



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)

(11) 

CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

1-0022119

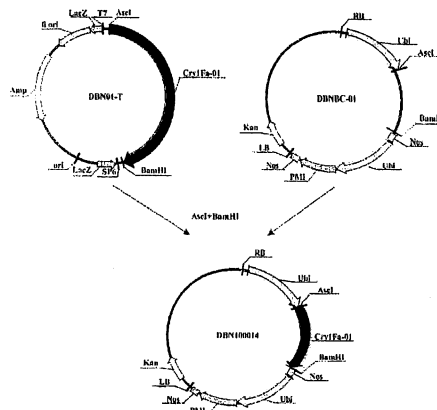
(51)⁷ A01N 47/44, A01P 7/04

(13) B

- (21) 1-2013-03912 (22) 11.12.2013
(30) 201210533805.3 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) Yuejing KANG (CN), Aihong ZHANG (CN), Jie PANG (CN), Dengyuan WANG (CN), Haili LIU (CN), Jincun HUANG (CN), Xuesong WEI (CN), Chunle LI (CN), Kangle TIAN (CN), Qingfang SONG (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 *Conogethes punctiferalis*, phương pháp này bao gồm bước cho *Conogethes punctiferalis* tiếp xúc với protein Cry1F. Phương pháp theo sáng chế có thể phòng trừ *Conogethes punctiferalis* bằng cách cho phép cây trồng sản sinh ra protein Cry1F in vivo, protein này làm cho *Conogethes punctiferalis* chết. So với phương pháp phòng trừ sâu bằng biện pháp hóa học và nông học và sinh học hiện tại, phương pháp theo sáng chế có thể phòng trừ được *Conogethes punctiferalis* trong toàn bộ các thời kỳ sinh trưởng của cây trồng và cho phép cây trồng này được bảo vệ hoàn toàn. Ngoài ra, phương pháp theo sáng chế còn ổn định, toàn diện, đơn giản, thuận lợi và kinh tế, không gây ô nhiễm và không có tồn dư hóa chất.



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 ngăn ngừa *Conogethes punctiferalis* gây hại cho cây trồng bằng cách sử dụng protein Cry1F được biểu hiện ở cây trồng này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

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

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

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

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

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

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

Để khắc phục các nhược điểm của phương pháp phòng trừ bằng biện pháp

nông học, biện pháp hóa học và biện pháp sinh học nêu trên, các nhà nghiên cứu đã phát hiện được rằng, khi chèn các gen mã hóa protein có hoạt tính trừ sâu hại vào hệ gen của cây trồng, có thể tạo ra cây trồng có khả năng kháng sâu hại. Protein có hoạt tính trừ sâu hại Cry1F, một protein trong nhóm gồm nhiều protein có hoạt tính trừ sâu hại, là một protein tinh thể bào tử vỏ không tan được sản sinh bởi *Bacillus thuringiensis*.

Protein Cry1F, nếu sâu hại ăn protein này, được hòa tan trong môi trường kiềm trong ruột giữa của sâu hại đó và giải phóng tiền độc tố, tiền chất của độc tố. Hơn nữa, proteaza kiềm sẽ phân giải tiền độc tố này tại đầu tận cùng C và đầu tận cùng N và tạo ra phân đoạn có hoạt tính, phân đoạn này sẽ gắn kết với thụ thể màng của tế bào biểu mô của ruột giữa của sâu hại và tự đi vào màng ruột, kết quả là phá vỡ màng tế bào, làm mất cân bằng độ pH nội mô và áp suất thẩm thấu qua màng tế bào, gây rối loạn tiêu hóa và cuối cùng làm cho sâu hại bị chết.

Đã khẳng định được rằng cây chuyển gen Cry1Fa có thể kháng sâu hại *Lepidoptera* như *Agrotis ypsilon* Rottemberg. Tuy nhiên, cho đến nay vẫn chưa có báo cáo nào đề cập đến việc phòng trừ *Conogethes punctiferalis* bằng cách tạo ra cây chuyển gen sản sinh ra protein Cry1F.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp phòng trừ sâu hại lần đầu tiên bằng cách sử dụng các cây chuyển gen biểu hiện protein Cry1F để phòng trừ sự gây hại của *Conogethes punctiferalis*. Phương pháp theo sáng chế khắc phục hữu hiệu các nhược điểm về mặt kỹ thuật của phương pháp phòng trừ sâu bằng biện pháp nông học và biện pháp hóa học.

Để đạt được mục đích nêu trên, sáng chế đề xuất phương pháp phòng trừ *Conogethes punctiferalis*, phương pháp này bao gồm bước cho *Conogethes punctiferalis* tiếp xúc với protein Cry1F.

Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất cây chuyển gen biểu hiện protein Cry1F và vật liệu sinh sản của cây trồng này như hạt, cây giống và các vật liệu tương tự.

Tốt hơn, nếu protein Cry1F là protein Cry1Fa.

Hơn nữa, protein Cry1Fa có mặt trong tế bào biểu hiện protein nêu trên của cây trồng, và *Conogethes punctiferalis* tiếp xúc với protein này bằng cách ăn tế bào.

Ngoài ra, protein Cry1Fa có mặt trong cây chuyển gen biểu hiện protein này và *Conogethes punctiferalis* tiếp xúc với protein Cry1Fa bằng cách ăn mô của cây chuyển gen này. Kết quả là, sự phát triển của *Conogethes punctiferalis* bị ức chế và cuối cùng gây chết *Conogethes punctiferalis*, và sau đó sự gây hại của *Conogethes punctiferalis* đối với cây trồng được phòng trừ.

Cây chuyển gen có thể ở giai đoạn phát triển bất kỳ.

Mô của cây chuyển gen có thể là rễ, lá, thân, cụm hoa, bắp, bao phấn hoặc sợi xơ.

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

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

Cây trồng có thể có nguồn gốc từ cây ngô, cây lúa miến, cây kê, cây hướng dương, cây thầu dầu, cây gừng, cây bông, cây đào, cây hồng vàng, cây óc chó, cây dẻ, cây sung hoặc cây thông.

Trước bước tiếp xúc, cây giống của cây chuyển gen chứa polynucleotit mã hóa protein Cry1Fa được trồng.

Tốt hơn, nếu trình tự axit amin của protein Cry1Fa chứa trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:2. Trình tự nucleotit của protein Cry1Fa có trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO:4.

Dựa vào giải pháp kỹ thuật nêu trên, các cây trồng có thể chứa thêm ít nhất một nucleotit thứ hai, nucleotit này khác với protein Cry1Fa.

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

Tốt hơn, nếu nucleotit thứ hai có thể mã hóa protein Cry1Ab, protein Cry1Ac, protein Cry1Ba hoặc protein Vip3A.

Hơn nữa, nucleotit thứ hai có trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO:5 hoặc SEQ ID NO:6.

Tùy ý, nucleotit thứ hai là ARN sợi đôi có tác dụng ức chế gen quan trọng của sâu hại đích.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là lưu đồ để thiết kế vector tách dòng tái tổ hợp DBN01-T chứa trình tự nucleotit của Cry1Fa-01 trong phương pháp phòng trừ sâu hại theo sáng chế;

Fig.2 là lưu đồ để thiết kế vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100014 chứa trình tự nucleotit của Cry1Fa-01 trong phương pháp phòng trừ sâu hại theo sáng chế;

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

Fig.4 thể hiện sự phát triển của ấu trùng *Conogethes punctiferalis* được cấy vào cây ngô chuyển gen trong phương pháp phòng trừ sâu hại theo sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo sáng chế, sự biểu hiện của protein Cry1F ở một cây chuyển gen có thể đi kèm 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 giống như Vip. Sự đồng biểu hiện này của nhiều hơn một độc tố trừ sâu trong cùng cây chuyển gen có thể đạt được bằng kỹ thuật di truyền để tạo ra cây trồng chứa và biểu hiện các gen quan tâm. Ngoài ra, một cây (cây bố mẹ thứ nhất) biểu hiện protein Cry1F bằng kỹ thuật di truyền, trong khi một cây khác (cây bố mẹ thứ hai) biểu hiện protein có hoạt tính trừ sâu giống như Cry và/hoặc protein có hoạt tính trừ sâu giống như Vip bằng kỹ thuật di truyền. Việc lai chéo cây bố mẹ thứ nhất với cây bố mẹ thứ hai thu được cây thế hệ con biểu hiện tất cả các gen đã đưa vào cây bố mẹ thứ nhất và cây bố mẹ thứ hai.

ARN can thiệp (RNA interference: ARNi) được gọi là hiện tượng thoái biến có tính đặc hiệu và hiệu quả cao của các mARN tương đồng gây ra bởi ARN sợi

đôi (double-stranded RNA: dsRNA), được bảo toàn ở mức cao trong quá trình tiến hóa. Do đó, sáng chế có thể sử dụng ARNi để làm mất hoặc ngăn chặn sự biểu hiện gen của sâu hại đích.

Mặc dù cả *Conogethes punctiferalis* và *Agrotis ypsilon Rottemberg* đều thuộc bộ *Lepidoptera* và là sâu ăn tạp, nhưng rõ ràng chúng là hai loài riêng biệt về mặt sinh học. *Conogethes punctiferalis* và *Agrotis ypsilon Rottemberg* có ít nhất các đặc điểm khác biệt sau:

1. Tập tính ăn khác nhau: *Conogethes punctiferalis* thuộc họ *Pyralidae*. Ngoài ngô và lúa miến, *Conogethes punctiferalis* còn ăn đào, lựu và các loại cây ăn quả khác và chủ yếu gây hại các phần phía trên mặt đất của chúng. Trong khi *Agrotis ypsilon Rottemberg* thuộc họ *Noctuidae*, chủ yếu ăn ngô và lúa miến, hiếm khi gây hại đào, lựu, và phần bề mặt hoặc phần dưới đất của cây trồng là mục tiêu chính của chúng.

2. Phạm vi phân bố về mặt địa lý khác nhau: *Conogethes punctiferalis* phân bố không chỉ trong khắp lãnh thổ Trung Quốc mà còn phân bố ở các vùng khác như Nhật Bản, bán đảo Hàn Quốc, Vương quốc Anh và Úc. Trong khi *Agrotis ypsilon Rottemberg* chủ yếu được tìm thấy ở một số vùng của Trung Quốc, nơi có khí hậu ẩm và lượng mưa dồi dào, như vùng châu thổ sông Trường Giang, vùng duyên hải Đông Nam, các vùng có khí hậu ẩm phía đông và phía nam của khu vực Đông Bắc Trung Quốc.

3. Tập tính gây hại khác nhau: Khi tấn công cây lúa miến, trước tiên, ấu trùng *Conogethes punctiferalis* mới nở chui vào hạt cây lúa miến chưa chín, tiếp đó chúng bịt miệng lỗ bằng phân hoặc phần thức ăn thừa, ở đó chúng ăn từng hạt cho đến giai đoạn nhộng 3. Sau giai đoạn nhộng 3, chúng kéo tơ gắn các bông gần nhau thành mạng đường hầm, ở đó chúng ăn hạt cho đến khi không còn lại gì trong trường hợp có dịch hại nghiêm trọng. Ngoài ra, chúng có thể gây hại cho thân. Khi gây hại cho ngô, chúng tập trung chính vào bắp. Sau khi ăn đến hạt non, chúng tạo ra phân dính để bịt lỗ sâu đục và gây hại bên trong. Đồng thời, chúng cũng có thể ăn thân, lá và hạt. Khi gây hại, *Conogethes punctiferalis* thường tạo ra phân dính, điều này sẽ làm gia tăng sự xuất hiện của nấm mốc, đặc biệt là loài *Aspergillus*

flavus, do đó ảnh hưởng đến quá trình xử lý thức ăn. Ở giai đoạn nhộng 1 và 2, ấu trùng *Agrotis ypsilon* Rottemberg tập hợp lại ở những lá non trên ngọn cây giống và ăn lá cả ngày lẫn đêm, nhưng chúng sẽ tản ra ở giai đoạn nhộng 3. Các đặc tính của ấu trùng này bao gồm phản xạ nhanh nhẹn, thói quen giả chết, cực kỳ nhạy cảm với ánh sáng và cuộn tròn lại khi bị động. Vào ban ngày, chúng ẩn nấp giữa các lớp đất khô và ẩm trên mặt đất, trong khi vào ban đêm chúng gặm các cây giống từ dưới mặt đất và kéo các cây này xuống dưới đất hoặc ăn các hạt chưa có mầm. Sau khi thân của các cây giống đã cứng, chúng chuyển sang tấn công các lá non, lá và các ngọn đang lớn. Chúng sẽ di chuyển trong điều kiện không có đủ nguồn thức ăn và kiếm nơi trú qua mùa đông.

4. Đặc tính hình thái học khác nhau.

1) Hình thái học của trứng khác nhau: Trứng *Conogethes punctiferalis* dài khoảng 0,6 đến 0,7mm, và có bề mặt nhám đầy các đốm tròn nhỏ hoặc dạng lưới. Trứng có màu đỏ cam trước khi nở và thường nằm đơn lẻ trên bề mặt nhám. Trong khi trứng của *Agrotis ypsilon* Rottemberg cũng có dạng hình bánh bao nhưng có đường gờ hình chữ thập. Trứng mới được đẻ ra có màu trắng kem rồi chuyển dần sang màu vàng; một chấm màu đen sẽ xuất hiện ở một đỉnh của quả trứng trước khi nó nở.

2) Hình thái học của ấu trùng khác nhau: Cơ thể của ấu trùng *Conogethes punctiferalis* dài 22mm, thân của chúng có nhiều màu sắc khác nhau từ xám nhạt đến đỏ thẫm: bụng thường có màu xanh nhạt, đầu màu tối, lưng màu đỏ thẫm, bụng màu xanh nhạt, và đốt ngực trước và đốt hậu môn màu nâu thẫm. Mỗi khúc trên cơ thể của ấu trùng này có các vệt lông rõ ràng với màu sắc từ nâu thẫm đến nâu đen. Mỗi vệt lông từ vệt thứ nhất đến vệt thứ tám đầu tiên của phần bụng có tám vệt, và chúng được sắp xếp thành hai hàng: hàng trước có khoảng sáu vệt lớn hơn trong khi hàng sau có hai vệt nhỏ hơn. Sau giai đoạn nhộng 3, hai tuyến sinh dục màu nâu thẫm lộ ra trên đoạn thứ năm của phần bụng của ấu trùng đực. Ngược lại, ấu trùng trưởng thành của *Agrotis ypsilon* Rottemberg dài từ 37 đến 50mm, đầu có màu nâu với các dải mắt lưới màu nâu đậm không đều. Thân của chúng màu nâu sẫm hoặc tối và bề ngoài xù xì có nhiều chấm có kích thước khác nhau. Đường

sống lưng và đường dưới bụng và đường lỗ thở đều có màu nâu đen, đốt ngực trước màu tối sẫm, đốt hậu môn màu ngăm đen với hai dải trắng đứng riêng biệt màu nâu sẫm, và khúc ngực mang chân và chân giả màu ngăm đen.

3) Hình thái học của nhộng khác nhau: Nhộng *Conogethes punctiferalis* dài 12mm và có màu xanh vàng nhạt ở giai đoạn đầu và dần chuyển sang màu nâu đen. Đầu và lưng từ đốt thứ nhất đến đốt thứ tám được phủ bởi lớp lông ngắn dày, và phần phân chia giữa phần phía trước từ đốt thứ năm đến đốt thứ bảy của phần bụng có một đường nổi lên tạo ra phần lồi có hình răng cưa nhỏ. Ở cuối của phần bụng, có sáu gai mảnh và cong hình móc câu. Ngược lại, nhộng *Agrotis ypsilon Rottermberg* dài từ 18 đến 24mm và có màu nâu vàng sáng. Phần miệng có hai râu dài đến cuối khúc bụng thứ tư. Giữa các khúc bụng từ 4 đến 7 có màu nâu sẫm với các vết lõm đốm thô, và có các vết đốm song song nhỏ kéo dài tới lỗ thở. Phần phía trước của các khúc bụng từ 5 đến 7 cũng có các vết lõm đốm nhỏ. Phía cuối bụng có một cặp gai ngắn.

