



(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

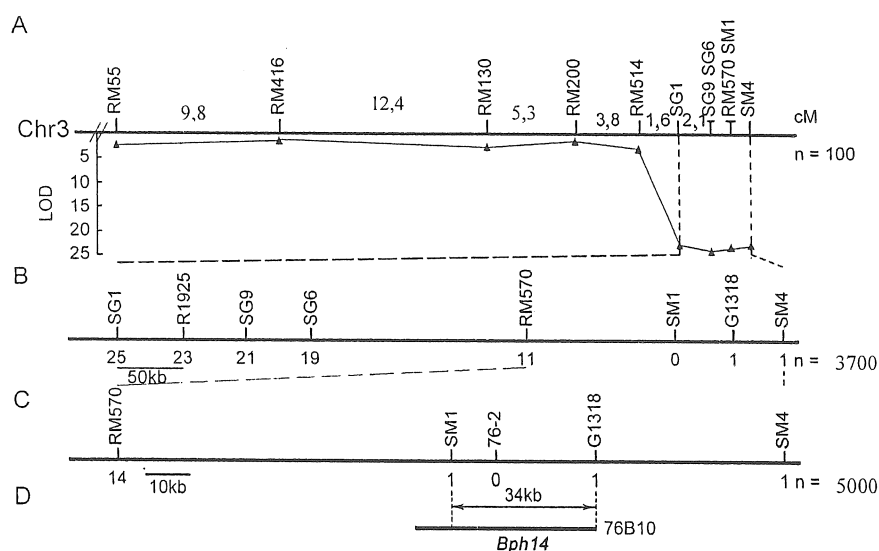
(11) 
1-0022945

(51)⁷ C12N 15/29, C07K 14/415, C12N 15/82, (13) B
A01H 5/00, 4/00

- (21) 1-2011-02034 (22) 30.12.2009
(86) PCT/IB2009/007988 30.12.2009 (87) WO2010/079383 15.07.2010
(30) 200910076514.4 06.01.2009 CN
(45) 27.01.2020 382 (43) 27.02.2012 287
(73) WUHAN UNIVERSITY (CN)
Luojia Hill, Wuhan, Hubei 430072, China
(72) HE, Guangcun (CN), DU, Bo (CN), ZHANG, Weilin (CN), ZHU, Lili (CN), CHEN, Rongzhi (CN)
(74) Công ty TNHH Ban Ca (BANCA)

(54) AXIT NUCLEIC CHỨA GEN KHÁNG RẦY NÂU, VECTƠ BIỂU HIỆN CHỨA AXIT NÀY, CADN MÃ HÓA GEN KHÁNG RẦY NÂU VÀ VECTƠ CHỨA CADN NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến gen Bph14 kháng rầy nâu ở lúa. Gen này có trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 1 và trình tự cADN của nó được nêu trong SEQ ID NO: 2. Gen Bph14 theo sáng chế thuộc họ gen CC-NBS-LRR, protein được gen này mã hóa liên quan đến tính kháng bệnh của cây. Gen Bph14 có chức năng kháng rầy nâu. Bằng việc đưa gen Bph14 này vào dòng lúa thông thường bằng cách biến nạp di truyền và lai chéo, tính kháng rầy nâu của lúa có thể được tăng cường, nhờ vậy thiệt hại do rầy nâu gây ra có thể được giảm bớt nhằm làm tăng và ổn định sản lượng cây lúa.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ gen thực vật. Đặc biệt, nó liên quan đến gen kháng rầy nâu ở lúa *Bph14* và ứng dụng của gen này trong cây lúa và thóc để kháng rầy nâu.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Lúa là cây lương thực quan trọng, là lương thực chính cho hơn nửa dân số thế giới. Hơn nữa, bản đồ chi tiết về di truyền và vật lý của bộ gen cây lúa đã được hoàn thành. Việc tạo ra lúa chuyển gen đã trở nên thông thường. Ngoài ra, lúa có tính cộng tuyển với bộ gen của các cây thân cỏ khác, do đó, nó được coi như là một cây mẫu. Do vậy, việc nghiên cứu các gen chức năng của lúa có một ý nghĩa quan trọng cho việc phát triển kinh tế xã hội và nghiên cứu sinh học.

Việc thiếu nguồn cung cấp lương thực thỏa đáng đang là một thách thức mà cả thế giới phải đối mặt. Sản lượng lúa đã được tăng đáng kể nhờ hai cuộc cách mạng công nghệ của cây lúa vào những năm 1950 và 1960, và cây lúa lai những năm 1970. Tuy nhiên, cây lúa vẫn bị phá hoại bởi những loài sâu bọ có hại trên những diện tích lớn và sản lượng gạo vẫn tiếp tục bị đe dọa, đặc biệt là do rầy nâu. Rầy nâu trưởng thành và nhộng đâm và hút nhựa của lúa bằng vòi của chúng, làm lá bị chuyển sang màu vàng hoặc bị héo cho đến chết, dẫn đến làm giảm hoặc làm mất hoàn toàn sản lượng. Theo ki yếu nông nghiệp của Trung Quốc, đã có các nạn dịch rầy nâu nghiêm trọng xảy ra trên cả nước vào các năm 1966, 1969, 1973, 1977, 1983 và 2003 và các đại dịch vào các năm 1987, 1991, 2005, 2006 và 2007. Vùng bị hại chiếm tới hơn 50% tổng diện tích trồng lúa và gây mất mùa lúa lớn cho Trung Quốc. Vì thiệt hại do rầy nâu gây ra xuất hiện chủ yếu trong giai đoạn làm đầy hạt và chín của lúa, rất nhiều thuốc trừ sâu phải được dùng trong giai đoạn này, điều này có thể gây nguy cơ gạo bị ô nhiễm. Ngành nông nghiệp cần phải có một biện pháp an toàn hơn để đảm bảo có sản lượng cao từ việc trồng lúa.

Sử dụng một gen kháng rầy nâu để nhân giống kháng côn trùng gây hại vào một giống lúa là cách hiệu quả và kinh tế nhất để kiểm soát đầy đủ rầy nâu. Các kết quả

ngiên cứu của Viện Nghiên cứu Lúa gạo Quốc tế (IRRI) và kinh nghiệm thực tiễn trong sản xuất lúa gạo ở Đông Nam Á cho thấy kể cả các giống lúa có mức độ kháng trung bình cũng đủ để kiểm soát mật độ rầy nâu sao cho không bị hư hại rõ rệt và không gây thiệt hại và tổn thất thực sự về sản lượng. Do vậy, việc phân lập gen kháng rầy nâu và ứng dụng nó trong dự án tạo giống lúa là những phương pháp cơ bản để kiểm soát thiệt hại ở cây lúa do rầy nâu gây ra.

Nghiên cứu gen kháng rầy nâu ở lúa bắt đầu từ những năm 1970. Cho đến nay, 19 gen kháng côn trùng gây hại chính đã được đặt tên (xem thông tin chi tiết trong tài liệu của Yang HY và cộng sự, 2004 High-resolution genetic mapping at the *Bph15* locus for brown planthopper resistance in rice. *Theor Appl Genet.* 110: 182-191). Trong số đó, khả năng kháng của ba giống lúa (Mudgo, CO22 và MTU15) được kiểm soát bởi một gen trội đơn, gen này có tên là *Bph1*, và một gen lặn khác là *bph2*, liên kết gần với *Bph1*, kiểm soát khả năng kháng của dòng lúa ASD7. Khi nghiên cứu di truyền của 28 giống, Lakshminarayana và Khush thấy rằng giống lúa Rathu Heenati mang gen kháng rầy nâu trội *Bph3* được di truyền độc lập từ *Bph1*. Ngoài ra, giống lúa Babawee có mang gen lặn *bph4* cũng được di truyền độc lập từ *bph2*. Sidhu và Khush thấy rằng *Bph3* và *bph4* liên kết gần với nhau, *bph4* cũng liên kết với gen cao hơn lùn *sd-1*. Phân tích di truyền của Khush và cộng sự về giống lúa ARC10550 cho thấy nó có mang gen lặn *bph5*. Trong nghiên cứu về 17 vật liệu kháng rầy nâu kiểu sinh học 4 BPH nhưng nhạy với ba loại kiểu sinh học khác, Kabir và Khush thấy rằng các giống Swarnalata và T12 có mang một gen kháng sâu bệnh có hại tương ứng có tên là *Bph6* và *bph7*. Việc phát hiện ra *bph8* và *Bph9* tương tự như việc phát hiện ra các gen khác, gen lặn *bph8* không đẳng vị với *bph2* và *bph4*, gen trội *Bph9* không đẳng vị với *Bph3* và *Bph4*. Trong số các gen kháng rầy nâu được đề cập trên đây, *bph5*, *Bph6* và *bph7* kháng với rầy nâu kiểu sinh học 4, đồng thời thể hiện tính nhạy với kiểu sinh học 1, 2 và 3.

Lúa kiểu đại cũng là một nguồn gen kháng rầy nâu. Năm 1994, Ishii và cộng sự đã xác định một gen kháng rầy nâu trội mới *Bph10* từ dòng biến nạp của lúa kiểu đại Úc (*O. australiensis*), IR65482-4-136-2-2. Gen này kháng lại rầy nâu kiểu sinh học 1, 2 và 3. *Bph11* được xác định từ *O. eichinger*. Cây lúa có gen kháng rầy nâu có thể ức chế quá trình lấy thức ăn, tăng trưởng và phát triển, và tái sinh sản của rầy nâu, nhờ đó mục tiêu kháng sâu bọ có hại sẽ đạt được (Hao PY và cộng sự, 2008).

Herbivore-induced callose deposition on the sieve plates of rice: an important mechanism for host resistance. *Plant Physiology* 146: 1810-1820). Tuy nhiên, cho đến nay, không có gen kháng rầy nâu ở lúa nào được tách dòng.

Tách dòng dựa trên bản đồ, hay cũng được gọi là tách dòng vị trí, là một kỹ thuật tách dòng gen được phát triển cùng với sự phát triển của bản đồ liên kết di truyền chỉ thị phân tử. Các bước tách dòng dựa trên bản đồ bao gồm tạo bản đồ di truyền của gen mục tiêu, bản đồ vật lý, phân tích trình tự và biến nạp di truyền và thử chức năng. Trên lý thuyết, bất cứ gen nào có thể xác định được vị trí đều có thể được phân lập bằng tách dòng dựa trên bản đồ. Nhìn chung, tách dòng dựa trên bản đồ thích hợp cho các loài có bộ gen tương đối nhỏ, ví dụ như cây lúa mẫu một lá mầm, trong đó tỉ lệ giữa khoảng cách vật lý và khoảng cách di truyền của bộ gen là nhỏ và có nhiều chỉ thị. Là một cây mẫu thân cỏ, lúa có bộ gen là trung tâm của vòng tròn đồng tâm được tạo ra bởi các bộ gen của 7 loại thân cỏ, ví dụ như lúa mạch và cao tương, và nó là một trong số các cây thích hợp nhất để sử dụng tách dòng dựa trên bản đồ để phân lập một gen mục tiêu. Nhiều gen đã được tách dòng trong lúa sử dụng phương pháp tách dòng dựa trên bản đồ, ví dụ như gen kháng *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* *Xa-21* (Song WY và cộng sự 1995, A Receptor Kinase-Like Protein Encoded by the Rice Disease Resistance Gene, *Xa21*. *Science*, 270: 1804-1806), *Xa-1* (Yoshimura và cộng sự 1998, Expression of *Xa-1*, a bacterial blight-resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation. *PNAS*, 95: 1663-1668) và *Xa-26* (Sun và cộng sự 2004, *Xa26* a gene conferring resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice, encodes an leuxin-rich repeat LRR receptor kinase-like protein. *Plant Journal*, 37: 517-527), gen kháng khô héo ở lúa *Pi-b* (Wang và cộng sự 1999, The *Pi-b* gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leuxin-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Plant Journal*, 1999, 19: 55-64) và *Pi-ta* (Bryan và cộng sự 2000, A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene *Pi-ta*. *Plant Cell*, 12: 2033-2046), và gen mọc chồi rẽ được tách dòng bởi Li (Li và cộng sự 2003, Control of tillering in rice. *Nature* 422: 618-621), gen chịu mặn (Ren và cộng sự 2005, A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter. *Nature Genetics* 37(10): 1141-1146) và gen cho sản lượng cao (Weiya Xue và cộng sự 2008. Natural variation in *Ghd7* is an important regulator of heading date and yield potential in rice. *Nature Genetics* 40, 761-767).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất gen kháng rầy nâu ở lúa *Bph14* có trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 1.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất các phương pháp sử dụng gen kháng rầy nâu ở lúa *Bph14* để cải thiện gây giống lúa.

Mục đích nữa của sáng chế là đề xuất các phương pháp dùng gen kháng rầy nâu ở lúa *Bph14* để tăng khả năng kháng rầy nâu của lúa.

Sáng chế đề xuất phương pháp để tạo ra một quần thể phân lập các cây lúa kháng rầy nâu. Nó sử dụng tách dòng dựa trên bản đồ và phân tách gen kháng rầy nâu ở lúa *Bph14*. Phân tích chỉ thị đồng chia tách chỉ ra rằng gen này được chia tách đồng thời với đặc tính kháng rầy nâu. Bằng biến nạp di truyền gen *Bph14*, để lúa được biến nạp cho thấy kiểu hình kháng rầy nâu, chức năng của gen này đã được xác nhận.

Trình tự nucleotit của gen *Bph14* trong sáng chế như được chỉ ra trong trình tự SEQ ID NO: 1. Chiều dài đầy đủ của gen này là 9921bp, bao gồm 1 intron và 2 exon, CDS của nó tương ứng là các vùng cặp bazơ 3387-7289 và cặp bazơ 7936-8004. Chiều dài đầy đủ của cADN là 3972bp, mã hóa cho 1323 axit amin, trình tự axit amin của nó được chỉ ra trong trình tự SEQ ID NO: 3. Protein này thuộc nhóm vị trí liên kết nucleotit-lập lại giàu leuxin NBS-LRR, vùng trung tâm hoạt động của 180-464 là một miền NB-ARC bảo tồn, bao gồm P-loop bảo tồn, miền liên kết ATP và kinaza 1a (Van der Biezen EA, Jones JDG. The NB-ARC domain: a novel signalling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. 26 March 1998. Current Biology 8(7):R226-R228).

Nên hiểu rằng không cần tác động đến hoạt động của protein Bph14, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể thay thế, chèn và/hoặc xóa một hoặc nhiều hơn axit amin của trình tự axit amin được chỉ ra trong trình tự SEQ ID NO: 3 để tạo một trình tự axit amin có cùng chức năng.

Bên cạnh đó, tính đến sự thoái hóa của các codon, ví dụ như, trình tự gen mã hóa cho protein nêu trên có thể được biến đổi trong vùng mã hóa của nó mà không cần thay đổi trình tự axit amin hoặc trong vùng không mã hóa mà không cần tác động đến biểu hiện gen. Do đó, sáng chế cũng bao gồm trình tự nucleotit có một hoặc nhiều hơn nucleotit được thay thế, chèn và/hoặc xóa khỏi trình tự gen mã hóa cho protein nêu

trên và có cùng chức năng như gen mã hóa nêu trên. Sáng chế cũng bao gồm cả trình tự có nghĩa hoặc đối nghĩa có nguồn gốc từ gen, bao gồm cả vectơ tách dòng hoặc vectơ biểu hiện có mang trình tự nucleotit hoặc các mảnh của nó, tế bào vật chủ mang vectơ, một tế bào thực vật biến nạp và một cây chuyển gen mang trình tự nucleotit hoặc một đoạn của chúng.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng các chỉ thị phân tử được thiết kế hoặc tạo ra theo trình tự được công bố của sáng chế có thể được dùng để gây giống cây lúa kháng rầy nâu.

Ưu điểm và hiệu quả của sáng chế:

1. Tách dòng thành công gen *Bph14* còn chứng minh khả năng tách dòng dựa trên bản đồ trong tách dòng các gen quan trọng ở lúa. Các gen được tách dòng sử dụng phương pháp này có các chức năng rõ ràng và hiệu quả tốt.

2. Mặc dù ở lúa, nhiều gen mã hóa cho cấu trúc vị trí liên kết nucleotit NBS mang protein đã được tách dòng, hầu hết chúng có liên quan đến kháng bệnh. Gen *Bph14* được tách dòng trong sáng chế có đặc tính hiển nhiên kháng rầy nâu và điều này là rất quan trọng để hiểu được đầy đủ về các chức năng sinh học của các gen thuộc loại này.

3. Cho đến nay, không có gen kháng rầy nâu ở lúa nào được biết đến là đã được tách dòng, và cơ chế phân tử của kháng rầy nâu ở lúa vẫn còn chưa rõ ràng. Gen *Bph14* được tách dòng trong sáng chế có thể tăng khả năng kháng của lúa đối với rầy nâu, điều này sẽ thúc đẩy việc nghiên cứu để hiểu được cơ chế phân tử của kháng rầy nâu ở lúa.

