



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **113273** (13) **C2**
(51) МПК (2016.01)

A01H 5/00

A01H 5/10 (2006.01)

A01N 63/02 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

C07K 14/325 (2006.01)

A01P 7/04 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2012 08557**
(22) Дата подання заявки: **16.12.2010**
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **10.01.2017**
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **61/284,252**
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **16.12.2009**
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **US**
(41) Публікація відомостей про заявку: **10.10.2012, Бюл.№ 19**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **10.01.2017, Бюл.№ 1**
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **РСТ/US2010/060815, 16.12.2010**

(72) Винахідник(и):
**Мід Томас (US),
Нарва Кенет (US),
Сторер Ніколас П. (US),
Шитс Джоел Дж. (US),
Вуслі Ерон Т. (US),
Бертон Стефані Л. (US)**
(73) Власник(и):
**ДАУ АГРОСАЄНСИЗ ЕЛЕЛСІ,
9330 Zionsville Road, Indianapolis, IN 46268,
United States of America (US)**
(74) Представник:
**Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр.
№115**
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
US 20050155103 A1, 14.07.2005
US 20040133942 A1, 08.07.2004
US 20050216969 A1, 29.09.2005
US 20030084606 A1, 08.05.2003
US 20100235951 A1, 16.09.2010
US 2009165359 A1, 02.07.2009
EP 0400246 A1, 05.12.1990
US 2007006340 A1, 04.01.2007
Roush R. T., "Two-toxin strategies for management of insecticidal transgenic crops: can pyramiding succeed where pesticide mixtures have not?", Philosophical Transactions. Royal Society of London. Biological Sciences, Royal Society, London, GB, 1998, vol. 353, no. 1376, doi:10.1098/RSTB.1998.0330, ISSN 0962-8436, pages 1777 – 1786
Gutierrez et al., "Physiologically based demographics of Bt cotton-pest interactions I. Pink bollworm resistance, refuge and risk", Ecological Modelling, 2006, vol. 191, no. 3-4, pages 346 - 359
Bravo A., Soberón M. How to cope with insect resistance to Bt toxins? Trends in Biotechnology, Elsevier Publications, Cambridge, GB, vol. 26, no. 10, doi:10.1016/J.tibtech.2008.06.005, ISSN 0167-7799, 2008, pages 573 – 579

UA 113273 C2

(54) ТРАНСГЕННА РОСЛИНА, ЯКА МІСТИТЬ ДНК, ЩО КОДУЄ І ЕКСПРЕСУЄ ІНСЕКТИЦИДНИЙ БІЛОК Cry1Da, І ДНК, ЩО КОДУЄ І ЕКСПРЕСУЄ ІНСЕКТИЦИДНИЙ БІЛОК Cry1Fa, ДЛЯ БОРОТЬБИ З СОВКОЮ ТРАВ'ЯНОЮ

(57) Реферат:

Даний винахід стосується трансгенних рослин, які містять ДНК, що кодує і експресує інсектицидний білок Cry1Da, і ДНК, що кодує і експресує інсектицидний білок Cry1Fa. Вказані білки не конкурують один з одним за зв'язування з кишковими рецепторами совки трав'яної (FAW). Даний винахід також описує способи боротьби з лускокрилим шкідником *Spodoptera frugiperda*. Вказані способи дозволяють сповільнювати або попереджати вироблення резистентності у вказаної комахи до цих білків.

Попередній рівень техніки

Людина вирощує кукурудзу для вживання в їжу і для енергетичних цілей. Людина також вирощує множину інших культур, включаючи сою і бавовну. Комахи поїдають і пошкоджують рослини, і тим самим наносять збиток діяльності людини. Для боротьби з комахами-шкідниками щорічно витрачаються мільярди доларів, і ще мільярди йдуть на відшкодування збитку, що наноситься цими шкідниками. Інсектициди, синтезовані методами органічної хімії, є головним інструментом, що використовується для боротьби з комахами-шкідниками, але в деяких регіонах, в боротьбі з комахами-шкідниками важливу роль грають біологічні інсектициди, такі як інсектицидні білки, що відбуваються від *Bacillus thuringiensis* (Bt). Можливість культивувати резистентні до комах рослини за допомогою трансформації цих рослин генами інсектицидних білків Bt була революцією в сучасному сільському господарстві і довела важливість і цінність інсектицидних білків і їх генів.

Деякі білки Bt були використані для створення резистентних до комах трансгенних рослин, які успішно пройшли випробування, і в цей час їх виготовляють в промисловому масштабі. Такими білками є Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1F і Cry3Bb, що вводяться в кукурудзу, Cry1Ac і Cry2Ab, що вводяться в бавовник, і Cry3A, що вводиться в картоплю.

Комерційно доступні продукти, експресуючі ці білки, експресують тільки один з цих білків, за винятком випадків, коли бажано отримати комбінований інсектицидний спектр з 2 білків (наприклад, в кукурудзі, Cry1Ab і Cry3Bb об'єднані для вироблення резистентності до лускокрилих шкідників і кореневих личинок, відповідно), або випадків, коли незалежна дія цих білків робить їх цінним інструментом для сповільнення розвитку резистентності до інсектицидів у сприйнятливих популяцій комах (наприклад, Cry1Ac і Cry2Ab в бавовнику об'єднують з метою вироблення у рослин резистентності до тютюнової листовійки).

Тобто, деякі сорти резистентних до комах трансгенних рослин, які швидко і повсюдно пристосовуються до цієї технології, також мають той недолік, що популяції шкідників виробляють резистентність до інсектицидних білків, що продукується цими рослинами. Було запропоновано декілька стратегій для збереження цінних ознак резистентності до Bt-комах, де вказані стратегії включають використання високих доз білків в комбінації із збереженням площ "сховищ" нетрансгенних рослин, і чергування або спільного використання різних токсинів (McGaughey et al. (1998), "Bt-Resistance Management" *Nature Biotechnol.* 16: 144-146).

Необхідно, щоб білки, відібрані для використання в IRM-кластерах, мали незалежну інсектицидну дію, при якій резистентність, що виробляється до одного білка, не розповсюджувалася на інший білок (тобто, не спостерігалася перехресна резистентність до білків). Так, наприклад, якщо популяція комах, вибраних на резистентність до "білка А", є сприйнятною до "білка В", то можна зробити висновок, що в цьому випадку перехресна резистентність відсутня, і комбінація "білок А і білок В" буде ефективною для сповільнення вироблення резистентності до одного білка А.

У випадку за відсутності популяції резистентних комах, оцінка може бути зроблена виходячи з інших характеристик, які, як передбачається, стосуються механізму дії і можливої перехресної резистентності. Було висловлене припущення, що застосування опосередкованого рецептором зв'язування при ідентифікації інсектицидних білків, очевидно, не буде приводити до вироблення перехресної резистентності. (van Mellaert et al. 1999). Ключовим прогностичним фактором відсутності перехресної резистентності, що з'являється при такому підході, є те, що інсектицидні білки не конкурують за зв'язування з рецепторами у сприйнятливих видів комах.

У випадку, коли два токсини Bt конкурують за зв'язування з одним і тим же рецептором, і якщо цей рецептор мутує у комахі так, що один з токсинів більше не зв'язується з цим рецептором, а тому не має інсектицидної дії проти комах, то така комаха може набувати резистентності до другого токсину (який конкурентно зв'язується з тим же рецептором). Тобто, можна сказати, що така комаха буде мати перехресну резистентність до обох токсинів Bt. Однак, якщо два токсини зв'язуються з двома різними рецепторами, то це означає, що така комаха не має одночасної резистентності до цих двох токсинів.

Cry1Fa може бути використаний для боротьби з лускокрилими шкідниками багатьох видів, включаючи Європейського кукурудзяного трача (ECB; *Ostrinia nubilalis* (Hubner)) і совку трав'яну (FAW; *Spodoptera frugiperda*), і має активність проти бурякового трача (SCB; *Diatraea saccharalis*). Білок Cry1Fa, що продукується в рослинах кукурудзи, які містять модифікацію TC1507, відповідальний за вироблення ознаки резистентності до комах, і цей білок застосовується у провідних галузях промисловості для боротьби з совкою трав'яною (FAW). Cry1Fa також використовується в продуктах Herculex®, SmartStax™ і WideStrike™.

Можливість провести дослідження на зв'язування з рецептором (конкурентне або гомологічне) з використанням білка Cry1Fa має певні обмеження, оскільки при застосуванні

більшості методів мічення білків для детектування в аналізах на зв'язування з рецептором відбувається інактивація інсектицидної активності білка Cry1Fa.

Додаткові токсини Cry перераховані на web-сайті офісу Комітету по номенклатурі B.t. (Crickmore et al; lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/). Див. Додаток А в даній заявці. У цей час відомо приблизно 60 основних груп токсинів "Cry" (Cry1-Cry59), і крім того, існують інші токсини, такі як токсини Cyt і токсини VIP і т. п. Багато токсинів з кожної пронумерованої групи мають підгрупи, позначені великими буквами, а підгрупи, позначені великими буквами, в свою чергу, поділяються на підгрупи (суб-підгрупи), позначені малими буквами (наприклад, Cry1 має підгрупу A-L, а Cry1A має підгрупу a-i).

Короткий опис суті винаходу

Даний винахід частково оснований на несподіваному виявленні того факту, що популяція трав'яної совки (*Spodoptera frugiperda*; FAW), відібрана на резистентність до інсектицидної активності білка Cry1Fa, не є резистентною до інсектицидної активності білка Cry1Ca. Для фахівця в даній галузі очевидно, що перевага такого відкриття полягає в тому, що рослини, експресуючі ці два інсектицидні білки або їх інсектицидні частини, можуть бути використані для сповільнення або попередження розвитку резистентності до будь-якого з цих окремо взятих інсектицидних білків.

Даний винахід також підтверджений виявленням того факту, що Cry1Fa і Cry1Da не конкурують один з одним за зв'язування з кишковими рецепторами совки трав'яної (FAW).

Даний винахід також стосується, зокрема, трикомпонентних кластерів або "пірамід" з трьох (або більше) токсинів, де токсини Cry1Fa і Cry1Da являють собою базову пару. Одна з переважних пірамід включає щонайменше два білки, що не мають перехресну резистентність до двох шкідників - до FAW і до ECB (Європейського кукурудзяного трача; *Ostrinia nubilalis*); Cry1Fa плюс Cry1Da плюс один або декілька анти-ECB токсинів, таких як Cry1Ab. У деяких переважних варіантах піраміди, вибрані токсини мають три різні механізми дії проти FAW. Цими переважними пірамідними комбінаціями з "трьома механізмами дії" є Cry1Fa плюс Cry1D плюс інший токсин/ген, вибраний з групи, яка складається з Vip3Ab, Cry1C, Cry1Be і Cry1E. Рослини (і посівні площі, засіяні такими рослинами), які продукують ці три токсини, входять в об'єм даного винаходу. Можуть бути також додані додаткові токсини/ген, але ці конкретні трикомпонентні кластери, відповідно до даного винаходу, будуть, як несподівано було виявлено, переважно діяти проти FAW по трьох механізмах. Це допоможе знизити або взагалі уникнути потреби в площах-"сховищах" нетрансгенних культур. У загальних рисах, даний винахід також стосується застосування трьох інсектицидних білків (в деяких переважних варіантах, білків Cry), які не конкурують один з одним проти одного шкідника-мішені.

Таким чином, Cry1Da може бути використаний у вигляді комбінації з 3 генів для кукурудзи і інших рослин (наприклад, бавовнику і сої). Ген Cry1Da може бути введений, наприклад, в продукт Cry1Fa, такий як Herculex®, Smarts tax™ і Wides Strike™. Відповідно до цього, використання Cry1Da може мати важливе значення для зниження тиску відбору на інші промислові білки.

Короткий опис графічного матеріалу

Фігура 1: Пошкодження (середній % пошкодження листя + сер. кв. пом.) сегментів листя кукурудзи, уражених FAW (сині стовпці) або rFAW (пурпурові стовпці). Всі оброблювані зразки, перед яким стоять числа "5163", являють собою сегменти від рослин, трансформованих конструкцією, що містить Cry1Da. Рослини, в яких не була детектована експресія Cry1Da, були розділені на групи, вказані в лівій крайній частині графіка. Рослини, в яких детектувалась експресія Cry1Da, були розділені на групи, вказані в центральній частині графіка. Нетрансгенний (тобто, негативний) контроль вказаний в крайній правій частині графіка і позначений "B104", "Hill" і "Isoline". Комерційно доступна інбредна лінія, що містить Cry1Fa, представлена першим обробленим зразком, вказаним праворуч (позначений "Herculex I") і є тим же самим генетичним фоном, як і нетрансгенний контроль, позначений "Isoline".

Фігура 2: Конкурування за зв'язування BBMV *Spodoptera frugiperda* з білком, що містить коровий токсин Cry1Fa, коровий токсин Cry1Da і ¹²⁵I-мічений коровий токсин Cry1Da.

Докладний опис винаходу

Як повідомляється в даній заявці, токсин Cry1Da, що продукується в трансгенній кукурудзі (і в інших рослинах наприклад, в бавовнику і сої), виявляє високу ефективність в боротьбі проти совки трав'яної (FAW; *Spodoptera frugiperda*), у якої виробляється резистентність до активності Cry1Fa. Таким чином, даний винахід частково оснований на несподіваному виявленні того факту, що совка трав'яна, резистентна до дії Cry1Fa, є сприйнятливою (тобто, не має перехресної резистентності) до дії Cry1Da.

Даний винахід також частково оснований на несподіваному виявленні того факту, що токсин Cry1Da є ефективним для захисту рослин (таких як рослини кукурудзи) від ураження Cry1Fa-резистентної совки трав'яної. Обговорення цього шкідника приводиться, наприклад, в публікації Tabashnik, PNAS (2008), vol. 105 no. 49, 19029-19030.

5 Даний винахід включає застосування токсину Cry1Da для захисту кукурудзи і інших економічно цінних видів рослин від ураження шкідниками і зниження врожайності, що викликається поїданням цих рослин совкою трав'яною або популяціями совки трав'яної, у яких виробляється резистентність до Cry1Fa.

10 Даний винахід також стосується кластера IRM, що використовується для попередження або сповільнення розвитку резистентності совки трав'яної до Cry1Fa і/або Cry1Da.

Даний винахід також стосується композицій, що використовуються для боротьби з лускокрилими шкідниками, в клітинах яких продукується білок, що містить коровий токсин Cry1Fa, і білок, що містить коровий токсин Cry1Da.

15 Даний винахід також стосується хазяїна, трансформованого так, щоб він продукував білок, що містить коровий токсин Cry1Fa, і білок, що містить коровий токсин Cry1Da, де вказаним хазяїном є клітина мікроорганізму або рослини. Полінуклеотид Cry1Fa, що розглядається, і полінуклеотид Cry1Da, що розглядається, переважно присутні в генетичній конструкції під контролем промотору, що не є промотором *Bacillus thuringiensis* (функціонально приєднані до цього промотору/містять цей промотор). Полінуклеотиди, що розглядаються, можуть містити звичайно кодони, що зустрічаються в цій рослині, що сприяють підвищенню рівня експресії в рослині.

20 Даний винахід також стосується способу боротьби з лускокрилими шкідниками, що включає контактування вказаних шкідників або середовища їх проживання з ефективною кількістю композиції, що містить білок, який включає коровий токсин Cry1Fa, а також білок, що включає коровий токсин Cry1Da.

25 У одному з своїх варіантів, даний винахід стосується рослини кукурудзи, що включає експресований в цій рослині ген, який кодує білок, що містить коровий токсин Cry1Da, і експресований в цій рослині ген, який кодує білок, що містить коровий токсин Cry1Fa, і насіння такої рослини.

30 У іншому своєму варіанті, даний винахід стосується рослини кукурудзи, де експресований в цій рослині ген, який кодує білок, що містить коровий токсин Cry1Da, і експресований в цій рослині ген, який кодує білок, що містить коровий токсин Cry1Fa, були введені у вказані рослини кукурудзи і в насіння таких рослин шляхом інтрогресії.

35 Рецептори комах. Як описано в прикладах, дослідження на конкурентне зв'язування з рецептором, що проводиться з використанням радіоактивно міченого білка корового токсину Cry1Da, показало, що цей білок корового токсину Cry1Fa не конкурує за високоафінне зв'язування з сайтом, присутнім в тканинах комах FAW, з яким зв'язується Cry1Da. Ці результати показали, що комбінація білків Cry1Fa і Cry1Da являє собою ефективний засіб для послаблення вироблення резистентності у популяції FAW до Cry1Fa (і аналогічно, для

40 послаблення вироблення резистентності до Cry1Da), а також для підвищення рівня резистентності рослин кукурудзи, експресуючих обидва ці білки, до вказаного шкідника. Таким чином, частково на основі даних, описаних вище, і даних, представлених в літературі, можна зробити висновок, що спільне продукування (у вигляді кластера) білків Cry1Da і Cry1Fa може бути застосоване для отримання високої дози IRM-кластера, що використовується для

45 боротьби з FAW. У цю комбінацію можуть бути додані і інші білки для розширення спектра комах-шкідників, що знищуються. Так, наприклад, для кукурудзи, додавання Cry1Ab дозволить створити IRM-піраміду, що використовується для боротьби з європейським кукурудзяним трачем. У іншому своєму варіанті, даний винахід стосується застосування одного або двох білків

50 Cry1Fa і Cry1Da в комбінації з іншим третім токсином/геном, і застосування цього трикомпонентного кластера для послаблення вироблення резистентності у FAW до будь-якого з цих токсинів. Таким чином, в іншому своєму варіанті, даний винахід стосується застосування одного, двох або трьох (або більше) з цих білків в сільськогосподарських регіонах, де FAW може розвиватися в резистентні популяції. Відповідно до цього, даний винахід також частково

55 стосується "трикомпонентних кластерів" або "пірамід" з трьох (або більше) токсинів, де токсини Cry1Fa і Cry1Da являють собою базову пару. Одна з переважних пірамід включає щонайменше два білки, що не мають перехресну резистентність до двох шкідників до FAW і до ECB (Європейського кукурудзяного трача; *Ostrinia nubilalis*); Cry1Fa плюс Cry1Da плюс один або декілька анти-ECB токсинів, таких як Cry1Ab (див. заявку США 20080311096), оскільки Cry1F

60 має активність проти обох комах. Іншими токсинами проти ECB є Cry1Be (див. заявку США

реєстр. № 61/284290, подану 16 грудня, 2009), Cry1I (див. заявку США реєстр. № 61/284278, подану 16 грудня, 2009), Cry2Aa (див. заявку США реєстр. № 61/284278, подану 16 грудня 2009) і DIG-3 (див. заявку США 201000269223). У деяких переважних варіантах "піраміди", вибрані токсини мають три різні механізми дії проти FAW. Такими переважними пірамідними комбінаціями з "трьома механізмами дії" є Cry1Fa плюс Cry1D плюс інший токсин/ген, вибраний з групи, яка складається з Vip3Ab, Cry1C (див. заявку США реєстр. № 61/284252, подану 16 грудня, 2009), Cry1Be і Cry1E (див. заявку США реєстр. № 61/284278, подану 16 грудня 2009). Рослини (і посівні площі, засіяні такими рослинами), які продукують ці три токсини, входять в об'єм даного винаходу. Можуть бути також додані додаткові токсини/ген, і ці конкретні трикомпонентні кластери, відповідно до даного винаходу, будуть, як несподівано було виявлено, переважно діяти проти FAW по трьох механізмах. Це допоможе знизити або уникнути потреби в площах-"сховищах" нетрансгенних культур. Таким чином, в даному винаході розглядається поле, засіяне культурами на площі понад 10 акрів.

Таким чином, Cry1Da може бути використаний у вигляді комбінації з 3 генів для кукурудзи, яка в цей час знаходиться на стадії Дослідження I процесу вироблення нових ознак. Cry1Fa присутній в продуктах Herculex®, SmartStax™ і WidesStrike™. Відповідно до цього, використання Cry1Da може мати важливе значення для зниження тиску відбору на інші промислові білки.

Інші токсини, наприклад, Vip3, перераховані в Додатку А. Ці номери GENBANK можуть бути також використані для ідентифікації послідовностей будь-яких описаних і згаданих тут генів і білків.

