



(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) 
1-0022118

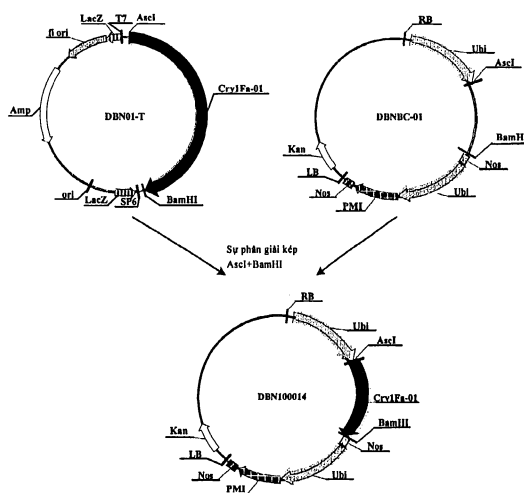
(51)⁷ **C12N 15/84**

(13) **B**

- (21) 1-2013-03911 (22) 11.12.2013
(30) 201210533580.1 11.12.2012 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) Chao HAN (CN), Jie PANG (CN), Yuejing KANG (CN), Haili LIU (CN), Yunzhu ZHANG (CN), Chengwei ZHANG (CN), Chunping XU (CN), Mei WEI (CN), Jincun HUANG (CN), Kangle TIAN (CN), Qianqin WANG (CN)
(74) Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ WINCO (WINCO CO., LTD.)

(54) **PHƯƠNG PHÁP PHÒNG TRỪ SÂU HẠI**

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp phòng trừ sâu *Sesamia inferens*. Phương pháp này bao gồm bước cho *Sesamia inferens* tiếp xúc với protein Cry1F. *Sesamia inferens* được phòng trừ bởi protein Cry1F có hoạt tính trừ sâu *Sesamia inferens*, mà được sản sinh ra ở cây trồng. So với phương pháp phòng trừ sâu bằng biện pháp nông học, phương pháp phòng trừ sâu bằng biện pháp hóa học và phương pháp phòng trừ sâu bằng biện pháp sinh học hiện đang được sử dụng, sáng chế có thể bảo vệ toàn bộ cây trồng ở toàn bộ các thời kỳ phát triển của nó khỏi sự tấn công của *Sesamia inferens*. Hơn thế nữa, sáng chế còn không gây ô nhiễm, không có tồn dư hóa chất và tạo ra hiệu quả phòng trừ ổn định và toàn diện. Ngoài ra, sáng chế còn đơn giản, thuận tiện và kinh tế.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp phòng trừ sâu hại, cụ thể là đề cập đến phương pháp phòng trừ sâu *Sesamia inferens* (sâu đục thân màu hồng) bởi protein Cry1F được biểu hiện ở cây trồng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Sesamia inferens thuộc loài Lepidoptera, Noctuidae, là một loài sâu ăn tạp. Ngoài cây ngô, chúng còn tấn công nhiều loại cây trồng khác thuộc họ lúa như cây lúa nước, cây mía đường, cây cao lương và các loại cây trồng tương tự. Loài sâu này phân bố rộng ở miền trung và miền tây nam Trung Quốc, đặc biệt là ở khu vực chuyên canh cây lúa nước ở miền nam tỉnh Thiểm Tây và Hà Nam. Ấu trùng của sâu *Sesamia inferens* đục thân tạo thành lỗ trên thân cây, thậm chí có thể gây chết cây. Các lỗ đục thân gây ra bởi sâu *Sesamia inferens* thường to và kèm theo một lượng lớn phân thải đùn ra từ thân cây. Loài sâu này gây hại nghiêm trọng ở những vùng đất thấp và trên những cánh đồng ngô trồng xen canh với lúa mì và ngô vụ hè bị ảnh hưởng nặng hơn ngô vụ xuân.

Cây ngô và lúa miền là các cây lương thực quan trọng của Trung Quốc. Hằng năm, sâu *Sesamia inferens* gây giảm sản lượng ngũ cốc rất lớn. Thậm chí nó còn ảnh hưởng đến cả điều kiện sống của cộng đồng địa phương. Hiện nay, phương pháp phòng trừ sâu bằng biện pháp nông học, phương pháp phòng trừ sâu bằng biện pháp hóa học và phương pháp phòng trừ sâu bằng biện pháp sinh học thường được sử dụng để phòng trừ sâu *Sesamia inferens*.

Phương pháp phòng trừ sâu bằng biện pháp nông học là phương pháp quản lý toàn diện nhiều yếu tố của toàn bộ hệ sinh thái đồng ruộng. Bằng cách điều chỉnh loại cây trồng, sinh vật gây hại, và các yếu tố môi trường, thiết lập nên hệ sinh thái đồng ruộng mà có lợi cho sự phát triển của cây trồng nhưng không có lợi để dịch *Sesamia inferens* bùng phát. Việc xử lý vật chủ của *Sesamia inferens* vào mùa đông, tái tạo hệ trồng trọt, trồng cây kháng *Sesamia inferens*, sử dụng cánh đồng bẫy và xen canh và các biện pháp tương tự, là các biện pháp chủ yếu nhằm làm giảm sự gây hại của *Sesamia inferens*. Do phải đảm bảo được sự phân bố và năng suất của cây trồng nên phương pháp phòng trừ sâu hại bằng biện pháp nông học bị giới hạn và không thể dùng làm biện pháp khẩn cấp được. Phương pháp này không áp dụng được khi dịch *Sesamia inferens* đã bùng phát.

Phương pháp phòng trừ sâu bằng biện pháp hóa học, nghĩa là diệt trừ bằng thuốc trừ sâu, đây là phương pháp trừ sâu bằng cách sử dụng thuốc trừ sâu hóa học. Phương pháp phòng trừ sâu bằng biện pháp hóa học là một phương pháp quan trọng trong việc xử lý *Sesamia inferens* một cách toàn diện. Phương pháp này nhanh, thuận tiện, đơn

giảm và kinh tế. Phương pháp phòng trừ sâu bằng biện pháp hóa học là công cụ không thể thiếu để áp dụng khẩn cấp khi dịch *Sesamia inferens* bùng phát. *Sesamia inferens* có thể được loại bỏ trước khi chúng gây hại và làm giảm năng suất bằng cách sử dụng phương pháp phòng trừ sâu bằng biện pháp hóa học. Hiện nay, phương pháp phòng trừ sâu bằng biện pháp hóa học chủ yếu bao gồm rắc thuốc bột, phun thuốc lên đất, phun dung dịch, hun sâu trưởng thành trong các đụn rơm vào mùa đông, v.v. nhưng phương pháp phòng trừ sâu bằng biện pháp hóa học này cũng có nhược điểm. Ví dụ, việc sử dụng không thích hợp thường gây ra sự nhiễm độc vật lý cho mùa vụ, sâu bệnh kháng thuốc. Ngoài ra, dịch hại tự nhiên của sâu này cũng có thể bị tiêu diệt bởi thuốc trừ sâu. Thuốc trừ sâu hóa học là nguyên nhân gây ô nhiễm môi trường, cũng như phá hủy hệ sinh thái đồng ruộng. Hơn nữa, tồn dư thuốc trừ sâu có thể đe dọa đến sự an toàn của người và động vật và điều này cũng dẫn đến nhiều hậu quả nghiêm trọng khác.

Phương pháp phòng trừ sâu bằng biện pháp sinh học là phương pháp phòng trừ quần thể sâu hại bằng cách sử dụng sinh vật có lợi hoặc các chất chuyển hóa sinh học có lợi mà có thể làm giảm hoặc loại bỏ hoàn toàn sâu hại. Phương pháp phòng trừ sâu bằng biện pháp sinh học này là an toàn đối với con người và vật nuôi và ít gây ô nhiễm môi trường. Phương pháp này có thể phòng trừ một số loài sâu hại trong một thời gian dài. Tuy nhiên, hiệu quả của phương pháp này thường không ổn định và việc đầu tư không tương ứng theo mức độ xuất hiện khác nhau khi *Sesamia inferens* tấn công.

Nhằm khắc phục các nhược điểm của các phương pháp phòng trừ sâu bằng biện pháp nông học, phương pháp phòng trừ sâu bằng biện pháp hóa học và phương pháp phòng trừ sâu bằng biện pháp sinh học trong thực tiễn, các nhà khoa học đã thấy rằng, bằng cách chuyển gen mã hóa protein có hoạt tính trừ sâu vào cây trồng, có thể thu được một số loài cây trồng được chuyển gen có khả năng trừ sâu. Protein có hoạt tính trừ sâu Cry1F là một trong số nhiều loại protein có hoạt tính trừ sâu, đây là một loại protein tinh thể giả bào tử không hòa tan được sản sinh bởi loài *Bacillus thuringiensis*.

Protein Cry1F được sâu ăn và đi vào ruột giữa và tiền độc tố protein gây độc này sẽ hòa tan trong ruột giữa của sâu trong điều kiện kiềm. Các đầu N và C của protein này được phân cắt bởi enzym proteaza kiềm và tiền độc tố này trở thành các phân đoạn mang hoạt tính. Các phân đoạn mang hoạt tính này gắn kết với các thụ thể trên màng tế bào biểu mô trong ruột giữa của sâu và chèn vào màng tế bào này, việc này sẽ gây ra các vết thương tổn trên màng tế bào. Các vết thương tổn này sẽ ảnh hưởng đến sự cân bằng pH và áp suất thẩm thấu giữa bên trong và bên ngoài màng tế bào, phá vỡ quá trình phân giải và cuối cùng khiến cho sâu bị chết.

Cây trồng chuyển gen Cry1F có thể kháng sâu hại *Lepidoptera* như *Agrotis ypsilon* *Rottemberg* là điều đã được chứng minh. Tuy nhiên, cho đến nay vẫn chưa có báo cáo nào về việc sử dụng các loài cây trồng chuyển gen biểu hiện protein Cry1F để phòng trừ *Sesamia inferens*.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến phương pháp phòng trừ sâu hại. Đây là lần đầu tiên việc phòng trừ *Sesamia inferens* được thực hiện bằng cách tạo ra cây trồng chuyển gen biểu hiện protein Cry1F. Sáng chế khắc phục được các nhược điểm của các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này như phương pháp phòng trừ sâu bằng biện pháp nông học, phương pháp phòng trừ sâu bằng biện pháp hóa học và phương pháp phòng trừ sâu bằng biện pháp sinh học nêu trên.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp phòng trừ *Sesamia inferens*, phương pháp này bao gồm bước cho *Sesamia inferens* tiếp xúc với protein Cry1F.

Theo một số phương án, protein Cry1F này là protein Cry1Fa.

Theo một số phương án, protein Cry1Fa này có trong tế bào cây trồng biểu hiện protein Cry1Fa, và *Sesamia inferens* tiếp xúc với Cry1Fa bằng cách ăn tế bào này.

Theo một số phương án, protein Cry1Fa này có ở cây trồng chuyển gen biểu hiện protein Cry1Fa, và *Sesamia inferens* tiếp xúc với protein Cry1Fa bằng cách ăn mô của cây trồng chuyển gen này khiến cho sự sinh trưởng của *Sesamia inferens* bị kìm hãm hoặc thậm chí gây chết *Sesamia inferens* nhằm kiểm soát được thiệt hại gây ra bởi *Sesamia inferens*.

Theo một số phương án, cây trồng chuyển gen nêu trên ở trong giai đoạn phát triển bất kỳ.

Theo một số phương án, mô của cây trồng chuyển gen nêu trên được lựa chọn từ nhóm bao gồm bẹ lá, thân, cụm hoa, quả, bao phấn và sợi xơ.

Theo một số phương án, việc phòng trừ thiệt hại gây ra bởi *Sesamia inferens* không phụ thuộc vào vị trí trồng cây.

Theo một số phương án, việc phòng trừ thiệt hại gây ra bởi *Sesamia inferens* không phụ thuộc vào thời gian trồng cây.

Theo một số phương án, cây trồng này được lựa chọn từ nhóm bao gồm ngô, lúa nước, lúa miến, lúa mì, kê, bông, sậy, mía đường, cây tre nước, đậu tằm và cây cải dầu.

Theo một số phương án, phương pháp này còn bao gồm bước trồng cây chứa polynucleotit mã hóa protein Cry1Fa được thực hiện trước bước cho tiếp xúc.

Theo một số phương án, trình tự axit amin của protein Cry1Fa chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2. Trình tự nucleotit mã hóa protein Cry1Fa này bao gồm trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 4.

Theo các giải pháp kỹ thuật nêu trên, cây trồng này còn có thêm ít nhất một trình tự nucleotit thứ hai khác với trình tự nucleotit mã hóa protein Cry1Fa.

Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ hai này 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.

Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ hai này mã hóa protein Cry1Ab, protein Cry1Ac, protein Cry1Ba hoặc protein Vip3A.

Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ hai này bao gồm trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 5 hoặc SEQ ID NO: 6.

Tùy ý, trình tự nucleotit thứ hai này là ARN sợi kép (dsARN) mà ARN này ức chế (các) gen thiết yếu của sâu hại đích.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là sơ đồ để thiết kế vector nhân dòng tái tổ hợp DBN01-T chứa trình tự nucleotit Cry1Fa-01 để phòng trừ sâu theo sáng chế;

Fig.2 là sơ đồ để thiết kế vector nhân dòng tái tổ hợp DBN100014 chứa trình tự nucleotit Cry1Fa-01 để phòng trừ sâu theo sáng chế;

Fig.3 thể hiện hiệu quả phòng trừ sâu *Sesamia inferen* của cây ngô chuyển gen theo sáng chế;

Fig.4 thể hiện hiệu quả phòng trừ sâu *Sesamia inferen* của cây lúa chuyển gen theo sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo sáng chế, protein Cry1F này được biểu hiện ở cây trồng chuyển gen cùng với sự biểu hiện của một hoặc nhiều protein có hoạt tính trừ sâu giống như Cry và/hoặc protein có hoạt tính trừ sâu như giống Vip. Việc đồng biểu hiện nhiều loại độc tố trừ sâu ở cùng một loài cây trồng có thể đạt được bằng cách chuyển nạp và biểu hiện gen quan tâm ở cây trồng bằng các kỹ thuật di truyền. Ngoài ra, protein Cry1F này có thể được biểu hiện ở cây thứ nhất (cây bố mẹ 1) thông qua kỹ thuật di truyền và protein có hoạt tính trừ sâu giống như Cry và/hoặc protein có hoạt tính trừ sâu giống như Vip có thể được biểu hiện ở cây thứ hai (cây bố mẹ 2) thông qua kỹ thuật di truyền. Có thể thu được thế hệ con có biểu hiện cả gen bố mẹ 1 và bố mẹ 2 bằng cách lai chéo giữa bố mẹ 1 với bố mẹ 2.

ARN can thiệp (ARN interference: RNAi) chỉ ARN thông tin (mRNA) đặc hiệu có khả năng thoái biến và bảo tồn cao gây ra bởi ARN sợi kép (dsARN) trong quá trình tiến hóa. Do đó, kỹ thuật ARNi được áp dụng để loại bỏ hoặc làm mất biểu hiện

của gen cụ thể của sâu hại đích theo sáng chế.

Cả *Sesamia inferens* và *Agrotis ypsilon* Rottemberg đều thuộc Lepidoptera, Noctuidae. Cả hai loài này đều là sâu ăn tạp nhưng chúng ưu tiên ăn cây trồng *gramineae*. Thông thường, chúng gây hại chủ yếu cho ngô, lúa nước, lúa miến, mía đường và các loài tương tự. Tuy nhiên, *Sesamia inferens* và *Agrotis ypsilon* Rottemberg rõ ràng là hai loài độc lập và hoàn toàn khác nhau về mặt sinh thái học. Điểm khác nhau chủ yếu của chúng như sau:

1. Phạm vi phân bố khác nhau.

Sesamia inferens phân bố rộng ở miền trung và cực nam của Trung Quốc, đặc biệt là trong khu vực chuyên canh lúa nước ở phía nam tỉnh Thiểm Tây và Hà Nam và khu vực chuyên canh ngô ở cực nam Trung Quốc. Ngoài Trung Quốc, *Sesamia inferens* còn phân bố rộng ở các quốc gia trồng lúa nước, ngô và mía đường ở Nam Á, bao gồm Việt Nam, Lào, Ấn Độ, v.v.. Trong khi đó *Agrotis ypsilon* Rottemberg là một loài sâu hại phân bố rộng trên khắp Trung Quốc, đặc biệt tập trung nhiều ở khu vực có độ ẩm cao và mưa nhiều như, lưu vực sông Trường Giang và khu vực duyên hải phía Đông Nam của Trung Quốc. *Agrotis ypsilon* Rottemberg cũng xuất hiện ở khu vực có độ ẩm cao phía tây và phía nam Trung Quốc.

2. Tập tính gây hại khác nhau.

Sesamia inferens thuộc loài sâu đục thân. Sự gây hại của chúng bao gồm, ví dụ theo quá trình như sau. Ấu trùng của chúng đục thân cây trồng, gây chết chồi hoặc gây chết toàn bộ cây. Lỗ đục thân do *Sesamia inferens* gây ra thường lớn với nhiều phân thải đùn ra từ thân, phần chất thải này được kẹp giữa bẹ lá và thân. Bẹ và lớp bao lá chuyển sang màu vàng. Khi mới nở, ấu trùng *Sesamia inferens* không phân tán mà tập trung thành từng cụm bên trong bẹ lá, đục bẹ lá và lá. Sau giai đoạn ấu trùng 3, ấu trùng này chuyển sang cây bên cạnh và có thể gây hại từ 5 đến 6 cây. Đây là giai đoạn gây hại nghiêm trọng nhất của *Sesamia inferens*. Nếu nhiệt độ cao hơn 10°C trước đầu mùa xuân thì *Sesamia inferens* xuất hiện sớm hơn. Chúng gây hại với mức độ nghiêm trọng ở những vùng đất thấp và trồng xen canh ngô với lúa mì và ngô vụ hè bị gây hại nghiêm trọng hơn ngô vụ xuân. Ngược lại, *Agrotis ypsilon* Rottemberg thuộc loài sâu ẩn dưới đất. Thế hệ ấu trùng thứ nhất và thứ hai có thể co cụm lại và ăn lá non trên ngọn của cây con cả ngày và đêm; sau giai đoạn ấu trùng 3, ấu trùng này mới lây lan. Ấu trùng này di chuyển nhanh, có hành động giả chết, và cực kỳ nhạy cảm với ánh sáng. Chúng có thể co tròn lại khi bị động đến. Vào ban ngày, chúng trốn dưới lớp đất ẩm và khô trên mặt đất và bò ra, cắn cây non và lôi chúng vào lỗ dưới đất hoặc trực tiếp cắn hạt nảy mầm. Sau khi mầm chính của cây non trở nên cứng, chúng chuyển sang ăn lá non, bẹ lá và điểm sinh trưởng. Chúng có thể di trú nếu thức ăn không đủ hoặc có nhu cầu tìm kiếm nơi trú đông. Ấu trùng già hơn gây hại cho cây non do tỷ lệ ăn nhiều và phàm ăn.

3. Đặc tính hình thái học khác nhau.

1) Hình thái học của trứng khác nhau: Trứng của *Sesamia inferen* có hình cầu dẹt với đường thẳng mảnh thẳng đứng và nằm ngang trên bề mặt. Trứng ban đầu có màu trắng nhưng chuyển dần sang màu vàng nâu theo độ tuổi. Trứng xếp riêng lẻ hoặc kết lại với nhau và thường sắp xếp thành từ 2 đến 3 hàng. Ngược lại, trứng của *Agrotis ypsilon Rottemberg* có hình bánh bao. Trứng này có đường sọc xuất phát từ đỉnh quả trứng và ban đầu trứng có màu trắng nhưng chuyển dần sang màu vàng theo độ tuổi. Thường thấy một chấm đen trên đỉnh quả trứng trước khi nở.

2) Hình thái học của ấu trùng khác nhau: Chiều dài thân của ấu trùng *Sesamia inferen* được báo cáo là khoảng 30mm ở cuối giai đoạn ấu trùng. Về vẻ bề ngoài, đầu có màu sắc chuyển từ nâu đỏ sang màu nâu đen và lưng và mặt sau màu tím đỏ nhạt. Giai đoạn ấu trùng của *Sesamia inferen* có từ năm đến bảy giai đoạn. Tuy nhiên, ấu trùng của *Agrotis ypsilon Rottemberg* có dạng hình trụ và chiều dài của ấu trùng trưởng thành nằm trong khoảng từ 37 đến 50mm. Đầu của ấu trùng này có màu đỏ nâu với màu đen mắt lưới không đều. Thân có màu sắc biến đổi từ nâu xám đến nâu đen. Trên thân xù xì và được phủ bởi nhiều cụm lông đen. Đường sống lưng, đường hai bên sống lưng và đường thở có màu đen. Phần cổ có màu nâu đen. Có hai dải màu nâu đen chạy dọc theo phiến mỏng chạy xuống đến dưới hậu môn màu nâu đen. Chân và phần bụng dưới chân có màu hung đen.

3) Hình thái học của nhộng khác nhau: Nhộng *Sesamia inferen* dài khoảng từ 13 đến 18mm, mập và có màu nâu đỏ. Bụng được phủ một lớp bột màu xám; đầu bụng có ba gai móc. Nhộng *Agrotis ypsilon Rottemberg* dài từ 18 đến 24mm, màu đỏ nhạt và sáng. Phần đầu chồi cánh được sắp xếp thẳng hàng và kéo thẳng về phía bao lưng của ngấn bụng thứ tư. Đường trung tâm của đường bao ở lưng từ đường thứ tư đến đường thứ bảy có màu nâu đen với các đốm chấm to. Hai đường chấm nhỏ kéo dài đến mũi. Đường bao phía trước ở phía bụng từ khúc thứ năm đến khúc thứ bảy cũng có các chấm nhỏ và có một cặp kéo dài từ bụng trên xuống đầu dưới của bụng.

4) Hình thái học của sâu bướm khác nhau: Sâu bướm cái của *Sesamia inferen* trưởng thành dài 15mm và sải cánh khoảng 30mm. Đầu và ngực có màu nâu vàng và bụng có màu từ vàng nhạt đến xám xanh. Râu có nhiều sợi nhỏ; cánh trước có hình dạng gần như hình chữ nhật và có màu xám đỏ. Bốn đốm nhỏ màu đen được sắp xếp thành hình tứ giác. Sâu bướm đực dài khoảng 12mm và sải cánh dài khoảng 27mm. Râu có hình tấm. *Agrotis ypsilon Rottemberg* trưởng thành dài khoảng 17 đến 23mm và có sải cánh dài khoảng từ 40 đến 54mm. Đầu và ngực có màu nâu đen, chân có màu nâu. Xương ống chân trước và rìa ngoài của xương cổ chân có màu nâu xám. Phần cuối của mỗi đoạn của chân giữa và chân sau tạo thành vòng nâu xám. Cánh trước màu nâu và phần biên phía trước màu nâu đen và màu sắc của phần phía trước cũng có màu nâu đen. Đường phân chia có màu nâu sáng. Có hai đường cơ gợn sóng, ngang sườn

màu đen. Bên trong của vòng tròn màu đen có điểm xám hình tròn. Đường hình như quả thận có màu đen và có rìa màu đen và có đường màu đen hình chữ V ở trung tâm mặt ngoài kéo dài đến hết đường nằm ngang bên ngoài, đường cơ ngang thắt lưng có màu nâu đen và có hai đường gợn sóng, đường cơ ngang bên ngoài màu nâu. Đường cuối mặt ngoài có hình răng cưa không đều màu xám và đường mép trong nằm giữa gân giữa có ba nhánh. Có các đốm nhỏ màu đen ở mỗi bên gân cánh nằm giữa đường mép ngoài của mút cánh. Cạnh của đường bên ngoài màu đen, phần giữa đường cơ ngang mặt ngoài và đường mép bên ngoài áp chót có màu nâu sáng, và ngoài đường mép ngoài có màu nâu đen. Cánh sau màu xám, đường mép và gân dọc màu nâu và phần trên bụng màu xám.

