



(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)



1-0025154

(51)⁷ A01H 5/00; G01N 21/76; A01H 1/02; (13) B
A01H 5/02; A01H 5/04; A01H 5/06;
A01H 5/10; A01H 5/12; A01N 37/14;
A01N 57/20; A01P 13/00; C07H 21/04;
C12N 15/29; C12N 15/82; C12Q 1/68;
A01C 7/00; A01G 1/00

(21) 1-2013-02976

(22) 21/02/2012

(86) PCT/US2012/025945 21/02/2012

(87) WO2012/115968 30/08/2012

(30) 13/032,142 22/02/2011 US

(45) 25/08/2020 389

(43) 25/12/2013 309A

(73) DOW AGROSCIENCES LLC (US)

9330 Zionsville Road, Indianapolis, IN 46268, United States of America

(72) BRAXTON, Leon, B. (US); PETERSON, Mark (US); McMASTER, Steven (US);
WRIGHT, Terry (US).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) PHƯƠNG PHÁP KHỎNG CHẾ CỎ ĐẠI TRONG VÙNG GIEO HẠT CHỨA GEN
AAD-1

(57) Sáng chế đề cập đến việc dùng thuốc diệt cỏ vào vùng hoặc cánh đồng được gieo hạt chứa biến thể gen AAD-1 trước khi gieo hạt và/hoặc trước khi hạt nảy mầm. Theo một số phương án ưu tiên, hạt này chứa biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô. Theo một số phương án ưu tiên, thuốc diệt cỏ có thể là chế phẩm chứa hoạt chất 2,4-D. Các thuốc diệt cỏ và chế phẩm này cũng có thể được sử dụng bằng cách đưa vào trước khi gieo hạt. Các thuốc diệt cỏ khác, như glyphosat, có thể được sử dụng kết hợp, bao gồm việc đưa vào trước khi gieo hạt.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp không chế cỏ dại liên quan đến thực vật AAD-1 và việc dùng thuốc diệt cỏ trước khi gieo hạt và/hoặc trước khi hạt nảy mầm.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Gen *aad-1* (có nguồn gốc từ *Sphingobium herbicidovorans*) mã hoá protein aryloxyalkanoat dioxygenaza (AAD-1). Tính trạng này tạo ra tính kháng các thuốc diệt cỏ axit 2,4-điclophenoxyaxetic và aryloxyphenoxypropionat (thường được gọi là thuốc diệt cỏ “fop” như quizalofop) và có thể được sử dụng làm chất chỉ dấu để chọn lọc trong quá trình biến nạp thực vật và trong gây giống tại vườn ươm. Bản thân gen *aad-1*, với tính kháng thuốc diệt cỏ ở thực vật, được bộc lộ lần đầu trong WO 2005/107437 (xem US 2009-0093366).

Sự biểu hiện của các gen khác loại hoặc ngoại lai ở thực vật bị ảnh hưởng bởi vị trí mà gen ngoại lai được xen vào trong nhiễm sắc thể. Điều này có thể là do cấu trúc chất nhiễm sắc (ví dụ, chất dị nhiễm sắc) hoặc sự lân cận của các yếu tố điều hòa phiên mã (ví dụ, gen tăng cường) gần với vị trí tích hợp (Weising *et al.*, *Ann. Rev. Genet* 22:421-477, 1988), chẳng hạn. Cùng một gen trong cùng một loại thực vật chuyển gen (hoặc sinh vật khác) có thể có mức độ biểu hiện với khoảng biến thiên rộng giữa các biến thể gen khác nhau. Cũng có thể có khác biệt về các kiểu biểu hiện không gian hoặc thời gian. Ví dụ, sự khác biệt về biểu hiện tương đối của gen chuyển trong các mô thực vật khác nhau có thể không tương ứng với các kiểu được kỳ vọng từ các yếu tố điều hòa phiên mã có mặt trong cấu trúc gen được đưa vào.

Do đó, số lượng lớn các biến thể gen thường được tạo ra và sàng lọc để xác định biến thể gen biểu hiện gen quan tâm được đưa vào ở mức thỏa đáng nhằm mục đích đã cho. Nhằm các mục đích thương mại, người ta thường tạo ra hàng trăm đến hàng nghìn biến thể gen khác nhau và sàng lọc các biến thể gen đó để chọn một biến thể gen có mức độ và kiểu biểu hiện gen chuyển mong muốn. Biến thể gen có mức độ và/hoặc kiểu biểu hiện gen chuyển mong muốn có thể được sử dụng để đưa gen chuyển vào các nền di truyền khác nhờ lai hữu tính cùng giống bằng các phương pháp gây giống thông thường. Con

cháu của các con lai này giữ được các đặc tính biểu hiện gen chuyển của thể biến nạp ban đầu. Phương pháp này được sử dụng để bảo đảm sự biểu hiện gen tin cậy trong một số giống được làm thích ứng tốt với các điều kiện sinh trưởng cục bộ.

Các đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 20020120964 A1 và 20040009504 A1 đề cập đến biến thể gen PV-GHGT07(1445) của cây bông cùng chế phẩm và phương pháp phát hiện nó. WO 02/100163 đề cập đến biến thể gen MONI5985 của cây bông cùng chế phẩm và phương pháp phát hiện nó. WO 2004/011601 đề cập đến biến thể gen MON863 của cây ngô, chế phẩm và phương pháp phát hiện nó. WO 2004/072235 đề cập đến biến thể gen MON88913 của cây bông, chế phẩm và phương pháp phát hiện nó.

WO 2006/098952 đề cập đến biến thể gen 3272 của cây ngô. WO 2007/142840 đề cập đến biến thể gen MIR162 của cây ngô.

Patent Mỹ số 7,179,965 đề cập đến cây bông có biến thể gen cry1F và biến thể gen cry1Ac.

Cây ngô AAD-1 có biến thể gen đặc hiệu được bộc lộ trong bản mô tả này đã không được bộc lộ trước đó.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến việc dùng thuốc diệt cỏ vào vùng hoặc cánh đồng được gieo hạt chứa biến thể gen AAD-1 trước khi gieo hạt và/hoặc trước khi hạt nảy mầm. Theo một số phương án ưu tiên, hạt này chứa biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô. Theo một số phương án ưu tiên, thuốc diệt cỏ có thể là chế phẩm chứa hoạt chất 2,4-D. Các thuốc diệt cỏ và chế phẩm này cũng có thể được sử dụng bằng cách đưa vào trước khi gieo hạt. Các thuốc diệt cỏ khác, như glyphosat, có thể được sử dụng kết hợp, bao gồm việc đưa vào trước khi gieo hạt.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện sơ đồ plasmit của pDAS1740.

Fig.2 thể hiện các thành phần của đoạn xen vào DAS-40278-9 (pDAS1740).

Fig.3 thể hiện sơ đồ cắt hạn chế và các thành phần của đoạn xen vào DAS-40278-9 (pDAS1740).

Fig.4 thể hiện các amplicon, đoạn môi, và phương pháp tách dòng đối với đoạn xen ADN và các biên của DAS-40278-9.

Fig.5 minh họa các vị trí đoạn môi tương ứng với đoạn xen và biên của DAS-40278-9.

Fig.6 minh họa vùng nối và xen đoạn của DAS-40278-9.

Fig.7 là sơ đồ gây giống được đề cập trong ví dụ 7.

Mô tả vắn tắt các trình tự

Các SEQ ID NO:1-28 là các đoạn môi như được nêu trong bản mô tả này.

SEQ ID NO:29 chỉ ra đoạn xen và các trình tự bên sườn cho biến thể gen DAS-40278-9.

Các SEQ ID NO:30-33 là các đoạn môi cho các chỉ dấu bên sườn như được mô tả trong ví dụ 4.

Mô tả chi tiết các phương án thực hiện sáng chế

Sáng chế đề cập đến việc dùng thuốc diệt cỏ vào vùng hoặc cánh đồng mà về sau được gieo hạt chứa biến thể gen AAD-1 trước khi gieo hạt và/hoặc trước khi hạt nảy mầm. Theo một số phương án ưu tiên, hạt này chứa biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô. Theo một số phương án ưu tiên, thuốc diệt cỏ có thể là chế phẩm chứa hoạt chất 2,4-D. Các thuốc diệt cỏ và chế phẩm này cũng có thể được sử dụng bằng cách đưa vào trước khi gieo hạt. Các thuốc diệt cỏ khác, như glyphosat, có thể được sử dụng kết hợp, bao gồm việc đưa vào trước khi gieo hạt. Sáng chế không bị giới hạn ở cây ngô mà còn có thể bao gồm việc sử dụng cây bông và/hoặc cây đậu tương, chẳng hạn, chứa gen aad-1.

Các ví dụ được trình bày trong bản mô tả này đề cập một phần đến việc dùng thuốc diệt cỏ trước khi gieo hạt và/hoặc trước khi hạt nảy mầm. Việc dùng này không bị giới hạn ở biến thể gen "278". Tính kháng được tạo ra bởi gen AAD-1 còn có ích ở chỗ rút ngắn được thời gian luân canh. Điều này giúp cho người trồng trọt có thể linh hoạt hơn trong việc lên kế hoạch gieo trồng sau khi diệt cỏ (burndown). Khi không sử dụng theo sáng chế, việc phải đợi 7-30 ngày hoặc tương đương sau khi diệt cỏ trước khi gieo hạt có thể gây thiệt hại đáng kể về năng suất. Do đó, sáng chế mang lại lợi ích về mặt này. Xem, ví dụ 13 chẳng hạn. Các khoảng thời gian gieo trồng / dùng thuốc diệt cỏ bất kỳ, và khoảng nồng độ

mức dùng bất kỳ của (các) thuốc diệt cỏ được nêu hoặc đề xuất trong bản mô tả này đều có thể được sử dụng theo sáng chế.

Do đó, sáng chế đề xuất các phương pháp dùng thuốc diệt cỏ mới. Việc dùng này có thể bao gồm việc trộn nhiều hơn một thuốc diệt cỏ trong thùng. Một số thuốc diệt cỏ được ưu tiên để sử dụng theo sáng chế bao gồm thuốc diệt cỏ phenoxy auxin như 2,4-D; 2,4-DB; MCPA; MCPB. Các thuốc diệt cỏ này có thể được xếp chồng với một hoặc nhiều gen kháng thuốc diệt cỏ bổ sung và thuốc diệt cỏ tương ứng (ví dụ, glyphosat và/hoặc glufosinat). Một, hai, ba, hoặc nhiều thuốc diệt cỏ có thể được sử dụng ở dạng kết hợp có lợi là dạng kết hợp hiển nhiên đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này được lợi từ sáng chế. Một hoặc nhiều thuốc diệt cỏ theo sáng chế có thể được đưa vào cánh đồng/vùng trước khi trồng cây bằng hạt theo sáng chế. Việc dùng này có thể là trong vòng 14 ngày sau khi trồng cây chẳng hạn. Một hoặc nhiều thuốc diệt cỏ theo sáng chế cũng có thể được đưa vào khi trồng và/hoặc sau khi trồng nhưng trước khi cây nảy mầm. Một hoặc nhiều thuốc diệt cỏ theo sáng chế cũng có thể được đưa vào đất (để khống chế cỏ dại) hoặc lên trên cỏ dại và/hoặc thực vật chuyển gen theo sáng chế. Ba thuốc diệt cỏ theo sáng chế có thể được luân phiên hoặc được sử dụng kết hợp để, ví dụ, khống chế hoặc ngăn ngừa cỏ dại mà có thể kháng một thuốc diệt cỏ nhưng không kháng thuốc diệt cỏ khác. Các thời điểm dùng khác nhau của ba loại thuốc diệt cỏ được nêu có thể được áp dụng theo nhiều cách khác nhau như đã biết trong lĩnh vực này.

Do đó, sáng chế cũng đề cập đến việc đưa thuốc diệt cỏ trước khi gieo hạt vào vùng hoặc cánh đồng mà về sau được gieo hạt chứa biến thể gen AAD-1. Theo một số phương án ưu tiên, hạt này chứa biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô. Theo một số phương án ưu tiên, thuốc diệt cỏ có thể là chế phẩm chứa hoạt chất 2,4-D. Các thuốc diệt cỏ và chế phẩm này có thể được sử dụng bằng cách đưa vào trước khi gieo hạt. Các thuốc diệt cỏ khác, như glyphosat, có thể được sử dụng kết hợp trong việc dùng trước khi trồng. Cây ngô, cây bông, và cây đậu tương, chẳng hạn, có thể được sử dụng trong các phương án bất kỳ này.

Gen aad-1 có thể được kết hợp với, ví dụ, các tính trạng mã hoá tính kháng glyphosat (ví dụ, thực vật hoặc vi khuẩn kháng *EPSPS*, *GOX*, *GAT*), tính kháng glufosinat (ví dụ, *Pat*, *bar*), tính kháng thuốc diệt cỏ ức chế axetolactat syntaza (ALS) (ví dụ, các imidazolinon [như imazethapyr], các sulfonylure, triazolopyrimidin sulfonanilit, các

pyrimidinylthiobenzoat, và các hóa chất khác [*Csr1*, *SurA*, *et al.*]), tính kháng bromoxynil (ví dụ, *Bxn*), tính kháng với các chất ức chế của enzyme HPPD (4-hydroxylphenyl-pyruvate dioxygenase), tính kháng với các chất ức chế của phytoene desaturase (PDS), tính kháng với các thuốc diệt cỏ ức chế hệ thống quang hóa II (ví dụ, *psbA*), tính kháng với các thuốc diệt cỏ ức chế hệ thống quang hóa I, tính kháng với các thuốc diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidase IX (PPO) (ví dụ, *PPO-1*), tính kháng với các thuốc diệt cỏ phenylurea (ví dụ, *CYP76B1*), enzyme phân hủy dicamba (xem, ví dụ, US 20030135879), và các tính trạng khác có thể được xếp chồng đơn lẻ hoặc trong nhiều kết hợp để tạo ra khả năng không chế hoặc ngăn ngừa một cách hiệu quả các đợt cỏ dại và/hoặc tính kháng với thuốc diệt cỏ bất kỳ thuộc các nhóm nêu trên.

Đối với các thuốc diệt cỏ bổ sung, một số chất ức chế ALS bổ sung được ưu tiên (còn được gọi là AHAS) bao gồm các triazolopyrimidin sulfonanilic (như cloransulam-methyl, diclosulam, florasulam, flumetsulam, metosulam, và penoxsulam), các pyrimidinylthiobenzoat (như bispyribac và pyriithiobac), và flucarbazone. Một số chất ức chế HPPD được ưu tiên bao gồm mesotrione, isoxaflutole, và sulcotrion. Một số chất ức chế PPO được ưu tiên bao gồm flumiclorac, flumioxazin, flufenpyr, pyraflufen, fluthiacet, butafenacil, carfentrazone, sulfentrazone, và các diphenylete (như acifluorfen, fomesafen, lactofen, và oxyfluorfen).

Các gen AAD-1 để sử dụng theo sáng chế cũng có thể tạo ra tính kháng với các hợp chất mà được chuyển hóa thành các thuốc diệt cỏ phenoxyacetat auxin (ví dụ, 2,4-DB, MCPB, v.v.). Gốc axit butyric có mặt trong thuốc diệt cỏ 2,4-DB được chuyển hóa qua sự oxy hoá β thành axit phytotoxic 2,4-diclophenoxyacetic. Tương tự như vậy, MCPB được chuyển hóa qua sự oxy hoá β thành phytotoxic MCPA. Các thuốc diệt cỏ axit butanoic bản thân không có tác dụng diệt cỏ. Chúng được chuyển hóa thành axit tương ứng của chúng nhờ sự oxy hoá β trong các thực vật mầm cảm, và nó là dạng axit axetic của thuốc diệt cỏ gây độc thực vật. Các thực vật không thể oxy hoá β nhanh không bị gây hại bởi các thuốc diệt cỏ axit butanoic. Tuy nhiên, các thực vật có khả năng oxy hoá β nhanh và có thể chuyển hóa thuốc diệt cỏ axit butanoic thành dạng axetic sau đó được bảo vệ bởi AAD-1.

Được bao gồm trong bản mô tả này là biến thể gen AAD-1 của cây ngô được gọi là DAS-40278-9 có mặt trong hạt được lưu giữ ở Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Mỹ (American Type Culture Collection - ATCC) với số lưu giữ PTA-10244, và con cháu có

nguồn gốc từ đó. Các khía cạnh khác bao gồm các cây con cháu, hạt giống và hạt hoặc các phần có thể tái sinh của các thực vật và hạt và con cháu của biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô, cũng như thức ăn hoặc các sản phẩm thực phẩm được làm từ thành phần bất kỳ của nó. Bản mô tả này còn bao gồm các phần thực vật của biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô bao gồm, nhưng không giới hạn ở, phần hoa, noãn, hoa, cành non, rễ, và lá, và các nhân của các tế bào sinh dưỡng, các tế bào phần hoa, và các tế bào trứng. Sáng chế còn bộc lộ cây ngô có khả năng kháng các thuốc diệt cỏ phenoxy auxinic và/hoặc aryloxyalkanoat, chế phẩm di truyền mới chứa biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô, và các khía cạnh về tính chất nông học của cây ngô chứa biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô.

Sáng chế bao gồm các phương pháp gây giống thực vật và các thực vật kháng thuốc diệt cỏ, chứa biến thể gen biến nạp *aad-1* trong cây ngô chứa trình tự polynucleotit, như được nêu trong bản mô tả này, được xen vào vị trí cụ thể trong hệ gen của tế bào cây ngô.

Theo một số phương án, biến thể gen / trình tự polynucleotit này có thể được “xếp chồng” với các tính trạng khác, bao gồm, ví dụ, (các) gen kháng thuốc diệt cỏ khác và/hoặc các protein ức chế côn trùng. Các thực vật có một biến thể gen cũng được mô tả trong bản mô tả này.

Các tính trạng bổ sung có thể được xếp chồng vào hệ gen thực vật thông qua việc gây giống thực vật, tái biến nạp thực vật chuyển gen chứa biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô, hoặc bổ sung các tính trạng mới qua sự tích hợp đích nhờ sự tái tổ hợp tương đồng.

Các phương án khác bao gồm việc cắt trình tự polynucleotit chứa biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô, bao gồm, ví dụ, băng biểu hiện gen *pat*. Khi cắt trình tự polynucleotit, biến thể gen được cải biến có thể được hướng đích lại ở vị trí nhiễm sắc thể cụ thể trong đó các trình tự polynucleotit bổ sung được xếp chồng với biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô.

Theo một phương án thực hiện, vị trí nhiễm sắc thể đích của cây ngô nằm trên nhiễm sắc thể 2 ở khoảng 20 cM giữa chỉ dấu SSR UMC1265 (xem SEQ ID NO:30 và SEQ ID NO:31) và MMC0111 (xem SEQ ID NO:32 và SEQ ID NO:33) ở khoảng 20 cM trên sơ đồ liên kết của cây ngô 2008 DAS, trong đó vị trí đích chứa axit nucleic khác loại. Theo một phương án khác là vị trí nhiễm sắc thể đích của cây ngô bao gồm vị trí được xác định trong hoặc bằng SEQ ID NO:29 và các phần còn lại của chúng như được nêu trong

bản mô tả này, như sẽ được công nhận bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Theo một phương án là phương pháp tạo ra cây ngô chuyển gen bao gồm bước xen axit nucleic khác loại ở vị trí trên nhiễm sắc thể 2 ở khoảng 20 cM giữa chỉ dấu SSR UMC1265 (xem SEQ ID NO:30 và SEQ ID NO:31) và MMC0111 (xem SEQ ID NO:32 và SEQ ID NO:33) ở khoảng 20 cM trên sơ đồ liên kết của cây ngô 2008 DAS. Theo một phương án khác nữa, axit nucleic khác loại xen vào được nằm bên sườn 5' bởi tất cả hoặc một phần của trình tự bên sườn 5' như được xác định trong bản mô tả này dựa trên SEQ ID NO:29, và nằm bên sườn 3' bởi tất cả hoặc một phần của trình tự bên sườn 5' như được xác định trong bản mô tả này dựa trên SEQ ID NO:29.

Ngoài ra, sáng chế bộc lộ các thử nghiệm để phát hiện sự có mặt của biến thể gen theo sáng chế trong mẫu (hạt ngô, chẳng hạn). Các thử nghiệm có thể dựa trên trình tự ADN của cấu trúc tái tổ hợp, được xen vào hệ gen của cây ngô, và trên các trình tự hệ gen bên sườn của vị trí xen đoạn. Các kit và các điều kiện hữu ích trong việc thực hiện các thử nghiệm cũng được đề xuất.

Sáng chế còn bộc lộ việc tách dòng và phân tích trình tự ADN của toàn bộ đoạn xen *AAD-1*, và các vùng biên của chúng (trong dòng cây ngô chuyển gen). Các trình tự này là duy nhất. Dựa trên các trình tự đoạn xen và biên này, các đoạn môi đặc hiệu biến thể gen được tạo ra. Phân tích PCR cho thấy rằng các biến thể gen này có thể được nhận diện bằng cách phân tích các amplicon PCR được tạo ra bằng các bộ đoạn môi đặc hiệu biến thể gen này. Do đó, các quy trình này và các quy trình liên quan khác có thể được sử dụng để nhận diện duy nhất dòng cây ngô chứa biến thể gen này.

Sáng chế còn mô tả việc sử dụng gây giống thực vật và các thực vật kháng thuốc diệt cỏ. Sáng chế bao gồm việc sử dụng các biến thể gen biến nạp của cây ngô (bắp) chứa các trình tự polynucleotit *aad-1* theo sáng chế, như được nêu trong bản mô tả này, được xen vào vị trí cụ thể trong hệ gen của tế bào cây ngô. Theo một số phương án, trình tự polynucleotit này có thể được “xếp chồng” với các tính trạng khác (như (các) gen kháng thuốc diệt cỏ khác và/hoặc (các) gen mã hóa protein ức chế côn trùng, chẳng hạn. Theo một số phương án, các trình tự polynucleotit này có thể được cắt và sau đó hướng đích lại với các trình tự polynucleotit bổ sung. Tuy nhiên, sáng chế bao gồm các thực vật có một biến thể gen, như được nêu trong bản mô tả này.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất các thử nghiệm để phát hiện sự có mặt của biến thể gen trong mẫu. Các khía cạnh bao gồm các phương pháp thiết kế và/hoặc tạo ra phân tử axit nucleic chẩn đoán bất kỳ được nêu hoặc đề xuất trong bản mô tả này, cụ thể là các phương pháp dựa trên toàn bộ hoặc một phần vào các trình tự bên sườn theo sáng chế.

Cụ thể hơn, sáng chế đề cập một phần đến biến thể gen của cây ngô chuyển gen DAS-40278-9 (còn được gọi là pDAS1740-278), việc sử dụng các dòng thực vật chứa các biến thể gen này, và việc tách dòng và phân tích các trình tự ADN của đoạn xen này, và/hoặc các vùng biên của chúng. Các dòng thực vật để sử dụng theo sáng chế có thể được phát hiện bằng cách sử dụng các trình tự được bộc lộ và đề xuất trong bản mô tả này. Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến các dòng cây ngô kháng thuốc diệt cỏ, và việc nhận diện chúng. Sáng chế đề cập một phần đến việc phát hiện sự có mặt của biến thể gen để xác định xem con lai hữu tính có chứa biến thể gen quan tâm không. Ngoài ra, phương pháp phát hiện biến thể gen được bao gồm và là hữu ích, ví dụ, đối với việc tuân theo các quy định cần phê chuẩn trước khi đưa ra thị trường và đánh dấu các thực phẩm có nguồn gốc từ cây mùa vụ tái tổ hợp, chẳng hạn. Có thể phát hiện sự có mặt của biến thể gen bằng phương pháp phát hiện axit nucleic bất kỳ đã biết như phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) hoặc tạo thể lai ADN bằng cách sử dụng đoạn dò axit nucleic. Thử nghiệm PCR đặc hiệu biến thể gen được bàn luận, ví dụ, bởi Windels và các đồng tác giả (Med. Fac. Landbouww, Univ. Gent 64/5b:459462, 1999). Thử nghiệm này liên quan đến việc nhận diện biến thể gen của cây đậu tương kháng glyphosat 40-3-2 bằng PCR bằng cách sử dụng bộ đoạn mỗi nối mỗi nối giữa đoạn xen và ADN bên sườn. Cụ thể hơn, một đoạn mỗi chứa trình tự từ đoạn xen và đoạn mỗi thứ hai chứa trình tự từ ADN bên sườn.

Cây ngô được cải biến bằng cách xen đoạn gen *aad-1* từ *Sphingobium herbicidovorans* mã hoá protein aryloxyalkanoat dioxygenaza (AAD-1). Tính trạng này tạo ra tính kháng các thuốc diệt cỏ axit 2,4-điclophenoxyaxetic và aryloxyphenoxypionat (thường được gọi là thuốc diệt cỏ “fop” như quizalofop) và có thể được sử dụng làm chất chỉ dấu dễ chọn lọc trong quá trình biến nạp thực vật và trong gây giống vườn ươm. Sự biến nạp cây ngô bằng đoạn ADN từ plasmid pDAS1740 được thực hiện về phía trước, qua gây giống, để tạo ra biến thể gen DAS-40278-9.

Các mẫu ADN hệ gen được tách từ hai mươi cây ngô riêng rẽ có nguồn gốc từ năm thế hệ và bốn cây mỗi thế hệ biến thể gen DAS-40278-9 được chọn để mô tả đặc điểm

phân tử của biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô AAD-1. Sự biểu hiện protein AAD-1 được thử nghiệm bằng cách sử dụng kit băng thử nhanh đặc hiệu AAD-1. Chỉ các thực vật được thử nghiệm dương tính đối với sự biểu hiện protein AAD-1 được chọn để mô tả đặc điểm phân tử tiếp sau. Kỹ thuật tạo thể lai Southern xác nhận rằng gen *aad-1* có mặt trong cây ngô được thử nghiệm dương tính đối với sự biểu hiện protein AAD-1, và gen *aad-1* được xen dưới dạng bản sao đơn nguyên vẹn trong các thực vật này khi được lai với đoạn dò của gen *aad-1*.

Mô tả đặc điểm phân tử của ADN được xen trong biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô AAD-1 cũng được nêu trong bản mô tả này. Biến thể gen này được tạo ra nhờ biến nạp Whiskers bằng mảnh *Fsp* I của plasmit pDAS1740. Phân tích thẩm tách Southern được sử dụng để thiết lập mẫu tích hợp của đoạn ADN được xen và xác định đoạn xen/số bản sao của gen *aad-1* trong biến thể gen DAS-40278-9. Dữ liệu thu được để chứng minh sự tích hợp và trạng thái nguyên vẹn của gen chuyển *aad-1* được xen vào hệ gen cây ngô. Việc mô tả đặc điểm tích hợp của các vùng không mã hóa (được dự định để điều hòa các vùng mã hóa), như các trình tự khởi đầu và các trình tự kết thúc, các vùng gắn chất nền RB7 Mar v3 và RB7 Mar v4, cũng như độ ổn định của đoạn xen gen chuyển qua các thế hệ, được đánh giá. Tính ổn định của ADN được xen được thể hiện qua năm thế hệ thực vật riêng rẽ. Ngoài ra, sự vắng mặt sự biến nạp trình tự xương sống plasmit chứa vùng gen kháng Ampicillin (*Ap^r*) được thể hiện bằng các đoạn dò phủ gần như toàn bộ vùng xương sống bên sườn các vị trí giới hạn (*Fsp* I) của plasmit pDAS1740. Sơ đồ vật lý chi tiết của việc xen đoạn được vẽ dựa trên các phân tích thẩm tách Southern của biến thể gen DAS-40278-9.

Các mức protein AAD-1 được xác định trong các mô cây ngô. Ngoài ra, việc phân tích thành phần được thực hiện trên cây ngô làm thức ăn cho gia súc và hạt để khảo sát tính tương đương giữa dòng cây ngô không được biến nạp đồng hợp tử và dòng cây ngô chuyển gen DAS-40278-9 (không được phun, được phun bằng 2,4-D, được phun bằng quizalofop, và được phun bằng 2,4-D và quizalofop). Các đặc tính nông học của dòng cây ngô không được biến nạp đồng hợp tử còn được so sánh với cây ngô DAS-40278-9.

Sự biểu hiện trên cánh đồng, thành phần dinh dưỡng, và các thử nghiệm nông học của đối chứng không chuyển gen và dòng cây ngô thể lai chứa Aryloxyalkanoat Dioxygenaza-1 (AAD-1) được tiến hành trong cùng năm ở sáu vị trí ở Iowa, Illinois (2 vị

trí), Indiana, Nebraska và Ontario, Canada. Các mức độ biểu hiện được tóm tắt trong bản mô tả này đối với protein AAD-1 trong lá, phần hoa, rễ, cây ngô làm thức ăn cho gia súc, toàn bộ cây, và hạt, các kết quả xác định nông học, và phân tích thành phần của các mẫu cây làm thức ăn cho gia súc và hạt từ cây ngô đối chứng và cây ngô AAD-1 DAS-40278-9.

Protein AAD-1 hòa tan chiết được được đo bằng cách sử dụng phương pháp thử nghiệm hấp thụ miễn dịch được liên kết enzym (ELISA) định lượng trong lá, phần hoa, rễ, forage, toàn bộ cây, và hạt cây ngô. Các giá trị biểu hiện trung bình khá được quan sát thấy trong mô rễ và phần hoa, như được bàn luận chi tiết hơn trong bản mô tả này. Các giá trị biểu hiện là tương tự đối với tất cả các biện pháp xử lý phun cũng như đối với các ô được phun và không được phun bằng các thuốc diệt cỏ 2,4-D và quizalofop.

Các phân tích thành phần, bao gồm các thành phần chính, chất khoáng, axit amin, axit béo, vitamin, các kháng chất dinh dưỡng, và các chất chuyển hóa thứ cấp được tiến hành để khảo sát tính tương đương của cây ngô AAD-1 DAS-40278-9 (có hoặc không xử lý bằng thuốc diệt cỏ) so với đối chứng. Các kết quả đối với các mẫu thành phần AAD-1 DAS-40278-9 đều tốt bằng, hoặc hơn so với (về sinh học và nông học), dựa trên các dòng đối chứng và/hoặc cây ngô thông thường, phân tích dữ liệu nông học thu được từ các đồ thị cây ngô đối chứng và AAD-1 DAS-40278-9.

Như được ám chỉ trên đây trong phần tình trạng kỹ thuật, việc đưa và tích hợp gen chuyển vào hệ gen thực vật bao gồm một số biến thể gen ngẫu nhiên (vì vậy tên “biến thể gen” đối với xen đoạn đã cho được biểu hiện). Nghĩa là, bằng nhiều kỹ thuật biến nạp như biến nạp *Agrobacterium*, “súng bắn gen,” và WHISKERS, không thể dự đoán được vị trí trong hệ gen mà gen chuyển sẽ được xen vào. Do đó, việc nhận diện ADN hệ gen bên sườn của thực vật trên cả hai mặt của đoạn xen có thể là quan trọng để nhận diện thực vật có biến thể gen xen đoạn đã cho. Ví dụ, các đoạn môi PCR có thể được thiết kế tạo ra amplicon PCR qua vùng nối của đoạn xen và hệ gen vật chủ. Amplicon PCR này có thể được sử dụng để nhận diện loại biến thể gen xen đoạn duy nhất hoặc riêng biệt.

Do “biến thể gen” là biến thể gen có nguồn gốc ngẫu nhiên, như một phần của sáng chế này, ít nhất 2500 hạt của dòng cây ngô chứa biến thể gen này đã được lưu giữ và cung cấp cho cộng đồng mà không giới hạn (nhưng theo quyền patent), ở Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật mỹ (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA, 20110. Việc lưu giữ được chỉ định dưới dạng số lưu giữ ATCC PTA-10244 (hạt ngô lai đốm vàng (*Zea Mays*

L.):DAS-40278-9; Được lưu giữ dưới tên của Dow AgroSciences LLC; Ngày nhận hạt/chủng bởi ATTC: ngày 10 tháng bảy năm 2009; khả năng sống được xác nhận ngày 17 tháng tám năm 2009). Việc lưu giữ này được thực hiện và sẽ được duy trì theo và dưới các điều khoản của Hiệp ước Budapest (Budapest Treaty) đối với hạt lưu giữ nhằm các mục đích của thủ tục patent. Việc lưu giữ sẽ được duy trì mà không giới hạn ở nơi lưu giữ ATCC, là nơi lưu giữ công cộng, trong giai đoạn 30 năm, hoặc năm năm sau yêu cầu gần nhất, hoặc trong thời gian tồn tại hiệu quả của patent, tùy theo thời gian nào lâu hơn, và sẽ được thay thế nếu nó không có khả năng sống trong giai đoạn đó.

Các hạt được lưu giữ là một phần của sáng chế này. Rõ ràng, cây ngô có thể được phát triển từ các hạt này, và các cây này là một phần của sáng chế. Sáng chế cũng đề cập đến trình tự ADN được chứa trong các cây ngô này, các trình tự này là hữu ích để phát hiện các cây này và con cháu của nó. Các phương pháp phát hiện và kit của sáng chế có thể nhằm nhận diện bất kỳ một, hai, hoặc thậm chí tất cả ba trong các biến thể gen này, tùy thuộc vào mục đích cuối cùng của thử nghiệm.

Các định nghĩa và ví dụ được đưa ra trong bản mô tả này để giúp mô tả sáng chế và hướng dẫn người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này thực hiện sáng chế. Trừ khi có lưu ý khác, các thuật ngữ được hiểu theo cách sử dụng thông thường bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực liên quan. Danh pháp cho các bazơ ADN như được nêu ở 37 CFR §1.822 được sử dụng.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "con cháu" chỉ con của thể hệ bất kỳ của tầng lớp bố mẹ chứa biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô AAD-1.

“Biến thể gen” chuyển gen được tạo ra bằng cách biến nạp các tế bào thực vật bằng ADN khác loại, *tức là*, cấu trúc axit nucleic chứa gen chuyển quan tâm, tái sinh quần thể thực vật thu được từ việc xen đoạn gen chuyển vào hệ gen của thực vật, và chọn lọc cây cụ thể được đặc trưng bởi việc xen đoạn vào vị trí hệ gen cụ thể. Thuật ngữ “biến thể gen” chỉ thể biến nạp ban đầu và con cháu của thể biến nạp này chứa ADN khác loại. Thuật ngữ “biến thể gen” còn chỉ con cháu được tạo ra bằng cách lai hữu tính giữa thể biến nạp và một giống khác chứa ADN hệ gen/gen chuyển. Ngay cả sau khi lai ngược lặp lại với bố mẹ lặp lại, ADN gen chuyển được xen và ADN hệ gen bên sườn (ADN hệ gen/gen chuyển) từ bố mẹ được biến nạp có mặt trong con cháu của con lai ở cùng vị trí nhiễm sắc thể. Thuật ngữ “biến thể gen” cũng chỉ ADN từ thể biến nạp ban đầu và con cháu của chúng chứa

ADN được xen và trình tự hệ gen bên sườn ngay cạnh ADN được xen mong muốn được chuyển sang con cháu nhận ADN được xen chứa gen chuyển quan tâm như là kết quả của việc lai hữu tính của một dòng bố mẹ chứa ADN được xen (ví dụ, thể biến nạp ban đầu và con cháu thu được từ việc tự thụ phấn) và dòng bố mẹ không chứa ADN được xen.

“Trình tự nối” kéo dài điểm ở đó ADN được xen vào hệ gen được liên kết với ADN từ hệ gen nguyên thể của cây ngô bên sườn điểm xen đoạn, nhận diện hoặc phát hiện một hoặc các trình tự nối khác trong vật liệu di truyền của thực vật là đủ để chẩn đoán biến thể gen. Được bao gồm là các trình tự ADN kéo dài sự xen đoạn trong các biến thể gen của cây ngô được nêu trong bản mô tả này và các độ dài tương tự của ADN bên sườn. Các ví dụ cụ thể của các trình tự chẩn đoán này được đưa ra trong bản mô tả này; tuy nhiên, các trình tự khác gói chồng điểm nối của các vị trí xen đoạn, hoặc điểm nối của vị trí xen đoạn và trình tự hệ gen, cũng được xác định và có thể được sử dụng theo sáng chế.

Sáng chế bao gồm việc nhận diện các trình tự bên sườn, nối, và xen đoạn này. Các đoạn môi và các amplicon PCR liên quan được bao gồm. Các phương pháp phân tích PCR bằng cách sử dụng các amplicon kéo dài qua ADN được xen và các biên của nó có thể được sử dụng để phát hiện hoặc nhận diện các giống hoặc dòng cây ngô chuyển gen thương mại có nguồn gốc từ các dòng cây ngô chuyển gen độc quyền theo sáng chế.

Toàn bộ các trình tự của từng đoạn xen này, cùng với các phần của các trình tự bên sườn tương ứng, được đề xuất trong bản mô tả này dưới dạng SEQ ID NO:29. Các tọa độ của đoạn xen và các trình tự bên sườn của biến thể gen này so với SEQ ID NO:29 (tổng số 8557 cặp bazơ (bp)) được in dưới đây. Điều này được bàn luận chi tiết hơn trong ví dụ 3.8, chẳng hạn. Các phương án trước khi gieo hạt theo sáng chế bao gồm việc sử dụng protein AAD-1 được mã hóa bởi các gốc 1874-6689 nêu trong SEQ ID NO:29.

	5' bên sườn	Đoạn xen	3' bên sườn
# gốc (SEQ:29):	1-1873	1874-6689	6690-8557
độ dài (bp):	1873 bp	4816 bp	1868 bp

Biến thể gen xen đoạn này, và các thành phần khác của chúng, được minh họa thêm trên các fig.1 và 2. Các trình tự này (cụ thể là các trình tự bên sườn) là duy nhất. Dựa trên các trình tự đoạn xen và biên này, các đoạn môi đặc hiệu biến thể gen được tạo ra. Phân tích PCR cho thấy rằng các dòng cây ngô này có thể được nhận diện trong các kiểu gen cây

ngô khác nhau bằng cách phân tích các amplicon PCR được tạo ra bằng các bộ đoạn môi đặc hiệu biến thể gen này. Do đó, các quy trình này và các quy trình liên quan khác có thể được sử dụng để nhận diện duy nhất các dòng cây ngô này. Các trình tự được nhận diện trong bản mô tả này là duy nhất. Ví dụ, tìm kiếm BLAST đối với cơ sở dữ liệu Ngân hàng gen không phát hiện sự tương đồng đáng kể bất kỳ giữa các trình tự biên tách dòng và các trình tự trong cơ sở dữ liệu.

Các kỹ thuật phát hiện là đặc biệt hữu ích trong gây giống thực vật, để xác định xem các cây con cháu nào chứa biến thể gen đã cho, sau khi cây bố mẹ chứa biến thể gen quan tâm được lai với một dòng thực vật khác trong nỗ lực truyền một hoặc nhiều tính trạng bổ sung quan tâm cho con cháu. Các phương pháp phân tích PCR này giúp ích cho các chương trình gây giống cây ngô cũng như kiểm soát chất lượng, đặc biệt là đối với hạt ngô chuyển gen thương mại. Kit phát hiện PCR đối với các dòng cây ngô chuyển gen này hiện cũng có thể được chế tạo và sử dụng. Điều này cũng có thể giúp ích cho việc đăng ký sản phẩm và quản lý sản phẩm.

Ngoài ra, các trình tự cây ngô/hệ gen bên sườn có thể được sử dụng để nhận diện đặc hiệu vị trí hệ gen của từng đoạn xen. Thông tin này có thể được sử dụng để chế tạo các hệ chỉ dấu phân tử đặc hiệu cho mỗi biến thể gen. Hệ này có thể được sử dụng cho các phương pháp gây giống cấp tốc và thiết lập dữ liệu liên kết.

Hơn nữa, thông tin trình tự bên sườn có thể được sử dụng để nghiên cứu và mô tả các quy trình tích hợp gen chuyển, các đặc tính vị trí tích hợp hệ gen, sắp xếp biến thể gen, độ ổn định của gen chuyển và các trình tự bên sườn của chúng, và sự biểu hiện gen (đặc biệt là liên quan đến bất hoạt gen, các kiểu methyl hóa gen chuyển, các tác dụng vị trí, và các yếu tố liên quan đến sự biểu hiện tiềm năng như MARS [vùng gắn chất nền], và các yếu tố tương tự).

Sáng chế bao gồm các hạt có sẵn với số lưu giữ ATCC là PTA-10244. Sáng chế cũng bao gồm việc sử dụng cây ngô kháng thuốc diệt cỏ được phát triển từ hạt được lưu giữ ở ATCC với số lưu giữ PTA-10244. Sáng chế còn bao gồm việc sử dụng các phần của cây này, như lá, các mẫu mô, hạt được sản xuất bởi cây này, phần hoa, và các phần tương tự.

Hơn nữa, sáng chế bao gồm việc sử dụng các thực vật con cái và/hoặc con cháu của các cây được phát triển từ hạt được lưu giữ, tốt hơn là cây ngô kháng thuốc diệt cỏ trong

đó thực vật này có hệ gen chứa trình tự nối ADN hệ gen/ADN xen đoạn kiểu đại để phát hiện như được nêu trong bản mô tả này. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “cây ngô” có nghĩa là giống cây ngô (*Zea mays*) và bao gồm tất cả các giống của nó có thể được gây giống bằng cây ngô này.

Sáng chế có thể còn bao gồm các quy trình lai giống bằng cách sử dụng thực vật theo sáng chế làm ít nhất là một bố mẹ. Ví dụ, sáng chế bao gồm việc sử dụng cây lai F_1 có một hoặc cả hai bố mẹ là bố mẹ của các thực vật được nêu làm ví dụ trong bản mô tả này. Sáng chế cũng bao gồm việc sử dụng hạt được sản xuất bởi thể lai F_1 này theo sáng chế. Sáng chế bao gồm phương pháp sản xuất hạt của thể lai F_1 bằng cách lai thực vật được nêu làm ví dụ với thực vật khác (ví dụ, bố mẹ lai cùng dòng) và thu hạt của thể lai thu được. Sáng chế bao gồm việc sử dụng thực vật được nêu làm ví dụ là một trong số bố hoặc mẹ. Các đặc tính của các thực vật thu được có thể được cải thiện bằng cách xem xét cẩn thận các thực vật bố mẹ.

Cây ngô kháng thuốc diệt cỏ có thể được gây giống bằng cách thứ nhất lai hữu tính cây ngô bố mẹ thứ nhất bao gồm cây ngô được phát triển từ hạt của một trong số các dòng được đề cập trong bản mô tả này, và cây ngô bố mẹ thứ hai, từ đó tạo ra tập hợp các cây con cháu thứ nhất; và sau đó chọn lọc cây con cháu thứ nhất kháng với thuốc diệt cỏ (hoặc có ít nhất một trong số các biến thể gen theo sáng chế); và tự thụ phấn cây con cháu thứ nhất, từ đó tạo ra tập hợp cây con cháu thứ hai; và sau đó chọn lọc từ các cây con cháu thứ hai này thực vật kháng với thuốc diệt cỏ (hoặc có ít nhất một trong số các biến thể gen theo sáng chế). Các bước này có thể còn bao gồm lai ngược cây con cháu thứ nhất hoặc cây con cháu thứ hai với cây ngô bố mẹ thứ hai hoặc cây ngô bố mẹ thứ ba. Sản phẩm thu hoạch của cây ngô bao gồm hạt ngô theo sáng chế, hoặc con cháu của nó, hạt này sau đó có thể được trồng.

Cũng cần hiểu rằng hai thực vật chuyển gen khác nhau cũng có thể được phối giống để tạo ra con chứa hai gen ngoại sinh được bổ sung riêng độc lập. Tự thụ phấn các con cháu thích hợp có thể tạo ra các thực vật là đồng hợp tử đối với cả hai gen ngoại sinh được bổ sung. Lai ngược với thực vật bố mẹ và lai cùng giống với thực vật không chuyển gen cũng được tính đến, gọi là nhân giống vô tính. Các phương pháp gây giống khác thường được sử dụng đối với các tính trạng và sản phẩm thu hoạch khác nhau là đã biết trong lĩnh vực. Gây giống bằng lai ngược đã được sử dụng để chuyển các gen quy định tính trạng có

khả năng di truyền cao, được thừa hưởng đơn giản sang cây trồng đồng hợp tử mong muốn hoặc dòng lai cùng dòng, là bố mẹ lặp lại. Nguồn tính trạng để chuyển được gọi là bố mẹ cho. Thực vật thu được được kỳ vọng là có các thuộc tính của bố mẹ lặp lại (ví dụ, cây trồng) và tính trạng mong muốn được chuyển từ bố mẹ cho. Sau khi lai giống lần đầu, các cá thể có kiểu hình của bố mẹ cho được chọn và lai lặp lại (lai ngược) với bố mẹ lặp lại. Bố mẹ thu được được kỳ vọng là có các thuộc tính của bố mẹ lặp lại (ví dụ, cây trồng) và tính trạng mong muốn được chuyển từ bố mẹ cho.