У патенті США № 5188960 і в патенті США № 5827514 описані білки, які містять коровий токсин Cry1Fa, і які можуть бути використані для здійснення даного винаходу. У патенті США № 6218188 описані оптимізовані для рослини послідовності ДНК, що кодують білки, які містять коровий токсин Cry1Fa, і які можуть бути використані в даному винаході.

Комбінації токсинів, описаних в даному винаході, можуть бути використані для боротьби з лускокрилими шкідниками. Дорослі лускокрилі, наприклад, метелики і молі, харчуються, головним чином, нектаром і грають значну роль в запиленні. Майже всі личинки лускокрилих, тобто, гусениці, поїдають рослини, і багато з них є небезпечними шкідниками. Гусениці живуть на листі або поїдають внутрішню частину листя, або вони пошкоджують коріння або стебла рослини, що приводить до виснаження поживних речовин у рослини, і в більшості випадків, до руйнування основної фізичної структури рослини. Крім того, гусениці пошкоджують плоди, тканини і зерно, що зберігається, і борошно, в результаті чого продукти або взагалі стають непридатними для продажу, або їх комерційна цінність значно знижується. Використовуваний тут термін "лускокрилі шкідники" також стосується різних стадій життєвого циклу шкідника, включаючи стадії розвитку личинок.

Деякі химерні токсини згідно з винаходом містять повнорозмірну частину N-кінцевого корового токсину Bt, і в певному положенні, розташованому за частиною корового токсину, цей білок переходить в гетерологічну послідовність протоксину. N-кінцева, інсектицидно активна частина токсину Bt називається "коровим токсином". Перехід від корового сегмента токсину в гетерологічний сегмент протоксину може відбуватися приблизно в області стику токсин/протоксин, або альтернативно, частина нативного протоксину (що простягається за межі корової частини токсину) може зберігатися, причому, перехід в гетерологічну частину протоксину може відбуватися нижче.

Одним з прикладів може служити один химерний токсин згідно з винаходом, який являє собою повнорозмірну частину корового токсину Cry1Fa (амінокислоти 1-601) і гетерологічний протоксин (амінокислоти від положення 602 до С-кінця). У одному переважному варіанті винаходу, частина химерного токсину, що містить протоксин, походить від токсину білка Cry1Ab. Другим прикладом може служити другий химерний токсин згідно з винаходом, який являє собою частину повнорозмірного корового токсину Cry1Da (амінокислоти 1-619) і гетерологічний протоксин (амінокислоти від положення 620 до С-кінця). У переважному варіанті винаходу, частина химерного токсину, що містить протоксин, походить від токсину білка Cry1Ab.

Для фахівців в даній галузі очевидно, що токсини Bt, навіть токсини, що належать до певного класу, такого як Cry1F, можуть до деякої міри варіюватися по своїй довжині і точній локалізації переходу від частини корового токсину в частину протоксину. Звичайно, токсини Cry1Da і Cry1Fa мають довжину приблизно від 1150 до 1200 амінокислот. Перехід від частини корового токсину в частину протоксину звичайно відбувається на ділянці між частинами, що складають приблизно від 50 % і приблизно до 60 % від всієї довжини токсину. Химерний токсин згідно з винаходом включає повнорозмірну область цієї N-кінцевої частини корового токсину. Таким чином, химерний токсин містить щонайменше приблизно 50 % повнорозмірного білка Cry1Fa токсину Bt або щонайменше приблизно 50 % повнорозмірного білка токсину Bt Cry1Da.

Цей білок має довжину, що звичайно складає щонайменше приблизно 590 амінокислот. Що стосується частини протоксину, то повнорозмірна область частини протоксину Cry1Ab простягається від кінця частини корового токсину до С-кінця молекули.

Гени і токсини. Гени і токсини, що використовуються в даному винаході, включають не тільки описані тут повнорозмірні послідовності, але також і фрагменти цих послідовностей, варіанти, мутанти і гібридні білки, які зберігають характерну пестицидну активність токсинів, конкретно описаних в даній заявці. Використовувані тут терміни "варіанти" або "модифікації" генів означають нуклеотидні послідовності, які кодують ті ж самі токсини або токсини, еквівалентні токсинам, що мають пестицидну активність. Використовуваний тут термін "еквівалентні токсини" означає токсини, що мають таку ж або, по суті, такою ж біологічну активність проти шкідників-мішеней, як і заявлені токсини.

Межі ідентичності, що використовуються тут, становлять приблизно 95 % (Cry1Fa і Cry1Da), 78 % (Cry1F і Cry1D) і 45 % (Cry1) відповідно до "змін номенклатури для пестицидних кристалічних білків *Bacillus thuringiensis*" ("Revision of the Nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Proteins", N. Crickmore, D.R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, and D.H. Dean. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* (1998) Vol 62: 807-813). Такі межі можуть бути також застосовані тільки для корових токсинів (для токсинів Cry1F і Cry1D).

Для фахівців в даній галузі очевидно, що гени, які кодують активні токсини, можуть бути ідентифіковані і отримані декількома способами. Специфічні гени або частини генів, описані в даній заявці, можуть бути отримані з ізолятів, депонованих в депозитаріях культур. Ці гени або їх частини або варіанти можуть бути також сконструйовані шляхом синтезу, наприклад, на синтезаторі генів. Варіанти генів можуть бути легко сконструйовані стандартними методами отримання точкових мутацій. Крім того, фрагменти цих генів можуть бути отримані з використанням комерційно доступних екзонуклеаз або ендонуклеаз відповідно до стандартних процедур. Так, наприклад, для систематичного відщеплення нуклеотидів від кінців цих генів можуть бути використані ферменти, такі як Bal31, або може бути застосований сайт-направлений мутагенез. Гени, що кодують активні фрагменти, можуть бути також отримані з використанням різних рестрикуючих ферментів. Для безпосереднього отримання активних фрагментів цих білків-токсинів можуть бути використані протеази.

Фрагменти і еквіваленти, які зберігають пестицидну активність описаних тут токсинів, входять в об'єм даного винаходу. Крім того, внаслідок надлишковості генетичного коду, ряд різних послідовностей ДНК може кодувати описані тут амінокислотні послідовності. Фахівець в даній галузі може легко отримати такі альтернативні послідовності ДНК, що кодують ті ж самі або, по суті, ті ж самі токсини. Такі варіанти послідовностей ДНК входять в об'єм даного винаходу. Використовуваний тут термін "по суті, ті ж самі" послідовності означає послідовності, які мають амінокислотні заміни, делеції, додавання або інсерції, які фактично не чинять впливу на пестицидну активність. У це визначення також входять фрагменти генів, що кодують білки, які зберігають пестицидну активність.

Іншим методом ідентифікації генів, що кодують токсини і частини генів, що використовуються в даному винаході, є застосування олігонуклеотидних зондів. Такими зондами є нуклеотидні послідовності, що детектуються. Такі послідовності можуть бути детектовані за допомогою відповідної мітки, або вони можуть бути спочатку зроблені флуоресцентними, як описано в Міжнародній заявці № WO93/16094. Як добре відомо фахівцям, якщо молекула-зонд і зразок нуклеїнової кислоти гібридизуються за допомогою утворення міцного зв'язку між двома молекулами, то розумно передбачити, що такий зонд і зразок будуть мати значну гомологію. Гібридизацію, переважно, проводять в жорстких умовах із застосуванням методів, добре відомих фахівцям, наприклад, описаних Keller, G. H., M. M. Manak (1987) *DNA Probes*, Stockton Press, New York, N.Y., pp. 169-170. Нижче приводяться деякі приклади комбінацій концентрацій солі і температур (в порядку зростання жорсткості): 2 x SSPE або SSC при кімнатній температурі; 1 x SSPE або SSC при 42 °C; 0,1 x SSPE або SSC при 42 °C; 0,1 x SSPE або SSC при 65 °C. Детектування зонда являє собою відомий метод, що застосовується для того, щоб визначити, відбувається гібридизація чи ні. Такий аналіз з використанням зонда являє собою швидкий метод ідентифікації токсин-кодуючих генів згідно з винаходом. Нуклеотидні сегменти, що використовуються як зонди згідно з винаходом, можуть бути синтезовані на синтезаторі ДНК відповідно до стандартних процедур. Ці нуклеотидні послідовності можуть бути також використані як ПЛР-праймери для ампліфікації генів згідно з винаходом.

Варіанти токсинів. Деякі токсини згідно з винаходом конкретно описані в даній заявці. Оскільки ці токсини приводяться тут просто як приклади токсинів згідно з винаходом, то

потрібно зазначити, що даний винахід включає варіанти токсинів або еквівалентні токсини (і нуклеотидні послідовності, що кодують еквівалентні токсини), що мають таку ж пестицидну активність, як і представлений тут токсин, або аналогічну активність. Еквівалентні токсини мають амінокислотну послідовність, гомологічну амінокислотній послідовності представленого тут токсину. Така гомологія амінокислотних послідовностей звичайно складає більше ніж 75 %, переважно, більше ніж 90 %, а найбільш переважно, більше ніж 95 %. Гомологія амінокислотних послідовностей є найвищою в критичних областях токсину, що відповідають за біологічну активність або визначають тривимірну конфігурацію, яка, зрештою, відповідає за біологічну активність. Відповідно до цього, деякі амінокислотні заміни є допустимими і можуть бути присутніми в тих областях, які не грають важливої ролі в повідомленні активності, або є консервативними амінокислотними замінами, які не впливають на тривимірну конфігурацію молекули. Так, наприклад, амінокислоти можуть бути поділені на наступні класи: неполярні, незаряджені полярні, основні і кислотні. Таким чином, при консервативних замінах, амінокислоту одного класу замінюють іншою амінокислотою того ж типу, і така заміна входить в об'єм даного винаходу, за умови, що вона, фактично, не буде впливати на біологічну активність сполуки. Нижче представлений список прикладів амінокислот, що належать до кожного класу.

Таблиця

Клас амінокислот	Приклади амінокислот
Неполярні	Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp
Незаряджені полярні	Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln
Кислотні	Asp, Glu
Основні	Lys, Arg, His

У деяких випадках можуть бути також зроблені неконсервативні заміни. Важливим фактором є те, що такі заміни не повинні значно знижувати біологічну активність токсину.

Рекомбінантні хазяїни. Гени, що кодують токсини згідно з винаходом, можуть бути введені мікробним або рослинним хазяїнам широкого ряду. Експресія гена токсину приводить, прямо або опосередковано, до продукування пестициду всередині клітин і його збереження в цих клітинах. Для отримання штаму Bt, що експресує обидва токсини згідно з винаходом, може бути застосоване кон'югативне і рекомбінантне перенесення. Інші організми-хазяїни можуть бути також трансформовані одним або обома генами токсинів, що використовуються для досягнення синергічного ефекту. З використанням прийнятних мікробів-хазяїнів, наприклад, *Pseudomonas*, ці мікроби можуть бути внесені в місця проживання шкідників, де вони можуть розмножуватися і поїдати ці мікроби. Це буде приводити до знищення шкідників. Альтернативно, мікроб, що містить ген токсину, може бути оброблений в умовах, сприяючих пролонгуванню активності токсину і стабілізації клітини. Оброблена клітина, яка зберігає токсичну активність, може бути потім внесена в середовище проживання шкідників-мішеней.

Якщо ген токсину Bt вводять мікробу-хазяїну за допомогою прийнятного вектора, і якщо вказаний хазяїн вносять в середовище проживання в живому вигляді, то важливо, щоб були використані певні мікроби-хазяїни. При цьому, вибирають такі мікроорганізми-хазяїни, які, як відомо, займають певну "фітосферу" (філоплан, філосферу, ризосферу і/або ризоплан) однієї або декількох культур, які представляють інтерес. Ці мікроорганізми вибирають так, щоб вони мали здатність успішно конкурувати в конкретних умовах (в культурі і в іншому середовищі проживання комах) з мікроорганізмами дикого типу, забезпечували стабільне збереження і експресію генів, що кодують поліпептид-пестицид, і бажано, забезпечували кращий захист пестициду від руйнування і інактивації в умовах навколишнього середовища.

Відомо, що велике число мікроорганізмів проживає на філоплані (на поверхні листя рослин) і/або на ризосфері (в ґрунті, що оточує коріння рослин) цінних сільськогосподарських культур широкого ряду. Такими мікроорганізмами є бактерії, водорості і гриби. Особливий інтерес представляють такі мікроорганізми, як бактерії, наприклад, бактерії роду *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Xanthomonas*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Methylophilus*, *Agrobacterium*, *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Leuconostoc* і *Alcaligenes*; гриби, а зокрема, дріжджі, наприклад, дріжджі роду *Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Kluveromyces*, *Sporobolomyces*, *Rhodotorula* і *Aureobasidium*. Особливий інтерес представляють такі види бактерій фітосфер, як *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Acetobacter xylinum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhodopseudomonas spheroides*, *Xanthomonas campestris*, *Rhizobium melioli*, *Alcaligenes entrophus* і *Azotobacter vinlandii*; і дріжджів-фітосфер, таких як *Rhodotorula rubra*, *R. glutinis*, *R. marina*, *R. aurantiaca*, *Cryptococcus*

albidus, *C. diffluens*, *C. laurentii*, *Saccharomyces rosei*, *S. pretoriensis*, *S. cerevisiae*, *Sporobolomyces roseus*, *S. odoratus*, *Kluyveromyces veronae* і *Aureobasidium pollulans*. Особливий інтерес представляють пігментовані мікроорганізми.

Для введення гена Bt, що кодує токсин, мікроорганізму-хазяїну в умовах, що забезпечують стабільне збереження гена і стабільну експресію гена, можуть бути застосовані методи широкого ряду. Такі методи добре відомі фахівцям в даній галузі і описані, наприклад, в патенті США № 5135867, який вводиться в даний опис за допомогою посилання.

Обробка клітин. *Bacillus thuringiensis* або рекомбінантні клітини, експресуючі токсини Bt, можуть бути оброблені з метою пролонгування активності токсину і стабілізації клітин. Пестицидна мікрокапсула, що утворюється, містить токсин або токсини Bt в клітинній структурі, яка стабілізує і захищає токсин у випадку, коли цю мікрокапсулу вносять в середовище проживання шкідника-мішені. Прийнятими клітинами-хазяїнами можуть бути прокаріоти або еукаріоти, і такими клітинами звичайно є, але не обмежуються ними, клітини, які не продукують речовини, що є токсичними для вищих організмів, таких як ссавці. Однак, можуть бути також використані і мікроорганізми, які продукують речовини, токсичні для вищих організмів, але, при цьому, ці токсичні речовини є нестабільними, або рівень їх введення є досить низьким, що виключає можливість якого-небудь токсичного впливу на ссавця-хазяїна. Як хазяїни, особливий інтерес представляють прокаріоти і нижчі еукаріоти, такі як гриби.

Клітини, що обробляються, звичайно є інтактними і, по суті, знаходяться в проліферативній формі, а не в формі спор, хоча, в деяких випадках можуть використовуватися і спори.

Обробка мікробних клітин, наприклад, мікробів, що містять ген або гени токсину Bt, може бути здійснена хімічними і/або фізичними методами, або комбінацією хімічних і фізичних методів, за умови, що такий метод не буде чинити негативного впливу на властивості токсину і не буде приводити до зниження здатності клітин захищати токсин. Прикладами хімічних реагентів є галогенуючі агенти, а зокрема, галогени з атомними номерами 17-80. Більш конкретно, може бути використаний йод в м'яких реакційних умовах протягом певного періоду часу, достатнього для досягнення бажаних результатів. Іншими прийнятними методами є обробка альдегідами, такими як глутаральдегід; протиінфекційними агентами, такими як хлорид зефірану і хлорид цетилпіридинію; спиртами, такими як ізопропіловий спирт і етанол; різними гістологічними фіксаторами, такими як йод Люголя, фіксатор Боуїна; різні кислоти і фіксатор Хеллі (см: Humason, Gretchen L., *Animal Tissue Techniques*, W. H. Freeman and Company, 1967); або комбінацією фізичного методу (нагрівання) і хімічних агентів, які зберігають і пролонгують активність токсину, що продукується в клітинах, введених в середовище проживання хазяїна. Прикладами фізичних методів є короткохвильове випромінювання, таке як гамма-випромінювання і рентгенівське випромінювання, заморожування, УФ-опромінення, ліофілізація і т. п. Методи обробки мікробних клітин описані в патентах США №№ 4695455 і 4695462, які вводяться в даний опис за допомогою посилання.

Ці клітини звичайно мають підвищену структурну стабільність, що приводить до збільшення резистентності до умов навколишнього середовища. Якщо пестицид присутній в формі попередника, то спосіб обробки клітин повинен бути вибраний так, щоб він не приводив до інгібування процесингу попередника з утворенням зрілої форми пестициду під дією патогена шкідника-мішені. Так, наприклад, формальдегід буде забезпечувати перехресне зшивання з білками, і тим самим інгібувати процесинг попередника поліпептидного пестициду. Спосіб обробки повинен зберігати щонайменше значну міру біологічної доступності або біологічної активності токсину.

Властивостями, що представляють особливий інтерес для продукування при виборі клітини-хазяїна, є простота введення гена або генів Bt хазяїну, доступність експресійних систем, ефективність експресії, стабільність пестициду в хазяїні і наявність додаткових генетичних ознак. Технологічними властивостями пестицидних мікрокапсул, які представляють інтерес, є їх захисна здатність відносно пестициду, наприклад, товщина клітинних стінок, пігментація і внутрішньоклітинна упаковка або здатність утворювати тільця включення; виживаність у водному середовищі; відсутність токсичності для ссавців; привабливість з точки зору поїдання шкідниками; простота утилізації; фіксація без пошкодження токсину і т. п. Іншими властивостями, що розглядаються, є простота приготування препарату і його транспортування, матеріальні витрати, стабільність при зберіганні і т. п.

Культивування клітин. Клітина-хазяїни, що містять інсектицидний ген або гени B.t., можуть бути вирощені в будь-якому прийнятному поживному середовищі, в якому ДНК-конструкція буде забезпечувати селективну перевагу, тобто, забезпечувати селективне середовище, в якій всі або майже всі клітини будуть зберігати ген B.t. Потім ці клітини можуть бути зібрані звичайними способами. Альтернативно, ці клітини можуть бути оброблені до їх збирання.

Клітини B.t., що продукують токсини згідно з винаходом, можуть бути культивовані з використанням стандартних середовищ і методом ферментації. Після завершення циклу ферментації, бактерії можуть бути зібрані спочатку шляхом відділення спор і кристалів B.t. від збродженого бульйону стандартними методами. Виділені спори і кристали B.t. можуть бути

приготовані у вигляді змочуваного порошку; рідкого концентрату; гранул або інших препаратів, отриманих шляхом додавання поверхнево-активних речовин, диспергуючих речовин, інертних носіїв і інших компонентів, що полегшує транспортування, і обробку ними конкретних шкідників-мішеней. Такі процедури приготування і застосування добре відомі фахівцям.

Препарати. Приготовані гранули-приманки, що містять аттрактант і спори, кристали і токсини ізолятів B.t., або рекомбінантні мікроби, що містять гени, отримані з описаних тут ізолятів B.t., можуть бути внесені в ґрунт. Приготований продукт може бути застосований у вигляді покриття, що наноситься на насіння, або препарату для обробки коріння або всієї рослини на останніх стадіях циклу вирощування сільськогосподарської культури. Для обробки рослин і ґрунту, клітини B.t. можуть бути приготовані у вигляді змочуваних порошоків, гранул або дустів, шляхом змішування з різними інертними матеріалами, такими як неорганічні мінеральні речовини (філосилікати, карбонати, сульфати, фосфати і т. п.) або рослинні матеріали (подрібнені в порошок качани кукурудзи, рисове лущиння, шкаралупа волоського горіха і т. п.). Такі препарати можуть включати ад'юванти типу "розпилювачів-зв'язувальних речовин", стабілізуючі агенти, інші пестицидні добавки або поверхнево-активні речовини. Рідкі препарати можуть бути водними або безводними, і можуть бути використані у вигляді пін, гелів, суспензій, емульгованих концентратів або т. п. Інгредієнтами можуть бути реологічні агенти, поверхнево-активні речовини, емульгатори, диспергуючі речовини або полімери.

