



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **104428** (13) **C2**
(51) МПК
C07K 14/325 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

| | |
|---|--|
| (21) Номер заявки: а 2011 00218 | (72) Винахідник(и): Абад Андре Р. (FR/US), Донг Хуа (CN/US), Ло Сю Б. (US), Ші Ксіаомеї (CA/US) |
| (22) Дата подання заявки: 04.06.2009 | (73) Власник(и): ПІОНЕР ХАЙ-БРЕД ІНТЕРНЕТШНЛ, ІНК., 7100 N.W. 62nd Avenue, Johnston, IA 50131- 1014, United States of America (US) |
| (24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 10.02.2014 | (74) Представник: Льгова Майя Миколаївна, реєстр. №12 |
| (31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 61/060,562 | (56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2006/083891 A, 10.08.2006 WO 2004/020636, 11.03.2004 KUO WHITE-SHANG ET AL: "Cloning of two new cry genes from <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>wuhanensis</i> strain" CURRENT MICROBIOLOGY, vol. 40, no. 4, April 2000 (2000-04), pages 227-232 DATABASE UniProt [Online] 1 october 2002 (2002-10-01), "SubName: Full=CryIBII;" retrieved from EBI accession no. UNIPROT:Q8KNY2 Database accession no. Q8KNY2 DATABASE EMBL [Online] 6 January 1999 (1999-01-06), "Bacillus thuringiensis <i>wuhanensis</i> insecticidal crystal protein CryE1 (cryLa1) gene, complete CDs" retrieved from EBI accession no. EMBL:U70726 Database accession no. U70726 DATABASE EMBL [Online] 16 August 2002 (2002-08-106), "Bacillus thuringiensis CryIBII (cryIBII) gene, complete CDs" retrieved from EBI accession no. EMBL:AY138457 Database accession no. AY138457 |
| (32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 11.06.2008 | |
| (33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US | |
| (41) Публікація відомостей про заявку: 11.04.2011, Бюл.№ 7 | |
| (46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.02.2014, Бюл.№ 3 | |
| (86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ PCT/US2009/046233, 04.06.2009 | |

(54) ГЕН *BACILLUS THURINGIENSIS* З АКТИВНІСТЮ ПРОТИ *LEPIDOPTERAN* (ЛУСКОКРИЛИХ)**(57) Реферат:**

Винахід належить до нуклеїнових кислот, отриманих зі штамів *Bacillus thuringiensis*, що кодують поліпептиди, що мають пестицидну активність відносно комах-шкідників, у тому числі *Lepidoptera* (лускокрилі).

UA 104428 C2

ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ, ДО ЯКОЇ ВІДНОСИТЬСЯ ВІНАХІД

Даний винахід відноситься до нуклеїнових кислот, що зустрічаються в природі й рекомбінантним нуклеїновим кислотам, отриманим з нових генів *Bacillus thuringiensis*, які кодують пестицидні поліпептиди, для яких характерна пестицидна активність відносно комах-шкідників. У композиціях і способах за даним винаходом використовують розкриті нуклеїнові кислоти, і кодуємі ними пестицидні поліпептиди, для контролю шкідників рослин.

ПЕРЕДУМОВИ ДО СТВОРЕННЯ ВІНАХОДУ

Комахи-шкідники являють собою основний фактор втрат сільськогосподарських культур у світі. Наприклад, шкода нанесена "похідними хробаками", збиток заподієний совкою-іпсилон або збиток від метелика кукурудзяного можуть бути економічно спустошувачими для виробників сільськогосподарських культур. Пов'язана з комахами-шкідниками втрата врожаю через навалу метелика кукурудзяного тільки на польову й солодку кукурудзу досягає приблизно одного мільярда доларів на рік у витратах збитку й контролю.

Традиційно, основним методом впливу на популяції комах-шкідників є застосування інсектицидів широкого спектра дії. Однак споживачі, а також урядові контрольні органи стають усе більш стурбовані забрудненнями навколишнього середовища, пов'язаними з виробництвом і застосуванням синтетичних хімічних пестицидів. Через такі проблеми контрольні органи наклали заборону або обмежили застосування деяких з найбільш шкідливих пестицидів. Таким чином, існує значний інтерес у розробці альтернативних пестицидів.

Для біологічного контролю комах-шкідників сільськогосподарського значення використовують мікробні агенти, такі як гриби, бактерії, або інший вид комах, надаючи нешкідливу для навколишнього середовища й комерційно привабливу альтернативу синтетичним хімічним пестицидам. Загалом, застосування біопестицидів являє собою більш низький ризик забруднення й екологічних небезпек, і біопестициди забезпечують більш значну цільову специфічність, що характерна для традиційних хімічних інсектицидів широкого спектра дії. Крім того, виробництво біопестицидів найчастіше менш затратно, що поліпшує економічний ефективний вихід продукції для широкого спектра сільськогосподарських культур.

Відомо, що деякі види мікроорганізмів роду *Bacillus* мають пестицидну активність відносно широкого спектра комах-шкідників, у тому числі *Lepidoptera* (лускокрилі), *Diptera* (двокрилі), *Coleoptera* (твердокрилі), *Hemiptera* (напівтвердокрилі), і інших. *Bacillus thuringiensis* (Bt) і *Bacillus papilliae* входять до числа найбільш успішних агентів біологічного контролю, виявлених дотепер. Патогенними шкідниками також були визнані штами *B.larvae*, *B.lentimorbus*, *B.sphaericus* (Harwood, ed., ((1989) *Bacillus* (Plenum Press), 306) і *B.cereus* (WO 96/10083). Очевидно, пестицидна активність сконцентрована в параспоральних кристалічних включеннях білкової природи, хоча пестицидні білки також були виділені з *Bacillus* у фазі вегетативного росту. Кілька генів, що кодують ці пестицидні білки, були виділені й охарактеризовані (див., наприклад, патенти США № 5366892 і 5840868).

Мікробні інсектициди, зокрема ті, які отримані зі штамів *Bacillus*, відіграють важливу роль у сільському господарстві в якості альтернативи боротьби зі шкідниками хімічними засобами. Останнім часом дослідники в галузі сільського господарства розробили сільськогосподарські культури з посиленою стійкістю до комах-шкідників за допомогою генетичної інженерії сільськогосподарських рослин для виробництва пестицидних білків з *Bacillus*. Наприклад, методами генетичної інженерії були створені рослини кукурудзи й бавовни, продуценти пестицидних білків, виділених зі штамів Bt (див., наприклад, Aronson (2002) *Cell Mol. Life Sci.* 59(3):417-425; Schnepf et al. (1998) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62(3): 775-806). Ці створені методами генетичної інженерії сільськогосподарські культури в даний час широко використовуються в американському сільському господарстві й надають фермерів безпечну для навколишнього середовища альтернативу традиційним способам боротьби з комахами-шкідниками. Крім того, американському фермерів продана створена методами генетичної інженерії картопля, що містить пестицидні токсини Cg. Незважаючи на те, що доведений їхній великий комерційний успіх, ці отримані методами генетичної інженерії стійкі до шкідників сільськогосподарські культури гарантують стійкість тільки проти вузького спектра важливих з економічної точки зору комах-шкідників.

Відповідно, залишається потреба в нових токсинах Bt з більш широким спектром інсектицидної активності проти комах-шкідників, наприклад, токсинах, які активні проти різноманіття комах із загону *Lepidoptera* (лускокрилі). Крім того, залишається потреба в біопестицидах, що мають активність проти різноманітних комах-шкідників, і в біопестицидах, які мають посилену інсектицидну активність.

КОРОТКИЙ ОПИС ВІНАХОДУ

Забезпечені композиції й способи впливу на комах-шкідників. Конкретніше, варіанти здійснення даного винаходу відносяться до методів впливу на комах, що використовують нуклеотидні послідовності, кодуючі інсектицидні пептиди, для виробництва трансформованих мікроорганізмів і рослин, які експресують інсектицидні поліпептиди за даними варіантами здійснення винаходу. Такі шкідники включають важливих із сільськогосподарської точки зору шкідників, таких як, наприклад: метелик кукурудзяний, наприклад, *Ostrinia nubilalis* Hübner. У деяких варіантах здійснення винаходу нуклеотидні послідовності кодують поліпептиди, які є пестицидними щонайменше для одного комах, що відноситься до загону *Lepidoptera* (лускокрилі).

Дані варіанти здійснення винаходу забезпечують нуклеїнові кислоти і їх фрагменти й варіанти, які кодують поліпептиди, що володіють пестицидною активністю проти комах-шкідників (наприклад, SEQ ID NO: 1, кодуюча SEQ ID NO: 2). Нуклеотидна послідовність дикого типу (наприклад, що зустрічається в природі) за даними варіантами здійснення за винаходом, яка була отримана з Bt, кодує новий інсектицидний пептид. Варіанти здійснення винаходу додатково забезпечують фрагменти й варіанти розкритої нуклеотидної послідовності, яка кодує біологічно активні (наприклад, інсектицидні) поліпептиди.

Варіанти здійснення винаходу додатково забезпечують ізольовані пестицидні (наприклад, інсектицидні) поліпептиди, кодуємі або, що зустрічається в природі, або модифіковані (наприклад, мутованою або модифікованою) нуклеїновою кислотою за даними варіантами здійснення. У конкретних прикладах пестицидні білки за даними варіантами здійснення винаходу включають фрагменти повнорозмірних білків і поліпептидів, які виробляються мутованими нуклеїновими кислотами, сконструйованими для введення конкретної амінокислотної послідовності в поліпептиди за даними варіантами здійснення. У конкретних варіантах здійснення винаходу дані поліпептиди мають посилену пестицидну активність у порівнянні з активністю поліпептидів, що зустрічаються в природі, з яких вони були отримані.

Нуклеїнові кислоти за варіантами здійснення винаходу також можна використовувати для одержання трансгенних (наприклад, трансформованих) однодольних або дводольних рослин, для яких характерні геноми, що містять щонайменше одну стабільно вбудовану нуклеотидну конструкцію, що містить кодуючу послідовність за даними варіантами здійснення, функціонально пов'язану із промотором, який управляє експресією кодуємого пестицидного поліпептиду. Відповідно, також забезпечені трансформовані рослинні клітини, рослинні тканини, рослини і їх насіння.

У конкретному варіанті здійснення винаходу трансформована рослина може бути отримана за допомогою нуклеїнової кислоти, яка була оптимізована для посиленої експресії в рослині-хазяїні. Наприклад, один з пестицидних поліпептидів за даними варіантами здійснення винаходу може бути назад трансльований для одержання нуклеїнової кислоти, включаючи кодони, оптимізовані для експресії в конкретному хазяїні, наприклад, у сільськогосподарській культурі, такої як рослина кукурудзи (кукурудза звичайна). Експресія кодуєщої послідовності такою трансформованою рослиною (наприклад, дводольним або однодольним) приведе до продукування пестицидного поліпептиду й додасть даній рослині посилену стійкість проти комах-шкідників. Деякі варіанти здійснення винаходу забезпечують трансгенні рослини, експресуючі пестицидні поліпептиди, які знайшли застосування в способах впливу на різних комах-шкідників.

Варіанти здійснення винаходу додатково включають пестицидні або інсектицидні композиції, що містять інсектицидні поліпептиди за даними варіантами здійснення, і можуть, при бажанні, містити додаткові інсектицидні пептиди. Варіанти здійснення винаходу охоплюють застосування таких композицій у середовищі, що оточує комах-шкідників, з метою впливу на даних комах-шкідників.

ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Варіанти здійснення даного винаходу відносяться до композицій і способам впливу на комах-шкідників, зокрема, шкідників рослин. Конкретніше, ізольована нуклеїнова кислота за варіантами здійснення винаходу і її фрагменти й варіанти містять нуклеотидні послідовності, які кодують пестицидні поліпептиди (наприклад, білки). Дані розкриті пестицидні білки є біологічно активними (наприклад, пестициди) проти комах-шкідників, таких як, але не обмежуються ними, комах-шкідники загону *Lepidoptera* (лускокрилі). Комах-шкідники, що представляють інтерес, включають, але не обмежуються ними: *Ostrinia nubilalis* (метелик кукурудзяний); *Paratoma nebris* (довгоносик звичайний); *Diatraea grandiosella* (вогнівка кукурудзяна південно-західна); *Spodoptera exigua* (совка мала) і *Plutella xylostella* (міль капустяна).

Композиції за варіантами здійснення винаходу включають ізольовані нуклеїнові кислоти і їх фрагменти й варіанти, кодуючі пестицидні поліпептиди, експресійні касети, що містять

нуклеотидні послідовності за даними варіантами здійснення, ізольовані пестицидні білки й пестицидні композиції. Деякі варіанти здійснення винаходу забезпечують модифіковані пестицидні поліпептиди, що характеризуються посиленою інсектицидною активністю проти *Lepidopterans* (лускокрилі), у порівнянні з пестицидною активністю відповідного білка дикого типу. Варіанти здійснення винаходу додатково забезпечують рослини й мікроорганізми, трансформовані за допомогою цих нових нуклеїнових кислот, і способи, що передбачають використання таких нуклеїнових кислот, пестицидних композицій, трансформованих організмів і їх продуктів при впливі на комах-шкідників.

Дані нуклеїнові кислоти й нуклеотидні послідовності за варіантами здійснення винаходу можуть бути використані для трансформації будь-якого організму для продукування кодуємих пестицидних білків. Забезпечені способи, які передбачають використання таких трансформованих організмів для впливу на, або контролю, шкідників рослин. Дані нуклеїнові кислоти й нуклеотидні послідовності за варіантами здійснення винаходу також можна використовувати для трансформації органел, таких як хлоропласти (Mcbride et al. (1995) *Biotechnology* 13: 362-365; and Kota et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 1840-1845).

Варіанти здійснення винаходу додатково відносяться до ідентифікації фрагментів і варіантів, кодуєчої послідовності, що зустрічаються в природі, яка кодує біологічно активні пестицидні білки. Нуклеотидні послідовності за даними варіантами здійснення винаходу знаходять пряме застосування в способах впливу на шкідників, зокрема, комах-шкідників, таких як комах загону *Lepidoptera* (лускокрилі). Відповідно, дані варіанти здійснення винаходу забезпечують нові підходи впливу на комах-шкідників, які не залежать від використання традиційних, синтетичних хімічних інсектицидів. Дані варіанти здійснення винаходу передбачають виявлення, пестицидів і генів, які їх кодують, що зустрічаються в природі, які піддаються біологічному розкладанню.

Варіанти здійснення винаходу додатково забезпечують фрагменти й варіанти кодуєчої послідовності, що зустрічається в природі, яка також кодує біологічно активні (наприклад, пестицидні) поліпептиди. Нуклеїнові кислоти за варіантами здійснення охоплюють нуклеїнову кислоту або нуклеотидні послідовності, які були оптимізовані для експресії клітинками конкретного організму, наприклад, послідовності нуклеїнових кислот, які були назад зчитані (а саме, назад трансльовані) з використанням кодонів, кращих для рослини, на основі амінокислотної послідовності поліпептиду, що має посилену пестицидну активність. Дані варіанти здійснення винаходу додатково забезпечують мутації, які надають поліпшені або змінені властивості поліпептидам за варіантами здійснення. Див., наприклад, перебувають одночасно на розгляді заявки США № 10/606320, зареєстровану 25 червня 2003 року, і 10/746914, зареєстровану 24 грудня 2003 року, що перебувають одночасно на розгляді.

У наступному описі широко використовується цілий ряд термінів. Наступні визначення наведені для полегшення розуміння варіантів здійснення винаходу.

Одиниці, префікси й символи можуть бути позначені в їхньому прийнятному форматі Cl. Якщо не зазначене інакше, нуклеїнові кислоти написані ліворуч праворуч в 5'-3' орієнтації; амінокислотні послідовності написані ліворуч праворуч в аміно-карбокси орієнтації, відповідно. Галузь числових значень включає значення, що задають, діапазону числа. Амінокислоти можуть бути позначені тут або за допомогою їх загальновідомих трілітерних символів, або за допомогою однолітерного символу, рекомендованого Комісією з Біомедицинської Номенклатури IUPAC-IUB. Нуклеотиди, аналогічно, можуть бути позначені за допомогою їхніх загальноприйнятих однолітерних кодів. Вищевизначні терміни більш докладно визначені виходячи з технічного опису в цілому.

Використовуваний тут термін "нуклеїнова кислота" включає посилання на дезоксирибонуклеотидний або рибонуклеотидний полімер у його або одно-, або двонитковий формі, і, якщо інакше не обмежене, охоплює відомі аналоги (наприклад, пептидні нуклеїнові кислоти), що мають необхідні основні властивості природних нуклеотидів, у яких вони гібридизовані з одонитковими нуклеїновими кислотами таким чином, що схожий з таким нуклеотидом, що зустрічається в природі.

Терміни, що використовуються тут, "кодуєчий" або "кодований", коли застосовуються відносно певної амінокислоти, означають, що нуклеїнова кислота містить необхідну інформацію для прямої трансляції даної нуклеотидної послідовності в певний білок. Дана інформація, за допомогою якої закодований білок, визначений використанням кодонів. Нуклеїнова кислота, кодуєча білок, може містити нетрансльовані послідовності (наприклад, інтрони) у межах трансльованих областей даної нуклеїнової кислоти або може не містити такі проміжні нетрансльовані послідовності (наприклад, як у кДНК).

Використовуваний тут термін "повнорозмірна послідовність" у відношенні до певного полінуклеотиду або кодованого їм білку означає повну послідовність, що має, нуклеїнову кислоту або повну амінокислотну послідовність природної (несинтетичної) ендегенної послідовності. Повнорозмірний полінуклеотид кодує повнорозмірну, каталітично активну форму певного білка.

Використовуваний тут термін "антизначенєвий" відносно розташування нуклеотидної послідовності відноситься до дуплексної полінуклеотидної послідовності, яка функціонально пов'язана із промотором у розташуванні, де дана антизначенєва нитка транскрибується. Дана антизначенєва нитка досить комплементарна продукту ендегенної транскрипції, так що трансляція ендегенного продукту транскрипції досить часто інгібується. Таким чином, коли термін "антизначенєвий" використовується у відношенні конкретної нуклеотидної послідовності, даний термін означає комплементарну нитку основного продукту транскрипції.

Терміни "поліпептид", "пептид" і "білок" використовуються тут взаємозамінно для позначення полімеру амінокислотних залишків. Дані терміни застосовуються до амінокислотних полімерів, у яких один або кілька амінокислотних залишків являють собою штучний хімічний аналог відповідної амінокислоти, що зустрічається в природі, а, також амінокислотних полімерів, що зустрічаються в природі.

Терміни "залишок", або "амінокислотний залишок", або "амінокислота" використовуються тут взаємозамінно для позначення амінокислоти, яка вбудована в білок, поліпептид або пептид (у збірному значенні "білок"). Дана амінокислота може бути природньою амінокислотою й, якщо інакше не обмежене, може охоплювати відомі аналоги природних амінокислот, які можуть функціонувати схожим чином із природними амінокислотами.

Поліпептиди за варіантами здійснення винаходу можуть бути отримані або з нуклеїнової кислоти, розкритої тут, або за допомогою використання стандартних технологій молекулярної біології. Наприклад, білок за варіантами здійснення винаходу може бути отриманий у результаті експресії рекомбінантної нуклеїнової кислоти за варіантами здійснення в підходящій клітині-хазяїні або, альтернативно, за допомогою комбінації процедур *ex vivo*.

Використовувані тут терміни "ізолюваний" і "очищений" застосовуються взаємозамінно для позначення нуклеїнових кислот або поліпептидів, або їх біологічно активних частин, які в значній мірі, або переважно, вільні від компонентів, які у звичайних умовах супроводжують, або взаємодіють із даною нуклеїновою кислотою або поліпептидом, при знаходженні в їхньому природньому навколишньому середовищі. Таким чином, ізолювана нуклеїнова кислота, або поліпептид, є по суті вільною від іншого клітинного матеріалу або культурального середовища, коли отримана в результаті застосування рекомбінантних технологій або по суті вільна від хімічних вихідних речовин або інших хімічних продуктів у випадку хімічного синтезу.

"Виділена" нуклеїнова кислота в більшості випадків не містить послідовностей (таких як, наприклад, послідовності, кодуєчі білок), які в природних умовах фланкують дану нуклеїнову кислоту (а саме, послідовності, розташовані на 5'- і 3'-кінцях даної нуклеїнової кислоти) у геномної ДНК організму, з якого дана нуклеїнова кислота отримана. Наприклад, у різних варіантах здійснення винаходу ізолювана нуклеїнова кислота може містити менш, чим приблизно 5 т.п.н., 4 т.п.н., 3 т.п.н., 2 т.п.н., 1 т.п.н., 0,5 т.п.н. або 0,1 т.п.н. нуклеотидних послідовностей, які природно фланкують дану нуклеїнову кислоту в геномної ДНК клітини, з якої дана нуклеїнова кислота отримана.

Використовувані терміни "виділений" і "очищений", фактично застосовувані тут щодо поліпептиду за варіантами здійснення винаходу, означають що даний виділений білок є по суті вільним від клітинного матеріалу, і включає композиції білка, що мають менш, чим приблизно 30 %, 20 %, 10 % або 5 % (по сухій масі) забруднюючого білка. У випадку, коли білок за варіантами здійснення винаходу або його біологічно активна частина отримані рекомбінантним способом, культуральне середовище містить менш, чим приблизно 30 %, 20 %, 10 % або 5 % (по сухій масі) хімічних вихідних речовин або хімічних компонентів, що не є білком, що представляють інтерес.

На всьому протязі даного опису винаходу слова "утримуючий" або варіації, такі як "містить" або "що включає", будуть розумітися для позначення включення зазначеного елемента, цілого або стадій, або групи елементів, цілого або стадій, але за винятком будь-якого іншого елемента, цілого або стадії, або групи елементів, цілого або стадій.

Використовуваний тут термін "вплив на комах-шкідників" означає ефективні зміни в раціоні харчування комах, росту і/або поведінці, на будь-якій стадії розвитку, у тому числі, але не обмежуються цим: знищення комах; затримка росту; запобігання репродуктивної здатності; антифідантна активність; і т.п.

Використовувані тут терміни "пестицидна активність" і "інсектицидна активність" є синонімами для позначення активності організму або речовини (такої як, наприклад, білок), яка може бути обмірювана по, але не обмежена цим, смертності шкідника, втраті у вазі шкідника, несприйнятливості шкідника й іншим поведінковим або фізичним змінам у шкідників після

годовлі й впливу протягом підходящого проміжку часу. Таким чином, організм або речовина, що має пестицидну активність, несприятливо впливає щонайменше на один з вимірюваних параметрів біологічної реакції шкідника. Наприклад, "пестицидні білки" являють собою білки, які проявляють пестицидну активність самостійно або в комбінації з іншими білками.

Використовуваний тут термін "пестицидна ефективна кількість" означає кількість речовини або організму, яка має пестицидну активність, коли є присутніми у навколишньому середовищі шкідника. Для кожної речовини або організму, дана пестицидна ефективна кількість визначається емпірично для кожного шкідника, ураженого в специфічних умовах навколишнього середовища. Схожим чином, термін "інсектицидна ефективна кількість" можна використовувати для позначення "пестицидної ефективної кількості", коли шкідником є комаха-шкідник.

Використовуваний тут термін "сконструйований" означає використання технологій рекомбінантних ДНК для введення (наприклад, конструювання) зміни в білкову структуру, ґрунтуючись на розумінні механізму дії білка й аналізі амінокислот, що вбудовуються, делетуємих або замінених.

Використовуваний тут термін "мутантна нуклеотидна послідовність", або "мутація", або "мутуюча нуклеотидна послідовність" означає нуклеотидну послідовність, яка була мутована або змінена таким чином, щоб містити один або декілька нуклеотидних залишків (наприклад, пару основ), які не присутні у відповідній послідовності дикого типу. Такий мутагенез або зміна включає одне або кілька приєднань, делецій або замін або заміщень залишків нуклеїнових кислот. Коли мутації здійснені за допомогою доповнення, видалення або заміни амінокислоти протеолітичної ділянки, таке доповнення, видалення або заміна може бути усередині або примикати до мотиву протеолітичної ділянки, за умови, що здійснюється мета мутації (а саме, за умови, що протеоліз у даній ділянки змінюється).

Мутантна нуклеотидна послідовність може кодувати мутантний інсектицидний токсин, що проявляє посилену або ослаблену інсектицидну активність, або амінокислотну послідовність, яка забезпечує посилену або ослаблену інсектицидну активність поліпептиду, що містить її. Використовуваний тут термін "мутант" або "мутація", стосовно до білка, поліпептиду або амінокислотної послідовності, означає послідовність, яка була мутована або змінена таким чином, щоб містити один або кілька амінокислотних залишків, які не присутні у відповідній послідовності дикого типу. Такий мутагенез або зміна включає одне або кілька доповнень, делецій, або замін або заміщень амінокислотних залишків. Мутантний поліпептид проявляє посилену або ослаблену інсектицидну активність або являє собою амінокислотну послідовність, яка привласнює посилену інсектицидну активність поліпептиду, що містить її. Таким чином, термін "мутант" або "мутація" відноситься до кожної із двох, або обом разом, мутантної нуклеотидної послідовності й кодованим амінокислотам. Мутанти можуть бути використані самостійно, або в будь-якій комбінації, що сполучається, з іншими мутантами за варіантами здійснення винахода, або іншими мутантами. З іншого боку, "мутантний поліпептид" може проявляти ослаблену інсектицидну активність. У випадку, коли більш однієї мутації введено в конкретну нуклеїнову кислоту або білок, дані мутації можуть бути додані одночасно або послідовно; якщо послідовно, то мутації можуть бути введені в будь-якому придатному порядку.

Використовуваний тут термін "поліпшена інсектицидна активність" або "поліпшена пестицидна активність" відноситься до інсектицидного поліпептиду за варіантами здійснення винахода, який має посилену інсектицидну активність у порівнянні з активністю його відповідного білка дикого типу, і/або інсектицидному поліпептиду, який є ефективним проти більш широкого спектра комах, і/або інсектицидному поліпептиду, що має специфічність до комах, яка несприйнятлива до токсичності білка дикого типу. Виявлення поліпшеної або посиленої пестицидної активності вимагає демонстрації збільшеної пестицидної активності щонайменше на 10 % проти комах-мішені, або щонайменше 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 60 %, 70 %, 100 %, 150 %, 200 % або 300 % або більше збільшення пестицидної активності в порівнянні з пестицидною активністю інсектицидного поліпептиду дикого типу, виявленої проти тієї же самої комах.

Наприклад, поліпшена пестицидна або інсектицидна активність забезпечена в тому випадку, коли більш широкий або більш вузький спектр комах піддається впливу даного поліпептиду, у порівнянні зі спектром комах, який підданий впливу токсину Bt дикого типу. Більш широкий спектр впливу може бути доцільний у випадку, коли потрібна універсальність, у той час як більш вузький спектр впливу може бути доцільний у випадку, наприклад, коли корисні комахи можуть

бути піддані впливу в результаті застосування або присутності даного токсину. Незважаючи на те, що варіанти здійснення не зв'язані будь-яким конкретним механізмом дії, поліпшена пестицидна активність також може бути забезпечена в результаті зміни однієї або декількох характеристик поліпептиду; наприклад, стабільність або довговічність поліпептиду в кишечнику
5 комах може бути підвищена в порівнянні зі стабільністю або довговічністю відповідного білка дикого типу.

Використовуваний тут термін "токсин" відноситься до поліпептиду, демонструючого пестицидну активність або інсектицидну активність, або поліпшену пестицидну активність, або поліпшену інсектицидну активність. Токсин "Bt" або "*Bacillus thuringiensis*" призначений для
10 включення більш широкого класу токсинів Cry, виявлених у різних штаммах Bt, що включає такі токсини, як, наприклад, Cry1s, Cry2s або Cry3s.

Терміни "протеолітична галузь" або "галузь розщеплення" відносяться до амінокислотної послідовності, яка присуджує чутливість до класу протеаз або конкретної протеази таким чином, що поліпептид, що містить дану амінокислотну послідовність, розщеплюється під дією даного
15 класу протеаз або конкретної протеази. Протеолітична ділянка називається "чутливою" до дії протеази(протеаз), яка розпізнає цю ділянку. З рівня техніки визнано, що ефективність розщеплення буде різною й що зниження ефективності розщеплення може привести до підвищення стабільності або довговічності даного поліпептиду в кишечнику комах. Таким чином, протеолітична ділянка може присуджувати чутливість до більш ніж однієї протеази або
20 класу протеаз, але ефективність розщеплення в цій ділянці під дією різних протеаз може різнитися. Протеолітичні ділянки включають, наприклад, трипсинові ділянки, хімотрипсинові ділянки й еластази ділянки.

