



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **112156** (13) **C2**
(51) МПК (2016.01)

A01H 5/00

A01H 5/10 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

A01N 63/02 (2006.01)

C07K 14/325 (2006.01)

A01P 7/04 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2012 08559**
(22) Дата подання заявки: **16.12.2010**
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **10.08.2016**
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **61/284,281**
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **16.12.2009**
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **US**
(41) Публікація відомостей про заявку: **10.10.2012, Бюл.№ 19**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **10.08.2016, Бюл.№ 15**
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **PCT/US2010/060817, 16.12.2010**

(72) Винахідник(и):
**Мід Томас (US),
Нарва Кеннет (US),
Сторер Ніколас П. (US),
Шитс Джоел Дж. (US),
Вуслі Аарон Т. (US),
Бертон Стефані Л. (US)**
(73) Власник(и):
**ДАУ АГРОСАЙЄНСІЗ ЕЛЕЛСІ,
9330 Zionsville Road, Indianapolis, IN 46268,
United States of America (US)**
(74) Представник:
**Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр.
№115**
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
**US 20050155103 A1, 14.07.2005
Gutierrez et al.: "Physiologically based
demographics of Bt cotton-pest interactions. I.
Pink bollworm resistance, refuge and risk",
Ecological Modelling, vol. 191, no. 3-4,
05.02.2006, pages 346-359
Bravo A. et al: "How to cope with insect
resistance to Bt toxins?", Trends in
Biotechnology Elsevier Publications,
Cambridge, GB, vol. 26, no. 10, 01.10.2008,
pages 573-579**

(54) ТРАНСГЕННА РОСЛИНА, ЯКА МІСТИТЬ ДНК, ЩО КОДУЄ ІНСЕКТИЦИДНИЙ БІЛОК Cry1Ca, І ДНК, ЩО КОДУЄ ІНСЕКТИЦИДНИЙ БІЛОК Cry1Fa, ДЛЯ ВИРОБЛЕННЯ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ДО КОМАХ

(57) Реферат:

Даний винахід описує рослини, стійкі до лускокрилих шкідників, та способи боротьби з цими шкідниками, де вказані рослини містять інсектицидний білок Cry1Fa і інсектицидний білок Cry1Ca. Запропонований винахід дозволяє сповільнювати або попереджувати вироблення резистентності у комахі совки трав'яної до токсину Cry.

UA 112156 C2

Попередній рівень техніки

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

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

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

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

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

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

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

Cry1Fa може бути використаний для боротьби з лускокрилими шкідниками багатьох видів, включаючи європейського кукурудзяного трача (ECB; *Ostrinia nubilalis* (Hubner)) і совку трав'яну (FAW; *Spodoptera frugiperda*), і має активність проти бурякового трача (SCB; *Diatraea saccharalis*).

Білок Cry1Fa, що продукується в рослинах кукурудзи, що містять модифікацію TC1507, відповідальний за вироблення ознаки резистентності до комах, і цей білок застосовується у провідних галузях промисловості для боротьби з совкою трав'яною (FAW). Cry1Fa також використовується в продуктах Herculex®, SmartStax™ і WideStrike™.

Можливість провести дослідження на зв'язування з рецептором (конкурентне або гомологічне) з використанням білка Cry1Fa має певні обмеження, оскільки при застосуванні більшості методів мічення білків для детектування в аналізах на зв'язування з рецептором відбувається інактивація інсектицидної активності білка Cry1Fa.

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

Короткий опис суті винаходу

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

Даний винахід також підтверджується виявленням того факту, що Cry1Fa і Cry1Ca не конкурують один з одним за зв'язування з кишковими рецепторами совки трав'яної (FAW) (або *Diatraea saccharalis* (бурякового трача; SCB)).

Даний винахід також стосується, зокрема, трикомпонентних кластерів або "пірамід" з трьох (або більше) токсинів, де токсини Cry1Fa і Cry1C являє собою базову пару. Одна з переважних пірамід включає щонайменше два білки, що не мають перехресної резистентності до двох шкідників до совки трав'яної і до ECB (Європейського кукурудзяного трача; *Ostrinia nubilalis*); Cry1Fa плюс Cry1Ca плюс один або декілька анти-ECB токсинів, таких як Cry1Ab. У деяких переважних варіантах піраміди, вибрані токсини мають три різні механізми дії проти FAW. Переважними пірамідними комбінаціями є Cry1Fa плюс Cry1Ca плюс інший токсин/ген, вибраний з групи, що складається з Vip3Ab, Cry1D, Cry1Be і Cry1E. Рослини (і посівні площі, засіяні такими рослинами), які продукують ці три токсини, входять в об'єм даного винаходу. Можуть бути також додані додаткові токсини/гени, але ці конкретні трикомпонентні кластери, відповідно до даного винаходу, будуть, як несподівано було виявлено, переважно діяти проти FAW по трьох механізмах. Це допоможе знизити або взагалі уникнути потреби в площах-"сховищах" нетрансгенних культур. У загальних рисах, даний винахід також стосується застосування трьох інсектицидних білків (в деяких переважних варіантах, білків Cry), які не конкурують один з одним проти одного шкідника-мішені.

Короткий опис графічного матеріалу

Фігура 1: Оцінка ступеня пошкодження кукурудзи, заражені *in vitro* щойно личинками совки трав'яної, що вилупилися (FAW), і совки трав'яної, резистентної до Cry1F (rFAW). Трансгенні рослини T0, відібрані після трансформації плазмідом pDAS5162, були розділені на дві групи за допомогою імуноблот-скринінгу з використанням антитіла DIG152RPC1: на рослини, які не продукують DIG-109 (на фігурі, з лівого боку), і на рослини, які не мають детектовані рівні DIG-109 (в центрі фігури). DIG-109-позитивні рослини ранжували по рівню експресії (зліва направо; від найменшого до найбільшого). HP-аналіз на DSM2 здійснювали на 36 pDAS5162-трансформованих лініях. У 95 % зразків була детектована проста подія інтеграції, визначена як 1-2 копії цього гена. Результати біологічного аналізу рослин, що використовуються як позитивний і негативний контроль, представлені на правій стороні фігури.

Фігура 2: Конкурування за зв'язування BBMV *Spodoptera frugiperda* з коровим токсином Cry1Fa, з коровим токсином Cry1Ca і з ¹²⁵I-міченим коровим токсином Cry1Ca.

Короткий опис послідовностей

SEQ ID NO:1 - Химерний білок "коровий Cry1Ca/протоксин Cry1Ab", що складається з 1164 амінокислот (DIG-152) (варіант pMYC2547)

SEQ ID NO:2 - Другий химерний білок "коровий Cry1Ca/протоксин Cry1Ab", що складається з 1164 амінокислот (DIG-109) (сорт кукурудзи)

SEQ ID NO:3 - Оптимізована для кукурудзи послідовність CDS, що кодує 3492 п. н. DIG-109

SEQ ID NO:4 - коровий токсин Cry1Fa.

SEQ ID NO:5 - коровий токсин Cry1Ca.

Докладний опис винаходу

Як повідомляється в даний заявці, токсин Cry1Ca, що продукується в трансгенній кукурудзі і в інших рослинах (наприклад, в бавовнику і сої), виявляє високу ефективність в боротьбі проти совки трав'яної (FAW; *Spodoptera frugiperda*), у якій виробляється резистентність до активності Cry1Fa. Таким чином, даний винахід частково оснований на несподіваному виявленні того факту, що совка трав'яна, резистентна до дії Cry1Fa, є сприйнятливою (тобто, не має перехресної резистентності) до дії Cry1Ca.

Даний винахід також частково оснований на несподіваному виявленні того факту, що токсин Cry1Ca є ефективним для захисту рослин (таких як рослини кукурудзи) від ураження Cry1Fa-резистентної совки трав'яної. Обговорення цього шкідника приводиться, наприклад, в публікації Tabashnik, PNAS (2008), vol. 105 no. 49, 19029-19030.

Даний винахід включає застосування токсину Cry1Ca для захисту кукурудзи і інших економічно цінних видів рослин від ураження шкідниками і зниження врожайності, що викликається поїданням цих рослин совкою трав'яною або популяціями совки трав'яної, у яких виробляється резистентність до Cry1Fa.

Даний винахід також стосується кластера IRM, що використовується для попередження або сповільнення розвитку резистентності совки трав'яної до Cry1Fa і/або Cry1Ca.

Даний винахід також стосується композицій, що використовуються для боротьби з лускокрилими шкідниками, в клітинах яких продукується білок, що містить коровий токсин Cry1Fa, і білок, що містить коровий токсин Cry1Ca.

Даний винахід також стосується хазяїна, трансформованого так, щоб він продукував білок, що містить коровий токсин Cry1Fa, і білок, що містить коровий токсин Cry1Ca, де вказаним хазяїном є клітина мікроорганізму або рослини. Полінуклеотид(и), що розглядається(ються) переважно присутній(і) в генетичній конструкції під контролем промотору, що не є промотором *Bacillus thuringiensis* (функціонально приєднаний(і) до цього промотору/містить(ять) цей промотор). Полінуклеотиди, що розглядаються, можуть містити звичайно кодони, що зустрічаються в цій рослині, сприяючи підвищенню рівня експресії в рослині.

Даний винахід також стосується способу боротьби з лускокрилими шкідниками, що включає контактування вказаних шкідників або середовища їх проживання з ефективною кількістю композиції, що містить білок, який включає коровий токсин Cry1Fa, а також білок, який включає коровий токсин Cry1Ca.

У одному зі своїх варіантів, даний винахід стосується рослини кукурудзи (і інших рослин, наприклад, бавовнику і сої), що включає експресований в цій рослині ген, який кодує білок, що містить коровий токсин Cry1Ca, і експресований в цій рослині ген, який кодує білок, що містить коровий токсин Cry1Fa, і насіння такої рослини.

У іншому своєму варіанті, даний винахід стосується рослини кукурудзи (і інших рослин, наприклад, бавовнику і сої), де експресований в цій рослині ген, який кодує білок, що містить коровий токсин Cry1Ca, і експресований в цій рослині ген, який кодує білок, що містить коровий токсин Cry1Fa, були введені у вказані рослини кукурудзи і в насіння таких рослин шляхом інтрогресії.

(Опис Cry1C, що використовується в рослинах як потенційний біоісектицид, приводиться в публікації Avisar et al. 2009). Avisar D, Eilenberg H, Keller M, Reznik N, Segal M, Sneh B, Zilberstein A (2009) The *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1C as a potential bioinsecticide in plants. *Plant Science* 176:315-324).

Рецептори комах. Як описано в прикладах, дослідження на конкурентне зв'язування з рецептором, що проводиться з використанням радіоактивно міченого білка корового токсину Cry1Ca, показало, що цей білок корового токсину Cry1Fa не конкурує за високоафінне зв'язування з сайтом, присутнім в тканинах комах FAW, з яким зв'язується Cry1Ca. Ці результати показали, що комбінація білків Cry1Fa і Cry1Ca являє собою ефективний засіб для послаблення вироблення резистентності у популяції FAW до Cry1Fa (і аналогічно, для послаблення вироблення резистентності до Cry1Ca), а також для підвищення рівня резистентності рослин кукурудзи, експресуючих обидва ці білки, до вказаного шкідника.

Таким чином, частково на основі даних, описаних вище, і даних, представлених в літературі, можна зробити висновок, що спільне продукування (у вигляді кластера) білків Cry1Ca і Cry1Fa може бути застосоване для отримання високої дози IRM-кластера, що використовується для боротьби з FAW. У цю комбінацію можуть бути додані і інші білки для розширення спектра комах-шкідників, що знищуються. Так, наприклад, для кукурудзи, додавання Cry1Ab дозволить створити IRM-піраміду, що використовується для боротьби з європейським кукурудзяним трачем.

У іншому своєму варіанті, даний винахід стосується застосування одного або двох білків Cry1Fa і Cry1Ca в комбінації з білком Cry1Ab для послаблення вироблення резистентності у

комах. Таким чином, в іншому своєму варіанті, даний винахід стосується застосування одного або двох білків Cry1Fa і Cry1Ca в сільськогосподарських регіонах, в яких застосування білка Cry1Ab стає неефективним для боротьби зі буряковим трачем, що зумовлено розвитком резистентності у таких популяцій шкідників. Відповідно до цього, переважного

5 "трикомпонентного кластера" або "пірамідної" комбінації, що застосовується відповідно до даного винаходу, є Cry1F плюс Cry1C плюс Cry1Ab.

Даний винахід також стосується, зокрема, трикомпонентних кластерів або "пірамід" з трьох (або більше) токсинів, де токсини Cry1Fa і Cry1C являє собою базову пару. Одна з переважних пірамід включає щонайменше два білки, що не мають перехресної резистентності до двох шкідників - до FAW і до ECB (Європейського кукурудзяного трача; *Ostrinia nubilalis*); Cry1Fa плюс Cry1Ca плюс один або декілька анти-ECB токсинів, таких як Cry1Ab (див. заявку США 20080311096), оскільки Cry1F має активність проти обох комах. Іншими токсинами проти ECB є Cry1Be (див. заявку США реєстр. № 61/284290, подану 16 грудня, 2009), Cry II (див. заявку США реєстр. № 61/284278, подану 16 грудня, 2009), Cry2Aa (див. заявку США реєстр. № 61/284278, подану 16 грудня 2009) і DIG-3 (див. заявку США 201000269223). У деяких переважних

10 варіантах "піраміди", вибрані токсини мають три різні механізми дії проти FAW, і такими переважними пірамідними комбінаціями є Cry1Fa плюс Cry1Ca плюс інший токсин/ген, вибраний з групи, що складається з Vip3Ab, Cry1D (див. заявку США реєстр. № 61/284252, подану 16 грудня, 2009), Cry1Be і Cry1E (див. заявку США реєстр. № 61/284278, подану 16 грудня 2009).

20 Рослини (і посівні площі, засіяні такими рослинами), які продукують ці три токсини, входять в об'єм даного винаходу. Можуть бути також додані додаткові токсини/гени, і ці конкретні трикомпонентні кластери, відповідно до даного винаходу, будуть, як несподівано було виявлено, переважно діяти проти FAW по трьох механізмах. Це дозволяє знизити або уникнути потреби в площах-"сховищах" нетрансгенних культур. Таким чином, в даному винаході

25 розглядається висівна площа понад 10 акрів.

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

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

Комбінації токсинів, описаних в даному винаході, можуть бути використані для боротьби з лускокрилими шкідниками. Дорослі лускокрилі, наприклад, метелики і молі, харчуються, головним чином, нектаром і відіграють значну роль в запиленні. Майже всі личинки лускокрилих, тобто, гусениці, поїдають рослини, і багато з них є небезпечними шкідниками. Гусениці живуть на листі або поїдають внутрішню частину листя, або вони пошкоджують коріння або стебла рослини, що приводить до виснаження поживних речовин у рослини, і в більшості випадків, до руйнування основної фізичної структури рослини. Крім того, гусениці пошкоджують

35 плоди, тканини і зерно, що зберігається, і борошно, в результаті чого продукти або взагалі стають непридатними для продажу, або їх комерційна цінність значно знижується. Використовуваний тут термін "лускокрилі шкідники" також стосується різних стадій життєвого циклу шкідника, включаючи стадії розвитку личинок.

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

45 межі коровою частини токсину) може зберігатися, причому, перехід в гетерологічну частину протоксину може відбуватися нижче.

Одним з прикладів може служити один химерний токсин згідно з винаходом, який являє собою повнорозмірну частину корового токсину Cry1Fa (амінокислоти 1-601) і гетерологічний протоксин (амінокислоти від положення 602 до С-кінця). У одному переважному варіанті

55 винаходу, частина химерного токсину, що містить протоксин, походить від токсину білка Cry1Ab. Другим прикладом може служити другий химерний токсин згідно з винаходом, який описаний в SEQ ID NO:1 і являє собою частину повнорозмірного корового токсину Cry1Ca (амінокислоти 1-619) і гетерологічний протоксин (амінокислоти від положення 620 до С-кінця). У переважному варіанті винаходу, частина химерного токсину, що містить протоксин, походить від токсину білка Cry1Ab.

60

Для фахівців в даній галузі очевидно, що токсини Bt, навіть токсини, які належать до певного класу, такого як Cry1F, можуть до деякої міри варіюватися по своїй довжині і точній локалізації переходу від частини корового токсину в частину протоксину. Звичайно, токсини Cry1Ca і Cry1Fa мають довжину приблизно від 1150 до 1200 амінокислот. Перехід від частини корового токсину в частину протоксину звичайно відбувається на ділянці між частинами, що складають приблизно від 50 % і приблизно до 60 % від всієї довжини токсину. Химерний токсин згідно з винаходом включає повнорозмірну область цієї N-кінцевої частини корового токсину. Таким чином, химерний токсин містить щонайменше приблизно 50 % повнорозмірного білка Cry1Fa токсину Bt або щонайменше приблизно 50 % повнорозмірного білка токсину Cry1Ca. Цей білок має довжину, що звичайно складає щонайменше приблизно 590 амінокислот. Що стосується частини протоксину, то повнорозмірна область частини протоксину Cry1Ab простягається від кінця частини корового токсину до C-кінця молекули.

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

Межі ідентичності, що використовуються тут, становлять приблизно 95 % (Cry1Fa і Cry1Ca), 78 % (Cry1F і Cry1C) і 45 % (Cry1) відповідно до "змін номенклатури для пестицидних кристалічних білків *Bacillus thuringiensis*" ("Revision of the Nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Proteins", N. Crickmore, D.R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, and D.H. Dean. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* (1998) Vol 62: 807-813). Такі межі можуть бути також застосовані тільки для корових токсинів (для токсинів Cry1F і Cry1C).

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

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

Іншим методом ідентифікації генів, що кодують токсини і частини генів, що використовуються в даному винаході, є застосування олігонуклеотидних зондів. Такими зондами є нуклеотидні послідовності, що детектуються. Такі послідовності можуть бути детектовані за допомогою відповідної мітки, або вони можуть бути спочатку зроблені флуоресцентними, як описано в Міжнародній заявці No. WO93/16094. Як добре відомо фахівцям, якщо молекула-зонд і зразок нуклеїнової кислоти гібридизуються за допомогою утворення міцного зв'язку між двома молекулами, то розумно передбачити, що такий зонд і зразок будуть мати значну гомологію. Гібридизацію, переважно, проводять в жорстких умовах із застосуванням методів, добре відомих фахівцям, наприклад, описаних Keller, G. H., M. M. Manak (1987) *DNA Probes*, Stockton Press, New York, N.Y., pp. 169-170. Нижче приводяться деякі приклади комбінацій концентрацій солі і температур (в порядку зростання жорсткості): 2 × SSPE або SSC при кімнатній температурі; 1 × SSPE або SSC при 42 °C; 0,1 × SSPE або SSC при

42 °C; 0,1 × SSPE або SSC при 65 °C. Детектування зонда являє собою відомий метод, що застосовується для того, щоб визначити, відбувається гібридизація чи ні. Такий аналіз з використанням зонда являє собою швидкий метод ідентифікації токсин-кодуєчих генів згідно з винаходом. Нуклеотидні сегменти, що використовуються як зонди згідно з винаходом, можуть

бути синтезовані на синтезаторі ДНК відповідно до стандартних процедур. Ці нуклеотидні послідовності можуть бути також використані як ПЛР-праймери для ампліфікації генів згідно з винаходом.

Варіанти токсинів. Деякі токсини згідно з винаходом конкретно описані в даний заявці. Оскільки ці токсини приводяться тут просто як приклади токсинів згідно з винаходом, то потрібно зазначити, що даний винахід включає варіанти токсинів або еквівалентні токсини (і нуклеотидні послідовності, що кодують еквівалентні токсини), що мають таку ж пестицидну активність, як і представлений тут токсин, або аналогічну активність. Еквівалентні токсини мають амінокислотну послідовність, гомологічну амінокислотну послідовність представленого тут токсину. Така гомологія амінокислотних послідовностей звичайно складає більше ніж 75 %, переважно, більше ніж 90 %, а найбільш переважно, більше ніж 95 %. Гомологія амінокислотних послідовностей є найвищою в критичних областях токсину, що відповідають за біологічну активність або визначають тривимірну конфігурацію, яка, зрештою, відповідальна за біологічну активність. Відповідно до цього, деякі амінокислотні заміни є допустимими і можуть бути присутнім в тих областях, які не грають важливої ролі в повідомленні активності, або є консервативними амінокислотними замінами, які не впливають на тривимірну конфігурацію молекули. Так, наприклад, амінокислоти можуть бути поділені на наступні класи: неполярні, незаряджені полярні, основні і кислотні. Таким чином, при консервативних замінах, амінокислоту одного класу замінюють іншою амінокислотою того ж типу, і така заміна входить в об'єм даного винаходу, при умові, що вона, фактично, не буде впливати на біологічну активність сполуки. У таблиці 1 представлений список прикладів амінокислот, що належать до кожного класу.

Таблиця 1

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

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

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

Якщо ген токсину Bt вводять мікробу-хазяїну за допомогою прийнятного вектора, і якщо вказаного хазяїна вносять в середовище проживання в живому вигляді, то важливо, щоб були використані певні мікроби-хазяїни. При цьому, вибирають такі мікроорганізми-хазяїни, які, як відомо, займають певну "фітосферу" (філоплан, філосферу, ризосферу і/або ризоплан) однієї або декількох представляючих інтерес культур. Ці мікроорганізми вибирають так, щоб вони мали здатність успішно конкурувати в конкретних умовах (в культурі і в іншому середовищі проживання комах) з мікроорганізмами дикого типу, забезпечували стабільне збереження і

експресію генів, що кодують поліпептид-пестицид, і бажано, забезпечували кращий захист пестициду від руйнування і інактивації в умовах навколишнього середовища.

