



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **122475** (13) **C2**
(51) МПК**A01H 1/06** (2006.01)
C07K 14/325 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
C12R 1/00 (2006.01)НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

(21) Номер заявки: a 2019 10391	(72) Винахідник(и): Лехтінен Дуан Алан (US), Сампсон Кімберлі С. (US), Робертс Кіра (US), Дунн Ітан (US), Чоугуле Нана (US)
(22) Дата подання заявки: 08.12.2014	(73) Володілець (володільці): АТЕНІКС КОРП., 3500 Paramount Parkway, Morrisville, NC 27560, USA (US)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 11.11.2020	(74) Представник: Петров Андрій Володимирович, реєстр. №139
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 61/913,905, 61/913,911	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2009158470 A2, 30.12.2009 WO 2007147096 A2, 21.12.2007 WO 2013134734 A2, 12.09.2013 WO 2011014749 A1, 03.02.2011 US 20050138685 A1, 23.06.2005 US 2006 156432 A1, 13.07.2006 YE W. et al. Mining new crystal protein genes from <i>Bacillus thuringiensis</i> on the basis of mixed plasmid-enriched genome sequencing and a computational pipeline. Applied and environmental microbiology, 2012, Vol. 78, no. 14, P. 4795 – 4801 KAUR S. Molecular approaches for identification and construction of novel insecticidal genes for crop protection. World journal of microbiology and biotechnology, Kluwer academic publishers, DO, 2006, Vol. 22, no. 3, P. 233 – 253
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 09.12.2013, 09.12.2013	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US, US	
(41) Публікація відомостей про заявку: 25.03.2020, Бюл.№ 6	
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 10.11.2020, Бюл.№ 21	
(62) Номер та дата подання попередньої заявки, з якої виділено заявку, позначену кодом (21): a201607471, 08.12.2014	

(54) ГЕН ТОКСИНУ АХМІ486 ТА СПОСІБ ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ**(57) Реферат:**

Винахід стосується молекули 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 під SEQ ID NO:3; b) нуклеотидної послідовності, що кодує поліпептид, який містить амінокислотну послідовність під будь-яким SEQ ID NO:15-19; c) нуклеотидної послідовності, що кодує поліпептид, який містить амінокислотну послідовність, яка

UA 122475 C2

щонайменше на 95 % ідентична амінокислотній послідовності під будь-яким SEQ ID NO:15-19.

Дана заявка заявляє пріоритет відповідно до тимчасової заявки на патент США з реєстраційним № 61/913905, поданої 9 грудня 2013 року, і тимчасової заявки на патент США з реєстраційним № 61/913911, поданої 9 грудня 2013 року, вміст яких включено у даний документ за допомогою посилання у їх повному обсязі.

Офіційна копія переліку послідовностей надається у електронній формі за допомогою EFS-Web як відформатований за ASCII перелік послідовностей у файлі з назвою "APA136054_ST25.txt", створеному 14 листопада 2014 року, що має розмір 97 кілобайт і подається одночасно з даним описом. Перелік послідовностей, що міститься у цьому відформатованому за ASCII документі, є частиною даного опису і включений у даний документ за допомогою посилання у всій своїй повноті.

Даний винахід стосується галузі молекулярної біології. Забезпечуються нові гени, які кодують пестицидні білки. Дані білки та нуклеотидні послідовності, що їх кодують, застосовуються для одержання пестицидних складів та при одержанні трансгенних рослин, стійких до сільськогосподарських шкідників.

Bacillus thuringiensis являє собою грампозитивну спороутворювальну ґрунтову бактерію, яка має здатність продукувати кристалічні включення, що проявляють специфічну токсичність щодо 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) від *Bacillus thuringiensis* мають потужну інсектицидну активність щодо переважно личинок лускокрилих, напівтвердокрилих, двокрилих та твердокрилих. Дані білки також продемонстрували активність щодо 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) і (VI). Додатково білки класифікували в підродини; більш спорідненим білкам у складі кожної родини надали кодові позначення, такі як Cry1A, Cry1B, Cry1C тощо. Ще більш спорідненим білкам в рамках кожної групи надали такі позначення, як Cry1C1, Cry1C2 тощо.

Було описано нову номенклатуру для генів Cry, яка більше базується на основі гомології амінокислотних послідовностей, ніж специфічності щодо комах-мішені (Crickmore et al. (1998) Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62:807-813). (1998) Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62:807-813). У цій 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 замінені арабськими цифрами у 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 активної токсичної молекули. (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 у результаті призводить до загибелі 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 упорядковані у конфігурації грецького ключа, а домен III складається з двох антипаралельних складчастих бета-шарів у структурі типу "jelly-roll" (de Maagd et al., 2001, вище). Домени II та III беруть участь у розпізнаванні та зв'язуванні рецепторів і тому вважаються детермінантами специфічності токсину.

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

Забезпечуються композиції та способи для надання пестицидної активності бактеріям,

рослинам, клітинам рослин, тканинам та насінню рослин. Композиції містять молекули нуклеїнових кислот, які кодують послідовності пестицидних та інсектицидних поліпептидів, 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 касетах експресії для трансформації та експресії в організмах, у тому числі мікроорганізмах та рослинах. Нуклеотидні або амінокислотні послідовності можуть являти собою синтетичні послідовності, які було сконструйовано для експресії в організмі, включаючи без обмеження мікроорганізм або рослину. Композиції також містять бактерії, рослини, клітини рослин, тканини та насіння рослин, 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 під SEQ ID NO:5-26, або нуклеотидну послідовність, викладену під SEQ ID NO:1-4, а також їх біологічно-активні варіанти та фрагменти. Нуклеотидні послідовності, що є комплементарними нуклеотидній послідовності за даним винаходом, або які гібридизуються з послідовністю за даним винаходом або комплементарним їй ланцюгом, також охоплюються. 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, що відносяться до лускокрилих, напівтвердокрилих, твердокрилих, нематод або двокрилих.

Також включено способи та набори для виявлення у зразку нуклеїнових кислот та поліпептидів за даним винаходом.

Композиції та способи за даним винаходом є застосовними для одержання організмів з підвищеною стійкістю або витривалістю до шкідника. Ці організми та композиції, що включають організми, є бажаними для сільськогосподарських цілей. Композиції за даним винаходу є також застосовними для створення змінених або покращених білків, які мають пестицидну активність, або для виявлення присутності пестицидних білків або нуклеїнових кислот у продуктах або організмах.

Даний винахід відноситься до композицій та способів регулювання стійкості або витривалості до шкідників у організмів, зокрема, у рослин або клітин рослин. Під виразом "стійкість" мається на увазі, що шкідник (наприклад, комаха) гине після поглинання або при іншому контакті з поліпептидами за даним винаходом. Під виразом "витривалість" мається на увазі погіршення або зниження руху, живлення, розмноження або інших функцій шкідника. Способи включають трансформування організмів за допомогою нуклеотидної послідовності, що кодує пестицидний білок за даним винаходом. Зокрема, нуклеотидні послідовності за даним винаходом застосовуються для одержання рослин і мікроорганізмів, які мають пестицидну активність. Таким чином, забезпечуються трансформовані бактерії, рослини, клітини рослин, 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 організми, що представляють інтерес, як зондів для виділення інших гомологічних (або частково гомологічних) генів та для створення змінених пестицидних білків із застосуванням способів, відомих з рівня техніки, таких як переміщення доменів або перестановка в ДНК, наприклад, із використанням представників родин ендотоксинів Cry1, Cry2 та Cry9. Білки знаходять застосування у здійсненні контролю або винищенні популяцій шкідників, що відносяться до 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 щодо одного або декількох шкідників, включаючи без обмеження представників рядів *Lepidoptera*, *Diptera*, *Hemiptera* та *Coleoptera* або 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 з нуклеотидних послідовностей повної довжини, розкритих у даному документі, та амінокислотні послідовності, які є коротшими за послідовності повної довжини або через застосування альтернативного сайту ініціювання транскрипції, що розташований нижче за ходом транскрипції, або через процесинг, який дає більш короткий білок, що має пестицидну активність. Процесинг може мати місце у тому

організмі, у якому експресується білок, або у організмі шкідника після поглинання білка.

Таким чином, у даному документі забезпечуються нові виділені або рекомбінантні нуклеотидні послідовності, які надають пестицидної активності. 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 їхні варіанти та фрагменти

Один аспект даного винаходу стосується виділених або рекомбінантних молекул нуклеїнових кислот, що містять нуклеотидні послідовності, які кодують пестицидні білки та поліпептиди або їх біологічно активні частини, а також молекул нуклеїнових кислот, які є придатними для застосування як гібридизаційні зонди для визначення молекул нуклеїнових кислот, що кодують білки з ділянками з гомологією послідовності. Також даним документом охоплені нуклеотидні послідовності, здатні до гібридизації з нуклеотидними послідовностями за даним винаходом в жорстких умовах, як визначено у іншому розділі даного документа. Як застосовується у даному документі, вираз "молекула нуклеїнової кислоти" передбачає включення в себе молекул ДНК (наприклад, рекомбінантної ДНК, кДНК або геномної ДНК) і молекул РНК (наприклад, мРНК), а також аналогів ДНК або РНК, одержаних із застосуванням нуклеотидних аналогів. Молекула нуклеїнової кислоти може бути одонитковою або двонитковою, але переважно є двонитковою ДНК.

Вираз "ізольована" або "рекомбінантна" послідовність нуклеїнової кислоти (або ДНК) застосовується у даному документі для позначення послідовності нуклеїнової кислоти (або ДНК), яка вже не перебуває у своєму природному оточенні, наприклад, знаходиться в умовах *in vitro* або в рекомбінантній бактерії або клітині рослини-хазяїні. У деяких варіантах здійснення виділена або рекомбінантна нуклеїнова кислота не містить послідовностей (переважно послідовностей, які кодують білок), що у природному стані фланкують нуклеїнову кислоту (тобто послідовності, які розташовані на 5'- та 3'-кінцях нуклеїнової кислоти) у геномній ДНК організму, з якого отримана нуклеїнова кислота. В контексті даного винаходу при застосуванні виразу "виділений" стосовно молекул нуклеїнової кислоти, він не включає виділені хромосоми. Наприклад, в різних варіантах здійснення виділена молекула нуклеїнової кислоти, яка кодує дельта-ендотоксин, може містити менше ніж приблизно 5 т.п.о., 4 т.п.о., 3 т.п.о., 2 т.п.о., 1 т.п.о., 0,5 т.п.о. або 0,1 т.п.о. з нуклеотидних послідовностей, які у природному стані фланкують молекулу нуклеїнової кислоти в геномній ДНК клітини, з якої одержана нуклеїнова кислота. В різних варіантах здійснення білок дельта-ендотоксину, який практично не містить клітинний матеріал, включає в себе препарати білка, що мають менше приблизно 30, 20, 10 або 5 % (за сухою вагою) білка, який не є дельта-ендотоксином (у даному документі також позначений як "забруднюючий білок").

Нуклеотидні послідовності, що кодують білки за даним винаходом, включають в себе послідовність, викладену під SEQ ID NO:1-4, 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 під SEQ ID NO:5-26.

Молекули нуклеїнових кислот, які є фрагментами цих нуклеотидних послідовностей, що кодують пестицидні білки, також охоплюються даним винаходом. Під виразом "фрагмент" мається на увазі частина нуклеотидної послідовності, що кодує пестицидний білок. Фрагмент нуклеотидної послідовності може кодувати біологічно активну частину пестицидного білка, або він може являти собою фрагмент, який може бути застосований як гібридизаційний зонд або ПЛР-праймер із застосуванням способів, розкритих нижче. Залежно від передбаченого застосування молекули нуклеїнових кислот, які є фрагментами нуклеотидної послідовності, що кодує пестицидний білок, складаються із щонайменше приблизно 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1350, 1400 суміжних нуклеотидів або аж до числа нуклеотидів, присутніх в нуклеотидній послідовності повної довжини, що кодує пестицидний білок, розкритий у даному документі. Під виразом "суміжні" нуклеотиди мають на увазі нуклеотидні залишки, які безпосередньо прилягають один до одного. Фрагменти нуклеотидних послідовностей за даним винаходом будуть кодувати фрагменти білка, які зберігають біологічну активність пестицидного білка і, отже, зберігають пестицидну активність. Таким чином, також охоплюються біологічно активні фрагменти поліпептидів, розкритих у даному документі. Під виразом "зберігає активність" мається на увазі, що фрагмент буде характеризуватися

щонайменше приблизно 30 %, щонайменше приблизно 50 %, щонайменше приблизно 70, 80, 90, 95 % або більшою пестицидною активністю пестицидного білка. У одному варіанті здійснення пестицидна активність являє собою активність, спрямовану на знищення твердокрилих комах. У іншому варіанті здійснення пестицидна активність являє собою активність, спрямовану на знищення лускокрилих комах. У іншому варіанті здійснення пестицидна активність являє собою активність, спрямовану на знищення нематод. У іншому варіанті здійснення пестицидна активність являє собою активність, спрямовану на знищення двокрилих комах. У іншому варіанті здійснення пестицидна активність являє собою активність, спрямовану на знищення напівтвердокрилих комах. Способи вимірювання пестицидної активності добре відомі в даній галузі техніки. Див., наприклад, Czapla and Lang (1990) J. Econ. Entomol. 83:2480-2485; Andrews et al. (1988) Biochem. J. 252:199-206; Marrone et al. (1985) J. of Economic Entomology 78:290-293; та патент США № 5743477, усі з яких включені в даний документ за допомогою посилання у всій своїй повноті.

Фрагмент нуклеотидної послідовності, що кодує пестицидний білок, який кодує біологічно активну частину білка за даним винаходом, буде кодувати щонайменше приблизно 15, 25, 30, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050 суміжних амінокислот або аж до загальної кількості амінокислот, присутніх у пестицидному білку повної довжини за даним винаходом. У деяких варіантах здійснення фрагмент являє собою фрагмент, одержаний внаслідок протеолітичного розщеплення. Наприклад, фрагмент, що утворюється у результаті протеолітичного розщеплення, може мати N-кінцеве або C-кінцеве відсікання довжиною щонайменше приблизно 30 амінокислот, щонайменше приблизно 40 амінокислот, щонайменше приблизно 50 амінокислот, щонайменше приблизно 100 амінокислот, приблизно 120, приблизно 130, приблизно 140, приблизно 150, приблизно 160, приблизно 170, приблизно 180, приблизно 190, приблизно 200, приблизно 210, приблизно 220, приблизно 230, приблизно 240, приблизно 250, приблизно 275, приблизно 300, приблизно 350, приблизно 400, приблизно 450, приблизно 500 або приблизно 550 амінокислот відносно SEQ ID NO:2, 3, 4, 5, 6 або 7. 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 кодувальну послідовність. У деяких варіантах здійснення фрагменти, які охоплені даним документом, утворені у результаті видалення N-кінцевого сигнального пептиду. N-кінцеві відсікання можуть додатково передбачати залишок метіоніну на N-кінці.

Переважні пестицидні білки за даним винаходом кодуються нуклеотидною послідовністю, яка є достатньо ідентичною нуклеотидній послідовності під SEQ ID NO: 1-4, або пестицидні білки є достатньо ідентичними амінокислотній послідовності, викладеній під SEQ ID NO: 5-26. Під виразом "достатньо ідентичний" мається на увазі амінокислотна або нуклеотидна послідовність, яка характеризується щонайменше приблизно 60 або 65 % ідентичністю послідовності, приблизно 70 або 75 % ідентичністю послідовності, приблизно 80 або 85 % ідентичністю послідовності, приблизно 90, 91 %, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 % або більшою ідентичністю послідовності порівняно з еталонною послідовністю із застосуванням однієї з програм вирівнювання, описаних у даному документі, із застосуванням стандартних параметрів. Фахівцю в даній галузі буде зрозуміло, що ці значення можна відповідним чином регулювати для визначення відповідної ідентичності білків, закодованих двома нуклеотидними послідовностями, з урахуванням виродженості кодонів, амінокислотної подібності, розташування рамки зчитування тощо.

Для визначення відсотка ідентичності двох амінокислотних послідовностей або двох послідовностей нуклеїнових кислот з метою оптимального порівняння послідовності вирівнюють. Відсоток ідентичності між двома послідовностями являє собою функцію кількості ідентичних положень, що є загальними для послідовностей (тобто відсоток ідентичності = кількість ідентичних положень/загальна кількість положень (наприклад, положення, що перекриваються) × 100). У одному варіанті здійснення дві послідовності мають однакову довжину. У іншому варіанті здійснення відсоток ідентичності розраховують в межах усієї еталонної послідовності (тобто послідовності, розкритої у даному документі, як будь-яка з SEQ ID NO:1-26). Відсоток ідентичності між двома послідовностями можна визначати із застосуванням методик, подібних до описаних нижче, з введенням гепів або без нього. Зазвичай, під час розрахунку відсотка ідентичності враховуються точні збіги. Геп, тобто положення у вирівнюванні, де залишок присутній в одній послідовності, але відсутній в іншій, вважають положенням з неідентичними залишками.

Визначення відсотка ідентичності між двома послідовностями може бути досягнуто із застосуванням математичного алгоритму. Необмежувальним прикладом математичного

алгоритму, що використовується для порівняння двох послідовностей, є алгоритм згідно Karlin and Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2 264, модифікований як у Karlin and Altschul (1993) Proc Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877. Такий алгоритм включений в програми BLASTN та BLASTX з Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403. Нуклеотидні пошуки BLAST можуть бути виконані за допомогою програми BLASTN, бал = 100, довжина слова = 12, для одержання нуклеотидних послідовностей, що є гомологічними до пестицидоподібних молекул нуклеїнових кислот за даним винаходом. Білкові пошуки BLAST можуть бути виконані за допомогою програми BLASTX, бал = 50, довжина слова = 3, з одержанням амінокислотних послідовностей, що є гомологічними до молекул пестицидного білка за даним винаходом. Для одержання вирівнювань з гепами з метою порівняння може використовуватись програма Gapped BLAST (в BLAST 2.0), як описано в Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389. Альтернативно, для виконання ітераційного пошуку, який виявляє віддалені взаємозв'язки між молекулами, може бути застосований PSI-Blast. Див. Altschul et al. (1997), вище. При використанні програм BLAST, Gapped BLAST та PSI-BLAST можуть бути застосовані параметри відповідних програм (наприклад, BLASTX та BLASTN) за замовчуванням. Вирівнювання також можна виконувати вручну шляхом огляду.

Іншим необмежувальним прикладом математичного алгоритму, що застосовується для порівняння послідовностей, є алгоритм ClustalW (Higgins et al. (1994) Nucleic Acids Res. 22:4673-4680). ClustalW порівнює послідовності, а також вирівнює всю амінокислотну послідовність або послідовність ДНК і, таким чином, може надавати дані про консервативність послідовності усієї амінокислотної послідовності. Алгоритм ClustalW застосовується в декількох комерційно доступних пакетах програмного забезпечення аналізу ДНК/амінокислот, таких як ALIGNX, що є модулем комплексу програм Vector NTI (Invitrogen Corporation, Карлсбад, Каліфорнія). Після вирівнювання амінокислотних послідовностей за допомогою ClustalW можна оцінювати відсоток ідентичності амінокислотних послідовностей. Необмежувальним прикладом програмного забезпечення, застосовного для аналізу вирівнювання ClustalW, є GENEDOC™. GENEDOC™ (Karl Nicholas) створює можливість оцінки подібності амінокислотної послідовності (або ДНК) та ідентичності між декількома білками. Іншим необмежувальним прикладом математичного алгоритму, що використовується для порівняння послідовностей, є алгоритм згідно з Myers and Miller (1988) CABIOS 4:11-17. Такий алгоритм включений в програму ALIGN (версія 2.0), яка є частиною пакету програмного забезпечення GCG Wisconsin Genetics, версія 10 (доступна від Accelrys, Inc., 9685 Scranton Rd., Сан-Дієго, Каліфорнія, США). При використанні програми ALIGN для порівняння амінокислотних послідовностей можна застосовувати таблицю ваги заміни залишку PAM 120, штраф за подовження гепу 12 та штраф за введення гепу 4.

Якщо не вказане інше, GAP версії 10, яка застосовує алгоритм згідно з Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48 (3): 443-453, буде застосовуватись для визначення ідентичності або подібності послідовності із застосуванням наступних параметрів: % ідентичності та % подібності для нуклеотидної послідовності із застосуванням штрафу за введення гепу 50 і штрафу за подовження гепу 3, а також матриці замін nwsgardna.cmp; % ідентичності або % подібності амінокислотної послідовності із застосуванням штрафу за введення гепу 8 і штрафу за подовження гепу 2, а також матриці замін BLOSUM62. Також можуть бути застосовані еквівалентні програми. Під виразом "еквівалентна програма" мається на увазі будь-яка програма порівняння послідовності, яка для будь-яких двох послідовностей, які розглядаються, створює вирівнювання, що характеризується ідентичними збігами нуклеотидних залишків та ідентичним відсотком ідентичності послідовності порівняно з відповідним вирівнюванням, виконаним за допомогою GAP версії 10.

Даний винахід також охоплює варіанти молекул нуклеїнових кислот. "Варіанти" нуклеотидних послідовностей, що кодують пестицидний білок, включають ті послідовності, що кодують пестицидні білки, розкриті у даному документі, але які відрізняються за консервативними замінами внаслідок виродженості генетичного коду, а також ті, які є достатньо ідентичними, як обговорюється вище. Алельні варіанти, що зустрічаються у природі, можна визначати із застосуванням добре відомих методик молекулярної біології, таких як полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) та методики гібридизації, як вказано нижче. Варіанти нуклеотидних послідовностей також включають одержані синтетичним шляхом нуклеотидні послідовності, які були створені, наприклад, із застосуванням сайт-спрямованого мутагенезу, але які все ще кодують пестицидні білки, розкриті в даному винаході, як обговорюється нижче. Варіанти білків, охоплених даним винаходом, є біологічно активними, тобто вони продовжують характеризуватися потрібною біологічною активністю нативного білка, тобто пестицидною активністю. Під виразом "зберігає активність" мається на увазі, що варіант буде характеризуватися щонайменше приблизно 30 %, щонайменше приблизно 50 %, щонайменше

приблизно 70 %, щонайменше приблизно 80 % пестицидною активністю нативного білка. Способи вимірювання пестицидної активності добре відомі в даній галузі техніки. Див., наприклад, Czapla and Lang (1990) J. Econ. Entomol. 83: 2480-2485; Andrews et al. (1988) Biochem. J. 252:199-206; Marrone et al. (1985) J. of Economic Entomology 78:290-293; та патент США № 5743477, усі з яких включені в даний документ за допомогою посилання у всій своїй повноті.

Крім того, фахівцеві в даній галузі буде зрозуміло, що зміни можна вводити шляхом здійснення мутацій у нуклеотидних послідовностях за даним винаходом, які, таким чином, призводять до змін у амінокислотній послідовності закодованих пестицидних білків без зміни біологічної активності білків. Таким чином, варіанти виділених молекул нуклеїнових кислот можна створювати шляхом введення однієї або декількох нуклеотидних заміни, додавань або делецій у відповідну нуклеотидну послідовність, що розкрита у даному документі, таким чином, що одна або декілька амінокислотних заміни, додавань або делецій вводяться у закодований білок. Мутації можна вводити за допомогою стандартних методик, таких як сайт-спрямований мутагенез та мутагенез, опосередкований ПЛР. Такі варіанти нуклеотидних послідовностей також охоплені даним винаходом.

Наприклад, консервативні амінокислотні заміни можна здійснювати за одним або декількома передбаченими несуттєвими амінокислотними залишками. Вираз "несуттєвий" амінокислотний залишок позначає залишок, який може бути змінений у послідовності пестицидного білка дикого типу без зміни біологічної активності, тоді як "суттєвий" амінокислотний залишок є необхідним для біологічної активності. Вираз "консервативна амінокислотна заміна" являє собою заміну, за якої амінокислотний залишок замінюється на амінокислотний залишок, який має подібний бічний ланцюг. Родини амінокислотних залишків, які мають подібні бічні ланцюги, були визначені в даній галузі техніки. Ці родини включають амінокислоти з основними бічними ланцюгами (наприклад, лізин, аргінін, гістидин), кислими бічними ланцюгами (наприклад, аспарагінова кислота, глутамінова кислота), незарядженими полярними бічними ланцюгами (наприклад, гліцин, аспарагін, глутамін, серин, треонін, тирозин, цистеїн), неполярними бічними ланцюгами (наприклад, аланін, валін, лейцин, ізолейцин, пролін, фенілаланін, метіонін, триптофан), бета-розгалуженими бічними ланцюгами (наприклад, треонін, валін, ізолейцин) та ароматичними бічними ланцюгами (наприклад, тирозин, фенілаланін, триптофан, гістидин).

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 упорядковані в структурі грецького ключа, а домен III складається з двох антипаралельних складчастих бета-шарів у структурі типу "jelly-roll" (de Maagd et al., 2001, вище). Домени II та III беруть участь у розпізнаванні та зв'язуванні рецепторів, а тому вважаються детермінантами специфічності токсину.

