



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **112286** (13) **C2**

(51) МПК (2016.01)

**C07K 14/325** (2006.01)

**A01H 5/00**

**A01H 5/10** (2006.01)

**A01N 63/02** (2006.01)

**C12N 15/82** (2006.01)

**A01P 7/04** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>а 2012 08626</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Мід Томас (US), Нарва Кеннет (US), Хей Тімоті (US), Ларрінуа Ігнасіо (US), Вуслі Аарон Т. (US), Бертон Стефані Л. (US)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>16.12.2010</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>ДАУ АГРОСАЙЄНСІЗ ЕЛЕЛСІ,</b> 9330 Zionsville Road, Indianapolis, IN 46268, United States of America (US)
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>25.08.2016</b>	<b>(74)</b> Представник: <b>Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115</b>
<b>(31)</b> Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>61/284,275</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 1995030752 A1, 16.11.1995 FR 2795739 A1, 05.01.2001 WO 9815567 A2, 16.04.1998 WO 9925581 A1, 27.05.1999 US 2003101482 A1, 29.05.2003
<b>(32)</b> Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>16.12.2009</b>	
<b>(33)</b> Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: <b>US</b>	
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заявку: <b>10.10.2012, Бюл.№ 19</b>	
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>25.08.2016, Бюл.№ 16</b>	
<b>(86)</b> Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: <b>РСТ/US2010/060826, 16.12.2010</b>	

## (54) МОДИФІКОВАНИЙ ІНСЕКТИЦИДНИЙ БЛОК CRY1Ca ТА СПОСІБ БОРОТЬБИ З ЛУСКОКРИЛИМИ КОМАХАМИ З ЙОГО ВИКОРИСТАННЯМ

### (57) Реферат:

Даний винахід стосується модифікованих інсектицидних білків B.t. Cry1Ca, що включають білки, які позначаються в даному описі як DIG-109 і DIG-152, а також варіантів DIG-109 і DIG-152, нуклеїнових кислот, що кодують ці білки, способів боротьби з паразитами з використанням цих білків, способів продукування цих білків в трансгенних клітинах-хазяїнах і трансгенних рослин, які продукують ці білки. Білки DIG-109 і DIG-152 містять химерні пептиди, що складаються з сегмента центрального токсину B.t. Cry1Ca і сегмента протоксину Cry1Ab. Також описані інсектицидно активні варіанти білків DIG-109 і DIG-152.

UA 112286 C2



## Галузь винаходу

Даний винахід стосується нових інсектицидних Cry-білків і їх застосування для боротьби з шкідливими комахами.

## Рівень техніки винаходу

5 Совка трав'яна (FAW; *Spodoptera frugiperda*) викликає значні пошкодження кукурудзи і інших культур, таких як соя і бавовна.

*Bacillus thuringiensis* (B.t.) являє собою бактерію, що передається через ґрунт, яка продукує пестицидні кристалічні білки, відомі як дельта-ендотоксини або Cry-білки. Cry-білки є пероральними токсичними речовинами, які функціонують, впливаючи на клітини середньої

10 кишки сприйнятливих комах. Великий перелік дельта-ендотоксинів підтримується і регулярно оновлюється на web-сайті: [livesci.sussex.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/intro.html](http://livesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/intro.html).

Трансгенна кукурудза, що експресує гени, які кодують Cry-білки, особливо Cry1F, забезпечує ефективність проти FAW на комерційному рівні.

Незважаючи на успіх FAW-стійкої трансгенної кукурудзи, можливість розвитку стійких популяцій комах загрожує тривалому терміну служби Cry-білків в боротьбі з FAW і створює необхідність у відкритті і розробці нових Cry-білків для боротьби з FAW та іншими паразитами. Стійкість комах до Cry-білків B.t. може розвинути за допомогою декількох механізмів (Heckel et al., 2007, Pigott and Ellar, 2007). У комах була ідентифікована множина класів рецепторних білків для Cry-білків, і в кожному класі рецепторів існують множинні приклади. Стійкість до

20 конкретного Cry-білка може розвиватися, наприклад, за допомогою мутації в частині домену, що зв'язує токсин, кадгерину рецепторного білка. Інший шлях стійкості може опосередковуватись протеазою, що здійснює процесинг протоксину. Таким чином, стійкість до токсинів Cry у видах *Lepidoptera* має комплексну генетичну основу щонайменше чотирма різними основними генами стійкості. Комахи *Lepidopteran*, стійкі до Cry-білка, розвинулися в польових умовах серед *Plutella xylostella* (Tabashnik, et al., 1994), *Trichoplusia ni* (Janmaat and Myers 2003, 2005), і *Helicoverpa zea* (Tabashnik et al., 2008). Розробка нових високоефективних Cry-білків може забезпечити додаткові інструменти для контролю FAW і інших комах-паразитів. Cry-білки з різними механізмами дії, що продукуються в комбінації в трансгенній кукурудзі, можуть попередити розвиток стійкості у комах FAW і забезпечити тривалий термін застосовності технології B.t. для

30 боротьби з шкідливими комахами.

