



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **121303** (13) **C2**
(51) МПК
C12N 15/32 (2006.01)
C07K 14/325 (2006.01)
A01N 63/23 (2020.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

| | |
|--|---|
| (21) Номер заявки: а 2016 02083 | (72) Винахідник(и): Тайєр Ребекка (US), Сампсон Кімберлі С. (US), Лехтінен Дуан (US), Магалес Леонардо (US) |
| (22) Дата подання заявки: 08.08.2014 | (73) Власник(и): АТЕНІКС КОРП., 3500 Paramount Parkway, Morrisville, NC 27560, United States of America (US) |
| (24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 12.05.2020 | (74) Представник: Петров Андрій Володимирович, реєстр. №139 |
| (31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 61/863,982 | (56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2011/014749 A1, 03.02.2011 WO 2007/147096 A2, 21.12.2007 W. Ye et al, "Mining New Crystal Protein Genes from Bacillus thuringiensis on the Basis of Mixed Plasmid-Enriched Genome Sequencing and a Computational Pipeline", Applied and Environmental Microbiology, 15.07.2012, vol. 78, no. 14, P. 4795 - 4801 A. E. Sheppard et al, "Complete Genome Sequence of Bacillus thuringiensis Strain 407 Cry-", Genome Announcements, 28.02.2013, vol. 1, no. 1, P. e00158 - 12 Steven e. Naranjo, "Impacts of Bt Transgenic Cotton on Integrated Pest Management", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 08.06.2011, vol. 59, no. 11, P. 5842 - 5851 Liliana Pardo-López et al, "Bacillus thuringiensis insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection", Fems Microbiology Reviews, 11.01.2013, vol. 37, no. 1, P. 3 - 22 |
| (32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 09.08.2013 | |
| (33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US | |
| (41) Публікація відомостей про заявку: 25.04.2016, Бюл.№ 8 | |
| (46) Публікація відомостей про видачу патенту: 12.05.2020, Бюл.№ 9 | |
| (86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/US2014/050327, 08.08.2014 | |

(54) МОЛЕКУЛА РЕКОМБІНАНТНОЇ НУКЛЕЇНОВОЇ КИСЛОТИ, ЩО КОДУЄ ТОКСИН АХМІ440, ТА ЇЇ ЗАСТОСУВАННЯ**(57) Реферат:**

Винахід стосується молекули рекомбінантної нуклеїнової кислоти, що містить нуклеотидну послідовність, яка кодує амінокислотну послідовність, що має пестицидну активність. Винахід також стосується вектора, що містить молекулу рекомбінантної нуклеїнової кислоти, клітини-хазяїна, що містить рекомбінантну нуклеїнову кислоту, трансгенної рослини, трансгенного насіння, рекомбінантного поліпептиду з пестицидною активністю, композиції, способу боротьби

UA 121303 C2

з популяцією лускокрилого шкідника, способу знищення лускокрилого шкідника, способу одержання поліпептиду з пестицидною активністю, рослини або рослинної клітини із стабільно вбудованою в її геном ДНК-конструкцією, способу захисту рослини від лускокрилого шкідника та способу підвищення врожайності рослини.

ГАЛУЗЬ ВІНАХОДУ

Даний винахід відноситься до галузі молекулярної біології. У даному документі забезпечуються нові гени, які кодують пестицидні білки. Дані білки та нуклеотидні послідовності, що їх кодують, є придатними при приготуванні пестицидних складів та при отриманні трансгенних рослин, стійких до сільськогосподарських шкідників.

ПЕРЕДУМОВИ ВІНАХОДУ

Bacillus thuringiensis являє собою грампозитивну спороутворювальну ґрунтову бактерію, яка здатна продукувати кристалічні включення, що специфічно токсичні для деяких рядів та видів комах, але є нешкідливими для рослин та інших нецільових організмів. У зв'язку з цим композиції, що містять штами *Bacillus thuringiensis* або їх інсектицидні білки, можуть застосовуватися як екологічно прийнятні інсектициди для контролю сільськогосподарських комах-шкідників або комах-переносників різних захворювань людей та тварин.

Кристалічні (Cry) білки (дельта-ендотоксини) *Bacillus thuringiensis* мають потужну інсектицидну активність проти переважно личинок лускокрилих, напівтвердокрилих, двокрилих та твердокрилих. Дані білки також продемонстрували активність проти шкідників рядів Hymenoptera, Homoptera, Phthiraptera, Mallophaga та Acari, а також інших рядів безхребетних, таких як Nematelminthes, Platyhelminthes та Sarcomastigophora (Feitelson (1993) The *Bacillus Thuringiensis* family tree. In Advanced Engineered Pesticides, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.). Дані білки первісно класифікували як CryI-CryV, переважно на основі їх інсектицидної активності. Основними класами були Lepidoptera-специфічні (I), Lepidoptera-специфічні та Diptera-специфічні (II), Coleoptera-специфічні (III), Diptera-специфічні (IV) та нематода-специфічні (V) та (VI). Додатково білки класифікували в підродини; більш спорідненим білкам у складі кожної родини надали кодові позначення Cry1A, Cry1B, Cry1C тощо. Ще більш спорідненим білкам в рамках кожної групи надали такі позначення як Cry1C1, Cry1C2 тощо.

Було описано номенклатуру для генів Cry, яка більше базується на основі гомології амінокислотних послідовностей, ніж специфічності до комахи-мішені (Crickmore et al. (1998) Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62:807-813). У даній класифікації кожному токсину надається унікальна назва, що включає первинний ієрархічний рівень (арабська цифра), вторинний ієрархічний рівень (велика літера), третинний ієрархічний рівень (мала літера) та четвертинний ієрархічний рівень (друга арабська цифра). Римські цифри було замінено арабськими цифрами на первинному ієрархічному рівні. Білки з ідентичністю послідовностей менше 45% мають різні первинні ієрархічні рівні, а критеріями для вторинних та третинних ієрархічних рівнів є ідентичність 78% та 95% відповідно.

Кристалічний білок не проявляє інсектицидної активності до моменту його поглинання та розчинення у середній кишці комах. Поглинений протоксин зазнає гідролізу протеазами у травному тракті комах з утворенням активних токсичних молекул. (Höfte and Whiteley (1989) Microbiol. Rev. 53:242-255). Даний токсин зв'язується з апікальними рецепторами щіткової облямівки у середній кишці личинок-мішеней та вбудовується в апікальну мембрану, утворюючи іонні канали або пори, що має результатом загибель личинки.

Дельта-ендотоксини загалом мають п'ять консервативних доменів послідовностей та три консервативні структурні домени (див., наприклад, de Maagd et al. (2001) Trends Genetics 17:193-199). Перший консервативний структурний домен складається із семи альфа-спіралей та бере участь у проникненні через мембрану та пороутворенні. Домен II складається з трьох складчастих бета-шарів, які впорядковані в структурі грецького ключа, а домен III складається з двох анти-паралельних складчастих бета-шарів у структурі типу "jelly-roll" (de Maagd et al., 2001, supra). Домени II та III беруть участь у розпізнаванні та зв'язуванні рецепторів та тому вважаються детермінантами специфічності токсину.

Через спустошення, яке можуть спричинити комах, та для покращення урожайності шляхом контролю комах-шкідників, існує постійна потреба у відкритті нових форм пестицидних токсинів.

КОРОТКИЙ ОПИС ВІНАХОДУ

Забезпечуються композиції та способи для надання пестицидної активності бактеріям, рослинам, рослинним клітинам, тканинам та насінню рослин. Композиції містять молекули нуклеїнових кислот, послідовності яких кодують пестицидні та інсектицидні поліпептиди, вектори, які містять дані молекули нуклеїнових кислот, та клітини-хазяїни, які містять такі вектори. Композиції також містять послідовності пестицидних поліпептидів та антитіла до даних поліпептидів. Нуклеотидні послідовності можуть застосовуватися в ДНК-конструкціях або експресійних касетах для трансформації та експресії в організмах, зокрема мікроорганізмах та рослинах. Нуклеотидні або амінокислотні послідовності можуть являти собою синтетичні послідовності, які було сконструйовано для експресії в організмі, включаючи, але без обмежень,

мікроорганізм або рослину. Композиції також містять бактерії, рослини, рослинні клітини, тканини та насіння, що містять нуклеотидну послідовність за даним винаходом.

Зокрема, забезпечуються виділені або рекомбінантні молекули нуклеїнових кислот, які кодують пестицидний білок. Крім того, охоплені амінокислотні послідовності, що відповідають пестицидному білку. Зокрема, даний винахід забезпечує виділену або рекомбінантну молекулу нуклеїнової кислоти, яка містить нуклеотидну послідовність, що кодує амінокислотну послідовність, показану в SEQ ID NO:3-6 або нуклеотидну послідовність, викладену в SEQ ID NO:1 або 2, а також їх біологічно-активні варіанти та фрагменти. Також охоплюються нуклеотидні послідовності, що є комплементарними нуклеотидній послідовності за даним винаходом або які гібридизуються з послідовністю за даним винаходом чи комплементарним їй ланцюгом. Додатково забезпечуються вектори, клітини-хазяїни, рослини та насіння, які містять нуклеотидні послідовності за даним винаходом або нуклеотидні послідовності, які кодують амінокислотні послідовності за даним винаходом, а також їх біологічно-активні варіанти та фрагменти.

Забезпечуються способи одержання поліпептидів за даним винаходом та застосування даних поліпептидів для контролю або знищення комах, які відносяться до рядів лускокрилі, напівтвердокрилі, твердокрилі, нематоди або двокрилі. Також включено способи та набори для виявлення у зразку нуклеїнових кислот та поліпептидів за даним винаходом.

Композиції та способи за даним винаходом є корисними для одержання організмів з підвищеною стійкістю або резистентністю до шкідників. Дані організми та композиції, що містять ці організми, є придатними для сільськогосподарських цілей. Композиції за даним винаходом також є придатними для створення змінених або покращених білків, які мають пестицидну активність або для виявлення присутності пестицидних білків чи нуклеїнових кислот у продуктах або організмах.

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС

Даний винахід відноситься до композицій та способів регулювання резистентності або стійкості до шкідників у організмах, зокрема, рослинах або рослинних клітинах. Під "резистентністю" мають на увазі, що шкідник (наприклад, комаха) гине при поглинанні або іншому контакті з поліпептидами за даним винаходом. Під "толерантністю" мають на увазі порушення або зменшення руху тіла, живлення, розмноження або інших функцій організму шкідника. Способи включають трансформування організмів із застосуванням нуклеотидної послідовності, яка кодує пестицидний білок за даним винаходом. Зокрема, нуклеотидні послідовності за даним винаходом є корисними для одержання рослин та мікроорганізмів, які мають пестицидну активність. Отже, забезпечуються трансформовані бактерії, рослини, рослинні клітини, тканини та насіння рослин. Композиції являють собою пестицидні нуклеїнові кислоти та білки від *Bacillus* або інших видів. Послідовності знаходять застосування в конструюванні векторів експресії для наступної трансформації в організмах, що представляють інтерес, як зонди для виділення інших гомологічних (або частково гомологічних) генів та для створення змінених пестицидних білків із застосуванням способів, відомих в рівні техніки, таких як переміщення доменних блоків або перестановка в ДНК, наприклад, з використанням представників родин ендотоксинів Cry1, Cry2 та Cry9. Білки знаходять застосування у здійсненні контролю або винищенні популяцій шкідників з лускокрилих, напівтвердокрилих, твердокрилих, двокрилих або нематод та для одержання композицій з пестицидною активністю.

Під виразом "пестицидний токсин" або "пестицидний білок" мають на увазі токсин, який має токсичну активність проти одного або декількох шкідників, включаючи, але без обмежень, представників рядів *Lepidoptera*, *Diptera*, *Hemiptera* та *Coleoptera* чи типу *Nematoda*, або білок, який характеризується гомологією до такого білка. Пестицидні білки було виділено з організмів, які включають, наприклад, *Bacillus* sp., *Clostridium bifermentans* та *Paenibacillus popilliae*. Пестицидні білки містять амінокислотні послідовності, виведені від нуклеотидних послідовностей повної довжини, що розкриваються в даному документі, та амінокислотні послідовності, які коротше послідовностей повної довжини за рахунок використання альтернативної нижче розташованої ділянки початку трансляції або за рахунок процесингу, який призводить до утворення більш короткого білка, що характеризується пестицидною активністю. Процесинг може мати місце у тому організмі, в якому експресується білок, або в організмі шкідника після поглинання білка.

Отже, у даному документі забезпечуються нові виділені або рекомбінантні нуклеотидні послідовності, які забезпечують пестицидну активність. Дані нуклеотидні послідовності кодують поліпептиди з гомологією до відомих дельта-ендотоксинів або бінарних токсинів. Також забезпечуються амінокислотні послідовності пестицидних білків. Білок, синтезований у результаті трансляції даного гена, дозволяє клітинам контролювати або знищувати шкідників,

які його поглинають.

Виділені молекули нуклеїнових кислот та їх варіанти і фрагменти

Один аспект за даним винаходом відноситься до виділених або рекомбінантних молекул нуклеїнових кислот, які містять нуклеотидні послідовності, що кодують пестицидні білки та поліпептиди або їх біологічно активні частини, а також молекул нуклеїнових кислот, що підходять для застосування як гібридизаційні зонди для ідентифікації молекул нуклеїнових кислот, які кодують білки з ділянками гомології послідовностей. Також у даному документі охоплено нуклеотидні послідовності, що здатні до гібридизації з нуклеотидними послідовностями за даним винаходом у жорстких умовах, як визначено у іншому розділі даного документа. Як використовується у даному документі, вираз "молекула нуклеїнової кислоти" включає молекули ДНК (наприклад, рекомбінантну ДНК, кДНК або геномну ДНК), молекули РНК (наприклад, іРНК) та аналоги ДНК або РНК, які створено із застосуванням аналогів нуклеотидів. Молекула нуклеїнової кислоти може бути одноланцюговою або дволанцюговою, але переважно є дволанцюговою ДНК.

Вираз "виділена" або "рекомбінантна" нуклеотидна послідовність (або ДНК) використовується в даному документі для позначення нуклеотидної послідовності (або ДНК), яка більше не перебуває в природному для неї середовищі, наприклад, перебуває у системі *in vitro* або у рекомбінантній бактеріальній або рослинній клітині-хазяїні. У деяких варіантах здійснення виділена або рекомбінантна нуклеїнова кислота не містить послідовностей (переважно послідовностей, що кодують білок), які у природних умовах фланкують нуклеїнову кислоту (тобто, послідовності, які розташовані на 5' та 3' кінцях нуклеїнової кислоти) у геномній ДНК організму, з якого отримана нуклеїнова кислота. У контексті за даним винаходом вираз "виділені", при використанні до молекул нуклеїнових кислот, виключає виділені хромосоми. Наприклад, у різних варіантах здійснення виділений дельта-ендотоксин, що кодує молекулу нуклеїнової кислоти, може містити нуклеотидні послідовності довжиною менше 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 у природних умовах фланкують молекулу нуклеїнової кислоти у геномній ДНК клітини, з якої було отримано нуклеїнову кислоту. У різних варіантах здійснення білок дельта-ендотоксин, який практично не містить клітинного матеріалу, включає склади білка, що містять менше приблизно 30%, 20%, 10% або 5% (на суху вагу) білка дельта-ендотоксину (також називається у даному документі "білок, що забруднює"). У деяких варіантах здійснення рекомбінантна нуклеїнова кислота за даним винаходом містить одну або декілька нуклеотидних замінів у порівнянні з SEQ ID NO:1 або її варіантом, чи фрагментом.

Нуклеотидні послідовності, що кодують білки за даним винаходом, містять у своєму складі послідовність, викладену в SEQ ID NO:1 або 2, та її варіанти, фрагменти і комплементарні ланцюги. Під "комплементарною" мають на увазі нуклеотидну послідовність, яка є достатньо комплементарною даній нуклеотидній послідовності, щоб вона могла гібридизуватися із заданою нуклеотидною послідовністю з утворенням стабільного дуплекса. Відповідні амінокислотні послідовності пестицидних білків, які кодуються даними нуклеотидними послідовностями, викладені в SEQ ID NO:3-6.

Молекули нуклеїнових кислот, що являють собою фрагменти даних нуклеотидних послідовностей, які кодують пестицидні білки, також включено у даний винахід. Під "фрагментом" мають на увазі частину нуклеотидної послідовності, яка кодує пестицидний білок. Фрагмент нуклеотидної послідовності може кодувати біологічно активну частину пестицидного білка, або це може бути фрагмент, який може використовуватися як гібридизаційний зонд або ПЛР-праймер із застосуванням способів, які розкрито нижче. Молекули нуклеїнових кислот, які являють собою фрагменти нуклеотидної послідовності, що кодує пестицидний білок, містять щонайменше приблизно 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1350, 1400 суміжних нуклеотидів або число нуклеотидів, що досягає числа нуклеотидів, присутніх у нуклеотидній послідовності повної довжини, що кодує пестицидний білок, розкрито у даному документі, залежно від передбачуваного застосування. Під "суміжними" нуклеотидами мають на увазі нуклеотидні залишки, які безпосередньо прилягають один до одного. Фрагменти нуклеотидних послідовностей за даним винаходом будуть кодувати фрагменти білків, які зберігають біологічну активність пестицидного білка і, отже, зберігають пестицидну активність. Отже, біологічно-активні фрагменти поліпептидів, розкритих у даному документі, також включено у даний винахід. Під виразом "зберігає активність" мають на увазі, що фрагмент матиме щонайменше приблизно 30%, щонайменше приблизно 50%, щонайменше приблизно 70%, 80%, 90%, 95% або більш високу пестицидну активність щодо пестицидного білка. У одному варіанті здійснення пестицидна активність являє собою активність щодо твердокрилих. В іншому варіанті здійснення пестицидна активність являє собою активність щодо лускокрилих.

В іншому варіанті здійснення пестицидна активність являє собою активність щодо нематод. В іншому варіанті здійснення пестицидна активність являє собою активність щодо двокрилих. В іншому варіанті здійснення пестицидна активність являє собою активність щодо напівтвердокрилих. Способи вимірювання пестицидної активності добре відомі в рівні техніки.

5 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, кожен з яких включено у даний документ у повному обсязі за допомогою посилання.

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 суміжних амінокислот або число амінокислот, величиною до загального числа амінокислот, що присутні у пестицидному білку повної довжини за даним винаходом. У деяких варіантах здійснення фрагмент являє собою фрагмент, що утворюється у результаті протеолітичного розщеплення. Наприклад, фрагмент, що утворюється у результаті протеолітичного розщеплення, може мати N-кінцеве або C-кінцеве відсікання довжиною щонайменше приблизно 100 амінокислот, приблизно 120, приблизно 130, приблизно 140, приблизно 150 або приблизно 160 амінокислот відносно SEQ ID NO:3-6. У деяких варіантах здійснення фрагменти, які включено у даний документ, утворені у результаті видалення C-кінцевого домену кристалізації, наприклад, за допомогою протеолізу або за допомогою вставки стоп-кодону у кодуючу послідовність.

Переважні пестицидні білки за даним винаходом кодуються нуклеотидною послідовністю, яка є достатньо ідентичною нуклеотидній послідовності SEQ ID NO:1 або 2, або пестицидні білки є достатньо ідентичними амінокислотній послідовності, викладеній у SEQ ID NO:3-6. Під виразом "достатньо ідентична" мають на увазі амінокислотну або нуклеотидну послідовність, яка має щонайменше приблизно 60% або 65% ідентичність послідовності, приблизно 70% або 75% ідентичність послідовності, приблизно 80% або 85% ідентичність послідовності, приблизно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% або більш високу ідентичність послідовності у порівнянні з еталонною послідовністю, як показано із застосуванням однієї з програм вирівнювання, описаних у даному документі, із застосуванням стандартних параметрів. Фахівцеві у даній галузі техніки буде зрозуміло, що ці значення можуть бути відповідним чином скоректовані для визначення відповідної ідентичності білків, які кодуються двома нуклеотидними послідовностями, з урахуванням виродженості кодонів, подібності амінокислот, позиціонування рамки читування тощо.

Для визначення відсотка ідентичності двох амінокислотних послідовностей або двох нуклеїнових кислот, послідовності вирівнюють з метою оптимального порівняння. Відсоток ідентичності між двома послідовностями є функцією від числа ідентичних положень, спільних для послідовностей (тобто, відсоток ідентичності = число ідентичних положень/загальне число положень (наприклад, положення, що перекриваються) $\times 100$). В одному варіанті здійснення дві послідовності мають однакову довжину. У іншому варіанті здійснення відсоток ідентичності розраховується по усій довжині еталонної послідовності (тобто, розкритої у даному документі послідовності у якості будь-якої з послідовностей SEQ ID NO:1-6). Відсоток ідентичності між двома послідовностями може бути визначено із застосуванням методик, подібних до тих, які описано нижче, з дозволом або без дозволу гепів. При розрахунках відсотка ідентичності, зазвичай, підраховується число точних збігів. Геп, тобто положення при вирівнюванні, у якому залишок присутній в одній послідовності, але не в іншій, розглядається як положення з неідентичними залишками.

