



(12) **BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ**

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

(11) 
1-0022743

(51)⁷ **A01H 5/10, C12C 1/18, 7/00, 12/00,**
C12N 15/01

(13) **B**

(21) 1-2011-01742

(22) 01.12.2009

(86) PCT/DK2009/050315 01.12.2009

(87) WO2010/063288 10.06.2010

(30) PA200801708 03.12.2008 DK

(45) 27.01.2020 382

(43) 25.06.2012 291

(73) 1. Carlsberg Breweries A/S (DK)

Ny Carlsberg Vej 100, 1799 Copenhagen V, Denmark

2. Heineken Supply Chain B.V. (NL)

2de Weteringsplansoer 21, 1017 ZD Amsterdam, Netherlands

(72) Soren Knudsen (DK), Gustav Hambraeus (SE), Lene Molskov Bech (DK), Steen Bech Sorensen (DK), Birgitte Skadhauge (DK), Klaus Breddam (DK), Ole Olsen (DK)

(74) Công ty TNHH Sở hữu công nghiệp Sao Bắc Đẩu (SAO BAC DAU IP CO.,LTD)

(54) **ĐỒ UỐNG SẢN XUẤT TỪ LÚA MẠCH VÀ MẠCH NHA VỚI LƯỢNG ĐIMETYL SULFUA RẤT NHỎ VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT ĐỒ UỐNG NÀY**

(57) Sáng chế đề xuất đồ uống sản xuất được từ lúa mạch, khác biệt ở chỗ, đồ uống này chứa cả đimetyl sulfua (DMS) và/hoặc tiền chất của nó S-metyl-L-methionin (SMM) với lượng giảm đáng kể, hoặc không chứa hợp chất này. Ngoài ra, sáng chế liên quan đến các phương pháp sản xuất đồ uống nêu trên và phương pháp trồng cây lúa mạch dùng cho việc sản xuất ra đồ uống này, cũng như các sản phẩm thực vật khác được sản xuất từ cây nêu trên. Sáng chế tạo ra các quy trình sản xuất đồ uống cải tiến với profin vị được cải thiện, và cũng cho phép giảm đáng kể nhiệt năng ban đầu để sản xuất bia.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế liên quan đến đồ uống sản xuất từ lúa mạch, khác biệt ở chỗ, nó chứa cả dimethyl sulfua (dimethyl sulfide-DMS) và/hoặc tiền chất S-metyl-L-methionin (S-methyl-L-methionine-SMM) với lượng giảm đáng kể, hoặc không chứa một, hoặc tốt hơn là không chứa cả hai hợp chất này. Ngoài ra, sáng chế cũng liên quan đến phương pháp sản xuất đồ uống này - và cả cây lúa mạch dùng để sản xuất đồ uống này, cũng như các sản phẩm thực vật khác sản xuất được từ các loại cây trồng này. Trong khi sáng chế cho phép sản xuất đồ uống khác biệt bởi profin vị được cải thiện, thì sáng chế cũng tạo điều kiện thuận lợi cho mẫu mới đối với các phương pháp sản xuất có sự giảm đáng kể nhiệt năng ban đầu - cụ thể là đối với việc đun sôi chế phẩm ủ men.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Đồ uống, đặc biệt là bia, có thể được sản xuất trên cơ sở lúa mạch - *Hordeum vulgare*, L. - là cây trồng một lá mầm trồng ở nhiều khu vực trên thế giới. Lúa mạch có ý nghĩa quan trọng về mặt kinh tế, vừa làm nguyên liệu cho các sản phẩm công nghiệp, kể cả bia, cũng vừa làm nguồn thức ăn cho động vật.

Trong bia, cũng như trong nhiều loại rau và thực phẩm khác - kể cả cây chè, cây coca, sữa, rượu vang, rượu mạnh (như rượu rum), ngô ngọt, và một số rau được nấu chín - DMS, nói chung bổ sung mùi và hương vị đặc biệt quan trọng có ích cho sản phẩm. Tuy nhiên, DMS với lượng lớn làm cho hương vị có thể trở nên không còn là mong muốn, thường được mô tả là "ngô ngọt nấu chín" hoặc đôi khi là "như quả lí chua đen".

Tùy thuộc vào loại bia, lượng DMS thường có thể lên tới 144 µg/L và đôi khi có thể đạt tới mức 150 ppb (150 µg/L), với lượng hợp chất nêu trên

thường góp phần tạo ra hương vị của “rau nấu chín” hoặc “giống như cải bắp” không mong muốn. Tuy nhiên, hợp chất này với lượng nhỏ đôi khi lại là điều mong muốn trong bia loại nhẹ vì nó có thể góp phần tạo ra độ đậm trong vòm miệng và hương vị của toàn bộ bia; ngưỡng có nghĩa nằm trong khoảng từ 25 đến 50 ppb (phần tỷ), nằm trong khoảng từ 30 đến 45 $\mu\text{g/L}$ chẳng hạn (Meilgaard, 1982). Nói chung, vị của DMS không cảm nhận được khi lượng $\text{DMS} < 10 \text{ ppb}$.

SMM, ở đây cũng có nghĩa là tiền chất của DMS (DMS precursor - DMSP), được tổng hợp trong các hạt lúa mạch đang nảy mầm bằng cách tác động vào các hợp phần chức năng của chu trình SMM (FIG.1A). Ở đây, enzym methionin (Met)-S-metyltransferaza (MMT) xúc tác cho việc chuyển hóa nhóm methyl từ S-adenosyl-methionin (AdoMet) thành Met, tạo ra SMM. Đến lượt mình, hợp chất này có thể được dùng làm chất cho methyl để tổng hợp Met từ homoxystein (Hey), phản ứng này được xúc tác bằng enzym Hcy-S-metyltransferaza (Hcy-S-methyltransferase-HMT). Mặc dù có sự tranh luận về vai trò xác định của MMT, nhưng ban đầu nó được đề xuất để ngăn không cho các nhóm Met để tổng hợp protein khỏi bị cạn kiệt do sự quá tải trong phương pháp tổng hợp AdoMet (Mudd và Datko, 1990). Chu trình SMM cũng đã được khuyến cáo để thực hiện trong việc chuyển lưu huỳnh đi xa trong thực vật, với dòng chủ yếu từ Met đến SMM trong các lá, chuyển libe của SMM, và chuyển đổi lại SMM vào Met trong các hạt đang phát triển hoặc các mô chìm khác (Bourgis và các đồng tác giả, 1999). Nhưng các thử nghiệm bằng chất phóng xạ đánh dấu sau đó đã phát hiện ra rằng, chu trình nêu trên quản lý việc điều khiển lượng AdoMet mà không phải là ngăn chặn sự cạn kiệt Met (Ranocha và các đồng tác giả, 2001). Một cách giải thích khác về vai trò sinh lý của SMM trong thực vật liên quan đến sự điều hòa quy trình tổng hợp etylen (Ko và các đồng tác giả, 2004), về nguyên tắc với ý tưởng xuất hiện thông qua nghiên cứu bằng gen tổng hợp 1-aminocyclopropan-1-carboxylat từ men của giống *Pichia*.

McElroy và Jacobsen (1995) đã suy đoán rằng, có thể điều khiển quy

trình tổng hợp SMM bằng cách sử dụng, ví dụ, công nghệ gen đối nghĩa. Tuy nhiên, không có hướng dẫn nào được đưa ra về các gen đích có liên quan đối với gen đối nghĩa, nhưng đã có hy vọng rằng, khả năng có kết quả khả quan là đáng ngờ vì sự giảm mạnh lượng SMM có thể gây hại cho sự sinh trưởng và phát triển của lúa mạch. Các giải pháp khác để thu được lượng SMM nhỏ hơn không được McElroy và Jacobsen (nêu trên) đưa ra bàn luận. Ngoài ra, như được bàn luận một cách chi tiết dưới đây, công nghệ gen đối nghĩa không được áp dụng một cách thành công ở lúa mạch để hủy bỏ hoàn toàn sự biểu hiện gen.

Tiếc rằng, hiện chưa có phương pháp nào để xử lý cây lúa mạch đột biến hoàn toàn không có sự biểu hiện của một protein nhất định. Nói chung đối với cây lúa mạch, việc áp dụng kỹ thuật gen đối nghĩa làm cho thực vật đột biến vẫn biểu hiện một số protein đang được xem xét đến (ví dụ, xem ấn phẩm của Robbins và các đồng tác giả, 1998; Stahl và các đồng tác giả, 2004; Hansen và các đồng tác giả, 2007).

Ngoài ra, các phương pháp hữu hiệu để xử lý các thể đột biến đặc thù bằng cách sử dụng ARN/ADN tách intron hoặc đột biến định hướng điểm đã không được phát triển để sử dụng cho cây lúa mạch. Do đó, và bất kể các nỗ lực tập trung, các tác giả sáng chế của sáng chế này chưa biết đến công trình bất kỳ nào đã được công bố về sự định hướng gen oligonucleotit thành công ở cây lúa mạch. Mặc dù không tiếp tục nghiên cứu về cây lúa mạch, nhưng Lida và Terada (2005) nhận thấy rằng sự định hướng gen đích oligonucleotit đã được thử nghiệm ở cây ngô, cây thuốc lá và cây lúa - nhưng trong tất cả các trường hợp này dùng gen tổng hợp axetolactat kháng-thuốc diệt cỏ (ALS - axetolactate syntase) làm đích. Theo kết luận của Lida và Terada (nêu trên), vẫn cần phải xác minh xem liệu phương pháp nêu trên, với các biến đổi thích hợp, có thể áp dụng được đối với các gen khác với các gen có thể chọn lọc một cách trực tiếp, như ALS hay không. Đột biến định hướng bằng cách sử dụng nucleaza có lỗi kẽm là một công cụ khác có thể có khả năng cho phép tiếp tục nghiên cứu về sinh học cơ bản của thực vật hoặc các biến đổi ở cây trồng

(Durai và các đồng tác giả, 2005; Tzfira và White, 2005; Kumar và các đồng tác giả, 2006). Cũng trong trường hợp này, đột biến đã không được tiếp tục nghiên cứu hoặc áp dụng một cách thành công ở cây lúa mạch.

Tuy nhiên, các thể đột biến của cây lúa mạch có thể được xử lý bởi đột biến ngẫu nhiên bằng cách chiếu xạ hoặc xử lý bằng hóa chất, như bằng cách xử lý bằng natri nitrua (NaN_3). Một ví dụ liên quan đến các hạt lúa mạch được gây đột biến thông qua sử dụng NaN_3 , và sau đó được sàng lọc để tạo ra lượng lớn phosphat tự do trong nỗ lực sàng lọc đối với các thể đột biến phytat thấp (Rasmussen và Hatzack, 1998); đã nhận dạng được tổng cộng 10 thể đột biến trong số 2000 hạt được sàng lọc. Mặc dù hoàn toàn không phải lúc nào cũng có thể, nhưng việc phát hiện thể đột biến cụ thể sau khi xử lý bằng NaN_3 phụ thuộc vào tính liên tục và phương pháp sàng lọc hữu hiệu, và do đó, hoàn toàn không phải lúc nào cũng thành công.

Vấn đề khó khăn liên quan đến việc nhận dạng các đích phân tử triển vọng ở sự nhân giống cây trồng truyền thống liên quan đến những khó khăn để xác minh xem hợp phần (các hợp phần) nào của quá trình sinh hóa nhất định cần phải được gây rối loạn để tạo ra sự biến đổi mong muốn của hệ đọc, và nhờ đó có khả năng xác minh phương pháp sàng lọc hữu ích.

Các quá trình ủ liên quan đến việc sản xuất bia ở nhiệt độ cao - như lò sấy mạch nha, hoặc đun nóng và đun sôi chế phẩm ủ men - có thể gây ra sự chuyển hóa hóa học của SMM thành DMS. Do những tính chất cố hữu của DMS, cụ thể là điểm sôi của nó chỉ là 37°C - 38°C , nên phần chính của DMS được tạo ra trong khi sấy khô và việc đun sôi chế phẩm ủ men có thể bị mất vào khí quyển. Ở nhiệt độ cao hơn $\sim 70^{\circ}\text{C}$, lượng DMS bay hơi giảm đến lượng rất nhỏ (Scheuren và Sommer, 2008), trong khi xuất hiện các điều kiện để oxy hóa tiếp tục thành dimetyl sulfoxit (DMSO). Khi thời gian giữ hoặc ưu thế của chế phẩm ủ men đun sôi là không thích hợp để chuyển hóa SMM kết tủa, thì DMS có thể tiếp tục tạo thành khi làm lạnh dịch đường - với việc chuyển hóa ở bước tiếp sau thành bia.

Các phương pháp công nghệ để làm giảm lượng DMS trong bia đã được phát triển. Do đó, AU 38578/93 mô tả phương pháp làm giảm lượng DMS trong mạch nha bao gồm bước xử lý mạch nha này bằng hơi nước. Trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ US 2006/0057684 của Bisgaard-Frantzen H. và các đồng tác giả đã mô tả phương pháp nấu bia bao gồm bước xử lý nhiệt mạch nha ở nhiệt độ 70°C và cao hơn. Và trong patent Mỹ số 5.242.694 cấp cho Reuther H. đã mô tả các phương pháp xử lý bia chứa lượng nhỏ hydrat cacbon, trong khi các phương pháp này bao gồm bước đun sôi mạnh chế phẩm ủ men, tiếp sau là rửa chế phẩm ủ men này bằng cacbon đioxit. Tuy nhiên, tất cả các bước xử lý nêu trên đều tiêu thụ nhiều năng lượng, và hơn nữa chúng có thể làm thay đổi các tính chất của mạch nha hoặc chế phẩm ủ men.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến đồ uống được sản xuất từ lúa mạch, hoặc các phần của nó, đặc biệt là bia có hương vị được cải thiện. Đồ uống được mô tả ở đây có lượng DMS rất nhỏ, hoặc thậm chí hoàn toàn không chứa DMS - cụ thể là đồ uống với lượng DMS nhỏ dưới ngưỡng vị giác, và nhờ đó khác biệt ở chỗ, nó không có vị của DMS.

Ngoài ra, đồ uống theo sáng chế có vị ngon hơn. Do đó, đồ uống theo sáng chế khác biệt ở chỗ hương vị được cân bằng và dễ uống, với độ tươi cao, thơm ngon và có hương vị thực vật.

Do vậy, sáng chế đề xuất đồ uống với hương vị nổi bật trên cơ sở không chứa DMS hoặc chứa lượng nhỏ DMS. Đã phát hiện ra rằng, DMS ảnh hưởng mạnh đến sự cảm nhận của người về các hợp chất este trong bia (xem Fig.1B), phù hợp với mô hình được các tác giả sáng chế đề xuất, trong đó DMS che được mùi vị của các hợp chất này.

Điều hết sức quan trọng được cân nhắc là sáng chế đề xuất các hạt lúa mạch hoặc mạch nha với khiếm khuyết mà đặc biệt ngăn chặn sự tạo thành tiền chất DMS. Theo cách này, sự che mùi vị este như được mô tả trên đây bởi DMS có thể tránh được, điều đó cho phép các cơ hội mới trong việc sử dụng

lúa mạch và mạch nha ở quy mô công nghiệp. Ngoài ra, các hạt lúa mạch hoặc mạch nha với khiếm khuyết mà đặc biệt ngăn chặn sự tạo thành tiền chất DMS cũng có các hương vị do chính sự không có mặt của DMS gây ra. Điều đáng chú ý là, kiểu lúa mạch hoặc mạch nha nêu trên có thể được khai thác làm nguyên liệu trong các ứng dụng công nghiệp hữu hiệu để giúp xác minh các thông số sản xuất phù hợp vượt quá xa các khả năng hiện có. Cụ thể, các cải thiện liên quan đến các vấn đề về chất lượng bia và giữ gìn môi trường trong sản xuất bia, cụ thể là để:

- (i) Bia có mùi vị đặc thù với lượng nhỏ DMS;
- (ii) Bia có profin vị được cải thiện;
- (iii) Giảm về tiêu thụ năng lượng ban đầu cho sản xuất bia; và
- (iv) Giảm về tiêu thụ năng lượng trong sản xuất chế phẩm ủ men.

Sáng chế đề xuất cây và hạt lúa mạch để đáp ứng các cải thiện nêu trên.

Như vậy, không bị ràng buộc bởi các lý thuyết về cách chuyển hóa SMM mà có thể liên quan đến các quá trình sinh học khác, sáng chế đưa ra các cơ hội vẫn chưa được đề xuất để khai thác và thăm dò sự nhân giống và ứng dụng công nghiệp của cây lúa mạch có khiếm khuyết trong quy trình tổng hợp SMM.

Sáng chế bộc lộ rằng đồ uống khác biệt ở chỗ nó có mùi vị đặc thù với lượng nhỏ DMS và profin vị este được cải thiện và/hoặc được đặc biệt cân bằng và dễ uống - tức là với độ tươi cao, thơm ngon, có hương vị thực vật - có thể được sản xuất từ cây lúa mạch, hoặc các bộ phận của nó, mang sự đột biến trong gen mã hóa MMT, mà làm mất hoàn toàn hoạt tính của MMT. Các cây trồng này ở đây được ký hiệu là lúa mạch "không chứa MMT".

Do vậy, sáng chế liên quan đến một khía cạnh về đồ uống được sản xuất từ cây lúa mạch, hoặc một bộ phận của nó, trong đó đồ uống này chứa DMS với lượng nhỏ hơn 30 ppb (như nhỏ hơn 30 ppb), và trong đó cây lúa mạch này mang sự đột biến trong gen mã hóa MMT, mà làm mất hoàn toàn hoạt tính của MMT.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất cây lúa mạch dùng để sản xuất

đồ uống này. Do đó, một mục đích nữa của sáng chế là đề xuất cây lúa mạch, hoặc bộ phận của nó, và trong đó cây lúa mạch này mang sự đột biến trong gen mã hóa MMT, mà làm mất hoàn toàn enzym MMT chức năng.

Ngoài ra, sáng chế liên quan đến các sản phẩm thực vật được sản xuất từ cây lúa mạch “không chứa MMT” nêu trên, kể cả, ví dụ, mạch nha và các chế phẩm ủ men, hoặc si rô hoặc sản phẩm chiết từ lúa mạch, hoặc si rô hoặc sản phẩm chiết từ mạch nha, hoặc các sản phẩm phụ. Các sản phẩm phụ theo sáng chế có thể là lúa mạch chưa được tạo mạch nha, nó có thể được sử dụng riêng rẽ hoặc kết hợp với lúa mạch được tạo mạch nha để sản xuất ra chế phẩm ủ men. Ngoài ra, sáng chế cũng đề xuất các phương pháp sản xuất ra các cây lúa mạch này, cũng như các phương pháp sản xuất ra đồ uống và các sản phẩm thực vật khác.

Hơn nữa, với khí hậu rối loạn trên thế giới trong chương trình nghị sự quốc tế, tổ chức xã hội và công nghiệp phải đóng góp vào chương trình cắt giảm khí thải vào ngôi nhà xanh chung và ích lợi môi trường. Do đó, một mục đích của sáng chế là đề xuất cây lúa mạch dùng để sản xuất bia bằng cách sử dụng phương pháp tiêu thụ ít năng lượng. Vì vậy, cây lúa mạch theo sáng chế là hữu ích để sản xuất bia bằng cách sử dụng phương pháp trong đó thời gian ở các bước đun nóng giảm, hoặc nhiệt độ ở các bước đun nóng giảm so với các phương pháp nấu bia thông thường. Điều quan trọng chủ yếu là ích lợi ở các bước của quy trình sấy khô trong lò và đun sôi chế phẩm ủ men có thể rút ngắn một cách đáng kể hoặc được thực hiện ở nhiệt độ thấp hơn so với các chế độ nấu và sản xuất bia tiêu chuẩn, làm giảm mức tiêu thụ năng lượng để tạo ra phương pháp bền vững hơn trong việc sản xuất bia.

Danh mục các trình tự

Sáng chế có thể được hiểu một cách đầy đủ hơn từ phần mô tả chi tiết sau và danh mục các trình tự kèm theo (được tóm tắt trong Bảng 10), cấu thành một phần của đơn này. Bảng nêu trên liệt kê các axit nucleic và polypeptit được mô tả ở đây, sự chỉ định các đoạn mỗi oligonucleotit cũng như các dòng ADN bổ trợ

và gADN bao gồm các đoạn axit nucleic mã hóa các polypeptit biểu hiện toàn bộ hoặc phần chủ yếu của các polypeptit này, và bộ nhận dạng tương ứng (SEQ ID NO:). Việc mô tả các trình tự và liệt kê các trình tự này được gắn vào đây tuân theo các quy tắc điều khiển trình tự nucleotit và/hoặc axit amin đã được công bố trong các đơn yêu cầu cấp patent.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện các hợp phần được chọn của chu trình SMM và điểm số hương vị trung bình. Fig.1A thể hiện các hợp phần được chọn của chu trình SMM, trong đó SMM được tổng hợp bằng cách chuyển hóa metyl từ S-adenosylmethionin (SAM) thành methionin (Met), được xúc tác bằng enzym Met-S-metyltransferaza (MMT). Về phần mình, SMM có thể được dùng làm chất cho metyl để tổng hợp Met từ homoxystein (Hey), trong phản ứng được xúc tác bằng enzym Hcy-S-metyltransferaza (HMT). Hình vẽ này thể hiện cách các phản ứng không thuận nghịch chủ yếu được nối kết. Mỗi vòng của chu trình này là không có hiệu quả vì nó tiêu thụ và sau đó hoàn nguyên hai Met trong khi chuyển hóa ATP thành adenosin, PPi và Pi (không được thể hiện). FIG.1B thể hiện điểm số hương vị trung bình, $\pm$ độ lệch chuẩn, được cho bởi hội đồng chuyên gia đánh giá hương vị bia về các tính chất được liệt kê – độ đặc, este, và DMS của các mẫu bia.

Các mẫu đối chứng của bia tiêu chuẩn được gán chỉ với bia (cột được đánh số "0"), hoặc được gán với hỗn hợp các este có các nồng độ sau trong bia: 5 ppm (phần triệu) etyl axetat, 1,5 ppm isoamylaxetat, 0,05 ppm etyl hexanoat, 0,13 ppm etyl octanoat (cột được đánh số "1"), và hỗn hợp este nêu trên kể cả 100 ppb DMS (cột được đánh số "2").

Fig.2 thể hiện các phân tử bị tham gia vào sự tạo thành kiềm của hợp chất huỳnh quang SMM-OPA.

Fig.3 thể hiện các kết quả phân tích HPLC và phép thâm tách Western để kiểm chứng kiểu hình không chứa MMT của thể đột biến 8063 và thể đột biến 14018. Fig.3A thể hiện một ví dụ về việc tách dựa vào HPLC sản phẩm chiết ra

khởi mầm cv. Prestige, thể hiện việc rửa giải bằng axit aspartic (Asp), axit glutamic (Glu), asparagin (Asn), serin (Ser) và SMM. Chất huỳnh quang các sản phẩm chiết được tạo dẫn xuất từ OPA của mầm lúa mạch được kích thích ở bước sóng 340 nm và bức xạ đo được ở bước sóng 450 nm. FIG.3B thể hiện quy trình tách dựa vào phép HPLC sản phẩm chiết từ các thể đột biến được chỉ dẫn trên đây và chủng cv. Sebastian kiểu dại. Việc tách các hợp phần trong sản phẩm chiết thể đột biến tạo ra biểu đồ sắc ký mà không có các đỉnh đặc trưng của SMM. Fig.3C thể hiện các kết quả của phép thẩm tách Western các protein được tách theo cỡ ra khỏi các sản phẩm chiết mầm của Prestige kiểu dại (cột 2), thể đột biến 8063 (cột 3), Sebastian kiểu dại (cột 5), và thể đột biến 14018 (cột 6). Các protein với khối lượng được biểu thị bằng kDa được tách ra ở các cột 1, 4, và 7, trong khi tái tổ hợp MMT từ các tế bào E. coli được sử dụng làm đối chứng và được tách ra ở cột 8. Như được mô tả một cách chi tiết trong ví dụ 12, các dải protein nhuộm màu 120kDa biểu thị MMT, trong khi dải 80kDa trong sản phẩm chiết các tế bào E. coli không nhận được từ MMT vì nó cũng xuất hiện trong các sản phẩm chiết của các tế bào đối chứng âm tính được chuyển hóa bằng vector pET19b (xem Fig.14B, C).

Fig.4 thể hiện sự vắng hoạt tính MMT trong mầm 4 ngày tuổi của thể đột biến 8063, nhưng biểu hiện các hoạt tính trong mầm kiểu dại có ngày tuổi tương tự. Hoạt tính MMT được xác định bằng cách sử dụng [3 H]SAM làm cơ chất. Sự chuyển hóa nhóm methyl từ [3 H]SAM thành Met được xúc tác bằng MMT, tạo ra SMM, được theo dõi bằng cách đếm nhấp nháy sau khi loại bỏ cặn [3 H]SAM bởi than hoạt tính. Chất này liên kết cơ chất - nhưng không phải là sản phẩm SMM mới được tổng hợp và được gắn nhãn. Hình vẽ này cũng thể hiện rằng SMM không có mặt trong mầm thể đột biến, nhưng có mặt trong các mầm của kiểu dại. Có tổng cộng 30 mầm của cả thể đột biến và kiểu dại được phân tích, mỗi loại 15 mầm.

Fig.5 thể hiện việc so sánh lượng DMSP tự do và DMS tự do trong mạch nha kiểu dại và mạch nha không chứa MMT, chế phẩm ủ men, và bia. Fig.5A

thể hiện cả mạch nha tươi và mạch nha được sấy khô của thể đột biến 8063 với lượng DMSP và lượng DMS tự do giảm đáng kể. Fig.5B thể hiện chế phẩm ủ men ngọt và chế phẩm ủ men sôi của thể đột biến 8063 hầu như không chứa DMSP và DMS tự do, và cũng như bia được sản xuất bằng cách sử dụng mạch nha của thể đột biến 8063 có lượng DMS tự do cực nhỏ.

Fig.6 thể hiện việc so sánh profin vị được xác minh bởi hội đồng chuyên gia đánh giá hương vị bia gồm 10 người; các thử nghiệm này bao gồm các bia được nấu bằng mạch nha cv. Power kiểu đại và thể đột biến 8063 (không chứa MMT). Kiểu phân tích này bắt buộc sử dụng một số đặc tính vị được xác định sơ bộ như được thể hiện trên đồ thị này, có thể được lượng hoá theo thang điểm từ 0 đến 5. Vị được phán xét là "cực kì", tương ứng với điểm 5, nếu chỉ tính chất của nó được xem là cực đại đối với loại bia được thử nghiệm. Fig. 6A thể hiện tóm lược việc đánh giá của hội đồng chuyên gia đánh giá hương vị bia được gán bằng este và rượu được liệt kê trong Bảng 1. Fig.6B thể hiện tóm lược chi tiết việc đánh giá của hội đồng chuyên gia đánh giá hương vị bia chưa được gán.

Fig.7 thể hiện cách nhân giống các hạt lúa mạch được tạo ra bởi NaN_3 . Các hạt đời M0 phát triển thành cây để thu được hạt đời M1. Các hạt này có thể được gieo và phát triển thành cây M1, cây này tạo ra các hạt đời M2. Tiếp theo, các cây M2 phát triển và tạo ra các hạt đời M3. Các hạt đời M3 có thể được phép nảy mầm, và các mẫu của nó, ví dụ, bao lá mầm, có thể được sử dụng để phân tích. Các hạt đời M3 có thể cũng được gieo và hoa của cây tương ứng được sử dụng để lai nhằm thu được cây đời M4.

Fig.8 thể hiện một cách tổng quát dạng sơ đồ đơn giản hóa quy trình được ưu tiên để sản xuất bia, bao gồm bước ngâm hạt lúa mạch (1), làm nảy mầm (2), sấy trong lò (3), nghiền mạch nha khô (4), ngâm ủ (5), lọc (6), đun sôi chế phẩm ủ men với sự có mặt của cây hoa bia được bổ sung vào (7), lên men với sự có mặt của men (8), tạo ra bia (9), lọc bia (10), đóng chai, lon, hoặc dụng cụ tương tự (11) chẳng hạn, và gắn nhãn (12). Các quy trình riêng lẻ có thể được gộp lại thành các công đoạn bao gồm việc sản xuất mạch nha (1-3), sản xuất chế phẩm ủ

men (4-7), lên men (8-9) và tạo ra bia thành phẩm (10-12). Mặc dù phương pháp được ưu tiên theo sáng chế được minh họa, nhưng các phương pháp thay thế có thể được dự tính bỏ qua một số bước đã được mô tả (ví dụ, bước lọc có thể được bỏ qua hoặc hy vọng có thể được bổ sung), hoặc các bước phụ được bổ sung (ví dụ, bổ sung chất bổ trợ hoặc cacbonat). Bia có thể cũng được sản xuất bằng cách sử dụng hỗn hợp gồm lúa mạch được tạo mạch nha và lúa mạch chưa được tạo mạch nha, hoặc chỉ lúa mạch chưa được tạo mạch nha, trong trường hợp đó các enzym ngoài được bổ sung vào một cách thường xuyên trong quá trình ngâm ủ.

Fig.9 ở dạng sơ đồ, thể hiện cấu trúc của gen lúa mạch mã hóa MMT, được minh họa là trình tự gen có độ dài 6368bp (SEQ ID NO:3), trình tự này mở rộng các codon bắt đầu và kết thúc dịch mã. Các exon và intron lần lượt được thể hiện dưới dạng các ô vuông được đánh số và các lần không được đánh số. Exon 12 được minh họa dưới dạng đầu mũi tên để biểu thị hướng chung của việc phiên và dịch mã. Số của các nucleotit đoạn các đầu 5' và 3' của các exon được chỉ ra liên quan đến bazơ thứ nhất của codon bắt đầu dịch mã. Cũng được minh họa là các vị trí gần của các đoạn PCR tương ứng với các cấu trúc mở rộng bằng cách sử dụng các bộ đoạn mồi được liệt kê trong Bảng 2.

Fig.10 thể hiện trình tự ADN bổ trợ đối với MMT của cây lúa mạch cv. Prestige, mở rộng codon bắt đầu và kết thúc dịch mã, tức là vùng mã hóa (SEQ ID NO:4), được so sánh với trình tự đã được dịch mã (SEQ ID NO:6), bằng cách sử dụng một mã chữ cái đối với các axit amin.

Fig.11 thể hiện sự so sánh trình tự của hầu hết các enzym đồng nhất MMT của lúa mạch chủng cv. Haruna Nijo (SEQ ID NO:2) và chủng cv. Prestige (SEQ ID NO:6). Hai khác biệt về gốc của axit amin riêng biệt được làm nổi bật dưới dạng ô vuông màu đen với chữ cái màu trắng.

Fig.12 thể hiện cách thể đột biến 8063 của lúa mạch kích hoạt các vị trí tách nitron kín trong gen đối với MMT. FIG.12A thể hiện các mũi tên nằm ngang nhỏ bên dưới của hình vẽ này minh họa cấu trúc hệ gen của gen đối với MMT biểu thị vị trí ghép đôi gần của bộ đoạn mồi 15, xem Bảng 4. Fig.12B thể

hiện các dải ADN sau khi phân tích điện di trên thạch tinh thể gel các sản phẩm của phản ứng mạch polymeraza sao chép ngược (reverse transcription polymerase chain reaction - RT-PCR) bằng cách sử dụng mô hình ARN của cv. Prestige kiểu dại hoặc thể đột biến 8063. Fig. 12C thể hiện cấu trúc intron-exon của các sản phẩm PCR trong panen B, bằng cách sử dụng các yếu tố đồ thị giống như trên Fig.12A. Exon 5 của sản phẩm 4 ngắn hơn so với exon của kiểu dại. Các đầu mũi tên thẳng đứng chỉ các vị trí gần của các codon kết thúc dịch mã sớm. Do sự chọn lọc các đoạn mỗi, nên các sản phẩm này không chứa các exon 1 và 2. Tuy nhiên, dự báo rằng ARN thông tin cũng chứa các exon 1 và 2. Fig.12D thể hiện một cách chi tiết các sản phẩm phiên mã thu được từ vị trí tách intron của gen đột biến (Mut.) và kiểu dại (WT) 5' trong intron 5, với điểm đột biến được đáp ứng bởi bazơ được gạch dưới. Các mũi tên được nối bởi các đường nét liền được gắn nhãn 3 và 4, lần lượt đánh dấu các vị trí của chất cho và chất nhận dùng trong khi tách intron sản phẩm 3 và sản phẩm 4 (xem panen C). Đường nét đứt, được đánh dấu 2*, chỉ ra việc tách intron sản phẩm phiên mã của kiểu dại (sản phẩm 1 trên panen C) và của sản phẩm 2 chưa được tách intron (xem Panen C). Các bazơ của exon và intron 5 lần lượt là các chữ cái thường và chữ cái viết hoa, nt: nucleotit. FIG.12E thể hiện đại cương về thành phần của các vị trí tách intron 5' và 3' trong cây một lá mầm (Sinibaldi và Mettler, 1992), được so sánh với trình tự của intron 5 trong gen đối với MMT của thể đột biến 8063.

Fig.13 thể hiện các plasmit biểu hiện để biểu hiện khác kiểu MMT lệch của thể đột biến 8063, và sự so sánh các protein được mã hóa. FIG.13A minh họa đoạn NcoI-BamHI của pET19b-MMT - kể cả các điểm cắt được chọn - mã hóa MMT kiểu dại dung hợp vào trình tự quy định His-tag (*; trình tự MGHHHHHHHHHH; SEQ ID NO:69) trong khung với vị trí enterokinaza (**; trình tự SSGHIDDDDKH; SEQ ID NO:70). Các cấu trúc của đoạn khuyết được minh họa trên các hình vẽ FIG.13B, FIG.13C, và FIG.13D). Fig.13E thể hiện sự so sánh các trình tự MMT đã được mã hóa (SEQ ID NO: 6, 11, 13, 15 đối với các cấu trúc lần lượt được thể hiện trên các hình vẽ Fig.13A Fig.13B, Fig.13C

và Fig.13D). Peptit tổng hợp tương ứng với đoạn của trình tự được đánh dấu bằng dấu hoa thị (*) được sử dụng để tạo ra các kháng thể đa dòng chống lại MMT của lúa mạch. Các số của các gốc mở rộng trình tự 333 và 1084 không được thể hiện đối với enzym kiểu đại (SEQ ID NO:6).

Fig.14 lần lượt thể hiện kết quả biểu hiện khác kiểu trong tế bào *E. coli* của các dạng MMT kiểu đại và của thể đột biến từ cv. Prestige và thể đột biến 8063, với các thử nghiệm chi tiết được mô tả trong ví dụ 12. Sản phẩm chiết của các tế bào *E. coli* được chuyển hóa bằng vector pET19b, cũng như phân phân ước của SMM tinh khiết, được dùng làm các mẫu thử nghiệm đối chứng. Các vùng gen giữa các lần 4 và 5 của cả hai phép thẩm tách, bao gồm dữ liệu không liên quan đến sáng chế này, được xóa bằng phương tiện điện tử sau khi quét. Fig.14A thể hiện các profin HPLC của SMM tinh khiết cũng như sản phẩm chiết từ các tế bào *E. coli* được chuyển hóa bằng các plasmit được chỉ ra. Nhằm mục đích so sánh, các profin này cũng là phần tích hợp của FIG.18. FIG.14B thể hiện các kết quả của phép thẩm tách Western protein được tách kích thước ra khỏi các sản phẩm chiết tế bào hòa tan của *E. coli* được chuyển hóa bằng các plasmit pET-MMT (lần 2), pET19b-Line8063-Prod3 (lần 3), pET19b-Line 8063-Prod4 (lần 4), và pET19b (lần 5). Các protein tham chiếu, với khối lượng được biểu thị bằng kDa, được tách ra trên lần 1. Fig.14C thể hiện các kết quả của phép thẩm tách Western protein được tách kích thước ra khỏi các sản phẩm chiết của các thể vùi của các tế bào *E. coli* được chuyển hóa bằng các plasmit như được nêu trong phần chú thích cho phần B của hình vẽ nêu trên. Các kháng thể ban đầu, đa dòng được sử dụng trong phép thẩm tách Western được nhân giống chống lại peptit dài có gốc 15 tổng hợp của MMT lúa mạch, tương ứng với đoạn của axit amin được đánh dấu bằng dấu hoa thị trên Fig.13.

Fig.15 thể hiện hình vẽ về các phương pháp nhận dạng các hạt khác biệt bởi G3076→ đột biến A trong gen đối với MMT của thể đột biến 8063. Fig.15A thể hiện rằng, trong các phản ứng giả định 1 và 2, bộ đoạn mỗi 20, xem Bảng 7, lần lượt thu được đoạn 271-bp PCR và đoạn không, như được thể hiện dưới

dạng sơ đồ bởi dải được nhuộm ethidi bromua sau khi điện di trên thạch tinh thể gel các phản ứng tương ứng (C). Trong các phản ứng giả định 3 và 4 (B), chỉ các phản ứng 4 (B) tạo ra đoạn PCR. Các mũi tên nằm ngang biểu thị trình tự hoàn chỉnh phù hợp với khuôn mẫu AND, trong khi các mũi tên có điểm uốn đột ngột biểu thị trình tự không phù hợp. (D) Phép thẩm tách Western với kháng thể kháng-MMT nhận dạng enzym MMT 120 kDa ở hạt cv. Prestige kiểu đại (lần 2), nhưng không có mặt trong thể đột biến 8063. Các protein chuẩn được tách ra trong lần 1, với khối lượng tương ứng được biểu thị bằng kDa.

Fig.16 thể hiện cách thể đột biến 14018 của lúa mạch kích hoạt các vị trí tách nitron kín trong gen đối với MMT. Fig.16A thể hiện các mũi tên nằm ngang nhỏ - bên dưới hình vẽ cấu trúc hệ gen của gen đối với MMT – biểu thị vị trí ghép đôi gần của bộ đoạn mỗi 16, xem Bảng 4. Fig.16B thể hiện sự nhận biết các dải ADN sau khi điện di trên thạch tinh thể gel các sản phẩm RT-PCR bằng cách sử dụng khuôn mẫu ARN từ kiểu đại (cv. Sebastian) hoặc thể đột biến 14018. Fig.16C minh họa cấu trúc intron-exon của các sản phẩm PCR trên panen B, bằng cách sử dụng cùng các yếu tố đồ thị như trên Fig.15A. Exon 2 của sản phẩm 8 bị cắt đứt so với cấu trúc của kiểu đại. Các đầu mũi tên thẳng đứng chỉ các vị trí gần của các codon kết thúc dịch mã sớm. Do sự chọn lọc các đoạn mỗi, nên các sản phẩm này không chứa exon 1. Tuy nhiên, có thể dự đoán rằng ARN thông tin cũng chứa exon 1. Fig.16D minh họa một cách chi tiết các sản phẩm phiên mã thu được từ vị trí tách intron của gen đột biến (Mut.) và của kiểu đại (WT) 5' trong intron 2, với điểm đột biến được biểu thị bởi bazơ được gạch dưới. Các mũi tên được nối bởi các đường nét liền được gắn nhãn 7 và 8, đánh dấu các vị trí của chất cho và chất nhận dùng trong khi lần lượt tách intron ra khỏi sản phẩm 7 và sản phẩm 8 (xem panen C). Đường nét đứt được đánh dấu 6*, chỉ ra việc tách intron ra khỏi sản phẩm phiên mã kiểu đại (sản phẩm 5 trên panen C) và sản phẩm 6 chưa được tách intron (xem Panen C). Các bazơ của exon và intron 2 lần lượt là các chữ cái thường và chữ cái hoa, nt: nucleotit. Fig.16E thể hiện đại cương về thành phần của các vị trí tách intron 5' và 3' trong cây một lá mầm (Sinibaldi và Mettler, nêu trên), so với trình tự intron 2 trong

gen đối với MMT của thể đột biến 14018.

Fig. 17 thể hiện các plasmit biểu hiện để biểu hiện khác kiểu MMT lệch của thể đột biến 14018, và sự so sánh các protein đã được mã hóa. FIG.17A minh họa đoạn NcoI-BamHI của pET19b-MMT - kể cả các vị trí phân cắt được chọn - mã hóa MMT kiểu đại dung hợp vào trình tự quy định His-tag (*; trình tự MGHHHHHHHHHH; SEQ ID NO:69) trong khung với vị trí enterokinaza {**; trình tự SSGHIDDDDKH; SEQ ID NO:70). Các cấu trúc đoạn khuyết được thể hiện trên Fig.17B, Fig.17C, và Fig.17D. Fig.17E thể hiện sự so sánh các trình tự MMT đã được mã hóa (SEQ ID NOs: 18, 22, 24, 26 đối với các cấu trúc lần lượt được thể hiện trên các hình vẽ Fig.17A, Fig.17B, Fig.17C và Fig.17D). Các số gốc mở rộng trình tự từ 213 đến 1084 không được thể hiện đối với enzym kiểu đại (SEQ ID NO:18).

Fig. 18 lần lượt thể hiện kết quả thử nghiệm biểu hiện khác kiểu dựa vào HPLC trong tế bào E. coli của các dạng MMT kiểu đại và của thể đột biến từ cv. Prestige và thể đột biến 14018, với các chi tiết thử nghiệm được mô tả trong Ví dụ 15. SMM tinh khiết và sản phẩm chiết của các tế bào E. coli được chuyển hóa bằng vector pET19b được dùng làm các mẫu thử nghiệm đối chứng. Nhằm mục đích so sánh, các biểu đồ sắc ký được đánh dấu bằng dấu hoa thị cũng là các phân tích hợp của Fig.14A.

Fig.19 thể hiện hình vẽ phương pháp di truyền để nhận biết các hạt khác biệt bởi sự đột biến G1462→A trong gen đối với MMT của thể đột biến 14018. Fig.19A thể hiện trong các phản ứng giả định 1 và 2, bộ đoạn mỗi 29, xem Bảng 9, lần lượt thu được đoạn 121 bp PCR và đoạn không, như được thể hiện dưới dạng sơ đồ bởi dải được nhuộm ethidii bromua sau khi điện di trên thạch tinh thể gel các phản ứng tương ứng (C). Trong các phản ứng giả định 3 và 4 (B), chỉ các phản ứng 4 (B) tạo ra đoạn PCR (123 bp). Các mũi tên nằm ngang chỉ ra trình tự hoàn chỉnh phù hợp với khuôn mẫu ADN, trong khi các mũi tên có điểm uốn đột ngột chỉ ra trình tự không phù hợp. Fig.19D thể hiện phép thẩm tách Western với kháng thể kháng MMT nhận biết enzym MMT 120 kDa trong hạt của chủng

cv. Sebastian hoang (lần 2), nhưng không có mặt trong thể đột biến 14018. Các protein chuẩn được tách ra trong lần 1, với khối lượng tương ứng được biểu thị bằng kDa.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các định nghĩa

Trong bản mô tả, các hình vẽ, và các bảng dưới đây có sử dụng số chỉ dẫn. Để tạo ra các đặc tính kỹ thuật và các điểm yêu cầu bảo hộ, kể cả phạm vi sử dụng các thuật ngữ này, các định nghĩa sau được đưa ra:

Như được sử dụng ở đây, danh từ số ít hoặc số nhiều được sử dụng tùy thuộc vào ngữ cảnh.

Thuật ngữ "tính trạng nông học" được dùng để chỉ tính trạng di truyền hoặc kiểu hình của cây trồng đóng góp vào giá trị tính năng hoặc kinh tế của cây trồng này. Các tính trạng này bao gồm sức đề kháng bệnh tật, kháng côn trùng, kháng virus, kháng giun tròn, chịu được hạn hán, dung nạp được độ mặn cao, năng suất, cao cây, số ngày cho đến khi chín, phân loại hạt (tức là phân đoạn cỡ hạt), hàm lượng nitơ trong hạt và dấu hiệu tương tự.

Thuật ngữ "lúa mạch" khi đề cập đến quá trình sản xuất bia, cụ thể là khi được sử dụng để mô tả quá trình tạo mạch nha, có nghĩa là các hạt lúa mạch. Trong tất cả các trường hợp khác, trừ khi có quy định khác, "lúa mạch" có nghĩa là cây lúa mạch (*Hordeum vulgare*, L), bao gồm loại bất kỳ, trong khi một bộ phận của cây lúa mạch có thể là bộ phận bất kỳ của cây lúa mạch, ví dụ, mô hoặc tế bào bất kỳ.

Cây "ngũ cốc" như được xác định ở đây là số cây họ Graminae, được trồng chủ yếu để lấy hạt chứa tinh bột. Các cây ngũ cốc bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, cây lúa mạch (*Hordeum*), cây lúa mì (*Triticum*), cây lúa (*Oryza*), cây ngô (*Zea*), cây lúa mạch đen (*Secale*), cây yến mạch (*Avena*), cây lúa miến (*Sorghum*), và cây Triticale, cây lai lúa mạch- mỳ.

"DMSP" như được sử dụng ở đây là chữ viết tắt đối với tiền chất DMS

hoặc chất tiềm năng DMS, tức là các phân tử này có thể được chuyển hoá thành DMS trong quá trình sản xuất đồ uống. SMM là phần chủ yếu của, nếu không là tất cả, DMSP. Lượng DMSP được xác định ở đây là lượng DMS có thể được tạo ra từ DMSP trong cây nguyên liệu quy định, hoặc sản phẩm của nó, bằng cách đun sôi trong môi trường kiềm trong 1 giờ. Như được xác định ở đây, 1 ppb DMSP có thể được chuyển hóa thành 1 ppb DMS.

Thuật ngữ "mã hóa" hoặc "được mã hóa" trong trường hợp axit nucleic có nghĩa bao gồm thông tin để dịch mã thành protein quy định. Axit nucleic mà mã hóa protein có thể chứa các trình tự không được dịch mã (ví dụ, intron) trong các vùng được dịch mã của axit nucleic, hoặc có thể không có mặt các trình tự xen kẽ không được dịch này (ví dụ, trong ADN bổ trợ). Thông tin để nhờ đó protein được mã hóa được quy định bằng cách sử dụng codon.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "biểu hiện" trong trường hợp axit nucleic được hiểu là phiên mã và tích lũy ARN thông tin có nghĩa hoặc ARN đối nghĩa thu được từ một đoạn axit nucleic. Thuật ngữ "biểu hiện" được sử dụng trong trường hợp protein dùng để chỉ việc dịch mã ARN thông tin thành polypeptit.

Thuật ngữ "gen" có nghĩa là đoạn ADN tham gia vào quy trình tạo ra mạch polypeptit; nó bao gồm các vùng nằm trước và nằm sau vùng mã hóa (gen khởi đầu và gen kết thúc). Hơn thế nữa, các gen của thực vật là không liên tục với các protein được chúng mã hóa, chứa các exon bị gián đoạn bởi intron. Sau khi phiên mã thành ARN, các intron này bị loại bỏ bằng cách tách intron để tạo ra ARN thông tin trưởng thành. Thuật ngữ "các vị trí tách intron" giữa các exon thường được xác định bởi các trình tự liên ứng hoạt động như là các tín hiệu tách intron đối với quá trình tách intron, bao gồm đoạn khuyết của intron từ sản phẩm phiên mã ARN chính và tách intron hoặc dung hợp các đầu của ARN còn lại vào mỗi phía của intron được kích thích.

Thuật ngữ "sự nảy mầm" như được sử dụng ở đây có nghĩa là bắt đầu hoặc khôi phục sự sinh trưởng nhờ hạt lúa mạch trong các chế phẩm khác nhau,

như đất bình thường trong tự nhiên. Sự nảy mầm có thể cũng xảy ra trong đất đặt trong hộp trong các buồng trồng trọt loại cây này, hoặc, ví dụ, xảy ra trên giấy lọc ướt đặt trong các đĩa Petri của phòng thí nghiệm chuẩn hoặc trong khi tạo mạch nha (trong các bể ngâm hoặc hộp nảy mầm của nhà máy tạo mạch nha chẳng hạn). Nói chung, sự nảy mầm được hiểu bao gồm sự hydrat hóa hạt, làm trương nở hạt và tác động đến sự sinh trưởng của phôi. Các yếu tố môi trường tác động đến sự nảy mầm bao gồm độ ẩm, nhiệt độ và lượng oxy. Sự phát triển của rễ và mầm quan sát được.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "được phân lập" nghĩa là chất liệu được loại ra khỏi môi trường gốc. Ví dụ, polynucleotit có trong tự nhiên hoặc polypeptit có trong cơ thể sống không được phân lập, nhưng polynucleotit hoặc polypeptit tương tự tách ra khỏi một số hoặc tất cả các chất cùng tồn tại trong hệ tự nhiên đều được phân lập. Các polynucleotit có thể là bộ phận của vật truyền và/hoặc các polynucleotit hoặc poly-peptit này có thể là bộ phận của một chế phẩm, và cũng được phân lập vì vật truyền hoặc chế phẩm như vậy không là bộ phận của môi trường tự nhiên.

Thuật ngữ "hạt" được xác định để bao gồm hạt ngũ cốc, cũng có nghĩa là mầm bên trong, mảy ngoài và vảy. Trong hầu hết các loại lúa mạch mảy ngoài và vảy bám dính vào hạt và là một bộ phận của hạt sau khi tuốt. Tuy nhiên, các loại lúa mạch trần cũng nằm trong thuật ngữ này. Trong các trường hợp như vậy, hạt không có mảy ngoài và vảy và hạt không tuốt có các bộ phận này như trong hạt lúa mì. Thuật ngữ "hạt" và "hạt nhỏ" được sử dụng ở đây có thể thay đổi cho nhau.

Thuật ngữ "sự phát triển của hạt" được dùng để chỉ giai đoạn trong chu kỳ sống của cây lúa mạch bắt đầu từ sự thụ phấn trong đó có sự dự trữ chuyển hóa, ví dụ, đường, oligosacarit, tinh bột, nhựa phenol, axit amin, và protein được bồi tích, với việc có hoặc không có sự đưa không bào vào các mô khác nhau trong hạt, ví dụ, nội bào tử, vỏ, lớp aleron, và vảy sừng, dẫn đến sự phát triển của hạt, hạt đầy lên, và kết thúc bằng hạt trưởng thành và khô.

Thuật ngữ "mất hoàn toàn MMT chức năng" và "mất hoàn toàn hoạt tính MMT" được dùng để chỉ sự thiếu hoạt tính của enzym MMT, tức là cây lúa mạch không có hoạt tính MMT phát hiện được khi sử dụng phép phân tích được mô tả trong ví dụ 2 dưới đây. Theo cách khác, hoạt tính MMT của cây lúa mạch được xác định bằng cách phân lập ADN hỗ trợ MMT của cây lúa mạch nêu trên và xác định xem liệu protein mã hóa bởi ADN hỗ trợ nêu trên có khả năng xúc tác sự chuyển nhóm metyl từ SAM thành Met được hay không, để nhờ đó tạo ra SMM.

Thuật ngữ "đồ uống sản xuất từ mạch nha" được dùng để chỉ đồ uống sản xuất được bằng cách sử dụng mạch nha, tùy ý trong hỗn hợp với các hợp phần khác, như hỗn hợp gồm mạch nha và lúa mạch chưa được tạo mạch nha, tốt hơn nếu đồ uống này sản xuất được nhờ phương pháp bao gồm bước ủ mạch nha với nước nóng. Ví dụ, đồ uống sản xuất từ mạch nha có thể là bia hoặc đồ uống từ mạch nha.

Thuật ngữ "đồ uống sản xuất từ mạch nha lên men" được dùng để chỉ đồ uống sản xuất từ mạch nha được lên men, ủ bằng men chẳng hạn.

Thuật ngữ "hoạt tính MMT" được dùng để chỉ hoạt tính enzym của enzym methionin S-metyltransferaza của cây lúa mạch. Trong trường hợp của sáng chế, "hoạt tính MMT" là sự metyl hóa được xúc tác bằng MMT trong nguyên tử lưu huỳnh của Met để thu được SMM. Mặc dù enzym MMT có thể có khả năng xúc tác các phản ứng khác, nhưng nhằm mục đích xác định hoạt tính của MMT theo sáng chế, thì chỉ hoạt tính tạo SMM cần được cân nhắc đến. Fig.1B phác họa các phản ứng sinh hóa trong đó Met được chuyển hóa thành SMM bằng cách metyl hóa.

Thuật ngữ "tạo mạch nha" là dạng đặc biệt của sự nảy mầm của hạt lúa mạch xảy ra trong điều kiện môi trường được điều khiển, nhưng không chỉ giới hạn ở, các bể ngâm hoặc hộp nảy mầm của nhà máy tạo mạch nha. Theo quy trình của sáng chế, việc tạo mạch nha bắt đầu xảy ra trong khi và/hoặc sau khi ngâm hạt lúa mạch. Quá trình tạo mạch nha có thể được dừng lại bằng cách sấy

khô các hạt lúa mạch, ví dụ, quá trình sấy khô trong lò. Trong trường hợp mạch nha không được sấy khô trong lò, thì có nghĩa là "mạch nha xanh". Chế phẩm mạch nha sản xuất được từ lúa mạch không chứa MMT được hiểu bao gồm mạch nha không chứa MMT, như mạch nha tinh khiết không chứa MMT hoặc hỗn hợp mạch nha bất kỳ chứa mạch nha không chứa MMT. Mạch nha có thể được chế biến, ví dụ, bằng cách nghiền, trong trường hợp đó có thể gọi là "mạch nha bột" hoặc "bột mạch nha".

"Ngâm ủ" là việc ủ mạch nha nghiền trong nước. Tốt hơn, nếu việc ngâm ủ được thực hiện ở nhiệt độ quy định và dung tích nước quy định để cho phép khử polyme của chất nền bằng enzym mong muốn. Nhiệt độ và dung tích nước là các yếu tố quan trọng vì chúng ảnh hưởng đến mức độ làm giảm hoạt tính của enzym thu được từ mạch nha, và nhờ đó có thể xảy ra quá trình thủy phân tinh bột một cách đặc biệt. Tác động của proteaza có thể cũng là quan trọng. Việc ngâm ủ có thể xảy ra với sự có mặt của chất bổ trợ, chất này được hiểu bao gồm nguồn hydrat cacbon bất kỳ khác với mạch nha, như, nhưng không chỉ giới hạn ở, lúa mạch (kể cả lúa mạch không chứa MMT), hoặc ngô, hoặc lúa hoặc dưới dạng nguyên hạt hoặc các sản phẩm đã qua xử lý giống như hạt nghiền hoặc tinh bột, về nguyên tắc tất cả chúng được sử dụng làm nguồn sản phẩm chiết bổ sung (si rô thường được định liều trong khi đun sôi chế phẩm ủ men). Các yêu cầu đối với chất bổ trợ trong nhà ủ bia phụ thuộc vào trạng thái và loại chất bổ trợ được sử dụng và cụ thể là gelatin hoá hoặc nhiệt độ hóa lỏng tinh bột. Nếu nhiệt độ gelatin hoá cao hơn nhiệt độ sacarit hóa mạch nha thông thường, thì sau đó tinh bột được gelatin hoá và được hóa lỏng trước khi bổ sung vào chế phẩm ngâm ủ.

Nếu sự đột biến gen nhất định được xác định là đặc tính gen đồng nhất, ví dụ, ở đời $\geq M3$, thì cây lúa mạch tương ứng ở đây có thể thay đổi cho nhau, được gọi là "thể đột biến", hoặc là "dòng đột biến", hoặc là "dòng".

"Đột biến" bao gồm đột biến mất đoạn, thêm đoạn, thay thế, đảo đoạn và đột biến điểm trong các vùng mã hóa và không mã hóa của gen, trong đó tốt hơn nếu vùng không mã hóa là vùng khởi đầu hoặc là các intron. Đột biến mất đoạn

có thể là toàn bộ gen hoặc chỉ là một phần của gen. Các đột biến điểm liên quan đến những thay đổi của một bazơ hoặc một cặp bazơ và có thể tạo ra các codon kết thúc, đột biến dịch khung hoặc thay thế axit amin. Đột biến sinh dưỡng là đột biến xảy ra chỉ trong các tế bào hoặc mô nhất định của cây và không được di truyền sang đời tiếp sau. Đột biến dòng mầm có thể được phát hiện trong tế bào thực vật bất kỳ và không được di truyền. Theo Fig.7 ở đây - thể hiện một cách khái quát về cách các hạt lúa mạch đột biến có thể được nhân giống trong chương trình nhân giống - các hạt đời M3, và các hạt của chúng được nhân giống một cách trực tiếp, hoặc đời tiếp sau bất kỳ, kể cả các cây của chúng, có thể được gọi là "đột biến thô". Hơn nữa, vẫn theo Fig.7 ở đây, thuật ngữ "dòng nhân giống" được dùng để chỉ các hạt đời M4, và đời tiếp sau bất kỳ, kể cả các cây của chúng, có thể là kết quả của việc lai chéo sang cây trồng, hoặc có thể là kết quả của việc lai chéo sang dòng nhân giống khác với tính trạng riêng đặc biệt.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "không chứa MMT" chỉ sự mất hoàn toàn enzym methionin S-metyl transferaza chức năng. Vì vậy, "cây lúa mạch không chứa MMT" là cây lúa mạch chứa đột biến gen mã hóa MMT làm mất hoàn toàn MMT chức năng. Tương tự, "các hạt không chứa MMT" là các hạt chứa đột biến gen mã hóa MMT, làm mất hoàn toàn MMT chức năng, và v.v..

Thuật ngữ "các bộ phận của cây lúa mạch", theo nghĩa của cụm từ "cây lúa mạch hoặc một bộ phận của nó", bao gồm các tế bào của cây lúa mạch, các thể nguyên sinh của cây lúa mạch, mô tế bào cấy của cây để từ đó cây lúa mạch có thể được tái sinh, thể chai của cây lúa mạch, và các tế bào nguyên vẹn của cây lúa mạch trong các cây hoặc phần lớn các cây lúa mạch, như phôi, phần hoa, noãn, hoa, hạt, lá, rễ, đầu rễ, bao phấn, hoặc bộ phận bất kỳ của cây.

"PCR" hoặc "phản ứng tạo mạch polymeraza" được các chuyên gia trong lĩnh vực này biết rõ dưới dạng kỹ thuật dùng để mở rộng các đoạn ADN đặc hiệu (Patent Mỹ số 4683195 và 4800159 cấp cho Mullis, K.B. và các đồng tác giả). Sự phiên mã ngược (RT)-PCR cũng được các chuyên gia trong lĩnh vực

này biết rõ. Việc thực hiện RT-PCR trên mẫu sinh học trợ giúp cho việc phát hiện ARN thông tin được biểu hiện đối với gen cụ thể. Trong mối liên hệ với MMT, nói chung RT-PCR bao gồm việc thu mẫu bị nghi là chứa ARN thông tin đối với MMT, thực hiện RT-PCR trên mẫu với transcriptaza ngược, polymeraza, và cặp đoạn mồi đặc thù, để mở rộng ARN, nếu có mặt, và phát hiện sản phẩm mở rộng dưới dạng chỉ báo về sự có mặt của MMT mã hóa ARN trong mẫu này. Các đoạn mồi hoạt động theo các cặp - "đoạn mồi xuôi" (hoặc "đoạn mồi ngược" hoặc "đoạn mồi trực tiếp"), và "đoạn mồi ngược" (hoặc "đoạn mồi dài dưới"). Các trình tự của đoạn mồi ở đây được khác kiểu theo hướng từ 5' đến 3'.

Thuật ngữ "sản phẩm thực vật" có nghĩa là sản phẩm thu được từ việc xử lý cây hoặc một bộ phận của cây. Ví dụ, sản phẩm thực vật này có thể là mạch nha, chế phẩm ủ men, đồ uống được lên men hoặc không được lên men, đồ ăn, hoặc thực phẩm.

"Hội đồng chuyên gia đánh giá hương vị bia" theo nghĩa của sáng chế này là hội đồng chuyên gia được đào tạo toàn diện về việc nếm thử vị và mô tả hương vị bia, đặc biệt nhấn mạnh về este, rượu cao, axit béo, các hợp phần lưu huỳnh và độ đặc. Mặc dù hiện có nhiều dụng cụ phân tích để đánh giá các hợp phần vị, nhưng các hợp phần hoạt hóa vị tương đối quan trọng lại khó đánh giá bằng cách phân tích. Tuy nhiên, các tính chất phức hợp này có thể được đánh giá bởi các chuyên gia về mùi vị. Việc đào tạo liên tục họ bao gồm việc nếm thử vị và đánh giá các mẫu bia chuẩn đã được gán với nồng độ quy định của các hợp phần bia - ví dụ, isoamylacetat, etyl acetat, etyl hexanoat và rượu isoamyllic.

Thuật ngữ "vị trí tách intron" có nghĩa là đường ranh giới giữa các exon và intron của gen. Vì vậy, vị trí tách intron có thể là biên đi từ exon đến intron - cũng được gọi là "vị trí của chất cho" - hoặc biên tách intron ra khỏi exon cũng có nghĩa là "vị trí của chất nhận". Vị trí tách intron trong cây thường là các trình tự liên ứng. Đầu 5' của intron nói chung là dinucleotit GT bảo tồn (GU trong ARN thông tin) và đầu 3' intron thường là dinucleotit AG bảo tồn. Vị trí tách intron 5' intron này là đầu 5' của intron, vị trí tách intron 3' là đầu 3' của intron.

Theo phạm vi của sáng chế, tốt hơn nếu vị trí tách intron của intron là:

(i) Vị trí tách intron 5' là dinucleotit lớn nhất 5' của intron, nói chung dinucleotit này là GT; hoặc

(ii) Vị trí tách intron 3' là dinucleotit lớn nhất 3' của intron, nói chung dinucleotit này là AG.

"Vị trí tách intron kín" không được nhận dạng trong các điều kiện thông thường và do vậy không tạo được sự tách intron thông thường. Tuy nhiên, trong các sản phẩm phiên mã mang đột biến điểm trong các đoạn tự nhiên, các vị trí này có thể được kích hoạt đối với các trường hợp tách intron.