## Короткий опис суті винаходу

Даний винахід стосується інсектицидних Cry-білків B.t., що включають білки, що позначаються в даному описі як DIG-109 і DIG-152, а також варіантів DIG-109 і DIG-152, нуклеїнових кислот, що кодують ці білки, способів боротьби з паразитами з використанням цих

35 білків, способів продукування білків в трансгенних клітинах-хазяїнах і трансгенних рослин, які продукують ці білки.

Як описано в прикладі 1, білки DIG-109 і DIG-152 містять химерні пептиди, що складаються з сегмента центрального токсину. Також описані інсектицидно активні варіанти білків DIG-109 і DIG-152.

40 Несподіване відкриття, описане в даному описі, полягає в тому, що білки DIG-109 і DIG-152 є активними проти популяцій личинок совки трав'яної і личинок очеретяної вогнівки, які є стійкими до Cry1F. Таким чином, білки DIG-109 і DIG-152 є ідеальними кандидатами для застосування в боротьбі з паразитами *Lepidopteran*. Ці білки можна використовувати окремо або в комбінації з іншими Cry-білками, такими як Cry1F, Cry1Ab і Cry1Ac, для боротьби з розвитком

45 стійких популяцій комах. Для обговорення таких паразитів див., наприклад, Tabashnik, PNAS (2008), vol. 105 No. 49, 19029-19030.

Іншим аспектом винаходу є інсектицидно активні фрагменти DIG-109 і DIG-152, і нуклеотиди, що кодують такі фрагменти.

В одному варіанті здійснення винахід стосується виділеного поліпептиду білка DIG-109, що

50 містить сегмент центрального токсину, вибраний з групи, що складається з:

(а) поліпептиду, що містить амінокислотну послідовність із залишків 28-619 SEQ ID NO: 1;

(b) поліпептиду, що містить амінокислотну послідовність, що має щонайменше 90% ідентичність послідовності з амінокислотою послідовністю із залишків 28-619 SEQ ID NO: 1;

(c) поліпептиду, що містить амінокислотну послідовність із залишків 28-619 SEQ ID NO: 1 з аж до 20 амінокислотними замінами, делеціями або модифікаціями, які не чинять несприятливого ефекту на експресію або активність білка, що кодується SEQ ID NO: 1.

55

В іншому варіанті здійснення винахід стосується виділеного поліпептиду токсину DIG-109, що містить сегмент центрального токсину DIG-109, вибраний з групи, що складається з:

(а) поліпептиду, що містить амінокислотну послідовність із залишків 1-619 SEQ ID NO: 1;

(b) поліпептиду, що містить амінокислотну послідовність, що має щонайменше 90% ідентичність послідовності з амінокислотою послідовністю із залишків 1-619 SEQ ID NO: 1;

(c) поліпептиду, що містить амінокислотну послідовність із залишків 1-619 SEQ ID NO: 1 з аж до 20 амінокислотними замінами, делеціями або модифікаціями, які не чинять несприятливого ефекту на експресію або активність білка, що кодується SEQ ID NO: 1.

В іншому варіанті здійснення винахід стосується рослини, що містить білок DIG-109.

В іншому варіанті здійснення винахід стосується способу боротьби з популяцією паразитів, що включає контактування вказаної популяції з пестицидно ефективною кількістю білка DIG-109.

В іншому варіанті здійснення винахід стосується виділеної нуклеїнової кислоти, яка кодує білок DIG-109.

В іншому варіанті здійснення винахід стосується конструкції ДНК, що містить нуклеотидну послідовність, яка кодує білок DIG-109, функціонально зв'язаний з промотором, який походить не з *Bacillus thuringiensis* і здатний запускати експресію в рослині. Також винахід стосується трансгенної рослини, яка містить конструкцію ДНК, стабільно вбудовану в його геном, і способу захисту рослини від паразитів, що включає введення конструкції у вказану рослину.

Короткий опис послідовностей

SEQ ID NO: 1 сегмент центрального токсину Cry1Ca; 619 а. к.

