



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **122114** (13) **C2**  
(51) МПК (2020.01)  
**C12N 15/82** (2006.01)  
**C07K 14/325** (2006.01)  
**A01H 5/00**

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ  
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА  
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

|                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>(21)</b> Номер заявки: <b>а 2014 02009</b>                                                                                                  | <b>(72)</b> Винахідник(и):<br><b>Хінрікс Фолькер (US),<br/>Вільямс Джеймі (US)</b>                                                                                                                  |
| <b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>27.07.2012</b>                                                                                             | <b>(73)</b> Володілець (володільці):<br><b>АТЕНІКС КОРП.,<br/>3500 Paramount Parkway, Morrisville, NC<br/>27560, United States of America (US)</b>                                                  |
| <b>(24)</b> Дата, з якої є чинними<br>права інтелектуальної<br>власності: <b>26.09.2020</b>                                                    | <b>(74)</b> Представник:<br><b>Петров Андрій Володимирович, реєстр.<br/>№139</b>                                                                                                                    |
| <b>(31)</b> Номер попередньої<br>заявки відповідно до<br>Парижської конвенції: <b>61/512,539</b>                                               | <b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги<br>експертизою:<br>WO 2011/002992 A1, 06.01.2011<br>WO 2010/091230 A1, 12.08.2010<br>WO 2007/147096 A2, 21.12.2007<br>WO 2010/141141 A2, 09.12.2010 |
| <b>(32)</b> Дата подання<br>попередньої заявки<br>відповідно до<br>Парижської конвенції: <b>28.07.2011</b>                                     |                                                                                                                                                                                                     |
| <b>(33)</b> Код держави-учасниці<br>Парижської конвенції,<br>до якої подано<br>попередню заявку: <b>US</b>                                     |                                                                                                                                                                                                     |
| <b>(41)</b> Публікація відомостей<br>про заявку: <b>10.04.2014, Бюл.№ 7</b>                                                                    |                                                                                                                                                                                                     |
| <b>(46)</b> Публікація відомостей<br>про державну<br>реєстрацію: <b>25.09.2020, Бюл.№ 18</b>                                                   |                                                                                                                                                                                                     |
| <b>(86)</b> Номер та дата<br>подання міжнародної<br>заявки, поданої<br>відповідно до<br>Договору РСТ: <b>PCT/US2012/048496,<br/>27.07.2012</b> |                                                                                                                                                                                                     |

**(54) РЕКОМБІНАНТНИЙ ПОЛІПЕПТИД АХМІ205 З ІНСЕКТИЦИДНОЮ АКТИВНІСТЮ ТА ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ**

**(57) Реферат:**

Винахід стосується конструкції, яка містить молекулу рекомбінантної нуклеїнової кислоти, яка містить нуклеотидну послідовність, яка кодує поліпептид, який являє собою варіант SEQ ID NO: 2, де зазначений поліпептид має поліпшену пестицидну активність порівняно з SEQ ID NO: 2; де нуклеотидна послідовність вибрана з SEQ ID NO: 4, 5 або 6, або нуклеотидну послідовність, яка кодує амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11 або 12, де зазначена нуклеотидна послідовність є функціонально зв'язаною з промотором, здатним керувати експресією зазначеної нуклеотидної послідовності у рослинній клітині. Винахід також стосується способу боротьби або знищення популяції лускокрилих або твердокрилих комах та способу захисту рослини від комах-шкідників.

UA 122114 C2



# ПЕРЕХРЕСНЕ ПОСИЛАННЯ НА СПОРІДНЕНІ ЗАЯВКИ

Дана заявка заявляє пріоритет за попередньою заявкою на патент США з реєстраційним номером 61/512539, поданою 28 липня 2011 р., зміст якої включено у даний документ за допомогою посилання у всій своїй повноті.

## ПОСИЛАННЯ НА ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ, НАДІСЛАНИЙ В ЕЛЕКТРОННОМУ ВИГЛЯДІ

Дану офіційну копію переліку послідовностей надіслано в електронному вигляді за допомогою EFS-Web як відформатований під ASCII перелік послідовностей у файлі з назвою "APA116029SEQLIST.txt", створеному 19 липня 2012 року та який має розмір 45,8 кілобайта, і подано одночасно з описом. Перелік послідовностей, що міститься у даному відформатованому під ASCII документі, є частиною опису, та його включено у даний документ за допомогою посилання у всій своїй повноті.

## ГАЛУЗЬ ВІНАХОДУ

Даний винахід відноситься до галузі молекулярної біології. Забезпечуються варіанти пестицидних білків, які мають активність проти шкідників, що є кореневими черв'яками. Ці білки та послідовності нуклеїнових кислот, що їх кодують, застосовні в отриманні пестицидних складів та в отриманні трансгенних рослин, стійких до корневих черв'яків.

## ПЕРЕДУМОВИ ВІНАХОДУ

Впровадження DDT (дихлордифенілтрихлоретану) і наступний рух у напрямку до невибіркового застосування синтетичних хімічних інсектицидів призвели до забруднення водних і харчових джерел, до отруєння нецільових корисних комах і до розвитку комах-шкідників, стійких до дії хімічних інсектицидів. Підвищене суспільне занепокоєння щодо негативного впливу невибіркового застосування хімічних інсектицидів на довкілля спонукало до пошуку альтернативних способів боротьби з комахами-шкідниками.

Однією з перспективних альтернатив було застосування засобів біологічної боротьби. Існує переконливо підтверджена документальними доказами інформація про безпечне застосування Bt (*B. thuringiensis*, грампозитивної ґрунтової бактерії) як ефективних біопестицидів, і є низка повідомлень про експресію гена (генів) дельта-ендотоксину у сільськогосподарських культурах. Для трансгенних Bt-культур необхідними є лише кілька інсектицидних розпорошуваних розчинів, що не тільки заощаджує ресурси та час, але також знижує ризики для здоров'я. У деяких випадках комахи можуть розвивати стійкість до різних інсектицидних сполук, що ставить питання необхідності ідентифікації альтернативних засобів біологічної боротьби для боротьби зі шкідниками.

## СТИСЛИЙ ОПИС ВІНАХОДУ

Забезпечуються композиції та способи для надання пестицидної активності бактеріям, рослинам, рослинним клітинам, тканинам та насінню. Композиції містять молекули нуклеїнових кислот, які кодують послідовності пестицидних та інсектицидних поліпептидів, вектори, які містять такі молекули нуклеїнових кислот, та клітини-хазяїни, які містять ці вектори. Композиції також містять послідовності пестицидних поліпептидів та антитіла до таких поліпептидів. Нуклеотидні послідовності можна застосовувати у ДНК-конструктах або експресійних касетах для трансформації та експресії в організмах, у тому числі у мікроорганізмах та рослинах. Нуклеотидні або амінокислотні послідовності можуть бути синтетичними послідовностями, сконструйованими для експресії в організмі, у тому числі, без обмежень, у мікроорганізмі або рослині. Композиції також містять трансформовані бактерії, рослини, рослинні клітини, тканини та насіння.

Зокрема, забезпечуються молекули виділених або рекомбінантних нуклеїнових кислот, які кодують пестицидний білок. Крім того, охоплено амінокислотні послідовності, що відповідають пестицидному білку. Зокрема, даний винахід забезпечує молекулу виділеної нуклеїнової кислоти, яка містить нуклеотидну послідовність, що кодує амінокислотну послідовність, показану в SEQ ID №:7, 8, 9, 10, 11 або 12, або нуклеотидну послідовність, наведену під SEQ ID №:4, 5 або 6, а також їх варіанти та фрагменти. Також охоплено нуклеотидні послідовності, комплементарні нуклеотидній послідовності за даним винаходом або такі, що гібридизуються з послідовністю за даним винаходом.

Забезпечуються способи отримання поліпептидів за даним винаходом та застосування цих поліпептидів для боротьби зі шкідниками, що є лускокрилими, твердокрилими комахами, нематодами або двокрилими комахами, або їх знищення. Також включено способи та набори для виявлення нуклеїнових кислот та поліпептидів за даним винаходом у зразку.

Композиції та способи за даним винаходом застосовні для отримання організмів з підвищеною стійкістю або толерантністю до шкідників. Ці організми та композиції, які містять організми, є бажаними для сільськогосподарських цілей. Композиції за даним винаходом також

застосовні для утворення змінених або поліпшених білків, які мають пестицидну активність, або для виявлення наявності пестицидних білків або нуклеїнових кислот у продуктах або організмах.

#### ДОКЛАДНИЙ ОПИС

Даний винахід спрямовано на композиції та способи для регуляції стійкості або толерантності організмів, зокрема, рослин або рослинних клітин, до шкідників. Під "стійкістю" мається на увазі, що шкідник (наприклад, комаха) знищується під час поглинання поліпептидів за даним винаходом або під час іншого контакту з ними. Під "толерантністю" мається на увазі порушення або ослаблення пересування, харчування, розмноження або інших функцій шкідника. Способи включають трансформацію організмів за допомогою нуклеотидної послідовності, яка кодує пестицидний білок за даним винаходом. Зокрема, нуклеотидні послідовності за даним винаходом застосовні для отримання рослин та мікроорганізмів, що мають пестицидну активність. Таким чином, забезпечуються трансформовані бактерії, рослини, рослинні клітини, тканини рослин та насіння. Композиції являють собою пестицидні нуклеїнові кислоти та білки видів бактерій. Послідовності знаходять застосування у конструюванні векторів експресії для наступного введення в організми, що становлять інтерес, шляхом трансформації як зондів для виділення інших гомологічних (або частково гомологічних) генів та для утворення змінених пестицидних білків за допомогою способів, відомих у даній галузі техніки, таких як перестановка доменів або ДНК-шафлінг. Білки знаходять застосування у боротьбі з популяцією шкідників, що є лускокрилими, твердокрилими, двокрилими комахами та нематодами, або її знищенні, а також в отриманні композицій з пестицидною активністю.

Під "пестицидним токсином" або "пестицидним білком" мається на увазі токсин, який має токсичну активність проти одного або декількох шкідників, включаючи, без обмеження, представників рядів *Lepidoptera*, *Diptera* і *Coleoptera* або типу *Nematoda*, або білок, гомологічний такому білку. Пестицидні білки були виділені з організмів, у тому числі, наприклад, *Bacillus* sp., *Clostridium bifermentans* та *Paenibacillus popilliae*. Пестицидні білки містять амінокислотні послідовності, розшифровані на основі нуклеотидних послідовностей повної довжини, розкритих у даному документі, і амінокислотні послідовності, які є коротшими, ніж послідовності повної довжини, внаслідок застосування альтернативного сайту ініціації, розташованого нижче, або внаслідок процесингу, за якого утворюється короткий білок, що має пестицидну активність. Процесинг може мати місце в організмі, у якому експресується білок, або в шкіднику після поглинання білка.

Таким чином, у даному документі представлено родини нових виділених або рекомбінантних нуклеотидних послідовностей, що надають пестицидну активність. Також у даному документі представлено амінокислотні послідовності пестицидних білків. Білок, отримуваний у результаті трансляції цього гена, забезпечує клітинам можливість боротьби зі шкідниками, які поглинають його, або знищення таких.

Молекули виділених нуклеїнових кислот, а також їх варіанти та фрагменти

Один аспект даного винаходу відноситься до молекул виділених або рекомбінантних нуклеїнових кислот, що містять нуклеотидні послідовності, які кодують пестицидні білки та поліпептиди або їх біологічно активні частини, а також належних молекул нуклеїнових кислот для застосування як гібридизаційних зондів для ідентифікації молекул нуклеїнових кислот, які кодують білки з ділянками гомології послідовностей. Застосовуваний у даному документі вираз "молекула нуклеїнової кислоти" включає молекули ДНК (наприклад, рекомбінантні ДНК, кДНК або геномні ДНК) та молекули РНК (наприклад, мРНК), а також аналоги ДНК або РНК, утворені за допомогою аналогів нуклеотидів. Молекула нуклеїнової кислоти може бути одноланцюговою або дволанцюговою, але переважно є двонитковою ДНК.

"Виділена" послідовність нуклеїнової кислоти (або ДНК) застосовується у даному документі для позначення послідовності нуклеїнової кислоти (або ДНК), яка більше не перебуває у своєму природному середовищі, наприклад, перебуває в умовах *in vitro* або у рекомбінантній бактеріальній або рослинній клітині-хазяїні. У деяких варіантах здійснення "виділена" нуклеїнова кислота не містить послідовностей (тобто послідовностей, які кодують білки), що зазвичай фланкують нуклеїнову кислоту (тобто послідовностей, розташованих на 5'- та 3'-кінцях нуклеїнової кислоти) у геномній ДНК організму, з якого отримана нуклеїнова кислота. Щодо даного винаходу вираз "виділена", застосовуваний для позначення молекул нуклеїнових кислот, виключає виділені хромосоми. Наприклад, у різних варіантах здійснення молекула виділеної нуклеїнової кислоти, яка кодує пестицидний білок, може містити нуклеотидні послідовності завдовжки менше ніж приблизно 5 т.п.о., 4 т.п.о., 3 т.п.о., 2 т.п.о., 1 т.п.о., 0,5 т.п.о. або 0,1 т.п.о., які зазвичай фланкують молекулу нуклеїнової кислоти у геномній ДНК клітини, з якої отримана ця нуклеїнова кислота. Пестицидний білок, практично вільний від клітинного матеріалу, включає

білкові препарати, що мають менше ніж приблизно 30 %, 20 %, 10 % або 5 % (у перерахунку на суху вагу) непестицидного білка (який також згадується у даному документі як "забруднювальний білок").

Нуклеотидні послідовності, які кодують білки, за даним винаходом включають послідовність, наведену під SEQ ID №:4, 5 або 6, та її варіанти, фрагменти та комплементарні їй послідовності. Під "комплементарною послідовністю" мається на увазі нуклеотидна послідовність, що є достатньою мірою комплементарна даній нуклеотидній послідовності, а отже, вона може гібридизуватися з даною нуклеотидною послідовністю з формуванням, таким чином, стабільного дуплекса. Відповідні амінокислотні послідовності пестицидного білка, кодованого даною нуклеотидною послідовністю, наведено під SEQ ID №:7, 8, 9, 10, 11 або 12.

Молекули нуклеїнових кислот, які являють собою фрагменти цих нуклеотидних послідовностей, що кодують пестицидні білки, також охоплено даним винаходом. Під "фрагментом" мається на увазі частина нуклеотидної послідовності, яка кодує пестицидний білок. Фрагмент нуклеотидної послідовності може кодувати біологічно активну частину пестицидного білка, або він може являти собою фрагмент, який можна застосовувати як гібридизаційний зонд або праймер для ПЛР за допомогою способів, розкритих нижче. Молекули нуклеїнових кислот, що є фрагментами нуклеотидної послідовності, яка кодує пестицидний білок, містять щонайменше приблизно 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1350, 1400, 1450, 1500, 1550, 1600 суміжних нуклеотидів або кількість нуклеотидів аж до такої, у якій вони присутні в нуклеотидній послідовності повної довжини, яка кодує пестицидний білок, розкритий у даному документі, залежно від передбачуваного застосування. Під "суміжними" нуклеотидами маються на увазі нуклеотидні залишки, що безпосередньо прилягають один до одного. Фрагменти нуклеотидних послідовностей за даним винаходом будуть кодувати білкові фрагменти, які зберігають або підвищують біологічну активність пестицидного білка й, таким чином, зберігають або підвищують пестицидну активність порівняно з пестицидною активністю Aхmі205 (SEQ ID №:2). Під виразом "зберігає активність" мається на увазі, що фрагмент буде мати пестицидну активність, що становить щонайменше приблизно 30 %, щонайменше приблизно 50 %, щонайменше приблизно 70 %, 80 %, 90 %, 95 % або вище від такої пестицидного білка. Під виразом "поліпшена активність" мається на увазі підвищення, що становить щонайменше приблизно 10 %, щонайменше приблизно 15 %, щонайменше приблизно 20 %, щонайменше приблизно 25 %, щонайменше приблизно 30 %, щонайменше приблизно 35 %, щонайменше приблизно 40 %, щонайменше приблизно 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % або вище, або підвищення щонайменше у приблизно 1,5 рази, щонайменше у приблизно 2 рази, щонайменше у приблизно 2,5 рази, щонайменше у приблизно 3 рази або вище, пестицидної активності варіанта білка порівняно з пестицидною активністю Aхmі205. У деяких варіантах здійснення поліпшення полягає у зменшенні LC50 порівняно з LC50 для Aхmі205, наприклад, у зменшенні, що становить щонайменше приблизно 10 %, щонайменше приблизно 20 %, щонайменше приблизно 30 %, щонайменше приблизно 40 %, щонайменше приблизно 50 %, щонайменше приблизно 55 %, щонайменше приблизно 60 %, або у більшому зниженні LC50.

У різних варіантах здійснення активність являє собою активність проти лускокрилих комах. У деяких варіантах здійснення активність являє собою активність проти кореневих черв'яків, наприклад, західного кукурудзяного жука. Способи вимірювання пестицидної активності добре відомі у даній галузі техніки. Див., наприклад, Czapla and Lang (1990) J. Econ. Entomol. 83:2480-2485; Andrews et al. (1988) Biochem. J. 252:199-206; Marrone et al. (1985) J. of Economic Entomology 78:290-293; та патент США № 5743477, усі з яких включено у даний документ за допомогою посилання у всій своїй повноті.

Фрагмент нуклеотидної послідовності, що кодує пестицидний білок, який кодує біологічно активну частину білка за даним винаходом, буде кодувати щонайменше приблизно 15, 25, 30, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550 або 600 суміжних амінокислот або кількість амінокислот аж до загальної такої, у якій вони присутні в пестицидному білку повної довжини за даним винаходом. У деяких варіантах здійснення фрагмент характеризується N-кінцевим або C-кінцевим усіканням щонайменше приблизно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25 або більше амінокислот порівняно з SEQ ID №:7, 8, 9, 10, 11 або 12. У деяких варіантах здійснення фрагменти, охоплювані у даному документі, отримують як результат видалення C-кінцевих 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25 або більше амінокислот, наприклад, шляхом протеолізу або шляхом вставки стоп-кодона у послідовність, яка кодує.

Переважні пестицидні білки за даним винаходом кодуються нуклеотидною послідовністю, яка є достатньою мірою ідентичною щодо нуклеотидної послідовності SEQ ID №:4, 5 або 6. Під

"достатньою мірою ідентичною" мається на увазі амінокислотна або нуклеотидна послідовність, яка має ідентичність послідовності, що становить щонайменше приблизно 60 % або 65 %, ідентичність послідовності, що становить приблизно 70 % або 75 %, ідентичність послідовності, що становить приблизно 80 % або 85 %, ідентичність послідовності, що становить приблизно 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або більше порівняно з еталонною послідовністю, визначену за допомогою однієї з програм вирівнювання, описаних у даному документі, із застосуванням стандартних параметрів. Фахівець у даній галузі візьме до уваги, що ці значення можна відповідним чином коригувати для визначення відповідної ідентичності білків, кодованих двома нуклеотидними послідовностями, з урахуванням виродженості кодонів, подібності амінокислот, положення рамки зчитування тощо.

Для визначення відсоткової ідентичності двох амінокислотних послідовностей або двох нуклеїнових кислот послідовності вирівнюються із метою оптимального порівняння. Відсоткова ідентичність двох послідовностей залежить від кількості ідентичних положень, спільних для послідовностей (тобто відсоткова ідентичність = кількість ідентичних положень/загальна кількість положень (наприклад, положень, що перекриваються)  $\times 100$ ). В одному варіанті здійснення дві послідовності мають однакову довжину. В іншому варіанті здійснення порівняння здійснюють по всій еталонній послідовності (наприклад, по всій одній з SEQ ID №:4, 5 або 6 або по всій одній з SEQ ID №:7, 8, 9, 10, 11 або 12). Відсоткову ідентичність двох послідовностей можна визначити за допомогою методик, подібних до описаних нижче, дозволяючи або не дозволяючи гепи. Розраховуючи відсоткову ідентичність, зазвичай підраховують точні збіги.

Визначення відсоткової ідентичності двох послідовностей можна виконати із застосуванням математичного алгоритму. Необмежувальним прикладом математичного алгоритму, використовуваного для порівняння двох послідовностей, є алгоритм за Karlin and Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264 у модифікації Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877. Такий алгоритм включено у програми BLASTN та BLASTX за Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403. Операції пошуку нуклеотидів за допомогою BLAST можна здійснювати у програмі BLASTN, результат підрахунку = 100, довжина слова = 12, з отриманням нуклеотидних послідовностей, гомологічних молекулам нуклеїнових кислот, подібних пестицидним, за даним винаходом. Операції пошуку білків за допомогою BLAST можна здійснювати у програмі BLASTX, результат підрахунку = 50, довжина слова = 3, з отриманням амінокислотних послідовностей, гомологічних молекулам пестицидних білків за даним винаходом. Для отримання вирівнювання з гепами з метою порівняння можна використовувати BLAST з гепами (у BLAST 2.0) відповідно до описаного в Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389. Альтернативно, можна застосовувати PSI-Blast для здійснення ітеративного пошуку, який виявляє віддалену спорідненість між молекулами. Див. Altschul et al. (1997) supra. Використовуючи програми BLAST, BLAST з гепами та PSI-Blast, можна застосовувати параметри за замовчуванням відповідних програм (наприклад, BLASTX та BLASTN). Вирівнювання можна також здійснювати вручну шляхом добору.

Іншим необмежувальним прикладом математичного алгоритму, використовуваного для порівняння послідовностей, є алгоритм ClustalW (Higgins et al. (1994) Nucleic Acids Res. 22:4673-4680). У ClustalW порівнюються послідовності та проводиться вирівнювання всієї амінокислотної послідовності або послідовності ДНК, і у ньому, таким чином, можуть забезпечуватися дані про консервативність послідовності, властиву усім амінокислотній послідовності. Алгоритм ClustalW застосовують у деяких комерційно доступних пакетах програмного забезпечення для аналізу ДНК/амінокислот, таких як модуль ALIGNX комплексу програм Vector NTI (Invitrogen Corporation, Карлсбад, Каліфорнія). Після вирівнювання амінокислотних послідовностей за допомогою ClustalW можна провести оцінку відсоткової ідентичності амінокислот. Необмежувальним прикладом програми із системи програмного забезпечення, застосовної в аналізі вирівнювань за допомогою ClustalW, є GENEDOC™. GENEDOC™ (Karl Nicholas) дозволяє проводити оцінку подібності та ідентичності амінокислот (або ДНК) між декількома білками. Іншим необмежувальним прикладом математичного алгоритму, використовуваного для порівняння послідовностей, є алгоритм за Myers and Miller (1988) CABIOS 4:11-17. Такий алгоритм включено до програми ALIGN (версія 2.0), яка є частиною пакета програмного забезпечення GCG Wisconsin Genetics, версія 10 (доступного від Accelrys, Inc., 9685 Scranton Rd., Сан-Дієго, Каліфорнія, США). Використовуючи програму ALIGN для порівняння амінокислотних послідовностей, можна застосовувати таблицю ваг заміни амінокислотних залишків PAM120, штраф за продовження гепи, що дорівнює 12, та штраф за відкриття гепи, що дорівнює 4.