Các phân tử ADN được bộc lộ trong bản mô tả này có thể được sử dụng làm các chỉ dấu phân tử trong phương pháp gây giống được hỗ trợ bởi các chất chỉ dấu (marker assisted breeding - MAB). Các phân tử ADN theo sáng chế có thể được sử dụng trong các phương pháp (như, chất chỉ dấu AFLP, chất chỉ dấu RFLP, chất chỉ dấu RAPD, SNP, và SSR) nhận diện các tính trạng hữu ích trong nông nghiệp được liên kết di truyền, như đã biết trong lĩnh vực. Tính trạng kháng thuốc diệt cỏ có thể được theo dõi ở con cháu của con lai với cây ngô theo sáng chế (hoặc con cháu của chúng và cây trồng hoặc giống ngô khác bất kỳ) bằng cách sử dụng các phương pháp MAB. Các phân tử ADN là các chỉ dấu cho tính trạng này, và phương pháp MAB đã biết trong lĩnh vực này có thể được sử dụng để theo dõi (các) tính trạng kháng thuốc diệt cỏ ở cây ngô trong đó ít nhất một dòng cây ngô theo sáng chế, hoặc con cháu của nó, là bố mẹ hoặc ông bà. Các phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng để nhận diện giống cây ngô bất kỳ có biến thể gen theo sáng chế.

Các phương pháp theo sáng chế bao gồm phương pháp tạo ra cây ngô kháng thuốc diệt cỏ trong đó phương pháp này bao gồm bước gây giống bằng thực vật để sử dụng trong sáng chế. Cụ thể hơn, các phương pháp này có thể bao gồm lai hai thực vật theo sáng chế, hoặc một thực vật theo sáng chế và thực vật khác bất kỳ. Các phương pháp được ưu tiên còn bao gồm chọn lọc con cháu của cây lai này bằng cách phân tích con cháu về biến thể gen có thể phát hiện theo sáng chế. Ví dụ, sáng chế có thể bao gồm theo dõi biến thể gen theo sáng chế qua các chu kỳ gây giống bằng các thực vật chứa các tính trạng mong muốn khác, ví dụ, các tính trạng nông học như các tính trạng được thử nghiệm trong bản mô tả này trong các ví dụ khác nhau. Các thực vật chứa biến thể gen theo sáng chế và tính trạng mong muốn có thể được phát hiện, nhận diện, chọn lọc, và sử dụng một cách nhanh chóng trong các chu kỳ gây giống tiếp, chẳng hạn. Biến thể gen / tính trạng theo sáng chế cũng có thể được kết hợp qua việc gây giống, và được theo dõi theo sáng chế, bằng (các) tính trạng

kháng côn trùng và/hoặc bằng các tính trạng kháng thuốc diệt cỏ khác. Một phương án thực hiện ưu tiên về các tính trạng kháng thuốc diệt cỏ là thực vật chứa biến thể gen được kết hợp với gen mã hoá tính kháng với thuốc diệt cỏ dicamba.

Ngoài ra, *AAD-1* đơn lẻ hoặc xếp chồng với một hoặc nhiều tính trạng HTC bổ sung có thể được xếp chồng với một hoặc nhiều tính trạng đầu vào bổ sung (ví dụ, tính kháng côn trùng, tính kháng nấm, hoặc khả năng chịu áp lực, v.v) hoặc tính trạng đầu ra (ví dụ, năng suất tăng, tính chất dầu được cải thiện, chất lượng sợi được cải thiện, v.v.). Do đó, sáng chế này có thể được sử dụng để tạo ra gói nông nghiệp hoàn chỉnh cải thiện chất lượng cây trồng với khả năng không chế linh hoạt và chi phí hiệu quả một số loài gây hại nông nghiệp bất kỳ.

Các phương pháp để tích hợp trình tự polynucleotit vào vị trí nhiễm sắc thể cụ thể của tế bào thực vật qua sự tái tổ hợp tương đồng đã được mô tả trong lĩnh vực này. Ví dụ, sự tích hợp cụ thể vị trí như được mô tả trong công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2009/0111188 A1 mô tả việc sử dụng recombinaza hoặc integraza làm trung gian đưa trình tự polynucleotit cho vào đích nhiễm sắc thể. Ngoài ra, đơn yêu cầu cấp patent quốc tế số WO 2008/021207 mô tả sự tái tổ hợp tương đồng qua trung gian ngón tay kềm để tích hợp một hoặc nhiều trình tự polynucleotit cho vào các vị trí cụ thể của hệ gen. Việc sử dụng các recombinaza như FLP/FRT như được mô tả trong patent Mỹ số 6,720,475 hoặc CRE/LOX như được mô tả trong patent Mỹ số 5,658,772 có thể được sử dụng để tích hợp trình tự polynucleotit vào vị trí nhiễm sắc thể cụ thể. Cuối cùng, việc sử dụng meganucleaza để hướng đích polynucleotit cho vào vị trí nhiễm sắc thể cụ thể được mô tả trong Puchta et al., PNAS USA 93 (1996) trang 5055-5060.

Các phương pháp khác nhau khác để tích hợp cụ thể vị trí vào các tế bào thực vật thường đã biết và có thể áp dụng được (Kumar et al., Trends in Plant Sci. 6(4) (2001) trang 155-159). Ngoài ra, các hệ tái tổ hợp cụ thể vị trí đã được nhận diện trong một số sinh vật chưa có nhân điển hình và sinh vật có nhân điển hình thấp hơn có thể được áp dụng để dùng trong các thực vật. Các ví dụ về các hệ này bao gồm, nhưng không giới hạn ở: hệ R/RS recombinaza từ plasmid pSR1 của nấm men *Zygosaccharomyces rouxii* (Araki et al. (1985) J. Mol. Biol. 182: 191-203), và hệ Gin/gix của thể thực khuẩn Mu (Maeser and Kahlmann (1991) Mol. Gen. Genet. 230: 170-176).

Theo một số phương án theo sáng chế, có thể mong muốn tích hợp hoặc xếp chồng (các) gen chuyển mới đến gần biến thể gen chuyển gen hiện có. Biến thể gen chuyển gen có thể được coi là locut hệ gen ưu tiên được chọn dựa trên các đặc tính duy nhất như vị trí xen đoạn đơn, sự phân ly bình thường của Mendel và sự biểu hiện ổn định, và kết hợp hiệu quả nổi trội, bao gồm tính kháng thuốc diệt cỏ và tính chất nông học trong và qua nhiều vị trí môi trường. Các gen chuyển mới được tích hợp duy trì các đặc tính biểu hiện gen chuyển của thể biến nạp hiện có. Ngoài ra, sự phát triển của các thử nghiệm để phát hiện và xác nhận biến thể gen mới được tích hợp sẽ được khắc phục do các trình tự bên sườn của hệ gen và vị trí nhiễm sắc thể của biến thể gen mới được tích hợp đã được nhận diện. Cuối cùng, sự tích hợp của gen chuyển mới vào vị trí nhiễm sắc thể cụ thể được liên kết với gen chuyển hiện có sẽ xúc tiến sự lai nhập của các gen chuyển vào nền di truyền khác bằng cách lai hữu tính cùng giống bằng cách sử dụng các phương pháp gây giống thông thường.

Theo một số phương án, có thể mong muốn cắt các trình tự polynucleotit từ biến thể gen chuyển gen. Ví dụ, việc cắt gen chuyển như được mô tả trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ tạm thời số 61/297,628 mô tả việc sử dụng ngón tay kềm nucleaza để loại bỏ trình tự polynucleotit, bao gồm băng biểu hiện gen, từ biến thể gen chuyển gen được tích hợp nhiễm sắc thể. Trình tự polynucleotit được loại bỏ có thể là chất chỉ dấu dễ chọn lọc. Khi cắt và loại bỏ trình tự polynucleotit, biến thể gen chuyển gen được cải biến có thể được hướng đích lại bằng cách xen trình tự polynucleotit. Việc cắt trình tự polynucleotit và hướng đích lại sau đó của biến thể gen chuyển gen được cải biến tạo ra các ưu điểm như tái sử dụng chất chỉ dấu dễ chọn lọc hoặc khả năng khắc phục các thay đổi không được dự tính trước đối với hệ sản phẩm phiên mã của thực vật là kết quả của việc biểu hiện các gen cụ thể.

Sáng chế bộc lộ vị trí cụ thể trên nhiễm sắc thể 2 trong hệ gen cây ngô, vị trí này là tuyệt vời để xen các axit nucleic khác loại. Sáng chế cũng bộc lộ chỉ dấu phân tử 5', chỉ dấu phân tử 3', trình tự bên sườn 5', và trình tự bên sườn 3' hữu ích trong việc nhận diện địa điểm của vị trí hướng đích trên nhiễm sắc thể 2. Do đó, sáng chế đề xuất phương pháp đưa các axit nucleic khác loại cần quan tâm vào vị trí đích được thiết lập trước này hoặc vùng lân cận vị trí đích này. Sáng chế cũng bao gồm việc sử dụng hạt ngô và/hoặc cây ngô chứa trình tự nucleotit khác loại bất kỳ được xen ở vị trí đích được bộc lộ hoặc vùng lân

cận chung của vị trí này. Một tùy chọn để thực hiện tích hợp đích này là cắt và/hoặc thay thế đoạn xen khác vào băng biểu hiện *pat* được nêu làm ví dụ trong bản mô tả này. Về vấn đề chung này, sự tái tổ hợp tương đồng đích, ví dụ và không giới hạn, có thể được sử dụng theo sáng chế.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, “xếp chồng” gen, biến thể gen hoặc tính trạng là kết hợp các tính trạng mong muốn vào một dòng chuyển gen. Các nhà gây giống thực vật xếp chồng các tính trạng chuyển gen bằng cách tiến hành lai giữa bố mẹ mà mỗi bố mẹ có tính trạng mong muốn và sau đó nhận diện con có cả hai tính trạng mong muốn này. Một cách khác để xếp chồng gen là bằng cách truyền hai hoặc nhiều gen vào nhân tế bào của thực vật đồng thời trong quá trình biến nạp. Một cách khác để xếp chồng gen là bằng cách tái biến nạp thực vật chuyển gen bằng một gen cần quan tâm khác. Ví dụ, việc xếp chồng gen có thể được sử dụng để kết hợp hai hoặc nhiều tính trạng khác nhau, bao gồm, ví dụ, hai hoặc nhiều tính trạng côn trùng khác nhau, (các) tính trạng kháng côn trùng và (các) tính trạng chống chịu bệnh, hai hoặc nhiều tính trạng kháng thuốc diệt cỏ, và/hoặc (các) tính trạng kháng côn trùng và (các) tính trạng kháng thuốc diệt cỏ. Việc sử dụng chất chỉ dấu dễ chọn lọc ngoài gen cần quan tâm cũng có thể được coi là xếp chồng gen.

“Sự tái tổ hợp tương đồng” được dùng để chỉ phản ứng giữa cặp trình tự nucleotit bất kỳ có vị trí tương ứng chứa trình tự nucleotit tương tự mà qua đó hai trình tự nucleotit có thể tương tác (tái kết hợp) để tạo ra trình tự ADN tái tổ hợp mới. Mỗi vị trí của trình tự nucleotit tương tự được đề cập trong bản mô tả này là “trình tự tương đồng”. Nói chung, tần số của sự tái tổ hợp tương đồng tăng do độ dài của trình tự tương đồng tăng. Do đó, trong khi sự tái tổ hợp tương đồng có thể xảy ra giữa hai trình tự nucleotit mà ít giống nhau hơn, thì tần số (hoặc hiệu quả) tái tổ hợp giảm do sự khác nhau giữa hai trình tự tăng. Sự tái tổ hợp có thể được thực hiện bằng cách sử dụng một trình tự tương đồng trên mỗi phân tử cho và đích, từ đó tạo ra sản phẩm tái tổ hợp “lai chéo đơn”. Theo cách khác, hai trình tự tương đồng có thể được đặt trên mỗi trình tự nucleotit đích và cho. Sự tái tổ hợp giữa hai trình tự tương đồng trên thể cho với hai trình tự tương đồng trên thể đích tạo ra sản phẩm tái tổ hợp “lai chéo kép”. Nếu các trình tự tương đồng trên phân tử cho bên sườn trình tự cần thao tác (ví dụ, trình tự cần quan tâm), thì sự tái tổ hợp lai chéo kép với phân tử đích sẽ thu được sản phẩm tái tổ hợp trong đó trình tự cần quan tâm thay thế trình tự ADN ban đầu nằm giữa các trình tự tương đồng trên phân tử đích. Sự trao đổi của trình tự

ADN giữa đích và cho qua biến thể gen tái tổ hợp lai chéo kép được gọi bằng thuật ngữ “thay thế trình tự”.

Enzym AAD-1 theo sáng chế cho phép sự biểu hiện chuyển gen dẫn đến tính kháng hỗn hợp các thuốc diệt cỏ, dẫn đến sẽ không chế gần như tất cả cỏ dại lá rộng và cỏ bãi. *AAD-1* có thể có chức năng như tính trạng cây kháng thuốc diệt cỏ (herbicide tolerant crop - HTC) tuyệt vời để xếp chồng với các tính trạng HTC khác (ví dụ, tính kháng glyphosat, tính kháng glufosinat, tính kháng imidazolinon, tính kháng bromoxynil, v.v.), và tính trạng kháng côn trùng (*CryIF*, *CryIAb*, *Cry 34/45*, v.v.) chẳng hạn. Ngoài ra, *AAD-1* có thể có chức năng như chất chỉ dấu để chọn lọc để trợ giúp trong việc chọn lọc thể biến nạp sơ cấp của các thực vật được xử lý bằng kỹ thuật di truyền với gen hoặc nhóm gen thứ hai.

Các tính trạng HTC theo sáng chế có thể được sử dụng trong hỗn hợp mới với các tính trạng HTC khác (bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tính kháng glyphosat). Các hỗn hợp tính trạng này tạo ra các phương pháp không chế các loài cỏ dại mới (và các loài tương tự), do tính kháng mới đạt được hoặc vốn kháng các thuốc diệt cỏ (ví dụ, glyphosat). Do đó, ngoài các tính trạng HTC, các phương pháp mới để không chế cỏ dại bằng cách sử dụng các thuốc diệt cỏ, nhờ đó tính kháng thuốc diệt cỏ được tạo ra bằng enzym này ở các cây chuyển gen, là nằm trong phạm vi của sáng chế.

Ngoài ra, các cây kháng glyphosat được phát triển trên toàn thế giới là thường thấy. Nhiều lần trong quá trình luân chuyển với các cây kháng glyphosat khác, việc không chế cây mọc tự nhiên kháng glyphosat có thể khó ở các cây luân chuyển. Do đó, việc sử dụng các tính trạng chuyển gen, được xếp chồng hoặc biến nạp một cách riêng rẽ vào cây, tạo ra công cụ để không chế các cây mọc tự nhiên HTC khác.

Thực vật được ưu tiên, hoặc hạt, để sử dụng theo sáng chế bao gồm trong hệ gen của nó các trình tự đoạn xen, như được xác định trong bản mô tả này, cùng với ít nhất 20-500 hoặc nhiều hơn các nucleotit bên sườn liền kề trên cả hai bên của đoạn xen, như được xác định trong bản mô tả này. Trừ khi có chỉ dẫn khác, đề cập đến các trình tự bên sườn chỉ các trình tự được nhận diện đối với SEQ ID NO:29 (xem bảng trên). Mặt khác, SEQ ID NO:29 bao gồm ADN khác loại được xen vào thể biến nạp ban đầu và các trình tự hệ gen bên sườn minh họa ngay cạnh ADN được xen. Tất cả hoặc một phần các trình tự bên sườn này có thể mong muốn được chuyển sang con cháu nhận ADN được xen như là kết quả của việc lai hữu tính của dòng bố mẹ chứa biến thể gen này.

Sáng chế bao gồm việc sử dụng môi trường nuôi cấy mô của các tế bào có thể tái sinh của thực vật theo sáng chế. Sáng chế cũng bao gồm việc sử dụng thực vật được tái sinh từ môi trường nuôi cấy mô này, cụ thể trong đó thực vật này có khả năng biểu hiện tất cả các đặc tính hình thái và sinh lý học của giống được nêu làm ví dụ. Các thực vật được ưu tiên để sử dụng theo sáng chế có thể có tất cả các đặc tính sinh lý và hình thái học của thực vật được phát triển từ hạt được lưu giữ. Sáng chế còn bao gồm việc sử dụng con cháu của hạt này và hạt có tính trạng về chất lượng cần quan tâm.

Các thao tác (như gây đột biến, chuyển nhiễm tiếp, và gây giống tiếp) của các thực vật hoặc hạt, hoặc các phần của chúng, có thể dẫn đến tạo ra cái có thể được gọi bằng thuật ngữ giống “có nguồn gốc cơ bản”. Hiệp hội quốc tế về bảo vệ các giống cây trồng mới (International Union for the Protection of New Varieties of Plants - UPOV) đã đưa ra hướng dẫn sau để xác định xem một giống có nguồn gốc cơ bản từ giống được bảo vệ hay không:

[A] giống dường như sẽ có nguồn gốc cơ bản từ một giống khác (“giống ban đầu”) khi

(i) chủ yếu có nguồn gốc từ giống ban đầu, hoặc từ giống bản thân nó chủ yếu có nguồn gốc từ giống ban đầu, trong khi giữ được sự biểu hiện của các đặc tính thiết yếu là kết quả từ kiểu gen hoặc kết hợp các kiểu gen của giống ban đầu;

(ii) có thể phân biệt rõ ràng với giống ban đầu; và

(iii) ngoại trừ đối với những khác biệt là kết quả của tác động của sự bất nguồn, nó phù hợp với giống ban đầu trong quá trình biểu hiện của các đặc tính thiết yếu là kết quả của kiểu gen hoặc kết hợp các kiểu gen của giống ban đầu.

UPOV, Sixth Meeting with International Organizations, Geneva, Oct. 30, 1992; tài liệu được soạn bởi văn phòng hiệp hội.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, “dòng” là nhóm thực vật biểu hiện ít hoặc không biểu hiện các biến đổi di truyền giữa các cá thể đối với ít nhất một tính trạng. Các dòng này có thể được tạo ra bởi một số thể hệ tự thụ phấn và chọn lọc, hoặc nhân giống vô tính từ bố mẹ đơn bằng cách sử dụng kỹ thuật nuôi cấy mô hoặc tế bào.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ “cây trồng” và “giống” là đồng nghĩa và chỉ dòng được sử dụng cho việc sản xuất thương mại.

“Độ ổn định” hoặc “ổn định” đối với thành phần đã cho có nghĩa là thành phần này được duy trì từ thế hệ này sang thế hệ khác và, tốt hơn là, ít nhất ba thế hệ ở mức độ gần giống nhau, ví dụ, tốt hơn là $\pm 15\%$, tốt hơn nữa là $\pm 10\%$, tốt nhất là $\pm 5\%$. Độ ổn định có thể bị ảnh hưởng bởi nhiệt độ, vị trí, áp lực và thời gian trồng cây. Việc so sánh các thế hệ sau đó trong các điều kiện trên cánh đồng sẽ tạo ra thành phần theo cách tương tự.

“Lợi ích thương mại” được xác định là có ưu thế cây tốt và khả năng sinh sản cao, sao cho cây có thể được tạo ra bởi người nông dân bằng cách sử dụng thiết bị nông nghiệp thông thường, và dầu có thành phần được nêu có thể được chiết từ hạt bằng cách sử dụng thiết bị nghiền và chiết thông thường. Để có lợi ích thương mại, hiệu suất, khi được đo bằng khối lượng hạt, hàm lượng dầu, và tổng lượng dầu được sản xuất trên mỗi mẫu Anh (0,4 ha), là nằm trong vòng 15% của hiệu suất trung bình của giống canola thương mại có thể so sánh được khác mà không có tính trạng giá trị khác được phát triển trong cùng vùng.

“Ưu thế nông học” có nghĩa là dòng có các đặc tính nông học mong muốn như hiệu suất, độ trưởng thành, khả năng chống bệnh, và các đặc tính tương tự, ngoài tính kháng côn trùng do (các) biến thể gen theo sáng chế. Các tính trạng nông học, được xét riêng rẽ hoặc trong kết hợp bất kỳ, như được nêu trong các ví dụ dưới đây, trong cây chứa biến thể gen theo sáng chế, là nằm trong phạm vi của sáng chế. Bất kỳ và tất cả các đặc tính nông học này và các điểm dữ liệu có thể được sử dụng để nhận diện các thực vật này, như là một điểm hoặc ở một đầu hoặc cả hai đầu của khoảng đặc tính được sử dụng để xác định các thực vật này.

Do người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ nhận biết được khi xem xét bản mô tả, các phương án được ưu tiên về kit phát hiện, chẳng hạn, có thể bao gồm các đoạn dò và/hoặc các đoạn môi hướng và/hoặc chứa “các trình tự nối” hoặc “các trình tự chuyển tiếp” (trong đó trình tự bên sườn hệ gen của cây ngô thoả mãn trình tự đoạn xen). Ví dụ, phương án này bao gồm các đoạn dò, đoạn môi, và/hoặc amplicon polynucleotit được dự định để nhận diện một hoặc cả hai trình tự nối (trong đó đoạn xen thoả mãn trình tự bên sườn), như được chỉ ra trong bảng 1. Một thiết kế phổ biến là có một đoạn môi lai trong vùng sườn, và một đoạn môi lai trong đoạn xen. Mỗi đoạn môi này thường có độ dài ít nhất là ~15 gốc. Với bố trí này, các đoạn môi có thể được sử dụng để tạo ra/khuếch đại amplicon có thể dò được chỉ ra sự có mặt của biến thể gen theo sáng chế. Các đoạn môi

này có thể được sử dụng để tạo ra amplicon kéo dài (và chứa) trình tự nổi như được chỉ ra trên đây.

(Các) đoạn môi "bắt cặp môi giảm dần" ở trình tự bên sườn thường không được dự định để lai vượt quá 200 bazơ hoặc vượt ra ngoài vùng nổi. Do đó, các đoạn môi bên sườn thông thường sẽ được thiết kế để chứa ít nhất 15 gốc của dải trong vòng 200 bazơ trong trình tự bên sườn từ đầu đoạn xen. Nghĩa là, các đoạn môi chứa trình tự có kích thước thích hợp trong các gốc ~1674-1873 và/hoặc ~6690-6890 nêu trong SEQ ID NO:29 là nằm trong phạm vi của sáng chế. Các đoạn môi xen đoạn tương tự có thể được thiết kế ở vị trí bất kỳ trên đoạn xen, nhưng các gốc ~1874-2074 và ~6489-6689, có thể được sử dụng, ví dụ, không chuyên biệt cho thiết kế đoạn môi như vậy.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cũng sẽ nhận ra rằng các đoạn môi và các đoạn dò có thể được dự định để lai, trong phạm vi lai và/hoặc các điều kiện PCR chuẩn, với đoạn nêu trong SEQ ID NO:29 (hoặc trình tự bổ sung), và các trình tự bổ sung của nó, trong đó đoạn môi hoặc đoạn dò không bổ sung hoàn toàn vào trình tự được nêu làm ví dụ. Nghĩa là, một mức độ không khớp có thể được cho phép. Đối với đoạn môi xấp xỉ 20 nucleotit, chẳng hạn, thông thường một hoặc hai hoặc nhiều hơn các nucleotit không cần gắn kết với dải đối mã nếu bazơ không khớp nằm ở bên trong hoặc trên đầu của đoạn môi đối mã với amplicon. Các điều kiện lai thích hợp khác được đề xuất dưới đây. Chất tương tự nucleotit tổng hợp, như inosin, cũng có thể được sử dụng trong các đoạn dò. Các đoạn dò axit peptit nucleic (PNA), cũng như các đoạn dò ADN và ARN, cũng có thể được sử dụng. Điều quan trọng là các đoạn dò và các đoạn môi này chuẩn đoán (có thể nhận diện và phân biệt duy nhất) sự có mặt của biến thể gen theo sáng chế.

Cần lưu ý rằng các sai số trong khuếch đại PCR có thể xảy ra, các sai số này có thể gây ra sai số nhỏ trong giải trình tự, chẳng hạn. Nghĩa là, trừ khi có chỉ dẫn khác, các trình tự được liệt kê trong bản mô tả này được xác định bằng cách tạo ra các amplicon dài từ ADN hệ gen của cây ngô, và sau đó tách dòng và giải trình tự các amplicon. Không bất thường khi tìm thấy sự khác biệt nhỏ và sự sai lệch nhỏ trong các trình tự được tạo ra và xác định theo cách này, miễn là nhiều chu kỳ khuếch đại là cần thiết để tạo ra đủ amplicon để giải trình tự từ ADN hệ gen. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ nhận biết và lưu ý các điều chỉnh bất kỳ cần thiết do các loại sai số hoặc sai lệch giải trình tự phổ biến này là nằm trong phạm vi của sáng chế.

Cũng cần lưu ý rằng không phổ biến đối với một số trình tự hệ gen cần loại bỏ, chẳng hạn, khi một trình tự được xen trong quá trình tạo biến thể gen. Do đó, một số khác biệt cũng có thể xuất hiện giữa các trình tự bên sườn và các trình tự hệ gen được liệt kê trong Ngân hàng gen, chẳng hạn. Một số trong (các) khác biệt này được bàn luận dưới đây trong phần ví dụ. Các điều chỉnh đối với các đoạn dò và các đoạn mồi có thể được thực hiện theo đó.

Do đó, việc sử dụng thực vật chứa polynucleotit có một mức độ đồng nhất với các trình tự bên sườn và/hoặc xen đoạn là nằm trong phạm vi của sáng chế. Mức độ đồng nhất với trình tự theo sáng chế có thể là trình tự polynucleotit có mức độ đồng nhất trình tự ít nhất là 65%, tốt hơn nếu mức độ đồng nhất trình tự ít nhất là 70%, tốt hơn nữa nếu mức độ đồng nhất trình tự ít nhất là 75%, tốt hơn nữa nếu mức độ đồng nhất trình tự ít nhất là 80%, và tốt hơn nữa nếu mức độ đồng nhất trình tự ít nhất là 85% 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% so với trình tự được nêu làm ví dụ hoặc được mô tả trong bản mô tả này. Sự lai và các điều kiện lai như được đề xuất trong bản mô tả này cũng có thể được sử dụng để xác định các thực vật này và các trình tự polynucleotit theo sáng chế. Trình tự của các trình tự bên sườn cộng với trình tự đoạn xen có thể được xác nhận liên quan đến hạt được lưu giữ.

Các thành phần của mỗi trong số các “đoạn xen” được minh họa trên các fig.1 và 2 và được bàn luận chi tiết hơn dưới đây trong các ví dụ. Các trình tự polynucleotit ADN của các thành phần này, hoặc mảnh của chúng, có thể được sử dụng làm các đoạn mồi hoặc các đoạn dò ADN trong các phương pháp theo sáng chế.

Theo một số phương án, các chế phẩm và phương pháp được đề xuất để phát hiện sự có mặt của vùng xen đoạn gen chuyển/hệ gen, trong các thực vật và hạt và các phần tương tự, từ cây ngô. Các trình tự ADN được đề xuất là chứa trình tự nối vùng xen đoạn gen chuyển/hệ gen được đề xuất trong bản mô tả này (giữa các gốc 1873-1874 và 6689-6690 nêu trong SEQ ID NO:29), các đoạn của nó, và các trình tự bổ sung của các trình tự được nêu làm ví dụ và đoạn bất kỳ của chúng. Trình tự nối vùng xen đoạn kéo dài điểm nối giữa ADN khác loại được xen vào hệ gen và ADN từ tế bào cây ngô bên sườn vị trí xen đoạn. Các trình tự này có thể chẩn đoán biến thể gen đã cho.

Dựa trên các trình tự đoạn xen và biên này, các đoạn mồi đặc hiệu biến thể gen có thể được tạo ra. Phân tích PCR cho thấy rằng các dòng cây ngô theo sáng chế có thể được

nhận diện trong các kiểu gen cây ngô khác nhau bằng cách phân tích các amplicon PCR được tạo ra bằng các bộ đoạn môi đặc hiệu biến thể gen này. Các quy trình này và các quy trình liên quan khác có thể được sử dụng để nhận diện duy nhất các dòng cây ngô này. Do đó, các amplicon PCR có nguồn gốc từ các cặp đoạn môi là duy nhất và có thể được sử dụng để nhận diện các dòng cây ngô này.

Theo một số phương án, các trình tự ADN chứa mảnh liên kề của vùng xen đoạn gen chuyển/hệ gen mới là một khía cạnh của sáng chế. Sáng chế bao gồm các trình tự ADN chứa chiều dài đầy đủ của các polynucleotit của trình tự đoạn xen gen chuyển và chiều dài đầy đủ của các polynucleotit của trình tự hệ gen của cây ngô từ một hoặc nhiều trong số ba cây ngô và/hoặc trình tự nêu trên, là hữu ích làm trình tự đoạn môi để sản xuất sản phẩm amplicon chẩn đoán cho một hoặc nhiều cây ngô này.

Các phương án liên quan đến các trình tự ADN chứa ít nhất 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, hoặc nhiều hơn các nucleotit liên kề của phân gen chuyển của trình tự ADN được nhận diện trong bản mô tả này (như SEQ ID NO:29 và các mảnh của nó), hoặc trình tự bổ sung của nó, và chiều dài tương tự của trình tự ADN bên sườn của cây ngô từ các trình tự này, hoặc các trình tự bổ sung của nó. Các trình tự này là hữu ích làm các đoạn môi ADN trong phương pháp khuếch đại ADN. Các amplicon được tạo ra bằng cách sử dụng các đoạn môi này chẩn đoán cho biến thể gen cây ngô bất kỳ được đề cập trong bản mô tả này. Do đó, sáng chế cũng bao gồm các amplicon được tạo ra bởi các đoạn môi ADN này và các đoạn môi tương đồng.

Sáng chế cũng có thể bao gồm các phương pháp phát hiện sự có mặt của ADN, trong mẫu, tương ứng với biến thể gen cây ngô được đề cập trong bản mô tả này. Các phương pháp này có thể bao gồm: (a) cho mẫu chứa ADN tiếp xúc với bộ đoạn môi mà, khi được sử dụng trong phản ứng khuếch đại axit nucleic bằng ADN từ ít nhất một trong số các biến thể gen cây ngô này, tạo ra amplicon chẩn đoán cho (các) biến thể gen này; (b) thực hiện phản ứng khuếch đại axit nucleic, từ đó tạo ra amplicon; và (c) phát hiện amplicon này.

Các phương pháp phát hiện khác có thể bao gồm phương pháp phát hiện sự có mặt của ADN, trong mẫu, tương ứng với ít nhất một trong số các biến thể gen này, trong đó phương pháp này bao gồm: (a) cho mẫu chứa ADN tiếp xúc với đoạn dò lai trong các điều kiện lai nghiêm ngặt với ADN từ ít nhất một trong số các biến thể gen của cây ngô này và

không lai trong các điều kiện lai nghiêm ngặt với cây ngô đối chứng (ADN không phải biến thể gen quan tâm); (b) đưa mẫu và đoạn dò vào các điều kiện lai nghiêm ngặt; và (c) phát hiện việc lai của đoạn dò với ADN.

Một số phương án thực hiện bao gồm các phương pháp tạo ra cây ngô chứa biến thể gen *aad-1* theo sáng chế, trong đó phương pháp này bao gồm các bước: (a) lai hữu tính dòng cây ngô bố mẹ thứ nhất (chứa băng biểu hiện theo sáng chế, tạo ra tính trạng kháng thuốc diệt cỏ cho thực vật thuộc dòng này) và dòng cây ngô bố mẹ thứ hai (không có tính trạng kháng thuốc diệt cỏ) từ đó tạo ra tập hợp các cây con cháu; và (b) chọn lọc cây con cháu bằng cách sử dụng các chỉ dấu phân tử. Các phương pháp này có thể tùy ý bao gồm bước lai ngược tiếp cây con cháu với dòng cây ngô bố mẹ thứ hai để tạo ra cây ngô gây giống thực chứa tính trạng kháng côn trùng này.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, các phương pháp xác định tình trạng tiếp hợp giao tử của con cháu của con lai với bất kỳ một (hoặc nhiều) trong số ba biến thể gen được đề xuất. Các phương pháp này có thể bao gồm cho mẫu chứa ADN cây ngô tiếp xúc với bộ đoạn mồi theo sáng chế. Các đoạn mồi này, khi được sử dụng trong phản ứng khuếch đại axit nucleic với ADN hệ gen từ ít nhất một trong số các biến thể gen của cây ngô này, tạo ra amplicon thứ nhất là chẩn đoán cho ít nhất một trong các biến thể gen của cây ngô này. Các phương pháp này còn bao gồm thực hiện phản ứng khuếch đại axit nucleic, từ đó tạo ra amplicon thứ nhất; phát hiện amplicon thứ nhất này; và cho mẫu chứa ADN cây ngô tiếp xúc với bộ đoạn mồi này (bộ đoạn mồi này, khi được sử dụng trong phản ứng khuếch đại axit nucleic với ADN hệ gen từ cây ngô, tạo ra amplicon thứ hai chứa ADN hệ gen nguyên thể của cây ngô tương đồng với vùng hệ gen của cây ngô; và thực hiện phản ứng khuếch đại axit nucleic, từ đó tạo ra amplicon thứ hai. Các phương pháp còn bao gồm phát hiện amplicon thứ hai, và so sánh các amplicon thứ nhất và thứ hai trong mẫu, trong đó sự có mặt của cả hai amplicon cho thấy mẫu này là dị hợp tử đối với sự xen đoạn gen chuyển.

Kit phát hiện ADN có thể được phát triển bằng cách sử dụng chế phẩm được bộc lộ trong bản mô tả này và các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này về việc phát hiện ADN. Các kit là hữu ích để nhận diện ADN biến thể gen của cây ngô trong mẫu và có thể được dùng trong các phương pháp gây giống cây ngô chứa ADN này. Các kit chứa các trình tự ADN tương đồng hoặc bổ sung với các amplicon, chẳng hạn, được bộc lộ trong bản mô tả

này, hoặc các trình tự ADN tương đồng hoặc bổ sung với ADN được chứa trong các yếu tố di truyền gen chuyển của biến thể gen theo sáng chế. Các trình tự ADN này có thể được sử dụng trong các phản ứng khuếch đại ADN hoặc làm đoạn dò trong phương pháp lai ADN. Các kit cũng có thể chứa các chất phản ứng và các nguyên liệu cần thiết cho việc tiến hành phương pháp phát hiện.

“Đoạn dò” là phân tử axit nucleic phân lập mà phân tử đánh dấu hoặc chỉ thị dễ phát hiện thông thường được gắn vào (như đồng vị phóng xạ, phốt pho, chất phát quang hóa học, hoặc enzym). Đoạn dò này là bổ sung cho sợi axit nucleic đích, trong trường hợp sáng chế này, cho sợi của ADN hệ gen từ một trong các biến thể gen của cây ngô, từ cây ngô hoặc từ mẫu chứa ADN từ biến thể gen. Các đoạn dò theo sáng chế bao gồm không chỉ axit deoxyribonucleic hoặc axit ribonucleic mà còn các polyamit và các nguyên liệu đoạn dò khác gắn kết đặc hiệu với trình tự ADN đích và có thể được sử dụng để phát hiện sự có mặt của trình tự ADN đích đó.

“Các đoạn mồi” là các axit nucleic phân lập/tổng hợp mà được gắn với sợi ADN đích bổ sung bằng cách lai axit nucleic để tạo ra thể lai giữa đoạn mồi và sợi ADN đích, sau đó kéo dài dọc sợi ADN đích bằng polymeraza, ví dụ, ADN polymeraza. Các cặp đoạn mồi theo sáng chế chỉ việc sử dụng chúng để khuếch đại trình tự axit nucleic đích, ví dụ, bằng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) hoặc các phương pháp khuếch đại axit nucleic thông thường khác.

Các đoạn dò và các đoạn mồi thường có chiều dài bằng 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232,

233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, hoặc 500 polynucleotit hoặc lớn hơn. Các đoạn dò và các đoạn mồi này lai đặc hiệu với trình tự đích trong các điều kiện lai có độ nghiêm ngặt cao. Tốt hơn là, các đoạn dò và các đoạn mồi theo sáng chế có mức độ tương đồng trình tự hoàn toàn so với trình tự đích, mặc dù các đoạn dò khác biệt so với trình tự đích và giữ được khả năng lai với trình tự đích có thể được thiết kế bằng các phương pháp thông thường.

Các phương pháp tạo ra và sử dụng các đoạn dò và các đoạn mồi được mô tả, ví dụ, trong *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., vol. 1-3, ed. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989. Các cặp đoạn mồi PCR có thể có nguồn gốc từ trình tự đã biết, ví dụ, bằng cách sử dụng các chương trình máy tính được dự định nhằm mục đích đó.

Các đoạn mồi và các đoạn dò dựa trên ADN bên sườn và các trình tự đoạn xen được bộc lộ trong bản mô tả này có thể được sử dụng để xác nhận (và, nếu cần, để hiệu chỉnh) các trình tự được bộc lộ bằng các phương pháp thông thường, ví dụ, bằng cách tái tách dòng và sắp xếp các trình tự này.

Các đoạn dò và các đoạn mồi axit nucleic theo sáng chế lai trong các điều kiện nghiêm ngặt với trình tự ADN đích. Phương pháp lai hoặc khuếch đại axit nucleic thông

thường bất kỳ có thể được sử dụng để nhận diện sự có mặt của ADN từ biến thể gen chuyển gen trong mẫu. Phân tử axit nucleic hoặc mảnh của nó có khả năng lai đặc hiệu với phân tử axit nucleic khác trong một số trường hợp. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, hai phân tử axit nucleic được cho là có khả năng lai đặc hiệu với nhau nếu hai phân tử này có khả năng tạo thành cấu trúc axit nucleic sợi kép, đối song song. Phân tử axit nucleic được cho là “trình tự bổ sung” của một phân tử axit nucleic khác nếu chúng biểu hiện tính bổ sung hoàn toàn. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, các phân tử được cho là biểu hiện “tính bổ sung hoàn toàn” khi mỗi nucleotit của một trong số các phân tử là bổ sung cho nucleotit của phân tử kia. Hai phân tử được cho là “bổ sung tối thiểu” nếu chúng có thể lai với nhau với độ ổn định đủ để cho phép chúng gắn với phân tử còn lại trong các điều kiện ít nhất là “nghiêm ngặt thấp” thông thường. Tương tự, các phân tử được cho là “bổ sung” nếu chúng có thể lai với nhau với độ ổn định đủ để cho phép chúng gắn với phân tử còn lại trong các điều kiện “nghiêm ngặt cao” thông thường. Các điều kiện nghiêm ngặt thông thường được mô tả bởi Sambrook và các đồng tác giả, 1989. Do đó, sự lệch so với tính bổ sung hoàn toàn là có thể cho phép, miễn là độ lệch này không hoàn toàn loại trừ khả năng phân tử tạo ra cấu trúc sợi kép. Để cho phân tử axit nucleic có chức năng như đoạn môi hoặc đoạn dò, nó chỉ cần bổ sung một cách đầy đủ trong trình tự để có thể tạo ra cấu trúc sợi kép ổn định trong dung môi và nồng độ muối cụ thể được dùng.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, trình tự gần như tương đồng là trình tự axit nucleic sẽ lai đặc hiệu với trình tự bổ sung của trình tự axit nucleic mà nó được so sánh trong các điều kiện nghiêm ngặt cao. Thuật ngữ “các điều kiện nghiêm ngặt” được xác định chức năng liên quan đến việc lai của đoạn dò axit nucleic với axit nucleic đích (tức là với trình tự axit nucleic cụ thể cần quan tâm) bằng quy trình lai cụ thể được bàn luận trong Sambrook và các đồng tác giả, 1989, ở 9.52-9.55. Cũng xem, Sambrook và các đồng tác giả, 1989 ở 9.47-9.52 và 9.56-9.58. Theo đó, các trình tự nucleotit theo sáng chế có thể được sử dụng trong khả năng của chúng để tạo ra một cách chọn lọc các phân tử kép với khoảng bổ sung của các đoạn ADN.

Tùy thuộc vào ứng dụng nhìn thấy được, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể sử dụng các điều kiện lai thay đổi để đạt được các mức độ chọn lọc đoạn dò thay đổi theo hướng trình tự đích. Đối với các ứng dụng yêu cầu mức độ chọn lọc cao, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này thường dùng các điều kiện tương đối

nghiêm ngặt để tạo ra thể lai, ví dụ, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ chọn điều kiện muối tương đối thấp và/hoặc nhiệt độ cao, như đề xuất là nồng độ nằm trong khoảng từ 0,02 M đến 0,15 M NaCl ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50°C đến 70°C. Các điều kiện nghiêm ngặt, ví dụ, có thể bao gồm rửa bộ lọc của quá trình lai ít nhất hai lần bằng dung dịch đệm rửa có tính nghiêm ngặt cao (0,2X SSC, 0,1% SDS, 65°C). Các điều kiện nghiêm ngặt thích hợp thúc đẩy lai ADN, ví dụ, 6,0X natri clorua/natri xitrat (SSC) ở nhiệt độ khoảng 45°C, tiếp theo rửa bằng 2,0X SSC ở nhiệt độ 50°C là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, 6.3.1-6.3.6. Ví dụ, nồng độ muối trong bước rửa có thể được chọn từ độ nghiêm ngặt thấp khoảng 2,0X SSC ở nhiệt độ 50°C đến độ nghiêm ngặt cao khoảng 0,2X SSC ở nhiệt độ 50°C. Ngoài ra, nhiệt độ trong bước rửa có thể được tăng lên từ điều kiện nghiêm ngặt thấp ở nhiệt độ phòng, khoảng 22°C, đến điều kiện nghiêm ngặt cao ở khoảng 65°C. Cả nhiệt độ và muối có thể được thay đổi, hoặc một trong số nhiệt độ hoặc nồng độ muối có thể được giữ không đổi trong khi biến số khác thay đổi. Các điều kiện chọn lọc này cho phép ít, nếu có, độ không khớp giữa đoạn dò và sợi khuôn mẫu hoặc sợi đích. Sự phát hiện các trình tự ADN qua việc lai là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, và các chỉ dẫn của patent Mỹ các số 4,965,188 và 5,176,995 là ví dụ về các phương pháp phân tích việc tạo thể lai.

Theo một số phương án, axit nucleic để sử dụng theo sáng chế sẽ lai đặc hiệu với một hoặc nhiều đoạn môi (hoặc amplicon hoặc các trình tự khác) được nêu hoặc đề xuất trong bản mô tả này, bao gồm các trình tự bổ sung và mảnh của chúng, trong các điều kiện nghiêm ngặt cao. Theo một khía cạnh, phân tử axit nucleic chỉ dấu theo sáng chế có trình tự axit nucleic được nêu trong SEQ ID NO:3-14, hoặc các trình tự bổ sung và/hoặc mảnh của chúng.

Theo một khía cạnh khác, phân tử axit nucleic chỉ dấu theo sáng chế có mức độ đồng nhất trình tự nằm trong khoảng từ 80% đến 100% hoặc từ 90% đến 100% so với các trình tự axit nucleic này. Theo khía cạnh khác, phân tử axit nucleic chỉ dấu để sử dụng theo sáng chế có mức độ đồng nhất trình tự nằm trong khoảng từ 95% đến 100% so với trình tự này. Các trình tự này có thể được sử dụng làm các chỉ dấu trong phương pháp gây giống thực vật để nhận diện con cháu lai di truyền. Việc lai đoạn dò với phân tử ADN đích có thể được phát hiện bằng một số phương pháp bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung

bình trong lĩnh vực này, các phương pháp này có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, nhãn huỳnh quang, nhãn phóng xạ, nhãn dựa trên kháng thể, và nhãn phát quang hóa học.

Đối với việc khuếch đại trình tự axit nucleic đích (ví dụ, bằng PCR) bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi khuếch đại cụ thể, “các điều kiện nghiêm ngặt” là các điều kiện cho phép cặp đoạn mồi này chỉ lai với trình tự axit nucleic đích mà đoạn mồi có trình tự kiểu đại tương ứng (hoặc trình tự bổ sung của nó) sẽ gắn và tốt hơn là tạo ra sản phẩm khuếch đại duy nhất, amplicon.

Thuật ngữ “đặc hiệu đối với (trình tự đích)” biểu thị rằng một đoạn dò hoặc đoạn mồi lai trong các điều kiện lai nghiêm ngặt chỉ với trình tự đích trong mẫu chứa trình tự đích này.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, “ADN được khuếch đại” hoặc “amplicon” chỉ sản phẩm của sự khuếch đại axit nucleic của trình tự axit nucleic đích là một phần của khuôn axit nucleic. Ví dụ, để xác định xem cây ngô thu được từ việc lai hữu tính có chứa ADN hệ gen của biến thể gen chuyển gen từ cây ngô theo sáng chế hay không, ADN được tách từ mẫu mô cây ngô có thể được đưa vào phương pháp khuếch đại axit nucleic bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi chứa đoạn mồi có nguồn gốc từ trình tự bên sườn trong hệ gen của thực vật liên kế vị trí xen đoạn của ADN khác loại được xen, và đoạn mồi thứ hai có nguồn gốc từ ADN khác loại được xen để tạo ra amplicon chẩn đoán sự có mặt của ADN biến thể gen. Amplicon này có độ dài và có trình tự cũng chẩn đoán cho biến thể gen. Amplicon này có thể có độ dài nằm trong khoảng từ độ dài kết hợp của các cặp đoạn mồi cộng với một cặp bazơ nucleotit, và/hoặc độ dài kết hợp của các cặp đoạn mồi cộng với khoảng 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206,

207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, hoặc 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750, 2000, hoặc nhiều hơn các cặp bazơ nucleotit (cộng hoặc trừ độ tăng bất kỳ được liệt kê trên đây). Theo cách khác, cặp đoạn mỗi có thể có nguồn gốc từ trình tự bên sườn trên cả hai cạnh của ADN được xen sao cho tạo ra amplicon chứa toàn bộ trình tự nucleotit đoạn xen. Phần của cặp đoạn mỗi có nguồn gốc từ trình tự hệ gen thực vật có thể được bố trí ở một khoảng cách so với trình tự ADN được xen. Khoảng cách này có thể nằm trong khoảng từ một cặp bazơ nucleotit lên đến hai mươi nghìn cặp bazơ nucleotit. Việc sử dụng thuật ngữ “amplicon” loại trừ cụ thể các đime đoạn mỗi có thể được tạo ra trong phản ứng khuếch đại nhiệt ADN.