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

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

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

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

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

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

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

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

Клітини B.t., що продукують токсини згідно з винаходом, можуть бути культивовані з використанням стандартних середовищ і методом ферментації. Після завершення циклу ферментації, бактерії можуть бути зібрані спочатку шляхом відділення спор і кристалів B.t. від збродженого бульйону стандартними методами. Виділені спори і кристали B.t. можуть бути приготовані у вигляді змочуваного порошку, рідкого концентрату, гранул або інших препаратів, отриманих шляхом додавання поверхнево-активних речовин, диспергуючих речовин, інертних носіїв і інших компонентів, що полегшують транспортування, і обробку ними конкретних шкідників-мішеней. Такі процедури приготування і застосування добре відомі фахівцям.

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

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

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

Трансформація рослин. Переважними рекомбінантними хазяїнами, які можуть бути використані для продукування інсектицидних білків згідно з винаходом, є трансформовані рослини. Гени, що кодують описані тут білки токсинів Bt, можуть бути введені в рослинні клітини із застосуванням різних методів, добре відомих фахівцям. Так, наприклад, існує велике число клонуючих векторів, що містять систему реплікації в *Escherichia coli*, і маркер, що дозволяє провести відбір трансформованих клітин, і ці вектори можуть бути використані з метою отримання препарату для інсерції чужорідних генів у вищі рослини. Вектори містять, наприклад, *inter alia* pBR322, серії pUC, серії M13mp, pACYC184. Відповідно до цього, ДНК-фрагмент, що має послідовність, яка кодує білок токсину Bt, може бути вбудований у вектор у прийнятний рестрикційний сайт. Отриману плазмиду використовують для трансформації *E. coli*. Клітини *E. coli* культивують у прийнятному поживному середовищі, а потім збирають і піддають лізису. Потім цю плазмиду виділяють. Методами аналізу звичайно є аналіз послідовності, рестрикційний аналіз, електрофорез і інші методи, що застосовуються в біохімії і молекулярній біології. Після

кожної маніпуляції, послідовність ДНК, що використовується, може бути розщеплена і приєднана до наступної послідовності ДНК. Кожна послідовність плазміди може бути клонована в одній і тій же або в інших плазмідах. Залежно від методу вбудовування потрібних генів в рослину, можуть виявитися необхідними і інші послідовності ДНК. Так, наприклад, якщо

плазмиду Tі або Rі використовують для трансформації клітин рослини, то щонайменше правий кордон, а в більшості випадків, правий і лівий кордони T-ДНК-плазмиди Tі або Rі приєднують як фланкуючі області генів, що вбудовуються. Використання T-ДНК для трансформації клітин рослин було ретельно досліджене і детально описане в EP 120516, Lee and Gelvin (2008), Hoekema (1985), Fraley et al., (1986), і An et al., (1985), і добре відомо фахівцям.

Після інтеграції вбудованої ДНК у геном рослини, така ДНК стає відносно стабільною. Трансформуючий вектор звичайно містить селективний маркер, що повідомляє трансформованим клітинам рослини резистентність до біоциду або антибіотика, такими як біалафос, канаміцин, G418, блеоміцин або гігromіцин, inter alia. З використанням окремо взятого маркера можна, відповідно, здійснювати відбір трансформованих клітин, а не клітин, що не містять вбудовану ДНК.

Існує багато методів, що підходять для вбудовування ДНК у клітини рослин-хазяїнів. Такими методами є трансформація молекулою T-ДНК із використанням *Agrobacterium tumefaciens* або *Agrobacterium rhizogenes* як трансформуючих агентів, злиття, інжекція, біобалістичні методи (бомбардування мікрочастинками) або електропорація, а також інші можливі методи. Якщо для трансформації використовуються агробактерії, то вбудовувану ДНК клонують у конкретні плазмиди, а саме, у проміжний або вектор у бінарний вектор. Проміжні вектори можуть бути інтегровані в плазмиду Tі або Rі за допомогою гомологічної рекомбінації з використанням послідовностей, гомологічних послідовностям, що є присутніми у T-ДНК. Плазмиди Tі або Rі також містять область *vir*, необхідну для переносу T-ДНК. Проміжні вектори не можуть самі реплікуватися в агробактеріях. Проміжний вектор може бути перенесений у *Agrobacterium tumefaciens* за допомогою хелперної плазмиди (кон'югування). Бінарні вектори можуть самі реплікуватися як у *E. coli*, так і в агробактеріях. Вони містять селективний маркерний ген і лінкер або полілінкер, що замикають праву і ліву приграничні області T-ДНК. Вони можуть бути трансформовані безпосередньо в агробактерії (Holsters et al., 1978). Агробактерія, використовувана як клітина-хазяїна, містить плазмиду, що несе область *vir*. Область *vir* необхідна для перенесення T-ДНК у клітину рослини. Може також бути присутньою і додаткова T-ДНК. Трансформовану в такий спосіб бактерію використовують для трансформації клітин рослин. Рослинні експлантати можуть бути переважно культивовані з *Agrobacterium tumefaciens* або *Agrobacterium rhizogenes* для перенесення ДНК у клітину рослини. Потім цілі рослини можуть бути вирощені з інфікованого рослинного матеріалу (наприклад, зі шматочків листя, сегментів стебел, коренів, а також протопластів або клітин, культивованих суспензійним методом) у придатному середовищі, що може містити антибіотики або біоциди для відбору. Потім вирощені в такий спосіб рослини можуть бути протестовані на присутність вбудованої ДНК. У випадку інжекції і електропорації, яких-небудь спеціальних вимог до одержання плазмід не пред'являється. При цьому, можуть бути використані стандартні плазмиди, такі як, наприклад, похідні pUC.

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

У переважному варіанті винаходу, рослини трансформують генами, у яких зустрічальність кодонів оптимізована для рослин. Див, наприклад, патент США No. 5380831, що вводиться в даний опис за допомогою посилання. Хоча в даній заявці описані деякі зрізані токсини, однак, фахівцям з Bt добре відомо, що токсини, які належать до типу токсинів довжиною 130 кДа (повнорозмірні), мають N-кінцеву половину, що являє собою коровий токсин, і C-кінцеву половину, що являє собою протоксиновий "хвіст". Таким чином, відповідні "хвости" можуть бути використані разом із зрізаними/коровими токсинами відповідно до винаходу. Див., наприклад, патент США № 6218188 і патент США № 6673990. Крім того, методи створення синтетичних генів Bt для їхнього використання в рослинах відомі фахівцям (Stewart and Burgin, 2007). Одним з необмежуваних прикладів переважної трансформованої рослини є фертильна рослина кукурудзи, що містить експресований у рослині ген, що кодує білок Cry1Fa, а також другий експресований у рослині ген, що кодує білок Cry1Ca.

Перенесення (або інтрогресія) Cry1Fa- і Cry1Ca-детермінованої(их) ознаки(к) в інбредні лінії кукурудзи може бути досягнуто шляхом рекурентного селективного схрещування, наприклад,

зворотного схрещування. У цьому випадку, потрібну рекурентну рослину спочатку схрещують з інбредним донором (нерекурентним батьком), що несе відповідний(і) ген(и), що повідомляє(ють) Cry1F- і Cry1C-детерміновані ознаки. Потім потомство цього кроса піддають зворотному схрещуванню з рекурентною рослиною з наступним відбором отриманого потомства на потрібну(і) ознаку(и), перенесену(і) від нереккурентного батька. Через три, переважно, чотири, а ще більш переважно, через п'ять або більше поколінь "бекросів" з рекурентним батьком з відбором на потрібну(і) ознаку(и), потомство буде гетерозиготним по локусах, що контролює перенесену(і) ознаку(и), але воно буде аналогічно рекурентному батьку по більшості або майже по всіх інших генах (див., наприклад, Poehlman & Sleper (1995) *Breeding Field Crops*, 4th Ed., 172-175; Fehr (1987) *Principles of Cultivar Development*, Vol. 1: Theory and Technique, 360-376).

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

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

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

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

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

Блоки:

Внутрішні (тобто, у полях з Bt)

Зовнішні (тобто, окремі поля в межах ½ милі (по можливості ¼ милі) від Bt-поля для максимізації вільного схрещування)

Смужки регулярно оброблюваних сільськогосподарських земель:

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

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

"Вимоги до IRM у випадку кукурудзяного трача:

- Засівати щонайменше 20 % акрів кукурудзою для збереження нетрансгенних гібридів

- У регіонах вирощування бавовнику, повинно залишатися 50 % площі-сховища

- Повинно бути засіяно 1/2 милі нетрансгенними гібридами

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Якщо це не зазначено або не мається на увазі конкретно, то використовувані тут артикли "а", "an" і "the" означають "щонайменше один".

Приклад 1

Конструювання химерних білків, що містять корові токсини Cry1Ca і протоксини Cry1Ab

Химерні токсини. Химерні білки, що містять домен корового токсину одного Cry, приєднаного до протоксинового сегмента іншого токсину Cry, були вже описані, наприклад, у патенті США № 5593881 і в патенті США № 5932209. Послідовність білка ендотоксину Cry1Ca3-дельта депонована у GenBank під реєстраційним номером AAA22343 під застарілим позначенням Cry1C(b).

Варіантами химерних білків Cry1Ca відповідно до винаходу є химерні токсини, що містять N-кінцевий сегмент корового токсину, що походить від інсектицидного токсину Cry1Ca3, приєднаного до гетерологічного протоксинового сегмента ендотоксину дельта у визначеному положенні, розташованому за межами сегмента корового токсину. Перехід від корового токсину в гетерологічний сегмент протоксину може відбуватися приблизно в природній області стику токсин/протоксин, або альтернативно, частина нативного протоксину (що простягається за межі сегмента корового токсину) може зберігатися, причому, перехід у гетерологічний протоксин може відбуватися нижче. В одному з варіантів, сегменти корового токсину і протоксину можуть включати точно таку ж амінокислотну послідовність нативних токсинів, від яких вони походять, або вони можуть включати амінокислотні додавання, делеції або заміни, що не погіршують, а можуть навіть поліпшувати біологічну функцію сегментів, зв'язаних один з одним.

Так, наприклад, химерний токсин відповідно до винаходу містить сегмент корового токсину, що походить від Cry1Ca3, і гетерологічний протоксин. У переважному варіанті винаходу, сегмент корового токсину, що походить від Cry1Ca3 (619 амінокислот), приєднаний до гетерологічного сегмента, який містить сегмент протоксину, що походить від дельта-ендотоксину Cry1Ab (545 амінокислот). Послідовність химерного білка з 1164 амінокислот, позначеного тут DIG-152, представлена як SEQ ID NO:1. Другий переважний варіант винаходу включає химерний білок, у якому сегмент корового токсину Cry1Ca (619 амінокислот) приєднаний до другого сегмента протоксину з 545 амінокислот, що походить від Cry1Ab. Послідовність другого химерного білка з 1164 амінокислот, позначеного тут DIG-109, представлена як SEQ ID NO:2 (варіант, оптимізований для кукурудзи). Слід зазначити, що в об'єм даного винаходу входять і інші химерні гібриди, що містять варіанти корового токсину Cry1Ca і протоксини, що походять від Cry1Ab.

Слід зазначити, що химерні білки DIG-152 і DIG-109, по суті, функціонально еквівалентні один одному, і відрізняються тільки в одному положенні послідовності (у положенні амінокислоти 620, що є положенням приєднання сегмента корового токсину Cry1Ca до сегмента протоксину Cry1Ab).

Приклад 2

Конструювання експресійних плазмід, що кодують химерні білки "коровий токсин Cry1Ca/протоксин Cry1Ab", і їх експресія в *Pseudomonas*

Для створення експресійної конструкції pMYC2547 *Pseudomonas fluorescens* (Pf), отриманої з метою продукування повнорозмірного химерного білка DIG-152 (представленого в SEQ ID NO:1) біли застосовані стандартні методи клонування (описані, наприклад, у посібнику Sambrook et al, (1989) і Ausubel et al, (1995), і в більш пізніх виданнях). Продукування білка здійснювали в штамі MB214 *Pseudomonas fluorescens* (похідному штаму MB101; *P. fluorescens*, біовар 1), що має інсерцію модифікованого оперону lac, як описано в патенті США № 5169760. Основна стратегія клонування включає субклонування фрагмента ДНК, що кодує DIG-152, у плазмідні вектори, у результаті чого цей фрагмент буде поміщений під експресійний контроль

промотору P_{tac} і термінатора grnBTI2, що походить від плазмиди pKK223-3 (PL Pharmacia, Milwaukee, WI). Одна з таких плазмід позначається pMYC2547, а ізолят MB214, що містить цю плазмиду, позначається Dpf108.

Аналіз на ріст і експресію в шейкерних колбах

Продуктування білка DIG-152 для характеристики і біологічного аналізу на його дію проти комах здійснювали з використанням штаму Dpf108 *P. fluorescens*, вирощеного в шейкерних колбах. Продуктування білка DIG-152, що знаходиться під контролем промотору P_{tac}, здійснювали, як описано раніше в патенті США No. 5527883. Докладний опис мікробіологічних маніпуляцій приводиться в публікації Squires et al., (2004), у заявці на патент США 20060008877, у заявці на патент США 20080193974 і в заявці на патент США 20080058262, що вводяться в даний опис за допомогою посилання. Експресія була індукована шляхом додавання ізопропіл-β-D-1-тіогалактопіранозиду (IPTG) після першого інкубування протягом 24 годин при 30 °C зі струшуванням. Зразки культур брали під час індукування й у різні періоди часу після індукування. Клітинну густину вимірювали по оптичній густині на 600 нм (OD₆₀₀).

Фракціонування клітин і аналіз зразків у шейкерних колбах, проведений за допомогою електрофорезу в ПААГ із ДСН. При кожному взятті зразка, клітинну густину зразків доводили до OD₆₀₀=20, і 1 мл-аліквоти центрифугували при 14000 x g протягом п'яти хвилин. Клітинний осад заморожували при -80 °C. Розчинні і нерозчинні фракції, узяті з заморожених зразків клітинного осаду в шейкерних колбах, одержували з використанням розчину для екстракції бактеріального білка EasyLyse™ (EPICENTRE® Biotechnologies, Madison, WI). Кожен клітинний осад ресуспендували в 1 мл розчину EasyLyse™, а потім розводили 1:4 у буфері для лізису і інкубували зі струшуванням при кімнатній температурі протягом 30 хвилин. Лізат центрифугували при 14000 об/хв протягом 20 хвилин при 40C, і супернатант виділяли у виді розчинної фракції. Потім осад (нерозчинну фракцію) ресуспендували в рівному обсязі забуференого фосфатом фізіологічного розчину (PBS; 11,9 mM Na₂HPO₄, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,4).

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

Одержання тілець включення. Одержання тілець включення білка DIG-152 (IB) здійснювали в клітинах, отриманих шляхом реакції ферментації *P. fluorescens*, що продукували нерозчинний інсектицидний Bt-білок, як показав аналіз, проведений за допомогою електрофорезу в ПААГ із ДСН і MALDI-MS (матрична лазерна десорбція/іонізуюча мас-спектрометрія). Гранули, отримані шляхом ферментації *P. fluorescens*, відтавали на водяній бані при 37 °C. Клітини ресуспендували до 25 % мас/об у буфері для лізису [50 мм трісу, pH 7,5, 200 мм NaCl, 20 мм EDTA-динатрієвої солі (етилендіамінтетраоцтової кислоти), 1 % тритону X-100 і 5 мм дитіотреїтолу (DTT); 5 мл/л "коктейлю" інгібіторів бактеріальної протеази (Catalog # P8465; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), що додавали безпосередньо перед застосуванням]. Клітини суспендували на гомогенізаторі з ручним керуванням з установкою шкали найменшого значення (Tissue Tearor, BioSpec Products, Inc., Bartlesville, OK). Лізоцим (25 мг Sigma L7651, виділеного з білка курячих яєць) додавали до клітинної суспензії шляхом змішування металевим шпателем, і суспензію інкубували при кімнатній температурі протягом однієї години. Суспензію прохолоджували на льоду протягом 15 хвилин, а потім обробляли ультразвуком на ультразвуковому генераторі Branson Sonifier 250 (два раунди по 1 хвилині, 50 % черговий цикл, 30 % вихід). Лізис клітин підтверджували за допомогою мікроскопії. При необхідності додавали 25 мг лізоциму, а потім інкубування й обробку ультразвуком повторювали. Після підтвердження лізису клітин під мікроскопом, лізат центрифугували при 11500 x g протягом 25 хвилин (4 °C) з одержанням осаду тілець включення (IB), і супернатант відкидали. Осад IB ресуспендували з 100 мл буфера для лізису, гомогенізували в міксері з ручним керуванням і центрифугували як описані вище. Осад IB повторно промивали шляхом ресуспендування (у 50 мл буфери для лізису), гомогенізації, обробки ультразвуком і центрифугування доти, доки супернатант не ставав безбарвним, а осад IB твердим і не зовсім білим. Для кінцевого промивання, осад IB ресуспендували в стерильно відфільтрованій (на фільтрі 0,22 мкм) дистильованій воді, що містить 2 mM EDTA, і центрифугували. Кінцевий осад ресуспендували в стерильно відфільтрованій дистильованій воді, що містить 2 mM EDTA, і зберігали у вигляді 1 мл-аліквот при -80 °C.

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

Солюбілізація тілець включення. 6 мл суспензії тілець включення DIG-152 від клону Pf, DPf108, центрифугували на мікроцентрифузі Еппендорфа моделі 5415С, установленій на найвище значення (приблизно 14000 x g), у результаті чого одержували осад тілець включення. Супернатант буфера для збереження видаляли і замінювали 25 мл 100 мМ натрійкарбонатного буфера, рН 11, у конічній 50 мл-пробірці. Тельця включення ресуспендували піпеткою і піддавали вихровому перемішуванню до одержання однорідної суміші. Пробірку поміщали на платформу, що повільно обертається, і залишали на ніч при 4 °С для екстракції білка-мішені. Екстракт центрифугували при 30000 x g протягом 30 хвилин при 4 °С, і отриманий супернатант 5-кратно концентрували на центрифугальному фільтруючому пристрої з регенованою целюлозою Amicon Ultra-15 (з відсіканням молекулярної маси 30000; Millipore). Буфер для зразків замінювали 10 мМ CAPS [3-(циклогексаміно)-1-пропансульфоновою кислотою], рН 10, з використанням одноразових стовпчиків PD-10 (GE Healthcare, Piscataway, NJ).

Солюбілізація білка тілець включення і їх активація трипсином. У деяких випадках, суспензію DIG-152 тілець включення від клону Pf, DPf108, центрифугували на мікроцентрифузі Еппендорфа моделі 5415С, установленій на найвище значення (приблизно 14000 x g), у результаті чого одержували осад тілець включення. Супернатант буфера для збереження видаляли і замінювали 100 мМ CAPS, рН 11, з одержанням білка, концентрація якого складала приблизно 50 мг/мл. Пробірку обертали при кімнатній температурі протягом трьох годин до повної солюбілізації білка. Потім додавали трипсин у рівних кількостях до 5 %-10 % (мас. %, по вихідній масі порошку ІВ) і здійснювали гідроліз шляхом інкубування при обертанні протягом ночі при 4 °С або обертанні протягом 90-120 хвилин при кімнатній температурі. Нерозчинний матеріал видаляли шляхом центрифугування при 10000 x g протягом 15 хвилин, і супернатант наносили на аніонообмінну колонку MonoQ (10 мм × 10 див). Активованій білок DIG-152 елюювали (як було визначено за допомогою електрофорезу в ПААГ із ДСН) 25 колонковими об'ємами 0 % - 100 % 1М градієнта NaCl. Фракції, що містять активований білок, поєднували, і при необхідності, концентрували до менше ніж 10 мл на центрифугальному фільтруючому пристрої з регенованою целюлозою Amicon Ultra-15 як описано вище. Потім матеріал пропускали через стовпчик з Superdex 200 (16 мм × 60 см) у буфері, що містить 100 мМ NaCl, 10 % гліцерину, 0,5 % твіну-20 і 1 мМ EDTA. Аналіз, проведений за допомогою електрофорезу в ПААГ із ДСН, показав, що активований (ферментативно зрізаний) білок елюється при 65-70 мл. Фракції, що містять активований білок, збирали і концентрували на центрифугальному концентраторі як описано вище.

Гель-електрофорез. Препарати концентрованого білка одержували для проведення електрофорезу шляхом розведення 1:50 у буфері для зразків LDS NuPAGE® (Invitrogen), що містить 5 мМ DTT як відновник, і нагрівали при 95 °С протягом 4 хвилин. Зразок завантажували на доріжки-дублікати з 4-12 % гелем NuPAGE® разом з п'ятьма BSA-стандартами в кількості від 0,2 мкг до 2 мкг/доріжку (для побудови стандартної кривої). Потім подавали напругу в 200 В з використанням буфера MOPS для електрофорезу з ДНС (Invitrogen) доти, доки барвник-"свідок" не досягав основи гелю. Гель забарвлювали 0,2 % кумасі синім G-250 у 45 % метанолі, 10 % оцтовою кислотою, і знебарвлювали спочатку шляхом швидкої обробки 45 % метанолом, 10 % оцтовою кислотою, а потім шляхом тривалої обробки 7 % оцтовою кислотою, 5 % метанолом до появи прозорого тла. Після знебарвлення, гель сканували на мультівізуалізаторі BioRad Fluor-S. Для одержання об'ємів пофарбованих смуг білка з вирахуванням тла і для побудови стандартної кривої BSA, що була використана для обчислення концентрації химерного білка DIG-152 у маточному розчині, використовували комп'ютерну програму Quantity One Software v.4.5.2.

