



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **115235** (13) **C2**
(51) МПК
C07K 14/32 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2014 10828	(72) Винахідник(и):	Сампсон Кімберлі С. (US), Тайєр Ребекка (US), Лехтінен Дуан (US)
(22) Дата подання заявки:	07.03.2013	(73) Власник(и):	АТЕНІКС КОРП., 3500 Paramount Parkway, Morrisville, NC 27560, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	10.10.2017	(74) Представник:	Гренчук Сергій Рудольфович, реєстр. №170
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	61/608,303	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	Revision of the nomenclature for the Bacillus thuringiensis pesticidal crystal proteins / Crickmore N, Zeigler D.R., Feitelson J. et al. // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 1998. – Vol. 62. – №3. – P. 807-813 WO 03/075655 A2, 18.09.2003 US 2010/004176 A1, 07.01.2010. Novel Vip3-related protein from Bacillus thuringiensis / Rang C., Gil P., Neisner N. et al // Applied and Environmental Microbiology. – 2005. – Vol. 71. – № 10. – P. 6276-6281.
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	08.03.2012		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	10.11.2014, Бюл.№ 21		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	10.10.2017, Бюл.№ 19		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/US2013/029647, 07.03.2013		

(54) ГЕН ТОКСИНУ АХМІ335 BACILLUS THURINGIENSIS ТА СПОСІБ ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ

(57) Реферат:

Винахід належить до виділеної молекул нуклеїнової кислоти ендотоксину Vip3Ba1, що містить нуклеотидну послідовність, яка кодує амінокислотну послідовність, показану в SEQ ID NO: 2 або 4, або нуклеотидну послідовність, викладену в SEQ ID NO: 1 або 3, її варіанти і фрагменти, ДНК-конструкти або касети експресії, а також до композиції, що її містять, і способів надання пестицидної активності бактеріям, рослинам, рослинним клітинам, тканинам, насінню за допомогою зазначених пептидів.

UA 115235 C2

Дана заявка заявляє пріоритет за попередньою заявкою на патент США, реєстраційний № 61/608303, поданою 8 березня 2012 року згідно із 35 U.S.C. § 111(b), зміст якої включено у даний документ за допомогою посилання у всій його повноті.

ГАЛУЗЬ ВІНАХОДУ

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

ПЕРЕДУМОВИ ВІНАХОДУ

10 *Bacillus thuringiensis* являє собою грампозитивну спороутворювальну ґрунтову бактерію, яка має здатність продукувати кристалічні включення, що проявляють специфічну токсичність щодо деяких рядів та видів комах, але є нешкідливими для рослин та інших нецільових організмів. У зв'язку з цим композиції, що містять штами *Bacillus thuringiensis* або їх інсектицидні білки, можуть застосовуватися в якості екологічно прийнятних інсектицидів для контролю

15 сільськогосподарських комах-шкідників або комах-переносників різних захворювань людей та тварин.

Кристалічні (Cry) білки (дельта-ендотоксини) від *Bacillus thuringiensis* мають потужну інсектицидну активність щодо переважно личинок лускокрилих, напівтвердокрилих, двокрилих та твердокрилих. Дані білки також продемонстрували активність щодо шкідників рядів

20 Hymenoptera, Homoptera, Phthiraptera, Mallophaga та Acari, а також інших рядів безхребетних, таких як Nematelminthes, Platyhelminthes та Sarcomastigophora (Feitelson (1993) The *Bacillus Thuringiensis* family tree. In Advanced Engineered Pesticides, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.). Дані білки первісно класифікували як CryI-Cryv, переважно на основі їх інсектицидної активності. Основними класами були Lepidoptera-специфічні (I), Lepidoptera-специфічні та Diptera-специфічні (II), Coleoptera-специфічні (III), Diptera-специфічні (IV) та нематода-специфічні (V) та (VI). Додатково білки класифікували в підродини; більш спорідненим білкам у складі кожної

25 родини надали кодові позначення Cry1A, Cry1B, Cry1C тощо. Ще більш спорідненим білкам в рамках кожної групи надали такі позначення як Cry1C1, Cry1C2 тощо.

Нещодавно було описано нову номенклатуру для генів Cry, яка більше базується на основі

30 гомології амінокислотних послідовностей, ніж специфічності щодо комах-мішені (Crickmore et al. (1998) Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62:807-813). У новій класифікації кожному токсину надається унікальна назва, що включає первинний ієрархічний рівень (арабська цифра), вторинний ієрархічний рівень (велика літера), третинний ієрархічний рівень (мала літера) та четвортинний ієрархічний рівень (друга арабська цифра). У новій класифікації римські цифри замінено

35 арабськими цифрами у первинному ієрархічному рівні. Білки з ідентичністю послідовностей менше 45 % мають різні первинні ієрархічні рівні, а критеріями для вторинних та третинних ієрархічних рівнів є ідентичність 78 % та 95 %, відповідно.

Кристалічний білок не проявляє інсектицидної активності до моменту його поглинання та розчинення у середній кишці комах. Поглинений протоксин зазнає гідролізу протеазами у

40 травному тракті комах з утворенням активних токсичних молекул. (Höfte and Whiteley (1989) Microbiol. Rev. 53:242-255). Даний токсин зв'язується з апікальними рецепторами щіткової облямівки у середній кишці личинок-мішеней та вбудовується в апікальну мембрану, утворюючи іонні канали або пори, що у результаті приводить до загибелі личинки.

Дельта-ендотоксини загалом мають п'ять консервативних доменів послідовностей та три

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

Крім дельта-ендотоксинів існує декілька інших відомих класів пестицидних білкових токсинів. Токсини VIP1/VIP2 (див. наприклад патент США № 5770696) є двокомпонентними пестицидними токсинами, які проявляють сильну активність проти комах за допомогою

55 механізму, що вважається таким, який включає опосередкований рецепторами ендоцитоз, що супроводжується подальшою клітинною токсифікацією, причому він схожий на спосіб дії інших двокомпонентних ("A/B") токсинів. A/B токсини, такі як VIP, C2, CDT, CST або токсин B. anthracis, що спричиняє набряк, та летальні токсини спочатку взаємодіють із цільовими клітинами шляхом специфічного, опосередкованого рецепторами зв'язування "B"-компонентів як мономерів. Потім ці мономерні формують гомопептамери. Потім "B"-гептамер рецепторний комплекс діє як

60

платформа для з'єднання, яка у подальшому зв'язується та уможливорює перенесення ферментного(-их) "А"-компонента(-ів) в цитозоль за допомогою опосередкованого рецепторами ендцитозу. Як тільки потрапили в цитозоль клітини, "А"-компоненти інгібують нормальну функцію клітини за допомогою, наприклад, ADP-рибозилування G-актину або підвищення внутрішньоклітинних рівнів циклічного AMP (cAMP). Див. Barth et al. (2004) Microbiol Mol Biol Rev 68:373-402.

Інтенсивне застосування інсектицидних речовин на основі *B. thuringiensis* вже призвело до підвищення стійкості в польових популяціях молі капустяної, *Plutella xylostella* (Ferré and Van Rie 5 (2002) Annu. Rev. Entomol. 47:501-533). Найбільш загальним механізмом стійкості є зниження зв'язування токсину з його специфічним(-и) рецептором(-ами) у середній кишці. Це також може надавати перехресну стійкість до інших токсинів, які мають спільний рецептор (Ferré and Van Rie (2002)).

СТИСЛИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Забезпечуються композиції та способи для надання пестицидної активності бактеріям, рослинам, рослинним клітинам, тканинам та насінню рослин. Композиції містять молекули нуклеїнових кислот, послідовності яких кодують пестицидні та інсектицидні поліпептидів, вектори, які містять дані молекули нуклеїнових кислот, та клітини-хазяїни, які містять такі вектори. Композиції також містять послідовності пестицидних поліпептидів та антитіла до даних поліпептидів. Нуклеотидні послідовності можуть застосовуватися в ДНК-конструктах або експресійних касетах для трансформації та експресії в організмах, у тому числі мікроорганізмах та рослинах. Нуклеотидні або амінокислотні послідовності можуть являти собою синтетичні послідовності, які було сконструйовано для експресії в організмі, включаючи, але без обмежень, мікроорганізм або рослину. Композиції також містять бактерії, рослини, рослинні клітини, тканини та насіння рослин, що містять нуклеотидну послідовність даного винаходу.

Зокрема, забезпечуються виділені або рекомбінантні молекули нуклеїнових кислот, які кодують пестицидний білок. Крім того, охоплені амінокислотні послідовності, що відповідають пестицидному білку. Зокрема, даний винахід забезпечує виділену або рекомбінантну молекулу нуклеїнової кислоти, яка містить нуклеотидну послідовність, що кодує амінокислотну послідовність, показану в SEQ ID NO:2 або 4 або нуклеотидну послідовність, викладену в SEQ ID NO:1 або 3, а також їх біологічно-активні варіанти та фрагменти. Нуклеотидні послідовності, що є комплементарними нуклеотидній послідовності даного винаходу, або які гібридизуються з послідовністю даного винаходу або комплементарним їй ланцюгом, також охоплюються. Додатково забезпечуються вектори, клітини-хазяїни, рослини та насіння, які містять нуклеотидні послідовності даного винаходу, або нуклеотидні послідовності, які кодують амінокислотні послідовності даного винаходу, а також їх біологічно-активні варіанти та фрагменти.

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

Композиції та способи даного винаходу придатні для одержання організмів з підвищеною стійкістю або резистентністю до шкідників, зокрема бактерій та рослин. Дані організми та композиції, що містять ці організми, є придатними для сільськогосподарських цілей. Композиції даного винаходу також придатні для створення змінених або покращених білків, які мають пестицидну активність, або для виявлення присутності пестицидних білків або нуклеїнових кислот у продуктах або організмах.

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС

Даний винахід відноситься до композицій та способів регулювання резистентності або стійкості до шкідників у організмах, зокрема, рослинах або рослинних клітинах. Під "резистентністю" мають на увазі, що шкідник (наприклад, комаха) гине при поглинанні або іншому контакті з поліпептидами даного винаходу. Під "толерантністю" мають на увазі порушення або пригнічування функцій руху, живлення, розмноження або інших функцій організму шкідника. Способи включають трансформування організмів із застосуванням нуклеотидної послідовності, яка кодує пестицидний білок даного винаходу. Зокрема, нуклеотидні послідовності даного винаходу застосовуються для одержання рослин та мікроорганізмів, які мають пестицидну активність. Таким чином, забезпечуються трансформовані бактерії, рослини, рослинні клітини, тканини та насіння рослин. Композиції являють собою пестицидні нуклеїнові кислоти та білки від *Bacillus* або інших видів. Послідовності знаходять застосування в конструюванні векторів експресії для наступної трансформації в організми, що представляють інтерес, у якості зондів для виділення інших гомологічних (або частково гомологічних) генів та для створення змінених пестицидних білків із

застосуванням способів, відомих у даній галузі техніки, таких як переміщення доменних блоків або перестановка в ДНК, наприклад, з використанням представників родин ендотоксинів Cgy1, Cgy2 та Cgy9. Білки знаходять застосування у здійсненні контролю або винищенню популяцій шкідників з рядів популяцій лускокрилого, напівтвердокрилого, твердокрилого, двокрилого або нематоди шкідника та для одержання композицій з пестицидною активністю.

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

Таким чином, у даному документі забезпечуються нові виділені або рекомбінантні нуклеотидні послідовності, які забезпечують пестицидну активність. Дані нуклеотидні послідовності кодують поліпептиди з гомологією до відомих токсинів VIP3. Також забезпечуються амінокислотні послідовності пестицидних білків. Білок, синтезований у результаті трансляції даного гена, дозволяє клітинам контролювати або знищувати шкідників, які його поглинають.

Виділені молекули нуклеїнових кислот та їх варіанти та фрагменти

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

Вираз "виділена" або "рекомбінантна" нуклеотидна послідовність (або ДНК) використовується в даному документі для позначення нуклеотидної послідовності (або ДНК), яка більше не перебуває в природному для неї середовищі, наприклад, перебуває у системі *in vitro* або у рекомбінантній бактеріальній або рослинній клітині-хазяїні. У деяких варіантах здійснення виділена або рекомбінантна нуклеїнова кислота не містить послідовностей (переважно послідовностей, що кодують білок), які у природних умовах фланкують нуклеїнову кислоту (тобто, послідовностей, які розташовані в 5' та 3' кінцях нуклеїнової кислоти) у геномній ДНК організму, з якого отримана нуклеїнова кислота. У контексті даного винаходу вираз "виділені", при використанні щодо молекул нуклеїнових кислот, виключає виділені хромосоми. Наприклад, у різних варіантах здійснення виділений дельта-ендотоксин, що кодує молекулу нуклеїнової кислоти, може містити нуклеотидні послідовності довжиною менше приблизно 5 т.п.о., 4 т.п.о., 3 т.п.о., 2 т.п.о., 1 т.п.о., 0,5 т.п.о. або 0,1 т.п.о., які у природних умовах фланкують молекулу нуклеїнової кислоти у геномній ДНК клітини, з якої було отримано нуклеїнову кислоту. У різних варіантах здійснення білок дельта-ендотоксин, який практично не містить клітинного матеріалу, включає склади білка, що містять менше приблизно 30 %, 20 %, 10 % або 5 % (на суху масу) білка дельта-ендотоксину (також називається у даному документі "білок, що забруднює").

Нуклеотидні послідовності, що кодують білки даного винаходу, містять у своєму складі послідовність, викладену в SEQ ID NO:1 або 3, та її варіанти, фрагменти та комплементарні ланцюги. Під "комплементарною" мають на увазі нуклеотидну послідовність, яка є досить комплементарною даній нуклеотидній послідовності, щоб вона могла гібридизуватися із заданою нуклеотидною послідовністю з утворенням стабільного дуплекса. Відповідна амінокислотна послідовність пестицидного білка, яка кодується даною нуклеотидною послідовністю, викладена в SEQ ID NO:2 або 4.