Якщо не вказане інше, буде застосовуватися GAP версії 10, у якому застосовується алгоритм за Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48(3):443-453, для визначення

ідентичності або подібності послідовностей із застосуванням наступних параметрів: % ідентичності та % подібності для нуклеотидної послідовності із застосуванням ваги гепу, що дорівнює 50, і ваги довжини, що дорівнює 3, і матриці заміни `nwsgardna.cmp`; % ідентичності або % подібності для амінокислотної послідовності із застосуванням ваги гепу, що дорівнює 8, і ваги довжини, що дорівнює 2, і програми підрахунку BLOSUM62. Також можна застосовувати еквівалентні програми. Під "еквівалентною програмою" мається на увазі будь-яка програма для порівняння послідовностей, у якій для будь-яких двох розглянутих послідовностей здійснюється побудова вирівнювання, яке характеризується ідентичними збігами нуклеотидних залишків та ідентичною відсотковою ідентичністю послідовностей порівняно з відповідними вирівнюваннями, побудова яких здійснюється в GAP версії 10. Даний винахід також охоплює молекули варіантів нуклеїнових кислот. "Варіанти" нуклеотидних послідовностей, які кодують пестицидні білки, включають послідовності, які кодують пестицидні білки, розкриті у даному документі, але які мають консервативні відмінності внаслідок виродженості генетичного коду, а також такі, що є достатньою мірою ідентичними, як обговорювалося вище. Апельні варіанти, що трапляються в природі, можуть бути ідентифіковані із застосуванням добре відомих методик молекулярної біології, таких як полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) та методики гібридизації, представлені у загальному вигляді нижче. Варіанти нуклеотидних послідовностей також включають нуклеотидні послідовності, отримані синтетично, які були утворені, наприклад, за допомогою застосування сайт-спрямованого мутагенезу, але які, як і раніше, кодують пестицидні білки, розкриті у даному винаході, як обговорюється нижче. Варіанти білків, охоплювані даним винаходом, є біологічно активними, тобто вони продовжують мати бажану біологічну активність нативного білка, тобто зберігати пестицидну активність. У деяких варіантах здійснення активність є поліпшеною порівняно з Axtm205. Під виразом "зберігає активність" мається на увазі, що варіант буде мати пестицидну активність, яка становить щонайменше приблизно 30 %, щонайменше приблизно 50 %, щонайменше приблизно 70 % або щонайменше приблизно 80 % від такої нативного білка. Способи вимірювання пестицидної активності добре відомі у даній галузі техніки. Див., наприклад, Czapla and Lang (1990) J. Econ. Entomol. 83: 2480-2485; Andrews et al. (1988) Biochem. J. 252:199-206; Marrone et al. (1985) J. of Economic Entomology 78:290-293; та патент США № 5743477, усі з яких включено у даний документ за допомогою посилання у всій своїй повноті.

Фахівець у даній галузі додатково визнає, що за допомогою мутації нуклеотидних послідовностей за даним винаходом можуть бути внесені зміни, що зумовлює, таким чином, зміни в амінокислотній послідовності кодованих пестицидних білків без зміни біологічної активності білків. Таким чином, молекули варіантів виділених нуклеїнових кислот можна створити шляхом впровадження одного або декількох з нуклеотидних заміни, додавань або делецій у відповідну нуклеотидну послідовність, розкриту у даному документі, таким чином, що в кодований білок впроваджується одне або декілька з амінокислотних заміни, додавань або делецій. Мутації можна впроваджувати за допомогою стандартних методик, таких як сайт-спрямований мутагенез та ПЛР-опосередкований мутагенез. Такі варіанти нуклеотидних послідовностей також охоплено даним винаходом.

Наприклад, консервативні амінокислотні заміни можна зробити щодо одного або декількох передбачених несуттєвих амінокислотних залишків. "Несуттєвий" амінокислотний залишок являє собою залишок, який можна змінити в послідовності дикого типу пестицидного білка без зміни біологічної активності, у той час як "істотний" амінокислотний залишок є необхідним для біологічної активності. "Консервативна амінокислотна заміна" є такою, за якої амінокислотний залишок заміщають амінокислотним залишком, що має подібний бічний ланцюг. Родини амінокислотних залишків, які мають подібні бічні ланцюги, визначено у даній галузі техніки. Ці родини включають амінокислоти з основними бічними ланцюгами (наприклад, лізин, аргінін, гістидин), кислими бічними ланцюгами (наприклад, аспарагінова кислота, глутамінова кислота), незарядженими полярними бічними ланцюгами (наприклад, гліцин, аспарагін, глутамін, серин, треонін, тирозин, цистеїн), неполярними бічними ланцюгами (наприклад, аланін, валін, лейцин, ізолейцин, пролін, фенілаланін, метіонін, триптофан), бета-розгалуженими бічними ланцюгами (наприклад, треонін, валін, ізолейцин) та ароматичними бічними ланцюгами (наприклад, тирозин, фенілаланін, триптофан, гістидин).

Амінокислотні заміни можна здійснити у неконсервативних ділянках, які зберігають свою функцію. Зазвичай такі заміни не можна здійснити щодо консервативних амінокислотних залишків або щодо амінокислотних залишків, які перебувають у консервативному мотиві, де такі залишки є істотними для активності білка. Приклади залишків, які є консервативними і які можуть бути істотними для активності білка, включають, наприклад, залишки, які є ідентичними серед усіх білків, що містяться у вирівнюванні токсинів, подібних або споріднених щодо

послідовностей за даним винаходом (наприклад, залишки, які є ідентичними у вирівнюванні гомологічних білків). Приклади залишків, які є консервативними, але щодо яких можна дозволяти консервативні амінокислотні заміни, і які, як і раніше, зберігають активність, включають, наприклад, залишки, що характеризуються тільки консервативними замінами серед усіх білків, які містяться у вирівнюванні токсинів, подібних або споріднених щодо послідовностей за даним винаходом (наприклад, залишки, що характеризуються тільки консервативними замінами серед усіх білків, що містяться у вирівнюванні гомологічних білків). Однак, фахівець у даній галузі зрозуміє, що функціональні варіанти можуть мати мінорні консервативні або неконсервативні зміни консервативних залишків.

Альтернативно, варіанти нуклеотидних послідовностей можна створювати шляхом випадкового впровадження мутацій у всю послідовність, яка кодує, або її частину, як, наприклад, шляхом насичувального мутагенезу, а отриманих мутантів можна піддавати скринінгу щодо їх здатності надавати пестицидну активність, щоб ідентифікувати мутантів, які зберігають активність. Після мутагенезу кодований білок може експресуватися рекомбінантним шляхом, та активність білка можна визначити за допомогою стандартних методик аналізу.

Застосовуючи способи, такі як ПЛР, гібридизація тощо, можна ідентифікувати відповідні пестицидні послідовності, при цьому такі послідовності мають істотну ідентичність стосовно послідовностей за даним винаходом. Див., наприклад, Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) та Innis et al. (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, NY).

У способі гібридизації всю пестицидну нуклеотидну послідовність або її частину можна застосовувати для скринінгу бібліотек кДНК або геномних бібліотек. Способи конструювання таких бібліотек кДНК та геномних бібліотек, як правило, відомі у даній галузі техніки та розкриті в Sambrook and Russell, 2001, *supra*. Так звані гібридизаційні зонди можуть бути фрагментами геномної ДНК, фрагментами кДНК, фрагментами РНК або іншими олігонуклеотидами й можуть бути міченими детективною групою, такою як  $^{32}\text{P}$ , або будь-яким іншим детективним маркером, таким як інші радіоактивні ізотопи, флуоресцентна сполука, фермент або кофактор ферменту. Зонди для гібридизації можна створити шляхом мічення синтетичних олігонуклеотидів на основі відомої нуклеотидної послідовності, яка кодує пестицидний білок, розкритої у даному документі. Додатково можна застосовувати вироджені праймери, розроблені на основі консервативних нуклеотидів або амінокислотних залишків у нуклеотидній послідовності або кодованій амінокислотній послідовності. Зонд зазвичай містить ділянку нуклеотидної послідовності, яка гібридується у жорстких умовах щонайменше із приблизно 12, щонайменше із приблизно 25, щонайменше із приблизно 50, 75, 100, 125, 150, 175 або 200 послідовними нуклеотидами нуклеотидної послідовності, яка кодує пестицидний білок за даним винаходом, або її фрагмента або варіанта. Способи отримання зондів для гібридизації, як правило, відомі у даній галузі техніки та розкриті в Sambrook and Russell, 2001, *supra*, включеному у даний документ за допомогою посилання.

Наприклад, усю послідовність пестицидного білка, розкриту у даному документі, або одну або декілька її частин можна застосовувати як зонд, здатний до специфічної гібридизації з відповідними послідовностями, подібними до таких пестицидного білка, та матричними РНК. Для досягнення специфічної гібридизації у різних умовах такі зонди містять у своєму складі послідовності, що є унікальними та переважно мають довжину щонайменше приблизно 10 нуклеотидів або мають довжину щонайменше приблизно 20 нуклеотидів. Такі зонди можна застосовувати для ампліфікації відповідних пестицидних послідовностей з вибраного організму за допомогою ПЛР. Дану методику можна застосовувати для виділення додаткових послідовностей, які кодують, з бажаного організму або як діагностичний аналіз для визначення наявності послідовностей, які кодують, в організмі. Методи гібридизації включають гібридизаційний скринінг бібліотек ДНК, висіяних на чашки (бляшок або колоній; див., наприклад, Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York).

Гібридизація таких послідовностей може бути проведена у жорстких умовах. Під "жорсткими умовами" або "жорсткими умовами гібридизації" маються на увазі умови, у яких зонд буде гібридуватися з його цільовою послідовністю помітно більшою мірою, ніж з іншими послідовностями (наприклад, з перевищенням фонового рівня щонайменше в 2 рази). Жорсткі умови залежать від послідовності та будуть відрізнятися за різних обставин. Шляхом регуляції жорсткості гібридизації та/або умов промивання можна ідентифікувати цільові послідовності, на 100 % комплементарні щодо зонда (застосування гомологічного зонда). Альтернативно, умови жорсткості можна коригувати для того, щоб дозволити певний незбіг у послідовностях таким чином, що будуть виявлятися нижчі ступені подібності (застосування гетерологічного зонда).



Зонд зазвичай має довжину, що становить менше приблизно ніж 1000 нуклеотидів, переважно має довжину, що становить менше ніж 500 нуклеотидів.

Жорсткі умови звичайно будуть такими, в яких концентрація солі становить менше ніж приблизно 1,5 М іонів Na, зазвичай будучи концентрацією іонів Na (або інших солей), яка становить від приблизно 0,01 до 1,0 М при рН від 7,0 до 8,3, а температура становить щонайменше приблизно 30 °С для коротких зондів (наприклад, від 10 до 50 нуклеотидів) та щонайменше приблизно 60 °С для довгих зондів (наприклад, більше 50 нуклеотидів). Жорстких умов також можна досягти шляхом додавання дестабілізуючих засобів, таких як формамід. Ілюстративні умови зниженої жорсткості включають гібридизацію з буферним розчином, що містить 30-35 % формамід, 1 М NaCl, 1 % SDS (додецилсульфат натрію), при 37 °С та промивання в 1X-2X SSC (20X SSC=3,0 М NaCl/0,3 М цитрат тринатрію) при 50-55 °С. Ілюстративні умови помірної жорсткості включають гібридизацію в 40-45 % формаміді, 1,0 М NaCl, 1 % SDS при 37 °С і промивання в 0,5X-1X SSC при 55-60 °С. Ілюстративні умови підвищеної жорсткості включають гібридизацію у 50 % формаміді, 1 М NaCl, 1 % SDS при 37 °С та промивання в 0,1X SSC при 60-65 °С. Промивальні буфери необов'язково можуть містити від приблизно 0,1 % до приблизно 1 % SDS. Тривалість гібридизації, як правило, становить менше ніж приблизно 24 години, зазвичай від приблизно 4 до приблизно 12 годин.

Специфічність звичайно залежить від промивань після гібридизації, при цьому критичними чинниками є іонна сила та температура кінцевого промивального розчину. Для гібридів ДНК-ДНК  $T_m$  можна приблизно визначити з рівняння за Meinkoth and Wahl (1984) *Anal. Biochem.* 138:267-284:  $T_m = 81,5 ^\circ\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\%GC) - 0,61 (\% \text{ форм}) - 500/L$ ; де М являє собою молярну концентрацію моновалентних катіонів, %GC являє собою відсотковий вміст гуанозинових та цитозинових нуклеотидів у ДНК, % форм являє собою відсотковий вміст формаміду у гібридизаційному розчині, а L являє собою довжину гібрида у парах основ.  $T_m$  являє собою температуру (за певних іонної сили та рН), за якої 50 % комплементарної цільової послідовності гібридується із зондом, що абсолютно збігається.  $T_m$  знижують на приблизно 1 °С з кожним 1 % незбігу; таким чином,  $T_m$ , умови гібридизації та/або промивання можна відкоригувати для гібридизації з послідовностями, які мають бажану ідентичність. Наприклад, якщо проводять пошук послідовностей з >90 % ідентичністю, то  $T_m$  можна знизити на 10 °С. Зазвичай жорсткі умови обирають так, щоб температура була на приблизно 5 °С нижче за точку плавлення ( $T_m$ ) конкретної послідовності та комплементарної їй послідовності за певних іонної сили та рН. Однак, в умовах надзвичайної жорсткості можна використовувати температуру гібридизації та/або промивання, на 1, 2, 3 або 4 °С нижчу за точку плавлення ( $T_m$ ); в умовах помірної жорсткості можна використовувати температуру гібридизації та/або промивання, на 6, 7, 8, 9 або 10 °С нижчу за точку плавлення ( $T_m$ ); в умовах зниженої жорсткості можна використовувати температуру гібридизації та/або промивання, на 11, 12, 13, 14, 15 або 20 °С нижчу за точку плавлення ( $T_m$ ). Застосовуючи рівняння, гібридизаційні та промивні композиції та бажану  $T_m$ , середній фахівець у даній галузі зрозуміє, що зміни жорсткості гібридизаційних та/або промивних розчинів описані по своїй суті. Якщо бажаний ступінь незбігу дає у результаті  $T_m$  менше 45 °С (водний розчин) або 32 °С (розчин формаміду), переважно підвищувати концентрацію SSC, так щоб можна було застосовувати вищу температуру. Великий посібник з гібридизації нуклеїнових кислот міститься в Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology—Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Part I, Chapter 2 (Elsevier, New York); та Ausubel et al., eds. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 2 (Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York). Див. Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York).

Виділені білки, а також їх варіанти та фрагменти

Пестицидні білки також охоплено даним винаходом. Під "пестицидним білком" мається на увазі білок, що має амінокислотну послідовність, наведену під SEQ ID №:7, 8, 9, 10, 11 або 12. Також представлено фрагменти, біологічно активні частини та їх варіанти (наприклад, SEQ ID №:5, 6, 7 та 8), і вони можуть бути використані для практичного здійснення способів даного винаходу. Вираз "виділений білок" застосовується для позначення білка, який більше не перебуває у своєму природному середовищі, наприклад, перебуває в умовах *in vitro* або у рекомбінантній бактеріальній або рослинній клітині-хазяїні.

"Фрагменти" або "біологічно активні частини" включають фрагменти поліпептидів, які містять амінокислотні послідовності, достатньою мірою ідентичні щодо амінокислотних послідовностей, наведених під SEQ ID №:7, 8, 9, 10, 11 або 12, та які проявляють пестицидну активність. Біологічно активна частина пестицидного білка може являти собою поліпептид завдовжки, наприклад, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250 або більше амінокислот. Такі біологічно активні частини можна отримати за допомогою методик рекомбінантних молекул та оцінити стосовно

пестицидної активності. Способи вимірювання пестицидної активності добре відомі у даній галузі техніки. Див., наприклад, Czapla and Lang (1990) J. Econ. Entomol. 83:2480-2485; Andrews et al. (1988) Biochem. J. 252:199-206; Marrone et al. (1985) J. of Economic Entomology 78:290-293; та патент США № 5743477, усі з яких включено у даний документ за допомогою посилання у всій своїй повноті. Як застосовується у даному документі, фрагмент містить щонайменше 8 суміжних амінокислот SEQ ID №:7, 8, 9, 10, 11 або 12. Даний винахід охоплює, однак, інші фрагменти, як, наприклад, будь-який фрагмент білка завдовжки більше ніж приблизно 10, 20, 30, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550 або більше амінокислот.

У деяких варіантах здійснення фрагмент характеризується N-кінцевим або C-кінцевим усіканням щонайменше приблизно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25 або більше амінокислот порівняно з SEQ ID №:7, 8, 9, 10, 11 або 12. У деяких варіантах здійснення фрагменти, охоплювані у даному документі, отримують як результат видалення C-кінцевих 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25 або більше амінокислот, наприклад, шляхом протеолізу або шляхом вставки стоп-кодона в послідовність, яка кодує.

Під "варіантами" маються на увазі білки або поліпептиди, що мають амінокислотну послідовність, щонайменше на приблизно 60 %, 65 %, приблизно 70 %, 75 %, приблизно 80 %, 85 %, приблизно 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичну щодо амінокислотної послідовності SEQ ID №:7, 8, 9, 10, 11 або 12, або амінокислотну послідовність з 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 або більше амінокислотними додаваннями, делеціями або замінами порівняно з амінокислотною послідовністю SEQ ID №:2. Варіанти також включають поліпептиди, кодовані молекулою нуклеїнової кислоти, яка гібридується з молекулою нуклеїнової кислоти SEQ ID №:4, 5 або 6 або з комплементарною їй послідовністю у жорстких умовах. Варіанти включають поліпептиди, що відрізняються за амінокислотною послідовністю у зв'язку з мутагенезом. Варіанти білків, охоплювані даним винаходом, є біологічно активними, тобто вони продовжують мати бажану біологічну активність нативного білка, тобто зберігати пестицидну активність. У деяких варіантах здійснення варіанти мають поліпшену активність порівняно з нативним білком (наприклад, порівняно з Aхmі205). Під виразом "зберігає активність" мається на увазі, що фрагмент буде мати пестицидну активність, що становить щонайменше приблизно 30 %, щонайменше приблизно 50 %, щонайменше приблизно 70 %, 80 %, 90 %, 95 % або вище від такої пестицидного білка. Під виразом "поліпшена активність" мається на увазі підвищення, що становить щонайменше приблизно 10 %, щонайменше приблизно 15 %, щонайменше приблизно 20 %, щонайменше приблизно 25 %, щонайменше приблизно 30 %, щонайменше приблизно 35 %, щонайменше приблизно 40 %, щонайменше приблизно 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % або вище, або підвищення щонайменше у приблизно 1,5 рази, щонайменше у приблизно 2 рази, щонайменше у приблизно 2,5 рази, щонайменше у приблизно 3 рази або вище, пестицидної активності варіанта білка порівняно з пестицидною активністю Aхmі205. У деяких варіантах здійснення поліпшення полягає в зменшенні LC50 порівняно з LC50 для Aхmі205, наприклад, у зменшенні, що становить щонайменше приблизно 10 %, щонайменше приблизно 20 %, щонайменше приблизно 30 %, щонайменше приблизно 40 %, щонайменше приблизно 50 %, щонайменше приблизно 55 %, щонайменше приблизно 60 %, або у більшому зниженні LC50. Способи вимірювання пестицидної активності добре відомі у даній галузі техніки. Див., наприклад, Czapla and Lang (1990) J. Econ. Entomol. 83:2480-2485; Andrews et al. (1988) Biochem. J. 252:199-206; Marrone et al. (1985) J. of Economic Entomology 78:290-293; та патент США № 5743477, усі з яких включено у даний документ за допомогою посилання у всій своїй повноті.

Гени бактерій, такі як гени ахmі за даним винаходом, досить часто мають декілька метіонінових ініціаторних кодонів у безпосередній близькості від початку відкритої рамки читування. Часто ініціація трансляції на одному або декількох із цих стартових кодонів зумовлює утворення функціонального білка. Ці стартові кодони можуть містити ATG-кодони. Однак, бактерії, такі як *Bacillus* sp., також розпізнають GTG-кодон як стартовий кодон, та білки, що ініціюють трансляцію на GTG-кодонах, містять амінокислоту метіонін у першому положенні. У рідкісних випадках трансляція у бактеріальних системах може ініціюватися на TTG-кодоні, хоча в цьому випадку TTG кодує метіонін. Крім того, часто не визначено а пріорі, який з цих кодонів застосовують у бактерії природним чином. Таким чином, зрозуміло, що застосування одного з альтернативних метіонінових кодонів також може зумовлювати утворення пестицидних білків. Ці пестицидні білки охоплено даним винаходом, і їх можна застосовувати у способах за даним винаходом. Буде зрозуміло, що у разі експресії в рослинах буде необхідно змінювати альтернативний стартовий кодон на ATG для належної трансляції.

Також охоплено антитіла до поліпептидів за даним винаходом або до їх варіантів або фрагментів. Способи отримання антитіл добре відомі у даній галузі техніки (див., наприклад, Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; патент США № 4196265).

Таким чином, один аспект даного винаходу відноситься до антитіл, одноланцюгових антиген-зв'язувальних молекул або інших білків, що специфічно зв'язуються з однією або декількома молекулами білків або пептидів за даним винаходом та їх гомологами, молекулами злиття або фрагментами. В особливо переважному варіанті здійснення антитіло специфічно зв'язується з білком, який має амінокислотну послідовність, наведену під SEQ ID №:7, 8, 9, 10, 11 або 12, або з його фрагментом. В іншому варіанті здійснення антитіло специфічно зв'язується з білком злиття, який містить амінокислотну послідовність, обрану з амінокислотної послідовності, наведеної під SEQ ID №:7, 8, 9, 10, 11 або 12, або з його фрагментом.

Антитіла за даним винаходом можна застосовувати для кількісного або якісного виявлення молекул білків або пептидів за даним винаходом або для виявлення посттрансляційних модифікацій білків. Як застосовується у даному документі, кажуть, що антитіло або пептид "специфічно зв'язуються" з молекулою білка або пептиду за даним винаходом, якщо таке зв'язування не зазнає конкурентного інгібування завдяки наявності неспоріднених молекул.