Амінокислотні заміни можна здійснювати у неконсервативних ділянках зі збереженням функції. Як правило, такі заміни не будуть здійснювати у консервативних амінокислотних залишках або амінокислотних залишках, розташованих у межах консервативного мотиву, де такі залишки є суттєвими для активності білка. Приклади залишків, які є консервативними та можуть бути суттєвими для активності білка, включають, наприклад, залишки, які є ідентичними в усіх білках, що містяться у вирівнюванні подібних або споріднених токсинів з послідовностями за даним винаходом (наприклад, залишки, які є ідентичними у вирівнюванні гомологічних білків). Приклади залишків, які є консервативними, але які можуть дозволяти консервативні амінокислотні заміни та все ще зберігати активність, включають, наприклад, залишки, які характеризуються лише консервативними замінами в усіх білках, що містяться у вирівнюванні подібних або споріднених токсинів з послідовностями за даним винаходом (наприклад, залишки, які характеризуються лише консервативними замінами в усіх білках, що включені у вирівнювання гомологічних білків). Однак, фахівцеві у даній галузі буде зрозуміло, що функціональні варіанти можуть мати незначні консервативні або неконсервативні зміни у консервативних залишках.

Альтернативно, варіанти нуклеотидних послідовностей можна одержати шляхом введення мутацій випадковим чином уздовж всієї або частини кодувальної послідовності, наприклад, шляхом насичувального мутагенезу, та одержаних мутантів можна піддавати скринінгу щодо здатності надавати пестицидну активність для визначення мутантів, які зберігають активність. Після мутагенезу, закодований білок може експресуватися рекомбінантним шляхом та активність цього білка можна визначати із застосуванням стандартних методик аналізу.

Із застосуванням способів, таких як ПЛР, гібридизація тощо, можна визначити відповідні

послідовності, що визначають пестицидну активність, при цьому такі послідовності характеризуються суттєвою ідентичністю послідовностям за даним винаходом. Див., наприклад, Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) and Innis, et al. (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, NY).

У способі гібридизації всю нуклеотидну послідовність, що визначає пестицидну активність, або її частину можна застосовувати для скринінгу кДНК або геномних бібліотек. Способи конструювання таких кДНК та геномних бібліотек, як правило, відомі в даній галузі техніки та розкриті у Sambrook and Russell, 2001, вище. Так звані гібридизаційні зонди можуть являти собою фрагменти геномної ДНК, фрагменти кДНК, фрагменти РНК або інші олігонуклеотиди, та їх можна мітити детективною групою, такою як ^{32}P , або будь-яким іншим детективним маркером, таким як інші радіоізотопи, флуоресцентна сполука, фермент або кофактор ферменту. Зонди для гібридизації можна одержувати шляхом мічення синтетичних олігонуклеотидів, основаних на відомій нуклеотидній послідовності, що кодує пестицидний білок, розкритий у даному документі. Додатково можна застосовувати вироджені праймери, що розроблені на основі консервативних нуклеотидів або амінокислотних залишків у нуклеотидній послідовності або закодованій амінокислотній послідовності. Зазвичай, зонд містить ділянку нуклеотидної послідовності, яка гібридизується за жорстких умов з щонайменше приблизно 12, щонайменше приблизно 25, щонайменше приблизно 50, 75, 100, 125, 150, 175 або 200 послідовними нуклеотидами нуклеотидної послідовності, що кодує пестицидний білок за даним винаходом або його фрагмент або варіант. Способи одержання зондів для гібридизації загалом відомі з рівня техніки та розкриті в Sambrook and Russell, 2001, вище у даному документі, включеному за допомогою посилання.

Наприклад, усю послідовність, що визначає пестицидну активність, розкриту у даному документі, або одну або декілька її частин, можна застосовувати як зонд, здатний до специфічної гібридизації з відповідними послідовностями, подібними до пестицидного білка, та з матричними РНК. Для досягнення специфічної гібридизації за різних умов такі зонди включають в себе послідовності, які є унікальними і становлять переважно щонайменше приблизно 10 нуклеотидів у довжину або щонайменше приблизно 20 нуклеотидів у довжину. Такі зонди можна застосовувати для ампліфікації відповідних послідовностей, що визначають пестицидну активність, з вибраного організму за допомогою ПЛР. Цю методику можна застосовувати для виділення додаткових кодуючих послідовностей з потрібного організму або як діагностичний аналіз для визначення наявності кодуючих послідовностей в організмі. Методики гібридизації включають в себе гібридизаційний скринінг висіяних ДНК-бібліотек (або 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)).

Таким чином, даний винахід охоплює зонди для гібридизації, а також нуклеотидні послідовності, здатні до гібридизації з усією нуклеотидною послідовністю за даним винаходом або її частиною (наприклад, із щонайменше приблизно 300, щонайменше приблизно 400, щонайменше приблизно 500, 1000, 1200, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500 нуклеотидами або аж до нуклеотидної послідовності повної довжини, розкритої у даному документі). Гібридизацію таких послідовностей можна здійснювати за жорстких умов. Під виразом "жорсткі умови" або "жорсткі умови гібридизації" маються на увазі умови, за яких зонд буде гібридизуватися зі своєю цільовою послідовністю з помітно більш високим ступенем, ніж з іншими послідовностями (наприклад, щонайменше у 2 рази більше за фон). Жорсткі умови залежать від послідовності і будуть відрізнятися за різних обставин. Шляхом контролю жорсткості умов гібридизації та/або відмивання, можна виявляти цільові послідовності, які на 100 % комплементарні до зонда (гомологічне зондування). Альтернативно, умови жорсткості можна регулювати для створення можливості утворення деяких неспіпадінь у послідовності, щоб виявляти більш низькі ступені подібності (гетерологічне зондування). Як правило, довжина зонда становить менше ніж приблизно 1000 нуклеотидів, переважно менше ніж 500 нуклеотидів.

Зазвичай, жорсткі умови будуть такими, за яких концентрація солі становить менше приблизно 1,5 М іонів Na, зазвичай приблизно 0,01-1,0 М концентрацію іонів Na (або інших солей) з рН від 7,0 до 8,3 та температурою щонайменше приблизно 30 °C для коротких зондів (наприклад, від 10 до 50 нуклеотидів) і щонайменше приблизно 60 °C для довгих зондів (наприклад, більше 50 нуклеотидів). Жорсткі умови можуть бути також досягнуті за допомогою додавання дестабілізуючих засобів, таких як формамід. Ілюстративні умови низької жорсткості включають гібридизацію у буферному розчині, що містить 30-35 % формаміду, 1 М NaCl, 1 % SDS (додецилсульфат натрію) при 37 °C, та відмивання в 1X-2X SSC (20X SSC=3,0 М NaCl/0,3 М тринатрійцитрат) при 50-55 °C. Ілюстративні умови помірної жорсткості включають

гібридизацію у розчині, що містить 40-45 % формаміду, 1,0 M NaCl, 1 % SDS при 37 °C, та відмивання в 0,5X-1X SSC при 55-60 °C. Ілюстративні умови високої жорсткості включають гібридизацію у розчині, що містить 50 % формаміду, 1 M NaCl, 1 % SDS при 37 °C, та відмивання у 0,1X SSC при 60-65 °C. Необов'язково буфери для відмивання можуть містити від
5 приблизно 0,1 % до приблизно 1 % SDS. Тривалість гібридизації, як правило, становить менше ніж приблизно 24 години, як правило, від приблизно 4 до приблизно 12 годин.

Специфічність, зазвичай, залежить від відмивання після гібридизації, при цьому критичними факторами є іонна сила та температура кінцевого розчину для відмивання. Для гібридів ДНК-ДНК T_m можна приблизно вирахувати за допомогою рівняння згідно з Meinkoth та Wahl (1984)
10 Anal. Biochem. 138:267-284: $T_m = 81,5\text{ }^{\circ}\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\% \text{ GC}) - 0,61 (\% \text{ form}) - 500 (L)$; де M являє собою молярність одновалентних катіонів, % GC являє собою відсоткову частку нуклеотидів гуанозину та цитозину в ДНК, % form являє собою відсоток вмісту формаміду в розчині для гібридизації, та L являє собою довжину гібрида у парах основ. T_m являє собою температуру (за певної іонної сили та pH), при якій 50 % комплементарної цільової
15 послідовності гібридується з відмінно співпадаючим зондом. Кожне зниження T_m на приблизно 1 °C веде до 1 % незбігу; таким чином, T_m , умови гібридизації та/або відмивання можна регулювати для гібридизації з послідовностями з потрібною ідентичністю. Наприклад, якщо шукають послідовності з >90 % ідентичністю, T_m може бути знижена на 10 °C. Як правило, жорсткі умови вибирають таким чином, щоб вони були приблизно на 5 °C нижчими за точку
20 плавлення (T_m) для конкретної послідовності та комплементарної до неї послідовності за певної іонної сили та pH. Однак гібридизацію та/або відмивання у надзвичайно жорстких умовах можна застосовувати при температурі, що на 1, 2, 3 або 4 °C нижча за температуру точки плавлення (T_m); гібридизацію та/або відмивання у помірно жорстких умовах можна застосовувати при температурі, що на 6, 7, 8, 9 або 10 °C нижча за температуру точки плавлення (T_m);
25 гібридизацію та/або відмивання в умовах низької жорсткості можна застосовувати при температурі, що на 11, 12, 13, 14, 15 або 20 °C нижча за температуру точки плавлення (T_m). Із застосуванням рівняння, композицій для гібридизації та відмивання та потрібної T_m фахівцям у даній області буде зрозуміло, що варіації в умовах жорсткості гібридизації та/або відмивання описані за своєю суттю. Якщо потрібний ступінь незбігу призводить до T_m , меншої за 45 °C
30 (водний розчин) або 32 °C (розчин формаміду), переважним є збільшення концентрації SSC, аби можна було застосовувати більш високі температури. Докладний посібник з гібридизації нуклеїнових кислот наведений 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
35 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 варіанти й фрагменти

Пестицидні білки також охоплені в межах даного винаходу. Під виразом "пестицидний білок" мають на увазі білок, що має амінокислотну послідовність, викладену під SEQ ID NO:5-26.
40 Також передбачені фрагменти, біологічно активні частини та їх варіанти, які можуть застосовуватися при здійсненні способів за даним винаходом на практиці. Вираз "виділений білок" або "рекомбінантний білок" застосовується для позначення білка, який більше не перебуває у своєму природному оточенні, наприклад, знаходиться в умовах in vitro або в рекомбінантній бактеріальній або клітині рослини-хазяїні.

Вираз "фрагменти" або "біологічно активні частини" включає в себе фрагменти поліпептиду, що містять амінокислотні послідовності, які є достатньо ідентичними амінокислотній послідовності, викладеній під SEQ ID NO: 5-26, та які проявляють пестицидну активність. Біологічно активна частина пестицидного білка може являти собою поліпептид, довжина якого становить, наприклад, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700,
50 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350 або більше амінокислот. Такі біологічно активні частини можна одержувати за допомогою методик рекомбінації та оцінювати щодо пестицидної активності. Способи вимірювання пестицидної активності добре відомі в даній галузі техніки. Див., наприклад, Czapla and Lang (1990) J. Econ. Entomol. 83:2480-2485; Andrews et al. (1988) Biochem. J. 252:199-206; Marrone et al. (1985) J. of Economic
55 Entomology 78:290-293; та патент США № 5743477, усі з яких включені в даний документ за допомогою посилання у всій своїй повноті. Як застосовується у даному документі, фрагмент містить щонайменше 8 суміжних амінокислот з SEQ ID NO:5-26. Проте винахід охоплює інші фрагменти, такі як будь-який фрагмент у білку, довжина якого становить більше приблизно 10, 20, 30, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950,
60 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350 або більше амінокислот.

Під виразом "варіанти" мають на увазі білки або поліпептиди, що мають амінокислотну послідовність, яка щонайменше на приблизно 60, 65 %, приблизно 70 %, 75 %, приблизно 80, 85 %, приблизно 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 або 99 % ідентична амінокислотній послідовності під SEQ ID NO:5-26. Варіанти також включають поліпептиди, закодовані молекулою нуклеїнової кислоти, яка гібридизується з молекулою нуклеїнової кислоти під SEQ ID NO: 1-4 або комплементарною до неї послідовністю за жорстких умов. Варіанти включають поліпептиди, які відрізняються за амінокислотою послідовністю внаслідок мутагенезу. Варіанти білків, охоплених даним винаходом, є біологічно активними, тобто вони продовжують характеризуватися потрібною біологічною активністю нативного білка, тобто зберігають пестицидну активність. У деяких варіантах здійснення варіанти мають поліпшену активність відносно нативного білка. Способи вимірювання пестицидної активності добре відомі з рівня 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 в даний документ за допомогою посилання у всій своїй повноті.

Бактеріальні гени, такі як гени ахмі за даним винаходом, доволі часто мають декілька метіонінових кодонів ініціації в безпосередній близькості від старт-кодону відкритої рамки зчитування. Часто ініціація трансляції з одного або декількох цих старт-кодонів веде до утворення функціонального білка. Ці старт-кодони можуть включати ATG-кодони. Однак бактерії, такі як *Bacillus* sp., також розпізнають кодон GTG як старт-кодон, а білки, трансляція яких ініціюється з GTG-кодонів, містять метіонін на місці першої амінокислоти. У рідкісних випадках, трансляція в бактеріальних системах може ініціюватися з TTG-кодону, хоча в цьому випадку TTG кодує метіонін. Крім того, не часто визначається заздалегідь, який з цих кодонів застосовується природним чином у бактерії. Таким чином, слід розуміти, що застосування одного з альтернативних кодонів метіоніну може також призвести до одержання пестицидних білків. Ці пестицидні білки охоплені даним винаходом, і їх можна застосовувати в способах за даним винаходом. Буде зрозуміло, що при експресії в рослинах необхідно змінювати альтернативний старт-кодон на ATG для правильної трансляції.

У різних варіантах здійснення даного винаходу пестицидні білки включають в себе амінокислотні послідовності, виведені з нуклеотидних послідовностей повної довжини, розкритих у даному документі, та амінокислотні послідовності, які є коротшими за послідовності повної довжини внаслідок використання альтернативного сайту ініціації транскрипції, що розташований нижче за ходом транскрипції. Таким чином, нуклеотидна послідовність за даним винаходом та/або вектори, клітини-хазяїни та рослини, що містять нуклеотидну послідовність за даним винаходом (і способи одержання та застосування нуклеотидної послідовності за даним винаходом), можуть містити нуклеотидну послідовність, що кодує амінокислотну послідовність, яка відповідає SEQ ID NO:6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 24, 25 і 26.

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

Таким чином, один аспект даного винаходу стосується антитіл, молекул, що зв'язують одноланцюговий антиген, або інших білків, які специфічно зв'язуються з однією або декількома білковими або пептидними молекулами за даним винаходом та їх гомологами, молекулами злиття або фрагментами. В особливо переважному варіанті здійснення антитіло специфічно зв'язується з білком, який має амінокислотну послідовність, викладену під SEQ ID NO:5-26, або з його фрагментом. У іншому варіанті здійснення антитіло специфічно зв'язується із білком злиття, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з амінокислотної послідовності, викладеної під SEQ ID NO:5-26, або його фрагментом.

Антитіла за даним винаходом можна застосовувати для кількісного або якісного виявлення білкових або пептидних молекул за даним винаходом або для виявлення посттрансляційних модифікацій білків. Як застосовується у даному документі, кажуть, що антитіло або пептид "специфічно зв'язуються" з білковою або пептидною молекулою за даним винаходом, якщо таке зв'язування конкурентно не інгібується внаслідок наявності неспоріднених молекул.

Антитіла за даним винаходом можуть входити до складу набору, застосовного для детектування білкових або пептидних молекул за даним винаходом. Даний винахід додатково охоплює спосіб детектування білкової або пептидної молекули за даним винаходом (зокрема білка, який кодується амінокислотою послідовністю, викладеною в SEQ ID NO:5-26, у тому числі його варіантів або фрагментів, що здатні специфічно зв'язуватися з антитілом за даним винаходом), який передбачає приведення зразка у контакт з антитілом за даним винаходом і

детектування того, чи містить зразок білкову або пептидну молекулу за даним винаходом. Способи застосування антитіл для детектування білка або пептида, які становлять інтерес, відомі з рівня техніки.

Змінені або покращені варіанти

5 Необхідно відзначити, що послідовності ДНК пестицидного білка можуть бути змінені з використанням різних способів, а також, що ці зміни можуть призвести до утворення послідовностей ДНК, які кодують білки з амінокислотними послідовностями, що відрізняються від тих, які кодують пестицидні білки за даним винаходом. Даний білок може бути змінений різними способами, у тому числі за допомогою амінокислотних замінів, делецій, відсікань та вставок однієї або декількох амінокислотних послідовностей під SEQ ID NO:5-26, включаючи до 10 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, 15 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 більшої кількості амінокислотних замінів, делецій або вставок. Способи проведення таких маніпуляцій загалом відомі з рівня техніки. Наприклад, варіанти амінокислотної послідовності пестицидного білка можуть бути одержані шляхом здійснення мутацій в ДНК. Це може також 20 бути досягнуто із застосуванням одного з декількох різновидів мутагенезу та/або шляхом спрямованої еволюції. У деяких аспектах зміни, що кодуються амінокислотними послідовностями, не будуть суттєво впливати на функцію білка. Такі варіанти будують мати необхідну пестицидну активність. Проте зрозуміло, що здатність пестицидного білка забезпечувати пестицидну активність може бути покращена шляхом застосування таких 25 методик щодо композицій за даним винаходом. Наприклад, можна експресувати пестицидний білок у клітинах-хазяїнах, які проявляють високі рівні помилкового включення основ при реплікації ДНК, таких 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 30 вектор), провести культивування пестицидного білка з мутаціями у немутагенному штамі та ідентифікувати мутантні гени з пестицидною активністю, наприклад, шляхом проведення аналізу для дослідження пестицидної активності. Як правило, білок змішують і застосовують в аналізах із годуванням. Див., наприклад Marrone et al. (1985) J. of Economic Entomology 78:290-293. Такі аналізи можуть включати приведення рослини у контакт з одним або декількома шкідниками та визначення здатності рослини до виживання та/або здатності викликати загибель 35 шкідників. Приклади мутацій, які призводять до підвищення токсичності, розглянуто в Schnepf et al. (1998) Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62:775-806.

Як альтернатива, зміни можна вносити у послідовності багатьох білків на аміно- або карбокси-кінцях, не справляючи при цьому істотного впливу на активність. Вони можуть 40 включати вставки, делеції або зміни, введені із застосуванням сучасних способів молекулярної біології, таких як ПЛР, у тому числі ПЛР-ампліфікація, які змінюють або подовжують послідовність, що кодує білок, за рахунок вставок послідовностей, що кодують амінокислоти, в олігонуклеотиди, використовуваних в ПЛР-ампліфікації. Як альтернатива, додані послідовності білків можуть включати цілі послідовності, що кодують білок, такі як ті, що зазвичай 45 застосовуються у даній галузі техніки для одержання злиття білків. Такі білки злиття часто використовують для (1) підвищення експресії білка, що представляє інтерес, (2) введення домену зв'язування, ферментативної активності або епітопу для полегшення або очищення білка, детектування білка, або для інших експериментальних застосувань, відомих у даній галузі техніки, (3) спрямовування секреції або трансляції білка в субклітинну органелу, таку як 50 периплазматичний простір грамнегативних бактерій або ендоплазматичний ретикулум еукаріотичних клітин, при цьому останнє часто призводить до глікозилювання білка.

Варіанти нуклеотидних та амінокислотних послідовностей за даним винаходом також охоплюють послідовності, одержані із застосуванням процедур мутагенезу та рекомбінації, таких як перестановка в ДНК. При виконанні такої процедури можуть використовуватися одна 55 або декілька різних ділянок, що кодують пестицидні білки, для створення нового пестицидного білка, що має необхідні властивості. Таким чином, бібліотеки рекомбінантних полінуклеотидів створюють з популяції полінуклеотидів зі спорідненими послідовностями, які містять ділянки послідовності, які характеризуються суттєвою ідентичністю та можуть гомологічно рекомбінуватися *in vitro* або *in vivo*. Наприклад, при застосуванні даного підходу мотиви 60 послідовностей, що кодують домен, який становить інтерес, можуть бути піддані перестановці

між пестицидним геном за даним винаходом та іншими відомими пестицидними генами для одержання нового гена, який кодує білок, що представляє інтерес, з покращеною властивістю, як, наприклад, з підвищеною інсектицидною активністю. Стратегії такої перестановки в ДНК відомі у даній галузі техніки. Див., наприклад, Stemmer (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-10751; Stemmer (1994) *Nature* 370:389-391; Cramer et al. (1997) *Nature Biotech.* 15:436-438; Moore et al. (1997) *J. Mol. Biol.* 272:336-347; Zhang et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4504-4509; Cramer et al. (1998) *Nature* 391:288-291; та патенти США №№ 5605793 і 5837458.

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 покращеними пестицидною активністю або спектром мішеней. Способи створення рекомбінантних білків та їх дослідження щодо пестицидної активності добре відомі з рівня 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, що визначає пестицидну активність, за даним винаходом може бути передбачена в касеті експресії для експресії у рослині, що представляє інтерес. Під "рослинною касетою експресії" мають на увазі ДНК-конструкцію, яка здатна призводити до експресії білка з відкритої рамки зчитування у клітині рослини. Зазвичай ці конструкції містять промотор та кодувальну послідовність. Часто такі конструкції також будуть містити 3'-нетрансльовану ділянку. Такі конструкції можуть містити "сигнальну послідовність" або "лідерну послідовність" для полегшення котрансляційного або 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 еукаріотів це зазвичай передбачає секрецію у апарат Гольджі з одержанням деякого ступеня глікозилювання. Інсектицидні токсини бактерій часто синтезуються як протоксини, які протеолітично активуються у кишці цільового шкідника (Chang (1987) *Methods Enzymol.* 153:507-516). У деяких варіантах здійснення за даним винаходом сигнальна послідовність локалізована у нативній послідовності, або її можна одержати із послідовності за даним винаходом. Під "лідерною послідовністю" мають на увазі будь-яку послідовність, яка під час трансляції призводить до утворення амінокислотної послідовності, достатньої для запуску котрансляційного транспорту пептидного ланцюга до субклітинної органели. Таким чином, лідерні послідовності містять у своєму складі лідерні послідовності, що спрямовують транспорт та/або глікозилювання за рахунок надходження в ендоплазматичний ретикулум, надходження у вакуолі, пластиди, у тому числі хлоропласти, мітохондрії тощо.

Під "вектором трансформації рослини" мають на увазі молекулу ДНК, яка необхідна для ефективною трансформації клітини рослини. Така молекула може містити одну або декілька рослинних касет експресії та може бути організованою у більше ніж одну "векторну" молекулу ДНК. Наприклад, бінарні вектори являють собою вектори трансформації рослин, в яких використовують два несуміжних ДНК-вектори для кодування усіх необхідних функцій, що діють у цис- та транс-положеннях, для трансформації клітин рослин (Hellens and Mullineaux (2000) *Trends in Plant Science* 5:446-451). Термін "вектор" стосується конструкції нуклеїнової кислоти, розробленої для перенесення між різними клітинами-хазяїнами. Термін "вектор експресії" стосується вектора, який має здатність вбудовувати, інтегрувати та експресувати гетерологічні послідовності або фрагменти ДНК у чужорідній клітині. 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 другою послідовністю, де послідовність промотору ініціює та опосередковує транскрипцію послідовності ДНК, що відповідає другій послідовності. Як правило, "функціонально зв'язаний" означає, що зв'язані послідовності нуклеїнових кислот є суміжними, і, якщо необхідно об'єднати дві ділянки, що кодують білок, вони є суміжними та перебувають в одній і тій самій рамці зчитування. Касета може додатково містити щонайменше один додатковий ген, що підлягає котрансформації у організм. Як альтернатива, додатковий ген (додаткові гени) забезпечують за допомогою декількох касет експресії.

У різних варіантах здійснення нуклеотидна послідовність за даним винаходом є функціонально зв'язаною з промотором, наприклад, рослинним промотором. "Промотором" називається послідовність нуклеїнової кислоти, функція якої полягає у керуванні транскрипцією

кодувальної послідовності, розташованої нижче за ходом транскрипції. Промотор разом з іншими транскрипційними та трансляційними регуляторними послідовностями нуклеїнових кислот (які також називаються "контрольними послідовностями") є необхідними для експресії послідовності ДНК, що становить інтерес.

5 Таку касету експресії забезпечують численними ділянками рестрикції для вставки послідовності, що визначає пестицидну активність, яка має перебувати під транскрипційним контролем регуляторних ділянок.

Касета експресії буде мати у своєму складі, у 5'-3'-напрямку транскрипції, ділянку ініціації транскрипції і трансляції (тобто промотор), послідовність ДНК за даним винаходом і ділянку термінації трансляції і транскрипції (тобто ділянку термінації), що функціонують у рослинах. Промотор може бути нативним або аналогічним або може бути чужорідним або гетерологічним щодо рослини-хазяїна та/або щодо послідовності ДНК за даним винаходом. Крім того, промотор може являти собою природну послідовність або, як альтернатива, синтетичну послідовність. Якщо промотор є "нативним" або "гомологічним" щодо рослини-хазяїна, то мають на увазі, що промотор міститься у нативній рослині, в яку цей промотор вводять. Якщо промотор є "чужорідним" або "гетерологічним" щодо послідовності ДНК за даним винаходом, то мають на увазі, що промотор не є нативним або таким, що зустрічається в природі, для функціонально зв'язаної послідовності ДНК за даним винаходом.

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

У разі необхідності, ген (гени) можна оптимізувати для підвищеної експресії в трансформованій клітині-хазяїні. Таким чином, гени можуть бути синтезовані з використанням переважних для клітини-хазяїна кодонів для покращення експресії або можуть бути синтезовані з використанням кодонів з частотою використання кодонів, переважною для хазяїна. Як правило, вміст GC у гені буде збільшено. Див., наприклад, Campbell and Gowri (1990) *Plant Physiol.* 92: 1-11 для обговорення застосування кодонів, переважних для хазяїна. З рівня техніки доступні способи синтезу генів, переважних для рослин. Див., наприклад, патенти США №№ 5380831 та 5436391, публікацію заявки на патент США № 20090137409 та Murray et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17: 477-498, включені в даний документ за допомогою посилання.