4) Hình thái học của sâu trưởng thành khác nhau: *Conogethes punctiferalis* trưởng thành dài 12mm và có sải cánh dài từ 22 đến 25mm. *Conogethes punctiferalis* trưởng thành có màu vàng đến cam với nhiều đốm đen ở ngực, bụng và cánh. Hai bên đốt ngực trước có nhiều lông và cả hai đều có một đốm màu đen. Phần cuối đốt thứ chín của phần bụng của con sâu bướm đực có màu đen tuyền, khá ngắn và có cụm màu đen. Phần cuối bụng sâu bướm cái có hình nón, và ở phần sau cùng, có một số đốm màu đen nằm phía tận cùng lưng. Ngược lại, *Agrotis ypsilon Rottermberg* trưởng thành dài từ 17 đến 23mm và sải cánh dài từ 40 đến 54mm. Đầu và phía sau ngực có màu tối, và chân có màu nâu. Đốt ống chân trước và xương cổ chân có màu nâu sẫm và phần cuối của tất cả các khúc của chân giữa và chân sau đều có các dải hình khuyên màu nâu sẫm. Cánh trước màu nâu có các vùng màu nâu đen ở phía trước, các đường biên ngoài có màu tối sẫm, các đường nền màu nâu nhạt và các đường ngang gọn sóng màu đen theo đường kép. Có một đốm nhỏ hình tròn màu xám ở giữa các dải hình khuyên màu đen. Hình khuyên dạng thận màu đen và có biên màu đen. Phần giữa bên ngoài của hình khuyên dạng thận có hình khuyên màu đen dạng hình nêm, kéo dài tới các đường ngang kéo dài.

Các đường ngang ở giữa có dạng hình gợn sóng màu tối sẫm. Các đường ngang kéo dài hình gợn sóng kép màu nâu. Các đường biên bên ngoài có dạng răng cưa không đều đặn và màu xám, phần giữa của đường biên bên trong có ba răng nhọn. Có các chấm nhỏ màu đen trên mỗi vân giữa đường biên ngoài và đường ngang bên ngoài. Đường biên ngoài cùng màu đen. Màu sắc của phần nằm giữa đường ngang ngoài và đường biên ngoài là màu nâu nhạt. Màu sắc của phần ngoài đường biên ngoài là màu nâu đen. Cánh sau màu trắng sẫm. Vân dọc và đường biên màu nâu. Lưng màu xám.

5. Tập tính sinh trưởng khác nhau: Số lượng lúa trong một năm thay đổi theo vị trí địa lý đối với sự sinh trưởng của *Conogethes punctiferalis*: từ 1 đến 2 lứa ở tỉnh Liêu Ninh, trong khi có tới 3 lứa ở tỉnh Hà Bắc, Sơn Đông hoặc Thiểm Tây, 4 lứa ở tỉnh Hà Nam, và có từ 4 đến 5 lứa ở thung lũng sông Trường Giang. Tất cả các lứa này đều sống qua mùa đông bằng cách tạo kén trong gốc cây ngô, cây hướng dương, cây thầu dầu, v.v.. Tại tỉnh Hồ Nam, ấu trùng của lứa thứ nhất gây hại cho cây đào từ cuối tháng năm đến cuối tháng sáu, ấu trùng của lứa 2 và 3 gây hại cho cả cây đào và lúa miến trong khi ấu trùng lứa 4 chỉ gây hại cây lúa miến và cây hướng dương trong vụ hè. Ấu trùng của lứa thứ 4 sống qua mùa đông. Vào năm tiếp theo, ấu trùng sống sót qua mùa đông hóa nhộng vào đầu tháng tư và giai đoạn đỉnh của sự hóa nhộng vào cuối tháng tư. Ấu trùng nở ra từ cuối tháng tư đến cuối tháng năm và dạng trưởng thành của lứa trải qua mùa đông này đẻ trứng trên cây đào. Ấu trùng của lứa thứ nhất hóa nhộng từ giữa tháng sáu đến cuối tháng sáu và dạng trưởng thành của lứa thứ nhất bắt đầu xuất hiện vào cuối tháng sáu và sau đó giai đoạn đỉnh của sự nở từ trứng vào đầu tháng bảy. Sau đó là giai đoạn đỉnh của sự nở từ trứng của lứa thứ hai khi lúa miến vụ xuân bắt đầu tạo đồng và ra hoa. Mức độ gây hại của ấu trùng lứa thứ hai cao điểm là vào giữa tháng bảy. Giai đoạn đỉnh của sự nở từ trứng của lứa thứ hai là vào đầu và giữa tháng tám, khi lúa miến vụ xuân bắt đầu chín và lúa miến gieo cuối mùa xuân và lúa miến gieo đầu mùa hè đang trong giai đoạn tạo đồng và trở bông. Dạng trưởng thành này đẻ trứng chủ yếu trên cây lúa miến. Trứng của lứa thứ ba nở vào cuối tháng bảy hoặc đầu tháng tám. Mức độ gây hại của ấu trùng lứa thứ ba nghiêm trọng nhất là vào giữa và cuối tháng tám. Dạng trưởng thành của lứa thứ ba xuất hiện vào cuối tháng tám và phát

triển mạnh vào đầu và giữa tháng chín, khi cây lúa miến và quả đào được thu hoạch. Dạng trưởng thành này đẻ trứng trên cây lúa miến cuối vụ hè và cây hướng dương chín muộn. Sự gây hại của ấu trùng lúa thứ tư là từ giữa tháng chín đến giữa tháng mười. Ấu trùng lúa thứ tư này sống qua mùa đông khi nhiệt độ hạ xuống thấp trong khoảng giữa và cuối tháng mười. Tại Hà Nam, giai đoạn trứng của lúa thứ nhất là 8 ngày, trong khi giai đoạn trứng của lúa thứ hai là 4,5 ngày, của lúa thứ ba là 4,2 ngày và của lúa qua mùa đông là 6 ngày. Giai đoạn ấu trùng của lúa thứ nhất là 19,8 ngày, trong khi giai đoạn ấu trùng của lúa thứ hai là 13,7 ngày, của lúa thứ ba là 13,2 ngày và của lúa trải qua mùa đông là 208 ngày. Ấu trùng có 5 giai đoạn. Giai đoạn nhộng của lúa thứ nhất là 8,8 ngày, trong khi giai đoạn nhộng của lúa thứ hai là 8,3 ngày, của lúa thứ ba là 8,7 ngày và của lúa sống qua mùa đông là 19,4 ngày. Giai đoạn trưởng thành của lúa thứ nhất là 7,3 ngày, trong khi giai đoạn trưởng thành của lúa thứ hai là 7,2 ngày, của lúa thứ ba là 7,6 ngày và của lúa sống qua mùa đông là 10,7 ngày. Sau khi trứng nở, dạng trưởng thành ẩn vào cánh đồng lúa miến và chỉ đẻ trứng thông qua nguồn dinh dưỡng đặc biệt, và chúng đẻ trứng trên cây lúa miến tạo đồng và ra hoa. Trứng này là từng quả riêng lẻ và mỗi sâu cái trưởng thành đẻ trung bình 169 trứng với từ 3 đến 5 trứng trên mỗi bẹ lá. Tại Nghi Tân thuộc tỉnh Tứ Xuyên, dạng trưởng thành đẻ trứng trên bẹ lá và cụm hoa, mép lá bao hoặc mặt trước và mặt sau của bẹ lá ở trạng thái trổ cờ đến trạng thái trưởng thành của ngô vụ thu, và số lượng trứng lên tới 1729 trứng trên một trăm cây ngô. Sau khi trưởng thành, ấu trùng này sống qua mùa đông trong bẹ lá hoặc trong nách lá, vỏ bao phiến lá, lá khô và cuống lá lúa miến, ngô và hướng dương. Mức độ gây hại nặng nhất vào năm có mưa nhiều. Trong những năm gần đây, phía tây bắc của Trung Quốc có lượng mưa lớn do ảnh hưởng của hiệu ứng nhà kính trên toàn cầu, điều này khiến cho *Conogethes punctiferalis* trở thành sâu hại chính đối với cây ngô ở miền bắc Trung Quốc. Do chúng ăn nhiều loại thức ăn và thường lây nhiễm giữa các vật chủ khác nhau và ưa thích nhất là chui vào và đục lỗ thông từ quả đến bẹ lá và thân, nên việc phun thuốc trừ sâu khó thông thường khó phòng trừ được chúng. Ngược lại, *Agrotis ypsilon* Rottermberg có 3 đến 4 lứa trong một năm. Ấu trùng trưởng thành hoặc nhộng trú đông trong đất và dạng trưởng thành bắt đầu xuất hiện vào tháng ba. Nói chung, có hai thời kỳ cao điểm ngài xuất hiện, đó là:

cuối tháng ba và giữa tháng tư. Con trưởng thành không hoạt động vào ban ngày và hoạt động từ lúc chạng vạng cho đến nửa đêm. Chúng có tính hướng sáng và thích vị chua, ngọt, vị lên men rượu, và các vị mật hoa khác nhau. Ấu trùng trải qua sáu giai đoạn: ở giai đoạn 1 và 2, ấu trùng trốn trong hạt hoặc bên trong lá cây, chúng ăn cả ngày và đêm nhưng không đáng kể, và vì thế gây hại không đáng kể; sau giai đoạn 3, chúng trốn dưới lớp đất bề mặt vào ban ngày và gây hại vào ban đêm; ở giai đoạn 5 và 6, ấu trùng bắt đầu có sự phàm ăn tăng lên đáng kể và mỗi ấu trùng này có thể cắn trung bình từ 4 đến 5 cây giống, thậm chí lên tới 10 cây giống trong các trường hợp gây hại nặng; và từ giai đoạn 3, sự kháng thuốc trừ sâu của chúng tăng lên đáng kể. Mức độ gây hại mạnh nhất do lúa thứ nhất của ấu trùng là từ cuối tháng ba đến giữa tháng tư. Các lứa xuất hiện từ tháng 10 đến tháng 4 của năm tiếp theo và gây hại. Số lượng các lứa trong một năm thay đổi theo khu vực địa lý: từ 2 đến 3 lứa một năm ở phía tây nam Trung Quốc, từ 2 đến 3 lứa một năm ở phía bắc Vạn Lý Trường Thành, 3 lứa một năm từ miền nam Vạn Lý Trường Thành đến miền bắc sông Hoàng Hà, 4 lứa một năm từ miền nam sông Hoàng Hà đến sông Trường Giang, từ 4 đến 5 lứa một năm ở phía nam sông Trường Giang và từ 6 đến 7 lứa một năm ở vùng rừng nhiệt đới của Nam Á. Tuy nhiên, bất kể sự khác biệt về số lượng lứa trong một năm, mức độ gây hại lớn nhất thường do ấu trùng của lứa thứ nhất gây ra. Dạng trưởng thành của lứa qua mùa đông xuất hiện vào tháng hai ở miền nam. Tuy nhiên, giai đoạn nở trứng mạnh nhất thường xuất hiện từ cuối tháng ba đến giữa tháng tư ở phần lớn các vùng ở Trung Quốc, ngoại trừ giai đoạn này ở tỉnh Ninh Hạ và Nội Mông xuất hiện vào cuối tháng tư. Dạng trưởng thành của *Agrotis ypsilon* Rottemberg có nhiều khả năng bắt đầu nở trứng từ 3 giờ chiều đến 10 giờ đêm. Chúng trốn trong các mảnh vỡ và kẽ nứt vào ban ngày và bắt đầu hoạt động, bay và tàn phá, sau khi trời tối. Sau từ 3 đến 4 ngày, chúng bắt đầu giao hợp và đẻ trứng. Trứng này chủ yếu ở trên cỏ mật độ cao và ngắn và trên cây giống, và đôi khi ở lá khô và kẽ nứt. Phần lớn trứng nằm gần mặt đất. Mỗi con cái có thể đẻ từ 800 đến 1000 trứng, hoặc thậm chí có thể đẻ tới 2000 trứng trong khoảng thời gian đẻ trứng của chúng khoảng 5 ngày. Giai đoạn ấu trùng gồm 6 giai đoạn và một số sâu hại có thể có thể có từ 7 đến 8 giai đoạn. Giai đoạn ấu trùng thay đổi giữa các vùng khác nhau nhưng lứa thứ nhất thường có thời gian này từ 30 đến 40 ngày.

Khi trưởng thành hoàn toàn, chúng phát triển thành nhộng trong trong các khoang đất cách mặt đất khoảng 5cm và giai đoạn nhộng kéo dài từ 9 đến 19 ngày. Nhiệt độ cao thường không thích hợp cho sự phát triển và sinh sản của *Agrotis ypsilon Rottemberg*, và do đó chúng thường ít xuất hiện trong mùa hè. Nhiệt độ sống tối ưu nằm trong khoảng từ 15°C đến 25°C. Tỷ lệ chết của ấu trùng *Agrotis ypsilon Rottemberg* tăng lên khi nhiệt độ mùa đông quá thấp, và tỷ lệ này giảm đi ở những nơi có địa hình thấp và ẩm ướt và có mưa nhiều. Ngoài ra, các điều kiện có lợi cho sự đẻ trứng và nguồn thức ăn của ấu trùng như mưa nhiều vào mùa thu, độ ẩm của đất cao và cỏ phát triển quá mức có thể dẫn đến sự bùng phát dịch vào năm sau. Tuy nhiên, nếu mưa quá nhiều và độ ẩm quá cao là các điều kiện bất lợi cho sự phát triển của ấu trùng do ấu trùng ở giai đoạn đầu tiên rất dễ bị chết trong môi trường này. Các vùng có hàm lượng ẩm của đất nằm trong khoảng từ 15 đến 20% trong giai đoạn đỉnh của sự đẻ trứng sẽ bị gây hại ở mức độ nặng hơn. Đất sét pha cát là thích hợp hơn cho sự sinh sản của *Agrotis ypsilon Rottemberg* so với đất sét và đất cát, do khả năng thấm nước và ráo nước nhanh tốt hơn của nó.

Nói chung, rõ ràng là *Conogethes punctiferalis* và *Agrotis ypsilon Rottemberg* là hai loài khác nhau và không thể lai chéo được.

Theo sáng chế, hệ gen của cây trồng, mô của cây trồng hoặc tế bào của cây trồng để chỉ vật liệu di truyền bất kỳ ở cây trồng, mô hoặc tế bào của cây trồng, kể cả nhân, thể hạt và hệ gen của thể hạt sợi.

Theo sáng chế, các polynucleotit và/hoặc nucleotit cấu thành "gen" hoàn chỉnh và mã hóa protein hoặc polypeptit trong tế bào chủ mong muốn. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ dễ dàng nhận thấy rằng các polynucleotit và/hoặc nucleotit này có thể được đưa vào trong điều kiện có kiểm soát của các trình tự điều hòa của vật chủ đích.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cũng sẽ biết rõ là ADN thường tồn tại ở dạng được gọi là cấu trúc sợi đôi. Theo sự sắp xếp này, một sợi là sợi bổ trợ cho sợi còn lại, và ngược lại. ADN tạo ra các sợi bổ trợ trong quá trình sao chép ở cây trồng, do đó, sáng chế bao gồm việc sử dụng các polynucleotit làm ví dụ trong danh mục trình tự và các sợi bổ trợ của chúng. Thuật ngữ "sợi mã hóa"

thường được sử dụng trong lĩnh vực này để chỉ sợi gắn kết với sợi đối mã. Để biểu hiện các protein *in vivo*, một sợi ADN thường được phiên mã thành sợi hỗ trợ dưới dạng ARN thông tin (mARN), sợi này được sử dụng làm khuôn để dịch mã thành protein. Trên thực tế, mRNA được phiên mã từ sợi "đối mã" của ADN. Sợi "có nghĩa" hoặc "mã hóa" có các dãy codon (một codon chứa ba nucleotit mã hóa axit amin cụ thể), và sợi này có thể được sử dụng làm khung đọc mở (open reading frame: ORF) và được dịch mã thành protein hoặc peptit. Sáng chế cũng bao hàm ARN và peptit axit nucleic (peptid nucleic acid: PNA), chúng có các chức năng quan trọng làm ADN làm ví dụ.