Thuật ngữ "môi trường cấy mô" biểu thị chế phẩm chứa các tế bào phân lập được cùng loại hoặc khác loại hoặc là tập hợp các tế bào như vậy được đưa vào các bộ phận của cây, ví dụ, tế bào nguyên sinh, thể chai, phôi, phần hoa, bao phấn, và bộ phận tương tự.

"Lúa mạch hoang", *Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*, được xem là tổ tiên của các dạng lúa mạch được trồng ngày nay. Sự biến đổi của lúa mạch từ loài hoang đến trạng thái được trồng cấy được hiểu là trùng khớp với sự thuần dưỡng cây này thành "lúa mạch trồng tự nhiên". Các cây này có sự liên quan mật thiết về gen với loài trồng cấy hiện đại so với lúa mạch hoang.

Thuật ngữ lúa mạch kiểu "hoang" (kiểu hoang dại hay kiểu dại) được dùng để chỉ cây lúa mạch được sinh trưởng trong điều kiện thông thường; tốt hơn nếu thuật ngữ này được dùng để chỉ cây lúa mạch để từ đó thu được cây lúa mạch theo sáng chế, tức là cây bố-mẹ. Nói chung, các hạt lúa mạch kiểu hoang được mua từ các công ty giống như "cây trồng" (thường được viết tắt là "cvs.") chẳng hạn, tức là các hạt này giống nhau về gen được các tổ chức nhân giống quốc gia liệt kê. Thuật ngữ "cây trồng" và "giống cây trồng" được sử dụng ở đây có thể thay đổi cho nhau.

Thuật ngữ "chế phẩm ủ men" có nghĩa là chế phẩm chiết mạch nha lỏng, ví dụ, chế phẩm mạch nha bột hoặc mạch nha xanh hoặc mạch nha xanh nghiền.

Ngoài loại mạch nha này, chế phẩm chiết có thể được sản xuất từ mạch nha và các hợp phần bổ sung, như chất chứa tinh bột bổ sung một phần được chuyển hóa thành đường có thể ủ men. Nói chung, chế phẩm ủ men thu được bằng cách ngâm ủ, tùy ý tiếp theo "sục khí", tức là quy trình chiết đường cặn và các hợp chất khác từ hạt đã sử dụng sau khi ngâm ủ với nước nóng. Việc sục khí thường được thực hiện trong thiết bị tách, bộ lọc ngâm ủ, hoặc thiết bị khác cho phép tách chất lỏng chiết từ hạt đã sử dụng. Chế phẩm ủ men thu được sau khi ngâm ủ nói chung được gọi là "chế phẩm ủ men thứ nhất", trong khi chế phẩm ủ men thu được sau khi sục khí nói chung được gọi là "chế phẩm ủ men thứ hai". Nếu không có quy định khác, thuật ngữ chế phẩm ủ men có thể là chế phẩm ủ men thứ nhất, chế phẩm ủ men thứ hai hoặc hỗn hợp của cả hai chế phẩm này. Nói chung, trong sản xuất bia chế phẩm ủ men được đun sôi cùng với cây hoa bia. Chế phẩm ủ men được tạo ra mà không đun sôi cùng với cây hoa bia có thể cũng được gọi là "chế phẩm ủ men ngọt", trong khi chế phẩm ủ men được đun sôi có hoặc không có cây hoa bia có thể được gọi là "chế phẩm ủ men sôi".

Cây lúa mạch

Cây lúa mạch là một họ thực vật. Lúa mạch hoang, *Hordeum vulgare* ssp. spontaneum, được xem là tổ tiên của các dạng lúa mạch được trồng ngày nay. Sự biến đổi của lúa mạch từ loài hoang đến trạng thái được trồng cấy được hiểu là trùng khớp với sự thay đổi căn bản của các tần suất alen ở rất nhiều locus. Các alen hiếm và các trường hợp đột biến mới được chọn dương tính bởi những nông dân nhanh chóng thiết lập các dấu hiệu mới trong quần thể cây được trồng cấy, có nghĩa là "lúa mạch trồng tự nhiên". Các cây này có sự liên quan mật thiết về gen với loài trồng cấy hiện đại so với lúa mạch hoang. Cho đến cuối thế kỷ 19, cây lúa mạch trồng tự nhiên tồn tại dưới dạng hỗn hợp rất khác kiểu của các dòng nội phối và lai phân ly, kể cả một số cây thu được từ cây lai ngẫu nhiên trong các đời trước. Hầu hết các cây lúa mạch trồng tự nhiên được di chuyển tới các vùng canh tác tiên tiến nhờ cây trồng dòng thuần khiết. Các mức gen đa dạng trung gian hoặc cao đặc trưng cho các cây lúa mạch trồng tự nhiên còn lại.

Ban đầu, cây "lúa mạch hiện đại" biểu thị sự chọn lọc từ các cây lúa mạch trồng tự nhiên. Sau đó, cây này thu được từ các chu trình nối tiếp nhau giữa các dòng thuần đã ổn định, như các dòng có nguồn gốc địa lý khác nhau. Cuối cùng, kết quả là sự thu hẹp dễ thấy bazơ của gen, trong nhiều, có lẽ là tất cả các vùng canh tác tiên tiến. So với các cây lúa mạch trồng tự nhiên, cây lúa mạch hiện đại có một số tính chất được cải thiện (Nevo, 1992; von Bothmer, 1992), ví dụ, nhưng không chỉ giới hạn ở:

- (i) hạt có vỏ và hạt trần;
- (ii) trạng thái ngủ của hạt;
- (iii) kháng bệnh;
- (iv) dung nạp môi trường (ví dụ, hạn hán hoặc độ pH của đất);
- (v) tỷ lệ giữa lysin và các axit amin khác;
- (vi) hàm lượng Protein;
- (vii) hàm lượng nitơ;
- (viii) thành phần hydrat cacbon; và
- (ix) thành phần horđein.

Theo sáng chế, thuật ngữ "lúa mạch" bao gồm cây lúa mạch bất kỳ. Vì vậy, sáng chế liên quan đến cây lúa mạch bất kỳ mang đột biến gen mã hóa MMT, làm mất hoàn toàn MMT chức năng.

Tuy nhiên, cây lúa mạch được ưu tiên để sử dụng theo sáng chế là cây lúa mạch hiện đại hoặc thuộc dòng thuần. Ví dụ, cây lúa mạch cần được sử dụng theo sáng chế có thể được chọn từ nhóm bao gồm Sebastian, Celeste, Tangent, Lux, Prestige, Saloon, Neruda, Harrington, Klages, Manley, Schooner, Stirling, Clipper, Franklin, Alexis, Blenheim, Ariel, Lenka, Maresi, Steffi, Gimpel, Cheri, Krona, Camargue, Chariot, Derkado, Prisma, Union, Beka, Kym, Asahi 5, KOU A, Swan Hals, Kanto Nakate Gold, Hakata No. 2, Kirin - choku No. 1, Kanto late Variety Gold, Fuji Nijo, New Golden, Satukio Nijo, Seijo No. 17, Akagi Nijo, Azuma Golden, Amagi Nijpo, Nishino Gold, Misato golden, Haruna Nijo, Scarlett, Quench, NFC Tipple và Jersey, tốt hơn nếu được chọn từ

nhóm bao gồm Haruna Nijo, Sebastian, Tangent, Lux, Prestige, Saloon, Neruda, Power, Quench và NFC Tipple.

Do đó, theo một phương án của sáng chế, cây nêu trên là cây lúa mạch hiện đại mang đột biến gen mã hóa MMT, làm mất hoàn toàn MMT chức năng, tốt hơn là cây này được chọn từ nhóm bao gồm cây lúa mạch được mô tả trên đây. Theo phương án này, tốt hơn nếu cây lúa mạch này không phải là lúa mạch trồng tự nhiên.

Cây lúa mạch này có thể ở dạng thích hợp bất kỳ. Ví dụ, cây lúa mạch theo sáng chế có thể là cây lúa mạch tươi, khô, cây đồng thể, hoặc hạt lúa mạch nghiền. Cây này có thể là cây trưởng thành, phôi, hạt nảy mầm, hạt được tạo mạch nha, hạt mạch nha bột hoặc dạng tương tự.

Các bộ phận của cây này có thể là bộ phận thích hợp bất kỳ của cây, như các hạt, phôi, lá, thân, rễ, hoa hoặc các phần của nó. Ví dụ, phần này có thể là một phần của hạt, phôi, lá, thân, rễ hoặc hoa. Một bộ phận của cây lúa mạch có thể cũng là một phần đồng thể, một phần của sản phẩm chiết, hoặc một phần của cây hoặc hạt lúa mạch nghiền nhỏ.

Theo một phương án của sáng chế, các bộ phận của cây lúa mạch có thể là các tế bào của cây lúa mạch nêu trên, tốt hơn là các tế bào sống có thể được nhân giống in vitro, trong các tế bào hoặc mô cấy chẳng hạn. Cụ thể, theo một phương án các tế bào này có thể là tế bào không có khả năng sinh trưởng thành cây lúa mạch hoàn chỉnh, tức là các tế bào này không phải là tế bào sinh sản.

Sự mất hoàn toàn MMT chức năng

Sáng chế liên quan đến các sản phẩm thực vật, như đồ uống được sản xuất từ cây lúa mạch, hoặc các bộ phận của nó, cây lúa mạch này mang đột biến trong gen mã hóa MMT, làm mất MMT chức năng, ví dụ, mất ít nhất 90% hoạt tính của MMT, tốt hơn là mất ít nhất 97%, tốt hơn nữa là mất ít nhất 99%, còn tốt hơn nữa là mất ít nhất 99,5% hoạt tính của MMT so với lượng tương ứng trong cây lúa mạch hoang, tốt hơn là so với cây lúa mạch hoang bất kỳ trồng cây mô tả trên đây, tốt hơn nữa nếu so với cây lúa mạch cv. Prestige hoang. Tốt nhất

là cây lúa mạch nêu trên mang sự đột biến trong gen mã hóa MMT, dẫn đến việc làm mất hoàn toàn chức năng của MMT.

Sự mất hoàn toàn enzym MMT chức năng có thể dựa trên cơ sở các cơ chế khác nhau. Ví dụ, sự mất hoàn toàn enzym MMT chức năng có thể là do protein trực trặc ở cây nêu trên, tức là enzym MMT hoạt động sai chức năng, như protein MMT đột biến có hoạt tính không phát hiện được. Ví dụ, protein MMT của thể đột biến này có thể là protein bị cắt cụt. Theo cách tương tự sự mất hoạt tính của MMT có thể dựa vào các cơ chế khác nhau, ví dụ, protein MMT hoạt động sai chức năng.

Tốt hơn, nếu hoạt tính của protein MMT đột biến được xác định bởi khả năng xúc tác việc chuyển hóa nhóm metyl từ SAM thành Met, nhờ đó tạo ra SMM. Ví dụ, điều này có thể được hiểu như được mô tả trong ví dụ 4 dưới đây. Tốt hơn, nếu trình tự axit amin MMT đột biến thu được bằng cách xác định trình tự được dịch mã của ADN bổ trợ của cây lúa mạch phân lập được tương ứng. Điều này có thể được thực hiện chủ yếu như được mô tả trong ví dụ 8 dưới đây. Theo cách khác, MMT đột biến của cây lúa mạch theo sáng chế thu được bởi sự biểu hiện khác kiểu trong tế bào cây vi khuẩn như được mô tả trong ví dụ 11 và ví dụ 12 dưới đây, tiếp theo xác nhận rằng protein tái tổ hợp là bất hoạt dưới dạng enzym MMT.

Sự mất hoàn toàn MMT chức năng có thể được thực hiện do thiếu protein MMT. Sự thiếu protein MMT sẽ dẫn đến sự mất chức năng của MMT. Do vậy, cây lúa mạch có thể không chứa, hoặc chứa chỉ rất ít, tốt hơn là chứa lượng không phát hiện được protein MMT. Sự có mặt hoặc không có mặt của protein MMT có thể được phát hiện bởi phương tiện thích hợp bất kỳ mà các chuyên gia trong lĩnh vực này đã biết rõ. Tuy nhiên, tốt hơn nếu protein (các protein) này được phân tích bởi kỹ thuật trong đó protein MMT được phát hiện nhờ các kháng thể đặc thù nhận dạng MMT. Ví dụ, kỹ thuật này có thể là phép thẩm tách Western hoặc phân tích hấp phụ miễn dịch được gắn enzym, và các kháng thể đặc thù nêu trên có thể là đơn dòng hoặc đa dòng. Tuy nhiên, tốt hơn nếu các

kháng thể này là đa dòng nhận dạng được một số epitop khác nhau bên trong protein MMT. Protein MMT này có thể cũng được phát hiện một cách gián tiếp, ví dụ, bằng các phương pháp xác định hoạt tính của MMT. Vì vậy, theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, cây lúa mạch là cây lúa mạch nêu trên mang đột biến trong gen mã hóa MMT, nhờ đó làm mất hoàn toàn hoạt tính của MMT, khi không còn protein MMT phát hiện được trong cây này. Cụ thể, như được phân tích nhờ phép thấm tách Western, đây là trường hợp khi không có protein MMT với khối lượng gần bằng 120 kD, $\pm 10\%$ có thể được phát hiện trong cây lúa mạch nêu trên - tốt hơn là trong hạt của cây lúa mạch nêu trên.

Sự mất hoàn toàn MMT chức năng có thể cũng là do không có hoặc có rất ít, tốt hơn là không có sự phiên mã MMT ARN thông tin. Các chuyên gia trong lĩnh vực này cần phải nhận thấy rằng sự thiếu sản phẩm phiên mã MMT cũng sẽ dẫn đến sự vắng mặt protein MMT.

Tuy nhiên, tốt hơn nếu sự mất hoàn toàn MMT chức năng là do sự biểu hiện của sản phẩm phiên mã MMT lệch. Tốt hơn, nếu sản phẩm phiên mã này là do sự tách intron lệch của sản phẩm phiên mã gốc gây ra, ví dụ, do sự đột biến ở vị trí tách intron. Ví dụ, sự biểu hiện của các sản phẩm phiên mã mã hóa MMT có thể được phát hiện bởi phép thấm tách Northern, hoặc bởi các phương pháp RT-PCR.

Sự mất hoàn toàn MMT chức năng trong cây lúa mạch theo sáng chế có thể do một hoặc nhiều sự đột biến gây ra. Do vậy, nói chung cây lúa mạch theo sáng chế mang ít nhất một đột biến trong gen MMT. Sự đột biến (các sự đột biến) này có thể ở trong các vùng điều hòa, trong đoạn mã mã hóa, hoặc các intron, hoặc sự đột biến (các sự đột biến) nêu trên có thể ở trong vùng mã hóa protein. Vì vậy, sự mất hoàn toàn MMT chức năng có thể cũng được phát hiện bằng cách phân tích các đột biến trong gen mã hóa MMT. Ví dụ, các sự đột biến trong gen mã hóa MMT có thể được phát hiện bằng cách tạo trình tự gen nêu trên, tiếp theo là so sánh với trình tự kiểu hoang, tốt hơn là trình tự của chủng cv. Prestige hoang được đưa ra ở đây dưới dạng SEQ ID NO:3, hoặc trình tự của

cv. Sebastian (SEQ ID NO:16). Tốt hơn là, sau khi nhận dạng được sự đột biến, sự mất chức năng này được khẳng định bằng thử nghiệm về hoạt tính của MMT, như được mô tả trong ví dụ 2 hoặc 4 chẳng hạn.

Thuật ngữ protein MMT có nghĩa bao hàm protein MMT có độ dài đầy đủ của lúa mạch như được nêu trong SEQ ID NO:6, protein đồng đẳng về chức năng của nó. Trong trường hợp này, protein đồng đẳng về chức năng này là protein MMT với lượng hoạt tính MMT tương tự, $\pm 25\%$, như protein đồng đẳng về MMT chức năng của lúa mạch như được nêu trong SEQ ID NO:6, trong đó hoạt tính MMT được xác định như được mô tả trong ví dụ 2 hoặc ví dụ 4 dưới đây.

Cây lúa mạch mất hoạt tính MMT ít nhất 90%, như 95%, ví dụ, ít nhất 99%, như 99,5% hoặc mất hoàn toàn hoạt tính MMT có thể có một phần chức năng hoặc tốt hơn là MMT ở dạng không có chức năng hoặc dạng bị cắt cụt, như dạng có đầu tận cùng N hoặc dạng đầu tận cùng C bị cắt cụt. Cây lúa mạch này có thể có nhiều dạng MMT bị cắt cụt, như 2, hoặc 3 chẳng hạn, hoặc như có nhiều hơn 3 dạng MMT khác nhau, có thể là do các sản phẩm phiên mã được tách intron lệch. Các dạng bị cắt cụt nêu trên bao gồm chỉ đoạn có đầu tận cùng N của MMT. Ngoài đoạn có đầu tận cùng N của MMT hoang, các dạng bị cắt cụt nêu trên của MMT có thể chứa các trình tự bổ sung có đầu tận cùng C không được phát hiện trong MMT hoang. Ví dụ, các trình tự có đầu tận cùng bổ sung C có thể là các trình tự intron được dịch mã, như các trình tự chứa thể đột biến ARN thông tin do tách intron lệch. Tốt hơn, nếu các dạng MMT bị cắt cụt nêu trên chứa tối đa 500, tốt hơn nữa là chứa tối đa 450, thậm chí tốt hơn nữa là chứa tối đa 400, còn tốt hơn nữa là chứa tối đa 350, vẫn tốt hơn nữa là chứa tối đa 320, cũng còn tốt hơn nữa là chứa tối đa 311, hoặc tối đa 288 gốc của axit amin có đầu tận cùng N của trình tự SEQ ID NO:6. Cụ thể, đây là trường hợp khi cây lúa mạch nêu trên mất hoàn toàn hoạt tính MMT. Tuy nhiên, MMT có thể cũng chứa ít, như chứa không nhiều hơn 300, ví dụ chứa không nhiều hơn 250, như chứa không nhiều hơn 200, ví dụ chứa tối đa 150, chứa không nhiều hơn 147

chẳng hạn, hoặc chứa không nhiều hơn 133 axit amin có đầu tận cùng N của trình tự SEQ ID NO:6.

Theo một phương án rất được ưu tiên, dạng MMT bị cắt cụt có thể chứa từ 1 đến 311 axit amin hoặc chứa từ 1 đến 288 axit amin của trình tự SEQ ID NO:6 và tùy ý các trình tự bổ sung có đầu tận cùng C không có mặt trong MMT hoang. Tốt hơn là, các trình tự bổ sung có đầu tận cùng C này chứa tối đa 50, tốt hơn nữa là chứa tối đa 30, thậm chí tốt hơn nữa là chứa tối đa 10, còn tốt hơn nữa là chứa tối đa 4, hoặc chứa tối đa 1 axit amin. Theo một phương án rất được ưu tiên, dạng MMT bị cắt cụt có thể là protein theo trình tự SEQ ID NO:11, hoặc trình tự SEQ ID NO:13, hoặc trình tự SEQ ID NO:15. Các protein của trình tự SEQ ID NO:11, hoặc trình tự SEQ ID NO:13, hoặc trình tự SEQ ID NO:15 không là các enzym MMT chức năng.

Theo một phương án rất được ưu tiên khác, dạng MMT bị cắt cụt có thể chứa từ 1 đến 147 axit amin, hoặc chứa từ 1 đến 133 axit amin của trình tự SEQ ID NO:18, và tùy ý các trình tự bổ sung có đầu tận cùng C không có mặt trong MMT hoang. Tốt hơn, nếu các trình tự bổ sung có đầu tận cùng C này chứa tối đa 50, tốt hơn nữa là chứa tối đa 40, thậm chí tốt hơn nữa là chứa tối đa 39, hoặc chứa tối đa 33, hoặc chứa tối đa 30 axit amin. Theo một phương án rất được ưu tiên, dạng MMT bị cắt cụt có thể là một protein theo trình tự SEQ ID NO:22, hoặc trình tự SEQ ID NO:24, hoặc trình tự SEQ ID NO:26. Các protein của trình tự SEQ ID NO:22, hoặc trình tự SEQ ID NO:24, hoặc trình tự SEQ ID NO:26 không là các enzym MMT chức năng.

Ví dụ, các dạng MMT bị cắt cụt nêu trên có thể có mặt trong cây lúa mạch mang sự đột biến trong gen mã hóa MMT, trong đó sự đột biến này đưa codon kết thúc sớm vào việc tạo ra gen mã hóa nêu trên của MMT dạng bị cắt cụt.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, cây lúa mạch có gen được phiên mã thành ARN thông tin, chứa một vài, nhưng không phải là chứa tất cả gen của MMT kiểu đại được tách intron cùng nhau mà không có sự can thiệp (cấu trúc intron-exon của gen MMT kiểu đại của cây lúa mạch được thể

hiện trên Fig. 9). Theo một phương án, tốt hơn là ARN thông tin MMT của cây lúa mạch theo sáng chế chứa tối đa các exon 1,2,3, 4, và 5 được tách intron cùng nhau mà không có sự can thiệp, hoặc chứa tối đa các exon 1 và 2 được tách intron cùng nhau mà không có sự can thiệp. Ngoài các exon được tách intron cùng nhau mà không có sự can thiệp nêu trên, các ARN thông tin MMT của cây lúa mạch theo sáng chế có thể là các trình tự bổ sung có đầu cuối 3' thu được từ các intron và/hoặc exon kiểu đại, trong đó các intron tách các trình tự exon. Các ví dụ được ưu tiên về ARN thông tin MMT lệch của cây lúa mạch theo sáng chế - như được xác định bởi RT-PCR và do đó với các đoạn có độ dài (biểu thị bằng bp) – được minh họa trên Fig.12 và Fig.16. Tốt hơn nữa, nếu các ARN thông tin lệch của cây lúa mạch theo sáng chế là các ARN thông tin lệch được minh họa trên Fig.12, tiếp theo là các exon 1 và 2 ở đầu 5', hoặc các ARN thông tin được minh họa trên Fig.16, tiếp theo là exon 1 ở đầu 5'.

Theo một phương án rất được ưu tiên của sáng chế, cây lúa mạch mang sự đột biến trong gen đối với MMT chứa sự đột biến ở vị trí tách intron trong gen MMT, mà tạo ra ARN thông tin được tách intron lệch. Tốt hơn nữa, nếu sự đột biến này nằm trong một intron của gen MMT, thậm chí tốt hơn nữa là ở vị trí tách intron 5' của intron, như ở vị trí tách intron 5' trên intron 1 (intron này phân cách các exon 1 và 2), như ở vị trí tách intron 5' trên intron 2 (intron này phân cách các exon 2 và 3), như ở vị trí tách intron 5' trên intron 3 (intron này phân cách các exon 3 và 4), như ở vị trí tách intron 5' trên intron 4 (intron này phân cách các exon 4 và 5), như ở vị trí tách intron 5' trên intron 5 (intron này phân cách các exon 5 và 6), như ở vị trí tách intron 5' trên intron 6 (intron này phân cách các exon 6 và 7), tốt nhất là ở vị trí tách intron 5' trên intron 2 hoặc intron 5.

Tốt hơn, nếu sự đột biến này là sự đột biến G→A của bazơ có đầu cuối 5' của các intron nêu trên. Do vậy, một sự đột biến rất được ưu tiên là sự đột biến G→A của bazơ có đầu cuối 5' của intron 2, hoặc là sự đột biến G→A của bazơ có đầu cuối 5' của intron 5.

Cây lúa mạch theo sáng chế có thể được trồng theo phương pháp thích

hợp bất kỳ mà các chuyên gia trong lĩnh vực này đã biết, tốt hơn là trồng theo phương pháp được phác thảo dưới đây trong phần "Trồng cây lúa mạch mát hoàn toàn MMT chức năng".

Theo một phương án của sáng chế, tốt hơn nếu cây lúa mạch theo sáng chế mát hoàn toàn hoạt tính MMT có các đặc tính sinh lý học và phát triển của hạt và cây so với cây lúa mạch hoang. Do đó, ở đây tốt hơn là cây lúa mạch không chứa MMT giống với cây lúa mạch hoang về các đặc tính nông nghiệp quan trọng như chiều cao cây, số lượng nhánh gốc ở mỗi cây, thời gian bắt đầu ra hoa và/hoặc số lượng hạt của mỗi bông.

Theo một phương án rất được ưu tiên, gen mã hóa MMT của cây lúa mạch theo sáng chế có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:8. Do vậy, tốt hơn, nếu cây lúa mạch theo sáng chế mang đột biến G→A của bazơ No.3076 của SEQ ID NO:3 (trong đó SEQ ID NO:3 là trình tự gen kiểu đại đối với MMT của cây lúa mạch, cv. Prestige).

Một ví dụ được ưu tiên về cây lúa mạch mát hoàn toàn hoạt tính MMT là cây lúa mạch được American Type Culture Collection (ATCC), Patent Depository, 10801 University Blvd., Manassas, VA20110, United States và được gọi là "Barley, Hordeum vulgare; Line 8063" nộp lưu ngày 13 tháng 10 năm 2008. Do vậy, cây lúa mạch theo sáng chế có thể là cây lúa mạch dòng 8063 được ATCC nộp lưu ngày 13 tháng 10 năm 2008 (số hiệu nộp lưu ATCC: PTA-9543), hoặc cây lúa mạch đời sau bất kỳ của nó, trong đó gen mã hóa MMT của cây lúa mạch theo sáng chế có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:8.

Theo một phương án rất được ưu tiên, gen mã hóa MMT của cây lúa mạch theo sáng chế có trình tự như nêu trong SEQ ID NO: 19. Do vậy, tốt hơn, nếu cây lúa mạch theo sáng chế mang đột biến G→A của bazơ số 1462 của SEQ ID NO:16 (trong đó SEQ ID NO:16 là trình tự gen kiểu đại đối với MMT của cây lúa mạch cv. Sebastian).

Trồng cây lúa mạch mát hoàn toàn MMT chức năng

Theo sáng chế, cây lúa mạch mất hoàn toàn MMT chức năng có thể được trồng theo phương pháp thích hợp bất kỳ mà các chuyên gia trong lĩnh vực này đã biết. Tốt hơn, nếu cây lúa mạch theo sáng chế được trồng theo phương pháp bao gồm các bước gây đột biến gen của cây lúa mạch - hoặc các bộ phận của nó, hạt lúa mạch chẳng hạn - tiếp theo là sàng lọc và chọn lọc những cây lúa mạch riêng lẻ mất hoàn toàn hoạt tính MMT. Điều thú vị là, theo một khía cạnh sáng chế liên quan đến phương pháp sàng lọc mới và rất hữu hiệu để cho phép nhận dạng các cây lúa mạch nêu trên.

Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp trồng cây lúa mạch mang sự đột biến trong gen mã hóa MMT, gây ra sự mất hoàn toàn hoạt tính MMT. Phương pháp này bao gồm các bước:

(i) Gây đột biến gen của cây lúa mạch, và/hoặc các tế bào của lúa mạch, và/hoặc mô lúa mạch, và/hoặc hạt lúa mạch, và/hoặc phôi lúa mạch, nhờ đó thu được đời lúa mạch M0; và

(ii) Nhân giống (gây giống chẳng hạn) cây lúa mạch, hạt, và/hoặc phôi được gây đột biến nêu trên, đối với các đời ≥ 2 , nhờ đó thu được cây lúa mạch đời Mx, trong đó x là số nguyên ≥ 2 ; và

(iii) Thu được mẫu của cây lúa mạch đời Mx nêu trên; và

(iv) Xác định lượng SMM trong mẫu nêu trên; và

(v) Chọn lọc cây trong đó mẫu này chứa SMM với lượng nhỏ hơn 10 ppb, tốt hơn là nhỏ hơn 5 ppb, tốt hơn nữa là chứa SMM với lượng không phát hiện được; và

(vi) Tạo trình tự ít nhất một phần của gen MMT; và

(vii) Chọn lọc cây mang sự đột biến trong gen MMT;

nhờ đó thu được cây lúa mạch, cây này mang sự đột biến trong gen MMT gây ra sự mất hoàn toàn MMT chức năng.

Bước (i) nêu trên có thể bao gồm việc gây đột biến chất liệu lúa mạch sống được chọn từ nhóm bao gồm cây lúa mạch, tế bào lúa mạch, mô lúa mạch, hạt lúa mạch và phôi lúa mạch, tốt hơn là được chọn từ nhóm bao gồm cây lúa

mạch, hạt lúa mạch và phôi lúa mạch, tốt hơn nữa là hạt lúa mạch. Việc gây đột biến có thể được thực hiện bằng phương pháp thích hợp bất kỳ. Theo một phương án, việc gây đột biến này được thực hiện bằng cách ủ cây lúa mạch hoặc một bộ phận của nó - ví dụ hạt lúa mạch hoặc các tế bào riêng lẻ - bằng các tác nhân gây đột biến. Các tác nhân này được các chuyên gia trong lĩnh vực này biết rõ, và có thể được chọn từ nhóm bao gồm, ví dụ, natri nitrua (NaN_3), etyl metansulfonat (EMS), azidoglyxerol (AG), metyl nitrosoure (MNU), hydrazit maleic (MH).

Theo một phương án khác, việc gây đột biến gen này được thực hiện bằng cách chiếu xạ, ví dụ, bằng tia tử ngoại, vào cây lúa mạch, hoặc một bộ phận của nó, như hạt lúa mạch. Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, việc gây đột biến được thực hiện theo phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp được phác họa dưới đây trong phần "Gây đột biến bằng phương pháp hóa học". Ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế về quy trình gây đột biến được nêu trong ví dụ 1 của Patent Mỹ số 7420105 cấp cho Breddam K. và các đồng tác giả, cũng giống như trong ví dụ 2 dưới đây.

Tốt hơn là, việc gây đột biến được thực hiện theo cách sao cho tần suất kỳ vọng của thể đột biến mong muốn ít nhất là 0,5, như nằm trong khoảng từ 0,5 đến 5, như nằm trong khoảng từ 0,9 đến 2,3 trong mỗi 10.000 hạt chẳng hạn, khi sàng lọc lúa mạch đời M3.

Theo một phương án được ưu tiên, các hạt lúa mạch được gây đột biến. Các hạt này được ký hiệu là hạt đời M0 (cũng xem Fig.7).

Sau khi gây đột biến, cây lúa mạch, hoặc các bộ phận của nó, được chọn nếu không có hoạt tính MMT được phát hiện. Tốt hơn, nếu việc chọn này là thu được mẫu từ cây lúa mạch, tốt hơn là từ cây lúa mạch đang nảy mầm, thậm chí còn tốt hơn là từ cây lúa mạch đã nảy mầm được 4 ngày. Tốt hơn là, mẫu này lấy từ bao lá mầm và/hoặc lá đầu tiên, tốt hơn là từ lá. Vì vậy, mẫu này có thể là mô lá có cỡ nằm trong khoảng từ 1 cm đến 3 cm chẳng hạn.

Như được mô tả ở đây, mẫu này có thể được chiết và được phân tích sau

khi qua quy trình phát triển gồm nhiều bước, kèm theo việc sử dụng nối tiếp nhau các dung môi và chất liên kết khác nhau. Nói chung, mẫu này có thể được chiết bằng dung môi hoặc hỗn hợp của các dung môi chẳng hạn, tốt hơn là nước và/hoặc các dung môi hữu cơ. Ví dụ, dung môi hữu cơ có thể là rượu, tốt hơn là metanol - hoặc dung môi hữu cơ có thể là alkyl- halogenua chẳng hạn, tốt hơn là clorofom. Theo một phương án được ưu tiên, dung môi này là hỗn hợp gồm nước, metanol, và clorofom. Có lợi, nếu việc chiết này được thực hiện trong khi trộn, ví dụ, bằng cách sử dụng máy khuấy hoặc máy trộn. Chất hỗ trợ rắn có thể được bổ sung vào hỗn hợp dung môi/mẫu - dạng hạt, như hạt bi thủy tinh chẳng hạn.

Theo một phương án được ưu tiên, mẫu lá nêu trên được lấy từ các hạt đời Mx, trong đó x là số nguyên ≥ 2 , tốt hơn là nằm trong khoảng từ 2 đến 10, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 3 đến 8. Theo một phương án rất được ưu tiên, lượng SMM được xác định trong cây nảy mầm đời M3, hoặc trong các mẫu của nó (như lá). Theo phương án nêu trên, tốt hơn là hạt lúa mạch bị đột biến gen đời M0 được sinh trưởng để thu được cây lúa mạch, cây này được lai chéo để thu được hạt đời M1. Quy trình này được lặp lại cho đến khi nhận được các hạt đời M3 (xem Fig.7).

Tốt hơn, nếu việc xác định lượng SMM dựa vào quy trình mới được mô tả dưới đây. Điều thú vị là, phương pháp này cho phép sàng lọc với năng suất cao, làm cho có thể thực hiện để nhận dạng cây lúa mạch khác biệt bởi tính mất hoàn toàn MMT chức năng.

Theo khái niệm chung, tốt hơn nếu phương pháp này có sự tác động vào mẫu, hoặc tốt hơn, nếu sản phẩm chiết của mẫu nêu trên được chuẩn bị như được mô tả trên đây nhờ hợp chất có khả năng liên kết với SMM. Đã phát hiện ra rằng chất phản ứng OPA (Sigma, cat.no. P7914; xem Fig.2), dưới đây được gọi đúng là OPA, là chất đặc biệt hữu ích cho việc xác định lượng SMM. Đặc biệt là, OPA phản ứng với SMM để tạo ra phân tử được gọi là SMM-OPA (xem Fig. 2). Tốt hơn, nếu phản ứng này có việc ủ OPA với sản phẩm chiết của mẫu

được chuẩn bị như được mô tả trên đây. Ngoài ra, tốt hơn là axit 3-mercaptopropionic được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng này. Tốt hơn, nếu hỗn hợp này được giữ ở độ pH kiềm, tốt hơn là ở độ pH nằm trong khoảng từ 8 đến 11, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 9 đến 11, thậm chí còn tốt hơn là nằm trong khoảng từ 9,5 đến 10,5, như ở độ pH = 10. Tốt hơn, nếu việc ủ được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0°C đến 10°C, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1°C đến 8°C, thậm chí còn tốt hơn là nằm trong khoảng từ 2°C đến 6°C, vẫn còn tốt hơn là nằm trong khoảng từ 3°C đến 5°C, như ở 4°C. Tốt hơn, nếu thời gian ủ $\geq$ 10 phút.

Dựa trên cơ sở theo dõi rằng SMM-OPA hấp phụ và phát ra ánh sáng tương ứng với các bước sóng 340 nm và 450 nm, thì có thể phát hiện SMM bằng cách sử dụng phổ huỳnh quang. Tốt hơn, nếu quá trình phát hiện ban đầu kèm theo việc tách sản phẩm chiết trên cột, tốt hơn là trên cột 30x2 mm Gemini 3u C18 (Phenomenex, cat.no. 00A-4439-80; Phenomenex, 2006), sau đó phát hiện bằng huỳnh quang bằng cách sử dụng thiết bị sắc ký lỏng tính năng cao, tốt hơn là sắc ký lỏng tính năng cực cao (Ultra Performance Liquid Chromatography - UPLC system, Waters), được chỉ định để nhận dạng và đo mức huỳnh quang của các phân tử có phổ kích thích ở 340 nm và phổ phát xạ ở 450 nm. Khi sử dụng phương pháp này, "SMM không phát hiện được" có nghĩa không có hợp chất có thể phát hiện được cùng rửa giải với SMM. Trong trường hợp này, một "gờ" nhỏ trên đỉnh biểu đồ sắc ký được coi là đỉnh giả. Do đó, một gờ nhỏ ở phía phải đỉnh Asn/Ser, xem Fig. 3, không được xem là biểu thị đỉnh SMM. Vì vậy, để làm ví dụ, hai biểu đồ sắc ký trên như được thể hiện trên Fig.3B được xem là để mô tả "SMM không phát hiện được", trong khi biểu đồ sắc ký dưới trên hình vẽ này biểu thị sự tách mẫu chứa SMM.

Tốt hơn, nếu việc phát hiện SMM có thể được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 2. Phương pháp được ưu tiên để chọn cây lúa mạch theo sáng chế được mô tả dưới đây trong ví dụ 2. Cây lúa mạch đang nảy mầm, thậm chí tốt hơn là từ cây lúa mạch đã nảy mầm được 4 ngày. Điều đáng chú ý là, phương

pháp sàng lọc nêu trên là phương pháp đặc biệt hữu ích. Trước hết, đó là phương pháp phân tích mới. Hơn thế nữa, ưu điểm quan trọng của phương pháp nêu trên là nó được thiết lập để xác định lượng SMM trong cây lúa mạch đang nảy mầm, như các lá của cây lúa mạch đang nảy mầm. Quá trình lấy mẫu từ cây lúa mạch đang nảy mầm tạo ra sự chuẩn bị tinh bất ngờ cho việc phát hiện SMM dựa vào UPLC. Các mẫu khác, ví dụ, các mẫu chế phẩm ủ men của các hạt tương tự như được mô tả trên đây cũng là phức chất trong thành phần, và nói chung có thể không được sử dụng trong phương pháp sắc ký nêu trên để xác định lượng SMM.

Sau khi nhận dạng cây lúa mạch với lượng SMM nhỏ hơn 10 ppb, tốt hơn là cây có SMM không phát hiện được, thì gen MMT tương ứng, hoặc một phần của gen này, thường được xác định trình tự để xác định xem liệu cây lúa mạch đang nói đến này có thể được phân loại là có sự đột biến MMT hay không. Cây lúa mạch này khác biệt ở chỗ, nó chứa SMM không phát hiện được, và trong đó một hoặc nhiều bazơ của gen mã hóa MMT là khác so với trình tự của kiểu đại, được chọn lọc sau đó. Trong trường hợp này, tốt hơn nếu trình tự kiểu đại là trình tự phát hiện được trong cây lúa mạch hoang tương ứng, tốt hơn là trình tự được đưa ra ở đây là SEQ ID NO:3. Các sự đột biến được ưu tiên được mô tả trên đây.

Lúa mạch đột biến chọn được có thể tiếp tục được nhân giống, và cây lúa mạch đời tiếp theo được sàng lọc lại về lượng SMM. Sau khi chọn cây lúa mạch hữu ích, cây này có thể được đưa vào chương trình nhân giống bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường được mô tả dưới đây trong phần "Nhân giống cây trồng".

Sản phẩm thực vật

Theo một khía cạnh, sáng chế liên quan đến đồ uống hoặc các sản phẩm thực vật khác với lượng DMS nhỏ được tạo ra từ cây lúa mạch, hoặc một bộ phận của nó, mang sự đột biến trong gen mã hóa MMT, làm mất hoàn toàn MMT chức năng. Nói chung, điều thú vị là các sản phẩm thực vật này chứa DMS với lượng rất nhỏ. Hơn thế nữa, các sản phẩm thực vật như vậy nói chung

cũng chứa SMM với lượng rất nhỏ, và tốt hơn là chứa DMSO cũng với lượng rất nhỏ. Không bị ràng buộc bởi lý thuyết, người nộp đơn thừa nhận rằng sự không có mặt của SMM được sản xuất từ lúa mạch và mạch nha làm cho DMS trong đồ uống với lượng rất nhỏ, và ngoài ra trong các sản phẩm thực vật khác được sản xuất từ lúa mạch nêu trên khác biệt bởi việc không có enzym MMT chức năng. Ví dụ về các sản phẩm thực vật hữu ích, như đồ uống được sản xuất từ cây lúa mạch có sự mất hoàn toàn hoạt tính MMT, được mô tả dưới đây.

Tốt hơn là, đồ uống nêu trên hoặc các sản phẩm thực vật nêu trên chứa:

(i) DMS với lượng nhỏ hơn 30%, tốt hơn là nhỏ hơn 20%, tốt hơn nữa là nhỏ hơn 15%, thậm chí còn tốt hơn là nhỏ hơn 10%; và/hoặc

(ii) SMM với lượng nhỏ hơn 30%, tốt hơn là nhỏ hơn 20%, tốt hơn nữa là nhỏ hơn 15%, thậm chí còn tốt hơn là nhỏ hơn 10%, như nhỏ hơn 5%, nhỏ hơn 2% chẳng hạn;

so với lượng tương ứng của DMS và SMM có trong đồ uống hoặc sản phẩm thực vật tương tự sản xuất được từ cây lúa mạch hoang.

Thậm chí tốt hơn là, đồ uống nêu trên hoặc sản phẩm thực vật nêu trên chứa:

(i) DMS với lượng nhỏ hơn 30 ppb, tốt hơn là nhỏ hơn 25 ppb, tốt hơn nữa là nhỏ hơn 20 ppb, thậm chí còn tốt hơn là nhỏ hơn 15 ppb, vẫn tốt hơn là nhỏ hơn 10 ppb, tốt hơn là nữa nhỏ hơn 5 ppb, vẫn tốt hơn là không phát hiện được DMS; và/hoặc

(ii) SMM với lượng nhỏ hơn 50 ppb, tốt hơn là nhỏ hơn 40 ppb, tốt hơn nữa là nhỏ hơn 30 ppb, thậm chí tốt hơn là nhỏ hơn 20 ppb, còn tốt hơn nữa là nhỏ hơn 10 ppb, thậm chí còn tốt hơn nữa là nhỏ hơn 5 ppb, thậm chí tốt hơn nữa là không phát hiện được SMM.

Ngoài ra, tốt hơn là sản phẩm thực vật này chứa DMSO với lượng nhỏ hơn 30%, tốt hơn là nhỏ hơn 20%, tốt hơn nữa là nhỏ hơn 15%, thậm chí tốt hơn là nhỏ hơn 10% so với lượng này có trong đồ uống hoặc sản phẩm thực vật

tương tự sản xuất được từ cây lúa mạch hoang.

Theo một khía cạnh, sản phẩm thực vật theo sáng chế có thể là các hạt lúa mạch mang đột biến làm mất hoàn toàn MMT chức năng. Sản phẩm này có thể cũng là chế phẩm chứa các hạt nêu trên và chế phẩm sản xuất được từ các hạt này, cũng như các sản phẩm thực vật khác sản xuất được từ các hạt nêu trên.

Theo một khía cạnh, sản phẩm thực vật theo sáng chế là chế phẩm mạch nha được sản xuất từ các hạt mạch nha của cây lúa mạch mang sự đột biến trong gen mã hóa MMT làm mất hoàn toàn hoạt tính MMT. Thuật ngữ "tạo mạch nha" được hiểu là làm nảy mầm các hạt lúa mạch được ngâm ướt, xảy ra trong điều kiện môi trường có điều khiển (như được minh họa trên Fig. 8 chẳng hạn).

Tạo mạch nha là quá trình ngâm và làm nảy mầm có điều khiển, tiếp theo là sấy khô (tốt hơn là sấy khô trong lò) hạt cây lúa mạch. Trước khi sấy khô, các hạt lúa mạch được ngâm và được cho nảy mầm được gọi là "mạch nha xanh", các hạt này có thể cũng là sản phẩm thực vật theo sáng chế. Quy trình này là đặc biệt quan trọng đối với việc tổng hợp một số enzym gây ra sự sửa đổi hạt trong các quy trình mà về nguyên tắc được dùng để khử polyme các thành tế bào nội nhũ chết và huy động dinh dưỡng của các hạt. Trong quá trình sấy khô, hương vị và màu sắc (màu nâu chẳng hạn) được tạo ra nhờ các phản ứng hóa học. Mặc dù việc sử dụng mạch nha ban đầu là để sản xuất đồ uống, nhưng nó có thể cũng được sử dụng trong các quy trình công nghiệp khác, làm nguồn enzym trong công nghiệp làm bánh nướng chẳng hạn, hoặc làm chất tạo hương vị và chất tạo màu trong công nghiệp thực phẩm, như làm mạch nha hoặc bột mạch nha, hoặc một cách gián tiếp làm si rô mạch nha, v.v..

Theo một khía cạnh, sáng chế liên quan đến các phương pháp sản xuất chế phẩm mạch nha nêu trên. Tốt hơn, nếu phương pháp này bao gồm các bước:

- (i) Thu hoạch các hạt lúa mạch từ cây lúa mạch mang sự đột biến trong gen mã hóa MMT làm mất hoàn toàn hoạt tính MMT;
- (ii) Ngâm các hạt nêu trên;
- (iii) Làm nảy mầm các hạt đã ngâm trong các điều kiện định trước;

(iv) Sấy khô các hạt đã nảy mầm nêu trên;

nhờ đó sản xuất ra chế phẩm mạch nha chứa SMM và/hoặc DMS với lượng nhỏ. Ví dụ, mạch nha này có thể được sản xuất ra bằng phương pháp bất kỳ được Briggs và các đồng tác giả (1981) và Hough và các đồng tác giả (1982) mô tả.

Tuy nhiên, phương pháp thích hợp bất kỳ khác để sản xuất mạch nha có thể cũng được sử dụng nhờ sáng chế, như các phương pháp sản xuất mạch nha chuyên dụng, kể cả, nhưng không chỉ giới hạn ở, các phương pháp rang mạch nha.

Điều thú vị là, DMS là hợp chất khá dễ bay hơi với điểm sôi là 37°C-38°C (Imashuku, nêu trên), và trong quy trình sản xuất mạch nha, khi sấy khô trong lò chẳng hạn, nói chung chế phẩm bị đun nóng, làm bay hơi một lượng đáng kể DMS. Tuy nhiên, trong quá trình làm nguội chế phẩm mạch nha bình thường, có thể có nhiều DMS được sản xuất từ tiền chất DMS (DMSP). Một ưu điểm chủ yếu của sáng chế là không có, hoặc chỉ có rất ít lượng DMS được tạo ra trong chế phẩm mạch nha (xem ví dụ 6; Fig. 5A).

Các phương pháp làm giảm lượng DMS trong mạch nha đã được mô tả. Nhiều phương pháp trong số các phương pháp này dựa trên việc xử lý mạch nha bằng nhiệt. Việc xử lý bằng nhiệt nêu trên có thể đơn giản là đun nóng mạch nha, ví dụ, trong khi sấy khô trong lò để làm bay hơi DMS tự do bằng cách cấp hơi nước. Do vậy, việc xử lý mạch nha bằng hơi nước có thể làm giảm lượng DMS tự do trong mạch nha. Tuy nhiên, các phương pháp chủ yếu làm giảm lượng DMS tự do trong mạch nha, nhưng chỉ tác động đến lượng SMM ở mức độ thấp hơn. Như nêu trên, tốt hơn là các sản phẩm thực vật theo sáng chế, như chế phẩm mạch nha chứa cả DMS và SMM với lượng nhỏ. Theo một phương án của sáng chế, chế phẩm mạch nha của sáng chế chỉ phụ thuộc vào bước xử lý giới hạn kèm theo việc làm bay hơi và khử DMS tự do bằng hơi nước, hoặc theo cách khác không phụ thuộc vào bước xử lý kèm theo việc làm bay hơi và khử DMS tự do bằng cách sử dụng hơi nước trong khi sấy khô trong lò.

Theo một phương án của sáng chế, tốt hơn là mạch nha theo sáng chế

không được xử lý bằng muối bromat, như kali bromat hoặc canxi bromat.

Mạch nha có thể được xử lý tiếp, ví dụ, bằng cách nghiền nhờ đó thu được mạch nha bột. Do vậy, sản phẩm thực vật theo sáng chế có thể là loại mạch nha bất kỳ, như mạch nha chưa được xử lý, hoặc mạch nha nghiền, hoặc bột mạch nha. Mạch nha nghiền, hoặc bột mạch nha là các hợp phần hóa học của mạch nha này, kể cả các tế bào chết không có khả năng nảy mầm lại.

Tốt hơn, nếu các chế phẩm mạch nha của sáng chế chứa DMS tự do với lượng tối đa là 3, tốt hơn nếu tối đa là 2, tốt hơn nữa nếu tối đa là 1, thậm chí tốt hơn nữa nếu tối đa là 0,5, như tối đa là 0,2 $\mu\text{g/g}$. Ngoài ra, tốt hơn nếu chế phẩm mạch nha của sáng chế chứa SMM với lượng tối đa là 2, tốt hơn nếu tối đa là 1, tốt hơn nữa nếu tối đa là 0,5 $\mu\text{g/g}$.

Theo một khía cạnh được ưu tiên, sáng chế đề xuất chế phẩm mạch nha chứa DMS tự do với lượng tối đa là 200, tốt hơn nếu tối đa là 150, tốt hơn nữa nếu tối đa là 100, thậm chí tốt hơn nữa nếu tối đa là 50, như tối đa là 25 ppb. Ngoài ra, tốt hơn nếu chế phẩm mạch nha của sáng chế chứa SMM với lượng tối đa là 1000, tốt hơn nếu tối đa là 500, tốt hơn nữa nếu tối đa là 250, thậm chí tốt hơn nữa nếu tối đa là 100 ppb, còn tốt hơn nữa nếu tối đa là 50 ppb. Cũng tốt hơn nếu chế phẩm mạch nha của sáng chế chứa DMSP với lượng tối đa là 1000, tốt hơn nếu tối đa là 500, tốt hơn nữa nếu tối đa là 100 ppb, còn tốt hơn nữa nếu tối đa là 50 ppb.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế liên quan đến chế phẩm mạch nha chứa DMSP với lượng tối đa là 5000, tốt hơn nếu tối đa là 2500, tốt hơn nữa nếu tối đa là 1000, thậm chí tốt hơn nữa nếu tối đa là 500, còn tốt hơn nữa nếu tối đa là 250, ví dụ tối đa là 150 ppb. Cũng tốt hơn nếu chế phẩm mạch nha xanh nêu trên chứa DMS tự do với lượng tối đa là 200, tốt hơn nếu tối đa là 150, tốt hơn nữa nếu tối đa là 100, thậm chí tốt hơn nữa nếu tối đa là 50, như tối đa là 25 ppb.

Theo một khía cạnh khác, các sản phẩm thực vật theo sáng chế là si rô, như si rô lúa mạch hoặc si rô mạch nha lúa mạch. Sản phẩm thực vật có thể cũng là sản phẩm chiết của lúa mạch hoặc mạch nha.

Theo một khía cạnh khác, các sản phẩm thực vật theo sáng chế là chế phẩm ủ men được sản xuất từ chế phẩm mạch nha thu được từ các hạt lúa mạch mang sự đột biến trong gen mã hóa MMT làm mất hoàn toàn hoạt tính MMT (xem ví dụ 6; Fig. 5B). Chế phẩm ủ men nêu trên có thể được sản xuất ra chỉ từ các hạt không chứa MMT, hoặc hỗn hợp gồm cả các hạt khác. Sáng chế cũng liên quan đến các chế phẩm ủ men được tạo ra bằng cách sử dụng cây lúa mạch không chứa MMT, hoặc các bộ phận của nó, riêng rẽ hoặc được trộn với các hợp phần khác. Trước hết các chế phẩm ủ men nêu trên có thể là, và/hoặc thứ hai là, và/hoặc còn là chế phẩm ủ men. Các chế phẩm ủ men có thể là chế phẩm ủ men ngọt, chế phẩm ủ men sôi, hoặc hỗn hợp của chúng. Nói chung, chế phẩm ủ men chứa nitơ amino và các hydrat cacbon có thể lên men với lượng lớn, chế phẩm này chủ yếu là maltoza. Trên Fig.8 minh họa phương pháp chung để sản xuất chế phẩm ủ men từ mạch nha. Nói chung, chế phẩm ủ men được sản xuất bằng cách ủ mạch nha với nước trong quá trình ngâm ủ. Trong quá trình ngâm ủ, chế phẩm mạch nha/nước có thể được bổ sung chế phẩm giàu hydrat cacbon bổ sung, ví dụ, cây lúa mạch, cây ngô, hoặc các sản phẩm phụ của cây lúa. Nói chung, các sản phẩm phụ của ngũ cốc chưa được tạo mạch nha đã biết chứa enzym với lượng rất nhỏ, tạo ra sự bổ sung với mạch nha hoặc các enzym ngoại sinh cần thiết cho việc chuyển hóa đường và/hoặc tạo ra sản phẩm chiết, kể cả sự tạo ra nitơ amino tự do.

Theo một phương án của sáng chế, sản phẩm thực vật này có thể là lúa mạch chưa được tạo mạch nha mà, ví dụ, có thể là hữu ích làm chất bổ trợ trong khi ngâm ủ.

Nói chung, bước thứ nhất trong quy trình sản xuất chế phẩm ủ men là nghiền mạch nha sao cho nước có thể xâm nhập vào các hạt nhỏ trong giai đoạn ngâm ủ này - có thể được coi là mở rộng quá trình tạo mạch nha bằng cách khử polyme hóa chất nền bằng enzym. Trong khi ngâm ủ, mạch nha nghiền được ủ với chất lỏng, như nước. Nhiệt độ ủ được giữ hoặc không đổi (ngâm ủ đẳng nhiệt), hoặc gia tăng dần dần. Theo một phương án được ưu tiên, nhiệt độ ngâm

ủ ban đầu không cao hơn 70°C, tốt hơn là không cao hơn 69°C, do đó nhiệt độ ngâm ủ ban đầu có thể nằm trong khoảng từ 50°C đến 69°C chẳng hạn, như nằm trong khoảng từ 55°C đến 69°C, ví dụ, nằm trong khoảng từ 55°C đến 65°C. Nếu nhiệt độ ngâm ủ ban đầu quá cao, thì sẽ ảnh hưởng đến hoạt tính enzym trong khi ngâm ủ và có thể làm giảm, hoặc thậm chí phá huỷ các hoạt tính enzym mong muốn làm cho chất lượng chế phẩm ủ men thay đổi. Trong mọi trường hợp, các chất hòa tan được tạo ra trong quy trình tạo mạch nha và ngâm ủ được giải phóng thành phân đoạn lỏng nêu trên. Bước lọc sau đó tách chế phẩm ủ men lỏng và các hạt rắn lắng xuống, các hạt rắn này có nghĩa là các hạt đã sử dụng. Chế phẩm ủ men nêu trên có thể cũng được ký hiệu là "chế phẩm ủ men thứ nhất". Sau khi lọc, có thể thu được "chế phẩm ủ men thứ hai" bằng cách sục khí bằng nước nóng. Ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế về các quy trình thích hợp để tạo ra chế phẩm ủ men đã được Briggs và các đồng tác giả (1981) và Hough và các đồng tác giả (1982) mô tả.

Các chế phẩm ủ men thứ nhất, thứ hai, chế phẩm ủ men tiếp theo có thể được hỗn hợp, và sau đó được đun sôi. Chế phẩm ủ men chưa được đun sôi, chế phẩm ủ men thứ nhất tinh khiết hoặc chế phẩm ủ men hỗn hợp đều được gọi là "chế phẩm ủ men ngọt", trong khi sau khi đun sôi chế phẩm ủ men này có thể được gọi là "chế phẩm ủ men sôi". Nếu chế phẩm ủ men này cần được sử dụng trong sản xuất bia, thì cây hoa bia thường được bổ sung vào trước khi đun sôi.

Chế phẩm ủ men có thể cũng được sản xuất ra bằng cách ủ cây lúa mạch không chứa MMT, hoặc các bộ phận của nó, như cây lúa mạch không chứa MMT chưa được tạo mạch nha, hoặc các bộ phận của nó, với một hoặc nhiều enzym thích hợp, như các chế phẩm enzym, hoặc chế phẩm enzym, ví dụ, Ultraflo hoặc Cereflo (Novozymes). Chế phẩm ủ men này có thể cũng được sản xuất ra bằng cách sử dụng hỗn hợp gồm mạch nha và lúa mạch chưa được tạo mạch nha, hoặc các bộ phận của nó, hoặc chỉ lúa mạch chưa được tạo mạch nha, tùy ý bổ sung một hoặc nhiều enzym thích hợp vào trong quá trình tạo ra chế phẩm ủ men nêu trên, cụ thể là amylaza, glucanaza (tốt hơn là (1-4)- và/hoặc

(1-3,1-4)-(3-glucanaza), và/hoặc xylanaza (như arabinoxylanaza), và/hoặc proteaza, hoặc hỗn hợp enzym bao gồm một hoặc nhiều enzym nêu trên, ví dụ, bổ sung hỗn hợp enzym Onda Pro (Novozymes).

Lúa mạch theo sáng chế có thể được bổ sung vào dịch ngâm ủ mạch nha và được sử dụng làm chất bổ trợ. Đặc biệt hơn, lúa mạch theo sáng chế có thể được sử dụng cùng với mạch nha trong hỗn hợp bất kỳ để ngâm ủ, với việc có hoặc không có enzym tạo hạt nẫu bia bên ngoài, như, nhưng không chỉ giới hạn ở, các tỷ lệ lúa mạch:mạch nha = 100:0, hoặc 75:25, hoặc 50:50, hoặc 25:75.

Theo các phương pháp nấu bia truyền thống, chế phẩm ủ men được đun sôi trong thời gian dài, nói chung nằm trong khoảng từ 60 phút đến 120 phút, sở dĩ như vậy là do quá trình đun sôi mở rộng nhằm làm giảm lượng DMS, vì nó dễ bay hơi. Tuy nhiên, quá trình đun sôi mở rộng là không mong muốn vì một số lý do khác, vì quá trình đun sôi mở rộng đòi hỏi cung cấp nhiều năng lượng. Ngoài ra, việc đun sôi nêu trên có thể dẫn tới sự phát sinh mùi hôi thối không mong muốn của aldehyt Strecker. Theo sáng chế, chế phẩm ủ men với lượng DMS nhỏ có thể được sản xuất từ cây lúa mạch không chứa MMT thậm chí không cần quá trình đun sôi kéo dài. Như vậy, chế phẩm ủ men theo một phương án được ưu tiên của sáng chế được đun sôi tối đa trong 45 phút, thậm chí tốt hơn là tối đa trong 30 phút, tối đa là 15 phút chẳng hạn. Điều đáng chú ý là, thậm chí nếu chế phẩm ủ men sôi quá lâu, thì DMS có thể vẫn sinh ra từ DMSP trong thời gian đó. Đặc biệt, chế phẩm ủ men theo sáng chế duy trì được lượng DMS nhỏ hơn đáng kể so với chế phẩm ủ men thu được sau khi đun sôi chế phẩm ủ men theo quy trình thông thường.

Theo một phương án bổ sung của sáng chế, tốt hơn là chế phẩm ủ men không phụ thuộc vào cacbon đioxit bằng cách rửa sau bước đun sôi và trước bước lên men.

Tốt hơn, nếu chế phẩm ủ men theo sáng chế chứa DMS với lượng nhỏ hơn 30 ppb, tốt hơn là nhỏ hơn 25 ppb, tốt hơn nữa là nhỏ hơn 20 ppb, thậm chí tốt hơn nữa là nhỏ hơn 15 ppb, còn tốt hơn nữa là nhỏ hơn 10 ppb, thậm chí còn

tốt hơn nữa là nhỏ hơn 5 ppb, còn tốt hơn nữa nếu DMS không phát hiện được - và/hoặc chứa SMM với lượng nhỏ hơn 50 ppb, tốt hơn là nhỏ hơn 40 ppb, tốt hơn nữa là nhỏ hơn 30 ppb, thậm chí tốt hơn nữa là nhỏ hơn 20 ppb, vẫn tốt hơn nữa là nhỏ hơn 10 ppb, thậm chí còn tốt hơn nữa là nhỏ hơn 5 ppb, thậm chí tốt hơn nữa là SMM không phát hiện được.

Các sản phẩm thực vật, hoặc các bộ phận của chúng theo sáng chế có thể cũng là các chế phẩm thực phẩm, thức ăn, và chế phẩm nguyên liệu có hương thơm chứa cây lúa mạch mang sự đột biến trong gen mã hóa MMT làm mất hoàn toàn hoạt tính của MMT. Ví dụ, các chế phẩm thực phẩm có thể là, nhưng không chỉ giới hạn ở, các hạt lúa mạch được tạo mạch nha và không được tạo mạch nha, bột lúa mạch, bánh mì, cháo đặc, hỗn hợp ngũ cốc chứa lúa mạch, các sản phẩm chăm sóc sức khỏe, như đồ uống chứa lúa mạch, si rô lúa mạch, các chế phẩm lúa mạch tạo thành viên nhỏ, nghiền nhỏ hoặc được ép đùn. Các chế phẩm làm thức ăn, ví dụ, bao gồm các chế phẩm chứa các hạt, và/hoặc bột lúa mạch. Các chế phẩm nguyên liệu có hương thơm được mô tả trong phần dưới đây.

Sáng chế cũng liên quan đến hỗn hợp các sản phẩm thực vật được mô tả ở đây. Ví dụ, theo một khía cạnh sáng chế liên quan đến chế phẩm được sản xuất ra bằng hỗn hợp bao gồm:

- (i) chế phẩm chứa cây lúa mạch, hoặc các bộ phận của nó, mang đột biến trong gen mã hóa MMT làm mất hoàn toàn hoạt tính của MMT; và
- (ii) chế phẩm mạch nha được sản xuất từ các hạt không chứa MMT.

Theo một khía cạnh được ưu tiên, sáng chế liên quan đến đồ uống, tốt hơn là đồ uống thu được từ mạch nha, thậm chí tốt hơn là đồ uống có cồn, như bia chứa DMS với lượng nhỏ, trong đó đồ uống này được sản xuất ra bằng cách sử dụng lúa mạch hoặc các bộ phận của nó không chứa MMT.