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

Ген, що визначає пестицидну активність, який підлягає спрямовуванню у хлоропласт, може бути оптимізований для експресії у хлоропласті з урахуванням відмінностей між ядром рослини і даною органелою при використанні кодону. Таким чином, нуклеїнові кислоти, що становлять інтерес, можна синтезувати з використанням кодонів, переважних для хлоропластів. Див., наприклад, патент США № 5380831, який включено у даний документ за допомогою посилання.

50 Трансформація рослини

Способи за даним винаходом включають введення нуклеотидної конструкції в рослину. Під "введенням" мають на увазі надання рослині нуклеотидної конструкції таким чином, щоб конструкція одержала доступ до внутрішнього простору клітини рослини. Способи за даним винаходом не потребують використання конкретного способу введення нуклеотидних конструкцій у використовувану рослину, лише тільки, щоб нуклеотидна конструкція одержала доступ до внутрішнього простору щонайменше однієї клітини рослини. Способи введення нуклеотидних конструкцій в рослини є відомими в даній галузі техніки, в тому числі без обмеження способи стабільної трансформації, способи транз'єнтної трансформації і способи, опосередкованої вірусом.

60 Під "рослиною" мають на увазі цілі рослини, органи рослини (наприклад, листки, стебла,

корені тощо), насіння, клітини рослин, паростки, зародки та потомків цих рослин. Клітини рослин можуть бути диференційованими або недиференційованими (наприклад, каліус, суспензійна культура клітин, протопласти, клітини листя, клітини кореня, клітини флоєми, пиліок).

"Трансгенні рослини", або "трансформовані рослини", або "стабільно трансформовані" рослини, або клітини, або тканини відносяться до рослин, які мають введені або інтегровані в клітину рослини екзогенні нуклеотидні послідовності або фрагменти ДНК. Дані послідовності нуклеїнової кислоти мають у своєму складі такі, які є екзогенними або не присутні у нетрансформованій клітині рослини, а також такі, які можуть бути ендегенними або присутніми у нетрансформованій клітині рослини. "Гетерологічний" загалом відноситься до послідовностей нуклеїнової кислоти, які не є ендегенними щодо клітини або частини нативного геному, у 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 токсину, розкритих у даному документі. У різних варіантах здійснення трансгенна рослина, крім того, містить один або декілька додаткових генів, що забезпечують стійкість до комах (наприклад, Cry1, такий як представники родин Cry1A, Cry 1B, Cry1C, Cry1D, Cry1E та Cry1F; Cry2, такий як представники родини Cry2A; Cry9, такий як представники родин Cry9A, Cry9B, Cry9C, Cry9D, Cry9E та Cry9F тощо). Фахівцям у даній галузі буде зрозуміло, що трансгенна рослина може містити будь-який ген, що забезпечує агрономічну ознаку, яка становить інтерес.

Трансформації клітин рослин можна досягати за допомогою однієї з декількох методик, відомих з рівня техніки. Ген, що визначає пестицидну активність, за даним винаходом можна модифікувати для одержання або посилення експресії в клітинах рослин. Як правило, конструкція, яка експресує такий білок, буде містити промотор для керування транскрипцією гена, а також 3'-нетрансльовану ділянку для створення можливості термінації транскрипції та поліаденілювання. Структура таких конструкцій добре відома з рівня техніки. У деяких випадках доцільним може бути конструювання гена таким чином, щоб одержаний у результаті пептид секретувався або іншим чином спрямовувався у клітину рослини. Наприклад, ген може бути сконструйований таким чином, щоб він містив сигнальний пептид для полегшення переносу пептиду в ендоплазматичний ретикулум. Також переважним може бути конструювання касети експресії, що містить інтрон, таким чином, що для експресії потрібен процесинг мРНК із видаленням інтрона.

Як правило, ця "рослинна касета експресії" буде введена до "вектора трансформації рослини". Цей вектор трансформації рослини може складатися з одного або декількох векторів ДНК, необхідних для досягнення трансформації рослини. Наприклад, використання векторів трансформації рослини, які складаються з більш ніж одного суміжного сегмента ДНК, є звичайною практикою в даній галузі. В даній галузі ці вектори часто називають "бінарними векторами". Бінарні вектори, як і вектори з хелперними плазмідами, найчастіше використовуються для опосередкованої *Agrobacterium* трансформації, де розмір і складність сегментів ДНК, необхідних для досягнення ефективної трансформації, є досить великими та доцільним є розділення функцій за окремими молекулами ДНК. Бінарні вектори, як правило, містять плазмідний вектор, що містить послідовності, які діють у цис-положенні, які є необхідними для переносу Т-ДНК (такі як розташовані на лівій межі та на правій межі), селективний маркер, який сконструйований таким чином, щоб бути здатним до експресії у клітині рослини, та "ген, що становить інтерес" (ген, сконструйований таким чином, щоб бути здатним до експресії у клітині рослини, для якої потрібне створення трансгенних рослин). Також у даному плазмідному векторі присутні послідовності, які необхідні для реплікації бактерій. Послідовності, що активні у цис-положенні, організовані таким чином, щоб забезпечувати можливість ефективного переносу у клітини рослин та експресії в них. Наприклад, ген селективного маркера та ген, що визначає пестицидну активність, локалізовані між лівою та правою межами. Часто другий плазмідний вектор містить фактори, що активні у транс-положенні, які опосередковують перенесення Т-ДНК з *Agrobacterium* у клітини рослин. Ця плазміда часто містить елементи вірулентності (гени Vir), які забезпечують можливість інфікування *Agrobacterium* клітин рослин та перенесення ДНК шляхом розщеплення граничних послідовностей та vir-опосередованого переносу ДНК, які відомі у даній галузі техніки (Hellens and Mullineaux (2000) Trends in Plant Science 5:446-451). Кілька типів штамів *Agrobacterium* (наприклад, LBA4404, GV3101, EHA101, EHA105 тощо) можуть бути використані для трансформації рослин. Другий плазмідний вектор не є необхідним для трансформації рослин із застосуванням інших способів, таких як бомбардування мікрочастинками, мікроін'єкція, електропорація, трансфекція за допомогою поліетиленгліколю тощо.

У цілому, способи трансформації рослин передбачають перенесення гетерологічної ДНК в цільові клітини рослин (наприклад, незрілі або зрілі зародки, суспензійні культури, недиференційований калюс, протопласти тощо) з подальшим застосуванням максимального порогового рівня відповідного відбору (залежно від гена селективного маркера) для виділення трансформованих клітин рослин з групи нетрансформованої клітинної маси. Як правило, експлантатів переносять у свіжу порцію такого самого середовища та культивують за стандартних умов. Згодом, після поміщення на середовище для регенерації, доповнене максимальним пороговим рівнем засобу для відбору, трансформовані клітини диференціюються в пагони. Потім пагони переносять на селективне середовище вкорінення для утворення пагона з коренями або саджанця. Потім трансгенний саджанець виростає у зрілу рослину та продукує схоже насіння (наприклад, Hiei et al. (1994) *The Plant Journal* 6:271-282; Ishida et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14:745-750). Як правило, експлантатів переносять на свіжу порцію такого самого середовища та культивують за стандартних умов. Загальний опис методик та способів одержання трансгенних рослин знаходиться 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 багато клітин, як трансформовані, так і нетрансформовані клітини присутні в будь-якій частці підданого обробці цільового калюсу, або тканини, або групи клітин. Внаслідок можливості забезпечення загибелі нетрансформованих клітин та проліферації трансформованих клітин одержують трансформовані культури рослин. Часто можливість видалення нетрансформованих клітин являє собою обмеження для швидкого відновлення трансформованих клітин рослин та успішного одержання трансгенних рослин.

Протоколи трансформації, а також протоколи для введення нуклеотидних послідовностей у рослини можуть змінюватися залежно від типу рослини або клітини рослини, тобто однодольних або дводольних рослин, на які спрямована трансформація. Створення трансгенних рослин можна виконувати за допомогою одного з декількох способів, у тому числі без обмеження мікроін'єкції, електропорації, прямого перенесення генів, введення гетерологічної ДНК в клітини рослин за допомогою *Agrobacterium* (трансформація, опосередкована *Agrobacterium*), бомбардування клітин рослин гетерологічною чужорідною ДНК, що приєднана до частинок, балістичного прискорення частинок, трансформації із застосуванням аерозольного пучкового інжектора (опублікована заявка на патент США № 20010026941; патент США № 4945050; публікація міжнародної заявки на патент № WO 91/00915; опублікована заявка на патент США № 2002015066), Лес1-трансформації, а також різних інших способів прямого перенесення ДНК без застосування частинок.

Способи трансформації хлоропластів добре відомі з рівня техніки. Див., наприклад, Svab et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:8526-8530; Svab and Maliga (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:913-917; Svab and Maliga (1993) *EMBO J.* 12:601-606. Спосіб залежить від доставки ДНК, що містить селективний маркер, з використанням генної гармати та спрямування ДНК в геном пластиди шляхом гомологічної рекомбінації. Крім того, трансформації пластиди можна досягати шляхом трансактивації мовчазного трансгена, що міститься у пластиді, завдяки тканино-переважній експресії РНК-полімерази, яка кодується ядерною ДНК та спрямовується до пластиди. Про таку систему повідомляли McBride et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:7301-7305.

Після інтеграції гетерологічної чужорідної ДНК в клітини рослин у середовищі застосовують максимальний пороговий рівень відповідного відбору для забезпечення загибелі нетрансформованих клітин, а також відокремлення та проліферації імовірно трансформованих клітин, які виживають після цієї обробки засобом для відбору, за допомогою регулярного перенесення на свіже середовище. Шляхом безперервного пересівання та стимулювання відповідним засобом для відбору виявляють та розмножують клітини, що трансформовані плазмідним вектором. Потім для підтвердження присутності інтегрованого гетерологічного гена, що становить інтерес, в геномі трансгенної рослини можна застосовувати молекулярні та біохімічні методи.

Клітини, які були трансформовані, можна вирощувати у рослинах згідно з традиційними методиками. Див., наприклад, McCormick et al. (1986) *Plant Cell Reports* 5:81-84. Потім ці рослини можна вирощувати та запилювати за допомогою тієї самої трансформованої лінії або інших ліній, та одержаний гібрид матиме конститутивну експресію визначеної потрібної фенотипічної ознаки. Щоб переконатися у тому, що експресія потрібної фенотипічної ознаки стабільно підтримується та успадковується, можна вирощувати два або більше поколінь, після чого збирають насіння, щоб переконатися у тому, що експресія потрібної фенотипічної ознаки була досягнута. Таким чином, у даному винаході передбачене трансформоване насіння (яке також називають "трансгенне насіння"), що має нуклеотидну конструкцію за даним винаходом,

наприклад, касету експресії за даним винаходом, яка стабільно включена в його геном.

Оцінка трансформації рослини

Після введення гетерологічної чужорідної ДНК в клітини рослин трансформацію або інтеграцію гетерологічного гена в геномі рослини підтверджують за допомогою різних способів, таких як аналіз нуклеїнових кислот, білків та метаболітів, пов'язаних з інтегрованим геном.

ПЛР-аналіз являє собою швидкий спосіб скринінгу трансформованих клітин, тканин або пагонів на присутність включеного гена на ранній стадії, до пересадки у ґрунт (Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). ПЛР проводять із застосуванням олігонуклеотидних праймерів, специфічних щодо гена, що становить інтерес, або векторної основи *Agrobacterium* тощо.

Трансформацію рослини можна підтверджувати за допомогою саузерн-блот аналізу геномної ДНК (Sambrook and Russell, 2001, вище). У цілому, загальну ДНК екстрагують з трансформанта, розщеплюють за допомогою відповідних рестрикційних ферментів, фракціонують в агарозному гелі та переносять на нітроцелюлозну або нейлонову мембрану. Потім мембрану або "блот" зондують, наприклад, за допомогою цільового фрагмента ДНК з радіоактивною міткою ^{32}P , щоб підтвердити інтеграцію введеного гена в геном рослини згідно із стандартними методиками (Sambrook and Russell, 2001, вище).

У нозерн-блот-аналізі РНК виділяють з конкретних тканин трансформанта, фракціонують у формальдегід-агарозному гелі та переносять на найлоновий фільтр згідно зі стандартними процедурами, які зазвичай застосовуються в даній галузі техніки (Sambrook and Russell, 2001, вище). Потім перевіряють експресію РНК, закодованої геном, що визначає пестицидну активність, шляхом гібридизації фільтра з радіоактивним зондом, отриманим з гена, що визначає пестицидну активність, за допомогою способів, відомих в даній галузі техніки (Sambrook and Russell, 2001, вище).

Вестерн-блот, біохімічні аналізи та подібне можна виконувати на трансгенних рослинах, щоб підтвердити присутність білка, який кодується геном, що визначає пестицидну активність, за допомогою стандартних процедур (Sambrook and Russell, 2001, вище) із застосуванням антитіл, які зв'язуються з одним або декількома епітопами, присутніми на пестицидному білку.

Пестицидна активність в рослинах

В іншому аспекті даного винаходу можна одержати трансгенні рослини, що експресують пестицидний білок, який характеризується пестицидною активністю. Способи, описані вище як приклад, можна використовувати для одержання трансгенних рослин, але спосіб, в який одержують трансгенні клітини рослин, не має вирішального значення для даного винаходу. За рішенням експериментатора можуть застосовуватися відомі або описані у рівні техніки способи, такі як трансформація, опосередкована *Agrobacterium*, білістична трансформація та способи, не опосередковані застосуванням частинок. Рослини, які експресують пестицидний білок, можна виділяти за допомогою звичайних способів, описаних у рівні техніки, наприклад, шляхом трансформації калюсу, відбору трансформованого калюсу та регенерації здатних до розмноження рослин з такого трансгенного калюсу. У такому процесі будь-який ген можна застосовувати як селективний маркер за умови, що його експресія в клітинах рослин надає можливість визначити або відібрати трансформовані клітини.

Була розроблена низка маркерів для застосування в клітинах рослин, таких, які надають стійкість до хлорамфеніколу, аміноглікозиду G418, гігromіцину тощо. Інші гени, що кодують продукт, який бере участь у метаболізмі хлоропластів, також можна застосовувати як селективні маркери. Наприклад, гени, що забезпечують стійкість до рослинних гербіцидів, таких як гліфосат, бромоксиніл або імідазолінон, можуть бути особливо застосовними. По такі гени повідомляли (Stalker et al. (1985) *J. Biol. Chem.* 263: 6310-6314 (ген нітрилази, що забезпечує стійкість до бромоксинілу); та Sathasivan et al. (1990) *Nucl. Acids Res.* 18: 2188 (ген AHAS, що забезпечує стійкість до імідазолінону). Крім того, гени, розкриті в даному документі, застосовні як маркери для оцінки трансформації клітин бактерій або рослин. Способи виявлення наявності трансгена у рослині, органі рослини (наприклад, лисках, стеблах, коренях тощо), насінні, клітині рослини, паростку, зародку або його нащадках добре відомі в даній галузі техніки. У одному варіанті здійснення наявності трансгена виявляють шляхом дослідження щодо пестицидної активності.

Здатні до розмноження рослини, що експресують пестицидний білок, можна тестувати щодо пестицидної активності, та рослин, що демонструють оптимальну активність, відбирають для подальшого розведення. В даній галузі техніки є доступними способи аналізу активності проти шкідника. Як правило, білок змішують і застосовують в аналізах живлення. Див., наприклад, Marrone et al. (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293.

Даний винахід можна застосовувати для трансформації будь-якого виду рослин, в тому

числі без обмежень однодольних та дводольних рослин. Приклади рослин, що становлять інтерес, включають без обмеження кукурудзу (маїс), сорго, пшеницю, соняшник, томат, хрестоцвіті, різновиди перцю, картоплю, бавовник, рис, сою, цукровий буряк, цукрову тростину, тютюн, ячмінь та олійний ріпак, *Brassica* sp., люцерну, жито, просо, сафлор, різновиди арахісу, солов'я, маніоку, каву, кокос, ананас, цитрусові дерева, какао, чай, банан, авокадо, інжир, гуаву, манго, маслину, папайю, кеш'ю, макаронами, мигдаль, овес, овочі, декоративні рослини та хвойні дерева.

Овочеві культури включають без обмеження різновиди томату, латук, зелені боби, лімські боби, різновиди гороху та представників роду *Cucumis*, таких як огірок, канталупа та мускусна диня. Декоративні культури включають без обмеження азалію, гортензію, гібіскус, різновиди троянди, різновиди тюльпанів, різновиди нарцисів, різновиди петунії, гвоздику, пуансетію та хризантеми. Переважно рослини за даним винаходом являють собою культурні рослини (наприклад, маїс, сорго, пшениця, соняшник, томат, хрестоцвіті, різновиди перцю, картопля, бавовник, рис, соя, цукровий буряк, цукрова тростина, тютюн, ячмінь, олійний ріпак тощо).

Застосування у контролі шкідників

З рівня техніки відомі загальні способи використання штамів, які містять нуклеотидну послідовність за даним винаходом або її варіант, у якості пестицидних засобів у контролі шкідників або у створенні інших організмів. Дивись, наприклад, патент США № 5039523 та патентний документ EP 0480762A2.

Штами *Bacillus*, що містять нуклеотидну послідовність за даним винаходом або її варіант, або мікроорганізми, які генетично змінювали для того, щоб вони містили ген, що визначає пестицидну активність, за даним винаходом та пестицидний білок, можна застосовувати для захисту сільськогосподарських культур та продуктів від шкідників. В одному аспекті даного винаходу цілі, тобто нелізовані клітини організму, що продукує токсин (пестицид), обробляють реагентами, які пролонгують активність токсину, що продукується у клітині, коли клітину поміщають у середовище цільового шкідника (цільових шкідників).

Як альтернатива, пестицид одержують за рахунок введення гена, що визначає пестицидну активність, у клітину-хазяїна. Експресія гена, що визначає пестицидну активність, прямо або опосередковано призводить до внутрішньоклітинного продукування та підтримання рівня пестициду. В одному аспекті даного винаходу дані клітини потім обробляють в умовах, які пролонгують активність токсину, що продукується у клітині, якщо клітину поміщають у середовище цільового шкідника (цільових шкідників). Одержаний у результаті продукт зберігає токсичність, притаманну токсину. Ці інкапсульовані природним чином пестициди можна потім складати у препарат відповідно до традиційних методик для внесення у середовище проживання цільового шкідника, наприклад, ґрунт, воду та листя рослин. Дивись, наприклад, ЕРА 0192319 та посилання, які цитуються у ньому. Як альтернатива, можна скласти препарат з клітин, що експресують ген за даним винаходом, таким чином, щоб забезпечити можливість застосування отриманого у результаті матеріалу як пестициду.

Активні інгредієнти за даним винаходом зазвичай вносять у формі композицій, та їх можна застосовувати одночасно або послідовно з іншими сполуками по відношенню до посівної площі або рослини, що підлягає обробці. Цими сполуками можуть бути добрива, засоби боротьби з бур'янами, кріопротектори, поверхнево-активні речовини, детергенти, пестицидні мила, масла, використовувані у період спокою, полімери та/або склади з носіями, що повільно вивільнюються або здатні до біологічного розкладання, які роблять можливою довгострокову дозовану обробку цільової площі після одноразового внесення складу. Вони також можуть являти собою селективні гербіциди, хімічні інсектициди, віруциди, мікробіциди, амебоциди, пестициди, фунгіциди, бактеріоциди, нематоциди, молюскоциди або суміші декількох даних препаратів, за необхідності, разом з додатковими прийнятними для сільського господарства носіями, поверхнево-активними речовинами або допоміжними речовинами, що сприяють внесенню, які, зазвичай, використовують у галузі складання. 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, змочувальні засоби, засоби, що надають липкість, зв'язувальні речовини або добрива. Подібним чином склади можна приготувати у формі їстівних "принад", або їм можна надати форму "пасток" для шкідників, щоб забезпечити можливість згодовування або поглинання пестицидного складу цільовим шкідником.

Способи внесення активного інгредієнта за даним винаходом або агрохімічної композиції за даним винаходом, які містять щонайменше один пестицидний білок, що продукується бактеріальними штамми за даним винаходом, включають нанесення на листя, покриття насіння та внесення в ґрунт. Кількість нанесень та норма внесення залежить від інтенсивності

зараження відповідним шкідником.

Композицію можна складати у вигляді порошку, дусту, пелети, гранули, спрею, емульсії, колоїду, розчину або подібних до них та можна одержувати за допомогою таких традиційних способів, як сушіння, ліофілізація, гомогенізація, екстракція, фільтрація, центрифугування, осадження або концентрування культури клітин, що містять поліпептид. У всіх 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 кількості лускокрилих, напівтвердокрилих, двокрилих або твердокрилих шкідників, або ці способи можна застосовувати профілактично щодо площі у навколишньому середовищі для запобігання зараженню чутливим шкідником. Переважно шкідник поглинає пестицидно ефективну кількість поліпептиду або контактує з нею. Під "пестицидно ефективною кількістю" мають на увазі кількість пестициду, що здатна призводити до загибелі 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, сільськогосподарська культура або сільськогосподарська ділянка, що підлягають обробці, умови навколишнього середовища та спосіб, норма, концентрація, стабільність та кількість внесень пестицидно ефективної композиції поліпептиду. Склади можна також змінювати з урахуванням кліматичних умов, впливу на навколишнє середовище та/або частоти внесення та/або тяжкості зараження шкідниками.

Описані пестицидні композиції можна приготувати шляхом складання або бактеріальної клітини, кристала та/або суспензії спор, або виділеного білкового компонента з необхідним прийнятним для сільського господарства 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, або гранульованого матеріалу, або суспензії в олії (рослинній або мінеральній), або водних, або масляних/водних емульсій, або у вигляді змочувального порошку, або у комбінації з будь-якою іншою речовиною-носієм, придатною для застосування у галузі сільського господарства. Придатні для сільського господарства носії можуть бути твердими або рідкими, та вони добре відомі у даній галузі техніки. Вираз "прийнятний для сільського господарства" охоплює усі допоміжні речовини, інертні компоненти, диспергувальні речовини, поверхнево-активні речовини, засоби, що надають липкість, зв'язувальні речовини, тощо, які зазвичай застосовують у технології складання пестицидних препаратів; при цьому вони добре відомі фахівцям у галузі складання 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 складання. Придатні складки і способи внесення описано у патенті США № 6468523, який включено у даний документ за допомогою посилання.

"Шкідник" включає без обмеження 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 і т.д., 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 родину Gyrinidae. Надродина Hydrophiloidea включає родину Hydrophilidae. Надродина Staphylinoidea включає родини Silphidae та Staphylinidae. Надродина Cantharoidea включає родини Cantharidae та Lampyridae. Надродина Cleroidea включає родини Cleridae та Dermestidae. Надродина Elateroidea включає родини Elateridae та Buprestidae. Надродина Cucujoidea включає родину Coccinellidae. Надродина Meloidea включає родину 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 родини Aschiza та Aschiza. Підряд Aschiza включає родини Phoridae, Syrphidae та Conopidae. Підряд Aschiza включає родини Acalyptratae та Calyptratae. Підряд Acalyptratae включає родини Otitidae, Tephritidae, Agromyzidae та Drosophilidae. Підряд Calyptratae включає родини Hippoboscidae, Oestridae, Tachinidae, Anthomyiidae, Muscidae, Calliphoridae та Sarcophagidae.

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

Нематоди включають паразитичних нематод, таких як бульбичкові, цистоутворювальні та нематоди, що ранять, які включають *Heterodera* spp., *Meloidogone* spp. та *Globodera* spp.; зокрема, представників цистоутворювальних нематод, включаючи без обмеження *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.

Напівтвердокрилі шкідники (що включають види, названі як Hemiptera, Homoptera або Heteroptera) включають без обмеження *Lygus* spp., такі як сліпняк західний матовий (*Lygus hesperus*), сліпняк матовий (*Lygus lineolaris*) та зелений сліпняк (*Lygus elisus*); тлі, такі як тля персикова зелена (*Myzus persicae*), тля бавовникова (*Aphis gossypii*), тля вишнева або тля черешнева (*Myzus cerasi*), тля соєва (*Aphis glycines* Matsumura); цикадка бугорова рисова (*Nilaparvata lugens*) та цикадка зелена рисова (*Nephotettix* spp.); а також щитники, такі як щитник зелений (*Acrosternum hilare*), щитник мармуровий (*Halyomorpha halys*), щитник овочевий зелений (*Nezara viridula*), щитник рисовий (*Oebalus pugnax*), щитник червононогий (*Pentatoma rufipes*), щитник європейський (*Rhaphigaster nebulosa*) та щитник деревний *Troilus luridus*.