Приклад 3

Інсектицидна активність білка DIG-152, що продукується в *Pseudomonas fluorescens*

Інсектицидна активність білка DIG-152 була продемонстрована на личинках совки трав'яної (FAW, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)) і на личинках Cry1F-резистентною FAW (rFAW).

Приготування і біоаналізи зразків. Препарати тілець включення (нативного повнорозмірного білка або білка, активованого трипсином) переносили в 10 мМ CAPS-буфер, рН10, методами заміни буфера, такими як діаліз, або на колонках PD-10. Потім зразки відповідним чином розводили в 10 мМ CAPS, рН 10, і всі біоаналітичні препарати містили контроль, що складається з цього буфера, який служив як фон для підтвердження загибелі комах або інгібування їх розвитку.

Концентрації білків в буфері для біоаналізу оцінювали за допомогою гель-електрофорезу з використанням BSA з метою побудови стандартної денситометричної кривої для гелю, і цей аналіз проводили з використанням системи візуалізації BioRad, як описано вище. Білки в гелевій матриці забарвлювали барвником на основі кумасі синього, і перед прочитанням знебарвлювали.

Очищені білки тестували на інсектицидну активність за допомогою біоаналізів, що проводяться з використанням щойно личинок, що вилупилися лускокрилих, яким давали штучний корм для комах. Личинки FAW вилуплювалися з яєць, отриманих з колоній, що зберігаються в комерційно доступному інсектарії (Benzon Research Inc., Carlisle, PA). Личинки rFAW вилуплювалися з яєць, отриманих з непромислових колоній (Dow AgroSciences, Indianapolis, IN).

Біоаналізи проводили в 128-ямкових пластикових планшетах, спеціально виготовлених для біоаналізів комах (C-D International, Pitman, NJ). Кожна ямка містила 1,0 мл корму для лускокрилих багатьох видів (Southland Products, Lake Village, AR). 40 аліквот зразка білка наносили піпеткою на поверхню в 1,5 см² кожної ямки з кормом (тобто, 26 мкл/см²). Концентрацію корму обчислювали як кількість (нг) білка DIG-152 на квадратний сантиметр площі поверхні в ямку. Оброблена ямка витримувала у витяжному шафі доти, поки рідина на поверхні корму не випаровувалася або не вбиралася в цьому кормі.

Протягом декількох часів розмноження, окремі личинки збирали зволоженою щіткою з верблюжкої вовни і вміщували на оброблений корм, одну личинку на ямку. Потім заражену ямку герметично закривали клейкими прозорими пластиковими пластинами, і забезпечували отвором для газообміну (C-D International). Планшети для біоаналізу витримували в регульованих умовах навколишнього середовища [28°, відносна вологість приблизно 40 % (ВВ), 16 год.:8 год. (день:ніч)] протягом 5 днів, після чого реєстрували загальне число комах, оброблених кожним зразком білка, число загиблих комах і масу комах, що вижили. Процент загиблих комах і процент інгібування їх росту обчислювали для кожної обробки. На кожній стадії обробки обчислювали процент загиблих комах і процент інгібування їх росту. Процент інгібування росту (GI) обчислювали таким чином:

$$\%GI = [1 - (TWIT/TNIT)/(TWIBC/TNIBC)] \times 100,$$

де TWIT означає загальну масу комах для даної обробки (Total Weight of Insects in the Treatment),

TNIT означає загальне число комах для даної обробки (Total Number of Insects in the Treatment),

TWIBC означає загальну масу комах в фоновому контролі (Total Weight of Insects in the Background Check) (буфер-контроль), і

TNIBC означає загальне число комах в фоновому контролі (Total Number of Insects in the Background Check) (буфер-контроль).

GI₅₀ визначали як концентрацію химерного білка DIG-152 в кормі, де величина %GI дорівнює 50. LC₅₀ (50 % летальну концентрацію) реєстрували як концентрацію білка DIG-152 в кормі, при якій гинуло 50 % тестованих комах. Статистичний аналіз (односторонній ANOVA) проводили з використанням комп'ютерної програми JMP (SAS, Cary, NC).

У таблиці 2 представлені результати біоаналізів білка DIG-152 на його поїдання личинками комахи совки трав'яної.

Таблиця 2

Величини GI_{50} і LC_{50} (в $нг/см^2$), обчислені для
корму комах, на верхню частину
якого був нанесений білок DIG-152

FAW		rFAW	
GI_{50}	LC_{50}	GI_{50}	LC_{50}
38,1	2828,7	78,9	2210,9

Відмітною ознакою білка DIG-152 згідно з винаходом є те, що ріст личинок совки трав'яної, які щойно вилупилися (*Spodoptera frugiperda*), інгібується після поїдання білка або DIG-152. Крім того, личинки совки трав'яної, які є резистентними до інтоксикації білком Cry1Fa, залишаються сприйнятливими до активності DIG-152, як і личинки совки трав'яної дикого типу. Значущість сприйнятливості цих Cry1Fa-резистентних комах до Cry1Ca детальніше обговорювалася вище.

Приклад 4

Конструювання послідовності, що оптимізована по кодонах кукурудзи і кодує білок DIG-109
Фахівцеві в галузі молекулярної біології рослин відомо, що множина послідовностей ДНК може бути сконструйована так, щоб вони кодували одну амінокислотну послідовність. Загальновідомий спосіб підвищення рівня експресії області, що кодує що представляє інтерес білок, полягає в створенні такої кодувальної області, в якій склад кодонів аналогічний загальному складу кодонів хазяїна, в якому повинна бути досягнута експресія генів. Посібник по конструюванню і продукуванню синтетичних генів можна знайти, наприклад, в заявці WO 1997/13402 і в патенті США № 5380831.

Послідовність ДНК, що має зміщення кодонів кукурудзи, конструювали і синтезували так, щоб вона продукувала химерний інсектицидний білок DIG-109 в трансгенних однодольних рослинах. Таблицю зустрічання кодонів в кукурудзі (*Zea mays* L.) складали виходячи з 706 білок-кодувальних послідовностей, виведених з послідовностей, депонованих в GenBank (world wide web: ncbi.nlm.nih.gov). Середньоваговий набір кукурудзяних кодонів обчислювали шляхом виключення будь-якого надлишкового кодону, кількість якого складає приблизно менше ніж 10 % від загального зустрічання кодонів для даної амінокислоти. Середньовагове уявлення для кожного кодону обчислювали за формулою:

Середньоваговий $\% C1 = 1/(\%C1 + \%C2 + \%C3 + \dots) \times \%C1 \times 100$, де C1 являє собою кодон, що розглядається, а %C2, %C3 і т. п. означає середній % зустрічання інших синонімічних кодонів.

Для отримання послідовності ДНК, яка оптимізована по кодонах кукурудзи і кодує білок DIG-109 SEQ ID NO:2, що складається з 1164 амінокислот, були зроблені заміни кодонів в нативній послідовності ДНК cry1Ca, що кодує сегмент корового токсину Cry1Ca, в результаті чого була отримана послідовність ДНК, що має загальний склад оптимізованих для кукурудзи кодонів, представлена в таблиці зміщення кодонів. Аналогічним чином, заміни кодонів в нативній послідовності ДНК cry1Ab, що кодує сегмент протоксину Cry1Ab були зроблені так, щоб отримана послідовність ДНК мала загальний склад оптимізованих для кукурудзи кодонів, представлені в таблиці зміщення кодонів. Додаткові уточнення послідовностей були зроблені для усунення небажаних сайтів розпізнавання рестрикуючих ферментів, потенційних сайтів сплайсингу інтронів рослин, довгих ділянок залишків A/T або C/G, і інших мотивів, які можуть негативно впливати на стабільність РНК, транскрипцію або трансляцію кодувальної області в клітинах рослин. Для введення потрібних сайтів розпізнавання рестрикуючих ферментів і для видалення довгих внутрішніх відкритих рамок зчитування (крім рамок +1) були зроблені потрібні заміни. Всі ці заміни були зроблені на ділянках, в межах яких приблизно залишалось зміщення кодонів в порівнянні зі складом кодонів кукурудзи. Повна оптимізована по кодонам кукурудзу послідовність (що кодує білок DIG-109) представлена в SEQ ID NO:3. Синтез фрагмента ДНК здійснювали відповідно до інструкцій постачальника (DNA2.0, Menlo Park, CA).

Приклад 5

Конструювання рослинних трансформуючих векторів, що містять експресовані в рослині гени, що кодують білки DIG-109

Для трансформації однодольних рослин-хазяїнів звичайно використовується супербінарна система *Agrobacterium* (Japan Tobacco, Токуо, JP). У такій супербінарній системі використовується човниковий плазмідний вектор pSBI1, що містить послідовності повторів правого кордону Т-ДНК (RB) і повторів лівого кордону Т-ДНК (LB), розділений сайтами множинного клонування. Похідне pSBI1 (що позначається pDAB7691) отримували стандартними

методами клонування ДНК. Плазмід рDAB7691 містить оптимізовану для кукурудзи DIG-109-кодуючу послідовність (CDS; тобто, SEQ ID NO:3), що знаходиться під транскрипційним контролем промотору убіхітину 1 кукурудзи з приєднаним інтроном 1 (патент США № 5510474) і з приєднаною 3'-нетрансльованою областю Per5 кукурудзи (3' UTR) (патент США № 7179902).

Крім того, рDAB7691 містить рослинний селективний маркерний ген, що включає послідовність CDS DSM2 Dow AgroSciences (WO 2008/070845 A2), що знаходиться під транскрипційним контролем промотору актину 1 рису з приєднаним інтроном 1 (патент США № 5641876), і з 3'UTR ліпази кукурудзи (патент США № 7179902). Фізичне розташування компонентів Т-області рDAB7691 можна представити як:

RB> промотор Ubi1 кукурудзи:CDS DIG-109:3'UTR Per5 кукурудзи > промотор Act1 рису:CDS DSM2:3'UTR ліпази кукурудзи >LB.

Друге похідне рSB11 (що позначається рDAB100276) отримували стандартними методами клонування ДНК. Плазмід рDAB100276 містить оптимізовану по кодонах кукурудзи DIG-109-кодуючу послідовність (CDS; тобто, SEQ ID NO:3), що знаходиться під транскрипційним контролем промотору убіхітину 1 кукурудзи з приєднаними інтроном 1 і 3'UTR Per5 кукурудзи. Крім того, плазмід рDAB100276 містить рослинний селективний маркерний ген, що включає послідовність CDS AAD1 Dow AgroSciences (заявка на патент США № 20090093366), що знаходиться під транскрипційним контролем промотору убіхітину 1 кукурудзи з приєднаними інтроном 1 і 3'UTR ліпази кукурудзи. Фізичне розташування компонентів Т-області рDAB100276 можна представити як:

RB>промотор Ubi1 кукурудзи:CDS DIG-109:3'UTR Per5 кукурудзи>промотор Ubi1 кукурудзи:CDS AAD-1:3'UTR ліпази кукурудзи >LB.

Для трансформації *Agrobacterium*, клітини клонуючого штаму DH5α *Escherichia coli*, що містить плазмід рDAB7691 або плазмід рDAB100276, культивували при 37 °C протягом ночі на середовищі з агаром LB (г/л: триптон Bacto, 10; дріжджовий екстракт Bacto, 5; NaCl, 10; агар, 15), містили спектиноміцин (100 мкг/мл). Клітини штаму DH5α, що містять кон'югативну мобілізуючу плазмід рRK2013, культивували на агарі LB, що містить канаміцин (50 мкг/мл). Після інкубування, планшети вміщували при 4 °C для забезпечення доступності штаму LBA4404 *Agrobacterium tumefaciens*, що містить плазмід рSBI.

Приклад 6

Трансформація *Agrobacterium* для отримання супербінарних векторів

Супербінарна система *Agrobacterium*, в якій використовується штам LBA4404 *Agrobacterium tumefaciens*, що містить плазмід рSB1, звичайно застосовується для трансформації однодольних рослин-хазяїнів. Методика конструювання і підтвердження створення супербінарних векторів добре описана в Технічному посібнику для рSB1 (Japan Tobacco). Для генерування і підтвердження створення супербінарної плазмід рDAS5162, яка являє собою до-інтегровану плазмід, що містить плазмід рSBI і рDAB7691, і супербінарної плазмід рDAS5848, яка являє собою до-інтегровану плазмід, що містить плазмід рSBI і рDAB100276, застосовували стандартні методи мікробіології молекулярної біології.

Приклад 7

Продуктування білка DIG-109 в рослинах кукурудзи

Agrobacterium-опосередкована трансформація кукурудзи. Насіння від кросів F1 Hi-II (Armstrong et al., 1991) висівало в 5-галлонні горщики, що містять суміш 95 % культурального середовища Metro-Mix 360 без ґрунту (Sun Gro Horticulture, Bellevue, WA) і 5 % ґрунту з глиною/вапном. Рослини вирощували в теплиці з використанням комбінації натрієвих і галогенових ламп високого тиску в режимі освітлення 16 годин день: 8 годин ніч. Для отримання незрілих ембріонів F2, що використовуються для трансформації, здійснювали контрольоване запилення сибсів. Качани кукурудзи збирали приблизно через 8-10 днів після запилення, коли незрілі ембріони мали розмір від 1,0 мм до 2,0 мм.

Інфікування і спільне культивування. З качанів кукурудзи знімала листя, і поверхню стерилізували шляхом очищення рідким милом, просоченим в 20 % комерційно доступному відбілювачі (що містить 5 % гіпохлорит натрію), залишали приблизно на 20 хвилин, а потім три рази промивали стерильною водою. Суспензію клітин *Agrobacterium tumefaciens*, що містять рDAS5162, супербінарний вектор, що включає ген, який кодує білок DIG-109, і рослинний селективний маркерний ген DSM2, отримували шляхом перенесення 1 або 2 петель бактерій [культивовані протягом 2-3 днів при 28 °C на твердому середовищі YEP (г/л: дріжджовий екстракт Bacto, 10; пептон Bacto, 10; NaCl, 5; агар, 15), що містить 100 мг/л спектиноміцину, 10 мг/л тетрацикліну і 250 мг/л стрептоміцину] в 5 мл рідкого інфекційного середовища [базального середовища LS (Linsmaier and Skoog, 1965), вітаміни N6 (Chu et al., 1975), 1,5 мг/л 2,4-

дихлорфеноксіоцтової кислоти (2,4-D), 68,5 г/л сахарози, 36,0 г/л глюкози, 6 мМ L-проліну, pH 5.2], що містить 100 мкК ацетосирингону.

Альтернативно, суспензію клітин *Agrobacterium tumefaciens*, що містять pDAS5848, супербінарний вектор, що включає ген, кодуючий білок DIG-109 і рослинний селективний маркерний ген AAD-1, отримували шляхом перенесення 1 або 2 петель бактерії, культивовані як описано вище, в 5 мл рідких інфекційного середовища, що містить 100-200 мкМ ацетосирингону.

У обох випадках, розчин струшували до отримання однорідної суспензії, і її концентрацію доводили до кінцевої густини 200 одиниць Клетта за допомогою колориметра Клетта-Саммерсона з використанням пурпурного фільтра (для трансформації pDAS5162), або до оптичної густини 1,2 на 550 нм (для трансформації pDAS5848). Незрілі ембріони виділяли безпосередньо в мікроцентрифугальну пробірку, що містить 2 мл інфекційного середовища. Потім середовище видаляли і замінювали 1 мл розчину *Agrobacterium*, після чого розчин *Agrobacterium*/ембріон інкубували протягом 5-10 хвилин при кімнатній температурі. Потім ембріони переносили в середовище для спільного культивування [базальне середовище LS, вітаміни N6, 1,5 мг/л 2,4-D, 30,0 г/л сахарози, 6 мМ L-проліну, 0,85 мг/л AgNO_3 , 2,8 г/л геланової камеді (PhytoTechnology Laboratories, Lenexa, KS), pH 5,8], що містить 100 мкМ ацетосирингону (для трансформантів pDAS5162) або 100-200 мкК ацетосирингону (для трансформантів pDAS5848), і спільно культивували протягом 3-4 днів при 20 °C в темряві.

Після спільного культивування, ембріони переносили в регенеруюче середовище, що містить солі MS і вітаміни, 6 мМ L-проліну, 100 мг/г міо-інозиту, 500 мг/г MES, 30 г/л сахарози, 1,5 мг/г 2,4-D, 0,85 мг/г AgNO_3 , 250 мг/г цефотаксиму, 2,8 г/л геланової камеді, pH 5,8. Приблизно через 7 днів, ембріони переносили в те ж саме середовище, в яке було додано 3 мг/г біалофосу (для трансформантів pDAS5162) або 100 нМ галоксифопу (для трансформантів pDAS5848) (селективне середовище). Трансформовані ізоляти ідентифікували приблизно через 8 тижнів і об'єднували в загальну масу шляхом перенесення на свіже селективне середовище з 2-тижневими інтервалами для регенерації і аналізу.

Регенерація і продукування насіння. Для регенерації, культури переносили в індукційну середовище "28" (солі MS і вітаміни, 30 г/л сахарози, 5 мг/г бензиламінопурину, 1,5 мг/г 2,4-D, 250 мг/г цефотаксиму, 2,8 г/л геланової камеді, pH 5,7), в яку було додано 3 мг/г біалофосу (для трансформантів pDAS5162) або 100 нМ галоксифопу (для трансформантів pDAS5848). Інкубування проводили протягом 1 тижня в умовах слабкого освітлення ($14 \text{ мкЕм}^{-2}\text{с}^{-1}$), а потім протягом 1 тижня в умовах сильного освітлення (приблизно $89 \text{ мкЕм}^{-2}\text{с}^{-1}$). Потім тканини переносили в середовище для регенерації "36" (середовище, аналогічне індукційному середовищу, за винятком того, що воно не містило регуляторів росту рослини). Коли паростки досягали 3-5 см в довжину, рослини переносили в скляні пробірки для культивування, що містять середовище SHGA [(Schenk and Hildebrandt (1972), salts and vitamins; PhytoTechnologies Labr.), що містить 1,0 г/л міо-інозиту, 10 г/л сахарози і 2,0 г/л геланової камеді, pH 5,8] для подальшого культивування і розвитку пагонів і коріння. Рослини пересаджували в ту ж саму суміш ґрунту, описану раніше, і культивували в теплиці до початку цвітіння. Для отримання насіння проводили штучне запилення.

Для фахівця в галузі трансформації кукурудзи очевидно, що для трансформації кукурудзи і для відбирання трансформованих рослин можуть бути застосовані і інші методи у випадку використання інших експресованих в рослині селективних маркерних генів (наприклад, генів толерантності до гербіцидів).

Приклад 8

Біохімічний аналіз і біоаналізи рослин кукурудзи, продукуючих білок DIG-109, на токсичність для комах

Продукування білка DIG-109 в трансгенних рослинах кукурудзи оцінювали по білках, екстрагованих з листя молодих рослин (генерація T0). Два диски листя кукурудзи діаметром 6 мм вміщували в пробірку для зразків, взятую з глибокого 96-ямкового планшета з набором пробірок (Costar Cat# 3957), і заморожували до -80° і зберігали до початку аналізу. У день аналізу, два 4,5-мілілітрових покритих цинком BB Daisy™ додавали в кожну (заморожену) пробірку разом з 200 мкл буфера для екстракції, що складається з PBS (забуференого фосфатом розчину; Fisher Cat# BP665-1) і 0,05 % твіну 20. Кожну пробірку закривали кришкою, і планшет вміщували в кульовий млин (Kleco™ 4-96 Pulverizer; Garcia Manufacturing, Visalia, CA) максимум на три хвилини. Подрібнені в порошок зразки центрифугували протягом 5 хвилин при 2500 × g, і супернатант, що містить розчинні білки, використовували в імуноаналізах.

Імуноблот-аналіз білків, екстрагованих з листя кукурудзи, показав, що поліклональне антитіло проти DIG152RPC1 (отримане у кроликів, імунізованих активованим трипсином білком,

що містить коровий токсин Cry1Ca) не вступає в перехресну реакцію з білками, екстрагованими з листя нетрансгенних рослин. У екстрактах рослин, трансформованих рDAS5162, білки деяких видів були детектовані з використанням антитіла проти DIG152PRC1.

Очевидно, що незважаючи на те, що трансген, введений в кукурудзу шляхом трансформації рDAS5162, буде кодувати повнорозмірний білок DIG-109, однак, протеолітична активність клітин кукурудзи буде приводити до зростання ланцюга білка з утворенням надмірної кількості стабільних молекул з меншою молекулярною масою.