4. *Bph14* làm tăng đáng kể khả năng kháng rầy nâu của lúa. Sử dụng *Bph14* để gây giống lúa bằng biến nạp di truyền hoặc lai chéo có thể làm tăng khả năng kháng rầy nâu của lúa, do đó thiệt hại do rầy nâu gây ra được giảm bớt và đạt được mục đích tăng và ổn định sản lượng.

5. Sâu bọ chọc hút là loài sâu bọ có hại với ngành nông nghiệp. Việc tách gen *Bph14* và việc chứng minh chức năng kháng rầy nâu của nó là một tham khảo quan trọng cho nghiên cứu về khả năng kháng trong các cây khác đối với các nhóm sâu bọ chọc hút khác.

Bằng cách sử dụng các môi được cung cấp (các trình tự SEQ ID NO: 14-27),

khả năng kháng rầy nâu có thể được xác định. Sự tồn tại của gen kháng rầy nâu *Bph14* trong giống lúa B5 được chỉ ra nếu các mảnh 222 cặp bazơ (bp) (SG1) có thể được khuếch đại khi sử dụng các trình tự SEQ ID NO: 14 và 15; hoặc các mảnh 221bp (SG6) có thể được khuếch đại bằng các trình tự SEQ ID NO: 16 và 17; hoặc các mảnh 227bp (SG9) có thể được khuếch đại bằng các trình tự SEQ ID NO: 18 và 19; hoặc các mảnh 158bp (RM570) có thể được khuếch đại bằng các trình tự SEQ ID NO: 20 và 21, hoặc các mảnh 230bp (SM1) có thể được khuếch đại bằng các trình tự SEQ ID NO: 22 và 23; hoặc các mảnh 172bp (76-2) có thể được khuếch đại bằng các trình tự SEQ ID NO: 24 và 25; hoặc các mảnh 218bp (SM4) có thể được khuếch đại bằng các trình tự SEQ ID NO: 26 và 27; trong đó gen *Bph14* nằm giữa chỉ thị SG1 và SM4 ở phần cuối của cánh dài của nhiễm sắc thể thứ 3 trong bộ gen lúa. Chúng tôi đã dùng SG1 và SM4 để sàng lọc 3700 cây đơn lẻ từ quần thể F_2 và 5000 cây đơn lẻ từ quần thể F_5 , và đã thu được các cây đơn lẻ có mang các chỉ thị phân tử tái tổ hợp nằm giữa SG1 và SM4. Dựa trên kiểu gen của các cây đơn lẻ tái tổ hợp này và cấp độ kháng của các dòng tương ứng của chúng, chỉ thị phân tử 76-2 cùng phân lập với gen kháng rầy nâu *Bph14*, và tất cả chỉ thị phân tử SG1, SG9, SG6, RM570, SM1 và SM4 có thể được sử dụng để sàng lọc giống lúa kháng rầy nâu có mang gen *Bph14*.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là sơ đồ xác định vị trí của gen *Bph14* chủ yếu kháng rầy nâu ở nhiễm sắc thể thứ 3 trong giống lúa B5. A là kết quả quét của QTL. Đường kẻ ngang là nhiễm sắc thể thứ 3 của lúa, và các đường ngắn vuông góc là các chỉ thị phân tử trong nhiễm sắc thể. Giá trị giữa các chỉ thị cho biết khoảng cách di truyền (cM) giữa các chỉ thị. Các hình tam giác là giá trị LOD của từng chỉ thị. LOD cao hơn 2,0 cho thấy sự xuất hiện của QTL. “n” là số lượng các cây đơn lẻ trong quần thể; B là kết quả sàng lọc của các cây đơn lẻ tái tổ hợp F_2 sử dụng SG1 và SM4. Các kết quả của kiểu gen và kiểu hình được kết hợp, và *Bph14* được đồng phân lập với chỉ thị phân tử SM1. Các giá trị phía dưới chỉ thị là số lượng các cây đơn lẻ tái tổ hợp giữa chỉ thị phân tử và *Bph14*. “n” là số lượng của tổng các cây đơn lẻ F_2 được sàng lọc; C là kết quả sàng lọc các cây đơn lẻ tái tổ hợp F_5 bằng RM570 và SM4. *Bph14* đồng phân lập với chỉ thị phân tử 76-2. Các giá trị bên dưới chỉ thị là số lượng các cây đơn lẻ tái tổ hợp giữa chỉ thị phân tử và *Bph14*. n là số lượng tổng các cây đơn lẻ F_5 được sàng lọc; và D, 76B10 là một dòng BAC của thư viện bộ gen B5. Dựa trên sự so sánh giữa trình tự của nó và trình tự

Nipponbare, 76-2, mỗi được thiết kế dựa trên sự khác nhau giữa các trình tự, đồng phân lập với *Bph14*. *Bph14* được đặt tại vùng 34kb giữa SM1 và G1318.

Hình 2 là ảnh chụp điện di của các cây đơn lẻ được kiểm tra bằng chỉ thị SSR 76B10-2. Hai hàng đầu tiên là cây bố mẹ kháng côn trùng RI35 và cây nhạy với côn trùng TN1, các hàng còn lại cho thấy kiểu gen của các cây đơn lẻ thuộc quần thể F2.

Hình 3 là bản đồ của *Bph14*. A: Kết quả của bản đồ sơ bộ *Bph14*. Tên của các chỉ thị nằm trên nhiễm sắc thể, các con số đại diện cho khoảng cách di truyền (cM) giữa các chỉ thị, kết quả quét QTL cho thấy có một giá trị LOD lớn nhất 49,3 giữa các chỉ thị phân tử R1925 và G1318.

B: Các kết quả của bản đồ chính xác. Các con số giữa các chỉ thị phân tử là số lượng của các cây đơn lẻ với sự tái tổ hợp của chỉ thị và *Bph14*. *Bph14* nằm giữa các chỉ thị phân tử SM1 và G1318.

C: Bản đồ vật lý giữa SM1 và G1318, *Bph14* nằm trong vùng 34kb giữa SM1-G1318.

Mô tả danh sách trình tự

SEQ ID NO: 1 là trình tự nucleotit của gen *Bph14*.

SEQ ID NO: 2 là trình tự cADN của *Bph14*.

SEQ ID NO: 3 là trình tự protein *Bph14* được mã hóa bởi SEQ ID số: 1.

SEQ ID NO: 4 và 5 và SEQ ID NO: 6 và 7 là các cặp mồi được sử dụng để khuếch đại gen *Bph14* từ bộ gen của B5.

SEQ ID NO: 8 và 9 là một cặp mồi được sử dụng để khuếch đại cADN của gen *Bph14*.

SEQ ID NO: 10 và 11 là một cặp mồi được sử dụng để khuếch đại trình tự khởi đầu phiên mã 35S từ pCAMBIA1301.

SEQ ID NO: 12 và 13 là mồi đánh dấu của gen *Bph14*.

SEQ ID NO: 14 và 15 là mồi cho chỉ thị phân tử SG1.

SEQ ID NO: 16 và 17 là mồi cho chỉ thị phân tử SG6.

SEQ ID NO: 18 và 19 là mồi cho chỉ thị phân tử SG9.

SEQ ID NO: 20 và 21 là mỗi cho chỉ thị phân tử RM570.

SEQ ID NO: 22 và 23 là mỗi cho chỉ thị phân tử SM1.

SEQ ID NO: 24 và 25 là mỗi cho chỉ thị phân tử 76-2.

SEQ ID NO: 26 và 27 là mỗi cho chỉ thị phân tử SM4.

Mô tả chi tiết sáng chế

Một khía cạnh của sáng chế đề xuất phân tử axit nucleic được phân lập mang trình tự nucleotit chứa gen *Bph14* kháng rầy nâu được chọn từ nhóm bao gồm trình tự SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2. Trong một khía cạnh khác, trình tự nucleotit mã hóa phân tử polynucleotit mang trình tự axit amin SEQ ID NO: 3. Trong một khía cạnh khác nữa, trình tự nucleotit được liên kết hoạt động với một trình tự khởi đầu phiên mã dị hợp.

Một khía cạnh khác của sáng chế đề xuất vector biểu hiện mang phân tử axit nucleic được phân lập có chứa một trình tự nucleotit mang gen *Bph14* kháng rầy nâu được lựa chọn từ nhóm bao gồm trình tự SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2. Trong một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất cây, mô cây, hoặc tế bào cây chuyển gen có mang vector biểu hiện. Cũng trong một khía cạnh khác, cây, mô cây, hoặc tế bào cây chuyển gen là một lá mầm. Trong một khía cạnh khác nữa, cây, mô cây, hoặc tế bào cây chuyển gen là lúa.

Một khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất phương pháp để tạo cây chuyển gen biểu hiện gen *Bph14* bao gồm các bước: (a) biến nạp ổn định một tế bào của cây với một phân tử axit nucleic chứa trình tự axit nucleic được lựa chọn từ nhóm bao gồm trình tự SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2 để tạo tế bào biến nạp; (b) tái tạo cây chuyển gen từ tế bào biến nạp; và (c) trồng cây chuyển gen trong đó phân tử axit nucleic được biểu hiện. Trong một khía cạnh khác, cây chuyển gen là một lá mầm. Vẫn trong một khía cạnh khác, cây chuyển gen là lúa.

Một khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất chỉ thị phân tử liên quan đến tính kháng rầy nâu, trong đó chỉ thị phân tử được chọn lựa từ nhóm bao gồm: SG1, SG6, SG9, RM570, SM1, 76-2, và SM4. Trong một khía cạnh, SG1 được khuếch đại bằng các mồi SEQ ID NO: 14 và 15. Trong một khía cạnh khác, SG6 được khuếch đại bằng

các môi SEQ ID NO: 16 và 17. Trong một khía cạnh khác nữa, SG9 được khuếch đại bằng các môi SEQ ID NO: 18 và 19. Trong một khía cạnh khác nữa, RM570 được khuếch đại bằng các môi SEQ ID NO: 20 và 21. Trong một khía cạnh khác nữa, SM1 được khuếch đại bằng các môi SEQ ID NO: 22 và 23. Trong một khía cạnh khác, 76-2 được khuếch đại bằng các môi SEQ ID NO: 24 và 25. Trong một khía cạnh khác nữa, SM4 được khuếch đại bằng các môi SEQ ID NO: 26 và 27.

Vẫn trong một khía cạnh của sáng chế là phương pháp để xác định sự có mặt hoặc vắng mặt của tính kháng rầy nâu ở cây hoặc hạt, bao gồm phân tích ADN bộ gen từ cây hoặc hạt để xác định sự có mặt của một chỉ thị phân tử liên kết với locus tính trạng định lượng có liên quan đến tính kháng rầy nâu, trong đó chỉ thị phân tử được chọn lựa từ nhóm bao gồm: SG1, SG6, SG9, RM570, SM1, 76-2, và SM4. Trong một khía cạnh khác, phương pháp còn bao gồm phân tích ADN bộ gen từ cây hoặc hạt để xác định sự có mặt của một chỉ thị phân tử thứ hai liên kết với locus tính trạng định lượng có liên quan đến tính kháng rầy nâu, trong đó chỉ thị phân tử thứ hai là G1318. Trong một khía cạnh khác, cây hoặc hạt là một lá mầm. Trong một khía cạnh khác nữa, cây hoặc hạt là lúa.

Một khía cạnh khác của sáng chế là một locus tính trạng định lượng có liên quan đến tính kháng rầy nâu, trong đó locus tính trạng định lượng nằm tại vùng 34kb giữa một chỉ thị phân tử thứ nhất và một chỉ thị phân tử thứ hai trên nhiễm sắc thể thứ 3 của lúa. Trong một khía cạnh khác, locus tính trạng định lượng mang gen *Bph14*.

Các phương án sau đây minh họa hơn nữa nội dung của sáng chế, nhưng chúng không được hiểu là giới hạn sáng chế. Những biến thể hoặc thay thế cho các phương pháp, quy trình hoặc điều kiện của sáng chế, khi không chệch hướng khỏi tinh thần và bản chất của sáng chế, tất cả đều thuộc phạm vi của sáng chế.

Nếu không được thể hiện cụ thể, các biện pháp kỹ thuật được sử dụng trong các phương án là các biện pháp thông thường đã được chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này biết đến.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Tách dòng vị trí của gen *Bph14*

1.1. Kết quả bản đồ sơ bộ của *Bph14*

Vật liệu lúa kháng rầy nâu RI35 (Hao PY, Liu CX, Wang YY, Chen RZ, Tang M, Du B, Zhu LL, He GC (2008) Herbivore-induced callose deposition in the sieve plates of rice: an important mechanism for host resistance. *Plant Physiology* 146: 1810-1820) được lai chéo với một giống lúa nhạy với rầy nâu (Taichung bản địa 1, TN1, được mua từ thư viện nguồn hạt thóc quốc gia) để tạo ra quần thể F2 mang gen *Bph14*. Để đánh giá kiểu hình kháng rầy nâu của từng cây đơn lẻ trong quần thể sơ đồ F2, thí nghiệm sàng lọc lượng lớn các cây con được sử dụng để kiểm tra tính kháng của từng cây đơn lẻ trong quần thể. Mức độ kháng sâu bọ của cây đơn lẻ F2 được tính toán theo mức độ kháng sâu bọ của tất cả các cây đơn lẻ của họ F₂₋₃ tương ứng. Bằng cách sử dụng phương pháp PCR (phản ứng chuỗi polymeraza), điện di gel polyacrylamit, đoạn dò RFLP và lai Southern blotting (Sambrook, và cộng sự), trạng thái phân tách của các đoạn dò phân tử RFLP và SSR phát hiện từng cây F2 đơn lẻ. Dựa trên kiểu phụ của chỉ thị phân tử F2, phần mềm JoinMap3.0 (Kyazma B.V., PO Box 182, 6700 AD Wageningen, Hà Lan) được sử dụng để tạo sơ đồ liên kết di truyền chỉ thị phân tử của nhiễm sắc thể lúa. Cùng sự trợ giúp của phần mềm phân tích đặc tính định lượng MapQTL5.0 (Kyazma B.V., PO Box 182, 6700 AD Wageningen, Hà Lan), phân tích bản đồ xen kẽ được kết hợp với số liệu định lượng của kiểu hình kháng rầy nâu thu thập được trong thí nghiệm sàng lọc lượng lớn cây non. Kết quả cho thấy: một giá trị đỉnh QTL tồn tại giữa các chỉ thị phân tử nhiễm sắc thể thứ ba R1925 và G1318, giá trị LOD đạt 49,3 và tỉ lệ góp phần vào đa dạng kiểu hình là 90,6%.

1.2. Bản đồ chính xác của *Bph14*

Dựa trên các kết quả trên, các phương pháp PCR (phản ứng chuỗi polymeraza) và điện di gel polyacrylamit được sử dụng để sàng lọc quần thể F2 với hai chỉ thị SSR RM514, nằm ngoài R1925 và G1318, và SM1, nằm trong R1925 và G1318, để thu được 54 cây đơn lẻ tái tổ hợp. Khi hợp nhất các chỉ thị phân tử của các cây đơn lẻ tái tổ hợp, các cây đơn lẻ này có chỉ thị phân tử giống nhau và cùng mức độ kháng sâu hại được đưa vào quỹ chung (Bảng 1). Trừ cây đơn lẻ SA69, 12 cây đơn lẻ RT25-RT15 có kiểu hình giống hệt nhau với chỉ thị phân tử SM1, nhưng ở SA69, kiểu hình giống hệt với G1318. Do đó, *Bph14* nằm giữa SM1 và G1318.

Bảng 1. Khả năng kháng sâu bọ có hại của các cây đơn lẻ F2 tái tổ hợp

Số lượng cây đơn lẻ	RM514	SG1	R1925	SG9	SG6	RM570	SM1	G1318	Kiểu hình	Cấp độ kháng
RT1	R	R	R	R	R	R	H	H	H	5,6
RT5	R	R	R	R	R	H	H	H	H	4,74
RT16	R	R	H	H	H	H	H	H	H	5,83
RT2	R	H	H	H	H	H	H	H	H	5,49
SA50	R	H	H	H	H	H	R	R	R	3,93
SA74	H	H	H	H	H	H	R	R	R	3,96
SA55	S	H	H	H	H	R	R	R	R	3,86
RT18	H	H	H	H	H	R	R	R	R	4,04
RT83	H	H	H	H	R	R	R	R	R	4,56
RT82	H	H	H	R	R	R	R	R	R	4,1
RT10	H	R	R	R	R	R	R	R	R	4,43
RT25	H	H	H	S	S	S	H	H	H	4,88
SA51	H	H	S	S	S	H	H	S	H	4,48
SA66	H	H	S	S	S	H	H	S	H	4,78
SA69	S	S	S	S	S	H	H	S	S	7,38
RT84	H	H	H	H	H	H	S	S	S	7,23
RT24	H	H	H	H	H	S	S	S	S	8,55
SA60	H	H	H	S	S	S	S	S	S	7,55
RT3	H	S	S	S	S	S	S	S	S	8,25
SA102	S	S	S	S	S	S	S	H	S	8,32
RT8	S	S	S	S	S	S	H	H	H	5,58
RT7	S	S	S	S	S	H	H	H	H	5,39
RT17	S	S	S	S	H	H	H	H	H	4,35
RT15	S	H	H	H	H	H	H	H	H	4,96

R = kháng, H = dị hợp, S = dễ bị ảnh hưởng.