Як відомо фахівцям в даній галузі, концентрація пестициду може значно варіюватися залежно від природи конкретного препарату, а зокрема, залежно від того, чи використовується він у вигляді концентрату або в чистому вигляді. Пестицид складає щонайменше 1 % по масі, а може становити 100 % по масі. Сухі препарати можуть становити приблизно 1-95 % по масі пестициду, а рідкі препарати звичайно становлять приблизно 1-60 % по масі твердих речовин в рідкій фазі. Ці препарати звичайно містять приблизно від 10^2 до 10^4 клітин/мг. Ці препарати можуть бути введені в кількості приблизно від 50 мг (в рідкому або в сухому вигляді) до 1 кг або більше на гектар.

Препарати можуть бути внесені в середовище проживання лускокрилих шкідників, наприклад, нанесені на листя або ґрунт шляхом розпилення, опилування, зрошування або т. п.

Трансформація рослин. Переважними рекомбінантними хазяїнами, які можуть бути використані для продукування інсектицидних білків згідно з винаходом, є трансформовані рослини. Гени, що кодують описані тут білки токсинів Bt, можуть бути введені в рослинні клітини із застосуванням різних методів, добре відомих фахівцям. Так, наприклад, існує велике число клонуючих векторів, що містять систему реплікації в *Escherichia coli*, і маркер, що дозволяє провести відбір трансформованих клітин, і ці вектори можуть бути використані з метою отримання препарату для інсерції чужорідних генів у вищі рослини. Вектори містять, наприклад, *inter alia* pBR322, серії pUC, серії M13mp, pACYC184. Відповідно до цього, ДНК-фрагмент, що має послідовність, яка кодує білок токсину Bt, може бути вбудований у вектор у прийнятний рестрикційний сайт. Отриману плазмиду використовують для трансформації *E. coli*. Клітини *E. coli* культивують у прийнятному поживному середовищі, а потім збирають і піддають лізису. Потім цю плазмиду виділяють. Методами аналізу звичайно є аналіз послідовності, рестрикційний аналіз, електрофорез і інші методи, що застосовуються в біохімії і молекулярній біології. Після кожної маніпуляції використовувана послідовність ДНК може бути розщепленням і приєднана до наступної послідовності ДНК. Кожна послідовність плазмиди може бути клонована в одній і тій же або в інших плазмідах. Залежно від методу вбудовування потрібних генів в рослину, можуть виявитися необхідними і інші послідовності ДНК. Так, наприклад, якщо плазмиду Ti або Ri використовують для трансформації клітин рослини, то щонайменше правий кордон, а в більшості випадків, правий і лівий кордони T-ДНК-плазмиди Ti або Ri приєднують як фланкуючу область генів, що вбудовуються. Використання T-ДНК для трансформації клітин рослин було ретельно досліджене і детально описане в EP 120516, Lee and Gelvin (2008), Hoeskema (1985), Fraley et al., (1986), і An et al., (1985), і добре відомо фахівцям.

Після інтеграції вбудованої ДНК в геном рослини, така ДНК стає відносно стабільною. Трансформуючий вектор звичайно містить селективний маркер, який повідомляє трансформованим клітинам рослини резистентність до біоциду або антибіотику, таких як біалафос, канаміцин, G418, блеоміцин або гігроміцин, *inter alia*. З використанням окремо взятого маркера можна, відповідно, здійснювати відбір трансформованих клітин, а не клітин, які не містять вбудовану ДНК.

Існує багато методів, прийнятних для вбудовування ДНК в клітини рослин-хазяїнів. Такими методами є трансформація молекулою Т-ДНК з використанням *Agrobacterium tumefaciens* або *Agrobacterium rhizogenes* як трансформуючі агенти, злиття, інжекція, біобалістичні методи (бомбардування мікрочастинками) або електропорація, а також інші можливі методи. Якщо для трансформації використовуються агробактерії, то ДНК, що вбудовується, клонують в конкретні плазмиди, а саме, в проміжний вектор або в бінарний вектор. Проміжні вектори можуть бути інтегровані в плазмиду Ti або Ri за допомогою гомологічної рекомбінації з використанням послідовностей, гомологічних послідовностям, присутнім в Т-ДНК. Плазмиди Ti або Ri також містять область *vir*, необхідну для перенесення Т-ДНК. Проміжні вектори не можуть самі реплікуватися в агробактеріях. Проміжний вектор може бути перенесений в *Agrobacterium tumefaciens* за допомогою хелперної плазмиди (кон'югування). Бінарні вектори можуть самі реплікуватися як в *E. coli*, так і в агробактеріях. Вони містять селективний маркерний ген і лінкер або полілінкер, які замикають праву і ліву приграничні області Т-ДНК. Вони можуть бути трансформовані безпосередньо в агробактерії (Holsters et al., 1978). Агробактерія, що використовується як клітина-хазяїн, містить плазмиду, що несе область *vir*. Область *vir* необхідна для перенесення Т-ДНК в клітину рослини. Може також бути присутньою і додаткова Т-ДНК. Трансформованим таким чином бактерію використовують для трансформації клітин рослин. Рослинні експлантати можуть бути переважно культивовані з *Agrobacterium tumefaciens* або *Agrobacterium rhizogenes* для перенесення ДНК в клітину рослини. Потім цілі рослини можуть бути вирощені з інфікованого рослинного матеріалу (наприклад, з шматочків листя, сегментів стебел, коріння, а також протопластів або клітин, культивованих суспензійним методом) у прийнятному середовищі, яке може містити антибіотики або біоциди для відбору. Потім вирощеним таким чином рослини можуть бути протестовані на присутність вбудованої ДНК. У випадку інжекції і електропорації, яких-небудь спеціальних вимог до отримання плазмід не пред'являється. При цьому, можуть бути використані стандартні плазмиди, такі як, наприклад, похідні pUC.

Трансформовані клітини розвиваються в рослині як звичайно. Вони можуть утворювати зародкові клітини і передавати трансформовану(і) ознаку(и) потомству. Такі рослини можуть бути вирощені звичайним способом і схрещені з рослинами, що мають трансформовані наслідовані фактори або інші наслідовані фактори. Отримані гібридні рослини мають відповідні фенотипічні властивості.

У переважному варіанті винаходу, рослини трансформують генами, у яких зустрічальність кодонів оптимізована для рослин. Див., наприклад, патент США № 5380831, що вводиться в даний опис за допомогою посилання. Хоча в даній заявці описані деякі зрізані токсини, однак, фахівцям з Bt добре відомо, що токсини, які належать до типу токсинів довжиною 130 кДа (повнорозмірні), мають N-кінцеву половину, що являє собою коровий токсин, і C-кінцеву половину, що являє собою протоксिनний "хвіст". Таким чином, відповідні "хвости" можуть бути використані разом із зрізаними/коровими токсинами відповідно до винаходу. Див., наприклад, патент США № 6218188 і патент США № 6673990. Крім того, методи створення синтетичних генів Bt для їхнього використання в рослинах відомі фахівцям (Stewart and Burgin, 2007). Одним з необмежувальних прикладів переважного трансформованої рослини є фертильна рослина кукурудзи, що містить експресований у рослині ген, кодуєчий білок Cry1Fa, а також другий експресований у рослині ген, кодуєчий білок Cry1Da.

Перенесення (або інтрогресія) Cry1Fa- і Cry1Da-детермінованого(их) ознаки(к) в інбредні лінії кукурудзи може бути досягнуто шляхом рекурентного селективного схрещування, наприклад, зворотного схрещування. У цьому випадку, потрібну рекурентну рослину спочатку схрещують з інбредним донором (нерекурентним батьком), що несе відповідний(і) ген(и), що повідомляє(ють) Cry1F- і Cry1D-детерміновані ознаки. Потім потомство цього кроса піддають зворотному схрещуванню з рекурентною рослиною з наступним відбором отриманого потомства на потрібну(і) ознаку(и), перенесену(і) від нерекурентного батька. Через три, переважно, чотири, а ще більш переважно, через п'ять або більше поколінь "бекросів" з рекурентним батьком з відбором на потрібну(і) ознаку(и), потомство буде гетерозиготним по локусах, що контролює перенесену(і) ознаку(и), але воно буде аналогічне рекурентному батьку по більшості або майже по всіх інших генах (див., наприклад, Poehlman & Sleper (1995) *Breeding Field Crops*, 4th Ed., 172-175; Fehr (1987) *Principles of Cultivar Development*, Vol. 1: Theory and Technique, 360-376).

Стратегії вирощування культур, резистентних до комах (IRM). Наприклад, Roush і співробітниками були описані стратегії з використанням двох токсинів, що також називаються створенням "пірамід" або "кластерів" для вирощування трансгенних культур, що мають інсектицидні властивості. (The Royal Society. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* (1998) 353, 1777-1786).

На web-сайті Агенства США по захисту навколишнього середовища (epa.gov/oprbppdl/biopesticides/pips/bt_corn_refuge_2006.htm) опубліковані наступні вимоги по забезпеченню площ-сховищ з не-трансгенними культурами (тобто, не-B.t.) культурами (земельної ділянки із сільськогосподарськими не-Bt-культурами/кукурудзою) для їхнього використання під трансгенні культури, що продукують один білок Bt, що має активність проти шкідників-мішеней.

"Конкретними структурними вимогами до продуктів з Bt-кукурудзи (Cry1Ab чи Cry1F), захищеної від кукурудзяного трача, є:

Структурні площі-"сховища": 20 % площі-притулку під Bt- кукурудзу, не захищену від Лускокрилих у Кукурудзяному поясі;

50 % площі-притулку під Bt-бавовник, не захищений від Лускокрилих у Бавовняному поясі;

Блоки:

Внутрішні (тобто, у полях з Bt);

Зовнішні (тобто, окремі поля в межах $\frac{1}{2}$ милі (по можливості $\frac{1}{4}$ милі) від Bt-поля для максимізації вільного схрещування).

Смужки регулярно оброблюваних сільськогосподарських земель:

Ці смужки повинні мати ширину щонайменше в 4 ряди (переважно, 6 рядів) для зниження числа випадків міграції личинок".

Крім того, Національна асоціація виробників кукурудзи, на своєму web-сайті (ncga.com/insect-resistance-management-fact-sheet-bt-corn) також опублікувала аналогічний посібник з вимог для площ-сховищ. Так, наприклад:

"Вимоги до IRM у випадку кукурудзяного трача:

- засівати щонайменше 20 % акрів кукурудзою для збереження нетрансгенних гібридів;

- у регіонах вирощування бавовнику, повинно залишатися 50 % площі-притулку;

- повинно бути засіяно $\frac{1}{2}$ милі нетрансгенними гібридами;

- площі-сховища можуть бути засіяні смугами на Bt-поля; площі-сховища повинні бути засіяні у вигляді смуг, що повинні мати ширину щонайменше в 4 ряди;

- площі-сховища можуть бути оброблені стандартними пестицидами тільки, якщо досягаються економічні пороги для комах-мішеней;

- розпилювані інсектициди на основі Bt не можуть бути використані на площах-сховищах під кукурудзу;

- відповідне сховище повинне бути засіяне Bt-кукурудзою на кожній фермі"

Як указували Roush і співробітники (наприклад, на сторінках 1780 і 1784 у правому стовпчику), кластери або піраміди з двох різних білків, кожний з яких є ефективним проти шкідників-мішеней з мінімальною перехресною резистентністю або з відсутністю такої резистентності, можуть бути використані на дрібніших "сховищах" нетрансгенних рослин. Roush висловив припущення, що для успішного використання кластерів, площа-сховище, розмір якого складає менше ніж 10 %, може бути оброблений культурою з резистентністю, порівнянною з резистентністю культур, оброблюваною приблизно на 50 % площі-притулку для одного (не-пірамідного) токсину. Що стосується доступних у даний час продуктів з кукурудзи, що містять "пірамідні" Bt, то Агентство США по захисту навколишнього середовища вимагає, щоб значно менша (звичайно 5 %) площа структурного притулку була засіяна не-Bt кукурудзою, а не культурою з одним токсином (звичайно 20 %).

Існують різні шляхи забезпечення IRM-ефектів використання площ-сховищ, включаючи різні геометричні схеми засівання на поля (як згадувалося вище) і суміші насіння в одному пакеті, що також обговорюється Roush і ін. (див. вище), і в патенті США № 6551962.

Вищевказані відсотки або аналогічні співвідношення площ-сховищ можуть бути використані для розглянутих двокомпонентних або трикомпонентних кластерів або пірамід. Для трикомпонентних кластерів із трьома механізмами дії проти одного шкідника-мішені, притулку взагалі бути не повинно (або наприклад, площа-сховище повинен бути меншим 5 %). Це особливо справедливо для площ під комерційні культури, наприклад, понад 10 акрів.

Усі патенти, патентні заявки, попередні заявки і або публікації цитовані в них роботи у всій своїй повноті вводяться в даний опис за допомогою посилання в тому ступені, у якому вони відповідають детальному опису даної заявки.

Нижче приводяться приклади, що ілюструють способи практичного здійснення даного винаходу.

Ці приклади не повинні розглядатися як обмеження обсягу винаходу. Усі відсотки дані по масі, а всі співвідношення сумішей розчинників дані по обсязі, якщо це не обговорено особливо. Усі температури дані в градусах Цельсія.

Якщо це не зазначено або не мається на увазі конкретно, то використовувати тут артиклі "a", "an" і "the" означають "щонайменше один".

Приклад 1

Дані біоаналізу

Cry1Da, експресований у трансгенній кукурудзі (pDAS5163), забезпечує захист від поїдання совкою трав'яною (FAW), *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). Така експресія є ефективнішою для боротьби з FAW, у яких виробляється резистентність до Cry1Fa, і очевидно, ще ефективнішою для рослин кукурудзи, що містять модифікацію TC1507, де зазначена модифікація, імовірно, є ознакою, що повідомляє резистентність, що може бути використана у провідних галузях промисловості для боротьби з FAW.

Авторами винаходу було також продемонстровано, що Cry1Fa (білок від рекомбінантного штаму DR1649 *Pseudomonas fluorescens*; плазмід рDAB1817) і Cry1Da (білок від рекомбінантного штаму DC782 *Pseudomonas fluorescens*) є ефективними для боротьби з FAW, як показали біоаналізи, проведені з використанням штучного корму, і що активність цієї комбінації виявилася вище, ніж це очікувалося у випадку використання цих білків окремо.

Виходячи з даних, описаних вище, до-експресія Cry1Da і Cry1Fa дає можливість одержати IRM-кластери, що у високій дозі можуть бути використані для боротьби з FAW, з іншим важливим видом *Spodoptera species* і, імовірно, з іншими лускокрилими шкідниками. У цю комбінацію, для розширення спектра, можуть бути додані й інші білки. Так, наприклад, для кукурудзи, додавання Cry1Ab дозволяє створити IRM-кластер для боротьби з європейським кукурудзяною трачем (ECB), *Ostrinia nubilalis* (Hubner).

На фігурі 1 проілюстроване ушкодження (середній % ушкодження листів + порівн. кв. пом.) сегментів листів кукурудзи, уражених FAW (сині стовпці) або rFAW (пурпурові стовпці). Всі оброблювані зразки, перед яким стоять числа "5163", являють собою сегменти від рослин, трансформованих конструкцією, що містить Cry1Da. Рослини, у яких не була детектована експресія Cry1Da, були розділені на групи, зазначені в лівій крайній частині графіка. Рослини, у яких детектувалася експресія Cry1Da, були розділені на групи, зазначені в центральній частині графіка. Нетрансгенний (тобто, негативний) контроль зазначений у крайній правій частині графіка і позначений "B104", "Hill" і "Isoline". Комерційно доступна інбредна лінія, що містить Cry1Fa, представлена першим обробленим зразком, зазначеним праворуч (позначений "Herculex I"), і є тим же самим генетичним тлом, як і нетрансгенний контроль, позначений "Isoline".

Протоксинову химеру, що складається з послідовності, яка кодує розщеплений по кінцях трипсином токсин Cry1Da, і послідовності, яка кодує С-кінцеву область протоксину Cry1Ab, конструювали, а потім вбудовували в експресійний кластер, здатний здійснювати спрямовану експресію в кукурудзі (pDAS5163). Кукурудзу трансформували з використанням *Agrobacterium tumefaciens*, і ідентифікували модифікації, що містять химеру Cry1Da/1Ab. Зрізи листів регенерованих рослин піддавали біоаналізу на поїдання совкою трав'яною дикого типу (FAW) або личинками популяції совки трав'яної, котра є резистентною до Cry1Fa (rFAW). Cry1Da/1Ab-трансформовані рослини в меншій мірі поїдалися личинками FAW, однак вони були не так ефективні, як інбредні рослини, що містять 2 копії Cry1Fa (фігура 1). (Протестовані Cry1Da-модифікації були гемізиготними по трансгену, а конвертована інбредна рослина була гомозиготною по модифікації TC1507). На противагу цьому, ті ж самі модифікації, що містять Cry1Da/1Ab, по суті, були набагато ефективнішими відносно зниження міри поїдання личинками rFAW, ніж інбредні лінії, що містять Cry1Fa (фігура 1).

Інсектицидну активність Cry1Fa (білка від рекомбінантного штаму *Pseudomonas fluorescens* DR1649; плазмід рDAB1817), Cry1Da (білка від рекомбінантного штаму *P. fluorescens* DC782), і комбінації з цих 2 білків у відношенні 1:1 (мас:мас) тестували в стандартних біоаналізах, проведених з використанням штучного корму для оцінки активності. Оцінку активності проводили за допомогою аналізу LOGIT (JMP®8.0, SAS Inc. 2008), що давав оцінки LC₅₀ і верхня і нижня межі (95 %) для LC₅₀. Тест на синергізм проводили методом, описаним Tabashnik (1992), у якому передбачувана величину активності комбінації обчислювали по активностях кожного окремого компонента. Дія комбінації вважалася синергічною, якщо оцінена верхня довірча межа активності даної комбінації був нижча, ніж обчислена величина передбачуваної активності. У випадку совки трав'яної (FAW) і популяції совки трав'яної, котрі є резистентними до Cry1Fa (rFAW), верхні довірчі межі для LC₅₀ даної комбінації нижчі, ніж обчислена величина передбачуваної активності (таблиці 1 і 2), з чого можна зробити висновок, що дія комбінації Cry1Fa і Cry1Da на ці 2 популяції є синергічною.

Таблиця 1. Оцінка активності, верхня і нижня межі 95 % довірчого інтервалу (LCL і UCL, відповідно) для Cry1Fa, Cry1Da і комбінації 1:1 (мас./мас) з цих 2 білків стосовно совки трав'яної

- дикого типу (FAW), *Spodoptera frugiperda*. В останньому стовпчику зазначені очікувані величини LC_{50} , отримані виходячи з активності кожного окремого білка по формулі, описаній Tabashnik (1992) (Tabashnik B.E. Evaluation of synergism among *Bacillus thuringiensis* toxins Applied and Environmental Microbiology 58[10], 3343-3346, 1992). Комбінація вважається синергічною, якщо
- 5 очікувана величина вища верхньої довірчої межі для даної комбінації.

Таблиця 1

	Величини, що спостерігаються			Очікувані
FAW	LC_{50}	LCL	UCL	LC_{50}
Тільки 1Da	530	234	1731	-
Тільки 1Fa	136	75	252	-
1Fa-1Da	79	49	126	215,8909

- Таблиця 2. Оцінка активності, верхня і нижня межі 95 % довірчого інтервалу (LCL і UCL, відповідно), для Cry1Fa, Cry1Da і комбінації 1:1 (мас./мас) з цих 2 білків стосовно Cry1Fa-резистентної совки трав'яної (rFAW), *Spodoptera frugiperda*. В останньому стовпчику зазначені очікувані величини LC_{50} , отримані виходячи з активності кожного окремого білка по формулі, описаній Tabashnik (1992). Комбінація вважається синергічною, якщо очікувана величина вища
- 10 верхньої довірчої межі для даної комбінації.