Việc khuếch đại axit nucleic có thể được thực hiện bằng phương pháp khuếch đại axit nucleic khác nhau bất kỳ đã biết trong lĩnh vực, bao gồm phản ứng chuỗi polymeraza (polymerase chain reaction - PCR). Nhiều phương pháp khuếch đại là đã biết trong lĩnh vực và được mô tả trong, không kể những tài liệu khác, patent Mỹ số 4,683,195 và patent Mỹ số 4,683,202. Các phương pháp khuếch đại PCR đã được phát triển để khuếch đại lên đến 22 kb ADN hệ gen. Các phương pháp này cũng như các phương pháp khác đã biết trong lĩnh vực khuếch đại ADN có thể được sử dụng trong việc thực hiện sáng chế. Trình

tự của đoạn xen ADN gen chuyển hoặc trình tự hệ gen bên sườn khác loại từ biến thể gen của cây ngô có thể được kiểm tra (và hiệu chỉnh nếu cần) bằng cách khuếch đại các trình tự này từ biến thể gen bằng cách sử dụng các đoạn mồi có nguồn gốc từ các trình tự được đề xuất trong bản mô tả này, tiếp theo giải trình tự ADN chuẩn của amplicon PCR hoặc của ADN được tách dòng.

Amplicon được tạo ra bằng các phương pháp này có thể được phát hiện bằng nhiều kỹ thuật. Điện di trên gel Agarosa và nhuộm bằng ethidi bromua là phương pháp đã biết phổ biến về phát hiện các amplicon ADN. Một phương pháp như vậy khác là Genetic Bit Analysis trong đó oligonucleotit của ADN được dự định gói chồng lên cả trình tự ADN hệ gen bên sườn liền kề và trình tự ADN được xen. Oligonucleotit được bắt động trong lỗ của đĩa vi lỗ. Sau PCR của vùng cần quan tâm (bằng cách sử dụng một đoạn mồi trong trình tự được xen và một đoạn mồi trong trình tự hệ gen bên sườn liền kề), sản phẩm PCR sợi đơn có thể được lai với oligonucleotit bắt động và có chức năng như khuôn cho phản ứng kéo dài đơn bazơ bằng cách sử dụng ADN polymeraza và các ddNTP được đánh dấu đặc hiệu cho bazơ kế tiếp mong muốn. Việc đọc thông tin có thể dựa trên huỳnh quang hoặc ELISA. Tín hiệu chỉ ra sự có mặt của trình tự đoạn xen/bên sườn do khuếch đại, lai, và kéo dài đơn bazơ thành công.

Một phương pháp khác là kỹ thuật giải trình tự bằng tổng hợp như được mô tả bởi Winge (Innov. Pharma. Tech. 00:18-24, 2000). Trong phương pháp này, oligonucleotit được dự định gói chồng lên ADN hệ gen liền kề và điểm nối ADN đoạn xen. Oligonucleotit được lai với sản phẩm PCR sợi đơn từ vùng cần quan tâm (một đoạn mồi trong trình tự được xen và một đoạn mồi trong trình tự hệ gen bên sườn) và được ủ với sự có mặt của ADN polymeraza, ATP, sulfurylaza, luxiferaza, apyrazaza, adenosin 5' phosphosulfat và luxiferin. Các DNTP được bổ sung riêng rẽ và sự hợp nhất này dẫn đến tín hiệu sáng, tín hiệu này được đo. Tín hiệu sáng chỉ ra sự có mặt của trình tự đoạn xen gen chuyển/bên sườn do khuếch đại, lai, và kéo dài đơn hoặc đa bazơ thành công.

Phân cực huỳnh quang là một phương pháp khác có thể được sử dụng để phát hiện amplicon theo sáng chế. Sau phương pháp này, oligonucleotit được dự định gói chồng lên điểm nối ADN bên sườn và điểm nối ADN được xen. Oligonucleotit được lai với sản phẩm PCR sợi đơn từ vùng cần quan tâm (một đoạn mồi trong ADN được xen và một đoạn mồi trong trình tự ADN hệ gen bên sườn) và được ủ với sự có mặt của ADN polymeraza và

ddNTP được đánh dấu huỳnh quang. Việc kéo dài đơn bazơ dẫn đến sự hợp nhất của ddNTP. Sự hợp nhất có thể được đo dưới dạng mức độ thay đổi về phân cực bằng cách sử dụng huỳnh quang kế. Mức độ thay đổi về phân cực chỉ ra sự có mặt của trình tự đoạn xen gen chuyển/bên sườn do khuếch đại, lai, và kéo dài đơn bazơ thành công.

TAQMAN (PE Applied Biosystems, Foster City, Calif.) là phương pháp phát hiện và định lượng sự có mặt của trình tự ADN. Nói ngắn gọn, đoạn dò oligonucleotit FRET được dự định gói chồng lên điểm nối ADN bên sườn hệ gen và đoạn xen. Đoạn dò FRET và đoạn mồi PCR (một đoạn mồi trong trình tự ADN đoạn xen và một đoạn mồi trong trình tự hệ gen bên sườn) được quay vòng với sự có mặt của polymeraza ổn định nhiệt và dNTP. Trong quá trình khuếch đại cụ thể, Taq ADN polymeraza làm sạch và giải phóng gốc huỳnh quang khỏi gốc làm ngừng trên đoạn dò FRET. Tín hiệu huỳnh quang chỉ ra sự có mặt của trình tự bên sườn/đoạn xen gen chuyển do khuếch đại và lai thành công.

Molecular Beacons đã được mô tả để sử dụng trong phát hiện trình tự. Nói ngắn gọn, đoạn dò oligonucleotit FRET được dự định gói chồng lên điểm nối ADN hệ gen bên sườn và đoạn xen. Cấu trúc duy nhất của đoạn dò FRET dẫn đến đoạn dò này chứa cấu trúc bậc hai giữ các gốc huỳnh quang và các gốc làm ngừng ở gần. Đoạn dò FRET và đoạn mồi PCR (một đoạn mồi trong trình tự ADN đoạn xen và một đoạn mồi trong trình tự hệ gen bên sườn) được quay vòng với sự có mặt của polymeraza ổn định nhiệt và dNTP. Sau khi khuếch đại PCR thành công, việc lai đoạn dò FRET với trình tự đích dẫn đến loại bỏ cấu trúc bậc hai của đoạn dò và tách không gian các gốc huỳnh quang và các gốc làm ngừng. Các kết quả tín hiệu huỳnh quang. Tín hiệu huỳnh quang chỉ ra sự có mặt của trình tự hệ gen bên sườn/đoạn xen gen chuyển do khuếch đại và lai thành công.

Sáng chế bộc lộ vị trí trong hệ gen cây ngô, vị trí này là tuyệt vời để xen đoạn, sáng chế còn bao gồm việc sử dụng hạt ngô và/hoặc cây ngô chứa ít nhất một đoạn xen không phải *aad1* trong vùng lân cận nói chung của vị trí hệ gen này. Một tùy chọn là thay thế đoạn xen khác vào vị trí của đoạn xen *aad-1* được nêu làm ví dụ trong bản mô tả này. Về các vấn đề chung này, sự tái tổ hợp tương đồng đích, chẳng hạn, có thể được sử dụng theo sáng chế. Kiểu kỹ thuật này là đối tượng của, ví dụ, WO 03/080809 A2 và đơn Mỹ tương ứng đã được công bố (US 20030232410). Do đó, sáng chế bao gồm việc sử dụng các thực vật và các tế bào thực vật chứa đoạn xen khác loại (thay cho hoặc với nhiều bản sao của *aad-1*), được nằm bên sườn bởi tất cả hoặc phần dễ nhận diện của các trình tự bên sườn

được nhận diện trong bản mô tả này (ví dụ, các gốc 1-1873 và 6690-8557 nêu trong SEQ ID NO:29).

Dưới đây là một số mục / phương án về các thực vật, hạt, polynucleotit, và phương pháp phát hiện có thể được sử dụng theo một số phương án của sáng chế:

1. Cây ngô chuyển gen chứa hệ gen, hệ gen này chứa SEQ ID NO:29.
2. Hạt ngô chứa hệ gen chứa biến thể gen AAD-1 DAS-40278-9 có mặt trong hạt được lưu giữ ở bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật mỹ (ATCC) với số lưu giữ PTA-10244.
3. Hạt ngô theo mục 2, hạt này chứa hệ gen, hệ gen này chứa SEQ ID NO:29.
4. Cây ngô được tạo ra bằng cách trồng hạt theo mục 2, cây này chứa SEQ ID NO:29.
5. Cây con cháu của cây ngô theo mục 4, cây con cháu này chứa biến thể gen AAD-1 DAS-40278-9.
6. Cây con cháu kháng thuốc diệt cỏ của cây ngô theo mục 1, cây con cháu này chứa SEQ ID NO:29.
7. Cây ngô chuyển gen chứa đoạn xen gen chuyển ở vị trí đích nhiễm sắc thể của cây ngô nằm trên nhiễm sắc thể 2 ở khoảng 20 cM giữa các chỉ dấu SSR UMC1265, có thể khuếch đại một phần bởi SEQ ID NO:30 và SEQ ID NO:31, và MMC0111, có thể khuếch đại một phần bởi SEQ ID NO:32 và SEQ ID NO:33, trong đó vị trí đích chứa axit nucleic khác loại.
8. Phương pháp tạo ra cây ngô chuyển gen theo mục 7, phương pháp này bao gồm xen axit nucleic khác loại ở vị trí trên nhiễm sắc thể 2 ở khoảng 20 cM giữa các chỉ dấu SSR UMC1265, có thể khuếch đại một phần bởi SEQ ID NO:30 và

SEQ ID NO:31, và MMC0111, có thể khuếch đại một phần bởi SEQ ID NO:32 và SEQ ID NO:33.

9. Bộ phận của cây theo mục 4, trong đó bộ phận này được chọn từ nhóm bao gồm phần hoa, noãn, hoa, quả nang, thớ, cành non, rễ, và lá, bộ phận này chứa SEQ ID NO:29.

10. Cây ngô chuyển gen theo mục 7, cây này chứa đoạn xen gen chuyển trong, hoặc nằm bên sườn bởi, trình tự hệ gen được chọn từ nhóm bao gồm các gốc 1-1873 nêu trong SEQ ID NO:29 và các gốc 6690-8557 nêu trong SEQ ID NO:29.

11. Phân tử polynucleotit phân lập, trong đó phân tử này

chứa ít nhất 15 nucleotit và duy trì việc lai trong các điều kiện rửa nghiêm ngặt với trình tự axit nucleic được chọn từ nhóm bao gồm các gốc 1-1873 nêu trong SEQ ID NO:29, các gốc 6690-8557 nêu trong SEQ ID NO:29, và các trình tự bổ sung của nó;

chứa trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:1-33; và/hoặc

lai trong các điều kiện rửa nghiêm ngặt với trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm các gốc 1863 đến 1875 nêu trong SEQ ID NO:29, các gốc 6679 đến 6700 nêu trong SEQ ID NO:29, và các trình tự bổ sung của nó.

12. Polynucleotit phân lập theo mục 11, trong đó polynucleotit này chứa trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:1-33.

13. Polynucleotit phân lập theo mục 11, trong đó polynucleotit này lai trong các điều kiện rửa nghiêm ngặt với trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm các gốc 1863 đến 1875 nêu trong SEQ ID NO:29, các gốc 6679 đến 6700 nêu trong

SEQ ID NO:29, và các trình tự bổ sung của nó.

14. Polynucleotit theo mục 13, trong đó polynucleotit này là amplicon được tạo ra bởi phản ứng chuỗi polymeraza.

15. Phương pháp phát hiện biến thể gen của cây ngô trong mẫu chứa ADN cây ngô, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho mẫu này tiếp xúc với ít nhất một polynucleotit chẩn đoán cho biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô AAD-1 có mặt trong hạt được lưu giữ ở bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Mỹ (ATCC) với số lưu giữ PTA-10244.

16. Phương pháp theo mục 15, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho mẫu này tiếp xúc với

- a. đoạn mỗi thứ nhất gắn với trình tự bên sườn được chọn từ nhóm bao gồm các gốc 1-1873 nêu trong SEQ ID NO:29, các gốc 6690-8557 nêu trong SEQ ID NO:29, và các trình tự bổ sung của nó; và
- b. đoạn mỗi thứ hai gắn với trình tự đoạn xen chứa các gốc 1874-6689 nêu trong SEQ ID NO:29 hoặc trình tự bổ sung của nó;

đưa mẫu này vào phản ứng chuỗi polymeraza; và phân tích amplicon được tạo ra giữa các đoạn mỗi này.

17. Phương pháp theo mục 16, trong đó các đoạn mỗi này được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:1-28.

18. Phương pháp theo mục 15, trong đó polynucleotit này chứa ít nhất 30 nucleotit và lai trong các điều kiện nghiêm ngặt với trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các gốc 1863 đến 1875 nêu trong SEQ ID NO:29, các gốc 6679 đến 6700 nêu trong SEQ ID NO:29, và các trình tự bổ sung của nó; trong đó phương pháp này còn bao gồm bước đưa mẫu và polynucleotit nêu trên vào các điều kiện lai nghiêm ngặt; và phân tích mẫu này về việc lai của polynucleotit nêu trên với ADN nêu trên.

19. Kit phát hiện ADN chứa đoạn mỗi thứ nhất và đoạn mỗi thứ hai theo mục 17.
20. Kit phát hiện ADN, để thực hiện phương pháp theo mục 18.
21. Kit phát hiện ADN chứa polynucleotit như được xác định ở mục 13.
22. Polynucleotit theo mục 12, polynucleotit này chứa SEQ ID NO:29.
23. Phương pháp tạo ra polynucleotit theo mục 22.
24. Phương pháp tạo ra cây chuyển gen theo mục 10, phương pháp này bao gồm xen gen chuyển vào phân đoạn ADN của hệ gen cây ngô, đoạn ADN này chứa đầu 5' chứa các gốc nucleotit 1-1873 nêu trong SEQ ID NO:29 và đầu 3' chứa các gốc nucleotit 6690-8557 nêu trong SEQ ID NO:29.
25. Phương pháp bao gồm bước lai cây ngô thứ nhất chứa SEQ ID NO:29 với cây ngô thứ hai để tạo ra cây ngô thứ ba chứa hệ gen, và phân tích cây ngô thứ ba này về sự có mặt của SEQ ID NO:29 trong hệ gen nêu trên.
26. Phương pháp theo mục 25, trong đó phương pháp này được sử dụng để gây giống cây ngô và/hoặc để đưa tính trạng kháng thuốc diệt cỏ vào cây ngô.

Tất cả các bằng sáng chế, đơn sáng chế, đơn tạm thời, và công bố được đề cập hoặc được trích dẫn trong bản mô tả này được đưa toàn bộ vào bằng cách viện dẫn ở phạm vi không gây mâu thuẫn với các chỉ dẫn rõ ràng trong bản mô tả này.

Các ví dụ dưới đây được bao gồm để minh họa các quy trình nhằm thực hiện sáng chế và để thể hiện một số phương án được ưu tiên theo sáng chế. Các ví dụ này không được hiểu là giới hạn sáng chế. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng các kỹ thuật được bộc lộ trong các ví dụ sau thể hiện phương pháp cụ thể được sử dụng để minh họa các phương án được ưu tiên nhằm thực hiện nó. Tuy nhiên, người có

hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, khi xem xét sáng chế, sẽ hiểu rằng nhiều thay đổi có thể được thực hiện trong các phương án cụ thể này trong khi vẫn thu được các kết quả giống hoặc tương tự mà không đi lệch khỏi ý tưởng và phạm vi của sáng chế. Trừ khi có chỉ dẫn khác, tất cả các tỷ lệ phần trăm là theo khối lượng và tất cả các tỷ lệ hỗn hợp dung môi là theo thể tích trừ khi có lưu ý khác.

Các ví dụ sau bao gồm việc dùng trước khi gieo hạt và/hoặc trước khi hạt nảy mầm. Việc dùng này không bị giới hạn ở biến thể gen "278". Tính kháng được tạo ra bởi gen AAD-1 còn có ích ở chỗ rút ngắn được thời gian luân canh. Điều này giúp cho người trồng trọt có thể linh hoạt hơn trong việc lên kế hoạch gieo trồng sau khi diệt cỏ. Khi không sử dụng sáng chế, việc phải đợi 7-30 ngày hoặc tương đương sau khi diệt cỏ trước khi gieo hạt có thể gây thiệt hại đáng kể về năng suất. Do đó, sáng chế mang lại lợi ích về mặt này. Xem, ví dụ 13 chẳng hạn. Các khoảng thời gian gieo trồng / dùng thuốc diệt cỏ bất kỳ, và khoảng nồng độ / mức dùng bất kỳ của (các) thuốc diệt cỏ được nêu hoặc đề xuất trong bản mô tả này đều có thể được sử dụng theo sáng chế.

Các từ viết tắt dưới đây được sử dụng trừ khi có chỉ dẫn khác.

AAD-1	aryloxyalkanoat dioxygenaza-1
bp	cặp bazơ
°C	độ Celcius
ADN	axit deoxyribonucleic
DIG	digoxigenin
EDTA	axit etylenđiamintetraaxetic
kb	kilobazơ
µg	microgam
µl	microlit
ml	mililit
M	khối lượng mol
OLP	đoạn dò gố chồng
PCR	phản ứng chuỗi polymeraza
PTU	đơn vị phiên mã thực vật
SDS	natri đodexyl sulfat
SOP	quy trình thao tác chuẩn
SSC	dung dịch đệm chứa hỗn hợp gồm natri clorua và natri xitrat, độ pH=7,0
TBE	dung dịch đệm chứa hỗn hợp gồm bazơ Tris, axit boric và EDTA, độ pH=8,3
V	vôn

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Biến nạp và chọn lọc biến thể gen AAD1 pDAS1740-278

Biến thể gen AAD1, pDAS1740-278, được tạo ra bởi WHISKER - qua trung gian biến nạp dòng cây ngô Hi-II. Phương pháp biến nạp được sử dụng được mô tả trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ # 20090093366. Mảnh FspI của plasmit pDAS1740, cũng được gọi là pDAB3812, (Fig.1) được biến nạp vào dòng cây ngô. Cấu trúc plasmit này chứa băng biểu hiện ở thực vật chứa RB7 MARv3 :: trình tự khởi đầu v2 *Zea mays* Ubiquitin 1 // AAD1 v3 // *Zea mays* PER5 3'UTR :: đơn vị phiên mã thực vật (plant transcription unit - PTU) RB 7 MARv4.

Nhiều biến thể gen được tạo ra. Các biến thể gen này tồn tại và tạo ra mô thể sản khỏe mạnh, kháng haloxyfop được định mã nhận diện duy nhất thể hiện các biến thể gen biến nạp giả định, và tiếp tục được chuyển sang môi trường chọn lọc mới. Các thực vật được tái sinh từ mô có nguồn gốc từ mỗi biến thể gen duy nhất và được chuyển sang nhà kính.

Các mẫu lá được lấy để phân tích phân tử để kiểm tra sự có mặt của gen chuyển AAD-1 bằng thấm tách Southern, xác nhận biên ADN, và xác nhận được hỗ trợ bởi chỉ dấu hệ gen. Các thực vật T0 dương tính được thụ phấn bằng dòng lai cùng dòng để thu được hạt T1. Các thực vật T1 có biến thể gen pDAS1470-278-9 (DAS-40278-9) được chọn, tự thụ phấn và được đặc trưng cho năm thế hệ. Trong khi đó, các thực vật T1 được lai ngược và được lai nhập vào chất mầm nguyên sinh ưu thế (XHH13) qua chọn lọc được hỗ trợ bởi chỉ dấu đối với một số thế hệ. Biến thể gen này được tạo ra từ thể phân lập được biến nạp độc lập. Biến thể gen này được chọn dựa trên các đặc tính duy nhất của nó như vị trí xen đoạn đơn, sự phân ly bình thường của Mendel và sự biểu hiện ổn định, và kết hợp hiệu quả nổi trội, bao gồm tính kháng thuốc diệt cỏ và tính chất nông học trong cơ sở kiểu gen rộng và qua nhiều vị trí môi trường. Các ví dụ sau chứa dữ liệu được sử dụng để mô tả đặc điểm biến thể gen pDAS-1740-278-9.

Ví dụ 2. Mô tả đặc điểm biến thể gen pDAS1740-278-9 bằng thấm tách Southern

Phân tích thấm tách Southern được sử dụng để thiết lập mẫu tích hợp của đoạn ADN được xen và xác định đoạn xen/số bản sao của gen *aad-1* trong biến thể gen pDAS-

1740-278-9 (DAS-40278-9). Dữ liệu thu được để chứng minh sự tích hợp và trạng thái nguyên vẹn của gen chuyển *aad-1* được xen vào hệ gen cây ngô.

Dữ liệu thẩm tách Southern gợi ý rằng đoạn xen mảnh pDAS1740/*Fsp* I trong biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô xảy ra dưới dạng tích hợp đơn giản của bản sao đơn, nguyên vẹn của PTU *aad-1* từ plasmit pDAS1740. Phân tích thẩm tách Southern chi tiết được tiến hành bằng cách sử dụng đoạn dò đặc hiệu với gen, trình tự khởi đầu, trình tự kết thúc, và các yếu tố điều hòa khác được chứa trong vùng plasmit và enzym giới hạn mô tả có vị trí phân cắt nằm trong plasmit và tạo ra mảnh lai bên trong plasmit hoặc các mảnh kéo dài điểm nối của plasmit bằng ADN hệ gen của cây ngô (các mảnh biên). Khối lượng phân tử được đưa ra từ việc tạo thể lai Southern để kết hợp enzym giới hạn và đoạn dò là duy nhất đối với biến thể gen, và thiết lập kiểu xác định của nó. Các phân tích này còn cho thấy rằng mảnh plasmit đã được xen vào ADN hệ gen của cây ngô mà không sắp xếp lại PTU *aad-1*. Các mảnh lai giống nhau được quan sát ở năm thế hệ riêng biệt của biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô chuyển gen cho thấy tính ổn định của sự di truyền của việc xen đoạn PTU *aad-1* qua các thế hệ. Việc lai bằng hỗn hợp ba đoạn dò xương sống nằm bên ngoài vị trí giới hạn của *Fsp* I trên plasmit pDAS1740 không phát hiện được mảnh ADN/gen cụ thể bất kỳ, cho thấy sự vắng mặt của gen kháng ampicillin và sự vắng mặt các vùng xương sống vector khác ngay cạnh vị trí giới hạn *Fsp* I của plasmit pDAS1740 trong biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô chuyển gen. Sơ đồ minh họa của đoạn xen trong biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô *aad-1* được thể hiện trên các fig.2-3.

Ví dụ 2.1. Thu mẫu lá ngô và tách ADN hệ gen (gDNA)

gDNA được lấy từ lá của các cây riêng rẽ chứa biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô *aad-1*. gDNA được tách từ mô lá được thu hoạch từ các cây riêng rẽ mang biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô *aad-1*. Hạt của cây ngô chuyển gen từ năm thế hệ riêng biệt chứa biến thể gen DAS-40278-9 được sử dụng. Hai mươi cây ngô riêng rẽ, có nguồn gốc từ bốn cây mỗi thế hệ, đối với biến thể gen DAS-40278-9 được chọn. Ngoài ra, gDNA được tách từ cây ngô thông thường, XHH13, chứa nền di truyền đại diện của dòng cơ bản, không có gen *aad-1*.

Trước khi tách gDNA, việc đục lỗ lá được thực hiện từ mỗi cây để thử nghiệm sự biểu hiện protein *aad-1* bằng cách sử dụng kit băng thử nhanh (American Bionostica,

Swedesboro, NJ) theo quy trình được đề nghị của nhà sản xuất. Mỗi mẫu đục lỗ lá được cho điểm + hoặc – lần lượt đối với sự có mặt hay không có *aad-1*. Chỉ các cây dương tính từ năm thế hệ chứa biến thể gen DAS-40278-9 được đem mô tả đặc điểm tiếp.

Các mẫu lá ngô được gom từ các cây riêng rẽ chứa biến thể gen DAS-40278-9 và cây đối chứng thông thường XHH13. Các mẫu lá được đông lạnh nhanh trong nitơ lỏng và được bảo quản ở khoảng -80°C cho đến khi sử dụng.

ADN hệ gen riêng rẽ được chiết từ mô lá ngô đông lạnh theo phương pháp CTAB chuẩn. Khi cần, một số ADN hệ gen được tinh chế tiếp bằng Qiagen Genomic-Tip (Qiagen, Valencia, CA) theo quy trình được đề nghị bởi nhà sản xuất. Sau khi chiết, ADN được định lượng bằng cách đo phổ huỳnh quang bằng chất phản ứng Pico Green (Invitrogen, Carlsbad, CA). Sau đó, ADN được làm hiện trên gel agarosa để xác nhận các giá trị từ phân tích Pico Green và để xác định chất lượng ADN.

Ví dụ 2.2. Phân cắt và tách ADN

Để mô tả đặc điểm phân tử của ADN, chín microgam (9 µg) của ADN hệ gen từ mẫu ADN của biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô và đối chứng thông thường được phân cắt bằng cách bổ sung xấp xỉ năm đến mười một đơn vị enzym giới hạn được chọn trên µg ADN và dung dịch đệm phản ứng tương ứng vào mỗi mẫu ADN. Mỗi mẫu được ủ ở nhiệt độ xấp xỉ 37°C qua đêm. Các enzym giới hạn *EcoR* I, *Nco* I, *Sac* I, *Fse* I, và *Hind* III được sử dụng để phân cắt (New England Biolabs, Ipswich, MA). Mẫu đối chứng lai dương tính được chuẩn bị bằng cách kết hợp ADN plasmit, pDAS1740 (pDAB3812), với ADN hệ gen từ đối chứng thông thường ở tỷ lệ đương lượng xấp xỉ 1 bản sao của gen chuyển trên hệ gen cây ngô, và được phân cắt bằng cách sử dụng quy trình và enzym giới hạn giống như các mẫu thử nghiệm. ADN từ đối chứng cây ngô thông thường (XHH13) được phân cắt bằng cách sử dụng các quy trình và enzym giới hạn giống như các mẫu thử nghiệm để làm đối chứng âm tính.

Các mẫu ADN được phân cắt kết tủa bằng Quick-Precip (Edge BioSystems, Gaithersburg, MD) và được tái tạo huyền phù trong 1× Blue Juice (Invitrogen, Carlsbad, CA) để đạt được thể tích mong muốn để nạp gel. Sau đó, các mẫu ADN và các chỉ dấu kích thước phân tử được điện di qua gel agarosa 0,8% bằng 1×dung dịch đệm TBE (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) ở 55-65 vôn trong xấp xỉ 18-22 giờ để đạt được việc tách mảnh.

Các gel được nhuộm bằng ethidi bromua (Invitrogen, Carlsbad, CA) và ADN được làm hiện dưới ánh sáng cực tím (ultraviolet - UV).

Ví dụ 2.3 Sự di chuyển Southern và xử lý màng

Phân tích thẩm tách Southern được thực hiện cơ bản như được mô tả bởi Memelink, et al. (1994) Southern, Northern, and Western Blot Analysis. Plant Mol. Biol. Manual F1:1-23. Nói ngắn gọn, tiếp theo việc tách điện di và làm hiện các đoạn ADN, các gel được tách purin bằng HCl 0,25N (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) trong khoảng 15 phút, và sau đó được tiếp xúc với dung dịch làm biến tính (AccuGENE, Sigma, St. Louis, MO) trong khoảng 30 phút, tiếp theo là dung dịch trung hòa (AccuGENE, Sigma, St. Louis, MO) trong ít nhất 30 phút. Sự di chuyển Southern được thực hiện qua đêm trên màng nilông (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) bằng cách sử dụng hệ thống bắc với 10×SSC (Sigma, St. Louis, MO). Sau khi di chuyển, các màng được rửa trong dung dịch 2× SSC và ADN được gắn với màng bằng cách liên kết ngang bằng UV. Quy trình này thu được màng thẩm tách Southern sẵn sàng để lai.

Ví dụ 2.4. Đánh dấu đoạn dò ADN và lai

Các đoạn ADN gắn với màng nilông được phát hiện bằng cách sử dụng đoạn dò được đánh dấu. Các đoạn dò được sử dụng để nghiên cứu được tạo ra bằng cách hợp nhất trên cơ sở PCR của nucleotit được đánh dấu bằng digoxigenin (DIG), [DIG-11]-dUTP, từ các mảnh được tạo ra bởi các đoạn mồi đặc hiệu với các yếu tố gen và các vùng khác từ plasmit pDAS1740. Việc tạo ra các đoạn dò ADN bằng cách tổng hợp PCR được thực hiện bằng cách sử dụng kit tổng hợp đoạn dò PCR DIG (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) theo quy trình được đề nghị bởi nhà sản xuất. Danh mục các đoạn dò được sử dụng để nghiên cứu được nêu trong bảng 1.

Bảng 1. Vị trí và chiều dài của các đoạn dò được sử dụng trong phân tích Southern

Tên đoạn dò	Yếu tố di truyền	Vị trí trên pDAS1740 (bp)	Chiều dài (bp)
OLP1-3	trình tự khởi đầu ubiquitin (ZmUbi1)	28-2123	2096
OLP2	gen <i>aad-1</i>	2103-3022	920

OLP3A	trình tự kết thúc peroxidaza (ZmPer5)	3002-3397	396
OLP3B	RB7 Mar v4	3375-4865	1491
OLP4ABC	Xương sống (OLP4A)	4900-5848	949
	Gen Ap ^r xương sống (OLP4B)	5828-6681	855
	Xương sống (OLP4C)	6660-7144	485
OLP5-2	RB7 Mar v3	7124-8507	1384

Các đoạn dò được đánh dấu được phân tích bằng cách điện di trên gel agarosa để xác định chất lượng và số lượng của chúng. Sau đó, lượng mong muốn của đoạn dò được đánh dấu được sử dụng để lai với ADN đích trên màng nilông để phát hiện các mảnh đặc hiệu bằng cách sử dụng các quy trình được mô tả đối với dung dịch DIG Easy Hyb (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Nói ngắn gọn, màng nilông thấm ADN được cố định trên đó được rửa nhanh trong 2×SSC và được lai trước bằng 20-25 ml dung dịch DIG Easy Hyb được làm ấm trước trong bình lai ở nhiệt độ xấp xỉ 50°C trong tối thiểu 30 phút trong buồng lai. Sau đó, dung dịch lai trước được gạn và thay bằng 20 ml dung dịch DIG Easy Hyb được làm ấm trước chứa một lượng mong muốn của các đoạn dò đặc hiệu được làm tiền biến tính bằng cách đun sôi trong nước trong 5 phút. Sau đó, bước lai được tiến hành ở nhiệt độ xấp xỉ 40-60°C qua đêm trong buồng lai.

Ví dụ 2.5. Phát hiện

Kết thúc việc lai đoạn dò, dung dịch DIG Easy Hyb chứa các đoạn dò được gạn vào các ống sạch và được bảo quản ở nhiệt độ -20°C. Các đoạn dò này có thể được tái sử dụng trong 2-3 lần theo quy trình được đề nghị bởi nhà sản xuất. Vết thấm trên màng được rửa nhanh và rửa hai lần trong vật chứa sạch bằng chất dẻo bằng dung dịch đệm rửa có độ nghiêm ngặt thấp (2×SSC, 0,1%SDS) trong khoảng 5 phút ở nhiệt độ phòng, tiếp theo rửa hai lần bằng dung dịch đệm rửa có độ nghiêm ngặt cao (0,1×SSC, 0,1% SDS) trong 15 phút, mỗi lần ở nhiệt độ xấp xỉ 65°C. Sau đó, vết thấm trên màng được chuyển sang vật chứa sạch khác bằng chất dẻo và rửa nhanh bằng 1×dung dịch đệm rửa từ bộ dung dịch đệm rửa và phong bế DIG (DIG Wash and Block Buffer Set) (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) trong khoảng 2 phút, tiếp theo phong bế trong 1× dung dịch đệm phong

bể trong tối thiểu 30 phút, tiếp theo ủ bằng kháng thể kháng DIG-AP (alkaline phosphatase - phosphatase kiềm) (tỷ lệ pha loãng 1:5.000, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) trong 1× dung dịch đệm phong bể trong tối thiểu 30 phút. Sau 2-3 lần rửa bằng 1× dung dịch đệm rửa, các đoạn dò ADN đặc hiệu vẫn gắn với vết thấm trên màng và mẫu chuẩn ADN được đánh dấu bằng DIG được làm hiện bằng cách sử dụng hệ phát hiện axit nucleic phát quang hóa học CDP-Star (CDP-Star Chemiluminescent Nucleic Acid Detection System) (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) theo đề nghị của nhà sản xuất. Các vết thấm được tiếp xúc với màng phát quang hóa học (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) trong một hoặc nhiều thời điểm để phát hiện các mảnh lai và để làm hiện mẫu chuẩn kích thước phân tử. Sau đó, các màng được làm hiện hình bằng chất hiện hình màng All-Pro 100 Plus (Konica SRX-101) và các ảnh được quét để báo cáo. Số và kích thước của các dải phát hiện được ghi lại đối với mỗi đoạn dò. Chỉ dấu khối lượng phân tử ADN được đánh dấu bằng DIG II (MWM DIG II), có thể nhìn thấy sau khi phát hiện bằng DIG như được mô tả, được sử dụng để xác định kích thước mảnh lai trên vết thấm Southern.

Ví dụ 2.6. Tách đoạn dò

Các đoạn dò ADN được tách ra khỏi vết thấm trên màng sau khi thu được dữ liệu lai Southern, và vết thấm trên màng có thể được tái sử dụng để lai với đoạn dò ADN khác theo các quy trình được đề nghị bởi nhà sản xuất (DIG Application Manual for Filter Hybridization, (2003). Roche Diagnostics). Nói ngắn gọn, sau khi phát hiện tín hiệu và phơi sáng màng, các vết thấm trên màng được rửa kỹ bằng nước Milli-Q và tiếp theo rửa hai lần trong dung dịch đệm tách (NaOH 0,2N, 0,1% SDS) trong khoảng 15 phút ở nhiệt độ phòng hoặc ở nhiệt độ 37°C. Sau đó, các vết thấm trên màng được rửa nhanh trong 2×SSC và sẵn sàng để lai trước và lai với một đoạn dò ADN khác. Các vết thấm trên màng được tiếp xúc với màng phát quang hóa học mới để bảo đảm tất cả các đoạn dò ADN được tách trước khi tiến hành bước lai tiếp theo. Các màng được phơi sáng lại được giữ cùng với gói dữ liệu lai trước đó trong hồ sơ nghiên cứu để lưu lại.

Ví dụ 2.7. Các kết quả thấm tách Southern

Các kích thước mảnh kỳ vọng và quan sát được với việc phân cắt và đoạn dò cụ thể, dựa trên các vị trí enzym giới hạn đã biết của mảnh pDAS1740/*Fsp* I, được đưa ra trong

bảng 2. Hai loại mảnh được nhận diện từ việc phân cắt và lai này: các mảnh bên trong, trong đó vị trí enzyme đã biết nằm bên sườn vùng đoạn dò và hoàn toàn chứa trong mảnh pDAS1740/*Fsp* I và các mảnh biên trong đó vị trí enzyme đã biết nằm ở một đầu của vùng đoạn dò và vị trí thứ hai được mong muốn trong hệ gen cây ngô. Các kích thước mảnh biên thay đổi theo biến thể gen bởi vì, trong hầu hết các trường hợp, các vị trí tích hợp đoạn ADN là duy nhất đối với mỗi biến thể gen. Các mảnh biên đưa ra cách để định vị vị trí enzyme giới hạn liên quan đến ADN được tích hợp và để đánh giá số lượng xen đoạn ADN. Dựa trên các phân tích thâm tách Southern được hoàn thành trong nghiên cứu này, kết luận rằng một bản sao của PTU *aad-1* nguyên vẹn từ plasmit pDAS1740/*Fsp* I được xen vào hệ gen cây ngô chứa biến thể gen DAS-40278-9 như được chi tiết hóa trong sơ đồ xen đoạn (các fig.2-3).

Bảng 2. Các mảnh lai được dự đoán và quan sát được trong phân tích thâm tách Southern

Đoạn dò ADN	Các enzyme giới hạn		Kích thước mảnh kỳ vọng (bp) ¹	Kích thước mảnh quan sát được (bp) ²
<i>aad-1</i>	<i>EcoR</i> I	pDAS1740	8512	8512
		XHH13	không	không
		DAS-40278-9	>3382 (biên)	~12000
	<i>Nco</i> I	pDAS1740	8512	8512
		XHH13	không	không
		DAS-40278-9	>2764 (biên)	~4000
	<i>Sac</i> I	pDAS1740	8512	8512
		XHH13	không	không
		DAS-40278-9	>4389 (biên)	~16000
	<i>Fse</i> I / <i>Hind</i> III	pDAS1740	3361	3361
		XHH13	không	không
		DAS-40278-9	3361	3361
ZmUbi1 prom.	<i>Nco</i> I	pDAS1740	8512	8512, ~3600*
		XHH13	không	~3600*
		DAS-40278-9	>3472 (biên)	~6300, ~3600*
	<i>Sac</i> I	pDAS1740	8512	8512, ~3800*
		XHH13	không	~3800*
		DAS-40278-9	>4389 (biên)	~3800*, ~16000
	<i>Fse</i> I / <i>Hind</i> III	pDAS1740	3361	3361, ~6400*
		XHH13	không	~6400*
		DAS-40278-9	3361	3361, ~6400*#

Đoạn dò ADN	Các enzym giới hạn		Kích thước mảnh kỳ vọng (bp) ¹	Kích thước mảnh quan sát được (bp) ²
ZmPer5 term.	<i>Nco</i> I	pDAS1740	8512	8512, ~3900*
		XHH13	không	~3900*
		DAS-40278-9	>2764 (biên)	~4000, ~3900*
	<i>Sac</i> I	pDAS1740	8512	8512, ~9000*
		XHH13	không	~9000*
		DAS-40278-9	>1847 (biên)	~1900, ~9000*
	<i>Fse</i> I / <i>Hind</i> III	pDAS1740	3361	3361, ~2100*
		XHH13	không	~2100*
		DAS-40278-9	3361	3361, ~2100*
RB7 mar4	<i>Nco</i> I	pDAS1740	8512	8512
		XHH13	không	không
		DAS-40278-9	>2764 (biên) >2764 (biên))	~4000 ~6300
	<i>Sac</i> I	pDAS1740	8512	8512
		XHH13	không	không
		DAS-40278-9	>1847 (biên) >1847 (biên)	~1900 ~16000
RB7 mar3	<i>Nco</i> I	pDAS1740	8512	8512
		XHH13	không	không
		DAS-40278-9	>2764 (biên) >2764 (biên))	~4000 ~6300
	<i>Sac</i> I	pDAS1740	8512	8512
		XHH13	không	không
		DAS-40278-9	>1847 (biên) >1847 (biên)	~1900 ~16000
xương sống	<i>Nco</i> I	pDAS1740	8512	8512
		XHH13	không	không
		DAS-40278-9	không	không
	<i>Sac</i> I	pDAS1740	8512	8512
		XHH13	không	không
		DAS-40278-9	không	không

Lưu ý: * Dấu sao sau kích thước mảnh quan sát được chỉ việc lai trình tự nội sinh được phát hiện qua tất cả các mẫu (bao gồm đối chứng âm tính)

Vạch đôi trong mẫu đối chứng thông thường, mẫu BC3S1, và một số mẫu BC3S2

1. Các kích thước mảnh kỳ vọng là dựa trên sơ đồ plasmit của pDAS1740 (pDAB3812) như được thể hiện trên fig.1.

2. Các kích thước mảnh quan sát được gần như được coi là từ các phân tích này và dựa trên các kích thước được chỉ ra của các mảnh chỉ dấu khối lượng phân tử ADN được đánh dấu bằng DIG II. Do sự hợp nhất của các phân tử DIG để hiện ảnh, các mảnh chỉ dấu thường có giá trị lớn hơn xấp xỉ 5-10% so với khối lượng phân tử được chỉ ra thực tế của chúng.

Các enzym giới hạn có vị trí giới hạn duy nhất trong plasmit pDAS1740, *EcoR* I, *Nco* I, *Sac* I, *Fse* I/*Hind* III, được chọn để mô tả đặc điểm đoạn xen gen *aad-1* trong biến thể gen DAS-40278-9. Mảnh biên > 3382 bp, >2764 bp, >4389 bp được dự đoán để lai với đoạn dò gen *aad-1* sau khi phân cắt lần lượt bằng *EcoR* I, *Nco* I, và *Sac* I (bảng 2). Các dải lai *aad-1* đơn ~12000 bp, ~4000 bp, và ~16000 bp quan sát được khi *EcoR* I, *Nco* I, và *Sac* I lần lượt được sử dụng, chỉ ra vị trí đơn của xen đoạn gen *aad-1* trong hệ gen cây ngô chứa biến thể gen DAS-40278-9. Việc phân cắt kép bằng *Fse* I và *Hind* III được chọn để giải phóng mảnh 3361 bp chứa đơn vị phiên mã thực vật *aad-1* (PTU, trình tự khởi đầu/gen/trình tự kết thúc) (bảng 2). Mảnh 3361 bp được dự đoán được quan sát bằng đoạn dò gen *aad-1* sau khi phân cắt *Fse* I/*Hind* III. Các kết quả thu được bằng cách phân cắt bằng tất cả bốn enzym/hỗn hợp enzym của mẫu DAS-40278-9 tiếp theo lai đoạn dò gen *aad-1* cho thấy rằng bản sao đơn của PTU *aad-1* nguyên vẹn từ plasmit pDAS1740 được xen vào hệ gen cây ngô chứa biến thể gen DAS-40278-9.

Các enzym giới hạn *Nco* I, *Sac* I và *Fse* I/*Hind* III được chọn để mô tả đặc điểm vùng trình tự khởi đầu (ZmUbi1) của *aad-1* trong biến thể gen DAS-40278-9. Việc phân cắt *Nco* I và *Sac* I được mong muốn tạo ra mảnh vùng biên lần lượt >3472 bp và >4389 bp, khi được lai với các đoạn dò ADN đặc hiệu với vùng trình tự khởi đầu ZmUbi1 (bảng 2). Hai dải lai ~6300 bp và ~3600 bp được phát hiện bằng đoạn dò trình tự khởi đầu ZmUbi1 sau khi phân cắt *Nco* I. Tuy nhiên, dải ~3600 bp, có mặt ở tất cả các làn mẫu kể cả đối chứng thông thường, gợi ý rằng dải ~3600 bp là dải tín hiệu không đặc hiệu thu được từ việc gắn kết tương đồng của đoạn dò trình tự khởi đầu ubiquitin có nguồn gốc từ cây ngô (ZmUbi1) với gen *ubi* nội sinh của cây ngô. Ngược lại, dải tín hiệu ~6300 bp được phát hiện trong mẫu DAS-40278-9 được thử nghiệm nhưng không có trong đối chứng thông thường, cho thấy rằng dải ~6300 bp là đặc hiệu với đoạn dò trình tự khởi đầu ZmUbi1 từ plasmit pDAS1740 và do đó nó là dải *Nco* I/ZmUbi1 mong muốn được chỉ ra trong bảng 2. Tương tự, hai dải lai ~3800 bp và ~16000 bp được phát hiện bằng đoạn dò trình tự khởi đầu ZmUbi1 sau phân cắt *Sac* I. Dải ~3800 bp xuất hiện trong tất cả các làn mẫu kể cả đối chứng thông thường và do đó được coi là lai không đặc hiệu của đoạn dò trình tự khởi đầu ZmUbi1 với gen *ubi* nội sinh của cây ngô. Dải lai ~16000 bp chỉ có mặt trong các mẫu DAS-40278-9 được coi là dải *Sac* I/ZmUbi1 kỳ vọng. Việc phân cắt kép bằng *Fse* I/*Hind* III được kỳ vọng giải phóng mảnh PTU *aad-1* có kích thước 3361 bp lai với đoạn dò trình

tự khởi đầu ZmUbi1 (bảng 2). Dải 3361 bp này và dải lai không đặc hiệu có kích thước ~6400 bp được phát hiện bằng đoạn dò trình tự khởi đầu ZmUbi1 sau phân cắt *Fse I/Hind III*. Dải ~6400 bp được coi là gắn kết không đặc hiệu của đoạn dò trình tự khởi đầu ZmUbi1 với gen *ubi* nội sinh của cây ngô bởi vì dải này có mặt trong tất cả các làn mẫu kể cả đối chứng thông thường. Ngoài ra, một dải khác rất gần ~6400 bp quan sát được trong mẫu đối chứng thông thường, mẫu BC3S1, và một số mẫu BC3S2. Dải bổ sung này rất gần ~6400 bp cũng được coi là không đặc hiệu bởi vì nó có mặt trong làn mẫu đối chứng thông thường XHH13 và có liên quan gần nhất với nền di truyền của XHH13.