Комахи-шкідники за даним винаходом для основних сільськогосподарських 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*, точильника зернового; *Diatraea saccharalis*, вогнівку цукрової тростини; *Diabrotica virgifera*, західного кукурудзяного кореневого жука; *Diabrotica longicornis barberi*, північного кукурудзяного кореневого жука; *Diabrotica undecimpunctata howardi*, південного кукурудзяного кореневого жука; *Melanotus* spp., дротяників; *Cyclocephala borealis*, хрущика північного (личинку хруща); *Cyclocephala immaculata*, хрущика південного (личинку хруща); *Popillia japonica*, хрущика японського; *Chaetocnema pulicaria*, земляну кукурудзяну білку; *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 мексиканську; *Hylemya platura*, личинку паросткової мухи; *Agromyza parvicornis*, міль-пістрянку кукурудзяну; *Anaphothrips obscurus*, трипса злакового; *Solenopsis milesta*, мураху-крадія; *Tetranychus urticae*, звичайного павутинного кліща; сорго: *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'явицю червоногрудку; *Chaetocnema pulicaria*, кукурудзяну білку; *Sphenophorus maidis*, кукурудзяного довгоносика; *Rhopalosiphum maidis*, кукурудзяну листову попелицю; *Sipha flava*, жовту попелицю цукрової тростини; *Blissus leucopterus leucopterus*, клопа-черепашку пшеничного північноамериканського; *Contarinia sorghicola*, галицю сорго; *Tetranychus cinnabarinus*, червоного павутинного кліща; *Tetranychus urticae*, звичайного павутинного кліща; пшениця: *Pseudaletia unipunctata*, гусінь совки лугової; *Spodoptera frugiperda*, совку трав'яну; *Elasmopalpus lignosellus*, маленького точильника кукурудзяного стебла; *Agrotis orthogonia*, прямокутну совку; *Elasmopalpus lignosellus*, маленького точильника кукурудзяного стебла; *Oulema melanopus*, п'явицю червоногрудку; *Hypera punctata*, довгоносика листового конюшинового; *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 відмітну; *Melanoplus sanguinipes*, кобилку мексиканську; *Mayetiola*

destructor, гесенську муху; *Sitodiplosis mosellana*, помаранчеву злакову галицю; *Meromyza americana*, личинку американської мепомізи; *Hylemya coarctata*, озиму муху; *Frankliniella fusca*, тютюнового трипса; *Cephus cinctus*, хлібного пильщика; *Aceria tulipae*, кліща цибулевого чотириноного; 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*, червононогу кобилку; *Melanoplus differentialis*, кобилку відмітну; *Thrips tabaci*, цибулевого трипса; *Frankliniella fusca*, тютюнового трипса; *Tetranychus cinnabarinus*, червоного павутинного кліща; *Tetranychus urticae*, звичайного павутинного кліща; рис: *Diatraea saccharalis*, точильника цукрової тростини; *Spodoptera frugiperda*, совку трав'яну; *Helicoverpa zea*, кукурудзяну совку; листоїда виду *Colaspis brunnea*; *Lissorhoptrus oryzophilus*, рисового водяного довгоносика; *Sitophilus oryzae*, рисового довгоносика; *Nephotettix nigropictus*, рисову цикадку; *Blissus leucopterus leucopterus*, клопа-черепашку пшеничного північноамериканського; *Acrosternum hilare*, зеленого клопа-щитника; соя: *Pseudopiusia includens*, соєвого п'ядака; *Anticarsia gemmatilis*, 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 зернівку; *Myzus persicae*, зелену персикову попелицю; *Empoasca fabae*, цикадку картопляну; *Acrosternum hilare*, зеленого клопа-щитника; *Melanoplus femurrubrum*, червононогу кобилку; *Melanoplus differentialis*, кобилку відмітну; *Hylemya platura*, личинку паросткової мухи; *Sericothrips variabilis*, трипса соєвого; *Thrips tabaci*, трипса цибулевого; *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 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 багатоїдну; ріпак олійний: *Brevicoryne brassicae*, попелицю капустяну; *Phyllotreta cruciferae*, блішку хрестоцвітну; *Mamestra configurata*, совку латукову; *Plutella xylostella*, капустяну совку; *Delia ssp.*, личинок весняної капустяної мухи.

Нематоди включають паразитичних нематод, таких як бульбчкові, цистоутворювальні та нематоди, що ранять, які включають *Heterodera* spp., *Meloidogyne* spp. та *Globodera* spp.; зокрема, представників цистоутворювальних нематод, включаючи без обмеження *Heterodera glycines* (соєву цистоутворювальну нематоду); *Heterodera schachtii* (бурякову цистоутворювальну нематоду); *Heterodera avenae* (зернову цистоутворювальну нематоду) та *Globodera rostochiensis*, а також *Globodera pailida* (картопляні цистоутворювальні нематоди). Нематоди, що ранять, включають *Pratylenchus* spp.

Способи підвищення врожайності рослини

Передбачені способи підвищення врожайності рослин. Способи включають забезпечення рослини або клітини рослини, які експресують поліпептид, що кодує пестицидний поліпептид, розкритий у даному документі, і вирощування рослини або одержаної з неї насінини у полі, ураженому (або сприйнятливому до ураження) шкідником, щодо якого зазначений поліпептид має пестицидну активність. У деяких варіантах здійснення поліпептид характеризується пестицидною активністю щодо лускокрилого, твердокрилого, двокрилого, напівтвердокрилого шкідника або нематоди-шкідника, а зазначене поле уражено лускокрилим, напівтвердокрилим, твердокрилим, двокрилим шкідником або нематодою-шкідником. Як визначено у даному документі, "врожайність" 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 врожайності рослин має кілька комерційних застосувань. Наприклад, зростання біомаси листя рослин може підвищувати врожайність листових овочів для споживання людиною або твариною. Додатково зростання біомаси листя можна застосовувати для збільшення виробництва фармацевтичних або промислових продуктів рослинного походження. Підвищення врожайності може включати будь-яке статистично значуще підвищення, включаючи без обмеження підвищення

щонайменше на 1 %, підвищення щонайменше на 3 %, підвищення щонайменше на 5 %, підвищення щонайменше на 10 %, підвищення щонайменше на 20 %, щонайменше на 30 %, щонайменше на 50 %, щонайменше на 70 %, щонайменше на 100 % або більше підвищення врожайності у порівнянні з рослиною, в якій не експресується послідовність, що визначає пестицидну активність. При використанні конкретних способів врожайність рослин підвищується у результаті підвищення стійкості до шкідників рослини, яка експресує пестицидний білок, розкритий у даному документі. Експресія пестицидного білка приводить до зниження здатності шкідника до зараження або поїдання.

Рослини можна також обробляти одним або декількома хімічними композиціями, що містять один або декілька гербіцидів, інсектицидів або фунгіцидів. Ілюстративні хімічні композиції включають гербіциди для захисту плодових/овочевих культур: атразин, бромацил, діурон, гліфосат, лінурон, метрибузин, симазин, трифлуралін, флуазифоп, глюфосинат, галосульфурон від Gowan, паракват, пропізамід, сетоксидим, бутафенацил, галосульфурон, індазифлам; інсектициди для захисту плодових/овочевих культур:

альдикарб, *Bacillus thuringiensis*, карбарил, карбофуран, хлорпірифос, циперметрин, дельтаметрин, абамектин, цифлутрин/бета-цифлутрин, есфенвалерат, лямбда-цигалотрин, ацеквіноцил, біфеназат, метоксифенозид, новалурон, хромафенозид, тіаклоприд, динотетруран, флуакрипирим, спіродиклофен, гамма-цигалотрин, спіромезифен, спіносад, ринаксіпир, ціазіпир, трифлумурон, спіротетрамат, імідаклоприд, флубендіамід, тіодикарб, метафлумізон, сульфоксафлор, цифлуметофен, ціанопірафен, клотіанідин, тіаметоксам, спіноторам, тіодикарб, флонікамід, метіокарб, емаектину бензоат, індоксакарб, фенаміфос, пірипроксифен, фенбутатин-оксид; фунгіциди для захисту плодових/овочевих культур: аметоктрадин, азоксистробін, бентіавалікарб, боскалід, каптан, карбендазим, хлороталоніл, мідь, ціазофамід, цифлуфенамід, цимоксаніл, ципроконазол, ципродиніл, дифенокназол, диметоморф, дитіанон, фенамідон, фенгексамід, флуазинам, флудіоксоніл, флуопіколід, флуопірам, флуоксастробін, флуксапіроксад, фолпет, фосетил, іпродіон, іпровалікарб, ізопіразам, крезоксим-метил, манкозеб, мандипропамід, металаксил/мефеноксам, метирам, метрафенон, міклобутаніл, пенконазол, пентіопірад, пікоксистробін, пропамокарб, пропіконазол, пропінеб, проквіназид, протіокназол, піраклостробін, приметаніл, квіноксифен, спіроксамін, сірка, тебуконазол, тіофанат-метил, трифлуксистробін; гербіциди для захисту зернових культур: 2,4-D, амідосульфурон, бромоксиніл, карфентразон-Е, хлоротолурон, хлорсульфурон, клодинафоп-Р, клопіралід, дикамба, диклофоп-М, дифлуфенікан, феноксапроп, флорасулам, флукарбазон-NA, флуфенацет, флупіросульфурон-М, флуороксіпир, флуртамон, гліфосат, йодосульфурон, іоксиніл, ізопротурон, МСРА, мезосульфурон, метсульфурон, пендиметалін, піноксаден, пропоксикарбазон, просульфокарб, піроксулам, сульфосульфурон, тифенсульфурон, тралоксидим, триасульфурон, трибенурон, трифлуралін, тритосульфурон; фунгіциди для захисту зернових культур: азоксистробін, біксафен, боскалід, карбендазим, хлороталоніл, цифлуфенамід, ципроконазол, ципродиніл, димоксистробін, епоксиконазол, фенпропідин, фенпропіморф, флуопірам, флуоксастробін, флуквінканазол, флуксапіроксад, ізопіразам, крезоксим-метил, метконазол, метрафенон, пентіопірад, пікоксистробін, прохлораз, пропіконазол, проквіназид, протіокназол, піраклостробін, квіноксифен, спіроксамін, тебуконазол, тіофанат-метил, трифлуксистробін; інсектициди для захисту зернових культур: диметоат, лямбда-цигалотрин, дельтаметрин, альфа-циперметрин, β-цифлутрин, біфентрин, імідаклоприд, клотіанідин, тіаметоксам, тіаклоприд, ацетаміприд, динетофуран, хлорпірифос, піримікарб, метіокарб, сульфоксафлор; гербіциди для захисту маїсу: атразин, алахлор, бромоксиніл, ацетохлор, дикамба, клопіралід, (S)-диметенамід, глюфосинат, гліфосат, ізоксафлутол, (S)-метолахлор, мезотріон, нікосульфурон, примісульфурон, римсульфурон, сулькотріон, форамсульфурон, топрамезон, темботріон, сафлуфенацил, тіенкарбазон, флуфенацет, піроксасульфурон; інсектициди для захисту маїсу: карбофуран, хлорпірифос, біфентрин, фіпроніл, імідаклоприд, лямбда-цигалотрин, тефлутрин, тербуфос, тіаметоксам, клотіанідин, спіромезифен, флубендіамід, трифлумурон, ринаксіпир, дельтаметрин, тіодикарб, β-цифлутрин, циперметрин, біфентрин, люфенурон, тебупірімфос, етипрол, ціазіпир, тіаклоприд, ацетаміприд, динетофуран, авермектин; фунгіциди для захисту маїсу: азоксистробін, біксафен, боскалід, ципроконазол, димоксистробін, епоксиконазол, фенітропан, флуопірам, флуоксастробін, флуксапіроксад, ізопіразам, метконазол, пентіопірад, пікоксистробін, пропіконазол, протіокназол, піраклостробін, тебуконазол, трифлуксистробін; гербіциди для захисту рису: бутахлор, пропаніл, азимсульфурон, бенсульфурон, цигалофоп, даїмулон, фентразамід, імазосульфурон, мефенацет, оксазикломефон, піразосульфурон, пірибутикарб, квінклорак, тіобенкарб, інданофан, флуфенацет, фентразамід, галосульфурон, оксазикломефон, бензобіциклон, пірифталід, пеноксилам, біспірибак, оксидіаргіл,

етоксисульфурон, претілахлор, мезотріон, тефурилтріон, оксадіазон, феноксапроп, піримісульфан; інсектициди для захисту рису: діазинон, фенобукарб, бенфуракарб, бупрофезин, динетофуран, фіпроніл, імідаклоприд, ізопрокарб, тіаклоприд, хромафенозид, клотіанідин, етипрол, флубендіамід, ринаксіпір, дельтаметрин, ацетаміприд, тіаметоксам, 5 ціазипір, спіносад, спіноторам, емаметину бензоат, циперметрин, хлорпірифос, етофенпрокс, карбофуран, бенфуракарб, сульфоксафлор; фунгіциди для захисту рису: азоксистробін, карбендазим, карпропамід, диклоцимет, дифеноконазол, едифенфос, феримзон, гентаміцин, гексаконазол, гімексазол, іпробенфос (IBP), ізопротіолан, ізотіаніл, касугаміцин, манкозєб, метоміностробін, орисастробін, пенцикурон, пробеназол, пропіконазол, пропінеб, піроквілон, 10 тебуконазол, тіофанат-метил, тіадиніл, трициклазол, трифлуксистробін, валідаміцин; гербіциди для захисту бавовнику: діурон, флуометурон, MSMA, оксифлуорфен, прометрин, трифлуралін, карфентразон, клетодим, флуазифоп-бутил, гліфосат, норфлуразон, пендиметалін, піритіобак-натрій, трифлуксисульфурон, тепралоксидим, глюфосинат, флуміоксазин, тидіазурон; інсектициди для захисту бавовнику: ацефат, альдикарб, хлорпірифос, циперметрин, 15 дельтаметрин, абамектин, ацетаміприд, емаметину бензоат, імідаклоприд, індоксакарб, лямбда-цигалотрин, спіносад, тіодикарб, гамма-цигалотрин, спіромезифен, піридаліл, флонікамід, флубендіамід, трифлумурон, ринаксіпір, бета-цифлутрин, спіротетрамат, клотіанідин, тіаметоксам, тіаклоприд, динетофуран, флубендіамід, ціазипір, спіносад, спіноторам, гамма-цигалотрин, 4-[[[6-хлорпіридин-3-іл)метил(2,2-дифторетил)аміно]фуран-2(5H)-он, тіодикарб, авермектин, флонікамід, піридаліл, спіромезифен, сульфоксафлор; 20 фунгіциди для захисту бавовнику: азоксистробін, біксафен, боскалід, карбендазим, хлороталоніл, мідь, ципроконазол, дифеноконазол, димоксистробін, епоксиконазол, фенамідон, флуазинам, флуопірам, флуоксастробін, флуксапіроксад, іпродіон, ізопіразам, ізотіаніл, манкозєб, манєб, метоміностробін, пентіопірад, пікоксистробін, пропінеб, протіоконазол, піраклостробін, квінтозен, тебуконазол, тетраконазол, тіофанат-метил, трифлуксистробін; 25 гербіциди для захисту сої: алахлор, бентазон, трифлуралін, хлоримурон-етил, хлорансулам-метил, феноксапроп, фомесафен, флуазифоп, гліфосат, імазамокс, імазаквін, імазетапір, (S)-метолахлор, метрибузин, пендиметалін, тепралоксидим, глюфосинат; інсектициди для захисту сої: лямбда-цигалотрин, метоміл, імідаклоприд, клотіанідин, тіаметоксам, тіаклоприд, ацетаміприд, динетофуран, флубендіамід, ринаксіпір, ціазипір, спіносад, спіноторам, емаметину бензоат, фіпроніл, етипрол, дельтаметрин, β-цифлутрин, гамма- та лямбда-цигалотрин, 4-[[[6-хлорпіридин-3-іл)метил(2,2-дифторетил)аміно]фуран-2(5H)-он, спіротетрамат, спінодиклофен, трифлумурон, флонікамід, тіодикарб, бета-цифлутрин; фунгіциди для захисту сої: азоксистробін, біксафен, боскалід, карбендазим, хлороталоніл, мідь, ципроконазол, 35 дифеноконазол, димоксистробін, епоксиконазол, флуазинам, флуопірам, флуоксастробін, флутриафол, флуксапіроксад, ізопіразам, іпродіон, ізотіаніл, манкозєб, манєб, метконазол, метоміностробін, міклобутаніл, пентіопірад, пікоксистробін, пропіконазол, пропінеб, протіоконазол, піраклостробін, тебуконазол, тетраконазол, тіофанат-метил, трифлуксистробін; гербіциди для захисту цукрового буряку: хлоридазон, десмедифам, етофумезат, фенмедифам, 40 триалат, клопіралід, флуазифоп, ленацил, метамітрон, квінмерак, циклоксидим, трифлусульфурон, тепралоксидим, квізалофоп; інсектициди для захисту цукрового буряку: імідаклоприд, клотіанідин, тіаметоксам, тіаклоприд, ацетаміприд, динетофуран, дельтаметрин, β-цифлутрин, гамма/лямбда-цигалотрин, 4-[[[6-хлорпіридин-3-іл)метил(2,2-дифторетил)аміно]фуран-2(5H)-он, тефлутрин, ринаксіпір, ціаксіпір, фіпроніл, карбофуран; 45 гербіциди для захисту каноли: клопіралід, диклофоп, флуазифоп, глюфосинат, гліфосат, метазахлор, трифлуралін, етаметсульфурон, квінмерак, квізалофоп, клетодим, тепралоксидим; фунгіциди для захисту каноли: азоксистробін, біксафен, боскалід, карбендазим, ципроконазол, дифеноконазол, димоксистробін, епоксиконазол, флуазинам, флуопірам, флуоксастробін, флусилазол, флуксапіроксад, іпродіон, ізопіразам, мелікват-хлорид, метконазол, 50 метоміностробін, паклобутразол, пентіопірад, пікоксистробін, прохлораз, протіоконазол, піраклостробін, тебуконазол, тіофанат-метил, трифлуксистробін, вінклозолін; інсектициди для захисту каноли: карбофуран, тіаклоприд, дельтаметрин, імідаклоприд, клотіанідин, тіаметоксам, ацетаміприд, динетофуран, β-цифлутрин, гамма- та лямбда-цигалотрин, тау-флувалеріат, етипрол, спіносад, спіноторам, флубендіамід, ринаксіпір, ціазипір, 4-[[[6-хлорпіридин-3-іл)метил(2,2-дифторетил)аміно]фуран-2(5H)-он.

Наступні приклади пропонуються як ілюстрація, а не як обмеження.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ПРИКЛАДИ

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

Ідентифікували нові гени, що визначають пестицидну активність, у бактеріальних штамів

АТХ47307 і АТХ65002 із застосуванням наступних етапів.

Одержання загальної ДНК із штаму. Загальна ДНК містить як геномну ДНК, так і позахромосомну ДНК. Позахромосомна ДНК містить суміш деяких або усіх з наступних: плазмиди різного розміру; фагові хромосоми; інші неописані позахромосомні молекули.

5 Секвенування ДНК. Загальну ДНК секвенують за допомогою способів секвенування нового покоління.

Ідентифікація передбачуваних генів токсинів за допомогою аналізів гомології та/або інших комп'ютерних аналізів.

10 Одержання остаточної уточненої послідовності гена, що представляє інтерес, за допомогою однієї з декількох стратегій ПЛР або клонування (наприклад, TAIL-PCR), якщо необхідно.

Таблиця 1

Новий ген, ідентифікований у штамі АТХ47307

Назва гена	Молекулярна маса (кДа)	Найближчий гомолог	Нуклеотидна SEQ ID NO	Амінокислотна SEQ ID NO
Axmi477	132	75 % Cry9Ba1 60 % Cry9Ba1(укороч.)	1	5
Axmi477.2				6
Axmi477.3				7
Axmi477 (укороч.)				8
Axmi477.2 (укороч.)				9
Axmi477.3 (укороч.)				10

Ахмі477.2 та Ахмі477.3 являють собою білки, кодування яких розпочинається із сайту ініціації транскрипції, розташованого нижче по відношенню до Ахмі477.

15

Таблиця 2

Новий ген, ідентифікований у штамі АТХ47307

Назва гена	Молекулярна маса (кДа)	Найближчий гомолог	Нуклеотидна SEQ ID NO	Амінокислотна SEQ ID NO
Axmi482	37	94 % Axmi486; 51 % Mtx3	2	11
Axmi482.2				12
Axmi482.3				13
Axmi482.4				14

Ахмі482.2, Ахмі482.3 та Ахмі482.4 являють собою білки, кодування яких розпочинається із сайту ініціації транскрипції, розташованого нижче відносно Ахмі482.

Таблиця 3

Новий ген, ідентифікований у штамі АТХ65002

Назва гена	Молекулярна маса (кДа)	Найближчий гомолог	Нуклеотидна SEQ ID NO	Амінокислотна SEQ ID NO
Axmi486	38	94 % Axmi482; 49 % Mtx3	3	15
Axmi486.2				16
Axmi486.3				17
Axmi486.4				18
Axmi486.5				19

20

Ахмі486.2, Ахмі486.3, Ахмі486.4 та Ахмі486.5 являють собою білки, кодування яких розпочинається із сайту ініціації транскрипції, розташованого нижче відносно Ахмі486.

Новий ген, ідентифікований у штамі ATX65002

Назва гена	Молекулярна маса (кДа)	Найближчий гомолог	Нуклеотидна SEQ ID NO	Амінокислотна SEQ ID NO
>Axmi525	38	97 % Axmi486; 51 % Mtx3	4	20
>Axmi525.2				21
>Axmi525.3				22
>Axmi525.4				23
>Axmi525.5				24
>Axmi525.6				25
>Axmi525.7				26

Axmi525.2, Axmi525.3, Axmi525.4, Axmi525.5, Axmi525.6 та Axmi525.7 являють собою білки, кодування яких розпочинається із сайту ініціації транскрипції, розташованого відносно Axmi525.

5 Приклад 2. Аналізи пестицидної активності

Нуклеотидні послідовності згідно з даним винаходом можна досліджувати щодо їх здатності виробляти пестицидні білки. Здатність пестицидного білка чинити вплив на шкідника як пестицид часто аналізують за допомогою ряду способів. Один спосіб, добре відомий у даній галузі, полягає у здійсненні аналізу з годуванням. У такому аналізі з годуванням шкідника піддають впливу зразка, що містить або сполуку, яку необхідно досліджувати, або контрольні зразки. Часто його здійснюють шляхом поміщення 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 досліджуваного матеріалу від комахи перегородкою, в ідеальному випадку секцією, яку сисна комаха може проколоти частинами сисного ротового апарату, щоб забезпечити поглинання досліджуваного матеріалу. Часто досліджуваний матеріал змішують із 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 листка, 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 описані 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, клонують у вектор експресії pMAL-C4x E. coli за геном malE, що кодує мальтоза-зв'язувальний білок (MBP). Ці гібриди усередині рамки приводять у результаті до експресії білків злиття MBP-Axmi в E. coli.

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

Усі безклітинні екстракти потім пропускають через колонку з амілозою, що приєднана до хроматографа для рідинної експрес-хроматографії білків (FPLC) для афінного очищення білків злиття MBP-axmi. Зв'язані білки злиття елюють зі смоли за допомогою 10 mM розчину

мальтози. Очищені білки злиття потім розщеплюють або фактором Ха, або трипсином для видалення амінокінцевої MBP-мітки з білка Ахмі. Розщеплення та розчинність білків можна визначити за допомогою SDS-PAGE.

Приклад 3. Експресія і очищення

- 5 Усічені варіанти Ахмі477 (який наведено у даному документі під SEQ ID NO:8), Ахмі482 (який наведено у даному документі під SEQ ID NO:13), Ахмі486 (який наведено у даному документі під SEQ ID NO:16) та Ахмі525 (який наведено у даному документі під SEQ ID NO:26) експресували та аналізували щодо біологічної активності. Дані гени ампліфікували з їх відповідних штамів за допомогою ПЛР, використовуючи ДНК-полімерази HERCULASE® II Fusion з праймерами, які вбудовують лінкер Ascl на 3'-кінці. Ампліфікований ПЛР-продукт розщеплювали за допомогою Ascl та лігували у вектор pMalC4X. Клонування підтверджували шляхом секвенування і трансформували клони у компетентні клітини BL21. Окрему колонію кожного клону інокулювали у середовище Лурія-Бертані, вирощували при 37 °C до log-фази і індукували 0,5 mM IPTG при 20 °C протягом 18 годин. Очищений білок розщеплювали за допомогою фактора Ха при співвідношенні 1:50 при кімнатній температурі протягом ночі. Очищені білки піддавали біологічному аналізу з вибраними шкідниками відповідно до стандартного протоколу. Результати показані у таблицях 5-8.

