



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **112287** (13) **C2**

(51) МПК

C12N 15/82 (2006.01)

C07K 14/325 (2006.01)

A01N 63/02 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2012 08627	(72) Винахідник(и):	Мід Томас (US), Нарва Кеннет (US), Сторер Ніколас П. (US), Шитс Джоел Дж. (US), Вуслі Аарон Т. (US), Бертон Стефані Л. (US)
(22) Дата подання заявки:	16.12.2010	(73) Власник(и):	ДАУ АГРОСАЙЄНСІЗ ЕЛЕЛСІ, 9330 Zionsville Road, Indianapolis, IN 46268, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	25.08.2016	(74) Представник:	Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	61/284,292	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2008145406 A1, 04.12. 2008 SALM ET AL.: "Insect resistance of transgenic plants that express modified Bacillus thuringiensis cryIA(b) and cryIC genes: a resistance management strategy." PLANT MOLECULAR BIOLOGY. vol. 26, 1994, pages 51 - 59
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	16.12.2009		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	10.10.2012, Бюл.№ 19		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	25.08.2016, Бюл.№ 16		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	РСТ/US2010/060819, 16.12.2010		

(54) ТРАНСГЕННА РОСЛИНА, ЩО МІСТИТЬ ДНК, ЯКА КОДУЄ ІНСЕКТИЦИДНИЙ БІЛОК CRY1Ca ТА CRY1Ab ДЛЯ БОРОТЬБИ З ЛУСКОКРИЛИМИ ШКІДНИКАМИ

(57) Реферат:

Даний винахід включає способи і рослини для контролю лускокрилих комах, і вказані рослини містять комбінацію інсектицидного білка Cry 1Ca і інсектицидного білка Cry 1Ab для сповільнення або запобігання розвитку стійкості комах.

UA 112287 C2

Рівень винаходу

Люди вирощують кукурудзу для використання як їжі і джерела енергії. Люди також вирощують бавовну і множини інших зернових культур, що включають в себе сою. Комахи поїдають і ушкоджують рослини і таким чином підривають зусилля людини. Щорічно 5 затрачуються мільярди доларів для контролю комах-шкідників, де збиток, який вони наносять, обчислюється додатковими мільярдами доларів. Для контролю комах-шкідників застосовуються насамперед синтетичні органічні хімічні інсектициди, разом з тим, в деяких сферах важливу роль відіграють біологічні інсектициди, такі як інсектицидні білки, отримані з *Bacillus thuringiensis* (Bt). Здатність виробляти стійкі до комах рослини за допомогою їх трансформації генами 10 інсектицидного білка Bt являє собою революційну зміну в сучасному сільському господарстві і підвищує важливість і значення інсектицидних білків і їх генів.

Для створення стійких до комах трансгенних рослин використовувалися декілька Bt-білків, які в цей час успішно зареєстровані і введені в комерційний обіг. Вони включають в себе білки кукурудзи Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Fa і Cry3Bb, білки бавовни Cry1Ac і Cry2Ab і картопляний білок Cry3A. 15

Експресуючі вказані білки комерційні продукти експресують єдиний білок, крім тих випадків, коли бажано об'єднати інсектицидний спектр 2 білків (наприклад, Cry1Ab і Cry3Bb в кукурудзі об'єднують для забезпечення стійкості до лускокрилих шкідників і до личинок, що ушкоджують коріння, відповідно), або якщо незалежна дія білків робить їх корисною як інструмент для 20 затримки розвитку стійкості у сприйнятливих популяцій комах (наприклад, об'єднують білки бавовни Cry1Ac і Cry2Ab для забезпечення контролю стійкості до листовійки-брунькоїду тютюну).

У зв'язку з цим, деякі з якостей стійких до комах трансгенних рослин, які привели до швидкого і широко поширеного прийняття цієї технології, також викликають стурбованість 25 можливістю розвитку у популяцій шкідників стійкості до інсектицидних білків, які продукуються цими рослинами.

Був запропонований ряд стратегій для збереження корисності властивостей стійкості до комах, зумовленої Bt білками, які включають в себе застосування білків у високих дозах, застосування в комбінації зі "сховищами", і спільне застосування з різними токсинами або 30 пошкодження цими токсинами (McGaughey et al. (1998), "B.t. Resistance Management", *Nature Biotechnol.* 16: 144-146).

Білки, вибрані для використання з метою керування стійкістю комах (IRM), в сукупності повинні виявляти свій інсектицидний ефект незалежно таким чином, щоб стійкість, що розвивається до одного білка, не викликала розвиток стійкості до другого білка (тобто, щоб була відсутня перехресна стійкість до цих білків). Якщо, наприклад, популяція шкідника, вибрана по 35 стійкості до "білка А", сприйнятлива до "білка В", можна зробити висновок про відсутність перехресної стійкості, і що комбінація білка А і білка В буде ефективно затримувати розвиток стійкості до білка А єдиного.

При відсутності стійких популяцій комах можна провести оцінку на основі інших характеристик, які, ймовірно, пов'язані з механізмом дії і інтенсивністю перехресної стійкості. 40 Було запропоноване застосування рецептор-опосередкованого зв'язування для ідентифікації інсектицидних білків з ймовірною відсутністю перехресної стійкості (van Mellaert et al. 1999). Ключовим фактом для прогнозу відсутності перехресної стійкості, який лежить в основі згаданого підходу, є те, що інсектицидні білки не конкурують за рецептори у сприйнятливих 45 видів комах.

У випадку, якщо два токсини B.t. Cry конкурують за один і той же рецептор, і згодом у комахи відбувається певна мутація рецептора, в результаті якої один з токсинів більше не зв'язується з цим рецептором і тому втрачає інсектицидну дію проти цієї комахи, то у цієї комахи може також виникати стійкість до другого токсину (який конкурентно зв'язується з цим рецептором). Разом з 50 тим, якщо два токсини зв'язуються з двома різними рецепторами, це може служити ознакою відсутності одночасної стійкості комахи до двох згаданих токсинів.

Для захисту рослин від множини комах-шкідників в цей час застосовується Cry1Ab, що являє собою інсектицидний білок, який використовується в трансгенній кукурудзі. Білок Cry1Ab забезпечує захист від основного шкідника кукурудзи, яким є європейський кукурудзяний 55 метелик.

Додаткові токсини Cry можна знайти в переліку на вебсайті комітету по офіційній номенклатурі B.t (Crickmore et al.; lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/). Див. Додаток А до вказаного джерела. У цей час існує близько 60 основних груп токсинів "Cry" (Cry1-Cry59), з 60 додатковими токсинами Cyt, токсинами VIP і подібними токсинами. Багато які з цих численних груп мають підгрупи, які позначаються великими буквами, і в підгрупах з великими буквами

виділяють підпідгрупи, які позначаються малими буквами. (Наприклад, Cry1 має підгрупи A-L, і в підгрупі Cry1A виділяють підпідгрупи a-i).

Коротка суть винаходу

Даний винахід частково стосується несподіваного відкриття, що Cry1Ca має високу активність проти популяції вогнівки цукрової тростини, що включає в себе популяцію стійкої до Cry1Ab вогнівки цукрової тростини. Фахівцям в даній галузі техніки буде очевидно, в плані переваги даного розкриття, що рослини, які продукують Cry1Ca і Cry1Ab (які включають в себе інсектицидні ділянки вказаних білків), будуть корисними для сповільнення або запобігання розвитку стійкості до будь-якого одного з вказаних інсектицидних білків. Наприклад, ген cry1Fa також може складатися з цих генів/білка з двох основ.

Даний винахід також стосується відкриття, що Cry1Ca і Cry1Ab не конкурують один з одним за зв'язування з рецепторами кишечника кукурудзяної листової совки (*Spodoptera frugiperda*; FAW).

КОРОТКИЙ ОПИС ФІГУР

Фіг. 1 показує конкурентне зв'язування корового токсину Cry1Ab, корового токсину Cry1Ca і корового токсину Cry1Ab, міченого ¹²⁵I, з мембранними везикулами щіткової облямівки (BBMV) *Spodoptera frugiperda*.

Фіг. 2 показує конкурентне зв'язування корового токсину Cry1Ca, корового токсину Cry1Ab і корового токсину Cry1Ab, міченого ¹²⁵I, з BBMV *Spodoptera frugiperda*.

КОРОТКИЙ ОПИС ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

SEQ ID NO:1 показує коровий Cry1Ca/протоксин Cry1Ab химерний білок 1164 aa (DIG-152),

SEQ ID NO:2 показує коровий токсин Cry1Ca,

SEQ ID NO:3 показує коровий токсин Cry1Ab.

ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Даний винахід частково стосується несподіваного відкриття, що Cry1Ca має високу активність проти популяції вогнівки цукрової тростини (SCB; *Diatraea saccharalis*), яка стійка до Cry1Ab. Відповідно, даний винахід частково стосується несподіваного відкриття, що Cry1Ca можна використовувати в комбінації або в "комплекті" з Cry1Ab для боротьби з розвитком стійкості до будь-якого одного зі згаданих інсектицидних білків. Інакше кажучи, даний винахід частково стосується несподіваного відкриття, що популяція вогнівки цукрової тростини, вибрана по стійкості до Cry1Ab, не має стійкості до Cry1Ca; популяція вогнівки цукрової тростини зі стійкістю до токсину Cry1Ab є сприйнятливою (тобто, не виявляє перехресної стійкості) до Cry1Ca. Таким чином, даний винахід включає в себе використання токсину Cry1Ca для контролю популяцій вогнівки цукрової тростини, які є стійкими до Cry1Ab.

Фахівцям в даній галузі техніки буде очевидно, в плані переваги даного розкриття, що рослини, які продукують Cry1Ca і Cry1Ab (які включають в себе інсектицидні ділянки вказаних білків), будуть корисними для сповільнення або запобігання розвитку стійкості до будь-якого одного з вказаних інсектицидних білків.

Даний винахід включає в себе використання Cry1Ca для захисту цукрової тростини і інших економічно важливих видів рослин від пошкодження і втрати урожаю, викликаного вогнівкою цукрової тростини або популяціями вогнівки цукрової тростини, які стали стійкими до Cry1Ab. Вогнівка цукрової тростини може також бути шкідником кукурудзи. Це особливо актуальне для деяких країн Центральної і Південної Америки, наприклад, Бразилії і Аргентини. Таким чином, згідно з даним винаходом також можна захищати, наприклад, кукурудзу.

Даний винахід, таким чином, описує сукупність заходів щодо керування стійкістю комах (IRM) для запобігання або зменшення розвитку стійкості до Cry1Ab і/або Cry1Ca у вогнівки цукрової тростини.

Додатково, дослідження зв'язування рецептора з допомогою радіоміченого Cry1Ca і тканини комах *Spodoptera frugiperda*; кукурудзяної листової совки (FAW), показали, що Cry1Ab не конкурує за ділянку високоафінного зв'язування, з якою зв'язується Cry1Ca. Ці результати вказують, що комбінацію Cry1Ab і Cry1Ca можна використовувати як ефективний спосіб зниження розвитку стійкості в популяціях комах (таких як FAW і SCB) до білків Cry1Ab і/або Cry1Ca для рослин (таких як кукурудза і цукрова тростина), які продукують обидва білки. Спільні дослідження токсину показали, що білок Cry1Ca зв'язується з двома білками в BBMV у *S.frugiperda*, один з яких має молекулярну масу 40 кДа і інший 44 кДа, де білок Cry1Ab зв'язується з єдиним білком 150 кДа (Aranda et al., 1996) і його не ввели в дослідженнях в дію неконкурентного зв'язування.

Таким чином, даний винахід також включає в себе комбінацію Cry1Ca і Cry1Ab як сукупність заходів IRM щодо зниження розвитку стійкості кукурудзяної листової совки і/або вогнівки цукрової тростини до якого-небудь білка, або по боротьбі зі стійкістю популяцій вогнівки

цукрової тростини, що виявляється до Cry1Ab.

Даний винахід стосується наступного: композицій для контролю лускокрилих шкідників, де вказані композиції містять клітини, які експресують коровий токсиновмісний білок Cry1Ca і коровий токсиновмісний білок Cry1Ab;

5 клітин-хазяїв, трансформованих для експресії обох білків: корового токсиновмісного білка Cry1Ab і корового токсиновмісного білка Cry1C, де вказаний хазяїн являє собою клітину мікроорганізму або рослини (полінуклеотидний суб'єкт (суб'єкти) переважно знаходяться в генетичній конструкції під контролем промотору, що не походить з *Bacillus thuringiensis* (функціонально зв'язаного з ним/які містять його); полінуклеотиди, що розглядаються, можуть

10 містити кодон, який використовується для посилення експресії в рослині); способу контролю лускокрилих шкідників, що містить контакт вказаних шкідників або навколишнього середовища вказаних шкідників з ефективною кількістю композиції, яка продукує коровий токсиновмісний білок Cry1Ab, і клітини, яка експресує коровий токсиновмісний білок Cry1C;

15 рослини (такоїж, наприклад, кукурудза або соя, або бавовна, або цукрова тростина), яка містить ДНК, що кодує коровий токсиновмісний білок Cry1Ca, і ДНК, що кодує коровий токсиновмісний білок Cry1Ab; і насіння такої рослини;

рослини (такоїж, наприклад, кукурудза або соя, або бавовна, або цукрова тростина), де у вказану рослину кукурудзи була впроваджена ДНК, що кодує коровий токсиновмісний білок Cry1Ca, і ДНК, що кодує коровий токсиновмісний білок Cry1Ab; і насіння такої рослини.

20 Автори винаходу в біотестах з штучним поживним середовищем продемонстрували, наприклад, що Cry1Ca (білок з рекомбінантного штаму *Pseudomonas fluorescens* MR1206/DC639; плазміда pMYC2547), має високу ефективність для контролю популяцій вогнівки цукрової тростини (SCB; *Diatraea saccharalis*), які були вибрані по стійкості до Cry1Ab. Це є показником корисності Cry1Ca для контролю популяцій SCB, які стійкі до Cry1Ab, або для зниження розвитку стійкості до Cry1Ab в популяціях SCB.

Частково виходячи з описаних у винаході даних, вважається, що спільна експресія Cry1Ca і Cry1Ab може створити високоефективний комплекс IRM для контролю SCB. Для розширення спектра дії до вказаної комбінації можна додавати інші білки. Наприклад, для кукурудзи, додавання Cry1Fa зможе створити комплекс IRM проти європейського кукурудзяного метелика (ECB), *Ostrinia nubilalis* (Hubner), при додаванні ще одного MOA створюється комплекс для контролю вогнівки цукрової тростини SCB.

Інформацію про білок Cry1C як потенційний біоінсектицид для рослин див. в публікації (Avisar et al. 2009). Avisar D, Eilenberg H, Keller M, Reznik N, Segal M, Sneh B, Zilberstein A (2009) The *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1C as a potential bioinsecticide in plants. *Plant Science* 176:315-324.

Рецептори комах. Як описано в розділі прикладів, дослідження конкурентного рецепторного зв'язування з використанням радіоміченого корового білка-токсину Cry1Ca показали, що коровий білок-токсин Cry1Ab не конкурує за присутню в тканинах комах FAW високоафінний сайт зв'язування, з якими зв'язується Cry1Ca. Ці результати показують, що комбінація білків Cry1Ab і Cry1Ca може бути ефективним засобом для зниження розвитку стійкості в популяціях FAW до Cry1Ab (і аналогічно, для зниження розвитку стійкості до Cry1Ca), і, ймовірно, буде підвищувати рівень стійкості до цього шкідника кукурудзяних рослин, які експресують обидва білки.

45 Виходячи з цих даних, також передбачається, що Cry1Ca буде ефективний для контролю популяцій SCB, які мають стійкість до Cry1Ab. Один варіант здійснення полягає у використанні згаданих білків Cry в регіонах, де Cry1Ab перестав бути ефективним для контролю SCB внаслідок розвитку стійкості. Інший варіант здійснення полягає у використанні Cry1Ca в комбінації з Cry1Ab для зниження розвитку стійкості у SCB до білка Cry1Ab.

50 Комбінації токсинів, описаних у винаході, можна використовувати для контролю лускокрилих шкідників. Дорослі лускокрилі, тобто, метелики і молі, харчуються в основному квітковим нектаром. Майже всі личинки, тобто, гусениці, харчуються рослинами, і багато які з личинок є серйозними шкідниками. Гусениці харчуються на листі або всередині листя, або поїдають коріння або стебла рослини, де вони позбавляють рослину поживних речовин і часто руйнують

55 конструкцію фізичної опори рослини. Додатково, гусениці харчуються фруктами, тканинами і зерном і борошном, які зберігаються, руйнуючи вказані продукти для продажу або значною мірою зменшуючи їх вартість. Лускокрилі шкідники, що згадуються у винаході, належать до різних стадій життя шкідника, включаючи в себе личинкові стадії.

Химерні токсини даного винаходу містять повну N-кінцеву токсичну ділянку корового токсину

60 B.t. і, в деякій точці після кінця ділянки токсину білок несе транзицію в гетерологічний

послідовності протоксину. N-кінцева токсична ділянка токсину B.t. називається згідно з винаходом "коровим" токсином. Транзиція в гетерологічному сегменті протоксину може відбуватися приблизно біля сполуки токсину/протоксину або, як альтернатива, може зберігатися ділянка нативного протоксину (розташована після ділянки токсину) з транзицією в гетерологічному протоксині, розташованою в 5'-3' напрямку.

Як приклад, один химерний токсин даного винаходу має повну корову токсичну ділянку Cry1Ab (амінокислоти від 1 до 601) і гетерологічний протоксин (амінокислоти від 602 до С-кінця). У одному переважному варіанті здійснення ділянка химерного токсину, яка містить протоксин, походить з білка-токсину Cry1Ab. Як другий приклад, другий химерний токсин даного винаходу, показаний в SEQ ID NO:1 (DIG-152), має повну корову токсичну ділянку Cry1Ca (амінокислоти від 1 до 619) і гетерологічний протоксин (амінокислоти від 620 до С-кінця). У переважному варіанті здійснення ділянка химерного токсину, яка містить протоксин, походить з білка-токсину Cry1Ab.

Фахівцям в даній галузі техніки буде очевидно, що токсини B.t., які навіть належать до конкретного класу, наприклад, до Cry1Ca, до деякої міри можуть варіювати по довжині і точній локалізації транзиції від ділянки токсину до ділянки протоксину. Звичайно довжина токсинів Cry1Ca складає від близько 1150 до близько 1200 амінокислот. Транзиція від ділянки токсину до ділянки протоксину буде звичайно займати ділянку в діапазоні від близько 50 % до близько 60 % від загальної довжини токсину. Химерний токсин даного винаходу буде повністю включати в себе всю протяжність цієї корової N-кінцевої ділянки токсину. Таким чином, химерний токсин буде містити щонайменше близько 50 % повнорозмірних B.t. токсинів Cry1Ca або Cry1Ab. Звичайно вони будуть складати щонайменше близько 590 амінокислот. Відносно ділянки протоксину, повнорозмірна ділянка Cry1(b) протоксину розташована від кінця ділянки токсину до С-кінця молекули. Кінець цієї ділянки довжиною приблизно від 100 до 150 амінокислот є найбільш важливим для включення в нього химерного токсину даного винаходу.

Гени і токсини. Гени і токсини, корисні згідно з даним винаходом, включають в себе не тільки повнорозмірні розкриті послідовності, але також і фрагменти цих послідовностей, варіанти, мутанти і злиті білки, які зберігають властивості пестицидної активності токсинів, конкретно описаних у винаході як приклади. Використовувані у винаході терміни "варіанти" або "зміни" генів стосуються нуклеотидних послідовностей, які кодують однакові токсини, або які кодують еквівалентні токсини, що мають пестицидну дію. Використовуваний у винаході термін "еквівалентні токсини" стосується токсинів, що мають однакову або по суті однакову біологічну дію проти цільових шкідників, як і токсини, вказані в формулі винаходу.

Використовувані в даному винаході межі ідентичності послідовностей складають близько 95 % (білки Cry1Ab і 1Ca), 78 % (Cry1A і Cry1C) і 45 % (Cry1), див. публікації "Revision of the Nomenclature of the Bacillus thuringiensis Pesticidal Crystal Proteins", N. Crickmore, D.R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, and D.H. Dean. Microbiology and Molecular Biology Reviews (1998) Vol 62: 807-813. Ці межі також можна застосовувати тільки для корових токсинів (для токсинів Cry1Ab і Cry1C). Перелік номерів GENBANK, приведений нижче в Додатку А, також можна використовувати для отримання послідовності для будь-якого з генів і білків, розкритих або згаданих в даному винаході.