Các enzym/hỗn hợp enzym giới hạn giống như vậy, *Nco I*, *Sac I* và *Fse I/Hind III* được chọn để mô tả đặc điểm vùng trình tự kết thúc (ZmPer5) của *aad-1* trong biến thể gen DAS-40278-9. Phân cắt *Nco I* được kỳ vọng tạo ra mảnh vùng biên >2764 bp khi được lai với các đoạn dò ADN đặc hiệu với vùng trình tự kết thúc ZmPer5 (bảng 2). Hai dải lai ~4000 bp và ~3900 bp được phát hiện bằng đoạn dò trình tự kết thúc ZmPer5 sau phân cắt *Nco I*. Dải ~3900 bp có mặt ở tất cả các làn mẫu kể cả đối chứng thông thường, gợi ý rằng dải ~3900 bp là dải tín hiệu không đặc hiệu có thể do gắn kết tương đồng của đoạn dò trình tự kết thúc gen peroxidaza có nguồn gốc từ cây ngô (ZmPer5) với gen *per* nội sinh của cây ngô. Ngược lại, dải tín hiệu ~4000 bp được phát hiện trong mẫu DAS-40278-9 được thử nghiệm nhưng không có trong đối chứng thông thường, cho thấy rằng dải ~4000 bp là đặc hiệu với đoạn dò trình tự kết thúc ZmPer5 từ plasmid pDAS1740 và do đó nó là dải *Nco I/ZmPer5* mong muốn được chỉ ra trong bảng 2. Mảnh biên >1847 bp được kỳ vọng để lai với đoạn dò trình tự kết thúc ZmPer5 sau phân cắt *Sac I*. Hai dải lai ~1900 bp và ~9000 bp được phát hiện bằng đoạn dò trình tự kết thúc ZmPer5 sau phân cắt *Sac I*. Dải ~9000 bp xuất hiện trong tất cả các làn mẫu kể cả đối chứng thông thường và do đó được coi là lai không đặc hiệu của đoạn dò trình tự kết thúc ZmPer5 với gen *per* nội sinh của cây ngô. Dải lai ~1900 bp chỉ có mặt trong các mẫu DAS-40278-9 được coi là dải *Sac I/ZmPer5* kỳ vọng. Việc phân cắt kép bằng *Fse I/Hind III* được kỳ vọng giải phóng mảnh PTU *aad-1* có kích thước 3361 bp lai với đoạn dò trình tự kết thúc ZmPer5 (bảng 2). Dải 3361 bp này và dải lai không đặc hiệu bổ sung có kích thước ~2100 bp được phát hiện bằng đoạn dò trình tự kết thúc ZmPer5 sau phân cắt *Fse I/Hind III*. Dải ~2100 bp bổ sung là dải gắn kết không đặc hiệu của đoạn dò trình tự kết thúc ZmPer5 với gen nội sinh của cây ngô do dải này có mặt trong tất cả các làn mẫu kể cả đối chứng âm tính. Các kết quả thu được bằng

các phân cắt của mẫu DAS-40278-9 tiếp theo lai đoạn dò trình tự khởi đầu *ZmUbi1* và trình tự kết thúc *ZmPer5* còn khẳng định rằng bản sao đơn của PTU *aad-1* nguyên vẹn từ plasmit pDAS1740 được xen vào hệ gen cây ngô chứa biến thể gen DAS-40278-9.

Các enzym giới hạn, *Nco* I và *Sac* I, được chọn để mô tả đặc điểm phần còn lại của các thành phần từ mảnh pDAS1740/*Fsp* I trong biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô AAD-1 (bảng 2). Các trình tự ADN của các thành phần RB7 Mar v3 và RB7 Mar v4 có mức độ đồng nhất trên 99,7%, do đó các đoạn dò ADN đặc hiệu với RB7 Mar v3 hoặc RB7 Mar v4 được kỳ vọng để lai với các đoạn ADN chứa một trong hai phiên bản của RB7 Mar. Hai mảnh biên >2764 bp và >3472 bp được kỳ vọng để lai với các đoạn dò RB7 Mar v4 và RB7 Mar v3 sau phân cắt *Nco* I (bảng 2). Hai dải lai ~4000 bp và ~6300 bp thu được với một trong hai đoạn dò RB7 Mar v4 hoặc RB7 Mar v3 sau phân cắt *Nco* I trong các mẫu DAS-40278-9. Tương tự, hai mảnh biên >1847 bp và >4389 bp được dự đoán với các đoạn dò RB7 Mar v4 và RB7 Mar v3 sau phân cắt *Sac* I (bảng 2). Các dải lai ~1900 bp và ~16000 bp được phát hiện trong các mẫu DAS-40278-9 bằng đoạn dò RB7 Mar v4 hoặc RB7 Mar v3 sau phân cắt *Sac* I.

Đồng thời, các kết quả lai Southern thu được bằng các đoạn dò yếu tố này chỉ ra rằng ADN được xen trong biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô chứa PTU *aad-1* nguyên vẹn cùng với vùng gắn chất nền RB7 Mar v3 và RB7 Mar v4 lần lượt ở các đầu 5' và 3' của đoạn xen.

Ví dụ 2.8. Sự vắng mặt của các trình tự xương sống

Sự kết hợp theo tỷ lệ mol tương đương của ba đoạn ADN (bảng 1) bao trùm gần như toàn bộ vùng xương sống *Fsp* I (4867-7143 bp trong plasmit pDAS1740) của plasmit pDAS1740 được sử dụng làm đoạn dò xương sống để mô tả đặc điểm biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô AAD-1. Mảnh plasmit pDAS1740/*Fsp* I được sử dụng để tạo ra biến thể gen DAS-40278-9, do đó, không có tín hiệu lai đặc hiệu được kỳ vọng với sự kết hợp đoạn dò xương sống (bảng 2) sau phân cắt bằng enzym giới hạn bất kỳ dưới đây. Đã xác định được rằng không có tín hiệu lai đặc hiệu được phát hiện bằng đoạn dò xương sống sau phân cắt *Nco* I hoặc *Sac* I trong tất cả các mẫu DAS-40278-9. Các lần đối chứng dương tính chứa các dải lai mong muốn thể hiện rằng các đoạn dò có khả năng lai với các đoạn ADN tương đồng bất kỳ nếu có mặt trong mẫu. Dữ liệu này gợi ý rằng việc xen đoạn trong

biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô không bao gồm trình tự xương sống vectơ bất kỳ bên ngoài vùng *Fsp* I từ plasmid pDAS1740.

Các mẫu lá từ năm thế hệ riêng biệt chứa biến thể gen DAS-40278-9 được sử dụng để tiến hành phân tích thẩm tách Southern để mô tả đặc điểm phân tử. Kiểu tích hợp được khảo sát bằng cách sử dụng phân cắt enzym giới hạn được chọn và kết hợp đoạn dò để mô tả đặc điểm gen được xen, *aad-1*, cũng như các vùng không mã hóa chứa trình tự khởi đầu, trình tự kết thúc của biểu hiện gen, và vùng gắn chất nền.

Việc mô tả đặc điểm thẩm tách Southern của ADN được xen vào biến thể gen DAS-40278-9 cho thấy rằng bản sao nguyên vẹn đơn của PTU *aad-1* đã được tích hợp vào biến thể gen DAS-40278-9. Khối lượng phân tử được đưa ra bằng cách tạo thể lai Southern để kết hợp enzym giới hạn và đoạn dò là duy nhất đối với biến thể gen, và thiết lập kiểu xác định của nó. Kiểu lai là giống nhau qua tất cả năm thế hệ, cho thấy rằng đoạn xen là ổn định trong hệ gen cây ngô. Việc lai bằng các đoạn dò bao trùm vùng xương sống ngoài mảnh biến nạp pDAS1740/*Fsp* I từ plasmid pDAS1740 khẳng định rằng không có trình tự xương sống vectơ được kết hợp vào biến thể gen DAS-40278-9.

Ví dụ 3. Tách dòng và mô tả đặc điểm của trình tự ADN trong đoạn xen và vùng biên bên sườn của biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô

Để mô tả đặc điểm ADN được xen và mô tả vị trí xen hệ gen, các trình tự ADN của đoạn xen và vùng biên của biến thể gen DAS-40278-9 được xác định. Tổng số 8557 bp của trình tự hệ gen của biến thể gen DAS-40278-9 được xác nhận, bao gồm 1873 bp của trình tự biên bên sườn 5', 1868 bp của trình tự biên bên sườn 3', và 4816 bp của đoạn xen ADN. Đoạn xen ADN 4816 bp chứa băng biểu hiện *aad-1* nguyên vẹn, một phần MAR v3 259 bp trên đầu tận cùng 5', và một phần MAR v4 1096 bp trên đầu tận cùng 3'. Phân tích trình tự phát hiện ra xen đoạn 21 bp ở điểm nối tích hợp 5' và loại bỏ hai cặp bazơ khỏi locut xen đoạn của hệ gen cây ngô. Xen đoạn một cặp bazơ được tìm thấy ở điểm nối tích hợp 3' giữa hệ gen cây ngô và đoạn xen DAS-40278-9. Ngoài ra, sự thay đổi bazơ đơn (T thành C) được tìm thấy trong đoạn xen ở vị trí 5212 trong vùng không mã hóa của 3' UTR. Không có thay đổi nào trong các thay đổi này ảnh hưởng đến thành phần khung đọc mở của băng biểu hiện *aad-1*.

Khuếch đại PCR dựa trên đoạn xen và trình tự biên của biến thể gen DAS-40278-9 xác nhận rằng các vùng biên có nguồn gốc từ cây ngô và các vùng nối có thể được sử dụng để xác định tính đặc hiệu với biến thể gen của DAS-40278-9. Phân tích kéo dài trình tự các vùng nối chỉ ra rằng không thu được khung đọc mở mới ($ORF \geq 200$ codon) từ đoạn xen ADN trong biến thể gen DAS-40278-9 và ngoài ra không khung đọc mở hệ gen nào bị phá vỡ bởi việc tích hợp DAS-40278-9 trong hệ gen cây ngô nguyên thể. Nói chung, việc mô tả đặc điểm của đoạn xen và các trình tự biên của biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô AAD-1 chỉ ra rằng bản sao nguyên vẹn đơn của băng biểu hiện *aad-1* được tích hợp vào hệ gen nguyên thể của cây ngô.

Ví dụ 3.1. Tách và định lượng ADN hệ gen

ADN hệ gen được tách từ mô lá đã nghiền được đông khô hoặc tươi bằng cách sử dụng phương pháp CTAB cải biến. Các mẫu ADN được hoà tan trong $1 \times TE$ (10mM Tris pH8,0, 1mM EDTA) (Fluka, Sigma, St. Louis, MO) và được định lượng bằng phương pháp Pico Green theo chỉ dẫn của nhà sản xuất (Molecular Probes, Eugene, OR). Đối với phân tích PCR, các mẫu ADN được pha loãng bằng nước đạt cấp độ sinh học phân tử (5 PRIME, Gaithersburg, MD) để thu được nồng độ bằng 10-100 ng/ μ l.

Ví dụ 3.2. Đoạn môi PCR

Bảng 3 liệt kê các trình tự đoạn môi được sử dụng để tách dòng đoạn xen ADN và các vùng biên bên sườn của biến thể gen DAS-40278-9, với các vị trí và mô tả được đánh dấu trên Fig. 4. Bảng 4 liệt kê các trình tự đoạn môi được sử dụng để xác nhận đoạn xen và các trình tự biên. Các vị trí đoạn môi được đánh dấu lần lượt trên các fig.4 và 5. Tất cả các đoạn môi được tổng hợp bởi Integrated DNA Technologies, Inc. (Coralville, IA). Các đoạn môi được hoà tan trong nước (5 PRIME, Gaithersburg, MD) đến nồng độ 100 μ M đối với dung dịch gốc và được pha loãng bằng nước đến nồng độ 10 μ M đối với dung dịch thử nghiệm.

Bảng 3. Danh sách các trình tự đoạn mồi được sử dụng trong việc tách dòng đoạn xen trong biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô và trình tự biên bên sườn

Tên đoạn mồi	Kích thước (bp)	Vị trí (bp)	Trình tự	Mục đích
5End3812_A	26	2231-2256 (-)	Seq ID No: 1: 5' – TGCACTGCAGGTCGACTCTAGAGGAT – 3'	PCR bậc một cho trình tự biên 5'
5End3812_B	23	2110-2132 (-)	Seq ID No: 2: 5' – GCGGTGGCCACTATTTTCAGAAG – 3'	PCR bậc hai cho trình tự biên 5'
3End3812_C	26	5535-5560 (+)	Seq ID No: 3: 5' – TTGTTACGGCATATATCCAATAGCGG – 3'	PCR bậc một cho trình tự biên 3'
3End3812_D	26	5587-5612 (+)	Seq ID No: 4: 5' – CCGTGGCCTATTTTCAGAAGAAGTTC – 3'	PCR bậc hai cho trình tự biên 3'
Amp 1F	23	736-758 (+)	Seq ID No: 5: 5' – ACAACCATATTGGCTTTGGCTGA – 3'	Khuếch đại đoạn xen, Amplicon 1, được sử dụng với Amp 1R
Amp 1R	28	2475-2502 (-)	Seq ID No: 6: 5' – CCTGTTGTCAAAATACTCAATTGTCCTT – 3'	Khuếch đại đoạn xen, Amplicon 1, được sử dụng với Amp 1F
Amp 2F	23	1696-1718 (+)	Seq ID No: 7: 5' – CTCCATTACAGGAGACCTCGCTTG – 3'	Khuếch đại đoạn xen, Amplicon 2, được sử dụng với Amp 2R
Amp 2R	23	3376-3398 (-)	Seq ID No: 8: 5' – GTACAGGTCGCATCCGTGTACGA – 3'	Khuếch đại đoạn xen, Amplicon 2, được sử dụng với Amp 2F
Amp 3F	25	3254-3278 (+)	Seq ID No: 9: 5' – CCCCCCTCTCTACCTTCTCTAGAT – 3'	Khuếch đại đoạn xen, Amplicon 3, được sử dụng với Amp 3R
Amp 3R	23	4931-4953 (-)	Seq ID No: 10: 5' – GTCATGCCCTCAATTCTCTGACA – 3'	Khuếch đại đoạn xen, Amplicon 3, được sử dụng với Amp 3F
Amp 4F	23	4806-4828 (+)	Seq ID No: 11: 5' – GTCGCTTCAGCAACACCTCAGTC – 3'	Khuếch đại đoạn xen, Amplicon 4, được sử dụng với

				Amp 4R
Amp 4R	23	6767-6789 (-)	Seq ID No: 12: 5' – AGCTCAGATCAAAGACACACCCC – 3'	Khuếch đại đoạn xen, Amplicon 4, được sử dụng với Amp 4F
Amp 5F	28	6300-6327 (+)	Seq ID No: 13: 5' – TCGTTTGACTAATTTTCGTTGATGTAC – 3'	Khuếch đại đoạn xen, Amplicon 5, được sử dụng với Amp 5R
Amp 5R	23	7761-7783 (-)	Seq ID No: 14: 5' – TCTCACTTTCGTGTCATCGGTCG – 3'	Khuếch đại đoạn xen, Amplicon 5, được sử dụng với Amp 5F

(+): Trình tự trực tiếp;

(-): Trình tự bổ sung;

Bảng 4. Danh sách các trình tự đoạn mồi được sử dụng trong việc xác nhận ADN hệ gen của cây ngô

Tên đoạn mồi	Kích thước (bp)	Vị trí (bp)	Trình tự	Mục đích
1F5End01	17	1816-1832 (+)	Seq ID No: 15: 5' – CCAGCACGAACCATTGA – 3'	Xác nhận ADN hệ gen biên 5', được sử dụng với AI5End01
1F5End02	24	1629-1652 (+)	Seq ID No: 16: 5' – CGTGTATATAAGGTCCAGAGGGTA – 3'	Xác nhận ADN hệ gen biên 5', được sử dụng với AI5End02
AI5End01	17	4281-4297 (-)	Seq ID No: 17: 5' – TTGGGAGAGAGGGCTGA – 3'	Xác nhận ADN hệ gen biên 5', được sử dụng với 1F5End01
AI5End02	20	4406-4426 (-)	Seq ID No: 18: 5' – TGGTAAGTGTGGAAGGCATC – 3'	Xác nhận ADN hệ gen biên 5', được sử dụng với 1F5End02
1F3End03	20	8296-8315 (-)	Seq ID No: 19: 5' – GAGGTACAACCGAGCGTTT – 3'	Xác nhận ADN hệ gen, được sử dụng với 1F5End03
1F3End04	19	8419-8437 (-)	Seq ID No: 20: 5' – CCGACGCTTTTCTGGAGTA – 3'	Xác nhận ADN hệ gen, được sử dụng với 1F5End04

1F5End03	22	378-399 (+)	Seq ID No: 21: 5' – TGTGCCACATAATCACGTAACA– 3'	Xác nhận ADN hệ gen, được sử dụng với 1F3End03
1F5End04	20	267-286 (+)	Seq ID No: 22: 5' – GAGACGTATGCGAAAATTCG– 3'	Xác nhận ADN hệ gen, được sử dụng với 1F3End04
AI3End01	22	4973-4994 (+)	Seq ID No: 23: 5' – TTGCTTCAGTTCCTCTATGAGC– 3'	Xác nhận ADN hệ gen biên 3', được sử dụng với 1F3End05
1F3End05	19	7060-7078 (-)	Seq ID No: 24: 5' – TCCGTGTCCACTCCTTTGT– 3'	Xác nhận ADN hệ gen biên 3', được sử dụng với AI3End01
1F5EndT1F	22	2033-2054 (-)	Seq ID No: 25: 5' – GCAAAGGAAACTGCCATTCTT– 3'	Khuếch đại trình tự đặc hiệu 278 ở điểm nối 5'
1F5EndT1R	20	1765-1784 (+)	Seq ID No: 26: 5' – TCTCTAAGCGGCCCAAACCTT– 3'	Khuếch đại trình tự đặc hiệu 278 ở điểm nối 5'
Corn278-F	23	1884-1906 (-)	Seq ID No: 27: 5' – ATTCTGGCTTTGCTGTAAATCGT– 3'	Khuếch đại trình tự đặc hiệu 278 ở điểm nối 5'
Corn278-R	24	1834-1857 (+)	Seq ID No: 28: 5' – TTACAATCAACAGCACCGTACCTT– 3'	Khuếch đại trình tự đặc hiệu 278 ở điểm nối 5'

(+): Trình tự trực tiếp;

(-): Trình tự bổ sung;

Ví dụ 3.3. Di chuyển đọc hệ gen

GenomeWalker™ Universal Kit (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA) được sử dụng để tách dòng các trình tự biên bên sườn 5' và 3' của biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô. Theo hướng dẫn của nhà sản xuất, khoảng 2,5 µg ADN hệ gen từ biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô AAD-1 được phân cắt qua đêm bằng *EcoR* V, *Stu* I (cả hai được cung cấp trong kit) hoặc *Sca* I (New England Biolabs, Ipswich, MA). ADN phân cắt được được tinh chế bằng cách sử dụng DNA Clean & Concentrator™-25 (ZYMO Research, Orange, CA) tiếp theo nối với bộ tiếp hợp GenomeWalker™ để xây dựng cấu trúc thư viện GenomeWalker™. Mỗi thư viện GenomeWalker™ được sử dụng làm khuôn ADN để khuếch đại PCR bậc một bằng đoạn mồi tiếp hợp AP1, được cung cấp trong kit,

và mỗi đoạn mồi đặc hiệu cấu trúc 5End3812_A và 3End3812_C. Một microlit của dịch pha loãng theo tỷ lệ 1:25 của phản ứng PCR bậc một sau đó được sử dụng làm khuôn cho khuếch đại PCR bậc hai với đoạn mồi tiếp hợp được lồng AP2 và mỗi đoạn mồi đặc hiệu cấu trúc được lồng 5End3812_B và 3End3812_D. TaKaRa LA Taq™ HS (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) được sử dụng trong khuếch đại PCR. Trong 50 µL phản ứng PCR, 1 µL mẫu ADN, 8 µL 2,5 mM của hỗn hợp dNTP, 0,2 µM mỗi đoạn mồi, 2,5 đơn vị TaKaRa LA Taq™ HS ADN Polymeraza, 5 µl 10 × LA dung dịch đệm PCR II (Mg²⁺ plus), và 1,5 µL MgCl₂ 25 mM được sử dụng. Các điều kiện PCR cụ thể được liệt kê trong bảng 5.

Bảng 5. Các điều kiện di chuyển dọc hệ gen của biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô AAD-1 để khuếch đại vùng biên bên sườn

Trình tự đích	Bộ đoạn mồi	Làm tiền biến tính (°C/phút)	Làm biến tính (°C/giây)	Gắn mồi (°C/giây)	Kéo dài (°C/phút:giây)	Làm biến tính (°C/giây)	Gắn mồi (°C/giây)	Kéo dài (°C/phút:giây)	Kéo dài lần cuối (°C/phút)
Biên 5'	5End3812_A / AP1	95/3	95/30	68 ^{-0,5/chu kỳ} →64 /30	68/10:00	95/30	64/30	68/10:00	72/10
			8 chu kỳ			22 chu kỳ			
Biên 5' (được lồng)	5End3812_B / AP2	95/3	95/30	68 ^{-0,5/chu kỳ} →64 /30	68/10:00	95/30	64/30	68/10:00	72/10
			8 chu kỳ			22 chu kỳ			
Biên 3'	3End3812_C / AP1	95/3	95/30	68 ^{-0,5/chu kỳ} →64 /30	68/10:00	95/30	64/30	68/10:00	72/10
			8 chu kỳ			22 chu kỳ			
Biên 3' (được lồng)	3End3812_D / AP2	95/3	95/30	68 ^{-0,5/chu kỳ} →64 /30	68/10:00	95/30	64/30	68/10:00	72/10
			8 chu kỳ			22 chu kỳ			

Ví dụ 3.4. PCR thông thường

PCR chuẩn được sử dụng để tách dòng và xác nhận đoạn xen ADN và trình tự biên trong biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô. TaKaRa LA Taq™ (Takara Bio Inc., Shiga, Japan), HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen, Valencia, CA), Expand High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics, Inc., Indianapolis, IN), hoặc Easy-A® High-Fidelity PCR Cloning Enzyme & Master Mix (Stratagene, LaJolla, CA) được sử dụng để khuếch đại

PCR thông thường theo các quy trình được đề nghị bởi nhà sản xuất. Các điều kiện PCR cụ thể và mô tả amplicon được liệt kê trong bảng 6.

Bảng 6. Các điều kiện để khuếch đại PCR chuẩn của các vùng biên trong biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô

Trình tự đích	Bộ đoạn mồi	Làm tiền biến tính (°C/phút)	Làm biến tính (°C/giây)	Gắn mồi (°C/giây)	Kéo dài (°C/phút:giây)	Kéo dài lần cuối (°C/phút)
Biên 5'	1F5End01 / AI5End01	95/3	95/30	60/30	68/5:00	72/10
			35 chu kỳ			
Biên 5'	1F5End02 / AI5End02	95/3	95/30	60/30	68/5:00	72/10
			35 chu kỳ			
Qua locut xen đoạn	1F3End03 / 1F5End03	95/3	95/30	60/30	68/5:00	72/10
			35 chu kỳ			
Qua locut xen đoạn	1F3End04 / 1F5End04	95/3	95/30	60/30	68/5:00	72/10
			35 chu kỳ			
Điểm nối 5' (Amplicon 1)	Amp 1F / Amp 1R	95/2	94/60	55/60	72/2:00	72/10
			35 chu kỳ			
Amplicon 2	Amp 1F / Amp 1R	95/2	94/60	55/60	72/2:00	72/10
			35 chu kỳ			
Amplicon 3	Amp 1F / Amp 1R	95/2	94/60	55/60	72/2:00	72/10
			35 chu kỳ			
Amplicon 4	Amp 1F / Amp 1R	95/2	94/60	55/60	72/2:00	72/10
			35 chu kỳ			
Điểm nối 3' (Amplicon 5)	Amp 1F / Amp 1R	95/2	94/60	55/60	72/2:00	72/10
			35 chu kỳ			
Biên 3'	1F3End05 / AI3End01	95/3	95/30	60/30	68/5:00	72/10
			35 chu kỳ			

Ví dụ 3.5. Phát hiện sản phẩm PCR, tinh chế, tách dòng phụ của các sản phẩm PCR, và giải trình tự

Các sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di bằng cách sử dụng E-gel 1,2% hoặc 2% (Invitrogen, Carlsbad, CA) theo hướng dẫn sử dụng sản phẩm. Kích thước mảnh được ước tính bằng cách so sánh với các chỉ dấu ADN. Nếu cần, các mảnh PCR được tinh chế bằng cách cắt các mảnh từ gel agarosa 1% trong 1× TBE được nhuộm bằng ethidii bromua, bằng cách sử dụng QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Carlsbad, CA).

Các mảnh PCR được tách dòng phụ trong pCR[®]4-TOPO[®] bằng cách sử dụng TOPO TA Cloning[®] Kit để giải trình tự (Invitrogen, Carlsbad, CA) theo hướng dẫn sử dụng sản phẩm. Đặc biệt, hai đến năm microlit dịch phản ứng tách dòng TOPO[®] được biến nạp vào tế bào khả biến hóa học TOP10 One Shot theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Các mảnh được tách dòng được kiểm tra bằng quy trình tạo ra ADN plasmit quy mô nhỏ (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen, Carlsbad, CA) tiếp theo phân cắt giới hạn bằng *EcoR* I hoặc bằng PCR khuẩn lạc trực tiếp bằng cách sử dụng các đoạn mồi T3 và T7, được cung cấp trong kit. Sau đó, ADN plasmit hoặc dung dịch dự trữ glyxerol của các khuẩn lạc được chọn được dùng để giải trình tự.

Sau khi tách dòng phụ, các sản phẩm PCR đích giả định được xếp trình tự ban đầu để xác nhận rằng các đoạn ADN mong muốn đã được tách dòng. Các khuẩn lạc chứa trình tự ADN thích hợp được chọn để di chuyển dọc đoạn mồi để xác định các trình tự ADN đầy đủ. Việc giải trình tự được thực hiện bởi Cogenics (Houston, TX).

Cuối cùng, lắp ráp đoạn xen và các trình tự biên được hoàn thành bằng cách sử dụng phần mềm Sequencher (Phiên bản 4.8 Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI). Việc chú thích của đoạn xen và các trình tự biên của biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô được thực hiện bằng cách sử dụng Vector NTI (Phiên bản 10 và 11, Invitrogen, Carlsbad, CA).

Tìm kiếm độ tương đồng được thực hiện bằng cách sử dụng chương trình BLAST đối với cơ sở dữ liệu Ngân hàng gen. Phân tích khung đọc mở (Open reading frame - ORF) bằng Vector NTI (Phiên bản 11, Invitrogen) được thực hiện để nhận diện các ORF (≥ 200 codon) trong đoạn xen và các trình tự biên bên sườn đầy đủ.

Ví dụ 3.6. Trình tự biên đầu 5'

Đoạn ADN được khuếch đại từ mỗi thư viện GenomeWalker™ biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô bằng bộ đoạn mồi được lồng đặc hiệu cho đầu 5' của gen chuyển. Sản phẩm PCR kích thước khoảng 800 bp được quan sát từ cả hai thư viện GenomeWalker™ của biến thể gen DAS-40278-9 *EcoR* V và *Stu* I. Thư viện GenomeWalker™ *Sca* I tạo ra sản phẩm khoảng 2 kb. Các mảnh được tách dòng vào pCR®4-TOPO® và sáu khuẩn lạc từ mỗi thư viện được chọn ngẫu nhiên để giải trình tự đầu để xác nhận đoạn xen chứa các trình tự mong muốn. Hoàn thành giải trình tự bằng cách di chuyển dọc đoạn mồi của các đoạn xen phát hiện ra rằng các mảnh được khuếch đại từ các thư viện GenomeWalker™ của biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô *Stu* I, *EcoR* V, và *Sca* I lần lượt là 793, 822, và 2132 bp. Các đoạn ADN được tạo ra từ các thư viện GenomeWalker™ *Stu* I và *EcoR* V khớp 100% với đoạn ADN được tạo ra từ thư viện GenomeWalker™ *Sca* I, gợi ý rằng các đoạn ADN này được khuếch đại từ vùng 5' của đoạn xen gen chuyển. Tìm kiếm BLAST thu được trình tự hệ gen cây ngô 1873 bp chỉ ra độ tương đồng cao với trình tự của dòng vô tính BAC của cây ngô. Ngoài ra, trình tự phân tích của điểm nối xen đoạn chỉ ra rằng 917 bp của MAR v3 ở vùng đầu 5' của nó được cắt so sánh với mảnh plasmid pDAS1740/Fsp I, để lại một phần 259 bp của MAR v3 ở vùng 5' của băng biểu hiện aad-1.

Ví dụ 3.7. Trình tự biên đầu 3'

Đoạn ADN có kích thước khoảng 3 kb được khuếch đại từ thư viện GenomeWalker™ biến thể gen DAS-40278-9 *Stu* I của cây ngô bằng bộ đoạn mồi được lồng đặc hiệu cho đầu 3' của gen chuyển. Đoạn ADN này được tách dòng vào pCR®4-TOPO® và mười khuẩn lạc được chọn ngẫu nhiên để giải trình tự đầu để xác nhận đoạn xen có các trình tự mong muốn. Ba dòng vô tính có đoạn xen mong muốn được giải trình tự hoàn toàn, tạo ra đoạn ADN 2997 bp. Phân tích trình tự của đoạn ADN này phát hiện ra rằng một phần yếu tố MAR v4 (thiếu 70 bp của vùng 5' của nó) và trình tự hệ gen cây ngô 1867 bp. Tìm kiếm BLAST cho thấy trình tự ADN hệ gen 1867 bp khớp 100% với trình tự trong cùng dòng vô tính BAC của cây ngô như được nhận diện bằng trình tự biên 5'.

Ví dụ 3.8. Đoạn xen ADN và trình tự nối

Đoạn xen ADN và các vùng nối được tách dòng từ biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô bằng cách sử dụng phương pháp dựa trên PCR như được mô tả trên đây. Năm cặp

đoạn mỗi được thiết kế dựa trên các trình tự biên bên sườn 5' và 3' và trình tự gen chuyển mong muốn. Tổng số, năm đoạn ADN gối chồng (Amplicon 1 có kích thước 1767 bp, Amplicon 2 có kích thước 1703 bp, Amplicon 3 có kích thước 1700 bp, Amplicon 4 có kích thước 1984 bp, và Amplicon 5 có kích thước 1484 bp) được tách dòng và được giải trình tự (Fig. 4). Toàn bộ đoạn xen và các trình tự biên bên sườn được lắp ráp dựa trên trình tự gối chồng trong số năm đoạn này. Trình tự cuối cùng xác nhận sự có mặt của 4816 bp của đoạn xen ADN có nguồn gốc từ pDAS1740/*Fsp* I, 1873 bp của trình tự biên bên sườn 5', và 1868 bp của trình tự biên bên sườn 3'. Đoạn xen ADN 4816 bp chứa băng biểu hiện *aad-1* nguyên vẹn, một phần MAR v3 259 bp trên đầu tận cùng 5', và một phần MAR v4 1096 bp trên đầu tận cùng 3' (Seq ID No: 29).

Ít nhất hai dòng vô tính đối với mỗi cặp đoạn mỗi được sử dụng để di chuyển đọc đoạn mỗi để thu được thông tin trình tự đầy đủ trên đoạn xen ADN và các trình tự biên của nó. Phân tích trình tự chỉ ra xen đoạn 21 bp ở điểm nối tích hợp 5' giữa ADN hệ gen cây ngô và một phần MAR v3 được tích hợp từ pDAS1740/*Fsp* I. Kết quả tìm kiếm BLAST và phân tích Vector NTI chỉ ra rằng ADN đoạn xen 21 bp không thể hiện độ tương đồng với ADN của loài thực vật bất kỳ hoặc ADN plasmit pDAS1740. Xen đoạn cặp bazơ đơn được tìm thấy ở điểm nối tích hợp 3' giữa ADN hệ gen cây ngô và một phần MAR v4 từ pDAS1740/*Fsp* I. Việc tích hợp ADN còn dẫn tới loại bỏ hai cặp bazơ ở locut xen đoạn của hệ gen cây ngô (Fig. 6). Ngoài ra, sự khác biệt một nucleotit (T thành C) ở vị trí của 5212 bp được quan sát thấy trong vùng UTR 3' không được dịch mã của đoạn xen ADN (Seq ID No: 29). Tuy nhiên, không một trong các thay đổi này dường như có tính quyết định với sự biểu hiện *aad-1* hoặc tạo ra các ORF mới bất kỳ (≥ 200 codon) qua các điểm nối trong đoạn xen DAS-40278-9.

Ví dụ 3.9. Xác nhận các trình tự hệ gen của cây ngô

Để xác nhận vị trí xen đoạn của gen chuyển biến thể gen DAS-40278-9 trong hệ gen cây ngô, việc khuếch đại PCR được thực hiện bằng các cặp đoạn mỗi khác nhau (Fig. 4). ADN hệ gen từ biến thể gen DAS-40278-9 và các dòng cây ngô chuyển gen hoặc không chuyển gen khác được sử dụng làm khuôn mẫu. Hai đoạn mỗi đặc hiệu *aad-1*, AI5End01 và AI5End02, và hai đoạn mỗi được thiết kế theo trình tự biên đầu 5', 1F5End01 và 1F5End02, được sử dụng để khuếch đại các đoạn ADN kéo dài gen *aad-1* đến trình tự biên

đầu 5'. Tương tự, để khuếch đại đoạn ADN kéo dài *aad-1* đến trình tự biên đầu 3', đoạn mồi 1F3End05 có nguồn gốc từ trình tự biên đầu 3' và đoạn mồi AI3End01 đặc hiệu *aad-1* được sử dụng. Các đoạn ADN có kích thước mong muốn chỉ được khuếch đại từ ADN hệ gen của biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô AAD-1, với mỗi cặp đoạn mồi chứa một đoạn mồi nằm trên biên bên sườn của biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô AAD-1 và một đoạn mồi đặc hiệu *aad-1*. Các mẫu ADN đối chứng không thu được sản phẩm PCR có cùng cặp đoạn mồi cho thấy rằng các trình tự biên đầu 5' và 3' được tách dòng quả thực lần lượt là trình tự phía trước và phía sau của cấu trúc gen *aad-1* được xen. Lưu ý rằng dải mờ có kích thước khoảng 8 kb được quan sát trong tất cả các mẫu cây ngô chứa biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô AAD-1, biến thể gen DAS-40474 của cây ngô AAD-1 và dòng cây ngô không chuyển gen XHH13 khi cặp đoạn mồi 1F5End01 và AI5End01 được sử dụng để khuếch đại PCR. Dải mờ quan sát được (trên gel đã được chuẩn bị) có thể là kết quả của khuếch đại không đặc hiệu trong hệ gen cây ngô bằng cặp đoạn mồi này.

Để xác nhận thêm việc xen đoạn ADN trong hệ gen cây ngô, hai đoạn mồi nằm ở trình tự biên đầu 5', 1F5End03 và 1F5End04, và hai đoạn mồi nằm ở trình tự biên đầu 3', 1F3End03 và 1F3End04, được sử dụng để khuếch đại các đoạn ADN kéo dài locut xen đoạn. Khuếch đại PCR bằng một trong hai cặp đoạn mồi 1F5End03/1F3End03 hoặc 1F5End04/1F3End04 thu được mảnh có kích thước mong muốn xấp xỉ 8 kb từ ADN hệ gen của biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô AAD-1. Ngược lại, không thu được sản phẩm PCR từ ADN hệ gen của biến thể gen DAS-40474-7 của cây ngô AAD-1 hoặc dòng cây ngô không chuyển gen XHH13. Cho rằng biến thể gen DAS-40278-9 và biến thể gen DAS-40474-7 của cây ngô AAD-1 được tạo ra nhờ sự biến nạp HiII, tiếp theo lai ngược biến thể gen chuyển gen ban đầu với dòng cây ngô XHH13, phần lớn hệ gen trong mỗi trong hai biến thể gen này về mặt lý thuyết là từ dòng cây ngô XHH13. Rất có thể là chỉ trình tự biên bên sườn gần với gen chuyển *aad-1* được chuyển từ ADN hệ gen ban đầu và được giữ trong quá trình chuyển biến thể gen AAD-1, trong khi các vùng khác của các trình tự hệ gen có thể đã được thay thế bởi các trình tự hệ gen của XHH13. Do đó, không bất ngờ rằng không có mảnh nào được khuếch đại từ ADN hệ gen của biến thể gen DAS-40474-7 của cây ngô AAD-1 và XHH13 bằng một trong hai cặp đoạn mồi 1F5End03/1F3End03 hoặc 1F5End04/1F3End04. Các mảnh có kích thước xấp xỉ 3,1 và 3,3 kb lần lượt được khuếch đại bằng các cặp đoạn mồi 1F5End03/ 1F3End03 và

1F5End04/1F3End04 trong ADN hệ gen của dòng cây ngô HiII và B73 nhưng không ở dòng cây ngô A188. Các kết quả chỉ ra rằng các trình tự biên có nguồn gốc từ hệ gen của dòng cây ngô B73.

Việc tách dòng bổ sung ADN hệ gen cây ngô từ B73/HiII được thực hiện để bảo đảm hiệu lực của các trình tự biên bên sườn. Các mảnh được khuếch đại PCR được giải trình tự để chứng minh vùng ADN đoạn xen được tích hợp vào vị trí cụ thể của ADN hệ gen B73/HiII. Các đoạn môi được thiết kế dựa trên trình tự thu được. Bộ đoạn môi Amp 1F/Amp 5R được sử dụng để khuếch đại mảnh 2212 bp kéo dài các điểm nối 5' đến 3' từ hệ gen B73/HiII nguyên thể mà không xen ADN. Phân tích trình tự phát hiện ra rằng có sự loại bỏ hai cặp bazơ khỏi hệ gen B73 nguyên thể trong locut xen đoạn gen chuyển. Phân tích các trình tự ADN từ mảnh hệ gen B73 nguyên thể được tách dòng nhận diện một ORF (≥ 200 codon) nằm phía sau của vùng nối tích hợp 3'. Ngoài ra, không có các ORF khác trong locut ban đầu trong đó biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô AAD-1 được hợp nhất. Tìm kiếm BLAST còn xác nhận rằng cả hai trình tự biên đầu 5' và đầu 3' từ biến thể gen DAS40278-9 được nằm cạnh nhau trên cùng dòng vô tính BAC của cây ngô.

Căn cứ vào tính duy nhất của điểm nối tích hợp 5' của biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô AAD-1, hai cặp đoạn môi PCR cụ thể, 1F5EndT1F/1F5EndT1R và Corn278-F/Corn278-R, được dự định để khuếch đại điểm nối đoạn xen với hệ gen thực vật này. Như được dự đoán, đoạn ADN mong muốn chỉ được tạo ra trong ADN hệ gen của biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô AAD-1 mà không ở dòng cây ngô khác bất kỳ chuyển gen hoặc không chuyển gen. Do đó, hai cặp đoạn môi đó có thể được sử dụng làm chất nhận diện đặc hiệu biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô AAD-1.

Ví dụ 4. Mô tả đặc điểm hệ gen bằng các chỉ dấu SSR bên sườn của DAS-40278-9

Để mô tả đặc điểm và mô tả vị trí xen đoạn hệ gen, các trình tự chỉ dấu nằm gần đoạn xen được xác định. Bảng các chỉ dấu SSR đa hình được sử dụng để nhận diện và lập sơ đồ vị trí gen chuyển. Biến thể gen pDAS1740-278 nằm trên nhiễm sắc thể 2 ở xấp xỉ 20 cM giữa các chỉ dấu SSR UMC1265 và MMC0111 ở xấp xỉ 20 cM trên sơ đồ liên kết cây ngô 2008 DAS. Bảng 6 tóm tắt thông tin đoạn môi đối với hai chỉ dấu này được tìm thấy ở gần gen chuyển pDAS1740-278.

Bảng 6. Tên đoạn mồi, chất màu đánh dấu, vị trí locut, các trình tự đoạn mồi xuôi và ngược, và các lưu ý quan trọng đối với chất chỉ dấu bên sườn được liên kết với biến thể gen pDAS1740-278.

Tên đoạn mồi	Chất đánh dấu	Chr	~cM	Bin	Đoạn mồi xuôi	Đoạn mồi ngược	Lưu ý
umc1265	NED	2	20	2,02	Seq ID No: 30: 5' -- GCCTAGTCGCC TACCCTACCAAT – 3'	Seq ID No: 31: 5'-- TGTGTTCTTGATT GGGTGAGACAT – 3'	Chỉ dấu bên sườn trái
mmc0111	FAM	2	20	2,03	Seq ID No: 32: 5' -- TACTGGGG ATTAGAGCAGAAG – 3'	Seq ID No: 33: 5'-- AATCTATGT GTGAACAGCAGC – 3'	Chỉ dấu bên sườn phải

Ví dụ 4.1. Tách gDNA (ADN hệ gen)

gDNA được tách từ máy đục lỗ lá bằng cách sử dụng DNEasy 96 Plant Test Kit (Qiagen, Valencia, California). Các cải biến được thực hiện đối với quy trình để điều chỉnh cho tự động hóa. gDNA tách được được định lượng bằng cách sử dụng chất màu PicoGreen® từ Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR). Nồng độ gDNA được pha loãng đến 5 ng/μl đối với tất cả các mẫu bằng cách sử dụng nước khử ion vô trùng.

Ví dụ 4.2. Sàng lọc gDNA bằng các chỉ dấu

gDNA pha loãng được phân loại kiểu gen bằng tập hợp con các chỉ dấu lặp lại trình tự đơn giản (simple sequence repeats - SSR). Các chỉ dấu SSR được tổng hợp bằng Applied Biosystems (Foster City, California) với các đoạn mồi xuôi được đánh dấu bằng các nhãn huỳnh quang 6-FAM, HEX/VIC, hoặc NED (lần lượt có màu lam, lục và vàng). Các chỉ dấu được chia thành các nhóm hoặc các làn dựa trên nhãn huỳnh quang của chúng và kích thước amplicon để tạo thuận lợi cho việc tạo phức và phân tích sau PCR.

PCR được thực hiện trong đĩa thử nghiệm 384 lỗ với mỗi phản ứng chứa 5 ng ADN hệ gen, 1,25X dung dịch đệm PCR (Qiagen, Valencia, California), 0,20 μM của từng đoạn mồi xuôi và ngược, 1,25 mM MgCl₂, 0,015 mM của từng dNTP, và 0,3 đơn vị HotStart Taq ADN polymeraza (Qiagen, Valencia, California). Việc khuếch đại được thực hiện trong GeneAmp PCR System 9700 với mô đun đầu kép 384 (Applied Biosystems, Foster City, California). Chương trình khuếch đại như sau: (1) kích hoạt Taq lần đầu ở 95°C trong 12 phút; (2) 30 giây ở 94°C; (3) 30 giây ở 55°C; (4) 30 giây ở 72°C; (5) lặp lại các bước 2-4

trong 40 chu kỳ; và (6) 30 phút kéo dài cuối cùng ở 72°C. Các sản phẩm PCR đối với mỗi lần chỉ dấu SSR được tạo phức cùng nhau bằng cách bổ sung 2 µl của từng sản phẩm PCR từ cùng cây vào nước khử ion vô trùng cho tổng thể tích bằng 60 µl. Đối với các sản phẩm PCR được tạo phức, 0,5 µl được rập vào đĩa nạp 384 lỗ chứa 5 µl dung dịch đệm nạp bao gồm tỷ lệ 1:100 của chuẩn kích thước LIZ cặp bazơ GeneScan 500 và ABI HiDi Formamide (Applied Biosystems, Foster City, California). Sau đó, các mẫu được nạp lên trên ABI Prism 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California) để điện di mao quản theo đề nghị của nhà sản xuất với tổng thời gian chạy bằng 36 phút. Dữ liệu chỉ dấu được thu bằng phần mềm ABI Prism 3730xl Automated Sequencer Data Collection Phiên bản 4.0 và được tách bằng phần mềm GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems) để mô tả đặc điểm alen và đánh dấu kích thước mảnh.

Ví dụ 4.3. Các kết quả chỉ dấu SSR

Dữ liệu đoạn môi đối với các chỉ dấu bên sườn được nhận diện ở vùng gần nhất với gen chuyển được liệt kê trong bảng 6. Hai chỉ dấu được liên kết gần nhất, *UMC1265* và *MMC0111*, nằm ở khoảng cách xấp xỉ 20 cM so với đoạn xen gen chuyển trên nhiễm sắc thể 2.