Визначення відсотка ідентичності між двома послідовностями можна здійснити з використанням математичного алгоритму. Необмежувальним прикладом математичного алгоритму, використовуваним для порівняння двох послідовностей, є алгоритм за Karlin and Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264, модифікований як у Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877. Такий алгоритм включено до програми BLASTN та BLASTX за Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403. Пошуки нуклеотидів BLAST можна здійснювати за допомогою програми BLASTN, оцінка = 100, довжина слова = 12, для одержання нуклеотидних послідовностей, гомологічних пестицидо-подібним молекулам нуклеїнових кислот за даним винаходом. BLAST-пошуки білків можна здійснювати за допомогою програми BLASTX, оцінка = 50, довжина слова = 3, для одержання амінокислотних послідовностей, гомологічних молекулам пестицидних білків за даним винаходом. Для одержання вирівнювань з гепами з метою порівняння можна застосовувати програму Gapped BLAST (в BLAST 2.0), як описано у Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389. Як альтернативу можна застосовувати програму PSI-Blast для ітераційного проведення повторного пошуку, який виявляє віддалені зв'язки між

молекулами. Див. Altschul et al. (1997) *supra*. При роботі з програмами BLAST, Gapped BLAST та PSI-Blast можуть застосовуватися параметри за замовчуванням, встановлені для відповідних програм (наприклад, BLASTX та BLASTN). Вирівнювання можна також проводити вручну шляхом звіряння.

Іншим необмежувальним прикладом математичного алгоритму, використовуваним для порівняння послідовності, є алгоритм ClustalW (Higgins et al. (1994) *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680). ClustalW порівнює послідовності та вирівнює цілісну амінокислотну або ДНК-послідовність та в такий спосіб може надати дані про консервативність для усієї амінокислотної послідовності. Алгоритм ClustalW застосовується у декількох наявних на ринку пакетах програмного забезпечення для аналізу ДНК/амінокислот, у таких як модуль ALIGNX, що входить у пакет програм Vector NTI (Invitrogen Corporation, Карлсбад, Каліфорнія). Після вирівнювання амінокислотних послідовностей за допомогою програми ClustalW, може бути оцінений відсоток ідентичності амінокислот. Необмежувальний приклад комп'ютерних програм, які застосовуються для аналізу вирівнювань ClustalW, включає GENEDOC™. GENEDOC™ (Karl Nicholas) дозволяє провести оцінку подібності та ідентичності амінокислот (або ДНК) серед численних білків. Іншим необмежувальним прикладом математичного алгоритму, що використовується для порівняння послідовності, є алгоритм Myers and Miller (1988) CABIOS 4:11-17. Такий алгоритм, інтегрований у програму ALIGN (version 2.0), яка є частиною пакета програм GCG Wisconsin Genetics, Version 10 (що пропонується Accelrys, Inc., 9685 Scranton Rd., Сан-Дієго, Каліфорнія, США). При роботі з програмою ALIGN для порівняння амінокислотних послідовностей можна використовувати таблицю заміни залишків PAM120, штраф за продовження гена, що дорівнює 12, та штраф за відкриття гена, що дорівнює 4.

Якщо не зазначено інше, програма GAP версії 10, в якій використовується алгоритм згідно Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48(3):443-453, буде використовуватися для того, щоб визначити ідентичність або подібність послідовностей із застосуванням наступних параметрів: % ідентичності та % подібності для нуклеотидної послідовності із застосуванням штрафу за відкриття гена, що дорівнює 50, штрафу за продовження, що дорівнює 3, та матриці заміни `nwsgapdna.cmp`; % ідентичності або % подібності для амінокислотної послідовності із застосуванням штрафу за відкриття гена, рівного 8, і штрафу за продовження, рівного 2, та програми підрахунку балів BLOSUM62. Також можуть використовуватися еквівалентні програми. Під "еквівалентною програмою" мають на увазі будь-яку програму для порівняння послідовностей, яка для будь-яких двох порівнюваних послідовностей створює вирівнювання, що має ідентичні збіги нуклеотидних залишків та ідентичну відсоткову тотожність послідовностей у порівнянні з відповідним вирівнюванням, отриманим з використанням GAP версії 10.

Даний винахід також охоплює варіантні молекули нуклеїнових кислот. "Варіанти" нуклеотидних послідовностей, що кодують пестицидні білки, включають ті послідовності, які кодують пестицидні білки, що розкриваються у даному документі, але які відрізняються консервативно у зв'язку з виродженістю генетичного коду, а також ті послідовності, які є достатньо ідентичними, як обговорювалося вище. Алельні варіанти, що виникають у природних умовах, можуть бути ідентифіковані із застосуванням добре відомих молекулярно-біологічних методик, таких як методики полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та гібридизації, які описано нижче. Варіантні нуклеотидні послідовності також включають одержані синтетичним шляхом нуклеотидні послідовності, які було створено, наприклад, із застосуванням сайт-специфічного мутагенезу, але які ще кодують пестицидні білки, що розкриваються у даному документі, як обговорюється нижче. Варіантні білки, які включено у даний винахід, є біологічно активними, що означає, що вони продовжують проявляти необхідну біологічну активність нативного білка, тобто, пестицидну активність. Під виразом "зберігає активність" мають на увазі, що варіант буде мати щонайменше приблизно 30%, щонайменше приблизно 50%, щонайменше приблизно 70% або щонайменше приблизно 80% пестицидної активності нативного білка. Способи визначення пестицидної активності добре відомі в рівні 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 включені у даний документ у повному обсязі за допомогою посилання.

Досвідченому фахівцю також буде зрозуміло, що зміни можуть бути введені шляхом мутацій нуклеотидних послідовностей за даним винаходом, що тим самим призведе до змін в амінокислотній послідовності, що кодує пестицидні білки, не змінюючи біологічну активність білків. Отже, варіантні молекули виділених нуклеїнових кислот можуть бути створені шляхом введення однієї або декількох нуклеотидних заміни, вставок або делецій у відповідну нуклеотидну послідовність, що розкривається у даному документі, таким чином, щоб одна або

декілька замін, вставок або делецій амінокислот були введені у кодований білок. Мутації можуть бути введені із застосуванням стандартних методик, таких як сайт-специфічний мутагенез та ПЛР-опосередкований мутагенез. Ці варіантні нуклеотидні послідовності також включено у даний винахід.

Наприклад, консервативні амінокислотні заміни можна здійснити в одному або декількох передбачених замінних амінокислотних залишках. "Замінний" амінокислотний залишок являє собою залишок, який може бути змінений у послідовності дикого типу пестицидного білка без змінення біологічної активності, у той час як "незамінний" амінокислотний залишок необхідний для здійснення біологічної активності. "Консервативна амінокислотна заміна" є такою, при якій амінокислотний залишок замінюється амінокислотним залишком, що має подібний бічний ланцюг. Родини амінокислотних залишків, що мають подібні бічні ланцюги, було визначено в рівні техніки. Дані родини включають амінокислоти з основними бічними ланцюгами (наприклад, лізин, аргінін, гістидин), кислотними 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).

Дельта-ендотоксини, як правило, мають п'ять консервативних доменів послідовностей та три консервативні структурні домени (див., наприклад, de Maagd et al. (2001) Trends Genetics 17:193-199). Перший консервативний структурний домен містить сім альфа-спіралей та приймає участь у інсерції мембрани та пороутворенні. Домен II складається із трьох складчастих бета-шарів, які упорядковано в структурі грецького ключа, а домен III складається з двох анти-паралельних складчастих бета-шарів у структурі типу "jelly-roll" (de Maagd et al., 2001, supra). Домени II і III беруть участь у розпізнаванні та зв'язуванні рецепторів і, отже, вважаються детермінантами специфічності токсину.

Амінокислотні заміни можуть бути здійснені в неконсервативних ділянках, які зберігають функцію. Загалом, такі заміни не здійснюються для консервативних амінокислотних залишків, або для амінокислотних залишків, що перебувають усередині консервативного мотиву, де такі залишки є необхідними для активності білка. Приклади залишків, які є консервативними та які можуть бути незамінними для активності білка, включають, наприклад, залишки, які є ідентичними для усіх білків, включених у вирівнювання схожих або споріднених токсинів до послідовностей за даним винаходом (наприклад, залишки, які ідентичні при вирівнюванні гомологічних білків). Приклади залишків, які є консервативними, але які можуть дозволяти консервативні амінокислотні заміни і при цьому зберігати активність, включають, наприклад, залишки які мають тільки консервативні заміни для усіх білків, включених у вирівнювання послідовностей подібних або споріднених токсинів до послідовності за даним винаходом (наприклад, залишки, які мають тільки консервативні заміни для усіх включених у вирівнювання гомологічних білків). Однак фахівцеві у даній галузі буде зрозуміло, що функціональні варіанти можуть мати незначні консервативні або неконсервативні альтерації у консервативних залишках.

Як альтернатива, різні нуклеотидні послідовності можуть бути отримані шляхом введення випадкових мутацій протягом усієї або частини кодуєчої послідовності, як, наприклад, із застосуванням насичувального мутагенезу, а одержані у результаті мутанти можуть бути піддані скринінгу щодо їх здатності забезпечувати пестицидну активність для виявлення мутантів, що зберігають активність. Після мутагенезу білок, що кодується, може експресуватись рекомбінантно, а активність цього білка можна визначити з використання стандартних методик аналізу.

Із застосуванням таких способів як ПЛР, гібридизація та інших, можна ідентифікувати відповідні пестицидні послідовності, такі послідовності, які мають значну ідентичність до послідовності 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).

При використанні способу гібридизації вся пестицидна нуклеотидна послідовність або її частина може використовуватись для скринінгу кДНК або геномних бібліотек. Способи конструювання такої кДНК та геномних бібліотек загалом відомі в рівні галузі та розкриті у Sambrook and Russell, 2001, supra. У ролі так званих гібридизаційних зондів можуть виступати фрагменти геномної ДНК, фрагменти кДНК, фрагменти РНК або інші олігонуклеотиди, та вони можуть бути мічені групою, що детектується, такою як ³²P, або будь-яким іншим маркером, що детектується, таким як інші радіоактивні ізотопи, флуоресцентна сполука, фермент або

кофактор ферменту. Зонди для гібридизації можуть бути одержані шляхом введення мітки у синтетичні олігонуклеотиди на основі відомої нуклеотидної послідовності, яка кодує пестицидний білок, що розкривається у даному документі. Додатково можуть використовуватися вироджені праймери, сконструйовані на основі консервативних нуклеотидів, амінокислотних залишків у нуклеотидній послідовності або кодованій амінокислотній послідовності. Зонд, зазвичай, містить ділянку нуклеотидної послідовності, яка гібридується за жорстких умов із щонайменше приблизно 12, щонайменше приблизно 25, щонайменше приблизно 50, 75, 100, 125, 150, 175 або 200 послідовними нуклеотидами нуклеотидної послідовності, яка кодує пестицидний білок даного винаходу, його фрагмент або варіант. Способи одержання зондів для гібридизації загалом відомі в рівні галузі і розкриті у Sambrook and Russell, 2001, *supra*, що включено у даний документ за допомогою посилання.

Наприклад, ціла послідовність, що визначає пестицидну активність, яка розкривається у даному документі, або одна або декілька її частин можуть використовуватися у якості зонда, здатного до специфічної гібридизації з відповідними пестицидними білок-подібними послідовностями та молекулами інформаційних РНК. Для досягнення специфічної гібридизації за різних умов, такі зонди містять послідовності, які є унікальними та переважно мають у довжину щонайменше приблизно 10 нуклеотидів або щонайменше приблизно 20 нуклеотидів. Такі зонди можуть використовуватися для ампліфікації відповідних пестицидних послідовностей з вибраного організму за допомогою ПЛР. Дану методику можна застосовувати для виділення додаткових кодуючих послідовностей з необхідного організму або як діагностичний аналіз для визначення присутності кодуючої послідовності у організмі. Методи гібридизації включають гібридизаційний скринінг висіяних на чашки бібліотек ДНК (у вигляді 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).

Отже, даний винахід охоплює зонди для гібридизації, а також нуклеотидні послідовності, що здатні до гібридизації усієї або частини нуклеотидної послідовності за даним винаходом (наприклад, довжиною щонайменше приблизно 300 нуклеотидів, щонайменше приблизно 400, щонайменше приблизно 500, 1000, 1200, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500 або нуклеотидної послідовності повної довжини, що розкривається у даному документі). Гібридизація таких послідовностей може здійснюватися у жорстких умовах. Під виразом "жорсткі умови" або "жорсткі умови гібридизації" мають на увазі такі умови, при яких зонд буде гібридуватися до своєї цільової послідовності із явно вищим ступенем, ніж до інших послідовностей (наприклад, щонайменше у 2 рази вище фонового рівня). Жорсткі умови залежать від послідовності та будуть різнитися за різних обставин. Шляхом контролю жорсткості умов гібридизації та/або відмивання можуть бути ідентифіковані цільові послідовності, які на 100% комплементарні зонду (гомологічне зондування). Альтернативно, умови жорсткості можна скоригувати для надання можливості виникнення невідповідності у послідовності для того, щоб можна було детектувати нижчі ступені подібності (гетерологічне зондування). Загалом, зонд має довжину менше приблизно 1000 нуклеотидів, переважно менше 500 нуклеотидів.

Як правило, жорсткими умовами будуть такі, при яких концентрація солей становить менше приблизно 1,5 М іонів Na, зазвичай, від приблизно 0,01 до 1,0 М іонів Na (або інших солей) при рН від 7,0 до 8,3, а температура становить щонайменше приблизно 30°C для коротких зондів (наприклад, від 10 до 50 нуклеотидів) та щонайменше приблизно 60°C для довгих зондів (наприклад, більше 50 нуклеотидів). Жорстких умов можна також досягти додаванням дестабілізуючих засобів, таких як формамід. Ілюстративні умови низької жорсткості включають гібридизацію із буферним розчином, що містить від 30 до 35% формаміду, 1 М NaCl, 1% SDS (додецилсульфат натрію) при 37°C, та відмивання в SSC від 1X до 2X (20X SSC = 3,0 М NaCl/0,3 М тринатрійцитрат) при 50 до 55°C. Ілюстративні умови середньої жорсткості включають гібридизацію з розчином, що містить від 40 до 45% формаміду, 1,0 М NaCl, 1% SDS при 37°C, та відмивання в SSC від 0,5X до 1X SSC при 55 до 60°C. Типові умови високої жорсткості включають гібридизацію з розчином, що містить 50% формаміду, 1 М NaCl, 1% SDS при температурі 37°C, та відмивання в 0,1X SSC при 60 до 65°C. Необов'язково, буфери для відмивання можуть містити від приблизно 0,1% до приблизно 1% SDS. Тривалість гібридизації становить загалом менше приблизно 24 годин, зазвичай, від приблизно 4 до приблизно 12 годин.

Специфічність, як правило, залежить від постгібридизаційних відмивань, при яких найбільш важливими факторами є іонна сила та температура кінцевого розчину для відмивання. Для ДНК-ДНК гібридів, значення T_m може бути апроксимовано з рівняння 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 - молярність моновалентних катіонів, %GC - процентний вміст гуанозинових та цитозинових

нуклеотидів ДНК, % форм. - це відсотковий вміст формаміду у розчині для гібридизації, а L - довжина гібрида у парі основ. T_m - температура (при заданій іонній силі та pH), при якій 50% комплементарної цільової послідовності гібридується з ідеально відповідним зондом. T_m знижується приблизно на 1°C при невідповідності на кожен 1%; отже, T_m , умови гібридизації та/або відмивання можуть бути скоректовані для гібридизації з послідовностями необхідної ідентичності. Наприклад, при проведенні пошуку послідовностей з $\geq 90\%$ ідентичністю, T_m може бути знижена на 10°C. Загалом, жорсткі умови вибирають так, щоб температура була приблизно на 5°C нижче температури плавлення (T_m) для специфічної послідовності та комплементарному їй ланцюгові при заданих значеннях іонної сили та pH. Однак дуже жорсткі умови можуть використовувати гібридизацію та/або відмивання при температурі на 1, 2, 3 або 4°C нижче температури плавлення (T_m); умови середньої жорсткості можуть використовувати гібридизацію та/або відмивання при температурі на 6, 7, 8, 9 або 10°C нижче температури плавлення (T_m); умови низької жорсткості можуть використовувати гібридизацію та/або відмивання при температурі на 11, 12, 13, 14, 15 або 20°C нижче температури плавлення (T_m). Із застосуванням рівняння, композицій для гібридизації та відмивання, а також необхідної T_m середньому фахівцеві у даній галузі буде зрозуміло, що варіації у жорсткості розчинів для гібридизації та/або відмивання, за своєю суттю, описані. Якщо необхідний ступінь невідповідності призводить до T_m менше 45°C (водний розчин) або 32°C (розчин формаміду), то переважним є підвищення концентрації SSC для того, щоб можна було використовувати більш високу температуру. Детальний посібник з гібридизації нуклеїнових кислот наведено у 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 та їх фрагменти

Пестицидні білки також охоплено у даному винаході. Під "пестицидним білком" мають на увазі білок, що має амінокислотну послідовність, викладену в SEQ ID NO:3-6. Їх фрагменти, біологічно активні частини та варіанти також представлені і можуть використовуватися для здійснення на практиці способів за даним винаходом. "Виділений білок" або "рекомбінантний білок" застосовують до білка, який більше не перебуває у природних умовах, а перебуває, наприклад, у системі *in vitro* або у рекомбінантній бактеріальній або рослинній клітині-хазяїні. У деяких варіантах здійснення рекомбінантний білок являє собою варіант SEQ ID NO:2-5, де варіант містить щонайменше одну амінокислотну заміну, делецію або вставку порівняно з SEQ ID NO:2-5.

"Фрагменти" або "біологічно активні частини" містять фрагменти поліпептиду, який містить амінокислотні послідовності, що достатньо ідентичні амінокислотній послідовності, викладеній в SEQ ID NO: 3-6, і які проявляють пестицидну активність. Біологічно активною частиною пестицидного білка може бути поліпептид довжиною, наприклад, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350 або більше амінокислот. Такі біологічно активні частини можуть бути одержані з використанням рекомбінантних методик та оцінені щодо пестицидної активності. Способи визначення пестицидної активності добре відомі в рівні галузі. Див., наприклад, Czaplak 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, кожен з яких включено у даний документ у повному обсязі за допомогою посилання. Як використовується у даному документі, фрагмент містить щонайменше 8 суміжних амінокислот з SEQ ID NO:3-6. Разом з тим, даний винахід охоплює інші фрагменти, такі як будь-який фрагмент у білку довжиною більше приблизно 10, 20, 30, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350 або більше амінокислот.

Під "варіантами" мають на увазі білки або поліпептиди, що мають амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 60%, 65%, приблизно на 70%, 75%, приблизно на 80%, 85%, приблизно на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% або 99% ідентична амінокислотній послідовності будь-якої з SEQ ID NO:3-6. Варіанти також включають поліпептиди, які кодується молекулою нуклеїнової кислоти, що гібридується з молекулою нуклеїнової кислоти SEQ ID NO:1 чи 2 або комплементарним їй ланцюгом у жорстких умовах. Варіанти включають поліпептиди, які відрізняються амінокислотними послідовностями у результаті мутагенезу. Варіантні білки, які охоплено за даним винаходом, є біологічно активними, тобто вони продовжують мати необхідну біологічну активність нативного білка,

тобто зберігають пестицидну активність. У деяких варіантах здійснення варіанти мають покращену активність до нативного білка. Способи визначення пестицидної активності добре відомі в рівні галузі. Див., наприклад, Czaplak 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, кожен з яких включено у даний документ у повному обсязі за допомогою посилання.

Бактеріальні гени, такі як гени ахмі за даним винаходом, доволі часто мають декілька метіонінових ініціаторних кодонів, розташованих поблизу початку відкритої рамки зчитування. Часто ініціація трансляції в одному або декількох даних стартових кодонів буде призводити до утворення функціонального білка. Дані стартові кодони можуть мати у своєму складі ATG-кодони. Однак бактерії, такі як *Bacillus* sp., також розпізнають кодон GTG у якості стартового кодону, а білки, які ініціюють трансляцію в GTG-кодонах, містять метіонін як першу амінокислоту. У рідких випадках трансляція у бактеріальних системах може починатися у TTG-кодоні, хоча у цьому випадку TTG кодує метіонін. Крім того, часто з самого початку не визначено які з даних кодонів використовуються у природних умовах у бактерії. Отже, зрозуміло, що застосування одного з альтернативних метіонінових кодонів може також призводити до утворення пестицидних білків. Дані пестицидні білки охоплені у даному винаході та можуть застосовуватися у способах за даним винаходом. Буде зрозуміло, що за експресії у рослинах необхідно буде змінити альтернативний стартовий кодон на ATG для проходження трансляції відповідним чином.

У різних варіантах здійснення за даним винаходом пестицидні білки містять послідовності, виведені від нуклеотидних послідовностей повної довжини, що розкриваються у даному документі, та амінокислотні послідовності, які коротші послідовностей повної довжини за рахунок використання розташованої нижче альтернативної ділянки початку трансляції. Отже, нуклеотидна послідовність за даним винаходом та/або вектори, клітини-хазяїни і рослини, що містять нуклеотидну послідовність за даним винаходом (і способи одержання та застосування нуклеотидної послідовності згідно з даним винаходом), можуть містити нуклеотидну послідовність, яка кодує амінокислотну послідовність, що відповідає SEQ ID NO:3, 4 або 5.

Також охоплено антитіла до поліпептидів даного винаходу або до їх варіантів чи фрагментів. Способи одержання антитіл добре відомі в рівні галузі (див., наприклад, Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; патент США № 4196265).