Фахівцям в даній галузі техніки буде очевидно, що існує ряд способів ідентифікації і отримання генів, що кодують активні токсини. Конкретні гени або ділянки генів, згадані у винаході як приклад, можна виділяти з колекцій депозитарію культур, як описано вище. Ці гени, або їх ділянки або варіанти, також можна конструювати штучно, наприклад, за допомогою синтезатора генів. Варіації генів можна легко конструювати за допомогою стандартних технологій створення точкових мутацій. Також можна створювати фрагменти цих генів згідно зі стандартними методиками з використанням комерційно доступних екзонуклеаз або ендонуклеаз. Наприклад, можна використовувати ферменти, такі як Bal31, або сайт-направлений мутагенез для систематичного відсікання нуклеотидів від кінців цих генів. Також можна отримувати гени, що кодують активні фрагменти, за допомогою ряду ферментів рестрикції. Можна використовувати протеази для прямого створення активних фрагментів згаданих токсинів.

Фрагменти і еквіваленти, які зберігають пестицидну дію токсинів, що розглядаються, входять в об'єм даного винаходу. Крім того, завдяки надмірності генного коду множина різних послідовностей ДНК може кодувати розкриті у винаході амінокислотні послідовності. Фахівцям в даній галузі техніки будуть очевидні способи створення таких альтернативних послідовностей ДНК, що кодують однакові, або по суті аналогічні токсини. Ці різні послідовності ДНК входять в об'єм даного винаходу. Використовуване у винаході поняття "по суті аналогічна" послідовність стосується послідовностей, що мають амінокислотні заміни, делеції, додавання або інсерції, які

фактично не впливають на пестицидну дію. У це визначення також включені фрагменти, що зберігають пестицидну дію.

Додатковим способом ідентифікації генів і генних ділянок, що кодують токсини і корисних згідно з даним винаходом, є використання олігонуклеотидних зондів. Ці зонди являють собою виявлювані нуклеотидні послідовності. Детекцію таких послідовностей можна провести за допомогою відповідної мітки, або можна задіяти флуоресцентні властивості, як описано в міжнародній патентній заявці № WO 93/16094. Як відомо в даній галузі техніки, якщо при гібридизації молекули зонда і зразка нуклеїнової кислоти утворюється міцний зв'язок між цими двома молекулами, то обґрунтовано передбачається, що зонд і зразок мають значний ступінь гомології. Переважно, гібридизацію проводять при суворих умовах способами, відомими в даній галузі техніки, які описані, наприклад, авторами Keller, G.H., M.M. Manak (1987) DNA Probes, Stockton Press, New York, N.Y., pp. 169-170. Деякі приклади концентрацій солей і температурних комбінацій являють собою (в порядку збільшення ступеня суворості): 2 X SSPE або SSC (розчин хлориду і цитрату натрію) при кімнатній температурі; 1 X SSPE або SSC при 42°C; 0,1 X SSPE або SSC при 42°C; 0,1 X SSPE або SSC при 65°C. Детекція зонда являє собою загальноприйнятий спосіб для визначення факту проведення гібридизації. Такий аналіз зондів забезпечує швидкий спосіб ідентифікації кодуючих токсини генів даного винаходу. Нуклеотидні сегменти, які використовуються як зонди згідно з винаходом, можна синтезувати за допомогою синтезатора ДНК і стандартних методик. Вказані нуклеотидні послідовності можна також використовувати як ПЛР-праймери для ампліфікації генів даного винаходу.

Конкретні токсини даного винаходу приведені у винаході як конкретні приклади. Оскільки згадані токсини є просто прикладами токсинів даного винаходу, буде очевидно, що даний винахід містить варіанти або еквіваленти токсинів (і нуклеотидні послідовності, що кодують еквівалентні токсини), що мають пестицидну дію, яка однакова або схожа з дією токсину, що розглядається. Еквівалентні токсини і токсин, що розглядається, мають амінокислотну гомологію. Ця амінокислотна гомологія звичайно перевищує 75 %, переважно складає більше 90 %, і найбільш переважно більше 95 %. Найбільш виражену амінокислотну гомологію виявляють в найважливіших областях токсину, які зумовлюють біологічну дію або залучені до зумовлення тривимірної конфігурації, яка зрештою відповідає за біологічну дію. У цьому відношенні підходять конкретні заміни амінокислоти, і можна передбачати, що ці заміни знаходяться в областях, які не мають вирішального значення для дії, або вони являють собою консервативні амінокислотні заміни, які не торкаються тривимірної конфігурації молекули. Наприклад, амінокислоти можуть належати до наступних класів: неполярні, незаряджені полярні, лужні і кислі. Консервативні заміни, за допомогою яких амінокислота одного класу замінюється на іншу амінокислоту того ж типу, входять в об'єм даного винаходу, якщо ця заміна значною мірою не змінює біологічну дію сполуки. У таблиці 1 приведений перелік прикладів амінокислот, що належать до кожного класу.

Таблиця 1

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

У деяких випадках також можна робити неконсервативні заміни. Вирішальним чинником є те, що ці заміни не повинні значною мірою знижувати біологічну дію токсину.

Рекомбінантні хазяї. Гени, які кодують токсини даного винаходу, можна вставляти в широкий спектр клітин-хазяїв мікроорганізмів або рослин. Експресія генів токсину прямо або опосередковано приводить до внутрішньоклітинної продукції і збереження пестициду. Можна використовувати кон'югаційне перенесення і рекомбінантне перенесення для створення штаму B.t., який експресує обидва токсини даного винаходу. Інші організми-хазяї також можна трансформувати одним або двома генами токсину, що використовуються в цьому випадку для досягнення синергетичного ефекту. Можна застосовувати мікроорганізми з прийнятними мікробними хазяями, наприклад, Pseudomonas, у шкідника в місці їх розмноження і поглинання.

Результатом є контроль над шкідником. Альтернативно, мікроорганізм, що є хазяєм гена токсину, можна обробляти при умовах, які пролонгують дію токсину і стабілізують клітину. Потім оброблену клітину, яка зберігає токсичну активність, можна застосовувати в навколишньому середовищі цільового шкідника.

5 Якщо ген токсину B.t. впроваджують в мікроорганізм-хазяїн за допомогою відповідного вектора, і вказаний хазяїн використовується в навколишньому середовищі в живому стані, має значення використання конкретних мікроорганізмів-хазяїв. Хазяїв вибирають з мікроорганізмів, які мають відому здатність в одній або більше сільськогосподарських культур, які розглядаються, заселяти "фітосферу" (філоплан, філосферу, ризосферу і/або ризоплан).
10 Вибирають такі мікроорганізми, які здатні успішно конкурувати в конкретному середовищі (сільськогосподарські культури і інші середовища мешкання комах) з мікроорганізмами дикого типу, забезпечувати стійке збереження і експресію гена, який експресує поліпептидний пестицид, і забезпечувати поліпшений захист пестициду від розкладання і інактивації в навколишньому середовищі.

15 Відомо, що велика кількість мікроорганізмів населяє філоплан (поверхня листя рослини) і/або ризосферу (ґрунт, який оточує коріння рослини) у широкого спектра важливих сільськогосподарських культур. Ці мікроорганізми включають в себе бактерії, морські водорості і гриби. Особливий інтерес викликають такі мікроорганізми, як, наприклад, бактерії роду *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Xanthomonas*, *Streptomyces*, *Rhizobium*,
20 *Rhodopseudomonas*, *Methylophilus*, *Agrobacterium*, *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Leuconostoc* і *Alcaligenes*; гриби, особливо дріжджі, наприклад, роду *Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Sporobolomyces*, *Rhodotorula* і *Aureobasidium*. Особливий інтерес викликають такі фітосферні види бактерій як *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Acetobacter xylinum*, *Agrobacterium tumefaciens*,
25 *Rhodopseudomonas spheroides*, *Xanthomonas campestris*, *Rhizobium melioli*, *Alcaligenes entrophus* і *Azotobacter vinlandii*; і фітосферні види дріжджів, такі як *Rhodotorula rubra*, *R. glutinis*, *R. marina*, *R. aurantiaca*, *Cryptococcus albidus*, *C. diffluens*, *C. laurentii*, *Saccharomyces rosei*, *S. pretoriensis*, *S. cerevisiae*, *Sporobolomyces roseus*, *S. odoratus*, *Kluyveromyces veronae* і *Aureobasidium pollulans*. Особливий інтерес викликають пігментовані мікроорганізми.

30 Широка різноманітність шляхів доступна для впровадження в мікроорганізм-хазяїн гена B.t., що кодує токсин при умовах, які дозволяють стійко зберігати і експресувати ген. Ці способи відомі фахівцям в даній галузі техніки і описані, наприклад, в патенті США № 5135867, який включений у винахід шляхом посилання.

Обробка клітин. *Bacillus thuringiensis* або рекомбінантні клітини, які експресують токсини B.t., можна обробляти для пролонгування дії токсину і стабілізації клітини. Утворювана мікрокапсула пестициду містить токсин B.t. або токсини в клітинній структурі, яка була стабілізована, і буде захищати токсин в ході застосування мікрокапсули в середовищі шкідника-мішені. Прийнятні клітини-хазяї можуть включати в себе або прокаріоти або еукаріоти, і звичайно обмежені клітинами, які не продукують речовин, що є токсичними для вищих організмів, наприклад,
40 ссавців. Разом з тим, можна використовувати організми, які продукують токсичні речовини для вищих організмів, якщо ці токсичні речовини нестабільні або рівень застосування є досить низьким, щоб уникнути будь-якої імовірності токсичного впливу на хазяя-ссавця. Як хазяї особливий інтерес представляють прокаріоти і нижчі еукаріоти, такі як гриби.

Звичайно для обробки задіюють інтактні клітини, в основному в проліферативній формі, а не у вигляді спори, хоч в деяких випадках можна використовувати спори.

45 Обробку мікробної клітини, наприклад, мікроорганізму, що містить ген або гени токсину B.t., можна здійснювати хімічними або фізичними способами, або комбінацією хімічних і/або фізичних способів при умові, що відсутній і шкідливий вплив технології на властивості токсину, і зменшення здатності клітин до захисту токсину. Прикладами хімічних реагентів є галогенові агенти, зокрема, галогени з атомними номерами 17-80. Більш конкретно, можна використовувати йод при помірних умовах і протягом достатнього часу для досягнення бажаних
50 результатів. Інші прийнятні способи включають в себе обробку альдегідами, такими як глутаральдегід; протиінфекційними агентами, наприклад, зефіран хлоридом і цетилпіридинію хлоридом; спиртами, такими як ізопропіл і етанол; різними гістологічними фіксаторами, такими як йодний розчин Люголю, фіксатор Боуена, різні кислоти і фіксатор Хеллі (див.: Humason, Gretchen L., Animal Tissue Techniques, W. H. Freeman and Company, 1967); або комбінацію фізичних впливів (нагрівання) і хімічних агентів, які зберігають і пролонгують дію токсину, який продукується в клітині при введенні клітини в середовище хазяя. Прикладами фізичних способів є короткохвильове випромінювання, наприклад, гамма-випромінювання і рентгенівське
60 випромінювання, заморожування, ультрафіолетове опромінення, ліофілізація і т. п. Способи

обробки мікробних клітин розкриті в патентах США № 4 695455 і 4695462, включених у винахід шляхом посилання.

Звичайно клітини мають підвищену структурну стійкість, яка збільшує їх стабільність в умовах навколишнього середовища. Якщо пестицид знаходиться в попередній формі, необхідно вибирати спосіб обробки клітин, який не інгібує перетворення пре-форми в зрілу форму пестициду за допомогою патогена цільового шкідника. Наприклад, формальдегід зшиває білки і здатний інгібувати перетворення пре-форми поліпептиду пестициду. Спосіб обробки повинен зберігати щонайменше значну частину властивостей біодоступності або біоактивності токсину.

Особливо важливі властивості для відбору клітин-хазяїв з метою продукції включають в себе простоту впровадження гена або генів *B.t.* в клітину-хазяя, доступність систем експресії, ефективність експресії, стабільність пестициду в хазяї і присутність додаткових генетичних здатностей. Властивості для застосування як пестицидної мікрокапсули, що розглядаються, включають в себе захисні характеристики для пестициду, такі як товсті клітинні стінки, пігментація і внутрішньоклітинна упаковка або утворення тілець включення; виживання у водному середовищі; відсутність токсичності для ссавців; привабливість для поглинання шкідниками; здатність легко викликати загибель і фіксуватися без пошкодження токсину; і т. п. Інші важливі умови включають в себе простоту виготовлення і використання, економічність, стабільність при зберіганні і тому подібне.

Ріст клітин. Клітину-хазяя, що містить інсектицидні ген або гени *B.t.*, можна вирощувати в будь-якому зручному поживному середовищі, в якому конструкція ДНК дає селективну перевагу, і у всьому середовищі або по суті у всіх клітинах в селективному середовищі забезпечується збереження гена *B.t.* Потім ці клітини можна збирати загальноприйнятими способами. Альтернативно, клітини можна обробляти перед їх збиранням.

Клітини *B.t.*, які продукують токсини за винаходом, можна культивувати з використанням стандартних в даній галузі техніки середовищ і способів ферментації. Після завершення циклу ферментації бактерії можна збирати з ферментаційного бульйону першою сепарацією спор *B.t.* і кристалів за допомогою способів, відомих в даній галузі. Відновлені спори *B.t.* і кристали можна об'єднувати в змочуваний порошок, рідкий концентрат, гранули або інші рецептури за допомогою додавання сурфактантів, диспергуючих агентів, інертних носіїв і інших компонентів, щоб полегшити обробку і застосування для конкретних цільових шкідників. Ці рецептури і методики застосування широко відомі в даній галузі техніки.

Рецептури. Рецептури гранульованих приманок, які містять аттрактант і спори, кристали і виділені *B.t.* токсини, або рекомбінантні мікроорганізми, які містять гени, що отримуються з ізолятів *B.t.*, розкриті в даному винаході, можна застосовувати на ґрунті. Рецептуру продукту також можна застосовувати як покриття насіння, або для обробки коріння, або для повної обробки рослини на більш пізніх етапах циклу злакової рослини. Для обробки рослин і ґрунту можна використовувати *B.t.*-клітини у вигляді змочуваних порошоків, гранул або порошкових препаратів шляхом змішування з різними інертними матеріалами, такими як неорганічні мінерали (філосилікати, карбонати, сульфати, фосфати і т. п.) або рослинними матеріалами (порошок з кукурудзяних качанів, рисове лушпиння, шкаралупа волоського горіха і т. п.). Рецептури можуть включати в себе адгезивні ад'юванти, стабілізуючі агенти, інші пестицидні добавки або сурфактанти. Рідкі рецептури можуть мати водну або неводну основу і використовуватися у вигляді піни, гелів, суспензій, емульгованих концентратів або подібних форм. Компоненти можуть включати в себе реологічні агенти, сурфактанти, емульгатори, диспергуючі агенти або полімери.

Фахівцям в даній галузі техніки буде очевидно, що концентрація пестициду може широко варіювати залежно від природи конкретної рецептури, зокрема, чи є вона концентратом або виготовлена для безпосереднього застосування. Пестицид може бути присутнім в кількості щонайменше 1 % ваги і може становити 100 % ваги. У сухих рецептурах пестицид може складати приблизно від 1 до 95 % ваги, тоді як рідкі рецептури звичайно можуть мати приблизно від 1 до 60 % ваги твердих частинок в рідкій фазі. У рецептурах звичайно може знаходитися від близько 10^2 близько до 10^4 клітин/мг. Вказані рецептури можна застосовувати в кількості приблизно від 50 мг (в рідкому або сухому вигляді) до 1 кг або більше на гектар.

Рецептури можна застосовувати в середовищі мешкання лускокрилих шкідників, наприклад, на листі або на ґрунті, шляхом розпилення, обпудрювання, обприскування або подібними способами.

Трансформація рослин. Переважним рекомбінантним хазяєм, який продукує інсектицидні білки даного винаходу, є трансформована рослина. Гени, що кодують *Bt* білки-токсини, розкриті у винаході, можна вставляти в клітини рослини, використовуючи множини способів, відомих в даній галузі техніки. Наприклад, для підготовки до вставки чужих генів у вищі рослини доступна

велика кількість векторів клонування, що містять систему реплікації в *Escherichia coli* і маркер, що дозволяє провести селекцію трансформованих клітин. Вектори містять, наприклад, серед іншого, рBR322, серії рUC, серії M13mp, рACYC184. Відповідно, фрагмент ДНК, який несе послідовність, що кодує Bt білок-токсин, можна вставляти у вектор на відповідній ділянці рестрикції. Отриману плазмиду використовують для трансформації в *E. coli*. Клітини *E. coli* вирощують у відповідному поживному середовищі, потім збирають і лізують. Відновлюють плазмиду. Як способи аналізу звичайно проводять аналіз послідовностей, аналіз рестрикції, електрофорез і інші біохімічні і молекулярно-біологічні тести. Після кожної маніпуляції використовувану послідовність ДНК можна розщеплювати і з'єднувати з наступною послідовністю ДНК. Кожну послідовність плазмиди можна клонувати в тій же плазміді або в інших плазмідах. Залежно від способу вставки бажаних генів в рослину можуть бути потрібні інші послідовності ДНК. Наприклад, якщо для трансформації рослинної клітини використана плазмиди Ti або Ri, то щонайменше права межа, але часто і права і ліва межа Ti або Ri плазмиди T-ДНК повинні з'єднуватися як фланкуюча область генів, призначених для вставки. Проведені інтенсивні дослідження використання T-ДНК для трансформації рослинних клітин, що в достатньому об'ємі описані в патенті EP 120516, Lee and Gelvin (2008), Hoekema (1985), Fraley et al., (1986) і An et al., (1985), і добре відомі в даній галузі техніки.

Після включення в геном рослини вставлена ДНК є відносно стабільною. Вектор трансформації звичайно містить вибраний маркер, який додає трансформованим рослинним клітинам резистентності до біоциду або антибіотику, такому як біалафос, канаміцин, G418, блеоміцин або гігromіцин, серед іншого. Конкретний використовуваний маркер повинен відповідно дозволяти відбір трансформованих клітин, а не клітин, що не містять ДНК-вставку.

Для вставки ДНК в рослинну клітину-хазяя доступна велика кількість способів. Ці способи включають в себе трансформацію з T-ДНК, з використанням як агента трансформації *Agrobacterium tumefaciens* або *Agrobacterium rhizogenes*, злиття, ін'єкцію, біолистику (бомбардування мікрочастинками) або електропорацію, а також інші можливі способи. Якщо для трансформації використовують *Agrobacteria*, ДНК, що вставляється, необхідно клонувати в спеціальні плазмиди, а саме, або в проміжний вектор або в бінарний вектор. Проміжні вектори можна інтегрувати в плазмиди Ti або Ri шляхом гомологічної рекомбінації зумовленої послідовностями, які є гомологічними послідовностям в T-ДНК. Плазмиди Ti або Ri також містять *vir*-область, необхідну для перенесення T-ДНК. Проміжні вектори не можуть самостійно реплікуватися в *Agrobacteria*. Проміжний вектор можна перенести в *Agrobacterium tumefaciens* за допомогою хелперної плазмиди (кон'югація). Бінарні вектори можуть реплікуватися і в *E. coli* і в *Agrobacteria*. Вони містять ген маркера селекції і лінкер або полилінкер, які обмежені правими і лівими прикордонними областями T-ДНК. Вони можуть бути трансформовані безпосередньо в *Agrobacteria* (Holsters et al., 1978). Та, що Використовується як клітина-хазяїн *Agrobacterium* повинен містити плазмиду, несучу *vir*-область. Ця *vir*-область необхідна для перенесення T-ДНК в клітину рослини. Може бути присутнім додаткова T-ДНК. Трансформована вказаним шляхом бактерія використовується для трансформації клітин рослини. Рослинні експланти переважно можна культивувати з *Agrobacterium tumefaciens* або *Agrobacterium rhizogenes* для перенесення ДНК в клітину рослини. Потім можна відновлювати цілі рослини з інфікованого рослинного матеріалу (наприклад, з частин листя, сегментів стебел, коріння, але також з протопластів або суспензії культивованих клітин) у відповідному середовищі, яке може містити антибіотики або біоциди для селекції. Отримані вказаним шляхом рослини потім можна тестувати на присутність вставки ДНК. Спеціальних вимог до плазмід у разі ін'єкції і електропорації не існує. Можна використовувати звичайні плазмиди, наприклад, такі як похідні рUC.