SEQ ID NO: 2 перший сегмент протоксину Cry1Ab; 545 а. к.

SEQ ID NO: 3 химерний білок DIG-152; 1164

SEQ ID NO: 4 другий сегмент протоксину Cry1Ab; 545 а. к.

SEQ ID NO: 5 химерний білок DIG-109; 1164

SEQ ID NO: 6 пептид Cry1Ca436; 10 а. к.

SEQ ID NO: 7 пептид Cry1Ca591; 10 а. к.

SEQ ID NO: 8 оптимізована для кукурудзи CDS, що кодує DIG-109; 3492 п. о.

SEQ ID NO: 9 олігонуклеотид ZGP3S; 21 нуклеотид

SEQ ID NO: 10 олігонуклеотид ZGP3A; 21 нуклеотид

SEQ ID NO: 11 олігонуклеотид TQZGP3; 23 нуклеотиди

SEQ ID NO: 12 олігонуклеотид DSM2S; 17 нуклеотидів

SEQ ID NO: 13 олігонуклеотид DSM2A; 19 нуклеотидів

SEQ ID NO: 14 олігонуклеотид DSM2FQ; 20 нуклеотидів

SEQ ID NO: 15 олігонуклеотид Cry1CaS; 18 нуклеотидів

SEQ ID NO: 16 олігонуклеотид Cry1CaA; 18 нуклеотидів

SEQ ID NO: 17 олігонуклеотид Cry1Ca; 23 нуклеотиди

SEQ ID NO: 18 олігонуклеотид AAD1S; 20 нуклеотидів

SEQ ID NO: 19 олігонуклеотид AAD1A; 22 нуклеотиди

SEQ ID NO: 20 олігонуклеотид AAD1; 24 нуклеотиди

SEQ ID NO: 21 олігонуклеотид Y1CAS; 18 нуклеотидів

SEQ ID NO: 22 олігонуклеотид Y1CAR; 18 нуклеотидів

SEQ ID NO: 23 олігонуклеотид F6Y1CA; 23 нуклеотиди

SEQ ID NO: 24 олігонуклеотид IVF-Taq; 18 нуклеотидів

SEQ ID NO: 25 олігонуклеотид IVR-TAQ; 19 нуклеотидів

SEQ ID NO: 26 олігонуклеотид IV-зонда; 26 нуклеотидів

SEQ ID NO: 27 DIG-110; 1079 а. к.

SEQ ID NO: 28 оптимізована для кукурудзи кодуюча область для DIG-110; 3237 п. о.

SEQ ID NO: 29 DIG-111; 543 а. к.

SEQ ID NO: 30 оптимізована для кукурудзи кодуюча область для DIG-111; 1629 п. о.

SEQ ID NO: 31 DIG-112; 1044 а. к.

SEQ ID NO: 32 оптимізована для кукурудзи кодуюча область для DIG-112; 3132 п. о.

SEQ ID NO: 33 DIG-113; 508 а. к.

SEQ ID NO: 34 оптимізована для кукурудзи кодуюча область для DIG-113; 1524 п. о.

SEQ ID NO: 35 DIG-114; 582 а. к.

SEQ ID NO: 36 оптимізована для кукурудзи кодуюча область для DIG-114; 1746 п. о.

Докладний опис винаходу

Білки DIG-109 і DIG-152 і інсектицидно активні варіанти. У доповнення до повнорозмірного білка DIG-109 з SEQ ID NO: 5 і білка DIG-152 з SEQ ID NO: 3, винахід стосується інсектицидно активних варіантів. Під терміном "варіант", заявники мають на увазі фрагменти, визначені делеційні і інсерційні мутанти і певні злиті білки. Сегмент центрального токсину Cry1Ca DIG-109 і DIG-152 являє собою класичний Cry-білок з трьох доменів. Як передмова для опису варіантів

білків DIG-109 і DIG-152, які включені у винахід, корисно стисло розглянути архітектуру Cry-білків з трьох доменів загалом і білкових токсинів DIG-109 і DIG-152 зокрема.

