



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **108348** (13) **C2**
(51) МПК**C12N 15/31** (2006.01)**C12N 15/82** (2006.01)**C07K 14/325** (2006.01)**C12R 1/07** (2006.01)ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

(21) Номер заявки: а 2011 10267	(72) Винахідник(и): Абад Андре Р. (FR/US), Капка-Кітзман Дейрдре М. (US), Матіс Джон П. (US), Волфе Томас С. (US)
(22) Дата подання заявки: 01.12.2009	(73) Власник(и): ПІОНЕР ХАЙ-БРЕД ІНТЕРНЕТШНЛ, ІНК., 7100 N. W. 62nd Avenue, Johnston, Iowa 50131-1000, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 27.04.2015	(74) Представник: Льгова Майя Миколаївна, реєстр. №12
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 61/146,708, 61/146,711	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 0026371 A1, 11.05.2000 WO 9504146 A2, 09.02.1995 WO 0026371 A1, 11.05.2000 DATABASE GENBANK ACCESSION 29 January 1999 Database accession no. AAD10292 CHRISTOU, P. ET AL.: 'Recent Development and Future Prospects in Insect Pest Control in Transgenic Crops' TRENDS PLANT SCI. vol. 11, no. 6, June 2006, pages 302 - 308 KUO WHITE-SHANG ET AL: "Cloning of two new cry genes from <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>wuhanensis</i> strain", CURRENT MICROBIOLOGY, SPRINGER, NEW YORK, NY, US, vol. 40, no. 4, 1 April 2000, pages 227-232
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 23.01.2009, 23.01.2009	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US, US	
(41) Публікація відомостей про заявку: 25.10.2011, Бюл.№ 20	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 27.04.2015, Бюл.№ 8	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ PCT/US2009/066181, 01.12.2009	

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

Винахід належить до виділеної молекули нуклеїнової кислоти або її повнорозмірного комплекменту, отриманої зі штамів *Bacillus thuringiensis*, що кодують поліпептид, що має пестицидну активність проти комах-шкідників з порядку *Lepidoptera* та застосування в способах боротьби з комахами-шкідниками із порядку *Lepidoptera*.

UA 108348 C2

ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ, ДО ЯКОЇ ВІДНОСИТЬСЯ ВІНАХІД

Даний винахід відноситься до природних і рекомбінантних нуклеїнових кислот, отриманих з нових генів *Bacillus thuringiensis*, які кодують пестицидні поліпептиди, що володіють пестицидною активністю відносно комах-шкідників. У композиціях і способах за даним винаходом використовуються описані нуклеїнові кислоти й кодуємі ними поліпептиди для цілей контролю шкідників рослин.

ПЕРЕДУМОВИ СТВОРЕННЯ ВІНАХОДУ

Комахи-шкідники представляють важливий фактор, що визначає втрати врожаю сільськогосподарських культур у світі. Так, наприклад, ушкодження, викликані такими шкідниками, як "похідні хробаки", совка іпсилон або метелик кукурудзяний, можуть розглядатися як реальна економічна погроза для виробників сільськогосподарської продукції. Так, втрати, обумовлені тільки одним комахом-шкідником, метеликом кукурудзяним, на полях і солодкій кукурудзі становили приблизно один мільярд доларів у рік, з обліком як втрат урожаю, так і витрат на боротьбу зі шкідником.

Традиційно, основним способом впливу на популяції вважалося використання хімічних інсектицидів широкого спектра дії. Однак, і в споживачів, і в контролюючих урядових органів викликає все більшу занепокоєність забруднення навколишнього середовища, пов'язане з виробництвом і застосуванням синтетичних хімічних пестицидів. У зв'язку з ростом такої заклопотаності органі, що контролюють, або забороняють, або обмежують використання деяких з найбільш шкідливих пестицидів. Таким чином, є виражений інтерес до розробки альтернативних пестицидів.

Біологічний контроль економічно значимих комах-шкідників з використанням мікробного агента, такого як гриби, бактерії або інший вид комах, являє собою екологічно безпечну й комерційно привабливу альтернативу синтетичним хімічним пестицидам. У цілому, слід зазначити, що використання біопестицидів знижує ризик забруднення навколишнього середовища, а самі біопестициди забезпечують більш високу специфічність впливу, ніж це характерно для традиційних хімічних інсектицидів широкого спектра дії. Крім того, біопестициди найчастіше дешевше виробляти, що підвищує економічний вихід у випадку великої кількості культур.

Відомо, що деякі мікроорганізми з роду *Bacillus* мають пестицидну активність відносно широкого спектра комах-шкідників, що включають *Lepidoptera*, *Diptera*, *Coleoptera*, *Hemiptera* і інших. *Bacillus thuringiensis* (Bt) і *Bacillus papilliae* відносяться до числа частіше й успішніше інших відомих до теперішнього часу агентів, застосовуваних з метою біологічного контролю. Патогенний ефект для комах також мають штами *B. larvae*, *B. lentimorbus*, *B. sphaericus* (Harwood, ed., ((1989) *Bacillus* (Plenum Press), 306) і *B. cereus* (WO 96/10083). Пестицидна активність концентрується, як видно, у параспорових кристалічних білках включення, хоча пестицидні білки були також виділені з *Bacillus* на стадії вегетативного росту. Було виділено й охарактеризовано кілька генів, кодуючих зазначені пестицидні білки (див., наприклад, патенти США NoNo. 5 366 892 і 5 840 868).

Мікробні інсектициди, особливо отримані зі штамів *Bacillus*, відігравали важливу роль у сільському господарстві, виконуючи функцію альтернативи хімічним засобам боротьби зі шкідниками. Останнім часом, вчені, що працюють у сфері сільського господарства створили культури рослин з підвищеною стійкістю до комах, шляхом генетичного конструювання культур рослин, продукуючих пестицидні білки з *Bacillus*. Наприклад, з використанням методів генетичної інженерії були отримані рослини кукурудзи й бавовни, продукуючі пестицидні білки, виділені зі штамів Bt (див., наприклад, Aronson (2002) *Cell Mol. Life Sci.* 59(3):417-425; Schnepf et al. (1998) *Microbiolmol Biol Rev.* 62(3):775-806). Зазначені генетично сконструйовані культури в даний час широко використовуються в сільськогосподарському секторі США і, як підтвердили фермери, є екологічно безпечною альтернативою традиційним способам контролю комах. Крім того, американському фермерові був проданий сорт картоплі, генетично модифікований з метою одержання пестицидних Cгу токсинів. Однак, хоча ці генетично модифіковані культури були комерційно вдалими, стійкі до комах культури рослин забезпечували резистентність тільки до вузького діапазону економічно значимих комах-шкідників.

Відповідно, залишається потреба в нових токсинах Bt з більш широким спектром інсектицидної активності проти комах-шкідників, наприклад, токсинах, які активні проти більшого числа видів комах з порядку *Lepidoptera*. Крім того, залишається потреба в біопестицидах, що володіють активністю проти безлічі шкідників, і в біопестицидах, які мають підвищену інсектицидну активність.

КОРОТКИЙ ОПИС СУТНОСТІ ВИНАХОДУ

Даний винахід відноситься до композицій і способам, що впливають на комах-шкідників. Більш конкретно, у варіантах здійснення даного винаходу розглядаються способи впливу на комах з використанням нуклеотидних послідовностей, кодуючих інсектицидні пептиди, для одержання трансформованих організмів і рослин, які експресують інсектицидний поліпептид за даним винаходом. Такі шкідники включають агрономічно значимих шкідників, таких як, наприклад, метелик кукурудзяний (*Ostnha nubilalis*), fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*), совка іпсилон (*Agrotis ipsilon*), corn earworm (*Heliothis zea*) і Southwestern corn borer (*Diatraea grandiosella*). У деяких варіантах здійснення даного винаходу, нуклеотидні послідовності кодують поліпептиди, які мають пестицидну активність у відношенні щонайменше одного комах, що належить до порядку *Lepidoptera*.

Різні варіанти здійснення даного винаходу відносяться до нуклеїнової кислоти і її фрагментам і варіантам, які кодують поліпептиди, що володіють пестицидною активністю проти комах-шкідників (наприклад, SEQ ID NONO: 1 і 3, кодуючі SEQ ID NONO: 2 і 4, відповідно). Згідно з варіантами здійснення даного винаходу, нуклеотидна послідовність дикого типу (наприклад, природна), яка була отримана з Bt, кодує новий інсектицидний пептид. Даний винахід також відноситься до фрагментів і варіантів розглянутої нуклеотидної послідовності, які кодують біологічно активні (наприклад, інсектицидні) поліпептиди.

Даний винахід, у різних варіантах свого здійснення, також відноситься до виділених пестицидним (наприклад, інсектицидним) поліпептидам, кодованої або природної, або модифікованої (наприклад, мутованої або отриманої в результаті маніпуляції) нуклеїновою кислотою за даним винаходом. У конкретних прикладах, інсектицидні білки за даним винаходом включають фрагменти повнорозмірних білків і поліпептидів, які утворюються з мutowаних нуклеїнових кислот, розроблених з метою введення певних амінокислотних послідовностей у поліпептиди за даним винаходом. У конкретних варіантах здійснення даного винаходу, поліпептиди мають підвищену пестицидну активність, у порівнянні з активністю природного поліпептиду, на основі якого вони були отримані.

Нуклеїнові кислоти за даним винаходом можуть також використовуватися для одержання трансгенних (наприклад, трансформованих) однодольних або дводольних рослин, які характеризуються наявністю геномів, що включають щонайменше одну стабільно вбудовану нуклеотидну конструкцію, що включає кодуючу послідовність за даним винаходом, оперативно зв'язану із промотором, який направляє експресію кодовуваного пестицидного поліпептиду. Відповідно, даний винахід також відноситься до трансформованих клітин рослин, рослинним тканинам, рослинам і їх насінням.

У конкретному варіанті здійснення даного винаходу, трансформована рослина може бути отримана з використанням нуклеїнової кислоти, яка була оптимізована для підвищеної експресії в рослині-хазяїні. Наприклад, один з пестицидних поліпептидів за даним винаходом може бути підданий бек-трансляції для одержання нуклеїнової кислоти, що включає кодони, оптимізовані для експресії в конкретному хазяїні, наприклад, у культурній рослині, такій, як рослина кукурудзи (*Zea mays*). Експресія кодуючої послідовності такою трансформованою рослиною (наприклад, дводольною або однодольною) буде приводити до продукції пестицидного поліпептиду й буде надавати рослині підвищену стійкість до комах. Деякі варіанти здійснення даного винаходу відносяться до трансгенних рослин, експресуючих пестицидні поліпептиди, які застосовуються в способах впливу на різні комах-шкідники.

Даний винахід, у різних варіантах його здійснення, також відноситься до пестицидних або інсектицидних композицій, що містять інсектицидні поліпептиди за даним винаходом, і може необов'язково включати інші інсектицидні пептиди. Даний винахід відноситься до застосування таких композицій у середовищі проживання комах-шкідників для впливу на комах-шкідників

ДОКЛАДНИЙ ОПИС ДАНОГО ВИНАХОДУ

Даний винахід, у різних варіантах свого здійснення, відноситься до композицій і способам впливу на комах-шкідників, зокрема, на шкідників рослин. Більш конкретно, виділена нуклеїнова кислота за даним винаходом і її фрагменти й варіанти, включають нуклеотидні послідовності, які кодують пестицидні поліпептиди (наприклад, білки). Розглянуті в даному винаході пестицидні білки біологічно активні (наприклад, мають пестицидну активність) проти широкого спектра комах-шкідників, таких як, без обмеження, комах-шкідників з порядку *Lepidoptera*. Представляючи інтерес, комах-шкідники включають, без обмеження, метелика кукурудзяного (*Ostrinia nubilalis*), совку трав'яну (*Spodoptera frugiperda*), совку іпсилон (*Agrotis ipsilon*), совку бавовняну (*Heliothis zea*) і вогнівку кукурудзяну південно-західну (*Diatraea grandiosella*).

Композиції за даним винаходом включають виділені нуклеїнові кислоти, а також їх фрагменти й варіанти, які кодують пестицидні поліпептиди, касети експресії, що включають нуклеотидні послідовності за даним винаходом, виділені пестицидні білки й пестицидні композиції. Деякі варіанти здійснення даного винаходу відносяться до модифікованих пестицидних поліпептидів, що відрізняються підвищеною інсектицидною активністю проти лускокрилих, у порівнянні з пестицидною активністю відповідного білка дикого типу. Даний винахід, у різних варіантах свого здійснення, також відноситься до рослин і мікроорганізмів, трансформованих даними новими нуклеїновими кислотами, і до способів, що включають використання таких нуклеїнових кислот, пестицидних композицій, трансформованих організмів і їх продуктів для впливу на комах-шкідників.

Нуклеїнові кислоти й нуклеотидні послідовності за даним винаходом можуть бути використані для трансформації будь-якого організму з метою одержання кодуючих пестицидних білків. У даному винаході представлені способи, які включають використання таких трансформованих організмів для впливу на шкідників рослин або для боротьби з ними. Нуклеїнові кислоти й нуклеотидні послідовності за даним винаходом можуть також використовуватися для трансформації органел, таких як хлоропласти (McBride et al. (1995) *Biotechnology* 13: 362-365; and Kota et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:1840-1845).

Даний винахід, у різних варіантах свого здійснення, також відноситься до ідентифікації фрагментів і варіантів природної кодуючої послідовності, яка кодує біологічно активні пестицидні білки. Нуклеотидні послідовності за даним винаходом знаходять безпосереднє застосування в способах впливу на шкідників, особливо, на комах-шкідників, таких як шкідники з порядку *Lepidoptera*. Відповідно, даний винахід, у різних варіантах свого здійснення, відноситься до нових підходів для впливу на комах-шкідників, які не залежать від використання традиційних, синтетичних хімічних інсектицидів. Даний винахід заснований на відкритті природних, біорозкладаємих пестицидів і до генів, які їх кодують.

Даний винахід, у різних варіантах свого здійснення, також відноситься до фрагментів і варіантів природної кодуючої послідовності, яка також кодує біологічно активні (наприклад, що володіють пестицидною активністю) поліпептиди. Нуклеїнові кислоти за даним винаходом включають нуклеїнову кислоту або нуклеотидні послідовності, які були оптимізовані для експресії клітинами конкретного організму, наприклад, до послідовностей нуклеїнової кислоти, які були піддані бек-трансляції (наприклад, зворотної трансляції) з використанням кращих для рослини кодонів, заснованих на амінокислотній послідовності поліпептиду, що володіє підвищеною пестицидною активністю. Даний винахід, у різних варіантах свого здійснення, також відноситься до мутацій, які надають поліпшені або змінені властивості поліпептидам за даним винаходом. Див., наприклад, спільно розглянуті заявки на патент США NoNo. 10/606 320, зареєстрована 25 липня 2003, і 10/746 914, зареєстрована 24 грудня 2003.

У наведеному нижче описі широко використовується безліч термінів. Для полегшення розуміння даного винаходу далі приводяться наступні визначення.

Одиниці, префікси й символи можна розглядати відповідно прийнятій в SI формі. Якщо не зазначено інше, нуклеїнові кислоти позначаються ліворуч праворуч в орієнтації 5'-3'; амінокислотні послідовності вказуються з ліва на право від аміно- до карбокси-кінцю, відповідно. Наведені цифрові діапазони включають цифри, що визначають кінець діапазону. Амінокислоти можуть бути наведені або у вигляді їх загальноприйнятих трьохлітерних символів, або у вигляді однолітерних символів, згідно з рекомендаціями Комісії з номенклатури біохімічних з'єднань IUPAC-IUB. Аналогічно, нуклеотиди можуть бути позначені у вигляді загальноприйнятих однобуквених кодів. Зазначені вище терміни в цілому й більш повно визначаються в наведених посиланнях.

У контексті даного опису, термін "нуклеїнова кислота" відноситься до дезоксирибонуклеотидному або рибонуклеотидному полімеру в одноланцюговій або двохланцюговій формі і, якщо не зазначено інше, включає відомі аналоги (наприклад, пептидні нуклеїнові кислоти), що володіють по суті основною властивістю природних нуклеотидів, обумовлених їхньою здатністю гібридуватися з одноланцюговими нуклеїновими кислотами аналогічним чином, що й природні нуклеотиди.

У контексті даного опису, терміни "кодуючий" або "кодовуваний", використовувані стосовно до конкретної нуклеїнової кислоти, означають, що зазначена нуклеїнова кислота включає потрібну інформацію для напрямку трансляції нуклеотидної послідовності в конкретний білок. Інформація, за допомогою якої білок кодується, визначається використанням кодонів. Нуклеїнова кислота, що і кодує білок, може включати нетрансльовані послідовності (наприклад, інтрони) у трансльованих ділянках нуклеїнової кислоти або може не містити такі вбудовані нетрансльовані послідовності (наприклад, як у випадку кДНК).

У контексті даного опису, термін "повнорозмірна послідовність", використовуваний стосовно до конкретного полінуклеотиду або до кодованому ним білку, означає, що є повна послідовність нуклеїнової кислоти або повна амінокислотна послідовність нативної (несинтетичної) ендегенної послідовності. Повнорозмірний полінуклеотид кодує повнорозмірну, каталітично активну форму конкретного білка.

У контексті даного опису, термін "антизначеннєвий", використовуваний стосовно до орієнтації нуклеотидної послідовності, відноситься до дуплексної полінуклеотидної послідовності, яка оперативно пов'язана із промотором у такій орієнтації, коли транскрибується антизначеннєвий ланцюг. Антизначеннєвий ланцюг має достатню комплементарність до ендегенного продукту транскрипції, так що трансляція ендегенного продукту транскрипції часто інгібується. Таким чином, термін "антизначеннєвий" використовується стосовно до конкретної нуклеотидної послідовності, і даний термін відноситься до комплементарного ланцюга розглянутого продукту транскрипції.

Терміни "поліпептид", "пептид" і "білок" використовуються в даному описі взаємозамінно для позначення полімеру з амінокислотних залишків. Терміни використовуються стосовно до амінокислотних полімерів, у яких один або кілька амінокислотних залишків являють собою штучний хімічний аналог відповідної природної амінокислоти, а також стосовно до природних амінокислотних полімерів.

Терміни "залишок" або "амінокислотний залишок" або "амінокислота" використовується в даному описі взаємозамінно для позначення амінокислоти, яка включена в білок, поліпептид або пептид (у цілому, "білок"). Амінокислота може являти собою природну амінокислоту і, якщо не зазначене інше, може включати відомі аналоги природних амінокислот, які можуть функціонувати аналогічним чином, що й природні амінокислоти.

Поліпептиди, згідно з різними варіантами здійснення даного винаходу, можуть бути отримані або з нуклеїнової кислоти за даним винаходом, або шляхом застосування стандартних методів молекулярної біології. Наприклад, білок за даним винаходом може бути отриманий шляхом експресії рекомбінантної нуклеїнової кислоти за даним винаходом в підходящій клітині-хазяїні або, альтернативно, при комбінації процедур *ex vivo*.

У контексті даного опису, терміни "виділений" і "очищений" використовуються взаємозамінно для позначення нуклеїнових кислот або поліпептидів або їх біологічно активних частин, які значною мірою або по суті не містять компонентів, які звичайно супроводжують або взаємодіють із нуклеїновою кислотою або поліпептидом у звичайних умовах природного середовища. Таким чином, виділена/ий або очищена/ий нуклеїнова кислота або поліпептид по суті вільні від іншого клітинного матеріалу або культурального середовища, при одержанні їх рекомбінантними методами, або по суті вільні від хімічних попередників або інших хімічних речовин, у випадку їх хімічного синтезу.

У такий спосіб "виділена" нуклеїнова кислота в основному не містить послідовностей (таких як, наприклад, послідовності, що кодують білок), які в природному стані фланкують нуклеїнову кислоту (тобто послідовностей, розташованих на 5' і 3' кінцях нуклеїнової кислоти) у геномної ДНК організму, з якого була отримана дана нуклеїнова кислота. Наприклад, у різних варіантах здійснення даного винаходу, виділені нуклеїнові кислоти можуть містити менш, чим приблизно 5 кбайт, 4 кбайт, 3 кбайт, 2 кбайт, 1 кбайт, 0,5 кбайт або 0,1 кбайт із нуклеотидних послідовностей, які в природному стані фланкують нуклеїнові кислоти в геномної ДНК клітини, з якої була отримана дана нуклеїнова кислота.

Використовуваний у тексті даного винаходу термін "виділений" або "очищений", стосовно до поліпептиду, згідно з варіантами даного винаходу, означає, що виділений білок по суті не містить клітинного матеріалу й включає препарати білка, що містить менш, чим приблизно 30 %, 20 %, 10 % або 5 % (по сухій вазі) контамінуючого білка. У тому випадку, коли білок за даним винаходом або його біологічно активну частину одержують рекомбінантними методами, культуральне середовище містить менш, чим приблизно 30 %, 20 %, 10 % або 5 % (по сухій вазі) хімічних попередників або інших хімічних речовин, що не відносяться до білка, що цікавить.

У тексті всього опису, слово «, що включає" або його варіації, такі як "включає" або ін., слід розуміти як включення зазначеного елемента, числа або стадії або групи елементів, чисел або стадій, але не як виключення будь-якого іншого елемента, числа або стадії або групи елементів, чисел або стадій.

У контексті даного опису, термін "вплив на комаху-шкідника" відноситься до внесення змін у харчування комах, їх ріст і/або поведінку на будь-якій стадії розвитку, що включають, без обмеження: знищення комах, затримку її росту, обмеження репродуктивної здатності, використання активності речовини, що охороняє рослину від поїдання комахами (антифідінг) і т.п.

У контексті даного опису, терміни "пестицидна активність" і "інсектицидна активність" використовуються як синоніми для позначення активності організму або речовини (такого як, наприклад, білок), яка може бути обмірювана по загибелі шкідника, по втраті ваги шкідника, по репелентній активності відносно шкідників і по інших поведінкових і фізичних змінах шкідника після його годівлі й через деякий проміжок часу. Таким чином, організм або речовина, що володіють пестицидною активністю, несприятливо впливають щонайменше на один вимірюваний параметр поведінки шкідника. Наприклад, "пестицидні білки" являють собою білки, які проявляють пестицидну активність самі по собі або в комбінації з іншими білками.

У контексті даного опису, термін "пестицидно ефективна кількість" відноситься до кількості речовини або організму, які мають пестицидну активність, у випадку їх присутності в середовищі проживання шкідника. Для такої речовини або організму, пестицидно ефективна кількість визначається емпірично для кожного шкідника в конкретному оточенні, на якого потрібно здійснити вплив. Аналогічно, "інсектицидно ефективна кількість" може використовуватися стосовно до "пестицидно ефективної кількості", коли шкідником є комаха-шкідник.

У контексті даного опису, термін "отриманий рекомбінантними методами" або "сконструйований" відноситься до використання методів рекомбінантних ДНК для введення (наприклад, для конструювання) зміни в структуру білка, заснованого на розумінні механізму дії білка, і з урахуванням амінокислот, що підлягають додаванню, делетуванню або заміщенню.

У контексті даного опису, термін "мутантна нуклеотидна послідовність" або "мутація" або "мутована нуклеотидна послідовність" відноситься до нуклеотидної послідовності, яка була мутована або змінена таким чином, що містить один або декілька нуклеотидних залишків (наприклад, пари основ), які не присутні у відповідній послідовності дикого типу. Такий мутагенез або така зміна складається з одного або декількох уведень, делецій або заміщень або замінів залишків нуклеїнової кислоти. У тому випадку, коли мутації вводять шляхом додавання, видалення або заміщення амінокислоти із протеолітичного сайту, таке додавання, видалення або заміщення може бути здійснене в межах мотиву протеолітичного сайту або поруч із ним, головне щоб була досягнута мета мутації (тобто щоб був змінений протеоліз у даному сайті).

Мутантна нуклеотидна послідовність може кодувати мутантний інсектицидний токсин, що володіє підвищеною або зниженою інсектицидною активністю, або амінокислотну послідовність, яка надає підвищену або знижену інсектицидну активність утримуючому її поліпептиду. У контексті даного опису, термін "мутант" або "мутація", стосовно до білка, поліпептиду або амінокислотної послідовності, відноситься до послідовності, яка була мутована або змінена таким чином, що містить один або кілька амінокислотних залишків, які не присутні у відповідній послідовності дикого типу. Такий мутагенез або така зміна складається з одного або декількох додавань, делецій або заміщень або замінів амінокислотних залишків. Мутантний поліпептид демонструє підвищену або знижену інсектицидну активність або являє собою амінокислотну послідовність, яка надає підвищену інсектицидну активність утримуючому її поліпептиду. Таким чином, термін "мутант" або "мутація" відноситься до мутантної нуклеотидної послідовності і/або до кодуванням амінокислотам. Мутанти можуть використовуватися самі по собі або в будь-якій сумісній комбінації з іншими мутантами за даним винаходом або з будь-якими іншими мутантами. "Мутантний поліпептид" може, навпаки, демонструвати зниження інсектицидної активності. Коли до конкретної нуклеїнової кислоти або до конкретного білка додають більш, ніж одну мутацію, зазначені мутації можуть вводитися в той самий час або послідовно і, якщо послідовно, то такі мутації можуть вводитися в будь-якому підходящому порядку.

У контексті даного опису, термін "підвищена інсектицидна активність" або "підвищена пестицидна активність" відноситься до інсектицидного поліпептиду, згідно з різними варіантами здійснення даного винаходу, який має підвищену інсектицидну активність, у порівнянні з відповідним білком дикого типу, і/або до інсектицидного поліпептиду, який ефективний проти більш широкого діапазону комах, і/або до інсектицидного поліпептиду, що володіє специфічністю для комах, яка не чутлива до токсичності білка дикого типу. Для підтвердження поліпшеної або підвищеної пестицидної активності потрібна демонстрація підвищення пестицидної активності щонайменше на 10 % проти цільової комах або підвищення щонайменше на 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 60 %, 70 %, 100 %, 150 %, 200 % або 300 % або більш пестицидної активності відносно пестицидної активності інсектицидного поліпептиду дикого типу, обумовленої стосовно до тої ж комах.

Наприклад, підвищена пестицидна або інсектицидна активність проявляється в тому випадку, коли йде вплив на більш широкий або звужений діапазон комах при використанні даного поліпептиду, у порівнянні з діапазоном комах, на яких справляє вплив Bt токсин дикого типу. Більш широкий діапазон впливу може бути бажаний у тому випадку, коли потрібна

універсальність впливу, тоді як більш вузький діапазон впливу може бути бажаний у тому випадку, коли, наприклад, впливу при наявності токсину можуть піддатися корисні комахи. Оскільки даний винахід у різних варіантах свого здійснення не пов'язаний з яким-небудь конкретним механізмом дії, підвищена пестицидна активність може бути також досягнута шляхом змін однієї або декількох характеристик поліпептиду; наприклад, стабільність або тривалість перебування поліпептиду в кишці комахи може бути підвищена щодо стабільності або тривалості перебування відповідного білка дикого типу.

Термін "токсин" у контексті даного опису відноситься до поліпептиду, що демонструє пестицидну активність або інсектицидну активність або поліпшену пестицидну активність або поліпшену інсектицидну активність. Токсин Bt або "*Bacillus thuringiensis*" у контексті даного опису включає розширений клас Cry токсинів, виявлених у різних штаммах Bt, який включає такі токсини як, наприклад, Cry1s, Cry2s або Cry3s.

Терміни "протеолітичний сайт" або "сайт розщеплення" відноситься до амінокислотної послідовності, яка надає чутливість до класу протеаз або до певної протеази, так що поліпептид, що містить дану (амінокислотну???) амінокислотну послідовність, розщеплюється протеазами даного класу або певною протеазою. Уважається, що протеолітичний сайт повинен бути "чутливим" до однієї або декількох протеазам, які розпізнають даний сайт. У даній галузі добре відомо, що ефективність розщеплення варіює й що зниження ефективності розщеплення може привести до підвищення стабільності або до тривалості перебування поліпептиду в кишці комахи. Таким чином, протеолітичний сайт може надавати чутливість більш, ніж до однієї протеази або класу протеаз, але ефективність розщеплення по цьому сайту різними протеазами може варіювати. Протеолітичні сайти включають, наприклад, сайти трипсину, сайти хімотрипсину й сайти еластази.

Проведені дослідження показали, що протеази в кишці лускокрилих комах включають трипсини, хімотрипсини й еластази. Див., наприклад, Lenz et al. (1991) Arch. Insect Biochem. Physiol. 16: 201-212; і Hedegus et al. (2003) Arch. Insect Biochem. Physiol. 53: 30-47. Наприклад, близько 18 різних трипсинів було виявлено в середній кишці личинки *Helicoverpa armigera* (див. Gatehouse et al. (1997) Insect Biochem. Mol. Biol. 27: 929-944). Були досліджені протеолітичні сайти кращих субстратів для цих протеаз. Див, наприклад, Peterson et al. (1995) Insect Biochem. Mol. Biol. 25: 765-774.

Уживали дослідження, спрямовані на поліпшення розуміння механізму дії Bt токсинів, і для конструювання токсинів з поліпшеними властивостями. Було показано, що протеази кишки комахи можуть виявляти ефект на Bt Cry білки комахи. Деякі протеази активують Cry білки шляхом процесингу їх від форми "протоксину" до токсичної форми, або "токсину". Див, Oppert (1999) Arch. Insect Biochem. Phys. 42:1-12; і Carroll et al. (1997) J. Invertebrate Pathology 70: 41-49. Зазначена активація токсину може включати видалення N- і C-кінцевих пептидів від білка й може також включати внутрішнє розщеплення білка. Інші протеази можуть розкладати Cry білки. Див. Oppert, *ibid*.

Порівняння амінокислотних послідовностей Cry токсинів з різною специфічністю виявило п'ять високо консервативних блоків послідовностей. Структурно, токсини включають три різні домени, які являють собою, від N- до C-кінця, кластер із семи альфа-спіралей, що брав участь в утворенні пор (позначені як "домен 1"), три антипаралельні складчасті бета-структури, що брали участь у зв'язуванні із клітиною (позначені як "домен 2") і бета-сендвіч (позначений як "домен 3"). Розташування й властивості цих доменів відомо фахівцям у даній галузі. Див, наприклад, Li et al. (1991) Nature, 305:815-821 і Morse et al. (2001) Structure, 9:409-417 Якщо робиться посилання на конкретний домен, такий як домен 1, слід розуміти, що точні кінці цього домену стосовно до конкретної послідовності не є вирішальним чинником, головне, щоб зазначена послідовність або її частина включала послідовність, яка забезпечує щонайменше деяку функцію, властиву конкретному домену. Так, наприклад, якщо йде посилання на домен 1, слід розуміти, що конкретна послідовність включає кластер із семи альфа-спіралей, але точні кінці послідовності, використовувані або зазначені стосовно до даного кластера, не є вирішальним чинником. Будь-який фахівець у даній галузі знає, як визначити такі кінцеві точки і як оцінити такі функції.