Таблиця 5

Показники смертності та затримки росту для Ахмі477

Група шкідника	Показник затримки росту	Показник смертності
<i>Plutella xylostella</i> (DBM)	4	100
<i>Anticarsia gemmatilis</i> (VBC)	4	100
<i>Diatraea grandiosella</i> (SWCB)	3,5	25
<i>Diatraea saccharalis</i> (SCB)	3,5	0
<i>Heliothis virescens</i> (Hv)	4	75
<i>Heliothis virescens</i> (Hz)	2	25
<i>Ostrinia nubilalis</i> (ECB)	3	25
<i>Spodoptera frugiperda</i> (FAW)	1	0
<i>Spodoptera exigua</i> (BAW)	3	0
<i>Agrotis ipsilon</i> (BCW)	4	0
<i>Pseudoplusia includens</i> (SBL)	4	100

Таблиця 6

Показники смертності та затримки росту для Ахмі482

Група шкідника	Показник затримки росту	Показник смертності
<i>Plutella xylostella</i> (DBM)	4	100
<i>Anticarsia gemmatilis</i> (VBC)	4	75
<i>Diatraea grandiosella</i> (SWCB)	4	50
<i>Diatraea saccharalis</i> (SCB)	3	0
<i>Heliothis virescens</i> (Hv)	1	0
<i>Heliothis virescens</i> (Hz)	4	0
<i>Ostrinia nubilalis</i> (ECB)	3	1
<i>Spodoptera frugiperda</i> (FAW)	3	0

Таблиця 7

Показники смертності та затримки росту для Ахмі486

Група шкідника	Показник затримки росту	Показник смертності
<i>Plutella xylostella</i> (DBM)	4	100
<i>Anticarsia gemmatilis</i> (VBC)	4	37
<i>Diatraea grandiosella</i> (SWCB)	3,5	50
<i>Diatraea saccharalis</i> (SCB)	2,5	25
<i>Heliothis virescens</i> (Hv)	3,5	0
<i>Helioverpa zea</i> (Hz)	3	0
<i>Pseudoplusia includens</i> (SBL)	1	0

Таблиця 8

Показники смертності та затримки росту для Ахмі525

Група шкідника	Показник затримки росту	Показник смертності
<i>Spodoptera frugiperda</i> (FAW)	1	0 %
<i>Heliothis virescens</i> (Hv)	1,5	0 %
<i>Helicoverpa zea</i> (Hz)	3	0 %
<i>Anticarsia gemmatilis</i> (VBC)	4	42 %
<i>Spodoptera eridania</i> (SAW)	3,2	70 %
<i>Plutella xylostella</i> (DBM)	4	100 %
<i>Diatraea grandiosella</i> (SWCB)	4	83 %
<i>Diatraea crambidoides</i> (SCB)	4	66 %

Показник затримки росту

0 - відсутність активності

1 - неоднорідна затримка росту

2 - незначна однорідна затримка росту

3 - сильна однорідна затримка росту

4 - надзвичайно сильна однорідна затримка росту.

Приклад 4. Перенос генів за допомогою вектора для експресії у рослині

- 5 Кодувальні 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 або убіквітиновий промотор маїсу для експресії в однодольних рослинах, промотор UBQ3 *Arabidopsis* або промотор CaMV 35S для експресії в дводольних рослинах і термінатори nos або PinII. Методики одержання і
- 10 підтвердження конструкцій промотор-ген-термінатор також добре відомі з рівня техніки.

В одному аспекті даного винаходу конструюють і створюють синтетичні послідовності ДНК. Ці синтетичні послідовності мають змінену нуклеотидну послідовність у порівнянні з вихідною послідовністю, але кодують білки, які, по суті, є ідентичними вихідній послідовності.

- 15 В іншому аспекті даного винаходу 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, приводять до націлювання білків злиття на органели рослини. Наприклад, з рівня техніки відомо, що N-кінцева ділянка білка, який кодується геном кислої фосфатази білого люпину *Lupinus albus* (GENBANK® ID GI:14276838, Miller et al. (2001) *Plant Physiology* 127: 594-606), приводить до націлювання гетерологічних білків на ендоплазматичний ретикулум. Якщо одержаний у результаті білок злиття також містить на C-кінці послідовність для утримання в ендоплазматичному ретикулумі, що містить з N-кінця пептиду лізин-аспарагінову кислоту-глутамінову кислоту-лейцин (тобто мотив "KDEL", SEQ ID NO:27), то білок злиття буде націлений на ендоплазматичний ретикулум. Якщо в білку злиття на C-кінці відсутня
- 20 послідовність, що націлює на ендоплазматичний ретикулум, білок буде націлений на ендоплазматичний ретикулум, але в остаточному підсумку буде зв'язаний в апопласті.

Таким чином, даний ген кодує білок злиття, який містить на N-кінці тридцять одну амінокислоту з гена кислої фосфатази білого люпину *Lupinus albus* (GENBANK® ID GI:14276838, Miller et al., 2001, вище), злиті з N-кінцем амінокислотної послідовності за даним винаходом, а

також послідовність KDEL (SEQ ID NO:27) на С-кінці. Таким чином, передбачається, що отриманий у результаті білок націлений на ендоплазматичний ретикулум рослини при експресії у клітині рослини.

Рослинні касети експресії, 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 опосередкованої *Agrobacterium* трансформації або прості плазмідні вектори для трансформації з використанням аерозолі або 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 виділяють з качанів і при трансформації переважно використовують зародки розміром 0,8-1,5 мм. Зародки висаджують щитком угору у 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 міо-інозиту; 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 придатними є середовища і солі, що відмінні від DN62A5S і відомі з рівня техніки. Зародки інкубують протягом ночі при 25 °C у темряві. Хоча інкубація зародків протягом ночі як така не є необхідною.

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

ДНК-конструкції, сконструйовані для експресії генів за даним винаходом у клітинах рослин, потрапляють за рахунок прискорення у рослинну тканину із застосуванням прискорювача пучка аерозолі, із застосуванням умов, які, по суті, описані в РСТ-публікації № WO/0138514. Після аерозольної інжекції зародки інкубують протягом приблизно 30 хвилин на осмотичному середовищі і поміщають в середовище для інкубації на ніч при 25 °C у темряві. Щоб уникнути зайвого ушкодження експлантатів, підданих аерозольній інжекції, їх інкубують протягом щонайменше 24 годин до переносу в середовище для відновлення. Зародки потім розподіляють у середовищі на період відновлення тривалістю приблизно 5 діб при 25 °C у темряві, потім переносять на селективне середовище. Експлантати інкубують 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 переносять на середовище для дозрівання зародків і культивують доти, поки не буде спостерігатися утворення зрілих соматичних зародків. Одержані у результаті зрілі соматичні зародки потім поміщають в умови з низьким рівнем освітленості та ініціюють процес регенерації за допомогою способів, відомих з рівня техніки. Одержаним у результаті пагонам дають можливість укорінитися на середовищі для укорінення, а одержані у результаті рослини переносять у горщики для розсади і розмножують як трансгенні рослини.

Матеріали Середовище DN62A5S

Компоненти	На літр	Джерело
Суміш основних солей N6 за Chu (номер продукту С 416)	3,98 г/л	Phytotechnology Labs
Розчин вітамінів N6 за Chu (номер продукту С 149)	1 мл/л (1000х маточного розчину)	Phytotechnology Labs
L-Аспарагін	800 мг/л	Phytotechnology Labs
Міо-інозитол	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 (1 мг/мл маточного розчину)	Sigma

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

Приклад 6. Трансформація генами за даним винаходом клітин рослин шляхом опосередкованої *Agrobacterium* трансформації

Качани найкраще збирати через 8-12 діб після запилення. Зародки виділяють з качанів, і при

- трансформації переважно застосовують зародки розміром 0,8-1,5 мм. Зародки висаджують щитком угору у придатне середовище для інкубації та інкубують протягом ночі при 25 °С у темряві. Проте інкубація зародків протягом ночі як така не є необхідною. Зародки приводять у контакт із штамом *Agrobacterium*, що містить придатні для опосередкованого Ті-плазмідною переносу вектори, протягом приблизно 5-10 хвилин і потім поміщають у середовище для спільного культивування приблизно на 3 доби (25 °С у темряві). Після спільного культивування експлантати переносять у середовище на період відновлення тривалістю приблизно п'ять діб (при 25 °С у темряві). Експлантати інкубують у селективному середовищі протягом періоду тривалістю до восьми тижнів залежно від природи і характеристик конкретного використовуваного способу відбору. Після періоду відбору отриманий у результаті калюс переносять у середовище для дозрівання зародка та культивують доти, поки не спостерігається утворення зрілих соматичних зародків. Отримані у результаті зрілі соматичні зародки потім поміщають в умови з низьким рівнем освітленості та ініціюють процес регенерації, як відомо з рівня техніки.
- Усі публікації і заявки на патент, згадані у даному описі, свідчать про кваліфікацію фахівців у даній галузі, до якої належить даний винахід. Усі публікації і заявки на патент включені в даний документ за допомогою посилання у тому ж об'ємі, якщо б кожна окрема публікація або заявка на патент була конкретно та індивідуально вказана як така, що включена за допомогою посилання.
- Хоча вищевикладений винахід був досить детально описаний з метою ілюстрації, а також як 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.
Лехтінен, Дуан
Сампсон, Кімберлі, С
Роберте, Кіра
Дунн, Ітан
Чоугуле, Нана
- <120> ГЕН ТОКСИНУ АХМІ486 ТА СПОСІБ ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ
- <130> АРА136054
- <150> 61/913905
- <151> 2013-12-09
- <150> 61/913911
- <151> 2013-12-09
- <160> 27
- <170> PatentIn версії 3.5
- <210> 1
- <211> 3695
- <212> ДНК
- <213> *Bacillus thuringiensis*
- <400> 1
- | | |
|---|-----|
| atgaatcgaa ataatcaagg tgaatatgaa attattgacg cttccacttg tggttgttcg | 60 |
| tcagatgatg ttgttcaata tcctttggca agagatccga atgctgcatt ccaaaatatg | 120 |
| aattataaag attatttgaa aatgtctgac ggagactacg tcgattctta tataaaccca | 180 |
| ggcttatcta ttggtcgtag agatgtgacc ctaactggag ttggtattgt tgcgctaata | 240 |
| gtagggactt taggtgggcc agttgggggt atagtaactg gcttgatttc ctctctttta | 300 |
| ggattattgt ggccaagtaa tgataatgat gtatgggaag cttttatggc acaaatagaa | 360 |
| gagctaattg aacaaaggat agcagatcaa gtagtaagga atgcactcga taacttaact | 420 |
| ggattgcgcg attattataa tcaataccta ttagcattgg aggagtggca ggaaaggccg | 480 |

aacgctgtaa gatctacctt agtttttaaat agatttgaaa ccctgcattc tcactttgta	540
actagtatgc caagcttttg tagtggeccct ggaagtgaaa ggtatgcggg acaattgctg	600
acagtttatg cacaagcggc aaatctgcat ttgttattat taagagatgc tgacatttat	660
ggggcaaggt ggggacttcg tgaatctcag attgatttat attttaatga gctacaaaat	720
cgtactcgag attataccaa tcattgtgta actgcgtaca ataatgggtt agaggagata	780
cgaggaacaa gccctgcaag ttggttgagg taccatcaat tccgtagaga gacaacacta	840
atagcattgg atttagtggc gatattccca tattacaacg tacgagaata tccaattggg	900
gtaaatcctc agcttacacg tgatgtatat acagatccaa taggggttac tttcagaaga	960
gaagattggg aaacaggagt agaatgcaga ccatgggtaa atactcctta catgagcttt	1020
toggatcttg aaaatgcaat aattcgtcca ccacatctat ttgaaacatt acgtaattta	1080
acaattcata caggctgata taacctagta ggagggggcga gatttattga aggatgggtc	1140
ggacattctg taacaaatac tcgcttgggt aattcaacag tatttacaag taattatggt	1200
tctttgccac ctcgttttca agtttttaaat ttactaatt ttgatgttta ccaaattaat	1260
acgagagcag attctacagg tacctttaga atccctggat ttgcagttac aagggcccaa	1320
ttcattccgg gtgggactta ttcagtagct caccgagatc caggggcatg tcaacaagat	1380
tatgattcaa ttgaagagtt accaagtcta gaccgggatg aacctattaa tagaagttat	1440
agtcatagat tatcgcatgt taccctttat aaatatactc tctcagatac agattatgga	1500
gttatcaatt atacagatta tggaagtatg cctgcatatg tctggacaca tcgcgatgtg	1560
gaccttacta acacgattac tgcagataga attacacaaac tccattagt aaaggcatct	1620
acactacctg cgggtactac tgttgtaaaa ggcccaggat ttacaggagg agatatactc	1680
cgaagaacaa ctaatggaac atttgggaca ttacatgtaa gggttaattc accattaaca	1740
caacaatatc gctaagagt tcgttttgcc tcaacaggaa atttcagtat aagggtactc	1800
cgtggaggga cttctatcgg tgatgctaga tttgggagca caatgaacag aggacaggaa	1860
ctaacttacg aatcctttgt cacaagagag ttactacta ctggtccgtt caatccgcct	1920
tttacattta caciaactca agaaattcta acagtgaatg cagaaggtgt tagcacgggt	1980
ggtgaatatt atatagatag tattgagatt gttcctgtaa atccgacgcg agaggcggaa	2040
gaggatctag aagcagcgaa gaaagcgggtg gcgagcttgt ttacacgtac aagggaacgga	2100
ttacaagtaa atgtgacaga ttatcaagtc gatcaagcgg caaatttagt gtcatgctta	2160
tcagatgaac aatatgggca tgacaaaaag atgttatttg aagcggtaag agcggcaaaa	2220
cgctcagcc gagaacgcaa cttacttcag gatccagatt ttaatacaat caatagtaca	2280
gaagaaaatg gatggaaagc aagtaacggc gttactatta gcgagggcgg tccattctat	2340

aaaggccgtg cgcttcagct agcaagcgca agagaaaatt acccaacata catttatcaa 2400
 aaagtaaatg catcagagtt aaagccgtat acacgttata gactggatgg gttcgtgaag 2460
 agtagtcaag atttagaaat tgatctcatt caccatcata aagtccatct cgtgaaaaat 2520
 gtaccagata atttagtata cgatacttac tcggatgggt cttgcagtgg aatgaatcga 2580
 tgtgaggaac aacagatggg aaatgcgcaa ctggaaacag aacatcatca tccgatggat 2640
 tgctgtgaag cggctcaaac acatgagttt tcttcctata ttaatacagg cgatctaaat 2700
 tcaagtgtag atcaaggcat ttgggttgta ttgaaagttc gaacaaccga tggttatgcg 2760
 acgctaggaa atcttgaatt ggtagaggtc ggaccgttat cgggtgaatc tctagaacgt 2820
 gaacaaaggg ataatgcgaa atggagtgc gagctaggaa gaaagcgtgc agaaacagat 2880
 cgcgtgtatc aagatgcaa acaatccatc aatcatttat ttgtggatta tcaagatcaa 2940
 caattaaatc cagaaatagg gatggcagat attattgacg ctcaaaatct tgtcgcata 3000
 atttcagatg tgtatagcga tgcagtactg caaatccctg gaattaacta tgagatttac 3060
 acagagctat ccaatcgctt acaacaagca tcgtatctgt atacgtctcg aaatgcggtg 3120
 caaaatgggg actttaacag cggctctagat agttggaatg caacaggggg ggctacggta 3180
 caacaggatg gcaatacgca tttcttagtt ctttctcatt gggatgcaca agtttctcaa 3240
 caatttagag tgcagccgaa ttgtaaatat gtattacgtg taacagcaga gaaagtaggc 3300
 ggcgagagac gatacgtgac aatccgggat ggtgctcatc atacagaaaa gcttacattt 3360
 aatgcatgtg attatgatat aaatggcacg tacgtgactg ataatacgta tctaacaaaa 3420
 gaagtggat tctattcaca tacagaacac atgtgggtag aggtaagtga aacagaaggt 3480
 gcatttcata tagatagtat tgaattcggt gaaacagaaa agtaacggga tgatgttcgg 3540
 aacatataag gtataaggaa cgatacgccg tataaaagat tctcaaacag aatgtgaaat 3600
 aaatgaggac cctccgggt agtcgtacat ggaaagtaca cgactaccgg gagggtat 3660
 tttatataaa aaatgtggtt tttcactacg gtcta 3695

- 5
- <210> 2
 - <211> 1008
 - <212> ДНК
 - <213> *Bacillus thuringiensis*
 - <400> 2

atgaataaaa aagtaacaaa aacagtatta agcgtggtaa tgggtataag tgttttagca	60
tctccttttag ctgtagccgc aaaaacagag aataataaag aacaacaagt aattacacag	120
tttaatcaga gagaaaataa gttccctgat gtaggacagg ggattcaatg gttatctcaa	180
ttttatggaa aatcttttaa gaataatggg gaaggatact ccttaggtaa tgatgtaatg	240
agctatTTTT tagaagtaaa gaattcttat ggtcaattgg caatagaacc tcaagtaata	300
agcactacac ctctttgggc tggccaaagc gacttggaaa atgcaactga tcatgaacaa	360
actttaaatt ccacagaatt taaaaaacg tattctaaca caaccaccac ctctacagaa	420
aatggattta tgataggcca ggaaaccgaa gggaaagttg gtataccctt tgtcgagaa	480
ggaaaagtca ccataaaaac tgaatataac tttaatcata ctaatgggta tgaaacatct	540
gaaagtgtag agtatattgc tccttctcaa tctattaagg taccaccgca tactattgcc	600
cgagtgcag cattattaga tgtgaaaaaa attaaaggaa agatgcatct atattcagaa	660
attgggctta ataaagatta tggttacgat atgggtgccac ttgtttataa atatggagga	720
ccatttaagt atgtaacctt aggcacatta tatgacgagg gctataagca ggcacaatta	780
gattattcca atatgggaaa tgttataccg gaagaaattg agactgtttc gaaaagtaac	840
aatcccaacc atttattagc aagtggatta ggaatctttg aatcagaata cggaagtgt	900
tttaatgtta aagttgaata cattaatatt aaaactaaaa agattgaaaa aacagagaat	960
cttactattg aacctacaat agtccctgtt gaaaagacga atacaaaa	1008

<210> 3

<211> 1023

<212> ДНК

<213> *Bacillus thuringiensis*

<400> 3

5

gtgagggaga aggatttgaa taaaaaagta acaaaggcag tattaagcat gatagtgggt	60
ataagtgttt tagcatctcc tttagctgta gccgcaaaaa cagagaataa taaagaacaa	120
caagtaatta cacattttta tcagagagaa aataagttcc ctgatgtagg acaggggatt	180
caatggttat ctcaatttta tggaaagtct ttaaagaata atgggtgaagg atactcetta	240
ggtcaggatg taatgagata ttttttagaa gtaaagaatt cttacggcca attggcaatg	300
gaacctcaag taataagcac tacacctctt tgggccggcc aaagtgactt ggaaaatgca	360
actgatcatg aacaaacttt aaattccaca gaatttaaaa aaacgtattc taacacaaca	420
accacctcta cagaaaatgg atttatgata ggtcaagaga ctgaaggga agttgggtatt	480

ccctttgtcg cagaaggaaa agtcaccata aaaactgaat ataactttaa tcataactaat 540
 ggggtatgaaa catctgaaag tgtagagtat attgctcctt ctcaatctat taaggtagca 600
 ccgcatacta ttgcccgagt gacagcatta ttagatgtga aaaaaatcaa agggaaaatg 660
 catctatatt cagaaattgg gcttaataaa gattatgggt acgatatggg gccacttggt 720
 tataaatatg gaggtccatt taagtatgta acctaggga cattatatga cgagggtat 780
 aagcaggcac aattagatta ttccaatatg ggaaatgtta taccggaaga aattgagact 840
 gtttcaaaaa gtaacaatcc caaccattta ttagcaagtg gagtaggaat ctttgaatca 900
 gaatacggaa gtgtatttaa tgttaaagtt gaatacatta atattaatac gaaaaagatt 960
 gaaaaaacag agaatcttac tattgaacct acaatagtcc ctgttaaaca gacgaataga 1020
 aaa 1023
 <210> 4
 <211> 1029
 <212> ДНК
 <213> *Bacillus thuringiensis*
 <400> 4
 gtgagggaga aagatatgga taaaaaata acaaaagcag cgttaagcat gataatgggt 60
 ataagtgttt tatcatctcc tttagctgta gccgcaaaaa cagagaataa taaagaacaa 120
 cacgtaatta cacagttaa tcagagagaa aataagttcc ctgatgtagg acaggggatt 180
 caatggttat ctcaatttta tggaaaatct ttaaagaata atggggaagg atactcctta 240
 ggtcaggatg taatgagcta ttttctagaa gtaaaaaatt cttatgggtca attggcaatg 300
 gaacctcaag taataagcac tacacctctt tgggctggcc aaagtgactt ggaaaatgca 360
 actgatcatg aacaaacttt aaattccaca gaatttaaaa aaacgtattc taacacaaca 420
 accacctcta cagaaaatgg atttatgata ggtcaagaga ctgaaggga agttgggtatt 480
 ccctttgtcg cagaaggaaa agtcaccata aaaactgaat ataactttaa tcataactaat 540
 ggggtatgaaa catctgaaag tgtagagtat attgctcctt ctcaatctat taaggtagca 600
 ccgcatacta ttgcccgagt gacagcatta ttagatgtga aaaaaatcaa agggaaaatg 660
 catctatatt cagaaattgg gcttaataaa gattatgggt acgatatggg gccacttggt 720
 tataaatatg gaggtccatt taagtatgta acctaggga cattatatga cgagggtat 780
 aagcaggcac aattagatta ttccaatatg ggaaatgtta taccggaaga aattgagact 840
 gtttcaaaaa gtaacaatcc caaccattta ttagcaagtg gagtaggaat ctttgaatca 900
 gaatacggaa gtgtatttaa tgttaaagtt gaatacatta atattaatac gaaaaagatt 960
 gaaaaaacag agaatcttac tattgaacct acaatagtcc ctgttaaaca gacgaatagc 1020
 aatacaaaa 1029
 <210> 5

<211> 1174

<212> БИЛОК

<213> *Bacillus thuringiensis*

<400> 5

5

Met Asn Arg Asn Asn Gln Gly Glu Tyr Glu Ile Ile Asp Ala Ser Thr
1 5 10 15

Cys Gly Cys Ser Ser Asp Asp Val Val Gln Tyr Pro Leu Ala Arg Asp
20 25 30

Pro Asn Ala Ala Phe Gln Asn Met Asn Tyr Lys Asp Tyr Leu Lys Met
35 40 45

Ser Asp Gly Asp Tyr Val Asp Ser Tyr Ile Asn Pro Gly Leu Ser Ile
50 55 60

Gly Arg Arg Asp Val Thr Leu Thr Gly Val Gly Ile Val Ala Leu Ile
65 70 75 80

Val Gly Thr Leu Gly Gly Pro Val Gly Gly Ile Val Thr Gly Leu Ile
85 90 95

Ser Ser Leu Leu Gly Leu Leu Trp Pro Ser Asn Asp Asn Asp Val Trp
100 105 110

Glu Ala Phe Met Ala Gln Ile Glu Glu Leu Ile Glu Gln Arg Ile Ala
115 120 125

Asp Gln Val Val Arg Asn Ala Leu Asp Asn Leu Thr Gly Leu Arg Asp
130 135 140

Tyr Tyr Asn Gln Tyr Leu Leu Ala Leu Glu Glu Trp Gln Glu Arg Pro
145 150 155 160

Asn Ala Val Arg Ser Thr Leu Val Phe Asn Arg Phe Glu Thr Leu His
165 170 175

Ser His Phe Val Thr Ser Met Pro Ser Phe Gly Ser Gly Pro Gly Ser
180 185 190

Glu Arg Tyr Ala Val Gln Leu Leu Thr Val Tyr Ala Gln Ala Ala Asn
195 200 205

Leu His Leu Leu Leu Leu Arg Asp Ala Asp Ile Tyr Gly Ala Arg Trp
210 215 220

Gly Leu Arg Glu Ser Gln Ile Asp Leu Tyr Phe Asn Glu Leu Gln Asn
 225 230 235 240
 Arg Thr Arg Asp Tyr Thr Asn His Cys Val Thr Ala Tyr Asn Asn Gly
 245 250 255
 Leu Glu Glu Ile Arg Gly Thr Ser Pro Ala Ser Trp Leu Arg Tyr His
 260 265 270
 Gln Phe Arg Arg Glu Thr Thr Leu Ile Ala Leu Asp Leu Val Ala Ile
 275 280 285
 Phe Pro Tyr Tyr Asn Val Arg Glu Tyr Pro Ile Gly Val Asn Pro Gln
 290 295 300
 Leu Thr Arg Asp Val Tyr Thr Asp Pro Ile Gly Val Thr Phe Arg Arg
 305 310 315 320
 Glu Asp Trp Glu Thr Gly Val Glu Cys Arg Pro Trp Val Asn Thr Pro
 325 330 335
 Tyr Met Ser Phe Ser Asp Leu Glu Asn Ala Ile Ile Arg Pro Pro His
 340 345 350
 Leu Phe Glu Thr Leu Arg Asn Leu Thr Ile His Thr Gly Arg Tyr Asn
 355 360 365
 Leu Val Gly Gly Ala Arg Phe Ile Glu Gly Trp Val Gly His Ser Val
 370 375 380
 Thr Asn Thr Arg Leu Gly Asn Ser Thr Val Phe Thr Ser Asn Tyr Gly
 385 390 395 400

Ser Leu Pro Pro Arg Phe Gln Val Phe Asn Phe Thr Asn Phe Asp Val
405 410 415

Tyr Gln Ile Asn Thr Arg Ala Asp Ser Thr Gly Thr Phe Arg Ile Pro
420 425 430

Gly Phe Ala Val Thr Arg Ala Gln Phe Ile Pro Gly Gly Thr Tyr Ser
435 440 445

Val Ala His Arg Asp Pro Gly Ala Cys Gln Gln Asp Tyr Asp Ser Ile
450 455 460

Glu Glu Leu Pro Ser Leu Asp Pro Asp Glu Pro Ile Asn Arg Ser Tyr
465 470 475 480

Ser His Arg Leu Ser His Val Thr Leu Tyr Lys Tyr Thr Leu Ser Asp
485 490 495

Thr Asp Tyr Gly Val Ile Asn Tyr Thr Asp Tyr Gly Ser Met Pro Ala
500 505 510

Tyr Val Trp Thr His Arg Asp Val Asp Leu Thr Asn Thr Ile Thr Ala
515 520 525

Asp Arg Ile Thr Gln Leu Pro Leu Val Lys Ala Ser Thr Leu Pro Ala
530 535 540

Gly Thr Thr Val Val Lys Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu
545 550 555 560