4. Tập tính sinh trưởng và tần suất gây dịch khác nhau.

Sesamia inferen có 2 đến 4 thế hệ trong 1 năm, sẽ giảm dần theo độ cao so với mặt nước biển của khu vực và tăng dần theo mức tăng của nhiệt độ. Ví dụ, có 2 đến 3 thế hệ một năm ở cao nguyên Vân Quý, có 3 đến 4 thế hệ một năm ở tỉnh Giang Tô và Chiết Giang, 4 thế hệ một năm ở tỉnh Giang Tây, Hồ Nam, Hồ Bắc và Tứ Xuyên, 4 đến 5 thế hệ ở tỉnh Phúc Kiến, Quảng Tây và thành phố Hạ Môn của tỉnh Vân Nam và có 6 đến 8 thế hệ ở miền nam của tỉnh Quảng Đông và Đài Loan. Trong vùng khí hậu ôn hòa, ấu trùng trưởng thành sống qua mùa đông trên phần còn lại của cây trồng mà chúng ký sinh (như thân cây hoặc thân rễ của cây tre nước và lúa nước) hoặc trong đất ở gần mặt đất. Trong khoảng trung tuần tháng ba của năm tiếp theo (khi mà nhiệt độ khoảng trên 10°C ấu trùng bắt đầu phát triển thành nhộng và bắt đầu nở khi nhiệt độ khoảng 15°C. Đầu tháng tư, chúng bắt đầu giao hợp để trứng và sau khoảng từ 3 đến 5 ngày, giai đoạn giao hợp và đẻ trứng đạt đến mức cao nhất. Giai đoạn trứng nở nhiều nhất xảy ra vào khoảng cuối tháng tư. Ban ngày, con trưởng thành thường trốn và thường trốn giữa các cây và bắt đầu hoạt động về chiều tối. Tính hướng sáng của chúng kém và thời gian sống khoảng 5 ngày. Sâu bướm cái bắt đầu đẻ trứng từ 2 đến 3 ngày sau khi giao hợp và sau từ 3 đến 5 ngày lượng trứng đẻ đạt mức lớn nhất. Chúng ưu tiên đẻ vào cây ngô non và ở bên ngoài cánh đồng. Trứng này thường ở bên trong màng bao của đốt lá thứ hai và thứ ba ở gần mặt đất của cây ngô, nơi mà thân cây nhỏ hơn và việc cuộn ngược của bao lá không chặt, lượng trứng nằm ở đây có thể lên đến 80% lượng trứng được đẻ ra. Mỗi con sâu bướm này có thể sinh ra 240 trứng và trong khi đẻ trứng, lứa thứ nhất trong 12 ngày, tiếp đó lứa thứ hai là từ 5 đến 6 ngày. Ấu trùng của thế hệ thứ nhất khoảng 30 ngày, thế hệ thứ hai khoảng 28 ngày, và thế hệ thứ ba khoảng 32 ngày. Trạng thái nhộng khoảng từ 10 đến 15 ngày. Sâu bướm cái bay yếu và đẻ trứng tương đối tập trung. Mật độ quần thể cao và gây hại nặng trong khoảng cách gần với nguồn sâu hại này. *Agrotis ypsilon* Rottemberg có khoảng từ 3 đến 4 thế hệ một năm, ấu trùng trưởng thành hoặc sâu bướm sống qua mùa đông trong đất. Đầu tháng ba, con trưởng thành bắt đầu xuất hiện và hai giai đoạn đỉnh cao của mùa đẻ trứng thường xuất hiện vào khoảng giữa và cuối tháng ba và đầu và giữa tháng tư. Con trưởng thành không hoạt động vào ban ngày. Từ chiều tối cho đến giữa đêm,

chúng hoạt động mạnh nhất. Chúng thích vị chua, ngọt và vật liệu lên men có mùi rượu vang và nhiều loại mật hoa khác nhau. Chúng bị tổn hại dưới ánh sáng mặt trời. Ấu trùng trải qua 6 giai đoạn. Ở giai đoạn ấu trùng 1, 2, ấu trùng trốn trong cuống lá của cỏ dại hoặc cây trồng, ăn ngày và đêm nhưng ăn rất ít, do đó chúng không gây hại đáng kể. Ở giai đoạn ấu trùng 3, chúng trốn dưới lớp đất bề mặt vào ban ngày và gây hại vào ban đêm. Sự phàm ăn từ thế hệ ấu trùng 5, 6 tăng lên rất nhiều và mỗi ấu trùng này có thể cắn từ 4 đến 5 cây con, thậm chí lên tới 10 cây con mỗi đêm. Việc kháng thuốc đối với ấu trùng sau giai đoạn ấu trùng 3 tăng lên đáng kể. Từ cuối tháng ba đến giữa tháng tư là thời kỳ gây hại mạnh nhất của thế hệ thứ nhất của ấu trùng. Việc xuất hiện và gây hại có thể nhận thấy bắt đầu từ tháng 11 đến tận tháng 4 của năm tiếp theo. Từ 2 đến 3 thế hệ một năm ở phía tây nam Trung Quốc, từ 2 đến 3 thế hệ một năm ở phía bắc Vạn Lý Trường Thành, 3 thế hệ một năm từ miền nam Vạn Lý Trường Thành đến miền bắc sông Hoàng Hà, 4 thế hệ một năm từ miền nam sông Hoàng Hà đến sông Trường Giang, từ 4 đến 5 thế hệ một năm ở phía nam sông Trường Giang và có từ 6 đến 7 thế hệ một năm ở vùng rừng nhiệt đới của Nam Á. Tuy nhiên, càng nhiều thế hệ trong một năm thì sự gây hại lớn nhất thuộc về thế hệ thứ nhất. Con trưởng thành qua mùa đông xuất hiện từ tháng hai ở miền nam. Giai đoạn nở thành sâu bướm mạnh nhất từ cuối tháng ba đến giữa tháng tư ở một số nơi ở Trung Quốc, nhưng giai đoạn này mạnh nhất ở cuối tháng tư tại tỉnh Ninh Hạ và Nội Mông. Việc nở thành sâu bướm trưởng thành của *Agrotis ypsilon Rottemberg* thường xảy ra vào khoảng từ 3 giờ chiều đến 10 giờ đêm. Chúng trốn trong các vị trí như các kẽ nứt và được hong khô dưới ánh sáng mặt trời và bắt đầu bay và tàn phá vào buổi tối. Sau từ 3 đến 4 ngày, chúng bắt đầu giao hợp và đẻ trứng. Trứng có màu đỏ thẫm ở phía dưới lá ở dưới thấp và dày và trên cây non, một số ở trên lá khô hoặc ở đường phân giới trên mặt đất. Phần lớn trứng nằm gần mặt đất. Mỗi con cái có thể đẻ từ 800 đến 1000 trứng, thậm chí có thể đẻ tới trên 2000 trứng. Thời gian trứng nở khoảng 5 ngày, có 6 giai đoạn ấu trùng và giai đoạn ấu trùng 7 và 8 độc lập. Giai đoạn ấu trùng khác nhau rất lớn giữa các nơi với nhau nhưng thế hệ đầu có chung thời gian khoảng từ 30 đến 40 ngày. Ấu trùng trưởng thành phát triển thành nhộng trong trong các khoang trống cách mặt đất khoảng 5 cm, giai đoạn nhộng kéo dài khoảng từ 9 đến 19 ngày. Nhiệt độ cao thường không thích hợp để *Agrotis ypsilon Rottemberg* phát triển và sinh sản, và do đó chúng thường phát triển ít trong mùa hè và xuất hiện khi nhiệt độ vào khoảng từ 15°C đến 25°C. Nhiệt độ mùa đông thường quá thấp, do đó ấu trùng *Agrotis ypsilon Rottemberg* bị chết nhiều vào mùa đông. Tần suất xuất hiện nhiều ở những nơi thấp và ẩm thấp với lượng mưa lớn. Dấu hiệu để dịch bệnh *Agrotis ypsilon Rottemberg* nổ ra nếu mưa nhiều trong mùa thu của cuối năm trước và độ ẩm của đất cao và cỏ dại mọc nhanh, đây là điều kiện thuận lợi để con trưởng thành đẻ trứng và sẵn nguồn thức ăn cho ấu trùng. Tuy nhiên, nếu mưa quá nhiều thì độ ẩm trở nên quá cao, khi đó sự phát triển của ấu trùng bị cản trở. Ấu trùng giai đoạn sớm dễ bị chết sau khi bị ngập nước. Sâu hại này sẽ gây hại nghiêm trọng nếu hàm lượng ẩm của đất vào khoảng từ 15 đến 20% trong giai đoạn cao điểm khi sâu bướm trưởng thành đẻ trứng. Đất sét cát có thể thấm

nước mưa nhanh chóng sẽ thích hợp cho việc sinh sản của *Agrotis ypsilon* Rottemberg; và nó không thích hợp nếu đó là đất thịt và đất cát.

Tóm lại, có thể thấy rằng *Sesamia inferen* và *Agrotis ypsilon* Rottemberg là hai loài sâu hại khác nhau nhiều về mối quan hệ di truyền và chúng không thể giao phối với nhau để sinh ra thế hệ con cháu.

Hệ gen của cây trồng, mô cây trồng hoặc tế bào cây trồng mô tả theo sáng chế chỉ vật liệu di truyền bất kỳ ở cây trồng, mô cây trồng hoặc tế bào cây trồng, kể cả nhân, plasmit và hệ gen của ty thể.

Như mô tả trong sáng chế, polynucleotit và/hoặc nucleotit tạo thành “gen” hoàn chỉnh, mã hóa protein hoặc polypeptit trong tế bào chủ quan tâm. Người có trình độ trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể dễ dàng nhận biết được là các polynucleotit và/hoặc nucleotit theo sáng chế có thể được đưa vào với sự kiểm soát của trình tự điều hòa của vật chủ đích.

Như đã biết đối với người có trình độ trong lĩnh vực kỹ thuật này, ADN thường tồn tại dưới dạng sợi kép, mà chúng bắt cặp bổ trợ với nhau. Nếu ADN này được sao chép ở cây trồng thì sợi bổ trợ của chúng cũng được sao chép. Do đó, trình tự polynucleotit được minh họa trong phần danh mục trình tự và sợi bổ trợ của nó cũng nằm trong phạm vi theo sáng chế. Thuật ngữ “sợi mã hóa” thường được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật này để chỉ sợi liên kết với sợi đối mang mã. Đối với sự biểu hiện protein *in vivo*, một sợi ADN thường được phiên mã thành sợi bổ trợ của mRNA, mà sợi này đóng vai trò như mẫu biểu hiện protein. Trên thực tế, mRNA được phiên mã từ các sợi “đối mã” của ADN. “Sợi mang mã” hoặc “sợi mã hóa” chứa một loạt các codon (mỗi codon bao gồm ba nucleoit mã hóa cho một loại axit amin cụ thể), có thể được đọc bởi khung đọc mở (open reading frame: ORF) tương ứng với gen mã hóa cho protein đích. ARNA và PNA (axit nucleic của peptit) có chức năng tương đương với ADN được đưa ra làm ví dụ cũng được đề cập đến trong sáng chế.

Phân tử axit nucleic hoặc các mảnh của nó được lai với gen *Cry1Fa* trong điều kiện lai nghiêm ngặt theo sáng chế. Phương pháp chính thống bất kỳ để lai hoặc khếch đại axit nucleic có thể được sử dụng để xác định tình trạng của gen *Cry1Fa* theo sáng chế. Phân tử axit nucleic hoặc các mảnh của nó có khả năng lai đặc hiệu với phân tử axit nucleic khác trong điều kiện cụ thể. Theo sáng chế, nếu hai phân tử axit nucleic có thể tạo thành cấu trúc axit nucleic sợi kép đối song song, thì có thể coi hai phân tử này có khả năng lai đặc hiệu với nhau. Nếu hai phân tử axit nucleic bắt cặp hoàn toàn với nhau, thì một trong hai phân tử đó được gọi là “bổ trợ” cho sợi còn lại. Theo sáng chế, nếu tất cả các nucleit của phân tử axit nucleic có thể bổ trợ với nucleotit tương ứng của phân tử axit nucleic khác thì chúng được xác định là hai phân tử này là “bắt cặp hoàn toàn”. Nếu hai phân tử phân tử axit nucleic này có thể lai với nhau và do đó chúng có khả năng ủ và liên kết với nhau đủ ổn định trong điều kiện có “tính nghiêm

ngặt thấp” bình thường, thì hai phân tử axit nucleic đó được coi là “có tính hỗ trợ tối thiểu”. Tương tự, nếu hai phân tử axit nucleic có thể lai được với nhau sao cho chúng có thể ủ và liên kết với nhau đủ ổn định trong điều kiện “ng nghiêm ngặt cao” bình thường, thì hai phân tử axit nucleic này có tính “hỗ trợ”. Dẫn xuất từ trình tự “bắt cặp hoàn toàn” có thể được phép, miễn là các dẫn xuất này không ngăn chặn sự bắt cặp của hai phân tử này để tạo ra cấu trúc sợi kép. Phân tử axit nucleic có thể có thể được lấy như đoạn mồi hoặc đoạn dò có trình tự hỗ trợ đủ để tạo thành cấu trúc sợi kép hòa tan đặc hiệu tại nồng độ muối cụ thể.

Theo sáng chế, trình tự về cơ bản là tương đồng chỉ phân tử axit nucleic, có thể lai đặc hiệu với sợi hỗ trợ của phân tử axit nucleic bắt cặp khác trong điều kiện “ng nghiêm ngặt cao”. Điều kiện ng nghiêm ngặt để lai ADN là đã biết đối với người có trình độ trong lĩnh vực kỹ thuật này, như là xử lý bằng dung dịch 6,0*natri clorua/natri xitrat (SSC) ở khoảng nhiệt độ 45°C và rửa bằng 2,0*SSC ở nhiệt độ 50°C. Ví dụ, nồng độ muối ở bước rửa được lựa chọn từ 2,0*SSC và 50°C đối với điều kiện “ng nghiêm ngặt thấp” và 0,2*SSC và 50°C đối với điều kiện “ng nghiêm ngặt cao”. Ngoài ra, nhiệt độ của bước rửa nằm trong khoảng từ 22°C đối với điều kiện “ng nghiêm ngặt thấp” đến 65°C đối với điều kiện “ng nghiêm ngặt cao”. Cả nhiệt độ và nồng độ muối có thể thay đổi cùng với nhau hoặc chỉ có một yếu tố trong hai yếu tố này thay đổi. Theo một số phương án, điều kiện ng nghiêm ngặt được sử dụng theo sáng chế có thể như sau. SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 4 được lai đặc hiệu ở 6,0*SSC và dung dịch 0,5% SDS ở 65°C. Tiếp đó màng này được rửa một lần ở trong 2*SSC và dung dịch 0,1% SDS và 1*SSC và dung dịch 0,1% SDS, một cách tương ứng.

Do đó, trình tự kháng sâu bệnh có thể được lai với SEQ ID NO: 3 và/hoặc SEQ ID NO: 4 trong điều kiện lai ng nghiêm ngặt cũng nằm trong sáng chế. Trình tự này có độ tương đồng về trình tự đạt ít nhất từ khoảng 40% đến 50% hoặc có độ tương đồng đạt khoảng 60%, 65% hoặc 70%, thậm chí độ tương đồng với trình tự theo sáng chế đạt ít nhất là 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc cao hơn.

Gen và protein được mô tả theo sáng chế không chỉ bao gồm các trình tự mẫu mà còn bao gồm các phần và/hoặc mảnh (kể cả (các) đoạn cắt trong và/hoặc tại đầu của protein có chiều dài toàn vẹn), các biến thể, thể đột biến, thay thế (protein chứa (các) axit amin thay thế), các protein khảm và protein dung hợp duy trì được hoạt tính trừ sâu của nó. “Biến thể” hoặc “sự biến đổi” chỉ trình tự nucleotit mã hóa cùng một protein hoặc mã hóa protein tương đương có hoạt tính trừ sâu. Thuật ngữ “protein tương đương” chỉ protein có cùng hoặc về cơ bản có cùng hoạt tính kháng *Sesamia inferens* như protein được yêu cầu bảo hộ.

“Mảnh” hoặc “đoạn cắt” của trình tự protein hoặc DNA theo sáng chế chỉ phần hoặc dạng trình tự cải biến nhân tạo của nó (ví dụ, trình tự về cơ bản thích hợp để biểu

hiện ở cây trồng) của trình tự protein hoặc ADN gốc (trình tự nucleotit hoặc axit amin) có liên quan theo sáng chế. Chiều dài của trình tự này thay đổi khác nhau nhưng đủ dài để đảm bảo rằng protein (được mã hóa) này là có độc tính trừ sâu.

Việc cải biến gen để tạo ra cấu trúc đột biến bằng cách sử dụng các kỹ thuật chuẩn, như kỹ thuật đột biến điểm đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này là việc dễ dàng. Ví dụ về phương pháp khác được mô tả trong US 5605793, trong đó các đoạn ADN được cắt ngẫu nhiên và tiếp đó ráp lại các đoạn này để tạo ra nhiều phân tử khác nhau. Các endonucleaza thương mại có thể được sử dụng để tạo ra các đoạn gen từ gen có chiều dài toàn vẹn, và các exonucleaza cũng có thể được thực hiện theo các quy trình kỹ thuật chuẩn. Ví dụ, các enzym như *Bal31* hoặc đột biến điểm trực tiếp có thể sử dụng để loại bỏ nucleotit đặc hiệu ra khỏi đầu của các gen này. Có nhiều enzym giới hạn có thể được sử dụng để thu được các đoạn hoạt tính mang mã của gen. Ngoài ra, các đoạn mang hoạt tính của các độc tố này có thể thu được bằng cách trực tiếp sử dụng các proteaza.

Theo sáng chế, protein tương ứng và/hoặc gen mã hóa các protein này có thể thu được bằng cách phân lập từ *B.t* và/hoặc thư viện ADN. Có nhiều cách để thu được protein có hoạt tính trừ sâu theo sáng chế. Ví dụ, lượng kháng thể kháng đặc hiệu protein có hoạt tính trừ sâu được mô tả và được bảo hộ theo sáng chế có thể được sử dụng để xác định và phân lập các loại protein khác nhau từ phức hợp protein. Cụ thể là, kháng thể này có thể tăng kháng phần bảo toàn nhất của protein và phần khác biệt nhất từ protein của *B.t*. khác. Các kháng thể này có thể được sử dụng cho protein có tính đặc hiệu tương ứng với hoạt tính đặc trưng bằng cách sử dụng các phương pháp tiếp hợp miễn dịch, phương pháp phân tích hấp phụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA) hoặc phương pháp phân tích thẩm tách Western. Để dàng tạo ra protein kháng kháng thể, các protein tương đương hoặc các mảnh của chúng được bọc lộ theo sáng chế bằng cách sử dụng các kỹ thuật chuẩn trong lĩnh vực kỹ thuật này. Gen mã hóa các protein này có thể thu được từ vi sinh vật..

Do có nhiều các codon di truyền, nên cũng có nhiều trình tự ADN khác nhau có thể mã hóa cho cùng loại trình tự axit amin. Người có trình độ trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể dễ dàng thu được trình tự ADN thay thế mã hóa cho cùng hoặc về cơ bản là cùng một protein. Các trình tự DNA khác nhau cũng bao hàm theo sáng chế. Thuật ngữ “về cơ bản là cùng” protein chỉ trình tự axit amin xác định được thay thế, xóa đoạn hoặc chèn đoạn hoặc bổ sung nhưng về cơ bản hoạt tính trừ sâu không bị ảnh hưởng, và cũng bao gồm cả các mảnh có hoạt tính trừ sâu.

Việc thay thế, chèn đoạn hoặc loại bỏ một số trình tự axit amin theo sáng chế là kỹ thuật thông thường trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo một số phương án, các sự thay đổi trình tự axit amin như vậy bao gồm: sự thay đổi nhỏ về đặc tính, nghĩa là khi thay thế một số axit amin được bảo tồn, thì điều này về cơ bản không ảnh hưởng đến

sự gấp nếp và/hoặc hoạt tính của protein; việc loại bỏ đoạn ngắn, thường cắt bỏ khoảng từ 1 đến 30 axit amin; gắn thêm một đoạn ngắn vào đầu amin hoặc carboxyl, như các gốc methionin ở tại đầu amin; gắn thêm một đoạn peptit ngắn, như là khoảng từ 20 đến 25 gốc theo chiều dài.

Các ví dụ về gốc thế bảo toàn là sự thay thế xảy ra trong các nhóm axit amin sau: axit amin bazơ (như arginin, lysin và histidin), axit amin axit (như axit glutamic và axit aspartic), axit amin phân cực (ví dụ, glutamin và asparagin), axit amin ưa nước (như leuxin, isoleuxin, và valin), axit amin thơm (ví dụ, phenylalanin, tryptophan và tyrosin), và các axit amin phân tử lượng nhỏ (như glyxin, alanin, serin và threonin và methionin). Axit amin thay thế không thay đổi tính đặc hiệu nói chung là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và đã được mô tả trong, ví dụ, ấn phẩm "Protein" của N. Neurath và R. L. Hill, xuất bản năm 1979 bởi Academic Press, New York. Các gốc thế thông dụng nhất là Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/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 bảo toàn của chúng.

Rõ ràng, đối với người có trình độ trong lĩnh vực kỹ thuật này, đã biết là việc thay thế như vậy có thể xảy ra bên ngoài vùng quan trọng quyết định chức năng của phân tử mà vẫn tạo ra phân tử polypeptit có hoạt tính. Đối với polypeptit theo sáng chế, gốc axit amin cần có hoạt tính và được coi là gốc không thể thay thế có thể được xác định theo các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, như đột biến điểm trực tiếp hoặc đột biến sàng lọc alanin (ví dụ, xem: Cunningham and Wells, 1989, Science 244:1081-1085). Kỹ thuật mới đây được thực hiện bằng cách đưa vào các điểm đột biến vào tất cả các gốc có thể thay thế trong phân tử và phát hiện hoạt tính trừ sâu của phân tử đột biến thu được sao cho nhận biết được gốc axit amin quan trọng đối với hoạt tính của phân tử đó. Vị trí tương tác enzym-cơ chất này cũng có thể được xác định bằng các phân tích trong cấu trúc ba chiều, một phương pháp có thể xác định được thông qua các phương pháp như phương pháp phân tích cộng hưởng từ hạt nhân (NMR), tinh thể học, hoặc đánh dấu quang ái lực (ví dụ, xem; 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 Cry1F bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các protein Cry1Fa2, Cry1Fa3, Cry1Fb3, Cry1Fb6 hoặc Cry1Fb7, hoặc các đoạn có hoạt tính trừ sâu với hoạt tính phòng trừ *Sesamia inferen*, toàn bộ trình tự axit amin có độ tương đồng về trình tự đạt ít nhất là 70% so với protein được đề cập ở trên.

Do đó, trình tự axit amin có độ tương đồng cụ thể với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 1 và/hoặc SEQ ID No. 2 cũng thuộc phạm vi của sáng chế. Độ đồng nhất/độ tương đồng trình tự giữa các trình tự này và các trình tự theo sáng chế thường lớn hơn 60%, tốt hơn là lớn hơn 75%, tốt hơn nữa là lớn hơn 80%, thậm chí tốt hơn

nữa là lớn hơn 90% và tốt hơn nữa là lớn hơn 95%. Các polynucleotit và protein ưu tiên theo sáng chế cũng có thể được xác định theo một hoặc nhiều khoảng đặc hiệu của độ đồng nhất và/hoặc độ tương đồng. Ví dụ, chúng có thể có độ tương đồng và/hoặc độ 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 theo sáng chế.

Trình tự điều hòa theo sáng chế bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, trình tự khởi đầu, peptit chuyển, trình tự kết thúc, trình tự tăng cường, trình tự dẫn đầu, intron và các trình tự điều hòa khác có thể liên kết một cách có kiểm soát được với trình tự protein Cry1F.