Дослідження показало, що протеази кишечника комах загону *Lepidopterans* (лускокрилі), включають трипсини, хімотрипсини й еластази. Див., наприклад, Lenz et al. (1991) Arch. Insect Biochem. Physiol. 16: 201-212; і Hedegus et al. (2003) Arch. Insect Biochem. Physiol. 53: 30-47. Наприклад, близько 18 різних трипсинів були виявлені в середній кишці личинки *Helicoverpa armigera* (див. Gatehouse et al. (1997) Insect Biochem. Mol. Biol. 27: 929-944). Були вивчені кращі ділянки протеолітичних субстратів цих протеаз. Див., наприклад, Peterson et al. (1995) Insect Biochem. Mol. Biol. 25: 765-774.
25

Були прикладені зусилля для розуміння механізму дії токсинів Bt і конструювання токсинів з поліпшеними властивостями. Було показано, що протеази кишечника комах можуть впливати на дію білків Bt Cry даної комах. Деякі протеази активують білки Cry за допомогою переробки їх з форми "протоксину" у токсичну форму, або "токсин". Див., Oppert (1999) Arch. Insect Biochem. Phys. 42: 1-12; і Carroll et al. (1997) J. Invertebrate Pathology 70: 41-49. Ця активація даного
30 токсину може включати видалення N- і C-кінцевих пептидів з білка й також може включати внутрішнє розщеплення даного білка. Інші протеази можуть розкласти білки Cry. Див. Oppert, там же.

Порівняння амінокислотних послідовностей токсинів Cry різних специфічностей виявило п'ять блоків висококонсервативних послідовностей. По своїй структурі дані токсини містять три окремих домена, які являють собою, від N- до C-кінця: кластер семи альфа-спіралей, залучений у формування пор (названі "домен 1"), три антипаралельні бета-складки, залучені в клітинне зв'язування (названі "домен 2"), і бета-сендвіч (названий "домен 3"). Місце розташування й властивості цих доменів відомі фахівцям в даній області. Див., наприклад, Li et al. (1991) Nature, 305: 815-821 і Morse et al. (2001) Structure, 9: 409-417. У випадку, коли посилення зроблене на певний домен, наприклад домен 1, мається на увазі, що точні кінцеві точки даного домену щодо конкретної послідовності не є критичними доти, поки дана послідовність або її частина, включає послідовність, що забезпечує щонайменше яку-небудь функцію, приписувану даному конкретному домену. Таким чином, наприклад, коли посиляються на "домен 1", мають на увазі, що конкретна послідовність включає кластер семи альфа-спіралей, але точні кінцеві точки,
45 використовувані або що відносяться до даного кластера, не є критичними. Фахівець у даній області знайомий з визначенням таких кінцевих точок і оцінкою таких функцій.

Для кращого опису властивостей і поліпшення токсинів Bt були вивчені штами бактерії Bt. Були виявлені кристалічні композиції, отримані з культур штамів Bt, що мають пестицидну активність проти метелика кукурудзяного (див., наприклад, Експериментальний Приклад 1).
55 Була почата спроба ідентифікації нуклеотидної послідовності, кодуєної кристалічні білки з відібраних штамів, і нуклеїнові кислоти дикого типу (а саме, таких, що зустрічаються в природі) за варіантами здійснення винахода були ізольовані із цих бактеріальних штамів, клоновані в експресуючий вектор і трансформовані в *E.coli*. Залежно від характеристик узятій композиції було виявлено, що виявлення пестицидною активності іноді вимагає попередньої обробки трипсином для активації пестицидних білків. У такий спосіб мається на увазі, що для деяких
60

пестицидних білків необхідне розщеплення протеазою (наприклад, за допомогою трипсину, хімотрипсину й т.п.) для активації, у той час як інші білки є біологічно активними (наприклад, пестицидними) під час відсутності активації.

Такі молекули можуть бути змінені за допомогою способів, описаних, наприклад, у патентній заявці США № 10/606320, зареєстрованої 25 червня 2003 року, і 10/746914, зареєстрованої 24 грудня 2003 року. Крім того, послідовності нуклеїнових кислот можуть бути сконструйовані таким чином, щоб кодувати поліпептиди, які містять додаткові мутації, що привласнюють поліпшену або змінену пестицидну активність, у порівнянні з пестицидною активністю поліпептиду природного походження. Нуклеотидні послідовності таких сконструйованих нуклеїнових кислот містять мутації, які не виявлені в послідовностях дикого типу.

Мутантні поліпептиди за варіантами здійснення винахода, головним чином, отримані в результаті процесу, що включає наступні стадії: одержання послідовності нуклеїнової кислоти, кодує поліпептид сімейства Cry; аналіз структури даного поліпептиду для ідентифікації конкретних ділянок-«мішеней» для мутагенезу базової послідовності гена, виходячи з міркувань планованої функції даного домену-мішені в способі дії даного токсину; введення однієї або декількох мутацій у дану послідовність нуклеїнової кислоти для одержання необхідної зміни в одному або декількох амінокислотних залишках кодуємої поліпептидної послідовності й аналіз отриманого поліпептиду на пестицидну активність.

Багато з інсектицидних токсинів Bt відносяться до різних категорій по схожості їх амінокислотних послідовностей і третинній структурі, і способи одержання кристалічних структур токсинів Bt добре відомі. Приклади пояснень кристалічної структури розчину з високим розрішенням обох поліпептидів, Cry3a і Cry3B, доступні в літературних джерелах. Розкрита структура гена Cry3A (Li et al. (1991) Nature 353: 815-821) забезпечує розуміння взаємин між структурою й функцією даного токсину. Сукупна оцінка опублікованих структурних аналізів токсинів і описаних функцій, пов'язаних з конкретними структурами, мотивами й т.п., показує, що певні частини токсину корелюються з певними функціями й Bt і розділними етапами способу дії даного білка. Наприклад, багато токсинів, виділені з Bt, в основному описані як утримуючі три домену: сім альфа-спіралей, які залучені в утворення пор, трискладчатий домен, який задіяний у зв'язуванні рецептора, і бета-сендвіч мотив (Li et al. (1991) Nature 305: 815-821).

Як повідомляється в патенті США № 7105332, і розглядуваної заявці США № 10/746914, зареєстрованої 24 грудня 2003 року, токсичність білків Cry може бути посилена в результаті таргетування частини, розташованої між альфа-спіралями 3 і 4 домену 1 даного токсину. Ця теорія була заснована на сукупності знань, що стосуються інсектицидних токсинів, що включає 1) повідомлення, що альфа-спіралі 4 і 5 домену 1 токсинів Cry3A вбудовані в ліпідний бішар кліток, що вистилають середню кишку сприйнятливих комах (Gazit et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 12289-12294); 2) знання авторами винаходу місця розташування ділянок розщеплення трипсину й хімотрипсину усередині амінокислотної послідовності білка дикого типу; 3) даних спостережень, що білок дикого типу був більш активний проти деяких комах після активації *in vitro* за допомогою обробки трипсином або хімотрипсином; і 4) повідомлення, що розщеплення токсинів в 3'-кінці приводить у результаті до зниженої токсичності для комах.

Для розробки нових поліпептидів, що мають поліпшену або змінену пестицидну активність, можна створити серії мутацій і помістити в різні вихідні послідовності. Див., наприклад, заявку США № 10/606320, зареєстровану 25 червня 2003 року, у цей час відкликану, і 10/746914, зареєстровану 24 грудня 2003 року. Ці мутанти включають, але не обмежені цим, додавання щонайменше ще однієї ділянки, чутливого до протеази (наприклад, ділянка розщеплення трипсину), в частину, розташовану між спіралями 3 і 4 домену 1; заміна вихідної ділянки, чутливої до протеази, у послідовності дикого типу на іншу ділянку, чутливої до протеази; додавання множинних ділянок, чутливих до протеаз, у специфічному місці розташування; додавання амінокислотних залишків поблизу від ділянки(ок), чутливої до протеази, для зміни укладання поліпептиду й, таким чином, збільшення розщеплення даного поліпептиду в даній ділянці(ах), чутливого до протеази; і додавання мутацій для захисту даного поліпептиду від розкладницького розщеплення, яке знижує токсичність (наприклад, здійснюючи серію мутацій, де амінокислота дикого типу замінена на валін для захисту даного поліпептиду від розщеплення). Мутації можуть бути використані окремо або в будь-якій комбінації для забезпечення поліпептидів за варіантами здійснення винахода.

Таким чином, варіанти здійснення винаходу забезпечують послідовності, що включають різноманітність мутацій, таких як, наприклад, мутації, які включають додаткову, або альтернативну, ділянку, чутливу до протеаз, розташовану між альфа-спіралями 3 і 4 домена 1 кодуємого поліпептиду. Мутація, яка являє собою додаткову або альтернативну ділянку, чутливу до протеаз, може бути чутливою до декількох класів протеаз, таких як серинові

протеази, які включають трипсин і хімотрипсин, або ферменти, такі як еластаза. Отже, мутація, яка являє собою додаткову або альтернативну ділянку, чутливу до протеаз, може бути сконструйована таким чином, що дана ділянка легко розпізнається і/або розщеплюється групою протеаз, таких як протеази ссавців або протеази комах. Ділянка, чутлива до протеаз, також

може бути сконструйована для розщеплення певним класом ферментів, або певним ферментом, який, як відомо, виробляється в організмі, таким як, наприклад, хімотрипсин, вироблюваний совкою бавовняної коробкової *Heliothis zea* (Lenz et al. (1991) Arch. Insect Biochem. Physiol. 16: 201-212). Мутації можуть також надавати стійкість до протеолітичного розщеплення, наприклад, до розщеплення хімотрипсином на 3-кінці даного пептиду.

Присутність додаткової і/або альтернативної ділянки, чутливої до протеаз, в амінокислотній послідовності кодуємого поліпептиду, може поліпшувати пестицидну активність і/або специфічність даного поліпептиду, кодуємого нуклеїновими кислотами за варіантами здійснення винахода. Відповідно, нуклеотидні послідовності за варіантами здійснення винаходу можуть бути сконструйовані з використанням рекомбінантних технологій або оброблені, для одержання поліпептиду, що має поліпшену або змінену інсектицидну активність і/або специфічність, у порівнянні з такою незміненою токсину дикого типу. Крім того, мутації, розкриті тут, можуть бути поміщені в, або використовуватися в комбінації з іншими нуклеотидними послідовностями, для забезпечення поліпшених властивостей. Наприклад, ділянка, чутлива до протеаз, яка легко розщеплюється хімотрипсином комах, наприклад, хімотрипсино, виявлений у гусениці совки латукової або гусениці совки бавовняної коробкової (Hegedus et al. (2003) Arch. Insect Biochem. Physiol. 53: 30-47; і Lenz et al. (1991) Arch. Insect Biochem. Physiol. 16: 201-212), може бути поміщений у вихідну послідовність Cry для забезпечення посиленої токсичності цієї послідовності. Таким чином, варіанти здійснення забезпечують токсичні поліпептиди з поліпшеними властивостями.

Наприклад, мutowана нуклеотидна послідовність Cry може містити додаткові мутанти, які включають додаткові кодони, які вводять другу амінокислотну послідовність, чутливу до трипсину (на додаток до природної ділянки трипсину) у даний кодуємий поліпептид. Альтернативний додатковий мутант за варіантами здійснення винахода включає додаткові кодони, сконструйовані для введення щонайменше одної додаткової відмінної ділянки, чутливої до трипсину, у поліпептид, наприклад, ділянка, чутлива до хімотрипсину, розташована безпосередньо на 5' або 3' природної ділянки трипсину. Альтернативно, можуть бути створені заміщені мутанти, у яких щонайменше один кодон нуклеїнової кислоти, кодує природну ділянку, чутливу до протеази, зруйнований, і альтернативні кодони введені в дану послідовність нуклеїнової кислоти таким чином, щоб забезпечити відмінну (наприклад, заміщену) ділянку, чутливу до протеази. Заміщені мутанти також можуть бути додані в послідовність Cry, у якій природна ділянка розщеплення трипсину, присутня у кодуємому поліпептиді, зруйнована, і на її місце введена ділянка розщеплення хімотрипсину або еластази.

Не можна не відзначити, що будь-яка нуклеотидна послідовність, кодує амінокислотні послідовності, що представляють собою протеолітичні ділянки або передбачувані протеолітичні ділянки (наприклад, такі послідовності, як NGSR, RR, або LKM), може бути використана, і що точна ідентичність кодонів, використовуваних для введення кожної із цих ділянок розщеплення у варіант поліпептиду, може змінюватися залежно від використання, а саме, експресії в певному рослинному виді. Також не можна не відзначити, що кожна з розкритих мутацій може бути введена в будь-яку полінуклеотидну послідовність за варіантами здійснення винахода, яка містить кодони для амінокислотних залишків, які забезпечує природна ділянка розщеплення трипсину, що є мішенню для модифікації. Відповідно, варіанти або повнорозмірних токсинів, або їх фрагментів, можуть бути модифіковані таким чином, щоб містити додаткові або альтернативні ділянки розщеплення, і ці варіанти здійснення призначені для включення в обсяг розкритих тут варіантів здійснення винаходу.

Фахівцеві в даній галузі буде зрозуміло, що будь-яка ефективна мутація може бути додана в послідовності за варіантами здійснення винахода, за умови, що кодує поліпептиди зберігають пестицидну активність. Таким чином, послідовності також можуть бути мutowані таким чином, що кодує поліпептиди будуть стійкими до протеолітичного розщеплення хімотрипсином. Більш однієї ділянки розпізнавання можна додати в певному розташуванні в будь-якій комбінації, і множинні ділянки розпізнавання можуть бути додані або вилучені з токсину. Таким чином, додаткові мутації можуть містити три, чотири або більш ділянок розпізнавання. Слід визнати, що множинні мутації можуть бути сконструйовані в будь-якій підходящій полінуклеотидній послідовності; або повнорозмірні послідовності, або їх фрагменти можуть бути модифіковані таким чином, щоб містити додаткові або альтернативні ділянки розщеплення, а також бути стійкими до протеолітичного розщеплення. Таким чином, варіанти

здійснення винаходу забезпечують токсини Cry, що містять мутації, які поліпшують пестицидну активність, а також поліпшують композиції й способи впливу на шкідників з використанням інших токсинів Bt.

Мутації можуть захищати від розкладання протеазами, наприклад, за допомогою видалення передбачуваних протеолітичних ділянок, таких як передбачувані ділянки серинових протеаз і ділянки розпізнавання еластази з різних зон. Деякі або всі такі передбачувані ділянки можуть бути вилучені або змінені таким чином, щоб протеоліз у даному місці розташування у вихідній ділянці був знижений. Зміни протеолізу можна оцінити при порівнянні мутантного поліпептиду з токсинами дикого типу, або порівнюючи мутантні токсини, які відрізняються своїми амінокислотними послідовностями. Передбачувані протеолітичні ділянки, або протеолітичні ділянки, включають, але не обмежуються цим, наступні послідовності: RR, ділянка розщеплення трипсину; LKM, ділянка хімотрипсину; і NGSР, ділянка трипсину. Ці ділянки можуть бути змінені за допомогою додавання або видалення будь-якого числа або типу амінокислотних залишків, за умови, що пестицидна активність даного поліпептиду збільшується. Таким чином, поліпептиди, кодуємі нуклеотидними послідовностями, що містять мутації, будуть містити щонайменше одну амінокислотну зміну або доповнення, у порівнянні із природньою вихідною послідовністю, або 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 35, 38, 40, 45, 47, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270 або 280 або більш амінокислотних змін або доповнень. Пестицидна активність поліпептиду також може бути поліпшена в результаті процесування природної або повнорозмірної послідовності, як відомо з рівня техніки.

Композиції за варіантами здійснення винаходу включають нуклеїнові кислоти, і їх фрагменти й варіанти, які кодуємі пестицидні поліпептиди. Зокрема, варіанти здійснення винаходу забезпечують ізольовані молекули нуклеїнових кислот, що містять нуклеотидні послідовності, кодуємі амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 2, або нуклеотидні послідовності, кодуємі зазначену амінокислотну послідовність, наприклад, нуклеотидна послідовність, представлена в SEQ ID NO: 1, і їх фрагменти й варіанти.

Крім того, великий інтерес представляють оптимізовані нуклеотидні послідовності, кодуємі пестицидні білки за варіантами здійснення винаходу. Використовувана тут фраза "оптимізовані нуклеотидні послідовності" відноситься до нуклеїнових кислот, які оптимізовані для експресії в певному організмі, наприклад, у рослині. Оптимізовані нуклеотидні послідовності можуть бути отримані для будь-якого організму, що представляє інтерес, за допомогою методів, відомих з рівня техніки. Див., наприклад, заявку США № 10/606320, зареєстровану 25 червня 2003 року, у цей час відкликану, і 10/746914, зареєстровану 24 грудня 2003 року, у яких описана оптимізована нуклеотидна послідовність, кодуємі розкритий пестицидний білок. У цьому прикладі дана нуклеотидна послідовність була отримана за допомогою зворотного транскрибування амінокислотної послідовності даного білка й зміни нуклеотидної послідовності таким чином, щоб вона містила кодони, кращі для кукурудзи, у той же час усе ще кодуємі ту ж саму амінокислотну послідовність. Ця процедура описана більш докладно в Murray et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17: 477-498. Оптимізовані нуклеотидні послідовності знаходять застосування при посиленій експресії пестицидного білка в рослині, наприклад, однодольні рослини сімейства Gramineae (злакові), такі як, наприклад, маїс або кукурудза.

Варіанти здійснення винаходу додатково забезпечують ізольовані пестицидні (наприклад, інсектицидні) поліпептиди, кодуємі або природньою, або модифікованою нуклеїновою кислотою за варіантами здійснення. Конкретніше, варіанти здійснення винаходу забезпечують поліпептиди, що містять амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 2, і поліпептиди, кодуємі описаними тут нуклеїновими кислотами, наприклад описаними в SEQ ID NO: 1, і їх фрагментами й варіантами.

У певних варіантах здійснення винаходу пестицидні білки за даними варіантами здійснення забезпечують повнорозмірні інсектицидні поліпептиди, фрагменти повнорозмірних інсектицидних поліпептидів і варіантні поліпептиди, які отримані з мутуючих нуклеїнових кислот, сконструйованих для введення певних амінокислотних послідовностей у поліпептиди за варіантами здійснення винаходу. У певних варіантах здійснення винаходу дані амінокислотні послідовності, які вбудовані в поліпептиди, містять послідовність, забезпечуючу ділянку розщеплення для такого ферменту, як протеаза.

З рівня техніки відомо, що пестицидна активність токсинів Bt звичайно активується в результаті розщеплення пептиду різними протеазами в кишечнику комахи. Через те, що пептиди не завжди можуть бути розщеплені з повною ефективністю в кишечнику комахи, фрагменти повнорозмірного токсину можуть мати посилену пестицидну активність у порівнянні із самим повнорозмірним токсином. Таким чином, деякі поліпептиди за варіантами здійснення

винахода включають фрагменти повнорозмірного інсектицидного поліпептиду, і деякі поліпептидні фрагменти, варіанти й мутації будуть мати посилену пестицидну активність у порівнянні з активністю природного інсектицидного поліпептиду, з якого вони отримані, зокрема, якщо природний інсектицидний поліпептид не активований *in vitro* за допомогою протеази перед скринінгом активності. Таким чином, дана заявка охоплює процесованні варіанти або

фрагменти даних послідовностей. Мутації можуть бути поміщені в будь-яку вихідну послідовність, у тому числі таких процесованих поліпептидів, за умови, що даний поліпептид зберігає пестицидну активність. Фахівець у даній галузі легко може зрівняти два або кілька білків у відношенні пестицидною активності, використовуючи тести, відомі з рівня техніки, або описані тут в іншому місці. Слід розуміти, що поліпептиди за варіантами здійснення можуть бути отримані або в результаті експресії нуклеїнової кислоти, розкритої тут, або в результаті застосування стандартних технологій молекулярної біології.

Не можна не відзначити, що пестицидні білки можуть бути олігомерними й будуть різнитися за молекулярною масою, кількості залишків, компонентам пептидів, активності проти певних шкідників і іншим характеристикам. Однак, за допомогою методів, описаних тут, білки, активні проти різноманітних шкідників, можуть бути ізольовані й охарактеризовані. Пестицидні білки за варіантами здійснення можна використовувати в комбінації з іншими токсинами Bt або іншими інсектицидними білками для розширення діапазону комах-мішеней. Більше того, використання пестицидних білків за варіантами здійснення винахода в комбінації з іншими токсинами Bt або з іншими інсектицидними принципами дії відмінної природи має специфічну вигоду для запобігання і/або керування стійкістю комах. Інші інсектицидні агенти включають інгібітори протеаз (обох типів, серинових і цистеїнових), α -амілазу й пероксидазу.

Фрагменти й варіанти нуклеотидних і амінокислотних послідовностей і поліпептиди, кодуємі ними, також охоплені варіантами здійснення винаходу. Використовуваний тут термін "фрагмент" відноситься до частини нуклеотидної послідовності полінуклеотиду, або частини амінокислотної послідовності поліпептиду за варіантами здійснення. Фрагменти нуклеотидної послідовності можуть кодувати білкові фрагменти, які зберігають біологічну активність нативного або повнорозмірного білка, і отже, мають пестицидну активність. Отже, визнано, що деякі полінуклеотиди й амінокислотні послідовності за варіантами здійснення винахода можуть безпомилково згадуватися і як фрагменти, і як мутанти.

Слід розуміти, що термін "фрагмент", використовуваний тут відносно послідовностей нуклеїнових кислот за варіантами здійснення винахода, також включає послідовності, які є придатними в якості зондів гібридизації. Цей клас нуклеотидних послідовностей у більшості випадків не кодує білкові фрагменти, що зберігають біологічну активність. Таким чином, фрагменти нуклеотидної послідовності можуть варіювати від щонайменше приблизно 20 нуклеотидів, від приблизно 50 нуклеотидів, від приблизно 100 нуклеотидів і аж до повнорозмірної нуклеотидною послідовності, кодуючий білки за варіантами здійснення винахода.

Фрагмент нуклеотидної послідовності за варіантами здійснення винахода, який кодує біологічно активну частину пестицидного білка за варіантами здійснення, буде кодувати щонайменше 15, 25, 30, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100 або 1200 суміжних амінокислот, або аж до повної кількості амінокислот, представлених в пестицидному поліпептиді за варіантами здійснення винахода (наприклад, 1231 амінокислот для SEQ ID NO: 2). Таким чином, зрозуміло, що варіанти здійснення винаходу також охоплюють поліпептиди, які являють собою фрагменти ілюстративних пестицидних білків за варіантами здійснення, що й мають довжину щонайменше 15, 25, 30, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100 або 1200 суміжних амінокислот, або аж до повної кількості амінокислот, представлених в пестицидному поліпептиді за варіантами здійснення винахода (наприклад, 1231 амінокислот для SEQ ID NO: 2). Фрагменти нуклеотидної послідовності за варіантами здійснення винахода, які придатні для використання як зондів гібридизації, або праймерів для ПЛР, у більшості випадків не повинні кодувати біологічно активну частину пестицидного білка. Таким чином, фрагмент нуклеїнової кислоти за варіантами здійснення винахода може кодувати біологічно активну частину пестицидного білка або може являти собою фрагмент, який можна застосовувати в якості зонда гібридизації або праймера для ПЛР, використовуючи методи, описані тут. Біологічно активна частина пестицидного білка може бути отримана за допомогою виділення частини однієї з нуклеотидних послідовностей за варіантами здійснення винахода, експресуючих кодуєму частину пестицидного білка (наприклад, за допомогою рекомбінантної експресії *in vitro*) і оцінки активності кодуємої частини даного пестицидного білка.

Нуклеїнові кислоти, які являють собою фрагменти нуклеотидної послідовності за варіантами здійснення винахода, містять щонайменше 16, 20, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800 або 2000 нуклеотидів, або аж до числа нуклеотидів, представлених в нуклеотидною послідовності, розкритої тут (наприклад, 3696 нуклеотидів для SEQ ID NO: 1). Конкретні варіанти здійснення винаходу передбачають фрагменти, що відбуваються з (наприклад, отримані з) першої нуклеїнової кислоти за варіантами здійснення винахода, де даний фрагмент кодує процесований токсин, для якого характерна пестицидна активність. Процесовані поліпептиди, кодуємі даними полінуклеотидними фрагментами за варіантами здійснення винахода, характеризуються пестицидною активністю, яка або еквівалентна, або поліпшена в порівнянні з активністю відповідного повнорозмірного поліпептиду, кодуємого першою нуклеїновою кислотою, з якого даний фрагмент отриманий. Передбачається, що такі фрагменти нуклеїнової кислоти за варіантами здійснення можуть бути процесовані на 3'-кінці нативної або відповідної повнорозмірної кодуєчої послідовності. Фрагменти нуклеїнової кислоти також можуть бути процесовані на обох, 5' і 3', кінцях нативної або відповідної повнорозмірної кодуєчої послідовності.

Термін "варіанти" використовується тут для позначення в значній мірі схожих послідовностей. Для нуклеотидних послідовностей консервативні варіанти включають ті послідовності, які, через виродженості генетичного коду, кодують амінокислотну послідовність одного з пестицидних поліпептидів за варіантами здійснення винахода. Алельні варіанти, що зустрічаються в природі, такі як ці, можуть бути ідентифіковані за допомогою застосування добре відомих технологій молекулярної біології, таких наприклад, як полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) і технології гібридизації, як було вже тут зазначено.

Варіантні нуклеотидні послідовності також включають нуклеотидні послідовності, отримані синтетичним шляхом, такі як ті, що сгенеровані, наприклад, у результаті застосування сайт-спрямованого мутагенезу, але які усе ще кодують пестицидний білок за варіантами здійснення винахода, такий як мутантний токсин. У більшості випадків варіанти конкретної нуклеотидної послідовності за варіантами здійснення винахода будуть мати щонайменше приблизно 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або більш ідентичності послідовності із цієї конкретної нуклеотидною послідовністю, що визначено за допомогою програм для вирівнювання послідовностей, описаних тут в іншому місці, з використанням параметрів за замовчуванням. Варіант нуклеотидної послідовності за варіантами здійснення винаходу може відрізнитися від цієї послідовності на таку невелику кількість, як 1-15 нуклеотидів, тільки на 1-10, тільки на 6-10, тільки на 5, тільки на 4, 3, 2 або навіть 1 нуклеотид.

Варіанти конкретної нуклеотидної послідовності за варіантами здійснення винахода (а саме, ілюстративна нуклеотидна послідовність) також можуть бути оцінені в результаті порівняння відсотка ідентичності послідовностей між поліпептидом, кодуємім варіантною нуклеотидною послідовністю, і поліпептидом, кодуємім референсною нуклеотидною послідовністю. Таким чином, наприклад, розкриті ізольовані нуклеїнові кислоти, які кодують поліпептид з даним відсотком ідентичності послідовності з поліпептидом, що мають послідовність SEQ ID NO: 2. Відсоток ідентичності послідовностей між будь-якими двома поліпептидами може бути обчислений за допомогою програм для вирівнювання послідовностей, описаних тут в іншому місці, з використанням параметрів за замовчуванням. У випадку, коли будь-яка дана пара полінуклеотидів за варіантами здійснення винахода оцінений за допомогою порівняння відсотка ідентичності послідовностей, спільно використовуваних кодуєміми ними двома поліпептидами, відсоток ідентичності послідовностей між даними двома кодуєміми поліпептидами становить щонайменше приблизно 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, у більшості випадків щонайменше приблизно 75 %, 80 %, 85 % щонайменше приблизно 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 % або щонайменше приблизно 98 %, 99 % або більш ідентичності послідовностей.

Використовуваний тут термін "варіантний білок" охоплює поліпептиди, які отримані з нативного білка за допомогою делеції (так зване процесування) або доповнення однієї або декількох амінокислот в N-кінцевій і/або С-кінцевій частини нативного білка; делеції або доповнення однієї або декількох амінокислот в одну або кілька ділянок у нативному білку; або заміщення однієї або декількох амінокислот в одній або декількох ділянках у даному нативному білку. Відповідно, термін "варіантний білок" включає біологічно активні фрагменти нативного білка, які містять достатню кількість суміжних амінокислотних залишків для збереження біологічної активності нативного білка, а саме, для володіння пестицидною активністю. Така

пестицидна активність може відрізнятися, або може бути поліпшена в порівнянні з нативним білком, або може бути незмінна, за умови, що збережена пестицидна активність.

Варіантні білки, охоплені варіантами здійснення винаходу, є біологічно активними, тобто вони продовжують мати необхідну біологічну активність нативного білка, а саме, пестицидною активністю, як тут описано. Такі варіанти можуть бути результатом, наприклад, генетичного поліморфізму або втручання людини. Біологічно активні варіанти нативного пестицидного білка за варіантами здійснення будуть мати щонайменше приблизно 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або більш, ідентичність послідовності з амінокислотою послідовністю для нативного білка, як визначено за допомогою програм вирівнювання послідовностей, описаних тут в іншому місці, з використанням параметрів за замовчуванням. Біологічно активний варіант білка за варіантами здійснення винаходу може відрізнятися від цього білка на таку невелику кількість амінокислотних залишків, як 1-15, тільки на 1-10, тільки на 6-10, тільки на 5, тільки на 4, 3, 2 або навіть 1 амінокислотний залишок.

