



(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) 
1-0022117

(51)⁷ **A01N 47/44, A01P 7/04**

(13) **B**

(21) 1-2013-03812

(22) 03.12.2013

(30) 201210511214.6 03.12.2012 CN

(45) 25.11.2019 380

(43) 25.06.2014 315

(73) 1. Beijing Dabeinong Technology Group Co., Ltd. (CN)

No. 14 Floor Zhongguancun Building, No. 27 Zhongguancun Street, Haidian District, Beijing 100080, P. R. China

2. BEIJING DABEINONG TECHNOLOGY GROUP CO., LTD., BIOTECH CENTER (CN)

No. 2 Building, Institute for Application of Atomic Energy, Institute of Plant Protection, No. 2 Yuanmingyuan West Road, Haidian District, Beijing 100193, P. R. China

3. BEIJING GREEN AGROSINO PLANT PROTECTION TECHNOLOGY CO., LTD. (CN)

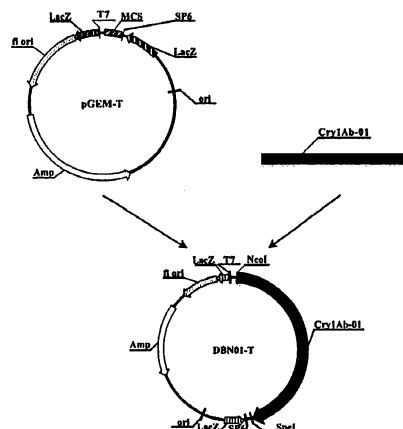
No. 14 Floor Zhongguancun Building, No. 27 Zhongguancun Street, Haidian District, Beijing 100080, P. R. China

(72) Shengbing LI (CN), Yuejing KANG (CN), Peng CHENG (CN), Ruiqi LIU (CN), Jing LIU (CN), Xiaoqian SONG (CN), Li LIU (CN), Jinfeng ZHANG (CN), Kangle TIAN (CN), Yanxiao LIU (CN)

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

(54) **PHƯƠNG PHÁP PHÒNG TRỪ SINH VẬT GÂY HẠI**

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp phòng trừ *Conogethes punctiferalis*, phương pháp này bao gồm bước cho *Conogethes punctiferalis* tiếp xúc với protein CryIA. Phương pháp phòng trừ sinh vật gây hại theo sáng chế có thể phòng trừ *Conogethes punctiferalis* bằng cách cho phép thực vật sản sinh ra protein CryIA in vivo, mà protein này gây chết *Conogethes punctiferalis*. So với phương pháp phòng trừ bằng biện pháp hóa học và nông học hiện tại, phương pháp theo sáng chế có thể phòng trừ được *Conogethes punctiferalis* trong toàn bộ các thời kỳ phát triển của thực vật và cho phép thực vật này được bảo vệ hoàn toàn. Ngoài ra, phương pháp theo sáng chế còn ổn định, toàn diện, đơn giản, thuận lợi và kinh tế, không gây ô nhiễm và không có tồn dư chất bảo vệ thực vật.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp phòng trừ sinh vật gây hại, cụ thể là đề cập đến phương pháp ngăn ngừa *Conogethes punctiferalis* gây hại cho thực vật bằng cách biểu hiện protein Cry1A ở thực vật này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Conogethes punctiferalis thuộc loài Lepidoptera, Crambidae. Cũng giống như sinh vật ăn tạp khác, chúng không chỉ gây hại cho cây trồng mùa vụ như ngô và lúa miến mà chúng còn gây hại cho cả các loại cây ăn quả như cây đào, cây hồng vàng và cây dẻ. Chúng phân bố rộng ở Trung Quốc, phía bắc từ Hắc Long Giang đến Nội Mông; phía nam từ Đài Loan, Hải Nam, Quảng Đông, Quảng Tây đến phía nam của Vân Nam; phía đông từ phía đông lãnh thổ của Liên Xô cũ và phía bắc của Bắc Hàn; phía tây từ Sơn Tây, Thiểm Tây và đằng sau đường dốc phía tây đến Ninh Hạ, Cam Túc, kéo dài đến Tứ Xuyên, Vân Nam và Tây Tạng. Khi tấn công ngô, chúng chủ yếu ăn cuống giả và đôi khi là cả thân cây, gây thiệt hại từ 30% đến 80% cây trồng. Khi tấn công lúa miến, ấu trùng mới nở chui vào hạt của cây lúa miến chưa chín, tiếp đó chúng bít miệng lỗ bằng phân hoặc phần thức ăn thừa, ở đó chúng ăn từng hạt cho đến giai đoạn nhộng 3. Sau giai đoạn nhộng 3, chúng kéo tơ gắn kết các bông gần nhau thành mạng đường hầm, ở đó chúng ăn hạt và do đó không còn gì sót lại trong trường hợp có dịch hại nghiêm trọng. Ngoài ra, chúng có thể gây hại thân cây, tương tự như *Ostrinia furnacalis*.

Vì ngô và lúa miến là các loại cây trồng quan trọng ở Trung Quốc, nên việc *Conogethes punctiferalis* gây hại cho các loại cây trồng này đã gây ra thiệt hại lớn về sản lượng lương thực hằng năm và thậm chí ảnh hưởng đến cả điều kiện sống của người dân địa phương. Hiện có ba phương pháp thường được sử dụng để phòng trừ *Conogethes punctiferalis* đó là: phương pháp phòng trừ bằng biện pháp nông học, phương pháp phòng trừ bằng biện pháp hóa học và phương pháp phòng trừ bằng biện pháp sinh học.

Phương pháp phòng trừ bằng biện pháp nông học là phương pháp quản lý đồng thời và kết hợp nhiều yếu tố của hệ sinh thái đồng ruộng, phương pháp này điều chỉnh

loại cây trồng, sinh vật gây hại và các yếu tố môi trường và thiết lập hệ sinh thái đồng ruộng có lợi cho sự phát triển của cây trồng nhưng không thích hợp với sự phát triển của *Conogethes punctiferalis*. Ví dụ, xử lý vật chủ của *Conogethes punctiferalis* trong suốt mùa đông, nhặt và loại bỏ quả rụng, loại bỏ quả bị phá hoại bởi sinh vật gây hại, tái lập quy tắc trồng trọt, trồng cây trồng kháng *Conogethes punctiferalis*, và trồng cánh đồng bẫy đã được thực hiện, nhằm làm giảm sự gây hại của *Conogethes punctiferalis*. Do phương pháp phòng trừ bằng biện pháp nông học phải tuân thủ các quy định về việc bố trí cây trồng và việc gia tăng sản lượng, nên phương pháp này có phạm vi ứng dụng giới hạn và không thể được dùng làm biện pháp khẩn cấp khi dịch *Conogethes punctiferalis* bùng phát.

Phương pháp phòng trừ bằng biện pháp hóa học, còn được biết đến như phương pháp phòng trừ bằng thuốc trừ sâu, phương pháp này tiêu diệt sinh vật gây hại bằng cách sử dụng thuốc trừ sâu. Như một công cụ quản lý phòng trừ hiệu quả, phương pháp phòng trừ này nhanh, thuận tiện, đơn giản và hiệu quả cao về mặt chi phí. Cụ thể, phương pháp này có thể được sử dụng làm biện pháp khẩn cấp để phòng trừ *Conogethes punctiferalis* trước khi có tổn thất. Hiện công cụ chủ yếu để phòng trừ bằng biện pháp hóa học bao gồm bẫy hóa chất, phun thuốc và các cách tương tự. Tuy nhiên, việc phòng trừ bằng biện pháp hóa học này có hạn chế: đó là khi sử dụng không thích hợp, chúng sẽ gây ra phá hủy dây chuyền, như gây độc cho sản phẩm nông nghiệp, làm cho sinh vật kháng thuốc, tiêu diệt động vật ăn thịt và gây ô nhiễm môi trường, do đó phá hủy hệ sinh thái đồng ruộng; tồn dư của thuốc trừ dịch gây ra mối đe dọa đến sự an toàn của người và vật nuôi trong vùng.

Phương pháp phòng trừ bằng biện pháp sinh học sử dụng một số sinh vật có ích hoặc các chất chuyển hóa sinh học nhất định để phòng trừ quần thể sinh vật gây hại nhằm làm giảm hoặc loại bỏ sinh vật gây hại đó. Phương pháp này có nhiều ưu điểm như không gây hại cho người và vật nuôi, ít gây ô nhiễm môi trường và có thời gian phòng trừ dài đối với một số sinh vật gây hại nhất định. Tuy nhiên, hiệu quả của phương pháp này thường không ổn định và nó cần cần lượng đầu tư như nhau bất kể mức độ nghiêm trọng của thiệt hại gây ra bởi *Conogethes punctiferalis*.

Để khắc phục các nhược điểm của phương pháp phòng trừ bằng biện pháp nông học, biện pháp hóa học và biện pháp sinh học nêu trên, các nhà nghiên cứu đã phát

hiện ra rằng, khi chèn một gen mã hóa protein có hoạt tính trừ sinh vật gây hại vào hệ gen của thực vật thì sẽ tạo ra thực vật chuyển gen có khả năng kháng sinh vật gây hại đó. Protein có hoạt tính trừ sinh vật gây hại Cry1A, một protein trong nhóm gồm nhiều protein có hoạt tính trừ sinh vật gây hại, là một protein tinh thể giả bào tử được tạo ra bởi loài phụ *Bacillus thuringiensis* (*Bacillus thuringiensis* subsp.kurstaki, *B.t.k*).

Protein Cry1A, nếu được sinh vật gây hại ăn, sẽ hòa tan trong môi trường kiềm trong ruột giữa của sinh vật gây hại đó, tạo ra một tiền độc tố, một tiền chất của chất gây độc. Hơn nữa, proteaza kiềm sẽ cắt tiền độc tố này tại đầu C và đầu N để tạo ra phân đoạn hoạt động, phân đoạn này sẽ gắn kết với thụ thể màng của tế bào biểu mô của ruột giữa của sinh vật gây hại đó và tự đi vào màng ruột, kết quả là phá vỡ màng tế bào, làm mất cân bằng pH nội mô và áp suất thẩm thấu qua màng tế bào, gây rối loạn tiêu hóa và cuối cùng khiến cho sinh vật gây hại đó bị chết.

Đã xác nhận rằng thực vật chuyển gen Cry1Ab có thể kháng sinh vật gây hại *Lepidoptera* như sâu đục thân ngô, sâu đục quả bông và sâu đục thân. Tuy nhiên, cho đến nay vẫn chưa có báo cáo nào đề cập đến việc phòng trừ *Conogethes punctiferalis* bằng cách tạo ra thực vật chuyển gen sản sinh ra protein Cry1A.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp phòng trừ sinh vật gây hại lần đầu tiên sử dụng thực vật chuyển gen biểu hiện protein Cry1A để phòng trừ sự gây hại của *Conogethes punctiferalis*. Phương pháp theo sáng chế đã khắc phục được các hạn chế của phương pháp phòng trừ bằng biện pháp nông học và phương pháp phòng trừ bằng biện pháp hóa học.

Để đạt được mục đích nêu trên, sáng chế đề xuất phương pháp phòng trừ *Conogethes punctiferalis*, phương pháp này bao gồm bước cho *Conogethes punctiferalis* tiếp xúc với protein Cry1A.

Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất thực vật chuyển gen biểu hiện protein Cry1A và vật liệu sinh sản của thực vật này như hạt, cây con và các vật liệu tương tự.

Tốt hơn là, protein Cry1A này là protein Cry1Ab hoặc protein Cry1Ah.

Hơn nữa, protein Cry1Ab có trong tế bào biểu hiện protein Cry1Ab của thực vật, và *Conogethes punctiferalis* tiếp xúc với protein này bằng cách ăn tế bào này.

Hơn nữa, protein Cry1Ab có ở thực vật chuyển gen biểu hiện protein Cry1b, và *Conogethes punctiferalis* tiếp xúc với protein Cry1Ab bằng cách ăn mô của thực vật chuyển gen này. Kết quả là, sự phát triển của *Conogethes punctiferalis* bị ức chế và cuối cùng gây chết *Conogethes punctiferalis*, và sự gây hại của *Conogethes punctiferalis* đối với thực vật được phòng trừ.

Hơn nữa, protein Cry1Ah có trong tế bào biểu hiện Cry1Ah của thực vật, và *Conogethes punctiferalis* tiếp xúc với protein này bằng cách ăn tế bào đó.

Hơn nữa, protein Cry1Ah có ở thực vật chuyển gen biểu hiện protein Cry1Ah, và *Conogethes punctiferalis* tiếp xúc với protein này bằng cách ăn mô của thực vật chuyển gen này. Tiếp đó sự sinh trưởng của *Conogethes punctiferalis* bị ức chế, và cuối cùng dẫn đến gây chết *Conogethes punctiferalis*, và sau đó sự gây hại của *Conogethes punctiferalis* cho thực vật này được phòng trừ.

Thực vật chuyển gen này có thể ở trong giai đoạn phát triển bất kỳ.

Mô của thực vật chuyển gen này có thể là rễ, lá, thân, cụm hoa, cuống giả, bao phấn hoặc sợi xơ.

Việc phòng trừ sự gây hại của *Conogethes punctiferalis* cho thực vật không phụ thuộc vào vị trí trồng cây.

Việc phòng trừ sự gây hại của *Conogethes punctiferalis* cho thực vật không phụ thuộc vào thời gian trồng cây.

Thực vật theo sáng chế có thể có nguồn gốc từ cây ngô, lúa miến, kê, hướng dương, thầu dầu, gừng, bông, đào, hồng vàng, cây óc chó, cây dẻ, cây sung hoặc cây thông.

Trước khi cho tiếp xúc với *Conogethes punctiferalis*, cây con của thực vật chuyển gen này chứa polynucleotit mã hóa protein Cry1A.

Tốt hơn là, trình tự axit amin của protein Cry1A chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:3. Trình tự nucleotit này mã hóa protein Cry1A chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6 hoặc SEQ ID NO:7.

Trên cơ sở giải pháp kỹ thuật nêu trên, thực vật chuyển gen theo sáng chế có thể

chứa thêm ít nhất một nucleotit thứ hai, nucleotit này khác với protein Cry1A.

Hơn nữa, nucleotit thứ hai này có thể mã hóa protein có hoạt tính trừ sâu giống như Cry, protein có hoạt tính trừ sâu giống như Vip, chất ức chế proteaza, lectin, α -amylaza hoặc peroxidaza.

Tốt hơn là, nucleotit thứ hai này có thể mã hóa protein Cry1Ie, protein Cry1Fa, protein Vip3A hoặc protein Cry1Ba.

Hơn nữa, nucleotit thứ hai này chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:8 hoặc SEQ ID NO:9.

Tùy ý, trình tự nucleotit thứ hai này là ARN sợi kép ức chế gen quan trọng của sinh vật gây hại đích.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là lưu đồ thiết kế vector nhân dòng tái tổ hợp DBN01-T chứa trình tự nucleotit nêu trong Cry1Ab-01 trong phương pháp phòng trừ sinh vật gây hại theo sáng chế;

Fig.2 là lưu đồ thiết kế vector biểu hiện tái tổ hợp DBN1000124 chứa trình tự nucleotit nêu trong Cry1Ab-01 trong phương pháp phòng trừ sinh vật gây hại theo sáng chế;

Fig.3 thể hiện thiệt hại đối với lá của cây ngô chuyển gen được gây nhiễm *Conogethes punctiferalis* trong phương pháp phòng trừ sinh vật gây hại theo sáng chế;

Fig.4 thể hiện sự phát triển của ấu trùng *Conogethes punctiferalis* được cho lây nhiễm vào cây ngô chuyển gen trong phương pháp phòng trừ sinh vật gây hại theo sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo sáng chế, sự biểu hiện của protein Cry1A ở thực vật chuyển gen có thể biểu hiện đồng thời với một hoặc nhiều protein có hoạt tính trừ sâu giống như Cry và/hoặc protein có hoạt tính trừ sâu giống như Vip. Việc đồng biểu hiện của nhiều loại độc tố trừ sâu trong cùng một loài thực vật chuyển gen có thể đạt được bằng kỹ thuật di truyền để tạo ra thực vật chứa và biểu hiện các gen quan tâm. Ngoài ra, một cây (cây bố mẹ thứ nhất) biểu hiện protein Cry1A bằng kỹ thuật di truyền, trong khi một cây

khác (cây bố mẹ thứ hai) cũng biểu hiện protein có hoạt tính trừ sâu giống như Cry và/hoặc protein có hoạt tính trừ sâu giống như Vip bằng kỹ thuật di truyền. Việc lai chéo cây bố mẹ thứ nhất với cây bố mẹ thứ hai có khả năng thu được cây có biểu hiện cả hai loại gen được đưa vào cây bố mẹ thứ nhất và cây bố mẹ thứ hai.

ARN can thiệp (RNA interference: ARNi) chỉ hiện tượng biến tính có tính đặc hiệu và hiệu quả cao của các mRNA tương đồng gây ra bởi ARN sợi kép (double-stranded RNA: dsRNA), mà được bảo toàn cao trong quá trình tiến hóa. Do đó, sáng chế có thể sử dụng ARNi để gây ra hoặc ngăn chặn sự biểu hiện gen của sinh vật gây hại đích.

Mặc dù cả *Conogethes punctiferalis* và *Ostrinia nubilalis* đều thuộc họ *Crambidae* của bộ *Lepidoptera* và là sinh vật gây hại ăn tạp, nhưng rõ ràng là chúng là hai loài độc lập với nhau về mặt sinh học. *Conogethes punctiferalis* và *Ostrinia nubilalis* có ít nhất các đặc điểm khác nhau sau:

1. Tập tính ăn khác nhau: Ngoài thực vật thuộc loài Gramineous như ngô, *Conogethes punctiferalis* cũng ăn các loại cây ăn quả bao gồm đào, lựu, cây dẻ và hồng vàng. Trong khi đó *Ostrinia nubilalis* chủ yếu ăn thực vật thuộc loài Gramineous, chủ yếu là ngô và lúa miến.
2. Phạm vi phân bố về mặt địa lý khác nhau: *Conogethes punctiferalis* phân bố không chỉ trong khắp lãnh thổ Trung Quốc mà còn phân bố ở các khu vực địa lý khác nhau như Nhật Bản, bán đảo Hàn Quốc, Vương quốc Anh và Úc. *Ostrinia nubilalis* bao gồm sâu đục thân ngô châu Á và sâu đục thân ngô châu Âu. Sâu đục thân ngô châu Á phân bố chủ yếu trong khu vực sản xuất ngô và lúa miến ở miền đông và phía tây nam của Trung Quốc, trong khi đó sâu đục thân ngô châu Âu chủ yếu được tìm thấy ở Tân Cương (Trung Quốc), châu Âu, Nam Mỹ và Thổ Nhĩ Kỳ. Theo sự phân bố về mặt địa lý, *Conogethes punctiferalis* phân bố rộng hơn với cả hai loại sâu đục thân ngô châu Âu và sâu đục thân ngô châu Á.
3. Tập tính xâm nhập và phá hoại khác nhau: Khi tấn công cây lúa miến, trước hết ấu trùng *Conogethes punctiferalis* mới nở chui vào hạt cây lúa miến chưa chín, tiếp đó chúng bịt miệng lỗ bằng phân hoặc phần thức ăn thừa, ở đó chúng ăn từng hạt cho đến giai đoạn nhộng 3. Sau giai đoạn nhộng 3, chúng kéo tơ gắn các bông gần nhau này thành mạng đường hầm, ở đó chúng ăn hạt và do đó không còn lại gì trong trường hợp

có dịch hại nghiêm trọng. Ngoài ra, chúng có thể gây hại cho thân. Khi gây hại cho ngô, chúng tập trung chính vào cuống giả. Sau khi ăn đến hạt non, chúng tạo ra phân dính để bịt lỗ sâu đục và gây hại bên trong. Đồng thời, chúng cũng có thể ăn thân, lá và hạt. Khi phá hoại, *Conogethes punctiferalis* thường tạo ra phân dính, điều này sẽ làm gia tăng sự xuất hiện của nấm mốc, cụ thể là loài *Aspergillus flavus*, do đó ảnh hưởng đến quá trình xử lý thức ăn. Ấu trùng *Ostrinia nubilalis* thường tập hợp với nhau sau khi nở, sau đó chúng bò đi khắp nơi và gây hại cho các phần non của cây. Ấu trùng mới nở có khả năng tự di chuyển sang cây kế bên: chúng chăng tơ và treo lơ lửng giữa các cây bị tấn công, nhờ gió thổi, chúng có thể tiếp cận với cây tiếp theo. Ấu trùng này trải qua 5 giai đoạn: trước khi vào giai đoạn ấu trùng 3, chúng chủ yếu ăn phần chồi non, cụm hoa, lá bao và sợi xơ, để lại nhiều lỗ nhỏ theo phương ngang, các lỗ này chỉ có thể nhìn thấy khi trải thẳng lá giữa; sau giai đoạn ấu trùng 4, chúng ăn thân cây. Chúng cũng có thể gây ra tổn hại về chức năng của tất cả các phần trên mặt đất của cây ngô: lá bị giảm khả năng quang hợp sau khi bị tổn hại; cụm hoa bị gãy sẽ mất đi khả năng thụ phấn; lớp vỏ bao và sợi xơ sau khi bị tổn hại sẽ dẫn đến cây ngô bị héo; thân và lõi ngô bị đục sẽ có các lỗ bên trong, ngăn cản sự vận chuyển chất dinh dưỡng và nước trong cây, dẫn đến làm tăng tỷ lệ cây bị gãy đổ và giảm năng suất hạt. Ngô vụ xuân, vụ hè và vụ thu ở các vùng đều có thể bị thiệt hại ở các mức độ khác nhau, trong đó ngô vụ thu bị ảnh hưởng lớn nhất.

4. Đặc tính hình thái học khác nhau:

1) Hình thái học của trứng khác nhau: Trứng *Conogethes punctiferalis* dài khoảng 0,6 đến 0,7mm, và có bề mặt nhám đầy các đốm tròn nhỏ hoặc dạng lưới. Trứng có màu đỏ cam trước khi nở và thường nằm đơn lẻ trên bề mặt nhám. Trong khi trứng của *Ostrinia nubilalis* có hình dạng bầu dục, đẹp với hàng tá đốm màu đen giống như vảy cá sắp không đều ở mặt trên của trước khi nở.