Отже, один аспект за даним винаходом стосується антитіл, одноланцюгових молекул, що зв'язують антиген, або інших білків, які специфічно зв'язуються з одним або декількома білками або пептидними молекулами за даним винаходом та їх гомологами, гібридами чи фрагментами. В особливо переважному варіанті здійснення антитіло специфічно зв'язується з білком, що має амінокислотну послідовність, викладену в SEQ ID NO:3-6, або її фрагмент. В іншому варіанті здійснення антитіло специфічно зв'язується з гібридним білком, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з амінокислотної послідовності, викладеної в SEQ ID NO:3-6, або її фрагмент. В різних варіантах здійснення антитіло, яке специфічно зв'язується з білком за даним винаходом, або білок злиття, що містить білок за даним винаходом, являє собою антитіло, яке не зустрічається у природі.

Антитіла за даним винаходом можуть застосовуватися для кількісного чи якісного визначення вмісту білка чи пептидної молекули за даним винаходом або детекції посттрансляційних модифікацій білків. Як використовується у даному документі, про антитіло або пептид кажуть, що вони "специфічно зв'язуються" з молекулою білка або пептиду за даним винаходом, якщо таке зв'язування не повністю інгібується присутністю неспоріднених молекул.

Антитіла за даним винаходом можуть входити до складу набору, що застосовується для детектування білка або пептидної молекули за даним винаходом. Даний винахід також пропонує спосіб детектування білка або пептидної молекули (зокрема білка, що кодується амінокислотою послідовністю, викладеною в SEQ ID NO:3-6, включно з варіантами або фрагментами, що здатні до специфічного зв'язування з антитілом за даним винаходом), що включає приведення зразка у контакт з антитілом за даним винаходом та визначення, чи містить зразок білок або пептидну молекулу за даним винаходом. Способи використання антитіл для детектування білка або пептиду, що представляють інтерес, відомі з рівня техніки.

Змінені або покращені варіанти

Відомо, що послідовності ДНК пестицидного білка можуть бути змінені із використанням різних способів, а також, що ці альтерації можуть призвести до утворення послідовності ДНК, яка кодує білки з амінокислотними послідовностями, що відрізняються від тих, які кодують пестицидні білки згідно з даним винаходом. Даний білок може бути змінений різними способами,

числі включно із амінокислотними замінами, делеціями, відсіканням та вставкою однієї або декількох амінокислотних послідовностей з SEQ ID NO:3-6, 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 більш амінокислотних замін, делецій або вставок. Способи проведення таких маніпуляцій загалом відомі в рівні галузі. Наприклад, варіанти амінокислотної послідовності пестицидного білка можуть бути отримані із застосуванням мутацій у ДНК. Це також може бути досягнуто шляхом одного з декількох різновидів мутагенезу та/або шляхом спрямованого розвитку. У деяких аспектах зміни, що кодуються амінокислотними послідовностями, не будуть суттєво впливати на функцію білка. Такі варіанти будуть мати необхідну пестицидну активність. Однак зрозуміло, що здатність пестицидного білка забезпечувати пестицидну активність може бути покращено шляхом застосування таких методик щодо композицій з даного винаходу. Наприклад, можна експресувати пестицидний білок у клітинах-хазяїнах, які проявляють високі рівні помилок вбудовування основ при реплікації ДНК, такі як XL-1 Red (Stratagene, Ла-Холла, Каліфорнія). Після розмноження в таких штаммах можна виділити ДНК (наприклад, шляхом одержання плазмідної ДНК або шляхом ампліфікування за допомогою ПЛР та клонування отриманого у результаті ПЛР-фрагмента у векторі), провести культивування пестицидного білка з мутаціями у немутагенному штамі та ідентифікувати гени з пестицидною активністю, що зазнали мутації, наприклад, шляхом проведення аналізу для дослідження пестицидної активності. Загалом, білок змішується і застосовується в аналізах із згодовуванням. Див., наприклад, Maggione et al. (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293. Такі аналізи можуть включати приведення рослини в контакт з одним або декількома шкідниками, визначення здатності рослини до виживання та/або здатності викликати загибель шкідників. Приклади мутацій, які призводять до підвищення токсичності, вказані в Schnepf et al. (1998) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:775-806.

Як альтернатива можуть бути введені альтерації у послідовність багатьох білків у аміно- або карбокси-кінцях без спричинення істотного впливу на активність. Такі зміни можуть включати вставки, делеції або зміни, індуковані застосуванням сучасних молекулярних способів, таких як ПЛР, числі включно із ПЛР-ампліфікацією, які змінюють або подовжують кодуючу білок послідовність за рахунок вставок кодуючих амінокислоти послідовностей в олігонуклеотидах, що залучені в ПЛР-ампліфікацію. Як альтернатива, додані послідовності білків можуть містити цілі послідовності, які кодують білок, такі як ті, що, зазвичай, застосовуються в рівні техніки для одержання гібридних білків. Такі гібридні білки часто використовують для (1) підвищення експресії білка, що представляє інтерес, (2) введення домену зв'язування, ферментативної активності або епітопа для того, щоб полегшити очищення білка, для детектування білка або інших експериментальних застосувань, відомих в рівні техніки, (3) спрямовування секреції або трансляції білка в субклітинну органелу, таку як периплазматичний простір грамнегативних бактерій, ендоплазматичний ретикулум еукаріотичних клітин, при цьому останнє часто призводить до глікозильовання білка.

Варіанти нуклеотидних та амінокислотних послідовностей за даним винаходом також охоплюють послідовності, одержані із процедур, що призводять до рекомбінації і мутацій, таких як перестановка в ДНК. При виконанні такої методики можуть використовуватися одна або декілька різних ділянок, що кодують пестицидні білки, для створення нового пестицидного білка, який має необхідні властивості. Таким чином, бібліотеки рекомбінантних полінуклеотидів створюють з популяції споріднених послідовностей полінуклеотидів, які містять ділянки послідовності, що мають суттєві ідентичності та можуть бути гомологічно рекомбіновані *in vitro* або *in vivo*. Наприклад, при застосуванні даного підходу мотиви послідовностей, що кодують домен, який представляє інтерес, можуть бути піддані перестановці між геном за даним винаходом, що визначає пестицидну активність, та іншими відовими генами, що визначають пестицидну активність, для одержання нового гена, який кодує послідовність білка, що представляє інтерес, з покращеною властивістю, як, наприклад, з підвищеною інсектицидною активністю. Стратегії такої перестановки в ДНК відомі в рівні 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 та 5837458.

Переміщення або перестановка доменів є ще одним механізмом створення змінених пестицидних білків. Домени можна переміщати між пестицидними білками, що призводить до утворення гібридних або химерних токсинів з покращеною пестицидною активністю або різними цільовими характеристиками. Способи створення рекомбінантних білків та їх дослідження щодо пестицидної активності добре відомі в рівні 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

Послідовність за даним винаходом, яка визначає пестицидну активність, може бути представлена в експресійній касеті для експресії у клітині-хазяїні, що представляє інтерес, наприклад, в рослинній клітині або мікроорганізмі. Під "рослинною експресійною касетою" мають на увазі ДНК-конструкцію, яка здатна призводити до експресії білка з відкритої рамки зчитування у клітині рослини. Зазвичай вони містять промотор та кодуючу послідовність. Часто такі конструкції будують також містити 3'-нетрансльовану ділянку. Такі конструкції можуть містити "сигнальну послідовність" або "лідерну послідовність" для полегшення котрансляційного чи посттрансляційного транспорту пептиду до певних внутрішньоклітинних структур, таких як хлоропласт (або інша пластида), ендоплазматичний ретикулум або комплекс Гольджі.

Під "сигнальною послідовністю" мають на увазі послідовність, для якої відомо або передбачається, що вона призводить до котрансляційного або посттрансляційного транспорту пептидів через клітинну мембрану. У еукаріот це зазвичай пов'язано з секрецією у апараті Гольджі з деяким підсумковим глікозильованням. Інсектицидні токсини бактерій часто синтезуються у вигляді протоксинів, які протеолітично активуються у кишечнику цільової комахи (Chang (1987) Methods Enzymol. 153:507-516). У деяких варіантах здійснення за даним винаходом сигнальна послідовність локалізована у нативній послідовності, або може бути отримана з послідовності за даним винаходом. Під "лідерною послідовністю" мають на увазі будь-яку послідовність, яка при трансляції призводить до утворення амінокислотної послідовності, достатньої для ініціації котрансляційного транспорту пептидного ланцюга до субклітинної органели. Отже, це включає лідерні послідовності, що виявляють спрямований вплив на транспорт та/або глікозильовання за рахунок проходження в ендоплазматичний ретикулум, проходження у вакуолі, пластиди, у тому числі хлоропласти, мітохондрії та їм подібні. Отже, додатково запропонований даному документі поліпептид містить амінокислотну послідовність за даним винаходом, яка функціонально зв'язана з гетерологічною лідерною або сигнальною послідовністю.

Під "рослинним трансформаційним вектором" мають на увазі молекулу ДНК, яка необхідна для ефективної трансформації клітини рослини. Така молекула може містити одну або декілька рослинних експресійних касет та може бути організованою у більше ніж одну "векторну" молекулу ДНК. Наприклад, бінарні вектори являють собою рослинні трансформаційні вектори, які використовують два несуміжні ДНК-вектори для кодування усіх необхідних функцій з активністю в цис- та транс-положеннях для трансформації рослинних клітин (Hellens and Mullineaux (2000) Trends in Plant Science 5:446-451). Вираз "вектор" відноситься до конструкції нуклеїнової кислоти, призначеної для переносу між різними хазяїнами. "Експресійним вектором" називається вектор, який має здатність вводити, інтегрувати у чужорідну клітину та експресувати в ній послідовності гетерологічної ДНК або її фрагменти. Касета буде мати у своєму складі 5' та/або 3' регуляторні послідовності, функціонально зв'язані з послідовністю за даним винаходом. Під "функціонально зв'язаним" мають на увазі функціональний зв'язок між послідовністю промотору та іншою послідовністю, де послідовність промотору ініціює і опосередковує транскрипцію послідовності ДНК, відповідної до другої послідовності. Загалом, вираз "функціонально зв'язаний" означає, що зв'язані нуклеотидні послідовності є суміжними і, у тих випадках, коли необхідно об'єднати дві ділянки, що кодують білок, вони є суміжними та перебувають в одній і тій же рамці зчитування. Касета може додатково містити щонайменше один додатковий ген для котрансформації всередині організму. Як альтернатива, додатковий(і) ген(и) забезпечують за допомогою численних експресійних касет.

У різних варіантах здійснення нуклеотидна послідовність за даним винаходом є функціонально зв'язаною з гетерологічним промотором, який здатен керувати експресією нуклеотидної послідовності у клітині, наприклад, у рослинній клітині або мікроорганізмі. "Промотором" називається нуклеотидна послідовність, функція якої полягає у керуванні транскрипцією нижче розташованої кодуючої послідовності. Промотор разом з іншими транскрипційними та трансляційними регуляторними нуклеотидними послідовностями (які також називаються "контрольними послідовностями") є необхідними для експресії послідовності ДНК,

що представляє інтерес.

Така експресійна касета забезпечується численними ділянками рестрикції для вставки послідовності, яка забезпечує пестицидну активність, що підлягає транскрипційній регуляції регуляторними ділянками.

Експресійна касета матиме у своєму складі в 5'-3' напрямку транскрипції ділянку ініціації транскрипції і трансляції (тобто, промотор), ДНК-послідовність за даним винаходом та ділянку термінації трансляції і транскрипції (тобто, ділянку термінації), що функціонує у рослині. Промотор може бути нативним чи аналогічним або може бути чужорідним чи гетерологічним до рослини-хазяїна та/або до послідовності ДНК за даним винаходом. Додатково, промотор може являти собою природну послідовність або, як альтернатива, синтетичну послідовність. Там, де промотор є "нативним" або "гомологічним" до рослини-хазяїна, мають на увазі, що промотор знайдений у нативній рослині, в яку цей промотор вводять. Там, де промотор є "чужорідним" або "гетерологічним" до послідовності ДНК за даним винаходом, мають на увазі, що промотор не є нативним або таким, що виникає у природних умовах, для функціонально зв'язаної послідовності ДНК за даним винаходом.

Ділянка термінації може бути нативною ділянці ініціації транскрипції, може бути нативною функціонально зв'язаною послідовності ДНК, що представляє інтерес, може бути нативною рослини-хазяїну, або може бути отримана з іншого джерела (тобто, чужорідного або гетерологічного до промотору, послідовності ДНК, що представляє інтерес, рослини-хазяїна або будь-якої їх комбінації). Придатні ділянки термінації, такі як октопінсинтази та нопалінсинтази, доступні з Ті-плазмиди *A. tumefaciens*. 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 необхідних випадках ген(и) можуть бути оптимізовані для підвищення експресії у трансформованій клітині-хазяїні. А саме, гени можуть бути синтезовані з використанням переважних для клітини-хазяїна кодонів для покращення експресії або можуть бути синтезовані з використанням кодонів за частоти використання кодонів, переважних для хазяїна. У цілому, вміст GC у гені підвищиться. Див., наприклад, Campbell and Gowri (1990) Plant Physiol. 92:1-11, де обговорюється застосування переважних для хазяїна кодонів. У даній галузі техніки існують способи синтезу переважних для рослини генів. Див., наприклад, патенти США № 5380831 та 5436391, публікацію патенту США № 20090137409 та Murray et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17:477-498, які включено у даний документ за допомогою посилання.

У одному варіанті здійснення пестицидний білок спрямовують у хлоропласт для експресії. Таким чином, у тих випадках, де пестицидний білок не вводиться безпосередньо в хлоропласт, експресійна касета буде додатково містити нуклеїнову кислоту, що кодує транзитний пептид, який спрямовує пестицидний білок у хлоропласти. Такі транзитні пептиди відомі в рівні 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.

Ген, що визначає пестицидну активність, який повинен бути спрямований у хлоропласт, може бути оптимізований для експресії у хлоропласті для обліку відмінностей між ядром рослини і даної органели при використанні кодону. Таким чином, нуклеїнові кислоти, що представляють інтерес, можуть бути синтезовані з використанням кодонів, переважних для хлоропластів. Див., наприклад, патент США № 5380831, який включено у даний документ за допомогою посилання.

Трансформація рослин

Способи за даним винаходом включають введення нуклеотидної конструкції у рослину. Під "введенням" мають на увазі забезпечення рослини нуклеотидною конструкцією таким чином, щоб конструкція одержала доступ до внутрішнього простору клітини рослини. Способи за даним винаходом не вимагають застосування конкретного способу введення нуклеотидної конструкції у рослину, а лише того, щоб ця нуклеотидна конструкція одержала доступ до внутрішнього простору щонайменше однієї клітини рослини. У рівні техніки відомі способи введення нуклеотидних конструкцій у рослини, включаючи, але без обмежень, способи стабільної трансформації, способи тимчасової трансформації та способи, опосередковані вірусами.

Під "рослиною" мають на увазі цілі рослини, органі рослини (наприклад, листя, стебла, коріння тощо), насіння, рослинні клітини, паростки, зародки та потомство даних рослин. Рослинні клітини можуть бути диференційованими або недиференційованими (наприклад, калюс, суспензія культури клітин, протопласти, клітини листя, клітини кореня, клітини флоєми, пилік).

"Трансгенні рослини", або "трансформовані рослини", або "стабільно трансформовані" рослини, або клітини, або тканини відносяться до рослин, які мають введені або інтегровані в рослинну клітину екзогенні нуклеотидні послідовності чи фрагменти ДНК. Дані нуклеотидні послідовності мають у своєму складі такі, які є екзогенними, або не представлені у

нетрансформованій рослинній клітині, а також такі, які можуть бути ендегенними, або присутні у нетрансформованій рослинній клітині. "Гетерологічний" загалом відноситься до нуклеотидних послідовностей, які не є ендегенними до клітини або не є частиною нативного генома, в якому вони присутні, та які були внесені в клітину шляхом зараження, трансфекції, мікроін'єкції, електропорації, бомбардування мікрочастинками тощо.

Трансгенні рослини за даним винаходом експресують одну або декілька нових послідовностей токсинів, що розкриваються у даному документі. У різних варіантах здійснення трансгенна рослина додатково містить один або декілька додаткових генів стійкості до комах (наприклад, Cry1, такі як представники родин Cry1A, Cry1B, Cry1C, Cry1D, Cry1E та Cry1F; Cry2, такі як представники родин Cry2A; Cry9, такі як представники родин Cry9A, Cry9B, Cry9C, Cry9D, Cry9E та Cry9F тощо). Фахівцям у даній галузі буде зрозуміло, що трансгенні рослини можуть містити будь-який ген, який наділяє сільськогосподарською ознакою, що представляє інтерес.

Трансформацію рослинних клітин може бути здійснено із застосуванням одного або декількох методів, відомих у рівні техніки. Ген, що визначає пестицидну активність, за даним винаходом може бути модифікований для одержання або підвищення експресії у клітинах рослин. Як правило, конструкція, яка експресує такий білок, містить промотор, що регулює транскрипцію гена, а також 3' нетрансльовану ділянку, яка забезпечує термінацію транскрипції та поліаденілювання. Структура таких конструкцій добре відома у даній галузі. У деяких випадках доцільним може бути конструювання гена таким чином, що це буде призводити до секреції синтезованого у результаті пептиду або іншої спрямованої дії у клітині рослини. Наприклад, ген може бути сконструйовано таким чином, щоб містити сигнальний пептид для полегшення переносу пептиду в ендоплазматичний ретикулум. Також переважним може бути конструювання експресійної касети, що містить інтрон, таким чином, що iPHK-процесинг даного інтрона необхідний для експресії.

Як правило, дана "рослинна експресійна касета" буде введена у "рослинний трансформувальний вектор". Даний рослинний трансформувальний вектор може містити один або декілька ДНК-векторів, необхідних для досягнення трансформації рослини. Наприклад, звичайною практикою у даній галузі є використання рослинних трансформувальних векторів, які містять більше одного суміжного сегмента ДНК. У даному рівні техніки ці вектори часто називають "бінарними векторами." Бінарні вектори, як і вектори з хелперними плазмідами, найчастіше використовуються для трансформації, опосередкованої *Agrobacterium*, де розмір та сумарна довжина сегментів ДНК, необхідних для досягнення ефективної трансформації, є досить великими, та є доцільним розділити функції за окремими молекулами ДНК. Бінарні вектори, як правило, містять плазмідний вектор, який містить цис-активні послідовності, необхідні для переносу T-DNA (як ті, що розташовані на лівій межі та на правій межі фрагмента), селективний маркер, який сконструйований таким чином, щоб бути здатним до експресії у клітині рослини, та "ген, що представляє інтерес," (ген, сконструйований таким чином, щоб бути здатним до експресії у рослинній клітині, для якої потрібне створення трансгенних рослин). Також у даному плазмідному векторі присутні послідовності, необхідні для реплікації бактерій. Цис-активні послідовності організовані таким чином, щоб забезпечувати ефективне перенесення у рослинні клітини та експресію в них. Наприклад, ген селективного маркера та ген, що визначає пестицидну активність, локалізовані між лівою та правою межами. Часто другий плазмідний вектор містить транс-активні фактори, які опосередковують перенесення T-DNA від *Agrobacterium* до рослинних клітин. Плазміда часто містить гени вірулентності (гени Vir), які забезпечують інфікування рослинних клітин з використанням *Agrobacterium* і перенесення ДНК шляхом розщеплення межових послідовностей та vir-опосередкованому переносі ДНК, як відомо у рівні техніки (Hellens and Mullineaux (2000) Trends in Plant Science 5:446-451). Кілька типів штамів *Agrobacterium* (наприклад, LBA4404, GV3101, EHA101, EHA105 тощо) може бути використано для трансформації рослин. Другий плазмідний вектор не є необхідним для трансформації рослини із застосуванням інших способів, таких як бомбардування мікрочастинками, мікроін'єкція, електропорація, трансфекція за допомогою поліетиленгліколю тощо.

Загалом, способи трансформації рослин включають перенесення гетерологічної ДНК у цільові рослинні клітини (наприклад, у незрілі або зрілі зародки, суспензійні культури, недиференційований калюс, протопласти тощо) з наступним застосуванням відповідного відбору з максимальним граничним рівнем відповідного відбору (залежно від селективного

маркерного гена) для того, щоб виділити трансформовані рослинні клітини з групи нетрансформованої клітинної маси. Експлантати, зазвичай, переносять у свіжу порцію такого ж культурального середовища та культивують стандартно. Пізніше, трансформовані клітини диференціюються у пагони після їх поміщення на регенераційне середовище, в яке додано засіб для селекції у концентрації максимального граничного рівня. Пагони потім переносять на селективне середовище для укорінення пагона або саджанця. Трансгенний саджанець потім виростає у зрілу рослину та продукує фертильне насіння (наприклад, Hiei et al. (1994) *The Plant Journal* 6:271-282; Ishida et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14:745-750). Експлантати, як правило, переносять у свіжу порцію такого ж культурального середовища і стандартно культивують.