Ví dụ 5. Mô tả đặc điểm của protein *aad-1* trong biến thể gen DAS-40278-9

Các đặc tính sinh hóa của protein *aad-1* tái tổ hợp có nguồn gốc từ biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô chuyển gen được mô tả. Điện di trên gel natri dodecyl sulfat polyacrylamit (SDS-PAGE, được nhuộm bằng xanh Coomassie và phương pháp phát hiện glycoprotein), thẩm tách Western, thử nghiệm bằng thử chẩn đoán miễn dịch, phổ khối với đầu dò kỹ thuật thời gian bay giải hấp/ion hoá laze được hỗ trợ bởi chất nền (MALDI-TOF MS) và phân tích giải trình tự protein bằng MS bộ đôi được sử dụng để mô tả đặc điểm các đặc tính sinh hóa của protein.

Ví dụ 5.1. Thử nghiệm bằng chẩn đoán miễn dịch

Sự có mặt của protein *aad-1* trong mô lá của DAS-40278-9 được xác nhận bằng cách sử dụng các băng thử chẩn đoán miễn dịch được điều chế thương mại từ American Bionostica. Các băng này có thể phân biệt giữa các thực vật chuyển gen và không chuyển

gen bằng cách thử nghiệm các dịch chiết lá thô (dữ liệu không được chỉ ra). Dịch chiết không chuyển gen (XHH13) không chứa các lượng protein phản ứng miễn dịch có thể phát hiện được. Kết quả này cũng được xác nhận bằng phân tích thẩm tách Western.

Để thử nghiệm sự biểu hiện của protein *aad-1*, phân tích bằng chẩn đoán miễn dịch được thực hiện. Bốn lần đục lỗ lá được thu từ mỗi thực vật đối với XHH13 (thực vật đối chứng) và biến thể gen DAS-40278-9 bằng cách kẹp mô giữa các nắp snap-cap của ống ly tâm nhỏ 1,5 ml được đánh dấu riêng rẽ. Khi nhận được trong phòng thí nghiệm, 0,5 ml dung dịch đệm chiết *aad-1* (American Bionostica, Swedesboro, NJ) được bổ sung vào mỗi ống, và mô này được làm đồng nhất bằng cách sử dụng chày dùng một lần tiếp theo lắc mẫu trong ~10 giây. Sau khi đồng nhất hoá, băng thử được đặt trong ống và để cho hiện hình trong ~ 5 phút. Sự có mặt hay vắng mặt của protein *aad-1* trong dịch chiết thực vật được xác nhận dựa trên sự xuất hiện (hoặc không xuất hiện) dải thử nghiệm trên băng chẩn đoán miễn dịch. Ngay khi sự biểu hiện của protein *aad-1* được xác nhận đối với biến thể gen chuyển gen, mô thân cây ngô được thu hoạch và đông khô và bảo quản ở khoảng -80°C cho đến khi sử dụng.

Ví dụ 5.2. Tinh chế protein *aad-1* từ cây ngô

Protein *aad-1* được tinh chế miễn dịch, có nguồn gốc từ cây ngô (khối lượng phân tử: ~33 kDa) hoặc dịch chiết nước thô từ mô thân cây ngô được tạo ra. Tất cả các mô lá và thân được thu hoạch và vận chuyển đến phòng thí nghiệm như sau: Lá được cắt khỏi cây bằng kéo và đặt trong các túi vải và được bảo quản ở nhiệt độ khoảng -20°C để sử dụng về sau. Một cách riêng rẽ, thân được cắt ở phần trên mặt đất, được đặt trong các túi vải và làm lạnh ngay ở nhiệt độ xấp xỉ -80°C trong ~6 giờ. Sau đó thân được đặt trong thiết bị đông khô trong 5 ngày để loại nước. Ngay khi các mô được làm khô hoàn toàn chúng được nghiền thành bột mịn bằng đá khô và được bảo quản ở nhiệt độ xấp xỉ -80°C cho đến khi cần dùng.

Protein *aad-1* có nguồn gốc từ cây ngô được chiết từ mô thân đông khô trong dung dịch đệm trên cơ sở phosphat (xem bảng 7 về các thành phần dung dịch đệm) bằng cách cân ~30 gam mô đông khô vào máy trộn thủy tinh 1000 ml đã được làm lạnh và bổ sung 500 ml dung dịch đệm chiết. Mô được trộn tốc độ cao trong 60 giây và các protein dễ tan được thu bằng cách ly tâm mẫu trong 20 phút ở $30.000 \times g$ ($300.000m/s^2$). Các hạt được

chiết lại như được mô tả, và dịch nổi được gộp lại và lọc qua bộ lọc 0,45 μ . Dịch nổi đã lọc được nạp ở nhiệt độ xấp xỉ +4°C lên trên cột ái lực miễn dịch kháng *ad* -1 được tiếp hợp với kháng thể đơn dòng được tạo ra bởi Strategic Biosolution Inc. (MAb 473F1 85.1; Protein A được tinh chế; Lô #: 609.03C-2-4; 6,5 mg/ml (tổng số ~35,2 mg)) (Windham, ME); Được tiếp hợp với Sepharose 4B được hoạt hóa bởi CNBr (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Các protein không gắn kết được gom và cột được rửa kỹ bằng dung dịch đệm amoni bicacbonat 20 mM đã được làm lạnh trước, pH= 8,0. Các protein gắn kết được rửa giải bằng NaSCN 3,5 M, (Sigma, St. Louis, MO), Tris 50 mM (Sigma, St. Louis, MO).) dung dịch đệm pH=8,0. Bảy phần 5-ml được gom và số phần từ 2 $\rightarrow$ 7 được thẩm tách qua đêm ở nhiệt độ xấp xỉ +4°C bằng Tris 10 mM, dung dịch đệm pH=8,0. Các phần được kiểm tra bằng SDS-PAGE và thẩm tách Western và các mẫu còn lại được bảo quản ở nhiệt độ xấp xỉ +4°C cho đến khi được sử dụng cho phân tích sau.

Bảng 7. Các chất đối chiếu có trên thị trường được sử dụng trong nghiên cứu này được liệt kê trong bảng sau:

Chất đối chiếu	Tên sản phẩm	Số lô	Thử nghiệm	Tham khảo
Chất ức chế trypsin đầu tương	Thành phần của GelCode Glycoprotein Staining Kit	IA110577	Glycosyl hóa	Pierce Cat #: 1856274
Peroxidaza củ cải ngựa	Thành phần của GelCode Glycoprotein Staining Kit	JG124509	Glycosyl hóa	Pierce Cat #: 1856273
Phần albumin huyết thanh bò V (BSA)	Bộ chuẩn thử nghiệm protein BSA được pha loãng trước	FH71884A	Glycosyl hóa, SDS-PAGE và thẩm tách Western	Pierce Cat #: 23208
Chỉ dấu khối lượng phân tử được nhuộm trước	Chỉ dấu protein được nhuộm trước Novex Sharp	469212 & 419493	Thẩm tách Western	Invitrogen Cat #: LC5800, Các chỉ dấu khối lượng phân tử bằng 260, 160, 110, 80, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10 và 3,5 kDa
Chỉ dấu khối lượng phân tử	Hỗn hợp chỉ dấu protein Invitrogen Mark12	39983 & 399895	SDS-PAGE	Invitrogen Cat #: LC5677, Các chỉ dấu khối lượng phân tử bằng 200, 116,3, 97,4, 66,3, 55,4, 36,5, 31,0, 21,5, 14,4, 6,0, 3,5 và 2,5 kDa

Protein gắn kết với cột ái lực miễn dịch được kiểm tra bằng SDS-PAGE và các kết quả cho thấy rằng các phân tử được rửa giải chứa protein *aad-1* ở khối lượng phân tử xấp xỉ bằng 33 kDa. Ngoài ra, thẩm tách Western cũng được thực hiện và là dương tính đối với protein *aad-1*. Protein *aad-1* có nguồn gốc từ cây ngô được tách từ ~30 g nguyên liệu thân đông khô.

Ví dụ 5.3. SDS-PAGE và thẩm tách Western

Mô đông khô từ biến thể gen DAS-40278-9 và thân XHH13 (~100 mg) được cân khối lượng trong các ống 2-ml của máy ly tâm ống nhỏ để bàn và được chiết bằng ~1 ml PBST (Sigma, St. Louis, MO) chứa 10% hỗn hợp chất ức chế proteaza của thực vật (Sigma, St. Louis, MO). Việc chiết được thuận tiện hoá bằng cách bổ sung 4 vòng bi nhỏ và mẫu Geno-Grinding trong 1 phút. Sau khi nghiền, các mẫu được ly tâm trong 5 phút ở $20.000 \times g$ ($200.000M/m^2$) và dịch nổi được trộn theo tỷ lệ 4:1 với 5x dung dịch đệm mẫu Laemmli (2% SDS, 50 mM Tris pH=6,8, 0,2 mg/ml xanh bromophenol, 50% (kl/kl) glyxerol chứa 10% 2-mercaptoetanol được bổ sung tươi) và được gia nhiệt trong 5 phút ở nhiệt độ ~100°C. Sau khi ly tâm nhanh, 45 μ L dịch nổi được nạp trực tiếp lên gel BioRad Criterion SDS-PAGE (Bio-Rad, Hercules, CA) được làm vừa khít trong buồng gel Criterion Cell. Chuẩn đối chiếu dương tính của *aad-1* có nguồn gốc vi sinh vật được tái tạo huyền phù ở 1 mg/ml trong PBST pH=7,4 và được pha loãng tiếp bằng PBST. Sau đó, mẫu được trộn với dung dịch đệm Bio-Rad Laemmli bằng 2-mercaptoetanol 5% và được xử lý như được nêu trên. Việc điện di được thực hiện bằng dung dịch đệm Tris/glyxin/SDS (Bio-Rad, Hercules, CA) ở điện áp bằng 150 - 200 V cho đến khi màu tiến đến cuối của gel. Sau khi tách, gel được cắt đôi và một nửa được nhuộm bằng thuốc nhuộm protein Pierce GelCode Blue và nửa kia được thẩm tách điện vào màng nitroxenluloza (Bio-Rad, Hercules, CA) bằng tế bào chuyển điện di Mini trans-blot (Bio-Rad, Hercules, CA) trong 60 phút dưới điện áp không đổi bằng 100 vôn. Dung dịch đệm chuyển chứa 20% metanol và dung dịch đệm Tris/glyxin từ Bio-Rad. Để phát hiện miễn dịch, màng được dò bằng kháng thể thô đa dòng đặc hiệu *aad-1* (Strategic Biosolution Inc., Newark, DE, Protein A purified rabbit polyclonal antibody Lot #: DAS F1 197-15 1, 1,6 mg/ml). Thẻ tiếp hợp của IgG dê kháng thô (H+L) và phosphataza kiềm (Pierce Chemical, Rockford, IL) được sử dụng làm kháng thể thứ cấp. Chất SigmaFast BCIP/NBT được sử dụng để phát triển và làm hiện ảnh của dải protein phản ứng miễn

dịch. Màng này được rửa kỹ bằng nước để làm ngừng phản ứng và việc ghi kết quả được lưu giữ bằng máy quét kỹ thuật số (Hewlett Packard, Palo Alto, CA)

Trong *aad-1* được sản sinh bởi *P. fluorescens*, dải protein chính, như được làm hiện trên gel SDS-PAGE được nhuộm Coomassie, là xấp xỉ 33 kDa. Như được mong muốn, protein *aad-1* có nguồn gốc từ cây ngô tương ứng (biến thể gen DAS-40278-9) là giống về kích thước với các protein được biểu hiện bởi vi sinh vật. Có thể dự đoán, các phân được tinh chế bởi thực vật chứa một lượng nhỏ các tạp chất không phản ứng miễn dịch ngoài protein *aad-1*. Các protein cùng được tinh chế có thể được giữ trên cột bằng tương tác yếu với chất nền của cột hoặc chiết kháng thể đơn dòng khỏi cột dưới các điều kiện rửa giải khắc nghiệt. Các nhà nghiên cứu khác cũng báo cáo sự hấp phụ không đặc hiệu của các peptit và các axit amin trên chất hấp phụ miễn dịch Sepharose 4B được hoạt hoá bởi xyanogen-bromua (Kennedy và Barnes, 1983; Holroyde và các đồng tác giả, 1976; Podlaski và Stern, 2008).

Protein *aad-1* có nguồn gốc từ *Pseudomonas* thể hiện tín hiệu về kích thước mong muốn dương tính bằng phân tích thâm tách Western của kháng thể đa dòng. Điều này cũng được quan sát thấy ở dịch chiết thân ngô chuyển gen DAS-40278-9. Trong phân tích thâm tách Western *aad-1*, không quan sát thấy có protein phản ứng miễn dịch trong dịch chiết XHH13 đối chứng và không thấy protein có kích thước khác (kết hợp hoặc sản phẩm phân hủy) trong các mẫu chuyển gen.

Ví dụ 5.4. Phát hiện sự glycosyl hóa sau dịch mã

Protein *aad-1* được tinh chế bằng sắc ký ái lực miễn dịch, có nguồn gốc từ cây ngô (Phần #3) được trộn theo tỷ lệ 4:1 với 5x dung dịch đậm Laemmli. *Aad-1* có nguồn gốc vi sinh vật, chất ức chế trypsin đậu tương, albumin huyết thanh bò và peroxidaza củ cải ngựa được pha loãng bằng nước Milli-Q đến nồng độ xấp xỉ của *aad-1* có nguồn gốc thực vật và được trộn với dung dịch đậm Bio-Rad Laemmli. Sau đó, các protein được gia nhiệt ở nhiệt độ ~95°C trong 5 phút và ly tâm ở 20000×g (200.000m/s²) trong 2 phút để thu được dịch nổi trong. Dịch nổi thu được được đưa trực tiếp lên Bio-Rad Criterion Gel và điện di bằng dung dịch đậm chạy XT MES (Bio-Rad, Hercules, CA) về cơ bản như được mô tả trên đây ngoại trừ rằng việc điện di được chạy ở 170 V trong ~60 phút. Sau khi điện di, gel được cắt đôi, và một nửa được nhuộm bằng thuốc nhuộm GelCode Blue đối với

protein toàn phần theo quy trình của nhà sản xuất. Sau khi việc nhuộm hoàn thành, gel được quét bằng mật độ kế Molecular Dynamics để thu được bản ghi trực quan cố định của gel. Nửa kia của gel được nhuộm bằng Kit nhuộm GelCode Glycoprotein (Pierce Chemical, Rockford, IL) theo quy trình của nhà sản xuất để làm hiện glycoproteins. Glycoprotein (với giới hạn phát hiện thấp đến 0,625 ng mỗi dải) được làm hiện dưới dạng dải đỏ tía trên nền ánh sáng màu hồng nhạt. Sau khi việc nhuộm bằng glycoprotein hoàn thành, gel được quét bằng máy quét kỹ thuật số Hewlett Packard để thu được bản ghi trực quan cố định của gel. Sau khi chụp ảnh nhuộm glycosyl hóa, gel này được nhuộm bằng xanh GelCode để kiểm tra sự có mặt của protein không glycosyl hóa. Các kết quả cho thấy rằng các protein *aad-1* có nguồn gốc từ cả cây ngô và vi sinh vật không có các hydrat cacbon được liên kết cộng hóa trị dễ phát hiện. Kết quả này còn được xác nhận bằng cách xác định dựa vào khối lượng peptit.

Ví dụ 5.5. Xác định dựa vào khối lượng peptit phổ khối và giải trình tự *aad-1* có nguồn gốc từ cây ngô và *Pseudomonas*

Phân tích phổ khối *aad-1* có nguồn gốc từ *Pseudomonas* và cây ngô được tiến hành. Protein *aad-1* có nguồn gốc từ thân cây ngô chuyển gen (biến thể gen DAS-40278-9) được đem vào phân cắt trong dung dịch bằng trypsin tiếp theo MALDI-TOF MS và ESI-LC/MS. Khối lượng của các peptit phát hiện được so sánh với khối lượng được suy ra dựa trên vị trí phân cắt proteaza tiềm năng trong trình tự của protein *aad-1* có nguồn gốc từ cây ngô. Việc phân cắt lý thuyết được tạo ra *in silico* bằng cách sử dụng phần mềm miễn phí Protein Analysis Worksheet (PAWS) từ Proteometrics LLC. Protein *aad-1*, ngay khi bị biến tính, dễ dàng bị phân cắt bởi proteaza và sẽ tạo ra nhiều đỉnh peptit.

Trong phân cắt trypsin của protein *aad-1* có nguồn gốc từ cây ngô chuyển gen (biến thể gen DAS-40278-9), các mảnh peptit phát hiện được bao trùm gần như toàn bộ trình tự protein chỉ thiếu một mảnh trypsin nhỏ ở đầu tận cùng C của protein, F²⁴⁸ đến R²⁵³ và một mảnh peptit ngắn (2 axit amin). Phân tích này xác nhận trình tự axit amin của protein có nguồn gốc từ cây ngô khớp với trình tự axit amin của protein *aad-1* có nguồn gốc từ vi sinh vật. Các kết quả của các phân tích này cho thấy rằng trình tự axit amin của

protein *aad-1* có nguồn gốc từ cây ngô là tương đương với protein được biểu hiện bởi *P. fluorescens*.

Ví dụ 5.5.1. Giải trình tự mảnh peptit trypsin

Ngoài việc xác định dựa vào khối lượng của peptit, các gốc axit amin ở đầu tận cùng N và C của protein *aad-1* có nguồn gốc từ cây ngô (được tinh chế ái lực miễn dịch từ biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô) được giải trình tự và so sánh với trình tự của protein có nguồn gốc vi sinh vật. Trình tự protein thu được, bằng phổ khối bộ đôi, đối với 11 gốc đầu tiên của protein có nguồn gốc từ vi sinh vật và từ cây ngô (bảng 8). Trình tự axit amin đối với cả hai protein là A' H A A L S P L S Q R'' (SEQ ID NO:30) thể hiện metionin đầu tận cùng N đã được loại bỏ bởi aminopeptidaza (bảng 8). Trình tự protein *aad-1* đầu tận cùng N được kỳ vọng là M' A H A A L S P L S Q R'^2. (SEQ ID NO:31) Các kết quả này gợi ý rằng trong hoặc sau khi dịch mã trong cây ngô và *P. fluorescens*, metionin đầu tận cùng N được tách bởi metionin aminopeptidaza (MAP). Các MAP tách các gốc metionyl nhanh chóng khi gốc thứ hai trên protein này là nhỏ, như Gly, Ala, Ser, Cys, Thr, Pro, và Val (Walsh, 2006). Ngoài metionin được loại bỏ, một phần nhỏ của peptit đầu tận cùng N của protein *aad-1* đã thể hiện là được axetyl hoá sau khi metionin đầu tận cùng N được tách (bảng 8). Kết quả này thường xuyên va chạm với các protein được biểu hiện bởi sinh vật có nhân điển hình (thực vật) vì khoảng 80-90% các gốc đầu tận cùng N được cải biến (Polevoda and Sherman, 2003). Ngoài ra, đã biết rằng các protein có serin và alanin ở đầu tận cùng N được axetyl hoá thường xuyên nhất (Polevoda and Sherman, 2002). Hai quy trình đồng dịch mã, việc phân cắt gốc metionin đầu tận cùng N và axetyl hóa đầu tận cùng N, là các cải biến chung nhất và xảy ra trên phần lớn (~85%) các protein của sinh vật có nhân điển hình (Polevoda and Sherman, 2002). Tuy nhiên, các ví dụ thể hiện ý nghĩa sinh học liên quan đến sự axetyl hóa đầu tận cùng N là hiếm (Polevoda and Sherman, 2000).

Bảng 8. Tóm tắt dữ liệu trình tự đầu tận cùng N của các protein có nguồn gốc từ cây ngô AAD-1 và vi sinh vật

Nguồn	Trình tự đầu tận cùng N kỳ vọng ¹
<i>P. fluorescens</i>	M ¹ A H A A L S P L S Q R ¹² (SEQ ID NO: 31)
Biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô	M ¹ A H A A L S P L S Q R ¹²
Nguồn	Tương đối ³ Trình tự đầu tận cùng N phát hiện được ² Lượng
<i>P. fluorescens</i>	A H A A L S P L S Q R ¹² 100%
Biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô	A H A A L S P L S Q R ¹² 31%
Biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô	N ^{-Ac} A H A A L S P L S Q R ¹² 3% (SEQ ID NO: 30)
Biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô	H A A L S P L S Q R ¹² 50% (SEQ ID NO: 32)
Biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô	A A L S P L S Q R ¹² 6% (SEQ ID NO: 33)
Biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô	A L S P L S Q R ¹² 12% (SEQ ID NO: 34)

¹Trình tự đầu tận cùng N kỳ vọng của 12 gốc axit amin đầu tiên của *P. fluorescens* và AAD-1 có nguồn gốc từ cây ngô.

²Trình tự đầu tận cùng N phát hiện được của AAD-1 có nguồn gốc từ *P. fluorescens* và cây ngô.

³Dữ liệu MS bộ đôi đối với các peptit đầu tận cùng N phát hiện ra hỗn hợp gồm AHAALSPLSQR (được axetyl hoá) và N-Axetyl-AHAALSPLSQR (được axetyl hoá). “Các đầu tận cùng N rời rạc” cũng được phát hiện (các peptit tương ứng với trình tự axit amin HAALSPLSQR, AALSPLSQR, và ALSPLSQR). Lượng tương đối, ước tính lượng mảnh peptit tương đối, được thực hiện dựa trên diện tích pic LC tương ứng được đo ở 214 nm.

Lưu ý:

Số chỉ số trên (R^x) biểu thị số gốc axit amin trên trình tự.

Các từ viết tắt gốc axit amin:

A:	alanin	H:	histidin
L:	leuxin	M:	metionin
P:	prolin	Q:	glutamin
R:	arginin	S:	serin
T:	threonin		

Ngoài N-axetyl hóa, cũng có hiện tượng cắt đứt đầu tận cùng N nhẹ xuất hiện trong khi tinh chế protein *aad-1* có nguồn gốc từ cây ngô (bảng 8). Các “đầu rời rạc” này dẫn đến làm mất các axit amin A2, H³ và A⁴ (ở dạng và lượng thay đổi) từ protein có nguồn gốc từ cây ngô. Việc cắt đứt này được cho là xảy ra trong khi tinh chế protein *aad-1* do đoạn dò thăm tách Western của dịch chiết lá thô chứa dải quần đơn ở cùng MW như protein *aad-1* có nguồn gốc vi sinh vật. Dung dịch đệm chiết cho mẫu thăm tách Western chứa lượng dư hỗn tạp chất ức chế proteaza cocktail, hỗn tạp này chứa hỗn hợp các chất ức chế proteaza có tính đặc hiệu rộng để ức chế serin, cystein, aspartic, và metalloprotease, và aminopeptidaza.

Trình tự đầu tận cùng C của protein *aad-1* có nguồn gốc từ cây ngô và vi sinh vật được xác định như đã mô tả trên đây và so sánh với trình tự axit amin mong muốn (bảng

9). Các kết quả chỉ ra các trình tự được đo là giống với các trình tự mong muốn, và cả hai protein *aad-1* có nguồn gốc từ cây ngô và vi sinh vật là giống nhau và không được biến đổi ở đầu tận cùng C.

Bảng 9. Tóm tắt dữ liệu trình tự đầu tận cùng C của các protein có nguồn gốc từ cây ngô AAD-1 và vi sinh vật

Nguồn	Trình tự đầu tận cùng C kỳ vọng ¹
<i>P. fluorescens</i>	²⁸⁷ T T V G G V R P A R ²⁹⁶
Biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô	²⁸⁷ T T V G G V R P A R ²⁹⁶

(SEQ ID NO:35)

Nguồn	Trình tự đầu tận cùng C phát hiện được ²
<i>P. fluorescens</i>	²⁸⁷ T T V G G V R P A R ²⁹⁶
Biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô	²⁸⁷ T T V G G V R P A R ²⁹⁶

(SEQ ID NO:35)

¹Trình tự đầu tận cùng C kỳ vọng của 10 gốc axit amin cuối cùng của *P. fluorescens* và AAD-1 có nguồn gốc từ cây ngô.

²Trình tự đầu tận cùng C phát hiện được của AAD-1 có nguồn gốc từ *P. fluorescens* và cây ngô.

Lưu ý:

Số chỉ số trên (R^x) biểu thị số gốc axit amin trên trình tự.

Các từ viết tắt gốc axit amin:

A:	alanin	G:	glyxin
P:	prolin	R:	arginin
T:	Threonin	V:	valin

Ví dụ 6. Biểu hiện trên cánh đồng, phân tích thành phần dinh dưỡng và các đặc tính nông học của dòng cây ngô thể lai chứa biến thể gen DAS-40278-9

Mục đích của nghiên cứu này là xác định mức protein AAD-1 được tìm thấy trong mô cây ngô. Ngoài ra, việc phân tích thành phần được thực hiện trên cây ngô làm thức ăn cho gia súc và hạt để khảo sát tính tương đương giữa dòng cây ngô không được biến nạp đồng hợp tử và dòng cây ngô chuyển gen DAS-40278-9 (không được phun, được phun bằng 2,4-D, được phun bằng quizalofop, và được phun bằng 2,4-D và quizalofop). Các đặc tính nông học của dòng cây ngô không được biến nạp đồng hợp tử còn được so sánh với cây ngô DAS-40278-9. Sự biểu hiện trên cánh đồng, thành phần, và các thử nghiệm nông học được tiến hành ở sáu địa điểm thử nghiệm nằm trong vùng sản xuất ngô chủ yếu của Mỹ và Canada. Các địa điểm này là các vùng có thực tế nông học và các điều kiện môi trường đa dạng. Các thử nghiệm được bố trí ở Iowa, Illinois (2 địa điểm), Indiana, Nebraska và Ontario, Canada.

Tất cả giá trị trung bình địa điểm đối với mẫu đối chứng, AAD-1 không được phun, AAD-1 + quizalofop, AAD-1 + 2,4-D và AAD-1 + cả hai mẫu đưa vào là nằm trong các khoảng ghi trong tài liệu đối với cây ngô. Một số khác biệt đáng kể giới hạn giữa AAD-1 không được phun, AAD-1 + quizalofop, AAD-1 + 2,4-D hoặc AAD-1 + cả cây ngô và đối chứng được quan sát, nhưng sự khác biệt này không được coi là có ý nghĩa sinh học do chúng nhỏ và các kết quả là nằm trong khoảng được tìm thấy đối với cây ngô thương mại. Đồ thị các kết quả về thành phần không cho thấy sự khác biệt thành phần liên quan đến việc xử lý có ý nghĩa sinh học bất kỳ trong số AAD-1 không được phun, AAD-1 + quizalofop, AAD-1 + 2,4-D hoặc AAD-1 + cả cây ngô và dòng cây ngô đối chứng. Cuối cùng, AAD-1 không được phun, AAD-1 + quizalofop, AAD-1 + 2,4-D và AAD-1 + cả hai kết quả thành phần cây ngô xác nhận sự tương đương của cây ngô AAD-1 (Biến thể gen DAS 40278-9) so với các dòng cây ngô thông thường.

Ví dụ 6.1. Các dòng cây ngô được thử nghiệm

Hạt lai chứa biến thể gen DAS-40278-9 và các cây đối chứng là hạt lai thông thường của cùng nền di truyền như dòng chất thử nghiệm, nhưng không chứa biến thể gen DAS-40278-9, được liệt kê trong bảng 10.

Bảng 10.

Nhóm thử nghiệm	Mô tả
1	Đối chứng không phải <i>aad-1</i>
2	<i>aad-1</i> không được phun
3	<i>aad-1</i> được phun w/ quizalofop
4	<i>aad-1</i> được phun w/ 2,4-D
5	<i>aad-1</i> được phun w/ 2,4-D và

Các cây ngô được mô tả trên đây được trồng ở các địa điểm trong các vùng trồng ngô chủ yếu của Mỹ và Canada. Sáu cánh đồng thử nghiệm điều kiện dễ dàng, Richland, IA; Carlyle, IL; Wyoming, IL; Rockville, IN; York, NE; và Branchton, Ontario, Canada (được gọi là IA, IL1, IL2, IN, NE và ON) là các vùng có thực tế nông học đa dạng và các điều kiện môi trường cho cây ngô.

Hạt ngô thử nghiệm và đối chứng được trồng ở mức độ gieo hạt xấp xỉ 24 hạt trên mỗi hàng với khoảng cách các hạt trong mỗi hàng xấp xỉ 10 in (25 cm). Ở mỗi địa điểm, thiết lập 4 ô bản sao của mỗi lần xử lý, với mỗi ô bao gồm các hàng 2-25 phút. Các ô được sắp xếp theo thiết kế khối đầy đủ ngẫu nhiên (randomized complete block - RCB), với sự ngẫu nhiên hoá duy nhất ở mỗi địa điểm. Mỗi ô cây ngô được tiếp giáp bởi 2 hàng cây ngô lai không chuyển gen có độ trưởng thành tương tự. Toàn bộ địa điểm thử nghiệm được bao quanh bởi tối thiểu 12 hàng (hoặc 30 phút) cây ngô lai không chuyển gen có độ trưởng thành tương đối tương tự.

Côn trùng thích hợp, cỏ dại, và thực tế đối chứng bị bệnh được đưa vào để tạo ra cây nông dụng. Nhiệt độ tối đa và tối thiểu hàng tháng cùng với lượng mưa và mức độ tưới là trung bình đối với từng địa điểm. Các khoảng này là thường gặp trong việc sản xuất ngô.

Ví dụ 6.2. Dùng thuốc diệt cỏ

Việc xử lý bằng thuốc diệt cỏ được dùng với thể tích phun xấp xỉ 20 galông trên mẫu anh (187 l/ha). Việc dùng này được dự định để lặp lại việc dùng thương mại ở mức tối đa trên nhãn. Bảng 11 liệt kê các thuốc diệt cỏ được sử dụng.

Bảng 11.

Thuốc diệt cỏ	TSN	Nồng độ
Weedar 64	026491-0006	39%, 3,76 lb ae ^a /gal, 451 g ae/l
Assure II	106155	10,2%, 0,87 lb ai ^b /gal, 104 g ai/l

^a ae = đương lượng axit.

^b ai = hoạt chất.

2,4-D (Weedar 64) được đưa vào dưới dạng 3 lần rắc lên trên đối với các nhóm thử nghiệm 4 và 5 (tổng số theo vụ bằng 3 lb ae/A). Các lần dùng riêng rẽ là ở thời điểm trước khi nảy mầm và khoảng giai đoạn V4 và V8 – V8,5. Mức dùng đích riêng rẽ là 1,0 lb ae/A đối với Weedar 64, hoặc 1120 g ae/ha. Mức dùng thực tế nằm trong khoảng từ 1096 – 1231 g ae/A.

Quizalofop (Assure II) được dùng dưới dạng rắc lên trên đối với các nhóm thử nghiệm 3 và 5. Thời điểm dùng là ở khoảng giai đoạn tăng trưởng V6. Mức dùng đích là

0,0825 lb ai/A đối với Assure II, hoặc 92 g ai/ha. Mức dùng thực tế nằm trong khoảng từ 90,8 – 103 g ai/ha.

Ví dụ 6.3. Thu dữ liệu nông học và kết quả

Các đặc tính nông học được ghi lại đối với tất cả các nhóm thử nghiệm trong lô 2, 3, và 4 ở mỗi địa điểm. Bảng 12 liệt kê các đặc tính được đo như sau.

Bảng 12.

Tính trạng	Thời điểm đánh giá	Mô tả dữ liệu
Mật độ ban đầu	V1 và V4	Số cây được nảy mầm trên mỗi ô.
Ưu thế cây con	V4	Ước lượng bằng mắt ưu thế trung bình của các cây đã nảy mầm trên mỗi ô
Ưu thế/Tồn thương thực vật	Khoảng 1-2 tuần sau khi dùng	Tồn thương do dùng thuốc diệt cỏ.
Thời gian làm héo	Héo khoảng 50%	Số đơn vị nhiệt tích lũy từ thời điểm gieo hạt cho đến khi khoảng 50% cây xuất hiện héo.
Thời gian phát tán phần hoa	Khoảng 50% phần hoa được phát tán	Số đơn vị nhiệt tích lũy từ thời điểm gieo hạt cho đến khi khoảng 50% cây phát tán phần hoa.
Khả năng sống của phần hoa	Khoảng 50%	Đánh giá màu và hình dạng của phần hoa theo thời gian
Chiều cao của cây	Xấp xỉ R6	Chiều cao đến đầu mút của cò
Chiều cao bắp	Xấp xỉ R6	Chiều cao đến gốc của bắp đầu tiên
Rập thân	Xấp xỉ R6	Ước tính bằng mắt tỷ lệ phần trăm các cây trong ô có thân bị gãy dưới bắp đầu tiên
Rập rễ	Xấp xỉ R6	Ước tính bằng mắt tỷ lệ phần trăm các cây trong ô bị nghiêng khoảng 30° hoặc lớn hơn ở ~1/2 mét đầu tiên trên mặt đất
Mật độ cuối cùng	Xấp xỉ R6	Số cây còn lại trên mỗi ô
Ngày đạt độ trưởng thành	Xấp xỉ R6	Số đơn vị gia nhiệt tích lũy từ thời điểm gieo hạt cho đến khi khoảng 50% cây đạt tới độ trưởng thành sinh lý.
Giữ được màu xanh lục	Xấp xỉ R6	Toàn bộ sức khỏe của cây
Tỷ lệ mắc bệnh	Xấp xỉ R6	Ước tính bằng mắt tỷ lệ mắc bệnh của lá
Phá hủy bởi côn trùng	Xấp xỉ R6	Ước tính bằng mắt mức phá hủy bởi côn trùng

Lưu ý: Đơn vị nhiệt = ((nhiệt độ MAX + nhiệt độ MIN) / 2) – 50°F

Phân tích dữ liệu nông học thu được từ nhóm đối chứng, aad-1 không được phun, aad-1 + 2,4-D, aad-1 + quizalofop, và aad-1 + cả hai nhóm được tiến hành. Đối với phân

tích chéo địa điểm, không thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê đối với các giá trị mật độ ban đầu (V1 và V4), ưu thế, mật độ cuối cùng, tổn thương cây, thời gian làm héo, thời gian phát tán phấn hoa, rạp thân, rạp rễ, tỷ lệ mắc bệnh, phá hủy bởi côn trùng, ngày đạt độ trưởng thành, chiều cao cây, và khả năng sống của phấn hoa (hình dạng và màu sắc) trong phân tích sơ lược chéo địa điểm (bảng 13). Đối với việc giữ được màu xanh lục và chiều cao bắp, quan sát thấy kiểm nghiệm t cặp đôi có nghĩa giữa nhóm đối chứng và nhóm *aad-1* + quizalofop, nhưng không tuân theo tác dụng xử lý tổng cộng hoặc giá trị p được điều chỉnh mức độ phát hiện sai (False Discovery Rate - FDR) đáng kể (bảng 13).

Bảng 13. Phân tích sơ lược các kết quả đặc tính nông học chéo địa điểm đối với cây ngô *aad-1* DAS-40278-9 (được phun và không được phun) và đối chứng

Chất phân tích	Tác dụng xử lý tổng cộng (Pr>F) ^a	Đối chứng	Không được phun (giá trị P, ^b P được điều chỉnh) ^c	Được phun Quizalofop (giá trị P, P được điều chỉnh)	Được phun 2,4-D (giá trị P, P được điều chỉnh)	Được phun cả hai (giá trị P, P được điều chỉnh)
Mật độ ban đầu V1 (số cây)	(0,351)	42,8	41,3 (0,303, 0,819)	41,7 (0,443, 0,819)	41,9 (0,556, 0,819)	44,1 (0,393, 0,819)
Mật độ ban đầu V4 (số cây)	(0,768)	43,1	43,3 (0,883, 0,984)	43,7 (0,687, 0,863)	44,3 (0,423, 0,819)	44,8 (0,263, 0,819)
Ưu thế cây con ^d	(0,308)	7,69	7,39 (0,197, 0,819)	7,36 (0,161, 0,819)	7,58 (0,633, 0,819)	7,78 (0,729, 0,889)
Mật độ cuối cùng (số cây)	(0,873)	40,1	39,6 (0,747, 0,889)	39,7 (0,802, 0,924)	39,9 (0,943, 1,00)	41,1 (0,521, 0,819)
Tổn thương cây – đưa vào lần 1 ^e	NA ¹	0	0	0	0	0
Tổn thương cây – đưa vào lần 2 ^e	(0,431)	0	0 (1,00, 1,00)	0 (1,00, 1,00)	0 (1,00, 1,00)	0,28 (0,130, 0,819)
Tổn thương cây – đưa vào lần 3 ^e	NA	0	0	0	0	0
Tổn thương cây – đưa vào lần 4 ^e	NA	0	0	0	0	0
Thời gian làm héo (đơn vị nhiệt) ^f	(0,294)	1291	1291 (0,996, 1,00)	1293 (0,781, 0,917)	1304 (0,088, 0,819)	1300 (0,224, 0,819)
Thời gian phát tán phấn hoa (đơn vị nhiệt) ^f	(0,331)	1336	1331 (0,564, 0,819)	1342 (0,480, 0,819)	1347 (0,245, 0,819)	1347 (0,245, 0,819)
Hình dạng phấn hoa 0 phút (%) ^g	(0,872)	10,9	10,9 (0,931, 1,00)	11,3 (0,546, 0,819)	11,4 (0,439, 0,819)	11,3 (0,605, 0,819)

Hình dạng phần hoa 30 phút (%)	(0,486)	49,2	50,8 (0,618, 0,819)	46,4 (0,409, 0,819)	48,1 (0,739, 0,889)	51,9 (0,409, 0,819)
Hình dạng phần hoa 60 phút (%)	(0,724)	74,4	74,7 (0,809, 0,924)	73,6 (0,470, 0,819)	73,9 (0,629, 0,819)	75,0 (0,629, 0,819)
Hình dạng phần hoa 120 phút (%)	(0,816)	82,6	82,6 (1,00, 1,00)	82,6 (1,00, 1,00)	82,6 (1,00, 1,00)	82,5 (0,337, 0,819)
Chất phân tích	Tác dụng xử lý tổng cộng (Pr>F) ^a	Đối chứng	Không được phun (giá trị P, ^b P được điều chỉnh) ^c	Được phun Quizalofop (giá trị P, P được điều chỉnh)	Được phun 2,4-D (giá trị P, P được điều chỉnh)	Được phun cả hai (giá trị P, P được điều chỉnh)
Màu sắc phần hoa 30 phút (%)	(0,524)	51,9	52,5 (0,850, 0,960)	48,9 (0,306, 0,819)	50,3 (0,573, 0,819)	53,6 (0,573, 0,819)
Màu sắc phần hoa 60 phút (%)	(0,332)	75,3	75,9 (0,612, 0,819)	74,2 (0,315, 0,819)	74,2 (0,315, 0,819)	75,9 (0,612, 0,819)
Màu sắc phần hoa 120 phút (%)	NA	84,0	84,0	84,0	84,0	84,0
Rập thân (%)	(0,261)	5,11	5,22 (0,356, 0,819)	5,00 (0,356, 0,819)	5,00 (0,356, 0,819)	5,00 (0,356, 0,819)
Rập rể (%)	(0,431)	0,44	0,17 (0,457, 0,819)	0,72 (0,457, 0,819)	0,17 (0,457, 0,819)	0,11 (0,373, 0,819)
Giữ được màu xanh lục ⁱ	(0,260)	4,67	4,28 (0,250, 0,819)	3,92 (0,034 ^m , 0,819)	4,17 (0,144, 0,819)	4,11 (0,106, 0,819)
Tỷ lệ mắc bệnh ^l	(0,741)	6,42	6,22 (0,383, 0,819)	6,17 (0,265, 0,819)	6,17 (0,265, 0,819)	6,17 (0,265, 0,819)
Phá hủy bởi côn trùng ^k	(0,627)	7,67	7,78 (0,500, 0,819)	7,78 (0,500, 0,819)	7,72 (0,736, 0,889)	7,56 (0,500, 0,819)
Ngày đạt độ trưởng thành (đơn vị nhiệt) ^f	(0,487)	2411	2413 (0,558, 0,819)	2415 (0,302, 0,819)	2416 (0,185, 0,819)	2417 (0,104, 0,819)
Chiều cao của cây (cm)	(0,676)	294	290 (0,206, 0,819)	290 (0,209, 0,819)	291 (0,350, 0,819)	291 (0,286, 0,819)
Chất phân tích	Tác dụng xử lý tổng cộng (Pr>F) ^a	Đối chứng	Không được phun (giá trị P, ^b P được điều chỉnh) ^c	Được phun Quizalofop (giá trị P, P được điều chỉnh)	Được phun 2,4-D (giá trị P, P được điều chỉnh)	Được phun cả hai (giá trị P, P được điều chỉnh)
Chiều cao bắp (cm)	(0,089)	124	120 (0,089, 0,819)	118 (0,018 ^m , 0,786)	121 (0,214, 0,819)	118 (0,016 ^m , 0,786)

^a Tác dụng xử lý tổng cộng được ước tính bằng cách sử dụng kiểm nghiệm F.

^b So sánh việc xử lý phun và không được phun với đối chứng bằng cách sử dụng kiểm nghiệm t.

- ^c Giá trị P được điều chỉnh bằng cách sử dụng quy trình mức độ phát hiện sai (FDR).
^d Ước tính bằng mắt trên thang 1-9; 9 = cây cao có lá khỏe rộng.
^e thang 0-100%; với 0 = không tổn thương và 100 = cây đã chết.
^f Số đơn vị nhiệt đã được tích lũy từ thời điểm gieo hạt.
^g thang 0-100%; với % hạt phấn hoa có thành bị xẹp.
^h thang 0-100%; với % hạt phấn hoa có màu vàng mạnh.
ⁱ Ước lượng bằng mắt trên thang 1-9 với 1 không có mô màu xanh lục nhìn thấy được.
^j Ước lượng bằng mắt trên thang 1-9 với 1 là khả năng chống bệnh kém.
^k Ước lượng bằng mắt trên thang 1-9 với 1 là tính kháng côn trùng kém.
^l NA = phân tích thống kê không được thực hiện vì không có sự biến đổi qua các bản sao hoặc lần xử lý.
^m Sự khác biệt thống kê được chỉ ra bởi giá trị $P < 0,05$.

Ví dụ 6.4. Thu mẫu

Các mẫu để biểu hiện và phân tích thành phần được thu như được liệt kê trong bảng

14.

Bảng 14.

Lô	Mô	Giai đoạn tăng trưởng ^a	Kích thước mẫu	Số mẫu mỗi nhóm	
				Nhóm đối chứng 1	Nhóm thử nghiệm 2-5
1 (biểu hiện)	Lá	V2-4	3 lá	3	3
	Lá	V9	3 lá	3	3
	Phấn hoa ^b	R ¹	1 cây	3	3
	Rễ ^b	R ¹	1 cây	3	3
	Lá ^b	R ¹	1 lá	3	3
	Cây làm thức ăn cho gia súc	R4	2 cây ^c	3	3
	Toàn bộ cây	R6	2 cây ^c	3	3
	Hạt	R6-Trưởng thành	1 bắp	3	3
Lô	Mô	Giai đoạn tăng trưởng ^a	Mẫu Kích thước	Nhóm đối chứng 1	Nhóm thử nghiệm 2-5
2 – 4 (thành phần)	Cây làm thức ăn cho gia súc	R4	3 cây ^c	1	1
	Hạt	R6-Trưởng	5 bắp	1	1

^a Giai đoạn tăng trưởng gần đúng.

^b Các mẫu phấn hoa, rễ, và lá thu được ở R1 được gom từ cùng cây.

^c Hai cây được chặt, gộp lại và lấy mẫu nhỏ để biểu hiện, hoặc 3 cây để phân tích thành phần.

Ví dụ 6.5. Xác định protein *aad-1* trong các mẫu cây ngô

Các mẫu cây ngô được phân tích về lượng protein *aad-1*. Protein *aad-1* hòa tan dễ chiết được định lượng bằng cách sử dụng kit thử nghiệm hấp thụ miễn dịch được liên kết enzym (ELISA) được mua từ Beacon Analytical System, Inc. (Portland, ME).