Trục trên của bảng 1 là chỉ thị phân tử được sàng lọc.

1.3. Xây dựng thư viện bộ gen rầy nâu

Để chuẩn bị ADN bộ gen phân tử khối lớn của cây, xem phương pháp của Zhang Hongbin và cộng sự (Zhang và cộng sự, Preparation of megabase DNA from plant nuclei. Plant J 1995, 7, 175-184). Nhân từ lá non của lúa B5 kháng rầy nâu (Wang BN, Huang Z, Shui LH, Ren X, Li XH, He GC (2001) Mapping of two new brown planthopper resistance genes from wild rice. Chinese Science Bulletin 46: 1092-1095) được tách chiết và được bọc thạch agarosa có điểm nóng chảy thấp. Một lượng thích hợp enzym giới hạn BamHI được bổ sung vào nhân đã được bọc để phân cắt. Điện di xung trường được thực hiện với hệ thống điện di xung trường CHEF Mapper để tách đoạn cần thiết. Băng gel rõ nhất từ vùng có chứa đoạn 50-250kb được cắt ra và đặt vào túi thẩm tách. Đoạn ADN được lấy lại bằng cách dùng điện di (electroelution) (Strong và cộng sự, Marked improvement of PAC and BAC cloning is achieved using electroelution of pulsed-field gel-separated partial digests of genomic DNA. Nucleic Acids Res. 1997, 25, 3969-3961). Đoạn ADN lớn phân tách bằng điện di được thu lại và cho vào ống ly tâm 1,5ml, 600ng đoạn ADN (50-250Kb) thu lại này được trộn với 200ng vectơ BIBAC2 khử photpho, ủ ở 60°C trong 10 phút và làm mát đến nhiệt độ phòng. Enzym T4 DNA ligaza được bổ sung vào và hỗn hợp được ủ ở 16°C trong 16 giờ. Lấy 2µl sản phẩm lai và 40µl tế bào DH10B bình thường, hệ thống Gene Pulser được sử dụng để thực hiện điện biến nạp. Các tế bào đã biến nạp được đưa sang đĩa agarosa có chứa 50mg/l Kanamycin và ủ ở 37°C qua đêm. Các dòng dương tính được nhặt từ đĩa và chuyển vào đĩa nuôi cấy tế bào 384 giếng có chứa 70µl môi trường và ủ ở 37°C trong 30 giờ. Sau khi xây dựng thư viện, hai bản sao được tạo ra bằng Genetix Q-PIX và một được bảo quản ở -80°C. Để đánh giá chiều dài của các đoạn chèn thu được và khối lượng các dòng, 30 dòng BIBAC được lấy ngẫu nhiên từ thư viện, và plasmit của chúng được tách chiết bằng thủy phân bằng kiềm. Sau khi cắt bằng một lượng thích hợp NotI, chiều dài của đoạn chèn được xác định bằng điện di xung trường (Shi ZY, Ren X, Weng QM, Li XH, He GC (2003) Construction of genomic library of a BPH-resistant rice line with binary vector and physical map of Qbp1 locus. Plant Science 1165:879-885).

1.4. Xây dựng bản đồ vật lý của vùng SM1-G1318

Tất cả các dòng BAC được sàng lọc cho vùng R1925-G1318. Sau khi cắt kép bằng BamHI và EcoRI, tiến hành xung điện và các mảnh axit nucleic được chuyển sang một màng thấm. Sau đó, phần cuối của dòng đã phân cắt được đánh dấu bằng α - ^{32}P -dCTP phóng xạ. Lai Southern blotting với các dòng BAC được thực hiện như trên, và các dòng BAC có các đoạn gối và chiều dài của các đoạn gối này dựa trên tín hiệu lai được xác định. Dựa trên các kết quả, bản đồ vật lý được xây dựng (hình 3C). Để phân tách phần cuối các dòng dương tính BAC, xem phương pháp TAIL-PCR do Liu Yaoguang và cộng sự tạo ra (Liu and Whittier, Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosomewalking. *Genomics* 25: 674-681). Kết quả sàng lọc và TAIL-PCR cho thấy dòng BAC 76B10 có chứa toàn bộ gen *Bph14* (hình 3C).

1.5. Phân tích các gen có thể thích hợp trong vùng SM1-G1318

Tiến hành phân tích trình tự cho trình tự toàn bộ dòng chứa gen *Bph14*. Trình tự này được dùng như là một trình tự đích để tìm trong ngân hàng dữ liệu NCBI nhằm xác định trình tự tương đồng của bộ gen Nipponbare trong vùng này. Phần mềm trực tuyến RiceGAAS (Sakata,K., Nagamura,Y., Numa,H., Antonio,B.A., Nagasaki,H., Idonuma,A., Watanabe,W., Shimizu,Y., Horiuchi,I., Matsumoto,T., Sasaki,T. & Higo,K.: "RiceGAAS: an automated annotation system and database for rice genome sequence", 2002. *Nucleic Acids Res.*, 30: 98-102) được sử dụng để thực hiện dự đoán và chú giải gen, ClustalW cũng được dùng để phân tích so sánh (bảng 2).

Bảng 2 So sánh các gen ở lúa được dự đoán kháng sâu bọ có hại ở vùng gen *Bph14* với các gen được dự đoán của Nipponbare

Gen được dự đoán của Nipponbare				Các gen ở lúa được dự đoán kháng sâu bệnh				Độ tương đồng (%)
Số:	Chức năng dự đoán	Số lượng axit amin	Số lượng exon	Số:	Chức năng dự đoán	Số lượng axit amin	Số lượng exon	
g1	Protein p20 ARPC giả định	75	2	g1	Protein p20 ARPC giả định	75	3	100
g2	Thụ quan tế bào B giả định liên quan đến protein 31	217	3	g2	Thụ quan tế bào B giả định liên quan đến protein 31	189	2	94,7
g3	Gen nhảy phiên mã ngược giả định	1997	4					
g4	Protein NOI kích ứng NO giả định	238	4	g3	Protein NOI kích ứng NO giả định	246	4	96,6
				g4	Protein kháng bệnh giả định	1333	2	83,4
				g5	Protein RIN4 tương tác RPM1 giả định	148	4	33,8
g5	Protein kháng bệnh giả định	1315	1	g6	Protein kháng bệnh giả định	1121	3	99,6
g6	Protein chưa biết	15	2	g7	Protein giả định	148	3	
g7	Protein chưa biết	132	2	g8	Protein giả định	115	3	
g8	Protein RIN4 tương tác RPM1 giả định	168	3	g9	Protein chưa biết	223	3	
g9	Protein chưa biết	49	2					
g10	Protein giả định	87	2					
g11	Protein kháng bệnh giả định	680	2	g10	Protein kháng bệnh giả định	680	2	99,7

Bằng cách so sánh các gen được dự đoán của cả hai, thấy rằng protein kháng bệnh được mã hóa bởi gen số 4 của lúa kháng sâu bọ có hại là khá khác so với gen đó của Nipponbare. Ngày nay, việc coi lúa bị hút và ăn bởi sâu bọ chọc-hút giống với quá trình tấn công cây lúa của vi khuẩn gây bệnh là phổ biến, do đó, cơ chế của lúa đề kháng sâu bọ chọc-hút có thể giống với cơ chế kháng vi khuẩn gây bệnh. Do vậy, gen này có thể được xác định là *Bph14*.

1.6. Sàng lọc thư viện cADN

Sử dụng các gen dự đoán tương ứng với EST như là một đoạn dò, tiến hành lai *in situ* thể thực khuẩn với thư viện cADN của lúa B5 kháng sâu bệnh cảm ứng rầy nâu

(Wang XL, Weng QM, You AQ, Zhu LL, He GC (2003) Cloning and characterization of rice RH3 gene induced by brown planthopper. Chinese Science Bulletin 48: 1976-1981). Sau khi lai *in situ* 3 vòng, hai dòng thể thực khuẩn chọn được bằng PCR được kiểm tra, và sau đó, chiều dài của mảnh chèn vào được xác định bằng phân cắt nhờ enzym. Chiều dài đầy đủ của cADN được đọc trình tự. Trình tự nucleotit của nó được thể hiện trong danh sách trình tự SEQ ID NO:2. Tuy nhiên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ hiểu rằng theo trình tự nucleotit được bộc lộ trong sáng chế, bằng cách thiết kế các môi thích hợp, gen *Bph14* có thể được khuếch đại và thu được từ bộ gen của lúa kháng rầy nâu. Ví dụ như, các môi 5'ctccctgactgaagaagagaagag3' (SEQ ID NO: 4) và 5'tgctagctgtgattctttatgatg3' (SEQ ID NO: 5), trình tự có thể thu được bằng cách sử dụng bộ kit khuếch đại PCR đoạn dài và khuếch đại bộ gen của lúa kháng rầy nâu hoặc lúa hoang dại (94°C trong 2 phút; 30 chu trình 94°C trong 15 giây, 58°C trong 30 giây, 72°C trong 7 phút; 72°C trong 2 phút).

Ví dụ 2: Kiểm tra chức năng của *Bph14* và ứng dụng của nó

2.1. Tạo vectơ biến nạp di truyền

Vectơ được sử dụng là pCAMBIA1301 (mua từ Trung tâm của Úc về ứng dụng sinh học phân tử cho nông nghiệp quốc tế). Dựa trên kết quả đọc trình tự bộ gen, các đoạn môi được thiết kế (5'cggaattctctccctgactgaagaagagaagag3' (SEQ ID NO: 6), 5'cggaattctgctagctgtgattctttatgatg3' (SEQ ID NO: 7) có chứa một đoạn nối EcoRI. Sử dụng các đoạn môi này, bộ gen của lúa B5 kháng sâu bệnh được khuếch đại như mô tả dưới đây (Z. Huang và cộng sự, Identification and mapping of two brown planthopper resistance genes in rice. *Theor Appl Genet*, 2001, 102: 929-934). Tổng thể tích của phản ứng PCR là 50µl: 1µl ADN, 5µl dung dịch đệm 10x, 1µl dNTP 10mM, 3µl mỗi môi 10mM, enzym Taq có độ chính xác cao 1U; chu trình phản ứng: 94°C 2 phút, 94°C 15 giây, 58°C 30 giây, 72°C 7 phút 30 giây, tổng cộng 30 chu trình. Sản phẩm được tinh sạch bằng bổ sung 1/10 thể tích NaAC 3mM và 2x thể tích cồn tuyệt đối. Trình tự thu được có chứa một trình tự khởi đầu phiên mã 1960bp và 4997bp phần đầu trình tự bộ gen *Bph14* và 436bp vùng không được dịch mã đầu 3' ở phần cuối bộ gen được phân cắt bằng EcoRI với tổng thể tích hệ phân cắt là 20µl: khoảng 5µl (1µg) sản phẩm PCR, dung dịch đệm phản ứng 1x, EcoRI 1U, trộn kỹ và ủ ở 37°C qua đêm. Sản phẩm được kết tủa bằng 1/10 thể tích NaAC 3mM và 2x thể tích cồn tuyệt đối, lấy lại phần cần lấy. Hệ phân

cắt của vector pCAMBIA1301 như đã được đề cập ở trên, được tinh sạch bằng bộ kit tinh sạch. Phản ứng lai như sau: 1µl mảnh thuộc bộ gen, 0,5µl vector, ligaza T4 2U, 2µl dung dịch đệm 5x, tổng thể tích 10µl, lai ở 4°C qua đêm. Sản phẩm lai được biến nạp vào *E.coli* DH10B bằng sốc nhiệt ở 42°C trong 90 giây, bổ sung 400µl LB, phục hồi trong 45 phút, chuyển sang 200µl môi trường nuôi cấy trên đĩa LA có kanamycin, và ủ trong 37°C qua đêm. Các dòng đơn được nhặt, khuếch đại và tách plasmit và kiểm tra bằng cắt enzym. Một dòng dương tính được nhặt và biến nạp xung điện vào *Argobacterium* EHA105. Việc tách dòng được xác minh bằng tách chiết plasmit và kiểm tra bằng PCR. Dịch nuôi cấy *Argobacterium* mang vector đã được tạo ra được bảo quản bằng cách lấy 750µl dịch đó và bổ sung cùng thể tích glycerol 50%, trộn đều. Dịch nuôi cấy được bảo quản ở -70°C.

Các đoạn mồi được thiết kế dựa trên trình tự cADN chiều dài đầy đủ, có chứa đoạn nối XmaI và XbaI (5'tccccccgggatggcgagctaattggccac3'(SEQ ID NO: 8), 5'gctctagactacttcaagcacatcagccta3' (SEQ ID NO: 9)). ARN tổng số được tách từ vỏ lá B5 bằng TRIzol của Invitrogen (Invitrogen Corporation, 5791 Van Allen Way, PO Box 6482, Carlsbad, California 92008), sau đó, cADN của B5 được thu lại bằng sử dụng bộ kit phiên mã ngược của Fermentas (Fermentas International Inc, 830 Harrington Court, Burlington Ontario L7N 3N4 Canada); hệ phản ứng: 1µg ARN tổng số, 1µl oligo(dT), 4µl dung dịch đệm 5x, 1µl chất ức chế, 2µl dNTP 10mM, 1µl enzym phiên mã ngược, ủ ở 42°C trong 1 giờ. cADN của B5 được khuếch đại bằng các đoạn mồi thiết kế. Hệ phản ứng PCR được mô tả ở trên, tuy nhiên, trong chương trình, kéo dài chuỗi ở 72°C trong 4 phút để thu được trình tự cADN của *Bph14*. Đồng thời, trình tự khởi đầu phiên mã cần cho phiên mã cADN có thể thu được từ khuếch đại PCR trình tự khởi đầu phiên mã 35S có trong pCAMBIA1301. Sử dụng các đoạn mồi được thiết kế có đoạn liên kết EcoRI và XmaI (5'cggaattcatggtggagcacgacactct3' (SEQ ID NO: 10), 5'tccccccgggatctcattgccccccgggat3' (SEQ ID NO: 11)), trình tự khởi đầu phiên mã 35S được khuếch đại từ pCAMBIA1301. Hệ phản ứng PCR được mô tả ở trên, tuy nhiên, thời gian kéo dài chuỗi là 1 phút. Trình tự khởi đầu phiên mã 35S và vector pCAMBIA1301 được phân cắt từng thứ bằng EcoRI và XmaI. Đoạn 35S và vector dạng thẳng được lai và biến nạp vào *E.coli* sau khi được phục hồi. Dòng dương tính thu

được và trình tự cADN *Bph14* được phân cắt từng thứ bằng XmaI và XbaI, sản phẩm được thu hồi, lai và biến nạp. Một vector 35S:*Bph14* được tạo ra và biến nạp bằng xung điện vào *Agrobacterium* EHA105, quy trình chi tiết được mô tả ở trên.

2.2. Biến nạp di truyền

Vectơ biến nạp di truyền *Bph14* ở trên và vectơ biến nạp cADN được đưa vào một cách riêng lẻ giống lúa bình thường Kasalath (được mua từ thư viện nguồn giống lúa quốc gia hoặc viện nghiên cứu lúa quốc gia) nhạy với rầy nâu bằng phương pháp biến nạp di truyền qua trung gian *Agrobacterium* EHA 105 (Hiei và cộng sự, 1994, Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant Journal* 6:271-282). Đồng thời, một vectơ trống (pCAMBIA1301) được dùng làm đối chứng âm.