Молекули нуклеїнових кислот, що являють собою фрагменти даних нуклеотидних послідовностей, які кодують пестицидні білки, також включено у даний винахід. Під "фрагментом" мають на увазі частину нуклеотидної послідовності, яка кодує пестицидний білок. Фрагмент нуклеотидної послідовності може кодувати біологічно активну частину пестицидного білка, або це може бути фрагмент, який може використовуватися у якості гібридизаційного зонда або ПЛР-праймера із застосуванням способів, які розкрито нижче. Молекули нуклеїнових кислот, які являють собою фрагменти нуклеотидної послідовності, що кодує пестицидний білок, містять щонайменше приблизно 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1350, 1400 суміжних нуклеотидів, або число нуклеотидів, що досягає числа нуклеотидів, присутніх у нуклеотидній послідовності повної довжини, яка кодує пестицидний білок, розкритий у даному документі, залежно від передбачуваного застосування. Під "суміжними" нуклеотидами мають на увазі нуклеотидні залишки, які безпосередньо прилягають один до одного. Фрагменти нуклеотидних послідовностей даного винаходу будуть кодувати фрагменти білків, які зберігають біологічну активність пестицидного білка і, отже, зберігають пестицидну активність. Таким чином, біологічно-активні фрагменти поліпептидів, розкритих у даному документі, також включені у даний винахід. Під виразом "зберігає активність" мають на увазі, що фрагмент буде мати щонайменше приблизно 30 %, щонайменше приблизно 50 %, щонайменше приблизно 70 %, 80 %, 90 %, 95 % або більш високу пестицидну активність щодо пестицидного білка. У одному варіанті здійснення пестицидна активність являє собою активність щодо твердокрилих. В іншому варіанті здійснення пестицидна активність являє собою активність щодо лускокрилих. В іншому варіанті здійснення пестицидна активність являє собою активність щодо нематод. В іншому варіанті здійснення пестицидна активність являє собою активність щодо двокрилих. В іншому варіанті здійснення пестицидна активність являє собою активність щодо напівтвердокрилих. Способи вимірювання пестицидної активності добре відомі у даній галузі техніки. Див., наприклад, Czarla and Lang (1990) J. Econ. Entomol. 83:2480-2485; Andrews et al. (1988) Biochem. J. 252:199-206; Marrone et al. (1985) J. of Economic Entomology 78:290-293; та патент США № 5743477, усі з яких включено у даний документ у повному обсязі за допомогою посилання.

Фрагмент нуклеотидної послідовності, що кодує пестицидний білок, який кодує біологічно активну частину білка даного винаходу, буде кодувати щонайменше приблизно 15, 25, 30, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450 суміжних амінокислот, або число амінокислот, величиною до загального числа амінокислот, що присутні у пестицидному білку повної довжини даного винаходу. У деяких варіантах здійснення фрагмент являє собою фрагмент, що утворюється у результаті протеолітичного розщеплення. Наприклад, фрагмент, що утворюється у результаті протеолітичного розщеплення, може мати N-кінцеве або C-кінцеве відсікання довжиною щонайменше приблизно 100 амінокислот, приблизно 120, приблизно 130, приблизно 140, приблизно 150 або приблизно 160 амінокислот відносно SEQ ID NO:2 або 4. У деяких варіантах здійснення фрагменти, які включено у даний документ, утворені у результаті видалення C-кінцевого домену кристалізації, наприклад, за допомогою протеолізу або за допомогою вставки стоп-кодону у кодуючу послідовність.

Переважні пестицидні білки даного винаходу кодуються нуклеотидною послідовністю, яка є достатньо ідентичною нуклеотидній послідовності SEQ ID NO:1 або 3, або пестицидні білки є достатньо ідентичними амінокислотній послідовності, викладеній у SEQ ID NO:2 або 4. Під виразом "достатньо ідентична" мають на увазі амінокислотну або нуклеотидну послідовність, яка має щонайменше приблизно 60 % або 65 % ідентичність послідовності, приблизно 70 % або 75 % ідентичність послідовності, приблизно 80 % або 85 % ідентичність послідовності, приблизно 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або більш високу ідентичність послідовності у порівнянні з еталонною послідовністю, як показано із застосуванням однієї з програм вирівнювання, описаних у даному документі, із застосуванням стандартних параметрів. Фахівцям у даній галузі техніки буде зрозуміло, що ці значення можуть бути відповідним чином скоректовані для визначення відповідної ідентичності білків, які кодуються двома нуклеотидними послідовностями, з урахуванням виродженості кодонів, подібності амінокислот, позиціонування рамки зчитування тощо.

Для визначення відсотка ідентичності двох амінокислотних послідовностей або двох нуклеїнових кислот, послідовності вирівнюють з метою оптимального порівняння.

Відсоток ідентичності між двома послідовностями є функцією від числа ідентичних положень, спільних для послідовностей (тобто, відсоток ідентичності = число ідентичних положень/загальне число положень (наприклад положення, що перекриваються) x 100).

В одному варіанті здійснення дві послідовності мають однакову довжину. У іншому варіанті здійснення відсоток ідентичності розраховується по усій довжині еталонної послідовності

(тобто, послідовності, що розкриваються у даному документі, у якості будь-якої з послідовностей SEQ ID NO:1-4). Відсоток ідентичності між двома послідовностями може бути визначено із застосуванням методик, подібних до тих, які описано нижче, з дозволом або без дозволу гепів. При розрахунках відсотка ідентичності, зазвичай підраховується число точних збігів. Геп, тобто положення при вирівнюванні, у якому залишок присутній в одній послідовності, але не в іншій, розглядається як положення з неідентичними залишками.

Визначення відсотка ідентичності між двома послідовностями можна здійснити з використанням математичного алгоритму. Необмежувальним прикладом математичного алгоритму, використовуваним для порівняння двох послідовностей, є алгоритм за Karlin and Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264, модифіковано як у Karlin and Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877. Такий алгоритм включено до програми BLASTN та BLASTX за Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403. Пошуки нуклеотидів BLAST можна здійснювати за допомогою програми BLASTN, оцінка = 100, довжина слова = 12, для одержання нуклеотидних послідовностей, гомологічних пестицидоподібним молекулам нуклеїнових кислот даного винаходу. BLAST-пошуки білків можна здійснювати за допомогою програми BLASTX, оцінка = 50, довжина слова = 3, для одержання амінокислотних послідовностей, гомологічних молекулам пестицидних білків даного винаходу. Для одержання вирівнювань з гепами з метою порівняння можна застосовувати програму Gapped BLAST (в BLAST 2.0) як описано у Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389. У якості альтернативи можна застосовувати програму PSI-Blast для ітераційного проведення повторного пошуку, який виявляє віддалені зв'язки між молекулами. Див. Altschul et al. (1997) *supra*. При роботі з програмами BLAST, Gapped BLAST та PSI-Blast можуть застосовуватися параметри за умовчанням, встановлені для відповідних програм (наприклад, BLASTX та BLASTN). Вирівнювання можна також проводити вручну шляхом звіряння.

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

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

Даний винахід також охоплює варіанти молекул нуклеїнових кислот. "Варіанти" нуклеотидних послідовностей, що кодують пестицидні білки, включають ті послідовності, які кодують пестицидні білки, що розкриваються у даному документі, але які різняться консервативно у зв'язку з виродженістю генетичного коду, а також ті послідовності, які є досить ідентичними, як обговорювалося вище. Алельні варіанти, що виникають у природних умовах,

можуть бути ідентифіковані із застосуванням добре відомих молекулярно-біологічних методик, таких як методики полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та гібридизації, які описані нижче. Варіанти нуклеотидних послідовностей також включають отримані синтетичним шляхом нуклеотидні послідовності, які були створені, наприклад, із застосуванням сайт-специфічного мутагенезу, але які ще кодують пестицидні білки, що розкриваються у даному документі, як обговорюється нижче. Варіанти білків, які включені у даний винахід, є біологічно активними, що означає, що вони продовжують проявляти необхідну біологічну активність нативного білка, тобто, пестицидну активність. Під виразом "зберігає активність" мають на увазі, що варіант буде мати щонайменше приблизно 30 %, щонайменше приблизно 50 %, щонайменше приблизно 70 % або щонайменше приблизно 80 % пестицидної активності нативного білка. Способи визначення пестицидної активності добре відомі у даній галузі техніки. Див., наприклад, Czarla and Lang (1990) J. Econ. Entomol. 83:2480-2485; Andrews et al. (1988) Biochem. J. 252:199-206; Marrone et al. (1985) J. of Economic Entomology 78:290-293; та патент США № 5743477, усі з яких включені у даний документ у повному обсязі за допомогою посилання.

Досвідченому фахівцю також буде зрозуміло, що зміни можуть бути введені за рахунок мутацій нуклеотидних послідовностей даного винаходу, що тим самим приведе до змін в амінокислотній послідовності, що кодує пестицидні білки, не змінюючи біологічну активність білків. Отже, варіанти виділених молекул нуклеїнових кислот можуть бути створені шляхом введення однієї або декількох нуклеотидних замін, вставок або делецій у відповідну нуклеотидну послідовність, що розкривається у даному документі, таким чином, щоб одна або декілька замін, вставок або делецій амінокислот були введені у кодований білок. Мутації можуть бути введені із застосуванням стандартних методик, таких як сайт-специфічний мутагенез та ПЛР-опосередкований мутагенез. Такі варіанти нуклеотидних послідовностей також включені у даний винахід.

Наприклад, консервативні амінокислотні заміни можуть бути здійснені у одному або декількох, передбачених, замінних амінокислотних залишках. "Замінний" амінокислотний залишок являє собою залишок, який може бути змінений у послідовності дикого типу пестицидного білка без змінення біологічної активності, тоді як "незамінний" амінокислотний залишок необхідний для здійснення біологічної активності. "Консервативна амінокислотна заміна" є такою, при якій амінокислотний залишок замінюється амінокислотним залишком, що має подібний бічний ланцюг. Родини амінокислотних залишків, що мають подібні бічні ланцюги, були визначені у даній галузі техніки. Дані родини включають амінокислоти з основними бічними ланцюгами (наприклад, лізин, аргінін, гістидин), кислотними бічними ланцюгами (наприклад, аспарагінова кислота, глутамінова кислота), незарядженими полярними бічними ланцюгами (наприклад, гліцин, аспарагін, глутамін, серин, треонін, тирозин, цистеїн), неполярними бічними ланцюгами (наприклад, аланін, валін, лейцин, ізолейцин, пролін, фенілаланін, метіонін, триптофан), бета-розгалуженими бічними ланцюгами (наприклад, треонін, валін, ізолейцин) та ароматичними бічними ланцюгами (наприклад, тирозин, фенілаланін, триптофан, гістидин).

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

У якості альтернативи, варіанти нуклеотидних послідовностей можуть бути отримані шляхом введення випадкових мутацій протягом усієї або частини кодуючої послідовності, як наприклад, із застосуванням насичувального мутагенезу, та отримані у результаті мутанти можуть бути піддані скринінгу щодо їх здатності забезпечувати пестицидну активність для виявлення мутантів, що зберігають активність. Після мутагенезу білок, що кодується, може експресуватися рекомбінантно, а активність цього білка можна визначити з використання стандартних методик аналізу.

Із застосуванням таких способів як ПЛР, гібридизація тощо можна ідентифікувати відповідні пестицидні послідовності, такі послідовності, які мають значну ідентичність до послідовності даного винаходу. Див., наприклад, Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) та Innis, et al. (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, NY).

При використанні способу гібридизації вся пестицидна нуклеотидна послідовність або її частина можуть використовуватися для скринінгу кДНК або геномних бібліотек. Способи конструювання такої кДНК та геномних бібліотек загалом відомі у даній галузі техніки та розкриті у Sambrook and Russell, 2001, *supra*. У якості так званих гібридизаційних зондів можуть виступати фрагменти геномної ДНК, фрагменти кДНК, фрагменти РНК або інші олігонуклеотиди, та вони можуть бути мічені групою, що детектується, такою як ^{32}P , або будь-яким іншим маркером, що детектується, таким як інші радіоактивні ізотопи, флуоресцентна сполука, фермент або кофактор ферменту. Зонди для гібридизації можуть бути отримані шляхом введення мітки у синтетичні олігонуклеотиди на основі відомої нуклеотидної послідовності, яка кодує пестицидний білок, що розкривається у даному документі. Додатково можуть використовуватися вироджені праймери, сконструйовані на основі консервативних нуклеотидів або амінокислотних залишків у нуклеотидній послідовності або кодованій амінокислотній послідовності. Зонд, зазвичай, містить ділянку нуклеотидної послідовності, яка гібридується у жорстких умовах із щонайменше приблизно 12, щонайменше приблизно 25, щонайменше приблизно 50, 75, 100, 125, 150, 175 або 200 послідовними нуклеотидами нуклеотидної послідовності, яка кодує пестицидний білок даного винаходу або його фрагмент або варіант. Способи одержання зондів для гібридизації загалом відомі у даній галузі техніки і розкриті у Sambrook and Russell, 2001, *supra*, включено у даному документі за допомогою посилання.