Для того щоб краще охарактеризувати й удосконалити Bt токсини, досліджували штамми бактерії Bt. Було виявлено, що кристалічні препарати, отримані з культур штамів Bt, мають пестицидну активність проти широкого спектра комах-шкідників, що включають метелика кукурудзяного, вогнівку кукурудзяну південно-західну, совку трав'яну, совку іпсилон і совку бавовняну (див., наприклад, експериментальний приклад 1).

Були початі спроби ідентифікувати нуклеотидні послідовності, що кодують кристалічні білки з обраних штамів, і нуклеїнові кислоти дикого типу (тоб- то, що існують у природі) були виділені

із цих бактеріальних штамів, клоновані у векторі експресії й трансформовані в *E. coli*. Було показано, що, залежно від характеристик даного препарату, для прояву пестицидної активності іноді потрібна попередня обробка трипсином для активації пестицидних білків. Із цього стало зрозуміло, що у випадку деяких пестицидних білків потрібно розщеплення протеазою (наприклад, трипсином, хімотрипсином і т.п.) для їхньої активації, тоді як інші білки біологічно активні (тобто, мають пестицидну активність) під час відсутності активації.

Такі молекули можуть бути змінені з використанням способів, описаних, наприклад, в заявках на патенти США No. 10/606 320, зареєстрованої 25 червня 2003 р., і No 10/746 914, зареєстрованої 24 грудня 2003 р. Крім того, послідовності нуклеїнової кислоти можуть бути сконструйовані таким чином, щоб вони кодували поліпептиди, що містять додаткові мутації, які надають підвищену або змінену пестицидну активність, у порівнянні з пестицидною активністю природного поліпептиду. Нуклеотидні послідовності таких сконструйованих нуклеїнових кислот включають мутації, не виявлені в послідовностях дикого типу.

Мутантні поліпептиди, згідно з різними варіантами здійснення даного винаходу, створювали по способу, який включає стадії одержання послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує сімейство *Cry* поліпептидів; аналізу структури поліпептиду з метою ідентифікації конкретних "цільових" сайтів для мутагенезу генної послідовності, з урахуванням передбачуваної функції цільового домену в механізмі дії токсину; вбудовування однієї або декількох мутацій у послідовність нуклеїнової кислоти для створення бажаної зміни одного або декількох амінокислотних залишків у кодовуваній поліпептидній послідовності й тестування отриманого поліпептиду на наявність пестицидної активності.

Багато інсектицидні *Bt* токсини характеризуються різним ступенем подібності по своїх амінокислотних послідовностях і третинній структурі, і добре відомі способи одержання кристалічних структур *Bt* токсинів. Репрезентативні приклади кристалічної структури високого дозволу поліпептидів *Cry3A* й *Cry3B* наведені в літературі. Виявлена структура *Cry3A* гена (Li et al. (1991) *Nature* 353:815-821) проливає світло на взаємозв'язок між структурою й функцією токсину. Об'єднаний розгляд даних структурного аналізу *Bt* токсинів і відомих функцій, асоційованих з конкретними структурами, мотивами й т.п., показує, що певні ділянки токсину корелюють із конкретними функціями й певними стадіями в механізмі дії білка. Наприклад, багато токсинів, виділені з *Bt*, в основному описані, що як включають три домену: семиспиральний пучок, який утягується в пороутворення, домен із трьох складчастих структур, який утягується у зв'язування з рецептором, і мотив типу бета-сендвіч (Li et al. (1991) *Nature* 305: 815-821).

Як вказувалося в патенті США No. 7105332 і в спільно розглянутій заявці на патент США No. 10/746914, зареєстрованої 24 грудня 2003 р., токсичність *Cry* білків може бути поліпшена при цільовому впливі на ділянку, розташований між альфа-спіралями 3 і 4 у домені 1 токсину. Ця посилка стала основою знань, що стосуються інсектицидних токсинів, які включають наступне: 1) той факт, що, згідно з наявними даними, альфа-спірали 4 і 5 у домені 1 *Cry3A* токсинів вбудовані в ліпідний бішар клітин, що вистилають середню кишку чутливих комах (Gazit et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 12289-12294); 2) знання заявників про розташування сайтів розщеплення трипсином і хімотрипсином в амінокислотній послідовності білка дикого типу; 3) той факт, що білок дикого типу був більш активним проти деяких комах після активації обробкою *in vitro* трипсином або хімотрипсином; і 4) дані про те, що розщеплення токсинів з 3'-кінця приводило до зниження токсичності для комах.

Може бути створена ціла серія мутацій і введена в різні фонові послідовності з метою одержання нових поліпептидів, що володіють підвищеною або зміненою пестицидною активністю. Див., наприклад, заявки на патенти США No. 10/606320, зареєстровану 25 червня 2003 р., у даний час скасовану, і No.10/746914, зареєстровану 24 грудня 2003 р. Зазначені мутації включають, без обмеження: додавання щонайменше ще одного чутливого до протеази сайту (наприклад, сайту розщеплення трипсином) у ділянку, розташований між спіралями 3 і 4 у домені 1; заміщення вихідного чутливого до протеази сайту в послідовності дикого типу іншим чутливим до протеази сайтом; додавання безлічі чутливих до протеаз сайтів у конкретних місцях; додавання амінокислотних залишків поблизу одного або декількох чутливих до протеаз сайтів для зміни складчастості поліпептиду й, відповідно, для посилення розщеплення поліпептиду в одному або декількох чутливих до протеаз сайтах; і додавання мутацій для захисту поліпептиду від розкладання шляхом розщеплення, яке знижує токсичність (наприклад, створення серії мутацій, у рамках яких амінокислота дикого типу заміщається валіном для захисту поліпептиду від розщеплення). Мутації можуть використовуватися окремо або в будь-якій комбінації для одержання поліпептидів за даним винаходом.

Згідно із вказаним способом, одержують послідовності за даним винаходом, що включають безліч мутацій, таких як, наприклад, мутація, яка включає додатковий або альтернативний чутливий до протеази сайт, розташований між альфа-спіралями 3 і 4 у домені 1 кодовуваного поліпептиду. Мутація, яка являє собою додатковий або альтернативний чутливий до протеази сайт, може бути чутлива до декількох класів протеаз, таких як серинові протеази, які включають трипсин і хімотрипсин або ферменти, такі як еластаза. Таким чином, може бути створена мутація, яка являє собою додатковий або альтернативний чутливий до протеази сайт, так що такий сайт буде легко розпізнаватися певною категорією протеаз, таких як протеаза ссавців або протеаза комах. Може бути також сконструйований чутливий до протеази сайт, який буде розщеплюватися деяким класом ферментів або конкретним ферментом, який, за відомими даними, продукується в організмі, таким як, наприклад, хімотрипсин, продукований совкою бавовняної *Heliothis zea* (Lenz et al.(1991) Arch. Insect Biochem. Physiol. 16: 201-212). Мутації можуть також віддавати стійкість до протеолітичного розщеплення, наприклад, до розщеплення хімотрипсином на С-кінці пептиду.

Присутність додаткового і/або альтернативного чутливого до протеази сайту в амінокислотній послідовності кодовуваного білка може поліпшувати пестицидну активність і/або специфічність поліпептиду, кодовуваного нуклеїновими кислотами, згідно з різними варіантами здійснення даного винаходу. Відповідно, нуклеотидні послідовності за даним винаходом можуть бути сконструйовані рекомбінантними методами або отримані в результаті генетичних маніпуляцій, спрямованих на створення поліпептидів, що володіють поліпшеною або зміненою інсектицидною активністю або специфічністю, у порівнянні з такими, властивими немодифікованому токсину дикого типу. Крім того, мутації за даним винаходом можуть бути введені і/або використані в комбінації з іншими нуклеотидними послідовностями для досягнення поліпшених властивостей. Наприклад, чутливий до протеази сайт, який легко розщеплюється хімотрипсином комах, наприклад, хімотрипсином, виявленим у совки латуквої або у совки бавовняної (Hegedus et al. (2003) Arch. Insect Biochem. Physiol. 53: 30-47; і Lenz et al. (1991) Arch. Insect Biochem. Physiol. 16: 201-212), може бути введений у фонову послідовність Cry для досягнення кращої токсичності цієї послідовності. У цьому зв'язку, різні варіанти здійснення даного винаходу забезпечують одержання токсичних поліпептидів з поліпшеними властивостями.

Наприклад, мутовання нуклеотидна послідовність Cry може включати додаткові мутанти, які містять додаткові кодони, які, у свою чергу, уводять другу чутливу до трипсину амінокислотну послідовність (на додаток до природного сайту трипсину) у кодовуваний поліпептид. Альтернативно, отриманий при додаванні мутант, згідно з різними варіантами здійснення даного винаходу, включає додаткові кодони, що дозволяють уводити щонайменше один інший додатковий сайт, чутливий до протеази, у поліпептид, наприклад, чутливий до хімотрипсину сайт, розташований відразу в 5' або 3' напрямку від природного сайту трипсину. Альтернативно, можуть бути отримані шляхом заміни мутанти, у яких щонайменше один кодон у нуклеїновій кислоті, який кодує природний чутливий до протеази сайт, зруйнований і в послідовність нуклеїнової кислоти введені альтернативні кодони для створення іншого (наприклад, що заміняє) чутливого до протеази сайту. Може бути також доданий до Cry послідовності, заміщаючий мутант у якому природний сайт розщеплення трипсином, наявний у кодовуваному поліпептиді, зруйнований і на його місце введений сайт розщеплення хімотрипсином або еластазою.

Відомо, що може використовуватися будь-яка нуклеотидна послідовність, що кодує амінокислотні послідовності, які являють собою протеолітичні сайти або можливі протеолітичні сайти (наприклад, послідовності, такі як NGSР, RR або LKM), і що точна ідентичність кодонів, використовуваних для введення кожного із зазначених сайтів розщеплення у варіантний поліпептид може варіювати, залежно від використання, тобто експресії в конкретному виді рослини. Відомо також, що кожна з розглянутих мутацій може бути введена в будь-яку полінуклеотидну послідовність, згідно з різними варіантами здійснення даного винаходу, яка включає кодони для амінокислотних залишків, що забезпечують нативний сайт розщеплення трипсином, який є мішенню для модифікації. Відповідно, варіанти або повнорозмірних токсинів, або їх фрагментів можуть бути модифіковані, так щоб вони містили додаткові або альтернативні сайти розщеплення, і ці варіанти охоплюються галуззю даного винаходу.

Для фахівців у даній галузі відомо, що будь-яка корисна мутація може бути додана до послідовностей за даним винаходом, головне, щоб кодовувані поліпептиди зберігали пестицидну активність. Відповідно, послідовності можуть бути також мутовані таким чином, щоб кодовувані поліпептиди стали стійкими до протеолітичного розщеплення хімотрипсином. Може бути доданий більш ніж один сайт розпізнавання в конкретному положенні, у будь-якій

комбінації, а також множинні сайти розпізнавання можуть бути додані до токсину або вилучені з нього. Таким чином, додаткові мутації можуть включати три, чотири або більш сайтів розпізнавання. Відомо, що можуть бути введені множинні мутації в підходящу полінуклеотидну послідовність і, відповідно, або повнорозмірні послідовності, або їх фрагменти можуть бути

модифіковані, для того щоб вони містили додаткові або альтернативні сайти розщеплення, а також, щоб вони стали стійкими до протеолітичного розщеплення. Таким чином, різні варіанти здійснення даного винаходу дозволяють одержувати Cru токсини, що містять мутації, які поліпшують пестицидну активність, а також одержувати поліпшені композиції й надають удосконалені способи впливу на шкідників з використанням інших Bt токсинів.

Мутації можуть захищати поліпептид від розкладання протеазою, наприклад, за рахунок видалення можливих протеолітичних сайтів, таких як можливі сайти серинової протеази й сайти розпізнавання еластази з інших областей. Деякі або всі з таких можливих сайтів можуть бути вилучені або змінені, так що протеоліз у положенні вихідного сайту знижується. Зміна в протеолізі можна оцінити при порівнянні мутантного поліпептиду з токсинами дикого типу або при порівнянні мутантних токсинів, які відрізняються по своїй амінокислотній послідовності. Можливі протеолітичні й протеолітичні сайти включають, без обмеження наступні послідовності: RR, сайт розщеплення трипсином; LKM, сайт хімотрипсину; і NGSR, сайт трипсину. Зазначені сайти можуть бути змінені шляхом додавання або делеції будь-якого числа й виду амінокислотних залишків, головне, щоб підвищувалася пестицидна активність поліпептиду.

Таким чином, поліпептиди, кодовувані нуклеотидними послідовностями, що включають мутації, будуть включати щонайменше одну зміну або додавання амінокислоти, відносно нативної або фонові послідовності, або зміни або додавання 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 35, 38, 40, 45, 47, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, або 280 або більш амінокислот. Пестицидна активність поліпептиду може бути також поліпшена шляхом усікання нативної або повнорозмірної послідовності, як це відомо в даній галузі.

Композиції, згідно з різними варіантами здійснення даного винаходу, включають нуклеїнові кислоти і їх фрагменти й варіанти, які кодують пестицидні поліпептиди, зокрема, даний винахід відноситься до виділених молекул нуклеїнової кислоти, що включають нуклеотидні послідовності, що кодують амінокислотну послідовність, представлену у вигляді SEQ ID NO: 2 і 4, або нуклеотидні послідовності, що кодують зазначену амінокислотну послідовність, наприклад, до нуклеотидної послідовності, показаної у вигляді SEQ ID NO: 1 і 3, і її фрагментам і варіантам.

Представляють також інтерес оптимізовані нуклеотидні послідовності, що кодують пестицидні білки, згідно з різними варіантами здійснення даного винаходу. У контексті даного опису, фраза "оптимізовані нуклеотидні послідовності" відноситься до нуклеїнових кислот, які оптимізовані для експресії в конкретному організмі, наприклад, у рослині. Оптимізовані нуклеотидні послідовності можуть бути створені для будь-якого організму, що представляє інтерес, з використанням відомих методів. Див., наприклад, заявки на патент США No 10/606320, зареєстровану 25 червня 2003 р., у даний час скасовану, і No. 10/746914, зареєстровану 24 грудня 2003 р., які описують оптимізовану нуклеотидну послідовність, що кодує розглянутий пестицидний білок. У цьому прикладі, нуклеотидна послідовність була отримана шляхом зворотної трансляції амінокислотної послідовності білка й зміни нуклеотидної послідовності, так щоб вона включала кращі для кукурудзи кодони, усе ще кодуючи ту ж амінокислотну послідовність. Ця процедура описана докладно в роботі Murray et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17:477-498. Оптимізовані нуклеотидні послідовності знаходять застосування для цілей підвищення експресії пестицидного білка в рослині, наприклад, в однодольних рослинах сімейства Gramineae (Poaceae), таких як, наприклад, у рослині кукурудзи або маїсу.

Варіанти здійснення даного винаходу також відносяться до виділених пестицидних (наприклад, до інсектицидних) поліпептидам, кодовуваним або природною, або модифікованою нуклеїновою кислотою за даним винаходом. Більш докладно, ці варіанти здійснення даного винаходу відносяться до поліпептидів, що включають амінокислотну послідовність, представлену у вигляді SEQ ID NO: 2 і 4, і до поліпептидів, кодовуваних нуклеїновими кислотами за даним винаходом, наприклад, представленими у вигляді SEQ ID NO: 1 і 3, і їх фрагментами й варіантами.

У конкретних варіантах здійснення даного винаходу, пестицидні білки за даним винаходом включають повнорозмірні інсектицидні поліпептиди, фрагменти повнорозмірних інсектицидних поліпептидів і варіантні поліпептиди, які одержують із мutowаних нуклеїнових кислот, сконструйованих таким чином, щоб уводити конкретні амінокислотні послідовності в поліпептиди за даним винаходом. У певних варіантах здійснення даного винаходу,

амінокислотні послідовності, які вводяться в поліпептиди, включають послідовність, яка забезпечує сайт розщеплення для ферменту, такого як протеаза.

У даній галузі відомо, що пестицидна активність Bt токсинів у типовому випадку активується при розщепленні пептиду в кишці комахи різними протеазами. Оскільки пептиди не завжди можуть розщеплюватися з достатньою ефективністю в кишці комахи, фрагменти повнорозмірного токсину можуть мати підвищену пестицидну активність, у порівнянні із самим повнорозмірним токсином. Таким чином, деякі поліпептиди, згідно з різними варіантами здійснення даного винаходу, включають фрагменти повнорозмірного інсектицидного поліпептиду, і деякі поліпептидні фрагменти, варіанти й мутації будуть мати підвищену пестицидну активність, у порівнянні з активністю природного поліпептиду, з якого вони були отримані, особливо, якщо природний інсектицидний поліпептид не активувався *in vitro* протеазою до скринінгу активності. Таким чином, дана заявка включає усічені версії або фрагменти послідовностей.

Мутації можуть бути введені в будь-яку фонову послідовність, що включає такі усічені поліпептиди, головне, щоб зазначений поліпептид зберігав пестицидну активність. Будь-який фахівець у даній галузі може легко порівняти два або більш білків за їх пестицидною активністю з використанням відомих і широко описаних тестів. Слід розуміти, що поліпептиди за даним винаходом можуть бути отримані або при експресії розглянутої нуклеїнової кислоти, або при використанні стандартних процедур молекулярної біології.

Відомо, що пестицидні білки можуть бути представлені в олігомерній формі й можуть варіювати по молекулярній масі, кількості залишків, складеним пептидам, активності проти конкретних шкідників і за іншими показниками. Однак, з використанням способів, наведених у даному описі, білки, активні проти безлічі шкідників, можуть бути виділені й охарактеризовані. Пестицидні білки, згідно з різними варіантами здійснення даного винаходу, можуть використовуватися в комбінації з іншими Bt токсинами або іншими інсектицидними білками для розширення діапазону комах, що є мішенню для впливу. Крім того, використання пестицидних білків за даним винаходом в комбінації з іншими Bt токсинами або іншими інсектицидними агентами іншої природи знайшло особливе застосування для попередження і/або ведення явища стійкості комах. Інші інсектицидні агенти включають інгібітори протеази (як серинового, так і цистеїнового типів), α -амілазу й пероксидазу.

Фрагменти й варіанти нуклеотидних і амінокислотних послідовностей і кодовувані поліпептиди також охоплюються галуззю даного винаходу. У контексті даного опису, термін "фрагмент" відноситься до частини нуклеотидної послідовності полінуклеотиду або до частини амінокислотної послідовності поліпептиду за даним винаходом. Фрагменти нуклеотидної послідовності можуть кодувати білкові фрагменти, які зберігають біологічну активність нативного або відповідного повнорозмірного білка й, у цьому зв'язку, мають пестицидну активність. Таким чином, слід мати на увазі, що деякі з полінуклеотидних і амінокислотних послідовностей, згідно з різними варіантами здійснення даного винаходу, можуть бути коректно позначені як фрагменти й мутанти.

Слід розуміти, що термін "фрагмент", використовуваний стосовно до послідовностей нуклеїнової кислоти за даним винаходом, також означає послідовності, які використовуються в якості зондів для гібридизації. Даний клас нуклеотидних послідовностей в основному не кодує фрагментні білки, що зберігають біологічну активність. Таким чином, фрагменти нуклеотидної послідовності можуть варіювати в діапазоні від щонайменше приблизно 20 нуклеотидів, приблизно 50 нуклеотидів, приблизно 100 нуклеотидів і до повнорозмірної нуклеотидної кодуючої послідовності білки, згідно з різними варіантами здійснення даного винаходу.

Фрагмент нуклеотидної послідовності за даним винаходом, який кодує біологічно активну частину пестицидного білка за даним винаходом, буде кодувати щонайменше 15, 25, 30, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 або 1100 безперервних амінокислот або аж до повного числа амінокислот, що присутні у пестицидному поліпептиді за даним винаходом (наприклад, 1231 амінокислота в SEQ ID NO: 2). Таким чином, слід розуміти, що різні варіанти здійснення даного винаходу також включають поліпептиди, які є фрагментами репрезентативних пестицидних білків за даним винаходом і які мають довжину, що включає щонайменше 15, 25, 30, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 або 1100 безперервних амінокислот або аж до повного числа амінокислот, що присутні у пестицидному поліпептиді за даним винаходом (наприклад, 1231 амінокислота в SEQ ID NO: 2). Фрагменти нуклеотидної послідовності за даним винаходом, які використовуються в якості зондів для гібридизації або ПЦР праймерів, звичайно не кодують біологічно активну частину пестицидного білка. Таким чином, фрагмент нуклеїнової кислоти за даним винаходом може кодувати біологічно активну частину пестицидного білка або він може бути фрагментом, який може

використовуватися в якості зонда для гібридизації або ПЦР праймеру, згідно наведеним у даному описі процедурам. Біологічно активна частина пестицидного білка може бути отримана при виділенні частини однієї з нуклеотидних послідовностей за даним винаходом, експресуючої кодуєму частину пестицидного білка (наприклад, шляхом рекомбінантної експресії *in vitro*), з наступною оцінкою активності кодовуваної частини пестицидного білка.

Нуклеїнові кислоти, які є фрагментами нуклеотидної послідовності за даним винаходом, включають щонайменше 16, 20, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800 або 2000 нуклеотидів або аж до кількості нуклеотидів, присутніх у нуклеотидній послідовності, наведеної в даному описі (наприклад, 7392 нуклеотиду SEQ ID NO: 1). У конкретних варіантах здійснення даного винаходу розглядаються фрагменти, отримані з (наприклад, створені на основі) першої нуклеїнової кислоти за даним винаходом, де такий фрагмент кодує усічений токсин, що володіє пестицидною активністю. Усічені поліпептиди, кодовувані полінуклеотидними фрагментами за даним винаходом, характеризуються пестицидною активністю, яка або еквівалентна, або поліпшена, щодо активності відповідного повнорозмірного поліпептиду, кодовуваного першою нуклеїновою кислотою, з якої був отриманий даний фрагмент. Уважається, що такі фрагменти нуклеїнової кислоти за даним винаходом можуть бути усічені на 3'-кінці нативної або відповідної повнорозмірної кодуєчої послідовності. Фрагменти нуклеїнової кислоти можуть бути також усічені й по 5'-, і по 3'-кінцю нативної або відповідної повнорозмірної кодуєчої послідовності.

Термін "варіанти" використовується відповідно до по суті подібним послідовностям. У випадку нуклеотидних послідовностей, консервативні варіанти включають такі послідовності, які, у зв'язку виродженістю генетичного коду, кодують амінокислотну послідовність одного з пестицидних поліпептидів за даним винаходом. Природні алельні варіанти, такі як були зазначені, можуть бути ідентифіковані в рамках добре відомих процедур молекулярної біології, таких як, наприклад, полімеразно-ланцюгова реакція (ПЦР) і методи гібридизації, наведені в даному описі.

Варіантні нуклеотидні послідовності також включають синтетично створені нуклеотидні послідовності, такі як нуклеотидні послідовності, отримані, наприклад, шляхом сайт-спрямованого мутагенезу, але які усе ще кодують пестицидний білок за даним винаходом, такий як мутантний токсин. В основному, варіанти конкретної нуклеотидної послідовності за даним винаходом характеризуються ідентичністю по послідовності на рівні щонайменше приблизно 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або більш, з іншою певною нуклеотидною послідовністю, при оцінці з використанням програм зіставлення послідовностей добре відомих і описаних, з використанням заданих параметрів. Варіант нуклеотидної послідовності за даним винаходом може відрізнятися від іншої послідовності всього на 1-15 нуклеотидів, усього на 1-10, зокрема, на 6-10, усього на 5, а також усього на 4, 3, 2 або навіть один нуклеотид.

Варіанти конкретної нуклеотидної послідовності за даним винаходом, наприклад, репрезентативна нуклеотидна послідовність, можуть бути також оцінені при порівнянні відсотка ідентичності по послідовності для поліпептиду, кодовуваного варіантною нуклеотидною послідовністю, і поліпептиду, кодовуваного стандартною нуклеотидною послідовністю. Так, наприклад, тут описуються виділені нуклеїнові кислоти, які кодують поліпептид із заданим відсотком ідентичності по послідовності з поліпептидом SEQ ID NO: 2 і 4. Відсоток ідентичності по послідовності між двома поліпептидами може бути розрахований з використанням відомих і описаних програм зіставлення послідовностей, з використанням заданих параметрів. Коли будь-яка дана пара полінуклеотидів за даним винаходом оцінюється при порівнянні відсотка ідентичності по послідовності, загальної для двох поліпептидів, які вони кодують, відсоток ідентичності по послідовності між двома кодовуваними поліпептидами становить щонайменше приблизно 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, в основному щонайменше приблизно 75 %, 80 %, 85 %, щонайменше приблизно 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 % або щонайменше приблизно 98 %, 99 % або більш відсотків ідентичності по послідовності.

У контексті даного опису, термін "варіантний білок" означає поліпептиди, які були отримані з нативного білка шляхом: делеції (так званого усікання) або додавання однієї або декількох амінокислот до N-кінцевій і/або C-кінцевій частині нативного білка; делеції або додавання однієї або декількох амінокислот в одному або декількох сайтах нативного білка; або заміни однієї або декількох амінокислот в одному або декількох сайтах нативного білка. Відповідно, термін "варіантний білок" означає біологічно активні фрагменти нативного білка, які включають достатнє число безперервних амінокислотних залишків для збереження біологічної активності нативного білка, тобто для прояву пестицидної активності. Така пестицидна активність може

бути іншою або поліпшеною, відносного нативного білка, або вона може не мінятися, головне, щоб зберігалася пестицидна активність.

Варіантні білки, охоплювані різними варіантами здійснення даного винаходу, є біологічно активними, і це значить, що вони продовжують демонструвати бажану біологічну активність нативного білка, або пестицидну активність по даному опису. Такі варіанти можуть бути результатом, наприклад, генетичного поліморфізму або проведених людиною процедур маніпуляції. Біологічно активні варіанти нативного пестицидного білка за даним винаходом будуть характеризуватися ідентичністю по послідовності на рівні щонайменше приблизно 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або більш, з амінокислотою послідовністю нативного білка, при визначенні з використанням відомих і описаних програм зіставлення послідовностей з використанням заданих параметрів. Біологічно активний варіант білка за даним винаходом може відрізнятися від іншого білка всього на 1-15 кислотних залишків, усього на 1-10, наприклад, на 6-10, усього на 5, усього на 4, 3, 2 або навіть 1 амінокислотний залишок.

Даний винахід, у різних варіантах свого здійснення, відноситься також до мікроорганізму, який був трансформований щонайменше однією нуклеїновою кислотою за даним винаходом, касетою експресії, що включає зазначену нуклеїнову кислоту, або вектором, що включає касету експресії. У деяких варіантах здійснення даного винаходу, зазначений мікроорганізм являє собою такий організм, який розмножується на рослинах. Один варіант здійснення даного винаходу відноситься до інкапсульованого пестицидного білку, який включає трансформований мікроорганізм, здатний до експресії щонайменше одного пестицидного білка за даним винаходом.

Різні варіанти здійснення даного винаходу відносяться до пестицидних композицій, що включають трансформований мікроорганізм за даним винаходом. У таких варіантах, трансформований мікроорганізм в основному є присутнім у пестицидній композиції в пестицидно ефективній кількості, разом з підходящим носієм. Різні варіанти здійснення даного винаходу також відносяться до пестицидних композицій, що включають виділений білок за даним винаходом, один або в комбінації із трансформованим організмом за даним винаходом і/або з інкапсульованим пестицидним білком за даним винаходом, в інсектицидно ефективній кількості, разом з підходящим носієм.

Різні варіанти здійснення даного винаходу також відносяться до способу розширення діапазону для цільового впливу на комах шляхом використання пестицидного білка за даним винаходом в комбінації щонайменше з одним іншим або "другим" пестицидним білком. Будь-який відомий у даній галузі пестицидний білок може використовуватися в способах даного винаходу. Такі пестицидні білки включають, без обмеження, Bt токсини, інгібітори протеази, α -амілази й пероксидази.

Різні варіанти здійснення даного винаходу також відносяться до трансформованих або до трансгенних рослин, що включають щонайменше одну нуклеотидну послідовність за даним винаходом. У деяких варіантах, така рослина була стабільно трансформована нуклеотидною конструкцією, що включає щонайменше одну нуклеотидну послідовність за даним винаходом, оперативно пов'язану із промотором, який направляє експресію в рослинній клітині. У контексті даного опису, терміни "трансформована рослина" і "трансгенна рослина" відносяться до рослини, яка містить у своєму геномі гетерологічний полінуклеотид. В основному, зазначений гетерологічний полінуклеотид стабільно інтегрований у геном трансгенної або трансформованої рослини, так що зазначений полінуклеотид проходить у наступні генерації. Гетерологічний полінуклеотид може бути інтегрований в геном один або у вигляді частини рекомбінантної касети експресії.

Слід розуміти, що використовуваний у даному описі термін "трансгенний" означає будь-яку клітину, клітинну лінію, каллус, тканину, частину рослини або рослину, генотип якого був змінений присутністю гетерологічної нуклеїнової кислоти, що включає початково змінені трансгенні частини, а також трансгенні елементи, утворені при половому схрещуванні або при нестатевому розмноженні вихідного трансгенного елемента. Термін "трансгенний" у контексті даного опису не відноситься до зміни генома (хромосомного або нехромосомного) традиційними способами вирощування рослин, або природними явищами, такими як випадкове перехресне запилення, нерекомбінантна вірусна інфекція, бактеріальна трансформація, нерекомбінантна транспозиція або спонтанна мутація.

У контексті даного опису термін "рослина" включає цілу рослину, органи рослини (наприклад, листя, стебла, коріння й т.п.), насіння, клітини рослин і їх потомство. Частини трансгенних рослин входять в галузь даного винаходу й включають, наприклад, рослинні клітини, протопласти, тканини, калус, ембріони й квіти, стебла, плоди, листя й коріння, що

вироблялося із трансгенних рослин або їх потомства, раніше трансформованих молекулою ДНК за даним винаходом й, у цьому зв'язку, складаються, щонайменше частково, із трансгенних клітин.

У контексті даного опису, термін рослина включає клітини рослин, протопласти рослин, культури тканин рослин, на основі яких рослини можуть бути регенеровані, калюси рослин, групи рослин і рослинні клітини, які є інтактними в рослинах або частинах рослин, таких як ембріони, пилки, сем'ябруньки, насіння, листя, квіти, гілки, плоди, зерна, колосся, качани, лушпайка, стебла, коріння, кінчики корінь, пильовики й т.п. Клас рослин, який може використовуватися, в основному так само широкий, як і клас вищих рослин, що підходить для здійснення на них методів трансформації, що включають і однодольні, і дводольні рослини. Такі рослини включають, наприклад, *Solanum tuberosum* і *Zea mays*.