2.3. Kết quả biểu hiện của gen *Bph14* và ứng dụng của nó

14 cây giống từ hạt, thu từ mỗi dòng biến nạp kể trên, và 4 cây giống từ hạt đối chứng được trồng trên cánh đồng. Sau khi thu hoạch thế hệ T1 riêng biệt, các cây đồng hợp (14 cây mỗi dòng) được lựa chọn để kiểm tra tính kháng sâu bệnh. Sau khi kiểm tra tính kháng sâu bệnh ở giai đoạn cây con gieo từ hạt và ở thời kì trưởng thành, trong cả hai trường hợp, tính kháng rầy nâu của cây chuyển gen được tăng rõ ràng, trong khi các cây đối chứng không có tính kháng rầy nâu. Tất cả các mức độ kháng sâu bệnh của lúa chuyển gen ở giai đoạn cây non gieo từ hạt nằm trong khoảng mức 3-5, như được xác định bằng quy trình được nêu trong Huang, và cộng sự (Huang Z và cộng sự, 2001 Identification and mapping of two brown planthopper resistance genes in rice. *Theor. Appl. Genet.* 102, 929–934). Cây chuyển gen ở giai đoạn trưởng thành ở điều kiện tốt sau khi cho sâu bệnh vào và chúng vẫn ra hạt bình thường. Đồng thời, EPG (Peiying Hao và cộng sự, Herbivore-induced callose deposition on the sieve plates of rice: an important mechanism for host resistance. *PlantPhysiol*, 2008, 146: 1810-1820) cho thấy khi rầy nâu ăn cây chuyển gen, thời gian dùng cho sợi li-be ít hơn rõ ràng. Thử bằng phương pháp mật ong (P. Paguia, Honeydew excretion measurement techniques for determining differential feeding activity of biotype of *Nilaparvata* lugens on rice varieties. *J. Econ. Entomol*, 1980, 73: 35-40) chứng minh rằng lượng chất bài tiết được tiết ra bởi rầy nâu ăn cây chuyển gen giảm. Do đó, gen *Bph14* tách dòng có thể tạo cho lúa tính kháng rầy nâu ăn lúa.

Ví dụ 3: Chỉ thị phân tử trợ giúp chọn lọc cây lúa kháng rầy nâu mang gen *Bph14*

3.1. Dựa trên trình tự bộ gen và trình tự cADN của gen *Bph14*, nhiều cặp mồi của chỉ thị SSR hoặc chỉ thị STS có thể được thiết kế. Trong phương án này, các cặp mồi 5'ctgctgctgctctcgtattg3' (SEQ ID NO: 12), 5'caggggaagctccaagaacag3' (SEQ ID NO: 13) được sử dụng làm các mồi đánh dấu để chọn lựa lúa kháng sâu bệnh. Chiều dài của đoạn khuếch đại là 172bp. Bằng cách thực hiện khuếch đại PCR, sử dụng các mồi được thiết kế trên trình tự gen *Bph14*, có thể kiểm tra sự có mặt của chỉ thị phân tử bằng điện di gel polyacrylamit. Các cây con lai giống chéo cho các băng điện di PCR giống với lúa kháng sâu bệnh (sản phẩm khuếch đại có chứa đoạn 172bp) là các cây được chọn có mang gen *Bph14* (hình 2). Tính kháng sâu bệnh của các cây này được khẳng định bằng thử nghiệm sàng lọc lượng lớn các cây non từ hạt giống và kiểm tra ở thời kì trưởng thành. Lúa kháng rầy nâu được nhân giống bằng tự lai chéo và chọn lọc các đặc điểm mang tính kinh tế của các cây này.

3.2. Có thể đánh giá tính kháng rầy nâu của quần thể bản đồ bằng cách kiểm tra sàng lọc lượng lớn cây non: Hạt F3 được thu hoạch từ cây F2, và khoảng 20 cây non (gọi là một họ) được trồng trong khay. Dòng RI35 đối chứng kháng và dòng TN1 đối chứng nhạy được trồng cùng nhau. Khi cây phát triển được khoảng 2-3 lá, cây được cấy nhộng rầy nâu 2-4 tuổi (10 nhộng/cây) và tình trạng bị phá hoại ở mỗi họ được ghi lại khi tất cả các cây TN1 đối chứng nhạy bị chết. Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần với từng vật liệu. Theo kết quả đánh giá tính kháng sâu bệnh, các họ của quần thể bản đồ được phân loại theo mức độ kháng sâu bệnh của chúng.

Ví dụ 4: Các chỉ thị phân tử khác để xác định kiểu gen kháng rầy nâu

4.1. Tạo quần thể RI35/TN1 F₂ và đánh giá kiểu hình

Sử dụng các phương pháp đã được biết đến trong lĩnh vực (Wang BN và cộng sự, 2001 Mapping of two new brown planthopper resistance genes from wild rice. *Chinese. Sci. Bull.* 46, 1092–1095, Huang Z và cộng sự, 2001 Identification and mapping of two brown planthopper resistance genes in rice. *Theor. Appl. Genet.* 102, 929–934), gen *Bph14* trội kháng rầy nâu được phát hiện và đưa vào đầu cuối của cánh dài nhiễm sắc thể thứ 3 của lúa, và chỉ thị RFLP của nó nằm giữa R1925 và G1318. Do kĩ thuật RFLP là rất khó thực hiện nên việc nhân giống và sàng lọc trên quy mô lớn đòi hỏi nhiều công sức.

Để tìm được các chỉ thị đơn giản và hiệu quả có liên hệ chặt chẽ với *Bph14*, chúng tôi chọn dòng RI35 kháng rầy nâu có nguồn gốc từ thế hệ thứ 7 của dòng lai gần tái tổ hợp giữa B5 và Minghui 63, chỉ mang gen *Bph14* chủ yếu kháng rầy nâu (Ren X và cộng sự, 2004 Dynamic mapping of quantitative trait loci for brown planthopper resistance in rice. *Cereal. Res. Commun.* 32, 31–38). Cây lai được tạo ra bằng cách dùng RI35 làm cây mẹ và dòng lúa nhạy với rầy nâu. TN1 là cây bố. Quần thể phân tách F_2 RI35/TN1 được tạo thành. Các dòng $F_{2:3}$ RI35/TN1 thu được tương ứng từ mỗi giống đơn F_2 bằng lai gần.

Đánh giá tính kháng của các cây bố mẹ và các dòng $F_{2:3}$ được thực hiện bằng cấy trong thời kì cây non. Để đảm bảo rằng các cây bố mẹ và mỗi dòng từ quần thể $F_{2:3}$ lớn cùng tốc độ, tất cả các vật liệu thí nghiệm được ngâm nước và thúc cho nảy mầm trước khi gieo hạt. 20 hạt từ mỗi dòng (loại) được gieo hạt trong hộp nhân giống dài 54cm, rộng 35cm và cao 8cm đổ đầy đất dinh dưỡng. 40 vật liệu được gieo hạt trong mỗi hộp, bao gồm 2 cây bố mẹ kháng và 4 cây bố mẹ nhạy. Thực hiện cắt bỏ sau bảy ngày gieo hạt. Các cây non ốm và yếu được loại bỏ, và ít nhất 15 cây được giữ trong mỗi cốc. Khi cây non đến giai đoạn ba lá, chúng được cấy vào ấu trung rầy nâu 2~3 tuổi với tỉ lệ 8 trên một cây non, và được phủ bằng lưới nilon. Khi các biến thể TN1 nhạy bị chết, mỗi giống đơn được đánh giá khả năng kháng ở các cấp độ 0, 1, 3, 5, 7 và 9 (bảng 3) theo phương pháp được mô tả bởi Huang và cộng sự (Huang Z và cộng sự, 2001 Identification and mapping of two brown planthopper resistance genes in rice. *Theor. Appl. Genet.* 102, 929–934), và cấp độ kháng của mỗi dòng từ các cây bố mẹ và quần thể được tính toán bằng trung bình cân nặng, và các kiểu gen giống đơn được ước lượng từ cấp độ kháng.

Bảng 3: Các tiêu chuẩn phân loại của cấp độ kháng và cấp độ nhạy rầy nâu được sử dụng trong nghiên cứu này

Cấp độ	Độ thương tổn (được đánh giá khi hơn 90% cây bản địa Taichung 1 bị chết)	Mức độ kháng
0	Cây khỏe mạnh, không có lá bị tổn thương	Kháng (R)
1	Một lá vàng	Kháng (R)
3	Một hoặc hai lá vàng, hoặc một lá héo	Kháng trung bình (MR)
5	Hai hoặc ba lá vàng, hoặc hai lá héo	Kháng trung bình (MR)
7	Ba hoặc bốn lá vàng, nhưng cây vẫn sống	Nhạy (S)
9	Cây chết	Nhạy (S)

4.2. Phân tích chỉ thị phân tử của quần thể F₂ RI35/TN1

ADN của các cây bố mẹ và mỗi dòng của quần thể F₂ được chiết bằng kỹ thuật CTAB (Murray MG & Thompson , 1980 Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 8: 4321-4325).

Vì R1925 và G1318 nằm riêng biệt trong 32G11 và 96M04, các dòng BAC của bộ gen lúa Nipponbare, chúng tôi tiến hành nghiên cứu cho kiểu SSR trong các trình tự của hai dòng BAC này bằng công cụ tìm kiếm SSRIT được Temnykh và cộng sự mô tả (Temnykh S, DeClerck G, Lukashova A, Lipovich, Cartinhour S, McCouch S. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. *Genome Research*. 2001. 11(8):1441-1452) với các thông số sau đây: chiều dài kiểu lớn nhất là cấu trúc phân tử, lần lặp tối thiểu là 5. Tất cả các kiểu SSR dài hơn 15 bazơ (chiều dài kiểu x số lần lặp) được lựa chọn và các mối được thiết kế dựa trên các trình tự biên của chúng như các chỉ thị phân tử SSR được đề xuất.

Các chỉ thị SSR được phân tích theo phương pháp của Temnykh (Temnykh S và cộng sự , 2000 Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice.

Theor Appl Genet 100 : 697-712). Hệ phản ứng 10 μ l bao gồm: Tris-HCl 10mM độ pH là 8,3, KCl 50mM, MgCl₂ 1,5mM, dNTPs 50 μ M, mỗi 0,2 μ M, Taq polymeraza 0,5U và khuôn ADN 20ng. Khuếch đại được thực hiện bằng máy khuếch đại PCR PTC-100: 94°C 2 phút; 94°C 15 giây, 55°C 30 giây, 72°C 1,5 phút, 35 chu trình; 72°C 5 phút. Sản phẩm khuếch đại được phân tách bằng gel PAGE biến tính 6%, và được nhìn thấy bằng nhuộm bạc (Zhu và cộng sự, 2004 Identification and characterization of a new blast resistance gene located on rice chromosome 1 through linkage and differential analyses. *Phytopathology* 94:515-519). Các băng ADN đã khuếch đại được quan sát bằng máy soi với đèn huỳnh quang. Các kết quả được ghi lại. Các mẫu đa hình giữa các cây bố mẹ được phân tích trong quần thể F₂ và thu được dữ liệu về kiểu gen quần thể.

Bản đồ di truyền của chỉ thị SSR lúa được xây dựng với dữ liệu kiểu gen quần thể dựa trên nguyên tắc liên kết và giao nhau. Phần mềm được dùng là MAPMAKER/EXP3.0.

Tiến hành kiểm tra bộ gen tổng thể bằng cách sử dụng lập bản đồ xen kẽ đa hợp (CIM) từ phần mềm Windows QTL Cartographer V2.0. Phân tích chia tách giữa kháng rầy nâu và các chỉ thị SSR được thực hiện bằng phần mềm phân tích MAPMAKER/EXP3.0, và các chức năng Kosambi được chuyển thành khoảng cách di truyền (cM).

4.3. Sàng lọc quần thể F₂ và F₅ RI35/TN1 bằng chỉ thị phân tử và xác định vị trí của gen *Bph14*

Dựa trên kết quả xác định vị trí của QTL, các cây đơn F₂ được sàng lọc bằng chỉ thị SSR biên SG1 và SM4 để thu được cây đơn lẻ có sự tái tổ hợp giữa hai chỉ thị. Kiểu gen và kiểu hình của mỗi giống đơn lẻ được kiểm tra như mô tả ở trên để phát hiện chỉ thị nào cùng phân tách với kiểu hình kháng.

Sử dụng chọn lọc nhờ chỉ thị phân tử, chúng tôi đã chọn cây đơn lẻ F₂ dị hợp tại vị trí của *Bph14* và tốt hơn là có nguồn gốc từ TN1 hoặc dị hợp tại các vị trí khác. Sau khi lai gần, thu được các cây đơn lẻ dị hợp tại vị trí của *Bph14* và tốt hơn là có nguồn

gốc từ TN1 tại các vị trí khác bằng chọn lọc nhờ chỉ thị phân tử. Cuối cùng, quần thể lai gần F₅ được tạo thành, trong đó trừ vị trí *Bph14*, tất cả các vùng khác đều từ bộ gen của TN1. Dựa trên các kết quả của (1), các cây đơn lẻ F₅ được sàng lọc bằng chỉ thị SSR vùng biên RM570 và SM4 để thu được các cây đơn lẻ có tái tổ hợp giữa hai chỉ thị. Kiểu hình và kiểu gen của mỗi giống đơn lẻ được kiểm tra như mô tả ở trên để phát hiện chỉ thị nào đồng phân tách với kiểu hình kháng.

Dựa trên kết quả của (2), thư viện gen của B5 được sàng lọc, và thu được các dòng BAC của thư viện gen B5 bao hàm hai chỉ thị. Sau khi đọc trình tự, trình tự nói trên được so sánh để phát hiện sự khác nhau của ADN với trình tự tương ứng của Nipponbare. Các mối được thiết kế dựa trên sự khác nhau về trình tự để khuếch đại trình tự ADN của RI35 và TN1. Các mối đa hình được sử dụng để phân tích các cây đơn lẻ tái tổ hợp F₂ và F₅ để phát hiện xem liệu chúng có đồng phân tách với kiểu gen kháng hay không.

4.4. Các kết quả và phân tích

Kiểm tra bằng cách cấy nhóm ở giai đoạn cây non cho thấy cấp độ kháng của RI35 và TN1 tương ứng là 2,7 và 9. Điều này chỉ ra rằng RI35 kháng rầy nâu trong khi TN1 lại nhạy. Cấp độ kháng của các cây F₁ là 3,4 cho thấy tính kháng rầy nâu, chỉ ra rằng tính kháng của RI35 được điều khiển bởi một gen trội. Sự phân bố tần suất của cấp độ kháng của 100 dòng F_{2:3} chống rầy nâu cho thấy sự phân bố liên tiếp. Giá trị bé nhất là 3,0 trong khi giá trị lớn nhất là 9,0 và ba đỉnh rõ ràng được phát hiện tại ba vị trí 3,5; 5,5 và 8,5. Dựa trên cấp độ kháng dòng F_{2:3} được chia làm ba kiểu hình: kháng, chia tách kháng và nhạy, và nhạy. Kiểu hình tương ứng của cây đơn lẻ F₂ được ghi lại với ba kiểu: RR (kháng đồng hợp), Rr (kháng dị hợp) và rr (nhạy đồng hợp). Sự phân tách tính kháng và nhạy của quần thể F₂ phù hợp với tỉ lệ 1:2:1 ($\chi^2=0,54$, $\chi^2_{0,05}=5,99$) (bảng 2).

Huang Zhen và Wang Buna đã xác định hai gen kháng rầy nâu trội, *Bph1* và *Bph15*, từ B5, một dòng có khả năng sinh sản của *O. officinalis*. RI35 có mang một gen *Bph14* chủ yếu kháng rầy nâu. Do đó, trong nghiên cứu này, QTL của quần thể F₂

được xác định vị trí bằng chỉ thị SSR từ nhiễm sắc thể thứ 3 để xác định xem liệu nó có đúng với các nghiên cứu trước đây không.

Dựa trên các kết quả tìm kiếm của SSRIT, chúng tôi lựa chọn tất cả các kiểu SSR dài hơn 15 bazơ (chiều dài kiểu x số lần lặp lại), và thiết kế mỗi dựa trên các trình tự biên của chúng. Dựa trên sự khác nhau của các dòng BAC, các kiểu này được xác định vị trí, các chỉ thị SSR này được đặt tên liên tiếp là SG1, SG2, v.v. và SM1, SM2, v.v.. Chúng tôi sử dụng các chỉ thị SSR này để khuếch đại ADN của các cây bố mẹ RI35 và TN1. Chỉ có SG1, SG2, SG9 và SM1, SM4 cho thấy đa hình giữa các cây bố mẹ trong điện di.

Sau đó, chúng tôi dùng chỉ thị SSR có đa hình giữa các cây bố mẹ để xác định vị trí QTL của quần thể F₂. Các kết quả cho thấy có một vị trí QTL giữa SG1 và SM4 tại đầu cuối của cánh dài nhiễm sắc thể thứ 3. Giá trị LOD của nó là 25,3 và tỉ lệ phân bố là 67,5%. Chỉ thị phân tử SG6 và SG9 đồng phân tách với *Bph14*. SG1 là 2,1cM từ *Bph14*; RM570 và SM1 là 0,8cM từ *Bph14*; SM4 là 1,5cM từ *Bph14* (hình 1). Tỉ lệ chính xác của SG1, SG6, SG9, RM570, SM1 và SM4 là 98%, 100%, 100%, 99%, 99% và 98%.