Варіанти здійснення винаходу додатково включають мікроорганізм, який трансформований щонайменше однією нуклеїновою кислотою за варіантами здійснення, з експресійною касетою, що містить дану нуклеїнову кислоту, або за допомогою вектора, що містить дану експресійну касету. У деяких варіантах здійснення винаходу даний мікроорганізм являє собою такий, який розмножується на рослинах. Варіант здійснення даного винаходу відноситься до некапсульованого пестицидного білку, який включає трансформований мікроорганізм, здатний експресувати щонайменше один пестицидний білок за варіантами здійснення.

Варіанти здійснення винаходу забезпечують пестицидні композиції, що містять трансформований мікроорганізм за варіантами здійснення. У таких варіантах здійснення винаходу даний трансформований мікроорганізм у більшості випадків присутній у пестицидній композиції в пестицидно ефективній кількості, разом з підходящим носієм. Варіанти здійснення винаходу також включають пестицидні композиції, що містять ізольований білок за варіантами здійснення, тільки один, або в комбінації із трансформованим мікроорганізмом за варіантами здійснення, і/або капсульованим пестицидним білком за варіантами здійснення, в інсектицидно ефективній кількості, разом з підходящим носієм.

Варіанти здійснення винаходу додатково забезпечують спосіб розширення діапазону цільових комах за допомогою використання пестицидного білка за варіантами здійснення в комбінації щонайменше з одним іншим або "другим" пестицидним білком. Будь-які пестицидні білки, відомі з рівня техніки, можуть бути використані в способах за варіантами здійснення. Такі пестицидні білки включають, але не обмежуються цим, токсини Bt, інгібітори протеаз, α -амілази й пероксидази.

Варіанти здійснення винаходу також включають трансформовані або трансгенні рослини, що містять щонайменше одну нуклеотидну послідовність за варіантами здійснення. У деяких варіантах здійснення винаходу дана рослина є стабільно трансформована за допомогою нуклеотидної конструкції, що містить щонайменше одну нуклеотидну послідовність за варіантами здійснення, функціонально пов'язану із промотором, який контролює експресію в рослинній клітині. Використовувані тут терміни "трансформована рослина" і "трансгенна рослина" відносяться до рослини, у геномі якої втримується гетерологічний полінуклеотид. У більшості випадків даний гетерологічний полінуклеотид стабільно інтегрований у геном трансгенної або трансформованої рослини таким чином, що даний полінуклеотид передається наступним поколінням. Гетерологічний полінуклеотид може бути інтегрований у геном окремо або як частина рекомбінантної експресійної касети.

Слід розуміти, що використовуваний тут термін "трансгенний" охоплює будь-яку клітину, клітинну лінію, калюс, тканину, частину рослини або рослину, генотип якого був змінений у результаті наявності гетерологічної нуклеїнової кислоти, у тому числі ті трансгени, які були первісно змінені, а також ті, які отримані в результаті полових схрещувань або вегетативних розмножень із первісних трансгенів. Використовуваний тут термін "трансгенний" не охоплює зміни генома (хромосомне або екстрахромосомне) у результаті стандартних методів розведення рослин або в результаті природних подій, таких як випадкове перехресне запилення, нерекомбінантна вірусна інфекція, нерекомбінантна бактеріальна трансформація, нерекомбінантна транспозиція або спонтанна мутація.

Використовуваний тут термін "рослина" охоплює цільні рослини, рослинні органи (наприклад, листи, стебла, коріння, і т.п.), насіння, рослинні клітини й потомство того ж самого. Частини трансгенних рослин входять у діапазон варіантів здійснення винаходу й включають, наприклад, рослинні клітини, протопласти, тканини, калюс, зародки, а також квіти, стебла, плоди, листи й коріння, отримані із трансгенних рослин або їх потомства, попередньо

трансформованих молекулою ДНК за варіантами здійснення винаходу, і таким чином, складаються щонайменше частково, із трансгенних кліток.

Використовуваний тут термін "рослина" охоплює рослинні клітини, рослинні протопласти, культури кліток тканини рослин, з яких рослини можуть бути відновлені, рослинні калюси, рослинні скупчення й рослинні клітини, які є інтактними в рослинах або частинах рослин, таких як зародки, пилок, сім'ябруньки, насіння, листи, квіти, гіля, плід, зерно, колоски, качани, лушпайка, черешки, коріння, кінчики кореня, пильові мишки, і т.п. Клас рослин, який можна використовувати в способах за варіантами здійснення винаходу, у більшості випадків так само широкий, як клас вищих рослин, що піддаються трансформаційним технологіям, у тому числі й однодольні, і дводольні рослини. Такі рослини включають, наприклад, *Solanum tuberosum* і *Zea mays*.

Хоча варіанти здійснення не залежать від конкретного біологічного механізму підвищення стійкості рослини до шкідника рослини, експресія нуклеотидних послідовностей, за варіантами здійснення винаходу, у рослині може привести в результаті до одержання пестицидних білків за варіантами здійснення й до підвищення стійкості даної рослини проти шкідників рослин. Рослини за варіантами здійснення знаходять застосування в сільськогосподарському виробництві в способах впливу на комах-шкідників. Деякі варіанти здійснення винаходу забезпечують трансформовані сільськогосподарські культури, такі як, наприклад, рослини кукурудзи, які знаходять застосування в способах впливу на комах-шкідників рослин, таких як, наприклад, метелик кукурудзяний.

"Випробувана рослина або рослинна клітина" являє собою таке, у якому генетична зміна, така як трансформація, здійснена у відношенні гена, що представляє інтерес, або рослина або рослинна клітина, що походить з рослини або клітини зміненої таким чином, і яка містить дану зміну. Терміни "контроль", або "контрольна рослина", або "контрольна клітина" забезпечують контрольні критерії для оцінки змін у фенотипі випробуваної рослини або рослинної клітини.

Контрольна рослина або рослинна клітина можуть включати, наприклад: (а) рослину або клітину дикого типу, а саме, що має той же самий генотип, як і вихідний матеріал для генетичної зміни, яка приведе до випробуваної рослини або клітини; (b) рослину або рослинну клітину, з таким же генотипом, як у вихідного матеріалу, але які були трансформовані з використанням нульової конструкції (а саме, конструкції, яка не виявляє вплив на ознаку, що представляє інтерес, такий як конструкція, що містить маркерний ген); (с) рослину або рослинну клітину, які являють собою нетрансформований сегрегант серед потомства випробуваної рослини або рослинної клітини; (d) рослину або рослинну клітину, генетично ідентичні випробуваній рослині або рослинній клітині, але яка не зазнає впливу умов або стимулів, які можуть індукувати експресію гена, що представляє інтерес; або (е) саму випробувану рослину або рослинну клітину, в умовах, при яких ген, що представляє інтерес, не експресується.

Фахівцем у даній галузі буде повністю визнано, що досягнення в галузі молекулярної біології, такі як сайт-специфічний або випадковий мутагенез, методики полімеразної ланцюгової реакції й технології білкової інженерії, забезпечують широкий набір засобів і протоколів, що підходять для використання при зміні або конструюванні й амінокислотної послідовності, і вихідної генетичної послідовності білків, що представляють інтерес із сільськогосподарської точки зору.

Таким чином, білки за варіантами здійснення винаходу можуть бути змінені різними способами, що включають амінокислотні заміщення, делеції, процесування й вставки. Методи для таких маніпуляцій загальновідомі з рівня техніки. Наприклад, варіанти амінокислотних послідовностей пестицидних білків можуть бути отримані в результаті введення мутацій у синтетичну нуклеїнову кислоту (наприклад, молекулу ДНК). Способи мутагенезу й змін амінокислот добре відомі з рівня техніки. Наприклад, сконструйовані зміни можуть бути введені з використанням технології олігонуклеотид-опосередкованого сайт-спрямованого мутагенезу. Див., наприклад, Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488-492; Kunkel et al. (1987) Methods in Enzymol. 154: 367-382; патент США № 4873192; Walker and Gastra, eds. (1983) Techniques in Molecular Biology (Macmillan Publishing Company, New York), і список довідкової літератури, наведений тут.

Мутуючі нуклеотидні послідовності за варіантами здійснення винаходу можуть бути модифіковані таким чином, щоб змінити приблизно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12 або більш амінокислот, представлених у вихідній послідовності кодуємого поліпептиду. Альтернативно, навіть більше змін нативної послідовності може бути введено, так щоб кодуємий білок міг мати щонайменше приблизно 1 % або 2 %, або приблизно 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 % або навіть приблизно 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 % або 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 % або 25 %, 30 %, 35 % або 40 % або більш змінених кодонів, або інакше

модифікованих у порівнянні з відповідним білком дикого типу. Аналогічним чином, даний кодуємий білок може мати щонайменше приблизно 1 %, або 2 %, або приблизно 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 % або навіть приблизно 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 % або 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, або 25 %, 30 %, 35 % або 40 % або більш додаткових кодонів, у порівнянні з відповідним білком дикого типу. Слід розуміти, що мутуючі нуклеотидні послідовності за варіантами здійснення мають на меті охопити біологічно функціональні, еквівалентні пептиди, які мають пестицидну активність, таку як поліпшена пестицидна активність, як визначено по антифідантним властивостям проти личинки метелика кукурудзяного. Такі послідовності можуть виникати як наслідок надмірності кодонів і функціональної еквівалентності, які, як відомо, зустрічаються в природі усередині послідовностей нуклеїнових кислот і закодованих у такий спосіб білків.

Фахівцеві в даній галузі буде зрозуміло, що амінокислотні доповнення і/або заміщення в більшості випадків засновані на відносній подібності груп, що заміщають, бічні ланцюги амінокислот, наприклад, їх гідрофобності, заряді, розмірі й т.п. Приклади, що заміщають амінокислотні групи, які враховують різні вищезгадані характеристики, добре відомі фахівцеві в даній галузі й включають аргінін і лізин; глутамат і аспартат; серин і треонін; глутамін і аспарагін; і валін, лейцин і ізолейцин.

Довідкову інформацію з відповідних амінокислотних заміщень, які не впливають на біологічну активність білка, що представляє інтерес, можна знайти в моделі Dayhoff et al. (1978) Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C), яка включена за допомогою посилання. Можуть бути здійснені консервативні заміщення, такі як заміна однієї амінокислоти на іншу, що має схожі властивості.

Таким чином, гени й нуклеотидні послідовності за варіантами здійснення винахода включають як природні послідовності, так і мутантні форми. Аналогічно, білки за варіантами здійснення винахода охоплюють як природні білки й варіанти (наприклад, процесованні поліпептиди), так і їхні модифіковані форми (наприклад, мутанти). Такі варіанти будуть продовжувати мати необхідну пестицидну активність. Очевидно, що мутації, які будуть здійснені в нуклеотидній послідовності, кодуєючий даний варіант, не повинні бути поміщені в послідовність поза рамкою зчитування й у більшості випадків не будуть створювати комплементарні ділянки, які можуть утворювати вторинну структуру мРНК. Див., публікацію європейської патентної заявки EP № 75444.

Як очікується, делеції, вставки й заміщення білкових послідовностей, охоплених тут, не приведуть до радикальних змін властивостей даного білка. Проте, у ситуації, коли складно припустити точний ефект даного заміщення, делеції або вставки, перед здійсненням цього, фахівець у даній галузі оцінить, що даний ефект буде визначений за допомогою рутинних скринінгових досліджень, таких як аналіз із годівлею комах. Див., наприклад, Marrone et al. (1985) J. Econ. Entomol. 78: 290-293 і Czapla and Lang (1990) J. Econ. Entomol. 83: 2480-2485, включені за допомогою посилання.

Варіантні нуклеотидні послідовності й білки також охоплюють послідовності й білки, отримані в результаті мутагенних і рекомбінантних процедур, таких як перестановка в ДНК. За допомогою такої процедури може бути оброблена одна або кілька різних кодуєючих послідовностей для того, щоб одержати новий пестицидний білок, що володіє необхідними властивостями. Таким чином, бібліотеки рекомбінантних полінуклеотидів, отримані з популяції полінуклеотидів з родинними послідовностями, що включають ділянки послідовностей, які мають істотну ідентичність послідовностей і можуть бути гомологічно рекомбіновані *in vitro* або *in vivo*. Наприклад, використовуючи цей підхід, повнорозмірні кодуєчі послідовності, мотиви послідовності, кодуєчі домен, що представляє, інтерес, або будь-який фрагмент нуклеотидної послідовності за варіантами здійснення винахода, можуть бути переставлені між нуклеотидними послідовностями за варіантами здійснення винахода й відповідними ділянками нуклеотидних послідовностей інших відомих *Cru*, для одержання нового гена, кодуєчого білок, з поліпшеною властивістю, що представляють інтерес.

Представляючи інтерес властивості включають, але не обмежені цим, пестицидну активність на одиницю пестицидного білка, стабільність білків і токсичність для нецільових видів, зокрема людини, домашньої худоби, і рослин і мікробів, які експресують дані пестицидні поліпептиди за варіантами здійснення винахода. Варіанти здійснення винаходу не зв'язані певною стратегією перестановки, за винятком того, що щонайменше одна нуклеотидна послідовність за варіантами здійснення, або її частина, залучена в таку стратегію перестановки. Перестановка може включати тільки нуклеотидні послідовності, розкриті тут, або може додатково передбачати перестановку інших нуклеотидних послідовностей, відомих з рівня техніки. Стратегії перестановок у ДНК відомі з рівня техніки. Див., наприклад, Stemmer (1994) Proc. Natl. Acad. Sci.

USA 91: 10747-10751; Stemmer (1994) *Nature* 370: 389-391; Cramer et al. (1997) *Nature Biotech.* 15: 436-438; Moore et al. (1997) *J. Mol. Biol.* 272: 336-347; Zhang et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 94: 4504-4509; Cramer et al. (1998) *Nature* 391: 288-291; і патенти США № 5605793 і 5837458.

Нуклеотидні послідовності за варіантами здійснення винахода також можна використовувати для виділення відповідних послідовностей з інших організмів, зокрема, інших бактерій, і більш конкретно, з інших штамів *Bacillus*. Таким чином, методи, такі як ПЛР, гібридизація й т.п., можна використовувати для ідентифікації таких послідовностей, виходячи з їх гомологічності з послідовностями, представленими тут. Послідовності, які відібрані на основі їх ідентичності із цілісними послідовностями, представленими тут, або їх фрагментами, охоплені варіантами здійснення. Такі послідовності включають послідовності, що представляють собою ортологи розкритих тут послідовностей. Термін "ортологи" означає гени, які походять із загального предкового гена і які виявлені в різних видах у результаті видоутворення. Гени, виявлені в різних видах, розглядаються як ортологи у випадку, коли їх нуклеотидні послідовності і/або послідовності їх кодуемого білка мають значну ідентичність, як визначено тут в іншому місці. Функції ортологів найчастіше висококонсервативні серед видів.

У методі ПЛР олігонуклеотидні праймери можуть бути сконструйовані для використання в реакціях ПЛР для ампліфікації відповідних послідовностей ДНК із кДНК або геномної ДНК, виділеної з будь-якого організму, що представляє інтерес. Способи конструювання праймерів для ПЛР і ПЛР-клонування загальновідомі з рівня техніки й описані в Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York), надалі "Sambrook". Див. також Innis et al., eds. (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, New York); Innis and Gelfand, eds. (1995) *PCR Strategies* (Academic Press, New York); і Innis and Gelfand, eds. (1999) *PCR Methods Manual* (Academic Press, New York). Відомі методи ПЛР включають, але не обмежуються цим, способи з використанням парних праймерів, гніздових праймерів, одиночних специфічних праймерів, вирождених праймерів, геноспецифічних праймерів, вектор-специфічних праймерів, частково некомплементарних праймерів і т.п.

У гібридизаційної технології вся або частина нуклеотидної послідовності використовується як зонд, який вибірково гібридується з іншими відповідними нуклеотидними послідовностями, представленими в популяції клонованих фрагментів геномної ДНК або фрагментів кДНК (а саме, бібліотеки геномної або кДНК) з обраного організму. Дані гібридизаційні зонди можуть являти собою фрагменти геномної ДНК, фрагменти кДНК, фрагменти РНК або інші олігонуклеотиди й можуть бути позначені обумовленою групою, такою як ³²P, або будь-якою іншою, що піддається виявленню маркером. Таким чином, наприклад, гібридизаційні зонди можуть бути отримані в результаті мічення синтетичних олігонуклеотидів, заснованих на послідовностях за варіантами здійснення винаходу. Способи підготовки зондів для гібридизації й для конструкції кДНК і геномних бібліотек загальновідомі з рівня техніки й описані в Sambrook.

Наприклад, повна послідовність, розкрита тут, або одна або декілька її частин можуть бути використані в якості зонда, здатного до специфічної гібридизації з відповідними послідовностями інформаційних РНК. Для здійснення специфічної гібридизації в різних умовах такі зонди включають послідовності, властиві тільки послідовностям за варіантами здійснення, і вони звичайно мають у довжину щонайменше приблизно 10 або 20 нуклеотидів. Такі зонди можна використовувати для ампліфікації послідовностей відповідних Сгу з обраного організму за допомогою ПЛР. Цю технологію можна використовувати для виділення додаткових кодуючих послідовностей з необхідного організму або в якості діагностичного методу для виявлення присутності кодуючих послідовностей в організмі. Гібридизаційні технології включають гібридизаційний скринінг висіяних на чашці ДНК-бібліотек (або бляшок, або колоній; див., наприклад, Sambrook).

Гібридизацію таких послідовностей можна проводити в строгих умовах. Використовуваний тут термін "строгі умови", або "строгі гібридизаційні умови" відноситься до умов, при яких зонд буде гібридуватися зі своєю цільовою послідовністю в очевидно більш значному ступені, ніж з іншими послідовностями (наприклад, 2-кратне, 5-кратне, або 10-кратне, щодо фону). Строгі умови є залежними від послідовності й будуть різнитися в різних оточеннях. Контролюючи строгість гібридизації і/або умов промивання, можуть бути ідентифіковані цільові послідовності, які на 100 % комплементарні зонду (гомологічне зондування). Альтернативно, строгість умов може бути адаптована таким чином, щоб уможливити деяку невідповідність послідовностей, щоб виявити більш низький ступінь схожості (гетерологічне зондування). У більшості випадків, зонд має довжину менш ніж 1000 або 500 нуклеотидів.

Як правило, строгими умовами будуть ті, при яких концентрація солі становить менш, чим приблизно 1,5 М іонів Na, звичайно концентрація від приблизно 0,01 до 1,0 М іонів Na (або іншої солі) при значенні pH від 7,0 до 8,3, і температурі щонайменше приблизно 30 °C для коротких зондів (наприклад, від 10 до 50 нуклеотидів), і щонайменше приблизно 60 °C для довгих зондів (наприклад, більш 50 нуклеотидів). Строгих умов також можна досягти за допомогою додавання дестабілізуючих агентів, таких як формамід. Приклади умов з низькою строгістю включають гібридизацію з буферним розчином 30-35 % формаміду, 1 М NaCl, 1 % SDS (додецилсульфат натрію) при 37 °C, і промивання в 1× до 2× SSC (20× SSC=3,0 М NaCl/0,3 М тринатрієвий цитрат) при 50-55 °C. Приклади умов середньої строгості включають гібридизацію в 40-45 % формаміді, 1,0 М NaCl, 1 % SDS при 37 °C, і промивання у від 0,5× до 1× SSC при 55-60 °C. Приклади умов високої строгості включають гібридизацію в 50 % формаміді, 1 М NaCl, 1 % SDS при 37 °C, і фінальне промивання в 0,1× SSC при 60-65 °C протягом щонайменше приблизно 20 хвилин. При бажанні, буфери для промивання можуть містити від приблизно 0,1 % до приблизно 1 % SDS. Тривалість гібридизації в більшості випадків становить менш 24 годин, звичайно від приблизно 4 до приблизно 12 годин.

Специфічність, як правило, є функцією постгібридаційних промивань, критичними факторами є іонна сила й температура розчину для заключного промивання. Для ДНК-ДНК гібридів, T_m (температура точки плавлення) може бути наближена до рівняння Meinkoth and Wahl (1984) *Anal. Biochem.* 138: 267-284: $T_m = 81,5 ^\circ\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\%GC) - 0,61 (\% \text{ форм.}) - 500/L$; де М являє собою молярність одновалентних катіонів, %GC - відсоток нуклеотидів гуанозину й цитозину в ДНК, «% форм.» - відсоток формаміду в розчині гібридизації, і L - довжина гібрида в парах азотистих основ. T_m являє собою температуру (при певній іонній силі й значенні pH), при якій 50 % комплементарної цільової послідовності гібридується з ідеально відповідним зондом. Промивання звичайно проводять щонайменше доти, поки не досягнутий рівноважний стан і низький рівень фону гібридизації, наприклад, протягом 2 годин, 1 години або 30 хвилин.

T_m зменшується приблизно на 1 °C з кожним 1 % невідповідності; таким чином, T_m , гібридизація і/або умови промивання можуть бути адаптовані для гібридизації з послідовностями ідентичності, що вимагається. Наприклад, якщо потрібно знайти послідовності з ≥ 90 %-й ідентичністю, T_m може бути зменшена на 10 °C. Звичайно строгі умови вибираються таким чином, щоб бути приблизно на 5 °C нижче, чим T_m для специфічної послідовності й комплементарної їй при певній іонній силі й значенні pH. Однак при дуже строгих умовах гібридизація і/або промивання можуть проводитися при температурі на 1, 2, 3 або 4 °C нижче, чим T_m ; при помірковано строгих умовах гібридизацію і/або промивання можна проводити при температурі на 6, 7, 8, 9 або 10 °C нижче, чим T_m ; в умовах низької строгості гібридизацію і/або промивання можна проводити при температурі на 11, 12, 13, 14, 15 або 20 °C нижче, чим T_m .

Використовуючи рівняння, гібридизацію й склади промивання й бажану T_m , фахівцеві, що володіє спеціальними навичками, зрозуміло, що по суті описана різноманітність у жорсткості гібридизації і/або розчинів промивання. Якщо бажана ступінь невідповідності приводить до T_m менше, чим 45 °C (водяний розчин) або 32 °C (розчин формаміду), переважно збільшити концентрацію SSC так, щоб можна було використовувати більш високу температуру. Великий посібник з гібридизації нуклеїнових кислот знайдено в Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Part I, Chapter 2 (Elsevier, New York); і Ausubel et al, eds. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 2 (Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York). Див. також Sambrook. Таким чином, ізольовані послідовності, кодуєчі білок Сгу за варіантами здійснення винахода й гібридизуються в строгих умовах з послідовностями Сгу, розкритими тут, або фрагментами таких, охоплені варіантами здійснення винаходу.

Наступні терміни застосовуються для опису взаємин послідовностей між двома або більш нуклеїновими кислотами або полінуклеотидами: (a) "референсна послідовність", (b) "вікно порівняння", (c) "ідентичність послідовностей", (d) "відсоток ідентичності послідовностей", (e) "істотна ідентичність".

(a) Використовуваний тут термін "референсна послідовність" визначає послідовність, застосовувану в якості стандарту для порівняння послідовностей. Референсна послідовність може являти собою скорочену або повну версію заданої послідовності; наприклад, у вигляді частини повнорозмірної послідовності кДНК або гена, або повністю послідовність кДНК або гена.

(b) Використовуваний тут термін "вікно порівняння" відноситься до безперервної й точно певної ділянки полінуклеотидної послідовності, у якому дана полінуклеотидна послідовність у даному вікні порівняння може містити доповнення або делеції (тобто розриви) у порівнянні з

референсною послідовністю (яка не містить доповнення або розриви) для оптимального вирівнювання даних двох послідовностей. Звичайне вікно порівняння становить щонайменше 20 безперервних нуклеотидів у довжину, і при бажанні, може становити 30, 40, 50, 100 або більш. Фахівцві в даній галузі буде зрозуміло, що для того, щоб уникнути високої схожості з референсною послідовністю в результаті включення розривів у полінуклеотидному ланцюгу, звичайно вводять штраф за пропуск у послідовності й віднімають із числа збігів.

Способи вирівнювання послідовностей для порівняння добре відомі з рівня техніки. Таким чином, визначення відсотка ідентичності послідовностей між будь-якими двома послідовностями може бути виконано за допомогою математичного алгоритму. Не обмежувачими прикладами таких математичних алгоритмів є алгоритм Myers and Miller (1988) CABIOS 4: 11-17; алгоритм місцевого вирівнювання Smith et al. (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482; алгоритм загального вирівнювання Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 443-453; метод вирівнювання з пошуком локалізації Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 2444-2448; алгоритм Karlin and Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264, як і змінений Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877.

Комп'ютерні втілення таких математичних алгоритмів можуть бути використані для порівняння послідовностей з метою визначення ідентичності послідовностей. Такі втілення включають, але не обмежуються ними: CLUSTAL у програмному забезпеченні PC/Gene (доступна в Intelligenetics, Mountain View, California); програмне забезпечення ALIGN (версія 2.0) і GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA і TFASTA у пакеті програмного забезпечення GCG Wisconsin Genetics, Версія 10 (доступні в Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, California, USA). Вирівнювання за допомогою цих програм може бути виконане з використанням параметрів за замовчуванням. Програма CLUSTAL добре описана в Higgins et al. (1988) Gene 73: 237-244 (1988); Higgins et al. (1989) CABIOS 5: 151-153; Corpet et al. (1988) Nucleic Acids Res. 16: 10881-90; Huang et al. (1992) CABIOS 8: 155-65; і Pearson et al. (1994) Meth. Mol. Biol. 24: 307-331. Програма ALIGN заснована на алгоритмі Myers and Miller (1988) *supra*. Таблиця ваги залишків PAM120, штраф довжини розриву 12 і штраф за пропуск у послідовності 4 можуть бути використані із програмою ALIGN при порівнянні двох амінокислотних послідовностей. Програми BLAST Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403 засновані на алгоритмі Karlin and Altschul (1990) *supra*. Blast-нуклеотидні пошуки можуть бути виконані за допомогою програми BLASTN, число очок = 100, довжина слова = 12, для одержання нуклеотидних послідовностей, гомологічних з нуклеотидною послідовністю, кодуєчий білок за варіантами здійснення. Blast-пошуки білка можуть бути здійснені за допомогою програми BLASTX, число очок = 50, довжина слова = 3, для одержання амінокислотних послідовностей, гомологічних білку або поліпептиду за варіантами здійснення. Для одержання з метою порівняння вирівнювань із розривами можна використовувати Gapped BLAST (в BLAST 2.0), як описано в Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389. Альтернативно, можна використовувати PSI-BLAST (в BLAST 2.0) для проведення повторного пошуку, щоб виявити віддалену спорідненість між молекулами. Див. Altschul et al. (1997) *supra*. При використанні BLAST, Gapped BLAST, PSI-BLAST, можна застосовувати параметри за замовчуванням для відповідних програм (наприклад, BLASTN для нуклеотидних послідовностей, BLASTX для білків). Див. вебсайт Національного Центру за Біотехнологічною Інформацією (National Center for Biotechnology Information) ncbi.nlm.nih.gov. Вирівнювання також може бути здійснене вручну шляхом перевірки.

Якщо не зазначене інакше, значення ідентичності/схожості послідовностей, надані тут, відносяться до значення, отриманого за допомогою програми GAP Версія 10, із застосуванням наступних параметрів: % ідентичності й % подібності для нуклеотидної послідовності з використанням GAP Weight 50 і Length Weight 3 і `nwsgapdna.cmp` матриці очок; % ідентичності або % подібності для амінокислотної послідовності з використанням GAP Weight 8 і Length Weight 2, і програми нарахування очок BLOSUM62; або будь-якої іншої еквівалентної програми. Використовуваний тут термін "еквівалентна програма" відноситься до будь-якої програми порівняння послідовностей, яка для будь-яких двох розглянутих послідовностей робить вирівнювання, що має ідентичні збіги нуклеотидів або амінокислотних залишків і однаковий відсоток ідентичності послідовностей у порівнянні з відповідним вирівнюванням, зробленим за допомогою GAP Версії 10.