Таблиця 2

	Величини, що спостерігаються			Очікувані
FAW	LC_{50}	LCL	UCL	LC_{50}
Тільки 1Da	92	58	144	-
Тільки 1Fa	3000	-	-	-
1Fa-1Da	39	27	58	177,9434

15

Приклад 2

Систематизовані дані зв'язування

- Експерименти по конкурентному зв'язуванню, проведені з використанням ^{125}I -міченого Cry1Da і мембранних везикул щіткової облямівки (BBMV), виділених у FAW, описані нижче.
- 20 Результати цих експериментів продемонстрували, що Cry1Da тісно зв'язано зі своїм рецептором, і що Cry1Fa не конкурує з Cry1Da за сайти зв'язування. Якщо резистентність до Cry1Da обумовлена мутацією рецептора, що спостерігається в цих дослідженнях, то отримані дані дають підставу припустити, що Cry1Fa є гарним IRM-засобом для знищення таких
- 25 резистентних популяцій або зниження розвитку такої резистентності. Результати біоаналізів, проведених з використанням Cry1Fa-резистентної FAW (rFAW), продемонстрували, що Cry1Da є активним стосовно цієї популяції. У цілому, ці дані дозволяють припустити, що Cry1Fa і Cry1Da можуть являти собою IRM-кластер, що ефективно пригнічує розвиток резистентності до будь-якого інсектицидного білка.

- Аналізи на зв'язування з рецептором показали, що ^{125}I -Cry1Da тісно зв'язується зі своїм(и) рецептором(ами) і може ефективно конкурувати за зв'язування з неміченим Cry1Da. Жоден з Cry1Ab, Cry1Fa або Cry1Be не може конкурувати з ^{125}I -Cry1Da за зв'язування із сайтом його рецептора в BBMV FAW, що вказує на те, що Cry1Da має унікальний сайт зв'язування в середній частині кишечника FAW, за зв'язування з яким не можуть конкурувати Cry1Ab, Cry1F і Cry1Be. Оскільки rFAW є такими ж чутливими до Cry1Da, як і FAW дикого типу, то це означає,
- 35 що передбачуваний сайт рецептора, що є модифікованим у комах rFAW, не є сайтом рецептора, з яким зв'язується Cry1Da. Таким чином, Cry1Da є чудовим партнером по кластеризації для Cry1Fa, оскільки він взаємодіє в іншому сайті мішені, що відповідає за його біологічну активність.

- При додаванні ^{125}I -Cry1Da до BBMV FAW, витіснити зв'язаний ^{125}I -Cry1Da здатний тільки сам Cry1Da, що не був позначений радіоактивною міткою. Нездатність Cry1Fa, Cry1Ab і Cry1Be витіснити зв'язаний ^{125}I -Cry1Da з BBMV вказує на те, що в середній частині кишки FAW, Cry1Da зв'язується з унікальним сайтом рецептора, з яким не взаємодіють Cry1Fa, Cry1Ab і Cry1Be, навіть незважаючи на те, що всі ці чотири різні токсини Cry мають активність, спрямовану проти личинок FAW.

- 45 Приклад 3

Конструювання химерних токсинів, що містять корові токсини Cry1 і гетерологічні протоксини

Химерні токсини. Химерні білки, що містять домен корового токсину одного Cry, приєднаного до протоксिनного сегмента іншого токсину Cry, були вже описані, наприклад, у патенті США № 5593881 і в патенті США № 5932209.

Варіантами химерних білків Cry1Da відповідно до винаходу є химерні токсини, що містять N-кінцевий сегмент корового токсину, що походить від інсектицидного токсину Cry1Da, приєднаного до гетерологічного протоксिनного сегмента ендотоксину дельта у визначеному положенні, розташованому за межами сегмента корового токсину. Перехід від корового токсину в гетерологічний сегмент протоксину може відбуватися приблизно в природній області стику токсин/протоксин, або альтернативно, частина нативного протоксину (що простягається за межі сегмента корового токсину) може зберігатися, причому, перехід у гетерологічний протоксин може відбуватися нижче. В одному з варіантів, сегменти корового токсину і протоксину можуть включати точно таку ж амінокислотну послідовність нативних токсинів, від яких вони походять, або вони можуть включати амінокислотні додавання, делеції або заміни, що не погіршують, а можуть навіть поліпшувати біологічну функцію сегментів, зв'язаних один з одним.

Так, наприклад, химерний токсин відповідно до винаходу містить сегмент корового токсину, що походить від Cry1Da, і гетерологічний протоксин. У переважному варіанті винаходу, сегмент корового токсину, що походить від Cry1Da2 (594 амінокислоти), приєднаний до гетерологічного сегмента, що містить сегмент протоксину, що походить від дельта-ендотоксину Cry1Ab (545 амінокислот). Послідовність химерного білка з 1139 амінокислот позначена тут Cry1Da. Слід зазначити, що інші химерні гібриди, що містять варіанти корового токсину Cry1Da2, і протоксини, що походять від Cry1Ab, входять в обсяг даного винаходу.

Другий химерний білок відповідно до винаходу містить сегмент корового токсину, що походить від Cry1Fa (603 амінокислоти) і приєднаний до гетерологічного сегмента, що містить сегмент протоксину, що походить від дельта-ендотоксину Cry1Ab (545 амінокислот). Послідовність химерного білка з 1148 амінокислот позначена тут Cry1Fa.

Приклад 4

Конструювання експресійних плазмід, що кодують химерні білки і їх експресію в *Pseudomonas*

Для створення експресійної конструкції pDOW2848 *Pseudomonas fluorescens* (Pf), отриманої з метою продукування повнорозмірного химерного білка Cry1Da, були застосовані стандартні методи клонування [описані, наприклад, в посібнику Sambrook et al, (1989) і Ausubel et al, (1995), і в більш пізніх виданнях]. Продукування білка здійснювали в штамі MB214 *Pseudomonas fluorescens* (похідному штаму MB101; *P. fluorescens*, біовар 1), що має інсерцію модифікованого оперонк lac, як описано в патенті США № 5169760. Основна стратегія клонування включає субклонування фрагмента ДНК, що кодує білок Cry1Da, в плазмідні вектори, в результаті чого цей фрагмент буде поміщений під експресійний контроль промотору Ptac і термінатора rrnBT1T2, що походить від плазмиди rKK223-3 (PL Pharmacia, Milwaukee, WI). Одна з таких плазмід позначена pDOW2848, а ізолят MB214, що містить цю плазмиду, позначений Dpf150.

Аналіз на ріст і експресію в шейкерних колбах. Продукування білка Cry1Da для характеристики і біологічного аналізу на його дію проти комах здійснювали з використанням штаму Dpf150 *P. fluorescens*, вирощеного в шейкерних колбах. Продукування білка Cry1Da, що знаходиться під контролем промотору Ptac, здійснювали як описано раніше в патенті США № 5527883. Докладний опис мікробіологічних маніпуляцій приводиться в публікації Squires et al., (2004), в заявці на патент США 20060008877, в заявці на патент США 20080193974 і в заявці на патент США 20080058262, які вводяться в даний опис за допомогою посилання. Експресія була індукована шляхом додавання ізопропіл-(-D-1-тіогалактопіранозиду (IPTG) після першого інкубування протягом 24 годин при 30 °C зі струшуванням. Зразки культур брали під час індукції і в різні періоди часу після індукції. Клітинну густину вимірювали по оптичній густині на 600 нм (OD₆₀₀).

Фракціонування клітин і аналіз зразків в шейкерних колбах, що проводиться за допомогою електрофорезу в ПААГ з ДСН. При кожному взятті зразка, клітинну густину зразків доводили до OD₆₀₀=20, і 1 мл-аліквоти центрифугували при 14000 x g протягом п'яти хвилин. Клітинний осад заморожували при -80 °C. Розчинні і нерозчинні фракції, взяті із заморожених зразків клітинного осаду в шейкерних колбах, отримували з використанням розчину для екстракції бактеріального білка EasyLyse™ (EPICENTRE® Biotechnologies, Madison, WI). Кожний клітинний осад ресуспендували в 1 мл розчину EasyLyse™, а потім розводили 1:4 в буфері для лізису і інкубували зі струшуванням при кімнатній температурі протягом 30 хвилин. Лізат центрифугували при 14000 про/міна протягом 20 хвилин при 40C, і супернатант виділяли у вигляді розчинної фракції. Потім осад (нерозчинну фракцію) ресуспендували в рівному об'ємі

забуференого фосфатом фізіологічного розчину (PBS; 11,9 мМ Na₂HPO₄, 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, pH 7,4).

Зразки змішували у відношенні 1:1 з 2 х буфером для зразків Леммлі, що містить β-меркаптоетанол (Sambrook et al, див. вище), і кип'ятили протягом 5 хвилин, а потім завантажували на 12 % біс-тріс-гель Criterion XT (Bio-Rad Inc., Hercules, CA). Електрофорез здійснювали в XT-буфері MOPS, рекомендованому виробником. Гелі забарвлювали кумасі синім Bio-Safe відповідно до протоколу, рекомендованого виробником (Bio-Rad), і візуалізували з використанням візуалізуючої системи Alpha Innotech (San Leandro, CA).

Отримання тілець включення. Отримання тілець включення білка Cry1Da (IB) здійснювали в клітинах, отриманих шляхом реакції ферментації *P. fluorescens*, які продукували нерозчинний інсектицидний Bt-білок, як показав аналіз, що проводиться за допомогою електрофорезу в ПААГ з ДСН і MALDI-MS (матрична лазерна десорбція/іонізувати мас-спектрометрія). Гранули, отримані шляхом ферментації *P. fluorescens*, відтавали на водяній бані при 37 °C. Клітини ресуспендували до 25 % мас/об в буфері для лізису [50 мМ трісу, pH 7,5, 200 мМ NaCl, 20 мМ EDTA-динатрієвої солі (етилендіамінтетраоцтової кислоти), 1 % тритони X-100 і 5 мМ дитіотреїтолу (DTT); 5 мл/л "коктейлю" інгібіторів бактеріальної протеази (Catalog # P8465; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), який додавали безпосередньо перед застосуванням]. Клітини суспендували на гомогенізаторі з ручним керуванням з установкою шкали найменшого значення (Tissue Tearor, BioSpec Products, Inc., Bartlesville, OK). Лізоцим (25 мг Sigma L7651, виділеного з білка курячих яєць) додавали до клітинної суспензії шляхом змішування металевим шпателем, і суспензію інкубували при кімнатній температурі протягом однієї години. Суспензію охолоджували на льоду протягом 15 хвилин, а потім обробляли ультразвуком на ультразвуковому генераторі Branson Sonifier 250 (два раунди по 1 хвилині, 50 % черговий цикл, 30 % вихід). Лізис клітин підтверджували за допомогою мікроскопії. При необхідності додавали 25 мг лізоциму, а потім інкубування і обробку ультразвуком повторювали. Після підтвердження лізису клітин під мікроскопом, лізат центрифугували при 11500 x g протягом 25 хвилин (4 °C) з отриманням осаду тілець включення (IB), і супернатант відкидали. Осад IB ресуспендували зі 100 мл буфера для лізису, гомогенізували в міксері з ручним керуванням і центрифугували як описано вище. Осад IB повторно промивали шляхом ресуспендування (в 50 мл буфера для лізису), гомогенізації, обробки ультразвуком і центрифугування доти, доки супернатант не ставав безбарвним, а осад IB твердим і не зовсім білим. Для кінцевого промивання, осад IB ресуспендували в стерильно відфільтрованій (на фільтрі 0,22 мкм) дистильованій воді, що містить 2 мМ EDTA, і центрифугували. Кінцевий осад ресуспендували в стерильно відфільтрованій дистильованій воді, що містить 2 мМ EDTA, і зберігали у вигляді 1 мл-аліквот при -80 °C.

Аналіз, що проводиться за допомогою електрофорезу в ПААГ з ДСН, і кількісну оцінку білка в препаратах IB здійснювали шляхом відтавання 1 мл-аліквоти осаду IB і розведення 1:20 стерильно відфільтрованою дистильованою водою. Потім розведений зразок кип'ятили з 4 х відновлюваним буфером для зразків [250 мМ тріс, pH 6,8, 40 % гліцерину (об/об), 0,4 % бромфенолового синього (мас/об), 8 % ДСН (мас/об) і 8 % β-меркаптоетанолу (об/об)] і завантажували на 4-20 % тріс-гліцин Novex® в гелі в ямку 12+2 (Invitrogen), обробленому 1 х тріс/гліцин/ДСН-буфер (BioRad). Гель піддавали електрофорезу протягом 60 хвилин при 200 вольт, а потім забарвлювали кумасі синім (50 % G-250/50 % R-250 в 45 % метанолі, 10 % оцтової кислоти), і знебарвлювали 7 % оцтовою кислотою, 5 % метанолом в дистильованій воді. Кількісну оцінку смуг-мішеней здійснювали шляхом порівняння денситометричних величин для смуг зі стандартними зразками альбуміну бичачої сироватки (BSA), проаналізованих на тому ж гелі для побудови стандартної кривої.

Солюбілізація тілець включення. 6 мл суспензії тілець включення Cry1Da від клону Pf, DPfl50 центрифугували на мікроцентрифузі Еппендорфа моделі 5415C, встановленій на найвище значення (приблизно 14000 x g), в результаті чого отримували осад тілець включення. Супернатант буфера для зберігання видаляли і замінювали 25 мл 100 мМ натрійкарбонатного буфера, pH 11, в конічній 50 мл-пробірці. Тільця включення ресуспендували піпеткою і піддавали вихровому перемішуванню до отримання однорідної суміші. Пробірку поміщували на платформу, що повільно обертається, і залишали на ніч при 4 °C для екстракції білка-мішені. Екстракт центрифугували при 30000 x g протягом 30 хвилин при 4 °C, і отриманий супернатант 5-кратно концентрували на центрифугальному фільтруючому пристрої з регенованою целюлозою Amicon Ultra-15 (з відсічкою молекулярної маси 30000; Millipore). Буфер для зразків замінювали 10 мМ CAPS [3-(циклогексаміно)-1-пропансульфоною кислотою], pH 10, з використанням одноразових колонок PD-10 (GE Healthcare, Piscataway, NJ).

Солюбілізація білка тілець включення і їх активація трипсином. У деяких випадках, суспензію Cry1Da тілець включення від клону Pf, DPf150, центрифугували на мікроцентрифузі Еппендорфа моделі 5415C, встановленій на найвище значення (приблизно 14000 x g), в результаті чого отримували осад тілець включення. Супернатант буфера для зберігання
 5 видаляли і замінювали 100 мМ CAPS, рН 11, з отриманням білка, концентрація якого становила приблизно 50 мг/мл. Пробірку обертали при кімнатній температурі протягом трьох годин до повної солюбілізації білка. Потім додавали трипсин в рівних кількостях до 5 % - 10 % (мас. %, по вихідній масі порошку IB) і здійснювали гідроліз шляхом інкубування при обертанні протягом
 10 ночі при 4 °C або обертанні протягом 90-120 хвилин при кімнатній температурі. Нерозчинний матеріал видаляли шляхом центрифугування при 10000 x g протягом 15 хвилин, і супернатант наносили на аніонообмінну колонку MonoQ (10 мм x 10 см). Активовані білки Cry1Da елюювали (як було визначено за допомогою електрофорезу в ПААГ з ДСН) 25 колонковими об'ємами 0-100 % 1М градієнта NaCl. Фракції, що містять активований білок, об'єднували, і при
 15 необхідності, концентрували до менше ніж 10 мл на центрифугальному фільтруючому пристрої з регенованою целюлозою Amicon Ultra-15 як описано вище. Потім матеріал пропускали через колонку з Superdex 200 (16 мм x 60 см) в буфері, що містить 100 мМ NaCl, 10 % гліцерину, 0,5 % твіну-20 і 1 мМ EDTA. Аналіз, що проводиться за допомогою електрофорезу в ПААГ з ДСН, показав, що активований (ферментативно зрізаний) білок елюється при 65-70 мл. Фракції, що містять активований білок, збирали і концентрували на центрифугальному
 20 концентраторі як описано вище.

Гель-електрофорез. Препарати концентрованого білка отримували для проведення електрофорезу шляхом розведення 1:50 в буфері для зразків LDS NuPAGE® (Invitrogen), що містить 5 мМ DTT як відновник, і нагрівали при 95 °C протягом 4 хвилин. Зразок завантажували на доріжки-дублікати з 4-12 % гелем NuPAGE® разом з п'ятьма BSA-стандартами в кількості від
 25 0,2 мкг до 2 мкг/доріжка (для побудови стандартної кривої). Потім подавали напругу в 200 В з використанням буфера MOPS для електрофорезу з ДНС (Invitrogen) доти, доки барвник "свідок" не досягав основи гелю. Гель забарвлювали 0,2 % кумасі синім G-250 в 45 % метанолі, 10 % оцтової кислоти, і знебарвлювали спочатку шляхом швидкої обробки 45 % метанолом, 10 % оцтовою кислотою, а потім шляхом тривалої обробки 7 % оцтовою кислотою, 5 %
 30 метанолом до появи прозорого фону. Після знебарвлення, гель сканували на мультівізуалізаторі BioRad Fluor-S. Для отримання об'ємів забарвлених смуг білка з відніманням фону і для побудови стандартної кривої BSA, яка була використана для обчислення концентрації химерного білка Cry1Da в маточному розчині, використовували комп'ютерну програму Quantity One Software v.4.5.2.

35 Приклад 5

Отримання білків, що містять корові токсини Cry1Fa і Cry1Da, і виділення мембранних везикул щіткової облямівки *Spodoptera frugiperda* для проведення експериментів по конкурентному зв'язуванню

У нижченаведених прикладах описана оцінка конкурентного зв'язування білків, що містять коровий токсин Cry1, з передбачуваними рецепторами в тканині кишечника комах. Було
 40 показано, що ¹²⁵I-мічений білок, що містить коровий токсин Cry1Da, зв'язується з високою афінністю з мембранними везикулами щіткової облямівки (BBMV), отриманими від *Spodoptera frugiperda* (совки трав'яної), і що білок, який містить коровий токсин Cry1Fa, не конкурує за зв'язування з цими везикулами.

Очищення білків Cry. Ген, що кодує химерний білок Cry1Da, експресували в експресійному штамі *Pseudomonas fluorescens* як описано в прикладі 4. Аналогічним чином, ген, що кодує химерний білок, який містить коровий токсин Cry1Fa (603 амінокислоти) і протоксин Cry1Ab (545 амінокислот), експресували в системі Pf. У випадку Cry1Fa, експресійна плазміда була позначена pDAB1817, а штам *P. fluorescens*, що містить pDAB1817, був позначений DPf129.
 50 Білки очищали методами, описаними в прикладі 4, і здійснювали гідроліз трипсином з отриманням активованих корових токсинів з повнорозмірних білків, а потім ці продукти очищали методами, описаними в прикладі 4. Препарати оброблених трипсином білків (що містять активований коровий токсин) мали чистоту >95 %, а їх молекулярна маса становила приблизно 65 кДа як було експериментально визначено за допомогою електрофорезу в ДСН-ПААГ.
 55 Використовуваний тут активований коровий токсин отриманий з білка Cry1Da, називається білком, що містить коровий токсин Cry1Da, а активований коровий токсин, отриманий з білка Cry1Fa, називається білком, що містить коровий токсин Cry1Fa.