2) Hình thái học của ấu trùng khác nhau: Cơ thể của ấu trùng *Conogethes punctiferalis* có nhiều màu sắc khác nhau từ xám nhạt đến đỏ thẫm: bụng thường màu xanh nhạt, đầu màu tối, lưng màu đỏ thẫm, bụng màu xanh nhạt, và đốt ngực trước và đốt hậu môn màu nâu thẫm. Mỗi khúc trên cơ thể của ấu trùng này có các vệt lông rõ ràng với màu sắc từ nâu thẫm đến nâu đen. Mỗi vệt lông trong tám đốt đầu tiên của phần bụng có tám vệt, và chúng được sắp xếp thành hai hàng: hàng trước có khoảng sáu vệt lớn hơn trong khi hàng sau có hai vệt nhỏ hơn. Sau giai đoạn nhộng 3, hai

tuyến sinh dục màu nâu thẫm lộ ra trên đoạn thứ năm của phần bụng của ấu trùng đực. Ngược lại, ấu trùng *Ostrinia nubilalis* có màu trắng vàng với lưng tối sậm màu, đầu màu nâu đen và các đốt ngực trước, đường sống lưng rõ, hai bên đường sống lưng có màu nâu đen không rõ, và có hai đường u lồi bắt đầu từ đốt đầu tiên đến đốt thứ tám của phần bụng (4 ở đường lưng và 2 ở đường bụng).

3) Hình thái học của nhộng khác nhau: Nhộng *Conogethes punctiferalis* màu xanh vàng nhạt ở giai đoạn đầu và dần chuyển sang màu nâu đen. Đầu và lưng từ đốt thứ nhất đến đốt thứ tám được phủ bởi lớp lông ngắn dày, và phần phân chia giữa phần phía trước từ đốt thứ năm đến đốt thứ bảy của phần bụng có một đường nổi lên tạo ra phần lồi có hình răng cưa nhỏ. Ở cuối của phần bụng, có sáu gai mảnh và cong hình móc câu. Trong khi nhộng của *Ostrinia nubilalis* có màu ngăm đen với hoa văn đậm với nếp gấp nằm ngang phía lưng bụng, và có từ 5 đến 8 gai ở cuối phần bụng.

4) Hình thái học thành trùng (sâu bướm) khác nhau: *Conogethes punctiferalis* trưởng thành có màu vàng đến cam với nhiều đốm đen ở ngực, bụng và cánh. Hai bên đốt ngực trước có nhiều lông và cả hai đều có một đốm màu đen. Phần cuối đốt thứ chín của phần bụng của con sâu bướm đực có màu đen tuyền, cắt ngắn và có cụm màu đen. Phần cuối bụng sâu bướm cái có hình nón, và ở phần sau cùng, có một số đốm màu đen nằm phía tận cùng lưng. Ngược lại, *Ostrinia nubilalis* trưởng thành có cánh sau màu nâu sẫm và cánh trước màu ngăm đen với hai đường gợn sóng nằm ngang màu nâu thẫm, giữa hai đường này có hai đường ngắn màu ngăm đen. So với con đực, con cái có cánh nhạt hơn; với đường cơ ngang bên trong, đường cơ ngang bên ngoài và vết đốm khó quan sát hơn, và cánh trước của chúng có màu vàng.

5. Tập tính sinh trưởng khác nhau: Số lượng thế hệ ấu trùng trong một năm biến đổi theo vị trí địa lý đối với sự sinh trưởng của *Conogethes punctiferalis*: từ 1 đến 2 thế hệ ở tỉnh Liêu Ninh, trong khi có tới 3 thế hệ ở tỉnh Hà Bắc, Sơn Đông hoặc Thiểm Tây, 4 thế hệ ở tỉnh Hà Nam, và có từ 4 đến 5 thế hệ ở thung lũng sông Trường Giang. Tất cả đều sống qua mùa đông ở giai đoạn ấu trùng trưởng thành sống thu rút trong gốc cây ngô, hướng dương, thầu dầu, v.v.. Tại tỉnh Hồ Nam, ấu trùng này trước hết gây hại cho cây đào từ cuối tháng năm đến đầu tháng sáu, ấu trùng thế hệ 2 và 3 gây hại cho cả đào và lúa miến trong khi ấu trùng thế hệ 4 chỉ gây hại cho lúa miến và hướng dương trong vụ hè. Ấu trùng thế hệ thứ 4 sống qua mùa đông. Năm tiếp theo, quần thể

Ấu trùng sống sót qua mùa đông bắt đầu phát triển thành nhộng vào tháng tư và quần thể đạt cao điểm nhất vào cuối tháng tư. Ấu trùng nở ra vào cuối tháng tư cho đến cuối tháng năm và sâu bướm trải qua mùa đông này để trứng trên cây đào. Ấu trùng này trước hết phát triển thành nhộng vào giữa tháng sáu cho đến cuối tháng sáu và sâu bướm của thế hệ thứ nhất xuất hiện vào cuối tháng sáu và sẽ đẻ trứng vào đầu tháng bảy. Điều này cho phép trứng nở cho ra thế hệ hai vào đúng giai đoạn lúa miến vụ xuân trước khi tạo đồng và ra hoa. Sự gây hại của ấu trùng thế hệ thứ hai cao điểm nhất vào giữa tháng bảy. Thời điểm nở trứng nhiều nhất của thế hệ thứ hai trong khoảng thời gian đầu và giữa tháng tám, khi này lúa miến vụ xuân bắt đầu chín và lúa miến gieo cuối mùa xuân và lúa miến gieo đầu mùa hè đang trong giai đoạn tạo đồng và trở bông. Sâu bướm đẻ trứng chủ yếu trên cây lúa miến. Trứng của thế hệ thứ ba nở vào cuối tháng bảy hoặc đầu tháng tám. Sự gây hại của ấu trùng thế hệ thứ ba nghiêm trọng nhất vào giữa và cuối tháng tám. Sâu bướm của thế hệ thứ ba xuất hiện vào cuối tháng tám và phát triển mạnh trong đầu và giữa tháng tám, khi đó cây lúa miến và quả đào đã được thu hoạch. Sâu bướm này đẻ trứng vào cuối vụ hè của cây lúa miến và hướng dương chín muộn. Sự gây hại của ấu trùng thế hệ thứ tư từ giữa tháng chín đến giữa tháng mười. Ấu trùng thế hệ thứ tư này sống qua mùa đông khi nhiệt độ hạ xuống thấp trong khoảng giữa và cuối tháng mười. Tại Hà Nam, giai đoạn trứng của thế hệ thứ nhất trong 8 ngày, trong khi giai đoạn trứng của thế hệ thứ hai là 4,5 ngày, thứ ba là 4,2 ngày và thế hệ qua mùa đông là 6 ngày. Trạng thái ấu trùng của thế hệ thứ nhất là 19,8 ngày, trong khi trạng thái ấu trùng của thế hệ thứ hai là 13,7 ngày, thế hệ thứ ba là 13,2 ngày và thế hệ trải qua mùa đông là 208 ngày. Ấu trùng có 5 giai đoạn. Giai đoạn nhộng của thế hệ thứ nhất là 8,8 ngày, trong khi giai đoạn nhộng của thế hệ thứ hai là 8,3 ngày, thứ ba là 8,7 ngày và thế hệ sống qua mùa đông là 19,4 ngày. Thời gian sống của sâu bướm thế hệ thứ nhất là 7,3 ngày, trong khi thời gian sống của sâu bướm thế hệ thứ hai là 7,2 ngày, thứ ba là 7,6 ngày và thế hệ sống qua mùa đông là 10,7 ngày. Sau khi trứng nở, sâu bướm ẩn vào cánh đồng lúa miến và chỉ đẻ trứng thông qua nguồn dinh dưỡng đặc biệt, chúng đẻ trứng trên cây lúa miến tạo đồng và ra hoa. Trứng này là từng quả riêng lẻ và mỗi con sâu bướm cái đẻ trung bình 169 trứng với từ 3 đến 5 trứng trên mỗi bẹ lá. Tại Nghi Tân thuộc tỉnh Tứ Xuyên, sâu bướm đẻ trứng trên cuống giả và cụm hoa, mép lá bao hoặc mặt trước và mặt sau của bẹ lá ở trạng thái trở cò đến trạng thái trưởng thành của ngô vụ thu, và số lượng trứng lên tới 1729 trứng

trên một ngàn cây ngô. Sau khi trưởng thành, ấu trùng này sống qua mùa đông trong bẹ lá hoặc trong nách lá, vỏ bao phiến lá, lá khô và cuống lá lúa miến, ngô và hướng dương. Sự gây hại mạnh nhất trong năm có nhiều mưa. Gần đây, phía tây bắc của Trung Quốc có lượng mưa lớn do ảnh hưởng của hiệu ứng nhà kính trên toàn cầu, điều này khiến cho *Conogethes punctiferalis* trở thành sinh vật gây hại chính đối với ngô ở miền bắc Trung Quốc. Do chúng ăn nhiều loại thức ăn và thường lây nhiễm giữa các vật chủ khác nhau và ưa thích nhất là chui vào và đục lỗ thông từ quả đến cuống giả và thân, nên việc phun thuốc trừ sâu khó có thể phòng trừ được chúng. Ngược lại, số thế hệ của *Ostrinia nubilalis* ở Trung Quốc khác nhau chủ yếu về mặt địa lý: một thế hệ nếu khu vực đó nằm trên 45° Bắc, hai thế hệ nếu chúng nằm ở trong khoảng từ 45° Bắc đến 40° Bắc, ba thế hệ nếu chúng nằm trong khoảng từ 40° Bắc đến 30° Bắc, bốn thế hệ nếu chúng nằm trong khoảng từ 30° Bắc đến 25° Bắc, và năm thế hệ nếu chúng nằm trong khoảng từ 25° Bắc đến 20° Bắc. Độ cao càng lớn thì càng ít thế hệ có thể phát triển được. Tại Tứ Xuyên, khu vực thấp, nhiệt độ cao thì chúng có thể phát triển được từ hai đến bốn thế hệ. Ấu trùng trưởng thành thường chui vào trong mầm và lõi ngô hoặc rom của cây lúa miến và hướng dương cho đến khoảng tháng tư và tháng năm của năm tiếp theo khi chúng đã sẵn sàng phát triển thành nhộng, việc này mất khoảng 10 ngày. Con trưởng thành có khoảng thời gian từ 5 đến 10 ngày và hoạt động về đêm với khả năng bay và nhìn rất tốt. Con cái thích đẻ trứng trên cả hai mặt của gân sống lá của lá ngô nằm cách mặt đất khoảng từ 50cm và mỗi con cái có thể đẻ khoảng từ 350 đến 700 trứng với thời gian đẻ trứng khoảng từ 3 đến 5 ngày. *Ostrinia nubilalis* phát triển tốt trong điều kiện nhiệt độ và độ ẩm cao. Trong những mùa đông ít lạnh, khi đó chúng cũng ít dịch hại ký sinh ảnh hưởng đến khả năng sinh sản của chúng, *Ostrinia nubilalis* là nguyên nhân gây hại lớn. Ngược lại, *Ostrinia nubilalis* lại gây hại ít hơn nếu chúng sinh sản trong điều kiện hạn hán, khi đó, lá ngô sẽ cong lại và do đó trứng của chúng sẽ bị rơi và dễ bị chết.

Tóm lại, đó là những bằng chứng cho thấy *Conogethes punctiferalis* và *Ostrinia nubilalis* là hai loài khác nhau và không thể lai chéo được.

Theo sáng chế, hệ gen thực vật hoặc tế bào thực vật chỉ vật liệu di truyền ở thực vật, trong mô hoặc tế bào thực vật, kể cả nhân, thể hạt và hệ gen ty lạp thể.

Theo sáng chế, polynucleotit và/hoặc nucleotit cấu thành “gen” hoàn chỉnh và mã

hóa protein hoặc polypeptit trong tế bào chủ mong muốn. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể dễ dàng nhận thấy rằng polynucleotit và/hoặc nucleotit này có thể được đặt trong điều kiện phòng trừ bởi trình tự điều hòa của vật chủ đích.

Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này cũng đã biết rõ là ADN thường tồn tại ở dạng đã biết đó là dạng cấu trúc xoắn kép. Trong cách sắp xếp này, một sợi là sợi bổ trợ cho sợi kia, và ngược lại. ADN tạo ra các sợi bổ trợ trong quá trình phiên mã ở thực vật, do đó, sáng chế bao gồm việc sử dụng polynucleotit mẫu trong danh mục trình tự và các sợi bổ trợ của chúng. "sợi mang mã" thường được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật này để chỉ sợi liên kết với sợi đối mã. Nhằm biểu hiện protein này *in vivo*, một sợi ADN thường được phiên mã thành sợi bổ trợ như là ARN thông tin (mARN), sợi này được sử dụng làm khuôn để dịch mã thành protein. Trên thực tế, mRNA được phiên mã từ sợi "đối mã" của ADN. Sợi "mang mã" hoặc "mã hóa" có nhiều codon (mỗi codon chứa ba nucleotit mã hóa axit amin đặc hiệu), và sợi này có thể được sử dụng như khung đọc mở (open reading frame: ORF) và được dịch mã thành protein hoặc peptit. Sáng chế cũng bao hàm ARN và peptit axit nucleic (peptid nucleic acid: PNA), mà chúng có các chức năng quan trọng là ADN mẫu.

Theo sáng chế, phân tử axit nucleic hoặc mảnh của nó lai với gen Cry1A theo sáng chế trong điều kiện nghiêm ngặt. Phương pháp lai hoặc khuếch đại axit nucleic thông thường bất kỳ có thể được sử dụng để xác định sự có mặt của gen Cry1A theo sáng chế. Phân tử axit nucleic hoặc mảnh của nó trong trường hợp cụ thể có thể lai đặc hiệu với phân tử axit nucleic khác. Theo sáng chế, nếu có thể hình thành hai phân tử axit nucleic từ cấu trúc axit nucleic sợi kép song song đối nhau, thì có thể nói rằng hai phân tử axit nucleic có thể lai với nhau một cách đặc hiệu. Nếu hai phân tử axit nucleic này biểu hiện tính bổ trợ toàn vẹn thì một phân tử axit nucleic này được gọi là "sợi bổ trợ" của phân tử axit nucleic còn lại. Theo sáng chế, nếu toàn bộ nucleotit của một phân tử axit nucleic này được bắt cặp với nucleotit tương ứng của phân tử axit nucleic khác thì hai phân tử axit nucleic này được gọi là có biểu hiện "tính bổ trợ toàn vẹn". Nếu hai phân tử axit nucleic này có thể lai với phân tử khác ở trạng thái đủ ổn định và liên kết với phân tử khác sau khi lai ít nhất trong điều kiện có "tính nghiêm ngặt thấp" thông dụng thì hai phân tử axit nucleic này được gọi là phân tử có "tính bổ trợ tối thiểu". Tương tự, nếu hai phân tử axit nucleic này có thể lai với nhau ở trạng thái đủ

ổn định mà vẫn liên kết với phân tử khác trong điều kiện lai "nghiêm ngặt cao" thông dụng thì hai phân tử axit nucleic này được gọi là có "tính bổ trợ". Các bắt cặp sai của tính bổ trợ toàn vẹn có thể chấp nhận được nếu các bắt cặp sai này không ngăn chặn hoàn toàn hai phân tử này tạo thành cấu trúc mạch kép. Để đảm bảo cho phân tử axit nucleic này có thể được sử dụng như đoạn mồi hoặc đầu dò, trình tự này phải có đủ tính bổ trợ sao cho nó có thể tạo ra được cấu trúc mạch kép ổn định trong dung môi và nồng độ muối nhất định.

Theo sáng chế, trình tự hầu như đồng nhất là phân tử axit nucleic, mà trong điều kiện lai nghiêm ngặt cao, có thể lai đặc hiệu với sợi bổ trợ bắt cặp của phân tử axit nucleic khác. Điều kiện lai nghiêm ngặt thích hợp để lai ADN, ví dụ, xử lý bằng 6,0x natri clorua/natri xitrat (SSC) ở khoảng 45°C và tiếp đó rửa bằng 2,0x SSC ở 50°C, là đã biết đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, ở bước rửa, nồng độ muối được lựa chọn trong điều kiện tính nghiêm ngặt thấp là khoảng 2,0x SSC và trong điều kiện lai nghiêm ngặt cao là khoảng 0,2x SSC ở 50°C. Ngoài ra, nhiệt độ ở bước rửa này cũng có thể lựa chọn từ điều kiện lai nghiêm ngặt thấp là nhiệt độ phòng ở khoảng 22°C đến nhiệt độ lai ở điều kiện nghiêm ngặt cao là khoảng 65°C. Cả nhiệt độ và nồng độ của muối này đều có thể thay đổi, hoặc có thể giữ nguyên trong khi thông số khác thay đổi. Tốt hơn là, điều kiện lai nghiêm ngặt theo sáng chế là: lai đặc hiệu với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 hoặc SEQ ID NO: 7 trong 6x SSC, 0,5% dung dịch SDS ở 65°C, và tiếp đó là rửa màng bằng 2x SSC, 0,1% SDS và 1x SSC, 0,1% SDS, mỗi loại một lần.

Do đó, sáng chế cũng đề xuất trình tự có hoạt tính kháng sinh vật gây hại có khả năng lai được với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 hoặc SEQ ID NO: 7 trong điều kiện lai nghiêm ngặt. Các trình tự này có độ tương đồng trình tự khoảng từ 40% đến 50% so với trình tự theo sáng chế, có độ tương đồng khoảng 60%, 65% hoặc 70% hoặc thậm chí ít nhất khoảng 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93 %, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc cao hơn so với trình tự theo sáng chế.

Gen và protein được mô tả theo sáng chế bao gồm, không chỉ các trình tự được đưa ra làm ví dụ, mà còn các phần và/hoặc mảnh của nó (bao gồm cả vùng bên trong và/hoặc vùng đầu được loại bỏ khi so với protein có chiều dài hoàn chỉnh), các biến

thể, đột biến và các đoạn thể (protein có axit amin thay thế), protein khảm và protein dung hợp của nó có hoạt tính trừ sâu của các protein mẫu này. Thuật ngữ "đột biến" hoặc "biến thể" chỉ trình tự nucleotit mã hóa cùng một protein hoặc protein tương đương có hoạt tính trừ sâu. Thuật ngữ "protein tương ứng" chỉ protein có cùng hoặc hầu như có cùng hoạt tính sinh học kháng *Conogethes punctiferalis* như protein được yêu cầu bảo hộ.

Thuật ngữ "mảnh" hoặc "phần cắt" của các trình tự ADN hoặc protein theo sáng chế chỉ phần hoặc dạng được cải biến nhân tạo (như trình tự thích hợp để biểu hiện ở thực vật) của ADN hoặc trình tự protein gốc (nucleotit hoặc axit amin). Chiều dài của trình tự trên có thể thay đổi nhưng nó phải đủ dài để đảm bảo protein đó (được mã hóa) vẫn là một độc tố đối với sinh vật gây hại.

Các gen có thể được cải biến một cách dễ dàng thành các biến thể gen bằng các kỹ thuật chuẩn. Ví dụ, kỹ thuật đột biến điểm đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Một ví dụ khác dựa trên US 5605793, tài liệu này đã mô tả phương pháp mà ADN có thể ghép lại để tạo ra tính đa dạng phân tử sau khi được cắt phân đoạn một cách ngẫu nhiên. Các endonucleaza được sản xuất thương mại có thể được sử dụng để tạo ra các đoạn của gen có chiều dài đầy đủ, và các exonucleaza có thể được sử dụng theo các quy trình chuẩn. Ví dụ, các enzyme như *Bal31* hoặc việc gây đột biến điểm trực tiếp có thể được sử dụng để loại bỏ một cách có hệ thống các nucleotit ra khỏi đầu của các gen này. Có nhiều enzym giới hạn nội phân tử endonucleaza có thể được sử dụng để thu gen mã hóa các mảnh hoạt tính. Các proteaza này cũng có thể được sử dụng để thu được mảnh mang hoạt tính của các độc tố này một cách trực tiếp.

Theo sáng chế, các protein và/hoặc gen tương đương mã hóa các protein này có thể thu được từ *B.t.* tinh sạch và/hoặc thư viện ADN. Có nhiều cách khác nhau để thu được protein có hoạt tính trừ sâu theo sáng chế. Ví dụ, kháng thể của protein có hoạt tính trừ sâu được bộc lộ và được yêu cầu bảo hộ bởi sáng chế có thể được sử dụng để nhận biết và phân lập các protein khác từ phức hợp protein. Cụ thể, các kháng thể này có thể được tạo ra bằng các phần cố định nhất và các phần biến đổi nhiều nhất của các protein *B.t.* khác. Bằng cách tiếp nhận miễn dịch, phân tích hấp phụ miễn dịch liên kết enzym (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA) hoặc thẩm tách Western, các kháng thể này có thể được sử dụng để xác định một cách cụ thể các protein tương

đương với hoạt tính đặc hiệu. Các kỹ thuật chuẩn trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được sử dụng để tạo ra kháng thể của protein hoặc dạng tương đương hoặc mảnh tương ứng của nó theo sáng chế. Ngoài ra, các gen mã hóa protein này cũng có thể thu được từ vi sinh vật.

Do có rất nhiều mã di truyền nên có nhiều trình tự ADN khác nhau có thể mã hóa cho cùng một trình tự axit amin. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể tạo ra trình tự ADN khác loại để mã hóa cho cùng một hoặc về cơ bản là cùng loại protein. Các trình tự ADN khác nhau này đều nằm trong phạm vi của sáng chế. Thuật ngữ “về cơ bản là giống” bao hàm cả mảnh có hoạt tính trừ sâu, chỉ trình tự có axit amin thay thế, loại bỏ, bổ sung hoặc chèn nhưng hoạt tính trừ sâu của nó hầu như không bị ảnh hưởng.

Theo sáng chế, việc thay thế, loại bỏ hoặc bổ sung trong trình tự axit amin là kỹ thuật thông thường đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Tốt hơn là, các thay đổi về trình tự axit amin này là: thay đổi một chút về đặc tính, nghĩa là, các axit amin thế mà không ảnh hưởng quyết định đến việc cuộn xoắn và/hoặc hoạt tính của protein; ví dụ, loại bỏ một đoạn ngắn, thường từ 1 đến 30 axit amin; kéo dài đầu amin hoặc đầu cacboxyl, như kéo dài đầu amin bằng gốc methionin; tạo liên kết peptit với một đoạn ngắn khoảng từ 20 đến 25 gốc.

Ví dụ về các nhóm thế bảo toàn là các nhóm thế được lựa chọn từ nhóm bao gồm các axit amin sau: các axit amin bazơ, như arginin, lysin và histidin; các axit amin axit, như axit glutamic và axit aspartic; các axit amin phân cực, như glutamin, asparagin; các axit amin ưa nước, như leuxin, isoleuxin và valin; các axit amin thơm, như phenylalanin, tryptophan và tyrosin; và axit amin phân tử lượng nhỏ, như glyxin, alanin, serin, threonin và methionin. Thông thường, các axit amin thay thế mà không làm thay đổi hoạt tính đặc hiệu là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này, và chúng đã được mô tả, ví dụ, trong "Protein" bởi N. Neurath và R. L. Hill, 1979, được công bố bởi Academic Press, New York. Các gốc thế thông thường là Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thu/Ser, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu và Asp/Gly, và các gốc thế ngược của chúng.