Трансформовані клітини ростуть всередині рослин звичайним шляхом. Вони можуть формувати зародкові клітини і передавати трансформовану ознаку (ознаки) рослинам-нащадкам. Такі рослини можна вирощувати звичайним шляхом і схрещувати з рослинами, які мають ті ж самі трансформовані спадкові чинники або інші спадкові чинники. Отримувані гібридні суб'єкти мають відповідні фенотипічні властивості.

У переважному варіанті здійснення даного винаходу рослини трансформують генами, в яких використовуваний кодон був оптимізований для рослин. Див., наприклад, патент США № 5380831, включений у винахід шляхом посилання. Деякі зрізані токсини розглянуті у винаході як приклад, разом з тим в галузі техніки Bt-білків відомо, що токсини 130 кДа-типу (повнорозмірні) мають N-кінцеву групу, яка являє собою коровий токсин, і C-кінцевий залишок, який є "хвостом" протоксину. Таким чином, відповідні "хвости" можна використовувати зі зрізаними/коровими токсинами даного винаходу. Див. наприклад, патент США № 6218188 і патент США № 6673990. Додатково, в даній галузі техніки відомі способи створення синтетичних Bt-генів для

використання в рослинах (Stewart and Burgin, 2007). Одним з необмежувальних прикладів переважної трансформованої рослини є фертильна рослина кукурудзи, що містить рослинний експресований ген, що кодує білок Cry1Fa, і що додатково містить другий рослинний експресований ген, що кодує білок Cry1Ca.

Перенесення (або вставка) ознаки (ознак) Cry1Ab і Cry1C в інбредні лінії кукурудзи може здійснюватися розмноженням з рекурентною селекцією, наприклад, шляхом зворотного схрещування. У цьому випадку, бажаного рекурентного батька спочатку схрещують з інбредним донором (нерекурентним батьком), який несе відповідний ген (гени) для ознак Cry1Ab і Cry1C. Потомство від цього схрещування потім зворотно парують з рекурентним батьком, з подальшою селекцією отриманого потомства на бажану ознаку (ознаки), яка переноситься від нерекурентного батька. Через три, переважно чотири, більш переважно, через п'ять або більше поколінь зворотних схрещувань з рекурентним батьком з селекцією на бажану ознаку (ознаки), потомство буде гетерозиготним по локусах, які відповідають за переносиму ознаку (ознаки), але буде схожим на рекурентного батька по більшості або майже по всіх інших генах (див., наприклад, Poehlman & Sleper (1995) *Breeding Field Crops*, 4th Ed., 172-175; Fehr (1987) *Principles of Cultivar Development*, Vol. 1: Theory and Technique, 360-376).

Стратегії керування стійкістю комах (IRM). Автори Roush et al., наприклад, виділяють стратегію двох токсинів, який також називається "пірамідинг" або "комплект", для керування інсектицидними трансгенними сільськогосподарськими культурами. (The Royal Society. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. (1998) 353, 1777-1786). На вебсайті Керування з охорони навколишнього середовища США (the United States Environmental Protection Agency: epa.gov/opppbpd/biopesticides/pips/bt_corn_refuge_2006.htm) опубліковані наступні вимоги для забезпечення посівів нетрансгенних (тобто, не-Bt) "сховищ" (блок не-Bt сільськогосподарських культур/кукурудзи), що висівається разом з трансгенними зерновими культурами, які продукують єдиний Bt білок, активний проти цільових шкідників.

Існують наступні конкретні структуровані вимоги для кукурудзяної продукції, Bt-захищеної від кукурудзяного метелика (Cry1Ab або Cry1F):

Структуровані "сховища":

20 % площі в кукурудзяній зоні відводять під "сховище" для Bt-незахищеної від лускокрилих шкідників кукурудзи

50 % площі в бавовняній зоні відводять для "сховища" культур, Bt-незахищених від лускокрилих шкідників

Блоки

1. Внутрішні (тобто, у межах Bt-поля)

2. Зовнішні (тобто, окремі поля в межах ½ милі (¼ милі, по можливості) від Bt-поля, для максимального збільшення частоти випадкового спарювання)

Смуги усередині поля

Ширина смуг повинна складати щонайменше 4 ряди (переважно 6 рядів), для зменшення ефекту переміщення личинок.

На вебсайті Національної асоціації виробників кукурудзи (ncga.com/insect-resistance-management-fact-sheet-bt-com), також опубліковане подібний посібник відносно вимог. Наприклад:

Вимоги IRM по кукурудзяному метелику:

- Щонайменше 20 % площ відводять під вирощування "сховищ" гібридної кукурудзи

- У зонах вирощування бавовни "сховища" повинні складати 50 %

- Вирощування повинне бути на відстані в межах 1/2 милі від гібридів "сховища"

- "Сховище" можна вирощувати у вигляді смуг усередині Bt-полю; смуги "сховища" повинні мати ширину щонайменше 4 ряди

- "Сховище" можна обробляти звичайними пестицидами, тільки у випадку досягнення економічного порога для цільової комах

- У "сховище" кукурудзи не можна застосовувати розпилювані інсектициди на основі Bt

- Відповідне "сховище" повинне вирощуватися на кожній фермі з Bt-кукурудзою.

Автори Roush et al. стверджують (наприклад, правий стовпчик, сторінки 1780 і 1784) що комплект або "пірамідинг" із двох різних білків, кожний з яких ефективний проти цільових шкідників і не має якої-небудь перехресної стійкості або слабку перехресну стійкість, може дати можливість застосовувати сховище меншого розміру. Roush припускає, що при успішному комплекті розмір сховища менше 10 % сховища може дати порівнянний контроль стійкості до рівня 50 % сховища для єдиної (не-пірамідної) ознаки. Для доступних у даний час пірамідних Bt-кукурудзяних продуктів відповідно до вимог Управління по охороні навколишнього середовища США необхідне структуроване сховище не-Bt кукурудзи значно меншої площі (звичайно 5 %),

ніж для продуктів з єдиною ознакою (звичайно 20 %).

Кожне з вищезгаданих процентних співвідношень (таких, як наприклад, для 1F/Ab), або подібних співвідношень сховищ можна застосовувати для розглянутих подвійних або потрійних комплектів або пірамід. Даний винахід містить у собі комерційну площу землі в акрах, наприклад, більше 10 акрів, з вирощуванням зі згаданим сховищем (або без нього), і з рослинами згідно із даним винаходом.

Існують різні способи вирощування сховищ, що включають у себе вирощування в полях з різним геометричним плануванням (як згадано вище), і упаковки з насінною сумішшю, як додатково розглянуто Roush і, наприклад, у патенті США № 6551962.

Усі патенти, патентні заявки, попередні заявки і публікації, згадані або цитовані у винаході, включені у винахід шляхом посилання у всій повноті за умови, що вони не суперечать ідеї даної заявки. Якщо конкретно не позначено або мається на увазі, використовувані у винаході терміни в однині позначають "щонайменше один".

Далі у винаході приведені наступні ілюстративні приклади. Приклади не повинні розглядатися як обмеження обсягу винаходу.

ПРИКЛАД 1

Дизайн химерних токсинів, що містять корові токсини Cry1 і гетерологічні протоксини, і інсектицидна дія білка DIG-152, який продукується в *Pseudomonas fluorescens*

Химерні токсини. Химерні білки, що несуть домен корового токсину з одного токсину Cry, які злиті із сегментом протоксину з іншого токсину Cry, описані раніше, наприклад, у патенті США № 5593881 і патенті США № 5932209.

Химерні варіанти білка Cry1Ca даного винаходу містять у собі химерні токсини, що містять N-кінцевий сегмент корового токсину, який походить з інсектицидного токсину Cry1Ca3, що злитий із сегментом гетерологічного дельта-ендотоксिनного протоксину в деякій точці після кінця сегмента корового токсину. Транзиція від корового токсину до сегмента гетерологічного протоксину може відбуватися приблизно біля зчленування нативного корового токсину/протоксину, може зберігатися ога-ділянка нативного протоксину (розташована після сегмента корового токсину), із транзицією гетерологічного протоксину, що виникає в 5'-3' напрямку. Різними механізмами сегменти корового токсину і протоксину можуть містити точну амінокислотну послідовність нативних токсинів, з якої вони походять, або можуть містити в собі амінокислотні додавання, делеції або заміни, що не зменшують біологічну функцію сегментів при злитті їхній один з одним і здатні підсилити вказану функцію.

Наприклад, химерний токсин даного винаходу містить сегмент корового токсину, який походить з Cry1Ca3 і гетерологічного протоксину. У переважному варіанті здійснення винаходу сегмент корового токсину, який походить з Cry1Ca3 (619 амінокислот), є злитим з гетерологічним сегментом, що містить сегмент протоксину, що походить з дельта-ендотоксину Cry1Ab (545 амінокислот). Амінокислотна послідовність, яка складається з 1164 амінокислот, химерного білка, який називається у винаході DIG-152, розкрита в SEQ ID NO:1. Мається на увазі, що інші химерні злиття, що містять варіанти корового токсину Cry1Ca3 і протоксини, які походять з Cry1Ab, входять в обсяг даного винаходу.

Інсектицидна дія білка DIG-152 проти лускокрилих була продемонстрована на личинках новонародженої вогнівки цукрової тростини (SCB; *Diatraea saccharalis*) і Cry1Ab-резистентної SCB (rSCB) в експериментах залежності реакції від дози, за допомогою методик уведення раціону. Тільки включення DIG-152 солюбілізували при акуратному погойдуванні при 4° протягом 4 годин у 7,5 мл 100 мМ CAPS, pH 11, 1 мМ ЕДТА, до якого додавали 200 мкл інгібітору бактеріальної протеази (Sigma P4865; виготовленої відповідно до інструкції постачальника). Після центрифугування до одержання осаду нерозчинного матеріалу стокову концентрацію білка доводили до 4,0 мг/мл у 100 мМ CAPS, pH 11. Для біотесту з комахами готували корм із концентрацією білка DIG-152 у діапазоні від 0,030 мкг до 102 мкг/г, шляхом змішування придатних об'ємів з раціоном меридик (meridic) (Bio-Serv, Frenchtown, NJ) безпосередньо перед розподілом близько 0,7 мл раціону в окремі осередки в кюветах з 128 осередками (Bio-Ba-128, C-D International).

Трипсин-активованний білок Cry1Ab (використовуваний як позитивний контроль інсектицидної активності) тестували в діапазоні концентрації від 0,03125 мкг до 32 мкг/г раціону (приготовленого шляхом змішування ліофілізованого порошку з відповідною кількістю дистильованої води перед готуванням раціону).

Як контрольні уведення використовували раціони, приготовлені з дистильованою водою (чистий контроль для тестів Cry1Ab) або з буфером єдиним (100 мМ CAPS pH 11 для DIG-152 тесту). З кожного осередку з поверхні раціону забирали одну новонароджену личинку *D. saccharalis* (< через 24 години після вилуплення). Після інокуляції личинки осередку накривали

кришками з отворами (C-D International), і кювети з біопробами поміщали в камеру зі штучним кліматом, де підтримували умови 28°C, відносну вологість RH 50 % і цикл світло/темрява 16 годин:8 годин. На сьомий день після інокуляції реєстрували смертність личинок, вагу личинок і число личинок, що вижили, що не показували збільшення ваги (<0,1 мг на личинку). Тест із

5 кожною комбінацією штам комах/концентрація білка Cry повторювали чотири рази, і в кожному повторі задіювали від 16 до 32 личинок.

Критерії смертності личинок вимірювали як "фактичну" смертність, яка враховувала і мертві (смертність) личинки і що вижили (чахлі, які не харчуються) личинки, що не показували значний приріст маси тіла (тобто <0,1 мг на личинку). Фактичну смертність личинок при обробці

10 обчислювали за допомогою рівняння:

$$\text{Фактична смертність (\%)} = [\text{TDS}/\text{TNIT}] \times 100,$$

де TDS означає загальну кількість мертвих личинок плюс кількість чахлих личинок, і TNIT означає загальну кількість комах при обробці.

"Фактичну" смертність (яка далі для спрощення називається "смертністю") кожного штаму *D. saccharalis* коректували по відносній личинковій смертності, що спостерігається з чистим водним контрольним раціоном для аналізу результатів після обробки Cry1Ab, або з раціоном єдиного буфера при обробці DIG-152.

Результати експериментів залежності реакції від дози додатково аналізували для встановлення значення GI_{50} , (тобто, концентрації B.t. білка в раціоні, при якому показники уповільнення росту личинок (%GI) складали 50). Процентний показник %GI личинок при раціоні, що містить білок Cry1Ab, обчислювали за допомогою формули:

$$\%GI = [\text{TWC}-\text{TWT}]/\text{TWC} \times 100,$$

де TWC означає загальну масу тіла личинок, що харчуються контрольним водним раціоном, і

25 TWT позначає загальну масу тіла личинок, що харчуються раціоном Cry1Ab, що вводиться, де для аналізу показника %GI личинок у результаті споживання білка DIG-152 розрахунки проводили за формулою:

$$\%GI = [\text{TWB}-\text{TWT}]/\text{TWB} \times 100,$$

де TWB означає загальну масу тіла личинок, що споживали контрольний раціон з єдиним

30 буфером, і

TWT означає загальну масу тіла личинок, що споживали раціон з білком DIG-152.

100 % уповільнення росту личинок пояснювалося реплікацією, якщо були відсутні які-небудь личинки з вираженим збільшенням ваги (< 0,1 мг на личинку). Аналіз показників уповільнення росту проводили за допомогою двопотокової ANOVA зі штамом комах і концентрацією білка Cry як основних двох факторів. Для визначення різниці в тестах на рівні = 0,05 застосовували тести LSMEANS.

Результати біотестів поглинання раціонів личинками *Diatraea saccharalis* приведені в таблиці 2.

Таблиця 2

Залежна від дози смертність і уповільнення росту личинок (середнє значення % \pm стандартна погрішність sem) Cry1Ab-сприйнятливих (SCB) і Cry1Ab-резистентних (rSCB) *Diatraea saccharalis*, що поглинали раціон, який містить білок Cry1Ab або DIG-152

Комаха	Білок Cry1Ab				Білок DIG-152			
	Концентрація білка ^b	Кількість личинок	Смертність ^c	% GI ^d	Концентрація білка ^b	Кількість личинок	Смертність ^c	% GI ^e
SCB	Чиста вода	126	3.2 \pm 1.3 a	---	Чиста вода	124	10.4 \pm 3.2 b	5.9 \pm 4.8 a
rSCB	Чиста вода	128	4.7 \pm 2.0 a	---	Чиста вода	125	4.1 \pm 2.5 a	3.1 \pm 5.5 a
SCB	Буфер	NT ^f			Буфер	121	10.9 \pm 3.9 b	---
rSCB	Буфер	NT			Буфер	127	1.6 \pm 0.9 a	---
SCB	0.03125	124	38.6 \pm 4.8 c	90.7 \pm 1.6 ef	0.03	126	53.1 \pm 2.3 c	69.5 \pm 6.5 c
rSCB	0.03125	123	8.3 \pm 3.2 ab	-15.9 \pm 4.6 a	0.03	127	3.2 \pm 0.0 a	8.0 \pm 5.1 a
SCB	0.125	128	34.3 \pm 7.9 c	87.4 \pm 2.5 e	0.1	127	88.2 \pm 3.5 d	100 \pm 0.0 d
rSCB	0.125	126	8.6 \pm 2.3 ab	10.0 \pm 5.3 b	0.1	127	11.8 \pm 0.8 b	49.0 \pm 3.5 b
SCB	0.5	119	75.6 \pm 2.9 e	94.3 \pm 1.0 fg	0.4	130	96.2 \pm 1.9 e	100 \pm 0.0 d
rSCB	0.5	128	5.5 \pm 1.5 a	26.7 \pm 3.1 c	0.4	125	91.2 \pm 2.0 d	100 \pm 0.0 d
SCB	2	125	93.6 \pm 2.2 f	100 \pm 0.0 g	1.6	122	100 \pm 0.0 f	100 \pm 0.0 d
rSCB	2	128	14.8 \pm 2.7 b	67.5 \pm 1.5 d	1.6	127	100 \pm 0.0 f	100 \pm 0.0 d
SCB	8	122	95.9 \pm 1.6 fg	100 \pm 0.0 g	6.4	125	100 \pm 0.0 f	100 \pm 0.0 d
rSCB	8	120	40.6 \pm 5.1 c	85.2 \pm 1.9 e	6.4	128	100 \pm 0.0 f	100 \pm 0.0 d
SCB	32	126	99.2 \pm 0.8 g	100 \pm 0.0 g	25.6	78	100 \pm 0.0 f	100 \pm 0.0 d
rSCB	32	128	60.9 \pm 5.8 d	90.3 \pm 2.2 ef	25.6	119	100 \pm 0.0 f	100 \pm 0.0 d
SCB					102	60	100 \pm 0.0 f	100 \pm 0.0 d
rSCB					102	126	100 \pm 0.0 f	100 \pm 0.0 d

^aСередні значення в стовпчику по всіх обробках, позначені однаковими буквами, не мали значних відмінностей ($P < 0.05$, тест LSMEANS). sem = стандартна погрішність середнього значення.

^bмкг білка/г раціону

^cВимірювання смертності личинок проводили відповідно до опису в тексті винаходу

^dЦі процентні показники розраховували по формулі, приведений в тексті

^eЦі процентні показники розраховували по формулі, приведений в тексті

^fNT = тест не проводили

Аналіз даних. Скоректовані дані доза/смертність потім піддавали пробіт-аналізу для визначення концентрацій використовуваного білка, які викликали смертність у 50 % випадків (значення LC_{50}), і відповідні 95 %-і довірчі інтервали (CI). Використовували в пробіт-аналізі введення білків показники містили в собі найвищу концентрацію, що викликала нульову смертність, найнижчу концентрацію, яка викликала 100 % смертність, і всі результати між цими крайніми значеннями. Співвідношення стійкості обчислювали шляхом розподілу значення LC_{50} від штаму rSCB на цей показник від комах SCB. Тест співвідношення летальної дози використовували для визначення виразності співвідношень стійкості на рівні = 0,05. Також використовували двопоточний тест ANOVA для аналізу даних смертності, з наступним тестом LSMEANS на рівні = 0,05, з метою визначення різниці при введенні білків. Результати досліджень представлені в таблиці 3.

Таблиця 3

Результати біотестів на личинках SCB і rSCB з використанням у комах раціону, у який уведений білок DIG-152 або Cry1Ab

	Комаха	Кількість личинок	LC_{50} (95% CI) (мкг/г) ^a	RR ^b
Білок DIG-152	SCB	505	0.03 (0.02-0.03)	6.0 NS
	rSCB	506	0.18 (0.15-0.24)	
Білок Cry1Ab	SCB	744	0.13 (0.08-0.20)	142S
	rSCB	440	18.46 (13.93-26.29)	

^aВимірювання смертності личинок проводили відповідно до опису в тексті винаходу.

^bСпіввідношення стійкості, позначені буквою S, були значимими, NS позначає незначний рівень у 5 % на основі тестів з летальною дозою.

Властивістю білка DIG-152 даного винаходу є уповільнення росту новонароджених личинок вогнівки цукрового очерету (*Diatraea saccharalis*) або смерть личинок після поглинання білка DIG-152 у кількості, подібній до кількості активованого білка Cry1Ab, що викликає аналогічну біологічну реакцію. Додаткова властивість білка DIG-152 полягає в тому, що личинки *Diatraea saccharalis*, які є стійкими до токсичного дії білка Cry1Ab, проте сприйнятливі до токсичного дії білка DIG-152.

ПРИКЛАД 2

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

Використовували стандартні способи клонування (описані, наприклад, авторами Sambrook et al, (1989) і Ausubel et al, (1995), з оновленнями] для дизайну конструкції експресії *Pseudomonas fluorescens* (Pf) pMYC2547, яку створювали генно-інженерним способом для продукції повнорозмірних химерних білків DIG-152. Продукцію білка здійснювали в штаммах MB214 *Pseudomonas fluorescens* (похідне штаму MB101; біовар I *P. fluorescens*), які несли вставку модифікованого lac-оперону, згідно з розкриттям в патенті США № 5169760. Основна стратегія клонування мала на увазі субклонування в плазмідні вектори фрагмента ДНК, що кодує DIG-152, за допомогою чого його вміщували під контроль експресії промотором P_{tac} і термінатором trnBTIT2 з плазміді pKK223-3 (PL Pharmacia, Milwaukee, WI). Одна з таких плазмід називається pMYC2547, і ізолят MB214, який несе вказану плазмиду, називається Drpf108.