Оскільки даний винахід у різних варіантах свого здійснення не залежить від конкретного біологічного механізму підвищення стійкості рослини до шкідника рослини, експресія нуклеотидних послідовностей за даним винаходом в рослині може приводити до продукції пестицидних білків за даним винаходом й до підвищення стійкості рослини до шкідника рослини. Рослина за даним винаходом знаходить застосування в сільському господарстві в рамках способів впливу на комах-шкідників. Деякі варіанти відносяться до трансформованих культурних рослин, таким як, наприклад, рослина кукурудзи, яка знаходить застосування в способах впливу на комах-шкідників рослини, таких як, наприклад, метелик кукурудзяний.

20 "Розглянута рослина або рослинна клітина" являє собою таку рослину або таку рослинну
клітину, де генетична зміна стосувалася гена, що представляє інтерес, або рослину або
рослинну клітину, яка є потомством зміненої рослини або зміненої рослинної клітини і яка
включає зазначені зміни. "Контроль" або "контрольна рослина" або "контрольна рослинна
клітина" забезпечують еталонний варіант для оцінки змін у фенотипі розглянутої рослини або
25 рослинної клітини.

Контрольна рослина або контрольна рослинна клітина може включати, наприклад: а) рослину або клітину дикого типу, тобто того ж генотипу, що й вихідний матеріал, узятий для генетичної зміни, яка привела до розглянутої рослини або клітини; б) рослину або рослинну клітину того ж генотипу, що й вихідний матеріал, але який був трансформований нульовою конструкцією (тобто конструкцією, яка не виявляє відомий ефект на розглянуту ознаку, таку як конструкція, що включає маркерний ген); с) рослину або рослинну клітину, яка являє собою нетрансформований сегрегант у потомстві розглянутої рослини або розглянутої рослинної клітини; d) рослину або рослинну клітину, генетично ідентичні розглянутій рослині або рослинній клітині, але яка не зазнала впливу умов або стимулів, здатних індукувати експресію гена, що представляє інтерес; або е) розглянуту рослину або рослинна клітина, в умовах при яких ген, що представляє інтерес, не експресується.

Для будь-якого фахівця в даній галузі очевидно, що досягнення в молекулярній біології, такі як сайт-специфічний і випадковий мутагенез, методи полімеразно-ланцюгової реакції, а також методи білкового конструювання дають більшу сукупність інструментів і процедур, прийнятних для використання з метою зміни або конструювання амінокислотних послідовностей і відповідних генетичних послідовностей для агрономічно значимих білків.

Таким чином, білки за даним винаходом можуть бути змінені різними способами, що включають заміщення, делеції, усікання й вставки амінокислот. Способи здійснення таких маніпуляцій в основному відомі в даній галузі. Наприклад, варіанти амінокислотних послідовностей пестицидних білків можуть бути отримані при введенні мутацій у синтетичну нуклеїнову кислоту (наприклад, у молекулу ДНК). Методи мутагенезу й змін нуклеїнових кислот добре відомі в даній галузі. Наприклад, потрібні зміни можуть бути введені по процедурі сайт-спрямованого мутагенезу з використанням олігонуклеотиду. Див., наприклад, Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492; Kunkel et al. (1987) Methods in Enzymol. 154:367-382; U.S. Patent No. 4,873,192; Walker and Gaastra, eds. (1983) Techniques in Molecular Biology (Macmillan Publishing COmpAny, New York), з наведеними в цих роботах посиланнями.

Мутовані нуклеотидні нуклеотидні послідовності за даним винаходом можуть бути модифіковані, так щоб змінилися приблизно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12 або більш амінокислот, що присутні у первинній послідовності кодуваного поліпептиду. Альтернативно, може бути введена навіть більша кількість змін, так що кодуєий білок може містити щонайменше 55 приблизно 1 % або 2 % або приблизно 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 % або навіть приблизно 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 % або 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 % або 25 %, 30 %, 35 % або 40 % або більш кодонів, змінених або іншим способом модифікованих, у порівнянні з відповідним білком диного типу. Аналогічно, кодований білок 60 може містити щонайменше приблизно 1 % або 2 % або приблизно 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %,

9 %, 10 %, 11 %, 12 % або навіть приблизно 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 % або 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 % або 25 %, 30 %, 35 % або 40 % або більш кодонів, змінених або іншим способом модифікованих, у порівнянні з відповідним білком дикого типу. Слід розуміти, що мутовані нуклеотидні послідовності за даним винаходом охоплюють біологічно функціональні, еквівалентні пептиди, які мають пестицидну активність, так що досягається підвищена пестицидна активність, обумовлена по антифідинговим властивостям проти личинок метелика кукурудзяного. Такі послідовності можуть з'являтися як наслідок надмірності кодонів і функціональної еквівалентності, яка, як відомо, зустрічається в природньому стані в послідовностях нуклеїнових кислот і в кодованих ними білках.

Для будь-якого фахівця в даній галузі очевидно, що додавання і/або заміщення амінокислот у цілому засноване на відносній подібності заступників у бічних ланцюгах амінокислот, наприклад, на їх гідрофобності, заряді, розмірі й т.п. Репрезентативні групи замісних амінокислот, у виборі яких ураховуються різні наведені далі характеристики, відомі фахівцям у даній галузі й включають: аргінін і лізин; глютамат і аспартат; серин і треонін; глютамін і аспарагін; а також валін, лейцин і ізолейцин.

Посібник із проведення відповідних амінокислот замінів, які не будуть впливати на біологічну активність білка, що представляє інтерес, дано в моделі, описаної в роботі Dayhoff et al. (1978) *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.), включеної в даний опис як посилання. Так, можуть бути виконані консервативні заміщення, такі як заміна однієї амінокислоти іншою з подібними властивостями.

Таким чином, гени й нуклеотидні послідовності за даним винаходом включають як природні послідовності, так і мутантні форми. Аналогічно, білки за даним винаходом включають як природні білки, так і їх варіації (наприклад, усічені поліпептиди) і їх модифіковані форми (наприклад, мутанти). Такі варіанти будуть продовжувати демонструвати бажану пестицидну активність. Очевидно, що мутації, які будуть введені в нуклеотидну послідовність, кодуючий варіант, не повинні перебувати в цій послідовності за межами рамки зчитування, і в основному вони не будуть створювати комплементарні ділянки, які могли б приводити до утворення вторинної структури мРНК. Див. публікацію за заявкою на ЕР патент No. 75444.

Не очікується, що делеції, вставки й заміщення білкових послідовностей, наведених у даному описі, будуть приводити до радикальних змін у характеристиках білка. Однак, коли заздалегідь важко передбачити точний ефект заміщення, делеції або вставки, будь-який фахівець у даній галузі розуміє, що в цілому даний ефект може бути оцінений за допомогою стандартних процедур скринінгу, таких як тести по поїданню комахами. Див., наприклад, роботи Marrone et al. (1985) *J. Econ. Entomol.* 78: 290-293 and Czaplá and Lang (1990) *J. Econ. Entomol.* 83: 2480-2485, включені в даний опис як посилання.

Варіантні нуклеотидні послідовності й білки також включають послідовності й білки, отримані в результаті мутагенної й рекомбіногенної процедури, такої як перестановка в ДНК. У рамках такої процедури, одна або кілька різних кодуючих послідовностей можуть зазнати генетичних маніпуляцій для створення нового пестицидного білка, що володіє бажаними властивостями. Аналогічним чином одержують бібліотеки рекомбінантних полінуклеотидів з популяції близьких по послідовності полінуклеотидів, що включають ділянки послідовності, які мають значну ідентичність по послідовності й можуть зазнати гомологічної рекомбінації *in vitro* або *in vivo*. Наприклад, у рамках даного підходу, повнорозмірні кодуючі послідовності, мотиви послідовності, кодуючі домен, що представляє, інтерес або будь-який фрагмент нуклеотидної послідовності за даним винаходом може бути переміщений між нуклеотидними послідовностями за даним винаходом й відповідними частинами інших відомих нуклеотидних послідовностей Сгу з метою одержання нового гена, що кодує білок з поліпшеною властивістю, яка становить інтерес.

Властивості, що представляють інтерес включають, без обмеження, пестицидну активність на одиницю пестицидного білка, стабільність білка й токсичність відносно нецільових видів, особливо, людей, домашньої худоби, рослин і мікробів, які експресують пестицидні поліпептиди згідно з різними варіантами здійснення даного винаходу. Різні варіанти здійснення даного винаходу не пов'язані з певною стратегією перестановки, важливо, щоб щонайменше одна нуклеотидна послідовність за даним винаходом або її частина утягувалася в таку стратегію перестановки. Перестановка може утягувати тільки нуклеотидні послідовності, наведені в даному описі, або може додатково утягувати перестановку інших нуклеотидних послідовностей, відомих у даній галузі. Стратегії перестановки в ДНК добре відомі й описані. Див, наприклад, Stemmer (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-10751; Stemmer (1994) *Nature* 370:389-391; Cramer et al. (1997) *Nature Biotech.* 15:436-438; Moore et al. (1997) *J. Mol. Biol.* 272:336-347; Zhang

etal. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4504-4509; Cramer et al. (1998) Nature 391:288-291; і патент США No. 5605793 і 5837458.

Нуклеотидні послідовності за даним винаходом можуть також використовуватися для виділення відповідних послідовностей з інших організмів, зокрема, з інших бактерій, і більш конкретно, з інших штамів *Bacillus*. Аналогічним чином, методи, такі як ПЦР, гібридизація й т.п., можуть використовуватися для ідентифікації таких послідовностей, на основі їх гомології по послідовності з послідовностями, наведеними в даному описі. Різні варіанти здійснення даного винаходу включають послідовності, які були обрані на основі їх ідентичності по послідовності з повними послідовностями, наведеними в даному описі, або з їхніми фрагментами. Такі послідовності включають ті послідовності, які є ортологами описуваних послідовностей. Термін "ортологи" відноситься до генів, які отримані із загального гена-попередника і які знайдені в різних видах у результаті видоутворення. Гени, знайдені в різних видах, розглядаються як ортологи, коли їх нуклеотидні послідовності й/їх кодовувані білкові послідовності мають значну ідентичність, обумовлену згідно з наведеним описом. Функції ортологів найчастіше характеризуються високою консервативністю серед різних видів.

У рамках ПЦР стратегії, можуть бути сконструйовані олігонуклеотидні праймери для використання в реакціях ПЦР із метою ампліфікації відповідних послідовностей ДНК із кДНК або геномної ДНК, екстрагованої з будь-якого організму, що представляє інтерес. Методи розробки праймерів для ПЦР і ПЦР-клонування відомі в даній галузі й описані в роботі: Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York), далі називаної "Sambrook". Див. також Innis et al., eds. (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, New York); Innis and Gelfand, eds. (1995) *PCR Strategies* (Academic Press, New York); і Innis and Gelfand, eds. (1999) *PCR Methods Manual* (Academic Press, New York). Відомі методи ПЦР включають без обмеження, методи з використанням парних праймерів, зчеплених праймерів, праймерів з одною специфічністю, вироджених праймерів, ген-специфічних праймерів, вектор-специфічних праймерів, частково-неспарованих праймерів

У методі гібридизації, повна або частина відомої нуклеотидної послідовності використовується як зонд, який селективно гібридується з іншими відповідними нуклеотидними послідовностями, що присутні в популяції клонованих фрагментів геномної ДНК або фрагментів кДНК (тобто в бібліотеках геномних ДНК або кДНК) з обраного організму. Зонди для гібридизації можуть являти собою фрагменти геномної ДНК, фрагменти кДНК, фрагменти РНК або інші олігонуклеотиди й можуть бути мічені детектуємою групою, такою як ^{32}P , або будь-якою іншим детектуємим маркером. Так, наприклад, зонди для гібридизації можуть бути створені шляхом мічення синтетичних олігонуклеотидів, заснованих на послідовностях за даним винаходом. Методи одержання зондів для гібридизації й конструювання бібліотек кДНК і геномних бібліотек в основному відомі в даній галузі й описані в керівництві Sambrook.

Наприклад, повнорозмірна послідовність за даним винаходом або одна або декілька її частин може використовуватися в якості зонда, здатного специфічно гібридуватися з відповідними послідовностями й матричними РНК. Для проведення специфічної гібридизації в самих різних умовах, використовувані зонди включають послідовності, які є унікальними для послідовності за даним винаходом й в основному включають щонайменше приблизно 10 або 20 нуклеотидів у довжину. Такі зонди можуть використовуватися для ампліфікації відповідних *Сгу* послідовностей з обраного організму в рамках ПЦР. Даний метод може використовуватися для виділення додаткових кодуючих послідовностей з бажаного організму або в якості діагностичного тесту для визначення присутності кодуючих послідовностей в організмі. Методи гібридизації включають гібридизаційний скринінг на планшетах бібліотек ДНК (у вигляді бляшок або колоній, див., наприклад, Sambrook).

Гібридизація таких послідовностей може проводитися в жорстких умовах. Термін « жорсткі умови » або « жорсткі умови гібридизації » у контексті даного опису відноситься до умов, при яких зонд буде гібридуватися зі своєю цільовою послідовністю на помітно більш високому рівні, ніж з іншими послідовностями (наприклад, перевищувати фон щонайменше в 2 рази, 5 раз або 10 раз). Жорсткість умов залежить від послідовності й буде мінятися в різних ситуаціях. Шляхом контролю жорсткості умов гібридизації й/або промивання, можуть бути ідентифіковані цільові послідовності, які на 100 % комплементарні даному зонду (гомологічне зондування). Альтернативно, жорсткість умов може бути відкорегована, для того щоб допустити деяку некоректність спарювання в послідовностях, так що в цьому випадку буде виявлятися менший рівень подібності (гетерологічне зондування). В основному, зонд включає менш, чим приблизно 1000 або 500 нуклеотидів у довжину.

У типовому випадку, жорсткість умов повинна бути такою, при якій концентрація солі становить менш, чим 1,5 М іона Na, звичайно концентрація становить від приблизно 0,01 до 1,0 іона Na (або інших солей) при pH 7,0-8,3 і температура становить 30 °C для коротких зондів (наприклад, від 10 до 50 нуклеотидів) і щонайменше приблизно 60 °C для довгих зондів (наприклад, понад 50 нуклеотидів). Потрібна жорсткість умов може бути також досягнута при додаванні дестабілізуючих агентів, таких як формаїди. Репрезентативні умови низької жорсткості включають гібридизацію в буферному розчині, що включає 30-35 % формаїду, 1 М NaCl, 1 % ДСН (додецилсульфат натрію) при температурі 37 °C і промивання в 1X-2X SSC (20X SSC=3,0 М NaCl/0,3 М цитрат натрію) при температурі 50-55 °C. Репрезентативні умови середньої жорсткості включають гібридизацію в розчині, що містить 40-45 % формаїду, 1,0 М NaCl, 1 % ДСН при температурі 37 °C і промивання в 0,5X-1X SSC при температурі 55-60 °C. Репрезентативні умови середньої жорсткості включають гібридизацію в розчині, що містить 50 % формаїду, 1 М NaCl, 1 % ДСН при температурі 37 °C і кінцеве промивання в 0,1X SSC при температурі 60-65 °C протягом щонайменше 20 хвилин. Необов'язково, промивні буфери можуть включати від приблизно 0,1 % до приблизно 1 % ДСН. Тривалість гібридизації в основному становить менш, чим 24 години, звичайно від приблизно 4 до приблизно 12 годин.

Специфічність у типовому випадку являє собою функцію пост-гібридизаційних промивань, і найважливішими факторами є іонна сила й температура розчину для кінцевого промивання. У випадку ДНК-ДНК гібридів, T_m (точка плавлення) може бути приблизно визначена з рівняння Мейнкота й Валя (Meinkoth and Wahl (1984) Anal. Biochem. 138:267-284): $T_m = 81,5 ^\circ\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\%GC) - 0,61 (\% \text{ form}) - 500/L$; де M означає молярність одновалентних катіонів, $\%GC$ означає процентний вміст гуанозинових і цитозинових нуклеотидів у ДНК, « $\% \text{ form}$ » означає процентний вміст формаїду в гібридизаційному розчині й L означає довжину гібрида по кількості пар основ. Показник T_m означає температуру (при певних значеннях іонної сили й pH), при якій 50 % комплементарної цільової послідовності гібридується з повністю підходящим для спарювання зондом. Промивання в типовому випадку проводяться щонайменше до досягнення рівноваги й досягнення низького фонового рівня гібридизації, що становить 2 години, 1 година або 30 хвилин.

Показник T_m знижується приблизно на 1 °C для кожного 1 % некоректного спарювання; таким чином, T_m , умови гібридизації і/або промивання можуть бути відкореговані для досягнення гібридизації з послідовностями бажаної ідентичності. Наприклад, якщо йде пошук послідовностей з ідентичністю $\geq 90\%$, T_m може бути знижений на 10 °C. В основному, умови жорсткості вибирають таким чином, щоб вони включали температуру приблизно на 5 °C нижче, чим T_m для конкретної послідовності і її комплементу, при певних значеннях іонної сили й pH. Однак, дуже жорсткі умови можуть включати гібридизацію і/або промивання при температурі на 1, 2, 3 або 4 °C нижче, чим T_m ; умови середньої жорсткості можуть включати гібридизацію і/або промивання при температурі на 6, 7, 8, 9 або 10 °C нижче, чим T_m ; умови низької жорсткості можуть включати гібридизацію і/або промивання при температурі на 11, 12, 13, 14, 15 або 20 °C нижче, чим T_m .

Для будь-якого фахівця в даній галузі зрозуміло, що у використовуваному рівнянні, де відбиті умови гібридизації й промивання й бажане значення T_m , варіації у жорсткості розчинів гібридизації і/або промивання добре описані. Якщо бажаний рівень некоректного спарювання відповідає значенню T_m менш, чим 45 °C (водяний розчин) або 32 °C (розчин формаїду), концентрація SSC може бути підвищена, для того щоб можна було використовувати більш високу температуру. Вичерпний посібник з гібридизації нуклеїнових кислот наведено в Tijssen (1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes, Part I, Chapter 2 (Elsevier, New York); і Ausubel et al., eds. (1995) Current Protocols in Molecular Biology, Chapter 2 (Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York). Див. також Sambrook. Таким чином, виділені послідовності, які кодують Сру білок за даним винаходом й гібридизуються в жорстких умовах з Сру послідовностями, наведеними в даному описі, або з їхніми фрагментами, охоплюються різними варіантами здійснення даного винаходу.

Наведені нижче терміни використовуються для опису подібності по послідовності між двома або більш нуклеїновими кислотами або полінуклеотидами: (a) "стандартна послідовність", (b) "вікно порівняння", (c) "ідентичність по послідовності", (d) "відсоток ідентичності по послідовності" і (e) "значна ідентичність".

(a) У контексті даного опису, "стандартна послідовність" являє собою певну послідовність, використовувану як основу для порівняння послідовностей. Стандартна послідовність може являти собою підмножину або повністю специфічну послідовність, наприклад, вона може являти собою сегмент повнорозмірної послідовності кднк або генної послідовності або повну послідовність кднк або гена.

(b) У контексті даного опису, термін "вікно порівняння" використовується для посилання на безперервний і певний сегмент полінуклеотидної послідовності, де полінуклеотидна послідовність у вікні порівняння може включати додавання або делеції (тобто гепи), щодо стандартної послідовності (яка не включає додавань або делецій) для проведення оптимального зіставлення двох послідовностей. В основному, вікно порівняння включає щонайменше 20 безперервних нуклеотидів у довжину й необов'язково може становити 30, 40, 50, 100 або більш нуклеотидів. Для фахівця в даній галузі зрозуміло, що для того, щоб уникнути високої подібності зі стандартною послідовністю через включення гепів у полінуклеотидну послідовність, у типовому випадку вводиться штраф за геп, і він віднімається із числа спарювань.

Способи зіставлення послідовностей для їхнього порівняння добре відомі в даній галузі. Так, визначення відсотка ідентичності по послідовності між будь-якими двома послідовностями може бути проведене з використанням математичного алгоритму. Не обмежуючі приклади таких математичних алгоритмів включають алгоритм Myers and Miller (1988) CABIOS 4:11-17; алгоритм для локального вирівнювання Smith et al. (1981) Adv.Appl. Math. 2:482; алгоритм для загального вирівнювання Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443-453; метод пошуку для локального вирівнювання Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444-2448; алгоритм Karlin and Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264, у модифікації Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877.

Комп'ютерне надання цих математичних алгоритмів може бути використане для порівняння послідовності з метою визначення ідентичності по послідовності. Такі комп'ютерні надання включають, без обмеження: CLUSTAL у програмі PC/Gene (доступна від Intelligenetics, Mountain View, California); програма ALIGN (версія 2.0) і GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA і TFASTA у пакеті програм по генетиці GCG Wisconsin Genetics Software Package, версія 10 (доступно від Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, California, USA). Зіставлення за допомогою таких програм може бути здійснене з використанням заданих параметрів. Програма CLUSTAL добре описана в літературі Higgins et al. (1988) Gene 73:237-244 (1988); Higgins et al. (1989) CABIOS 5:151-153; Corpet et al. (1988) Nucleic Acids Res. 16:10881-90; Huang et al. (1992) CABIOS 8:155-65; and Pearson et al. (1994) Meth. Mol. Biol. 24:307-331. Програма ALIGN заснована на алгоритмі Майерса й Міллера (Myers and Miller (1988) supra). При використанні програми ALIGN для порівняння амінокислотних послідовностей можуть використовуватися наступні параметри: PAM120- вага залишку, штраф за довжину гепу 12, штраф за геп 4. Програми BLAST (Altschul et al (1990) J. Mol. Biol. 215:403) засновані на алгоритмі Karlin and Altschul (1990) supra. Нуклеотидні пошуки в BLAST можуть бути проведені з використанням програми BLASTN, очки = 100, довжина слова = 12, для одержання нуклеотидних послідовностей, гомологічної нуклеотидної послідовності кодуючої білок за даним винаходом. Білкові пошуки BLAST можуть бути проведені з використанням програми BLASTX, очки = 50, довжина слова = 3, для одержання амінокислотних послідовностей, гомологічних білку або пептиду за даним винаходом. Для одержання гепірованих зіставлень для цілей порівняння може використовуватися програма Gapped BLAST (в BLAST 2.0), описана Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389. Альтернативно, може використовуватися PSI-BLAST (в BLAST 2.0) для проведення повторних пошуків, які виявляють віддалену подібність між молекулами. Див. Altschul et al. (1997) supra. При використанні BLAST, Gapped BLAST, PSI-BLAST, можуть використовуватися задані параметри відповідних програм (наприклад, BLASTN для нуклеотидних послідовностей, BLASTX для білків). Див. інтернет-сайт Національного Центру біотехнологічної інформації (National Center for Biotechnology Information) на www.ncbi.nlm.nih.gov. Зіставлення може також проводитися вручну при огляді.

Якщо не зазначене інше, значення ідентичності/подібності по послідовності, наведені в даному описі, відносяться до значення, отриманого з використанням програми GAP, версії 10, з використанням наступних параметрів: % ідентичності і % подібності для нуклеотидної послідовності з використанням вагового значення геп 50, ваги довжини 3 і матриці nwsgapdna.cmp; % ідентичності і % подібності для амінокислотної послідовності з використанням вагового значення геп 8, ваги довжини 2 і матриці BLOSUM62; або будь-якої еквівалентної програми. Термін "еквівалентна програма" у контексті даного опису відноситься до будь-якої програми порівняння послідовностей, яка для двох розглянутих послідовностей дає зіставлення з ідентичним спарюванням нуклеотидних і амінокислотних залишків і таким же значенням ідентичності по послідовності, при порівнянні з відповідними результатами, отриманими при проведенні зіставлення по програмі GAP, версія 10.

У програмі GAP використовується алгоритм Needleman and Wunsch (1970) supra для виявлення шляхом зіставлення двох повних послідовностей, які дають максимальне число

спарювань і мінімальне число гепів. Програма GAP урахує всі можливі варіанти вирівнювання й положення гепів і проводить вирівнювання з досягненням найбільшого числа спарених основ і найменшого числа гепів. Вона допускає штраф за створення гепів і штраф за розширення гепів в одиницях спарених основ. Програма GAP за кожний, геп, що вводиться знижує штраф за створення гепів в кількості спарювань. Якщо штраф за розширення гепів більше, ніж обране нульове значення, програма GAP повинна додатково давати винагороду за кожний, геп, що вводиться у довжині гепів, щораз за штраф по розширенню гепів. Задане значення штрафу по створенню гепів й задане значення штрафу по розширенню гепів у версії 10 пакета прикладних програм GCG Wisconsin Genetics Software Package для білкових послідовностей становлять 8 і 2, відповідно. Для нуклеотидних послідовностей задане значення штрафу по створенню гепів становить 50, а задане значення штрафу по розширенню гепів становить 3. Штрафи за створення гепів й розширення гепів можуть бути виражені у вигляді цілого числа, обраного із групи цілих чисел, що становлять від 0 до 200. Так, наприклад, штрафи за створення гепів й розширення гепів можуть становити 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 або більш.

Програма GAP є лише одним представником сімейства найкращих програм по зіставленню. У цьому сімействі є багато інших представників, але жоден з них не відрізняється кращою якістю. Програма GAP характеризується чотирма показниками корисності його використання для зіставлення: якість, співвідношення, ідентичність і подібність. Якість являє собою метричну характеристику, що максимально підходить для зіставлення послідовностей. Співвідношення являє собою якість, розділене на кількість основ у більш короткому сегменті. Відсоток ідентичності являє собою відсоток символів, які фактично спаровуються. Відсоток подібності являє собою символи, які близькі. Символи, які перетинають гепи, ігноруються. Подібність підраховується в балах, коли значення рахункової матриці для пари символів вище або рівно 0,50, відзначається граничне значення подібності. Рахунковою матрицею, використовуваною у версії 10 пакета прикладних програм GCG Wisconsin Genetics Software Package, є BLOSUM62 (див. Henikoff and Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915).

(с) У контексті даного опису, "ідентичність по послідовності" або "ідентичність", стосовно до двом послідовностям нуклеїнових кислот або поліпептидним послідовностям, відноситься до залишків у двох послідовностях, які є однаковими при їхньому вирівнюванні для досягнення максимальної відповідності уздовж певного вікна порівняння. Коли використовується відсоток ідентичності по послідовності стосовно до білка, вважається, що положення залишків, які не ідентичні, часто різняться по консервативних заміщеннях амінокислот, де амінокислотні залишки були заміщені іншими амінокислотними залишками із близькими хімічними властивостями (наприклад, по заряду або гідрофобності), так що, у цьому зв'язку, не міняються функціональні властивості молекули. Коли послідовності відрізняються по консервативним заміщенням, відсоток ідентичності по послідовності може бути підвищений для корегування консервативної природи заміщення. Говорять, що послідовності, які відрізняються по таких консервативних заміщеннях, характеризуються "подібністю по послідовності" або "подібністю". Способи проведення такого коректування відомі фахівцям у даній галузі. У типовому випадку, проводиться підрахунок консервативного заміщення у вигляді часткового, а не повного некоректного спарювання, що підвищує відсоток ідентичності по послідовності. Таким чином, наприклад, якщо ідентична амінокислота має бал один, а консервативному заміщенню дане нульове значення бала, то консервативному заміщенню привласнюється значення бала від 0 до 1. Балове значення консервативних заміщень розраховують, наприклад, відповідно до програми PC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, California).

(d) У контексті даного опису, "відсоток ідентичності по послідовності", означає значення, обумовлене при порівнянні двох оптимально вирівняних послідовностей уздовж вікна порівняння, де частина полінуклеотидної послідовності у вікні порівняння може включати додавання або делеції (тобто гепи), щодо стандартної послідовності (яка не включає додавання або делеції) для цілей оптимального зіставлення двох послідовностей. Відсоток розраховується при визначенні числа положень по обом послідовностям, у яких є присутньою ідентична основа нуклеїнової кислоти або ідентичний амінокислотний залишок, для виявлення числа спарених положень, а при розподілі числа спарених положень на загальне число положень у вікні порівняння й при множенні результату на 100 одержують значення відсотка ідентичності по послідовності.

(e)(i) Термін "ідентичність по суті" у відношенні полінуклеотидних послідовностей означає, що полінуклеотид включає послідовність, яка характеризується щонайменше 70 %, 80 %, 90 % або 95 % або більшою ідентичністю по послідовності, при порівнянні зі стандартною послідовністю з використанням однієї з описаних програм зіставлення й з використанням

стандартних параметрів. Для фахівця в даній галузі зрозуміло, що ці значення можуть бути відповідним чином відкореговані для визначення відповідної ідентичності білків, кодуючих двома нуклеотидними послідовностями, з врахуванням виродженості кодонів, амінокислотної подібності, положення рамки зчитування й т.п. Ідентичність по суті амінокислотних послідовностей для цих цілей в основному визначається ідентичністю на рівні щонайменше 60 %, 70 %, 80 %, 90 % або 95 % або більшої ідентичності по послідовності.

Іншим показником того, що нуклеотидні послідовності значною мірою ідентичні, буде той факт, що дві молекули гібридизуються одна з одною у жорстких умовах. В основному, жорсткі умови вибирають таким чином, щоб температура була приблизно на 5 °C нижче, чим T_m для конкретної послідовності, при певних значеннях іонної сили й pH. Однак, жорсткі умови охоплюють температури, які від приблизно 1 °C до приблизно 20 °C нижче, чим T_m, залежно від бажаного ступеня жорсткості, як тут було описано. Нуклеїнові кислоти, які не гібридизуються одна з одною у жорстких умовах, усе ще будуть значною мірою ідентичними, якщо поліпептиди, які вони кодують, будуть по суті ідентичними. Це може мати місце, наприклад, у тому випадку, коли створюється копія нуклеїнової кислоти з використанням максимальної виродженості кодонів, що допускається генетичним кодом. Одним з показників того, що дві послідовності нуклеїнових кислот по суті ідентичні, є той факт, що поліпептид, кодуємий першою нуклеїновою кислотою, здатний до перехресної імунологічної реакції з поліпептидом, кодовуваним другою нуклеїновою кислотою.

(e)(ii) Термін "ідентичність по суті" відносно пептиду показує, що пептид включає послідовність, яка щонайменше на 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % або більш ідентична по послідовності стандартній послідовності уздовж установленого вікна порівняння. Оптимальне зіставлення для цих цілей може бути проведене з використанням алгоритму загального вирівнювання Needleman and Wunsch (1970) *supra*. Вказівкою на те, що дві пептидні послідовності по суті ідентичні, буде той факт, що один пептид здатний до імунологічної реакції з антитілами проти другого пептиду. Таким чином, пептид по суті ідентичний другому пептиду, наприклад, коли два пептиди відрізняються тільки по консервативному заміщенню. Пептиди, які « по суті подібні », мають загальні послідовності, як було зазначено вище, за винятком того, що положення залишків, які не ідентичні, можуть відрізнятися по консервативним амінокислотним змінам.