Vì vậy, theo một phương án được ưu tiên, sáng chế liên quan đến đồ uống, tốt hơn nữa là đồ uống sản xuất được từ mạch nha, thậm chí tốt hơn nữa là đồ uống có cồn, như bia, đồ uống hoặc bia nêu trên chứa:

(i) DSM với lượng nhỏ hơn 30 ppb, tốt hơn là nhỏ hơn 25 ppb, tốt hơn nữa là nhỏ hơn 20 ppb, thậm chí tốt hơn nữa là nhỏ hơn 15 ppb, còn tốt hơn nữa là nhỏ hơn 10 ppb, thậm chí còn tốt hơn nữa là nhỏ hơn 5 ppb, còn tốt hơn nữa nếu không phát hiện được DSM; và/hoặc

(ii) SMM với lượng nhỏ hơn 50 ppb, tốt hơn là nhỏ hơn 40 ppb, tốt hơn nữa là nhỏ hơn 30 ppb, thậm chí tốt hơn nữa là nhỏ hơn 20 ppb, còn tốt hơn nữa là nhỏ hơn 10 ppb, thậm chí còn tốt hơn nữa là nhỏ hơn 5 ppb, thậm chí còn tốt hơn nữa nếu không phát hiện được SMM.

Tốt hơn là, đồ uống được sản xuất ra bằng cách lên men lúa mạch - hoặc các bộ phận của nó không chứa MMT, hoặc sản phẩm chiết của nó - ví dụ bằng cách lên men chế phẩm ủ men được sản xuất bằng cách sử dụng mạch nha được sản xuất từ lúa mạch không chứa MMT, riêng rẽ hoặc kết hợp với các hợp phần khác.

Tuy nhiên, theo các phương án khác của sáng chế, đồ uống này là đồ uống không lên men, ví dụ chế phẩm ủ men, tốt hơn nếu chế phẩm ủ men được sản xuất từ mạch nha không chứa MMT. Cũng nằm trong phạm vi của sáng chế là đồ uống nêu trên có thể được sản xuất từ cây lúa mạch chưa được tạo mạch nha hoặc các bộ phận của nó, tốt hơn là từ cây lúa mạch không chứa MMT hoặc các bộ phận của nó.

Đồ uống này có thể là đồ uống không chứa cồn, như bia không chứa cồn hoặc các loại đồ uống khác không chứa cồn, như đồ uống mạch nha không chứa cồn, như lúa mạch nấu mạch nha.

Tuy nhiên, tốt hơn nếu đồ uống nêu trên được sản xuất từ chế phẩm mạch nha chứa các hạt lúa mạch không chứa MMT. Tốt hơn nữa, nếu đồ uống nêu trên là bia. Bia này có thể là loại bia đã được các chuyên gia trong lĩnh vực này biết đến. Theo một phương án, ví dụ bia này là bia nhẹ. Tốt hơn, nếu bia này được nấu bằng cách sử dụng chế phẩm mạch nha chứa hạt lúa mạch không chứa MMT đã nảy mầm. Tuy nhiên, chế phẩm mạch nha này có thể chứa các hợp phần khác, ví dụ các hạt ngũ cốc khác đã nảy mầm hoặc chưa được nảy mầm,

như lúa mạch hoang, lúa mỳ, và/hoặc lúa mạch, hoặc nguyên liệu thô chưa nảy mầm chứa đường hoặc các chế phẩm thu được từ chất liệu thô được tạo mạch nha hoặc chưa được tạo mạch nha, kể cả các chế phẩm si rô.

Nói chung cần phải hiểu là trải qua thời gian DMS có thể được sinh ra từ DMSP, kể cả SMM. Vì vậy, thậm chí nếu ban đầu trong đồ uống không có hoặc có rất ít DMS, thì sau đó DMS có thể tích lũy theo thời gian. Tuy nhiên, một mục đích của sáng chế là đề xuất đồ uống chứa ít hoặc không chứa DMS - ngay cả sau khi cất giữ.

Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất đồ uống được sản xuất từ cây lúa mạch, như bia chứa DSM với lượng nhỏ hơn 30 ppb, tốt hơn là nhỏ hơn 25 ppb, tốt hơn nữa là nhỏ hơn 20 ppb, thậm chí tốt hơn nữa là nhỏ hơn 15 ppb, còn tốt hơn nữa là nhỏ hơn 10 ppb, thậm chí còn tốt hơn nữa là nhỏ hơn 5 ppb, còn tốt hơn nếu không phát hiện được DSM sau khi cất giữ ít nhất 1 tuần, tốt hơn là ít nhất 2 tuần, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 3 tuần, thậm chí tốt hơn nữa nếu ít nhất là 4 tuần, như nằm trong khoảng từ 1 tháng đến 3 tháng, ví dụ, nằm trong khoảng từ 3 tháng đến 6 tháng, như nằm trong khoảng từ 6 tháng đến 12 tháng, ví dụ, được cất giữ hơn 1 năm. Việc cất giữ bia được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 5°C đến 40°C, như nằm trong khoảng từ 15°C đến 40°C.

Hơn thế nữa, tốt hơn là đồ uống theo sáng chế khác biệt ở chỗ nó có tính chất về mùi vị tốt hơn. Cụ thể, tốt hơn là đồ uống theo sáng chế khác biệt ở chỗ nó có mùi vị thơm hơn và ngát hương hơn so với bia tương ứng "thông thường" (xem ví dụ 7; Fig. 6). Không bị ràng buộc bởi lý thuyết, sáng chế đề xuất lý luận là DMS và SMM với lượng nhỏ, thậm chí không chứa DMS và SMM đều làm gia tăng cảm nhận về hương vị thơm và đậm.

Tốt hơn, nếu hương vị thơm và ngát được xác định bằng hội đồng chuyên gia đánh giá hương vị bia. Theo các phương án nếu đồ uống là bia, thì tốt hơn nếu hội đồng chuyên gia đánh giá hương vị bia là người nếm bia chuyên nghiệp. Ở đây "hội đồng chuyên gia đánh giá hương vị bia" cũng được gọi là "hội đồng chuyên gia đánh giá hương vị bia được đào tạo", hoặc "hội đồng chuyên gia

đánh giá hương vị bia". Mặc dù có kiến thức tốt rằng chính DMS có tác động sâu sắc đến các tính chất về mùi vị của bia, nhưng một số hội đồng chuyên gia đánh giá hương vị bia có thể biểu hiện xu hướng đưa ra những đánh giá không chính xác về hương vị đa yếu tố giống như lưu huỳnh. Lý do này đơn giản là vì các chuyên gia đánh giá này vẫn “hiệu chỉnh” một cách không thích hợp khi chúng có kết quả khác nhau trong cảm nhận về hương vị. Trở ngại phức tạp này đã được giải quyết, như được mô tả ở đây, bằng cách xây dựng hội đồng chuyên gia đánh giá hương vị bia được đào tạo một cách toàn diện gồm ít nhất 9 người nếm thử bia, những người này có kỹ năng mang tính quyết định để đánh giá tính chất về mùi vị của este, rượu cao cấp, các hợp phần lưu huỳnh, và độ đặc của bia.

Do vậy, hội đồng chuyên gia đánh giá hương vị bia này phải gồm ít nhất 9 người, tốt hơn là có từ 9 đến 20 người, như có từ 9 đến 12 người, có 10 người chẳng hạn. Tốt hơn, nếu mỗi thành viên của hội đồng chuyên gia đánh giá hương vị bia phải được đào tạo một cách toàn diện, cụ thể là mỗi thành viên này phải có kỹ năng để đánh giá tính chất về mùi vị của este, rượu cao cấp, các hợp phần lưu huỳnh, và độ đặc của bia. Sau đó, mỗi thành viên của hội đồng chuyên gia đánh giá hương vị bia có thể đánh giá hương vị khác nhau và ghi vào phiếu theo thang điểm từ 0 đến 5. Tốt hơn, nếu những tính chất về hương vị được chọn từ nhóm bao gồm cấp mùi vị đắng, chất lượng vị đắng, độ đặc, độ cân bằng, độ tươi, tính dễ uống, hương thơm, độ este, độ rượu/dung môi, hương vị, đồ uống không có cồn, mùi vị nhựa, mùi vị mạch nha, vị cặn hạt, vị đường thẳng, vị cháy, lượng phenolic, lượng lưu huỳnh, độ axit, và độ ngọt.

Khi sử dụng phương pháp nêu trên, tốt hơn là đồ uống theo sáng chế đạt được điểm số cao hơn về ít nhất một, tốt hơn nếu ít nhất là hai, thậm chí tốt hơn nữa nếu ít nhất là 3, vẫn tốt hơn nữa nếu ít nhất là 4, thậm chí còn tốt hơn nữa nếu tất cả các tính chất về hương vị thơm/đậm được chọn từ nhóm bao gồm hương thơm, vị este, độ rượu/dung môi, lượng hoa, và đồ uống không có cồn so với đồ uống với lượng ethanol tương tự, và được sản xuất từ lúa mạch hoang, tốt

hơn là từ cv. Power, khi profin este/rượu của cả hai đồ uống được điều chỉnh để trở nên giống nhau, và các đồ uống này đều được sản xuất ra theo cách giống nhau.

Hơn thế nữa, bằng cách sử dụng phương pháp nêu trên, tốt hơn là đồ uống theo sáng chế có điểm số cao hơn về ít nhất một, tốt hơn nếu ít nhất là hai, thậm chí còn tốt hơn nữa nếu tất cả ba tính chất chung về độ cân bằng, độ tươi, tính dễ uống so với đồ uống với lượng etanol tương tự, và được sản xuất từ lúa mạch hoang, tốt hơn là từ cv. Power, khi profin este/rượu của cả hai đồ uống được điều chỉnh để trở nên giống nhau, và các đồ uống này đều được sản xuất ra theo cách giống nhau.

Bằng cách sử dụng phương pháp nêu trên, tốt hơn là đồ uống theo sáng chế có điểm số ít nhất là 0,1, tốt hơn nếu ít nhất là 0,2 điểm cao hơn về độ tươi và/hoặc độ este so với đồ uống với lượng etanol tương tự, và được sản xuất từ lúa mạch hoang, tốt hơn là từ cv. Power, khi profin este của cả hai đồ uống được điều chỉnh để trở nên giống nhau.

Trong trường hợp của sáng chế, profin este/rượu được xem là như nhau nếu 12 hợp chất nêu trong Bảng 1 được điều chỉnh đến các mức giống nhau (cũng xem ví dụ 7), tức là đồ uống chứa cùng một lượng của 12 hợp chất nêu trong Bảng 1, $\pm 20\%$. Lượng etanol được coi là như nhau nếu chúng giống nhau, $\pm 20\%$, tốt hơn là giống nhau, $\pm 10\%$.

Như vậy, tốt hơn là đồ uống theo sáng chế chứa lượng của 12 hợp chất được điều chỉnh (xem Bảng 1 và ví dụ 7) với lượng:

(i) Axetaldehyt	1,20 ppm $\pm 20\%$;
(ii) Etylformiat	0,24 ppm $\pm 20\%$;
(iii) Etylaxetat	23,40 ppm $\pm 20\%$;
(iv) Isobutylaxetat	0,05 ppm $\pm 20\%$;
(v) 1-Propanol	13,80 ppm $\pm 20\%$;
(vi) Isobutanol	9,60 ppm $\pm 20\%$;
(vii) Isoamylaxetat	3,43 ppm $\pm 20\%$;

(viii) 1-Butanol	0,23 ppm $\pm$ 20%;
(ix) Rượu isoamylic	52,00 ppm $\pm$ 20%;
(x) Etylhexanoat	0,13 ppm $\pm$ 20%;
(xi) n-Hexylaxetat	0,01 ppm $\pm$ 20%;
(xii) Etyloctanoat	0,33 ppm $\pm$ 20%.

khác biệt ở chỗ, nó có điểm số ít nhất là 1, tốt hơn nếu ít nhất là 2, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 3, thậm chí tốt hơn nữa nếu ít nhất là 4, còn tốt hơn nữa nếu ít nhất là 5, thậm chí còn tốt hơn nữa nếu tất cả các tính chất nêu dưới đây (nếu được xác định như được mô tả trong ví dụ 7):

- (i) "độ cân bằng" (điểm số ít nhất là 2,5, tốt hơn nếu ít nhất là 2,7);
- (ii) "độ tươi" (điểm số ít nhất là 2,5, tốt hơn nếu ít nhất là 2,7, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 2,9, còn tốt hơn nữa nếu ít nhất là 3,1);
- (iii) "tính dễ uống" (điểm số ít nhất là 2,5, tốt hơn nếu ít nhất là 2,7, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 2,9, còn tốt hơn nữa nếu ít nhất là 3,0);
- (iv) "hương thơm" (điểm số ít nhất là 2,5, tốt hơn nếu ít nhất là 2,7, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 2,9);
- (v) "độ este" (điểm số ít nhất là 2,5, tốt hơn nếu ít nhất là 2,7, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 2,9, còn tốt hơn nữa nếu ít nhất là 3,0);
- (vi) "độ rượu/dung môi" (điểm số ít nhất là 1,5);
- (vii) "lượng hoa" (điểm số ít nhất là 1,7, tốt hơn nếu ít nhất là 1,9);
- (viii) "đồ uống không có cồn" (điểm số ít nhất là 1,8);

tốt hơn nữa là các tính chất sau (nếu được xác định như được mô tả trong ví dụ 7):

- (i) "độ tươi" (điểm số ít nhất là 2,5, tốt hơn nếu ít nhất là 2,7, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 2,9, còn tốt hơn nữa nếu ít nhất là 3,1);
- (ii) "tính dễ uống" (điểm số ít nhất là 2,5, tốt hơn nếu ít nhất là 2,7, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 2,9, còn tốt hơn nữa nếu ít nhất là 3,0);
- (iii) "hương thơm" (điểm số ít nhất là 2,5, tốt hơn nếu ít nhất là 2,7, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 2,9);

(iv) "độ este" (điểm số ít nhất là 2,5, tốt hơn nếu ít nhất là 2,7, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 2,9, còn tốt hơn nữa nếu ít nhất là 3,0).

Vì vậy, tốt hơn là đồ uống theo sáng chế có:

(i) "độ tươi" điểm số ít nhất là 2,5 theo thang điểm từ 0 đến 5 nếu được đánh giá bởi hội đồng chuyên gia đánh giá hương vị bia; và/hoặc

(ii) "tính dễ uống" điểm số ít nhất là 2,5 theo thang điểm từ 0 đến 5 nếu được đánh giá bởi hội đồng chuyên gia đánh giá hương vị bia; và/hoặc

(iii) "hương thơm" điểm số ít nhất là 2,5 theo thang điểm từ 0 đến 5 nếu được đánh giá bởi hội đồng chuyên gia đánh giá hương vị bia; và/hoặc

(iv) "mùi vị este" điểm số ít nhất là 2,5 theo thang điểm từ 0 đến 5 nếu được đánh giá bởi hội đồng chuyên gia đánh giá hương vị bia;

với điều kiện profin este/rượu của đồ uống như được biểu thị trong ví dụ 7, Bảng 1 ở cột "không chứa MMT" mà hỗn hợp của hợp chất 1 và hỗn hợp của hợp chất 2 được bổ sung vào.

Cụ thể, sáng chế đề cập đến sự có mặt của DMS trong đồ uống có thể che mùi vị của este. Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất đồ uống có điểm số cao hơn về mùi vị este, trong đó mùi vị này được đánh giá bởi hội đồng chuyên gia đánh giá hương vị bia được đào tạo - tốt hơn là hội đồng chuyên gia đánh giá hương vị bia được đào tạo này gồm ít nhất 9 thành viên - so với đồ uống được sản xuất ra theo cách tương tự, nhưng chứa ít nhất 100 ppb DMS, như chứa từ 100 đến 200 ppb DMS, hoặc so với đồ uống được sản xuất ra theo cách tương tự, nhưng chứa ít nhất 50 ppb DMS, như chứa từ 50 đến 100 ppb. Tốt hơn, nếu điểm số nêu trên về vị este ít nhất là 0,5 điểm, tốt hơn nếu ít nhất là 0,7 điểm, ví dụ, ít nhất 0,9 điểm, cao hơn nếu vị este này được xác định theo thang điểm từ 0 đến 5 như được mô tả trên đây.

Sáng chế cũng liên quan đến các phương pháp sản xuất đồ uống nêu trên, tốt hơn là phương pháp này bao gồm các bước:

(i) tạo ra chế phẩm mạch nha chứa các hạt nảy mầm không chứa MMT;

(ii) xử lý chế phẩm mạch nha nêu trên thành đồ uống;

nhờ đó thu được đồ uống chứa DMS với lượng nhỏ hơn 30 ppb, tốt hơn là nhỏ hơn 25 ppb, tốt hơn nữa là nhỏ hơn 20 ppb, thậm chí tốt hơn nữa là nhỏ hơn 15 ppb, còn tốt hơn nữa là nhỏ hơn 10 ppb, thậm chí còn tốt hơn nữa là nhỏ hơn 5 ppb, còn tốt hơn nữa nếu không phát hiện được DMS.

Theo một phương án được ưu tiên, đồ uống này là bia. Trong trường hợp này, tốt hơn nếu bước xử lý bao gồm việc tạo ra chế phẩm ủ men từ chế phẩm mạch nha nêu trên, ví dụ, bằng phương pháp bất kỳ được mô tả trên đây, và bước lên men chế phẩm ủ men này.

Theo thuật ngữ chung, đồ uống có cồn - như bia chẳng hạn - có thể được sản xuất từ các hạt lúa mạch được tạo mạch nha và/hoặc chưa được tạo mạch nha. Ngoài cây hoa bia và men, mạch nha còn đóng góp vào mùi vị và màu của bia. Hơn thế nữa, mạch nha còn thực hiện chức năng làm nguồn đường lên men của các enzym. Quy trình chung về sản xuất bia dạng sơ đồ được thể hiện trên Fig. 8, trong khi phần mô tả chi tiết về các phương pháp tạo mạch nha và nấu bia có thể dựa trên, ví dụ, các công bố của Briggs và các đồng tác giả. (1981) và Hough và các đồng tác giả. (1982). Hiện có một số phương pháp được cập nhật thường xuyên để phân tích các sản phẩm lúa mạch, mạch nha, và bia. Ví dụ, các phương pháp này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, American Association of Cereal Chemists (1995), American Society of Brewing Chemists (1992), European Brewery Convention (1998), và Institute of Brewing (1997). Cần phải nhận thấy rằng nhiều quy trình đặc biệt được sử dụng đối với nhà máy bia nhất định, với những phương án rất quan trọng liên quan đến sở thích của người tiêu dùng địa phương. Phương pháp sản xuất bia bất kỳ như vậy có thể được sử dụng theo sáng chế.

Chế phẩm mạch nha của đồ uống nêu trên - ví dụ, kể cả bia, đồ uống từ mạch nha, hoặc chế phẩm ủ men không lên men - có thể thu được nhờ phương pháp bất kỳ được mô tả trên đây chẳng hạn. Chế phẩm ủ men có thể được sản xuất từ chế phẩm mạch nha nêu trên.

Tốt hơn, nếu bước thứ nhất của quy trình sản xuất bia từ chế phẩm ủ men kèm theo việc đun sôi chế phẩm ủ men này. Trong quá trình đun sôi, các hợp phần khác có thể được bổ sung vào, như si rô ngũ cốc hoặc cây hoa bia, trong đó cây hoa bia có thể tạo ra vị đắng thông thường và các đặc tính thơm ngon của bia. Việc đun sôi chế phẩm ủ men có thể cũng gây ra sự kết tụ giữa các polyphenol và các protein biến tính có thể kết tủa trong các giai đoạn tiếp theo của quy trình sản xuất bia. Ngoài ra, việc đun sôi chế phẩm ủ men có thể làm bay hơi các hợp chất dễ bay hơi, kể cả DMS. Tuy nhiên, như nêu trên, chế phẩm ủ men được sản xuất từ lúa mạch không chứa MMT chứa rất ít, hoặc không chứa DMS, do đó có thể làm giảm đáng kể thời gian đun sôi chế phẩm ủ men này. Sau khi được làm nguội, chế phẩm ủ men này được chuyển đến các bể lên men chứa men, tốt hơn là men nấu bia của các loài *Saccharomyces carlsbergensis*. Chế phẩm ủ men này sẽ được lên men trong khoảng thời gian thích hợp, nói chung là trong khoảng từ 1 đến 100 ngày. Trong quá trình lên men mở rộng một số ngày, đường được chuyển hóa thành rượu và CO₂, kèm theo sự phát triển của một số tính chất về mùi vị khác.

Tiếp theo, bia này có thể được xử lý tiếp, được làm lạnh chẳng hạn. Bia này có thể cũng được lọc và/hoặc được xử lý để trở thành bia nhẹ - quá trình phát triển hương thơm dễ chịu và không còn vị của men. Cũng có thể bổ sung các chất phụ gia. Hơn thế nữa, CO₂ có thể được bổ sung vào. Cuối cùng, bia này có thể được thanh trùng và lọc, trước khi được đóng chai hoặc hộp.

Các phương pháp hiện có khác nhau để xác định xem liệu có phải cây lúa mạch hoặc sản phẩm thực vật được sản xuất từ cây lúa mạch mang sự đột biến trong gen mã hóa MMT làm mất hoàn toàn MMT chức năng hay không. Nói chung, các sản phẩm thực vật sẽ chứa ít nhất một số ADN hệ gen từ cây dùng để sản xuất ra chúng. Vì vậy, mạch nha sẽ chứa lượng lớn ADN hệ gen, nhưng thậm chí lúa mạch hoặc các sản phẩm chiết mạch nha, như chế phẩm ủ men, có thể chứa ADN hệ gen từ lúa mạch hoặc mạch nha nêu trên. Ngoài đồ uống trên cơ sở lúa mạch, như bia, đồ uống này có thể chứa ADN hệ gen từ cây nêu trên.

Bằng cách phân tích ADN trong sản phẩm thực vật, có thể xác định được liệu có phải sản phẩm thực vật được sản xuất từ cây mang sự đột biến trong gen mã hóa MMT làm mất hoàn toàn MMT chức năng hay không. Ví dụ, sự đột biến nêu trên có thể là thể đột biến bất kỳ chứa gen MMT được mô tả trên đây trong phần "Mất enzym MMT chức năng". ADN hệ gen này có thể được phân tích bằng phương pháp hữu ích bất kỳ, như phương pháp xác định trình tự hoặc phương pháp trên cơ sở mở rộng, kể cả phương pháp trên cơ sở PCR. Nếu sự đột biến cụ thể trong gen MMT được giả định, thì có thể sử dụng phép phân tích tính đa hình, phép phân tích SNP chẳng hạn. Phép phân tích này có thể được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 13 và 17 dưới đây. Chuyên gia trong lĩnh vực này hoàn toàn có thể làm thích ứng phép phân tích SNP đặc biệt được mô tả trong các ví dụ này để dùng với các sự đột biến hoặc nguyên liệu khác.

Nếu các sản phẩm thực vật nêu trên chỉ được sản xuất từ cây lúa mạch mang sự đột biến trong gen mã hóa MMT, làm mất hoàn toàn MMT chức năng, thì sự có mặt của ARN thông tin MMT và/hoặc protein MMT của lúa mạch so với sự vắng mặt của của ARN thông tin MMT và/hoặc protein MMT của lúa mạch này có thể là chỉ báo liệu có phải sản phẩm thực vật này được sản xuất từ lúa mạch không chứa MMT hay không. Do đó, có thể thực hiện việc phân tích sản phẩm thực vật bằng phép thấm tách Western, hoặc phương pháp phân tích protein khác, hoặc bằng phương pháp RT-PCR, hoặc bằng phép thấm tách Northern, hoặc bằng các phương pháp phân tích ARN thông tin khác. Các phép phân tích như vậy là đặc biệt hữu ích nếu sản phẩm thực vật này là mạch nha.

SMM và DMS

Lượng SMM và DMS trong sản phẩm thực vật có thể được xác định bằng phương pháp thích hợp bất kỳ. SMM có thể được xác định chủ yếu như được mô tả trên đây trong phần "Trồng cây lúa mạch mất hoàn toàn MMT chức năng", trong đó mô tả việc xác định lượng SMM trong mẫu cây lúa mạch. Vì vậy, SMM có thể được xác định bằng cách liên kết nó với hợp chất, như hợp chất OPA, và xác định phổ huỳnh quang, ví dụ, bằng cách sử dụng thiết bị

UPLC. Để đo khối lượng, có thể xác định diện tích phổ sắc ký tương ứng với điểm đỉnh SMM.

Để đo chính xác hơn, cả lượng DMS và lượng DMSP (như SMM), hợp chất SMM được đo dưới dạng DMS sau khi hoạt hóa, tốt hơn là được xác định bằng cách sử dụng sắc ký khí mao dẫn có độ phân giải cao. Tổng lượng DMS trong các mẫu chế phẩm ủ men hoặc bia được xác định ở đây dưới dạng tổng lượng DMS tự do và dạng tiền chất của nó, được ký hiệu là DMSP. Bằng cách sử dụng cách xác định này, lượng DMSP của mẫu chế phẩm ủ men hoặc bia có thể được xác định mức chênh lệch giữa tổng lượng DMS (đo được trong mẫu đã đun sôi, tốt hơn là trong mẫu đã được đun sôi trong môi trường kiềm trong 1 giờ), và lượng DMS tự do (đo được trong mẫu chưa được đun sôi). Ví dụ 6 mô tả chi tiết các phương pháp ưu tiên để đo lượng DMS tổng và DMS tự do.

Gây đột biến bằng phương pháp hóa học

Để tạo ra cây lúa mạch mang đột biến trong gen mã hóa MMT, làm mất hoàn toàn hoạt tính của MMT theo sáng chế, phải tạo ra một lượng rất lớn các thể đột biến lúa mạch bằng phương pháp đột biến thích hợp bất kỳ, ví dụ bằng cách sử dụng phương pháp đột biến các hạt lúa mạch bằng phương pháp hóa học - phương pháp này là đã biết để tạo ra các đột biến ngẫu nhiên. Việc gây đột biến lúa mạch này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng hóa chất gây đột biến. Tuy nhiên, tốt hơn là nó được thực hiện bằng cách xử lý các hạt bằng NaN_3 (xem Fig.7), cho phép các hạt sống sót nảy mầm, tiếp theo phân tích các cây đời sau. Cây hình thành này sinh trưởng từ các hạt được gây đột biến, gọi là cây đời M0, cây này chứa các thể ghép khác kiểu đối với đột biến nhất định. Các cây đời sau được chọn sau khi tự thụ phấn gọi là đời M1, trong đó đột biến nhất định tách ra thành các thể khác kiểu và đồng hợp tử tương ứng.

Việc xử lý các hạt lúa mạch bằng NaN_3 là không tương đương với việc xử lý một tế bào lúa mạch đơn lẻ, vì các hạt này sau khi xử lý sẽ chứa một số tế bào không có đột biến và các tế bào có đột biến có ADN khác nhau. Các đột biến bị mất trong các tế bào dòng hệ phả không dẫn tới dòng tế bào mầm, có nghĩa mục

tiêu là đưa chất gây đột biến vào một số tế bào mà phát triển thành các mô sinh sản, góp phần vào việc phát triển đời M1.

Để đánh giá tổng thể hiệu quả gây đột biến, các thể ghép bạch tạng và cây bạch tạng có thể lần lượt được tính ở các đời M0 và M1. Điểm số của chất gây đột biến là hàm số của các cây sống sót đưa ra sự dự đoán về hiệu quả gây đột biến, trong khi điểm số của chất gây đột biến là hàm số của các hạt được xử lý lại cung cấp số đo tổng hợp về cả hiệu quả gây đột biến và làm chết hạt.

Đáng lưu ý là các tế bào có các cơ chế đảm bảo chất lượng hầu như ở mỗi bước biểu hiện gen, có khả năng điều tiết ảnh hưởng của các đột biến gây tổn thương. Một ví dụ đã được nghiên cứu kỹ trong sinh vật có nhân thực là sự phân rã ARN thông tin do đột biến đối nghĩa gây ra, được ký hiệu là NMD, mà cản trở sự tổng hợp của các protein bị cắt cụt sớm gây hại (Maquat và Carmichael, 2001; Wu và các đồng tác giả, 2007). Trong NMD, codon tận cùng được nhận dạng dưới dạng sớm bởi vị trí của nó tương ứng với các phần tử làm mất ổn định cuối. Các đột biến mà tạo ra các codon tận cùng sớm (đối nghĩa), được ký hiệu là PTC, đôi khi làm gia tăng như lượng các sản phẩm phiên mã được tách intron có thể thay thế lẫn nhau mà bỏ qua các đột biến tấn công, nhờ đó về tiềm năng tiết kiệm protein chức năng (Mendell và Dietz, 2001).

Nhân giống cây trồng

Sự phát triển của cây trồng có thể được thấy như là quá trình kéo dài bắt đầu với việc đưa vào dấu hiệu mới. Từ quan điểm của người nhân giống cây, đôi khi bước này có thể làm cho cây có profin tổng thể ít mong muốn hơn về các tính trạng nông học so với các loại hiện có bán trên thị trường. Do đó, theo một phương án được ưu tiên, mục đích của sáng chế là đề xuất cây lúa mạch hữu ích về mặt nông học mang đột biến trong gen mã hóa MMT, làm mất hoàn toàn MMT chức năng.

Ngoài dấu hiệu không chứa MMT, các yếu tố khác có thể cũng được cân nhắc trong lĩnh vực này để sản xuất ra giống lúa mạch tạo mạch nha có bán trên thị trường, kể cả, nhưng không chỉ giới hạn ở, năng suất hạt, kích thước hạt, và

các thông số liên quan đến việc tạo mạch nha hoặc nhân giống. Vì nhiều, nếu không phải tất cả, các dấu hiệu này đang trong quá trình kiểm soát di truyền, nên sáng chế cũng đề xuất cây lúa mạch hiện đại, đồng hợp tử, năng suất cao có thể được sản xuất từ việc lai chéo với cây lúa mạch không chứa MMT. Hạt của cây lúa mạch này tạo ra chất liệu thô mới không chứa enzym MMT chức năng. Nhà nhân giống cây lúa mạch có tự phối này sẽ có khả năng lai chéo cây lúa mạch không chứa MMT theo sáng chế với các cây lúa mạch khác, và sau đó chọn lọc và phát triển các đời sau có các dấu hiệu tạo ra cây trồng tốt hơn. Các đời sau như vậy cũng được coi là một phần của sáng chế. Theo cách khác, nhà nhân giống cây lúa mạch này có thể dùng các cây theo sáng chế để gây đột biến tiếp để nhà sản xuất tạo ra các cây trồng mới thu được từ cây lúa mạch không chứa MMT.

Cây lúa mạch theo sáng chế có thể được sử dụng trong nỗ lực nhân giống theo sơ đồ thích hợp bất kỳ.

Một mục đích khác của sáng chế là đề xuất cây lúa mạch có cùng một tính trạng nông học là dấu hiệu không chứa MMT. Do đó, sáng chế cũng hướng tới các phương pháp trồng cây lúa mạch mới không chứa MMT bằng cách lai chéo cây lúa mạch bố mẹ đời thứ nhất với cây lúa mạch bố mẹ đời thứ hai, trong đó cây thứ nhất hoặc thứ hai này là cây lúa mạch không chứa MMT. Ngoài ra, cả cây lúa mạch thứ nhất và thứ hai này đều là giống lúa mạch không chứa MMT. Vì vậy, phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp sau sử dụng giống lúa mạch không chứa MMT là một phần của sáng chế: sự tự phối, lai ngược, lai quần thể, và phương pháp tương tự. Tất cả các cây được sản xuất ra bằng cách sử dụng giống lúa mạch không chứa MMT làm đời bố mẹ đều nằm trong phạm vi của sáng chế, kể cả các cây lúa mạch phát triển từ các loại sản xuất được từ giống lúa mạch không chứa MMT. Lúa mạch không chứa MMT có thể được sử dụng để biến đổi tự phối trong các trường hợp khi ADN ngoại sinh được đưa vào và được biểu hiện trong cây hoặc mô cây không chứa MMT.

Các phương pháp lai ngược có thể được sử dụng cùng với sáng chế để

đưa dấu hiệu không chứa MMT của cây lúa mạch đã được gây đột biến vào giống khác, ví dụ, vào cây trồng khác, như vào chủng cv. Scarlett hoặc cv. Jersey - cả hai chủng này đều là cây lúa mạch tạo mạch nha đương thời, năng suất cao. Theo quy trình lai ngược chuẩn, giống gốc đáng quan tâm, tức là cây bố mẹ truy hồi đáng quan tâm, được lai chéo với giống thứ hai (tức là cây bố mẹ không truy hồi), mang một gen duy nhất đáng quan tâm cần được chuyển. Cây đời sau thu được không chứa MMT từ việc lai chéo này sau đó được lai chéo vào cây bố mẹ truy hồi, với quy trình này được lặp lại cho đến khi thu được cây lúa mạch trong đó chủ yếu là tất cả các đặc tính được quy định bởi cây bố mẹ không truy hồi được khôi phục trong cây được sản xuất ra, ngoài sự thiết lập di truyền được chuyển cho cây bố mẹ không truy hồi với dấu hiệu không chứa MMT. Cuối cùng, cây lai ngược sinh ra sau cùng là cây được tự phối để thu được cây đời sau bằng cách nhân giống thuần khiết, không chứa MMT.

Việc có được cây bố mẹ truy hồi thích hợp là được ưu tiên trong quy trình lai ngược thành công, có mục tiêu bao gồm việc đưa dấu hiệu không chứa MMT vào giống cây gốc. Để thực hiện điều này, sự thiết lập di truyền của giống cây truy hồi được cải biến với dấu hiệu không chứa MMT từ cây bố mẹ không truy hồi, trong khi vẫn giữ lại được hầu như toàn bộ các tính chất di truyền của loài gốc. Mặc dù các phương pháp lai ngược được đơn giản hóa khi tính chất di truyền này đang được chuyển do alen trội quy định, nhưng có thể lai ngược với dấu hiệu không chứa MMT là lặn.

Một cách để tăng tốc quy trình nhân giống cây trồng bao gồm bước nhân ban đầu các thể đột biến sinh ra bằng cách ứng dụng việc cấy mô và kỹ thuật tái sinh. Vì vậy, theo một khía cạnh khác sáng chế đề xuất các tế bào, là các tế bào mà khi sinh trưởng và phân hóa tạo ra cây lúa mạch với dấu hiệu không chứa MMT. Ví dụ, việc nhân giống có thể kèm theo sự lai truyền thống, sản xuất ra cây thu được từ bao phấn hữu thụ hoặc bằng cách sử dụng các phương pháp cấy tiểu bào tử.

Theo một phương án sáng chế cũng đề xuất cây lúa mạch không chỉ mang

đột biến trong gen mã hóa MMT, làm mất hoàn toàn hoạt tính của MMT mà còn có một hoặc nhiều đột biến hữu ích bổ sung. Ví dụ, các đột biến bổ sung này có thể bao gồm các đột biến trong gen của lúa mạch dịch mã lipoxygenaza-1 (LOX-1), như đột biến gây ra hoạt tính của LOX-1 ở mức thấp hơn (ví dụ, thể đột biến được mô tả trong Patent Mỹ No. 6660915 cấp cho Douma A.C. và các đồng tác giả), hoặc đột biến gây ra sự mất hoàn toàn chức năng của LOX-1, như thể đột biến bất kỳ trong số các thể đột biến nêu trong Patent Mỹ No. 7420105 hoặc trong công bố đơn quốc tế WO 2005/087934 của Breddam K. và các đồng tác giả, cụ thể các thể đột biến này chứa trình tự gen mã hóa LOX-1 theo SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:6 của Patent Mỹ số 7420105 cấp cho Breddam K. và các đồng tác giả.

Như được mô tả trong các patent và các đơn yêu cầu cấp patent nêu trên, mạch nha không chứa LOX-1 có thể tạo ra chất liệu thô cho việc sấy khô trong lò nhiệt độ thấp trong quá trình tạo mạch nha bởi chính nó. Tuy nhiên, thể đột biến kép gồm tổ hợp không chứa LOX-1-không chứa MMT sẽ tốt hơn và là rất hữu ích trong công nghiệp nhân giống vì hoạt tính của cả LOX-1 và MMT sẽ bị bất hoạt. Cây lúa mạch này có thể thu được bằng cách lai cây lúa mạch theo sáng chế với cây lúa mạch được mô tả trong Patent Mỹ số 7420105 hoặc đơn yêu cầu cấp patent quốc tế WO 2005/087934 của Breddam K. và các đồng tác giả.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ đưa ra ở đây minh họa các phương án được ưu tiên của sáng chế, và không được coi là giới hạn phạm vi của sáng chế.

Trừ khi có chỉ dẫn khác, các kỹ thuật sinh học phân tử cơ bản được thực hiện để xử lý axit nucleic, protein, và vi khuẩn như được mô tả trong ấn phẩm của Sambrook và Russel (2001).

Ví dụ 1

DMS che vị este của bia

Nói chung, việc mô tả đặc tính vị như lưu huỳnh được xem là khó khăn,

thậm chí trong số những người của hội đồng chuyên gia đánh giá hương vị bia nói chung. Thông thường, chuyên gia đánh giá bia sử dụng thuật ngữ thông dụng "vị lưu huỳnh" mà không phải là trị số vị lưu huỳnh có mang tính chuyên môn hoá hơn – ví dụ "mercaptan", "hydro sulfua" và "DMS" - để xác định trị số của vị lưu huỳnh.

Sau khi thành lập hội đồng chuyên gia đánh giá hương vị bia mở rộng gồm 9 người đánh giá vị bia, các thành viên đánh giá vị bia được đào tạo một cách toàn diện để theo dõi mùi thơm của các hợp phần chứa lưu huỳnh, đã ngạc nhiên khám phá ra rằng việc bổ sung các hợp phần lưu huỳnh có ảnh hưởng mạnh đến sự cảm nhận các hợp phần có mùi thơm, tính chất dẫn đến điểm số thấp hơn về vị este chẳng hạn và về độ đặc của bia.

Trong các thử nghiệm khác, DMS được chọn để đào tạo hội đồng chuyên gia đánh giá hương vị bia này. Các mẫu bia, được bổ sung bằng hợp phần chứa lưu huỳnh nồng độ cao, được trình cho hội đồng chuyên gia đánh giá hương vị bia này, những người được hỏi về vị bia và cho điểm các đặc tính về "độ đặc", "vị este", và "DMS", theo thang điểm từ 0 (không có mặt) đến 5 (nhiều nhất). Mỗi loạt thử nghiệm bao gồm một bia chuẩn có bán trên thị trường và hai mẫu vô danh, dùng cho các chuyên gia đánh giá.

Trên Fig.1B minh họa các kết quả về điểm số trung bình từ các loạt thử nghiệm bao gồm các mẫu bia lần lượt được bổ sung bằng este và este/DMS. Kết quả không ngờ là việc bổ sung DMS, nếu được kết hợp với este, có ảnh hưởng âm tính đến điểm số vị este nhận thấy được so với điểm số nhận được bằng cách bổ sung chỉ bằng este. Tương tự, trị số độ đặc của bia giảm. Điều không ngạc nhiên là, bổ sung bằng DMS làm gia tăng điểm số về tính chất này.

Các kết quả nêu trên chứng minh rằng khả năng của các chuyên gia đánh giá một thành phần hương vị duy nhất dường như là phụ thuộc rất nhiều vào “bối cảnh hương vị” như xác định được bởi các thành phần hương liệu khác.

Sự phát hiện đáng ngạc nhiên từ các thử nghiệm về vị được tóm tắt trên Fig.1B, cũng tạo cơ sở cho sáng chế bằng cách đề xuất đồ uống với lượng DMS

nhỏ, và các thể đột biến của lúa mạch hữu ích cho việc sản xuất ra đồ uống này, tức là thể đột biến của lúa mạch này không có khả năng tổng hợp SMM - sao cho sử dụng chất liệu thô tương ứng trong việc sản xuất đồ uống không chỉ có thể cho phép sản xuất ra sản phẩm với lượng DMS rất nhỏ hoặc không chứa DMS, mà còn với triển vọng về các cải thiện đối với trị số của vị este.

Ví dụ 2

Thiết lập thử nghiệm sàng lọc, phương pháp 1

Các hạt được thu gom từ cây lúa mạch chủng cv. Prestige và cv. Sebastian được ủ riêng biệt với chất gây đột biến NaN_3 , tiếp theo các chi tiết thử nghiệm được Kleinhofs và các đồng tác giả (1978) đề xuất. Quy trình được đã biết chọn vì tiềm năng của nó trong việc tạo ra sự đột biến điểm trong AND di truyền của lúa mạch.

Trong các thử nghiệm này, các hạt đã được gây đột biến đời M1 được nhân giống trên các luống của cánh đồng qua hai đời sau đó, rồi cuộc là cho năng suất cao ứng với các cây đồng hợp tử đời M3 nhằm mục đích sàng lọc. Các hạt đã được gây đột biến đời M3 được kỳ vọng là chứa các thể đột biến với tần suất 0,9-2,3 cho 10.000 hạt (Kleinhofs và các đồng tác giả, nêu trên). Lưu ý là các hạt đời M2 không được sàng lọc.

Điều thú vị là, sáng chế mô tả quy trình sàng lọc năng suất cao để phát hiện các hạt lúa mạch đã được gây đột biến đời M3 không có hoạt tính MMT, không tạo ra sự tổng hợp SMM có thể phát hiện được trong khi tạo mạch nha. Vì vậy, người nộp đơn này đã phát hiện ra rằng, SMM chủ yếu tích tụ trong bao lá mầm và lá gốc của hạt lúa mạch đang nảy mầm, và việc phát hiện SMM có thể không thực hiện được bằng cách chiết các axit amin ra khỏi các mô lá của các hạt nảy mầm 4 ngày tuổi được nghiền nhỏ, tiếp theo cho các axit amin này phản ứng với OPA để tạo ra các sản phẩm cao huỳnh quang (xem Fig. 2).

Trong điều kiện thực tế, mỗi thử nghiệm được thực hiện bằng cách cho hai hạt nảy mầm từ mỗi trong số 94 thể đột biến tiềm năng và hai cây hoang với một tờ giấy whatman #1 làm giấy lọc (296x20,9 mm). Thử nghiệm này được lặp

lại đối với nhiều hạt đột biến tiềm năng (xem phần dưới đây). Ở thời điểm bắt đầu nảy mầm, bổ sung 25 mL nước máy vào hộp chất dẻo nêu trên, sau đó bổ sung 15 mL nước máy vào ngày nảy mầm thứ 2. Sau khi nảy mầm được 4 ngày, các mô lá có chiều dài 1-3 cm được chuyển tới các đĩa cất giữ (ABgene), trong đó mỗi trong số 96 lỗ với dung tích 1,2 mL chứa hạt thủy tinh đường kính 5 mm và 500 μ L hỗn hợp gồm nước:metanol:clorofom theo tỷ lệ 12:5:6 (theo thể tích). Sau đó, đĩa này được lắc trong 45 giây với tần số 30 Hz trong máy trộn thí nghiệm MM 300 (Retsch). Tiếp theo, đĩa này được chuyển tới máy ly tâm (Rotanta 460R, Hettich), và được ly tâm với tốc độ 4000 vòng/phút trong 15 phút ở nhiệt độ trong phòng để làm kết tủa chất không hòa tan. 10 μ L chất nổi trên bề mặt được đưa tới đĩa 96 lỗ đang cất giữ (Waters, cat no. 186002481), và được trộn với 200 μ L H₂O và 60 μ L dung dịch phản ứng chứa hỗn hợp gồm chất phản ứng OPA (Sigma, cat.no. P7914): axit 3-mercaptopropionic (Aldrich, cat.no. M5801) theo tỷ lệ 15000:45 (theo thể tích). Hỗn hợp này được ủ ở 4°C trong ít nhất 10 phút để thu được dẫn xuất định lượng của mẫu các axit amin với OPA. Bằng cách sử dụng thiết bị UPLC trên cơ sở nước được trang bị đầu dò huỳnh quang, tách 2 μ L hỗn hợp được tạo dẫn xuất này trên cột 2,1 x30-mm C18 Gemini chứa các hạt cỡ 3 μ m (Phenomenex, cat.no. 00A-4439-80), nhờ sử dụng gradien rửa giải bằng cách trộn pha động A (dung dịch đệm NaH₂PO₄ 40 mM, được điều chỉnh đến độ pH= 7,8) và pha động B [dung dịch chứa axetonitril:metanol:nước theo tỷ lệ 45:45:10 (theo thể tích) như được mô tả trong ấn phẩm: (Phenomenex, 2006)]. Việc kích thích các dẫn xuất OPA rửa giải được ở bước sóng 340 nm, trong khi bức xạ ánh sáng đo được ở bước sóng 450 nm. Ví dụ về phổ sắc ký được thể hiện trên Fig. 3A để minh họa profin rửa giải của axit aspartic (Asp), axit glutamic (Glu), asparagin (Asn), serin (Ser) và SMM. Vì mục đích của đề án tổng thể là nhận dạng cây lúa mạch không có khả năng tổng hợp SMM, tức là cây có điểm đỉnh trên phổ sắc ký tương ứng là rất nhỏ hoặc tốt hơn là không có, nên hợp chất SMM được đưa vào.

Thiết lập thử nghiệm sàng lọc, phương pháp 2

Song song với các thử nghiệm được mô tả trên đây theo sáng chế, các cố gắng được thực hiện để thiết lập rất nhanh phương pháp sàng lọc cho việc nhận dạng cây mầm lúa mạch không chứa enzym MMT hoạt tính. Dựa trên thực tế là cây mầm này có thể sinh trưởng với sự có mặt của 250 μM Na-selenit, với điều kiện cây này chứa hoạt tính MMT để làm chuyển hóa Na-selenit, việc sàng lọc được thiết kế để cho điểm bằng mặt với cây mầm có sự sinh trưởng giảm với sự có mặt của Na-selenit ở nồng độ nêu trên. Trong điều kiện thực tế, sử dụng 22704 bông – mỗi bông có 20-30 hạt lúa mạch chủng cv. Prestige được gây đột biến bởi NaN_3 , đời M3, được đặt vào các khay nhựa chứa đầy môi trường sinh trưởng chuẩn Vermiculite được bổ sung 250 μM Na-selenit. Các hạt của những bông này được phép nảy mầm và phát triển thành cây mầm cao ~15 cm. Tổng cộng có 812 cây khác biệt do sự sinh trưởng giảm, tức cây mầm có chiều cao <15 cm, được chuyển tới đất mới và được phép phát triển tiếp. Tuy nhiên, không một cây nào trong số các cây này được phát hiện là có hoạt tính MMT giảm, như xác định được bằng cách so sánh với lượng SMM kiểu dại. Do đó, phương pháp sàng lọc được mô tả trên đây không tạo thể đột biến, và do đó được chấm dứt.

Ví dụ 3

Các thể đột biến tiềm năng

Tổng cộng có 10248 và 3858 hạt của lúa mạch chủng cv. Prestige và cv. Sebastian lần lượt được gây đột biến bởi NaN_3 được sàng lọc về lượng SMM (xem phương pháp 1 trong Ví dụ 2), với mục đích nhận dạng hạt có sự giảm mạnh về lượng SMM nêu trên khi so với các hạt kiểu dại. Chỉ có 2 thể đột biến tiềm năng đời M3 được nhận dạng, cụ thể là các hạt của mẫu No. 8063 (được tạo ra từ chủng cv. Prestige, và dưới đây được ký hiệu là thể đột biến 8063, ký hiệu này cũng được sử dụng đối với các hạt của các đời tiếp sau; Fig. 3B), và các hạt của mẫu No. 14018 (được tạo ra từ chủng cv. Sebastian, và dưới đây được ký hiệu là thể đột biến 14018, ký hiệu này cũng được sử dụng đối với các hạt của các đời tiếp sau; được minh họa trên Fig. 3B). Các hạt của mỗi thể đột biến được nhân giống tới đời M4, sau đó thu hoạch, và cuối cùng được thử

nghiệm lại. Kết quả này được xác minh là các hạt của thể đột biến 8063 và thể đột biến 14018 có lượng SMM cực nhỏ, khả năng hoàn toàn không chứa SMM.

Trong thử nghiệm riêng biệt, phép thấm tách Western được sử dụng để xác minh rằng thể đột biến 8063 và thể đột biến 14018 thiếu enzym MMT. Các hạt của các thể đột biến và cây hoang tương ứng được cho nảy mầm trong bóng tối trong 4 ngày trên giấy lọc nhúng trong nước. Một hạt của mỗi mẫu được chuyển tới ống Eppendorf chứa 250 μL H_2O , và được đồng nhất hóa bằng cách sử dụng thiết bị đồng nhất hóa. Sau khi ly tâm kéo dài 10 phút với tốc độ 13000 vòng/phút, hỗn hợp 15 μL phần chiết dạng lỏng với 5 μL dung dịch đệm chứa mẫu SDS được cô 4 lần theo tiêu chuẩn. Bằng cách sử dụng phương pháp miễn dịch tương tự như được mô tả trong Ví dụ 12, và một phần kháng thể kháng MMT tương tự được mô tả chi tiết trong ví dụ nêu trên, các protein của phần chiết mẫu các hạt nảy mầm nêu trên được tách điện di bởi kích thước và được đặt vào phép thấm tách Western. Sự vắng mặt của dải protein 120-kDa được nhuộm màu, tương ứng với MMT, được đánh dấu đối với các phần chiết được tách theo kích thước của thể đột biến 8063 và thể đột biến 14018. Tuy nhiên, dải protein 120 kDa này được nhìn thấy rõ trong các phần chiết của các hạt kiểu dại đã nảy mầm (Fig. 3C). Tập hợp các kết quả của phép thấm tách Western với sự vắng mặt của SMM trong các phần chiết thể đột biến 8063 và thể đột biến 14018, nhưng có mặt SMM trong các phần chiết của các hạt kiểu dại (xem Fig.3B), chứng tỏ rằng thể đột biến 8063 và thể đột biến 14018 là các thể đột biến không có dấu hiệu về MMT.

Ví dụ 4

Đo hoạt tính MMT của thể đột biến 8063

Enzym MMT xúc tác quá trình chuyển hóa nhóm metyl từ SAM thành Met, tạo ra SMM (xem Fig.1B). Bằng cách sử dụng [^3H]SAM làm chất nền, trong đó nhóm metyl được gắn nhãn triti, việc chuyển nhóm metyl nêu trên có thể được theo dõi nhờ đếm nhấp nháy sau khi loại bỏ phần còn lại của [^3H]SAM nhờ than hoạt tính. Hợp chất này liên kết với chất nền, nhưng không phải chất

nền mới được tổng hợp, được gắn nhãn sản phẩm SMM (Pimenta và các đồng tác giả, 1995). Điều này cho phép xác định các hoạt tính của MMT và lượng SMM, lượng SMM được xác định như được mô tả trong ví dụ 2, trong các phần chiết của 15 mầm của mỗi thể đột biến 8063 và chủng cv. Prestige (Fig.4). Khảo sát dữ liệu đã xác minh rằng sự tạo ra SMM trong các hạt kiểu dại được xúc tác bởi MMT, không còn tính chất này trong các hạt của thể đột biến 8063.

Ví dụ 5

Tạo mạch nha và nấu bia các hạt không chứa MMT thể đột biến 8063 ở quy mô thử nghiệm

Các thử nghiệm tạo mạch nha và nấu bia bằng mạch nha từ các hạt của thể đột biến 8063 và mạch nha tham chiếu từ chủng cv. Power kèm theo các bước:

- (i) Cho nảy mầm, kể cả ngâm, để tạo ra mạch nha xanh, đôi khi tiếp theo sấy khô trong lò để thu được mạch nha khô;
- (ii) Tạo ra chế phẩm ủ men;
- (iii) Tách chế phẩm ủ men;
- (iv) Đun sôi chế phẩm ủ men;
- (v) Lên men chế phẩm ủ men với men *Saccharomyces carlsbergensis*;
- (vi) Làm nhẹ bia;
- (vii) Lọc để làm sáng bia; và
- (viii) Đóng chai bia.

Đối với cả thể đột biến 8063 và chủng cv. Power (mẫu tham chiếu), sử dụng 30 kg mạch nha để nấu bia. Các mẫu mạch nha được nghiền, và sau đó bổ sung 150 L nước máy vào mỗi mẫu. Quá trình ngâm ủ được thực hiện ở 60°C trong 20 phút, tiếp theo nâng nhiệt độ trong 5 phút đến 65°C, ở nhiệt độ này tiếp tục ủ trong 55 phút. Sau đó, việc ngâm ủ được thực hiện để nâng nhiệt độ lên 78°C trong 15 phút, kết thúc bước ngâm ủ này sau khi ủ 5 phút.

Các bước nấu bia tiếp theo bao gồm bước lọc chế phẩm ủ men, bước đun sôi kéo dài trong 1 giờ, và bước để sôi kéo dài 1 giờ, bước tách trong dòng nước

xoáy. Bước lên men kéo dài 7 ngày, làm nhẹ, và rót đầy bia thành phẩm vào các chai thủy tinh màu xanh được thực hiện theo các quy định đối với thực tế nấu bia thông thường, ví dụ như được Briggs và các đồng tác giả (1981), và Hough và các đồng tác giả (1982) đã mô tả. Tổng cộng, thu được 100 chai dung tích 33 cL bia sản xuất được từ mạch nha kiểu đại và mạch nha của thể đột biến.

Ví dụ 6

Lượng DMS và DMSP trong bia được làm từ mạch nha không chứa MMT

Bia được nấu từ mạch nha không chứa MMT và từ chủng cv. Power như được mô tả trong ví dụ 5. Trong các quá trình tạo mạch nha và nấu bia, lượng DMS tự do và DMSP được xác định trong mạch nha xanh và mất hoàn toàn hoạt tính MMT khô (Fig. 5A), cũng như trong chế phẩm ủ men ngọt và sôi tương ứng, và cũng như trong bia thành phẩm (Fig. 5B).

Lượng DMS và DMSP chủ yếu được xác định như được Hysert và các đồng tác giả (1980) mô tả, với việc phát hiện lưu huỳnh đặc trưng bằng cách sử dụng sắc ký khí khoảng đầu trên 350B Sulfur Chemiluminescence Detector (Sievers). Việc lấy mẫu được thực hiện bằng cách sử dụng thiết bị tự động (HS-40 Automated Headspace Sampler, Perkin Elmer). Tổng lượng DMS, tức là tổng lượng DMS tự do và DMSP trong chế phẩm ủ men và trong các phần chiết mạch nha xanh và mạch nha khô, thu được bằng cách đun sôi các mẫu tương ứng trong điều kiện kiểm trong 1 giờ. Sau đó, các mẫu này được thử nghiệm bằng sắc ký khoảng đầu để xác định lượng DMS. Như được mô tả trên đây, sự khác biệt giữa tổng lượng DMS trong các mẫu được đun sôi và DMS tự do trong các mẫu chưa được đun sôi tương ứng được xác định bằng lượng DMSP của mẫu. Lượng DMS tự do trong bia được xác định chủ yếu như đã tiến hành trong chế phẩm ủ men (Hysert và các đồng tác giả, nêu trên).

Ví dụ 7

Thử vị bia nấu bằng mạch nha không chứa MMT

Cố gắng thành lập hội đồng chuyên gia đánh giá hương vị bia để đánh giá

bia được sản xuất ra ở quy mô thử nghiệm được nấu bằng mạch nha không chứa MMT, profin vị được thực hiện ở bia được đo chứa 4 ppb DMS. Để làm đối chứng sử dụng bia bình thường chứa 76 ppb DMS, bia này sản xuất được bằng cách sử dụng mạch nha của cv. Power.

Trước khi phân tích vị, profin của este bia và rượu cao cấp thu được nhờ phân tích sắc ký khí. Bia chứa mạch nha không chứa MMT có lượng nhỏ hơn ở 3 trong số 12 hợp chất được phân tích (Bảng 1). Trong thử nghiệm vị thứ nhất, Hỗn hợp 1 - gồm etylaxetat, isoamylaxetat, và etyloctanoat – được bổ sung thành bia được nấu bằng mạch nha không chứa MMT, để đảm bảo rằng hai bia nhẹ có cùng lượng các hợp chất hoạt tính vị đóng góp vào profin este tiêu chuẩn (xem Bảng 1). Mục đích của thử nghiệm thứ hai là làm cho bia có trị số este cao với hương vị gia tăng. Do đó, Hỗn hợp 2 - gồm isoamylaxetat, etylhexanot, và etyloctanoat - được bổ sung thành bia từ mạch nha chủng cv. Power (Bảng 1), trong khi bia từ mạch nha không chứa MMT được bổ sung bằng cả Hỗn hợp 1 và Hỗn hợp 2.

Sau đó, bia được mô tả trên đây được thử nghiệm bởi hội đồng gồm 10 chuyên gia đánh giá lớn, hội đồng này đánh giá 20 thuộc tính hương vị đặc biệt - mỗi thuộc tính theo thanh điểm từ 0 đến 5 (Fig.6).

Như được thể hiện một cách chi tiết trên Fig.6A đối với bia có độ este cao, có một yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến sự cảm nhận hương vị thơm trong "bia có lượng DMS rất nhỏ" nấu được từ mạch nha không chứa MMT, so với bia thông thường được bổ sung tới lượng tương tự. Các điểm số cao hơn được thấy đối với tất cả các hương vị thơm được đánh giá. Thậm chí trong bia nấu từ mạch nha không chứa MMT được bổ sung để có profin este bình thường (Fig. 6B), không thấy sự cảm nhận gia tăng về hương liệu thơm, điều này là cho thấy rằng lượng DMS nhỏ tạo ra hiệu ứng tích cực đối với sự cảm nhận các hợp chất làm cho bia thơm. Một sự giải thích về hiện tượng đó là đơn giản rằng DMS trong bia che vị đắng của các hương vị tạo mùi thơm cho bia, là các yếu tố quan trọng khi độ tươi của bia được đánh giá.

Bảng 1: Thử nghiệm độ este và độ cồn của bia

Nồng độ của các hợp chất tạo vị

Hợp chất tạo vị	Mạch nha loại		Hợp chất tạo vị được bổ sung	
	cv. Power	không chứa MMT	Hỗn hợp 1	Hỗn hợp 2
	<i>Ppm</i>			
Axetalđehyt	1,00	1,20		
Etylformiat	0,26	0,24		
Etylaxetat	23,40	19,40	4,00	
Isobutylaxetat	0,06	0,05		
1-Propanol	13,80	13,80		
Isobutanol	9,00	9,60		
Isoamylaxetat*	2,05	1,43	0,50	1,50
1-Butanol	0,21	0,23		
Rượu Isoamylic**	59,00	52,00		
Etylhexanoat	0,09	0,08		0,05
n-Hexylaxetat	0,01	0,01		
Etyloctanoat	0,20	0,13	0,07	0,13

*) tổng nồng độ của 2-metyl-butyl axetat và isoamylaxetat.

**) tổng nồng độ của 2-metyl-1-butanol và rượu isoamylic.

Ví dụ 8

Xác định trình tự gen dịch mã MMT trong cây lúa mạch, chủng cv. Prestige

Với mục đích thiết lập sự đa dạng di truyền giải thích sự chênh lệch về hoạt tính của MMT giữa cây lúa mạch hoang và cây lúa mạch đột biến, nỗ lực đầu tiên là xác định trình tự ADN mở rộng các codon bắt đầu và kết thúc của gen lúa mạch tương ứng. Để xác định trình tự gen chưa biết trước đó của gen MMT của lúa mạch, bước thứ nhất là tinh chế trình tự gen ADN (gADN) từ lá của cây lúa mạch giống 6 ngày tuổi, chủng cv. Prestige, theo hướng dẫn của nhà cung cấp về sự phân lập ADN của cây (Roche, cat.no. 1667319).

Tiếp theo, các đoạn môi oligonucleotit được dự định để liên kết với trình

tự ADN bổ trợ mã hóa MMT (ngân hàng gen (GenBank) số hiệu lưu giữ AB028870; SEQ ID NO:1). Bằng cách sử dụng gADN làm khuôn mẫu, các bộ mở rộng PCR chuẩn được thực hiện với 6 đoạn mồi khác nhau, các trình tự ADN này được liệt kê trong Bảng 2. Từng đôi một, các đoạn mồi được phát hiện để ghép đôi trong các exon 1 (kể cả và đầu cuối của codon bắt đầu dịch mã) và 2, các exon 2 và 4, các exon 4 và 5, các exon 5 và 9, các exon 9 và 11, và các exon 11 và 12 (kể cả và đầu trên của codon kết thúc sự dịch mã). Năm trong số sáu phản ứng nêu trên tạo ra các đoạn ADN mở rộng các exon 2-4, các exon 4-5, các exon 5-9, các exon 9-11, và các exon 11-12 (xem Fig.9). Một phản ứng cũng được coi là tạo ra đoạn ADN mở rộng codon bắt đầu dịch mã và exon 2 (tức là phản ứng với đoạn mồi No.1 như được liệt kê trong bảng 2 và Fig. 9), nhưng chỉ quan sát thấy phản ứng giả. Mặc dù đối với khó khăn này vẫn là điều khó hiểu, nhưng lượng lớn đáng kể của các bazơ G và C trong đoạn gen đáng quan tâm có thể là nguyên nhân gây ra sự thất bại trong quá trình mở rộng trình tự chính xác. Kết quả là, rất nhiều phần phụ của phản ứng PCR có bán trên thị trường – được yêu cầu bảo hộ để tạo điều kiện thuận lợi cho việc mở rộng các vùng gen giàu G-C - được dùng trong các thử nghiệm để mở rộng đầu cuối của đoạn AND, nhưng vẫn chứa codon bắt đầu của gen mã hóa MMT của lúa mạch. Mặc dù rất nhiều thử nghiệm, tất cả các nỗ lực sử dụng mẫu gADN đều thất bại về việc mở rộng đoạn được quy định bởi các đoạn mồi trong phản ứng 1 như được liệt kê trong Bảng 2.