GAP використовує алгоритм Needleman and Wunsch (1970) *supra*, для виявлення вирівнювання двох повних послідовностей, що максимально збільшує число збігів і гранично зменшує число розривів. GAP урахує всі можливі вирівнювання й позиції розривів і створює вирівнювання з найбільшим числом співпадаючих основ і найменшою кількістю розривів. Це передбачає забезпечення штрафу за створення розриву й штрафу за розширення розриву в одиницях основ, що сполучаються. GAP повинна забезпечити вигоду числа збігів штрафів за

створення розриву для кожного вбудованого розриву. Якщо обраний штраф за розширення розриву більше нуля, GAP повинна додатково забезпечити виграш для кожного розриву, вбудованого в довжину розриву, помноженого на штраф за розширення розриву. Значення за замовчуванням штрафу за створення розриву у Версії 10 пакета прикладних програм GCG Wisconsin Genetics для білкових послідовностей рівні 8 і 2, відповідно. Для нуклеотидних послідовностей штраф за створення розриву за замовчуванням становить 50, у той час, як штраф за розширення розриву рівний 3. Штрафи за створення розриву й розширення розриву можуть бути виражені як цілі числа, обрані групи цілих чисел від 0 до 200. Так, наприклад, штрафи за створення розривів і розширення розривів можуть бути 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 або більше.

GAP є одним зі членів сімейства кращих вирівнювань. Існує можливо, багато членів цього сімейства, але ніякі інші члени не мають кращої якості. GAP демонструє чотири показники якості для вирівнювань: якість, співвідношення, ідентичність і подібність. Якість являє собою показник, максимально збільшений для вирівнювання послідовностей. Співвідношення являє собою якість, поділену на число основ у більш короткому сегменті. Відсоток ідентичності являє собою відсоток символів, які фактично збіглися. Відсоток подібності являє собою відсоток символів, які є схожими. Символи, що перебувають напроти розривів, зігноровані. Схожість оцінюють, коли значення матриці заміни для пари символів становить більш, або рівно 0,50, граничному значенню схожості. Матрицею заміни, використовуваною у Версії 10 пакета прикладних програм GCG Wisconsin Genetics є BLOSUM62 (див. Henikoff and Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915).

(с) Використовуваний тут термін "ідентичність послідовностей" або "ідентичність" стосовно до двох послідовностей нуклеїнових кислот або поліпептидів, відноситься до залишків у даних двох послідовностях, які є однаковими при вирівнюванні для максимальної відповідності в межах установленого вікна порівняння. У випадку, коли відсоток ідентичності використовується стосовно до білка, визнано, що положення залишків, які не є ідентичними, найчастіше відрізняються замінами консервативних амінокислот, де амінокислотні залишки заміщені іншими амінокислотними залишками зі схожими хімічними властивостями (наприклад, заряд або гідрофобність) і внаслідок цього не міняють функціональні властивості даної молекули. У випадку, коли послідовності відрізняються консервативними замінами, відсоток ідентичності послідовностей може бути збільшений для корекції консервативної природи заміни. Говорять, що послідовності, які відрізняються такими консервативними замінами, мають "схожість послідовностей" або "схожість". Засоби для здійснення такого коректування добре відомі Фахівцям в даній галузі. У більшості випадків це включає підрахунок очок консервативної заміни як часткової, а не повної розбіжності, у такий спосіб підвищуючи відсоток ідентичності послідовностей. Таким чином, наприклад, коли ідентичній амінокислоті присуджене число очок, рівне 1, і неконсервативній заміні присуджене число очок, рівне нулю, консервативній заміні буде присуджене число очок між нулем і 1. Число очок консервативних замін підраховують, наприклад, як реалізовано в програмі PC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, California).

(d) Використовуваний тут термін "відсоток ідентичності послідовностей" відноситься до значення, певного в результаті порівняння двох оптимально вирівняних послідовностей у межах вікна порівняння, де частина полінуклеотидної послідовності в межах вікна порівняння може містити доповнення або делеції (тобто пропуски) у порівнянні з референсною послідовністю (яка не містить доповнення або делеції) для оптимального вирівнювання даних двох послідовностей. Відсоток обчислюється за допомогою визначення числа положень, у яких ідентичні основи нуклеїнових кислот або амінокислотні залишки перебувають в обох послідовностях, для одержання числа співпадаючих положень, ділячи дане число співпадаючих положень на загальне число положень у даному вікні порівняння, і множачи результат на 100, для того, щоб одержати відсоток ідентичності послідовностей.

(e) (i) Термін "істотна ідентичність" полінуклеотидних послідовностей означає, що полінуклеотид містить послідовність, яка має щонайменше ідентичність послідовності 70 %, 80 %, 90 % або 95 % або більш при порівнянні з референсною послідовністю, з використанням однієї з описаних програм вирівнювання, із застосуванням стандартних параметрів. Фахівцям в даній галузі техніки буде зрозуміло, що ці значення можуть бути належним чином скоректовані для визначення відповідної ідентичності білків, кодуємих двома нуклеотидними послідовностями, беручи до уваги виродженість кодонів, схожість амінокислот, положення рамки читування, і т.п. У більшості випадків для цих цілей істотна ідентичність амінокислотних послідовностей означає ідентичність послідовностей на щонайменше 60 %, 70 %, 80 %, 90 % або 95 % або більш значну ідентичність послідовностей.

Інший показник того, що нуклеотидні послідовності є суттєво ідентичними, складається в тому, чи можуть дві молекули гібридизуватися одна з одною у строгих умовах. У більшості випадків строгі умови обрані таким чином, щоб бути на 5 °C нижче, чим T_m для конкретної послідовності при заданих значеннях іонної сили й pH.

Проте, строгі умови включають температуру в діапазоні, на від приблизно 1 °C до приблизно на 20 °C нижче, чим T_m , залежно від необхідної ступені строгості, як інакше оговорено тут. Нуклеїнові кислоти, які не гібридизуються одна з одною у строгих умовах, усе ще є по суті ідентичними, якщо кодуючи ними поліпептиди є суттєво ідентичними. Це може відбутися, наприклад, коли копія нуклеїнової кислоти створена з використанням максимально можливої вираженості кодонів, дозволеної генетичним кодом. Одне свідчення того, що дві послідовності нуклеїнових кислот є суттєво ідентичними, складається в тому, що поліпептид, кодуєми першою нуклеїновою кислотою, є імунологічно перехресно реагуючими з поліпептидом, кодуєми другою нуклеїновою кислотою.

(е) (ii) Термін "істотна ідентичність" відносно пептиду означає, що пептид містить послідовність із щонайменше 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % або більш ідентичністю послідовностей з референсною послідовністю в межах установленого вікна порівняння. Оптимальне вирівнювання для цих цілей може бути проведене за допомогою алгоритму загального вирівнювання Needleman and Wunsch (1970) *supra*. Показник того, що дві пептидні послідовності суттєво ідентичні, складається в тому, що один пептид є імунологічно реактивним з антитілами, виробленими проти другого пептиду. Таким чином, пептид є суттєво ідентичним другому пептиду, наприклад, у випадку, коли дані два пептиди різняться тільки консервативною заміною. Пептиди, що є "суттєво схожими", мають послідовності, як відзначалося вище, за винятком того, що положення залишків, які не є ідентичними, можуть різнитися змінами консервативних амінокислот.

Використовуваний тут термін "нуклеотидні конструкції" не призначений для обмеження варіантів здійснення винаходу нуклеотидними конструкціями, що містять ДНК. Фахівцві зі звичайними навичками в даній галузі буде зрозуміло, що нуклеотидні конструкції, зокрема полінуклеотиди й олігонуклеотиди, що складаються із рибонуклеотидів і комбінацій рибонуклеотидів з дезоксирибонуклеотидами, також можуть бути використані в способах, описаних тут. Нуклеотидні конструкції, нуклеїнові кислоти й нуклеотидні послідовності за варіантами здійснення винаходу додатково охоплюють усі комплементарні форми таких конструкцій, молекул і послідовностей. Далі, нуклеотидні конструкції, молекули нуклеотидів і нуклеотидні послідовності за варіантами здійснення винаходу охоплюють усі нуклеотидні конструкції, молекули й послідовності, які можуть бути використані в методах за варіантами здійснення, для трансформованих рослин, у тому числі, але не обмежуються цим, ті, які містять дезоксирибонуклеотиди, рибонуклеотиди і їх комбінації. Такі дезоксирибонуклеотиди й рибонуклеотиди включають і природні молекули, і синтетичні аналоги. Нуклеотидні конструкції, нуклеїнові кислоти й нуклеотидні послідовності за варіантами здійснення винаходу включають, але не обмежуються цим, одониткові форми, двохниткові форми, шпилькоподібні структури, структури типу "стебло-петля" і т.п.

Додатковий варіант здійснення винаходу відноситься до трансформованого організму, такого, як організм, обраний із групи, що включає клітини рослин і комах, бактерії, дріжджі, бакуловіруси, найпростіших, круглих хробаків і водорості. Трансформований організм містить молекулу ДНК за варіантами здійснення винаходу, експресійну касету, що містить зазначену молекулу ДНК, або вектор, що містить зазначену експресійну касету, який може бути стабільно вбудований у геном даного трансформованого організму.

Послідовності за варіантами здійснення винаходу забезпечені в ДНК-конструкціях для експресії в представляючому організмі інтерес. Дана конструкція буде включати 5'- і 3'-регуляторні послідовності, функціонально пов'язані з послідовністю за варіантами здійснення винаходу. Використовуваний тут термін "функціонально зв'язаний" означає функціональний зв'язок між промотором і другою послідовністю, де послідовність промотору ініціює й опосередковує транскрипцію з послідовності ДНК, відповідної до другої послідовності. Звичайно "функціонально зв'язаний" означає, що зв'язані послідовності нуклеїнової кислоти є послідовними й, при необхідності приєднання двох кодуючих білок ділянок, сполученими й в одній і тій же рамці зчитування. Дана конструкція може додатково містити щонайменше один додатковий ген для спільної трансформації в даному організмі. Альтернативно, даний додатковий ген(и) може бути забезпечений у множинних ДНК-конструкціях.

Така ДНК-конструкція забезпечена безліччю ділянок рестрикції для вставки послідовності токсину *Cry*, для того, щоб перебувати під транскрипційним контролем регуляторних областей. Дана ДНК-конструкція може додатково містити гени селектуємих маркерів.

Дана ДНК-конструкція в 5'- 3'-напрямку транскрипції буде містити ділянку ініціації транскрипції й трансляції (а саме промотор), послідовність ДНК за варіантами здійснення винахода й галузь термінації транскрипції й трансляції (тобто ділянка термінації), функціональні в організмі, що виступає в якості хазяїна. Ділянка ініціації транскрипції (тобто промотор) може бути нативною, аналогічною, чужорідною або гетерологічною організму-хазяїнові і/або послідовності за варіантами здійснення винахода. Додатково, даний промотор може являти собою природню послідовність або, альтернативно, синтетичну послідовність. Використовуваний тут термін "чужорідний" означає, що даний промотор не виявлений у нативному організмі, у який даний промотор уведений. Якщо промотор є "чужорідним" або "гетерологічним" послідовності за варіантами здійснення винахода, це означає, що даний промотор не є нативним або, промотором, що зустрічається в природі, функціонально пов'язаним з послідовністю за варіантами здійснення винахода. Як використовується тут, химерний ген містить кодуєчу послідовність функціонально пов'язану з областю ініціації транскрипції, яка є гетерологічною даній кодуєчій послідовності. У випадку, коли промотор є нативною або природньою послідовністю, експресія функціонально зв'язаної послідовності відрізняється від експресії дикого типу, що приводить до зміни фенотипу.

Ділянка термінації може бути однакового походження з областю ініціації транскрипції, може бути однакового походження з функціонально зв'язаною послідовністю ДНК, що представляє інтерес, може бути нативною для рослини-хазяїна або може бути отримана з іншого джерела (а саме, чужорідний або гетерологічний промотору, цільовій послідовності, рослині-хазяїнові або будь-яка комбінація).

Підходящі ділянки термінації доступні з Ti-плазмідів *A.tumefaciens*, такі як ділянки термінації октопінсинтази або 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; i Joshi et al. (1987) *Nucleic Acid Res.* 15: 9627-9639.

Коли це доцільно, нуклеїнова кислота може бути оптимізована для підвищеної експресії в організмі-хазяїні. Таким чином, у випадку, коли організмом-хазяїном є рослина, для поліпшеної експресії синтетична нуклеїнова кислота може бути синтезована з використанням кодонів, кращих для рослини. Див., наприклад, Campbell and Gowri (1990) *Plant Physiol.* 92: 1-11 для обговорення використання кодонів, кращих для організму-хазяїна. Наприклад, незважаючи на те, що послідовності нуклеїнових кислот за варіантами здійснення винаходу можуть бути експресовані як в однодольних, так і у дводольних рослинних видах, послідовності можуть бути модифіковані, беручи до уваги кращі специфічні кодони й кращий вміст GC для однодольних або дводольних рослин, оскільки ці переваги, як показано, різняться (Murray et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17: 477-498). Таким чином, кодон для певної амінокислоти, кращий для кукурудзи, може бути отриманий з відомої послідовності гена з кукурудзи. Використання кодонів для кукурудзи, для 28 генів кукурудзи, презентовано в Таблиці 4 в Murray et al., supra. З рівня техніки доступні способи синтезу генів, кращих для рослин. Див., наприклад, патенти США № 5380831, i 5436391, i Murray et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17: 477-498, включені тут за допомогою посилань.

Додаткові модифікації послідовностей відомі для посилення експресії гена в клітинному хазяїні. Вони включають усунення послідовностей, кодуєчих неправильні сигнали поліаденілювання, сигнали ділянок екзон-інтронового сплайсингу, транспозон-подібні повтори, i інші добре охарактеризовані послідовності, які можуть бути шкідливими для експресії гена. Зміст GC у послідовності може бути адаптовано до рівнів, середніх для даного клітинного хазяїна, як обчислено, виходячи з відомих генів, експресуємих у даної клітини-хазяїні. Використовуваний тут термін "клітина-хазяїн" відноситься до клітини, яка містить вектор i підтримує реплікацію i/або призначена для експресії експресуючого вектора. Клітини-хазяїна можуть являти собою прокаріотичні клітини, такі як *E.coli*, або еукаріотичні клітини, такі як дріжджі, клітини комах, амфібій або ссавців, або клітини однодольних або дводольних рослин. Прикладом клітини-хазяїна однодольної рослини є кукурудзяна клітина-хазяїн. При наявності можливості послідовність модифікована таким чином, щоб уникнути утворенню обчислених шпильок вторинних структур мРНК.

Експресійні касети можуть додатково містити 5'-лідерні послідовності. Такі лідерні послідовності можуть діяти в якості підсилювачів трансляції. Трансляційні лідери відомі з рівні техніки й включають лідерні послідовності пікорнавірусів, наприклад EMCV-лідер (5'-некодуєча, ділянка вірусу енцефаломіокардиту) (Elroy-Stein (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6126-6130); лідерні послідовності потивірусів, наприклад, TEV-лідер (Вірус гравірування тютюну) (Gallie et al. (1995) *Gene* 165(2): 233-238), MDMV-лідер (вірус мозаїчної карликовості кукурудзи),

зв'язувальний білок важкого ланцюга імуноглобуліну людини (BiP) (Macejak et al. (1991) *Nature* 353: 90-94); нетрансльовану лідерну послідовність мРНК із оболочечного білка вірусу мозаїки люцерни (AMV RNA 4) (Jobling et al. (1987) *Nature*, 325: 622-625); лідерну послідовність вірусу тютюнової мозаїки (TMV) (Gallie et al. (1989) в *Molecular Biology of RNA*, ed. Cech (Liss, New York), pp. 237-256); і лідерну послідовність вірусу хлоротичної мозаїки кукурудзи (MCMV) (Lommel et al. (1991) *Virology* 81: 382-385). Також див., Della-Cioppa et al. (1987) *Plant Physiol.* 84: 965-968.

При одержанні експресійної касети різні фрагменти ДНК можуть бути оброблені таким чином, щоб забезпечити ДНК-послідовності у належному напрямку, і, залежно від ситуації, у підходящій рамці зчитування. Для досягнення цієї мети, можна використовувати адаптери або лінкери для з'єднання фрагментів ДНК, або інші маніпуляції можуть бути здійснені для забезпечення підходящих сайтів рестрикції, видалення надлишкової ДНК, видалення сайтів рестрикції, і т.п. Для цієї мети можна використовувати мутагенез *in vitro*, відновлення праймера, рестрикцію, ренатурацію, повторні заміни, наприклад, трансзиції й трансверсії.

При практичному застосуванні варіантів здійснення винаходу можна використовувати ряд промоторів. Промотори можуть бути обрані виходячи з очікуваного результату. Нуклеїнові кислоти можуть бути скомбіновані з конститутивними, тканиноспецифічними, індукцйбельними або іншими промоторами, для експресії в організмі-хазяїні. Підходящі конститутивні промотори для застосування в рослинній клітині-хазяїні включають, наприклад, коров'ячий промотор промотору Rsyn7 і інших конститутивних промоторів, розкритих в WO 99/43838 і патенті США № 6072050; коров'ячий промотор CaMV 35S (Odell et al. (1985) *Nature* 313: 810-812); актин рису (Mcelroy et al. (1990) *Plant Cell* 2: 163-171); убіквітин (Christensen et al. (1989) *Plant Mol. Biol.* 12: 619-632 і Christensen et al. (1992) *Plant Mol. Biol.* 18: 675-689); pEMU (Last et al. (1991) *Theor. Appl. Genet.* 81: 581-588); MAS (Velten et al. (1984) *EMBO J.* 3: 2723-2730); промотор ALS (патент США № 5659026), і т.п. Інші конститутивні промотори включають наприклад, такі, як розкриті в патентах США № 5608149; 5608144; 5604121; 5569597; 5466785; 5399680; 5268463; 5608142; і 6177611.

Залежно від бажаного результату може бути вигідна експресія гена з індукцйбельного промотору. Особливий інтерес для регулювання експресії нуклеотидних послідовностей за варіантами здійснення винаходу в рослинах являють собою промотори, індукуючи рани. Такі промотори, індукуються ранами, можуть реагувати на ушкодження, викликане потрапою комахам, і включають ген інгібітору протеїнази картоплі (pin II) (Ryan (1990) *Ann. Rev. Phytopath.* 28: 425-449; Duan et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 494-498); wun1 і wun2, патент США № 5428148; win1 і win2 (Stanford et al. (1989) *Mol. Gen. Genet.* 215: 200-208); системін (Mcgurl et al. (1992) *Science* 225: 1570-1573); WIP1 (Rohmeier et al. (1993) *Plant Mol. Biol.* 22: 783-792; Eckelkamp et al. (1993) *FEBS Letters* 323: 73-76); ген MPI (Corderok et al. (1994) *Plant J.* 6(2): 141-150); і т.п., включені тут за допомогою посилання.

Додатково, патоген-індукцйбельні промотори можуть бути використані в способах і нуклеотидних конструкціях за варіантами здійснення винаходу. Такі патоген-індукцйбельні промотори включають ті з білків, пов'язаних з патогенезом (білки PR), які індукують наступну інфекцію за допомогою патогену; наприклад, білки PR, білки SAR, бета-1, 3-глюканаза, хітиназа, і т.п. Див., наприклад, Redolfi et al. (1983) *Neth. J. Plant Pathol.* 89: 245-254; Uknes et al. (1992) *Plant Cell* 4: 645-656; і Van Loon (1985) *Plant Mol. Virol.* 4: 111-116. Див. також WO 99/43819, включену тут за допомогою посилання.

Являють собою інтерес промотори, які експресуються локально, або поблизу, від ділянки патогенної інфекції. Див., наприклад, Marineau et al. (1987) *Plant Mol. Biol.* 9: 335-342; Matton et al. (1989) *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2: 325-331; Somsisch et al. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 2427-2430; Somsisch et al. (1988) *Mol. Gen. Genet.* 2: 93-98; і Yang (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 14972-14977. Див., також, Chen et al. (1996) *Plant J.* 10: 955-966; Zhang et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 2507-2511; Warner et al. (1993) *Plant J.* 3: 191-201; Siebertz et al. (1989) *Plant Cell* 1: 961-968; патент США № 5750386 (індукцйбельний для нематод); і посилання, процитовані там. Особливий інтерес являє собою індукцйбельний промотор для гена PRms кукурудзи, чия експресія індукується патогеном *Fusarium moniliforme* (див., наприклад, Cordero et al. (1992) *Physiol. Mol. Plant Path.* 41: 189-200).

Хімічно регульовані промотори можна використовувати для регулювання експресії гена в рослині, застосовуючи екзогенний хімічний регулятор. Залежно від мети, промотор може являти собою хімічно індукцйбельний промотор, у випадку, коли застосування хімічної речовини індукує експресію гена, або хімічно репресуємий промотор, у випадку, коли застосування хімікату пригнічує експресію гена. Хімічно індукцйбельні промотори відомі з рівня техніки, і включають, але не обмежуються цим, промотор In2-2 кукурудзи, який активується антидотами

бензолсульфонамідних гербіцидів, промотор GST кукурудзи, що активується гідрофобними електрофільними сполуками, які використовуються в якості передсходових гербіцидів, і промотор PR-1а тютюну, що активується саліциловою кислотою. Інші, що представляють інтерес хімічно регульовані промотори включають стероїд-сприйнятливі промотори (див.,
 5 наприклад, глюোকортикоїд-індукуємий промотор в Schena et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10421-10425 і Mcnellis et al. (1998) Plant J. 14(2): 247-257) і тетрациклін-індукуємий і тетрациклін-супресуємий промотори (див., наприклад, Gatz et al. (1991) Mol. Gen. Genet. 227: 229-237, і патенти США № 5814618 і 5789156), включені тут за допомогою посилання.

Тканинонайкращі промотори можуть бути використані для посилення експресії пестицидного білка в межах певної тканини рослини. Тканинонайкращі промотори включають такі, як описано в Yamamoto et al. (1997) Plant J. 12(2):255-265; Kawamata et al. (1997) Plant Cell Physiol. 38(7): 792-803; Hansen et al. (1997) Mol. Gen. Genet. 254(3): 337-343; Russell et al. (1997) Transgenic Res. 6(2): 157-168; Rinehart et al. (1996) Plant Physiol. 112(3): 1331-1341; Van Camp et al. (1996) Plant Physiol. 112(2): 525-535; Canevascini et al. (1996) Plant Physiol. 112(2): 513-524; Yamamoto et al. (1994) Plant Cell Physiol. 35(5): 773-778; Lam (1994) Results Probl. Cell Differ. 20: 181-196; Orozco et al. (1993) Plant Mol. Biol. 23(6): 1129-1138; Matsuoka et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(20): 9586-9590; і Guevara-Garcia et al. (1993) Plant J. 4(3): 495-505. Такі промотори можуть бути модифіковані, при необхідності, для слабкої експресії.

3 рівні техніки відомі промотори, кращі для листя. Див., наприклад, Yamamoto et al. (1997) Plant J. 12(2): 255-265; Kwon et al. (1994) Plant Physiol. 105: 357-67; Yamamoto et al. (1994) Plant Cell Physiol. 35(5): 773-778; Gotor et al. (1993) Plant J. 3: 509-18; Orozco et al. (1993) Plant Mol. Biol. 23(6): 1129-1138; і Matsuoka et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(20): 9586-9590.

Кращі для коріння або специфічні для коріння промотори відомі й можуть бути обрані з безлічі доступних у літературних джерелах, або заново ізольованих з різних схожих видів. Див.,
 25 наприклад, Hire et al. (1992) Plant Mol. Biol. 20(2): 207-218 (ген глутамінсинтетази, специфічної для коріння сої); Keller and Baumgartner (1991) Plant Cell 3(10): 1051-1061 (контрольний елемент гена GRP 1.8 квасолі звичайної, специфічний для коріння); Sanger et al. (1990) Plant Mol. Biol. 14(3): 433-443 (специфічний для коріння промотор гена манопінсинтази (MAS) *Agrobacterium tumefaciens*); і Miao et al. (1991) Plant Cell 3(1): 11-22 (повнорозмірний клон кДНК, кодуючий цитозольну глутамінсинтетазу (GS), експресуєму в коріннях і кореневих вузликах сої). Див., також Bogusz et al. (1990) Plant Cell 2(7): 633-641, де описано два специфічні для коріння промотори, ізольованих з гена гемоглобіну азотфіксуючої небобової рослини *Parasponia andersonii* і родинної азотфіксуючої небобової рослини *Trema tomentosa*. Промотори цих генів були пов'язані з репортерним геном β -глюкуронидази й вбудовані в у небобову рослину *Nicotiana tabacum*, і в бобову рослину *Lotus corniculatus*, і в обох випадках активність промотору, специфічного для коріння, була збережена. Leach and Aoyagi (1991) описали своє дослідження промоторів високоекспресуємих, індукуючих експресію в коріннях генів *rolC* і *rolD* *Agrobacterium rhizogenes* (див. Plant Science (Limerick) 79(1): 69-76). Вони прийшли до висновку, що енхансер і
 35 тканинонайкращі ДНК детермінанти роз'єднані в цих промоторах. Teeri et al. (1989) використовував злиття генів з *lacZ* для демонстрації того, що ген Т-ДНК *Agrobacterium*, кодуючий октопінсинтазу, є особливо активним в епідермісі кінчика кореня, і що ген TR2' є специфічним для коріння в інтактній рослині й стимулюється в результаті ушкодження тканини
 40 листя, що надзвичайно підходить комбінації характеристик для застосування з інсектицидним або лаврицидним геном (див. EMBO J. 8(2):343-350). Ген TR1', злитий з *nptII* (неоміцин фосфотрансфераза II) проявляє схожі характеристики. Додаткові промотори, кращі для коріння, включають промотор гена *VfENOD-GRP3* (Kuster et al. (1995) Plant Mol. Biol. 29(4): 759-772); і промотор *rolB* (Carana et al. (1994) Plant Mol. Biol. 25(4): 681-691). Див. також патенти США № 5837876; 5750386; 5633363; 5459252; 5401836; 5110732; і 5023179.

"Кращі для насіння" промотори включають як "специфічні для насіння" промотори (ті промотори, які активні під час розвитку насіння, такі як промотори білків, що зберігають насіння), так і промотори "проростання насіння" (ті промотори, які активні під час проростання насіння). Див. Thompson et al. (1989) Bioessays 10: 108, включену тут за допомогою посилання. Такі кращі для насіння промотори включають, але не обмежуються ними, *Cim1* (цитокинін-індукований сигнал); *cz19B1* (зеїн 19 кДа кукурудзи); і *milps* (міо-інозитол-1-фосфатсинтаза) (див. патент США № 6225529, включену тут за допомогою посилання). Гамма-зеїн і *Glob-1* являють собою ендосперм-специфічні промотори. Для дводольних рослин специфічні для насіння промотори включають, але не обмежуються ними, β -фазеолін бобів, напін, β -конгліцинін, лектин сої, круциферин і т.п. Для однодольних рослин, специфічні для насіння промотори включають, але не обмежуються ними, зеїн 15 кДа кукурудзи, зеїн 22 кДа, зеїн 27 кДа, δ -зеїн, *shrunken 1*, *shrunken 2*, глобулін 1, і т.п. Див. також WO 00/12733, де розкриті кращі для насіння промотори з
 60

генів end1 і end2; включена тут у якості посилання. Промотор, який має "кращу" експресію в певній тканині, експресується в цій тканині більшою мірою, чим щонайменше в одній іншій тканині рослини. Деякі тканинонакращі промотори демонструють експресію майже винятково в певній тканині.

У випадку, коли бажаний низький рівень експресії, будуть використовувати слабкі промотори. У більшості випадків, використовуваний тут термін "слабкий промотор" відноситься до промотору, який направляє експресію послідовності, кодує, на низькому рівні. Під низьким рівнем мається на увазі експресія на рівні від приблизно 1/1000 транскриптів до приблизно 1/100000 транскриптів, до приблизно 1/500000 транскриптів. Альтернативно, визнано, що термін "слабкі промотори" також включає промотори, які направляють експресію тільки в декількох клітках, але не в інших, що приводить до загального низького рівня експресії. У випадку коли промотор направляє експресію неприпустимо високого рівня, частини послідовності промотору можуть бути вилучені або модифіковані, щоб знизити рівні експресії.

Такі слабкі конститутивні промотори включають, наприклад, коров'ячий промотор промотору Rsyn7 (WO 99/43838 і патент США № 6072050), серцевину промотору 35S CaMV і т.п. Інші конститутивні промотори включають, наприклад, ті, які розкриті в патентах США № 5608149; 5608144; 5604121; 5569597; 5466785; 5399680; 5268463; 5608142 і 6177611; включені тут за допомогою посилання.