Загальний опис методик та способів одержання трансгенних рослин наведено в Ayres and Park (1994) *Critical Reviews in Plant Science* 13:219-239 та Bommineni and Jauhar (1997) *Maydica* 42:107-120. Через те, що трансформований матеріал містить численні клітини, як трансформовані, так і нетрансформовані клітини присутні у будь-якій частині обробленого цільового калюся, тканини або групи клітин. Здатність викликати загибель нетрансформованих клітин та дозволяти проліферацію трансформованих клітин одержати має результатом культури трансформованих рослин. Часто, здатність до видалення нетрансформованих клітин є обмеженням для швидкого виділення трансформованих рослинних клітин та успішного створення трансгенних рослин.

Протоколи трансформації, а також протоколи для введення нуклеотидних послідовностей у рослини можуть варіювати залежно від типу рослини або рослинної клітини, тобто, однодольна чи дводольна, призначених для трансформації. Створення трансгенних рослин можна здійснювати із застосуванням одного з декількох способів, включаючи, але без обмежень, мікроін'єкцію, електропорацію, спрямоване перенесення генів, введення гетерологічної ДНК за допомогою *Agrobacterium* у рослинні клітини (трансформація, опосередкована *Agrobacterium*), бомбардування рослинних клітин гетерологічною чужорідною ДНК, кон'югованою з частинками, способом прискорених частинок, трансформація із застосуванням аерозольного пучкового інжектора (опублікована заявка на патент США № 20010026941; патент США № 4945050; міжнародна публікація № WO 91/00915; опублікована заявка на патент США № 2002015066), Лес 1-трансформація та різні інші способи переносу ДНК, не опосередковані прямим введенням часток.

Способи для трансформації хлоропластів відомі у рівні 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. Даний спосіб базується на використанні генної гармати для доставки ДНК, що містить селективний маркер, та спрямованого введення ДНК у геном пластиди за допомогою гомологічної рекомбінації. Додатково, трансформації пластид досягнуто можна досягнути шляхом транс-активації неактивного пластидного трансгена за рахунок тканино-переважної експресії пластидної, ядерної РНК-полімерази. Таку систему описано у McBride et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:7301-7305.

Після інтеграції гетерологічної чужорідної ДНК у рослинні клітини використовують відповідний відбір з максимальним граничним рівнем відповідного відбору у середовищі, щоб викликати загибель нетрансформованих клітин, відокремити та викликати проліферацію передбачувано трансформованих клітин, які виживають у результаті даної селекційної обробки, шляхом регулярного перенесення клітин у свіже середовище. За допомогою безперервного пасажу та введення відповідного засобу для відбору ідентифікують та стимулюють проліферацію клітин, які були трансформовані за допомогою плазмідного вектора. Молекулярні та біохімічні способи потім може бути використано для підтвердження присутності інтегрованого гетерологічного гена, що представляє інтерес, у геномі трансгенної рослини.

Клітини, які було трансформовано, можна виростити у рослини відповідно до загальноприйнятих способів. Див., наприклад, McCormick et al. (1986) *Plant Cell Reports* 5:81-84. Дані рослини потім можна вирощувати та або запилювати такою ж трансформованою лінією, або іншою лінією, а отриманий у результаті гібрид, що має конститутивну експресію необхідної фенотипічної характеристики, може бути ідентифікований. Два або більше покоління можуть бути вирощені для того, щоб впевнитися, що експресія необхідної фенотипічної ознаки стабільно зберігається та успадковується, а потім насіння збирають для того, щоб впевнитися, що експресія бажаної фенотипічної ознаки була досягнута. Таким чином, даний винахід забезпечує трансформоване насіння (також називають "трансгенне насіння"), що містить нуклеотидну конструкцію за даним винаходом, наприклад, експресійну касету за даним винаходом, стабільно вбудовану у їх геном.

Оцінка трансформації рослин

Після введення гетерологічної чужорідної ДНК у рослинні клітини, підтверджують

трансформацію або інтеграцію гетерологічного гена у геном рослин різними способами, такими як аналіз нуклеїнових кислот, білків та метаболітів, асоційованих з інтегрованим геном.

ПЛР-аналіз являє собою експрес-методику скринінгу трансформованих клітин, тканини або пагонів на присутність введеного гена на більш ранній стадії до пересаджування в ґрунт (Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). ПЛР здійснюють з використанням олігонуклеотидних праймерів, специфічних до гена, що представляє інтерес, фону вектора *Agrobacterium* тощо.

Трансформацію рослин можна підтвердити за допомогою Саузерн-блот аналізу геномної ДНК (Sambrook and Russell, 2001, *supra*). Загалом, сукупну ДНК екстрагують із трансформанта, розщеплюють за допомогою відповідних рестрикційних ферментів, фракціонують в агарозному гелі та переносять на нітроцелюлозну або нейлонову мембрану. Мембрану або "блот" далі досліджують за допомогою, наприклад, міченого радіоактивним ^{32}P фрагментом цільової ДНК для підтвердження інтеграції введеного гена у геном рослин згідно зі стандартними методиками (Sambrook and Russell, 2001, *supra*).

У нозерн-блот аналізі виділяють РНК із спеціальних тканин трансформанта, фракціонують в агарозному гелі, що містить формальдегід, та переносять на нейлоновий фільтр згідно із стандартними процедурами, які регулярно використовують у даній галузі техніки (Sambrook and Russell, 2001, *supra*). Потім досліджують експресію РНК, яка кодується геном, що визначає пестицидну активність, шляхом гібридизації на фільтрі з радіоактивним зондом, отриманим з гена, що визначає пестицидну активність, за допомогою способів, відомих у рівні техніки (Sambrook and Russell, 2001, *supra*).

Підтвердження присутності білка, який кодується геном, що визначає пестицидну активність, можна здійснювати на трансгенних рослинах з використанням стандартних процедур вестерн-блота, біохімічних аналізів та їм подібних на трансгенних рослинах (Sambrook and Russell, 2001, *supra*) з використанням антитіл, які зв'язуються з одним або декількома епітопами, присутніми на пестицидному білку.

Пестицидна активність у рослин

В іншому аспекті за даним винаходом можна створити трансгенні рослини, у яких експресується пестицидний білок, що має пестицидну активність. Для створення трансгенних рослин можна використовувати способи, описані вище як приклад, але спосіб, згідно з яким отримують трансгенні рослинні клітини, не є критично важливим для даного винаходу. На розсуд експериментатора можна застосовувати способи, відомі або описані в даній галузі, такі як трансформація, опосередкована *Agrobacterium*, біолістична трансформація та способи, не опосередковані частинками. Рослини, що експресують пестицидний білок, можна виділити за допомогою загальновідомих способів, описаних у рівні техніки, наприклад, за допомогою трансформації калюсу, відбору трансформованого калюсу та регенерації плодоносної рослини з такого трансгенного калюсу. У такому способі можна використовувати будь-який ген як селективний маркер за умови, що його експресія у рослинних клітинах надасть можливість для ідентифікації або відбору трансформованих клітин.

Для застосування у рослинних клітинах було розроблено цілий ряд маркерів, таких як стійкість до хлорамфениколу, аміноглікозиду G418, піроміцину або їм подібним. Також як селективні маркери можна використовувати інші гени, які кодують продукт, залучений до метаболізму хлоропластів. Наприклад, окреме використання можуть знайти гени, які забезпечують стійкість рослин до гербіцидів, таких як гліфосат, бромоксиніл або імідазолінон. Такі гени було описано (Stalker et al. (1985) *J. Biol. Chem.* 263:6310-6314 (ген нітрилази, яка надає стійкість до бромоксинілу); та Sathasivan et al. (1990) *Nucl. Acids Res.* 18:2188 (ген AHAS, який надає стійкість до імідазолінонів). Додатково, гени, розкриті у даному документі, є придатними як маркери для оцінки трансформації бактеріальних або рослинних клітин. Способи виявлення присутності трансгена у рослині, органі рослини (наприклад, листі, стеблах, корінні тощо), насінні, рослинній клітині, паростку, зародку або їх потомстві добре відомі у галузі рівні техніки. В одному варіанті здійснення присутність трансгена виявляють шляхом дослідження пестицидної активності.

Плодоносні рослини, у яких експресується пестицидний білок, можна досліджувати щодо пестицидної активності, а для подальшого схрещування можна проводити відбір рослин, у яких проявляється оптимальна активність. У галузі рівні техніки доступні способи аналізу щодо пестицидної активності. Зазвичай, білок перемішують та використовують у аналізах із згодовуванням. Дивись, наприклад Marrone et al. (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293.

Даний винахід можна застосовувати для трансформації будь-якого виду рослин, включаючи, але без обмежень, однодольні та дводольні рослини. Приклади рослин, які представляють інтерес, включають, але без обмежень, кукурудзу (маїс), сорго, пшеницю, соняшник, помідор,

хрестоцвіті, перцеві, картоплю, бавовник, рис, сою, цукровий буряк, цукрову тростину, тютюн, ячмінь та олійний рапс, Brassica sp., люцерну, жито, просо, сафлор, земляні горіхи, солодку картоплю, маніок, кавове дерево, кокос, ананас, цитрусові дерева, дерево какао, чайний кущ, банан, авокадо, фігове дерево, гуаву, мангове дерево, маслину, папайю, кеш'ю, маकाдамію, мигдаль, овес, овочі, декоративні рослини та хвойні.

Овочі включають, але без обмежень, помідори, латук, зелену квасолю, квасолю ліма, види гороху та представників роду Cirsium, таких як огірок, канталупа та мускусна диня. Декоративні рослини включають, але без обмежень, азалію, гортензію, гібіскус, троянди, тюльпани, жовті нарциси, петунію, гвоздику, пуансетію та хризантему. Переважно рослини за даним винаходом являють собою культурні рослини (наприклад, маїс, сорго, пшениця, соняшник, помідор, хрестоцвіті, перцеві, картопля, бавовник, рис, соя, цукровий буряк, цукрова тростина, тютюн, ячмінь, олійний рапс тощо).

Застосування у боротьбі зі шкідниками

У даній галузі техніки відомі загальні способи використання штамів, які містять нуклеотидну послідовність за даним винаходом чи її варіант, як пестицидних засобів у боротьбі зі шкідниками або при створенні інших організмів. Дивись, наприклад, патент США № 5039523 та EP 0480762A2.

Штами Bacillus, що містять нуклеотидну послідовність за даним винаходом чи її варіант, або мікроорганізми, які генетично змінювали так, щоб вони містили ген, який визначає пестицидну активність за даним винаходом, та білок можна застосовувати для захисту сільськогосподарських культур та продуктів від шкідників. У одному аспекті за даним винаходом, цільні, тобто нелізовані клітини організму, що продукує токсин (пестицид), обробляють реактивами, які пролонгують активність токсину, що продукується у клітині, якщо клітину поміщають у середовище цільового шкідника (шкідників).

Як альтернатива, пестицид отримують за рахунок введення гена, що визначає пестицидну активність, у клітину-хазяїна. Експресія гена, що визначає пестицидну активність, прямо або опосередковано призводить до внутрішньоклітинної продукції та підтримання рівня пестициду. У одному аспекті за даним винаходом дані клітини потім обробляють в умовах, які пролонгують активність токсину, що продукується у клітині, якщо клітину поміщають у середовище цільового шкідника (шкідників). Отриманий у результаті продукт зберігає токсичність, характерну для токсину. Ці природно капсульовані пестициди згодом можуть бути розроблені згідно традиційним методикам для внесення в середовище проживання цільового шкідника, наприклад, ґрунт, воду та на листя рослин. Дивись, наприклад, EPO 0192319 та посилання, які цитуються у ньому. Як альтернатива, можна розробити препарат з клітин, що експресують ген за даним винаходом, таким чином, щоб забезпечити застосування отриманого у результаті матеріалу у якості пестициду.

Активні інгредієнти за даним винаходом зазвичай застосовуються у формі композицій, та їх можна наносити одночасно або послідовно з іншими сполуками на посівну площу або рослину, що підлягають обробці. Цими сполуками можуть бути добрива, гербіциди, кріопротектори, поверхнево-активні речовини, детергенти, пестицидні мила, масла, використовувані у період спокою рослини, полімери та/або склади з носіями, що повільно вивільнюються або здатні до біологічного розкладання, які дають можливість довгострокового дозованого вивільнення у цільовій області після разового внесення складу. Вони також можуть являти собою селективні гербіциди, хімічні інсектициди, віруциди, мікробіциди, амебіциди, пестициди, фунгіциди, бактерициди, нематоциди, молюскоциди або суміші декількох даних препаратів, якщо потрібно, разом з додатковими прийнятними у сільському господарстві носіями, поверхнево-активними речовинами або допоміжними речовинами, що сприяють нанесенню, які зазвичай використовують у рівні техніки складу. Придатні носії та допоміжні речовини можуть бути твердими або рідкими та відповідають речовинам, які зазвичай використовують у технології складання, наприклад, натуральні або відновлені мінеральні речовини, розчинники, диспергувальні речовини, засоби, що змочують, речовини, що надають липкість, речовини, що зв'язують, або добрива. Подібним чином склади можна приготувати у формі їстівних "наживок", або їм можна надати форму "пасток" для шкідників, щоб забезпечити можливість згодовування або поглинання пестицидного складу цільовим шкідником.

Способи нанесення активного інгредієнта за даним винаходом або агрохімічної композиції за даним винаходом, яка містить щонайменше один з пестицидних білків, що продукуються бактеріальними штамми за даним винаходом, включають нанесення на листя, покриття насіння та внесення в ґрунт. Кількість нанесень та норма нанесення залежить від інтенсивності зараження відповідним шкідником.

Композицію можна складати у вигляді порошку, дусту, пелети, гранули, аерозолі емульсії,

колоїду, розчину або їм подібних та можна одержати за допомогою таких традиційних способів, як сушіння, ліофілізація, гомогенізація, екстракція, фільтрація, центрифугування, осадження або концентрування культури клітин, що містять поліпептид. В усіх таких композиціях, які містять щонайменше один такий пестицидний поліпептид, даний поліпептид може бути присутнім у концентрації від приблизно 1% до приблизно 99% за вагою.

За допомогою способів за даним винаходом на даній площі можна знищувати або зменшувати кількість лускокрилих, напівтвердокрилих, двокрилих чи твердокрилих шкідників, або їх можна використовувати профілактично у навколишньому середовищі для запобігання зараженню чутливим шкідником. Переважно шкідник поглинає або контактує з пестицидно-ефективною кількістю поліпептиду. Під "пестицидно-ефективною кількістю" мають на увазі кількість пестициду, що здатна викликати загибель щонайменше одного шкідника або помітно обмежувати ріст шкідника, харчування або нормальний фізіологічний розвиток. Дана кількість буде варіювати залежно від таких факторів, як, наприклад, конкретні цільові шкідники, що підлягають контролю, конкретне навколишнє середовище, місцезнаходження, рослина, культура або сільськогосподарська ділянка, що підлягає обробці, умови навколишнього середовища та спосіб, норма, концентрація, стабільність та кількість нанесення пестицидно-ефективної композиції поліпептиду. Склади можна також варіювати з урахуванням кліматичних умов, впливу на навколишнє середовище та/або частоти нанесення та/або тяжкості зараження шкідниками.

Описані пестицидні композиції можна приготувати шляхом складання препарату або з бактеріальної клітини, кристала та/або суспензії спор, або з виділеного білкового компонента з необхідним сільськогосподарсько-прийнятним носієм. Композиції можна складати перед застосуванням за допомогою відповідних способів, таких як ліофілізація, висушування сублімацією, сушіння, або у водному носії, середовищі або придатному розріджувачі, такому як сольовий розчин або інший буфер. Складені композиції можуть бути у формі дусту чи гранульованого матеріалу, або суспензії у олії (рослинній олії або мінеральному маслі), або водних, або масляних/водних емульсій, або як порошок, що змочується, або у комбінації з будь-якою іншою речовиною-носієм, що придатна для застосування у галузі сільського господарства. Придатні для сільського господарства носії можуть бути твердими або рідкими, та добре відомі у рівні техніки. Вираз "придатний у сільському господарстві носій" охоплює усі допоміжні речовини, інертні компоненти, диспергувальні речовини, поверхнево-активні речовини, речовини, що надають липкість, речовини, що зв'язують, тощо, які зазвичай застосовують у технології розробки складу пестицидних препаратів; вони добре відомі фахівцям у даній галузі розробки складу пестицидних препаратів. Дані складки можна змішувати з одним або декількома твердими або рідкими допоміжними речовинами та одержувати різними способами, наприклад, шляхом рівномірного змішування, перемішування та/або подрібнення пестицидної композиції з придатними допоміжними речовинами із застосуванням традиційних методик розробки складу. Придатні складки та способи нанесення описано у патенті США № 6468523, який включено у даний документ за допомогою посилання.

"Шкідник" включає, але без обмежень, комах, грибів, бактерій, нематод, кліщів, іксодових кліщів та їм подібних. Комахи-шкідники включають комах, вибраних із 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 надродини Caraboidea та Gyrinoidea, у той час як підряд Polyphaga включає надродини 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 родини 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 Meloidae. 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. Секція Acalyptratae включає родини Otitidae, Tephritidae, Agromyzidae та Drosophilidae. Секція 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 для основних культур включають: маїс: *Ostrinia nubilalis*, європейського кукурудзяного метелика; *Agrotis ipsilon*, совку-іпсилон; *Helicoverpa zea*, кукурудзяну совку; *Spodoptera frugiperda*, совку трав'яну; *Diatraea grandiosella*, вогнівку кукурудзяну південно-західну; *Elasmopalpus lignosellus*, зернового точильника; *Diatraea saccharalis*, вогнівку цукрового очерету; *Diabrotica virgifera*, західного кукурудзяного кореневого жука; *Diabrotica longicornis barberi*, північного кукурудзяного кореневого жука; *Diabrotica undecimpunctata howardi*, південного кукурудзяного кореневого жука; *Melanotus* spp., жуків-коваликів; *Cyclocephala borealis*, хрущика північного (личинку хруща); *Cyclocephala immaculata*, хрущика південного (личинку хруща); *Popillia japonica*, хрущика японського; *Chaetocnema pulicaria*, земляну кукурудзяну блішку; *Sphenophorus maidis*, кукурудзяного довгоносика; *Rhopalosiphum maidis*, кукурудзяну листову попелицю; *Anuraphis maidiradicis*, кукурудзяну кореневу попелицю; *Blissus leucopterus leucopterus*, клопа-черепашку пшеничного північноамериканського; *Melanoplus femurrubrum*, червононого кобилку; *Melanoplus sanguinipes*, кобилку, що мігрує; *Hylemya platura*, личинку паросткової мухи; *Agromyza parvicornis*, міль-пістрянку кукурудзяну; *Anaphothrips obscurus*, трипса злакового; *Solenopsis milesta*, мураху-крадія; *Tetranychus urticae*, звичайного павутинного кліща; сorgho: *Chilo partellus*, соргового точильника; *Spodoptera frugiperda*, совку трав'яну; *Helicoverpa zea*, кукурудзяну совку; *Elasmopalpus lignosellus*, маленького точильника кукурудзяного стебла; *Feltia subterranea*, гусеницю озимої совки; *Phyllophaga crinita*, личинку хруща; *Eleodes*, *Conoderus* та *Aeolus* spp., дротяників; *Oulema melanopus*, п'явицу червоногрудку; *Chaetocnema pulicaria*, кукурудзяну блішку; *Sphenophorus maidis*, кукурудзяного довгоносика; *Rhopalosiphum maidis*, кукурудзяну листову попелицю; *Sipha flava*, жовту попелицю цукрового очерету; *Blissus leucopterus leucopterus*, клопа-черепашку пшеничного північноамериканського; *Contarinia sorghicola*, галівницю сорго; *Tetranychus cinnabarinus*, червоного павутинного кліща; *Tetranychus urticae*, звичайного павутинного кліща; пшениця: *Pseudaletia unipunctata*, совку лугову; *Spodoptera frugiperda*, совку трав'яну; *Elasmopalpus lignosellus*, маленького точильника кукурудзяного стебла; *Agrotis orthogonia*, прямокутну совку; *Elasmopalpus lignosellus*, маленького точильника кукурудзяного стебла; *Oulema melanopus*, п'явицу червоногрудку; *Hypera punctata*, довгоносика листового конюшинного; *Diabrotica undecimpunctata howardi*, південного кукурудзяного кореневого жука; російську пшеничну попелицю; *Schizaphis graminum*, звичайну злакову попелицю; *Macrosiphum avenae*, велику злакову попелицю; *Melanoplus femurrubrum*, червононого кобилку; *Melanoplus differentialis*, кобилку виду; *Melanoplus sanguinipes*, кобилку, що мігрує; *Mayetiola destructor*, гесенську муху; *Sitodiplosis mosellana*, оранжеву злакову галівницю; *Meromyza americana*, личинку американської меромізи; *Hylemya coarctata*, озиму муху; *Frankliniella fusca*, тютюнового трипса; *Cephus cinctus*, хлібного пильщика; *Aceria tulipae*, кліщ цибульний чотириногий; соняшник: *Suleima helianthana*, соняшникову брунькову листовійку; *Homoeosoma electellum*, соняшникову вогнівку; *zygogramma exclamationis*, соняшникову окличну совку; *Bothyrus gibbosus*, морквяного жука; *Neolasioptera murtfeldtiana*, галицю соняшникового насіння; бавовник: *Heliothis virescens*, бавовникову листовійку; *Helicoverpa zea*, бавовникову совку; *Spodoptera exigua*, совку малу; *Pectinophora gossypiella*, рожевого бавовникового хробака; *Anthonomus grandis*, бавовникового довгоносика; *Aphis gossypii*, бавовникову попелицю; *Pseudatomoscelis seriatus*, бавовникового гедзя; *Trialeurodes abutilonea*, бавовникову білокрилку; *Lygus lineolaris*, трав'яного клопа; *Melanoplus femurrubrum*, червононого кобилку; *Melanoplus differentialis*, кобилку виду; *Thrips tabaci*, цибулевого трипса; *Frankliniella fusca*, тютюнового трипса; *Tetranychus cinnabarinus*, червоного павутинного кліща; *Tetranychus urticae*, звичайного павутинного кліща; рис: *Diatraea saccharalis*, точильника цукрового очерету; *Spodoptera frugiperda*, совку трав'яну; *Helicoverpa zea*, кукурудзяну совку; листоїда виду *Colaspis brunnea*; *Lissorhoptus oryzophilus*, рисового водяного довгоносика; *Sitophilus oryzae*, рисового довгоносика; *Nephotettix nigropictus*, рисову цикадку; *Blissus leucopterus leucopterus*, клопа-черепашку пшеничного північноамериканського; *Acrosternum hilare*, зеленого клопа-щитника;

со́я: *Pseudoplusia includens*, соєвого п'ядака; *Anticarsia gemmatalis*, гусеницю совки оксамитових бобів; *Plathypena scabra*, зеленого шкідника конюшини; *Ostrinia nubilalis*, європейського кукурудзяного метелика; *Agrotis ipsilon*, совку-іпсилон; *Spodoptera exigua*, совку малу; *Heliothis virescens*, бавовникову листовійку; *Helicoverpa zea*, кукурудзяну совку; *Epilachna varivestis*, мексиканську бобову зерновку; *Myzus persicae*, зелену персикову попелицю; *Empoasca fabae*, цикадку картопляну; *Acrosternum hilare*, зеленого клопа-щитника; *Melanoplus femurrubrum*, червононогого кобилку; *Melanoplus differentialis*, кобилку виду, *Hylemya platura*, личинку паросткової мухи; *Sericothrips variabilis*, трипса соєвого; *Thrips tabaci*, трипса цибульного; *Tetranychus turkestanii*, туркестанського павутинного кліща; *Tetranychus urticae*, звичайного павутинного кліща; ячмінь: *Ostrinia nubilalis*, європейського кукурудзяного метелика; *Agrotis ipsilon*, совку-іпсилон; *Schizaphis graminum*, звичайну злакову попелицю; *Blissus leucopterus*, клопа-черепашку пшеничного північноамериканського; *Acrosternum hilare*, зеленого клопа-щитника; *Euschistus servus*, коричневого клопа-щитника; *Delia platura*, личинку паросткової мухи; *Mayetiola destructor*, гесенську муху; *Petrobia latens*, петробію багатодіну; олійний рапс: *Brevicoryne brassicae*, попільницю; *Phyllotreta cruciferae*, блішку хрестоцвітну; *Mamestra configurata*, совку латукову; *Plutella xylostella*, капустяну совку; *Delia* spp., личинок весняної капустяної мухи.