Theo sáng chế, các phân tử axit nucleic hoặc mảnh của chúng lai với gen Cry1F theo sáng chế trong điều kiện nghiêm ngặt. Phương pháp lai hoặc khuếch đại axit nucleic thông thường bất kỳ có thể được sử dụng để xác định sự có mặt của gen Cry1F theo sáng chế. Các phân tử axit nucleic hoặc mảnh của chúng trong một số trường hợp có thể lai đặc hiệu với các phân tử axit nucleic khác. Theo sáng chế, nếu hai phân tử axit nucleic có thể tạo thành cấu trúc axit nucleic sợi đôi đối song song, có thể nói rằng hai phân tử axit nucleic này có thể lai với nhau một cách đặc hiệu. Nếu hai phân tử axit nucleic này có tính hỗ trợ toàn vẹn thì một phân tử axit nucleic được gọi là "sợi hỗ trợ" của phân tử axit nucleic còn lại. Theo sáng chế, nếu toàn bộ nucleotit của một phân tử axit nucleic hỗ trợ cho nucleotit tương ứng của phân tử axit nucleic khác thì hai phân tử axit nucleic này được gọi là có "tính hỗ trợ toàn vẹn". Nếu hai phân tử axit nucleic có thể lai với nhau ở trạng thái đủ ổn định và gắn kết với nhau sau khi lai trong điều kiện ít nhất là có "tính nghiêm ngặt thấp" thông thường thì hai phân tử axit nucleic này được gọi là phân tử có "tính hỗ trợ tối thiểu". Tương tự, nếu hai phân tử axit nucleic này có thể lai với nhau ở trạng thái đủ ổn định và vẫn gắn kết với nhau sau khi lai trong điều kiện "nghiêm ngặt ở mức cao" thông thường thì hai phân tử axit nucleic này được gọi là có "tính hỗ trợ". Độ lệch so với tính hỗ trợ toàn vẹn có thể chấp nhận được miễn là độ lệch này không ngăn chặn hoàn toàn việc hai phân tử tạo thành cấu trúc sợi đôi. Để đảm bảo rằng phân tử axit nucleic có thể được sử dụng làm đoạn mồi hoặc đoạn dò, trình tự của nó phải có đủ tính hỗ trợ sao cho nó có thể tạo ra cấu trúc sợi đôi ổn định trong dung môi và nồng độ muối cụ thể.

Theo sáng chế, trình tự gần như tương đồng là phân tử axit nucleic, mà trong điều kiện lai nghiêm ngặt ở mức cao, có thể lai đặc hiệu với sợi bổ trợ thích hợp của phân tử axit nucleic khác. Điều kiện nghiêm ngặt thích hợp để lai ADN, ví dụ, xử lý bằng 6,0x natri clorua/natri xitrat (SSC) ở nhiệt độ khoảng 45°C và sau đó rửa bằng 2,0x SSC ở nhiệt độ 50°C, là đã được biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Ví dụ, trong bước rửa, nồng độ muối có thể được chọn từ điều kiện nghiêm ngặt ở mức thấp là khoảng 2,0x SSC đến điều kiện nghiêm ngặt ở mức cao là khoảng 0,2x SSC ở nhiệt độ 50°C. Ngoài ra, nhiệt độ trong bước rửa có thể được chọn từ điều kiện nghiêm ngặt ở mức thấp là nhiệt độ trong phòng khoảng 22°C đến điều kiện nghiêm ngặt ở mức cao là khoảng 65°C. Cả nhiệt độ và nồng độ của muối đều có thể được thay đổi, hoặc có thể giữ nguyên một thông số trong khi thông số còn lại được thay đổi. Tốt hơn, nếu các điều kiện nghiêm ngặt theo sáng chế là: lai đặc hiệu với trình tự SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 4 trong 6x SSC, dung dịch SDS 0,5% ở nhiệt độ 65°C, và sau đó, rửa màng bằng 2x SSC, SDS 0,1% và 1x SSC, SDS 0,1%, mỗi loại một lần.

Do đó, sáng chế cũng đề xuất trình tự có hoạt tính kháng sâu hại và có khả năng lai với trình tự SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 4 trong các điều kiện nghiêm ngặt. Các trình tự này có độ tương đồng trình tự ít nhất là nằm trong khoảng từ 40% đến 50% so với trình tự theo sáng chế, có độ tương đồng khoảng 60%, 65% hoặc 70% hoặc thậm chí ít nhất khoảng 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93 %, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc cao hơn so với trình tự theo sáng chế.

Các gen và protein được mô tả trong sáng chế bao gồm, không chỉ các trình tự được đưa ra làm ví dụ cụ thể, mà còn cả các phần và/hoặc mảnh của nó (bao gồm cả các trình tự có sự khuyết đoạn bên trong và/hoặc ở đầu tận cùng so với các protein có chiều dài đầy đủ), các biến thể, thể đột biến và chất thay thế (protein có axit amin được thế), protein thể khảm và protein dung hợp của chúng có hoạt tính trừ sâu của các protein làm ví dụ. Các thuật ngữ "thể đột biến" hoặc "biến thể" để chỉ trình tự nucleotit mã hóa cùng một protein hoặc protein tương đương có hoạt tính trừ sâu. Thuật ngữ "protein tương đương" để chỉ protein có cùng hoặc gần như có cùng hoạt tính sinh học kháng *Conogethes punctiferalis* như protein được yêu

cầu bảo hộ.

Thuật ngữ "mảnh" hoặc "sự cắt cụt" của các trình tự ADN hoặc protein được mô tả trong sáng chế để chỉ phần hoặc dạng được cải biến bằng phương pháp nhân tạo (như các trình tự thích hợp để biểu hiện ở cây trồng) của các trình tự ADN hoặc protein ban đầu (nucleotit hoặc axit amin). Chiều dài của các trình tự nêu trên có thể thay đổi nhưng nó phải đủ dài để đảm bảo protein này (được mã hóa) vẫn là độc tố đối với sâu hại.

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

Theo sáng chế, các protein và/hoặc gen tương đương mã hóa các protein tương đương này có thể có nguồn gốc từ thể phân lập *B.t.* và/hoặc thư viện ADN. Có nhiều cách khác nhau để thu được protein có hoạt tính trừ sâu theo sáng chế. Ví dụ, kháng thể của protein có hoạt tính trừ sâu được bộc lộ và yêu cầu bảo hộ bởi sáng chế có thể được sử dụng để nhận biết và phân lập các protein khác từ hỗn hợp của các protein. Cụ thể, các kháng thể có thể được tạo ra bằng các phản cố định nhất và các phản khác biệt nhất của các protein *B.t.* khác. Bằng cách kết tủa miễn dịch, thử nghiệm hấp phụ miễn dịch liên kết enzym (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA) hoặc thẩm tách Western, các kháng thể này có thể được sử dụng để nhận biết đặc hiệu các protein tương đương với hoạt tính đặc trưng. Các kỹ thuật chuẩn trong lĩnh vực này có thể được sử dụng để tạo ra kháng

thể của protein hoặc dạng tương đương hoặc mảnh của nó được bộc lộ trong sáng chế. Ngoài ra, các gen mã hóa các protein này có thể thu được từ các vi sinh vật.

Do có rất nhiều mã di truyền, có nhiều trình tự ADN khác nhau có thể mã hóa cùng một trình tự axit amin. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ có thể tạo ra trình tự ADN khác để mã hóa cùng một hoặc về cơ bản là cùng loại protein. Các trình tự ADN khác nhau này đều nằm trong phạm vi của sáng chế. Thuật ngữ các trình tự “về cơ bản là giống” bao gồm cả mảnh có hoạt tính trừ sâu, để chỉ các trình tự có sự thay thế, làm khuyết đoạn, bổ sung hoặc chèn thêm axit amin nhưng hoạt tính trừ sâu của nó gần như không bị ảnh hưởng.

Theo sáng chế, việc thay thế, làm khuyết đoạn hoặc bổ sung trong trình tự axit amin là kỹ thuật thông thường trong lĩnh vực này. Tốt hơn, nếu các thay đổi về trình tự axit amin này là: thay đổi một chút về đặc tính, nghĩa là sự thay thế axit amin bảo toàn mà không làm ảnh hưởng đáng kể đến sự cuộn gấp và/hoặc hoạt tính của protein; làm khuyết một đoạn ngắn, thường là từ 1 đến 30 axit amin; sự kéo dài đầu amin hoặc đầu cacboxyl nhỏ, như kéo dài đầu amin của gốc methionin; nhóm liên kết peptit nhỏ, ví dụ, có chiều dài khoảng từ 20 đến 25 gốc.

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

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ biết rằng sự thay thế này có thể xuất hiện ở ngoài vùng đóng vai trò quan trọng đối với chức năng của phân tử và vẫn tạo ra polypeptit có hoạt tính. Đối với polypeptit theo sáng chế, các gốc

axit amin cần thiết cho hoạt tính của chúng không được chọn để thay thế, và các gốc này có thể được nhận biết bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này như phương pháp đột biến định hướng vị trí hoặc phương pháp đột biến sàng lọc alanin (xem tài liệu: Cunningham and Wells, 1989, Science 244: 1081-1085). Kỹ thuật đột biến sàng lọc alanin là đưa (các) đột biến vào mỗi gốc có điện tích dương trong phân tử và phát hiện hoạt tính kháng sâu hại của thể đột biến tạo thành, và sau đó xác định xem các gốc axit amin nào là quan trọng đối với hoạt tính của phân tử. Các vị trí tương tác enzym-cơ chất có thể được nhận biết bằng phương pháp phân tích cấu trúc ba chiều của chúng, các cấu trúc này có thể được xác định bằng cách phân tích cộng hưởng từ hạt nhân, tinh thể học, đánh dấu ái lực quang v.v. (xem tài liệu: 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, các protein Cry1F bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, protein Cry1Fa2, Cry1Fa3, Cry1Fb3, Cry1Fb6 và Cry1Fb7, các mảnh hoặc vùng chức năng có hoạt tính trừ sâu và có độ tương đồng ít nhất 70% so với trình tự axit amin của protein nêu trên và có hoạt tính trừ sâu hại *Conogethes punctiferalis*.

Do đó, sáng chế cũng bao gồm các trình tự axit amin có tính tương đồng nhất định với trình tự SEQ ID NO: 1 và/hoặc 2. Thông thường, tính tương đồng/tính tương tự/tính đồng nhất của các trình tự này so với các trình tự theo sáng chế là cao hơn 60%, tốt hơn là cao hơn 75%, tốt hơn nữa là cao hơn 80%, đặc biệt tốt hơn là cao hơn 90% và có thể cao hơn 95%. Ngoài ra, các polynucleotit và protein được ưu tiên theo sáng chế có thể được xác định bằng khoảng cụ thể hơn của tính đồng nhất và/hoặc tính tương tự và/hoặc tính đồng nhất, ví dụ, có tính tương đồng và/hoặc tính tương tự và/hoặc tính đồng nhất 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 làm ví dụ của sáng chế.

Các trình tự điều hòa được mô tả trong sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, trình tự khởi đầu, peptit chuyển tiếp, trình tự kết thúc, trình tự tăng

cường, trình tự dẫn đầu, các trình tự intron và trình tự điều hòa khác có thể được liên kết khi hoạt động với protein Cry1F.

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

Peptit chuyển tiếp, còn được gọi là trình tự tín hiệu kích thích sự tiết hoặc trình tự định hướng sự tiết, có thể định hướng các sản phẩm chuyển gen đến cơ quan tế bào hoặc khoang tế bào cụ thể. Các peptit chuyển tiếp này cũng có thể khác loại với protein đích. Ví dụ, các trình tự mã hóa peptit chuyển tiếp hạt diệp lục được sử dụng để hướng đích hạt diệp lục, hoặc trình tự duy trì 'KDEL' được sử dụng để hướng đích lưới nội bào tương, hoặc CTPP của gen lectin cây lúa mạch được sử dụng để hướng đích không bào.

Các trình tự dẫn đầu bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, trình tự dẫn đầu

của virus có ARN nhỏ, như trình tự dẫn đầu của EMCV (vùng không mã hóa ở đầu 5' của EMCV (encephalomyocarditis virus: virus gây não cơ tim)); trình tự dẫn đầu của potyvirus, như trình tự dẫn đầu virus thể khảm lùn ở ngô (maize dwarf mosaic virus: MDMV); protein gắn kết chuỗi nặng globulin miễn dịch của người (BiP); trình tự dẫn đầu không dịch mã của mRNA protein lớp vỏ của virus thể khảm cỏ linh lăng (AMV RNA4); và trình tự dẫn đầu của virus thể khảm (TMV) cây thuốc lá.

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

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

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

"Sự liên kết có hiệu quả" được mô tả trong sáng chế nghĩa là sự liên kết của

các trình tự axit nucleic và sự liên kết này cho phép các trình tự tạo ra chức năng mong muốn cho các trình tự đã được liên kết. "Sự liên kết có hiệu quả" được mô tả trong sáng chế có thể là sự liên kết giữa các trình tự khởi đầu và trình tự quan tâm, và nhờ đó sự phiên mã của trình tự quan tâm được kiểm soát và điều hòa bởi trình tự khởi đầu. Khi trình tự của protein mã hóa quan tâm và sự biểu hiện của protein là mong muốn, "sự liên kết có hiệu quả" nghĩa là trình tự khởi đầu này được liên kết với trình tự đó theo cách sao cho chúng khiến cho các sản phẩm phiên mã tạo thành được dịch mã với hiệu quả cao. Nếu sự liên kết của trình tự khởi đầu và trình tự mã hóa tạo ra các sản phẩm phiên mã dung hợp và sự biểu hiện của protein đã mã hóa là mong muốn, thì sự liên kết này cho phép codon khởi đầu của sản phẩm phiên mã tạo thành là codon ban đầu của trình tự mã hóa. Theo cách khác, nếu sự liên kết của trình tự khởi đầu và trình tự mã hóa tạo ra sự dịch mã dung hợp và sự biểu hiện của protein là mong muốn thì sự liên kết này cho phép codon khởi đầu thứ nhất được chứa trong trình tự không được dịch mã ở đầu 5' cần được liên kết với trình tự khởi đầu, và sản phẩm dịch mã tạo thành nằm trong khung so với khung đọc mở của protein quan tâm. Trình tự axit nucleic để "liên kết có hiệu quả" bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các trình tự tạo ra gen có chức năng biểu hiện, ví dụ, các thành phần biểu hiện gen, như trình tự khởi đầu, vùng không được dịch mã ở đầu 5', intron, vùng mã hóa protein, vùng không được dịch mã ở đầu 3', vị trí polyadenyl hóa và/hoặc trình tự kết thúc phiên mã; trình tự tạo ra sự vận chuyển và/hoặc hợp nhất ADN, nghĩa là các trình tự bao T-ADN, vị trí nhận biết của recobinaza đặc hiệu vị trí, vị trí nhận biết integraza; trình tự tạo ra sự chọn lọc nghĩa là các dấu hiệu kháng kháng sinh, các gen sinh tổng hợp; trình tự tạo ra dấu hiệu đánh dấu và hoạt động hỗ trợ *in vitro* hoặc *in vivo*, nghĩa là trình tự của nhóm đa liên kết, trình tự tái tổ hợp đặc hiệu vị trí; và trình tự tạo ra sự sao chép, nghĩa là sự sao chép có nguồn gốc từ vi khuẩn, trình tự tự sao chép, và trình tự trung tâm.

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

Theo sáng chế, protein Cry1F có tính gây độc tế bào đối với *Conogethes punctiferalis*. Cây chuyển gen, đặc biệt là cây ngô và cây lúa miến, trong đó hệ gen

của chúng chứa ADN ngoại sinh có các trình tự nucleotit mã hóa protein Cry1F, có thể dẫn đến sự kìm hãm sinh trưởng và cuối cùng là gây chết *Conogethes punctiferalis* bằng cách cho chúng tiếp xúc với protein này sau khi ăn mô của cây trồng. Sự kìm hãm là gây chết hoặc cận gây chết. Đồng thời, các cây trồng phải có hình thái học bình thường và có thể được trồng bằng phương pháp thông thường để thu hoạch và/hoặc tạo ra sản phẩm. Ngoài ra, cây chuyển gen này có thể hầu như không phải sử dụng thuốc trừ sâu sinh học hoặc hóa học là chất hướng đích Cry1F đối với *Conogethes punctiferalis*.

Mức độ biểu hiện của các protein dạng tinh thể trừ sâu (ICP) trong mô của cây trồng có thể được xác định bằng nhiều phương pháp khác nhau trong lĩnh vực này, ví dụ, phương pháp định lượng mRNA mã hóa các protein có hoạt tính trừ sâu bằng các đoạn môi đặc hiệu, hoặc phương pháp định lượng trực tiếp các protein có hoạt tính trừ sâu.