Trình tự khởi đầu là trình tự khởi đầu có thể biểu hiện ở cây trồng, trong đó thuật ngữ “trình tự khởi đầu có thể biểu hiện ở cây trồng” chỉ trình tự mà nó đảm bảo trình tự mang mã liên kết với trình tự khởi đầu đó và có thể biểu hiện trong tế bào cây trồng. Trình tự khởi đầu có thể biểu hiện ở cây trồng này có thể là trình tự khởi đầu cơ định. Ví dụ về trình tự khởi đầu này có khả năng trực tiếp biểu hiện cơ định ở cây trồng, nhưng không bị giới hạn ở, trình tự khởi đầu 35S có nguồn gốc từ virus khảm súp lơ, trình tự khởi đầu Ubi, trình tự khởi đầu của gen *GOS2* có nguồn gốc từ cây lúa nước và các trình tự khởi đầu tương tự. Theo cách khác, trình tự khởi đầu có khả năng biểu hiện ở cây trồng có thể là trình tự khởi đầu đặc hiệu mô, có nghĩa là mức biểu hiện của trình tự này trực tiếp biểu hiện ở một số loại mô cây trồng như trong mô diệp lục, là cao hơn so với các loại mô khác của cây trồng (có thể được xác định bằng thử nghiệm kiểm tra RNA thông thường), như trình tự khởi đầu PEP carboxylaza. Theo cách khác, trình tự khởi đầu này có thể biểu hiện ở cây trồng có thể là trình tự khởi đầu làm lành vết thương. Trình tự khởi đầu làm lành vết thương hoặc trình tự khởi đầu mà biểu hiện trực tiếp làm lành vết thương chỉ trình tự khởi đầu mà mức biểu hiện của trình tự mang mã tăng lên đáng kể so với cây ở trong trạng thái phát triển bình thường khi cây này bị gây tổn thương bằng biện pháp cơ khí hoặc tổn thương gây ra bởi côn trùng gặm. Ví dụ về trình tự khởi đầu làm lành vết thương bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở trình tự khởi đầu của gen ức chế proteaza của cà chua, khoai tây (pin I và pin II) và trình tự khởi đầu của gen ức chế proteaza của ngô (MPI).

Peptit chuyển (còn được gọi là trình tự tín hiệu tín hiệu ghi chép hoặc trình tự dẫn đầu) trực tiếp của sản phẩm gen đến cơ quan hoặc khoang nội chất. Đối với protein thụ thể, peptit chuyển có thể là tương đồng. Ví dụ, trình tự mã hóa peptit chuyển diệp lục được sử dụng để dẫn lập lục; hoặc trình tự dự trữ ‘KDEL’ được sử dụng để dẫn vào mạng lưới nội chất hoặc CTPP của gen mã hóa lectin của lúa mạch được sử dụng để dẫn vào không bào.

Trình tự dẫn đầu bao gồm, nhưng không giới hạn ở, trình tự dẫn đầu virus ARN

nhỏ, như trình tự dẫn đầu EMCV (vùng mang mã đầu 5' của virus encephalomyocarditis); trình tự dẫn đầu của virus Y của khoai tây, như trình tự dẫn đầu MDMV (virus gây lùn khảm ngô); protein chuỗi nặng của globulin miễn dịch của người (BiP); trình tự dẫn đầu không được dịch mã của mRNA protein vỏ của virus khảm cỏ linh lăng (AMV RNA4); trình tự dẫn đầu virus khảm khoai tây (TMV).

Trình tự tăng cường bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, trình tự tăng cường của virus khảm súp lơ (CaMV), trình tự tăng cường của virus khảm Figwort (FMV), trình tự tăng cường của virus vòng axit cây cẩm chướng (CERV), trình tự tăng cường của virus khảm mao mạch cây sắn (CsVMV), trình tự tăng cường virus khảm mirabilis (MMV), trình tự tăng cường của virus gây vàng xoắn lá *Cestrum* CmYLCV), trình tự tăng cường gây xoắn lá cây bông Multan (CLCuMV), trình tự tăng cường của virus gây đốm vàng lá cây *Commelina* (CoYMV) và trình tự tăng cường virus caulimo gây bệnh úa vàng cho cây lạc (PCLSV).

Đối với các ứng dụng cho cây một lá mầm, các intron bao gồm, nhưng không giới hạn ở các intron hsp70 của cây ngô, các intron ubiquitin của cây ngô, intron Adh 1, intron sucroza synthaza hoặc intron Act1 của cây lúa nước. Đối với các ứng dụng cho cây trồng hai lá mầm, các intron bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các intron CAT-1, intron pKANNIBAL, intron PIV2 và intron “siêu ubiquitin”.

Trình tự kết thúc có thể chứa trình tự tín hiệu polyadenyl hóa đóng vai trò ở cây trồng. Chúng bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, trình tự tín hiệu polyadenyl hóa thu được từ gen nipalin synthetaza (NOS) của *Agrobacterium tumefaciens*, trình tự tín hiệu polyadenyl hóa có nguồn gốc từ gen ức chế proteaza II (pin II), trình tự tín hiệu polyadenyl hóa có nguồn gốc từ gen ssRUBISCO E9 của đậu Hà Lan và trình tự tín hiệu polyadenyl hóa có nguồn gốc từ gen α -tubulin.

Thuật ngữ “liên kết một cách có kiểm soát” theo sáng chế chỉ đến mỗi liên kết của trình tự axit nucleic, mà liên kết này cung cấp chức năng cần thiết của trình tự liên kết. Thuật ngữ “liên kết một cách có kiểm soát” theo sáng chế có thể là liên kết với trình tự khởi đầu với trình tự quan tâm, mà liên kết này khiến phiên mã được các trình tự này trong điều kiện có kiểm soát và điều hòa bởi trình tự liên kết đó. Nếu trình tự quan tâm mã hóa protein và việc biểu hiện protein này là cần thiết thì thuật ngữ “liên kết một cách có kiểm soát” chỉ mỗi liên kết của trình tự khởi đầu và trình tự này sao cho có thể phiên mã để dịch mã một cách có hiệu quả. Mỗi liên kết giữa trình tự khởi đầu này và trình tự mã hóa thu được trong phiên mã protein dung hợp và biểu hiện protein này là cần thiết thì những mỗi liên kết được tạo ra này sẽ đảm bảo codon thứ nhất khởi đầu phiên mã của đoạn phiên mã thu được là codon khởi đầu của trình tự mang mã. Theo cách khác, nếu mỗi liên kết của trình tự khởi đầu này và trình tự mang mã có được kết quả thu được sự dung hợp dịch mã và biểu hiện protein mã hóa này là cần thiết thì những liên kết như vậy tạo ra để đảm bảo cho điểm thứ đầu tiên của codon

khởi đầu dịch mã của trình tự đầu 5' không dịch mã liên kết được với trình tự khởi đầu phiên mã này, và những mối liên kết như vậy tạo ra mối quan hệ giữa sản phẩm dịch mã thu được và khung đọc mở mã hóa protein quan tâm thỏa mãn khung đọc đó. Trình tự axit nucleic mà có thể liên kết một cách có kiểm soát bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, trình tự cung cấp chức năng cho biểu hiện gen (nghĩa là thành phần biểu hiện gen, như trình tự khởi đầu, vùng không dịch mã đầu 5', các intron, vùng mã hóa protein, vùng không dịch mã đầu 3', vị trí polyadenyl hóa và/hoặc trình tự kết thúc phiên mã); các trình tự cung cấp chức năng của việc chuyển và/hoặc kết hợp ADN (nghĩa là trình tự biên T-ADN, vị trí nhận biết enzym tái tổ hợp đặc hiệu điểm, vị trí nhận biết điểm enzym hợp nhất); trình tự chức năng có thể cho phép lựa chọn được (nghĩa là, trình tự chỉ thị kháng chất kháng sinh, gen sinh tổng hợp); trình tự cung cấp chức năng của chất chỉ thị chấm điểm; trình tự hỗ trợ hoạt động của trình tự *in vitro* hoặc *in vivo* (trình tự đa liên kết, trình tự tái tổ hợp đặc hiệu điểm) và trình tự cho phép phiên mã (nghĩa là, điểm khởi đầu phiên mã của vi khuẩn, trình tự phiên mã tự động, trình tự, trình tự trung tâm).

Thuật ngữ “trừ sâu” theo sáng chế có nghĩa là gây độc cho sâu hại mùa màng. Cụ thể là, côn trùng đích là sâu *Sesamia inferens* Walker.

Protein Cry1F theo sáng chế gây độc cho sâu *Sesamia inferens* Walker. Cây trồng được đề cập theo sáng chế, cụ thể là lúa miến và ngô, chứa ADN ngoại lai trong hệ gen của chúng. ADN ngoại lai này có chứa trình tự nucleotit mã hóa protein Cry1F. Khi *Sesamia inferens* tiếp xúc với protein Cry1Fa thông qua việc ăn mô của cây chuyển gen này, sự sinh trưởng của *Sesamia inferens* bị ức chế và thậm chí gây chết *Sesamia inferens*. Thuật ngữ “ức chế” chỉ việc gây chết hoặc gần chết. Đồng thời, cây trồng này phải bình thường về mặt hình thái học, và có thể thu hoạch được bằng cách thông thường để tiêu thụ và/hoặc sản sinh ra sản phẩm. Ngoài ra, yêu cầu về thuốc trừ sâu sinh học hoặc hóa học của cây trồng đó có thể hầu như không cần thiết (thuốc trừ sâu sinh học hoặc hóa học của cây trồng đó có thể hầu như không cần thiết (thuốc trừ sâu sinh học hoặc hóa học này là loại thuốc để phòng trừ *Sesamia inferens* được hướng đích bởi protein Cry1F).

Mức độ biểu hiện của protein tinh thể có hoạt tính trừ sâu (pesticidal crystal protein: ICP) trong vật liệu cây trồng có thể được xác định thông qua nhiều phương pháp khác nhau trong lĩnh vực kỹ thuật này, như phương pháp định lượng mRNA mã hóa protein có hoạt tính trừ sâu trong mô thông qua việc sử dụng các đoạn môi đặc hiệu hoặc thông qua các phương pháp định lượng protein có hoạt tính trừ sâu một cách trực tiếp và đặc hiệu.

Hiệu quả trừ sâu của ICP ở cây trồng có thể được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp thử kiểm tra khác nhau. Sâu hại đích theo sáng chế chủ yếu là *Sesamia inferens*.

Protein Cry1F theo sáng chế có thể có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1

và/hoặc SEQ ID NO: 2 trong danh mục trình tự. Protein này không chỉ chứa vùng mã hóa protein Cry1F mà còn chứa các thành phần khác, như thành phần mã hóa protein chỉ thị có thể chọn lọc được.

Ngoài ra, các cát xét biểu hiện chứa trình tự nucleotit mã hóa protein Cry1F theo sáng chế cũng có thể đồng biểu hiện với ít nhất một loại protein mã hóa bởi một gen kháng thuốc diệt cỏ ở cây trồng, kết quả là cây trồng chuyển gen thu được này có cả hoạt tính trừ sâu và hoạt tính kháng thuốc diệt cỏ. Gen kháng thuốc diệt cỏ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các gen kháng glufosinat (như gen *bar* và gen *pat*), gen kháng phenmedipham (như gen *pmph*), gen kháng glyphosat (như gen EPSPS), gen kháng bromoxynil, gen kháng sulfonyleurea, gen kháng dalapon, gen kháng cyanamid hoặc gen kháng chất ức chế sinh tổng hợp glutamin (như PPT).

Theo sáng chế, ADN gen ngoại lai được đưa vào cây trồng. Ví dụ, các gen, có vectơ tái tổ hợp hoặc cát xét biểu hiện mã hóa protein Cry1F được đưa và đưa vào trong tế bào cây trồng. Các phương pháp chuyển gen thông thường nhưng không giới hạn ở, chuyển nạp bằng *Agrobacterium*, bắn vi đạn, trực tiếp đưa ADN vào trong tế bào chất, điện chuyển hoặc chuyển ADN bằng silicon.

Phương pháp trừ sâu theo sáng chế có các ưu điểm sau:

1. Trừ sâu trên cơ sở nội tại. Các kỹ thuật đã biết chủ yếu kiểm soát sự gây hại của sâu *Sesamia inferen* bằng hoạt động bên ngoài (nghĩa là bởi yếu tố bên ngoài), như phương pháp phòng trừ sâu bằng biện pháp sinh học, phương pháp phòng trừ sâu bằng biện pháp hóa học và phương pháp phòng trừ sâu bằng biện pháp sinh học; trong khi đó phương pháp phòng trừ sâu theo sáng chế trừ sâu *Sesamia inferen* thông qua protein Cry1F được tạo ra ở cây trồng mà có khả năng tiêu diệt sâu *Sesamia inferen*.

2. Không gây ô nhiễm và không có dư lượng hóa chất. Mặc dù phương pháp phòng trừ sâu bằng biện pháp hóa học được sử dụng trong kỹ thuật đã biết đã có vai trò trong việc phòng trừ *Sesamia inferen*, nhưng nó lại là nguyên nhân chính gây ô nhiễm, phá vỡ cân bằng hệ sinh thái đồng ruộng, tồn dư thuốc trừ sâu gây hại cho người, vật nuôi; thông qua việc phòng trừ sâu *Sesamia inferen* bằng phương pháp theo sáng chế, các tác động có hại nêu trên có thể được loại trừ.

3. Việc phòng trừ sâu kéo dài trong suốt quá trình sinh trưởng. Mỗi phương pháp phòng trừ sâu *Sesamia inferen* được sử dụng trong các kỹ thuật đã biết là theo tình trạng sâu bệnh, trong khi đó phương pháp phòng trừ sâu theo sáng chế có khả năng bảo vệ cây trồng trong toàn bộ quá trình phát triển của cây trồng đó. Cây trồng chuyển gen (protein Cry1F) có thể loại trừ sự phá hoại của *Sesamia inferen* từ mầm, phát triển cho đến khi ra hoa và thu sản phẩm.

4. Phòng trừ cho toàn bộ cây trồng. Phần lớn các phương pháp phòng trừ sâu *Sesamia inferen* đã biết chỉ phòng trừ cục bộ, như phun lên bề mặt lá. Trong khi

phương pháp theo sáng chế bảo vệ toàn bộ cây trồng khỏi *Sesamia inferen*, như lá, thân, hoa đực, bắp, bao phấn và bẹ xò của cây trồng chuyển gen (protein Cry1F).

5. Hiệu quả ổn định. Thuốc trừ sâu sinh học được sử dụng trong các kỹ thuật đã biết được phun trực tiếp lên cây trồng, kết quả là gây biến tính protein tinh thể hoạt động (kể cả protein Cry1F) trong môi trường. So với phương pháp theo sáng chế, protein Cry1F được biểu hiện ở cây trồng, do đó khắc phục được nhược điểm thiếu ổn định trong môi trường của các thuốc trừ sâu sinh học. Hơn nữa, hiệu quả trừ sâu của cây trồng chuyển gen (protein Cry1F) theo sáng chế là ổn định và không bị ảnh hưởng bởi vị trí địa lý khác nhau, thời gian và cơ sở di truyền khác nhau.

6. Phương pháp theo sáng chế đơn giản, thuận tiện và kinh tế. Thuốc trừ sâu sinh học được sử dụng trong các kỹ thuật đã biết dễ bị biến tính trong môi trường, và do đó việc tái sản xuất và ứng dụng bị hạn chế, điều này khiến cho khó khăn trong thực tiễn sản xuất nông nghiệp và do đó làm gia tăng chi phí. Theo sáng chế, điều duy nhất là trồng cây chuyển gen biểu hiện protein Cry1F mà không cần đến các biện pháp khác, do đó tiết kiệm được nhân lực, vật liệu và nguồn tài chính.

7. Hiệu quả triệt để. Hiệu quả phòng trừ của các phương pháp đã biết để phòng trừ sâu *Sesamia inferen* là không triệt để và có thể chỉ có hiệu quả làm giảm nhẹ dịch hại. Trong khi đó, cây trồng chuyển gen (protein Cry1F) theo sáng chế có thể làm chết hàng loạt ấu trùng *Sesamia inferen* mới nở. Hơn nữa, nó cũng kìm hãm đáng kể tiến trình phát triển của lượng nhỏ ấu trùng còn sống sót. Sau 3 ngày, lượng ấu trùng còn sống sót này vẫn ở trạng thái mới nở hoặc giữa trạng thái mới nở và trạng thái kiểm soát âm, là trạng thái ấu trùng rất chậm phát triển, và sự phát triển của chúng bị ngừng lại. Tuy nhiên, cây trồng chuyển gen bị tổn hại không đáng kể.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Phương pháp phòng trừ sâu theo sáng chế sẽ được minh họa hơn nữa thông qua các ví dụ dưới đây.

Ví dụ 1: Thu nhận và tổng hợp gen *Cry1Fa*

1. Thu nhận trình tự nucleotit Cry1Fa

Trình tự axit amin của protein có hoạt tính trừ sâu Cry1Fa-01 (605 axit amin) được nêu trong SEQ ID NO: 1 trong danh mục trình tự; trình tự nucleotit của gen Cry1Fa-01 (1818 nucleotit) mã hóa trình tự axit amin tương ứng của protein có hoạt tính trừ sâu Cry1Fa-01 (605 axit amin) được nêu trong SEQ ID NO: 3 trong danh mục trình tự; trình tự axit amin của protein Cry1Fa-02 có hoạt tính trừ sâu (1148 axit amin) được nêu trong SEQ ID NO: 2 trong danh mục trình tự; trình tự nucleotit của gen Cry1Fa-02 (3447 nucleotit) mã hóa trình tự axit amin tương ứng của Cry1Fa-02 protein có hoạt tính trừ sâu (1148 axit amin) được nêu trong SEQ ID NO: 4 trong danh

mục trình tự.

2. Thu nhận các trình tự nucleotit của Cry1Ab và Vip3A

Trình tự nucleotit của Cry1Ab (1848 nucleotit) mã hóa trình tự axit amin tương ứng của protein Cry1Ab có hoạt tính trừ sâu (615 axit amin) được nêu trong SEQ ID NO: 5 trong danh mục trình tự và trình tự nucleotit của Vip3A (2370 nucleotit) mã hóa trình tự axit amin tương ứng của protein có hoạt tính trừ sâu Vip3A (789 axit amin) được nêu trong SEQ ID NO: 6 trong danh mục trình tự.

3. Tổng hợp các trình tự nucleotit nêu trên

Trình tự nucleotit Cry1Fa-01 (nêu trong SEQ ID NO: 3 trong danh mục trình tự), trình tự nucleotit Cry1Fa-02 (nêu trong SEQ ID NO: 4 trong danh mục trình tự), trình tự nucleotit Cry1Ab (nêu trong SEQ ID NO: 5 trong danh mục trình tự) và trình tự nucleotit Vip3A (nêu trong SEQ ID NO: 6 trong danh mục trình tự) được tổng hợp bởi công ty GenScript CO., LTD, Nam Kinh, Trung Quốc. Trình tự nucleotit Cry1Fa-01 tổng hợp được (SEQ ID NO: 3) được liên kết với một vị trí giới hạn *AscI* ở đầu 5' và vị trí giới hạn *BamHI* ở đầu 3'. Trình tự nucleotit Cry1Fa-02 tổng hợp được (SEQ ID NO: 4) được liên kết với một vị trí giới hạn *AscI* ở đầu 5' và một vị trí giới hạn *BamHI* ở đầu 3'. Trình tự nucleotit Cry1Ab tổng hợp được (SEQ ID NO: 5) được liên kết với một vị trí giới hạn *NcoI* ở đầu 5' và một vị trí giới hạn *SwaI* ở đầu 3'. Trình tự nucleotit Vip3A tổng hợp được (SEQ ID NO: 6) được liên kết với một vị trí giới hạn *ScaI* ở đầu 5' và một vị trí giới hạn *SpeI* ở đầu 3'.

Ví dụ 2: Thiết kế các vector biểu hiện tái tổ hợp và sự chuyển nạp *Agrobacterium* bằng các vector biểu hiện tái tổ hợp này

1. Thiết kế các vector nhân dòng tái tổ hợp chứa *gen Cry1F*

Trình tự nucleotit Cry1Fa-01 tổng hợp được được nhân dòng phụ vào vector nhân dòng pGEM-T (Promega, Madison, USA, CAT: A3600), để thu được vector nhân dòng DBN01-T theo các chỉ dẫn của vector Promega pGEM-T, và quy trình thiết kế được thể hiện trên Fig.1 (trong đó Amp là gen kháng ampicilin; f1 là bản sao ban đầu 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; Cry1Fa-01 là trình tự nucleotit Cry1Fa-01 (SEQ ID NO: 3); MCS các vị trí nhân đa dòng).

Sau đó, vector nhân dòng tái tổ hợp DBN01-T được chuyển vào tế bào chức năng T1 của *E. coli* (Transgen, Bắc Kinh, Trung Quốc, CAT: CD501) bằng phương pháp sốc nhiệt. Các điều kiện sốc nhiệt là như sau: 50µl các tế bào chức năng T1 của *E. coli* và 10µl plasmit ADN (vector nhân dòng tái tổ hợp DBN01-T) được ủ trong bể nước ở 42°C trong 30 giây. Sau đó các tế bào *E. coli* được ủ trong bể nước ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ (trong thiết bị lắc ở tốc độ 100 vòng/phút) và sau đó được nuôi trong khay

LB (trypton 10g/l, chiết suất men 5g/l, NaCl 10g/l, aga 15g/l, trị số pH được điều chỉnh đến 7,5 bằng NaOH) được phủ bề mặt bằng IPTG (Isopropyl thio-beta-D-galactoseglucosit), X-gal (5-brom-4-clo -3-indole-beta-D-galactosa glucosit) và ampicilin (100mg/l) qua đêm. Các khuẩn lạc màu trắng được chọn ra và được nuôi qua đêm trong môi trường LB (10g/l Trypton, 5g/l chiết suất men, 10g/l NaCl, 100mg/l ampicilin và pH được điều chỉnh tới 7,5 bằng NaOH) ở nhiệt độ 37°C. Các plasmit của nó được chiết tách bằng cách sử dụng phương pháp tiêu kiềm như sau: nước chứa tế bào này được quay ly tâm trong 1 phút ở tốc độ 12000 vòng/phút, dịch nổi được loại bỏ và phần hạt chìm được tạo huyền phù lại trong 100µl dung dịch được làm lạnh bằng đá I (25mM Tris- HCl, 10mM EDTA (axit etylenediaminetetraaxetic) và 50mM glucoza, pH=8,0); sau đó 150µl dung dịch mới được chuẩn bị II (0,2M NaOH, 1% SDS (natri dodecyl sunfat)) được thêm vào và ống này được xoay ngược bốn lần, được trộn và sau đó được đặt vào nước đá trong thời gian 3 đến 5 phút; 150µl dung dịch lạnh III (kali axetat 4M, axit axetic 2M) được thêm vào, trộn kỹ ngay lập tức và được ủ trong đá trong 5 đến 10 phút; hỗn hợp này được quay ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút trong thời gian 5 phút ở nhiệt độ 4°C, 2 lần thể tích của etanol được khử nước được thêm vào phần dịch nổi, được trộn và sau đó được đặt ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 5 phút, hỗn hợp này được quay ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút trong thời gian 5 phút ở nhiệt độ 4°C và phần dịch nổi được loại bỏ, phần viên được rửa bằng 70% etanol (thể tích/thể tích); 30µl TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH=8,0) chứa RNase (20µg /ml) được cho thêm vào để hòa tan kết tủa; hỗn hợp này được ủ ở nhiệt độ 37°C trong bể nước trong thời gian 30 phút để phân giải RNA và được bảo quản ở nhiệt độ - 20°C để sử dụng về sau.

Sau khi các plasmit chiết tách được được xác nhận với các enzym giới hạn AscI và BamHI, các dòng dương được xác nhận thông qua việc giải trình tự. Các kết quả đã cho thấy rằng trình tự nucleotit Cry1Fa-01 được chèn vào vector nhân dòng tái tổ hợp DBN01-T là trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 3 trong danh mục trình tự, điều này cho thấy việc trình tự nucleotit Cry1Fa-01 đã được chèn một cách chính xác.

Trình tự nucleotit Cry1Fa-02 tổng hợp được được chèn vào vector nhân dòng pGEM-T để thu được vector nhân dòng tái tổ hợp DBN02-T theo quy trình thiết kế vector nhân dòng DBN01-T được mô tả ở trên, trong đó Cry1Fa-02 là trình tự nucleotit Cry1Fa-02 (SEQ ID NO: 4). Trình tự nucleotit Cry1Fa-02 trong vector nhân dòng tái tổ hợp DBN02-T được xác nhận là đã được chèn một cách chính xác bằng việc giải trình tự và phân giải bằng enzym giới hạn.

Trình tự nucleotit Cry1Ab tổng hợp được được chèn vào vector nhân dòng pGEM-T để thu được vector nhân dòng tái tổ hợp DBN03-T theo quy trình thiết kế vector nhân dòng DBN01-T như được mô tả ở trên, trong đó Cry1Ab là trình tự nucleotit Cry1Ab (SEQ ID NO: 5). Trình tự nucleotit Cry1Ab trong vector nhân dòng tái tổ hợp DBN03-T được xác nhận là đã được chèn một cách chính xác bằng việc giải

trình tự và phân giải bằng enzym giới hạn.