Листя, зібране від незалежно отриманих трансгенних рослин кукурудзи, трансформованих конструкцією рDAS5162, тестували *in vitro* на токсичність для комах з використанням щойно личинок совки трав'яної, що вилупилися (FAW, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)), і Cry1F-резистентною FAW (rFAW). Яйця FAW були отримані з комерційно доступного інсектарію (Benzob), а яйця rFAW були отримані від непромислових популяцій (Dow AgroSciences). Зразки сегментів листя були взяті для біоаналізів вирощених в теплиці рослин T0 на токсичність для комах, і приблизно через два тижні, рослини перенесли з лабораторії в теплицю. Для шматочка листя від кожної рослини (приблизно 1 кв. дюйм кожні) вміщували в окрему ямку 32-ямкового планшета (CD International), поверхня якого була покрита 3 мл отвердженого 2 % агару. З яйць вилуплювалися личинки, яким давали корм, прийнятний для лускокрилих багатьох видів (Southland Products), і менше ніж через 24 години личинки відбирали. Приблизно 10 личинок на сегмент листя обережно вміщували в кожну ямку щіткою з верблюжої вовни. Інфіковані планшети герметично закривали перфорованими кришками, що поставляються разом з планшетами, а потім зберігали при 28 °C, при відносній вологості (BB) 40 %, в режимі освітлення 16 год.: 8 год. (день:ніч) протягом трьох днів. Процент ураження (% DAM) кожного шматочка листа реєстрували по закінченні тесту. Ступінь ураження усереднювали і використовували для того, щоб визначити, які рослини мали найменше ураження комахами кожного тестованого типу. Тести повторювали декілька разів для всіх комах.

Дані аналізували з використанням статистичної комп'ютерної програми JMP (SAS, Cary, NC) шляхом усереднення величин % DAM для кожної рослини і для кожного типу комах. Для одностороннього аналізу ANOVA використовували модель "Fit Y × X". Якщо це необхідно, то для оцінки значущої відмінності середніх величин %DAM для кожної обробки застосовували метод розділення середніх Тьюкі-Крамера. Порівняння проводили для величин %DAM, отриманих від контрольних рослин одного і того ж віку. Рослини позитивного контролю вирощували з насіння комерційно доступного гібрида Herculex I™, продукуючого токсин Cry1Fa B.t. Негативний контроль (тобто, нетрансформовані рослини) був представлений лініями Hi II і B104, і ізоліцією Herculex I™ (батько-гібрид Herculex I™, що не містить Cry).

На фігурі 1 систематизовані результати, отримані в таких тестах за допомогою біоаналізу комах. Була несподівано виявлена позитивна кореляція між продукуванням DIG-109 в листі трансгенних рослин і %DAM. Для FAW, $F=35,3$; d.f. (ступінь свободи) =1,33; $P<0,0001$; $r^2=0,52$, а для rFAW, $F=25,3$; d.f.=1,33; $P<0,0001$; $r^2=0,43$. Було також несподівано і уперше виявлено, що личинки совки трав'яної, які є резистентними до інтоксикації токсином Cry1Fa B.t., вже гинули після поїдання ними листя з токсином DIG-109 B.t.

Потрібно зазначити, що інші комах-шкідники кукурудзи можуть бути протестовані аналогічним чином. Такими шкідниками є, але не обмежуються ними: *Agromyza parvicornis* (кукурудзяна мінуюча муха), *Agrotis ipsilon* (совка-іпсилон), *Anticarsia gemmatilis* (совка квасоляна), *Diatraea grandiosella* (американський кукурудзяний трач), *Diatraea saccharalis* (трач буряковий), *Elasmopalpus lignosellus* (шашіль зернова), *Helicoverpa zea* (совка кукурудзяна), *Heliothis virescens* (совка тютюнова), *Ostrinia nubilalis* (європейський кукурудзяний трач), Cry1F-резистентні *O. nubilalis*, *Plutella xylostella* (моль капустяна), Cry1-резистентна *P. xylostella*, *Spodoptera exigua* (совка бурякова) і *Trichoplusia ni* (п'ядун капустяний).

Трансгенні рослини кукурудзи, трансформовані рDAS5848 (генерація T0), також піддавали біоаналізу на резистентність до комах і імуноаналізам. Кількість білка DIG-109 в екстрактах листя кількісно оцінювали з використанням комерційно доступного набору для детектування Cry1C за допомогою ELISA-аналізу (Envirologix™, Portland, MA; Cat# AP007), і рівень детектованого білка DIG-109 виражали в мільйонних частках (м. ч.; 1 м. ч. означає 1 нг білка DIG-109 на мг загального розчинного білка в екстракті).

Ступінь ураження шкідниками FAW і rFAW оцінювали по наступних балах: 0 = відсутність ураження або декілька помітних дірок, 1=25-50 % ураження листя, і 2 = з'їдений майже весь лист або з'їдена ліва частина листя. Захищеною від шкідників рослиною є рослина, ступінь ураження якої становить 0,67 або нижче.

Дані, представлені в таблиці 3, вказували на позитивну кореляцію між присутністю білка DIG-109, детектованого за допомогою ELISA в рослинах T0, і зниженням рівня ураження

- личинкою совки трав'яної в in vitro біоаналізах. Рослини з найвищим детектованим рівнем білка DIG-109 (рослина 5848-005.4) мали найнижчу оцінку ступеня поїдання листя. Листя від рослин з більш низькими рівнями детектованого білка DIG-109 в межах концентрацій 190-230 м. ч. було також менше уражене, ніж листя рослин негативного контролю (тобто, нетрансформованого контролю B104 і Hi II), яке мало середні оцінки ураження 1,7 і 1,8. У всьому оціненому листі з рDAS5848 переважав детектований білок типу DIG-109, який містив дублет з пептидів розміром приблизно 60 кДа і 55 кДа.

Таблиця 3

Рівні білка DIG-109 в екстрактах рDAS5848-трансформованого листя трансгенної кукурудзи і зниження ступеня ураження личинками совки трав'яної

Ідентифікуючий номер рослини	DIG-109, м. ч.	Ураження совкою трав'яною (FAW)
5848-005.4	680	0
5848-008.4	230	0,67
5848-001.3	220	1
5848-001.1	210	1
5848-001.2	190	0,33
5848-003.1	190	1
5848-003.2	190	0,67
5848-003.3	190	0,67
Контрольні рослини (число тестованих рослин)	DIG-109, м. ч.	Ураження совкою трав'яною (FAW) (SDb)
B104 (19)	NAa	1,8 (0,5)
Hi II (20)	NA	1,7 (0,5)
Herculex I™ (20)	NA	0,5 (0,6)

a) NA не прийнятне;

b) SD = стандартне відхилення середнього

- Таким чином, відмітною ознакою даного винаходу є те, що білок DIG-109, при його продукуванні в рослинах кукурудзи, повідомляє рослинам резистентність до ураження личинками совки трав'яної і личинками Cry1F-резистентної совки трав'яної.

Приклад 9

- Експерименти по конкурентному зв'язуванню білків, що містять корові токсини Cry1Fa і Cry1Ca, з виділеними мембранними везикулами щіткової облямівки *Spodoptera frugiperda*

- У нижченаведених прикладах описана оцінка конкурентного зв'язування білків, що містять коровий токсин Cry1, з передбачуваними рецепторами в тканині кишечника комах. Було показано, що ¹²⁵I-мічений білок, який містить коровий токсин Cry1Ca, зв'язується з високої афінністю з мембранними везикулами щіткової облямівки (BBMV), отриманими від *Spodoptera frugiperda* (совки трав'яної), і що білок, який містить коровий токсин Cry1Fa, не конкурує за зв'язування з цими везикулами.

- Очищення білків Cry. Ген, що кодує химерний білок, який містить коровий токсин Cry1Ca і протоксин Cry1Ab, експресували в експресійному штамі *Pseudomonas fluorescens* як описано в прикладі 2. Аналогічним чином, ген, що кодує химерний білок, який містить коровий токсин Cry1Fa (603 амінокислоти) і протоксин Cry1Ab (545 амінокислот), експресували в системі Pf. Білки очищали методами, описаними в прикладі 2, і здійснювали гідроліз трипсином з отриманням активованих корових токсинів з повнорозмірних білків, а потім ці продукти очищали методами, описаними в прикладі 2. Препарати оброблених трипсином білків (що містять активований коровий токсин) мали чистоту >95 %, а їх молекулярна маса становила приблизно 65 кДа як було експериментально визначено за допомогою електрофорезу в ДСН-ПААГ.

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

- Отримання і фракціонування солюбілізованих BBMV. Личинки *Spodoptera frugiperda* в останній віковій стадії витримували в умовах голодування протягом ночі, а потім, після охолодження на льоду протягом 15 хвилин, розкривали. Тканину середньої частини кишечника видаляли з порожнини тіла, а задню частину кишечника залишали приєднаною до покривного шару. Середню частину кишечника вміщували в 9 × об'єм охолодженого льодом

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

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

Йодування білка, що містить коровий токсин Cry1Ca. Очищений білок, що містить коровий токсин Cry1Ca, піддавали реакції йодування з використанням йодуючих сфер Pierce Iodination Beads (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). Коротко, дві йодуючі сфери два рази промивали 500 мкл PBS (20 мМ фосфат натрію, 0,15 М NaCl, pH 7,5), і вміщували в центрифугальну 1,5 мл-пробірку, що містить 100 мкл PBS. Потім додавали 0,5 мкі ^{125}I -міченого йодиду натрію, після чого компоненти залишали для реакції на 5 хвилин при кімнатній температурі, а потім до розчину додавали 1 мкг білки, що містить коровий токсин Cry1Ca, і суміш залишали для реакції ще на 3-5 хвилин. Реакцію завершували шляхом піпетування розчину з йодуючих сфер і наносили на центрифугальну колонку Zeba™ (Invitrogen), урівноважену в 50 мМ CAPS, pH 10,0, 1 мМ DTT (дитіотреїтол), 1 мМ EDTA і 5 % гліцерині. Йодуючі сфери два рази промивали 10 мкл PBS і промивальний розчин також наносили на знесолуючу колонку Zeba™. Радіоактивний розчин елюювали з центрифугальної колонки шляхом центрифугування при $1000 \times g$ протягом 2 хвилин. Потім, білок, що містить коровий токсин Cry1Ca і мічену радіоактивну ^{125}I , діалізували проти 50 мМ CAPS, pH 10,0, 1 мМ DTT, 1 мМ EDTA і 5 % гліцерину.

Візуалізація. Нерадіоактивний йодований білок, що містить коровий токсин Cry1Ca, визначали за допомогою електрофорезу в ДСН-ПААГ і візуалізації флуоресцентним методом. Коротко, ДСН-ПААГ-гелі сушили з використанням апарату для сушіння гелю BioRad відповідно до інструкцій виробників. Осушені гелі візуалізували шляхом їх загортання в плівку Mylar (товщиною в 12 мкм) і експонування під флуоресцюючим екраном з накопиченням Molecular Dynamics (35 см \times 43 см) протягом 1 години. Планшети виявляли за допомогою флуоресцентного візуалізатора Molecular Dynamics Storm 820, і зображення аналізували за допомогою комп'ютерної програми ImageQuant™.

Приклад 10

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

З метою визначення оптимальної кількості білка BBMV для його використання в аналізах на зв'язування з білками, що містять корові токсини Cry1Ca і Cry1Fa, будували криву насичення з використанням ^{125}I -міченого білка, що містить коровий токсин Cry1Ac. 0,5 нМ ^{125}I -міченого білка, що містить коровий токсин Cry1Ac, інкубували протягом 1 години при 28 °C в буфері для зв'язування (8 мМ NaH_2PO_4 , 2 мМ KH_2PO_4 , 150 мМ NaCl, 0,1 % BSA, pH 7,4) з білком BBMV в кількості, що складає від 0 мкг/мл до 500 мкг/мл (загальний об'єм 0,5 мл). ^{125}I -мічений білок, що

містить коровий токсин Cry1Ac і зв'язаний з білками BBMV, відділяли від незв'язаної фракції шляхом взяття зразків 150 мкл реакційної суміші з трьома повторностями, які вміщували в окремі центрифугальні 1,5 мл-пробірки і центрифугували при $14000 \times g$ протягом 8 хвилин при кімнатній температурі. Супернатант обережно видаляли, і осад три рази промивали охолодженим льодом буфером для зв'язування. Дно центрифугальної пробірки, що містить осад, відрізали, вміщували в скляну пробірку для культивування розміром 13×75 мм, і кожний зразок підраховували протягом 5 хвилин в гамма-лічильнику. Потім будували графік залежності CPM (число імпульсів в хвилину) мінус фоновий CPM (за відсутності реакції з білком BBMV) від концентрації білка BBMV. Крім того, відповідно до результатів, отриманих в іншому аналізі, оптимальна концентрація білка BBMV, що використовується в аналізах на зв'язування, становила 150 мкг/мл.

Приклад 11

Аналізи на конкурентне зв'язування BBMV від *S. frugiperda* з білками, що містять корові токсини Cry1Ca і Cry1Fa

Аналізи на гомологічне і гетерологічне конкурентне зв'язування проводили з використанням 150 мкг/мл білка BBMV і $0,5 \text{ нМ}$ ^{125}I -мічені білки, що містить коровий токсин Cry1Ca. До реакційної суміші додавали конкурентний нерадіоактивний білок, що містить коровий токсин Cry1Fa в концентраціях від $0,045 \text{ нМ}$ до 1000 нМ і одночасно додавали радіоактивний білок, що містить коровий токсин Cry1Ca, для гарантії істинного конкурентного зв'язування. Інкубування проводили протягом 1 години при 28°C і вимірювали кількість ^{125}I -міченого білка, що містить коровий токсин Cry1Ca і зв'язаного з BBMV (специфічно зв'язаного) як описано вище. Неспецифічне зв'язування виражали як величину, отриману в присутності 1000 нМ нерадіоактивного білка, що містить коровий токсин Cry1Ca. 100% -е загальне зв'язування розглядається як кількість зв'язування за відсутності якого-небудь конкурентно зв'язаного білка, що містить коровий токсин Cry1Fa.

У аналізах на зв'язування з рецептором, що проводяться з використанням ^{125}I -міченого білка, що містить коровий токсин Cry1Ca, визначали здатність білка, що містить коровий токсин Cry1Fa, витіснити цей радіоактивно мічений ліганд з його сайту зв'язування з BBMV від *S. frugiperda*. Результати (фігура 2) показали, що білок, який містить коровий токсин Cry1Fa, не витісняв зв'язаний ^{125}I -мічений білок, що містить коровий токсин Cry1Ca, з його рецепторного(их) білка(ів) при концентраціях до 300 нМ (при концентрації, яка в 600 разів перевищувала концентрацію радіоактивного зв'язувального ліганду). Як і передбачалося, немічений білок, що містить коровий токсин Cry1Ca, мав здатність витіснити радіоактивно мічений білок, що містить коровий токсин Cry1Ca, з його білка(ів), що зв'язується(ються), на що вказувала сигмоїдальна крива доза-відповідь, де 50% -е витіснення відбувалося при 5 нМ .

Таким чином, було показано, що білок, який містить коровий токсин Cry1Ca взаємодіє з сайтом зв'язування BBMV *S. frugiperda*, який не зв'язується з білком, що містить коровий токсин Cry1Fa.

Див. фігуру 2: Конкуренція корового токсину Cry1Fa, корового токсину Cry1Ca і ^{125}I -міченого корового токсину Cry1Ca за зв'язування з BBMV *Spodoptera frugiperda*.

Приклад 12

Конкурентне зв'язування білка, що містить коровий токсин Cry1Ca, і міченого біотином білка, що містить коровий токсин Cry1Fa, з BBMV *Diatraea saccharalis*

У нижченаведених прикладах описана оцінка конкурентного зв'язування білків, що містять коровий токсин Cry1, з передбачуваними рецепторами в тканині кишечника комах. Було показано, що мічений біотином білок, який містить коровий токсин Cry1Fa зв'язується з високою афінністю з мембранними везикулами щіткової облямівки (BBMV), отриманими від *Diatraea saccharalis* (бурякового трача), і що білок, який містить коровий токсин Cry1Ca, не конкурує за зв'язування з цими везикулами.

Отримання і фракціонування солюбілізованих BBMV. Личинки *D. saccharalis* в останній віковій стадії витримували в умовах голодування протягом ночі, а потім, після охолодження на льоду протягом 15 хвилин, розкривали. Препарати BBMV отримували методами, описаними в прикладі 10.

Результати, отримані в аналізі на конкурентне зв'язування, що проводиться з використанням ^{125}I -міченого білка, що містить коровий токсин Cry1Fa, можуть мати обмежену біологічну значущість, оскільки йодування білка Cry1Fa робить цей білок неактивним в біологічних аналізах на поїдання такого білка комахами. У протилежність цьому, було виявлено, що біотинільований білок, який містить коровий токсин Cry1Fa, зберігав свою токсичність відносно комах. Крім того, можна виміряти рівень взаємодії цього (біотинільованого) білка з рецепторами в присутності не-біотинільованих (конкуруючих) білків, що містять коровий токсин Cry. Такий

експеримент по конкурентному зв'язуванню дозволяє детектувати зв'язування міченого біотином білка, що містить коровий токсин Cry1Fa з рецепторами в BBMV *D. saccharalis* після електрофорезу білків BBMV і перенесення всього зразка в ПВДФ-мембрану (полівініліденторидну мембрану). Авідин, кон'югований з пероксидазою хрину, в комбінації з реагентом, що посилює хімічну люмінесценцію, використали для візуалізації міченого біотином білка, що містить коровий токсин Cry1Fa.

Білок, що містить коровий токсин Cry1Fa мітили біотином з використанням набору для біотинілування сульфо-NHS-LC Pierce EZ-Linko (Thermo Fisher Scientific). Коротко, 40 мкл сульфо-NHS-LC-біотину (10 мг/мл в диметилсульфоксиді) додавали до 500 мкл білки, що містить коровий токсин Cry1Fa (2,0 мг/мл), в 0,1 М натрійфосфатного буфера, pH7,2. Реакційну суміш інкубували при 4 °C протягом ночі, а потім сульфо-NHS-LC-біотин, що не прореагував, видаляли на знесолювальній колонці Zeba™. Рівень включення біотину в білок, що містить коровий токсин Cry1Fa, вимірювали за допомогою аналізу на витіснення НАВА-авідину Pierce (Thermo Fisher Scientific) як описано виробником.

Мічений біотином білок, що містить коровий токсин Cry1Fa (2,5 нМ), інкубували протягом 1 години при 28 °C з 0,2 мг BBMV, отриманого від *D. saccharalis* [в загальному об'ємі 1,0 мл] в присутності або за відсутності 500-кратного надлишку неміченого білка, що містить коровий токсин Cry1Fa або Cry1Ca. Незв'язаний мічений біотином білок, що містить коровий токсин Cry1Fa видаляли шляхом центрифугування при 16000 × g протягом 10 хвилин, і отриманий осад 3 рази промивали охолодженим льодом зв'язувальним буфером. Осад суспендували в 15 мкл 4 × буфера для зразків Лемлі, струшували і обробляли ультразвуком для гарантії повної солюбілізації, а потім нагрівали до 90 °C протягом 3 хвилин. Весь зразок завантажували на 4 %-20 % тріс-гліциновий гель, розділяли за допомогою електрофорезу в ДСН-ПААГ, і піддавали електроперенесенню на ПВДФ-мембрану відповідно до інструкцій постачальників (BioRad). 1000 нг білка, що містить коровий токсин Cry1Fa і коровий токсин Cry1Ca, також піддавали електрофорезу на гелі і використали як негативний контроль. Мічений біотином білок, що містить коровий токсин Cry1Fa, візуалізували з використанням кон'югованої з авідином пероксидази хрину при розведенні 1:15000 з активацією хемілюмінесценції з використанням 1:1-суміші пероксидного розчину SuperSignal® West Pico з люмінальним розчином-підсилювачем (Thermo Fisher Scientific, номери по каталогу 1859674 і 1859675). Смуги реєстрували на мультівізуалізаторі Biorad Fluor-S за допомогою комп'ютерної програми Quantity One v.4.5.2.

Результати вказували на детектування міченого біотином білка, що містить коровий токсин Cry1Fa і зв'язаного з рецепторами в BBMV *D. saccharalis*, а також показали, що небіотинільований білок, що містить коровий токсин Cry1Fa, при 500-кратній надмірній концентрації повністю витісняв зв'язаний біотинільований білок, що містить коровий токсин Cry1Fa, з його рецептора(ів). На противагу цьому, білок, що містить коровий токсин Cry1Ca при 500-кратній надмірній концентрації не мав здатності витіснити зв'язаний біотинільований білок, що містить коровий токсин Cry1Fa, що вказує на те, що білок, який містить коровий токсин Cry1Ca, не конкурує за сайт(и) зв'язування білка, що містить коровий токсин Cry1Fa, в BBMV *D. saccharalis*. Також було показано, що відповідно до результатів, отриманих для BBMV *S. frugiperda*, білок, що містить коровий токсин Cry1Fa, і білок, що містить коровий токсин Cry1Ca, зв'язувався з окремими сайтами зв'язування BBMV *D. saccharalis*.

Бібліографія

- Finney, D.J. 1971. Probit analysis. Cambridge University Press, England.
- Hua, G., L. Masson, J. L. Jurat-Fuentes, G. Schwab, and M. J. Adang. Binding analyses of *Bacillus thuringiensis* Cry d-endotoxins using brush border membrane vesicles of *Ostrinia nubilalis*. *Applied and Environmental Microbiology* 67[2], 872-879. 2001.
- LeOra Software. 1987. POLO-PC. A user's guide to probit and logit analysis. Berkeley, CA.
- McGaughey, W. H., F. Gould, and W. Gelernter. Bt resistance management. *Nature Biotechnology* 16[2], 144-146. 1998
- Marcon, P.R.G.C., L.J. Young, K. Steffey, and B.D. Siegfried. 1999. Baseline susceptibility of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hubner) (Lepidoptera: Pyralidae) to *Bacillus thuringiensis* toxins. *J. Econ. Entomol.* 92 (2): 280-285.
- Robertson, L.J. and H.K. Preisler. 1992. Pesticide bioassays with arthropods. CRC Press, Boca Ranton, FL.
- SAS Institute Inc. 1988. SAS procedures guide, Release 6.03 edition. SAS Institute Inc, Cary, NC.
- Stone, B.F. 1968. A formula for determining degree of dominance in cases of monofactorial inheritance of resistance to chemicals. *Bull. WHO* 38:325-329.