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

Theo sáng chế, protein Cry1F có thể chứa trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 và/hoặc SEQ ID NO: 3 trong danh mục trình tự. Ngoài vùng mã hóa protein Cry1F, cũng có thể thu được các thành phần khác, như các vùng mã hóa protein đánh dấu chọn lọc.

Hơn nữa, cát xét biểu hiện chứa trình tự nucleotit mã hóa protein Cry1F theo sáng chế có thể biểu hiện đồng thời ít nhất là một hoặc nhiều gen mã hóa protein kháng thuốc diệt cỏ. Các gen kháng thuốc diệt cỏ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các gen kháng glufosinat, như gen *bar* và gen *pat*; các gen kháng phenmedipham, như gen *pmph*; các gen kháng glyphosat, như gen *EPSPS*; các gen kháng bromoxynil; các gen kháng sulfonylure; các gen kháng thuốc diệt cỏ dalapon; các gen kháng xyanamit; hoặc các gen kháng chất ức chế glutamin synthetaza như *PPT*, nhờ đó thu được cây chuyển gen có cả hoạt tính trừ sâu cao và khả năng kháng thuốc diệt cỏ cao.

Theo sáng chế, ADN ngoại lai được đưa vào cây trồng; ví dụ, các gen hoặc

cát xét biểu hiện hoặc các vector tái tổ hợp mã hóa protein Cry1F được đưa vào các tế bào của cây trồng. Các phương pháp biến nạp thông thường bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, biến nạp qua trung gian *Agrobacterium*, phương pháp bắn phá bằng các hạt cỡ micro, phương pháp hấp thu ADN trực tiếp của các hạt nguyên sinh, phương pháp đánh thủng bằng điện, hoặc phương pháp đưa ADN vào qua trung gian sợi tinh thể silic.

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

1. Phòng trừ từ bên trong. Các kỹ thuật hiện nay chủ yếu thông qua tác dụng từ bên ngoài, nghĩa là các yếu tố bên ngoài để phòng trừ sự nhiễm *Conogethes punctiferalis*, như phòng trừ bằng biện pháp nông nghiệp và phòng trừ bằng biện pháp hóa học. Trong khi sáng chế sử dụng Cry1F được tạo ra bởi cây trồng để tiêu diệt *Conogethes punctiferalis* và sau đó phòng trừ *Conogethes punctiferalis*, nghĩa là thông qua các yếu tố bên trong để phòng trừ.

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

3. Phòng trừ trong toàn bộ thời kỳ sinh trưởng. Các phương pháp phòng trừ *Conogethes punctiferalis* trong lĩnh vực này là theo thời kỳ, trong khi sáng chế tạo ra cây trồng có khả năng bảo vệ trong toàn bộ thời kỳ sinh trưởng của nó. Nghĩa là cây chuyển gen (có Cry1F) từ khi nảy mầm, sinh trưởng, cho đến khi nở hoa, ra quả có thể tránh được sự gây hại bởi *Conogethes punctiferalis*.

4. Phòng trừ toàn bộ từng cây một. Các phương pháp phòng trừ *Conogethes punctiferalis* trong lĩnh vực này, ví dụ, phun vào tán lá, phần lớn là theo khu vực. Trong khi sáng chế tạo ra sự bảo vệ cho toàn bộ từng cây một, ví dụ, rễ, lá, thân, cụm hoa, bắp, bao phấn, sợi xơ, v.v. của từng cây chuyển gen (có Cry1F) kháng lại *Conogethes punctiferalis*.

5. Hiệu quả lâu dài. Các phương pháp phun thuốc trừ sâu hiện nay cần phải

phun trực tiếp vào bề mặt của cây trồng, gây ra sự thoái biến của protein dạng tinh thể có hoạt tính (bao gồm cả protein Cry1F) trong môi trường. Sáng chế tạo ra cây trồng biểu hiện protein Cry1F ở mức độ ổn định *in vivo*, điều này tránh được nhược điểm về tính không ổn định của các thuốc trừ sâu trong môi trường. Ngoài ra, cây chuyển gen (có protein Cry1F) có tác dụng phòng trừ lâu dài ở các vị trí khác nhau, thời điểm khác nhau và môi trường di truyền khác nhau.

6. Đơn giản, thuận tiện, kinh tế. Các thuốc trừ sâu sinh học được sử dụng trong lĩnh vực này rất dễ bị phân hủy trong môi trường, do đó cần sản xuất lặp lại và sử dụng lặp lại, và gây ra nhiều khó khăn cho việc sản xuất nông nghiệp trong thực tế, do đó làm tăng chi phí đáng kể. Ngược lại, sáng chế chỉ cần trồng cây chuyển gen biểu hiện protein Cry1F, do đó sáng chế tiết kiệm được nhiều nhân lực, nguyên liệu và chi phí.

7. Hiệu quả toàn diện. Các phương pháp phòng trừ *Conogethes punctiferalis* trong lĩnh vực này không có hiệu quả toàn diện, và chỉ làm giảm mức độ gây hại một chút. Ngược lại, cây chuyển gen (có Cry1F) theo sáng chế có thể tiêu diệt số lượng rất lớn các ấu trùng *Conogethes punctiferalis* mới nở, và có thể kìm hãm sự phát triển đáng kể của số lượng nhỏ ấu trùng sống sót. Sau 3 ngày, các ấu trùng vẫn ở trạng thái mới nở hoặc giữa trạng thái mới nở và trạng thái kiểm soát âm tính và rõ ràng là chúng chậm phát triển và ngừng phát triển, nói chung, cây chuyển gen theo sáng chế chịu ít tổn hại.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ cụ thể sau đây minh họa thêm cho phương pháp phòng trừ sâu hại theo sáng chế.

Ví dụ 1: Tạo ra và tổng hợp gen Cry1Fa

I. Tạo ra các trình tự nucleotit của Cry1Fa

Trình tự axit amin (605 axit amin) của protein có hoạt tính trừ sâu Cry1Fa-01 được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 1 trong danh mục trình tự; trình tự nucleotit (1818 nucleotit) của Cry1Fa-01 mã hóa trình tự axit amin nêu trên (605

axit amin) của protein có hoạt tính trừ sâu Cry1Fa-01 được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 3 trong danh mục trình tự. Trình tự axit amin (1148 axit amin) của protein có hoạt tính trừ sâu Cry1Fa-02 được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 2 trong danh mục trình tự; trình tự nucleotit (3447 nucleotit) của Cry1Fb-02 mã hóa trình tự axit amin (1148 axit amin) của protein có hoạt tính trừ sâu Cry1Fa-02 được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 4 trong danh mục trình tự.

II. Tạo ra các trình tự nucleotit của protein Cry1Ab và Vip3A

Trình tự nucleotit (1818 nucleotit) của protein Cry1Ab mã hóa trình tự axit amin (615 axit amin) của protein có hoạt tính trừ sâu Cry1Ab được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 5 trong danh mục trình tự; trình tự nucleotit (2370 nucleotit) của protein Vip3A mã hóa trình tự axit amin (789 axit amin) của protein có hoạt tính trừ sâu Vip3A được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 6 trong danh mục trình tự.

III. Tổng hợp các trình tự nucleotit nêu trên

Trình tự nucleotit của Cry1Fa-01 (được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 3 trong danh mục trình tự), Cry1Fa-02 (được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 4 trong danh mục trình tự), Cry1Ab (được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 5 trong danh mục trình tự) và Vip3A (được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 6 trong danh mục trình tự) được tổng hợp bởi công ty Nam Kinh GenScript Ltd. Đầu 5' của trình tự nucleotit tổng hợp được của Cry1Fa-01 (SEQ ID NO: 3) được liên kết với vị trí giới hạn AscI, đầu 3' của trình tự nucleotit tổng hợp được của Cry1Fa-01 (SEQ ID NO: 3) được liên kết với vị trí giới hạn BamHI; đầu 5' của trình tự nucleotit tổng hợp được của Cry1Fa-02 (SEQ ID NO: 4) được liên kết với vị trí giới hạn AscI, đầu 3' của trình tự nucleotit tổng hợp được của Cry1Fa-02 (SEQ ID NO: 4) được liên kết với vị trí giới hạn BamHI; đầu 5' của trình tự nucleotit tổng hợp được của Cry1Ab (SEQ ID NO: 5) được liên kết với vị trí giới hạn NcoI, đầu 3' của trình tự nucleotit tổng hợp được của Cry1Ab (SEQ ID NO: 5) được liên kết với vị trí giới hạn SwaI; đầu 5' của trình tự nucleotit tổng hợp được của protein Vip3A (SEQ ID NO: 6) được liên kết với vị trí giới hạn ScaI, đầu 3' của trình tự nucleotit tổng hợp được của protein Vip3A (SEQ ID NO: 6) được liên kết với vị trí giới hạn SpeI.

Ví dụ 2: Thiết kế các vector biểu hiện tái tổ hợp và biến nạp vector này vào *Agrobacterium*

I. Thiết kế các vector tách dòng tái tổ hợp chứa gen Cry1F

Như được thể hiện trên Fig.1, trình tự nucleotit tổng hợp được của Cry1Fa-01 được gắn với vector tách dòng pGEM-T (Promega, Madison, USA, CAT: A3600) theo quy trình của nhà sản xuất để tạo ra vector tách dòng tái tổ hợp DBN01-T. (Lưu ý: Amp thể hiện gen kháng Ampicillin; f1 ori thể hiện nguồn gốc sao chép của thể thực khuẩn f1; LacZ là codon khởi đầu của LacZ; SP6 là gen khởi đầu của SP6 ARN polymeraza; T7 là gen khởi đầu của T7 ARN polymeraza; Cry1Fa-01 là trình tự nucleotit của Cry1Fa-01 (SEQ ID NO: 4); và MCS là vị trí tách đa dòng).

Bước tiếp theo là biến nạp vector tách dòng tái tổ hợp DBN01-T vào các tế bào chức năng T1 của *E. coli* (Transgen, Bắc kinh, Trung Quốc, CAT: CD501) bằng phương pháp sốc nhiệt. Cụ thể, 50µl tế bào chức năng T1 của *E. coli* được trộn với 10µl ADN plasmit (vector tách dòng tái tổ hợp DBN01-T), được ủ trong bể nước ở nhiệt độ 42°C trong 30 giây và sau đó ủ trong bể nước ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ (trong thiết bị lắc ở tốc độ 100 vòng/phút). Sau đó, hỗn hợp này được để sinh trưởng qua đêm trên đĩa LB (trypton 10 g/l, chất chiết nấm men 5 g/l, NaCl 10 g/l, aga 15 g/l, độ pH được điều chỉnh đến mức 7,5 bằng NaOH) với Ampicillin (100 mg/l), bề mặt của đĩa này được phủ bằng IPTG (isopropyl-thio-β-D-galactosit) và X-gal (5-bromo-4-clo-3-indolyl-β-D-galactosit). Các cụm khuẩn lạc màu trắng được thu hoạch và nuôi cấy thêm ở nhiệt độ 37°C qua đêm trong môi trường LB (trypton 10 g/l, chất chiết nấm men 5 g/l, NaCl 10 g/l, Ampicillin 100 mg/l, độ pH được điều chỉnh đến mức 7,5 bằng NaOH). Các plasmit được chiết bằng phương pháp kiềm. Cụ thể, các vi khuẩn đã nuôi cấy trong môi trường được ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút trong 1 phút. Dịch nổi bề mặt được loại bỏ và các tế bào kết tủa được tái tạo hỗn dịch trong 100µl dung dịch I được làm lạnh bằng đá (Tris-HCl 25mM, EDTA 10mM (axit etylendiamin tetraaxetic), glucoza 50mM, độ pH = 8,0). Sau khi bổ sung 150µl dung dịch II mới được chuẩn bị (NaOH 0,2M, SDS 1% (natri dodecyl sunfat)), ống này được xoay ngược bốn lần và được đặt vào nước đá trong thời gian từ 3 đến 5 phút. 150µl dung dịch III được làm lạnh bằng đá (kali

axetat 4M, axit axetic 2M) được bổ sung vào hỗn hợp này, được trộn ngay lập tức và trộn kỹ và sau đó được đặt vào nước đá trong thời gian từ 5 đến 10 phút, sau đó ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút trong 5 phút ở nhiệt độ 4°C. Dịch nổi bề mặt được cho vào 2 lần thể tích của etanol khan, trộn kỹ và sau đó được ủ trong 5 phút ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp này được ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút trong 5 phút ở nhiệt độ 4°C và dịch nổi bề mặt được loại bỏ. Phần viên vón được rửa bằng etanol 70% (theo thể tích) và sau đó được làm khô trong không khí, tiếp đó cho thêm 30µl TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, độ pH = 8,0) chứa RNaza (20 µg/ml) để hòa tan phần viên vón này và phân giải ARN trong bể nước ở nhiệt độ 37°C trong 30 phút. Các plasmit thu được được bảo quản ở nhiệt độ -20°C trước khi sử dụng.

AscI và BamHI được sử dụng để nhận biết các plasmit chiết được, và các dòng dương tính được xác nhận thêm bằng cách giải trình tự. Các kết quả cho thấy rằng trình tự nucleotit được chèn vào vectơ tách dòng tái tổ hợp DBN01-T là Cry1Fa-01 được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 1 trong danh mục trình tự, điều này cho thấy việc chèn đúng trình tự nucleotit của Cry1Fa-01.

Theo phương pháp thiết kế vectơ tách dòng tái tổ hợp DBN01-T nêu trên, trình tự nucleotit tổng hợp được của Cry1Fa-02 được gắn với vectơ tách dòng pGEM-T để tạo ra vectơ tách dòng tái tổ hợp DBN02-T, trong đó Cry1Fa-02 là trình tự nucleotit của Cry1Fa-02 (SEQ ID NO: 4). Phương pháp phân giải bằng enzym hoặc giải trình tự được sử dụng để xác nhận sự chèn chính xác trình tự nucleotit Cry1Fa-02 trong vectơ tách dòng tái tổ hợp DBN02-T.

Theo phương pháp thiết kế vectơ tách dòng tái tổ hợp DBN01-T nêu trên, trình tự nucleotit tổng hợp của Cry1Ab được gắn với vectơ tách dòng pGEM-T để tạo ra vectơ tách dòng tái tổ hợp DBN03-T, trong đó Cry1Ab là trình tự nucleotit của Cry1Ab (SEQ ID NO: 5). Phương pháp phân giải bằng enzym hoặc giải trình tự được sử dụng để xác nhận sự chèn chính xác trình tự nucleotit Cry1Ab trong vectơ tách dòng tái tổ hợp DBN03-T.

Theo phương pháp thiết kế vectơ tách dòng tái tổ hợp DBN01-T nêu trên, trình tự nucleotit tổng hợp được của Vip3A được gắn với vectơ tách dòng pGEM-T

để tạo ra vector tách dòng tái tổ hợp DBN04-T, trong đó Vip3A là trình tự nucleotit của Vip3A (SEQ ID NO: 6). Phương pháp phân giải bằng enzym hoặc giải trình tự được sử dụng để xác nhận sự chèn chính xác trình tự nucleotit của Vip3A trong vector tách dòng tái tổ hợp DBN04-T.

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

Các phương pháp thiết kế vector bằng cách phân giải bằng enzym thông thường là đã biết rõ trong lĩnh vực này. Như được thể hiện trên Fig.2, vector tách dòng tái tổ hợp DBN01-T và vector biểu hiện DBNBC-01 (khung chính của vector: pCAMBIA2301 (cung cấp bởi viện nghiên cứu CAMBIA)) được phân giải lần lượt bởi các enzym giới hạn AscI và BamHI; và sau đó mảnh tạo thành của trình tự nucleotit của Cry1Fa-01 được chèn vào vector biểu hiện DBNBC-01 đã được phân giải giữa các vị trí AscI và BamHI để tạo ra vector biểu hiện tái tổ hợp DBN10014. (Lưu ý: Kan thể hiện gen kanamycin; RB thể hiện ranh giới bên phải; Ubi thể hiện gen khởi đầu của gen ngô ubiquitin (SEQ ID NO: 7); Cry1Fa-01 thể hiện trình tự nucleotit của Cry1Fa-01 (SEQ ID NO: 3); Nos thể hiện điểm kết thúc của gen nopal synthase (SEQ ID NO: 8); PMI thể hiện gen phosphomannose isomerase (SEQ ID NO: 9); và LB thể hiện ranh giới bên trái).