Отримання і фракціонування солюбілізованих BBMV. Стандартні методи кількісної оцінки білка і електрофорезу в поліакриламідному гелі з ДСН проводили як описано, наприклад, в посібнику Sambrook et al. (1989) і Ausubel et al. (1995), і в більш пізніх виданнях.
 60

Личинки *S. frugiperda* в останній віковій стадії витримували в умовах голодування протягом ночі, а потім, після охолодження на льоду протягом 15 хвилин, розкривали. Тканину середньої частини кишечника видаляли з порожнини тіла, а задню частину кишечника залишали приєднаною до покривного шару. Середню частину кишечника вміщували в 9 х об'єм охолодженого льодом гомогенізуючого буфера (300 мМ маніт, 5 мМ EGTA, 17 мМ основи тріс, рН 7,5), в який була додана суміш інгібіторів протеази (Sigma-Aldrich P-2714), розведена відповідно до рекомендації постачальників. Тканину гомогенізували 15-а імпульсами, що подаються скляним гомогенізатором тканини. BBMV отримували методом $MgCl_2$ -преципітації, описаним Wolfersberger (1993). Коротко, рівний об'єм 24 мМ розчину $MgCl_2$ в 300 мМ маніту змішували з гомогенатом, виділеним з середньої частини кишки, перемішували протягом 5 хвилин і залишали на льоду на 15 хвилин. Розчин центрифугували при 2500 x g протягом 15 хвилин при 40 °C. Супернатант зберігали, і осад суспендували у вихідному об'ємі 0,5 x розведеного гомогенізуючого буфера, а потім знову центрифугували. Два супернатанти об'єднували і центрифугували при 27000 x g протягом 30 хвилин при 4 °C з отриманням фракції BBMV. Осад суспендували в буфері для зберігання BBMV (10 мМ HEPES, 130 мМ KCl, 10 % гліцерин, рН 7,4) до отримання концентрації білка приблизно 3 мг/мл. Концентрацію білка визначали з використанням альбуміну бичачої сироватки (BSA) як стандарт. Визначення рівня лужної фосфатази (ферменту-маркера для фракції BBMV) проводили до заморожування зразків з використанням набору для аналізу лужний фосфатази QuantiChrom™ DALP-250 (Gentaur Molecular Products, Kampenhout, BE) відповідно до інструкцій виробників. Питома активність цього ферменту звичайно зростала в 7 разів в порівнянні з активністю, що виявляється у вихідній фракції гомогенату середньої частини кишки. BBMV розділяли на зразки-аліквоти по 250 мкл, швидко заморожували в рідкому азоті і зберігали при -80 °C.

Електрофорез. Аналіз білків за допомогою електрофорезу в ДСН-ПААГ проводили у відновних умовах (тобто, в 5 % β -меркаптоетанолі, BME) і в денатуруючих умовах (тобто, при нагріванні протягом 5 хвилин, при 90 °C в присутності 2 % ДСН). Білки завантажували на ямку з 4-20 % тріс-гліциновим поліакриламідним гелем (BioRad; Hercules, CA) і розділяли під напругою 200 вольт протягом 60 хвилин. Смуги білка детектували шляхом фарбування кумасі діамантовим блакитним R-250 (BioRad) протягом однієї години, і знебарвлювали розчином 5 % метанолу в 7 % оцтовій кислоті. Гелі візуалізували і аналізували на візуалізаторі BioRad Fluro-S Multi Imager™. Відносні молекулярні маси смуг білка визначали шляхом порівняння з рухливістю білків з відомою молекулярною масою, що спостерігаються в зразку ледера білка BenchMark™ (Life Technologies, Rockville, MD), завантаженого на одну ямку гелю.

Йодування білка, що містить коровий токсин Cry1Da. Очищений білок, що містить коровий токсин Cry1Da, піддавали реакції йодування з використанням йодуючих сфер Pierce Iodination Beads (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). Коротко, дві йодуючі сфери два рази промивали 500 мкл PBS (20 мМ фосфат натрію, 0,15 М NaCl, рН 7,5), і вміщували в центрифугальну 1,5 мл-пробірку, що містить 100 мкл PBS. Потім додавали 0,5 мкі ^{125}I -міченого йодиду натрію, після чого компоненти залишали для реакції на 5 хвилин при кімнатній температурі, а потім до розчину додавали 1 мкг білка, що містить коровий токсин Cry1Da, і суміш залишали для реакції ще на 3-5 хвилин. Реакцію завершували шляхом піпетування розчину з йодуючих сфер і наносили на центрифугальну колонку Zeba™ (Invitrogen), урівноважену в 50 мМ CAPS, рН 10,0, 1 мМ DTT (дитіотреїтол), 1 мМ EDTA і 5 % гліцерині. Йодуючі сфери два рази промивали 10 мкл PBS і промивальний розчин також наносили на знесолювальну колонку Zeba™. Радіоактивний розчин елюювали з центрифугальної колонки шляхом центрифугування при 1000 x g протягом 2 хвилин. Потім, білок, що містить коровий токсин Cry1Da і мічену радіоактивну ^{125}I , діалізували проти 50 мМ CAPS, рН 10,0, 1 мМ DTT, 1 мМ EDTA і 5 % гліцерину.

Візуалізація. Нерадіоактивний йодований білок, що містить коровий токсин Cry1Da, визначали за допомогою електрофорезу в ДСН-ПААГ і візуалізації флуоресцентним методом. Коротко, ДСН-ПААГ-гелі сушили з використанням апарату для сушіння гелю BioRad відповідно до інструкцій виробників. Осушені гелі візуалізували шляхом їх загортання в плівку Mylar (товщиною в 12 мкм) і експонування під флуоресцентним екраном з накопиченням Molecular Dynamics (35 см x 43 см) протягом 1 години. Планшети виявляли за допомогою флуоресцентного візуалізатора Molecular Dynamics Storm 820, і зображення аналізували за допомогою комп'ютерної програми ImageQuant™.

Приклад 6

Зв'язування ^{125}I -міченого білка, що містить коровий токсин Cry1, з BBMV від *Spodoptera frugiperda*

З метою визначення оптимальної кількості білка BBMV для його використання в аналізах на зв'язування з білками, що містять корові токсини Cry1Da і Cry1Fa, будували криву насичення.

0,5 нМ 125 I-міченого білка, що містить коровий токсин Cry1, інкубували протягом 1 години при 28 °C в буфері для зв'язування (8 мМ NaHPO₄, 2 мМ KH₂PO₄, 150 мМ NaCl, 0,1 % BSA, pH7,4) з білком BBMV в кількості, що складає від 0 мкг/мл до 500 мкг/мл (загальний об'єм 0,5 мл). 125 I-мічений білок, що містить коровий токсин Cry1 і зв'язаний з білками BBMV, відділяли від незв'язаної фракції шляхом взяття зразків 150 мкл реакційної суміші з трьома повторностями, які вміщували в окремі центрифугальні 1,5 мл-пробірки і центрифугували при 14000 x g протягом 8 хвилин при кімнатній температурі. Супернатант обережно видаляли, і осад три рази промивали охолодженим льодом буфером для зв'язування. Дно центрифугальної пробірки, що містить осад, відрізали, вміщували в скляну пробірку для культивування розміром 13 x 75 мм, і кожний зразок підраховували протягом 5 хвилин в гамма-лічильнику. Потім будували графік залежності CPM (число імпульсів в хвилину) мінус фоновий CPM (за відсутності реакції з білком BBMV) від концентрації білка BBMV. Крім того, відповідно до результатів, отриманих в іншому аналізі (Luo et al., 1999) оптимальна концентрація білка BBMV, що використовується в аналізах на зв'язування, становила 150 мкг/мл.

Приклад 7

Аналізи на конкурентне зв'язування BBMV від *S. frugiperda* з білками, що містять корові токсини Cry1Da і Cry1Fa

Аналізи на гомологічне і гетерологічне конкурентне зв'язування проводили з використанням 150 мкг/мл білка BBMV *S. frugiperda* і 0,5 нМ 125 I-міченого білка, що містить коровий токсин Cry1Da. До реакційної суміші додавали конкурентний нерадіоактивний білок, що містить коровий токсин Cry1Fa, в концентраціях від 0,045 нМ до 1000 нМ, і одночасно додавали радіоактивний білок, що містить коровий токсин Cry1Da, для гарантії істинного конкурентного зв'язування. Інкубування проводили протягом 1 години при 28 °C і вимірювали кількість 125 I-міченого білка, що містить коровий токсин Cry1Da і зв'язаного з BBMV (специфічно зв'язаного) як описано вище. Неспецифічне зв'язування виражали як величину, отриману в присутності 1000 нМ нерадіоактивного білка, що містить коровий токсин Cry1Da. 100 %-е загальне зв'язування розглядається як кількість зв'язування за відсутності якого-небудь конкурентно зв'язаного білка, що містить коровий токсин Cry1Fa.

У аналізах на зв'язування з рецептором, що проводяться з використанням 125 I-міченого білка, що містить коровий токсин Cry1Da, визначали здатність білка, який містить коровий токсин Cry1Fa, витіснити цей радіоактивно мічений ліганд з його сайту зв'язування з BBMV від *S. frugiperda*. Результати показали, що білок, який містить коровий токсин Cry1Fa, не витісняв зв'язаний 125 I-мічений білок, що містить коровий токсин Cry1Da, з його рецепторного(их) білка(ів) при концентрації до 1000 нМ (при концентрації, яка в 2000 разів перевищувала концентрацію радіоактивного зв'язувального ліганду). Як і передбачалося, немічений білок, що містить коровий токсин Cry1Da, мав здатність витіснити радіоактивно мічений білок, що містить коровий токсин Cry1Da, з його білка(ів), що зв'язується(ються), на що вказувала сигмоїдальна крива доза-відповідь, де 50 %-е витіснення відбувалося при 5 нМ.

Таким чином, було показано, що білок, який містить коровий токсин Cry1Da, взаємодіє з сайтом зв'язування BBMV *S. frugiperda*, який не зв'язується з білком, що містить коровий токсин Cry1Fa.

Джерела інформації:

Finney, D.J. 1971. Probit analysis. Cambridge University Press, England.

Hua, G., L. Masson, J. L. Jurat-Fuentes, G. Schwab, and M. J. Adang. Binding analyses of *Bacillus thuringiensis* Cry d-endotoxins using brush border membrane vesicles of *Ostrinia nubilalis*. *Applied and Environmental Microbiology* 67[2], 872-879. 2001.

LeOra Software. 1987. POLO-PC. A user's guide to probit and logit analysis. Berkeley, CA.

McGaughey, W. H., F. Gould, and W. Gelernter. Bt resistance management. *Nature Biotechnology* 16[2], 144-146. 1998

Marcon, P.R.G.C., L.J. Young, K. Steffey, and B.D. Siegfried. 1999. Baseline susceptibility of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hubner) (Lepidoptera: Pyralidae) to *Bacillus thuringiensis* toxins. *J. Econ. Entomol.* 92 (2): 280-285.

Robertson, L.J. and H.K. Preisler. 1992. Pesticide bioassays with arthropods. CRC Press, Boca Ranton, FL.

SAS Institute Inc. 1988. SAS procedures guide, Release 6.03 edition. SAS Institute Inc, Cary, NC.

Stone, B.F. 1968. A formula for determining degree of dominance in cases of monofactorial inheritance of resistance to chemicals. *Bull. WHO* 38:325-329.

Van Mellaert, H., J. Botterman, J. Van Rie, and H. Joos. Transgenic plants for the prevention of development of insects resistant to *Bacillus thuringiensis* toxins. (Plant Genetic Systems N.V., Belg. 89-401499[400246], 57-19901205. EP. 5-31-1989.

Додаток А

Список дельта-ендотоксинів Crickmore et al. web-сайт (вказаний в заявці)

Реєстраційний номер для доступу в NCBI

Назва	Реєстр. №	Автори	Рік	Штам-джерело	Коментарі
CryIAa1	AAA22353	Schnepf et al	1985	Bt kurstaki HD1	
CryIAa2	AAA22552	Shibano et al	1985	Bt sotto	
CryIAa3	BAA00257	Shimizu et al	1988	Bt aizawai IPL7	
CryIAa4	CAA31886	Masson et al	1989	Bt entomocidus	
CryIAa5	BAA04468	Udayasuriyan et al	1994	Bt Fu-2-7	
CryIAa6	AAA86265	Masson et al	1994	Bt kurstaki NRD-12	
CryIAa7	AAD46139	Osman et al	1999	Bt C12	
CryIAa8	I26149	Liu	1996		тільки послідовність ДНК
CryIAa9	BAA77213	Nagamatsu et al	1999	Bt dendrolimus T84A1	
CryIAa10	AAD55382	Hou and Chen	1999	Bt kurstaki HD-1-02	
CryIAa11	CAA70856	Tounsi et al	1999	Bt kurstaki	
CryIAa12	AAP80146	Yao et al	2001	Bt Ly30	
CryIAa13	AAM44305	Zhong et al	2002	Bt sotto	
CryIAa14	AAP40639	Ren et al	2002	неопублікован	
CryIAa15	AAAY66993	Sauka et al	2005	Bt INTA Mol-12	
CryIAb1	AAA22330	Wabiko et al	1986	Bt berliner 1715	
CryIAb2	AAA22613	Thorne et al	1986	Bt kurstaki	
CryIAb3	AAA22561	Geiser et al	1986	Bt kurstaki HD1	
CryIAb4	BAA00071	Kondo et al	1987	Bt kurstaki HD1	
CryIAb5	CAA28405	Hofte et al	1986	Bt berliner 1715	
CryIAb6	AAA22420	Hefford et al	1987	Bt kurstaki NRD-12	
CryIAb7	CAA31620	Haider & Ellar	1988	Bt aizawai IC1	
CryIAb8	AAA22551	Oeda et al	1987	Bt aizawai IPL7	
CryIAb9	CAA38701	Chak & Jen	1993	Bt aizawai HD133	
CryIAb10	A29125	Fischhoff et al	1987	Bt kurstaki HD1	
CryIAb11	I12419	Ely & Tippet	1995	Bt A20	тільки послідовність ДНК
CryIAb12	AAC64003	Silva-Werneck et al	1998	Bt kurstaki S93	
CryIAb13	AAN76494	Tan et al	2002	Bt c005	
CryIAb14	AAG16877	Meza-Basso & Theoduloz	2000	Native Chilean Bt	
CryIAb15	AAO13302	Li et al	2001	Bt B-Hm-16	
CryIAb16	AAK55546	Yu et al	2002	Bt AC-11	

<u>CryIAc27</u>	FJ617447	Guan Peng et al	2009	Bt Tm44-1B	№ NCBI, зареєстр. 09 липня
<u>CryIAc28</u>	ACM90319	Li et al	2009	Bt Q-12	
<u>CryIAd1</u>	AAA22340	Feitelson	1993	Bt aizawai PS8II	
<u>CryIAd2</u>	CAA01880	Anonymous	1995	Bt PS81RR1	
<u>CryIAe1</u>	AAA22410	Lee & Aronson	1991	Bt alesti	
<u>CryIAf1</u>	AAB82749	Kang et al	1997	Bt NT0423	
<u>CryIAg1</u>	AAD46137	Mustafa	1999		
<u>CryIAh1</u>	AAQ14326	Tan et al	2000		
<u>CryIAh2</u>	ABB76664	Qi et al	2005	Bt alesti	
<u>CryIAi1</u>	AAO39719	Wang et al	2002		
<u>CryIA-like</u>	AAK14339	Nagarathinam et al	2001	Bt kunthala nags3	невизначена послідовність
<u>CryIBa1</u>	CAA29898	Brizzard & Whiteley	1988	Bt thuringiensis HD2	
<u>CryIBa2</u>	CAA65003	Soetaert	1996	Bt entomocidus HD110	
<u>CryIBa3</u>	AAK63251	Zhang et al	2001		
<u>CryIBa4</u>	AAK51084	Nathan et al	2001	Bt entomocidus HD9	
<u>CryIBa5</u>	ABO20894	Song et al	2007	Bt sfw-12	
<u>CryIBa6</u>	ABL60921	Martins et al	2006	Bt S601	
<u>CryIBb1</u>	AAA22344	Donovan et al	1994	Bt EG5847	
<u>CryIBc1</u>	CAA86568	Bishop et al	1994	Bt morrisoni	
<u>CryIBd1</u>	AAD10292	Kuo et al	2000	Bt wuhanensis HD525	
<u>CryIBd2</u>	AAM93496	Isakova et al	2002	Bt 834	
<u>CryIBe1</u>	AAC32850	Payne et al	1998	Bt PS158C2	
<u>CryIBe2</u>	AAQ52387	Baum et al	2003		
<u>CryIBe3</u>	FJ716102	Xiaodong Sun et al	2009	Bt	№ NCBI, зареєстр. 09 липня
<u>CryIBf1</u>	CAC50778	Arnaut et al	2001		
<u>CryIBf2</u>	AAQ52380	Baum et al	2003		
<u>CryIBg1</u>	AAO39720	Wang et al	2002		
<u>CryICa1</u>	CAA30396	Honee et al	1988	Bt entomocidus 60.5	
<u>CryICa2</u>	CAA31951	Sanchis et al	1989	Bt aizawai 7.29	
<u>CryICa3</u>	AAA22343	Feitelson	1993	Bt aizawai PS8II	
<u>CryICa4</u>	CAA01886	Van Mellaert et al	1990	Bt entomocidus HD110	
<u>CryICa5</u>	CAA65457	Strizhov	1996	Bt aizawai 7.29	
<u>CryICa6</u>	AAF37224	Yu et al	2000	Bt AF-2	
<u>CryICa7</u>	AAG50438	Aixing et al	2000	Bt J8	
<u>CryICa8</u>	AAM00264	Chen et al	2001	Bt c002	
<u>CryICa9</u>	AAL79362	Kao et al	2003	Bt G10-01A	
<u>CryICa10</u>	AAN16462	Lin et al	2003	Bt E05-20a	
<u>CryICa11</u>	AAX53094	Cai et al	2005	Bt C-33	

<u>CryIAb17</u>	AAT46415	Huang et al	2004	Bt WB9	
<u>CryIAb18</u>	AAQ88259	Stobdan et al	2004	Bt	
<u>CryIAb19</u>	AAW31761	Zhong et al	2005	Bt X-2	
<u>CryIAb20</u>	ABB72460	Liu et al	2006	BtC008	
<u>CryIAb21</u>	ABS18384	Swiecicka et al	2007	Bt IS5056	
<u>CryIAb22</u>	ABW87320	Wu and Feng	2008	BtS2491Ab	
<u>CryIAb-like</u>	AAK14336	Nagarathinam et al	2001	Bt kunthala RX24	невизначена послідовність
<u>CryIAb-like</u>	AAK14337	Nagarathinam et al	2001	Bt kunthala RX28	невизначена послідовність
<u>CryIAb-like</u>	AAK14338	Nagarathinam et al	2001	Bt kunthala RX27	невизначена послідовність
<u>CryIAb-like</u>	ABG88858	Lin et al	2006	Bt ly4a3	невизначена послідовність
<u>CryIAc1</u>	AAA22331	Adang et al	1985	Bt kurstaki HD73	
<u>CryIAc2</u>	AAA22338	Von Tersch et al	1991	Bt kenya	
<u>CryIAc3</u>	CAA38098	Dardenne et al	1990	Bt BTS89A	
<u>CryIAc4</u>	AAA73077	Feitelson	1991	Bt kurstaki PS85A1	
<u>CryIAc5</u>	AAA22339	Feitelson	1992	Bt kurstaki PS81GG	
<u>CryIAc6</u>	AAA86266	Masson et al	1994	Bt kurstaki NRD-12	
<u>CryIAc7</u>	AAB46989	Herrera et al	1994	Bt kurstaki HD73	
<u>CryIAc8</u>	AAC44841	Omolo et al	1997	Bt kurstaki HD73	
<u>CryIAc9</u>	AAB49768	Gleave et al	1992	Bt DSIR732	
<u>CryIAc10</u>	CAA05505	Sun	1997	Bt kurstaki YBT-1520	
<u>CryIAc11</u>	CAA10270	Makhdoom & Riazuddin	1998		
<u>CryIAc12</u>	II2418	Ely & Tippett	1995	Bt A20	тільки послідовність ДНК
<u>CryIAc13</u>	AAD38701	Qiao et al	1999	Bt kurstaki HD1	
<u>CryIAc14</u>	AAQ06607	Yao et al	2002	Bt Ly30	
<u>CryIAc15</u>	AAN07788	Tzeng et al	2001	Bt from Taiwan	
<u>CryIAc16</u>	AAU87037	Zhao et al	2005	Bt H3	
<u>CryIAc17</u>	AAX18704	Hire et al	2005	Bt kenya HD549	
<u>CryIAc18</u>	AAY88347	Kaur & Allam	2005	Bt SK-729	
<u>CryIAc19</u>	ABD37053	Gao et al	2005	Bt C-33	
<u>CryIAc20</u>	ABB89046	Tan et al	2005		
<u>CryIAc21</u>	AAY66992	Sauka et al	2005	INTA Mol-12	
<u>CryIAc22</u>	ABZ01836	Zhang & Fang	2008	Bt W015-1	
<u>CryIAc23</u>	CAQ30431	Kashyap et al	2008	Bt	
<u>CryIAc24</u>	ABL01535	Arango et al	2008	Bt 146-158-01	
<u>CryIAc25</u>	FJ513324	Guan Peng et al	2008	Bt Tm37-6	№ NCBI, зареєстр. 09 липня
<u>CryIAc26</u>	FJ617446	Guan Peng et al	2009	Bt Tm41-4	№ NCBI, зареєстр. 09 липня