Cùng với các thử nghiệm mở rộng gADN, cũng đã khảo sát ADN bổ trợ được tạo ra từ ARN của lá cây lúa mạch mầm có thể cấu thành khuôn mẫu chức năng để mở rộng trình tự gen đối với MMT có exon 1 gây rối loạn. Do đó, tổng lượng ARN được chiết và tinh chế từ các lá mỏng của cây lúa mạch mầm 4 ngày tuổi, chủng cv. Prestige, bằng cách sử dụng các hợp phần và hướng dẫn của bộ FastRNA ProGreen Kit (Q-BIOgene, cat.no. 6045-050). Các phần ARN này được sử dụng trong các phản ứng RT-PCR chuẩn 8x2 [tức là 8 tổ hợp của các cặp đoạn mồi (Bảng 3), mỗi tổ hợp với 2 dung dịch đệm phản ứng], như được mô tả một cách chi tiết trong hướng dẫn đối với kit OneStep RT-PCR (Qiagen,

cat.no. 210212). Các đoạn được tách ra trên agarosa gel 1 %, với thử nghiệm tiếp theo đã khám phá ra rằng các sản phẩm phản ứng có thể thu được chỉ bằng cách sử dụng dung dịch đệm 1 của kit nêu trên. Các dải ADN đáng quan tâm sau đó được tinh chế bằng cách sử dụng kit chiết gel QiaexM (Qiagen, cat.no. 20051). Tách các đoạn mở rộng RT-PCR bằng đoạn mồi No. 7, 10, và 11 (xem Bảng 3), với sự có mặt của dung dịch Q của bộ dụng cụ RT-PCR. Các đoạn ADN trong trường hợp này cũng được tinh chế. Tiếp theo lồng các đoạn ADN riêng lẻ vào vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen, cat.no. K4500-01), và chuyển nhiễm các tế bào E. coli bằng cấu trúc này, xác định được các trình tự ADN tương ứng của plasmit đáng quan tâm.

Đồng thời, các nỗ lực tổng hợp được mô tả trên đây kết tinh trong bộ trình tự gen mở rộng các codon bắt đầu và kết thúc sự dịch mã của gen MMT đối với lúa mạch chủng cv. Prestige (SEQ ID NO:3). Thông qua việc so sánh trình tự ADN hỗ trợ với các trình tự gen, tức là việc so sánh SEQ ID NO:3 với SEQ ID NO:1, đã xác định được rằng gen MMT đối với lúa mạch như được minh họa trên Fig. 9, chứa 12 exon (trong tổng số 3267 bp) được tách bởi 11 intron (trong tổng số 3192 bp). Trình tự axit amin thu được đối với MMT của chủng cv. Prestige được thể hiện trên Fig.10, và được liệt kê là SEQ ID NO:6. Ngoại trừ Pro157→Ala và Met985→Tyr trong trình tự axit amin thu được nêu trên đối với MMT của chủng cv. Prestige, việc so sánh với trình tự axit amin của chủng cv. Haruna Nijo (ngân hàng gen (GenBank) số hiệu lưu giữ AB028870; SEQ ID NO:2) cho thấy sự nhận dạng hoàn toàn (Fig.11).

Bảng 2: Các đoạn mồi để mở rộng trình tự gen mã hóa MMT của lúa mạch

Bộ đoạn mồi số	Các đầu của sản phẩm PCR*	Đoạn mồi xuôi (trình tự ADN 5'→3') **	Đoạn mồi ngược (trình tự ADN 5'→3')***
1	1-1462	ATGGCTGCGGCGGGGACGTGG (SEQ ID NO: 37)	CCTTCGAAGGGCACCACCTTTCTGC (SEQ ID NO:43)
2	1268-2214	AGGATTCCAGCAAAGAAAGAAGC (SEQ ID NO:38)	CTGGAGAGCACAGTAGTTGCTCAAG (SEQ ID NO: 44)
3	2118-3075	GATTCTTAACCCCAATCCAGAGGC (SEQ ID NO: 39)	CTGCATAATTTTGTGTTGCCAGAGC (SEQ ID NO :45)
4	2886-4409	GGGTTTTGTTGAGGACCAATTGGC (SEQ ID NO: 40)	TACACCATTGAGCTTGGCAGACT (SEQ ID NO: 46)

5	4301-5188	TGCTGCTTTCGTGAACCTATT (SEQ ID NO: 41)	AAAATGGAGGCGTTTACTGCAGAA (SEQ ID NO: 47)
6	5130-6459	CATATGGATCTGGACCGCAGCTTCTT (SEQ ID NO: 42)	CTAGTTGCTACCATTACCTTAGCACC (SEQ ID NO: 48)

*) Đánh số cặp bazơ là cặp bazơ của trình tự gen đối với MMT (SEQ ID NO:3; cũng xem Fig.9).

**) Trình tự ở đầu 5' của đoạn được liệt kê trong cột có tên "các đầu của sản phẩm PCR".

***) Trình tự bù ở đầu 3' của đoạn trong cột có tên "các đầu của sản phẩm PCR".

Bảng 3: Các đoạn mồi để mở rộng trình tự ADN bổ trợ mã hóa MMT của lúa mạch

Bộ đoạn mồi số	Các đầu của sản phẩm PCR*	Đoạn mồi xuôi (trình tự ADN 5'→3') **	Đoạn mồi ngược (trình tự ADN 5'→3')***
7	1-69	ATGGCTGCGGCGGCGGGGACGTGG (SEQ ID NO:49)	GTACGCCGCGTCGCCCCGACG (SEQ ID NO: 57)
8	1-170	ATGGCTGCGGCGGCGGGGACGTGG (SEQ ID NO: 50)	CCGCCGCGGCGAAGCGCCG (SEQ ID NO: 58)
9	1-200	ATGGCTGCGGCGGCGGGGACGTGG (SEQ ID NO: 51)	GTGCGGAAGCACTCGAGCCC (SEQ ID NO:59)
10	1-221	ATGGCTGCGGCGGCGGGGACGTGG (SEQ ID NO: 52)	CGTGGATGCGGAAGTGGAAG (SEQ ID NO: 60)
11	1-247	ATGGCTGCGGCGGCGGGGACGTGG (SEQ ID NO: 53)	CTTGGAGGTGGGGGTCGAGGACGACG (SEQ ID NO: 61)
12	131-200	GGCTCCTCGGCGCCGTGCGACGGCG (SEQ ID NO: 54)	GTGCGGAAGCACTCGAGCCC (SEQ ID NO: 62)
13	131-221	GGCTCCTCGGCGCCGTGCGACGGCG (SEQ ID NO: 55)	CGTGGATGCGGAAGTGGAAG (SEQ ID NO: 63)
14	131-247	GGCTCCTCGGCGCCGTGCGACGGCG (SEQ ID NO: 56)	CTTGGAGGTGGGGGTCGAGGACGACG (SEQ ID NO: 64)

*) Đánh số cặp bazơ là cặp bazơ của trình tự gen đối với MMT (SEQ ID NO:3).

**) Trình tự ở đầu 5' của đoạn được liệt kê trong cột có tên "các đầu của sản phẩm PCR".

***) trình tự bổ sung ở đầu 3' của đoạn được chú giải trong cột có tên "các đầu của sản phẩm PCR".

Ví dụ 9

Gen mã hóa MMT của thể đột biến 8063 của lúa mạch được gây đột biến ở vị trí tách intron 5' của intron 5

Lượng SMM trong cây lúa mạch giống chứa thể đột biến 8063 là cực nhỏ hoặc không có (ví dụ 3), trong dòng không có hoạt tính MMT (ví dụ 4). Dựa trên sự phát hiện này, đã tiến hành khảo sát liệu có phải các sự thể bazơ trong gen mã hóa MMT là do việc xử lý các hạt lúa mạch bằng chất gây đột biến ban

dầu NaN_3 gây ra hay không. Do đó, các cố gắng được thực hiện để mở rộng dòng vô tính và trình tự gen nêu trên của thể đột biến 8063 để thiết lập cơ sở phân tử đối với kiểu hình không chứa MMT này.

Trình tự nucleotit của gen kiểu đại đối với MMT của chủng cv. Prestige (Bảng 2; được mô tả chi tiết trong ví dụ 8) được mở rộng bằng 6 đoạn mồi, một phương pháp tương tự cũng được thực hiện đối với thể đột biến 8063 của lúa mạch. Một cách vắn tắt, ADN hệ gen được chiết ra khỏi thể đột biến này và các đoạn đặc hiệu gen MMT mở rộng của nó được lồng vào vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen, cat.no. K4500-01), được tách dòng, xác định trình tự, nối ghép (SEQ ID NO:8), và cuối cùng được so sánh với gen của lúa mạch hoang. Không có đột biến được nhận dạng trong protein mã hóa phần gen đối với MMT. Tuy nhiên, so sánh các trình tự intron của gen thể đột biến và kiểu đại đã cho thấy sự chuyển bazơ $\text{G} \rightarrow \text{A}$ trong bazơ thứ nhất của intron 5 (nucleotit No.3076 của SEQ ID NO:8). Bazơ này là một phần của vị trí tách intron 5' của intron 5, và sẽ ảnh hưởng đến việc xử lý ARN ban đầu của gen này, tức là tách intron của ARN (Sinibaldi and Mettler, 1992; cũng xem Fig.12).

Để đánh giá các vai trò có thể của sự đột biến bazơ đối với sự nhiễu loạn của việc tách intron của gen bình thường trong gen mã hóa MMT của thể đột biến 8063, thử nghiệm chi tiết được thực hiện đối với ARN thu được từ thể đột biến để phát hiện bán thành phẩm tách intron. Phương pháp này được chọn vì có những thay đổi trong dinucleotit GT 5' của các intron có thể dẫn đến sự tích tụ các bán thành phẩm tách intron (Lai và các đồng tác giả, 1999).

Để mở rộng các đoạn đáng quan tâm, thử nghiệm theo khuyến cáo để sử dụng kit RT-PCR (OneStep RT-PCR từ Qiagen, cat.no. 210212). Để làm mẫu đã sử dụng 1 μg của tổng ARN từ các lá mỏng của cây mầm 4 ngày tuổi chủng cv. Prestige và thể đột biến 8063, được tinh chế như được mô tả trong ví dụ 8. Bằng cách sử dụng đoạn mồi 15 (Bảng 4), phản ứng RT-PCR được dùng để mở rộng vùng gen mở rộng exon 3 và exon 7 của các sản phẩm phiên mã đối với MMT của Prestige kiểu đại và thể đột biến 8063 (Fig.12A). Sau khi mở rộng, các sản

phẩm của phản ứng được phân giải bằng cách điện di trên agarosa gel 1% (Fig.12B).

Việc xem xét các sản phẩm mở rộng đã cho thấy chỉ một dải duy nhất từ phản ứng với ARN kiểu đại (Fig.12B). Dải này được kích thích bởi gel, được tinh chế bằng cách sử dụng các hợp phần của kit Qiaexll (Qiagen, cat.no. 20051), được lồng vào vectơ pCR2.1-TOPO (Invitrogen, cat.no. K4500-01), được tách dòng, và xác định trình tự. Các phân tích chứng minh sự có mặt của đoạn 882-bp (sản phẩm 1 trên Fig.12B, Fig.12C; SEQ ID NO:9), khác biệt bởi trình tự đồng nhất với trình tự mở rộng các bazơ 442-1323 của ADN bổ trợ có độ dài đầy đủ đối với MMT (SEQ ID NO:4) của lúa mạch hoang. Dựa trên phát hiện này, việc tách intron theo phương án thay thế được coi là không thích hợp đối với sự biểu hiện gen kiểu đại.

Phản ứng RT-PCR giống như phản ứng được mô tả trong phần nêu trên, ngoại trừ việc gắn khuôn mẫu ARN đã được tinh chế từ thể đột biến 8063, tạo ra ba đoạn ADN đặc thù – được ký hiệu là Sản phẩm 2, Sản phẩm 3, Sản phẩm 4 trên Fig.12B – các sản phẩm này khác nhau về độ dài so với Sản phẩm 1 được mở rộng bằng cách sử dụng ARN kiểu đại (Fig.12B). Do đó, việc xử lý tiền ARN thông tin bị cản trở bởi một sự đột biến bazơ duy nhất ở vị trí tách intron 5' của intron 5 trong gen đối với MMT của thể đột biến 8063. Diễn biến này hủy bỏ hoàn toàn việc sử dụng vị trí tách intron 5', nhưng lại kích hoạt việc sử dụng các vị trí tách intron kín bổ sung.

Trong một nỗ lực để giải quyết việc giải thích nguyên nhân phân tử để thu được ba đoạn PCR nêu trên trong thể đột biến 8063, mỗi đoạn này được tạo ra để xác định trình tự ADN bằng cách sử dụng quy trình như được mô tả trên đây trong ví dụ 8 đối với các dải ADN thu được từ PCR của chủng cv. Prestige. Đoạn dài nhất có độ dài là 1089 bp (sản phẩm 2 trên Fig.12C; SEQ ID NO:10), và được phát hiện để chứa toàn bộ intron 5, trong khi Sản phẩm 3 (Fig.12C; SEQ ID NO:12) và Sản phẩm 4 (Fig.12C; SEQ ID NO:14) có độ dài lần lượt là 955 bp và 810 bp, và vì vậy ngắn hơn so với đoạn có độ dài 882 bp của ARN

kiểu đại (xem phần mô tả nêu trên). Việc thử nghiệm trình tự ADN của Sản phẩm 3 cho thấy vị trí tách intron kín ở giữa intron 5, trong khi trình tự này của Sản phẩm 4 là ở trong exon 5 (Fig.12D).

Cũng là một phát hiện quan trọng của việc thử nghiệm trình tự ADN để khám phá ra các codon kết thúc sự dịch mã sớm trong Sản phẩm 2 [TGA ở vị trí 3088-3090 theo cách đánh số bazơ của ADN di truyền của lúa mạch, chủng cv. Prestige (SEQ ID NO:3)], Sản phẩm 3 [TGA ở vị trí 3088-3090 theo cách đánh số bazơ của AND di truyền của lúa mạch, chủng cv. Prestige (SEQ ID NO:3)], và Sản phẩm 4 [TGA ở vị trí 3289-3291 theo cách đánh số bazơ của AND di truyền của lúa mạch, chủng cv. Prestige (SEQ ID NO:3)], tạo ra các protein dịch mã axit amin có độ dài lần lượt là 315, 315, và 289. Fig.12C thể hiện sự so sánh bằng đồ thị và tóm tắt kết quả của việc tạo trình tự Sản phẩm 1, Sản phẩm 2, Sản phẩm 3, và Sản phẩm 4, trong khi hình vẽ trên Fig.12D và Fig.12E thể hiện dữ liệu riêng về các bazơ đặc hiệu kèm theo trong các trường hợp tách intron theo phương án thay thế.

Bảng 4: Các đoạn môi để phát hiện vị trí tách intron theo phương án thay thế của gen mã hóa MMT của lúa mạch

Bộ đoạn môi số	Các đầu của sản phẩm PCR*	Đoạn môi xuôi (trình tự ADN 5'→3') **	Đoạn môi ngược (trình tự ADN 5'→3')***
15†	442-1323	GTTTATGGTCTGGATATAAACCCAAG (SEQ ID NO: 65)	AAATCCAGCAACAAGATTCCGAAA (SEQ ID NO: 67)
16‡	246-933	AGGATTCCAGCAAAGAAAGAAGC (SEQ ID NO: 66)	CTGCATAATTTTGTGGCCAGAGC (SEQ ID NO: 68)

†) Đối với RT-PCR bằng cách sử dụng khuôn mẫu ARN của thể đột biến 8063.

‡) Đối với RT-PCR bằng cách sử dụng khuôn mẫu ARN của thể đột biến 14018.

*) Đánh số cặp bazơ dưới dạng cặp ba zơ của ADN bổ trợ đối với MMT (SEQ ID NO:4).

**) Trình tự ở đầu 5' của đoạn được liệt kê trong cột có tên "các đầu của sản phẩm PCR".

***) Trình tự bổ sung ở đầu 3' của đoạn được nêu trong cột có tên "các đầu của sản phẩm PCR".

Ví dụ 10

Biểu hiện plasmit mã hóa MMT kiểu đại

Vì hai quan sát sau:

(i) các tế bào *E. coli* không chứa MMT và khả năng để tổng hợp SMM (Thanbicher và các đồng tác giả, 1998);

(ii) thực vật MMT có thể được tổng hợp trong tế bào *E. coli* (Tagamont và các đồng tác giả, 2002);

sự biểu hiện khác kiểu của MMT trong lúa mạch được gây đột biến hoặc bị cắt cụt trong vi khuẩn nêu trên cho phép phương pháp mới mô phỏng, hoặc khẳng định việc không có hoạt tính enzym. Vì MMT tái tổ hợp của lúa mạch hoang từ tế bào *E. coli* sẽ được dùng làm đối chứng dương tính trong các thử nghiệm này, nên nhiệm vụ là thiết kế và xây dựng cấu trúc plasmid biểu hiện *E. coli* đối với việc biểu hiện khác kiểu của MMT trong lúa mạch.

Để mở rộng các trình tự thích hợp, tổng lượng ARN được chiết lần đầu từ lá mầm của cây mầm 4 ngày tuổi chủng cv. Prestige (như được mô tả một cách chi tiết trong ví dụ 9), và 1 μ g phần chiết được sử dụng làm khuôn mẫu trong phản ứng RT-PCR chuẩn, ngoại trừ đoạn mồi 17 được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng này (Bảng 5). Sản phẩm đã được mở rộng được lồng vào vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen), tạo ra plasmid pCR2.1-TOPO-MMT. Sau khi tách dòng plasmid này, toàn bộ phần lồng được tạo trình tự (SEQ ID NO:5), và so sánh với trình tự của chủng cv. Prestige (SEQ ID NO:4). Ba nucleotit khác nhau do PCR tạo ra được nhận dạng trong sản phẩm đã được dòng (T1310→A, T2954→C, and G3031→A), thu được các sự thế của axit amin MMT Leu437→His, Tyr985→Met, và Gly1011→Ser (như xác định được bằng cách so sánh SEQ ID NO:6 và SEQ ID NO:7). Không có sự thay đổi nào của axit amin được kỳ vọng là thỏa hiệp tác động của MMT tái tổ hợp theo cách mà có thể là thích hợp trong ứng dụng này. Kết luận này dựa trên cơ sở phát hiện ra rằng protein biểu hiện là protein hoạt tính có thể được nhận dạng bởi kháng thể kháng MMT (xem Ví dụ 12).

Tiếp theo, pCR2.1-TOPO-MMT được cắt bằng NdeI-EcoRI để tạo ra đoạn 569 bp NdeI-EcoRI 5' và đoạn 2699 bp 3' EcoRI. Đoạn 5' được lồng vào vector pET19b biểu hiện NdeI-EcoRI được tạo mạch thẳng (Novagen, cat.no.

69677-3), và lồng đoạn 2699 bp 3' nêu trên vào vị trí EcoRI của plasmit thu được, nhờ đó tạo ra plasmit biểu hiện pET19b-MMT (Fig.13A). Plasmit biểu hiện này mã hóa MMT liên kết với đầu tận cùng N của His-tag (MGHHHHHHHHHH; SEQ ID NO: 69) và vị trí enterokinaza (SSGHIDDDDKH; SEQ ID NO:70).

Bảng 5 : Các đoạn mồi để mở rộng trình tự mã hóa protein của gen lúa mạch đối với MMT

Bộ đoạn mồi số	Các đầu của sản phẩm PCR*	Đoạn mồi xuôi (trình tự ADN 5'→3') **	Đoạn mồi ngược (trình tự ADN 5'→3')***
17	1-3267	CATATGATGGCTGCGGCGGCGGGGACGTGG (SEQ ID NO:71)	GAATTCWGTGCTACCATTCACCTTAGCACC (SEQ ID NO:72)

*) Đánh số cặp bazơ dưới dạng cặp bazơ của ADN bổ trợ đối với MMT (SEQ ID NO:5), tức là lần lượt trừ các phần mở rộng CAT và AATTC với đầu trên và đầu cuối của codon bắt đầu và kết thúc.

**) Trình tự ở đầu 5' của đoạn được nêu trong cột có tên "các đầu của sản phẩm RT-PCR", như xác định được bởi đoạn mồi. Vị trí NdeI – được gạch chân; codon kết thúc sự dịch mã – hai đường gạch chân.

***) Trình tự bổ sung ở đầu 3' của đoạn được nêu trong cột có tên "các đầu của sản phẩm RT-PCR". Vị trí EcoRI – được gạch chân; codon kết thúc sự dịch mã – kể cả phần vị trí EcoRI được thể hiện bằng chữ nghiêng.

Ví dụ 11

Các plasmit biểu hiện mã hóa MMT đã được cắt cụt của thể đột biến 8063

Gen mã hóa MMT của thể đột biến 8063 được thể hiện trong ví dụ 9 chứa sự chuyển tiếp của bazơ ở vị trí tách intron 5' của intron 5, nhờ đó hoạt hóa hai vị trí tách intron kín mà dẫn đến sự biểu hiện của ba sản phẩm phiên mã bất thường (xem Fig.12B, Fig.12C), mỗi sản phẩm phiên mã này chứa một codon kết thúc dịch mã sớm.

Để khẳng định rằng các sản phẩm phiên mã của thể đột biến mã hóa các MMT không có chức năng, mỗi khung đọc mở tương ứng được mở rộng và được lồng vào vectơ biểu hiện E. coli, như được mô tả dưới đây. Lưu ý là hai sản phẩm phiên mã được tách intron theo cách luân phiên nhau, đặc biệt là các

sản phẩm này tạo ra Sản phẩm 2 và Sản phẩm 3 (Fig.12B), mã hóa các protein giống nhau. Do đó, chỉ hai plasmit biểu hiện là đủ để xác định xem liệu có phải các gen được tách intron theo cách bất thường của lúa mạch thể đột 8063 mã hóa các enzym MMT hay không.

Khi biết trình tự của các sản phẩm tách intron kín trong thể đột biến 8063, xem Fig.12D, có thể tiến hành mở rộng các phần của gen thích hợp từ plasmit biểu hiện pET19b-MMT - cấu trúc của nó được mô tả một cách chi tiết trong ví dụ 10. Đoạn mỗi 18, như được liệt kê trong Bảng 6, được sử dụng để mở rộng các phần 3' của gen dưới dạng các đoạn SacII-BamHI của Sản phẩm 2 (SEQ ID NO:27), và Sản phẩm 3 (SEQ ID NO:28). Sau đó, các đoạn này được trao đổi với đoạn tương ứng của pET19b-MMT (xem Fig.13A), để thu được các plasmit biểu hiện pET19b-Line8063-Prod2 (Fig.13B), và pET19b-Line8063-Prod3 (Fig.13C). Các phản ứng thực hiện song song sử dụng đoạn mỗi 19 (Bảng 6), để tạo ra plasmit biểu hiện pET19b-Line8063-Prod4 (Fig.13D; với SEQ ID NO:29 liệt kê trình tự của Sản phẩm 4 để tách dòng), được dùng để tổng hợp MMT bị cắt cụt tương ứng với plasmit liên quan đến Sản phẩm 4 (xem FIG.12B).

Fig.13E đưa ra sự so sánh trình tự của axit amin được mô tả một cách chi tiết của MMT kiểu dại với sản phẩm bị cắt cụt được mã hóa bởi thể đột biến 8063.

Bảng 6: Các đoạn mỗi để mở rộng các đoạn ADN của thể đột biến 8063 (để xây dựng plasmit)

Bộ đoạn mỗi số	Các đầu của sản phẩm PCR*	Các đầu của sản phẩm (SEQ ID NO:)	Trình tự đoạn mỗi ** (trình tự ADN 5'→3')
18	1-27 736-781	27 và 28	Xuôi: GGCCGCGGGGCTCGAGTGCTTCCGCAC (SEQ ID NO: 73) Ngược: <u>GGATCCTCA</u> AAGAATTGCTATCTGCATAA- TTTTTGTTTGCCAGAGC (SEQ ID NO: 74)
19	1-27 667-703	29	Xuôi: GGCCGCGGGGCTCGAGTGCTTCCGCAC (SEQ ID NO:75) Ngược: <u>GATCCTTAGCAGCCTT</u> GTCTGGCCGGCCTCCCATG (SEQ ID NO:76)

*) Các số được dùng để chỉ số nucleotit trong SEQ ID NO tương ứng như được liệt kê trong cột bên cạnh.

**) Một đường gạch chân được sử dụng để đánh dấu các vị trí SacII và BamHI của đoạn môi xuôi và đoạn môi ngược tương ứng. Hai đường gạch chân chỉ các codon kết thúc.

Ví dụ 12

Các dạng MMT tái tổ hợp của thể đột biến 8063 là bất hoạt

Để xác minh rằng các dạng đoạn khuyết MMT của thể đột biến 8063 là bất hoạt về mặt enzym, các tế bào E. coli của chủng BL21 được chuyển một cách riêng biệt với các plasmit pET19b, pET19b-MMT, pET19b-Line8063-Prod3, và pET19b-Line8063-Prod4 (xem Fig.13), và sau đó nhân giống qua đêm trong 5 mL môi trường chuẩn Luria Broth (LB) chứa ampicillin. Bổ sung 1,25mL phần phân ước chứa tế bào cấy vào 100mL LB mới, và được ủ ở 37°C cho đến khi mật độ tế bào đạt tới $OD_{600} = 0,6$. Tại thời điểm này, 40μL 1M IPTG được bổ sung vào để gây ra sự biểu hiện của protein khác kiểu. Tiếp theo ủ qua đêm ở 20°C, các tế bào cấy đơn lẻ được làm kết tủa bằng cách ly tâm trong 20 phút với tốc độ 4000 vòng/phút, ở 4°C. Mỗi hạt tế bào được tạo huyền phù trong 5mL H₂O, sau đó đưa vào một số chu trình đông lạnh-rã đông, và cuối cùng được ủ trong 30 phút ở 37°C với sự có mặt của nucleaza 750 đơn vị/L (Sigma, cat.no. E8263-25KU), để làm giảm độ nhớt của mẫu. Sau khi ly tâm trong 30 phút với tốc độ 4000 vòng/phút, ở 4°C, tách các protein hòa tan tế bào (xác định được là protein trong pha lỏng) từ các protein không hòa tan (xác định được là protein trong hạt), sau đó hạt này được rửa bằng cách tạo huyền phù trong 2 mL H₂O chứa 1 mg lysozym. Sau khi ủ được 5 phút ở nhiệt độ môi trường, mẫu này được pha loãng bằng cách bổ sung 15 mL H₂O. Tiến hành ba chu trình rửa-làm kết tủa trước khi protein của các thể vùi trong hạt được chiết bằng 1mL dung dịch đệm chứa 50mM Tris-Cl, độ pH= 8,0, chứa 7M ure, 2mM β-mercaptoetanol.

Để thử nghiệm về hoạt tính đối với MMT, chuyển 50μL các mẫu chứa protein hòa tan tế bào (như xác định được trên đây) vào 250μL dung dịch đệm K-phosphat 25mM, độ pH= 6,0, chứa 0,4mM AdoMet, 10mM Met, 1mM DTT, 0,1mg/mL BSA. Sau khi ủ trong 1 giờ ở 50°C, các mẫu này được lọc, và cho

phép 10 μ L phản ứng với OPA như được mô tả một cách chi tiết trong ví dụ 2. Tiếp theo, việc thử nghiệm sau đó về lượng SMM như được mô tả trong ví dụ nêu trên, với các kết quả được tóm tắt trên Fig.14A. Chỉ có phần chiết từ các tế bào đã được biến đổi bằng pET19b-MMT tạo ra đỉnh của phổ sắc ký có cùng thời gian lưu như của SMM tiêu chuẩn. Do đó, sự không có các đỉnh giống nhau trên các phổ sắc ký từ các tế bào được biến đổi bằng pET19b-Line8063-Prod3 và pET19b-Line8063-Prod4 chỉ báo rằng thể đột biến 8063 không có khả năng tạo ra MMT hoạt tính.

Thử nghiệm riêng biệt nhằm mục đích chứng minh rằng thể đột biến 8063 không có khả năng tạo ra MMT hoạt tính có độ dài đầy đủ. 5 μ L các mẫu tế bào hòa tan và 10 μ L các mẫu protein thu được từ hạt của các phần chiết E. coli nêu trên được tách ra bằng cách điện di tiêu chuẩn, và được thử bằng kháng thể kháng MMT của thỏ đa dòng trực tiếp kháng kháng nguyên peptit dài có gốc 15 của MMT của lúa mạch [xem Fig.13E (đoạn của trình tự được đánh dấu bằng dấu hoa thị)]; chế phẩm kháng thể kháng MMT đa dòng có độ dính bám được tinh chế theo ái lực nhẹ dung tích 12mL được mua từ Invitrogen (Project No. L0402801K; animal No. C7511), và được sử dụng trong phép thấm tách Western chuẩn với tỷ lệ pha loãng là 1:1000 (Fig.14B, Fig.14C)].

Về chi tiết, các protein nêu trên được nạp lên gel SDS-polyacrylamit 10% và được tách bằng cách điện di ở 150V trong 75 phút, sau đó các protein này được chuyển tới màng polyvinyliden florua (Immobilon-P, Millipore) thông qua thiết bị thấm tách điện (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, BioRad) được vận hành với mật độ 2,5mA/cm² (cực đại là 25 V). Các sản phẩm thấm tách được đặt trong 1 giờ ở 25°C trong dung dịch đệm phong bế [nước muối đệm phosphat 1x - (PBS), 1% BSA]. Dung dịch phong bế này được loại bỏ và màng này được đặt vào dung dịch chứa kháng thể kháng MMT trong 1 giờ. Sau đó, màng này được rửa bằng 1xPBS và được ủ trong 1 giờ trong dung dịch phosphatasa kiềm để kháng thể IgG (Sigma). Sau bước ủ nêu trên, màng này được rửa trong 1xTBS, sau đó quan sát bằng mắt thường các dải protein sau khi

ử bằng cách sử dụng tetrazoli nitroblu và 5-bromo-4-clo-3-indolyl phosphat (Sigma). Cuối cùng, gel được rửa trong nước và dùng phản ứng phosphataza.

Chế phẩm chứa kháng thể kháng MMT, như được mô tả trên đây, được sử dụng để thử các sản phẩm thâm tách của protein hòa tan tế bào và protein thu được từ hạt tế bào được chuyển bằng pET19b-MMT (Fig.14B.C; các làn được đánh dấu "2"), pET19b-Line8063-Prod3 (Fig.14B.C; các làn được đánh dấu "3"), pET19b-Line8063-Prod4 (Fig.14B.C; các làn được đánh dấu "4"), và pET19b (Fig.14B,C; các làn được đánh dấu "5"). Mặc dù có các khác biệt về mẫu băng tổng thể của các protein hòa tan tế bào và thu được từ viên kết (với viên kết nói chung dường như là lượng vết của băng protein mà bắt đầu trên phần trên của gel và kéo dài xuống đáy gel), MMT có độ dài đầy đủ được nhận dạng là dải protein cùng di chuyển với protein đánh dấu 120kDa (các làn được đánh dấu "1") trong các phần chiết tế bào được biến đổi bằng pET19b-MMT. Các dạng bất hoạt của protein tế bào MMT được biến đổi bằng pET19b-Line8063-Prod3 và pET19b-Line8063-Prod4 được kỳ vọng là tương ứng với các dải được nhuộm màu bền trong vùng thâm tách nằm trong khoảng từ 30kDa đến 40kDa. Lưu ý là băng protein 80kDa được nhuộm màu này không phải là băng thu được từ MMT vì nó cũng xuất hiện trong phần chiết của tế bào đối chứng âm tính được biến đổi bằng vector pET19b.

Dựa trên các kết quả thử nghiệm với sự biểu hiện khác kiểu của các dạng MMT, như được mô tả trên đây, và được dùng để tạo ra các dạng MMT tái tổ hợp của lúa mạch hoang và thể đột biến 8063, kết luận là chỉ dạng MMT kiểu dại, mà không phải là dạng MMT trong thể đột biến nêu trên, là hoạt hóa. Do đó, khả năng xúc tác chuyển hóa Met thành tiền chất DMS (SMM) được giới hạn ở lúa mạch hoang, vì đối lập với thể đột biến 8063.

Ví dụ 13

Thiết bị theo dõi thể đột biến 8063 của lúa mạch

Ngoài phép thử nghiệm sinh học để phát hiện thể đột biến 8063 của các hạt lúa mạch (xem ví dụ 2), ví dụ này sẽ mô tả phương pháp di truyền dùng để

nhận dạng các hạt đột biến hoặc các sản phẩm của chúng. Với các cải biến thích hợp mà chuyên gia trong lĩnh vực này đã biết, phương pháp này cũng được áp dụng để phát hiện xem liệu có phải sản phẩm thực vật nêu trên được tạo ra bằng cách sử dụng thể đột biến 8063 của lúa mạch hay không. Thử nghiệm này dựa trên cơ sở phân tích để phát hiện hiện tượng đa hình duy nhất của nucleotit (single nucleotide polymorphism - SNP), đặc biệt là đột biến G→A ở vị trí 3076 của gen đối với MMT trong thể đột biến 8063, như được minh họa trên Fig.15, và với các đặc tính của đoạn mỗi oligonucleotit được liệt kê trong Bảng 7.

Sản phẩm 271bp của PCR - với trình tự được đưa ra là SEQ ID NO:33 - được tạo ra khi bộ đoạn mỗi số 20 được đưa vào phản ứng với ADN hệ gen của lúa mạch chủng cv. Prestige làm khuôn mẫu, trong khi không có sản phẩm nào được mở rộng nếu ADN hệ gen của thể đột biến 8063 dùng làm khuôn mẫu - trường hợp sau đơn giản là vì không có bazơ cặp đôi giữa đầu 3' của đoạn mỗi ngược và khuôn mẫu (Fig.19A). Tuy nhiên, sản phẩm 271bp của PCR thu được bằng bộ đoạn mỗi số 21 khi mở rộng PCR bằng ADN hệ gen của thể đột biến 8063 (SEQ ID NO:34; Fig.19A), vì đoạn mỗi ngược có trình tự đầy đủ cặp đôi với khuôn mẫu. Bộ đoạn mỗi số 22, chứa bốn đoạn mỗi nêu trên được liệt kê đối với các bộ đoạn mỗi số 20 và 21 - hai bộ này được dùng để mở rộng đoạn chứa đột biến G3076→A trong gen MMT của thể đột biến 8063, và hai bộ cho đột biến G1462→A trong gen MMT của thể đột biến 14018 (SEQ ID NO:36, xem ví dụ 17) - được dùng để theo dõi sự có mặt của gen đã được đột biến đổi với MMT chứa cả hai sự đột biến của nucleotit nêu trên.

Mỗi PCR mở rộng nêu trên được thử nghiệm dưới dạng phản ứng polymeraza 50µL RedTaq (Sigma, cat.no. D6063), chứa 200ng ADN hệ gen và 50-100pmol mỗi đoạn mỗi của bộ đoạn mỗi đặc hiệu (bảng 7). Sau khi mở rộng trong chu trình PCR chuẩn (1 phút ở 95°C; sau đó là 30 chu trình gồm: 94°C, 60 giây - 64°C, 30 giây - 72°C, 30 giây; kết thúc với 10 phút ở 72°C), phần phân ước 25µL của mẫu được điện di chuẩn trên gel agarosa 2%. Như được minh họa trên Fig.15C, PCR với ADN hệ gen của cv. Prestige với sự có mặt của

bộ đoạn mỗi số 20 và bộ đoạn mỗi số 21 lần lượt tạo ra đoạn ADN 271bp và đoạn 0. Còn PCR với ADN hệ gen của thể đột biến 8063 với sự có mặt của bộ đoạn mỗi số 20 và bộ đoạn mỗi số 21 lần lượt tạo ra đoạn 0 và đoạn ADN 271bp. Trong các trường hợp trong đó, kết quả sau là hậu quả PCR với ADN hệ gen của hạt lúa mạch không được nhận dạng, rất có thể là ADN của khuôn mẫu là đồng nhất với ADN của thể đột biến 8063. Các nỗ lực sau đó hỗ trợ cho kết luận bao gồm các phân tích để thử nghiệm về lượng SMM (xem ví dụ 2), và về hoạt tính MMT (xem ví dụ 4).

Phương pháp tách để chứng minh rằng thể đột biến 8063 không chứa MMT kèm theo phép thẩm tách Western, bằng cách sử dụng quy trình kỹ thuật và kháng thể kháng MMT như được mô tả một cách chi tiết trong ví dụ 3. Trong điều kiện thực tế, các hạt của chủng cv. Prestige và thể đột biến 8063 được cho nảy mầm ở nhiệt độ 20°C trong 4 ngày, sau đó đồng nhất riêng biệt một hạt kiểu dại và một hạt của thể đột biến, mỗi loại chứa trong 250µL H₂O. Sau khi ly tâm ở tốc độ 13000 vòng/phút trong 10 phút, hỗn hợp 15µL mỗi chất nổi trên bề mặt với 5µL dung dịch đệm nạp SDS, đun sôi trong 5 phút, nạp vào gel SDS-polyacrylamit 12%, tách bằng cách điện di, điện thẩm tách, và cuối cùng thử bằng kháng thể kháng MMT đa dòng (Fig.15D). Băng protein khác biệt MMT 120kDa dễ dàng được nhận dạng trong phần chiết chủng cv. Prestige, trong khi protein không có phản ứng miễn dịch của thể đột biến 8063 cùng di chuyển với protein đánh dấu 120kDa. Do đó, phương pháp thẩm tách Western nêu trên là hữu ích để kiểm tra xem liệu có phải các hạt lúa mạch nảy mầm tạo ra MMT hoặc không có khả năng này. Các thử nghiệm phân tử và sinh hóa tiếp theo có thể được sử dụng để khẳng định xem liệu có phải hạt nêu trên thu được từ thể đột biến 8063 hay không.

Bảng 7: Các đoạn mồi để phát hiện SNP của thể đột biến 8063

Bộ đoạn mồi số	Các đầu của sản phẩm	Các đầu của sản phẩm (SEQ ID NO:)	Đoạn mồi (trình tự ADN 5'→3' cho trước) ****	Đoạn mồi ngược (trình tự ADN 5'→3')*****
20	2831-3101 *	33	CGATTCCAGCTTCCGGTTG (SEQ ID NO:77)	CATCTAGTCACTCAAAGAATTGCTAC (SEQ ID NO:81)
21	2831-3101**	34	CGATTCCAGCTTCCGGTTG (SEQ ID NO:78)	CATCTAGTCACTCAAAGAATTGCTAT (SEQ ID NO:82)
22	2831-3101**	34	CGATTCCAGCTTCCGGTTG (SEQ ID NO:79)	CATCTAGTCACTCAAAGAATTGCTAT (SEQ ID NO:83)
	1361-1483***	36	GGCATCCAGATTCCATCTTCAG (SEQ ID NO:80)	CTACGGAACAAGAGGTGCCAAT (SEQ ID NO: 84)

*) Đánh số cặp bazơ dưới dạng cặp bazơ của trình tự gen kiểu dại đối với MMT (SEQ ID NO:3).

**) Đánh số cặp bazơ dưới dạng cặp bazơ của trình tự gen đối với MMT của thể đột biến 8063 (SEQ ID NO:8).

***) Đánh số cặp bazơ dưới dạng cặp bazơ của trình tự gen đối với MMT của thể đột biến 14018 (SEQ ID NO:19).

****) Trình tự ở đầu 5' của đoạn được nêu trong cột có tên "các đầu của sản phẩm RT-PCR".

*****) Trình tự bổ sung ở đầu 3' của đoạn được nêu trong cột có tên "các đầu của sản phẩm RT-PCR".

Ví dụ 14

Gen mã hóa MMT của thể đột biến 14018 trong lúa mạch được gây đột biến ở vị trí tách intron 5' của intron 2

Tiếp theo việc phát hiện lượng SMM cực nhỏ, hoặc hoàn toàn không có, trong các phần chiết của các hạt lúa mạch đang nảy mầm của thể đột biến 14018, cây này được trải qua các thử nghiệm trong các điều kiện thử nghiệm tương tự như các điều kiện được mô tả một cách chi tiết đối với thể đột biến 8063 trong ví dụ 9 nêu trên. Tuy nhiên, chất liệu của cây hoang trong trường hợp này là từ chủng cv. Sebastian, vì nó được dùng để gây đột biến bằng NaN_3 trong bể chứa các hạt của thể đột biến 14018. Các thử nghiệm nhằm nhận dạng đột biến gây ra kiểu hình không chứa MMT, được dùng và hoàn thành như được mô tả dưới đây.

Trước hết, việc so sánh được thực hiện đối với các trình tự gen ADN khác

biệt đối với gen mã hóa MMT của chủng cv. Sebastian (SEQ ID NO:16 đối với trình tự gen ADN; SEQ ID NO:17 đối với trình tự ADN bổ trợ; SEQ ID NO:18 đối với trình tự ADN bổ trợ dịch mã; trong tất cả các trường hợp với các trình tự đồng nhất với các trình tự của chủng cv. Prestige như được mô tả trong ví dụ 8) và thể đột biến 14018 (SEQ ID NO:19 đối với trình tự gen, và SEQ ID NOs:20, 21, 23, 25 đối với các trình tự ADN bổ trợ), với sự nhấn mạnh vào các vùng mở rộng các codon bắt đầu và kết thúc sự dịch mã. Việc chuyển bazơ G→A được nhận dạng trong phần gen được tạo trình tự của thể đột biến 14018, đặc biệt là vị trí của chất cho tách intron ngay đầu sau của exon 2 trên bazơ thứ nhất của intron 2, đặc biệt hơn là trên nucleotit No.1462 – và sau đó được tiên liệu để tác động đến việc xử lý ARN gốc của sản phẩm phiên mã của gen (Fig.16).

Thứ hai, bằng cách sử dụng bộ đoạn mồi 16 (Bảng 4), phản ứng RT-PCR được thiết kế và thiết lập để mở rộng vùng gen mở rộng exon 2 và exon 5 của gen mã hóa MMT của chủng cv. Sebastian và thể đột biến 14018 (Fig.16A). Tiếp theo mở rộng ADN, các sản phẩm của phản ứng được đưa vào điện di agarosa gel, với kết quả được thể hiện trên Fig.16B. Tương tự như được mô tả đối với thể đột biến 8063 trong ví dụ 9, ARN kiểu đại từ chủng cv. Sebastian tạo ra một đoạn PCR, Sản phẩm 5 trên Fig.16B, có cùng độ dài và trình tự ADN, xem SEQ ID NO:20, là giống hệt với các bazơ mở rộng từ 246 đến 933 của ADN bổ trợ có độ dài cặp đôi đối với MMT của lúa mạch hoang (SEQ ID NO: 17). Kết quả này lại làm nổi bật rằng việc theo cách thay thế không phải là dấu hiệu của sự biểu hiện gen kiểu đại.

Thứ ba, mẫu ARN được tinh chế từ thể đột biến 14018 được sử dụng trong phản ứng PCR, tạo ra ba đoạn đặc thù - ký hiệu là Sản phẩm 6 (SEQ ID NO:21), Sản phẩm 7 (SEQ ID NO:23), và Sản phẩm 8 (SEQ ID NO:25) trên Fig.16B, Fig.16C - các sản phẩm này khác nhau về độ dài và trình tự thu được từ sản phẩm mở rộng của mẫu kiểu đại. Sự quan sát này khuyến cáo rằng một đột biến duy nhất ở vị trí tách intron 5' của intron 2 trong gen đối với MMT của thể đột biến 14018 gây cản trở cho việc xử lý tiền ARN thông tin bằng cách loại

bỏ vị trí tách intron bình thường, nhưng thay vào đó việc kích thích sử dụng các vị trí tách intron kín bổ sung. Theo cách này, đối với cả Sản phẩm 6 và Sản phẩm 7, vị trí tách intron kín được nhận dạng trong intron 2, trong khi vị trí này của Sản phẩm 8 là ở exon 2. So sánh các kết quả tạo trình tự nêu trên bằng đồ thị được đưa ra trên Fig.16C.

Ngoài ra, các thử nghiệm trình tự ADN đã cho thấy các codon kết thúc sự dịch mã sớm trong Sản phẩm 6 [TAG trên các bazơ 1579-1581 theo cách từ số bazơ của ADN hệ gen từ lúa mạch, chủng cv. Sebastian (SEQ ID NO:16)], Sản phẩm 7 [TAA trên các bazơ 1840-1842 theo cách từ số bazơ của ADN hệ gen từ lúa mạch, chủng cv. Sebastian (SEQ ID NO: 16)], và Sản phẩm 8 [TGA trên các bazơ 1916-1918 theo cách từ số bazơ của ADN hệ gen từ lúa mạch, chủng cv. Sebastian (SEQ ID NO:16)], tạo ra các protein đã được dịch mã dài của axit amin 186, 180, và 163, lần lượt được liệt kê là SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, và SEQ ID NO:26. Song song với kết quả được mô tả trên đây đối với thể đột biến 8063 (Fig.12D, Fig.12E), các hình vẽ trên Fig.16D, Fig.16E đưa ra dữ liệu riêng về bản chất của các bazơ đặc hiệu tham gia vào trong các trường hợp tách intron theo phương án thay thế.

Ví dụ 15

Các plasmit biểu hiện để tổng hợp MMT bị cắt cụt của thể đột biến 14018

Lý do cơ bản và chiến lược thiết kế các plasmit biểu hiện là tổng hợp trực tiếp ba phiên bản tái tổ hợp đã được cắt cụt của MMT thu được từ thể đột biến 14018 giống như các plasmit được mô tả trong ví dụ 11 đối với thể đột biến 8063. Nói ngắn gọn, mục đích của thử nghiệm này là để xác nhận rằng các trường hợp tách intron lệch của thể đột biến 14086 sinh ra các sản phẩm phiên mã mã hóa các MMT bất hoạt. Do đó, các đoạn gen tái tổ hợp cần phải mã hóa các protein có trình tự được liệt kê trong SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, và SEQ ID NO:26 - phản ánh các trường hợp tách intron lệch tạo ra Sản phẩm 6, Sản phẩm 7, và Sản phẩm 8 (xem Fig.16B, Fig.16C).

Bằng cách sử dụng plasmit pET19b-MMT, xem ví dụ 10, làm khuôn mẫu

trong ba PCR chuẩn nối tiếp nhau với bộ đoạn mồi số 23, 24, và 25 (Bảng 8), tạo ra đến đoạn mở rộng 394bp (SEQ ID NO:30). Đoạn này được phân giải bằng SacII-BamHI và được thất bằng đoạn SacII-BamHI rộng của pET19b-MMT (Fig.17A), thu được plasmit biểu hiện pET19b-l_{ine}14086-Prod6 (Fig.17B), được dùng để tổng hợp MMT đã được cắt cụt tương ứng với Sản phẩm 6 như được thể hiện trên Fig.16B.

Bằng cách sử dụng quy trình tương tự như được mô tả trên đây đối với đoạn 394bp, nhưng bây giờ là với bộ đoạn mồi số 23, 24, và 26 trong ba đoạn PCR mở rộng nối tiếp nhau (Bảng 8), tạo ra đoạn 376bp (SEQ ID NO:31), mà khi phân giải bằng SacII-BamHI thì được thất bằng đoạn SacII-BamHI rộng của pET19b-MMT (Fig.17A), tạo ra plasmit biểu hiện pET19b-Line14086-Prod7 (Fig.17C). Plasmit biểu hiện này được dùng để tổng hợp MMT đã được cắt cụt tương ứng plasmit tạo ra Sản phẩm 7 như được thể hiện trên Fig.16B.

Theo thử nghiệm được tiến hành song song - được thực hiện theo cách tương tự như được mô tả trên đây đối với pET19b-MMT, nhưng với bộ đoạn mồi số 27 và 28 (Bảng 8) - có đoạn 325bp được mở rộng (SEQ ID NO:32), mà khi phân giải bằng SacII-BamHI thì được thất bằng đoạn SacII-BamHI rộng của pET19b-MMT (Fig.17A), tạo ra plasmit biểu hiện pET19b-Line14086-Prod8 (Fig.17D) để tổng hợp MMT bị cắt cụt tương ứng với Sản phẩm 8 (xem Fig.16B).

Bảng 8: Các đoạn mồi để mở rộng các đoạn ADN của thể đột biến 14018 (để thiết kế plasmit)

Bộ đoạn mồi số	Trình tự của đoạn mồi (trình tự ADN 5'→3') *	Các đầu của sản phẩm PCR **	Các đầu của sản phẩm (SEQ ID NO:)
23	Xuôi: GGCCGCGGGGCTCGAGTGCTTCCGCAC (SEQ ID NO:85) Ngược: CGAGATMGAIMAIAICTACGG- AACAAGAGGTGCCAATCTTCGAAGGGCACCCTTTCTGC (SEQ ID NO:86)	1-27 245-307	30
24	Xuôi: GGCCGCGGGGCTCGAGTGCTTCCGCAC (SEQ ID NO:87) Ngược: AACCTGAGTAAATGTCTAACTTCTGCAGGTCCCATG- TTTGCAACAAACGAGATAAGATAAATATCTACGG (SEQ ID NO:88)	1-27 285-354	30

25	Xuôi: GGCCGCGGGGCTCGAGTGCTTCCGCAC (SEQ ID NO:89) Ngược: GGATCCCTACTGGCAGACACCTAAAAGTTTCATATAAAGT- AACCTGAGTAAATGTCTAACTTCTGC (SEQ ID NO:90)	1-27 329-394	30
26	Xuôi: GGCCGCGGGGCTCGAGTGCTTCCGCAC (SEQ ID NO: 91) Ngược: <u>GGATCCTT</u> ATATCCAGACCATAA- ACCTGAG-TAAATGTCTAACTTCTGC (SEQ ID NO: 92)	1-27 329-376	31
27	Xuôi: <u>GGCCGCGGGG</u> GCTCGAGTGCTTCCGCAC (SEQ ID NO:93) Ngược: <u>AGGTTTATCCATGCAATCTTGATAGCTCTTG-</u> GGTTTATATCCAGACCATAAACCATTGCC- ACATCCCAGCTCTGCTACTG (SEQ ID NO:94)	1-27 198-277	32
28	Xuôi: <u>GGCCGCGG</u> GGCTCGAGTGCTTCCGCAC (SEQ ID NO: 95) Ngược: <u>GGATCCTTAGATTGGGAGACCA-</u> <u>TCGTCGTCTAGTGCATTCAAGTAA-</u> AGGTTTATCCATGCAATCTTGATAGCTCTTGG (SEQ ID NO: 96)	1-27 246-325	32

*) Lưu ý rằng cùng một đoạn mỗi xuôi tương tự, với vị trí SacII được gạch chân, được sử dụng trong tất cả các phản ứng. Đối với các đoạn mỗi ngược, các đoạn mở rộng 5' mà không ghép đôi với ADN khuôn mẫu được chỉ ra với đường gạch chân dạng sóng; các vị trí BamHI được thể hiện bằng chữ nghiêng, còn các codon bù kết thúc sự dịch mã được thể hiện ở dạng chữ nét đậm.

**) Các số được dùng để chỉ số nucleotit trong SEQ ID NO tương ứng được liệt kê ở cột bên cạnh.

Ví dụ 16

Các dạng MMT tái tổ hợp của thể đột biến 14018 là bất hoạt

Trình tự của ví dụ 12 là như sau, các cấu trúc thu được từ thể đột biến 8063 được thay bằng các cấu trúc thu được từ thể đột biến 14018. Vi khuẩn E. coli được biến đổi bằng pET19b-Line14018-Prod6, pET19b-Line14018-Prod7 và pET19b-Line14018-Prod8 (Fig.17A - Fig.17D, với sự so sánh axit amin tương ứng được thể hiện trên Fig.17E) - nhưng các thử nghiệm này loại trừ phép thâm tách Western dưới dạng kháng thể kháng MMT được mô tả trong ví dụ 12 được nâng lên dựa vào đoạn trình tự không có mặt trong thể đột biến - phần của MMT đặc hiệu với 14018.

Không phần chiết nào chứa vi khuẩn đã được biến đổi cho thấy khả năng

tạo ra SMM (Fig.18), vì vậy cùng một biện luận giống như biện luận đưa ra trong ví dụ 12 trên đây tạo ra cơ sở để kết luận là thể đột biến 14018 của lúa mạch không tạo ra được các enzym MMT chức năng, thể này không có khả năng xúc tác để tạo ra SMM, tiền chất của DMS.

Ví dụ 17

Thiết bị theo dõi thể đột biến 14018 của lúa mạch

Ngoài thử nghiệm sinh hóa để phát hiện thể đột biến 14018 của các hạt lúa mạch (xem ví dụ 2), ví dụ này mô tả phương pháp di truyền được dùng để nhận dạng các hạt hoặc sản phẩm thực vật đột biến được sản xuất từ thể đột biến 14018 của lúa mạch. Dựa trên cơ sở phân tích để phát hiện một thể đa hình nucleotit (SNP), đặc biệt là đột biến G→A ở vị trí 1462 của gen đối với MTT trong thể đột biến 14018, như được minh họa trên Fig.19, và với các đặc tính của các bộ đoạn môi oligonucleotit được liệt kê trong Bảng 9.

Sản phẩm 121bp của PCR - với trình tự được đưa ra là SEQ ID NO:35 - được tạo ra khi bộ đoạn môi số 29 được sử dụng trong phản ứng với ADN hệ gen của lúa mạch chủng cv. Sebastian làm khuôn mẫu, trong khi không sản phẩm nào được mở rộng khi ADN hệ gen của thể đột biến 14018 được dùng làm khuôn mẫu - trong trường hợp sau đơn giản là vì không có bazơ cặp đôi nào giữa đầu 3' của đoạn môi ngược và khuôn mẫu (Fig.19B). Tuy nhiên, sản phẩm 121bp của PCR thu được bằng bộ đoạn môi số 30 khi mở rộng PCR bằng ADN hệ gen của thể đột biến 14018 (SEQ ID NO:36), vì đoạn môi ngược có trình tự với độ dài đầy đủ cặp đôi với khuôn mẫu (Fig.19B). Bộ đoạn môi số 31 bao gồm bốn đoạn môi nêu trên được liệt kê đối với các bộ đoạn môi số 29 và 30 - hai đối với việc mở rộng đoạn chứa đột biến G1462→A trong gen MMT của thể đột biến 14018 (tức là SEQ ID NO:36), và hai đối với đột biến G3076→A trong gen MMT của thể đột biến 8063 (tức là SEQ ID NO:34; xem ví dụ 9) - được dùng để theo dõi sự có mặt của gen được gây đột biến đối với MMT chứa cả hai sự đột biến của nucleotit nêu trên.

Mỗi sự mở rộng PCR nêu trên được tiến hành bằng thử nghiệm dưới dạng

phản ứng polymeraza 50 μ l RedTaq (Sigma, cat.no. D6063), chứa 200ng ADN hệ gen và 50-100 pmol mỗi đoạn mỗi của đoạn mỗi đặc hiệu (Bảng 7). Sự mở rộng tiếp theo trong chu trình PCR chuẩn (1 phút ở 95°C; sau đó là 30 chu kỳ bao gồm: 94°C, 60 giây - 64°C, 30 giây - 72°C, 30 giây; kết thúc bằng 10 phút ở 72°C), đưa 25 μ l phần phân ước chứa mẫu được điện di chuẩn trên gel agarosa 2%. Như được minh họa trên Fig.19C, PCR với ADN hệ gen của chủng cv. Sebastian với sự có mặt của bộ đoạn mỗi số 30 lần lượt tạo ra đoạn ADN 121bp và đoạn 0. Còn PCR với ADN hệ gen của thể đột biến 14018 với sự có mặt của đoạn mỗi số 30 lần lượt thu được đoạn 0 và đoạn ADN 121-bp. Trong các trường hợp trong đó kết quả sau là hậu quả PCR với ADN hệ gen của hạt lúa mạch không được nhận dạng, chắc chắn rằng ADN khuôn mẫu là đồng nhất với ADN của thể đột biến 14018. Các nỗ lực sau đó nhằm ủng hộ cho kết luận bao gồm các phân tích để thử nghiệm về lượng SMM (xem ví dụ 2), và về hoạt tính MMT (xem ví dụ 4).

Một phương pháp riêng biệt để xác nhận rằng thể đột biến 14018 không chứa MMT tham gia vào phép thẩm tách Western, bằng cách sử dụng quy trình kỹ thuật và kháng thể kháng MMT như được mô tả một cách chi tiết trong ví dụ 3. Trong điều kiện thực tế, các hạt của chủng cv. Sebastian và thể đột biến 14018 được cho nảy mầm ở nhiệt độ 20°C trong 4 ngày, sau đó là đồng nhất hóa một hạt hoang và một hạt của thể đột biến, mỗi loại chứa trong 100 μ L H₂O. Sau khi ly tâm ở tốc độ 13000 vòng/phút trong 10 phút, hỗn hợp 15 μ L mỗi chất nổi trên bề mặt với 5 μ L dung dịch đệm nạp SDS, đun sôi trong 5 phút, nạp vào gel SDS-polyacrylamit 12%, tách bằng cách điện di, điện thẩm tách, và cuối cùng thử bằng kháng thể kháng MMT đa dòng (Fig.15D). Băng protein MMT khác biệt 120 kDa dễ dàng được nhận dạng trong phần chiết của chủng cv. Sebastian, trong khi protein không có phản ứng miễn dịch của thể đột biến 14018 cùng di chuyển với protein đánh dấu 120kDa. Do đó, phương pháp thẩm tách Western nêu trên là hữu ích để kiểm tra xem liệu có phải các hạt lúa mạch nảy mầm tạo ra MMT hoặc không có khả năng này.

Các thử nghiệm phân tử và sinh hóa tiếp theo có thể được sử dụng để khẳng định xem liệu có phải hạt nêu trên thu được từ thể đột biến 14018 hay không.

Bảng 9: Các đoạn mồi để phát hiện SNP của thể đột biến 14018

Bộ đoạn mồi số	Các đầu của sản phẩm PCR	Thành phẩm (SEQ ID NO:)	Đoạn mồi xuôi (trình tự ADN 5'→3' cho trước) ****	Đoạn mồi ngược (trình tự ADN 5'→3')*****
29	1361-1481*	35	GGCATCCAGATTCCATCTTCAG (SEQ ID NO: 97)	CTACGGAACAAGAGGTGCCAAC (SEQ ID NO: 101)
30	1361-1483**	36	GGCATCCAGATTCCATCTTCAG (SEQ ID NO: 98)	CTACGGAACAAGAGGTGCCAAT (SEQ ID NO: 102)
31	1361-1483**	36	GGCATCCAGATTCCATCTTCAG (SEQ ID NO: 99)	CTACGGAACAAGAGGTGCCAAT (SEQ ID NO: 103)
	2831-3101***	34	CGATTCCAGCTCCGGTTG (SEQ ID NO: 100)	CATCTAGTCACTCAAAGAATTGCTAT (SEQ ID NO: 104)

*) Đánh số cặp bazơ dưới dạng cặp bazơ của trình tự gen kiểu dại đối với MMT (SEQ ID NO:16).

**) Đánh số cặp bazơ dưới dạng cặp bazơ của trình tự gen đối với MMT của thể đột biến 14018 (SEQ ID NO:19).

***) Đánh số cặp bazơ dưới dạng cặp bazơ của trình tự gen đối với MMT của thể đột biến 8063 (SEQ ID NO:8).

****) Trình tự ở đầu 5' của đoạn được nêu trong cột có tên "các đầu của sản phẩm RT-PCR".

*****) Trình tự bổ sung ở đầu 3' của đoạn được nêu trong cột có tên "các đầu của sản phẩm RT-PCR".

Danh mục tư liệu sáng chế

Patent Mỹ số 4,683,195 cấp cho Mullis, K.B. et al.

Patent Mỹ số 4,800,159 cấp cho Mullis, K.B. et al.

Patent Mỹ số 5,242,694 cấp cho Reuther, H.

Patent Mỹ số 6,660,915 cấp cho Douma, A.C. et al.

Patent Mỹ số 7,420,105 cấp cho Breddam, K. et al.

Đơn yêu cầu patent Mỹ số 2006/0057684 cấp cho Bisgaard-Frantzen, H. et al.

Patent Úc số 38578/93

Công bố đơn quốc tế số WO 2005/087934 của Breddam, K. et al.

Các ấn phẩm khác

American Association of Cereal Chemists, "Approved methods of the American Association of Cereal Chemists." ISBN 0-913250-86-4 (1995).

American Society of Brewing Chemists, "Methods of analysis of the American Society of Brewing Chemists." ISBN 1-881696-01-4 (1992).

Bourgis, F. et al., "S-Methylmethionine plays a major role in phloem sulfur transport and is synthesized by a novel type of methyltransferase." *Plant Cell* 11:1485-1497, 1999.

Briggs, D.E. et al., "Malting and brewing science. Volume I Malt and sweet wort." Chapman and Hall, New York, USA. ISBN 0412165805, 1981.

Dufour, J.P., "Direct assay of S-methylmethionine using high-performance liquid chromatography and fluorescence techniques." *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 44:1-6, 1986.

Durai, S. et al., "Zinc finger nucleases: custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells." *Nucleic Acids Res.* 33:5978-5990, 2005.

European Brewery Convention, "Analytica - EBC." ISBN 3-418-00759-7 (1998).

Hansen, M. et al., "Antisense-mediated suppression of C-hordein biosynthesis in the barley grain results in correlated changes in the transcriptome, protein profile, and amino acid composition." *J. Exp. Bot.* 58:3987-3995, 2007.

Hough, J.S. et al. "Malting and brewing science. Volume II Hopped wort and beer." Chapman and Hall, New York, USA. ISBN 0412165902, 1982.

Hysert, D.W. et al., "The origin and control of dimethyl sulfide and its precursor in malt." *Tech. Q. MBAA* 17:34-43, 1980.

Iida, S. and Terada, R., "Modification of endogenous natural genes by gene targeting in rice and other higher plants." *Plant Mol. Biol.* 59:205-219, 2005.

Imashuku, H., "Two new technologies for efficient and flexible wort boiling: 1. Rest before wort boiling to convert SMM to DMS; 2. Hop boiling separately

from wort." 3rd World Brewing Congress, Presentation 0-52, Program Book, p. 91 and attached presentation slides, 2008.

Institute of Brewing, "Institute of Brewing. Methods of analysis." ISBN 0-900489-10-3, 1997.