Trình tự nucleotit Vip3A tổng hợp được được chèn vào vector nhân dòng pGEM-T để thu được vector nhân dòng tái tổ hợp DBN04-T theo quy trình thiết kế vector nhân dòng DBN01-T như được mô tả ở trên, trong đó Vip3A là trình tự nucleotit Vip3A (SEQ ID NO: 6). Trình tự nucleotit Vip3A trong vector nhân dòng tái tổ hợp DBN04-T được xác nhận là đã được chèn một cách chính xác bằng việc giải trình tự và phân giải bằng enzym giới hạn.

2. Thiết kế các vector biểu hiện tái tổ hợp chứa gen Cry1F

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 AscI và BamHI. Các mảnh trình tự nucleotit Cry1Fa-01 tách được được chèn vào giữa các vị trí giới hạn AscI và BamHI của vector biểu hiện DBNBC-01 để thiết kế vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100014. Đó là một phương pháp truyền thống đã biết rõ để thiết kế vector biểu hiện thông qua việc phân giải enzym giới hạn. Sơ đồ thiết kế được nêu trên Fig.2 (Kan: gen kanamycin; RB: đường biên bên phải; Ubi: gen khởi đầu Ubiquitin ngô (Ubiquitin) (SEQ ID NO: 7); Cry1Fa-01: trình tự nucleotit Cry1Fa-01 (SEQ ID NO: 3); Nos, gen kết thúc của gen nopal synthetaza (SEQ ID NO: 8); PMI: gen phosphomanoza isomeraza (SEQ ID NO: 9); LB: biên bên trái).

Vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100014 được chuyển vào các tế bào chức năng *T1* của *E. coli* bằng phương pháp sốc nhiệt như sau: 50µl tế bào chức năng *T1* của *E. coli* và 10µl plasmit ADN (vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100014) được ủ trong bể nước ở nhiệt độ 42°C trong thời gian 30 giây. Sau đó các tế bào *E. coli* này được ủ trong bể nước ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 1 giờ (máy ủ rung được ở vận tốc 100 vòng/phút) và sau đó được nuôi trong khay rắn LB (10g/l Trypton, 5g/l chất chiết men, 10g/l NaCl, 15g/l Aga và pH được điều chỉnh tới 7,5 bằng NaOH) chứa 50mg/l kanamycin ở 37°C trong thời gian 12 giờ. Các khuẩn lạc trắng được chọn ra và được nuôi cấy trong nước LB (10g/l Trypton, 5g/l chất chiết men, 10g/l NaCl, 50mg/l kanamycin và pH được điều chỉnh tới 7,5 bằng NaOH) ở nhiệt độ 37°C qua đêm. Các plasmit của nó được chiết tách bằng cách sử dụng phương pháp tiêu kiềm. Sau khi các plasmit chiết tách được được xác nhận với các enzym giới hạn AscI và BamHI, các dòng dương được xác nhận thông qua việc giải trình tự. Các kết quả đã cho thấy rằng trình tự nucleotit giữa các vị trí giới hạn AscI và BamHI trong vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100014 là trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 3 trong danh mục trình tự, tức là trình tự nucleotit Cry1Fa-01,

Theo quy trình thiết kế vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100014 như được mô tả ở trên, các vector nhân dòng tái tổ hợp DBN01-T và DBN03-T được phân giải lần lượt bằng các enzym giới hạn AscI/BamHI và NcoI/SwaI để cắt trình tự nucleotit

Cry1Fa-01 và trình tự nucleotit Cry1Ab mà sau đó được chèn vào vector biểu hiện DBNBC-01 để thu được vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100012. Việc phân giải bằng enzym giới hạn và việc giải trình tự gen đã xác nhận rằng vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100012 chứa trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 3 và SEQ ID NO: 5 trong danh mục trình tự, tức là trình tự nucleotit Cry1Fa-01 và Cry1Ab.

Theo quy trình thiết kế vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100014 như được mô tả ở trên, các vector nhân dòng tái tổ hợp DBN02-T và DBN04-T được phân giải lần lượt bằng các enzym giới hạn *AscI/BamHI* và *ScaI/SpeI* để cắt trình tự nucleotit Cry1Fa-02 và trình tự nucleotit Vip3A mà sau đó được chèn vào vector biểu hiện DBNBC-01 để thu được vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100276. Việc phân giải bằng enzym giới hạn và việc giải trình tự gen đã xác nhận rằng vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100276 chứa trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 6 trong danh mục trình tự, tức là trình tự nucleotit Cry1Fa-02 và Vip3A.

3. Sự chuyển nạp *Agrobacterium tumefaciens* bằng các vector biểu hiện tái tổ hợp

Các vector biểu hiện tái tổ hợp đã được thiết kế chính xác DBN100014, DBN100012 và DBN100276 được chuyển nạp vào *Agrobacterium* LBA4404 (Invitrogen, Chicago, USA, Cat. No: 18313-015) bằng phương pháp làm lạnh nhanh bằng nitơ lỏng như sau: 100µL *Agrobacterium* LBA4404 và 3µL plasmit ADN (vector biểu hiện tái tổ hợp) được cho vào nitơ lỏng trong 10 phút và sau đó được ủ trong bể nước ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 10 phút. Sau đó, các tế bào LBA4404 *Agrobacterium* đã được chuyển nạp được tiêm vào trong nước LB và được nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C, được quay ly tâm với tốc độ 200 vòng/phút trong thời gian 2 giờ và được phun vào khay LB chứa 50mg/l rifampicin (Rifampicin) và 100mg/l kanamycin (Kanamycin) cho đến khi các dòng đơn dương xuất hiện. Các dòng đơn dương này được chọn và được nuôi cấy và các plasmit của nó được chiết tách. Các vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100014 và DBN100012 được xác nhận với các enzym giới hạn *AhdI* và *XbaI* và vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100276 được xác nhận với các enzym giới hạn *AhdI* và *AatII*. Các kết quả đã cho thấy rằng các vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100014, DBN100012 và DBN100276 lần lượt được thiết kế chính xác.

Ví dụ 3: Thu nhận và xác nhận cây ngô chuyển gen với *Gen Cry1F* được chèn vào

1. Thu nhận cây ngô chuyển gen với *Gen Cry1F* được chèn vào

Theo phương pháp chuyển nạp *Agrobacterium* truyền thống, cây ngô Zong 31 (Z31) được nuôi cấy trong điều kiện được tiệt trùng và phôi non được đồng được nuôi cấy với các chủng *Agrobacterium* thiết kế được trong phần 3 của Ví dụ 2 để đưa T-ADNs trong các vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100014, DBN100012 và DBN100276 thiết kế được trong phần 2 của Ví dụ 2 (bao gồm trình tự gen khởi đầu

Ubiquitin ngô, trình tự nucleotit Cry1Fa-01, trình tự nucleotit Cry1Fa-02, trình tự nucleotit Cry1Ab, trình tự nucleotit Vip3A, gen PMI và trình tự kết thúc gen Nos) vào trong bộ gen ngô. Các cây ngô chứa trình tự nucleotit Cry1Fa-01, các cây ngô chứa Trình tự nucleotit Cry1Fa-01-Cry1Ab và các cây ngô chứa trình tự nucleotit Cry1Fa-02-Vip3A lần lượt được thu nhận và cây ngô kiều đại được lấy làm đối chứng.

Đối với sự chuyển nạp ngô bằng *Agrobacterium*, nói vắn tắt, phôi ngô non được phân lập từ ngô và được cho tiếp xúc với huyền phù chứa *Agrobacterium*, trong đó *Agrobacterium* có thể phân phối trình tự nucleotit Cry1Fa-01, Cry1Fa-01 trình tự nucleotit Cry1Ab hoặc trình tự nucleotit Cry1Fa-02-Vip3A tới ít nhất một tế bào của một phôi non. (Bước 1: làm nhiễm). Ở bước này, tốt hơn là, phôi non được nhúng vào huyền phù chứa *Agrobacterium* ($OD_{660} = 0,4-0,6$, môi trường làm nhiễm (4,3g/l MS muối, MS các vitamin, 300mg/l casein, 68,5g/l sucroza, 36g/l glucoza, 40mg/l Acetosyringon (AS), 1mg/l axit 2,4-dichlorophenoxyaxetic (2,4-D), pH=5,3)) để kích hoạt việc chuyển nạp. Phôi non và *Agrobacterium* được đồng nuôi cấy trong một khoảng thời gian (3 ngày) (Bước 2: bước đồng nuôi cấy). Tốt hơn là, phôi non được nuôi cấy trong môi trường rắn (4,3g/l MS muối, MS các vitamin, 300mg/l casein, 20g/l sucroza, 10g/l glucoza, 100mg/l Acetosyringon (AS), 1mg/l axit 2,4-dichlorophenoxyaxetic (2,4-D) và 8g/l Aga, pH=5,8) sau bước làm nhiễm. Sau bước đồng nuôi cấy này, bước “hồi phục” chọn lọc có thể tiếp tục. Ở bước “hồi phục” này, môi trường hồi phục (4,3g/l MS muối, MS các vitamin, 300mg/l casein, 30g/l sucroza, 1mg/l axit 2,4-dichlorophenoxyaxetic (2,4-D) và 8g/l Aga, pH=5,8) chứa ít nhất một loại chất kháng sinh ức chế *Agrobacterium* đã biết (cephamycin) mà không có tác nhân chọn lọc đối với các tế bào cây được chuyển nạp (Bước 3: bước hồi phục). Tốt hơn là, phôi non được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy rắn chứa các chất kháng sinh mà không có tác nhân chọn lọc để loại bỏ *Agrobacterium* và để tạo ra một khoảng thời gian hồi phục cho các tế bào đã được chuyển nạp. Sau đó, phôi non đã được cấy được nuôi cấy trong môi trường chứa tác nhân chọn lọc (manozax) và thể chai chuyển nạp được được lựa chọn (Bước 4: bước lựa chọn). Tốt hơn là, phôi non được nuôi cấy trong môi trường chọn lọc rắn chứa tác nhân chọn lọc (4,3g/l MS muối, MS các vitamin, 300mg/l casein, 5g/l sucroza, 12,5g/l manozax, 1mg/l axit 2,4-dichlorophenoxyaxetic (2,4-D) và 8g/l Aga, pH=5,8), thu được sự phát triển chọn lọc của các tế bào được chuyển nạp. Sau đó, thể chai được tái sinh vào cây (Bước 5: bước tái sinh). Tốt hơn là, thể chai này được nuôi cấy trong môi trường rắn chứa tác nhân chọn lọc (MS môi trường biệt hóa và MS môi trường tạo rễ) để tái sinh vào cây.

Thể chai kháng thu được được chuyển sang MS môi trường biệt hóa (4,3g/l MS muối, MS các vitamin, 300mg/l casein, 30g/l sucroza, 2mg/l 6-benzyladenin, 5g/l manozax và 8g/l Aga, pH=5,8) và được nuôi cấy và được biệt hóa ở 25°C. Các cây con đã biệt hóa được chuyển sang môi trường tạo rễ MS (2,15g/l MS muối, MS các vitamin, 300mg/l casein, 30g/l sucroza, 1mg/l axit indole-3-axetic và 8g/l Aga, pH=5,8) và được nuôi cấy đến độ cao khoảng 10 cm ở 25°C. Tiếp theo, các cây con này được

chuyển được chuyển sang và được nuôi cấy trong nhà kính cho đến khi ra bắp. Trong nhà kính, các cây ngô này được nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C trong thời gian 16 giờ và ở nhiệt độ 20°C trong thời gian 8 giờ mỗi ngày.

2. Xác nhận cây ngô chuyển gen với *gen Cry1F* được chèn vào bằng cách sử dụng kỹ thuật TaqMan

100 mg lá cây từ mỗi cây ngô được chuyển nạp (lần lượt, cây ngô được chuyển nạp với trình tự nucleotit Cry1Fa-01, trình tự nucleotit Cry1Fa-01- Cry1Ab hoặc trình tự nucleotit Cry1Fa-02-Vip3A) lần lượt được lấy làm mẫu. Bộ gen ADN của chúng được chiết tách bằng cách sử dụng DNeasy Plant Maxi Kit (Qiagen) và số lượng bản sao của *Gen Cry1F*, *Cry1Ab* và *gen Vip3A* được định lượng bằng xét nghiệm PCR định lượng huỳnh quang dựa vào đầu dò Taqman. Cây ngô kiểu dại được lấy làm đối chứng và được phân tích theo quy trình như được mô tả ở trên. Các thực nghiệm được thực hiện ba lần và các kết quả là các trị số trung bình.

Phương pháp cụ thể để phát hiện số lượng bản sao của *Gen Cry1F*, *gen Cry1Ab* và *gen Vip3A* được mô tả dưới đây.

Bước 11: 100 mg lá từ mỗi cây ngô được chuyển nạp (lần lượt cây ngô được chuyển nạp với trình tự nucleotit của Cry1Fa-01, Cry1Fa-01-Cry1Ab hoặc Cry1Fa-02-Vip3A) lần lượt được lấy và nghiền đến khi đồng nhất trong cối nghiền chứa nitơ lỏng. Mỗi mẫu được thực hiện ba lần.

Bước 12: bộ gen ADNs của các mẫu nêu trên được chiết tách bằng cách sử dụng DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) theo hướng dẫn sản phẩm.

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

Bước 14: hàm lượng bộ gen ADN được điều chỉnh đến cùng khoảng 80-100 ng/ μ l.

Bước 15: số lượng bản sao của các mẫu này được định lượng bằng cách sử dụng xét nghiệm PCR định lượng huỳnh quang dựa vào đầu dò Taqman, mẫu đã được định lượng với số lượng bản sao đã biết được lấy làm mẫu tiêu chuẩn và cây ngô kiểu dại được lấy làm đối chứng. Mỗi mẫu được thực hiện ba lần và kết quả là trị số trung bình. Các đoạn mồi và các đầu dò dùng trong xét nghiệm PCR định lượng huỳnh quang nêu trên được nêu dưới đây.

Các đoạn mồi và các đầu dò sau đây được sử dụng để phát hiện trình tự nucleotit Cry1Fa-01:

Đoạn mồi 1 (CF1): CAGTCAGGAAGTACAGTTGTAAGAGGG (của SEQ ID NO: 10 trong danh mục trình tự);

Đoạn môi 2 (CR1): ACGCGAATGGTCCTCCACTAG (của SEQ ID NO: 11 trong danh mục trình tự);

Đầu dò 1 (CP1): CGTCGAAGAATGTCTCCTCCCGTGAAC (của SEQ ID NO: 12 trong danh mục trình tự)

Các đoạn môi và các đầu dò sau đây được sử dụng để phát hiện trình tự nucleotit Cry1Ab :

Đoạn môi 3 (CF2): TGGTGGAGAACGCATTGAAAC (của SEQ ID NO: 13 trong danh mục trình tự);

Đoạn môi 4 (CR2): GCTGAGCAGAACTGTGTCAAGG (của SEQ ID NO: 14 trong danh mục trình tự);

Đầu dò 2 (CP2): CGGTTACACTCCCATCGACATCTCCTTG (của SEQ ID NO: 15 trong danh mục trình tự);

Các đoạn môi và các đầu dò sau đây được sử dụng để phát hiện trình tự nucleotit Cry1Fa-02:

Đoạn môi 5 (CF3): CAGTCAGGAAGTACAGTTGTAAGAGGG (của SEQ ID NO: 16 trong danh mục trình tự);

Đoạn môi 6 (CR3): ACGCGAATGGTCCTCCACTAG (của SEQ ID NO: 17 trong danh mục trình tự);

Đầu dò 3 (CP3): CGTCGAAGAATGTCTCCTCCCGTGAAC (của SEQ ID NO: 18 trong danh mục trình tự)

Các đoạn môi và các đầu dò sau đây được sử dụng để phát hiện trình tự nucleotit Vip3A:

Đoạn môi 7 (CF4): ATTCTCGAAATCTCCCCTAGCG (của SEQ ID NO: 19 trong danh mục trình tự);

Đoạn môi 8 (CR4): GCTGCCAGTGGATGTCCAG (của SEQ ID NO: 20 trong danh mục trình tự);

Đầu dò 4 (CP4): CTCCTGAGCCCCGAGCTGATTAACACC (của SEQ ID NO: 21 trong danh mục trình tự)

Hệ thống phản ứng PCR như sau:

JumpStart™ Taq ReadyMix™ (Sigma)	10μl
Hỗn hợp đoạn môi/đầu dò 50X	1μl

Bộ gen ADN	3µl
Nước (ddH ₂ O)	6µl

Hỗn hợp đoạn môi/đầu dò 50X chứa 45 µl mỗi đoạn môi (1mM), 50µl đầu dò (100µM) và 860µl đệm 1XTE và được bảo quản trong một ống hổ phách ở nhiệt độ 4°C.

Các điều kiện phản ứng PCR được nêu dưới đây:

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 và lặp lại 40 lần	

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

Các kết quả thực nghiệm đã cho thấy rằng trình tự nucleotit của Cry1Fa-01, Cry1Fa-01-Cry1Ab và Cry1Fa-02-Vip3A tất đều được hợp nhất vào bộ gen của cây ngô được phát hiện tương ứng. Hơn thế nữa, các cây ngô được chuyển nạp với trình tự nucleotit của Cry1Fa-01, Cry1Fa-01-Cry1Ab và Cry1Fa-02-Vip3A lần lượt chứa một bản sao của gen *Cry1F*, gen *Cry1Ab*, và/hoặc gen *Vip3A* tương ứng.

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

1. Phát hiện hàm lượng protein có hoạt tính trừ sâu ở cây ngô chuyển gen

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

Dung dịch đệm để chiết tách: 8g/l NaCl, 0,2g/l KH₂PO₄, 2,9g/l Na₂HPO₄·12 H₂O, 0,2g/l KCl, 5,5 ml/l Tween-20, pH=7,4;

Dung dịch đệm để rửa PBST: 8g/l NaCl, 0,2g/l KH₂PO₄, 2,9g/l Na₂HPO₄·12 H₂O, 0,2g/l KCl, 0,5 ml/l Tween-20, pH=7,4;

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

3 mg lá cây tươi từ mỗi cây ngô được chuyển nạp (lần lượt, cây ngô được chuyển nạp trình tự nucleotit của Cry1Fa-01, Cry1Fa-01-Cry1Ab hoặc Cry1Fa-02-Vip3A) lần lượt được lấy làm mẫu. Tất cả các mẫu này đều được nghiền trong nitơ lỏng và 800 µl dung dịch chiết tách được bổ sung thêm vào. Hỗn hợp này được quay ly tâm ở tốc độ 4000 vòng/phút trong 10 phút và phần dịch nổi trên bề mặt được pha loãng 40 lần bằng dung dịch đệm để chiết tách và 80 µl phần dịch nổi trên bề mặt đã được pha

loãng được lấy cho thử nghiệm ELISA. Tỷ lệ protein có hoạt tính trừ sâu (protein Cry1Fa, protein Cry1Ab và protein Vip3A)/khối lượng lá cây tươi được xác định bằng cách sử dụng kit ELISA (thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết bằng enzym) (ENVIRLOGIX Co., kit Cry1Fa, kit Cry1Ab và kit Vip3A) và phương pháp cụ thể được nêu trong hướng dẫn sản phẩm.

Đồng thời, các cây ngô kiểu dại và các cây ngô không chuyển gen được xác nhận bởi kỹ thuật Taqman được sử dụng làm đối chứng và được phân tích theo các phương pháp nêu trên. Có ba chủng (S1, S2, và S3) chứa trình tự nucleotit Cry1Fa-01 được chèn vào, ba chủng (S4, S5 và S6) chứa trình tự nucleotit Cry1F -01-Cry1Ab được chèn vào và ba chủng (S7, S8 và S9) chứa trình tự nucleotit Cry1Fa-02-Vip3A. Một dòng được xác nhận là cây không chuyển gen (NGM) bởi kỹ thuật Taqman và một dòng là dòng kiểu dại (CK1). Ba cây mỗi dòng được lựa chọn cho các thử nghiệm tiếp theo và mỗi cây được lặp lại sáu lần.

Hàm lượng protein có hoạt tính trừ sâu (protein Cry1Fa) trong các cây ngô chuyển gen được thể hiện trong bảng 1, hàm lượng protein có hoạt tính trừ sâu (protein Cry1Ab) trong các cây ngô chuyển gen được thể hiện trong bảng 2, hàm lượng protein có hoạt tính trừ sâu (protein Vip3A) trong các cây ngô chuyển gen được thể hiện trong bảng 3. Các tỷ lệ (ng/g) của trị số biểu hiện trung bình của protein có hoạt tính trừ sâu (protein Cry1Fa) và khối lượng lá cây tươi của các cây ngô chứa trình tự nucleotit của lần lượt Cry1Fa-01, Cry1Fa-01-Cry1Ab hoặc Cry1Fa-02-Vip3A là 3475,52, 3712,48 hoặc 3888,76. Tỷ lệ (ng/g) của trị số biểu hiện trung bình của protein có hoạt tính trừ sâu (protein Cry1Ab) và khối lượng lá cây tươi của cây ngô chứa trình tự nucleotit Cry1Fa-01-Cry1Ab là 8234,7. Tỷ lệ (ng/g) của trị số biểu hiện trung bình của protein có hoạt tính trừ sâu (protein Vip3A) và khối lượng lá cây tươi của cây ngô chứa trình tự nucleotit Cry1Fa-02-Vip3A là 3141,02. Các kết quả trên đã cho thấy rằng tất cả protein Cry1Fa, protein Cry1Ab và protein Vip3A đã được biểu hiện ở mức độ cao và ổn định ở các cây ngô nêu trên.

Bảng 1 Các trị số biểu hiện trung bình của protein Cry1Fa ở các cây ngô chuyển gen

	Trị số biểu hiện của Protein Cry1Fa ở một cây (ng/g) (lặp lại sáu lần mỗi cây)			Trị số biểu hiện của Protein Cry1Fa ở mỗi dòng (ng/g)
Dòng	1	2	3	Trị số biểu hiện trung bình (ng/g)
S1	3535,02	3697,34	2928,71	3475,52
S2	3904,88	2808,72	3044,88	
S3	3954,63	3572,96	3832,55	
S4	3039,78	3600,01	3753,22	3712,48
S5	4543,98	4251,25	3862,03	

S6	3049,4	3834,01	3478,66	
S7	3892,15	4215,07	3941,55	
S8	3905,47	3816,27	4028,96	3888,76
S9	3617,49	3795,65	3786,19	
NGM1	-0,23	0	-4,21	0
CK1	-2,36	-1,98	0	0

Bảng 2 Các trị số biểu hiện trung bình của protein Cry1Ab ở các cây ngô chuyển gen

	Trị số biểu hiện của Protein Cry1Ab trên một cây ngô (ng/g) (lặp lại sáu lần mỗi cây)			Trị số biểu hiện của Protein Cry1Ab ở mỗi dòng (ng/g)
Dòng	1	2	3	Trị số biểu hiện trung bình (ng/g)
S4	7088,4	9837,5	10626,4	8234,7
S5	9866,7	6863,3	4222,4	
S6	9912,1	7724,1	7970,9	
NGM1	-4,51	-2,44	0	0
CK1	0	-6,33	-1,97	0

Bảng 3 Các trị số biểu hiện trung bình của protein Vip3A ở cây ngô chuyển gen

	Trị số biểu hiện của Protein Vip3A trên một cây ngô (ng/g) (lặp lại sáu lần mỗi cây)			Trị số biểu hiện của Protein Vip3A ở mỗi dòng (ng/g)
Dòng	1	2	3	Các trị số biểu hiện trung bình (ng/g)
S7	2989,67	3123,65	3176,48	3141,02
S8	3205,68	3102,69	3312,03	
S9	3059,11	3246,85	3167,95	
NGM1	-1,52	0	-6,34	0
CK1	0	-0,95	-2,31	0

2. Thử nghiệm khả năng kháng côn trùng của các cây ngô chuyển gen

Khả năng kháng *Sesamia inferen* của các cây ngô được chuyển nạp trình tự nucleotit Cry1Fa-01, cây ngô được chuyển nạp trình tự nucleotit Cry1Fa-01-Cry1Ab,

cây ngô được chuyển nạp trình tự nucleotit Cry1Fa-02-Vip3A, cây ngô kiểu dại và cây ngô được xác nhận là cây không chuyển gen (NGM) bởi kỹ thuật Taqman được thử nghiệm.