<u>Cry1Cb1</u>	M97880	Kalman et al	1993	Bt galleriae HD29	тільки послідовність ДНК
<u>Cry1Cb2</u>	AAG35409	Song et al	2000	Bt c001	
<u>Cry1Cb3</u>	ACD50894	Huang et al	2008	Bt 087	
<u>Cry1Cb-like</u>	AAX63901	Thammasittirong et al	2005	Bt TA476-1	недостатня послідовність
<u>Cry1Da1</u>	CAA38099	Hofte et al	1990	Bt aizawai HD68	тільки послідовність ДНК
<u>Cry1Da2</u>	I76415	Payne & Sick	1997		
<u>Cry1Db1</u>	CAA80234	Lambert	1993	Bt BTS00349A	
<u>Cry1Db2</u>	AAK48937	Li et al	2001	Bt B-Pr-88	
<u>Cry1Dc1</u>	ABK35074	Lertwiriawong et al	2006	Bt JC291	
<u>Cry1Ea1</u>	CAA37933	Visser et al	1990	Bt kenyaе 4F1	
<u>Cry1Ea2</u>	CAA39609	Bosse et al	1990	Bt kenyaе	
<u>Cry1Ea3</u>	AAA22345	Feitelson	1991	Bt kenyaе PS81F	
<u>Cry1Ea4</u>	AAD04732	Barboza-Corona et al	1998	Bt kenyaе LBIT-147	тільки послідовність ДНК
<u>Cry1Ea5</u>	A15535	Botterman et al	1994		
<u>Cry1Ea6</u>	AAL50330	Sun et al	1999	Bt YBT-032	
<u>Cry1Ea7</u>	AAW72936	Huehne et al	2005	Bt JC190	
<u>Cry1Ea8</u>	ABX11258	Huang et al	2007	Bt HZM2	
<u>Cry1Eb1</u>	AAA22346	Feitelson	1993	Bt aizawai PS81A2	
<u>Cry1Fa1</u>	AAA22348	Chambers et al	1991	Bt aizawai EG6346	
<u>Cry1Fa2</u>	AAA22347	Feitelson	1993	Bt aizawai PS81I	
<u>Cry1Fb1</u>	CAA80235	Lambert	1993	Bt BTS00349A	
<u>Cry1Fb2</u>	BAA25298	Masuda & Asano	1998	Bt morrisoni INA67	
<u>Cry1Fb3</u>	AAF21767	Song et al	1998	Bt morrisoni	
<u>Cry1Fb4</u>	AAC10641	Payne et al	1997		
<u>Cry1Fb5</u>	AAO13295	Li et al	2001	Bt B-Pr-88	
<u>Cry1Fb6</u>	ACD50892	Huang et al	2008	Bt 012	
<u>Cry1Fb7</u>	ACD50893	Huang et al	2008	Bt 087	
<u>Cry1Ga1</u>	CAA80233	Lambert	1993	Bt BTS0349A	
<u>Cry1Ga2</u>	CAA70506	Shevelev et al	1997	Bt wuhanensis	
<u>Cry1Gb1</u>	AAD10291	Kuo & Chak	1999	Bt wuhanensis HD525	
<u>Cry1Gb2</u>	AAO13756	Li et al	2000	Bt B-Pr-88	
<u>Cry1Gc</u>	AAQ52381	Baum et al	2003		
<u>Cry1Ha1</u>	CAA80236	Lambert	1993	Bt BTS02069AA	
<u>Cry1Hb1</u>	AAA79694	Koo et al	1995	Bt morrisoni BF190	
<u>Cry1H-like</u>	AAF01213	Srifah et al	1999	Bt JC291	недостатня послідовність
<u>Cry1Ia1</u>	CAA44633	Tailor et al	1992	Bt kurstaki	
<u>Cry1Ia2</u>	AAA22354	Gleave et al	1993	Bt kurstaki	

<u>CryIIa3</u>	AAC36999	Shin et al	1995	Bt kurstaki HD1	
<u>CryIIa4</u>	AAB00958	Kostichka et al	1996	Bt AB88	
<u>CryIIa5</u>	CAA70124	Selvapandiyan	1996	Bt 61	
<u>CryIIa6</u>	AAC26910	Zhong et al	1998	Bt kurstaki S101	
<u>CryIIa7</u>	AAM73516	Porcar et al	2000	Bt	
<u>CryIIa8</u>	AAK66742	Song et al	2001		
<u>CryIIa9</u>	AAQ08616	Yao et al	2002	Bt Ly30	
<u>CryIIa10</u>	AAP86782	Espindola et al	2003	Bt thuringiensis	
<u>CryIIa11</u>	CAC85964	Tounsi et al	2003	Bt kurstaki BNS3	
<u>CryIIa12</u>	AAV53390	Grossi de Sa et al	2005	Bt	
<u>CryIIa13</u>	ABF83202	Martins et al	2006	Bt	
<u>CryIIa14</u>	ACG63871	Liu & Guo	2008	Bt11	
<u>CryIIa15</u>	FJ617445	Guan Peng et al	2009	Bt E-1B	№ NCBI, зареєстр. 09 липня
<u>CryIIa16</u>	FJ617448	Guan Peng et al	2009	Bt E-1A	№ NCBI, зареєстр. 09 липня
<u>CryIIb1</u>	AAA82114	Shin et al	1995	Bt entomocidus BP465	
<u>CryIIb2</u>	ABW88019	Guan et al	2007	Bt PP61	
<u>CryIIb3</u>	ACD75515	Liu & Guo	2008	Bt GS8	
<u>CryIIc1</u>	AAC62933	Osman et al	1998	Bt C18	
<u>CryIIc2</u>	AAE71691	Osman et al	2001		
<u>CryIId1</u>	AAD44366	Choi	2000		
<u>CryIIe1</u>	AAG43526	Song et al	2000	Bt BTC007	
<u>CryIIIf1</u>	AAQ52382	Baum et al	2003		
<u>CryII-like</u>	AAC31094	Payne et al	1998		недостатня послідовність
<u>CryII-like</u>	ABG88859	Lin & Fang	2006	Bt ly4a3	недостатня послідовність
<u>CryIJal</u>	AAA22341	Donovan	1994	Bt EG5847	
<u>CryIJB1</u>	AAA98959	Von Tersch & Gonzalez	1994	Bt EG5092	
<u>CryIJc1</u>	AAC31092	Payne et al	1998		
<u>CryIJc2</u>	AAQ52372	Baum et al	2003		
<u>CryIJD1</u>	CAC50779	Arnaut et al	2001	Bt	
<u>CryIKa1</u>	AAB00376	Koo et al	1995	Bt morrisoni BF190	
<u>CryILa1</u>	AAS60191	Je et al	2004	Bt kurstaki K1	
<u>CryI-like</u>	AAC31091	Payne et al	1998		недостатня послідовність
<u>Cry2Aa1</u>	AAA22335	Donovan et al	1989	Bt kurstaki	
<u>Cry2Aa2</u>	AAA83516	Widner & Whiteley	1989	Bt kurstaki HD1	
<u>Cry2Aa3</u>	D86064	Sasaki et al	1997	Bt sotto	тільки послідовність ДНК
<u>Cry2Aa4</u>	AAC04867	Misra et al	1998	Bt kenya HD549	
<u>Cry2Aa5</u>	CAA10671	Yu & Pang	1999	Bt SL39	
<u>Cry2Aa6</u>	CAA10672	Yu & Pang	1999	Bt YZ71	
<u>Cry2Aa7</u>	CAA10670	Yu & Pang	1999	Bt CY29	

<u>Cry2Aa8</u>	AAO13734	Wei et al	2000	Bt Dongbei 66	
<u>Cry2Aa9</u>	AAO13750	Zhang et al	2000		
<u>Cry2Aa10</u>	AAQ04263	Yao et al	2001		
<u>Cry2Aa11</u>	AAQ52384	Baum et al	2003		
<u>Cry2Aa12</u>	ABI83671	Tan et al	2006	Bt Rpp39	
<u>Cry2Aa13</u>	ABL01536	Arango et al	2008	Bt 146-158-01	
<u>Cry2Aa14</u>	ACF04939	Hire et al	2008	Bt HD-550	
<u>Cry2Ab1</u>	AAA22342	Widner & Whiteley	1989	Bt kurstaki HD1	
<u>Cry2Ab2</u>	CAA39075	Dankocsik et al	1990	Bt kurstaki HD1	
<u>Cry2Ab3</u>	AAG36762	Chen et al	1999	Bt BTC002	
<u>Cry2Ab4</u>	AAO13296	Li et al	2001	Bt B-Pr-88	
<u>Cry2Ab5</u>	AAQ04609	Yao et al	2001	Bt ly30	
<u>Cry2Ab6</u>	AAP59457	Wang et al	2003	Bt WZ-7	
<u>Cry2Ab7</u>	AAZ66347	Udayasuriyan et al	2005	Bt 14-1	
<u>Cry2Ab8</u>	ABC95996	Huang et al	2006	Bt WB2	
<u>Cry2Ab9</u>	ABC74968	Zhang et al	2005	Bt LLB6	
<u>Cry2Ab10</u>	EF157306	Lin et al	2006	Bt LyD	
<u>Cry2Ab11</u>	CAM84575	Saleem et al	2007	Bt CMBL-BT1	
<u>Cry2Ab12</u>	ABM21764	Lin et al	2007	Bt LyD	
<u>Cry2Ab13</u>	ACG76120	Zhu et al	2008	Bt ywc5-4	
<u>Cry2Ab14</u>	ACG76121	Zhu et al	2008	Bt Bts	
<u>Cry2Ac1</u>	CAA40536	Aronson	1991	Bt shanghai S1	
<u>Cry2Ac2</u>	AAG35410	Song et al	2000		
<u>Cry2Ac3</u>	AAQ52385	Baum et al	2003		
<u>Cry2Ac4</u>	ABC95997	Huang et al	2006	Bt WB9	
<u>Cry2Ac5</u>	ABC74969	Zhang et al	2005		
<u>Cry2Ac6</u>	ABC74793	Xia et al	2006	Bt wuhanensis	
<u>Cry2Ac7</u>	CAL18690	Saleem et al	2008	Bt SBSBT-1	
<u>Cry2Ac8</u>	CAM09325	Saleem et al	2007	Bt CMBL-BT1	
<u>Cry2Ac9</u>	CAM09326	Saleem et al	2007	Bt CMBL-BT2	
<u>Cry2Ac10</u>	ABN15104	Bai et al	2007	Bt QCL-1	
<u>Cry2Ac11</u>	CAM83895	Saleem et al	2007	Bt HD29	
<u>Cry2Ac12</u>	CAM83896	Saleem et al	2007	Bt CMBL-BT3	
<u>Cry2Ad1</u>	AAF09583	Choi et al	1999	Bt BR30	
<u>Cry2Ad2</u>	ABC86927	Huang et al	2006	Bt WB10	
<u>Cry2Ad3</u>	CAK29504	Saleem et al	2006	Bt 5_2AcT(1)	
<u>Cry2Ad4</u>	CAM32331	Saleem et al	2007	Bt CMBL-BT2	
<u>Cry2Ad5</u>	CAO78739	Saleem et al	2007	Bt HD29	
<u>Cry2Ae1</u>	AAQ52362	Baum et al	2003		
<u>Cry2Afl</u>	ABO30519	Beard et al	2007	Bt C81	
<u>Cry2Ag</u>	ACH91610	Zhu et al	2008	Bt JF19-2	
<u>Cry2Ah</u>	EU939453	Zhang et al	2008	Bt	№ NCBI, зареєстр. 09 липня
<u>Cry2Ah2</u>	ACL80665	Zhang et al	2009	Bt BRC-ZQL3	
<u>Cry2Ai</u>	FJ788388	Udayasuriyan et al	2009	Bt	№ NCBI, зареєстр. 09 липня

<u>Cry3Aa1</u>	AAA22336	Herrnstadt et al	1987	Bt san diego	
<u>Cry3Aa2</u>	AAA22541	Sekar et al	1987	Bt tenebrionis	
<u>Cry3Aa3</u>	CAA68482	Hofte et al	1987		
<u>Cry3Aa4</u>	AAA22542	McPherson et al	1988	Bt tenebrionis	
<u>Cry3Aa5</u>	AAA50255	Donovan et al	1988	Bt morrisoni EG2158	
<u>Cry3Aa6</u>	AAC43266	Adams et al	1994	Bt tenebrionis	
<u>Cry3Aa7</u>	CAB41411	Zhang et al	1999	Bt 22	
<u>Cry3Aa8</u>	AAS79487	Gao and Cai	2004	Bt YM-03	
<u>Cry3Aa9</u>	AAW05659	Bulla and Candas	2004	Bt UTD-001	
<u>Cry3Aa10</u>	AAU29411	Chen et al	2004	Bt 886	
<u>Cry3Aa11</u>	AAW82872	Kurt et al	2005	Bt tenebrionis Mm2	
<u>Cry3Aa12</u>	ABY49136	Sezen et al	2008	Bt tenebrionis	
<u>Cry3Ba1</u>	CAA34983	Sick et al	1990	Bt tolworthi 43F	
<u>Cry3Ba2</u>	CAA00645	Peferoen et al	1990	Bt PGSI208	
<u>Cry3Bb1</u>	AAA22334	Donovan et al	1992	Bt EG4961	
<u>Cry3Bb2</u>	AAA74198	Donovan et al	1995	Bt EG5144	
<u>Cry3Bb3</u>	II5475	Peferoen et al	1995		тільки послідовність ДНК
<u>Cry3Ca1</u>	CAA42469	Lambert et al	1992	Bt kurstaki BtI109P	
<u>Cry4Aa1</u>	CAA68485	Ward & Ellar	1987	Bt israelensis	
<u>Cry4Aa2</u>	BAA00179	Sen et al	1988	Bt israelensis HD522	
<u>Cry4Aa3</u>	CAD30148	Berry et al	2002	Bt israelensis	
<u>Cry4A-like</u>	AAV96321	Mahalakshmi et al	2005	Bt LDC-9	недостатня послідовність
<u>Cry4Ba1</u>	CAA30312	Chungjatpornchai et al	1988	Bt israelensis 4Q2-72	
<u>Cry4Ba2</u>	CAA30114	Tungpradubkul et al	1988	Bt israelensis	
<u>Cry4Ba3</u>	AAA22337	Yamamoto et al	1988	Bt israelensis	
<u>Cry4Ba4</u>	BAA00178	Sen et al	1988	Bt israelensis HD522	
<u>Cry4Ba5</u>	CAD30095	Berry et al	2002	Bt israelensis	
<u>Cry4Ba-like</u>	ABC47686	Mahalakshmi et al	2005	Bt LDC-9	недостатня послідовність
<u>Cry4Ca1</u>	EU646202	Shu et al	2008		№ NCBI, зареєстр. 09 липня
<u>Cry4Cb1</u>	FJ403208	Jun & Furong	2008	Bt HS18-1	№ NCBI, зареєстр. 09 липня
<u>Cry4Cb2</u>	FJ597622	Jun & Furong	2008	Bt Ywc2-8	№ NCBI, зареєстр. 09 липня
<u>Cry4Cc1</u>	FJ403207	Jun & Furong	2008	Bt MC28	№ NCBI, зареєстр. 09 липня
<u>Cry5Aa1</u>	AAA67694	Narva et al	1994	Bt darmstadiensis PS17	
<u>Cry5Ab1</u>	AAA67693	Narva et al	1991	Bt darmstadiensis PS17	
<u>Cry5Ac1</u>	I34543	Payne et al	1997		тільки послідовність ДНК

<u>Cry5Ad1</u>	ABQ82087	Lenane et al	2007	Bt L366	
<u>Cry5Ba1</u>	AAA68598	Foncerrada & Narva	1997	Bt PS86Q3	
<u>Cry5Ba2</u>	ABW88932	Guo et al	2008	YBT 1518	
<u>Cry6Aa1</u>	AAA22357	Narva et al	1993	Bt PS52A1	
<u>Cry6Aa2</u>	AAM46849	Bai et al	2001	YBT 1518	
<u>Cry6Aa3</u>	ABH03377	Jia et al	2006	Bt 96418	
<u>Cry6Ba1</u>	AAA22358	Narva et al	1991	Bt PS69D1	
<u>Cry7Aa1</u>	AAA22351	Lambert et al	1992	Bt galleriae PGSI245	
<u>Cry7Ab1</u>	AAA21120	Narva & Fu	1994	Bt dakota HD511	
<u>Cry7Ab2</u>	AAA21121	Narva & Fu	1994	Bt kumamotoensis 867	
<u>Cry7Ab3</u>	ABX24522	Song et al	2008	Bt WZ-9	
<u>Cry7Ab4</u>	EU380678	Shu et al	2008	Bt	№ NCBI, зареєстр. 09 липня
<u>Cry7Ab5</u>	ABX79555	Aguirre-Arzola et al	2008	Bt monterrey GM- 33	
<u>Cry7Ab6</u>	ACI44005	Deng et al	2008	Bt HQ122	№ NCBI, зареєстр. 09 липня
<u>Cry7Ab7</u>	FJ940776	Wang et al	2009		№ NCBI, зареєстр. 09 липня
<u>Cry7Ab8</u>	GU145299	Feng Jing	2009		
<u>Cry7Ba1</u>	ABB70817	Zhang et al	2006	Bt huazhongensis	
<u>Cry7Ca1</u>	ABR67863	Gao et al	2007	Bt BTH-13	
<u>Cry7Da1</u>	ACQ99547	Yi et al	2009	Bt LH-2	
<u>Cry8Aa1</u>	AAA21117	Narva & Fu	1992	Bt kumamotoensis	
<u>Cry8Ab1</u>	EU044830	Cheng et al	2007	Bt B-JJX	№ NCBI, зареєстр. 09 липня
<u>Cry8Ba1</u>	AAA21118	Narva & Fu	1993	Bt kumamotoensis	
<u>Cry8Bb1</u>	CAD57542	Abad et al	2002		
<u>Cry8Bc1</u>	CAD57543	Abad et al	2002		
<u>Cry8Ca1</u>	AAA21119	Sato et al.	1995	Bt japonensis Buibui	
<u>Cry8Ca2</u>	AAR98783	Shu et al	2004	Bt HBF-1	№ NCBI, зареєстр. 09 липня
<u>Cry8Ca3</u>	EU625349	Du et al	2008	Bt FTL-23	
<u>Cry8Da1</u>	BAC07226	Asano et al	2002	Bt galleriae	тільки послідовність ДНК
<u>Cry8Da2</u>	BD133574	Asano et al	2002	Bt	
<u>Cry8Da3</u>	BD133575	Asano et al	2002	Bt	тільки послідовність ДНК
<u>Cry8Db1</u>	BAF93483	Yamaguchi et al	2007	Bt BBT2-5	
<u>Cry8Ea1</u>	AAQ73470	Fuping et al	2003	Bt 185	
<u>Cry8Ea2</u>	EU047597	Liu et al	2007	Bt B-DLL	№ NCBI, зареєстр. 09 липня
<u>Cry8Fa1</u>	AAT48690	Shu et al	2004	Bt 185	також <u>AAW81032</u>
<u>Cry8Ga1</u>	AAT46073	Shu et al	2004	Bt HBF-18	
<u>Cry8Ga2</u>	ABC42043	Yan et al	2008	Bt 145	
<u>Cry8Ga3</u>	FJ198072	Xiaodong et al	2008	Bt FCD114	№ NCBI, зареєстр. 09 липня
<u>Cry8Ha1</u>	EF465532	Fuping et al	2006	Bt 185	№ NCBI, зареєстр. 09 липня
<u>Cry8Ia1</u>	EU381044	Yan et al	2008	Bt su4	№ NCBI, зареєстр. 09 липня
<u>Cry8Ja1</u>	EU625348	Du et al	2008	Bt FPT-2	№ NCBI, зареєстр. 09 липня