Kleinhofs, A. et al., "Induction and selection of specific gene mutations in *Hordeum* and *Pisum*." *Mutat. Res.* 51:29-35, 1978.

Ko, S. et al., "S-Methylmethionine is both a substrate and an inactivator of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase." *Arch. Biochem. Biophys.* 421:85-90, 2004.

Kocsic, M.G. et al., "Insertional inactivation of the methionine S-methyltransferase gene eliminates the S-methylmethionine cycle and increases the methylation ratio." *Plant Physiol.* 131:1808-1815, 2003.

Kumar, S. et al., "Gene targeting in plants: fingers on the move." *Trends Plant Sci.* 11:159-161, 2006.

Lai, S. et al., "A splice site mutant of maize activates cryptic splice sites, elicits intron inclusion and exon exclusion, and permits branch point elucidation." *Plant Physiol.* 121:411-418, 1999.

Maquat, L.E. and Carmichael, G.G., "Quality control of mRNA function." *Cell* 104:173-176, 2001.

McElroy, D. and Jacobsen, J., "What's brewing in barley biotechnology?" *Bio/Technology* 13:245-249, 1995.

Meilgaard, M.C., "Prediction of flavour differences between beers from their chemical composition." *J. Agric. Food Chem.* 30:1009-1017, 1982.

Mendell, J.T. and Dietz, H.C., "When the message goes awry: Disease-producing mutations that influence mRNA content and performance." *Cell* 107:411-414, 2002.

Mudd, S.H. and Datko, A.H., "The S-methylmethionine cycle in *Lemna*

paucicostata." *Plant Physiol.* 93:623-630, 1990.

Nevo, E. "Origin, evolution, population genetics and resources for breeding of wild barley, *Hordeum spontaneum*, in the Fertile Crescent." In Shewry, P.R. (ed.): "Barley: Genetics, Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology," pp. 19-43. CAB International, Wallingford, UK. ISBN 0-85198-725-7, 1992. 1992.

Pimenta, M.J. et al., "Determination of S-adenosyl-L-methionine:L-methionine S-methyltransferase activity by selective adsorption of [methyl-³H]S-adenosylmethionine onto activated charcoal." *Anal. Biochem.* 225:167-169, 1995.

Phenomenex, "HPLC application." ID No.: 15992, 2006.

Ranocha, P. et al., "The S-methylmethionine cycle in angiosperms: ubiquity, antiquity and activity." *Plant J.* 25:575-584, 2001.

Rasmussen, S.K. and Hatzack, F., "Identification of two low-phytate barley (*Hordeum vulgare* L.) grain mutants by TLC and genetic analysis." *Hereditas* 129:107-112, 1998.

Robbins M.P. et al., "Gene manipulation of condensed tannins in higher plants." *Plant Physiol.* 116:1133-1144, 1998.

Sambrook, J. and Russell, D.W., "Molecular cloning. A laboratory manual, 3rd Ed.", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, U.S.A. ISBN 0-87969-577-3, 2001.

Scheuren, H. and Sommer, K., "Vaporescence versus boiling - Expulsion of aromatic compounds during the whole wort production." 3rd World Brewing Congress, Presentation 0-55, Program Book, p. 92 and attached presentation slides, 2008.

Sinibaldi, R.M. and Mettler I.J., "Intron splicing and intron-mediated enhanced expression in monocots." *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 42:229-257, 1992.

Stahl, Y. et al., "Antisense downregulation of the barley limit dextrinase inhibitor modulates starch granule sizes distribution, starch composition and

amylopectin structure". *Plant J.* 39:599-611, 2004.

Tagmount, A. et al., "An essential role of S-adenosyl-L-methionine:L-methionine S-methyltransferase in selenium volatilization by plants. Methylation of selenomethionine to selenium-methyl-L-selenium-methionine, the precursor of volatile selenium." *Plant Phys.* 130:847-856, 2002.

Thanbichler, M. et al., "S-Methylmethionine metabolism in *Escherichia coli*." *J. Bacteriol.* 181:662-665, 1998.

Tzfira, T. and White, C, "Towards targeted mutagenesis and gene replacement in plants." *Trends Biotechnol.* 23:567-569, 2005.

von Bothmer, R. "The wild species of *Hordeum*: Relationships and potential use for Improvement of cultivated barley." In Shewry, P. R. (ed.): "Barley: Genetics, Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology," pp. 3-18. CAB International, Wallingford, UK. ISBN 0-85198-725-7, 1992.

Wu, J. et al., "Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) silences the accumulation of aberrant trypsin proteinase inhibitor mRNA in *Nicotiana attenuata*." *Plant J.* 51:693-706, 2007.

Bảng 10: Danh mục các trình tự

SEQ ID	Kiểu	Mô tả
NO:1	Axit nucleic	ADN bổ trợ của lúa mạch chủng cv. Haruna Nijo, mở rộng các codon bắt đầu và kết thúc của gen đối với MMT, trình tự ADN bổ trợ của khung đọc mở đối với MMT. Trình tự chiết được từ ngân hàng gen (GenBank) số hiệu lưu giữ AB028870.
NO:2	Protein	Trình tự đối với MMT của lúa mạch chủng cv. Haruna Nijo, được dịch mã từ SEQ ID NO:1.
NO:3	Axit nucleic	gADN của lúa mạch chủng cv. Prestige, trình tự gen mở rộng các codon bắt đầu và kết thúc của gen đối với MMT.
NO:4	Axit nucleic	ADN bổ trợ của lúa mạch chủng cv. Prestige, mở rộng các codon bắt đầu và kết thúc của gen đối với MMT, trình tự ADN bổ trợ của khung đọc mở đối với MMT.
NO:5	Axit nucleic	ADN bổ trợ được tách dòng lại của lúa mạch chủng cv. Prestige; ADN bổ trợ được tách dòng lại của khung đọc mở đối với MMT mở rộng các codon bắt đầu và kết thúc của gen đối với MMT, nhưng chứa ba đột biến (xem Ví dụ 10). Được sử dụng để biểu hiện khác kiểu MMT của lúa mạch trong E. coli.
NO:6	Protein	Trình tự đối với MMT của lúa mạch chủng cv. Prestige, được dịch mã từ SEQ ID NO:4.
NO:7	Protein	Trình tự đối với MMT của lúa mạch chủng, cv. Prestige, được dịch mã từ SEQ ID NO:5, được sử dụng để tổng hợp ở E. coli.
NO:8	Axit nucleic	gADN của lúa mạch chứa thể đột biến 8063, trình tự gen đối với MMT mở rộng các codon bắt đầu và kết thúc của gen đối với MMT.
NO:9	Axit nucleic	Trình tự của đoạn RT-PCR được mở rộng của lúa mạch chủng cv. Prestige, tương ứng với Sản phẩm 1 trên Fig.12B và Fig.12C.
NO:10	Axit nucleic	Trình tự của đoạn RT-PCR được mở rộng của lúa mạch chứa thể đột biến 8063, tương ứng với Sản phẩm 2 trên Fig. 12B và Fig.12C.
NO:11	Protein	Trình tự được dịch mã hoàn toàn thu được từ ARN được tách sai của thể đột biến 8063, ARN chức năng nêu trên là khuôn mẫu khi mở rộng RT-PCR tạo ra Sản phẩm 2 trên Fig.12B và Fig.12C.
NO:12	Axit nucleic	Trình tự của đoạn RT-PCR được mở rộng của lúa mạch chứa thể đột biến 8063, tương ứng với Sản phẩm 3 trên Fig.12B và Fig.12C.

NO:13	Protein	Trình tự được dịch mã hoàn toàn thu được từ ARN được tách sai của thể đột biến 8063, ARN chức năng nêu trên là khuôn mẫu khi mở rộng RT-PCR tạo ra Sản phẩm 3 trên Fig.12B và Fig.12C.
NO:14	Axit nucleic	Trình tự của đoạn RT-PCR được mở rộng của lúa mạch chứa thể đột biến 8063, tương ứng với Sản phẩm 4 trên Fig.12B và Fig.12C.
NO:15	Protein	Trình tự được dịch mã hoàn toàn thu được từ ARN được tách sai của thể đột biến 8063, ARN chức năng nêu trên là khuôn mẫu khi mở rộng RT-PCR tạo ra Sản phẩm 4 trên Fig.12B và Fig.12C.
NO:16	Axit nucleic	gADN của lúa mạch chủng cv. Sebastian, trình tự gen đối với MMT mở rộng các codon bắt đầu và kết thúc của gen đối với MMT.
NO:17	Axit nucleic	ADN bổ trợ của lúa mạch chủng cv. Sebastian, trình tự ADN bổ trợ của khung đọc mở đối với MMT mở rộng các codon bắt đầu và kết thúc của gen đối với MMT.
NO:18	Protein	Trình tự gen đối với MMT của lúa mạch chủng cv. Sebastian, được dịch mã từ SEQ ID NO:17.
NO:19	Axit nucleic	gADN của lúa mạch chứa thể đột biến 14018, trình tự gen đối với MMT mở rộng các codon bắt đầu và kết thúc của gen đối với MMT.
NO:20	Axit nucleic	Trình tự của đoạn RT-PCR được mở rộng của lúa mạch chủng cv. Sebastian, tương ứng với Sản phẩm 5 trên Fig.16B và Fig.16C.
NO:21	Axit nucleic	Trình tự của đoạn RT-PCR được mở rộng của lúa mạch chứa thể đột biến 14018, tương ứng với Sản phẩm 6 trên Fig.16B và Fig.16C.
NO:22	Protein	Trình tự được dịch mã hoàn toàn thu được từ ARN được tách sai của thể đột biến 14018, ARN chức năng nêu trên là khuôn mẫu khi mở rộng RT-PCR tạo ra Sản phẩm 6 trên Fig.16B và Fig.16C.
NO:23	Axit nucleic	Trình tự của đoạn RT-PCR được mở rộng của lúa mạch chứa thể đột biến 14018, tương ứng với Sản phẩm 7 trên Fig.16B và Fig.16C.
NO:24	Protein	Trình tự được dịch mã hoàn toàn thu được từ ARN được tách sai của thể đột biến 8063, ARN chức năng nêu trên là khuôn mẫu khi mở rộng RT-PCR tạo ra Sản phẩm 7 trên Fig.16B và Fig.16C.
NO:25	Axit nucleic	Trình tự của đoạn RT-PCR được mở rộng của lúa mạch chứa thể đột biến 14018, tương ứng với Sản phẩm 8 trên Fig.16B và Fig.16C.

NO:26	Protein	Trình tự được dịch mã hoàn toàn thu được từ ARN được tách sai của thể đột biến 8063, ARN chức năng nêu trên là khuôn mẫu khi mở rộng RT-PCR tạo ra Sản phẩm 8 trên Fig.16B và Fig.16C.
NO:27	Axit nucleic	Đoạn SacII-BamHI của Sản phẩm 2 (Fig.12B và Fig.12C) - với vị trí BamHI được đưa một cách trực tiếp vào đầu dưới của codon kết thúc dịch mã – để tạo lập plasmit biểu hiện pET19b-Line8063-Prod2 (xem Fig.13B).
NO:28	Axit nucleic	Đoạn SacII-BamHI của Sản phẩm 3 (Fig.12B và Fig.12C) - với vị trí BamHI được đưa một cách trực tiếp vào đầu dưới của codon kết thúc dịch mã - để tạo lập plasmit biểu hiện pET19b-Line 8063-Prod3 (xem Fig.13C) (đồng nhất với SEQ ID NO:27).
NO:29	Axit nucleic	Đoạn SacII-BamHI của Sản phẩm 4 (Fig.12B và Fig.12C) - với vị trí BamHI được đưa một cách trực tiếp vào đầu dưới của codon kết thúc dịch mã – để tạo lập plasmit biểu hiện pET19b-Line8063-Prod4 (xem Fig.13D).
NO:30	Axit nucleic	Đoạn SacII-BamHI của Sản phẩm 6 (Fig. 16B,C) - với vị trí BamHI được đưa một cách trực tiếp vào đầu dưới của codon kết thúc dịch mã – để tạo lập plasmit biểu hiện pET19b-Line14018-Prod6 (xem Fig.17B).
NO:31	Axit nucleic	Đoạn SacII-BamHI của Sản phẩm 7 (Fig.16B và Fig.16C) - với vị trí BamHI được đưa một cách trực tiếp vào đầu dưới của codon kết thúc dịch mã – để tạo lập plasmit biểu hiện pET19b-Line14018-Prod7 (xem Fig.17C).
NO:32	Axit nucleic	Đoạn SacII-BamHI của Sản phẩm 8 (Fig.16B và Fig.16C) - với vị trí BamHI được đưa một cách trực tiếp vào đầu dưới của codon kết thúc dịch mã – để tạo lập plasmit biểu hiện pET19b-Line14018-Prod8 (xem Fig.17D).
NO:33	Axit nucleic	Đoạn PCR được tạo ra từ ADN hệ gen chủng cv. Prestige, được mở rộng bằng cách sử dụng bộ đoạn mồi số 20 (xem Bảng 7).
NO:34	Axit nucleic	Đoạn PCR được tạo ra từ ADN hệ gen của thể đột biến 8063, được mở rộng bằng cách sử dụng bộ đoạn mồi số 21 (xem Bảng 7).
NO:35	Axit nucleic	Đoạn PCR được tạo ra từ ADN hệ gen chủng cv. Sebastian, được mở rộng bằng cách sử dụng bộ đoạn mồi số 29 (xem Bảng 9).
NO:36	Axit nucleic	Đoạn PCR được tạo ra từ ADN hệ gen của thể đột biến 14018, được mở rộng bằng cách sử dụng bộ đoạn mồi số 30 (xem Bảng 9).
NO:37	Axit nucleic	Đoạn mồi xuôi để mở rộng trình tự ADN bổ trợ mã hóa MMT của lúa mạch.

NO:38	Axit nucleic	Đoạn môi xuôi để mở rộng trình tự ADN bổ trợ mã hóa MMT của lúa mạch.
NO:39	Axit nucleic	Đoạn môi xuôi để mở rộng trình tự ADN bổ trợ mã hóa MMT của lúa mạch.
NO:40	Axit nucleic	Đoạn môi xuôi để mở rộng trình tự ADN bổ trợ mã hóa MMT của lúa mạch.
NO:41	Axit nucleic	Đoạn môi xuôi để mở rộng trình tự ADN bổ trợ mã hóa MMT của lúa mạch.
NO:42	Axit nucleic	Đoạn môi xuôi để mở rộng trình tự ADN bổ trợ mã hóa MMT của lúa mạch.
NO:43	Axit nucleic	Đoạn môi ngược để mở rộng trình tự gen mã hóa MMT của lúa mạch.
NO:44	Axit nucleic	Đoạn môi ngược để mở rộng trình tự gen mã hóa MMT của lúa mạch.
NO:45	Axit nucleic	Đoạn môi ngược để mở rộng trình tự gen mã hóa MMT của lúa mạch.
NO:46	Axit nucleic	Đoạn môi ngược để mở rộng trình tự gen mã hóa MMT của lúa mạch.
NO:47	Axit nucleic	Đoạn môi ngược để mở rộng trình tự gen mã hóa MMT của lúa mạch.
NO:48	Axit nucleic	Đoạn môi ngược để mở rộng trình tự gen mã hóa MMT của lúa mạch.
NO:49	Axit nucleic	Đoạn môi xuôi để mở rộng trình tự ADN bổ trợ mã hóa MMT của lúa mạch.
NO:50	Axit nucleic	Đoạn môi xuôi để mở rộng trình tự ADN bổ trợ mã hóa MMT của lúa mạch.
NO:51	Axit nucleic	Đoạn môi xuôi để mở rộng trình tự ADN bổ trợ mã hóa MMT của lúa mạch.
NO:52	Axit nucleic	Đoạn môi xuôi để mở rộng trình tự ADN bổ trợ mã hóa MMT của lúa mạch.
NO:53	Axit nucleic	Đoạn môi xuôi để mở rộng trình tự ADN bổ trợ mã hóa MMT của lúa mạch.
NO:54	Axit nucleic	Đoạn môi xuôi để mở rộng trình tự ADN bổ trợ mã hóa MMT của lúa mạch.
NO:55	Axit nucleic	Đoạn môi xuôi để mở rộng trình tự ADN bổ trợ mã hóa MMT của lúa mạch.
NO:56	Axit nucleic	Đoạn môi xuôi để mở rộng trình tự ADN bổ trợ mã hóa MMT của lúa mạch.

NO:57	Axit nucleic	Đoạn môi ngược để mở rộng trình tự ADN bổ trợ mã hóa MMT của lúa mạch.
NO:58	Axit nucleic	Đoạn môi ngược để mở rộng trình tự ADN bổ trợ mã hóa MMT của lúa mạch.
NO:59	Axit nucleic	Đoạn môi ngược để mở rộng trình tự ADN bổ trợ mã hóa MMT của lúa mạch.
NO:60	Axit nucleic	Đoạn môi ngược để mở rộng trình tự ADN bổ trợ mã hóa MMT của lúa mạch.
NO:61	Axit nucleic	Đoạn môi ngược để mở rộng trình tự ADN bổ trợ mã hóa MMT của lúa mạch.
NO:62	Axit nucleic	Đoạn môi ngược để mở rộng trình tự ADN bổ trợ mã hóa MMT của lúa mạch.
NO:63	Axit nucleic	Đoạn môi ngược để mở rộng trình tự ADN bổ trợ mã hóa MMT của lúa mạch.
NO:64	Axit nucleic	Đoạn môi ngược để mở rộng trình tự ADN bổ trợ mã hóa MMT của lúa mạch.
NO:65	Axit nucleic	Đoạn môi xuôi để phát hiện sự tách intron của gen mã hóa MMT của lúa mạch theo phương án thay thế.
NO:66	Axit nucleic	Đoạn môi xuôi để phát hiện sự tách intron của gen mã hóa MMT của lúa mạch theo phương án thay thế.
NO:67	Axit nucleic	Đoạn môi xuôi để phát hiện sự tách intron của gen mã hóa MMT của lúa mạch theo phương án thay thế.
NO:68	Axit nucleic	Đoạn môi xuôi để phát hiện sự tách intron của gen mã hóa MMT của lúa mạch theo phương án thay thế.
NO:69	Peptit	His-tag
NO:70	Peptit	Vị trí Enterokinaza
NO:71	Axit nucleic	Đoạn môi xuôi để mở rộng đoạn protein mã hóa trình tự gen đối với MMT của lúa mạch.
NO:72	Axit nucleic	Đoạn môi ngược để mở rộng đoạn protein mã hóa trình tự gen đối với MMT của lúa mạch.
NO:73	Axit nucleic	Đoạn môi ngược để mở rộng đoạn ADN của thể đột biến 8063
NO:74	Axit nucleic	Đoạn môi xuôi để mở rộng đoạn ADN của thể đột biến 8063
NO:75	Axit nucleic	Đoạn môi ngược để mở rộng đoạn ADN của thể đột biến 8063
NO:76	Axit nucleic	Đoạn môi ngược để mở rộng đoạn ADN của thể đột biến 8063

NO:77	Axit nucleic	Đoạn môi xuôi để phát hiện SNP của thể đột biến 8063
NO:78	Axit nucleic	Đoạn môi xuôi để phát hiện SNP của thể đột biến 8063
NO:79	Axit nucleic	Đoạn môi xuôi để phát hiện SNP của thể đột biến 8063
NO:80	Axit nucleic	Đoạn môi xuôi để phát hiện SNP của thể đột biến 8063
NO:81	Axit nucleic	Đoạn môi ngược để phát hiện SNP của thể đột biến 8063
NO:82	Axit nucleic	Đoạn môi ngược để phát hiện SNP của thể đột biến 8063
NO:83	Axit nucleic	Đoạn môi ngược để phát hiện SNP của thể đột biến 8063
NO:84	Axit nucleic	Đoạn môi ngược để phát hiện SNP của thể đột biến 8063
NO:85	Axit nucleic	Đoạn môi xuôi để mở rộng đoạn ADN của thể đột biến 14018
NO:86	Axit nucleic	Đoạn môi ngược để mở rộng đoạn ADN của thể đột biến 14018
NO:87	Axit nucleic	Đoạn môi xuôi để mở rộng đoạn ADN của thể đột biến 14018
NO:88	Axit nucleic	Đoạn môi ngược để mở rộng đoạn ADN của thể đột biến 14018
NO:89	Axit nucleic	Đoạn môi xuôi để mở rộng đoạn ADN của thể đột biến 14018
NO:90	Axit nucleic	Đoạn môi ngược để mở rộng đoạn ADN của thể đột biến 14018
NO:91	Axit nucleic	Đoạn môi xuôi để mở rộng đoạn ADN của thể đột biến 14018
NO:92	Axit nucleic	Đoạn môi ngược để mở rộng đoạn ADN của thể đột biến 14018
NO:93	Axit nucleic	Đoạn môi xuôi để mở rộng đoạn ADN của thể đột biến 14018
NO:94	Axit nucleic	Đoạn môi ngược để mở rộng đoạn ADN của thể đột biến 14018
NO:95	Axit nucleic	Đoạn môi xuôi để mở rộng đoạn ADN của thể đột biến 14018
NO:96	Axit nucleic	Đoạn môi ngược để mở rộng đoạn ADN của thể đột biến 14018
NO:97	Axit nucleic	Đoạn môi xuôi để phát hiện SNP của thể đột biến 14018
NO:98	Axit nucleic	Đoạn môi xuôi để phát hiện SNP của thể đột biến 14018
NO:99	Axit nucleic	Đoạn môi xuôi để phát hiện SNP của thể đột biến 14018
NO:100	Axit nucleic	Đoạn môi xuôi để phát hiện SNP của thể đột biến 14018
NO:101	Axit nucleic	Đoạn môi ngược để phát hiện SNP của thể đột biến 14018

NO:102	Axit nucleic	Đoạn mồi ngược để phát hiện SNP của thể đột biến 14018
NO:103	Axit nucleic	Đoạn mồi ngược để phát hiện SNP của thể đột biến 14018
NO:104	Axit nucleic	Đoạn mồi ngược để phát hiện SNP của thể đột biến 14018

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Đồ uống được sản xuất từ cây lúa mạch, hoặc bộ phận của nó, trong đó đồ uống này chứa dimethyl sulfua (DMS) với lượng nhỏ hơn 20 ppb và S-methyl-l-methionin (SMM) với lượng nhỏ hơn 20 ppb, và trong đó cây lúa mạch này, hoặc bộ phận của nó, mang đột biến trong gen mã hóa methionin S-methyl-transferaza (MMT), làm mất hoàn toàn MMT chức năng.
2. Đồ uống theo điểm 1, trong đó đồ uống nêu trên là đồ uống mạch nha.
3. Đồ uống theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó đồ uống này là bia.
4. Đồ uống theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó đồ uống này chứa DMS với lượng nhỏ hơn 10 ppb.
5. Đồ uống theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó đồ uống này chứa SMM với lượng nhỏ hơn 10 ppb.
6. Cây lúa mạch, trong đó cây lúa mạch mang đột biến trong gen mã hóa methionin-S-methyltransferaza (MMT) làm mất hoàn toàn MMT chức năng.
7. Cây lúa mạch theo điểm 6, trong đó đột biến xảy ra ở vị trí tách intron của gen mã hóa MMT.
8. Cây lúa mạch theo điểm bất kỳ trong số các điểm 6 đến 7, trong đó đột biến trong gen mã hóa MMT là đột biến G→A của bazơ số 3076 của SEQ ID NO:3 hoặc là đột biến G→A của bazơ số 1462 của SEQ ID NO:16.
9. Cây lúa mạch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 8, trong đó các kết quả gây đột biến trong gen mã hóa dạng MMT đã được cắt cụt bao gồm đoạn có đầu tận cùng N của MMT kiểu dại và tùy ý các trình tự bổ sung có đầu tận cùng C không phát hiện được trong MMT kiểu dại, trong đó đoạn có đầu tận cùng N nêu trên chứa tối đa 500 gốc axit amin có đầu tận cùng N của SEQ ID NO:6.
10. Cây lúa mạch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 9, trong đó cây lúa mạch mang đột biến gen mã hóa lipooxygenaza 1, làm mất hoàn toàn hoạt

tính của lipoxygenaza 1.

11. Bộ phận của cây lúa mạch, trong đó bộ phận của cây lúa mạch mang đột biến trong gen mã hóa methionin-S-metyltransferaza (MMT) làm mất hoàn toàn MMT chức năng.

12. Bộ phận của cây lúa mạch cây lúa mạch theo điểm 11, trong đó đột biến xảy ra ở vị trí tách intron của gen mã hóa MMT.

13. Bộ phận của cây lúa mạch theo điểm bất kỳ trong số các điểm 11 đến 12, trong đó đột biến trong gen mã hóa MMT là đột biến G→A của bazơ số 3076 của SEQ ID NO:3 hoặc là đột biến G→A của bazơ số 1462 của SEQ ID NO:16.

14. Bộ phận của cây lúa mạch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 11 đến 13, trong đó các kết quả gây đột biến trong gen mã hóa dạng MMT đã được cắt cụt bao gồm đoạn có đầu tận cùng N của MMT kiểu đại và tùy ý các trình tự bổ sung có đầu tận cùng C không phát hiện được trong MMT kiểu đại, trong đó đoạn có đầu tận cùng N nêu trên chứa tối đa 500 gốc axit amin có đầu tận cùng N của SEQ ID NO:6.

15. Bộ phận của cây lúa mạch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 11 đến 14, trong đó cây lúa mạch mang đột biến gen mã hóa lipoxygenaza 1, làm mất hoàn toàn hoạt tính của lipoxygenaza 1.

16. Đồ uống theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó đồ uống này được sản xuất từ cây lúa mạch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 10, hoặc bộ phận của cây lúa mạch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 11 đến 15.

17. Chế phẩm mạch nha chứa cây lúa mạch, hoặc bộ phận của nó, đã được xử lý, trong đó cây lúa mạch này là cây lúa mạch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 10, hoặc bộ phận của cây lúa mạch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 11 đến 15.

18. Chế phẩm mạch nha theo điểm 17, trong đó chế phẩm mạch nha này là mạch nha nghiền.

19. Chế phẩm ủ men được sản xuất ra bằng cách sử dụng cây lúa mạch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 10, hoặc bộ phận của cây lúa mạch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 11 đến 15, hoặc bằng cách sử dụng chế phẩm mạch nha được sản xuất từ cây lúa mạch hoặc bộ phận của nó, hoặc hỗn hợp của chúng, trong đó chế phẩm ủ men chứa SMM với lượng nhỏ hơn 20 ppb.

20. Phương pháp sản xuất đồ uống chứa DMS với lượng nhỏ hơn 20 ppb và SMM với lượng nhỏ hơn 20 ppb, phương pháp này bao gồm các bước:

(i) tạo ra chế phẩm chứa cây lúa mạch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 9, hoặc bộ phận của cây lúa mạch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 11 đến 15; và

(ii) xử lý chế phẩm thu được từ bước (i) thành đồ uống,

nhờ đó thu được đồ uống chứa DMS với lượng nhỏ hơn 20 ppb và SMM với lượng nhỏ hơn 20 ppb.

21. Phương pháp sản xuất chế phẩm mạch nha chứa DMS tự do với lượng tối đa là 200 ppb, phương pháp này bao gồm các bước:

(i) tạo ra các hạt từ cây lúa mạch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 10;

(ii) ngâm các hạt nêu trên;

(iii) làm nảy mầm các hạt đã được ngâm trong điều kiện xác định trước;

và

(iv) xử lý nhiệt các hạt nảy mầm;

nhờ đó tạo ra chế phẩm mạch nha chứa DMS tự do với lượng tối đa là 200 ppb.

22. Chế phẩm mạch nha theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 17 đến 18, trong đó chế phẩm mạch nha được sản xuất từ cây lúa mạch theo điểm 10, hoặc bộ phận của cây lúa mạch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 11 đến 15.

23. Chế phẩm ủ men theo điểm 19, trong đó chế phẩm ủ men được sản xuất từ cây lúa mạch theo điểm 10, hoặc bộ phận của cây lúa mạch theo điểm bất kỳ

trong số các điểm từ 11 đến 15.

24. Đồ uống theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó đồ uống được sản xuất từ cây lúa mạch theo điểm 10, hoặc từ bộ phận của cây lúa mạch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 11 đến 15.

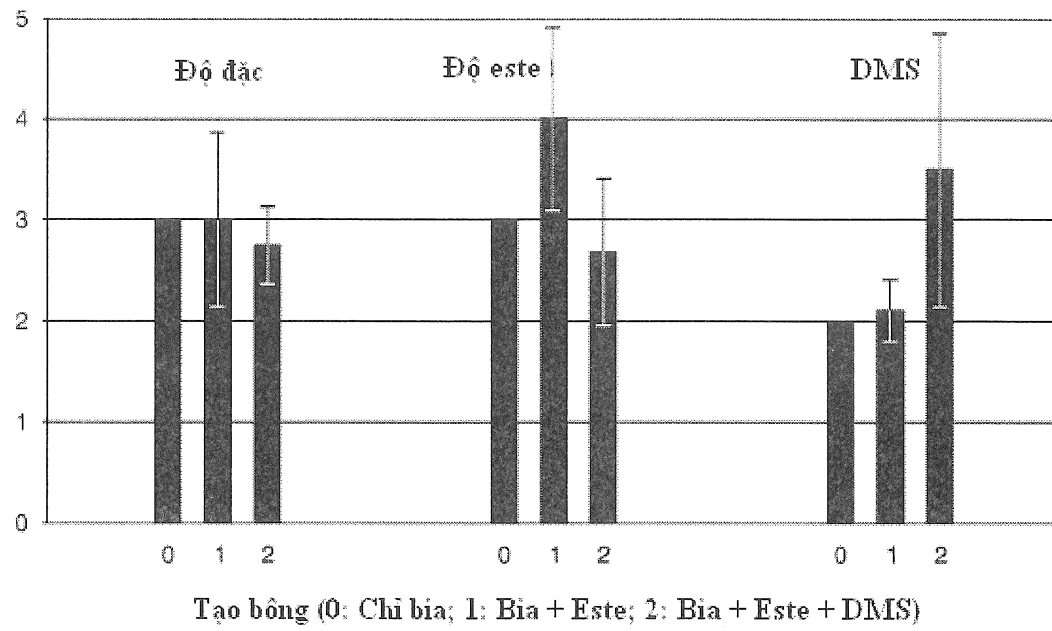
A Điểm số hương vị

FIG. 1

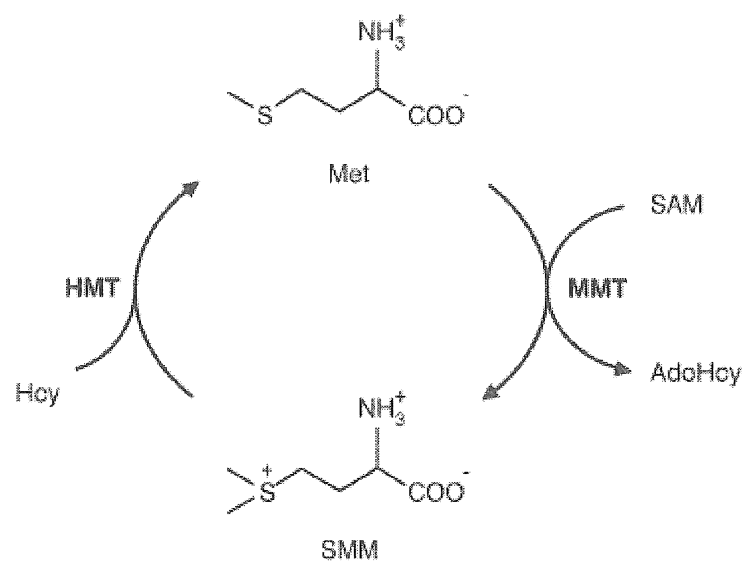
B

FIG. 1

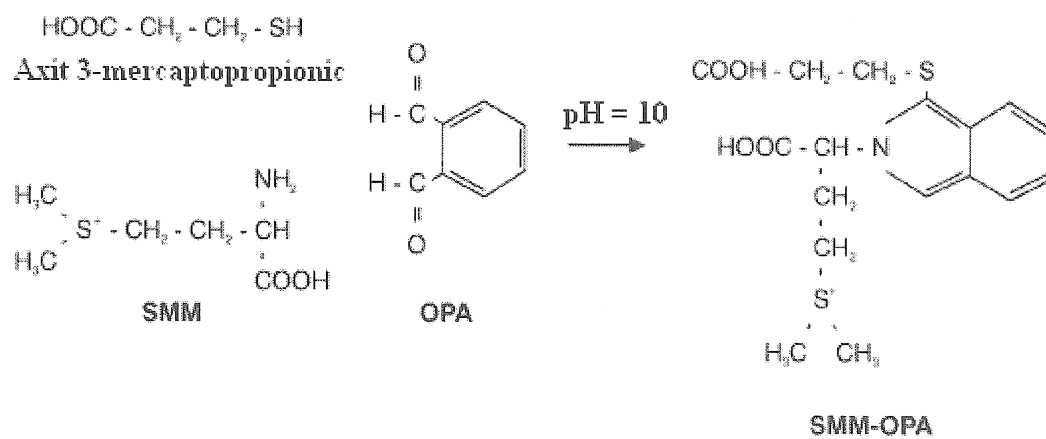


FIG. 2

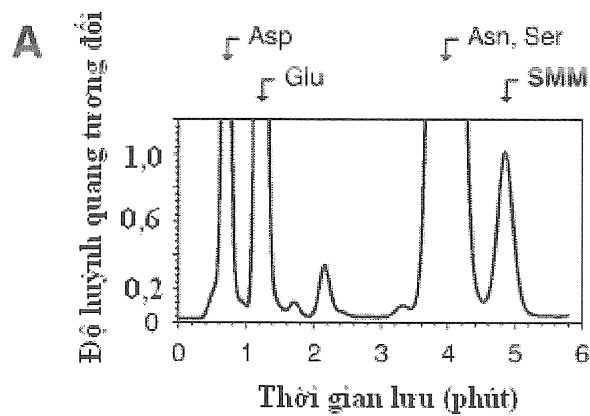


FIG. 3

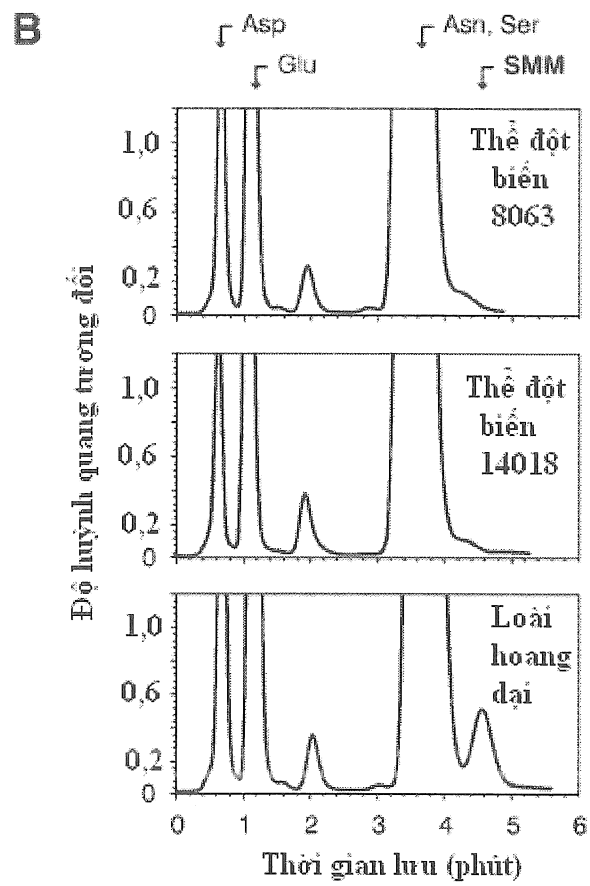


FIG. 3

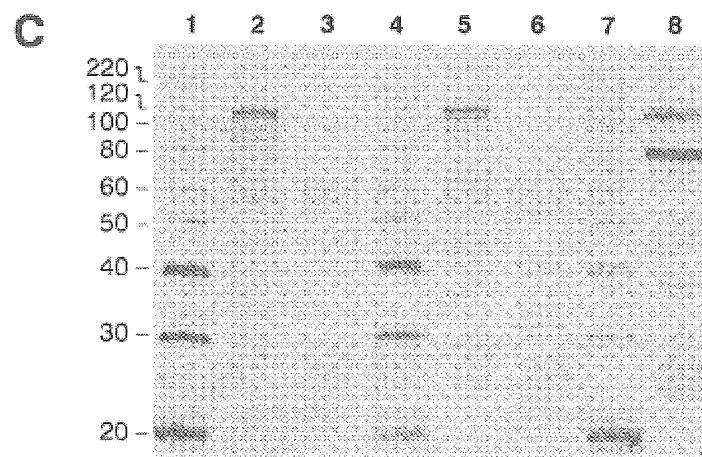


FIG. 3

Độ hoạt tính MMT (tính trong 1 phút x 1000)

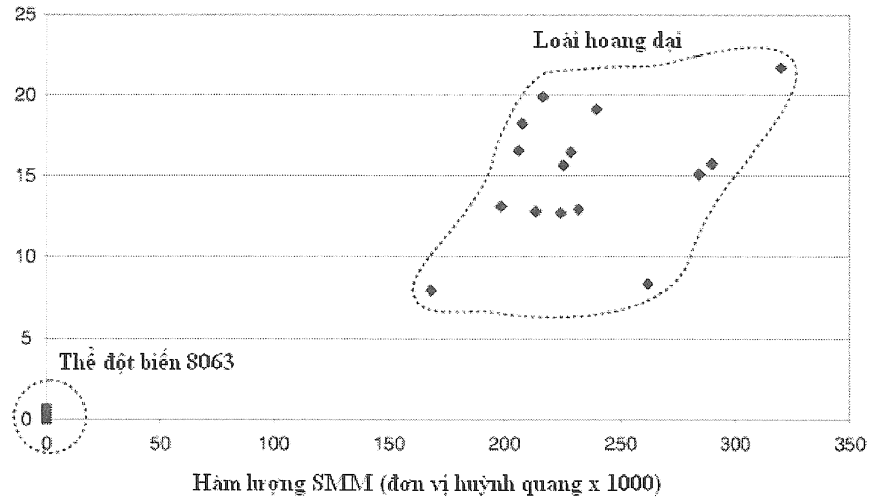


FIG. 4

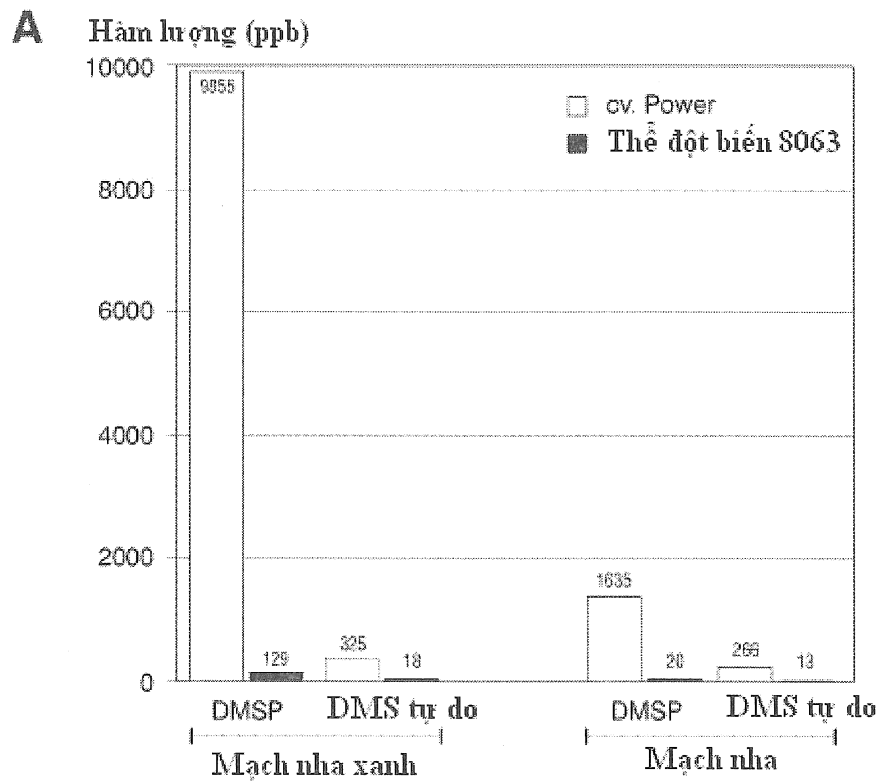


FIG. 5

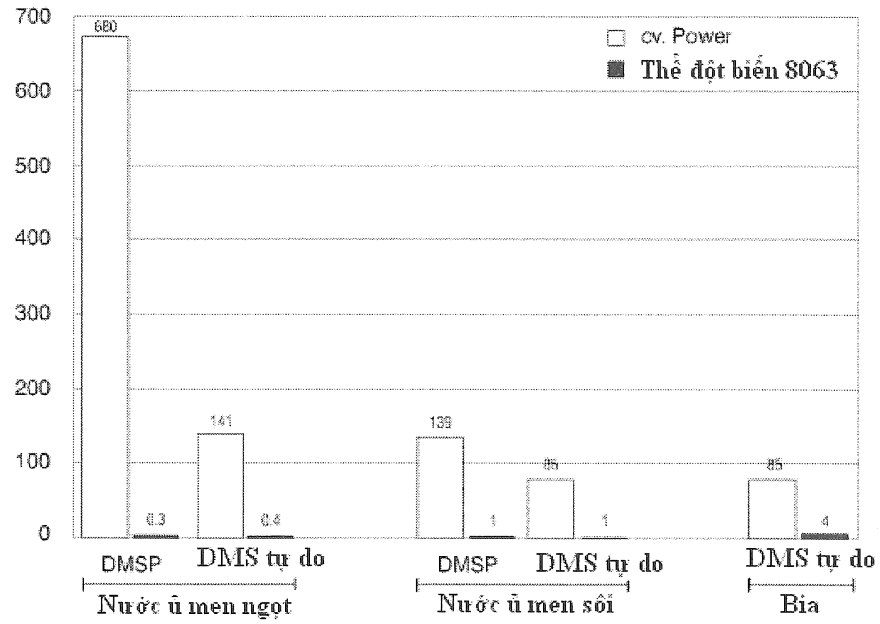
B Hàm lượng (ppb)

FIG. 5

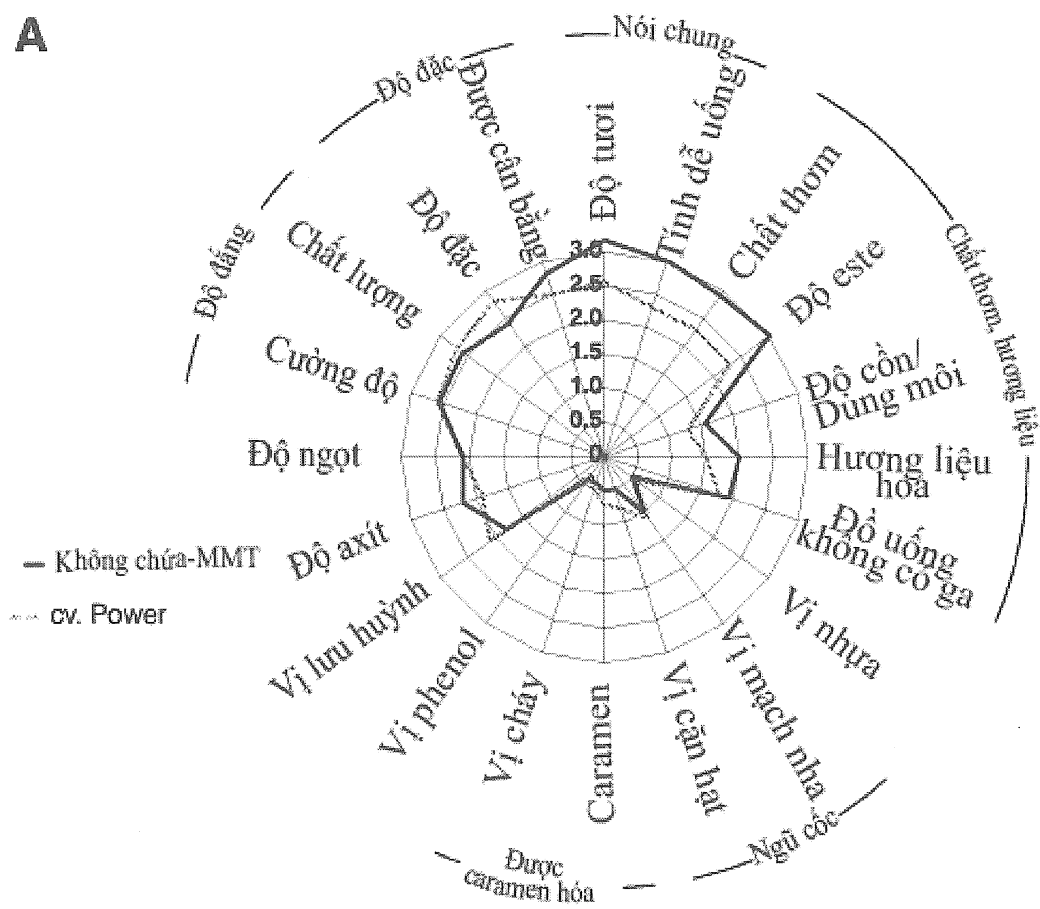
A

FIG. 6

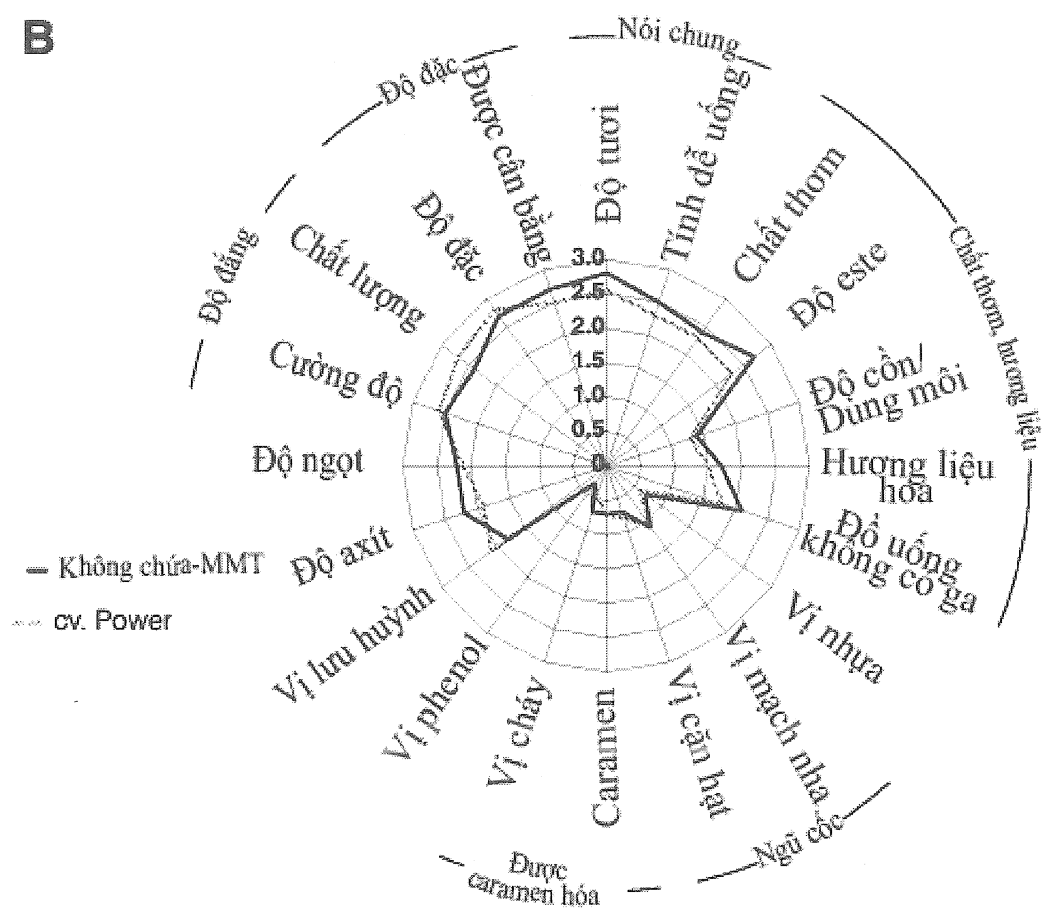
B

FIG. 6

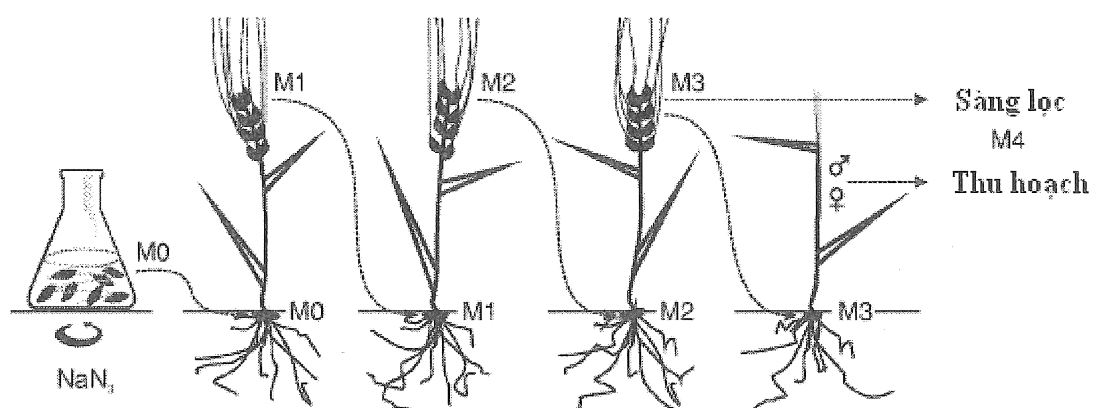


FIG. 7

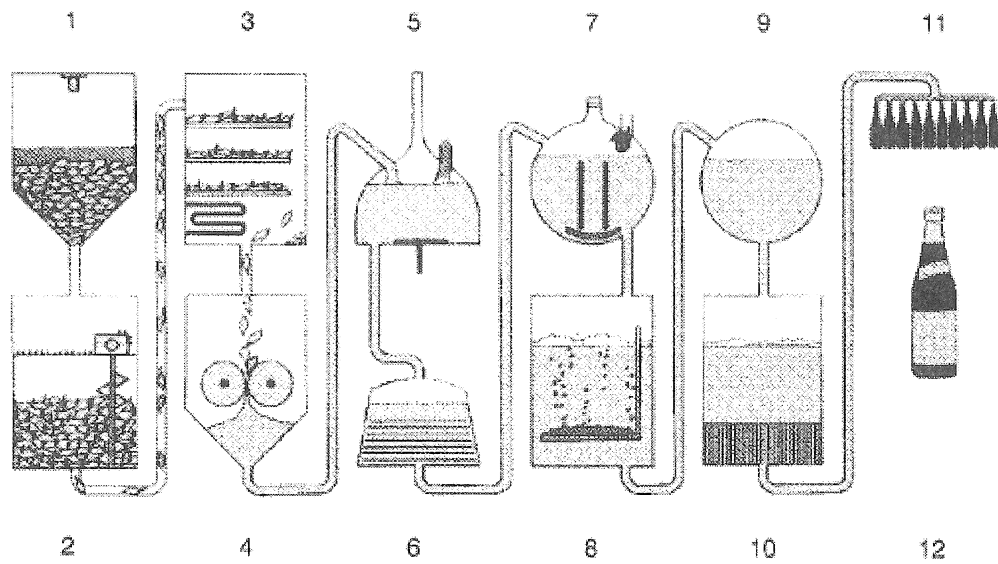


FIG. 8

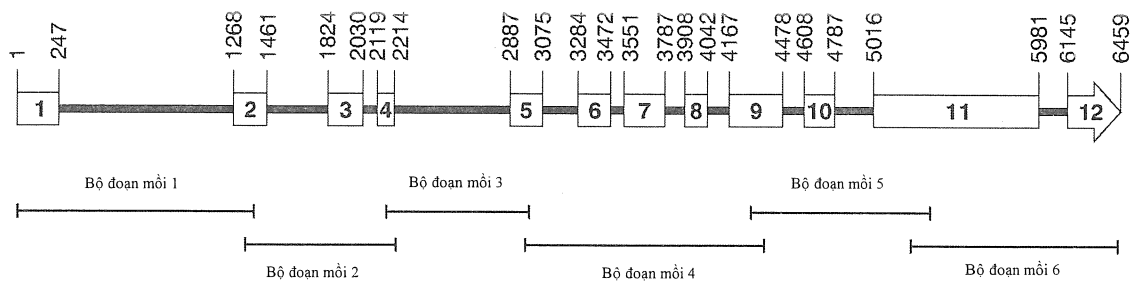


FIG. 9

1	ATGGCTGCGGCGGCGGGGACGTGGAGGCGTTCTGGCGGCGTGCCAGGCGTCGGGCGAC	60
1	M A A A A G D V E A F L A A C Q A S G D	20
61	GCGGCGTACGGCGCCGCCAAGGCCGTGCTGGAGCGGCTCGAGGCGCCGCCACGCGCGCC	120
21	A A Y G A A K A V L E R L E A P A T R A	40
121	GAGGCCAGGCGGCTCCTCGGCGCCGTGCGACGGCGCTTCGCCGCCGGCGGCCCGGCGCG	180
41	E A R R L L G A V R R R F A A G G P A A	60
181	GGGCTCGAGTGCTTCCGCACCTTCCACTTCCGCATCCACGACGTCGTCTCGACCCCCAC	240
61	G L E C F R T F H F R I H D V V L D P H	80
241	CTCCAAGGATTCCAGCAAAGAAAGAAGCTAACAATGATGGAGATACCCAGCATTTTCATT	300
81	L Q G F Q Q R K K L T M M E I P S I F I	100
301	CCAGAAGACTGGTCATTCACTTTCTACGAGGGTCTCAACCGGCATCCAGATTCCATCTTC	360
101	P E D W S F T F Y E G L N R H P D S I F	120
361	AGGGATAAGACAGTAGCAGAGCTGGGATGTGGCAATGGTTGGATATCCATTGCACTTGCA	420
121	R D K T V A E L G C G N G W I S I A L A	140
421	GAAAAGTGGTGCCCTTCGAAGGTTTATGGTCTGGATATAAACCCAAGAGCTATCAAGATT	480
141	E K W C P S K V Y G L D I N P R A I K I	160
481	GCATGGATAAACCTTTACTTGAATGCACTAGACGACGATGGTCTCCCAATCTATGATGCG	540
161	A W I N L Y L N A L D D D G L P I Y D A	180
541	GAGGGGAAAACATTGCTTGACAGAGTCGAATTCTATGAATCTGATCTTCTTTCTTACTGT	600
181	E G K T L L D R V E F Y E S D L L S Y C	200
601	AGAGATAACAAGATAGAACTTGATCGCATTGTTGGATGCATACCACAGATTCTTAACCCC	660
201	R D N K I E L D R I V G C I P Q I L N P	220
661	AATCCAGAGGCAATGTCAAAGATTGTAAGTGAATAATTCAAGTGAGGAGTTCTTGTACTCC	720
221	N P E A M S K I V T E N S S E E F L Y S	240
721	TTGAGCAACTACTGTGCTCTCCAGGGTTTTGTTGAGGACCAATTTGGCCTCGGGTTGATT	780
241	L S N Y C A L Q G F V E D Q F G L G L I	260
781	GCTCGGGCTGTTGAAGAAGGGATATCTGTGATAAAGCCTAGTGGTCTTATGGTATTCAAC	840
261	A R A V E E G I S V I K P S G L M V F N	280
841	ATGGGAGGCCGCCAGGACAAGGTGTCTGTGAGCGCCTATTTCTACGCCGTGGATTTGCG	900
281	M G G R P G Q G V C E R L F L R R G F R	300
901	ATCAATAAGCTCTGGCAAACAAAAATTATGCAGGCTGCTGACACAGACATCTCCGCTTTA	960
301	I N K L W Q T K I M Q A A D T D I S A L	320
961	GTTGAAATTGAGAAAAATAGCCGACATCGCTTCGAGTTCTTTATGGATCTTGTTGGGGAT	1020
321	V E I E K N S R H R F E F F M D L V G D	340
1021	CAGCCTGTGTGTGCGCGCACAGCATGGGCATACATGAAATCTGGTGGCCGCATTTACAT	1080
341	Q P V C A R T A W A Y M K S G G R I S H	360

FIG. 10

1081	GCTTTGTCTGTGTATAGCTGTCAACTTCGCCAGCCCAACCAGGTGAAGAAAATATTTGAG	1140
361	A L S V Y S C Q L R Q P N Q V K K I F E	380
1141	TTCTTAAAGACGGATTCCATGAAGTCAGCAGCTCCCTCGATTTGTCCTTTGATGATGAT	1200
381	F L K D G F H E V S S S L D L S F D D D	400
1201	TCTGTTGCTGATGAAAAATTCCTTTCCTAGCATACCTAGCTAGTTTCTTGCAAGAGAAT	1260
401	S V A D E K I P F L A Y L A S F L Q E N	420
1261	AAGTCTAATCCTTGTGAGCCTCCAGCTGGATGTTTAAATTTCCGGAATCTTGTGCTGGA	1320
421	K S N P C E P P A G C L N F R N L V A G	440
1321	TTTATGAAGAGTTACCACCACATCCCATTAACCTCCTGATAATGTTGTTGTGTTCCCATCC	1380
441	F M K S Y H H I P L T P D N V V V F P S	460
1381	CGTGCTGTTGCAATCGAAAATGCTCTTCGGTTGTTCTCACCTGGACTTGCAATTGTTGAC	1440
461	R A V A I E N A L R L F S P G L A I V D	480
1441	GAACACCTAACCAGACACTTGCCCAAGCAATGGTTAACATCTTTAGCAATTGAGGAAAGT	1500
481	E H L T R H L P K Q W L T S L A I E E S	500
1501	AACCATGCTAAAGATACAGTAACTGTAATCGAAGCACCACGCCAATCAGATTTGCTGATT	1560
501	N H A K D T V T V I E A P R Q S D L L I	520
1561	GAGTTGATCAGGAAACTGAAGCCTCAGGTTGTTGTTACTGGCATGGCTCAGTTTGAGGCT	1620
521	E L I R K L K P Q V V V T G M A Q F E A	540
1621	ATCACCAGTGCTGCTTTTCGTGAACCTTATTAAGTGTAACGAAAGATGTTGGTTCCTCGATTA	1680
541	I T S A A F V N L L S V T K D V G S R L	560
1681	TTACTAGATATTTTCAGAACATCTGGAATTGTCTAGTCTGCCAAGCTCAAATGGTGTATTG	1740
561	L L D I S E H L E L S S L P S S N G V L	580
1741	AAATATCTTGCTGGGAAGACCCTGCCTTCACATGCGGCTATATTGTGTGGCTTAGTTAAG	1800
581	K Y L A G K T L P S H A A I L C G L V K	600
1801	AATCAGGTTTATTCTGATCTGGAAGTTGCTTTTGCTATCTCTGAAGATCCAACGTGTTAT	1860
601	N Q V Y S D L E V A F A I S E D P T V Y	620
1861	AAGGCATTGTCACAACTATTGAGCTATTGGAAGGACATACTTCTGTGATCAGCCAGCAC	1920
621	K A L S Q T I E L L E G H T S V I S Q H	640
1921	TATTATGGTTGTCTTTTCCATGAGCTGCTGGCATTTCAAATTGGTGACCGGCATCCACAA	1980
641	Y Y G C L F H E L L A F Q I G D R H P Q	660
1981	CAAGAGAGAGAACCTGCAGAAGTGATATCTAAGGAGATGATAGGGTTTTCAAGTTCAGCT	2040
661	Q E R E P A E V I S K E M I G F S S S A	680
2041	ATGTCCACCCTAGAAGGAGCTGAGTTTTTCGTTTCCTGGTTCCATGGAATCCGGTGTGATA	2100
681	M S T L E G A E F F V P G S M E S G V I	700
2101	CATATGGATCTGGACCGCAGCTTCTTGCCAGTACCTTCTGCAGTAAACGCCTCCATTTTC	2160
701	H M D L D R S F L P V P S A V N A S I F	720
2161	GAAAGTTTTGTTGTCGACAGACATCACTGATTCTGAAACCGATGTCCGTTCCAGCATTGAG	2220
721	E S F V R Q N I T D S E T D V R S S I Q	740