Змінені або поліпшені варіанти

Вважається, що послідовності ДНК, які кодують пестицидний білок, можна додатково змінювати за допомогою різних способів, і що ці зміни можуть давати у результаті послідовності ДНК, які кодують білки з амінокислотними послідовностями, відмінними від кодованих у пестицидному білку за даним винаходом. Даний білок можна змінювати різними способами, включаючи амінокислотні заміни, делеції, усікання та вставки однієї або декількох амінокислот SEQ ID №:2, включаючи до приблизно 2, приблизно 3, приблизно 4, приблизно 5, приблизно 6, приблизно 7, приблизно 8, приблизно 9, приблизно 10, приблизно 15, приблизно 20, приблизно 25, приблизно 30, приблизно 35, приблизно 40, приблизно 45, приблизно 50, приблизно 55, приблизно 60, приблизно 65, приблизно 70, приблизно 75, приблизно 80, приблизно 85, приблизно 90, приблизно 100, приблизно 105, приблизно 110, приблизно 115, приблизно 120, приблизно 125, приблизно 130, приблизно 135, приблизно 140, приблизно 145, приблизно 150, приблизно 155 або більше амінокислотних заміни, делецій або вставок. У деяких варіантах здійснення заміни мають місце у одному або декількох з амінокислотних положень 464, 465, 466 або 467 порівняно з амінокислотною послідовністю SEQ ID №:2. У деяких варіантах здійснення варіант амінокислотної послідовності наведений під SEQ ID №:7, 8, 9, 10, 11 або 12. Фахівець у даній області візьме до уваги, що у SEQ ID №:7, 8, 9, 10, 11 або 12 можуть бути впроваджені додаткові амінокислотні додавання, заміни або делеції, як описано у даному документі.

Способи таких дій добре відомі у даній галузі техніки. Наприклад, варіанти амінокислотних послідовностей пестицидного білка можна отримати за допомогою мутацій у ДНК. Це також може бути виконано за допомогою одного або декількох видів мутагенезу та/або під час спрямованого розвитку. У деяких аспектах зміни, кодовані в амінокислотній послідовності, не будуть істотно впливати на функцію білка. Такі варіанти будуть мати бажану пестицидну активність. Проте зрозуміло, що здатність пестицидного білка до надання пестицидної активності можна поліпшити шляхом застосування таких методик щодо композицій за даним винаходом. Наприклад, можна експресувати пестицидний білок у клітинах-хазяїнах, які проявляють високі показники помилкового введення основ під час реплікації ДНК, таких як XL-1 Red (Stratagene, Ла-Холла, Каліфорнія). Після розмноження таких штамів можна виділити ДНК (наприклад, шляхом отримання плазмідної ДНК або шляхом ампліфікації за допомогою ПЛР та клонування отриманого у результаті ПЛР фрагмента у вектор), підтримувати мутації пестицидних білків у культурі немутагенного штаму та ідентифікувати мутантні гени з пестицидною активністю, наприклад, шляхом здійснення аналізу для тестування щодо пестицидної активності. Як правило, білок змішують та застосовують в аналізах із згодовуванням. Див., наприклад, Marrone et al. (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293. Такі аналізи можуть включати приведення рослин у контакт з одним або декількома шкідниками та визначення здатності рослини до виживання та/або викликання загибелі шкідників.

Альтернативно, у білковій послідовності багатьох білків можуть бути здійснені зміни на аміно- або карбокси-кінці без істотного впливу на активність. Вони можуть включати вставки, делеції або зміни, впроваджені за допомогою сучасних молекулярних способів, таких як ПЛР, включаючи ПЛР-ампліфікації, які змінюють або подовжують послідовність, що кодує білок, за допомогою включення послідовностей, які кодують амінокислоти, в олігонуклеотиди, використовуваних в ПЛР-ампліфікації. Альтернативно, білкові послідовності, що додаються, можуть включати цілі послідовності, які кодують білки, такі як широко застосовувані у даній

галузі техніки для утворення білків злиття. Такі білки злиття часто застосовують для (1) підвищення рівня експресії білка, що становить інтерес, (2) впровадження зв'язувального домену, ферментативної активності або епітопу для сприяння очищенню білка, виявленню білка або іншим шляхам експериментального застосування, відомим у даній галузі техніки, (3) цільової секреції або трансляції білка в субклітинну органелу, таку як периплазматичний простір грамнегативних бактерій або ендоплазматичний ретикулум еукаріотичних клітин, при цьому остання часто зумовлює глікозилювання білка.

Варіанти нуклеотидних та амінокислотних послідовностей за даним винаходом також охоплюють послідовності, отримані в результаті мутагенних та рекомбіногенних процедур, таких як ДНК-шафлінг. За допомогою такої процедури одну або декілька різних ділянок, які кодують пестицидний білок, можна застосовувати для створення нового пестицидного білка, який має бажані властивості. Таким чином, бібліотеки рекомбінантних полінуклеотидів утворюють із сукупності полінуклеотидів зі спорідненими послідовностями, які містять ділянки послідовностей, що мають значну ідентичність послідовностей та можуть бути піддані гомологічній рекомбінації в умовах *in vitro* або *in vivo*. Наприклад, використовуючи такий підхід, мотиви послідовностей, які кодують домен, що становить інтерес, можна піддати шафлінгу між пестицидним геном за даним винаходом та іншими відомими пестицидними генами з отриманням нових генів, які кодують білок з поліпшеною властивістю, що становить інтерес, такою як підвищена інсектицидна активність. Стратегії такого ДНК-шафлінгу відомі у даній галузі техніки. Див., наприклад, Stemmer (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-10751; Stemmer (1994) *Nature* 370:389-391; Cramer et al. (1997) *Nature Biotech.* 15:436-438; Moore et al. (1997) *J. Mol. Biol.* 272:336-347; Zhang et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4504-4509; Cramer et al. (1998) *Nature* 391:288-291; та патенти США №№ 5605793 і 5837458.

Перестановка або шафлінг доменів являє собою інший механізм для утворення змінених пестицидних білків. Домени можна піддати перестановці між пестицидними білками, що дає в результаті гібридні або химерні токсини з поліпшеними пестицидною активністю або спектром дії на цільові організми. Способи утворення рекомбінантних білків та їх тестування щодо пестицидної активності добре відомі у даній галузі техніки (див., наприклад, Naimov et al. (2001) *Appl. Environ. Microbiol.* 67:5328-5330; de Maagd et al. (1996) *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1537-1543; Ge et al. (1991) *J. Biol. Chem.* 266:17954-17958; Schnepf et al. (1990) *J. Biol. Chem.* 265:20923-20930; Rang et al. (1999) *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2918-2925).

#### Вектори

Пестицидну послідовність за даним винаходом можна забезпечити в експресійній касеті для експресії у рослині, яка становить інтерес. Під "експресійною касетою для рослини" мається на увазі ДНК-конструкт, здатний зумовлювати експресію білка з відкритої рамки зчитування у рослинній клітині. Він зазвичай містить промотор та послідовність, яка кодує. Такі конструкти також часто містять 3'-нетрансльовану ділянку. Такі конструкти можуть містити "сигнальну послідовність" або "лідерну послідовність", яка сприяє котрансляційному або посттрансляційному транспорту пептиду в певні внутрішньоклітинні структури, такі як хлоропласт (або інша пластида), ендоплазматичний ретикулум або апарат Гольджі.

Під "сигнальною послідовністю" мається на увазі послідовність, яка, як відомо або як припускають, зумовлює котрансляційний або посттрансляційний транспорт пептидів клітинною мембраною. В еукаріот він зазвичай включає секрецію в апарат Гольджі з певним глікозилюванням, яке відбувається у результаті. Інсектицидні токсини бактерій часто синтезуються як протоксини, які зазнають протеолітичної активації у кишці цільового шкідника (Chang (1987) *Methods Enzymol.* 153:507-516). У деяких варіантах здійснення даного винаходу сигнальна послідовність перебуває у нативній послідовності або може бути отримана з послідовності за даним винаходом. Під "лідерною послідовністю" мається на увазі будь-яка послідовність, яка під час трансляції дає у результаті амінокислотну послідовність, достатню для запуску котрансляційного транспорту пептидного ланцюга в субклітинну органелу. Таким чином, це поняття включає лідерні послідовності, які цілеспрямовано впливають на транспорт та/або глікозилювання шляхом проходження в ендоплазматичний ретикулум, проходження у вакуолі, пластиди, у тому числі хлоропласти, мітохондрії тощо.

Під "вектором для трансформації рослин" мається на увазі молекула ДНК, необхідна для ефективною трансформації рослинної клітини. Така молекула може складатися з однієї або декількох експресійних касет для рослин і може бути організованою у більш ніж одну "векторну" молекулу ДНК. Наприклад, бінарні вектори являють собою вектори для трансформації рослин, у яких використовуються два несуміжні ДНК-вектори, які кодують усі необхідні цис- та транс-діючі функції для трансформації рослинних клітин (Hellens and Mullineaux (2000) *Trends in Plant Science* 5:446-451). "Вектор" відноситься до конструкта нуклеїнової кислоти, призначеного для

перенесення між різними клітинами-хазяїнами. "Вектор експресії" стосується вектора, що має здатність до включення, інтеграції та експресії гетерологічних послідовностей ДНК або фрагментів у чужорідній клітині. Касета буде включати 5'- та 3'-регуляторні послідовності, функціонально пов'язані з послідовностями за даним винаходом. Під "функціонально пов'язаним" мається на увазі функціональний зв'язок між промотором і другою послідовністю, де промоторна послідовність ініціює та опосередковує транскрипцію послідовності ДНК, відповідної до другої послідовності. Зазвичай "функціонально пов'язаний" означає, що послідовності пов'язаних нуклеїнових кислот є суміжними, та, якщо є необхідність з'єднання двох ділянок, що кодують білок, вони є суміжними та перебувають в одній і тій самій рамці читування. Касета може додатково містити щонайменше один додатковий ген для котрансформації в організм. Альтернативно, додатковий ген (гени) можна забезпечувати в декількох експресійних касетах.

"Промотор" відноситься до послідовності нуклеїнової кислоти, що функціонує для керування транскрипцією послідовності, яка кодує, розташованої нижче. Промотор, а також інші послідовності нуклеїнових кислот, які регулюють транскрипцію і трансляцію (що також мають назву "контрольних послідовностей"), є необхідними для експресії послідовності ДНК, що становить інтерес.

Така експресійна касета забезпечується з багатьма сайтами рестрикції для вставки пестицидної послідовності, регуляцію транскрипції якої будуть здійснювати регуляторні ділянки.

Експресійна касета у напрямку транскрипції 5'-3' буде містити ділянку ініціації транскрипції і трансляції (тобто промотор), послідовність ДНК за даним винаходом та ділянку термінації транскрипції і трансляції (тобто ділянку термінації), що функціонують у рослинах. Промотор може бути нативним або аналогічним, або чужорідним або гетерологічним щодо рослини-хазяїна та/або послідовності ДНК за даним винаходом. Додатково, промотор може являти собою природну послідовність або, альтернативно, синтетичну послідовність. Якщо промотор є "нативним" або "гомологічним" щодо рослини-хазяїна, мається на увазі, що промотор трапляється у нативній рослині, у яку впроваджують промотор. Якщо промотор є "чужорідним" або "гетерологічним" щодо послідовності ДНК за даним винаходом, мається на увазі, що промотор не є нативним або таким, що трапляється у природі, промотором щодо функціонально пов'язаної послідовності ДНК за даним винаходом.

Ділянка термінації може бути нативною щодо ділянки ініціації транскрипції, може бути нативною щодо функціонально пов'язаної послідовності ДНК, що становить інтерес, може бути нативною щодо рослини-хазяїна або може походити з іншого джерела (тобто чужорідного або гетерологічного стосовно промотора, послідовності ДНК, що становить інтерес, рослини-хазяїна або будь-якої їх комбінації). Придатні ділянки термінації доступні з Ті-плазмиди *A. tumefaciens*, такі як ділянки термінації генів октопінсинтази та нопалінсинтази. Див. також Guerineau et al. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 262:141-144; Proudfoot (1991) *Cell* 64:671-674; Sanfacon et al. (1991) *Genes Dev.* 5:141-149; Mogen et al. (1990) *Plant Cell* 2:1261-1272; Munroe et al. (1990) *Gene* 91:151-158; Ballas et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:7891-7903; та Joshi et al. (1987) *Nucleic Acid Res.* 15:9627-9639.

У разі необхідності ген (гени) можна оптимізувати для експресії у трансформованій клітині-хазяїні на підвищеному рівні. Це означає, що гени можна синтезувати за допомогою кодонів, переважних для клітини-хазяїна, для поліпшення експресії або можна синтезувати за допомогою кодонів з частотою використання кодона, переважною для хазяїна. Вміст GC у гені зазвичай буде підвищеним. Див., наприклад, Campbell and Gowri (1990) *Plant Physiol.* 92:1-11 щодо обговорення частоти використання кодона, переважної для хазяїна. Способи синтезу генів, переважних для рослин, доступні у даній галузі техніки. Див., наприклад, патенти США №№ 5380831 та 5436391 та Murray et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:477-498, включені у даний документ за допомогою посилання.

В одному варіанті здійснення пестицидний білок націлений на хлоропласт для експресії. Таким чином, якщо пестицидний білок не є безпосередньо введеним у хлоропласт, то експресійна касета буде додатково містити нуклеїнову кислоту, яка кодує транзитний пептид для спрямування пестицидного білка у хлоропласти. Такі транзитні пептиди відомі у даній галузі техніки. Див., наприклад, Von Heijne et al. (1991) *Plant Mol. Biol. Rep.* 9:104-126; Clark et al. (1989) *J. Biol. Chem.* 264:17544-17550; Della-Cioppa et al. (1987) *Plant Physiol.* 84:965-968; Romer et al. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196:1414-1421; та Shah et al. (1986) *Science* 233:478-481.

Пестицидний ген, що підлягає націлюванню на хлоропласт, може бути оптимізованим для експресії у хлоропласті для підрахунку відмінностей у частоті використання кодона між рослинним ядром та цією органелою. Таким чином, нуклеїнові кислоти, які становлять інтерес,

можна синтезувати за допомогою кодонів, переважних для хлоропластів. Див., наприклад, патент США № 5380831, включений у даний документ за допомогою посилання.

#### Трансформація рослин

Способи за даним винаходом включають впровадження нуклеотидного конструкта у рослину. Під "впровадженням" мається на увазі представлення нуклеотидного конструкта рослині таким чином, що конструкт отримує доступ до внутрішньої частини клітини рослини. Способи за даним винаходом не вимагають того, щоб застосовували конкретний спосіб впровадження нуклеотидного конструкта в рослину, а тільки того, щоб нуклеотидний конструкт отримувач доступ до внутрішньої частини щонайменше однієї клітини рослини. Способи впровадження нуклеотидних конструктів у рослини відомі в даній галузі техніки, у тому числі, без обмеження, способи стабільної трансформації, способи транзійтної трансформації та способи, опосередковані вірусами.

Під "рослиною" маються на увазі цілі рослини, органи рослин (наприклад, листя, стебла, коріння тощо), насіння, рослинні клітини, пагони, зародки та їх потомство. Рослинні клітини можуть бути диференційованими або недиференційованими (наприклад, калюс, клітини суспензійної культури, протопласти, клітини листка, клітини кореня, клітини флоєми, пилки).

"Трансгенні рослини", або "трансформовані рослини", або "стабільно трансформовані" рослини, або клітини, або тканини відносяться до рослин, що мають включені або інтегровані послідовності екзогенних нуклеїнових кислот або фрагменти ДНК у рослинній клітині. Ці послідовності нуклеїнових кислот включають такі, що є екзогенними або не присутніми у нетрансформованій рослинній клітині, а також такі, які можуть бути ендегенними або присутніми у нетрансформованій рослинній клітині. "Гетерологічний", як правило, відноситься до послідовностей нуклеїнових кислот, які не є ендегенними щодо клітини або частини нативного генома, у якому вони присутні, і додаються в клітину шляхом інфікування, трансфекції, мікроін'єкції, електропорації, бомбардування мікрочастинками або т. ін.

Трансгенні рослини за даним винаходом експресують одну або декілька послідовностей пестициду, розкритих у даному документі. У різних варіантах здійснення трансгенна рослина додатково містить один або декілька додаткових генів стійкості до комах, наприклад, один або декілька додаткових генів для боротьби зі шкідниками, що є твердокрилими, лускокрилими комахами, клопами або нематодами. Фахівцеві у даній галузі буде зрозуміло, що трансгенна рослина може містити будь-який ген, який надає агрономічну ознаку, що становить інтерес.

Трансформацію рослинних клітин можна виконувати за допомогою однієї з декількох методик, відомих у даній галузі техніки. Пестицидний ген за даним винаходом можна модифікувати з отриманням або посиленням експресії у рослинних клітинах. Конструкт, який експресує такий білок, зазвичай буде містити промотор, який керує транскрипцією гена, а також 3'-нетрансльовану ділянку, яка забезпечує можливість термінації транскрипції та поліаденілювання. Організація таких конструктів добре відома у даній галузі техніки. У деяких випадках може бути корисним таке конструювання гена, що отримуваний у результаті пептид секретується або в інший спосіб націлюється в рослинній клітині. Наприклад, ген може бути сконструйований таким, що містить сигнальний пептид, який сприяє перенесенню пептиду в ендоплазматичний ретикулум. Також може бути переважним таке конструювання експресійної касети для рослини, яка містить інтрон, що для експресії потрібен процесинг мРНК стосовно інтрона.

Зазвичай цю "експресійну касету для рослини" будуть вставляти у "вектор для трансформації рослин". Цей вектор для трансформації рослин може містити один або декілька ДНК-векторів, необхідних для досягнення трансформації рослин. Наприклад, звичайною практикою у даній галузі техніки є використання векторів для трансформації рослин, які містять більше одного суміжного сегмента ДНК. Ці вектори у даній галузі техніки часто мають назву "бінарних векторів". Бінарні вектори, а також вектори з хелперними плазмідами найчастіше застосовують у трансформації, опосередкованій *Agrobacterium*, де розмір і складність сегментів ДНК, необхідних для досягнення ефективної трансформації, є досить великими, і переважним є розподіл функцій між окремими молекулами ДНК. Бінарні вектори зазвичай містять плазмідні вектори, які містять цис-діючі послідовності, необхідні для перенесення Т-ДНК (такі як ліва погранична та права погранична), селективний маркер, сконструйований здатним до експресії у рослинній клітині, і "ген, що становить інтерес" (ген, сконструйований здатним до експресії у рослинній клітині, створення трансгенних рослин за яким є бажаним). Також у цьому плазмідному векторі присутні послідовності, необхідні для реплікації у бактерій. Цис-діючі послідовності розташовуються таким чином, щоб забезпечити можливість ефективного перенесення у рослинні клітини та експресії в них. Наприклад, селективний маркерний ген і пестицидний ген розташовуються між лівою та правою границями. Часто другий плазмідний

вектор містить транс-діючі фактори, які опосередковують перенесення Т-ДНК з *Agrobacterium* у рослинні клітини. Ця плазміда часто містить фактори вірулентності (гени *Vir*), що забезпечують можливість інфікування рослинних клітин за допомогою *Agrobacterium* та перенесення ДНК шляхом розщеплення за пограничними послідовностями та *vir*-опосередкованого перенесення ДНК, як розуміють у даній галузі техніки (Hellens and Mullineaux (2000) *Trends in Plant Science* 5:446-451). Для трансформації рослин можна застосовувати декілька типів штамів *Agrobacterium* (наприклад, LBA4404, GV3101, EHA101, EHA105 тощо). Другий плазмідний вектор не є необхідним для трансформації рослин за допомогою інших способів, таких як бомбардування мікрочастинками, мікроін'єкція, електропорація, застосування поліетиленгліколю тощо.

У цілому, способи трансформації рослин включають перенесення гетерологічної ДНК у цільові рослинні клітини (наприклад, незрілі або зрілі зародки, суспензійні культури, недиференційований калюс, протопласти тощо) з наступним застосуванням відповідної селекції на максимальному граничному рівні (залежно від селективного маркерного гена) для виділення трансформованих рослинних клітин з групи нетрансформованих клітин у масі. Експлантати звичайно переносять у свіжоприготовлений запас того самого середовища та культивують згідно з стандартною методикою. Згодом трансформовані клітини диференціюються у паростки після поміщення у середовище для відновлення, доповнене селективним засобом на максимальному граничному рівні. Паростки потім переносять у селективне середовище для вкорінення для відновлення вкорінених паростків або проростків. З трансгенного проростка потім виростає зріла рослина та виробляє фертильне насіння (наприклад, Hiei et al. (1994) *The Plant Journal* 6:271-282; Ishida et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14:745-750). Експлантати зазвичай переносять у свіжоприготовлений запас того самого середовища та культивують згідно з стандартною методикою. Загальний опис методик і способів створення трансгенних рослин міститься в Ayres and Park (1994) *Critical Reviews in Plant Science* 13:219-239 та в Bommineni and Jauhar (1997) *Maydica* 42:107-120. Оскільки трансформований матеріал містить багато клітин, то у будь-якій ділянці цільових калюсу, або тканини, або групи клітин, що зазнають впливу, присутні як трансформовані, так і нетрансформовані клітини. Здатність до знищення нетрансформованих клітин та забезпечення можливості проліферації трансформованих клітин дає в результаті культури трансформованих рослин. Здатність до видалення нетрансформованих клітин часто обмежує швидке виділення трансформованих рослинних клітин і вдале створення трансгенних рослин.

Протоколи трансформації, а також протоколи впровадження нуклеотидних послідовностей у рослини можуть відрізнятися залежно від типу рослини або рослинної клітини, тобто однодольних або дводольних, призначених для трансформації. Створення трансгенних рослин можна здійснювати за допомогою одного з декількох способів, включаючи, без обмеження, мікроін'єкцію, електропорацію, пряме перенесення генів, впровадження гетерологічної ДНК за допомогою *Agrobacterium* у рослинні клітини (трансформація, опосередкована *Agrobacterium*), бомбардування рослинних клітин за допомогою гетерологічної чужорідної ДНК, що налипає на частинки, балістичне прискорення частинок, трансформацію за допомогою пучка аерозольних частинок (опублікована заявка на патент США № 20010026941; патент США № 4945050; міжнародна публікація № WO 91/00915; опублікована заявка на патент США № 2002015066), трансформацію за допомогою *Lec1* та різні інші способи прямого та опосередкованого перенесення ДНК без застосування частинок.

Способи трансформації хлоропластів добре відомі у даній галузі техніки. Див., наприклад, Svab et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:8526-8530; Svab and Maliga (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:913-917; Svab and Maliga (1993) *EMBO J.* 12:601-606. Спосіб базується на доставці ДНК, яка містить селективний маркер, за допомогою генної гармати та цілеспрямованому впливі ДНК на геном пластид за допомогою гомологічної рекомбінації. Додатково, трансформацію пластид можна виконувати шляхом трансактивації мовчазного пластидного трансгена за допомогою переважної для тканини експресії РНК-полімерази, кодованій у ядрі, яка спрямовується в пластиди. Про таку систему повідомлялося в McBride et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:7301-7305.