У більшості випадків експресійна касета буде містити ген селектованого маркера для селекції трансформованих кліток. Гени селектованих маркерів використовуються для відбору трансформованих кліток або тканин. Маркерні гени включають гени, кодує стійкість до антибіотиків, такі, наприклад, як кодує неоміцин фосфотрансферазу II (NEO) і гіроміцин фосфотрансферазу (HPT), а також гени, що надають стійкість проти гербіцидних сполук, наприклад, глютофозинату амонію, бромоксінілу, імідазолінонів і 2,4-дихлорфеноксиацетату (2,4-D). Додаткові приклади підходящих генів селектуємих маркерів включають, але не обмежуються цим, гени, кодує стійкість до хлорамфеніколу (Herrera Estrella et al. (1983) EMBO J. 2: 987-992); метотрексату (Herrera Estrella et al. (1983) Nature 303: 209-213; і Meijer et al. (1991) Plant Mol. Biol. 16: 807-820); стрептоміцину (Jones et al. (1987) Mol. Gen. Genet. 210: 86-91); спектиноміцину (Bretagne-Sagnard et al. (1996) Transgenic Res. 5: 131-137); блеоміцину (Hille et al. (1990) Plant Mol. Biol. 7: 171-176); сульфонамідів (Guerineau et al. (1990) Plant Mol. Biol. 15: 127-136); бромоксінілу (Stalker et al. (1988) Science 242: 419-423); гліфосату (Shaw et al. (1986) Science 233: 478-481; і заявки США із серійними № 10/004357; і 10/427692); фосфінотрицину (DeBlock et al. (1987) EMBO J. 6: 2513-2518). Див., у цілому, Yarranton (1992) Curr. Opin. Biotech. 3: 506-511; Christopherson et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6314-6318; Yao et al. (1992) Cell 71: 63-72; Reznikoff (1992) Mol. Microbiol. 6: 2419-2422; Barkley et al. (1980) в The Operon, pp. 177-220; Hu et al. (1987) Cell 48: 555-566; Brown et al. (1987) Cell 49: 603-612; Figge et al. (1988) Cell 52: 713-722; Deuschle et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5400-5404; Fuerst et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2549-2553; Deuschle et al. (1990) Science 248: 480-483; Gossen (1993) Ph.D. Thesis, University of Heidelberg; Reines et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 1917-1921; Labow et al. (1990) Mol. Cell. Biol. 10: 3343-3356; Zambretti et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 3952-3956; Baim et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 5072-5076; Wyborski et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19: 4647-4653; Hillenand-Wissman (1989) Topics Mol. Struc. Biol. 10: 143-162; Degenkolb et al. (1991) Antimicrob. Agents Chemother. 35: 1591-1595; Kleinschmidt et al. (1988) Biochemistry 27: 1094-1104; Bonin (1993) Ph.D. Thesis, University of Heidelberg; Gossen et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5547-5551; Oliva et al. (1992) Antimicrob. Agents Chemother. 36: 913-919; Hlavka et al. (1985) Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 78 (Springer-Verlag, Berlin); і Gill et al. (1988) Nature 334: 721-724. Такі розкриття включені тут за допомогою посилання.

Вищенаведений список генів селектованих маркерів не є обмежувачим. Будь-які гени селектованих маркерів можуть бути використані у варіантах здійснення винаходу.

Способи за варіантами здійснення винаходу включають вбудовування поліпептиду або полінуклеотиду в рослину. Термін "вбудовування" означає введення в рослину полінуклеотиду або поліпептиду таким чином, щоб дана послідовність одержала доступ до внутрішніх кліток даної рослини. Способи за варіантами здійснення не залежать від конкретного способу введення полінуклеотиду або поліпептиду в рослину, важливо тільки, що полінуклеотид або поліпептиди одержують доступ усередину щонайменше однієї клітини даної рослини. Способи введення полінуклеотиду або поліпептидів у рослини відомі з рівня техніки, і включають, але не обмежуються ними, методи стабільної трансформації, методи нестійкої трансформації й вірус-опосередковані методи.

"Стабільна трансформація" означає, що нуклеотидна конструкція, уведена в рослину, інтегрується в геном даної рослини й може бути успадкована його потомством. "Нестійка трансформація" означає, що полінуклеотид уведений у рослину й не інтегрується в геном даної рослини, або поліпептид уведений у рослину.

5 Протоколи трансформації так само, як і протоколи введення нуклеотидних послідовностей у рослину, можуть змінюватися залежно від типу рослини або рослинної клітини, а саме, однодольна або двохдольна рослина, що є мішенню трансформації. Підходящі методи введення нуклеотидних послідовностей у рослинні клітини й наступного вбудовування в геном рослини, включають мікроін'єкцію (Crossway et al. (1986) *Biotechniques* 4: 320-334), електропорацію (Riggs et al. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 5602-5606), *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію (патенти США № 5563055 і 5981840), прямий перенос генів (Paszowski et al. (1984) *EMBO J.* 3: 2717-2722), і балістичне бомбардування частками (див., наприклад, патенти США № 4945050; 5879918; 5886244; і 5932782; Tomes et al. (1995) в *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture: Fundamental Methods*, ed. Gamborg and Phillips (Springer-Verlag, Berlin); і McCabe et al. (1988) *Biotechnology* 6: 923-926); і трансформацію *Lecl* (WO 00/28058). Для трансформації картоплі див. Tu et al. (1998) *Plant Molecular Biology* 37: 829-838 і Chong et al. (2000) *Transgenic Research* 9: 71-78. Додаткові трансформаційні процедури можна знайти в Weissinger et al. (1988) *Ann. Rev. Genet.* 22: 421-477; Sanford et al. (1987) *Particulate Science and Technology* 5: 27-37 (лук); Christou et al. (1988) *Plant Physiol.* 87: 671-674 (соя); McCabe et al. (1988) *Bio/Technology* 6: 923-926 (соя); Finer and McMullen (1991) *In Vitro Cell Dev. Biol.* 27P: 175-182 (соя); Singh et al. (1998) *Theor. Appl. Genet.* 96: 319-324 (соя); Datta et al. (1990) *Biotechnology* 8: 736-740 (рис); Klein et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 4305-4309 (кукурудза); Klein et al. (1988) *Biotechnology* 6: 559-563 (кукурудза); патенти США № 5240855; 5322783 і 5324646; Klein et al. (1988) *Plant Physiol.* 91: 440-444 (кукурудза); Fromm et al. (1990) *Biotechnology* 8: 833-839 (кукурудза); Hooykaas-Van Slooter et al. (1984) *Nature (London)* 311: 763-764; патент США № 5736369 (зернові); Bytebier et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 5345-5349 (лілейні); De Wet et al. (1985) в *The Experimental Manipulation of Ovule Tissues*, ed. Chapman et al. (Longman, New York), pp. 197-209 (пилок); Kaeppler et al. (1990) *Plant Cell Reports* 9: 415-418 і Kaeppler et al. (1992) *Theor. Appl. Genet.* 84: 560-566 (трансформація за допомогою вусів); D'Halluin et al. (1992) *Plant Cell* 4: 1495-1505 (електропорація); Li et al. (1993) *Plant Cell Reports* 12: 250-255 і Christou and Ford (1995) *Annals of Botany* 75: 407-413 (рис); Osjoda et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 745-750 (кукурудза за допомогою *Agrobacterium tumefaciens*); усе включено тут за допомогою посилання.

У певних варіантах здійснення винаходу, послідовності за варіантами здійснення можуть бути забезпечені рослинам з використанням безлічі способів нестійкої трансформації. Такі способи нестійкої трансформації включають, але не обмежуються ними, введення білка токсину *Cry*, або його варіантів або фрагментів, безпосередньо в рослину, або введення транскрипту токсину *Cry* у дану рослину. Такі методи включають, наприклад, мікроін'єкцію або бомбардування частками. Див., наприклад, Crossway et al. (1986) *Mol Gen. Genet.* 202: 179-185; Nomura et al. (1986) *Plant Sci.* 44: 53-58; Hepler et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 2176-2180 і Hush et al. (1994) *The Journal of Cell Science* 107: 775-784, усе включено тут у якості посилання. Альтернативно, полінуклеотид токсину *Cry* може бути нестійко трансформований у рослині з використанням технологій, відомих з рівня техніки. Такі технології включають вірусну векторну систему й виділення полінуклеотиду таким чином, щоб запобігти наступному вивільненню ДНК. Таким чином, транскрипція пов'язана із часткою ДНК може відбутися, але частота, з якої вона вивільняється щоб бути інтегрованою в геном, значно знижена. Такі методи включають використання часток, покритих поліетиліміном (PEI; Sigma #P3143).

З рівня техніки відомі способи спрямованого вбудовування полінуклеотиду в певне місце розташування в геномі рослини. В одному варіанті здійснення винаходу вбудовування полінуклеотиду в бажане положення в геномі досягнуте за допомогою системи сайт - специфічної рекомбінації. Див., наприклад, WO99/25821, WO99/25854, WO99/25840, WO99/25855 і WO99/25853, усе включено тут за допомогою посилання. Коротше, полінуклеотид за варіантами здійснення винаходу може втримуватися в касеті для переносу, фланкованою двома неідентичними рекомбінантними сайтами. Дана касета для переносу, що вводиться в рослину, має стабільно інкорпорований у геном сайт-мішень, який фланкований двома неідентичними рекомбінаційними сайтами, відповідними до ділянок касети для переносу. Підходяща рекомбіназа забезпечена, і дана касета для переносу інтегрована в сайт-мішень. Представляє інтерес полінуклеотид інтегрований у такий спосіб у певну хромосомну позицію в геномі рослини.

Клітини, які були трансформовані, можуть бути вирощені в рослинах відповідно до загальноприйнятих способів. Див., наприклад, McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5: 81-84. Ці рослини потім можуть бути вирощені й обпилені або тим же самим трансформованим штамом, або відмінними штамми, і отриманий гібрид, що має конститутивну або індукцибельну експресію необхідної ідентифікованої фенотипової особливості, може бути ідентифікований. Два або кілька поколінь можуть бути вирощені для гарантії того, що експресія необхідної фенотипової особливості стабільно підтримується й успадковується, а потім збирають насіння для підтвердження того, що експресія бажаної фенотипової особливості була досягнута.

Нуклеотидні послідовності за варіантами здійснення винаходу можуть бути забезпечені рослині в результаті контакту даної рослини з вірусом або вірусними нуклеїновими кислотами. У більшості випадків такі способи передбачають розміщення нуклеотидної конструкції, що представляє інтерес, усередину вірусної молекули ДНК або РНК. Визнано, що рекомбінантні білки за варіантами здійснення винаходу можуть бути первісно синтезовані як частина вірусного поліпротеїну, який пізніше може бути оброблений за допомогою протеолізу *in vivo* або *in vitro*, для підтримання необхідного пестицидного білка. Також визнано, що такий вірусний поліпротеїн, що містить щонайменше частина амінокислотної послідовності пестицидного білка за варіантами здійснення винаходу, може мати необхідну пестицидну активність. Такі вірусні поліпротеїни й нуклеотидні послідовності, які їх кодує, охоплені варіантами здійснення винаходу. З рівня техніки відомі способи забезпечення рослин з нуклеотидними послідовностями й одержання кодуємих білків у рослинах, які передбачають використання молекул вірусної ДНК або РНК. Див., наприклад, патенти США № 5889191; 5889190; 5866785; 5589367; і 5316931; включені тут за допомогою посилання.

Варіанти здійснення винаходу далі відносяться до матеріалу для розмноження трансформованої рослини за варіантами здійснення, що включає, але без обмеження цим, насіння, бульби, бульбоцибулини, цибулини, листя й обрізки коріння і паростків.

Варіанти здійснення винаходу також можна використовувати для трансформації будь-яких видів рослин, у тому числі, але не обмежуючись цим, однодольних і дводольних. Приклади, рослин що представляють інтерес включають, але не обмежуються цим, кукурудзу (*Zea mays*), рід *Brassica* (наприклад, *B. napus*, *B. rapa*, *B. juncea*), зокрема ті види *Brassica*, які придатні в якості джерел рослинної олії, люцерну (*Medicago sativa*), рис (*Oryza sativa*), жито (*Secale cereale*), сорго (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), просо (наприклад, пенісетум рогозовидний (*Pennisetum glaucum*), просо звичайне (*Panicum miliaceum*), просо італійське (*Setaria italica*), просо пальчасте (*Eleusine coracana*)), соняшник (*Helianthus annuus*), сафлор (*Carthamus tinctorius*), пшеницю (*Triticum aestivum*), сою (*Glycine max*), тютюн (*Nicotiana tabacum*), картоплю (*Solanum tuberosum*), арахіс (*Arachis hypogaea*), бавовну (*Gossypium barbadense*, *Gossypium hirsutum*), солодку картоплю (*Ipomoea batatas*), маніоку (*Manihot esculenta*), кава (*Coffea* spp.), кокос (*Cocos nucifera*), ананас (*Ananas comosus*), цитрусові рослини (*Citrus* spp.), какао (*Theobroma cacao*), чай (*Camellia sinensis*), банани (*Musa* spp.), авокадо (*Persea americana*), смоківницю (*Ficus casica*), гуаву (*Psidium guajava*), манго (*Mangifera indica*), оливу (*Olea europaea*), папайю (*Carica papaya*), горіх кеш'ю (*Anacardium occidentale*), макадамію (*Macadamia integrifolia*), мигдаль (*Prunus amygdalus*), цукровий буряк (*Beta vulgaris*), цукровий очерет (*Saccharum* spp.), овес, ячмінь, городини, декоративні рослини й хвойні.

Городини включають томати (*Lycopersicon esculentum*), салат (наприклад, *Lactuca sativa*), зелену квасолю (*Phaseolus vulgaris*), лімську квасолю (*Phaseolus limensis*), горошок (*Lathyrus* spp.), і членів роду *Cucumis*, такі як огірок (*C. sativus*), канталупа (*C. cantalupensis*) і мускусна диня (*C. melo*). Декоративні рослини включають азалію (*Rhododendron* spp.), гортензію (*Macrophylla hydrangea*), гібікус (*Hibiscus rosasanensis*), троянди (*Rosa* spp.), тюльпани (*Tulipa* spp.), нарциси (*Narcissus* spp.), петунії (*Petunia hybrida*), гвоздику (*Dianthus caryophyllus*), паунсетію (*Euphorbia pulcherrima*) і хризантеми. Хвойні, які можна використовувати в практичному застосуванні варіантів здійснення винаходу, включають наприклад, сосни, такі як сосна ладанна (*Pinus taeda*), сосна Еліота (*Pinus elliotii*), сосна жовта (*Pinus ponderosa*), сосна скручена широкохвойна (*Pinus contorta*) і сосна промениста (*Pinus radiata*); Дугласову ялицю (*Pseudotsuga menziesii*); тсугу західну (*Tsuga canadensis*); ялину ситхінську (*Picea glauca*); цінна деревина (*Sequoia sempervirens*); дійсні ялиці, такі як ялиця шляхетна (*Abies amabilis*) і ялиця бальзамічна (*Abies balsamea*); і кедри, такі як туя (*Thuja plicata*) і кипарисовик нутканський (*Chamaecyparis nootkatensis*). Рослини за варіантами здійснення винаходу включають оброблювані рослини (наприклад, кукурудза, люцерна, соняшник, *Brassica*, соя, бавовна, сафлор, арахіс, сорго, пшениця, просо, тютюн і т.п.), наприклад, рослини кукурудзи й сої.

Газонні трави включають, але не обмежуються цим: тонконіг однолітній (*Poa annua*); плевел однолітній (*Lolium multiflorum*); тонконіг сплюснений (*Poa compressa*); кострицю червону (*Festuca*

rubra); мітлицю волосоподібну (*Agrostis tenuis*); мітлицю болотну (*Agrostis palustris*); пирій гребінчастий (*Agropyron desertorum*); пирій вузкоколосий (*Agropyron cristatum*); кострицю жестковату (*Festuca longifolia*); тонконіг лучний (*Poa pratensis*); ежу збірну (*Dactylis glomerata*); плевел багаторічний (*Lolium perenne*); кострицю червону (*Festuca rubra*); мітлицю білу (*Agrostis alba*); тонконіг звичайний (*Poa trivialis*); кострицю овечу (*Festuca ovina*); стоколос(костер)безостний (*Bromus inermis*); кострицю високу (*Festuca arundinacea*); тимофіївку лугову (*Phleum pratense*); мітлицю бархатисту (*Agrostis canina*); бескильницю розставлену (*Puccinellia distans*); пирій Сміта (*Agropyron smithii*); бермудську траву (*Cynodon spp.*); августинову траву (*Stenotaphrum secundatum*); цойсію (*Zoysia spp.*); гречку помітну (*Paspalum notatum*); аксонопс афінський (*Axonopus affinis*); жорстку газонну траву (*Eremochloa ophiuroides*); кикую (*Pennisetum clandestinum*); паспалю приморський (*Paspalum vaginatum*); бутелю витончену (*Bouteloua gracilis*); бізонову траву (*Buchloe dactyloids*); бічний овес (*Bouteloua curtipendula*).

Рослини, що представляють інтерес включають зернові рослини, які забезпечують насіння, що представляють інтерес, оліїсті рослини й рослини із сімейства бобових. Насіння, що представляють інтерес, включають посівне зерно, таке як кукурудза, пшениця, ячмінь, рис, сорго, жито, просо й т.п. Оліїсті рослини включають бавовну, сою, сафлор, соняшник, *Brassica*, маїс, люцерну, пальмове дерево, кокос, льон, ріцину, оливу й т.п. Стручкові рослини включають боби й горох. Боби включають гуар, плоди ріжкового дерева, пажитник, соєві боби, садові боби, коров'ячі боби, квасолю золотаву, лімську квасолю, кормові боби, сочевицю, турецький горіх і т.п.

У деяких варіантах здійснення винаходу послідовності нуклеїнових кислот за варіантами здійснення можуть бути скомбіновані з будь-якою комбінацією, представляючих інтерес полінуклеотидних послідовностей для того, щоб створити рослини з очікуваним фенотипом. Наприклад, полінуклеотиди за варіантами здійснення винаходу можуть бути скомбіновані з будь-якими іншими полінуклеотидами, що кодують поліпептиди, що мають пестицидну і/або інсектицидну активність, наприклад, інші токсичні білки Bt (описані в патентах США № 5366892; 5747450; 5736514; 5723756; 5593881; і Geiser et al. (1986) Gene 48: 109), пентин (описаний у патенті США № 5981722) і т.п. Отримані комбінації також можуть включати множинні копії будь-якого представляючого інтерес полінуклеотиду. Полінуклеотиди за варіантами здійснення винаходу також можуть бути скомбіновані з будь-яким іншим геном або комбінацією генів для одержання рослин з різноманітними комбінаціями необхідних ознак, у тому числі, але не обмежуються ознаками, сприятливими для годівлі тварин, наприклад, гени високого вмісту олії (наприклад, патент США № 6232529); збалансовані амінокислоти (наприклад, хордотіоніни (патенти США № 5990389; 5885801; 5885802; і 5703049); ячмінь із високим вмістом лізину (Williamson et al. (1987) Eur. J. Biochem. 165: 99-106; і WO 98/20122) і білки з високим вмістом метіоніну (Pedersen et al. (1986) J. Biol. Chem. 261: 6279; Kiriha et al. (1988) Gene 71: 359; і Musumura et al. (1989) Plant Mol. Biol. 12: 123)); підвищена засвоюваність (наприклад, модифіковані запасні білки (заявка США, серійний № 10/053410, зареєстрована 7 листопада 2001 року); і тіоредоксини (заявка США, серійний № 10/005429, зареєстрована 3 грудня 2001 року)), усі описи яких включені тут за допомогою посилання.

Полінуклеотиди за варіантами здійснення винаходу також можуть бути скомбіновані з генетичними ознаками, відповідальними за стійкість до захворювань або гербіцидів (наприклад, гени детоксикації фумонізину (патент США № 5792931); генами авірулентності й стійкості до захворювань (Jones et al. (1994) Science 266: 789; Martin et al. (1993) Science 262: 1432; і Mindrinos et al. (1994) Cell 78:1089); мутантами ацетолататсинтази (ALS), які приводять до стійкості до гербіцидів, такі як мутації S4 і/або Hra; інгібіторами глутамінсинтази, такі як фосфінотрицин або баста (наприклад, ген bar); і стійкості до гліфосату (ген EPSPS і ген GAT, як розкрито в заявках США, серійні № 10/004357; і 10/427692); і ознаками, необхідними для обробки або переробки продукції, такими як високий вміст олії (наприклад, патент США № 6232529); модифіковані олії (наприклад, гени десатураз жирних кислот (патент США № 5952544; WO 94/11516)); модифіковані крохмалі (наприклад, пірофосфорилази ADPG (AGPaза), крохмальні синтази (SS), рогаужені ферменти крохмалю (SBE) і дерогаужені ферменти крохмалю (SDBE)); і полімери або біопластики (наприклад, патент США № 5602321; бета-кетотіолази, полігідроксибутират синтаза, і ацетоацетил-соа-редуктаза (Schubert et al. (1988) J. Bacteriol. 170: 5837-5847), яка полегшує експресію полігідроксиалканоатів (PHA)), описи яких включені тут за допомогою посилання. Також можна скомбінувати полінуклеотиди за варіантами здійснення винаходу з полінуклеотидами, що забезпечують агротехнічні особливості, такі як чоловіча стерильність (наприклад, див. патент США № 5583210), міцність стебла, час цвітіння або особливості технології трансформації, такі як регулювання клітинного циклу або

спрямований вплив на гени (наприклад, WO 99/61619; WO 00/17364; WO 99/25821), описи яких включені тут за допомогою посилання.

Ці об'єднані комбінації можуть бути створені за допомогою будь-якого способу, у тому числі, але не обмежуються цим, кросбридингу рослин за допомогою будь-якої загальноприйнятої або
 5 TOPCROSS® методики, або генетичної трансформації. Якщо особливі ознаки об'єднані за допомогою генетичної трансформації рослин, полінуклеотидні послідовності, що представляють інтерес можуть бути скомбіновані в будь-який час і в будь-якому порядку. Наприклад, трансгенна рослина, що містить один або кілька необхідних ознак, може бути використана в якості мішені для введення додаткових ознак у результаті наступної трансформації. Особливі
 10 ознаки можуть бути введені одночасно в протоколі спільної трансформації з полінуклеотидами, що представляють інтерес, забезпеченими будь-якою комбінацією трансформаційних касет. Наприклад, якщо будуть введені дві послідовності, дані дві послідовності можуть утримуватися в окремих трансформаційних касетах (транс) або втримуватися в одній і тій же трансформаційній касеті (цис). Експресія даних послідовностей може направлятися тим самим промотором, або різними промоторами. У деяких випадках може бути доцільним уведення трансформаційної касети, яка буде пригнічувати експресію полінуклеотиду, що представляє
 15 інтерес. Це може сполучатися з будь-якою комбінацією інших супресуючих касет або надекспресуючих касет для вироблення необхідної комбінації ознак у даної рослини. Додатково визнано, що полінуклеотидні послідовності можуть бути скомбіновані в необхідному місці розташування в геномі за допомогою системи сайт-специфічної рекомбінації. Див., наприклад, WO99/25821, WO99/25854, WO99/25840, WO99/25855 і WO99/25853, усе включено тут за допомогою посилання.

Композиції за варіантами здійснення знаходять застосування при захисті рослин, насіння і
 25 рослинної продукції різними шляхами. Наприклад, дані композиції можна використовувати в способі, який передбачає доставку ефективної кількості даної пестицидної композиції в оточення шкідника за допомогою процедури, обраної із групи, що включає зрошення, запилення, розкидання внесення добрив або дражування насіння.

До вступу в продаж як комерційний продукт, матеріал для розмноження рослин (плоди, бульби, цибулини, бульбоцибулини, зерна, насіння), і насамперед насіння, звичайно
 30 обробляють захисним покриттям, що містять гербіциди, інсектициди, фунгіциди, бактерициди, нематоциди, молюскоциди або суміші, що складаються із декількох цих препаратів, при необхідності разом з додатковими носіями, поверхнево-активними речовинами або сприятливими нанесенню ад'ювантами, звичайно застосовуваними в ділянки виготовлення препаративних форм для забезпечення захисту від ушкодження, викликаного бактеріями,
 35 грибами або тваринами-шкідниками. Для обробки насінного матеріалу захисне покриття може бути нанесене на насінний матеріал або шляхом просочення бульб або зерен рідким складом, або шляхом нанесення на них покриття зі складною вологою або сухою композицією. Крім того, в особливих випадках, можливе використання інших способів обробки рослин, наприклад шляхом спрямованої обробки бруньок або плодів.

Насіння рослин за варіантами здійснення винаходу, що містять нуклеотидну послідовність, кодуєючий пестицидний білок за варіантами здійснення, можуть бути оброблені захисним покриттям насіння, що містять з'єднання, призначене для обробки насіння, таке як, наприклад, каптан, карбоксин, тирам, металаксил, піримифос-метил, або інші, які звичайно застосовуються для обробки насіння. В одному варіанті здійснення винаходу захисне покриття насіння, що
 45 містить пестицидну композицію за варіантами здійснення, використовується самостійно або в комбінації з одним із захисних покриттів для насіння, звичайно застосовуваних для обробки насіння.

Визнано, що гени, кодуєчі пестицидні білки, можна використовувати для трансформації патогенних для комах організмів. До таких організмів відносяться бакуловіруси, гриби,
 50 найпростіші, бактерії й нематоди.

Гени, кодуєчі пестицидні білки за варіантами здійснення винаходу можуть бути введені за допомогою підходящого вектора в мікробний організм-хазяїн, і зазначеного хазяїна поміщають у навколишнє середовище, або на рослини, або тварин. Термін "уведений" у випадку вбудовування нуклеїнової кислоти в клітину означає "трансфекцію", або "трансформацію", або
 55 "трансдукцію" і включає інкорпорацію нуклеїнової кислоти в еукаріотичну або прокаріотичну клітину, де дана нуклеїнова кислота може бути об'єднана з геномом даної клітини (наприклад, хромосома, плазміда, пластида або мітохондріальна ДНК), перетворена в автономний реплікон, або швидкоплинно(скоротечно) експресована (наприклад, трансфікована РНК).

Можуть бути відібрані мікроорганізми-хазяї, для яких відома здатність заселяти "фітосферу" (філоплану, філосферу, ризосферу і/або ризоплану) одного або декількох культурних рослин,

що представляють інтерес. Відбирають такі мікроорганізми, які здатні успішно конкурувати в певному навколишньому середовищі з мікроорганізмами дикого типу, забезпечувати стабільну підтримку й експресію гена, експресуючого пестицидний білок і, при необхідності, забезпечувати поліпшений захист пестициду від розкладання й інактивації в навколишньому середовищі.

5 Такі мікроорганізми включають бактерії, водорості й гриби. Особливий інтерес являють собою такі мікроорганізми, як бактерії, наприклад, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Xanthomonas*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Methylius*, *Agrobacterium*, *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Leuconostoc* и *Alcaligenes*; гриби, насамперед дріжджові гриби, наприклад, *Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Kluuyveromyces*,
10 *Sporobolomyces*, *Rhodotorula* і *Aureobasidium*. Особливий інтерес являють собою такі види бактерій фітосфери, як *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Acetobacter xylinum*, *Agrobacteria*, *Rhodopseudomonas spheroides*, *Xanthomonas campestris*, *Rhizobium melioli*, *Alcaligenes entrophus*, *Clavibacter xyli* і *Azotobacter vinelandii*; а також такі види дріжджових грибів фітосфери, як *Rhodotorula rubra*, *R. glutinis*, *R. marina*, *R. aurantiaca*,
15 *Cryptococcus albidus*, *C. diffluens*, *C. laurentii*, *Saccharomyces rosei*, *S. pretoriensis*, *S. cerevisiae*, *Sporobolomyces rosues*, *S. odoratus*, *Kluuyveromyces veronae* і *Aureobasidium pollulans*. Особливий інтерес являють собою пігментовані мікроорганізми.

Існує велика кількість способів уведення гена, експресуючого пестицидний білок, у мікроорганізм-хазяїн в умовах, що забезпечують стабільну підтримку й експресію гена.
20 Наприклад, можуть бути сконструйовані експресійні касети, що включають нуклеотидні конструкції, що представляють інтерес, функціонально пов'язані з регуляторними сигналами транскрипції й трансляції для експресії нуклеотидних конструкцій, і нуклеотидної послідовності, гомологічної послідовності в організмі-хазяїні, за допомогою чого досягається інтеграція, і/або система реплікації, яка функціонує в хазяїні, за допомогою чого досягається інтеграція або
25 стабільна підтримка.

Регуляторні сигнали транскрипції й трансляції включають, але не обмежені ними, промотори, ділянки початку ініціації транскрипції, оператори, активатори, енхансери, інші регуляторні елементи, ділянки зв'язування рибосом, ініціуючий кодон, сигнали термінації й т.п. Див., наприклад, патент США № 5039523 і № 4853331; EPO 0480762 A2; Sambrook et al. (1992)
30 *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, ed. Maniatis et al. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York), далі тут "Sambrook II"; Davis et al., eds. (1980) *Advanced Bacterial Genetics* (Cold Spring Harbor Press Laboratory) Cold Spring Harbor, New York; і зазначені в цих публікаціях посилання.