Một điều hiển nhiên đối với người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đó là: những sự thay thế nêu trên xuất hiện bên trong vùng mà đóng vai trò

quan trọng đối với chức năng của phân tử nhưng vẫn tạo ra được hoạt tính của polypeptit đó. Đối với polypeptit theo sáng chế, các gốc axit amin mà cần thiết cho hoạt tính của protein thì không được lựa chọn để thay thế, và các gốc này có thể được xác định thông qua các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, như đột biến điểm trực tiếp hoặc đột biến sàng lọc alanin (tham khảo: Cunningham và Wells, 1989, Science 244: 1081-1085). Kỹ thuật gần đây là đưa vào (các) điểm đột biến đối với từng gốc tích điện dương trong phân tử và phát hiện hoạt tính kháng sinh vật gây hại của thể đột biến thu được đó, và tiếp đó xác định xem liệu gốc axit amin nào là quan trọng đối với hoạt tính của phân tử đó. Các vị trí phản ứng enzym-cơ chất có thể xác định được bằng cách phân tích cấu trúc ba chiều, cấu trúc này có thể được xác định bằng cách phân tích cộng hưởng từ hạt nhân, tinh thể học, đánh dấu ái lực quang v.v. (tham khảo: de Vos *et al.*, 1992, Science 255: 306-312; Smith *et al.*, 1992, J. Mol. Biol. 224: 899-904; Wlodaver *et al.*, 1992, FEBS Letters 309: 59-64).

Theo sáng chế, protein Cry1A bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, protein Cry1Ab, Cry1Ah, Cry1A.105 và Cry1Ac, các vùng chức năng, hoặc các đoạn có hoạt tính trừ sâu có độ tương đồng về trình tự axit amin ít nhất là 70% so với trình tự của protein nêu trên và có hoạt tính trừ *Conogethes punctiferalis*.

Do đó, sáng chế cũng bao gồm trình tự axit amin với có tính tương đồng nhất định với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 và/hoặc SEQ ID NO: 3. Thông thường, độ tương đồng/tính tương đồng/tính đồng nhất của các trình tự này so với trình tự theo sáng chế là cao hơn 60%, tốt hơn là cao hơn 75%, tốt hơn nữa là cao hơn 80%, thậm chí tốt hơn nữa là cao hơn 90% và có thể cao hơn 95%. Tương tự, polynucleotit và protein ưu tiên theo sáng chế có thể được xác định bởi một khoảng cụ thể về độ tương đồng hoặc độ đồng nhất và/hoặc tính đồng nhất, ví dụ, có độ tương đồng, độ đồng nhất và/hoặc tính đồng nhất đạt 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% so với trình tự mẫu theo sáng chế.

Trình tự điều hòa được mô tả theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, trình tự khởi đầu, peptit chuyển, trình tự kết thúc, trình tự tăng cường, trình tự đầu, các

trình tự intron và các trình tự điều hòa khác mà có thể được liên kết một cách có kiểm soát với protein Cry1A.

Trình tự khởi đầu là trình tự có khả năng biểu hiện ở thực vật; thuật ngữ "trình tự khởi đầu có khả năng biểu hiện ở thực vật" chỉ trình tự khởi đầu mà đảm bảo biểu hiện trình tự mã hóa được ghép vào tế bào thực vật đó. Trình tự khởi đầu này có thể biểu hiện ở thực vật có thể là trình tự khởi đầu cơ định. Ví dụ về trình tự khởi đầu biểu hiện cơ định trực tiếp ở thực vật bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, trình tự khởi đầu 35S từ virus khảm súp lơ, trình tự khởi đầu Ubi, trình tự khởi đầu gen GOS2 của cây lúa, v.v.. Theo cách khác, trình tự khởi đầu có thể biểu hiện ở thực vật này có thể đặc hiệu mô, nghĩa là, việc biểu hiện của trình tự mã hóa trực tiếp bởi trình tự khởi đầu như vậy ở thực vật, như mô diệp lục, là cao hơn so với các loại mô khác, như xác định được bằng các thử nghiệm ARN thông thường, nghĩa là, trình tự khởi đầu carboxylaza PEP. Theo cách khác, trình tự khởi đầu này có thể biểu hiện ở thực vật có thể là trình tự khởi đầu kích thích làm lành vết thương. Trình tự khởi đầu kích thích làm lành vết thương hoặc trình tự khởi đầu trực tiếp làm lành vết thương chỉ sự biểu hiện của các trình tự mã hóa được điều hòa bởi các trình tự khởi đầu như vậy cao hơn đáng kể ở thực vật bị tổn thương tổn cơ học hoặc tổn thương gây ra bởi sinh vật gây hại so với các cây ở điều kiện phát triển bình thường. Ví dụ về trình tự khởi đầu làm lành vết thương bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, trình tự khởi đầu của gen ức chế proteaza của khoai tây và cà chua (*pin I* và *pin II*) và gen ức chế proteaza của cây ngô (*MPI*).

Peptit chuyển, cũng còn được biết đến là trình tự tín hiệu kích thích bài tiết hoặc trình tự dẫn đường, có thể trực tiếp tạo ra sản phẩm chuyển gen cho cơ quan tế bào hoặc khoang tế bào đặc hiệu. Peptit chuyển này cũng có thể tương đồng với protein đích. Ví dụ, trình tự mã hóa của peptit chuyển lục lap được sử dụng cho tế bào lục lap đích, hoặc trình tự bảo toàn 'KDEL' được sử dụng cho mạng lưới nội chất đích, hoặc sử dụng CTPP của gen lectin cây lúa mạch để cho không bào đích.

Trình tự dẫn đầu bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, trình tự dẫn đầu của ARN virus nhỏ, như trình tự dẫn đầu của EMCV (vùng đầu 5' không mang mã của EMCV (virus encephalomyocarditis)); trình tự dẫn đầu của potyvirus, như trình tự dẫn đầu virus gây khảm lùn ở ngô (maize dwarf mosaic virus: MDMV); protein liên kết

chuỗi nặng globulin miễn dịch của người (human immunoglobulin heavy-chain binding protein: BiP); trình tự dẫn đầu không dịch mã của mRNA protein lớp vỏ của virus khảm cỏ linh lăng (AMV RNA4); và trình tự dẫn đầu của virus khảm (TMV).

Trình tự tăng cường bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, trình tự tăng cường của virus khảm súp lơ (cauliflower mosaic virus: CaMV), trình tự tăng cường của virus khảm figwort (FMV), trình tự tăng cường của virus vòng hoa cẩm chướng (carnation efflorescence ring virus: CERV), trình tự tăng cường của virus khảm mao mạch cây sắn (cassava vein mosaic virus: CsVMV), trình tự tăng cường của virus khảm mirabilis (mirabilis mosaic virus: MMV), trình tự tăng cường virus gây xoắn vàng lá cestrum (cestrum yellow leaf curl virus: CmYLCV), trình tự tăng cường virus Multan gây xoắn lá bông (cotton leaf curl Multan virus: CLCuMV), trình tự tăng cường của virus gây vằn vàng commelina (commelina yellow mottle virus: CoYMV) và trình tự tăng cường của virus gây sọc úa vàng cây lạc (peanut chlorotic leaf streak virus: PCLSV).

Đối với các ứng dụng trên cây một lá mầm, bao gồm cả intron, nhưng không chỉ giới hạn ở, intron hsp 70 của ngô, intron ubiquitin của ngô, intron Adh 1, intron sucroza synthaza hoặc intron Act1 của cây lúa. Đối với các ứng dụng trên cây hai lá mầm, các intron bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, intron CAT-1, intron pKANNIBAL, intron PIV2 và intron "siêu ubiquitin".

Trình tự kết thúc có thể là trình tự tín hiệu thích hợp để polyadenyl hóa và tạo chức năng ở thực vật, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, trình tự tín hiệu polyadenyl hóa thu được từ gen nopalin synthaza (NOS) của *Agrobacterium tumefaciens*, từ gen mã hóa chất ức chế proteaza II (pin II), từ gen pea ssRUBISCO E9 và từ gen α -tubulin.

Việc "kết nối có hiệu quả" theo sáng chế nghĩa là việc kết nối của các trình tự axit nucleic và việc kết nối này cho phép các trình tự tạo ra chức năng mong muốn đối với trình tự đã được kết nối. Việc "kết nối có hiệu quả" theo sáng chế có thể là việc kết nối giữa trình tự khởi đầu và trình tự quan tâm, và khi phiên mã trình tự quan tâm này thì chúng được điều hòa bởi trình tự khởi đầu đó. Khi trình tự mã hóa protein quan tâm và biểu hiện protein mong muốn, việc "kết nối có hiệu quả" nghĩa là trình tự khởi đầu này được kết nối với trình tự đó theo cách mà chúng khiến cho kết quả dịch mã thành phần phiên mã với hiệu quả cao. Nếu việc kết nối của trình tự khởi đầu này và trình tự

mã hóa dung hợp giữa việc phiên mã và biểu hiện của protein được mã hóa mong muốn, thì việc kết nối này cho phép codon khởi đầu của đoạn dịch mã thu được là codon ban đầu của trình tự mang mã. Theo cách khác, nếu việc kết nối trình tự khởi đầu này và trình tự mang mã thu được từ việc dung hợp giữa việc dịch mã và biểu hiện protein mong muốn thì việc kết nối này cho phép codon khởi đầu đầu tiên chứa trình tự không dịch mã đầu 5' được gắn với trình tự khởi đầu đó, và sản phẩm phiên mã thu được trong khung liên quan tới khung đọc mở của protein quan tâm. Trình tự axit nucleic đối với "kết nối có hiệu quả" bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, trình tự gen đề xuất với chức năng biểu hiện, nghĩa là thành phần biểu hiện gen, như trình tự khởi đầu, vùng không dịch mã 5', intron, vùng mã hóa protein, vùng không dịch mã 3', vị trí polyadenyl hóa và/hoặc trình tự kết thúc phiên mã; trình tự đề xuất ADN chuyển và/hoặc ghép, nghĩa là, trình tự bao T-ADN, vị trí nhận biết của recobinaza đặc hiệu vị trí, vị trí nhận biết integraza; trình tự chọn lọc được đề xuất, nghĩa là, các chỉ thị kháng chất kháng sinh, các gen sinh tổng hợp; trình tự đề xuất chỉ thị điểm và hỗ trợ hoạt động *in vitro* hoặc *in vivo*, nghĩa là, trình tự đa kết nối, trình tự kết hợp đặc hiệu vị trí; và trình tự tái bản, nghĩa là, trình tự tái bản có nguồn gốc từ vi khuẩn, trình tự tự tái bản, và trình tự trung tâm.

Thuật ngữ "trừ sâu" được mô tả theo sáng chế nghĩa là nó gây độc cho sinh vật gây hại mùa màng, và cụ thể là gây độc cho *Conogethes punctiferalis*.

Theo sáng chế, protein Cry1A biểu hiện tính gây độc tế bào đối với *Conogethes punctiferalis*. Thực vật chuyển gen, cụ thể là cây ngô và cây lúa miến, trong đó hệ gen chứa ADN ngoại lai bao gồm trình tự nucleotit mã hóa protein Cry1A, có thể dẫn đến sự kìm hãm sinh trưởng và cuối cùng là gây chết *Conogethes punctiferalis* bằng cách cho chúng tiếp xúc với protein này sau khi ăn thực vật chứa protein đó. Sự kìm hãm này là gây chết hoặc gây chết về sau. Đồng thời, thực vật đó phải có hình thái học bình thường và có thể gieo trồng bằng phương pháp thông dụng để thu hoạch và/hoặc tạo ra sản phẩm. Ngoài ra, thực vật chuyển gen này, có thể hầu như không phải sử dụng thuốc trừ sâu sinh học hoặc hóa học hướng đích Cry1A đối với *Conogethes punctiferalis*.

Mức độ biểu hiện của các protein dạng tinh thể trừ sâu (ICP) trong mô thực vật có thể được xác định bằng nhiều phương pháp khác nhau trong lĩnh vực này, ví dụ,

phương pháp định lượng mRNA mã hóa các protein có hoạt tính trừ sâu bằng các đoạn mồi cụ thể, hoặc phương pháp định lượng trực tiếp các protein có hoạt tính trừ sâu.

Nhiều thử nghiệm khác nhau có thể được thực hiện để xác định tác dụng trừ sâu của ICP trên thực vật. Mục đích chính của sáng chế là trừ sâu *Conogethes punctiferalis*.

Theo sáng chế, protein Cry1A này có thể chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 và/hoặc SEQ ID NO: 3 trong danh mục trình tự. Ngoài vùng mã hóa protein Cry1A, cũng có thể thu được các thành phần khác, như các vùng mã hóa protein đánh dấu chọn lọc.

Hơn nữa, băng cát xét biểu hiện chứa trình tự nucleotit mã hóa protein Cry1A theo sáng chế có thể biểu hiện đồng thời ít nhất là một hoặc nhiều gen mã hóa protein kháng thuốc diệt cỏ. Các gen kháng thuốc diệt cỏ này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các gen kháng glufosinat, như gen *bar* and gen *pat*; các gen kháng phenmedipham, như gen *pmpH*; các gen kháng glyphosate, như gen *EPSPS*; các gen kháng bromoxynil; các gen kháng sulfonyleurea; các gen kháng thuốc diệt cỏ dalapon; các gen kháng cyanamid; hoặc các gen kháng chất ức chế synthetaza glutamin như *PPT*, nhờ đó thu được thực vật chuyển gen có đồng thời hoạt tính trừ sâu cao và khả năng kháng thuốc diệt cỏ.

Theo sáng chế, ADN ngoại lai được đưa vào thực vật; ví dụ, các gen hoặc các cát xét biểu hiện hoặc các vector tái tổ hợp mã hóa protein Cry1A được đưa vào các tế bào thực vật. Các phương pháp chuyển gen truyền thống bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chuyển gen bằng *Agrobacterium*, chuyển gen bằng cách bắn phá bằng các hạt cỡ micro, hấp thu ADN trực tiếp của các tế bào nguyên sinh, điện chuyển, hoặc đưa ADN vào bằng sợi tinh thể silic oxit.

Sáng chế đề xuất phương pháp phòng trừ sinh vật gây hại, có các ưu điểm sau:

I. Phòng trừ từ bên trong. Các kỹ thuật đã biết chủ yếu thông qua các hành động từ bên ngoài, nghĩa là các yếu tố bên ngoài để phòng trừ sự lây nhiễm *Conogethes punctiferalis*, như phòng trừ bằng biện pháp nông nghiệp và phòng trừ bằng biện pháp hóa học. Trong khi sáng chế thông qua Cry1A được tạo ra bởi thực vật để tiêu diệt *Conogethes punctiferalis* và phòng *Conogethes punctiferalis* về sau, nghĩa là, thông qua các yếu tố từ bên trong để phòng trừ.

II. Không ô nhiễm và không có chất tồn dư. Việc phòng trừ bằng biện pháp hóa học trong lĩnh vực này đóng vai trò nhất định trong việc phòng trừ *Conogethes punctiferalis*, nhưng nó gây ra ô nhiễm, gây hại và các chất tồn dư đối với con người, vật nuôi và hệ sinh thái đất nông nghiệp. Phương pháp phòng trừ *Conogethes punctiferalis* theo sáng chế có thể loại trừ các tác động xấu nêu trên.

III. Phòng trừ được sinh vật gây hại ở toàn bộ các thời kỳ sinh trưởng. Các phương pháp phòng trừ *Conogethes punctiferalis* trong lĩnh vực này là theo thời kỳ, trong khi đó sáng chế tạo ra thực vật có khả năng tự bảo vệ trong toàn bộ các thời kỳ sinh trưởng của nó. Nghĩa là, thực vật chuyển gen này (có Cry1A) từ khi nảy mầm, sinh trưởng, cho đến khi nở hoa, ra quả có thể tránh được sự gây hại bởi *Conogethes punctiferalis*.

IV. Phòng trừ toàn bộ từng cây một. Các phương pháp phòng trừ *Conogethes punctiferalis* trong lĩnh vực này, ví dụ phun vào tán lá, phần lớn là theo khu vực. Trong khi sáng chế tạo ra sự bảo vệ cho toàn bộ từng cây một, ví dụ, rễ, lá, thân, cụm hoa, cuống giả, bao phấn, sợi xơ, v.v. của từng cây chuyển gen (có Cry1A) chống lại *Conogethes punctiferalis*.

V. Tác dụng lâu dài. Các phương pháp phun thuốc trừ sâu hiện có cần phun trực tiếp vào phần ngoài của cây, gây ra sự suy biến của dạng tinh thể hoạt tính (bao gồm protein Cry1A) trong môi trường. Sáng chế tạo ra thực vật biểu hiện protein Cry1A có độ bền ở mức *in vivo*, mà khắc phục được nhược điểm về tính không bền ở trong môi trường của các thuốc trừ sâu. Ngoài ra, thực vật chuyển gen (protein Cry1A) có tác dụng phòng trừ lâu dài ở các vị trí khác nhau, các thời điểm khác nhau và các loại gen khác nhau.

VI. Đơn giản, thuận tiện, hiệu quả kinh tế. Các thuốc trừ sâu sinh học được sử dụng trong lĩnh vực này rất dễ bị phân hủy trong môi trường, do đó cần sản xuất lại và sử dụng lại, và gây ra nhiều khó khăn cho việc sản xuất nông nghiệp trong thực tế, do đó làm tăng chi phí đáng kể. Ngược lại, sáng chế chỉ cần có thực vật chuyển gen biểu hiện protein Cry1A, do đó sáng chế tiết kiệm được nhiều nhân lực, nguyên liệu và chi phí.

VII. Hiệu quả toàn diện. Các phương pháp phòng trừ *Conogethes punctiferalis* trong lĩnh vực này không có hiệu quả toàn diện, mà chỉ làm giảm thiệt hại một chút.

Ngược lại, thực vật chuyển gen (có Cry1A) theo sáng chế có thể có thể tiêu diệt số lượng rất lớn các ấu trùng *Conogethes punctiferalis* mới nở, và sự phát triển của số lượng rất nhỏ ấu trùng sống sót được cũng bị kìm hãm rất mạnh. Sau 3 ngày, các ấu trùng vẫn trong trạng thái mới nở, và rõ ràng là chúng chậm phát triển và ngừng phát triển, nói chung, thực vật chuyển theo sáng chế chịu ít tổn hại.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ minh họa phương pháp phòng trừ sinh vật gây hại theo sáng chế được mô tả dưới đây.

Ví dụ 1: Tạo ra và tổng hợp gen Cry1A

I. Tạo ra các trình tự nucleotit của Cry1A

Trình tự axit amin (818 axit amin) của protein có hoạt tính trừ sâu Cry1Ab-01 được nêu trong SEQ ID NO: 1 trong danh mục trình tự; trình tự nucleotit (2457 nucleotit) của Cry1Ab-01 mã hóa trình tự axit amin nêu trên (818 axit amin) của protein có hoạt tính trừ sâu Cry1Ab-01 được nêu trong SEQ ID NO: 4 trong danh mục trình tự. Trình tự axit amin (615 axit amin) của protein có hoạt tính trừ sâu Cry1Ab-02 được nêu trong SEQ ID NO: 2 trong danh mục trình tự; trình tự nucleotit (1848 nucleotit) của Cry1Ab-02 mã hóa trình tự axit amin (615 axit amin) của protein có hoạt tính trừ sâu Cry1Ab-02 được nêu trong SEQ ID NO: 5 trong danh mục trình tự.

Trình tự axit amin (699 axit amin) của protein có hoạt tính trừ sâu Cry1Ah được nêu trong SEQ ID NO: 3 trong danh mục trình tự; trình tự nucleotit (2100 nucleotit) của Cry1Ah-01 mã hóa trình tự axit amin nêu trên (699 axit amin) của protein có hoạt tính trừ sâu Cry1Ah được nêu trong SEQ ID NO: 6 trong danh mục trình tự; trình tự nucleotit (2100 nucleotit) của Cry1Ah-02 mã hóa trình tự axit amin (699 axit amin) của protein có hoạt tính trừ sâu Cry1Ah được nêu trong SEQ ID NO: 7 trong danh mục trình tự.

II. Tạo ra các trình tự nucleotit của các gen giống như Cry

Trình tự nucleotit (1818 nucleotit) của Cry1Fa mã hóa trình tự axit amin (605 axit amin) của protein có hoạt tính trừ sâu Cry1Fa, được nêu trong SEQ ID NO: 8 trong danh mục trình tự; trình tự nucleotit (1947 nucleotit) của Cry1Ie mã hóa trình tự axit amin (648 axit amin) của protein có hoạt tính trừ sâu Cry1Ie, được nêu trong SEQ

ID NO: 9 trong danh mục trình tự.

III. Tổng hợp các trình tự nucleotit nêu trên

Trình tự nucleotit của Cry1Ab-01 (nêu trong SEQ ID NO: 4 trong danh mục trình tự), Cry1Ab-02 (nêu trong SEQ ID NO: 5 trong danh mục trình tự), Cry1Ah-01 (nêu trong SEQ ID NO: 6 trong danh mục trình tự), CryAh-02 (nêu trong SEQ ID NO: 7 trong danh mục trình tự), Cry1Fa (nêu trong SEQ ID NO: 8 trong danh mục trình tự) và Cry1Ie (nêu trong SEQ ID NO: 9 trong danh mục trình tự) được tổng hợp bởi công ty Nam Kinh GenScript Ltd. Đầu tận cùng 5' của trình tự nucleotit tổng hợp nêu trong Cry1Ab-01 (SEQ ID NO: 4) được nối với vị trí giới hạn NcoI, đầu tận cùng 3' của trình tự nucleotit tổng hợp nêu trong Cry1Ab-01 (SEQ ID NO: 4) được nối với vị trí giới hạn SpeI; đầu tận cùng 5' của trình tự nucleotit tổng hợp nêu trong Cry1Ab-02 (SEQ ID NO: 5) được nối với vị trí giới hạn NcoI, đầu tận cùng 3' của trình tự nucleotit tổng hợp nêu trong Cry1Ab-02 (SEQ ID NO: 5) được nối với vị trí giới hạn SmaI; đầu tận cùng 5' của trình tự nucleotit tổng hợp nêu trong Cry1Ah-01 (SEQ ID NO: 6) được nối với vị trí giới hạn AscI, đầu tận cùng 3' của trình tự nucleotit tổng hợp nêu trong Cry1Ah-01 (SEQ ID NO: 6) được nối với vị trí giới hạn SpeI; đầu tận cùng 5' của trình tự nucleotit tổng hợp nêu trong Cry1Ah-02 (SEQ ID NO: 7) được nối với vị trí giới hạn AscI, đầu tận cùng 3' của trình tự nucleotit tổng hợp nêu trong Cry1Ah-02 (SEQ ID NO: 7) được nối với vị trí giới hạn SpeI; đầu tận cùng 5' của trình tự nucleotit tổng hợp nêu trong Cry1Fa (SEQ ID NO: 8) được nối với vị trí giới hạn AscI, đầu tận cùng 3' của trình tự nucleotit tổng hợp nêu trong Cry1Fa (SEQ ID NO: 8) được nối với vị trí giới hạn BamHI; đầu tận cùng 5' của trình tự nucleotit tổng hợp nêu trong Cry1Ie (SEQ ID NO: 9) được nối với vị trí giới hạn NcoI, đầu tận cùng 3' của trình tự nucleotit tổng hợp nêu trong Cry1Ie (SEQ ID NO: 9) được nối với vị trí giới hạn SmaI.