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

Додаток А

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

Реєстраційний номер для доступу в NCBI

Назва	Реєстр. №	Автори	Рік	Штам-джерело	Коментарі
Cry1Aa1	AAA22353	Schnepf et al	1985	Bt kurstaki HD1	
Cry1Aa2	AAA22552	Shibano et al	1985	Bt sotto	
Cry1Aa3	BAA00257	Shimizu et al	1988	Bt aizawai IPL7	
Cry1Aa4	CAA31886	Masson et al	1989	Bt entomocidus	
Cry1Aa5	BAA04468	Udayasuriyan et al	1994	Bt Fu-2-7	
Cry1Aa6	AAA86265	Masson et al	1994	Bt kurstaki NRD-12	
Cry1Aa7	AAD46139	Osman et al	1999	BtC12	
Cry1Aa8	I126149	Liu	1996		тільки послідовність ДНК
Cry1Aa9	BAA77213	Nagamatsu et al	1999	Bt dendrolimus T84A1	
Cry1Aa10	AAD55382	Hou and Chen	1999	Bt kurstaki HD-1-02	
Cry1Aa11	CAA70856	Tounsi et al	1999	Bt kurstaki	
Cry1Aa12	AAP80146	Yao et al	2001	Bt Ly30	
Cry1Aa13	AAM44305	Zhong et al	2002	Bt sotto	
Cry1Aa14	AAP40639	Ren et al	2002	неопублікований	
Cry1Aa15	AAV66993	Sauka et al	2005	Bt INTA Mol-12	
Cry1Ab1	AAA22330	Wabiko et al	1986	Bt berliner 1715	
Cry1Ab2	AAA22613	Thorne et al	1986	Bt kurstaki	
Cry1Ab3	AAA22561	Geiser et al	1986	Bt kurstaki HD1	
Cry1Ab4	BAA00071	Kondo et al	1987	Bt kurstaki HD1	
Cry1Ab5	CAA28405	Hofte et al	1986	Bt berliner 1715	
Cry1Ab6	AAA22420	Hefford et al	1987	Bt kurstaki NRD-12	
Cry1Ab7	CAA31620	Haider & Ellar	1988	Bt aizawai IC1	
Cry1Ab8	AAA22551	Oeda et al	1987	Bt aizawai IPL7	
Cry1Ab9	CAA38701	Chak & Jen	1993	Bt aizawai HD133	
Cry1Ab10	A29125	Fischhoff et al	1987	Bt kurstaki HD1	
Cry1Ab11	I12419	Ely & Tippet	1995	Bt A20	тільки послідовність ДНК
Cry1Ab12	AAC64003	Silva-Werneck et al	1998	Bt kurstaki S93	
Cry1Ab13	AAN76494	Tan et al	2002	Btc 005	
Cry1Ab14	AAG16877	Meza-Basso & Theoduloz	2000	Native Chilean Bt	
Cry1Ab15	AAO13302	Li et al	2001	Bt B-Hm-16	
Cry1Ab16	AAK55546	Yu et al	2002	Bt AC-11	
Cry1Ab17	AAT46415	Huang et al	2004	BtWB9	
Cry1Ab18	AAQ88259	Stobdan et al	2004	Bt	
Cry1Ab19	AAW31761	Zhong et al	2005	BtX-2	
Cry1Ab20	ABB72460	Liu et al	2006	BtC008	
Cry1Ab21	ABS18384	Swiecicka et al	2007	BtIS5056	
Cry1Ab22	ABW87320	Wu and Feng	2008	BtS2491Ab	
Cry1Ab-like	AAK14336	Nagarathinam et al	2001	Bt kunthala RX24	невизначена послідовність
Cry1Ab-like	AAK14337	Nagarathinam et al	2001	Bt kunthala RX28	невизначена послідовність
Cry1Ab-like	AAK14338	Nagarathinam et al	2001	Bt kunthala RX27	невизначена послідовність
Cry1Ab-	ABG88858	Lin et al	2006	Bt ly4a3	недостатня

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

Реєстраційний номер для доступу в NCBI

Назва	Реєстр. №	Автори	Рік	Штам-джерело	Коментарі
like					послідовність
Cry1Ac1	AAA22331	Adang et al	1985	Bt kurstaki HD73	
Cry1Ac2	AAA22338	Von Tersch et al	1991	Bt kenyaе	
Cry1Ac3	CAA38098	Dardenne et al	1990	Bt BTS89A	
Cry1Ac4	AAA73077	Feitelson	1991	Bt kurstaki PS85A1	
Cry1Ac5	AAA22339	Feitelson	1992	Bt kurstaki PS81GG	
Cry1Ac6	AAA86266	Mas son et al	1994	Bt kurstaki NRD-12	
Cry1Ac7	AAB46989	Herrera et al	1994	Bt kurstaki HD73	
Cry1Ac8	AAC44841	Omolo et al	1997	Bt kurstaki HD73	
Cry1Ac9	AAB49768	Gleave et al	1992	BtDSIR732	
Cry1Ac10	CAA05505	Sun	1997	Bt kurstaki YBT-1520	
Cry1Ac11	CAA10270	Makhdoom & Riazuddin	1998		тільки послідовність ДНК
Cry1Ac12	I12418	Ely & Tippet	1995	BtA20	
Cry1Ac13	AAD38701	Qiao et al	1999	Bt kurstaki HD1	
Cry1Ac14	AAQ06607	Yao et al	2002	Bt Ly30	
Cry1Ac15	AAN07788	Tzeng et al	2001	Bt from Taiwan	
Cry1Ac16	AAU87037	Zhao et al	2005	Bt H3	
Cry1Ac17	AAx18704	Hire et al	2005	Bt kenyaе HD549	
Cry1Ac18	AAy88347	Kaur & Allam	2005	Bt SK-729	
Cry1Ac19	ABD37053	Gao et al	2005	Bt C-33	
Cry1Ac20	ABB89046	Tan et al	2005		
Cry1Ac21	AAy66992	Sauka et al	2005	INTAMol-12	
Cry1Ac22	ABZ01836	Zhang & Fang	2008	Bt W015-1	
Cry1Ac23	CAQ30431	Kashyap et al	2008	Bt	
Cry1Ac24	ABL01535	Arango et al	2008	Bt 146-158-01	
Cry1Ac25	FJ513324	Guan Peng et al	2008	Bt Tm37-6	№ NCBI, зареєстр. 09 липня
Cry1Ac26	FJ617446	Guan Peng et al	2009	Bt Tm41-4	№ NCBI, зареєстр. 09 липня
Cry1Ac27	FJ617447	Guan Peng et al	2009	Bt Tm44-1B	№ NCBL зареєстр. 09 липня
Cry1Ac28	ACM90319	Li et al	2009	BtQ-12	
Cry1Ad1	AAA22340	Feitelson	1993	Bt aizawai PS81I	
Cry1Ad2	CAA01880	Anonymous	1995	Bt PS81RR1	
Cry1Ae1	AAA22410	Lee & Aronson	1991	Bt alesti	
Cry1Af1	AAB82749	Kang et al	1997	Bt NT0423	
Cry1Ag1	AAD46137	Mustafa	1999		
Cry1Ah1	AAQ14326	Tan et al	2000		
Cry1Ah2	ABB76664	Qi et al	2005	Bt alesti	
Cry1Ai1	AAO39719	Wang et al	2002		
Cry1A-like	AAK14339	Nagarathinam et al	2001	Bt kunthala nags3	невизначена послідовність
Cry1Ba1	CAA29898	Brizzard & Whiteley	1988	Bt thunngiensis HD2	
Cry1Ba2	CAA65003	Soetaert	1996	Bt entomocidus HD110	
Cry1Ba3	AAK63251	Zhang et al	2001		
Cry1Ba4	AAK51084	Nathan et al	2001	Bt entomocidus HD9	
Cry1Ba5	ABO20894	Song et al	2007	Btsfw-12	
Cry1Ba6	ABL60921	Martins et al	2006	Bt S601	
Cry1Bb1	AAA22344	Donovan et al	1994	BtEG5847	
Cry1Bc1	CAA86568	Bishop et al	1994	Bt morrisoni	
Cry1Bd1	AAD10292	Kuo et al	2000	Bt wuhanensis HD525	

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

Реєстраційний номер для доступу в NCBI

Назва	Реєстр. №	Автори	Рік	Штам-джерело	Коментарі
Cry1Bd2	AAM93496	Isakova et al	2002	Bt834	
Cry1Be1	AAC32850	Payne et al	1998	BtPS158C2	
Cry1Be2	AAQ52387	Baum et al	2003		
Cry1Be3	FJ716102	Xiaodong Sun et al	2009	Bt	№ NCBI, зареєстр. 09 липня
Cry1Bf1	CAC50778	Arnaut et al	2001		
Cry1Bf2	AAQ52380	Baum et al	2003		
Cry1Bg1	AAO39720	Wang et al	2002		
Cry1Ca1	CAA30396	Honee et al	1988	Bt entomocidus 60.5	
Cry1Ca2	CAA31951	Sanchis et al	1989	Bt aizawai 7.29	
Cry1Ca3	AAA22343	Feitelson	1993	Bt aizawaiPS81I	
Cry1Ca4	CAA01886	Van Mellaert et al	1990	Bt entomocidus HD110	
Cry1Ca5	CAA65457	Strizhov	1996	Bt aizawai 7.29	
Cry1Ca6	AAF37224	Yu et al	2000	Bt AF-2	
Cry1Ca7	AAG50438	Aixing et al	2000	Bt J8	
Cry1Ca8	AAM00264	Chen et al	2001	Bt c002	
Cry1Ca9	AAL79362	Kao et al	2003	Bt G10-01A	
Cry1Ca10	AAN16462	Lin et al	2003	Bt E05-20a	
Cry1Ca11	AAX53094	Cai et al	2005	Bt C-33	
Cry1Cb1	M97880	Kalman et al	1993	Bt galleriae	HD2тільки послідовність ДНК
Cry1Cb2	AAG35409	Song et al	2000	Bt c001	
Cry1Cb3	ACD50894	Huang et al	2008	Bt 087	
Cry1Cb-like	AAX63901	Thammasittirong et al	2005	BtTA476-1	недостатня послідовність
Cry1Da1	CAA38099	Hofte et al	1990	Bt aizawai HD68	
Cry1Da2	I76415	Payne & Sick	1997		тільки послідовність ДНК
Cry1Db1	CAA80234	Lambert	1993	Bt BTS00349A	
Cry1Db2	AAK48937	Li et al	2001	Bt B-Pr-88	
Cry1Dc1	ABK35074	Lertwiriya Wong et al	2006	BtJC291	
Cry1Ea1	CAA37933	Visser et al	1990	Bt kenyaе 4F1	
Cry1Ea2	CAA39609	Bosse et al	1990	Bt kenyaе	
Cry1Ea3	AAA22345	Feitelson	1991	Bt kenyaе PS81F	
Cry1Ea4	AAD04732	Barboza-Corona et al	1998	Bt kenyaе LBIT-147	
Cry1Ea5	A15535	Botterman et al	1994		тільки послідовність ДНК
Cry1Ea6	AAL50330	Sun et al	1999	Bt YBT-032	
Cry1Ea7	AAW72936	Huehne et al	2005	Bt JC190	
Cry1Ea8	ABX11258	Huang et al	2007	Bt HZM2	
Cry1Eb1	AAA22346	Feitelson	1993	Bt aizawai PS81A2	
Cry1Fa1	AAA22348	Chambers et al	1991	Bt aizawai EG6346	
Cry1Fa2	AAA22347	Feitelson	1993	Bt aizawai PS81I	
Cry1Fb1	CAA80235	Lambert	1993	Bt BTS00349A	
Cry1Fb2	BAA25298	Masuda & Asano	1998	Bt morrisoni INA67	
Cry1Fb3	AAF21767	Song et al	1998	Bt morrisoni	
Cry1Fb4	AAC10641	Payne et al	1997		
Cry1Fb5	AAO13295	Li et al	2001	Bt B-Pr-88	
Cry1Fb6	ACD50892	Huang et al	2008	Bt012	
Cry1Fb7	ACD50893	Huang et al	2008	Bt087	
Cry1Ga1	CAA80233	Lambert	1993	Bt BTS0349A	

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

Реєстраційний номер для доступу в NCBI

Назва	Реєстр. №	Автори	Рік	Штам-джерело	Коментарі
Cry1Ga2	CAA70506	Shevelev et al	1997	Bt wuhanensis	
Cry1Gb1	AAD10291	Kuo & Chak	1999	Bt wuhanensis HD525	
Cry1Gb2	AAO13756	Li et al	2000	Bt B-Pr-88	
Cry1Gc	AAQ52381	Baum et al	2003		
Cry1Ha1	CAA80236	Lambert	1993	Bt BTS02069AA	
Cry1Hb1	AAA79694	Koo et al	1995	Bt morrisoni BF190	
Cry1H-like	AAF01213	Srifah et al	1999	Bt JC291	недостатня послідовність
Cry1Ia1	CAA44633	Tailor et al	1992	Bt kurstaki	
Cry1Ia2	AAA22354	Gleave et al	1993	Bt kurstaki	
Cry1Ia3	AAC36999	Shin et al	1995	Bt kurstaki HD1	
Cry1Ia4	AAB00958	Kostichka et al	1996	Bt AB88	
Cry1Ia5	CAA70124	Selvapandiyar	1996	Bt 61	
Cry1Ia6	AAC26910	Zhong et al	1998	Bt kurstaki S101	
Cry1Ia7	AAM73516	Porcar et al	2000	Bt	
Cry1Ia8	AAK66742	Song et al	2001		
Cry1Ia9	AAQ08616	Yao et al	2002	Bt Ly30	
Cry1Ia10	AAP86782	Espindola et al	2003	Bt thuringiensis	
Cry1Ia11	CAC85964	Tounsi et al	2003	Bt kurstaki BNS3	
Cry1Ia12	AAV53390	Grossi de Sa et al	2005	Bt	
Cry1Ia13	ABF83202	Martins et al	2006	Bt	
Cry1Ia14	ACG63871	Liu & Guo	2008	Bt11	
Cry1Ia15	FJ617445	Guan Peng et al	2009	Bt E-1B	№ NCBI, зареєстр. 09 липня
Cry1Ia16	FJ617448	Guan Peng et al	2009	Bt E-1A	№ NCBI, зареєстр. 09 липня
Cry1Ib1	AAA82114	Shin et al	1995	Bt entomocidus BP465	
Cry1Ib2	ABW88019	Guan et al	2007	BtPP61	
Cry1Ib3	ACD75515	Liu & Guo	2008	BtGS8	
Cry1Ic1	AAC62933	Osman et al	1998	BtC18	
Cry1Ic2	AAE71691	Osman et al	2001		
Cry1Id1	AAD44366	Choi	2000		
Cry1Ie1	AAG43526	Song et al	2000	Bt BTC007	
Cry1If1	AAQ52382	Baum et al	2003		
Cry1I-like	AAC31094	Payne et al	1998		недостатня послідовність
Cry1I-like	ABG88859	Lin & Fang	2006	Bt ly4a3	недостатня послідовність
Cry1Ja1	AAA22341	Donovan	1994	Bt EG5847	
Cry1Jb1	AAA98959	Von Tersch & Gonzalez	1994	Bt EG5092	
Cry1Jc1	AAC31092	Payne et al	1998		
Cry1Jc2	AAQ52372	Baum et al	2003		
Cry1Jd1	CAC50779	Arnaut et al	2001	Bt	
Cry1Ka1	AAB00376	Koo et al	1995	Bt morrisoni BF190	
Cry1La1	AAS60191	Je et al	2004	Bt kurstaki KI	недостатня послідовність
Cry1-like	AAC31091	Payne et al	1998		
Cry2Aa1	AAA22335	Donovan et al	1989	Bt kurstaki	
Cry2Aa2	AAA83516	Widner & Whiteley	1989	Bt kurstaki HD1	
Cry2Aa3	D86064	Sasaki et al	1997	Bt sotto	тільки послідовність ДНК
Cry2Aa4	AAC04867	Misra et al	1998	Bt kenya HD549	

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

Реєстраційний номер для доступу в NCBI

Назва	Реєстр. №	Автори	Рік	Штам-джерело	Коментарі
Cry2Aa5	CAA10671	Yu & Pang	1999	Bt SL39	
Cry2Aa6	CAA10672	Yu & Pang	1999	Bt YZ71	
Cry2Aa7	CAA10670	Yu & Pang	1999	Bt CY29	
Cry2Aa8	AAO13734	Wei et al	2000	Bt Dongbei 66	
Cry2Aa9	AAO13750	Zhang et al	2000		
Cry2Aa10	AAQ04263	Yao et al	2001		
Cry2Aa11	AAQ52384	Baum et al	2003		
Cry2Aa12	ABI83671	Tan et al	2006	Bt Rpp39	
Cry2Aa13	ABL01536	Arango et al	2008	Bt 146-158-01	
Cry2Aa14	ACF04939	Hire et al	2008	Bt HD-550	
Cry2Ab1	AAA22342	Widner & Whiteley	1989	Bt kurstaki HD1	
Cry2Ab2	CAA39075	Dankocsik et al	1990	Bt kurstaki HD1	
Cry2Ab3	AAG36762	Chen et al	1999	Bt BTC002	
Cry2Ab4	AAO13296	Li et al	2001	Bt B-Pr-88	
Cry2Ab5	AAQ04609	Yao et al	2001	Bt ly30	
Cry2Ab6	AAP59457	Wang et al	2003	Bt WZ-7	
Cry2Ab7	AAZ66347	Udayasuriyan et al	2005	Bt 14-1	
Cry2Ab8	ABC95996	Huang et al	2006	Bt WB2	
Cry2Ab9	ABC74968	Zhang et al	2005	Bt LLB6	
Cry2Ab10	EF157306	Lin et al	2006	Bt LyD	
Cry2Ab11	CAM84575	Saleem et al	2007	Bt CMBL-BT1	
Cry2Ab12	ABM21764	Lin et al	2007	Bt LyD	
Cry2Ab13	ACG76120	Zhu et al	2008	Bt ywc5-4	
Cry2Ab14	ACG76121	Zhu et al	2008	Bt Bts	
Cry2Ac1	CAA40536	Aronson	1991	Bt shanghai S1	
Cry2Ac2	AAG35410	Song et al	2000		
Cry2Ac3	AAQ52385	Baum et al	2003		
Cry2Ac4	ABC95997	Huang et al	2006	Bt WB9	
Cry2Ac5	ABC74969	Zhang et al	2005		
Cry2Ac6	ABC74793	Xia et al	2006	Bt wuhanensis	
Cry2Ac7	CAL18690	Saleem et al	2008	Bt SBSBT-1	
Cry2Ac8	CAM09325	Saleem et al	2007	BtCMBL-BT1	
Cry2Ac9	CAM09326	Saleem et al	2007	Bt CMBL-BT2	
Cry2Ac10	ABN15104	Bai et al	2007	Bt QCL-1	
Cry2Ac11	CAM83895	Saleem et al	2007	Bt HD29	
Cry2Ac12	CAM83896	Saleem et al	2007	Bt CMBL-BT3	
Cry2Ad1	AAF09583	Choi et al	1999	Bt BR30	
Cry2Ad2	ABC86927	Huang et al	2006	Bt WB10	
Cry2Ad3	CAK29504	Saleem et al	2006	Bt 5_2AcT(1)	
Cry2Ad4	CAM32331	Saleem et al	2007	Bt CMBL-BT2	
Cry2Ad5	CAO78739	Saleem et al	2007	Bt HD29	
Cry2Ae1	AAQ52362	Baum et al	2003		
Cry2Af1	ABO30519	Beard et al	2007	BtC81	
Cry2Ag	ACH91610	Zhu et al	2008	Bt JF19-2	
Cry2Ah	EU939453	Zhang et al	2008	Bt	№ NCBI, зареєстр. 09 липня
Cry2Ah2	ACL80665	Zhang et al	2009	Bt BRC-ZQL3	
Cry2Ai	FJ788388	Udayasuriyan et al	2009	Bt	№ NCBI, зареєстр. 09 липня
Cry3Aa1	AAA22336	Herrastadt et al	1987	Bt san diego	
Cry3Aa2	AAA22541	Sekar et al	1987	Bt tenebrionis	