Підходящі клітини-хазяї, у яких утримуючі пестицидний білок клітини можуть бути оброблені
35 для пролонгування активності даних пестицидних білків у клітині, коли оброблені клітини вносяться у середовище, що оточує цільового шкідника(ій), можуть включати як клітини прокариот, так і еукариот, але звичайно обмежені такими клітками, які не продукують речовин, токсичних для вищих організмів, таких як ссавці. Однак можуть застосовуватися організми, утворюючи токсичні для вищих організмів речовини, якщо токсини нестабільні, або якщо ступінь
40 обробки досить низька, що дозволяє виключити будь-яку можливість інтоксикації хазяїна-ссавця. У якості хазяїв особливий інтерес являють собою прокариоти й нижчі еукариоти, такі як гриби. Прикладами прокариот, як грам-негативних, так і грам-позитивних, є *Enterobacteriaceae*, такі як *Escherichia*, *Erwinia*, *Shigella*, *Salmonella* и *Proteus*; *Bacillaceae*; *Rhizobiceae*, такі як *Rhizobium*; *Spirillaceae*, такі як *Rhizobium*; *Spirillaceae*, такі як фотобактерія, *Zymomonas*, *Serratia*,
45 *Aeromonas*, *Vibrio*, *Desulfovibrio*, *Spirillum*; *Lactobacillaceae*; *Pseudomonadaceae*, такі як *Pseudomonas* і *Acetobacter*; *Azotobacteraceae* і *Nitrobacteraceae*. Серед еукариот можна назвати гриби, такі як *Phycomycetes* і *Ascomycetes*, які включають дріжджові гриби, такі як *Saccharomyces* і *Schizosaccharomyces*; і дріжджові гриби *Basidiomycetes*, такі як *Rhodotorula*, *Aureobasidium*, *Sporobolomyces* і т.п.

50 При виборі хазяїна для цілей виробництва пестицидного білка особливий інтерес являють собою такі характеристики, як легкість уведення гена пестицидного білка в хазяїна, доступність експресійних систем, ефективність експресії, стабільність даного білка в хазяїні й наявність додаткових генетичних можливостей. Характеристики, що представляють інтерес для застосування в якості пестицидної мікрокапсули, включають захисні якості для пестициду, такі
55 як товсті клітинні стінки, пігментація й внутрішньоклітинне впакування або утворення тілець-включень; спорідненість до листя; відсутність токсичності для ссавців; привабливість для шкідників при харчуванні; здатність легко викликати загибель і поглинатися без ушкодження токсину; і т.п. Інші важливі фактори включають простоту виготовлення й застосування, економічність, стабільність при зберіганні й т.п.

Організми-хазяїна, представляють особливий інтерес, включають дріжджі, такі як *Rhodotorula* spp., *Aureobasidium* spp., *Saccharomyces* spp. (такі як *S. cerevisiae*), *Sporobolomyces* spp., організми, що живуть на філоплані, такі як *Pseudomonas* spp. (такі як *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*), *Erwinia* spp., і *Flavobacterium* spp., і інші такі організми, у тому числі *Bt*, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, і т.п.

Гени, кодуєчі пестицидні білки за варіантами здійснення винаходу, можуть бути введені в мікроорганізми, які розмножуються на рослинах (епіфіти), з метою доставки пестицидних білків до потенційних шкідників-мішенів. Епіфіти, наприклад, можуть являти собою грам-позитивні або грам-негативні бактерії.

Бактерії, що утворюють колонії на коріннях, наприклад, можуть бути виділені з рослини, що представляє інтерес, за допомогою методів, відомих з рівня техніки. Зокрема, з коріння рослини може бути виділений штам *Bacillus cereus*, який утворює колонії на коріннях (див., наприклад, Handelsman et al. (1991) Appl. Environ. Microbiol. 56: 713-718). Гени, кодуєчі пестицидні білки за варіантами здійснення винаходу, можуть бути введені в *Bacillus cereus*, що утворює колонії в коріннях, стандартними методами, відомими з рівня техніки.

Гени, кодуєчі пестицидні білки, можуть бути введені, наприклад, в *Bacillus*, що утворюють колонії в коріннях, за допомогою електропорації. Зокрема, гени, кодуєчі пестицидні білки, можуть бути клоновані в човниковий вектор, наприклад, pHT3101 (Lerectius et al. (1989) FEMS Microbiol. Letts. 60: 211-218). Даний човниковий вектор pHT3101, що містить кодуєчу послідовність гена певного пестицидного білка, може, наприклад, бути трансформований в *Bacillus*, що утворює колонії в коріннях, за допомогою електропорації (Lerectius et al. (1989) FEMS Microbiol. Letts. 60: 211-218).

Експресійні системи можуть бути сконструйовані таким чином, щоб пестицидні білки секретувались поза цитоплазмою грам-негативних бактерій, таких як *E. coli*, наприклад. Переваги володіння секретуємих пестицидних білків полягають у тому, що це (1) дозволяє уникнути потенційних токсичних ефектів експресуємих пестицидних білків; і (2) поліпшує ефективність очищення пестицидного білка, у тому числі, але не обмежуються цим, підвищує ефективність відновлення й очищення білка на об'єм клітинного бульйону й знижує час і/або вартість відновлення й очищення на одиницю білка.

Можуть бути створені пестицидні білки, секретуємі в *E. coli*, наприклад, за допомогою злиття підходящого сигнального пептиду *E. coli* з амінокінцем даного пестицидного білка. Сигнальні пептиди, розпізнавані *E. coli*, можуть бути виявлені в білках, про яких уже відомо, що вони секретуються в *E. coli*, наприклад білок *OmpA* (Ghrayeb et al. (1984) EMBO J, 3: 2437-2442). *OmpA* являє собою головний білок зовнішньої мембрани *E. coli*, і в такий спосіб вважають, що його сигнальний пептид є ефективним у процесі транслокації. Також, немає необхідності в модифікації сигнального пептиду *OmpA* перед процесингом, як може бути у випадку інших сигнальних пептидів, наприклад, сигнального пептиду ліпопротеїну (Duffaud et al. (1987) Meth. Enzymol. 153: 492).

Пестицидні білки за варіантами здійснення винаходу можна піддати ферментації в бактеріальному хазяїні, і отримані оброблені бактерії використовують як мікробний аерозоль у такий же спосіб, як і штами *Bt*, використовувані в якості інсектицидних аерозолів. У випадку пестицидного білка(ів), який секретується з *Bt*, сигнал секреції вилучений або видозмінений за допомогою процедур, відомих з рівня техніки. Такі мутації і/або делеції запобігають секреції пестицидного білка(ів) у середовищі для вирощування під час процесу ферментації. Пестицидні білки зберігаються в межах клітини, і дані клітини потім обробляють для того, щоб одержати некапсульовані пестицидні білки. Для цієї мети можна використовувати будь-які підходящі мікроорганізми. *Pseudomonas* використовували для експресії токсинів *Bt* у вигляді інкапсульованих білків, і отримані клітини обробляли й розпорошували в якості інсектициду (Gaertner et al. (1993), в Advanced Engineered Pesticides, ed. Kim).

Альтернативно, пестицидні білки можна одержати в результаті введення гетерологічних генів до клітинного хазяїна. Експресія гетерологічних генів приводить у результаті, прямо або опосередковано, до внутрішньоклітинної продукції й підтримці пестициду. Потім ці клітини обробляли в умовах, які продовжують активність токсину, продукуємого в даній клітині, коли цю клітину поміщають у середовище, що оточує цільового шкідника(ій). Отриманий продукт зберігає токсичність даного токсину. Ці природно інкапсульовані пестицидні білки потім можуть бути приготовлені у формі рецептур відповідно до загальноприйнятих технологій, для застосування в середовищі, у якому перебуває цільовий шкідник, наприклад, ґрунті, воді й листі рослин. Див., наприклад, EPA 0192319, і згадані там посилання.

У варіантах здійснення винаходу трансформований мікроорганізм (у тому числі, цільні організми, клітини, спора(и), пестицидний білок(білки), пестицидний компонент(и), компонент(и)

шкідника, що виявляє вплив на, мутант(и), живі або мертві клітини й клітинні компоненти, у тому числі суміші живих і мертвих кліток і клітинних компонентів, і, у тому числі, зруйновані клітини й клітинні компоненти), або ізолюваний пестицидний білок, може бути об'єднаний з підходящим носієм у пестицидну композицію(i), а саме, наприклад, суспензію, розчин, емульсію, опудрюючий засіб, диспергуємі гранули або крупинки, змочувального порошку і емульгуємий концентрат, аерозоль або спрей, просочені гранули, ад'ювант, маса для нанесення покриття, колоїд, а також включення в капсулу в, наприклад, полімерних речовинах. Такі приготувані у формі рецептур композиції можна одержати, використовуючи такі звичайні способи, як осушення, ліофілізація, гомогенізація, екстракція, фільтрація, центрифугування, осадження або концентрування культури клітин, що містить поліпептид.

Такі композиції, розкриті вище, можуть бути отримані в результаті додавання поверхнево-активної речовини, інертного носія, консерванту, зволожуючої речовини, стимулятора апетиту, атрактанту, інкапсулюючої речовини, зв'язувальної речовини, емульгуючої речовини, барвника, речовини, що захищає від УФ, буфера, агента, що забезпечує плинність, або добрива, донорів мікронутрієнтів, або інших композицій, які впливають на ріст рослини. Один або кілька сільськогосподарських хімікатів, що включають, але не обмежуваних цим, гербіциди, інсектициди, фунгіциди, бактерициди, нематодциди, моллюскоциди, аскарициди, регулятори росту рослин, засобів, що допомагають при зборі врожаю, і добрива, можуть бути скомбіновані з носіями, сурфактантами або ад'ювантами, звичайно застосовуваними в ділянки розробки подібних композицій, або іншими компонентами, для полегшення обробки й застосування продукту проти певних цільових шкідників. Підходящі носії й ад'юванти можуть бути твердими або рідкими і являють собою речовини, звичайно застосовувані в технології готування препаративних форм, наприклад натуральні або регенеровані мінеральні речовини, розчинники, диспергуючі агенти, змочувальні агенти, речовини, що підвищують клейкість, зв'язувальні речовини або добрива. Діючі активні речовини за варіантами здійснення винаходу звичайно застосовуються у формі композицій і можуть застосовуватися на оброблюваній посівній площі, рослині або насінні. Наприклад, композиції за варіантами здійснення винаходу можна застосовувати на зернах при підготовці до зберігання, або під час зберігання в бункері для зерна або силосній вежі, і т.п. Композиції за варіантами здійснення винаходу можна застосовувати одночасно або по черзі з іншими з'єднаннями. Методи застосування діючої активної речовини за варіантами здійснення винаходу або агрохімічної композиції за варіантами здійснення винаходу, яка містить щонайменше один пестицидний білок, продукуємий бактеріальними штамами, включають, але не обмежуються ними, листову підгодівлю, дражування насіння і ґрунтову підгодівлю. Число застосувань і доза внесення залежать від інтенсивності засмічення відповідним шкідником.

Підходящі поверхнево-активні речовини включають, але не обмежуються ними, аніонні з'єднання, такі як, наприклад, карбоксилат металу; карбоксилат довголанцюгової жирної кислоти; N-ацилсаркозинат; моно- або діефіри пірофосфорної кислоти з етоксилатами жирних спиртів або солі таких ефірів; сульфати жирних спиртів, такі як додецилсульфат натрію, октадецилсульфат натрію, або цетилсульфат натрію; етоксильовані сульфати жирних кислот; сульфати етоксильованих алкілфенолів; лігнінсульфонати; нафтові сульфонати; алкіларилсульфонати, такі як алкілбензолсульфонати, або нижчі алкілнафталінсульфонати, наприклад, бутилнафталінсульфат; солі сульфонованих нафталінформальдегід конденсатів; солі сульфонованих фенолформальдегід конденсатів; більш комплексні сульфонати, такі як амідсульфонати, наприклад, сульфонований продукт конденсації олеїнової кислоти й N-метилтаурину; або діалкілсульфосукцинати, наприклад, сульфат натрію діоктилсукцину. Неіонні реагенти включають продукти конденсації ефірів жирних кислот, спиртів жирного ряду, амідів жирних кислот або жирно-алкіл- або алкенілзаміщених фенолів з етиленоксидом, жирних ефірів багатоатомних спиртів, наприклад сорбітанові ефіри жирної кислоти; продукти конденсації таких ефірів з етиленоксидом, наприклад поліоксиетиленсорбітанові ефіри жирних кислот, блок-співполімери етиленоксиду й пропіленоксиду, ацетиленгліколі, такі як 2,4,7,9-тетраетил-децин-4,7-діол, або етоксильовані гліколі ацетиленового ряду. Приклади катіонних поверхнево-активних речовин включають, наприклад, аліфатичний моно-, ди- або поліамін, такий як ацетат, нафтенат або олеат; або кисеньутримуючий амін, такий як аміноксид поліоксиетиленаалкіламіну; утримуючий амідні зв'язки амін, отриманий у результаті конденсації карбонової кислоти з ди- або поліаміном; або четвертинну амонієву сіль.

Приклади інертних речовин включають, але не обмежуються ними, неорганічні мінерали, такі як каолін, філосилікати, карбонати, сульфати, фосфати, або ботанічні матеріали, такі як пробка, кукурудзяні качани, стерті в порошок, шкарлупа горіхів арахісу, рисова лушпайка й шкарлупа волоських горіхів.

Композиції за варіантами здійснення винаходу можуть бути отримані у формі, придатної для безпосереднього використання, або у вигляді концентрату первинної композиції, яка вимагає розведення у відповідній кількості води або іншого розчинника перед застосуванням. Концентрація пестициду може варіювати залежно від природи даної композиції й, особливо, від того, є вона концентратом або формою, уже готовою до безпосереднього застосування. Композиція містить від 1 до 98 % твердого або рідкого інертного носія й від 0 до 50 %, або від 0,1 до 50 % сурфактанту. Ці композиції будуть застосовуватися в дозі відповідно до норми, установлені для комерційного продукту, наприклад, приблизно 0,01-5,0 фунтів на акр у випадку сухої форми й приблизно 0,01-10 пінт на акр у випадку рідкої форми.

У подальших варіантах здійснення винаходу даної композиції, також як і трансформовані мікроорганізми й пестицидні білки за варіантами здійснення, можуть бути оброблені перед готуванням складу для пролонгування пестицидної активності при застосуванні в середовищі, що оточує цільового шкідника, за умови, якщо ця попередня обробка не є пагубною для пестицидної активності. Така обробка може бути проведена як хімічними, так і/або фізичними методами, що не виявляють небажаного впливу на властивості композиції(ій). Прикладами хімічних реагентів є, але не обмежуються ними, галогенеручі агенти; альдегіди, такі як формальдегід і глутаральдегід; антиінфекційні агенти, такі як зефіранхлорид; спирти, такі як ізопропанол і етанол; і гістологічні фіксатори, такі як фіксатор Боуїна й фіксатор Хеллі (див., наприклад, Humason (1967) *Animal Tissue Techniques* (W.H. Freeman and Co.)).

В інших варіантах здійснення винаходу може бути вигідна обробка поліпептидів токсину Cry протеазою, наприклад трипсином, для активації білка перед застосуванням композиції пестицидного білка за варіантами здійснення в середовищі, що оточує цільового шкідника. Способи активації протоксину сериновими протеазами добре відомі з рівня техніки. Див., наприклад, Cooksey (1968) *Biochem. J.* 6: 445-454 і Carroll and Ellar (1989) *Biochem. J.* 261: 99-105, основоположення яких включені тут за допомогою посилання. Наприклад підходячий протокол активації включає, але не обмежується цим, об'єднання активованого поліпептиду, наприклад, очищеного нового поліпептиду Cry (наприклад, що має амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 2), і трипсину в масовому співвідношенні 1/100 білок/трипсин в 20 нМ NaHCO_3 , pH 8, і переварювання даного зразка при 36 °C протягом 3 годин.

Дані композиції (включаючи трансформовані мікроорганізми й пестицидні білки за варіантами здійснення винаходу) можуть бути внесені в середовище, що оточує комаху-шкідника, за допомогою, наприклад, обприскування, дрібнокапельного обприскування, запилення, розкидання, нанесення захисного покриття або поливу, уведення в або на поверхню ґрунту, включення до складу іригаційних вод, за допомогою обробки насіння або внесення розбризкуванням або запиленням під час, коли шкідник почав з'являтися, або перед часом появи шкідника, у якості захисних заходів. Наприклад, для захисту зерна під час зберігання пестицидний білок і/або трансформовані організми за варіантами здійснення винаходу можуть бути змішані із зерном. У цілому важливо забезпечити гарний контроль шкідників на ранніх стадіях росту рослини, оскільки цей час, коли рослина може бути найбільше серйозно ушкоджена. Якщо це необхідно, композиції за варіантами здійснення винаходу можуть містити інший пестицид. В одному варіанті здійснення винаходу композиція наноситься безпосередньо на ґрунт, під час посадки, у гранульованій формі композиції носія й мертвих кліток штаму *Bacillus*, або трансформованих мікроорганізмів за варіантами здійснення. Інший варіант здійснення винаходу являє собою гранульовану форму композиції, що містить агрохімікат, такий як, наприклад, гербіцид, інсектицид, добриво, інертний носій і мертві клітини штаму *Bacillus* або трансформовані мікроорганізми за варіантами здійснення.

Фахівцеві в даній галузі буде зрозуміло, що не всі сполуки є однаково ефективними відносно всіх шкідників. Сполуки за варіантами здійснення винаходу демонструють активність проти комах-шкідників, що може включати важливих з економічної точки зору шкідників сільськогосподарських, лісових, оранжерейних, шкідників розсади, декоративних рослин, їжі й деревини, здоров'я населення й тварин, комунальних і комерційних приміщень і споруджень, побутових і шкідників продуктів, що зберігаються. Комахи-шкідники включають комах, обраних із загону твердокрилих (Coleoptera), двокрилих (Diptera), перетинчастокрилих комах (Hymenoptera), лускокрилих (Lepidoptera), пухоеди (Mallophaga), равнокрилих (Homoptera), клопи (Hemiptera), прямокрилих (Orthoptera), бахромчатокрилих (Thysanoptera), шкірястокрилих (Dermaptera), терміти (Isoptera), воші (Anoplura), блохи (Siphonaptera), волосистокрилих (Trichoptera), і т.п., зокрема лускокрилих (Coleoptera) і лускокрилих (Lepidoptera).

Личинки загону лускокрилих (Lepidoptera) включають, але не обмежуються цим, похідних хробаків, озимих хробаків, п'ядаків і совок сімейства ночниць *Spodoptera frugiperda* JE Smith (совка трав'яна); *S. exigua* Hübner (совка мала); *S. litura* Fabhcius (азіатська бавовняна совка,

- кластерна гусениця); *Mamestra configurata* Walker (гусениця совки латуквої); *M. brassicae* Linnaeus (совка капустяна); *Agrotis ipsilon* Hufnagel (совка-іпсилон); *A. orthogonia* Morrison (совка прямокутна); *A. subterranea* Fabricius (гусениця озимої совки); *Alabama argillacea* Hübner (гусениця совки бавовняної американської); *Trichoplusia ni* Hübner (совка капустяна);
- 5 *Pseudoplusia includens* Walker (п'ядак соєвий); *Anticarsia gemmatilis* Hübner (гусениця оксамитових бобів); *Hyponomeuta scabra* Fabricius (зелений конюшиновий хробак); *Heliothis virescens* Fabricius (тютюнова листовійка-брунькоїд); *Pseudaletia unipuncta* Haworth (совка лугова); *Aethes mindara* Barnes і McDunnough (совка, що підгризає кору); *Euxoa messoria* Harris (совка Харриса); *Earias insulana* Boisduval (шиповатий хробак); *E. vittella* Fabricius (плямистий хробак); *Helicoverpa armigera* Hübner (коробковий хробак); *H. zea* Boddie (совка бавовняна або коробковий хробак);
- 10 *Melanchra picta* Harris (совка); *Egira* (*Xylomyges*) *curialis* Grote (цитрусова совка); *Richia albicosta* Smith (західна совка бобових); свердлильників, чохлоносиків, гусениць, що випускають павутину, шишкових хробаків, і шкідників, що скелетують листи із сімейства вогнівок *Ostrinia nubilalis* Hübner (метелик кукурудзяний); *Amyelois transitella* Walker (гусениця, що ушкоджує цитрусові); *Anagasta kuehniella* Zeller (вогнівка мірошницька); *Cadra cautella* Walker (вогнівка сухофруктова); *Chilo suppressalis* Walker (вогнівка азіатська стеблова); *C. partellus*, (свердлильник сорго); *Corcyra cephalonica* Stainton (вогнівка рисова); *Crambus caliginosellus* Clemens (гусениця, що будує павутинне гніздо в коріннях зернових); *C. teterrellus* Zincken (гусениця, що будує павутинне гніздо в коріннях мятлика); *Snaphalocrocis medinalis* Guenée (рисова листовійка); *Desmia funeralis* Hübner (вогнівка виноградна); *Diaphania hyalinata* Linnaeus (гусениця динячого метелика); *D. nitidalis* Stoll (вогнівка); *Diatraea grandiosella* Dyar (вогнівка кукурудзяна південно-західна); *D. saccharalis* Fabricius (точильник цукрового очерету); *Eoreuma loftini* Dyar (мексиканський рисовий точильник); *Ephestia elutella* Hübner (тютюнова (шоколадна) вогнівка); *Galleria mellonella* Linnaeus (міль воскова більша); *Herpetogramma licarsisalis* Walker (луговий метелик); *Homoeosoma electellum* Hulst (вогнівка соняшникова); *Elasmopalpus lignosellus* Zeller (малий точильник стебел кукурудзи); *Achroia grisella* Fabricius (міль дрібна вощана); *Loxostege sticticalis* Linnaeus (метелик лугової); *Orthaga thyrisalis* Walker (павутинна міль чайного дерева); *Maruca testulalis* Geyer (вогнівка акацієва); *Plodia interpunctella* Hübner (міль індійська борошняна); *Scirpophaga incertulas* Walker (жовтий стеблевий точильник); *Udea rubigalis* Guenée (вогнівка іржаво-коричнева); і листовійок(листоверок) гусениць, листовійок-брунькоєдів, зернових гусениць і плодових гусениць із сімейства листовійок *Acleris gloverana* Walsingham (західна чорноголова листовійка); *A. variana* Fernald (східна чорноголова листовійка); *Archips argyrospila* Walker (листовійка плодових дерев); *A. rosana* Linnaeus (листовійка різана золотава); і інші види *Archips*, *Adoxophyes orana* Fischer von Rösslerstamm (літня фруктова листовійка); *Cochylis hospes* Walsingham (вогнівка соняшникова смугаста); *Cydia latiferreana* Walsingham (ліщиновий хробак); *C. pomonella* Linnaeus (плодожерка яблунова); *Platynota flavedana* Clemens (листовійка строката); *P. stultana* Walsingham (листовійка всеїдна); *Lobesia botrana* Denis & Schiffermüller (листовійка гронова виноградна); *Spilonota ocellana* Denis & Schiffermüller (листовійка брунькова плямиста); *Endopiza viteana* Clemens (листовійка виноградна); *Eupoecilia ambiguella* Hübner (вертуха(вертунця, вертунья) виноградна); *Bonagota salubricola* Meyrick (бразильська яблунова листовійка); *Grapholita molesta* Busck (листовійка східна персикова); *Suleima helianthana* Riley (листовійка брунькова соняшникова); *Argyrotaenia* spp.; *Choristoneura* spp.

- Відібрані інші сільськогосподарські шкідники загону лускокрилі (Lepidoptera) включають, але не обмежуються ними, *Alsophila pometaria* Harris (п'ядак осінній); *Anarsia lineatella* Zeller (міль фруктова смугаста); *Anisota senatoria* J. E. Smith (оранжева смугаста гусениця, що харчується листами дуба); *Antheraea pernyi* Guérin-Meneville (китайський дубовий шовкопряд); *Bombyx mori* Linnaeus (шовковичний шовкопряд); *Bucculatrix thurberiella* Busck (гусениця, що ушкоджує листи бавовни); *Colias eurytheme* Boisduval (гусениця люцернова); *Datana integerrima* Grote & Robinson (гусениця-шкідник волоського горіха); *Dendrolimus sibiricus* Tschetwerikov (шовкопряд шовковичний сибірський); *Ennomos subsignaria* Hübner (гусениця п'ядака в'яза); *Erannis tiliaria* Harris (п'ядак липовий); *Euproctis chrysorrhoea* Linnaeus (метелик златогуз); *Harrisina americana* Guérin-Meneville (шкідник, що скелетує виноградні листи); *Hemileuca oliviae* Cockrell; *Hyphantria cunea* Drury (американський білий метелик); *Keiferia lycopersicella* Walsingham (томатна міль-мінер); *Lambdina fiscellaria fiscellaria* Hulst (п'ядак тсуги канадської); *L. fiscellaria lugubrosa* Hulst (п'ядак тсуги західної); *Leucoma salicis* Linnaeus (шовкопряд вербовий); *Lymantria dispar* Linnaeus (непарний шовкопряд); *Manduca quinquemaculata* Haworth (п'ятиточковий бражник, бражник п'ятиточковий, бражник томатний); *M. sexta* Haworth (бражник томатний, бражник тютюновий); *Operophtera brumata* Linnaeus (п'ядак зимовий); *Paleacrita vernata* Peck (п'ядак весняний); *Papilio cresphontes* Cramer (гігантський метелик-вітрянник); *Phryganidia californica* Packard

(каліфорнійська гусениця, що харчується листами дуба); *Phyllocnistis citrella* Stainton (цитрусова міль-мінер); *Phyllonorycter blancardella* Fabricius (плодова нижньомінуюча міль-пестрянка); *Pieris brassicae* Linnaeus (білявка капустяна); *P. rapae* Linnaeus (білявка ріпна); *P. napi* Linnaeus (білявка бруквяна); *Platyptilia carduidactyla* Riley (пальцекрыла??) міль артишокова; *Plutella xylostella* Linnaeus (міль капустяна); *Pectinophora gossypiella* Saunders (рожевий коробковий хробак бавовнику); *Pontia protodice* Boisduval & Leconte (гусениця метелика-капусниці південної); *Sabulodes aegrotata* Guenée (п'ядак всеїдний); *Schizura concinna* J.E. Smith (червона горбата гусениця); *Sitotroga cerealella* Olivier (міль зернова); *Thaumetopoea pityocampa* Schiffermuller (гусениця соснового шовкопряда); *Tineola bisselliella* Hummel (міль кімнатна); *Tuta absoluta* Meyrick (томатна мінуюча мушка); *Yponomeuta padella* Linnaeus (горностаєва міль); *Heliothis subflexa* Guenée; *Malacosoma* spp. і *Orgyia* spp.

Личинки й дорослі особини інших твердокрилих (Coleoptera), що представляють інтерес включають жуків із сімейств ложноносики, зерновки і довгоносики (у тому числі, але не обмежуються ними, *Anthonomus grandis* Boheman (довгоносик бавовняний); *Lissorhoptrus oryzophilus* Kuschel (довгоносик рисовий водяник); *Sitophilus granarius* Linnaeus (довгоносик комірний звичайний); *S. oryzae* Linnaeus (довгоносик рисовий); *Hypera punctata* Fabricius (довгоносик точковий); *Cylindrocopturus adspersus* Leconte (довгоносик стеблевий соняшниковий); *Smicronyx fulvus* Leconte (червоний довгоносик насінний соняшниковий); *S. sordidus* Leconte (сірий довгоносик насінний соняшниковий); *Sphenophorus maidis* Chittenden (довгоносик кукурудзяний)); земляних блошок, листоїда *Diabrotica*, личинок, що ушкоджують коріння, листоїдів, колорадських жуків й мінуючих мушок у сімействі листоїдів (у тому числі, але не обмежуються ними, *Leptinotarsa decemlineata* Say (колорадський жук); *Diabrotica virgifera virgifera* Leconte (західний кукурудзяний жук); *D. barberi* Smith & Lawrence (блішка довговуса); *D. undecimpunctata howardi* Barber (блішка одинадцятиточкова Говарда); *Chaetocnema pulicaria* Melsheimer (кукурудзяний жук-блішка); *Phyllotreta cruciferae* Goeze (кукурудзяний жук-блішка); *Colaspis brunnea* Fabricius (виноградний листоїд); *Oulema melanopus* Linnaeus (п'явиця червоногруда); *Zygogramma exclamatoris* Fabricius (совка соняшникова оклична)); жуків із сімейства сонечка(божьи коровки) (у тому числі, але не обмежуються ними: *Epilachna varivestis* Mulsant (мексиканська зерновка бобова); хрущів і інших жуків із сімейства пластинчатоусих (у тому числі, але не обмежуються ними: *Popillia japonica* Newman (хрущик японський); *Cyclocephala borealis* Arrow, личинка хруща); *C. immaculata* Olivier (личинка хруща); *Rhizotrogus majalis* Razoumowsky; *Phyllophaga crinita* Burmeister (личинка хруща); *Ligyris gibbosus* De Geer (жук морквяний)); шкіроїдів із сімейства шкіроїдів; проволочників із сімейства щелкунов, *Eleodes* spp., *Melanotus* spp.; *Conoderus* spp.; *Limonius* spp.; *Agriotes* spp.; *Ctenicera* spp.; *Aeolus* spp.; жуків короїдів із сімейства короїдів і жуків із сімейства чернотюлок.