Khoảng cách giữa SG1 và SM4 là lớn. Ở dòng lúa Ấn Độ Nipponbare được đọc trình tự, khoảng cách là 270kb. Do đó, để tìm chỉ thị liên kết chặt hơn với *Bph14*, chúng tôi sàng lọc 3700 cây đơn lẻ F₂ bằng SG1 và SM4. Kết quả cho thấy, chỉ có 26 cây đơn lẻ có tái tổ hợp giữa chỉ thị SG1 và SM4. Chúng tôi sử dụng các chỉ thị SSR khác, cũng như là R1925 và G1318 để kiểm tra kiểu gen của cây đơn lẻ tái tổ hợp, và kết hợp với các kết quả đánh giá tính kháng, chúng tôi phát hiện ra rằng *Bph14* đồng phân tách với SM1 (bảng 5, hình 1).

Chúng tôi xây dựng quần thể F₅ lai gần bằng phương pháp chọn lọc nhờ chỉ thị phân tử trong đó ngoài vị trí *Bph14*, tất cả các vùng khác đều từ bộ gen của TN1. 5000 cây đơn lẻ F₅ được sàng lọc bằng chỉ thị SSR vùng biên RM570 và SM4, và thu được 15 cây đơn lẻ có tái tổ hợp giữa hai chỉ thị. Chúng tôi kiểm tra kiểu gen của các cây đơn lẻ tái tổ hợp, và kết hợp với các kết quả đánh giá tính kháng của các cây đơn lẻ tái tổ hợp, chúng tôi phát hiện rằng *Bph14* nằm giữa SM1 và SM4. G1318 được sử dụng để kiểm tra kiểu gen của các cây đơn lẻ tái tổ hợp này, và cuối cùng *Bph14* được xác

định vị trí giữa SM1 và G1318 (bảng 6, hình 1). Bằng cách sàng lọc thư viện gen của B5, 76B10 thu được một dòng BAC có mang cả hai chỉ thị này. Sau khi đọc trình tự, trình tự được so sánh về sự khác nhau của ADN với trình tự tương ứng của Nipponbare, và các môi có tên 76-1, 76-2, v.v., được thiết kế dựa trên sự khác nhau về trình tự để khuếch đại trình tự ADN của RI35 và TN1. Cuối cùng, chỉ có 76-2 có đa hình giữa RI35 và TN1. Các cây đơn lẻ thu được được phân tích bằng 76-2, và thấy rằng 76-2 đồng phân tách với *Bph14*.

Các kết quả cho thấy các chỉ thị phân tử được mô tả ở trên có một số cây đơn lẻ tái tổ hợp với *Bph14*, do đó chúng có thể dùng để phát hiện sự tồn tại của gen chủ yếu kháng *Bph14*, và các dòng lúa kháng rầy nâu có thể thu được bằng cách sử dụng phương pháp gây giống có trợ giúp của chỉ thị phân tử nhờ đó gây giống hàng loạt các dòng lúa kháng rầy nâu ở Trung Quốc có thể được tiến hành.

Bảng 4: Tỷ lệ phân tách kháng –nhạy đối với rầy nâu trong 100 cây đơn lẻ từ quần thể phân tách F₂ RI35/TN1

Kiểu gen F ₂ ^a	Số lượng các cá thể F ₂ ^b	Kiểu hình tương ứng của các dòng F _{2:3} ^c
RR	23	RS ≤ 4
Rr	49	4 < RS < 7
Rr	28	7 ≤ RS

^a RR kháng đồng hợp ; Rr kháng dị hợp ; rr nhạy đồng hợp ; ^b 1RR: 2Rr: 1rr

Giá trị thích hợp $\chi^2=0,54$, $\chi^2_{0,05}=5,99$; ^cCấp độ kháng : RS , Điểm kháng

Bảng 5: Kiểu gen và kiểu hình của các cây đơn lẻ tái tổ hợp F₂ được sàng lọc bằng chỉ thị phân tử

Số lượng các cây đơn lẻ	SG1	R1925	SG9	SG6	RM570	SM1 ^a	G1318	SM4	Kiểu hình	Cấp độ kháng
RT1	R	R	R	R	R	H	H	H	H	5,6
RT5	R	R	R	R	H	H	H	H	H	4,74
RT16	R	H	H	H	H	H	H	H	H	5,83
SA50	H	H	H	H	H	R	R	R	R	3,93
SA74	H	H	H	H	H	R	R	R	R	3,96
RT18	H	H	H	H	R	R	R	R	R	4,04
RT83	H	H	H	R	R	R	R	R	R	4,56
RT82	H	H	R	R	R	R	R	R	R	4,1
SA51	H	S	S	S	H	H	S	S	H	4,48
RT84	H	H	H	H	H	S	S	S	S	7,23
RT24	H	H	H	H	S	S	S	S	S	8,55
SA60	H	H	S	S	S	S	S	S	S	7,55
SA102	S	S	S	S	S	S	H	H	S	8,32
RT8	S	S	S	S	S	H	H	H	H	5,58
RT7	S	S	S	S	H	H	H	H	H	5,39
RT17	S	S	S	H	H	H	H	H	H	4,35

^a Từ bảng này, chúng ta có thể thấy rằng chỉ thị phân tử SM1 đồng phân tách với kiểu gen kháng. Kết quả này cho thấy Bph14 nằm giữa chỉ thị phân tử RM570 và G1318 và đồng phân tách với SM1.

Bảng 6: Kiểu gen và kiểu hình của các cây đơn lẻ tái tổ hợp F₅ được sàng lọc bằng các chỉ thị phân tử

Số lượng các cây đơn lẻ ^a	RM570	SM1	76-2 ^b	G1318	SM4	Kiểu hình	Cấp độ kháng
RT40-9	S	R	R	R	R	R	3,63
RT85-1	S	R	R	R	R	R	4,56
RT87-4	R	S	S	S	S	S	8,66
RT84-5	R	S	S	S	S	S	7,75
RT12-5	R	H	H	H	H	H	5,65
RT7-8	S	S	H	H	H	H	6,07
SA102	S	S	S	H	H	S	8,32

^a Số lượng của các cây đơn lẻ cho thấy cuối cùng thu được các quần thể F₅ từ các cây đơn lẻ F₂ bằng chọn lọc nhờ chỉ thị phân tử được sử dụng để xác định vị trí chính xác *Bph14*.

^b Từ bảng này, chúng ta có thể thấy rằng chỉ thị phân tử 76-2 đồng phân tách với kiểu hình kháng. Các kết quả cho thấy *Bph14* nằm giữa chỉ thị phân tử SM1 và G1318 và đồng phân tách với 76-2.

Một phương án của sáng chế đề xuất phân tử axit nucleic được phân lập có mang trình tự nucleotit chứa gen *Bph14* kháng rầy nâu được chọn lọc từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2. Theo phương án khác, trình tự nucleotit mã hóa phân tử polypeptit chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 3. Cũng theo phương án khác nữa, trình tự nucleotit liên kết hoạt động với trình tự khởi đầu phiên mã dị hợp.

Một phương án khác của sáng chế đề xuất vector biểu hiện có chứa phân tử axit nucleic được phân lập có mang trình tự nucleotit chứa gen *Bph14* kháng rầy nâu được chọn lọc từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2. Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất cây, mô cây hoặc tế bào cây chuyển gen mang vector biểu hiện. Cũng vẫn theo phương án khác, cây, mô cây hoặc tế bào cây chuyển gen là một lá mầm. Theo phương án khác nữa, cây, mô cây hoặc tế bào cây chuyển gen là lúa.

Một phương án khác nữa của sáng chế đề xuất phương pháp để tạo cây chuyển gen có biểu hiện gen *Bph14*, bao gồm các bước: (a) biến nạp ổn định một tế bào của cây với một phân tử axit nucleic chứa trình tự axit nucleic được chọn lựa từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2 để tạo tế bào biến nạp; (b) tái tạo cây chuyển

gen từ tế bào biến nạp; và (c) trồng cây chuyển gen nơi phân tử axit nucleic được biểu hiện. Theo phương án khác, cây chuyển gen là cây một lá mầm. Cũng theo phương án khác, cây chuyển gen là lúa.

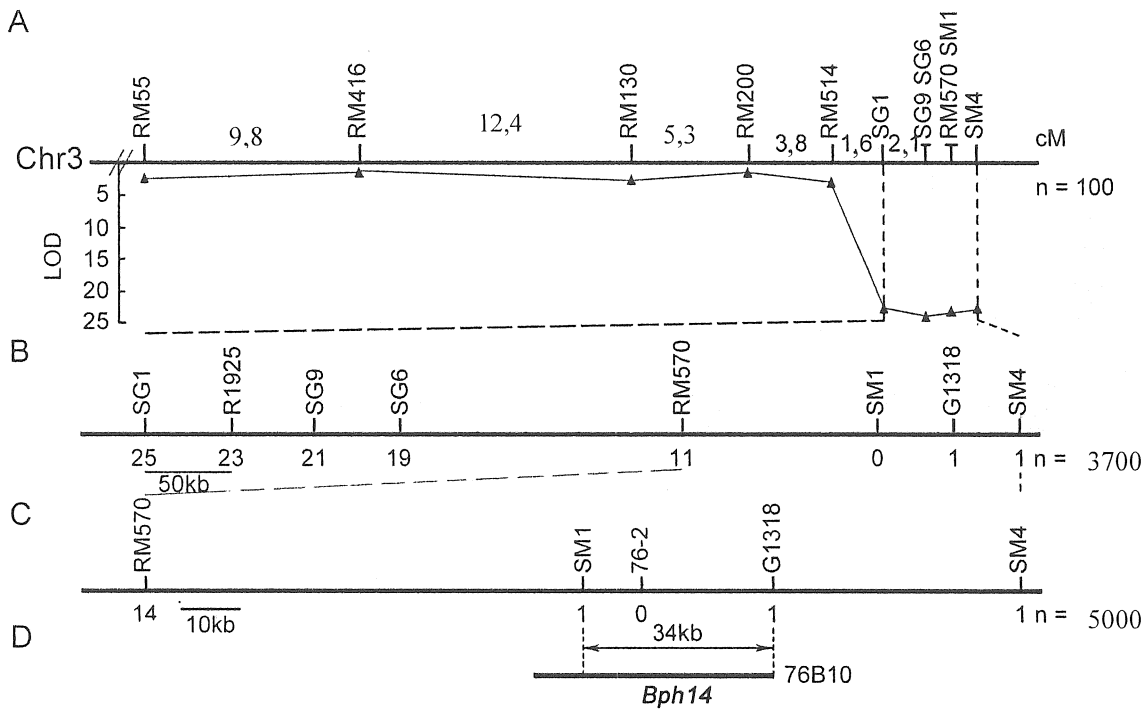
Một phương án khác nữa của sáng chế đề xuất chỉ thị phân tử liên kết với kháng rầy nâu, trong đó chỉ thị phân tử được chọn lựa từ nhóm bao gồm: SG1, SG6, SG9, RM570, SM1, 76-2, và SM4. Trong một phương án, SG1 được khuếch đại bằng mỗi SEQ ID NO: 14 và 15. Theo phương án khác, SG6 được khuếch đại bằng mỗi SEQ ID NO: 16 và 17. Theo phương án khác nữa, SG9 được khuếch đại bằng mỗi SEQ ID NO: 18 và 19. Cũng theo phương án khác nữa, RM570 được khuếch đại bằng mỗi SEQ ID NO: 20 và 21. Theo phương án khác nữa, SM1 được khuếch đại bằng mỗi SEQ ID NO: 22 và 23. Theo phương án khác, 76-2 được khuếch đại bằng mỗi SEQ ID NO: 24 và 25. Theo phương án khác nữa, SM4 được khuếch đại bằng mỗi SEQ ID NO: 26 và 27.

Một phương án khác nữa của sáng chế là phương pháp để xác định sự có mặt hoặc vắng mặt của tính kháng rầy nâu ở cây hoặc hạt, bao gồm phân tích ADN bộ gen từ cây hoặc hạt để kiểm tra sự có mặt của chỉ thị phân tử liên kết với một locus tính trạng định lượng liên kết với tính kháng rầy nâu, trong đó chỉ thị phân tử được lựa chọn từ nhóm bao gồm: SG1, SG6, SG9, RM570, SM1, 76-2, và SM4. Theo phương án khác, phương pháp còn bao gồm phân tích ADN bộ gen từ cây hoặc hạt để kiểm tra sự có mặt của chỉ thị phân tử thứ hai được liên kết với một locus tính trạng định lượng liên kết với tính kháng rầy nâu, trong đó chỉ thị phân tử thứ hai là G1318. Theo phương án khác nữa, cây hoặc hạt là một lá mầm. Cũng theo phương án khác nữa, cây hoặc hạt là lúa.

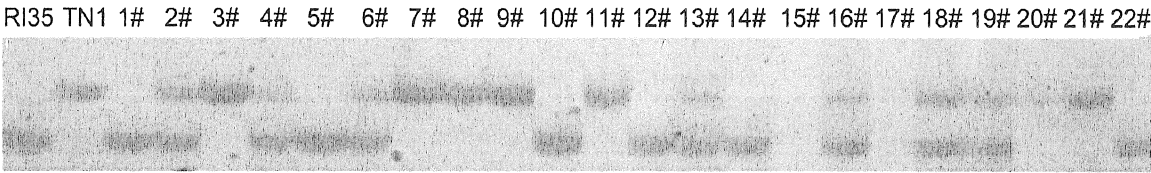
Một phương án khác của sáng chế là locus tính trạng định lượng liên kết với tính kháng rầy nâu, trong đó locus tính trạng định lượng được đặt tại vùng 34kb giữa chỉ thị phân tử thứ nhất và chỉ thị phân tử thứ hai trên nhiễm sắc thể 3 của lúa. Theo phương án khác, locus tính trạng định lượng mang gen *Bph14*.

YÊU CẦU BẢO HỘ

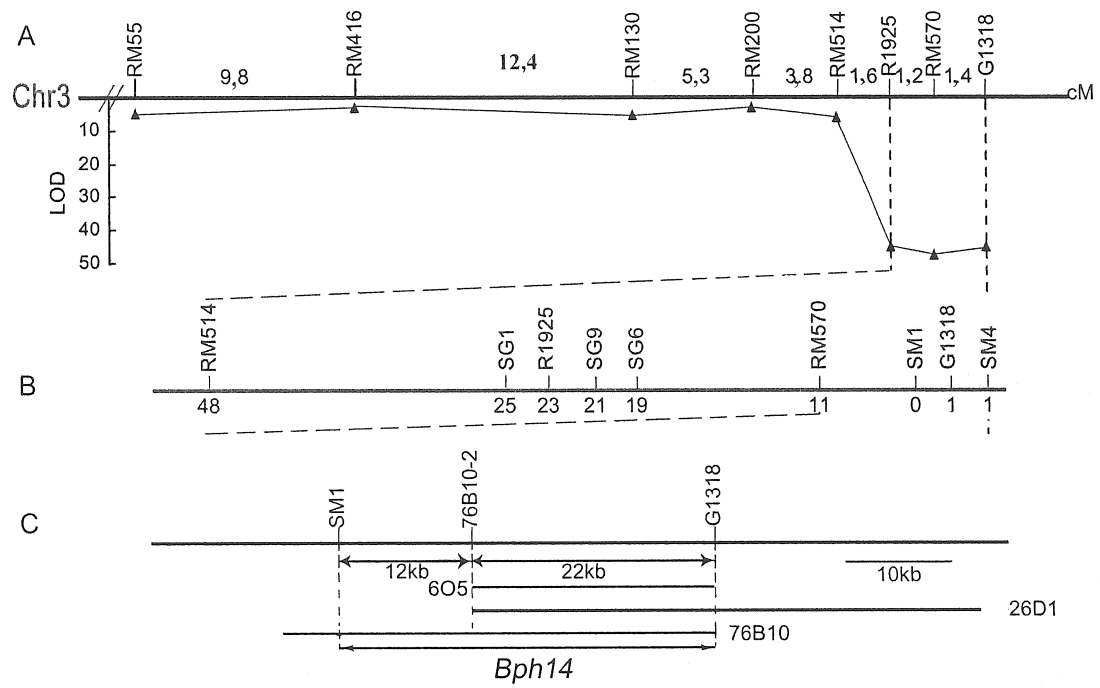
1. Axit nucleic chứa gen kháng rầy nâu (*Bph14*), trong đó trình tự mã hóa của nó được nêu trong SEQ ID NO: 2, được liên kết linh hoạt với trình tự khởi đầu phiên mã dị hợp.
2. Axit nucleic theo điểm 1, trong đó trình tự mã hóa này mã hóa polypeptit, trình tự axit amin của nó được nêu trong SEQ ID NO: 3.
3. Vector biểu hiện chứa axit nucleic theo điểm 1.
4. cADN mã hóa gen kháng rầy nâu ở lúa, trong đó trình tự mã hóa của nó mã hóa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 3.
5. cADN theo điểm 4, trong đó trình tự nucleotit của nó được nêu trong SEQ ID NO: 2.
6. Vector chứa cADN theo điểm 4.