Наприклад, ціла послідовність, що визначає пестицидну активність, яка розкривається у даному документі, або одна або декілька її частин можуть використовуватися у якості зонда, здатного до специфічної гібридизації з відповідними пестицидними білок-подібними послідовностями та молекулами інформаційних РНК. Для досягнення специфічної гібридизації за різних умов, такі зонди містять послідовності, які є унікальними та переважно мають у довжину щонайменше приблизно 10 нуклеотидів або щонайменше приблизно 20 нуклеотидів. Такі зонди можуть використовуватися для ампліфікації відповідних пестицидних послідовностей з вибраного організму за допомогою ПЛР. Дану методику можна застосовувати для виділення додаткових кодуючих послідовностей з необхідного організму або у якості діагностичного аналізу для визначення присутності кодуючої послідовності у організмі. Методики гібридизації включають гібридизаційний скринінг висіяних на чашки бібліотек ДНК (у вигляді бляшок або колоній; див., наприклад, Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York)).

Таким чином, даний винахід охоплює зонди для гібридизації, а також нуклеотидні послідовності, що здатні до гібридизації усієї або частини нуклеотидної послідовності даного винаходу (наприклад, довжиною щонайменше приблизно 300 нуклеотидів, щонайменше приблизно 400, щонайменше приблизно 500, 1000, 1200, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500 або нуклеотидні послідовності повної довжини, що розкривається у даному документі). Гібридизація таких послідовностей може здійснюватися у жорстких умовах. Під виразом "жорсткі умови" або "жорсткі умови гібридизації" мають на увазі умови, за яких зонд буде гібридуватися із своєю цільовою послідовністю до більш високого ступеня, який можна детектувати, ніж з іншими послідовностями (наприклад, щонайменше у 2 рази вище фонового рівня). Жорсткі умови залежать від послідовності та будуть різнитися за різних обставин. Контролюванням жорсткості умов гібридизації та/або відмивання можуть бути ідентифіковані цільові послідовності, які на 100 % комплементарні зонду (гомологічне зондування). У якості альтернативи, умови жорсткості можуть бути скоректовані для надання можливості виникнення невідповідності у послідовності для того, щоб більш низькі ступені подібності можна було детектувати (гетерологічне зондування). Загалом, зонд має довжину менше приблизно 1000 нуклеотидів, переважно менше 500 нуклеотидів.

Як правило, жорсткими умовами будуть такі, за яких концентрація солей становить менше приблизно 1,5 М іонів Na, зазвичай, від приблизно 0,01 до 1,0 М іонів Na (або інших солей) при рН від 7,0 до 8,3, а температура становить щонайменше приблизно 30 °C для коротких зондів (наприклад, від 10 до 50 нуклеотидів) та щонайменше приблизно 60 °C для довгих зондів (наприклад, більше 50 нуклеотидів). Жорстких умов можна також досягти додаванням засобів, що дестабілізують, таких як формамід. Ілюстративні умови низької жорсткості включають гібридизацію з буферним розчином, що містить від 30 до 35 % формаміду, 1 М NaCl, 1 % SDS (додецилсульфат натрію) при 37 °C, та відмивання в SSC від 1X до 2X (20X SSC=3,0 М NaCl/0,3

М тринатрійцитрат) при 50-55 °С. Ілюстративні умови середньої жорсткості включають гібридизацію з розчином, що містить від 40 до 45 % формаміду, 1,0 М NaCl, 1 % SDS при 37 °С, та відмивання в SSC від 0,5X до 1X SSC при 55-60 °С. Типові умови високої жорсткості включають гібридизацію з розчином, що містить 50 % формаміду, 1 М NaCl, 1 % SDS при температурі 37 °С, та відмивання в 0,1X SSC при 60-65 °С. Необов'язково, буфери для відмивання можуть містити від приблизно 0,1 % до приблизно 1 % SDS. Тривалість гібридизації становить загалом менше приблизно 24 годин, зазвичай, від приблизно 4 до приблизно 12 годин.

Специфічність, як правило, залежить від постгібридизаційних відмивань, при яких найбільш важливими факторами є іонна сила та температура кінцевого розчину для відмивання. Для ДНК-ДНК гібридів, значення T_m може бути апроксимовано з рівняння Meinkoth and Wahl (1984) Anal. Biochem. 138:267-284: $T_m = 81,5 ^\circ\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\%GC) - 0,61 (\% \text{ form}) - 500/L$; де М - молярність моновалентних катіонів, %GC - процентний вміст гуанозинових та цитозинових нуклеотидів ДНК, % form - це процентний вміст формаміду у розчині для гібридизації, а L - довжина гібрида у парі основ. T_m - температура (при заданій іонній силі та pH), при якій 50 % комплементарної цільової послідовності гібридується з ідеально відповідним зондом. T_m знижується приблизно на 1 °С при невідповідності на кожний 1 %; таким чином, T_m умови гібридизації та/або відмивання можуть бути скоректовані для гібридизації з послідовностями необхідної ідентичності. Наприклад, при проведенні пошуку послідовностей з 90 % ідентичністю, T_m може бути знижена на 10 °С. Загалом, жорсткі умови вибирають таким чином, щоб температура була приблизно на 5 °С нижче температури плавлення (T_m) для специфічної послідовності та комплементарного їй ланцюга при заданих значеннях іонної сили та pH. Однак дуже жорсткі умови можуть використовувати гібридизацію та/або відмивання при температурі на 1, 2, 3 або 4 °С нижче температури плавлення (T_m); умови середньої жорсткості можуть використовувати гібридизацію та/або відмивання при температурі на 6, 7, 8, 9 або 10 °С нижче температури плавлення (T_m); умови низької жорсткості можуть використовувати гібридизацію та/або відмивання при температурі на 11, 12, 13, 14, 15 або 20 °С нижче температури плавлення (T_m).

Із застосуванням рівняння, композицій для гібридизації та відмивання та необхідної T_m середньому фахівцеві у даній галузі техніки буде зрозуміло, що варіації у жорсткості розчинів для гібридизації та/або відмивання, за своєю суттю, описані. Якщо необхідний ступінь невідповідності приводить до T_m менше 45 °С (водний розчин) або 32 °С (розчин формаміду), то переважним є підвищення концентрації для того, щоб могла використовуватися більш висока температура. Детальний посібник з гібридизації нуклеїнових кислот наведено у Tijssen (1993) Laboratory Methods in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes, Part I, Chapter 2 (Elsevier, New York); та Ausubel et al., eds. (1995) Current Protocols in Molecular Biology, Chapter 2 (Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York). Див. Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York).

Виділені білки та їх варіанти та фрагменти

Пестицидні білки також охоплено у даному винаході. Під "пестицидним білком" мають на увазі білок, що має амінокислотну послідовність, викладену в SEQ ID NO:2 або 4. Їх фрагменти, біологічно активні частини та варіанти також представлені і можуть використовуватися для здійснення на практиці способів даного винаходу. "Виділений білок" або "рекомбінантний білок" застосовують щодо білка, який більше не перебуває у природних умовах, а перебуває, наприклад, у системі in vitro або у рекомбінантній бактеріальній або рослинній клітині-хазяїні.

"Фрагменти" або "біологічно активні частини" містять фрагменти поліпептиду, який містить амінокислотні послідовності, що достатньо ідентичні амінокислотній послідовності, викладеній в SEQ ID NO:2 або 4, і які проявляють пестицидну активність. Біологічно активною частиною пестицидного білка може бути поліпептид довжиною, наприклад, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350 або більше амінокислот. Такі біологічно активні частини можуть бути отримані з використанням рекомбінантних методик та оцінені щодо пестицидної активності. Способи визначення пестицидної активності добре відомі у даній галузі техніки. Див., наприклад, Czapla and Lang (1990) J. Econ. Entomol. 83:2480-2485; Andrews et al. (1988) Biochem. J. 252:199-206; Marrone et al. (1985) J. of Economic Entomology 78:290-293; та патент США № 5743477, усі з яких включено у даний документ у повному обсязі за допомогою посилання. Як використовується у даному документі, фрагмент містить щонайменше 8 суміжних амінокислот з SEQ ID NO:2 або 4. Разом з тим, даний винахід охоплює інші фрагменти, такі як будь-який фрагмент у білку, довжиною більше приблизно 10, 20, 30, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600,

650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350 або більше амінокислот.

Під "варіантами" мають на увазі білки або поліпептиди, що мають амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 60 %, 65 %, приблизно на 70 %, 75 %, приблизно на 80 %, 85 %, приблизно на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентична амінокислотній послідовності будь-якій з SEQ ID NO:2 або 4. Варіанти також включають поліпептиди, які кодуються молекулою нуклеїнової кислоти, що гібридизується з молекулою нуклеїнової кислоти з SEQ ID NO:1 або 3 або комплементарним їй ланцюгом, у жорстких умовах. Варіанти включають поліпептиди, які різняться амінокислотними послідовностями у результаті мутагенезу. Варіанти білків, які охоплені у даному винаході, є біологічно активними, тобто вони продовжують мати необхідну біологічну активність нативного білка, тобто, зберігають пестицидну активність. У деяких варіантах здійснення варіанти мають покращену активність щодо нативного білка. Способи визначення пестицидної активності добре відомі у даній галузі техніки. Див., наприклад, Czapla and Lang (1990) J. Econ. Entomol. 83:2480-2485; Andrews et al. (1988) Biochem. J. 252:199-206; Marrone et al. (1985) J. of Economic Entomology 78:290-293; та патент США № 5743477, усі з яких включені у даний документ у повному обсязі за допомогою посилання.

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

У різних варіантах здійснення даного винаходу пестицидні білки містять послідовності, виведені від нуклеотидних послідовностей повної довжини, що розкриваються у даному документі, та амінокислотні послідовності, які коротше послідовностей повної довжини за рахунок використання розташованої нижче альтернативної ділянки початку трансляції. Таким чином, нуклеотидна послідовність даного винаходу та/або вектори, клітини-хазяїни і рослини, що містять нуклеотидну послідовність даного винаходу (і способи одержання та застосування нуклеотидної послідовності згідно з даним винаходом), можуть містити нуклеотидну послідовність, яка кодує амінокислотну послідовність, що відповідає залишкам 2-800 з SEQ ID NO:2 (яка викладена тут як SEQ ID NO:4), залишкам 35-800 з SEQ ID NO:2, залишкам 37-800 з SEQ ID NO:2 або залишкам 101-800 з SEQ ID NO:2.

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

Таким чином, один аспект даного винаходу стосується антитіл, одноланцюгових молекул, що зв'язують антиген, або інших білків, які специфічно зв'язуються з одним або декількома білками або пептидними молекулами даного винаходу та їх гомологами, гібридами або фрагментами. В особливо переважному варіанті здійснення антитіло специфічно зв'язується з білком, що має амінокислотну послідовність, викладену в SEQ ID NO:2 або 4, або її фрагмент. В іншому варіанті здійснення антитіло специфічно зв'язується з гібридним білком, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з амінокислотної послідовності, викладеної в SEQ ID NO:2 або 4, або її фрагмент.

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

Змінені або покращені варіанти

Відомо, що послідовності ДНК пестицидного білка можуть бути змінені з використанням

різних способів, а також, що ці альтерації можуть привести до утворення послідовності ДНК, яка кодує білки з амінокислотними послідовностями, що відрізняються від тих, які кодують пестицидні білки згідно з даним винаходом. Даний білок може бути змінений різними способами, у тому числі амінокислотні заміни, делеції, відскання та вставки однієї або декількох амінокислотних послідовностей з SEQ ID NO:2 або 4, включаючи до приблизно 2, приблизно 3, приблизно 4, приблизно 5, приблизно 6, приблизно 7, приблизно 8, приблизно 9, приблизно 10, приблизно 15, приблизно 20, приблизно 25, приблизно 30, приблизно 35, приблизно 40, приблизно 45, приблизно 50, приблизно 55, приблизно 60, приблизно 65, приблизно 70, приблизно 75, приблизно 80, приблизно 85, приблизно 90, приблизно 100, приблизно 105, приблизно 110, приблизно 115, приблизно 120, приблизно 125, приблизно 130, приблизно 135, приблизно 140, приблизно 145, приблизно 150, приблизно 155 або більш амінокислотних заміні, делецій або вставок. Способи проведення таких маніпуляцій загалом відомі у даній галузі техніки. Наприклад, варіанти амінокислотної послідовності пестицидного білка можуть бути отримані із застосуванням мутацій у ДНК. Це може також бути досягнуто із застосуванням одного з декількох різновидів мутагенезу та/або шляхом спрямованого розвитку. У деяких аспектах зміни, що кодуються амінокислотними послідовностями, не будуть суттєво впливати на функцію білка. Такі варіанти будуть мати необхідну пестицидну активність. Однак зрозуміло, що здатність пестицидного білка забезпечувати пестицидну активність може бути покращена шляхом застосування таких методик щодо композицій даного винаходу. Наприклад, можна експресувати пестицидний білок у клітинах-хазяїнах, які проявляють високі рівні помилок вбудовування основ при реплікації ДНК, такі як XL-1 Red (Stratagene, Ла-Холла, Каліфорнія). Після розмноження в таких штаммах можна виділити ДНК (наприклад, шляхом одержання плазмідної ДНК або шляхом ампліфікування за допомогою ПЛР та клонування отриманого у результаті ПЛР-фрагмента у векторі), провести культивування пестицидного білка з мутаціями у немутагенному штамі, та ідентифікувати гени з пестицидною активністю, що зазнали мутації, наприклад шляхом проведення аналізу для дослідження пестицидної активності. Загалом, білок змішується і застосовується в аналізах із згодовуванням. Див., наприклад Magrone et al. (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293. Такі аналізи можуть включати приведення рослини в контакт з одним або декількома шкідниками та визначення здатності рослини до виживання та/або здатності викликати загибель шкідників. Приклади мутацій, які приводять до підвищення токсичності, вказані в Schnepf et al. (1998) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:775-806.