Являють собою інтерес дорослі й незрілі особини загону двокрили (Diptera), у тому числі мушки-мінери *Agromyza parvicornis* Loew (кукурудзяна міль-пестрянка); комарі (у тому числі, але не обмежуються ними: *Contarinia sorghicola* Coquillett (галлиця соргова); *Mayetiola destructor* Say (гессенська мушка); *Sitodiplosis mosellana* Géhin (галлиця злакова оранжева); *Neolasioptera murtfeldtiana* Felt (соняшникова мушка); плодові мушки (пестрокрылки), *Oscinella frit* Linnaeus (злакові мушки); безногі личинки (у тому числі, але не обмежуються ними: *Delia platura* Meigen (личинка мухи паросткової); *D. coarctata* Fallen (муха озима); і інші *Delia* spp., *Meromyza americana* Fitch (личинка американської меромизи); *Musca domestica* Linnaeus (муха кімнатна); *Fannia canicularis* Linnaeus, *F. femoralis* Stein (муха кімнатна мала); *Stomoxys calcitrans* Linnaeus (справжні мухи)); мухи звичайні польові, жигалки коров'ячі малі, мухи м'ясні сині, *Chrysomya* spp.; *Phormia* spp.; і інші мухоподібні літаючі шкідники, гедзі *Tabanus* spp.; носоглоткові гедзі *Gastrophilus* spp.; *Oestrus* spp.; гедзі бичачі *Hypoderma* spp.; оленячі гедзі *Chrysops* spp.; *Melophagus ovinus* Linnaeus (кровососки); і інші *Brachycera*, москіти *Aedes* spp.; *Anopheles* spp.; *Culex* spp.; попелиця чорна *Prosimum* spp.; *Simulium* spp.; кровососні мошки, москіти, плодові комаріки й інші *Nematocera*.

У число шкідників, що представляють інтерес, входять дорослі особини й личинки загонів справжніх напівжорстких клопів (Hemiptera) і рівнокрилих хоботних (Homoptera), такі як, але не обмежуються ними, хермеси із сімейства *Adelgidae*, клопи спінняки із сімейства *Miridae*, цикади із сімейства *Cicadidae*, кобилочки, *Empoasca* spp.; із сімейства *Cicadellidae*, дельфациди із сімейств *Cixiidae*, *Flatidae*, *Fulgoroidea*, *Issidae* і *Delphacidae*, бодушки із сімейства *Membracidae*, справжні листоблішки із сімейства *Psyllidae*, білокрылки із сімейства *Aleyrodidae*, справжні попелиці із сімейства *Aphididae*, філоксера із сімейства *Phylloxeridae*, повстярі із сімейства *Pseudococcidae*, щитівки із сімейств *Asterolecanidae*, *Coccidae*, *Dactylopiidae*, *Diaspididae*, *Eriosoccidae*, *Ortheziidae*, *Phoenicococcidae* і *Margarodidae*, мереживниці із сімейства *Tingidae*, щитники із сімейства *Pentatomidae*, земляні клопи, *Blissus* spp.; і інші наземники із сімейства

Lygaeidae, пінниці із сімейств Cercopidae, клоп-ромбовик сумний із сімейства Coreidae, і клопи постільні й червоний бавовняний клоп із сімейства Pyrrhocoridae.

Важливі із сільськогосподарської точки зору члени загону рівнокрили (Homoptera) додатково включають, але не обмежуються ними: *Acyrtosiphon pisum* Harris (попелиця горохова); *Aphis craccivora* Koch (попелиця люцернова); *A. fabae* Scopoli (попелиця бурякова); *A. gossypii* Glover (попелиця бавовняна, тля баштанна); *A. maidiradicis* Forbes (попелиця кукурудзяна коренева); *A. pomi* De Geer (попелиця яблунева); *A. spiraeicola* Patch (попелиця спіреєва); *Aulacorthum solani* Kaltentbach (попелиця картопляна звичайна); *Chaetosiphon fragaefolii* Cockerell (попелиця сунична американська); *Diuraphis noxia* Kurdjumov/Mordvilko (попелиця пшенична російська); *Dysaphis plantaginea* Raaserini (попелиця яблунева рожева); *Eriosoma lanigerum* Hausmann (попелиця кров'яна яблунева); *Brevicoryne brassicae* Linnaeus (попелиця капустяна); *Hyalopterus pruni* Geoffroy (попелиця борошніста сливова); *Lipaphis erysimi* Kaltentbach (попелиця гірчична листова); *Metopolophium dirhodum* Walker (попелиця злакова); *Macrosiphum euphorbiae* Thomas (попелиця картопляна більша); *Myzus persicae* Sulzer (попелиця оранжерейна, тля перськова); *Nasonovia ribisnigri* Mosley (попелиця цикорієво-смородинова); *Pemphigus* spp. (тлі кореневі й галлові тлі); *Rhopalosiphum maidis* Fitch (попелиця кукурудзяна); *R. padi* Linnaeus (попелиця черемхова звичайна); *Schizaphis graminum* Rondani (попелиця злакова звичайна); *Sipha flava* Forbes (попелиця жовта цукрового очерету); *Sitobion avenae* Fabricius (попелиця зернова англійська); *Therioaphis maculata* Buckton (попелиця конюшинова); *Toxoptera aurantii* Boyer de Fonscolombe (попелиця помаранчева); *T. citricida* Kirkaldy (попелиця цитрусова); *Adelges* spp. (хермеси); *Phylloxera devastatrix* Pergande (філлоксера гикори); *Bemisia tabaci* Gennadius (білокрилка тютюнова, білокрилка бататова); *B. argentifolii* Bellows & Perring (білокрилка магнолієва); *Dialeurodes citri* Ashmead (білокрилка цитрусова); *Trialeurodes abutiloneus* i *T. vaporariorum* Westwood (білокрилка теплична); *Empoasca fabae* Harris (цикадка картопляна); *Laodelphax striatellus* Fallen (цикадка темна); *Macrolestes quadrilineatus* Forbes (айстрова цикадка); *Nephotettix cincticeps* Uhler (цикадка зелена); *N. nigropictus* Stål (цикадка рисова); *Nilaparvata lugens* Stål (коричнева цикадка); *Peregrinus maidis* Ashmead (цикадка кукурудзяна); *Sogatella furcifera* Horvath (білобока цикадка); *Sogatodes orizicola* Muir (рисова цикадка); *Typhlocyba pomaria* Mcatee (цикадка яблунева); *Erythroneoura* spp. (цикадка виноградна); *Magicicada septendecim* Linnaeus; *Icerya purchasi* Maskell (червець австралійський жолобчастий); *Quadraspidiotus perniciosus* Comstock (щитівка каліфорнійська); *Planococcus citri* Risso (борошністий червець виноградинний); *Pseudococcus* spp. (інша група червців борошністих); *Sacopsylla pyricola* Foerster (листоблішка грушева жовта); *Trioza diospyri* Ashmead (листоблішка хурмова).

Важливі із сільськогосподарської точки зору види із загону напівтвердокрилих клопів (Hemiptera) включають, але не обмежуються ними, *Acrosternum hilare* Say (щитники); *Anasa tristis* De Geer (клоп-ромбовик сумний); *Blissus leucopterus leucopterus* Say (клоп постільний); *Corythucha gossypii* Fabricius (клоп бавовняний); *Cyrtopeltis modesta* Distant (клоп томатний); *Dysdercus suturellus* Herrich-Schäffer (червоний бавовняний клоп); *Euschistus servus* Say (коричневий смердючий клоп); *E. variolarius* Palisot de Beauvois (плямистий смердючий клоп); *Graptostethus* spp. (група наземників); *Leptoglossus corculus* Say (клоп, що ушкоджує черешки соснових шишок); *Lygus lineolaris* Palisot de Beauvois (клоп трав'яної); *L. hesperus* Knight (клоп трав'яний західний); *L. pratensis* Linnaeus (клоп луговий звичайний); *L. rugulipennis* Poppius (клоп трав'яний європейський); *Lygocoris pabulinus* Linnaeus (звичайний зелений твердопанцирні клоп); *Nezara viridula* Linnaeus; *Oebalus pugnax* Fabricius (щитник рисовий); *Oncopeltus fasciatus* Dallas (клоп великий молочайний); *Pseudatomoscelis seriatus* Reuter (бавовняний шкідник).

Більше того, варіанти здійснення даного винаходу можуть бути ефективними у відношенні напівтвердокрилих клопів (Hemiptera) таких як, *Calocoris porvegicus* Gmelin (суничний клоп); *Orthops campestris* Linnaeus; *Plesiocoris rugicollis* Fallen (клопик яблуневий); *Cyrtopeltis modestus* Distant (клоп томатний); *Cyrtopeltis notatus* Distant (клоп-сосальщик); *Spanagonicus albofasciatus* Reuter; *Diaphnocoris chlorionis* Say (клоп-сніпняк гледичії солодкої); *Labopidicola allii* Knight (цибульний клоп-сніпняк); *Pseudatomoscelis seriatus* Reuter (бавовняний клоп); *Adelphocoris rapidus* Say (клоп швидкозростаючих рослин); *Poecilopsus lineatus* Fabhcius; *Nysius ericae* Schilling (нізіус вересковий); *Nysius raphanus* Howard (нізіус вересковий); *Nezara viridula* Linnaeus; *Eurygaster* spp.; *Coreidae* spp.; *Pyrrhocoridae* spp.; *Tinidae* spp.; *Blotomatidae* spp.; *Reduviidae* spp.; i *Cimicidae* spp.

Також ураховуються дорослі особини й личинки загону Acari (кліщі), такі як *Aceria tosichella* Keifer; *Petrobia latens* Müller; кліщик павутинний і червоний кліщик сімейства Tetranychidae, *Ranonychus ulmi* Koch (червоний плодовий кліщ); *Tetranychus urticae* Koch (кліщик павутинний двохплямистий); *T. mcdanieli* McGregor (кліщ Mcdaniel); *T. cinnabarinus* Boisduval (червоний

павутинний кліщ); *T. turkestan* Ugarov & Nikolski (кліщик павутинний атлантичний); плоскі кліщі сімейства *Tenuipalpidae*, *Brevipalpus lewisi* McGregor (цитрусовий плоский кліщ); галлові й брунькові кліщі сімейства *Eriophyidae*, і інші кліщі, що харчуються листям, і кліщі, важливі для здоров'я людини й тварин, а саме, кліщі домашнього пилу сімейства *Epidermoptidae*, железници сімейства *Demodicidae*, зернові кліщі сімейства *Glycyphagidae*, кліщі заgonу *Ixodidae*. *Ixodes scapularis* Say (чорноногий кліщ); *I. holocyclus* Neumann (австралійський кліщ, що викликає параліч); *Dermacentor variabilis* Say (іксодовий кліщ изменчатий); *Amblyomma americanum* Linnaeus (іксодовий кліщ *Amblyomma*); і струпьєві й коростяві кліщі сімейств *Psoroptidae*, *Pyemotidae*, і *Sarcoptidae*.

Становлять інтерес комахи-шкідники заgonу щетинкохвосток (*Thysanura*), такі як *Lepisma saccharina* Linnaeus (чешуйниця звичайна); *Thermobia domestica* Packard (чешуйниця домашня).

Додаткові досліджені членистоногі шкідники включають павуків заgonу *Araneae*, таких як *Loxosceles reclusa* Gertsch & Mulaik (коричневий павук затворник); і *Latrodectus mactans* Fabricius (павук "чорна вдова"); і багатоніжок заgonу *Scutigera*, таких як *Scutigera coleoptrata* Linnaeus (мухоловка звичайна).

Пестицидна активність композицій за варіантами здійснення винаходу може бути протестована на комах-шкідниках на ранніх стадіях розвитку, наприклад, на стадії личинки або інших незрілих форм. Комах можуть розводити в повній темряві при температурі від приблизно 20 °C до приблизно 30 °C, і відносної вологості від приблизно 30 % до приблизно 70 %. Біологічні аналізи можна проводити як описано в Czaplak and Lang (1990) J. Econ. Entomol. 83(6): 2480-2485. Методи розведення личинок комах і біологічного аналізу добре відомі Фахівцєві в даній галузі.

Фахівцєві в даній галузі добре відома велика різноманітність біологічних методів аналізу. Загальні процедури включають додавання експериментального з'єднання або організму у вихідний раціон у контейнер закритого типу. Пестицидну активність можна виміряти по, але не обмежуються цим, змінам у смертності, втраті маси тіла, тяжінню, несприйнятливості й іншим поведінковим або фізичним змінам після годівлі й впливу протягом належного проміжку часу. Описані тут біологічні аналізи можна використовувати для будь-яких комах-шкідників, яких вигодовують на стадії личинки або дорослої особини.

Наступні приклади представлені як ілюстрація, а не з метою обмеження.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Приклад 1: Біологічне тестування пестицидної активності токсину *B. thuringiensis* відносно відібраних комах

Біологічні тестування проводили для оцінки ефектів інсектицидного токсичного пептиду Bt, представленого в послідовності SEQ ID NO: 2, на різних комах-шкідниках заgonу лускокрилі, як презентовано в Таблиці 1. Аналіз харчування проводили в штучному живильному середовищі, що включає даний інсектицидний білок. Даний інсектицидний білок застосовували місцево, використовуючи штучне живильне середовище, специфічне для лускокрилих. Токсин вводили в дозі 0,3 мкг на 25 мкл зразка в лунку, і залишали висушитися. Даний білок перебуває в 10 мм карбонатному буфері при значенні pH, рівному 10. У кожен лунку поміщали по одній новонародженій личинці для вигодовування без обмежень протягом 5 днів. Позитивні результати виражені у вигляді реакцій личинок, таких як зупинка в рості і/або загибель. Результати розглядали як негативні, якщо личинки були схожі з негативним контролем, у чий раціон був уведений тільки вищевказаний буфер.

Таблиця 1

Результати біологічного тестування харчування для SEQ ID NO: 2

| Минуле тестування комахи | Результат |
|--|-----------|
| Метелик кукурудзяний (<i>Ostrinia nubilalis</i>) | + |
| Совка бавовняна (<i>Helicoverpa zea</i>) | + |
| Совка Іпсилон (<i>Agrotis ipsilon</i>) | + |
| Совка трав'яна (<i>Spodoptera frugiperda</i>) | + |
| Вогнівка кукурудзяна південно-західна (<i>Diatraea grandiosella</i>) | + |
| Західна совка бобових (<i>Richia albicosta</i>) | + |
| П'ядак соєвий (<i>Pseudoplusia includens</i>) | + |
| Гусениця оксамитових бобів (<i>Anticarsia gemmatilis</i>) | + |

Приклад 2: Визначення IC₅₀

Для визначення IC_{50} були проведені біологічні тестування інсектицидного токсичного пептиду, представленого в SEQ ID NO: 2, на метелику кукурудзяному (*Ostrinia nubilalis*), совці бавовняної (*Helicoverpa zea*), совці-іпсилон (*Agrotis ipsilon*), совці трав'яної (*Spodoptera frugiperda*), вогнівці кукурудзяної південно-західної (*Diatraea grandiosella*) і Western bean cutworm (західна совка бобових) (*Richia albicosta*). Аналіз харчування проводили в штучному живильному середовищі, що включає даний інсектицидний білок. Даний інсектицидний білок був розведений в 10 мМ карбонатному буфері зі значенням pH 10, і кормом комахи, щоб одержати кінцеву концентрацію токсину 10000, 1000, 100, 10 і 1 ppm (частин на мільйон). У кожен лунку поміщали по одній новонародженій личинці для вигодовування без обмежень протягом 5 днів. Кожний біоаналіз проводили у восьми дублікатах для кожної дози, і дане біологічне тестування відтворювали три рази. Результати виражені як IC_{50} для смертності і/або як IC_{50} , визначаючи масу тіла личинок, що вижили, при кожній концентрації токсину.

Результати досліджень IC_{50} для інсектицидного токсичного пептиду представлено в Таблиці 2.

Таблиця 2

Результати IC_{50}

| Минуле тестування комахи | IC_{50} ppm |
|--|---------------|
| Метелик кукурудзяний (<i>Ostrinia nubilalis</i>) | 2,89 |
| Совка бавовняна (<i>Helicoverpa zea</i>) | 175,2 |
| Совка-Іпсилон (<i>Agrotis ipsilon</i>) | 57,7 |
| Совка трав'яна (<i>Spodoptera frugiperda</i>) | >200 |
| Вогнівка кукурудзяна південно-західна (<i>Diatraea grandiosella</i>) | 3,05 |
| Західна совка бобових (<i>Richia albicosta</i>) | >100 |

Приклад 3: Трансформація кукурудзи за допомогою бомбардування частками й відновлення трансгенних рослин

Незрілі зав'язі кукурудзи від тепличних рослин-донорів бомбардували молекулою ДНК, що містить нуклеотидну послідовність токсину (наприклад, SEQ ID NO: 1), функціонально пов'язану із промотором убіквітину й геном селективного маркера PAT (Wohlleben et al. (1988) Gene 70: 25-37), який забезпечує стійкість до гербіциду Білафос. Альтернативно, ген селективного маркера забезпечується в іншій молекулі ДНК. Трансформацію здійснюють, як описано далі. Пропис середовищ представлений нижче.

Підготовка цільової тканини

Качани очищають від листової обгортки й поверхню стерилізують в 30 % вибілювальному розчині CLOROXTM з 0,5 % детергентом Мікро протягом 20 хвилин і промивають два рази в стерильній воді. Вирізують незрілі зав'язі й поміщають зародок рубчиком униз (щитком зародка нагору), 25 зав'язей на планшет, у середовище 560Y на 4 години, а потім вирівнюють по одній лінії в 2,5 см зоні об'єктів удару для підготовки до бомбардування.

Підготовка ДНК

Був створений плазмідний вектор, що містить нуклеотидну послідовність токсину (наприклад, SEQ ID NO: 1), функціонально пов'язану із промотором убіквітину. Наприклад, підходящий вектор для трансформації містить промотор UBI1 з *Zea mays*, 5' UTR з UBI1 і інтрон з UBI1, у комбінації з термінатором PinII. Даний вектор додатково містить ген селективного маркера PAT, що направляється промотором CAMV35S, і включає термінатор CAMV35S. При бажанні, даний селективний маркер може розташовуватися на окремій плазміді. Молекулу ДНК, що містить нуклеотидну послідовність токсину, а також селективний маркер PAT, осаджують на 1,1 мкм (середній діаметр) вольфрамових гранулах, використовуючи наступний протокол осадження в $CaCl_2$:

- 100 мкл підготовлених вольфрамових часток у воді
- 10 мкл (1 мкг) ДНК у буфері Трис ЕДТА (1 мкг загальної ДНК)
- 100 мкл 2,5 М $CaCl_2$
- 10 мкл 0,1 М спермідину

Кожний реагент додають послідовно до суспензії вольфрамових часток при постійному перемішуванні на багатоканальному перемішувачу обладнанні. Кінцеву суміш обробляють протягом короткого періоду часу ультразвуком і залишають інкубуватися протягом 10 хвилин при постійному інтенсивному перемішуванні. Після періоду осадження пробірки протягом короткого періоду часу центрифугували, рідину видаляли, промивали з використанням 500 мол

100 % етанолу й центрифугували протягом 30 секунд. Знову видаляли рідину й додавали 105 мкл 100 % етанолу до отриманих гранул вольфрамових часток. Для бомбардування з допомогою генної гармати вольфрамові/ДНК частки коротко обробляли ультразвуком і 10 мкл наносили в центр кожного макроносія, і залишали сушитися протягом приблизно 2 хвилин

5 перед бомбардуванням.

Застосування генної гармати

Пластили зі зразками бомбардували на рівні #4 у генній гарматі #HE34-1 або #HE34-2. Усі зразки одержали одиночний заряд у режимі 650 PSI, у загальному 10 аліквот, узятих з кожної пробірки з підготовленими частками/ДНК.

10 Наступна обробка

Після бомбардування зародки зберігали протягом 2 днів у середовищі 560Y, потім перенесли в селективне середовище 560R, що містить 3 мг/літр Біалафосу, і пасирували кожні 2 тижня. Після приблизно 10 тижнів селекції клони каллюсів, стійкі до відбору, переносили в середовище 288J для стимулювання відновлення рослини. Після соматичного дозрівання зародків (2-4 тижня) добре розвинені соматичні зародки переносили в середовище для пророщення й переміщали в освітлену культуральну кімнату. Приблизно через 7-10 днів розвинені проростки переносили в пробірки з вільним від гормонів середовищем 272V на 7-10 днів, доти поки проростки добре не вкореняться. Потім рослини переносили у вкладиші в ділянках (еквівалент 2, 5-дюймовому горщику), що містять ґрунт для горшкових культур, і вирощували протягом 1 тижня у вегетаційній камері, потім вирощували протягом додаткових 1-2 тижнів у теплиці, потім переносили в класичні горщики 600 (1,6 галона) і вирощували до дозрівання. Проводили моніторинг рослин і оцінювали експресію токсину, використовуючи способи, відомі з рівня техніки або описані вище.

Середовища для бомбардування й культивування

25 Середовище для бомбардування (560Y) містить 4,0 г/л основних солей N6 (SIGMA C-1416), 1,0 мол/л вітамінної суміші Eriksson's Vitamin Mix (1000× SIGMA-1511), 0,5 мг/л тіаміну HCl, 120,0 г/л сахарози, 1,0 мг/л 2,4-D, і 2,88 г/л L-проліну (доведений до об'єму з допомогою ді H₂O, з наступною корекцією pH до 5,8 за допомогою KOH); 2,0 г/л Gelritetm (доданий після доведення об'єму за допомогою ді H₂O); і 8,5 мг/л нітрату срібла (доданий після стерилізації середовища й охолодження до кімнатної температури). Селективне середовище (560R) містить 4,0 г/л основних солей N6 (SIGMA C-1416), 1,0 мол/л вітамінної суміші Eriksson's Vitamin Mix (1000× SIGMA-1511), 0,5 мг/л тіаміну HCl, 30,0 г/л сахарози, і 2,0 мг/л 2,4-D (доведений до об'єму за допомогою ді H₂O, з наступною корекцією pH до 5,8 за допомогою KOH); 3,0 г/л Gelrite™ (доданий після доведення об'єму за допомогою ді H₂O); і 0,85 мг/л нітрату срібла й 3,0 мг/л Біалафосу (обоє додані після стерилізації середовища й охолодження до кімнатної температури).

40 Середовище для відновлення рослини (288J) містить 4,3 г/л солей MS (GIBCO 11117-074), 5,0 мол/л вихідного розчину вітамінів MS (0,100 г/л нікотинової кислоти, 0,02 г/л тіаміну HCl, 0,10 г/л піридоксину HCl, і 0,40 г/л гліцину, доведені до об'єму за допомогою очищеної D-I H₂O) (Murashige and Skoog (1962) Physiol. Plant. 15: 473), 100 мг/л міо-інозитулу, 0,5 мг/л зеатину, 60 г/л сахарози, і 1,0 мол/л 0,1 мМ абсцизинової кислоти (доведені до об'єму за допомогою очищеної ді H₂O після корекції значення pH 5,6); 3,0 г/л Gelritetm (доданий після доведення об'єму за допомогою ді H₂O); і 1,0 мг/л індолоцтової кислоти й 3,0 мг/л Біалафосу (доданий після стерилізації середовища й охолодження до 60 °C).

45 Не утримуюче гормонів середовище (272V) містить 4,3 г/л солей MS (GIBCO 11117-074), 5,0 мол/л вихідного розчину вітамінів MS (0,100 г/л нікотинової кислоти, 0,02 г/л тіаміну HCl, 0,10 г/л піридоксину HCl, і 0,40 г/л гліцину, доведені до об'єму за допомогою очищеної ді H₂O), 0,1 г/л міо-інозитулу, і 40,0 г/л сахарози (доведена до об'єму за допомогою очищеної ді H₂O після корекції значення pH 5,6); і 6 г/л Бакто-агару (доданий після доведення об'єму за допомогою очищеної ді H₂O), стерилізована й охолоджена до 60 °C.

50 Приклад 4: Трансформація кукурудзи, опосередкована Agrobacterium, і відновлення трансгенних рослин

Для опосередкованої Agrobacterium трансформації кукурудзи нуклеотидною послідовністю токсину (наприклад, SEQ ID NO: 1), можна використовувати метод Zhao (патент США № 5981840 і PCT публікація патенту WO98/32326; змісти яких включені тут за допомогою посилання). Коротенько, незрілих зародків виділяли з кукурудзи й дані зародки зазнали контакту із суспензією Agrobacterium в умовах, при яких дана бактерія здатна передати нуклеотидну послідовність токсину (SEQ ID NO: 1) щонайменше однієї клітини щонайменше одного з незрілих зародків (стадія 1: стадія інфікування). На цій стадії незрілі зародки можуть бути занурені в суспензію Agrobacterium для ініціації інокуляції. Зародки протягом деякого часу

сокультивуються з *Agrobacterium* (стадія 2: стадія сокультивування). Незрілі зародки можна культивувати на щільному середовищі після стадії інфікування. Після цього періоду сокультивування передбачена необов'язкова стадія "спокою". На стадії спокою зародки інкубують у присутності щонайменше одного антибіотика, який, як відомо, інгібує ріст *Agrobacterium* без додавання селективного агента для рослинних трансформантів (стадія 3: стадія спокою). Незрілі зародки можна інкубувати на щільному середовищі з антибіотиком, але без селективного агента, для елімінації *Agrobacterium* і для фази спокою для заражених кліток. Далі, інокульовані(инокулированые) зародки культивують на середовищі, що містить селективний агент, і вирощений трансформований каллюс відновлений (стадія 4: стадія відбору). Культивування незрілих зародків на щільному середовищі із селективним агентом приводить до виборчого вирощування трансформованих кліток. Потім каллюси відновлюють у рослині (стадія 5: стадія відновлення), і каллюси, вирощені в селективному середовищі, можна культивувати на щільному середовищі для відновлення рослин.

Приклад 5: Трансформація зародків сої

Зародки сої піддавали бомбардуванню плазмідом, що містить нуклеотидну послідовність токсину SEQ ID NO: 1, функціонально пов'язану із промотором *pinII*, як зазначено далі. Для індукції соматичних зародків сім'ядолі, 3-5 мм довжиною, виділені з поверхнево-стерилізованих, незрілих насіннь відповідного сорту сої, культивували при світлі або в темряві при 26 °C на підходящому агаровому середовищі протягом від шести до десяти тижнів. Соматичні зародки, що роблять вторинні зародки, потім видаляли й поміщали в підходяще рідке середовище. Після повторного відбору кластерів соматичних зародків, які розмножувалися як ранні кулясті зародки, дані суспензії підтримували, як описано далі.

Культури соєвих зародкових суспензій можна підтримувати в 35 мол рідкого середовища в ротаційному змішувачі, 150 об/хв., при 26 °C, із флуоресцентним висвітленням у режимі день/ніч 16:8 годин. Культури пасирують кожні два тижні, за допомогою посіву приблизно 35 мг тканини в 35 мол рідкого середовища.

Культури соєвих зародкових суспензій можна потім трансформувати, використовуючи метод бомбардування за допомогою генної гармати (Klein et al. (1987) *Nature* (London) 327: 70-73, патент США № 4945050). Для цих трансформацій можна використовувати прилад Du Pont Biolistic PDS1000/HE (гелева модифікація).

Ген селективного маркера, який може застосовуватися для полегшення трансформації сої, являє собою трансген, що складається із промотору 35S вірусу мозаїки кольорової капусти (Odell et al. (1985) *Nature* 313: 810-812), гена гігроміцинофосфотрансферази плазмиди *pJR225* (з *E.coli*; Gritz et al. (1983) *Gene* 25: 179-188), і 3'-ділянки гена нопалінсинтази з Т-ДНК плазмиди *Ti* *Agrobacterium tumefaciens*. Експресійна касета, що містить нуклеотидну послідовність токсину (наприклад, SEQ ID NO: 1), функціонально пов'язану із промотором *pinII*, можна виділити у вигляді рестрикційного фрагменту. Цей фрагмент потім може бути вбудований у специфічний сайт рестрикції вектора, що несе даний маркерний ген.