Vector biểu hiện tái tổ hợp DBN10014 được biến nạp vào các tế bào chức năng T1 của *E. coli* bằng phương pháp sốc nhiệt. Cụ thể, 50µl tế bào chức năng T1 của *E. coli* được trộn với 10µl ADN plasmit (vector biểu hiện tái tổ hợp DBN10014), được ủ trong bể nước ở nhiệt độ 42°C trong 30 giây và sau đó được ủ trong bể nước ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ (trong thiết bị lắc ở tốc độ 100 vòng/phút). Sau đó, hỗn hợp này được sinh trưởng ở nhiệt độ 37°C trong 12 giờ trên đĩa LB (trypton 10 g/l, chất chiết nấm men 5 g/l, NaCl 10 g/l, aga 15 g/l, độ pH được điều chỉnh đến mức 7,5 bằng NaOH) với 50 mg/l Kanamycin. Các khuẩn lạc màu trắng được thu hoạch và nuôi cấy thêm ở nhiệt độ 37°C qua đêm trong môi trường LB (trypton 10 g/l, chất chiết nấm men 5 g/l, NaCl 10 g/l, Kanamycin 50 mg/l, độ pH được điều chỉnh đến mức 7,5 bằng NaOH). Các plasmit được chiết tách bằng phương pháp kiềm. Phương pháp phân giải bằng enzym AscI và BamHI được sử dụng để nhận biết các plasmit chiết được, và các dòng dương tính được

xác nhận thêm bằng cách giải trình tự. Các kết quả cho thấy rằng, trình tự nucleotit được chèn vào vector biểu hiện tái tổ hợp DBN0100124 giữa các vị trí AscI và BamHI là Cry1Fa-01 được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 3 trong danh mục trình tự.

Theo phương pháp thiết kế vector tách dòng tái tổ hợp DBN100014 nêu trên, vector tách dòng tái tổ hợp DBN01-T và DBN03-T được phân giải bằng enzym AscI và BamHI, NcoI và SmaI tương ứng, để tạo ra trình tự nucleotit của Cry1Fa-01 và Cry1Ab, được chèn vào vector biểu hiện DBNBC-01 để thu được vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100012. Như được xác nhận bằng phương pháp phân giải bằng enzym hoặc giải trình tự, vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100012 chứa trình tự nucleotit của Cry1Fa-01 và Cry1Ab được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 3 và SEQ ID NO: 5 trong danh mục trình tự.

Theo phương pháp thiết kế vector tách dòng tái tổ hợp DBN100014 nêu trên, các vector tách dòng tái tổ hợp DBN02-T và DBN04-T được phân giải bằng enzym AscI và BamHI, SmaI và SpeI tương ứng để tạo ra trình tự nucleotit của Cry1Fa-02 và Vip3A, được chèn thêm vào vector biểu hiện DBNBC-01 để thu được vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100276. Như được xác nhận bằng phương pháp phân giải bằng enzym hoặc giải trình tự, vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100276 chứa các trình tự nucleotit của Cry1Fa-02 và Vip3A được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 6 trong danh mục trình tự.

III. Vector biểu hiện tái tổ hợp được biến nạp vào *Agrobacterium*

Các vector biểu hiện tái tổ hợp được thiết kế một cách chính xác là DBN100014, DBN100012 và DBN100276 được biến nạp vào *Agrobacterium* LBA4404 (Invitrogen, Chicago, Mỹ; Cat số: 18313-015) bằng phương pháp nitơ lỏng. Cụ thể, 100µl *Agrobacterium* LBA4404 và 3µl ADN plasmit (các vector biểu hiện tái tổ hợp) được đặt vào trong nitơ lỏng trong 10 phút, sau đó ủ trong bể nước ở nhiệt độ 37°C trong 10 phút. *Agrobacterium* LBA4404 đã biến nạp được ủ trong ống LB, sau đó được nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C, ly tâm ở tốc độ 200 vòng/phút trong 2 giờ. Sau đó, môi trường nuôi cấy được phủ lên đĩa LB chứa Rifampicin 50 mg/l và Kanamycin 100 mg/l cho đến khi các dòng riêng biệt dương tính phát triển. Các

dòng riêng biệt này được thu hoạch để nuôi cấy thêm để chiết các plasmit. Các vector biểu hiện tái tổ hợp được xác định bằng phương pháp phân giải bằng enzym, nghĩa là các vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100014 và DBN100012 được phân giải bằng các enzym giới hạn AhdI và XbaI, trong khi vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100276 được phân giải bằng các enzym giới hạn AhdI và AatII, điều này cho thấy việc thiết kế đúng các vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100014, DBN100012 và DBN100276.

Ví dụ 3: Tạo ra và kiểm tra cây ngô được biến nạp gen Cry1F

I. Tạo ra cây ngô được biến nạp gen Cry1F

Theo phương pháp gây nhiễm *Agrobacterium* thông thường, các phôi chưa trưởng thành được nuôi cấy vô khuẩn của cây ngô Z31 được nuôi cấy với các chủng *Agrobacterium* thu được ở phần III của ví dụ 2. T-ADN (bao gồm trình tự gen khởi đầu của gen Ubiquitin ngô, trình tự nucleotit của Cry1Fa-01, trình tự nucleotit của Cry1Fa-02, trình tự nucleotit của Cry1Ab, trình tự nucleotit của Vip3A, gen PMI và trình tự gen kết thúc của Nos) của các vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100014, DBN100012 và DBN100276 đã được thiết kế ở phần II của ví dụ 2 được cấy vào hệ gen của cây ngô để tạo ra cây ngô được biến nạp với trình tự nucleotit của Cry1Fa-01, cây ngô được biến nạp với trình tự nucleotit của Cry1Fa-01-Cry1Ab và cây ngô được biến nạp với trình tự nucleotit của Cry1Fa-02-Vip3A. Cây ngô kiểu dại được sử dụng làm đối chứng.

Quy trình biến nạp cây ngô qua trung gian *Agrobacterium* được mô tả một cách vắn tắt như sau. Các phôi chưa trưởng thành được phân lập từ cây ngô được cho tiếp xúc với huyền phù *Agrobacterium*, nhờ đó trình tự nucleotit của Cry1Fa-01, Cry1Fa-01-Cry1Ab và/hoặc Cry1Fa-02-Vip3A được cung cấp vào ít nhất một tế bào của phôi chưa trưởng thành nêu trên bằng *Agrobacterium* (bước 1: gây nhiễm). Ở bước này, tốt hơn là các phôi chưa trưởng thành được ngâm trong huyền phù *Agrobacterium* ($OD_{660} = 0,4-0,6$, môi trường gây nhiễm (muối MS 4,3 g/l, các vitamin MS, casein 300 mg/l, sucroza 68,5 g/l, glucoza 36 g/l, Acetosyringone (AS) 40 mg/l, axit 2,4-diclorophenoxyaxetic (2,4-D) 1 mg/l, độ pH = 5,3)) để khơi mào sự cấy. Các phôi chưa trưởng thành này được nuôi cấy với các chủng

Agrobacterium trong một khoảng thời (3 ngày) (bước 2: đồng nuôi cấy). Tốt hơn, nếu sau bước gây nhiễm, các phôi chưa trưởng thành được nuôi cấy trên môi trường dạng rắn (muối MS 4,3 g/l, các vitamin MS, casein 300 mg/l, sucroza 20 g/l, glucoza 10 g/l, Acetosyringone (AS) 100 mg/l, axit 2,4-diclophenoxyaxetic (2,4-D) 1 mg/l, aga 8 g/l, độ pH = 5,8). Sau bước đồng nuôi cấy, bước "phục hồi" là tùy ý, trong đó có ít nhất một kháng sinh đã biết là có tác dụng ức chế sự phát triển của *Agrobacterium* (Cephalosporins) và không có các chất chọn lọc đối với thể biến nạp của cây trồng trong môi trường phục hồi (muối MS 4,3 g/l, các vitamin MS, casein 300 mg/l, sucroza 30 g/l, axit 2,4-diclorophenoxyaxetic (2,4-D) 1 mg/l, aga 8 g/l, độ pH = 5,8) (bước 3: phục hồi). Tốt hơn, nếu các phôi chưa trưởng thành được nuôi cấy trên môi trường dạng rắn với một chất kháng sinh mà không có chất chọn lọc để loại bỏ *Agrobacterium* và tạo ra một khoảng thời gian phục hồi cho các tế bào đã được biến nạp. Tiếp theo, các phôi chưa trưởng thành đã cấy được nuôi cấy trên môi trường có chất chọn lọc (manozax) và các thể chai đã biến nạp đang phát triển được lựa chọn (bước 4: chọn lọc). Tốt hơn, nếu các phôi chưa trưởng thành được nuôi cấy trên môi trường chọn lọc dạng rắn có chất chọn lọc (muối MS 4,3 g/l, các vitamin MS, casein 300 mg/l, sucroza 5 g/l, manozax 12,5g/l, axit 2,4-diclophenoxyaxetic (2,4-D) 1 mg/l, aga 8 g/l, độ pH = 5,8), để tạo ra sự phát triển chọn lọc của các tế bào đã biến nạp. Hơn nữa, các thể chai được tái sinh vào cây (bước 5: tái sinh). Tốt hơn, nếu các thể chai này được phát triển trên môi trường có chất chọn lọc được nuôi cấy trên môi trường dạng rắn (môi trường biệt hóa MS và môi trường tạo rễ MS) để tái sinh cây trồng.

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

giờ mỗi ngày.

II. Đánh giá các cây ngô được biến nạp gen Cry1F bằng phương pháp TaqMan

Sử dụng khoảng 100mg lá từ mỗi cây ngô trong số cây ngô được biến nạp với trình tự nucleotit của Cry1Fa-01, cây ngô đã biến nạp với trình tự nucleotit của Cry1Fa-01-Cry1Ab và cây ngô đã biến nạp với trình tự nucleotit của Cry1Fa-02-Vip3A làm mẫu, ADN hệ gen được chiết bằng kit DNeasy Plant Maxi của Qiagen, và số lượng bản sao của các gen Cry1F, Cry1Ab và Vip3A được xác định bằng phương pháp PCR định lượng sự phát huỳnh quang với đoạn dò Taqman. Các cây ngô kiểu dại được phân tích làm đối chứng theo phương pháp nêu trên. Các thử nghiệm được lặp lại 3 lần và các kết quả được tính trung bình.

Quy trình chi tiết để xác định số lượng bản sao của các gen Cry1F, Cry1Ab và Vip3A là như sau:

Bước 11: 100mg lá của mỗi cây ngô trong số cây ngô được biến nạp với trình tự nucleotit của Cry1Fa-01, cây ngô được biến nạp với trình tự nucleotit của Cry1Fa-01-Cry1Ab và cây ngô được biến nạp với trình tự nucleotit của Cry1Fa-02-Vip3A, và 100mg lá của cây ngô kiểu dại được lấy mẫu và được làm đồng nhất trong cối với ni tơ lỏng. Mỗi mẫu được lấy ba lần.

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

Bước 13: NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) được sử dụng để xác định nồng độ ADN hệ gen của các mẫu nêu trên.

Bước 14: Nồng độ ADN hệ gen của các mẫu thử nêu trên được điều chỉnh đến cùng nồng độ nằm trong khoảng từ 80 đến 100 ng/μl.

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

huỳnh quang là như sau.

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

Đoạn môi 1 (CF1): CAGTCAGGAAGTACAGTTGTAAGAGGG, được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 10 trong danh mục trình tự;

Đoạn môi 2 (CR1): ACGCGAATGGTCCTCCACTAG, được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 11 trong danh mục trình tự;

Đoạn dò 1 (CP1): CGTCGAAGAATGTCTCCTCCCGTGAAC, được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 12 trong danh mục trình tự;

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

Đoạn môi 3 (CF2): TGGTGGAGAACGCATTGAAAC, được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 13 trong danh mục trình tự;

Đoạn môi 4 (CR2): GCTGAGCAGAACTGTGTCAAGG, được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 14 trong danh mục trình tự;

Đoạn dò 2 (CP2): CGGTTACACTCCCATCGACATCTCCTTG, được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 15 trong danh mục trình tự;

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

Đoạn môi 5 (CF3): CAGTCAGGAAGTACAGTTGTAAGAGGG, được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 16 trong danh mục trình tự;

Đoạn môi 6 (CR3): ACGCGAATGGTCCTCCACTAG, được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 17 trong danh mục trình tự;

Đoạn dò 3 (CP3): CGTCGAAGAATGTCTCCTCCCGTGAAC, được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 18 trong danh mục trình tự;

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

Đoạn mồi 7 (CF4): ATTCTCGAAATCTCCCCTAGCG, được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 19 trong danh mục trình tự;

Đoạn mồi 8 (CR4): GCTGCCAGTGGATGTCCAG, được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 20 trong danh mục trình tự;

Đoạn dò 4 (CP4): CTCCTGAGCCCCGAGCTGATTAAACACC, được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 21 trong danh mục trình tự;

Hệ phản ứng PCR:

JumpStart™ Taq ReadyMix™ (Sigma) 10µl

50× hỗn hợp các đoạn mồi/đoạn dò 1µl

ADN hệ gen 3µl

Nước cất hai lần (ddH₂O) 6µl

50× hỗn hợp các đoạn mồi/đoạn dò chứa 45µl của mỗi đoạn mồi nồng độ 1mM, 50µl của đoạn dò nồng độ 100µM và 860µl dung dịch đệm 1× TE, được bảo quản trong ống hồ phách ở nhiệt độ 4°C.

Điều kiện của phản ứng PCR như sau:

Bước	Nhiệt độ	Thời gian
21	95°C	5 phút
22	95°C	30 giây
23	60°C	1 phút
24	quay trở lại bước 22, lặp lại 40 lần	

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

Như được thể hiện bởi các kết quả, trình tự nucleotit của Cry1Fa-01, Cry1Fa-01-Cry1Ab và Cry1Fa-02-Vip3A đều được hợp nhất thành công vào hệ gen của các cây ngô được phát hiện tương ứng. Các cây ngô được biến nạp với trình tự nucleotit của Cry1Fa-01, cây ngô được biến nạp với trình tự nucleotit của Cry1Fa-01-Cry1Ab, cây ngô được biến nạp với trình tự nucleotit của Cry1Fa-02-Vip3A đã thu được một bản sao của gen Cry1F, Cry1Ab và/hoặc Vip3A.

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

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

Các dung dịch liên quan trong thử nghiệm này là như sau:

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

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

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

3mg lá tươi từ mỗi cây ngô trong số cây ngô được biến nạp với trình tự nucleotit của Cry1Fa-01, cây ngô được biến nạp với trình tự nucleotit của Cry1Fa-01-Cry1Ab, cây ngô được biến nạp với trình tự nucleotit của Cry1Fa-02-Vip3A được lấy mẫu và làm đồng nhất với nitơ lỏng, sau đó bổ sung 800 μ l dung dịch đệm để chiết. Hỗn hợp này được ly tâm ở tốc độ 4000 vòng/phút trong 10 phút, sau đó, dịch nổi bề mặt được pha loãng 40 lần bằng dung dịch đệm để chiết và 80 μ l dịch nổi bề mặt đã pha loãng được sử dụng cho thử nghiệm ELISA. Kit ELISA (thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym) (Công ty ENVIRLOGIX, các kit Cry1Fa, Cry1Fa/Cry1Ac và Vip3A) được sử dụng để xác định tỷ lệ của hàm lượng protein có hoạt tính trừ sâu (các protein Cry1Fa, Cry1Ab và Vip3A) chia cho trọng lượng của lá tươi. Phương pháp này được nêu chi tiết theo quy trình của nhà sản xuất.

Trong khi cây ngô kiểu dại và cây ngô không chuyển gen được nhận biết bằng phương pháp Taqman được sử dụng làm đối chứng, và việc xác định theo các phương pháp như đã mô tả trên đây. Đối với ba dòng được biến nạp với Cry1Fa-01 (S1, S2 và S3), với Cry1Fa-01-Cry1Ab (S4, S5 và S6) và với Cry1Fa-02-Vip3A (S7, S8 và S9), một dòng được xác định là cây không chuyển gen (NGM) bằng phương pháp Taqman và một dòng là dòng kiểu dại kiểu dại (CK), ba cây của mỗi dòng được sử dụng và mỗi cây được lặp lại sáu lần.