У якості альтернативи, можуть бути введені альтерації у послідовність багатьох білків у аміно- або карбокси-кінцях, не справляючи при цьому істотного впливу на активність. Такі зміни можуть включати вставки, делеції або зміни, індуковані застосуванням сучасних молекулярних способів, таких як ПЛР, у тому числі ПЛР-ампліфікації, які змінюють або подовжують послідовність, що кодує білок, за рахунок вставок послідовностей, що кодують амінокислоти, в олігонуклеотиди, використовувані в ПЛР-ампліфікації. У якості альтернативи, додані послідовності білків можуть містити цілі послідовності, що кодують білок, такі як ті, які зазвичай застосовуються у даній галузі техніки для одержання гібридних білків.

Такі гібридні білки часто використовують для (1) підвищення експресії білка, що представляє інтерес, (2) введення домена зв'язування, ферментативної активності або епітопа для того, щоб полегшити очищення білка, детектування білка або для інших експериментальних застосувань, відомих у даній галузі техніки, (3) спрямовування секреції або трансляції білка в субклітинну органелу, таку як периплазматичний простір грамнегативних бактерій, ендоплазматичний ретикулум еукаріотичних клітин, при цьому останнє часто приводить до глікозилювання білка.

Варіанти нуклеотидних та амінокислотних послідовностей даного винаходу також охоплюють послідовності, отримані із застосуванням процедур, що приводять до рекомбінації, і викликають утворення мутацій, таких як перестановка в ДНК. При виконанні такої методики можуть використовуватися одна або декілька різних ділянок, що кодують пестицидні білки, для створення нового пестицидного білка, що має необхідні властивості. Таким чином, бібліотеки рекомбінантних полінуkleотидів створюють з популяції споріднених послідовностей полінуkleотидів, які містять ділянки послідовності, що мають суттєві ідентичності та можуть бути гомологічно рекомбіновані *in vitro* або *in vivo*.

Наприклад, при застосуванні даного підходу мотиви послідовностей, що кодують домен, який представляє інтерес, можуть бути піддані перестановці між геном за даним винаходом, що визначає пестицидну активність, та іншими відомими генами, що визначають пестицидну активність, для одержання нового гена, який кодує послідовність білка, що представляє інтерес, з покращеною властивістю, як, наприклад, з підвищеною інсектицидною активністю. Стратегії такої перестановки в ДНК відомі у даній галузі техніки. Див., наприклад, Stemmer (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 154 91:10747-10751; Stemmer (1994) *Nature* 370:389-391; Cramer et al.

(1997) *Nature Biotech.* 15:436-438; Moore et al. (1997) *J. Mol. Biol.* 272:336-347; Zhang et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4504-4509; Cramer et al. (1998) *Nature* 391:288-291; та патенти США №№ 5605793 та 5837458.

Переміщення або перестановка доменів є ще одним механізмом створення змінених пестицидних білків. Домени можна переміщати між пестицидними білками, що приводить до утворення гібридних або химерних токсинів з покращеною пестицидною активністю або різними цільовими характеристиками. Способи створення рекомбінантних білків та їх дослідження щодо пестицидної активності добре відомі у даній галузі техніки (див., наприклад, Naimov et al. (2001) *Appl. Environ. Microbiol.* 67:5328-5330; de Maagd et al.

(1996) *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1537-1543; Ge et al. (1991) *J. Biol. Chem.* 266:17954-17958; Schnepf et al. (1990) *J. Biol. Chem.* 265:20923-20930; Rang et al. (1999) *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2918-2925).

Вектори

Послідовність даного винаходу, яка визначає пестицидну активність, може бути представлена в експресійній касеті для експресії у рослині, що представляє інтерес. Під "експресійною касетою для рослин" мають на увазі ДНК-конструкт, який здатний приводити до експресії білка з відкритої рамки зчитування у клітині рослини. Зазвичай вони містять промотор та кодуєчу послідовність. Часто такі конструкти будують також містити 3'-нетрансльовану ділянку. Такі конструкти можуть містити "сигнальну послідовність" або "лідерну послідовність" для полегшення котрансляційного або посттрансляційного транспорту пептиду до певних внутрішньоклітинних структур, таких як хлоропласт (або інша пластида), ендоплазматичний ретикулум або комплекс Гольджі.

Під "сигнальною послідовністю" мають на увазі послідовність, для якої відомо або передбачається, що вона приводить до котрансляційного або посттрансляційного транспорту пептидів через клітинну мембрану. У еукаріот вона зазвичай пов'язана з секрецією у апараті Гольджі з деяким у результаті глікозилюванням. Інсектицидні токсини бактерій часто синтезуються у якості протоксинів, які протеолітично активуються у кишечнику цільової комахи (Chang (1987) *Methods Enzymol.* 153:507-516). У деяких варіантах здійснення даного винаходу сигнальна послідовність локалізована у нативній послідовності, або може бути отримана з послідовності даного винаходу. Під "лідерною послідовністю" мають на увазі будь-яку послідовність, яка при трансляції приводить до утворення амінокислотної послідовності, достатньої для запуску котрансляційного транспорту пептидного ланцюга до субклітинної органели. Таким чином, лідерні послідовності містять у своєму складі лідерні послідовності, що виявляють спрямований вплив на транспорт та/або глікозилювання за рахунок проходження в ендоплазматичний ретикулум, проходження у вакуолі, пластиди, у тому числі хлоропласти, мітохондрії та їм подібні.

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

У різних варіантах здійснення нуклеотидна послідовність даного винаходу є функціонально зв'язаною з промотором, наприклад, з рослинним промотором. "Промотором" називається нуклеотидна послідовність, функція якої полягає у керуванні транскрипцією нижче розташованої кодуєчої послідовності. Промотор разом з іншими транскрипційними та трансляційними регуляторними нуклеотидними послідовностями (які також називаються "контрольними

послідовностями") необхідні для експресії послідовності ДНК, що представляє інтерес.

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

Експресійна касета буде мати у своєму складі в 5'-3' напрямку транскрипції ділянку ініціації транскрипції і трансляції (тобто, промотор), ДНК-послідовність даного винаходу та ділянку термінації трансляції і транскрипції (тобто, ділянка термінації), що функціонує у рослині. Промотор може бути нативним або аналогічним, або може бути чужорідним або гетерологічним щодо рослини-хазяїна та/або щодо послідовності ДНК даного винаходу. Додатково, промотор може являти собою природню послідовність або, у якості альтернативи, синтетичну послідовність. Там, де промотор є "нативним" або "гомологічним" щодо рослини-хазяїна, мають на увазі, що промотор виявляють у нативній рослині, у яку цей промотор вводять. Там, де промотор є "чужорідним" або "гетерологічним" щодо послідовності ДНК даного винаходу, мають на увазі, що промотор не є нативним або є таким, що виникає у природних умовах, для функціонально зв'язаної послідовності ДНК даного винаходу.

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

У необхідних випадках ген(и) можуть бути оптимізовані для підвищення експресії у трансформованій клітині-хазяїні. Таким чином, гени можуть бути синтезовані з використанням переважних для клітини-хазяїна кодонів для покращення експресії, або можуть бути синтезовані з використанням кодонів за частоти використання кодонів, переважних для хазяїна. У цілому, вміст GC у гені підвищиться. Див., наприклад, Campbell and Gowri (1990) *Plant Physiol.* 92:1-11, де обговорюється застосування переважних для хазяїна кодонів. У даній галузі техніки існують способи синтезу переважних для рослини генів. Див., наприклад, патенти США № 5380831 та 5436391, публікацію патенту США № 20090137409 та Murray et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:477-498, які включено у даний документ за допомогою посилання.

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

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

Трансформація рослин

Способи даного винаходу включають введення нуклеотидного конструкта у рослину. Під "введенням" мають на увазі забезпечення рослини нуклеотидним конструктом таким чином, щоб конструкт одержав доступ до внутрішнього простору клітини рослини. Способи даного винаходу не вимагають застосування конкретного способу введення нуклеотидного конструкта у рослину, а лише, щоб даний нуклеотидний конструкт одержав доступ до внутрішнього простору щонайменше однієї клітини рослини. У даній галузі техніки відомі способи введення нуклеотидних конструктів у рослини, включаючи, але без обмежень, способи стабільної трансформації, способи тимчасової трансформації та способи, опосередковані вірусами.

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

пилок).

"Трансгенні рослини" або "трансформовані рослини" або "стабільно трансформовані" рослини або клітини або тканини відносяться до рослин, які мають введені або інтегровані в рослинну клітину екзогенні нуклеотидні послідовності або фрагменти ДНК. Дані нуклеотидні послідовності мають у своєму складі такі, які є екзогенними, або не представлені у нетрансформованій рослинній клітині, а також такі, які можуть бути ендегенними, або бути присутніми у нетрансформованій рослинній клітині. "Гетерологічний" загалом відноситься до нуклеотидних послідовностей, які не є ендегенними щодо клітини або не є частиною нативного генома, у якому вони присутні, та які були внесені в клітину шляхом зараження, трансфекції, мікроін'єкції, електропорації, бомбардування мікрочастинками тощо.

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

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

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

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

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

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

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

Способи для трансформації хлоропластів відомі у даній галузі техніки. Див., наприклад, Svab et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:8526-8530; Svab and Maliga (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:913-917; Svab and Maliga (1993) *EMBO J.* 12:601-606. Даний спосіб базується на використанні генної гармати для доставки ДНК, що містить селективний маркер, та спрямованого введення ДНК у геном пластиди за допомогою гомологічної рекомбінації. Додатково, трансформація пластид може бути досягнута за допомогою транс-активації мовчазного, пластидного трансгена за рахунок тканино-переважної експресії пластидної, ядерної РНК-полімерази. Таку систему описано у McBride et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:7301-7305.

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

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

Оцінка трансформації рослин

Після введення гетерологічної чужорідної ДНК у рослинні клітини, підтверджують трансформацію або інтеграцію гетерологічного гена у геном рослин різними способами, такими як аналіз нуклеїнових кислот, білків та метаболітів, асоційованих з інтегрованим геном.

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

Трансформацію рослин можна підтвердити за допомогою Саузерн-блот аналізу геномної ДНК (Sambrook and Russell, 2001, *supra*). Загалом, загальну ДНК екстрагують із трансформанта, розщеплюють за допомогою відповідних рестрикційних ферментів, фракціонують в агарозному гелі та переносять на нітроцелюлозну або нейлонову мембрану.

Мембрану або "блот" далі досліджують за допомогою, наприклад, міченого радіоактивним P^{32} фрагментом цільової ДНК для підтвердження інтеграції введеного гена у геном рослин згідно з стандартними методиками (Sambrook and Russell, 2001, *supra*).

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

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

Пестицидна активність у рослин

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

Для застосування у рослинних клітинах було розроблено цілий ряд маркерів, таких як стійкість до хлорамфеніколу, аміноглікозиду G418, гіроміцину або їм подібним.

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

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

Даний винахід можна застосовувати для трансформації будь-якого виду рослин, включаючи, але без обмежень, однодольні та дводольні рослини. Приклади рослин, які представляють інтерес, включають, але без обмежень, кукурудзу (маїс), сорго, пшеницю, соняшник, помідор, хрестоцвіт, перцеві, картоплю, бавовник, рис, сою, цукровий буряк, цукрову тростину, тютюн, ячмінь та олійний рапс, *Brassica* sp., люцерну, жито, просо, сафлор, земляні горіхи, солодку картоплю, маніок, кавове дерево, кокос, ананас, цитрусові дерева, дерево какао, чайний кущ, банан, авокадо, фігове дерево, гуаву, мангове дерево, маслину, папайю, кеш'ю, маकाдамію, мигдаль, овес, овочі, декоративні рослини та хвоїні.

Овочі включають, але без обмежень, помідори, латук, зелену квасолю, квасолю ліма, види гороху та представників роду *Cucumis*, таких як огірок, канталупа та мускусна диня.

Декоративні рослини включають, але без обмежень, азалію, гортензію, гібіскус, троянди, тюльпани, жовті нарциси, петунію, гвоздику, пуансетію та хризантему. Переважно рослини даного винаходу являють собою культурні рослини (наприклад, маїс, сорго, пшениця, соняшник, помідор, хрестоцвіт, перцеві, картопля, бавовник, рис, соя, цукровий буряк, цукрова тростина, тютюн, ячмінь, олійний рапс тощо).

Застосування у боротьбі зі шкідниками

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

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

У якості альтернативи, пестицид отримують за рахунок введення гена, що визначає пестицидну активність, у клітину-хазяїна. Експресія гена, що визначає пестицидну активність, прямо або опосередковано приводить до внутрішньоклітинної продукції та підтримці рівня пестициду. У одному аспекті даного винаходу дані клітини потім обробляють в умовах, які пролонгують активність токсину, що продукується у клітині, якщо клітину поміщають у середовище цільового шкідника (шкідників). Отриманий у результаті продукт зберігає токсичність, характерну для токсину. З цих інкапсульованих природним чином пестицидів можна потім скласти препарат відповідно до традиційних методик для внесення в середовище проживання цільового шкідника, наприклад, ґрунт, воду та на листя рослин. Дивись, наприклад, EPO 0192319 та посилання, які цитуються у ньому. У якості альтернативи, можна скласти препарат з клітин, що експресують ген згідно з даним винаходом, таким чином, щоб забезпечити застосування отриманого у результаті матеріалу у якості пестициду.

Активні інгредієнти даного винаходу зазвичай наносять у формі композицій, та їх можна наносити одночасно або послідовно з іншими сполуками на посівну площу або рослину, що підлягають обробці. Цими сполуками можуть бути добрива, гербіциди, кріопротектори, поверхнево-активні речовини, детергенти, пестицидні мила, масла, використовувані у період спокою, полімери та/або склади з носіями, що повільно вивільнюються або здатні до біологічного розкладання, які дають можливість довгострокового дозованого вивільнення у цільовій області після разового внесення складу.