До 50 мкл суспензії 60 мг/мол 1 мкм золотих часток додавали (один по одному): 5 мкл ДНК (1 мкг/мкл), 20 мкл спермидину (0,1 М), і 50 мкл CaCl_2 (2,5 М). Потім композицію із часток збовтували протягом трьох хвилин, осаджували в мікроцентрифузі протягом 10 секунд і видаляли супернатант. Потім частки, покриті ДНК, промивали один раз в 400 мкл 70 % етанолу й ресуспендували в 40 мкл збездвоженого етанолу. Суспензію ДНК/частки можна обробити ультразвуком три рази, протягом однієї секунди щораз. П'ять мікролітрів золотих часток, покритих ДНК, потім завантажують на кожний диск макроносія.

Приблизно 300-400 мг двотижневої суспензійної культури поміщали в порожні чашки Петри розміром 60×15 мм рідини та рідину, що залишилася видаляли із тканини за допомогою піпетки. Для кожного експериментального дослідження трансформації звичайно бомбардують приблизно 5-10 чашок із тканинами. Тиск розриву мембрани встановлюють рівним 1100 фунт/кв. дюйм, і з камери викачували повітря до вакууметричного тиску 28 дюймів ртутного стовпа. Тканину поміщали на відстані приблизно 3,5 дюйма від затримуючого екрана й бомбардували три рази. Після бомбардування тканину розділяли навпіл і поміщали назад у рідину й культивували, як описано вище.

Через п'ять-сім днів після бомбардування рідке середовище заміняли свіжим середовищем, і через одинадцять-дванадцять днів після бомбардування заміняли свіжим середовищем, що містить 50 мг/мол гігроміцину. Це селективне середовище можна обновляти щотижня. Через сім-вісім тижнів після бомбардування можна спостерігати зелену трансформовану тканину, що росте з нетрансформованих некротичних зародкових кластерів. Ізольовану зелену тканину видаляють і висівають в індивідуальні флакони для формування нових вегетативно розмножених, трансформованих зародкових суспензійних культур. Кожну нову лінію можна

розглядати як незалежну трансформаційну подію. Ці суспензії потім можна пасивувати і підтримувати у вигляді кластерів незрілих зародків, або відновлювати в цільну рослину в результаті дозрівання й пророщення окремих соматичних зародків.

Усі публікації, патенти й патентні заявки, згадані в даному описі, відповідають знанням фахівця в галузі, до якої належить даний винахід. Усі публікації, патенти й патентні заявки включені в справжній опис за допомогою посилання в тому ж самому ступені, як якби кожна окрема публікація, патент або патентна заявка були специфічно й індивідуально включені за допомогою посилання.

Незважаючи на те, що вищевикладений винахід був описаний досить докладно за допомогою ілюстрації й прикладу для ясності розуміння, буде очевидно, що деякі зміни й модифікації можуть бути здійснені в рамках варіантів здійснення даного винаходу.

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Pioneer Hi-Bred International, Inc.
 15 <120> Новий ген *Bacillus thuringiensis* з активністю проти Lepidopteran (лускокрилих)
 <130> 2963-РСТ
 <150> 61/060,562
 <151> 2008-06-11
 <160> 2
 20 <170> Fastseq for Windows Version 4.0
 <210> 1
 <211> 3696
 <212> ДНК
 <213> *Bacillus thuringiensis*
 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 9
 (0)...(0)
 <223> GS088
 30 <400> 1
 atgacttcaa ataggaaaa tgagaatgaa attataaatg ccttatcgat tccagctgta 60
 tcgaatcatt ccgcacaaat ggatctatcg ctatgatgctc gtattgagga ttctttgtgt 120
 atagccgagg ggaataatat caatccactt gtagcgcat caacagtcca aacgggtata 180
 aacatagctg gtagaatatt gggcgatta ggtgtgccgt ttgctggaca actagctagt 240
 35 tttatagtt ttctgttg ggaattatgg cctagtggca gagatccatg ggaaattttc 300
 ctggaacatg tagaacaact tataagacaa caagtaacag aaaatactag gaatacggct 360
 attgctcgat tagaaggctt aggaagaggc tatagatctt accagcaggc tcttgaaact 420
 tggtagata accgaaatga tgcaagatca agaagcatta ttcttgagcg ctatgttgc 480
 ttgaacttg acattactac tgctataccg ctttcagaa tacgaaatga agaagtcca 540
 40 ttattaatgg tatatgctca agctgcaaat ttacacctat tattattgag agacgcatcc 600
 ctttttgta gtgaatgggg gatggcatct tccgatgta accaatatta ccaagaacaa 660
 atcagatata cagaggaata ttctaaccat tgcgtacaat ggtataatac agggctaaat 720
 aacttaagag ggacaaatgc tgaaattgg ttgcggtata atcaattccg tagagaccta 780
 acgttagggg tattagattt agtagcccta ttccaagct atgatactcg cacttatcca 840
 45 atcaatacga gtgctcagtt aacaagagaa atttatacag atccaattgg gagaacaaat 900
 gcaccttcag gatttgcaag tacgaattgg tttaataata atgcaccatc gtttctgcc 960
 atagaggctg ccatttcag gcctccgcat ctacttgatt ttccagaaca acttacaatt 1020
 tacagtgc atagccgttg gagtagcact caacgtatga attattgggt gggacatagg 1080
 ctttaactcc gcccaatagg agggacatta aatacctcaa cacaaggact tactaataat 1140
 50 acttcaatta atcctgtaac attacagttt acgtctcgtg acgtttatag aacagaatca 1200
 aatgcaggga caaatatact atttactact cctgtgaatg gagtaccttg ggctagattt 1260
 aattttataa accctcagaa tatttatgaa agaggcgcca ctacctacag tcaaccgtat 1320
 cagggagttg ggattcaatt atttgattca gaaactgaat taccaccaga aacaacagaa 1380
 cgaccaaat atgaatcata tagtcataga ttatctcata taggactaat cataggaaac 1440
 55 actttgagag caccagtcta ttctggacg catcgtagtg cagatcgtag gaatacgatt 1500
 ggaccaata gaattactca aattcctgca gtgaaggga gatttcttt taatggttct 1560
 gtaatttcag gaccaggatt tactggtgga gacgtagtta gattgaatag gaataatggt 1620
 aatatcaaaa atagagggtta tattgaagtt ccaattcaat tcacgtcgac atctaccaga 1680
 tatcgagttc gagtagctta tgcttctgta acctcgattg agtcaatgt taattgggc 1740
 60 aattcatcaa ttttacgaa cacattacca gcaacagctg caccattaga taatctacaa 1800

tcaggggatt ttggttatgt tgaaatcaac aatgcttta catccgcaac aggtaata 1860
 gtaggtgcta gaaatttttag tgcaaatgca gaagtaataa tagacagatt tgaatttacc 1920
 ccagtactg caaccttcga ggcagaatat gatttagaaa gagcacaaaa ggcggtgaat 1980
 gctctgttta ctctacaaa tccaagaaga tgaaaacag atgtgacaga ttatcatatt 2040
 5 gaccaagtgt ccaatatggt ggcattgtta tcagatgaat ttgcttga tgagaagcga 2100
 ggattatttg agaaagtga atagcgaag cgactcagtg atgaaagaaa ctactccaa 2160
 gatccaaact tcacattcat cagtgggcaa ttaagtttcg catccatcga tggacaatca 2220
 aactcacct ctattaatga gctatctgaa catggatggt ggggaagtga gaatgttacc 2280
 attcaggaag ggaatgacgt atttaagag aattacgtca cactaccggg tactttta 2340
 10 gagtgttacc caaattattt atatacaaaa ataggagagt cagaattaaa agcttatac 2400
 cgctatcaat taagagggtg tattgaagat agtcaagatc tagagattta ttaattcgt 2460
 tacaatgcaa agcatgaaac attgggtgtt ccaggtaccg attccctatg gccgctttca 2520
 gttaaaagcc caatcggaag gtgcggagaa ccaaatcgat ggcgaccaca tttgaatgg 2580
 aatcctgatc tagattgttc ctgcaggat ggagaaagat gtgcgcatca ttccatcat 2640
 15 ttactttgg atattgatgt tggatgcaca gactgcatg agaacctagg cgtgtgggtg 2700
 gtattcaaga ttaagacgca ggaaggttat gcaagattag gaaatctgga atttatcgaa 2760
 gagaaacct taattggaga agcactgtct cgtgtgaaga gagcgaaaaa aaaatggaga 2820
 gacaaacggg aaaaactaca attggaaca aaacgagat atacagaggc aaaagaaact 2880
 gtggatgctt tattcgtaga ttctactat aatagattac aagcagatac aaacattggt 2940
 20 atgattcatg cggcagatag actgttcat cggatccacg aggttatct tccagaacta 3000
 cctttatc caggaataaa tgcggtgatt ttgaagaat tagaaaatcg ttttctact 3060
 gcgttctct tatacgatgc gagaaatgtc attaaaaatg gcgatttcaa taatggctta 3120
 tcatgtgga acgtaaaagg gcatgtaggt gtacaacaga gccatcatcg ttctgacctt 3180
 gttatcccag aatgggaagc agaagtgtca caagcagttc gcgtttgtcc gggcggtggc 3240
 25 tatatcttc gtgtcacagc gtacaaagag ggatatggag agggctgcgt aacgatccat 3300
 gaaatcgaga acaatacaga cgagctaaaa ttaaaaact gtgaagaaga ggaagtgtat 3360
 ccaacggata caggaacgtg taatgattat actgcacacc aaggtacagc agcatgta 3420
 tcccgaatg ctggatatga ggatgcatat gaagtgata ctacagcatc tgtaattac 3480
 aaaccgactt atgaagaaga aacgtataca gatgtacgaa gagataatca ttgtgaat 3540
 30 gacagagggt atgtgaatta tccaccagta ccagctggtt atgtgacaaa agaattagaa 3600
 tacttcccag aaacagatac agtatggatt gagattggag aaacggaagg aaagttatt 3660
 gtagatagcg tggaaactact cctcatggaa gaatag 3696
 <210> 2
 <211> 1231
 35 <212> Білок
 <213> *Bacillus thuringiensis*
 <220>
 <221> Пептид
 <222> (0)...(0)
 40 <223> GS088
 <400> 2

<400> 2

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Thr | Ser | Asn | Arg | Lys | Asn | Glu | Asn | Glu | Ile | Ile | Asn | Ala | Leu | Ser |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Ile | Pro | Ala | Val | Ser | Asn | His | Ser | Ala | Gln | Met | Asp | Leu | Ser | Leu | Asp |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| Ala | Arg | Ile | Glu | Asp | Ser | Leu | Cys | Ile | Ala | Glu | Gly | Asn | Asn | Ile | Asn |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| Pro | Leu | Val | Ser | Ala | Ser | Thr | Val | Gln | Thr | Gly | Ile | Asn | Ile | Ala | Gly |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| Arg | Ile | Leu | Gly | Val | Leu | Gly | Val | Pro | Phe | Ala | Gly | Gln | Leu | Ala | Ser |
| 65 | | | | | 70 | | | | 75 | | | | | 80 | |
| Phe | Tyr | Ser | Phe | Leu | Val | Gly | Glu | Leu | Trp | Pro | Ser | Gly | Arg | Asp | Pro |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | 95 | | |
| Trp | Glu | Ile | Phe | Leu | Glu | His | Val | Glu | Gln | Leu | Ile | Arg | Gln | Gln | Val |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 100 | | 105 | | 110 | | | | | | | | | | |
| Thr | Glu | Asn | Thr | Arg | Asn | Thr | Ala | Ile | Ala | Arg | Leu | Glu | Gly | Leu | Gly |
| | 115 | | 120 | | 125 | | | | | | | | | | |
| Arg | Gly | Tyr | Arg | Ser | Tyr | Gln | Gln | Ala | Leu | Glu | Thr | Trp | Leu | Asp | Asn |
| | 130 | | 135 | | 140 | | | | | | | | | | |
| Arg | Asn | Asp | Ala | Arg | Ser | Arg | Ser | Ile | Ile | Leu | Glu | Arg | Tyr | Val | Ala |
| | 145 | | 150 | | 155 | | | | | | | | | | 160 |
| Leu | Glu | Leu | Asp | Ile | Thr | Thr | Ala | Ile | Pro | Leu | Phe | Arg | Ile | Arg | Asn |
| | | | 165 | | 170 | | | | | | | | | | 175 |
| Glu | Glu | Val | Pro | Leu | Leu | Met | Val | Tyr | Ala | Gln | Ala | Ala | Asn | Leu | His |
| | | | 180 | | 185 | | | | | | | | | | 190 |
| Leu | Leu | Leu | Leu | Arg | Asp | Ala | Ser | Leu | Phe | Gly | Ser | Glu | Trp | Gly | Met |
| | | | 195 | | 200 | | | | | | | | | | 205 |
| Ala | Ser | Ser | Asp | Val | Asn | Gln | Tyr | Tyr | Gln | Glu | Gln | Ile | Arg | Tyr | Thr |
| | | | 210 | | 215 | | | | | | | | | | 220 |
| Glu | Glu | Tyr | Ser | Asn | His | Cys | Val | Gln | Trp | Tyr | Asn | Thr | Gly | Leu | Asn |
| | | | 225 | | 230 | | | | | | | | | | 240 |
| Asn | Leu | Arg | Gly | Thr | Asn | Ala | Glu | Ser | Trp | Leu | Arg | Tyr | Asn | Gln | Phe |
| | | | 245 | | 250 | | | | | | | | | | 255 |
| Arg | Arg | Asp | Leu | Thr | Leu | Gly | Val | Leu | Asp | Leu | Val | Ala | Leu | Phe | Pro |
| | | | 260 | | 265 | | | | | | | | | | 270 |
| Ser | Tyr | Asp | Thr | Arg | Thr | Tyr | Pro | Ile | Asn | Thr | Ser | Ala | Gln | Leu | Thr |
| | | | 275 | | 280 | | | | | | | | | | 285 |
| Arg | Glu | Ile | Tyr | Thr | Asp | Pro | Ile | Gly | Arg | Thr | Asn | Ala | Pro | Ser | Gly |
| | | | 290 | | 295 | | | | | | | | | | 300 |
| Phe | Ala | Ser | Thr | Asn | Trp | Phe | Asn | Asn | Asn | Ala | Pro | Ser | Phe | Ser | Ala |
| | | | 305 | | 310 | | | | | | | | | | 320 |
| Ile | Glu | Ala | Ala | Ile | Phe | Arg | Pro | Pro | His | Leu | Leu | Asp | Phe | Pro | Glu |
| | | | 325 | | 330 | | | | | | | | | | 335 |
| Gln | Leu | Thr | Ile | Tyr | Ser | Ala | Ser | Ser | Arg | Trp | Ser | Ser | Thr | Gln | Arg |
| | | | 340 | | 345 | | | | | | | | | | 350 |
| Met | Asn | Tyr | Trp | Val | Gly | His | Arg | Leu | Asn | Phe | Arg | Pro | Ile | Gly | Gly |
| | | | 355 | | 360 | | | | | | | | | | 365 |
| Thr | Leu | Asn | Thr | Ser | Thr | Gln | Gly | Leu | Thr | Asn | Asn | Thr | Ser | Ile | Asn |
| | | | 370 | | 375 | | | | | | | | | | 380 |
| Pro | Val | Thr | Leu | Gln | Phe | Thr | Ser | Arg | Asp | Val | Tyr | Arg | Thr | Glu | Ser |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 385 | | 390 | | 395 | | 400 | | | | | | | | | |
| Asn | Ala | Gly | Thr | Asn | Ile | Leu | Phe | Thr | Thr | Pro | Val | Asn | Gly | Val | Pro |
| | | 405 | | | | | | 410 | | | | | | 415 | |
| Trp | Ala | Arg | Phe | Asn | Phe | Ile | Asn | Pro | Gln | Asn | Ile | Tyr | Glu | Arg | Gly |
| | | 420 | | | | | | 425 | | | | | | 430 | |
| Ala | Thr | Thr | Tyr | Ser | Gln | Pro | Tyr | Gln | Gly | Val | Gly | Ile | Gln | Leu | Phe |
| | | 435 | | | | | | 440 | | | | | | 445 | |
| Asp | Ser | Glu | Thr | Glu | Leu | Pro | Pro | Glu | Thr | Thr | Glu | Arg | Pro | Asn | Tyr |
| | | 450 | | | | | | 455 | | | | | | 460 | |
| Glu | Ser | Tyr | Ser | His | Arg | Leu | Ser | His | Ile | Gly | Leu | Ile | Ile | Gly | Asn |
| | | 465 | | | | | | 470 | | | | | | 475 | |
| Thr | Leu | Arg | Ala | Pro | Val | Tyr | Ser | Trp | Thr | His | Arg | Ser | Ala | Asp | Arg |
| | | | | | | | | 485 | | | | | | 490 | |
| Thr | Asn | Thr | Ile | Gly | Pro | Asn | Arg | Ile | Thr | Gln | Ile | Pro | Ala | Val | Lys |
| | | 500 | | | | | | 505 | | | | | | 510 | |
| Gly | Arg | Phe | Leu | Phe | Asn | Gly | Ser | Val | Ile | Ser | Gly | Pro | Gly | Phe | Thr |
| | | 515 | | | | | | 520 | | | | | | 525 | |
| Gly | Gly | Asp | Val | Val | Arg | Leu | Asn | Arg | Asn | Asn | Gly | Asn | Ile | Gln | Asn |
| | | 530 | | | | | | 535 | | | | | | 540 | |
| Arg | Gly | Tyr | Ile | Glu | Val | Pro | Ile | Gln | Phe | Thr | Ser | Thr | Ser | Thr | Arg |
| | | 545 | | | | | | 550 | | | | | | 555 | |
| Tyr | Arg | Val | Arg | Val | Arg | Tyr | Ala | Ser | Val | Thr | Ser | Ile | Glu | Leu | Asn |
| | | | | | | | | 565 | | | | | | 570 | |
| Val | Asn | Leu | Gly | Asn | Ser | Ser | Ile | Phe | Thr | Asn | Thr | Leu | Pro | Ala | Thr |
| | | | | | | | | 580 | | | | | | 585 | |
| Ala | Ala | Pro | Leu | Asp | Asn | Leu | Gln | Ser | Gly | Asp | Phe | Gly | Tyr | Val | Glu |
| | | 595 | | | | | | 600 | | | | | | 605 | |
| Ile | Asn | Asn | Ala | Phe | Thr | Ser | Ala | Thr | Gly | Asn | Ile | Val | Gly | Ala | Arg |
| | | 610 | | | | | | 615 | | | | | | 620 | |
| Asn | Phe | Ser | Ala | Asn | Ala | Glu | Val | Ile | Ile | Asp | Arg | Phe | Glu | Phe | Ile |
| | | 625 | | | | | | 630 | | | | | | 635 | |
| Pro | Val | Thr | Ala | Thr | Phe | Glu | Ala | Glu | Tyr | Asp | Leu | Glu | Arg | Ala | Gln |
| | | | | | | | | 645 | | | | | | 650 | |
| Lys | Ala | Val | Asn | Ala | Leu | Phe | Thr | Ser | Thr | Asn | Pro | Arg | Arg | Leu | Lys |
| | | 660 | | | | | | 665 | | | | | | 670 | |
| Thr | Asp | Val | Thr | Asp | Tyr | His | Ile | Asp | Gln | Val | Ser | Asn | Met | Val | Ala |

| | | |
|-------------------------|---|-----|
| 675 | 680 | 685 |
| Cys Leu Ser Asp Glu Phe | Cys Leu Asp Glu Lys Arg Gly Leu Phe Glu | |
| 690 | 695 | 700 |
| Lys Val Lys Tyr Ala Lys | Arg Leu Ser Asp Glu Arg Asn Leu Leu Gln | |
| 705 | 710 | 715 |
| 720 | | |
| Asp Pro Asn Phe Thr Phe | Ile Ser Gly Gln Leu Ser Phe Ala Ser Ile | |
| 725 | 730 | 735 |
| Asp Gly Gln Ser Asn Phe | Thr Ser Ile Asn Glu Leu Ser Glu His Gly | |
| 740 | 745 | 750 |
| Trp Trp Gly Ser Glu Asn | Val Thr Ile Gln Glu Gly Asn Asp Val Phe | |
| 755 | 760 | 765 |
| Lys Glu Asn Tyr Val Thr | Leu Pro Gly Thr Phe Asn Glu Cys Tyr Pro | |
| 770 | 775 | 780 |
| Asn Tyr Leu Tyr Gln Lys | Ile Gly Glu Ser Glu Leu Lys Ala Tyr Thr | |
| 785 | 790 | 795 |
| 800 | | |
| Arg Tyr Gln Leu Arg Gly | Tyr Ile Glu Asp Ser Gln Asp Leu Glu Ile | |
| 805 | 810 | 815 |
| Tyr Leu Ile Arg Tyr Asn | Ala Lys His Glu Thr Leu Gly Val Pro Gly | |
| 820 | 825 | 830 |
| Thr Asp Ser Leu Trp Pro | Leu Ser Val Lys Ser Pro Ile Gly Arg Cys | |
| 835 | 840 | 845 |
| Gly Glu Pro Asn Arg Cys | Ala Pro His Phe Glu Trp Asn Pro Asp Leu | |
| 850 | 855 | 860 |
| Asp Cys Ser Cys Arg Asp | Gly Glu Arg Cys Ala His His Ser His His | |
| 865 | 870 | 875 |
| 880 | | |
| Phe Thr Leu Asp Ile Asp | Val Gly Cys Thr Asp Leu His Glu Asn Leu | |
| 885 | 890 | 895 |
| Gly Val Trp Val Val Phe | Lys Ile Lys Thr Gln Glu Gly Tyr Ala Arg | |
| 900 | 905 | 910 |
| Leu Gly Asn Leu Glu Phe | Ile Glu Glu Lys Pro Leu Ile Gly Glu Ala | |
| 915 | 920 | 925 |
| Leu Ser Arg Val Lys Arg | Ala Glu Lys Lys Trp Arg Asp Lys Arg Glu | |
| 930 | 935 | 940 |
| Lys Leu Gln Leu Glu Thr | Lys Arg Val Tyr Thr Glu Ala Lys Glu Thr | |
| 945 | 950 | 955 |
| 960 | | |
| Val Asp Ala Leu Phe Val | Asp Ser His Tyr Asn Arg Leu Gln Ala Asp | |

| | | | |
|---|------|------|------|
| | 965 | 970 | 975 |
| Thr Asn Ile Gly Met Ile His Ala Ala Asp Arg Leu Val His Arg Ile | | | |
| | 980 | 985 | 990 |
| His Glu Ala Tyr Leu Pro Glu Leu Pro Phe Ile Pro Gly Ile Asn Ala | | | |
| | 995 | 1000 | 1005 |
| Val Ile Phe Glu Glu Leu Glu Asn Arg Ile Ser Thr Ala Phe Ser Leu | | | |
| | 1010 | 1015 | 1020 |
| Tyr Asp Ala Arg Asn Val Ile Lys Asn Gly Asp Phe Asn Asn Gly Leu | | | |
| 1025 | 1030 | 1035 | 1040 |
| Ser Cys Trp Asn Val Lys Gly His Val Gly Val Gln Gln Ser His His | | | |
| | 1045 | 1050 | 1055 |
| Arg Ser Asp Leu Val Ile Pro Glu Trp Glu Ala Glu Val Ser Gln Ala | | | |
| | 1060 | 1065 | 1070 |
| Val Arg Val Cys Pro Gly Arg Gly Tyr Ile Leu Arg Val Thr Ala Tyr | | | |
| | 1075 | 1080 | 1085 |
| Lys Glu Gly Tyr Gly Glu Gly Cys Val Thr Ile His Glu Ile Glu Asn | | | |
| | 1090 | 1095 | 1100 |
| Asn Thr Asp Glu Leu Lys Phe Lys Asn Cys Glu Glu Glu Glu Val Tyr | | | |
| 1105 | 1110 | 1115 | 1120 |
| Pro Thr Asp Thr Gly Thr Cys Asn Asp Tyr Thr Ala His Gln Gly Thr | | | |
| | 1125 | 1130 | 1135 |
| Ala Ala Cys Asn Ser Arg Asn Ala Gly Tyr Glu Asp Ala Tyr Glu Val | | | |
| | 1140 | 1145 | 1150 |
| Asp Thr Thr Ala Ser Val Asn Tyr Lys Pro Thr Tyr Glu Glu Glu Thr | | | |
| | 1155 | 1160 | 1165 |
| Tyr Thr Asp Val Arg Arg Asp Asn His Cys Glu Tyr Asp Arg Gly Tyr | | | |
| | 1170 | 1175 | 1180 |
| Val Asn Tyr Pro Pro Val Pro Ala Gly Tyr Val Thr Lys Glu Leu Glu | | | |
| 1185 | 1190 | 1195 | 1200 |
| Tyr Phe Pro Glu Thr Asp Thr Val Trp Ile Glu Ile Gly Glu Thr Glu | | | |
| | 1205 | 1210 | 1215 |
| Gly Lys Phe Ile Val Asp Ser Val Glu Leu Leu Leu Met Glu Glu | | | |
| | 1220 | 1225 | 1230 |

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Виділена молекула нуклеїнової кислоти, вибрана із:
 - (a) молекули нуклеїнової кислоти, що містить нуклеотидну послідовність SEQ ID NO: 1 або її повнорозмірний комплемент; і
 - (b) молекули нуклеїнової кислоти, кодуєчий поліпептид, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2.
- 10 2. Виділена молекула нуклеїнової кислоти за п. 1, де зазначена нуклеотидна послідовність являє собою синтетичну послідовність, яка була сконструйована для експресії в рослині.
3. ДНК-конструкція, що містить молекулу нуклеїнової кислоти за п. 1.

4. ДНК-конструкція за п. 3, що додатково містить молекулу нуклеїнової кислоти, що кодує гетерологічний поліпептид.
5. Клітина-хазяїн, яка містить ДНК-конструкцію за п. 3.
6. Клітина-хазяїн за п. 5, яка являє собою бактеріальну клітину.
- 5 7. Клітина-хазяїн за п. 5, яка являє собою рослинну клітину.
8. Виділений поліпептид з пестицидною активністю, вибраний із:
 - (a) поліпептиду, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2; і
 - (b) поліпептиду, що кодується нуклеотидною послідовністю SEQ ID NO: 1.
9. Поліпептид за п. 8, що додатково включає гетерологічні амінокислотні послідовності.
- 10 10. Композиція, що включає поліпептид за п. 8.
11. Композиція за п. 10, де зазначена композиція вибрана із групи, що складається з порошкового препарату, пилоподібного препарату, пелети, гранули, аерозолу, емульсії, колоїду й розчину.
12. Композиція за п. 10, де зазначена композиція отримана за допомогою зневоднювання, ліофілізації, гомогенізації, екстракції, фільтрації, центрифугування, осадження або концентрації культури клітин *Bacillus thuringiensis*.
- 15 13. Композиція за п. 10, що містить зазначений поліпептид від приблизно 1 % до приблизно 99 % по масі.
14. Спосіб контролю популяції лускокрилих шкідників, що включає забезпечення контакту зазначеної популяції з пестицидно-ефективною кількістю поліпептиду за п. 8.
- 20 15. Спосіб знищення лускокрилих шкідників, що включає забезпечення контакту зазначеного шкідника з або згодовування зазначеному шкідникові пестицидно-ефективної кількості поліпептиду за п. 8.
16. Спосіб одержання поліпептиду з пестицидною активністю, що включає культивування клітини-хазяїна за п. 5 в умовах, при яких експресується молекула нуклеїнової кислоти, кодуюча даний поліпептид, де зазначений поліпептид вибраний із групи, що складається з
 - (a) поліпептиду, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2; і
 - (b) поліпептиду, що кодується нуклеотидною послідовністю SEQ ID NO: 1.
- 25 17. Рослина кукурудзи або сої, що має стабільно вбудовану в її геном ДНК-конструкцію, що включає нуклеотидну послідовність, яка кодує білок, що має пестицидну активність, де зазначена нуклеотидна послідовність вибрана із групи, що складається з:
 - (a) молекули нуклеїнової кислоти, що містить нуклеотидну послідовність SEQ ID NO: 1 або її повнорозмірний комплемент; і
 - (b) молекули нуклеїнової кислоти, яка кодує поліпептид, що містить амінокислотну послідовність
- 30 35 SEQ ID NO: 2;
де зазначена нуклеотидна послідовність функціонально пов'язана із промотором, який направляє експресію кодуючої послідовності у рослинній клітині.
18. Рослина за п. 17, де зазначена рослина являє собою рослинну клітину.
19. Рослина за п. 17, яка є трансгенною рослиною, що містить клітину-хазяїн за п. 7.
- 40 20. Трансформоване насіння рослини за будь-яким з пп. 17-19, де зазначене насіння містить зазначену ДНК-конструкцію.

Комп'ютерна верстка С. Чулій

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

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