Аналіз росту і експресії у струшуваних колбах. Продукцію білка DIG-152 для вивчення властивостей і біотестів з комахами здійснювали шляхом вирощування у струшуваних колбах штаму Drpf108 *P. fluorescens*. Продукцію білка DIG-152 з допомогою промотору P_{tac} проводили, згідно з описом з раніше опублікованого патенту США № 5527883. Подробиці мікробіологічних маніпуляцій доступні в публікаціях Squires et al., (2004), патентній заявці США № 20060008877, патентній заявці США 20080193974 і патентній заявці США, які включені у винахід шляхом посилання. Експресію індукували додаванням ізопропіл-β-D-1-тіогалактопіранозиду (IPTG) після початкової інкубації протягом 24 годин при 30° зі струшуванням. Культури збирали в момент індукції і в різні точки часу після індукції. Густина клітин вимірювали по оптичній густині при 600

нм (OD_{600}).

Фракціонування клітин і аналіз SDS-PAGE зразків струшуваних колб. У кожний момент збору зразків густину клітин в зразках регулювали до $OD_{600}=20$, і аліквотні кількості об'ємом 1 мл центрифугували при $14000\times g$ протягом п'яти хвилин. Клітинний осад заморожували при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Розчинні і нерозчинні фракції із заморожених зразків клітинного осаду зі струшуваних колб отримували за допомогою екстракційного розчину EasyLyse™ для бактеріального білка (EPICENTRE® Biotechnologies, Madison, WI). Кожний клітинний осад ресуспендували в 1 мл розчину EasyLyse™, додатково розводили 1:4 в лікуючому буфері і інкубували зі струшуванням при кімнатній температурі протягом 30 хвилин. Лізат центрифугували при 14000 обертів за хвилину протягом 20 хвилин при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, і супернатант відновлювали у вигляді розчинної фракції. Осад (нерозчинну фракцію) потім ресуспендували в однаковому об'ємі фосфатно-буферного розчину (ФБР; 11,9 мМ Na_2HPO_4 , 137 мМ NaCl , 2,7 мМ KCl , pH 7,4).

Зразки змішували 1:1 з 2 X буфера для зразків Laemmli, що містить β -меркаптоетанол (Sambrook et al., вище), і кип'ятили протягом 5 хвилин до завантаження на гелі Criterion XT 12 % Bis-Tris (Bio-Rad Inc., Hercules, CA). Електрофорез проводили в рекомендованому буфері XT MOPS. Гелі забарвлювали біобезпечним барвником Кумассі (Bio-Safe Coomassie) згідно з протоколом виготовлювача (Bio-Rad) і візуалізували з використанням системи відображення Alpha Innotech (San Leandro, CA).

Приготування тілець включення. Приготування тілець включення (IB) білка DIG-152 проводили на клітинах після ферментації *P. fluorescens*, при якій продукувався нерозчинний інсектицидний Bt-білок, що виявляли за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію SDS-PAGE і MALDI-MS (лазерною десорбцією/іонізація з використанням матриці - мас-спектрометрією). Ферментаційний осад *P. fluorescens* відморожували при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ на водяній бані. Клітини ресуспендували до 25 % вага/об'єм в лікуючому буфері [50 мМ Tris, pH 7,5, 200 мМ NaCl , 20 мМ динатрієвої солі ЕДТА (етилендіамінтетраоцтова кислота), 1 % Тритону X-100 і 5 мМ дитіотретіолу (ДТТ); безпосередньо перед використанням додавали 5 мл/л інгібуючого коктейлю бактеріальної протеази (№ в каталозі P8465; Sigma-Aldrich, St.Louis, MO)]. Клітини суспендували за допомогою переносного гомогенізатора з установками на найнижчому рівні (Tissue Tearor, BioSpec Products, Inc., Bartlesville, OK). До суспензії клітин додавали лізозим (25 мг Sigma L7651, з білка курячого яйця) шляхом змішування металевою лопаточкою, і суспензію інкубували при кімнатній температурі протягом однієї години. Суспензію охолоджували на льоду протягом 15 хвилин, потім обробляли ультразвуком з допомогою Branson Sonifier 250 (дві сесії по 1 хвилині, робочий цикл 50 %, вихід 30 %). Лізис клітин перевіряли мікроскопією. При необхідності додавали додаткові 25 мг лізозиму, і повторювали інкубацію і обробку ультразвуком. Після підтвердження лізису клітин за допомогою мікроскопії лізат центрифугували при $11500\times g$ протягом 25 хвилин ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) для отримання осаду IB, потім видаляли супернатант. Осад IB ресуспендували з 100 мл ліуючого буфера, гомогенізували в переносному міксері і центрифугували, як указано вище. Осад IB повторно промивали шляхом ресуспендування (в 50 мл ліуючого буфера), проводили гомогенізацію, обробку ультразвуком і центрифугування, поки супернатант не ставав безбарвним, і отримували твердий осад IB брудно-білого кольору. Для заключного промивання осад IB ресуспендували в фільтрованій в стерильних умовах (0,22 мкМ) дистильованій воді, що містить 2 мМ ЕДТА і центрифугували. Кінцевий осад ресуспендували в стерильній фільтрованій дистильованій воді, що містить 2 мМ ЕДТА, і зберігали в аліквотних кількостях 1 мл при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Аналіз SDS-PAGE і кількісне визначення білка в препаратах IB проводили шляхом відморожування аліквотної кількості 1 мл осаду IB і розведення його 1:20 в стерильній фільтрованій дистильованій воді. Потім розведений зразок кип'ятили з 4 X редукуючим буфером для зразків [250 мМ Tris, pH 6,8, 40 % гліцерин (об'єм/об'єм), бромфенол синій 0,4 % (вага/об'єм), 8 % додецилсульфат натрію SDS (вага/об'єм) і 8 % β -меркаптоетанол (об./об.)] і завантажували на гель 4-20 % Novex® Tris-гліцин, 12+2 ямок (Invitrogen), який пропускали з 1X буфером Tris/гліцин/SDS (BioRad). Гель пропускали протягом 60 хвилин при 200 вольт, потім забарвлювали Кумассі синім (50 % G-250/50 % R-250 в 45 % метанолі, 10 % оцтова кислота) і знебарвлювали 7 % оцтовою кислотою, 5 % метанолом в дистильованій воді. Кількісне визначення цільових смуг проводили шляхом порівняння денситометричних показників для смуг зі стандартними зразками бичачого сироваткового альбуміну (BSA), які проганяли на тому ж гелі для отримання стандартної кривої.

Солюбілізація тілець включення. Шість мл суспензії тілець включення DIG-152 з Pf клону DPf108 центрифугували з найвищими установками на мікроцентрифузі моделі 5415C Eppendorf (близько $14000\times g$) до осадження включень. Супернатант буфера для зберігання видаляли і

замінювали на 25 мл 100 мМ буфера карбонату натрію, рН 11, в конічній пробірці 50 мл. Включення ресуспендували, використовуючи піпетку і перемішування на вортексі для повного змішування. Для екстракції цільового білка пробірку залишали на платформі, що плавно гойдається, при 4 °С протягом ночі. Екстракт центрифугували при 30000×g протягом 30 хвилин при 4 °С, і отриманий супернатант концентрували до 5-кратної зміни об'єму за допомогою Amicon Ultra-15 центрифугального фільтра з відновленої целюлози (зі зрізаною молекулярною масою 30000; Millipore). Потім буфер для зразків замінювали на 10 мМ CAPS [3-(циклогексаміно)1-пропансульфонова кислота], рН 10, з використанням одноразових колонок PD-10 (GE Healthcare, Piscataway, NJ).

Солюбілізація і активація трипсином білка тілець включення. У деяких випадках суспензії тілець включення DIG-152 з Pf клону DPf108 центрифугували з найвищими установками на мікроцентрифузі моделі 5415C Eppendorf (близько 14000×g) до осадження включень. Супернатант буфера для зберігання видаляли і замінювали на 100 мМ CAPS, рН 11, щоб отримати концентрацію білка близько 50 мг/мл. Пробірку залишали на гойдалці при кімнатній температурі протягом трьох годин до повної солюбілізації білка. Додавали трипсин в кількості, яка дорівнює від 5 % до 10 % (вага/вага, в перерахунку на вихідну вагу порошку IB), і в ході інкубації доводили до розщеплення, залишаючи на гойдалці протягом ночі при 4 °С або 90-120 хвилин на гойдалці при кімнатній температурі. Нерозчинний матеріал видаляли центрифугуванням при 10000×g протягом 15 хвилин, і супернатант завантажували в аніонобмінну колонку MonoQ (10 мм на 10 см). Активовані білки DIG-152 елюювали (як указано в умовах SDS-PAGE, див. нижче) з градієнтом 1М NaCl від 0 % до 100 % в більше ніж 25 колонкових об'ємах. Об'єднували фракції, що містять активований білок, і при необхідності концентрували до менше ніж 10 мл, за допомогою обладнання - центрифугального фільтра Amicon Ultra-15 з відновленої целюлози, як указано вище. Потім матеріал пропускали через колонку Superdex 200 (16 мм на 60 см) в буфері, що містить 100 мМ NaCl, 10 % гліцерину, 0,5 % Твін-20 і 1 мМ ЕДТА. Проводили аналіз SDS-PAGE щоб визначити елювання від 65 до 70 мл активованого (ферментативно зрізаного) білка. Фракції, що містять активований білок, об'єднували і концентрували з використанням центрифугального концентратора, як описано вище.

Електрофорез в гелі. Концентровані білкові препарати були підготовлені для електрофорезу шляхом розведення 1:50 в буфері для зразків NuPAGE® LDS (Invitrogen), що містить 5 мМ DTT як редукуючий агент, і нагрівали при 95 °С протягом 4 хвилин. Зразок завантажували в дві смуги гелю NuPAGE® 4-12 % поруч з п'ятьма стандартними смугами BSA в діапазоні від 0,2 мкг до 2 мкг/смуга (для створення стандартної кривої). Застосовували напругу 200 V з використанням рухомого буфера MOPS-SDS (Invitrogen), поки фарба-свідок не досягала основи гелю. Гель забарвлювали 0,2 % Кумассі синім G 250 в 45 % метанолі, 10 % оцтової кислоти, і знебарвлювали спочатку коротким впливом 45 % метанолу, 10 % оцтовою кислотою і потім більш ретельно з 7 % оцтовою кислотою, 5 % метанол до очищення фону. Після знебарвлення гель сканували на візуалізаторі BioRad Fluor-S Multimager. Як програмне забезпечення застосовували Quantity One Software v.4.5.2, щоб отримати вираховані фонові значення об'єму забарвлених смуг білка і створити стандартну криву BSA, яку використовували для розрахунку концентрації химерного білка DIG-152 в стоковому розчині.

ПРИКЛАД 3

Приготування корових білків-токсину Cry1Ca і Cry1Ab і виділення мембранних везикул щіткової облямівки *Spodoptera frugiperda* для використання в експериментах конкурентного зв'язування

Наступні приклади оцінюють конкурентне зв'язування корових білків-токсинів Cry1 з передбачуваними рецепторами в тканинах кишечника комах. Показано, що ¹²⁵I мічений коровий білок-токсин Cry1Ca зв'язується з високою афінністю з препаратом мембранних везикул щіткової облямівки (BBMV), виготовленим зі *Spodoptera frugiperda* (кукурудзяної листової совки), і вказаний коровий білок-токсин Cry1Ab не конкурує за це зв'язування. Як альтернатива показано, що ¹²⁵I мічений коровий білок-токсин Cry1Ab зв'язується з високою афінністю з BBMV, виготовленими з *S. frugiperda*, і що коровий білок-токсин Cry1Ca не конкурує за це зв'язування.

Очищення білків Cry. Здійснювали експресію гена, що кодує химерний білок DIG-152, який містить коровий токсин Cry1Ca3 і протоксин Cry1Ab, в експресуючому штамі *Pseudomonas fluorescens*, як описано в Прикладі 2. Аналогічно, експресували ген, що кодує білок Cry1Ab, в системі експресії Pf. Штам *P. fluorescens*, який експресує білок Cry1Ab, називається DPf88.

Білки очищали способами з прикладу 2, і потім розщеплювали трипсином для отримання активованих корових токсинів з повнорозмірних білків, потім продукти очищали способами,

описаними в прикладі 2. Білкові препарати після обробки трипсином (активований коровий токсин) мали чистоту >95 % і молекулярну масу близько 65 кДа, що експериментально визначали аналізом SDS-PAGE. Активований коровий токсин, що використовується у винаході, приготований з білка DIG-152, називають коровим білком-токсином Cry1Ca, і активований коровий токсин, приготований з білка Cry1Ab, називають коровим білком-токсином Cry1Ab.

Приготування і фракціонування солюбілізованих BBMV. Стандартні способи кількісного визначення білка і електрофорез в SDS-поліакриламідному гелі використовували згідно з, наприклад, авторами Sambrook et al. (1989) і Ausubel et al. (1995), з оновленнями вказаних способів.

Личинок *S. frugiperda* в останній віковій стадії не годували протягом ночі і потім розкривали після охолодження на льоду протягом 15 хвилин. Тканину середньої кишки видаляли з порожнини, залишаючи після видалення задню кишку, сполучену із зовнішнім покривом. Середню кишку вміщували в 9 X об'єм крижаного буфера для гомогенізації (300 мМ маніт, 5 мМ етиленгліколь-тетраоцтова кислота (EGTA), 17 мМ основи Trisа, рН 7,5), з додаванням протеазного інгібуючого коктейлю (Sigma-Aldrich P-2714), розведеного згідно з рекомендацією виготовлювача. Тканину гомогенізували 15 поштовхами скляного тканинного гомогенізатора. Готували BBMV способом преципітації з $MgCl_2$ по Wolfersberger (1993). Коротко, однакові об'єми 24 мМ розчину $MgCl_2$ в 300 мМ маніті змішували з гомогенатом середньої кишки, перемішували протягом 5 хвилин і залишали на льоду на 15 хв. Розчин центрифугували при $2500 \times g$ протягом 15 хвилин при 4 °C. Супернатант зберігали і осад ресуспендували у вихідний об'єм 0,5 X розведеного буфера для гомогенізації, і потім знов центрифугували. Два супернатанти об'єднували і центрифугували при $27000 \times g$ протягом 30 хвилин при 4 °C для отримання фракції BBMV. Осад ресуспендували в буфер для зберігання BBMV (10 мМ HEPES, 130 мМ KCl, 10 % гліцерин, рН 7,4) до концентрації білка близько 3 мг/мл. Концентрацію білка визначали з використанням як стандарт бичачого сироваткового альбуміну (BSA). Перед заморожуванням зразків проводили визначення лужної фосфатази (маркерний фермент для фракції BBMV), з використанням комплексу для аналізу на лужну фосфатазу QuantiChrom™ DALP-250 (Gentaur Molecular Products, Kampenhout, BE) згідно з інструкціями виготовлювача. Звичайно специфічна активність вказаного ферменту підвищувалася в 7 разів в порівнянні з аналогічними показниками, що виявляються у вихідному гомогенаті фракції середньої кишки. Аліквотні кількості BBMV розділяли на 250 зразків, вміть заморожували в рідкому азоті і зберігали при -80 °C.

Електрофорез. Проводили аналіз білків SDS-PAGE при редуруючих умовах (а саме, в 5 % β -меркаптоетанол, BME) і денатуруючих умовах (а саме, з нагріванням протягом 5 хвилин при 90 °C в присутності 2 % SDS). Білки завантажували в осередки з Tris-гліцин поліакриламідним гелем від 4 % до 20 % (BioRad; Hercules, CA) і сепарували при 200 Вт протягом 60 хвилин. Детекцію смуг білка проводили за допомогою фарбування Кумасі діамантовим синім R-250 (BioRad) протягом однієї години, і знебарвлювали розчином 5 % метанолу в 7 % оцтової кислоті. Гелі візуалізували і аналізували з допомогою BioRad Fluro-S MultiImager™. Відносні молекулярні маси смуг білка визначала в порівнянні з рухливістю білків з відомою молекулярною масою, що спостерігаються в зразку BenchMark™ Protein Ladder (Life Technologies, Rockville, MD), який завантажували в один осередок гелю.

Йодування корових білків-токсинів Cry1Ca або Cry1Ab. Очищені коровий білок-токсин Cry1 або коровий білок-токсин Cry1Ab піддавали йодуванню за допомогою кульок для йодування Pierce (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). Коротко, дві кульки йодування двічі промивали 500 мкл ФБР (20 мМ фосфат натрію, 0,15 M NaCl, рН 7,5), і вміщували в центрифугальну пробірку об'ємом 1,5 мл з 100 ФБР. Потім додавали 0,5 мCi ^{125}I міченого йодиду натрію, компоненти залишали для реакції протягом 5 хвилин при кімнатній температурі, після цього до розчину додавали 1 мкг корового білка-токсини Cry1Ca (або 1 мкг корового білка-токсини Cry1Ab) і залишали для проведення реакції протягом додаткових 3-5 хвилин. Реакцію завершували додаванням за допомогою піпетки розчину з кульок йодування і вносили розчин на спінову колонку Zeba™ (Invitrogen), врівноважували додаванням 50 мМ CAPS, рН 10,0, 1 мМ ДТТ (дитіотретіол), 1 мМ ЕДТА і 5 % гліцерину. Кульки для йодування двічі промивали 10 мкл ФБР і розчин для миття також вносили на знесолювальну колонку Zeba™. Радіоактивний розчин елюювали через спінову колонку шляхом центрифугування при $1000 \times g$ протягом 2 мін. Потім ^{125}I -радіомічений коровий білок-токсин Cry1Ca (або коровий білок-токсин Cry1Ab) діалізували проти 50 мМ CAPS, рН 10,0, 1 мМ ДТТ, 1 мМ ЕДТА і 5 % гліцерину.

Візуалізація. Чистоту відносно радіоактивності йодованих корових білків-токсинів Cry1Ca або Cry1Ab визначали за допомогою SDS-PAGE і відображення на фосфорному покритті. Коротко, гелі SDS-PAGE висушували з використанням пристрою для сушіння гелю BioRad згідно

з інструкціями виготовлювача. Висушені гелі візуалізували шляхом загортання їх в плівку Майлара (товщиною 12 мкм) і протягом 1 години залишали їх під впливом молекулярного люмінесцентного екрана з фосфором з тривалим післясвітінням Molecular Dynamics (35×43 см). Планшети обробляли з використанням Molecular Dynamics Storm, візуалізатора з люмінесцентним фосфорним покриттям 820 і зображення аналізували з програмним забезпеченням ImageQuant™.

ПРИКЛАД 4

Зв'язування ¹²⁵I міченого корового білка-токсину Cry1 з BBMV з *Spodoptera frugiperda*

Для визначення оптимальної кількості білка BBMV створювали криву насичення, щоб застосовувати її в аналізі зв'язування з коровими білками-токсинами Cry1Ca і Cry1Ab. Інкубували 0,5 нм ¹²⁵I-радіоміченого корового білка токсину Cry1 протягом 1 години при 28 °C в зв'язувальному буфері (8 мМ NaHPO₄, 2 мМ KH₂PO₄, 150 мМ NaCl, 0,1 % BSA pH 7,4) з кількістю білка BBMV в діапазоні від 0 мкг/мл до 500 мкг/мл (повний об'єм 0,5 мл). Потім сепарували ¹²⁵I-мічений коровий білок-токсин Cry1, зв'язаний з білками BBMV, від незв'язаної фракції, шляхом відбору в трикратному виконанні 150 мкл зразка реакційної суміші в окремій центрифугальній пробірці 1,5 мл і центрифугуванням зразків при 14000×g протягом 8 хвилин при кімнатній температурі. Супернатант акуратно видаляли і осад промивали три рази з крижаним зв'язувальним буфером. Дно центрифугальної пробірки, що містить осад, відсікали, вміщували в скляну культуральну пробірку 13×75 мм, і кожний із зразків підраховували протягом 5 хвилин в гамма-лічильнику. Графічно зображували отримані показники CPM (кількість імпульсів на хвилину) мінус початкові показники CPM (реакція без білка BBMV) залежно від концентрації білка BBMV. Згідно з результатами інших дослідників (Luo et al. 1999), була визначена оптимальна концентрація білка BBMV для використання в аналізі зв'язування, яка становила 150 мкг/мл.