Нематоди включають паразитичні нематоди, такі як бульбочкові, цистоутворювальні, та нематоди, що ранять, які включають *Heterodera* spp., *Meloidogyne* spp. та *Globodera* spp.; зокрема, представників цистоутворювальних нематод, включаючи, але без обмежень, *Heterodera glycines* (соєву цистоутворювальну нематоду); *Heterodera schachtii* (бурякову цистоутворювальну нематоду); *Heterodera avenae* (зернову цистоутворювальну нематоду); та *Globodera rostochiensis* та *Globodera pallida* (картопляні цистоутворювальні нематоди). Нематоди, що ранять, включають *Pratylenchus* spp.

Способи підвищення урожайності рослин

Забезпечуються способи підвищення урожайності рослин. Способи включають забезпечення рослини або рослинної клітини, які експресують поліпептид, що кодує послідовність пестицидного поліпептиду, розкритого у даному документі, та вирощування рослини або отриманого з неї насіння у полі, ураженому (або сприйнятливому до ураження) шкідником, проти якого зазначений поліпептид має пестицидну активність. У деяких варіантах здійснення поліпептид володіє пестицидною активністю проти лускокрилого, твердокрилого, двокрилого, напівтвердокрилого шкідника або нематоди-шкідника, а зазначене поле уражено лускокрилим, напівтвердокрилим, твердокрилим, двокрилим шкідником або нематодом-шкідником. Як визначено у даному документі, "урожайність" рослини відноситься до якості та/або кількості біомаси, що продукується рослиною. Під "біомасою" мають на увазі будь-який визначуваний продукт рослинного походження. Підвищення продукції біомаси являє собою будь-яке покращення визначуваного виходу продукту рослинного походження. Підвищення урожайності рослин має кілька комерційних застосувань. Наприклад, підвищення біомаси листя рослин може підвищувати урожайність листяних овочів для споживання людиною або твариною. Додатково підвищення біомаси листя можна застосовувати для підвищення виробництва фармацевтичних або промислових продуктів рослинного походження. Підвищення урожайності може включати будь-яке статистично значуще підвищення, включаючи, але без обмежень, підвищення щонайменше на 1%, підвищення щонайменше на 3%, підвищення щонайменше на 5%, підвищення щонайменше на 10%, підвищення щонайменше на 20%, підвищення щонайменше на 30%, підвищення щонайменше на 50%, підвищення щонайменше на 70%, підвищення щонайменше на 100% або більше підвищення урожайності у порівнянні з рослиною, у якій не експресується послідовність, що визначає пестицидну активність. При використанні конкретних способів урожайність рослин підвищується у результаті підвищення стійкості до шкідників рослини, яка експресує пестицидний білок, розкритий у даному документі. Експресія пестицидного білка призводить до зниження здатності шкідника до зараження або поїдання.

Рослини можна також обробляти одним або декількома хімічними композиціями, що містять один або кілька гербіцидів, інсектицидів або фунгіцидів. Ілюстративні хімічні композиції включають: гербіциди для фруктів/овочів: атразин, бромацил, діурон, гліфосат, лінурон, метрибузин, симазин, трифлуралін, флуазифоп, глюфосинат, галосульфурон компанії Gowan, паракват, пропізамід, сетоксидим, бутафенацил, галосульфурон, індазифлам; інсектициди для фруктів/овочів: алдікарб, *Bacillus thuringiensis*, карбарил, карбофуран, хлорпірифос, циперметрин, дельтаметрин, абамектин, цифлутрин/бета-цифлутрин, есфенвалерат, лямбда-цигалотрин, ацеквіноцил, біфеназат, метоксифенозид, новалурон, хромафенозид, тіаклоприд, динотефуран, флуакупірим, спіродиклофен, гамма-цигалотрин, спіромезифен, спіносад, ринаксіпір, ціазіпір, трифлумурон, спіротетрамат, імідаклоприд, флубендіамід, тіодікарб,

метафлумізон, сульфоксафлор, цифлуметофен, ціанопірафен, клотіанідин, тіаметоксам, спінеторам, тіодікарб, флонікамід, метіокарб, емаектин бензоат, індоксакарб, фенаміфос, піріпроксифен, фенбутатин-оксид; фунгіциди для фруктів/овочів: аметоктрадин, азоксистробін, бентіавалікарб, боскалід, каптан, карбендазим, хлороталоніл, мідь, ціазофамід, цифлуфенамід,

5 цимоксаніл, ципроконазол, ципродиніл, дифенокназол, диметоморф, дитіанон, фенамідон, фенгексамід, флуазилам, флудіоксоніл, флуопіколід, флуопірам, флуоксастробін, флуксапіроксад, фолпет, фосетил, іпродіон, іпровалікарб, ізопіразам, крезоксим-метил, манкоцеб, мандіпропамід, металаксил/мефеноксам, метирам, метрафенон, міклобутаніл, пенконазол, пентіопірад, пікоксистробін, пропамокарб, пропіконазол, пропінеб, проквіназид,

10 протіокназол, піраклостробін, піриметаніл, квіноксифен, спіроксамін, сірка, тебуконазол, тіофанат-метил, трифлоксистробін; гербіциди для зернових: 2,4-D, амідосульфурон, бромоксиніл, карфентразон-Е, хлоротолурон, хлорсульфурон, клодинафоп-Р, клопіралід, диамба, диклофоп-М, дифлуфенікан, феноксапроп, флорасулам, флукарбазон-NA, флуфенацет, флупіросульфурон-М, флуороксибір, флуртамон, гліфосат, іодосульфурон,

15 іюксиніл, ізопротурон, MCPA, мезосульфурон, метсульфурон, пендиметалін, піноксаден, пропоксикарбазон, просульфокарб, піроксулам, сульфосульфурон, тифенсульфурон, тралкоксидим, тріасульфурон, трибенурон, трифлуралін, тритосульфурон; фунгіциди для зернових: азоксистробін, біксафен, боскалід, карбендазим, хлороталоніл, цифлуфенамід, ципроконазол, ципродиніл, димоксистробін, епоксиконазол, фенпропідин, фенпропіморф,

20 флуопірам, флуоксастробін, флуквінканазол, флуксапіроксад, ізопіразам, крезоксим-метил, метконазол, метрафенон, пентіопірад, пікоксистробін, прохлораз, пропіконазол, проквіназид, протіокназол, піраклостробін, квіноксифен, спіроксамін, тебуконазол, тіофанат-метил, трифлоксистробін; інсектициди для зернових: диметоат, лямбда-цигалотрин, дельтаметрин, альфа-циперметрин, β-цифлутрин, біфентрин, імідаклопрід, клотіанідин, тіаметоксам, тіаклопрід, ацетаміпрід, динетофуран, хлорпірифос, піримікарб, метіокарб, сульфоксафлор;

25 гербіциди для маїсу: атразин, алахлор, бромоксиніл, ацетохлор, диамба, клопіралід, (S-)диметенамід, глюфосинат, гліфосат, ізоксафлютол, (S-)метолахлор, мезотріон, нікосульфурон, примісульфурон, римсульфурон, сулкотріон, форамсульфурон, топрамезон, темботріон, сафлуфенацил, тіенкарбазон, флуфенацет, піроксасульфурон; інсектициди для маїсу: карбофуран, хлорпірифос, біфентрин, фіпроніл, імідаклопрід, лямбда-цигалотрин, тефлутрин, тербуфос, тіаметоксам, клотіанідин, спіромезифен, флубендіамід, трифлумурон, ринаксібір, дельтаметрин, тіодікарб, β-цифлутрин, циперметрин, біфентрин, луфенурон, тебупірімфос, етіпрол, ціазібір, тіаклопрід, ацетаміпрід, динетофуран, авермектин; фунгіциди для маїсу: азоксистробін, біксафен, боскалід, ципроконазол, димоксистробін, епоксиконазол, фенітропан,

35 флуопірам, флуоксастробін, флуксапіроксад, ізопіразам, метконазол, пентіопірад, пікоксистробін, пропіконазол, протіокназол, піраклостробін, тебуконазол, трифлоксистробін; гербіциди для рису: бутахлор, пропаніл, азимсульфурон, бенсульфурон, цигалофоп, даїмурон, фентразамід, імазосульфурон, мефенацет, оксазикломефон, піразосульфурон, пірибутикарб, квінклорак, тіобенкарб, інданофан, флуфенацет, фентразамід, галосульфурон,

40 оксазикломефон, бензобіциклон, пірифталід, пеносулам, биспірибак, оксадіаргіл, етоксисульфурон, претілахлор, мезотріон, тефурилтріон, оксадіазон, феноксапроп, піримісульфурон; інсектициди для рису: діазінон, фенобукарб, бенфуракарб, бупрофезин, динотефуран, фіпроніл, імідаклопрід, ізопрокарб, тіаклопрід, хромафенозид, клотіанідин, етіпрол, флубендіамід, ринаксібір, дельтаметрин, ацетаміпрід, тіаметоксам, ціазібір,

45 спіносад, спінеторам, емаектин-бензоат, циперметрин, хлорпірифос, етофенпрокс, карбофуран, бенфуракарб, сульфоксафлор; фунгіциди для рису: азоксистробін, карбендазим, карпропамід, диклоцимет, дифенокназол, едифенфос, феримзон, гентаміцин, гексаконазол, гімексазол, іпробенфос (IBP), ізопротіолан, ізотіаніл, касугаміцин, манкоцеб, метоміностробін, оризастробін, пенцикурон, пробеназол, пропіконазол, пропінеб, піроквілон, тебуконазол, тіофанат-метил, тіадиніл, трициклазол, трифлоксистробін, валідаміцин; гербіциди для бавовнику: діурон, флуометурон, MSMA, оксифлуорфен, прометрин, трифлуралін, карфентразон, клетодим, флуазифоп-бутил, гліфосат, норфлуразон, пендиметалін, піритіобак-натрій, трифлоксисульфурон, тепралоксидим, глюфосинат, флуміоксазин, тидіазурон;

50 інсектициди для бавовнику: ацефат, алдікарб, хлорпірифос, циперметрин, дельтаметрин, абамектин, ацетаміпрід, емаектин бензоат, імідаклопрід, індоксакарб, лямбда-цигалотрин, спіносад, тіодікарб, гамма-цигалотрин, спіромезифен, піридаліл, флонікамід, флубендіамід, трифлумурон, ринаксібір, бета-цифлутрин, спіротетрамат, клотіанідин, тіаметоксам, тіаклопрід, динетофуран, флубендіамід, ціазібір, спіносад, спінеторам, гамма-цигалотрин, 4-[[[(6-хлорпіридин-3-іл)метил](2,2-дифторетил)аміно]фуран-2(5H)-он, тіодікарб, авермектин,

60 флонікамід, піридаліл, спіромезифен, сульфоксафлор; фунгіциди для бавовнику: азоксистробін,

біксафен, боскалід, карбендазим, хлороталоніл, мідь, ципроконазол, дифеноконазол, димоксистробін, епоксиконазол, фенамідон, флуазинам, флуопірам, флуоксастробін, флуксапіроксад, іпродіон, ізопіразам, ізотіаніл, манкоцеб, манеб, метоміностробін, пентіопірад, пікоксистробін, пропінеб, протіоконазол, піраклостробін, квінтозен, тебуконазол, тетраконазол, тіофанат-метил, трифлуксистробін; гербіциди для сої: алахлор, бентазон, трифлуралін, хлорімурон-етил, хлорансулам-метил, феноксапроп, фомезафен, флуазифоп, гліфосат, імазамокс, імазаквін, імазетапір, (S-)метолахлор, метрибузин, пендиметалін, тепралоксидим, глюфосинат; інсектициди для сої: лямбда-цигалотрин, метоміл, імідаклоприд, клотіанідин, тіаметоксам, тіаклоприд, ацетаміприд, динетофуран, флубендіамід, ринаксіпір, ціазіпір, спіносад, спінеторам, емаектин-бензоат, фіпроніл, етіпрол, дельтаметрин, β-цифлутрин, гама- та лямбда-цигалотрин, 4-[[[(6-хлорпіридин-3-іл)метил](2,2-дифторетил)аміно]фуран-2(5H)-он, спіротетрамат, спінодиклофен, трифлумурон, флонікамід, тіодікарб, бета-цифлутрин; фунгіциди для сої: азоксистробін, біксафен, боскалід, карбендазим, хлороталоніл, мідь, ципроконазол, дифеноконазол, димоксистробін, епоксиконазол, флуазинам, флуопірам, флуоксастробін, флутріафол, флуксапіроксад, ізопіразам, іпродіон, ізотіаніл, манкоцеб, манеб, метконазол, метоміностробін, міклобутаніл, пентіопірад, пікоксистробін, пропіконазол, пропінеб, протіоконазол, піраклостробін, тебуконазол, тетраконазол, тіофанат-метил, трифлуксистробін; гербіциди для цукрового буряка: хлоридазон, десмедифам, етофумезат, фенмедифам, тріаллат, клопіралід, флуазифоп, ленацил, метамитрон, квінмерак, циклоксидим, трифлусульфурон, тепралоксидим, хізалофоп; інсектициди для цукрового буряка: імідаклоприд, клотіанідин, тіаметоксам, тіаклоприд, ацетаміприд, динетофуран, дельтаметрин, β-цифлутрин, гама/лямбда-цигалотрин, 4-[[[(6-хлорпіридин-3-іл)метил](2,2-дифторетил)аміно]фуран-2(5H)-он, тефлутрин, ринаксіпір, ціаксіпір, фіпроніл, карбофуран; гербіциди для каноли: клопіралід, диклофоп, флуазифоп, глюфосинат, гліфосат, метазахлор, трифлуралін етаметсульфурон, квінмерак, хізалофоп, клетодим, тепралоксидим; фунгіциди для каноли: азоксистробін, біксафен, боскалід, карбендазим, ципроконазол, дифеноконазол, димоксистробін, епоксиконазол, флуазинам, флуопірам, флуоксастробін, флусилазол, флуксапіроксад, іпродіон, ізопіразам, мепікват-хлорид, метконазол, метоміностробін, паклобутразол, пентіопірад., пікоксистробін, прохлораз, протіоконазол, піраклостробін, тебуконазол, тіофанат-метил, трифлуксистробін, вінклозолін; інсектициди для каноли: карбофуран, тіаклоприд, дельтаметрин, імідаклоприд, клотіанідин, тіаметоксам, ацетаміприд, динетофуран, β-цифлутрин, гама- та лямбда-цигалотрин, тау-флувалеріат, етіпрол, спіносад, спінеторам, флубендіамід, ринаксіпір, ціазіпір, 4-[[[(6-хлорпіридин-3-іл)метил](2,2-дифторетил)аміно]фуран-2(5H)-он.

Наступні приклади запропоновано з метою ілюстрації, а не з метою обмеження.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ПРИКЛАДИ

Приклад 1. Виявлення нових генів, що визначають пестицидну активність, у *Bacillus thuringiensis*

Ідентифікували нові гени, що визначають пестицидну активність, у бактеріального штаму ATX27487 із застосуванням наступних етапів:

- Одержання сукупної ДНК зі штаму. Сукупна ДНК містить як геномну ДНК, так і позахромосомну ДНК. Позахромосомна ДНК містить суміш деякого або усього з наступного: плазміді різного розміру; фагові хромосоми; інші неохарактеризовані позахромосомні молекули.
- Секвенування ДНК. Сукупну ДНК секвенують за допомогою способів секвенування наступного покоління.
- Ідентифікація ймовірних генів токсинів за допомогою аналізів гомології та/або інших комп'ютерних аналізів.
- Обробка послідовності гена, що представляє інтерес, за допомогою однієї з декількох стратегій ПЛР або клонування (наприклад, TAIL-PCR), якщо необхідно.

Штам ATX66600 виділили зі зразка ґрунту, відібраного на острові Санта Круз Галапагоського архіпелагу.

Таблиця 1

Новий ген, ідентифікований зі штаму ATX66600

| Назва гена | Молекулярна маса (кДа) | Найближчий гомолог | Нуклеотидна SEQ ID NO | Амінокислотна SEQ ID NO |
|--------------|------------------------|----------------------|-----------------------|-------------------------|
| Axmi440 | 134,6 | 37% Axmi129, 33% | 1 | 3 |
| Axmi440.2* | | Cry7Ca1 | 2 | 4 |
| Axmi440 | | | | 5 |
| (укорочений) | | 42% ZP_04148895, 41% | | |
| Axmi440.2 | | | | 6 |
| (укорочений) | | Cry7Ca1 | | |

*Axmi440.2 представляє собою білок, що кодується з сайту ініціації транскрипції, розташованого нижче відносно Axmi440. Axmi440.2 (укорочений) являє собою білок що кодується з сайту ініціації транскрипції, розташованого нижче відносно домену токсину Axmi440, викладеного тут як Axmi440(укорочений).

Приклад 2. Аналізи пестицидної активності

Нуклеотидні послідовності за даним винаходом можна досліджувати щодо їх здатності виробляти пестицидні білки. Здатність пестицидного білка діяти на шкідника як пестициду часто аналізують за допомогою ряду методик. Одна методика, добре відома у рівні техніки, полягає у здійсненні аналізу із згодовуванням. У ході такого аналізу із згодовуванням шкідника піддавали впливу зразка, що містить або сполуку, яку необхідно досліджувати, або контрольні зразки. Часто його здійснювали при розміщенні матеріалу, який необхідно досліджувати, або придатного розчину такого матеріалу на матеріал, який шкідник буде поглинати, як, наприклад, штучне живильне середовище. Матеріал, який необхідно досліджувати, може складатися з рідини, твердої речовини або суспензії. Матеріал, який необхідно досліджувати, можна помістити на поверхню і потім надати йому можливість висохнути. Як альтернатива, матеріал, який необхідно досліджувати, можна змішати з розплавленим штучним живильним середовищем і потім розподілити у камері для аналізу. Камерою для аналізу може бути, наприклад, чашка, тарілка або лунка мікротитрувального планшета.

Аналізи із сисними шкідниками (наприклад, попелицями) можуть включати відділення від комах матеріалу, що тестують, перегородкою, в ідеальному випадку - секцією, яку сисна комаха може проколоти частинами сисного ротового апарату, щоб забезпечити поглинання досліджуваного матеріалу. Часто досліджуваний матеріал змішували зі стимулятором поїдання, таким як сахароза, щоб сприяти поглинанню досліджуваної сполуки.