Використання терміна "нуклеотидні конструкції" у контексті даного опису не слід розглядати як обмежуючі варіанти здійснення даного винаходу нуклеотидними конструкціями, що включають ДНК. Для фахівця в даній галузі зрозуміло, що нуклеотидні конструкції, зокрема, полінуклеотиди й олігонуклеотиди, що складаються із рибонуклеотидів і комбінацій рибонуклеотидів і дезоксирибонуклеотидів, можуть також використовуватися в способах, наведених у даному описі. Нуклеотидні конструкції, нуклеїнові кислоти й нуклеотидні послідовності за даним винаходом додатково включають усі комплементарні форми таких конструкцій, молекул і послідовностей. Крім того, нуклеотидні конструкції, нуклеотидні молекули й нуклеотидні послідовності за даним винаходом охоплюють усі нуклеотидні конструкції, молекули й послідовності, які можуть використовуватися в способах за даним винаходом для трансформації рослин, включаючи, без обмеження, ті нуклеотидні конструкції, молекули й послідовності, які складаються з дезоксирибонуклеотидів, рибонуклеотидів і їх комбінацій. Такі дезоксирибонуклеотиди й рибонуклеотиди включають як природні молекули, так і синтетичні аналоги. Нуклеотидні конструкції, нуклеїнові кислоти й нуклеотидні послідовності за даним винаходом також охоплюють усі форми нуклеотидних конструкцій, що включають, без обмеження, одноланцюгові форми, дволанцюгові форми, шпилькові форми, структури типу стебла й петлі й т.п.

Інший варіант здійснення даного винаходу відноситься до трансформованого організму, такому як організм, обраний із групи, що складається з рослинних клітин і клітин комах, бактерій, дріжджів, бакуловірусів, найпростіших, нематод і водоростей. Трансформований організм включає: молекулу ДНК за даним винаходом, касету експресії, що включає зазначену молекулу ДНК, або вектор, що включає зазначену касету експресії, який може бути стабільно включений у геном трансформованого організму. Різні варіанти здійснення даного винаходу включають послідовності в конструкції ДНК для експресії в організмі, що представляє інтерес. Зазначена конструкція буде включати 5'- і 3'-регуляторні послідовності, оперативно пов'язані з послідовністю за даним винаходом. Термін "оперативно зв'язаний" у контексті даного опису відноситься до функціонального зв'язку між промотором і другою послідовністю, де промоторна послідовність ініціює й проводить транскрипцію послідовності ДНК, відповідної до другої послідовності. В основному, термін "оперативно зв'язаний" означає, що послідовності нуклеїнової кислоти, будучи зв'язаними, є безперервними і, де необхідно, з'єднують дві ділянки

кодуючого білка, які безперервні й перебувають в одній рамці зчитування. Зазначена конструкція може додатково містити щонайменше один додатковий ген, який підлягає спільній трансформації в організм. Альтернативно, один або кілька додаткових генів можуть перебувати на багатьох конструкціях ДНК.

5 Така конструкція ДНК включає велику кількість сайтів рестрикції для вбудовування послідовностей *Cy* токсину, транскрипція якого здійснюється регуляторними ділянками. Конструкція ДНК може також містити гени селектовуваного маркера.

10 Конструкція ДНК буде включати в напрямку 5'-3' -транскрипції: ділянку ініціації транскрипції й трансляції (тобто промотор), послідовність ДНК за даним винаходом й ділянку термінації транскрипції й трансляції (тобто ділянка термінації), що функціонують в організмі, що виконують функцію хазяїна. Ділянка ініціації транскрипції (тобто промотор) може бути нативною, аналогічним, чужорідним або гетерологічним для організму-хазяїна і/або послідовності за даним винаходом.

15 Додатково, промотор може являти собою природну послідовність або, альтернативно, синтетичну послідовність. Термін "чужорідний" у даному контексті означає, що зазначений промотор не знайдений у нативному організмі, у який уводять даний промотор. У тому випадку, коли промотор є "чужорідним" або "гетерологічним" для послідовності за даним винаходом, вважається, що промотор не є нативним або природним промотором для оперативно зв'язаної послідовності за даним винаходом. У контексті даного опису, химерний ген включає кодуючу 20 послідовність, оперативно пов'язану з ділянкою ініціації транскрипції, який є гетерологічним для кодуючої послідовності. Коли промотор є нативною або природною послідовністю, експресія оперативно зв'язаної послідовності міняється убік від експресії дикого типу, що приводить до зміни фенотипу.

25 Ділянка термінації транскрипції може бути нативною для ділянки ініціації транскрипції, може бути нативною для оперативно зв'язаної послідовності ДНК, що представляє інтерес, може бути нативною для рослини-хазяїна або може бути отримана з іншого джерела (тобто буде чужорідною або гетерологічною для промотору, для розглянутої послідовності, для рослини-хазяїна або будь-якої їхньої комбінації).

30 Підходящі ділянки доступні з *Ti*-плазмиди *A.tumefaciens*, такі як ділянки термінації октопін-синтази й нопалін-синтази. Див. також Guerineau et al. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 262:141-144; Proudfoot (1991) *Cell* 64:671-674; Sanfacon et al. (1991) *Genes Dev.* 5:141-149; Mogenef (1990) *Plantcell* 2:1261-1272; Munroe et al. (1990) *Gene* 91:151-158; Ballas et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:7891-7903; і Joshi et al. (1987) *Nucleic Acid Res.* 15:9627-9639.

35 Де це прийнятне, нуклеїнова кислота може бути оптимізована для підвищення експресії в організмі-хазяїні. Так, коли організмом-хазяїном є рослина, можуть бути синтезовані синтетичні нуклеїнові кислоти з використанням кращих для рослини кодонів для підвищення експресії. Обговорення використання кращих для рослини кодонів наведено, наприклад, у роботі Campbell and Gowri (1990) *Plant Physiol.* 92:1-11. Наприклад, хоча послідовності нуклеїнової 40 кислоти за даним винаходом можуть експресуватися й у однодольних, і у дводольних рослинах, послідовності можуть бути модифіковані для відповідності специфічним кодоновим перевагам і перевагам по вмісту GC в однодольних і дводольних рослин, оскільки, як було показано, ці переваги різняться (Murray et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:477-498). Так, кращий для кукурудзи кодон для конкретної амінокислоти може бути отриманий з відомих генних послідовностей кукурудзи. Використання кодонів кукурудзи для 28 генів з рослин кукурудзи 45 описано в таблиці 4 у роботі Murray et al., *supra*. У даній галузі відомі способи синтезу кращих рослин генів. Див., наприклад, патенти США NoNo. 5380831 і 5436391 і Murray et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:477-498,.

Відомі інші модифікації послідовності, які підвищують експресію гена в клітині-хазяїні. Вони включають елімінацію послідовностей, що кодують неправильні сигнали поліаденілювання, 50 сигнали для сайт-сплайсингу екзона-інтрону, транспозон-подібні повтори й інші добре описані послідовності, які можуть бути несприятливими для генної експресії. Вміст GC у послідовності може бути відкорегований до середніх рівнів для даної клітини-хазяїна, який розраховується з урахуванням відомих генів, експресуємих у клітині-хазяїні. Термін « Клітина-хазяїн » у контексті даного опису відноситься до клітини, яка містить вектор і підтримує реплікацію і/або експресію 55 вектора експресії. Клітини-Хазяїна можуть являти собою прокаріотичні клітини, такі як *E. coli*, або еукаріотичні клітини, такі як клітини дріжджів, комах, земноводних або ссавців або однодольних або дводольних рослин. Прикладом клітини-хазяїна однодольної рослини є Клітина-хазяїн кукурудзи. Коли це можливо, послідовність модифікують, для того, щоб уникнути можливого утворення вторинних шпилькових структур мРНК.

Касети експресії можуть додатково містити 5'-лідерні послідовності. Такі лідерні послідовності можуть діяти в напрямку підвищення трансляції. Лідери для трансляції відомі у даній галузі й включають: лідер пікорновірусу, наприклад, EMCV лідер (5'-некодуєча ділянка енцефаломіокардиту) (Elroy-Stein (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6126-6130); лідери потівірусу, наприклад, TEV лідер (Etch вірус тютюну) (Gallie et al. (1995) *Gene* 165(2): 233-238), MDMV лідер (вірус мозаїки, що викликає карликовість кукурудзи), білок зв'язування з важким ланцюгом імуноглобуліну людини (BiP) (Macejak et al. (1991) *Nature* 353: 90-94); нетрансльований лідер із мРНК для білкової оболонки вірусу мозаїки люцерни (AMV RNA 4) (Jobling et al. (1987) *Nature* 325: 622-625); лідер вірусу мозаїки тютюну (TMV) (Gallie et al. (1989) in *Molecular Biology of RNA*, ed. Cech (Liss, New York), pp. 237-256); лідер вірусу хлорозу кукурудзи (MCMV) (Lommel et al. (1991) *Virology* 81: 382-385). Див. також Della-Cioppa et al. (1987) *Plant Physiol.* 84: 965-968.

При виготовленні касети експресії можуть використовуватися різні касети ДНК для одержання послідовності ДНК у потрібній орієнтації і, де це можливо, у відповідній рамки зчитування. У цьому зв'язку, можуть використовуватися адаптори або лінкери для сполуки фрагментів ДНК, або можуть проводитися інші маніпуляції для створення підходящих сайтів рестрикції, видалення надлишкової кількості ДНК, видалення сайтів рестрикції або т.п. Із цією метою, може проводитися мутагенез *in vitro*, відновлення праймерів, рестрикція, відпал, повторне заміщення, наприклад, переходи й перестановки.

У практиці здійснення даного винаходу може використовуватися безліч промоторів. Промотори можуть бути обрані з урахуванням бажаного результату. Нуклеїнові кислоти можуть бути об'єднані з конститутивними, тканино-переважними, індукцйбельними або іншими промоторами для експресії в організмі-хазяїні. Підходящі конститутивні промотори для використання в рослинній клітині-хазяїні включають, наприклад, ядерний промотор Rsyn7 промотору й інші конститутивні промотори, описані в WO 99/43838 і патенті США No. 6072050; ядерний промотор CaMV 35S (Odell et al. (1985) *Nature* 313: 810-812); актин рису (McElroy et al. (1990) *Plant Cell* 2:163-171); убіхтін (Christensen et al. (1989) *Plant Mol. Biol.* 12: 619-632 and Christensen et al. (1992) *Plant Mol. Biol.* 18: 675-689); pEMU (Last et al. (1991) *Theor. Appl. Genet.* 81: 581-588); MAS (Velten et al. (1984) *EMBOJ.* 3:2723-2730); ALS промотор (патент США No. 5659026) і т.п. Інші конститутивні промотори включають, наприклад, промотори, описані в патентах США No. 5608149, 5608144, 5604121, 5569597, 5,466,785, 5399680, 5268463, 5608142 і 6177611.

Залежно від бажаного результату, може бути корисно проводити експресію гена з використанням індукцйбельного промотору. Особливий інтерес для регуляції експресії нуклеотидних послідовностей за даним винаходом в рослинах представляють промотори, індуктовані ушкодженням. Такі індуктовані ушкодженням промотори можуть відповідати на ушкодження, викликане поїданням комах, і включають ген інгібітору протеїнази картоплі (pin II) (Ryan (1990) *Ann. Rev. Phytopath.* 28: 425-449; Duan et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 494-498); *wun1* і *wun2*, патент США No. 5428148; *win1* і *win2* (Stanford et al. (1989) *Mol. Gen. Genet.* 215: 200-208); системін (McGurl et al. (1992) *Science* 225:1570-1573); WIP1 (Rohmeier et al. (1993) *Plant Mol. Biol.* 22: 783-792; Eckelkamp et al. (1993) *FEBS Letters* 323: 73-76); MPI ген (Corderok et al. (1994) *Plant J.* 6(2): 141-150); і т.п., включені в даний опис як посилання.

Додатково, у способах і нуклеотидних конструкціях за даним винаходом можуть використовуватися промотори, індуктовані патогеном. Такі індуктовані патогеном промотори включають промотори з патогенез-родинних білків (PR білки), які індукуються після інфекції патогеном, наприклад, PR білки, SAR білки, бета-1,3-глюканаза, хітиназа й т.п. Див., наприклад, Redolfi et al. (1983) *Neth. J. Plant Pathol.* 89: 245-254; Uknes et al. (1992) *Plant Cell* 4: 645-656; і Van Loon (1985) *Plant Mol. Virol.* 4:111-116. Див. також патент WO 99/43819, включений у якості посилання.

Представляють також інтерес промотори, які експресуються локально, у сайті або поруч із сайтом інфекції патогеном. Див., наприклад, Marineau et al. (1987) *Plant Mol. Biol.* 9:335-342; Matton et al. (1989) *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2:325-331; Somsisch et al. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:2427-2430; Somsisch et al. (1988) *Mol. Gen. Genet.* 2:93-98; і Yang (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:14972-14977. Див. також Chen et al. (1996) *Plant J.* 10:955-966; Zhang et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:2507-2511; Warner et al. (1993) *Plant J.* 3:191-201; Siebertz et al. (1989) *Plant Cell* 1:961-968; патент США No. 5750386 (індукція нематодою); посилання, що містяться в них. Особливий інтерес представляє індукцйбельний промотор для *Prms* гена кукурудзи, експресія якого індуктується патогеном *Fusarium moniliforme* (див., наприклад, Cordero et al. (1992) *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 41:189-200).

Хімічно регульовані промотори можуть використовуватися для модуляції експресії генів у рослині шляхом нанесення екзогенного хімічного регулятора. Залежно від мети, промотор може являти собою хімічно індукований промотор, коли нанесення хімічної речовини індукуює генну експресію, або хімічно репресуючий промотор, коли нанесення хімічної речовини пригнічує експресію гена. Хімічно індуковані промотори відомі в даній галузі й включають, без обмеження, In2-2 промотор кукурудзи, який активується бензолсульфонамідними гербіцидними рятувальниками, GST промотор кукурудзи, який активується гідрофобними електрофільними сполуками, які використовуються в якості гербіцидів, застосовуваних до сходів, і PR-1a промотор тютюну, який активується саліциловою кислотою. Інші, хімічно регульовані промотори, що представляють інтерес включають реагуючі на стероїди промотори (див., наприклад, індукований глюкокортикоїдами промотор, описаний Schena et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10421-10425 і McNellis et al. (1998) Plant J. 14(2):247-257) і тетрациклін-індуковані й тетрациклін-репресуючі промотори (див., наприклад, Gatz et al. (1991) Mol. Gen. Genet. 227:229-237 і патенти США NoNo. 5814618 і 5789156), де всі зазначені роботи включені як посилання.

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

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

Кращі для коріння або корнеспецифічні промотори відомі й можуть бути обрані з багатьох доступних літературних джерел або виділені *de novo* з різних сумісних видів. Див., наприклад, Hire et al. (1992) Plant Mol. Biol. 20(2):207-218 (корнеспецифічний ген глютамінсинтетази сої); Keller and Baumgartner (1991) Plant Cell 3(10):1051-1061 (корнеспецифічний контрольний елемент в GRP 1.8 гени французької квасолі); Sanger et al. (1990) Plant Mol. Biol. 14(3):433-443 (корнеспецифічний промотор гена маннопін-синтази (MAS) з *Agrobacterium tumefaciens*); і Miao et al. (1991) Plant Cell 3(1):11-22 (повнорозмірний клон кДНК, що кодує цитозольну глютамінсинтазу (GS), який експресується в коріннях і корневих клубеньках сої). Див. також Bogusz et al. (1990) Plant Cell 2(7):633-641, де описано два корнеспецифічних промоторів, виділені з генів гемоглобіну небобового азотфіксатора *Parasponia andersonii* і родин небобової рослини, що не фіксує азот, *Trema tomentosa*. Промотори цих генів були з'єднані з репортерним геном бета-глюкоронидази й уведені в небобову рослину *Nicotiana tabacum* і в бобову рослину *Lotus corniculatus*, і в обох випадках зберігалася корнеспецифічна промоторна активність. Leach and Aoyagi (1991) описують аналіз промоторів високо експресуємих індукуюваних у коріннях генів *rolc* і *rold* з *Agrobacterium mizogenes* (див. Plant Science (Limerick) 79(1):69-76). Вони зробили висновок, що енхансер і тканинопереважні детермінанти ДНК дисоціюють у цих промоторах. Teeri et al. (1989) використовував злиття гена з *lacZ* і показав, що T-DNA ген *Agrobacterium*, що кодує октопінсинтазу, особливо активний в епідермісі кінчиків корінь і що ген TR2' є корнеспецифічним в інтактній рослині й стимулюється ушкодженням тканини лисття, що є особливо бажаною комбінацією характеристик для використання з інсектицидним або ларвицидним геном (див. EMBO J 8(2):343-350). Ген TR1', злитий з *prtII* (неоміцин-фосфотрансфераза II), демонстрував аналогічні характеристики. Додаткові корненайкращі промотори включають промотор гена *Vfenod-grp3* (Kuster et al. (1995) Plant Mol. Biol. 29(4):759-772); і промотор *rolb* (Capana et al. (1994) Plant Mol. Biol. 25(4):681-691). Див. також патенти США NoNo. 5837876, 5750386, 5633363, 5459252, 5401836, 5110732 і 5023179.

"Специфічні для насіння" промотори включають як "специфічні для насіння" промотори (промотори, які активні в ході розвитку насіння, такі як промотори білків, зберігаючого насіння), так і промотори « насіння, що проростають, » (промотори, активні при проростанні насіння). Див. Thompson et al. (1989) Bioessays 10:108, де зазначена робота включена як посилання. Такі кращі для насіння промотори включають, без обмеження, *Cim1* (цитокін-індукований месенджер); *cz19B1* (зеїн кукурудзи розміром 19 кДа); і *milps* (міо-інозит-1-

фосфат-синтаза) (див. патент США No. 6225529, включений у якості посилання). Гамма-зеїн і Glob-1 являють собою специфічні для ендосперму промотори. У випадку дводольних рослин, специфічні для насіння промотори включають, без обмеження, β -фазеолін, напін, β -конгліцинин квасолі, соевий лектин, круциферин і т.п. У випадку однодольних рослин, специфічні для насіння промотори включають, без обмеження, зеїн кукурудзи розміром 15 кДа, зеїн розміром 22 кДа, зеїн розміром 27 кДа, g-зеїн, waxy, shrunken 1, shrunken 2, глобулін 1 і т.п. См також включений у якості посилання патент WO 00/12733, у якому описуються кращі для насіння промотори з генів end1 і end2. Промотор, який характеризується "кращою" експресією в конкретній тканині, експресується в цій тканині на більш високому рівні, ніж в іншій, щонайменше однієї рослинній тканині. Деякі тканиро-переважні промотори демонструють практично ексклюзивну експресію в конкретній тканині.

Коли бажаний низький рівень експресії, використовують слабкі промотори. В основному, термін "слабкий промотор" використовується в даному описі для позначення промотору, який направляє експресію кодуючої послідовності, на низькому рівні. При низькому рівні експресії утворюються від приблизно 1/1000 транскриптів до приблизно 1/100,000 і до приблизно 1/500,000 транскриптів. Альтернативно, термін "слабкий промотор" також означає промотори, які направляють експресію тільки в деяких клітинах, але не в інших, з досягненням низького рівня експресії. У тому випадку, коли промотор направляє експресію на неприйнятно високих рівнях, частині промоторної послідовності можуть бути делетировані або модифіковані для зниження рівнів експресії.

Такі слабкі конститутивні промотори включають, наприклад, ядерний промотор Rsyn7 промотору (WO 99/43838 і патент США No. 6072050), ядерний промотор 35S Camv і т.п. Інші конститутивні промотори включають, наприклад, промотори, описані в патентах США NoNo. 5608149, 5608144, 5604121, 5569597, 5466785, 5399680, 5268463, 5608142 і 6177611, включених у якості посилання.

В основному, касета експресії включає селектовуваний маркерний ген для селекції трансформованих клітин. Селектовуваний маркерні гени використовуються для селекції трансформованих клітин або тканин. Маркерні гени включають гени, що кодують резистентність до антибіотиків, такі як гени, що кодують неоміцин-фосфотрансферазу II (NEO) і гігromіцин-фосфотрансферазу (HPT), а також гени, що надають резистентність до гербіцидних з'єднань, таким як глюфозинат амонію, бромоксиніл, імідазоліони й 2,4-дихлорфеноксиацетат (2,4-D). Додаткові приклади підходящих селектуємих маркерних генів включають, без обмеження, гени, що кодують резистентність до хлорамфеніколу (Herrera Estrella et al. (1983) EMBO J. 2:987-992); метотрексату (Herrera Estrella et al. (1983) Nature 303:209-213; i Meijer et al. (1991) Plant Mol. Biol. 76:807-820); стрептоміцину (Jones et al. (1987) Mol. Gen. Genet. 270:86-91); спектиноміцину (Bretagne-Sagnard et al. (1996) Transgenic Res. 5:131-137); блеоміцину (Hille et al. (1990) Plant Mol. Biol. 7:171-176); сульфонамідів (Guerineau et al. (1990) Plant Mol. Biol. 75:127-136); бромоксиніл у (Stalker et al. (1988) Science 30 242:419-423); гліфозату (Shaw et al. (1986) Science 233:478-481; і серійні заявки на патенти США NoNo. 10/004357 і 10/427692); фосфінотрицину (Deblock et al. (1987) EMBO J. 6:2513-2518). Див. також Yarranton (1992) Curr. Opin. Biotech. 3: 506-511; Christopherson et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6314-6318; Yao et al. (1992) Cell 71: 63-72; Reznikoff (1992) Mol. Microbiol. 6: 2419-2422; Barkley et al. (1980) in The Operon, pp. 177-220; Hu et al. (1987) Cell 48: 555-566; Brown et al. (1987) Cell 49: 603-612; Figge et al. (1988) Cell 52: 713-722; Deuschle et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5400-5404; Fuerst et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2549-2553; Deuschle et al. (1990) Science 248:480-483; Gossen (1993) Ph.D. Thesis, University of Heidelberg; Reines et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:1917-1921; Labow et al. (1990) Mol. Cell. Biol. 10: 3343-3356; Zambretti et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 3952-3956; Bairn et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 5072-5076; Wyborski et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19: 4647-4653; Hillenand-Wissman (1989) Topics Mol. Struc. Biol. 10:143-162; Degenkolb et al. (1991) Antimicrob. Agents Chemother. 35:1591-1595; Kleinschmidt et al. (1988) Biochemistry 27:1094-1104; Bonin (1993) Ph.D. Thesis, University of Heidelberg; Gossen et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5547-5551; Oliva et al. (1992) Antimicrob. Agents Chemother. 36: 913-919; Hlavka et al. (1985) Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 78 (Springer-Verlag, Berlin); и Gill et al. (1988) Nature 334: 721-724 Зазначені роботи включені як посилання.

Наведений вище перелік селектовуваних маркерних генів не слід розглядати як обмежувачий. Будь-який селектовуваний маркерний ген може використовуватися в практиці здійснення даного винаходу.

Способи за даним винаходом включають введення поліпептиду або полінуклеотиду в рослину. Термін "введення" означає надання рослині полінуклеотиду або поліпептиду в такому

режимі, що зазначена послідовність одержує доступ усередину клітини рослини. Способи за даним винаходом не залежать від конкретного методу введення полінуклеотиду або поліпептиду в рослину, головне, щоб зазначені полінуклеотид або поліпептиди одержували доступ усередину щонайменше однієї клітини рослини. Способи введення полінуклеотиду або поліпептидів у рослини відомі в даній галузі й включають, методи стабільної трансформації, методи тимчасової трансформації й методи, засновані на застосуванні вірусів.

"Стабільна трансформація" означає, що нуклеотидна конструкція, уведена в рослину, інтегрувалася в геном рослини й здатна передаватися потомству. "Тимчасова трансформація" означає, що полінуклеотид уведений у рослину й не інтегрований у геном рослини або поліпептид уведений у рослину.

Протоколи трансформації, а також протоколи введення нуклеотидних послідовностей у рослину можуть варіювати, залежно від типу рослини й рослинної клітини, т.е. однодольна ця рослина або дводольна, що підлягає трансформації. Підходящі способи введення нуклеотидних послідовностей у клітини рослин і наступного вбудовування в геном рослини включають мікроін'єкцію (Crossway et al. (1986) *Biotechniques* 4: 320-334), електропорацію (Riggs et al. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 5602-5606), трансформацію з використанням *Agrobacterium* (патенти США NoNo. 5563055 і 5981840), прямий генний перенос (Paszowski et al. (1984) *EMBO J.* 3: 2717-2722), і обробку швидкими балістичними частками (див, наприклад, патенти США NoNo. 4945050, 5879918, 5886244 і 5932782; Tomes et al. (1995) in *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture: Fundamental Methods*, ed. Gamborg and Phillips (Springer-Verlag, Berlin); і McCabe et al. (1988) *Biotechnology* 6: 923-926); і Lecl трансформацію (WO 00/28058). Стосовно до картопляної трансформації див. Tu et al. (1998) *Plant Molecular Biology* 37: 829-838 і Chong et al. (2000) *Transgenic Research* 9:71-78. Інші процедури трансформації описані в роботах: Weissinger et al. (1988) *Ann. Rev. Genet.* 22: 421-477; Sanford et al. (1987) *Particulate Science and Technology* 5: 27-37 (цибуля); Christou et al. (1988) *Plant Physiol.* 87: 671-674 (соя); McCabe et al. (1988) *Bio/Technology* 6: 923-926 (соя); Finer and McMullen (1991) *In Vitro Cell Dev. Biol.* 27P: 175-182 (соя); Singh et al. (1998) *Theor. Appl. Genet.* 96: 319-324 (соя); Datta et al. (1990) *Biotechnology* 8: 736-740 (рис); Klein et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 4305-4309 (кукурудза); Klein et al. (1988) *Biotechnology* 6:559-563 (кукурудза); патенти США NoNo. 5240855, 5322783 і 5324646; Klein et al. (1988) *Plant Physiol.* 91: 440-444 (кукурудза); Fromm et al. (1990) *Biotechnology* 8: 833-839 (кукурудза); Hooykaas-Van Slogteren et al. (1984) *Nature (London)* 311: 763-764; патент США No. 5736369 (зернові); Bytebier et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 5345-5349 (Liliaceae); De Wet et al. (1985) in *The Experimental Manipulation of Ovule Tissues*, ed. Chapman et al. (Longman, New York), pp. 197-209 (пилок); Kaeppler et al. (1990) *Plant Cell Reports* 9: 415-418 and Kaeppler et al. (1992) *Theor. Appl. Genet.* 84: 560-566 (whisker-опосередкована трансформація); D'Halluin et al. (1992) *Plant Cell* 4: 1495-1505 (електропорація); Li et al. (1993) *Plant Cell Reports* 12: 250-255 і Christou and Ford (1995) *Annals of Botany* 75:407-413 (рис); Osjoda et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 745-750 (кукурудза, через *Agrobacterium tumefaciens*), які, усі, включені в даний опис як посилання.

У конкретних варіантах здійснення даного винаходу, послідовності за даним винаходом можуть бути введені в рослину з використанням різних методів тимчасової трансформації. Такі методи тимчасової трансформації включають, без обмеження, введення білка Cry токсину або його варіантів і фрагментів безпосередньо в рослину або введення транскрипту Cry токсину в рослину. Такі методи включають, наприклад, мікроін'єкцію або бомбардування частками. Див., наприклад, Crossway et al. (1986) *Mol Gen. Genet.* 202: 179-185; Nomura et al. (1986) *Plant Sci.* 44: 53-10 58; Hepler et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 2176-2180 and Hush et al. (1994) *The Journal of Cell Science* 107: 775-784, де всі зазначені роботи включені в даний опис як посилання. Альтернативно, полінуклеотид Cry токсину може бути тимчасово трансформований у рослину з використанням процедур, відомих у даній галузі. Такі процедури включають системи на основі вірусного вектора й осадження полінуклеотиду таким чином, що попереджається наступне вивільнення ДНК. Таким чином, транскрипція такої пов'язаної із часткою ДНК може відбуватися, але частота, з якої вона вивільняється для інтеграції в геном, дуже знижена. Такі методи включають використання часток, покритих поліетиламіном (PEI; Sigma #P3143).

У даній галузі відомі способи цільового вбудовування полінуклеотиду в конкретне положення в рослинному геномі. В одному варіанті, вбудовування полінуклеотиду в бажаному положенні в геномі досягається з використанням сайт-специфічної системи рекомбінації. Див., наприклад, WO99/25821, WO99/25854, WO99/25840, WO99/25855 і WO99/25853, які включені в якості посилання. Загалом, процедура полягає в тому, що полінуклеотид за даним винаходом може втримуватися в касеті переносу, фланкований двома неідентичними сайтами рекомбінації. Касету переносу вводять у рослину, у геном якої її слід стабільно включити в

цільовому сайті, який фланкований двома неідентичними сайтами рекомбінації, відповідними до сайтів у касеті переносу. Підходяща рекомбіназа є. і касета переносу інтегрується в цільовий сайт. Таким чином, полінуклеотид, що представляє інтерес, буде інтегрований у конкретному положенні хромосоми в рослинному геномі.

Клітини, трансформовані таким чином, можуть бути вирощені з одержанням рослин, з використанням стандартних способів. Див., наприклад, McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5: 81-84. Ці рослини можуть бути потім вирощені й далі вони будуть запилюватися тим же трансформованим штамом або іншими штамми, і отриманий гібрид буде відрізнятися конститутивною або індукційною експресією ідентифікованою бажаною фенотиповою характеристикою. Може бути вирощено два або більш поколінь, для гарантії того, що експресія бажаної фенотипової характеристики стабільно підтримується й успадковується й що зібрані насіння також будуть підтримувати експресію бажаної фенотипової характеристики.

Нуклеотидні послідовності за даним винаходом можуть бути введені в рослину шляхом контакту рослини з вірусом або нуклеїновими кислотами вірусу. В основному, такі методи включають уведення потрібної нуклеотидної конструкції в молекулу вірусної ДНК або РНК. Відомо, що рекомбінантні білки за даним винаходом можуть спочатку синтезуватися у вигляді частини вірусного поліпротеїну, який пізніше може бути процесований шляхом протеолізу in vivo або in vitro з бажаного пестицидного білка. Відомо також, що такий вірусний поліпротеїн, що включає щонайменше частину амінокислотної послідовності пестицидного білка за даним винаходом, може мати бажану пестицидну активність. Такі вірусні поліпротеїни й нуклеотидні послідовності, які їх кодують, охоплюються галуззю даного винаходу. У даній галузі відомі способи одержання рослин з використанням нуклеотидних конструкцій і утворенням кодуючих ними білків у рослинах, які включають молекули вірусної ДНК або РНК. Див., наприклад, патенти США No. 5889191, 5889190, 5866785, 5589367 і 5,316,931, які включені в даний опис як посилання.