Ví dụ 2: Thiết kế các vector biểu hiện tái tổ hợp và sự chuyển gen của vector này vào *Agrobacterium*

I. Thiết kế các vector nhân dòng tái tổ hợp chứa gen Cry1A

Như được thể hiện trên Fig.1, trình tự nucleotit tổng hợp được nêu trong Cry1Ab-01 được liên kết với vector nhân dòng pGEM-T (Promega, Madison, USA, CAT: A3600) theo quy trình của nhà sản xuất để tạo ra vector nhân dòng tái tổ hợp

DBN01-T. (Lưu ý: Amp thể hiện gen kháng Ampicillin; f1 thể hiện sự sao chép bản gốc của thể thực khuẩn f1; LacZ là codon khởi đầu của LacZ; SP6 là gen khởi đầu của SP6 RNA polymeraza; T7 là gen khởi đầu của T7 RNA polymeraza; Cry1Ab-01 là trình tự nucleotit nêu trong Cry1Ab-01 (SEQ ID NO: 4); và MCS là vị trí nhân đa dòng).

Bước tiếp theo là chuyển vector nhân dòng tái tổ hợp DBN01-T vào các tế bào chức năng T1 của *E. coli* (Transgen, Bắc kinh, Trung Quốc, CAT: CD501) bằng phương pháp sốc nhiệt. Cụ thể là, 50 µl các tế bào chức năng T1 của *E. coli* được trộn với 10 µl plasmid ADN (vector nhân dòng tái tổ hợp DBN01-T), được ủ trong bể nước ở 42°C trong 30 giây và sau đó ủ trong bể nước ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ (trong thiết bị lắc ở tốc độ 100 vòng/phút). Sau đó, hỗn hợp này được nuôi qua đêm trong khay LB (trypton 10 g/l, chiết suất men 5 g/l, NaCl 10 g/l, aga 15 g/l, trị số pH được điều chỉnh đến 7,5 bằng NaOH) với Ampicillin (100 mg/l), bề mặt của khay này được phủ bằng IPTG (isopropyl-thio-β-D-galactosit) và X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolyl-β-D-galactosit). Các cụm khuẩn trắng được chọn và được nuôi cấy thêm ở 37°C qua đêm trong môi trường LB (trypton 10 g/l, chiết suất men 5 g/l, NaCl 10 g/l, Ampicillin 100 mg/l, trị số pH được điều chỉnh đến 7,5 bằng NaOH). Các plasmid này được chiết tách bằng phương pháp kiềm. Cụ thể là, các vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường này được quay ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút trong 1 phút. Dịch nổi được loại bỏ và các tế bào chìm được tạo huyền phù trong 100 µl dung dịch được làm lạnh bằng đá I (25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA (etylenediamin axit tetraaxetic), 50 mM glucoza, pH 8,0). Sau khi bổ sung 150 µl dung dịch mới được chuẩn bị II (0,2 M NaOH, 1% SDS (natri dodexyl sunfat)), ống này được xoay ngược bốn lần và được đặt vào nước đá trong thời gian 3 đến 5 phút. 150 µl dung dịch được làm lạnh bằng đá III (4 M kali axetat, 2 M axit axetic) được bổ sung vào hỗn hợp này, được trộn ngay lập tức và trộn kỹ và sau đó được đặt vào nước đá trong thời gian 5 đến 10 phút, sau đó được quay ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút trong 5 phút ở 4°C. Phần dịch nổi được cho vào 2 lần thể tích của etanol được khử nước, trộn kỹ và sau đó được ủ trong 5 phút ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp này được quay ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút trong 5 phút ở 4°C và phần dịch nổi được loại bỏ. Phần viên được rửa bằng 70% etanol (thể tích/thể tích) và sau đó được làm khô bằng không khí, tiếp theo là bổ sung 30 µl TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) chứa RNase (20 µg/ml) để hòa tan phần viên này và

phân giải RNA trong bể nước ở 37°C trong 30 phút. Các plasmit thu được được lưu giữ ở nhiệt độ -20°C trước khi sử dụng.

Các plasmit chiết tách được nhận biết bằng sự phân giải KpnI và BglI, và các dòng dương được xác nhận tiếp bằng giải trình tự gen. Các kết quả đã cho thấy rằng, trình tự nucleotit được chèn vào vector nhân dòng tái tổ hợp DBN01-T là trình tự nucleotit nêu trong Cry1Ab-01 nêu trong SEQ ID NO: 4 trong danh mục trình tự, điều này cho thấy việc chèn đúng trình tự nucleotit nêu trong Cry1Ab-01.

Theo phương pháp thiết kế vector nhân dòng tái tổ hợp DBN01-T nêu trên, trình tự nucleotit tổng hợp được nêu trong Cry1Ab-02 (nêu trong SEQ ID NO: 5) được liên kết với vector nhân dòng pGEM-T để tạo ra vector nhân dòng tái tổ hợp DBN02-T. Việc chèn đúng trình tự nucleotit Cry1Ab-02 trong vector tái tổ hợp DBN02-T này được xác nhận bằng việc giải trình tự hoặc phân giải bằng enzym.

Theo phương pháp thiết kế vector nhân dòng tái tổ hợp DBN01-T nêu trên, trình tự nucleotit tổng hợp được nêu trong Cry1Ah-01 (nêu trong SEQ ID NO: 6) được liên kết với vector nhân dòng pGEM-T để tạo ra vector nhân dòng tái tổ hợp DBN03-T. Việc chèn đúng trình tự nucleotit Cry1Ah-01 trong vector tái tổ hợp DBN03-T được xác nhận bằng việc giải trình tự hoặc phân giải bằng enzym.

Theo phương pháp thiết kế vector nhân dòng tái tổ hợp DBN01-T nêu trên, trình tự nucleotit tổng hợp được nêu trong Cry1Ah-02 (nêu trong SEQ ID NO: 7) được liên kết với vector nhân dòng pGEM-T để tạo ra vector tái tổ hợp DBN04-T. Việc chèn đúng trình tự nucleotit Cry1Ah-02 trong vector tái tổ hợp DBN04-T được xác nhận bằng việc giải trình tự hoặc phân giải bằng enzym.

Theo phương pháp thiết kế vector nhân dòng tái tổ hợp DBN01-T nêu trên, trình tự nucleotit tổng hợp được nêu trong Cry1Fa (nêu trong SEQ ID NO: 8) được liên kết với vector nhân dòng pGEM-T để tạo ra vector tái tổ hợp DBN05-T. Việc chèn đúng trình tự nucleotit Cry1Fa trong vector tái tổ hợp DBN05-T được xác nhận bằng việc giải trình tự hoặc phân giải bằng enzym.

Theo phương pháp thiết kế vector nhân dòng tái tổ hợp DBN01-T nêu trên, trình tự nucleotit tổng hợp được nêu trong Cry1Ie (nêu trong SEQ ID NO: 9) được liên kết với vector nhân dòng pGEM-T để tạo ra vector tái tổ hợp DBN06-T. Việc chèn đúng

trình tự nucleotit Cry1Ie trong vector tái tổ hợp DBN06-T được xác nhận bằng việc giải trình tự hoặc phân giải bằng enzym.

II. Thiết kế các vector biểu hiện tái tổ hợp chứa gen Cry1A

Các phương pháp thiết kế vector bằng cách phân giải bằng enzym truyền thống là đã biết rõ trong lĩnh vực này. Như thể hiện trên Fig.2, vector nhân dòng tái tổ hợp DBN01-T và vector biểu hiện DBNBC-01 (Vector xương sống: pCAMBIA2301 (cung cấp bởi viện nghiên cứu CAMBIA)) được phân giải lần lượt bởi các enzym giới hạn NcoI và SpeI; và các mảnh thu được của trình tự nucleotit nêu trong Cry1Ab-01 sau đó được chèn vào vector biểu hiện DBNBC-01 đã được phân giải giữa các vị trí NcoI và SpeI để tạo ra vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100124. (Lưu ý: Kan thể hiện gen kanamycin; RB thể hiện danh giới bên phải; Ubi thể hiện gen khởi đầu của gen ngô ubiquitin (SEQ ID NO: 10); Cry1Ab-01 thể hiện trình tự nucleotit nêu trong Cry1Ab-01 (SEQ ID NO: 4); Nos thể hiện phần tận cùng của gen nopal synthase (SEQ ID NO: 11); PMI thể hiện gen phosphomannose isomerase (SEQ ID NO: 12); và LB thể hiện danh giới bên phải).

Vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100124 này được chuyển gen vào các tế bào chức năng T1 của *E. coli* bằng phương pháp sốc nhiệt. Cụ thể là, 50 µl các tế bào chức năng T1 của *E. coli* được trộn với 10 µl plasmit ADN (vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100124), được ủ trong bể nước ở 42°C trong 30 giây và sau đó được ủ trong bể nước ở 37°C trong 1 giờ (trong thiết bị lắc ở tốc độ 100 vòng/phút). Hỗn hợp này sau đó được nuôi ở 37°C trong 12 giờ trong khay LB (trypton 10 g/l, chiết suất men 5 g/l, NaCl 10 g/l, aga 15 g/l, trị số pH được điều chỉnh đến 7,5 bằng NaOH) với 50 mg/l Kanamycin. Các cụm khuẩn trắng được chọn và được nuôi cấy thêm ở 37°C qua đêm trong môi trường LB (trypton 10 g/l, chiết suất men 5 g/l, NaCl 10 g/l, Kanamycin 50 mg/l, trị số pH được điều chỉnh đến 7,5 bằng NaOH). Các plasmit được chiết tách bằng phương pháp kiềm. Sự phân giải bằng enzym với NcoI và SpeI được sử dụng để nhận biết các plasmit chiết tách được, và các dòng dương tiếp tục được xác nhận bằng giải trình tự. Các kết quả đã cho thấy rằng, trình tự nucleotit được chèn vào vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100124 giữa các vị trí NcoI và SpeI là Cry1Ab-01 nêu trong SEQ ID NO: 4 trong danh mục trình tự.

Theo phương pháp thiết kế vector nhân dòng tái tổ hợp DBN100124 nêu trên,

vector nhân dòng tái tổ hợp DBN02-T và DBN05-T được phân giải bằng enzym lần lượt bởi NcoI và SmaI, AscI và BamHI để tạo ra trình tự nucleotit của Cry1Ab-02 và Cry1Fa, mà được chèn vào vector biểu hiện DBNBC-01 để thu được vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100075. Như đã được xác nhận bởi việc giải trình tự hoặc phân giải bằng enzym, vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100075 chứa trình tự nucleotit của Cry1Ab-02 và Cry1Fa nêu trong SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 8 trong danh mục trình tự.

Theo phương pháp thiết kế vector nhân dòng tái tổ hợp DBN100124 nêu trên, vector nhân dòng tái tổ hợp DBN03-T được phân giải bằng enzym bởi AscI và SpeI để tạo ra trình tự nucleotit nêu trong Cry1Ah-01, mà được chèn vào vector biểu hiện DBNBC-01 để thu được vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100071. Như đã được xác nhận bởi việc giải trình tự hoặc phân giải bằng enzym, trình tự nucleotit được chèn vào vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100071 giữa các vị trí AscI và SpeI là Cry1Ah-01.

Theo phương pháp thiết kế vector nhân dòng tái tổ hợp DBN100124 nêu trên, vector nhân dòng tái tổ hợp DBN04-T và DBN06-T được phân giải bằng enzym lần lượt bởi AscI và SpeI, NcoI và SmaI để tạo ra trình tự nucleotit của Cry1Ah-02 và Cry1Ie, mà được chèn vào vector biểu hiện DBNBC-01 để thu được vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100147. Như đã được xác nhận bởi việc giải trình tự hoặc phân giải bằng enzym, vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100147 chứa trình tự nucleotit của Cry1Ah-02 và Cry1Ie nêu trong SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 9 trong danh mục trình tự.

III. Vector biểu hiện tái tổ hợp được chuyển gen vào *Agrobacterium*

Các vector biểu hiện tái tổ hợp được thiết kế một cách chính xác của DBN100124, DBN100075, DBN100071 và DBN100147 lần lượt được chuyển gen vào *Agrobacterium* LBA4404 (Invitrogen, Chicago, USA; Cat No: 18313-015) bằng phương pháp ni tơ lỏng. Cụ thể là, 100 µl *Agrobacterium* LBA4404 và 3 µl plasmit ADN (vector biểu hiện tái tổ hợp từ DBN100124, DBN100075, DBN100071 và DBN100147) được đặt vào trong ni tơ lỏng trong 10 phút, tiếp theo là ủ trong bể nước ở 37°C trong 10 phút. *Agrobacterium* LBA4404 đã được chuyển gen được ủ trong ống LB, sau đó được nuôi cấy ở 28°C, quay ly tâm 200 vòng/phút trong 2 giờ. Sau đó, sản phẩm nuôi cấy được phủ lên đĩa LB chứa 50 mg/l Rifampicin và 100 mg/l Kanamycin cho đến khi các dòng đơn dương phát triển. Các dòng đơn này được chọn để tiếp tục nuôi cấy nhằm chiết tách các plasmit. Vector biểu hiện tái tổ hợp được xác định bởi sự

phân giải bằng enzym, nghĩa là, vectơ biểu hiện tái tổ hợp DBN100124 và DBN100075 được phân giải với các enzym giới hạn AhdI và XbaI, và các vectơ biểu hiện tái tổ hợp DBN100071 và DBN100147 được phân giải với các enzym giới hạn StyI và BglII, điều này cho thấy rằng việc thiết kế đúng các vectơ biểu hiện tái tổ hợp, DBN100124, DBN100075, DBN100071 và DBN100147.

Ví dụ 3: Thu được và xác nhận lại cây ngô được chuyển gen Cry1A

I. Tạo ra và xác định cây ngô được chuyển gen Cry1A

Theo phương pháp lây nhiễm *Agrobacterium* thông thường, các phôi non được nuôi cấy và tiệt trùng của Ngô Z31 được nuôi cấy với các chủng *Agrobacterium* thu được ở phần III, ví dụ 2, sao cho để chuyển gen T-ADN trong các vectơ biểu hiện tái tổ hợp DBN100124, DBN100075, DBN100071 và DBN100147 (chứa trình tự gen khởi đầu của gen Ubiquitin ngô, trình tự nucleotit của gen Cry1Ab-01, Cry1Ab-02, Cry1Ah-01, Cry1Ah-02, Cry1Fa và Cry1Ie, PMI và trình tự tận cùng của Nos) vào bộ gen ngô, tạo ra cây ngô được chuyển gen với trình tự nucleotit nêu trong Cry1Ab-01, cây ngô được chuyển gen trình tự nucleotit nêu trong Cry1Ab-02-Cry1Fa này, cây ngô được chuyển gen trình tự nucleotit nêu trong Cry1Ah-01 và cây ngô được chuyển gen trình tự nucleotit nêu trong Cry1Ah-02-Cry1Ie. Cây ngô kiểu đại được sử dụng làm đối chứng.

Quy trình chuyển gen bằng *Agrobacterium* của cây ngô được mô tả một cách vắn tắt dưới đây. Các phôi non phân lập được từ ngô được cho tiếp xúc với huyền phù *Agrobacterium*, nhờ đó trình tự nucleotit của Cry1Ab-01, Cry1Ah-02-Cry1Fa, Cry1Ah-01 và/hoặc Cry1Ah-02-Cry1Ie được phân phối vào ít nhất là một tế bào của một trong số các phôi ngô non nêu trên bởi *Agrobacterium* (bước 1: lây nhiễm). Ở bước này, các phôi non nêu trên tốt hơn là được nhúng vào huyền phù *Agrobacterium* ($OD_{660} = 0,4-0,6$, môi trường lây nhiễm (muối MS 4,3 g/l, MS các vitamin, casein 300 mg/l, sucroza 68,5 g/l, glucoza 36 g/l, Acetosyringon (AS) 40 mg/l, axit 2,4-diclorophenoxyaxetic (2,4-D) 1 mg/l, pH 5,3)) để kích hoạt sự lây nhiễm. Các phôi non này được nuôi cấy với *Agrobacterium* trong một khoảng thời (3 ngày) (bước 2: đồng nuôi cấy). Tốt hơn là, sau bước lây nhiễm, các phôi non này được nuôi cấy trong môi trường rắn (muối MS 4,3 g/l, MS các vitamin, casein 300 mg/l, sucroza 20 g/l, glucoza 10 g/l, Acetosyringon (AS) 100 mg/l, axit 2,4-diclorophenoxyaxetic (2,4-D) 1

mg/l, aga 8 g/l, pH 5,8). Sau bước đồng nuôi cấy, bước "hồi phục" là tùy ý, trong đó có ít nhất một kháng sinh đã biết là ức chế sự phát triển của *Agrobacterium* (Cephalosporins) và không có các tác nhân chọn lọc đối với cây được chuyển gen trong môi trường hồi phục (muối MS 4,3 g/l, MS các vitamin, casein 300 mg/l, sucroza 30 g/l, axit 2,4-diclorophenoxyaxetic (2,4-D) 1 mg/l, aga 8 g/l, pH 5,8) (bước 3: Hồi phục). Tốt hơn là, các phôi non được nuôi cấy trong môi trường rắn với một chất kháng sinh mà có tác nhân chọn lọc để loại bỏ *Agrobacterium* và tạo ra một khoảng thời gian hồi phục cho các tế bào đã được chuyển gen. Tiếp theo, các phôi non đã được tiêm được nuôi cấy trong môi trường có tác nhân chọn lọc (manosa) và các thể chai được chuyển gen đang phát triển được lựa chọn (bước 4: lựa chọn). Tốt hơn là, các phôi non được nuôi cấy trong môi trường chọn lọc rắn có tác nhân lựa chọn (muối MS 4,3 g/l, MS các vitamin, casein 300 mg/l, sucroza 5 g/l, manosa 12. 5g/l, axit 2,4-diclorophenoxyaxetic (2,4-D) 1 mg/l, aga 8 g/l, pH 5,8), mà có kết quả là sự phát triển có chọn lọc của các tế bào được chuyển gen. Hơn nữa, các thể chai sinh sản thành cây (bước 5: sinh sản). Tốt hơn là, các thể chai này được nuôi trong môi trường rắn có tác nhân chọn lọc được được nuôi cấy trong môi trường rắn (MS môi trường biệt hóa và MS môi trường tạo rễ) để tạo ra thực vật.

Các thể chai chọn lọc được được chuyển gen vào môi trường biệt hóa MS (muối MS 4,3 g/l, MS các vitamin, casein 300 mg/l, sucroza 30 g/l, 6-benzyladenin 2 mg/l, manosa 5 g/l, aga 8 g/l, pH 5,8), và được nuôi cấy dưới 25°C để biệt hóa. Các cây giống con differentiated được chuyển vào môi trường tạo rễ MS (MS muối 2,15 g/l, MS các vitamin, casein 300 mg/l, sucroza 30 g/l, axit indol-3-axetic 1 mg/l, aga 8 g/l, pH 5,8), và được nuôi cấy dưới 25°C cho đến khi đạt chiều cao khoảng 10 cm. Sau đó, các cây con này được chuyển vào nhà kính và được trồng cho đến khi ra bắp. Trong suốt quá trình được trồng trong nhà kính, các cây này được giữ ở nhiệt độ 28°C trong 16 giờ và sau đó được giữ ở nhiệt độ 20°C trong 8 giờ mỗi ngày.

II. Kiểm tra lại cây ngô được chuyển gen với gen Cry1A bằng phương pháp TaqMan

Sử dụng khoảng 100 mg lá từ mỗi cây ngô trong số cây ngô được chuyển gen với trình tự nucleotit nêu trong Cry1Ab-01, cây ngô được chuyển gen với trình tự nucleotit nêu trong Cry1Ab-02-Cry1Fa, cây ngô được chuyển gen với trình tự nucleotit nêu

trong Cry1Ah-01 và cây ngô được chuyển gen với trình tự nucleotit nêu trong Cry1Ah-02-Cry1Ie làm mẫu, bộ gen ADN được chiết tách với DNeasy Plant Maxi Kit của Qiagen, và số lượng bản sao của các gen Cry1A, Cry1F và Cry1Ie được xác định bằng xét nghiệm khếch đại PCR định lượng bằng huỳnh quang với đoạn dò Taqman. Cây ngô kiểu dại được phân tích làm đối chứng theo phương pháp nêu trên. Các thử nghiệm được lặp lại 3 lần và các kết quả được lấy trung bình.

Quy trình được nêu chi tiết để xác định số lượng bản sao của các gen Cry1A, Cry1F và Cry1Ie như sau:

Bước 11: 100 mg lá của từng cây ngô trong số các cây ngô sau: cây ngô được chuyển gen với trình tự nucleotit nêu trong Cry1Ab-01, cây ngô được chuyển gen với trình tự nucleotit nêu trong Cry1Ab-02-Cry1Fa, cây ngô được chuyển gen với trình tự nucleotit nêu trong Cry1Ah-01 và cây ngô được chuyển gen với trình tự nucleotit nêu trong Cry1Ah-02- Cry1Ie, và 100 mg lá của cây ngô kiểu dại được lấy làm mẫu và được làm đồng nhất trong cối say với ni tơ lỏng. Mỗi mẫu được lấy ba lần.

Bước 12: Bộ gen ADN của các mẫu nêu trên được chiết tách với DNeasy Plant Maxi Kit của Qiagen, và phương pháp được nêu chi tiết theo quy trình của nhà sản xuất.

Bước 13: NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) được sử dụng để xác định hàm lượng của bộ gen ADN của các mẫu nêu trên.

Bước 14: Hàm lượng của bộ gen ADN của các mẫu thử nêu trên được điều chỉnh bằng nhau với trị số nằm trong khoảng từ 80 đến 100 ng/μl.

Bước 15: Số lượng bản sao của các mẫu được xác định bằng phương pháp PCR định lượng bằng huỳnh quang với đầu dò Taqman. Một mẫu mà có số lượng bản sao đã biết được sử dụng làm tiêu chuẩn, và một mẫu từ cây ngô kiểu dại được sử dụng làm đối chứng. Mỗi mẫu được lấy ba lần và các kết quả được lấy trung bình. Các đoạn mồi và các đoạn dò dùng trong phương pháp PCR định lượng bằng huỳnh quang được nêu dưới đây.

Các đoạn mồi và các đoạn dò dưới đây được sử dụng để phát hiện trình tự nucleotit nêu trong Cry1Ab-01:

Đoạn mồi 1 (CF1): CGAACTACGACTCCCGCAC, nêu trong SEQ ID NO: 13 trong

danh mục trình tự;

Đoạn mỗi 2 (CR1): GTAGATTTCGCGGGTCAGTTG, nêu trong SEQ ID NO: 14 trong danh mục trình tự;

Đoạn dò 1 (CP1): CTACCCGATCCGCACCGTGTCC, nêu trong SEQ ID NO: 15 trong danh mục trình tự.