ПРИКЛАД 5

Аналізи конкурентного зв'язування BBMV з *S. frugiperda* з коровими білками-токсинами Cry1Ab і Cry1Ca

Аналізи гомологічного і гетерологічного конкурентного зв'язування проводили з використанням 150 мкг/мл білка BBMV з *S. frugiperda* і 0,5 нм ¹²⁵I-радіоміченого корового білка-токсину Cry1Ca. Концентрації конкурентного не-радіоміченого корового білка-токсину Cry1Ab, доданого до реакційної суміші, варіювали від 0,045 нм до 300 нм, і цей білок додавали в ті ж точки часу, що і радіоактивний коровий білок-токсин Cry1Ca, щоб гарантувати дійсно конкурентне зв'язування. Інкубацію проводили протягом 1 години при 28 °C, і кількісне вимірювання ¹²⁵I-міченого корового білка-токсину Cry1Ca, зв'язаного з BBMV (специфічне зв'язування), виконували згідно з вищенаведеним описом. Неспецифічне зв'язування було відображене при підрахунку, отриманому в присутності 1000 нм не-радіоміченого корового білка-токсину Cry1Ca. Стопроцентним сумарним зв'язуванням вважалось кількість зв'язування при відсутності якого-небудь конкурента корового білка-токсину Cry1Ab.

У аналізі зв'язування рецептора з використанням ¹²⁵I-міченого корового білка-токсину Cry1Ca визначали здатність корового білка-токсину Cry1Ab переміщувати цей радіомічений ліганд з його сайту зв'язування на BBMV з *S. frugiperda*. Результати (фіг. 1) показують, що коровий білок-токсин Cry1Ab не переміщує зв'язаний ¹²⁵I-мічений коровий білок-токсин Cry1Ca зі свого рецепторного білка (білків) при таких високих концентраціях, як 300 нм (в 600 раз вище концентрації радіоактивного зв'язуючого ліганду). Передбачається, що немічений коровий білок-токсин Cry1Ca здатний переміщувати радіомічений коровий білок-токсин Cry1Ca зі свого зв'язувального білка (білків), демонструючи сигмоїдальну криву залежності реакції від дози із 50 % зміщенням, яке відбувається при концентрації 5 нм.

Таким чином показано, що коровий білок-токсин Cry1Ca взаємодіє зі зв'язувальною ділянкою BBMV з *S. frugiperda*, яка не зв'язується з коровим білком-токсином Cry1Ab.

ПРИКЛАД 6

Аналіз конкурентного зв'язування BBMV з *S. frugiperda* з коровими білками-токсинами Cry1Ca і Cry1Ab

Аналізи гомологічного і гетерологічного конкурентного зв'язування проводили з використанням 150 мкг/мл білка BBMV з *S. frugiperda* і 0,5 нм ¹²⁵I-радіоміченого корового білка-токсину Cry1Ab. Концентрації конкурентного не-радіоміченого корового білка-токсину Cry1Ca, доданого до реакційної суміші, варіювали від 0,045 нм до 300 нм, і цей білок додавали в ті ж точки часу, що і радіоактивний коровий білок-токсин Cry1Ab, щоб гарантувати дійсно конкурентне зв'язування. Інкубацію проводили протягом 1 години при 28 °C, і кількісне вимірювання ¹²⁵I-міченого корового білка-токсину Cry1Ab, зв'язаного з BBMV (специфічне зв'язування), виконували згідно з вищенаведеним описом. Неспецифічне зв'язування було

відображене при підрахунку, отриманому в присутності 1000 нМ не-радіоміченого корового білка-токсину Cry1Ab. Стопроцентним сумарним зв'язуванням вважалося кількість зв'язування при відсутності якого-небудь конкурента корового білка-токсину Cry1Ca.

У аналізі зв'язування рецептора з використанням ^{125}I -міченого корового білка-токсину Cry1Ab визначали здатність корового білка-токсину Cry1Ca переміщувати цей радіомічений ліганд з його сайту зв'язування на BBMV з *S. frugiperda*. Результати (фігура 2) показують, що коровий білок-токсин Cry1Ca не переміщує зв'язаний ^{125}I -мічений коровий білок-токсин Cry1Ab зі свого рецепторного білка (білків) при таких високих концентраціях, як 300 нМ (в 600 раз вище концентрації радіоактивного зв'язуючого ліганду). Передбачається, що немічений коровий білок-токсин Cry1Ab здатний переміщувати радіомічений коровий білок-токсин Cry1Ab зі свого зв'язувального білка (білків), демонструючи сигмоїдальну криву залежності реакції від дози із 50 % зміщенням, що відбувається при концентрації 5 нМ.

Таким чином показано, що коровий білок-токсин Cry1Ab взаємодіє зі зв'язувальною ділянкою BBMV з *S. frugiperda*, яка не зв'язується з коровим білком-токсином Cry1Ca.

Посилання

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Додаток А

Перелік дельта-ендотоксинів з веб-сайту, автори
Crickmore et. al. (цитовані в заявці)Номер доступу в Національному центрі біотехнологічної інформації NCNI
(якщо доступний)

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

<u>Cry1Ab16</u>	AAK55546	Yu et al	2002	Bt AC-11	
<u>Cry1Ab17</u>	AAT46415	Huang et al	2004	Bt WB9	
<u>Cry1Ab18</u>	AAQ88259	Stobdan et al	2004	Bt	
<u>Cry1Ab19</u>	AAW31761	Zhong et al	2005	Bt X-2	
<u>Cry1Ab20</u>	ABB72460	Liu et al	2006	BtC008	
<u>Cry1Ab21</u>	ABS18384	Swiecicka et al	2007	Bt IS5056	
<u>Cry1Ab22</u>	ABW87320	Wu and Feng	2008	BtS2491Ab	
<u>Cry1Ab-like</u>	AAK14336	Nagarathinam et al	2001	Bt kunthala RX24	невизначена послідовність
<u>Cry1Ab-like</u>	AAK14337	Nagarathinam et al	2001	Bt kunthala RX28	невизначена послідовність
<u>Cry1Ab-like</u>	AAK14338	Nagarathinam et al	2001	Bt kunthala RX27	невизначена послідовність
<u>Cry1Ab-like</u>	ABG88858	Lin et al	2006	Bt ly4a3	недостатня послідовність
<u>Cry1Ac1</u>	AAA22331	Adang et al	1985	Bt kurstaki HD73	
<u>Cry1Ac2</u>	AAA22338	Von Tersch et al	1991	Bt kenya	
<u>Cry1Ac3</u>	CAA38098	Dardenne et al	1990	Bt BTS89A	
<u>Cry1Ac4</u>	AAA73077	Feitelson	1991	Bt kurstaki PS85A1	
<u>Cry1Ac5</u>	AAA22339	Feitelson	1992	Bt kurstaki PS81GG	
<u>Cry1Ac6</u>	AAA86266	Masson et al	1994	Bt kurstaki NRD-12	
<u>Cry1Ac7</u>	AAB46989	Herrera et al	1994	Bt kurstaki HD73	
<u>Cry1Ac8</u>	AAC44841	Omolo et al	1997	Bt kurstaki HD73	
<u>Cry1Ac9</u>	AAB49768	Gleave et al	1992	Bt DSIR732	
<u>Cry1Ac10</u>	CAA05505	Sun	1997	Bt kurstaki YBT-1520	
<u>Cry1Ac11</u>	CAA10270	Makhdoom & Riazuddin	1998		
<u>Cry1Ac12</u>	II2418	Ely & Tippet	1995	Bt A20	послідовність ДНК єдина
<u>Cry1Ac13</u>	AAD38701	Qiao et al	1999	Bt kurstaki HD1	
<u>Cry1Ac14</u>	AAQ06607	Yao et al	2002	Bt Ly30	
<u>Cry1Ac15</u>	AAN07788	Tzeng et al	2001	Bt from Taiwan	
<u>Cry1Ac16</u>	AAU87037	Zhao et al	2005	Bt H3	
<u>Cry1Ac17</u>	AAX18704	Hire et al	2005	Bt kenya HD549	
<u>Cry1Ac18</u>	AAY88347	Kaur & Allam	2005	Bt SK-729	
<u>Cry1Ac19</u>	ABD37053	Gao et al	2005	Bt C-33	
<u>Cry1Ac20</u>	ABB89046	Tan et al	2005		
<u>Cry1Ac21</u>	AAY66992	Sauka et al	2005	INTA Mol-12	
<u>Cry1Ac22</u>	ABZ01836	Zhang & Fang	2008	Bt W015-1	
<u>Cry1Ac23</u>	CAQ30431	Kashyap et al	2008	Bt	

<u>CryIAc24</u>	ABL01535	Arango et al	2008	Bt 146-158-01	
<u>CryIAc25</u>	FJ513324	Guan Peng et al	2008	Bt Tm37-6	немає зв'язку з NCBI, липень 09
<u>CryIAc26</u>	FJ617446	Guan Peng et al	2009	Bt Tm41-4	немає зв'язку з NCBI, липень 09
<u>CryIAc27</u>	FJ617447	Guan Peng et al	2009	Bt Tm44-1B	немає зв'язку з NCBI, липень 09
<u>CryIAc28</u>	ACM90319	Li et al	2009	Bt Q-12	
<u>CryIAd1</u>	AAA22340	Feitelson	1993	Bt aizawai PS81I	
<u>CryIAd2</u>	CAA01880	Anonymous	1995	Bt PS81RR1	
<u>CryIAe1</u>	AAA22410	Lee & Aronson	1991	Bt alesti	
<u>CryIAf1</u>	AAB82749	Kang et al	1997	Bt NT0423	
<u>CryIAg1</u>	AAD46137	Mustafa	1999		
<u>CryIAh1</u>	AAQ14326	Tan et al	2000		
<u>CryIAh2</u>	ABB76664	Qi et al	2005	Bt alesti	
<u>CryIAi1</u>	AAO39719	Wang et al	2002		
<u>CryIA-like</u>	AAK14339	Nagarathinam et al	2001	Bt kunthala nags3	невизначена послідовність
<u>CryIBa1</u>	CAA29898	Brizzard & Whiteley	1988	Bt thuringiensis HD2	
<u>CryIBa2</u>	CAA65003	Soetaert	1996	Bt entomocidus HD110	
<u>CryIBa3</u>	AAK63251	Zhang et al	2001		
<u>CryIBa4</u>	AAK51084	Nathan et al	2001	Bt entomocidus HD9	
<u>CryIBa5</u>	ABO20894	Song et al	2007	Bt sfw-12	
<u>CryIBa6</u>	ABL60921	Martins et al	2006	Bt S601	
<u>CryIBb1</u>	AAA22344	Donovan et al	1994	Bt EG5847	
<u>CryIBc1</u>	CAA86568	Bishop et al	1994	Bt morrisoni	
<u>CryIBd1</u>	AAD10292	Kuo et al	2000	Bt wuhanensis HD525	
<u>CryIBd2</u>	AAM93496	Isakova et al	2002	Bt 834	
<u>CryIBe1</u>	AAC32850	Payne et al	1998	Bt PS158C2	
<u>CryIBe2</u>	AAQ52387	Baum et al	2003		
<u>CryIBe3</u>	FJ716102	Xiaodong Sun et al	2009	Bt	немає зв'язку з NCBI, липень 09
<u>CryIBf1</u>	CAC50778	Arnaut et al	2001		
<u>CryIBf2</u>	AAQ52380	Baum et al	2003		
<u>CryIBg1</u>	AAO39720	Wang et al	2002		
<u>CryICa1</u>	CAA30396	Honee et al	1988	Bt entomocidus 60.5	
<u>CryICa2</u>	CAA31951	Sanchis et al	1989	Bt aizawai 7.29	
<u>CryICa3</u>	AAA22343	Feitelson	1993	Bt aizawai PS81I	
<u>CryICa4</u>	CAA01886	Van Mellaert et al	1990	Bt entomocidus HD110	
<u>CryICa5</u>	CAA65457	Strizhov	1996	Bt aizawai 7.29	
<u>CryICa6</u>	AAF37224	Yu et al	2000	Bt AF-2	

<u>Cry1Ca7</u>	AAG50438	Aixing et al	2000	Bt J8	
<u>Cry1Ca8</u>	AAM00264	Chen et al	2001	Bt c002	
<u>Cry1Ca9</u>	AAL79362	Kao et al	2003	Bt G10-01A	
<u>Cry1Ca10</u>	AAN16462	Lin et al	2003	Bt E05-20a	
<u>Cry1Ca11</u>	AAX53094	Cai et al	2005	Bt C-33	
<u>Cry1Cb1</u>	M97880	Kalman et al	1993	Bt galleriae HD29	послідовність ДНК єдина
<u>Cry1Cb2</u>	AAG35409	Song et al	2000	Bt c001	
<u>Cry1Cb3</u>	ACD50894	Huang et al	2008	Bt 087	
<u>Cry1Cb-like</u>	AAX63901	Thammasittirong et al	2005	Bt TA476-1	недостатня послідовність
<u>Cry1Da1</u>	CAA38099	Hofte et al	1990	Bt aizawai HD68	
<u>Cry1Da2</u>	I76415	Payne & Sick	1997		послідовність ДНК єдина
<u>Cry1Db1</u>	CAA80234	Lambert	1993	Bt BTS00349A	
<u>Cry1Db2</u>	AAK48937	Li et al	2001	Bt B-Pr-88	
<u>Cry1Dc1</u>	ABK35074	Lertwiriawong et al	2006	Bt JC291	
<u>Cry1Ea1</u>	CAA37933	Visser et al	1990	Bt kenyaе 4F1	
<u>Cry1Ea2</u>	CAA39609	Bosse et al	1990	Bt kenyaе	
<u>Cry1Ea3</u>	AAA22345	Feitelson	1991	Bt kenyaе PS81F	
<u>Cry1Ea4</u>	AAD04732	Barboza-Corona et al	1998	Bt kenyaе LBIT-147	
<u>Cry1Ea5</u>	A15535	Botterman et al	1994		послідовність ДНК єдина
<u>Cry1Ea6</u>	AAL50330	Sun et al	1999	Bt YBT-032	
<u>Cry1Ea7</u>	AAW72936	Huehne et al	2005	Bt JC190	
<u>Cry1Ea8</u>	ABX11258	Huang et al	2007	Bt HZM2	
<u>Cry1Eb1</u>	AAA22346	Feitelson	1993	Bt aizawai PS81A2	
<u>Cry1Fa1</u>	AAA22348	Chambers et al	1991	Bt aizawai EG6346	
<u>Cry1Fa2</u>	AAA22347	Feitelson	1993	Bt aizawai PS81I	
<u>Cry1Fb1</u>	CAA80235	Lambert	1993	Bt BTS00349A	
<u>Cry1Fb2</u>	BAA25298	Masuda & Asano	1998	Bt morrisoni INA67	
<u>Cry1Fb3</u>	AAF21767	Song et al	1998	Bt morrisoni	
<u>Cry1Fb4</u>	AAC10641	Payne et al	1997		
<u>Cry1Fb5</u>	AAO13295	Li et al	2001	Bt B-Pr-88	
<u>Cry1Fb6</u>	ACD50892	Huang et al	2008	Bt 012	
<u>Cry1Fb7</u>	ACD50893	Huang et al	2008	Bt 087	
<u>Cry1Ga1</u>	CAA80233	Lambert	1993	Bt BTS0349A	
<u>Cry1Ga2</u>	CAA70506	Shevelev et al	1997	Bt wuhanensis	
<u>Cry1Gb1</u>	AAD10291	Kuo & Chak	1999	Bt wuhanensis HD525	
<u>Cry1Gb2</u>	AAO13756	Li et al	2000	Bt B-Pr-88	

<u>CryIGc</u>	AAQ52381	Baum et al	2003		
<u>CryIHa1</u>	CAA80236	Lambert	1993	Bt BTS02069AA	
<u>CryIHb1</u>	AAA79694	Koo et al	1995	Bt morrisoni BF190	
<u>CryIH-like</u>	AAF01213	Srifah et al	1999	Bt JC291	недостатня послідовність
<u>CryIIa1</u>	CAA44633	Tailor et al	1992	Bt kurstaki	
<u>CryIIa2</u>	AAA22354	Gleave et al	1993	Bt kurstaki	
<u>CryIIa3</u>	AAC36999	Shin et al	1995	Bt kurstaki HD1	
<u>CryIIa4</u>	AAB00958	Kostichka et al	1996	Bt AB88	
<u>CryIIa5</u>	CAA70124	Selvapandiyam	1996	Bt 61	
<u>CryIIa6</u>	AAC26910	Zhong et al	1998	Bt kurstaki S101	
<u>CryIIa7</u>	AAM73516	Porcar et al	2000	Bt	
<u>CryIIa8</u>	AAK66742	Song et al	2001		
<u>CryIIa9</u>	AAQ08616	Yao et al	2002	Bt Ly30	
<u>CryIIa10</u>	AAP86782	Espindola et al	2003	Bt thuringiensis	
<u>CryIIa11</u>	CAC85964	Tounsi et al	2003	Bt kurstaki BNS3	
<u>CryIIa12</u>	AAV53390	Grossi de Sa et al	2005	Bt	
<u>CryIIa13</u>	ABF83202	Martins et al	2006	Bt	
<u>CryIIa14</u>	ACG63871	Liu & Guo	2008	Bt11	
<u>CryIIa15</u>	FJ617445	Guan Peng et al	2009	Bt E-1B	немає зв'язку з NCBI, липень 09
<u>CryIIa16</u>	FJ617448	Guan Peng et al	2009	Bt E-1A	немає зв'язку з NCBI, липень 09
<u>CryIIb1</u>	AAA82114	Shin et al	1995	Bt entomocidus BP465	
<u>CryIIb2</u>	ABW88019	Guan et al	2007	Bt PP61	
<u>CryIIb3</u>	ACD75515	Liu & Guo	2008	Bt GS8	
<u>CryIIc1</u>	AAC62933	Osman et al	1998	Bt C18	
<u>CryIIc2</u>	AAE71691	Osman et al	2001		
<u>CryIId1</u>	AAD44366	Choi	2000		
<u>CryIIe1</u>	AAG43526	Song et al	2000	Bt BTC007	
<u>CryIIfl</u>	AAQ52382	Baum et al	2003		
<u>CryII-like</u>	AAC31094	Payne et al	1998		недостатня послідовність
<u>CryII-like</u>	ABG88859	Lin & Fang	2006	Bt ly4a3	недостатня послідовність
<u>CryIIJa1</u>	AAA22341	Donovan	1994	Bt EG5847	
<u>CryIIJb1</u>	AAA98959	Von Tersch & Gonzalez	1994	Bt EG5092	
<u>CryIIJc1</u>	AAC31092	Payne et al	1998		
<u>CryIIJc2</u>	AAQ52372	Baum et al	2003		
<u>CryIIJd1</u>	CAC50779	Arnaut et al	2001	Bt	
<u>CryIIKa1</u>	AAB00376	Koo et al	1995	Bt morrisoni	