Bảng 1: Lượng trung bình của protein Cry1Fa được biểu hiện ở cây ngô chuyển gen

Lượng protein Cry1a được biểu hiện trong mỗi cây (ng/g) (lặp lại sáu lần/chủng)				Lượng protein Cry1a được biểu hiện trong mỗi loại của các dòng (ng/g)
Dòng	1	2	3	Lượng trung bình (ng/g)
S1	3535,02	3697,34	2928,71	
S2	3904,88	2808,72	3044,88	3475,52
S3	3954,63	3572,96	3832,55	
S4	3039,78	3600,01	3753,22	
S5	4543,98	4251,25	3862,03	3712,48
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	
NGM	-0,23	0	-4,21	0
CK	-2,36	-1,98	0	0

Các kết quả thử nghiệm của hàm lượng protein có hoạt tính trừ sâu Cry1Fa trong cây chuyển gen được thể hiện trong bảng 1. Các kết quả thử nghiệm của hàm lượng protein có hoạt tính trừ sâu Cry1Ab trong cây chuyển gen được thể hiện trong bảng 2. Các kết quả thử nghiệm của hàm lượng protein có hoạt tính trừ sâu Vip3A trong cây chuyển gen được thể hiện trong bảng 3. Tỷ lệ biểu hiện trung bình của protein có hoạt tính trừ sâu Cry1Aa chia cho trọng lượng của lá tươi từ cây ngô được biến nạp với trình tự nucleotit của Cry1Fa-01, Cry1Fa-01-Cry1Ab và Cry1Fa-02-Vip3A được xác định lần lượt là 3475,52, 3741,48 và 3888,76; tỷ lệ biểu hiện trung bình của protein có hoạt tính trừ sâu Cry1Ab chia cho trọng lượng lá tươi từ cây ngô được biến nạp với trình tự nucleotit của Cry1Fa-01-Cry1Ab xác định được là 8234,7 và tỷ lệ biểu hiện trung bình của protein có hoạt tính trừ sâu Vip3A chia cho trọng lượng lá tươi ở cây ngô được chuyển gen với trình tự nucleotit của

Cry1Fa-02-Vip3A là 3141,02. Các kết quả này chỉ ra rằng các cây ngô chuyển gen thu được có sự biểu hiện ổn định và tương đối cao của protein Cry1Fa, protein Cry1Ab và protein Vip3A.

Bảng 2: Lượng trung bình của protein Cry1Ab được biểu hiện ở cây ngô chuyển gen

Lượng protein Cry1Ab được biểu hiện ở mỗi cây (ng/g) (lặp lại sáu lần/cây)				Lượng protein Cry1Ab được biểu hiện trên mỗi loại của các dòng (ng/g)
Dòng	1	2	3	Lượng 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	
NGM	-4,51	-2,44	0	0
CK	0	-6,33	-1,97	0

Bảng 3: Lượng trung bình của protein Vip3A được biểu hiện ở cây ngô chuyển gen

Lượng protein Vip3A được biểu hiện ở mỗi cây (ng/g) (lặp lại sáu lần/cây)				Lượng protein Vip3A được biểu hiện ở mỗi loại của các dòng (ng/g)
Dòng	1	2	3	Lượng 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	
NGM	-1,52	0	-6,34	0
CK	0	-0,95	-2,31	0

II. Phát hiện khả năng kháng sâu hại của cây ngô chuyển gen

Cây ngô được biến nạp với trình tự nucleotit của Cry1Fa-01, cây ngô được biến nạp với trình tự nucleotit của Cry1Fa-01-Cry1Ab và cây ngô được biến nạp với trình tự nucleotit của Cry1Fa-02-Vip3A, cây ngô kiểu dại và cây ngô không được chuyển gen được xác nhận bằng phương pháp Taqman được phát hiện về khả năng kháng lại *Conogethes punctiferalis* của chúng.

Lá tươi của cây ngô được biến nạp với trình tự nucleotit của Cry1Fa-01, cây ngô được biến nạp với trình tự nucleotit của Cry1Fa-01-Cry1Ab và cây ngô được biến nạp với trình tự nucleotit của Cry1Fa-02-Vip3A, và lá tươi của cây ngô kiểu dại và cây ngô được xác định là cây không chuyển gen (giai đoạn V3-V4) bằng phương pháp Taqman lần lượt được lấy mẫu. Lá ngô được rửa bằng nước vô khuẩn và nước trên các lá này được làm khô bằng gạc. Gân lá được loại bỏ, và các lá này được cắt thành các dải có kích thước khoảng 1 cm × 2 cm. Hai dải lá được đặt trên giấy lọc đã được thấm ướt bằng nước cất trên đáy của đĩa Petri tròn bằng chất dẻo. Mùir đầu của *Conogethes punctiferalis* (ấu trùng mới nở) được đặt vào mỗi đĩa, và các đĩa có sâu hại này được đậy nắp và để ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25 đến 28°C, độ ẩm tương đối nằm trong khoảng từ 70% đến 80% và chu kỳ sáng (sáng/tối) là 16:8 trong 3 ngày. Theo ba dấu hiệu, quá trình phát triển, tỷ lệ chết và tỷ lệ hư hại của lá do ấu trùng *Conogethes punctiferalis* gây ra, điểm số về khả năng kháng sâu hại được tính như sau: điểm số = 100 x tỷ lệ chết + [100 x tỷ lệ tử vong + 90 x (số lượng sâu hại mới nở/tổng số sâu hại đã cấy vào) + 60 x (số lượng sâu hại mới nở - số lượng sâu hại đối chứng âm/tổng số sâu hại đã cấy vào) + 10 x (số lượng sâu hại đối chứng âm/tổng số sâu hại đã cấy vào)] + 100 x (1-tỷ lệ hư hại của lá). Ba dòng được biến nạp với trình tự nucleotit của Cry1Fa-01 (S1, S2 và S3), ba dòng được biến nạp với trình tự nucleotit của Cry1Fa-01-Cry1Ab (S4, S5 và S6), ba dòng được biến nạp với trình tự nucleotit của Cry1Fa-02-Vip3A (S7, S8 và S9), một dòng được xác định là cây không chuyển gen (NGM) bằng phương pháp Taqman và một dòng là kiểu dại (CK), ba cây được chọn để thử nghiệm cho mỗi dòng và mỗi cây được lặp lại sáu lần. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 4 cũng như trên Fig.3 và Fig.4.

Bảng 4: Khả năng kháng sâu hại của cây ngô chuyển gen được gây nhiễm bằng *Conogethes punctiferalis*

Dòng	Tỷ lệ hư hại của lá (%)	Quá trình phát triển của <i>Conogethes punctiferalis</i> (mỗi dòng)			Tỷ lệ chết của <i>Conogethes punctiferalis</i> (mỗi dòng)		Điểm số (mỗi dòng)	Trung bình
		Mới nở	Đối chứng âm tính- mới nở	≥ Đối chứng âm tính	Tổng số sâu hại đã cấy vào	Tỷ lệ chết (%)		
S1	1	2	0	0	10	80	277	
S2	1	1	0	0	10	90	288	288
S3	1	0	0	0	10	100	299	
S4	1	0,5	0	0	10	95	294	
S5	1	0,6	0	0	10	94	292	283
S6	1	0,6	0	0	10	94	283	
S7	1	0,3	0	0	10	97	296	
S8	1	0,6	0	0	10	94	292	284
S9	1	0,4	0	0	10	96	295	
NGM	63	0,7	0	9,3	10	0	53	53
CK	50	2,3	0	6	10	17	111	111

Như thể hiện trong bảng 4, điểm số của cây ngô được biến nạp với trình tự nucleotit của Cry1Fa-01, cây ngô được biến nạp với trình tự nucleotit của Cry1Fa-01-Cry1Ab và cây ngô được biến nạp với trình tự nucleotit của Cry1Fa-02-Vip3A phần lớn là cao hơn 290 điểm, trong khi điểm số của cây ngô kiểu dại thường là khoảng 100 điểm hoặc thấp hơn.

Như thể hiện trên Fig.3 và Fig.4, so với cây ngô kiểu dại, cây ngô được biến nạp với trình tự nucleotit của Cry1Fa-01, cây ngô được biến nạp với trình tự nucleotit của Cry1Fa-01-Cry1Ab và cây ngô được biến nạp với trình tự nucleotit của Cry1Fa-02-Vip3A tiêu diệt lượng lớn ấu trùng *Conogethes punctiferalis* mới nở, và ức chế đáng kể sự phát triển của lượng nhỏ ấu trùng còn sống đến mức ấu trùng mới nở vẫn còn trong trạng thái mới nở hoặc giữa trạng thái mới nở và đối chứng âm tính sau 3 ngày. Ngoài ra, cây ngô được biến nạp với trình tự nucleotit của Cry1Fa-01, cây ngô được biến nạp với trình tự nucleotit của Cry1Fa-01-Cry1Ab và cây ngô được biến nạp với trình tự nucleotit của Cry1Fa-02-Vip3A chỉ có sự thiệt hại không đáng kể, có một lượng rất nhỏ thiệt hại dạng lỗ nhỏ. Tỷ lệ thiệt hại đối với toàn bộ lá là khoảng 1% hoặc thấp hơn.

Do đó, đã chứng minh được rằng các cây ngô được biến nạp với trình tự nucleotit của Cry1Fa-01, cây ngô được biến nạp với trình tự nucleotit của Cry1Fa-01-Cry1Ab và cây ngô được biến nạp với trình tự nucleotit của Cry1Fa-02-Vip3A đều có khả năng kháng lại *Conogethes punctiferalis* cao, đủ để gây ra tác động bất lợi đối với sự phát triển của *Conogethes punctiferalis* để chúng có thể được phòng trừ.

Các kết quả trên đây cũng cho thấy rằng, sự phòng trừ có hiệu quả đối với *Conogethes punctiferalis* là do protein Cry1F được sản sinh bởi cây ngô được biến nạp với trình tự nucleotit của Cry1Fa-01, cây ngô được biến nạp với trình tự nucleotit của Cry1Fa-01-Cry1Ab và cây ngô được biến nạp với trình tự nucleotit của Cry1Fa-02-Vip3A. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ biết rõ rằng các cây chuyển gen tương tự có thể biểu hiện protein Cry1F có thể được tạo ra để phòng trừ *Conogethes punctiferalis*, dựa trên hiệu quả gây độc giống như của protein Cry1F đối với *Conogethes punctiferalis*. Các protein Cry1Fa được mô tả trong sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, protein Cry1F được thể hiện trong các phương án cụ thể bởi các trình tự cụ thể. Cây chuyển gen cũng có thể sản sinh ra ít nhất là một loại protein có hoạt tính trừ sâu bổ sung khác với Cry1F, ví dụ, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ba và Vip3A.

Kết luận, giải pháp theo sáng chế có thể phòng trừ *Conogethes punctiferalis*

bằng cách làm cho cây trồng sản sinh ra protein Cry1F *in vivo*, là chất độc đối với *Conogethes punctiferalis*. So với các phương pháp phòng trừ bằng biện pháp hóa học và nông học và sinh học hiện nay, phương pháp theo sáng chế có thể phòng trừ *Conogethes punctiferalis* trong suốt thời kỳ phát triển của cây trồng và tạo ra sự bảo vệ toàn diện cho cây. Ngoài ra, phương pháp này ổn định, toàn diện, đơn giản, thuận lợi và kinh tế, không gây ô nhiễm và không có tồn dư hóa chất.

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

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp phòng trừ *Conogethes punctiferalis*, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho *Conogethes punctiferalis* tiếp xúc với protein Cry1F.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó protein Cry1F này là protein Cry1Fa.
3. Phương pháp theo điểm 2, trong đó protein Cry1Fa có mặt trong tế bào biểu hiện protein Cry1Fa của cây trồng, và *Conogethes punctiferalis* tiếp xúc với protein Cry1Fa bằng cách ăn tế bào này.
4. Phương pháp theo điểm 3, trong đó protein Cry1Fa có mặt trong cây chuyển gen biểu hiện protein Cry1Fa, và *Conogethes punctiferalis* tiếp xúc với protein Cry1Fa bằng cách ăn mô của cây chuyển gen này; sau đó, sự phát triển của *Conogethes punctiferalis* bị kìm hãm, và cuối cùng *Conogethes punctiferalis* bị chết và do đó phòng trừ được sự gây hại của *Conogethes punctiferalis* cho cây trồng.
5. Phương pháp theo điểm 4, trong đó cây chuyển gen này ở giai đoạn sinh trưởng bất kỳ.
6. Phương pháp theo điểm 4, trong đó mô của cây chuyển gen này là lá, thân, cụm hoa, bắp, bao phấn hoặc sợi xơ.
7. Phương pháp theo điểm 4, trong đó việc phòng trừ sự gây hại của *Conogethes punctiferalis* cho cây trồng không phụ thuộc vào vị trí trồng cây.
8. Phương pháp theo điểm 4, trong đó việc phòng trừ sự gây hại của *Conogethes punctiferalis* cho cây trồng không phụ thuộc vào thời gian trồng cây.
9. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 3 hoặc 8, trong đó cây trồng

này có nguồn gốc từ cây ngô, cây lúa miến, cây kê, cây hướng dương, cây thầu dầu, cây gừng, cây bông, cây đào, cây hồng vàng, cây óc chó, cây dẻ, cây sung hoặc cây thông.

10. Phương pháp theo điểm 9, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước trồng cây có chứa polynucleotit mã hóa protein Cry1Fa trước bước cho tiếp xúc với protein Cry1F.
11. Phương pháp theo điểm 10, trong đó trình tự axit amin của protein Cry1Fa được thể hiện bởi SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:2.
12. Phương pháp theo điểm 11, trong đó trình tự axit amin của protein Cry1Fa được thể hiện bởi SEQ ID NO:3 hoặc SEQ ID NO:4.
13. Phương pháp theo điểm 3, 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.
14. Phương pháp theo điểm 13, trong đó trình tự nucleotit thứ hai 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 nucleotit thứ hai mã hóa protein Cry1Ab, protein Cry1Ac, protein Cry1Ba hoặc protein Vip3A.
16. Phương pháp theo điểm 15, trong đó trình tự nucleotit thứ hai được thể hiện bởi SEQ ID NO:5 hoặc SEQ ID NO:6.
17. Phương pháp theo điểm 13, trong đó trình tự nucleotit thứ hai là ARN sợi đôi ức chế gen quan trọng của sâu hại đích.