Các đoạn mỗi và các đoạn dò dưới đây được sử dụng để phát hiện trình tự nucleotit nêu trong Cry1Ab-02:

Đoạn mỗi 3 (CF2): TGCGTATTCAATTCAACGACATG, nêu trong SEQ ID NO: 16 trong danh mục trình tự;

Đoạn mỗi 4 (CR2): CTTGGTAGTTCTGGACTGCGAAC, nêu trong SEQ ID NO: 17 trong danh mục trình tự;

Đoạn dò 2 (CP2): CAGCGCCTTGACCACAGCTATCCC, nêu trong SEQ ID NO: 18 trong danh mục trình tự;

Các đoạn mỗi và đoạn dò dưới đây được sử dụng để phát hiện trình tự nucleotit nêu trong Cry1Fa:

Đoạn mỗi 5 (CF3): CAGTCAGGAAGTACAGTTGTAAGAGGG, nêu trong SEQ ID NO: 19 trong danh mục trình tự;

Đoạn mỗi 6 (CR3): ACGCGAATGGTCCTCCACTAG, nêu trong SEQ ID NO: 20 trong danh mục trình tự;

Đoạn dò 3 (CP3): CGTCGAAGAATGTCTCCTCCCGTGAAC, nêu trong SEQ ID NO: 21 trong danh mục trình tự;

Các đoạn mỗi và đoạn dò dưới đây được sử dụng để phát hiện trình tự nucleotit nêu trong Cry1Ah-01:

Đoạn mỗi 7 (CF4): ATCGTGAACAACCAGAACCAGTG, nêu trong SEQ ID NO: 22 trong danh mục trình tự;

Đoạn mỗi 8 (CR4): CTCCAGGATCTCGATCTCCG, nêu trong SEQ ID NO: 23 trong danh mục trình tự;

Đoạn dò 4 (CP4): CGTGCCGTACAACCTGCCTGAACAACC, nêu trong SEQ ID NO:

24 trong danh mục trình tự;

Các đoạn môi và đoạn dò dưới đây được sử dụng để phát hiện trình tự nucleotit nêu trong Cry1Ah-02:

Đoạn môi 9 (CF5): TCATTG GGGCTTCGTCG, nêu trong SEQ ID NO: 25 trong danh mục trình tự;

Đoạn môi 10 (CR5): TGATTGATCAGCTGCTCAACCT, nêu trong SEQ ID NO: 26 trong danh mục trình tự;

Đoạn dò 5 (CP5): CCAGTGGGATGCGTTCCTCGCTC, nêu trong SEQ ID NO: 27 trong danh mục trình tự;

Các đoạn môi và đoạn dò dưới đây được sử dụng để phát hiện trình tự nucleotit nêu trong Cry1Ie:

Đoạn môi 11 (CF6): GAGCATTGATCCTTTCGTCAGTG, nêu trong SEQ ID NO: 28 trong danh mục trình tự;

Đoạn môi 12 (CR6): CAAAGTACCGAGGATCTTACCAGC, nêu trong SEQ ID NO: 29 trong danh mục trình tự;

Đoạn dò 6 (CP6): CCTCCACAATCCAAACGGGCATCG, nêu trong SEQ ID NO: 30 trong danh mục trình tự.

Hệ thống phản ứng PCR:

JumpStart™ Taq ReadyMix™ (Sigma)	10 µl
50× hỗn hợp các đoạn môi/đoạn dò	1 µl
Bộ gen ADN	3 µl
Nước (dung dịch H ₂ O)	6 µl

50× hỗn hợp các đoạn môi/đoạn dò này chứa 45 µl của 1 mM mỗi đoạn môi, 50 µl của 100 µM đoạn dò và 860 µl của 1× TE đệm, được lưu giữ trong ống hồ phách ở 4°C.

Điều kiện PCR như sau:

Bước	Nhiệt độ	Thời gian
21	95°C	5 phút

- 22 95°C 30 giây
- 23 60°C 1 phút
- 24 quay trở lại bước 22, lặp lại 40 lần

Dữ liệu được phân tích bằng phần mềm SDS2.3 (Applied Biosystem).

Như được thể hiện bởi các kết quả, trình tự nucleotit của Cry1Ab-01, Cry1Ab-02-Cry1Fa, Cry1Ah-01 và Cry1Ah-02-Cry1Ie tất cả đều được hợp nhất vào bộ gen của cây ngô được phát hiện. Cây ngô được chuyển gen với trình tự nucleotit nêu trong Cry1Ab-01, cây ngô được chuyển gen với trình tự nucleotit nêu trong Cry1Ab-02-Cry1Fa, cây ngô được chuyển gen với trình tự nucleotit nêu trong Cry1Ah-01 cùng với cây ngô được chuyển gen với trình tự nucleotit Cry1Ah-02-Cry1Ie đã thu được một bản sao của gen Cry1A, Cry1F và/hoặc Cry1Ie trong cây ngô chuyển gen tương ứng.

Ví dụ 4: Phát hiện các protein có hoạt tính trừ sâu trên cây ngô chuyển gen

I. Phát hiện hàm lượng protein có hoạt tính trừ sâu trên cây ngô chuyển gen

Các dung dịch được sử dụng trong thử nghiệm này được nêu dưới đây:

Dung dịch đệm để chiết tách: 8 g/l NaCl, 0,2 g/l KH_2PO_4 , 2,9 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g/l KCl, 5,5 ml/L Tween-20, pH 7,4;

Dung dịch đệm để rửa PBST: 8 g/l NaCl, 0,2 g/l KH_2PO_4 , 2,9 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g/l KCl, 0,5 ml/L Tween-20, pH 7,4;

Dung dịch để kết thúc phản ứng: 1M HCl.

3 mg lá cây tươi từ mỗi cây ngô trong số các cây ngô sau: cây ngô được chuyển gen với trình tự nucleotit nêu trong Cry1Ab-01, cây ngô được chuyển gen với trình tự nucleotit nêu trong Cry1Ab-02-Cry1Fa, cây ngô được chuyển gen với trình tự nucleotit nêu trong Cry1Ah-01 cũng như cây ngô được chuyển gen với trình tự nucleotit Cry1Ah-02-Cry1Ie được lấy làm mẫu và được làm đồng nhất với nitơ lỏng, sau đó bổ sung 800 μl dung dịch đệm để chiết tách. Hỗn hợp này được quay ly tâm ở tốc độ 4000 vòng/phút trong 10 phút, sau đó phần dịch nổi được pha loãng 40 lần với dung dịch đệm để chiết tách và 80 μl phần dịch nổi trên bề mặt đã được pha loãng được sử dụng cho xét nghiệm ELISA. Do sự tương đồng cao giữa trình tự axit amin Cry1Ah và trình tự axit amin Cry1Ab, kháng thể kháng Cry1Ab có thể được áp dụng cho protein có hoạt tính trừ sâu Cry1Ah. Kit ELISA (xét nghiệm chất hấp thụ miễn

dịch liên kết được với enzym) (Công ty ENVIRLOGIX, kit Cry1Ab/Cry1Ac) được sử dụng để xác định tỷ lệ của hàm lượng protein có hoạt tính trừ sâu (Cry1Ab và Cry1Ah) chia cho trọng lượng của lá tươi. Phương pháp được nêu chi tiết bởi quy trình của nhà sản xuất.

Trong khi cây ngô kiểu dại và cây ngô không chuyển gen được xác nhận bởi Taqman được sử dụng làm đối chứng, và việc xác định theo các phương pháp được mô tả dưới đây. Đối với ba dòng được chuyển gen với Cry1Ab-01 (S1, S2 và S3), ba dòng được chuyển gen với Cry1Ab-01-Cry1Fa (S4, S5 và S6), ba dòng được chuyển gen với Cry1Ah-01 (S7, S8 và S9), ba dòng được chuyển gen với Cry1Ah-02-Cry1Ie (S10, S11 và S12), một dòng được xác nhận là cây không chuyển gen (NGM) bởi Taqman và một dòng là dòng kiểu dại kiểu dại (CK), ba cây mỗi dòng được sử dụng và mỗi cây được lặp lại sáu lần.

Các kết quả thực nghiệm của hàm lượng protein có hoạt tính trừ sâu (protein Cry1Ab) ở cây chuyển gen được thể hiện trong bảng 1. Các kết quả thực nghiệm của hàm lượng protein có hoạt tính trừ sâu (protein Cry1Ah) trên cây chuyển gen được thể hiện trong bảng 2. Tỷ lệ biểu hiện được lấy trung bình của protein có hoạt tính trừ sâu (Cry1Ab) chia cho trọng lượng của lá tươi trên cây ngô được chuyển gen với trình tự nucleotit nêu trong Cry1Ab-01 và Cry1Ab-01-Cry1Fa được xác định lần lượt là 8536,2 và 8234,7; tỷ lệ biểu hiện của protein có hoạt tính trừ sâu (Cry1Ah) được lấy trung bình chia cho trọng lượng của lá tươi trên cây ngô được chuyển gen với trình tự nucleotit nêu trong Cry1Ah-01 và Cry1Ah-02-Cry1Ie được xác định lần lượt là 5374,3 và 5382,2. Các kết quả này chỉ ra rằng Cry1Ab và protein Cry1Ahs có sự biểu hiện ổn định và ở mức cao trên cây ngô chuyển gen.

Bảng 1: lượng trung bình của protein Cry1Ab được biểu hiện trên cây ngô chuyển gen

	Lượng protein Cry1Ab được biểu hiện trên từng cây (ng/g) (lặp lại sáu lần mỗi cây)			Lượng protein Cry1Ab được biểu hiện trên mỗi loại của các dòng (ng/g)
Dòng	1	2	3	Lượng trung bình (ng/g)
S1	7160,2	10444,4	9080,8	8536,2
S2	8534,4	8581,2	7330,2	
S3	8817,4	9185,7	7691,2	

S4	7088,4	9837,5	10626,4	8234,7
S5	9866,7	6863,3	4222,4	
S6	9912,1	7724,1	7970,9	
NGM	-1,7	0	-1,0	0
CK	0	-4,2	2,3	0

Bảng 2: Lượng trung bình của protein Cry1Ah được biểu hiện trên cây ngô chuyển gen

	Lượng protein Cry1Ab được biểu hiện trên từng cây (ng/g) (lặp lại sáu lần mỗi cây)			Lượng protein Cry1Ab được biểu hiện trên mỗi loại của các dòng (ng/g)
Dòng	1	2	3	Lượng trung bình (ng/g)
S7	5220,5	5520,2	5550,6	5374,3
S8	5130,4	5249,3	5486,5	
S9	5205,4	5437,5	5568,1	
S10	5305,3	5374,9	5653,8	5382,2
S11	5136,0	5229,5	5546,8	
S12	5240,3	5502,2	5450,7	
NGM	-12,68	0	-11,26	0
CK	0	-15,13	-13,21	0

II. Phát hiện khả năng kháng sinh vật gây hại của cây ngô chuyển gen

Cây ngô được chuyển gen với trình tự nucleotit nêu trong Cry1Ab-01, cây ngô được chuyển gen với trình tự nucleotit nêu trong Cry1Ab-02-Cry1Fa, cây ngô được chuyển gen với trình tự nucleotit nêu trong Cry1Ah-01, cây ngô được chuyển gen với trình tự nucleotit Cry1Ah-02-Cry1Ie, cây ngô kiểu dại và cây ngô không được chuyển gen xác nhận được bởi Taqman được phát hiện bởi khả năng kháng lại *Conogethes punctiferalis* của nó.

Lá tươi của cây ngô được chuyển gen với trình tự nucleotit nêu trong Cry1Ab-01, cây ngô được chuyển gen với trình tự nucleotit nêu trong Cry1Ab-02-Cry1Fa, cây ngô được chuyển gen với trình tự nucleotit nêu trong Cry1Ah-01, cây ngô được chuyển gen với trình tự nucleotit Cry1Ah-02-Cry1Ie, cây ngô kiểu dại và cây ngô xác nhận được là cây ngô không chuyển gen (giai đoạn V3-V4) bởi Taqman lần lượt được lấy mẫu. Lá ngô được rửa qua bằng nước được tiệt trùng và nước trên các lá này được làm

khô bằng gạc. Gân lá được loại bỏ, và các lá này được cắt thành các mảnh khoảng 1 cm × 4 cm hoặc 1 cm × 2 cm. Một hoặc hai mảnh lá này được đặt trên giấy lọc đã được thấm ướt bằng nước cất trên đáy của đĩa Petri tròn bằng chất dẻo. Mười đầu của *Conogethes punctiferalis* (ấu trùng mới nở) được đặt vào mỗi đĩa, và các đĩa có sinh vật gây hại này được đậy bằng nắp và được đặt ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25-28°C, độ ẩm tương đối nằm trong khoảng từ 70% đến 80% và chu kỳ sáng (sáng/tối) là 16:8 trong 3 ngày. Theo ba dấu hiệu chỉ dẫn, tiến trình phát triển, tỷ lệ chết và tỷ lệ thiệt hại đối với lá cây gây ra bởi ấu trùng *Conogethes punctiferalis*, điểm số về khả năng kháng sinh vật gây hại được tính như sau: điểm = 100 x tỷ lệ chết + [100 x tỷ lệ tử vong + 90 x (số lượng sinh vật gây hại mới nở/tổng số sinh vật gây hại đã được gây nhiễm) + 60 x (số lượng mới nở - số lượng sinh vật hại phòng trừ âm/tổng số sinh vật gây hại được gây nhiễm) + 10 x (số lượng sinh vật gây hại phòng trừ âm /tổng số sinh vật gây hại được gây nhiễm)] + 100 x (1-tỷ lệ thiệt hại của lá). Đối với ba dòng được chuyển gen với trình tự nucleotit Cry1Ab-01 (S1, S2 và S3), ba dòng được chuyển gen với trình tự nucleotit Cry1Ab-02-Cry1Fa (S4, S5 và S6), ba dòng được chuyển gen với trình tự nucleotit Cry1Ah-01 (S7, S8 và S9), ba dòng được chuyển gen với trình tự nucleotit Cry1Ah-02-Cry1Ie (S10, S11 và S12), một dòng được xác nhận là cây không chuyển gen (NGM) bởi Taqman và một dòng là kiểu đại (CK), ba cây mỗi dòng được sử dụng và mỗi cây được lặp lại sáu lần. Các kết quả được thể hiện trong bảng 3 cũng như trên Fig.3 và Fig. 4.

Bảng 3: Khả năng kháng sinh vật gây hại của cây ngô chuyển gen được gây nhiễm *Conogethes punctiferalis*

Dòng	Tỷ lệ thiệt hại của lá (%)	Tiến trình phát triển của <i>Conogethes punctiferalis</i> (mỗi dòng)			Tỷ lệ chết của <i>Conogethes punctiferalis</i> (mỗi dòng)		Điểm (mỗi dòng)	Trung bình
		Mới nở	Phòng trừ âm mới nở	≥Phòng trừ âm	Tổng số sinh vật gây hại	Tỷ lệ chết (%)		
S1	1	1,5	0	0	10	85	283	285
S2	1	1	0	0	10	90	288	
S3	0,5	0	0	1	10	90	285	

S4	1	1,5	0	0	10	85	283	282
S5	3	1	0	0	10	85	279	
S6	1	1,5	0	0	10	85	283	
S7	2	0,5	0	0	10	93	293	284
S8	2	1,5	0	0	10	85	282	
S9	2	2	0	0	10	80	282	
S10	1	1,5	0	0	10	85	283	286
S11	3	0	0	0,5	10	95	288	
S12	1	1	0	0	10	90	288	
NGM	40	0	0	7,3	10	0	27	121
CK	50	0	0	7,5	10	17	15	94

Như thể hiện trong bảng 3, điểm của cây ngô được chuyển gen với trình tự nucleotit nêu trong Cry1Ab-01, cây ngô được chuyển gen với trình tự nucleotit nêu trong Cry1Ab-02-Cry1Fa, cây ngô được chuyển gen với trình tự nucleotit nêu trong Cry1Ah-01, cây ngô được chuyển gen với trình tự nucleotit Cry1Ah-02-Cry1Ie tất cả đều khoảng 280 hoặc cao hơn, trong khi đó điểm của cây ngô kiểu dại nói chung là khoảng 120 hoặc thấp hơn.

Như thể hiện trên Fig.3 và Fig.4, so với cây ngô kiểu dại, cây ngô được chuyển gen với trình tự nucleotit nêu trong Cry1Ab-01, cây ngô được chuyển gen với trình tự nucleotit nêu trong Cry1Ab-02-Cry1Fa, cây ngô được chuyển gen với trình tự nucleotit nêu trong Cry1Ah-01 và cây ngô được chuyển gen với trình tự nucleotit Cry1Ah-02-Cry1Ie tiêu diệt một lượng lớn ấu trùng *Conogethes punctiferalis* mới nở, và kiềm chế đáng kể sự phát triển của một lượng nhỏ ấu trùng còn sống sót đến nỗi mà ấu trùng mới nở vẫn còn trong trạng thái mới nở sau 3 ngày. Ngoài ra, cây ngô được chuyển gen với trình tự nucleotit nêu trong Cry1Ab-01, cây ngô được chuyển gen với trình tự nucleotit nêu trong Cry1Ab-02-Cry1Fa, cây ngô được chuyển gen với trình tự nucleotit nêu trong Cry1Ah-01 và cây ngô được chuyển gen với trình tự nucleotit Cry1Ah-02-Cry1Ie chỉ có thiệt hại không đáng kể, có một lượng rất thấp thiệt hại dạng lỗ nhỏ; Tỷ lệ thiệt hại đối với lá là khoảng 3% hoặc thấp hơn.

Vì vậy, đã sáng tỏ là cây ngô được chuyển gen với trình tự nucleotit nêu trong Cry1Ab-01, cây ngô được chuyển gen với trình tự nucleotit nêu trong Cry1Ab-02-Cry1Fa, cây ngô được chuyển gen với trình tự nucleotit nêu trong Cry1Ah-01 và cây

ngô được chuyển gen với trình tự nucleotit Cry1Ah-02-Cry1Ie tất cả đều cho thấy khả năng chống lại *Conogethes punctiferalis* cao, đủ để tạo ra tác động bất lợi đối với sự phát triển của *Conogethes punctiferalis* đến nỗi mà chúng có thể được phòng trừ.

Các kết quả nêu trên cũng cho thấy rằng, sự phòng trừ có hiệu quả đối với *Conogethes punctiferalis* là kết quả từ protein Cry1A đã được tạo ra trên cây ngô được chuyển gen với trình tự nucleotit nêu trong Cry1Ab-01, cây ngô được chuyển gen với trình tự nucleotit nêu trong Cry1Ab-02-Cry1Fa, cây ngô được chuyển gen với trình tự nucleotit nêu trong Cry1Ah-01 và cây ngô được chuyển gen với trình tự nucleotit Cry1Ah-02-Cry1Ie. Cây chuyển gen tương tự có khả năng biểu hiện gen Cry1A có thể được tạo ra để phòng trừ *Conogethes punctiferalis*, dựa trên tác động gây độc giống như vậy của protein Cry1A đối với *Conogethes punctiferalis*. Protein Cry1bs được mô tả trong sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, protein Cry1A được thể hiện trong các phương án cụ thể của các trình tự cụ thể. Thực vật chuyển gen này cũng có thể sản sinh ra ít nhất là một loại protein có hoạt tính trừ sâu thứ hai mà khác với Cry1A, ví dụ, Cry1Ie, Cry1Fa, Vip3A và protein Cry1Bas.

Kết luận, sáng chế có thể phòng trừ *Conogethes punctiferalis* bằng cách làm cho cây sản sinh ra protein Cry1A *in vivo*, mà gây độc đối với *Conogethes punctiferalis*. So với các phương pháp phòng trừ bằng biện pháp hóa học và biện pháp nông học đã biết, phương pháp theo sáng chế có thể phòng trừ *Conogethes punctiferalis* trong suốt các thời kỳ phát triển của cây và tạo ra sự bảo vệ toàn diện cho cây. Thêm vào đó, phương pháp này là ổn định, toàn diện, đơn giản, thuận lợi và kinh tế, không gây ô nhiễm và không có tồn dư chất bảo vệ thực vật.

Cuối cùng, cần phải lưu ý rằng, các phương án nêu trên chỉ đơn thuần minh họa giải pháp kỹ thuật của sáng chế mà không giới hạn nó, mặc dù các phương án được ưu tiên của sáng chế đã được mô tả một cách chi tiết, nhưng người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này cần phải hiểu rằng giải pháp kỹ thuật theo sáng chế có thể được cải biến hoặc thay thế tương đương mà vẫn nằm trong phạm vi của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp phòng trừ *Conogethes punctiferalis*, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho *Conogethes punctiferalis* tiếp xúc với protein Cry1A, trong đó protein Cry1A này là protein Cry1Ab hoặc protein Cry1Ah.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó protein Cry1Ab có mặt trong tế bào biểu hiện protein Cry1Ab của thực vật, và *Conogethes punctiferalis* tiếp xúc với protein Cry1Ab này bằng cách ăn tế bào này.
3. Phương pháp theo điểm 2, trong đó protein Cry1Ab có mặt ở thực vật chuyển gen biểu hiện protein Cry1Ab, và *Conogethes punctiferalis* tiếp xúc với protein Cry1b này bằng cách ăn mô của thực vật chuyển gen này; sau đó, sự sinh trưởng của *Conogethes punctiferalis* bị kìm hãm, và cuối cùng khiến *Conogethes punctiferalis* bị chết và do đó phòng trừ được sự gây hại của *Conogethes punctiferalis* cho thực vật.
4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó protein Cry1Ah có mặt trong tế bào có biểu hiện protein Cry1Ah thực vật, và *Conogethes punctiferalis* tiếp xúc với protein Cry1Ah này bằng cách ăn tế bào đó.
5. Phương pháp theo điểm 4, trong đó protein Cry1Ah có trong thực vật chuyển gen biểu hiện protein Cry1Ah, và *Conogethes punctiferalis* tiếp xúc với protein Cry1Ah này bằng cách ăn mô của thực vật chuyển gen đó; sau đó, sự sinh trưởng của *Conogethes punctiferalis* bị kìm hãm, và cuối cùng khiến cho *Conogethes punctiferalis* bị chết và do đó phòng trừ được sự gây hại của *Conogethes punctiferalis* cho thực vật.
6. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 5, trong đó cây là cây ngô, lúa miến, kê, hướng dương, thầu dầu, gừng, bông, đào, hồng vàng, cây óc chó, cây dẻ, cây sung hoặc cây thông.
7. Phương pháp theo điểm 6, trong đó thực vật chuyển gen ở trong giai đoạn phát triển bất kỳ.
8. Phương pháp theo điểm 6, trong đó mô thực vật chuyển gen là lá, thân, cụm hoa, cuống giả, bao phấn hoặc sợi xơ.
9. Phương pháp theo điểm 6, trong đó việc phòng trừ sự gây hại của *Conogethes*

punctiferalis cho thực vật không phụ thuộc vào vị trí trồng cây.