Lá cây tươi của các cây ngô được chuyển nạp trình tự nucleotit Cry1Fa-01, trình tự nucleotit Cry1Fa-01-Cry1Ab hoặc trình tự nucleotit Cry1Fa-02-Vip3A, cây ngô kiểu dại và cây ngô được xác nhận là cây không chuyển gen (NGM) bởi kỹ thuật Taqman (thời kỳ V6-V8) lần lượt được lấy và được rửa bằng nước được tiệt trùng, và nước còn sót lại trên bề mặt lá cây được làm khô bằng gạc. Gân lá được loại bỏ và đồng thời lá được cắt thành các dải (1cm*2cm). Hai dải lá được đặt trên giấy lọc trên đáy của đĩa Petri tròn bằng chất dẻo. Giấy lọc được làm ướt bằng nước cất và 10 *Sesamia inferens* được nuôi nhân tạo (ấu trùng mới nở) được đặt vào đĩa Petri tròn bằng chất dẻo. Sau đó, đĩa Petri này được đậy lại và giữ trong 3 ngày trong điều kiện nhiệt độ nằm trong khoảng từ 26 đến 28°C, độ ẩm tương đối nằm trong khoảng từ 70% đến 80%, thời kỳ chiếu sáng (sáng/tối) 16 : 8. Sau đó, các số liệu về sự ăn lá cây, số ấu trùng sống sót và các điều kiện phát triển được thống kê, và tỷ lệ chết trung bình được chuẩn hóa và trọng lượng ấu trùng từ mỗi mẫu được tính toán. Tỷ lệ chết $M = (M_t - M_c) / (1 - M_c) * 100\%$, trong đó M là tỷ lệ chết trung bình được chuẩn hóa (%), M_t là tỷ lệ chết trung bình (%) của côn trùng trên các cây ngô được thử nghiệm, M_c là tỷ lệ chết trung bình (%) của côn trùng ở các cây đối chứng (CK1). Tiêu chuẩn chấm điểm khả năng kháng côn trùng được nêu trong bảng 4, ba dòng (S1, S2, và S3) của các cây ngô được chuyển nạp trình tự nucleotit Cry1Fa-01; ba dòng (S4, S5, và S6) của các cây ngô được chuyển nạp trình tự nucleotit Cry1F-01- Cry1Ab; ba dòng (S7, S8, và S9) của các cây ngô được chuyển nạp trình tự nucleotit Cry1Fa-02-Vip3A; một dòng được xác nhận là cây không chuyển gen (NGM) bởi kỹ thuật Taqman và một dòng kiểu dại (CK1) đã được lựa chọn. Ba cây mỗi dòng được thử nghiệm và mỗi cây được lặp lại 6 lần. Các kết quả được thể hiện trong bảng 5 và Fig.3.

Bảng 4 Tiêu chuẩn chấm điểm khả năng kháng côn trùng

Chấm điểm	Tỷ lệ chết được chuẩn hóa (%), điều kiện phát triển
HR (khả năng kháng cao)	85,1-100, hiếm thấy các con côn trùng thử nghiệm sống sót phát triển
R (kháng)	60,1-85, sự phát triển của các con côn trùng thử nghiệm bị kìm hãm rõ rệt
MR (khả năng kháng trung bình)	40,1-60, hoặc các con côn trùng thử nghiệm sống sót và phát triển nhưng sự phát triển của chúng phần nào bị kìm chế.

MS(mẫu cảm trung bình)	20,1-40, sự phát triển của các con côn trùng thử nghiệm hầu như bình thường.
S (mẫu cảm)	<20, các con côn trùng thử nghiệm sống sót bình thường và phát triển

Bảng 5 Khả năng kháng côn trùng của các cây ngô chuyển gen được cấy *Sesamia inferens*

	Số lượng ấu trùng		Trọng lượng tổng của ấu trùng sống sót	Tỷ lệ chết được chuẩn hóa		Trọng lượng/mỗi con côn trùng	
	Ấu trùng được đưa vào	Ấu trùng sống sót	(mg)	(%)	Trung bình	(mg)	Trung bình
S1-1	10	0	0	100		0	
S1-2	10	0	0	100		0	
S1-3	10	0	0	100		0	
S2-1	10	1	0,2	89,3		0,20	
S2-2	10	1	0,1	89,3	94,1	0,10	0,15
S2-3	10	2	0,4	78,5		0,20	
S3-1	10	0	0	100		0	
S3-2	10	0	0	100		0	
S3-3	10	1	0,1	89,3		0,10	
S4-1	10	2	0,1	78,5	91,7	0,10	0,15
S4-2	10	1	0,2	89,3		0,20	
S4-3	10	0	0	100		0	
S5-1	10	0	0	100		0	
S5-2	10	2	0,2	78,5		0,10	
S5-3	10	0	0	100		0	
S6-1	10	0	0	100		0	
S6-2	10	2	0,3	78,5	92,9	0,15	0,12
S6-3	10	0	0	100		0	
S7-1	10	0	0	100,0		0	
S7-2	10	1	0,1	89,3	92,9	0,10	0,12
S7-3	10	1	0,2	89,3		0,20	

S8-1	10	0	0	100,0		0	
S8-2	10	1	0,1	89,3		0,10	
S8-3	10	0	0	100,0		0	
S9-1	10	2	0,2	78,5		0,10	
S9-2	10	1	0,1	89,3		0,10	
S9-3	10	0	0	100,0		0	
NGM 1-1	10	8	102,2	14,0	10,4	12,78	15,32
NGM 1-2	10	8	128,9	14,0		16,11	
NGM 1-3	10	9	153,6	3,2		17,07	
CK1-1	10	9	114,4		0	12,71	16,31
CK1-2	10	10	189,3			18,93	
CK1-3	10	9	155,5			17,28	

Các kết quả của bảng 5 và Fig.3 đã cho thấy rằng tỷ lệ chết trung bình được chuẩn hóa của phần lớn các cây ngô được chuyển nạp trình tự nucleotit Cry1Fa-01, các cây ngô được chuyển nạp Cry1Fa-01-Cry1Ab và các cây ngô được chuyển nạp Cry1Fa-02-Vip3A được làm tròn trên 90%, và tỷ lệ chết trung bình được chuẩn hóa của một vài dòng lên đến 100%. So với tỷ lệ này, tỷ lệ chết trung bình được chuẩn hóa của các cây ngô kiểu dại nói chung được làm tròn là dưới 10%. So với các cây ngô kiểu dại, hiệu quả phòng trừ ấu trùng mới nở của các cây ngô được chuyển nạp trình tự nucleotit Cry1Fa-01, các cây ngô được chuyển nạp Cry1Fa-01-Cry1Ab và các cây ngô được chuyển nạp Cry1Fa-02-Vip3A hầu như là 100% và từng ấu trùng sống sót cũng hầu như ngừng phát triển. Hơn thế nữa, các cây ngô được chuyển nạp trình tự nucleotit Cry1Fa-01, các cây ngô được chuyển nạp Cry1Fa-01-Cry1Ab và các cây ngô được chuyển nạp Cry1Fa-02-Vip3A nói chung chỉ bị tổn hại không đáng kể.

Do đó, một điều đã được minh chứng là tất cả các cây ngô được chuyển nạp trình tự nucleotit Cry1Fa-01, các cây ngô được chuyển nạp Cry1Fa-01-Cry1Ab và các cây ngô được chuyển nạp Cry1Fa-02-Vip3A đã cho thấy hoạt tính kháng *Sesamia inferen* cao, mà đủ để có tác động bất lợi đến sự phát triển của *Sesamia inferen* và để phòng trừ *Sesamia inferen*.

Ví dụ 5: Thu nhận và xác nhận cây lúa chuyển gen với gen *Cry1F* được chèn vào

1. Thu nhận cây lúa chuyển gen với Gen *Cry1F* được chèn vào

Theo phương pháp chuyển nạp *Agrobacterium* truyền thống, cây lúa Japonica Nipponbare được nuôi cấy trong điều kiện được tiệt trùng và phôi non được đồng nuôi cấy với các dòng *Agrobacterium* thiết kế được trong phần 3 của Ví dụ 2 để đưa T-ADNs trong các vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100014, DBN100012 và DBN100276 thiết kế được trong phần 2 của Ví dụ 2 (bao gồm trình tự gen khởi đầu Ubiquitin ngô, trình tự nucleotit của trình tự nucleotit Cry1Fa-01, trình tự nucleotit Cry1Fa-02, trình tự nucleotit Cry1Ab, trình tự nucleotit Vip3A, gen PMI và trình tự gen kết thúc Nos) vào bộ gen của cây lúa này. Lần lượt thu được các cây lúa chứa trình tự nucleotit Cry1Fa-01, các cây lúa chứa trình tự nucleotit Cry1Fa-01-Cry1Ab và các cây lúa chứa trình tự nucleotit Cry1Fa-02-Vip3A và cây lúa kiểu dại được lấy làm đối chứng.

Đối với sự chuyển nạp cây lúa bằng *Agrobacterium*, nói vắn tắt, các hạt lúa được cấy trong môi trường kích thích (N6 muối, N6 các vitamin, 300mg/l casein, 30g/l sucroza, 2mg/l axit 2,4-dichlorophenoxyaxetic (2,4-D) và 3g/l gelatum cây trồng, pH=5,8) và thể chai được kích thích từ phôi trưởng thành của cây lúa (Bước 1: bước kích thích thể chai). Sau đó bước tiếp theo là tối ưu hóa thể chai. Thể chai này được cho tiếp xúc với huyền phù *Agrobacterium*, trong đó *Agrobacterium* có thể được phân phối trình tự nucleotit Cry1Fa-01, trình tự nucleotit Cry1Fa-01-Cry1Ab hoặc trình tự nucleotit Cry1Fa-02-Vip3A vào ít nhất một tế bào của thể chai này (Bước 2: bước làm nhiễm). Ở bước này, tốt hơn là, thể chai được nhúng vào huyền phù *Agrobacterium* ($OD_{660} = 0,3$, môi trường làm nhiễm (N6 muối, N6 các vitamin, 300mg/l casein, 30g/l sucroza, 10g/l glucoza, 40mg/l Acetosyringon (AS), 2mg/l axit 2,4-dichlorophenoxyaxetic (2,4-D), pH=5,4) để kích hoạt sự làm nhiễm. Thể chai và *Agrobacterium* được đồng được nuôi cấy trong một khoảng thời gian (3 ngày) (Bước 3: bước đồng nuôi cấy). Tốt hơn là, thể chai được nuôi cấy trong môi trường rắn (N6 muối, N6 các vitamin, 300mg/l casein, 30g/l sucroza, 10g/l glucoza, 40mg/l Acetosyringon (AS), 2mg/l axit 2,4-dichlorophenoxyaxetic (2,4-D) và 3g/l gelatum cây trồng, pH=5,8) sau bước làm nhiễm. Sau bước đồng nuôi cấy này, bước "hồi phục" có thể tiếp tục. Ở bước "hồi phục" này, môi trường hồi phục (N6 muối, N6 các vitamin, 300mg/l casein, 30g/l sucroza, 10g/l glucoza, 2mg/l axit 2,4-dichlorophenoxyaxetic (2,4-D) và 3g/l gelatum cây trồng, pH=5,8) chứa ít nhất một chất kháng sinh ức chế *Agrobacterium* đã biết (cephamycin) mà không chứa tác nhân chọn lọc đối với các tế bào cây được chuyển nạp (Bước 4: hồi phục bước). Tốt hơn là, thể chai này được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy rắn chứa chất kháng sinh mà không chứa tác nhân chọn lọc để loại bỏ *Agrobacterium* và để tạo ra thời kỳ hồi phục cho các tế bào được cấy. Sau đó thể chai đã được cấy được nuôi cấy trong môi trường chứa tác nhân chọn lọc (manozax) và thể chai được chuyển nạp được lựa chọn (Bước 5: bước lựa chọn). Tốt hơn là, thể chai này được nuôi cấy trong môi trường chọn lọc rắn chứa tác nhân chọn lọc (N6 muối, N6 các vitamin, 300mg/l casein, 10g/l sucroza, 10g/l manozax, 2mg/l axit 2,4-dichlorophenoxyaxetic (2,4-D) và 3g/l gelatum cây trồng,

pH=5,8), mà có kết quả là sự phát triển có chọn lọc của các tế bào được chuyển gen. Sau đó, các thể chai sinh sản thành cây (Bước 6: bước tái sinh). Tốt hơn là, các thể chai này được nuôi trong môi trường rắn có tác nhân chọn lọc được (N6 môi trường biệt hóa và MS môi trường tạo rễ) để tạo ra cây.

Thể chai có khả năng kháng thu được được chuyển sang môi trường biệt hóa N6 (N6 muối, N6 các vitamin, 300mg/l casein, 20g/l sucroza, 2mg/l 6-benzyladenin, 1 mg /L axit naphthylaxetic và 3g/l gelatum cây trồng, pH=5,8) và được nuôi cấy và được biệt hóa ở 25°C. Các cây con đã được biệt hóa được chuyển sang môi trường tạo rễ MS (MS muối, MS các vitamin, 300mg/l casein, 15g/l sucroza, 3g/l gelatum cây trồng, pH=5,8) và được nuôi cấy đến độ cao khoảng 10 cm ở 25°C. Tiếp theo, các cây con này được chuyển sang và được nuôi cấy trong nhà kính cho đến khi có hạt. Trong nhà kính, các cây lúa này được nuôi cấy ở 30°C mỗi ngày.

2. Xác nhận cây lúa được chuyển gen với gen *Cry1F* bằng phương pháp TaqMan

100 mg lá từ mỗi cây lúa được chuyển nạp (lần lượt, các cây lúa được chuyển nạp với trình tự nucleotit Cry1Fa-01, trình tự nucleotit Cry1Fa-01-Cry1Ab và trình tự nucleotit Cry1Fa-02-Vip3A) lần lượt được lấy làm mẫu. Bộ gen ADN của chúng được chiết tách bằng cách sử dụng DNeasy Plant Maxi Kit (Qiagen) và số lượng bản sao của gen *Cry1F*, gen *Cry1Ab* và gen *Vip3A* được định lượng bằng xét nghiệm PCR định lượng huỳnh quang dựa trên đầu dò Taqman. Cây lúa kiểu dại được lấy làm đối chứng và được phân tích theo quy trình như được mô tả ở trên. Các thử nghiệm được thực hiện ba lần và các kết quả là các trị số trung bình.

Phương pháp cụ thể để phát hiện số lượng bản sao của gen *Cry1F*, gen *Cry1Ab* và gen *Vip3A* được mô tả dưới đây.

Bước 21: 100 mg lá cây từ mỗi cây lúa được chuyển nạp (lần lượt các cây lúa được chuyển nạp trình tự nucleotit của Cry1Fa-01, Cry1Fa-01-Cry1Ab hoặc Cry1Fa-02-Vip3A) được lấy và được nghiền đến đồng nhất trong cối nghiền trong nitơ lỏng. Mỗi mẫu được thực hiện ba lần.

Bước 22: bộ gen ADN của các mẫu nêu trên được chiết tách bằng cách sử dụng kit DNeasy Plant Mini (Qiagen) theo hướng dẫn của sản phẩm.

Bước 23: hàm lượng bộ gen ADN của các mẫu nêu trên được xác định bằng cách sử dụng NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

Bước 24: hàm lượng bộ gen ADN được điều chỉnh đến trong cùng một khoảng từ 80 đến 100ng/μl.

Bước 25: số lượng bản sao của các mẫu này được định bằng xét nghiệm PCR định lượng huỳnh quang dựa trên đầu dò Taqman, mẫu đã được định lượng với số lượng bản sao đã biết được lấy làm mẫu chuẩn và cây lúa kiểu dại được lấy làm đối

chúng. Mỗi mẫu được thực hiện ba lần và các kết quả là các trị số trung bình. Các đoạn môi và các đầu dò dùng trong xét nghiệm PCR định lượng huỳnh quang nêu trên được nêu dưới đây.

Các đoạn môi và các đầu dò sau đây được sử dụng để phát hiện trình tự nucleotit Cry1Fa-01:

Các đoạn môi và các đầu dò sau đây được sử dụng để phát hiện trình tự nucleotit Cry1Fa-01:

Đoạn môi 1 (CF1): CAGTCAGGAAGTACAGTTGTAAGAGGG (của SEQ ID NO: 10 trong danh mục trình tự);

Đoạn môi 2 (CR1): ACGCGAATGGTCCTCCACTAG (của SEQ ID NO: 11 trong danh mục trình tự);

Đầu dò 1 (CP1): CGTCGAAGAATGTCTCCTCCCGTGAAC (của SEQ ID NO: 12 trong danh mục trình tự)

Các đoạn môi và các đầu dò sau đây được sử dụng để phát hiện trình tự nucleotit Cry1Ab:

Đoạn môi 3 (CF2): TGGTGGAGAACGCATTGAAAC (của SEQ ID NO: 13 trong danh mục trình tự);

Đoạn môi 4 (CR2): GCTGAGCAGAACTGTGTCAAGG (của SEQ ID NO: 14 trong danh mục trình tự);

Đầu dò 2 (CP2): CGGTTACACTCCCATCGACATCTCCTTG (của SEQ ID NO: 15 trong danh mục trình tự);

Các đoạn môi và các đầu dò sau đây được sử dụng để phát hiện trình tự nucleotit Cry1Fa-02:

Đoạn môi 5 (CF3): CAGTCAGGAAGTACAGTTGTAAGAGGG (của SEQ ID NO: 16 trong danh mục trình tự);

Đoạn môi 6 (CR3): ACGCGAATGGTCCTCCACTAG (của SEQ ID NO: 17 trong danh mục trình tự);

Đầu dò 3 (CP3): CGTCGAAGAATGTCTCCTCCCGTGAAC (của SEQ ID NO: 18 trong danh mục trình tự)

Các đoạn môi và các đầu dò sau đây được sử dụng để phát hiện Vip3A trình tự nucleotit:

Đoạn môi 7 (CF4): ATTCTCGAAATCTCCCTAGCG (của SEQ ID NO: 19

trong danh mục trình tự);

Đoạn mồi 8 (CR4): GCTGCCAGTGGATGTCCAG (của SEQ ID NO: 20 trong danh mục trình tự);

Đầu dò 4 (CP4): CTCCTGAGCCCCGAGCTGATTAACACC (của SEQ ID NO: 21 trong danh mục trình tự)

Hệ thống phản ứng PCR như sau:

JumpStart™ Taq ReadyMix™ (Sigma)	10µl
Hỗn hợp đoạn mồi/đầu dò 50X	1µl
Bộ gen ADN	3µl
Nước (ddH ₂ O)	6µl

Hỗn hợp đoạn mồi/đầu dò 50X chứa 45µl mỗi đoạn mồi (1mM), 50µl đầu dò (100µM) và 860µl đệm 1XTE và được bảo quản trong ống hồ phách ở nhiệt độ 4°C.

Các điều kiện phản ứng PCR được nêu dưới đây:

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 và lặp lại 40 lần	

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

Các kết quả thực nghiệm đã cho thấy rằng tất cả các trình tự nucleotit Cry1Fa-01, Cry1Fa-01-Cry1Ab và Cry1Fa-02-Vip3A đã được tích hợp vào bộ gen của các cây lúa được phát hiện. Hơn thế nữa, các cây lúa được chuyển nạp trình tự nucleotit Cry1Fa-01, Cry1Fa-01-Cry1Ab và Cry1Fa-02-Vip3A tương ứng chứa một bản sao của gen *Cry1F*, gen *Cry1Ab*, và/hoặc gen *Vip3A* tương ứng.

Ví dụ 6: Phát hiện protein có hoạt tính trừ sâu trên các cây lúa chuyển gen

1. Phát hiện hàm lượng của protein có hoạt tính trừ sâu các cây lúa chuyển gen

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

Dung dịch đệm để chiết tách: 8g/l NaCl, 0,2g/l KH₂PO₄, 2,9g/l Na₂HPO₄ · 12 H₂O, 0,2g/l KCl, 5,5 ml/l Tween-20, pH=7,4;

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

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

3 mg lá cây tươi từ mỗi cây lúa được chuyển nạp (lần lượt cây lúa được chuyển nạp trình tự nucleotit của Cry1Fa-01, Cry1Fa-01-Cry1Ab hoặc Cry1Fa-02-Vip3A) lần lượt được lấy làm mẫu. Tất cả các mẫu này được nghiền trong nitơ lỏng và 800 μ l dung dịch chiết tách được bổ sung vào đó. Hỗn hợp này được quay ly tâm ở tốc độ 4000 vòng/phút trong thời gian 10 phút và phần dịch nổi được pha loãng 40 lần với dung dịch đệm để chiết tách và 80 μ l phần dịch nổi trên bề mặt đã được pha loãng được sử dụng cho xét nghiệm ELISA. Tỷ lệ của protein có hoạt tính trừ sâu (protein Cry1Fa, protein Cry1Ab và protein Vip3A)/trọng lượng lá cây tươi được xác định bằng cách sử dụng kit ELISA (xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết bằng enzym) (ENVIRLOGIX Co., kit Cry1Fa, kit Cry1Ab và kit Vip3A) và phương pháp cụ thể được nêu trong hướng dẫn sản phẩm.

Đồng thời, các cây lúa kiểu dại và các cây lúa xác định được là không chuyển gen bằng kỹ thuật Taqman được lấy làm đối chứng và được phân tích theo các phương pháp nêu trên.

Có ba dòng (S10, S11, và S12) chứa trình tự nucleotit Cry1Fa-01 được chèn vào, ba dòng (S13, S14 và S15) chứa trình tự nucleotit Cry1F -01-Cry1Ab được chèn vào và ba dòng (S16, S17 và S18) chứa trình tự nucleotit Cry1Fa-02-Vip3A được chèn vào. Có một dòng xác định được là không chuyển gen (NGM2) thông qua kỹ thuật Taqman và một dòng là dòng kiểu dại kiểu dại (CK2). ba cây mỗi dòng được lựa chọn cho các thử nghiệm tiếp theo và mỗi cây được lặp lại sáu lần.

Hàm lượng protein có hoạt tính trừ sâu (Protein Cry1Fa) trong các cây lúa chuyển gen được thể hiện trong bảng 6, hàm lượng protein có hoạt tính trừ sâu (protein Cry1Ab) trong các cây lúa chuyển gen được thể hiện trong bảng 7, hàm lượng protein có hoạt tính trừ sâu (protein Vip3A) trong các cây lúa chuyển gen được thể hiện trong bảng 8, Tỷ lệ (ng/g) của trị số biểu hiện trung bình của protein có hoạt tính trừ sâu (protein Cry1Fa) và khối lượng lá cây tươi của các cây lúa chứa trình tự nucleotit của Cry1Fa-01, Cry1Fa-01-Cry1Ab hoặc Cry1Fa-02-Vip3A lần lượt là 4194,80, 4140,16 hoặc 4227,60. Tỷ lệ (ng/g) của trị số biểu hiện trung bình của protein có hoạt tính trừ sâu (protein Cry1Ab) và khối lượng lá cây tươi của cây lúa chứa trình tự nucleotit Cry1Fa-01-Cry1Ab là 13861,64. Tỷ lệ (ng/g) của trị số biểu hiện trung bình của protein có hoạt tính trừ sâu (protein Vip3A) và khối lượng lá cây tươi của cây lúa chứa trình tự nucleotit Cry1Fa-02-Vip3A là 3913,97. Các kết quả trên đã cho thấy rằng tất cả các protein Cry1Fa, protein Cry1Ab và protein Vip3A được biểu hiện ở mức cao và ổn định ở cây lúa.