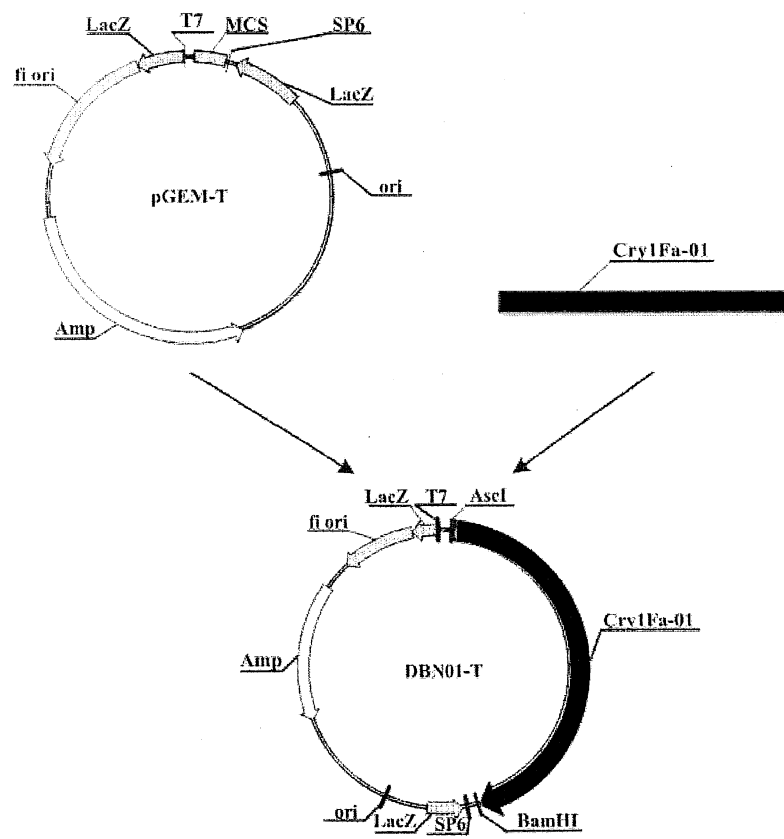


Fig.1

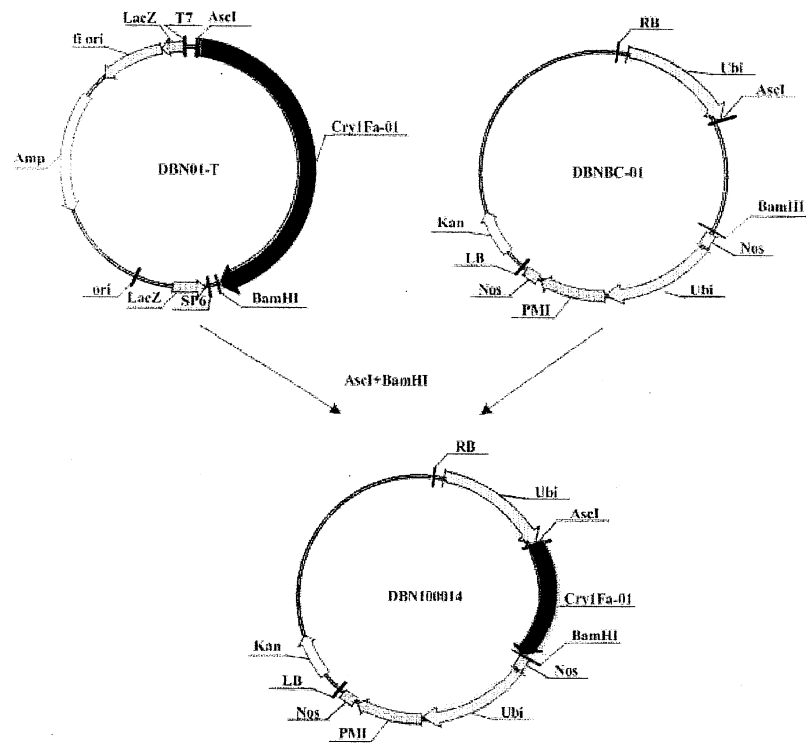
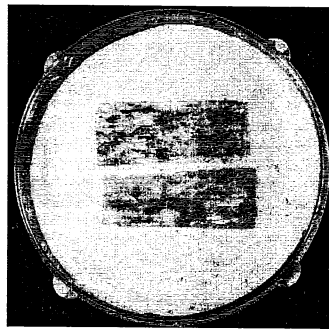
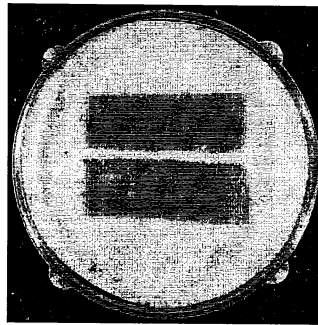


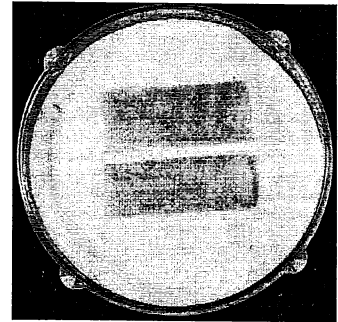
Fig.2



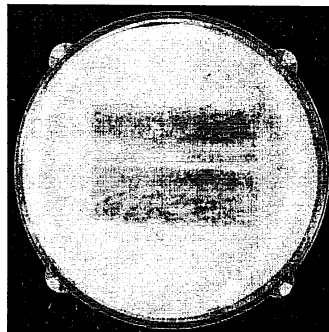
CK



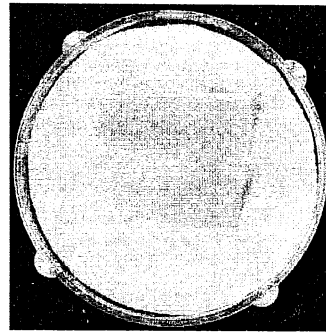
Cry1Fa-01



Cry1Fa-01-Cry1Ab



NGM



Cry1Fa-02-Vip3A

Fig.3



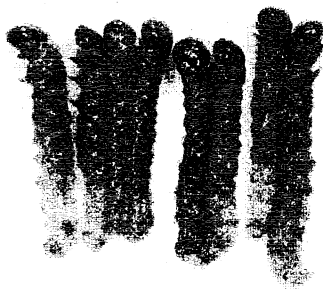
CK



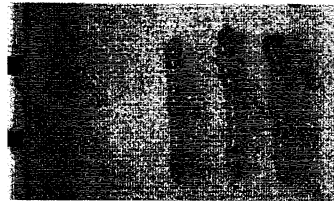
Cry1Fa-01



Cry1Fa-01-Cry1Ab



NGM



Cry1Fa-02-Vip3A

Fig.4

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Beijing Dabeinong Technology Group Co., Ltd.

Beijing Dabeinong Technology Group Co., Ltd.♦♦Biotech Center

<120> PHƯƠNG PHÁP PHÒNG TRỪ SÂU HẠI

<130> 133052CN01-VN

<160> 21

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 605

<212> PRT

<213> Trình tự axit amin 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 amin 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	65	70	75
Leu	Ile	Glu	Gln	Arg	Ile	Glu	Thr	Leu	Glu	Arg	Asn	Arg	Ala	Ile	Thr	80	85	90
Thr	Leu	Arg	Gly	Leu	Ala	Asp	Ser	Tyr	Glu	Thr	Tyr	Ile	Glu	Ala	Leu	95	100	105
Arg	Glu	Arg	Glu	Ala	Asn	Pro	Asn	Asn	Ala	Gln	Pro	Arg	Glu	Asp	Val	110	115	120
Arg	Ile	Arg	Phe	Ala	Asn	Thr	Asp	Asp	Ala	Leu	Ile	Thr	Ala	Thr	Asn	125	130	135
Asn	Phe	Thr	Leu	Thr	Ser	Phe	Glu	Thr	Pro	Leu	Leu	Ser	Val	Tyr	Val	140	145	150
Gln	Ala	Ala	Asn	Leu	His	Leu	Ser	Leu	Leu	Arg	Asp	Ala	Val	Ser	Phe	155	160	165
Gly	Gln	Gly	Trp	Gly	Leu	Asp	Ile	Ala	Thr	Ala	Asn	Asn	His	Tyr	Asn	170	175	180
Arg	Leu	Ile	Asn	Leu	Ile	His	Arg	Tyr	Thr	Lys	His	Cys	Leu	Asp	Thr	185	190	195
Tyr	Asn	Gln	Gly	Leu	Glu	Asn	Leu	Arg	Gly	Thr	Asn	Thr	Arg	Gln	Trp	200	205	210
Ala	Arg	Phe	Asn	Gln	Phe	Arg	Arg	Asp	Leu	Thr	Leu	Thr	Val	Leu	Asp	215	220	225
Thr	Val	Ala	Leu	Phe	Pro	Asn	Tyr	Asp	Val	Arg	Thr	Tyr	Pro	Thr	Gln	230	235	240
Thr	Ser	Ser	Gln	Leu	Thr	Arg	Glu	Ile	Tyr	Thr	Ser	Ser	Val	Ile	Glu	245	250	255
Asp	Ser	Pro	Val	Ser	Ala	Asn	Ile	Pro	Asn	Gly	Phe	Asn	Arg	Ala	Glu	260	265	270
Phe	Gly	Ala	Arg	Pro	Pro	His	Leu	Thr	Asp	Phe	Met	Asn	Ser	Leu	Phe	275	280	285
Val	Thr	Ala	Glu	Thr	Val	Arg	Ser	Gln	Thr	Val	Arg	Gly	Gly	His	Leu	290	295	300
Val	Ser	Ser	Arg	Asn	Thr	Ala	Gly	Asn	Arg	Ile	Asn	Phe	Pro	Ser	Tyr	305	310	315
Gly	Val	Phe	Asn	Pro	Gly	Gly	Ala	Ile	Trp	Ile	Ala	Asp	Glu	Asp	Pro	320	325	330
Arg	Pro	Phe	Tyr	Arg	Thr	Leu	Ser	Asp	Pro	Val	Phe	Val	Arg	Gly	Gly	335	340	345
Phe	Gly	Asn	Pro	His	Tyr	Val	Leu	Gly	Leu	Arg	Gly	Val	Ala	Phe	Gln	350	355	360
Gln	Thr	Gly	Thr	Asn	His	Thr	Arg	Thr	Phe	Arg	Asn	Ser	Gly	Thr	Ile	365	370	375
Asp	Ser	Leu	Asp	Glu	Ile	Pro	Pro	Gln	Asp	Asn	Ser	Gly	Ala	Pro	Trp	380	385	390
Asn	Asp	Tyr	Ser	His	Val	Leu	Asn	His	Val	Thr	Phe	Val	Arg	Trp	Pro	395	400	405
Gly	Glu	Ile	Ser	Gly	Ser	Asp	Ser	Trp	Arg	Ala	Pro	Met	Phe	Ser	Trp	410	415	420
Thr	His	Arg	Ser	Ala	Thr	Pro	Thr	Asn	Thr	Ile	Asp	Pro	Glu	Arg	Ile	425	430	435
Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Val	Lys	Ala	His	Thr	Leu	Gln	Ser	Gly	Thr	Thr	440	445	450
																455	460	465
																465	470	475
																475	480	485

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					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	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					640
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
 945 950 955 960
 Gly His Val Asp Val Glu Glu Gln Asn Asn His Arg Ser Val Pro Val
 965 970 975
 Val Pro Glu Trp Glu Ala Glu Val Ser Gln Glu Val Arg Ala Cys Pro
 980 985 990
 Gly Arg Gly Tyr Thr Leu Arg Val Thr Ala Tyr Lys Glu Gly Tyr Gly
 995 1000 1005
 Glu Gly Cys Val Thr Ile His Glu Ile Glu Asn Asn Thr Asp Glu
 1010 1015 1020
 Leu Lys Phe Ser Asn Cys Val Glu Glu Glu Val Tyr Pro Asn Asn
 1025 1030 1035
 Thr Val Thr Cys Asn Asp Tyr Thr Ala Thr Gln Glu Glu His Glu
 1040 1045 1050
 Gly Thr Tyr Thr Ser Arg Asn Arg Gly Tyr Asp Gly Ala Tyr Glu
 1055 1060 1065
 Ser Asn Ser Ser Ala Pro Ala Asp Tyr Ala Ser Ala Tyr Glu Glu
 1070 1075 1080
 Lys Ala Tyr Thr Asp Gly Arg Arg Asp Asn Pro Cys Glu Pro Asn
 1085 1090 1095
 Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Thr Pro Leu Pro Ala Gly Tyr Val Thr
 1100 1105 1110
 Lys Glu Leu Glu His Leu Pro Glu Thr Asp Lys Val Trp Ile Glu
 1115 1120 1125
 Ile Gly Glu Thr Glu Gly Thr Leu Ile Val Asp Ser Val Glu Leu
 1130 1135 1140
 Pro Leu Met Glu Glu
 1145

<210> 3
 <211> 1818
 <212> ADN
 <213> Trình tự nucleotit của Cry1Fa-01

<400> 3
 atggagaaca acatacagaa tcagtgcgtc ccctacaact gcctcaacaa tcctgaagta 60
 gagattctca acgaagagag gtcgactggc agattgccgt tagacatctc cctgtccctt 120
 acacgtttcc tgttgctctga gtttgttcca ggtgtgggag ttgcgtttgg cctcttcgac 180
 ctcatctggg gcttcatcac tccatctgat tggagcctct ttcttctcca gattgaacag 240
 ttgattgaac aaaggattga gaccttggaa aggaatcggg ccatcactac ccttcgtggc 300
 ttagcagaca gctatgagat ctacattgaa gcactaagag agtgggaagc caatcctaac 360
 aatgccccac tgagagaaga tgtgcgtata cgctttgcta acacagatga tgctttgatc 420
 acagccatca acaacttcac ccttaccagc ttcgagatcc ctcttctctc ggtctatggt 480
 caagctgcta acctgcactt gtcactactg cgcgacgctg tgtcgtttgg gcaagggttg 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 gtcattccaa 780
 cttacaaggg agatctacac cagttcagtc attgaagact ctccagtttc tgcgaacata 840

cccaatgggt	tcaacagggc	tgagtttggg	gtcagaccac	cccatctcat	ggacttcatg	900
aactctttgt	ttgtgactgc	agagactgtt	agatcccaaa	ctgtgtgggg	aggacactta	960
gtagctcac	gcaacacggc	tggcaatcgt	atcaactttc	ctagttacgg	ggtcttcaat	1020
cccgggggcg	ccatctggat	tgcatgatga	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	ctttgtgctc	tggccagggtg	agatctcagg	ttccgactca	1320
tggagagcac	caatgttctc	ttggacgcat	cgtagcgcta	ccccacaaa	caccattgat	1380
ccagagagaa	tcactcagat	tcccttgggtg	aaggcacaca	cacttcagtc	aggaactaca	1440
gttgtaagag	ggccgggggt	cacgggagga	gacattcttc	gacgcactag	tggaggacca	1500
ttcgcgtaca	ccattgtcaa	catcaatggg	caacttcccc	aaaggatatcg	tgccaggata	1560
cgctatgcct	ctactaccaa	tctaagaatc	tacgttacgg	ttgcagggtga	acggatcttt	1620
gctggtcagt	tcaacaagac	aatggatacc	ggtgatccac	ttacattcca	atctttctcc	1680
tacgccacta	tcaacaccgc	gttcaccttt	ccaatgagcc	agagcagttt	cacagtaggt	1740
gctgatacct	tcagttcagg	caacgaagtg	tacattgaca	ggtttgagtt	gattccagtt	1800
actgccacac	tcgagtaa					1818

<210> 4

<211> 3447

<212> ADN

<213> Trình tự nucleotit của Cry1Fa-02

<400> 4

atggagaaca	acatacagaa	tcagcgcgtc	ccctacaact	gccccaaaca	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	ccttcgtggc	300
ttagcagaca	gctatgagac	ctacattgaa	gcactaagag	agcgggaagc	caatcctaac	360
aatgccccac	cgagagaaga	tgtgcgtata	cgctttgcta	acacagatga	tgctttgatc	420
acagccacca	acaacttcac	ccttaccagc	ttcgagaccc	ctcttctctc	ggtctatggt	480
caagctgcca	acctgcactt	gtcactactg	cgcgacgctg	tgtcgtttgg	gcaaggttgg	540
ggactggaca	tagctactgc	caacaatcac	tacaacagac	tcataaatct	gattcatcga	600
tacacgaaac	attgttttgg	tacctacaat	cagggattgg	agaacctgag	aggtactaac	660
actcgccaat	gggccagggt	caatcagttc	aggagagacc	ttacacttac	tgtgttagac	720
acagttgctc	tctttccgaa	ctacgatgtt	cgtacctatc	cgactcaaac	gtcatcccaa	780
cttacaaggg	agatctacac	cagttcagtc	attgaagact	ctccagtttc	tgcgaacata	840
cccaatgggt	tcaacagggc	tgagtttggg	gccagaccac	cccatctcac	ggacttcatg	900
aactctttgt	ttgtgactgc	agagactgtt	agatcccaaa	ctgtgcgggg	aggacactta	960
gtagctcac	gcaacacggc	tggcaatcgt	atcaactttc	ctagctacgg	ggtcttcaat	1020
cccgggggcg	ccatctggat	tgcatgatga	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	ctttgtgctc	tggccagggtg	agatctcagg	ttccgactca	1320
tggagagcac	caatgttctc	ttggacgcat	cgtagcgcta	ccccacaaa	caccattgat	1380
ccagagagaa	tcactcagac	tcccttgggtg	aaggcacaca	cacttcagtc	aggaactaca	1440
gttgtaagag	ggccgggggt	cacgggagga	gacattcttc	gacgcactag	tggaggacca	1500
ttcgcgtaca	ccattgtcaa	catcaatggg	caacttcccc	aaaggatatcg	tgccaggata	1560
cgccatgcct	ctactaccaa	tctaagaatc	tacgttacgg	ttgcagggtga	acggatcttt	1620
gctggtcagt	tcaacaagac	aatggatacc	ggtgatccac	ttacattcca	atctttctcc	1680
tacgccacta	tcaacaccgc	gttcaccttt	ccaatgagcc	agagcagttt	cacagtaggt	1740

gctgatacct	tcagttcagg	caacgaagtg	tacattgaca	ggtttgagtt	gattccagtt	1800
actgccacac	tcgaggcaga	gtctgacttg	gaaagagcac	agaaggcgg	gaatgctctg	1860
ttcacttcgt	ccaatcagat	tgggctcaag	acagatgtga	ctgactatca	catcgatcgc	1920
gtttccaacc	ttgttgagtg	cctctctgat	gagttctgtt	tggatgagaa	gaaggagttg	1980
tccgagaagg	tcaaacatgc	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	tgagagggtta	catcgaggac	agtcaagacc	ttgagatcta	cctcatcaga	2280
tacaacgcc	aacatgagac	agtcaatgtg	cctgggacgg	gttcactctg	gccactttca	2340
gccccaaagt	ccatcggaac	gtgcgccac	cactcacacc	acttctcctc	ggacatagac	2400
gttggctgta	ccgacctgaa	cgaagacctc	gggtgtgtggg	cgatcttcaa	gatcaagact	2460
caagatggcc	atgccaggct	aggcaatctg	aagttcctag	aagagaaacc	acttggtgga	2520
gaagccctcg	ctagagtga	gagggctgag	aagaagtgga	gggacaagag	agagaagttg	2580
gaatgggaaa	caaacactgt	gtacaaagaa	gccaaagaaa	gcgttgacgc	tctgtttgtg	2640
aactcccagt	atgataggct	ccaagctgat	accaacatag	ctatgattca	tgctgcagac	2700
aaacgcgttc	atagcattcg	ggaagcttac	cttcctgaac	ttagcgtgat	tccgggtgtc	2760
aatgctgcta	tctttgaaga	gttagaaggg	cgcatcttca	ctgcaccctc	cttgatgat	2820
gcgaggaatg	tcatcaagaa	tggtgacttc	aacaatggcc	tatcctgctg	gaatgtgaaa	2880
gggcacgtag	atgtagaaga	acagaacaat	caccgctctg	tccctgttgt	tcctgagtg	2940
gaagcagaag	tttcacaaga	agttcgtgcc	tgtcccgcc	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	tgcatcagcc	3240
tacgaggaga	aggcttacac	cgatggacgt	agggacaacc	cttgcaacc	taacagaggc	3300
tacggggact	acacaccgtt	accagccggc	tatgtcacca	aagagctaga	gcaccttcca	3360
gaaaccgaca	aggtttggat	tgagattgga	gaaacggaag	gaacactcat	tgttgatagc	3420
gtggagttac	ctctgatgga	ggaataa				3447