Вони також можуть являти собою селективні гербіциди, хімічні інсектициди, віруциди, мікробіциди, амебіциди, пестициди, фунгіциди, бактеріциди, нематодици, молюскоциди або суміші декількох даних препаратів, якщо потрібно, разом з додатковими сільськогосподарсько-прийнятними носіями, поверхнево-активними речовинами або допоміжними речовинами, що сприяють нанесенню, які зазвичай використовують у даній галузі складання. Придатні носії та допоміжні речовини можуть бути твердими або рідкими та відповідають речовинам, які зазвичай використовують у технології складання, наприклад, натуральні або відновлені мінеральні речовини, розчинники, диспергувальні речовини, засоби, що змочують, речовини, що надають липкість, речовини, що зв'язують, або добрива.

Подібним чином склади можна приготувати у формі їстівних "принад", або їм можна надати форму "пасток" для шкідників, щоб забезпечити можливість згодовування або поглинання пестицидного складу цільовим шкідником.

Способи нанесення активного інгредієнта даного винаходу або агрохімічної композиції даного винаходу, яка містить щонайменше один з пестицидних білків, що продукуються

бактеріальними штамами даного винаходу, включають нанесення на листя, покриття насіння та внесення в ґрунт. Кількість нанесень та норма нанесення залежить від інтенсивності зараження відповідним шкідником.

Композицію можна складати у вигляді порошку, дусту, пелети, гранули, аерозолі емульсії, колоїду, розчину або їм подібних та можна одержати за допомогою таких традиційних способів, як сушіння, ліофілізація, гомогенізація, екстракція, фільтрація, центрифугування, осадження або концентрування культури клітин, що містять поліпептид.

В усіх таких композиціях, які містять щонайменше один такий пестицидний поліпептид, даний поліпептид може бути присутнім у концентрації від приблизно 1 % до приблизно 99 % за масою.

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

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

"Шкідник" включає, але без обмежень, комах, грибів, бактерій, нематод, кліщів, іксодових кліщів та їм подібних. Комахи-шкідники включають комах, вибраних із рядів Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Mallophaga, Homoptera, Hemiptera, Orthoptera, Thysanoptera, Dermaptera, Isoptera, Anoplura, Siphonaptera, Trichoptera тощо, зокрема, Coleoptera, Lepidoptera, Diptera.

Ряд Coleoptera включає підряди Adephaga та Polyphaga. Підряд Adephaga включає надродина Caraboidea та Gyrinoidea, у той час як підряд Polyphaga включає надродина Hydrophiloidea, Staphylinoidea, Cantharoidea, Cleroidea, Elateroidea, Dascilloidea, Dryopoidea, Byrrhoidea, Cucujoidea, Meloidea, Mordelloidea, Tenebrionoidea, Bostrichoidea, Scarabaeoidea, Cerambycoidea, Chrysomeloidea та Curculionoidea. Надродина Caraboidea включає родини Cicindelidae, Carabidae та Dytiscidae. Надродина Gyrinoidea включає родини Gyrinidae. Надродина Hydrophiloidea включає родину Hydrophilidae. Надродина Staphylinoidea включає родини Silphidae та Staphylinidae. Надродина Cantharoidea включає родини Cantharidae та Lampyridae. Надродина Cleroidea включає родини Cleridae та Dermestidae. Надродина Elateroidea включає родини Elateridae та Buprestidae. Надродина Cucujoidea включає родину Coccinellidae. Надродина Meloidea включає родину Meloidae. Надродина Tenebrionoidea

включає родину Tenebrionidae. Надродина Scarabaeoidea включає родини Passalidae та Scarabaeidae. Надродина Cerambycoidea включає родину Cerambycidae. Надродина Chrysomeloidea включає родину Chrysomelidae. Надродина Curculionoidea включає родини Curculionidae та Scolytidae.

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

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

Комахи-шкідники згідно з даним винаходом для основних культур включають:

- маїс: *Ostrinia nubilalis*, європейського кукурудзяного метелика; *Agrotis ipsilon*, совку-іпсилон; *Helicoverpa zea*, кукурудзяну совку; *Spodoptera frugiperda*, совку трав'яну; *Diatraea grandiosella*, вогнівку кукурудзяну південно-західну; *Elasmopalpus lignosellus*, зернового точильника; *Diatraea*
- 20 *saccharalis*, вогнівку цукрового очерету; *Diabrotica virgifera*, західного кукурудзяного кореневого жука; *Diabrotica longicornis barberi*, північного кукурудзяного кореневого жука; *Diabrotica undecimpunctata howardi*, південного кукурудзяного кореневого жука; *Melanotus* spp., жуків-коваликів; *Cyclocephala borealis*, хрущика північного (личинку хруща); *Cyclocephala immaculata*, хрущика південного (личинку хруща); *Popillia japonica*, хрущика японського; *Chaetocnema*
- 25 *pulicaria*, земляну кукурудзяну білшку; *Sphenophorus maidis*, кукурудзяного довгоносика; *Rhopalosiphum maidis*, кукурудзяну листову попелицю; *Anuraphis maidiradicis*, кукурудзяну кореневу попелицю; *Blissus leucopterus leucopterus*, клопа-черепашку пшеничного північноамериканського; *Melanoplus femurrubrum*, червононого кобилку; *Melanoplus sanguinipes*, кобилку, що мірпує; *Hylemya platura*, личинку паросткової мухи; *Agromyza parvicornis*, міль-
- 30 пістрянку кукурудзяну; *Anaphothrips obscurus*, трипса злакового; *Solenopsis milesta*, мураху-крадія; *Tetranychus urticae*, звичайного павутинного кліща; сорго: *Chilo partellus*, соргового точильника; *Spodoptera frugiperda*, совку трав'яну; *Helicoverpa zea*, кукурудзяну совку; *Elasmopalpus lignosellus*, маленького точильника кукурудзяного стебла; *Feltia subterranea*, гусеницю озимої совки; *Phyllophaga crinita*, личинку хруща; *Eleodes*, *Conoderus* та *Aeolus* spp., дротяників; *Oulema melanopus*, п'явицу червоногрудку; *Chaetocnema pulicaria*, кукурудзяну білшку; *Sphenophorus maidis*, кукурудзяного довгоносика; *Rhopalosiphum maidis*, кукурудзяну
- 35 листову попелицю; *Sipha flava*, жовту попелицю цукрового очерету; *Blissus leucopterus leucopterus*, клопа-черепашку пшеничного північноамериканського; *Contarinia sorghicola*, галівницю сорго; *Tetranychus cinnabarinus*, червоного павутинного кліща; *Tetranychus urticae*, звичайного павутинного кліща; пшениця: *Pseudaletia unipunctata*, совку лугову; *Spodoptera frugiperda*, совку трав'яну; *Elasmopalpus lignosellus*, маленького точильника кукурудзяного стебла; *Agrotis orthogonia*, прямокутну совку; *Elasmopalpus lignosellus*, маленького точильника кукурудзяного стебла; *Oulema melanopus*, п'явицу червоногрудку; *Hypera punctata*, довгоносика
- 40 листового конюшинового; *Diabrotica undecimpunctata howardi*, південного кукурудзяного кореневого жука; російську пшеничну попелицю; *Schizaphis graminum*, звичайну злакову попелицю; *Macrosiphum avenae*, велику злакову попелицю; *Melanoplus femurrubrum*, червононого кобилку; кобилку виду *Melanoplus differentialis*; *Melanoplus sanguinipes* кобилку, що мірпує; *Mayetiola destructor*, гесенську муху; *Sitodiplosis mosellana*, оранжеву злакову галівницю; *Meromyza americana*, личинку американської меромізи; *Hylemya coarctata*, озиму муху;
- 45 *Frankliniella fusca*, тютюнового трипса; *Cephus cinctus*, хлібного пильщика; *Aceria tulipae*, кліщ цибульний чотириногий; соняшник: *Suleima helianthana*, соняшникову брунькову листовійку; *Homoeosoma electellum*, соняшникову вогнівку; *zygogramma exclamationis*, соняшникову окличну совку; *Bothyrus gibbosus*, моркв'яного жука; *Neolasioptera murtfeldtiana*, галицю соняшникового насіння; бавовник: *Heliothis virescens*, бавовникову листовійку; *Helicoverpa zea*, бавовникову
- 50 совку; *Spodoptera exigua*, совку малу; *Pectinophora gossypiella*, рожевого бавовникового хробака; *Anthonomus grandis*, бавовникового довгоносика; *Aphis gossypii*, бавовникову попелицю; *Pseudatomoscelis seriatus*, бавовникового гедзя; *Trialeurodes abutilonea*, бавовникову білокрилку; *Lygus lineolaris*, трав'яного клопа; *Melanoplus femurrubrum*, червононого кобилку; кобилку виду *Melanoplus differentialis*; *Thrips tabaci*, цибулевого трипса; *Frankliniella fusca*, тютюнового
- 60 трипса; *Tetranychus cinnabarinus*, червоного павутинного кліща; *Tetranychus urticae*, звичайного

павутинного кліща; рис: *Diatraea saccharalis*, точильника цукрового очерету; *Spodoptera frugiperda*, совку трав'яну; *Helicoverpa zea*, кукурудзяну совку; листоїда виду *Colaspis brunnea*; *Lissorhoptus oryzophilus*, рисового водяного довгоносика; *Sitophilus oryzae*, рисового довгоносика; *Nephotettix nigropictus*, рисову цикадку; *Blissus leucopterus leucopterus*, клопа-черепашку пшеничного північноамериканського; *Acrosternum hilare*, зеленого клопа-щитника; соя: *Pseudopiusia includens*, соєвого п'ядака; *Anticarsia gemmatalis*, гусеницю совки оксамитових бобів; *Plathypena scabra*, зеленого шкідника конюшини; *Ostrinia nubilalis*, європейського кукурудзяного метелика; *Agrotis ipsilon*, совку-іпсилон; *Spodoptera exigua*, совку малу; *Heliothis virescens*, бавовникову листовійку; *Helicoverpa zea*, кукурудзяну совку; *Epilachna varivestis*, мексиканську бобову зерновку; *Myzus persicae*, зелену персикову попелицю; *Empoasca fabae*, цикадку картопляну; *Acrosternum hilare*, зеленого клопа-щитника; *Melanoplus femurrubrum*, червононогого кобилку; кобилку виду *Melanoplus differentialis*; *Hylemya platura*, личинку паросткової мухи; *Sericothrips variabilis*, трипса соєвого; *Thrips tabaci*, трипса цибульного; *Tetranychus turkestan*, туркестанського павутинного кліща; *Tetranychus urticae*, звичайного павутинного кліща; ячмінь: *Ostrinia nubilalis*, європейського кукурудзяного метелика; *Agrotis ipsilon*, совку-іпсилон; *Schizaphis graminum*, звичайну злакову попелицю; *Blissus leucopterus leucopterus*, клопа-черепашку пшеничного північноамериканського; *Acrosternum hilare*, зеленого клопа-щитника; *Euschistus servus*, коричневого клопа-щитника; *Delia platura*, личинку паросткової мухи; *Mayetiola destructor*, гесенську муху; *Petrobia latens*, петробію багатідна; олійний рапс: *Brevicoryne brassicae*, попільницю; *Phyllotreta cruciferae*, білшку хрестоцвітну; *Mamestra configurata*, совку латукову; *Plutella xylostella*, капустяну совку; *Delia ssp.*, личинок весняної капустяної мухи.

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

Нематоди, що ранять, включають *Pratylenchus* spp.