10. Phương pháp theo điểm 6, trong đó việc phòng trừ sự gây hại của *Conogethes punctiferalis* cho thực vật không phụ thuộc vào thời gian trồng cây.
11. Phương pháp theo điểm 6, trong đó trước bước cho tiếp xúc, phương pháp này còn bao gồm bước trồng hạt nảy mầm chứa polynucleotit mã hóa protein Cry1A.
12. Phương pháp theo điểm 11, trong đó trình tự axit amin của protein Cry1A được thể hiện bởi SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:3.
13. Phương pháp theo điểm 12, trong đó trình tự nucleotit nêu trên mã hóa protein Cry1A được thể hiện bởi SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6 hoặc SEQ ID NO:7.
14. Phương pháp theo 12, trong đó thực vật nêu trên còn biểu hiện thêm ít nhất một trình tự nucleotit thứ hai khác với trình tự mã hóa protein Cry1A.
15. Phương pháp theo điểm 14, trong đó trình tự nucleotit thứ hai nêu trên mã hóa protein có hoạt tính trừ sâu giống như Cry, protein có hoạt tính trừ sâu giống như Vip, chất ức chế proteaza, lectin, α -amylaza hoặc peroxidaza.
16. Phương pháp theo điểm 15, trong đó trình tự nucleotit thứ hai mã hóa protein Cry1Ie, protein Cry1Fa, protein Vip3A hoặc protein Cry1Ba.
17. Phương pháp theo điểm 16, trong đó trình tự nucleotit thứ hai được thể hiện bởi SEQ ID NO:8 hoặc SEQ ID NO:9.
18. Phương pháp theo điểm 14, trong đó trình tự nucleotit thứ hai là ARN sợi kép ức chế gen quan trọng của sinh vật gây hại đích.
19. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó trình tự axit amin của protein Cry1A được thể hiện bởi SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:3.
20. Phương pháp theo điểm 19, trong đó trình tự nucleotit nêu trên mã hóa protein Cry1A được thể hiện bởi SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6 hoặc SEQ ID NO:7.
21. Phương pháp theo điểm 19, trong đó thực vật nêu trên còn biểu hiện thêm ít nhất một trình tự nucleotit thứ hai khác với trình tự mã hóa protein Cry1A.

22. Phương pháp theo điểm 21, trong đó trình tự nucleotit thứ hai nêu trên mã hóa protein có hoạt tính trừ sâu giống như Cry, protein có hoạt tính trừ sâu giống như Vip, chất ức chế proteaza, lectin, α -amylaza hoặc peroxidaza.
23. Phương pháp theo điểm 22, trong đó trình tự nucleotit thứ hai mã hóa protein Cry1Ie, protein Cry1Fa, protein Vip3A hoặc protein Cry1Ba.
24. Phương pháp theo điểm 23, trong đó trình tự nucleotit thứ hai được thể hiện bởi SEQ ID NO:8 hoặc SEQ ID NO:9.
25. Phương pháp theo điểm 21, trong đó trình tự nucleotit thứ hai là ARN sợi kép ức chế gen quan trọng của sinh vật gây hại đích.
26. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 5, trong đó thực vật nêu trên còn biểu hiện thêm ít nhất một trình tự nucleotit thứ hai khác với trình tự mã hóa protein Cry1A.
27. Phương pháp theo điểm 26, trong đó trình tự nucleotit thứ hai nêu trên mã hóa protein có hoạt tính trừ sâu giống như Cry, protein có hoạt tính trừ sâu giống như Vip, chất ức chế proteaza, lectin, α -amylaza hoặc peroxidaza.
28. Phương pháp theo điểm 27, trong đó trình tự nucleotit thứ hai mã hóa protein Cry1Ie, protein Cry1Fa, protein Vip3A hoặc protein Cry1Ba.
29. Phương pháp theo điểm 28, trong đó trình tự nucleotit thứ hai được thể hiện bởi SEQ ID NO:8 hoặc SEQ ID NO:9.
30. Phương pháp theo điểm 26, trong đó trình tự nucleotit thứ hai là ARN sợi kép ức chế gen quan trọng của sinh vật gây hại đích.

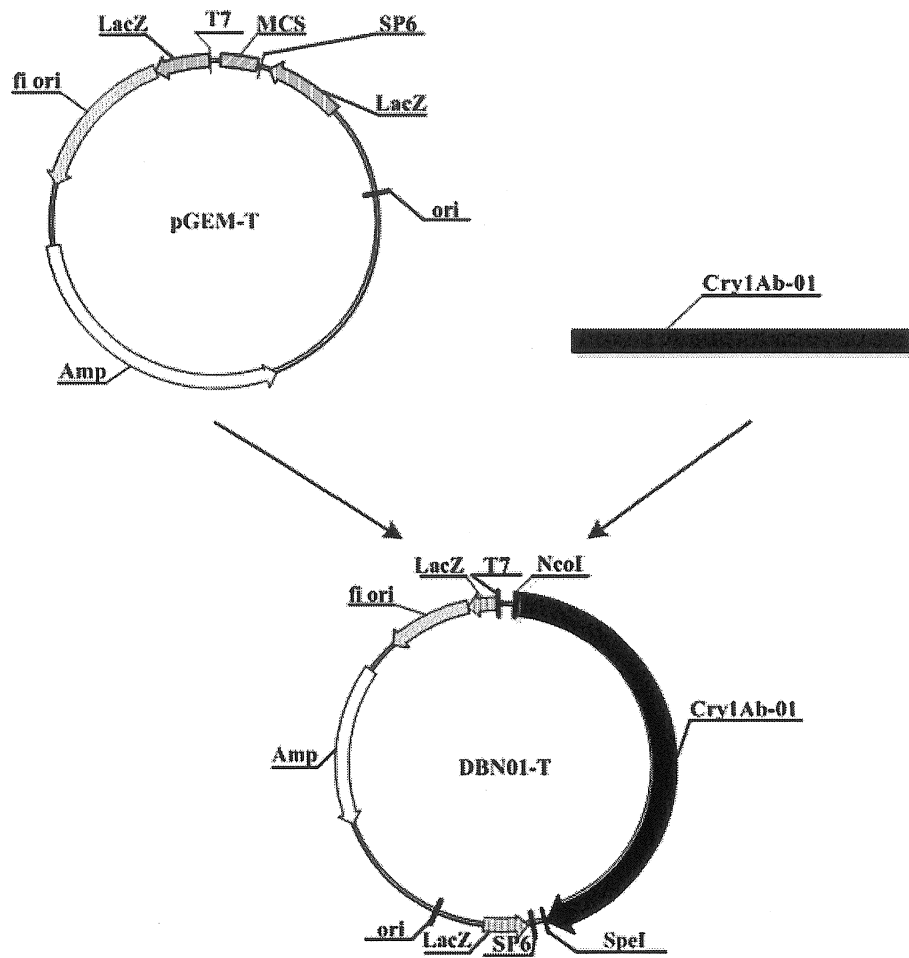


Fig.1

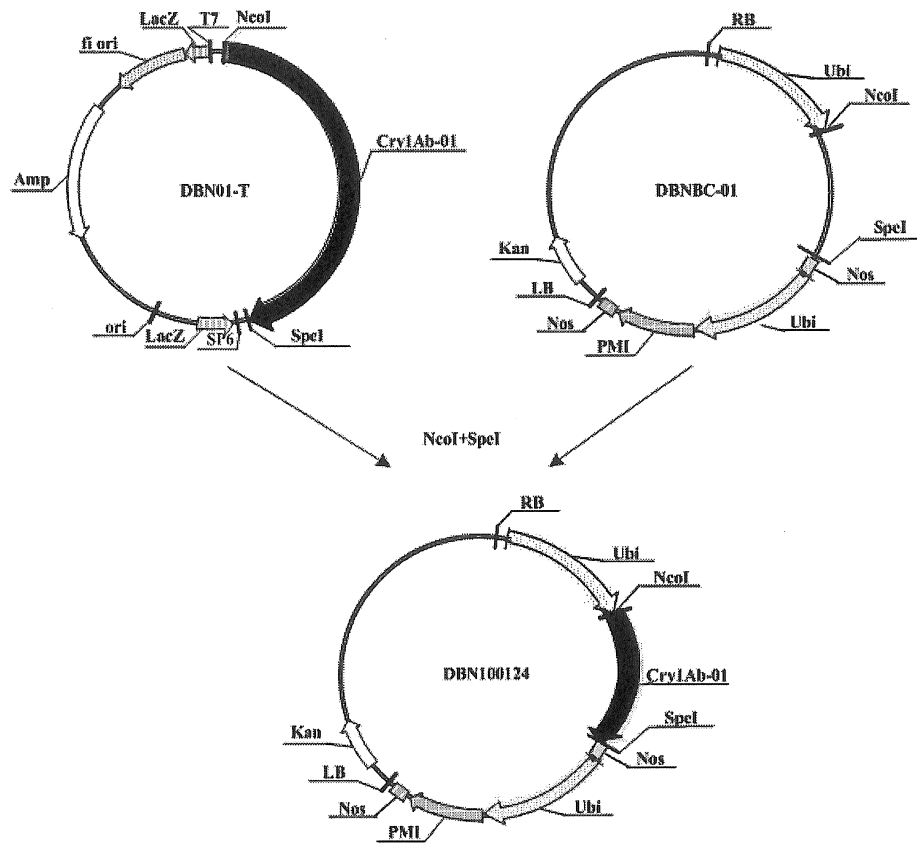
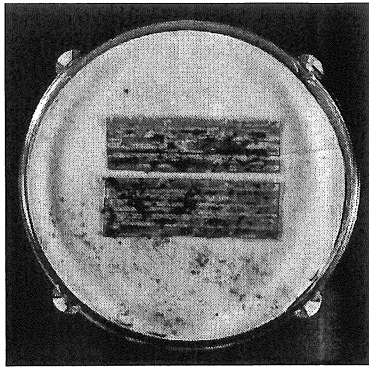
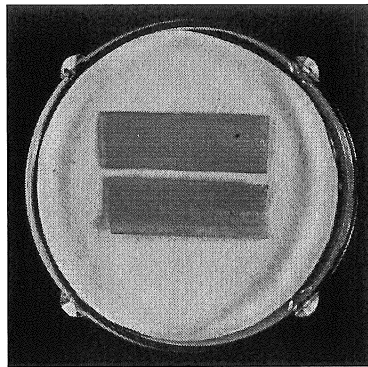


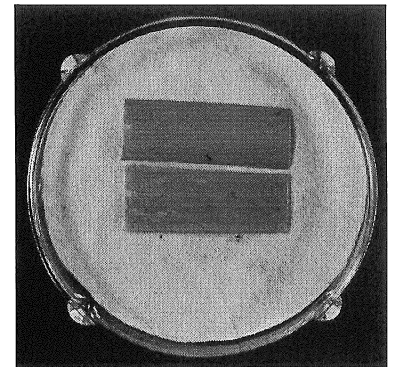
Fig.2



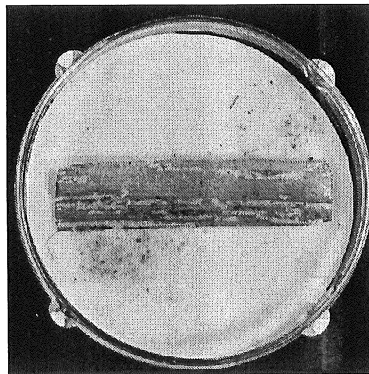
CK



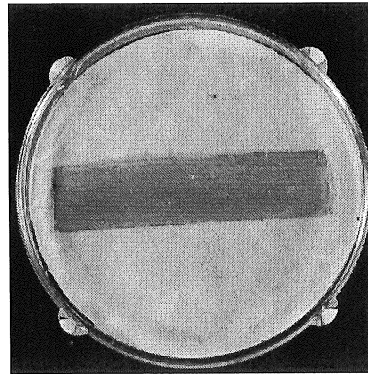
Cry1Ab-01



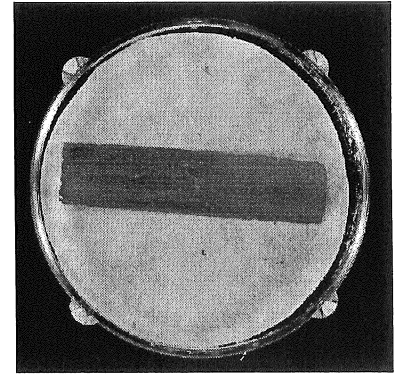
Cry1Ab-01-Cry1Fa



NGM



Cry1Ah-01



Cry1Ah-02-Cry1Ie

Fig.3

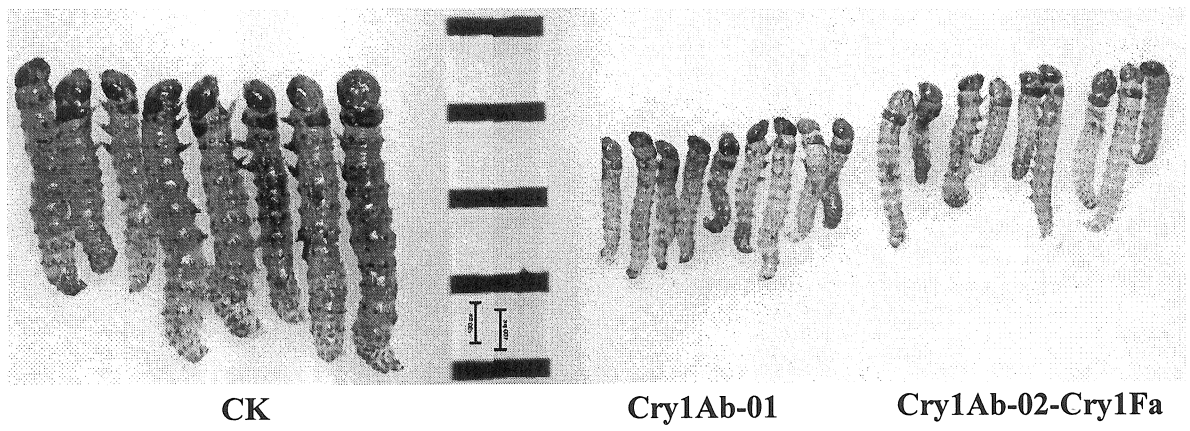


Fig.4

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Beijing Dabeinong Technology Group Co., Ltd.
 Beijing Dabeinong Technology Group Co., Ltd. Biotech Center
 <120> Phương pháp phòng trừ sinh vật gây hại
 <130> 133044CN01-VN
 <160> 30
 <170> PatentIn phiên bản 3.5

 <210> 1
 <211> 818
 <212> PRT
 <213> Trình tự axit amin Cry1Ab-01

 <400> 1
 Met Asp Asn Asn Pro Asn Ile Asn Glu Cys Ile Pro Tyr Asn Cys Leu
 1 5 10 15
 Ser Asn Pro Glu Val Glu Val Leu Gly Gly Glu Arg Ile Glu Thr Gly
 20 25 30
 Tyr Thr Pro Ile Asp Ile Ser Leu Ser Leu Thr Gln Phe Leu Leu Ser
 35 40 45
 Glu Phe Val Pro Gly Ala Gly Phe Val Leu Gly Leu Val Asp Ile Ile
 50 55 60
 Trp Gly Ile Phe Gly Pro Ser Gln Trp Asp Ala Phe Leu Val Gln Ile
 65 70 75 80
 Glu Gln Leu Ile Asn Gln Arg Ile Glu Glu Phe Ala Arg Asn Gln Ala
 85 90 95
 Ile Ser Arg Leu Glu Gly Leu Ser Asn Leu Tyr Gln Ile Tyr Ala Glu
 100 105 110
 Ser Phe Arg Glu Trp Glu Ala Asp Pro Thr Asn Pro Ala Leu Arg Glu
 115 120 125
 Glu Met Arg Ile Gln Phe Asn Asp Met Asn Ser Ala Leu Thr Thr Ala
 130 135 140
 Ile Pro Leu Phe Ala Val Gln Asn Tyr Gln Val Pro Leu Leu Ser Val
 145 150 155 160
 Tyr Val Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser Val Leu Arg Asp Val Ser
 165 170 175
 Val Phe Gly Gln Arg Trp Gly Phe Asp Ala Ala Thr Ile Asn Ser Arg
 180 185 190
 Tyr Asn Asp Leu Thr Arg Leu Ile Gly Asn Tyr Thr Asp His Ala Val
 195 200 205
 Arg Trp Tyr Asn Thr Gly Leu Glu Arg Val Trp Gly Pro Asp Ser Arg
 210 215 220
 Asp Trp Ile Arg Tyr Asn Gln Phe Arg Arg Glu Leu Thr Leu Thr Val
 225 230 235 240
 Leu Asp Ile Val Ser Leu Phe Pro Asn Tyr Asp Ser Arg Thr Tyr Pro
 245 250 255
 Ile Arg Thr Val Ser Gln Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Asn Pro Val
 260 265 270
 Leu Glu Asn Phe Asp Gly Ser Phe Arg Gly Ser Ala Gln Gly Ile Glu
 275 280 285
 Gly Ser Ile Arg Ser Pro His Leu Met Asp Ile Leu Asn Ser Ile Thr
 290 295 300
 Ile Tyr Thr Asp Ala His Arg Gly Glu Tyr Tyr Trp Ser Gly His Gln
 305 310 315 320
 Ile Met Ala Ser Pro Val Gly Phe Ser Gly Pro Glu Phe Thr Phe Pro
 325 330 335
 Leu Tyr Gly Thr Met Gly Asn Ala Ala Pro Gln Gln Arg Ile Val Ala
 340 345 350
 Gln Leu Gly Gln Gly Val Tyr Arg Thr Leu Ser Ser Thr Leu Tyr Arg
 355 360 365

```

Arg Pro Phe Asn Ile Gly Ile Asn Asn Gln Gln Leu Ser Val Leu Asp
 370                               375                               380
Gly Thr Glu Phe Ala Tyr Gly Thr Ser Ser Asn Leu Pro Ser Ala Val
385                               390                               395                               400
Tyr Arg Lys Ser Gly Thr Val Asp Ser Leu Asp Glu Ile Pro Pro Gln
                               405                               410                               415
Asn Asn Asn Val Pro Pro Arg Gln Gly Phe Ser His Arg Leu Ser His
                               420                               425                               430
Val Ser Met Phe Arg Ser Gly Phe Ser Asn Ser Ser Val Ser Ile Ile
                               435                               440                               445
Arg Ala Pro Met Phe Ser Trp Ile His Arg Ser Ala Glu Phe Asn Asn
                               450                               455                               460
Ile Ile Pro Ser Ser Gln Ile Thr Gln Ile Pro Leu Thr Lys Ser Thr
465                               470                               475                               480
Asn Leu Gly Ser Gly Thr Ser Val Val Lys Gly Pro Gly Phe Thr Gly
                               485                               490                               495
Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr Ser Pro Gly Gln Ile Ser Thr Leu Arg
                               500                               505                               510
Val Asn Ile Thr Ala Pro Leu Ser Gln Arg Tyr Arg Val Arg Ile Arg
                               515                               520                               525
Tyr Ala Ser Thr Thr Asn Leu Gln Phe His Thr Ser Ile Asp Gly Arg
                               530                               535                               540
Pro Ile Asn Gln Gly Asn Phe Ser Ala Thr Met Ser Ser Gly Ser Asn
545                               550                               555                               560
Leu Gln Ser Gly Ser Phe Arg Thr Val Gly Phe Thr Thr Pro Phe Asn
                               565                               570                               575
Phe Ser Asn Gly Ser Ser Val Phe Thr Leu Ser Ala His Val Phe Asn
                               580                               585                               590
Ser Gly Asn Glu Val Tyr Ile Asp Arg Ile Glu Phe Val Pro Ala Glu
                               595                               600                               605
Val Thr Phe Glu Ala Glu Tyr Asp Leu Glu Arg Ala Gln Lys Ala Val
610                               615                               620
Asn Glu Leu Phe Thr Ser Ser Asn Gln Ile Gly Leu Lys Thr Asp Val
625                               630                               635                               640
Thr Asp Tyr His Ile Asp Gln Val Ser Asn Leu Val Glu Cys Leu Ser
                               645                               650                               655
Asp Glu Phe Cys Leu Asp Glu Lys Lys Glu Leu Ser Glu Lys Val Lys
660                               665                               670
His Ala Lys Arg Leu Ser Asp Glu Arg Asn Leu Leu Gln Asp Pro Asn
675                               680                               685
Phe Arg Gly Ile Asn Arg Gln Leu Asp Arg Gly Trp Arg Gly Ser Thr
690                               695                               700
Asp Ile Thr Ile Gln Gly Gly Asp Asp Val Phe Lys Glu Asn Tyr Val
705                               710                               715                               720
Thr Leu Leu Gly Thr Phe Asp Glu Cys Tyr Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln
725                               730                               735
Lys Ile Asp Glu Ser Lys Leu Lys Ala Tyr Thr Arg Tyr Gln Leu Arg
740                               745                               750
Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln Asp Leu Glu Ile Tyr Leu Ile Arg Tyr
755                               760                               765
Asn Ala Lys His Glu Thr Val Asn Val Pro Gly Thr Gly Ser Leu Trp
770                               775                               780
Pro Leu Ser Ala Pro Ser Pro Ile Gly Lys Cys Ala His His Ser His
785                               790                               795                               800
His Phe Ser Leu Asp Ile Asp Val Gly Cys Thr Asp Leu Asn Glu Asp
805                               810                               815
Phe Arg