Hình 1



Hình 2



Hình 3

DANH SÁCH TRÌNH TỰ

<110> Syngenta Participations, AG

Wuhan University

He, Guancun

Du, Bo

Zhang, Weilin

Zhu, Lili

Chen, Rongzhi

<120> AXIT NUCLEIC CHỨA GEN KHÁNG RẦY NÂU, VECTƠ BIỂU HIỆN CHỨA AXIT NÀY, cADN MÃ HÓA GEN KHÁNG RẦY NÂU VÀ VECTƠ CHỨA cADN NÀY

<130> 72694PCT1

<160> 27

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 9921

<212> ADN

<213> *Oryza officinalis*

<220>

<221> gen

<222> (1)..(9921)

<400> 1

```

cccgggcctt tctccagtat ctccatgatg attgtttgga ttaacagacc tccctggaga    60

tttacccttg cgggcatttt cgaaatactg tgtgtagagg tgttcaccac ggtcttcac    120

ctcccagctt ccaaatttag gaacttgttt atgctggtag agattaacaa acaagtacca    180

tttgcgttag gcagacagca tatgctgatt gctgaatcta ctacacgggc ttgtgcctt    240

gtcagttgtc atctttcata tgtaacagga aatagtatat aattctagcc taaacaggta    300

ttccatccgt atatttctag attcattagc atcaatataa atacggaaa tactagaatg    360

acttacattg taaaacagag aaagtatgat tatctaaact ctcatagatg ctattgtaat    420

cattgtatgc atgacatcag ctgtgtgcaa agctgcagct ttgttgatc aaccagaatt    480

tactagtctt aaaaaaaca gaatttactt agatcctgct gaaagacttc gggccaatta    540

gaagcccagt atttgcccca aaactggtgt aaactacagg ccataatag aaataagttc    600

actggaggtc ccccaactta acaccgagat tttttgagg tcccttaacc ataaaccaga    660

```

aatgcgtacc cctaaactat gtaaaaccgt caaaaaaaaa aaggtcccga ggcagtatag 720

ttgctcggtt tcgctgacgt ggcacccctag tcagcaaaaa aaattaaaat aaatatgtgg 780

ggcccacatg taagtgaagag aaaatggtgt gggccccaca ttctccttt cttttcttt 840

tctcttctct tctctcccga tttctcgag tgggcgcggc ggcagagggg agagaggtga 900

ccggcgggtgg agcgggggtg gtgggagagg ggggctggcg cgacgtcggc ggcgggagaa 960

aaggagagga ggcggctggc gcgacggcga gctcggacgg caacggcggg aggaggagga 1020

ggagaggagg cagtcggcgc tgtaaacgc gcatgggatg cggcggatga tctcgagcgg 1080

gacggtgtcc tcaccacat cttctcacc gtcacgcag tctgcgggtg ccgggcggag 1140

cggtttggga gggaggggga ggcggccagc gagcccgctc gagctcgccc ggcctgcgcg 1200

cgagctgcc cctcccatag cttggtgtgc tggggacgac gacaggaaa gggggagaaa 1260

ggaattgacg gccgatgata gcaatggcgg gcgagcgcgg cgccgggctg ctcatgctcg 1320

ccgaccagge ccccggttc gccgcactcg tccgccgtgc tcgccacgc actcgccgac 1380

ctccgctcca cccgccgctc ctgcccgctg cccgctgccc gccggcctcc ctgactgaag 1440

aagagaagag agaaattaaa gagaagagaa ggagaagaaa agagaagaga agaaaaaaag 1500

atgtgtagct gacatgtggg ccccatgtac tttttattt ttttgctga ctagaatgcc 1560

acgtcagcga aaccacccat atatactgtc ataggacctt gagtgcatag tttgtgtgag 1620

tttagggata cacatttctc gtttttagt taaggacct cgtaaaaatc tcgctgttaa 1680

gttgagagac ccctccggtg aacttattcc cccaaatatt ttctccatgc tctgggctca 1740

aacgcactct tggatgggcc gtgtaatcta caccatttct ggcccaatcc aacgaaggta 1800

gtccagact cctaactccg ccgccgatg cccaatctc gccggccgcc gctgccatct 1860

ccctccccc accgccaccg tcgccttctc cgttccccca acaaaggctc agtagcagca 1920

gccgcggcgc ggagagcaga ggcttggag ggctgcaga ggagcggccg cgtcgacgaa 1980

gacgacatca gcaggcagtg gacatggcga ctgcgaatgc tatgccgac gtgggagctt 2040

caggcgagga tgcgtggcct tcatcagctg ctgctccctt acctgctctg gtttgcatt 2100

gtgttggttc gtggttggg gatatcagga tggggaaggg gaatgggtt cgtgcatgt 2160

tgttctattg tgcaattga tgttctcttg tgaattca tggatgattca atctgcatct 2220

gtgttattgg ttgtcaagca aacattttat ttcttcgag atgggtgttt catctgaaat 2280

tgggtgtgtct gatgatgtga ccttgtgcaa atcattgttt cattttcttc tattccacag 2340

agattttttt gtttagagtt tattctacca tcttcttacc ttttgaatgc tatgcaccac 2400

agatttctga tttttacaca ttcaatcaca gtgccgaccc ttggcgaatt taaaatttctc 2460

tcaccgtcaa aatttaataca aacatctgat ctaacagtag tagcgccagc acggctggta 2520

tttaaggcag aaagaaaggt tgcgagggcg aggagtgggt gatgatctgc cggctgtgtc 2580

gtgacttttag gctataaaag atagctgttt ggattaaccc aaccaatgaa gcgaatcatc 2640

gatggccgat agcgagatta tatccaacta atgaagagaa tcaactttaa tcttttgtga 2700

gctacaagtt tcgtgggtgaa ggcataact aataccacca tcatggctgc agcgaatcaa 2760

cgagatgcat ttgtcttgca catttccac cggatacttt gccatccatg getttatctc 2820

ctccatgatt gtatccctt cttctcaac aaggaacgat cgatcattgt ttgcttcttt 2880

ctctgacgac actttggtgc aagtgaagg ctcttctctg gaactcgtcc cgtgagctcc 2940

ttcttggtta catctcctt aattccttgc cgatttcgg cttegtcttc actatcgtca 3000

gttcattct cccgtctgc ctgagagtc agtttctgg agatagtcgc cggttgctc 3060

tctctctc tctcccttct catgccagc tccagctcac aatccgagct tacgtggtgg 3120

aatcgtatc gccaccttc ggaagattat tgtacttgc ctgcctact tcttgagtc 3180

gatcaaacac atccatcatg catctgttg tacttgcat cagccaaaca ctccagttt 3240

aactcgtcc gcaagtcaat acttgcatc aattccatt tctacaaaa gcagctgctc 3300

agactctgc ctctccacc cagcaatct gtttcttcc ctgtatctg cgcgtgtgtt 3360

cttagctgct ctaggggac ctccaatgg cggagctaat ggccaccatg gtggtcgggc 3420

cactgctgc catggtgaag gacaaggcct ccagctacct cctggagcag tacaaggtga 3480

tggagggcat ggaggagcag cagagatcc taaacgcaa gctgccagcc atctcgacg 3540

tcatgccga cgccaggag caggcggcta aacacaggga aggggtgaaa gcatggctcg 3600

aggcgtccg gaaggtggcc taccaggcca atgacgtct cgacagttc aagtacagg 3660

cactccgccg caaggccaag gggcactaca agatgctcag cagcatgggt gtaatcaage 3720

tcattcctac tcacaaccgt attctgttca gttataggat gggcaacaag ctcaggatga 3780

ttctgaatgc cattgaagtt ctaattgaag agatgaatgc ctttaggttt aaattccgac 3840

cagagccacc aatgtcgtcc atgaaatgga ggaagacaga ttctaaaatc tccgaccttt 3900

caaagctaag tgacttagag atatctaaag gcaatcaaca aatatcccta caggcagcca 3960

gcagacatat tacttcattg tccagtctcg ttctgcatth gtccactgat gacacagaaa 4020

cagcatcggg ggccaagcaa caagattcga gtgatttggg gattgaggat gagaaatgga 4080

gtcataaatc tcccctggaa cttatggtct tgagtcgggt caacctttta ttcttcacc 4140

caagtgcact ggctctgtgg acatgttttg ctcagctcct agatctgaaa attcggtatg 4200

ttgatgcgct tgcagctgg ccagaagagg tgtccaggg cttagtttcc ttaggaagt 4260

tagagatttc tgtatgcgag aatctgacag gacacacaca agctcgtggg caatctacac 4320

ccgcaccaag tgaactctg ccacgtttgg agtcctaga gataacgtgt tgtgattcta 4380

ttgtggaggt ccccaatcta ccggcgtctc tcaagctatt agaaattagg gggtgccccg 4440

gcctggagtc catcgtattc aatcagcagc aggataggac gatgttggtg agtgcagaaa 4500

gctttgcaga gcaggataag tcacgttaa taccagggtc cacaagcgag accaacgac 4560

acgtccttc acgcctagaa tctcttgtaa taaattgggtg cgtcgtttg gaggttctcc 4620

atcttctcc gtccatcaag aaattgggta ttatagctg tgaaaaactt cggctcctct 4680

cagtaaagct ggatgccgtt cgagaattaa gtaccagaca ttgcgggagc ttgaaatcac 4740

tggaatcttg cttaggagag ctgcgctgc tgcaacaact caaactttt gattgcaaga 4800

gcctggaatc cttgccgaag gggcctcaag catactcacc tttacatct cttgaaatc 4860

gtggtgttc tggataaag gtgcttcac cgaccctaca gcaacgtctg gatgacatcg 4920

aggacaaaga actagatgcc tgctatgaag gtaattctca gttcttaac cgtgtaccat 4980

ttagtggtta aagtttcgag ttctgtgtc agaacccta gtcaaccatt aatatgatta 5040

tatgtacata gattacaatg cgattcata actactctc gcagctgtgt catctaaacc 5100

ctttaaactt tgagttgcat ttgggtatct aatcgcatgc aaaggaattt agttatatct 5160

cccgtagcca ttccctatat gtgatgatct cttcctgtga ttatgcttgc tagtttgac 5220

tatgtaatta atttgccgg gtgactatgt aattacatga cttcatttag tcgccaggtg 5280

tggcatcatg caattattat ggcaaagctg tattagtcat gatcgaagcc acttggtgaa 5340

cttattccct gctacttga accaatactc attgattatt tccctttaag cgtttgatat 5400

ggacgacagt ttaaatttgc agagctaact aacgcagcgc ttgtctttac atttctctgg 5460

aaactcacag ctccattgca tatgtagttt gagtatacat agtttctttg aactgtctta 5520

tgcccttgaa aagcttgact atggaattct agtctatata ttcaatacat atatttttt 5580

ttcttttgtt tgccagaggg agaagcagaa ccaaagtctc gtcategtca atctgcaate 5640

agtaggctga tgtgcttgaa gtagcagttt caggaccaga tgagagttgt catcatggtt 5700

tgtaacgcgt gcttgatgat tgatttcgaa tgaaattcta gccactatcc ttatgcttac 5760

tcctctatg gtgtgacttc cttgtaggat cgttaccgaa tctgcaattg ttgggttatt 5820

aattgtgtgg ttgtatctca tggtagaatg tattacctac ctacccttcc tcaagataaa 5880

ctccagtaaa gtcgategtc tggttggtgt gagctgctac aagaaggatg aagccgatga 5940

tccaaggcc ttgactftaa gctagtccca ggttgtaagc tgaagaacaa catactggag 6000

ctaaactgc tteactcttt ttttatectt ttccctttct tgtgaactgt gatgtgtttg 6060

atctcgttca tgctccatca taagagaatc acagctagca cttccatttc aatgatgttt 6120

ttcctaakat gacatgactg cagaggatac ttgtgattga tcaacaacat ttgcagcaa 6180

cgttctctcc cgataacgct gcaatggaat tgatcaattg gtgttcctac ttattggaat 6240

ctttggacat tgccaacaac tcaagaaagg aagataaaca ggagattgtc agcagattgc 6300

ttgttccagc cagcgaaggg gatctcactg ttcttccat ttaggaatg ggggggatgg 6360

gcaagaccac cttagcgcag ctcatttaca atgaccctga cattcagaag cattccagt 6420

tgctgctctg ggtgtgtgtt tccgacaact tcgatgtgga ttgctggct aaaagcatag 6480

ttgaagcagc tcgcaaacag aagaatgata acagtggaag tactaacaag tcaccattgg 6540

atgaacttaa agaagttgtg agtgggcaga ggtacctct cgttttggat gatgtctgga 6600

accgtgatgc tcgtaagtgg gaagcgtca agtcctacct tcagcacggt ggcagcggt 6660

gctcagtttt gacaacaact cgtgatcaag aagtggctca agtgatggct ccagctcaaa 6720

aaccttatga tctcaagaga ctgaaggaaa gcttcataga ggaaattatc aggacaagtg 6780

cttcagttc acaacaagaa aggcctcctg agcttctcaa aatggttggt gatattgcca 6840

agaaatgttc tggttccctt ttactgcaa cagcattggg ctctacactg cgtacgaaga 6900

ccaccaagaa agaatgggag gctatattaa gcagaagcac aatttgcgat gaggaaaatg 6960

gaattttacc aatactcaag ctacgttaca attgcttgcc atcatatatg cggcaatgct 7020

ttccttttg tgcaatttc cccaaggatc atgagattga cgtggaaatg ctgatccagt 7080

tatggatggc caatggtttt atcccagagc aacaaggaga gtgccctgaa atcattggta 7140

aaagaatttt cagtgagttg gtgtcaaggt cattttttca ggatgcgaaa gggatcccgt 7200

ttgagtcca tgatataaag aactctaaga ttactgtaa gatccatgac cttatgcatg 7260

atgttcaca atcctccatg ggaaaagaat gcgctgctat agatacagaa gttagtaaaa 7320

gtgaggattt tccttattct gctcgccatc tattttgtc aggtgataga ccagaagcta 7380

ttccgactcc ttccccagag aaaggatatc caggatatcca aacattaata tgttcacgtt 7440
 tcaaatattt gcagaatgta tcaaaataca ggtcattgcg agtattaaca acgatgtggg 7500
 aaggttcatt cctgatacca aaatatcatc atcacctgag gtatcttgat ctctcagaaa 7560
 gtgaaattaa agcacttcct gaagacataa gcatactata tcatttgcaa acattgaacc 7620
 ttcccggtg ttatctctc cgtcgacttc caaaggggaat gaagtacatg accgccctcc 7680
 gtcacttgta cactcacgga tgttgagtt taggaagcat gcctcctgac ctggacacc 7740
 tcacttgctt acagacgctt acatgcttg tagccggtac ttgctctggc tgcagtgatt 7800
 tgggagagct gcggcagttg gaccttggtg gtcgactaga gctaagaaaa ctggaaaatg 7860
 tgacaaaagc tgatgcaaaa gcagcaaatc tcggaaagaa ggaaaaactg accaaattga 7920
 ccttaatatg gactgatcag gagtacaagg aggcacagag taataatcat aaagaggtgc 7980
 tggaaggtct cagcctcac gaggggctca aggttctgag tatatatcac tgtgggagca 8040
 gtacatgtcc aacttgatg aataaactgc gggacatggt ggggcttgag ttaaatggtt 8100
 gcaaaaatct cgagaagctt cctccgttgt ggcagctacc ggctctacaa gttctttgcc 8160

tggaaggact gggtagtta aattgcttgt tcaactgtga cacacacaca cccttcacat 8220

tttcagact gaaggagcta accttgtctg atatgacaaa tttgagaca tgggtgggaca 8280

caaatgaggt acaaggagaa gagctgatgt ttectgaggt tgaaaagctg tcaatcgaaa 8340

gttgccatag gctaactgcc ttgcaaaaag catcaaatgc gatttcagaa tegtccggcg 8400

aagttagcac cgtgtgtcgt tctgcatttc cagcattgaa ggaaatgaaa ttatatgatt 8460

tgcgtatctt tcagaaatgg gaggcagtcg atggaactcc aaggaggag gcaacatttc 8520

ctcagcttga caaattagaa atcagacagt gccagagct gactactcta cctgaagcac 8580

gaatttccca ttgtggaata aaatggaaag attggtacaa tctgctgaaa aatgaactgt 8640

cgttactcaa gttgaaacat gtgtcatgtg tgtaactatc agaattgttc tcgacaaaat 8700

cgttgggact tgcaaggtaa aaaaaaaaaa ttctcagct ctgtaaatgc tattgctgaa 8760

ctaaagttca gaaagctata gtgccgaaag atctcagatg gcctactgca acaaaattca 8820

gtacaaatgc aaaacaatgt aacattacgt ggcccagccc atcatggtaa gcccatactg 8880

tatgcgctgc aaactaatat tagttcaggc aattactctg aaatttctga tagacgaacc 8940

tgatttttc atgtcagggtg ccgtgcttgt tcagattcag caactfacat ttccaaagaa 9000

gaaaaaggaa attcatacct tctctttatt tggtttttaa aagtggcctg gattttcatt 9060

atttggttaa aatttggcct ttgtcgtaag gatttggatc ctctatccaa acacatgcct 9120

tccaagataa acgaatccct cattatacaa aaaaaaaagc acaagatgct caacaagaag 9180

cttcaaattc gtgtaaatac atgtcatgtc tcgctaccaa acaatatctc aacaatgaca 9240

acagattgga ggtattcatc tcacaatgat acatttcaac acaaatttat gtaggcctcg 9300

ctgacaggac ttggctggat ggctgtcagt tcagttcttg aaccaactga agcatgagca 9360

gccctgcaag gaagcgataa actgaattaa aataggaatt tgttacacaa tacctgtaaa 9420

gtggattaca ttaaaatatt accaaatcat actgtaagca atcatacagt acaagattcc 9480

ttgcaaacaa ccctaaccaa acttctagta aaaccattat ttttctgta gtaccaactt 9540

tttgcaacca ctatatactc cagtaaaaac cagaagtatt gttgcaatga ctttgccgat 9600

aaattataga acgcggctac tcgaagcagt agatttaaga caatttttac tgcataataa 9660

ctacgcatgg tgtcaagatc cctaaaaatt aacagaggca gaccagctc aagtattgac 9720

aaactcaagt ggcaactggc atatgaacaa tttctcgtt caaatatata tgaagcaatg 9780

tgtaaaacaa attagttttg ctccacacat ctgacaataa ttttttcag taagcagact 9840

tactgtggat tcatatattgc gttgttgata gcgtttgata taatctgcct cgctagtcac 9900

gacgggagcg ttcccggtac c 9921

<210> 2

<211> 3972

<212> ADN

<213> *Oryza officinalis*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(3972)