Способи підвищення урожайності рослин

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

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

фруктів/овочів: алдікарб, *Bacillus thuriangiensis*, карбарил, карбофуран, хлорпірифос, циперметрин, дельтаметрин, абамектин, цифлутрин/бета-цифлутрин, есфенвалерат, лямбда-цигалотрин, ацеквіноцил, біфеназат, метоксифенозид, новалурон, хромафенозид, тіаклоприд, динотефуран, флаукрипірим, спіродиклофен, гамма-цигалотрин, спіромезифен, спіносад, ринаксіпір, ціазіпір, трифлумурон, спіротетрамат, імідаклоприд, флубендіамід, тіодікарб, метафлумізон, сульфоксафлор, цифлуметофен, ціанопірафен, клотіанідин, тіаметоксам, спінеторам, тіодікарб, флонікамід, метіокарб, емаектин бензоат, індоксакарб, фенаміфос, пірпроксифен, фенбутатин-оксид; фунгіциди для фруктів/овочів: аметоктрадин, азоксистробін, бентіавалікарб, боскалід, каптан, карбендазим, хлороталоніл, мідь, ціазофамід, цифлуфенамід, цимоксаніл, ципроконазол, ципродиніл, дифенокназол, диметоморф, дитіанон, фенамідон, фенгексамід, флаузінам, флудіоксоніл, флуопіколід, флуопірам, флуоксастробін, флуксапіроксад, фолпет, фосетил, іпродіон, іпровалікарб, ізопіразам, крезоксим-метил, манкоцеб, мандіпропамід, металаксил/мефеноксам, метирам, метрафенон, міклобутаніл, пенконазол, пентіопірад, пікоксистробін, пропамокарб, пропіконазол, пропінеб, проквіназид, протіокназол, піраклостробін, піриметаніл, квіноксифен, спіроксамін, сірка, тебуконазол, тіофанат-метил, трифлуксистробін; гербіциди для зернових: 2,4-D, амідосульфурон, бромоксиніл, карфентразон-Е, хлоротолурон, хлорсульфурон, клодинафоп-Р, клопіралід, дикамба, диклофоп-М, дифлуфенікан, феноксапроп, флорасулам, флакарбазон-NA, флуфенацет, флупіросульфурон-М, флуроксіпір, флуртамон, глифосат, іодосульфурон, іоксиніл, ізопротурон, MCPA, мезосульфурон, метсульфурон, пендиметалін, піноксаден, пропоксикарбазон, просульфокарб, піроксулам, сульфосульфурон, тифенсульфурон, тралкоксидим, тріасульфурон, трибенурон, трифлуралін, тритосульфурон; фунгіциди для зернових: азоксистробін, біксафен, боскалід, карбендазим, хлороталоніл, цифлуфенамід, ципроконазол, ципродиніл, димоксистробін, епоксиконазол, фенпропідин, фенпропіморф, флуопірам, флуоксастробін, флуквінканазол, флуксапіроксад, ізопіразам, крезоксим-метил, метконазол, метрафенон, пентіопірад, пікоксистробін, прохлораз, пропіконазол, проквіназид, протіокназол, піраклостробін, квіноксифен, спіроксамін, тебуконазол, тіофанат-метил, трифлуксистробін; інсектициди для зернових: диметоат, лямбда-цигалотрин, дельтаметрин, альфа-циперметрин, β-цифлутрин, біфентрин, імідаклоприд, клотіанідин, тіаметоксам, тіаклоприд, ацетаміприд, динетофуран, хлорпірифос, піримікарб, метіокарб, сульфоксафлор; гербіциди для маїсу: атразин, алахлор, бромоксиніл, ацетохлор, дикамба, клопіралід, (S-)диметенамід, глюфосинат, гліфосат, ізоксафлютол, (S-)метолахлор, мезотріон, нікосульфурон, примісульфурон, римсульфурон, сулкотріон, форамсульфурон, топрамезон, темботріон, сафлуфенацил, тіенкарбазон, флуфенацет, піроксасульфон; інсектициди для маїсу: карбофуран, хлорпірифос, біфентрин, фіпроніл, імідаклоприд, лямбда-цигалотрин, тефлутрин, тербуфос, тіаметоксам, клотіанідин, спіромезифен, флубендіамід, трифлумурон, ринаксіпір, дельтаметрин, тіодікарб, β-цифлутрин, циперметрин, біфентрин, луфенурон, тебупіримфос, етіпрол, ціазіпір, тіаклоприд, ацетаміприд, динетофуран, авермектин; фунгіциди для маїсу: азоксистробін, біксафен, боскалід, ципроконазол, димоксистробін, епоксиконазол, фенітропан, флуопірам, флуоксастробін, флуксапіроксад, ізопіразам, метконазол, пентіопірад, пікоксистробін, пропіконазол, протіокназол, піраклостробін, тебуконазол, трифлуксистробін; гербіциди для рису: бутахлор, пропаніл, азимсульфурон, бенсульфурон, цигалофоп, даїмуран, фентразамід, імазосульфурон, мефенацет, оксазикломефон, піразосульфурон, пірибутикарб, квінклолак, тіобенкарб, інданофан, флуфенацет, фентразамід, галосульфурон, оксазикломефон, бензобіциклон, пірифталід, пеноксилам, биспірибак, оксادیаргіл, етоксисульфурон, претілахлор, мезотріон, тефурилтріон, оксадіазон, феноксапроп, піримісульфурон; інсектициди для рису: діазинон, фенобукарб, бенфуракарб, бупрофезин, динотефуран, фіпроніл, імідаклоприд, ізопрокарб, тіаклоприд, хромафенозид, клотіанідин, етіпрол, флубендіамід, ринаксіпір, дельтаметрин, ацетаміприд, тіаметоксам, ціазіпір, спіносад, спінеторам, емаектин-бензоат, циперметрин, хлорпірифос, етофенпрокс, карбофуран, бенфуракарб, сульфоксафлор; фунгіциди для рису: азоксистробін, карбендазим, карпропамід, диклоцимет, дифенокназол, едифенфос, феримзон, гентаміцин, гексаконазол, гімексазол, іпробенфос (IBP), ізопротіолан, ізотіаніл, касугаміцин, манкоцеб, метоміностробін, оризастробін, пенцикурон, пробеназол, пропіконазол, пропінеб, піроквілон, тебуконазол, тіофанат-метил, тіадиніл, трициклазол, трифлуксистробін, валідаміцин; гербіциди для бавовнику: діурон, флуометурон, MSMA, оксифлуорфен, прометрин, трифлуралін, карфентразон, клетодим, флаузіфоп-бутил, гліфосат, норфлуразон, пендиметалін, піритіобак-натрій, трифлуксисульфурон, тепралоксидим, глюфосинат, флуміоксазин, тидіазурон; інсектициди для бавовнику: ацефат, алдікарб, хлорпірифос, циперметрин, дельтаметрин, абамектин, ацетаміприд, емаектин бензоат, імідаклоприд, індоксакарб, лямбда-цигалотрин,

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

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

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ПРИКЛАДИ

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

Ідентифікували новий ген, що визначає пестицидну активність, у бактеріального штаму ATX65158 із застосуванням наступних етапів:

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

Секвенування ДНК. Загальну ДНК секвенують за допомогою способів секвенування наступного покоління.

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

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

Штам ATX65158 був отриманий зі зразку зернового пилу з Хайкоу у провінції Хайнань, Китай.

Таблиця 1

Новий ген, ідентифікований у штаму ATX65158

Назва гена	Молекулярна маса (кДа)	Найближчий гомолог	Нуклеотидна SEQ ID NO	Амінокислотна SEQ ID NO
Axmi335	90,6	73 % Vip3Ba1	1	2

Ахмі335 ампліфікували за допомогою ПЛР з рAX980, а ПЛР-продукт клонували у вектор експресії рAX916 *Bacillus* за допомогою способів, добре відомих з рівня техніки. Отриманий у результаті штам *Bacillus*, що містить вектор з Ахмі335, культивували на традиційному ростовому середовищі, такому як середовище CYS (10 г/л Bacto-casitone; 3 г/л дріжджового екстракту; 6 г/л KH_2PO_4 ; 14 г/л K_2HPO_4 ; 0,5 мМ MgSO_4 ; 0,05 мМ MnCl_2 ; 0,05 мМ FeSO_4), доти, поки спороутворення не підтвердилося шляхом мікроскопічного дослідження. Зразки отримували і досліджували щодо активності у біологічних аналізах.

Приклад 2. Аналізи пестицидної активності

Нуклеотидні послідовності згідно з даним винаходом можна досліджувати щодо їх здатності виробляти пестицидні білки. Здатність пестицидного білка діяти на шкідника у якості пестициду часто аналізують за допомогою ряду методів. Один метод, добре відомий у даній галузі техніки, полягає у здійсненні аналізу із згодовуванням. У ході такого аналізу із згодовуванням шкідника піддають впливу зразка, що містить або сполуку, яку необхідно досліджувати, або контрольні зразки. Часто його здійснюють при поміщенні матеріалу, який необхідно досліджувати, або придатного розчину такого матеріалу на матеріал, який шкідник буде поглинати, як наприклад, штучне живильне середовище. Матеріал, який необхідно досліджувати, може складатися з рідини, твердої речовини або суспензії. Матеріал, який необхідно досліджувати, можна помістити на поверхню і потім надати йому можливість висохнути. У якості альтернативи, матеріал, який необхідно досліджувати, можна змішати з розплавленим штучним живильним середовищем і потім розподілити у камері для аналізу.

Камерою для аналізу може бути, наприклад, чашка, тарілка або лунка мікротитрувального планшета.

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

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

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

Приклад 3. Експресія та очищення

Ахмі335 (SEQ ID NO:1 або 3) клонували у вектор експресії рMAL-C4x *E. coli* за геном malE, що кодує мальтоза-зв'язувальний білок (MBP). Ці злиття усередині рамки приводили у результаті до експресії гібридного білка MBP-Ахмі335 в *E. coli*.

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

Усі безклітинні екстракти потім пропускали через колонку з амілозою, що з'єднана з хроматографом для рідинної експрес-хроматографії білків (FPLC) для афінного очищення

гібридних білків MBP-ахті. Зв'язаний гібридний білок елюювали із смоли за допомогою 10 мМ розчину мальтози. Очищений гібридний білок потім розщеплювали або фактором Ха, або трипсином для видалення амінокінцевої MBP-мітки з білка Ахті. Розщеплення та розчинність білків можна визначати за допомогою SDS-PAGE.

- 5 Приклад 4. Активність білків, експресованих з генів ахті у біологічних аналізах
 Біологічний аналіз експресованих генів Ахті призвів у результаті до спостереження наступних активностей щодо шкідливих комах.

Таблиця 2

Активність експресованих білків у біологічному аналізі

Плазміда	Ген	DBM	Hv	Hz	SWCB	SBL	SCB
pAX8513	Axmi335	помірно сповільнений ріст, 25 % смертні сть	помірно сповільнений ріст	помірно сповільнений ріст	помірно сповільнений ріст	сильно сповільнений ріст, 100 % смертні сть	сильно сповільнений ріст, 100 % смертні сть

- 10 DBM: Міль капуста
 Hv: Совка тютюнова
 Hz: Бавовняна совка
 SWCB: Метелик кукурудзяний південно-західний
 SBL: П'ядак соєвий

- 15 SCB: Вогнівка цукрової тростини

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

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

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

- В іншому аспекті даного винаходу конструюють модифіковані варіанти синтетичних генів таким чином, щоб отриманий у результаті пептид був націлений на органелу рослини, таку як ендоплазматичний ретикулум або апопласт. З рівня техніки відомі послідовності пептидів, які, як відомо, приводять до націлювання гібридних білків на органелу рослини.

- Наприклад, з рівня техніки відомо, що N-кінцева ділянка білка, який кодується геном кислої фосфатази білого люпину *Lupinus albus* (GENBANK® ID GI:14276838, Miller et al. (2001) Plant Physiology 127:594-606), приводить до націлювання гетерологічних білків на ендоплазматичний ретикулум. Якщо отриманий у результаті гібридний білок також містить на C-кінці послідовність для утримання в ендоплазматичному ретикулумі, яка містить з N-кінця пептиду лізин-аспарагінову кислоту-глутамінову кислоту-лейцин (тобто мотив "KDEL", SEQ ID NO:5), то гібридний білок буде націлений на ендоплазматичний ретикулум. Якщо в гібридному білку на C-кінці відсутня послідовність, що націлює на ендоплазматичний ретикулум, білок буде націлений на ендоплазматичний ретикулум, але в остаточному підсумку буде зв'язаний в апопласті.

- Таким чином, даний ген кодує гібридний білок, який містить на N-кінці тридцять одну амінокислоту з гена кислої фосфатази білого люпину *Lupinus albus* (GENBANK® ID GI:14276838, Miller et al., 2001, supra), зливу з N-кінцем амінокислотної послідовності даного винаходу, а також послідовність KDEL (SEQ ID NO:5) на C-кінці. Таким чином, передбачається, що отриманий у результаті білок націлений на ендоплазматичний ретикулум рослини при експресії у рослинній клітині.

- Експресійні касети для рослин, описані вище, поєднують з придатним для рослини селективним маркером, щоб полегшити відбір трансформованих клітин і тканин, і лігують у вектори для трансформації рослин.

- Вони можуть містити бінарні вектори для опосередкованої *Agrobacterium* трансформації або прості плазмідні вектори для трансформації з використанням аерозолі або біолістичної трансформації.

- 50 Приклад 6. Трансформація клітин маїсу генами пестицидного білка, описаними в даному документі

Качани маїсу найкраще збирати через 8-12 діб після запилення. Зародки виділяють з качанів і при трансформації переважно використовують зародки розміром 0,8-1,5 мм. Зародки висаджують щитком угору у придатне середовище для інкубації, таке як середовище DN62A5S (3,98 г/л солей N6; 1 мл/л (1000х маточного розчину), вітаміни N6; 800 мг/л L-аспарагіну; 100

5

мг/л міоїнозиту; 1,4 г/л L-проліну; 100 мг/л казамінових кислот; 50 г/л сахарози; 1 мл/л (маточного розчину з концентрацією 1 мг/мол) 2,4-D). Проте, придатні середовища і солі, що відмінні від DN62A5S і відомі з рівня техніки. Зародки інкубують протягом ночі при 25 °C у темряві. Хоча інкубація зародків протягом ночі як така не є необхідною.

10

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

ДНК-конструкти, сконструйовані для експресії генів згідно з даним винаходом у рослинних клітинах, попадають за рахунок прискорення у рослинну тканину із застосуванням прискорювача пучка аерозолів, із застосуванням умов, які, по суті, описані в РСТ публікації № WO/0138514. Після аерозольної інжекції зародки інкубують протягом приблизно 30 хвилин на осмотичному середовищі і поміщають в середовище для інкубації на ніч при 25 °C у темряві. Щоб уникнути зайвого uszkodження експлантів, підданих аерозольній інжекції, їх інкубують протягом щонайменше 24 годин до переносу в середовище для відновлення. Зародки потім розподіляють у середовищі на період відновлення тривалістю приблизно 5 діб при 25 °C у темряві, потім переносять на селективне середовище. Експлантати інкубують у селективному середовищі протягом періоду тривалістю до восьми тижнів залежно від природи і характеристик конкретного використовуваного методу відбору. Після періоду відбору отриманий у результаті каліус переносять на середовище для дозрівання зародків і культивують доти, поки не спостерігається утворення зрілих соматичних зародків. Отримані у результаті зрілі соматичні зародки потім поміщають в умови з низьким рівнем освітленості та ініціюють процес регенерації за допомогою способів, відомих з рівня техніки. Отриманим у результаті пагонам дають можливість укоренитися на середовищі для укорінення, а отримані у результаті рослини переносять у горщики для розсади і розмножують як трансгенні рослини.