FIG. 10 - tiếp

2221	CAGCTGGTGAAAGATAGCTATGGTTTCTCAGCAGGCGGTGCTTCTGAAATTATATACGGG	2280
741	Q L V K D S Y G F S A G G A S E I I Y G	760
2281	AACACCTGTCTCGCGCTCTTCAACAAGCTTGTTCTTTGCTGCATGCAAGAACAGGGCACC	2340
761	N T C L A L F N K L V L C C M Q E Q G T	780
2341	TTGCTTTTCCCCTTGGGAACCAACGGGCATTACGTCAACGCAGCAAAGTTTGTGAATGCA	2400
781	L L F P L G T N G H Y V N A A K F V N A	800
2401	ACCACCTTGACTATTCCAACGAAGGCAGATTCAAGCTTCAAGATCGAACCAAGTGCTCTA	2460
801	T T L T I P T K A D S G F K I E P S A L	820
2461	GCCGACACACTAGAGAAGGTGTCTCAGCCGTGGGTCTATATTTCTGGCCCCACAATCAAC	2520
821	A D T L E K V S Q P W V Y I S G P T I N	840
2521	CCTACTGGCTTCCTGTACAGTGACGACGATATAGCAGAGCTGCTTTCTGTCTGTGCGACA	2580
841	P T G F L Y S D D D I A E L L S V C A T	860
2581	TACGGAGCCAGGGTGGTGATAGATACCTCCTCCTCTGGTCTGGAGTTCCAAGCCACCGGC	2640
861	Y G A R V V I D T S S S G L E F Q A T G	880
2641	TGCAGCCAGTGGAATTTGGAAAGATGTCTTTCTAATGTCAAGTCTTCAAAGCCCTCGTTC	2700
881	C S Q W N L E R C L S N V K S S K P S F	900
2701	TCCGTTGTCCTGCTCGGAGAGCTGTCCTTTGAGCTGACCACGGCTGGGCTTGATTTCCGGG	2760
901	S V V L L G E L S F E L T T A G L D F G	920
2761	TTTCTGATTATGAGCGACTCGTCCTTGGTTGACACATTTTACAGTTTCCCAAGCTTGAGT	2820
921	F L I M S D S S L V D T F Y S F P S L S	940
2821	CGGCCACACAGCACGTTGAAGTACACGTTTCAGGAAGCTGTTGGGTCTTAAGAACCAGAAG	2880
941	R P H S T L K Y T F R K L L G L K N Q K	960
2881	GATCAGCATTCTCTGATCTCATCCTTGAGCAGAAGGAGACGTTGAAGAATCGTGCCGAC	2940
961	D Q H F S D L I L E Q K E T L K N R A D	980
2941	CAGTTGATCAAGACGCTTGAGAGCTGCGGCTGGGACGCTGTGGGCTGCCATGGCGGCATC	3000
981	Q L I K T L E S C G W D A V G C H G G I	1000
3001	TCGATGCTTGCAAAACCGACCGCCTACATTGGCAAATCGCTCAAGGTGGACGGCTTTGAG	3060
1001	S M L A K P T A Y I G K S L K V D G F E	1020
3061	GGCAAGCTGGACAGCCACAACATGAGGGAAGCCCTCCTGAGGTCCACCGGGCTGTGCATT	3120
1021	G K L D S H N M R E A L L R S T G L C I	1040
3121	AGCAGCAGCGGGTGGACAGGGGTGCCGGACTACTGCCGCTTCAGCTTTGCTCTGGAGAGC	3180
1041	S S S G W T G V P D Y C R F S F A L E S	1060
3181	GGCGACTTCGACCGGGCCATGGAGTGCATCGCCCGGTTTCAGGGAGCTGGTCCTTGGTGGC	3240
1061	G D F D R A M E C I A R F R E L V L G G	1080
3241	GGTGCTAAGGTGAATGGTAGCAACTAG	
1081	G A K V N G S N *	

FIG. 10 - Tiếp

cv. Haruna Nijo	1	60
cv. Prestige	MAAAAGDVEAFLAACQASGDAAYGAAKAVLERLEAPATRAEARRLLGAVRRRFAAGGPAA	MAAAAGDVEAFLAACQASGDAAYGAAKAVLERLEAPATRAEARRLLGAVRRRFAAGGPAA
cv. Haruna Nijo	61	120
cv. Prestige	GLECFRTFHFRIHDVVLDPHLQGFQQRKKLTMEIPSIFIPEDWSFTFYEGLNHRPDSIF	GLECFRTFHFRIHDVVLDPHLQGFQQRKKLTMEIPSIFIPEDWSFTFYEGLNHRPDSIF
cv. Haruna Nijo	121	180
cv. Prestige	RDKTVAELGCGNGWISIALAEKWCP SKVYGLDINPR IK IAWINLYLNALDDDGLPIYDA	RDKTVAELGCGNGWISIALAEKWCP SKVYGLDINPR IK IAWINLYLNALDDDGLPIYDA
cv. Haruna Nijo	181	240
cv. Prestige	EGKTL LDRVEFYESDLLSYCRDNKIELDRIVGCIPQILNPNPEAMSKIIVTENSSEEF LYS	EGKTL LDRVEFYESDLLSYCRDNKIELDRIVGCIPQILNPNPEAMSKIIVTENSSEEF LYS
cv. Haruna Nijo	241	300
cv. Prestige	LSNYCALQGFVEDQFGLGLIARAVEEGISVIKPSGLMVFNMGGRPQGVCERLFLRRGFR	LSNYCALQGFVEDQFGLGLIARAVEEGISVIKPSGLMVFNMGGRPQGVCERLFLRRGFR
cv. Haruna Nijo	301	360
cv. Prestige	INKLWQTKIMQAADTDISALVEIEKNSRHRFEFFMDLVGDQPVCARTAWAYMKSGGRISH	INKLWQTKIMQAADTDISALVEIEKNSRHRFEFFMDLVGDQPVCARTAWAYMKSGGRISH
cv. Haruna Nijo	361	420
cv. Prestige	ALSVYSCQLRQPNQVKKIFEF LKDG FHEVSSSLDLSFDDDSVADEKIPFLAYLASFLQEN	ALSVYSCQLRQPNQVKKIFEF LKDG FHEVSSSLDLSFDDDSVADEKIPFLAYLASFLQEN
cv. Haruna Nijo	421	480
cv. Prestige	KSNPCEPPAGCLNFRNLVAGFMKSYHHIPLTPDNVVVFPSRAVAIENALRLFSPGLAIVD	KSNPCEPPAGCLNFRNLVAGFMKSYHHIPLTPDNVVVFPSRAVAIENALRLFSPGLAIVD
cv. Haruna Nijo	481	540
cv. Prestige	EHLTRHLPKQWLTS LAIEESNHAKDVTVIEAPRQSDLLIELIRKLKPQVVVTGMAQFEA	EHLTRHLPKQWLTS LAIEESNHAKDVTVIEAPRQSDLLIELIRKLKPQVVVTGMAQFEA

FIG. 11

cv. Haruna Nijo	541	600
cv. Prestige	ITSAAFVNLLSVTKDVGSRLLLDISEHLELSSLPSSNGVLKYLAKGKTLPSHAAILCGLVK ITSAAFVNLLSVTKDVGSRLLLDISEHLELSSLPSSNGVLKYLAKGKTLPSHAAILCGLVK	
cv. Haruna Nijo	601	660
cv. Prestige	NQVYSDLEVAFAISEDPTVYKALSOTIELLEGHTSVISQHYYGCLFHELLAFQIGDRHPQ NQVYSDLEVAFAISEDPTVYKALSQTIELLEGHTSVISQHYYGCLFHELLAFQIGDRHPQ	
cv. Haruna Nijo	661	720
cv. Prestige	QEREPAEVIKEMIGFSSSAMSTLEGAEFFVPGSMESGVIHMDLDRSFLPVPSAVNASIF QEREPAEVIKEMIGFSSSAMSTLEGAEFFVPGSMESGVIHMDLDRSFLPVPSAVNASIF	
cv. Haruna Nijo	721	780
cv. Prestige	ESFVRQNITDSETDVRSSIQQLVKDSYGFSAAGGASEIIYGNTCLALFNKLVLCMQEQGT ESFVRQNITDSETDVRSSIQQLVKDSYGFSAAGGASEIIYGNTCLALFNKLVLCMQEQGT	
cv. Haruna Nijo	781	840
cv. Prestige	LLFPLGTNGHYVNAAKFVNATTLTIPTKADSGFKIEPSALADTLEKVSQPWVYISGPTIN LLFPLGTNGHYVNAAKFVNATTLTIPTKADSGFKIEPSALADTLEKVSQPWVYISGPTIN	
cv. Haruna Nijo	841	900
cv. Prestige	PTGFLYSDDDDIAELLSVCATYGARVVIDTSSSGLEFQATGCSQWNLERCLSNVKSSKPSF PTGFLYSDDDDIAELLSVCATYGARVVIDTSSSGLEFQATGCSQWNLERCLSNVKSSKPSF	
cv. Haruna Nijo	901	960
cv. Prestige	SVVLLGELSFELTTAGLDFGFLIMSDSSLVDTFYSFPSLSRPHSTLKYTFRKLLGLKNQK SVVLLGELSFELTTAGLDFGFLIMSDSSLVDTFYSFPSLSRPHSTLKYTFRKLLGLKNQK	
cv. Haruna Nijo	961	1020
cv. Prestige	DQHFSDLILEQKETLKNRADQLIKMLLESCGWDAVGCHGGISMLAKPTAYIGKSLKVDGFE DQHFSDLILEQKETLKNRADQLIKMLLESCGWDAVGCHGGISMLAKPTAYIGKSLKVDGFE	
cv. Haruna Nijo	1021	1080
cv. Prestige	GKLD SHNMREALLRSTGLCISSSGWTGVPDYCRFSFALESGDFDRAMECIARFRELVLGG GKLD SHNMREALLRSTGLCISSSGWTGVPDYCRFSFALESGDFDRAMECIARFRELVLGG	
cv. Haruna Nijo	1081	
cv. Prestige	GAKVNGSN GAKVNGSN	

FIG. 11 - Tiếp

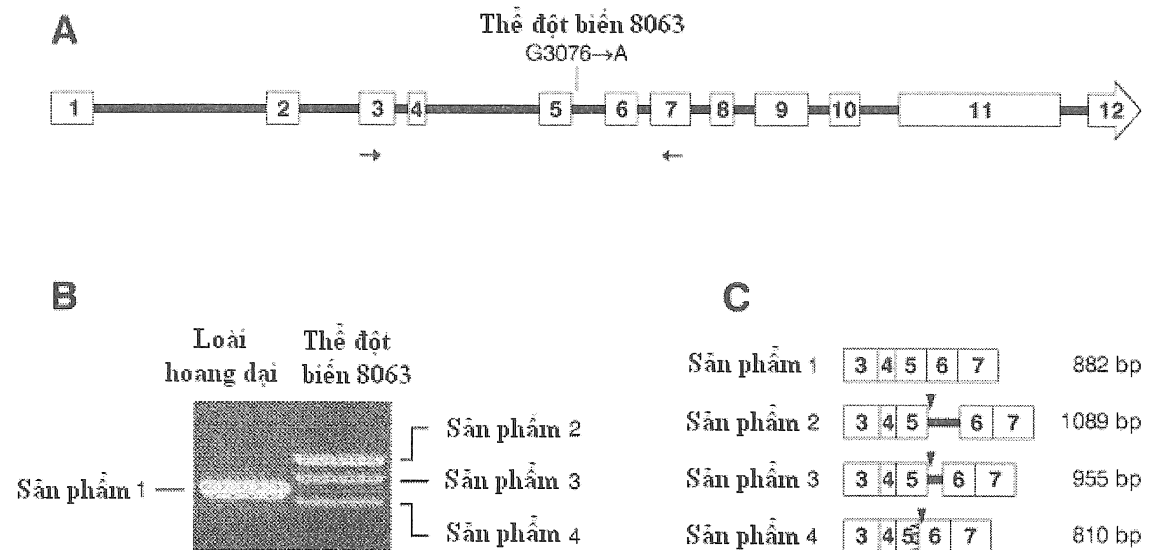


FIG. 12

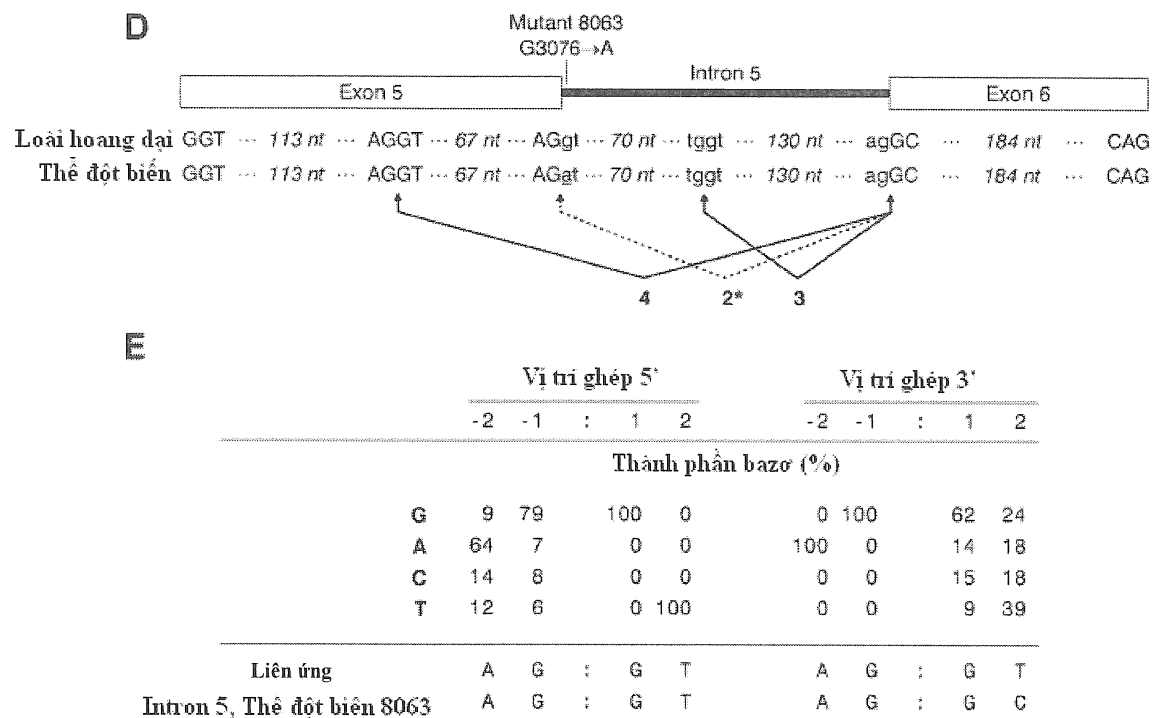


FIG. 12

FIG. 13

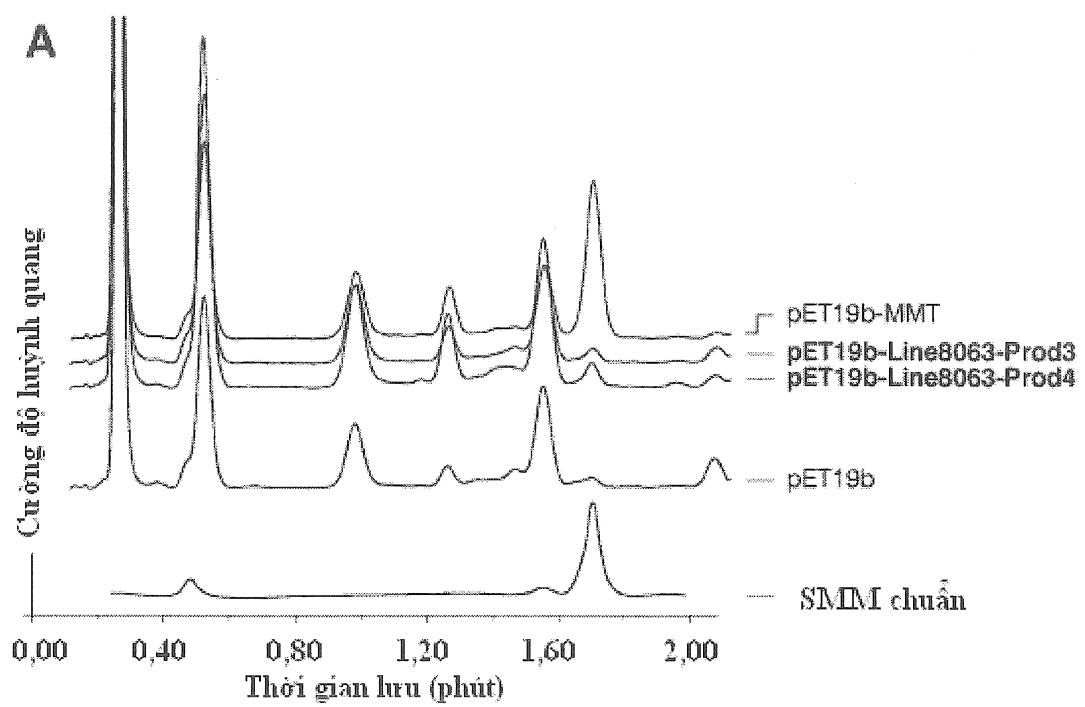


FIG. 14

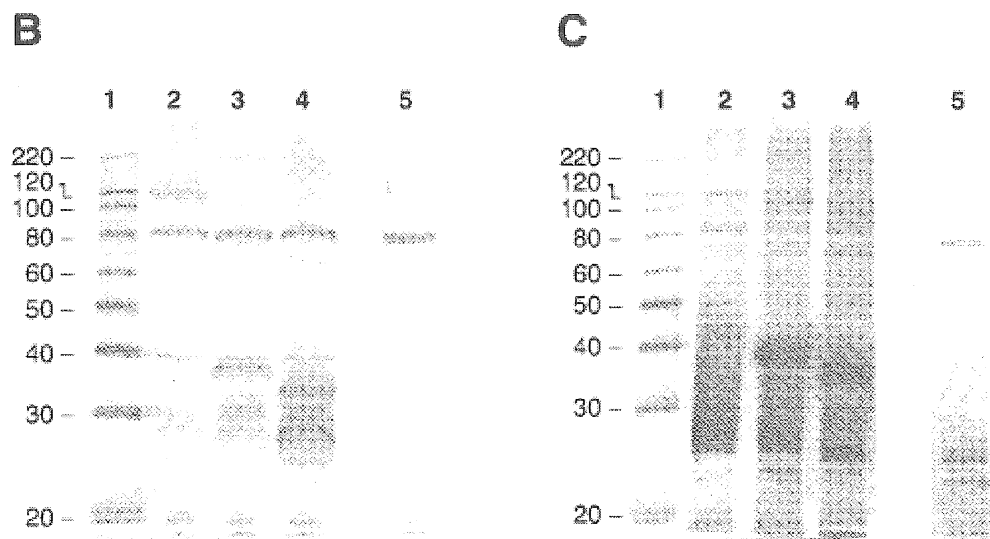


FIG. 14

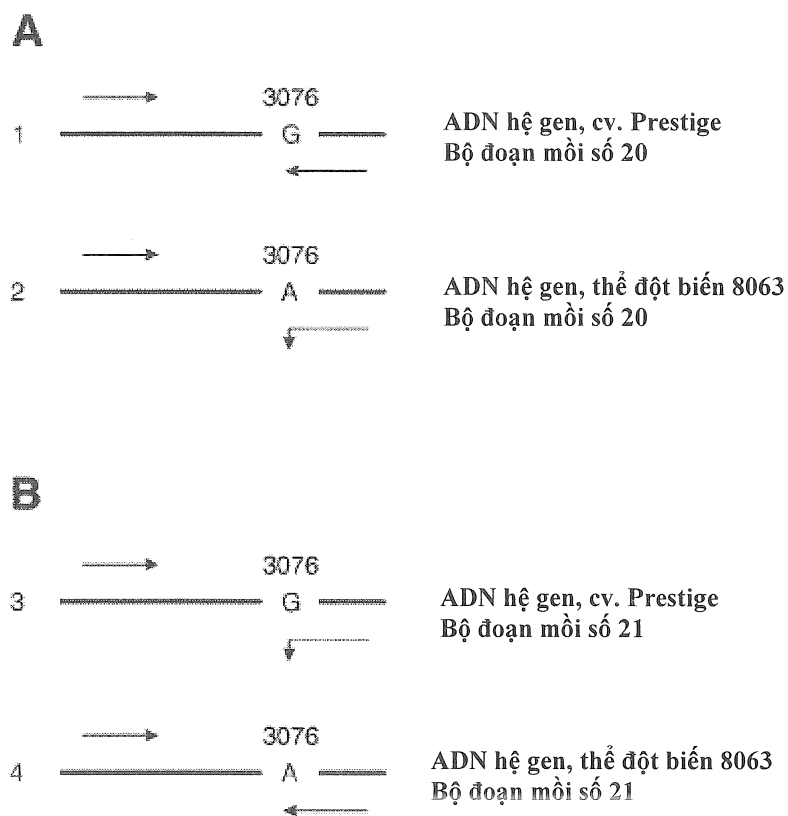


FIG. 15

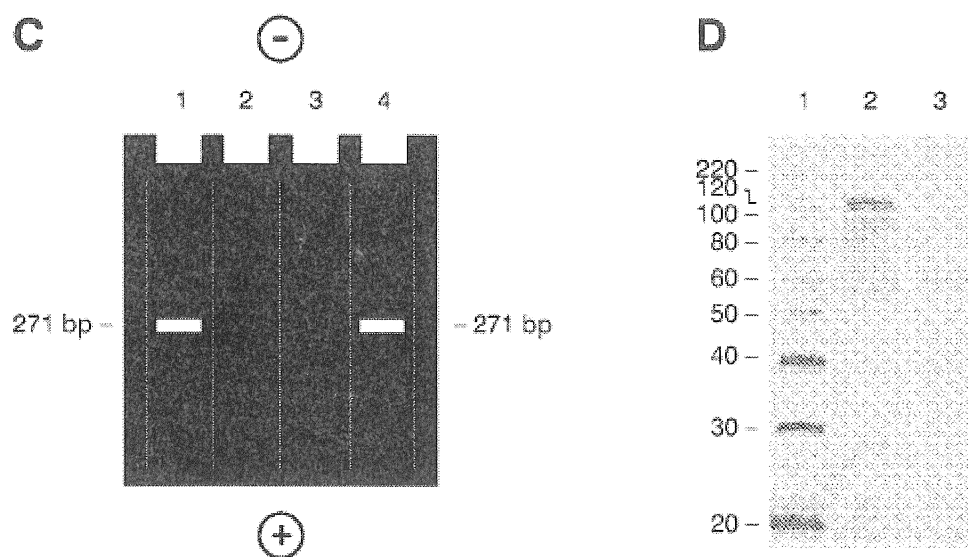


FIG. 15

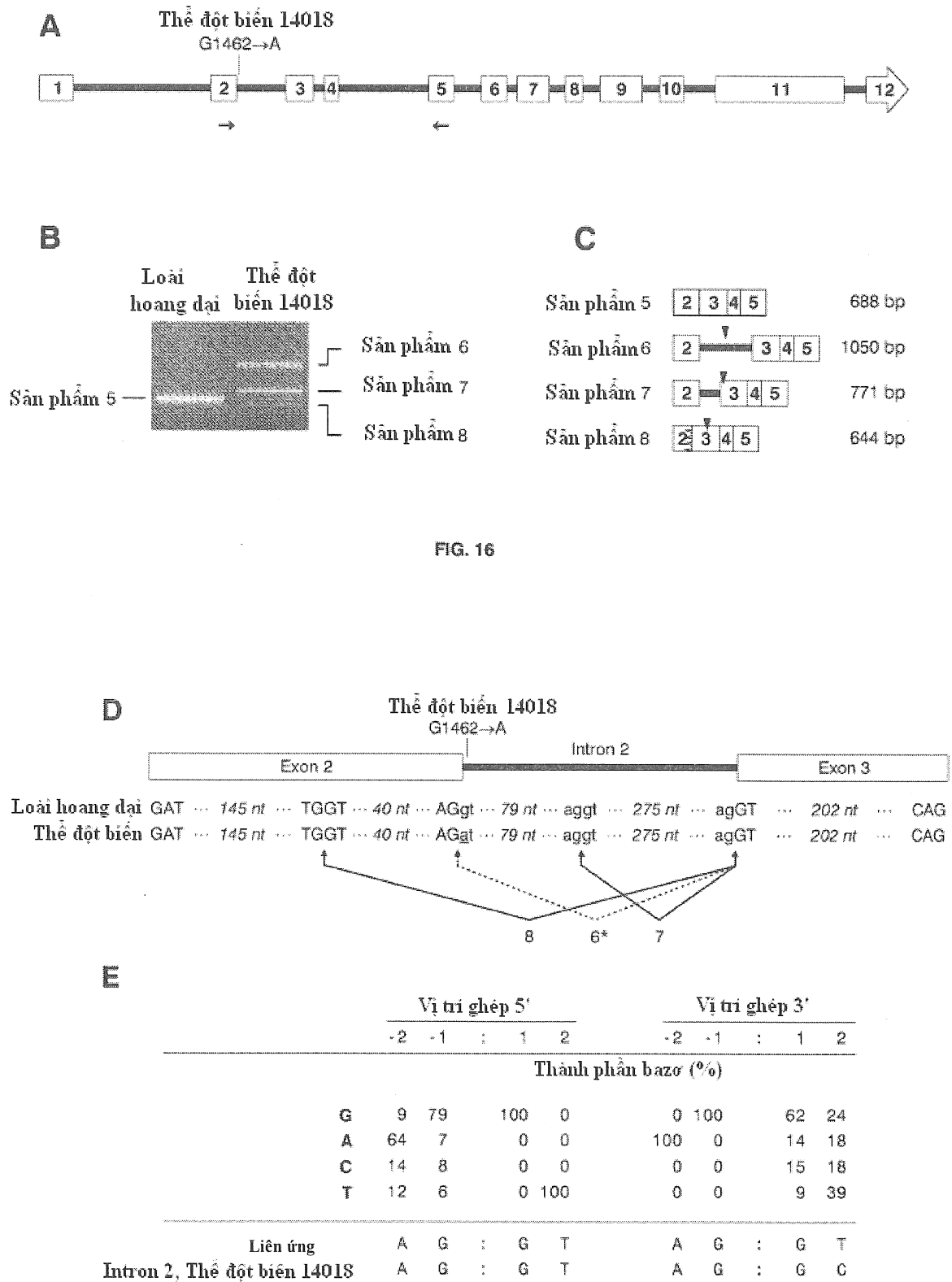


FIG. 16



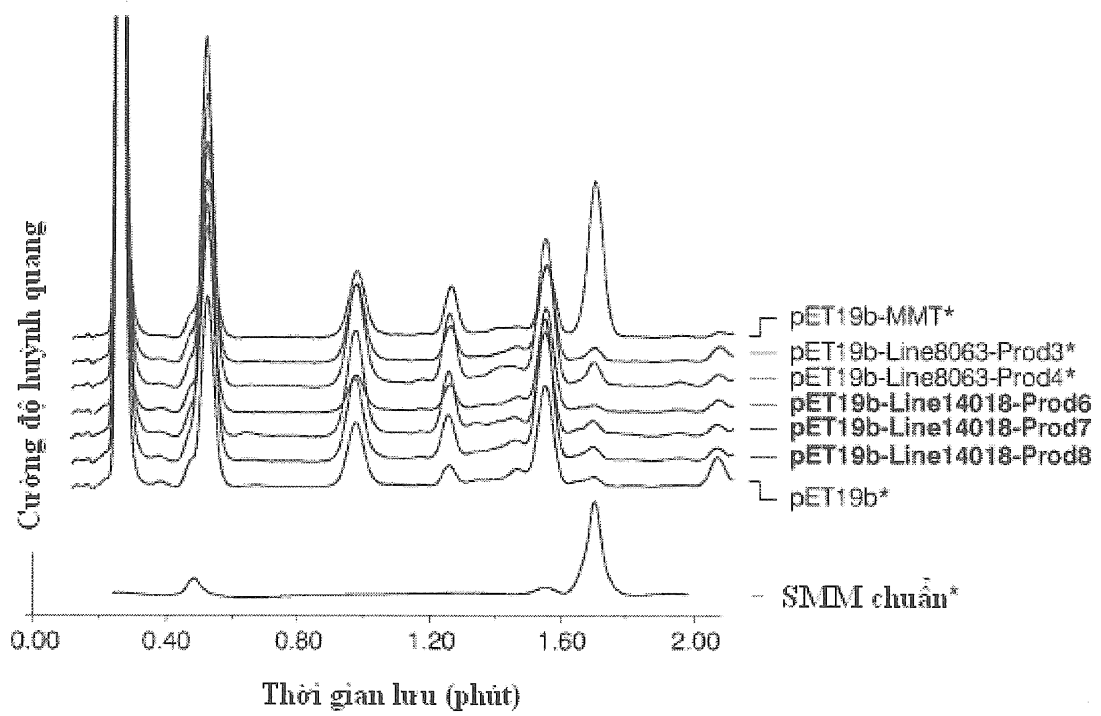


FIG. 18

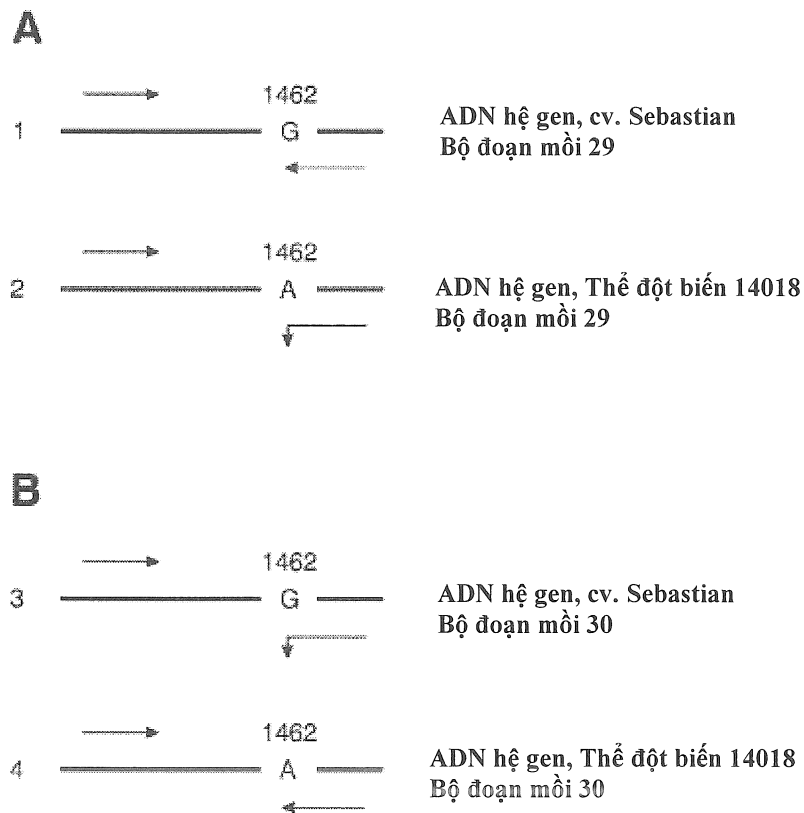


FIG. 19

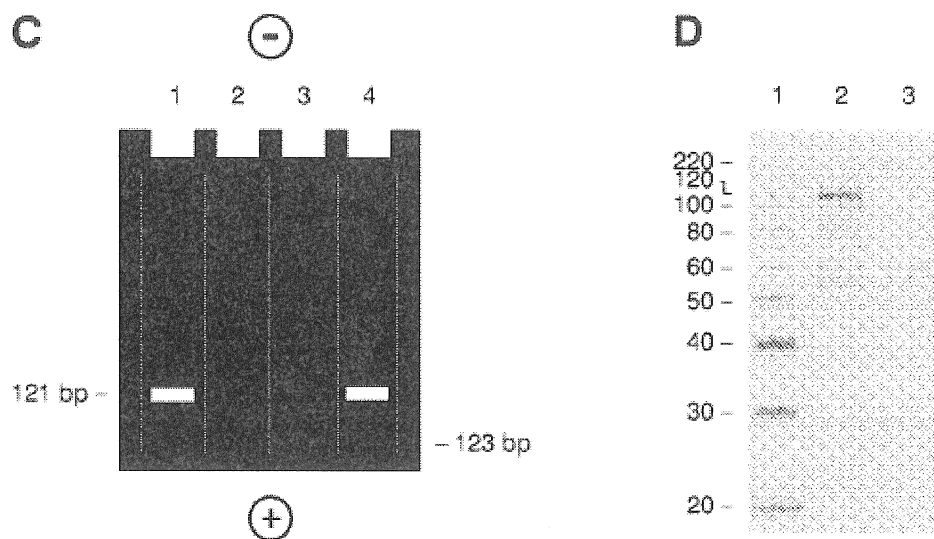


FIG. 19

Danh mục trình tự

<110> Carlsberg Breweries A/S
Heineken Supply Chain B.V.

<120> Đồ uống sản xuất từ lúa mạch và mạch nha với lượng dimetyl sulfua rất nhỏ và phương pháp sản xuất đồ uống này

<130> P1600PC00

<160> 104

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1
<211> 3267
<212> ADN
<213> Cây lúa mạch cv. Haruna Nijo

<400> 1
atggctgcgg cggcggggga cgtggaggcg ttctctggcg cgtgccaggc gtcgggcgac 60
gcggcgctacg gcgcgcgcaa ggccgtgctg gagcggctcg aggcgcgggc cacgcgcgcc 120
gaggccaggc ggctctctcg cgccgtgcga cggcgcttcg ccgcggcgcg cccggcgcg 180
gggctcgagt gcttcgcgac ctccacttc cgcattccag acgtcgtcct cgacccccac 240
ctccaaggat tccagcaaag aaagaagcta acaatgatgg agataccag cattttcatt 300
ccagaagact ggtcattcac tttctacgag ggtctcaacc ggcatccaga ttccatcttc 360
agggataaga cagtagcaga gctgggatgt ggcaatggtt ggatatccat tgcacttgca 420
gaaaagtggg gcccttcgaa ggtttatggg ctggatataa acccaagacc tatcaagatt 480
gcatggataa acctttactt gaatgcacta gacgacgatg gtctcccaat ctatgatgcg 540
gaggggaaaa cattgcttga cagagtcgaa ttctatgaat ctgatcttct ttcttactgt 600
agagataaca agatagaact tgatcgcatt gttggatgca taccacagat tcttaacccc 660
aatccagagg caatgtcaaa gattgtaact gaaaattcaa gtgaggagtt cttgtactcc 720
ttgagcaact actgtgctct ccagggtttt gttgaggacc aatttggcct cgggttgatt 780
gctcgggctg ttgaagaagg gatattctgtg ataaagccta gtggtcttat ggtattcaac 840
atgggaggcc ggccaggaca aggtgtctgt gagcgcctat ttcttcgccg tggatttcgc 900
atcaataagc tctggcaaac aaaaattatg caggctgccg acacagacat ctccgcttta 960
gttgaaattg agaaaaatag ccggcatcgc ttcgagttct ttatggatct tgttggggat 1020
cagcctgtgt gtgcgcgcac agcatgggca tacatgaaat ctggtggccg catttcacat 1080
gctttgtctg tgtatagctg tcaacttcgc cagcccaacc aggtgaagaa aatatttgag 1140
ttccttaaag acggattcca tgaagtcagc agctccctcg atttgtcctt tgatgatgat 1200
tctgttgctg atgaaaaaat tcttttcta gcatacctag ctagtcttctt gcaagagaat 1260
aagtctaata cttgtgagcc tccagctgga tgtttaaatt tccggaatct tgttgctgga 1320

tttatgaaga gttaccacca catcccatta actcctgata atgttggtgt gttcccatcc	1380
cgtgctggtg caatcgaaaa tgctcttcgg ttgttctcac ctggacttgc aattggtgac	1440
gaacacctaa ccagacactt gcccaagcaa tggttaacat ctttagcaat tgaggaaagt	1500
aaccatgcta aagatacagt aactgtaato gaagcaccac gccaatcaga tttgctgatt	1560
gagttgatca ggaaactgaa gccccagggt gttgttactg gcatggctca gtttgaggct	1620
atcaccagtg ctgctttcgt gaacttatta agtgtaacga aagatgttgg ttcccgatta	1680
ttactagata tttcagaaca tctggaattg tctagtctgc caagctcaaa tgggtgtattg	1740
aaatatcttg ctgggaagac cctgccttca catgcggcta tattgtgtgg cttagttaag	1800
aatcaggttt attctgatct ggaagttgct tttgctatct ctgaagatcc aactgtttat	1860
aaggcattgt cacaaactat tgagctattg gaaggacata cttctgtgat cagccagcac	1920
tattatgggt gtcttttcca tgagctgctg gcatttcaaa ttggtgaccg gcatccacaa	1980
caagagagag aacctgcaga agtgatatct aaggagatga tagggttttc aagttcagct	2040
atgtccacce tagaaggagc tgagtttttc gttcctgggt ccatggaatc cgggtgcata	2100
catatggatc tggaccgcag cttcttgcca gtaccttctg cagtaaacgc ctccattttc	2160
gaaagttttg ttcgtcagaa catcactgat tctgaaactg atgtccgttc cagcattcag	2220
cagctggtga aagatagcta tggtttctca gcaggcgggt cttctgaaat tatatacggg	2280
aacacctgtc tcgcgtctt caacaagctt gttctttgct gcatgcaaga acagggcacc	2340
ttgcttttcc ccttgggaac caacgggcat tatgtcaacg cagcaaagtt tgtgaatgca	2400
accaccttga ctattccaac gaaggcagat tcaggcttca agatcgaacc aagtgtctta	2460
gccgacacac tagagaaggt gtctcagccg tgggtctata tttctggccc cacaatcaac	2520
cctactggct tcctgtacag tgacgacgat atagcagagc tgctttctgt ctgtgcgaca	2580
tacggagcca ggggtggtgat agatacctcc tcctctggtc tggagttcca agccaccggc	2640
tgcagccagt ggaatttgga aagatgtctt tctaattgca agtcttcaaa gccctcgttc	2700
tccgttgctc tgctcggaga gctgtccttt gagctgacca cggctgggct tgatttcggg	2760
tttctgatta tgagcgactc gtccttggtt gacacathtt acagtttccc aagcttgagt	2820
cggccacaca gcacgttgaa gtacactttc aggaagctgt tgggtcttaa gaaccagaag	2880
gatcagcatt tctctgatct catccttgag cagaaggaga cgttgaagaa tcgtgccgac	2940
cagttgatca agatgcttga gagctgcggc tgggacgctg tgggctgcca tggcggcatc	3000
tcgatgcttg caaaaccgac cgcctacatt ggcaaatcgc tcaaggtgga cggctttgag	3060
ggcaagctgg acagccacaa catgagggaa gccctcctga ggtccaccgg gctgtgcatt	3120
agcagcagcg ggtggacagg ggtgccggac tactgccgct tcagctttgc tctggagagc	3180
ggcgacttcg accgggccat ggagtgcac gcccggttca gggagctgggt ccttggtggc	3240

ggtgctaagg tgaatggttag caactag

3267

<210> 2

<211> 1088

<212> PRT

<213> Cây lúa mạch cv. Haruna Nijo

<400> 2

Met Ala Ala Ala Ala Gly Asp Val Glu Ala Phe Leu Ala Ala Cys Gln
 1 5 10 15

Ala Ser Gly Asp Ala Ala Tyr Gly Ala Ala Lys Ala Val Leu Glu Arg
 20 25 30

Leu Glu Ala Pro Ala Thr Arg Ala Glu Ala Arg Arg Leu Leu Gly Ala
 35 40 45

Val Arg Arg Arg Phe Ala Ala Gly Gly Pro Ala Ala Gly Leu Glu Cys
 50 55 60

Phe Arg Thr Phe His Phe Arg Ile His Asp Val Val Leu Asp Pro His
 65 70 75 80

Leu Gln Gly Phe Gln Gln Arg Lys Lys Leu Thr Met Met Glu Ile Pro
 85 90 95

Ser Ile Phe Ile Pro Glu Asp Trp Ser Phe Thr Phe Tyr Glu Gly Leu
 100 105 110

Asn Arg His Pro Asp Ser Ile Phe Arg Asp Lys Thr Val Ala Glu Leu
 115 120 125

Gly Cys Gly Asn Gly Trp Ile Ser Ile Ala Leu Ala Glu Lys Trp Cys
 130 135 140

Pro Ser Lys Val Tyr Gly Leu Asp Ile Asn Pro Arg Pro Ile Lys Ile
 145 150 155 160

Ala Trp Ile Asn Leu Tyr Leu Asn Ala Leu Asp Asp Asp Gly Leu Pro
 165 170 175

Ile Tyr Asp Ala Glu Gly Lys Thr Leu Leu Asp Arg Val Glu Phe Tyr
 180 185 190

Glu Ser Asp Leu Leu Ser Tyr Cys Arg Asp Asn Lys Ile Glu Leu Asp
 195 200 205

Arg Ile Val Gly Cys Ile Pro Gln Ile Leu Asn Pro Asn Pro Glu Ala
 210 215 220

Met Ser Lys Ile Val Thr Glu Asn Ser Ser Glu Glu Phe Leu Tyr Ser
 225 230 235 240
 Leu Ser Asn Tyr Cys Ala Leu Gln Gly Phe Val Glu Asp Gln Phe Gly
 245 250 255
 Leu Gly Leu Ile Ala Arg Ala Val Glu Glu Gly Ile Ser Val Ile Lys
 260 265 270
 Pro Ser Gly Leu Met Val Phe Asn Met Gly Gly Arg Pro Gly Gln Gly
 275 280 285
 Val Cys Glu Arg Leu Phe Leu Arg Arg Gly Phe Arg Ile Asn Lys Leu
 290 295 300
 Trp Gln Thr Lys Ile Met Gln Ala Ala Asp Thr Asp Ile Ser Ala Leu
 305 310 315 320
 Val Glu Ile Glu Lys Asn Ser Arg His Arg Phe Glu Phe Phe Met Asp
 325 330 335
 Leu Val Gly Asp Gln Pro Val Cys Ala Arg Thr Ala Trp Ala Tyr Met
 340 345 350
 Lys Ser Gly Gly Arg Ile Ser His Ala Leu Ser Val Tyr Ser Cys Gln
 355 360 365
 Leu Arg Gln Pro Asn Gln Val Lys Lys Ile Phe Glu Phe Leu Lys Asp
 370 375 380
 Gly Phe His Glu Val Ser Ser Ser Leu Asp Leu Ser Phe Asp Asp Asp
 385 390 395 400
 Ser Val Ala Asp Glu Lys Ile Pro Phe Leu Ala Tyr Leu Ala Ser Phe
 405 410 415
 Leu Gln Glu Asn Lys Ser Asn Pro Cys Glu Pro Pro Ala Gly Cys Leu
 420 425 430
 Asn Phe Arg Asn Leu Val Ala Gly Phe Met Lys Ser Tyr His His Ile
 435 440 445
 Pro Leu Thr Pro Asp Asn Val Val Val Phe Pro Ser Arg Ala Val Ala
 450 455 460
 Ile Glu Asn Ala Leu Arg Leu Phe Ser Pro Gly Leu Ala Ile Val Asp
 465 470 475 480

Glu His Leu Thr Arg His Leu Pro Lys Gln Trp Leu Thr Ser Leu Ala
 485 490 495

Ile Glu Glu Ser Asn His Ala Lys Asp Thr Val Thr Val Ile Glu Ala
 500 505 510

Pro Arg Gln Ser Asp Leu Leu Ile Glu Leu Ile Arg Lys Leu Lys Pro
 515 520 525

Gln Val Val Val Thr Gly Met Ala Gln Phe Glu Ala Ile Thr Ser Ala
 530 535 540

Ala Phe Val Asn Leu Leu Ser Val Thr Lys Asp Val Gly Ser Arg Leu
 545 550 555 560

Leu Leu Asp Ile Ser Glu His Leu Glu Leu Ser Ser Leu Pro Ser Ser
 565 570 575

Asn Gly Val Leu Lys Tyr Leu Ala Gly Lys Thr Leu Pro Ser His Ala
 580 585 590

Ala Ile Leu Cys Gly Leu Val Lys Asn Gln Val Tyr Ser Asp Leu Glu
 595 600 605

Val Ala Phe Ala Ile Ser Glu Asp Pro Thr Val Tyr Lys Ala Leu Ser
 610 615 620

Gln Thr Ile Glu Leu Leu Glu Gly His Thr Ser Val Ile Ser Gln His
 625 630 635 640

Tyr Tyr Gly Cys Leu Phe His Glu Leu Leu Ala Phe Gln Ile Gly Asp
 645 650 655

Arg His Pro Gln Gln Glu Arg Glu Pro Ala Glu Val Ile Ser Lys Glu
 660 665 670

Met Ile Gly Phe Ser Ser Ser Ala Met Ser Thr Leu Glu Gly Ala Glu
 675 680 685

Phe Phe Val Pro Gly Ser Met Glu Ser Gly Val Ile His Met Asp Leu
 690 695 700

Asp Arg Ser Phe Leu Pro Val Pro Ser Ala Val Asn Ala Ser Ile Phe
 705 710 715 720

Glu Ser Phe Val Arg Gln Asn Ile Thr Asp Ser Glu Thr Asp Val Arg
 725 730 735

Ser Ser Ile Gln Gln Leu Val Lys Asp Ser Tyr Gly Phe Ser Ala Gly
 740 745 750
 Gly Ala Ser Glu Ile Ile Tyr Gly Asn Thr Cys Leu Ala Leu Phe Asn
 755 760 765
 Lys Leu Val Leu Cys Cys Met Gln Glu Gln Gly Thr Leu Leu Phe Pro
 770 775 780
 Leu Gly Thr Asn Gly His Tyr Val Asn Ala Ala Lys Phe Val Asn Ala
 785 790 795 800
 Thr Thr Leu Thr Ile Pro Thr Lys Ala Asp Ser Gly Phe Lys Ile Glu
 805 810 815
 Pro Ser Ala Leu Ala Asp Thr Leu Glu Lys Val Ser Gln Pro Trp Val
 820 825 830
 Tyr Ile Ser Gly Pro Thr Ile Asn Pro Thr Gly Phe Leu Tyr Ser Asp
 835 840 845
 Asp Asp Ile Ala Glu Leu Leu Ser Val Cys Ala Thr Tyr Gly Ala Arg
 850 855 860
 Val Val Ile Asp Thr Ser Ser Ser Gly Leu Glu Phe Gln Ala Thr Gly
 865 870 875 880
 Cys Ser Gln Trp Asn Leu Glu Arg Cys Leu Ser Asn Val Lys Ser Ser
 885 890 895
 Lys Pro Ser Phe Ser Val Val Leu Leu Gly Glu Leu Ser Phe Glu Leu
 900 905 910
 Thr Thr Ala Gly Leu Asp Phe Gly Phe Leu Ile Met Ser Asp Ser Ser
 915 920 925
 Leu Val Asp Thr Phe Tyr Ser Phe Pro Ser Leu Ser Arg Pro His Ser
 930 935 940
 Thr Leu Lys Tyr Thr Phe Arg Lys Leu Leu Gly Leu Lys Asn Gln Lys
 945 950 955 960
 Asp Gln His Phe Ser Asp Leu Ile Leu Glu Gln Lys Glu Thr Leu Lys
 965 970 975
 Asn Arg Ala Asp Gln Leu Ile Lys Met Leu Glu Ser Cys Gly Trp Asp
 980 985 990

Ala Val Gly Cys His Gly Gly Ile Ser Met Leu Ala Lys Pro Thr Ala
 995 1000 1005

Tyr Ile Gly Lys Ser Leu Lys Val Asp Gly Phe Glu Gly Lys Leu
 1010 1015 1020

Asp Ser His Asn Met Arg Glu Ala Leu Leu Arg Ser Thr Gly Leu
 1025 1030 1035

Cys Ile Ser Ser Ser Gly Trp Thr Gly Val Pro Asp Tyr Cys Arg
 1040 1045 1050

Phe Ser Phe Ala Leu Glu Ser Gly Asp Phe Asp Arg Ala Met Glu
 1055 1060 1065

Cys Ile Ala Arg Phe Arg Glu Leu Val Leu Gly Gly Gly Ala Lys
 1070 1075 1080

Val Asn Gly Ser Asn
 1085

<210> 3
 <211> 6459
 <212> ADN
 <213> Cây lúa mạch cv. Prestige

<400> 3
 atggctgcgg cggcggggga cgtggaggcg ttcctggcgg cgtgccaggc gtcgggcgac 60
 gcggcgtagc gcgcgcgcaa ggccgtgctg gagcggctcg aggcgcgggc cacgcgcgcc 120
 gaggccaggc ggctcctcgg cgccgtgcga cggcgcttcg ccgcccggcg cccggccgcg 180
 gggctcgagt gcttcgcgac ctccacttc cgcattccag acgtcgctct cgacccccac 240
 ctccaagggt gcccgggccc ttccctacac acccgttgtc gaccgcgcat tcttttcgcg 300
 atctggccgt caaaagcacg cggcttggtg gaaatcaagc ctgcaatcct gatccgttta 360
 tggctggcca gtcgatcagt aatttgcca taactggagt ataaccttggt tctctaattct 420
 ctacctgacc atataccgag ttggttttct ttcttcttgt ttccgtatct gtgtagtttt 480
 ttcttttctt tcgagcatga tggtctttga attaatgctg accagactcc agtaattcga 540
 cattttgaat tttggcgagt gttcttgga tttataacac aacgaggctt tgatcaagtg 600
 gtttatgtag aggagtgttt ttgttcttgt gcaccgtata caattctcta tttcccaaca 660
 attttgatgg cctctaagca tccgtgagtc atgtctactg tgtaagctac agatttatct 720
 atgtctatgt gtaagctgca aatggagaga aaagctatct atttggttgt tccagcttgt 780
 tctttggcag aacaatcctg cccatcctat caccataagt ataaaagcac gacaaatgag 840

tggggcaagc atgctgccaa gctaatacac gacataagct acatatTTTTg aggggcatgt	900
tatctTTTTt tttcccttct actcagtttc ttctttggga gaacaatcct actcaacct	960
taatcataag aataaaagca agacagatga gtgctgcaga ctattggcat atataacaac	1020
taaataggac atctgtccgc tatactttta gttaataatt gtatatagac gcagtctttg	1080
tgctggaaaa actgcaacta aatattttct tacattatat ggaatctggg tgtgatatga	1140
cttctttgtt acgttttgtg tgcataaagc attaacttct gtcttttagtt ggcgcagcgg	1200
taaaaacacc cattgcttaa tattttattt gctttccgta gcttgataaa atttcaactg	1260
cttctaggat tccagcaaag aaagaagcta acaatgatgg agatacccag cattttcatt	1320
ccagaagact ggtcattcac tttctacgag ggtctcaacc ggcatccaga ttccatcttc	1380
agggataaga cagtagcaga gctgggatgt ggcaatgggt ggatatccat tgcacttgca	1440
gaaaagtggg gcccttcgaa ggttggcacc tcttggtccg tagatatTTa tcttatctcg	1500
tttgttgcaa acatgggacc tgcagaagtt agacatttac tcaggttact ttatatgaaa	1560
cttttaggtg tctgccagta gtctgctggg ggtctaattt tcttggtata cctgatgccg	1620
tcgagcatat tgctttcaaa ttttgggcaa ggcattacca ccacatatg tttctacaat	1680
gctgaacaat tgctctcctt tgaaaggaag aaaaacaaga atgacatgca ccttagtagt	1740
ttaagccaca aataccagcg aatcaaatta gtttgcagtc agcttggcat taccttactt	1800
gagccttggg tgttcttttg aaggtttatg gtctggatat aaaccaaga gctatcaaga	1860
ttgcatggat aaacctttac ttgaatgcac tagacgacga tggctctcca atctatgatg	1920
cggaggggaa aacattgctt gacagagtcg aattctatga atctgatctt ctttcttact	1980
gtagagataa caagatagaa cttgatcgca ttggtggatg cataccacag gtacggtcag	2040
gtttttacca atttctgtg aatggggatt atagtcgac agaacttgat caaaatgcc	2100
ttaatatctg ctttccagat tcttaacccc aatccagagg caatgtcaaa gattgtaact	2160
gaaaattcaa gtgaggagtt cttgtactcc ttgagcaact actgtgctct ccagggtgag	2220
tgagatctat ttaaactcaa gccattcagt ttacctgtta ctaaattggtt acccatgtca	2280
gagtctccaa atctttttct tttctcaaac agcaaagaga gaagaaaact ttttaagttct	2340
atcctgaaat tgactttaca atgcttggtc ataactctgt tacgaaatat gcgtttgaac	2400
atttctcttt tcttgtagg catgtggtca gacctttata taagaaaatg aagtttttgt	2460
agaaataatg tatgctttgt acttatgaca tggttccacc agtataatca atttaagtct	2520
aggtagttag gaacctagga tggagagcac cgacagtgt taatatatat atgtcgatag	2580
ggggttagca gtccaaatcc acctcaagtt caacctattg cataactttt ggtcttaca	2640
cctgtatgga caaatgtgat cagcacccca gtctttccta taaaaatgtc tgctggaata	2700
tggaattatt aacagcggta tttattttta cctgttttaa ttttttctt tgctaaaaga	2760

atgataatcc ttatgccacg aggttacatt gtattactca agtcaatatt tgttactatg	2820
gctgattgta cgattccagc ttccggttgt taattttgtt atgtttgtga actttgctgc	2880
attcaggggtt ttgttgagga ccaatttggc ctccgggttga ttgctcgggc tgttgaagaa	2940
gggatatctg tgataaagcc tagtggtctt atggatttca acatgggagg ccggccagga	3000
caaggtgtct gtgagcgctt atttctacgc cgtggatttc gcatcaataa gctctggcaa	3060
acaaaaatta tgcaggtagc aattctttga gtgactagat gttaactaat ccagtggtt	3120
ttccatgcca gcaacagcat tatatcctgg ttagaggaat atgctcttca tgttgcacac	3180
caatcttcag ctgggcoctag aattttcatc taccggctta cttttttaca ttacagaacc	3240
aatttttgtt gaggatcatt accaactagt tgggtctttg caggetgctg acacagacat	3300
ctccgcttta gttgaaattg agaaaaatag ccgacatcgc ttcgagttct ttatggatct	3360
tgttggggat cagcctgtgt gtgcgcgcac agcatgggca tacatgaaat ctggtggccg	3420
catttcacat gctttgtctg tgtatagctg tcaacttcgc cagcccaacc aggtacctat	3480
actctctgat tagatcttta caacaataat atagtaatgt caggaataat aataatttgg	3540
agaatttcag gtgaagaaaa tatttgagtt ccttaaagac ggattccatg aagtcagcag	3600
ctccctcgat ttgtcctttg atgatgattc tgttgcctgat gaaaaaattc ctttcttagc	3660
atacctagct agtttcttgc aagagaataa gtctaatact tgtgagcctc cagctggatg	3720
tttaaatttc oggaatcttg ttgctggatt tatgaagagt taccaccaca toccattaac	3780
tcttgatgta agacttggtg tctattgcoo acaattatgt ttgcttatta gaaattcata	3840
agatcaacct atttgatgct tctcacgtat gcttcatgtg acacttcctt ttctcttggt	3900
gcaccagaat gttgttgtgt tcccatcccg tgctgttgca atcgaaaatg ctcttcgggt	3960
gttctcaoct ggacttgcaa ttgttgacga acacctaacc agacacttgc ccaagcaatg	4020
gttaacatct ttagcaattg aggtactttg accgatactc cctcttttct ttctgtgttt	4080
ggaactgtgg aaaatacatg tgttctgtga agaaaaagtt atgctgacaa gaatttcgat	4140
gttattgcca ttcttctaaa tttcaggaaa gtaaccatgc taaagatata gtaactgtaa	4200
tcgaagcacc acgccaatca gatttgctga ttgagttgat caggaaactg aagcctcagg	4260
ttgttggttac tggcatggct cagtttgagg ctatcaccag tgctgctttc gtgaacttat	4320
taagtgtaac gaaagatgtt ggttcccgat tattactaga tatttcagaa catctggaat	4380
tgtctagtct gccaaagctc aatggtgtat tgaaatatct tgctgggaag accctgcctt	4440
cacatgcggc tatattgtgt ggcttagtta agaatacagg gtgtgtcaat cagcctgaac	4500
tctagttgaa ctggttgca tactatatag aatatcttga cttttatatg tacttttagaa	4560
acactgttta aatgtactca tttctttttg cttcatttta cttgcagggt tattctgatc	4620
tggaagttgc ttttgcctac tctgaagatc caactgttta taaggcattg tcacaaacta	4680

```

ttgagctatt ggaaggacat acttctgtga tcagccagca ctattatggt tgtcttttcc 4740
atgagctgct ggcatttcaa attggtgacc ggcattccaca acaagaggta aacatggcct 4800
gcctcttcca gttctccatc tcaactcagtt ctgtccacaa ggtgccgaat gatctgttca 4860
agtggacact cccctcagca cgggcaagct agtccatgaa tttggattag ttccctctta 4920
gctgggtact tcgattacac cacaatgagc tcctcaacgt ggtctggttt atgtttttca 4980
tgttttccct ctaatgtttg gttgctcttt ttcagagaga acctgcagaa gtgatatacta 5040
aggagatgat agggttttca agttcagcta tgtccaccct agaaggagct gagtttttctg 5100
ttcctgggtc catggaatcc ggtgtcatac atatggatct ggaccgcagc ttcttgccag 5160
taccttctgc agtaaacgcc tccattttcg aaagttttgt tcgtcagaac atcactgatt 5220
ctgaaaccga tgtccgttcc agcattcagc agctggtgaa agatagctat ggtttctcag 5280
caggcgggtgc ttctgaaatt atatacggga acacctgtct cgcgctcttc aacaagcttg 5340
ttctttgctg catgcaagaa cagggcacct tgcttttccc ctggggaacc aacgggcatt 5400
acgtcaacgc agcaaagttt gtgaatgcaa ccaccttgac tattccaacg aaggcagatt 5460
caggcttcaa gatcgaacca agtgctctag ccgacacact agagaagggtg tctcagccgt 5520
gggtctatat ttctggcccc acaatcaacc ctactggctt cctgtacagt gacgacgata 5580
tagcagagct gctttctgtc tgtgcgacat acggagccag ggtggtgata gataacctct 5640
cctctggtct ggagttccaa gccaccggct gcagccagtg gaatttgga agatgtcttt 5700
ctaattgtcaa gtcttcaaag cctcgtttct ccgttgctct gctcggagag ctgtcctttg 5760
agctgaccac ggctgggctt gatttcgggt ttctgattat gagcgactcg tccttggttg 5820
acacatttta cagtttccca agcttgagtc ggccacacag cacgttgaag tacacgttca 5880
ggaagctggt gggctcttaag aaccagaagg atcagcattt ctctgatctc atccttgagc 5940
agaaggagac gttgaagaat cgtgccgacc agttgatcaa ggtatgcctt ttgggatata 6000
ctgtgttttag gctctctgtt ttcttccct gatcagctct ccgatccct tacatcctta 6060
ggctaatttc agtacttcaa gtttgccacg ctttctgac atattctttc ctcttgtttt 6120
atcttctgt gatgtgatga acagacgctt gagagctgcg gctgggacgc tgtgggctgc 6180
catggcggca tctcgatgct tgcaaaaccg accgcctaca ttggcaaata gctcaagggtg 6240
gacggctttg agggcaagct ggacagccac aacatgaggg aagccctcct gaggtccacc 6300
gggctgtgca ttagcagcag cgggtggaca ggggtgccgg actactgccg cttcagcttt 6360
gctctggaga gcggcgactt cgaccgggcc atggagtgca tcgcccgggt caggagagctg 6420
gtccttggtg gcggtgctaa ggtgaatggt agcaactag 6459

```

```

<210> 4
<211> 3267
<212> ADN

```

<213> Cây lúa mạch cv. Prestige

<400> 4

```

atggctgcgg cggcggggga cgtggaggcg ttcttggcgg cgtgccaggc gtcgggagac      60
gcgggcgtacg ggcgcgccaa ggccgtgctg gagcggctcg aggcgccggc caccgcgcgc      120
gagggccaggc ggctctcggc cgccgtgcga cggcgcttcg ccgcggggcg cccggccgcg      180
gggctcgagt gcttccgcac cttccacttc cgcattccac acgtcgtcct cgacccccac      240
ctccaaggat tccagcaaag aaagaagcta acaatgatgg agatacccag cattttcatt      300
ccagaagact ggtcattcac tttctacgag ggtctcaacc ggcattccaga ttccatcttc      360
agggataaga cagtagcaga gctgggatgt ggcaatgggt ggatatccat tgcacttgca      420
gaaaagtggg gcccttcgaa ggtttatggg ctggatataa acccaagagc tatcaagatt      480
gcatggataa acctttactt gaatgcacta gacgacgatg gtctcccaat ctatgatgag      540
gaggggaaaa cattgcttga cagagtcgaa ttctatgaat ctgatcttct ttcttactgt      600
agagataaca agatagaact tgatcgcatt gttggatgca taccacagat tcttaacccc      660
aatccagagg caatgtcaaa gattgtaact gaaaattcaa gtgaggagtt cttgtactcc      720
ttgagcaact actgtgctct ccagggtttt gttgaggacc aatttggcct cgggttgatt      780
gctcgggctg ttgaagaagg gatattctgtg ataaagccta gtggtcttat ggtattcaac      840
atgggaggcc ggccaggaca aggtgtctgt gagcgcctat ttctacgcgc tggatttcgc      900
atcaataagc tctggcaaac aaaaattatg caggctgctg acacagacat ctccgcttta      960
gttgaaattg agaaaaatag ccgacatcgc ttcgagttct ttatggatct tgttggggat     1020
cagcctgtgt gtgcgcgcac agcatgggca tacatgaaat ctggtggcgc catttcacat     1080
gctttgtctg tgtatagctg tcaacttcgc cagcccaacc aggtgaagaa aatatttgag     1140
ttccttaaag acggattcca tgaagtcage agctccctcg atttgtcctt tgatgatgat     1200
tctgttgctg atgaaaaaat tcctttccta gcatacctag ctagtttctt gcaagagaat     1260
aagtctaatc cttgtgagcc tccagctgga tgtttaaatt tccggaatct tgttgctgga     1320
tttatgaaga gttaccacca catcccatta actcctgata atgttgttgt gttcccatcc     1380
cgtgctgttg caatcgaaaa tgctcttcgg ttgttctcac ctggacttgc aattgttgac     1440
gaacacctaa ccagacactt gcccaagcaa tggttaacat ctttagcaat tgaggaaagt     1500
aaccatgcta aagatacagt aactgtaatc gaagcaccac gccaatcaga tttgctgatt     1560
gagttgatca ggaaactgaa gcctcagggt gttgttactg gcatggctca gtttgaggct     1620
atcaccagtg ctgctttcgt gaacttatta agtgtaacga aagatgttgg ttcccgatta     1680
ttactagata tttcagaaca tctggaattg tctagtctgc caagctcaaa tgggtgattg     1740
aaatatcttg ctgggaagac cctgccttca catgcggcta tattgtgtgg cttagttaag     1800
aatcaggttt attctgatct ggaagttgct ttgtctatct ctgaagatcc aactgtttat     1860