<400> 2

atg gcg gag cta atg gcc acc atg gtg gtc ggg cca ctg ctg tcc atg 48

Met Ala Glu Leu Met Ala Thr Met Val Val Gly Pro Leu Leu Ser Met

1 5 10 15

gtg aag gac aag gcc tcc agc tac ctc ctg gag cag tac aag gtg atg 96

Val Lys Asp Lys Ala Ser Ser Tyr Leu Leu Glu Gln Tyr Lys Val Met

20 25 30

gag ggc atg gag gag cag cac gag atc ctc aaa cgc aag ctg cca gcc 144

Glu Gly Met Glu Glu Gln His Glu Ile Leu Lys Arg Lys Leu Pro Ala

35 40 45

atc ctc gac gtc atc gcc gac gcc gag gag cag gcg gct aaa cac agg 192

Ile Leu Asp Val Ile Ala Asp Ala Glu Glu Gln Ala Ala Lys His Arg

50 55 60

gaa ggg gtg aaa gca tgg ctc gag gcg ctc cgg aag gtg gcc tac cag 240

Glu Gly Val Lys Ala Trp Leu Glu Ala Leu Arg Lys Val Ala Tyr Gln

65 70 75 80

gcc aat gac gtc ttc gac gag ttc aag tac gag gca ctc cgc cgc aag 288

Ala Asn Asp Val Phe Asp Glu Phe Lys Tyr Glu Ala Leu Arg Arg Lys

85 90 95

gcc aag ggg cac tac aag atg ctc agc agc atg gtt gta atc aag ctc 336

Ala Lys Gly His Tyr Lys Met Leu Ser Ser Met Val Val Ile Lys Leu

100 105 110

att cct act cac aac cgt att ctg ttc agt tat agg atg ggc aac aag 384

Ile Pro Thr His Asn Arg Ile Leu Phe Ser Tyr Arg Met Gly Asn Lys

115

120

125

ctc agg atg att ctg aat gcc att gaa gtt cta att gaa gag atg aat 432

Leu Arg Met Ile Leu Asn Ala Ile Glu Val Leu Ile Glu Glu Met Asn

130

135

140

gcc ttt agg ttt aaa ttc cga cca gag cca cca atg tcg tcc atg aaa 480

Ala Phe Arg Phe Lys Phe Arg Pro Glu Pro Pro Met Ser Ser Met Lys

145

150

155

160

tgg agg aag aca gat tct aaa atc tcc gac ctt tct ttg gac att gcc 528

Trp Arg Lys Thr Asp Ser Lys Ile Ser Asp Leu Ser Leu Asp Ile Ala

165

170

175

aac aac tca aga aag gaa gat aaa cag gag att gtc agc aga ttg ctt 576

Asn Asn Ser Arg Lys Glu Asp Lys Gln Glu Ile Val Ser Arg Leu Leu

180

185

190

gtt cca gcc agc gaa ggg gat ctc act gtt ctt ccc att gta gga atg 624

Val Pro Ala Ser Glu Gly Asp Leu Thr Val Leu Pro Ile Val Gly Met

195

200

205

ggg ggg atg ggc aag acc acc tta gcg cag ctc att tac aat gac cct 672

Gly Gly Met Gly Lys Thr Thr Leu Ala Gln Leu Ile Tyr Asn Asp Pro

210

215

220

gac att cag aag cat ttc cag ttg ctg ctc tgg gtg tgt gtt tcc gac 720

Asp Ile Gln Lys His Phe Gln Leu Leu Leu Trp Val Cys Val Ser Asp

225

230

235

240

aac ttc gat gtg gat ttg ctg gct aaa agc ata gtt gaa gca gct cgc 768

Asn Phe Asp Val Asp Leu Leu Ala Lys Ser Ile Val Glu Ala Ala Arg

245

250

255

aaa cag aag aat gat aac agt gga agt act aac aag tca cca ttg gat 816

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

260

265

270

gaa ctt aaa gaa gtt gtg agt ggg cag agg tac ctc ctc gtt ttg gat 864

Glu Leu Lys Glu Val Val Ser Gly Gln Arg Tyr Leu Leu Val Leu Asp

275

280

285

gat gtc tgg aac cgt gat gct cgt aag tgg gaa gcg ctc aag tcc tac 912

Asp Val Trp Asn Arg Asp Ala Arg Lys Trp Glu Ala Leu Lys Ser Tyr

290

295

300

ctt cag cac ggt ggc agc ggt agc tca gtt ttg aca aca act cgt gat 960

Leu Gln His Gly Gly Ser Gly Ser Ser Val Leu Thr Thr Thr Arg Asp

305 310 315 320

caa gaa gtg gct caa gtg atg gct cca gct caa aaa cct tat gat ctc 1008

Gln Glu Val Ala Gln Val Met Ala Pro Ala Gln Lys Pro Tyr Asp Leu

325 330 335

aag aga ctg aag gaa agc ttc ata gag gaa att atc agg aca agt gct 1056

Lys Arg Leu Lys Glu Ser Phe Ile Glu Glu Ile Ile Arg Thr Ser Ala

340 345 350

ttc agt tca caa caa gaa agg cct cct gag ctt ctc aaa atg gtt ggt 1104

Phe Ser Ser Gln Gln Glu Arg Pro Pro Glu Leu Leu Lys Met Val Gly

355 360 365

gat att gcc aag aaa tgt tct ggt tcc cct tta gct gca aca gca ttg 1152

Asp Ile Ala Lys Lys Cys Ser Gly Ser Pro Leu Ala Ala Thr Ala Leu

370 375 380

ggc tct aca ctg cgt acg aag acc acc aag aaa gaa tgg gag gct ata 1200

Gly Ser Thr Leu Arg Thr Lys Thr Thr Lys Lys Glu Trp Glu Ala Ile

385 390 395 400

tta agc aga agc aca att tgc gat gag gaa aat gga att tta cca ata 1248

Leu Ser Arg Ser Thr Ile Cys Asp Glu Glu Asn Gly Ile Leu Pro Ile

405

410

415

ctc aag ctc agt tac aat tgc ttg cca tca tat atg cgg caa tgc ttt 1296

Leu Lys Leu Ser Tyr Asn Cys Leu Pro Ser Tyr Met Arg Gln Cys Phe

420

425

430

tcc ttt tgt gca att ttc ccc aag gat cat gag att gac gtg gaa atg 1344

Ser Phe Cys Ala Ile Phe Pro Lys Asp His Glu Ile Asp Val Glu Met

435

440

445

ctg atc cag tta tgg atg gcc aat ggt ttt atc cca gag caa caa gga 1392

Leu Ile Gln Leu Trp Met Ala Asn Gly Phe Ile Pro Glu Gln Gln Gly

450

455

460

gag tgc cct gaa atc att ggt aaa aga att ttc agt gag ttg gtg tca 1440

Glu Cys Pro Glu Ile Ile Gly Lys Arg Ile Phe Ser Glu Leu Val Ser

465

470

475

480

agg tca ttt ttt cag gat gcg aaa ggg atc ccg ttt gag ttc cat gat 1488

Arg Ser Phe Phe Gln Asp Ala Lys Gly Ile Pro Phe Glu Phe His Asp

485

490

495

ata aag aac tct aag att act tgt aag atc cat gac ctt atg cat gat 1536

Ile Lys Asn Ser Lys Ile Thr Cys Lys Ile His Asp Leu Met His Asp

500

505

510

gtt gca caa tcc tcc atg gga aaa gaa tgc gct gct ata gat aca gaa 1584

Val Ala Gln Ser Ser Met Gly Lys Glu Cys Ala Ala Ile Asp Thr Glu

515

520

525

gtt agt aaa agt gag gat ttt cct tat tct gct cgc cat cta ttt ttg 1632

Val Ser Lys Ser Glu Asp Phe Pro Tyr Ser Ala Arg His Leu Phe Leu

530

535

540

tca ggt gat aga cca gaa gct att cgg act cct tcc cca gag aaa gga 1680

Ser Gly Asp Arg Pro Glu Ala Ile Arg Thr Pro Ser Pro Glu Lys Gly

545

550

555

560

tat cca ggt atc caa aca tta ata tgt tca cgt ttc aaa tat ttg cag 1728

Tyr Pro Gly Ile Gln Thr Leu Ile Cys Ser Arg Phe Lys Tyr Leu Gln

565

570

575

aat gta tca aaa tac agg tca ttg cga gta tta aca acg atg tgg gaa 1776

Asn Val Ser Lys Tyr Arg Ser Leu Arg Val Leu Thr Thr Met Trp Glu

580

585

590

ggt tca ttc ctg ata cca aaa tat cat cat cac ctg agg tat ctt gat 1824

Gly Ser Phe Leu Ile Pro Lys Tyr His His His Leu Arg Tyr Leu Asp

595

600

605

ctc tca gaa agt gaa att aaa gca ctt cct gaa gac ata agc atc cta 1872

Leu Ser Glu Ser Glu Ile Lys Ala Leu Pro Glu Asp Ile Ser Ile Leu

610

615

620

tat cat ttg caa aca ttg aac ctt tcc cgt tgt tta tct ctc cgt cga 1920

Tyr His Leu Gln Thr Leu Asn Leu Ser Arg Cys Leu Ser Leu Arg Arg

625

630

635

640

ctt cca aag gga atg aag tac atg acc gcc ctc cgt cac ttg tac act 1968

Leu Pro Lys Gly Met Lys Tyr Met Thr Ala Leu Arg His Leu Tyr Thr

645

650

655

cac gga tgt tgg agt tta gga agc atg cct cct gac ctc gga cac ctc 2016

His Gly Cys Trp Ser Leu Gly Ser Met Pro Pro Asp Leu Gly His Leu

660

665

670

act tgc cta cag acg ctt aca tgc ttt gta gcc ggt act tgc tct ggc 2064

Thr Cys Leu Gln Thr Leu Thr Cys Phe Val Ala Gly Thr Cys Ser Gly

675

680

685

tgc agt gat ttg gga gag ctg cgg cag ttg gac ctt ggt ggt cga cta 2112

Cys Ser Asp Leu Gly Glu Leu Arg Gln Leu Asp Leu Gly Gly Arg Leu

690

695

700

gag cta aga aaa ctg gaa aat gtg aca aaa gct gat gca aaa gca gca 2160

Glu Leu Arg Lys Leu Glu Asn Val Thr Lys Ala Asp Ala Lys Ala Ala

705 710 715 720

aat ctc gga aag aag gaa aaa ctg acc aaa ttg acc tta ata tgg act 2208

Asn Leu Gly Lys Lys Glu Lys Leu Thr Lys Leu Thr Leu Ile Trp Thr

725 730 735

gat cag gag tac aag gag gca cag agt aat aat cat aaa gag gtg ctg 2256

Asp Gln Glu Tyr Lys Glu Ala Gln Ser Asn Asn His Lys Glu Val Leu

740 745 750

gaa ggt ctc acg cct cac gag ggg ctc aag gtt ctg agt ata tat cac 2304

Glu Gly Leu Thr Pro His Glu Gly Leu Lys Val Leu Ser Ile Tyr His

755 760 765

tgt ggg agc agt aca tgt cca act tgg atg aat aaa ctg cgg gac atg 2352

Cys Gly Ser Ser Thr Cys Pro Thr Trp Met Asn Lys Leu Arg Asp Met

770 775 780

gtg ggg ctt gag tta aat ggt tgc aaa aat ctc gag aag ctt cct ccg 2400

Val Gly Leu Glu Leu Asn Gly Cys Lys Asn Leu Glu Lys Leu Pro Pro

785 790 795 800

ttg tgg cag cta ccg gct cta caa gtt ctt tgc ctg gaa gga ctg ggt 2448

Leu Trp Gln Leu Pro Ala Leu Gln Val Leu Cys Leu Glu Gly Leu Gly

805

810

815

agt tta aat tgc ttg ttc aac tgt gac aca cac aca ccc ttc aca ttt 2496

Ser Leu Asn Cys Leu Phe Asn Cys Asp Thr His Thr Pro Phe Thr Phe

820

825

830

tgc aga ctg aag gag cta acc ttg tct gat atg aca aat ttt gag aca 2544

Cys Arg Leu Lys Glu Leu Thr Leu Ser Asp Met Thr Asn Phe Glu Thr

835

840

845

tgg tgg gac aca aat gag gta caa gga gaa gag ctg atg ttt cct gag 2592

Trp Trp Asp Thr Asn Glu Val Gln Gly Glu Glu Leu Met Phe Pro Glu

850

855

860

gtt gaa aag ctg tca atc gaa agt tgc cat agg cta act gcc ttg cca 2640

Val Glu Lys Leu Ser Ile Glu Ser Cys His Arg Leu Thr Ala Leu Pro

865

870

875

880

aaa gca tca aat gcg att tca gaa tcg tcc ggc gaa gtt agc acc gtg 2688

Lys Ala Ser Asn Ala Ile Ser Glu Ser Ser Gly Glu Val Ser Thr Val

885

890

895

tgt cgt tct gca ttt cca gca ttg aag gaa atg aaa tta tat gat ttg 2736

Cys Arg Ser Ala Phe Pro Ala Leu Lys Glu Met Lys Leu Tyr Asp Leu

900

905

910

cgt atc ttt cag aaa tgg gag gca gtc gat gga act cca agg gag gag 2784

Arg Ile Phe Gln Lys Trp Glu Ala Val Asp Gly Thr Pro Arg Glu Glu

915

920

925

gca aca ttt cct cag ctt gac aaa tta gaa atc aga cag tgc cca gag 2832

Ala Thr Phe Pro Gln Leu Asp Lys Leu Glu Ile Arg Gln Cys Pro Glu

930

935

940

ctg act act cta cct gaa gca cca aag cta agt gac tta gag ata tct 2880

Leu Thr Thr Leu Pro Glu Ala Pro Lys Leu Ser Asp Leu Glu Ile Ser

945

950

955

960

aaa ggc aat caa caa ata tcc cta cag gca gcc agc aga cat att act 2928

Lys Gly Asn Gln Gln Ile Ser Leu Gln Ala Ala Ser Arg His Ile Thr

965

970

975

tca ttg tcc agt ctc gtt ctg cat ttg tcc act gat gac aca gaa aca 2976

Ser Leu Ser Ser Leu Val Leu His Leu Ser Thr Asp Asp Thr Glu Thr

980

985

990

gca tcg gtg gcc aag caa caa gat tcg agt gat ttg gtg att gag gat 3024

Ala Ser Val Ala Lys Gln Gln Asp Ser Ser Asp Leu Val Ile Glu Asp

995

1000

1005

gag aaa tgg agt cat aaa tct ccc ctg gaa ctt atg gtc ttg agt 3069

Glu Lys Trp Ser His Lys Ser Pro Leu Glu Leu Met Val Leu Ser

1010

1015

1020

cgg tgc aac ctt tta ttc tct cac cca agt gca ctg gct ctg tgg 3114

Arg Cys Asn Leu Leu Phe Ser His Pro Ser Ala Leu Ala Leu Trp

1025

1030

1035

aca tgt ttt gct cag ctc cta gat ctg aaa att cgg tat gtt gat 3159

Thr Cys Phe Ala Gln Leu Leu Asp Leu Lys Ile Arg Tyr Val Asp

1040

1045

1050

gcg ctt gtc agc tgg cca gaa gag gtg ttc cag ggc tta gtt tcc 3204

Ala Leu Val Ser Trp Pro Glu Glu Val Phe Gln Gly Leu Val Ser

1055

1060

1065

ttg agg aag tta gag att tct gta tgc gag aat ctg aca gga cac 3249

Leu Arg Lys Leu Glu Ile Ser Val Cys Glu Asn Leu Thr Gly His

1070

1075

1080

aca caa gct cgt ggg caa tct aca ccc gca cca agt gaa ctc ctg 3294

Thr Gln Ala Arg Gly Gln Ser Thr Pro Ala Pro Ser Glu Leu Leu

1085

1090

1095

cca cgt ttg gag tcc cta gag ata acg tgt tgt gat tct att gtg 3339

Pro Arg Leu Glu Ser Leu Glu Ile Thr Cys Cys Asp Ser Ile Val

1100

1105

1110

gag gtc ccc aat cta ccg gcg tct ctc aag cta tta gaa att agg 3384

Glu Val Pro Asn Leu Pro Ala Ser Leu Lys Leu Leu Glu Ile Arg

1115

1120

1125

ggg tgc ccc ggc ctg gag tcc atc gta ttc aat cag cag cag gat 3429

Gly Cys Pro Gly Leu Glu Ser Ile Val Phe Asn Gln Gln Gln Asp

1130

1135

1140

agg acg atg ttg gtg agt gca gaa agc ttt gca gag cag gat aag 3474

Arg Thr Met Leu Val Ser Ala Glu Ser Phe Ala Glu Gln Asp Lys

1145

1150

1155