Bảng 6 Các trị số biểu hiện trung bình của protein Cry1Fa ở các cây lúa chuyển gen

	Lượng Protein Cry1Fa trên mỗi cây (ng/g) (lặp lại sáu lần mỗi cây)			Trị số của lượng protein Cry1Fa đã biểu hiện trên mỗi dòng (ng/g)
Dòng	1	2	3	Trị số biểu hiện trung bình (ng/g)
S10	4922,79	4845,05	3420,91	4194,80
S11	4769,75	4316,96	3676,25	
S12	3876,94	4665,52	3259,06	
S13	4019,57	3762,15	3958,23	4140,16
S14	4586,27	4585,64	4158,94	
S15	4035,26	4062,15	4093,26	
S16	4502,02	4973,23	3278,55	4227,60
S17	3938,5	4266,58	4278,23	
S18	3664,84	4897,37	4249,15	
NGM2	-2,36	0	-3,54	0
CK2	0	-0,14	-5,18	0

Bảng 7 Các trị số biểu hiện trung bình của protein Cry1Ab trên các cây lúa chuyển gen

	Trị số biểu hiện của protein Cry1Ab trên mỗi cây ngô (ng/g) (lặp lại sáu lần mỗi cây)			Trị số biểu hiện của protein Cry1Ab ở mỗi dòng (ng/g)
Dòng	1	2	3	Trị số biểu hiện trung bình (ng/g)
S13	12359,18	15500,82	12940,71	13861,64
S14	14465,69	13589,34	13876,85	
S15	12367,59	13678,21	15976,34	
NGM2	-3,58	0	-2,45	0
CK2	0	-0,78	-5,41	0

Bảng 8 Các trị số biểu hiện trung bình của protein Vip3A trên các cây lúa chuyển gen

	Trị số biểu hiện của protein Vip3A trên một cây ngô (ng/g) (lặp lại sáu lần mỗi cây)			Trị số biểu hiện của protein Vip3A ở mỗi dòng (ng/g)
Dòng	1	2	3	Các trị số biểu hiện trung bình (ng/g)
S16	3921,15	3769,52	4016,86	3913,97
S17	3797,35	3684,75	3926,49	
S18	4035,16	3906,52	4167,95	
NGM2	-2,64	0	-5,51	0
CK2	0	-0,89	-9,31	0

2. Thử nghiệm tác dụng kháng côn trùng của các cây lúa chuyển gen

Tác dụng kháng *Sesamia inferens* của các cây lúa được chuyển nạp trình tự nucleotit Cry1Fa-01, các cây lúa được chuyển nạp trình tự nucleotit Cry1Fa-01-Cry1Ab, các cây lúa được chuyển nạp trình tự nucleotit Cry1Fa-02-Vip3A, các cây lúa kiểu dại và các cây lúa xác định được là không chuyển gen bằng kỹ thuật Taqman được thử nghiệm.

Lá cây tươi của các cây lúa được chuyển nạp trình tự nucleotit Cry1Fa-01, trình tự nucleotit Cry1Fa-01-Cry1Ab hoặc trình tự nucleotit Cry1Fa-02-Vip3A, cây lúa kiểu dại và cây lúa xác định được là không chuyển gen bằng kỹ thuật Taqman (thời kỳ ra rể) được lấy tương ứng và được rửa bằng nước được tiệt trùng, và nước còn sót lại trên bề mặt lá được làm khô bằng gạc. Gân lá được loại bỏ, và đồng thời các lá này được cắt thành các dải khoảng (1cm*3cm). Một dải được đặt trên giấy lọc trên đáy của đĩa Petri tròn bằng chất dẻo. Giấy lọc này được làm ướt bằng nước cất và 10 *Sesamia inferens* (ấu trùng mới nở) được cho vào mỗi đĩa Petri tròn bằng chất dẻo. Sau đó đĩa Petri này được đậy lại và giữ trong 3 ngày ở điều kiện nhiệt độ nằm trong khoảng từ 26 đến 28°C, độ ẩm tương đối nằm trong khoảng từ 70% đến 80%, chu kỳ chiếu sáng (sáng/tối) 16 : 8. Sau đó, các số liệu về sự ăn lá cây, số ấu trùng sống sót và các điều kiện phát triển được thống kê, và tỷ lệ chết trung bình được chuẩn hóa và trọng lượng ấu trùng từ mỗi mẫu được tính toán. Tỷ lệ chết $M = (Mt - Mc) / (1 - Mc) * 100\%$, trong đó M là tỷ lệ chết trung bình được chuẩn hóa (%), Mt là tỷ lệ chết trung bình (%) của côn trùng trên các cây lúa được thử nghiệm, Mc là tỷ lệ chết trung bình (%) của côn trùng ở các cây đối chứng (CK2). Tiêu chuẩn chấm điểm khả năng kháng côn trùng được nêu trong bảng 4. Ba dòng (S13, S14, và S15) của các cây lúa được chuyển nạp trình tự nucleotit Cry1Fa-01; ba (S13, S14, và S15) của các cây lúa được chuyển nạp trình tự nucleotit Cry1F-01- Cry1Ab; ba dòng (S16, S17, và S18) của các cây lúa được chuyển nạp trình tự nucleotit Cry1Fa-02-Vip3A; một dòng được xác nhận là cây không chuyển gen (NGM2) bằng kỹ thuật Taqman và một dòng kiểu dại (CK2) đã được lựa chọn. Ba cây mỗi dòng được thử nghiệm và mỗi cây được lặp lại 6 lần. Các

kết quả được thể hiện trong bảng 9 và Fig.4.

Bảng 9 Khả năng kháng côn trùng của các cây lúa chuyển gen đã được cây *Sesamia inferens*

	Số lượng ấu trùng		Trọng lượng tổng của ấu trùng sống sót	Tỷ lệ chết được chuẩn hóa		Trọng lượng/mỗi con côn trùng	
	Ấu trùng được cây	Ấu trùng sống sót	(mg)	(%)	Trung bình	(mg)	Trung bình
S10-1	10	1	0,2	88,9		0,20	
S10-2	10	1	0,1	88,9		0,10	
S10-3	10	0	0	100,0		0	
S11-1	10	2	0,4	77,8		0,20	
S11-2	10	1	0,1	88,9		0,10	
S11-3	10	0	0	100,0		0	
S12-1	10	0	0	100,0		0	
S12-2	10	0	0	100,0		0	
S12-3	10	1	0,1	88,9		0,10	
S13-1	10	1	0,1	88,9	90,1	0,10	0,13
S13-2	10	2	0,3	77,8		0,15	
S13-3	10	0	0	100		0	
S14-1	10	2	0,3	77,8		0,20	
S14-2	10	0	0	100		0	
S14-3	10	1	0,1	88,9		0,20	
S15-1	10	1	0,1	88,9		0,10	
S15-2	10	1	0,2	88,9		0,20	
S15-3	10	0	0	100		0	
S16-1	10	2	0,4	77,8	92,6	0,20	0,13
S16-2	10	1	0,1	88,9		0,10	
S16-3	10	0	0	100		0	
S17-1	10	0	0	100		0	
S17-2	10	0	0	100		0	

S17-3	10	1	0,1	88,9		0,10	
S18-1	10	2	0,2	77,8		0,10	
S18-2	10	0	0	100		0	
S18-3	10	0	0	100		0	
NGM2-1	10	8	142,2	11,1	3,7	17,78	14,29
NGM2-2	10	9	105,3	0		11,70	
NGM2-3	10	9	120,4	0		13,38	
CK2-1	10	9	123,5		0	13,72	15,20
CK2-2	10	9	125,6			13,96	
CK2-3	10	9	161,3			17,92	

Các kết quả nêu trong bảng 9 và Fig.4 đã cho thấy tỷ lệ chết trung bình được chuẩn hóa của hầu hết các cây lúa được chuyển nạp trình tự nucleotit Cry1Fa-01, các cây lúa được chuyển nạp Cry1Fa-01-Cry1Ab và các cây lúa được chuyển nạp Cry1Fa-02-Vip3A được làm tròn khoảng trên 90%, và tỷ lệ chết trung bình được chuẩn hóa của một vài dòng lên đến 100%. So với tỷ lệ này, tỷ lệ chết trung bình được chuẩn hóa của các cây lúa kiểu dại nói chung được làm tròn khoảng dưới 10%. So với các lúa kiểu dại, hiệu quả phòng trừ ấu trùng mới nở của các cây lúa được chuyển nạp trình tự nucleotit Cry1Fa-01, các cây lúa được chuyển nạp Cry1Fa-01-Cry1Ab và các cây lúa được chuyển nạp Cry1Fa-02-Vip3A hầu như là 100% và từng ấu trùng sống sót cũng hầu như ngừng phát triển. Hơn thế nữa, các cây lúa được chuyển nạp trình tự nucleotit Cry1Fa-01, các cây lúa được chuyển nạp Cry1Fa-01-Cry1Ab và các cây lúa được chuyển nạp Cry1Fa-02-Vip3A nói chung chỉ bị tổn hại không đáng kể.

Do đó, một điều đã được minh chứng là tất cả các cây lúa được chuyển nạp trình tự nucleotit Cry1Fa-01, các cây lúa được chuyển nạp Cry1Fa-01-Cry1Ab và các cây lúa được chuyển nạp Cry1Fa-02-Vip3A đã cho thấy hoạt tính kháng *Sesamia inferen* cao, mà đủ để có tác động bất lợi đến sự phát triển của *Sesamia inferen* và để phòng trừ *Sesamia inferen*.

Các kết quả thực nghiệm nêu trên cũng đã cho thấy khả năng phòng trừ *Sesamia inferen* của các cây ngô được chuyển nạp trình tự nucleotit Cry1Fa-01, các cây ngô được chuyển nạp Cry1Fa-01-Cry1Ab, các cây ngô được chuyển nạp Cry1Fa-02-Vip3A, các cây lúa được chuyển nạp trình tự nucleotit Cry1Fa-01, các cây lúa được chuyển nạp Cry1Fa-01-Cry1Ab và các cây lúa được chuyển nạp Cry1Fa-02-Vip3A là do các protein Cry1F biểu hiện được trên các cây này. Do đó, như đã biết rõ đối với người có trình độ trong lĩnh vực này, dựa vào cùng một tác dụng gây độc của các protein Cry1F đối với *Sesamia inferen*, các cây chuyển gen tương tự có khả năng biểu hiện các protein Cry1F có thể thu được để phòng trừ *Sesamia inferen*. Các protein Cry1F theo sáng chế bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở các protein mà

trình tự axit amin của chúng được nêu ra trong các phương án cụ thể của sáng chế. Đồng thời, các cây chuyển gen này còn có thể sản sinh ra ít nhất một protein thứ hai có hoạt tính trừ sâu khác với protein Cry1F như protein Cry1Ab, protein Cry1Ac, protein Cry1Ba hoặc protein Vip3A, v.v.

Kết luận, các phương pháp phòng trừ sâu hại theo sáng chế là để phòng trừ sâu *Sesamia inferens* với protein Cry1F được sản sinh ra bởi cây trồng, mà có thể tiêu diệt *Sesamia inferens*. So với 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 được sử dụng gần đây, sáng chế có thể bảo vệ toàn bộ cây trong toàn bộ các thời kỳ phát triển của nó khỏi sự gây hại của *Sesamia inferens*. Hơn thế nữa, sáng chế không gây ô nhiễm và không có tồn dư hóa chất và tạo ra hiệu quả phòng trừ toàn diện và ổn định. Ngoài ra, sáng chế còn đơn giản, thuận tiện và kinh tế.

Cuối cùng, tất cả ví dụ nêu trên chỉ nhằm minh họa cho giải pháp theo sáng chế mà không làm giới hạn sáng chế. Mặc dù sự mô tả chi tiết sáng chế đã được đưa ra bằng cách viện dẫn các ví dụ được ưu tiên, nhưng người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này cần phải hiểu rằng giải pháp 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 sâu *Sesamia inferens* (sâu đục thân màu hồng) bao gồm bước cho *Sesamia inferens* tiếp xúc với protein Cry1F.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó protein Cry1F là protein Cry1Fa.
3. Phương pháp theo điểm 2, trong đó protein Cry1Fa có trong tế bào cây trồng mà tế bào cây trồng này có thể biểu hiện protein Cry1Fa, và *Sesamia inferens* tiếp xúc với protein Cry1Fa bằng cách ăn tế bào này.
4. Phương pháp theo điểm 3, trong đó protein Cry1Fa có trong cây trồng chuyển gen mà cây trồng chuyển gen này biểu hiện protein Cry1Fa, và *Sesamia inferens* tiếp xúc với protein Cry1Fa bằng cách ăn mô của cây trồng chuyển gen này khiến cho sự sinh trưởng của *Sesamia inferens* bị kìm hãm hoặc thậm chí gây chết *Sesamia inferens* để đạt được sự kiểm soát thiệt hại bị gây ra bởi *Sesamia inferens*.
5. Phương pháp theo điểm 4, trong đó cây trồng chuyển gen đã nêu ở trong giai đoạn phát triển bất kỳ.
6. Phương pháp theo điểm 4, trong đó mô của cây trồng chuyển gen đã nêu được chọn từ nhóm bao gồm bẹ lá, thân, cụm hoa, quả, bao phấn và sợi xơ.
7. Phương pháp theo điểm 4, trong đó việc phòng trừ thiệt hại bị gây ra bởi *Sesamia inferens* cho cây trồng không phụ thuộc vào vị trí trồng cây.
8. Phương pháp theo điểm 4, trong đó việc phòng trừ thiệt hại bị gây ra bởi *Sesamia inferens* cho cây trồng không phụ thuộc vào thời gian trồng cây.
9. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 3 đến 8, trong đó cây trồng này được chọn từ nhóm bao gồm ngô, lúa nước, lúa miến, lúa mì, kê, bông, sậy, mía đường, cây tre nước, đậu tằm và cây cải dầu.
10. Phương pháp theo điểm 9, trong đó bước trồng cây chứa polynucleotit mã hóa protein Cry1Fa được thực hiện trước bước cho tiếp xúc.
11. Phương pháp theo điểm 10, trong đó trình tự axit amin của protein Cry1Fa bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2.
12. Phương pháp theo điểm 11, trong đó trình tự nucleotit mã hóa protein Cry1Fa bao gồm trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 4.
13. Phương pháp theo điểm 12, trong đó cây trồng này còn có thêm ít nhất một trình tự nucleotit thứ hai, là khác với trình tự nucleotit mã hóa protein Cry1Fa.
14. Phương pháp theo điểm 13, trong đó trình tự nucleotit thứ hai này 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.

15. Phương pháp theo điểm 14, trong đó trình tự nucleotit thứ hai này mã hóa protein Cry1Ab, protein Cry1Ac, protein Cry1Ba hoặc protein Vip3A.

16. Phương pháp theo điểm 15, trong đó trình tự nucleotit thứ hai này bao gồm trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 5 hoặc SEQ ID NO: 6.

17. Phương pháp theo điểm 13, trong đó trình tự nucleotit thứ hai này là ARN sợi kép (dsARN) mà ARN này ức chế (các) gen thiết yếu của sâu hại đích.

18. Phương pháp theo điểm 11, trong đó cây trồng nêu trên còn chứa ít nhất một trình tự nucleotit thứ hai, khác với trình tự nucleotit mã hóa protein Cry1Fa.

19. Phương pháp theo điểm 18, trong đó trình tự nucleotit thứ hai này 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.

20. Phương pháp theo điểm 19, trong đó trình tự nucleotit thứ hai này mã hóa protein Cry1Ab, protein Cry1Ac, protein Cry1Ba hoặc protein Vip3A.

21. Phương pháp theo điểm 20, trong đó trình tự nucleotit thứ hai này bao gồm trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 5 hoặc SEQ ID NO: 6.

22. Phương pháp theo điểm 18, trong đó trình tự nucleotit thứ hai này là ARN sợi kép (dsARN) mà ARN này ức chế (các) gen thiết yếu của sâu hại đích.

23. Phương pháp theo điểm 10, trong đó cây trồng này còn có thêm ít nhất một trình tự nucleotit thứ hai khác với trình tự nucleotit mã hóa protein Cry1Fa.

24. Phương pháp theo điểm 23, trong đó trình tự nucleotit thứ hai này 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.

25. Phương pháp theo điểm 24, trong đó trình tự nucleotit thứ hai này mã hóa protein Cry1Ab, protein Cry1Ac, protein Cry1Ba hoặc protein Vip3A.

26. Phương pháp theo điểm 25, trong đó trình tự nucleotit thứ hai này bao gồm trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 5 hoặc SEQ ID NO: 6.

27. Phương pháp theo điểm 23, trong đó trình tự nucleotit thứ hai này là ARN sợi kép (dsARN) mà ARN này ức chế (các) gen thiết yếu của sâu hại đích.

28. Phương pháp theo điểm 9, trong đó cây trồng này còn có thêm ít nhất một trình tự nucleotit thứ hai khác với trình tự nucleotit mã hóa protein Cry1Fa.

29. Phương pháp theo điểm 28, trong đó trình tự nucleotit thứ hai này 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.

30. Phương pháp theo điểm 29, trong đó trình tự nucleotit thứ hai này mã hóa protein Cry1Ab, protein Cry1Ac, protein Cry1Ba hoặc protein Vip3A.

31. Phương pháp theo điểm 30, trong đó trình tự nucleotit thứ hai này bao gồm trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 5 hoặc SEQ ID NO: 6.

32. Phương pháp theo điểm 28, trong đó trình tự nucleotit thứ hai này là ARN sợi kép (dsARN) mà ARN này ức chế (các) gen thiết yếu của sâu hại đích.

33. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 3 đến 8, trong đó cây trồng này còn có thêm ít nhất một trình tự nucleotit thứ hai khác với trình tự nucleotit mã hóa protein Cry1Fa.

34. Phương pháp theo điểm 33, trong đó trình tự nucleotit thứ hai này 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.

35. Phương pháp theo điểm 34, trong đó trình tự nucleotit thứ hai này mã hóa protein Cry1Ab, protein Cry1Ac, protein Cry1Ba hoặc protein Vip3A.

36. Phương pháp theo điểm 35, trong đó trình tự nucleotit thứ hai này bao gồm trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 5 hoặc SEQ ID NO: 6.

37. Phương pháp theo điểm 34, trong đó trình tự nucleotit thứ hai này là ARN sợi kép (dsARN) mà ARN này ức chế (các) gen thiết yếu của sâu hại đích.

38. Phương pháp theo điểm 9, trong đó trình tự axit amin của protein Cry1Fa gồm có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2.

39. Phương pháp theo điểm 38, trong đó trình tự nucleotit mã hóa protein Cry1Fa gồm có trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 4.

40. Phương pháp theo điểm 39, trong đó cây trồng này còn có thêm ít nhất một trình tự nucleotit thứ hai khác với trình tự nucleotit mã hóa protein Cry1Fa.

41. Phương pháp theo điểm 40, trong đó trình tự nucleotit thứ hai này 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.

42. Phương pháp theo điểm 41, trong đó trình tự nucleotit thứ hai này mã hóa protein Cry1Ab, protein Cry1Ac, protein Cry1Ba hoặc protein Vip3A.

43. Phương pháp theo điểm 42, trong đó trình tự nucleotit thứ hai này bao gồm trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 5 hoặc SEQ ID NO: 6.

44. Phương pháp theo điểm 40, trong đó trình tự nucleotit thứ hai này là ARN sợi kép (dsARN) mà ARN này ức chế (các) gen thiết yếu của sâu hại đích.
45. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 3 đến 8, trong đó trình tự axit amin của protein Cry1Fa gồm có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2.
46. Phương pháp theo điểm 45, trong đó trình tự nucleotit mã hóa protein Cry1Fa này bao gồm trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 4.
47. Phương pháp theo điểm 46, trong đó cây trồng này còn có thêm ít nhất một trình tự nucleotit thứ hai khác với trình tự nucleotit mã hóa protein.
48. Phương pháp theo điểm 47, trong đó trình tự nucleotit thứ hai này 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.
49. Phương pháp theo điểm 48, trong đó trình tự nucleotit thứ hai này mã hóa protein Cry1Ab, protein Cry1Ac, protein Cry1Ba hoặc protein Vip3A.
50. Phương pháp theo điểm 49, trong đó trình tự nucleotit thứ hai này bao gồm trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 5 hoặc SEQ ID NO: 6.
51. Phương pháp theo điểm 47, trong đó trình tự nucleotit thứ hai này là ARN sợi kép (dsARN) mà ARN này ức chế (các) gen thiết yếu của sâu hại đích.
52. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 3 đến 8, trong đó bước trồng cây chứa polynucleotit mã hóa protein Cry1Fa được thực hiện trước bước cho tiếp xúc.
53. Phương pháp theo điểm 52, trong đó trình tự axit amin của protein Cry1Fa gồm có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2.
54. Phương pháp theo điểm 53, trong đó trình tự nucleotit mã hóa protein Cry1Fa gồm có trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 4.
55. Phương pháp theo điểm 54, trong đó cây trồng này còn có thêm ít nhất một trình tự nucleotit thứ hai khác với trình tự nucleotit mã hóa protein Cry1Fa.
56. Phương pháp theo điểm 55, trong đó trình tự nucleotit thứ hai này 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.
57. Phương pháp theo điểm 56, trong đó trình tự nucleotit thứ hai này mã hóa protein Cry1Ab, protein Cry1Ac, protein Cry1Ba hoặc protein Vip3A.
58. Phương pháp theo điểm 57, trong đó trình tự nucleotit thứ hai này bao gồm trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 5 hoặc SEQ ID NO: 6.

59. Phương pháp theo điểm 55, trong đó trình tự nucleotit thứ hai này là ARN sợi kép (dsARN) mà ARN này ức chế (các) gen thiết yếu của sâu hại đích.