Інші варіанти здійснення даного винаходу відносяться до матеріалу для розмноження рослин, застосованому до рослини, що трансформується, за даним винаходом, що включає, без обмеження, насіння, коренеплоди, качани, бульби, лисття й черешки коріння і стебла.

Даний винахід у всіх варіантах свого здійснення може використовуватися для трансформації будь-якого виду рослини, що включає, без обмеження, однодольні й дводольні рослини. Приклади рослин, що представляють інтерес, включають, без обмеження, кукурудзу (*Zea mays*), *Brassica* sp. (наприклад, *B. napus*, *B. rapa*, *B. juncea*), зокрема, види *Brassica*, використовувані в якості джерел масла з насіння, люцерну (*Medicago sativa*), рису (*Oryza sativa*), жито (*Secale cereale*), сорго (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), проса (наприклад, пенісетум рогузovidний (*Pennisetum glaucum*), проса звичайного (*Panicum miliaceum*), проса італійського (*Setaria italica*), проса пальчастого (*Eleusine coracana*), соняшника (*Helianthus annuus*), сафлор (*Carthamus tinctorius*), пшениці (*Triticum aestivum*), сої (*Glycine max*), тютюну (*Nicotiana tabacum*), картоплі (*Solanum tuberosum*), арахісу (*Arachis hypogaea*), бавовни (*Gossypium barbadense* *Gossypium hirsutum*), солодкої картоплі (*Ipomoea batatas*), каваї (*Manihot esculenta*), кави (*Coffea* spp.), кокосу (*Cocos nucifera*), ананасу (*Ananas comosus*), цитрусового дерева (*Citrus* spp.), какао (*Theobroma cacao*), чаю (*Camellia sinensis*), банану (*Musa* spp.), авокадо (*Persea americana*), інжиру (*Ficus casica*), гуаву (*Psidium guajava*), манго (*Mangifera indica*), оливки (*Olea europaea*), папайю (*Carica papaya*), горіху кешью (*Anacardium occidentale*), макамського горіху (*Macadamia integrifolia*), мигдалю (*Prunus amygdalus*), цукрового буряку (*Beta vulgaris*), цукрового очерету (*Saccharum* spp.), овсу, ячміню, городини, декоративних рослин й хвойних.

Городини включають томати (*Lycopersicon esculentum*), латук (наприклад, *Lactuca sativa*), зелену квасолю (*Phaseolus vulgaris*), лимську квасолю (*Phaseolus limensis*), горох (*Lathyrus* spp.) і представників роду *Cucumis*, таких як огірок (*C. sativus*), канталупа (*C. cantalupensis*) і мускусна диня (*C. melo*). Декоративні рослини включають азалію (*Rhododendron* spp.), гортензію (*Macrophylla hydrangea*), гібіскус (*Hibiscus rosasanensis*), троянди (*Rosa* spp.), тюльпани (*Tulipa* spp.), жовті нарциси (*Narcissus* spp.), петунії (*Petunia hybrida*), гвоздику (*Dianthus caryophyllus*), пуансетію (*Euphorbia pulcherrima*) і хризантему. Хвойні рослини, які можуть використовуватися в практиці здійснення даного винаходу, включають, наприклад, сосни, такі як сосна ладанна (*Pinus taeda*), сосна Елліота (*Pinus elliotii*), жовта сосна (*Pinus ponderosa*), сосна скручена, широкохвойна (*Pinus contorta*) і промениста сосна (*Pinus radiata*); дугласову ялицю (*Pseudotsuga menziesii*); тсугу західну (*Tsuga canadensis*); ялину ситхенську (*Picea glauca*); червону деревину (*Sequoia sempervirens*); справжні ялиці, такі як сріблиста ялиця (*Abies amabilis*) і бальзамна ялиця (*Abies balsamea*); і кедр, такі як кедр червоний західний (*Thuja plicata*) і аляскинський жовтий кедр (*Chamaecyparis nootkatensis*). Рослини за даним винаходом включають культурні

рослини (наприклад, кукурудзу, люцерну, соняшник, Brassica, сою, бавовну, сафлор, арахіс, сорго, пшеницю, просо, тютюн і т.п...), такі як рослини кукурудзи й сої.

Газонна трава включає, без обмеження: однолітній м'ятлик (*Poa annua*); однолітний плевел (*Lolium multiflorum*); м'ятлик сплюснений (*Poa compressa*); вівсяницю (*Festuca rubra*); мітлицю (*Agrostis tenuis*); мітлицю повзучу (*Agrostis palustris*); пирій гребенчатий (*Agropyron desertorum*); пирій пустирний (*Agropyron cristatum*); вівсяницю жестковату (*Festuca longifolia*); м'ятлик луговий (*Poa pratensis*); їжакову збірню (*Dactylis glomerata*); плевел багаторічний (*Lolium perenne*); вівсяницю червону (*Festuca rubra*); мітлицю білу (*Agrostis alba*); м'ятлик звичайний (*Poa trivialis*); вівсяницю овечу (*Festuca ovina*); багаття м'яке (*Bromus inermis*); вівсяницю гігантську (*Festuca arundinacea*); тимофіївку (*Phleum pratense*); мітлицю оксамитову (*Agrostis canina*); уніолу колосисту (*Puccinellia distans*); пирій західний (*Agropyron smithii*); бермудську траву (*Cynodon spp.*); августинову траву (*Stenotaphrum secundatum*); цойсію японську (*Zoysia spp.*); гречку помітну (*Paspalum notatum*); килимову траву (*Axonopus affinis*); траву-багатоніжку (*Eremochloa orphioides*); траву кикуйю (*Pennisetum clandestinum*); траву паспалон (*Paspalum vaginatum*); пасовищну траву блакитну (*Bouteloua gracilis*); бізонову траву (*Buchloe dactyloids*); бутелуа короткопоникаючу (*Bouteloua curtipendula*).

Рослини, що представляють інтерес, включають зернові рослини, які дають насіння, що представляють інтерес, олійні рослини й бобові. Насіння, що представляють інтерес, включають зернові насіння культур, таких як кукурудза, пшениця, ячмінь, рис, сорго, жито, просо й т.п. Олійні рослини включають бавовну, сою, сафлор, соняшник, Brassica, кукурудзу, люцерну, пальму, кокос, льон, ріцину, оливки й т.п. Бобові рослини включають боби й горох. Боби включають гуар, ріжкове дерево, фенхель, сою, садову квасолю, вигну китайську, боби маш, лімську квасолю, стручкову квасолю, сочевицю, турецький горох і т.п.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу, послідовності нуклеїнових кислот за даним винаходом можуть бути об'єднані з будь-якою комбінацією полінуклеотидних послідовностей, що представляють інтерес, для створення рослин з бажаним фенотипом. Наприклад, полінуклеотиди за даним винаходом можуть бути об'єднані з будь-якими іншими полінуклеотидами, що кодують поліпептиди, що володіють пестицидною і/або інсектицидною активністю, такі як інші Bt токсичні білки (описані в патентах США No. 5366892, 5747450, 5736514, 5723756, 5593881 і Geiser et al. (1986) Gene 48:109), пентин (описаний у патенті США No. 5981722) і т.п. Отримані комбінації можуть також включати множинні копії кожного з полінуклеотидів, що представляють інтерес. Полінуклеотиди за даним винаходом можуть бути також об'єднані з будь-яким іншим геном або комбінацією генів для одержання рослин з безліччю комбінацій бажаних ознак, що включають, без обмеження, ознаки, бажані для корму тварин, такі як гени, що визначають високий вміст масла (наприклад, патент США No. 6232529); збалансованість по амінокислотному складу (наприклад, гордотіоніни (патенти США No. 5990389, 5885801; 5885802 і 5703049)); високий вміст лізину в ячмені (Williamson et al. (1987) Eur. J. Biochem. 165: 99-106; and WO 98/20122) і високий вміст метіоніну в білках (Pedersen et al. (1986) J. Biol. Chem. 261: 6279; Kirihara et al. (1988) Gene 71: 359; і Musumura et al. (1989) Plant Mol. Biol. 12: 123)); підвищену розщеплюємість (наприклад, модифіковані білки зберігання (серійна заявка на патент США No. 10/053410, зареєстрована 7 листопада 2001 р.); і тіоредоксини (серійна заявка на патент США No. 10/005429, зареєстрована 3 грудня 2001 р.)), включені в даний опис як посилання.

Полінуклеотиди за даним винаходом також можуть бути об'єднані з елементами, бажаними для досягнення резистентності до захворювань або гербіцидів (наприклад, гени детоксикації фумонизину (патент США No. 5792931)); з генами авірулентності й резистентності до захворювання (Jones et al. (1994) Science 266:789; Martin et al. (1993) Science 262:1432; і Mindrinos et al. (1994) Cell 78:1089); з мутантами по ацетолатат-синтазі (ALS), які ведуть до резистентності до гербіцидів, що включають такі мутації як S4 і/або Hra; з інгібіторами глютамін-синтази, такими як фосфінотрицин або баста (наприклад, bar ген); і елементами, що визначають резистентність до гліфозату (EPSPS ген і GAT ген, описаний у серійних заявках на патент США No. 10/004357 і 10/427692); і з елементами, що сприяють досягненню ознак, бажаних для обробки або процесингу продуктів, таких як високий вміст масла (наприклад, патент США No. 6232529); модифіковані масла (наприклад, гени десатурази жирних кислот (патент США No. 5952544; WO 94/11516)); модифіковані крохмалі (наприклад, ADPG-пірофосфорилази (AGPaза), крохмаль-синтази (SS), ветвящие крохмаль ферменти (SBE) і ферменти, що знижують розгалуження крохмалю (SDBE)); і полімери біопластиків (наприклад, патент США No. 5602321; бета-кетотіолаза, полігідроксибутират-синтаза й ацетоацетил-коа-редуктаза (Schubert et al. (1988) J. Bacteriol. 170: 5837-5847) сприяють експресії полігідроксиалканоатів (PHA)), опис яких включено в якості посилання. Можна також поєднувати

полінуклеотиди за даним винаходом з полінуклеотидами, що визначають агрономічні ознаки, такі як чоловіча стерильність (див., наприклад, патент США No. 5583210), міцність стебла, час цвітіння, або з елементами, що визначають метод трансформації, такими як регуляція клітинного циклу й цільовий вплив на ген (наприклад, WO 99/61619, WO 00/17364, WO 25 99/25821), опис яких включено в якості посилання.

Зазначені об'єднані комбінації можуть бути створені по будь-якому способу, що включає, без обмеження, перехресне запліднення рослин за традиційною методикою або по методу TOPCROSS® або шляхом генетичної трансформації. Якщо об'єднання ознак було здійснено шляхом генетичної трансформації рослини, що представляють інтерес полінуклеотидні послідовності можуть бути об'єднані в будь-який час і в будь-якому порядку. Наприклад, трансгенна рослина, що включає один або кілька бажаних ознак, може використовуватися в якості мішені для введення інших ознак шляхом наступної трансформації. Зазначені ознаки можуть вводитися одночасно по протоколу спільної трансформації з полінуклеотидами, що представляють інтерес, у зв'язку з будь-якою їхньою комбінацією в касетах трансформації. Наприклад, якщо слід увести дві послідовності, те зазначені дві послідовності можуть утримуватися в окремих касетах трансформації (транс) або втримуватися в одній і тій же касеті трансформації (цис). Експресія послідовностей може направлятися тим самим промотором або різними промоторами. У деяких випадках, може бути бажане вводити касету трансформації, яка буде пригнічувати експресію полінуклеотиду інтерес, що представляє. Вона може бути об'єднана з будь-якою комбінацією інших касет супресії або касет суперекспресії для створення бажаної комбінації ознак у рослині. Відомо також, що полінуклеотидні послідовності можуть бути об'єднані в бажанім положенні генома з використанням системи сайт- специфічної рекомбінації. Див., наприклад, W099/25821, W099/25854, W099/25840, W099/25855, і W099/25853, які включені в даний опис як посилання.

Композиції за даним винаходом знаходять застосування в захисті різними способами рослин, насіння і продуктів рослин. Наприклад, зазначені композиції можуть використовуватися в рамках способу, який включає внесення ефективної кількості пестицидної композиції в середовище проживання шкідника по процедурі, обраній із групи, що полягає з розбризкування, розпилення, розкидання або нанесення покриття на насіння.

Перед тем, як матеріал для розмноження рослин (плід, коренеплід, бульба, бульбоцибулина, зерна, насіння), особливо насіння, продаються в якості комерційного продукту, його звичайно обробляють захисним покриттям, що включають гербіциди, інсектициди, фунгіциди, бактерициди, нематодциди, моллюскоциди або суміші декількох таких препаратів, якщо бажане, у комбінації з іншими носіями, поверхнево-активними речовинами або сприятливими нанесенню допоміжними речовинами, звичайно використовуваними при одержанні композиції, для забезпечення захисту проти ушкодження, викликаного бактеріальними, грибними шкідниками або тваринами-шкідниками. Для обробки насіння, захисне покриття може наноситися на насіння або шляхом просочування коренеплідів або зерен рідкою композицією або шляхом нанесення на них покриття з об'єднаної вологої або сухої композиції. Додатково, в особливих випадках можливе застосування інших способів нанесення на рослину, наприклад, обробка бруньок або плодів.

Насіння рослин за даним винаходом, що включають нуклеотидну послідовність, що кодує пестицидний білок за даним винаходом, можуть бути оброблені захисним покриттям для насіння, що включають сполуки, використовуване для обробки насіння, таке як, наприклад, каптан, карбоксин, тирам, металаксил, піриміфос-метил і інші, які звичайно використовуються при обробці насіння. В одному варіанті, захисне покриття для насіння, що включає пестицидну композицію за даним винаходом, використовують одне або в комбінації з одним із захисних покриттів для насіння, звичайно використовуваних при обробці насіння.

Відомо, що гени, що кодують пестицидні білки, можуть використовуватися для трансформації патогенних організмів для комах. Такі організми включають бакуловіруси, гриби, найпростіші, бактерії й нематоди.

Ген, що кодує пестицидний білок за даним винаходом, може бути введений у підходящому векторі в мікробний організм-хазяїн, і зазначений хазяїн далі може бути внесений у середовище проживання або в рослину або у тварину. Термін "уводиться" у контексті вбудовування нуклеїнової кислоти в клітину означає "трансфекцію" або "трансформацію" або "трансдукцію" і відноситься до тем посиланням по включенню нуклеїнової кислоти в еукаріотичну клітину, де нуклеїнова кислота могла бути включена в клітину (наприклад, у хромосому, плазміді, пластиді або мітохондріальну ДНК), з наступним перетворенням в автономний реплікон, або де вона тимчасово експресувалася (наприклад, трансфікована мРНК). Можуть бути обрані мікроорганізми-хазяї, у відношенні яких відомо, що вони займають "фітосферу" (філоплан,

філосферу, ризосферу і/або ризоплан) однієї або декількох культур, що представляють інтерес. Зазначені організми можуть бути обрані таким чином, щоб вони були здатні успішно конкурувати в конкретній навколишньому середовищі з мікроорганізмами дикого типу, забезпечуючи стабільне/у підтримку й експресію гена, експресуючого пестицидний білок, і

5 бажане, забезпечуючи підвищений захист пестициду від розкладання й інактивації в навколишньому середовищі.

Такі мікроорганізми включають бактерії, водорості й гриби. Особливий інтерес представляють мікроорганізми, такі як бактерії, наприклад, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Xanthomonas*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Methylius*, *Agrobacterium*, *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Leuconostoc* і *Alcaligenes*, гриби, зокрема, дріжджі, наприклад, *Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Kluveromyces*, *Sporobolomyces*, *Rhodotorula* і *Aureobasidium*. Особливий інтерес представляють такі фітосферні види бактерій, як *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Acetobacter xylinum*, *Agrobacteria*, *Rhodopseudomonas spheroides*, *Xanthomonas campestris*, *Rhizobium meliloti*, *Alcaligenes entrophus*, *Clavibacter xyli* і *Azotobacter vinelandii*, 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*, *Kluveromyces veronae* і *Aureobasidium pollulans*. Особливий інтерес представляють пігментовані мікроорганізми.

Доступна безліч способів для введення гена, експресуючого пестицидний білок, у мікроорганізм-хазяїн в умовах, які дозволяють стабільна підтримка й експресію даного гена. Наприклад, можуть бути сконструйовані касети експресії, які включають, що представляють інтерес нуклеотидні конструкції, оперативно пов'язані з регуляторними сигналами транскрипції й трансляції, для експресії нуклеотидних конструкцій, і нуклеотидну послідовність, гомологічну послідовності в організмі-хазяїні, що приводить до інтеграції і/або до функціонування системи реплікації в хазяїні, що приведе до інтеграції або уводити, увести до ладу стабільній підтримці.

Регуляторні сигнали транскрипції й трансляції включають, без обмеження, промотори, старт-сайти ініціації транскрипції, оператори, активатори, енхансери, інші регуляторні елементи, сайти зв'язування з рибосомами, кодон ініціації, сигнали термінації й т.п. Див., наприклад, патенти США No. 5039523 і 4853331, EPO 0480762A2; Sambrook et al. (1992) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, ed. Maniatis et al. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York), далі "Sambrook II"; Davis et al., eds. (1980) *Advanced Bacterial Genetics* (Cold Spring Harbor Laboratory Press), Cold Spring Harbor, New York; посилання, що й утримуються в роботах

Підходящі клітини-хазяї, у випадку яких клітини, що містять пестицидний білок, обробляються для продовження активності пестицидного білка в клітині, коли оброблена клітина вноситься в середовище проживання одного або декількох шкідників, можуть включати прокаріотів або еукаріотів, які звичайно обмежені тими клітинами, які не утворюють речовин, токсичних для вищих організмів, таких як ссавці. Однак, організми, які утворюють речовини, токсичні для вищих організмів, можуть використовуватися в тому випадку, коли токсин нестабільний або рівень нанесення досить низький, що дозволить уникнути якої-небудь можливості токсичності для організму-хазяїна ссавця. У якості хазяїв, особливий інтерес представляють прокаріоти й нижчі еукаріоти, такі як гриби. Репрезентативні приклади прокаріотів, і Грам-негативних, і Грам-позитивних, включають *Enterobacteriaceae*, такі як *Escherichia*, *Erwinia*, *Shigella*, *Salmonella* і *Proteus*; *Bacillaceae*; *Rhizobiaceae*, такі як *Rhizobium*; *Spirillaceae*, такі як фотобактерія, *Zymomonas*, *Serratia*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Desulfovibrio*, *Spirillum*; *Lactobacillaceae*; *Pseudomonadaceae*, такі як *Pseudomonas* і *Acetobacter*, *Azotobacteraceae* і *Nitrobacteraceae*. У число еукаріотів включаються гриби, такі як *Phycomycetes* і *Ascomycetes*, які включають дріжджі, такі як *Saccharomyces* і *Schizosaccharomyces*; і дріжджі *Basidiomycetes*, такі як *Rhodotorula*, *Aureobasidium*, *Sporobolomyces* і т.п.

Характеристики, що представляють особливий інтерес при виборі клітини-хазяїна для цілей продукції пестицидного білка, включають легкість введення гена пестицидного білка в організм хазяїна, доступність систем експресії, ефективність експресії, стабільність білка в організмі-хазяїні й наявність допоміжних генетичних якостей. Характеристики, що представляють інтерес у випадку використання в якості пестицидної мікрокапсули, включають захисні якості для пестициду, такі як товсті клітинні стінки, пігментація й внутрішньоклітинне впакування або утворення тіл включення; афіність для листів; відсутність токсичності для ссавців; атрактивність для поїдання шкідниками; легкість знищення й фіксації без ушкодження токсину й т.п. Інші фактори включають легкість створення композиції й роботи з нею, економічність, стабільність при зберіганні й т.п.

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

Гени, що кодують пестицидні білки за даним винаходом, можуть бути введені в мікроорганізми, які розмножуються на рослинах (епіфіти) для доставки пестицидних білків до потенційних цільових шкідників. Епіфіти, наприклад, можуть являти собою Грам-позитивні або Грам-негативні бактерії.

Бактерії, що утворюють колонії на коріннях, наприклад, можуть бути виділені з рослини, що представляє інтерес, по відомих у даній галузі методах. Конкретно, штам *Bacillus cereus*, який утворює колонії на коріннях, може бути виділений з корінь рослини (див., наприклад, Handelsman et al. (1991) Appl. Environ. Microbiol. 56:713-718). Гени, що кодують пестицидні білки за даним винаходом, можуть бути введені в *Bacillus cereus*, що утворює колонії на коріннях, по стандартних процедурах, відомих у даній галузі.

Гени, що кодують пестицидні білки, можуть бути введені, наприклад, в утворюючу колонії на коріннях *Bacillus*, шляхом електротрансформації. Конкретно, гени, що кодують пестицидні білки, можуть бути клоновані в шаттл-векторі, наприклад, pHT3101 (Lerecius et al. (1989) FEMS Microbiol. Letts. 60: 211-218). Шаттл-вектор pHT3101, що містить кодуючу послідовність для гена конкретного пестицидного білка, може бути, наприклад, трансформований в *Bacillus*, що утворює колонії на грибах, шляхом електропорації (Lerecius et al. (1989) FEMS Microbiol. Letts. 60: 211-218).

Системи експресії можуть бути розроблені таким чином, що пестицидні білки будуть секретуватися із цитоплазми Грам-негативних бактерій, таких як, наприклад, *E. coli*. Переваги секретування пестицидних білків включають: (1) відсутність можливих цитотоксичних ефектів експресуемого пестицидного білка; і (2) підвищення ефективності очищення пестицидного білка, що включає, без обмеження, підвищену ефективність відновлення й очищення білка на обсяг клітинного бульйону й знижений час і/або знижена вартість відновлення й очищення на одиницю білка.

Пестицидні білки, які можуть бути отримані так, щоб вони секретувалися в *E. coli*, наприклад, при злитті відповідного сигнального пептиду з *E. coli* з аміно-кінцем пестицидного білка. Сигнальні пептиди, розпізнавані *E. coli*, можуть бути обрані з тих білків, у відношенні яких відомо, що вони секретуються в *E. coli*, наприклад, це може бути OmpA білок (Ghrayeb et al. (1984) EMBO J, 3:2437-2442). OmpA являє собою основний білок зовнішньої мембрани *E. coli* і, у цьому зв'язку, слід уважати, що його сигнальний пептид буде ефективний у процесі транслокації. Крім того, у випадку сигнального пептиду OmpA відсутня потреба в модифікації перед процесингом, що може відбуватися у випадку інших сигнальних пептидів, наприклад, сигнального пептиду ліпопротеїну (Duffaud et al. (1987) Meth. Enzymol. 153: 492).

Пестицидні білки за даним винаходом можуть ферментуватися в бактеріальному хазяїні, і отримані оброблені бактерії можуть використовуватися в якості мікробного спрею в такий же спосіб, як *Bt* штамми використовувалися в якості інсектицидних спреїв. У випадку одного або декількох пестицидних білків, які секретуються з *Bacillus*, сигнал секреції віддається або мутується з використанням процедур, відомих у даній галузі. Такі мутації і/або делеції перешкоджають секреції одного або декількох пестицидних білків у ростове середовище в процесі ферментації. Пестицидні білки втримуються в клітині, і зазначені клітини потім обробляють із одержанням інкапсульованих пестицидних білків. Для цієї мети може використовуватися будь-який підходящий мікроорганізм. *Pseudomonas* використовували для експресії *Bt* токсинів у вигляді інкапсульованих білків, і отримані клітини обробляли й розприскували в якості інсектициду (Gaertner et al. (1993), in: Advanced Engineered Pesticides, ed. Kim).

Альтернативно, пестицидні білки одержують при введенні гетерологічного гена в клітину-хазяїн. Експресія гетерологічного гена приводить, прямо або опосередковано, до внутрішньоклітинної продукції пестициду і її підтримці. Зазначені клітини потім обробляють в умовах, які продовжують активність токсину, продукованого в клітині, коли клітина вноситься в середовище проживання одного або декількох цільових шкідників. Отриманий продукт зберігає токсичність токсину. Такі інкапсульювання в природному стані пестицидні білки можуть бути потім введені до складу композиції з використанням стандартних методик внесення в середовище проживання цільового шкідника, наприклад, у ґрунт, у воду й на листя рослин. Див., наприклад, ЕРА 0192319 посилання, що й утримуються в ньому.

У різних варіантах здійснення даного винаходу, трансформований мікроорганізм (який включає цілий організм, клітини, одну або декілька спор, один або декілька пестицидних білків, один або декілька пестицидних компонентів, один або кілька компонентів, що впливають на шкідників, один або декілька мутантів, живі або мертві клітини й клітинні компоненти, включаючи також зруйновані клітини й клітинні компоненти) або виділений пестицидний білок можуть бути введені разом з підходящим носієм в одну або декілька пестицидних композицій, які являють собою, наприклад, суспензію, розчин, емульсію порошок, що розпорошується, дисперговані гранули або кульки, порошок, що змочується і емульгований концентрат, аерозоль або спрей, імпрегновану гранулу, що покриває пасту, колоїд, і далі також інкапсульовані, наприклад, у полімерні речовини. Такі виготовлювані композиції можуть бути отримані з використанням стандартних способів, що включають сушіння, ліофілізацію, гомогенізацію, екстракцію, фільтрування, центрифугування, осадження або концентрування культури клітин, що включають зазначений поліпептид.

Описані вище композиції можуть бути отримані при додаванні поверхнево-активної речовини, інертного носія, консерванту, зволожувача, харчового стимулятора, атрактанту, інкапсулюючої речовини, зв'язувальної речовини, емульгатора, барвника, Уф-протекторної речовини, буфера, засоба, що підвищує плинність, або добрив, донорів мікроелементів або інших препаратів, які впливають на ріст рослини. Один або кілька агрохімічних засобів, що включають, без обмеження, гербіциди, інсектициди, фунгіциди, бактерициди, нематоциди, моллюскоциди, акарициди, регулятори росту рослин, допоміжні речовини для збору врожаю й добрива, можуть бути об'єднані з носіями, сурфактантами або допоміжними речовинами, звичайно використовуваними при виготовленні композицій, або з використанням інших компонентів, які полегшують роботу із продуктом і його нанесення на конкретних цільових шкідників. Підходящі носії й допоміжні речовини можуть бути твердими або рідкими й відповідати тим речовинам, які звичайно використовуються в процедурах виготовлення композицій, наприклад, природні або відновлені мінеральні речовини, розчинники, диспергуючі засоби, зволожувачі, приліплювачі, зв'язувальні речовини або добрива. Активні інгредієнти за даним винаходом звичайно наносяться у вигляді композиції й можуть наноситися на культивовану площу, рослини або насіння, що підлягають обробці. Наприклад, композиції за даним винаходом можуть наноситися на зерно при підготовці його до зберігання або в ході зберігання в зерносховищі або елеваторі й т.п. Композиції за даним винаходом можуть наноситися одночасно або послідовно щодо інших з'єднань. Способи нанесення активного інгредієнта за даним винаходом або агрохімічної композиції за даним винаходом, яка містить щонайменше один з пестицидних білків, продукуємих бактеріальними штамми за даним винаходом, включають, без обмеження, нанесення на листя, нанесення покриттів на насіння й внесення в ґрунт. Кількість нанесень і рівень нанесення залежить від інтенсивності зараження відповідним шкідником.

Підходящі поверхнево-активні речовини включають, без обмеження, аніонні сполуки, такі як карбоксилат, наприклад, металу; карбоксилат длиноланцюгової жирної кислоти; N-ацилсаркозинат; моно- або ди- ефіри фосфорної кислоти з жирноспиртовими етоксилатами або солі таких складних ефірів; сульфати жирного спирту, такі як додецилсульфат натрію, октодецилсульфат натрію або цетилсульфат натрію; сульфати етоксильованих жирних спиртів; сульфати етоксильованих алкілфенолів; сульфонати лігніну; сульфонати нафти; алкіларилсульфонати, такі як алкілбензолсульфонати або нижчі алкілнафталінсульфонати, наприклад, бутилнафталінсульфонат; солі сульфонованих нафталін-формальдегідних конденсатів; солі сульфонованих фенол-формальдегідних конденсатів; більш складні сульфонати, такі як амід-сульфонати, наприклад, сульфонований продукт конденсації олеїнової кислоти й N-метилтаурину; або діалкілсукцинати, наприклад, натрій-сульфонат діоктилсукцинату. Неіонні засоби включають продукти конденсації складних ефірів жирних кислот, жирних спиртів, амідів жирних кислот або жирних алкіл- або алкеніл-заміщених фенолів з етиленоксидом, складні ефіри жирної кислоти й ефірів поліатомних спиртів, наприклад, складні ефіри сорбітану й жирної кислоти, продукти конденсації таких складних ефірів з етиленоксидом, наприклад, складні ефіри поліоксиетилена-сорбітану жирної кислоти, блок-співполімери етиленоксиду й пропіленоксиду, ацетиленові гліколі, такі як 2,4,7,9-тетраетил-5-децин-4,7-діол або етоксильовані ацетиленові гліколі. Приклади катіонної поверхнево-активної речовини включають, наприклад, аліфатичні моно-, ди- або поліамін, такий як ацетат, нафталінат або олеат, або кисень-утримуючий амін, такий як амін-оксид поліоксиетилена-алкіламіну; амід-зв'язаний амін, одержуваний при конденсації карбонової кислоти з ди- або поліаміном; або четвертинну амонієву сіль.

Приклади інертних матеріалів включають, без обмеження, неорганічні мінерали, такі як каолін, філосилікати, карбонати, сульфати, фосфати або рослинні матеріали, такі як кора, розтерті в порошок кукурудзяні качани, арахісова лушпайка, рисова лушпайка й шкарлупа волоських горіхів.

Композиції за даним винаходом можуть бути представлені у формі, що підходить для безпосереднього нанесення, або у вигляді концентрату первинної композиції, яку необхідно розвести певною кількістю води або іншим розріджувачем перед нанесенням. Концентрація пестициду буде варіювати, залежно від природи конкретної композиції, зокрема, від того, чи є дана композиція концентратом або може використовуватися безпосередньо. Композиція містить від 1 до 98 % твердого або рідкого інертного носія й від 0 до 50 % або 0,1 до 50 % сурфактанту. Зазначені композиції вводяться в кількості, зазначеній для комерційного продукту, наприклад, 0,01 фунт-5,0 фунт на акр, якщо вони представлені в сухій формі, і приблизно 0,01 пінти -10 пінт на акр, якщо вони представлені в рідкій формі.