```

aaggcattgt cacaactat tgagctattg gaaggacata cttctgtgat cagccagcac 1920
tattatgggt gtcttttcca tgagctgctg gcatttcaaa ttggtgaccg gcatccacaa 1980
caagagagag aacctgcaga agtgatatct aaggagatga tagggttttc aagttcagct 2040
atgtccaccc tagaaggagc tgagtttttc gttcctgggt ccatggaatc cgggtgcata 2100
catatggatc tggaccgcag cttcttgcca gtaccttctg cagtaaaccg ctccattttc 2160
gaaagttttg ttcgtcagaa catcactgat tctgaaaccg atgtccgttc cagcattcag 2220
cagctgggtga aagatagcta tggttttctca gcaggcgggt cttctgaaat tatatacggg 2280
aacacctgtc tcgcgctctt caacaagctt gttctttgct gcatgcaaga acagggcacc 2340
ttgcttttcc ccttgggaac caacgggcat tacgtcaacg cagcaaagtt tgtgaatgca 2400
accaccttga ctattccaac gaaggcagat tcaggcttca agatcgaacc aagtgtctta 2460
gccgacacac tagagaaggt gtctcagccg tgggtctata tttctggccc cacaatcaac 2520
cctactgggt tcctgtacag tgacgacgat atagcagagc tgctttctgt ctgtgcgaca 2580
tacggagcca ggggtggtgat agatacctcc tcctctgggtc tggagttcca agccaccggc 2640
tgcagccagt ggaatttgga aagatgtctt tctaattgtca agtcttcaaa gccctcggtc 2700
tccgttggtc tgctcggaga gctgtccttt gagctgacca cggctggggt tgatttcggg 2760
tttctgatta tgagcgactc gtccttgggt gacacathtt acagtttccc aagcttgagt 2820
cggccacaca gcacgttgaa gtacacgttc aggaagctgt tgggtcttaa gaaccagaag 2880
gatcagcatt tctctgatct catccttgag cagaaggaga cgttgaagaa tcgtgccgac 2940
cagttgatca agacgcttga gagctgcggc tgggacgctg tgggctgcca tggcggcatc 3000
tcgatgcttg caaaaccgac cgcctacatt ggcaaatcgc tcaaggtgga cggctttgag 3060
ggcaagctgg acagccacaa catgagggaa gccctcctga ggtccaccgg gctgtgcatt 3120
agcagcagcg ggtggacagg ggtgccggac tactgccgct tcagctttgc tctggagagc 3180
ggcgacttcg accggggcat ggagtgcac gcccggttca gggagctgggt ccttgggtggc 3240
ggtgctaagg tgaatggtag caactag 3267

<210> 5
<211> 3267
<212> ADN
<213> Cây lúa mạch cv. Prestige

<400> 5
atggctgcgg cggcggggga cgtggaggcg ttcttggcgg cgtgccaggc gtcgggcgac 60
gcggcgtagc gcgccgcaa ggccgtgctg gagcggctcg aggcgcgggc caccgctgca 120
gaggcccgtc ggctcctcgg cgcgtgcca cgtcggtttg cagcaggtgg tcagcccgcg 180
gggctcgagt gcttccgcac cttccacttc cgcattccacg acgtcgtcct cgacccccac 240

ctccaaggat	tccagcaaag	aaagaagcta	acaatgatgg	agatacccag	catttttcatt	300
ccagaagact	ggtcattcac	tttctacgag	ggctctcaacc	ggcatccaga	ttccatcttc	360
agggataaga	cagtagcaga	gctgggatgt	ggcaatgggt	ggatatccat	tgcacttgca	420
gaaaagtggg	goccttogaa	ggtttatggg	ctggatataa	acccaagagc	tatcaagatt	480
gcatggataa	acctttactt	gaatgcacta	gacgacgatg	gtctcccaat	ctatgatgcg	540
gaggggaaaa	cattgcttga	cagagtcgaa	ttctatgaat	ctgatcttct	ttcttactgt	600
agggataaca	agatagaact	tgatcgcatt	gttggatgca	taccacagat	tcttaacccc	660
aatccagagg	caatgtcaaa	gattgtaact	gaaaattcaa	gtgaggagtt	cttggtactcc	720
ttgagcaact	actgtgctct	ccagggtttt	gttgaggacc	aatttggcct	cgggttgatt	780
gctcgggctg	ttgaagaagg	gatatctgtg	ataaagccta	gtggctcttat	ggtattcaac	840
atgggaggcc	ggcccgggca	aggtgtctgt	gagcgccctat	ttcttcgccg	tggatttcgc	900
atcaataagc	tctggcaaac	aaaaattatg	caggctgccg	acacagacat	ctccgcttta	960
gttgaaattg	agaaaaatag	ccggcatogc	ttcgagttct	ttatggatct	tgttggggat	1020
cagcctgtgt	gtgcgcgcac	agcatgggca	tacatgaaat	ctgggtggcgc	catttcacat	1080
gctttgtctg	tgtatagctg	tcaacttcgc	cagcccaacc	aggtgaagaa	aatatattgag	1140
ttccttaaag	acggattcca	tgaagtcagc	agctccctcg	atttgtcctt	tgatgatgat	1200
tctgttgctg	atgaaaaaat	tcctttccta	gcatacctag	ctagtttctt	gcaagagaat	1260
aagtctaate	cttgtgagcc	tccagctgga	tgtttaaatt	tcgggaatca	tgttgctgga	1320
tttatgaaga	gttaccacca	catccatta	actcctgata	atgttgttgt	gttcccatcc	1380
cgtgctgttg	caatcgaaaa	tgctcttcgg	ttgttctcac	ctggacttgc	aattgttgac	1440
gaacacctaa	ccagacactt	gccaagcaa	tgggttaacat	ctttagcaat	tgaggaaagt	1500
aaccatgcta	aagatacagt	aactgtaate	gaagcaccac	gccaatcaga	tttgctgatt	1560
gagttgatca	ggaaactgaa	gccccagggt	gttggttactg	gcatggctca	gtttgaggct	1620
atcaccagtg	ctgctttcgt	gaacttatta	agtgtaacga	aagatgttgg	ttcccgatta	1680
ttactagata	tttcagaaca	tctggaattg	tctagtctgc	caagctcaaa	tggtgtattg	1740
aaatatcttg	ctgggaagac	cctgccttca	catgcggcta	tattgtgtgg	cttagttaag	1800
aatcaggttt	attctgatct	ggaagtgtgt	tttgctatct	ctgaagatcc	aactgtttat	1860
aaggcattgt	cacaaactat	tgagctattg	gaaggacata	cttctgtgat	cagccagcac	1920
tattatgggt	gtctttttcca	tgagctgctg	gcatttcaaa	ttgggtgaccg	gcatccacaa	1980
caagagagag	aacctgcaga	agtgatatct	aaggagatga	tagggttttc	aagttcagct	2040
atgtccacce	tagaaggagc	tgagtttttc	gttcctgggt	ccatggaatc	cgggtgcata	2100
catatggatc	tggaccgcag	cttcttgcca	gtaccttctg	cagtaaacgc	ctccattttc	2160

gaaagttttg ttcgtcagaa catcactgat tctgaaactg atgtccgttc cagcattcag 2220
 cagctgggtga aagatagcta tggttttctca gcaggcgggtg cttctgaaat tatatacggg 2280
 aacacctgtc tcgcgctctt caacaagctt gttcttttgc gcattgcaaga acagggcacc 2340
 ttgctttttcc ccttgggaac caacgggcat tatgtcaacg cagcaaagtt tgtgaatgca 2400
 accaccttga ctattccaac gaaggcagat tcaggcttca agatcgaacc aagtgtctta 2460
 gccgacacac tagagaaggt gtctcagccg tgggtctata tttctggccc cacaatcaac 2520
 cctactgggt tctgttacag tgacgacgat atagcagagc tgctttctgt ctgtgcgaca 2580
 tacggagoca ggggtgggtgat agatacctcc tctctgggtc tggagtcca agccaccggc 2640
 tgcagccagt ggaatttggg aagatgtctt tctaattgtca agtcttcaaa gccctcgttc 2700
 tccgttgtcc tgctcggaga gctgtccttt gagctgacca cggctggggt tgatttcggg 2760
 tttctgatta tgagcgactc gtccttgggt gacacatttt acagtttccc aagcttgagt 2820
 cggccacaca gcacgttgaa gtacactttc aggaagctgt tgggtcttaa gaaccagaag 2880
 gatcagcatt tctctgatct catccttgag cagaaggaga cgttgaagaa tcgtgcgac 2940
 cagttgatca agatgcttga gagctgcggc tgggacgctg tgggctgcca tggcggcacc 3000
 tcgatgcttg caaaaccgac cgcctacatt agcaaatcgc tcaaggtgga cggctttgag 3060
 ggcaagctgg acagccacaa catgaggga ggcctcctga ggtccaccgg gctgtgcatt 3120
 agcagcagcg ggtggacagg ggtgccggac tactgccgct tcagctttgc tctggagagc 3180
 ggcgacttcg accggggccat ggagtgcacc gcccggttca gggagctggg ccttgggtgga 3240
 ggtgctaagg tgaatggtag caactag 3267

<210> 6
 <211> 1088
 <212> PRT
 <213> Cây lúa mạch cv. Prestige

<400> 6

Met Ala Ala Ala Ala Gly Asp Val Glu Ala Phe Leu Ala Ala Cys Gln
1 5 10 15

Ala Ser Gly Asp Ala Ala Tyr Gly Ala Ala Lys Ala Val Leu Glu Arg
20 25 30

Leu Glu Ala Pro Ala Thr Arg Ala Glu Ala Arg Arg Leu Leu Gly Ala
35 40 45

Val Arg Arg Arg Phe Ala Ala Gly Gly Pro Ala Ala Gly Leu Glu Cys
50 55 60

Phe Arg Thr Phe His Phe Arg Ile His Asp Val Val Leu Asp Pro His
65 70 75 80

Leu Gln Gly Phe Gln Gln Arg Lys Lys Leu Thr Met Met Glu Ile Pro
 85 90 95

Ser Ile Phe Ile Pro Glu Asp Trp Ser Phe Thr Phe Tyr Glu Gly Leu
 100 105 110

Asn Arg His Pro Asp Ser Ile Phe Arg Asp Lys Thr Val Ala Glu Leu
 115 120 125

Gly Cys Gly Asn Gly Trp Ile Ser Ile Ala Leu Ala Glu Lys Trp Cys
 130 135 140

Pro Ser Lys Val Tyr Gly Leu Asp Ile Asn Pro Arg Ala Ile Lys Ile
 145 150 155 160

Ala Trp Ile Asn Leu Tyr Leu Asn Ala Leu Asp Asp Asp Gly Leu Pro
 165 170 175

Ile Tyr Asp Ala Glu Gly Lys Thr Leu Leu Asp Arg Val Glu Phe Tyr
 180 185 190

Glu Ser Asp Leu Leu Ser Tyr Cys Arg Asp Asn Lys Ile Glu Leu Asp
 195 200 205

Arg Ile Val Gly Cys Ile Pro Gln Ile Leu Asn Pro Asn Pro Glu Ala
 210 215 220

Met Ser Lys Ile Val Thr Glu Asn Ser Ser Glu Glu Phe Leu Tyr Ser
 225 230 235 240

Leu Ser Asn Tyr Cys Ala Leu Gln Gly Phe Val Glu Asp Gln Phe Gly
 245 250 255

Leu Gly Leu Ile Ala Arg Ala Val Glu Glu Gly Ile Ser Val Ile Lys
 260 265 270

Pro Ser Gly Leu Met Val Phe Asn Met Gly Gly Arg Pro Gly Gln Gly
 275 280 285

Val Cys Glu Arg Leu Phe Leu Arg Arg Gly Phe Arg Ile Asn Lys Leu
 290 295 300

Trp Gln Thr Lys Ile Met Gln Ala Ala Asp Thr Asp Ile Ser Ala Leu
 305 310 315 320

Val Glu Ile Glu Lys Asn Ser Arg His Arg Phe Glu Phe Phe Met Asp
 325 330 335

Leu Val Gly Asp Gln Pro Val Cys Ala Arg Thr Ala Trp Ala Tyr Met
 340 345 350

Lys Ser Gly Gly Arg Ile Ser His Ala Leu Ser Val Tyr Ser Cys Gln
 355 360 365

Leu Arg Gln Pro Asn Gln Val Lys Lys Ile Phe Glu Phe Leu Lys Asp
 370 375 380

Gly Phe His Glu Val Ser Ser Ser Leu Asp Leu Ser Phe Asp Asp Asp
 385 390 395 400

Ser Val Ala Asp Glu Lys Ile Pro Phe Leu Ala Tyr Leu Ala Ser Phe
 405 410 415

Leu Gln Glu Asn Lys Ser Asn Pro Cys Glu Pro Pro Ala Gly Cys Leu
 420 425 430

Asn Phe Arg Asn Leu Val Ala Gly Phe Met Lys Ser Tyr His His Ile
 435 440 445

Pro Leu Thr Pro Asp Asn Val Val Val Phe Pro Ser Arg Ala Val Ala
 450 455 460

Ile Glu Asn Ala Leu Arg Leu Phe Ser Pro Gly Leu Ala Ile Val Asp
 465 470 475 480

Glu His Leu Thr Arg His Leu Pro Lys Gln Trp Leu Thr Ser Leu Ala
 485 490 495

Ile Glu Glu Ser Asn His Ala Lys Asp Thr Val Thr Val Ile Glu Ala
 500 505 510

Pro Arg Gln Ser Asp Leu Leu Ile Glu Leu Ile Arg Lys Leu Lys Pro
 515 520 525

Gln Val Val Val Thr Gly Met Ala Gln Phe Glu Ala Ile Thr Ser Ala
 530 535 540

Ala Phe Val Asn Leu Leu Ser Val Thr Lys Asp Val Gly Ser Arg Leu
 545 550 555 560

Leu Leu Asp Ile Ser Glu His Leu Glu Leu Ser Ser Leu Pro Ser Ser
 565 570 575

Asn Gly Val Leu Lys Tyr Leu Ala Gly Lys Thr Leu Pro Ser His Ala
 580 585 590

Ala Ile Leu Cys Gly Leu Val Lys Asn Gln Val Tyr Ser Asp Leu Glu
 595 600 605
 Val Ala Phe Ala Ile Ser Glu Asp Pro Thr Val Tyr Lys Ala Leu Ser
 610 615 620
 Gln Thr Ile Glu Leu Leu Glu Gly His Thr Ser Val Ile Ser Gln His
 625 630 635 640
 Tyr Tyr Gly Cys Leu Phe His Glu Leu Leu Ala Phe Gln Ile Gly Asp
 645 650 655
 Arg His Pro Gln Gln Glu Arg Glu Pro Ala Glu Val Ile Ser Lys Glu
 660 665 670
 Met Ile Gly Phe Ser Ser Ser Ala Met Ser Thr Leu Glu Gly Ala Glu
 675 680 685
 Phe Phe Val Pro Gly Ser Met Glu Ser Gly Val Ile His Met Asp Leu
 690 695 700
 Asp Arg Ser Phe Leu Pro Val Pro Ser Ala Val Asn Ala Ser Ile Phe
 705 710 715 720
 Glu Ser Phe Val Arg Gln Asn Ile Thr Asp Ser Glu Thr Asp Val Arg
 725 730 735
 Ser Ser Ile Gln Gln Leu Val Lys Asp Ser Tyr Gly Phe Ser Ala Gly
 740 745 750
 Gly Ala Ser Glu Ile Ile Tyr Gly Asn Thr Cys Leu Ala Leu Phe Asn
 755 760 765
 Lys Leu Val Leu Cys Cys Met Gln Glu Gln Gly Thr Leu Leu Phe Pro
 770 775 780
 Leu Gly Thr Asn Gly His Tyr Val Asn Ala Ala Lys Phe Val Asn Ala
 785 790 795 800
 Thr Thr Leu Thr Ile Pro Thr Lys Ala Asp Ser Gly Phe Lys Ile Glu
 805 810 815
 Pro Ser Ala Leu Ala Asp Thr Leu Glu Lys Val Ser Gln Pro Trp Val
 820 825 830
 Tyr Ile Ser Gly Pro Thr Ile Asn Pro Thr Gly Phe Leu Tyr Ser Asp
 835 840 845

Asp Asp Ile Ala Glu Leu Leu Ser Val Cys Ala Thr Tyr Gly Ala Arg
 850 855 860
 Val Val Ile Asp Thr Ser Ser Ser Gly Leu Glu Phe Gln Ala Thr Gly
 865 870 875 880
 Cys Ser Gln Trp Asn Leu Glu Arg Cys Leu Ser Asn Val Lys Ser Ser
 885 890 895
 Lys Pro Ser Phe Ser Val Val Leu Leu Gly Glu Leu Ser Phe Glu Leu
 900 905 910
 Thr Thr Ala Gly Leu Asp Phe Gly Phe Leu Ile Met Ser Asp Ser Ser
 915 920 925
 Leu Val Asp Thr Phe Tyr Ser Phe Pro Ser Leu Ser Arg Pro His Ser
 930 935 940
 Thr Leu Lys Tyr Thr Phe Arg Lys Leu Leu Gly Leu Lys Asn Gln Lys
 945 950 955 960
 Asp Gln His Phe Ser Asp Leu Ile Leu Glu Gln Lys Glu Thr Leu Lys
 965 970 975
 Asn Arg Ala Asp Gln Leu Ile Lys Thr Leu Glu Ser Cys Gly Trp Asp
 980 985 990
 Ala Val Gly Cys His Gly Gly Ile Ser Met Leu Ala Lys Pro Thr Ala
 995 1000 1005
 Tyr Ile Gly Lys Ser Leu Lys Val Asp Gly Phe Glu Gly Lys Leu
 1010 1015 1020
 Asp Ser His Asn Met Arg Glu Ala Leu Leu Arg Ser Thr Gly Leu
 1025 1030 1035
 Cys Ile Ser Ser Ser Gly Trp Thr Gly Val Pro Asp Tyr Cys Arg
 1040 1045 1050
 Phe Ser Phe Ala Leu Glu Ser Gly Asp Phe Asp Arg Ala Met Glu
 1055 1060 1065
 Cys Ile Ala Arg Phe Arg Glu Leu Val Leu Gly Gly Gly Ala Lys
 1070 1075 1080
 Val Asn Gly Ser Asn
 1085

<210> 7
 <211> 1088
 <212> PRT
 <213> Cây lúa mạch cv. Prestige

<400> 7

Met Ala Ala Ala Ala Gly Asp Val Glu Ala Phe Leu Ala Ala Cys Gln
 1 5 10 15

Ala Ser Gly Asp Ala Ala Tyr Gly Ala Ala Lys Ala Val Leu Glu Arg
 20 25 30

Leu Glu Ala Pro Ala Thr Arg Ala Glu Ala Arg Arg Leu Leu Gly Ala
 35 40 45

Val Arg Arg Arg Phe Ala Ala Gly Gly Pro Ala Ala Gly Leu Glu Cys
 50 55 60

Phe Arg Thr Phe His Phe Arg Ile His Asp Val Val Leu Asp Pro His
 65 70 75 80

Leu Gln Gly Phe Gln Gln Arg Lys Lys Leu Thr Met Met Glu Ile Pro
 85 90 95

Ser Ile Phe Ile Pro Glu Asp Trp Ser Phe Thr Phe Tyr Glu Gly Leu
 100 105 110

Asn Arg His Pro Asp Ser Ile Phe Arg Asp Lys Thr Val Ala Glu Leu
 115 120 125

Gly Cys Gly Asn Gly Trp Ile Ser Ile Ala Leu Ala Glu Lys Trp Cys
 130 135 140

Pro Ser Lys Val Tyr Gly Leu Asp Ile Asn Pro Arg Ala Ile Lys Ile
 145 150 155 160

Ala Trp Ile Asn Leu Tyr Leu Asn Ala Leu Asp Asp Asp Gly Leu Pro
 165 170 175

Ile Tyr Asp Ala Glu Gly Lys Thr Leu Leu Asp Arg Val Glu Phe Tyr
 180 185 190

Glu Ser Asp Leu Leu Ser Tyr Cys Arg Asp Asn Lys Ile Glu Leu Asp
 195 200 205

Arg Ile Val Gly Cys Ile Pro Gln Ile Leu Asn Pro Asn Pro Glu Ala
 210 215 220

22743

Met	Ser	Lys	Ile	Val	Thr	Glu	Asn	Ser	Ser	Glu	Glu	Phe	Leu	Tyr	Ser	
225					230					235					240	
Leu	Ser	Asn	Tyr	Cys	Ala	Leu	Gln	Gly	Phe	Val	Glu	Asp	Gln	Phe	Gly	
				245					250					255		
Leu	Gly	Leu	Ile	Ala	Arg	Ala	Val	Glu	Glu	Gly	Ile	Ser	Val	Ile	Lys	
			260					265					270			
Pro	Ser	Gly	Leu	Met	Val	Phe	Asn	Met	Gly	Gly	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	
		275					280					285				
Val	Cys	Glu	Arg	Leu	Phe	Leu	Arg	Arg	Gly	Phe	Arg	Ile	Asn	Lys	Leu	
	290					295					300					
Trp	Gln	Thr	Lys	Ile	Met	Gln	Ala	Ala	Asp	Thr	Asp	Ile	Ser	Ala	Leu	
305					310					315					320	
Val	Glu	Ile	Glu	Lys	Asn	Ser	Arg	His	Arg	Phe	Glu	Phe	Phe	Met	Asp	
				325					330					335		
Leu	Val	Gly	Asp	Gln	Pro	Val	Cys	Ala	Arg	Thr	Ala	Trp	Ala	Tyr	Met	
			340					345					350			
Lys	Ser	Gly	Gly	Arg	Ile	Ser	His	Ala	Leu	Ser	Val	Tyr	Ser	Cys	Gln	
		355					360					365				
Leu	Arg	Gln	Pro	Asn	Gln	Val	Lys	Lys	Ile	Phe	Glu	Phe	Leu	Lys	Asp	
	370					375					380					
Gly	Phe	His	Glu	Val	Ser	Ser	Ser	Leu	Asp	Leu	Ser	Phe	Asp	Asp	Asp	
385					390					395					400	
Ser	Val	Ala	Asp	Glu	Lys	Ile	Pro	Phe	Leu	Ala	Tyr	Leu	Ala	Ser	Phe	
				405					410					415		
Leu	Gln	Glu	Asn	Lys	Ser	Asn	Pro	Cys	Glu	Pro	Pro	Ala	Gly	Cys	Leu	
			420					425					430			
Asn	Phe	Arg	Asn	His	Val	Ala	Gly	Phe	Met	Lys	Ser	Tyr	His	His	Ile	
		435					440					445				
Pro	Leu	Thr	Pro	Asp	Asn	Val	Val	Val	Phe	Pro	Ser	Arg	Ala	Val	Ala	
	450					455					460					
Ile	Glu	Asn	Ala	Leu	Arg	Leu	Phe	Ser	Pro	Gly	Leu	Ala	Ile	Val	Asp	
465					470					475					480	

Glu His Leu Thr Arg His Leu Pro Lys Gln Trp Leu Thr Ser Leu Ala
 485 490 495
 Ile Glu Glu Ser Asn His Ala Lys Asp Thr Val Thr Val Ile Glu Ala
 500 505 510
 Pro Arg Gln Ser Asp Leu Leu Ile Glu Leu Ile Arg Lys Leu Lys Pro
 515 520 525
 Gln Val Val Val Thr Gly Met Ala Gln Phe Glu Ala Ile Thr Ser Ala
 530 535 540
 Ala Phe Val Asn Leu Leu Ser Val Thr Lys Asp Val Gly Ser Arg Leu
 545 550 555 560
 Leu Leu Asp Ile Ser Glu His Leu Glu Leu Ser Ser Leu Pro Ser Ser
 565 570 575
 Asn Gly Val Leu Lys Tyr Leu Ala Gly Lys Thr Leu Pro Ser His Ala
 580 585 590
 Ala Ile Leu Cys Gly Leu Val Lys Asn Gln Val Tyr Ser Asp Leu Glu
 595 600 605
 Val Ala Phe Ala Ile Ser Glu Asp Pro Thr Val Tyr Lys Ala Leu Ser
 610 615 620
 Gln Thr Ile Glu Leu Leu Glu Gly His Thr Ser Val Ile Ser Gln His
 625 630 635 640
 Tyr Tyr Gly Cys Leu Phe His Glu Leu Leu Ala Phe Gln Ile Gly Asp
 645 650 655
 Arg His Pro Gln Gln Glu Arg Glu Pro Ala Glu Val Ile Ser Lys Glu
 660 665 670
 Met Ile Gly Phe Ser Ser Ser Ala Met Ser Thr Leu Glu Gly Ala Glu
 675 680 685
 Phe Phe Val Pro Gly Ser Met Glu Ser Gly Val Ile His Met Asp Leu
 690 695 700
 Asp Arg Ser Phe Leu Pro Val Pro Ser Ala Val Asn Ala Ser Ile Phe
 705 710 715 720
 Glu Ser Phe Val Arg Gln Asn Ile Thr Asp Ser Glu Thr Asp Val Arg
 725 730 735

Ser Ser Ile Gln Gln Leu Val Lys Asp Ser Tyr Gly Phe Ser Ala Gly
 740 745 750
 Gly Ala Ser Glu Ile Ile Tyr Gly Asn Thr Cys Leu Ala Leu Phe Asn
 755 760 765
 Lys Leu Val Leu Cys Cys Met Gln Glu Gln Gly Thr Leu Leu Phe Pro
 770 775 780
 Leu Gly Thr Asn Gly His Tyr Val Asn Ala Ala Lys Phe Val Asn Ala
 785 790 795 800
 Thr Thr Leu Thr Ile Pro Thr Lys Ala Asp Ser Gly Phe Lys Ile Glu
 805 810 815
 Pro Ser Ala Leu Ala Asp Thr Leu Glu Lys Val Ser Gln Pro Trp Val
 820 825 830
 Tyr Ile Ser Gly Pro Thr Ile Asn Pro Thr Gly Phe Leu Tyr Ser Asp
 835 840 845
 Asp Asp Ile Ala Glu Leu Leu Ser Val Cys Ala Thr Tyr Gly Ala Arg
 850 855 860
 Val Val Ile Asp Thr Ser Ser Ser Gly Leu Glu Phe Gln Ala Thr Gly
 865 870 875 880
 Cys Ser Gln Trp Asn Leu Glu Arg Cys Leu Ser Asn Val Lys Ser Ser
 885 890 895
 Lys Pro Ser Phe Ser Val Val Leu Leu Gly Glu Leu Ser Phe Glu Leu
 900 905 910
 Thr Thr Ala Gly Leu Asp Phe Gly Phe Leu Ile Met Ser Asp Ser Ser
 915 920 925
 Leu Val Asp Thr Phe Tyr Ser Phe Pro Ser Leu Ser Arg Pro His Ser
 930 935 940
 Thr Leu Lys Tyr Thr Phe Arg Lys Leu Leu Gly Leu Lys Asn Gln Lys
 945 950 955 960
 Asp Gln His Phe Ser Asp Leu Ile Leu Glu Gln Lys Glu Thr Leu Lys
 965 970 975
 Asn Arg Ala Asp Gln Leu Ile Lys Met Leu Glu Ser Cys Gly Trp Asp
 980 985 990

Ala Val Gly Cys His Gly Gly Ile Ser Met Leu Ala Lys Pro Thr Ala
 995 1000 1005

Tyr Ile Ser Lys Ser Leu Lys Val Asp Gly Phe Glu Gly Lys Leu
 1010 1015 1020

Asp Ser His Asn Met Arg Glu Ala Leu Leu Arg Ser Thr Gly Leu
 1025 1030 1035

Cys Ile Ser Ser Ser Gly Trp Thr Gly Val Pro Asp Tyr Cys Arg
 1040 1045 1050

Phe Ser Phe Ala Leu Glu Ser Gly Asp Phe Asp Arg Ala Met Glu
 1055 1060 1065

Cys Ile Ala Arg Phe Arg Glu Leu Val Leu Gly Gly Gly Ala Lys
 1070 1075 1080

Val Asn Gly Ser Asn
 1085

<210> 8
 <211> 6459
 <212> ADN
 <213> Cây lúa mạch, Thẻ đột biến 8063

<400> 8
 atggctgcgg cggcggggga cgtggaggcg ttcttggcgg cgtgccaggc gtcgggcgac 60
 gcggcgctacg gcgcgcgcaa ggccgtgctg gagcggctcg aggcgccggc cacgcgcgcc 120
 gaggccaggc ggctcctcgg cgcctgcca cggcgttcg ccgcggcgg cccggccgcg 180
 gggctcgagt gcttcgcac ctccacttc cgcattccac acgtcgtcct cgacccccac 240
 ctccaagggt gcccgcccc ttccctacac acccgttgtc gaccgcgcat tctttgcgcg 300
 atctggccgt caaaagcac cggcttggt gaaatcaagc ctgcaatcct gatccgttta 360
 tggctggcca gtcgatcagt aatttgcca taactggagt ataacccttg tctctaattct 420
 ctacctgacc atataccgag ttgggtttct ttcttcttgt ttccgtatct gtgtagtttt 480
 ttcttttctt tcgagcatga tggtctttga attaatgcgt accagactcc agtaattcga 540
 cattttgaat ttggcgagt gttcttgga ttataacac aacgaggctt tgatcaagtg 600
 gtttatgtag aggagtgttt ttgttcttgt gcaccgtata caattctcta tttcccaaca 660
 attttgatgg cctctaagca tctgtagtc atgtctactg tgtaagctac agattttattc 720
 atgtctatgt gtaagctgca aatggagaga aaagctatct atttggttgt tccagcttgt 780
 tctttggcag aacaatcctg ccctcctat caccataagt ataaaagcac gacaaatgag 840
 tggggcaagc atgctgccaa gctaatacac gacataagct acatattttg aggggcatgt 900

tatctttttt	tttcccttct	actcagtttc	ttctttggga	gaacaatcct	actcaacct	960
taatcataag	aataaaagca	agacagatga	gtgctgcaga	ctattggcat	atataacaac	1020
taaataggac	atctgtccgc	tatatcttta	gttaataatt	gtatatagac	gcagttcttg	1080
tgtctggaaaa	actgcaacta	aatattttct	tacattatat	ggaatctggg	tgtgatatga	1140
cttctttggt	acgttttgtg	tgcataaagc	attaacttct	gtcttttagt	ggcgcagcgg	1200
taaaaacacc	cattgcttaa	tattttat	gctttccgta	gcttgataaa	atttcaactg	1260
cttctaggat	tccagcaaag	aaagaagcta	acaatgatgg	agatacccag	cattttcatt	1320
ccagaagact	ggtcattcac	tttctacgag	ggctccaacc	ggcatccaga	ttccatcttc	1380
agggataaga	cagtagcaga	gctgggatgt	ggcaatgggt	ggatatccat	tgcacttgca	1440
gaaaagtggg	gcccttcgaa	ggttggcacc	tcttggtccg	tagatattta	tcttatctcg	1500
tttggtgcaa	acatgggacc	tgcagaagtt	agacatttac	tcagggttact	ttatatgaaa	1560
cttttaggtg	tctgccagta	gtctgctggg	ggtotaattt	tcttggtata	cctgatgcog	1620
tcgagcatat	tgctttcaaa	ttttgggcaa	ggcattacca	ccacatattg	tttctacaat	1680
gctgaacaat	tgctctcctt	tgaaggaag	aaaaacaaga	atgacatgca	ccttagtagt	1740
ttaagccaca	aataccagcg	aatcaaatta	gtttgcagtc	agcttggcat	taccttactt	1800
gagccttggg	tgttcttttg	aaggtttatg	gtctggatat	aaaccaaga	gctatcaaga	1860
ttgcatggat	aaacctttac	ttgaatgcac	tagacgacga	tggctcccca	atctatgatg	1920
cggaggggaa	aacattgctt	gacagagtcg	aattctatga	atctgatctt	ctttcttact	1980
gtagagataa	caagatagaa	cttgatcgca	ttggtggatg	cataccacag	gtacggtcag	2040
gtttttacca	atttctgtg	aatggggatt	atagtcgata	agaacttgat	caaaatgccc	2100
ttaatatctg	cctttcagat	tcttaacccc	aatccagagg	caatgtcaaa	gattgtaact	2160
gaaaattcaa	gtgaggagtt	cttggtactc	ttgagcaact	actgtgctct	ccagggtgagt	2220
tgagatctat	ttaaactcaa	gccattcagt	ttacctgtta	ctaaatgggt	acctatgtca	2280
gagtcctcaa	atctttttct	tttctcaaac	agcaaagaga	gaagaaaact	tttaagttct	2340
atcctgaaat	tgactttaca	atgcttggtc	ataatctgct	tacgaaatat	gcgtttgaac	2400
atttctcttt	tccttgtagg	catgtgggtc	gacctttata	taagaaaatg	aagtttttgt	2460
agaaataatg	tatgctttgt	acttatgaca	tggttccacc	agtataatca	atttaagtct	2520
aggtagttag	gaacctagga	tggagagcac	cgacagtgt	taatatatat	atgtcgatag	2580
ggggtttagca	gtccaaatcc	acctcaagtt	caacctattg	cataactttt	ggtcttacia	2640
cctgtatgga	caaatgtgat	cagcaccoca	gtctttccca	taaaaatgtc	tgtctggaata	2700
tggaattatt	aacagcggta	tttattttta	ccctgtttta	ttttttcctt	tgtctaaaaga	2760
atgataatcc	ttatgccacg	aggttacatt	gtattactca	agtcaatatt	tgttactatg	2820

gctgattgta	cgattccagc	ttccggttgt	taattttgtt	atgtttgtga	actttgctgc	2880
attcaggggtt	ttgttgagga	ccaatttggc	ctcgggttga	ttgctcgggc	tgttgaagaa	2940
gggatatctg	tgataaagcc	tagtggtctt	atggatttca	acatgggagg	ccggccagga	3000
caaggtgtct	gtgagcgctt	atttctacgc	cgtggatttc	gcatcaataa	gctctggcaa	3060
acaaaaatta	tgcagatagc	aattctttga	gtgactagat	gttaactaat	cccagtgttt	3120
ttccatgcca	gcaacagcat	tatatcctgg	ttagaggaat	atgctcttca	tgttgcacac	3180
caatcttcag	ctgggcctag	aattttcatc	taccggctta	cattttttaca	ttacagaacc	3240
aattttttgtt	gaggatcatt	accaactagt	tgggtctttg	caggctgctg	acacagacat	3300
ctccgcttta	gttgaaattg	agaaaaatag	ccgacatcgc	ttcgagttct	ttatggatct	3360
tgttggggat	cagcctgtgt	gtgcgcgcac	agcatgggca	tacatgaaat	ctggtggccg	3420
catttcacat	gctttgtctg	tgtatagctg	tcaacttcgc	cagcccaacc	aggtacctat	3480
actctctgat	tagatcttta	caacaataat	atagtaatgt	caggaataat	aataatttgg	3540
agaatttcag	gtgaagaaaa	tatttgagtt	ccttaaagac	ggattccatg	aagtcagcag	3600
ctccctcgat	ttgtcctttg	atgatgattc	tgttgcctgat	gaaaaaatc	ctttcctagc	3660
atacctagct	agtttcttgc	aagagaataa	gtctaatacct	tgtgagcctc	cagctggatg	3720
tttaaatttc	cggaatcttg	ttgctggatt	tatgaagagt	taccaccaca	tcccatthaac	3780
tcttgatgta	agacttggtg	tctattgcct	acaattatgt	ttgcttatta	gaaattcata	3840
agatcaacct	atttgatgct	tctcacgtat	gcttcattgtg	acacttcctt	ttcctctggt	3900
gcaccagaat	gttgttgtgt	tcccatcccg	tgctgttgca	atcgaaaatg	ctcttcgggt	3960
gttctcacct	ggacttgcaa	ttgttgacga	acacctaacc	agacacttgc	ccaagcaatg	4020
gttaacatct	ttagcaattg	aggtactttg	accgatactc	ccctctttct	ttctgtgttt	4080
ggaactgtgg	aaaatacatg	tgttctgtga	agaaaaagtt	atgctgacaa	gaatttcgat	4140
gttattgcca	ttcttctaaa	tttcaggaaa	gtaaccatgc	taaagataca	gtaactgtaa	4200
tcgaagcacc	acgccaatca	gatttgctga	ttgagttgat	caggaaactg	aagcctcagg	4260
ttgttgttac	tggcatggct	cagtttgagg	ctatcaccag	tgctgctttc	gtgaacttat	4320
taagtgtaac	gaaagatggt	ggttcccgat	tattactaga	tatttcagaa	catctggaat	4380
tgtctagtct	gccaaagctca	aatggtgtat	tgaaatatct	tgctgggaag	accctgcctt	4440
cacatgcggc	tatattgtgt	ggcttagtta	agaatcaggt	gtgtgtcaat	cagcctgaac	4500
tctagttgaa	ctgttggtga	tactatatag	aatatcttga	cttttatatg	tacttttagaa	4560
acactgttta	aatgtactca	tttctttttg	cttcatttta	cttgcagggt	tattctgatac	4620
tggaagttgc	ttttgctatc	tctgaagatc	caactgttta	taaggcattg	tcacaaacta	4680
ttgagctatt	ggaaggacat	acttctgtga	tcagccagca	ctattatggt	tgtctttttcc	4740

```

atgagctgct ggcatttcaa attggtgacc ggcattccaca acaagaggta aacatggcctt 4800
gcctcttcca gttctccatc tcaactcagtt ctgtccacaa ggtgccgaat gatctgttca 4860
agtggacact cccctcagca cgggcaagct agtccatgaa tttggattag ttccctctta 4920
gctgggtact togattacac cacaatgagc tcctcaacgt ggtctggttt atgtttttca 4980
tgttttccct ctaatgtttg gttgctcttt ttcagagaga acctgcagaa gtgatatacta 5040
aggagatgat agggttttca agttcagcta tgtccaccct agaaggagct gagttttctg 5100
ttcctgggtc catggaatcc ggtgtcatac atatggatct ggaccgcagc ttcttgccag 5160
taccttctgc agtaaacgcc tccattttcg aaagtgttgt tcgtcagaac atcaactgatt 5220
ctgaaaccga tgtccgttcc agcattcagc agctggtgaa agatagctat ggtttctcag 5280
caggcgggtgc ttctgaaatt atatacggga acacctgtct cgcgctcttc aacaagcttg 5340
ttctttgctg catgcaagaa cagggcacct tgcttttccc cttgggaacc aacgggcatt 5400
acgtcaacgc agcaaagttt gtgaatgcaa ccaccttgac tattccaacg aaggcagatt 5460
caggcttcaa gatcgaacca agtgctctag ccgacacact agagaagggtg tctcagccgt 5520
gggtctatat ttctggcccc acaatcaacc ctactggctt cctgtacagt gacgacgata 5580
tagcagagct gctttctgtc tgtgcgacat acggagccag ggtggtgata gatacctcct 5640
cctctggtct ggagttccaa gccaccggct gcagccagtg gaatttgga agatgtcttt 5700
ctaattgtcaa gtcttcaaag cctcgtttct ccgttgctct gctcggagag ctgtcctttg 5760
agctgaccac ggctgggctt gatttcgggt ttctgattat gagcgactcg tccttggttg 5820
acacatttta cagtttccca agcttgagtc ggccacacag cacgttgaag tacacgttca 5880
ggaagctggt gggctcttaag aaccagaagg atcagcattt ctctgatctc atccttgagc 5940
agaaggagac gttgaagaat cgtgccgacc agttgatcaa ggtatgcctt ttgggatata 6000
ctgtgtttag gctctctgtt ttcttccct gatcagctct ccgatccct tacatcctta 6060
ggctaatttc agtacttcaa gtttgccacg cttttctgac atattctttc ctcttggttt 6120
atcttctctgt gatgtgatga acagacgctt gagagctgcg gctgggacgc tgtgggctgc 6180
catggcgcca tctcgatgct tgcaaaaccg accgcctaca ttggcaaata gctcaagggtg 6240
gacggctttg agggcaagct ggacagccac aacatgaggg aagccctcct gaggtccacc 6300
gggctgtgca ttagcagcag cgggtggaca ggggtgccgg actactgccg cttcagcttt 6360
gctctggaga gcggcgactt cgaccgggcc atggagtgca tcgcccggtt caggagctg 6420
gtccttggtg gcggtgctaa ggtgaatggt agcaactag 6459

```

<210> 9

<211> 882

<212> ADN

<213> Cây lúa mạch cv. Prestige

<400> 9
 gtttatgggc tggatataaa cccaagagct atcaagattg catggataaa cctttacttg 60
 aatgcactag acgacgatgg tctcccaatc tatgatgcgg aggggaaaac attgcttgac 120
 agagtogaat tctatgaatc tgatcttctt tcttactgta gagataacaa gatagaactt 180
 gatcgcatgg ttggatgcat accacagatt ctttaaccca atccagaggc aatgtcaaag 240
 attgtaactg aaaattcaag tgaggagttc ttgtactcct tgagcaacta ctgtgctctc 300
 caggggttttg ttgaggacca atttggcctc ggggttgattg ctgggctgtg tgaagaaggg 360
 atatctgtga taaagcctag tggctttatg gtattcaaca tgggaggccg gccaggacaa 420
 ggtgtctgtg agcgccctatt tcttcgcgtt ggatttcgca tcaataagct ctggcaaaca 480
 aaaattatgc aggctgctga cacagacatc tccgcttttag ttgaaattga gaaaaatagc 540
 cgacatcgct tcgagttctt tatggatctt gttggggatc agcctgtgtg tgcgcgcaca 600
 gcatgggcat acatgaaatc tgggtggcgc atttcacatg ctttgtctgt gtatagctgt 660
 caacttcgcc agcccaacca ggtgaagaaa atatttgagt tccttaaaga cggattocat 720
 gaagtcagca gctccctcga tttgtccttt gatgatgatt ctgttgctga tgaaaaaatt 780
 cctttcctag catacctagc tagtttcttg caagagaata agtctaatac ttgtgagcct 840
 ccagctggat gtttaaattt ccggaatctt gttgctggat tt 882

<210> 10
 <211> 1089
 <212> ADN
 <213> Cây lúa mạch, Thẻ đột biến 8063

<400> 10
 gtttatgggc tggatataaa cccaagagct atcaagattg catggataaa cctttacttg 60
 aatgcactag acgacgatgg tctcccaatc tatgatgcgg aggggaaaac attgcttgac 120
 agagtogaat tctatgaatc tgatcttctt tcttactgta gagataacaa gatagaactt 180
 gatcgcatgg ttggatgcat accacagatt ctttaaccca atccagaggc aatgtcaaag 240
 attgtaactg aaaattcaag tgaggagttc ttgtactcct tgagcaacta ctgtgctctc 300
 caggggtttgt tgaggaccaa tttggcctcg ggttgattgc tcgggctgtt gaagaagggg 360
 tatctgtgat aaagcctagt ggtctttatg tattcaacat gggaggccgg ccaggacaag 420
 gtgtctgtga gcgcctatct ctacgcctgt gatttcgcat caataagctc tggcaaacaa 480
 aaattatgca gatagcaatt cttcgagtga ctagatgtta actaatccca gtgtttttcc 540
 atgccagcaa cagcattgta tcctgggttag aggaatatgc tcttcatggt gcacaccaat 600
 cttcatctgg acctggaatt ttcatctacc ggcttacatt ttacattac agaaccaatt 660
 tttgttgagg atcattacca actagttggg tctttgcagg ctgctgacac agacatctcc 720
 gcttttagttg aaattgagaa aaatagccga catcgcttcg agttctttat ggatcttggt 780

```

ggggatcagc ctgtgtgtgc ggcacagca tgggcataca tgaaatctgg tggccgcatt      840
tcacatgctt tgtctgtgta tagctgtcaa cttcgccagc ccaaccaggt gaagaaaata      900
tttgagtcc ttaaagacgg attccatgaa gtcagcagct ccctcgattt gtcctttgat      960
gatgattctg ttgctgatga aaaaattcct ttcctagcat acctagctag tttcttgcaa     1020
gagaataagt ctaatccttg tgagcctcca gctggatggt taaatttccg gaatcttggt     1080
gctggattt                                     1089

```

<210> 11
 <211> 315
 <212> PRT
 <213> Cây lúa mạch, Thẻ đột biến 8063

<400> 11

```

Met Ala Ala Ala Ala Gly Asp Val Glu Ala Phe Leu Ala Ala Cys Gln
1              5              10              15

```

```

Ala Ser Gly Asp Ala Ala Tyr Gly Ala Ala Lys Ala Val Leu Glu Arg
              20              25              30

```

```

Leu Glu Ala Pro Ala Thr Arg Ala Glu Ala Arg Arg Leu Leu Gly Ala
              35              40              45

```

```

Val Arg Arg Arg Phe Ala Ala Gly Gly Pro Ala Ala Gly Leu Glu Cys
              50              55              60

```

```

Phe Arg Thr Phe His Phe Arg Ile His Asp Val Val Leu Asp Pro His
65              70              75              80

```

```

Leu Gln Gly Phe Gln Gln Arg Lys Lys Leu Thr Met Met Glu Ile Pro
              85              90              95

```

```

Ser Ile Phe Ile Pro Glu Asp Trp Ser Phe Thr Phe Tyr Glu Gly Leu
              100              105              110

```

```

Asn Arg His Pro Asp Ser Ile Phe Arg Asp Lys Thr Val Ala Glu Leu
              115              120              125

```

```

Gly Cys Gly Asn Gly Trp Ile Ser Ile Ala Leu Ala Glu Lys Trp Cys
              130              135              140

```

```

Pro Ser Lys Val Tyr Gly Leu Asp Ile Asn Pro Arg Ala Ile Lys Ile
145              150              155              160

```

```

Ala Trp Ile Asn Leu Tyr Leu Asn Ala Leu Asp Asp Asp Gly Leu Pro
              165              170              175

```

Ile Tyr Asp Ala Glu Gly Lys Thr Leu Leu Asp Arg Val Glu Phe Tyr
180 185 190

Glu Ser Asp Leu Leu Ser Tyr Cys Arg Asp Asn Lys Ile Glu Leu Asp
195 200 205

Arg Ile Val Gly Cys Ile Pro Gln Ile Leu Asn Pro Asn Pro Glu Ala
210 215 220

Met Ser Lys Ile Val Thr Glu Asn Ser Ser Glu Glu Phe Leu Tyr Ser
225 230 235 240

Leu Ser Asn Tyr Cys Ala Leu Gln Gly Phe Val Glu Asp Gln Phe Gly
245 250 255

Leu Gly Leu Ile Ala Arg Ala Val Glu Glu Gly Ile Ser Val Ile Lys
260 265 270

Pro Ser Gly Leu Met Val Phe Asn Met Gly Gly Arg Pro Gly Gln Gly
275 280 285

Val Cys Glu Arg Leu Phe Leu Arg Arg Gly Phe Arg Ile Asn Lys Leu
290 295 300

Trp Gln Thr Lys Ile Met Gln Ile Ala Ile Leu
305 310 315

<210> 12

<211> 955

<212> ADN

<213> Cây lúa mạch, Thẻ đột biến 8063

<400> 12

```
gtttatggctc tggatataaa cccaagagct atcaagattg catggataaa cctttacttg      60
aatgcactag acgacgatgg tctcccaatc tatgatgcgg aggggaaaac attgcttgac      120
agagtcgaat tctatgaatc tgatcttctt tcttactgta gagataacaa gatagaactt      180
gatcgcatgg ttggatgcat accacagatt cttaacccca atccagaggc aatgtcaaag      240
attgtaactg aaaattcaag tgaggagtgc ttgtactcct tgagcaacta ctgtgctctc      300
caggttttgt tgaggaccaa tttggcctcg ggttgattgc tcgggctggt gaagaaggga      360
tatctgtgat aaagcctagt ggtcttatgg tattcaacat gggaggccgg ccaggacaag      420
gtgtctgtga ggcctatctt ctacgccgtg gatttcgcat caataagctc tggcaaacaa      480
aaattatgca gatagcaatt cttcgagtga ctagatgtta actaatccca gtgtttttcc      540
atgccagcaa cagcattgta tcttggtcgc tgacacagac atctccgctt tagttgaaat      600
tgagaaaaat agccgacatc gcttcgagtt ctttatggat cttgttgggg atcagcctgt      660
```

gtgtgcgcgcg acagcatggg catacatgaa atctggtggc cgcatttcac atgctttgtc 720
 tgtgtatagc tgtcaacttc gccagcccaa ccagggtgaag aaaatatttg agttccttaa 780
 agacggattc catgaagtca gcagctccct cgatttgtcc tttgatgatg attctgttgc 840
 tgatgaaaaa attcctttcc tagcatacct agctagtttc ttgcaagaga ataagtctaa 900
 tccttgtgag cctccagctg gatgtttaaa ttcccggaat cttgttgctg gattt 955

<210> 13
 <211> 315
 <212> PRT
 <213> Cây lúa mạch, Thẻ đột biến 8063

<400> 13

Met Ala Ala Ala Ala Gly Asp Val Glu Ala Phe Leu Ala Ala Cys Gln
 1 5 10 15

Ala Ser Gly Asp Ala Ala Tyr Gly Ala Ala Lys Ala Val Leu Glu Arg
 20 25 30

Leu Glu Ala Pro Ala Thr Arg Ala Glu Ala Arg Arg Leu Leu Gly Ala
 35 40 45

Val Arg Arg Arg Phe Ala Ala Gly Gly Pro Ala Ala Gly Leu Glu Cys
 50 55 60

Phe Arg Thr Phe His Phe Arg Ile His Asp Val Val Leu Asp Pro His
 65 70 75 80

Leu Gln Gly Phe Gln Gln Arg Lys Lys Leu Thr Met Met Glu Ile Pro
 85 90 95

Ser Ile Phe Ile Pro Glu Asp Trp Ser Phe Thr Phe Tyr Glu Gly Leu
 100 105 110

Asn Arg His Pro Asp Ser Ile Phe Arg Asp Lys Thr Val Ala Glu Leu
 115 120 125

Gly Cys Gly Asn Gly Trp Ile Ser Ile Ala Leu Ala Glu Lys Trp Cys
 130 135 140

Pro Ser Lys Val Tyr Gly Leu Asp Ile Asn Pro Arg Ala Ile Lys Ile
 145 150 155 160

Ala Trp Ile Asn Leu Tyr Leu Asn Ala Leu Asp Asp Asp Gly Leu Pro
 165 170 175

Ile Tyr Asp Ala Glu Gly Lys Thr Leu Leu Asp Arg Val Glu Phe Tyr

22743

180

185

190

Glu Ser Asp Leu Leu Ser Tyr Cys Arg Asp Asn Lys Ile Glu Leu Asp
195 200 205

Arg Ile Val Gly Cys Ile Pro Gln Ile Leu Asn Pro Asn Pro Glu Ala
210 215 220

Met Ser Lys Ile Val Thr Glu Asn Ser Ser Glu Glu Phe Leu Tyr Ser
225 230 235 240

Leu Ser Asn Tyr Cys Ala Leu Gln Gly Phe Val Glu Asp Gln Phe Gly
245 250 255

Leu Gly Leu Ile Ala Arg Ala Val Glu Glu Gly Ile Ser Val Ile Lys
260 265 270

Pro Ser Gly Leu Met Val Phe Asn Met Gly Gly Arg Pro Gly Gln Gly
275 280 285

Val Cys Glu Arg Leu Phe Leu Arg Arg Gly Phe Arg Ile Asn Lys Leu
290 295 300

Trp Gln Thr Lys Ile Met Gln Ile Ala Ile Leu
305 310 315

<210> 14

<211> 810

<212> ADN

<213> Cây lúa mạch, Thở đột biến 8063

<400> 14

gtttatgggtc tggatataaaa cccaagagct atcaagattg catggataaa cctttacttg 60
aatgcactag acgacgatgg tctcccaatc tatgatgcgg aggggaaaac attgcttgac 120
agagtcgaat tctatgaatc tgatcttctt tcttactgta gagataacaa gatagaactt 180
gatcgcatgg ttggatgcat accacagatt ctttaaccca atccagaggc aatgtcaaag 240
attgtaactg aaaattcaag tgaggagttc ttgtactcct tgagcaacta ctgtgctctc 300
caggttttgt tgaggaccaa tttggcctcg ggttgattgc tcgggctggt gaagaaggga 360
tatctgtgat aaagcctagt ggtcttatgg tattcaacat gggaggccgg ccaggacaag 420
gctgctgaca cagacatctc cgcttttagtt gaaattgaga aaaatagccg acatcgcttc 480
gagttcttta tggatcttgt tggggatcag cctgtgtgtg cgcgcacagc atgggcatac 540
atgaaatctg gtggcgcgat ttcacatgct ttgtctgtgt atagctgtca acttcgccag 600
cccaaccagg tgaagaaaat atttgagttc cttaaagacg gattccatga agtcagcagc 660
tccctcgatt tgtcctttga tgatgattct gttgctgatg aaaaaattcc tttcctagca 720

tacctagcta gtttcttgca agagaataag tctaatacctt gtgagcctcc agctggatgt 780
 ttaaatttcc ggaatcttgt tgctggattt 810

<210> 15
 <211> 289
 <212> PRT
 <213> Cây lúa mạch, Thẻ đột biến 8063

<400> 15

Met Ala Ala Ala Ala Gly Asp Val Glu Ala Phe Leu Ala Ala Cys Gln
 1 5 10 15

Ala Ser Gly Asp Ala Ala Tyr Gly Ala Ala Lys Ala Val Leu Glu Arg
 20 25 30

Leu Glu Ala Pro Ala Thr Arg Ala Glu Ala Arg Arg Leu Leu Gly Ala
 35 40 45

Val Arg Arg Arg Phe Ala Ala Gly Gly Pro Ala Ala Gly Leu Glu Cys
 50 55 60

Phe Arg Thr Phe His Phe Arg Ile His Asp Val Val Leu Asp Pro His
 65 70 75 80

Leu Gln Gly Phe Gln Gln Arg Lys Lys Leu Thr Met Met Glu Ile Pro
 85 90 95

Ser Ile Phe Ile Pro Glu Asp Trp Ser Phe Thr Phe Tyr Glu Gly Leu
 100 105 110

Asn Arg His Pro Asp Ser Ile Phe Arg Asp Lys Thr Val Ala Glu Leu
 115 120 125

Gly Cys Gly Asn Gly Trp Ile Ser Ile Ala Leu Ala Glu Lys Trp Cys
 130 135 140

Pro Ser Lys Val Tyr Gly Leu Asp Ile Asn Pro Arg Ala Ile Lys Ile
 145 150 155 160

Ala Trp Ile Asn Leu Tyr Leu Asn Ala Leu Asp Asp Asp Gly Leu Pro
 165 170 175

Ile Tyr Asp Ala Glu Gly Lys Thr Leu Leu Asp Arg Val Glu Phe Tyr
 180 185 190

Glu Ser Asp Leu Leu Ser Tyr Cys Arg Asp Asn Lys Ile Glu Leu Asp
 195 200 205

Arg Ile Val Gly Cys Ile Pro Gln Ile Leu Asn Pro Asn Pro Glu Ala
210 215 220

Met Ser Lys Ile Val Thr Glu Asn Ser Ser Glu Glu Phe Leu Tyr Ser
225 230 235 240

Leu Ser Asn Tyr Cys Ala Leu Gln Gly Phe Val Glu Asp Gln Phe Gly
245 250 255

Leu Gly Leu Ile Ala Arg Ala Val Glu Glu Gly Ile Ser Val Ile Lys
260 265 270

Pro Ser Gly Leu Met Val Phe Asn Met Gly Gly Arg Pro Gly Gln Gly
275 280 285

Cys

<210> 16
<211> 6459
<212> ADN
<213> Cây lúa mạch cv. Sebastian

<400> 16
atggctgcgg cggcggggga cgtggaggcg ttcttgccgg cgtgccaggc gtcgggcgac 60
gcggcgtaac gcgcgcgcaa ggccgtgctg gagcggctcg aggcgcgggc caccgcgcgc 120
gaggccaggc ggctcctcgg cgccgtgcga cggcgcttcg ccgcgggcgg cccggccgcg 180
gggctcgagt gcttcgcgac ctccacttc cgcattccac acgtcgtcct cgacccccac 240
ctccaagggt gcccgggccc ttccctacac acccgttgtc gaccgcgcat tctttcgccg 300
atctggccgt caaaagcacg cggcttggtg gaaatcaagc ctgcaatcct gatccgttta 360
tggttgccca gtcgatcagt aatttgccca taactggagt ataaccttgg tctctaattct 420
ctacctgacc atataccgag ttgggtttct ttcttcttgt ttccgtatct gtgtagtttt 480
ttcttttctt tcgagcatga tgttctttga attaatgcgt accagactcc agtaattoga 540
cattttgaat tttggcgagt gttcttgga tttataacac aacgaggctt tgatcaagtg 600
gtttatgtag aggagtgttt ttgttcttgt gcaccgtata caattctcta tttcccaaca 660
atcttgatgg cctctaagca tctgtagtc atgtctactg tgtaagctac agattttattc 720
atgtctatgt gtaagctgca aatggagaga aaagctatct atttggttgt tccagcttgt 780
tctttggcag aacaatcctg cccatcctat caccataagt ataaaagcac gacaaatgag 840
tggggcaagc atgtgcgcaa gctaatacac gacataagct acatattttg aggggcatgt 900
tatctttttt ttcccttct actcagtttc ttctttggga gaacaatcct actcaacctt 960
taatcataag aataaaagca agacagatga gtgctgcaga ctattggcat atataacaac 1020

taaataggac atctgtccgc tataatcttta gtttaataatt gtatatagac gcagtcctttg	1080
tgctggaaaa actgcaacta aatattttct tacattatat ggaatctggg tgtgatatga	1140
cttcttttggt acgtttttgtg tgcataaagc attaaacttct gtcttttagtt ggcgagcggg	1200
taaaaacacc cattgcttaa tattttatatt gctttccgta gcttgataaa atttcaactg	1260
cttctaggat tccagcaaag aaagaagcta acaatgatgg agataccag cattttcatt	1320
ccagaagact ggtcattcac tttctacgag ggtctcaacc ggcatccaga ttocatcttc	1380
agggataaga cagtagcaga gctgggatgt ggcaatgggt ggatatccat tgcacttgca	1440
gaaaagtggg gcccttcgaa ggttggcacc tcttggtccg tagatattta tcttatctcg	1500
tttggtgcaa acatgggacc tgcagaagtt agacatttac tcaggttact ttatatgaaa	1560
cttttaggtg tctgccagta gtctgctggg ggtctaattt tcttggtata cctgatgccg	1620
tcgagcatat tgctttcaaa ttttgggcaa ggcattacca ccacatattg tttctacaat	1680
gctgaacaat tgctctcctt tgaaaggaag aaaaacaaga atgacatgca ccttagtagt	1740
ttaagccaca aataccagcg aatcaaatta gtttgcagtc agcttggcat taccttactt	1800
gagccttggg tgttcttttg aagggttatg gtctggatat aaaccaaga gctatcaaga	1860
ttgcatggat aaacctttac ttgaatgcac tagacgacga tggctctcca atctatgatg	1920
cggaggggaa aacattgctt gacagagtcg aattctatga atctgatctt ctttcttact	1980
gtagagataa caagatagaa cttgatcgca ttggtggatg cataccacag gtacggtcag	2040
gtttttacca atttctgtg aatggggatt atagtcgatc agaacttgat caaaatgcc	2100
ttaatatctg cctttcagat tcttaacccc aatccagagg caatgtcaaa gattgtaact	2160
gaaaattcaa gtgaggagtt cttgtactcc ttgagcaact actgtgctct ccagggtgagt	2220
tgagatctat ttaaactcaa gccattcagt ttacctgtta ctaaattgggt acccatgtca	2280
gagtctccaa atctttttct tttctcaaac agcaaagaga gaagaaaact ttttaagttct	2340
atcctgaaat tgactttaca atgcttggtc ataactctgct tacgaaatat gcgtttgaac	2400
atttctcttt tcttgtagg catgtggtca gacctttata taagaaaatg aagtttttgt	2460
agaaataatg tatgctttgt acttatgaca tgggtccacc agtataatca atttaagtct	2520
aggtagttag gaacctagga tggagagcac cgacagtgt taatatatat atgtcgatag	2580
ggggttagca gtccaaatcc acctcaagtt caacctattg cataactttt ggtcttacia	2640
cctgtatgga caaatgtgat cagcacccca gtctttccta taaaaatgtc tgctggaata	2700
tggaattatt aacagcggta tttattttta ccctgtttta ttttttctt tgctaaaaga	2760
atgataatcc ttatgccag aggttacatt gtattactca agtcaatatt tgttactatg	2820
gctgattgta cgattccagc ttccggttgt taattttgtt atgtttgtga actttgctgc	2880
attcagggtt ttgttgagga ccaatttggc ctgggttgga ttgctcgggc tgttgaagaa	2940

```

gggatatctg tgataaagcc tagtggtctt atggtattca acatgggagg cgggccagga 3000
caaggtgtct gtgagcgcct atttctacgc cgtggatttc gcatcaataa gctctggcaa 3060
acaaaaatta tgcaggtagc aattctttga gtgactagat gttaactaat ccagtgttt 3120
ttccatgcc a gcaacagcat tatatcctgg ttagaggaat atgctcttca tgttgcacac 3180
caatcttcag ctgggcctag aattttcatc taccggctta catttttaca ttacagaacc 3240
aatttttggt gaggatcatt accaactagt tgggtctttg caggctgctg acacagacat 3300
ctccgcttta gttgaaattg agaaaaatag ccgacatcgc ttcgagttct ttatggatct 3360
tgttggggat cagcctgtgt gtgcgcgcac agcatgggca tacatgaaat ctggtggccg 3420
catttcacat gctttgtctg tgtatagctg tcaacttcgc cagcccaacc aggtacctat 3480
actctctgat tagatcttta caacaataat atagtaatgt caggaataat aataatttgg 3540
agaatttcag gtgaagaaaa tatttgagtt ccttaaagac ggattccatg aagtcagcag 3600
ctccctcgat ttgtcctttg atgatgattc tgttgctgat gaaaaaatc ctttcctagc 3660
atacctagct agtttcttgc aagagaataa gtctaatacct tgtgagcctc cagctggatg 3720
tttaaatttc cggaatcttg ttgctggatt tatgaagagt taccaccaca tcccataac 3780
tcctgatgta agacttggtg tctattgcct acaattatgt ttgcttatta gaaattcata 3840
agatcaacct atttgatgct tctcacgtat gcttcatgtg acacttcctt ttcctctggt 3900
gcaccagaat gttgttgtgt tcccatcccg tgctgttgca atcgaaaatg ctcttcggtt 3960
gttctcacct ggacttgcaa ttgttgacga acacctaacc agacacttgc ccaagcaatg 4020
gttaacatct ttagcaattg aggtactttg accgatactc ccctctttct ttctgtgttt 4080
ggaactgtgg aaaatacatg tgttctgtga agaaaaagtt atgctgacaa gaatttcgat 4140
gttattgcc a ttcttctaaa tttcaggaaa gtaaccatgc taaagataca gtaactgtaa 4200
tcgaagcacc acgccaatca gatttgctga ttgagttgat caggaaactg aagcctcagg 4260
ttgttgttac tggcatggct cagtttgagg ctatcaccag tgctgcttcc gtgaacttat 4320
taagtgtaac gaaagatggt gggtcccgat tattactaga tatttcagaa catctggaat 4380
tgtctagtct gccaaagctca aatggtgtat tgaaatatct tgctgggaag accctgcctt 4440
cacatgcggc tatattgtgt ggcttagtta agaatacagg gtgtgtcaat cagcctgaac 4500
tctagttgaa ctgttgctga tactatatag aatatcttga cttttatatg tactttagaa 4560
acactgttta aatgtactca tttctttttg cttcatttta cttgcagggt tattctgatc 4620
tggaagttgc ttttgctatc tctgaagatc caactgttta taaggcattg tcacaaacta 4680
ttgagctatt ggaaggacat acttctgtga tcagccagca ctattatggt tgtcttttcc 4740
atgagctgct ggcatttcaa attggtgacc ggcattccaca acaagaggta aacatggctt 4800
gcctcttcca gttctccatc tcaactcagtt ctgtccacaa ggtgccgaat gatctgttca 4860