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

Реєстраційний номер для доступу в NCBI

Назва	Реєстр. №	Автори	Рік	Штам-джерело	Коментарі
Cry3Aa3	CAA68482	Hofte et al	1987		
Cry3Aa4	AAA22542	McPherson et al	1988	Bt tenebrionis	
Cry3Aa5	AAA50255	Donovan et al	1988	Bt morrisoni EG2158	
Cry3Aa6	AAC43266	Adams et al	1994	Bt tenebrionis	
Cry3Aa7	CAB41411	Zhang et al	1999	Bt22	
Cry3Aa8	AAS79487	Gao and Cai	2004	Bt YM-03	
Cry3Aa9	AAW05659	Bulla and Candas	2004	Bt UTD-001	
Cry3Aa10	AAU29411	Chen et al	2004	Bt 886	
Cry3Aa11	AAW82872	Kurt et al	2005	Bt tenebrionis Mm2	
Cry3Aa12	ABY49136	Sezen et al	2008	Bt tenebrionis	
Cry3Ba1	CAA34983	Sick et al	1990	Bt tolworthi 43F	
Cry3Ba2	CAA00645	Peferoen et al	1990	Bt PGSI208	
Cry3Bb1	AAA22334	Donovan et al	1992	Bt EG4961	
Cry3Bb2	AAA74198	Donovan et al	1995	Bt EG5144	
Cry3Bb3	I15475	Peferoen et al	1995		тільки послідовність ДНК
Cry3Ca1	CAA42469	Lambert et al	1992	Bt kurstaki Btl109P	
Cry4Aa1	CAA68485	Ward & Ellar	1987	Bt israelensis	
Cry4Aa2	BAA00179	Sen et al	1988	Bt israelensis HD522	
Cry4Aa3	CAD30148	Berry et al	2002	Bt israelensis	
Cry4A-like	AAV96321	Mahalakshmi et al	2005	Bt LDC-9	недостатня послідовність
Cry4Ba1	CAA30312	Chungjatpornchai et al	1988	Bt israelensis 4Q2-72	
Cry4Ba2	CAA30114	Tungpradubkul et al	1988	Bt israelensis	
Cry4Ba3	AAA22337	Yamamoto et al	1988	Bt israelensis	
Cry4Ba4	BAA00178	Sen et al	1988	Bt israelensis HD522	
Cry4Ba5	CAD30095	Berry et al	2002	Bt israelensis	
Cry4Ba-like	ABC47686	Mahalakshmi et al	2005	Bt LDC-9	недостатня послідовність
Cry4Ca1	EU646202	Shu et al	2008		№ NCBI, зареєстр. 09 липня
Cry4Cb1	FJ403208	Jun & Furong	2008	Bt HS18-1	№ NCBI, зареєстр. 09 липня
Cry4Cb2	FJ597622	Jun & Furong	2008	Bt Ywc2-8	№ NCBI, зареєстр. 09 липня
Cry4Cc1	FJ403207	Jun & Furong	2008	Bt MC28	№ NCBI, зареєстр. 09 липня
Cry5Aa1	AAA67694	Narva et al	1994	Bt darmstadiensis PS17	
Cry5Ab1	AAA67693	Narva et al	1991	Bt darmstadiensis PS17	
Cry5Ac1	I34543	Payne et al	1997		тільки послідовність ДНК
Cry5Ad1	ABQ82087	Lenane et al	2007	Bt L366	
Cry5Ba1	AAA68598	Foncerrada & Narva	1997	Bt PS86Q3	
Cry5Ba2	ABW88932	Guo et al	2008	YBT 1518	
Cry6Aa1	AAA22357	Narva et al	1993	Bt PS52A1	
Cry6Aa2	AAM46849	Bai et al	2001	YBT 1518	
Cry6Aa3	ABH03377	Jia et al	2006	Bt96418	
Cry6Ba1	AAA22358	Narva et al	1991	BtPS69DI	
Cry7Aa1	AAA22351	Lambert et al	1992	Bt galleriae PGSI245	

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

Реєстраційний номер для доступу в NCBI

Назва	Реєстр. №	Автори	Рік	Штам-джерело	Коментарі
Cry7Ab1	AAA21120	Narva & Fu	1994	BtdakotaHD511	
Cry7Ab2	AAA21121	Narva & Fu	1994	Bt kumamotoensis 867	
Cry7Ab3	ABX24522	Song et al	2008	Bt WZ-9	
Cry7Ab4	EU380678	Shu et al	2008	Bt	№ NCBI, зареєстр. 09 липня
Cry7Ab5	ABX79555	Aguirre-Arzola et al	2008	Bt monterrey GM-33	
Cry7Ab6	ACI44005	Deng et al	2008	BtHQ122	
Cry7Ab7	FJ940776	Wang et al Feng Jing	2009		№ NCBI, зареєстр. 09 липня
Cry7Ab8	GU145299		2009		№ NCBI, зареєстр. 09 липня
Cry7Ba1	ABB70817	Zhang et al	2006	Bt huazhongensis	
Cry7Ca1	ABR67863	Gao et al	2007	BtBTH-13	
Cry7Da1	ACQ99547	Yi et al	2009	Bt LH-2	
Cry8Aa1	AAA21117	Narva & Fu	1992	Bt kumamotoensis	
Cry8Ab1	EU044830	Cheng et al	2007	Bt B-JJX	№ NCBI, зареєстр. 09 липня
Cry8Ba1	AAA21118	Narva & Fu	1993	Bt kumamotoensis	
Cry8Bb1	CAD57542	Abad et al	2002		
Cry8Bc1	CAD57543	Abad et al	2002		
Cry8Ca1	AAA21119	Sato et al.	1995	Bt japonensis Buibui	
Cry8Ca2	AAR98783	Shu et al	2004	Bt HBF-1	
Cry8Ca3	EU625349	Du et al	2008	Bt FTL-23	№ NCBI, зареєстр. 09 липня
Cry8Da1	BAC07226	Asano et al	2002	Bt galleriae	
Cry8Da2	BD133574	Asano et al	2002	Bt	тільки послідовність ДНК
Cry8Da3	BD133575	Asano et al	2002	Bt	тільки послідовність ДНК
Cry8Db1	BAF93483	Yamaguchi et al	2007	Bt BBT2-5	
Crv8Ea1	AAQ73470	Fuping et al	2003	Bt 185	
Cry8Ea2	EU047597	Liu et al	2007	Bt B-DLL	№ NCBI, зареєстр. 09 липня
Cry8Fa1	AAT48690	Shu et al	2004	Bt 185	також AAW81032
Cry8Ga1	AAT46073	Shu et al	2004	Bt HBF-18	
Cry8Ga2	ABC42043	Yan et al	2008	Bt 145	
Cry8Ga3	FJ198072	Xiaodong et al	2008	Bt FCD114	№ NCBI, зареєстр. 09 липня
Cry8Ha1	EF465532	Fuping et al	2006	Bt 185	№ NCBI, зареєстр. 09 липня
Cry8Ia1	EU381044	Yan et al	2008	Bt su4	№ NCBI, зареєстр. 09 липня
Cry8Ja1	EU625348	Du et al	2008	Bt FPT-2	№ NCBI, зареєстр. 09 липня
Cry8Ka1	FJ422558	Quezado et al	2008		№ NCBI, зареєстр. 09 липня
Cry8Ka2	ACN87262	Noguera & Ibarra	2009	Bt kenyaе	
Cry8-like	FJ770571	Noguera & Ibarra	2009	Bt canadensis	тільки послідовність ДНК
Cry8-like	ABS53003	Mangena et al	2007	Bt	
Cry9Aa1	CAA41122	Shevelev et al	1991	Bt galleriae	
Cry9Aa2	CAA41425	Gleave et al	1992	BtDSIR517	
Cry9Aa3	GQ249293	Su et al	2009	Bt SC5(D2)	№ NCBI, зареєстр. 09 липня
Cry9Aa4	GQ249294	Su et al	2009	Bt T03C001	№ NCBI, зареєстр. 09

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

Реєстраційний номер для доступу в NCBI

Назва	Реєстр. №	Автори	Рік	Штам-джерело	Коментарі
				липня	
Cry9Aa-like	AAQ52376	Baum et al	2003	неповна послідовність	
Cry9Ba1	CAA52927	Shevelev et al	1993	Bt galleriae	
Cry9Bb1	AAV28716	Silva-Werneck et al	2004	Bt japonensis	
Cry9Ca1	CAA85764	Lambert et al	1996	Bt tolworthi	
Cry9Ca2	AAQ52375	Baum et al	2003		неповна послідовність
Cry9Da1	BAA19948	Asano	1997	Bt japonensis N141	
Cry9Da2	AAB97923	Wasano & Ohba	1998	Bt japonensis	
Cry9Da3	GQ249295	Su et al	2009	Bt T03B001	№ NCBI, зареєстр. 09 липня
Cry9Da4	GQ249297	Su et al	2009	BtT03B001	№ NCBI, зареєстр. 09 липня
Cry9Db1	AAX78439	Flannagan & Abad	2005	Bt kurstaki DP1019	
Cry9Ea1	BAA34908	Midoh & Oyama	1998	Bt aizawai SSK-10	
Cry9Ea2	AAO12908	Li et al	2001	Bt B-Hm-16	
Cry9Ea3	ABM21765	Lin et al	2006	Bt lyA	
Cry9Ea4	ACE88267	Zhu et al	2008	Bt ywc5-4	
Cry9Ea5	ACF04743	Zhu et al	2008	Bts	
Cry9Ea6	ACG63872	Liu & Guo	2008	Bt 11	
Cry9Ea7	FJ380927	Sun et al	2008		№ NCBI, зареєстр. 09 липня
Cry9Ea8	GQ249292	Su et al	2009	GQ249292	№ NCBI, зареєстр. 09 липня
Cry9Eb1	CAC50780	Arnaut et al	2001		
Cry9Eb2	GQ249298	Su et al	2009	Bt T03B001	№ NCBI, зареєстр. 09 липня
Cry9Ec1	AAC63366	Wasano et al	2003	Bt galleriae	
Cry9Ed1	AAX78440	Flannagan & Abad	2005	Bt kurstaki DP1019	
Cry9Eel	GQ249296	Su et al	2009	BtT03B001	№ NCBI, зареєстр. 09 липня
Cry9-like	AAC63366	Wasano et al	1998	Bt galleriae	
Cry10Aa1	AAA22614	Thorne et al	1986	Bt israelensis	
Cry10Aa2	E00614	Aran & Toomasu	1996	Bt israelensis ONR-60A	тільки послідовність ДНК
Cry10Aa3	CAD30098	Berry et al	2002	Bt israelensis	
Cry10A-like	DQ167578	Mahalakshmi et al	2006	Bt LDC-9	неповна послідовність
Cry11Aa1	AAA22352	Donovan et al	1988	Bt israelensis	
Cry11Aa2	AAA22611	Adams et al	1989	Bt israelensis	
Cry11Aa3	CAD30081	Berry et al	2002	Bt israelensis	
Cry11Aa-like	DQ166531	Mahalakshmi et al	2007	Bt LDC-9	неповна послідовність
Cry11Ba1	CAA60504	Delecluse et al	1995	Bt jegathesan 367	
Cry11Bb1	AAC97162	Ordaz et al	1998	Bt medellin	
Cry12Aa1	AAA22355	Narva et al	1991	Bt PS33F2	
Cry13Aa1	AAA22356	Narva et al	1992	Bt PS63B	
Cry14Aa1	AAA21516	Narva et al	1994	BtsottoPS80JJI	
Cry15Aa1	AAA22333	Brown & Whiteley	1992	Bt thompsoni	

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

Реєстраційний номер для доступу в NCBI

Назва	Реєстр. №	Автори	Рік	Штам-джерело	Коментарі
Cry16Aa1	CAA63860	Barloy et al	1996	Cb malaysiaCH18	
Cry17Aa1	CAA67841	Barloy et al	1998	Cb malaysiaCH18	
Cry18Aa1	CAA67506	Zhang et al	1997	Paenibacillus popilliae	
Cry18Ba1	AAF89667	Patel et al	1999	Paenibacillus popilliae	
Cry18Ca1	AAF89668	Patel et al	1999	Paenibacillus popilliae	
Cry19Aa1	CAA68875	Rosso & Delecluse	1996	Bt jegathesan 367	
Cry19Ba1	BAA32397	Hwang et al	1998	Bt higo	
Cry20Aa1	AAB93476	Lee & Gill	1997	Bt fukuokaensis	
Cry20Ba1	ACS93601	Noguera & Ibarra	2009	Bt higo LBIT-976	
Cry20-like	GQ144333	Yi et al	2009	Bt Y-5	тільки послідовність ДНК
Cry21Aa1	I32932	Payne et al	1996		тільки послідовність ДНК
Cry21Aa2	I66477	Feitelson	1997		тільки послідовність ДНК
Cry21Ba1	BAC06484	Sato & Asano	2002	Bt roskildiensis	
Cry22Aa1	I34547	Payne et al	1997		тільки послідовність ДНК
Cry22Aa2	CAD43579	Isaac et al	2002	Bt	
Cry22Aa3	ACD93211	Du et al	2008	Bt FZ-4	
Cry22Ab1	AAK50456	Baum et al	2000	BtEG4140	
Cry22Ab2	CAD43577	Isaac et al	2002	Bt	
Cry22Ba1	CAD43578	Isaac et al	2002	Bt	
Cry23Aa1	AAF76375	Donovan et al	2000	Bt	об'єднаний з Cry37Aa1
Cry24Aa1	AAC61891	Kawalek and Gill	1998	Bt jegathesan	
Cry24Ba1	BAD32657	Ohgushi et al	2004	Bt sotto	
Cry24Ca1	CAJ43600	Beron & Salerno	2005	BtFCC-41	
Cry25Aa1	AAC61892	Kawalek and Gill	1998	Bt jegathesan	
Cry26Aa1	AAD25075	Wojciechowska et al	1999	Bt finitimus B-1166	
Cry27Aa1	BAA82796	Saitoh	1999	Bt higo	
Cry28Aa1	AAD24189	Wojciechowska et al	1999	Bt finitimus B-1161	
Cry28Aa2	AAG00235	Moore and Debro	2000	Bt finitimus	
Cry29Aa1	CAC80985	Delecluse et al	2000	Bt medellin	
Cry30Aa1	CAC80986	Delecluse et al	2000	Bt medellin	
Cry30Ba1	BAD00052	Ito et al	2003	Bt entomocidus	
Cry30Ca1	BAD67157	Ohgushi et al	2004	Bt sotto	
Cry30Ca2	ACU24781	Sun and Park	2009	Bt jegathesan 367	
Cry30Da1	EF095955	Shu et al	2006	Bt Y41 № NCBI, зареєстр. 09 липня	
Cry30Db1	BAE80088	Kishida et al	2006	Bt aizawai BUN1-14	
Cry30Ea1	ACC95445	Fang et al	2007	Bt S2160-1	
Cry30Ea2	FJ499389	Jun et al	2008	Bt Ywc2-8 № NCBI, зареєстр. 09 липня	
Cry30Fa1	ACI22625	Tan et al	2008	Bt MC28	
Cry30Ga1	ACG60020	Zhu et al	2008	Bt HS18-1	
Cry31Aa1	BAB11757	Saitoh & Mizuki	2000	Bt 84-HS-1-11	
Cry31Aa2	AAL87458	Jung and Cote	2000	Bt M15	
Cry31Aa3	BAE79808	Uemori et al	2006	Bt B0195	
Cry31Aa4	BAF32571	Yasutake et al	2006	Bt 79-25	
Cry31Aa5	BAF32572	Yasutake et al	2006	Bt 92-10	
Cry31Ab1	BAE79809	Uemori et al	2006	Bt B0195	

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

Реєстраційний номер для доступу в NCBI

Назва	Реєстр. №	Автори	Рік	Штам-джерело	Коментарі
Cry31Ab2	BAF32570	Yasutake et al	2006	Bt 31-5	
Cry31Ac1	BAF34368	Yasutake et al	2006	Bt 87-29	
Cry32Aa1	AAG36711	Balasubramanian et al	2001	Bt yunnanensis	
Cry32Ba1	BAB78601	Takebe et al	2001	Bt	
Cry32Ca1	BAB78602	Takebe et al	2001	Bt	
Cry32Da1	BAB78603	Takebe et al	2001	Bt	
Cry33Aa1	AAL26871	Kim et al	2001	Bt dakota	
Cry34Aa1	AAG50341	Ellis et al	2001	Bt PS80JJl	об'єднаний з Cry35Aa1
Cry34Aa2	AAK64560	Rupar et al	2001	Bt EG5899	об'єднаний з Cry35Aa2
Cry34Aa3	AAT29032	Schnepf et al	2004	Bt PS69Q	об'єднаний з Cry35Aa3
Cry34Aa4	AAT29030	Schnepf et al	2004	Bt PS185GG	об'єднаний з Cry35Aa4
Cry34Ab1	AAG41671	Moellenbeck et al	2001	Bt PS149BI	об'єднаний з Cry35Ab1
Cry34Ac1	AAG50118	Ellis et al	2001	Bt PS167H2	об'єднаний з Cry35Ac1
Cry34Ac2	AAK64562	Rupar et al	2001	Bt EG9444	об'єднаний з Cry35Ab2
Cry34Ac3	AAT29029	Schnepf et al	2004	Bt KR1369	об'єднаний з Cry35Ab3
Cry34Ba1	AAK64565	Rupar et al	2001	Bt EG4851	об'єднаний з Cry35Ba1
Cry34Ba2	AAT29033	Schnepf et al	2004	Bt PS201L3	об'єднаний з Cry35Ba2
Cry34Ba3	AAT29031	Schnepf et al	2004	Bt PS201HH2	об'єднаний з Cry35Ba3
Cry35Aa1	AAG50342	Ellis et al	2001	Bt PS80JJl	об'єднаний з Cry34Aa1
Cry35Aa2	AAK64561	Rupar et al	2001	Bt EG5899	об'єднаний з Cry34Aa2
Cry35Aa3	AAT29028	Schnepf et al	2004	Bt PS69Q	об'єднаний з Cry34Aa3
Cry35Aa4	AAT29025	Schnepf et al	2004	Bt PS185GG	об'єднаний з Cry34Aa4
Cry35Ab1	AAG41672	Moellenbeck et al	2001	Bt PS149BI	об'єднаний з Cry34Ab1
Cry35Ab2	AAK64563	Rupar et al	2001	Bt EG9444	об'єднаний з Cry34Ac2
Cry35Ab3	AY536891	AAT29024	2004	Bt KR1369	об'єднаний з Cry34Ab3
Cry35Ac1	AAG50117	Ellis et al	2001	Bt PS167H2	об'єднаний з Cry34Ac1
Cry35Ba1	AAK64566	Rupar et al	2001	Bt EG4851	об'єднаний з Cry34Ba1
Cry35Ba2	AAT29027	Schnepf et al	2004	Bt PS201L3	об'єднаний з Cry34Ba2
Cry55Aa2	AAE33526	Bradfish et al	2000	BT Y41	
Cry56Aa1	FJ597621	Jun & Furong	2008	Bt Ywc2-8	№ NCBI, зареєстр. 09 липня
Cry56Aa2	GQ483512	Guan Peng et al	2009	Bt G7-l	№ NCBI, зареєстр. 09 липня
Cry57Aa1	ANC87261	Noguera & Ibarra	2009	Bt kim	
Cry58Aa1	ANC87260	Noguera & Ibarra	2009	Bt entomocidus	
Cry59Aa1	ACR43758	Noguera & Ibarra	2009	Bt kim LBIT-980	

Vip3Aa1	Vip3Aa	AAC37036	Estruch et al	1996	PNAS 93, 5389-5394	AB88	
Vip3Aa2	Vip3Ab	AAC37037	Estruch et al	1996	PNAS 93, 5389-5394	AB424	
Vip3Aa3	Vip3Ac		Estruch et al	2000	US 6137033 Oct 2000		
Vip3Aa4	PS36A Sup	AAR81079	Feitelson et al	1998	US 6656908 Dec 2003	Bt PS36A	WO9818932(A 2,A3) 7 May 1998
Vip3Aa5	PS81F Sup	AAR81080	Feitelson et al	1998	US 6656908 Dec 2003	Bt PS81F	WO9818932(A 2,A3) 7 May 1998
Vip3Aa6	Jav90 Sup	AAR81081	Feitelson et al	1998	US 6656908 Dec 2003	Bt	WO9818932(A 2,A3) 7 May 1998
Vip3Aa7	Vip83	AAK95326	Cai et al	2001	не опубліковано	Bt YBT-833	
Vip3Aa8	Vip3A	AAK97481	Loguercio et al	2001	не опубліковано	Bt HD125	
Vip3Aa9	VipS	CAA76665	Selvapandiyam et al	2001	не опубліковано	Bt A13	
Vip3Aa10	Vip3V	AAN60738	Doss et al	2002	Protein Expr. Purif. 26, 82- 88	Bt	
Vip3Aa11	Vip3A	AAR36859	Liu et al	2003	не опубліковано	Bt C9	
Vip3Aa12	Vip3A-WB5	AAM22456	Wu and Guan	2003	не опубліковано	Bt	
Vip3Aa13	Vip3A	AAL69542	Chen et al	2002	Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao 18, 687-692	Bt S184	
Vip3Aa14	Vip	AAQ12340	Polumetla et al	2003	не опубліковано	Bt tolworthi	
Vip3Aa15	Vip3A	AAP51131	Wu et al	2004	не опубліковано	Bt WB50	
Vip3Aa16	Vip3LB	AAW65132	Mesrati et al	2005	FEMS Micro Lett 244, 353-358	Bt	
Vip3Aa17	Jav90		Feitelson et al	1999	US 6603063 Aug 2003	Javelin 1990	WO9957282(A 2,A3) 11Nov 1999
Vip3Aa18		AAX49395	Cai and Xiao	2005	не опубліковано	Bt 9816C	
Vip3Aa19	Vip3ALD	DQ241674	Liu et al	2006	не опубліковано	Bt AL	
Vip3Aa19	Vip3A-I	DQ539887	Hart et al	2006	не опубліковано		