Các mẫu mô cây ngô được tách từ cây thử nghiệm và được chuẩn bị để phân tích sự biểu hiện bằng cách nghiền thô, đông khô và nghiền mịn (nếu cần) bằng Geno/Grinder (Certiprep, Metuchen, New Jersey). Không cần chuẩn bị thêm đối với phần hoa. Protein *aad-1* được chiết từ mô cây ngô bằng dung dịch muối đệm phosphat chứa chất tẩy rửa Tween-20 (PBST) chứa 0,5% albumin huyết thanh bò (BSA). Đối với phần hoa, protein được chiết bằng dung dịch đệm 0,5% PBST/BSA chứa 1 mg/ml natri ascorbat và 2% hỗn hợp chất ức chế proteaza. Dịch chiết mô thực vật và phần hoa được ly tâm; dịch nổi nước được gom, pha loãng bằng dung dịch đệm thích hợp nếu cần, và phân tích bằng cách sử dụng kit ELISA *aad-1* ở dạng kẹp. Kit sử dụng các bước sau. Phần mẫu của mẫu đã pha loãng và kháng thể đơn dòng kháng *aad-1* được biotin hóa được ủ trong lỗ của đĩa vi chuẩn được phủ kháng thể đơn dòng kháng *aad-1* bất động. Các kháng thể này gắn với protein *aad-1* trong lỗ và tạo thành "dạng kẹp" với protein *aad-1* được gắn kết giữa kháng thể hòa tan và kháng thể bất động. Các mẫu không gắn kết và thể tiếp hợp sau đó được loại bỏ khỏi đĩa bằng cách rửa bằng PBST. Một lượng dư thể tiếp hợp streptavidin-enzym (phosphatase kiềm) được bổ sung vào lỗ để ủ. Cuối giai đoạn ủ, các chất phản ứng không gắn kết được loại bỏ khỏi đĩa bằng cách rửa. Việc bổ sung sau đó chất nền enzym tạo ra sản phẩm có màu. Do *aad-1* được gắn kết trong kháng thể kẹp, mức độ hiện màu có liên quan đến nồng độ của *aad-1* trong mẫu (tức là, nồng độ còn lại càng thấp thì mức độ hiện màu càng thấp). Độ hấp thụ ở 405 nm được đo bằng cách sử dụng máy đọc đĩa Molecular Devices V-max hoặc Spectra Max 190. Đường cong hiệu chỉnh được tạo ra và nồng độ *aad-1* trong các mẫu chưa biết được tính từ phương trình hồi quy đa thức bằng cách sử dụng phần mềm Soft-MAX Pro™ tương thích với máy đọc đĩa. Các mẫu được phân tích trong các lỗ bản sao với nồng độ trung bình của lỗ bản sao được báo cáo.

Tóm tắt các nồng độ protein *aad-1* (được tính trung bình qua các địa điểm) trong các ma trận cây ngô khác nhau được thể hiện trong bảng 15. Nồng độ protein trung bình *aad-1* nằm trong khoảng từ 2,87 ng/mg khối lượng khô trong rễ giai đoạn R1 đến 127 ng/mg trong phần hoa. Các kết quả biểu hiện đối với các ô không được phun và được phun

là tương tự. Protein *aad-1* không được phát hiện trong mẫu đối chứng bất kỳ, ngoại trừ một mẫu rễ đối chứng từ địa điểm Indiana.

Bảng 15. Tóm tắt các mức nồng độ trung bình của protein *aad-1* được đo trong các mô cây ngô *aad-1* không được phun, *aad-1* + Quizalofop, *aad-1* + 2,4-D và *aad-1* + Quizalofop và 2,4-D

Mô cây ngô	Xử lý	Khối lượng khô của mô AAD-1 ng/mg		
		Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng
Lá V2-V4	AAD-1 không được phun	13,4	8,00	1,98-29,9
	AAD-1 + Quizalofop	13,3	6,89	4,75-24,5
	AAD-1 + 2,4-D	14,2	7,16	4,98-26,7
	AAD-1 + Quizalofop và 2,4-D	12,3	7,09	4,07-22,5
Lá V9	AAD-1 không được phun	5,96	2,50	2,67-10,9
	AAD-1 + Quizalofop	5,38	1,84	2,52-9,15
	AAD-1 + 2,4-D	6,37	2,41	3,03-10,9
	AAD-1 + Quizalofop và 2,4-D	6,52	2,38	3,11-11,1
Lá R1	AAD-1 không được phun	5,57	1,66	3,47-9,34
	AAD-1 + Quizalofop	5,70	1,63	2,70-7,78
	AAD-1 + 2,4-D	5,99	1,90	2,40-9,42
	AAD-1 + Quizalofop và 2,4-D	6,06	2,27	1,55-10,2
Phấn hoa	AAD-1 không được phun	127	36,2	56,3-210
	AAD-1 + Quizalofop	108	29,9	52,2-146
	AAD-1 + 2,4-D	113	30,2	37,5-137
	AAD-1 + Quizalofop và 2,4-D	112	32,6	45,4-162
Rễ R1	AAD-1 không được phun	2,92	1,87	0,42-6,10
	AAD-1 + Quizalofop	3,09	1,80	0,56-6,06
	AAD-1 + 2,4-D	3,92	2,03	0,91-7,62
	AAD-1 + Quizalofop và 2,4-D	2,87	1,23	1,09-5,56
Cây làm thức ăn cho gia súc R4	AAD-1 không được phun	6,87	2,79	2,37-12,1
	AAD-1 + Quizalofop	7,16	2,84	3,05-11,6
	AAD-1 + 2,4-D	7,32	2,46	2,36-10,6
	AAD-1 + Quizalofop và 2,4-D	6,84	2,31	2,25-10,3
Toàn bộ cây	AAD-1 không được phun	4,53	2,55	0,78-8,88
	AAD-1 + Quizalofop	4,61	2,22	0,75-8,77
	AAD-1 + 2,4-D	5,16	2,53	0,83-10,2
	AAD-1 + Quizalofop và 2,4-D	4,55	1,77	1,30-8,21
Hạt	AAD-1 không được phun	5,00	1,53	2,66-8,36
	AAD-1 + Quizalofop	4,63	1,51	1,07-6,84

	AAD-1 + 2,4-D	4,98	1,78	2,94-9,10
	AAD-1 + Quizalofop và 2,4-D	4,61	1,62	1,81-7,49

^a ND = giá trị nhỏ hơn giới hạn phát hiện (Limit Of Detection - LOD) của phương pháp.

^b Giá trị trong ngoặc là nằm giữa LOD và giới hạn định lượng (Limit Of Quantitation - LOQ) của phương pháp.

Ví dụ 6.6. Phân tích thành phần

Các mẫu cây ngô làm thức ăn cho gia súc và hạt được phân tích về hàm lượng dinh dưỡng bằng nhiều thử nghiệm. Các phân tích được thực hiện đối với cây làm thức ăn cho gia súc bao gồm tro, tổng chất béo, độ ẩm, protein, hydrat cacbon, sợi thô, xơ axit, xơ trung tính, canxi và phospho. Các phân tích được thực hiện đối với hạt bao gồm các thành phần chính (tro, tổng chất béo, độ ẩm, protein, hydrat cacbon, sợi thô, xơ axit), xơ trung tính (neutral detergent fiber - NDF), chất khoáng, axit amin, axit béo, vitamin, các chất chuyển hóa thứ cấp và các kháng chất dinh dưỡng. Các kết quả phân tích dinh dưỡng đối với cây ngô làm thức ăn cho gia súc và hạt được so sánh với các giá trị được báo cáo trong các tài liệu (xem; Watson, 1982 (4); Watson, 1984 (5); ILSI Crop Composition Database, 2006 (6); OECD Consensus Document on Compositional Considerations for maize, 2002 (7); và Codex Alimentarius Commission 2001 (8)).

Ví dụ 6.6.1. Phân tích thành phần chính, sợi và chất khoáng của cây làm thức ăn cho gia súc

Phân tích protein, chất béo, tro, độ ẩm, hydrat cacbon, ADF, NDF, canxi và phospho trong các mẫu cây ngô làm thức ăn cho gia súc từ nhóm đối chứng, *aad-1* không được phun, *aad-1* + quizalofop, *aad-1* + 2,4-D và *aad-1* + cả hai được thực hiện. Tóm tắt các kết quả qua tất cả các địa điểm được thể hiện trong bảng 16. Đối với phân tích chéo địa điểm và riêng từng địa điểm, tất cả các giá trị trung bình của thành phần chính, sợi và chất khoáng là nằm trong các khoảng được ghi trong tài liệu. Không quan sát thấy sự khác biệt thống kê trong phân tích chéo địa điểm giữa nhóm đối chứng và nhóm chuyển gen về độ ẩm, ADF, NDF, canxi và phospho. Đối với protein và tro, quan sát thấy kiểm nghiệm t cặp đôi có nghĩa đối với AAD-1 không được phun (protein), *aad-1* + quizalofop (protein:), và *aad-1* + cả hai (tro), nhưng không tuân theo tác dụng xử lý tổng cộng hoặc giá trị p được điều chỉnh FDR đáng kể. Đối với chất béo, cả kiểm nghiệm t cặp đôi có nghĩa và giá trị p được điều chỉnh được quan sát đối với *aad-1* + quizalofop so với nhóm đối chứng, nhưng không quan sát thấy tác dụng xử lý tổng cộng đáng kể. Đối với các hydrat cacbon, tác dụng

xử lý tổng cộng có ý nghĩa thống kê, kiểm nghiệm t cặp đôi và giá trị p được điều chỉnh FDR được quan sát thấy giữa nhóm *aad-1* + quizalofop và đối chứng. Tương tự đối với các hydrat cacbon, kiểm nghiệm t cặp đôi có nghĩa đối với nhóm *aad-1* không được phun được quan sát, nhưng không quan sát thấy giá trị p được điều chỉnh FDR đáng kể. Các khác biệt này là không có ý nghĩa sinh học do tất cả các kết quả chéo địa điểm đối với các chất phân tích này là nằm trong các khoảng được báo cáo trong tài liệu đối với cây ngô, và các khác biệt so với đối chứng là nhỏ (<23%).

Bảng 16. Tóm tắt phân tích thành phần chính, sợi và chất khoáng của cây ngô làm thức ăn cho gia súc từ tất cả các địa điểm

Thành phần chính (% khối lượng khô)	Các giá trị trong tài liệu ^a	Tác dụng xử lý tổng cộng (Pr>F) ^b	Đối chứng	Không được phun (Giá trị P, ^c P được điều chỉnh) ^d	Được phun Quizalofop (giá trị P, P được điều chỉnh)	Được phun 2,4-D (giá trị P, P được điều chỉnh)	Được phun cả hai (giá trị P, P được điều chỉnh)
Protein	3,14-15,9	(0,054)	7,65	6,51 (0,016 ^e , 0,066)	6,41 (0,010 ^e , 0,051)	7,17 (0,285, 0,450)	7,13 (0,245, 0,402)
Chất béo	0,296-6,7	(0,068)	2,29	2,08 (0,202, 0,357)	1,78 (0,005 ^e , 0,028 ^e)	2,10 (0,233, 0,391)	2,01 (0,093, 0,213)
Tro	1,3-10,5	(0,072)	3,90	3,84 (0,742, 0,859)	4,03 (0,525, 0,708)	3,99 (0,673, 0,799)	4,40 (0,019 ^e , 0,069)
Độ ẩm	53,3-87,5	(0,819)	69,5	69,2 (0,651, 0,782)	69,5 (0,988, 0,988)	69,8 (0,699, 0,820)	70,0 (0,501, 0,687)
Hydrat cacbon	66,9-94,5	(0,026 ^e)	86,1	87,6 (0,015 ^e , 0,061)	87,8 (0,006 ^e , 0,034 ^e)	86,8 (0,262, 0,424)	86,5 (0,538, 0,708)

Sợi
(% khối lượng khô)

Xơ axit (Acid Detergent Fiber - ADF)	16,1-47,4	(0,968)	26,5	26,6 (0,925, 0,970)	26,8 (0,833, 0,925)	26,0 (0,677, 0,800)	26,8 (0,851, 0,937)
Xơ trung tính (NDF)	20,3-63,7	(0,345)	41,6	43,6 (0,169, 0,322)	43,3 (0,242, 0,402)	41,3 (0,809, 0,911)	41,6 (0,978, 0,985)

Chất khoáng
(% khối lượng khô)

Canxi	0,071-0,6	(0,321)	0,212	0,203 (0,532, 0,708)	0,210 (0,930, 0,970)	0,215 (0,815, 0,911)	0,231 (0,150, 0,296)
Phospho	0,094-0,55	(0,163)	0,197	0,189 (0,198, 0,354)	0,202 (0,427, 0,615)	0,203 (0,288, 0,450)	0,200 (0,608, 0,762)

^a khoảng kết hợp.

- ^b Tác dụng xử lý tổng cộng được ước tính bằng cách sử dụng kiểm nghiệm F.
^c So sánh việc xử lý chuyển gen với đối chứng bằng cách sử dụng kiểm nghiệm t.
^d Các giá trị p được điều chỉnh bằng cách sử dụng quy trình mức độ phát hiện sai (False Discovery Rate - FDR).
^e Sự khác biệt thống kê được chỉ ra bởi giá trị $p < 0,05$.

Ví dụ 6.6.2. Phân tích thành phần chính và sợi của hạt

Tóm tắt các kết quả về các thành phần chính (protein, chất béo, tro, độ ẩm, cholesterol và hydrat cacbon) và sợi (ADF, NDF và tổng xơ thô) trong hạt ngô qua tất cả các địa điểm được thể hiện trong bảng 17. Tất cả các kết quả về các thành phần chính và sợi là nằm trong các khoảng trong tài liệu, và không thấy có sự khác biệt đáng kể trong phân tích chéo địa điểm giữa nhóm đối chứng và chuyển gen về chất béo, tro, NDF và tổng xơ thô. Đối với độ ẩm, tác dụng xử lý tổng cộng đáng kể được quan sát, nhưng không tuân theo kiểm nghiệm t cặp đôi có nghĩa hoặc giá trị p được điều chỉnh FDR. Đối với ADF, kiểm nghiệm t cặp đôi có nghĩa được quan sát đối với *aad-1* + cả hai, nhưng không thấy tác dụng xử lý tổng cộng hoặc giá trị p được điều chỉnh FDR đáng kể. Đối với cả protein và hydrat cacbon, kiểm nghiệm tạo cặp, giá trị p được điều chỉnh và tác dụng xử lý tổng cộng đáng kể được thấy đối với *aad-1* không được phun, *aad-1* + quizalofop, và *aad-1* + cả hai. Do các khác biệt này là nhỏ ($< 12\%$) và tất cả các giá trị là nằm trong các khoảng trong tài liệu, các khác biệt này không được coi là có ý nghĩa sinh học.

Bảng 17. Tóm tắt phân tích thành phần chính và sợi của hạt ngô từ tất cả các địa điểm

Thành phần chính (% khối lượng khô)	Các giá trị trong tài liệu ^a	Tác dụng xử lý tổng cộng ($Pr > F$) ^b	Đối chứng	Không được phun (Giá trị P, ^c P được điều chỉnh) ^d	Được phun Quizalofop (giá trị P, P được điều chỉnh)	Được phun 2,4-D (giá trị P, P được điều chỉnh)	Được phun cả hai (giá trị P, P được điều chỉnh)
Protein	6-17,3	(0,003 ^e)	9,97	10,9 (0,002 ^e , 0,016 ^e)	11,1 (0,0004 ^e , 0,013 ^e)	10,5 (0,061, 0,161)	10,9 (0,002 ^e , 0,015 ^e)
Chất béo	1,2-18,8	(0,369)	4,26	4,19 (0,238, 0,397)	4,16 (0,095, 0,215)	4,26 (0,955, 0,977)	4,22 (0,427, 0,615)
Tro	0,62-6,28	(0,553)	1,45	1,55 (0,178, 0,330)	1,52 (0,364, 0,557)	1,45 (0,982, 0,985)	1,51 (0,397, 0,587)
Độ ẩm	6,1-40,5	(0,038 ^e)	25,1	25,5 (0,406, 0,594)	24,4 (0,056, 0,152)	24,5 (0,117, 0,254)	24,5 (0,114, 0,250)
Cholesterol	NR ^f	NA ^g	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ

Hydrat cacbon	63,3-89,8	(0,005 ^e)	84,3	83,3 (0,002 ^e , 0,015 ^e)	83,2 (0,001 ^e , 0,013 ^e)	83,8 (0,074, 0,185)	83,4 (0,003 ^e , 0,019 ^e)
---------------	-----------	-----------------------	------	---	---	---------------------------	---

Sợi

(% khối lượng khô)

Xơ axit (ADF)	1,82-11,3	(0,247)	4,23	3,94 (0,130, 0,269)	3,99 (0,197, 0,354)	3,89 (0,078, 0,193)	3,82 (0,035 ^e , 0,106)
Xơ trung tính (NDF)	5,59-22,6	(0,442)	10,6	10,3 (0,455, 0,638)	9,89 (0,120, 0,254)	9,90 (0,121, 0,254)	10,3 (0,552, 0,708)
Tổng xơ thô	8,3-35,3	(0,579)	13,4	12,8 (0,164, 0,313)	12,9 (0,195, 0,353)	13,1 (0,487, 0,679)	12,9 (0,215, 0,370)

^a khoảng kết hợp.^b Tác dụng xử lý tổng cộng được ước tính bằng cách sử dụng kiểm nghiệm F.^c So sánh việc xử lý chuyên gen với đối chứng bằng cách sử dụng kiểm nghiệm t.^d Các giá trị p được điều chỉnh bằng cách sử dụng quy trình mức độ phát hiện sai (False Discovery Rate - FDR).^e Sự khác biệt thống kê được chỉ ra bởi giá trị $P < 0,05$.^f NR = không được báo cáo.^g NA= phân tích thống kê không được thực hiện do phần lớn dữ liệu < LOQ.

Ví dụ 6.6.3 Phân tích chất khoáng của hạt

Tiến hành phân tích các mẫu hạt ngô về các chất khoáng canxi, crom, đồng, iot, sắt, magie, mangan, molybden, phospho, kali, selen, natri, và kẽm. Tóm tắt các kết quả qua tất cả các địa điểm được thể hiện trong bảng 18. Tất cả các kết quả là nằm trong các khoảng trong tài liệu được báo cáo. Đối với phân tích chéo địa điểm, không quan sát thấy các khác biệt đáng kể về canxi, đồng, sắt, và kali. Các kết quả trung bình của crom, iot, selen và natri là thấp hơn giới hạn định lượng của phương pháp. Đối với magie và phospho, quan sát thấy kiểm nghiệm t cặp đôi có nghĩa đối với nhóm *aad-1* không được phun và *aad-1* + quizalofop, nhưng không tuân theo tác dụng xử lý tổng cộng hoặc giá trị p được điều chỉnh FDR đáng kể. Đối với mangan và molybden, quan sát thấy kiểm nghiệm t cặp đôi có nghĩa đối với *aad-1* không được phun, nhưng không thấy giá trị p được điều chỉnh FDR và tác dụng xử lý tổng cộng đáng kể. Đối với nhóm *aad-1* + cả hai, quan sát thấy kiểm nghiệm t cặp đôi có nghĩa đối với kẽm, nhưng không thấy giá trị p được điều chỉnh FDR hoặc tác dụng xử lý tổng cộng đáng kể. Ngoài ra, các khác biệt này so với đối chứng là nhỏ (< 13%), và tất cả các giá trị là nằm trong các khoảng trong tài liệu, nếu có.

Bảng 18. Tóm tắt phân tích chất khoáng của hạt ngô từ tất cả các địa điểm

Chất khoáng (mg/100g khối lượng khô)	Các giá trị trong tài liệu ^a	Tác dụng xử lý tổng cộng (Pr>F) ^b	Đối chứng	Không được phun (Giá trị P; ^c P được điều chỉnh) ^d	Được phun Quizalofop (giá trị P; P được điều chỉnh)	Được phun 2,4-D (giá trị P; P được điều chỉnh)	Được phun cả hai (giá trị P; P được điều chỉnh)
Canxi	1,27-100	(0,493)	4,05	4,21 (0,146, 0,289)	4,12 (0,505, 0,687)	4,04 (0,944, 0,977)	4,06 (0,898, 0,957)
Crom	0,006- 0,016	NA ^e	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Đồng	0,073-1,85	(0,963)	0,144	0,151 (0,655, 0,782)	0,146 (0,890, 0,957)	0,141 (0,817, 0,911)	0,149 (0,749, 0,863)
Iot	7,3-81	NA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Sắt	0,1-10	(0,333)	2,49	2,60 (0,086, 0,206)	2,56 (0,310, 0,482)	2,51 (0,801, 0,911)	2,59 (0,145, 0,289)
Magie	59,4- 1000	(0,072)	122	129 (0,010 ^f , 0,051)	128 (0,017 ^f , 0,066)	126 (0,145, 0,289)	127 (0,070, 0,177)
Mangan	0,07-5,4	(0,099)	0,525	0,551 (0,025 ^f , 0,082)	0,524 (0,884, 0,957)	0,526 (0,942, 0,977)	0,532 (0,505, 0,687)
Molypden	NR	(0,143)	261	229 (0,020 ^f , 0,072)	236 (0,067, 0,173)	244 (0,206, 0,362)	234 (0,046, 0,132)
Phospho	147-750	(0,102)	289	303 (0,012 ^f , 0,057)	300 (0,035 ^f , 0,106)	299 (0,055, 0,150)	298 (0,085, 0,206)
Kali	181-720	(0,453)	362	368 (0,330, 0,510)	359 (0,655, 0,782)	364 (0,722, 0,839)	357 (0,454, 0,638)
Selen	0,001-0,1	NA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Natri	0-150	NA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Kẽm	0,65-3,72	(0,166)	2,26	2,32 (0,183, 0,336)	2,34 (0,108, 0,238)	2,29 (0,627, 0,768)	2,37 (0,027 ^f , 0,085)

^a khoảng kết hợp.^b Tác dụng xử lý tổng cộng được ước tính bằng cách sử dụng kiểm nghiệm F.^c So sánh việc xử lý chuyển gen với đối chứng bằng cách sử dụng kiểm nghiệm t.^d Các giá trị p được điều chỉnh bằng cách sử dụng quy trình mức độ phát hiện sai (False Discovery Rate - FDR).^e NA= phân tích thống kê không được thực hiện do phần lớn dữ liệu < LOQ.^f Sự khác biệt thống kê được chỉ ra bởi giá trị P < 0,05.

Ví dụ 6.6.4 Phân tích axit amin của hạt

Các mẫu cây ngô được phân tích về hàm lượng axit amin trong cây ngô đối chứng, *aad-1* không được phun, *aad-1* + quizalofop, *aad-1* + 2,4-D và *aad-1* + cả hai, và tóm tắt các kết quả ở tất cả các địa điểm và từng địa điểm cánh đồng riêng được thể hiện trong bảng 19. Mức tất cả các axit amin là nằm trong các khoảng trong tài liệu được báo cáo, và không quan sát thấy các khác biệt đáng kể trong phân tích chéo địa điểm đối với arginin, lysin, và tyrosin. Các khác biệt đáng kể được quan sát thấy đối với một số axit amin trong phân tích chéo địa điểm. Trong các trường hợp này, hàm lượng axit amin của nhóm đối chứng thấp hơn so với dòng chuyển gen *aad-1*, điều này có thể liên quan đến tổng hàm lượng protein thấp hơn trong hạt đối chứng so với dòng *aad-1*. Đối với nhóm *aad-1* không được phun, thấy có tác dụng xử lý tổng cộng đáng kể cùng với kiểm nghiệm t cặp đôi và giá trị p được điều chỉnh FDR đáng kể đối với tất cả các axit amin ngoại trừ arginin, glyxin, lysin, tryptophan và tyrosin. Đối với nhóm *aad-1* + quizalofop, thấy có tác dụng xử lý tổng cộng đáng kể cùng với kiểm nghiệm t cặp đôi và giá trị p được điều chỉnh FDR đáng kể đối với tất cả các axit amin ngoại trừ arginin, xystein, glyxin, lysin, tryptophan và tyrosin. Đối với nhóm *aad-1* + 2,4-D, thấy có tác dụng xử lý tổng cộng đáng kể cùng với kiểm nghiệm t cặp đôi có nghĩa (với giá trị p được điều chỉnh FDR đáng kể) đối với tất cả các axit amin ngoại trừ arginin, axit aspartic, glyxin, histidin, lysin, tyrosin và valin. Đối với nhóm *aad-1* + cả hai, thấy có tác dụng xử lý tổng cộng đáng kể cùng với kiểm nghiệm t cặp đôi và giá trị p được điều chỉnh FDR đáng kể đối với tất cả các axit amin ngoại trừ arginin, glyxin, lysin, serin, tryptophan và tyrosin. Mặc dù có nhiều khác biệt được quan sát đối với các axit amin, nhưng các khác biệt này là nhỏ (< 15%), không quan sát thấy qua tất cả các địa điểm, và tất cả các giá trị trung bình là nằm trong các khoảng trong tài liệu được báo cáo.

Bảng 19. Tóm tắt phân tích axit amin của hạt ngô từ tất cả các địa điểm

Axit amin (% khối lượng khô)	Các giá trị trong tài liệu ^a	Tác dụng xử lý tổng cộng (Pr>F) ^b	Đối chứng	Không được phun (Giá trị P, ^c P được điều chỉnh) ^d	Được phun Quizalofop (giá trị P, P được điều chỉnh)	Được phun 2,4-D (giá trị P, P được điều chỉnh)	Được phun cả hai (giá trị P, P được điều chỉnh)
Alanin	0,44-1,39	(0,002 ^e)	0,806	0,901 (0,0005 ^e , 0,013 ^e)	0,900 (0,0005 ^e , 0,013 ^e)	0,863 (0,021 ^e , 0,074)	0,894 (0,001 ^e , 0,013 ^e)

Arginin	0,12-0,64	(0,371)	0,486	0,499 (0,286, 0,450)	0,505 (0,139, 0,283)	0,487 (0,929, 0,970)	0,484 (0,897, 0,957)
Axit aspartic	0,34-1,21	(0,010 ^e)	0,712	0,768 (0,002 ^e , 0,015 ^e)	0,764 (0,003 ^e , 0,021 ^e)	0,743 (0,060, 0,160)	0,762 (0,004 ^e , 0,027 ^e)
Xystein	0,08-0,51	(0,033 ^e)	0,213	0,225 (0,009 ^e , 0,050 ^e)	0,223 (0,020 ^e , 0,072)	0,223 (0,018 ^e , 0,067)	0,226 (0,005 ^e , 0,028 ^e)
Axit Glutamic	0,97-3,54	(0,001 ^e)	1,97	2,22 (0,0003 ^e , 0,013 ^e)	2,21 (0,0004 ^e , 0,013 ^e)	2,12 (0,017 ^e , 0,067)	2,20 (0,001 ^e , 0,013 ^e)
Glyxin	0,18-0,54	(0,052)	0,383	0,397 (0,018 ^e , 0,067)	0,398 (0,013 ^e , 0,059)	0,390 (0,217, 0,371)	0,397 (0,016 ^e , 0,066)
Histidin	0,14-0,43	(0,005 ^e)	0,283	0,303 (0,001 ^e , 0,013 ^e)	0,302 (0,002 ^e , 0,014 ^e)	0,295 (0,036, 0,109)	0,302 (0,002 ^e , 0,014 ^e)
Isoleuxin	0,18-0,71	(0,003 ^e)	0,386	0,427 (0,001 ^e , 0,014 ^e)	0,427 (0,001 ^e , 0,014 ^e)	0,410 (0,044 ^e , 0,127)	0,431 (0,001 ^e , 0,013 ^e)
Leuxin	0,64-2,49	(0,001 ^e)	1,35	1,54 (0,0003 ^e , 0,013 ^e)	1,54 (0,0003 ^e , 0,013 ^e)	1,47 (0,013 ^e , 0,059)	1,53 (0,001 ^e , 0,013 ^e)
Lysin	0,05-0,56	(0,211)	0,310	0,315 (0,210, 0,367)	0,316 (0,128, 0,265)	0,309 (0,879, 0,956)	0,316 (0,102, 0,226)
Metionin	0,10-0,47	(0,003 ^e)	0,195	0,209 (0,001 ^e , 0,013 ^e)	0,209 (0,001 ^e , 0,013 ^e)	0,205 (0,014 ^e , 0,061)	0,208 (0,001 ^e , 0,014 ^e)
Phenylalanin	0,24-0,93	(0,002 ^e)	0,551	0,617 (0,001 ^e , 0,013 ^e)	0,619 (0,001 ^e , 0,013 ^e)	0,592 (0,023 ^e , 0,077)	0,615 (0,001 ^e , 0,013 ^e)
Prolin	0,46-1,63	(0,002 ^e)	0,910	1,01 (0,0004 ^e , 0,013 ^e)	1,01 (0,001 ^e , 0,013 ^e)	0,975 (0,012 ^e , 0,059)	0,997 (0,001 ^e , 0,014 ^e)
Serin	0,24-0,91	(0,009 ^e)	0,498	0,550 (0,002 ^e , 0,014 ^e)	0,550 (0,001 ^e , 0,014 ^e)	0,529 (0,042 ^e , 0,122)	0,536 (0,015 ^e , 0,061)
Axit amin (% khối lượng khô)	Các giá trị trong tài liệu ^a	Tác dụng xử lý tổng cộng (Pr>F) ^b	Đối chứng	Không được phun (Giá trị P, ^c P được điều chỉnh) ^d	Được phun Quizalofop (giá trị P, P được điều chỉnh)	Được phun 2,4-D (giá trị P, P được điều chỉnh)	Được phun cả hai (giá trị P, P được điều chỉnh)
Threonin	0,22-0,67	(0,005 ^e)	0,364	0,394 (0,001 ^e , 0,014 ^e)	0,394 (0,001 ^e , 0,013 ^e)	0,384 (0,023 ^e , 0,077)	0,390 (0,003 ^e , 0,020 ^e)
Tryptophan	0,03-0,22	(0,088)	0,052	0,055 (0,067, 0,173)	0,056 (0,025 ^e , 0,082)	0,056 (0,014 ^e , 0,060)	0,056 (0,029 ^e , 0,092)
Tyrosin	0,10-0,79	(0,390)	0,336	0,355 (0,535, 0,708)	0,375 (0,214, 0,370)	0,339 (0,907, 0,964)	0,314 (0,500, 0,687)

Valin	0,21-0,86	(0,005 ^e)	0,495	0,537 (0,002 ^e , 0,014 ^e)	0,538 (0,002 ^e , 0,014 ^e)	0,519 (0,054, 0,148)	0,538 (0,001 ^e , 0,014 ^e)
-------	-----------	-----------------------	-------	--	--	----------------------------	--

^a khoảng kết hợp.

^b Tác dụng xử lý tổng cộng được ước tính bằng cách sử dụng kiểm nghiệm F.

^c So sánh việc xử lý chuyển gen với đối chứng bằng cách sử dụng kiểm nghiệm t.

^d Các giá trị p được điều chỉnh bằng cách sử dụng quy trình mức độ phát hiện sai (False Discovery Rate - FDR).

^e Sự khác biệt thống kê được chỉ ra bởi giá trị $P < 0,05$.

Ví dụ 6.6.5. Phân tích axit béo của hạt

Phân tích các mẫu hạt ngô về axit béo được thực hiện. Tóm tắt các kết quả qua tất cả các địa điểm được thể hiện trong bảng 20. Tất cả các kết quả đối với các mẫu hạt ngô đối chứng, *aad-1* không được phun, *aad-1* + quizalofop, *aad-1* + 2,4-D và *aad-1* + cả hai được phân tích về các axit béo này là nằm trong các khoảng ghi trong tài liệu được công bố. Các kết quả đối với axit caprylic (8:0), capric (10:0), lauric (12:0), myristic (14:0), myristoleic (14:1), pentadecanoic (15:0), pentadexenoic (15:1), heptadecanoic (17:0), heptadexenoic (17:1), gamma linolenic (18:3), eicosadienoic (20:2), eicosatrienoic (20:3), và arachidonic (20:4) là thấp hơn giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp này. Trong phân tích chéo địa điểm, không quan sát thấy có khác biệt đáng kể đối với 16:0 palmitic, 16:1 pamitoleic, 18:0 stearic, 18:2 linoleic, 18:3 linolenic, và 20:0 arachidic. Đối với 18:1 oleic và 20:1 eicosenoic, quan sát thấy kiểm nghiệm t cặp đôi có nghĩa đối với nhóm *aad-1* không được phun (18:1) và *aad-1* + 2,4-D (18:1 và 20:1), nhưng không tuân theo tác dụng xử lý tổng cộng hoặc giá trị p được điều chỉnh FDR đáng kể. Đối với 22:0 behenic, thấy có tác dụng xử lý tổng cộng đáng kể và kiểm nghiệm t cặp đôi có nghĩa đối với *aad-1* + 2,4-D và *aad-1* + cả hai, nhưng không thấy giá trị p được điều chỉnh FDR đáng kể.

Bảng 20. Tóm tắt phân tích axit béo của hạt ngô từ tất cả các địa điểm

Axit béo (% tổng số các axit béo) ^a	Các giá trị trong tài liệu ^b	Tác dụng xử lý tổng cộng ($Pr > F$) ^c	Đối chứng	Không được phun (giá trị p, ^d P được điều chỉnh) ^e	Được phun Quizalofop (giá trị P, P được điều chỉnh)	Được phun 2,4-D (giá trị P, P được điều chỉnh)	Được phun cả hai (giá trị P, P được điều chỉnh)
8:0 Caprylic	0,13–0,34	NA ^f	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
10:0 Capric	ND	NA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
12:0 Lauric	ND–0,687	NA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ

14:0 Myristic	ND-0,3	NA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
14:1 Myristoleic	NR	NA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
15:0 Pentadecanoic	NR	NA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
15:1 Pentadexenoic	NR	NA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
16:0 Palmitic	7–20,7	(0,559)	9,83	9,88 (0,618, 0,763)	9,95 (0,280, 0,445)	9,78 (0,617, 0,763)	9,90 (0,544, 0,708)
16:1 Palmitoleic	ND–1,0	(0,552)	0,056	0,044 (0,804, 0,911)	0,047 (0,551, 0,708)	0,041 (0,555, 0,708)	0,079 (0,392, 0,582)
17:0 Heptadecanoic	ND–0,11	NA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
17:1 Heptadexenoic	ND– 0,1	NA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
18:0 Stearic	ND-3,4	(0,561)	2,04	1,98 (0,119, 0,254)	2,01 (0,437, 0,626)	2,00 (0,259, 0,421)	2,02 (0,598, 0,756)
18:1 Oleic	17,4 - 46	(0,076)	31,3	30,4 (0,013 ^g , 0,059)	30,8 (0,178, 0,329)	30,4 (0,015 ^g , 0,061)	30,7 (0,092, 0,213)
18:2 Linoleic	34,0-70	(0,474)	47,5	48,3 (0,189, 0,345)	48,4 (0,144, 0,289)	48,0 (0,453, 0,638)	48,5 (0,119, 0,254)
18:3 Gama Linolenic	NR	NA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Axit béo (% tổng số các axit béo) ^a	Các giá trị trong tài liệu ^b	Tác dụng xử lý tổng cộng (Pr>F) ^c	Đôi chứng	Không được phun (giá trị p, ^d P được điều chỉnh) ^e	Được phun Quizalofop (giá trị P, P được điều chỉnh)	Được phun 2,4-D (giá trị P, P được điều chỉnh)	Được phun cả hai (giá trị P, P được điều chỉnh)
18:3 Linolenic	ND-2,25	(0,479)	1,04	1,05 (0,537, 0,708)	1,06 (0,202, 0,357)	1,04 (0,842, 0,932)	1,06 (0,266, 0,428)
20:0 Arachidic	0,1-2	(0,379)	0,400	0,386 (0,061, 0,161)	0,393 (0,341, 0,525)	0,390 (0,153, 0,297)	0,390 (0,175, 0,328)
20:1 Eicosenoic	0,17–1,92	(0,107)	0,232	0,226 (0,089, 0,210)	0,230 (0,497, 0,687)	0,223 (0,013 ^g , 0,059)	0,227 (0,121, 0,254)
20:2 Eicosadienoic	ND–0,53	NA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
20:3 Eicosatrienoic	0,275	NA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
20:4 Arachidonic	0,465	NA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ

22:0 Behenic	ND-0,5	(0,044 ^b)	0,136	0,088 (0,093, 0,213)	0,076 (0,887, 0,957)	0,086 (0,011 ^g , 0,054)	0,108 (0,023 ^g , 0,077)
--------------	--------	-----------------------	-------	----------------------------	----------------------------	--	--

^a Các kết quả được chuyển từ đơn vị % khối lượng khô sang % axit béo.

^b khoảng kết hợp.

^c Tác dụng xử lý tổng cộng được ước tính bằng cách sử dụng kiểm nghiệm F.

^d So sánh việc xử lý chuyển gen với đối chứng bằng cách sử dụng kiểm nghiệm t.

^e Các giá trị p được điều chỉnh bằng cách sử dụng quy trình mức độ phát hiện sai (False Discovery Rate - FDR).

^f NA= phân tích thống kê không được thực hiện do phần lớn dữ liệu < LOQ.

^g Sự khác biệt thống kê được chỉ ra bởi giá trị P < 0,05.

Ví dụ 6.6.6. Phân tích vitamin của hạt

Các mức vitamin A, B1, B2, B5, B6, B12, C, D, E, niacin, và axit folic trong các mẫu hạt ngô từ nhóm cây ngô đối chứng, *aad-1* không được phun, *aad-1* + quizalofop, *aad-1* + 2,4-D và *aad-1* + cả hai được xác định. Tóm tắt các kết quả qua tất cả các địa điểm được thể hiện trong bảng 21. Các vitamin B12, D và E không định lượng được bằng phương pháp phân tích được sử dụng. Tất cả các kết quả trung bình được báo cáo đối với các vitamin là tương tự như các giá trị trong tài liệu được báo cáo, nếu có. Các kết quả đối với các vitamin mà không thuộc khoảng trong tài liệu được báo cáo (các vitamin B5 và C) là tương tự như các giá trị đối chứng thu được (khác biệt < 22% so với đối chứng). Đối với phân tích chéo địa điểm, không quan sát thấy sự khác biệt thống kê, ngoại trừ các vitamin B1, C và niacin. Kiểm nghiệm t cặp đôi có nghĩa đối với vitamin B1 được quan sát giữa nhóm đối chứng và *aad-1* không được phun, *aad-1* + quizalofop, và *aad-1* + cả hai, nhưng không tuân theo tác dụng xử lý tổng cộng hoặc giá trị p được điều chỉnh FDR đáng kể. Đối với vitamin C, quan sát thấy tác dụng xử lý tổng cộng đáng kể cùng với kiểm nghiệm t cặp đôi có nghĩa và giá trị p được điều chỉnh FDR đối với *aad-1* + quizalofop và *aad-1* + 2,4-D. Tương tự đối với niacin, quan sát thấy tác dụng xử lý tổng cộng đáng kể cùng với kiểm nghiệm t cặp đôi có nghĩa và giá trị p được điều chỉnh FDR đối với *aad-1* + quizalofop và *aad-1* + cả hai. Kiểm nghiệm t cặp đôi có nghĩa đối với *aad-1* + 2,4-D cũng được thấy đối với niacin đối với nhóm *aad-1* + 2,4-D, nhưng không tuân theo tác dụng xử lý tổng cộng hoặc giá trị p được điều chỉnh FDR đáng kể. Do các khác biệt này không được quan sát thấy qua các địa điểm và các giá trị là nằm trong các khoảng trong tài liệu (khi có thể), các khác biệt này không được coi là có ý nghĩa sinh học.

Bảng 21. Tóm tắt phân tích vitamin của hạt ngô từ tất cả các địa điểm

Vitamin (mg/kg khối lượng khô)	Các giá trị trong tài liệu ^a	Tác dụng xử lý tổng cộng (Pr>F) ^b	Đối chứng	Không được phun (Giá trị P, ^c P được điều chỉnh) ^d	Được phun Quizalofop (giá trị P, P được điều chỉnh)	Được phun 2,4-D (giá trị P, P được điều chỉnh)	Được phun cả hai (giá trị P, P được điều chỉnh)
Beta Caroten (Vitamin A)	0,19 – 46,8	(0,649)	1,80	1,85 (0,372, 0,566)	1,80 (0,967, 0,983)	1,82 (0,770, 0,883)	1,87 (0,221, 0,376)
Vitamin B1 (Thiamin)	1,3 - 40	(0,068)	3,47	3,63 (0,041 ^e , 0,121)	3,67 (0,013 ^e , 0,059)	3,54 (0,375, 0,567)	3,64 (0,032 ^e , 0,100)
Vitamin B2 (Riboflavin)	0,25 - 5,6	(0,803)	2,15	2,05 (0,443, 0,631)	2,08 (0,600, 0,756)	1,99 (0,227, 0,383)	2,07 (0,543, 0,708)
Vitamin B5 (Axit pantothenic)	NR ^f	(0,820)	5,28	5,17 (0,623, 0,766)	5,09 (0,391, 0,582)	5,29 (0,968, 0,983)	5,10 (0,424, 0,615)
Vitamin B6 (pyridoxin)	3,68 – 11,3	(0,431)	6,52	6,57 (0,859, 0,938)	6,66 (0,652, 0,782)	6,66 (0,652, 0,782)	7,08 (0,088, 0,210)
Vitamin B12	NR	NA ^g	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Vitamin C	NR	(0,018 ^e)	22,4	21,2 (0,268, 0,429)	17,5 (0,005 ^e , 0,028 ^e)	18,0 (0,004 ^e , 0,026 ^e)	20,4 (0,068, 0,173)
Vitamin D	NR	NA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Vitamin E (alpha Tocopherol)	1,5 - 68,7	(0,558)	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Niixin (axit nicotinic, Vit. B3)	9,3 - 70	(0,013 ^e)	26,1	24,2 (0,050, 0,140)	22,9 (0,002 ^e , 0,017 ^e)	23,7 (0,018 ^e , 0,067)	22,9 (0,002 ^e , 0,016 ^e)
Axit folic	0,15 - 683	(0,881)	0,594	0,588 (0,779, 0,890)	0,574 (0,403, 0,592)	0,592 (0,931, 0,970)	0,597 (0,916, 0,970)

^a khoảng kết hợp.

^b Tác dụng xử lý tổng cộng được ước tính bằng cách sử dụng kiểm nghiệm F.

^c So sánh việc xử lý chuyển gen với đối chứng bằng cách sử dụng kiểm nghiệm t.

^d Các giá trị p được điều chỉnh bằng cách sử dụng quy trình mức độ phát hiện sai (False Discovery Rate - FDR).

^e Sự khác biệt thống kê được chỉ ra bởi giá trị P < 0,05.

^f NR = không được báo cáo.

^g NA= phân tích thống kê không được thực hiện do phần lớn dữ liệu < LOQ.

Ví dụ 6.6.7. Phân tích kháng chất dinh dưỡng và chất chuyển hóa thứ cấp của hạt

Mức độ chất chuyển hóa thứ cấp (axit coumaric, axit ferulic, furfural và inositol) và kháng chất dinh dưỡng (axit phytic, raffinosa, và chất ức chế trypsin) trong các mẫu hạt

ngô từ các nhóm cây ngô đối chứng, *aad-1* không được phun, *aad-1* + quizalofop, *aad-1* + 2,4-D và *aad-1* + cả hai được xác định. Tóm tắt các kết quả qua tất cả các địa điểm được thể hiện trong bảng 22 và 23. Đối với phân tích chéo địa điểm, tất cả các giá trị là nằm trong các khoảng trong tài liệu. Không quan sát thấy khác biệt đáng kể giữa các kết quả của các nhóm *aad-1* và nhóm đối chứng trong phân tích chéo địa điểm đối với inositol và chất ức chế trypsin. Các kết quả của furfural và raffinosa là thấp hơn giới hạn định lượng của phương pháp. Quan sát thấy kiểm nghiệm t cặp đôi có nghĩa đối với axit coumaric (*aad-1* không được phun, *aad-1* + 2,4-D và *aad-1* + cả hai), và axit ferulic (*aad-1* + quizalofop và *aad-1* + cả hai). Các khác biệt này không tuân theo tác dụng xử lý tổng cộng hoặc giá trị p được điều chỉnh FDR đáng kể và tương tự như đối chứng (chênh lệch < 10%). Thấy có tác dụng xử lý tổng cộng, kiểm nghiệm t cặp đôi, và giá trị p được điều chỉnh FDR đáng kể đối với axit phytic (*aad-1* không được phun). Do tất cả các kết quả là nằm trong các khoảng trong tài liệu và tương tự như đối chứng (chênh lệch < 11%), các khác biệt này không được coi là có ý nghĩa sinh học.

Bảng 22. Tóm tắt phân tích chất chuyển hóa thứ cấp của hạt ngô từ tất cả các địa điểm

Chất chuyển hóa thứ cấp (% khối lượng khô)	Các giá trị trong tài liệu ^a	Tác dụng xử lý tổng cộng (Pr>F) ^b	Đối chứng	Không được phun (Giá trị P, ^c P được điều chỉnh) ^d	Được phun Quizalofop (giá trị P, P được điều chỉnh)	Được phun 2,4-D (giá trị P, P được điều chỉnh)	Được phun cả hai (giá trị P, P được điều chỉnh)
Axit Coumaric	0,003-0,058	(0,119)	0,021	0,020 (0,038^e , 0,113)	0,020 (0,090, 0,211)	0,019 (0,022^e , 0,074)	0,020 (0,029^e , 0,091)
Axit Ferulic	0,02-0,389	(0,077)	0,208	0,199 (0,051, 0,141)	0,196 (0,010^e , 0,051)	0,200 (0,080, 0,196)	0,197 (0,019^e , 0,069)
Furfural	0,0003-0,0006	NA ^f	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Inositol	0,0089-0,377	(0,734)	0,218	0,224 (0,548, 0,708)	0,218 (0,973, 0,984)	0,213 (0,612, 0,763)	0,211 (0,526, 0,708)

^a khoảng kết hợp.

^b Tác dụng xử lý tổng cộng được ước tính bằng cách sử dụng kiểm nghiệm F.

^c So sánh việc xử lý chuyển gen với đối chứng bằng cách sử dụng kiểm nghiệm t.

^d Các giá trị p được điều chỉnh bằng cách sử dụng quy trình mức độ phát hiện sai (False Discovery Rate - FDR).

^e Sự khác biệt thống kê được chỉ ra bởi giá trị P < 0,05.