```

agtggacact cccctcagca cgggcaagct agtccatgaa tttggattag ttccctctta 4920
 gctgggtact tcgattacac cacaatgagc tcctcaacgt ggtctggttt atgtttttca 4980
 tgttttccct ctaatgtttg gttgctcttt ttccagagaga acctgcagaa gtgatatacta 5040
 aggagatgat aggggttttca agttcagcta tgtccaccct agaaggagct gagtttttctg 5100
 ttcttggttc catggaatcc ggtgtcatac atatggatct ggaccgcagc ttcttgccag 5160
 taccttctgc agtaaacgcc tccattttctg aaagttttgt tcgtcagaac atcactgatt 5220
 ctgaaaccga tgtccgttcc agcattcagc agctggtgaa agatagctat ggtttctcag 5280
 caggcgggtgc ttctgaaatt atatacggga acacctgtct cgcgctcttc aacaagcttg 5340
 ttctttgctg catgcaagaa cagggcacct tgcttttccc cttgggaacc aacgggcatt 5400
 acgtcaacgc agcaaagttt gtgaatgcaa ccaccttgac tattccaacg aaggcagatt 5460
 caggcttcaa gatcgaacca agtgccttag ccgacacact agagaagggtg tctcagccgt 5520
 gggctctatat ttctggcccc acaatcaacc ctactggctt cctgtacagt gacgacgata 5580
 tagcagagct gctttctgtc tgtgcgacat acggagccag ggtgggtgata gatacctcct 5640
 cctctgggtct ggagttccaa gccaccggct gcagccagtg gaatttggaa agatgtcttt 5700
 ctaatgtcaa gtcttcaaag cctcgtttct ccgttgctct gctcggagag ctgtcctttg 5760
 agctgaccac ggctgggctt gatttcgggt ttctgattat gagcgactcg tccttggttg 5820
 acacatttta cagtttccca agcttgagtc ggccacacag cacgttgaag tacacgttca 5880
 ggaagctggt gggctcttaag aaccagaagg atcagcattt ctctgatctc atccttgagc 5940
 agaaggagac gttgaagaat cgtgccgacc agttgatcaa ggtatgcctt ttgggatatac 6000
 ctgtgttttag gctctctggt ttcttccctt gatcagctct ccgatccctt tacatcctta 6060
 ggctaatttc agtacttcaa gtttgccacg catttctgac atattctttc ctcttgtttt 6120
 attttctgt gatgtgatga acagacgctt gagagctgcg gctgggacgc tgtgggctgc 6180
 catggcggca tctcgatgct tgcaaaaccg accgcctaca ttggcaaata gctcaagggtg 6240
 gacggctttg agggcaagct ggacagccac aacatgaggg aagccctcct gaggtccacc 6300
 gggctgtgca ttagcagcag cgggtggaca ggggtgccgg actactgccg cttcagcttt 6360
 gctctggaga gcggcgactt cgaccgggcc atggagtgca tcgcccgggt caggagctg 6420
 gtccttggtg gcggtgctaa ggtgaatggt agcaactag 6459

<210> 17

<211> 3267

<212> ADN

<213> Cây lúa mạch cv. Sebastian

<400> 17

atggctgcgg cggcggggga cgtggaggcg ttcttgccgg cgtgccaggc gtcgggcgac 60

gcggcgtacg	gcgccgccaa	ggccgtgctg	gagcggctcg	aggcgccggc	cacgcgcgcc	120
gagggcagge	ggctcctcgg	cgccgtgcga	cggcgcttcg	ccgcggcgcg	cccggccgcg	180
gggctcgagt	gcttcgcgac	cttccacttc	cgcatccacg	acgtcgtoct	cgacccccac	240
ctccaaggat	tccagcaaag	aaagaagcta	acaatgatgg	agatacccag	catttttcatt	300
ccagaagact	ggtcattcac	tttctacgag	ggtctcaacc	ggcatccaga	ttccatcttc	360
agggataaga	cagtagcaga	gctgggatgt	ggcaatgggt	ggatatccat	tgcacttgca	420
gaaaagtggg	gcccttcgaa	ggtttatggg	ctggatataa	acccaagagc	tatcaagatt	480
gcatggataa	acctttactt	gaatgacta	gacgacgatg	gtctcccaat	ctatgatgcg	540
gaggggaaaa	cattgcttga	cagagtcgaa	ttctatgaat	ctgatctttc	ttcttactgt	600
agagataaca	agatagaact	tgatcgcatt	gttggatgca	taccacagat	tcttaacccc	660
aatccagagg	caatgtcaaa	gattgtaact	gaaaattcaa	gtgaggagtt	cttgtactcc	720
ttgagcaact	actgtgctct	ccagggtttt	gttgaggacc	aatttggcct	cgggttgatt	780
gctcgggctg	ttgaagaagg	gatatctgtg	ataaagccta	gtggtcttat	ggtattcaac	840
atgggaggcc	ggccaggaca	aggtgtctgt	gagcgccctat	ttctacgccg	tggatttcgc	900
atcaataagc	tctggcaaac	aaaaattatg	caggctgctg	acacagacat	ctccgcttta	960
gttgaaattg	agaaaaatag	ccgacatcgc	ttcgagttct	ttatggatct	tgttggggat	1020
cagcctgtgt	gtgcgcgcac	agcatgggca	tacatgaaat	ctggtggccg	catttcacat	1080
gctttgtctg	tgtatagctg	tcaacttcgc	cagcccaacc	aggtgaagaa	aatatattgag	1140
ttccttaaag	acggattcca	tgaagtcagc	agctccctcg	atttgtcctt	tgatgatgat	1200
tctgttgctg	atgaaaaaat	tcctttccta	gcatacctag	ctagtttcct	gcaagagaat	1260
aagtctaate	cttgtgagcc	tccagctgga	tgtttaaatt	tccggaatct	tgttgctgga	1320
tttatgaaga	gttaccacca	catccatta	actcctgata	atgttgttgt	gttcccatcc	1380
cgtgctgttg	caatcgaaaa	tgctcttcgg	ttgttctcac	ctggacttgc	aattgttgac	1440
gaacacctaa	ccagacactt	gccaagcaa	tggttaacat	ctttagcaat	tgaggaaagt	1500
aaccatgcta	aagatacagt	aactgtaate	gaagcaccac	gccaatcaga	tttgctgatt	1560
gagttgatca	ggaaactgaa	gcctcagggt	gttgttactg	gcatggctca	gtttgaggct	1620
atcaccagtg	ctgctttcgt	gaacttatta	agtgtaacga	aagatgttgg	ttcccgatta	1680
ttactagata	tttcagaaca	tctggaattg	tctagtctgc	caagctcaaa	tggtgtattg	1740
aaatatcttg	ctgggaagac	cctgccttca	catgcggcta	tattgtgtgg	cttagttaag	1800
aatcaggttt	attctgatct	ggaagttgct	tttgctatct	ctgaagatcc	aactgtttat	1860
aaggcattgt	cacaaactat	tgagctattg	gaaggacata	cttctgtgat	cagccagcac	1920
tattatgggt	gtcttttcca	tgagctgctg	gcatttcaaa	ttggtgaccg	gcatccacaa	1980

```

caagagagag aacctgcaga agtgatatct aaggagatga tagggttttc aagttcagct 2040
atgtccaccc tagaaggagc tgagtttttc gttcctgggt ccatggaatc cgggtgtcata 2100
catatggatc tggaccgcag cttcttgcca gtaccttctg cagtaaacgc ctccattttc 2160
gaaagttttg ttcgtcagaa catcactgat tctgaaaccg atgtccgttc cagcattcag 2220
cagctgggtga aagatagcta tggttttctca gcaggcgggtg cttctgaaat tatatacggg 2280
aacacctgtc tcgcgctctt caacaagctt gttcttttgc gcatgcaaga acagggcacc 2340
ttgctttttc ccttgggaac caacgggcat tacgtcaacg cagcaaagtt tgtgaatgca 2400
accaccttga ctattccaac gaaggcagat tcaggcttca agatcgaacc aagtgtctta 2460
gccgacacac tagagaaggt gtctcagccg tgggtctata tttctggccc cacaatcaac 2520
cctactgggt tctgttacag tgacgacgat atagcagagc tgcttttctgt ctgtgcgaca 2580
tacggagcca ggggtggtgat agatacctcc tcctctggtc tggagttcca agccaccggc 2640
tgcagccagt ggaatttgga aagatgtctt tctaattgtca agtcttcaaa gccctcggtc 2700
tcggttgctc tgctcggaga gctgtccttt gagctgacca cggctggggt tgatttcggg 2760
tttctgatta tgagcgactc gtccttgggt gacacatttt acagttttcc aagcttgagt 2820
cggccacaca gcacgttgaa gtacacgttc aggaagctgt tgggtcttaa gaaccagaag 2880
gatcagcatt tctctgatct catccttgag cagaaggaga cgttgaagaa tcgtgccgac 2940
cagttgatca agacgcttga gagctgcggc tgggaacgtg tgggctgcca tggcggcacc 3000
tcgatgcttg caaaaccgac cgcctacatt ggcaaatcgc tcaaggtgga cggctttgag 3060
ggcaagctgg acagccacaa catgagggaa gccctcctga ggtccaccgg gctgtgcatt 3120
agcagcagcg ggtggacagg ggtgccggac tactgccgct tcagctttgc tctggagagc 3180
ggcgacttcg accggggccat ggagtgcac gcccggttca gggagctgggt ccttgggtggc 3240
ggtgctaagg tgaatggtag caactag 3267

```

<210> 18
 <211> 1088
 <212> PRT
 <213> Cây lúa mạch cv. Sebastian

<400> 18

Met Ala Ala Ala Ala Gly Asp Val Glu Ala Phe Leu Ala Ala Cys Gln
 1 5 10 15

Ala Ser Gly Asp Ala Ala Tyr Gly Ala Ala Lys Ala Val Leu Glu Arg
 20 25 30

Leu Glu Ala Pro Ala Thr Arg Ala Glu Ala Arg Arg Leu Leu Gly Ala
 35 40 45

22743

Val	Arg	Arg	Arg	Phe	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ala	Ala	Gly	Leu	Glu	Cys	50	55	60	
Phe	Arg	Thr	Phe	His	Phe	Arg	Ile	His	Asp	Val	Val	Leu	Asp	Pro	His	65	70	75	80
Leu	Gln	Gly	Phe	Gln	Gln	Arg	Lys	Lys	Leu	Thr	Met	Met	Glu	Ile	Pro	85	90	95	
Ser	Ile	Phe	Ile	Pro	Glu	Asp	Trp	Ser	Phe	Thr	Phe	Tyr	Glu	Gly	Leu	100	105	110	
Asn	Arg	His	Pro	Asp	Ser	Ile	Phe	Arg	Asp	Lys	Thr	Val	Ala	Glu	Leu	115	120	125	
Gly	Cys	Gly	Asn	Gly	Trp	Ile	Ser	Ile	Ala	Leu	Ala	Glu	Lys	Trp	Cys	130	135	140	
Pro	Ser	Lys	Val	Tyr	Gly	Leu	Asp	Ile	Asn	Pro	Arg	Pro	Ile	Lys	Ile	145	150	155	160
Ala	Trp	Ile	Asn	Leu	Tyr	Leu	Asn	Ala	Leu	Asp	Asp	Asp	Gly	Leu	Pro	165	170	175	
Ile	Tyr	Asp	Ala	Glu	Gly	Lys	Thr	Leu	Leu	Asp	Arg	Val	Glu	Phe	Tyr	180	185	190	
Glu	Ser	Asp	Leu	Leu	Ser	Tyr	Cys	Arg	Asp	Asn	Lys	Ile	Glu	Leu	Asp	195	200	205	
Arg	Ile	Val	Gly	Cys	Ile	Pro	Gln	Ile	Leu	Asn	Pro	Asn	Pro	Glu	Ala	210	215	220	
Met	Ser	Lys	Ile	Val	Thr	Glu	Asn	Ser	Ser	Glu	Glu	Phe	Leu	Tyr	Ser	225	230	235	240
Leu	Ser	Asn	Tyr	Cys	Ala	Leu	Gln	Gly	Phe	Val	Glu	Asp	Gln	Phe	Gly	245	250	255	
Leu	Gly	Leu	Ile	Ala	Arg	Ala	Val	Glu	Glu	Gly	Ile	Ser	Val	Ile	Lys	260	265	270	
Pro	Ser	Gly	Leu	Met	Val	Phe	Asn	Met	Gly	Gly	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	275	280	285	
Val	Cys	Glu	Arg	Leu	Phe	Leu	Arg	Arg	Gly	Phe	Arg	Ile	Asn	Lys	Leu	290	295	300	

22743

Trp Gln Thr Lys Ile Met Gln Ala Ala Asp Thr Asp Ile Ser Ala Leu
 305 310 315 320
 Val Glu Ile Glu Lys Asn Ser Arg His Arg Phe Glu Phe Phe Met Asp
 325 330 335
 Leu Val Gly Asp Gln Pro Val Cys Ala Arg Thr Ala Trp Ala Tyr Met
 340 345 350
 Lys Ser Gly Gly Arg Ile Ser His Ala Leu Ser Val Tyr Ser Cys Gln
 355 360 365
 Leu Arg Gln Pro Asn Gln Val Lys Lys Ile Phe Glu Phe Leu Lys Asp
 370 375 380
 Gly Phe His Glu Val Ser Ser Ser Leu Asp Leu Ser Phe Asp Asp Asp
 385 390 395 400
 Ser Val Ala Asp Glu Lys Ile Pro Phe Leu Ala Tyr Leu Ala Ser Phe
 405 410 415
 Leu Gln Glu Asn Lys Ser Asn Pro Cys Glu Pro Pro Ala Gly Cys Leu
 420 425 430
 Asn Phe Arg Asn Leu Val Ala Gly Phe Met Lys Ser Tyr His His Ile
 435 440 445
 Pro Leu Thr Pro Asp Asn Val Val Val Phe Pro Ser Arg Ala Val Ala
 450 455 460
 Ile Glu Asn Ala Leu Arg Leu Phe Ser Pro Gly Leu Ala Ile Val Asp
 465 470 475 480
 Glu His Leu Thr Arg His Leu Pro Lys Gln Trp Leu Thr Ser Leu Ala
 485 490 495
 Ile Glu Glu Ser Asn His Ala Lys Asp Thr Val Thr Val Ile Glu Ala
 500 505 510
 Pro Arg Gln Ser Asp Leu Leu Ile Glu Leu Ile Arg Lys Leu Lys Pro
 515 520 525
 Gln Val Val Val Thr Gly Met Ala Gln Phe Glu Ala Ile Thr Ser Ala
 530 535 540
 Ala Phe Val Asn Leu Leu Ser Val Thr Lys Asp Val Gly Ser Arg Leu
 545 550 555 560

22743

Leu	Leu	Asp	Ile	Ser	Glu	His	Leu	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Pro	Ser	Ser	565	570	575
Asn	Gly	Val	Leu	Lys	Tyr	Leu	Ala	Gly	Lys	Thr	Leu	Pro	Ser	His	Ala	580	585	590
Ala	Ile	Leu	Cys	Gly	Leu	Val	Lys	Asn	Gln	Val	Tyr	Ser	Asp	Leu	Glu	595	600	605
Val	Ala	Phe	Ala	Ile	Ser	Glu	Asp	Pro	Thr	Val	Tyr	Lys	Ala	Leu	Ser	610	615	620
Gln	Thr	Ile	Glu	Leu	Leu	Glu	Gly	His	Thr	Ser	Val	Ile	Ser	Gln	His	625	630	635
Tyr	Tyr	Gly	Cys	Leu	Phe	His	Glu	Leu	Leu	Ala	Phe	Gln	Ile	Gly	Asp	645	650	655
Arg	His	Pro	Gln	Gln	Glu	Arg	Glu	Pro	Ala	Glu	Val	Ile	Ser	Lys	Glu	660	665	670
Met	Ile	Gly	Phe	Ser	Ser	Ser	Ala	Met	Ser	Thr	Leu	Glu	Gly	Ala	Glu	675	680	685
Phe	Phe	Val	Pro	Gly	Ser	Met	Glu	Ser	Gly	Val	Ile	His	Met	Asp	Leu	690	695	700
Asp	Arg	Ser	Phe	Leu	Pro	Val	Pro	Ser	Ala	Val	Asn	Ala	Ser	Ile	Phe	705	710	715
Glu	Ser	Phe	Val	Arg	Gln	Asn	Ile	Thr	Asp	Ser	Glu	Thr	Asp	Val	Arg	725	730	735
Ser	Ser	Ile	Gln	Gln	Leu	Val	Lys	Asp	Ser	Tyr	Gly	Phe	Ser	Ala	Gly	740	745	750
Gly	Ala	Ser	Glu	Ile	Ile	Tyr	Gly	Asn	Thr	Cys	Leu	Ala	Leu	Phe	Asn	755	760	765
Lys	Leu	Val	Leu	Cys	Cys	Met	Gln	Glu	Gln	Gly	Thr	Leu	Leu	Phe	Pro	770	775	780
Leu	Gly	Thr	Asn	Gly	His	Tyr	Val	Asn	Ala	Ala	Lys	Phe	Val	Asn	Ala	785	790	795
Thr	Thr	Leu	Thr	Ile	Pro	Thr	Lys	Ala	Asp	Ser	Gly	Phe	Lys	Ile	Glu	805	810	815

22743

Pro Ser Ala Leu Ala Asp Thr Leu Glu Lys Val Ser Gln Pro Trp Val
 820 825 830
 Tyr Ile Ser Gly Pro Thr Ile Asn Pro Thr Gly Phe Leu Tyr Ser Asp
 835 840 845
 Asp Asp Ile Ala Glu Leu Leu Ser Val Cys Ala Thr Tyr Gly Ala Arg
 850 855 860
 Val Val Ile Asp Thr Ser Ser Ser Gly Leu Glu Phe Gln Ala Thr Gly
 865 870 875 880
 Cys Ser Gln Trp Asn Leu Glu Arg Cys Leu Ser Asn Val Lys Ser Ser
 885 890 895
 Lys Pro Ser Phe Ser Val Val Leu Leu Gly Glu Leu Ser Phe Glu Leu
 900 905 910
 Thr Thr Ala Gly Leu Asp Phe Gly Phe Leu Ile Met Ser Asp Ser Ser
 915 920 925
 Leu Val Asp Thr Phe Tyr Ser Phe Pro Ser Leu Ser Arg Pro His Ser
 930 935 940
 Thr Leu Lys Tyr Thr Phe Arg Lys Leu Leu Gly Leu Lys Asn Gln Lys
 945 950 955 960
 Asp Gln His Phe Ser Asp Leu Ile Leu Glu Gln Lys Glu Thr Leu Lys
 965 970 975
 Asn Arg Ala Asp Gln Leu Ile Lys Met Leu Glu Ser Cys Gly Trp Asp
 980 985 990
 Ala Val Gly Cys His Gly Gly Ile Ser Met Leu Ala Lys Pro Thr Ala
 995 1000 1005
 Tyr Ile Gly Lys Ser Leu Lys Val Asp Gly Phe Glu Gly Lys Leu
 1010 1015 1020
 Asp Ser His Asn Met Arg Glu Ala Leu Leu Arg Ser Thr Gly Leu
 1025 1030 1035
 Cys Ile Ser Ser Ser Gly Trp Thr Gly Val Pro Asp Tyr Cys Arg
 1040 1045 1050
 Phe Ser Phe Ala Leu Glu Ser Gly Asp Phe Asp Arg Ala Met Glu
 1055 1060 1065

Cys Ile Ala Arg Phe Arg Glu Leu Val Leu Gly Gly Gly Ala Lys
 1070 1075 1080

Val Asn Gly Ser Asn
 1085

<210> 19
 <211> 6459
 <212> ADN
 <213> Cây lúa mạch, Thẻ đột biến 14018

<400> 19
 atggctgcgg cgccggggga cgtggaggcg ttccctggcgg cgtgccaggc gtcggggcgac 60
 gcggcgctacg gcgcgcgcaa ggccgtgctg gagcgggctcg aggcgcgggc cacgcgcgcgc 120
 gaggccaggc ggctcctcgg cgccgtgcga cggcgcttcg ccgcgggcgg ccgcggcgcgc 180
 gggctcgagt gcttcgcgcac ctccacttc cgcattccacg acgtcgtcct cgacccccac 240
 ctccaagggt gcccgggccc ttccctacac acccggtgtc gaccgcgcat tctttcgcgc 300
 atctggccgt caaaagcacg cggcttggtg gaaatcaagc ctgcaatcct gatccgttta 360
 tggctggcca gtcgatcagt aatttggtg taactggagt ataaccttgg tctctaattct 420
 ctacctgacc atataccgag ttgggtttct ttcttcttctg ttccgtatct gtgtagtttt 480
 ttcttttctt tcgagcatga tggtctttga attaatgcgt accagactcc agtaattcga 540
 cattttgaat tttggcgagt gttcttggaa ttataacac aacgaggctt tgatcaagtg 600
 gtttatgtag aggagtgttt ttgttcttctg gcaccgtata caattctcta tttcccaaca 660
 attttgatgg cctctaagca tctgtagtc atgtctactg tgtaagctac agatttatct 720
 atgtctatgt gtaagctgca aatggagaga aaagctatct atttgggtgt tccagcttgt 780
 tctttggcag aacaatcctg cccatcctat caccataagt ataaaagcac gacaaatgag 840
 tggggcaagc atgctgcaa gctaatacac gacataagct acatattttg aggggcatgt 900
 tatctttttt tttcccttct actcagtttc ttctttggga gaacaatcct actcaacct 960
 taatcataag aataaaagca agacagatga gtgctgcaga ctattggcat atataacaac 1020
 taaataggac atctgtccgc tatatcttta gttaataatt gtatatagac gcagtctttg 1080
 tgctggaaaa actgcaacta aatattttct tacattatat ggaatctggg tgtgatatga 1140
 cttctttgtt acgttttgtg tgcataaagc attaacttct gtcttttagtt ggcgagcgcg 1200
 taaaaacacc cattgcttaa tattttatct gctttccgta gcttgataaa atttcaactg 1260
 cttctaggat tccagcaaag aaagaagcta acaatgatgg agataccag cattttcatt 1320
 ccagaagact ggtcattcac tttctacgag ggtctcaacc ggcattcaga ttccatcttc 1380
 agggataaga cagtagcaga gctgggatgt ggcaatggtt ggatatccat tgcacttgca 1440
 gaaaagtggg gcccttcgaa gattggcacc tcttggttcg tagatattta tcttatctcg 1500

tttgttgcaa	acatgggacc	tgacagaagt	agacattttac	tcagggttact	ttatatgaaa	1560
cttttaggtg	tctgccagta	gtctgctggg	gggtctaattt	tcttggtata	cctgatgccg	1620
tcgagcatat	tgctttcaaa	ttttgggcaa	ggcattacca	ccacatatgt	tttctacaat	1680
gctgaacaat	tgctctcctt	tgaaaggaag	aaaaacaaga	atgacatgca	ccttagtagt	1740
ttaagccaca	aataccagcg	aatcaaatta	gtttgcagtc	agcttggcat	taccttactt	1800
gagccttggg	tgctcttttg	aagggtttatg	gtctggatat	aaaccaaga	gctatcaaga	1860
ttgcatggat	aaacctttac	ttgaatgcac	tagacgacga	tggtctccca	atctatgatg	1920
cggaggggaa	aacattgctt	gacagagtcg	aattctatga	atctgatctt	ctttcttact	1980
gtagagataa	caagatagaa	cttgatcgca	ttgttggatg	cataccacag	gtacggtcag	2040
gtttttacca	atttctctgt	aatggggatt	atagtcgac	agaacttgat	caaatgccc	2100
ttaatatctg	cctttcagat	tcttaacccc	aatccagagg	caatgtcaaa	gattgtaact	2160
gaaaattcaa	gtgaggagtt	cttggtactcc	ttgagcaact	actgtgctct	ccagggtgagt	2220
tgagatctat	ttaaactcaa	gccattcagt	ttacctgtta	ctaaatgggt	acctatgtca	2280
gagtctccaa	atctttttct	tttctcaaac	agcaaagaga	gaagaaaact	tttaagttct	2340
atcctgaaat	tgactttaca	atgcttggtc	ataatctgct	tacgaaatat	gcgtttgaac	2400
atttctcttt	tccttgtagg	catgtgggtca	gacctttata	taagaaaatg	aagtttttgt	2460
agaaataatg	tatgctttgt	acttatgaca	tggttccacc	agtataatca	atttaagtct	2520
aggtagttag	gaacctagga	tggagagcac	cgacagtgtg	taatataat	atgtcgatag	2580
ggggtttagca	gtccaaatcc	acctcaagtt	caacctattg	cataactttt	ggtcttaca	2640
cctgtatgga	caaatgtgat	cagcacccca	gtctttccta	taaaaatgtc	tgctggaata	2700
tggaattatt	aacagcggta	tttattttta	ccctgtttta	ttttttcctt	tgctaaaaga	2760
atgataatcc	ttatgccacg	aggttacatt	gtattactca	agtcaatatt	tgttactatg	2820
gctgattgta	cgattccagc	ttccggttgt	taattttgtt	atgtttgtga	actttgctgc	2880
attcaggggt	ttgttgagga	ccaatttggc	ctcgggttga	ttgctcgggc	tggtgaagaa	2940
gggatattctg	tgataaagcc	tagtgggtctt	atggatttca	acatgggagg	ccggccagga	3000
caaggtgtct	gtgagcgctt	atttctacgc	cgtggatttc	gcatcaataa	gctctggcaa	3060
acaaaaatta	tgaggttagc	aattctttga	gtgactagat	gttaactaat	cccagtgttt	3120
ttccatgcca	gcaacagcat	tatatcctgg	ttagagggaat	atgctcttca	tggtgcacac	3180
caatcttcag	ctgggcctag	aattttcatc	taccggctta	cattttttaca	ttacagaacc	3240
aatttttgtt	gaggatcatt	accaactagt	tgggtctttg	caggctgctg	acacagacat	3300
ctccgcttta	gttgaaattg	agaaaaatag	ccgacatcgc	ttcgagttct	ttatggatct	3360
tggtggggat	cagcctgtgt	gtgcgcgcac	agcatgggca	tacatgaaat	ctggtggccg	3420

catttcacat	gctttgtctg	tgtatagctg	tcaacttcgc	cagcccaacc	aggtacctat	3480
actctctgat	tagatcttta	caacaataat	atagtaatgt	caggaataat	aataatttgg	3540
agaatttcag	gtgaagaaaa	tatttgagtt	ccttaaagac	ggattccatg	aagtcagcag	3600
ctccctcgat	ttgtcccttg	atgatgattc	tgttgctgat	gaaaaaattc	ctttcctagc	3660
atacctagct	agtttcttgc	aagagaataa	gtctaatect	tgtgagcctc	cagctggatg	3720
tttaaatttc	cggaatcttg	ttgctggatt	tatgaagagt	taccaccaca	tcccattaac	3780
tcctgatgta	agacttggtg	tctattgcct	acaattatgt	ttgcttatta	gaaattcata	3840
agatcaacct	atltgatgct	tctcacgtat	gcttcatgtg	acacttcctt	ttcctctggt	3900
gcaccagaat	gttggttgtg	tcccatcccg	tgctgttgca	atcgaaaatg	ctcttcgggt	3960
gttctcacct	ggacttgcaa	ttgttgacga	acacctaacc	agacacttgc	ccaagcaatg	4020
gttaacatct	ttagcaattg	aggtactttg	accgatactc	ccctctttct	ttctgtgttt	4080
ggaactgtgg	aaaatacatg	tgttctgtga	agaaaaagtt	atgctgacaa	gaatttcgat	4140
gttattgcca	ttcttctaaa	tttcaggaaa	gtaaccatgc	taaagataca	gtaactgtaa	4200
tcgaagcacc	acgccaatca	gatttgctga	ttgagttgat	caggaaaactg	aagcctcagg	4260
ttgttggttac	tggcatggct	cagtttgagg	ctatcaccag	tgctgctttc	gtgaacttat	4320
taagtgtaac	gaaagatggt	ggttcccgat	tattactaga	tatttcagaa	catctggaat	4380
tgtctagtct	gccaagctca	aatgggtgat	tgaaatatct	tgctgggaag	accctgcctt	4440
cacatgcggc	tatatgtgtg	ggcttagtta	agaatcaggt	gtgtgtcaat	cagcctgaac	4500
tctagttgaa	ctgttggtga	tactatatag	aatatcttga	cttttatatg	tactttagaa	4560
acactgttta	aatgtactca	tttctttttg	cttcatttta	cttgcagggt	tattctgata	4620
tggaagttgc	ttttgctatc	tctgaagatc	caactgttta	taaggcattg	tcacaaacta	4680
ttgagctatt	ggaaggacat	acttctgtga	tcagccagca	ctattatggg	tgtcttttcc	4740
atgagctgct	ggcattttcaa	attgggtgacc	ggcatccaca	acaagaggta	aacatggcct	4800
gcctcttcca	gttctccatc	tcactcagtt	ctgtccacaa	ggtgccgaat	gatctgttca	4860
agtggacact	cccctcagca	cgggcaagct	agtcocatgaa	tttggattag	ttccctctta	4920
gctgggtact	tcgattacac	cacaatgagc	tcctcaacgt	ggctctgggtt	atgtttttca	4980
tgttttccct	ctaattgttg	gttgctcttt	ttcagagaga	acctgcagaa	gtgatatacta	5040
aggagatgat	agggttttca	agttcagcta	tgtccaccct	agaaggagct	gagtttttctg	5100
ttcctgggtc	catggaatcc	ggtgtcatac	atatggatct	ggaccgcagc	ttcttgccag	5160
taccttctgc	agtaaacgcc	tccattttcg	aaagttttgt	tcgtcagaac	atcactgatt	5220
ctgaaaccga	tgtccgttcc	agcattcagc	agctggtgaa	agatagctat	ggtttctcag	5280
caggcgggtgc	ttctgaaatt	atatacggga	acacctgtct	cgcgctcttc	aacaagcttg	5340

ttctttgctg catgcaagaa cagggcacct tgcttttccc cttgggaacc aacgggcatt 5400
 acgtcaacgc agcaaagttt gtgaatgcaa ccaccttgac tattccaacg aaggcagatt 5460
 caggcttcaa gatcgaacca agtgctctag ccgacacact agagaagggtg tctcagccgt 5520
 ggggtctatat ttctggcccc acaatcaacc ctactggctt cctgtacagt gacgacgata 5580
 tagcagagct gctttctgtc tgtgcgacat acggagccag ggtgggtgata gatacctcct 5640
 cctctgggtct ggagttccaa gccaccggct gcagccagtg gaatttggaa agatgtcttt 5700
 ctaatgtcaa gtcttcaaag ccctcgttct ccgttgtcct gctcggagag ctgtcctttg 5760
 agctgaccac ggctgggctt gatttcgggt ttctgattat gagcgactcg tccttggttg 5820
 acacatttta cagtttccca agcttgagtc ggccacacag cacgttgaag tacacgttca 5880
 ggaagctggt gggctcttaag aaccagaagg atcagcattt ctctgatctc atccttgagc 5940
 agaaggagac gttgaagaat cgtgccgacc agttgatcaa ggtatgcctt ttgggatatc 6000
 ctgtgttttag gctctctgtt ttcttcccct gatcagctct ccgatcccct tacatcctta 6060
 ggctaatttc agtacttcaa gtttgccacg catttctgac atattctttc ctcttgtttt 6120
 attttctgt gatgtgatga acagacgctt gagagctgcg gctgggacgc tgtgggctgc 6180
 catggcggca tctcgatgct tgcaaaaccg accgcctaca ttggcaaata gctcaagggtg 6240
 gacggctttg agggcaagct ggacagccac aacatgaggg aagccctcct gaggtccacc 6300
 gggctgtgca ttagcagcag cgggtggaca ggggtgcccg actactgccg cttcagcttt 6360
 gctctggaga gcggcgactt cgaccgggcc atggagtgca tcgcccgggt cagggagctg 6420
 gtccttggtg gcggtgctaa ggtgaatggt agcaactag 6459

<210> 20

<211> 688

<212> ADN

<213> Cây lúa mạch cv. Sebastian

<400> 20

aggattccag caaagaaaga agctaacaat gatggagata ccagcattt tcattccaga 60
 agactggtca ttcactttct acgagggctt caaccggcat ccagattcca tcttcagggga 120
 taagacagta gcagagctgg gatgtggcaa tggttggata tccattgcac ttgcagaaaa 180
 gtgggtgcct tcgaagggtt atggtctgga tataaaccca agagctatca agattgcatg 240
 gataaacctt tacttgaatg cactagacga cgatggtctc ccaatctatg atgcggaggg 300
 gaaaacattg cttgacagag tcgaattcta tgaatctgat cttctttctt actgtagaga 360
 taacaagata gaacttgatc gcattgttgg atgcatacca cagattctta accccaatcc 420
 agaggcaatg tcaaagattg taactgaaaa ttcaagtgag gagttcttgt actccttgag 480
 caactactgt gctctccagg gttttgttga ggaccaattt ggccctcgggt tgattgctcg 540
 ggctgttgaa gaagggatat ctgtgataaa gcctagtgggt cttatgggtat tcaacatggg 600

aggccggcca ggacaaggtg tctgtgagcg cctatttctt cgccgtggat ttgcgcatcaa 660
 taagctctgg caaacaaaaa ttatgcag 688

<210> 21
 <211> 1050
 <212> ADN
 <213> Cây lúa mạch, Thẻ đột biến 14018

<400> 21
 aggattccag caaagaaaga agctaacaat gatggagata ccagcattt tcattccaga 60
 agactggtca ttcaactttct acgaggggtct caaccggcat ccagattcca ttttcagggga 120
 taagacagta gcagagctgg gatgtggcaa tggttggata tccattgcac ttgcagaaaa 180
 gtgggtgccct tcgaagattg gcacctcttg ttccgtagat atttatctta tctcgtttgt 240
 tgcaaacatg ggacctgcag aagttagaca ttactcagg ttactttata tgaaactttt 300
 aggtgtctgc cagtagtctg ctgggtggtct aattttcttg gtatacctga tgccgtcgag 360
 catattgctt tcaaattttg ggcaaggcat taccaccaca tattgtttct acaatgctga 420
 acaattgctc tcctttgaaa ggaagaaaaa caagaatgac atgcacctta gtagtttaag 480
 ccacaaatac cagcgaatca aattagtttg cagtcagctt ggcattacct tacttgagcc 540
 ttggttgttc ttttgaaggt ttatggtctg gatataaacc caagagctat caagattgca 600
 tggataaacc ttacttgaa tgcactagac gacgatggtc tcccaatcta tgatgctggag 660
 gggaaaacat tgcttgacag agtcgaattc tatgaatctg atcttctttc ttactgtaga 720
 gataacaaga tagaacttga tcgcattggt ggatgcatac cacagattct taaccccaat 780
 ccagaggcaa tgtcaaagat tgtaactgaa aattcaagtg aggagtctt gtactccttg 840
 agcaactact gtgctctcca gggttttggt gaggaccaat ttggcctcgg gttgattgct 900
 cgggctgttg aagaaggat atctgtgata aagcctagtg gtcttatggt attcaacatg 960
 ggaggccggc caggacaagg tgtctgtgag cgcctatttc ttccgctggg atttcgcac 1020
 aataagctct ggcaacaaa aattatgcag 1050

<210> 22
 <211> 186
 <212> PRT
 <213> Cây lúa mạch, Thẻ đột biến 14018

<400> 22

Met Ala Ala Ala Ala Gly Asp Val Glu Ala Phe Leu Ala Ala Cys Gln
 1 5 10 15

Ala Ser Gly Asp Ala Ala Tyr Gly Ala Ala Lys Ala Val Leu Glu Arg
 20 25 30

Leu Glu Ala Pro Ala Thr Arg Ala Glu Ala Arg Arg Leu Leu Gly Ala
 35 40 45
 Val Arg Arg Arg Phe Ala Ala Gly Gly Pro Ala Ala Gly Leu Glu Cys
 50 55 60
 Phe Arg Thr Phe His Phe Arg Ile His Asp Val Val Leu Asp Pro His
 65 70 75 80
 Leu Gln Gly Phe Gln Gln Arg Lys Lys Leu Thr Met Met Glu Ile Pro
 85 90 95
 Ser Ile Phe Ile Pro Glu Asp Trp Ser Phe Thr Phe Tyr Glu Gly Leu
 100 105 110
 Asn Arg His Pro Asp Ser Ile Phe Arg Asp Lys Thr Val Ala Glu Leu
 115 120 125
 Gly Cys Gly Asn Gly Trp Ile Ser Ile Ala Leu Ala Glu Lys Trp Cys
 130 135 140
 Pro Ser Lys Ile Gly Thr Ser Cys Ser Val Asp Ile Tyr Leu Ile Ser
 145 150 155 160
 Phe Val Ala Asn Met Gly Pro Ala Glu Val Arg His Leu Leu Arg Leu
 165 170 175
 Leu Tyr Met Lys Leu Leu Gly Val Cys Gln
 180 185

<210> 23

<211> 771

<212> ADN

<213> Cây lúa mạch, Thẻ đột biến 14018

<400> 23

aggattccag caaagaaaga agctaacaat gatggagata cccagcattt tcattccaga 60
 agactggtca ttcaactttct acgaggggtct caaccggcat ccagattcca tcttcaggga 120
 taagacagta gcagagctgg gatgtggcaa tggttggata tccattgcac ttgcagaaaa 180
 gtggtgccct tcgaagattg gcacctcttg ttccgtagat atttatctta tctcgtttgt 240
 tgcaaacatg ggacctgcag aagttagaca ttactcagg tttatggtct ggatataaac 300
 ccaagagcta tcaagattgc atggataaac ctttacttga atgcactaga cgacgatggt 360
 ctcccaatct atgatgcgga ggggaaaaca ttgcttgaca gagtogaatt ctatgaatct 420
 gatcttcttt cttactgtag agataacaag atagaacttg atcgcatgtg tggatgcata 480
 ccacagattc ttaaccccaa tccagaggca atgtcaaaga ttgtaactga aaattcaagt 540

22743

gaggagttct tgtactcctt gagcaactac tgtgctctcc agggttttgt tgaggaccaa 600
 tttggcctcg ggttgattgc tcgggctggt gaagaaggga tatctgtgat aaagcctagt 660
 ggtcttatgg tattcaacat gggaggccgg ccaggacaag gtgtctgtga ggcctatatt 720
 cttcgccgtg gatttcgcat caataagctc tggcaaacaa aaattatgca g 771

<210> 24
 <211> 180
 <212> PRT
 <213> Cây lúa mạch, Thẻ đột biến 14018

<400> 24

Met Ala Ala Ala Ala Gly Asp Val Glu Ala Phe Leu Ala Ala Cys Gln
 1 5 10 15

Ala Ser Gly Asp Ala Ala Tyr Gly Ala Ala Lys Ala Val Leu Glu Arg
 20 25 30

Leu Glu Ala Pro Ala Thr Arg Ala Glu Ala Arg Arg Leu Leu Gly Ala
 35 40 45

Val Arg Arg Arg Phe Ala Ala Gly Gly Pro Ala Ala Gly Leu Glu Cys
 50 55 60

Phe Arg Thr Phe His Phe Arg Ile His Asp Val Val Leu Asp Pro His
 65 70 75 80

Leu Gln Gly Phe Gln Gln Arg Lys Lys Leu Thr Met Met Glu Ile Pro
 85 90 95

Ser Ile Phe Ile Pro Glu Asp Trp Ser Phe Thr Phe Tyr Glu Gly Leu
 100 105 110

Asn Arg His Pro Asp Ser Ile Phe Arg Asp Lys Thr Val Ala Glu Leu
 115 120 125

Gly Cys Gly Asn Gly Trp Ile Ser Ile Ala Leu Ala Glu Lys Trp Cys
 130 135 140

Pro Ser Lys Ile Gly Thr Ser Cys Ser Val Asp Ile Tyr Leu Ile Ser
 145 150 155 160

Phe Val Ala Asn Met Gly Pro Ala Glu Val Arg His Leu Leu Arg Phe
 165 170 175

Met Val Trp Ile
 180

<210> 25
 <211> 644
 <212> ADN
 <213> Cây lúa mạch, Thẻ đột biến 14018

<400> 25
 aggattccag caaagaaaga agctaacaat gatggagata ccagcattt tcattocaga 60
 agactggtca ttcactttct acgaggtct caaccggcat ccagattcca tcttcaggga 120
 taagacagta gcagagctgg gatgtggcaa tggtttatgg tctggatata aacccaagag 180
 ctatcaagat tgcatggata aacctttact tgaatgcact agacgacgat ggtctcccaa 240
 tctatgatgc ggaggggaaa acattgcttg acagagtcga attctatgaa tctgatcttc 300
 tttcttactg tagagataac aagatagaac ttgatcgcat tgttgatgc ataccacaga 360
 ttcttaaccc caatccagag gcaatgtcaa agattgtaac tgaaaattca agtgaggagt 420
 tcttgacttc cttgagcaac tactgtgctc tccagggttt tgttgaggac caatttggcc 480
 tcgggttgat tgctcgggct gttgaagaag ggatatctgt gataaagcct agtgggtctta 540
 tggatttcaa catgggagge cggccaggac aagggtgtctg tgagcgcta tttcttcgcc 600
 gtggatttcg catcaataag ctctggcaaa caaaaattat gcag 644

<210> 26
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Cây lúa mạch, Thẻ đột biến 14018

<400> 26

Met Ala Ala Ala Ala Gly Asp Val Glu Ala Phe Leu Ala Ala Cys Gln
 1 5 10 15

Ala Ser Gly Asp Ala Ala Tyr Gly Ala Ala Lys Ala Val Leu Glu Arg
 20 25 30

Leu Glu Ala Pro Ala Thr Arg Ala Glu Ala Arg Arg Leu Leu Gly Ala
 35 40 45

Val Arg Arg Arg Phe Ala Ala Gly Gly Pro Ala Ala Gly Leu Glu Cys
 50 55 60

Phe Arg Thr Phe His Phe Arg Ile His Asp Val Val Leu Asp Pro His
 65 70 75 80

Leu Gln Gly Phe Gln Gln Arg Lys Lys Leu Thr Met Met Glu Ile Pro
 85 90 95

Ser Ile Phe Ile Pro Glu Asp Trp Ser Phe Thr Phe Tyr Glu Gly Leu
 100 105 110

22743

Asn Arg His Pro Asp Ser Ile Phe Arg Asp Lys Thr Val Ala Glu Leu
115 120 125

Gly Cys Gly Asn Gly Leu Trp Ser Gly Tyr Lys Pro Lys Ser Tyr Gln
130 135 140

Asp Cys Met Asp Lys Pro Leu Leu Glu Cys Thr Arg Arg Arg Trp Ser
145 150 155 160

Pro Asn Leu

<210> 27
<211> 781
<212> DNA
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Đoạn SacII BamHI của Sản phẩm 2

<400> 27
ggccgcgggg ctcgagtgc tccgcacctt ccacttccgc atccacgacg tcgtcctcga 60
ccccacctc caaggattcc agcaaagaaa gaagctaaca atgatggaga taccagcat 120
tttcattcca gaagactggc cattcacttt ctacgagggt ctcaaccggc atccagattc 180
catcttcagg gataagacag tagcagagct gggatgtggc aatgggttga tatccattgc 240
acttgcagaa aagtgggtgcc cttcgaaggt ttatgggtctg gatataaacc caagagctat 300
caagattgca tggataaacc ttacttgaa tgcactagac gacgatggtc tcccaatcta 360
tgatgcggag gggaaaacat tgcttgacag agtcgaattc tatgaatctg atcttctttc 420
ttactgtaga gataacaaga tagaacttga tcgcattggt ggatgcatac cacagattct 480
taacccaat ccagaggcaa tgtcaaagat tgtaactgaa aattcaagtg aggagttctt 540
gtactccttg agcaactact gtgctctcca gggttttggt gaggaccaat ttggcctcgg 600
gttgattgct cgggctgttg aagaaggat atctgtgata aagcctagtg gtcttatggt 660
attcaacatg ggaggccggc caggacaagg tgtctgtgag cgcctatttc tacgccgtgg 720
atttcgcac aataagctct ggcaaacaaa aattatgcag atagcaattc tttgaggatc 780
c 781

<210> 28
<211> 781
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Đoạn SacII BamHI của Sản phẩm 3

<400> 28
ggccgcgggg ctcgagtgc tccgcacctt ccacttccgc atccacgacg tcgtcctcga 60

```

ccccacctc caaggattcc agcaaagaaa gaagctaaca atgatggaga taccagcat 120
tttcattcca gaagactggt cattcacttt ctacgagggt ctcaaccggc atccagattc 180
catcttcagg gataagacag tagcagagct gggatgtggc aatggttgga tatccattgc 240
acttgcagaa aagtgggtgcc cttcgaaggt ttatggtctg gatataaacc caagagctat 300
caagattgca tggataaacc ttacttgaa tgcactagac gacgatggtc tcccaatcta 360
tgatgcggag gggaaaacat tgcttgacag agtcgaattc tatgaatctg atcttctttc 420
ttactgtaga gataacaaga tagaacttga tcgcattggt ggatgcatac cacagattct 480
taaccccaat ccagaggcaa tgtcaaagat tgtaactgaa aattcaagtg aggagtctct 540
gtactccttg agcaactact gtgctctcca gggttttggt gaggaccaat ttggcctcgg 600
gttgattgct cgggctgttg aagaagggat atctgtgata aagcctagtg gtcttatggt 660
attcaacatg ggaggccggc caggacaagg tgtctgtgag cgcctatttc tacgccgtgg 720
atttcgcac c aataagctct ggcaaacaaa aattatgcag atagcaattc tttgaggatc 780
c 781

```

<210> 29
 <211> 703
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn SacII BamHI của Sản phẩm 4

```

<400> 29
ggccgcgggg ctcgagtgt tccgcacctt ccacttcgc atccacgacg tcgtcctcga 60
ccccacctc caaggattcc agcaaagaaa gaagctaaca atgatggaga taccagcat 120
tttcattcca gaagactggt cattcacttt ctacgagggt ctcaaccggc atccagattc 180
catcttcagg gataagacag tagcagagct gggatgtggc aatggttgga tatccattgc 240
acttgcagaa aagtgggtgcc cttcgaaggt ttatggtctg gatataaacc caagagctat 300
caagattgca tggataaacc ttacttgaa tgcactagac gacgatggtc tcccaatcta 360
tgatgcggag gggaaaacat tgcttgacag agtcgaattc tatgaatctg atcttctttc 420
ttactgtaga gataacaaga tagaacttga tcgcattggt ggatgcatac cacagattct 480
taaccccaat ccagaggcaa tgtcaaagat tgtaactgaa aattcaagtg aggagtctct 540
gtactccttg agcaactact gtgctctcca gggttttggt gaggaccaat ttggcctcgg 600
gttgattgct cgggctgttg aagaagggat atctgtgata aagcctagtg gtcttatggt 660
attcaacatg ggaggccggc caggacaagg ctgctaagga tcc 703

```

<210> 30
 <211> 394

<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Đoạn SacII BamHI của Sản phẩm 6

<400> 30
ggccgcggggg ctcgagtgtt tccgcacctt ccacttccgc atccacgacg tcgtcctcga 60
ccccacctc caaggattcc agcaaagaaa gaagctaaca atgatggaga taccagcat 120
tttcattcca gaagactggg cattcacttt ctacgagggt ctcaaccggc atccagattc 180
catcttcagg gataagacag tagcagagct gggatgtggc aatgggttga tatccattgc 240
acttgcagaa aagtgggtgcc cttcgaagat tggcacctct tgttccgtag atatttatct 300
tatctcgttt gttgcaaaca tgggacctgc agaagttaga catttactca gggttacttta 360
tatgaaactt ttaggtgtct gccagtaggg atcc 394

<210> 31
<211> 376
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Đoạn SacII BamHI của Sản phẩm 7

<400> 31
ggccgcggggg ctcgagtgtt tccgcacctt ccacttccgc atccacgacg tcgtcctcga 60
ccccacctc caaggattcc agcaaagaaa gaagctaaca atgatggaga taccagcat 120
tttcattcca gaagactggg cattcacttt ctacgagggt ctcaaccggc atccagattc 180
catcttcagg gataagacag tagcagagct gggatgtggc aatgggttga tatccattgc 240
acttgcagaa aagtgggtgcc cttcgaagat tggcacctct tgttccgtag atatttatct 300
tatctcgttt gttgcaaaca tgggacctgc agaagttaga catttactca gggttatggg 360
ctggatataa ggatcc 376

<210> 32
<211> 325
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Đoạn SacII BamHI của Sản phẩm 8

<400> 32
ggccgcggggg ctcgagtgtt tccgcacctt ccacttccgc atccacgacg tcgtcctcga 60
ccccacctc caaggattcc agcaaagaaa gaagctaaca atgatggaga taccagcat 120
tttcattcca gaagactggg cattcacttt ctacgagggt ctcaaccggc atccagattc 180
catcttcagg gataagacag tagcagagct gggatgtggc aatgggttat ggtctggata 240
taaaccgaag agctatcaag attgcatgga taaaccttta ctggaatgca ctgacgacg 300

atggtctccc aatctataag gatcc	325
<210> 33	
<211> 271	
<212> ADN	
<213> Cây lúa mạch cv. Prestige	
<400> 33	
cgattccagc ttccggttgt taattttggt atgtttgtga actttgctgc attcaggggt	60
ttgttgagga ccaatttggc ctccgggttga ttgctcgggc tgttgaagaa gggatatctg	120
tgataaagcc tagtggtctt atgggtattca acatgggagg ccggccagga caaggtgtct	180
gtgagcgctt atttctacgc cgtggatttc gcatcaataa gctctggcaa acaaaaatta	240
tgcaggtagc aattctttga gtgactagat g	271
<210> 34	
<211> 271	
<212> ADN	
<213> Cây lúa mạch Thẻ đột biến 8063	
<400> 34	
cgattccagc ttccggttgt taattttggt atgtttgtga actttgctgc attcaggggt	60
ttgttgagga ccaatttggc ctccgggttga ttgctcgggc tgttgaagaa gggatatctg	120
tgataaagcc tagtggtctt atgggtattca acatgggagg ccggccagga caaggtgtct	180
gtgagcgctt atttctacgc cgtggatttc gcatcaataa gctctggcaa acaaaaatta	240
tgcagatagc aattctttga gtgactagat g	271
<210> 35	
<211> 121	
<212> ADN	
<213> Cây lúa mạch cv. Sebastian	
<400> 35	
ggcatccaga ttccatcttc agggataaga cagtagcaga gctgggatgt ggcaatgggt	60
ggatatccat tgcacttgca gaaaagtggg gcccttcgaa gggtggcacc tcttgttccg	120
t	121
<210> 36	
<211> 123	
<212> ADN	
<213> Cây lúa mạch đột biến 14018	
<400> 36	
ggcatccaga ttccatcttc agggataaga cagtagcaga gctgggatgt ggcaatgggt	60
ggatatccat tgcacttgca gaaaagtggg gcccttcgaa gattggcacc tcttgttccg	120
tag	123

<210> 37
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mồi PCR

 <400> 37
 atggctgcgg cggcggggga cgtgg 25

 <210> 38
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mồi PCR

 <400> 38
 aggattccag caaagaaaga agc 23

 <210> 39
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mồi PCR

 <400> 39
 gattcttaac cccaatccag aggc 24

 <210> 40
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mồi PCR

 <400> 40
 gggttttgtt gaggaccaat ttggc 25

 <210> 41
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mồi PCR

 <400> 41
 tgctgctttc gtgaacttat t 21

 <210> 42
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi PCR

 <400> 42
 catatggatc tggaccgcag cttctt 26

 <210> 43
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mồi PCR

 <400> 43
 ccttcgaagg gcaccacttt tctgc 25

 <210> 44
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mồi PCR

 <400> 44
 ctggagagca cagtagttgc tcaag 25

 <210> 45
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mồi PCR

 <400> 45
 ctgcataatt tttgtttgcc agagc 25

 <210> 46
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mồi PCR

 <400> 46
 tacaccatth gagcttggca gact 24

 <210> 47
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mồi PCR

<400> 47
 aaaatggagg cgtttactgc agaa 24

<210> 48
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi PCR

<400> 48
 ctagttgcta ccattcacct tagcacc 27

<210> 49
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi PCR

<400> 49
 atggctgcgg cggcggggga cgtgg 25

<210> 50
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi PCR

<400> 50
 atggctgcgg cggcggggga cgtgg 25

<210> 51
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi PCR

<400> 51
 atggctgcgg cggcggggga cgtgg 25

<210> 52
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi PCR

<400> 52
 atggctgcgg cggcggggga cgtgg 25

<210> 53
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi PCR

 <400> 53
 atggctgcgg cgccggggga cgtgg 25

 <210> 54
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi PCR

 <400> 54
 ggctcctcgg cgccgtgcga cggcg 25

 <210> 55
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi PCR

 <400> 55
 ggctcctcgg cgccgtgcga cggcg 25

 <210> 56
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi PCR

 <400> 56
 ggctcctcgg cgccgtgcga cggcg 25

 <210> 57
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi PCR

 <400> 57
 gtacgccgcg tcgcccgcgcg 20

 <210> 58
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi PCR

 <400> 58
 ccgccggcg cgaagcgccg 20

 <210> 59
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mồi PCR

 <400> 59
 gtgcggaagc actcgagccc 20

 <210> 60
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mồi PCR

 <400> 60
 cgtggatgcg gaagtggaag 20

 <210> 61
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mồi PCR

 <400> 61
 cttggaggtg ggggtcgagg acgacg 26

 <210> 62
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mồi PCR

 <400> 62
 gtgcggaagc actcgagccc 20

 <210> 63
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mồi PCR

<400> 63	
cgtggatgcg gaagtggaag	20
<210> 64	
<211> 26	
<212> ADN	
<213> Nhân tạo	
<220>	
<223> Đoạn mồi PCR	
<400> 64	
cttggaggtg ggggtcgagg acgacg	26
<210> 65	
<211> 26	
<212> ADN	
<213> Nhân tạo	
<220>	
<223> Đoạn mồi PCR	
<400> 65	
gtttatggtc tggatataaa cccaag	26
<210> 66	
<211> 23	
<212> ADN	
<213> Nhân tạo	
<220>	
<223> Đoạn mồi PCR	
<400> 66	
aggattccag caaagaaaga agc	23
<210> 67	
<211> 25	
<212> ADN	
<213> Nhân tạo	
<220>	
<223> Đoạn mồi PCR	
<400> 67	
aaatccagca acaagattcc ggaaa	25
<210> 68	
<211> 25	
<212> ADN	
<213> Nhân tạo	
<220>	
<223> Đoạn mồi PCR	
<400> 68	
ctgcataatt tttgtttgcc agagc	25

<210> 69
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> His Tag

<400> 69

Met Gly His His His His His His His His His His His
 1 5 10

<210> 70
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Enterokinase site

<400> 70

Ser Ser Gly His Ile Asp Asp Asp Asp Lys His
 1 5 10

<210> 71
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi PCR

<400> 71
 catatgatgg ctgcggcggc gggggacgtg g 31

<210> 72
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi PCR

<400> 72
 gaattctagt tgctaccatt caccttagca cc 32

<210> 73
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi PCR

<400> 73
 ggccgcgggg ctcgagtgt tccgcac 27

<210> 74
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi PCR

 <400> 74
 ggatcctcaa agaattgcta tctgcataat ttttgtttgc cagagc 46

 <210> 75
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi PCR

 <400> 75
 ggccgcgggg ctcgagtgtc tccgcac 27

 <210> 76
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi PCR

 <400> 76
 ggatccttag cagccttgtc ctggccggcc tcccatg 37

 <210> 77
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi PCR

 <400> 77
 cgattccagc ttccggttg 19

 <210> 78
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi PCR

 <400> 78
 cgattccagc ttccggttg 19

 <210> 79
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi PCR

 <400> 79
 cgattccagc ttccggttg 19

<210> 80
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi PCR

 <400> 80
 ggcattccaga ttccattcttc ag 22

<210> 81
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi PCR

 <400> 81
 catctagtca ctcaaagaat tgctac 26

<210> 82
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi PCR

 <400> 82
 catctagtca ctcaaagaat tgctat 26

<210> 83
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi PCR

 <400> 83
 catctagtca ctcaaagaat tgctat 26

<210> 84
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi PCR

<400> 84
 ctacggaaca agaggtgcca at 22

<210> 85
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi PCR

<400> 85
 ggccgcgggg ctcgagtgct tccgcac 27

<210> 86
 <211> 63
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi PCR

<400> 86
 cgagataaga taaatatcta cggaacaaga ggtgccaatc ttcgaagggc accacttttc 60
 tgc 63

<210> 87
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi PCR

<400> 87
 ggccgcgggg ctcgagtgct tccgcac 27

<210> 88
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi PCR

<400> 88
 aacctgagta aatgtctaac ttctgcaggt cccatgtttg caacaaacga gataagataa 60
 atatctacgg 70

<210> 89
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi PCR

<400> 89
 ggccgcgggg ctcgagtgc tccgcac 27

<210> 90
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi PCR

<400> 90
 ggatccctac tggcagacac ctaaaagttt catataaagt aacctgagta aatgtctaac 60
 ttctgc 66

<210> 91
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi PCR

<400> 91
 ggccgcgggg ctcgagtgc tccgcac 27

<210> 92
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi PCR

<400> 92
 ggatccttat atccagacca taaacctgag taaatgtcta acttctgc 48

<210> 93
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi PCR

<400> 93
 ggccgcgggg ctcgagtgc tccgcac 27

<210> 94
 <211> 80
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi PCR

<400> 94
 aggtttatcc atgcaatctt gatagctctt gggtttatat ccagaccata aaccattgcc 60

acatcccagc tctgctactg	80
<210> 95	
<211> 27	
<212> ADN	
<213> Nhân tạo	
<220>	
<223> Đoạn mồi PCR	
<400> 95	
ggcgcggggg ctcgagtgc tccgcac	27
<210> 96	
<211> 80	
<212> ADN	
<213> Nhân tạo	
<220>	
<223> Đoạn mồi PCR	
<400> 96	
ggatccttat agattgggag accatcgtcg tctagtgcac tcaagtaaag gtttatccat	60
gcaatcttga tagctcttgg	80
<210> 97	
<211> 22	
<212> ADN	
<213> Nhân tạo	
<220>	
<223> Đoạn mồi PCR	
<400> 97	
ggcatccaga ttccatcttc ag	22
<210> 98	
<211> 22	
<212> ADN	
<213> Nhân tạo	
<220>	
<223> Đoạn mồi PCR	
<400> 98	
ggcatccaga ttccatcttc ag	22
<210> 99	
<211> 22	
<212> ADN	
<213> Nhân tạo	
<220>	
<223> Đoạn mồi PCR	
<400> 99	
ggcatccaga ttccatcttc ag	22

<210> 100
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi PCR

<400> 100
 cgattccagc ttccggttg 19

<210> 101
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi PCR

<400> 101
 ctacggaaca agaggtgcca ac 22

<210> 102
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi PCR

<400> 102
 ctacggaaca agaggtgcca at 22

<210> 103
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi PCR

<400> 103
 ctacggaaca agaggtgcca at 22

<210> 104
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi PCR

<400> 104
 catctagtca ctcaaagaat tgctat 26