Vip3Aa20	Vip3A-2	DQ539888	Hart et al	2006	не опубліковано		
Vip3Aa21	Vip	ABD84410	Panbangred	2006	не опубліковано	Bt aizawai	
Vip3Aa22	Vip3A-LS1	AAV41427	Lu et al	2005	не опубліковано	Bt LS1	
Vip3Aa23	Vip3A-LS8	AAV41428	Lu et al	2005	не опубліковано	Bt LS8	
Vip3Aa24		BI 880913	Song et al	2007	не опубліковано	Bt WZ-7	
Vip3Aa25		EF608501	Hsieh et al	2007	не опубліковано		
Vip3Aa26		EU294496	Shen and Guo	2007	не опубліковано	Bt TF9	
Vip3Aa27		EU332167	Shen and Guo	2007	не опубліковано	Bt 16	
Vip3Aa28		FJ494817	Xiumei Yu	2008	не опубліковано	Bt JF23-8	
Vip3Aa29		FJ626674	Xiumei et al	2009	не опубліковано	Bt JF21-1	
Vip3Aa30		FJ626675	Xiumei et al	2009	не опубліковано	MD2-1	
Vip3Aa31		FJ626676	Xiumei et al	2009	не опубліковано	JF21-1	
Vip3Aa32		FJ626677	Xiumei et al	2009	не опубліковано	MD2-1	
Vip3Ab1	Vip3B	AAR40284	Feitelson et al	1999	US 6603063 Aug 2003	Bt KB59A4-6	WO9957282(A 2,A3) 11Nov 1999
Vip3Ab2	Vip3D	AAV88247	Feng and Shen	2006	не опубліковано	Bt	
Vip3Ac1	PS49C		Narva et al		заявка на патент США 2004012871 6		
Vip3Ad1	PS158C2		Narva et al		заявка на патент США 2004012871 6		
Vip3Ad2	ISP3B	CAI43276	Van Rie et al	2005	не опубліковано	Bt	
Vip3Ae1	ISP3C	CAI43277	Van Rie et al	2005	не опубліковано	Bt	
Vip3Af1	ISP3A	CAI43275	Van Rie et al	2005	не опубліковано	Bt	
Vip3Af2	Vip3C	ADN08753	Syngenta		WO 03/075655		
Vip3Ag1	Vip3B	ADN08758	Syngenta		WO 02/078437		
Vip3Ag2		FJ556803	Audtho et al	2008	не опубліковано	Bt	
Vip3Ah1	Vip3S	DQ832323	Li and Shen	2006	не опубліковано	Bt	
Vip3Ba1		AAV70653	Rang et al	2004			
Vip3Bb1	Vip3Z	ADN08760	Syngenta		WO 03/075655		
Vip3Bb2		EF439819	Akhurst et al	2007			

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Dow AGROSCIENCES LLC
 <120> КОМБІНОВАНЕ ЗАСТОСУВАННЯ БІЛКІВ CRY1Ca I CRY1Fa
 ДЛЯ ВИРОБЛЕННЯ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ДО КОМАХ
 <130> DAS-P0162-US-01
 <160> 5
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 1164
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Химерний білок DIG-152
 <400> 1
 Met Asp Asn Asn Pro Asn Ile Asn Glu Cys Ile Pro Tyr Asn Cys Leu
 1 5 10 15
 Ser Asn Pro Glu Glu Val Leu Leu Asp Gly Glu Arg Ile Ser Thr Gly
 20 25 30
 Asn Ser Ser Ile Asp Ile Ser Leu Ser Leu Val Gln Phe Leu Val Ser
 35 40 45
 Asn Phe Val Pro Gly Gly Gly Phe Leu Val Gly Leu Ile Asp Phe Val
 50 55 60
 Trp Gly Ile Val Gly Pro Ser Gln Trp Asp Ala Phe Leu Val Gln Ile
 65 70 75 80
 Glu Gln Leu Ile Asn Glu Arg Ile Ala Glu Phe Ala Arg Asn Ala Ala
 85 90 95
 Ile Ala Asn Leu Glu Gly Leu Gly Asn Asn Phe Asn Ile Tyr Val Glu
 100 105 110
 Ala Phe Lys Glu Trp Glu Glu Asp Pro Lys Asn Pro Ala Thr Arg Thr
 115 120 125
 Arg Val Ile Asp Arg Phe Arg Ile Leu Asp Gly Leu Leu Glu Arg Asp
 130 135 140
 Ile Pro Ser Phe Arg Ile Ser Gly Phe Glu Val Pro Leu Leu Ser Val
 145 150 155 160
 Tyr Ala Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ala Ile Leu Arg Asp Ser Val
 165 170 175
 Ile Phe Gly Glu Arg Trp Gly Leu Thr Thr Ile Asn Val Asn Glu Asn
 180 185 190

Tyr Asn Arg Leu Ile Arg His Ile Asp Glu Tyr Ala Asp His Cys Ala
 195 200 205
 Asn Thr Tyr Asn Arg Gly Leu Asn Asn Leu Pro Lys Ser Thr Tyr Gln
 210 215 220
 Asp Trp Ile Thr Tyr Asn Arg Leu Arg Arg Asp Leu Thr Leu Thr Val
 225 230 235 240
 Leu Asp Ile Ala Ala Phe Phe Pro Asn Tyr Asp Asn Arg Arg Tyr Pro
 245 250 255
 Ile Gln Pro Val Gly Gln Leu Thr Arg Glu Val Tyr Thr Asp Pro Leu
 260 265 270
 Ile Asn Phe Asn Pro Gln Leu Gln Ser Val Ala Gln Leu Pro Thr Phe
 275 280 285
 Asn Val Met Glu Asn Ser Ala Ile Arg Asn Pro His Leu Phe Asp Ile
 290 295 300
 Leu Asn Asn Leu Thr Ile Phe Thr Asp Trp Phe Ser Val Gly Arg Asn
 305 310 315 320
 Phe Tyr Trp Gly Gly His Arg Val Ile Ser Ser Leu Ile Gly Gly Gly
 325 330 335
 Asn Ile Thr Ser Pro Ile Tyr Gly Arg Glu Ala Asn Gln Glu Pro Pro
 340 345 350
 Arg Ser Phe Thr Phe Asn Gly Pro Val Phe Arg Thr Leu Ser Asn Pro
 355 360 365
 Thr Leu Arg Leu Leu Gln Gln Pro Trp Pro Ala Pro Pro Phe Asn Leu
 370 375 380
 Arg Gly Val Glu Gly Val Glu Phe Ser Thr Pro Thr Asn Ser Phe Thr
 385 390 395 400
 Tyr Arg Gly Arg Gly Thr Val Asp Ser Leu Thr Glu Leu Pro Pro Glu
 405 410 415
 Asp Asn Ser Val Pro Pro Arg Glu Gly Tyr Ser His Arg Leu Cys His
 420 425 430
 Ala Thr Phe Val Gln Arg Ser Gly Thr Pro Phe Leu Thr Thr Gly Val
 435 440 445
 Val Phe Ser Trp Thr His Arg Ser Ala Thr Leu Thr Asn Thr Ile Asp
 450 455 460
 Pro Glu Arg Ile Asn Gln Ile Pro Leu Val Lys Gly Phe Arg Val Trp
 465 470 475 480
 Gly Gly Thr Ser Val Ile Thr Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile
 485 490 495
 Leu Arg Arg Asn Thr Phe Gly Asp Phe Val Ser Leu Gln Val Asn Ile
 500 505 510
 Asn Ser Pro Ile Thr Gln Arg Tyr Arg Leu Arg Phe Arg Tyr Ala Ser
 515 520 525

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

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

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

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

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

Asp Lys Ile Glu Ile Ile Leu Ala Asp Ala Thr Phe Glu Ala Glu Ser
610 615 620

Asp Leu Glu Arg Ala Gln Lys Ala Val Asn Ala Leu Phe Thr Ser Ser
625 630 635 640

Asn Gln Ile Gly Leu Lys Thr Asp Val Thr Asp Tyr His Ile Asp Arg
645 650 655

Val Ser Asn Leu Val Glu Cys Leu Ser Asp Glu Phe Cys Leu Asp Glu
660 665 670

Lys Lys Glu Leu Ser Glu Lys Val Lys His Ala Lys Arg Leu Ser Asp
675 680 685

Glu Arg Asn Leu Leu Gln Asp Pro Asn Phe Arg Gly Ile Asn Arg Gln
690 695 700

Leu Asp Arg Gly Trp Arg Gly Ser Thr Asp Ile Thr Ile Gln Gly Gly
705 710 715 720

Asp Asp Val Phe Lys Glu Asn Tyr Val Thr Leu Leu Gly Thr Phe Asp
725 730 735

Glu Cys Tyr Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln Lys Ile Asp Glu Ser Lys Leu
740 745 750

Lys Ala Tyr Thr Arg Tyr Gln Leu Arg Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln
755 760 765

Asp Leu Glu Ile Tyr Leu Ile Arg Tyr Asn Ala Lys His Glu Thr Val
770 775 780

Asn Val Pro Gly Thr Gly Ser Leu Trp Pro Leu Ser Ala Pro Ser Pro
785 790 795 800

Ile Gly Lys Cys Ala His His Ser His His Phe Ser Leu Asp Ile Asp
805 810 815

Val Gly Cys Thr Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly Val Trp Val Ile Phe
820 825 830

Lys Ile Lys Thr Gln Asp Gly His Ala Arg Leu Gly Asn Leu Glu Phe
835 840 845

Leu Glu Glu Lys Pro Leu Val Gly Glu Ala Leu Ala Arg Val Lys Arg
850 855 860

Ala Glu Lys Lys Trp Arg Asp Lys Arg Glu Lys Leu Glu Trp Glu Thr
865 870 875 880

Asn Ile Val Tyr Lys Glu Ala Lys Glu Ser Val Asp Ala Leu Phe Val
885 890 895

Asn Ser Gln Tyr Asp Arg Leu Gln Ala Asp Thr Asn Ile Ala Met Ile
900 905 910

His Ala Ala Asp Lys Arg Val His Ser Ile Arg Glu Ala Tyr Leu Pro
915 920 925

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Leu Leu Met Glu Glu
1160

<210> 2
 <211> 1164
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Химерний білок DIG-109

<400> 2

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Val Met Glu Asn Ser Ala Ile Arg Asn Pro His Leu Phe Asp Ile
 290 295 300
 Leu Asn Asn Leu Thr Ile Phe Thr Asp Trp Phe Ser Val Gly Arg Asn
 305 310 315 320
 Phe Tyr Trp Gly Gly His Arg Val Ile Ser Ser Leu Ile Gly Gly Gly
 325 330 335
 Asn Ile Thr Ser Pro Ile Tyr Gly Arg Glu Ala Asn Gln Glu Pro Pro
 340 345 350
 Arg Ser Phe Thr Phe Asn Gly Pro Val Phe Arg Thr Leu Ser Asn Pro
 355 360 365
 Thr Leu Arg Leu Leu Gln Gln Pro Trp Pro Ala Pro Pro Phe Asn Leu
 370 375 380
 Arg Gly Val Glu Gly Val Glu Phe Ser Thr Pro Thr Asn Ser Phe Thr
 385 390 395 400
 Tyr Arg Gly Arg Gly Thr Val Asp Ser Leu Thr Glu Leu Pro Pro Glu
 405 410 415
 Asp Asn Ser Val Pro Pro Arg Glu Gly Tyr Ser His Arg Leu Cys His
 420 425 430
 Ala Thr Phe Val Gln Arg Ser Gly Thr Pro Phe Leu Thr Thr Gly Val
 435 440 445
 Val Phe Ser Trp Thr His Arg Ser Ala Thr Leu Thr Asn Thr Ile Asp
 450 455 460
 Pro Glu Arg Ile Asn Gln Ile Pro Leu Val Lys Gly Phe Arg Val Trp
 465 470 475 480
 Gly Gly Thr Ser Val Ile Thr Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile
 485 490 495
 Leu Arg Arg Asn Thr Phe Gly Asp Phe Val Ser Leu Gln Val Asn Ile
 500 505 510
 Asn Ser Pro Ile Thr Gln Arg Tyr Arg Leu Arg Phe Arg Tyr Ala Ser
 515 520 525
 Ser Arg Asp Ala Arg Val Ile Val Leu Thr Gly Ala Ala Ser Thr Gly
 530 535 540
 Val Gly Gly Gln Val Ser Val Asn Met Pro Leu Gln Lys Thr Met Glu
 545 550 555 560
 Ile Gly Glu Asn Leu Thr Ser Arg Thr Phe Arg Tyr Thr Asp Phe Ser
 565 570 575
 Asn Pro Phe Ser Phe Arg Ala Asn Pro Asp Ile Ile Gly Ile Ser Glu
 580 585 590
 Gln Pro Leu Phe Gly Ala Gly Ser Ile Ser Ser Gly Glu Leu Tyr Ile
 595 600 605
 Asp Lys Ile Glu Ile Ile Leu Ala Asp Ala Thr Leu Glu Ala Glu Ser
 610 615 620
 Asp Leu Glu Arg Ala Gln Lys Ala Val Asn Ala Leu Phe Thr Ser Ser

625		630		635		640
Asn Gln Ile Gly Leu Lys Thr Asp Val Thr Asp Tyr His Ile Asp Arg						
	645			650		655
Val Ser Asn Leu Val Glu Cys Leu Ser Asp Glu Phe Cys Leu Asp Glu						
	660			665		670
Lys Lys Glu Leu Ser Glu Lys Val Lys His Ala Lys Arg Leu Ser Asp						
	675			680		685
Glu Arg Asn Leu Leu Gln Asp Pro Asn Phe Arg Gly Ile Asn Arg Gln						
	690			695		700
Leu Asp Arg Gly Trp Arg Gly Ser Thr Asp Ile Thr Ile Gln Gly Gly						
	705			710		715
Asp Asp Val Phe Lys Glu Asn Tyr Val Thr Leu Leu Gly Thr Phe Asp						
	725			730		735
Glu Cys Tyr Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln Lys Ile Asp Glu Ser Lys Leu						
	740			745		750
Lys Ala Tyr Thr Arg Tyr Gln Leu Arg Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln						
	755			760		765
Asp Leu Glu Ile Tyr Leu Ile Arg Tyr Asn Ala Lys His Glu Thr Val						
	770			775		780
Asn Val Pro Gly Thr Gly Ser Leu Trp Pro Leu Ser Ala Pro Ser Pro						
	785			790		795
Ile Gly Lys Cys Ala His His Ser His His Phe Ser Leu Asp Ile Asp						
	805			810		815
Val Gly Cys Thr Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly Val Trp Val Ile Phe						
	820			825		830
Lys Ile Lys Thr Gln Asp Gly His Ala Arg Leu Gly Asn Leu Glu Phe						
	835			840		845
Leu Glu Glu Lys Pro Leu Val Gly Glu Ala Leu Ala Arg Val Lys Arg						
	850			855		860
Ala Glu Lys Lys Trp Arg Asp Lys Arg Glu Lys Leu Glu Trp Glu Thr						
	865			870		875
Asn Ile Val Tyr Lys Glu Ala Lys Glu Ser Val Asp Ala Leu Phe Val						
	885			890		895
Asn Ser Gln Tyr Asp Arg Leu Gln Ala Asp Thr Asn Ile Ala Met Ile						
	900			905		910
His Ala Ala Asp Lys Arg Val His Ser Ile Arg Glu Ala Tyr Leu Pro						
	915			920		925
Glu Leu Ser Val Ile Pro Gly Val Asn Ala Ala Ile Phe Glu Glu Leu						
	930			935		940
Glu Gly Arg Ile Phe Thr Ala Phe Ser Leu Tyr Asp Ala Arg Asn Val						
	945			950		955
Ile Lys Asn Gly Asp Phe Asn Asn Gly Leu Ser Cys Trp Asn Val Lys						
	965			970		975

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Leu Leu Met Glu Glu
 1160

<210> 3
 <211> 3492
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Оптимізована для кукурудзи ділянка, яка кодує DIG-109

<400> 3
 atggataaca accccaacat taacgagtgac atcccgtaga actgcctctc gaatccagaa 60
 gaagtgcctc tggatggcga gaggatttcg actggcaaca gctccatcga catttcctc 120
 tccttggttc agttccttgt gtctaacttc gtccctggcg gtggcttcct tgttggectt 180
 atcgacttcg tctggggaat tctcggaccc tcccagtgga atgcgtttct ggtgcagata 240
 gagcagctga tcaacgagag gatcgctgag ttccgcgagaa atgctgcaat cgccaacctt 300
 gaagggcttg gcaacaacct caacatctac gtggaggcgt tcaaggagtg ggaagaggac 360

cctaagaatc cagcgaccag aacgaggggt atagatcggg tccgcatacct cgatggcctt	420
ttggagaggg acatcccag cttccgcatt tcgggatttg aggttcctct gctctcagtc	480
tacgctcaag ctgctaactc gcatactggc atcttgaggg attcagtcac ctttggcgaa	540
cgctggggtc ttacgactat caacgtgaac gagaactaca atcggttgat tcggcacata	600
gacgagtatg ccgaccactg tgctaacacc tacaataggg gtctgaacaa tctgccaaag	660
tcaacgtatc aagactggat aacctacaat aggctcagac gggacctcac tctcaccgtg	720
ctggacatag ctgccttctt tccgaactac gacaaccgga gatatactat tcaaccggtt	780
ggtcagctca ctgcgaggt ctacaccgat cccctcatca acttcaatcc ccagctgcaa	840
tcggctgcac agctgcccac cttcaatgtg atggaaaact cagcgatccg gaatccccat	900
ctgtttgaca tacttaacaa cctcactatc ttcaaccgatt ggttttcagt tggacgcaac	960
ttctactggg gagggcacag agtgatttca agcctcattg gaggagggaa cattacatcg	1020
cctatctatg gaagggaggg caaccaagag ccaccaaggt ctttcacctt caacggtccg	1080
gtgttcagaa cacttagcaa tcccacattg cgcttgctgc aacagccgtg gccagcacca	1140
ccattcaatc tgaggggagt ggaggggtgt gagttctcga cgcctacaaa ctcttttacg	1200
tacagaggca gagggacagt ggactcactg acagaactcc cacctgagga caactctgtt	1260
cctccgaggg agggctactc gcaccggctt tgccatgcc acttcgtcca gaggtctggc	1320
acgccttttc tgaccactgg ggttgctctt agctggactc accgctcagc gacgctgacc	1380
aacacaatcg acccagagag gatcaatcag atccctctgg tgaagggctt tcgcgtttgg	1440
ggtggcacia gcgtgatcac cggacctggg ttactggtg gggatatact cagacgcaat	1500
acgtttggcg atttcgtgag ctttcaagtc aacatcaatt cccaatcac ccagagatat	1560
cggtccgct tcagatacgc ctcatccaga gacgcaaggg tcacgtcct tactggagca	1620
gccagcaccg gagtcggagg ccaagttagc gtcaacatgc cgttgacaaa aacgatggaa	1680
atcggtgaaa acctcaccag cagaaccttt cgctatacag atttcagcaa ccctttctcc	1740
ttcagagcca atccggacat aatcggcata tccgagcagc ccttgttcgg tgctgggtcc	1800
atctctcttg gcgagctgta catcgacaag attgagatca ttctcgaga tgcgactctc	1860
gaggctgaat cggatcttga aagggcacag aaggcagtc acgctctctt caccagctca	1920
aatcagattg gcttaagac cgatgttact gactatcata tcgacagagt ttctaacctt	1980
gtcgagtgc tctccgacga gttctgtctc gacgaaaaga aggaactctc cgagaaagtg	2040
aagcacgga aacgcctctc ggatgaacgg aacttgctgc aagatccgaa cttcagaggc	2100
atcaatcgcc agttggatag aggtggagg ggatcaaccg acataaccat tcaaggtggg	2160
gatgatgtgt tcaaggaaaa ctacgtgaca ttgctgggca ccttcgacga gtgctatccc	2220
acgtatctct atcagaagat tgacgagtcc aagctcaaag cctacacacg ctatcagctc	2280

```

agaggctaca ttgaggactc tcaagacctc gaaatctact tgatcagata caacgccaag 2340
cacgagacgg tgaacgtccc tgggactggg tcaactgtggc cactgtcggc accctcgcca 2400
atcggaagt gcgtcacca cagccaccac ttctcccttg acatagatgt tgggtgtacg 2460
gacttgaatg aggatctggg tgtgtgggtg atctttaaga tcaagacca agatggtcac 2520
gcgaggcttg gcaaccttga gttccttgaa gagaagcctt tggtcggaga ggcaactggc 2580
cgcgtaaga gggctgagaa gaaatggagg gacaagaggg agaaactgga gtgggagacc 2640
aacatagtgt acaaggaggc caaggagtca gtggacgcac tgtttgtcaa ttcccagtat 2700
gataggctcc aagcggacac gaacatcgcc atgatccatg cagcggacaa gaggggtcac 2760
tcataagggt aggcctatct tccggagctg tcaagtattc ctgggggtcaa cgcagccatc 2820
tttgaggaat tggaagggtg gatcttcacc gctttctctc tgtacgacgc tcggaacgtc 2880
atcaagaatg gtgatttcaa caatggactc agctgctgga acgtgaaagg gcatgtcgat 2940
gttgaagaac agaacaatca ccgcagcgtg ctggtgggtc cggagtggga agccgaggtc 3000
tcacaagaag tcagagtgtg ccctgggagg gggttacatc tgcgggtcac agcctacaag 3060
gaaggttatg gcgaaggctg tgtcacgac catgagatcg aaaacaacac agacgagctg 3120
aagttttcca actgtgttga ggaggaggtc tatcctaaca atactgttac gtgcaacgac 3180
tacacagcca ctcaagagga gtacgagggc acttacacct ctgcaacag aggctacgac 3240
ggtgcctacg agtcaaacag ctccgtgcca gcggactacg cctcggctta cgaagagaag 3300
gcgtacaccg acggtcggag ggataacccg tgcgagagca atagaggcta tggcgactac 3360
actcctctcc cagctggcta cgtgaccaag gagtggagt actttccgga gacagacaaa 3420
gtctggattg agattggaga gacagaaggc acgttcatcg tggactctgt tgaactcttg 3480
ctgatggagg ag 3492