Інші типи аналізів можуть включати мікроін'єкцію досліджуваного матеріалу у ротову порожнину або кишечник шкідника, а також - розробку трансгенних рослин з наступним дослідженням здатності шкідника харчуватися на трансгенній рослині. Дослідження рослин може включати ізоляцію частин рослин, які зазвичай споживають, наприклад, у невеликі камери, прикріплені до аркуша, або ізоляцію цілих рослин у камерах, в яких утримуються комахи.

З рівня техніки відомі інші способи та підходи до аналізу шкідників, і їх можна знайти, наприклад, в Robertson and Preisler, eds. (1992) Pesticide bioassays with arthropods, CRC, Boca Raton, FL. Як альтернатива, аналізи, зазвичай, описано в журналах Arthropod Management Tests та Journal of Economic Entomology, або їх обговорюють з членами Ентомологічного суспільства Америки (ESA).

У деяких варіантах здійснення ділянки ДНК, що кодують ділянку токсину в пестицидних білках, розкритих у даному документі, клонували у вектор експресії pMAL-C4x E. coli за геном malE, що кодує мальтоза-зв'язувальний білок (MBP). Ці гібриди усередині рамки призводять у результаті до експресії гібридних білків MBP-Axmi в E. coli.

Для експресії в E. coli BL21*DE3 трансформували окремими плазмідами. Окремі колонії інокулювали у середовище Лурія-Бертані, доповнене карбеніциліном і глюкозою, та вирощували протягом ночі при 37°C. Наступної доби свіже середовище інокулювали 1% добової культури і вирощували при 37°C до логарифмічної фази росту. Потім культури індукували 0,3 mM IPTG протягом ночі при 20°C. Кожний осад клітин суспендували в 20 mM буфері Tris-Cl, pH 7,4 + 200 mM NaCl + 1 mM DTT + інгібітори протеаз і руйнували ультразвуком. Для підтвердження експресії гібридних білків можна застосовувати аналіз за допомогою SDS-PAGE.

Усі безклітинні екстракти потім пропускали через стовпчик з амілозою, що приєднаний до хроматографа для рідинної експрес-хроматографії білків (FPLC) для афінного очищення

гібридних білків MBP-ахті. Зв'язані гібридні білки елювали зі смоли за допомогою 10 мМ розчину мальтози. Очищені гібридні білки потім розщеплювали або фактором Ха, або трипсином для видалення амінокінцевої MBP-мітки з білка Ахті. Розщеплення та розчинність білків можна визначити за допомогою SDS-PAGE.

5 Приклад 3. Експресія та очищення

Укорочений варіант Ахті440 (викладений у даному документі як SEQ ID NO:5) експресували та аналізували його біологічну активність. Даний ген ампліфікували за допомогою ПЛР із штаму ATX66600 з використанням ДНК полімерази HERCULASE®II Fusion і праймерів, які вбудовують на 3' кінці лінкер, що містить сайт AclI. Ампліфікований за допомогою ПЛР продукт розщеплювали з використанням AclI та лігували у вектор pMalC4X для утворення плазмиди рAX8548. Клон аналізували за допомогою секвенування та рAX8548 трансформували у компетентні клітини B121. Окрему колонію інокулювали у середовище LB, вирощували при 37°C до досягнення логарифмічної фази росту та індукували за допомогою 0,5 мМ IPTG при 20°C протягом 16 годин. Очищений Ахті440 розщеплювали за допомогою фактора Ха у співвідношенні 1:50 при кімнатній температурі протягом ночі. Очищений Ахті440 надавали для біологічного аналізу з вибраними комахами відповідно до стандартного протоколу. Результати показано у таблиці 2.

Таблиця 2

Бали затримки росту та відсоток смертності

| Група шкідника | Бал затримки росту | Відсоток смертності |
|-------------------------------------|--------------------|---------------------|
| <i>Plutella xylostella</i> (DBM) | 4 | 100% |
| <i>Pseudoplusia includens</i> (SBL) | 2 | 25% |
| <i>Diatraea grandiosella</i> (SWCB) | 4 | 50% |
| <i>Anticarsia gemmatilis</i> (VBC) | 4 | 0% |

20 Приклад 4. Перенос генів за допомогою вектора для експресії у рослинах

Кодуючі ділянки за даним винаходом з'єднують з відповідними послідовностями промоторів і термінаторів для експресії в рослинах. Такі послідовності добре відомі з рівня техніки, і можуть містити актиновий промотор рису, промотор убіквітину маїсу для експресії в однодольних рослинах, промотор UBQ3 *Arabidopsis* або промотор CaMV 35S для експресії у дводольних рослинах, і термінатори nos або PinII. Методики одержання і підтвердження конструкцій промотор - ген - термінатор також добре відомі з рівня техніки.

В одному аспекті за даним винаходом конструюють і створюють синтетичні послідовності ДНК. Ці синтетичні послідовності мають змінену нуклеотидну послідовність у порівнянні з вихідної послідовністю, але кодують білки, які, по суті, ідентичні вихідній послідовності.

В іншому аспекті за даним винаходом конструюють модифіковані варіанти синтетичних генів таким чином, щоб отриманий у результаті пептид був націлений на органелу рослини, таку як ендоплазматичний ретикулум або апопласт. З рівня техніки відомі послідовності пептидів, які, як відомо, призводять до націлювання гібридних білків на органелу рослини. Наприклад, з рівня техніки відомо, що N-кінцева ділянка білка, який кодується геном кислотої фосфатази білого люпину *Lupinus albus* (GENBANK® ID GI:14276838, Miller et al. (2001) *Plant Physiology* 127:594-606), призводить до націлювання гетерологічних білків на ендоплазматичний ретикулум. Якщо отриманий у результаті гібридний білок також містить на C-кінці послідовність для утримання в ендоплазматичному ретикулумі, яка містить з N-кінця пептиду лізин-аспарагінову кислоту-глутамінову кислоту-лейцин (тобто мотив "KDEL", SEQ ID NO:7), то гібридний білок буде націлений на ендоплазматичний ретикулум. Якщо в гібридному білку на C-кінці відсутня послідовність, що націлює на ендоплазматичний ретикулум, білок буде націлений на ендоплазматичний ретикулум, але в остаточному підсумку буде зв'язаний в апопласті.

Отже, даний ген кодує гібридний білок, який містить на N-кінці тридцять одну амінокислоту з гена кислотої фосфатази білого люпину *Lupinus albus* (GENBANK® ID GI:14276838, Miller et al., 2001, supra), зливу з N-кінцем амінокислотної послідовності за даним винаходом, а також послідовність KDEL (SEQ ID NO:7) на C-кінці. Отже, передбачається, що отриманий у результаті білок націлений на ендоплазматичний ретикулум рослини при експресії у рослинній клітині.

Рослинні експресійні касети, описані вище, поєднують з придатним для рослини селективним маркером, щоб полегшити відбір трансформованих клітин і тканин, і лігують у вектори для трансформації рослин. Вони можуть містити бінарні вектори для трансформації, опосередкованої *Agrobacterium*, або прості плазмідні вектори для трансформації з

використанням аерозолі чи біолістичної трансформації.

Приклад 5. Трансформація клітин маїсу генами пестицидного білка, описаними в даному документі

Качани маїсу найкраще збирати через 8-12 діб після запилення. Зародки виділяли з качанів і при трансформації переважно використовували зародки розміром 0,8-1,5 мм. Зародки висаджували щитком угору придатне середовище для інкубації, таке як середовище DN62A5S (3,98 г/л солей N6; 1 мл/л (1000х маточного розчину), вітаміни N6; 800 мг/л L-аспарагіну; 100 мг/л міоінозиту; 1,4 г/л L-проліну; 100 мг/л казамінових кислот; 50 г/л сахарози; 1 мл/л (маточного розчину з концентрацією 1 мг/мл) 2,4-D). Проте, придатні середовища і солі, що відмінні від DN62A5S, є відомими з рівня техніки. Зародки інкубували протягом ночі при 25°C у темряві. Хоча інкубація зародків протягом ночі як така не є необхідною.

Одержані у результаті експлантати переносили у комірки сітки (30-40 на чашку), переносили на осмотичне середовище приблизно на 30-45 хвилин, потім переносили на пластину для інжекції (див., наприклад, РСТ публікацію № WO/0138514 і патент США № 5240842).

ДНК-конструкції, сконструйовані для експресії генів за даним винаходом у рослинних клітинах потрапляють у рослинну тканину за рахунок прискорення із застосуванням прискорювача пучків аерозолі, із застосуванням умов, які, по суті, описані в РСТ публікації № WO/0138514. Після інжекції зародки інкубували протягом приблизно 30 хвилин на осмотичному середовищі і поміщали в середовище для інкубації на ніч при 25°C у темряві. Щоб уникнути зайвого ушкодження експлантів, підданих інжекції, їх інкубували протягом щонайменше 24 годин до переносу в середовище для відновлення. Зародки потім розподіляли у середовищі на період відновлення тривалістю приблизно 5 діб при 25°C у темряві, потім переносили на селективне середовище. Експлантати інкубували у селективному середовищі протягом періоду тривалістю до восьми тижнів, залежно від природи і характеристик конкретного використовуваного методу відбору. Після періоду відбору отриманий у результаті калюс переносили на середовище для дозрівання зародків і культивували доти, доки не спостерігалось утворення зрілих соматичних зародків. Отримані у результаті зрілі соматичні зародки потім поміщали в умови з низьким рівнем освітленості та ініціювали процес регенерації за допомогою способів, відомих в рівні техніки. Отриманим у результаті пагонам давали можливість укорінитись на середовищі для укорінення, а одержані у результаті рослини переносили у горщики для розсади і розмножували як трансгенні рослини.

Матеріали

Середовище DN62A5S

| Компоненти | На літр | Постачальник |
|---|--|----------------------|
| Суміш основних солей N6 за Chu (номер продукту C 416) | 3,98 г/л | Phytotechnology Labs |
| Розчин вітамінів N6 за Chu (номер продукту C 149) | 1 мл/л (1000х маточного розчину) | Phytotechnology Labs |
| L-Аспарагін | 800 мг/л | Phytotechnology Labs |
| Міоінозит | 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 (маточний розчин з концентрацією 1 мг/мл) | Sigma |

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

Приклад 6. Трансформація генами за даним винаходом рослинних клітин шляхом трансформації, опосередкованої Agrobacterium

Качани найкраще збирати через 8-12 діб після запилення. Зародки виділяли з качанів і при трансформації переважно застосовували зародки розміром 0,8-1,5 мм. Зародки висаджували щитком угору у середовище для інкубації та інкубували протягом ночі при 25°C у темряві. Хоча інкубація зародків протягом ночі як така не є необхідною. Зародки зв'язували зі штамом Agrobacterium, що містить придатні для опосередкованого Ti-плазмідом переносу вектори, протягом приблизно 5-10 хвилин і потім поміщали у середовище для спільного культивування

приблизно на 3 доби (25°C у темряві). Після спільного культивування експланти переносили у середовище на період відновлення тривалістю приблизно п'ять діб (при 25°C у темряві). Експланти інкубували у селективному середовищі протягом періоду тривалістю вісім тижнів залежно від природи і характеристик конкретного використовуваного методу відбору. Після
5 періоду відбору отриманий у результаті калюс переносили у середовище для дозрівання зародка та культивували доти, доки не спостерігалось утворення зрілих соматичних зародків. Отримані у результаті зрілі соматичні зародки потім поміщали в умови з низьким рівнем освітленості та ініціювали процес регенерації, як відомо в рівні техніки.

Усі публікації і заявки на патент, згадані у даному описі, свідчать про кваліфікацію фахівців у
10 галузі техніки, до якої належить даний винахід. Усі публікації і заявки на патент включені у даний документ за допомогою посилання тією самою мірою, якби малося б на увазі, що кожна окрема публікація або заявка на патент конкретно і окремо включена за допомогою посилання.

Хоча вищевикладений винахід був досить детально описаний шляхом ілюстрації, а також як
15 приклад для чіткості розуміння, очевидно, що при практичному здійсненні можна вносити певні зміни та модифікації у межах обсягу прикладеної формули винаходу.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Атенікс Корп.
ТАЙЕР, Ребекка
САМПСОН, Кімберлі, С.
ЛЕХТІНЕН, Дуан
МАГАЛЕС, Леонардо

<120> ТОКСИН ГЕНУ АХМІ440 ТА СПОСОБИ ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ

<130> АРА13-6051

<150> 61/863982

<151> 2013-08-09

<160> 7

<170> PatentIn версії 3.5

<210> 1

<211> 4299

<212> ДНК

<213> *Bacillus thuringiensis*

<400> 1

| | |
|--|------|
| atgaaaaaag ataatgaaat aagcaattac gttaatgata accatgtgaa ttcccataag | 60 |
| aaagttcctt tttgtttgtgt catagcaatt ccagatggat ttgaactcgt accacattgt | 120 |
| tatccaaaag taatatacag tcttgagtgt ctagccctat gtaaagatgt atgtcgcaaa | 180 |
| accgtgccag tagaagggtg tggtcaggca gaaattgatt tacatgttct aaagataaag | 240 |
| ggatgcattc cttatatagt caatattgaa gtacgaccta catgtgattg gaaaggatgt | 300 |
| tcaacagact cacattcaaa agaaatcaca ttatgttgta aagagagtgt atgtattgat | 360 |
| gcagttttac aatgtagtgt gcaactgtgta gacagcatag atttaaactg tgaaaatgta | 420 |
| aagggtatgtg acttaagcat acaaatttct gattgtatga attcctgtca tcttgctaaa | 480 |
| atctccggtt actttcagtt ttgctagaat aaaataaaga taatttagag ttataagtct | 540 |
| aacaataaat gaatattata aaatgtctta aggaacaatg ttcctttagat atactttaaa | 600 |
| aaataagaag ggacgattaa ataccagaat atggaggggg gagaggggct tttcgtactg | 660 |
| atattaaaga atgaatttat atatataagt acaagtggaa aatcattgat aatgcgagta | 720 |
| tatccttgaa atgtataaat aggaggtata gatgtgaaga taaatgatgt aaatgaatgg | 780 |
| gataatgtag cagagggtgac tgaaaaccct cttgcaccta gcattccgta caatgttcta | 840 |
| caacgtaaag aaaacacagc aaacgaatta acctatgata attataattt ccaagatttt | 900 |
| ttaacattag gttatgaaga tattactcaa gcagctaattg cgcaagatgt aattaatacg | 960 |
| acactaaatg taactgcaac aattttgaat ttcttaggag tcccgtatgc agggactgta | 1020 |
| atttctatgt atcaaaaact atttaattat ttatggcctt atgaagacac ttcagaatgg | 1080 |
| gataaaatga tggcggcagt agaagcgcta ataaatcaaa aaatcaatga gacagttaaa | 1140 |

| | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|------|
| agtttggtc | ttgcggattt | agatggttta | gggcgcaact | taaagtotta | tggaatgca | 1200 |
| cttaagaatt | ggaatgagaa | taaaaatgat | gcagatagca | cagctttagt | gttagatcgc | 1260 |
| tttagaacag | ttaatgaact | atttgtaaat | gatatggctt | cttttgetcc | taaaggttac | 1320 |
| gaggctactac | ttctggacgt | atatgcaaaa | gcagcaaate | tacatttgct | ttttttaaga | 1380 |
| gatgcagaac | tatatggtgc | agattgggga | atgcctgaag | atgagataaa | tttattttat | 1440 |
| caagaacaag | aagattatag | aaaagaatat | tgggaccatt | gcatatcttg | gtatcaaaaa | 1500 |
| gggttaaate | agtttaataa | gtctagtgc | ctggattgga | taaaatataa | tcgttacaga | 1560 |
| acccaaatga | caattaatgt | gttggtttt | gttgcgttat | atccaaatta | tgatgttcgt | 1620 |
| aaatatccaa | tgtccacaca | cacggagctt | acaagaactg | tatattcaga | tcctattggt | 1680 |
| tttgatgaac | gaacgggaac | tggtactagt | ggggttcgtg | cttggtatga | agctggacgc | 1740 |
| tcttttgctg | agatagaaaa | taatgctatt | cctgcacctg | atctcgtaa | atttataaat | 1800 |
| aaactaacag | tatattcaaa | aaggataaat | gccagtccat | tcattggccac | tcgttgggca | 1860 |
| gggcattcca | taactcagga | cactacattt | acaggttcag | cacaagaaat | aaagtatgga | 1920 |
| gatgtttcag | gtgtccctac | cacattttta | tttaaaaaaca | cagatattta | tcgtacgata | 1980 |
| tcaacggtag | gaacgtatta | ttatacta | ggcccttata | aactgccact | ttcaaaagtt | 2040 |
| catttttatg | gaataaatac | ttctaatacga | aaggaaactt | tcaattatga | tcaagatatt | 2100 |
| aattttaaat | ttcagcatca | aaaagactca | agtaatgaga | tagctgtagt | ccttccagga | 2160 |
| cccacagact | atggggacta | taataaatat | agtcacgggt | taagttatat | ttctgatgcc | 2220 |
| cctataaaac | agttcactgg | gttaagctca | aatgaagggt | ttgtccctgt | atttggttgg | 2280 |
| atgcattcaa | gcacaactcg | taaaaatttt | cttagtgcca | atcaaatcac | gcaaattcca | 2340 |
| gctgtaaagt | ctcacgaata | taactcatcc | atggcaattg | taagctcaaa | cggatattgt | 2400 |
| ggcgatata | ttatgaagggt | ttcaaaagta | ttccattcca | atgaagtgc | agctggaaac | 2460 |
| tatgtagtag | attgtgaaga | ttatagtcaa | caatttcgtt | ttcgggttag | atatgcttcc | 2520 |
| actgtaagct | gtccactacg | gtttgctaca | ttcagcatat | ctgggtccaac | cgtaatttta | 2580 |
| gaaaaaacac | tacaaaaagg | tgatgaaata | aaatatagtt | cctttaaata | ttctgaatac | 2640 |
| tcagatcctg | tgaggtttaa | ccctcctggt | acctcaggat | tccttagttt | taatcttata | 2700 |
| tttgtaggat | tatctgctaa | tgaaaatgta | tatatagata | aaattgaatg | tattccagtc | 2760 |
| acaaaagatg | atttagacaa | ggaaacatta | gaaaaagcag | aaaaagcgggt | gaatgctttg | 2820 |
| tttattgatg | gtaccacagaa | tttaaaaaaca | gaagtgcag | attattgtat | agatcagggt | 2880 |
| tctatgataa | tagattgtgt | gtctgaagaa | ctatatccaa | atgaaaaacg | agatcttttg | 2940 |

| | |
|---|------|
| tatttagtaa agcatgcgaa aagacaaagt aatacacgaa acttaattct ggattccaac | 3000 |
| tttacttcta ttaattcaga agatgttaac ggttggtatg gaagtcctgg tcttatagta | 3060 |
| gaatctggag atgtggtctt taaagaaaat tatgtacatt tacgtggtcc aaatgatgaa | 3120 |
| cgctatccaa cgtacctgta tcaaaaaata gacgaatcaa aattaacaga atatacaaga | 3180 |
| tatcaattgc gaggtttcat agaaggaagt cgtgggttgg aagtatatgt aattcgttat | 3240 |
| gatgcaaaac atgaaacact gaatgtttta ggggatttat ctctagataa tctgtcttac | 3300 |
| aacgaatgtg gtcaaccaga tcgctgttca caagaacat atattgaaca gaggttacia | 3360 |
| caagaagaag ttgctaatac acgtgcatgt ctttttgatt ccaatgactc cctgtcttca | 3420 |
| tcaaatggat atccttctga ttcacatcat ttatccctac acgttgatac cggatctatt | 3480 |
| gatttttaag aaaatttagg tatctggatt ttattcaaat tatcgacaac agatggatat | 3540 |
| gcaaagattg ggaatattga attggtggaa gagggaccat taacaggaag tgcgctcgga | 3600 |
| tctataaaaa gaatggaaaa taaatggaaa gaaaaagtgg agagcattcg ttacaaggg | 3660 |
| aaaaaagcat atgatacagc aaaactatat attgataatc ttttgaagg ctctcaaaat | 3720 |
| acaaagtgtg atccttttgt cacattttta acactatcca atgctcgaca acttataaat | 3780 |
| aagatttata acaaatatag tccttggtta tcattaattc ctggagtga tttatgattta | 3840 |
| tttgaagaat tagccgtcag atttcaaaat gctttacaat tatatgatac aagaaacttg | 3900 |
| atacaaaatg ggcgatttat tgacggttta gtgagttgga tgacaacacc aggtgtacia | 3960 |
| gtgcgaaaag atagtgcac ctccatactt gagttaaata gttggaaga acaagtggta | 4020 |
| caaaaagtac cagtgtgcca aggttatggg tatgtattac gtgtaacagc aagtaaagaa | 4080 |
| gatttaggag agggatatat taaggttagt gatgaaatgg gtaatagtga tactataata | 4140 |
| tttagtgcac gtaataattc aaataatgac gtctctataa ataattatgt tacacaagag | 4200 |
| ttagagttct tccctgattc agattacgtt caccttgaaa ttggggaaac agaaggaaca | 4260 |
| tttcagattg taagtgttga gctaatttta atggaagat | 4299 |