```

<210> 2

<211> 615
 <212> PRT
 <213> Trình tự axit amin Cry1Ab-02

<400> 2

Met	Asp	Asn	Asn	Pro	Asn	Ile	Asn	Glu	Cys	Ile	Pro	Tyr	Asn	Cys	Leu
1				5					10					15	
Ser	Asn	Pro	Glu	Val	Glu	Val	Leu	Gly	Gly	Glu	Arg	Ile	Glu	Thr	Gly
			20					25					30		
Tyr	Thr	Pro	Ile	Asp	Ile	Ser	Leu	Ser	Leu	Thr	Gln	Phe	Leu	Leu	Ser
		35					40					45			
Glu	Phe	Val	Pro	Gly	Ala	Gly	Phe	Val	Leu	Gly	Leu	Val	Asp	Ile	Ile
	50					55					60				
Trp	Gly	Ile	Phe	Gly	Pro	Ser	Gln	Trp	Asp	Ala	Phe	Leu	Val	Gln	Ile
65					70				75						80
Glu	Gln	Leu	Ile	Asn	Gln	Arg	Ile	Glu	Glu	Phe	Ala	Arg	Asn	Gln	Ala
				85					90					95	
Ile	Ser	Arg	Leu	Glu	Gly	Leu	Ser	Asn	Leu	Tyr	Gln	Ile	Tyr	Ala	Glu
			100					105					110		
Ser	Phe	Arg	Glu	Trp	Glu	Ala	Asp	Pro	Thr	Asn	Pro	Ala	Leu	Arg	Glu
		115					120					125			
Glu	Met	Arg	Ile	Gln	Phe	Asn	Asp	Met	Asn	Ser	Ala	Leu	Thr	Thr	Ala
	130					135					140				
Ile	Pro	Leu	Phe	Ala	Val	Gln	Asn	Tyr	Gln	Val	Pro	Leu	Leu	Ser	Val
145					150					155					160
Tyr	Val	Gln	Ala	Ala	Asn	Leu	His	Leu	Ser	Val	Leu	Arg	Asp	Val	Ser
				165					170					175	
Val	Phe	Gly	Gln	Arg	Trp	Gly	Phe	Asp	Ala	Ala	Thr	Ile	Asn	Ser	Arg
			180					185					190		
Tyr	Asn	Asp	Leu	Thr	Arg	Leu	Ile	Gly	Asn	Tyr	Thr	Asp	His	Ala	Val
		195					200					205			
Arg	Trp	Tyr	Asn	Thr	Gly	Leu	Glu	Arg	Val	Trp	Gly	Pro	Asp	Ser	Arg
	210					215					220				
Asp	Trp	Ile	Arg	Tyr	Asn	Gln	Phe	Arg	Arg	Glu	Leu	Thr	Leu	Thr	Val
225					230					235					240
Leu	Asp	Ile	Val	Ser	Leu	Phe	Pro	Asn	Tyr	Asp	Ser	Arg	Thr	Tyr	Pro
				245					250					255	
Ile	Arg	Thr	Val	Ser	Gln	Leu	Thr	Arg	Glu	Ile	Tyr	Thr	Asn	Pro	Val
			260					265					270		
Leu	Glu	Asn	Phe	Asp	Gly	Ser	Phe	Arg	Gly	Ser	Ala	Gln	Gly	Ile	Glu
	275						280					285			
Gly	Ser	Ile	Arg	Ser	Pro	His	Leu	Met	Asp	Ile	Leu	Asn	Ser	Ile	Thr
	290					295					300				
Ile	Tyr	Thr	Asp	Ala	His	Arg	Gly	Glu	Tyr	Tyr	Trp	Ser	Gly	His	Gln
305					310					315					320
Ile	Met	Ala	Ser	Pro	Val	Gly	Phe	Ser	Gly	Pro	Glu	Phe	Thr	Phe	Pro
				325					330					335	
Leu	Tyr	Gly	Thr	Met	Gly	Asn	Ala	Ala	Pro	Gln	Gln	Arg	Ile	Val	Ala
			340					345					350		
Gln	Leu	Gly	Gln	Gly	Val	Tyr	Arg	Thr	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Tyr	Arg
		355					360					365			
Arg	Pro	Phe	Asn	Ile	Gly	Ile	Asn	Asn	Gln	Gln	Leu	Ser	Val	Leu	Asp
	370					375					380				
Gly	Thr	Glu	Phe	Ala	Tyr	Gly	Thr	Ser	Ser	Asn	Leu	Pro	Ser	Ala	Val
385					390					395					400
Tyr	Arg	Lys	Ser	Gly	Thr	Val	Asp	Ser	Leu	Asp	Glu	Ile	Pro	Pro	Gln
				405					410					415	
Asn	Asn	Asn	Val	Pro	Pro	Arg	Gln	Gly	Phe	Ser	His	Arg	Leu	Ser	His
			420					425					430		
Val	Ser	Met	Phe	Arg	Ser	Gly	Phe	Ser	Asn	Ser	Ser	Val	Ser	Ile	Ile
			435				440					445			

```

Arg Ala Pro Met Phe Ser Trp Ile His Arg Ser Ala Glu Phe Asn Asn
450                               455                               460
Ile Ile Pro Ser Ser Gln Ile Thr Gln Ile Pro Leu Thr Lys Ser Thr
465                               470                               475                               480
Asn Leu Gly Ser Gly Thr Ser Val Val Lys Gly Pro Gly Phe Thr Gly
485                               490                               495
Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr Ser Pro Gly Gln Ile Ser Thr Leu Arg
500                               505                               510
Val Asn Ile Thr Ala Pro Leu Ser Gln Arg Tyr Arg Val Arg Ile Arg
515                               520                               525
Tyr Ala Ser Thr Thr Asn Leu Gln Phe His Thr Ser Ile Asp Gly Arg
530                               535                               540
Pro Ile Asn Gln Gly Asn Phe Ser Ala Thr Met Ser Ser Gly Ser Asn
545                               550                               555                               560
Leu Gln Ser Gly Ser Phe Arg Thr Val Gly Phe Thr Thr Pro Phe Asn
565                               570                               575
Phe Ser Asn Gly Ser Ser Val Phe Thr Leu Ser Ala His Val Phe Asn
580                               585                               590
Ser Gly Asn Glu Val Tyr Ile Asp Arg Ile Glu Phe Val Pro Ala Glu
595                               600                               605
Val Thr Phe Glu Ala Glu Tyr
610                               615

```

```

<210> 3
<211> 699
<212> PRT
<213> Trình tự axit amin Cry1Ah

```

```

<400> 3
Met Lys Asn Ser Ile Lys Leu Ser Glu Leu Trp Tyr Phe Asn Glu Arg
1      5      10      15
Lys Trp Arg Tyr Phe Met Glu Ile Val Asn Asn Gln Asn Gln Cys Val
20      25      30
Pro Tyr Asn Cys Leu Asn Asn Pro Glu Ile Glu Ile Leu Glu Gly Gly
35      40      45
Arg Ile Ser Val Gly Asn Thr Pro Ile Asp Ile Ser Leu Ser Leu Thr
50      55      60
Gln Phe Leu Leu Ser Glu Phe Val Pro Gly Ala Gly Phe Val Leu Gly
65      70      75      80
Leu Ile Asp Leu Ile Trp Gly Phe Val Gly Pro Ser Gln Trp Asp Ala
85      90      95
Phe Leu Ala Gln Val Glu Gln Leu Ile Asn Gln Arg Ile Ala Glu Ala
100     105     110
Val Arg Asn Thr Ala Ile Gln Glu Leu Glu Gly Met Ala Arg Val Tyr
115     120     125
Arg Thr Tyr Ala Thr Ala Phe Ala Glu Trp Glu Lys Ala Pro Asp Asp
130     135     140
Pro Glu Leu Arg Glu Ala Leu Arg Thr Gln Phe Thr Ala Thr Glu Thr
145     150     155     160
Tyr Ile Ser Gly Arg Ile Ser Val Leu Lys Ile Gln Thr Phe Glu Val
165     170     175
Gln Leu Leu Ser Val Phe Ala Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser Leu
180     185     190
Leu Arg Asp Val Val Phe Phe Gly Gln Arg Trp Gly Phe Ser Thr Thr
195     200     205
Thr Val Asn Asn Tyr Tyr Asn Asp Leu Thr Glu Gly Ile Ser Thr Tyr
210     215     220
Thr Asp Tyr Ala Val Arg Trp Tyr Asn Thr Gly Leu Glu Arg Val Trp
225     230     235     240
Gly Pro Asp Ser Arg Asp Trp Val Arg Tyr Asn Gln Phe Arg Arg Glu

```

				245					250				255				
Leu	Thr	Leu	Thr	Val	Leu	Asp	Ile	Val	Ala	Leu	Phe	Pro	Asn	Tyr	Asp		
			260						265				270				
Ser	Arg	Arg	Tyr	Pro	Ile	Arg	Thr	Val	Ser	Gln	Leu	Thr	Arg	Glu	Ile		
		275					280					285					
Tyr	Thr	Asn	Pro	Val	Leu	Glu	Asn	Phe	Asp	Gly	Ser	Phe	Arg	Gly	Ser		
	290					295					300						
Ala	Gln	Gly	Ile	Glu	Arg	Ser	Ile	Arg	Ser	Pro	His	Leu	Met	Asp	Ile		
305					310					315					320		
Leu	Asn	Ser	Ile	Thr	Ile	Tyr	Thr	Asp	Ala	His	Arg	Gly	Tyr	Tyr	Tyr		
				325					330					335			
Trp	Ser	Gly	His	Gln	Ile	Met	Ala	Ser	Pro	Val	Gly	Phe	Ser	Gly	Pro		
			340						345				350				
Glu	Phe	Thr	Phe	Pro	Leu	Tyr	Gly	Thr	Met	Gly	Asn	Ala	Ala	Pro	Gln		
		355					360					365					
Gln	Arg	Ile	Val	Ala	Gln	Leu	Gly	Gln	Gly	Val	Tyr	Arg	Thr	Leu	Ser		
	370					375					380						
Ser	Thr	Phe	Tyr	Arg	Arg	Pro	Phe	Asn	Ile	Gly	Ile	Asn	Asn	Gln	Gln		
385					390					395					400		
Leu	Ser	Val	Leu	Asp	Gly	Thr	Glu	Phe	Ala	Tyr	Gly	Thr	Ser	Ser	Asn		
				405					410					415			
Leu	Pro	Ser	Ala	Val	Tyr	Arg	Lys	Ser	Gly	Thr	Val	Asp	Ser	Leu	Asp		
			420						425				430				
Glu	Ile	Pro	Pro	Gln	Asn	Asn	Asn	Val	Pro	Pro	Arg	Gln	Gly	Phe	Ser		
		435					440					445					
His	Arg	Leu	Ser	His	Val	Ser	Met	Phe	Arg	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Ser		
	450					455					460						
Val	Ser	Ile	Ile	Arg	Ala	Pro	Met	Phe	Ser	Trp	Ile	His	Arg	Ser	Ala		
465					470					475					480		
Glu	Phe	Asn	Asn	Ile	Ile	Ala	Ser	Asp	Ser	Ile	Thr	Gln	Ile	Pro	Ala		
				485					490					495			
Val	Lys	Gly	Asn	Phe	Leu	Phe	Asn	Gly	Ser	Val	Ile	Ser	Gly	Pro	Gly		
			500					505					510				
Phe	Thr	Gly	Gly	Asp	Leu	Val	Arg	Leu	Asn	Ser	Ser	Gly	Asn	Asn	Ile		
		515					520					525					
Gln	Asn	Arg	Gly	Tyr	Ile	Glu	Val	Pro	Ile	His	Phe	Pro	Ser	Thr	Ser		
	530					535					540						
Thr	Arg	Tyr	Arg	Val	Arg	Val	Arg	Tyr	Ala	Ser	Val	Thr	Pro	Ile	His		
545					550					555					560		
Leu	Asn	Val	Asn	Trp	Gly	Asn	Ser	Ser	Ile	Phe	Ser	Asn	Thr	Val	Pro		
				565					570					575			
Ala	Thr	Ala	Thr	Ser	Leu	Asp	Asn	Leu	Gln	Ser	Ser	Asp	Phe	Gly	Tyr		
			580					585					590				
Phe	Glu	Ser	Ala	Asn	Ala	Phe	Thr	Ser	Ser	Leu	Gly	Asn	Ile	Val	Gly		
		595					600					605					
Val	Arg	Asn	Phe	Ser	Gly	Thr	Ala	Gly	Val	Ile	Ile	Asp	Arg	Phe	Glu		
	610					615					620						
Phe	Ile	Pro	Val	Thr	Ala	Thr	Leu	Glu	Ala	Glu	Tyr	Asn	Leu	Glu	Arg		
625					630					635					640		
Ala	Gln	Lys	Ala	Val	Asn	Ala	Leu	Phe	Thr	Ser	Ser	Asn	Gln	Ile	Gly		
				645					650					655			
Leu	Lys	Thr	Asp	Val	Thr	Asp	Tyr	His	Ile	Asp	Gln	Val	Ser	Asn	Leu		
			660					665					670				
Val	Glu	Cys	Leu	Ser	Asp	Glu	Phe	Cys	Leu	Asp	Glu	Lys	Lys	Glu	Leu		
	675						680					685					
Ser	Glu	Lys	Val	Lys	His	Ala	Lys	Arg	Leu	Ser							
	690					695											

<210> 4

<211> 2457

<212> ADN

<213> Trình tự nucleotit Cry1Ab-01

<400> 4

atggacaaca	acccaaacat	caacgagtg	atcccggtaca	actgcctcag	caaccctgag	60
gtcgaggtgc	tggcggtga	gcgcacgcag	accggttaca	cccccatcga	catctccctc	120
tccctcacgc	agttcctgct	cagcgagttc	gtgccaggcg	ctggcttcgt	cctggggcctc	180
gtggacatca	tctggggcat	ctttggcccc	tcccagtg	acgccttcct	ggtgcaaatc	240
gagcagctca	tcaaccagag	gacgaggag	tgcgccagga	accaggccat	cagccgcctg	300
gagggcctca	gcaacctcta	ccaaatctac	gctgagagct	tccgcgagtg	ggaggccgac	360
ccactaacc	cagctctccg	cgaggagatg	cgcatccagt	tcaacgacat	gaacagcgcc	420
ctgaccaccg	ccatcccact	cttcgccgtc	cagaactacc	aagtcccgtc	cctgtccgtg	480
tacgtccagg	ccgccaacct	gcacctcagc	gtgctgaggg	acgtcagcgt	gtttggccag	540
aggtggggct	tgcagcgccg	caccatcaac	agccgctaca	acgacctcac	caggctgac	600
ggcaactaca	ccgaccacgc	tgtccgctgg	tacaacactg	gcctggagcg	cgtctggggc	660
cctgattcta	gagactggat	tgcctacaac	cagttcaggc	gcgagctgac	cctcaccgtc	720
ctggacattg	tgtccctctt	cccgaactac	gactcccgca	cctacccgat	ccgcaccgtg	780
tcccaactga	ccgcgcaa	ctacaccaac	cccgtcctgg	agaacttcga	cggtagcttc	840
aggggcagcg	cccagggc	cgagggtcc	atcaggagcc	cacacctgat	ggacatcctc	900
aacagcatca	ctatctacac	cgatgccac	cgcggcgagt	actactggtc	cggccaccag	960
atcatggcct	ccccggtcgg	cttcagcggc	cccaggttta	cctttcctct	ctacggcacg	1020
atgggcaacg	ccgctccaca	acaacgcac	gtcgtcagc	tgggccaggg	cgtctaccgc	1080
accctgagct	ccaccctgta	ccgcaggccc	ttcaacatcg	gtatcaacaa	ccagcagctg	1140
tccgtcctgg	atggcactga	gttcgcctac	ggcacctcct	ccaacctgcc	ctccgctgtc	1200
taccgaaga	cgggcacggg	ggattccctg	gacgagatcc	caccacagaa	caacaatgtg	1260
ccccccaggc	aggggttttc	ccacaggctc	agccacgtgt	ccatgttccg	ctccggtctc	1320
agcaactcgt	ccgtgagcat	catcagagct	cctatgttct	cctggattca	tgcgacgcg	1380
gagttcaaca	atatcattcc	gtcctcccaa	atcacccaaa	tccccctcac	caagtccacc	1440
aacctgggca	gcggcacctc	cgtggtgaag	ggccaggct	tcacgggcg	cgacatcctg	1500
cgcaggacct	ccccgggcca	gatcagcacc	ctccgcgtca	acatcaccgc	tcccctgtcc	1560
cagaggtacc	gcgtcaggat	tgcctacgct	agcaccacca	acctgcaatt	ccacacctcc	1620
atcgacggca	ggccgatcaa	tcagggtaac	ttctccgcca	ccatgtccag	cggcagcaac	1680
ctccaatccg	gcagcttccg	caccgtgggt	ttcaccaccc	ccttcaactt	ctccaacggc	1740
tccagcgttt	tcaccttgag	cgcccacgtg	ttcaattccg	gcaatgaggt	gtacattgac	1800
cgcattgagt	tcggtccagc	cgagggtcacc	ttcgaagccg	agtacgacct	ggagagagcc	1860
cagaaggctg	tcaatgagct	cttcacgtcc	agcaatcaga	tccgctgaa	gaccgacgtc	1920
actgactacc	acatcgacca	agtctccaac	ctcgtggagt	gcctctccga	tgagttctgc	1980
ctcgacgaga	agaaggagct	gtccgagaag	gtgaagcatg	ccaagcgtct	cagcgacgag	2040
aggaatctcc	tccaggaccc	caatttccgc	ggcatcaaca	ggcagctcga	ccgcggctgg	2100
cgcgcagca	ccgacatcac	gatccagggc	ggcgacgatg	tgttcaagga	gaactacgtg	2160
actctcctgg	gcacttccga	cgagtgtctac	cctacctact	tgtaccagaa	gatcgatgag	2220
tccaagctca	aggtttacac	tgcctaccag	ctccgcggct	acatcgaaga	cagccaagac	2280
ctcgagattt	aactgatccg	ctacaacgcc	aagcacgaga	ccgtcaacgt	gcccgtact	2340
ggttccctct	ggcgcgtgag	cgcccccagc	ccgatcggca	agtgtgccca	ccacagccac	2400
cacttctcct	tggacatcga	tgtgggctgc	accgacctga	acgaggactt	tccgtag	2457

<210> 5

<211> 1848

<212> ADN

<213> Trình tự nucleotit Cry1Ab-02

<400> 5

atggacaaca	acccaaacat	caacgaatgc	attccatata	actgcttgag	taaccacagaa	60
gttgaagtag	ttggtggaga	acgcattgaa	accggttaca	ctcccatcga	catctccttg	120
tccctgacac	agtttctgct	cagcgagttc	gtgccagggtg	ctgggttcgt	tctcggacta	180
gttgacatca	tctgggggat	ctttgggtcca	tctcaatggg	atgcattcct	ggtgcaaat	240
gagcagttga	tcaaccagag	gatcgaagag	tgcgccagga	accaggccat	ctctaggttg	300
gaaggattga	gcaatctcta	ccaaatctat	cgagagagct	tcagagagtg	ggaagccgat	360
cctactaacc	cagctctccg	cgaggaaatg	cgatttcaat	tcaacgacat	gaacagcgcc	420
ttgaccacag	ctatcccatt	gttcgcagtc	cagaactacc	aagttcctct	cttgtccgtg	480

tacgttcaag	cagctaattct	tcacctcagc	gtgcttcgag	acgttagcgt	gtttgggcaa	540
aggtggggat	togatgctgc	aacctatcaat	agccgttaca	acgaccttac	taggctgatt	600
ggaaactaca	ccgaccacgc	tggtcgttgg	tacaacactg	gcttggagcg	tgtctgggggt	660
cctgattcta	gagattggat	tagatacaac	cagttcagga	gagaattgac	cctcacagtt	720
ttggacattg	tgtctctctt	cccgaactat	gactccagaa	cctaccttat	ccgtacagtg	780
tcccaactta	ccagagaaat	ctatactaac	ccagttcttg	agaacttcga	cggtagcttc	840
cgtggttctg	cccaagggtat	cgaaggctcc	atcaggagcc	cacacttgat	ggacatcttg	900
aacagcataa	ctatctacac	cgatgctcac	agaggagagt	attactggtc	tggacaccag	960
atcatggcct	ctccagttgg	attcagcggg	cccaggttta	cctttcctct	ctatggaact	1020
atgggaaacg	ccgctccaca	acaacgtatc	gttgctcaac	taggtcaggg	tgtctacaga	1080
accttgtctt	ccaccttgta	cagaagacct	ttcaatatcg	gtatcaacaa	ccagcaactt	1140
tccgttcttg	acggaacaga	gttcgcctat	ggaacctctt	ctaacttgcc	atccgctggt	1200
tacagaaaga	gcggaaccgt	tgattccttg	gacgaaatcc	caccacagaa	caacaatgtg	1260
ccaccaggc	aaggattctc	ccacagggtg	agccacgtgt	ccatgttccg	ttccggattc	1320
agcaacagtt	ccgtgagcat	catcagagct	cctatgttct	catggattca	tcgtagtgtc	1380
gagttcaaca	atatcattcc	ttcctctcaa	atcacccaaa	tcccattgac	caagtctact	1440
aaccttggat	ctggaacttc	tgctcgtgaa	ggaccaggct	tcacaggagg	tgatattctt	1500
agaagaactt	ctcctggcca	gattagcacc	ctcagagtta	acatcactgc	accactttct	1560
caaagatata	gtgtcaggat	tcgttacgca	tctaccaacta	acttgcaatt	ccacacctcc	1620
atcgacggaa	ggcctatcaa	tcagggtaac	ttctccgcaa	ccatgtcaag	cggcagcaac	1680
ttgcaatccg	gcagcttcag	aaccgtcggg	ttcaactactc	ctttcaactt	ctctaacgga	1740
tcaagcgttt	tcacccttag	cgctcatgtg	ttcaattctg	gcaatgaagt	gtacattgac	1800
cgtattgagt	ttgtgcctgc	cgaagttacc	ttcgaggctg	agtactga		1848

<210> 6
 <211> 2100
 <212> ADN
 <213> Trình tự nucleotit Cry1Ah-01

<400> 6						
atgaagaaca	gcataaagct	gagcgagctg	tggtacttca	acgagaggaa	gtggaggtac	60
ttcatggaga	tcgtgaacaa	ccagaaccag	tgctgtgccg	acaactgcct	gaacaacccg	120
gagatcgaga	tcctggaggg	cggcaggatc	agcgtgggca	acaccccgat	cgacatcagc	180
ctgagcctga	cccagttcct	gctgagcgag	ttcgtgtccg	gcgccgggct	cgtgctgggc	240
ctgatcgacc	tgatctgggg	cttcgtgggc	ccgagccagt	gggacgcctt	cctggcccag	300
gtggagcagc	tgatcaacca	gaggatcgcc	gaggccgtga	ggaacaccgc	catccaggag	360
ctggagggca	tggccagggt	gtacaggacc	tacgccaccg	ccttcgccga	gtgggagaag	420
gccccggacg	acccggagct	gagggaggcc	ctgaggaccc	agttcaccgc	caccgagacc	480
tacatcagcg	gcaggatcag	cgtgtcgaag	atccagacct	tcgaggtgca	gctgtcagc	540
gtgttcgccc	aggccgcaa	cctgcacctg	agcctgtcga	gggacgtggt	gttcttcggc	600
cagaggtggg	gcttcagcac	caccaccgtg	aacaactact	acaacgacct	gaccgagggc	660
atcagacct	acaccgacta	cgccgtgagg	tggtacaaca	ccggcctgga	gaggggtgtg	720
ggccccggaca	gcagggactg	ggtgaggtac	aaccagttca	ggagggagct	gaccctgacc	780
gtgctggaca	tcgtggccct	gttcccgaac	tacgacagca	ggcgctaccc	gatcaggacc	840
gtgagccagc	tgaccaggga	gatctacacc	aaccgggtgc	tggagaactt	cgacggcagc	900
ttcaggggca	gcgcccaggg	catcgagagg	agcatcagga	gcccgcacct	gatggacatc	960
ctgaacagca	tcaccatcta	caccgacgcc	cacaggggct	actactactg	gagcggccac	1020
cagatcatgg	ccagcccggg	gggcttcagc	ggcccggagt	tcaccttccc	gctgtacggc	1080
accatgggca	acgcccggcc	gcagcagagg	atcgtggccc	agctgggcca	gggctgtac	1140
aggaccctga	gcagcacctt	ctacaggagg	ccgttcaaca	tcggcatcaa	caaccagcag	1200
ctgagcgtgc	tggacggcac	cgagttcgcc	tacggcacca	gcagcaacct	gccgagcgcc	1260
gtgtacagga	agagcggcac	cgtggacagc	ctggacgaga	tcccggcgca	gaacaacaac	1320
gtgccgcccga	ggcaggggctt	cagccacagg	ctgagccacg	tgagcatggt	caggagcggc	1380
agcagcagca	gcgtgagcat	catcaggggc	ccgatgttca	gctggattca	caggagcgcc	1440
gagttcaaca	acatcatcgc	cagcgacagc	atcacccaga	tcccggccgt	gaagggcaac	1500
ttcctgttca	acggcagcgt	gatcagcggc	ccgggcttca	ccggcggcga	cctggtgagg	1560
ctgaacagca	gcggcaacaa	catccagaac	aggggctaca	tcgaggtgcc	gatccacttc	1620
ccgagcacca	gcaccaggta	caggggtgag	gtgaggtacg	ccagcgtgac	cccgatccac	1680
ctgaacgtga	actggggcaa	cagcagcatc	ttcaggaaca	ccgtgccggc	caccgccacc	1740
agcctggaca	acctgcagag	cagcgacttc	ggctacttcg	agagcgccaa	cgcccttcacc	1800

agcagcctgg	gcaacatcgt	gggcgtgagg	aacttcagcg	gcaccgccgg	cgatgatcatc	1860
gacagggttcg	agttcatccc	ggtgaccgcc	accctggagg	ccgagtacaa	cctggagcgc	1920
gcccagaagg	ccgtgaacgc	cctgttcacc	agcagcaacc	agatcggcct	gaagaccgac	1980
gtgaccgact	accacatcga	ccagggtgagc	aacctgggtg	agtgcctgag	cgacgagttc	2040
tgcctggacg	agaagaagga	gctgagcgag	aaggtgaagc	acgccaagag	gctgagctga	2100