<u>Cry8Ka1</u>	FJ422558	Quezado et al	2008		№ NCBI, зареєстр. 09 липня
<u>Cry8Ka2</u>	ACN87262	Noguera & Ibarra	2009	Bt kenyaе	
<u>Cry8-like</u>	FJ770571	Noguera & Ibarra	2009	Bt canadensis	тільки послідовність ДНК
<u>Cry8-like</u>	ABS53003	Mangena et al	2007	Bt	
<u>Cry9Aa1</u>	CAA41122	Shevelev et al	1991	Bt galleriae	
<u>Cry9Aa2</u>	CAA41425	Gleave et al	1992	Bt DSIR517	
<u>Cry9Aa3</u>	GQ249293	Su et al	2009	Bt SC5(D2)	№ NCBI, зареєстр. 09 липня
<u>Cry9Aa4</u>	GQ249294	Su et al	2009	Bt T03C001	№ NCBI, зареєстр. 09 липня
<u>Cry9Aa-like</u>	AAQ52376	Baum et al	2003		неповна послідовність
<u>Cry9Ba1</u>	CAA52927	Shevelev et al	1993	Bt galleriae	
<u>Cry9Bb1</u>	AAV28716	Silva-Werneck et al	2004	Bt japonensis	
<u>Cry9Ca1</u>	CAA85764	Lambert et al	1996	Bt tolworthi	
<u>Cry9Ca2</u>	AAQ52375	Baum et al	2003		неповна послідовність
<u>Cry9Da1</u>	BAA19948	Asano	1997	Bt japonensis N141	
<u>Cry9Da2</u>	AAB97923	Wasano & Ohba	1998	Bt japonensis	
<u>Cry9Da3</u>	GQ249295	Su et al	2009	Bt T03B001	№ NCBI, зареєстр. 09 липня
<u>Cry9Da4</u>	GQ249297	Su et al	2009	Bt T03B001	№ NCBI, зареєстр. 09 липня
<u>Cry9Db1</u>	AAX78439	Flannagan & Abad	2005	Bt kurstaki DP1019	
<u>Cry9Ea1</u>	BAA34908	Midoh & Oyama	1998	Bt aizawai SSK-10	
<u>Cry9Ea2</u>	AAO12908	Li et al	2001	Bt B-Hm-16	
<u>Cry9Ea3</u>	ABM21765	Lin et al	2006	Bt lyA	
<u>Cry9Ea4</u>	ACE88267	Zhu et al	2008	Bt ywc5-4	
<u>Cry9Ea5</u>	ACF04743	Zhu et al	2008	Bts	
<u>Cry9Ea6</u>	ACG63872	Liu & Guo	2008	Bt 11	
<u>Cry9Ea7</u>	FJ380927	Sun et al	2008		№ NCBI, зареєстр. 09 липня
<u>Cry9Ea8</u>	GQ249292	Su et al	2009	GQ249292	№ NCBI, зареєстр. 09 липня
<u>Cry9Eb1</u>	CAC50780	Arnaut et al	2001		№ NCBI, зареєстр. 09 липня
<u>Cry9Eb2</u>	GQ249298	Su et al	2009	Bt T03B001	№ NCBI, зареєстр. 09 липня
<u>Cry9Ec1</u>	AAC63366	Wasano et al	2003	Bt galleriae	
<u>Cry9Ed1</u>	AAX78440	Flannagan & Abad	2005	Bt kurstaki DP1019	
<u>Cry9Ee1</u>	GQ249296	Su et al	2009	Bt T03B001	№ NCBI, зареєстр. 09 липня
<u>Cry9-like</u>	AAC63366	Wasano et al	1998	Bt galleriae	
<u>Cry10Aa1</u>	AAA22614	Thorne et al	1986	Bt israelensis	тільки послідовність ДНК
<u>Cry10Aa2</u>	E00614	Aran & Toomasu	1996	Bt israelensis ONR-60A	
<u>Cry10Aa3</u>	CAD30098	Berry et al	2002	Bt israelensis	
<u>Cry10A-like</u>	DQ167578	Mahalakshmi et al	2006	Bt LDC-9	неповна послідовність
<u>Cry11Aa1</u>	AAA22352	Donovan et al	1988	Bt israelensis	
<u>Cry11Aa2</u>	AAA22611	Adams et al	1989	Bt israelensis	

<u>Cry11Aa3</u>	CAD30081	Berry et al	2002	Bt israelensis	
<u>Cry11Aa-like</u>	DQ166531	Mahalakshmi et al	2007	Bt LDC-9	неповна послідовність
<u>Cry11Ba1</u>	CAA60504	Delecluse et al	1995	Bt jegathesan	367
<u>Cry11Bb1</u>	AAC97162	Ordaz et al	1998	Bt medellin	
<u>Cry12Aa1</u>	AAA22355	Narva et al	1991	Bt PS33F2	
<u>Cry13Aa1</u>	AAA22356	Narva et al	1992	Bt PS63B	
<u>Cry14Aa1</u>	AAA21516	Narva et al	1994	Bt sotto PS80JJ1	
<u>Cry15Aa1</u>	AAA22333	Brown & Whiteley	1992	Bt thompsoni	
<u>Cry16Aa1</u>	CAA63860	Barloy et al	1996	Cb malaysia CH18	
<u>Cry17Aa1</u>	CAA67841	Barloy et al	1998	Cb malaysia CH18	
<u>Cry18Aa1</u>	CAA67506	Zhang et al	1997	Paenibacillus popilliae	
<u>Cry18Ba1</u>	AAF89667	Patel et al	1999	Paenibacillus popilliae	
<u>Cry18Ca1</u>	AAF89668	Patel et al	1999	Paenibacillus popilliae	
<u>Cry19Aa1</u>	CAA68875	Rosso & Delecluse	1996	Bt jegathesan	367
<u>Cry19Ba1</u>	BAA32397	Hwang et al	1998	Bt higo	
<u>Cry20Aa1</u>	AAB93476	Lee & Gill	1997	Bt fukuokaensis	
<u>Cry20Ba1</u>	ACS93601	Noguera & Ibarra	2009	Bt higo LBIT-976	
<u>Cry20-like</u>	GQ144333	Yi et al	2009	Bt Y-5	тільки послідовність ДНК
<u>Cry21Aa1</u>	I32932	Payne et al	1996		тільки послідовність ДНК
<u>Cry21Aa2</u>	I66477	Feitelson	1997		тільки послідовність ДНК
<u>Cry21Ba1</u>	BAC06484	Sato & Asano	2002	Bt roskildiensis	
<u>Cry22Aa1</u>	I34547	Payne et al	1997		тільки послідовність ДНК
<u>Cry22Aa2</u>	CAD43579	Isaac et al	2002	Bt	
<u>Cry22Aa3</u>	ACD93211	Du et al	2008	Bt FZ-4	
<u>Cry22Ab1</u>	AAK50456	Baum et al	2000	Bt EG4140	
<u>Cry22Ab2</u>	CAD43577	Isaac et al	2002	Bt	
<u>Cry22Ba1</u>	CAD43578	Isaac et al	2002	Bt	
<u>Cry23Aa1</u>	AAF76375	Donovan et al	2000	Bt	об'єднаний з Cry37Aa1
<u>Cry24Aa1</u>	AAC61891	Kawalek and Gill	1998	Bt jegathesan	
<u>Cry24Ba1</u>	BAD32657	Ohgushi et al	2004	Bt sotto	
<u>Cry24Ca1</u>	CAJ43600	Beron & Salerno	2005	Bt FCC-41	
<u>Cry25Aa1</u>	AAC61892	Kawalek and Gill	1998	Bt jegathesan	
<u>Cry26Aa1</u>	AAD25075	Wojciechowska et al	1999	Bt finitimus B-1166	
<u>Cry27Aa1</u>	BAA82796	Saitoh	1999	Bt higo	
<u>Cry28Aa1</u>	AAD24189	Wojciechowska et al	1999	Bt finitimus B-1161	
<u>Cry28Aa2</u>	AAG00235	Moore and Debro	2000	Bt finitimus	
<u>Cry29Aa1</u>	CAC80985	Delecluse et al	2000	Bt medellin	
<u>Cry30Aa1</u>	CAC80986	Delecluse et al	2000	Bt medellin	
<u>Cry30Ba1</u>	BAD00052	Ito et al	2003	Bt entomocidus	

<u>Cry30Ca1</u>	BAD67157	Ohgushi et al	2004	Bt sotto		
<u>Cry30Ca2</u>	ACU24781	Sun and Park	2009	Bt jegathesan 367		
<u>Cry30Da1</u>	EF095955	Shu et al	2006	Bt Y41	№ NCBI, зарегистр. 09 липня	
<u>Cry30Db1</u>	BAE80088	Kishida et al	2006	Bt aizawai BUN1-14		
<u>Cry30Ea1</u>	ACC95445	Fang et al	2007	Bt S2160-1		
<u>Cry30Ea2</u>	FJ499389	Jun et al	2008	Bt Ywc2-8	№ NCBI, зарегистр. 09 липня	
<u>Cry30Fa1</u>	ACI22625	Tan et al	2008	Bt MC28		
<u>Cry30Ga1</u>	ACG60020	Zhu et al	2008	Bt HS18-1		
<u>Cry31Aa1</u>	BAB11757	Saitoh & Mizuki	2000	Bt 84-HS-1-11		
<u>Cry31Aa2</u>	AAL87458	Jung and Cote	2000	Bt M15		
<u>Cry31Aa3</u>	BAE79808	Uemori et al	2006	Bt B0195		
<u>Cry31Aa4</u>	BAF32571	Yasutake et al	2006	Bt 79-25		
<u>Cry31Aa5</u>	BAF32572	Yasutake et al	2006	Bt 92-10		
<u>Cry31Ab1</u>	BAE79809	Uemori et al	2006	Bt B0195		
<u>Cry31Ab2</u>	BAF32570	Yasutake et al	2006	Bt 31-5		
<u>Cry31Ac1</u>	BAF34368	Yasutake et al	2006	Bt 87-29		
<u>Cry32Aa1</u>	AAG36711	Balasubramanian et al	2001	Bt yunnanensis		
<u>Cry32Ba1</u>	BAB78601	Takebe et al	2001	Bt		
<u>Cry32Ca1</u>	BAB78602	Takebe et al	2001	Bt		
<u>Cry32Da1</u>	BAB78603	Takebe et al	2001	Bt		
<u>Cry33Aa1</u>	AAL26871	Kim et al	2001	Bt dakota		
<u>Cry34Aa1</u>	AAG50341	Ellis et al	2001	Bt PS80JJ1	об'єднаний з	Cry35Aa1
<u>Cry34Aa2</u>	AAK64560	Rupar et al	2001	Bt EG5899	об'єднаний з	Cry35Aa2
<u>Cry34Aa3</u>	AAT29032	Schnepf et al	2004	Bt PS69Q	об'єднаний з	Cry35Aa3
<u>Cry34Aa4</u>	AAT29030	Schnepf et al	2004	Bt PS185GG	об'єднаний з	Cry35Aa4
<u>Cry34Ab1</u>	AAG41671	Moellenbeck et al	2001	Bt PS149B1	об'єднаний з	Cry35Ab1
<u>Cry34Ac1</u>	AAG50118	Ellis et al	2001	Bt PS167H2	об'єднаний з	Cry35Ac1
<u>Cry34Ac2</u>	AAK64562	Rupar et al	2001	Bt EG9444	об'єднаний з	Cry35Ab2
<u>Cry34Ac3</u>	AAT29029	Schnepf et al	2004	Bt KR1369	об'єднаний з	Cry35Ab3
<u>Cry34Ba1</u>	AAK64565	Rupar et al	2001	Bt EG4851	об'єднаний з	Cry35Ba1
<u>Cry34Ba2</u>	AAT29033	Schnepf et al	2004	Bt PS201L3	об'єднаний з	Cry35Ba2
<u>Cry34Ba3</u>	AAT29031	Schnepf et al	2004	Bt PS201HH2	об'єднаний з	Cry35Ba3
<u>Cry35Aa1</u>	AAG50342	Ellis et al	2001	Bt PS80JJ1	об'єднаний з	Cry34Aa1
<u>Cry35Aa2</u>	AAK64561	Rupar et al	2001	Bt EG5899	об'єднаний з	Cry34Aa2
<u>Cry35Aa3</u>	AAT29028	Schnepf et al	2004	Bt PS69Q	об'єднаний з	Cry34Aa3
<u>Cry35Aa4</u>	AAT29025	Schnepf et al	2004	Bt PS185GG	об'єднаний з	Cry34Aa4
<u>Cry35Ab1</u>	AAG41672	Moellenbeck et al	2001	Bt PS149B1	об'єднаний з	Cry34Ab1
<u>Cry35Ab2</u>	AAK64563	Rupar et al	2001	Bt EG9444	об'єднаний з	Cry34Ac2
<u>Cry35Ab3</u>	AY536891	AAT29024	2004	Bt KR1369	об'єднаний з	Cry34Ab3
<u>Cry35Ac1</u>	AAG50117	Ellis et al	2001	Bt PS167H2	об'єднаний з	Cry34Ac1
<u>Cry35Ba1</u>	AAK64566	Rupar et al	2001	Bt EG4851	об'єднаний з	Cry34Ba1
<u>Cry35Ba2</u>	AAT29027	Schnepf et al	2004	Bt PS201L3	об'єднаний з	Cry34Ba2

Cry55Aa2 AAE33526 Bradfish et al 2000 BT Y41
Cry56Aa1 FJ597621 Jun & Furong 2008 Bt Ywc2-8 № NCBI, зареєстр. 09 липня
Cry56Aa2 GQ483512 Guan Peng et al 2009 Bt G7-1 № NCBI, зареєстр. 09 липня
Cry57Aa1 ANC87261 Noguera & Ibarra 2009 Bt kim
Cry58Aa1 ANC87260 Noguera & Ibarra 2009 Bt entomocidus
Cry59Aa1 ACR43758 Noguera & Ibarra 2009 Bt kim LBIT-980

Vip3Aa1	Vip3Aa	AAC37036	Estruch et al	1996	PNAS 93, 5389-5394	AB88	
Vip3Aa2	Vip3Ab	AAC37037	Estruch et al	1996	PNAS 93, 5389-5394	AB424	
Vip3Aa3	Vip3Ac		Estruch et al	2000	US 6137033 Oct 2000		
Vip3Aa4	PS36A Sup	AAR81079	Feitelson et al	1998	US 6656908 Dec 2003	Bt PS36A	WO9818932(A2,A3) 7 May 1998
Vip3Aa5	PS81F Sup	AAR81080	Feitelson et al	1998	US 6656908 Dec 2003	Bt PS81F	WO9818932(A2,A3) 7 May 1998
Vip3Aa6	Jav90 Sup	AAR81081	Feitelson et al	1998	US 6656908 Dec 2003	Bt	WO9818932(A2,A3) 7 May 1998
Vip3Aa7	Vip83	AAK95326	Cai et al	2001	не опубліковано	Bt YBT-833	
Vip3Aa8	Vip3A	AAK97481	Loguercio et al	2001	не опубліковано	Bt HD125	
Vip3Aa9	VipS	CAA76665	Selvapandiyam et al	2001	не опубліковано	Bt A13	
Vip3Aa10	Vip3V	AAN60738	Doss et al	2002	Protein Expr. Purif. 26, 82-88	Bt	
Vip3Aa11	Vip3A	AAR36859	Liu et al	2003	не опубліковано	Bt C9	
Vip3Aa12	Vip3A-WB5	AAM22456	Wu and Guan	2003	не опубліковано	Bt	
Vip3Aa13	Vip3A	AAL69542	Chen et al	2002	Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao 18, 687-692	Bt S184	
Vip3Aa14	Vip	AAQ12340	Polumetla et al	2003	не опубліковано	Bt tolworthi	
Vip3Aa15	Vip3A	AAP51131	Wu et al	2004	не опубліковано	Bt WB50	
Vip3Aa16	Vip3LB	AAW65132	Mesrati et al	2005	FEMS Micro Lett 244, 353-358	Bt	
Vip3Aa17	Jav90		Feitelson et al	1999	US 6603063 Aug 2003	Javelin 1990	WO9957282(A2,A3) 11Nov 1999
Vip3Aa18		AAX49395	Cai and Xiao	2005	не опубліковано	Bt 9816C	
Vip3Aa19	Vip3ALD	DQ241674	Liu et al	2006	не опубліковано	Bt AL	
Vip3Aa19	Vip3A-l	DQ539887	Hart et al	2006	не опубліковано		

Vip3Aa20	Vip3A-2	<u>DQ539888</u>	Hart et al	2006	не опубліковано		
Vip3Aa21	Vip	<u>ABD84410</u>	Panbangred	2006	не опубліковано	Bt aizawai	
Vip3Aa22	Vip3A-LS1	<u>AAV41427</u>	Lu et al	2005	не опубліковано	Bt LS1	
Vip3Aa23	Vip3A-LS8	<u>AAV41428</u>	Lu et al	2005	не опубліковано	Bt LS8	
Vip3Aa24		BI 880913	Song et al	2007	не опубліковано	Bt WZ-7	
Vip3Aa25		EF608501	Hsieh et al	2007	не опубліковано		
Vip3Aa26		EU294496	Shen and Guo	2007	не опубліковано	Bt TF9	
Vip3Aa27		EU332167	Shen and Guo	2007	не опубліковано	Bt 16	
Vip3Aa28		FJ494817	Xiumei Yu	2008	не опубліковано	Bt JF23-8	
Vip3Aa29		FJ626674	Xieumei et al	2009	не опубліковано	Bt JF21-1	
Vip3Aa30		FJ626675	Xieumei et al	2009	не опубліковано	MD2-1	
Vip3Aa31		FJ626676	Xieumei et al	2009	не опубліковано	JF21-1	
Vip3Aa32		FJ626677	Xieumei et al	2009	не опубліковано	MD2-1	
Vip3Ab1	Vip3B	<u>AAR40284</u>	Feitelson et al	1999	US 6603063 Aug 2003	Bt KB59A4-6	WO9957282(A 2,A3) 11Nov 1999
Vip3Ab2	Vip3D	<u>AAV88247</u>	Feng and Shen	2006	не опубліковано	Bt	
Vip3Ac1	PS49C		Narva et al		заявка на патент США 2004012871 6		
Vip3Ad1	PS158C2		Narva et al		заявка на патент США 2004012871 6		
Vip3Ad2	ISP3B	<u>CAI43276</u>	Van Rie et al	2005	не опубліковано	Bt	
Vip3Ac1	ISP3C	<u>CAI43277</u>	Van Rie et al	2005	не опубліковано	Bt	
Vip3Af1	ISP3A	<u>CAI43275</u>	Van Rie et al	2005	не опубліковано	Bt	
Vip3Af2	Vip3C	ADN08753	Syngenta		WO 03/075655		
Vip3Ag1	Vip3B	ADN08758	Syngenta		WO 02/078437		
Vip3Ag2		FJ556803	Audtho et al	2008	не опубліковано	Bt	
Vip3Ah1	Vip3S	<u>DQ832323</u>	Li and Shen	2006	не опубліковано	Bt	
Vip3Ba1		<u>AAV70653</u>	Rang et al	2004			
Vip3Bb1	Vip3Z	ADN08760	Syngenta		WO 03/075655		
Vip3Bb2		EF439819	Akhurst et al	2007			

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Dow AGROSCIENCES LLC

<120> КОМБІНОВАНЕ ЗАСТОСУВАННЯ БІЛКІВ CRY1Da I CRY1Fa
ДЛЯ ВИРОВЛЕННЯ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ДО КОМАХ

<130> DAS-P0161-US

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 605

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Cry1Fa

<400> 1

Met Glu Asn Asn Ile Gln Asn Gln Cys Val Pro Tyr Asn Cys Leu Asn
1 5 10 15

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

Pro Leu Asp Ile Ser Leu Ser Leu Thr Arg Phe Leu Leu Ser Glu Phe
35 40 45

Val Pro Gly Val Gly Val Ala Phe Gly Leu Phe Asp Leu Ile Trp Gly
50 55 60

Phe Ile Thr Pro Ser Asp Trp Ser Leu Phe Leu Leu Gln Ile Glu Gln
65 70 75 80

Leu Ile Glu Gln Arg Ile Glu Thr Leu Glu Arg Asn Arg Ala Ile Thr
85 90 95

Thr Leu Arg Gly Leu Ala Asp Ser Tyr Glu Ile Tyr Ile Glu Ala Leu
100 105 110

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

Arg Ile Arg Phe Ala Asn Thr Asp Asp Ala Leu Ile Thr Ala Ile Asn
130 135 140

Asn Phe Thr Leu Thr Ser Phe Glu Ile Pro Leu Leu Ser Val Tyr Val
145 150 155 160

Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser Leu Leu Arg Asp Ala Val Ser Phe
165 170 175