<210> 2
 <211> 3546
 <212> ДНК
 <213> Bacillus thuringiensis

| | |
|---|-----|
| <400> 2 | |
| gtgaagataa atgatgtaaa tgaatgggat aatgtagcag aggtgactga aaacctctt | 60 |
| gcacctagca ttccgtacaa tgttctacaa cgtaaagaaa acacagcaaa cgaattaacc | 120 |
| tatgataatt ataatttcca agatttttta acattaggtt atgaagatat tactcaagca | 180 |
| gctaatacgc aagatgtaat taatacgaca ctaaagttaa ctgcaacaat tttgaatttc | 240 |

| | |
|--|------|
| ttaggagtcc cgtatgcagg gactgtaatt tctatgtatc aaaaactatt taattattta | 300 |
| tggccttatg aagacacttc agaatgggat aaaatgatgg cggcagtaga agcgctaata | 360 |
| aatcaaaaaa tcaatgagac agttaaagat ttggctcttg cggatttaga tggtttaggg | 420 |
| cgcaacttaa agtcttatgg aaatgcactt aagaattgga atgagaataa aaatgatgca | 480 |
| gatagcacag ctttagtggt agatcgcttt agaacagtta atgaactatt tgtaaagtat | 540 |
| atggcttctt ttgctcctaa aggttacgag gtactacttc tggacgtata tgcaaaagca | 600 |
| gcaaactctac atttgctttt ttttaagagat gcagaactat atgggtgcaga ttggggaatg | 660 |
| cctgaagatg agataaattt attttatcaa gaacaagaag attatagaaa agaataattcg | 720 |
| gaccattgca tatcttggtt tcaaaaaggg ttaaatcagt ttaataagtc tagtgcaactg | 780 |
| gattggataa aatataatcg ttacagaacc caaatgacaa ttaatgtggt ggattttggt | 840 |
| gcgttatatc caaattatga tggtcgtaaa tatccaatgt ccacacacac ggagcttaca | 900 |
| agaactgtat attcagatcc tattgggttt gatgaacgaa cgggaactgg tactagtggg | 960 |
| gttcgtgctt ggtatgaagc tggacgctct tttgctgaga tagaaaataa tgctattcct | 1020 |
| gcacctgata tcgttaaatt tataaataaa ctaacagtat attcaaaaag gataaatgcc | 1080 |
| agtccattca tggccactcg ttgggcaggg cattccataa ctcaggacac tacatttaca | 1140 |
| ggttcagcac aagaaataaa gtatggagat gtttcaggtg tccctaccac atttttattt | 1200 |
| aaaaacacag atatttatcg tacgatatca acggtaggaa cgtattatta tactaatggc | 1260 |
| ccttataaac tgccactttc aaaagttcat ttttatggaa taaatacttc taatcgaaag | 1320 |
| gaaactttca attatgatca agatattaat tttaaatttc agcatcaaaa agactcaagt | 1380 |
| aatgagatag ctgtagtcct tccaggaccc acagactatg gggactataa taaatatagt | 1440 |
| catcggttaa gttatatctt tgatgcccct ataaaacagt tcaactgggtt aagctcaaat | 1500 |
| gaagggtttg tccctgtatt tgggttgatg cattcaagca caactcgtaa aaattttctt | 1560 |
| agtgccaatc aaatcacgca aattccagct gtaaagcttc acgaatataa ctcatccatg | 1620 |
| gcaattgtaa gctcaaacgg atattgtggc ggatatatta tgaagggttc aaaagtattt | 1680 |
| ccattcaatg aagtgcagc tggaaactat gtagtagatt gtgaagatta tagtcaacaa | 1740 |
| tttctgtttc gggtttagata tgcttccact gtaagctgtc cactacgggt tgctacattc | 1800 |
| agcatatctg gtccaaccgt taatttagaa aaaacactac aaaaagggtga tgaaataaaa | 1860 |
| tatagttcct ttaaataatt tgaataactca gatcctgtga ggtttaaccc tcctggtacc | 1920 |
| tcaggattcc ctagttttta tcttatattt gtaggattat ctgctaataa aaatgtatat | 1980 |
| atagataaaa ttgaatgtat tccagtcaca aaagatgatt tagacaagga aacattagaa | 2040 |
| aaagcagaaa aagcggtgaa tgctttgttt attgatggta cccagaattt aaaaacagaa | 2100 |

```

gtgacagatt attgtataga tcaggtttct atgataatag attgtgtgtc tgaagaacta 2160
tatccaaatg aaaaacgaga tcttttgtat ttagtaaagc atgcgaaaag acaaagtaat 2220
acacgaaaact taattctgga ttccaacttt acttotatta attcagaaga tgttaacggg 2280
tggtatggaa gtccctgggtct tatagtagaa tctggagatg tggctcttta agaaaattat 2340
gtacattttac gtggtccaaa tgatgaacgc tatccaacgt acctgtatca aaaaatagac 2400
gaatcaaaat taacagaata tacaagatat caattgcgag gtttcataga aggaagtcgt 2460
ggtttggaag tatatgtaat tcgttatgat gcaaaacatg aaacactgaa tgttttaggg 2520
gatttatctc tagataatct gtcttacaac gaatgtgggtc aaccagatcg ctgttcacaa 2580
gaacatata ttgaacagag gttacaacaa gaagaagttg ctaatgaacg tgcattgtcat 2640
tttgattcca atgactocct gtcttcatca aatggatata cttctgattc acatcattta 2700
tccctacacg ttgataccgg atctattgat tttaaagaaa atttaggtat ctggatttta 2760
ttcaaattat cgacaacaga tggatatgca aagattggga atattgaatt ggtggaagag 2820
ggaccattaa caggaagtgc gctcggatct ataaaaagaa tggaaaataa atggaaagaa 2880
aaagtggaga gcattcgttt acaagggaaa aaagcatatg atacagcaaa actatatatt 2940
gataatctat ttgaaggctc tcaaaataca aagttgtatc cttttgtcac atttttaaca 3000
ctatccaatg ctcgacaact tataaataag atttataaca aatatagtcc ttggttatca 3060
ttaattcctg gagtgaatta tgatttattt gaagaattag ccgtcagatt tcaaaatgct 3120
ttacaattat atgatacaag aaacttgata caaaatgggc gatttattga cggttttagtg 3180
agttggatga caacaccagg tgtacaagtg cgaaaagata gtgcacctc catacttgag 3240
ttaaatagtt gggaagaaca agtgggtacaa aaagtaccag tgtgccaagg gtatgggtat 3300
gtattacgtg taacagcaag taaagaagat ttaggagagg gatataattaa ggtagtgat 3360
gaaatgggta atagtgtac tataatattt agtgcattga ataattcaaa taatgacgtc 3420
totataaata attatgttac acaagagtta gagttcttcc ctgattcaga ttacgttcac 3480
cttgaaattg gggaacaga aggaacattt cagattgtaa gtgttgagct aattttaatg 3540
gaagat 3546

```

<210> 3

<211> 1182

<212> B1JOK

<213> *Bacillus thuringiensis*

<400> 3

Met Lys Ile Asn Asp Val Asn Glu Trp Asp Asn Val Ala Glu Val Thr
1 5 10 15

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

Ser Ser Ala Leu Asp Trp Ile Lys Tyr Asn Arg Tyr Arg Thr Gln Met
260 265 270

Thr Ile Asn Val Leu Asp Phe Val Ala Leu Tyr Pro Asn Tyr Asp Val
275 280 285

Arg Lys Tyr Pro Met Ser Thr His Thr Glu Leu Thr Arg Thr Val Tyr
290 295 300

Ser Asp Pro Ile Gly Phe Asp Glu Arg Thr Gly Thr Gly Thr Ser Gly
305 310 315 320

Val Arg Ala Trp Tyr Glu Ala Gly Arg Ser Phe Ala Glu Ile Glu Asn
325 330 335

Asn Ala Ile Pro Ala Pro Asp Ile Val Lys Phe Ile Asn Lys Leu Thr
340 345 350

Val Tyr Ser Lys Arg Ile Asn Ala Ser Pro Phe Met Ala Thr Arg Trp
355 360 365

Ala Gly His Ser Ile Thr Gln Asp Thr Thr Phe Thr Gly Ser Ala Gln
370 375 380

Glu Ile Lys Tyr Gly Asp Val Ser Gly Val Pro Thr Thr Phe Leu Phe
385 390 395 400

Lys Asn Thr Asp Ile Tyr Arg Thr Ile Ser Thr Val Gly Thr Tyr Tyr
405 410 415

Tyr Thr Asn Gly Pro Tyr Lys Leu Pro Leu Ser Lys Val His Phe Tyr
420 425 430

Gly Ile Asn Thr Ser Asn Arg Lys Glu Thr Phe Asn Tyr Asp Gln Asp
435 440 445

Ile Asn Phe Lys Phe Gln His Gln Lys Asp Ser Ser Asn Glu Ile Ala
450 455 460

Val Val Leu Pro Gly Pro Thr Asp Tyr Gly Asp Tyr Asn Lys Tyr Ser
465 470 475 480

His Arg Leu Ser Tyr Ile Ser Asp Ala Pro Ile Lys Gln Phe Thr Gly
485 490 495

Leu Ser Ser Asn Glu Gly Phe Val Pro Val Phe Gly Trp Met His Ser
500 505 510

Ser Thr Thr Arg Lys Asn Phe Leu Ser Ala Asn Gln Ile Thr Gln Ile
515 520 525

Pro Ala Val Lys Ser His Glu Tyr Asn Ser Ser Met Ala Ile Val Ser
530 535 540

Ser Asn Gly Tyr Cys Gly Gly Tyr Ile Met Lys Val Ser Lys Val Phe
545 550 555 560

Pro Phe Asn Glu Val Thr Ala Gly Asn Tyr Val Val Asp Cys Glu Asp
565 570 575

Tyr Ser Gln Gln Phe Arg Phe Arg Val Arg Tyr Ala Ser Thr Val Ser
580 585 590

Cys Pro Leu Arg Phe Ala Thr Phe Ser Ile Ser Gly Pro Thr Val Asn
595 600 605

Leu Glu Lys Thr Leu Gln Lys Gly Asp Glu Ile Lys Tyr Ser Ser Phe
610 615 620

Lys Tyr Ser Glu Tyr Ser Asp Pro Val Arg Phe Asn Pro Pro Gly Thr
625 630 635 640

Ser Gly Phe Pro Ser Phe Asn Leu Ile Phe Val Gly Leu Ser Ala Asn
645 650 655

Glu Asn Val Tyr Ile Asp Lys Ile Glu Cys Ile Pro Val Thr Lys Asp
660 665 670

Asp Leu Asp Lys Glu Thr Leu Glu Lys Ala Glu Lys Ala Val Asn Ala
675 680 685

Leu Phe Ile Asp Gly Thr Gln Asn Leu Lys Thr Glu Val Thr Asp Tyr
690 695 700

Cys Ile Asp Gln Val Ser Met Ile Ile Asp Cys Val Ser Glu Glu Leu
705 710 715 720

Tyr Pro Asn Glu Lys Arg Asp Leu Leu Tyr Leu Val Lys His Ala Lys
725 730 735

Arg Gln Ser Asn Thr Arg Asn Leu Ile Leu Asp Ser Asn Phe Thr Ser

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

Tyr Pro Phe Val Thr Phe Leu Thr Leu Ser Asn Ala Arg Gln Leu Ile
995 1000 1005

Asn Lys Ile Tyr Asn Lys Tyr Ser Pro Trp Leu Ser Leu Ile Pro
1010 1015 1020

Gly Val Asn Tyr Asp Leu Phe Glu Glu Leu Ala Val Arg Phe Gln
1025 1030 1035

Asn Ala Leu Gln Leu Tyr Asp Thr Arg Asn Leu Ile Gln Asn Gly
1040 1045 1050

Arg Phe Ile Asp Gly Leu Val Ser Trp Met Thr Thr Pro Gly Val
1055 1060 1065

Gln Val Arg Lys Asp Ser Ala Ser Ser Ile Leu Glu Leu Asn Ser
1070 1075 1080

Trp Glu Glu Gln Val Val Gln Lys Val Pro Val Cys Gln Gly Tyr
1085 1090 1095

Gly Tyr Val Leu Arg Val Thr Ala Ser Lys Glu Asp Leu Gly Glu
1100 1105 1110

Gly Tyr Ile Lys Val Ser Asp Glu Met Gly Asn Ser Asp Thr Ile
1115 1120 1125

Ile Phe Ser Ala Cys Asn Asn Ser Asn Asn Asp Val Ser Ile Asn
1130 1135 1140

Asn Tyr Val Thr Gln Glu Leu Glu Phe Phe Pro Asp Ser Asp Tyr
1145 1150 1155

Val His Leu Glu Ile Gly Glu Thr Glu Gly Thr Phe Gln Ile Val
1160 1165 1170

Ser Val Glu Leu Ile Leu Met Glu Asp
1175 1180

<210> 4

<211> 1091

<212> EIJOK

<213> Bacillus thuringiensis

<400> 4

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Tyr | Gln | Lys | Leu | Phe | Asn | Tyr | Leu | Trp | Pro | Tyr | Glu | Asp | Thr | Ser | 1 | 5 | 10 | 15 |
| Glu | Trp | Asp | Lys | Met | Met | Ala | Ala | Val | Glu | Ala | Leu | Ile | Asn | Gln | Lys | 20 | 25 | 30 | |
| Ile | Asn | Glu | Thr | Val | Lys | Ser | Leu | Ala | Leu | Ala | Asp | Leu | Asp | Gly | Leu | 35 | 40 | 45 | |
| Gly | Arg | Asn | Leu | Lys | Ser | Tyr | Gly | Asn | Ala | Leu | Lys | Asn | Trp | Asn | Glu | 50 | 55 | 60 | |
| Asn | Lys | Asn | Asp | Ala | Asp | Ser | Thr | Ala | Leu | Val | Leu | Asp | Arg | Phe | Arg | 65 | 70 | 75 | 80 |
| Thr | Val | Asn | Glu | Leu | Phe | Val | Asn | Asp | Met | Ala | Ser | Phe | Ala | Pro | Lys | 85 | 90 | 95 | |
| Gly | Tyr | Glu | Val | Leu | Leu | Leu | Asp | Val | Tyr | Ala | Lys | Ala | Ala | Asn | Leu | 100 | 105 | 110 | |
| His | Leu | Leu | Phe | Leu | Arg | Asp | Ala | Glu | Leu | Tyr | Gly | Ala | Asp | Trp | Gly | 115 | 120 | 125 | |
| Met | Pro | Glu | Asp | Glu | Ile | Asn | Leu | Phe | Tyr | Gln | Glu | Gln | Glu | Asp | Tyr | 130 | 135 | 140 | |
| Arg | Lys | Glu | Tyr | Ser | Asp | His | Cys | Ile | Ser | Trp | Tyr | Gln | Lys | Gly | Leu | 145 | 150 | 155 | 160 |
| Asn | Gln | Phe | Asn | Lys | Ser | Ser | Ala | Leu | Asp | Trp | Ile | Lys | Tyr | Asn | Arg | 165 | 170 | 175 | |
| Tyr | Arg | Thr | Gln | Met | Thr | Ile | Asn | Val | Leu | Asp | Phe | Val | Ala | Leu | Tyr | 180 | 185 | 190 | |
| Pro | Asn | Tyr | Asp | Val | Arg | Lys | Tyr | Pro | Met | Ser | Thr | His | Thr | Glu | Leu | 195 | 200 | 205 | |
| Thr | Arg | Thr | Val | Tyr | Ser | Asp | Pro | Ile | Gly | Phe | Asp | Glu | Arg | Thr | Gly | 210 | 215 | 220 | |
| Thr | Gly | Thr | Ser | Gly | Val | Arg | Ala | Trp | Tyr | Glu | Ala | Gly | Arg | Ser | Phe | 225 | 230 | 235 | 240 |
| Ala | Glu | Ile | Glu | Asn | Asn | Ala | Ile | Pro | Ala | Pro | Asp | Ile | Val | Lys | Phe | | | | |

| 245 | | | | | | | | | | 250 | | | | | 255 | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|--|
| Ile | Asn | Lys | Leu | Thr | Val | Tyr | Ser | Lys | Arg | Ile | Asn | Ala | Ser | Pro | Phe | | | | | |
| | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | | | | | | |
| Met | Ala | Thr | Arg | Trp | Ala | Gly | His | Ser | Ile | Thr | Gln | Asp | Thr | Thr | Phe | | | | | |
| | | 275 | | | | | 280 | | | | | 285 | | | | | | | | |
| Thr | Gly | Ser | Ala | Gln | Glu | Ile | Lys | Tyr | Gly | Asp | Val | Ser | Gly | Val | Pro | | | | | |
| | 290 | | | | | 295 | | | | | 300 | | | | | | | | | |
| Thr | Thr | Phe | Leu | Phe | Lys | Asn | Thr | Asp | Ile | Tyr | Arg | Thr | Ile | Ser | Thr | | | | | |
| 305 | | | | | 310 | | | | | 315 | | | | | 320 | | | | | |
| Val | Gly | Thr | Tyr | Tyr | Tyr | Thr | Asn | Gly | Pro | Tyr | Lys | Leu | Pro | Leu | Ser | | | | | |
| | | | | 325 | | | | | 330 | | | | | 335 | | | | | | |
| Lys | Val | His | Phe | Tyr | Gly | Ile | Asn | Thr | Ser | Asn | Arg | Lys | Glu | Thr | Phe | | | | | |
| | | | 340 | | | | | 345 | | | | | 350 | | | | | | | |
| Asn | Tyr | Asp | Gln | Asp | Ile | Asn | Phe | Lys | Phe | Gln | His | Gln | Lys | Asp | Ser | | | | | |
| | | 355 | | | | | 360 | | | | | 365 | | | | | | | | |
| Ser | Asn | Glu | Ile | Ala | Val | Val | Leu | Pro | Gly | Pro | Thr | Asp | Tyr | Gly | Asp | | | | | |
| | 370 | | | | | 375 | | | | | 380 | | | | | | | | | |
| Tyr | Asn | Lys | Tyr | Ser | His | Arg | Leu | Ser | Tyr | Ile | Ser | Asp | Ala | Pro | Ile | | | | | |
| 385 | | | | | 390 | | | | | 395 | | | | | 400 | | | | | |
| Lys | Gln | Phe | Thr | Gly | Leu | Ser | Ser | Asn | Glu | Gly | Phe | Val | Pro | Val | Phe | | | | | |
| | | | | 405 | | | | | 410 | | | | | 415 | | | | | | |
| Gly | Trp | Met | His | Ser | Ser | Thr | Thr | Arg | Lys | Asn | Phe | Leu | Ser | Ala | Asn | | | | | |
| | | | 420 | | | | | 425 | | | | | 430 | | | | | | | |
| Gln | Ile | Thr | Gln | Ile | Pro | Ala | Val | Lys | Ser | His | Glu | Tyr | Asn | Ser | Ser | | | | | |
| | | 435 | | | | | 440 | | | | | 445 | | | | | | | | |
| Met | Ala | Ile | Val | Ser | Ser | Asn | Gly | Tyr | Cys | Gly | Gly | Tyr | Ile | Met | Lys | | | | | |
| | 450 | | | | | 455 | | | | | 460 | | | | | | | | | |
| Val | Ser | Lys | Val | Phe | Pro | Phe | Asn | Glu | Val | Thr | Ala | Gly | Asn | Tyr | Val | | | | | |
| 465 | | | | | 470 | | | | | 475 | | | | | 480 | | | | | |
| Val | Asp | Cys | Glu | Asp | Tyr | Ser | Gln | Gln | Phe | Arg | Phe | Arg | Val | Arg | Tyr | | | | | |
| | | | | 485 | | | | | 490 | | | | | | 495 | | | | | |