<210> 7
 <211> 2100
 <212> ADN
 <213> Trình tự nucleotit Cry1Ah-02

<400> 7	
atgaagaata	gcatcaagct gtcggagctg tggtacttca acgagcgcaa gtggaggtac 60
ttcatggaga	tcgtcaacaa tcagaatcag tgcgtcccat acaactgcct caacaatcct 120
gagatcgaga	ttctggaggg cgggaggatc tccgtgggca acactccgat cgacatttct 180
ctctcactga	cccagttcct cctgagcgag ttctgtgccag gcgctgggtt cgtcctcggc 240
ctgatcgacc	tcatttgggg cttcgtcggg ccatccaggt gggatgcgtt cctcgtctcag 300
gttgagcagc	tgatcaatca gcgcacgcgc gaggtgtgga ggaacaccgc catccaggag 360
ctggaggggca	tggctagggt ctaccggacc tacgctacgg ctttcgctga gtgggagaag 420
gccccggacg	atccagagct cagggagggt ctgaggaccc agttcactgc caccgagacg 480
tacatctccg	gcaggattag cgtgctcaag atccagacgt tcgagggtcca gtcctgtct 540
gttttcgcgc	aggccgcgaa cctccacctg tcaactcctgc gcgacgtggt cttcttcggc 600
cagcgtcggg	ggttcagcac cagcagagtc aacaattact acaacgacct cactgagggc 660
atctcgacat	acactgatta cgccgtgcgg tggtacaaca ccgggctgga gagggtttgg 720
ggcccagaca	gcagggattg ggtgcggtac aatcagttcc gcagggagct caccctgacg 780
gtgctcgaca	tcgtcgcgct gttcccgaaac tacgattcac ggcgctaccc catcaggacc 840
gtctcccagc	tcacgcggga gatctacaca aatccagttc tggagaactt cgacggctcg 900
ttccgcgggt	ctgctcaggg catcgagagg tcaattaggt cccctcatct catggacatc 960
ctgaactcga	tcacaatcta cactgatgcg cacaggggggt actactactg gtctggccat 1020
cagatcatgg	cttcaccagt gggcttctcc gggccagagt tcaactttccc cctgtacggc 1080
accatgggca	acgccgcccc gcagcagcgc atcgttgctc agctcggcca gggggtgtac 1140
aggacactgt	ccagcacttt ctacaggcgg ccgttcaaca tcggcattaa caatcagcag 1200
ctctccgtcc	tggacgggac ggagttcgct tacggcacat cgtctaacct cccaagcgct 1260
gtctaccgca	agagcggcac ggttgactcg ctggatgaga tcccgcccca gaacaataac 1320
gtgccacctc	ggcagggtct ctcccacagg ctccagccatg ttctgatgtt cagggtccggc 1380
tcattccagct	cgggtgagcat cattagggcc cccatgttct cttggatcca ccggtcagcg 1440
gagttcaata	acatcatcgc ctccgacagc atcaccaga ttccagcgggt caaggggaat 1500
ttcctgttca	acggctctgt tatctcaggc cctgggttca ccggcgggga tctcgtccgg 1560
ctgaattctt	caggggaataa cattcagaac cgcggtaca tcgaggtgcc aattcacttc 1620
ccttcgacat	ctactcgcta cagggttcgg gtgcgtacg cttagcgtgac gccaatccac 1680
ctcaacgtga	actggggcaa ttccagcatt ttcagcaaca cagtgcctgc caccgcgacg 1740
tcgctcgaca	atctgcagtc gtctgatttc ggctacttcg agtccgctaa cgccttcacg 1800
tcattccctgg	ggaatatcgt cggcggttagg aacttcagcg gcacagcggg cgtgatcatc 1860
gaccggttcg	agttcatccc ggtcacagcc actctcgagg cggagtacaa cctggagagg 1920
gctcagaagg	ctgtgaacgc cctcttcacc tcctcgaacc agatcggcct gaagaccgac 1980
gtgacggatt	accacatcga ccaggtttcg aacctcgtgg agtgcctgtc tgatgagttc 2040
tgcctggatg	agaagaagga gctgtctgag aaggtgaagc acgccaagcg gctgtcgtag 2100

<210> 8
 <211> 1818
 <212> ADN
 <213> Trình tự nucleotit Cry1Fa

<400> 8	
atggagaaaca	acatacagaa tcagtgcgtc ccctacaact gcctcaacaa tcctgaagta 60
gagattctca	acgaagagag gtgcactggc agattgccgt tagacatctc cctgtccctt 120
acacgtttcc	tggtgtctga gtttggtcca ggtgtgggag ttgcgtttgg cctcttcgac 180
ctcatctggg	gcttcatcac tccatctgat ttgagcctct ttcttctcca gattgaacag 240
ttgattgaac	aaaggattga gaccttgaa aggaatcggg ccatcactac ccttcgtggc 300

ttagcagaca	gctatgagat	ctacattgaa	gcactaagag	agtgggaagc	caatcctaac	360
aatgcccaac	tgagagaaga	tgtgcgtata	cgctttgcta	acacagatga	tgctttgatc	420
acagccatca	acaacttcac	ccttaccagc	ttcgagatcc	ctcttctctc	ggtctatgtt	480
caagctgcta	acctgcactt	gtcactactg	cgcgacgctg	tgtcgtttgg	gcaaggttgg	540
ggactggaca	tagctactgt	caacaatcac	tacaacagac	tcatcaatct	gattcatcga	600
tacacgaaac	attgttttga	tacctacaat	cagggatttg	agaacctgag	aggtactaac	660
actcgccaat	gggccagggt	caatcagttc	aggagagacc	ttacacttac	tgtgttagac	720
atagttgctc	tctttccgaa	ctacgatgtt	cgtacctatc	cgattcaaac	gtcatcccaa	780
cttacaaggg	agatctacac	cagttcagtc	attgaagact	ctccagtttc	tgcgaaacata	840
cccaatgggt	tcaacagggc	tgagtttggg	gtcagaccac	cccatctcat	ggacttcatg	900
aactctttgt	ttgtgactgc	agagactggt	agatcccaaa	ctgtgtgggg	aggacactta	960
gttagctcac	gcaacacggc	tggcaatcgt	atcaactttc	ctagttacgg	ggtcttcaat	1020
ccggggggcg	ccatctggat	tgcagatgaa	gatccacgtc	ctttctatcg	gaccttgtca	1080
gatcctgtct	togtccgagg	aggctttggc	aatcctcaact	atgtactcgg	tcttagggga	1140
gtggcctttc	aacaaactgg	tacgaatcac	acccgcacat	tcaggaaactc	cgggaccatt	1200
gactctctag	atgagatacc	acctcaagac	aacagcggcg	caccttggaa	tgactactcc	1260
catgtgctga	atcatgttac	ctttgtgcgc	tggccagggtg	agatctcagg	ttccgactca	1320
tggagagcac	caatgttctc	ttggacgcac	cgtagcgcta	ccccacaaa	caccattgat	1380
ccagagagaa	tactcagat	tcccttgggtg	aaggcacaca	cacttcagtc	aggaaactaca	1440
gttgtaagag	ggccgggggt	cacgggagga	gacattcttc	gacgcactag	tggaggacca	1500
ttcgcgta	ccattgtcaa	catcaatggg	caacttcccc	aaaggatatcg	tgccaggata	1560
cgctatgcct	ctactaccaa	tctaagaatc	tacgttacgg	ttgcagggtga	acggatcttt	1620
gctggtcagt	tcaacaagac	aatggatacc	ggtgatccac	ttacattcca	atctttctcc	1680
tacgccacta	tcaacaccgc	gttcaccttt	ccaatgagcc	agagcagttt	cacagtaggt	1740
gctgatacct	tcagttcagg	caacgaagtg	tacattgaca	ggtttgagtt	gattccagtt	1800
actgcccacac	tcgagtaa					1818

<210> 9
 <211> 1947
 <212> ADN
 <213> Trình tự nucleotit CryIIe

<400> 9						
atgaagctca	agaacccaga	caagcaccaa	agcctgtcta	gtaacgctaa	agtggacaag	60
attgctactg	acagtctcaa	gaacgaaaca	gacattgagt	tgaagaacat	caaccacgaa	120
gactttctta	ggatgtcaga	gcatgagagc	attgatcctt	tcgtcagtg	ctccacaatc	180
caaacgggca	tcggaattgc	tggtaagatc	ctcggtaactt	tgggtgttcc	tttcgctgga	240
cagattgcca	gtctctacag	tttcatcttg	ggcgaaactct	ggcctaaggg	caagagccaa	300
tgggaaatct	tcattggaaca	tgtcgaagag	cttatcgacc	aaaagatcag	tacttacgcc	360
aggaacattg	cccttgacga	cttgaaaggc	tggggcgatg	ccttggctgt	ctaccacgaa	420
agcttgagga	gttggtacaa	gaaccgcaac	aacgcaaggg	ctacaagcgt	tgtcaagagc	480
cagtacatcg	ccttggaact	cctctttgtt	caaaaagctgc	catcattcgc	tgtgtcaggt	540
gaggaagtcc	cactcttgcc	tatctatgct	caagctgcaa	acctccactt	actcctccta	600
agagacgctt	ctgtgttcgg	aaaagagtgg	ggactctcta	actcgcaaat	cagcacattc	660
tacaaccgtc	aagtggaaag	aactagtgc	tactccgacc	actgcgtgaa	gtggtacagc	720
actggactca	acaacttgag	aggtacaaat	gccgaaagct	gggtccgtta	caatcagttt	780
cgtaaggata	tgactctcat	ggtgctcgat	ctcattgcac	tcttcccaag	ctatgacaca	840
ctcgtgtatc	ctatcaagac	cacttctcaa	ctcacaagag	aagtgtatac	cgacgcaatc	900
gggacagttc	atccaaacgc	cagcttcgca	tcaacaacct	ggtataacaa	caatgcacct	960
tccttctctg	ccattgagtc	agctgttggt	cgtaatccac	atctactcga	cttcttggaa	1020
caagttacaa	tctacagctt	gctctctaga	tggagtaaca	ctcagtacat	gaacatgtgg	1080
ggaggacaca	gactggagtt	tcgtacaatc	ggtggagttc	tcaacacttc	aacacaagga	1140
tctactaaca	cttccatcaa	tcctgtgaca	ttgccattca	cctctcgtga	cgtctatcgt	1200
actgaatcat	tggcaggact	gaatctcttc	ctcactcaac	ctgttaacgg	agttccaagg	1260
gttgacttcc	attggaagtt	cgccacactt	ccaatcgctt	ctgataactt	ctactatctc	1320
ggatattgctg	gagttgggtac	tcaactccaa	gactcagaga	atgaaactcc	acctgaaacc	1380
actggacagc	caactatgga	atcctattcc	catagattgt	cccacatcgg	actcattagt	1440
gcatcccacg	tgaaggcatt	ggtgtactct	tggagccatc	gtagcgacga	tcgtactaac	1500
accattgagc	ctaacagcat	cacacaaaatc	ccattgggtga	aggccttcaa	tctctctagt	1560
ggtgcccgtg	ttgttagagg	accaggattc	acaggtggag	acattcttcg	taggactaac	1620

actggtacat	tccgagatat	ccgtgtgaac	atcaaccac	catttgcaca	acgttatcgc	1680
gttaggattc	gctatgcctc	cactacagat	ctccaattcc	acacctccat	caatggtaaa	1740
gctatcaatc	aggggtaactt	ctcagcaacc	atgaacagag	gagaggacct	cgactacaag	1800
accttttagga	ctgtgggctt	taccactcca	ttcagcttct	ccgacgtgca	aagtaccttc	1860
accattgggtg	cttggaactt	ctcttccggt	aacgaagttt	acatcgatcg	tattgagttt	1920
gtgccagttg	aagttaccta	cgagtga				1947

<210> 10
 <211> 1992
 <212> ADN
 <213> Trình tự khởi đầu của gen Maize Ubiquitin

<400> 10

ctgcagtga	gcgtgaccgc	gtcgtgcccc	tctctagaga	taatgagcat	tgcatgtcta	60
agttataaaa	aattaccaca	tatttttttt	gtcacacttg	tttgaagtgc	agtttatcta	120
tctttataca	tatatTTaaa	ctttactcta	cgaataatat	aatctatagt	actacaataa	180
tatcagtgtt	ttagagaatc	atataaatga	acagtttagac	atgggtctaaa	ggacaattga	240
gtatttttgac	aacaggactc	tacagttttta	tcttttttagt	gtgcatgtgt	tctccttttt	300
ttttgcaaat	agcttcacct	atataatact	tcatccattt	tattagtaca	tccatttagg	360
gttttaggggt	aatgggtttt	atagactaat	tttttttagta	catctatttt	attctatttt	420
agcctctaaa	ttaagaaaac	taaaactcta	tttttagttt	tttattttaat	aatttagata	480
taaaatagaa	taaaataaag	tgactaaaaa	ttaaacaat	accctttaag	aaattaaaaa	540
aactaaggaa	acatttttct	tgtttcagag	agataatgcc	agcctgttaa	acgccgtcga	600
cgagtctaac	ggacaccaac	cagcgaacca	gcagcgtcgc	gtcgggcca	gcgaagcaga	660
cggcacggca	tctctgtcgc	tgccctctgga	ccccctcga	gagttccgct	ccaccgttgg	720
acttgctccg	ctgtcggcat	ccagaaattg	cgtggcggag	cggcagacgt	gagccggcac	780
ggcaggcggc	ctcctcctcc	tctcacggca	cggcagctac	gggggattcc	tttcccaccg	840
ctccttcgct	ttcccttcc	cgcccgcgt	aataaataga	cacccctcc	acaccctctt	900
tccccaacct	cgtgttggtc	ggagcgcaca	cacacacaac	cagatctccc	ccaaatccac	960
ccgtcggcac	ctcgcgttca	aggtacgccc	ctcgtcctcc	ccccccccc	ctctctacct	1020
tctctagatc	ggcgttccgg	tccatggtta	gggcccggta	gttctacttc	tgttcatgtt	1080
tgtgttagat	ccgtgtttgt	gttagatccg	tgctgctagc	gttcgtacac	ggatgcgacc	1140
tgtacgtcag	acacgttctg	attgctaact	tgccagtgtt	tctctttggg	gaatcctggg	1200
atggctctag	ccgttccgca	gacgggatcg	atttcatgat	tttttttggt	tcgttgcata	1260
gggtttgggt	tgcccttttc	ctttatttca	atatatgccg	tgcaactgtt	tgctcgggtca	1320
tcttttcatg	cttttttttg	tcttggttgt	gatgatgtgg	tctggttggg	cggctcgttct	1380
agatcggagt	agaattctgt	ttcaaaactac	ctggtggatt	tattaatttt	ggatctgtat	1440
gtgtgtgcca	tacatattca	tagttacgaa	ttgaagatga	tggttgga	tatcgatcta	1500
ggataggat	acatgttgat	gcgggtttta	ctgatgcata	tacagagatg	ctttttgttc	1560
gcttggttgt	gatgatgtgg	tgtggttggg	cggtcgttca	ttcgttctag	atcggagtag	1620
aatactgttt	caaactacct	ggtgtattta	ttaatttttg	aactgtatgt	gtgtgtcata	1680
catcttcata	gttacgagtt	taagatggat	ggaaatatcg	atctaggata	ggtatacatg	1740
ttgatgtggg	ttttactgat	gcataacat	gatggcatat	gcagcatcta	ttcatatgct	1800
ctaaccttga	gtacctatct	attataataa	acaagtatgt	tttataatta	ttttgatctt	1860
gatatacttg	gatgatggca	tatgcagcag	ctatatgtgg	atTTTTTTtag	ccctgccttc	1920
atacgtatatt	tatttgcttg	gtactgtttc	ttttgtcgat	gctcaccctg	ttgtttgggtg	1980
ttactttctgc	ag					1992

<210> 11
 <211> 253
 <212> ADN
 <213> Trình tự kết thúc của gen nopalin synthaza

<400> 11

gacgtttcaa	acattttggca	ataaagtttc	ttaagattga	atcctgttgc	cggctcttgcg	60
atgattatca	tataatttct	gttgaattac	gttaagcatg	taataattaa	catgtaatgc	120
atgacgttat	ttatgagatg	ggttttttatg	attagagtc	cgcaattata	catttaatac	180
gcgatagaaa	acaaaatata	gcgcgcaaac	taggataaat	tatcgcgcgc	ggtgtcatct	240
atgttactag	atc					253

<210> 12
 <211> 1176
 <212> ADN
 <213> Gen Phosphomanoza isomeraza

<400> 12
 atgcaaaaac tcattaactc agtgcaaaaac tatgcctggg gcagcaaaaac ggcgttgact 60
 gaactttatg gtatggaaaa tccgtccagc cagccgatgg ccgagctgtg gatgggacga 120
 catccgaaaa gcagttcacg agtgcagaat gccgccggag atatcgtttc actgcgtgat 180
 gtgattgaga gtgataaatc gactctgctc ggagaggccg ttgccaaaacg ctttggcgaa 240
 ctgcctttcc tgttcaaaagt attatgcgca gcacagccac tctccattca ggttcatcca 300
 aacaaacaca attctgaaat cggttttgcc aaagaaaatg ccgcaggtat cccgatggat 360
 gccgccgagc gtaactataa agatcctaac cacaagccgg agctgggtttt tgcgctgacg 420
 cctttccttg cgatgaacgc gtttcgtgaa ttttccgaga ttgtctccct actccagccg 480
 gtcgcaggtg cacatccggc gattgctcac tttttacaac agcctgatgc cgaacgttta 540
 agcgaactgt tcgccagcct gttgaatatg cagggtgaag aaaaatcccg cgcgctggcg 600
 attttaaaat cggccctcga tagccagcag ggtgaaccgt ggcaaacgat tcgtttaatt 660
 tctgaatttt acccggaaga cagcggctctg ttctccccgc tattgctgaa tgtggtgaaa 720
 ttgaaccctg gcgaagcgat gttcctgttc gctgaaacac cgcacgctta cctgcaaggc 780
 gtggcgctgg aagtgatggc aaactccgat aacgtgctgc gtgcgggtct gacgcctaaa 840
 tacattgata ttccggaact ggttgccaat gtgaaattcg aagccaaacc ggctaaccag 900
 ttgttgaccc agccggtgaa acaagggtgca gaactggact tcccgattcc agtggatgat 960
 tttgccttct cgctgcatga ccttagtgat aaagaaacca ccattagcca gcagagtgcc 1020
 gccattttgt tctgcgtcga aggcgatgca acgttggtgga aaggttctca gcagttacag 1080
 cttaaaccgg gtgaatcagc gtttattgcc gccaacgaat caccggtgac tgtcaaaggc 1140
 cacggcgggt tagcgcgtgt ttacaacaag ctgtaa 1176

<210> 13
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi 1

<400> 13
 cgaactacga ctccccgac 19

<210> 14
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi 2

<400> 14
 gtagatttcg cgggtcagtt g 21

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

<220>
 <223> Đoạn dò 1

<400> 15	
ctaccggtc cgcaccgtgt cc	22
<210> 16	
<211> 23	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> Đoạn mỗi 3	
<400> 16	
tgcgtattca attcaacgac atg	23
<210> 17	
<211> 23	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> Đoạn mỗi 4	
<400> 17	
cttggtagtt ctggactgcg aac	23
<210> 18	
<211> 24	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> Đoạn dò 2	
<400> 18	
cagcgcttg accacagcta tccc	24
<210> 19	
<211> 27	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> Đoạn mỗi 5	
<400> 19	
cagtcaggaa ctacagttgt aagaggg	27
<210> 20	
<211> 21	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> Đoạn mỗi 6	

<400> 20	
acgcgaatgg tcctccacta g	21
<210> 21	
<211> 27	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> Đoạn dò 3	
<400> 21	
cgtcgaagaa tgtctcctcc cgtgaac	27
<210> 22	
<211> 23	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> Đoạn mỗi 7	
<400> 22	
atcgtgaaca accagaacca gtg	23
<210> 23	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> Đoạn mỗi 8	
<400> 23	
ctccaggatc tcgatctccg	20
<210> 24	
<211> 26	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> Đoạn dò 4	
<400> 24	
cgtgccgtac aactgcctga acaacc	26
<210> 25	
<211> 18	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> Đoạn mỗi 9	
<400> 25	

tcatttgggg ctctgtcg

18

<210> 26

<211> 22

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi 10

<400> 26

tgattgatca gctgctcaac ct

22

<210> 27

<211> 23

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn dò 5

<400> 27

ccagtgggat gcgttcctcg ctc

23

<210> 28

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi 11

<400> 28

gagcattgat cctttcgtca gtg

23

<210> 29

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi 12

<400> 29

caaagtaccg aggatcttac cagc

24

<210> 30

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn dò 6

<400> 30

cctccacaat ccaaacgggc atcg

24