^f NA= phân tích thống kê không được thực hiện do phần lớn dữ liệu < LOQ.

Bảng 23. Tóm tắt phân tích kháng chất dinh dưỡng của hạt ngô từ tất cả các địa điểm

Kháng chất dinh dưỡng (% khối lượng khô)	Các giá trị trong tài liệu ^a	Tác dụng xử lý tổng cộng (Pr>F) ^b	Đối chứng	Không được phun (Giá trị P, ^c P được điều chỉnh) ^d	Được phun Quizalofop (giá trị P, P được điều chỉnh)	Được phun 2,4-D (giá trị P, P được điều chỉnh)	Được phun cả hai (giá trị P, P được điều chỉnh)
Axit Phytic	0,11-1,57	(0,046 ^e)	0,727	0,806 (0,003 ^e , 0,020 ^e)	0,767 (0,099, 0,224)	0,755 (0,245, 0,402)	0,761 (0,158, 0,304)
Raffinosa	0,02-0,32	NA ^f	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Chất ức chế trypsin (TIU/mg)	1,09-7,18	(0,742)	5,08	5,10 (0,954, 0,977)	4,87 (0,631, 0,770)	5,45 (0,387, 0,582)	5,18 (0,813, 0,911)

^a khoảng kết hợp.^b Tác dụng xử lý tổng cộng được ước tính bằng cách sử dụng kiểm nghiệm F.^c So sánh việc xử lý chuyển gen với đối chứng bằng cách sử dụng kiểm nghiệm t.^d Các giá trị p được điều chỉnh bằng cách sử dụng quy trình mức độ phát hiện sai (False Discovery Rate - FDR).^e Sự khác biệt thống kê được chỉ ra bởi giá trị P < 0,05.^f NA= phân tích thống kê không được thực hiện do phần lớn dữ liệu < LOQ.

Ví dụ 7 - Các thử nghiệm nông học bổ sung

Các đặc tính nông học của dòng cây ngô 40278 so với dòng cây ngô đối chứng không chuyển gen lân cận (near-isoline) được đánh giá qua các môi trường đa dạng. Việc xử lý bao gồm 4 thể lai riêng biệt về di truyền và các thể lai đối chứng không chuyển gen lân cận thích hợp của chúng được thử nghiệm qua tổng số 21 địa điểm.

Bốn thể lai thử nghiệm là các thể lai có độ trưởng thành từ trung bình đến muộn với độ trưởng thành tương đối nằm trong khoảng từ 99 đến 113 ngày. Thử nghiệm A đánh giá biến thể gen DAS-40278-9 trong nền di truyền chuyển đổi Inbred C x BC3S1. Thể lai này có độ trưởng thành tương đối là 109 ngày và được thử nghiệm ở 16 địa điểm (bảng 24). Thử nghiệm B đánh giá nền lai chuyển đổi Inbred E x BC3S1, thể lai có độ trưởng thành tương đối 113 ngày. Thể lai này được thử nghiệm ở 14 địa điểm, bằng cách sử dụng tập hợp các địa điểm hơi khác nhau so với Thử nghiệm A (bảng 24). Thử nghiệm C và D lần lượt đánh giá nền lai chuyển đổi BC2S1 x Inbred D và chuyển đổi BC2S1 x Inbred F. Cả hai thể lai này có độ trưởng thành tương đối là 99 ngày và được thử nghiệm ở 10 địa điểm giống nhau.

Bảng 24. Các địa điểm của các thử nghiệm nông học

Địa điểm	Thử nghiệm			
	2A	2B	2C	2D
Atlantic, IA	X	X		
Fort Dodge, IA	X	X	X	X
Huxley, IA	X	X	X	X
Nora Springs, IA	X			
Wyman, IA	X	X		
Lincoln, IL		X		
Pontiac, IL	X	X	X	X
Princeton, IL	X	X		
Seymour, IL	X			
Shannon, IL	X		X	X
Viola, IL	X	X		
Bremen, IN	X	X	X	X
Evansville, IN		X		
Fowler, IN	X	X	X	X
Mt. Vernon, IN		X		
Olivia, MN			X	X
Wayne, NE	X	X		
York, NE	X	X		
Arlington, WI	X		X	X
Patteville, WI	X		X	X
Watertown, WI			X	X

Đối với mỗi thử nghiệm, thiết kế ô đầy đủ ngẫu nhiên được sử dụng với hai lần lặp lại mỗi địa điểm và các ô gồm hai hàng. Chiều dài hàng là 20 phút (6,1 m) và mỗi hàng được gieo ở mức 34 hạt mỗi hàng. Thực hành nông học vùng chuẩn được sử dụng trong việc quản lý các thử nghiệm.

Dữ liệu được thu và phân tích về tám đặc tính nông học; chiều cao cây, chiều cao bắp, rạp thân, rạp rễ, mật độ cuối cùng, độ ẩm hạt, khối lượng thử nghiệm, và hiệu suất. Các thông số chiều cao cây và chiều cao bắp đưa ra thông tin về sự xuất hiện thể lai. Các đặc tính nông học về tỷ lệ phần trăm rạp thân và rạp rễ xác định khả năng thu hoạch của thể lai. Tổng số mật độ cuối cùng đánh giá chất lượng hạt và các điều kiện sinh trưởng theo mùa ảnh hưởng đến hiệu suất. Tỷ lệ phần trăm độ ẩm của hạt khi thu hoạch xác định độ trưởng thành của thể lai, và hiệu suất (gạ/mẫu anh được điều chỉnh theo độ ẩm) và khối lượng thử nghiệm (khối lượng tính theo pao của gạ của cây ngô được điều chỉnh về độ ẩm 15,5%) mô tả khả năng sinh sản của thể lai.

Phân tích phương sai được tiến hành qua các địa điểm cánh đồng bằng cách sử dụng mô hình tuyến tính. Nhóm và địa điểm được bao gồm trong mô hình là ảnh hưởng cố định. Mô hình hỗn hợp bao gồm địa điểm và địa điểm theo nhóm làm ảnh hưởng ngẫu nhiên được nghiên cứu, nhưng địa điểm theo nhóm chỉ mô tả một phần nhỏ phương sai và thành phần phương sai của nó thường không khác nhau đáng kể so với không. Đối với rạp thân và rễ, sự biến đổi logarit được sử dụng để làm ổn định phương sai, tuy nhiên trung bình cộng và các khoảng được báo cáo theo phạm vi ban đầu. Sự khác biệt đáng kể được biểu thị ở mức độ tin cậy 95%. Ý nghĩa của tác dụng xử lý tổng cộng được ước tính bằng cách sử dụng kiểm nghiệm t.

Các kết quả từ các thử nghiệm mô tả đặc tính nông học này có thể thấy trong bảng 2. Không thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê đối với thể lai bất kỳ trong bốn thể lai 40278 so với đối chứng không chuyển gen (ở $p < 0,05$) về các thông số chiều cao bắp, rạp thân, rạp rễ, độ ẩm hạt, khối lượng thử nghiệm, và hiệu suất. Tổng số mật độ cuối cùng và chiều cao cây là khác biệt thống kê lần lượt trong Thử nghiệm A và B, nhưng không thấy sự khác biệt tương tự khi so sánh với thể lai 40278 khác được thử nghiệm. Một số biến đổi thấy được có thể là do mức thấp của tính biến đổi di truyền còn lại từ việc lai ngược biến thể gen DAS-40278-9 vào các dòng lai cùng dòng ưu thế. Khoảng giá trị tổng cộng đối với các thông số được đo đều nằm trong khoảng giá trị thu được đối với cây ngô lai truyền thống và sẽ không dẫn đến kết luận tăng tình trạng cỏ dại. Tóm lại, dữ liệu mô tả đặc tính nông học cho thấy rằng cây ngô 40278 là tương đương sinh học với cây ngô thông thường.

Bảng 25. Phân tích các đặc tính nông học

Thử nghiệm A

Thông số (đơn vị)	Xử lý	Trung bình	Khoảng		Giá trị p
			Min	Max	
Chiều cao cây (inso (cm))	AAD-1	96,31 (244,63)	94,00 (238,76)	99,00 (251,46)	0,6174
	Đối chứng	95,41 (242,34)	95,00 (241,30)	98,00 (248,92)	
Chiều cao bắp (inso (cm))	AAD-1	41,08 (104,34)	30,00 (76,20)	48,00 (121,92)	0,4538
	Đối chứng	44,42 (112,83)	40,00 (101,60)	47,00 (119,38)	
Rạp thân (%)	AAD-1	3,64	0,00	27,70	0,2020
	Đối chứng	2,49	0,00	28,57	
Rạp rễ (%)	AAD-1	1,00	0,00	7,81	0,7658

	Đối chứng	0,89	0,00	28,33	
Mật độ cuối cùng (cây/mẫu anh (cây/ha) tính theo 1000)	AAD-1	31,06 (76,75)	27,00 (66,72)	36,00 (88,96)	0,0230
	Đối chứng	32,17 (79,49)	27,00 (66,72)	36,00 (88,96)	
Độ ẩm hạt (%)	AAD-1	22,10	14,32	27,80	0,5132
	Đối chứng	21,84	14,52	31,00	
Khối lượng thử nghiệm (lb/giạ)	AAD-1	54,94	51,10	56,80	0,4123
	Đối chứng	54,66	51,00	56,80	
Hiệu suất (giạ/mẫu anh)	AAD-1	193,50	138,85	229,38	0,9712
	Đối chứng	187,05	99,87	256,72	

Thử nghiệm B

Thông số (đơn vị)	Xử lý	Trung bình	Khoảng		Giá trị p
			Min	Max	
Chiều cao cây (inso (cm))	AAD-1	106,92 (271,58)	104,00 (264,16)	108,00 (274,32)	0,0178
	Đối chứng	100,79 (256,01)	95,00 (241,30)	104,00 (264,16)	
Chiều cao bắp (inso (cm))	AAD-1	51,75 (131,45)	49,00 (124,46)	50,00 (127,00)	0,1552
	Đối chứng	45,63 (115,90)	38,00 (96,52)	50,00 (127,00)	
Rạp thân (%)	AAD-1	1,24	0,00	15,07	0,1513
	Đối chứng	0,72	0,00	22,22	
Rạp rễ (%)	AAD-1	0,64	0,00	6,15	0,2498
	Đối chứng	0,40	0,00	9,09	
Mật độ cuối cùng (cây/mẫu anh (cây/ha) tính theo 1000)	AAD-1	31,30 (77,34)	26,00 (64,25)	37,00 (91,43)	0,4001
	Đối chứng	30,98 (76,55)	25,00 (61,78)	35,00 (86,49)	
Độ ẩm hạt (%)	AAD-1	23,71	14,34	28,70	0,9869
	Đối chứng	23,72	13,39	31,10	
Khối lượng thử nghiệm (lb/giạ)	AAD-1	56,96	50,90	59,50	0,2796
	Đối chứng	56,67	52,00	60,10	
Hiệu suất (giạ/mẫu anh)	AAD-1	200,08	102,32	258,36	0,2031
	Đối chứng	205,41	95,35	259,03	

Bảng 25. (tiếp theo) Phân tích các đặc tính nông học

Thử nghiệm C

Thông số (đơn vị)	Xử lý	Trung bình	Khoảng		Giá trị p
			Min	Max	
Chiều cao cây (inso (cm))	AAD-1	95,92 (243,64)	94,00 (238,76)	96,00 (243,84)	0,1262
	Đối chứng	90,92 (230,94)	90,00 (228,60)	90,00 (228,60)	
Chiều cao bắp (inso (cm))	AAD-1	47,75 (121,29)	41,00 (104,14)	50,00 (127,00)	0,4630

	Đối chứng	43,75 (111,13)	37,00 (93,98)	46,00 (116,84)	
Rập thân (%)	AAD-1	6,74	0,00	27,47	0,4964
	Đối chứng	5,46	0,00	28,12	
Rập rễ (%)	AAD-1	0,3512	0,00	7,58	0,8783
	Đối chứng	0,3077	0,00	33,33	
Mật độ cuối cùng (cây/mẫu anh (cây/ha) tính theo 1000)	AAD-1	32,78 (81,00)	29,00 (71,66)	36,00 (88,96)	0,0543
	Đối chứng	31,68 (78,28)	24,00 (59,31)	35,00 (86,49)	
Độ ẩm hạt (%)	AAD-1	19,09	13,33	25,90	0,5706
	Đối chứng	19,36	13,66	26,50	
Khối lượng thử nghiệm (lb/giạ)	AAD-1	54,62	42,10	58,80	0,1715
	Đối chứng	55,14	52,80	58,40	
Hiệu suất (giạ/mẫu anh)	AAD-1	192,48	135,96	243,89	0,2218
	Đối chứng	200,35	129,02	285,58	

Thử nghiệm D

Thông số (đơn vị)	Xử lý	Trung bình	Khoảng		Giá trị p
			Min	Max	
Rập thân (%)	AAD-1	7,29	0,00	9,26	0,4364
	Đối chứng	4,17	0,00	39,06	
Mật độ cuối cùng (cây/mẫu anh (cây/ha) tính theo 1000)	AAD-1	29,93 (73,96)	27,00 (66,72)	34,00 (84,02)	0,0571
	Đối chứng	31,86 (78,73)	29,00 (71,66)	35,00 (86,49)	
Độ ẩm hạt (%)	AAD-1	18,74	19,40	24,40	0,4716
	Đối chứng	19,32	13,35	25,70	
Khối lượng thử nghiệm (lb/giạ)	AAD-1	56,59	54,80	58,30	0,0992
	Đối chứng	55,50	52,70	57,40	
Hiệu suất (giạ/mẫu anh)	AAD-1	203,55	196,51	240,17	0,7370
	Đối chứng	199,82	118,56	264,11	

Ví dụ 8 - Sử dụng vị trí xen đoạn biên thể gen DAS-40278-9 của cây ngô nhằm tích hợp đích

Biểu hiện nông học nhất quán của gen chuyển của biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô qua một số thế hệ trong các điều kiện trên cánh đồng gợi ý rằng các vùng được nhận diện quanh vị trí cài xen biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô cung cấp vị trí hệ gen tốt để tích hợp đích của các gen chuyển khác cần quan tâm. Việc tích hợp đích này khắc phục các vấn đề được gọi là “tác dụng vị trí,” và nguy cơ tạo ra đột biến trong hệ gen khi tích hợp gen chuyển vào vật chủ. Các ưu điểm khác của việc tích hợp đích này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, giảm số lượng lớn các biến thể gen biến nạp cần phải được sàng lọc và thử nghiệm trước khi thu cây chuyển gen thể hiện mức độ biểu hiện gen

chuyển mong muốn mà cũng không biểu hiện bất thường do sự xen đoạn vô ý của gen chuyển vào locut quan trọng trong hệ gen vật chủ. Ngoài ra, việc tích hợp đích này cho phép xếp chồng gen chuyển làm cho việc gây giống các dòng thực vật ưu thế bằng cả hai gen hiệu quả hơn.

Bằng cách sử dụng hướng dẫn được bộc lộ, người có hiểu biết trung bình có thể nhằm đích các axit polynucleic quan tâm đến cùng vị trí xen đoạn trên nhiễm sắc thể 2 như trong biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô hoặc đến vị trí ở gần vị trí xen đoạn trong biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô. Một phương pháp như vậy được bộc lộ trong đơn yêu cầu cấp patent quốc tế số WO2008/021207, được hợp nhất vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn toàn bộ.

Nói ngắn gọn, lên đến 20 Kb của trình tự hệ gen bên sườn 5' đến vị trí xen đoạn và lên đến 20 Kb của trình tự hệ gen bên sườn 3' đến vị trí xen đoạn (các phần của nó được nhận diện so với SEQ ID NO:29) được sử dụng để nằm bên sườn gen hoặc các gen cần quan tâm được dự định để xen vào vị trí hệ gen trên nhiễm sắc thể 2 thông qua sự tái tổ hợp tương đồng. Gen hoặc các gen cần quan tâm có thể được đặt một cách chính xác như trong vị trí xen đoạn của biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô hoặc có thể được đặt ở vị trí bất kỳ trong vùng 20 Kb quanh các vị trí xen đoạn của biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô để tạo ra mức độ biểu hiện gen chuyển nhất quán mà không ảnh hưởng bất lợi lên thực vật. Các vectơ ADN chứa gen hoặc các gen cần quan tâm và các trình tự bên sườn có thể được phân phối vào các tế bào thực vật bằng một trong một số phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, biến nạp qua trung gian *Agrobacterium*. Việc xen đoạn của vectơ ADN cho vào vị trí đích của biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô có thể còn được tăng cường bằng một trong một số phương pháp, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, đồng biểu hiện hoặc điều chỉnh tăng gen tăng cường tái tổ hợp hoặc điều chỉnh giảm các gen ức chế sự tái tổ hợp nội sinh. Ngoài ra, đã biết trong lĩnh vực này rằng việc phân cắt sợi kép của các trình tự đặc hiệu trong hệ gen có thể được sử dụng để làm tăng tần suất tái tổ hợp tương đồng, do đó việc xen đoạn vào vị trí xen đoạn của biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô và vùng sườn của nó có thể được tăng cường nhờ biểu hiện các endonucleaza đặc hiệu trình tự tự nhiên hoặc thiết kế đối với việc phân cắt các trình tự này. Do đó, bằng cách sử dụng hướng dẫn được đưa ra trong bản mô tả này, axit nucleic khác loại bất kỳ có thể được xen vào nhiễm sắc thể

2 của cây ngô ở vị trí đích nằm giữa chỉ dấu phân tử 5' được bàn luận trong ví dụ 4 và chỉ dấu phân tử 3' được bàn luận trong ví dụ 4, tốt hơn là trong SEQ ID NO:29, và/hoặc các vùng của nó như được bàn luận ở trong bản mô tả này.

Ví dụ 9 - Cắt băng biểu hiện gen *pat* ra khỏi biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô

Việc loại bỏ băng biểu hiện gen đánh dấu để chọn lọc là có lợi đối với việc xen đoạn đích vào các locut hệ gen của biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô. Việc loại bỏ gen đánh dấu để chọn lọc *pat* ra khỏi biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô cho phép tái sử dụng gen đánh dấu để chọn lọc *pat* trong tích hợp đích của các axit polynucleic vào nhiễm sắc thể 4 trong các thể hệ sau của cây ngô.

Bằng hướng dẫn được bộc lộ, người có hiểu biết trung bình có thể cắt các axit polynucleic cần quan tâm từ biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô. Một phương pháp như vậy được bộc lộ trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ tạm thời số 61/297,628, được hợp nhất vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn toàn bộ.

Nói ngắn gọn, các endonucleaza đặc hiệu trình tự như các nucleaza ngón tay kềm được dự định nhận diện, gắn kết và phân tách các trình tự ADN đặc hiệu nằm bên sườn băng biểu hiện gen. Các nucleaza ngón tay kềm được phân phối vào tế bào thực vật bằng cách lai cây bố mẹ chứa băng biểu hiện nucleaza ngón tay kềm chuyển gen với cây bố mẹ thứ hai chứa biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô. Con cháu thu được được phát triển đến độ trưởng thành và được phân tích về việc mất băng biểu hiện *pat* qua việc nhuộm lá bằng thuốc diệt cỏ chứa glufosinat. Các cây con cháu không kháng với thuốc diệt cỏ được xác nhận về mặt phân tử và phát triển để tự thụ phấn. Việc cắt và loại bỏ băng biểu hiện *pat* được xác nhận về mặt phân tử trong con cháu thu được từ việc tự thụ phấn. Bằng cách sử dụng hướng dẫn được đưa ra trong bản mô tả này, axit nucleic khác loại bất kỳ có thể được cắt khỏi nhiễm sắc thể 2 của cây ngô ở vị trí đích nằm giữa chỉ dấu phân tử 5' và chỉ dấu phân tử 3' như được bàn luận trong ví dụ 4, tốt hơn là trong SEQ ID NO:29 hoặc các vùng được chỉ định của nó.

Ví dụ 10 - Tính chống gãy giòn

Gãy giòn chỉ việc gãy thân cây ngô do gió mạnh sau khi dùng các thuốc diệt cỏ điều hòa tăng trưởng, thường là trong giai đoạn tăng trưởng nhanh. Thử nghiệm “đẩy” cơ học,

sử dụng một thước để đẩy vật lý cây ngô để mô phỏng sự phá hủy do gió mạnh, được thực hiện trên cây ngô lai chứa biến thể gen DAS-40278-9 và cây đối chứng không chứa biến thể gen DAS-40278-9. Việc xử lý được hoàn thành ở bốn địa điểm địa lý khác nhau và được lặp lại bốn lần (ngoại trừ một thử nghiệm chỉ được lặp lại ba lần). Các ô gồm có tám hàng: bốn hàng của một trong hai thể lai, với hai hàng chứa biến thể gen DAS-40278-9 và hai hàng không chứa biến thể gen này. Mỗi hàng có chiều dài hai mươi phút (6,1m). Cây ngô được phát triển đến giai đoạn phát triển V4, và thuốc diệt cỏ thương mại chứa 2,4-D (Weedar 64, Nufarm Inc., Burr Ridge, IL) được dùng ở mức 1120 g ae/ha, 2240 g ae/ha và 4480 g ae/ha. Bảy ngày sau khi dùng thuốc diệt cỏ, thử nghiệm đẩy cơ học được thực hiện. Thử nghiệm đẩy cơ học về tính gãy giòn bao gồm kéo hai hàng cây ngô xuống một thước 4 phút (1,2m) để mô phỏng sự phá hủy do gió. Chiều cao của thước và tốc độ di chuyển được thiết đặt để tạo ra mức gãy thân thấp (10% hoặc nhỏ hơn) đối với cây không được xử lý để bảo đảm mức độ trầm trọng của thử nghiệm đủ để thể hiện sự khác nhau giữa các lần xử lý. Sự định hướng xử lý gãy giòn được áp dụng đối với cây ngô bị nghiêng.

Hai trong số các địa điểm thử nghiệm trải qua gió mạnh và giông bão 2-3 ngày sau khi dùng thuốc diệt cỏ 2,4-D. Vào hai ngày liên tiếp, giông bão bắt đầu ở Huxley IA. Tốc độ gió từ 2 đến 17 m s⁻¹ với tốc độ cao bằng 33 m s⁻¹ được báo cáo ở vị trí của ô trên cánh đồng. Hướng gió có thể thay đổi. Vào một ngày, giông bão được báo cáo ở Lanesboro MN. Gió có tốc độ cao được báo cáo ở vị trí của ô cánh đồng này. Ngoài ra, cả hai cơn bão đều tạo ra mưa. Sự kết hợp của mưa và gió được quy cho các phá hủy gãy giòn được báo cáo.

Việc đánh giá sự phá hủy gãy giòn do thử nghiệm đẩy cơ học (và thời tiết khắc nghiệt) được thực hiện bằng cách đánh giá tỷ lệ phần trăm tổn hại bằng mắt thường. Trước khi xử lý gãy giòn cơ học bằng thước đo, việc đếm các cây đứng được thực hiện đối với cây ngô lai chứa biến thể gen DAS-40278-9 và cây đối chứng. Vài ngày sau khi xử lý gãy giòn bằng thước đo, việc đếm cây đứng được đánh giá lại. Tỷ lệ phần trăm bị nghiêng và tỷ lệ phần trăm đứng vững giảm trong ô được xác định (bảng 26). Dữ liệu từ các thử nghiệm thể hiện rằng cây ngô lai chứa biến thể gen DAS-40278-9 có thiên hướng ít gãy giòn hơn so với các cây không chứa biến thể gen này sau khi dùng 2,4-D.

Bảng 26: Tính chống gãy giòn của cây ngô DAS-40278-9 với việc dùng 2,4-D amin ở giai đoạn V4. Tỷ lệ phần trăm gãy giòn được tính đối với cây ngô lai chứa biến thể gen DAS-40278-9 và so với cây đối chứng không chứa biến thể gen này.

Trước khi làm gãy cơ học % bị nghiêng trung bình 7-8 ngày sau khi dùng ¹				
Xử lý	278 (SLB01-278//4XP811XTR)	Không chứa biến thể gen (SLB01//4XP811XTR)	278 (SLB01VX-278//BE9515XT)	Không chứa biến thể gen (SLB01VX//BE9515XT)
Weedar 64 1120 g ae/ha	0%	38%	0%	33%
Weedar 64 2240 g ae/ha	1%	42%	0%	33%
Weedar 64 4480 g ae/ha	2%	55%	1%	46%
Không được xử lý	0%	0%	0%	0%
Sau khi làm gãy cơ học % bị nghiêng trung bình ³ 11-14 ngày sau khi dùng				
Xử lý	278 (SLB01-278//4XP811XTR)	Không chứa biến thể gen (SLB01//4XP811XTR)	278 (SLB01VX-278//BE9515XT)	Không chứa biến thể gen (SLB01VX//BE9515XT)
Weedar 64 1120 g ae/ha	0%	19%	1%	24%
Weedar 64 2240 g ae/ha	4%	20%	7%	27%
Weedar 64 4480 g ae/ha	4%	26%	6%	28%
Không được xử lý	0%	0%	0%	0%
Sau khi làm gãy cơ học % giảm đứng vững trung bình ³ 11-14 ngày sau khi dùng				
Xử lý	278 (SLB01-278//4XP811XTR)	Không chứa biến thể gen (SLB01//4XP811XTR)	278 (SLB01VX-278//BE9515XT)	Không chứa biến thể gen (SLB01VX//BE9515XT)
Weedar 64 1120 g ae/ha	3%	38%	6%	42%
Weedar 64 2240 g ae/ha	9%	35%	12%	41%
Weedar 64 4480 g ae/ha	9%	40%	16%	40%
Không được xử lý	0%	0%	0%	0%

¹Giông bão và gió mạnh xảy ra 2-3 ngày sau khi dùng trong hai thử nghiệm

²Việc xử lý được lặp lại bốn lần trong thiết kế khối hoàn chỉnh ngẫu nhiên (một thử nghiệm chỉ được hoàn thành với ba lần lặp lại)

³Trung bình được hiệu chỉnh với sự xuất hiện nhóm không được xử lý (trung bình của nhóm không được xử lý được đưa về 0)

Ví dụ 11 - Phân tích protein của hạt

Hạt có tổng hàm lượng protein tăng được sản xuất từ cây ngô lai chứa biến thể gen DAS-40278-9 so với các cây đối chứng không chứa biến thể gen này. Hai thử nghiệm trên cánh đồng đa vị trí liên tiếp được tiến hành bao gồm không được phun thuốc diệt cỏ và xử

lý bằng thuốc diệt cỏ với ba hỗn hợp thuốc diệt cỏ khác nhau. Trong 7 trong số 8 so sánh thống kê, biến thể gen DAS-40278-9 tạo ra hạt có tổng hàm lượng protein cao hơn đáng kể (bảng 27). Dữ liệu này được chứng thực bằng phân tích của các axit amin riêng rẽ.

Bảng 27: Hàm lượng protein của hạt từ thử nghiệm trên cánh đồng đa vị trí

Mùa vụ 2008	Đối chứng lân cận không chuyển gen	Biến thể gen DAS-40278-9 không được phun	Biến thể gen DAS-40278-9 quizalofop	Biến thể gen DAS-40278-9 2,4-D	Biến thể gen DAS-40278-9 quizalofop và 2,4-D
Trung bình	9,97	10,9	11,1	10,5	10,9
% tăng so với đối chứng không chuyển gen	0	9,3	11,3	5,3	9,3
Kiểm nghiệm t cặp đôi	NA	0,002	0,0004	0,061	0,002
Mùa vụ 2008	Đối chứng lân cận không chuyển gen	Biến thể gen DAS-40278-9 không được phun	Biến thể gen DAS-40278-9 quizalofop	Biến thể gen DAS-40278-9 2,4-D	Biến thể gen DAS-40278-9 quizalofop và 2,4-D
Trung bình	10,9	11,6	11,7	11,7	11,5
% tăng so với đối chứng không chuyển gen	0	6,4	7,3	7,2	5,5
Kiểm nghiệm t cặp đôi	NA	0,0048	0,001	0,0012	0,0079

Ví dụ 12 – Các thử nghiệm nông học bổ sung

Các đặc tính nông học của cây ngô lai chứa biến thể gen DAS-40278-9 so với cây ngô đối chứng không chuyển gen lân cận được thu từ nhiều thử nghiệm trên cánh đồng qua các môi trường địa lý đa dạng đối với mùa sinh trưởng. Dữ liệu được thu và phân tích về các đặc tính nông học như được mô tả trong ví dụ 7. Các kết quả của dòng cây ngô lai chứa biến thể gen DAS-40278-9 so với cây không chứa biến thể gen được liệt kê trong bảng 28. Ngoài ra, các đặc tính nông học của dòng cây ngô lai chứa biến thể gen DAS-40278-9 và các cây không chứa biến thể gen được phun bằng thuốc diệt cỏ quizalofop (280 g ae/ha) ở giai đoạn phát triển V3 và 2,4-D (2,240 g ae/ha) được phun ở giai đoạn phát triển V6 được mô tả trong bảng 29.

Bảng 28: Các kết quả về hiệu suất, tỷ lệ phần trăm độ ẩm, và mật độ cuối cùng của cây ngô lai chứa biến thể gen DAS-40278-9 so với đối chứng không chuyển gen lân cận

Tên	Hiệu suất	Độ ẩm hạt (%)	Mật độ cuối cùng (cây/mẫu anh (cây/ha) tính theo 1000)
Cây ngô lai chứa DAS-40278-9	218,1	21,59	31,69 (78,31)
cây ngô lai đối chứng	217,4	21,91	30,42 (75,17)

Bảng 29: Hiệu suất, tỷ lệ phần trăm độ ẩm, tỷ lệ phần trăm rập thân, tỷ lệ phần trăm rập rễ và tổng mật độ của dòng cây ngô lai chứa biến thể gen DAS-40278-9 so với đối chứng không chuyển gen lân cận

Thử nghiệm	Hiệu suất	Độ ẩm hạt (%)	Rập thân (%)	Rập rễ (%)	Mật độ cuối cùng (cây/mẫu anh (cây/ha) tính theo 1000)
Thử nghiệm phun					
Cây ngô lai #1 chứa DAS-40278-9	214,9	23,4	0,61	2,19	30 (74,13)
Cây ngô lai #1 đối chứng	177,9	23,46	0,97	36,32	28,36 (70,08)
LSD (0,5)	13,3	1,107	0,89	10,7	1,1 (2,72)
Không phun					
Cây ngô lai #1 chứa DAS-40278-9	219,6	22,3	0,95	1,78	30,8 (76,11)
Cây ngô lai #1 đối chứng	220,3	22,51	0,54	1,52	30,55 (75,49)
LSD (0,5)	6,9	0,358	0,98	1,65	0,7 (1,73)
Thử nghiệm phun					
Cây ngô lai #2 chứa DAS-40278-9	198,6	26,76	0,38	2,08	29,29 (72,38)
Cây ngô lai #2 đối chứng	172,3	23,76	1,5	39,16	28,86 (71,31)
LSD (0,5)	13,3	1,107	0,89	10,7	1,1 (2,72)
Không phun					
Cây ngô lai #2 chứa DAS-40278-9	207,8	24,34	0,22	0,59	31 (76,60)
Cây ngô lai #2 đối chứng	206,2	24,88	0,35	0,12	30,94 (76,45)
LSD (0,5)	8,0	0,645	0,55	1,79	0,9 (2,22)

Ví dụ 13 – Dùng thuốc diệt cỏ để diệt cỏ trước khi gieo hạt nảy mầm

Việc dùng thuốc diệt cỏ để diệt cỏ trước khi gieo hạt được dự định để diệt cỏ dại mọc suốt mùa đông hoặc đầu xuân trước khi trồng cây đã định. Thông thường việc dùng này được ứng dụng ở các hệ thống quản lý không hoặc ít canh tác nơi mà việc loại bỏ cỏ dại bằng vật lý không được hoàn thành trước khi trồng cây. Do đó, chương trình diệt cỏ

phải không chế phổ rất rộng của cỏ dại lá rộng và cỏ bãi xuất hiện ở thời điểm trồng cây. Glyphosat, gramoxon, và glufosinat là các ví dụ về các thuốc diệt cỏ không chọn lọc, không tồn dư được sử dụng một cách rộng rãi để diệt cỏ trước khi gieo hạt.

Tuy nhiên, một số cỏ dại rất khó không chế ở thời điểm này của mùa do một hoặc nhiều lý do sau: tính không miễn cảm vốn có của các loài cỏ dại hoặc kiểu sinh học đối với thuốc diệt cỏ, kích thước tương đối lớn của cỏ dại mùa đông hằng năm, và điều kiện thời tiết mát mẻ hạn chế hấp thu và hoạt tính của thuốc diệt cỏ. Một số tùy chọn thuốc diệt cỏ là có thể dễ trộn trong thùng với các thuốc diệt cỏ này để làm tăng phổ và hoạt tính trên cỏ dại trong đó các thuốc diệt cỏ không chọn lọc là yếu. Ví dụ, có thể trộn trong thùng 2,4-D với glyphosat để hỗ trợ trong việc không chế *Conyza canadensis* (cỏ bông). Glyphosat có thể được sử dụng từ 420 đến 1680g ae/ha, thông thường hơn là từ 560 đến 840g ae/ha, để diệt cỏ không chế hầu hết cỏ dại xuất hiện trước khi gieo hạt; tuy nhiên, 280 - 1120g ae/ha 2,4-D có thể được đưa vào để trợ giúp trong việc không chế nhiều loài cỏ dại lá rộng (ví dụ, cỏ bông).

2,4-D là thuốc diệt cỏ được lựa chọn bởi vì nó có hiệu quả trên rất nhiều cỏ dại lá rộng, hiệu quả ngay cả ở nhiệt độ thấp, và rất rẻ. Tuy nhiên, nếu cây mùa vụ sau là cây hai lá mầm miễn cảm, phần tồn dư 2,4-D trong đất (mặc dù trong thời gian ngắn) có thể ảnh hưởng tiêu cực đến cây mùa vụ. Các cây chứa gen *aad-1* có tính kháng 2,4-D và không ảnh hưởng tiêu cực bởi phần tồn dư của 2,4-D trong đất. Tính linh hoạt tăng và chi phí giảm của các thành phần hỗn hợp trộn (hoặc hỗn hợp trộn sẵn thương mại) sẽ cải thiện các tùy chọn không chế cỏ dại và tăng tính chống chịu khi dùng diệt cỏ ở các vị trí không hoặc ít canh tác quan trọng.

Cây ngô *aad-1*

Cây ngô lai chuyển gen (pDAS1740-278) chứa gen *aad-1* mã hoá protein aryloxyalkanoat dioxygenaza (AAD-1) được đánh giá về khả năng kháng với việc dùng 2,4-D trước khi hạt nảy mầm trên cánh đồng. Các thử nghiệm được tiến hành ở nhiều địa điểm ở Mississippi, Indiana, và Minnesota bằng cách sử dụng thiết kế khối đầy đủ ngẫu nhiên với ba lần lặp lại của hai hàng ô, có chiều dài xấp xỉ 6m, ở mỗi vị trí. Các ô được xử lý bằng thuốc diệt cỏ được cặp đôi với các ô không được xử lý để đưa ra đánh giá chính xác về việc nảy mầm và phát triển mùa sớm. Việc xử lý thuốc diệt cỏ với 1120, 2240, và 4480g ae/ha 2,4-D amin được áp dụng ngay sau khi gieo hạt nhưng trước khi cây nảy mầm

(0-2 ngày sau khi gieo hạt). Thông tin về đất và lượng mưa đối với các thử nghiệm này được nêu trong bảng 30.

Bảng 30. Thông tin về đất và lượng mưa để đánh giá tính kháng của thể lai pDAS1740-278 với việc dùng thuốc diệt cỏ trước khi cây mọc

Thử nghiệm	% chất hữu cơ	Cấu trúc	Lượng mưa lần đầu (ngày sau khi dùng)	Tổng lượng mưa (cm)
#1	0,9	Đất sét pha	1	2,0
#2	3,3	Đất pha sét	5	0,3
#3	1,3	Đất sét pha bùn	4	1,3

Khoảng 16-21 ngày sau khi gieo hạt và dùng 2,4-D, tổn hại được tính trung bình từ 12 đến 31% đối với thể lai đối chứng thông thường do mức độ 2,4-D amin tăng từ 1120 đến 4480g ae/ha. Tổn hại với cây ngô lai chứa pDAS1740-278 nằm trong khoảng từ 3 đến 9% qua cùng khoảng mức dùng. Mức dùng đích 2,4-D hiện được đề xuất đối với cây ngô lai chuyển gen (pDAS1740-278) chứa gen *aad-1* là bằng hoặc dưới 1.120 g ae/ha đối với 2,4-D. Các kết quả thử nghiệm trên cánh đồng cho thấy rằng cây ngô lai chứa pDAS1740-278 tạo ra tính kháng mạnh khi xử lý bằng thuốc diệt cỏ 2,4-D ở các mức nhiều hơn hai đến bốn lần mức sử dụng đích được đề xuất có mức thiệt hại tối thiểu (bảng 31).

Bảng 31. Tính kháng của thể lai pDAS1740-278 với việc dùng 2,4-D trước khi hạt nảy mầm

Thuốc diệt cỏ	Mức ^a (g ae/ha)	Giai đoạn dùng ^b	Phần trăm tổn hại cây ^c	
			Thể lai pDAS1740-278	Thể lai đối chứng
2,4-D amin	1120	Trước	3	12
2,4-D amin	2240	Trước	4	16
2,4-D amin	4480	Trước	9	31

^aae = đương lượng axit, ha = hecta

^bĐược dùng 0-2 ngày sau khi gieo hạt, trước khi cây mọc.

^cĐánh giá được tiến hành 16-21 ngày sau khi dùng.

Việc dùng 2,4-D amin trước khi hạt nảy mầm được áp dụng ở các mức 1120, 2240, 4480 g ae/ha ở 7 ngày, 15 ngày, hoặc 30 ngày trước khi gieo hạt ngô lai chứa gen *aad-1* và

thể lai thông thường đối chứng. Việc dùng trước khi hạt nảy mầm được áp dụng bằng cách sử dụng các quy trình đã biết trong lĩnh vực cho các ô trên cánh đồng nằm ở các vị trí riêng biệt về địa lý. Các ô được xử lý bằng thuốc diệt cỏ được cặp đôi với các ô không được xử lý để đưa ra đánh giá chính xác về việc nảy mầm và phát triển mùa sớm. Khoảng 16-21 ngày sau khi gieo hạt và dùng 2,4-D ở 7, 15 hoặc 30 ngày trước khi gieo hạt; tổn hại của thể lai đối chứng thông thường và cây ngô lai chứa *aad-1* được đo. Các kết quả thử nghiệm trên cánh đồng cho thấy rằng cây ngô lai chứa *aad-1* tạo ra tính kháng tốt với việc xử lý bằng thuốc diệt cỏ 2,4-D trước khi hạt nảy mầm ở 7, 15, hoặc 30 ngày trước khi gieo hạt.

Cây bông *aad-1*

Cây bông chuyển gen chứa gen *aad-1* mã hoá protein aryloxyalkanoat dioxygenaza (AAD-1) được đánh giá về tính kháng với việc dùng 2,4-D trước khi hạt nảy mầm trên cánh đồng. Các thử nghiệm gồm ba lần lặp lại và được tiến hành ở nhiều địa điểm ở Mississippi, Georgia, Tennessee, và Arkansas. Sử dụng thiết kế khối đầy đủ ngẫu nhiên của hàng đơn được phân tách bởi hàng bảo vệ, có chiều dài khoảng 10 phút (3m) (20 phút (6m) đối với thử nghiệm ở Mississippi). Hạt được gieo với 8 hạt mỗi phút (0,3 m), sau đó các cây được làm thưa thủ công xuống 3,5 cây/phút (0,3 m) mỗi hàng. Các ô được xử lý bằng thuốc diệt cỏ được cặp đôi với các ô không được xử lý để đưa ra đánh giá chính xác về việc nảy mầm và phát triển mùa sớm. Tất cả các ô được nhận ít nhất ½ in (1,27 cm) lượng nước mưa hoặc nước tưới trong vòng 24 giờ dùng. Xử lý bằng thuốc diệt cỏ với 560, 1120, 2240, và 4480 g ae/ha 2,4-D amin (WEEDAR 64, Nufarm, Burr Ridge, IL) được áp dụng ngay sau khi gieo hạt nhưng trước khi cây mọc. Thông tin về đất và lượng mưa đối với các thử nghiệm này được nêu trong bảng 32.

Bảng 32. Thông tin về đất và lượng mưa để đánh giá cây bông chứa *aad-1*

Thử nghiệm số	Loại đất	Độ pH	% Chất hữu cơ	% Cát	% Bùn	% Đất sét
#1	Đất sét pha bùn	8,1	1,3	20	55	25
#2	Cát					
#3	Đất sét pha cát	6,3	0,9	57	34	9
#4	Đất sét pha bùn	6,2	1,1	24	72	4

Việc dùng 2,4-D trước khi hạt nảy mầm ở mức 560, 1120, và 2240 gm ae/ha không ảnh hưởng đáng kể đến việc đứng vững của cây bông chuyển gen chứa gen *aad-1* so với ô không được xử lý.

Khoảng 7 đến 8 ngày sau khi gieo hạt và dùng 2,4-D trước khi hạt nảy mầm ở các nồng độ bằng 560, 1120, 2240, và 4480 gm ae/ha, mức giảm đứng vững lần lượt là 3%, không giảm, giảm 19%, và 34%, được báo cáo đối với cây bông chứa *aad-1* so với mức giảm đứng vững của cây đối chứng không được xử lý. Ở 11 đến 14 ngày sau khi gieo hạt và dùng 2,4-D ở các nồng độ bằng 560, 1120, 2240, và 4480 gm ae/ha, mức giảm đứng vững lần lượt là 5%, 2%, 14%, và 25%, được báo cáo đối với cây bông chứa *aad-1* so với mức giảm đứng vững của cây đối chứng không được xử lý.

Việc dùng 2,4-D trước khi hạt nảy mầm ở các nồng độ bằng 560, 1120, 2240, và 4480 gm ae/ha không gây ra tính sinh trưởng cong. Bệnh úa vàng được thấy ở <5% đánh giá bằng mắt thường, 7-8 ngày sau khi dùng khi xử lý bằng 2240 và 4480 gm ae/ha. Bệnh úa vàng không phát hiện thấy khi xử lý bằng 560 và 1120 gm ae/ha ở 7 đến 8 ngày sau khi dùng. Ngoài ra, bệnh úa vàng không phát hiện thấy trong cây bông bất kỳ chứa *aad-1*, được xử lý bằng các nồng độ 560, 1120, 2240, và 4480 gm ae/ha, trong thời gian mùa vụ còn lại.

Việc dùng 2,4-D trước khi hạt nảy mầm ở các nồng độ 560 và 1120 gm ae/ha dẫn đến mức ức chế phát triển tối thiểu ít hơn 2% (mức này không có ý nghĩa thống kê so với ô đối chứng không được xử lý). Các kết quả này là nhất quán trong suốt thử nghiệm: 7 đến 8; 11 đến 14; 27 đến 30; và, 52 đến 57 ngày sau khi dùng. Việc dùng 2,4-D trước khi hạt nảy mầm ở nồng độ 2240 gm ae/ha dẫn đến mức ức chế phát triển <10%. Việc dùng 2,4-D trước khi hạt nảy mầm ở nồng độ 4480 gm ae/ha dẫn đến mức ức chế phát triển bằng 27%, 28%, 17%, và 8,3% khi đánh giá ở 7 đến 8, 11 đến 14, 27 đến 30, và 52 đến 57 ngày sau khi dùng.

Tồn hại gây ra bởi việc dùng 2,4-D trước khi hạt nảy mầm ở các nồng độ 560 và 1120 gm ae/ha không khác một cách đáng kể với ô đối chứng không được xử lý. Các mức tồn hại đối với cây bông *aad-1* được xử lý bằng 2,4-D ở nồng độ 2240 gm ae/ha nằm trong khoảng từ 3% đến 15% trong suốt giai đoạn thử nghiệm. Các mức tồn hại đối với cây bông *aad-1* được xử lý bằng 2,4-D ở nồng độ 4480 gm ae/ha nằm trong khoảng từ 8% đến 34% trong suốt giai đoạn thử nghiệm.

Sự khác biệt về chiều cao cây, kiểu kết trái, và hiệu suất không phát hiện được ở cây bông *aad-1* đã được xử lý bằng cách dùng 2,4-D trước khi hạt nảy mầm ở các nồng độ 560, 1120, 2240, và 4480 gm ae/ha.

Việc dùng 2,4-D amin trước khi hạt nảy mầm được áp dụng ở các mức 560, 1120, 2240, 4480 g ae/ha ở 7 ngày, 15 ngày, hoặc 30 ngày trước khi gieo hạt bông chứa gen *aad-1* và hạt bông đối chứng. Việc dùng trước khi hạt nảy mầm được áp dụng bằng cách sử dụng các quy trình đã biết trong lĩnh vực cho các ô trên cánh đồng nằm ở các vị trí riêng biệt về địa lý. Các ô được xử lý bằng thuốc diệt cỏ được cặp đôi với các ô không được xử lý để đưa ra đánh giá chính xác về việc nảy mầm và phát triển mùa sớm. Sau khi gieo hạt và dùng 2,4-D ở 7, 15 hoặc 30 ngày trước khi gieo hạt; tổn hại của cây bông chứa gen *aad-1* và cây đối chứng được đánh giá. Các kết quả thử nghiệm trên cánh đồng cho thấy rằng cây bông chứa gen *aad-1* tạo ra tính kháng với việc xử lý bằng thuốc diệt cỏ 2,4-D trước khi hạt nảy mầm ở 7, 15, hoặc 30 ngày trước khi gieo hạt.