Після інтеграції гетерологічної чужорідної ДНК у рослинні клітини в середовищі можна застосовувати відповідну селекцію на максимальному граничному рівні для знищення нетрансформованих клітин та відокремлення і забезпечення проліферації передбачуваних трансформованих клітин, що вижили після цієї обробки за типом селекції, шляхом регулярного перенесення у свіжоприготовлене середовище. Шляхом безперервного пасивування та випробування за допомогою відповідної селекції ідентифікують клітини, трансформовані за допомогою плазмідного вектора, і забезпечують їх проліферацію. Потім можна застосовувати

молекулярні та біохімічні способи для підтвердження наявності інтегрованого гетерологічного гена, що становить інтерес, у геномі трансгенної рослини.

З трансформованих клітин можна вирощувати рослини відповідно до традиційних способів. Див., наприклад, McCormick et al. (1986) *Plant Cell Reports* 5:81-84. Ці рослини можна потім вирощувати та навіть запилювати тим самим трансформованим штамом або різними штамми, і можна ідентифікувати отриманий гібрид, що характеризується конститутивною експресією бажаної фенотипової характеристики. Можна вирощувати дві або більше генерації для гарантування стабільної підтримки та наслідування експресії бажаної фенотипової характеристики та потім збирати врожай насіння для гарантування досягнення бажаної фенотипової характеристики. Таким чином, даний винахід забезпечує трансформоване насіння (яке також має назву "трансгенного насіння"), яке має нуклеотидний конструкт за даним винаходом, наприклад, експресійну касету за даним винаходом, стабільно включений у його геном.

#### Оцінювання трансформації рослин

Після впровадження гетерологічної чужорідної ДНК у рослинні клітини трансформацію або інтеграцію гетерологічного гена у геном рослин підтверджують за допомогою різних способів, таких як аналіз нуклеїнових кислот, білків та метаболітів, асоційованих з інтегрованим геном.

ПЛР-аналіз є швидким способом скринінгу трансформованих клітин, тканин або паростків щодо наявності введеного в них гена на ранній стадії перед пересаджуванням у ґрунт (Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). ПЛР проводять за допомогою олігонуклеотидних праймерів, специфічних щодо гена, що становить інтерес, або вектора у середовищі *Agrobacterium*, тощо.

Трансформацію рослин можна підтвердити за допомогою Саузерн-блот-аналізу геномної ДНК (Sambrook and Russell, 2001, *supra*). У цілому, загальну ДНК екстрагують з трансформанту, розщеплюють за допомогою відповідних ферментів рестрикції, фракціонують в агарозному гелі та переносять на нітроцелюлозну або нейлонову мембрану. Мембрану або "блот" потім зондують за допомогою, наприклад, фрагмента цільової ДНК з радіоактивною міткою  $^{32}\text{P}$  для підтвердження інтеграції впровадженого гена в геном рослини згідно зі стандартними методиками (Sambrook and Russell, 2001, *supra*).

У нозерн-блот-аналізі РНК виділяють з конкретних тканин трансформанту, фракціонують в агарозному гелі, який містить формальдегід, та блотують на нейлоновому фільтрі згідно з стандартними процедурами, зазвичай застосовуваними у даній галузі техніки (Sambrook and Russell, 2001, *supra*). Експресію РНК, кодованої пестицидним геном, потім тестують шляхом гібридизації фільтра з радіоактивним зондом, отриманим з пестицидного гена, за допомогою способів, відомих у даній галузі техніки (Sambrook and Russell, 2001, *supra*).

Вестерн-блотинг, біохімічні аналізи й таке інше можна проводити на трансгенних рослинах для підтвердження наявності білка, кодованого пестицидним геном, за допомогою стандартних процедур (Sambrook and Russell, 2001, *supra*), застосовуючи антитіла, які зв'язуються з одним або декількома епітопами, присутніми у пестицидному білку.

#### Пестицидна активність у рослин

В іншому аспекті даного винаходу можна створити трансгенні рослини, у яких експресується пестицидний білок, що має пестицидну активність. Способи, описані вище як приклад, можна використовувати для створення трансгенних рослин, але те, яким чином створюють трансгенні рослинні клітини, не є критично важливим для даного винаходу. Способи, відомі або описані у даній галузі техніки, такі як трансформація, опосередкована *Agrobacterium*, біобалістична трансформація та способи, не опосередковані частинками, можна застосовувати за бажанням експериментатора. Рослини, у яких експресується пестицидний білок, можна виділяти за допомогою відомих способів, описаних у даній галузі техніки, наприклад, за допомогою трансформації калюсу, селекції трансформованого калюсу та регенерації фертильних рослин з такого трансгенного калюсу. У такому способі можна застосовувати будь-який ген як селективний маркер, оскільки його експресія в рослинних клітинах забезпечує можливість ідентифікації або селекції трансформованих клітин.

Для застосування у рослинних клітинах було розроблено низку маркерів, таких як маркери стійкості до хлорамфеніколу, аміноглікозиду G418, гігromіцину тощо. Інші гени, які кодуєть продукт, залучений до метаболізму у хлоропластах, також можна застосовувати як селективні маркери. Наприклад, гени, які забезпечують стійкість до гербіцидів для рослин, таких як гліфосат, бромоксиніл або імідазолінон, можуть знаходити особливе застосування. Про такі гени повідомлялося в Stalker et al. (1985) *J. Biol. Chem.* 263:6310-6314 (ген нітрилази, що забезпечує стійкість до бромоксинілу) та Sathasivan et al. (1990) *Nucl. Acids Res.* 18:2188 (ген



ANAS, що забезпечує стійкість до імідазолінону). Додатково, гени, розкриті у даному документі, є застосовними як маркери для оцінки трансформації бактеріальних або рослинних клітин. Способи виявлення наявності трансгена в рослинах, органах рослин (наприклад, у листі, стеблах, корінні тощо), насінні, рослинних клітинах, пагонах, зародках або їх потомстві добре відомі у даній галузі техніки. В одному варіанті здійснення наявності трансгена виявляють шляхом тестування щодо пестицидної активності.

Фертильні рослини, у яких експресується пестицидний білок, можна тестувати щодо пестицидної активності, а рослини, які показують оптимальну активність, відбирають для подальшої селекції. У даній галузі техніки доступні способи для проведення аналізу активності щодо шкідників. Як правило, білок змішують та застосовують в аналізах із згодовуванням. Див., наприклад, Marrone et al. (1985) J. of Economic Entomology 78:290-293.

Даний винахід можна застосовувати для трансформації будь-яких видів рослин, включаючи, без обмеження, однодольні та дводольні. Приклади рослин, що становлять інтерес, включають, без обмеження, кукурудзу (маїс), сорго, пшеницю, соняшник, томат, хрестоцвіті, види перцю, картоплю, бавовник, рис, сою, цукровий буряк, цукрову тростину, тютюн, ячмінь та олійний рапс, Brassica sp., люцерну, жито, просо, сафлор, земляний горіх, солодку картоплю, маніок, кавове дерево, кокосову пальму, ананас, цитрусові дерева, какао, чай, банан, авокадо, інжир, гуаяву, манго, маслину, папаю, кеш'ю, макадамію, мигдаль, овес, овочі, декоративні рослини і хвойні рослини.

Овочі включають, без обмеження, томат, латук, овочеву зеленостручкову квасолю, лімську квасолю, горох та представників роду Cuscutis, таких як огірок, канталупа та мускусна диня. Декоративні рослини включають, без обмеження, азалію, гортензію, гібіскус, троянду, тюльпан, жовтий нарцис, петунію, гвоздику, пуансетію та хризантему. Рослини за даним винаходом переважно є культурними рослинами (наприклад, маїс, сорго, пшениця, соняшник, томат, хрестоцвіті, види перцю, картопля, бавовник, рис, соя, цукровий буряк, цукрова тростина, тютюн, ячмінь, олійний рапс тощо).

Застосування у боротьбі за допомогою пестицидів

Загальні способи використання штамів, що містять нуклеотидну послідовність за даним винаходом або її варіант, у боротьбі за допомогою пестицидів або у конструюванні інших організмів як пестицидних засобів відомі у даній галузі техніки. Див., наприклад, патент США № 5039523 та EP 0480762A2.

Штами Bacillus, що містять нуклеотидну послідовність за даним винаходом або її варіант, або мікроорганізми, які містять пестицидний ген та білок як результат генної зміни, можна застосовувати у захисті сільськогосподарських культур та продуктів від шкідників. В одному аспекті даного винаходу цілі, тобто нелізовані, клітини організму, який виробляє токсин (пестицид), обробляють реагентами, що продовжують активність токсину, вироблюваного в клітині, у разі внесення клітини в середовище існування цільового шкідника (шкідників).

Альтернативно, пестицид виробляється за допомогою впровадження пестицидного гена в клітинного хазяїна. Експресія пестицидного гена прямо або непрямо зумовлює внутрішньоклітинне вироблення та підтримку рівня пестициду. В одному аспекті даного винаходу ці клітини потім обробляють в умовах, у яких продовжується активність токсину, вироблюваного в клітині, у разі внесення клітини в середовище існування цільового шкідника (шкідників). Отриманий продукт зберігає токсичність токсину. Ці пестициди, інкапсульовані природним чином, можна потім складати відповідно до традиційних методик для внесення у середовище існування, у якому перебуває цільовий шкідник, наприклад, у ґрунт, воду й листя рослин. Див., наприклад, EPA 0192319 та посилання, які наводяться там. Альтернативно, можна складати клітини, які експресують ген за даним винаходом, таким чином, щоб забезпечити можливість застосування отриманого матеріалу як пестициду.

Пестицидні композиції

Активні інгредієнти за даним винаходом зазвичай вносять у формі композицій, і їх можна вносити на посівну площу або рослину, що підлягають обробці, одночасно або послідовно з іншими сполуками. Ці сполуки можуть являти собою добрива, засоби боротьби з бур'янами, кріопротектори, поверхнево-активні речовини, мийні засоби, пестицидні мила, олії для внесення в період спокою, полімери та/або склади носіїв з уповільненим вивільненням або біорозкладані такі, які дозволяють здійснювати тривале дробове внесення на цільову площу після одноразового внесення складу. Вони також можуть являти собою селективні гербіциди, хімічні інсектициди, віруліциди, мікробіциди, амебіциди, пестициди, фунгіциди, бактеріциди, нематодіциди, молюскоциди або суміші деяких із цих препаратів, за бажання, разом з додатковими носіями, прийнятними у сільському господарстві, поверхнево-активними речовинами або допоміжними засобами, що стимулюють внесення, зазвичай

використовуваними в галузі отримання складів. Придатні носії та допоміжні засоби можуть бути твердими або рідкими та відповідати речовинам, звичайно використовуваним у технології отримання складів, наприклад, природним або регенерованим мінеральним речовинам, розчинникам, диспергувальним засобам, змочувальним засобам, речовинам для підвищення

5 клейкості, зв'язувальним речовинам або добривам. Подібним чином, склади можна отримати у формі їстівних "приманок" або надати їм вид "пасток" для шкідників, щоб дозволити згодовування цільовому шкіднику або поглинання таким пестицидного складу.

Способи застосування активного інгредієнта за даним винаходом або агрохімічної композиції за даним винаходом, яка містить щонайменше один пестицидний білок, вироблюваний бактеріальними штамами за даним винаходом, включають нанесення на листя,

10 дражирування насіння і внесення в ґрунт. Число внесень та норма внесення залежать від інтенсивності зараження відповідним шкідником.

Композицію можна скласти у формі порошку, пилоподібного препарату, пелети, гранули, розпорошеного розчину, емульсії, колоїдного розчину, істинного розчину або т. ін. і можна

15 отримати за допомогою таких традиційних способів, як висушування, ліофілізація, гомогенізація, екстракція, фільтрація, центрифугування, седиментація або концентрування культури клітин, що містять поліпептид. У всіх таких композиціях, які містять щонайменше один такий пестицидний поліпептид, поліпептид може бути присутнім у концентрації від приблизно 1 % до приблизно 99 % за масою.

Шкідників, що є лускокрилими, двокрилими комахами, клопами, нематодами або твердокрилими комахами, можна знищити, або їх чисельність на даній площі можна скоротити за допомогою способів за даним винаходом, або можна здійснювати профілактичне застосування цих способів щодо ділянки довкілля для попередження зараження сприйнятливим шкідником. Переважно, шкідник поглинає пестицидно ефективну кількість поліпептиду або

20 контактує з нею. Під "пестицидно ефективною кількістю" мається на увазі кількість пестициду, здатна викликати загибель щонайменше одного шкідника або значно послаблювати ріст, харчування або нормальний фізіологічний розвиток шкідників. Ця кількість буде варіювати залежно від таких чинників, як, наприклад, конкретні цільові шкідники, з якими слід боротися, конкретне середовище існування, місце розташування, рослина, сільськогосподарська культура

25 або сільськогосподарська ділянка, що підлягають обробці, умови довкілля та спосіб, норма, концентрація, стабільність і кількість внесень композиції пестицидно ефективного поліпептиду. Склади також можуть варіювати з урахуванням кліматичних умов, міркувань, пов'язаних із забрудненням довкілля, та/або частоти внесення, та/або тяжкості зараження шкідниками.

Розкриті пестицидні композиції можна отримувати шляхом складання або бактеріальної клітини, кристалічної суспензії та/або суспензії спор, або виділеного білкового компонента з бажаним носієм, прийнятним з точки зору сільського господарства. Композиції можна складати перед уведенням за допомогою відповідних способів, таких як ліофілізація, сублимаційне сушіння, висушування, або у водному носії, середовищі або придатному розріджувачі, такому як

35 сольовий розчин або інший буфер. Складені композиції можуть бути у формі пилоподібного або гранулярного матеріалу, або суспензії в олії (рослинній або мінеральній), або водної емульсії, або емульсії типу олія у воді, або у формі змочуваного порошку, або в комбінації з будь-яким іншим матеріалом-носієм, придатним для застосування у сільському господарстві. Придатні носії, застосовувані у сільському господарстві, можуть бути твердими або рідкими та добре відомі у даній галузі техніки. Вираз "носій, придатний у сільському господарстві" охоплює всі

40 допоміжні засоби, інертні компоненти, диспергувальні засоби, поверхнево-активні речовини, речовини для підвищення клейкості, зв'язувальні речовини тощо, зазвичай застосовувані у технології складання пестицидів; вони добре відомі фахівцям у галузі складання пестицидів. Склади можна змішувати з одним або декількома твердими або рідкими допоміжними засобами та отримувати за допомогою різних способів, наприклад, шляхом гомогенного змішування,

45 розмішування та/або подрібнювання пестицидної композиції з придатними допоміжними засобами за допомогою традиційних методик складання. Придатні склади та способи застосування описано у патенті США № 6468523, включеному у даний документ за допомогою посилання.

Рослини також можна обробляти за допомогою однієї або декількох хімічних композицій, у

55 тому числі одним або декількома гербіцидами, інсектицидами та фунгіцидами. Ілюстративні хімічні композиції включають: гербіциди для фруктів/овочів: атразин, бромацил, діурон, гліфосат, лінурон, метрибузин, симазин, трифлуралін, флуазифоп, глюфосинат, галосульфурон Gowan, паракват, пропізамід, сетоксидим, бутафенацил, галосульфурон, індазифлам; інсектициди для фруктів/овочів: альдикарб, *Bacillus thuriangiensis*, карбарил, карбофуран,

60 хлорпірифос, циперметрин, дельтаметрин, діазинон, малатіон, абамектин, цифлутрин/бета-

цифлутрин, есфенвалерат, лямбда-цигалотрин, ацеควіноцил, біфеназат, метоксифенозид, новалурон, хромафенозид, тіаклоприд, динотефуран, флуакрипірим, толфенпірад, клотіанідин, спіродиклофен, гамма-цигалотрин, спіромезифен, спіносад, ринаксіпір, ціазіпір, трифлумурон, спіротетрамат, імідаклоприд, флубендіамід, тіодикарб, метафлумізон, сульфоксафлор, 5 цифлуметофен, ціанопірафен, імідаклоприд, клотіанідин, тіаметоксам, спіноторам, тіодикарб, флонікамід, метіокарб, бензоат емаектину, індоксакарб, фозтіазат, фенаміфос, кадусафос, пірипроксифен, фенбутатиноксид, гекстіазокс, метоміл, 4-[[[(6-хлорпіридин-3-іл)метил](2,2-дифторетил)аміно]фуран-2(5H)-он; фунгіциди для фруктів/овочів: карбендазим, хлорталоніл, EBDC, сірку, тіофанат-метил, азоксистробін, цимоксаніл, флуазинам, фосетил, іпродіон, 10 крезоксим-метил, металаксил/мефеноксам, трифлуксистробін, етабоксам, іпровалікарб, трифлуксистробін, фенгексамід, фумарат окспоконазолу, ціазофамід, фенамідон, зоксамід, пікоксистробін, піраклостробін, цифлуфенамід, боскалід; гербіциди для злаків: ізопротурон, бромоксиніл, іоксиніл, феноксільні гербіциди, хлорсульфурон, клодинафоп, диклофоп, дифлуфенікан, феноксапроп, флорасулам, флуороксіпір, метсульфурон, тріасульфурон, 15 флукарбазон, іодсульфурон, пропоксикарбазон, піколінафен, мезосульфурон, бєфлубутамід, піноксаден, амідосульфурон, тифенсульфурон, трибенурон, флупірсульфурон, сульфосульфурон, пірасульфотол, піроксулам, флуфенацет, тралоксидим, піроксасульфоп; фунгіциди для злаків: карбендазим, хлорталоніл, азоксистробін, ципроконазол, ципродиніл, фенпропіморф, епоксиконазол, крезоксим-метил, квіноксифен, тебуконазол, трифлуксистробін, 20 симеконазол, пікоксистробін, піраклостробін, димоксистробін, протіоконазол, флуоксастробін; інсектициди для злаків: диметоат, лямбда-цигалотрин, дельтаметрин, альфа-циперметрин, β-цифлутрин, біфентрин, імідаклоприд, клотіанідин, тіаметоксам, тіаклоприд, ацетаміприд, динетофуран, хлорпірифос, метамідофос, оксидеметон-метил, піримікарб, метіокарб; гербіциди для маїсу: атразин, алахлор, бромоксиніл, ацетохлор, дикамба, клопіралід, (S-)диметенамід, 25 глюфосинат, гліфосат, ізоксафлютол, (S-)метолахлор, мезотріон, нікосульфурон, примісульфурон, римсульфурон, сулкотріон, форамсульфурон, топрамезон, темботріон, сафлуфенацил, тіенкарбазон, флуфенацет, піроксасульфоп; інсектициди для маїсу: карбофуран, хлорпірифос, біфентрин, фіпроніл, імідаклоприд, лямбда-цигалотрин, тефлутрин, тербуфос, тіаметоксам, клотіанідин, спіромезифен, флубендіамід, трифлумурон, ринаксіпір, 30 дельтаметрин, тіодикарб, β-цифлутрин, циперметрин, біфентрин, люфенурон, трифлуморон, тефлутрин, тебупірімфос, етипрол, ціазіпір, тіаклоприд, ацетаміприд, динетофуран, авермектин, метіокарб, спіродиклофен, спіротетрамат; фунгіциди для маїсу: фенітропан, тирам, протіоконазол, тебуконазол, трифлуксистробін; гербіциди для рису: бутахлор, пропаніл, азимсульфурон, бенсульфурон, цигалофоп, даїмурон, фентразамід, імазосульфурон, 35 мефенацет, оксазикломефон, піразосульфурон, пірибутикарб, квінклорак, тіобенкарб, інданофан, флуфенацет, фентразамід, галосульфурон, оксазикломефон, бензобіциклон, пірифталід, пеноксулам, біспірибак, оксадіаргіл, етоксисульфурон, претілахлор, мезотріон, тефурилтріон, оксадіазон, феноксапроп, піримісульфоп; інсектициди для рису: діазінон, фенітротіон, фенобукарб, монокротофос, бенфуракарб, бупрофезин, динотефуран, фіпроніл, 40 імідаклоприд, ізопрокарб, тіаклоприд, хромафенозид, тіаклоприд, дінотефуран, клотіанідин, етипрол, флубендіамід, ринаксіпір, дельтаметрин, ацетаміприд, тіаметоксам, ціазіпір, спіносад, спіноторам, бензоат емаектину, циперметрин, хлорпірифос, картап, метамідофос, етофенпрокс, триазофос, 4-[[[(6-хлорпіридин-3-іл)метил](2,2-дифторетил)аміно]фуран-2(5H)-он, карбофуран, бенфуракарб; фунгіциди для рису: тіофанат-метил, азоксистробін, карпропамід, 45 едифенфос, феримзон, іпробенфос, ізопротіолан, пенцикурон, пробеназол, піроквілон, трициклазол, трифлуксистробін, диклоцимет, феноксаніл, симеконазол, тіадиніл; гербіциди для бавовнику: діурон, флуометурон, MSMA, оксифлуорфен, прометрин, трифлуралін, карфентразон, клетодим, флуазифоп-бутил, гліфосат, норфлуразон, пендиметалін, піритіобак-натрій, трифлуксисульфурон, тепралоксидим, глюфосинат, флуміоксазин, тидіазурон; 50 інсектициди для бавовнику: ацефат, альдикарб, хлорпірифос, циперметрин, дельтаметрин, малатіон, монокротофос, абамектин, ацетаміприд, бензоат емаектину, імідаклоприд, індоксакарб, лямбда-цигалотрин, спіносад, тіодикарб, гамма-цигалотрин, спіромезифен, піридаліл, флонікамід, флубендіамід, трифлумурон, ринаксіпір, бета-цифлутрин, спіротетрамат, клотіанідин, тіаметоксам, тіаклоприд, динетофуран, флубендіамід, ціазіпір, 55 спіносад, спіноторам, гамма-цигалотрин, 4-[[[(6-хлорпіридин-3-іл)метил](2,2-дифторетил)аміно]фуран-2(5H)-он, тіодикарб, авермектин, флонікамід, піридаліл, спіромезифен, сульфоксафлор, профенофос, триазофос, ендосульфоп; фунгіциди для бавовнику: етридіазол, металаксил, квінтозен; гербіциди для сої: алахлор, бентазон, трифлуралін, хлоримурон-етил, клорансулам-метил, феноксапроп, фомесафен, флуазифоп, 60 гліфосат, імазамокс, імазаквін, імазетапір, (S-)метолахлор, метрибузин, пендиметалін,

тепралоксидим, глюфосинат; інсектициди для сої: лямбда-цигалотрин, метоміл, паратіон, тіокарб, імідаклоприд, клотіанідин, тіаметоксам, тіаклоприд, ацетаміприд, динетофуран, флубендіамід, ринаксипір, ціазипір, спіносад, спіноторам, бензоат емабектину, фіпроніл, етипрол, дельтаметрин, β-цифлутрин, гамма- та лямбда-цигалотрин, 4-[[[(6-хлорпіридин-3-іл)метил](2,2-дифторетил)аміно]фуран-2(5H)-он, спіротетрамат, спінодиклофен, трифлумурон, флонікамід, тіодикарб, бета-цифлутрин; фунгіциди для сої: азоксистробін, ципроконазол, епоксиконазол, флутриафол, піраклостробін, тебуконазол, трифлуксистробін, протіоконазол, тетраконазол; гербіциди для цукрового буряка: хлоридазон, десмедифам, етофумезат, фенмедифам, триаллат, клопіралід, флуазифоп, ленацил, метамітрон, квінмерак, циклоксидим, трифлусульфурон, теprалоксидим, квізалофоп; інсектициди для цукрового буряка: імідаклоприд, клотіанідин, тіаметоксам, тіаклоприд, ацетаміприд, динетофуран, дельтаметрин, β-цифлутрин, гамма/лямбда-цигалотрин, 4-[[[(6-хлорпіридин-3-іл)метил](2,2-дифторетил)аміно]фуран-2(5H)-он, тефлутрин, ринаксипір, ціаксипір, фіпроніл, карбофуран; гербіциди для канолі: клопіралід, диклофоп, флуазифоп, глюфосинат, гліфосат, метазахлор, трифлуралін, етаметсульфурон, квінмерак, квізалофоп, клетодим, теprалоксидим; фунгіциди для канолі: азоксистробін, карбендазим, флудіоксоніл, іпродіон, прохлораз, вінклозолін; інсектициди для канолі: карбофуран, фосфорорганічні сполуки, піретроїди, тіаклоприд, дельтаметрин, імідаклоприд, клотіанідин, тіаметоксам, ацетаміприд, динетофуран, β-цифлутрин, гамма- і лямбда-цигалотрин, тау-флювалінат, етипрол, спіносад, спіноторам, флубендіамід, ринаксипір, ціазипір, 4-[[[(6-хлорпіридин-3-іл)метил](2,2-дифторетил)аміно]фуран-2(5H)-он.