Fig.1

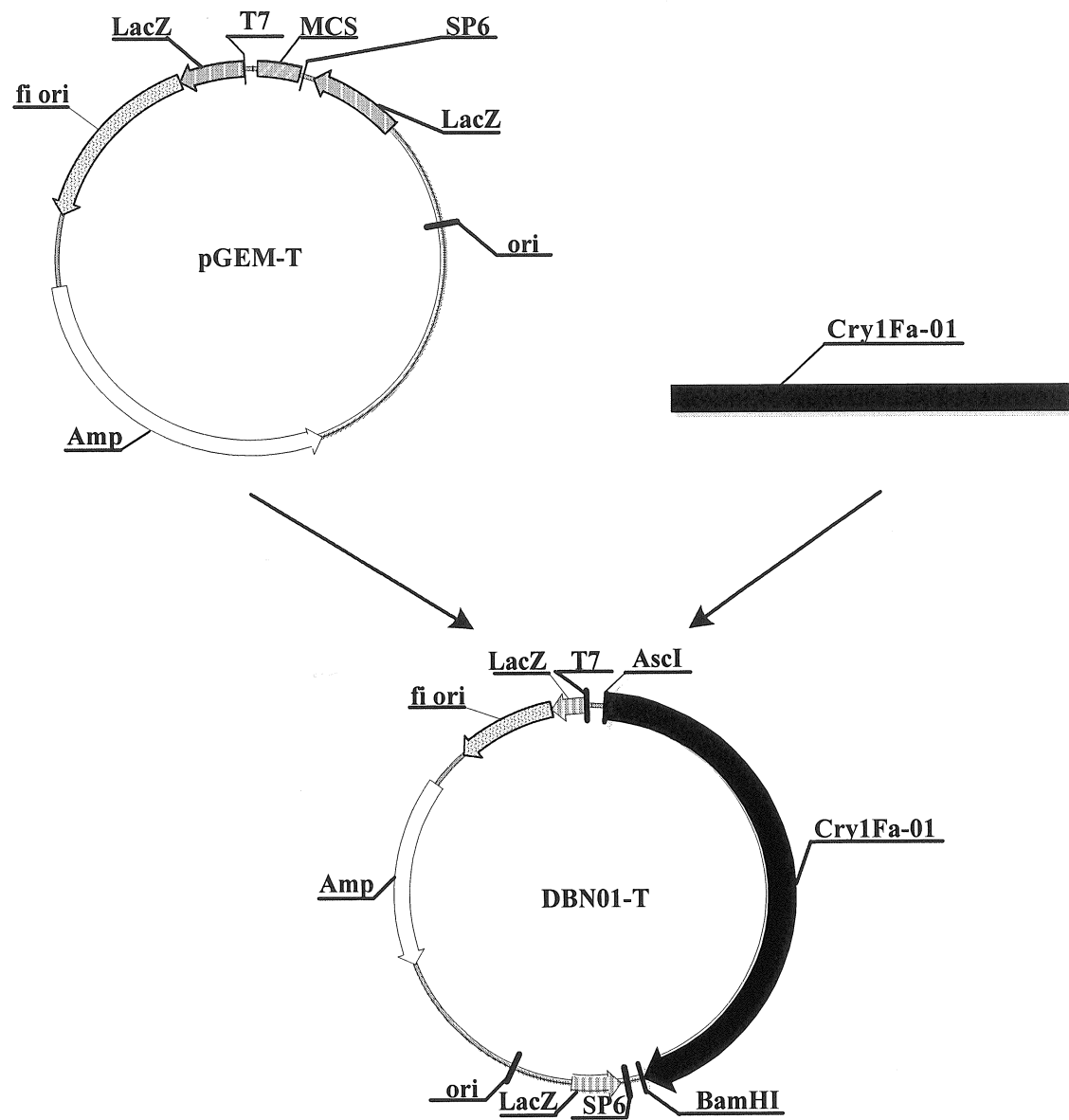


Fig.2

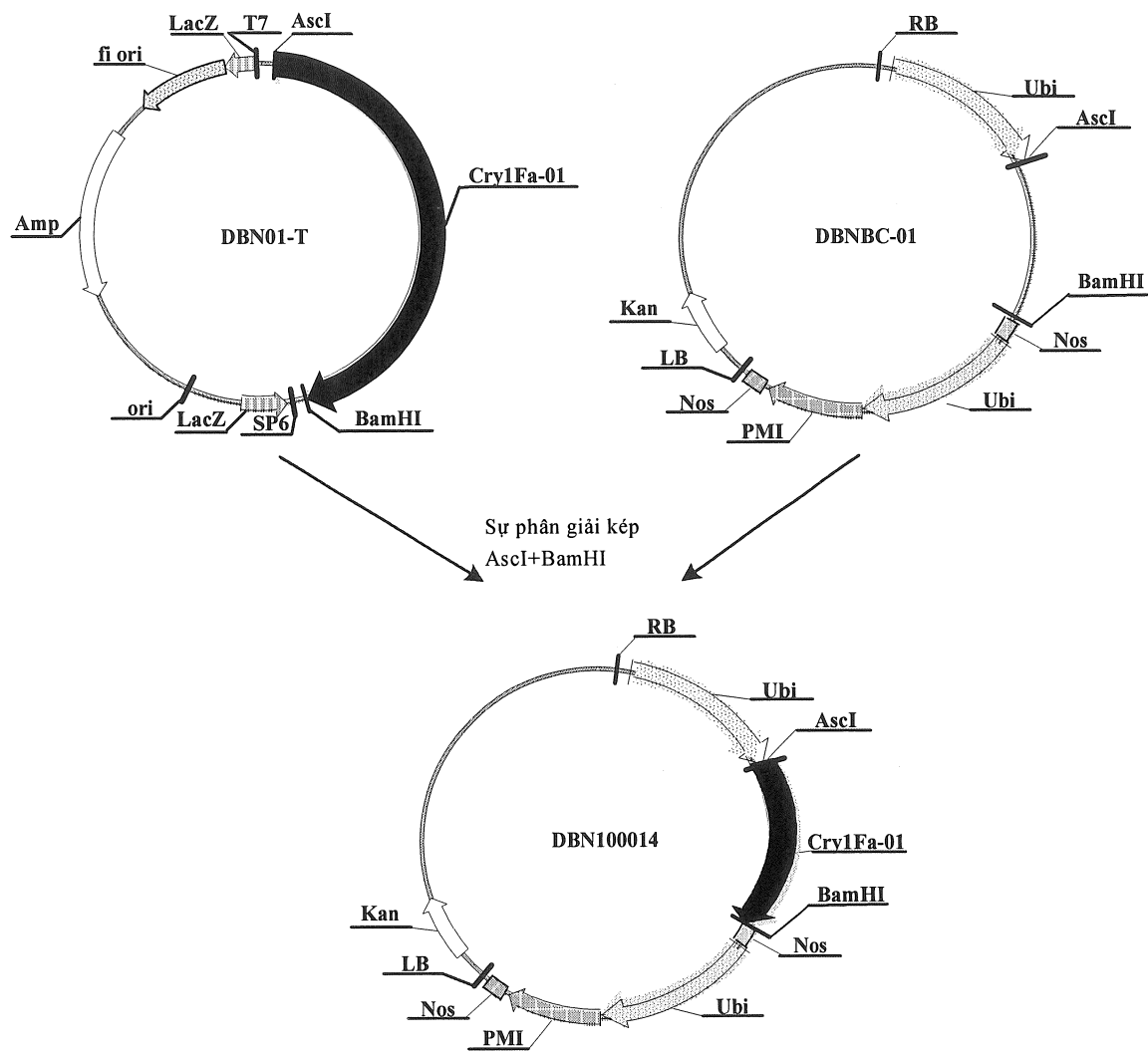
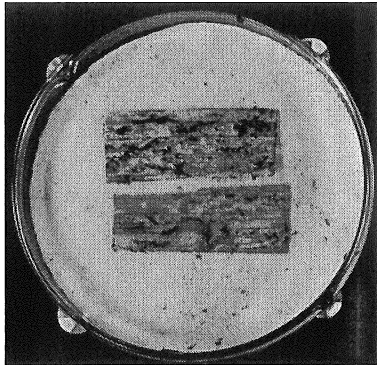
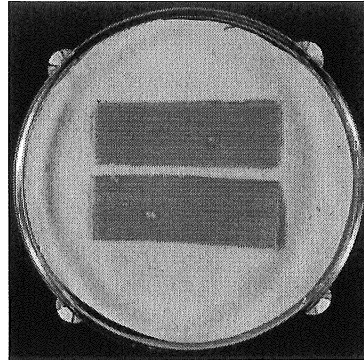


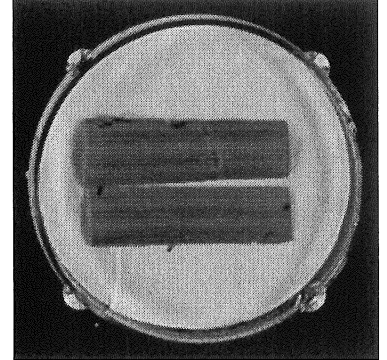
Fig.3



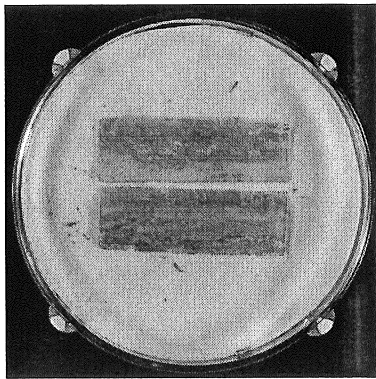
CK1



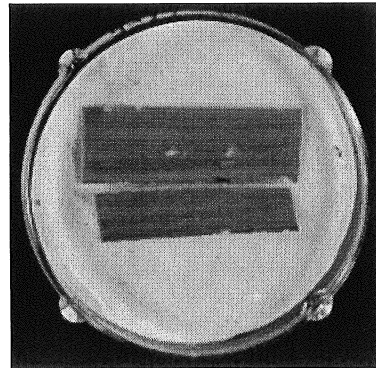
Zm-Cry1Fa-01



Zm-Cry1Fa-01-Cry1Ab

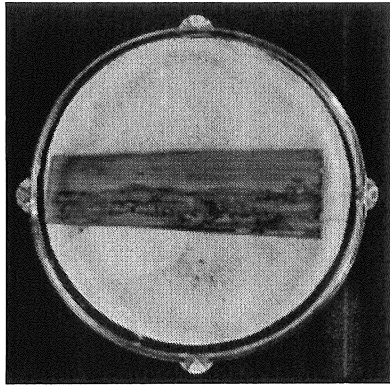
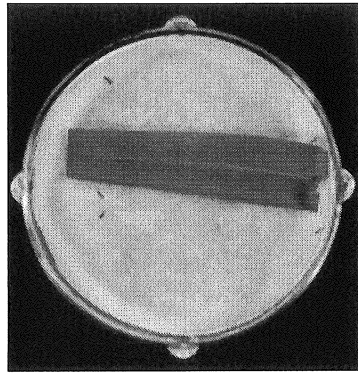
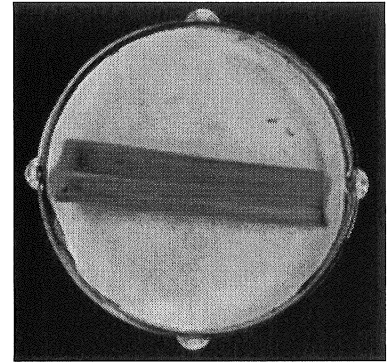
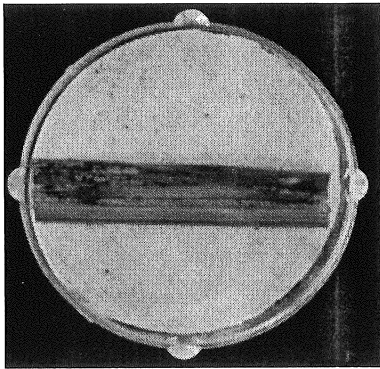
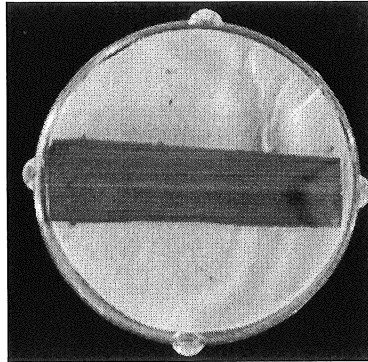


NGM1



Zm-Cry1Fa-02-Vip3A

Fig.4

**CK2****Os-Cry1Fa-01****Os-Cry1Fa-01-Cry1Ab****NGM2****Os-Cry1Fa-02-Vip3A**

Danh mục trình tự

<110> Beijing Dabeinong Technology Group Co., Ltd

Biotechnology Center, Beijing Dabeinong Technology Group Co., Ltd

<120> Phương pháp phòng trừ sâu hại

<130> DBNBC18

<160> 21

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 605

<212> PRT

<213> Trình tự axit amino của Cry1Fa-01

<400> 1

Met Glu Asn Asn Ile Gln Asn Gln Cys Val Pro Tyr Asn Cys Leu Asn

1 5 10 15

Asn Pro Glu Val Glu Ile Leu Asn Glu Glu Arg Ser Thr Gly Arg Leu

20 25 30

Pro Leu Asp Ile Ser Leu Ser Leu Thr Arg Phe Leu Leu Ser Glu Phe

35 40 45

Val Pro Gly Val Gly Val Ala Phe Gly Leu Phe Asp Leu Ile Trp Gly

50 55 60

Phe Ile Thr Pro Ser Asp Trp Ser Leu Phe Leu Leu Gln Ile Glu Gln

65 70 75 80

Leu Ile Glu Gln Arg Ile Glu Thr Leu Glu Arg Asn Arg Ala Ile Thr

85 90 95

Thr Leu Arg Gly Leu Ala Asp Ser Tyr Glu Ile Tyr Ile Glu Ala Leu
 100 105 110
 Arg Glu Trp Glu Ala Asn Pro Asn Asn Ala Gln Leu Arg Glu Asp Val
 115 120 125
 Arg Ile Arg Phe Ala Asn Thr Asp Asp Ala Leu Ile Thr Ala Ile Asn
 130 135 140
 Asn Phe Thr Leu Thr Ser Phe Glu Ile Pro Leu Leu Ser Val Tyr Val
 145 150 155 160
 Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser Leu Leu Arg Asp Ala Val Ser Phe
 165 170 175
 Gly Gln Gly Trp Gly Leu Asp Ile Ala Thr Val Asn Asn His Tyr Asn
 180 185 190
 Arg Leu Ile Asn Leu Ile His Arg Tyr Thr Lys His Cys Leu Asp Thr
 195 200 205
 Tyr Asn Gln Gly Leu Glu Asn Leu Arg Gly Thr Asn Thr Arg Gln Trp
 210 215 220
 Ala Arg Phe Asn Gln Phe Arg Arg Asp Leu Thr Leu Thr Val Leu Asp
 225 230 235 240
 Ile Val Ala Leu Phe Pro Asn Tyr Asp Val Arg Thr Tyr Pro Ile Gln
 245 250 255
 Thr Ser Ser Gln Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Ser Ser Val Ile Glu
 260 265 270
 Asp Ser Pro Val Ser Ala Asn Ile Pro Asn Gly Phe Asn Arg Ala Glu
 275 280 285
 Phe Gly Val Arg Pro Pro His Leu Met Asp Phe Met Asn Ser Leu Phe
 290 295 300
 Val Thr Ala Glu Thr Val Arg Ser Gln Thr Val Trp Gly Gly His Leu

305	310	315	320
Val Ser Ser Arg Asn Thr Ala Gly Asn Arg Ile Asn Phe Pro Ser Tyr			
	325	330	335
Gly Val Phe Asn Pro Gly Gly Ala Ile Trp Ile Ala Asp Glu Asp Pro			
	340	345	350
Arg Pro Phe Tyr Arg Thr Leu Ser Asp Pro Val Phe Val Arg Gly Gly			
	355	360	365
Phe Gly Asn Pro His Tyr Val Leu Gly Leu Arg Gly Val Ala Phe Gln			
	370	375	380
Gln Thr Gly Thr Asn His Thr Arg Thr Phe Arg Asn Ser Gly Thr Ile			
385	390	395	400
Asp Ser Leu Asp Glu Ile Pro Pro Gln Asp Asn Ser Gly Ala Pro Trp			
	405	410	415
Asn Asp Tyr Ser His Val Leu Asn His Val Thr Phe Val Arg Trp Pro			
	420	425	430
Gly Glu Ile Ser Gly Ser Asp Ser Trp Arg Ala Pro Met Phe Ser Trp			
	435	440	445
Thr His Arg Ser Ala Thr Pro Thr Asn Thr Ile Asp Pro Glu Arg Ile			
	450	455	460
Thr Gln Ile Pro Leu Val Lys Ala His Thr Leu Gln Ser Gly Thr Thr			
465	470	475	480
Val Val Arg Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr			
	485	490	495
Ser Gly Gly Pro Phe Ala Tyr Thr Ile Val Asn Ile Asn Gly Gln Leu			
	500	505	510
Pro Gln Arg Tyr Arg Ala Arg Ile Arg Tyr Ala Ser Thr Thr Asn Leu			
	515	520	525

Arg Ile Tyr Val Thr Val Ala Gly Glu Arg Ile Phe Ala Gly Gln Phe

530

535

540

Asn Lys Thr Met Asp Thr Gly Asp Pro Leu Thr Phe Gln Ser Phe Ser

545

550

555

560

Tyr Ala Thr Ile Asn Thr Ala Phe Thr Phe Pro Met Ser Gln Ser Ser

565

570

575

Phe Thr Val Gly Ala Asp Thr Phe Ser Ser Gly Asn Glu Val Tyr Ile

580

585

590

Asp Arg Phe Glu Leu Ile Pro Val Thr Ala Thr Leu Glu

595

600

605

<210> 2

<211> 1148

<212> PRT

<213> Trình tự axit amino của Cry1Fa-02

<400> 2

Met Glu Asn Asn Ile Gln Asn Gln Arg Val Pro Tyr Asn Cys Pro Asn

1

5

10

15

Asn Pro Glu Val Glu Ile Leu Asn Glu Glu Arg Ser Thr Gly Arg Leu

20

25

30

Pro Leu Asp Ile Ser Leu Ser Leu Thr Arg Phe Leu Leu Ser Glu Phe

35

40

45

Val Pro Gly Val Gly Val Ala Phe Gly Leu Phe Asp Leu Ile Trp Gly

50

55

60

Phe Ile Thr Pro Ser Asp Trp Ser Leu Phe Leu Leu Gln Ile Glu Gln

22118

65	70	75	80
Leu Ile Glu Gln Arg Ile Glu Thr Leu Glu Arg Asn Arg Ala Ile Thr			
	85	90	95
Thr Leu Arg Gly Leu Ala Asp Ser Tyr Glu Thr Tyr Ile Glu Ala Leu			
	100	105	110
Arg Glu Arg Glu Ala Asn Pro Asn Asn Ala Gln Pro Arg Glu Asp Val			
	115	120	125
Arg Ile Arg Phe Ala Asn Thr Asp Asp Ala Leu Ile Thr Ala Thr Asn			
	130	135	140
Asn Phe Thr Leu Thr Ser Phe Glu Thr Pro Leu Leu Ser Val Tyr Val			
145	150	155	160
Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser Leu Leu Arg Asp Ala Val Ser Phe			
	165	170	175
Gly Gln Gly Trp Gly Leu Asp Ile Ala Thr Ala Asn Asn His Tyr Asn			
	180	185	190
Arg Leu Ile Asn Leu Ile His Arg Tyr Thr Lys His Cys Leu Asp Thr			
	195	200	205
Tyr Asn Gln Gly Leu Glu Asn Leu Arg Gly Thr Asn Thr Arg Gln Trp			
	210	215	220
Ala Arg Phe Asn Gln Phe Arg Arg Asp Leu Thr Leu Thr Val Leu Asp			
225	230	235	240
Thr Val Ala Leu Phe Pro Asn Tyr Asp Val Arg Thr Tyr Pro Thr Gln			
	245	250	255
Thr Ser Ser Gln Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Ser Ser Val Ile Glu			
	260	265	270
Asp Ser Pro Val Ser Ala Asn Ile Pro Asn Gly Phe Asn Arg Ala Glu			
	275	280	285

Phe Gly Ala Arg Pro Pro His Leu Thr Asp Phe Met Asn Ser Leu Phe
 290 295 300
 Val Thr Ala Glu Thr Val Arg Ser Gln Thr Val Arg Gly Gly His Leu
 305 310 315 320
 Val Ser Ser Arg Asn Thr Ala Gly Asn Arg Ile Asn Phe Pro Ser Tyr
 325 330 335
 Gly Val Phe Asn Pro Gly Gly Ala Ile Trp Ile Ala Asp Glu Asp Pro
 340 345 350
 Arg Pro Phe Tyr Arg Thr Leu Ser Asp Pro Val Phe Val Arg Gly Gly
 355 360 365
 Phe Gly Asn Pro His Tyr Val Leu Gly Leu Arg Gly Val Ala Phe Gln
 370 375 380
 Gln Thr Gly Thr Asn His Thr Arg Thr Phe Arg Asn Ser Gly Thr Ile
 385 390 395 400
 Asp Ser Leu Asp Glu Ile Pro Pro Gln Asp Asn Ser Gly Ala Pro Trp
 405 410 415
 Asn Asp Tyr Ser His Val Leu Asn His Val Thr Phe Val Arg Trp Pro
 420 425 430
 Gly Glu Ile Ser Gly Ser Asp Ser Trp Arg Ala Pro Met Phe Ser Trp
 435 440 445
 Thr His Arg Ser Ala Thr Pro Thr Asn Thr Ile Asp Pro Glu Arg Ile
 450 455 460
 Thr Gln Thr Pro Leu Val Lys Ala His Thr Leu Gln Ser Gly Thr Thr
 465 470 475 480
 Val Val Arg Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr
 485 490 495
 Ser Gly Gly Pro Phe Ala Tyr Thr Ile Val Asn Ile Asn Gly Gln Leu

500	505	510
Pro Gln Arg Tyr Arg Ala Arg Ile Arg His Ala Ser Thr Thr Asn Leu		
515	520	525
Arg Ile Tyr Val Thr Val Ala Gly Glu Arg Ile Phe Ala Gly Gln Phe		
530	535	540
Asn Lys Thr Met Asp Thr Gly Asp Pro Leu Thr Phe Gln Ser Phe Ser		
545	550	555
Tyr Ala Thr Ile Asn Thr Ala Phe Thr Phe Pro Met Ser Gln Ser Ser		
565	570	575
Phe Thr Val Gly Ala Asp Thr Phe Ser Ser Gly Asn Glu Val Tyr Ile		
580	585	590
Asp Arg Phe Glu Leu Ile Pro Val Thr Ala Thr Leu Glu Ala Glu Ser		
595	600	605
Asp Leu Glu Arg Ala Gln Lys Ala Val Asn Ala Leu Phe Thr Ser Ser		
610	615	620
Asn Gln Ile Gly Leu Lys Thr Asp Val Thr Asp Tyr His Ile Asp Arg		
625	630	635
Val Ser Asn Leu Val Glu Cys Leu Ser Asp Glu Phe Cys Leu Asp Glu		
645	650	655
Lys Lys Glu Leu Ser Glu Lys Val Lys His Ala Lys Arg Leu Ser Asp		
660	665	670
Glu Arg Asn Leu Leu Gln Asp Pro Asn Phe Arg Gly Ile Asn Arg Gln		
675	680	685
Leu Asp Arg Gly Trp Arg Gly Ser Thr Asp Thr Thr Ile Gln Gly Gly		
690	695	700
Asp Asp Ala Phe Lys Glu Asn Tyr Val Thr Leu Leu Gly Thr Ser Asp		
705	710	715
		720

Glu Arg Tyr Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln Lys Ile Asp Glu Ser Lys Leu
 725 730 735
 Lys Ala Tyr Thr Arg Tyr Gln Leu Arg Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln
 740 745 750
 Asp Leu Glu Ile Tyr Leu Ile Arg Tyr Asn Ala Lys His Glu Thr Val
 755 760 765
 Asn Val Pro Gly Thr Gly Ser Leu Trp Pro Leu Ser Ala Pro Ser Pro
 770 775 780
 Ile Gly Lys Cys Ala His His Ser His His Phe Ser Ser Asp Ile Asp
 785 790 795 800
 Val Gly Cys Thr Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly Val Trp Ala Ile Phe
 805 810 815
 Lys Ile Lys Thr Gln Asp Gly His Ala Arg Leu Gly Asn Leu Glu Phe
 820 825 830
 Leu Glu Glu Lys Pro Leu Val Gly Glu Ala Leu Ala Arg Val Lys Arg
 835 840 845
 Ala Glu Lys Lys Trp Arg Asp Lys Arg Glu Lys Leu Glu Trp Glu Thr
 850 855 860
 Asn Thr Val Tyr Lys Glu Ala Lys Glu Ser Val Asp Ala Leu Phe Val
 865 870 875 880
 Asn Ser Gln Tyr Asp Arg Leu Gln Ala Asp Thr Asn Ile Ala Met Ile
 885 890 895
 His Ala Ala Asp Lys Arg Val His Ser Ile Arg Glu Ala Tyr Leu Pro
 900 905 910
 Glu Leu Ser Val Ile Pro Gly Val Asn Ala Ala Ile Phe Glu Glu Leu
 915 920 925
 Glu Gly Arg Ile Phe Thr Ala Pro Ser Leu Tyr Asp Ala Arg Asn Val

930	935	940
Ile Lys Asn Gly Asp Phe Asn Asn Gly Leu Ser Cys Trp Asn Val Lys		
945	950	955
Gly His Val Asp Val Glu Glu Gln Asn Asn His Arg Ser Val Pro Val		960
	965	970
Val Pro Glu Trp Glu Ala Glu Val Ser Gln Glu Val Arg Ala Cys Pro		975
	980	985
Gly Arg Gly Tyr Thr Leu Arg Val Thr Ala Tyr Lys Glu Gly Tyr Gly		990
	995	1000
Glu Gly Cys Val Thr Ile His Glu Ile Glu Asn Asn Thr Asp Glu		1005
	1010	1015
Leu Lys Phe Ser Asn Cys Val Glu Glu Glu Val Tyr Pro Asn Asn		1020
	1025	1030
Thr Val Thr Cys Asn Asp Tyr Thr Ala Thr Gln Glu Glu His Glu		1035
	1040	1045
Gly Thr Tyr Thr Ser Arg Asn Arg Gly Tyr Asp Gly Ala Tyr Glu		1050
	1055	1060
Ser Asn Ser Ser Ala Pro Ala Asp Tyr Ala Ser Ala Tyr Glu Glu		1065
	1070	1075
Lys Ala Tyr Thr Asp Gly Arg Arg Asp Asn Pro Cys Glu Pro Asn		1080
	1085	1090
Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Thr Pro Leu Pro Ala Gly Tyr Val Thr		1095
	1100	1105
Lys Glu Leu Glu His Leu Pro Glu Thr Asp Lys Val Trp Ile Glu		1110
	1115	1120
Ile Gly Glu Thr Glu Gly Thr Leu Ile Val Asp Ser Val Glu Leu		1125
	1130	1135
		1140