Ví dụ này đề xuất một số trong nhiều tùy chọn có thể. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực khổng chế cỏ dại sẽ lưu ý nhiều cách dùng khác bao gồm, nhưng không giới hạn ở, gramoxon + 2,4-D hoặc glufosinat + 2,4-D bằng cách sử dụng các sản phẩm được mô tả trong các nhãn thuốc diệt cỏ của liên bang (CPR, 2003) và việc sử dụng được mô tả trong Agrilience Crop Protection Guide (2003), làm ví dụ. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cũng sẽ nhận biết rằng ví dụ nêu trên có thể được áp dụng cho cây mùa vụ bất kỳ miễn cảm với 2,4-D (hoặc thuốc diệt cỏ phenoxy auxin khác) sẽ được bảo vệ bởi gen AAD-1 (v3) nếu được biến nạp một cách ổn định.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp không chế cỏ dại bao gồm bước gieo hạt ở một vùng, và đưa thuốc diệt cỏ aryloxyalkanoat vào vùng này trong vòng 30 ngày trước khi gieo hạt ở vùng này hoặc trong vòng 30 ngày trước khi cây nảy mầm từ hạt được gieo ở vùng này, hạt này chứa polynucleotit mã hoá protein AAD-1 có mức độ đồng nhất bằng ít nhất 75% so với protein AAD-1 được mã hóa bởi SEQ ID NO:29.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó thuốc diệt cỏ được chọn từ nhóm bao gồm 2,4-D; 2,4-DB; MCPA; MCPB; và aryloxyphenoxypropionat.
3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước đưa thuốc diệt cỏ thứ hai vào vùng này.
4. Phương pháp theo điểm 3, trong đó thuốc diệt cỏ thứ hai này được chọn từ nhóm bao gồm glufosinat, glyphosat, và dicamba.
5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vùng này là cánh đồng, và thuốc diệt cỏ này được đưa vào trong vòng 7 ngày, 11 ngày, 14 ngày, hoặc 15 ngày sau khi dùng thuốc diệt cỏ.
6. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này được sử dụng để không chế cỏ dại kháng glyphosat trong vùng này, trong đó hạt này được phát triển thành cây còn bao gồm tính trạng kháng glyphosat, và phương pháp này bao gồm bước đưa thuốc diệt cỏ aryloxyalkanoat vào ít nhất một phần của vùng này.
7. Phương pháp theo điểm 1, trong đó thuốc diệt cỏ này là phenoxy auxin.
8. Phương pháp theo điểm 6, trong đó thuốc diệt cỏ này được đưa vào từ hỗn hợp trộn với glyphosat trong thùng.
9. Phương pháp theo điểm 6, trong đó ít nhất một trong các cỏ dại này là cây mọc tự nhiên kháng glyphosat thuộc loài khác với cây nêu trên.

10. Phương pháp theo điểm 1, trong đó cỏ dại nêu trên ở vùng trồng trọt, vùng này chứa tập hợp các cây được phát triển từ hạt nêu trên, phương pháp này bao gồm bước đưa thuốc diệt cỏ aryloxyalkanoat lên trên cây.
11. Phương pháp theo điểm 10, bao gồm bước đưa thuốc diệt cỏ vào cây, các bộ phận của cây, và/hoặc vào vùng trồng trọt trước khi hạt này nảy mầm, sau khi hạt này nảy mầm, hoặc trước khi hạt này nảy mầm và sau khi hạt này nảy mầm.
12. Phương pháp theo điểm 10, bao gồm bước đưa thuốc diệt cỏ nêu trên đồng thời hoặc riêng rẽ với thuốc diệt cỏ thứ hai.
13. Phương pháp theo điểm 11, bao gồm bước đưa thuốc diệt cỏ nêu trên đồng thời hoặc riêng rẽ với thuốc diệt cỏ thứ hai.
14. Phương pháp theo điểm 1, trong đó thuốc diệt cỏ aryloxyalkanoat nêu trên là 2,4-D amin, và 2,4-D amin này được dùng ở mức nằm trong khoảng được chọn từ nhóm bao gồm 560, 1120, 2240, và 4480 g ae/ha (đương lượng axit/ha).
15. Phương pháp theo điểm 4, trong đó glyphosat nêu trên được dùng ở mức nằm trong khoảng từ 420 đến 1680 g ae/ha.
16. Phương pháp theo điểm 15, trong đó glyphosat nêu trên được dùng ở mức nằm trong khoảng từ 560 đến 840 g ae/ha.
17. Phương pháp theo điểm 1, trong đó thuốc diệt cỏ aryloxyalkanoat nêu trên là 2,4-D amin, và 2,4-D amin này được dùng ở mức nằm trong khoảng 280 - 1120 g ae/ha.
18. Phương pháp theo điểm 1, trong đó hạt này là hạt từ cây được chọn từ nhóm bao gồm cây ngô, cây bông, cây lúa, và cây đậu tương.
19. Phương pháp theo điểm 1, trong đó polynucleotit này chứa SEQ ID NO:29.

20. Phương pháp theo điểm 1, trong đó hạt này chứa hệ gen chứa biến thể gen AAD-1 DAS-40278-9 có mặt trong hạt được lưu giữ ở bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Mỹ (ATCC) với số lưu giữ PTA-10244.

21. Phương pháp theo điểm 1, trong đó việc đưa thuốc diệt cỏ nêu trên được thực hiện trước khi gieo hạt.

22. Phương pháp theo điểm 1, trong đó việc gieo hạt nêu trên được thực hiện trước khi dùng thuốc diệt cỏ.

23. Phương pháp theo điểm 22, trong đó thuốc diệt cỏ nêu trên được đưa vào 0-2 ngày sau khi gieo hạt.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Dow AgroSciences LLC
 <120> Phương pháp không chế cỏ dại trong vùng gieo hạt chứa gen ADD-1
 <130> DAS-P0167-02-WO
 <160> 33
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mồi
 <400> 1
 tgcactgcag gtcgactcta gaggat 26
 <210> 2
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mồi
 <400> 2
 gcggtggcca ctattttcag aag 23
 <210> 3
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mồi
 <400> 3
 ttggttacggc atatatccaa tagcgg 26
 <210> 4
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mồi
 <400> 4
 ccgtggccta ttttcagaag aagttc 26
 <210> 5

<211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi

<400> 5
 acaaccatat tggctttggc tga 23

<210> 6
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi

<400> 6
 cctgttgatca aaataactcaa ttgtcctt 28

<210> 7
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi

<400> 7
 ctccattcag gagacctcgc ttg 23

<210> 8
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi

ADD-1

<400> 8
 gtacaggtcg catccgtgta cga 23

<210> 9
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi

<400> 9
 cccccctct ctaccttctc tagat 25

<210> 10
 <211> 23

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi

 <400> 10
 gtcattgccct caattctctg aca 23

 <210> 11
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi

 <400> 11
 gtcgcttcag caacacctca gtc 23

 <210> 12
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi

 <400> 12
 agctcagatc aaagacacac ccc 23

 <210> 13
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi

 <400> 13
 tcgtttgact aatttttcgt tgatgtac 28

 <210> 14
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi

 <400> 14
 tctcactttc gtgtcatcgg tcg 23

 <210> 15
 <211> 17
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 15

ccagcacgaa ccattga

17

<210> 16

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 16

cgtgtatata aggtccagag ggta

24

<210> 17

<211> 17

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 17

ttgggagaga gggctga

17

<210> 18

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 18

tggttaagtg ggaaggcac

20

<210> 19

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 19

gaggtacaac cggagcggtt

20

<210> 20

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi

 <400> 20
 ccgacgcttt tctggagta 19

 <210> 21
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi

 <400> 21
 tgtgccacat aatcacgtaa ca 22

 <210> 22
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi

 <400> 22
 gagacgtatg cgaaaattcg 20

 <210> 23
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi

 <400> 23
 ttgcttcagt tcctctatga gc 22

 <210> 24
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi

 <400> 24
 tccgtgtcca ctcctttgt 19

 <210> 25
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi

 <400> 25
 gcaaaggaaa actgccattc tt 22

 <210> 26
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi

 <400> 26
 tctctaagcg gcccaaactt 20

 <210> 27
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi

 <400> 27
 attctggctt tgctgtaaat cgt 23

 <210> 28
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi

 <400> 28
 ttacaatcaa cagcacgta cctt 24

 <210> 29
 <211> 8557
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự xen đoạn và bên sườn của biến thể gen DAS-40278-9

 <400> 29
 actggtatatt aatatacttt aataaatatt attagattcc tcgtcaaaga actttttaca 60
 atatattctat ttagaatcat atatgtcata gttttttttc taagagtcta gttttactagt 120
 aaaatccgac tcacattttt cgaacttggg atgcaacact taaatagtagc aaaaccttgg 180
 tatgcagtat ttacatttgt aagattcaaa atttctaaag cagtatatat atgtttccag 240
 aaacttatag atatagaaaa aacagagaga cgtatgcgaa aattcgataa aggtgtacat 300

tggattcgca aggctaaata catatztatc gtggatccat gcagagtttg ggtaataaaa	360
ttagatactt ccaatcatgt gccacataat cacgtaacat tagtaattta aatgacatta	420
ccatgtccaa ctgatttaaa acacaaactc ttcttgaacc atatagtttg acaaaccaaa	480
tatatataac tggagctact agttatgaat caattaaaaa ttactttgaa gattcaacgt	540
agtgccagtt tggctctagc acatctaacc agaagggcta aggctggctt caacaggaac	600
agccaaatcc gagatcgagc catttgccat ttttgggtag ttagtttaac tttcatatat	660
cttcccatcc ttttttgctt agcctaaatg gctttgatgt tgaagaccat attaatttgc	720
ttcagtggca ctaggacaac catattggct ttggctgacc cgttagagtt agcctaattg	780
gtggaagggg agggaagggg aggatcgatg gtggcatgag agaggggttg acgatcacga	840
tgatgatgcg agtgaggagg agaggggtggc gacgacacag gggagaaagg agagggacgc	900
taggagcgtc aagggcggtg gggaggggag ggtcggaggg atgaaggatg acctaaatat	960
tattgttgag tgatagaggg ttattcaact atccgacctg tcgattttga tggatatgta	1020
aatttggtg tcatgtgtt gatggattta gtaaagggtta tgggtctaga ggtgattttt	1080
gttgggtggg ttttacagag tttaaactag cggattatat agtggatatag aagatatagt	1140
tttattagaa catctccaaa atgtgactcg aaataatacc cccaaaattt aaaatactac	1200
atcattttga taaaaaagg aaagtagagc actgttgga cagtttttaa aagttgtgcc	1260
ctatatttta aaatagggtt ctgatttaaa atattgttgt gggggataga tatccccggg	1320
tccactagaa ggcgagaagg cctcgctgtt ggccacgggc cagttacccc gcaaggccat	1380
cccttcgtgg gtcgagctag aattactggt agaatgggct gaccgaagaa ggcaacagac	1440
tcgagcccaa acaatccatc ggctcgtgcg ctatccacag aaactacccg actttccggc	1500
gcatggcatc ctagaatatc ggggcgtatt agggatgagt cagcgagatt ttcggaagat	1560
tagttcagtt tgttcgctat tatttaggag acatatgatc ctcatgtacg tatggagtgc	1620
cccacggtcg tgtatataag gtccagaggg taccatca tttctatcga ccatctacct	1680
atctcatcag cttttctcca ttcaggagac ctgccttgta acccaccaca tatagatcca	1740
tccaagaag tagtgtatta cgcctctcta agcggcccaa acttgcagaa aacgcctat	1800
ccctctctcg tgcgtccagc acgaaccatt gagttacaat caacagcacc gtaccttgaa	1860
gcggaataca atgaagggtta gctacgattt acagcaaagc cagaatacaa tgaaccataa	1920
agtgattgaa gctcgaaata tacgaaggaa caaatatttt taaaaaata cgcaatgact	1980
tggaaacaaaa gaaagtgata tattttttgt tcttaaacaa gcatccccctc taaagaatgg	2040
cagttttcct ttgcatgtaa ctattatgct cccttcgtta caaaaatttt ggactactat	2100

tggggaacttc ttctgaaaat agtggccacc gcttaattaa ggcgcgccat gcccgggcaa	2160
gcggccgctt aattaaattt aaatgtttaa actaggaaat ccaagcttgc atgcctgcag	2220
atccccgggg atcctctaga gtcgacctgc agtgcagcgt gacccggtcg tgccccctctc	2280
tagagataat gagcattgca tgtctaagtt ataaaaaatt accacatatt ttttttgtca	2340
cacttgtttg aagtgcagtt tatctatctt tatacatata tttaaacttt actctacgaa	2400
taatataatc tatagtacta caataatatc agtgtttttag agaatcatat aaatgaacag	2460
ttagacatgg tctaaaggac aattgagtat ttgacaaca ggactctaca gttttatctt	2520
tttagtgtgc atgtgttctc cttttttttt gcaaatagct tcacctatat aatacttcat	2580
ccattttatt agtacatcca tttagggttt aggggttaatg gtttttatag actaattttt	2640
ttagttacatc tattttattc tatttttagcc tctaaattaa gaaaactaaa actctatttt	2700
agttttttta tttaatagtt tagatataaa atagaataaa ataaagtgac taaaaattaa	2760
acaaataccc tttaagaaat taaaaaaact aaggaaacat ttttcttggt tcgagtagat	2820
aatgccagcc tgttaaacgc cgtcgacgag tctaaccggac accaaccagc gaaccagcag	2880
cgtcgcgctc ggccaagcga agcagacggc acggcatctc tgcgctgcc tctggacccc	2940
tctcgagagt tccgctccac cgttggactt gctccgctgt cggcatccag aaattgcgtg	3000
gcggagcggc agacgtgagc cggcacggca ggcggcctcc tctcctctc acggcaccgg	3060
cagctacggg ggattccttt cccaccgctc cttegccttc ccttctctc cgcgcgtaat	3120
aaatagacac cccctccaca cctcttttc ccaacctcgt gttgttcgga gcgcacacac	3180
acacaaccag atctccccc aatccaccg tcggcacctc cgcttcaagg tacgccgctc	3240
gtcctccccc ccccccccc tctctacct ctctagatcg gcgttccggt ccatgcatgg	3300
ttagggcccc gtagttctac ttctgttcat gtttgtgtta gatccgtggt tgtgttagat	3360
ccgtgctgct agcgttcgta cacggatgcg acctgtacgt cagacacggt ctgattgcta	3420
acttgccagt gtttctcttt ggggaatcct gggatggctc tagccgttcc gcagacggga	3480
tcgatttcat gatTTTTTTT gtttcgttgc atagggtttg gtttgccctt ttcctttatt	3540
tcaatatatg ccgtgcactt gtttgtcggg tcatcttttc atgctttttt ttgtcttggt	3600
tgtgatgatg tggctctggt ggcgggtcgt tctagatcgg agtagaattc tgtttcaaac	3660
tacctggtgg atttattaat ttggatctg tatgtgtgtg ccatacatat tcatagttac	3720
gaattgaaga tgatggatgg aaatatcgat ctaggatagg tatacatggt gatgcggggt	3780
ttactgatgc atatacagag atgctttttg ttcgcttggt tgtgatgatg tgggtgtggt	3840
ggcggtcgt tcattcgttc tagatcggag tagaatactg tttcaaacta cctggtgtat	3900
ttattaattt tggaactgta tgtgtgtgtc atacatcttc atagttacga gtttaagatg	3960

gatggaaata tcgatctagg ataggtatac atgttgatgt gggttttact gatgcatata	4020
catgatggca tatgcagcat ctattcatat gctctaacct tgagtaccta tctattataa	4080
taaacaagta tgttttataa ttatttcgat cttgatatac ttggatgatg gcatatgcag	4140
cagctatatg tggatTTTTT tagccctgcc ttcatacgct atttatttgc ttggtactgt	4200
ttcttttgtc gatgctcacc ctgttgtttg gtgttacttc tgcagggtag ccccggggtc	4260
gaccatggct catgctgccc tcagccctct ctcccaacgc tttgagagaa tagctgtcca	4320
gccactcact ggtgtccttg gtgctgagat cactggagtg gacttgaggg aaccacttga	4380
tgacagcacc tggaatgaga tattggatgc cttccacact taccaagtca tctactttcc	4440
tggccaagca atcaccaatg agcagcacat tgcattctca agaaggtttg gaccagttga	4500
tccagtgcct cttctcaaga gcattgaagg ctatccagag gttcagatga tccgcagaga	4560
agccaatgag tctggaaggg tgattggtga tgactggcac acagactcca ctttccttga	4620
tgcacctcca gctgctgttg tgatgagggc catagatgtt cctgagcatg gcggagacac	4680
tgggttcctt tcaatgtaca cagcttggga gacctgtct ccaaccatgc aagccaccat	4740
cgaaggggtc aacgttggtc actctgccac acgtgtgttc ggttcctct accaagcaca	4800
gaaccgtcgc ttcagcaaca cctcagtcaa ggtgatggat gttgatgctg gtgacagaga	4860
gacagtccat cccttggttg tgactcatcc tggctctgga aggaaaggcc tttatgtgaa	4920
tcaagtctac tgtcagagaa ttgagggcat gacagatgca gaatcaaagc cattgcttca	4980
gttcctctat gagcatgcca ccagatttga cttcacttgc cgtgtgaggt ggaagaaaga	5040
ccaagtcctt gtctgggaca acttgtgcac catgcaccgt gctgttcctg actatgctgg	5100
caagttcaga tacttgactc gcaccacagt tgggtggagt aggctgccc gctgagtagt	5160
tagcttaatc acctagagct cgtttaaact gagggcactg aagtcgcttg acgtgctgaa	5220
ttgtttgtga tgttggtggc gtattttgtt taaataagta agcatggctg tgattttatc	5280
atatgatcga tctttggggT tttatttaac acattgtaaa atgtgtatct attaataact	5340
caatgtataa gatgtgttca ttcttcgggt gccatagatc tgcttatttg acctgtgatg	5400
ttttgactcc aaaaaccaa atcacaaact aataaactca tggaatatgt ccacctgttt	5460
cttgaagagt tcatctacca ttccagttgg catttatcag tgttgcagcg gcgctgtgct	5520
ttgtaacata acaattgtta cggcatatat ccaatagcgg ccggcctcct gcagggttta	5580
aacttgccgt ggcctatttt cagaagaagt tcccaatagt agtccaaaat ttttgtaacg	5640
aaggagcat aatagttaca tgcaaaggaa aactgccatt ctttagaggg gatgcttggt	5700
taagaacaaa aaatatatca ctttcttttg ttccaagtca ttgcgtattt ttttaaaaat	5760

atttgttcct tcgtatattt cgagcttcaa tcactttatg gttcttttga ttctggcttt	5820
gctgtaaate gtagctaacc ttcttcctag cagaaattat taatacttgg gatatttttt	5880
tagaatcaag taaattacat attaccacca catcgagctg cttttaaaatt catattacag	5940
ccatataggc ttgattcatt ttgcaaaaatt tccaggatat tgacaacggt aacttaataa	6000
tatcttgaaa tattaagct attatgatta ggggtgcaaa tggaccgagt tggttcgggt	6060
tatatcaaaa tcaaaccaaa ccaactatat cggtttgat tggttcgggt ttgccgggt	6120
ttcagcattt tctggttttt tttttgttag atgaatatta ttttaattt actttgtcaa	6180
atttttgata agtaaatata tgtgttagta aaaattaatt ttttttcaa acatatgatc	6240
tattaaaata ttcttatagg agaattttct taataacaca tgatatttat ttattttagt	6300
cgtttgacta atttttcggt gatgtacact ttcaaagtta accaaattta gtaattaagt	6360
ataaaaatca atatgatacc taaataatga tatgttctat ttaattttta attatcgaaa	6420
tttcacttca aattcgaaaa agatatataa gaattttgat agattttgac atatgaatat	6480
ggaagaacaa agagattgac gcattttagt aacacttgat aagaaagtga tcgtacaacc	6540
aattatttaa agttaataaa aatggagcac ttcatattta acgaaatatt acatgccaga	6600
agagtcgcaa atattttctag atatttttta aagaaaattc tataaaaagt cttaaaggca	6660
tatatataaa aactatatat ttatattttt taccctaaaag caccgcaagg ggtagccctg	6720
ggtgtgcgga cggactctaa acaccgacag ctggcgcgcc aggtaggggg tgtgtctttg	6780
atctgagcta gctcaatgac cattacctcc aaatgcaaga tcgcccttcg ccccgggact	6840
atgttttgct ttggaaccat ctcatccata gcagatgaag aggggaactct gcaccgcata	6900
gcagatctat tggagaagaa gctttcctca gaaatctcga ggggagccag ggcagaacag	6960
cgggtggcac catcaccgc acctcaagcg aagatgacct cttacaaacc gaaagtcggg	7020
agctcaccta cccgaaaaac tccgctgtcc acttcgcca caaaggagt gacacggatt	7080
actcgaaaga aggaagcgag tgtcccgagt caggggacgg gaacacgcca agccatcttt	7140
ccgacgcctt cgccctcaa tgaggatgga aagaagagcg ccatcgcgct ggctcctttc	7200
taccccgacg tcctcttcat cagggggaga ttggagttag caccgtctt caacgatgag	7260
ccaaccatgc aaggggaaga gcctccccag cgtgaggcgc gacgacggag gaatagaagc	7320
cagaacgtgc ggcgacatca cgaggctggg gaacgggatc cggcgcaacc cgtatcccgg	7380
gacgaagctt tagaagtagg aaaaactccc gacgagtggg tacaccgaga aaggcggaac	7440
ttctgccgcc gtgatcgccg acaagcttag gaccgagaac gagagcaagc cgagcaaggt	7500
gcaaggctgc gccgagagaa tgctctcttt gtcggaacc tgtacccga cttcgctcgt	7560
gcaatgaaca cgccgagtga agtcggaggg gtactggccc agatagctga cggcctcccg	7620

cgaaccctag acacggaagg ctaccggcgg ctgcttactc gagcagttaa tcaccttcta 7680
 cccatcacta atcctccaag cgacctacgc catgccatca acagccggcg agacacgcgg 7740
 agctccatca acgcttcgcg cgaccgatga cagcaaagtg agatagggaa ccgagaggag 7800
 tatgtccgag atcatgccat cctggcatga agtcatgcca cccgagctga gtcgggtgcg 7860
 gcctcgacca gtgtcccggt ccagggacga tcaagatgac acacaactgg ctccccctct 7920
 tgggaccgac ctcacgaacg ccgacatgaa gacacgtgcg gagtcttcgc acttactccg 7980
 tgtctccggg ccatccagtg gccctaact tcaaggtctc caacgtcagc aagtatgagc 8040
 gcaagcagga cctgggtggc tggttagcca tctacacgat tgtcacatgg gccgccggag 8100
 cgacggagga cgtgatgaca gtgtattttc ccattgtcct agggcaagac gcaatgcagt 8160
 ggctccgaca tctaccccaa cattgcatag acaattggag cgacttcagt tgggtgcttca 8220
 tcgccaaactt ccagtccttc ttgacaagc cggcgagcc atgggaccta aaatccattg 8280
 ggcacaggg cgatgaaacg ctccggttgt acctcaagag gtttttagacc atgaggaacc 8340
 acacccccga agtcgccgag gcgggggtga ttgaagactt ctaccgagga tocaatgact 8400
 cggctttcgt ccgagccata ctccagaaaa gcgtcgcca cctccgaaca cttgttccgg 8460
 gaggcagacc tctacatcac cacggattaa cgggccaggg acctcatcgg aggcacgaaa 8520
 gccgcgccac acgcgccacg gtgtgacacg aaccagc 8557

<210> 30
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi cho chỉ dấu bên sườn

<400> 30
 gcctagtcgc ctaccctacc aat 23

<210> 31
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi cho chỉ dấu bên sườn

<400> 31
 tgtgttcttg attgggtgag acat 24

<210> 32
 <211> 21
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi cho chỉ dấu bên sườn

<400> 32

tactggggat tagagcagaa g

21

<210> 33

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi cho chỉ dấu bên sườn

<400> 33

aatctatgtg tgaacagcag c

21

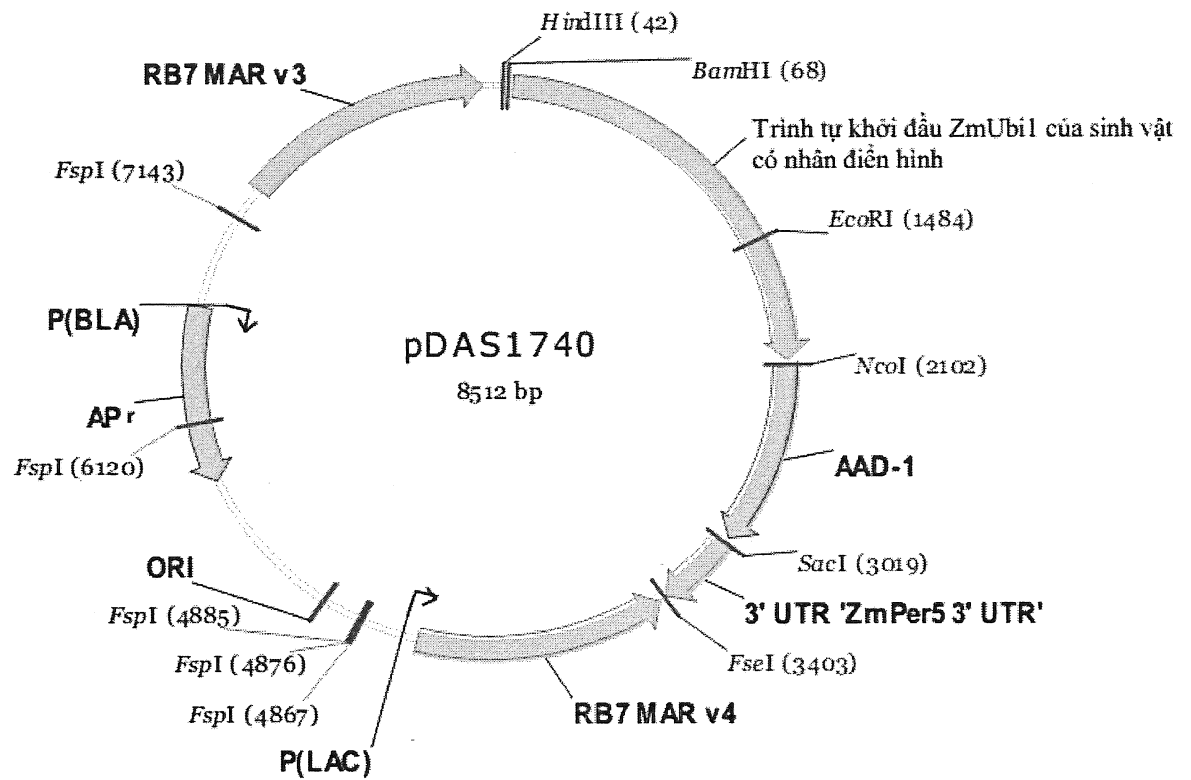


Fig.1: Sơ đồ plasmit của pDAS1740 (pDAB3812) với các vị trí enzym giới hạn

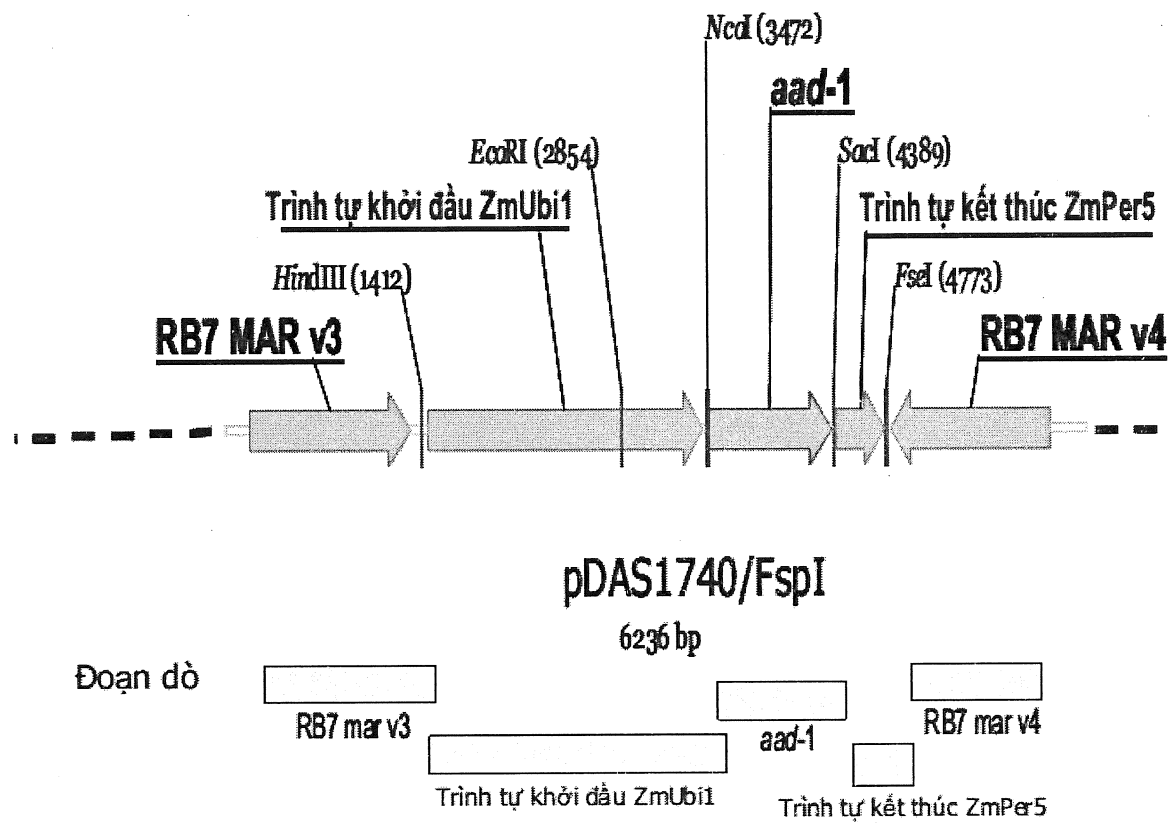


Fig.2: Sơ đồ giới hạn của vị trí xen đoạn đơn có mặt trong hệ gen của cây ngô DAS-40278-9 (pDAS1740-278)

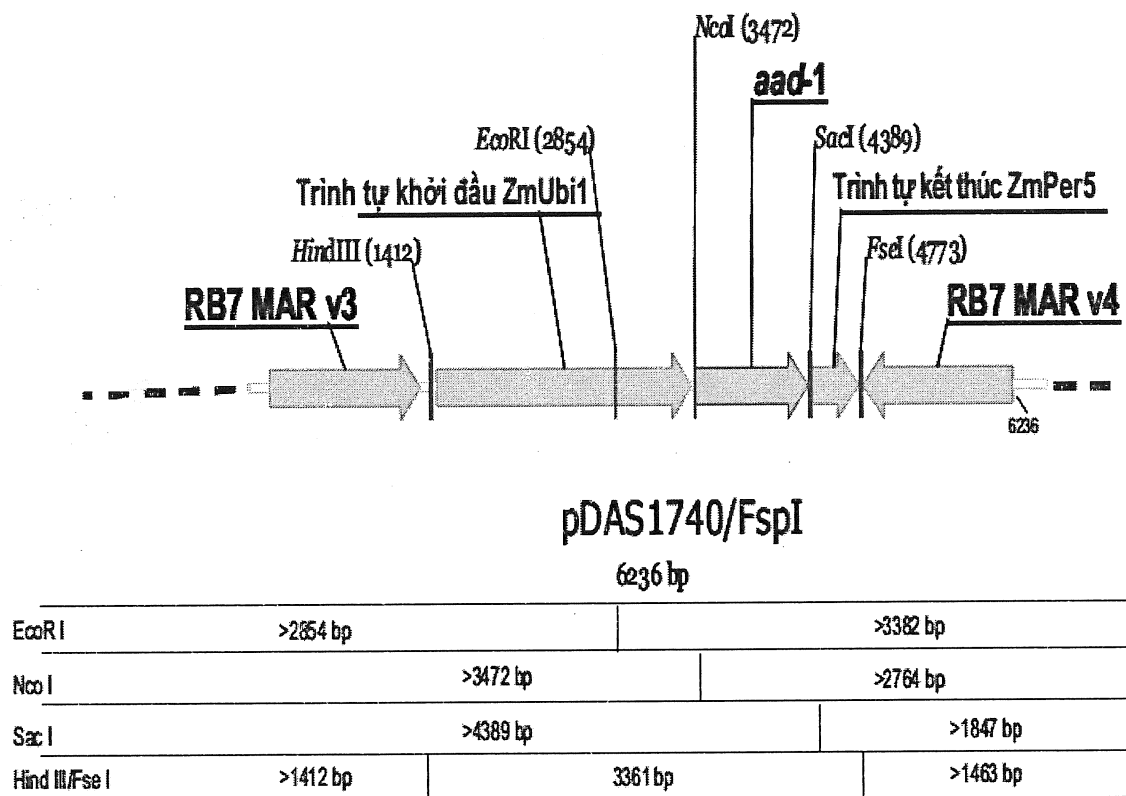


Fig.3: Sơ đồ giới hạn của vị trí xen đoạn đơn có mặt trong hệ gen của cây ngô DAS-40278-9

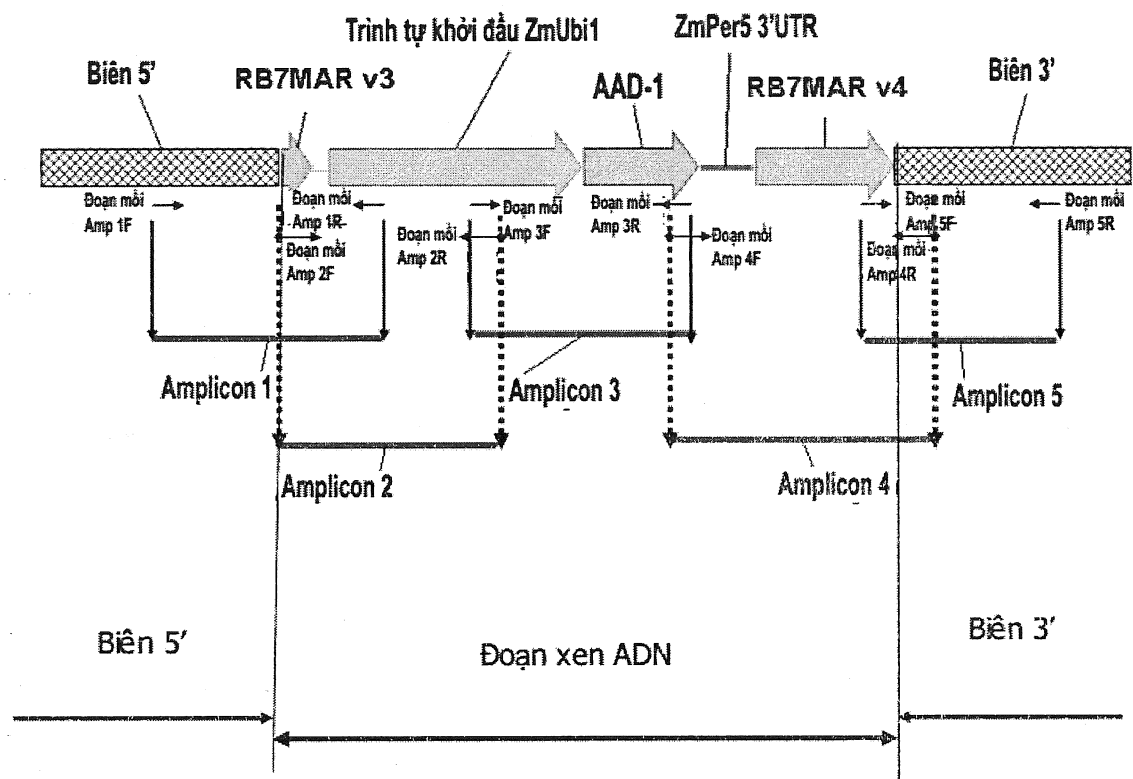


Fig.4: Phương pháp tách dòng của đoạn xen ADN trong biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô

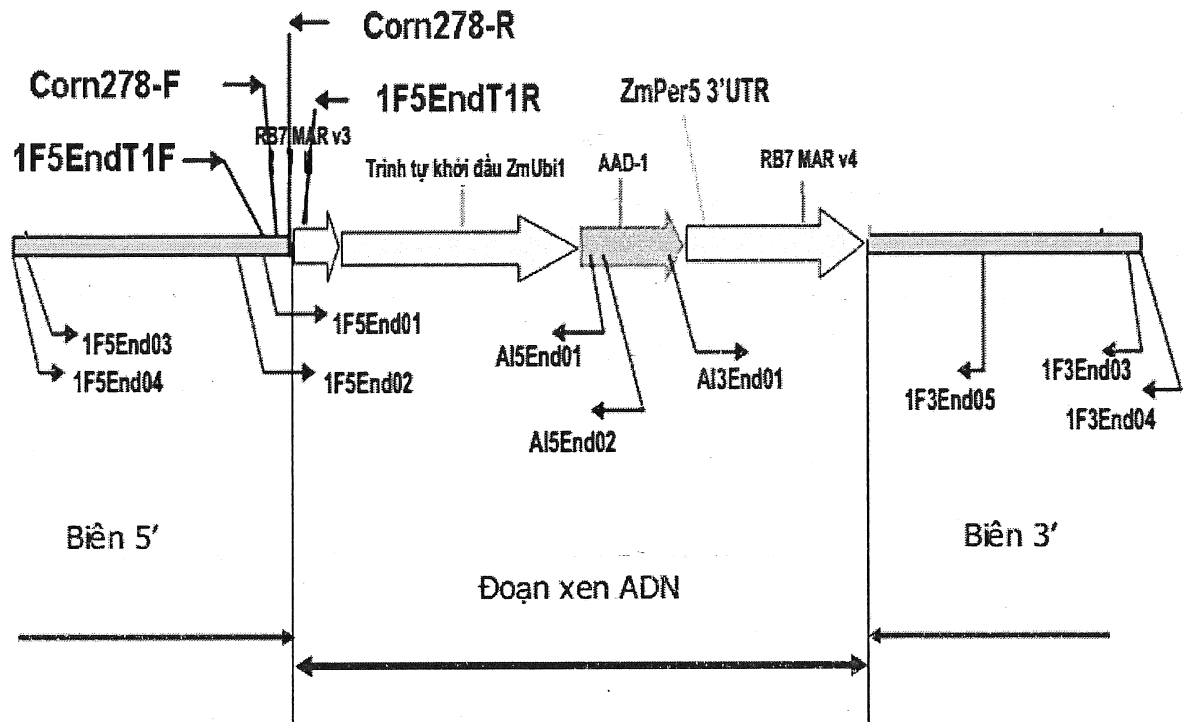


Fig.5: Sơ đồ các đoạn mồi được sử dụng trong khuếch đại PCR để xác định vùng biên bên sườn của biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô. Sơ đồ này mô tả các vị trí đoạn mồi để xác định trình tự chiều dài đầy đủ của biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô aad-1 từ biên 5' đến 3'

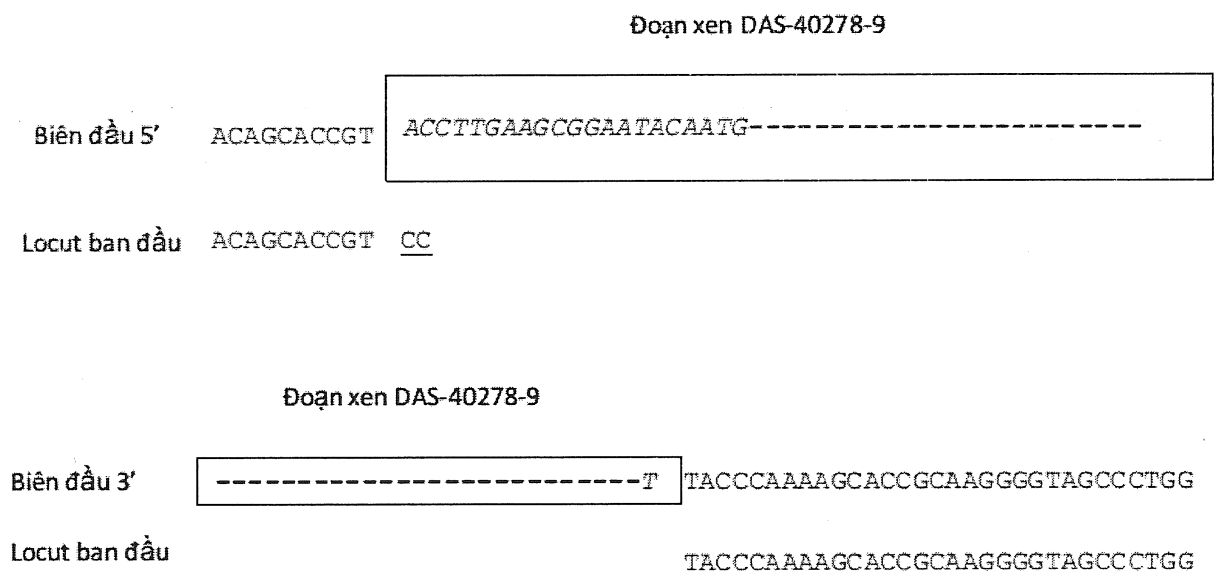
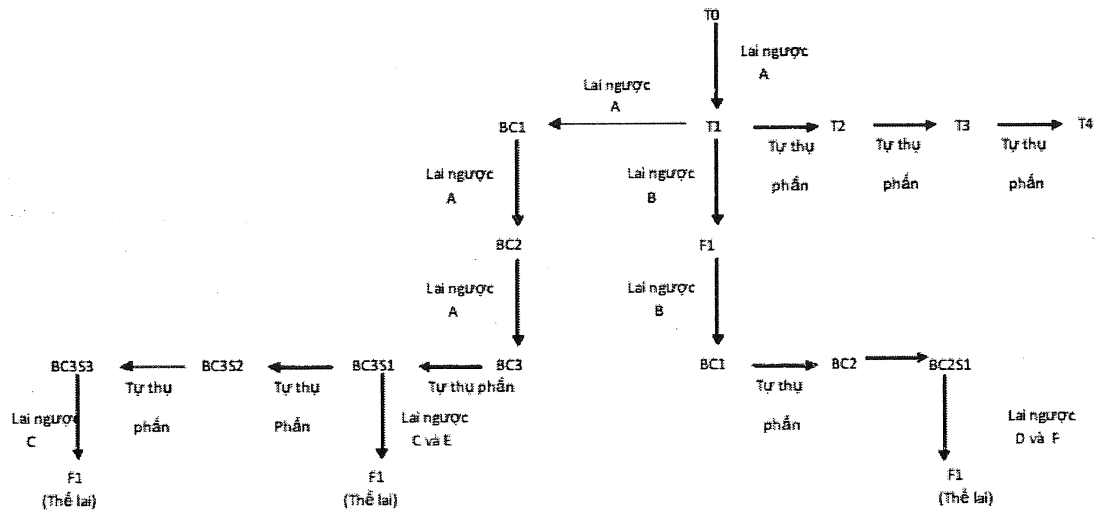


Fig.6: Đoạn xen trình tự AND trong vùng nối của biến thể gen DAS-40278-9 của cây ngô. Đoạn xen 21 bp (in nghiêng) ở điểm nối tích hợp 5' gây ra sự mất đoạn 2 bp (gạch dưới) của locut hệ gen ban đầu. Đoạn xen 1 bp (in nghiêng) cũng được tìm thấy ở vùng nối tích hợp 3'.



Lai A = Lai ưu thế DAS XHH13 Lai B = Lai ưu thế DAS SLB01 Lai C, D, E, F = Lai ưu thế DAS được sử dụng để tạo thế lai	BC1 = lai ngược lần đầu với bố mẹ lai ưu thế BC2 = lai ngược lần thứ hai với bố mẹ lai ưu thế BC3 = lai ngược lần thứ ba với bố mẹ lai ưu thế
T0 = thể biến nạp ban đầu T1 = thế hệ thứ nhất, có nguồn gốc từ việc lai T0 với dòng lai ưu thế T2 (T1S1) = có nguồn gốc từ việc tự thụ phấn của T1 T3 (T1S2) = có nguồn gốc từ việc tự thụ phấn của T2 T4 (T1S3) = có nguồn gốc từ việc tự thụ phấn của T3	BC2S1 = có nguồn gốc từ việc tự thụ phấn của BC2 BC3S1 = có nguồn gốc từ việc tự thụ phấn của BC3 BC3S2 = có nguồn gốc từ việc tự thụ phấn của BC3S1 BC3S3 = có nguồn gốc từ việc tự thụ phấn của BC3S2 F1 (Thế lai) = lai giữa hai dòng lai ưu thế

Fig.7: Sơ đồ gây giống của cây ngô 40278 và các thể hệ được sử dụng để phân tích