"Шкідник" включає, без обмеження, комах, гриби, бактерії, нематод, кліщиків, іксодових кліщів тощо. Комахи-шкідники включають комах, обраних з рядів Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Mallophaga, Homoptera, Hemiptera, Orthoptera, Thysanoptera, Dermaptera, Isoptera, Anoplura, Siphonaptera, Trichoptera тощо, зокрема, Coleoptera, Lepidoptera та Diptera.

Ряд Coleoptera включає підряди Adephaga та Polyphaga. Підряд Adephaga включає надродина Caraboidea та Gyrinoidea, а підряд Polyphaga включає надродина Hydrophiloidea, Staphylinoidea, Cantharoidea, Cleroidea, Elateroidea, Dascilloidea, Dryopoidea, Byrrhoidea, Cucujoidea, Meloidea, Mordelloidea, Tenebrionoidea, Bostrichoidea, Scarabaeoidea, Cerambycoidea, Chrysomeloidea та Curculionoidea. Надродина Caraboidea включає родини Cicindelidae, Carabidae та Dytiscidae. Надродина Gyrinoidea включає родину Gyrinidae. Надродина Hydrophiloidea включає родину Hydrophilidae. Надродина Staphylinoidea включає родини Silphidae та Staphylinidae. Надродина Cantharoidea включає родини Cantharidae та Lampyridae. Надродина Cleroidea включає родини Cleridae та Dermestidae. Надродина Elateroidea включає родини Elateridae та Buprestidae. Надродина Cucujoidea включає родину Coccinellidae. Надродина Meloidea включає родину Meloidea. Надродина Tenebrionoidea включає родину Tenebrionidae. Надродина Scarabaeoidea включає родини Passalidae та Scarabaeidae. Надродина Cerambycoidea включає родину Cerambycidae. Надродина Chrysomeloidea включає родину Chrysomelidae. Надродина Curculionoidea включає родини Curculionidae та Scolytidae.

Ряд Diptera включає підряди Nematocera, Brachycera та Cyclorrhapha. Підряд Nematocera включає родини Tipulidae, Psychodidae, Culicidae, Ceratopogonidae, Chironomidae, Simuliidae, Bibionidae та Cecidomyiidae. Підряд Brachycera включає родини Stratiomyidae, Tabanidae, Therevidae, Asilidae, Mydidae, Bombyliidae та Dolichopodidae. Підряд Cyclorrhapha включає секції Aschiza та Aschiza. Секція Aschiza включає родини Phoridae, Syrphidae та Conopidae. Секція Aschiza включає підсекції Acalyptratae та Calyptratae. Підсекція Acalyptratae включає родини Otitidae, Tephritidae, Agromyzidae та Drosophilidae. Підсекція Calyptratae включає родини Hippoboscidae, Oestridae, Tachinidae, Anthomyiidae, Muscidae, Calliphoridae та Sarcophagidae.

Ряд Lepidoptera включає родини Papilionidae, Pieridae, Lycaenidae, Nymphalidae, Danaidae, Satyridae, Hesperidae, Sphingidae, Saturniidae, Geometridae, Arctiidae, Noctuidae, Lymantriidae, Sesiidae та Tineidae.

Комахи-шкідники за даним винаходом, які пошкоджують основні сільськогосподарські культури, включають: маїс: *Ostrinia nubilalis*, кукурудзяного метелика; *Agrotis ipsilon*, совку-іпсилон; *Helicoverpa zea*, кукурудзяну совку; *Spodoptera frugiperda*, кукурудзяну листяну совку; *Diatraea grandiosella*, південно-західну кукурудзяну вогнівку; *Elasmopalpus lignosellus*, кукурудзяну стеблову вогнівку; *Diatraea saccharalis*, стеблового точильника цукрової тростини; *Diabrotica virgifera*, західного кукурудзяного жука; *Diabrotica longicornis barberi*, північного кукурудзяного жука; *Diabrotica undecimpunctata howardi*, південного кукурудзяного жука; *Melanotus* spp., дротяників; дупляка *Cyclocephala borealis* (личинку хруща); дупляка *Cyclocephala immaculata* (личинку хруща); *Popillia japonica*, японського жука; *Chaetocnema pulicaria*, земляну

блішку; *Sphenophorus maidis*, кукурудзяного довгоносика; *Rhopalosiphum maidis*, соргову попелицю; *Anuraphis maidiradicis*, кукурудзяну кореневу попелицю; *Blissus leucopterus leucopterus*, північноамериканського пшеничного клопа-черепашку; *Melanoplus femurrubrum*, червононого кобилку; *Melanoplus sanguinipes*, перелітну кобилку; *Hylemya platura*, паросткову муху; *Agromyza parvicornis*, кукурудзяну мінуучу муху; *Anaphothrips obscurus*, злакового трипса; *Solenopsis molesta*, мурашку-злодія; *Tetranychus urticae*, звичайного павутинного кліща; сорго: вогнівку-трав'янку *Chilo partellus*, *Spodoptera frugiperda*, кукурудзяну листяну совку; *Helicoverpa zea*, кукурудзяну совку; *Elasmopalpus lignosellus*, кукурудзяну стеблову вогнівку; совку *Feltia subterranea*; *Phyllophaga crinita*, личинку хруща; *Eleodes*, *Conoderus* та *Aeolus* spp., дротяників; *Oulema melanopus*, червоногруду п'явицю; *Chaetocnema pulicaria*, земляну білішку; *Sphenophorus maidis*, кукурудзяного довгоносика; *Rhopalosiphum maidis*, соргову попелицю; *Sipha flava*, жовту попелицю цукрової тростини; *Blissus leucopterus leucopterus*, північноамериканського пшеничного клопа-черепашку; *Contarinia sorghicola*, соргову галицю; *Tetranychus cinnabarinus*, червоного павутинного кліща; *Tetranychus urticae*, звичайного павутинного кліща; пшениця: *Pseudaletia unipunctata*, лугову совку; *Spodoptera frugiperda*, кукурудзяну листяну совку; *Elasmopalpus lignosellus*, малого стеблового точильника кукурудзи; *Agrotis orthogonia*, личинку західної озимої совки; *Elasmopalpus lignosellus*, малого стеблового точильника кукурудзи; *Oulema melanopus*, червоногруду п'явицю; *Hypera punctata*, листового бобового довгоносика; *Diabrotica undecimpunctata howardi*, південного кукурудзяного жука; російську пшеничну попелицю; *Schizaphis graminum*, звичайну злакову попелицю; *Macrosiphum avenae*, велику злакову попелицю; *Melanoplus femurrubrum*, червононого кобилку; *Melanoplus differentialis*, відмітну кобилку; *Melanoplus sanguinipes*, перелітну кобилку; *Mayetiola destructor*, гесенську муху; *Sitodiplosis mosellana*, помаранчевого злакового комарика; *Meromyza americana*, личинку американської меромізи; *Hylemya coarctata*, озиму муху; *Frankliniella fusca*, тютюнового трипса; *Cephus cinctus*, американського пшеничного пильщика; *Aceria tulipae*, кореневого цибулевого кліща; соняшник: *Suleima helianthana*, соняшникову брунькову листокрутку; *Homoeosoma electellum*, соняшникову вогнівку; *Zygogramma exclamationis*, соняшникову окличну совку; *Bothyrus gibbosus*, морквяного жука; *Neolasioptera murtfeldiana*, соняшникову галицю; бавовник: *Heliothis virescens*, бавовникову совку; *Helicoverpa zea*, бавовникового коробочкового черв'яка; *Spodoptera exigua*, наземну малу совку; *Pectinophora gossypiella*, бавовняну міль; *Anthonomus grandis*, бавовняного довгоносика; *Aphis gossypii*, баштанну попелицю; *Pseudatomoscelis seriatus*, блошицю бавовни; *Trialeurodes abutilonea*, облямовану білокрилку; *Lygus lineolaris*, польового клопа; *Melanoplus femurrubrum*, червононого кобилку; *Melanoplus differentialis*, відмітну кобилку; *Thrips tabaci*, цибулевого трипса; *Frankliniella fusca*, тютюнового трипса; *Tetranychus cinnabarinus*, червоного павутинного кліща; *Tetranychus urticae*, звичайного павутинного кліща; рис: *Diatraea saccharalis*, стеблового точильника цукрової тростини; *Spodoptera frugiperda*, кукурудзяну листяну совку; *Helicoverpa zea*, кукурудзяну совку; *Colaspis brunnea*, виноградного коласника; *Lissorhoptus oryzophilus*, рисового водяного довгоносика; *Sitophilus oryzae*, рисового довгоносика; *Nephotettix nigropictus*, рисову цикадку; *Blissus leucopterus leucopterus*, північноамериканського пшеничного клопа-черепашку; *Acrosternum hilare*, звичайного щитника; соя: *Pseudoplusia includens*, соєву совку; гусінь совки *Anticarsia gemmatilis*; вусатку *Plathypena scabra*; *Ostrinia nubilalis*, кукурудзяного метелика; *Agrotis ipsilon*, совку-іпсилон; *Spodoptera exigua*, наземну малу совку; *Heliothis virescens*, бавовникову совку; *Helicoverpa zea*, бавовникового коробочкового черв'яка; *Epilachna varivestis*, мексиканську бобову зернівку; *Myzus persicae*, персикову попелицю; *Empoasca fabae*, картопляну цикадку; *Acrosternum hilare*, звичайного щитника; *Melanoplus femurrubrum*, червононого кобилку; *Melanoplus differentialis*, відмітну кобилку; *Hylemya platura*, паросткову муху; *Sericothrips variabilis*, соєвого трипса; *Thrips tabaci*, цибулевого трипса; *Tetranychus turkestani*, суничного кліща; *Tetranychus urticae*, звичайного павутинного кліща; ячмінь: *Ostrinia nubilalis*, кукурудзяного метелика; *Agrotis ipsilon*, совку-іпсилон; *Schizaphis graminum*, звичайну злакову попелицю; *Blissus leucopterus leucopterus*, північноамериканського пшеничного клопа-черепашку; *Acrosternum hilare*, звичайного щитника; *Euschistus servus*, коричневого щитника; *Delia platura*, паросткову муху; *Mayetiola destructor*, гесенську муху; *Petrobia latens*, коричневого пшеничного кліща; олійний рапс: *Brevicoryne brassicae*, капустиану попелицю; *Phyllotreta cruciferae*, звичайну хрестоцвіту білішку; *Mamestra configurata*, совку латукову; *Plutella xylostella*, капустиану міль; *Delia* spp., личинки кореневих мух.

Нематоди включають паразитичних нематод, таких як бульбочкові, цистоутворювальні та проникаючі нематоди, у том числі *Heterodera* spp., *Meloidogyne* spp. та *Globodera* spp.; зокрема, представників цистоутворювальних нематод, включаючи, без обмеження, *Heterodera glycines* (соєва цистоутворювальна нематода); *Heterodera schachtii* (бурякова цистоутворювальна

нематода); *Heterodera avenae* (злакова цистоутворювальна нематода) та *Globodera rostochiensis* і *Globodera pallida* (картопляні цистоутворювальні нематоди). Проникаючі нематоди включають *Pratylenchus* spp.

Способи збільшення врожайності рослин

Забезпечуються способи збільшення врожайності рослин. Способи включають забезпечення рослини або рослинної клітини, у яких відбувається експресія полінуклеотиду, який кодує послідовність пестицидного поліпептиду, розкриту в даному документі, та вирощування рослини або її насінини у полі, зараженому шкідником, пестицидну активність проти якого має зазначений поліпептид. У деяких варіантах здійснення поліпептид має пестицидну активність проти шкідника, що є лускокрилою, твердокрилою, двокрилою, напівтвердокрилою комахою або нематодою, і зазначене поле заражене шкідником, що є лускокрилою, напівтвердокрилою, твердокрилою, двокрилою комахою або нематодою.

Як визначено у даному документі, "врожайність" рослини відноситься до якості та/або кількості біомаси, що виробляється рослиною. Під "біомасою" мається на увазі будь-який вимірюваний продукт рослин. Збільшення виробництва біомаси являє собою будь-яке поліпшення врожаю вимірюваного продукту рослини. Збільшення врожайності рослин має кілька шляхів комерційного застосування. Наприклад, збільшення біомаси листя рослин може збільшувати врожай листових овочів, споживаних людиною або тваринами. Додатково, збільшення біомаси листя можна застосовувати для збільшення виробництва рослинних фармацевтичних або промислових продуктів. Збільшення врожайності може включати будь-яке статистично значуще збільшення, у тому числі, без обмеження, збільшення щонайменше на 1 %, збільшення щонайменше на 3 %, збільшення щонайменше на 5 %, збільшення щонайменше на 10 %, збільшення щонайменше на 20 %, щонайменше на 30 %, щонайменше на 50 %, щонайменше на 70 %, щонайменше на 100 % або більше збільшення врожайності порівняно з такою рослиною, у якій не відбувається експресія пестицидної послідовності.

У конкретних способах врожайність рослини збільшується як результат поліпшення стійкості рослини, у якій відбувається експресія пестицидного білка, розкритого у даному документі, до шкідників. Експресія пестицидного білка зумовлює послаблення здатності шкідника до зараження або харчування рослиною, що, таким чином, поліпшує врожайність рослини.

Наступні приклади пропонуються як ілюстрація, а не як обмеження.

#### ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

##### Приклад 1. Мутагенез N-кінцевої частини Axmi205

Axmi205 являє собою токсин, активний стосовно личинки західного кукурудзяного жука (WCRW) (див. патентну публікацію США № 20110023184, включену у даний документ за допомогою посилання у всій своїй повноті). Нуклеотидна послідовність для Axmi205 наведена під SEQ ID №:1. Амінокислотна послідовність Axmi205 наведена під SEQ ID №:2.

Тривимірне моделювання та вирівнювання послідовностей показують, що N-кінцева половина Axmi205 є гомологічною пороутворювальним доменам перфоринів. С-кінцева половина Axmi205 не виявляє гомології, і її функція невідома. Інші білкові ендотоксини, що є активними щодо комах, містять пороутворювальний домен та рецептор-зв'язувальний домен. Можливо, що С-кінцева половина Axmi205 залучена в націлювання Axmi205 на місця розташування в WCRW, де відбувається пороутворення.

Бібліотеку точкових мутацій, що зачіпає 30 положень у С-кінцевій частині Axmi205, створювали за допомогою набору для полегшеного мутагенезу QUIKCHANGE® (Stratagene). Плазмідну рAX7011, що кодує нативний Axmi205 в рRSF1b, піддавали мутагенезу. Бібліотека мала загальну складність, що становила 506.

Об'єднаних мутантів, а також рAX7011, вводили в клітини BL21\*DE3 шляхом трансформації та висівали на середовище Лурія-Бертані + канаміцин (100 мкг/мл). Свіжоотримані колонії збирали в 8 мл рідкого середовища LB + канаміцин (100 мкг/мл) та вирощували в блоках з 24 глибокими лунками при 37 градусах С та 300 об./хв. до досягнення OD при 600 нм, що становила 0,3. Додавали IPTG до кінцевої концентрації 0,5 мМ, і культури інкубували протягом додаткових 18 годин при 20 градусах С. Визначали OD при 600 нм, і клітини збирали за допомогою центрифугування (10 хвилин при 4000 об./хв., 4 градуси С). Клітинні осадки ресуспендували в 20 мМ Tris/HCl, pH 7,4, 150 мМ NaCl, 1 мМ DTT за щільності 20 OD600/мл. Клітини руйнували шляхом розмелювання за допомогою гранул, і після центрифугування при 4500 об./хв. протягом 15 хвилин при 4 градусах С отримували розчинні екстракти.

Екстракти аналізували щодо активності проти WCRW у чотирьох повторях на варіант. Через 5 і 6 днів визначали показник токсичності для кореневого черв'яка шляхом усереднювання показників від чотирьох повторностей. Під час цього первинного скринінгу одну тисячу сто тридцять дев'ять варіантів піддавали скринінгу, що давало 2,2х охоплення бібліотеки. Варіанти

- з вищими показниками, ніж в Axmi205 дикого типу, секвенували та повторно аналізували. Потім здійснювали масштабні аналізи для ранжування мутантів стосовно до Axmi205 та Axmi205(evo25) дикого типу (патентна публікація США № 20110023184 та наведена у даному документі SEQ ID №:3). Дані масштабного аналізу показано в таблицях 1 і 2 для кращих варіантів, показники яких переважали над такими Axmi205 дикого типу у первинному аналізі, повторному аналізі та обох масштабних аналізах.

Таблиця 1

|                               | Середній % смертності WCRW | Середньоквадратичне відхилення |
|-------------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| Axmi205                       | 16,35                      | 12,60                          |
| Axmi205(evo25)                | 20,20                      | 12,17                          |
| Axmi205(evo30)                | 23,05                      | 4,61                           |
| Axmi205 PMlib1 Pool 1G2_p2a11 | 19,56                      | 9,47                           |
| Axmi205 PMlib1 Pool 1G2_p1c1  | 18,36                      | 7,09                           |
| Axmi205 PMlib1 Pool 1G2_p1a4  | 17,97                      | 11,42                          |

- Варіант Axmi205(evo30) демонстрував поліпшену активність порівняно з такою Axmi205(evo25). Він несе мутацію V467L. Нуклеотидна послідовність, що кодує Axmi205(evo30), наведена під SEQ ID №:4. Амінокислотна послідовність наведена під SEQ ID №:7. Наступними найактивнішими варіантами є Axmi205 PMlib1 Pool 1G2\_p2a11 (мутація S468L; SEQ ID №:10), Axmi205 PMlib1 Pool 1G2\_p1c1 (мутація V467T; SEQ ID №:11) та Axmi205 PMlib1 Pool 1G2\_p1a4 (мутація R464N; SEQ ID №:12). При тому, що мутагенезу зазнали 30 положень, поліпшені варіанти несли мутації, які утворюють кластер з Axmi205(evo25) (мутація V467A). Ці результати дозволяють припустити, що положення 467 та 468 пов'язані з поліпшеною активністю в Axmi205.

Приклад 2. Випадковий мутагенез Axmi205

Цілий ген:

- Здійснювали випадковий ПЛР-мутагенез усього білка Axmi205. Одну тисячу сто шістдесят шість варіантів аналізували на рівні чотирьох повторностей, повторно аналізували та піддавали масштабному аналізу для ідентифікації того, що варіант Axmi205(evo35) має поліпшені властивості (таблиця 2). Нуклеотидна послідовність, що кодує Axmi205(evo35), наведена під SEQ ID №:6. Амінокислотна послідовність наведена під SEQ ID №:9.

Приклад 3. Мутагенез С-кінцевої частини Axmi205

- Відомо, що у N-кінцевому пороутворювальному домені токсинів типу перфоруни кілька альфа-спіралей взаємодіють із мембраною цільових організмів. Ці спіралі перебудовуються з утворенням трансмембранного каналу токсинів типу перфоруни. Ці спіралі піддавали спрямованому мутагенезу. Мутагенезу піддавали тридцять дев'ять положень із загальною різноманітністю, що становила 648. Одну тисячу п'ятдесят п'ять варіантів піддавали скринінгу, 116 попадань аналізували повторно, і 34 попадання піддавали масштабному аналізу. Серед цих варіантів Axmi205(evo34) був найактивнішим варіантом (таблиця 2) і демонстрував поліпшену експресію порівняно з експресією Axmi205wt. Нуклеотидна послідовність, що кодує Axmi205(evo34), наведена під SEQ ID №:5. Амінокислотна послідовність наведена під SEQ ID №:8.

Таблиця 2

|                              | SEQ ID № нуклеотидної послідовності | SEQ ID № амінокислотної послідовності | Середній показник зупинки росту WCRW | Середня смертність WCRW (%) |
|------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|
| Axmi205wt                    | 1                                   | 2                                     | 0,33                                 | 11,28                       |
| Axmi205(evo30)               | 4                                   | 7                                     | 0,56                                 | 18,17                       |
| Axmi205(evo34)               | 5                                   | 8                                     | 0,94                                 | 19,46                       |
| Axmi205(evo35)               | 6                                   | 9                                     | 0,75                                 | 20,19                       |
| pRSF1b (негативний контроль) | --                                  | --                                    | 0,13                                 | 0,00                        |

Приклад 4. Додаткові аналізи пестицидної активності

Нуклеотидні послідовності за даним винаходом можна тестувати щодо їх здатності виробляти пестицидні білки. Здатність пестицидного білка діяти на шкідника як пестицид часто оцінюється за допомогою ряду способів. Одним способом, добре відомим у даній галузі техніки, є здійснення аналізу із згодовуванням. У такому аналізі із згодовуванням шкідника піддають впливу зразка, який містить сполуки, що підлягають тестуванню, або контрольні зразки. Часто його здійснюють шляхом поміщення матеріалу, що підлягає тестуванню, або такого матеріалу в придатному розведенні на матеріал, який буде поглинений шкідником, такий як штучне поживне середовище. Матеріал, що підлягає тестуванню, може складатися з рідини, твердої речовини або кашки. Матеріал, що підлягає тестуванню, можна помістити на поверхню, а потім дозволити йому висохнути. Альтернативно, матеріал, що підлягає тестуванню, можна змішати з розплавленим поживним середовищем і потім розподілити в камеру для аналізу. Камера для аналізу може, наприклад, являти собою склянку, чашку або лунку титраційного мікропланшета.