В іншому варіанті, композиції, а також трансформовані мікроорганізми й пестицидні білки за даним винаходом можуть бути оброблені для збільшення тривалості дії пестицидної активності, при нанесенні її в середовище проживання цільового шкідника, головне, щоб така попередня обробка не виявляла несприятливий ефект на пестицидну активність. Така обробка може являти собою хімічну і/або фізичну обробку, головне, щоб така обробка не погіршувала властивості однієї або декількох зазначених композицій. Приклади хімічних реагентів включають, без обмеження, галогенуючі засоби; альдегіди, такі як формальдегід і глютаральдегід; протиінфекційні засоби, такі як зефіран-хлорид, спирти, такі як ізопропанол і етанол; і гістологічні фіксатори, такі як фіксатор Буїна (Bouin) і фіксатор Хеллі (Helly) (див., наприклад, Humason (1967) *Animal Tissue Techniques* (W.H. Freeman and Co.).

В інших варіантах здійснення даного винаходу, може бути корисно обробити поліпептиди Сгу токсину протеазою, наприклад, трипсином, для активації білка перед нанесенням композиції пестицидного білка за даним винаходом в середовище проживання цільового шкідника. Способи активації протоксину сериною протеазою відомі в даній галузі. Див. наприклад, Cooksey (1968) *Biochem. J.* 6:445-454 і Carroll and Ellar (1989) *Biochem. J.* 261:99-105, опис яких включено в якості посилання. Наприклад, протокол, що підходить, активації включає, без обмеження, об'єднання активованого поліпептиду, наприклад, очищеного нового поліпептиду Сгу (наприклад, з амінокислотою послідовністю, показаною в SEQ ID NO:2 або 4) і трипсину, у ваговому співвідношенні білок/трипсин, рівному 1/100, в 20 mM NaHCO₃, pH 8 і розщеплення зразка при температурі 36 °C протягом 3 годин.

Композиції (що включають трансформовані мікроорганізми й пестицидні білки за даним винаходом) можуть вноситися в середовище проживання комах-шкідника шляхом, наприклад, розбризкування, атомізації, розпилення, нанесення покриття або вливання, уведення в ґрунт або на ґрунт, уведення у воду для поливу, шляхом обробки насіння або шляхом загального нанесення або розпилення в той час, коли шкідник почав з'являтися, або ще до появи шкідників, у якості захисного заходу. Наприклад, пестицидний білок і/або трансформовані мікроорганізми за даним винаходом можуть бути змішані із зерном для захисту зерна в процесі зберігання. У цілому, важливо досягти гарного контролю шкідників на ранніх стадіях росту рослин, оскільки це той час, коли рослина може бути особливо серйозно ушкоджена. Композиції за даним винаходом можуть містити інший інсектицид, якщо вважається, що це необхідно. В одному варіанті, композицію вносять безпосередньо на ґрунт, під час посадки, у гранулярній формі композиції носія й мертвих клітин штаму *Bacillus* або трансформованого мікроорганізму за даним винаходом. Інший варіант відноситься до гранулярної форми композиції, що включає агрохімічний засіб, такий як, наприклад, гербіцид, інсектицид, добриво, інертний носій і мертві клітини штаму *Bacillus* або трансформованого мікроорганізму за даним винаходом.

Для фахівців у даній галузі очевидно, що не всі сполуки будуть так само ефективні проти всіх шкідників. Сполуки за даним винаходом проявляють активність проти комах-шкідників, які можуть включати економічно важливих агрономічних, лісових, тепличних шкідників, шкідників розплідників, шкідників садів, шкідників харчових продуктів і волокон, комах, шкідливих для здоров'я людей і тварин, удома й комерційних структур, домашнього господарства, і шкідників продуктів, що зберігаються. Комахи-шкідники включають комах, обраних з порядків *Coleoptera*, *Diptera*, *Hymenoptera*, *Lepidoptera*, *Mallophaga*, *Homoptera*, *Hemiptera*, *Orthoptera*, *Thysanoptera*, *Dermaptera*, *Isoptera*, *Anoplura*, *Siphonaptera*, *Trichoptera* і т.п., зокрема, *Coleoptera* і *Lepidoptera*.

Комахи з порядку *Lepidoptera* включають, без обмеження, "похідних хробаків", совок, п'ядаків і геліотинових із сімейства *Noctuidae* *Agrotis ipsilon* Hufnagel (совка іпсилон); *A. orthogonia* Morrison (совка прямокутна); *A. segetum* Denis & Schiffermuller (совка озима); *A. subterranea* Fabricius (совка зерниста); *Alabama argillacea* Hubner (листова гусениця бавовни);

- Anticarsia gemmatilis Hubner (гусениця бобів оксамитових); Athetis mindara Barnes and McDunnough (совка шорстка); Earias insulana Boisduval (шиповатий хробак); E. vittella Fabricius (хробак плямистий); Egira (Xylomyges) curialis Grote (совка цитрусових); Euxoa messoria Harris (совка темнобока); Helicoverpa armigera Hubner (хробак американський); H. zea Boddie (совка кукурудзяна або совка бавовняна); Heliothis virescens Fabricius (тютюновий жучок); Hypena scabra Fabricius (зелена конюшинова гусениця); Hyponeuma taltula Schaus; (Mamestra configurata Walker (совка латуква); M. brassicae Linnaeus (капустяна совка); Melanchra picta Harris (совка); Mods latipes Guenee (п'ядак смугастий); Pseudaletia unipuncta Haworth ("похідні хробаки"); Pseudoplusia includens Walker (п'ядак соєвий); Richia albicosta Smith (совка бобів західна); Spocoptera frugiperda JE Smith (совка трав'яна); S. exigua Hubner (совка бурякова); S. litura Fabricius (совка тютюнова); Trichoplusia ni Hubner (п'ядак капустяний); точильників, молей чехликових, павутинних гусениць, черв'яків Кону, шкідників, скелетуючі листя, із сімейства Pyralidae і Crambidae, такі як Achroia grisella Fabricius (моль воскова більша); Amyeloides transitella Walker (совка апельсинова); Anagasta kuehniella Zeller (пшенична совка середземноморська); Cadra cautella Walker (мигдальна совка); Chilo partellus Swinhoe (точильник стебла плямистий); C. suppressalis Walker (рисовий точильник смугастий); C. terrenellus Pagenstecher (точильник цукрового очерету); Corcyra cephalonica Stainton (листокрутка рисова); Crambus caliginosellus Clemens (кукурудзяна павутинна гусениця); C. teterrellus Zincken (павутинна гусениця м'ятлика); Snaphalocrocis medinalis Guenee (рисова листокрутка); Desmia funeralis Hubner (вогнівка виноградна); Diaphania hyalinata Linnaeus (динячий хробак); D. Nitidalis Stoll (вогнівка); Diatraea lavipennella Box; D. grandiosella Dyar (кукурудзяний точильник південно-західний); D. saccharalis Fabricius (точильник цукрового очерету); Elasmopalpus lignosellus Zeller (малий кукурудзяний точильник); Eoreuma loftini Dyar (точильник рисовий мексиканський); Ephestia elutella Hubner (вогнівка тютюнова (какао)); Galleria mellonella Linnaeus (моль воскова більша); Hedylepta assecta Butler (листокрутка цукрова); Herpetogramma licarsisalis Walker (ґрунтова павутинна гусениця); Homoeosoma electellum Hulst (вогнівка соняшникова); Loxostege sticticalis Linnaeus (буряковий хробак); Maruca testulalis Geyer (точильник бобовий); Orthaga thyrsalis Walker (павутинна гусениця чайного дерева); Ostrinia nubilalis Hubner (листокрутка різана); Plodia interpunctella Hubner (моль індійська борошняна); Scirpophaga incertulas Walker (жовтий точильник стебла); Udea rubigalis Guenee (вогнівка іржаво-коричнева) і листокруток, листокруток-брунькоїдів, хробаків, що харчуються насіннями, і плодових хробаків із сімейства Tortricidae Accleris gloverana Walsingham (чорноголова листокрутка-брунькоїд західна); A. variana Fernald (чорноголова листокрутка-брунькоїд східна); Adoxophyes orana Fischer von Rosslerstamm (листокрутка плодова); Archips spp., включаючи A. Argyrospila Walker (листокрутка фруктових дерев) і A. rosana Linnaeus (листокрутка європейська); Argyrotaenia spp.; Bonagota salubricola Meyrick (листокрутка яблучна бразильська); Choristoneura spp.; Cochylis hospes Walsingham (вогнівка соняшникова нахилена); Cydia latiferreana Walsingham (попелиця ліщинова); C. pomonella Linnaeus (плодожерка яблучна); Endopiza viteana Clemens (моль виноградику); Eupoecilia ambiguella Hubner (винна міль); Grapholita molesta Busck (моль фруктова східна); Lobesia botrana Denis & Schiffermuller (моль виноградна європейська); Platynota flavedana Clemens (листокрутка строката); P. stultana Walsingham (листокрутка всеїдна); Spilonota ocellana Denis & Schiffermuller (листокрутка плямиста) і Suleima helianthana Riley (моль-брунькоїд соняшникова).
- Обрані інші агрономічно значимі шкідники з порядку Lepidoptera включають, без обмеження, Alsophila pometaria Harris (плодовий хробак); Anarsia lineatella Zeller (персиковий точильник); Anisota senatoria J.E. Smith (жовто-смугаста гусениця дуба); Antheraea pernyi Guerin-Meneville (китайський шовковичний шовкопряд); Bombyx mori Linnaeus (шовкопряд); Bucculatrix thurberiella Busck (бавовняна міль); Colias eurytheme Boisduval (гусениця люцерни); Datana integerrima Grote & Robinson (гусениця волоського горіха); Dendrolimus sibiricus Tschetwerikov (сибірський шовкопряд); Ennomos subsignaria Hubner (п'ядак ільмовий); Erannis tiliaha Harris (п'ядак липовий); Erechthias flavistriata Walsingham (моль-брунькоїд цукрова); Euproctis chrysorrhoea Linnaeus (златогузка); Harrisina americana Guerin-Meneville (шкідник, скелетуючий виноградні листи); Heliothis subflexa Guenee; Hemileuca oliviae Cockrell (гусениця маслинова); Hyphantha cunea Drury (павутинна гусениця); Keiferia lycopersicella Walsingham (томатний хробак); Lambdina fiscellaria fiscellaha Hulst (п'ядак тсуги східна); L. fiscellaria lugubrosa Hulst (п'ядак тсуги західна); Leucoma salicis Linnaeus (волнянка вербова); Lymantria dispar Linnaeus (непарний шовкопряд); Malacosoma spp.; Manduca quinquemaculata Haworth (бражник п'яти крапковий); M. sexta Haworth (бражник тютюновий); Operophtera brumata Linnaeus (зимова міль); Orgyia spp.; Paleacrita vernata Peck (моль плодових дерев весняна); Papilio cresphontes Cramer (метелик-вітільник гігантська); Phryganidia californica Packard (каліфорнійська міль); Phyllocnistis citrella

Stainton (мінер цитрусових); *Phyllonorycter blancardella* Fabricius (моль-пестрянка плодова нижньобокова); *Pieris brassicae* Linnaeus (метелик білий); *P. rapae* Linnaeus (метелик білий мала); *P. napi* Linnaeus (метелик біло-зелена); *Platyptilia carduidactyla* Riley (пильцекрылка артишокова); *Plutella xylostella* Linnaeus (моль капустяна); *Pectinophora gossypiella* Saunders (рожевий коробковий хробак); *Pontia protodice* Boisduval & Leconte (гусениця кабачкова південна); *Sabulodes aegrotata* Guenee (п'ядак всеїдний); *Schizura concinna* J.E. Smith (червона горбата гусениця); *Sitotroga cerealella* Olivier (моль ячмінна); *Telchin licus* Drury (точильник цукрового очерету гігантський); *Thaumetopoea pityocampa* Schiffermuller (гусениця соснова); *Tineola bisselliella* Hummel (павутинна міль); *Tuta absoluta* Meyrick (мінер томатів) і *Yponomeuta padella* Linnaeus (горноставі моли).

У контексті даного винаходу, представляють також інтерес личинки й дорослі особини з порядку Coleoptera, що включають довгоносиків із сімейств Anthribidae, Bruchidae, and Curculionidae, які включають, без обмеження: *Anthonomus grandis* Boheman (бавовняний довгоносик); *Cylindrocopturus adspersus* Leconte (довгоносик соняшниковий); *Diaprepes abbreviatus* Linnaeus (скосар люцерновий); *Hypera punctata* Fabricius (скосар конюшинових листів); *Lissorhoptrus oryzophilus* Kuschel (довгоносик рисовий водний); *Metamasius hemipterus hemipterus* Linnaeus (західно-індійський довгоносик); *M. hemipterus sericeus* Olivier (довгоносик бурий); *Sitophilus granarius* Linnaeus (довгоносик амбарний звичайний); *S. oryzae* Linnaeus (довгоносик рисовий); *Smicronyx fulvus* Leconte (довгоносик насіння соняшника червоний); *S. sordidus* Leconte (довгоносик насіння соняшника сірий); *Sphenophorus maidis* Chittenden (кукурудзяний довгоносик); *S. livis* Vaurie (довгоносик цукрового очерету); *Rhabdoscelus obscurus* Boisduval (довгоносик цукрового очерету ново-гвінейський); білош, листоїдів огірка, личинок, що ушкоджують коріння, листоїдів, листоїдів картоплі й мінерів із сімейства Chrysomelidae, що включають, без обмеження: *Chaetocnema ectypa* Horn (білка кукурудзяна десертна); *C. pulicaria* Melsheimer (білка кукурудзяна); *Colaspis brunnea* Fabricius (лістоїд виноградний); *Diabrotica barberi* Smith & Lawrence (коренева личинка кукурудзи північна); *D. undecimpunctata howardi* Barber (коренева личинка кукурудзи південна); *D. virgifera virgifera* Leconte (коренева личинка кукурудзи західна); *Leptinotarsa decemlineata* Say (колорадський жук картоплі); *Oulema melanopus* Linnaeus (п'явица червоногруда); *hyllotreta cruciferae* Goeze (кукурудзяна білка); *Zygogramma exclamationis* Fabricius (хрущ соняшниковий); жуків із сімейства Coccinellidae, що включають, без обмеження: *Epilachna varivestis* Mulsant (жук бобовий мексиканський); хрущів і інших жуків із сімейства Scarabaeidae, що включають, без обмеження: *Antitrogon parvulus* Britton (хрущ очеретяний); *Cyclocephala borealis* Arrow (хрущ білий північний); *C. immaculata* Olivier (хрущ білий південний); *Dermolepida albobirtum* Waterhouse (хрущ очеретяний сірий); *Euethola humilis rugiceps* Leconte (точильник цукрового очерету); *Lepidota frenchi* Blackburn (очеретяний хрущ французький); *Tomarus gibbosus* De Geer (жучок морквяний); *T. subtropicus* Blatchley (жучок цукрового очерету); *Phyllophaga crinita* Burmeister (хрущ білий); *P. latifrons* Leconte (червневий хрущ); *Popillia japonica* Newman (японський хрущ); *Rhizotrogus majalis* Razoumowsky (хрущ європейський); килимових жуків із сімейства Dermestidae; проволочників із сімейства Elateridae, *Eleodes* spp., *Melanotus* spp., що включають *M. communis* Gyllenhal (проволочник); *Conoderus* spp.; *Limonius* spp.; *Agriotes* spp.; *Ctenicera* spp.; *Aeolus* spp.; короїдів із сімейства Scolytidae; жуків із сімейства Tenebrionidae; жуків із сімейства Cerambycidae, без обмеження, таких як *Migdolus fryanus* Westwood (жук деревний); і жуків із сімейства Buprestidae, що включають, без обмеження, *Aphanisticus cochinchinae seminulum* Obenberger (златка мінуюча).

У контексті даного винаходу представляють також інтерес дорослі й незрілі особини з порядку Diptera мінерів, що включають, *Agromyza parvicornis* Loew (моль-пестрянка кукурудзяна); галлиць, що включають, без обмеження: *Contarinia sorghicola* Coquillett (галлиця сорго); *Mayetiola destructor* Say (реccіанска муха); *Neolasioptera murtfeldtiana* Felt, (галлиця насіння соняшника); *Sitodiplosis mosellana* Gehin (біла галлиця); фруктових мух (Tephritidae), *Oscinella frit* Linnaeus (овсяніци); личинок, хробаків, що включають, без обмеження: *Delia* spp., що включають *Delia platura* Meigen (личинка кукурудзяних качанів); *D. coarctata* Fallen (муха озима); *Fannia canicularis* Linnaeus, *F. femoralis* Stein (кімнатні мухи малі); *Meromyza americana* Fitch (личинка стебел біла); *Musca domestica* Linnaeus (кімнатні мухи); *Stomoxys calcitrans* Linnaeus (жигалки звичайні); мух польових, жигалок коров'ячих малих, мух звичайних, *Chrysomya* spp.; *Phormia* spp.; і інших мухоподібних літаючих шкідників, кінських мух *Tabanus* spp.; носоглоткових гедзів *Gastrophilus* spp.; *Oestrus* spp.; гедзів бичачих *Hypoderma* spp.; золотоочок *Chrysops* spp.; *Melophagus ovinus* Linnaeus (рунци овечі); і інших представників *Brachycera*, комарів *Aedes* spp.; *Anopheles* spp.; *Culex* spp.; чорних мух *Prosimulium* spp.; *Simulium* spp.; мокреців, москітів, скиарид і інших представників *Nematocera*.

До галузі даного винаходу відносяться комахи, що представляють інтерес, з порядку Hemiptera без обмеження, такі як, комахи, що відносяться до наступних сімейств: Adelgidae, Aleyrodidae, Aphididae, Asterolecaniidae, Cercopidae, Cicadellidae, Cicadidae, Cixiidae, Coccidae, Coreidae, Dactylopiidae, Delphacidae, Diaspididae, Eriococcidae, Flatidae, Fulgoridae, Issidae, Lygaeidae, Margarodidae, Membracidae, Miridae, Ortheziidae, Pentatomidae, Phoenicococcidae, Phylloxeridae, Pseudococcidae, Psyllidae, Pyrrhocoridae and Tingidae.

Агрономічно значимі шкідники з порядку Hemiptera включають, без обмеження: *Acrosternum hilare* Say (щитники); *Acyrtosiphon pisum* Harris (попелиця горохова); *Adelges* spp. (хермеси); *Adelphocoris rapidus* Say (клоп швидкий); *Anasa tristis* De Geer (клоп-ромбовик сумний); *Aphis craccivora* Koch (попелиця вігні китайської); *A. fabae* Scopoli (попелиця квасолева чорна); *A. gossypii* Glover (бавовняна попелиця); *A. maidiradicis* Forbes (попелиця коренева кукурудзяна); *A. pomi* De Geer (яблунева попелиця); *A. spiraeola* Patch (попелиця спіреї); *Aulacaspis tegalensis* Zehntner (подушенниця цукрового очерету); *Aulacorthum solani* Kaltenbach (попелиця наперстянки); *Bemisia tabaci* Gennadius (тютюнова білокрилка, білокрилка батату); *B. argentifolii* Bellows & Perring (білокрилка магнолії); *Blissus leucopterus leucopterus* Say (клоп-черепашка пшеничний); *Blostomatidae* spp.; *Brevicoryne brassicae* Linnaeus (попелиця кабачкова); *Cacopsylla pyricola* Foerster (листоблішка грушева); *Calocoris norvegicus* Gmelin (попелиця картопляна звичайна); *Chaetosiphon fragaefolii* Cockerell (попелиця хлебнича); *Cimicidae* spp.; *Coreidae* spp.; *Corythucha gossypii* Fabricius (клоп бавовняний); *Cyrtopeltis modesta* Distant (клоп томатів); *C. notatus* Distant (кровосос); *Deois flavopicta* Stal (пінявка); *Dialeurodes citri* Ashmead (білокрилка цитрусових); *Diaphnocoris chlorionis* Say (клоп гледичії); *Diuraphis noxia* Kurdjumov/Mordvilko (попелиця біла російська); *Diplachionaspis divergens* Green (щитівка); *Dysaphis plantaginea* Raaserini (попелиця яблонна рожева); *Dysdercus suturellus* Herrich-Schaffer (кроноклоп бавовняний); *Dysmicoccus boninsis* Kuwana (войлочник цукрового очерету сирій); *Empoasca fabae* Harris (картопляний листоїд); *Eriosoma lanigerum* Hausmann (попелиця яблонна); *Erythroneoura* spp. (листоїди виноградні); *Eumetopina flavipes* Muir (кобилка цукрового очерету); *Eurygaster* spp.; *Euschistus servus* Say (булавник бурий); *E. variolarius* Palisot de Beauvois (щитник однокрапковий); *Graptostethus* spp. (група клопів, що поїдають насіння); *Hyalopterus pruni* Geoffroy (попелиця сливова звичайна); *Icerya purchasi* Maskell (червець австралійський жолобчастий); *Labopidicola allii* Knight (сліпняк цибулинний); *Laodelphax striatellus* Fallen (дельфацида бура мала); *Leptoglossus scurculus* Say (клоп сосновий); *Leptodictya tabida* Herrich-Schaeffer (мереживниця цукрового очерету); *Lipaphis erysimi* Kaltenbach (попелиця гірчична листовая); *Lygocoris pabulinus* Linnaeus (зелена попелиця звичайна); *Lygus lineolaris* Palisot de Beauvois (клоп трав'яний); *L. hesperus* Knight (клоп трав'яний західний); *L. pratensis* Linnaeus (луговий клоп звичайний); *L. rugulipennis* Poppius (клоп трав'яний європейський); *Macrosiphum euphorbiae* Thomas (попелиця картопляна); *Macrosteles quadrilineatus* Forbes (листоїд айстри); *Magisicada septendecim* Linnaeus (цикада звичайна); *Mahanarva fimbriolata* Stal (пінявка цукрового очерету); *M. posticata* Stål (цикада цукрового очерету мала); *Melanaphis sacchari* Zehntner (попелиця цукрового очерету); *Melanaspis glomerata* Green (клоп чорний); *Metopolophium dirhodum* Walker (попелиця розанно-злакова); *Myzus persicae* Sulzer (попелиця картопляно-персикова, зелена попелиця персиків); *Nasonovia ribisnigri* Mosley (попелиця латуків); *Nephotettix cincticeps* Uhler (зелена цикадка); *N. nigropictus* Stål (рисова цикадка); *Nezara viridula* Linnaeus (щитник зелений південний); *Nilaparvata lugens* Stål (цикадка коричнева); *Nysius ericae* Schilling (низіус вересковий); *Nysius raphanus* Howard (низіус вересковий); *Oebalus pugnax* Fabricius (щитник рисовий); *Oncopeltus fasciatus* Dallas (клоп молочаю великий); *Orthops campestris* Linnaeus; *Pemphigus* spp. (кореневі попелиці й галоові попелиці); *Peregrinus maidis* Ashmead (цикада кукурудзяна); *Perkinsiella saccharicida* Kirkaldy (дельфацида цукрового очерету); *Phylloxera devastatrix* Pergande (філооксера гікори); *Planococcus citri* Risso (повстяр цитрусових); *Plesiocoris rugicollis* Fallen (жучок яблонний); *Poecilocapsus lineatus* Fabricius (клоп чотиристрічковий); *Pseudatomoscelis seriatus* Reuter (цикадка бавовняна); *Pseudococcus* spp. (група інших червців борошнистих); *Pulvinaria elongata* Newstead (подушечниця трав'яна); *Pyrrilla perpusilla* Walker (цикадка цукрового очерету); *Pyrrhocoridae* spp.; *Quadraspidotus pemiciosus* Comstock (щитівка каліфорнійська); *Reduviidae* spp.; *Rhopalosiphum maidis* Fitch (попелиця листовая кукурудзяна); *R. padi* Linnaeus (попелиця черемхова звичайна); *Saccharicoccus sacchari* Cockerell (повстяр цукрового очерету рожевий); *Scaptocoris castanea* Perty (щитник кореневий бурий); *Schizaphis graminum* Rondani (попелиця злакова звичайна); *Sipha flava* Forbes (попелиця цукрового очерету жовта); *Sitobion avenae* Fabricius (зернова попелиця англійська); *Sogatella furcifera* Horvath (цикада білоспінна); *Sogatodes oryzicola* Muir (дельфацида рисова); *Spanagonicus albofasciatus* Reuter (попелиця біла смугаста); *Therioaphis maculata* Buckton (попелиця люцернова плямиста); *Tinidae* spp.; *Toxoptera*

aurantii Boyer de Fonscolombe (попелиця цитрусових чорна); і *T. citricida* Kirkaldy (попелиця цитрусових буре); *Trialeurodes abutiloneus* (смуриста білокрилка) і *T. vaporariorum* Westwood (білокрилка теплична); *Trioza diospyri* Ashmead (листоблішка хурмова); і *Typhlocyba pomaria* McAtee (цикада яблонна біла).

До галузі даного винаходу також включаються дорослі особини й личинки шкідників з порядку Acari (зудні, кліщі), такі як *Aceha tosichella* Keifer (білий кліщ); *Panonychus ulmi* Koch (кліщ червоний плодовий); *Petrobia latens* Miiller (кліщ біло-бурий смугастий); *Steneotarsonemus bancrofti* Michael (кліщ цукрового очерету); павутинні кліщі й кліщі червоні плодові із сімейства Tetranychidae, *Oligonychus grypus* Baker & Pritchard, *O. indicus* Hirst (аркушевий кліщ цукрового очерету); *O. pratensis* Banks (кліщ трав'яний), *O. stickneyi* McGregor (павутинний кліщ цукрового очерету); *Tetranychus urticae* Koch (павутинний кліщ двокрапковий); *T. mcdanieli* McGregor (кліщ МакДаниеля); *T. cinnabarinus* Boisduval (червоний павутинний кліщ); *T. Turkestani* Ugarov & Nikolski (путинний кліщ полуниці), широкі кліщі із сімейства Tenuipalpidae, *Brevipalpus lewisii* McGregor (широкий кліщ цитрусових); ржавчинні й брунькові кліщі із сімейства Eriophyidae і інші листові кліщі й кліщі, важливі для здоров'я людини й тварин, тобто пилові кліщі із сімейства Epidermoptidae, железниці із сімейства Demodicidae, зернові кліщі із сімейства Glycyphagidae, зудні з порядку іксодових Ixodidae; *Ixodes scapularis* Say (чорноногий кліщ); *I. holocyclus* Neumann (кліщ австралійського паралічу); *Dermacentor variabilis* Say (іксодовий кліщ собачий); *Amblyomma americanum* Linnaeus (іксодовий кліщ Amblyomma); а також парша й коростяний кліщ із сімейств Psoroptidae, Pyemotidae і Sarcoptidae.

Шкідники, що представляють інтерес, з порядку Thysanura включають таких шкідників, як *Lepisma saccharina* Linnaeus (железниця); *Thermobia domestica* Packard (домашня лусочниця).

Інші комахи-шкідники, що відносяться до галузі даного винаходу і представляють інтерес, включають: павутинних кліщів з порядку Araneae, таких як *Loxosceles reclusa* Gertsch & Mulaik (коричневий павутинний пустельник); і *Latrodectus mactans* Fabricius (павук "чорна вдова"); і багатоніжок з порядку Scutigermorpha, таких як *Scutigera coleoptrata* Linnaeus (мухоловка звичайна). Додатково, представляють також інтерес комахи-шкідники з порядку Isoptera комах, що включають, комах-шкідників із сімейства Termitidae, таких як, без обмеження, *Cornitermes cumulans* Kollar, *Cylindrotermes nordenskiöldi* Holmgren і *Pseudacanthotermes militaris* Hagen (sugarcane termite); а також комах-шкідників із сімейства Rhinotermitidae, що включають, без обмеження, *Heterotermes tenuis* Hagen. Представляють також інтерес, у контексті даного винаходу, комах-шкідники з порядку Thysanoptera, що включають, без обмеження, трипсів, таких як *Stenchaetothrips minutus* van Deventer (трипси цукрового очерету).

Комах-шкідників можуть бути протестовані на пестицидну активність композиції за даним винаходом на ранніх стадіях розвитку, наприклад, таких як личинки або інші незрілі форми. Комахи можуть вигодовувати в повній темряві при температурі від приблизно 20 °C до приблизно 30 °C і при відносній вологості від приблизно 30 % до приблизно 70 %. Біотести можуть проводитися по процедурі, описаній Czaplá and Lang (1990) J. Econ. Entomol. 83(6): 2480-2485. Способи вигодовування личинок комах і проведення біотестів відомі фахівцям у даній галузі.

Для фахівців у даній галузі відома безліч процедур проведення біотестів. В основному, такі процедури включають додавання досліджуваної сполуки або організму до джерела їжі в закритому контейнері. Пестицидна активність може бути визначена, без обмеження, по зміні рівня смертності комах, втраті ваги, атрактивності, репелентності й іншим біхевіоральними і фізичним змінам після вигодовування й через деякий період часу. Описані біотести можуть використовуватися в комбінації з будь-якою їжею для комах-шкідника на стадії личинки або дорослої стадії.

Наведені нижче приклади дані для ілюстрації даного винаходу, але жодним чином не обмежують його галузь.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Приклад 1: Біотест для визначення пестицидної активності токсину *B. thuringiensis* проти обраних комах

Біотести проводилися для оцінки ефектів пептидів інсектицидного токсину, показаних у вигляді SEQ ID NO: 2 і 4, на обраних комах-шкідників, наведених у таблиці 1.

Тести по годівлі проводили з використанням штучної дієти, що містить інсектицидний білок. Інсектицидний білок вносили місцево з використанням штучного корму, специфічного для лускокрилих. Токсин вносили в кількості 0,3 мг на 25 мкл зразка в лунку й залишали для висушування. Білок перебував в 10 мМ карбонатного буфера при pH 10. Одну новонароджену личинку поміщали в кожну лунку для годівлі ad libitum на 5 днів. Результати виражали у вигляді позитивних, стосовно до личинок, реакцій, таких як зупинка росту або смертність. Результати

виражали як негативні, якщо личинки виглядали як негативний контроль, який являв собою корм, що містить тільки зазначений вище буфер.

Таблиця 1:

Результати біотестів по годівлі з використанням SEQ ID NO: 2 і 4

Досліджувана комаха	Результат SID: 2	Результат SID: 4
Метелик кукурудзяний (<i>Ostnia nubilalis</i>)	+	+
Совка трав'яна (<i>Spodoptera frugiperda</i>)	+	+
Совка іпсилон (<i>Agrotis ipsilon</i>)	+	+
Совка бавовняна (<i>Heliothis zea</i>)	+	+
Вогнівка кукурудзяна південно-західна (<i>Diatraea grandiosella</i>)	+	-
П'ядак соєвий (<i>Pseudoplusia includens</i>)	+	+

5 Слід зазначити, що відмінність в одній амінокислоті між SEQ ID NO: 2 і SEQ ID NO: 4 міняє спектр шкідників, проти яких пептид має активність. Як видно з наведеної таблиці, відмінність по одній амінокислоті видаляє активність проти вогнівки кукурудзяної південно-західної.