				BF190	
<u>Cry1La1</u>	AAS60191	Je et al	2004	Bt kurstaki K1	
<u>Cry1-like</u>	AAC31091	Payne et al	1998		недостатня послідовність
<u>Cry2Aa1</u>	AAA22335	Donovan et al	1989	Bt kurstaki	
<u>Cry2Aa2</u>	AAA83516	Widner & Whiteley	1989	Bt kurstaki HD1	
<u>Cry2Aa3</u>	D86064	Sasaki et al	1997	Bt sotto	послідовність ДНК єдина
<u>Cry2Aa4</u>	AAC04867	Misra et al	1998	Bt kenyae HD549	
<u>Cry2Aa5</u>	CAA10671	Yu & Pang	1999	Bt SL39	
<u>Cry2Aa6</u>	CAA10672	Yu & Pang	1999	Bt YZ71	
<u>Cry2Aa7</u>	CAA10670	Yu & Pang	1999	Bt CY29	
<u>Cry2Aa8</u>	AAO13734	Wei et al	2000	Bt Dongbei 66	
<u>Cry2Aa9</u>	AAO13750	Zhang et al	2000		
<u>Cry2Aa10</u>	AAQ04263	Yao et al	2001		
<u>Cry2Aa11</u>	AAQ52384	Baum et al	2003		
<u>Cry2Aa12</u>	ABI83671	Tan et al	2006	Bt Rpp39	
<u>Cry2Aa13</u>	ABL01536	Arango et al	2008	Bt 146-158-01	
<u>Cry2Aa14</u>	ACF04939	Hire et al	2008	Bt HD-550	
<u>Cry2Ab1</u>	AAA22342	Widner & Whiteley	1989	Bt kurstaki HD1	
<u>Cry2Ab2</u>	CAA39075	Dankocsik et al	1990	Bt kurstaki HD1	
<u>Cry2Ab3</u>	AAG36762	Chen et al	1999	Bt BTC002	
<u>Cry2Ab4</u>	AAO13296	Li et al	2001	Bt B-Pr-88	
<u>Cry2Ab5</u>	AAQ04609	Yao et al	2001	Bt ly30	
<u>Cry2Ab6</u>	AAP59457	Wang et al	2003	Bt WZ-7	
<u>Cry2Ab7</u>	AAZ66347	Udayasuriyan et al	2005	Bt 14-1	
<u>Cry2Ab8</u>	ABC95996	Huang et al	2006	Bt WB2	
<u>Cry2Ab9</u>	ABC74968	Zhang et al	2005	Bt LLB6	
<u>Cry2Ab10</u>	EF157306	Lin et al	2006	Bt LyD	
<u>Cry2Ab11</u>	CAM84575	Salceme et al	2007	Bt CMBL-BT1	
<u>Cry2Ab12</u>	ABM21764	Lin et al	2007	Bt LyD	
<u>Cry2Ab13</u>	ACG76120	Zhu et al	2008	Bt ywc5-4	
<u>Cry2Ab14</u>	ACG76121	Zhu et al	2008	Bt Bts	
<u>Cry2Ac1</u>	CAA40536	Aronson	1991	Bt shanghai S1	
<u>Cry2Ac2</u>	AAG35410	Song et al	2000		
<u>Cry2Ac3</u>	AAQ52385	Baum et al	2003		
<u>Cry2Ac4</u>	ABC95997	Huang et al	2006	Bt WB9	
<u>Cry2Ac5</u>	ABC74969	Zhang et al	2005		
<u>Cry2Ac6</u>	ABC74793	Xia et al	2006	Bt wuhanensis	
<u>Cry2Ac7</u>	CAL18690	Salceme et al	2008	Bt SBSBT-1	
<u>Cry2Ac8</u>	CAM09325	Salceme et al	2007	Bt CMBL-BT1	
<u>Cry2Ac9</u>	CAM09326	Salceme et al	2007	Bt CMBL-BT2	
<u>Cry2Ac10</u>	ABN15104	Bai et al	2007	Bt QCL-1	
<u>Cry2Ac11</u>	CAM83895	Salceme et al	2007	Bt HD29	

<u>Cry2Ac12</u>	CAM83896	Saleem et al	2007	Bt CMBL-BT3	
<u>Cry2Ad1</u>	AAF09583	Choi et al	1999	Bt BR30	
<u>Cry2Ad2</u>	ABC86927	Huang et al	2006	Bt WB10	
<u>Cry2Ad3</u>	CAK29504	Saleem et al	2006	Bt 5_2AcT(1)	
<u>Cry2Ad4</u>	CAM32331	Saleem et al	2007	Bt CMBL-BT2	
<u>Cry2Ad5</u>	CAO78739	Saleem et al	2007	Bt HD29	
<u>Cry2Ae1</u>	AAQ52362	Baum et al	2003		
<u>Cry2Af1</u>	ABO30519	Beard et al	2007	Bt C81	
<u>Cry2Ag</u>	ACH91610	Zhu et al	2008	Bt JF19-2	
<u>Cry2Ah</u>	EU939453	Zhang et al	2008	Bt	немає зв'язку з NCBI, липень 09
<u>Cry2Ah2</u>	ACL80665	Zhang et al	2009	Bt BRC-ZQL3	
<u>Cry2Ai</u>	FJ788388	Udayasuriyan et al	2009	Bt	немає зв'язку з NCBI, липень 09
<u>Cry3Aa1</u>	AAA22336	Herrnstadt et al	1987	Bt san diego	
<u>Cry3Aa2</u>	AAA22541	Sekar et al	1987	Bt tenebrionis	
<u>Cry3Aa3</u>	CAA68482	Hofte et al	1987		
<u>Cry3Aa4</u>	AAA22542	McPherson et al	1988	Bt tenebrionis	
<u>Cry3Aa5</u>	AAA50255	Donovan et al	1988	Bt morrisoni EG2158	
<u>Cry3Aa6</u>	AAC43266	Adams et al	1994	Bt tenebrionis	
<u>Cry3Aa7</u>	CAB41411	Zhang et al	1999	Bt 22	
<u>Cry3Aa8</u>	AAS79487	Gao and Cai	2004	Bt YM-03	
<u>Cry3Aa9</u>	AAW05659	Bulla and Candas	2004	Bt UTD-001	
<u>Cry3Aa10</u>	AAU29411	Chen et al	2004	Bt 886	
<u>Cry3Aa11</u>	AAW82872	Kurt et al	2005	Bt tenebrionis Mm2	
<u>Cry3Aa12</u>	ABY49136	Sezen et al	2008	Bt tenebrionis	
<u>Cry3Ba1</u>	CAA34983	Sick et al	1990	Bt tolworthi 43F	
<u>Cry3Ba2</u>	CAA00645	Peferoen et al	1990	Bt PGSI208	
<u>Cry3Bb1</u>	AAA22334	Donovan et al	1992	Bt EG4961	
<u>Cry3Bb2</u>	AAA74198	Donovan et al	1995	Bt EG5144	
<u>Cry3Bb3</u>	II5475	Peferoen et al	1995		послідовність ДНК єдина
<u>Cry3Ca1</u>	CAA42469	Lambert et al	1992	Bt kurstaki BtI109P	
<u>Cry4Aa1</u>	CAA68485	Ward & Ellar	1987	Bt israelensis	
<u>Cry4Aa2</u>	BAA00179	Sen et al	1988	Bt israelensis HD522	
<u>Cry4Aa3</u>	CAD30148	Berry et al	2002	Bt israelensis	
<u>Cry4A-like</u>	AAAY96321	Mahalakshmi et al	2005	Bt LDC-9	недостатня послідовність
<u>Cry4Ba1</u>	CAA30312	Chungjatpornchai et al	1988	Bt israelensis 4Q2-72	
<u>Cry4Ba2</u>	CAA30114	Tungpradubkul et al	1988	Bt israelensis	

<u>Cry4Ba3</u>	AAA22337	Yamamoto et al	1988	Bt israelensis	
<u>Cry4Ba4</u>	BAA00178	Sen et al	1988	Bt israelensis HD522	
<u>Cry4Ba5</u>	CAD30095	Berry et al	2002	Bt israelensis	
<u>Cry4Ba-like</u>	ABC47686	Mahalakshmi et al	2005	Bt LDC-9	недостатня послідовність
<u>Cry4Ca1</u>	EU646202	Shu et al	2008		немає зв'язку з NCBI, липень 09
<u>Cry4Cb1</u>	FJ403208	Jun & Furong	2008	Bt HS18-1	немає зв'язку з NCBI, липень 09
<u>Cry4Cb2</u>	FJ597622	Jun & Furong	2008	Bt Ywc2-8	немає зв'язку з NCBI, липень 09
<u>Cry4Cc1</u>	FJ403207	Jun & Furong	2008	Bt MC28	немає зв'язку з NCBI, липень 09
<u>Cry5Aa1</u>	AAA67694	Narva et al	1994	Bt darmstadiensis PS17	
<u>Cry5Ab1</u>	AAA67693	Narva et al	1991	Bt darmstadiensis PS17	
<u>Cry5Ac1</u>	I34543	Payne et al	1997		послідовність ДНК єдина
<u>Cry5Ad1</u>	ABQ82087	Lenane et al	2007	Bt L366	
<u>Cry5Ba1</u>	AAA68598	Foncerrada & Narva	1997	Bt PS86Q3	
<u>Cry5Ba2</u>	ABW88932	Guo et al	2008	YBT 1518	
<u>Cry6Aa1</u>	AAA22357	Narva et al	1993	Bt PS52A1	
<u>Cry6Aa2</u>	AAM46849	Bai et al	2001	YBT 1518	
<u>Cry6Aa3</u>	ABH03377	Jia et al	2006	Bt 96418	
<u>Cry6Ba1</u>	AAA22358	Narva et al	1991	Bt PS69D1	
<u>Cry7Aa1</u>	AAA22351	Lambert et al	1992	Bt galleriae PGSI245	
<u>Cry7Ab1</u>	AAA21120	Narva & Fu	1994	Bt dakota HD511	
<u>Cry7Ab2</u>	AAA21121	Narva & Fu	1994	Bt kumamotoensis 867	
<u>Cry7Ab3</u>	ABX24522	Song et al	2008	Bt WZ-9	
<u>Cry7Ab4</u>	EU380678	Shu et al	2008	Bt	немає зв'язку з NCBI, липень 09
<u>Cry7Ab5</u>	ABX79555	Aguirre-Arzola et al	2008	Bt monterrey GM-33	
<u>Cry7Ab6</u>	ACI44005	Deng et al	2008	Bt HQ122	
<u>Cry7Ab7</u>	FJ940776	Wang et al	2009		немає зв'язку з NCBI, вересень 09
<u>Cry7Ab8</u>	GU145299	Feng Jing	2009		немає зв'язку з NCBI, листопад 09
<u>Cry7Ba1</u>	ABB70817	Zhang et al	2006	Bt huazhongensis	
<u>Cry7Ca1</u>	ABR67863	Gao et al	2007	Bt BTH-13	
<u>Cry7Da1</u>	ACQ99547	Yi et al	2009	Bt LH-2	
<u>Cry8Aa1</u>	AAA21117	Narva & Fu	1992	Bt kumamotoensis	
<u>Cry8Ab1</u>	EU044830	Cheng et al	2007	Bt B-JJX	немає зв'язку з NCBI, липень 09
<u>Cry8Ba1</u>	AAA21118	Narva & Fu	1993	Bt kumamotoensis	
<u>Cry8Bb1</u>	CAD57542	Abad et al	2002		
<u>Cry8Bc1</u>	CAD57543	Abad et al	2002		
<u>Cry8Ca1</u>	AAA21119	Sato et al.	1995	Bt japonensis	

				Buibui	
<u>Cry8Ca2</u>	AAR98783	Shu et al	2004	Bt HBF-1	
<u>Cry8Ca3</u>	EU625349	Du et al	2008	Bt FTL-23	немає зв'язку з NCBI, липень 09
<u>Cry8Da1</u>	BAC07226	Asano et al	2002	Bt galleriae	
<u>Cry8Da2</u>	BD133574	Asano et al	2002	Bt	послідовність ДНК єдина
<u>Cry8Da3</u>	BD133575	Asano et al	2002	Bt	послідовність ДНК єдина
<u>Cry8Db1</u>	BAF93483	Yamaguchi et al	2007	Bt BBT2-5	
<u>Cry8Ea1</u>	AAQ73470	Fuping et al	2003	Bt 185	
<u>Cry8Ea2</u>	EU047597	Liu et al	2007	Bt B-DLL	немає зв'язку з NCBI, липень 09
<u>Cry8Fa1</u>	AAT48690	Shu et al	2004	Bt 185	також AAW81032
<u>Cry8Ga1</u>	AAT46073	Shu et al	2004	Bt HBF-18	
<u>Cry8Ga2</u>	ABC42043	Yan et al	2008	Bt 145	
<u>Cry8Ga3</u>	FJ198072	Xiaodong et al	2008	Bt FCD114	немає зв'язку з NCBI, липень 09
<u>Cry8Ha1</u>	EF465532	Fuping et al	2006	Bt 185	немає зв'язку з NCBI, липень 09
<u>Cry8Ia1</u>	EU381044	Yan et al	2008	Bt su4	немає зв'язку з NCBI, липень 09
<u>Cry8Ja1</u>	EU625348	Du et al	2008	Bt FPT-2	немає зв'язку з NCBI, липень 09
<u>Cry8Ka1</u>	FJ422558	Quezado et al	2008		немає зв'язку з NCBI, липень 09
<u>Cry8Ka2</u>	ACN87262	Noguera & Ibarra	2009	Bt kenyaе	
<u>Cry8-like</u>	FJ770571	Noguera & Ibarra	2009	Bt canadensis	послідовність ДНК єдина
<u>Cry8-like</u>	ABS53003	Mangena et al	2007	Bt	
<u>Cry9Aa1</u>	CAA41122	Shevelev et al	1991	Bt galleriae	
<u>Cry9Aa2</u>	CAA41425	Gleave et al	1992	Bt DSIR517	
<u>Cry9Aa3</u>	GQ249293	Su et al	2009	Bt SC5(D2)	немає зв'язку з NCBI, липень 09
<u>Cry9Aa4</u>	GQ249294	Su et al	2009	Bt T03C001	немає зв'язку з NCBI, липень 09
<u>Cry9Aa like</u>	AAQ52376	Baum et al	2003		неповна послідовність
<u>Cry9Ba1</u>	CAA52927	Shevelev et al	1993	Bt galleriae	
<u>Cry9Bb1</u>	AAV28716	Silva-Werneck et al	2004	Bt japonensis	
<u>Cry9Ca1</u>	CAA85764	Lambert et al	1996	Bt tolworthi	
<u>Cry9Ca2</u>	AAQ52375	Baum et al	2003		
<u>Cry9Da1</u>	BAA19948	Asano	1997	Bt japonensis N141	
<u>Cry9Da2</u>	AAB97923	Wasano & Ohba	1998	Bt japonensis	
<u>Cry9Da3</u>	GQ249295	Su et al	2009	Bt T03B001	немає зв'язку з NCBI, липень 09
<u>Cry9Da4</u>	GQ249297	Su et al	2009	Bt T03B001	немає зв'язку з NCBI, липень 09
<u>Cry9Db1</u>	AAX78439	Flannagan & Abad	2005	Bt kurstaki DP1019	
<u>Cry9Ea1</u>	BAA34908	Midoh & Oyama	1998	Bt aizawai SSK-10	
<u>Cry9Ea2</u>	AAO12908	Li et al	2001	Bt B-Hm-16	
<u>Cry9Ea3</u>	ABM21765	Lin et al	2006	Bt lyA	
<u>Cry9Ea4</u>	ACE88267	Zhu et al	2008	Bt ywc5-4	

<u>Cry9Ea5</u>	ACF04743	Zhu et al	2008	Bts	
<u>Cry9Ea6</u>	ACG63872	Liu & Guo	2008	Bt 11	
<u>Cry9Ea7</u>	FJ380927	Sun et al	2008		немає зв'язку з NCBI, липень 09
<u>Cry9Ea8</u>	GQ249292	Su et al	2009	GQ249292	немає зв'язку з NCBI, липень 09
<u>Cry9Eb1</u>	CAC50780	Arnaut et al	2001		
<u>Cry9Eb2</u>	GQ249298	Su et al	2009	Bt T03B001	немає зв'язку з NCBI, липень 09
<u>Cry9Ec1</u>	AAC63366	Wasano et al	2003	Bt galleriae	
<u>Cry9Ed1</u>	AAX78440	Flannagan & Abad	2005	Bt kurstaki DP1019	
<u>Cry9Ec1</u>	GQ249296	Su et al	2009	Bt T03B001	немає зв'язку з NCBI, серпень 09
<u>Cry9-like</u>	AAC63366	Wasano et al	1998	Bt galleriae	недостатня послідовність
<u>Cry10Aa1</u>	AAA22614	Thorne et al	1986	Bt israelensis	
<u>Cry10Aa2</u>	E00614	Aran & Toomasu	1996	Bt israelensis ONR-60A	послідовність ДНК єдина
<u>Cry10Aa3</u>	CAD30098	Berry et al	2002	Bt israelensis	
<u>Cry10A-like</u>	DQ167578	Mahalakshmi et al	2006	Bt LDC-9	неповна послідовність
<u>Cry11Aa1</u>	AAA22352	Donovan et al	1988	Bt israelensis	
<u>Cry11Aa2</u>	AAA22611	Adams et al	1989	Bt israelensis	
<u>Cry11Aa3</u>	CAD30081	Berry et al	2002	Bt israelensis	
<u>Cry11Aa-like</u>	DQ166531	Mahalakshmi et al	2007	Bt LDC-9	неповна послідовність
<u>Cry11Ba1</u>	CAA60504	Delecluse et al	1995	Bt jegathesan 367	
<u>Cry11Bb1</u>	AAC97162	Orduz et al	1998	Bt medellin	
<u>Cry12Aa1</u>	AAA22355	Narva et al	1991	Bt PS33F2	
<u>Cry13Aa1</u>	AAA22356	Narva et al	1992	Bt PS63B	
<u>Cry14Aa1</u>	AAA21516	Narva et al	1994	Bt sotto PS80JJ1	
<u>Cry15Aa1</u>	AAA22333	Brown & Whiteley	1992	Bt thompsoni	
<u>Cry16Aa1</u>	CAA63860	Barloy et al	1996	Cb malaysia CH18	
<u>Cry17Aa1</u>	CAA67841	Barloy et al	1998	Cb malaysia CH18	
<u>Cry18Aa1</u>	CAA67506	Zhang et al	1997	Paenibacillus popilliae	
<u>Cry18Ba1</u>	AAF89667	Patel et al	1999	Paenibacillus popilliae	
<u>Cry18Ca1</u>	AAF89668	Patel et al	1999	Paenibacillus popilliae	
<u>Cry19Aa1</u>	CAA68875	Rosso & Delecluse	1996	Bt jegathesan 367	
<u>Cry19Ba1</u>	BAA32397	Hwang et al	1998	Bt higo	
<u>Cry20Aa1</u>	AAB93476	Lee & Gill	1997	Bt fukuokaensis	
<u>Cry20Ba1</u>	ACS93601	Noguera & Ibarra	2009	Bt higo LBIT-976	
<u>Cry20-like</u>	GQ144333	Yi et al	2009	Bt Y-5	послідовність ДНК єдина
<u>Cry21Aa1</u>	I32932	Payne et al	1996		послідовність ДНК єдина
<u>Cry21Aa2</u>	I66477	Feitelson	1997		послідовність ДНК єдина

<u>Cry21Ba1</u>	BAC06484	Sato & Asano	2002	Bt roskildiensis	
<u>Cry22Aa1</u>	I34547	Payne et al	1997		послідовність ДНК єдина
<u>Cry22Aa2</u>	CAD43579	Isaac et al	2002	Bt	
<u>Cry22Aa3</u>	ACD93211	Du et al	2008	Bt FZ-4	
<u>Cry22Ab1</u>	AAK50456	Baum et al	2000	Bt EG4140	
<u>Cry22Ab2</u>	CAD43577	Isaac et al	2002	Bt	
<u>Cry22Ba1</u>	CAD43578	Isaac et al	2002	Bt	
<u>Cry23Aa1</u>	AAF76375	Donovan et al	2000	Bt	бінарний з Cry37Aa1
<u>Cry24Aa1</u>	AAC61891	Kawalek and Gill	1998	Bt jegathesan	
<u>Cry24Ba1</u>	BAD32657	Ohgushi et al	2004	Bt sotto	
<u>Cry24Ca1</u>	CAJ43600	Beron & Salerno	2005	Bt FCC-41	
<u>Cry25Aa1</u>	AAC61892	Kawalek and Gill	1998	Bt jegathesan	
<u>Cry26Aa1</u>	AAD25075	Wojciechowska et al	1999	Bt finitimus B-1166	
<u>Cry27Aa1</u>	BAA82796	Saitoh	1999	Bt higo	
<u>Cry28Aa1</u>	AAD24189	Wojciechowska et al	1999	Bt finitimus B-1161	
<u>Cry28Aa2</u>	AAG00235	Moore and Debro	2000	Bt finitimus	
<u>Cry29Aa1</u>	CAC80985	Delecluse et al	2000	Bt medellin	
<u>Cry30Aa1</u>	CAC80986	Delecluse et al	2000	Bt medellin	
<u>Cry30Ba1</u>	BAD00052	Ito et al	2003	Bt entomocidus	
<u>Cry30Ca1</u>	BAD67157	Ohgushi et al	2004	Bt sotto	
<u>Cry30Ca2</u>	ACU24781	Sun and Park	2009	Bt jegathesan 367	
<u>Cry30Da1</u>	EF095955	Shu et al	2006	Bt Y41	немає зв'язку з NCBI, липень 09
<u>Cry30Db1</u>	BAE80088	Kishida et al	2006	Bt aizawai BUN1-14	
<u>Cry30Ea1</u>	ACC95445	Fang et al	2007	Bt S2160-1	
<u>Cry30Ea2</u>	FJ499389	Jun et al	2008	Bt Ywc2-8	немає зв'язку з NCBI, липень 09
<u>Cry30Fa1</u>	ACI22625	Tan et al	2008	Bt MC28	
<u>Cry30Ga1</u>	ACG60020	Zhu et al	2008	Bt HS18-1	
<u>Cry31Aa1</u>	BAB11757	Saitoh & Mizuki	2000	Bt 84-HS-1-11	
<u>Cry31Aa2</u>	AAL87458	Jung and Cote	2000	Bt M15	
<u>Cry31Aa3</u>	BAE79808	Uemori et al	2006	Bt B0195	
<u>Cry31Aa4</u>	BAF32571	Yasutake et al	2006	Bt 79-25	
<u>Cry31Aa5</u>	BAF32572	Yasutake et al	2006	Bt 92-10	
<u>Cry31Ab1</u>	BAE79809	Uemori et al	2006	Bt B0195	
<u>Cry31Ab2</u>	BAF32570	Yasutake et al	2006	Bt 31-5	
<u>Cry31Ac1</u>	BAF34368	Yasutake et al	2006	Bt 87-29	
<u>Cry32Aa1</u>	AAG36711	Balasubramanian et al	2001	Bt yunnanensis	
<u>Cry32Ba1</u>	BAB78601	Takebe et al	2001	Bt	
<u>Cry32Ca1</u>	BAB78602	Takebe et al	2001	Bt	