Більшість молекул кристалічного білка дельта-ендотоксину *Bacillus thuringiensis* складаються з двох функціональних сегментів. Стійкий до протеази центральний токсин являє собою перший сегмент, і він відповідає приблизно першій половині молекули білка. Повна молекула протоксину розміром ~130 кДа швидко процесується протеазами в кишечнику комах в стійкий центральний сегмент. Сегмент, який віддаляється шляхом цього процесингу, називають в даному описі "сегментом протоксину". Вважають, що сегмент протоксину бере участь в утворенні кристалів токсину (Arvidson et al., (1989). Таким чином, сегмент протоксину може надавати токсину часткової специфічності до комах шляхом обмеження доступності центральної частини комасі за допомогою зниження процесингу протеазою молекули токсину (Haider et al. (1986)) або за допомогою зниження розчинності токсину (Aronson et al., (1991). Токсини B.t., навіть в межах певного класу, варіюють в деякій мірі по довжині і по точному розташуванню точки переходу від сегмента центрального токсину до сегмента протоксину. Точка переходу від сегмента центрального токсину до сегмента протоксину, як правило, знаходиться на рівні від приблизно 50% до приблизно 60% повнорозмірного токсину. В SEQ ID NO: 3 представлена послідовність з 1164 амінокислот для повнорозмірного поліпептиду DIG-152, серед яких N-кінцеві 619 амінокислот містять центральний токсин Cry1Ca, представлений як SEQ ID NO: 1. В SEQ ID NO: 5 представлена послідовність з 1164 амінокислот для повнорозмірного поліпептиду DIG-109, серед яких N-кінцеві 619 амінокислот містять центральний токсин Cry1Ca.

Тривимірні кристалічні структури визначені для Cry1Aa1, Cry2Aa1, Cry3Aa1, Cry3Bb1, Cry4Aa, Cry4Ba і Cry8Ea1. Ці структури для центральних токсинів є виключно схожими і складаються з трьох різних доменів з ознаками, описаними нижче (розглянуто в Maagd et al., 2003).

Домен I являє собою пучок з семи альфа-спіралей, де п'ята спіраль оточена шістьма амфіпатичними спіралями. Цей домен залучений до утворення пор і має гомологію з іншими білками, що утворюють пори, включаючи гемолізینی і коліцини. Домен I білка центрального токсину Cry1Ca містить амінокислотні залишки 36-254 SEQ ID NO: 1. [Потрібно розуміти, що химерні білки DIG-109 і DIG-152 містять сегмент центрального токсину Cry1Ca, і, таким чином, координати, привласнені амінокислотній послідовності сегмента центрального токсину Cry1Ca, як описано в SEQ ID NO: 1, також застосовні до амінокислотної послідовності химерного білка DIG-109, представленого в SEQ ID NO: 5, і амінокислотної послідовності химерного білка DIG-152, представленого в SEQ ID NO: 3.]

Домен II утворений трьома антипаралельними бета-шарами, упакованими разом в бета-призму. Петлі цього домену відіграють важливу роль в зв'язуванні рецепторів середньої кишки комах. У білках Cry1A експоновані на поверхні петлі на вершинах бета-шарів домену II залучені до зв'язування з рецепторами кадгерину *Lepidopteran*. Петлі домену II Cry3Aa зв'язують асоційовану з мембраною металопроtease *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (колорадський жук) аналогічним чином (Ochoa-Campuzano et al., 2007). Домен II має гомологію з певними білками, що зв'язують вуглеводи, в тому числі з вітеліном і якаліном. Домен II білка центрального токсину Cry1Ca містить амінокислотні залишки 262-458 SEQ ID NO: 1.

Домен III являє собою бета-сендвіч з двох антипаралельних бета-шарів. Структурно цей домен є спорідненим до вуглеводзв'язувальних доменів білків, таких як глюканази, галактозооксидази, сіалідази і інші. Домен III зв'язує певні класи рецепторних білків і, можливо, бере участь у вбудовуванні олігомерної препори токсину, яка взаємодіє з другим класом рецепторів, прикладами яких є амінопептидаза і лужна фосфатаза у разі Cry1A-білків (Pigott and Ellar, 2007). Аналогічні рецептори домену III Cry ще належить ідентифікувати в *Coleoptera*. Блоки 2 і 3 консервативної послідовності B.t. знаходяться поблизу N-кінця і C-кінця домену 2, відповідно. Таким чином, ці блоки 2 і 3 консервативної послідовності є приблизними прикордонними областями між трьома функціональними доменами. Ці області консервативної ДНК і гомології білків використовували для інженерії рекомбінантних токсинів Домен III білка Cry1Ca містить амінокислотні залишки 468-617 SEQ ID NO: 1.