tca tgc tta ata tca ggg tcc aca agc gag acc aac gat cac gtc 3519

Ser Ser Leu Ile Ser Gly Ser Thr Ser Glu Thr Asn Asp His Val

1160

1165

1170

ctt cca cgc cta gaa tct ctt gta ata aat tgg tgc gat cgt ttg 3564

Leu Pro Arg Leu Glu Ser Leu Val Ile Asn Trp Cys Asp Arg Leu

1175

1180

1185

gag gtt ctc cat ctt cct ccg tcc atc aag aaa ttg ggt att tat 3609

Glu Val Leu His Leu Pro Pro Ser Ile Lys Lys Leu Gly Ile Tyr

1190

1195

1200

agc tgt gaa aaa ctt cgg tcc ctc tca gta aag ctg gat gcc gtt 3654

Ser Cys Glu Lys Leu Arg Ser Leu Ser Val Lys Leu Asp Ala Val

1205

1210

1215

cga gaa tta agt atc aga cat tgc ggg agc ttg aaa tca ctg gaa 3699

Arg Glu Leu Ser Ile Arg His Cys Gly Ser Leu Lys Ser Leu Glu

1220

1225

1230

tct tgc tta gga gag ctc gcg tcg ctg caa caa ctc aaa ctt ttt 3744

Ser Cys Leu Gly Glu Leu Ala Ser Leu Gln Gln Leu Lys Leu Phe

1235

1240

1245

gat tgc aag agc ctg gaa tcc ttg ccg aag ggg cct caa gca tac 3789

Asp Cys Lys Ser Leu Glu Ser Leu Pro Lys Gly Pro Gln Ala Tyr

1250

1255

1260

tca tct ctt aca tct ctt gaa att cgt ggt tgt tct ggt ata aag 3834

Ser Ser Leu Thr Ser Leu Glu Ile Arg Gly Cys Ser Gly Ile Lys

1265

1270

1275

gtg ctt cca ccg agc cta cag caa cgt ctg gat gac atc gag gac 3879

Val Leu Pro Pro Ser Leu Gln Gln Arg Leu Asp Asp Ile Glu Asp

1280

1285

1290

aaa gaa cta gat gcc tgc tat gaa gag gca gaa gca gaa cca aag 3924

Lys Glu Leu Asp Ala Cys Tyr Glu Glu Ala Glu Ala Glu Pro Lys

1295

1300

1305

tct cgt cat cgt caa tct gca atc agt agg ctg atg tgc ttg aag 3969

Ser Arg His Arg Gln Ser Ala Ile Ser Arg Leu Met Cys Leu Lys

1310

1315

1320

tag

3972

<210> 3

<211> 1323

<212> PRT

<213> *Oryza officinalis*

<400> 3

Met Ala Glu Leu Met Ala Thr Met Val Val Gly Pro Leu Leu Ser Met

1

5

10

15

Val Lys Asp Lys Ala Ser Ser Tyr Leu Leu Glu Gln Tyr Lys Val Met

20

25

30

Glu Gly Met Glu Glu Gln His Glu Ile Leu Lys Arg Lys Leu Pro Ala

35

40

45

Ile Leu Asp Val Ile Ala Asp Ala Glu Glu Gln Ala Ala Lys His Arg

50

55

60

Glu Gly Val Lys Ala Trp Leu Glu Ala Leu Arg Lys Val Ala Tyr Gln

65

70

75

80

Ala Asn Asp Val Phe Asp Glu Phe Lys Tyr Glu Ala Leu Arg Arg Lys

85

90

95

Ala Lys Gly His Tyr Lys Met Leu Ser Ser Met Val Val Ile Lys Leu

100

105

110

Ile Pro Thr His Asn Arg Ile Leu Phe Ser Tyr Arg Met Gly Asn Lys

115

120

125

Leu Arg Met Ile Leu Asn Ala Ile Glu Val Leu Ile Glu Glu Met Asn

130

135

140

Ala Phe Arg Phe Lys Phe Arg Pro Glu Pro Pro Met Ser Ser Met Lys

145

150

155

160

Trp Arg Lys Thr Asp Ser Lys Ile Ser Asp Leu Ser Leu Asp Ile Ala

165

170

175

Asn Asn Ser Arg Lys Glu Asp Lys Gln Glu Ile Val Ser Arg Leu Leu

180

185

190

Val Pro Ala Ser Glu Gly Asp Leu Thr Val Leu Pro Ile Val Gly Met

195

200

205

Gly Gly Met Gly Lys Thr Thr Leu Ala Gln Leu Ile Tyr Asn Asp Pro

210

215

220

Asp Ile Gln Lys His Phe Gln Leu Leu Leu Trp Val Cys Val Ser Asp

225

230

235

240

Asn Phe Asp Val Asp Leu Leu Ala Lys Ser Ile Val Glu Ala Ala Arg

245

250

255

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

260

265

270

Glu Leu Lys Glu Val Val Ser Gly Gln Arg Tyr Leu Leu Val Leu Asp

275

280

285

Asp Val Trp Asn Arg Asp Ala Arg Lys Trp Glu Ala Leu Lys Ser Tyr

290

295

300

Leu Gln His Gly Gly Ser Gly Ser Ser Val Leu Thr Thr Thr Arg Asp

305

310

315

320

Gln Glu Val Ala Gln Val Met Ala Pro Ala Gln Lys Pro Tyr Asp Leu

325

330

335

Lys Arg Leu Lys Glu Ser Phe Ile Glu Glu Ile Ile Arg Thr Ser Ala

340

345

350

Phe Ser Ser Gln Gln Glu Arg Pro Pro Glu Leu Leu Lys Met Val Gly

355

360

365

Asp Ile Ala Lys Lys Cys Ser Gly Ser Pro Leu Ala Ala Thr Ala Leu

370

375

380

Gly Ser Thr Leu Arg Thr Lys Thr Thr Lys Lys Glu Trp Glu Ala Ile

385

390

395

400

Leu Ser Arg Ser Thr Ile Cys Asp Glu Glu Asn Gly Ile Leu Pro Ile

405

410

415

Leu Lys Leu Ser Tyr Asn Cys Leu Pro Ser Tyr Met Arg Gln Cys Phe

420

425

430

Ser Phe Cys Ala Ile Phe Pro Lys Asp His Glu Ile Asp Val Glu Met

435

440

445

Leu Ile Gln Leu Trp Met Ala Asn Gly Phe Ile Pro Glu Gln Gln Gly

450

455

460

Glu Cys Pro Glu Ile Ile Gly Lys Arg Ile Phe Ser Glu Leu Val Ser

465

470

475

480

Arg Ser Phe Phe Gln Asp Ala Lys Gly Ile Pro Phe Glu Phe His Asp

485

490

495

Ile Lys Asn Ser Lys Ile Thr Cys Lys Ile His Asp Leu Met His Asp

500

505

510

Val Ala Gln Ser Ser Met Gly Lys Glu Cys Ala Ala Ile Asp Thr Glu

515

520

525

Val Ser Lys Ser Glu Asp Phe Pro Tyr Ser Ala Arg His Leu Phe Leu

530

535

540

Ser Gly Asp Arg Pro Glu Ala Ile Arg Thr Pro Ser Pro Glu Lys Gly

545

550

555

560

Tyr Pro Gly Ile Gln Thr Leu Ile Cys Ser Arg Phe Lys Tyr Leu Gln

565

570

575

Asn Val Ser Lys Tyr Arg Ser Leu Arg Val Leu Thr Thr Met Trp Glu

580

585

590

Gly Ser Phe Leu Ile Pro Lys Tyr His His His Leu Arg Tyr Leu Asp

595

600

605

Leu Ser Glu Ser Glu Ile Lys Ala Leu Pro Glu Asp Ile Ser Ile Leu

610

615

620

Tyr His Leu Gln Thr Leu Asn Leu Ser Arg Cys Leu Ser Leu Arg Arg

625

630

635

640

Leu Pro Lys Gly Met Lys Tyr Met Thr Ala Leu Arg His Leu Tyr Thr

645

650

655

His Gly Cys Trp Ser Leu Gly Ser Met Pro Pro Asp Leu Gly His Leu

660

665

670

Thr Cys Leu Gln Thr Leu Thr Cys Phe Val Ala Gly Thr Cys Ser Gly

675

680

685

Cys Ser Asp Leu Gly Glu Leu Arg Gln Leu Asp Leu Gly Gly Arg Leu

690

695

700

Glu Leu Arg Lys Leu Glu Asn Val Thr Lys Ala Asp Ala Lys Ala Ala

705

710

715

720

Asn Leu Gly Lys Lys Glu Lys Leu Thr Lys Leu Thr Leu Ile Trp Thr

725

730

735

Asp Gln Glu Tyr Lys Glu Ala Gln Ser Asn Asn His Lys Glu Val Leu

740

745

750

Glu Gly Leu Thr Pro His Glu Gly Leu Lys Val Leu Ser Ile Tyr His

755

760

765

Cys Gly Ser Ser Thr Cys Pro Thr Trp Met Asn Lys Leu Arg Asp Met

770

775

780

Val Gly Leu Glu Leu Asn Gly Cys Lys Asn Leu Glu Lys Leu Pro Pro

785

790

795

800

Leu Trp Gln Leu Pro Ala Leu Gln Val Leu Cys Leu Glu Gly Leu Gly

805

810

815

Ser Leu Asn Cys Leu Phe Asn Cys Asp Thr His Thr Pro Phe Thr Phe

820

825

830

Cys Arg Leu Lys Glu Leu Thr Leu Ser Asp Met Thr Asn Phe Glu Thr

835

840

845

Trp Trp Asp Thr Asn Glu Val Gln Gly Glu Glu Leu Met Phe Pro Glu

850

855

860

Val Glu Lys Leu Ser Ile Glu Ser Cys His Arg Leu Thr Ala Leu Pro

865

870

875

880

Lys Ala Ser Asn Ala Ile Ser Glu Ser Ser Gly Glu Val Ser Thr Val

885

890

895

Cys Arg Ser Ala Phe Pro Ala Leu Lys Glu Met Lys Leu Tyr Asp Leu

900

905

910

Arg Ile Phe Gln Lys Trp Glu Ala Val Asp Gly Thr Pro Arg Glu Glu

915

920

925

Ala Thr Phe Pro Gln Leu Asp Lys Leu Glu Ile Arg Gln Cys Pro Glu

930

935

940

Leu Thr Thr Leu Pro Glu Ala Pro Lys Leu Ser Asp Leu Glu Ile Ser

945

950

955

960

Lys Gly Asn Gln Gln Ile Ser Leu Gln Ala Ala Ser Arg His Ile Thr

965

970

975

Ser Leu Ser Ser Leu Val Leu His Leu Ser Thr Asp Asp Thr Glu Thr

980

985

990

Ala Ser Val Ala Lys Gln Gln Asp Ser Ser Asp Leu Val Ile Glu Asp

995

1000

1005

Glu Lys Trp Ser His Lys Ser Pro Leu Glu Leu Met Val Leu Ser

1010

1015

1020

Arg Cys Asn Leu Leu Phe Ser His Pro Ser Ala Leu Ala Leu Trp

1025

1030

1035

Thr Cys Phe Ala Gln Leu Leu Asp Leu Lys Ile Arg Tyr Val Asp

1040

1045

1050

Ala Leu Val Ser Trp Pro Glu Glu Val Phe Gln Gly Leu Val Ser

1055

1060

1065

Leu Arg Lys Leu Glu Ile Ser Val Cys Glu Asn Leu Thr Gly His

1070

1075

1080

Thr Gln Ala Arg Gly Gln Ser Thr Pro Ala Pro Ser Glu Leu Leu

1085

1090

1095

Pro Arg Leu Glu Ser Leu Glu Ile Thr Cys Cys Asp Ser Ile Val

1100

1105

1110

Glu Val Pro Asn Leu Pro Ala Ser Leu Lys Leu Leu Glu Ile Arg

1115

1120

1125

Gly Cys Pro Gly Leu Glu Ser Ile Val Phe Asn Gln Gln Gln Asp

1130

1135

1140

Arg Thr Met Leu Val Ser Ala Glu Ser Phe Ala Glu Gln Asp Lys

1145

1150

1155

Ser Ser Leu Ile Ser Gly Ser Thr Ser Glu Thr Asn Asp His Val

1160

1165

1170

Leu Pro Arg Leu Glu Ser Leu Val Ile Asn Trp Cys Asp Arg Leu

1175

1180

1185

Glu Val Leu His Leu Pro Pro Ser Ile Lys Lys Leu Gly Ile Tyr

1190

1195

1200

Ser Cys Glu Lys Leu Arg Ser Leu Ser Val Lys Leu Asp Ala Val

1205

1210

1215

Arg Glu Leu Ser Ile Arg His Cys Gly Ser Leu Lys Ser Leu Glu

1220

1225

1230

Ser Cys Leu Gly Glu Leu Ala Ser Leu Gln Gln Leu Lys Leu Phe

1235

1240

1245

Asp Cys Lys Ser Leu Glu Ser Leu Pro Lys Gly Pro Gln Ala Tyr

1250

1255

1260

Ser Ser Leu Thr Ser Leu Glu Ile Arg Gly Cys Ser Gly Ile Lys

1265

1270

1275

Val Leu Pro Pro Ser Leu Gln Gln Arg Leu Asp Asp Ile Glu Asp

1280

1285

1290

Lys Glu Leu Asp Ala Cys Tyr Glu Glu Ala Glu Ala Glu Pro Lys

1295

1300

1305

Ser Arg His Arg Gln Ser Ala Ile Ser Arg Leu Met Cys Leu Lys

1310

1315

1320

<210> 4

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 4

ctccctgact gaagaagaga agag

24

<210> 5

<211> 25

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 5

tgctagctgt gattctctta tgatg

25

<210> 6

<211> 32

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 6

cggaattcct ccctgactga agaagagaag ag

32

<210> 7

<211> 33

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 7

cggaattctg ctactgtga ttctcttatg atg

33

<210> 8

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 8

tccccccggg atggcggagc taatggccac

30

<210> 9

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 9

gctctagact acttcaagca catcagccta

30

<210> 10

<211> 28

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 10

cggaattcat ggtggagcac gacactct 28

<210> 11

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 11

tccccccggg atctcattgc cccccgggat 30

<210> 12

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> môi

<400> 12

ctgctgctgc tctcgattg 20

<210> 13

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> môi

<400> 13

cagggaagct ccaagaacag 20

<210> 14

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 14

tccaccttg caaatccaat 20

<210> 15

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 15

cttcttctc tggctggcta 20

<210> 16

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 16

ccggcgagaa gttctacctc 20

<210> 17

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 17

gctgtaatcc tgcgtgtcct 20

<210> 18

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mới

<400> 18

tgtgggtttt gcttctcact t 21

<210> 19

<211> 22

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mới

<400> 19

caaaccactg tgagtacggc ta 22

<210> 20

<211> 26

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 20

agaaatggtg aaagatggtg ctaccg

26

<210> 21

<211> 25

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 21

ctgaatgttc ttcaactccc agtgc

25

<210> 22

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 22

agcgttaagc gccattatca

20

<210> 23

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 23

cgccgaggca ttagagtaga

20

<210> 24

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 24

ctgctgctgc tctcgtattg

20

<210> 25

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 25

cagggaagct ccaagaacag

20

<210> 26

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 26

gcaaataatgt gcatacctgg a

21

<210> 27

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 27

ctgacatctc cgcctgga

18