Ala Ser Thr Val Ser Cys Pro Leu Arg Phe Ala Thr Phe Ser Ile Ser
500 505 510

Gly Pro Thr Val Asn Leu Glu Lys Thr Leu Gln Lys Gly Asp Glu Ile
515 520 525

Lys Tyr Ser Ser Phe Lys Tyr Ser Glu Tyr Ser Asp Pro Val Arg Phe
530 535 540

Asn Pro Pro Gly Thr Ser Gly Phe Pro Ser Phe Asn Leu Ile Phe Val
545 550 555 560

Gly Leu Ser Ala Asn Glu Asn Val Tyr Ile Asp Lys Ile Glu Cys Ile
565 570 575

Pro Val Thr Lys Asp Asp Leu Asp Lys Glu Thr Leu Glu Lys Ala Glu
580 585 590

Lys Ala Val Asn Ala Leu Phe Ile Asp Gly Thr Gln Asn Leu Lys Thr
595 600 605

Glu Val Thr Asp Tyr Cys Ile Asp Gln Val Ser Met Ile Ile Asp Cys
610 615 620

Val Ser Glu Glu Leu Tyr Pro Asn Glu Lys Arg Asp Leu Leu Tyr Leu
625 630 635 640

Val Lys His Ala Lys Arg Gln Ser Asn Thr Arg Asn Leu Ile Leu Asp
645 650 655

Ser Asn Phe Thr Ser Ile Asn Ser Glu Asp Val Asn Gly Trp Tyr Gly
660 665 670

Ser Pro Gly Leu Ile Val Glu Ser Gly Asp Val Val Phe Lys Glu Asn
675 680 685

Tyr Val His Leu Arg Gly Pro Asn Asp Glu Arg Tyr Pro Thr Tyr Leu
690 695 700

Tyr Gln Lys Ile Asp Glu Ser Lys Leu Thr Glu Tyr Thr Arg Tyr Gln
705 710 715 720

Leu Arg Gly Phe Ile Glu Gly Ser Arg Gly Leu Glu Val Tyr Val Ile
725 730 735

Arg Tyr Asp Ala Lys His Glu Thr Leu Asn Val Leu Gly Asp Leu Ser
740 745 750

Leu Asp Asn Leu Ser Tyr Asn Glu Cys Gly Gln Pro Asp Arg Cys Ser
755 760 765

Gln Glu Pro Tyr Ile Glu Gln Arg Leu Gln Gln Glu Glu Val Ala Asn
770 775 780

Glu Arg Ala Cys His Phe Asp Ser Asn Asp Ser Leu Ser Ser Ser Asn
785 790 795 800

Gly Tyr Pro Ser Asp Ser His His Leu Ser Leu His Val Asp Thr Gly
805 810 815

Ser Ile Asp Phe Lys Glu Asn Leu Gly Ile Trp Ile Leu Phe Lys Leu
820 825 830

Ser Thr Thr Asp Gly Tyr Ala Lys Ile Gly Asn Ile Glu Leu Val Glu
835 840 845

Glu Gly Pro Leu Thr Gly Ser Ala Leu Gly Ser Ile Lys Arg Met Glu
850 855 860

Asn Lys Trp Lys Glu Lys Val Glu Ser Ile Arg Leu Gln Gly Lys Lys
865 870 875 880

Ala Tyr Asp Thr Ala Lys Leu Tyr Ile Asp Asn Leu Phe Glu Gly Ser
885 890 895

Gln Asn Thr Lys Leu Tyr Pro Phe Val Thr Phe Leu Thr Leu Ser Asn
900 905 910

Ala Arg Gln Leu Ile Asn Lys Ile Tyr Asn Lys Tyr Ser Pro Trp Leu
915 920 925

Ser Leu Ile Pro Gly Val Asn Tyr Asp Leu Phe Glu Glu Leu Ala Val
930 935 940

Arg Phe Gln Asn Ala Leu Gln Leu Tyr Asp Thr Arg Asn Leu Ile Gln
945 950 955 960

Asn Gly Arg Phe Ile Asp Gly Leu Val Ser Trp Met Thr Thr Pro Gly
965 970 975

Val Gln Val Arg Lys Asp Ser Ala Ser Ser Ile Leu Glu Leu Asn Ser
980 985 990

Trp Glu Glu Gln Val Val Gln Lys Val Pro Val Cys Gln Gly Tyr Gly
995 1000 1005

Tyr Val Leu Arg Val Thr Ala Ser Lys Glu Asp Leu Gly Glu Gly
1010 1015 1020

Tyr Ile Lys Val Ser Asp Glu Met Gly Asn Ser Asp Thr Ile Ile
1025 1030 1035

Phe Ser Ala Cys Asn Asn Ser Asn Asn Asp Val Ser Ile Asn Asn
1040 1045 1050

Tyr Val Thr Gln Glu Leu Glu Phe Phe Pro Asp Ser Asp Tyr Val
1055 1060 1065

His Leu Glu Ile Gly Glu Thr Glu Gly Thr Phe Gln Ile Val Ser
1070 1075 1080

Val Glu Leu Ile Leu Met Glu Asp
1085 1090

<210> 5
<211> 669
<212> B1MOK
<213> Bacillus thuringiensis

<400> 5

Met Lys Ile Asn Asp Val Asn Glu Trp Asp Asn Val Ala Glu Val Thr
1 5 10 15

Glu Asn Pro Leu Ala Pro Ser Ile Pro Tyr Asn Val Leu Gln Arg Lys
20 25 30

Glu Asn Thr Ala Asn Glu Leu Thr Tyr Asp Asn Tyr Asn Phe Gln Asp
35 40 45

Phe Leu Thr Leu Gly Tyr Glu Asp Ile Thr Gln Ala Ala Asn Ala Gln
50 55 60

Asp Val Ile Asn Thr Thr Leu Asn Val Thr Ala Thr Ile Leu Asn Phe
65 70 75 80

Leu Gly Val Pro Tyr Ala Gly Thr Val Ile Ser Met Tyr Gln Lys Leu
85 90 95

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Phe | Asn | Tyr | Leu | Trp | Pro | Tyr | Glu | Asp | Thr | Ser | Glu | Trp | Asp | Lys | Met | 100 | 105 | 110 | |
| Met | Ala | Ala | Val | Glu | Ala | Leu | Ile | Asn | Gln | Lys | Ile | Asn | Glu | Thr | Val | 115 | 120 | 125 | |
| Lys | Ser | Leu | Ala | Leu | Ala | Asp | Leu | Asp | Gly | Leu | Gly | Arg | Asn | Leu | Lys | 130 | 135 | 140 | |
| Ser | Tyr | Gly | Asn | Ala | Leu | Lys | Asn | Trp | Asn | Glu | Asn | Lys | Asn | Asp | Ala | 145 | 150 | 155 | 160 |
| Asp | Ser | Thr | Ala | Leu | Val | Leu | Asp | Arg | Phe | Arg | Thr | Val | Asn | Glu | Leu | 165 | 170 | 175 | |
| Phe | Val | Asn | Asp | Met | Ala | Ser | Phe | Ala | Pro | Lys | Gly | Tyr | Glu | Val | Leu | 180 | 185 | 190 | |
| Leu | Leu | Asp | Val | Tyr | Ala | Lys | Ala | Ala | Asn | Leu | His | Leu | Leu | Phe | Leu | 195 | 200 | 205 | |
| Arg | Asp | Ala | Glu | Leu | Tyr | Gly | Ala | Asp | Trp | Gly | Met | Pro | Glu | Asp | Glu | 210 | 215 | 220 | |
| Ile | Asn | Leu | Phe | Tyr | Gln | Glu | Gln | Glu | Asp | Tyr | Arg | Lys | Glu | Tyr | Ser | 225 | 230 | 235 | 240 |
| Asp | His | Cys | Ile | Ser | Trp | Tyr | Gln | Lys | Gly | Leu | Asn | Gln | Phe | Asn | Lys | 245 | 250 | 255 | |
| Ser | Ser | Ala | Leu | Asp | Trp | Ile | Lys | Tyr | Asn | Arg | Tyr | Arg | Thr | Gln | Met | 260 | 265 | 270 | |
| Thr | Ile | Asn | Val | Leu | Asp | Phe | Val | Ala | Leu | Tyr | Pro | Asn | Tyr | Asp | Val | 275 | 280 | 285 | |
| Arg | Lys | Tyr | Pro | Met | Ser | Thr | His | Thr | Glu | Leu | Thr | Arg | Thr | Val | Tyr | 290 | 295 | 300 | |
| Ser | Asp | Pro | Ile | Gly | Phe | Asp | Glu | Arg | Thr | Gly | Thr | Gly | Thr | Ser | Gly | 305 | 310 | 315 | 320 |
| Val | Arg | Ala | Trp | Tyr | Glu | Ala | Gly | Arg | Ser | Phe | Ala | Glu | Ile | Glu | Asn | 325 | 330 | 335 | |

Asn Ala Ile Pro Ala Pro Asp Ile Val Lys Phe Ile Asn Lys Leu Thr
340 345 350

Val Tyr Ser Lys Arg Ile Asn Ala Ser Pro Phe Met Ala Thr Arg Trp
355 360 365

Ala Gly His Ser Ile Thr Gln Asp Thr Thr Phe Thr Gly Ser Ala Gln
370 375 380

Glu Ile Lys Tyr Gly Asp Val Ser Gly Val Pro Thr Thr Phe Leu Phe
385 390 395 400

Lys Asn Thr Asp Ile Tyr Arg Thr Ile Ser Thr Val Gly Thr Tyr Tyr
405 410 415

Tyr Thr Asn Gly Pro Tyr Lys Leu Pro Leu Ser Lys Val His Phe Tyr
420 425 430

Gly Ile Asn Thr Ser Asn Arg Lys Glu Thr Phe Asn Tyr Asp Gln Asp
435 440 445

Ile Asn Phe Lys Phe Gln His Gln Lys Asp Ser Ser Asn Glu Ile Ala
450 455 460

Val Val Leu Pro Gly Pro Thr Asp Tyr Gly Asp Tyr Asn Lys Tyr Ser
465 470 475 480

His Arg Leu Ser Tyr Ile Ser Asp Ala Pro Ile Lys Gln Phe Thr Gly
485 490 495

Leu Ser Ser Asn Glu Gly Phe Val Pro Val Phe Gly Trp Met His Ser
500 505 510

Ser Thr Thr Arg Lys Asn Phe Leu Ser Ala Asn Gln Ile Thr Gln Ile
515 520 525

Pro Ala Val Lys Ser His Glu Tyr Asn Ser Ser Met Ala Ile Val Ser
530 535 540

Ser Asn Gly Tyr Cys Gly Gly Tyr Ile Met Lys Val Ser Lys Val Phe
545 550 555 560

Pro Phe Asn Glu Val Thr Ala Gly Asn Tyr Val Val Asp Cys Glu Asp
565 570 575

Tyr Ser Gln Gln Phe Arg Phe Arg Val Arg Tyr Ala Ser Thr Val Ser
580 585 590

Cys Pro Leu Arg Phe Ala Thr Phe Ser Ile Ser Gly Pro Thr Val Asn
595 600 605

Leu Glu Lys Thr Leu Gln Lys Gly Asp Glu Ile Lys Tyr Ser Ser Phe
610 615 620

Lys Tyr Ser Glu Tyr Ser Asp Pro Val Arg Phe Asn Pro Pro Gly Thr
625 630 635 640

Ser Gly Phe Pro Ser Phe Asn Leu Ile Phe Val Gly Leu Ser Ala Asn
645 650 655

Glu Asn Val Tyr Ile Asp Lys Ile Glu Cys Ile Pro Val
660 665

<210> 6

<211> 578

<212> BIJOK

<213> Bacillus thuringiensis

<400> 6

Met Tyr Gln Lys Leu Phe Asn Tyr Leu Trp Pro Tyr Glu Asp Thr Ser
1 5 10 15

Glu Trp Asp Lys Met Met Ala Ala Val Glu Ala Leu Ile Asn Gln Lys
20 25 30

Ile Asn Glu Thr Val Lys Ser Leu Ala Leu Ala Asp Leu Asp Gly Leu
35 40 45

Gly Arg Asn Leu Lys Ser Tyr Gly Asn Ala Leu Lys Asn Trp Asn Glu
50 55 60

Asn Lys Asn Asp Ala Asp Ser Thr Ala Leu Val Leu Asp Arg Phe Arg
65 70 75 80

Thr Val Asn Glu Leu Phe Val Asn Asp Met Ala Ser Phe Ala Pro Lys
85 90 95

Gly Tyr Glu Val Leu Leu Leu Asp Val Tyr Ala Lys Ala Ala Asn Leu
100 105 110

His Leu Leu Phe Leu Arg Asp Ala Glu Leu Tyr Gly Ala Asp Trp Gly
115 120 125

Met Pro Glu Asp Glu Ile Asn Leu Phe Tyr Gln Glu Gln Glu Asp Tyr
130 135 140

Arg Lys Glu Tyr Ser Asp His Cys Ile Ser Trp Tyr Gln Lys Gly Leu
145 150 155 160

Asn Gln Phe Asn Lys Ser Ser Ala Leu Asp Trp Ile Lys Tyr Asn Arg
165 170 175

Tyr Arg Thr Gln Met Thr Ile Asn Val Leu Asp Phe Val Ala Leu Tyr
180 185 190

Pro Asn Tyr Asp Val Arg Lys Tyr Pro Met Ser Thr His Thr Glu Leu
195 200 205

Thr Arg Thr Val Tyr Ser Asp Pro Ile Gly Phe Asp Glu Arg Thr Gly
210 215 220

Thr Gly Thr Ser Gly Val Arg Ala Trp Tyr Glu Ala Gly Arg Ser Phe
225 230 235 240

Ala Glu Ile Glu Asn Asn Ala Ile Pro Ala Pro Asp Ile Val Lys Phe
245 250 255

Ile Asn Lys Leu Thr Val Tyr Ser Lys Arg Ile Asn Ala Ser Pro Phe
260 265 270

Met Ala Thr Arg Trp Ala Gly His Ser Ile Thr Gln Asp Thr Thr Phe
275 280 285

Thr Gly Ser Ala Gln Glu Ile Lys Tyr Gly Asp Val Ser Gly Val Pro
290 295 300

Thr Thr Phe Leu Phe Lys Asn Thr Asp Ile Tyr Arg Thr Ile Ser Thr
305 310 315 320

Val Gly Thr Tyr Tyr Tyr Thr Asn Gly Pro Tyr Lys Leu Pro Leu Ser
325 330 335

Lys Val His Phe Tyr Gly Ile Asn Thr Ser Asn Arg Lys Glu Thr Phe
340 345 350

Asn Tyr Asp Gln Asp Ile Asn Phe Lys Phe Gln His Gln Lys Asp Ser
355 360 365

Ser Asn Glu Ile Ala Val Val Leu Pro Gly Pro Thr Asp Tyr Gly Asp
370 375 380

Tyr Asn Lys Tyr Ser His Arg Leu Ser Tyr Ile Ser Asp Ala Pro Ile
385 390 395 400

Lys Gln Phe Thr Gly Leu Ser Ser Asn Glu Gly Phe Val Pro Val Phe
405 410 415

Gly Trp Met His Ser Ser Thr Thr Arg Lys Asn Phe Leu Ser Ala Asn
420 425 430

Gln Ile Thr Gln Ile Pro Ala Val Lys Ser His Glu Tyr Asn Ser Ser
435 440 445

Met Ala Ile Val Ser Ser Asn Gly Tyr Cys Gly Gly Tyr Ile Met Lys
450 455 460

Val Ser Lys Val Phe Pro Phe Asn Glu Val Thr Ala Gly Asn Tyr Val
465 470 475 480

Val Asp Cys Glu Asp Tyr Ser Gln Gln Phe Arg Phe Arg Val Arg Tyr
485 490 495

Ala Ser Thr Val Ser Cys Pro Leu Arg Phe Ala Thr Phe Ser Ile Ser
500 505 510

Gly Pro Thr Val Asn Leu Glu Lys Thr Leu Gln Lys Gly Asp Glu Ile
515 520 525

Lys Tyr Ser Ser Phe Lys Tyr Ser Glu Tyr Ser Asp Pro Val Arg Phe
530 535 540

Asn Pro Pro Gly Thr Ser Gly Phe Pro Ser Phe Asn Leu Ile Phe Val
545 550 555 560

Gly Leu Ser Ala Asn Glu Asn Val Tyr Ile Asp Lys Ile Glu Cys Ile
565 570 575

Pro Val

<210> 7

<211> 4

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Пептид, що націлюється на ендоплазматичний ретикулум

<400> 7

Lys Asp Glu Leu

1

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Молекула рекомбінантної нуклеїнової кислоти, що містить нуклеотидну послідовність, яка кодує амінокислотну послідовність, що має пестицидну активність, де зазначена нуклеотидна послідовність вибрана з групи, яка складається з:
 - а) нуклеотидної послідовності, викладеної в SEQ ID NO: 1 або 2;
 - 10 б) нуклеотидної послідовності, що кодує поліпептид, який містить амінокислотну послідовність будь-якої з SEQ ID NO: 3-6;
 - с) нуклеотидної послідовності, що кодує поліпептид, який містить амінокислотну послідовність із щонайменше 95 % ідентичністю послідовності з амінокислотною послідовністю будь-якої з SEQ ID NO: 3-6.
- 15 2. Молекула рекомбінантної нуклеїнової кислоти за п. 1, де зазначена нуклеотидна послідовність являє собою синтетичну послідовність, яку було сконструйовано для експресії у рослині.
3. Молекула рекомбінантної нуклеїнової кислоти за п. 1, де зазначена нуклеотидна послідовність функціонально зв'язана з промотором, здатним керувати експресією зазначеної нуклеотидної послідовності у рослинній клітині.
- 20 4. Вектор, що містить молекулу рекомбінантної нуклеїнової кислоти за п. 1, де зазначена рекомбінантна нуклеїнова кислота функціонально зв'язана з гетерологічним промотором, який здатен керувати експресією зазначеної нуклеотидної послідовності в клітині-хазяїні.
5. Вектор за п. 4, що додатково містить молекулу нуклеїнової кислоти, яка кодує гетерологічний поліпептид.
- 25 6. Клітина-хазяїн, що містить рекомбінантну нуклеїнову кислоту за п. 1, де зазначена рекомбінантна нуклеїнова кислота функціонально зв'язана з гетерологічним промотором, який здатен керувати експресією зазначеної нуклеотидної послідовності в клітині-хазяїні.
7. Клітина-хазяїн за п. 6, що являє собою бактеріальну клітину-хазяїна.
8. Клітина-хазяїн за п. 6, що являє собою рослинну клітину.
- 30 9. Трансгенна рослина, що містить клітину-хазяїна за п. 8.
10. Трансгенна рослина за п. 9, де зазначена рослина вибрана з групи, що складається з маїсу, сорго, пшениці, капусти, соняшнику, помідора, хрестоцвітів, перцевих, картоплі, бавовнику, рису, сої, цукрового буряка, цукрової тростини, тютюну, ячменю та олійного рапсу.
11. Трансгенне насіння, що містить молекулу нуклеїнової кислоти за п. 1, де зазначена нуклеотидна послідовність функціонально зв'язана з гетерологічним промотором, який здатен керувати експресією нуклеїнової кислоти в насінні.
- 35 12. Рекомбінантний поліпептид з пестицидною активністю, вибраний з групи, що складається з:
 - а) поліпептиду, що містить амінокислотну послідовність будь-якої з SEQ ID NO: 3-6, та
 - б) поліпептиду, що містить амінокислотну послідовність із щонайменше 95 % ідентичністю послідовності з амінокислотною послідовністю будь-якої з SEQ ID NO: 3-6.
- 40 13. Поліпептид за п. 12, що додатково містить гетерологічні амінокислотні послідовності.
14. Композиція, що містить поліпептид за п. 12.
15. Композиція за п. 14, де зазначена композиція вибрана з групи, яка складається з порошку, дусту, пелети, гранули, аерозолу, емульсії, колоїду та розчину.
- 45 16. Композиція за п. 14, де зазначена композиція отримана за допомогою сушіння, ліофілізації, гомогенізації, екстракції, фільтрації, центрифугування, осадження або концентрування культури бактеріальних клітин.
17. Композиція за п. 14, що містить від 1 % до 99 % за масою зазначеного поліпептиду.
18. Спосіб боротьби з популяцією лускокрилого шкідника, що включає згодовування зазначених популяції пестицидно ефективною кількістю поліпептиду за п. 12.
- 50 19. Спосіб знищення лускокрилого шкідника, що включає згодовування зазначеному шкідникові пестицидно ефективною кількістю поліпептиду за п. 12.

20. Спосіб одержання поліпептиду з пестицидною активністю, що включає культивування клітини-хазяїна за п. 6 в умовах, за яких експресується молекула нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид.

5 21. Рослина або рослинна клітина із стабільно вбудованою в її геном ДНК-конструкцією, що містить нуклеотидну послідовність, яка кодує білок, що має пестицидну активність, де зазначена нуклеотидна послідовність вибрана з групи, яка складається з:

а) нуклеотидної послідовності, викладеної в SEQ ID NO: 1 або 2;

б) нуклеотидної послідовності, яка кодує поліпептид, що містить амінокислотну послідовність будь-якої з SEQ ID NO: 3-6, і

10 с) нуклеотидної послідовності, яка кодує поліпептид, що містить амінокислотну послідовність із щонайменше 95 % ідентичністю послідовності з амінокислотною послідовністю будь-якої з SEQ ID NO: 3-6.

22. Спосіб захисту рослини від лускокрилого шкідника, який включає експресію в рослині або її клітині нуклеотидної послідовності, що кодує поліпептид, що має пестицидну активність проти лускокрилого шкідника, де зазначену нуклеотидну послідовність вибрано з групи, яка складається з:

а) нуклеотидної послідовності, викладеної в SEQ ID NO: 1 або 2;

б) нуклеотидної послідовності, яка кодує поліпептид, що містить амінокислотну послідовність будь-якої з SEQ ID NO: 3-6, і

20 с) нуклеотидної послідовності, яка кодує поліпептид, що містить амінокислотну послідовність із щонайменше 95 % ідентичністю послідовності з амінокислотною послідовністю будь-якої з SEQ ID NO: 3-6.

23. Спосіб підвищення врожайності рослини, що включає вирощування у полі рослини або її насінини із стабільно вбудованою у її геном ДНК-конструкцією, що містить нуклеотидну послідовність, яка кодує білок, що має пестицидну активність, де зазначена нуклеотидна послідовність вибрана з групи, яка складається з:

а) нуклеотидної послідовності, викладеної в SEQ ID NO: 1 або 2;

б) нуклеотидної послідовності, яка кодує поліпептид, що містить амінокислотну послідовність будь-якої з SEQ ID NO: 3-6, і

30 с) нуклеотидної послідовності, яка кодує поліпептид, що містить амінокислотну послідовність із щонайменше 95 % ідентичністю послідовності з амінокислотною послідовністю будь-якої з SEQ ID NO: 3-6,

де зазначене поле заражене шкідником, проти якого зазначений поліпептид проявляє пестицидну активність.

35

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

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