Arg Arg Thr Thr Asn Gly Thr Phe Gly Thr Leu His Val Arg Val Asn
565 570 575

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

Gly Asn Phe Ser Ile Arg Val Leu Arg Gly Gly Thr Ser Ile Gly Asp
595 600 605

Ala Arg Phe Gly Ser Thr Met Asn Arg Gly Gln Glu Leu Thr Tyr Glu
610 615 620

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

Phe Thr Phe Thr Gln Thr Gln Glu Ile Leu Thr Val Asn Ala Glu Gly
 645 650 655
 Val Ser Thr Gly Gly Glu Tyr Tyr Ile Asp Ser Ile Glu Ile Val Pro
 660 665 670
 Val Asn Pro Thr Arg Glu Ala Glu Glu Asp Leu Glu Ala Ala Lys Lys
 675 680 685
 Ala Val Ala Ser Leu Phe Thr Arg Thr Arg Asp Gly Leu Gln Val Asn
 690 695 700
 Val Thr Asp Tyr Gln Val Asp Gln Ala Ala Asn Leu Val Ser Cys Leu
 705 710 715 720
 Ser Asp Glu Gln Tyr Gly His Asp Lys Lys Met Leu Leu Glu Ala Val
 725 730 735
 Arg Ala Ala Lys Arg Leu Ser Arg Glu Arg Asn Leu Leu Gln Asp Pro
 740 745 750
 Asp Phe Asn Thr Ile Asn Ser Thr Glu Glu Asn Gly Trp Lys Ala Ser
 755 760 765
 Asn Gly Val Thr Ile Ser Glu Gly Gly Pro Phe Tyr Lys Gly Arg Ala
 770 775 780
 Leu Gln Leu Ala Ser Ala Arg Glu Asn Tyr Pro Thr Tyr Ile Tyr Gln
 785 790 795 800
 Lys Val Asn Ala Ser Glu Leu Lys Pro Tyr Thr Arg Tyr Arg Leu Asp
 805 810 815
 Gly Phe Val Lys Ser Ser Gln Asp Leu Glu Ile Asp Leu Ile His His
 820 825 830
 His Lys Val His Leu Val Lys Asn Val Pro Asp Asn Leu Val Ser Asp
 835 840 845
 Thr Tyr Ser Asp Gly Ser Cys Ser Gly Met Asn Arg Cys Glu Glu Gln
 850 855 860
 Gln Met Val Asn Ala Gln Leu Glu Thr Glu His His His Pro Met Asp
 865 870 875 880

Cys Cys Glu Ala Ala Gln Thr His Glu Phe Ser Ser Tyr Ile Asn Thr
885 890 895

Gly Asp Leu Asn Ser Ser Val Asp Gln Gly Ile Trp Val Val Leu Lys
900 905 910

Val Arg Thr Thr Asp Gly Tyr Ala Thr Leu Gly Asn Leu Glu Leu Val
915 920 925

Glu Val Gly Pro Leu Ser Gly Glu Ser Leu Glu Arg Glu Gln Arg Asp
930 935 940

Asn Ala Lys Trp Ser Ala Glu Leu Gly Arg Lys Arg Ala Glu Thr Asp
945 950 955 960

Arg Val Tyr Gln Asp Ala Lys Gln Ser Ile Asn His Leu Phe Val Asp
965 970 975

Tyr Gln Asp Gln Gln Leu Asn Pro Glu Ile Gly Met Ala Asp Ile Ile
980 985 990

Asp Ala Gln Asn Leu Val Ala Ser Ile Ser Asp Val Tyr Ser Asp Ala
995 1000 1005

Val Leu Gln Ile Pro Gly Ile Asn Tyr Glu Ile Tyr Thr Glu Leu
1010 1015 1020

Ser Asn Arg Leu Gln Gln Ala Ser Tyr Leu Tyr Thr Ser Arg Asn
1025 1030 1035

Ala Val Gln Asn Gly Asp Phe Asn Ser Gly Leu Asp Ser Trp Asn
1040 1045 1050

Ala Thr Gly Gly Ala Thr Val Gln Gln Asp Gly Asn Thr His Phe
1055 1060 1065

Leu Val Leu Ser His Trp Asp Ala Gln Val Ser Gln Gln Phe Arg
1070 1075 1080

Val Gln Pro Asn Cys Lys Tyr Val Leu Arg Val Thr Ala Glu Lys
1085 1090 1095

Val Gly Gly Gly Asp Gly Tyr Val Thr Ile Arg Asp Gly Ala His
1100 1105 1110

His Thr Glu Lys Leu Thr Phe Asn Ala Cys Asp Tyr Asp Ile Asn
1115 1120 1125

Gly Thr Tyr Val Thr Asp Asn Thr Tyr Leu Thr Lys Glu Val Val
1130 1135 1140

Phe Tyr Ser His Thr Glu His Met Trp Val Glu Val Ser Glu Thr
1145 1150 1155

Glu Gly Ala Phe His Ile Asp Ser Ile Glu Phe Val Glu Thr Glu
1160 1165 1170

Lys

<210> 6

<211> 1135

<212> БИЛОК

<213> Bacillus thuringiensis

<400> 6

5

Met Asn Tyr Lys Asp Tyr Leu Lys Met Ser Asp Gly Asp Tyr Val Asp
1 5 10 15

Ser Tyr Ile Asn Pro Gly Leu Ser Ile Gly Arg Arg Asp Val Thr Leu
20 25 30

Thr Gly Val Gly Ile Val Ala Leu Ile Val Gly Thr Leu Gly Gly Pro
35 40 45

Val Gly Gly Ile Val Thr Gly Leu Ile Ser Ser Leu Leu Gly Leu Leu
50 55 60

Trp Pro Ser Asn Asp Asn Asp Val Trp Glu Ala Phe Met Ala Gln Ile
65 70 75 80

Glu Glu Leu Ile Glu Gln Arg Ile Ala Asp Gln Val Val Arg Asn Ala
85 90 95

Leu Asp Asn Leu Thr Gly Leu Arg Asp Tyr Tyr Asn Gln Tyr Leu Leu
100 105 110

Ala Leu Glu Glu Trp Gln Glu Arg Pro Asn Ala Val Arg Ser Thr Leu
115 120 125

Val Phe Asn Arg Phe Glu Thr Leu His Ser His Phe Val Thr Ser Met
130 135 140

Pro Ser Phe Gly Ser Gly Pro Gly Ser Glu Arg Tyr Ala Val Gln Leu
 145 150 155 160
 Leu Thr Val Tyr Ala Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Leu Leu Leu Arg
 165 170 175
 Asp Ala Asp Ile Tyr Gly Ala Arg Trp Gly Leu Arg Glu Ser Gln Ile
 180 185 190
 Asp Leu Tyr Phe Asn Glu Leu Gln Asn Arg Thr Arg Asp Tyr Thr Asn
 195 200 205
 His Cys Val Thr Ala Tyr Asn Asn Gly Leu Glu Glu Ile Arg Gly Thr
 210 215 220
 Ser Pro Ala Ser Trp Leu Arg Tyr His Gln Phe Arg Arg Glu Thr Thr
 225 230 235 240
 Leu Ile Ala Leu Asp Leu Val Ala Ile Phe Pro Tyr Tyr Asn Val Arg
 245 250 255
 Glu Tyr Pro Ile Gly Val Asn Pro Gln Leu Thr Arg Asp Val Tyr Thr
 260 265 270
 Asp Pro Ile Gly Val Thr Phe Arg Arg Glu Asp Trp Glu Thr Gly Val
 275 280 285
 Glu Cys Arg Pro Trp Val Asn Thr Pro Tyr Met Ser Phe Ser Asp Leu
 290 295 300
 Glu Asn Ala Ile Ile Arg Pro Pro His Leu Phe Glu Thr Leu Arg Asn
 305 310 315 320
 Leu Thr Ile His Thr Gly Arg Tyr Asn Leu Val Gly Gly Ala Arg Phe
 325 330 335
 Ile Glu Gly Trp Val Gly His Ser Val Thr Asn Thr Arg Leu Gly Asn
 340 345 350
 Ser Thr Val Phe Thr Ser Asn Tyr Gly Ser Leu Pro Pro Arg Phe Gln
 355 360 365
 Val Phe Asn Phe Thr Asn Phe Asp Val Tyr Gln Ile Asn Thr Arg Ala
 370 375 380

Asp Ser Thr Gly Thr Phe Arg Ile Pro Gly Phe Ala Val Thr Arg Ala
 385 390 395 400
 Gln Phe Ile Pro Gly Gly Thr Tyr Ser Val Ala His Arg Asp Pro Gly
 405 410 415
 Ala Cys Gln Gln Asp Tyr Asp Ser Ile Glu Glu Leu Pro Ser Leu Asp
 420 425 430
 Pro Asp Glu Pro Ile Asn Arg Ser Tyr Ser His Arg Leu Ser His Val
 435 440 445
 Thr Leu Tyr Lys Tyr Thr Leu Ser Asp Thr Asp Tyr Gly Val Ile Asn
 450 455 460
 Tyr Thr Asp Tyr Gly Ser Met Pro Ala Tyr Val Trp Thr His Arg Asp
 465 470 475 480
 Val Asp Leu Thr Asn Thr Ile Thr Ala Asp Arg Ile Thr Gln Leu Pro
 485 490 495
 Leu Val Lys Ala Ser Thr Leu Pro Ala Gly Thr Thr Val Val Lys Gly
 500 505 510
 Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr Thr Asn Gly Thr
 515 520 525
 Phe Gly Thr Leu His Val Arg Val Asn Ser Pro Leu Thr Gln Gln Tyr
 530 535 540
 Arg Leu Arg Val Arg Phe Ala Ser Thr Gly Asn Phe Ser Ile Arg Val
 545 550 555 560
 Leu Arg Gly Gly Thr Ser Ile Gly Asp Ala Arg Phe Gly Ser Thr Met
 565 570 575
 Asn Arg Gly Gln Glu Leu Thr Tyr Glu Ser Phe Val Thr Arg Glu Phe
 580 585 590
 Thr Thr Thr Gly Pro Phe Asn Pro Pro Phe Thr Phe Thr Gln Thr Gln
 595 600 605
 Glu Ile Leu Thr Val Asn Ala Glu Gly Val Ser Thr Gly Gly Glu Tyr
 610 615 620

Tyr	Ile	Asp	Ser	Ile	Glu	Ile	Val	Pro	Val	Asn	Pro	Thr	Arg	Glu	Ala	625	630	635	640
Glu	Glu	Asp	Leu	Glu	Ala	Ala	Lys	Lys	Ala	Val	Ala	Ser	Leu	Phe	Thr	645	650	655	
Arg	Thr	Arg	Asp	Gly	Leu	Gln	Val	Asn	Val	Thr	Asp	Tyr	Gln	Val	Asp	660	665	670	
Gln	Ala	Ala	Asn	Leu	Val	Ser	Cys	Leu	Ser	Asp	Glu	Gln	Tyr	Gly	His	675	680	685	
Asp	Lys	Lys	Met	Leu	Leu	Glu	Ala	Val	Arg	Ala	Ala	Lys	Arg	Leu	Ser	690	695	700	
Arg	Glu	Arg	Asn	Leu	Leu	Gln	Asp	Pro	Asp	Phe	Asn	Thr	Ile	Asn	Ser	705	710	715	720
Thr	Glu	Glu	Asn	Gly	Trp	Lys	Ala	Ser	Asn	Gly	Val	Thr	Ile	Ser	Glu	725	730	735	
Gly	Gly	Pro	Phe	Tyr	Lys	Gly	Arg	Ala	Leu	Gln	Leu	Ala	Ser	Ala	Arg	740	745	750	
Glu	Asn	Tyr	Pro	Thr	Tyr	Ile	Tyr	Gln	Lys	Val	Asn	Ala	Ser	Glu	Leu	755	760	765	
Lys	Pro	Tyr	Thr	Arg	Tyr	Arg	Leu	Asp	Gly	Phe	Val	Lys	Ser	Ser	Gln	770	775	780	
Asp	Leu	Glu	Ile	Asp	Leu	Ile	His	His	His	Lys	Val	His	Leu	Val	Lys				

785		790		795		800
Asn Val Pro Asp	Asn Leu Val Ser	Asp Thr Tyr Ser	Asp Gly Ser Cys			
	805	810	815			
Ser Gly Met	Asn Arg Cys Glu Glu	Gln Gln Met Val	Asn Ala Gln Leu			
	820	825	830			
Glu Thr Glu	His His His Pro Met	Asp Cys Cys Glu	Ala Ala Gln Thr			
	835	840	845			
His Glu Phe	Ser Ser Tyr Ile Asn	Thr Gly Asp Leu	Asn Ser Ser Val			
	850	855	860			
Asp Gln Gly	Ile Trp Val Val Leu	Lys Val Arg Thr Thr	Asp Gly Tyr			
	865	870	875			880
Ala Thr Leu	Gly Asn Leu Glu Leu	Val Glu Val Gly Pro	Leu Ser Gly			
	885	890	895			
Glu Ser Leu	Glu Arg Glu Gln Arg	Asp Asn Ala Lys Trp	Ser Ala Glu			
	900	905	910			
Leu Gly Arg	Lys Arg Ala Glu Thr	Asp Arg Val Tyr	Gln Asp Ala Lys			
	915	920	925			
Gln Ser Ile	Asn His Leu Phe Val	Asp Tyr Gln Asp	Gln Gln Leu Asn			
	930	935	940			
Pro Glu Ile	Gly Met Ala Asp Ile Ile	Asp Ala Gln Asn Leu	Val Ala			
	945	950	955			960
Ser Ile Ser	Asp Val Tyr Ser Asp	Ala Val Leu Gln Ile	Pro Gly Ile			
	965	970	975			
Asn Tyr Glu	Ile Tyr Thr Glu Leu	Ser Asn Arg Leu	Gln Gln Ala Ser			
	980	985	990			
Tyr Leu Tyr	Thr Ser Arg Asn Ala	Val Gln Asn Gly Asp	Phe Asn Ser			
	995	1000	1005			
Gly Leu Asp	Ser Trp Asn Ala Thr	Gly Gly Ala Thr	Val Gln Gln			
	1010	1015	1020			
Asp Gly Asn	Thr His Phe Leu Val	Leu Ser His Trp	Asp Ala Gln			
	1025	1030	1035			

Val Ser Gln Gln Phe Arg Val Gln Pro Asn Cys Lys Tyr Val Leu
1040 1045 1050

Arg Val Thr Ala Glu Lys Val Gly Gly Gly Asp Gly Tyr Val Thr
1055 1060 1065

Ile Arg Asp Gly Ala His His Thr Glu Lys Leu Thr Phe Asn Ala
1070 1075 1080

Cys Asp Tyr Asp Ile Asn Gly Thr Tyr Val Thr Asp Asn Thr Tyr
1085 1090 1095

Leu Thr Lys Glu Val Val Phe Tyr Ser His Thr Glu His Met Trp
1100 1105 1110

Val Glu Val Ser Glu Thr Glu Gly Ala Phe His Ile Asp Ser Ile
1115 1120 1125

Glu Phe Val Glu Thr Glu Lys
1130 1135

<210> 7

<211> 1127

<212> БИЛОК

<213> Bacillus thuringiensis

<400> 7

5

Met Ser Asp Gly Asp Tyr Val Asp Ser Tyr Ile Asn Pro Gly Leu Ser
1 5 10 15

Ile Gly Arg Arg Asp Val Thr Leu Thr Gly Val Gly Ile Val Ala Leu
20 25 30

Ile Val Gly Thr Leu Gly Gly Pro Val Gly Gly Ile Val Thr Gly Leu
35 40 45

Ile Ser Ser Leu Leu Gly Leu Leu Trp Pro Ser Asn Asp Asn Asp Val
50 55 60

Trp Glu Ala Phe Met Ala Gln Ile Glu Glu Leu Ile Glu Gln Arg Ile
65 70 75 80

Ala Asp Gln Val Val Arg Asn Ala Leu Asp Asn Leu Thr Gly Leu Arg
85 90 95

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

340					345					350					
Gly	Ser	Leu	Pro	Pro	Arg	Phe	Gln	Val	Phe	Asn	Phe	Thr	Asn	Phe	Asp
		355					360					365			
Val	Tyr	Gln	Ile	Asn	Thr	Arg	Ala	Asp	Ser	Thr	Gly	Thr	Phe	Arg	Ile
	370					375					380				
Pro	Gly	Phe	Ala	Val	Thr	Arg	Ala	Gln	Phe	Ile	Pro	Gly	Gly	Thr	Tyr
385					390					395					400
Ser	Val	Ala	His	Arg	Asp	Pro	Gly	Ala	Cys	Gln	Gln	Asp	Tyr	Asp	Ser
				405					410					415	
Ile	Glu	Glu	Leu	Pro	Ser	Leu	Asp	Pro	Asp	Glu	Pro	Ile	Asn	Arg	Ser
			420					425					430		
Tyr	Ser	His	Arg	Leu	Ser	His	Val	Thr	Leu	Tyr	Lys	Tyr	Thr	Leu	Ser
		435					440					445			
Asp	Thr	Asp	Tyr	Gly	Val	Ile	Asn	Tyr	Thr	Asp	Tyr	Gly	Ser	Met	Pro
	450					455					460				
Ala	Tyr	Val	Trp	Thr	His	Arg	Asp	Val	Asp	Leu	Thr	Asn	Thr	Ile	Thr
465					470					475					480
Ala	Asp	Arg	Ile	Thr	Gln	Leu	Pro	Leu	Val	Lys	Ala	Ser	Thr	Leu	Pro
				485					490					495	
Ala	Gly	Thr	Thr	Val	Val	Lys	Gly	Pro	Gly	Phe	Thr	Gly	Gly	Asp	Ile
			500					505					510		
Leu	Arg	Arg	Thr	Thr	Asn	Gly	Thr	Phe	Gly	Thr	Leu	His	Val	Arg	Val
		515					520					525			
Asn	Ser	Pro	Leu	Thr	Gln	Gln	Tyr	Arg	Leu	Arg	Val	Arg	Phe	Ala	Ser
	530					535					540				
Thr	Gly	Asn	Phe	Ser	Ile	Arg	Val	Leu	Arg	Gly	Gly	Thr	Ser	Ile	Gly
545					550					555					560
Asp	Ala	Arg	Phe	Gly	Ser	Thr	Met	Asn	Arg	Gly	Gln	Glu	Leu	Thr	Tyr
				565					570					575	
Glu	Ser	Phe	Val	Thr	Arg	Glu	Phe	Thr	Thr	Thr	Gly	Pro	Phe	Asn	Pro
			580					585					590		

Pro Phe Thr Phe Thr Gln Thr Gln Glu Ile Leu Thr Val Asn Ala Glu
595 600 605

Gly Val Ser Thr Gly Gly Glu Tyr Tyr Ile Asp Ser Ile Glu Ile Val
610 615 620

Pro Val Asn Pro Thr Arg Glu Ala Glu Glu Asp Leu Glu Ala Ala Lys
625 630 635 640

Lys Ala Val Ala Ser Leu Phe Thr Arg Thr Arg Asp Gly Leu Gln Val
645 650 655

Asn Val Thr Asp Tyr Gln Val Asp Gln Ala Ala Asn Leu Val Ser Cys
660 665 670

Leu Ser Asp Glu Gln Tyr Gly His Asp Lys Lys Met Leu Leu Glu Ala
675 680 685

Val Arg Ala Ala Lys Arg Leu Ser Arg Glu Arg Asn Leu Leu Gln Asp
690 695 700

Pro Asp Phe Asn Thr Ile Asn Ser Thr Glu Glu Asn Gly Trp Lys Ala
705 710 715 720

Ser Asn Gly Val Thr Ile Ser Glu Gly Gly Pro Phe Tyr Lys Gly Arg
725 730 735

Ala Leu Gln Leu Ala Ser Ala Arg Glu Asn Tyr Pro Thr Tyr Ile Tyr
740 745 750

Gln Lys Val Asn Ala Ser Glu Leu Lys Pro Tyr Thr Arg Tyr Arg Leu
755 760 765

Asp Gly Phe Val Lys Ser Ser Gln Asp Leu Glu Ile Asp Leu Ile His
770 775 780

His His Lys Val His Leu Val Lys Asn Val Pro Asp Asn Leu Val Ser
785 790 795 800

Asp Thr Tyr Ser Asp Gly Ser Cys Ser Gly Met Asn Arg Cys Glu Glu
805 810 815

Gln Gln Met Val Asn Ala Gln Leu Glu Thr Glu His His His Pro Met
820 825 830

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

Glu Lys Leu Thr Phe Asn Ala Cys Asp Tyr Asp Ile Asn Gly Thr
1070 1075 1080

Tyr Val Thr Asp Asn Thr Tyr Leu Thr Lys Glu Val Val Phe Tyr
1085 1090 1095

Ser His Thr Glu His Met Trp Val Glu Val Ser Glu Thr Glu Gly
1100 1105 1110

Ala Phe His Ile Asp Ser Ile Glu Phe Val Glu Thr Glu Lys
1115 1120 1125

<210> 8

<211> 673

<212> БИЛОК

<213> Bacillus thuringiensis

<400> 8

5

Met Asn Arg Asn Asn Gln Gly Glu Tyr Glu Ile Ile Asp Ala Ser Thr
1 5 10 15

Cys Gly Cys Ser Ser Asp Asp Val Val Gln Tyr Pro Leu Ala Arg Asp
20 25 30

Pro Asn Ala Ala Phe Gln Asn Met Asn Tyr Lys Asp Tyr Leu Lys Met
35 40 45

Ser Asp Gly Asp Tyr Val Asp Ser Tyr Ile Asn Pro Gly Leu Ser Ile
50 55 60

Gly Arg Arg Asp Val Thr Leu Thr Gly Val Gly Ile Val Ala Leu Ile
65 70 75 80

Val Gly Thr Leu Gly Gly Pro Val Gly Gly Ile Val Thr Gly Leu Ile
85 90 95

Ser Ser Leu Leu Gly Leu Leu Trp Pro Ser Asn Asp Asn Asp Val Trp
100 105 110

Glu Ala Phe Met Ala Gln Ile Glu Glu Leu Ile Glu Gln Arg Ile Ala
115 120 125

Asp Gln Val Val Arg Asn Ala Leu Asp Asn Leu Thr Gly Leu Arg Asp
130 135 140

Tyr Tyr Asn Gln Tyr Leu Leu Ala Leu Glu Glu Trp Gln Glu Arg Pro
145 150 155 160

Asn	Ala	Val	Arg	Ser	Thr	Leu	Val	Phe	Asn	Arg	Phe	Glu	Thr	Leu	His
				165					170					175	
Ser	His	Phe	Val	Thr	Ser	Met	Pro	Ser	Phe	Gly	Ser	Gly	Pro	Gly	Ser
			180					185					190		
Glu	Arg	Tyr	Ala	Val	Gln	Leu	Leu	Thr	Val	Tyr	Ala	Gln	Ala	Ala	Asn
		195					200					205			
Leu	His	Leu	Leu	Leu	Leu	Arg	Asp	Ala	Asp	Ile	Tyr	Gly	Ala	Arg	Trp
	210					215					220				
Gly	Leu	Arg	Glu	Ser	Gln	Ile	Asp	Leu	Tyr	Phe	Asn	Glu	Leu	Gln	Asn
225					230					235					240
Arg	Thr	Arg	Asp	Tyr	Thr	Asn	His	Cys	Val	Thr	Ala	Tyr	Asn	Asn	Gly
			245					250						255	
Leu	Glu	Glu	Ile	Arg	Gly	Thr	Ser	Pro	Ala	Ser	Trp	Leu	Arg	Tyr	His
			260					265					270		
Gln	Phe	Arg	Arg	Glu	Thr	Thr	Leu	Ile	Ala	Leu	Asp	Leu	Val	Ala	Ile
		275					280					285			
Phe	Pro	Tyr	Tyr	Asn	Val	Arg	Glu	Tyr	Pro	Ile	Gly	Val	Asn	Pro	Gln
	290					295					300				
Leu	Thr	Arg	Asp	Val	Tyr	Thr	Asp	Pro	Ile	Gly	Val	Thr	Phe	Arg	Arg
305					310					315					320
Glu	Asp	Trp	Glu	Thr	Gly	Val	Glu	Cys	Arg	Pro	Trp	Val	Asn	Thr	Pro
			325					330						335	
Tyr	Met	Ser	Phe	Ser	Asp	Leu	Glu	Asn	Ala	Ile	Ile	Arg	Pro	Pro	His
			340					345					350		
Leu	Phe	Glu	Thr	Leu	Arg	Asn	Leu	Thr	Ile	His	Thr	Gly	Arg	Tyr	Asn
		355					360					365			
Leu	Val	Gly	Gly	Ala	Arg	Phe	Ile	Glu	Gly	Trp	Val	Gly	His	Ser	Val
	370					375					380				
Thr	Asn	Thr	Arg	Leu	Gly	Asn	Ser	Thr	Val	Phe	Thr	Ser	Asn	Tyr	Gly
385					390					395					400