<210> 5

<211> 1848

<212> ADN

<213> Trình tự nucleotit của Cry1Ab

<400> 5

atggacaaca	acccaaacat	caacgaatgc	attccataca	actgcttgag	taaccagaa	60
gttgaagtac	ttggtggaga	acgcattgaa	accggttaca	ctcccatcga	catctccttg	120
tccttgacac	agtttctgct	cagcgagttc	gtgccaggtg	ctgggttcgt	tctcggacta	180
gttgacatca	tctgggggtat	ctttggtcca	tctcaatggg	atgcattcct	ggtgcaaat	240
gagcagttga	tcaaccagag	gatcgaagag	ttcgccagga	accaggccat	ctctaggttg	300
gaaggattga	gcaatctcta	ccaaatctat	gcagagagct	tcagagagtg	ggaagccgat	360
cctactaacc	cagctctccg	cgaggaaatg	cgtattcaat	tcaacgacat	gaacagcgcc	420
ttgaccacag	ctatccatt	gttcgcagtc	cagaactacc	aagttcctct	cttgctccgtg	480
tacgttcaag	cagctaattct	tcacctcagc	gtgcttcgag	acgttagcgt	gtttgggcaa	540
aggtggggat	tcgatgctgc	aaccatcaat	agccgttaca	acgaccttac	taggctgatt	600
ggaaactaca	ccgaccacgc	tggtcgttgg	tacaacactg	gcttgagcgc	tgtctgggg	660
cctgattcta	gagattggat	tagatacaac	cagttcagga	gagaattgac	cctcacagtt	720
ttggacattg	tgtctctctt	cccgaactat	gactccagaa	cctacctat	ccgtacagtg	780
tcccaactta	ccagagaaat	ctatactaac	ccagttcttg	agaacttcga	cggtagcttc	840
cgtggttctg	cccaaggtat	cgaaggctcc	atcaggagcc	cacacttgat	ggacatcttg	900
aacagcataa	ctatctacac	cgatgctcac	agaggagagt	attactgggtc	tggacaccag	960
atcatggcct	ctccagttgg	attcagcggg	cccaggttta	cctttcctct	ctatggaact	1020

atgggaaacg	ccgctccaca	acaacgtatc	gttgctcaac	taggtcaggg	tgtctacaga	1080
accttgtctt	ccaccttgta	cagaagaccc	ttcaatatcg	gtatcaacaa	ccagcaactt	1140
tccgttcttg	acggaacaga	gttcgcctat	ggaacctctt	ctaacttgcc	atccgctgtt	1200
tacagaaaga	gcggaaccgt	tgattccttg	gacgaaatcc	caccacagaa	caacaatgtg	1260
ccaccagggc	aaggattctc	ccacagggtg	agccacgtgt	ccatgttccg	ttccggattc	1320
agcaacagtt	ccgtgagcat	catcagagct	cctatgttct	catggattca	tcgtagtgtc	1380
gagttcaaca	atatcattcc	ttcctctcaa	atcacccaaa	tcccattgac	caagtctact	1440
aaccttggat	ctggaacttc	tgtcgtgaaa	ggaccaggct	tcacaggagg	tgatattctt	1500
agaagaactt	ctcctggcca	gatttagcacc	ctcagagtta	acatcactgc	accactttct	1560
caaagatata	gtgtcaggat	tcgttacgca	tctaccacta	acttgcaatt	ccacacctcc	1620
atcgacggaa	ggcctatcaa	tcagggtaac	ttctccgcaa	ccatgtcaag	cggcagcaac	1680
ttgcaatccg	gcagcttcag	aaccgtcggg	ttcactactc	ctttcaactt	ctctaacgga	1740
tcaagcgttt	tcacccttag	cgctcatgtg	ttcaattctg	gcaatgaagt	gtacattgac	1800
cgtattgagt	ttgtgcctgc	cgaagttacc	ttcagggtcg	agtactga		1848

<210> 6
 <211> 2370
 <212> ADN
 <213> Trình tự nucleotit của 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	tcacttaacg	acctcatcgc	tcaggggaat	240
ctcaacacag	aactgtctaa	ggagatcctc	aagattgcaa	atgagcagaa	ccaagttctt	300
aatgatgtga	acaataagct	cgacgccatc	aacacaatgc	ttcgcgtgta	cctcccaaag	360
attactagca	tgctctcgga	cgctcatgaag	cagaactacg	cgctgtccct	tcaaattgag	420
tatctgagca	agcagcttca	agaaatctcg	gacaagctgg	atatcattaa	tgtgaacgtc	480
ctcatcaaca	gcaccctgac	ggagattaca	ccggcgtacc	agaggatcaa	gtatgtgaat	540
gagaagttcg	aggaactcac	ttttgctaca	gaaacttcca	gcaagggtcaa	gaaggatggc	600
tcaccagccg	acatcctgga	tgagcttaca	gaactcactg	agctggcgaa	gtccgtgacc	660
aagaatgacg	tcgatggcct	cgagttttac	ctgaacacgt	tccacgacgt	tatgggtgggc	720
aacaatcttt	ttgggctggg	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	tctaattcaa	actacgctaa	ggtcaagggc	1020
tccgacgaag	atgcaaagat	gatcgttgag	gccaaagcctg	gccatgcgct	catcgggttc	1080
gagatttcta	acgactcaat	taccgtgctg	aagggtctacg	aggcgaagct	caagcagaat	1140
tatcaagtgg	acaaggattc	tctgtcagag	gttatctacg	gcgacatgga	taagctgctt	1200
tgccctgatc	agtccgagca	aatctactat	acgaacaata	ttgtcttccc	caacgaatac	1260
gtgatcacca	agattgactt	tacgaagaag	atgaagacac	tccgggtacga	ggtgacggct	1320
aacttctatg	attcgtctac	gggcgagatc	gacctcaaca	agaagaagggt	cgaatcatcc	1380
gaggccgaat	acagaaccct	gtcggcgaac	gacgatggcg	tgtatatgcc	tcttgggggtc	1440
atttctgaga	ccttcctcac	gcccataaat	ggctttgggc	tccaggcaga	tgagaactcc	1500
cgcctgatca	cccttacgtg	caagagctac	ctcaggggagc	tgctgcttgc	caccgacctc	1560
tctaacaagg	aaacgaagct	gatcgttccg	ccatcagggt	tcattctcaa	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	agaggttcac	aactggcact	1920

gacctgaagg	gggtctatct	tattctcaag	tcccagaatg	gcatgaggc	ctggggcgac	1980
aacttcatca	ttctcgaat	ctcccctagc	gagaagctcc	tgagccccga	gctgattaac	2040
accaataact	ggacatccac	tggcagcacg	aatatctcgg	ggaacaccct	gacgctttac	2100
cagggcgggg	gaggcattct	gaagcagaac	ctccaactgg	attcgttctc	tacctacaga	2160
gtctatTTTT	cagtttccgg	cgacgcgaat	gtgcgcatca	ggaactcgcg	ggaagtcctc	2220
ttcgagaaga	gatacatgtc	tggcgctaag	gatgtgtcag	aaatgttcac	cacgaagttt	2280
gagaaggaca	acttttatat	cgaactgtcc	caagggaata	acctctacgg	cggccccatt	2340
gttcattttt	acgacgtgag	catcaagtga				2370

<210> 7

<211> 1992

<212> ADN

<213> Gen khởi đầu Ubiquitin của ngô

<400> 7

ctgcagtga	gcgtgaccg	gtcgtgccc	tctctagaga	taatgagcat	tgcattgtcta	60
agttataaaa	aattaccaca	tatttttttt	gtcacacttg	tttgaagtgc	agttttatcta	120
tctttataca	tatatTTaaa	ctttactcta	cgaataatat	aatctatagt	actacaataa	180
tatcagtgtt	ttagagaatc	atataaatga	acagtttagac	atggtctaaa	ggacaattga	240
gtattttgac	aacaggactc	tacagtttta	tcttttttagt	gtgcatgtgt	tctccttttt	300
ttttgcaaat	agcttcacct	atataatact	tcatccattt	tattagtaca	tccatttagg	360
gtttagggtt	aatggttttt	atagactaat	tttttttagta	catctatttt	attctatttt	420
agcctctaaa	ttaagaaaac	taaaactcta	tttttagtttt	tttatttaaat	aatttagata	480
taaaatagaa	taaaataaag	tgactaaaaa	ttaaacaat	acctttaag	aaattaaaaa	540
aactaaggaa	acattttttct	tgtttcgagt	agataatgcc	agcctgttaa	acgccgtcga	600
cgagtctaac	ggacaccaac	cagcgaacca	gcagcgtcgc	gtcgggcca	gcgaagcaga	660
cggcacggca	tctctgtcgc	tgctctgga	cccctctcga	gagttccgct	ccaccgttgg	720
acttgctcgc	ctgtcggcat	ccagaaattg	cgtggcggag	cggcagacgt	gagccggcac	780
ggcaggcggc	ctcctcctcc	tctcacggca	cggcagctac	gggggattcc	tttcccaccg	840
ctccttcgct	ttcccttcct	cgcccgccgt	aataaataga	cacccctcc	acaccctctt	900
tccccaacct	cgtgttgttc	ggagcgcaca	cacacacaac	cagatctccc	ccaaatccac	960
ccgtcggcac	ctccgcttca	aggtacgccg	ctcgtcctcc	ccccccccc	ctctctacct	1020
tctctagatc	ggcgttccgg	tccatgggta	ggggccggta	gttctacttc	tgttcatgtt	1080
tgtgttagat	ccgtgtttgt	gttagatccg	tgctgctagc	gttcgtacac	ggatgcgacc	1140
tgtacgtcag	acacgttctg	attgctaact	tgccagtgtt	tctctttggg	gaatcctggg	1200
atggctctag	ccgttccgca	gacgggatcg	atttcatgat	tttttttgtt	tcgttgcata	1260
gggtttgggt	tgcccttttc	ctttatttca	atataatgcc	tgcaattgtt	tgtcgggtca	1320
tcttttcatg	cttttttttg	tcttggttgt	gatgatgtgg	tctggttggg	cggtcgttct	1380
agatcggagt	agaattctgt	ttcaaactac	ctgggtggatt	tattaatttt	ggatctgtat	1440
gtgtgtgcca	tacatattca	tagttacgaa	ttgaagatga	tggatggaaa	tatcgatcta	1500
ggatagggtat	acatgttgat	gcgggtttta	ctgatgcata	tacagagatg	ctttttgttc	1560
gcttggttgt	gatgatgtgg	tgtggttggg	cggtcgttca	ttcgttctag	atcggagtag	1620
aatactgttt	caaactacct	ggtgtattta	ttaatttttg	aactgtatgt	gtgtgtcata	1680
catcttcata	gttacgagtt	taagatggat	ggaaatatcg	atctaggata	ggtatacatg	1740
ttgatgtggg	ttttactgat	gcataatacat	gatggcatat	gcagcatcta	ttcatatgct	1800
ctaactttga	gtacctatct	attataataa	acaagtatgt	tttataatta	ttttgatctt	1860
gatatacttg	gatgatggca	tatgcagcag	ctatatgtgg	atttttttag	ccctgccttc	1920
atacgtattt	tatttgcttg	gtactgtttc	ttttgtcgat	gctcaccctg	ttgtttgggtg	1980
ttacttctgc	ag					1992

<210> 8

<211> 253

<212> ADN

<213> Gen kết thúc của nopalin synthaza

<400> 8

gatcgttcaa	acatttggca	ataaagtttc	ttaagattga	atcctgttgc	cggtcttgcg	60
atgattatca	tataatttct	gttgaattac	gttaagcatg	taataattaa	catgtaatgc	120
atgacgttat	ttatgagatg	ggtttttatg	attagagtcc	cgcaattata	catttaatac	180
gcgatagaaa	acaaaatata	gcgcgcaaac	taggataaat	tatcgcgcg	ggtgtcatct	240
atgttactag	atc					253

<210> 9

<211> 1176

<212> ADN

<213> Gen phosphomanoza isomeraza

<400> 9

atgcaaaaac	tcattaactc	agtgcaaaaac	tatgcctggg	gcagcaaaaac	ggcgttgact	60
gaacttttatg	gtatggaaaa	tccgtccagc	cagccgatgg	ccgagctgtg	gatgggcgca	120
catccgaaaa	gcagttcacg	agtgcagaat	gccgccggag	atatcgtttc	actgcgtgat	180
gtgattgaga	gtgataaatc	gactctgctc	ggagaggccg	ttgccaaaacg	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
gtcgcagggtg	cacatccggc	gattgctcac	tttttacaac	agcctgatgc	cgaacgttta	540
agcgaactgt	tcgccagcct	gttgaatatg	cagggtgaag	aaaaatccc	cgcgctggcg	600
attttaaaat	cggccctcga	tagccagcag	ggtgaaccgt	ggcaaacgat	tcgtttaatt	660
tctgaatttt	acccggaaga	cagcggctcg	ttctccccgc	tattgctgaa	tgtgggtgaaa	720
ttgaaccctg	gcgaagcgat	gttcctgttc	gctgaaacac	cgcacgctta	cctgcaaggc	780
gtggcgctgg	aagtgatggc	aaactccgat	aacgtgctgc	gtgcgggtct	gacgcctaaa	840
tacattgata	ttccggaact	ggttgccaat	gtgaaattcg	aagccaaacc	ggctaaccag	900
ttgttgaccc	agccggtgaa	acaagggtgca	gaactggact	tcccgattcc	agtggatgat	960
tttgctttct	cgctgcatga	ccttagtgat	aaagaaacca	ccattagcca	gcagagtgcc	1020
gccattttgt	tctgcgtcga	aggcgatgca	acgttgtgga	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 mồi 1

<400> 10

cagtcaggaa	ctacagttgt	aagaggg	27
------------	------------	---------	----

<210> 11

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi 2

<400> 11

acgcgaatgg tcctccacta 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 mồi 3

<400> 13

tggtggagaa cgcattgaaa c

21

<210> 14

<211> 23

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi 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 mồi 5

<400> 16
 cagtcaggaa ctacagttgt aagaggg 27

<210> 17
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi 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 mồi 7

<400> 19
 attctcgaaa tctcccctag cg 22

<210> 20
 <211> 19
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi 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