Pro Leu Met Glu Glu

1145

<210> 3

<211> 1818

<212> ADN

<213> Trình tự nucleotit mã hóa Cry1Fa-01

<400> 3

atggagaaca acatacagaa tcagtgcgtc ccctacaact gcctcaacaa tcctgaagta	60
gagattctca acgaagagag gtcgactggc agattgccgt tagacatctc cctgtccctt	120
acacgtttcc tgttgtctga gtttgttcca ggtgtgggag ttgcgtttgg cctcttcgac	180
ctcatctggg gcttcatcac tccatctgat tggagcctct ttcttctcca gattgaacag	240
ttgattgaac aaaggattga gaccttggaa aggaatcggg ccatcactac ccttcgtggc	300
ttagcagaca gctatgagat ctacattgaa gcactaagag agtggggaagc caatcctaac	360
aatgcccac tgagagaaga tgtgcgtata cgctttgcta acacagatga tgctttgatc	420
acagccatca acaacttcac ccttaccagc ttcgagatcc ctcttctctc ggtctatgtt	480
caagctgcta acctgcactt gtcactactg cgcgacgtg tgtcgtttgg gcaaggttgg	540
ggactggaca tagctactgt caacaatcac tacaacagac tcatcaatct gattcatcga	600
tacacgaaac attgtttgga tacctacaat cagggattgg agaacctgag aggtactaac	660
actcgccaat gggccagggt caatcagttc aggagagacc ttacacttac tgtgttagac	720
atagttgctc tctttccgaa ctacgatgtt cgtacctatc cgattcaaac gtcacccaa	780
cttacaaggg agatctacac cagttcagtc attgaagact ctccagtttc tgccaacata	840
cccaatgggt tcaacagggc tgagtttgga gtcagaccac cccatctcat ggacttcatg	900
aactctttgt ttgtgactgc agagactgtt agatcccaaa ctgtgtgggg aggacactta	960
gtagctcac gcaacacggc tggcaatcgt atcaactttc ctagttacgg ggtcttcaat	1020

cccgggggcg ccattctggat tgcagatgaa gatccacgtc ctttctatcg gaccttgtca 1080
 gatcctgtct tcgtccgagg aggctttggc aatcctcact atgtactcgg tcttagggga 1140
 gtggcctttc aacaaactgg tacgaatcac acccgcacat tcaggaactc cgggaccatt 1200
 gactctctag atgagatacc acctcaagac aacagcggcg caccttggaa tgactactcc 1260
 catgtgctga atcatgttac ctttgtgcgc tggccaggtg agatctcagg ttccgactca 1320
 tggagagcac caatgtttctc ttggacgcat cgtagcgcta cccccacaaa caccattgat 1380
 ccagagagaa tcactcagat tcccttggtg aaggcacaca cacttcagtc aggaactaca 1440
 gttgtaagag ggccgggggtt cacgggagga gacattcttc gacgcactag tggaggacca 1500
 ttgcgtaca ccattgtcaa catcaatggg caacttcccc aaaggtatcg tgccaggata 1560
 cgctatgcct ctactaccaa tctaagaatc tacgttacgg ttgcaggtga acgatcttt 1620
 gctggtcagt tcaacaagac aatggatacc ggtgatccac ttacattcca atctttctcc 1680
 tacgccacta tcaacaccgc gttcaccttt ccaatgagcc agagcagttt cacagtaggt 1740
 gctgatacct tcagttcagg caacgaagtg tacattgaca ggtttgagtt gattccagtt 1800
 actgccacac tcgagtaa 1818

<210> 4

<211> 3447

<212> ADN

<213> Trình tự nucleotit mã hóa Cry1Fa-02

<400> 4

atggagaaca acatacagaa tcagcgcgtc ccctacaact gcccacaaa tcctgaagta 60
 gagattctca acgaagagag gtcgactggc agattgccgt tagacatctc cctgtccctt 120
 acacgtttcc tgttgtctga gtttgttcca ggtgtgggag ttgcgtttgg cctcttcgac 180
 ctcatctggg gcttcatcac tccatctgat tggagcctct ttcttctcca gattgaacag 240
 ctgattgaac aaaggattga gaccttggaa aggaatcggg ccatcactac ctttcgtggc 300

ttagcagaca gctatgagac ctacattgaa gcactaagag agcgggaagc caatcctaac	360
aatgcccac cgagagaaga tgtgcgtata cgctttgcta acacagatga tgctttgatc	420
acagccacca acaacttcac ccttaccagc ttcgagaccc ctcttctctc ggtctatggt	480
caagctgcca acctgcactt gtcactactg cgcgacgctg tgctgtttgg gcaaggttgg	540
ggactggaca tagctactgc caacaatcac tacaacagac tcatcaatct gattcatcga	600
tacacgaaac attgtttgga tacctacaat cagggtattgg agaacctgag aggtactaac	660
actcgccaat gggccaggtt caatcagttc aggagagacc ttacacttac tgtgttagac	720
acagttgctc tctttccgaa ctacgatgtt cgtacctatc cgactcaaac gtcattccaa	780
cttacaaggg agatctacac cagttcagtc attgaagact ctccagtttc tgccaacata	840
cccaatgggt tcaacagggc tgagtttgga gccagaccac cccatctcac ggacttcatg	900
aactctttgt ttgtgactgc agagactgtt agatcccaaa ctgtgcgggg aggacactta	960
gttagctcac gcaacacggc tggcaatcgt atcaactttc ctagctacgg ggtcttcaat	1020
cccgggggcg ccatctggat tgcagatgaa gatccacgtc ctttctatcg gacctgtca	1080
gatcctgtct tegtccgagg aggctttggc aatcctcact atgtactcgg tcttagggga	1140
gtggcctttc acaaaactgg tacgaatcac acccgcacat tcaggaaactc cgggaccatt	1200
gactctctag atgagatacc acctcaagac aacagcggcg caccttgga tgactactcc	1260
catgtgctga atcatgttac ctttgtgcgc tggccagggt agatctcagg ttccgactca	1320
tggagagcac caatgttctc ttggacgcat cgtagcgcta cccccacaaa caccattgat	1380
ccagagagaa tctctcagac tcccttggtg aaggcacaca cacttcagtc aggaactaca	1440
gttgtaagag ggccgggggt cacgggagga gacattcttc gacgcactag tggaggacca	1500
ttcgcgtaca ccattgtcaa catcaatggg caacttcccc aaaggtatcg tgccaggata	1560
cgccatgcct ctactaccaa tctaagaatc tacgttacgg ttgcaggatga acggatcttt	1620
gctggtcagt tcaacaagac aatggatacc ggtgatccac ttacattcca atctttctcc	1680
tacgccacta tcaacaccgc gttcaccttt ccaatgagcc agagcagttt cacagtaggt	1740
gctgatacct tcagttcagg caacgaagtg tacattgaca ggtttgagtt gattccagtt	1800
actgccacac tcgaggcaga gtctgacttg gaaagagcac agaaggcggg gaatgctctg	1860
ttcacttcgt ccaatcagat tgggctcaag acagatgtga ctgactatca catcgatcgc	1920

gtttccaacc ttgttgagtg cctctctgat gagttctgtt tggatgagaa gaaggagttg	1980
tccgagaagg tcaaacaatgc taagcgactt agtgatgagc ggaacttgct tcaagatccc	2040
aacttttcgcg ggatcaacag gcaactagac cgtggatgga ggggaagtac ggacaccacc	2100
attcaaggag gtgatgatgc gttcaaggag aactatgtca cgctcttggg tacctctgac	2160
gagcgctatc caacatacct gtaccagaag atagatgaat cgaaactcaa agcctacaca	2220
agataccagt tgagaggtta catcgaggac agtcaagacc ttgagatcta cctcatcaga	2280
tacaacgcca aacatgagac agtcaatgtg cctgggacgg gttcactctg gccactttca	2340
gccccaaagtc ccatcggaac gtgcgcccac cactcacacc acttctcctc ggacatagac	2400
gttggctgta cggacctgaa cgaagacctc ggtgtgtggg cgatcttcaa gatcaagact	2460
caagatggcc atgccaggct aggcaatctg gagttcctag aagagaaacc acttgttgga	2520
gaagccctcg ctagagtgaag gagggctgag aagaagtgga gggacaagag agagaagttg	2580
gaatgggaaa caaacactgt gtacaaagaa gccaaagaaa gcgttgacgc tctgtttgtg	2640
aactcccagt atgataggct ccaagctgat accaacaatag ctatgattca tgctgcagac	2700
aaacgcgttc atagcattcg ggaagcttac cticctgaac ttagcgtgat tccgggtgtc	2760
aatgctgcta tctttgaaga gttagaaggc cgcatcttca ctgcaccctc cttgtatgat	2820
gcgaggaatg tcatcaagaa tggtagcttc aacaatggcc tatcctgctg gaatgtgaaa	2880
gggcacgtag atgtagaaga acagaacaat caccgctctg tccctgttgt tcctgagtgg	2940
gaagcagaag tttcacaaga agttcgtgcc tgtcccggcc gtggctacac tcttcgtgtt	3000
accgcgtaca aagaaggata cggagaaggt tgcgtcacca tacacgagat tgagaacaac	3060
accgacgagc tgaagttcag caactgcgtc gaggaggaag tctacccaaa caacaccgta	3120
acttgcaatg actacactgc gactcaagag gagcacgagg gtacttacac ttctcgcaat	3180
cgaggatacg atggagccta tgagagcaac tcttctgcac ccgctgacta tgcacagcc	3240
tacgaggaga aggcttacac cgatggacgt agggacaacc cttgcgaacc taacagaggc	3300
tacggggact acacaccgtt accagccggc tatgtcacca aagagctaga gcaccttcca	3360
gaaaccgaca aggttttgat tgagattgga gaaacggaag gaacactcat tgttgatagc	3420
gtggagttac ctctgatgga ggaataa	3447

<210> 5

<211> 1848

<212> ADN

<213> Trình tự nucleotit mã hóa Cry1Ab

<400> 5

atggacaaca acccaaacat caacgaatgc attccataca actgcttgag taaccagaa	60
gttgaagtac ttggtggaga acgcattgaa accggttaca ctcccatcga catctccttg	120
tccttgacac agttttctgct cagcgagttc gtgccaggtg ctgggttcgt tctcggacta	180
gttgacatca tctgggggtat ctttgggtcca tctcaatggg atgcattcct ggtgcaaatt	240
gagcagttga tcaaccagag gatcgaagag ttgccagga accaggccat ctctaggttg	300
gaaggattga gcaatctcta ccaaattctat gcagagagct tcagagagtg ggaagccgat	360
cctactaacc cagctctccg cgaggaaatg cgtattcaat tcaacgacat gaacagcgcc	420
ttgaccacag ctatccatt gttcgcagtc cagaactacc aagttcctct cttgtccgtg	480
tacgttcaag cagctaattt tcacctcagc gtgcttcgag acgttagcgt gtttgggcaa	540
aggtggggat tcgatgctgc aaccatcaat agccgttaca acgaccttac taggctgatt	600
ggaaactaca ccgaccacgc tgttcgttgg tacaacactg gcttggagcg tgtctggggt	660
cctgattcta gagattggat tagatacaac cagttcagga gagaattgac cctcacagtt	720
ttggacattg tgtctctctt ccggaactat gactccagaa cctaccctat ccgtacagtg	780
tcccaactta ccagagaaat ctatactaac ccagttcttg agaacttcga cggtagcttc	840
cgtggttctg cccaaggtat cgaaggctcc atcaggagcc cacacttgat ggacatcttg	900
aacagcataa ctatctacac cgatgctcac agaggagagt attactggtc tggacaccag	960
atcatggcct ctccagttgg attcagcggg cccgagttta cctttcctct ctatggaact	1020
atgggaaacg ccgctccaca acaacgtatc gttgctcaac taggtcaggg tgtctacaga	1080
accttgtctt ccaccttgta cagaagaccc ttcaatatcg gtatcaacaa ccagcaactt	1140
tccgttcttg acggaacaga gttcgcttat ggaacctctt ctaacttgcc atccgtgtt	1200

tacagaaaga gcggaaccgt tgattccttg gacgaaatcc caccacagaa caacaatgtg	1260
ccaccaggc aaggattctc ccacaggttg agccacgtgt ccatgttccg ttccggattc	1320
agcaacagtt ccgtgagcat catcagagct cctatgttct catggattca tcgtagtgct	1380
gagttcaaca atatcattcc ttctctctca atcaccctaaa tccattgac caagtctact	1440
aaccttggat ctggaacttc tgtcgtgaaa ggaccaggct tcacaggagg tgatattctt	1500
agaagaactt ctcttgcca gattagcacc ctacagagta acatcactgc accactttct	1560
caaagatata gtgtcaggat tcgttacgca tctaccacta acttgcaatt ccacacctcc	1620
atcgacggaa ggcctatcaa tcagggtaac ttctccgcaa ccatgtcaag cggcagcaac	1680
ttgcaatccg gcagcttcag aaccgtcggt ttactactc ctttcaactt ctctaacgga	1740
tcaagcgttt tcacccttag cgctcatgtg ttcaattctg gcaatgaagt gtacattgac	1800
cgtattgagt ttgtgcctgc cgaagttacc ttcgaggctg agtactga	1848

<210> 6

<211> 2370

<212> ADN

<213> Trình tự nucleotit mã hóa Vip3A

<400> 6

atgaacaaga acaacaccaa gctctccaca cgggcacttc cctcctttat tgactacttt	60
aatggcatct atgggtttgc tacggggatc aaggacatta tgaacatgat cttcaagaca	120
gacactggcg gggatcttac gctcgacgag attcttaaga atcagcaact cctgaacgat	180
atctctggca agctggacgg cgtgaatggg tcaacttaacg acctcatcgc tcagggggaat	240
ctcaacacag aactgtctaa ggagatcctc aagattgcaa atgagcagaa ccaagttctt	300
aatgatgtga acaataagct cgacgccatc aacacaatgc ttgcgtgta cctcccaaag	360
attactagca tgctctcgga cgtcatgaag cagaactacg cgctgtccct tcaaattgag	420
tatctgagca agcagcttca agaaatctcg gacaagctgg atatcattaa tgtgaacgtc	480

ctcatcaaca gcaccctgac ggagattaca ccggcggtacc agaggatcaa gtatgtgaat	540
gagaagttcg aggaactcac ttttgctaca gaaacttcca gcaaggtcaa gaaggatggc	600
tcaccagccg acatcctgga tgagcttaca gaactcactg agctggcgaa gtccgtgacc	660
aagaatgacg tcgatggctt cgagttttac ctgaacacgt tccacgacgt tatgggtggc	720
aacaatcttt ttgggctggag cgctctcaag actgcatcgg aactgatcac caaggagaac	780
gttaagacga gcggtctgga ggtcgggaat gtttacaact tccttatcgt cctcaccgca	840
ctccaggccc aagcgtttct cacgctgacc acctgccgca agctcctcgg cctcgcagac	900
atcgattaca cctccatcat gaacgagcac ctgaacaagg agaaggagga gttccgcgtg	960
aatatccttc cgacactctc gaacactttt tctaatacaa actacgctaa ggtcaagggc	1020
tccgacgaag atgcaaagat gatcggtgag gccaaagcctg gccatgcgct catcggggtc	1080
gagattttcta acgactcaat taccgtgctg aaggtctacg aggcgaaagct caagcagaat	1140
tatcaagtgg acaaggattc tctgtcagag gttatctacg gcgacatgga taagctgctt	1200
tgccctgata agtccgagca aatctactat acgaacaata ttgtcttccc caacgaatac	1260
gtgatcacca agattgactt tacgaagaag atgaagacac tccggtacga ggtgacggct	1320
aacttctatg attcgtctac gggcgagatc gacctcaaca agaagaaggt cgaatcatcc	1380
gaggccgaat acagaaccct gtcggcgaaac gacgatggcg tgtatatgcc tcttggggtc	1440
atttctgaga ccttctctac gcccatcaat ggctttgggc tccaggcaga tgagaactcc	1500
cgcctgatca cccttacgtg caagagctac ctccaggagc tgctgcttgc caccgacctc	1560
tctaacaagg aaacgaagct gatcggtccg ccatcaggct tcatctccaa tattgtggag	1620
aacgggtcaa ttgaggaaga taatctggaa ccgtggaagg ctaacaataa gaacgcatac	1680
gttgaccaca caggcggggg gaatggcact aaggcgctct atgtgcataa ggatgggtggc	1740
atctcccagt tcattggcga caagctgaag ccgaagacag aatacgtgat tcaatatact	1800
gtgaagggca agccaagcat ccacctcaag gatgagaaca cagggtacat ccattacgaa	1860
gatactaaca acaacctgga ggactaccag acaatcaata agagggtcac aactggcact	1920
gacctgaagg gggctctatct tattctcaag tcccagaatg gcgatgaggc ctggggcgac	1980
aacttcatca ttctcgaaat ctcccctagc gagaagctcc tgagccccga gctgattaac	2040
accaataact ggacatccac tggcagcacg aatatctcgg ggaacaccct gacgctttac	2100

cagggcggga gaggcattct gaagcagaac ctccaactgg attcgttctc tacctacaga 2160
gtctatTTTT cagtttccgg cgacgcgaat gtgcgcatca ggaactcgcg ggaagtcctc 2220
ttcgagaaga gatacatgtc tggcgctaag gatgtgtcag aaatgttcac cacgaagttt 2280
gagaaggaca actttttatat cgaactgtcc caaggaata acctctacgg cggccccatt 2340
gttcattttt acgacgtgag catcaagtga 2370

<210> 7

<211> 1992

<212> ADN

<213> Gen khởi đầu Ubiquitin ngô

<400> 7

ctgcagtgca gcgtgacccg gtctgtcccc tctctagaga taatgagcat tgcattgtcta 60
agttataaaa aattaccaca tatttttttt gtcacacttg tttgaagtgc agtttatcta 120
tctttataca tatattttaa ctttactcta cgaataatat aatctatagt actacaataa 180
tatcagtgtt ttagagaatc atataaatga acagtttagac atgggtctaaa ggacaattga 240
gtattttgac aacaggactc tacagtttta tcttttttagt gtgcattgtgt tctccttttt 300
ttttgcaaat agcttcacct atataatact tcatccattt tattagtaca tccatttagg 360
gttttaggggtt aatgggttttt atagactaat ttttttagta catctatttt attctatttt 420
agcctctaaa ttaagaaaac taaaactcta ttttagtttt tttatttaaat aatttagata 480
taaaatagaa taaaataaag tgactaaaaa ttaaacaat accctttaag aaattaaaaa 540
aactaaggaa acatttttct tgtttcgagt agataatgcc agcctgttaa acgccgtcga 600
cgagtctaac ggacaccaac cagcgaacca gcagcgtcgc gtcgggcca gcaagcaga 660
cggcacggca tctctgtcgc tgcctctgga cccctctcga gagttccgct ccaccgttgg 720
acttgctccg ctgtcggcat ccagaaattg cgtggcggag cggcagacgt gagccggcac 780
ggcaggcggc ctcctcctcc tctcacggca cggcagctac gggggattcc tttcccaccg 840

ctcccttgcgt ttcccttcct cgcccgccgt aataaataga caccctctcc acaccctctt 900
 tccccaacct cgtgttggtc ggagcgcaca cacacacaac cagatctccc ccaaaccac 960
 ccgtcggcac ctccgcttca aggtacgccg ctctctctcc ccccccccc ctctctacct 1020
 tctctagatc ggcgttcggg tccatggta gggcccggtg gttctacttc tgttcatgtt 1080
 tgtgttagat ccgtgtttgt gttagatccg tgctgctagc gttcgtacac ggatgcgacc 1140
 tgtacgtcag acacgttctg attgctaact tgccagtgtt tctctttggg gaatcctggg 1200
 atggctctag ccgttcgcga gacgggatcg atttcatgat tttttttgtt tcgttgcata 1260
 gggtttggtt tgcccttttc ctttatttca atatatgccg tgcacttggt tgcgggtca 1320
 tcttttcatg cttttttttg tcttggttgt gatgatgtgg tctggttggg cggtcgttct 1380
 agatcggagt agaattctgt ttcaaactac ctggtggatt tattaatttt ggatctgtat 1440
 gtgtgtgcca tacatattca tagttacgaa ttgaagatga tggatggaaa tatcgatcta 1500
 ggataggtat acatgttgat gcgggtttta ctgatgcata tacagagatg ctttttggtc 1560
 gcttggttgt gatgatgtgg tgtggttggg cggtcgttca ttcgttctag atcggagtag 1620
 aatactgttt caaactacct ggtgtattta ttaattttgg aactgtatgt gtgtgtcata 1680
 catcttcata gttacgagtt taagatggat ggaaatatcg atctaggata ggtatacatg 1740
 ttgatgtggg ttttactgat gcatatacat gatggcatat gcagcatcta ttcatatgct 1800
 ctaaccttga gtacctatct attataataa acaagtatgt tttataatta ttttgatctt 1860
 gatatacttg gatgatggca tatgcagcag ctatatgtgg attttttttag ccctgccttc 1920
 atacgctatt tatttgcttg gtactgtttc ttttgtcgat gctcaccctg ttgtttgggtg 1980
 ttacttctgc ag 1992

<210> 8

<211> 253

<212> ADN

<213> Gen kết thúc nopalin synthetaza

<400> 8

gatcggttcaa acatttggca ataaagtttc ttaagattga atcctgttgc cggctcttgcg	60
atgattatca tataatttct gttgaattac gtttaagcatg taataattaa catgtaatgc	120
atgacgttat ttatgagatg ggtttttatg attagagtcc cgcaattata catttaatac	180
gcgatagaaa acaaaatata gcgcgcaaac taggataaat tatcgcgcg cgtgtcatct	240
atgttactag atc	253

<210> 9

<211> 1176

<212> ADN

<213> Gen phosphomanoza isomeraza

<400> 9

atgcaaaaac tcattaactc agtgcaaaaac tatgcctggg gcagcaaaaac ggcgttgact	60
gaactttatg gtatggaaaa tccgtccagc cagccgatgg ccgagctgtg gatgggcgca	120
catccgaaaa gcagttcacg agtgcagaat gccgccggag atatcgtttc actgctgat	180
gtgattgaga gtgataaatc gactctgctc ggagaggccg ttgccaaacg ctttggcgaa	240
ctgcctttcc tgttcaaagt attatgcgca gcacagccac tctccattca ggttcatcca	300
aacaaacaca attctgaaat cggttttgcc aaagaaaatg ccgcaggtat cccgatggat	360
gccgccgagc gtaactataa agatcctaac cacaagccgg agctggtttt 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 cgcacgtta cctgcaaggc	780

gtggcgctgg aagtgatggc aaactccgat aacgtgctgc gtgcgggtct gacgcctaaa	840
tacattgata ttccggaact ggttgccaat gtgaaattcg aagccaaacc ggctaaccag	900
ttgttgaccc agccggtgaa acaaggtgca gaactggact tcccgattcc agtggatgat	960
tttgctttct cgctgcatga ccttagtgat aaagaaacca ccattagcca gcagagtgcc	1020
gccattttgt tctgcgtcga aggcgatgca acgttggtga aaggttctca gcagttacag	1080
cttaaaccgg gtgaatcagc gtttattgcc gccaacgaat caccggtgac tgtcaaaggc	1140
cacggccgtt tagcgcgtgt ttacaacaag ctgtaa	1176

<210> 10

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn dò 1

<400> 10

cagtcaggaa ctacagttgt aagaggg

27

<210> 11

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn dò 2

<400> 11

acgcgaatgg tcttcacta g

21

<210> 12

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn dò 1

<400> 12

cgtcgaagaa tgtctcctcc cgtgaac

27

<210> 13

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn dò 3

<400> 13

tggtggagaa cgcattgaaa c

21

<210> 14

<211> 23

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn dò 4

<400> 14

gctgagcaga aactgtgtca agg

23

<210> 15

<211> 28

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn dò 2

<400> 15

cggttacact cccatcgaca tctccttg

28

<210> 16

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn dò 5

<400> 16

cagtcaggaa ctacagttgt aagaggg

27

<210> 17

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn dò 6

<400> 21

acgcgaatgg tcctccacta g

21

<210> 18

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn dò 3

<400> 18

cgtcgaagaa tgtctcctcc cgtgaac

27

<210> 19

<211> 22

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn dò 7

<400> 19

attctcgaaa tctcccctag cg

22

<210> 20

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn dò 8

<400> 20

gctgccagtg gatgtccag

19

<210> 21

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn dò 4

<400> 21

ctcctgagcc ccgagctgat taacacc

27