Приклад 2: Трансформація кукурудзи при бомбардуванні частками й регенерація трансгенних рослин

10 Незрілі зародки кукурудзи з тепличних донорних рослин бомбардували молекулою ДНК, що містить нуклеотидну послідовність токсину (наприклад, SEQ ID NO: 1 або 3), оперативно пов'язану із промотором убіхітину й селектуємим маркерним геном PAT (Wohlleben et al. (1988) Gene 70: 25-37), який надає стійкість до гербіциду білафосу. Альтернативно, селектовуваний маркерний ген перебував на окремій молекулі ДНК. Трансформацію проводили по зазначеній

15 нижче процедурі. Нижче також описаний склад використаних середовищ.
Одержання цільової тканини
Колосся слущували й поверхню стерилізували в 30 % CLOROX™ плюс 0,5 % детергенту Місро протягом 20 хвилин, після чого промивали два рази стерильною водою. Незрілі зародки вирізали й поміщали лицьовою стороною вниз (щитком зародка нагору), по 25 зародків на

20 планшет, на середовище 560Y протягом 4 годин і потім зіставляли із цільовою зоною довжиною 2,5 см у препараті для бомбардування.
Одержання ДНК
Одержували плазмідний вектор, що включає нуклеотидну послідовність токсину (наприклад, SEQ ID NO 1 або 3), оперативно пов'язану із промотором убіхітину. Наприклад підходящий

25 вектор трансформації включає промотор UBI1 з Zea mays, 5'-UTR з UBI1 і інтрон UBI1, у комбінації з термінатором PinII. Вектор додатково містить селектовуваний маркерний ген PAT, що направляється промотором з CAMV35S, і включає термінатор з CAMV35S. Необов'язково, селектовуваний маркерний ген перебував на окремій плазміді. Молекулу ДНК, що включає нуклеотидну послідовність токсину й селектовуваний маркерний ген PAT, осаджували на

30 вольфрамових кульках, розміром 1,1 мкм (середній діаметр) по процедурі, що включає використання CaCl_2 , у такий спосіб: брали 100 мкл підготовлених вольфрамових часток у воді, 10 мкл (1 мкг) ДНК у буфері Трис-ЕДТА (1 мкг сумарної ДНК), 100 мкл 2,5М CaCl_2 і 10 мкл 0,1 М спермідину.
Кожний реагент додавали послідовно до суспензії вольфрамових часток, при перемішуванні

35 у вихровому змішувачі. Готову суміш озвучували протягом короткого часу й інкубували при постійному вихровому перемішуванні протягом 10 хвилин. Після завершення періоду осадження, пробірки центрифугували протягом короткого періоду часу, рідину видаляли, промивали 500 мл 100 % етанолу й центрифугували протягом 30 секунд. Рідину знову видаляли й додавали 105 мкл до готових вольфрамових кульок. Для проведення бомбардування

40 частками, частки вольфраму/ДНК озвучували протягом короткого періоду часу й наносили у вигляді плями в кількості 10 мкл у центр кожного макроносія й висушували протягом приблизно 2 хвилин перед бомбардуванням.
Бомбардування частками
Планшети зі зразками бомбардували протягом 4 раз із використанням біобалістичної пушки

45 #HE34-1 або #HE34-2. Усі зразки одержали один постріл при 650 PSI, і в цілому було відібрано десять аліквот з кожної пробірки з отриманими частками/ДНК.

Наступна обробка

Після бомбардування, зародки витримували на середовищі 560Y протягом 2 днів, потім переносили в селективне середовище 560R, що містить 3 мг/літр біалафосу, і проводили субкультивування кожні 2 тижня. Приблизно через 10 тижнів після селекції, стійкі, за даними
 5 добору, клони калюсу переносили в середовище 288J для початку регенерації рослини. Після дозрівання соматичного зародка (2-4 тижня), добре розвинені соматичні зародки переносили в середовище для проростання й переміщали у світлу кімнату для культивування. Приблизно через 7-10 днів рослини, що розвилися, переносили в не утримуючу гормон середовище 272V у пробірку на 7-10 днів до гарного встановлення рослини. Потім рослини переносили в підсобні
 10 приміщення в судини (які були еквівалентно 2,5" вегетаційної судини), що містять ґрунт для вегетування й ростили протягом 1 тижня в ростовій камері, після чого ростили ще 1-2 тижня в теплиці й потім переносили в класичні вегетаційні судини 600 (1,6 галонів) і ростили до дозрівання. Отримані рослини оглядали й оцінювали експресію токсину по відомих у даній галузі тестах або по описаній нижче процедурі.

Бомбардування й культуральні середовища

Середовище для бомбардування (560Y) включає 4,0 г/л базальних солей N6 (SIGMA C-1416), 1,0 мл /л вітамінної суміші Ерикссона (1000x SIGMA-1511), 0,5 мг/л тіаміну-HCl, 120,0 г/л сахарози, 1,0 мг/л 2,4-D і 2,88 г/л L-проліну (доводять до потрібного об'єму деіонізованою водою
 20 с наступним коректуванням до pH 5,8 з використанням KOH); 2,0 г/л Gelrite™ (уводиться після доведення об'єму деіонізованою водою); і 8,5 мг/л нітрату срібла (додається після стерилізації середовища й охолодження до кімнатної температури). Середовища для селекції (560R) включає 4,0 г/л базальних солей N6 (SIGMA C-1416), 1,0 мл /л вітамінної суміші Ерикссона (1000x SIGMA-1511), 0,5 мг/л тіаміну-HCl, 30,0 г/л сахарози й 2,0 мг/л 2,4-D (доводять обсяг деіонізованої H₂O з наступним коректуванням pH до 5,8 з використанням KOH); 3,0 г/л Gelrite™
 25 (додають після доведення об'єму деіонізованої H₂O); і 0,85 мг/л нітрату срібла й 3,0 мг/л біалафосу (обоє речовини додають після стерилізації суміші й охолодження до кімнатної температури).

Середовище для регенерації рослин (288J) включає 4,3 г/л солей MS (GIBCO 11117-074), 5,0 мл /л концентрованого розчину вітамінів MS (0,100 г нікотинової кислоти, 0,02 г/л тіаміну-HCl, 0,10 г/л піридоксину-HCl і 0,40 г/л гліцину, доведеного до об'єму очищеною деіонізованою водою) (Murashige and Skoog (1962) *Physiol. Plant.* 15:473), 100 мг/л міоінозиту, 0,5 мг/л зеатину, 60 г/л сахарози й 1,0 мл /л 0,1 мМ абсцизової кислоти (доводять до об'єму очищеною деіонізованою водою після корекції до pH 5,6); 3,0 г/л Gelrite™ (додають після доведення об'єму деіонізованою водою) і 1,0 мг/л індолоцтової кислоти й 3,0 мг/л біалафосу (додають після
 35 стерилізації середовища й охолодження до 60 °C).

Не утримуюче гормонів середовище (272V) включає 4,3 г/л солей MS (GIBCO 11117-074), 5,0 мл /л концентрованого розчину вітамінів MS (0,100 г/л нікотинової кислоти, 0,02 г/л тіаміну-HCl, 0,10 г/л піридоксину-HCl і 0,40 г/л гліцину, доведеного до об'єму очищеною деіонізованою водою), 0,1 г/л міоінозиту й 40,0 г/л сахарози (доводять до об'єму очищеною деіонізованою водою після корекції pH до 5,6); і 6 г/л бакто-агару (додають після доведення об'єму очищеною деіонізованою водою), стерилізують і охолоджують до 60 °C.

Приклад 3: Трансформація кукурудзи з використанням *Agrobacterium* і регенерація трансгенних рослин

Для трансформації кукурудзи, з використанням *Agrobacterium*, нуклеотидної послідовності токсину (наприклад, SEQ ID NO: 1 або 3), може бути використаний метод Zhao (патент США No. 5981840 і публікація по PCT патенту W098/32326, вміст яких включено в даний винахід як посилання). Загалом, процедура полягає в тому, що незрілі зародки виділяють із кукурудзи, і зазначені зародки приводять у контакт із суспензією *Agrobacterium* в умовах, у яких бактерії здатні переносити нуклеотидну послідовність токсину (SEQ ID NO: 1 або 3) щонайменше в одну клітину щонайменше одного з незрілих зародків (стадія 1: стадія інфікування). На цій стадії, незрілі зародки можуть бути занурені в суспензію *Agrobacterium* для початку інокуляції. Зародки піддають спільному культивуванню з *Agrobacterium* протягом певного періоду часу (стадія 2: стадія спільної культивації). Незрілі зародки можуть культивуватися на твердому середовищі після стадії інфекції. Після завершення періоду спільного культивування, уводиться необов'язкова стадія "спокою". На даній стадії спокою, зародки інкубують у присутності щонайменше одного антибіотика, у відношенні якого відомо, що він інгібує ріст *Agrobacterium*, без додавання селективного агента для рослинних трансформантів (стадія 3: стадія спокою). Незрілі зародки можуть культивуватися на твердому середовищі з антибіотиком, але без селективного агента, для видалення *Agrobacterium* і для здійснення фази спокою інфікованих
 60 клітин. Далі, інокульовані зародки культивують на середовищі, що містить селективний агент, і

відновлюють зростаючий трансформований калюс (стадія 4: стадія селекції). Незрілі ембріони культивують на твердому середовищі із селективним агентом, що приводить до селективного росту трансформованих клітин. Далі калюс відновлюють до рослин (стадія 5: стадія регенерації), і калюси, що ростуть на селективному середовищі, можуть культивуватися на твердому середовищі для регенерації рослин.

Приклад 4: Трансформація зародків сої

Зародки сої бомбардували з використанням плазмиди, що містить нуклеотидну послідовність токсину SEQ ID NO: 1 або 3, оперативно пов'язану із промотором *pinII*, по зазначеній нижче процедурі. Для індукції соматичних зародків, котиледони, довжиною 3-5 мм, вирізали з незрілого насіння, після поверхневої стерилізації, із сої відповідного сорту й культивували на світлі або в темряві при температурі 26 °C на відповідному агаровому середовищі протягом шести-десяти тижнів. Соматичні зародки, продукуючі вторинні зародки, потім вирізали й поміщали в підходяще рідке середовище. Після повторної селекції кластерів соматичних зародків, які розмножувалися досить рано, а також глобулярних зародків, суспензії підтримували по описаній нижче процедурі.

Суспензійні культури соєвих зародків можна підтримувати в 35 мл рідкого середовища на роторній качалці, зі швидкістю 150 про/хв., при температурі 26 °C під флуоресцентним світлом, зі світло-темним періодом, що становить 16:8 годин. Культури піддавали субкультивуванню кожні два тижні при інокуляції приблизно 35 мг тканини в 35 мл рідкого середовища.

Потім ембріогені суспензійні культури сої можуть бути трансформовані по методу бомбардування частками з біобалістичної пушки (Klein et al. (1987) *Nature* (London) 327: 70-73, патент США No. 4945050). Для таких трансформацій може використовуватися прилад Du Pont Biolistic PDS1000/HE (гелієвий варіант).

Селектовуваний маркерний ген, який може використовуватися для полегшення трансформації сої, являє собою трансген, що складається із промотору 35S з вірусу мозаїки кольорової капусти (Odell et al. (1985) *Nature* 313: 810-812), гена фосфотрансфери гігроміцину із плазмиди pJR225 (з *E. coli*; Gritz et al. (1983) *Gene* 25:179-188) і 3'-ділянки гена нопалін-синтази з Т-ДНК Ti плазмиди з *Agrobacterium tumefaciens*. Касета експресії, що включає нуклеотидну послідовність токсину (наприклад, SEQ ID NO: 1 або 3), оперативно пов'язану із промотором *pinII*, може бути виділена у вигляді фрагмента рестрикції. Даний фрагмент може бути потім вбудований в унікальний сайт рестрикції вектора, що містить маркерний ген.

До 50 мкл додають суспензії золотих часток розміром 1 мкм із концентрацією 60 мг/мл (у зазначеному порядку): 5 мкл ДНК (1 мг/мкл), 20 мкл спермідину (0,1 M) і 50 мкл CaCl_2 (2,5 M). Препарат часток потім перемішують протягом трьох хвилин, центрофугують у мікроцентрифугі протягом 10 і видаляють супернатант. Далі частки із ДНК-покриттям промивають один раз в 400 мкл 70 % етанолу й ресуспендують в 40 мкл безводного етанолу. Суспензія ДНК/часток може бути оброблена ультразвуком протягом трьох раз по одній секундці щораз. Потім на кожний диск макроносія вносять по п'ять мікролітрів золотих часток із ДНК-покриттям.

Приблизно 300-400 мг двотижневої суспензійної культури вносять у порожню чашку Петри розміром 60 × 15 мм рідину, що залишився, видаляють із тканини піпеткою. Звичайно, при кожному експерименті трансформації, бомбардуванню піддають приблизно 5-10 планшетів для тканини. Тиск, при якому відбувається розрив мембрани, установлюють на рівні 1100 фунт/дюйм², і з камери відкачують повітря до рівня 28 дюймів ртутного стовпа. Тканину поміщають приблизно на відстані 3,5 дюймів від утримуючого екрана й проводять потрібне бомбардування. Після бомбардування, тканина може бути розділена навпіл, і її вносять знову в рідину й культивують, як було описано вище.

Через п'ять-сім днів після бомбардування, рідкі середовища можуть бути замінені свіжим середовищем, а через одинадцять-дванадцять днів після бомбардування - свіжим середовищем, що містить 50 мг/мг гігроміцину. Зазначене середовище може замінитися щотижня. Через сім-вісім тижнів після бомбардування, можна спостерігати зелену трансформовану тканину, що росте з нетрансформованих некротичних ембріогенних кластерів. Виділену зелену тканину відбирають і інокують в окремі колби для одержання нових, що клонально розмножуються, трансформованих ембріогенних суспензійних культур. Кожна нова лінія може розглядатися як незалежне явище трансформації. Зазначені суспензії далі можуть бути піддані субкультивуванню й підтримуватися у вигляді кластерів незрілих зародків або можуть бути регенеровані при дозріванні й проростанні окремих соматичних зародків.

Усі публікації, патенти й патентні заявки, наведені в описі, указують на досягнутий рівень у тій галузі, до якої відноситься даний винахід. Усі публікації, патенти й патентні заявки наведені в даному описі в тому виді й у тому ступені, які враховують відповідність кожної конкретно

зазначеної публікації, кожного конкретно зазначеного патенту або кожної конкретно зазначеної патентної заявки справжньому винаходу.

Незважаючи на те, що наведений вище винахід був докладно описаний за допомогою ілюстрацій і прикладів, даних для більш повного його розуміння в галузь даного винаходу, мабуть у всіх варіантах його здійснення, можуть бути введені деякі зміни й модифікації.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> – Pioneer Hi-Bred International, Inc.;

<120> Новий ген *Bacillus thuringiensis* з активністю проти Lepidopteran

<130> 3101-РСТ

<150> 61/146,708

<151> 2009-01-23

<150> 61/146,711

<151> 2009-01-23

<160> 4 – ДНК;

<170> – Fastseq для windows, версія 4.0.1.1

<210> 1 – Pioneer Hi-Bred International, Inc.

<211> 7392

<212> DNA

<213> *Bacillus thuringiensis*

<220>

<221> misc_feature

<222> (0)...(0)

<223> 4C6

<400> 1 – Pioneer Hi-Bred International, Inc.;

atgacttcaa	ataggaaaaa	tgagaatgaa	attataaatg	ccttatcgat	tccagctgta	60
tcgaatcatt	ccgcacaaat	ggatctatcg	ctagatgctc	gtattgagga	ttctttgtgt	120
atagccgagg	ggaataatat	caatccactt	gttagcgcat	caacagtgca	aacgggtata	180
aacatagctg	gtagaatatt	gggcgtatta	gggtgtccgt	ttgctggaca	actagctagt	240
ttttatagtt	ttcttgtttg	ggaattatgg	cctagtggca	gagatccatg	ggaaattttc	300
ctggaacatg	tagaacaact	tataagacaa	caagtaacag	aaaatactag	gaatacggct	360
attgctcgat	tagaaggctt	aggaagaggc	tatagatctt	accagcaggc	tcttgaaact	420
tgggttagata	accgaaatga	tgcaagatca	agaagcatta	ttcttgagcg	ctatgtttgt	480
ttagaacttg	acattactac	tgctataccg	cttttcagaa	tacgaaatga	agaagttcca	540
ttattaatgg	tatatgctca	agctgcaaat	ttacacctat	tattattgag	agacgcatcc	600
cttttttggt	gtgaatgggg	gatggcatct	tccgatgtta	accaatatta	ccaagaacaa	660
atcagggtata	cagaggaata	ttctaaccat	tgcgtaaca	gggtataata	agggctaaat	720
aacttaagag	ggacaaatgc	tgaaagttag	ctgcggtata	atcaattccg	tagagacctt	780
acgttagggg	tattagattt	agtagcccta	ttcccaagct	atgatactcg	cacttatcca	840
atcaatacga	gtgctcagtt	aacaagagaa	atttatacag	atccaattgg	gagaacaaat	900
gcacettcag	gatttgcaag	tacgaattgg	tttaataata	atgcaccatc	gttttctgcc	960
atagaggctg	ccattttcag	gcctccgcat	ctacttgatt	ttccagaaca	acttacaatt	1020
tacagtgcac	caagccgttg	gagtagcact	caacatatga	attattgggt	gggacatagg	1080
cttaacttcc	gcccaatagg	agggacatta	aatacctcaa	cacaaggact	tactaataat	1140
acttcaatta	atcctgtaac	attacagttt	acgtctcgtg	acgtttatag	aacagaatca	1200
aatgcaggga	caaataactt	atttactact	cctgtgaatg	gagtaccttg	ggctagattt	1260
aattttataa	accctcagaa	tatttatgaa	agaggcgcca	ctacctacag	tcaaccgtat	1320
cagggagttg	ggattcaatt	atttgattca	gaaactgaat	taccaccaga	aacaacagaa	1380
cgaccaaatt	atgaatcata	tagtcataga	ttatctcata	taggactaat	cataggaaac	1440
actttgagag	caccagtcta	ttcttggacg	catcgtagtg	cagatcgtag	gaatacgaat	1500
ggaccaaata	gaattactca	aattcctgca	gtgaaggga	gatttctttt	taatggttct	1560
gtaatttcag	gaccaggatt	tactggtgga	gacgtagtta	gattgaatag	gaataatggt	1620
aatattcaaa	atagagggtt	tattgaagtt	ccaattcaat	tcacgtcgac	atctaccaga	1680
tatcgagttc	gagtacgtta	tgcttctgta	acctcgattg	agctcaatgt	taatttgggc	1740
aattcatcaa	tttttacgaa	cacattacca	gcaacagctg	catcattaga	taattctaca	1800
tcaggggatt	ttggttatgt	tgaaatcaac	aatgctttta	catccgcaac	aggtaatata	1860
gtaggtgcta	gaaattttag	tgcaaatgca	gaagtaataa	tagacagatt	tgaatttatc	1920
ccagttactg	caaccttcga	ggcagaatat	gatttagaaa	gagcacaaaa	ggcgggtgaat	1980
gccctgttta	cttctacaaa	tccaagaaga	ttgaaaacag	atgtgacaga	ttatcatatt	2040
gaccaagtgt	ccaatatggt	ggcatgttta	tcagatgaat	tttgcttggg	tgagaagcga	2100
gaattatttg	agaaagtga	atatgcgaag	cgactcagtg	atgaaagaaa	cttactccaa	2160
gatccaaact	tcacattcat	cagtgggcaa	ttaagtttcg	catccatcga	tggaacatca	2220
aacttcacct	ctattaatga	gctatctgaa	ctatggatgg	ggggaagtga	gaattgttacc	2280
attcaggaag	ggaatgacgt	atttaaagag	aattacgtca	cactaccggg	tacttttaat	2340
gagtgttatc	caaattattt	atatcaaaaa	ataggagagt	cagaattaaa	agcttatacg	2400

```

gttcacgga tccacgagc ttatcttcca gaactacctt tcattccagg aataaatgcg 6720
gtgatttttg aagaattaga aaatcgattt tctactgcgt tctccttata cgaatgcgaga 6780
aatgtcatta aaaatggcga ttcaataaat ggccttatcat gctggaacgt aaaagggcga 6840
gtagatgtac aacagagcca tcacgtttct gaccttggtt tcccagaatg ggaagcagaa 6900
gtgtcacaaag cagttcgcgt ttgtccgggg cgtggctata tccttcgtgt cacagcgta 6960
aaagagggat atggagaggg ctgcgtaacg atccatgaaa tcgagaacaa tacagacgaa 7020
ctaaaattta aaaactgtga agaagaggaa gtgtatccaa cggatacagg aacgtgtaat 7080
gattatactg cacaccaagg tacagcagca tgtaattccc gtaatgctgg atatgaggat 7140
gcatatgaag ttgatactac agcatctgtt aattacagac cgacttatga agaagaaacg 7200
tatacagatg tacgaagaga taatcattgt gaatatgaca gagggatgt gaattatcca 7260
ccagtaccag ctggttatgt gacaaaagaa ttagaatact tcccagaaac agatacagta 7320
tggattgaga ttggagaaac ggaaggaaag tttattgtag atagcgtgga actactctc 7380
atggaagaat ag 7392

```

<210> 2 - Новий ген *Bacillus thuringiensis* з активністю проти *Lepidoptera*;

<211> 1231

<212> PRT

<213> *Bacillus thuringiensis*

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (0)...(0)

<223> 4C6

<400> 2 - Новий ген *Bacillus thuringiensis* з активністю проти *Lepidoptera*;

```

Met Thr Ser Asn Arg Lys Asn Glu Asn Glu Ile Ile Asn Ala Leu Ser
1      5      10      15
Ile Pro Ala Val Ser Asn His Ser Ala Gln Met Asp Leu Ser Leu Asp
20      25      30
Ala Arg Ile Glu Asp Ser Leu Cys Ile Ala Glu Gly Asn Asn Ile Asn
35      40      45
Pro Leu Val Ser Ala Ser Thr Val Gln Thr Gly Ile Asn Ile Ala Gly
50      55      60
Arg Ile Leu Gly Val Leu Gly Val Pro Phe Ala Gly Gln Leu Ala Ser
65      70      75      80
Phe Tyr Ser Phe Leu Val Gly Glu Leu Trp Pro Ser Gly Arg Asp Pro
85      90      95
Trp Glu Ile Phe Leu Glu His Val Glu Gln Leu Ile Arg Gln Gln Val
100     105     110
Thr Glu Asn Thr Arg Asn Thr Ala Ile Ala Arg Leu Glu Gly Leu Gly
115     120     125
Arg Gly Tyr Arg Ser Tyr Gln Gln Ala Leu Glu Thr Trp Leu Asp Asn
130     135     140
Arg Asn Asp Ala Arg Ser Arg Ser Ile Ile Leu Glu Arg Tyr Val Ala
145     150     155     160
Leu Glu Leu Asp Ile Thr Thr Ala Ile Pro Leu Phe Arg Ile Arg Asn
165     170     175
Glu Glu Val Pro Leu Leu Met Val Tyr Ala Gln Ala Ala Asn Leu His
180     185     190
Leu Leu Leu Leu Arg Asp Ala Ser Leu Phe Gly Ser Glu Trp Gly Met
195     200     205
Ala Ser Ser Asp Val Asn Gln Tyr Tyr Gln Glu Gln Ile Arg Tyr Thr
210     215     220
Glu Glu Tyr Ser Asn His Cys Val Gln Trp Tyr Asn Thr Gly Leu Asn
225     230     235     240
Asn Leu Arg Gly Thr Asn Ala Glu Ser Trp Leu Arg Tyr Asn Gln Phe
245     250     255
Arg Arg Asp Leu Thr Leu Gly Val Leu Asp Leu Val Ala Leu Phe Pro
260     265     270
Ser Tyr Asp Thr Arg Thr Tyr Pro Ile Asn Thr Ser Ala Gln Leu Thr
275     280     285
Arg Glu Ile Tyr Thr Asp Pro Ile Gly Arg Thr Asn Ala Pro Ser Gly
290     295     300
Phe Ala Ser Thr Asn Trp Phe Asn Asn Asn Ala Pro Ser Phe Ser Ala
305     310     315     320
Ile Glu Ala Ala Ile Phe Arg Pro Pro His Leu Leu Asp Phe Pro Glu
325     330     335
Gln Leu Thr Ile Tyr Ser Ala Ser Ser Arg Trp Ser Ser Thr Gln His
340     345     350
Met Asn Tyr Trp Val Gly His Arg Leu Asn Phe Arg Pro Ile Gly Gly
355     360     365

```



```

Thr Leu Asn Thr Ser Thr Gln Gly Leu Thr Asn Asn Thr Ser Ile Asn
370 375
Pro Val Thr Leu Gln Phe Thr Ser Arg Asp Val Tyr Arg Thr Glu Ser
385 390
Asn Ala Gly Thr Asn Ile Leu Phe Thr Thr Pro Val Asn Gly Val Pro
405 410
Trp Ala Arg Phe Asn Phe Ile Asn Pro Gln Asn Ile Tyr Glu Arg Gly
420 425
Ala Thr Thr Tyr Ser Gln Pro Tyr Gln Gly Val Gly Ile Gln Leu Phe
435 440
Asp Ser Glu Thr Glu Leu Pro Pro Glu Thr Thr Glu Arg Pro Asn Tyr
450 455
Glu Ser Tyr Ser His Arg Leu Ser His Ile Gly Leu Ile Ile Gly Asn
465 470
Thr Leu Arg Ala Pro Val Tyr Ser Trp Thr His Arg Ser Ala Asp Arg
485 490
Thr Asn Thr Ile Gly Pro Asn Arg Ile Thr Gln Ile Pro Ala Val Lys
500 505
Gly Arg Phe Leu Phe Asn Gly Ser Val Ile Ser Gly Pro Gly Phe Thr
515 520
Gly Gly Asp Val Val Arg Leu Asn Arg Asn Asn Gly Asn Ile Gln Asn
530 535
Arg Gly Tyr Ile Glu Val Pro Ile Gln Phe Thr Ser Thr Ser Thr Arg
545 550
Tyr Arg Val Arg Val Arg Tyr Ala Ser Val Thr Ser Ile Glu Leu Asn
555 560
Val Asn Leu Gly Asn Ser Ser Ile Phe Thr Asn Thr Leu Pro Ala Thr
570 575
Ala Ala Ser Leu Asp Asn Leu Gln Ser Gly Asp Phe Gly Tyr Val Glu
580 585
Ile Asn Asn Ala Phe Thr Ser Ala Thr Gly Asn Ile Val Gly Ala Arg
595 600
Asn Phe Ser Ala Asn Ala Glu Val Ile Ile Asp Arg Phe Glu Phe Ile
610 615
Pro Val Thr Ala Thr Phe Glu Ala Glu Tyr Asp Leu Glu Arg Ala Gln
625 630
Lys Ala Val Asn Ala Leu Phe Thr Ser Thr Asn Pro Arg Arg Leu Lys
640 645
Thr Asp Val Thr Asp Tyr His Ile Asp Gln Val Ser Asn Met Val Ala
655 660
Cys Leu Ser Asp Glu Phe Cys Leu Asp Glu Lys Arg Glu Leu Phe Glu
665 670
Lys Val Lys Tyr Ala Lys Arg Leu Ser Asp Glu Arg Asn Leu Leu Gln
675 680
Asp Pro Asn Phe Thr Phe Ile Ser Gly Gln Leu Ser Phe Ala Ser Ile
685 690
Asp Gly Gln Ser Asn Phe Thr Ser Ile Asn Glu Leu Ser Glu His Gly
695 700
Trp Trp Gly Ser Glu Asn Val Thr Ile Gln Glu Gly Asn Asp Val Phe
705 710
Lys Glu Asn Tyr Val Thr Leu Pro Gly Thr Phe Asn Glu Cys Tyr Pro
715 720
Asn Tyr Leu Tyr Gln Lys Ile Gly Glu Ser Glu Leu Lys Ala Tyr Thr
725 730
Arg Tyr Gln Leu Arg Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln Asp Leu Glu Ile
735 740
Tyr Leu Ile Arg Tyr Asn Ala Lys His Glu Thr Leu Asp Val Pro Gly
745 750
Thr Asp Ser Leu Trp Pro Leu Ser Val Lys Ser Pro Ile Gly Arg Cys
755 760
Gly Glu Pro Asn Arg Cys Ala His Phe Glu Trp Asn Pro Asp Leu
765 770
Asp Cys Ser Cys Arg Asp Gly Glu Arg Cys Ala His His Ser His His
775 780
Phe Thr Leu Asp Ile Asp Val Gly Cys Thr Asp Leu His Glu Asn Leu
785 790
Gly Val Trp Val Val Phe Lys Ile Lys Thr Gln Glu Gly Tyr Ala Arg
795 800
Leu Gly Asn Leu Glu Phe Ile Glu Glu Lys Pro Leu Ile Gly Glu Ala
805 810
Leu Ser Arg Val Lys Arg Ala Glu Lys Lys Trp Arg Asp Lys Arg Glu
815 820
825 830
835 840
845 850
855 860
865 870
875 880
885 890
895 900
905 910
915 920
925

```

```

      930      935      940
Lys Leu Gln Leu Glu Thr Lys Arg Val Tyr Thr Glu Ala Lys Glu Thr
945      950      955      960
Val Asp Ala Leu Phe Val Asp Ser His Tyr Asn Arg Leu Gln Ala Asp
      965      970      975
Thr Asn Ile Gly Met Ile His Ala Ala Asp Arg Leu Val His Arg Ile
      980      985      990
His Glu Ala Tyr Leu Pro Glu Leu Pro Phe Ile Pro Gly Ile Asn Ala
      995      1000      1005
Val Ile Phe Glu Glu Leu Glu Asn Arg Ile Ser Thr Ala Phe Ser Leu
      1010      1015      1020
Tyr Asp Ala Arg Asn Val Ile Lys Asn Gly Asp Phe Asn Asn Gly Leu
1025      1030      1035      1040
Ser Cys Trp Asn Val Lys Gly His Val Asp Val Gln Gln Ser His His
      1045      1050      1055
Arg Ser Asp Leu Val Ile Pro Glu Trp Glu Ala Glu Val Ser Gln Ala
      1060      1065      1070
Val Arg Val Cys Pro Gly Arg Gly Tyr Ile Leu Arg Val Thr Ala Tyr
      1075      1080      1085
Lys Glu Gly Tyr Gly Glu Gly Cys Val Thr Ile His Glu Ile Glu Asn
      1090      1095      1100
Asn Thr Asp Glu Leu Lys Phe Lys Asn Cys Glu Glu Glu Glu Val Tyr
1105      1110      1115      1120
Pro Thr Asp Thr Gly Thr Cys Asn Asp Tyr Thr Ala His Gln Gly Thr
      1125      1130      1135
Ala Ala Cys Asn Ser Arg Asn Ala Gly Tyr Glu Asp Ala Tyr Glu Val
      1140      1145      1150
Asp Thr Thr Ala Ser Val Asn Tyr Arg Pro Thr Tyr Glu Glu Glu Thr
      1155      1160      1165
Tyr Thr Asp Val Arg Arg Asp Asn His Cys Glu Tyr Asp Arg Gly Tyr
      1170      1175      1180
Val Asn Tyr Pro Pro Val Pro Ala Gly Tyr Val Thr Lys Glu Leu Glu
1185      1190      1195      1200
Tyr Phe Pro Glu Thr Asp Thr Val Trp Ile Glu Ile Gly Glu Thr Glu
      1205      1210      1215
Gly Lys Phe Ile Val Asp Ser Val Glu Leu Leu Leu Met Glu Glu
      1220      1225      1230