15

20

25

30

Матеріали

Середовище DN62A5S

Компоненти	На літр	Джерело
Суміш основних солей N6 за Chu (номер продукту С 416)	3,98 г/л	Phytotechnology Labs
Розчин вітамінів N6 за Chu (номер продукту С 149)	1 мол/л (1000х маточного розчину)	Phytotechnology Labs
L-Аспарагін	800 мг/л	Phytotechnology Labs
Міоїнозит	100 мг/л	Sigma
L-Пролін	1,4 г/л	Phytotechnology Labs
Казамінові кислоти	100 мг/л	Fisher Scientific
Сахароза	50 г/л	Phytotechnology Labs
2,4-D (номер продукту D-7299)	1 мол/л (маточний розчин з концентрацією 1 мг/мол)	Sigma

35

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

Приклад 7. Трансформація генами згідно з даним винаходом рослинних клітин шляхом опосередкованої *Agrobacterium* трансформації

40

Качани найкраще збирати через 8-12 діб після запилення. Зародки виділяють з качанів і при трансформації переважно застосовують зародки розміром 0,8-1,5 мм. Зародки висаджують щитком угору у придатне середовище для інкубації та інкубують протягом ночі при 25 °C у темряві. Хоча інкубація зародків протягом ночі як така не є необхідною. Зародки приводять у контакт зі штамом *Agrobacterium*, що містить придатні для опосередкованого Ti-плазмідом переносу вектори, протягом приблизно 5-10 хвилин і потім поміщають у середовище для спільного культивування приблизно на 3 доби (25 °C у темряві). Після спільного культивування експлантати переносять у середовище на період відновлення тривалістю приблизно п'ять діб (при 25 °C у темряві). Експлантати інкубують у селективному середовищі протягом періоду тривалістю вісім тижнів залежно від природи і характеристик конкретного використовуваного методу

45

відбору. Після періоду відбору отриманий у результаті калюс переносять у середовище для дозрівання зародка та культивують доти, поки не спостерігається утворення зрілих соматичних зародків. Отримані у результаті зрілі соматичні зародки потім поміщають в умови з низьким рівнем освітленості та ініціюють процес регенерації, як відомо з рівня техніки.

5 Приклад 8. Експресія та активність Ахмі335 у *Z. mays*

10 За допомогою конструктора, який містить оптимізовану нуклеїнову кислоту, що кодує Ахмі335 під контролем промотора PScubi4-N1, а також ген, що визначає витривалість до гербіцидів, під контролем промотора PScubi4-N1, трансформували кукурудзу із застосуванням протоколу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації, описаного у даному документі. Оптимізована нуклеотидна послідовність викладена у SEQ ID NO:3, а білок, який кодується, викладений у SEQ ID NO:4.

15 Зразки листової пластинки одержували із зрілих рослин, які були позитивними щодо експресії Ахмі335, як було виміряно за допомогою вестерн-блотингу та аналізу RT-PCR. Цільовим шкідникам дозволяли годуватися листовими пластинками протягом 2 діб. Потім, після періоду годування, листові пластинки оцінювали згідно із об'ємом ушкодження, завданого пластинці. Контролі (нетрансгенна тканина листка Hill) продемонстрували значне ушкодження всіма комахами у наборі без смертності. Результати показані у таблиці 3.

Таблиця 3

	n	Hz	ECB	FAW	BCW	HV
Відсоток неушкодженості	41	24 %	24 %	7 %	0 %	46 %
Відсоток легкої ушкодженості	41	27 %	10 %	18 %	0 %	30 %

20 Hz: Бавовняна совка
ECB: Метелик кукурудзяний
Hv: Совка тютюнова
FAW: Совка трав'яна
BCW: Совка-іпсилон

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

30 Хоча вищевикладений винахід був досить детально описаний з метою ілюстрації, а також у якості прикладу для чіткості розуміння, очевидно, що при практичному здійсненні можна вносити певні зміни та модифікації у межах обсягу формули винаходу, що додається.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

- <110> АТЕНІКС КОРП.
САМПСОН, Кімберлі С.
ТАЙСР, Ребекка
ЛЕХТІНЕН, Дуан
- <120> ГЕН ТОКСИНУ АХМІ335 *BACILLUS THURINGIENSIS* ТА СПОСОБИ ЙОГО
ЗАСТОСУВАННЯ
- <130> 2916693-098977
- <150> 61/608303
- <151> 2012-03-08
- <160> 5
- <170> PatentIn версія 3.5
- <210> 1
- <211> 2400
- <212> ДНК
- <213> *Bacillus thuringiensis*

<400> 1

atgatgattg tggataataa taaattaaat gtaagagctt taccaagctt tattgattat	60
tttaacggta tttatggatt tgccactggt atcaaagata ttatgggaat gatttttaaa	120
acagatacag gtggtagtaa tttacatta gatgagattt taaagaatca aaatttacta	180
aatgatattct cgggtaagct cgtgggtatt aatggagggt taggtgatct tattgcacaa	240
gggaacttaa attcagaatt agctaaggaa ttgctaaaaa tttctaata gaagaatcag	300
atgttaaatc atgttaatgc tcaacttaat gcaatcaatt caacacttaa tgtatatctt	360
cccaaaatta catctatgtt aaatgagggt atgatgcaaa accatgtttt aagtctacaa	420
atagaatttc taagtaaaca attgcaagaa atttcagata aacttgatat tatcaactta	480
aacgtactga ttaactctac attgacagag attactcttg cttatcaacg tattaatat	540
gttaacgaaa aatttgatga attgacttct actgtagaga aaaattcaaa agcatatcaa	600
gataacgtta ctaaagaagt tattgaaaat ttaactgatc taactgaatt ggccaaaagt	660
gttacaaaaa atgatatgga tagttttgaa ttttatcttc aaactttcca tgatgtaatg	720
actggaaata atttatttgg tcgctcagca ttaaaaactg ctgcagaatt aatcacaaaa	780
gaaaatgtca cgacaagagg aagtgagata ggaaaagttt ataatttctt gattgtttta	840
acttctttac aagcaaaagc tttctcact ttaactgcat gtcgaaagtt attgggttta	900
acagatatgg attatactaa aactatgaat cagcathtag atggacaaaa aagagaattt	960
cgtattaata ttcttccaac acttttcta atgtttttcta atcctagtta ttcaaagaat	1020

agaggaagtg atatcgatga tccaattggt gtgttagaag cagcacctgg atatgcctta 1080
 ataggatttc aaattctaaa cgatccactt ccgattttta aaggatatca ggctagggtta 1140
 aaaccaaatt atcaagttga cagagagtcg atgtcagaaa caatttatgg ggatattcat 1200
 aaattatttt gtccaaaaca gctggagcaa aaatattata ttaaagatat tgaatttcct 1260
 gaaggctatg taatcactaa aatcgtgttt gaaaaaaggc taaatcaatt gggttatgag 1320
 gtaacggcaa atttttatga cccctctaca ggaacatcg atttaacaa ggtaaagta 1380
 gaatcttgga aggaaaagtc ttgcgaggag gaatcctgag aagatgagtt ctgcgaacat 1440
 gagtatagcc ttataaaggc tgaaacggat ggtatttata tgccattagg ttagtaagt 1500
 gagacctttt taacccaat ttatggtttt ggattaacag ttgacgaaaa aaatcaaaaa 1560
 ataactttta caggtaaata ctatttacgt gaatccttac tagaaacaga ttagttaac 1620
 aatgaaacat atttaattgc ttcaccagac ggttatttta gtagtattgt agaaaattgg 1680
 aatataacat cagataattt tggatcttgg agagcaaata ataataatgc atttgctgat 1740
 aaggaagata ctgtaaaagg atcaagttct ctgtatactc ataaagatgg ggaattctcg 1800
 caatttattg gaaataagct aaaacctaaa actaattatg ttattcaata tgctataaaa 1860
 ggaagaccgg ctatttattt aaaaaataat aaggatacct tgtttgagga taccaataac 1920
 aactttagcg attttcagac tgtaacaaaa aaattcaatt caggagcaaa tccttcggaa 1980
 atttatttgc tttttaaaaa tcaagggtgaa tacgaggctt gggggaataa ctttattatt 2040
 ttagaaatta aatcgcttga attattgccg caaatgttga aacctgagga ttggatacca 2100
 tcaggaaatg tgcaaatgaa agacgaagga cgcctagaga ttttaggaga tggctatttt 2160
 aaacaattca ttaaattgca aaatgattca acctatcatc taagattatc agttaaggga 2220
 accggtaggg tatcaataat tgatgaatct aactatttat tttttgtaaa tattaaggat 2280
 gaagatttta ctacgcttat taaaaatagg tottcagaag gtgattgttt tatagctctt 2340
 gaggggtctt atgtagaaaa ttctagtacc attttttcta gtgtatctat cgttaaagaa 2400

<210> 2
 <211> 800
 <212> БИЖОК
 <213> *Bacillus thuringiensis*

<400> 2

Met Met Ile Val Asp Asn Asn Lys Leu Asn Val Arg Ala Leu Pro Ser
 1 5 10 15

Phe Ile Asp Tyr Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Lys
 20 25 30

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

```

Val Tyr Asn Phe Leu Ile Val Leu Thr Ser Leu Gln Ala Lys Ala Phe
    275                                280                285

Leu Thr Leu Thr Ala Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Thr Asp Ile Asp
    290                                295                300

Tyr Thr Lys Thr Met Asn Gln His Leu Asp Gly Gln Lys Arg Glu Phe
    305                                310                315                320

Arg Ile Asn Ile Leu Pro Thr Leu Ser Asn Ser Phe Ser Asn Pro Ser
    325                                330                335

Tyr Ser Lys Asn Arg Gly Ser Asp Ile Asp Asp Pro Ile Val Val Leu
    340                                345                350

Glu Ala Ala Pro Gly Tyr Ala Leu Ile Gly Phe Gln Ile Leu Asn Asp
    355                                360                365

Pro Leu Pro Ile Leu Lys Gly Tyr Gln Ala Arg Leu Lys Pro Asn Tyr
    370                                375                380

Gln Val Asp Arg Glu Ser Met Ser Glu Thr Ile Tyr Gly Asp Ile His
    385                                390                395                400

Lys Leu Phe Cys Pro Lys Gln Leu Glu Gln Lys Tyr Tyr Ile Lys Asp
    405                                410                415

Ile Glu Phe Pro Glu Gly Tyr Val Ile Thr Lys Ile Val Phe Glu Lys
    420                                425                430

Arg Leu Asn Gln Leu Gly Tyr Glu Val Thr Ala Asn Phe Tyr Asp Pro
    435                                440                445

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

Glu Lys Ser Cys Glu Glu Glu Ser Cys Glu Asp Glu Phe Cys Glu His
    465                                470                475                480

Glu Tyr Ser Leu Ile Lys Ala Glu Thr Asp Gly Ile Tyr Met Pro Leu
    485                                490                495

Gly Val Val Ser Glu Thr Phe Leu Thr Pro Ile Tyr Gly Phe Gly Leu
    500                                505                510

```

Thr	Val	Asp	Glu	Lys	Asn	Gln	Lys	Ile	Thr	Leu	Thr	Gly	Lys	Ser	Tyr	515	520	525
Leu	Arg	Glu	Ser	Leu	Leu	Glu	Thr	Asp	Leu	Val	Asn	Asn	Glu	Thr	Tyr	530	535	540
Leu	Ile	Ala	Ser	Pro	Asp	Gly	Tyr	Phe	Ser	Ser	Ile	Val	Glu	Asn	Trp	545	550	555
Asn	Ile	Thr	Ser	Asp	Asn	Phe	Gly	Ser	Trp	Arg	Ala	Asn	Asn	Asn	Asn	565	570	575
Ala	Phe	Val	Asp	Lys	Glu	Asp	Thr	Val	Lys	Gly	Ser	Ser	Ser	Leu	Tyr	580	585	590
Thr	His	Lys	Asp	Gly	Glu	Phe	Ser	Gln	Phe	Ile	Gly	Asn	Lys	Leu	Lys	595	600	605
Pro	Lys	Thr	Asn	Tyr	Val	Ile	Gln	Tyr	Ala	Ile	Lys	Gly	Arg	Pro	Ala	610	615	620
Ile	Tyr	Leu	Lys	Asn	Asn	Lys	Asp	Thr	Leu	Phe	Glu	Asp	Thr	Asn	Asn	625	630	635
Asn	Phe	Ser	Asp	Phe	Gln	Thr	Val	Thr	Lys	Lys	Phe	Asn	Ser	Gly	Ala	645	650	655
Asn	Pro	Ser	Glu	Ile	Tyr	Leu	Leu	Phe	Lys	Asn	Gln	Gly	Glu	Tyr	Glu	660	665	670
Ala	Trp	Gly	Asn	Asn	Phe	Ile	Ile	Leu	Glu	Ile	Lys	Ser	Leu	Glu	Leu	675	680	685
Leu	Pro	Gln	Met	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Trp	Ile	Pro	Ser	Gly	Asn	Val	690	695	700
Gln	Met	Lys	Asp	Glu	Gly	Arg	Leu	Glu	Ile	Leu	Gly	Asp	Gly	Tyr	Phe	705	710	715
Lys	Gln	Phe	Ile	Lys	Leu	Gln	Asn	Asp	Ser	Thr	Tyr	His	Leu	Arg	Leu	725	730	735
Ser	Val	Lys	Gly	Thr	Gly	Arg	Val	Ser	Ile	Ile	Asp	Glu	Ser	Asn	Tyr	740	745	750

Leu Phe Phe Val Asn Ile Lys Asp Glu Asp Phe Thr Ser Val Ile Lys
755 760 765

Asn Arg Ser Ser Glu Gly Asp Cys Phe Ile Ala Leu Glu Gly Ser Tyr
770 775 780

Val Glu Asn Ser Ser Thr Ile Phe Ser Ser Val Ser Ile Val Lys Glu
785 790 795 800

<210> 3
<211> 2397
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетична нуклеотидна послідовність, що кодує Ахмі335