Ser Leu Pro Pro Arg Phe Gln Val Phe Asn Phe Thr Asn Phe Asp Val
405 410 415

Tyr Gln Ile Asn Thr Arg Ala Asp Ser Thr Gly Thr Phe Arg Ile Pro
420 425 430

Gly Phe Ala Val Thr Arg Ala Gln Phe Ile Pro Gly Gly Thr Tyr Ser
435 440 445

Val Ala His Arg Asp Pro Gly Ala Cys Gln Gln Asp Tyr Asp Ser Ile
450 455 460

Glu Glu Leu Pro Ser Leu Asp Pro Asp Glu Pro Ile Asn Arg Ser Tyr
465 470 475 480

Ser His Arg Leu Ser His Val Thr Leu Tyr Lys Tyr Thr Leu Ser Asp
485 490 495

Thr Asp Tyr Gly Val Ile Asn Tyr Thr Asp Tyr Gly Ser Met Pro Ala
500 505 510

Tyr Val Trp Thr His Arg Asp Val Asp Leu Thr Asn Thr Ile Thr Ala
515 520 525

Asp Arg Ile Thr Gln Leu Pro Leu Val Lys Ala Ser Thr Leu Pro Ala
530 535 540

Gly Thr Thr Val Val Lys Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu
545 550 555 560

Arg Arg Thr Thr Asn Gly Thr Phe Gly Thr Leu His Val Arg Val Asn
565 570 575

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

Gly Asn Phe Ser Ile Arg Val Leu Arg Gly Gly Thr Ser Ile Gly Asp
595 600 605

Ala Arg Phe Gly Ser Thr Met Asn Arg Gly Gln Glu Leu Thr Tyr Glu
610 615 620

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

Phe Thr Phe Thr Gln Thr Gln Glu Ile Leu Thr Val Asn Ala Glu Gly
645 650 655

Val Ser Thr Gly Gly Glu Tyr Tyr Ile Asp Ser Ile Glu Ile Val Pro
660 665 670

Val

<210> 9

<211> 634

<212> БИЛЮК

5 <213> Bacillus thuringiensis

<400> 9

Met Asn Tyr Lys Asp Tyr Leu Lys Met Ser Asp Gly Asp Tyr Val Asp
1 5 10 15

Ser Tyr Ile Asn Pro Gly Leu Ser Ile Gly Arg Arg Asp Val Thr Leu
20 25 30

Thr Gly Val Gly Ile Val Ala Leu Ile Val Gly Thr Leu Gly Gly Pro
35 40 45

Val Gly Gly Ile Val Thr Gly Leu Ile Ser Ser Leu Leu Gly Leu Leu
50 55 60

Trp Pro Ser Asn Asp Asn Asp Val Trp Glu Ala Phe Met Ala Gln Ile
65 70 75 80

Glu Glu Leu Ile Glu Gln Arg Ile Ala Asp Gln Val Val Arg Asn Ala
85 90 95

Leu Asp Asn Leu Thr Gly Leu Arg Asp Tyr Tyr Asn Gln Tyr Leu Leu
100 105 110

Ala Leu Glu Glu Trp Gln Glu Arg Pro Asn Ala Val Arg Ser Thr Leu
115 120 125

Val Phe Asn Arg Phe Glu Thr Leu His Ser His Phe Val Thr Ser Met
130 135 140

Pro Ser Phe Gly Ser Gly Pro Gly Ser Glu Arg Tyr Ala Val Gln Leu
145 150 155 160

Leu Thr Val Tyr Ala Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Leu Leu Leu Arg
165 170 175

Asp Ala Asp Ile Tyr Gly Ala Arg Trp Gly Leu Arg Glu Ser Gln Ile
 180 185 190
 Asp Leu Tyr Phe Asn Glu Leu Gln Asn Arg Thr Arg Asp Tyr Thr Asn
 195 200 205
 His Cys Val Thr Ala Tyr Asn Asn Gly Leu Glu Glu Ile Arg Gly Thr
 210 215 220
 Ser Pro Ala Ser Trp Leu Arg Tyr His Gln Phe Arg Arg Glu Thr Thr
 225 230 235 240
 Leu Ile Ala Leu Asp Leu Val Ala Ile Phe Pro Tyr Tyr Asn Val Arg
 245 250 255
 Glu Tyr Pro Ile Gly Val Asn Pro Gln Leu Thr Arg Asp Val Tyr Thr
 260 265 270
 Asp Pro Ile Gly Val Thr Phe Arg Arg Glu Asp Trp Glu Thr Gly Val
 275 280 285
 Glu Cys Arg Pro Trp Val Asn Thr Pro Tyr Met Ser Phe Ser Asp Leu
 290 295 300
 Glu Asn Ala Ile Ile Arg Pro Pro His Leu Phe Glu Thr Leu Arg Asn
 305 310 315 320
 Leu Thr Ile His Thr Gly Arg Tyr Asn Leu Val Gly Gly Ala Arg Phe
 325 330 335
 Ile Glu Gly Trp Val Gly His Ser Val Thr Asn Thr Arg Leu Gly Asn
 340 345 350
 Ser Thr Val Phe Thr Ser Asn Tyr Gly Ser Leu Pro Pro Arg Phe Gln
 355 360 365
 Val Phe Asn Phe Thr Asn Phe Asp Val Tyr Gln Ile Asn Thr Arg Ala
 370 375 380
 Asp Ser Thr Gly Thr Phe Arg Ile Pro Gly Phe Ala Val Thr Arg Ala
 385 390 395 400
 Gln Phe Ile Pro Gly Gly Thr Tyr Ser Val Ala His Arg Asp Pro Gly
 405 410 415

Ala Cys Gln Gln Asp Tyr Asp Ser Ile Glu Glu Leu Pro Ser Leu Asp
420 425 430

Pro Asp Glu Pro Ile Asn Arg Ser Tyr Ser His Arg Leu Ser His Val
435 440 445

Thr Leu Tyr Lys Tyr Thr Leu Ser Asp Thr Asp Tyr Gly Val Ile Asn
450 455 460

Tyr Thr Asp Tyr Gly Ser Met Pro Ala Tyr Val Trp Thr His Arg Asp
465 470 475 480

Val Asp Leu Thr Asn Thr Ile Thr Ala Asp Arg Ile Thr Gln Leu Pro
485 490 495

Leu Val Lys Ala Ser Thr Leu Pro Ala Gly Thr Thr Val Val Lys Gly
500 505 510

Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr Thr Asn Gly Thr
515 520 525

Phe Gly Thr Leu His Val Arg Val Asn Ser Pro Leu Thr Gln Gln Tyr
530 535 540

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

Leu Arg Gly Gly Thr Ser Ile Gly Asp Ala Arg Phe Gly Ser Thr Met
565 570 575

Asn Arg Gly Gln Glu Leu Thr Tyr Glu Ser Phe Val Thr Arg Glu Phe
580 585 590

Thr Thr Thr Gly Pro Phe Asn Pro Pro Phe Thr Phe Thr Gln Thr Gln
595 600 605

Glu Ile Leu Thr Val Asn Ala Glu Gly Val Ser Thr Gly Gly Glu Tyr
610 615 620

Tyr Ile Asp Ser Ile Glu Ile Val Pro Val
625 630

5

<210> 10
<211> 626
<212> БИЛОК
<213> Bacillus thuringiensis
<400> 10

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

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

Ala Asp Arg Ile Thr Gln Leu Pro Leu Val Lys Ala Ser Thr Leu Pro
485 490 495

Ala Gly Thr Thr Val Val Lys Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile
500 505 510

Leu Arg Arg Thr Thr Asn Gly Thr Phe Gly Thr Leu His Val Arg Val
515 520 525

Asn Ser Pro Leu Thr Gln Gln Tyr Arg Leu Arg Val Arg Phe Ala Ser
530 535 540

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

Asp Ala Arg Phe Gly Ser Thr Met Asn Arg Gly Gln Glu Leu Thr Tyr
565 570 575

Glu Ser Phe Val Thr Arg Glu Phe Thr Thr Thr Gly Pro Phe Asn Pro
580 585 590

Pro Phe Thr Phe Thr Gln Thr Gln Glu Ile Leu Thr Val Asn Ala Glu
595 600 605

Gly Val Ser Thr Gly Gly Glu Tyr Tyr Ile Asp Ser Ile Glu Ile Val
610 615 620

Pro Val
625

<210> 11

<211> 336

<212> БІЛОК

<213> *Bacillus thuringiensis*

<400> 11

Met Asn Lys Lys Val Thr Lys Thr Val Leu Ser Val Val Met Gly Ile
1 5 10 15

Ser Val Leu Ala Ser Pro Leu Ala Val Ala Ala Lys Thr Glu Asn Asn
20 25 30

Lys Glu Gln Gln Val Ile Thr Gln Phe Asn Gln Arg Glu Asn Lys Phe
35 40 45

Pro Asp Val Gly Gln Gly Ile Gln Trp Leu Ser Gln Phe Tyr Gly Lys

50		55		60											
Ser 65	Leu 66	Lys 67	Asn 68	Asn 69	Gly 70	Glu 71	Gly 72	Tyr 73	Ser 74	Leu 75	Gly 76	Asn 77	Asp 78	Val 79	Met 80
Ser 85	Tyr 86	Phe 87	Leu 88	Glu 89	Val 90	Lys 91	Asn 92	Ser 93	Tyr 94	Gly 95	Gln 96	Leu 97	Ala 98	Ile 99	Glu 100
Pro 105	Gln 106	Val 107	Ile 108	Ser 109	Thr 110	Thr 111	Pro 112	Leu 113	Trp 114	Ala 115	Gly 116	Gln 117	Ser 118	Asp 119	Leu 120
Glu 125	Asn 126	Ala 127	Thr 128	Asp 129	His 130	Glu 131	Gln 132	Thr 133	Leu 134	Asn 135	Ser 136	Thr 137	Glu 138	Phe 139	Lys 140
Lys 145	Thr 146	Tyr 147	Ser 148	Asn 149	Thr 150	Thr 151	Thr 152	Thr 153	Ser 154	Thr 155	Glu 156	Asn 157	Gly 158	Phe 159	Met 160
Ile 165	Gly 166	Gln 167	Glu 168	Thr 169	Glu 170	Gly 171	Lys 172	Val 173	Gly 174	Ile 175	Pro 176	Phe 177	Val 178	Ala 179	Glu 180
Gly 185	Lys 186	Val 187	Thr 188	Ile 189	Lys 190	Thr 191	Glu 192	Tyr 193	Asn 194	Phe 195	Asn 196	His 197	Thr 198	Asn 199	Gly 200
Tyr 205	Glu 206	Thr 207	Ser 208	Glu 209	Ser 210	Val 211	Glu 212	Tyr 213	Ile 214	Ala 215	Pro 216	Ser 217	Gln 218	Ser 219	Ile 220
Lys 225	Val 226	Pro 227	Pro 228	His 229	Thr 230	Ile 231	Ala 232	Arg 233	Val 234	Thr 235	Ala 236	Leu 237	Leu 238	Asp 239	Val 240
Lys 245	Lys 246	Ile 247	Lys 248	Gly 249	Lys 250	Met 251	His 252	Leu 253	Tyr 254	Ser 255	Glu 256	Ile 257	Gly 258	Leu 259	Asn 260
Lys 265	Asp 266	Tyr 267	Gly 268	Tyr 269	Asp 270	Met 271	Val 272	Pro 273	Leu 274	Val 275	Tyr 276	Lys 277	Tyr 278	Gly 279	Gly 280
Pro 285	Phe 286	Lys 287	Tyr 288	Val 289	Thr 290	Leu 291	Gly 292	Thr 293	Leu 294	Tyr 295	Asp 296	Glu 297	Gly 298	Tyr 299	Lys 300
Gln 305	Ala 306	Gln 307	Leu 308	Asp 309	Tyr 310	Ser 311	Asn 312	Met 313	Gly 314	Asn 315	Val 316	Ile 317	Pro 318	Glu 319	Glu 320
Ile 325	Glu 326	Thr 327	Val 328	Ser 329	Lys 330	Ser 331	Asn 332	Asn 333	Pro 334	Asn 335	His 336	Leu 337	Leu 338	Ala 339	Ser 340
Gly 345	Leu 346	Gly 347	Ile 348	Phe 349	Glu 350	Ser 351	Glu 352	Tyr 353	Gly 354	Ser 355	Val 356	Phe 357	Asn 358	Val 359	Lys 360

Val Glu Tyr Ile Asn Ile Lys Thr Lys Lys Ile Glu Lys Thr Glu Asn
305 310 315 320

Leu Thr Ile Glu Pro Thr Ile Val Pro Val Glu Lys Thr Asn Thr Lys
325 330 335

<210> 12

<211> 323

<212> БИЛОК

<213> *Bacillus thuringiensis*

<400> 12

5

Met Gly Ile Ser Val Leu Ala Ser Pro Leu Ala Val Ala Ala Lys Thr
1 5 10 15

Glu Asn Asn Lys Glu Gln Gln Val Ile Thr Gln Phe Asn Gln Arg Glu
20 25 30

Asn Lys Phe Pro Asp Val Gly Gln Gly Ile Gln Trp Leu Ser Gln Phe
35 40 45

Tyr Gly Lys Ser Leu Lys Asn Asn Gly Glu Gly Tyr Ser Leu Gly Asn
50 55 60

Asp Val Met Ser Tyr Phe Leu Glu Val Lys Asn Ser Tyr Gly Gln Leu
65 70 75 80

Ala Ile Glu Pro Gln Val Ile Ser Thr Thr Pro Leu Trp Ala Gly Gln
85 90 95

Ser Asp Leu Glu Asn Ala Thr Asp His Glu Gln Thr Leu Asn Ser Thr
100 105 110

Glu Phe Lys Lys Thr Tyr Ser Asn Thr Thr Thr Thr Ser Thr Glu Asn
115 120 125

Gly Phe Met Ile Gly Gln Glu Thr Glu Gly Lys Val Gly Ile Pro Phe
130 135 140

Val Ala Glu Gly Lys Val Thr Ile Lys Thr Glu Tyr Asn Phe Asn His
145 150 155 160

Thr Asn Gly Tyr Glu Thr Ser Glu Ser Val Glu Tyr Ile Ala Pro Ser
165 170 175

Gln Ser Ile Lys Val Pro Pro His Thr Ile Ala Arg Val Thr Ala Leu
180 185 190

Leu Asp Val Lys Lys Ile Lys Gly Lys Met His Leu Tyr Ser Glu Ile
195 200 205

Gly Leu Asn Lys Asp Tyr Gly Tyr Asp Met Val Pro Leu Val Tyr Lys
210 215 220

Tyr Gly Gly Pro Phe Lys Tyr Val Thr Leu Gly Thr Leu Tyr Asp Glu
225 230 235 240

Gly Tyr Lys Gln Ala Gln Leu Asp Tyr Ser Asn Met Gly Asn Val Ile
245 250 255

Pro Glu Glu Ile Glu Thr Val Ser Lys Ser Asn Asn Pro Asn His Leu
260 265 270

Leu Ala Ser Gly Leu Gly Ile Phe Glu Ser Glu Tyr Gly Ser Val Phe
275 280 285

Asn Val Lys Val Glu Tyr Ile Asn Ile Lys Thr Lys Lys Ile Glu Lys
290 295 300

Thr Glu Asn Leu Thr Ile Glu Pro Thr Ile Val Pro Val Glu Lys Thr
305 310 315 320

Asn Thr Lys

<210> 13

<211> 310

<212> БИЛОК

<213> Bacillus thuringiensis

<400> 13

Met Lys Thr Glu Asn Asn Lys Glu Gln Gln Val Ile Thr Gln Phe Asn
1 5 10 15

Gln Arg Glu Asn Lys Phe Pro Asp Val Gly Gln Gly Ile Gln Trp Leu
20 25 30

Ser Gln Phe Tyr Gly Lys Ser Leu Lys Asn Asn Gly Glu Gly Tyr Ser
35 40 45

Leu Gly Asn Asp Val Met Ser Tyr Phe Leu Glu Val Lys Asn Ser Tyr
50 55 60

Gly	Gln	Leu	Ala	Ile	Glu	Pro	Gln	Val	Ile	Ser	Thr	Thr	Pro	Leu	Trp	65	70	75	80
Ala	Gly	Gln	Ser	Asp	Leu	Glu	Asn	Ala	Thr	Asp	His	Glu	Gln	Thr	Leu	85	90	95	
Asn	Ser	Thr	Glu	Phe	Lys	Lys	Thr	Tyr	Ser	Asn	Thr	Thr	Thr	Thr	Ser	100	105	110	
Thr	Glu	Asn	Gly	Phe	Met	Ile	Gly	Gln	Glu	Thr	Glu	Gly	Lys	Val	Gly	115	120	125	
Ile	Pro	Phe	Val	Ala	Glu	Gly	Lys	Val	Thr	Ile	Lys	Thr	Glu	Tyr	Asn	130	135	140	
Phe	Asn	His	Thr	Asn	Gly	Tyr	Glu	Thr	Ser	Glu	Ser	Val	Glu	Tyr	Ile	145	150	155	160
Ala	Pro	Ser	Gln	Ser	Ile	Lys	Val	Pro	Pro	His	Thr	Ile	Ala	Arg	Val	165	170	175	
Thr	Ala	Leu	Leu	Asp	Val	Lys	Lys	Ile	Lys	Gly	Lys	Met	His	Leu	Tyr	180	185	190	
Ser	Glu	Ile	Gly	Leu	Asn	Lys	Asp	Tyr	Gly	Tyr	Asp	Met	Val	Pro	Leu	195	200	205	
Val	Tyr	Lys	Tyr	Gly	Gly	Pro	Phe	Lys	Tyr	Val	Thr	Leu	Gly	Thr	Leu	210	215	220	
Tyr	Asp	Glu	Gly	Tyr	Lys	Gln	Ala	Gln	Leu	Asp	Tyr	Ser	Asn	Met	Gly	225	230	235	240
Asn	Val	Ile	Pro	Glu	Glu	Ile	Glu	Thr	Val	Ser	Lys	Ser	Asn	Asn	Pro	245	250	255	
Asn	His	Leu	Leu	Ala	Ser	Gly	Leu	Gly	Ile	Phe	Glu	Ser	Glu	Tyr	Gly	260	265	270	
Ser	Val	Phe	Asn	Val	Lys	Val	Glu	Tyr	Ile	Asn	Ile	Lys	Thr	Lys	Lys	275	280	285	
Ile	Glu	Lys	Thr	Glu	Asn	Leu	Thr	Ile	Glu	Pro	Thr	Ile	Val	Pro	Val	290	295	300	
Glu	Lys	Thr	Asn	Thr	Lys											305	310		

<211> 257

<212> БИЛОК

<213> *Bacillus thuringiensis*

<400> 14

Met Ser Tyr Phe Leu Glu Val Lys Asn Ser Tyr Gly Gln Leu Ala Ile
1 5 10 15

Glu Pro Gln Val Ile Ser Thr Thr Pro Leu Trp Ala Gly Gln Ser Asp
20 25 30

Leu Glu Asn Ala Thr Asp His Glu Gln Thr Leu Asn Ser Thr Glu Phe
35 40 45

Lys Lys Thr Tyr Ser Asn Thr Thr Thr Thr Ser Thr Glu Asn Gly Phe
50 55 60

Met Ile Gly Gln Glu Thr Glu Gly Lys Val Gly Ile Pro Phe Val Ala
65 70 75 80

Glu Gly Lys Val Thr Ile Lys Thr Glu Tyr Asn Phe Asn His Thr Asn
85 90 95

Gly Tyr Glu Thr Ser Glu Ser Val Glu Tyr Ile Ala Pro Ser Gln Ser
100 105 110

Ile Lys Val Pro Pro His Thr Ile Ala Arg Val Thr Ala Leu Leu Asp
115 120 125

Val Lys Lys Ile Lys Gly Lys Met His Leu Tyr Ser Glu Ile Gly Leu
130 135 140

Asn Lys Asp Tyr Gly Tyr Asp Met Val Pro Leu Val Tyr Lys Tyr Gly
145 150 155 160

Gly Pro Phe Lys Tyr Val Thr Leu Gly Thr Leu Tyr Asp Glu Gly Tyr
165 170 175

Lys Gln Ala Gln Leu Asp Tyr Ser Asn Met Gly Asn Val Ile Pro Glu
180 185 190

Glu Ile Glu Thr Val Ser Lys Ser Asn Asn Pro Asn His Leu Leu Ala

5

195

200

205

Ser Gly Leu Gly Ile Phe Glu Ser Glu Tyr Gly Ser Val Phe Asn Val
210 215 220

Lys Val Glu Tyr Ile Asn Ile Lys Thr Lys Lys Ile Glu Lys Thr Glu
225 230 235 240

Asn Leu Thr Ile Glu Pro Thr Ile Val Pro Val Glu Lys Thr Asn Thr
245 250 255

Lys

<210> 15

<211> 341

<212> БИЛОК

5 <213> Bacillus thuringiensis

<400> 15

Met Arg Glu Lys Asp Leu Asn Lys Lys Val Thr Lys Ala Val Leu Ser
1 5 10 15

Met Ile Val Gly Ile Ser Val Leu Ala Ser Pro Leu Ala Val Ala Ala
20 25 30

Lys Thr Glu Asn Asn Lys Glu Gln Gln Val Ile Thr His Phe Asn Gln
35 40 45

Arg Glu Asn Lys Phe Pro Asp Val Gly Gln Gly Ile Gln Trp Leu Ser
50 55 60

Gln Phe Tyr Gly Lys Ser Leu Lys Asn Asn Gly Glu Gly Tyr Ser Leu
65 70 75 80

Gly Gln Asp Val Met Arg Tyr Phe Leu Glu Val Lys Asn Ser Tyr Gly
85 90 95

Gln Leu Ala Met Glu Pro Gln Val Ile Ser Thr Thr Pro Leu Trp Ala
100 105 110

Gly Gln Ser Asp Leu Glu Asn Ala Thr Asp His Glu Gln Thr Leu Asn
115 120 125

Ser Thr Glu Phe Lys Lys Thr Tyr Ser Asn Thr Thr Thr Thr Ser Thr
130 135 140

Glu Asn Gly Phe Met Ile Gly Gln Glu Thr Glu Gly Lys Val Gly Ile
145 150 155 160

Pro Phe Val Ala Glu Gly Lys Val Thr Ile Lys Thr Glu Tyr Asn Phe
165 170 175

Asn His Thr Asn Gly Tyr Glu Thr Ser Glu Ser Val Glu Tyr Ile Ala
180 185 190

Pro Ser Gln Ser Ile Lys Val Pro Pro His Thr Ile Ala Arg Val Thr
195 200 205

Ala Leu Leu Asp Val Lys Lys Ile Lys Gly Lys Met His Leu Tyr Ser
210 215 220

Glu Ile Gly Leu Asn Lys Asp Tyr Gly Tyr Asp Met Val Pro Leu Val
225 230 235 240

Tyr Lys Tyr Gly Gly Pro Phe Lys Tyr Val Thr Leu Gly Thr Leu Tyr
245 250 255

Asp Glu Gly Tyr Lys Gln Ala Gln Leu Asp Tyr Phe Asn Met Gly Asn
260 265 270

Val Ile Pro Glu Glu Ile Glu Thr Val Ser Lys Ser Asn Asn Pro Asn
275 280 285

His Leu Leu Ala Ser Gly Val Gly Ile Phe Glu Ser Glu Tyr Gly Ser
290 295 300

Val Phe Asn Val Lys Val Glu Tyr Ile Asn Ile Asn Thr Lys Lys Ile
305 310 315 320

Glu Lys Thr Glu Asn Leu Thr Ile Glu Pro Thr Ile Val Pro Val Lys
325 330 335

Gln Thr Asn Thr Lys
340

<210> 16

<211> 325

<212> БИЛЮК

<213> Bacillus thuringiensis

<400> 16

Met Ile Val Gly Ile Ser Val Leu Ala Ser Pro Leu Ala Val Ala Ala

1	5	10	15
Lys Thr Glu	Asn Asn Lys Glu Gln Gln Val Ile Thr His Phe Asn Gln		
	20	25	30
Arg Glu Asn Lys Phe Pro Asp Val Gly Gln Gly Ile Gln Trp Leu Ser			
	35	40	45
Gln Phe Tyr Gly Lys Ser Leu Lys Asn Asn Gly Glu Gly Tyr Ser Leu			
	50	55	60
Gly Gln Asp Val Met Arg Tyr Phe Leu Glu Val Lys Asn Ser Tyr Gly			
	65	70	75
Gln Leu Ala Met Glu Pro Gln Val Ile Ser Thr Thr Pro Leu Trp Ala			
	85	90	95
Gly Gln Ser Asp Leu Glu Asn Ala Thr Asp His Glu Gln Thr Leu Asn			
	100	105	110
Ser Thr Glu Phe Lys Lys Thr Tyr Ser Asn Thr Thr Thr Thr Ser Thr			
	115	120	125
Glu Asn Gly Phe Met Ile Gly Gln Glu Thr Glu Gly Lys Val Gly Ile			
	130	135	140
Pro Phe Val Ala Glu Gly Lys Val Thr Ile Lys Thr Glu Tyr Asn Phe			
	145	150	155
Asn His Thr Asn Gly Tyr Glu Thr Ser Glu Ser Val Glu Tyr Ile Ala			
	165	170	175
Pro Ser Gln Ser Ile Lys Val Pro Pro His Thr Ile Ala Arg Val Thr			
	180	185	190
Ala Leu Leu Asp Val Lys Lys Ile Lys Gly Lys Met His Leu Tyr Ser			
	195	200	205
Glu Ile Gly Leu Asn Lys Asp Tyr Gly Tyr Asp Met Val Pro Leu Val			
	210	215	220
Tyr Lys Tyr Gly Gly Pro Phe Lys Tyr Val Thr Leu Gly Thr Leu Tyr			
	225	230	235
Asp Glu Gly Tyr Lys Gln Ala Gln Leu Asp Tyr Phe Asn Met Gly Asn			
	245	250	255