Аналізи щодо сисних шкідників (наприклад, попелиць) можуть включати відокремлення тестованого матеріалу від комахи частинами, в ідеальному варіанті порціями, які може проколоти сисний ротовий апарат сисної комахи, щоб забезпечити можливість поглинання тестованого матеріалу. Часто матеріал, що тестується, змішують зі стимулятором харчування, таким як сахароза, для стимуляції поглинання тестованої сполуки.

Інші типи аналізів можуть включати мікроін'єкцію тестованого матеріалу в рот або кишку шкідника, а також розвиток трансгенних рослин з наступним тестуванням здатності шкідника до харчування трансгенною рослиною. Тестування рослин може включати ізолювання зазвичай споживаних частин рослини, наприклад, за допомогою невеликих кошиків, що прикріплюються до листка, або ізолювання цілих рослин у кошиках, що містять комах.

Інші способи та підходи для оцінки шкідників відомі у даній галузі техніки і містяться, наприклад, у Robertson and Preisler, eds. (1992) *Pesticide bioassays with arthropods*, CRC, Boca Raton, FL. Альтернативно, аналізи у загальному вигляді описано в журналах *Arthropod Management Tests* та *Journal of Economic Entomology* або шляхом обговорення з членами Ентомологічного товариства Америки (ESA).

Приклад 5. Перенос генів за допомогою вектора для експресії у рослинах

Кодуючі ділянки за даним винаходом з'єднують із відповідними промоторними та термінаторними послідовностями для експресії у рослинах. Такі послідовності добре відомі у даній галузі техніки та можуть містити промотор гена актину рису або промотор гена убіквітину маїсу для експресії в однодольних рослинах, промотор UBQ3 *Arabidopsis* або промотор 35S CaMV для експресії у дводольних рослинах та термінатори nos або PinII. Методики отримання та підтвердження конструктів промотор – ген – термінатор також добре відомі у даній галузі техніки.

В одному аспекті даного винаходу розробляють і створюють синтетичні послідовності ДНК. Ці синтетичні послідовності є зміненими нуклеотидними послідовностями порівняно з вихідною послідовністю, але кодують білки, які є практично ідентичними щодо вихідного білка (наприклад, SEQ ID №:7-12).

В іншому аспекті даного винаходу модифіковані варіанти синтетичних генів розробляють таким чином, що отримуваний у результаті пептид націлюється на рослинні органели, такі як ендоплазматичний ретикулум та апопласт. Послідовності пептидів, про які відомо, що вони обумовлюють націлювання білків злиття на рослинні органели, відомі в даній галузі техніки. Наприклад, у даній галузі техніки відомо, що N-кінцева ділянка гена кислої фосфатази білого люпину *Lupinus albus* (GENBANK® ID GI:14276838, Miller et al. (2001) *Plant Physiology* 127: 594-606) обумовлює націлювання гетерологічних білків на ендоплазматичний ретикулум. Якщо отриманий білок злиття також містить послідовність, відповідальну за утримання в ендоплазматичному ретикулумі, яка містить пептид N-кінець-лізин-аспарагінова кислота-глутамінова кислота-лейцин (тобто мотив "KDEL", SEQ ID №:13) на C-кінці, то білок злиття буде націлено на ендоплазматичний ретикулум. Якщо у білку злиття немає послідовності, яка націлюється на ендоплазматичний ретикулум, на C-кінці, білок буде націлено на ендоплазматичний ретикулум, але в кінцевому підсумку буде секвестровано в апопласті.

Таким чином, цей ген кодує білок злиття, що містить тридцять одну N-кінцеву амінокислоту гена кислої фосфатази білого люпину *Lupinus albus* (GENBANK® ID GI:14276838, Miller et al., 2001, *supra*), злиту з N-кінцем амінокислотної послідовності за даним винаходом, а також послідовність KDEL на C-кінці. Таким чином, передбачається, що отриманий білок націлюється на ендоплазматичний ретикулум рослини під час експресії у рослинній клітині.

Експресійні касети для рослин, описані вище, поєднують з відповідним селективним маркером для рослин для сприяння селекції трансформованих рослинних клітин і тканин та лігують у вектори для трансформації рослин. Вони можуть містити бінарні вектори для



трансформації, опосередкованої *Agrobacterium*, або прості плазмідні вектори для трансформації за допомогою аерозолі або біобалістичної трансформації.

Приклад 6. Перенос генів за допомогою вектора для експресії у рослинах

ДНК кодууючої ділянки генів за даним винаходом функціонально з'єднують із відповідними промоторними та термінаторними послідовностями для експресії в рослинах. Такі послідовності добре відомі в даній галузі техніки та можуть включати в себе промотор гена актину рису або промотор гена убіквітину маїсу для експресії в однодольних рослинах, промотор UBQ3 *Arabidopsis* або промотор 35S CaMV для експресії у дводольних рослинах та термінатори *nos* або *PinII*. Методики отримання та підтвердження конструктів промотор – ген – термінатор також

добре відомі у даній галузі техніки. Експресійні касети для рослин, описані вище, поєднують з відповідним селективним маркером для рослин для сприяння селекції трансформованих рослинних клітин і тканин та лігують у вектори для трансформації рослин. Вони можуть містити бінарні вектори для трансформації, опосередкованої *Agrobacterium*, або прості плазмідні вектори для трансформації за допомогою аерозолі або біобалістичної трансформації.

Приклад 7. Трансформація клітин маїсу за допомогою генів, що кодують пестицидні білки, описаних у даному документі

Качани маїсу найкраще збирати через 8-12 днів після запилення. Зародки виділяють із качанів, і такі зародки розміром 0,8-1,5 мм є переважними для застосування у трансформації. Зародки висівають щитком догори на придатне інкубаційне середовище, таке як середовище DN62A5S (3,98 г/л солей N6; 1 мл/л (з 1000х вихідного розчину) вітамінів N6; 800 мг/л L-аспарагіну; 100 мг/л міоїнозиту; 1,4 г/л L-проліну; 100 мг/л казамінових кислот; 50 г/л сахарози; 1 мл/л (з 1 мг/мл вихідного розчину) 2,4-D). Середовища та солі, відмінні від DN62A5S, однак, є придатними та відомі у даній галузі техніки. Зародки інкубують протягом ночі при 25 °C у темряві. Однак, інкубування зародків протягом ночі як таке не є необхідним.

Отримані експлантати переносять на сітку із квадратними отворами (30-40 на пластину), переносять в осмотичне середовище на приблизно 30-45 хвилин, потім переносять на пластину для інжекції (див., наприклад, публікацію згідно з РСТ № WO/0138514 та патент США № 5240842).

ДНК-конструкти, призначені для генів за даним винаходом у рослинних клітинах, попадають за рахунок прискорення у рослинну тканину за допомогою прискорювача пучка аерозолі із застосуванням умов, переважно описаних у публікації згідно з РСТ № WO/0138514. Після інжекції зародки інкубують протягом приблизно 30 хв. в осмотичному середовищі та поміщають в інкубаційне середовище, витримуючи протягом ночі при 25 °C у темряві. Щоб уникнути надмірного ушкодження експлантатів, які зазнають інжекції, їх інкубують протягом щонайменше 24 годин перед перенесенням у відновне середовище. Зародки потім вносять середовище для відновлення на період, що складає приблизно 5 днів, при 25 °C у темряві, а потім переносять на селективне середовище. Експлантати інкубують у селективному середовищі протягом до восьми тижнів залежно від природи та характеристик конкретного використовуваного способу селекції. Після періоду селекції отриманий калюс переносять у середовище для дозрівання зародків, поки не буде спостерігатися утворення зрілих соматичних зародків. Отримані зрілі соматичні зародки потім поміщають в умови слабкого освітлення, і процес регенерації ініціюють за допомогою способів, відомих у даній галузі техніки. Отриманим паросткам дозволяють вкоренитися у середовищі для вкорінення, і отримані рослини переносять у горщики для розсади і розмножують як трансгенні рослини.

Матеріали

Середовище DN62A5S

| Компоненти                                      | На літр                              | Постачальник         |
|-------------------------------------------------|--------------------------------------|----------------------|
| Базова суміш солей Чу N6 (номер продукту C 416) | 3,98 г/л                             | Phytotechnology Labs |
| Розчин вітамінів Чу N6 (номер продукту C 149)   | 1 мл/л (з 1000х вихідного розчину)   | Phytotechnology Labs |
| L-аспарагін                                     | 800 мг/л                             | Phytotechnology Labs |
| Міоїнозитол                                     | 100 мг/л                             | Sigma                |
| L-пролін                                        | 1,4 г/л                              | Phytotechnology Labs |
| Казамінові кислоти                              | 100 мг/л                             | Fisher Scientific    |
| Сахароза                                        | 50 г/л                               | Phytotechnology Labs |
| 2,4-D (номер продукту D-7299)                   | 1 мл/л (з 1 мг/мл вихідного розчину) | Sigma                |

pH розчину доводять до pH 5,8 за допомогою 1 N KOH/1 N KCl, додають Gelrite (Sigma) у концентрації до 3 г/л, і середовище автоклавують. Після охолодження до 50 °C додають 2 мл/л нітрату срібла з 5 мг/мл вихідного розчину (Phytotechnology Labs).

5 Приклад 8. Трансформація генів за даним винаходом у рослинних клітинах за допомогою трансформації, опосередкованої *Agrobacterium*

Качани найкраще збирати через 8-12 днів після запилення. Зародки виділяють із качанів, і такі зародки розміром 0,8-1,5 мм є переважними для застосування в трансформації. Зародки висівають щитком догори на придатне інкубаційне середовище та інкубують протягом ночі при 10 25 °C у темряві. Однак, інкубування зародків протягом ночі як таке не є необхідним. Зародки приводять у контакт зі штамом *Agrobacterium*, який містить відповідні вектори для перенесення, опосередкованого Ті-плазмідом, на приблизно 5-10 хвилин, а потім висівають на середовище для спільного культивування протягом приблизно 3 днів (25 °C у темряві). Після спільного культивування експлантати переносять у відновне середовище на період, що складає 15 приблизно п'ять днів (при 25 °C у темряві). Експлантати інкубують у селективному середовищі протягом до восьми тижнів залежно від природи та характеристик конкретного використовуваного способу селекції. Після періоду селекції отриманий калюс переносять у середовище для дозрівання зародків, поки не буде спостерігатися утворення зрілих соматичних зародків. Отримані зрілі соматичні зародки потім поміщають в умови слабого освітлення, і 20 процес регенерації ініціюють так, як відомо в даній галузі техніки.

Усі публікації та заявки на патенти, що згадуються у даному описі, свідчать про рівень компетентності фахівців в галузі, до якої належить даний винахід. Усі публікації та заявки на патенти включено у даний документ за допомогою посилання такою ж мірою, як якби кожен конкретну публікацію або заявку на патент було конкретно й окремо зазначено як включену за 25 допомогою посилання.

Хоча викладений вище винахід був достатньо докладно описаний за допомогою ілюстрацій та прикладів з метою ясності розуміння, буде очевидно, що у межах обсягу прикладеної формули винаходу можна на практиці здійснювати певні зміни та модифікації.

## 30 ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Конструкція, яка містить молекулу рекомбінантної нуклеїнової кислоти, яка містить нуклеотидну послідовність, яка кодує поліпептид, який являє собою варіант SEQ ID NO: 2, де зазначений поліпептид має поліпшену пестицидну активність порівняно з SEQ ID NO: 2; де 35 нуклеотидна послідовність вибрана з SEQ ID NO: 4, 5 або 6, або нуклеотидну послідовність, яка кодує амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11 або 12, де зазначена нуклеотидна послідовність є функціонально зв'язаною з промотором, здатним керувати експресією зазначеної нуклеотидної послідовності у рослинній клітині.

2. Клітина-хазяїн, яка містить молекулу рекомбінантної нуклеїнової кислоти за п. 1, яка є переважно бактеріальною клітиною-хазяїном або рослинною клітиною.

3. Трансгенна рослина, яка містить клітину-хазяїна за п. 2, де зазначена рослина вибрана з групи, яка складається з маїсу, сорго, пшениці, капусти, соняшника, томата, хрестоцвітних, видів перцю, картоплі, бавовнику, рису, сої, цукрового буряка, цукрової тростини, тютюну, ячменю та олійного рапсу.

4. Рекомбінантний поліпептид з інсектицидною активністю, де зазначений поліпептид являє собою варіант SEQ ID NO: 2, і де зазначений поліпептид має поліпшену інсектицидну активність порівняно з SEQ ID NO: 2 та містить амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11 або 12.

5. Композиція, яка містить поліпептид за п. 4, яка:

50 (а) вибрана з групи, яка складається з порошку, пилоподібного препарату, пелети, гранули, розпорошеного розчину, емульсії, колоїдного розчину та істинного розчину;

(б) одержана шляхом висушування, ліофілізації, гомогенізації, екстракції, фільтрації, центрифугування, седиментації або концентрування культури клітин *Bacillus thuringiensis*;

(с) містить інсектицидно ефективну кількість зазначеного поліпептиду.

55 6. Спосіб боротьби або знищення популяції лускокрилих або твердокрилих комах, який включає надання в раціон зазначеній популяції інсектицидно ефективної кількості поліпептиду за п. 4.

7. Спосіб одержання поліпептиду з інсектицидною активністю, який включає культивування клітини-хазяїна за п. 2 в умовах, у яких експресується молекула нуклеїнової кислоти, що кодує 60 поліпептид.

8. Рослина, яка має у своєму геномі стабільно включений ДНК-конструкт, що містить нуклеотидну послідовність, яка кодує поліпептид, що являє собою варіант SEQ ID NO: 2, яка **відрізняється** тим, що зазначений поліпептид має поліпшену інсектицидну активність порівняно з SEQ ID NO: 2, де зазначена нуклеотидна послідовність вибрана з SEQ ID NO: 4, 5 або 6, або нуклеотидної послідовності, яка кодує амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11 або 12, де зазначена нуклеотидна послідовність є функціонально зв'язаною з промотором, що керує експресією кодуючої послідовності, у рослинній клітині, переважно коли зазначена рослина є рослинною клітиною.

9. Трансгенна насінина рослини за п. 8, яка **відрізняється** тим, що зазначена насінина містить нуклеотидну послідовність, вибрану з SEQ ID NO: 4, 5 або 6 або нуклеотидної послідовності, яка кодує амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11 або 12.

10. Спосіб захисту рослини від комах-шкідника, який включає експресію у рослині або її клітині нуклеотидної послідовності, яка кодує поліпептид, що являє собою варіант SEQ ID NO: 2, який **відрізняється** тим, що зазначений поліпептид має поліпшену інсектицидну активність порівняно з SEQ ID NO: 2, де зазначену нуклеотидну послідовність вибирають із SEQ ID NO: 4, 5 або 6 або нуклеотидної послідовності, що кодує амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11 або 12.

11. Спосіб за п. 10, який **відрізняється** тим, що зазначена рослина виробляє інсектицидний поліпептид, який має інсектицидну активність проти шкідника, що є лускокрилою або твердокрилою комахою.

| ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ                                             |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| <110> Хірірікс, Фолькер<br>Вільямс, Джеймі                         |      |
| <120> ВАРІАНТИ ВІЛКІВ АХМІ205 ТА СПОСОБИ ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ           |      |
| <130> AFA116029                                                    |      |
| <150> 61/512539                                                    |      |
| <151> 2011-07-28                                                   |      |
| <160> 13                                                           |      |
| <170> PatentIn версія 3.5                                          |      |
| <210> 1                                                            |      |
| <211> 1608                                                         |      |
| <212> ДНК                                                          |      |
| <213> Chromobacterium sp.                                          |      |
| <400> 1                                                            |      |
| atggcatccg cagcaaatgc aggtcagctt ggcaacctcc ccggcggttac ttccatgggc | 60   |
| atgggctatg acgtgaatgg ttgtacgcc agcccggaag gcctgcttgg ccaaccttg    | 120  |
| ttcgatttcg gcggcgagct ggacagcatc gaaatcgagg gccgcagcta cacccttccc  | 180  |
| cgcagcatgc atgtacacac ctatttccat tccgacttca aacaggatgt cagcaaggaa  | 240  |
| atcgaagagt atcggggaaa aatgagccag cactggggcg tgccggcccg ctacaagttg  | 300  |
| ttcagcgctt cgtcgagcgt ggatttcacc accacggacc agcaactgac cgagattacc  | 360  |
| tacagctcca cccgcgaagc ccatgtgctg tggtacatca gcctgcctgg cgcggccacg  | 420  |
| ctgcgttcga tgctgcgccg cgatttccgc gacgacctga acaacccaa tatgcggccc   | 480  |
| atggagctgt tcaagcgcta tggttccctac tacatctcgg aagcggcggt ggcgggccgg | 540  |
| ctggactaca gcgcggccag caagaccttg aagatggaca gcagccagtc gctgtccacc  | 600  |
| accgccgaaa tgtcctacaa ggcgctggtg ggcgagatca agatcgagca tggctcgag   | 660  |
| atggaagagc aggtcaacag cttccgcagc aactccacca tccgtctcac cgccacggc   | 720  |
| ggcaagccgg gcatgaccca tcgcatactg cactggccgg attcgcagca ggcggttctc  | 780  |
| caatggggcg aatcgctgct cgactatgcg acgctgatgg acttttccac cgaagccctg  | 840  |
| caaccgatct ggcgctggc cgacaagccc gagcgcccg tcgagcttga ggacgcttc     | 900  |
| cccgaattca tgaagcagtc gcagcagtc atccccaagg tggacaaggt gctgctgatg   | 960  |
| gacgcgcggc cgcctatggt gaaggctggg gaggatagcg gctccggcgc gtcggaggat  | 1020 |
| ctggctgtgt tcaatccca caccctcaat ggctacaaga tggttggcca gttcggtcag   | 1080 |
| cgcgaacctg ccagcgtggc ggatggccat gcgcgattt tcaaggatct gttegatctg   | 1140 |
| ggcgtgctga agcgccgggt ggggtggcag cgggtgtggg acgacgcggg ctccggcaag  | 1200 |
| tccaaggact acgcgtgctg gcgcgcgatt ccggccgagg gctaccgcgc gctggggcat  | 1260 |

```

gtgatgatgc tggccaccag cggetataac cgcgcgaatc tgccggacta tgtttgcgtg 1320
catcaaaagcc tgtgcgcgga tgtgcagacg ctgcaaaacc ggggtgtgtg ggacaagggc 1380
accggcgccg gcaaggatgt cagcctgtgg caaccgggcg cggccggcgc ggtggcgctc 1440
tcttgccttcg ccggcggtgcc taattacaac aaccgcacca attccggcga catcgagcgc 1500
ttgcgcggca gcacgcgatg cgtgaagacc agcgcgatcg cgtccatgca ggaatgaag 1560
tcacatgctca gccagcacca aggcattgaa gcgatgatgt ccaagctg 1608

```

```

<210> 2
<211> 536
<212> БИЛОР
<213> Chromobacterium sp.