<400> 3
atgattgtgg acaacaacaa gctcaatgtc cgcgcgctgc catccttcat cgactacttc 60
aatggcatct atggcttcgc caccggcatc aaggacatca tggggatgat cttcaagaca 120
gacactggag gatcaaacct caccttggat gagatcctca agaaccagaa cctgctgaat 180
gacatcagcg gcaagctgga tggcatcaat ggaggccttg gagatctgat tgctcaagga 240
aacctcaact cagagctggc caaggagctg ctgaagatca gcaatgagca gaaccagatg 300
ctgaaccatg tcaatgotca gctcaatgcc atcaacagca ccttcaatgt ttatcttcca 360
aagatcacct caatgctgaa tgaggatgat atgcaaaatc atgtgctgag cctccagatc 420
gagttcctct ccaagcagct gcaagagatc tccgacaagc tggacatcat caacctcaat 480
gtgctgatca actcaacatt gacagagatc acgccggcct accagaggat caaatatgtc 540
aatgagaagt ttgatgagct gacaagcacc gtggagaaga acagcaaggc ctaccaggac 600
aatgtcacca aggaggtgat tgagaacctg acagatctga cagagctggc aaaatcagtc 660
accaagaatg acatggacag ctctgagttc tacctccaga ccttccatga tgtgatgaca 720
ggcaacaacc tctttggaag aagcgcgctg aagacagcag cagagctgat caccaaggag 780
aatgtgacaa caagaggatc agagattggc aaggtgtaca acttctctcat cgtgctgaca 840
agcctccagg ccaaggcctt cctcaccctc accgcctgcc gaaagctgct gggcctcact 900
gacatcgact acaccaagac catgaaccag catctggatg gccagaagag ggagttcaga 960
atcaacatcc tgccaacatt gagcaacagc ttcagcaacc caagctacag caagaacaga 1020
ggatcagaca ttgatgatcc aattgtggtg ctggaagctg ctcttgata tgctctcatc 1080
ggcttccaga tcctcaatga tcctcttccc atcctcaaag gatatcaagc aaggctgaag 1140

```

ccaaactacc aggtggacag agaaagcatg tcagaaacca tctatggaga catccacaag 1200
ctcttctgcc ccaagcagct ggagcagaag tactacatca aggacatcga gttcccagaa 1260
ggatatgtca tcaccaagat cgtcttcgag aagaggctga accagctggg atatgaggtc 1320
accgccaaact tctatgatcc atcaactggc aacatcgacc tcaacaaggt gaaggtggag 1380
agctggaagg agaagagctg cgaggaggag agctgtgaag atgagttctg cgagcatgag 1440
tacagcttga tcaaggcaga aacagatggc atctacatgc cgctcggcgt ggtttcagaa 1500
accttcttga cgcccatcta tggcttcggc ctaccctgg atgagaagaa ccagaagatc 1560
accttgacag ggaagagcta cctgagggag agcttgctgg agacagatct ggtgaacaat 1620
gaaacatatt tgattgcttc tccagatggc tacttcagca gcatcgtgga gaactggaac 1680
atcacctcag acaactttgg aagctggagg gccaaacaaca acaatgcttt tgtggacaag 1740
gaggacaccg tcaaaggaag cagcagcctc tacaccaca aggatggaga gttctcacag 1800
ttcattggaa ataagctgaa gccaaagacc aactatgtca tccaatatgc catcaaagga 1860
aggccggcca tctacctgaa gaacaacaag gacaccctct tcgaggacac caacaacaac 1920
ttctccgact tccaaactgt caccaagaag ttcaacagcg gcgccaaccc ttcagagatc 1980
tacctgctct tcaagaatca aggagaatat gaagcatggg gcaacaactt catcatcctg 2040
gagatcaaga gcttggagct gctgccgag atgtgaagc cagaagattg gattccatca 2100
ggaaatgttc agatgaagga tgaaggaagg ctggagatcc ttggagatgg ctacttcaag 2160
cagttcatca agctgcaaaa tgacagcacc taccacctcc gcctctcgt caaaggaact 2220
ggccgctct ccatcattga tgaaagcaac tacctcttct tcgtgaacat caaggatgaa 2280
gatttcacct ccgtcatcaa gaacagaagc tcagaaggag attgcttcat cgcgctggaa 2340
ggaagctatg tggagaacag cagcaccatc ttctcctccg totccatcgt caaggaa 2397

```

```

<210> 4
<211> 799
<212> БИЛОК
<213> Bacillus thuringiensis

```

<400> 4

```

Met Ile Val Asp Asn Asn Lys Leu Asn Val Arg Ala Leu Pro Ser Phe
1           5           10          15

```

```

Ile Asp Tyr Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Lys Asp
20          25          30

```

```

Ile Met Gly Met Ile Phe Lys Thr Asp Thr Gly Gly Ser Asn Leu Thr

```

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

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

515	520	525
Arg Glu Ser Leu Leu Glu Thr Asp Leu Val Asn Asn Glu Thr Tyr Leu		
530	535	540
Ile Ala Ser Pro Asp Gly Tyr Phe Ser Ser Ile Val Glu Asn Trp Asn		
545	550	555 560
Ile Thr Ser Asp Asn Phe Gly Ser Trp Arg Ala Asn Asn Asn Asn Ala		
	565	570 575
Phe Val Asp Lys Glu Asp Thr Val Lys Gly Ser Ser Ser Leu Tyr Thr		
	580	585 590
His Lys Asp Gly Glu Phe Ser Gln Phe Ile Gly Asn Lys Leu Lys Pro		
	595	600 605
Lys Thr Asn Tyr Val Ile Gln Tyr Ala Ile Lys Gly Arg Pro Ala Ile		
	610	615 620
Tyr Leu Lys Asn Asn Lys Asp Thr Leu Phe Glu Asp Thr Asn Asn Asn		
	625	630 635 640
Phe Ser Asp Phe Gln Thr Val Thr Lys Lys Phe Asn Ser Gly Ala Asn		
	645	650 655
Pro Ser Glu Ile Tyr Leu Leu Phe Lys Asn Gln Gly Glu Tyr Glu Ala		
	660	665 670
Trp Gly Asn Asn Phe Ile Ile Leu Glu Ile Lys Ser Leu Glu Leu Leu		
	675	680 685
Pro Gln Met Leu Lys Pro Glu Asp Trp Ile Pro Ser Gly Asn Val Gln		
	690	695 700
Met Lys Asp Glu Gly Arg Leu Glu Ile Leu Gly Asp Gly Tyr Phe Lys		
	705	710 715 720
Gln Phe Ile Lys Leu Gln Asn Asp Ser Thr Tyr His Leu Arg Leu Ser		
	725	730 735
Val Lys Gly Thr Gly Arg Val Ser Ile Ile Asp Glu Ser Asn Tyr Leu		
	740	745 750
Phe Phe Val Asn Ile Lys Asp Glu Asp Phe Thr Ser Val Ile Lys Asn		

755

760

765

Arg Ser Ser Glu Gly Asp Cys Phe Ile Ala Leu Glu Gly Ser Tyr Val
 770 775 780

Glu Asn Ser Ser Thr Ile Phe Ser Ser Val Ser Ile Val Lys Glu
 785 790 795

<210> 5

<211> 4

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Пептид, що націлюється на ендоплазматичний ретикулум

<400> 5

Lys Asp Glu Leu

1

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Молекула рекомбінантної нуклеїнової кислоти, що містить нуклеотидну послідовність, яка кодує амінокислотну послідовність, що має пестицидну активність, яка **відрізняється** тим, що зазначена нуклеотидна послідовність вибрана з групи, яка складається з:
 - а) нуклеотидної послідовності, викладеної в SEQ ID NO: 1 або 3;
 - 10 б) нуклеотидної послідовності, що кодує поліпептид, який містить амінокислотну послідовність з SEQ ID NO: 2 або 4;
 - в) нуклеотидної послідовності, що кодує поліпептид, який містить амінокислотну послідовність із щонайменше 95 % ідентичністю послідовності з амінокислотною послідовністю з SEQ ID NO: 2 або 4.
- 15 2. Молекула рекомбінантної нуклеїнової кислоти за п. 1, яка **відрізняється** тим, що зазначена нуклеотидна послідовність являє собою синтетичну послідовність, яку було сконструйовано для експресії у рослині.
3. Молекула рекомбінантної нуклеїнової кислоти за п. 1, яка **відрізняється** тим, що зазначена нуклеотидна послідовність функціонально зв'язана з промотором, здатним керувати експресією зазначеної нуклеотидної послідовності у рослинній клітині.
- 20 4. Вектор, що містить молекулу рекомбінантної нуклеїнової кислоти за п. 1.
5. Вектор за п. 4, який додатково містить молекулу нуклеїнової кислоти, яка кодує гетерологічний поліпептид.
6. Клітина-хазяїн, що містить рекомбінантну нуклеїнову кислоту за п. 1.
7. Клітина-хазяїн за п. 6, що являє собою бактеріальну клітину-хазяїна.
- 25 8. Клітина-хазяїн за п. 6, що являє собою рослинну клітину.
9. Трансгенна рослина, що містить клітину-хазяїна за п. 8.
10. Трансгенна рослина за п. 9, яка **відрізняється** тим, що зазначена рослина вибрана з групи, що складається з маїсу, сорго, пшениці, капусти, соняшнику, помідора, хрестоцвітих, перцевих, картоплі, бавовнику, рису, сої, цукрового буряку, цукрової тростини, тютюну, ячменю та олійного рапсу.
- 30 11. Трансгенне насіння, що містить молекулу нуклеїнової кислоти за п. 1.
12. Рекомбінантний поліпептид з пестицидною активністю, вибраний з групи, що складається з:
 - а) поліпептиду, що містить амінокислотну послідовність з SEQ ID NO: 2 або 4, та
 - 35 б) поліпептиду, що містить амінокислотну послідовність із щонайменше 95 % ідентичністю послідовності з амінокислотною послідовністю з SEQ ID NO: 2 або 4.
13. Поліпептид за п. 12, що додатково містить гетерологічні амінокислотні послідовності.
14. Композиція, що містить поліпептид за п. 12.
15. Композиція за п. 14, яка **відрізняється** тим, що зазначена композиція вибрана з групи, яка складається з порошку, дусту, пелети, гранули, аерозолу, емульсії, колоїду та розчину.
- 40 16. Композиція за п. 14, яка **відрізняється** тим, що зазначена композиція отримана за допомогою сушіння, ліофілізації, гомогенізації, екстракції, фільтрації, центрифугування, осадження або концентрування культури бактеріальних клітин.

17. Композиція за п. 14, яка містить від приблизно 1 % до приблизно 99 % за масою зазначеного поліпептиду.

18. Спосіб контролю популяції лускокрилого, напівтвердокрилого, твердокрилого, нематоди або двокрилого шкідника, що включає приведення зазначеної популяції у контакт з пестицидно ефективною кількістю поліпептиду за п. 12.

19. Спосіб знищення лускокрилого, напівтвердокрилого, твердокрилого, нематоди або двокрилого шкідника, що включає приведення зазначеного шкідника у контакт з або згодовування зазначеному шкідникові пестицидно ефективною кількістю поліпептиду за п. 12.

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

21. Рослина або рослинна клітина із стабільно вбудованим в її геном ДНК-конструктом, що містить нуклеотидну послідовність, яка кодує білок, що має пестицидну активність, яка **відрізняється** тим, що зазначена нуклеотидна послідовність вибрана з групи, яка складається з:

а) нуклеотидної послідовності, викладеної в SEQ ID NO: 1 або 3;

б) нуклеотидної послідовності, яка кодує поліпептид, що містить амінокислотну послідовність з SEQ ID NO: 2 або 4, і

20. в) нуклеотидної послідовності, яка кодує поліпептид, що містить амінокислотну послідовність із щонайменше 95 % ідентичністю послідовності з амінокислотною послідовністю з SEQ ID NO: 2 або 4.

22. Спосіб захисту рослини від шкідника, який включає експресію в рослині або її клітині нуклеотидної послідовності, що кодує пестицидний поліпептид, який **відрізняється** тим, що зазначена нуклеотидна послідовність вибрана з групи, яка складається з:

25. а) нуклеотидної послідовності, викладеної в SEQ ID NO: 1 або 3;

б) нуклеотидної послідовності, яка кодує поліпептид, що містить амінокислотну послідовність з SEQ ID NO: 2 або 4, і

30. в) нуклеотидної послідовності, яка кодує поліпептид, що містить амінокислотну послідовність із щонайменше 95 % ідентичністю послідовності з амінокислотною послідовністю з SEQ ID NO: 2 або 4.

23. Спосіб за п. 22, який **відрізняється** тим, що зазначена рослина продукує пестицидний поліпептид, який має пестицидну активність щодо лускокрилого, напівтвердокрилого, твердокрилого, нематоди або двокрилого шкідника.

35. 24. Спосіб підвищення врожайності рослини, що включає вирощування у полі рослини або її насіння із стабільно вбудованим у її геном ДНК-конструктом, що містить нуклеотидну послідовність, яка кодує білок, що має пестицидну активність, який **відрізняється** тим, що зазначена нуклеотидна послідовність вибрана з групи, яка складається з:

а) нуклеотидної послідовності, викладеної в SEQ ID NO: 1 або 3;

40. б) нуклеотидної послідовності, яка кодує поліпептид, що містить амінокислотну послідовність з SEQ ID NO: 2 або 4, і

в) нуклеотидної послідовності, яка кодує поліпептид, що містить амінокислотну послідовність із щонайменше 95 % ідентичністю послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 2 або 4;

45. при цьому зазначене поле заражене шкідником, щодо якого зазначений поліпептид проявляє пестицидну активність.

Комп'ютерна верстка О. Рябко

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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