```

```

<210> 4
<211> 605
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

```

```

<220>
<223> CrylFa

```

```

<400> 4

```

```

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

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

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

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

```

Phe Ile Thr Pro Ser Asp Trp Ser Leu Phe Leu Leu Gln Ile Glu Gln
 65 70 75 80
 Leu Ile Glu Gln Arg Ile Glu Thr Leu Glu Arg Asn Arg Ala Ile Thr
 85 90 95
 Thr Leu Arg Gly Leu Ala Asp Ser Tyr Glu Ile Tyr Ile Glu Ala Leu
 100 105 110
 Arg Glu Trp Glu Ala Asn Pro Asn Asn Ala Gln Leu Arg Glu Asp Val
 115 120 125
 Arg Ile Arg Phe Ala Asn Thr Asp Asp Ala Leu Ile Thr Ala Ile Asn
 130 135 140
 Asn Phe Thr Leu Thr Ser Phe Glu Ile Pro Leu Leu Ser Val Tyr Val
 145 150 155 160
 Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser Leu Leu Arg Asp Ala Val Ser Phe
 165 170 175
 Gly Gln Gly Trp Gly Leu Asp Ile Ala Thr Val Asn Asn His Tyr Asn
 180 185 190
 Arg Leu Ile Asn Leu Ile His Arg Tyr Thr Lys His Cys Leu Asp Thr
 195 200 205
 Tyr Asn Gln Gly Leu Glu Asn Leu Arg Gly Thr Asn Thr Arg Gln Trp
 210 215 220
 Ala Arg Phe Asn Gln Phe Arg Arg Asp Leu Thr Leu Thr Val Leu Asp
 225 230 235 240
 Ile Val Ala Leu Phe Pro Asn Tyr Asp Val Arg Thr Tyr Pro Ile Gln
 245 250 255
 Thr Ser Ser Gln Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Ser Ser Val Ile Glu
 260 265 270
 Asp Ser Pro Val Ser Ala Asn Ile Pro Asn Gly Phe Asn Arg Ala Glu
 275 280 285
 Phe Gly Val Arg Pro Pro His Leu Met Asp Phe Met Asn Ser Leu Phe
 290 295 300
 Val Thr Ala Glu Thr Val Arg Ser Gln Thr Val Trp Gly Gly His Leu
 305 310 315 320
 Val Ser Ser Arg Asn Thr Ala Gly Asn Arg Ile Asn Phe Pro Ser Tyr
 325 330 335
 Gly Val Phe Asn Pro Gly Gly Ala Ile Trp Ile Ala Asp Glu Asp Pro
 340 345 350
 Arg Pro Phe Tyr Arg Thr Leu Ser Asp Pro Val Phe Val Arg Gly Gly
 355 360 365
 Phe Gly Asn Pro His Tyr Val Leu Gly Leu Arg Gly Val Ala Phe Gln
 370 375 380
 Gln Thr Gly Thr Asn His Thr Arg Thr Phe Arg Asn Ser Gly Thr Ile
 385 390 395 400

Asp Ser Leu Asp Glu Ile Pro Pro Gln Asp Asn Ser Gly Ala Pro Trp
 405 410 415
 Asn Asp Tyr Ser His Val Leu Asn His Val Thr Phe Val Arg Trp Pro
 420 425 430
 Gly Glu Ile Ser Gly Ser Asp Ser Trp Arg Ala Pro Met Phe Ser Trp
 435 440 445
 Thr His Arg Ser Ala Thr Pro Thr Asn Thr Ile Asp Pro Glu Arg Ile
 450 455 460
 Thr Gln Ile Pro Leu Val Lys Ala His Thr Leu Gln Ser Gly Thr Thr
 465 470 475 480
 Val Val Arg Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr
 485 490 495
 Ser Gly Gly Pro Phe Ala Tyr Thr Ile Val Asn Ile Asn Gly Gln Leu
 500 505 510
 Pro Gln Arg Tyr Arg Ala Arg Ile Arg Tyr Ala Ser Thr Thr Asn Leu
 515 520 525
 Arg Ile Tyr Val Thr Val Ala Gly Glu Arg Ile Phe Ala Gly Gln Phe
 530 535 540
 Asn Lys Thr Met Asp Thr Gly Asp Pro Leu Thr Phe Gln Ser Phe Ser
 545 550 555 560
 Tyr Ala Thr Ile Asn Thr Ala Phe Thr Phe Pro Met Ser Gln Ser Ser
 565 570 575
 Phe Thr Val Gly Ala Asp Thr Phe Ser Ser Gly Asn Glu Val Tyr Ile
 580 585 590
 Asp Arg Phe Glu Leu Ile Pro Val Thr Ala Thr Leu Glu
 595 600 605

<210> 5
 <211> 619
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Cry1Ca

<400> 5

Met Asp Asn Asn Pro Asn Ile Asn Glu Cys Ile Pro Tyr Asn Cys Leu
 1 5 10 15
 Ser Asn Pro Glu Glu Val Leu Leu Asp Gly Glu Arg Ile Ser Thr Gly
 20 25 30
 Asn Ser Ser Ile Asp Ile Ser Leu Ser Leu Val Gln Phe Leu Val Ser
 35 40 45
 Asn Phe Val Pro Gly Gly Gly Phe Leu Val Gly Leu Ile Asp Phe Val
 50 55 60
 Trp Gly Ile Val Gly Pro Ser Gln Trp Asp Ala Phe Leu Val Gln Ile

65	70	75	80
Glu Gln Leu Ile Asn Glu Arg Ile Ala Glu Phe Ala Arg Asn Ala Ala	85	90	95
Ile Ala Asn Leu Glu Gly Leu Gly Asn Asn Phe Asn Ile Tyr Val Glu	100	105	110
Ala Phe Lys Glu Trp Glu Glu Asp Pro Lys Asn Pro Ala Thr Arg Thr	115	120	125
Arg Val Ile Asp Arg Phe Arg Ile Leu Asp Gly Leu Leu Glu Arg Asp	130	135	140
Ile Pro Ser Phe Arg Ile Ser Gly Phe Glu Val Pro Leu Leu Ser Val	145	150	155
Tyr Ala Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ala Ile Leu Arg Asp Ser Val	165	170	175
Ile Phe Gly Glu Arg Trp Gly Leu Thr Thr Ile Asn Val Asn Glu Asn	180	185	190
Tyr Asn Arg Leu Ile Arg His Ile Asp Glu Tyr Ala Asp His Cys Ala	195	200	205
Asn Thr Tyr Asn Arg Gly Leu Asn Asn Leu Pro Lys Ser Thr Tyr Gln	210	215	220
Asp Trp Ile Thr Tyr Asn Arg Leu Arg Arg Asp Leu Thr Leu Thr Val	225	230	235
Leu Asp Ile Ala Ala Phe Phe Pro Asn Tyr Asp Asn Arg Arg Tyr Pro	245	250	255
Ile Gln Pro Val Gly Gln Leu Thr Arg Glu Val Tyr Thr Asp Pro Leu	260	265	270
Ile Asn Phe Asn Pro Gln Leu Gln Ser Val Ala Gln Leu Pro Thr Phe	275	280	285
Asn Val Met Glu Asn Ser Ala Ile Arg Asn Pro His Leu Phe Asp Ile	290	295	300
Leu Asn Asn Leu Thr Ile Phe Thr Asp Trp Phe Ser Val Gly Arg Asn	305	310	315
Phe Tyr Trp Gly Gly His Arg Val Ile Ser Ser Leu Ile Gly Gly Gly	325	330	335
Asn Ile Thr Ser Pro Ile Tyr Gly Arg Glu Ala Asn Gln Glu Pro Pro	340	345	350
Arg Ser Phe Thr Phe Asn Gly Pro Val Phe Arg Thr Leu Ser Asn Pro	355	360	365
Thr Leu Arg Leu Leu Gln Gln Pro Trp Pro Ala Pro Pro Phe Asn Leu	370	375	380
Arg Gly Val Glu Gly Val Glu Phe Ser Thr Pro Thr Asn Ser Phe Thr	385	390	395
Tyr Arg Gly Arg Gly Thr Val Asp Ser Leu Thr Glu Leu Pro Pro Glu			

```

          405              410              415
Asp Asn Ser Val Pro Pro Arg Glu Gly Tyr Ser His Arg Leu Cys His
          420              425              430
Ala Thr Phe Val Gln Arg Ser Gly Thr Pro Phe Leu Thr Thr Gly Val
          435              440              445
Val Phe Ser Trp Thr His Arg Ser Ala Thr Leu Thr Asn Thr Ile Asp
          450              455              460
Pro Glu Arg Ile Asn Gln Ile Pro Leu Val Lys Gly Phe Arg Val Trp
          465              470              475              480
Gly Gly Thr Ser Val Ile Thr Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile
          485              490              495
Leu Arg Arg Asn Thr Phe Gly Asp Phe Val Ser Leu Gln Val Asn Ile
          500              505              510
Asn Ser Pro Ile Thr Gln Arg Tyr Arg Leu Arg Phe Arg Tyr Ala Ser
          515              520              525
Ser Arg Asp Ala Arg Val Ile Val Leu Thr Gly Ala Ala Ser Thr Gly
          530              535              540
Val Gly Gly Gln Val Ser Val Asn Met Pro Leu Gln Lys Thr Met Glu
          545              550              555              560
Ile Gly Glu Asn Leu Thr Ser Arg Thr Phe Arg Tyr Thr Asp Phe Ser
          565              570              575
Asn Pro Phe Ser Phe Arg Ala Asn Pro Asp Ile Ile Gly Ile Ser Glu
          580              585              590
Gln Pro Leu Phe Gly Ala Gly Ser Ile Ser Ser Gly Glu Leu Tyr Ile
          595              600              605
Asp Lys Ile Glu Ile Ile Leu Ala Asp Ala Thr
          610              615

```

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Трансгенна рослина, яка містить ДНК, що кодує інсектицидний білок Cry1Ca, і ДНК, що кодує інсектицидний білок Cry1Fa.
2. Трансгенне насіння рослини за п. 1, яке містить ДНК, що кодує інсектицидний білок Cry1Ca, і ДНК, що кодує інсектицидний білок Cry1Fa.
- 10 3. Трансгенна рослина за п. 1, де ДНК, що кодує інсектицидний білок Cry1Ca, і ДНК, що кодує інсектицидний білок Cry1Fa, були введені у вказану рослину шляхом інтрогресії.
4. Трансгенне насіння рослини за п. 3, яке містить ДНК, що кодує інсектицидний білок Cry1Ca, і ДНК, що кодує інсектицидний білок Cry1Fa.
- 15 5. Сукупність рослин в полі, що містить не-*Bacillus thuringiensis* (не-Bt) рослини-сховища, які не експресують трансгенні інсектицидні білки, і сукупність трансгенних рослин за п. 1, де вказані трансгенні рослини містять ДНК, що кодує інсектицидний білок Cry1Ca, і ДНК, що кодує інсектицидний білок Cry1Fa, де вказані не-Bt рослини-сховища складають менше ніж 40 % від всіх сільськогосподарських культур в указаній сукупності рослин.
6. Сукупність рослин за п. 5, де вказані рослини-сховища складають менше ніж 30 % від всіх сільськогосподарських культур в указаній сукупності рослин.
- 20 7. Сукупність рослин за п. 5, де вказані рослини-сховища складають менше ніж 20 % від всіх сільськогосподарських культур в указаній сукупності рослин.
8. Сукупність рослин за п. 5, де вказані рослини-сховища складають менше ніж 10 % від всіх сільськогосподарських культур в указаній сукупності рослин.
- 25 9. Сукупність рослин за п. 5, де вказані рослини-сховища складають менше ніж 5 % від всіх сільськогосподарських культур в указаній сукупності рослин.

10. Сукупність рослин за п. 5, де вказані рослини-сховища розташовані у вигляді блоків або смуг.

11. Суміш насіння, що містить насіння не-Bt рослин-сховищ і сукупність трансгенного насіння за п. 4, яке містить ДНК, що кодує інсектицидний білок Cry1Ca, і ДНК, що кодує інсектицидний білок Cry1Fa, де вказане насіння рослин-сховищ складає менше ніж 40 % від всього насіння у вказаній суміші.

12. Суміш насіння за п. 11, де вказане насіння рослин-сховищ складає менше ніж 30 % від всього насіння у вказаній суміші.

13. Суміш насіння за п. 11, де вказане насіння рослин-сховищ складає менше ніж 20 % від всього насіння у вказаній суміші.

14. Суміш насіння за п. 11, де вказане насіння рослин-сховищ складає менше ніж 10 % від всього насіння у вказаній суміші.

15. Суміш насіння за п. 11, де вказане насіння рослин-сховищ складає менше ніж 5 % від всього насіння у вказаній суміші.

16. Спосіб запобігання виробленню у комахі совки трав'яної (FAW; *Spodoptera frugiperda*) резистентності до токсину Cry, де вказаний спосіб включає висівання насіння для отримання сукупності трансгенних рослин, які містять ДНК, що кодує інсектицидний білок Cry1Ca, і ДНК, що кодує інсектицидний білок Cry1Fa, і контактування вказаної комахі з указаною сукупністю трансгенних рослин.

17. Трансгенна рослина за п. 1, де вказана рослина також включає ДНК, що кодує білок, який містить коровий токсин Cry1Ab.

18. Сукупність рослин в полі, що містить не-Bt рослини-сховища і сукупність трансгенних рослин за п. 17, де вказані рослини-сховища складають приблизно менше ніж 20 % від всіх сільськогосподарських культур в указаній сукупності рослин.

19. Сукупність рослин в полі, що містить не-Bt рослини-сховища і сукупність рослин за п. 17, де вказана сукупність рослин-сховищ складає приблизно менше ніж 10 % від всіх сільськогосподарських культур на вказаному полі.

20. Спосіб запобігання виробленню у комахі совки трав'яної резистентності до токсину Cry, де вказаний спосіб включає висівання насіння для отримання сукупності рослин за п. 19 і контактування вказаної комахі з указаною сукупністю трансгенних рослин.

21. Композиція для боротьби з лускокрилими шкідниками, що містить клітини, які експресують інсектицидно активну кількість білка, що містить коровий токсин Cry1Fa, і білка, що містить коровий токсин Cry1Ca.

22. Композиція за п. 21, що містить хазяїна, трансформованого так, щоб він експресував білок, що містить коровий токсин Cry1Fa, і білок, що містить коровий токсин Cry1Ca, де вказаним хазяїном є мікроорганізм або клітина рослини.

23. Спосіб боротьби з лускокрилими шкідниками, що включає обробку вказаних шкідників або середовища проживання цих шкідників інсектицидно активною кількістю композиції за п. 21.

24. Трансгенна рослина, що продукує білок Cry1Fa плюс білок Cry1Ca, плюс третій білок, вибраний з групи, що складається з білків Vip3A, Cry1D, Cry1Be і Cry1E.

25. Спосіб запобігання виробленню у комахі совки трав'яної резистентності до токсину Cry, де вказаний спосіб включає висівання насіння для отримання сукупності рослин за п. 24, і контактування вказаної комахі з указаною сукупністю трансгенних рослин.

26. Сукупність рослин в полі, що містить не-Bt рослини-сховища і сукупність трансгенних рослин за п. 24, де вказані не-Bt рослини-сховища складають менше ніж приблизно 10 % від всіх сільськогосподарських культур в указаній сукупності рослин.

27. Сукупність рослин за п. 26, де вказана сукупність рослин містить менше ніж 5 % рослин-сховищ.

28. Спосіб запобігання виробленню у комахі совки трав'яної резистентності до токсину Cry, де вказаний спосіб включає висівання насіння для отримання сукупності рослин за п. 26 або 27 і контактування вказаної комахі з указаною сукупністю трансгенних рослин.

29. Суміш насіння, що містить насіння не-Bt рослин-сховищ і сукупність трансгенного насіння рослин за п. 24, де вказане насіння рослин-сховищ складає менше ніж 10 % від всього насіння у вказаній суміші.

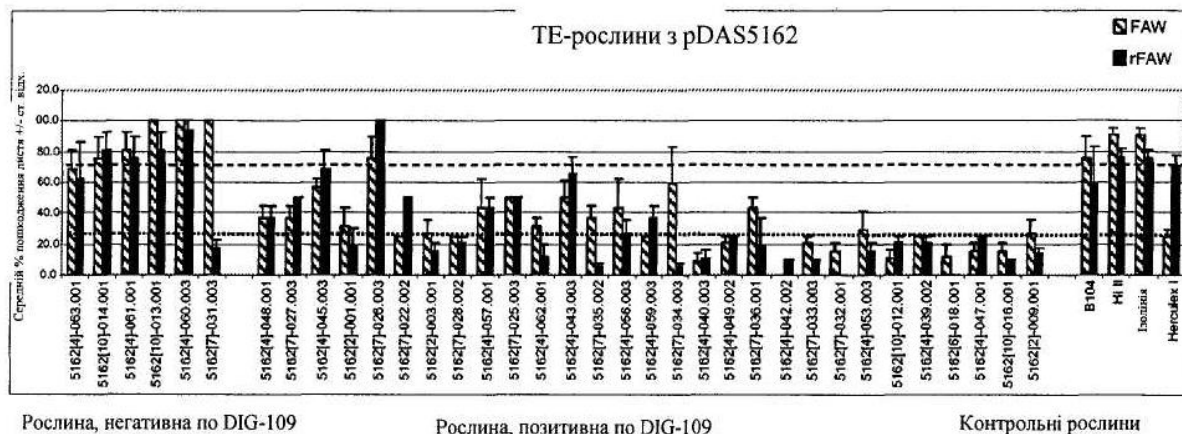
30. Сукупність рослин за будь-яким з пп. 5, 18 і 26, де вказані рослини займають площу понад 10 акрів.

31. Трансгенна рослина за будь-яким з пп. 1, 17 і 24, де вказана рослина вибрана з групи, що складається з кукурудзи, сої і бавовнику.

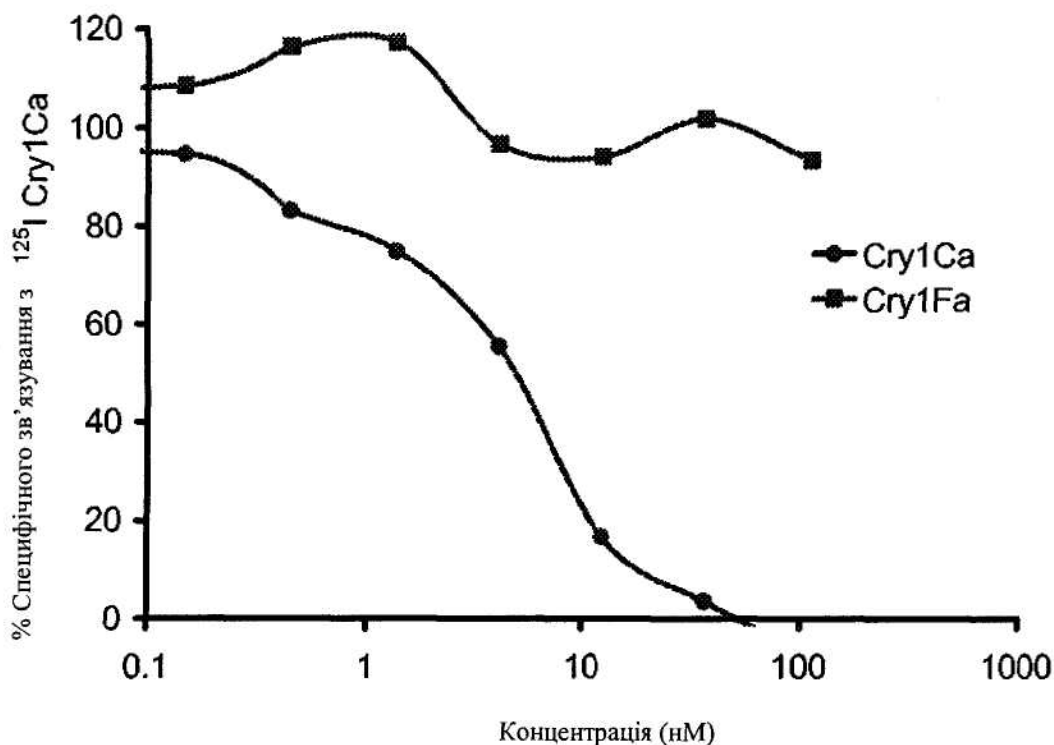
32. Трансгенна рослина за будь-яким з пп. 1, 17 і 24, де вказаною рослиною є рослина кукурудзи.

33. Клітина рослини за будь-яким з пп. 1, 17, 31 і 32, де вказана клітина рослини містить вказану ДНК, що кодує вказаний інсектицидний білок Cry1Ca, і вказану ДНК, що кодує вказаний інсектицидний білок Cry1Fa, і де вказаний інсектицидний білок Cry1Fa щонайменше на 99 % ідентичний послідовності SEQ ID NO:4, а вказаний інсектицидний білок Cry1Ca щонайменше на 99 % ідентичний послідовності SEQ ID NO:5.

34. Трансгенна рослина за будь-яким з пп. 1, 17, 24, 31 і 32, де вказаний інсектицидний білок Cry1Fa містить SEQ ID NO:4, а вказаний інсектицидний білок Cry1Ca містить SEQ ID NO:5.



Фіг. 1



Фіг. 2

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

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

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