```

```

<400> 2

```

```

Met Ala Ser Ala Ala Asn Ala Gly Gln Leu Gly Asn Leu Pro Gly Val
1 5 10 15

```

```

Thr Ser Met Gly Met Gly Tyr Asp Val Asn Gly Leu Tyr Ala Ser Pro
20 25 30

```

```

Glu Ser Leu Leu Gly Gln Pro Leu Phe Asp Phe Gly Gly Glu Leu Asp
35 40 45

```

```

Ser Ile Glu Ile Glu Gly Arg Ser Tyr Thr Phe Pro Arg Ser Met His
50 55 60

```

```

Val His Thr Tyr Phe His Ser Asp Phe Lys Gln Asp Val Ser Lys Glu
65 70 75 80

```

```

Ile Glu Glu Tyr Arg Glu Lys Met Ser Gln His Val Gly Val Ser Gly
85 90 95

```

```

Arg Tyr Lys Leu Phe Ser Ala Ser Leu Ser Val Asp Phe Thr Thr Thr
100 105 110

```

```

Asp Gln Gln Leu Thr Glu Ile Thr Tyr Ser Ser Thr Arg Glu Ala His
115 120 125

```

```

Val Leu Trp Tyr Ile Ser Leu Pro Gly Ala Ala Thr Leu Arg Ser Met
130 135 140

```

```

Leu Arg Arg Asp Phe Arg Asp Asp Leu Asn Asn Pro Asn Met Pro Ala
145 150 155 160

```

```

Met Glu Leu Phe Lys Arg Tyr Gly Pro Tyr Tyr Ile Ser Glu Ala Ala
165 170 175

```

```

Val Gly Gly Arg Leu Asp Tyr Ser Ala Ala Ser Lys Thr Leu Lys Met
180 185 190

```

```

Asp Ser Ser Gln Ser Leu Ser Thr Thr Ala Glu Met Ser Tyr Lys Ala
195 200 205

```

```

Leu Val Gly Glu Ile Lys Ile Glu His Gly Ser Glu Met Glu Lys Gln
210 215 220

```

```

Val Asn Ser Phe Arg Ser Asn Ser Thr Ile Arg Leu Thr Ala Thr Gly
225 230 235 240

```

```

Gly Lys Pro Gly Met Thr Asp Arg Ile Leu His Gly Pro Asp Ser Gln
245 250 255

```

```

Gln Ala Phe Ser Gln Trp Ala Glu Ser Leu Leu Asp Tyr Ala Thr Leu
260 265 270

```

```

Met Asp Phe Ser Thr Glu Ser Leu Gln Pro Ile Trp Ala Leu Ala Asp
275 280 285

```

```

Lys Pro Glu Arg Arg Val Glu Leu Glu Asp Ala Phe Pro Glu Phe Met
290 295 300

```

```

Lys Gln Ser Gln Gln Ser Ile Pro Lys Val Asp Lys Val Leu Leu Met
305 310 315 320

```

```

Asp Ala Arg Pro Pro Met Val Lys Ala Gly Glu Asp Ser Gly Ser Gly
325 330 335

```

```

Ala Ser Glu Asp Leu Ala Val Phe Asn Pro Ser Thr Ser Asn Gly Tyr
340 345 350

```

```

Lys Met Val Gly Gln Phe Gly Gln Arg Asn His Ala Ser Val Ala Asp
355 360 365

```

```

Gly His Ala Pro Ile Phe Lys Asp Leu Phe Asp Leu Gly Val Leu Lys
370 375 380

```

```

Ala Pro Val Gly Trp Gln Arg Val Trp Asp Asp Ala Gly Ser Gly Lys
385 390 395 400

```

```

Ser Lys Asp Tyr Ala Cys Trp Arg Ala Ile Pro Pro Gln Gly Tyr Arg
405 410 415

```

```

Ala Leu Gly Asp Val Met Met Leu Ala Thr Ser Gly Tyr Asn Pro Pro
420 425 430

```

```

Asn Leu Pro Asp Tyr Val Cys Val His Gln Ser Leu Cys Ala Asp Val
435          440          445

Gln Thr Leu Gln Asn Arg Val Trp Trp Asp Lys Gly Thr Gly Ala Arg
450          455          460

Lys Asp Val Ser Leu Trp Gln Pro Gly Ala Ala Gly Ala Val Ala Ser
465          470          475          480

Ser Cys Phe Ala Gly Val Pro Asn Tyr Asn Asn Pro Pro Asn Ser Gly
485          490          495

Asp Ile Glu Arg Leu Arg Gly Ser Ile Ala Cys Val Lys Thr Ser Ala
500          505          510

Ile Ala Ser Met Gln Glu Met Lys Ser Met Leu Ser Gln His Gln Gly
515          520          525

Met Glu Ala Met Met Ser Lys Leu
530          535

<210> 3
<211> 536
<212> БІЛЖОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> мутант Ахм1205(evo25)

<400> 3
Met Ala Ser Ala Ala Asn Ala Gly Gln Leu Gly Asn Leu Pro Gly Val
1          5          10          15

Thr Ser Met Gly Met Gly Tyr Asp Val Asn Gly Leu Tyr Ala Ser Pro
20          25          30

Glu Ser Leu Leu Gly Gln Pro Leu Phe Asp Phe Gly Gly Glu Leu Asp
35          40          45

Ser Ile Glu Ile Glu Gly Arg Ser Tyr Thr Phe Pro Arg Ser Met His
50          55          60

Val His Thr Tyr Phe His Ser Asp Phe Lys Gln Asp Val Ser Lys Glu
65          70          75          80

Ile Glu Glu Tyr Arg Glu Lys Met Ser Gln His Val Gly Val Ser Gly
85          90          95

Arg Tyr Lys Leu Phe Ser Ala Ser Leu Ser Val Asp Phe Thr Thr Thr
100         105         110

Asp Gln Gln Leu Thr Glu Ile Thr Tyr Ser Ser Thr Arg Glu Ala His
115         120         125

Val Leu Trp Tyr Ile Ser Leu Pro Gly Ala Ala Thr Leu Arg Ser Met
130         135         140

Leu Arg Arg Asp Phe Arg Asp Asp Leu Asn Asn Pro Asn Met Pro Ala
145         150         155         160

Met Glu Leu Phe Lys Arg Tyr Gly Pro Tyr Tyr Ile Ser Glu Ala Ala
165         170         175

Val Gly Gly Arg Leu Asp Tyr Ser Ala Ala Ser Lys Thr Leu Lys Met
180         185         190

Asp Ser Ser Gln Ser Leu Ser Thr Thr Ala Glu Met Ser Tyr Lys Ala
195         200         205

Leu Val Gly Glu Ile Lys Ile Glu His Gly Ser Glu Met Glu Lys Gln
210         215         220

Val Asn Ser Phe Arg Ser Asn Ser Thr Ile Arg Leu Thr Ala Thr Gly
225         230         235         240

Gly Lys Pro Gly Met Thr Asp Arg Ile Leu His Gly Pro Asp Ser Gln
245         250         255

Gln Ala Phe Ser Gln Trp Ala Glu Ser Leu Leu Asp Tyr Ala Thr Leu
260         265         270

Met Asp Phe Ser Thr Glu Ser Leu Gln Pro Ile Trp Ala Leu Ala Asp
275         280         285

Lys Pro Glu Arg Arg Val Glu Leu Glu Asp Ala Phe Pro Glu Phe Met
290         295         300

Lys Gln Ser Gln Gln Ser Ile Pro Lys Val Asp Lys Val Leu Leu Met
305         310         315         320

Asp Ala Arg Pro Pro Met Val Lys Ala Gly Glu Asp Ser Gly Ser Gly
325         330         335

Ala Ser Glu Asp Leu Ala Val Phe Asn Pro Ser Thr Ser Asn Gly Tyr
340         345         350

Lys Met Val Gly Gln Phe Gly Gln Arg Asn His Ala Ser Val Ala Asp
355         360         365

```



|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| Gly His Ala Pro Ile Phe Lys Asp Leu Phe Asp Leu Gly Val Leu Lys    |      |
| 370 375 380                                                        |      |
| Ala Pro Val Gly Trp Gln Arg Val Trp Asp Asp Ala Gly Ser Gly Lys    |      |
| 385 390 395 400                                                    |      |
| Ser Lys Asp Tyr Ala Cys Trp Arg Ala Ile Pro Pro Gln Gly Tyr Arg    |      |
| 405 410 415                                                        |      |
| Ala Leu Gly Asp Val Met Met Leu Ala Thr Ser Gly Tyr Asn Pro Pro    |      |
| 420 425 430                                                        |      |
| Asn Leu Pro Asp Tyr Val Cys Val His Gln Ser Leu Cys Ala Asp Val    |      |
| 435 440 445                                                        |      |
| Gln Thr Leu Gln Asn Arg Val Trp Trp Asp Lys Gly Thr Gly Ala Arg    |      |
| 450 455 460                                                        |      |
| Lys Asp Ala Ser Leu Trp Gln Pro Gly Ala Ala Gly Ala Val Ala Ser    |      |
| 465 470 475 480                                                    |      |
| Ser Cys Phe Ala Gly Val Pro Asn Tyr Asn Asn Pro Pro Asn Ser Gly    |      |
| 485 490 495                                                        |      |
| Asp Ile Glu Arg Leu Arg Gly Ser Ile Ala Cys Val Lys Thr Ser Ala    |      |
| 500 505 510                                                        |      |
| Ile Ala Ser Met Gln Glu Met Lys Ser Met Leu Ser Gln His Gln Gly    |      |
| 515 520 525                                                        |      |
| Met Glu Ala Met Met Ser Lys Leu                                    |      |
| 530 535                                                            |      |
| <210> 4                                                            |      |
| <211> 1611                                                         |      |
| <212> ДНК                                                          |      |
| <213> Штучна послідовність                                         |      |
| <220>                                                              |      |
| <223> нуклеотидна послідовність, що кодує Axl205(evo30)            |      |
| <400> 4                                                            |      |
| atggcatccg cagcaaatgc aggtcagctt ggcaacctcc ccggcggttac ttccatgggc | 60   |
| atgggctatg acgtgaatgg ttgtacgcc agcccggaag gctgcttg ccaaccttg      | 120  |
| ttcgatttcg gcggcgagct ggaacagcgc gaaatcgagg gcgcagccta cactttccc   | 180  |
| cgcaagatgc atgtacacac ctatttccat tccgacttca aacaggatgt cagcaaggaa  | 240  |
| atcgaagagt atcgggagaa aatgagccag cactgtggcg tgtccggccg ctacaagttg  | 300  |
|                                                                    |      |
| ttcagcgctt cgtctgagct ggatttcacc accacggacc agcaactgac cgagattacc  | 360  |
| tacagctcca ccgcggaagc ccatgtgctg tggatcatca gctgctctgg cgcggccacg  | 420  |
| ctgcgttcga tgcctgcgcc cgatttcgcg gacgacctga acaaccacca tatgcggccc  | 480  |
| atggagctgt tcaagcgcta tggteccatc tacatatcgg aagcggcggt ggcggcgccg  | 540  |
| ctggactaca gcgcggccag caagaccttg aagatggaca gcagccagtc gctgtccacc  | 600  |
| accgccgaaa gtctctacaa ggcgctgggt ggcgagatca agatcgagca tggctcgagg  | 660  |
| atggaaaaagc aggtcaacag ctctccgacg aactccacca tccgtctcac cgcacccgpc | 720  |
| ggcaagccgg gcatacagca tgcatactg cactgtccgg attcgacgca ggcgttctcg   | 780  |
| caatggcgcg aatcgctgct cgactatgcg acgctgatgg acttttccac cgaaagcctg  | 840  |
| caacagatct gggcgctggc cgacaagccc gagcgccggc tcgagcttga ggaagccttc  | 900  |
| ccgaattca tgaagcagtc gcagcagctc atccccaaag tgaacaaggt gctgctgatg   | 960  |
| gacgcgcggc cgcctatggt gaagcctggg gaggatagcg gctccggcgc gtcggaggat  | 1020 |
| ctgctgtgtg tcaatcccaq cactccaat ggctacaaga tggttggcca gttcggtcag   | 1080 |
| cgaaccatg ccagcgtggc ggaatggcat gcgcgattt tcaaggatct gttcgatctg    | 1140 |
| ggcgtgctga aggcgcgggt gggttggcag cgggtgtggg acgacgcggc ctccggccaag | 1200 |
| tcaaggact acgcgtgctg gcgcgcgatt ccgcgcgagg gctaccgcgc gctgggcgat   | 1260 |
| gtgatgatgc tggccaccag cggctataac ccgcgcgaatc tgcgcgacta tgtttgcgtg | 1320 |
| catacaagcc tgtgcgcgga tgtgcagacg ctgcacaaacc ggggtgtggt ggaacaaggc | 1380 |
| accggcgccg gcaaggattt gagcctgtgg caaccggggc cggccgggoc ggtggcgtcc  | 1440 |
| tttctcttcg ccggcgtgcc taattacaac aaccgcacca attccggcga catcgagcgc  | 1500 |
| ttgcgcggca gcacgcgatg cgtgaagacc agcgcgatcg cgtccatgca ggaatgaag   | 1560 |
| tcacatgcca gccagcacca aggcattgaa gcgatgatgt ccaagctgtg a           | 1611 |
|                                                                    |      |
| <210> 5                                                            |      |
| <211> 1755                                                         |      |
| <212> ДНК                                                          |      |
| <213> Штучна послідовність                                         |      |
| <220>                                                              |      |
| <223> нуклеотидна послідовність, що кодує Axl205(evo34)            |      |
| <400> 5                                                            |      |
| atggcatccg cagcaaatgc aggtcagctt ggcaacctcc ccggcggttac ttccatgggc | 60   |
| atgggctatg acgtgaatgg ttgtacgcc agcccggaag gctgcttg ccaaccttg      | 120  |
| ttcgatttcg gcggcgagct ggaacagcgc gaaatcgagg gcgcagccta cactttccc   | 180  |
| cgcaagatgc atgtacacac ctatttccat tccgacttca aacaggatgt cagcaaggaa  | 240  |
| atcgaagagt atcggaccaa aatgagccag cactgtggcg tgtccggccg ctacaagttg  | 300  |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ttcagcgctt cgtgagcgt ggaatttcacc accacggacc agcaactgac cgagattacc                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 360  |
| tacagctcca ccgcggaagc ccatgtgctg tggtagatca gcctgctgg cgcgccacg                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 420  |
| ctgcttoga tgcgtgcgcg cgatttccgc gacgacctga acaaccccaa tatgcggcc                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 480  |
| atggagctgt tcaagcgcta tggccctac tacatatcgg aagcggcggg ggcggcgcg                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 540  |
| ctggactaca gcgcggccag caagaccttg aagatggaca gcagccagtc gctgtccacc                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 600  |
| accgccgaaa tgtccataaa ggcgctgggt ggcgagatca agatcgagca tggctcgag                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 660  |
| atggaaaaagc aggtcaaacg ctcccgacgc aactccacca tccgtctcac cgccaccggc                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 720  |
| ggcaagccgg gcatgaaccg tcgcatactg caggtccgg attcgacga ggcgttctcg                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 780  |
| caatggcgcg aatcgtgct cgactatgcg acgctgatgg acttttccac cgaaagcctg                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 840  |
| caaccgatct gggcgctggc cgacaagccc gacgcgcgcg tcgagcttga ggacgccttc                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 900  |
| cccgaattca tgaagcagtc gcagcagtc atccccaaag tggacaaggt gctgctgatg                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 960  |
| gacgcgcggc cgcctatggt gaaggctggg gaggatagcg gctccggcgc gtcggaagat                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 1020 |
| ctggctgtgt tcaatccag cacttccaat ggtacaaga tggttggcca gttcggtcag                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 1080 |
| cgcaaccatg ccagcgtggc ggaaggccat gcgccgattt tcaaggatct gttcgatctg                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 1140 |
| ggcgtgctga aggcgcgggt ggggtggcag cgggtgtggg acgacgcgcg ctccggcaa                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 1200 |
| tccaaaggact acgctgctg gcgcgcgatt ccgcgcgagc gctaccgcgc gctggggcat                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 1260 |
| gtgatgatgc tggccaccag cggctataac ccgcggaate tgcggacta tgtttgcgtg                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 1320 |
| catcaaaagc tgtgcgcgga tgtgcagacg ctgcaaaacc ggggtgtggt ggacaagggc                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 1380 |
| accggcgcgc gcaaggatgt cagcctgtgg caaccggcg cgccggcgcg ggtggcgctc                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 1440 |
| tcttgcctcg ccggcgctgc taattacaac aaccggcca attccggcga catcgagcgc                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 1500 |
| ttgcgcggca gcacgcagtc cgtgaagacc agcgcgatcg cgtccatgca ggaatgaag                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 1560 |
| tccatgctca gccagacca aggcattgaa gcgatgatgt ccaagctgtg atcggcgcgc                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 1620 |
| cggtcgacaa gcttgcggcc gcactgagct ctggtaaaga aaccgctgct gcgaaatttg                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 1680 |
| aacgccagca catggaatcg tctactagcg cagcttaatt aacctaggct gctgccaccg                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 1740 |
| ctgagcaata actag                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 1755 |
| <210> 6<br><211> 1608<br><212> ДНК<br><213> Штучна послідовність<br><220><br><223> нуклеотидна послідовність, що кодує Axmi205(evo35)<br><400> 6<br>atggcaccgc cagcaaatgc aggtcagctt ggcacacctcc ccggcgtaac ttccatgggc 60<br>atgggcatatg acgtgaatgg ttgtacgcgc agcccggaag gctcgttgg ccaaccttg 120                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |      |
| ttccatttcg gggcgagct ggacagcacc gaaatcgagg gccgaagcta cactttccc 180<br>cgcagcatgc atgtacacac ctatttccat tccgacttca aacaggatgt cagcaaggaa 240<br>atcgaagagt atcgggaagaa aatgagccag cactgtggcg tgtccggcg ctacaagtgt 300<br>ttcagcgctt cgtgagcgt ggaatttcacc accacggacc agcaactgac cgagattacc 360<br>tacagctcca ccgcggaagc ccatgtgctg tggtagatca gcctgctgg cgcgccacg 420<br>ctgcttoga tgcgtgcgcg cgatttccgc gacgacctga acaaccccaa tatgcggcc 480<br>atggagctgt tcaagcgcta tggccctac tacatatcgg aagcggcggg ggcggcgcg 540<br>ctggactaca gcgcggccag caagaccttg aagatggaca gcagccagtc gctgtccacc 600<br>accgccgaaa tgtccataaa ggcgctgggt ggcgagatca agatcgagca tggctcgag 660<br>atggaaaaagc aggtcaaacg ctcccgacgc aactccacca tccgtctcac cgccaccggc 720<br>ggcaagccgg gcatgaaccg tcgcatactg caggtccgg attcgacga ggcgttctcg 780<br>caatggcgcg aatcgtgct cgactatgcg acgctgatgg acttttccac cgaaagcctg 840<br>caaccgatct gggcgctggc cgacaagccc gacgcgcgcg tcgagcttga ggacgccttc 900<br>cccgaattca tgaagcagtc gcagcagtc atccccaaag tggacaaggt gctgctgatg 960<br>gacgcgcggc cgcctatggt gaaggctggg gaggatagcg gctccggcgc gtcggaagat 1020<br>ctggctgtgt tcaatccag cacttccaat ggtacaaga tggttggcca gttcggtcag 1080<br>cgcaaccatg ccagcgtggc ggaaggccat gcgccgattt tcaaggatct gttcgatctg 1140<br>ggcgtgctga aggcgcgggt ggggtggcag cgggtgtggg acgacgcgcg ctccggcaa 1200<br>tccaaaggact acgctgctg gcgcgcgatt ccgcgcgagc gctaccgcgc gctggggcat 1260<br>gtgatgatgc tggccaccag cggctataac ccgcggaate tgcggacta tgtttgcgtg 1320<br>catcaaaagc tgtgcgcgga tgtgcagacg ctgcaaaacc ggggtgtggt ggacaagggc 1380<br>accggcgcgc gcaaggatgt cagcctgtgg caaccggcg cgccggcgcg ggtggcgctc 1440<br>tcttgcctcg ccggcgctgc taattacaac aaccggcca attccggcga catcgagcgc 1500<br>ttgcgcggca gcacgcagtc cgtgaagacc agcgcgatcg cgtccatgca ggaatgaag 1560<br>tccatgctca gccagacca aggcattgaa gcgatgatgt ccaagctg 1608 |      |
| <210> 7<br><211> 536<br><212> ВІЛОК<br><213> Штучна послідовність<br><220><br><223> мутант Axmi205(evo30)<br><400> 7<br>Met Ala Ser Ala Ala Asn Ala Gly Gln Leu Gly Asn Leu Pro Gly Val<br>1 5 10 15                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |      |

Thr Ser Met Gly Met Gly Tyr Asp Val Asn Gly Leu Tyr Ala Ser Pro  
 20 25 30  
 Glu Ser Leu Leu Gly Gln Pro Leu Phe Asp Phe Gly Gly Glu Leu Asp  
 35 40 45  
 Ser Ile Glu Ile Glu Gly Arg Ser Tyr Thr Phe Pro Arg Ser Met His  
 50 55 60  
 Val His Thr Tyr Phe His Ser Asp Phe Lys Gln Asp Val Ser Lys Glu  
 65 70 75 80  
 Ile Glu Glu Tyr Arg Glu Lys Met Ser Gln His Val Gly Val Ser Gly  
 85 90 95  
 Arg Tyr Lys Leu Phe Ser Ala Ser Leu Ser Val Asp Phe Thr Thr Thr  
 100 105 110  
 Asp Gln Gln Leu Thr Glu Ile Thr Tyr Ser Ser Thr Arg Glu Ala His  
 115 120 125  
 Val Leu Trp Tyr Ile Ser Leu Pro Gly Ala Ala Thr Leu Arg Ser Met  
 130 135 140  
 Leu Arg Arg Asp Phe Arg Asp Asp Leu Asn Asn Pro Asn Met Pro Ala  
 145 150 155 160  
 Met Glu Leu Phe Lys Arg Tyr Gly Pro Tyr Tyr Ile Ser Glu Ala Ala  
 165 170 175  
 Val Gly Gly Arg Leu Asp Tyr Ser Ala Ala Ser Lys Thr Leu Lys Met  
 180 185 190  
 Asp Ser Ser Gln Ser Leu Ser Thr Thr Ala Glu Met Ser Tyr Lys Ala  
 195 200 205  
 Leu Val Gly Glu Ile Lys Ile Glu His Gly Ser Glu Met Glu Lys Gln  
 210 215 220  
 Val Asn Ser Phe Arg Ser Asn Ser Thr Ile Arg Leu Thr Ala Thr Gly  
 225 230 235 240  
 Gly Lys Pro Gly Met Thr Asp Arg Ile Leu His Gly Pro Asp Ser Gln  
 245 250 255  
 Gln Ala Phe Ser Gln Trp Ala Glu Ser Leu Leu Asp Tyr Ala Thr Leu  
 260 265 270

Met Asp Phe Ser Thr Glu Ser Leu Gln Pro Ile Trp Ala Leu Ala Asp  
 275 280 285  
 Lys Pro Glu Arg Arg Val Glu Leu Glu Asp Ala Phe Pro Glu Phe Met  
 290 295 300  
 Lys Gln Ser Gln Gln Ser Ile Pro Lys Val Asp Lys Val Leu Leu Met  
 305 310 315 320  
 Asp Ala Arg Pro Pro Met Val Lys Ala Gly Glu Asp Ser Gly Ser Gly  
 325 330 335  
 Ala Ser Glu Asp Leu Ala Val Phe Asn Pro Ser Thr Ser Asn Gly Tyr  
 340 345 350  
 Lys Met Val Gly Gln Phe Gly Gln Arg Asn His Ala Ser Val Ala Asp  
 355 360 365  
 Gly His Ala Pro Ile Phe Lys Asp Leu Phe Asp Leu Gly Val Leu Lys  
 370 375 380  
 Ala Pro Val Gly Trp Gln Arg Val Trp Asp Asp Ala Gly Ser Gly Lys  
 385 390 395 400  
 Ser Lys Asp Tyr Ala Cys Trp Arg Ala Ile Pro Pro Gln Gly Tyr Arg  
 405 410 415  
 Ala Leu Gly Asp Val Met Met Leu Ala Thr Ser Gly Tyr Asn Pro Pro  
 420 425 430  
 Asn Leu Pro Asp Tyr Val Cys Val His Gln Ser Leu Cys Ala Asp Val  
 435 440 445  
 Gln Thr Leu Gln Asn Arg Val Trp Trp Asp Lys Gly Thr Gly Ala Arg  
 450 455 460  
 Lys Asp Leu Ser Leu Trp Gln Pro Gly Ala Ala Gly Ala Val Ala Ser  
 465 470 475 480  
 Ser Cys Phe Ala Gly Val Pro Asn Tyr Asn Asn Pro Pro Asn Ser Gly  
 485 490 495  
 Asp Ile Glu Arg Leu Arg Gly Ser Ile Ala Cys Val Lys Thr Ser Ala  
 500 505 510  
 Ile Ala Ser Met Gln Glu Met Lys Ser Met Leu Ser Gln His Gln Gly  
 515 520 525



```

Met Glu Ala Met Met Ser Lys Leu
530                               535

<210> 8
<211> 536
<212> БІЛЖОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> мутант Axmi205(evo34)

<400> 8

Met Ala Ser Ala Ala Asn Ala Gly Gln Leu Gly Asn Leu Pro Gly Val
1                               10                               15

Thr Ser Met Gly Met Gly Tyr Asp Val Asn Gly Leu Tyr Ala Ser Pro
20                               25                               30

Glu Ser Leu Leu Gly Gln Pro Leu Phe Asp Phe Gly Gly Glu Leu Asp
35                               40                               45

Ser Ile Glu Ile Glu Gly Arg Ser Tyr Thr Phe Pro Arg Ser Met His
50                               55                               60

Val His Thr Tyr Phe His Ser Asp Phe Lys Gln Asp Val Ser Lys Glu
65                               70                               75                               80

Ile Glu Glu Tyr Arg Thr Lys Met Ser Gln His Val Gly Val Ser Gly
85                               90                               95

Arg Tyr Lys Leu Phe Ser Ala Ser Leu Ser Val Asp Phe Thr Thr Thr
100                              105                              110

Asp Gln Gln Leu Thr Glu Ile Thr Tyr Ser Ser Thr Arg Glu Ala His
115                              120                              125

Val Leu Trp Tyr Ile Ser Leu Pro Gly Ala Ala Thr Leu Arg Ser Met
130                              135                              140

Leu Arg Arg Asp Phe Arg Asp Asp Leu Asn Asn Pro Asn Met Pro Ala
145                              150                              155                              160

Met Glu Leu Phe Lys Arg Tyr Gly Pro Tyr Tyr Ile Ser Glu Ala Ala
165                              170                              175

Val Gly Gly Arg Leu Asp Tyr Ser Ala Ala Ser Lys Thr Leu Lys Met
180                              185                              190