```

<210> 3 -- Fastseq для windows, версия 4.0;

<211> 3696

<212> DNA

<213> Bacillus Thuringiensis

<220>

<221> misc_feature

<222> (0)...(0)

<223> 4C5

<400> 3 -- Fastseq для windows, версия 4.0;

```

atgacttcaa ataggaaaaa tgagaatgaa attataaatg ccttatcgat tccagctgta 60
tcgaatcatt ccgcacaaat ggatctatcg ctatagcttc gtattgagga ttctttgtgt 120
atagccgagg ggaataatat caatccactt gttagcgcac caacagtgca aacgggtata 180
aacatagctg gtagaatatatt gggcggtatta ggtgtgccgt ttgctggaca actagctagt 240
ttttatagtt ttcttggttg ggaattatgg cctagtggca gagatccatg ggaaattttc 300
ctggaacatg tagaacaact tataagacaa caagtaacag aaaatactag gaatacggct 360
attgtctgat tagaagggtct aggaaaaaggc tatagatctt accagcaggc tcttgaaact 420
tggttagata accgaaatga tgcaagatca agaagcatta ttcttgagcg ctatgttgc 480
ttagaacttg acattactac tgctataccg ctttcagaa tacgaaatga agaagttcca 540
ttattaatgg tatatgctca agctgcaaat ttacacctat tattattgag agacgcattc 600
ctttttggta gtgaatgggg galggcatct tccgatgtta accaatatta ccaagaacaa 660
atcagggtata cagaggaata ttctaaccat tgcgtacaat ggtataatac agggctaaat 720
aacttaagag ggacaaatgc tgaaagtggg ctgcggtata atcaattccg tagagacct 780
acgttagggg tattagattt agtagcccta ttccaagct atgatactcg cacttatcca 840
atcaatacga gtgctcagtt aacaagagaa atttatacag atccaattgg gagaacaaat 900
gcaccttcag gatttgcaag tacgaattgg ttttaataata atgcaccatc gttttctgcc 960
atagaggctg ccattttcag gcctccgcat ctacttgatt ttccagaaca acttacaatt 1020
tacagtgcac caagccgttg gagtagcact caacatatga attattgggt gggacatagg 1080
cttaacttcc gcccaatagg agggacatta aatacctcaa cacaaggact tactaataat 1140
acttcaatta atcctgtaac attacagttt acgtctcgtg acgtttatag aacagaatca 1200
aatgcaggga caaatatact atttactact cctgtgaatg gagtaccttg ggctagattt 1260

```


cgctatcaat	taagagggta	tattgaagat	agtcaagatc	tagagattta	tttaattcgt	2460
tacaatgcaa	agcatgaaac	attggatgtt	ccaggtaaccg	attccctatg	gccgctttca	2520
gttaaaagcc	caatcggaag	gtgaggagaa	ccaaatcgat	gcgcaccaca	ttttgaatgg	2580
aatccctgac	tagattgttc	ctgcagagat	ggagaaagat	gtgcgcatca	ttcccatcat	2640
ttcactttgg	atattgatgt	tggatgcaca	gacttgcatg	agaacctagg	cggtgtgggtg	2700
gtattcaaga	ttaaagacgca	ggaagggttat	gcaagatttag	gaaatcttga	atttatcgaa	2760
gagaaacct	taattggaga	agcactgtct	cggtgaaga	gagcggaaaa	aaaatggaga	2820
gacaaacggg	aaaaactaca	attggaaca	aaacgagtat	atacagaggc	aaaagaaact	2880
gtggatgctt	tattcgtaga	ttctcactat	aatagattac	aagcagatac	aaacattggg	2940
atgattcatg	cggcagatag	acttggtcat	cggatccacg	aggcttatct	tccagaacta	3000
cccttcattc	caggaataaa	tgcggtgatt	tttgaagaat	tagaaaatcg	tatttctact	3060
gcgtttctct	tatacgatgc	gagaaatgtc	attaaaaatg	gcgatttcaa	taatggctta	3120
tcattgctgga	acgtaaaagg	gcatgtagat	gtacaacaga	gccatcatcg	ttctgacctt	3180
gttatcccg	aatgggaagc	agaagtgtca	caagcagttc	gcgtttgtcc	ggggcgtggc	3240
tatatccctc	gtgtcacagc	gtacaaagag	ggatatggag	agggtcgcgt	aacgatccat	3300
gaaatcgaga	acaatacaga	cgaactaaaa	tttaaaaact	gtgaagaaga	ggaagtgtat	3360
ccaacggata	caggaaactg	taattgattat	actgcacacc	aaggtagacg	agcatgtaat	3420
ccccgtaatg	ctggatafga	ggatgcatac	gaagtgtgata	ctacagcatc	tgtaattac	3480
agaccgactt	atgaagaaga	aacgtataca	gatgtacgaa	gagataatca	ttgtgaatat	3540
gacagagggt	atgtgaatta	tccaccagta	ccagctgggt	atgtgacaaa	agaatttagaa	3600
tactttcccg	aaacagatac	agtatggatt	gagattggag	aaacgggaagg	aaagtttatt	3660
gtagatagcg	tggaactact	cctcatggaa	gaatagatga	cttcaaatag	gaaaaatgag	3720
aatgaaatta	taaatgcctt	atcgattcca	gctgtatcga	atcattccgc	acaaatggat	3780
ctatcgctag	atgctcgtat	tgaggattct	ttgtgtatag	ccgaggggaa	taatatcaat	3840
ccacttggtt	gcgcactaac	agtccaaacg	ggtataaaca	tagctggtag	aatatgggaa	3900
gtattgggtg	tgccgtttgc	tggaacaacta	gctagttttt	atagttttct	tggtggggaa	3960
ttatggccta	gtggcagaga	tccatgggaa	attttcttgg	aacatgtaga	acaacttata	4020
agacaacaag	taacagaaaa	tactaggaat	acggctattg	ctcgattaga	aggtctagga	4080
agaggctata	gatcttacca	gcaggctctt	gaaacttgg	tagataaccg	aaatgatgca	4140
agatcaagaa	gcattattct	tgagcgctat	gttgctttag	aacttgacat	tactactgct	4200
ataccgcttt	tcagaatac	aatgaagaa	gttccatfat	taatgggtata	tgctcaagct	4260
gcaaatttac	acctattatt	attgagagac	gcattccctt	ttggtagtga	atgggggtag	4320
gcatcttccg	atgttaacca	atattaccaa	gaacaaatca	ggtatacaga	ggaatatctt	4380
aaccattgctg	tacaatggta	taatacaggg	ctaaataact	taagagggac	aaatgctgaa	4440
agttggctgc	ggtataatca	attccgtaga	gacctaacgt	taggggtatt	agatttagta	4500
gccctattcc	caagctatga	tactcgact	tatccaatca	atacagagtc	tcagtttaaca	4560
agagaaattt	atacagatcc	aattgggaga	acaaatgcac	cttcaggatt	tgcaagtacg	4620
aatgtgttta	ataataatgc	accatcggtt	tctgccatag	aggctgccat	tttcaggcct	4680
ccgcactctac	ttgattttcc	agaacaactt	acaatttaca	gtgcatcaag	ccgttggagt	4740
agcactcaac	atatgaatta	ttgggtggga	ctagggctta	acttcgcgcc	aataggaggg	4800
acattaaata	cctcaacaca	aggacttact	aataatactt	caattaatcc	tgtaacatta	4860
cagtttacgt	ctcgtgacgt	ttatagaaca	gaatcaaattg	cagggacaaa	tatactatrt	4920
actactcctg	tgaaatggagt	accttgggct	agattttaatt	ttataaaccc	tcagaaatct	4980
tatgaaagag	gcgccactac	ctacagtcaa	ccgtatcagg	gagttgggat	tcaattatrt	5040
gattcagaaa	ctgaattacc	accagaaaca	acagaacgac	caaattatga	atcatatagt	5100
ctagatttat	ctcatatagg	actaatcata	ggaaacactt	tgagagcacc	agtcatttct	5160
tggaacgac	gtagtgcaga	tcgtacgaat	acgattggac	caaatagaat	tactcaattt	5220
cctgcagtg	aggggaagatt	tctttttaat	ggttctgtaa	tttcaggacc	aggatttact	5280
gggtggagacg	tagttagatt	gaataggaat	aatggtaata	ttcaaaatag	agggtatat	5340
gaagttccaa	ttcaattcac	gtcgacatct	accagatctc	gagttcgagt	acgtttatgt	5400
tctgtaacct	cgattgagct	caatgttaat	ttgggcaatt	catcaatttt	tacgaacaca	5460
ttaccagcaa	cagctgcac	attagataat	ctacaatcag	gggattttgg	ttatgttgaa	5520
atcaacaatg	cttttacatc	cgcaacaggt	aatatagtag	gtgctagaaa	ttttagtga	5580
aatgcagaag	taataataga	cagatttgaa	tttatccag	ttactgcaac	cttcgaggca	5640
gaatatgatt	tagaaagagc	acaaaaggcg	gtgaatgccc	tgtttacttc	tacaaatcca	5700
agaagattga	aaacagatgt	gacagattat	catattgacc	aagtgtccaa	tatggtggca	5760
tgtttatcag	atgaattttg	cttggatgag	aagcgagaat	tatttgagaa	agtgaatat	5820
gcgaagcgac	tcagtgatga	aagaaactta	ctccaagatc	caaacttcac	attcatcagt	5880
gggcaattaa	gtttcgcatc	catcgatgga	caatcaaact	tcacctctat	taatgagcta	5940
tctgaacatg	gatgggtggg	agtgagaat	gttaaccattc	aggaagggaa	tgacgtatrt	6000
aaagagaatt	acgtcacact	accgggtact	tttaattagt	gttatccaaa	ttatttatrt	6060
caaaaaatag	gagagtcaga	attaaaagct	tatacgcgct	atcaatttaag	agggtatat	6120
gaagatagtc	aagatctaga	gattttatrt	attcgttaca	atgcaaaagca	tgaacatttg	6180
gatgttccag	gtaccgattc	cctatggccg	ctttcagttt	aaagcccaat	cggaaaggtgc	6240
ggagaaccaa	atcgatgcgc	accacatttt	gaatggaatc	ctgatctaga	ttgttcctgc	6300
agagatggag	aaagatgtgc	gcacatttcc	catcatttca	ctttggatat	tgatgttgga	6360
tgcacagact	tgcatgagaa	cctagggcgtg	tggtgtgtat	tcaagattaa	gacgcaggaa	6420
ggtttatgcaa	gattaggaat	tctggaattt	atcgaaagaga	aaccattaat	tggaagagca	6480
ctgtctcgtg	tgaagagagc	ggaaaaaaaa	tggagagaca	aacgggaaaa	actacaattg	6540
gaacaaaaac	gagtatatac	agaggcaaaa	gaaactgtgg	atgctttatt	cgtagattct	6600
cactataata	gattacaagc	agatacaaac	attggtatga	ttcatgcggc	agatagactt	6660

```

aattttataa accctcagaa tatttatgaa agaggcgcca ctacctacag tcaaccgtat 1320
cagggagttg ggattcaatt atttgattca gaaactgaat taccaccaga aacaacagaa 1380
cgaccaaat atgaatcata tagtcataga ttatctcata taggactaat cataggaaac 1440
actttgagag caccagtccta ttcttggacg catcgtagtg cagatcgtac gaatacgtat 1500
ggaccaataa gaattactca aattctctgca gtgaaggga gatttctttt taatggttct 1560
gtaatttcag gaccaggatt tactggtgga gacgtagtta gattgaatag gaataatggt 1620
aatattcaaa atagagggtta tattgaagtt ccaattcaat tcacgtcgac atctaccaga 1680
tatcgagttc gagtacgtta tgcttctgta acctcgattg agctcaatgt taatttgggc 1740
aattcatcaa tttttacgaa cacattacca gcaacagctg catcattaga taatctacaa 1800
tcaggggatt ttggttatgt tgaatcaaac aatgctttta catccgcaac aggtaatata 1860
gtagggtgcta gaaatttttag tgcaaatgca gaagtaataa tagacagatt tgaatttatc 1920
ccagttactg caaccttcga ggcagaatat gatttagaaa gaggacaaaaa ggcggtgaat 1980
gccctgttta cttctacaaa tccaagaaga ttgaaaaacag atgtgacaga ttatcatatt 2040
gaccaagtgt ccaatatggt ggcattgtta tcagatgaat ttgcttggga tgagaagcga 2100
gaattatttg agaaagtga atatgcgaag cgactcagtg atgaaagaaa cttactccaa 2160
gatccaaact tcacattcat cagtgggcaa ttaagtctcg catccatcga tggacaatca 2220
aacttcacct ctattaatga gctatctgaa catggatggt ggggaagtga gaattgtacc 2280
attcaggaag ggaatgacgt atttaaaagag aattacgtca cactaccggg tacttttaat 2340
gagtgttatc caaattattt atatcaaaaa ataggagagt cagaattaaa agctttatac 2400
cgctatcaat taagagggtta tattgaagat agtcaagatc tagagattta tttaattcgt 2460
tacaatgcaa agcatgaaac attggatggt ccagggtaccg attccctatg gccgctttca 2520
gttaaaaagcc caatcggaag gtgcggagaa ccaaatcgat gcgcaccaca ttttgaatgg 2580
aatcctgata tagattgttc ctgcagagat ggagaaagat gtgcgcatca ttcccatcat 2640
ttcactttgg atattgatgt tggatgcaca gacttgcata agaacctagg cgtgtgggtg 2700
gtattcaaga ttaagacgca ggaagggttat gcaagattag gaaatctgga atttatcgaa 2760
gagaaaccat taattggaga agcactgtct cgtgtgaaga gagcggaaaa aaaatggaga 2820
gacaaacggg aaaaaactaca attggaacaa aaacgagtat atacagagggc aaaagaaact 2880
gtggatgctt tattcgtaga ttctcactat aatagattac aagcagatac aaacattggt 2940
atgattcatg cggcagatag acttgttcat cggatccacg aggccttatc tccagaacta 3000
cctttcattc caggaataaaa tgcggtgatt ttgaagaat tagaaaaatc tatttctact 3060
gcgttctcct tatacagatgc gagaaatgtc attaaaaatg gcgatttcaa taatggctta 3120
ttatgtcggg acgtaaaagg gcatgtagat gtacaacaga gccatcatcg ttctgacctt 3180
gtatcccgag aatgggaagc agaagtgatc caagcagttc gcgtttgtcc ggggcgtggc 3240
tatatccttc gtgtcacagc gtacaaagag ggatattggag agggctgcgt aacgatccat 3300
gaaatcgaga acaatacaga cgaactaaaa tttaaaaact gtgaagaaga ggaagtgtat 3360
ccaacggata caggaacgtg taatgattat actgcacacc aaggtacagc agcatgtaat 3420
tcccgtaatg ctggatatga ggatgcatat gaagttgata ctacagcatc tgttaattac 3480
agaccgactt atgaagaaga aacgtatata gatgtacgaa gagataatca ttgtgaatat 3540
gacagagggt atgtgaatta tccaccagta ccagctgggt atgtgacaaa agaattagaa 3600
tacttcccag aaacagatac agtatggatt gaatttgag aaacggaagg aaagtttatt 3660
gtagatagcg tggaactact cctcatggaa gaatag 3696

```

<210> 4- ДНК;

<211> 1231

<212> PRT

<213> *Bacillus thuringiensis*

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (0)...(0)

<223> 4C5

<400> 4- ДНК;

```

Met Thr Ser Asn Arg Lys Asn Glu Asn Glu Ile Ile Asn Ala Leu Ser
 1          5          10          15
Ile Pro Ala Val Ser Asn His Ser Ala Gln Met Asp Leu Ser Leu Asp
          20          25          30
Ala Arg Ile Glu Asp Ser Leu Cys Ile Ala Glu Gly Asn Asn Ile Asn
          35          40          45
Pro Leu Val Ser Ala Ser Thr Val Gln Thr Gly Ile Asn Ile Ala Gly
          50          55          60
Arg Ile Leu Gly Val Leu Gly Val Pro Phe Ala Gly Gln Leu Ala Ser
          65          70          75          80
Phe Tyr Ser Phe Leu Val Gly Glu Leu Trp Pro Ser Gly Arg Asp Pro
          85          90          95
Trp Glu Ile Phe Leu Glu His Val Glu Gln Leu Ile Arg Gln Gln Val
          100          105          110
Thr Glu Asn Thr Arg Asn Thr Ala Ile Ala Arg Leu Glu Gly Leu Gly
          115          120          125
Lys Gly Tyr Arg Ser Tyr Gln Gln Ala Leu Glu Thr Trp Leu Asp Asn
          130          135          140

```



```

Arg Asn Asp Ala Arg Ser Arg Ser Ile Ile Leu Glu Arg Tyr Val Ala
145 150 155 160
Leu Glu Leu Asp Ile Thr Thr Ala Ile Pro Leu Phe Arg Ile Arg Asn
165 170 175
Glu Glu Val Pro Leu Leu Met Val Tyr Ala Gln Ala Ala Asn Leu His
180 185 190
Leu Leu Leu Leu Arg Asp Ala Ser Leu Phe Gly Ser Glu Trp Gly Met
195 200 205
Ala Ser Ser Asp Val Asn Gln Tyr Tyr Gln Glu Gln Ile Arg Tyr Thr
210 215 220
Glu Glu Tyr Ser Asn His Cys Val Gln Trp Tyr Asn Thr Gly Leu Asn
225 230 235 240
Asn Leu Arg Gly Thr Asn Ala Glu Ser Trp Leu Arg Tyr Asn Gln Phe
245 250 255
Arg Arg Asp Leu Thr Leu Gly Val Leu Asp Leu Val Ala Leu Phe Pro
260 265 270
Ser Tyr Asp Thr Arg Thr Tyr Pro Ile Asn Thr Ser Ala Gln Leu Thr
275 280 285
Arg Glu Ile Tyr Thr Asp Pro Ile Gly Arg Thr Asn Ala Pro Ser Gly
290 295 300
Phe Ala Ser Thr Asn Trp Phe Asn Asn Asn Ala Pro Ser Phe Ser Ala
305 310 315 320
Ile Glu Ala Ala Ile Phe Arg Pro Pro His Leu Leu Asp Phe Pro Glu
325 330 335
Gln Leu Thr Ile Tyr Ser Ala Ser Ser Arg Trp Ser Ser Thr Gln His
340 345 350
Met Asn Tyr Trp Val Gly His Arg Leu Asn Phe Arg Pro Ile Gly Gly
355 360 365
Thr Leu Asn Thr Ser Thr Gln Gly Leu Thr Asn Asn Thr Ser Ile Asn
370 375 380
Pro Val Thr Leu Gln Phe Thr Ser Arg Asp Val Tyr Arg Thr Glu Ser
385 390 395 400
Asn Ala Gly Thr Asn Ile Leu Phe Thr Thr Pro Val Asn Gly Val Pro
405 410 415
Trp Ala Arg Phe Asn Phe Ile Asn Pro Gln Asn Ile Tyr Glu Arg Gly
420 425 430
Ala Thr Thr Tyr Ser Gln Pro Tyr Gln Gly Val Gly Ile Gln Leu Phe
435 440 445
Asp Ser Glu Thr Glu Leu Pro Glu Thr Thr Glu Arg Pro Asn Tyr
450 455 460
Glu Ser Tyr Ser His Arg Leu Ser His Ile Gly Leu Ile Ile Gly Asn
465 470 475 480
Thr Leu Arg Ala Pro Val Tyr Ser Trp Thr His Arg Ser Ala Asp Arg
485 490 495
Thr Asn Thr Ile Gly Pro Asn Arg Ile Thr Gln Ile Pro Ala Val Lys
500 505 510
Gly Arg Phe Leu Phe Asn Gly Ser Val Ile Ser Gly Pro Gly Phe Thr
515 520 525
Gly Gly Asp Val Val Arg Leu Asn Arg Asn Asn Gly Asn Ile Gln Asn
530 535 540
Arg Gly Tyr Ile Glu Val Pro Ile Gln Phe Thr Ser Thr Ser Thr Arg
545 550 555 560
Tyr Arg Val Arg Val Arg Tyr Ala Ser Val Thr Ser Ile Glu Leu Asn
565 570 575
Val Asn Leu Gly Asn Ser Ser Ile Phe Thr Asn Thr Leu Pro Ala Thr
580 585 590
Ala Ala Ser Leu Asp Asn Leu Gln Ser Gly Asp Phe Gly Tyr Val Glu
595 600 605
Ile Asn Asn Ala Phe Thr Ser Ala Thr Gly Asn Ile Val Gly Ala Arg
610 615 620
Asn Phe Ser Ala Asn Ala Glu Val Ile Ile Asp Arg Phe Glu Phe Ile
625 630 635 640
Pro Val Thr Ala Thr Phe Glu Ala Glu Tyr Asp Leu Glu Arg Ala Gln
645 650 655
Lys Ala Val Asn Ala Leu Phe Thr Ser Thr Asn Pro Arg Arg Leu Lys
660 665 670
Thr Asp Val Thr Asp Tyr His Ile Asp Gln Val Ser Asn Met Val Ala
675 680 685
Cys Leu Ser Asp Glu Phe Cys Leu Asp Glu Lys Arg Glu Leu Phe Glu
690 695 700
Lys Val Lys Tyr Ala Lys Arg Leu Ser Asp Glu Arg Asn Leu Leu Gln

```

```

705          710          715          720
Asp Pro Asn Phe Thr Phe Ile Ser Gly Gln Leu Ser Phe Ala Ser Ile
          725
Asp Gly Gln Ser Asn Phe Thr Ser Ile Asn Glu Leu Ser Glu His Gly
          740          745          750
Trp Trp Gly Ser Glu Asn Val Thr Ile Gln Glu Gly Asn Asp Val Phe
          755          760          765
Lys Glu Asn Tyr Val Thr Leu Pro Gly Thr Phe Asn Glu Cys Tyr Pro
          770          775          780
Asn Tyr Leu Tyr Gln Lys Ile Gly Glu Ser Glu Leu Lys Ala Tyr Thr
          785          790          795          800
Arg Tyr Gln Leu Arg Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln Asp Leu Glu Ile
          805          810          815
Tyr Leu Ile Arg Tyr Asn Ala Lys His Glu Thr Leu Asp Val Pro Gly
          820          825          830
Thr Asp Ser Leu Trp Pro Leu Ser Val Lys Ser Pro Ile Gly Arg Cys
          835          840          845
Gly Glu Pro Asn Arg Cys Ala Pro His Phe Glu Trp Asn Pro Asp Leu
          850          855          860
Asp Cys Ser Cys Arg Asp Gly Glu Arg Cys Ala His Ser His His
          865          870          875          880
Phe Thr Leu Asp Ile Asp Val Gly Cys Thr Asp Leu His Glu Asn Leu
          885          890          895
Gly Val Trp Val Val Phe Lys Ile Lys Thr Gln Glu Gly Tyr Ala Arg
          900          905          910
Leu Gly Asn Leu Glu Phe Ile Glu Glu Lys Pro Leu Ile Gly Glu Ala
          915          920          925
Leu Ser Arg Val Lys Arg Ala Glu Lys Lys Trp Arg Asp Lys Arg Glu
          930          935          940
Lys Leu Gln Leu Glu Thr Lys Arg Val Tyr Thr Glu Ala Lys Glu Thr
          945          950          955          960
Val Asp Ala Leu Phe Val Asp Ser His Tyr Asn Arg Leu Gln Ala Asp
          965          970          975
Thr Asn Ile Gly Met Ile His Ala Ala Asp Arg Leu Val His Arg Ile
          980          985          990
His Glu Ala Tyr Leu Pro Glu Leu Pro Phe Ile Pro Gly Ile Asn Ala
          995          1000          1005
Val Ile Phe Glu Glu Leu Glu Asn Arg Ile Ser Thr Ala Phe Ser Leu
          1010          1015          1020
Tyr Asp Ala Arg Asn Val Ile Lys Asn Gly Asp Phe Asn Asn Gly Leu
          1025          1030          1035          1040
Ser Cys Trp Asn Val Lys Gly His Val Asp Val Gln Gln Ser His His
          1045          1050          1055
Arg Ser Asp Leu Val Ile Pro Glu Trp Glu Ala Glu Val Ser Gln Ala
          1060          1065          1070
Val Arg Val Cys Pro Gly Arg Gly Tyr Ile Leu Arg Val Thr Ala Tyr
          1075          1080          1085
Lys Glu Gly Tyr Gly Glu Gly Cys Val Thr Ile His Glu Ile Glu Asn
          1090          1095          1100
Asn Thr Asp Glu Leu Lys Phe Lys Asn Cys Glu Glu Glu Glu Val Tyr
          1105          1110          1115          1120
Pro Thr Asp Thr Gly Thr Cys Asn Asp Tyr Thr Ala His Gln Gly Thr
          1125          1130          1135
Ala Ala Cys Asn Ser Arg Asn Ala Gly Tyr Glu Asp Ala Tyr Glu Val
          1140          1145          1150
Asp Thr Thr Ala Ser Val Asn Tyr Arg Pro Thr Tyr Glu Glu Glu Thr
          1155          1160          1165
Tyr Thr Asp Val Arg Arg Asp Asn His Cys Glu Tyr Asp Arg Gly Tyr
          1170          1175          1180
Val Asn Tyr Pro Pro Val Pro Ala Gly Tyr Val Thr Lys Glu Leu Glu
          1185          1190          1195          1200
Tyr Phe Pro Glu Thr Asp Thr Val Trp Ile Glu Ile Gly Glu Thr Glu
          1205          1210          1215
Gly Lys Phe Ile Val Asp Ser Val Glu Leu Leu Leu Met Glu Glu
          1220          1225          1230

```

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Виділена молекула нуклеїнової кислоти, вибрана із:
 - а) молекули нуклеїнової кислоти, що включає SEQ ID NO:1 або її повнорозмірний комплемент; і
 - б) молекули нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид, що включає SEQ ID NO:2.
2. Конструкція ДНК, що включає молекулу нуклеїнової кислоти за п. 1.
3. Конструкція ДНК за п. 2, що включає додатково молекулу нуклеїнової кислоти, що кодує
- 10 гетерологічний поліпептид.
4. Клітина-хазяїн, яка містить конструкцію ДНК за п. 2.

5. Клітина-хазяїн за п. 4, яка являє собою бактеріальну клітину.
6. Клітина-хазяїн за п. 4, яка являє собою рослинну клітину.
7. Трансгенна рослина, що включає клітину-хазяїна за п. 6.
8. Трансгенна рослина за п. 7, яка **відрізняється** тим, що зазначена рослина вибрана із групи,
5 що складається з кукурудзи, сорго, пшениці, кабачка, соняшника, томатів, хрестоцвітих рослин, перців, картоплі, бавовни, рису, сої, цукрового буряка, цукрового очерету, тютюну, ячменя й олійного рапсу.
9. Трансформоване насіння рослини за п. 8, яке **відрізняється** тим, що зазначене насіння включає конструкцію ДНК.
10. Виділений поліпептид з пестицидною активністю, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:2.
11. Поліпептид за п. 10, що включає додатково гетеролічні амінокислотні послідовності.
12. Композиція, що включає поліпептид за п. 10.
13. Композиція за п. 12, яка **відрізняється** тим, що зазначена композиція вибрана із групи, що
15 складається з форми порошку, що розпорошується, кульки, гранули, спрея, емульсії, колоїду й розчину.
14. Композиція за п. 12, яка **відрізняється** тим, що вказану композицію одержують шляхом сушіння, ліофілізації, гомогенізації, екстракції, фільтрування, центрифугування, осадження або концентрування культури клітин *Bacillus thuringiensis*.
- 20 15. Композиція за п. 12, що включає від приблизно 1 ваг. % до приблизно 99 ваг. % зазначеного поліпептиду.
16. Спосіб контролю популяції комах-шкідників, що включає контакт зазначеної популяції з пестицидно-ефективною кількістю поліпептиду за п. 10.
17. Спосіб знищення комах-шкідників з порядку *Lepidoptera*, що включає контакт зазначеного
25 шкідника або згодовування зазначеному шкідникові пестицидно-ефективної кількості поліпептиду за п. 10.
18. Спосіб одержання поліпептиду з пестицидною активністю, що включає культивування клітини-хазяїна за п. 4, в умовах, при яких експресується молекула нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид, який **відрізняється** тим, що зазначений поліпептид включає амінокислотну
30 послідовність SEQ ID NO:2.
19. Трансгенна рослина, що містить стабільно включену в її геном конструкцію ДНК, що включає нуклеотидну послідовність, яка кодує білок, що має пестицидну активність, де зазначена нуклеотидна послідовність вибрана із:
а) молекули нуклеїнової кислоти, що включає SEQ ID NO:1; і
35 б) молекули нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид, що включає SEQ ID NO:2;
де зазначена нуклеотидна послідовність оперативно пов'язана із промотором, який направляє експресію кодуючої послідовності, у рослинній клітині.
20. Рослина за п. 19, яка **відрізняється** тим, що зазначена рослина являє собою рослинну клітину.
- 40 21. Спосіб захисту трансгенної рослини від шкідника з порядку *Lepidoptera*, що включає введення в зазначену рослину або в його клітину щонайменше одного вектора експресії, що включає нуклеотидну послідовність, яка кодує пестицидний поліпептид, де зазначена нуклеотидна послідовність вибрана із:
а) молекули нуклеїнової кислоти, що включає SEQ ID NO:1; і
45 б) молекули нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид, що включає SEQ ID NO:2.
22. Спосіб за п. 21, який **відрізняється** тим, що зазначена рослина продукує пестицидний поліпептид, що має пестицидну активність проти комах-шкідника.

Комп'ютерна верстка О. Рябіо

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

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