Val Ile Pro Glu Glu Ile Glu Thr Val Ser Lys Ser Asn Asn Pro Asn
260 265 270

His Leu Leu Ala Ser Gly Val Gly Ile Phe Glu Ser Glu Tyr Gly Ser
275 280 285

Val Phe Asn Val Lys Val Glu Tyr Ile Asn Ile Asn Thr Lys Lys Ile
290 295 300

Glu Lys Thr Glu Asn Leu Thr Ile Glu Pro Thr Ile Val Pro Val Lys
305 310 315 320

Gln Thr Asn Thr Lys
325

<210> 17

<211> 315

<212> БИЛОК

<213> *Bacillus thuringiensis*

<400> 17

5

Met Leu Ala Val Ala Ala Lys Thr Glu Asn Asn Lys Glu Gln Gln Val
1 5 10 15

Ile Thr His Phe Asn Gln Arg Glu Asn Lys Phe Pro Asp Val Gly Gln
20 25 30

Gly Ile Gln Trp Leu Ser Gln Phe Tyr Gly Lys Ser Leu Lys Asn Asn
35 40 45

Gly Glu Gly Tyr Ser Leu Gly Gln Asp Val Met Arg Tyr Phe Leu Glu
50 55 60

Val Lys Asn Ser Tyr Gly Gln Leu Ala Met Glu Pro Gln Val Ile Ser
65 70 75 80

Thr Thr Pro Leu Trp Ala Gly Gln Ser Asp Leu Glu Asn Ala Thr Asp
85 90 95

His Glu Gln Thr Leu Asn Ser Thr Glu Phe Lys Lys Thr Tyr Ser Asn
100 105 110

Thr Thr Thr Thr Ser Thr Glu Asn Gly Phe Met Ile Gly Gln Glu Thr
115 120 125

Glu Gly Lys Val Gly Ile Pro Phe Val Ala Glu Gly Lys Val Thr Ile
130 135 140

Lys Thr Glu Tyr Asn Phe Asn His Thr Asn Gly Tyr Glu Thr Ser Glu
145 150 155 160

Ser Val Glu Tyr Ile Ala Pro Ser Gln Ser Ile Lys Val Pro Pro His
165 170 175

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

Lys Met His Leu Tyr Ser Glu Ile Gly Leu Asn Lys Asp Tyr Gly Tyr
195 200 205

Asp Met Val Pro Leu Val Tyr Lys Tyr Gly Gly Pro Phe Lys Tyr Val
210 215 220

Thr Leu Gly Thr Leu Tyr Asp Glu Gly Tyr Lys Gln Ala Gln Leu Asp
225 230 235 240

Tyr Phe Asn Met Gly Asn Val Ile Pro Glu Glu Ile Glu Thr Val Ser
245 250 255

Lys Ser Asn Asn Pro Asn His Leu Leu Ala Ser Gly Val Gly Ile Phe
260 265 270

Glu Ser Glu Tyr Gly Ser Val Phe Asn Val Lys Val Glu Tyr Ile Asn
275 280 285

Ile Asn Thr Lys Lys Ile Glu Lys Thr Glu Asn Leu Thr Ile Glu Pro
290 295 300

Thr Ile Val Pro Val Lys Gln Thr Asn Thr Lys
305 310 315

5 <210> 18
<211> 257
<212> БІЛОК
<213> Bacillus thuringiensis
<400> 18

Met Arg Tyr Phe Leu Glu Val Lys Asn Ser Tyr Gly Gln Leu Ala Met
1 5 10 15

Glu Pro Gln Val Ile Ser Thr Thr Pro Leu Trp Ala Gly Gln Ser Asp
20 25 30

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

Lys

<210> 19
 <211> 242
 <212> БИЛЮК
 <213> Bacillus thuringiensis
 <400> 19

Met Glu Pro Gln Val Ile Ser Thr Thr Pro Leu Trp Ala Gly Gln Ser
1 5 10 15

Asp Leu Glu Asn Ala Thr Asp His Glu Gln Thr Leu Asn Ser Thr Glu
20 25 30

Phe Lys Lys Thr Tyr Ser Asn Thr Thr Thr Thr Ser Thr Glu Asn Gly
35 40 45

Phe Met Ile Gly Gln Glu Thr Glu Gly Lys Val Gly Ile Pro Phe Val
50 55 60

Ala Glu Gly Lys Val Thr Ile Lys Thr Glu Tyr Asn Phe Asn His Thr
65 70 75 80

Asn Gly Tyr Glu Thr Ser Glu Ser Val Glu Tyr Ile Ala Pro Ser Gln
85 90 95

Ser Ile Lys Val Pro Pro His Thr Ile Ala Arg Val Thr Ala Leu Leu
100 105 110

Asp Val Lys Lys Ile Lys Gly Lys Met His Leu Tyr Ser Glu Ile Gly
115 120 125

Leu Asn Lys Asp Tyr Gly Tyr Asp Met Val Pro Leu Val Tyr Lys Tyr
130 135 140

Gly Gly Pro Phe Lys Tyr Val Thr Leu Gly Thr Leu Tyr Asp Glu Gly
145 150 155 160

Tyr Lys Gln Ala Gln Leu Asp Tyr Phe Asn Met Gly Asn Val Ile Pro
165 170 175

Glu Glu Ile Glu Thr Val Ser Lys Ser Asn Asn Pro Asn His Leu Leu
180 185 190

Ala Ser Gly Val Gly Ile Phe Glu Ser Glu Tyr Gly Ser Val Phe Asn
195 200 205

Val Lys Val Glu Tyr Ile Asn Ile Asn Thr Lys Lys Ile Glu Lys Thr
210 215 220

Glu Asn Leu Thr Ile Glu Pro Thr Ile Val Pro Val Lys Gln Thr Asn
225 230 235 240

Thr Lys

<210> 20

<211> 343

<212> БИЛОК

<213> Bacillus thuringiensis

5

<400> 20

Met Arg Glu Lys Asp Met Asp Lys Lys Ile Thr Lys Ala Ala Leu Ser
1 5 10 15

Met Ile Met Gly Ile Ser Val Leu Ser Ser Pro Leu Ala Val Ala Ala
20 25 30

Lys Thr Glu Asn Asn Lys Glu Gln His Val Ile Thr Gln Phe Asn Gln
35 40 45

Arg Glu Asn Lys Phe Pro Asp Val Gly Gln Gly Ile Gln Trp Leu Ser
50 55 60

Gln Phe Tyr Gly Lys Ser Leu Lys Asn Asn Gly Glu Gly Tyr Ser Leu
65 70 75 80

Gly Gln Asp Val Met Ser Tyr Phe Leu Glu Val Lys Asn Ser Tyr Gly
85 90 95

Gln Leu Ala Met Glu Pro Gln Val Ile Ser Thr Thr Pro Leu Trp Ala
100 105 110

Gly Gln Ser Asp Leu Glu Asn Ala Thr Asp His Glu Gln Thr Leu Asn
115 120 125

Ser Thr Glu Phe Lys Lys Thr Tyr Ser Asn Thr Thr Thr Ser Thr
130 135 140

Glu Asn Gly Phe Met Ile Gly Gln Glu Thr Glu Gly Lys Val Gly Ile
145 150 155 160

Pro Phe Val Ala Glu Gly Lys Val Thr Ile Lys Thr Glu Tyr Asn Phe
165 170 175

Asn His Thr Asn Gly Tyr Glu Thr Ser Glu Ser Val Glu Tyr Ile Ala
180 185 190

Pro Ser Gln Ser Ile Lys Val Pro Pro His Thr Ile Ala Arg Val Thr
195 200 205

Ala Leu Leu Asp Val Lys Lys Ile Lys Gly Lys Met His Leu Tyr Ser
210 215 220

Glu Ile Gly Leu Asn Lys Asp Tyr Gly Tyr Asp Met Val Pro Leu Val
225 230 235 240

Tyr Lys Tyr Gly Gly Pro Phe Lys Tyr Val Thr Leu Gly Thr Leu Tyr
245 250 255

Asp Glu Gly Tyr Lys Gln Ala Gln Leu Asp Tyr Phe Asn Met Gly Asn
260 265 270

Val Ile Pro Glu Glu Ile Glu Thr Val Ser Lys Ser Asn Asn Pro Asn
275 280 285

His Leu Leu Ala Ser Gly Val Gly Ile Phe Glu Ser Glu Tyr Gly Ser
290 295 300

Val Phe Asn Val Lys Val Glu Tyr Ile Asn Ile Asn Thr Lys Lys Ile
305 310 315 320

Glu Lys Thr Glu Asn Leu Thr Ile Glu Pro Thr Ile Val Pro Val Lys
325 330 335

Gln Thr Asn Thr Asn Thr Lys
340

<210> 21

<211> 338

<212> БИЛОК

<213> Bacillus thuringiensis

<400> 21

Met Asp Lys Lys Ile Thr Lys Ala Ala Leu Ser Met Ile Met Gly Ile
1 5 10 15

Ser Val Leu Ser Ser Pro Leu Ala Val Ala Ala Lys Thr Glu Asn Asn
20 25 30

Lys Glu Gln His Val Ile Thr Gln Phe Asn Gln Arg Glu Asn Lys Phe

35	40	45
Pro Asp Val Gly Gln Gly Ile Gln Trp Leu Ser Gln Phe Tyr Gly Lys		
50	55	60
Ser Leu Lys Asn Asn Gly Glu Gly Tyr Ser Leu Gly Gln Asp Val Met		
65	70	75
Ser Tyr Phe Leu Glu Val Lys Asn Ser Tyr Gly Gln Leu Ala Met Glu		
85	90	95
Pro Gln Val Ile Ser Thr Thr Pro Leu Trp Ala Gly Gln Ser Asp Leu		
100	105	110
Glu Asn Ala Thr Asp His Glu Gln Thr Leu Asn Ser Thr Glu Phe Lys		
115	120	125
Lys Thr Tyr Ser Asn Thr Thr Thr Thr Ser Thr Glu Asn Gly Phe Met		
130	135	140
Ile Gly Gln Glu Thr Glu Gly Lys Val Gly Ile Pro Phe Val Ala Glu		
145	150	155
Gly Lys Val Thr Ile Lys Thr Glu Tyr Asn Phe Asn His Thr Asn Gly		
165	170	175
Tyr Glu Thr Ser Glu Ser Val Glu Tyr Ile Ala Pro Ser Gln Ser Ile		
180	185	190
Lys Val Pro Pro His Thr Ile Ala Arg Val Thr Ala Leu Leu Asp Val		
195	200	205
Lys Lys Ile Lys Gly Lys Met His Leu Tyr Ser Glu Ile Gly Leu Asn		
210	215	220
Lys Asp Tyr Gly Tyr Asp Met Val Pro Leu Val Tyr Lys Tyr Gly Gly		
225	230	235
Pro Phe Lys Tyr Val Thr Leu Gly Thr Leu Tyr Asp Glu Gly Tyr Lys		
245	250	255
Gln Ala Gln Leu Asp Tyr Phe Asn Met Gly Asn Val Ile Pro Glu Glu		
260	265	270
Ile Glu Thr Val Ser Lys Ser Asn Asn Pro Asn His Leu Leu Ala Ser		
275	280	285

Gly Val Gly Ile Phe Glu Ser Glu Tyr Gly Ser Val Phe Asn Val Lys
290 295 300

Val Glu Tyr Ile Asn Ile Asn Thr Lys Lys Ile Glu Lys Thr Glu Asn
305 310 315 320

Leu Thr Ile Glu Pro Thr Ile Val Pro Val Lys Gln Thr Asn Thr Asn
325 330 335

Thr Lys

<210> 22

<211> 327

<212> БИЛОК

5 <213> *Bacillus thuringiensis*

<400> 22

Met Ile Met Gly Ile Ser Val Leu Ser Ser Pro Leu Ala Val Ala Ala
1 5 10 15

Lys Thr Glu Asn Asn Lys Glu Gln His Val Ile Thr Gln Phe Asn Gln
20 25 30

Arg Glu Asn Lys Phe Pro Asp Val Gly Gln Gly Ile Gln Trp Leu Ser
35 40 45

Gln Phe Tyr Gly Lys Ser Leu Lys Asn Asn Gly Glu Gly Tyr Ser Leu
50 55 60

Gly Gln Asp Val Met Ser Tyr Phe Leu Glu Val Lys Asn Ser Tyr Gly
65 70 75 80

Gln Leu Ala Met Glu Pro Gln Val Ile Ser Thr Thr Pro Leu Trp Ala
85 90 95

Gly Gln Ser Asp Leu Glu Asn Ala Thr Asp His Glu Gln Thr Leu Asn
100 105 110

Ser Thr Glu Phe Lys Lys Thr Tyr Ser Asn Thr Thr Thr Thr Ser Thr
115 120 125

Glu Asn Gly Phe Met Ile Gly Gln Glu Thr Glu Gly Lys Val Gly Ile
130 135 140

Pro Phe Val Ala Glu Gly Lys Val Thr Ile Lys Thr Glu Tyr Asn Phe
145 150 155 160

Asn His Thr Asn Gly Tyr Glu Thr Ser Glu Ser Val Glu Tyr Ile Ala
165 170 175

Pro Ser Gln Ser Ile Lys Val Pro Pro His Thr Ile Ala Arg Val Thr
180 185 190

Ala Leu Leu Asp Val Lys Lys Ile Lys Gly Lys Met His Leu Tyr Ser
195 200 205

Glu Ile Gly Leu Asn Lys Asp Tyr Gly Tyr Asp Met Val Pro Leu Val
210 215 220

Tyr Lys Tyr Gly Gly Pro Phe Lys Tyr Val Thr Leu Gly Thr Leu Tyr
225 230 235 240

Asp Glu Gly Tyr Lys Gln Ala Gln Leu Asp Tyr Phe Asn Met Gly Asn
245 250 255

Val Ile Pro Glu Glu Ile Glu Thr Val Ser Lys Ser Asn Asn Pro Asn
260 265 270

His Leu Leu Ala Ser Gly Val Gly Ile Phe Glu Ser Glu Tyr Gly Ser
275 280 285

Val Phe Asn Val Lys Val Glu Tyr Ile Asn Ile Asn Thr Lys Lys Ile
290 295 300

Glu Lys Thr Glu Asn Leu Thr Ile Glu Pro Thr Ile Val Pro Val Lys
305 310 315 320

Gln Thr Asn Thr Asn Thr Lys
325

<210> 23

<211> 325

<212> БІЛОК

<213> *Bacillus thuringiensis*

<400> 23

Met Gly Ile Ser Val Leu Ser Ser Pro Leu Ala Val Ala Ala Lys Thr
1 5 10 15

Glu Asn Asn Lys Glu Gln His Val Ile Thr Gln Phe Asn Gln Arg Glu
20 25 30

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

Leu Ala Ser Gly Val Gly Ile Phe Glu Ser Glu Tyr Gly Ser Val Phe
275 280 285

Asn Val Lys Val Glu Tyr Ile Asn Ile Asn Thr Lys Lys Ile Glu Lys
290 295 300

Thr Glu Asn Leu Thr Ile Glu Pro Thr Ile Val Pro Val Lys Gln Thr
305 310 315 320

Asn Thr Asn Thr Lys
325

<210> 24

<211> 259

<212> БИЖОК

<213> Bacillus thuringiensis

<400> 24

5

Met Ser Tyr Phe Leu Glu Val Lys Asn Ser Tyr Gly Gln Leu Ala Met
1 5 10 15

Glu Pro Gln Val Ile Ser Thr Thr Pro Leu Trp Ala Gly Gln Ser Asp
20 25 30

Leu Glu Asn Ala Thr Asp His Glu Gln Thr Leu Asn Ser Thr Glu Phe
35 40 45

Lys Lys Thr Tyr Ser Asn Thr Thr Thr Thr Ser Thr Glu Asn Gly Phe
50 55 60

Met Ile Gly Gln Glu Thr Glu Gly Lys Val Gly Ile Pro Phe Val Ala
65 70 75 80

Glu Gly Lys Val Thr Ile Lys Thr Glu Tyr Asn Phe Asn His Thr Asn
85 90 95

Gly Tyr Glu Thr Ser Glu Ser Val Glu Tyr Ile Ala Pro Ser Gln Ser
100 105 110

Ile Lys Val Pro Pro His Thr Ile Ala Arg Val Thr Ala Leu Leu Asp
115 120 125

Val Lys Lys Ile Lys Gly Lys Met His Leu Tyr Ser Glu Ile Gly Leu
130 135 140

Asn Lys Asp Tyr Gly Tyr Asp Met Val Pro Leu Val Tyr Lys Tyr Gly

145											150											155											160
Gly	Pro	Phe	Lys	Tyr	Val	Thr	Leu	Gly	Thr	Leu	Tyr	Asp	Glu	Gly	Tyr																		
				165					170								175																
Lys	Gln	Ala	Gln	Leu	Asp	Tyr	Phe	Asn	Met	Gly	Asn	Val	Ile	Pro	Glu																		
				180					185								190																
Glu	Ile	Glu	Thr	Val	Ser	Lys	Ser	Asn	Asn	Pro	Asn	His	Leu	Leu	Ala																		
				195					200								205																
Ser	Gly	Val	Gly	Ile	Phe	Glu	Ser	Glu	Tyr	Gly	Ser	Val	Phe	Asn	Val																		
				210					215								220																
Lys	Val	Glu	Tyr	Ile	Asn	Ile	Asn	Thr	Lys	Lys	Ile	Glu	Lys	Thr	Glu																		
225					230								235								240												
Asn	Leu	Thr	Ile	Glu	Pro	Thr	Ile	Val	Pro	Val	Lys	Gln	Thr	Asn	Thr																		
				245					250								255																

Asn Thr Lys

<210> 25

$\langle 211 \rangle$ 244

<212> БІЛОК

<213> *Bacillus thuringiensis*

<400> 25

Met Glu Pro Gln Val Ile Ser Thr Thr Pro Leu Trp Ala Gly Gln Ser
1 5 10 15

Asp Leu Glu Asn Ala Thr Asp His Glu Gln Thr Leu Asn Ser Thr Glu
20 25 30

Phe Lys Lys Thr Tyr Ser Asn Thr Thr Thr Thr Ser Thr Glu Asn Gly
35 40 45

Phe Met Ile Gly Gln Glu Thr Glu Gly Lys Val Gly Ile Pro Phe Val
50 55 60

Ala Glu Gly Lys Val Thr Ile Lys Thr Glu Tyr Asn Phe Asn His Thr
65 70 75 80

Asn Gly Tyr Glu Thr Ser Glu Ser Val Glu Tyr Ile Ala Pro Ser Gln
85 90 95

Ser Ile Lys Val Pro Pro His Thr Ile Ala Arg Val Thr Ala Leu Leu
100 105 110

Asp Val Lys Lys Ile Lys Gly Lys Met His Leu Tyr Ser Glu Ile Gly
115 120 125

Leu Asn Lys Asp Tyr Gly Tyr Asp Met Val Pro Leu Val Tyr Lys Tyr
130 135 140

Gly Gly Pro Phe Lys Tyr Val Thr Leu Gly Thr Leu Tyr Asp Glu Gly
145 150 155 160

Tyr Lys Gln Ala Gln Leu Asp Tyr Phe Asn Met Gly Asn Val Ile Pro
165 170 175

Glu Glu Ile Glu Thr Val Ser Lys Ser Asn Asn Pro Asn His Leu Leu
180 185 190

Ala Ser Gly Val Gly Ile Phe Glu Ser Glu Tyr Gly Ser Val Phe Asn
195 200 205

Val Lys Val Glu Tyr Ile Asn Ile Asn Thr Lys Lys Ile Glu Lys Thr
210 215 220

Glu Asn Leu Thr Ile Glu Pro Thr Ile Val Pro Val Lys Gln Thr Asn
225 230 235 240

Thr Asn Thr Lys

<210> 26

<211> 312

<212> БИЛОК

<213> Bacillus thuringiensis

<400> 26

Met Lys Thr Glu Asn Asn Lys Glu Gln His Val Ile Thr Gln Phe Asn
1 5 10 15

Gln Arg Glu Asn Lys Phe Pro Asp Val Gly Gln Gly Ile Gln Trp Leu
20 25 30

Ser Gln Phe Tyr Gly Lys Ser Leu Lys Asn Asn Gly Glu Gly Tyr Ser
35 40 45

Leu Gly Gln Asp Val Met Ser Tyr Phe Leu Glu Val Lys Asn Ser Tyr

UA 122475 C2

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

Lys Gln Thr Asn Thr Asn Thr Lys
305 310

<210> 27

<211> 4

<212> БЛОК

5 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Пептид, націлений на ендоплазматичний ретикулум

<400> 27

Lys Asp Glu Leu

1

10

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

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 під SEQ ID NO:3;
 - б) нуклеотидної послідовності, що кодує поліпептид, який містить амінокислотну послідовність під будь-яким SEQ ID NO:15-19;
 - в) нуклеотидної послідовності, що кодує поліпептид, який містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична амінокислотній послідовності під будь-яким SEQ ID NO:15-19.
2. Молекула рекомбінантної нуклеїнової кислоти за п. 1, де зазначена нуклеотидна послідовність є синтетичною послідовністю, яка була сконструйована для експресії у рослині.
3. Молекула рекомбінантної нуклеїнової кислоти за п. 1, де зазначена нуклеотидна послідовність функціонально пов'язана з промотором, здатним керувати експресією зазначеної нуклеотидної послідовності у клітині рослини.
4. Вектор, що містить молекулу рекомбінантної нуклеїнової кислоти за п. 1.
5. Вектор за п. 4, що додатково містить молекулу нуклеїнової кислоти, яка кодує гетерологічний поліпептид.
6. Клітина-хазяїн, що містить рекомбінантну нуклеїнову кислоту за п. 1.
7. Клітина-хазяїн за п. 6, яка є бактеріальною клітиною-хазяїном.
8. Клітина-хазяїн за п. 6, яка є клітиною рослини.
9. Трансгенна рослина, що містить клітину-хазяїна за п. 8.
10. Трансгенна рослина за п. 9, де зазначена рослина вибрана з групи, яка складається з маїсу, сорго, пшениці, капусти, соняшника, томата, хрестоцвітих, різновидів перцю, картоплі, бавовнику, рису, сої, цукрового буряка, цукрової тростини, тютюну, ячменю та олійного ріпаку.
11. Трансгенна насінина, що містить молекулу нуклеїнової кислоти за п. 1.
12. Рекомбінантний поліпептид з пестицидною активністю, вибраний з групи, що складається з:
 - а) поліпептиду, що містить амінокислотну послідовність під будь-яким SEQ ID NO:15-19; та
 - б) поліпептиду, що містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична амінокислотній послідовності під будь-яким SEQ ID NO:15-19.
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, спрею, емульсії, колоїду та розчину.
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 приблизно 1 % до приблизно 99 % за масою зазначеного поліпептиду.
18. Спосіб контролю популяції лускокрилого, напівтвердокрилого, твердокрилого шкідника, нематоди-шкідника або двокрилого шкідника, що включає приведення зазначеної популяції у контакт з пестицидно-ефективною кількістю поліпептиду за п. 12.
19. Спосіб знищення лускокрилого, напівтвердокрилого, твердокрилого шкідника, нематоди-шкідника або двокрилого шкідника, що включає приведення зазначеного шкідника у контакт з пестицидно-ефективною кількістю поліпептиду за п. 12 або її згодовування зазначеному шкідникові.

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.
21. Рослина або клітина рослини зі стабільно вбудованою в її геном ДНК-конструкцією, що містить нуклеотидну послідовність, яка кодує білок з пестицидною активністю, де зазначена нуклеотидна послідовність вибрана з групи, яка складається з:
- а) нуклеотидної послідовності, викладеної під SEQ ID NO:3;
 - б) нуклеотидної послідовності, що кодує поліпептид, який містить амінокислотну послідовність під будь-яким SEQ ID NO:15-19; та
 - в) нуклеотидної послідовності, що кодує поліпептид, який містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична амінокислотній послідовності під будь-яким SEQ ID NO:15-19.
22. Спосіб захисту рослини від шкідника, який включає експресію в рослині або її клітині нуклеотидної послідовності, що кодує пестицидний поліпептид, де зазначена нуклеотидна послідовність вибрана з групи, яка складається з:
- а) нуклеотидної послідовності, викладеної під SEQ ID NO:3;
 - б) нуклеотидної послідовності, що кодує поліпептид, який містить амінокислотну послідовність під будь-яким SEQ ID NO:15-19; та
 - в) нуклеотидної послідовності, що кодує поліпептид, який містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична амінокислотній послідовності під будь-яким SEQ ID NO:15-19.
23. Спосіб за п. 22, де зазначена рослина продукує пестицидний поліпептид, який має пестицидну активність щодо лускокрилого, напівтвердокрилого, твердокрилого шкідника, нематоди-шкідника або двокрилого шкідника.
24. Спосіб підвищення врожайності рослини, що включає вирощування у полі рослини або її насінини зі стабільно вбудованою у її геном ДНК-конструкцією, що містить нуклеотидну послідовність, яка кодує білок із пестицидною активністю, де зазначена нуклеотидна послідовність вибрана з групи, яка складається з:
- а) нуклеотидної послідовності, викладеної під SEQ ID NO:3;
 - б) нуклеотидної послідовності, що кодує поліпептид, який містить амінокислотну послідовність під будь-яким SEQ ID NO:15-19; та
 - в) нуклеотидної послідовності, що кодує поліпептид, який містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична амінокислотній послідовності під будь-яким SEQ ID NO:15-19;
- при цьому зазначене поле заражене шкідником, щодо якого зазначений поліпептид проявляє пестицидну активність.