<u>Cry32Da1</u>	BAB78603	Takebe et al	2001	Bt	
<u>Cry33Aa1</u>	AAL26871	Kim et al	2001	Bt dakota	
<u>Cry34Aa1</u>	AAG50341	Ellis et al	2001	Bt PS80JJ1	бінарний з Cry35Aa1
<u>Cry34Aa2</u>	AAK64560	Rupar et al	2001	Bt EG5899	бінарний з : Cry35Aa2
<u>Cry34Aa3</u>	AAT29032	Schnepf et al	2004	Bt PS69Q	бінарний з : Cry35Aa3
<u>Cry34Aa4</u>	AAT29030	Schnepf et al	2004	Bt PS185GG	бінарний з Cry35Aa4
<u>Cry34Ab1</u>	AAG41671	Moellenbeck et al	2001	Bt PS149B1	бінарний з : Cry35Ab1
<u>Cry34Ac1</u>	AAG50118	Ellis et al	2001	Bt PS167H2	бінарний з : Cry35Ac1
<u>Cry34Ac2</u>	AAK64562	Rupar et al	2001	Bt EG9444	бінарний з Cry35Ab2
<u>Cry34Ac3</u>	AAT29029	Schnepf et al	2004	Bt KR1369	бінарний з : Cry35Ab3
<u>Cry34Ba1</u>	AAK64565	Rupar et al	2001	Bt EG4851	бінарний з : Cry35Ba1
<u>Cry34Ba2</u>	AAT29033	Schnepf et al	2004	Bt PS201L3	бінарний з Cry35Ba2
<u>Cry34Ba3</u>	AAT29031	Schnepf et al	2004	Bt PS201HH2	бінарний з Cry35Ba3
<u>Cry35Aa1</u>	AAG50342	Ellis et al	2001	Bt PS80JJ1	бінарний з Cry34Aa1
<u>Cry35Aa2</u>	AAK64561	Rupar et al	2001	Bt EG5899	бінарний з Cry34Aa2
<u>Cry35Aa3</u>	AAT29028	Schnepf et al	2004	Bt PS69Q	бінарний з Cry34Aa3
<u>Cry35Aa4</u>	AAT29025	Schnepf et al	2004	Bt PS185GG	бінарний з Cry34Aa4
<u>Cry35Ab1</u>	AAG41672	Moellenbeck et al	2001	Bt PS149B1	бінарний з Cry34Ab1
<u>Cry35Ab2</u>	AAK64563	Rupar et al	2001	Bt EG9444	бінарний з Cry34Ac2
<u>Cry35Ab3</u>	AY536891	AAT29024	2004	Bt KR1369	бінарний з Cry34Ab3
<u>Cry35Ac1</u>	AAG50117	Ellis et al	2001	Bt PS167H2	бінарний з Cry34Ac1
<u>Cry35Ba1</u>	AAK64566	Rupar et al	2001	Bt EG4851	бінарний з Cry34Ba1
<u>Cry35Ba2</u>	AAT29027	Schnepf et al	2004	Bt PS201L3	бінарний з Cry34Ba2
<u>Cry35Ba3</u>	AAT29026	Schnepf et al	2004	Bt PS201HH2	бінарний з : Cry34Ba3
<u>Cry36Aa1</u>	AAK64558	Rupar et al	2001	Bt	
<u>Cry37Aa1</u>	AAF76376	Donovan et al	2000	Bt	бінарний з : Cry23Aa
<u>Cry38Aa1</u>	AAK64559	Rupar et al	2000	Bt	
<u>Cry39Aa1</u>	BAB72016	Ito et al	2001	Bt aizawai	
<u>Cry40Aa1</u>	BAB72018	Ito et al	2001	Bt aizawai	
<u>Cry40Ba1</u>	BAC77648	Ito et al	2003	Bun1-14	
<u>Cry40Ca1</u>	EU381045	Shu et al	2008	Bt Y41	немає зв'язку з NCBI, липень 09
<u>Cry40Da1</u>	ACF15199	Zhang et al	2008	Bt S2096-2	
<u>Cry41Aa1</u>	BAD35157	Yamashita et al	2003	Bt A1462	
<u>Cry41Ab1</u>	BAD35163	Yamashita et al	2003	Bt A1462	
<u>Cry42Aa1</u>	BAD35166	Yamashita et al	2003	Bt A1462	
<u>Cry43Aa1</u>	BAD15301	Yokoyama and Tanaka	2003	P. lentimorbus semadara	
<u>Cry43Aa2</u>	BAD95474	Nozawa	2004	P. popilliae popilliae	
<u>Cry43Ba1</u>	BAD15303	Yokoyama and Tanaka	2003	P. lentimorbus semadara	
<u>Cry43-like</u>	BAD15305	Yokoyama and	2003	P. lentimorbus	

		Tanaka		semadara	
<u>Cry44Aa</u>	BAD08532	Ito et al	2004	Bt entomocidus INA288	
<u>Cry45Aa</u>	BAD22577	Okumura et al	2004	Bt 89-T-34-22	
<u>Cry46Aa</u>	BAC79010	Ito et al	2004	Bt dakota	
<u>Cry46Aa2</u>	BAG68906	Ishikawa et al	2008	Bt A1470	
<u>Cry46Ab</u>	BAD35170	Yamagiwa et al	2004	Bt	
<u>Cry47Aa</u>	AAAY24695	Kongsuwan et al	2005	Bt CAA890	
<u>Cry48Aa</u>	CAJ18351	Jones and Berry	2005	Bs IAB59	бінарний з Cry49Aa
<u>Cry48Aa2</u>	CAJ86545	Jones and Berry	2006	Bs 47-6B	бінарний з : Cry49Aa2
<u>Cry48Aa3</u>	CAJ86546	Jones and Berry	2006	Bs NHA15b	бінарний з : Cry49Aa3
<u>Cry48Ab</u>	CAJ86548	Jones and Berry	2006	Bs LP1G	бінарний з : Cry49Ab1
<u>Cry48Ab2</u>	CAJ86549	Jones and Berry	2006	Bs 2173	бінарний з Cry49Aa4
<u>Cry49Aa</u>	CAH56541	Jones and Berry	2005	Bs IAB59	бінарний з Cry48Aa
<u>Cry49Aa2</u>	CAJ86541	Jones and Berry	2006	Bs 47-6B	бінарний з : Cry48Aa2
<u>Cry49Aa3</u>	CAJ86543	Jones and Berry	2006	BsNHA15b	бінарний з : Cry48Aa3
<u>Cry49Aa4</u>	CAJ86544	Jones and Berry	2006	Bs 2173	бінарний з Cry48Ab2
<u>Cry49Ab1</u>	CAJ86542	Jones and Berry	2006	Bs LP1G	бінарний з Cry48Ab1
<u>Cry50Aa1</u>	BAE86999	Ohgushi et al	2006	Bt sotto	
<u>Cry51Aa1</u>	ABI14444	Meng et al	2006	Bt F14-1	
<u>Cry52Aa1</u>	EF613489	Song et al	2007	Bt Y41	немає зв'язку з NCBI, липень 09
<u>Cry52Ba1</u>	FJ361760	Jun et al	2008	Bt BM59-2	немає зв'язку з NCBI, липень 09
<u>Cry53Aa1</u>	EF633476	Song et al	2007	Bt Y41	немає зв'язку з NCBI, липень 09
<u>Cry53Ab1</u>	FJ361759	Jun et al	2008	Bt MC28	немає зв'язку з NCBI, липень 09
<u>Cry54Aa1</u>	ACA52194	Tan et al	2009	Bt MC28	
<u>Cry55Aa1</u>	ABW88931	Guo et al	2008	YBT 1518	немає зв'язку з NCBI, липень 09
<u>Cry55Aa2</u>	AAE33526	Bradfish et al	2000	BT Y41	
<u>Cry56Aa1</u>	FJ597621	Jun & Furong	2008	Bt Ywc2-8	немає зв'язку з NCBI, липень 09
<u>Cry56Aa2</u>	GQ483512	Guan Peng et al	2009	Bt G7-1	немає зв'язку з NCBI, серпень 09
<u>Cry57Aa1</u>	ANC87261	Noguera & Ibarra	2009	Bt kim	
<u>Cry58Aa1</u>	ANC87260	Noguera & Ibarra	2009	Bt entomocidus	
<u>Cry59Aa1</u>	ACR43758	Noguera & Ibarra	2009	Bt kim LBIT-980	

Vip3Aa1	Vip3Aa	<u>AAC37036</u>	Estruch et al	1996	<u>PNAS 93, 5389-5394</u>	AB88	
Vip3Aa2	Vip3Ab	<u>AAC37037</u>	Estruch et al	1996	<u>PNAS 93, 5389-5394</u>	AB424	
Vip3Aa3	Vip3Ac		Estruch et al	2000	<u>US 6137033</u> Oct 2000		

Vip3Aa4	PS36A Sup	AAR81079	Feitelson et al	1998	US 6656908 Грудень 2003	Bt PS36A	WO9818932(A 2,A3) 7 травня 1998
Vip3Aa5	PS81F Sup	AAR81080	Feitelson et al	1998	US 6656908 Грудень 2003	Bt PS81F	WO9818932(A 2,A3) 7 травня 1998
Vip3Aa6	Jav90 Sup	AAR81081	Feitelson et al	1998	US 6656908 Грудень 2003	Bt	WO9818932(A 2,A3) 7 травня 1998
Vip3Aa7	Vip83	AAK95326	Cai et al	2001	не опубліковано	Bt YBT-833	
Vip3Aa8	Vip3A	AAK97481	Loguercio et al	2001	не опубліковано	Bt HD125	
Vip3Aa9	VipS	CAA76665	Selvapandiyam et al	2001	не опубліковано	Bt A13	
Vip3Aa10	Vip3V	AAN60738	Doss et al	2002	Protein Expr. Purif. 26, 82- 88	Bt	
Vip3Aa11	Vip3A	AAR36859	Liu et al	2003	не опубліковано	Bt C9	
Vip3Aa12	Vip3A-WB5	AAM22456	Wu and Guan	2003	не опубліковано	Bt	
Vip3Aa13	Vip3A	AAL69542	Chen et al	2002	Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao 18, 687-692	Bt S184	
Vip3Aa14	Vip	AAQ12340	Polumetla et al	2003	не опубліковано	Bt tolworthi	
Vip3Aa15	Vip3A	AAP51131	Wu et al	2004	не опубліковано	Bt WB50	
Vip3Aa16	Vip3LB	AAW65132	Mesrati et al	2005	FEMS Micro Lett 244, 353-358	Bt	
Vip3Aa17	Jav90		Feitelson et al	1999	US 6603063 Серпень 2003	Javelin 1990	WO9957282(A 2,A3)11 листопада 1999
Vip3Aa18		AAX49395	Cai and Xiao	2005	не опубліковано	Bt 9816C	
Vip3Aa19	Vip3ALD	DQ241674	Liu et al	2006	не опубліковано	Bt AL	
Vip3Aa19	Vip3A-1	DQ539887	Hart et al	2006	не опубліковано		
Vip3Aa20	Vip3A-2	DQ539888	Hart et al	2006	не опубліковано		
Vip3Aa21	Vip	ABD84410	Panbangred	2006	не опубліковано	Bt aizawai	
Vip3Aa22	Vip3A-LS1	AAY41427	Lu et al	2005	не опубліковано	Bt LS1	
Vip3Aa23	Vip3A-LS8	AAY41428	Lu et al	2005	не опубліковано	Bt LS8	
Vip3Aa24		BI 880913	Song et al	2007	не опубліковано	Bt WZ-7	
Vip3Aa25		EF608501	Hsieh et al	2007	не опубліковано		
Vip3Aa26		EU294496	Shen and Guo	2007	не опубліковано	Bt TF9	
Vip3Aa27		EU332167	Shen and Guo	2007	не опубліковано	Bt 16	
Vip3Aa28		FJ494817	Xiumei Yu	2008	не опубліковано	Bt JF23-8	
Vip3Aa29		FJ626674	Xiumei et al	2009	не опубліковано	Bt JF21-1	
Vip3Aa30		FJ626675	Xiumei et al	2009	не опубліковано	MD2-1	

Vip3Aa31		FJ626676	Xieumei et al	2009	не опубліковано	JF21-1	
Vip3Aa32		FJ626677	Xieumei et al	2009	не опубліковано	MD2-1	
Vip3Ab1	Vip3B	<u>AAR40284</u>	Feitelson et al	1999	US <u>6603063</u> Серпень 2003	Bt KB59A4-6	WO9957282(A 2,A3) 11 1999 листопада
Vip3Ab2	Vip3D	<u>AAV88247</u>	Feng and Shen	2006	не опубліковано	Bt	
Vip3Ac1	PS49C		Narva et al		US заявка 2004012871 6		
Vip3Ad1	PS158C2		Narva et al		US заявка 2004012871 6		
Vip3Ad2	ISP3B	<u>CAI43276</u>	Van Rie et al	2005	не опубліковано	Bt	
Vip3Ae1	ISP3C	<u>CAI43277</u>	Van Rie et al	2005	не опубліковано	Bt	
Vip3Af1	ISP3A	<u>CAI43275</u>	Van Rie et al	2005	не опубліковано	Bt	
Vip3Af2	Vip3C	ADN08753	Syngenta		WO 03/075655		
Vip3Ag1	Vip3B	ADN08758	Syngenta		WO 02/078437		
Vip3Ag2		FJ556803	Audtho et al	2008		Bt	
Vip3Ah1	Vip3S	<u>DQ832323</u>	Li and Shen	2006	не опубліковано	Bt	
Vip3Ba1		<u>AAV70653</u>	Rang et al	2004	не опубліковано		
Vip3Bb1	Vip3Z	ADN08760	Syngenta		WO 03/075655		
Vip3Bb2		EF439819	Akhurst et al	2007			

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Dow AGROSCIENCES LLC
 <120> КОМБІНОВАНЕ ВИКОРИСТАННЯ БІЛКІВ CRY1Ca I CRY1Ab ДЛЯ КОНТРОЛЮ
 СТІЙКОСТІ КОМАХ
 <130> DAS-P0162-US-02
 <160> 3
 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 1164
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Химерний білок DIG-152
 <400> 1

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

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

Asn Ser Ser Ile Asp Ile Ser Leu Ser Leu Val Gln Phe Leu Val Ser
 35 40 45

Asn Phe Val Pro Gly Gly Gly Phe Leu Val Gly Leu Ile Asp Phe Val
 50 55 60

Trp Gly Ile Val Gly Pro Ser Gln Trp Asp Ala Phe Leu Val Gln Ile
 65 70 75 80

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

Ile Ala Asn Leu Glu Gly Leu Gly Asn Asn Phe Asn Ile Tyr Val Glu
 100 105 110

Ala Phe Lys Glu Trp Glu Glu Asp Pro Lys Asn Pro Ala Thr Arg Thr
 115 120 125

Arg Val Ile Asp Arg Phe Arg Ile Leu Asp Gly Leu Leu Glu Arg Asp
 130 135 140

Ile Pro Ser Phe Arg Ile Ser Gly Phe Glu Val Pro Leu Leu Ser Val
 145 150 155 160

Tyr Ala Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ala Ile Leu Arg Asp Ser Val
 165 170 175
 Ile Phe Gly Glu Arg Trp Gly Leu Thr Thr Ile Asn Val Asn Glu Asn
 180 185 190
 Tyr Asn Arg Leu Ile Arg His Ile Asp Glu Tyr Ala Asp His Cys Ala
 195 200 205
 Asn Thr Tyr Asn Arg Gly Leu Asn Asn Leu Pro Lys Ser Thr Tyr Gln
 210 215 220
 Asp Trp Ile Thr Tyr Asn Arg Leu Arg Arg Asp Leu Thr Leu Thr Val
 225 230 235 240
 Leu Asp Ile Ala Ala Phe Phe Pro Asn Tyr Asp Asn Arg Arg Tyr Pro
 245 250 255
 Ile Gln Pro Val Gly Gln Leu Thr Arg Glu Val Tyr Thr Asp Pro Leu
 260 265 270
 Ile Asn Phe Asn Pro Gln Leu Gln Ser Val Ala Gln Leu Pro Thr Phe
 275 280 285
 Asn Val Met Glu Asn Ser Ala Ile Arg Asn Pro His Leu Phe Asp Ile
 290 295 300
 Leu Asn Asn Leu Thr Ile Phe Thr Asp Trp Phe Ser Val Gly Arg Asn
 305 310 315 320
 Phe Tyr Trp Gly Gly His Arg Val Ile Ser Ser Leu Ile Gly Gly Gly
 325 330 335
 Asn Ile Thr Ser Pro Ile Tyr Gly Arg Glu Ala Asn Gln Glu Pro Pro
 340 345 350
 Arg Ser Phe Thr Phe Asn Gly Pro Val Phe Arg Thr Leu Ser Asn Pro
 355 360 365
 Thr Leu Arg Leu Leu Gln Gln Pro Trp Pro Ala Pro Pro Phe Asn Leu
 370 375 380
 Arg Gly Val Glu Gly Val Glu Phe Ser Thr Pro Thr Asn Ser Phe Thr
 385 390 395 400
 Tyr Arg Gly Arg Gly Thr Val Asp Ser Leu Thr Glu Leu Pro Pro Glu
 405 410 415

Asp Asn Ser Val Pro Pro Arg Glu Gly Tyr Ser His Arg Leu Cys His
 420 425 430
 Ala Thr Phe Val Gln Arg Ser Gly Thr Pro Phe Leu Thr Thr Gly Val
 435 440 445
 Val Phe Ser Trp Thr His Arg Ser Ala Thr Leu Thr Asn Thr Ile Asp
 450 455 460
 Pro Glu Arg Ile Asn Gln Ile Pro Leu Val Lys Gly Phe Arg Val Trp
 465 470 475 480
 Gly Gly Thr Ser Val Ile Thr Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile
 485 490 495
 Leu Arg Arg Asn Thr Phe Gly Asp Phe Val Ser Leu Gln Val Asn Ile
 500 505 510
 Asn Ser Pro Ile Thr Gln Arg Tyr Arg Leu Arg Phe Arg Tyr Ala Ser
 515 520 525
 Ser Arg Asp Ala Arg Val Ile Val Leu Thr Gly Ala Ala Ser Thr Gly
 530 535 540
 Val Gly Gly Gln Val Ser Val Asn Met Pro Leu Gln Lys Thr Met Glu
 545 550 555 560
 Ile Gly Glu Asn Leu Thr Ser Arg Thr Phe Arg Tyr Thr Asp Phe Ser
 565 570 575
 Asn Pro Phe Ser Phe Arg Ala Asn Pro Asp Ile Ile Gly Ile Ser Glu
 580 585 590
 Gln Pro Leu Phe Gly Ala Gly Ser Ile Ser Ser Gly Glu Leu Tyr Ile
 595 600 605
 Asp Lys Ile Glu Ile Ile Leu Ala Asp Ala Thr Phe Glu Ala Glu Ser
 610 615 620
 Asp Leu Glu Arg Ala Gln Lys Ala Val Asn Ala Leu Phe Thr Ser Ser
 625 630 635 640
 Asn Gln Ile Gly Leu Lys Thr Asp Val Thr Asp Tyr His Ile Asp Arg
 645 650 655
 Val Ser Asn Leu Val Glu Cys Leu Ser Asp Glu Phe Cys Leu Asp Glu
 660 665 670