Gly Gln Gly Trp Gly Leu Asp Ile Ala Thr Val Asn Asn His Tyr Asn
180 185 190

Arg Leu Ile Asn Leu Ile His Arg Tyr Thr Lys His Cys Leu Asp Thr
195 200 205

Tyr Asn Gln Gly Leu Glu Asn Leu Arg Gly Thr Asn Thr Arg Gln Trp
210 215 220

Ala Arg Phe Asn Gln Phe Arg Arg Asp Leu Thr Leu Thr Val Leu Asp
225 230 235 240

Ile Val Ala Leu Phe Pro Asn Tyr Asp Val Arg Thr Tyr Pro Ile Gln
245 250 255

Thr Ser Ser Gln Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Ser Ser Val Ile Glu
260 265 270

Asp Ser Pro Val Ser Ala Asn Ile Pro Asn Gly Phe Asn Arg Ala Glu
275 280 285

Phe Gly Val Arg Pro Pro His Leu Met Asp Phe Met Asn Ser Leu Phe
290 295 300

Val Thr Ala Glu Thr Val Arg Ser Gln Thr Val Trp Gly Gly His Leu
305 310 315 320

Val Ser Ser Arg Asn Thr Ala Gly Asn Arg Ile Asn Phe Pro Ser Tyr
325 330 335

Gly Val Phe Asn Pro Gly Gly Ala Ile Trp Ile Ala Asp Glu Asp Pro
340 345 350

Arg Pro Phe Tyr Arg Thr Leu Ser Asp Pro Val Phe Val Arg Gly Gly
355 360 365

Phe Gly Asn Pro His Tyr Val Leu Gly Leu Arg Gly Val Ala Phe Gln
370 375 380

Gln Thr Gly Thr Asn His Thr Arg Thr Phe Arg Asn Ser Gly Thr Ile
385 390 395 400

Asp Ser Leu Asp Glu Ile Pro Pro Gln Asp Asn Ser Gly Ala Pro Trp
405 410 415

Asn Asp Tyr Ser His Val Leu Asn His Val Thr Phe Val Arg Trp Pro
420 425 430

Gly Glu Ile Ser Gly Ser Asp Ser Trp Arg Ala Pro Met Phe Ser Trp
435 440 445

Thr His Arg Ser Ala Thr Pro Thr Asn Thr Ile Asp Pro Glu Arg Ile
450 455 460

Thr Gln Ile Pro Leu Val Lys Ala His Thr Leu Gln Ser Gly Thr Thr
465 470 475 480

Val Val Arg Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr
485 490 495

Ser Gly Gly Pro Phe Ala Tyr Thr Ile Val Asn Ile Asn Gly Gln Leu
500 505 510

Pro Gln Arg Tyr Arg Ala Arg Ile Arg Tyr Ala Ser Thr Thr Asn Leu
515 520 525

Arg Ile Tyr Val Thr Val Ala Gly Glu Arg Ile Phe Ala Gly Gln Phe
530 535 540

Asn Lys Thr Met Asp Thr Gly Asp Pro Leu Thr Phe Gln Ser Phe Ser
545 550 555 560

Tyr Ala Thr Ile Asn Thr Ala Phe Thr Phe Pro Met Ser Gln Ser Ser
 565 570 575
 Phe Thr Val Gly Ala Asp Thr Phe Ser Ser Gly Asn Glu Val Tyr Ile
 580 585 590
 Asp Arg Phe Glu Leu Ile Pro Val Thr Ala Thr Leu Glu
 595 600 605
 <210> 2
 <211> 594
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> CrylDa
 <400> 2
 Met Glu Ile Asn Asn Gln Asn Gln Cys Val Pro Tyr Asn Cys Leu Ser
 1 5 10 15
 Asn Pro Lys Glu Ile Ile Leu Gly Glu Glu Arg Leu Glu Thr Gly Asn
 20 25 30
 Thr Val Ala Asp Ile Ser Leu Gly Leu Ile Asn Phe Leu Tyr Ser Asn
 35 40 45
 Phe Val Pro Gly Gly Gly Phe Ile Val Gly Leu Leu Glu Leu Ile Trp
 50 55 60
 Gly Phe Ile Gly Pro Ser Gln Trp Asp Ile Phe Leu Ala Gln Ile Glu
 65 70 75 80
 Gln Leu Ile Ser Gln Arg Ile Glu Glu Phe Ala Arg Asn Gln Ala Ile
 85 90 95
 Ser Arg Leu Glu Gly Leu Ser Asn Leu Tyr Lys Val Tyr Val Arg Ala
 100 105 110
 Phe Ser Asp Trp Glu Lys Asp Pro Thr Asn Pro Ala Leu Arg Glu Glu
 115 120 125
 Met Arg Ile Gln Phe Asn Asp Met Asn Ser Ala Leu Ile Thr Ala Ile
 130 135 140
 Pro Leu Phe Arg Val Gln Asn Tyr Glu Val Ala Leu Leu Ser Val Tyr
 145 150 155 160
 Val Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser Ile Leu Arg Asp Val Ser Val
 165 170 175
 Phe Gly Glu Arg Trp Gly Tyr Asp Thr Ala Thr Ile Asn Asn Arg Tyr
 180 185 190
 Ser Asp Leu Thr Ser Leu Ile His Val Tyr Thr Asn His Cys Val Asp
 195 200 205
 Thr Tyr Asn Gln Gly Leu Arg Arg Leu Glu Gly Arg Phe Leu Ser Asp
 210 215 220
 Trp Ile Val Tyr Asn Arg Phe Arg Arg Gln Leu Thr Ile Ser Val Leu
 225 230 235 240

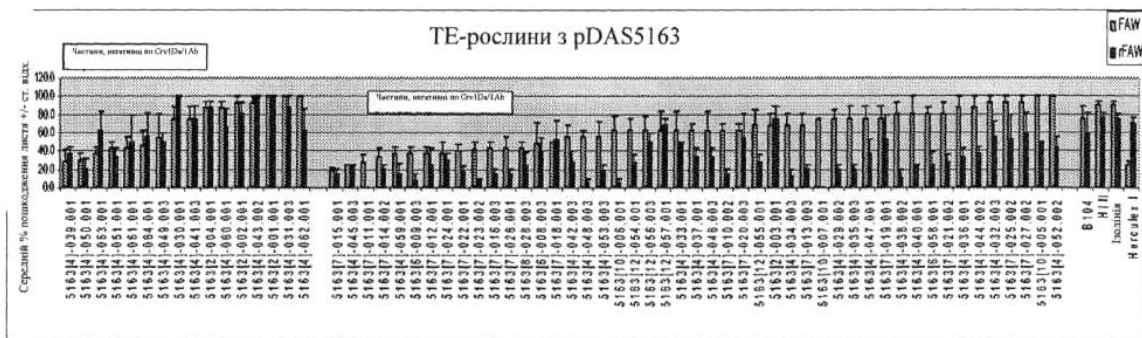
Asp Ile Val Ala Phe Phe Pro Asn Tyr Asp Ile Arg Thr Tyr Pro Ile
 245 250 255
 Gln Thr Ala Thr Gln Leu Thr Arg Glu Val Tyr Leu Asp Leu Pro Phe
 260 265 270
 Ile Asn Glu Asn Leu Ser Pro Ala Ala Ser Tyr Pro Thr Phe Ser Ala
 275 280 285
 Ala Glu Ser Ala Ile Ile Arg Ser Pro His Leu Val Asp Phe Leu Asn
 290 295 300
 Ser Phe Thr Ile Tyr Thr Asp Ser Leu Ala Arg Tyr Ala Tyr Trp Gly
 305 310 315 320
 Gly His Leu Val Asn Ser Phe Arg Thr Gly Thr Thr Thr Asn Leu Ile
 325 330 335
 Arg Ser Pro Leu Tyr Gly Arg Glu Gly Asn Thr Glu Arg Pro Val Thr
 340 345 350
 Ile Thr Ala Ser Pro Ser Val Pro Ile Phe Arg Thr Leu Ser Tyr Ile
 355 360 365
 Thr Gly Leu Asp Asn Ser Asn Pro Val Ala Gly Ile Glu Gly Val Glu
 370 375 380
 Phe Gln Asn Thr Ile Ser Arg Ser Ile Tyr Arg Lys Ser Gly Pro Ile
 385 390 395 400
 Asp Ser Phe Ser Glu Leu Pro Pro Gln Asp Ala Ser Val Ser Pro Ala
 405 410 415
 Ile Gly Tyr Ser His Arg Leu Cys His Ala Thr Phe Leu Glu Arg Ile
 420 425 430
 Ser Gly Pro Arg Ile Ala Gly Thr Val Phe Ser Trp Thr His Arg Ser
 435 440 445
 Ala Ser Pro Thr Asn Glu Val Ser Pro Ser Arg Ile Thr Gln Ile Pro
 450 455 460
 Trp Val Lys Ala His Thr Leu Ala Ser Gly Ala Ser Val Ile Lys Gly
 465 470 475 480
 Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu Thr Arg Asn Ser Met Gly Glu
 485 490 495
 Leu Gly Thr Leu Arg Val Thr Phe Thr Gly Arg Leu Pro Gln Ser Tyr
 500 505 510
 Tyr Ile Arg Phe Arg Tyr Ala Ser Val Ala Asn Arg Ser Gly Thr Phe
 515 520 525
 Arg Tyr Ser Gln Pro Pro Ser Tyr Gly Ile Ser Phe Pro Lys Thr Met
 530 535 540
 Asp Ala Gly Glu Pro Leu Thr Ser Arg Ser Phe Ala His Thr Thr Leu
 545 550 555 560
 Phe Thr Pro Ile Thr Phe Ser Arg Ala Gln Glu Glu Phe Asp Leu Tyr
 565 570 575

Ile Gln Ser Gly Val Tyr Ile Asp Arg Ile Glu Phe Ile Pro Val Thr
 580 585 590
 Ala Thr

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

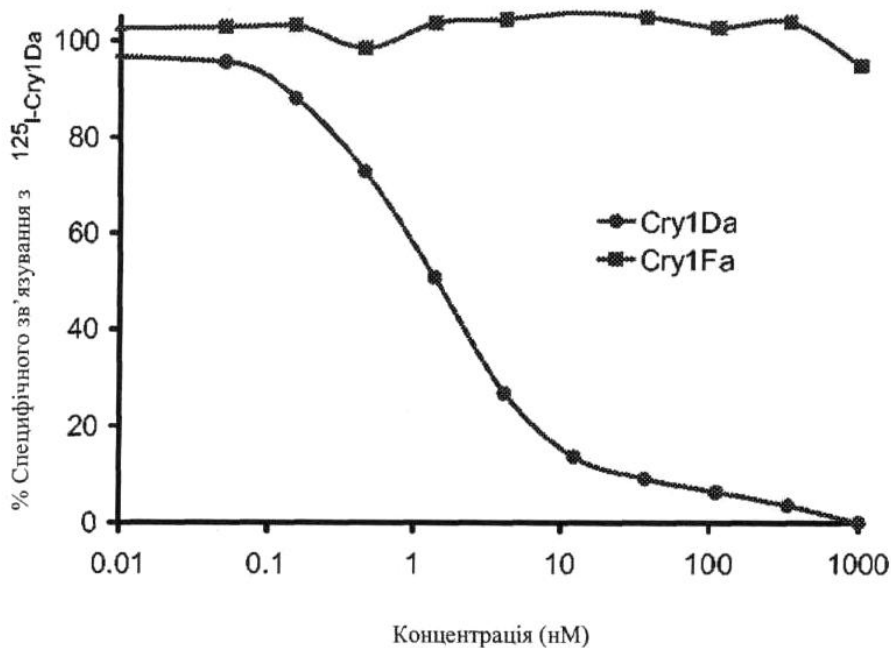
- 5 1. Трансгенна рослина, яка містить ДНК, що кодує і експресує інсектицидний білок Cry1Da, і ДНК, що кодує і експресує інсектицидний білок Cry1Fa.
2. Трансгенна насіннина рослини за п. 1, яка містить ДНК, що кодує і експресує інсектицидний білок Cry1Da, і ДНК, що кодує і експресує інсектицидний білок Cry1Fa.
3. Трансгенна рослина за п. 1, де ДНК, що кодує і експресує інсектицидний білок Cry1Da, і ДНК, що кодує і експресує інсектицидний білок Cry1Fa, були введені у вказану рослину шляхом інтрогресії.
4. Трансгенна насіннина трансгенної рослини за п. 3, яка містить ДНК, що кодує і експресує інсектицидний білок Cry1Da, і ДНК, що кодує і експресує інсектицидний білок Cry1Fa.
5. Сукупність рослин, що містить не-Bt рослини-сховища, і сукупність трансгенних рослин за п. 1, де вказані рослини-сховища складають менше ніж 40 % від вказаної сукупності рослин.
6. Сукупність рослин за п. 5, де вказані рослини-сховища складають менше ніж 30 % від вказаної сукупності рослин.
7. Сукупність рослин за п. 5, де вказані рослини-сховища складають менше ніж 20 % від вказаної сукупності рослин.
8. Сукупність рослин за п. 5, де вказані рослини-сховища складають менше ніж 10 % від вказаної сукупності рослин.
9. Сукупність рослин за п. 5, де вказані рослини-сховища складають менше ніж 5 % від вказаної сукупності рослин.
10. Суміш насіння, що містить насіння не-Bt рослин-сховищ і сукупність трансгенного насіння за п. 4, що містить ДНК, яка кодує і експресує інсектицидний білок Cry1Da, і ДНК, яка кодує і експресує інсектицидний білок Cry1Fa, де вказане насіння рослин-сховищ складає менше ніж 40 % від всього насіння у вказаній суміші.
11. Суміш насіння за п. 10, де вказане насіння рослин-сховищ складає менше ніж 30 % від всього насіння у вказаній суміші.
12. Суміш насіння за п. 10, де вказане насіння рослин-сховищ складає менше ніж 20 % від всього насіння у вказаній суміші.
13. Суміш насіння за п. 10, де вказане насіння рослин-сховищ складає менше ніж 10 % від всього насіння у вказаній суміші.
14. Суміш насіння за п. 10, де вказане насіння рослин-сховищ складає менше ніж 5 % від всього насіння у вказаній суміші.
15. Спосіб запобігання виробленню у совки трав'яної резистентності до токсинів Cry, де вказаний спосіб включає висівання насіння для отримання сукупності рослин за п. 5, де вказана сукупність рослин містить трансгенні рослини, які містять ДНК, що кодує і експресує інсектицидний білок Cry1Da, і ДНК, що кодує і експресує інсектицидний білок Cry1Fa.
16. Трансгенна рослина за п. 1, де вказана рослина також включає ДНК, що кодує і експресує білок, який містить коровий токсин Cry1Ab.
17. Сукупність рослин, що містить не-Bt рослини-сховища і сукупність трансгенних рослин за п. 16, де вказані рослини-сховища складають менше ніж 20 % від всіх сільськогосподарських культур у вказаній сукупності рослин.
18. Сукупність рослин, що містить сукупність трансгенних рослин за п. 16, де вказана сукупність рослин містить менше ніж 10 % рослин-сховищ.
19. Спосіб запобігання виробленню у совки трав'яної резистентності до токсину Cry, де вказаний спосіб включає висівання насіння, яке містить ДНК, що кодує і експресує інсектицидний білок Cry1Da, і ДНК, що кодує і експресує інсектицидний білок Cry1Fa, для отримання сукупності рослин за п. 18.
20. Композиція для боротьби з Cry-резистентними лускокрилими шкідниками або їх попередження, що містить клітини, які експресують інсектицидно-активну кількість білка, що містить коровий токсин Cry1Fa, і білка, що містить коровий токсин Cry1Da, де вказаний лускокрилий шкідник являє собою совку трав'яну.

21. Композиція за п. 20, що містить хазяїна, трансформованого так, щоб він експресував білок, що містить коровий токсин Cry1Fa, і білок, що містить коровий токсин Cry1Da, де вказаним хазяїном є мікроорганізм або клітина рослини.
- 5 22. Спосіб боротьби з Cry-резистентними лускокрилими шкідниками або їх попередження, що включає обробку вказаних шкідників або середовища проживання цих шкідників інсектицидно-активною кількістю композиції за п. 20, де вказаний лускокрилий шкідник являє собою совку трав'яної.
- 10 23. Трансгенна рослина, що продукує білок Cry1Fa плюс білок Cry1Da, плюс третій інсектицидний білок, які мають інсектицидну дію проти совки трав'яної, у якої може вироблятися резистентність до будь-якого одного зі вказаних білків Cry, і де кожний зі вказаних білків Cry зв'язується з сайтом зв'язування рецептора, що відрізняється від інших, у кишечнику вказаної совки трав'яної.
- 15 24. Трансгенна рослина, що продукує білок Cry1Fa плюс білок Cry1Da плюс третій білок, вибраний з групи, яка складається з білків Vip3A, Cry1C, Cry1Be і Cry1E.
- 25 25. Спосіб запобігання виробленню у совки трав'яної резистентності до токсину Cry, де вказаний спосіб включає висівання насіння для отримання сукупності трансгенних рослин за п. 24, де вказана сукупність трансгенних рослин продукує вказаний білок Cry1Fa, вказаний білок Cry1Da і вказаний третій білок, вибраний з групи, яка складається з білків Vip3A, Cry1C, Cry1Be і Cry1E.
- 20 26. Сукупність рослин, що містить не-Bt рослини-сховища і множину трансгенних рослин за п. 24, де вказані рослини-сховища складають менше ніж приблизно 10 % від всіх сільськогосподарських культур у вказаній сукупності рослин.
27. Сукупність рослин за п. 26, де вказані рослини-сховища складають менше ніж приблизно 5 % від всіх сільськогосподарських культур у вказаній сукупності рослин.
- 25 28. Спосіб запобігання виробленню у совки трав'яної резистентності до токсину Cry, де вказаний спосіб включає висівання насіння для отримання сукупності рослин за п. 26 або 27.
- 30 29. Суміш насіння, що містить насіння не-Bt рослин-сховищ і сукупність насіння трансгенної рослини за п. 24, де вказана трансгенна рослина продукує вказаний білок Cry1Fa, вказаний білок Cry1Da і вказаний третій білок, вибраний з групи, яка складається з білків Vip3A, Cry1C, Cry1Be і Cry1E, де вказане насіння рослин-сховищ складає менше ніж 10 % від всього насіння у вказаній суміші.
- 30 30. Сукупність рослин за будь-яким з пп. 5, 17 або 26, де вказані рослини займають площу, більшу ніж 10 акрів.
31. Трансгенна рослина за будь-яким з пп. 1, 16, 23 і 24, де вказана рослина вибрана з групи, яка складається з кукурудзи, сої і бавовника.
- 35 32. Трансгенна рослина за будь-яким з пп. 1, 16, 23 і 24, де вказаною рослиною є рослина кукурудзи.
33. Клітина трансгенної рослини за будь-яким з пп. 1, 16, 23 і 24, 31 і 32, де вказана клітина рослини містить вказану ДНК, що кодує і експресує вказаний інсектицидний білок Cry1Da, і вказану ДНК, що кодує і експресує вказаний інсектицидний білок Cry1Fa, і де вказаний інсектицидний білок Cry1Fa щонайменше на 99 % ідентичний послідовності SEQ ID NO:1, а вказаний інсектицидний білок Cry1Da щонайменше на 99 % ідентичний послідовності SEQ ID NO:2.
- 40 34. Трансгенна рослина за будь-яким з пп. 1, 16, 23 і 24, 31 і 32, де вказаний інсектицидний білок Cry1Fa містить SEQ ID NO:1, а вказаний інсектицидний білок Cry1Da містить SEQ ID NO:2.



Фіг. 1

Конкурування за зв'язування BbMV Spodoptera frugiperda з білком, що містить коровий токсин Cry1Fa, коровий токсин Cry1Da і ¹²⁵I-мічений коровий токсин Cry1Da



Фіг. 2

Комп'ютерна верстка Т. Вахричева

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

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