```

```

Asp Ser Ser Gln Ser Leu Ser Thr Thr Ala Glu Met Ser Tyr Lys Ala
195                              200                              205

Leu Val Gly Glu Ile Lys Ile Glu His Gly Ser Glu Met Glu Lys Gln
210                              215                              220

Val Asn Ser Phe Arg Ser Asn Ser Thr Ile Arg Leu Thr Ala Thr Gly
225                              230                              235                              240

Gly Lys Pro Gly Met Thr Asp Arg Ile Leu His Gly Pro Asp Ser Gln
245                              250                              255

Gln Ala Phe Ser Gln Trp Ala Glu Ser Leu Leu Asp Tyr Ala Thr Leu
260                              265                              270

Met Asp Phe Ser Thr Glu Ser Leu Gln Pro Ile Trp Ala Leu Ala Asp
275                              280                              285

Lys Pro Glu Arg Arg Val Glu Leu Glu Asp Ala Phe Pro Glu Phe Met
290                              295                              300

Lys Gln Ser Gln Gln Ser Ile Pro Lys Val Asp Lys Val Leu Leu Met
305                              310                              315                              320

Asp Ala Arg Pro Pro Met Val Lys Ala Gly Glu Asp Ser Gly Ser Gly
325                              330                              335

Ala Ser Glu Asp Leu Ala Val Phe Asn Pro Ser Thr Ser Asn Gly Tyr
340                              345                              350

Lys Met Val Gly Gln Phe Gly Gln Arg Asn His Ala Ser Val Ala Asp
355                              360                              365

Gly His Ala Pro Ile Phe Lys Asp Leu Phe Asp Leu Gly Val Leu Lys
370                              375                              380

Ala Pro Val Gly Trp Gln Arg Val Trp Asp Asp Ala Gly Ser Gly Lys
385                              390                              395                              400

Ser Lys Asp Tyr Ala Cys Trp Arg Ala Ile Pro Pro Gln Gly Tyr Arg
405                              410                              415

Ala Leu Gly Asp Val Met Met Leu Ala Thr Ser Gly Tyr Asn Pro Pro
420                              425                              430

Asn Leu Pro Asp Tyr Val Cys Val His Gln Ser Leu Cys Ala Asp Val
435                              440                              445

```

Gln Thr Leu Gln Asn Arg Val Trp Trp Asp Lys Gly Thr Gly Ala Arg  
450 455 460

Lys Asp Val Ser Leu Trp Gln Pro Gly Ala Ala Gly Ala Val Ala Ser  
465 470 475 480

Ser Cys Phe Ala Gly Val Pro Asn Tyr Asn Asn Pro Pro Asn Ser Gly  
485 490 495

Asp Ile Glu Arg Leu Arg Gly Ser Ile Ala Cys Val Lys Thr Ser Ala  
500 505 510

Ile Ala Ser Met Gln Glu Met Lys Ser Met Leu Ser Gln His Gln Gly  
515 520 525

Met Glu Ala Met Met Ser Lys Leu  
530 535

<210> 9  
<211> 536  
<212> БІЛОК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Axmi205(evo35)

<400> 9

Met Ala Ser Ala Ala Asn Ala Gly Gln Leu Gly Asn Leu Pro Gly Val  
1 5 10 15

Thr Ser Met Gly Met Gly Tyr Asp Val Asn Gly Leu Tyr Ala Ser Pro  
20 25 30

Glu Ser Leu Leu Gly Gln Pro Leu Phe Asp Phe Gly Gly Glu Leu Asp  
35 40 45

Ser Ile Glu Ile Glu Gly Arg Ser Tyr Thr Phe Pro Arg Ser Met His  
50 55 60

Val His Thr Tyr Phe His Ser Asp Phe Lys Gln Asp Val Ser Lys Glu  
65 70 75 80

Ile Glu Glu Tyr Arg Glu Lys Met Ser Gln His Val Gly Val Ser Gly  
85 90 95

Arg Tyr Lys Leu Phe Ser Ala Ser Leu Ser Val Asp Phe Thr Thr Thr  
100 105 110

Asp Gln Gln Leu Thr Glu Ile Thr Tyr Ser Ser Thr Arg Glu Ala His  
115 120 125

Val Leu Trp Tyr Ile Ser Leu Pro Gly Ala Ala Thr Leu Arg Ser Met  
130 135 140

Leu Arg Arg Asp Phe Arg Asp Asp Leu Asn Asn Pro Asn Met Pro Ala  
145 150 155 160

Met Glu Leu Phe Lys Arg Tyr Gly Pro Tyr Tyr Ile Ser Glu Ala Ala  
165 170 175

Val Gly Gly Arg Leu Asp Tyr Ser Ala Ala Ser Lys Thr Leu Lys Met  
180 185 190

Asp Ser Ser Gln Ser Leu Ser Thr Thr Ala Glu Met Ser Tyr Lys Ala  
195 200 205

Leu Val Gly Glu Ile Lys Ile Glu His Gly Ser Glu Met Glu Lys Gln  
210 215 220

Val Asn Ser Phe Arg Ser Asn Ser Thr Ile Arg Leu Thr Ala Thr Gly  
225 230 235 240

Gly Lys Pro Gly Met Thr Asp Arg Ile Leu His Gly Pro Asp Ser Gln  
245 250 255

Gln Ala Phe Ser Gln Trp Ala Glu Ser Leu Leu Asp Tyr Ala Thr Leu  
260 265 270

Met Asp Phe Ser Thr Glu Ser Leu Gln Pro Ile Trp Ala Leu Ala Asp  
275 280 285

Lys Pro Glu Arg Arg Val Glu Leu Glu Asp Ala Phe Pro Glu Phe Met  
290 295 300

Lys Gln Ser Gln Gln Ser Ile Pro Lys Val Asp Lys Val Leu Leu Met  
305 310 315 320

Asp Ala Arg Pro Pro Met Val Lys Ala Gly Glu Asp Ser Gly Ser Gly  
325 330 335

Ala Ser Glu Asp Leu Ala Val Phe Asn Pro Ser Thr Ser Asn Gly Tyr  
340 345 350

Lys Met Val Gly Gln Phe Gly Gln Arg Asn His Ala Ser Val Ala Asp  
355 360 365

Gly His Ala Pro Ile Phe Lys Asp Leu Phe Asp Leu Gly Val Leu Lys  
370 375 380

Ala Pro Val Gly Trp Gln Arg Val Trp Asp Asp Ala Gly Ser Gly Lys  
385 390 395 400

Ser Lys Asp Tyr Ala Cys Trp Arg Ala Ile Pro Pro Gln Gly Tyr Arg  
405 410 415

Ala Leu Gly Asp Val Met Met Leu Ala Thr Ser Gly Tyr Asn Pro Pro  
420 425 430

Asn Leu Pro Asp Tyr Val Cys Val His Gln Ser Leu Cys Ala Asp Val  
435 440 445

Gln Thr Leu Gln Asn Arg Val Trp Trp Asp Lys Gly Thr Gly Ala Arg  
450 455 460

Lys Asp Val Ser Leu Trp Gln Pro Gly Ala Ala Gly Ala Val Ala Ser  
465 470 475 480

Ser Cys Phe Ala Gly Val Pro Asn Tyr Asn Asn Pro Pro Asn Ser Gly  
485 490 495

Asp Ile Glu Arg Leu Arg Gly Ser Ile Ala Cys Val Lys Thr Ser Ala  
500 505 510

Ile Ala Ser Met Arg Glu Met Lys Ser Met Leu Ser Gln His Gln Gly  
515 520 525

Met Glu Ala Met Met Ser Lys Leu  
530 535

<210> 10

<211> 536

<212> ВІДРОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> мутант Axmi205 (PMlib1 Pool IG2\_p2all)

<400> 10

Met Ala Ser Ala Ala Asn Ala Gly Gln Leu Gly Asn Leu Pro Gly Val  
1 5 10 15

Thr Ser Met Gly Met Gly Tyr Asp Val Asn Gly Leu Tyr Ala Ser Pro  
20 25 30

Glu Ser Leu Leu Gly Gln Pro Leu Phe Asp Phe Gly Gly Glu Leu Asp  
35 40 45

Ser Ile Glu Ile Glu Gly Arg Ser Tyr Thr Phe Pro Arg Ser Met His  
50 55 60

Val His Thr Tyr Phe His Ser Asp Phe Lys Gln Asp Val Ser Lys Glu  
65 70 75 80

Ile Glu Glu Tyr Arg Glu Lys Met Ser Gln His Val Gly Val Ser Gly  
85 90 95

Arg Tyr Lys Leu Phe Ser Ala Ser Leu Ser Val Asp Phe Thr Thr Thr  
100 105 110

Asp Gln Gln Leu Thr Glu Ile Thr Tyr Ser Ser Thr Arg Glu Ala His  
115 120 125

Val Leu Trp Tyr Ile Ser Leu Pro Gly Ala Ala Thr Leu Arg Ser Met  
130 135 140

Leu Arg Arg Asp Phe Arg Asp Asp Leu Asn Asn Pro Asn Met Pro Ala  
145 150 155 160

Met Glu Leu Phe Lys Arg Tyr Gly Pro Tyr Tyr Ile Ser Glu Ala Ala  
165 170 175

Val Gly Gly Arg Leu Asp Tyr Ser Ala Ala Ser Lys Thr Leu Lys Met  
180 185 190

Asp Ser Ser Gln Ser Leu Ser Thr Thr Ala Glu Met Ser Tyr Lys Ala  
195 200 205

Leu Val Gly Glu Ile Lys Ile Glu His Gly Ser Glu Met Glu Lys Gln  
210 215 220

Val Asn Ser Phe Arg Ser Asn Ser Thr Ile Arg Leu Thr Ala Thr Gly  
225 230 235 240

Gly Lys Pro Gly Met Thr Asp Arg Ile Leu His Gly Pro Asp Ser Gln  
245 250 255

Gln Ala Phe Ser Gln Trp Ala Glu Ser Leu Leu Asp Tyr Ala Thr Leu  
260 265 270

Met Asp Phe Ser Thr Glu Ser Leu Gln Pro Ile Trp Ala Leu Ala Asp  
275 280 285

Lys Pro Glu Arg Arg Val Glu Leu Glu Asp Ala Phe Pro Glu Phe Met  
290 295 300

```

Lys Gln Ser Gln Gln Ser Ile Pro Lys Val Asp Lys Val Leu Leu Met
305                               310           315           320

Asp Ala Arg Pro Pro Met Val Lys Ala Gly Glu Asp Ser Gly Ser Gly
                               325           330           335

Ala Ser Glu Asp Leu Ala Val Phe Asn Pro Ser Thr Ser Asn Gly Tyr
340                               345           350

Lys Met Val Gly Gln Phe Gly Gln Arg Asn His Ala Ser Val Ala Asp
355                               360           365

Gly His Ala Pro Ile Phe Lys Asp Leu Phe Asp Leu Gly Val Leu Lys
370                               375           380

Ala Pro Val Gly Trp Gln Arg Val Trp Asp Asp Ala Gly Ser Gly Lys
385                               390           395           400

Ser Lys Asp Tyr Ala Cys Trp Arg Ala Ile Pro Pro Gln Gly Tyr Arg
405                               410           415

Ala Leu Gly Asp Val Met Met Leu Ala Thr Ser Gly Tyr Asn Pro Pro
420                               425           430

Asn Leu Pro Asp Tyr Val Cys Val His Gln Ser Leu Cys Ala Asp Val
435                               440           445

Gln Thr Leu Gln Asn Arg Val Trp Trp Asp Lys Gly Thr Gly Ala Arg
450                               455           460

Lys Asp Val Ser Leu Trp Gln Pro Gly Ala Ala Gly Ala Val Ala Ser
465                               470           475           480

Ser Cys Phe Ala Gly Val Pro Asn Tyr Asn Asn Pro Pro Asn Ser Gly
485                               490           495

Asp Ile Glu Arg Leu Arg Gly Ser Ile Ala Cys Val Lys Thr Ser Ala
500                               505           510

Ile Ala Ser Met Gln Glu Met Lys Ser Met Leu Ser Gln His Gln Gly
515                               520           525

Met Glu Ala Met Met Ser Lys Leu
530                               535

<210> 11
<211> 536
<212> БІЛКОК
<213> Штучна послідовність

```

```

<220>
<223> мутант Axm1205 PMlib1 Pool IG2_plc1

<400> 11

Met Ala Ser Ala Ala Asn Ala Gly Gln Leu Gly Asn Leu Pro Gly Val
1           5           10           15

Thr Ser Met Gly Met Gly Tyr Asp Val Asn Gly Leu Tyr Ala Ser Pro
20           25           30

Glu Ser Leu Leu Gly Gln Pro Leu Phe Asp Phe Gly Gly Glu Leu Asp
35           40           45

Ser Ile Glu Ile Glu Gly Arg Ser Tyr Thr Phe Pro Arg Ser Met His
50           55           60

Val His Thr Tyr Phe His Ser Asp Phe Lys Gln Asp Val Ser Lys Glu
65           70           75           80

Ile Glu Glu Tyr Arg Glu Lys Met Ser Gln His Val Gly Val Ser Gly
85           90           95

Arg Tyr Lys Leu Phe Ser Ala Ser Leu Ser Val Asp Phe Thr Thr Thr
100          105          110

Asp Gln Gln Leu Thr Glu Ile Thr Tyr Ser Ser Thr Arg Glu Ala His
115          120          125

Val Leu Trp Tyr Ile Ser Leu Pro Gly Ala Ala Thr Leu Arg Ser Met
130          135          140

Leu Arg Arg Asp Phe Arg Asp Asp Leu Asn Asn Pro Asn Met Pro Ala
145          150          155          160

Met Glu Leu Phe Lys Arg Tyr Gly Pro Tyr Tyr Ile Ser Glu Ala Ala
165          170          175

Val Gly Gly Arg Leu Asp Tyr Ser Ala Ala Ser Lys Thr Leu Lys Met
180          185          190

Asp Ser Ser Gln Ser Leu Ser Thr Thr Ala Glu Met Ser Tyr Lys Ala
195          200          205

Leu Val Gly Glu Ile Lys Ile Glu His Gly Ser Glu Met Glu Lys Gln
210          215          220

Val Asn Ser Phe Arg Ser Asn Ser Thr Ile Arg Leu Thr Ala Thr Gly
225          230          235          240

```

```

Gly Lys Pro Gly Met Thr Asp Arg Ile Leu His Gly Pro Asp Ser Gln
245                250                255

Gln Ala Phe Ser Gln Trp Ala Glu Ser Leu Leu Asp Tyr Ala Thr Leu
260                265                270

Met Asp Phe Ser Thr Glu Ser Leu Gln Pro Ile Trp Ala Leu Ala Asp
275                280                285

Lys Pro Glu Arg Arg Val Glu Leu Glu Asp Ala Phe Pro Glu Phe Met
290                295                300

Lys Gln Ser Gln Gln Ser Ile Pro Lys Val Asp Lys Val Leu Leu Met
305                310                315

Asp Ala Arg Pro Pro Met Val Lys Ala Gly Glu Asp Ser Gly Ser Gly
325                330                335

Ala Ser Glu Asp Leu Ala Val Phe Asn Pro Ser Thr Ser Asn Gly Tyr
340                345                350

Lys Met Val Gly Gln Phe Gly Gln Arg Asn His Ala Ser Val Ala Asp
355                360                365

Gly His Ala Pro Ile Phe Lys Asp Leu Phe Asp Leu Gly Val Leu Lys
370                375                380

Ala Pro Val Gly Trp Gln Arg Val Trp Asp Asp Ala Gly Ser Gly Lys
385                390                395

Ser Lys Asp Tyr Ala Cys Trp Arg Ala Ile Pro Pro Gln Gly Tyr Arg
405                410                415

Ala Leu Gly Asp Val Met Met Leu Ala Thr Ser Gly Tyr Asn Pro Pro
420                425                430

Asn Leu Pro Asp Tyr Val Cys Val His Gln Ser Leu Cys Ala Asp Val
435                440                445

Gln Thr Leu Gln Asn Arg Val Trp Trp Asp Lys Gly Thr Gly Ala Arg
450                455                460

Lys Asp Thr Ser Leu Trp Gln Pro Gly Ala Ala Gly Ala Val Ala Ser
465                470                475

Ser Cys Phe Ala Gly Val Pro Asn Tyr Asn Asn Pro Pro Asn Ser Gly
485                490                495

Asp Ile Glu Arg Leu Arg Gly Ser Ile Ala Cys Val Lys Thr Ser Ala
500                505                510

Ile Ala Ser Met Gln Glu Met Lys Ser Met Leu Ser Gln His Gln Gly
515                520                525

Met Glu Ala Met Met Ser Lys Leu
530                535

<210> 12
<211> 536
<212> БІЛЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Axmi205 PML1b1 Pool 1G2_pla4

<400> 12
Met Ala Ser Ala Ala Asn Ala Gly Gln Leu Gly Asn Leu Pro Gly Val
1      5      10      15

Thr Ser Met Gly Met Gly Tyr Asp Val Asn Gly Leu Tyr Ala Ser Pro
20     25     30

Glu Ser Leu Leu Gly Gln Pro Leu Phe Asp Phe Gly Gly Glu Leu Asp
35     40     45

Ser Ile Glu Ile Glu Gly Arg Ser Tyr Thr Phe Pro Arg Ser Met His
50     55     60

Val His Thr Tyr Phe His Ser Asp Phe Lys Gln Asp Val Ser Lys Glu
65     70     75     80

Ile Glu Glu Tyr Arg Glu Lys Met Ser Gln His Val Gly Val Ser Gly
85     90     95

Arg Tyr Lys Leu Phe Ser Ala Ser Leu Ser Val Asp Phe Thr Thr Thr
100    105    110

Asp Gln Gln Leu Thr Glu Ile Thr Tyr Ser Ser Thr Arg Glu Ala His
115    120    125

Val Leu Trp Tyr Ile Ser Leu Pro Gly Ala Ala Thr Leu Arg Ser Met
130    135    140

Leu Arg Arg Asp Phe Arg Asp Asp Leu Asn Asn Pro Asn Met Pro Ala
145    150    155    160

```



```

Met Glu Leu Phe Lys Arg Tyr Gly Pro Tyr Tyr Ile Ser Glu Ala Ala
    165              170              175

Val Gly Gly Arg Leu Asp Tyr Ser Ala Ala Ser Lys Thr Leu Lys Met
    180              185              190

Asp Ser Ser Gln Ser Leu Ser Thr Thr Ala Glu Met Ser Tyr Lys Ala
    195              200              205

Leu Val Gly Glu Ile Lys Ile Glu His Gly Ser Glu Met Glu Lys Gln
    210              215              220

Val Asn Ser Phe Arg Ser Asn Ser Thr Ile Arg Leu Thr Ala Thr Gly
    225              230              235              240

Gly Lys Pro Gly Met Thr Asp Arg Ile Leu His Gly Pro Asp Ser Gln
    245              250              255

Gln Ala Phe Ser Gln Trp Ala Glu Ser Leu Leu Asp Tyr Ala Thr Leu
    260              265              270

Met Asp Phe Ser Thr Glu Ser Leu Gln Pro Ile Trp Ala Leu Ala Asp
    275              280              285

Lys Pro Glu Arg Arg Val Glu Leu Glu Asp Ala Phe Pro Glu Phe Met
    290              295              300

Lys Gln Ser Gln Gln Ser Ile Pro Lys Val Asp Lys Val Leu Leu Met
    305              310              315              320

Asp Ala Arg Pro Pro Met Val Lys Ala Gly Glu Asp Ser Gly Ser Gly
    325              330              335

Ala Ser Glu Asp Leu Ala Val Phe Asn Pro Ser Thr Ser Asn Gly Tyr
    340              345              350

Lys Met Val Gly Gln Phe Gly Gln Arg Asn His Ala Ser Val Ala Asp
    355              360              365

Gly His Ala Pro Ile Phe Lys Asp Leu Phe Asp Leu Gly Val Leu Lys
    370              375              380

Ala Pro Val Gly Trp Gln Arg Val Trp Asp Asp Ala Gly Ser Gly Lys
    385              390              395              400

Ser Lys Asp Tyr Ala Cys Trp Arg Ala Ile Pro Pro Gln Gly Tyr Arg
    405              410              415

Ala Leu Gly Asp Val Met Met Leu Ala Thr Ser Gly Tyr Asn Pro Pro
    420              425              430

Asn Leu Pro Asp Tyr Val Cys Val His Gln Ser Leu Cys Ala Asp Val
    435              440              445

Gln Thr Leu Gln Asn Arg Val Trp Trp Asp Lys Gly Thr Gly Ala Asn
    450              455              460

Lys Asp Val Ser Leu Trp Gln Pro Gly Ala Ala Gly Ala Val Ala Ser
    465              470              475              480

Ser Cys Phe Ala Gly Val Pro Asn Tyr Asn Asn Pro Pro Asn Ser Gly
    485              490              495

Asp Ile Glu Arg Leu Arg Gly Ser Ile Ala Cys Val Lys Thr Ser Ala
    500              505              510

Ile Ala Ser Met Gln Glu Met Lys Ser Met Leu Ser Gln His Gln Gly
    515              520              525

Met Glu Ala Met Met Ser Lys Leu
    530              535

<210> 13
<211> 4
<212> БІЛЮК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> пептид, що націляється на ендоплазматичний ретикулум

<400> 13
Lys Asp Glu Leu
1

```

---

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

---

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,  
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

---

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601