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

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

 Glu Gly Arg Ile Phe Thr Ala Phe Ser Leu Tyr Asp Ala Arg Asn Val
 945 950 955 960

 Ile Lys Asn Gly Asp Phe Asn Asn Gly Leu Ser Cys Trp Asn Val Lys
 965 970 975

 Gly His Val Asp Val Glu Glu Gln Asn Asn His Arg Ser Val Leu Val
 980 985 990

 Val Pro Glu Trp Glu Ala Glu Val Ser Gln Glu Val Arg Val Cys Pro
 995 1000 1005

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

 Gly Glu Gly Cys Val Thr Ile His Glu Ile Glu Asn Asn Thr Asp
 1025 1030 1035

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

 Asn Thr Val Thr Cys Asn Asp Tyr Thr Ala Thr Gln Glu Glu Tyr
 1055 1060 1065

 Glu Gly Thr Tyr Thr Ser Arg Asn Arg Gly Tyr Asp Gly Ala Tyr
 1070 1075 1080

 Glu Ser Asn Ser Ser Val Pro Ala Asp Tyr Ala Ser Ala Tyr Glu
 1085 1090 1095

 Glu Lys Ala Tyr Thr Asp Gly Arg Arg Asp Asn Pro Cys Glu Ser
 1100 1105 1110

 Asn Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Thr Pro Leu Pro Ala Gly Tyr Val
 1115 1120 1125

 Thr Lys Glu Leu Glu Tyr Phe Pro Glu Thr Asp Lys Val Trp Ile
 1130 1135 1140

 Glu Ile Gly Glu Thr Glu Gly Thr Phe Ile Val Asp Ser Val Glu
 1145 1150 1155

 Leu Leu Leu Met Glu Glu
 1160


```

<210> 2
<211> 619
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Cry1Ca

<400> 2

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

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

Asn Ser Ser Ile Asp Ile Ser Leu Ser Leu Val Gln Phe Leu Val Ser
          35          40          45

Asn Phe Val Pro Gly Gly Gly Phe Leu Val Gly Leu Ile Asp Phe Val
          50          55          60

Trp Gly Ile Val Gly Pro Ser Gln Trp Asp Ala Phe Leu Val Gln Ile
65          70          75          80

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

Ile Ala Asn Leu Glu Gly Leu Gly Asn Asn Phe Asn Ile Tyr Val Glu
          100          105          110

Ala Phe Lys Glu Trp Glu Glu Asp Pro Lys Asn Pro Ala Thr Arg Thr
          115          120          125

Arg Val Ile Asp Arg Phe Arg Ile Leu Asp Gly Leu Leu Glu Arg Asp
          130          135          140

Ile Pro Ser Phe Arg Ile Ser Gly Phe Glu Val Pro Leu Leu Ser Val
145          150          155          160

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

Ile Phe Gly Glu Arg Trp Gly Leu Thr Thr Ile Asn Val Asn Glu Asn
          180          185          190

Tyr Asn Arg Leu Ile Arg His Ile Asp Glu Tyr Ala Asp His Cys Ala
          195          200          205

```

```

Asn Thr Tyr Asn Arg Gly Leu Asn Asn Leu Pro Lys Ser Thr Tyr Gln
210                215                220

Asp Trp Ile Thr Tyr Asn Arg Leu Arg Arg Asp Leu Thr Leu Thr Val
225                230                235                240

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

Ile Gln Pro Val Gly Gln Leu Thr Arg Glu Val Tyr Thr Asp Pro Leu
                260                265                270

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

Asn Val Met Glu Asn Ser Ala Ile Arg Asn Pro His Leu Phe Asp Ile
290                295                300

Leu Asn Asn Leu Thr Ile Phe Thr Asp Trp Phe Ser Val Gly Arg Asn
305                310                315                320

Phe Tyr Trp Gly Gly His Arg Val Ile Ser Ser Leu Ile Gly Gly Gly
                325                330                335

Asn Ile Thr Ser Pro Ile Tyr Gly Arg Glu Ala Asn Gln Glu Pro Pro
                340                345                350

Arg Ser Phe Thr Phe Asn Gly Pro Val Phe Arg Thr Leu Ser Asn Pro
                355                360                365

Thr Leu Arg Leu Leu Gln Gln Pro Trp Pro Ala Pro Pro Phe Asn Leu
370                375                380

Arg Gly Val Glu Gly Val Glu Phe Ser Thr Pro Thr Asn Ser Phe Thr
385                390                395                400

Tyr Arg Gly Arg Gly Thr Val Asp Ser Leu Thr Glu Leu Pro Pro Glu
                405                410                415

Asp Asn Ser Val Pro Pro Arg Glu Gly Tyr Ser His Arg Leu Cys His
                420                425                430

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

Val Phe Ser Trp Thr His Arg Ser Ala Thr Leu Thr Asn Thr Ile Asp
450                455                460

```

Pro Glu Arg Ile Asn Gln Ile Pro Leu Val Lys Gly Phe Arg Val Trp
465 470 475 480

Gly Gly Thr Ser Val Ile Thr Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile
485 490 495

Leu Arg Arg Asn Thr Phe Gly Asp Phe Val Ser Leu Gln Val Asn Ile
500 505 510

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

Ser Arg Asp Ala Arg Val Ile Val Leu Thr Gly Ala Ala Ser Thr Gly
530 535 540

Val Gly Gly Gln Val Ser Val Asn Met Pro Leu Gln Lys Thr Met Glu
545 550 555 560

Ile Gly Glu Asn Leu Thr Ser Arg Thr Phe Arg Tyr Thr Asp Phe Ser
565 570 575

Asn Pro Phe Ser Phe Arg Ala Asn Pro Asp Ile Ile Gly Ile Ser Glu
580 585 590

Gln Pro Leu Phe Gly Ala Gly Ser Ile Ser Ser Gly Glu Leu Tyr Ile
595 600 605

Asp Lys Ile Glu Ile Ile Leu Ala Asp Ala Thr
610 615

<210> 3
<211> 612
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Cry1Ab

<400> 3

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

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

Tyr Thr Pro Ile Asp Ile Ser Leu Ser Leu Thr Gln Phe Leu Leu Ser
35 40 45

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

Trp Gly Ile Phe Gly Pro Ser Gln Trp Asp Ala Phe Leu Val Gln Ile
 65 70 75 80
 Glu Gln Leu Ile Asn Gln Arg Ile Glu Glu Phe Ala Arg Asn Gln Ala
 85 90 95
 Ile Ser Arg Leu Glu Gly Leu Ser Asn Leu Tyr Gln Ile Tyr Ala Glu
 100 105 110
 Ser Phe Arg Glu Trp Glu Ala Asp Pro Thr Asn Pro Ala Leu Arg Glu
 115 120 125
 Glu Met Arg Ile Gln Phe Asn Asp Met Asn Ser Ala Leu Thr Thr Ala
 130 135 140
 Ile Pro Leu Phe Ala Val Gln Asn Tyr Gln Val Pro Leu Leu Ser Val
 145 150 155 160
 Tyr Val Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser Val Leu Arg Asp Val Ser
 165 170 175
 Val Phe Gly Gln Arg Trp Gly Phe Asp Ala Ala Thr Ile Asn Ser Arg
 180 185 190
 Tyr Asn Asp Leu Thr Arg Leu Ile Gly Asn Tyr Thr Asp Tyr Ala Val
 195 200 205
 Arg Trp Tyr Asn Thr Gly Leu Glu Arg Val Trp Gly Pro Asp Ser Arg
 210 215 220
 Asp Trp Val Arg Tyr Asn Gln Phe Arg Arg Glu Leu Thr Leu Thr Val
 225 230 235 240
 Leu Asp Ile Val Ala Leu Phe Pro Asn Tyr Asp Ser Arg Arg Tyr Pro
 245 250 255
 Ile Arg Thr Val Ser Gln Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Asn Pro Val
 260 265 270
 Leu Glu Asn Phe Asp Gly Ser Phe Arg Gly Ser Ala Gln Gly Ile Glu
 275 280 285
 Arg Ser Ile Arg Ser Pro His Leu Met Asp Ile Leu Asn Ser Ile Thr
 290 295 300
 Ile Tyr Thr Asp Ala His Arg Gly Tyr Tyr Tyr Trp Ser Gly His Gln
 305 310 315 320

Ile Met Ala Ser Pro Val Gly Phe Ser Gly Pro Glu Phe Thr Phe Pro
325 330 335

Leu Tyr Gly Thr Met Gly Asn Ala Ala Pro Gln Gln Arg Ile Val Ala
340 345 350

Gln Leu Gly Gln Gly Val Tyr Arg Thr Leu Ser Ser Thr Leu Tyr Arg
355 360 365

Arg Pro Phe Asn Ile Gly Ile Asn Asn Gln Gln Leu Ser Val Leu Asp
370 375 380

Gly Thr Glu Phe Ala Tyr Gly Thr Ser Ser Asn Leu Pro Ser Ala Val
385 390 395 400

Tyr Arg Lys Ser Gly Thr Val Asp Ser Leu Asp Glu Ile Pro Pro Gln
405 410 415

Asn Asn Asn Val Pro Pro Arg Gln Gly Phe Ser His Arg Leu Ser His
420 425 430

Val Ser Met Phe Arg Ser Gly Phe Ser Asn Ser Ser Val Ser Ile Ile
435 440 445

Arg Ala Pro Met Phe Ser Trp Ile His Arg Ser Ala Glu Phe Asn Asn
450 455 460

Ile Ile Pro Ser Ser Gln Ile Thr Gln Ile Pro Leu Thr Lys Ser Thr
465 470 475 480

Asn Leu Gly Ser Gly Thr Ser Val Val Lys Gly Pro Gly Phe Thr Gly
485 490 495

Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr Ser Pro Gly Gln Ile Ser Thr Leu Arg
500 505 510

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

Tyr Ala Ser Thr Thr Asn Leu Gln Phe His Thr Ser Ile Asp Gly Arg
530 535 540

Pro Ile Asn Gln Gly Asn Phe Ser Ala Thr Met Ser Ser Gly Ser Asn
545 550 555 560

Leu Gln Ser Gly Ser Phe Arg Thr Val Gly Phe Thr Thr Pro Phe Asn
565 570 575

Phe Ser Asn Gly Ser Ser Val Phe Thr Leu Ser Ala His Val Phe Asn
580 585 590

Ser Gly Asn Glu Val Tyr Ile Asp Arg Ile Glu Phe Val Pro Ala Glu
595 600 605

Val Thr Phe Glu
610

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Трансгенна рослина, що має стійкість до комах-шкідників кукурудзяної листової совки (FAW; *Spodoptera frugiperda*) і/або вогнівки цукрової тростини (SCB; *Diatraea saccharalis*), що містить
- 5 ДНК, яка кодує інсектицидний білок Cry1Ca з послідовністю SEQ ID NO: 2, і ДНК, яка кодує інсектицидний білок Cry1Ab з послідовністю SEQ ID NO: 3; де вказану рослину вибирають з групи, що складається з кукурудзи, сої, цукрової тростини і бавовни.
2. Насіння рослини за п. 1, що містить ДНК, яка кодує інсектицидний білок Cry1Ca з послідовністю SEQ ID NO: 2, і ДНК, яка кодує інсектицидний білок Cry1Ab з послідовністю SEQ
- 10 ID NO: 3.
3. Трансгенна рослина за п. 1, де ДНК, яка кодує інсектицидний білок Cry1Ca, і ДНК, яка кодує інсектицидний білок Cry1Ab, були введені у вказану рослину.
4. Трансгенне насіння рослини за п. 3, що містить ДНК, яка кодує інсектицидний білок Cry1Ca з послідовністю SEQ ID NO: 2, і ДНК, яка кодує інсектицидний білок Cry1Ab з послідовністю SEQ
- 15 ID NO: 3.
5. Сукупність рослин в полі, що містить не-*Bt* рослини-сховища і сукупність трансгенних рослин за п. 1, де вказані трансгенні рослини містять ДНК, яка кодує інсектицидний білок Cry1Ca з послідовністю SEQ ID NO: 2, і ДНК, яка кодує інсектицидний білок Cry1Ab з послідовністю SEQ
- 20 ID NO: 3, де вказані рослини-сховища містять менше 40 % всіх злакових рослин у вказаній сукупності рослин.
6. Сукупність рослин за п. 5, де вказані рослини-сховища містять менше 30 % всіх злакових рослин у вказаній сукупності рослин.
7. Сукупність рослин за п. 5, де вказані рослини-сховища складають менше 20 % всіх злакових рослин у вказаній сукупності рослин.
- 25 8. Сукупність рослин за п. 5, де вказані рослини-сховища складають менше 10 % всіх злакових рослин у вказаній сукупності рослин.
9. Сукупність рослин за п. 5, де вказані рослини-сховища складають менше 5 % всіх злакових рослин у вказаній сукупності рослин.
10. Сукупність рослин за п. 5, де вказані рослини-сховища висаджені блоками або смугами.
- 30 11. Суміш насіння, що містить насіння-сховища від не-*Bt* рослин-сховищ, і сукупність трансгенного насіння за п. 7, що містять ДНК, яка кодує інсектицидний білок Cry1Ca з послідовністю SEQ ID NO: 2, і ДНК, яка кодує інсектицидний білок Cry1Ab з послідовністю SEQ ID NO: 3, де вказане насіння-сховище містить менше 40 % всього насіння в суміші.
12. Суміш насіння за п. 11, де вказане насіння-сховище складає менше 30 % всього насіння в суміші.
- 35 13. Суміш насіння за п. 11, де вказане насіння-сховище складає менше 20 % всього насіння в суміші.
14. Суміш насіння за п. 11, де вказане насіння-сховище складає менше 10 % всього насіння в суміші.
- 40 15. Суміш насіння за п. 11, де вказане насіння-сховище складає менше 5 % всього насіння в суміші.
16. Спосіб керування розвитком стійкості комах вогнівки цукрової тростини і/або кукурудзяної листової совки до токсину Cry, де вказаний спосіб включає вирощування насіння для отримання сукупності трансгенних рослин за п. 5, що містять ДНК, яка кодує інсектицидний білок Cry1Ca з послідовністю SEQ ID NO: 2, і ДНК, яка кодує інсектицидний білок Cry1Ab з послідовністю SEQ
- 45 ID NO: 3, і приведення вказаних комах в контакт із вказаною сукупністю трансгенних рослин.
17. Рослина за п. 1, де визначена рослина додатково містить ДНК, яка кодує коровий Cry1Fa токсинвмісний білок.
18. Сукупність рослин в полі, що містить не-*Bt* рослини-сховища, що не експресують
- 50 трансгенний інсектицидний білок, і сукупність трансгенних рослин кукурудзи за п. 17, яка має інсектицидну активність відносно кукурудзяної листової совки і/або вогнівки цукрової тростини, де вказані рослини-сховища містять менше 20 % всіх злакових рослин у вказаній сукупності рослин.
19. Сукупність рослин в полі, що містить не-*Bt* рослини-сховища, що не експресують
- 55 трансгенний інсектицидний білок, і сукупність трансгенних рослин за п. 17, яка має інсектицидну активність відносно кукурудзяної листової совки і/або вогнівки цукрової тростини, де вказане поле містить менше 10 % всіх злакових рослин у вказаній сукупності рослин.
20. Спосіб керування розвитком стійкості комах вогнівки цукрової тростини і/або кукурудзяної листової совки до токсину Cry, де вказаний спосіб включає вирощування насіння для отримання

сукупності рослин за п. 19, і приведення вказаних комах в контакт із вказаною сукупністю трансгенних рослин.

21. Композиція для контролю лускокрилих шкідників, яка містить клітини, що експресують інсектицидно активні кількості і корового токсинвмісного білка Cry1Ab з послідовністю SEQ ID NO: 3, і корового токсинвмісного білка Cry1Ca з послідовністю SEQ ID NO: 2.

22. Композиція за п. 21, що містить хазяїна, трансформованого для експресії як корового токсинвмісного білка Cry1Ab з послідовністю SEQ ID NO: 3, так і корового токсинвмісного білка Cry1Ca з послідовністю SEQ ID NO: 2, де вказаний хазяїн являє собою клітину мікроорганізму чи клітину рослини.

23. Спосіб боротьби з лускокрилими шкідниками, що включає приведення вказаних шкідників чи навколишнього середовища вказаних шкідників у контакт з інсектицидно активною кількістю композиції за п. 21.

24. Сукупність рослин в полі за п. 5 або 18, де вказані рослини займають площу понад 10 акрів.

25. Рослина за будь-яким з пп. 1, 3 і 17, де вказана рослина є рослиною кукурудзи.

Конкурентів зв'язування корового токсину Cry1Ab, корового токсину Cry1Ca і корового токсину Cry1Ab, міченого ^{125}I , з BBMV з *Spodoptera frugiperda*

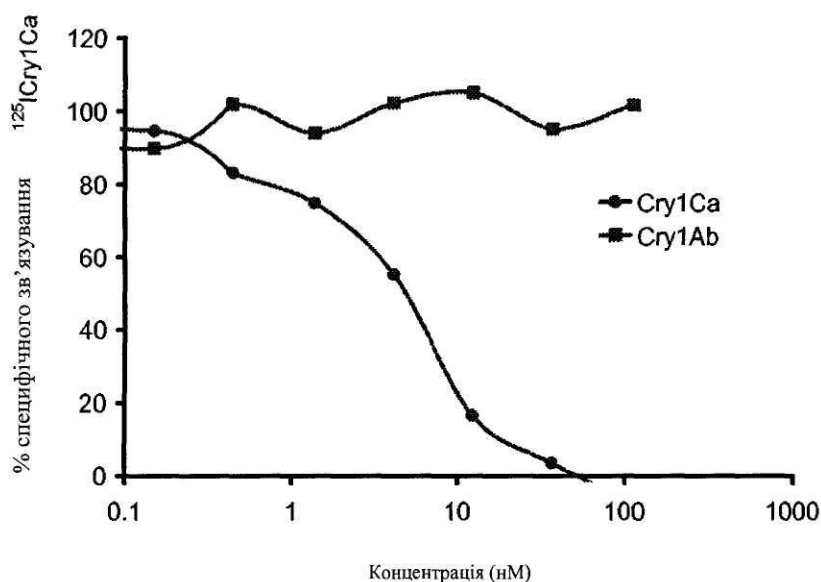


Fig. 1

Конкурентне зв'язування корового токсину Cry1Ca, корового токсину Cry1Ab і корового токсину Cry1Ab, міченого ^{125}I , з BBMV *Spodoptera frugiperda*

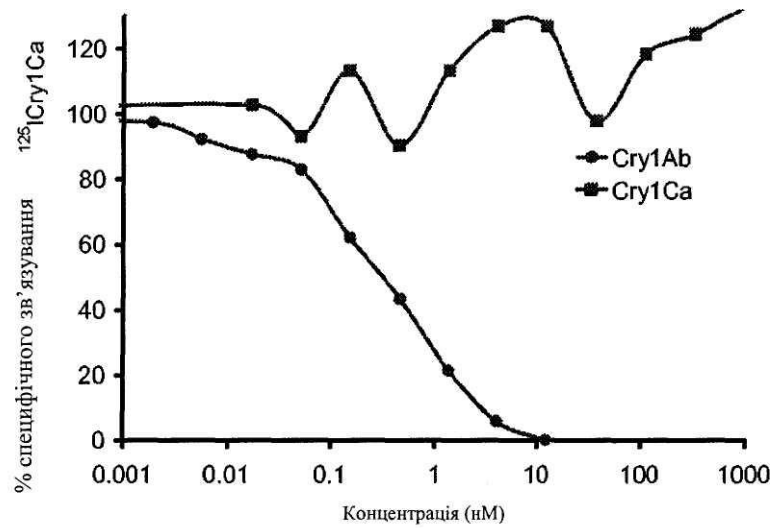


Fig. 2

Комп'ютерна верстка М. Мацело

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

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