Було описано, що  $\alpha$ -спіраль 1 домену I віддаляється після зв'язування рецептора. Aronson et al. (1999) продемонстрували, що Cry1Ac, зв'язаний з BBMV, був захищений від розщеплення протеазою K, починаючи із залишку 59, безпосередньо після  $\alpha$ -спіралі 1; схожі результати були цитовані для Cry1Ab. Gomez et al. (2002) виявили, що олігомери Cry1Ab, що утворилися при зв'язуванні рецептора BBMV, були позбавлені частини домену I у вигляді  $\alpha$ -спіралі 1. Також Soberon et al. (2007) показали, що N-кінцеві делеційні мутанти Cry1Ab і Cry1Ac, які позбавлені приблизно 60 амінокислот, що охоплюють  $\alpha$ -спіраль 1 на тривимірній структурі Cry, здатні до

збирання мономерів з молекулярною масою приблизно 60 кДа в препори за відсутності зв'язування кадгерину. Було описано, що ці N-кінцеві делеційні мутанти є активними відносно стійких до Cry личинок комах. Більш того, Diaz-Mendoza et al. (2007) описали фрагменти Cry1Ab розміром 43 кДа і 46 кДа, які зберігали активність відносно середземноморської кукурудзяної совки (*Sesamia nonagrioides*). Було продемонстровано, що ці фрагменти включають амінокислотні залишки 116-423; однак точні амінокислотні послідовності не були встановлені і механізм активності цих протеолітичних фрагментів невідомий. Результати Gomez et al., (2002), Soberon et al., 2007 і Diaz-Mendoza et al., (2007) суперечать результатам Hofte et al., (1986), які описали, що делеція 36 амінокислот з N-кінця Cry1Ab приводила до втрати інсектицидної активності.

Автори винаходу встановили початок і кінець спіралей 1, 2A, 2B, 3 і 4 і розташування спейсерних областей між ними в домені I центрального токсину Cry1Ca шляхом порівняння амінокислотної послідовності Cry1Ca з амінокислотною послідовністю Cry8Ea1, для якої структура відома. Ці положення описані в таблиці 1.

Таблиця 1

Координати амінокислот передбачуваних  $\alpha$ -спіралей білка центрального токсину Cry1Ca

	Спіраль 1	Спейсер	Спіраль 2A	Спейсер	Спіраль 2B	Спейсер	Спіраль 3	Спейсер	Спіраль 4
Залишки SEQ ID NO: 1	35-49	50-54	55-62	63-70	71-84	85-90	91-119	120-123	124-145

Варіанти DIG-109 і DIG-152 з N-кінцевою делецією. В одному з аспектів винахід стосується варіантів DIG-109 і DIG-152, в яких всі або частина альфа-спіралей 1, 2A і 2B видалені для збільшення інсектицидної активності і запобігання розвитку стійкості у комах. Ці модифікації вносять для отримання варіантів DIG-109 і DIG-152 з поліпшеними ознаками, такими як поліпшений спектр паразитів-мішеней, ефективність і контроль стійкості у комах. У деяких варіантах здійснення даного винаходу модифікації, що розглядаються, можуть впливати на ефективність активації протоксину і утворення пор, що приводить до інтоксикації комах. Більш конкретно, для отримання варіантів DIG-109 і DIG-152 з поліпшеними ознаками, описані покрокові делеції, які видаляють частину гену, що кодує N-кінець. Делеції видаляють всю  $\alpha$ -спіраль 1 і всю або частину  $\alpha$ -спіралі 2 в домені I, при збереженні структурної цілісності  $\alpha$ -спіралей 3-7. Таким чином, даний винахід стосується, частково, збільшення ефективності білка Cry, досягнутого шляхом інженерії  $\alpha$ -спіральних компонентів домену 1 для більш ефективного утворення пор. Більш конкретно, даний винахід стосується частково вдосконалених білків DIG-109 і DIG-152, сконструйованих так, щоб вони мали N-кінцеві делеції в областях з передбачуваною гомологією вторинної структури з  $\alpha$ -спіралями 1 і 2 в домені I білків Cry1.

Делеції для поліпшення інсектицидних властивостей токсинів DIG-109 і DIG-152 можуть починатися до передбаченого початку  $\alpha$ -спіралі 2A, і можуть закінчуватися після закінчення  $\alpha$ -спіралі 2B, переважно не продовжуючись на  $\alpha$ -спіраль 3.

При конструюванні кодуючих послідовностей для варіантів з N-кінцевою делецією ініціюючий кодон ATG, що кодує метіонін, вбудовують на 5'-кінці нуклеотидної послідовності, призначеної для експресії варіанту з делецією. Для послідовностей, призначених для застосування в трансгенних рослинах, може бути корисним дотримуватися "правила N-кінця" Varshavsky (1997). Воно свідчить, що деякі амінокислоти можуть брати участь в нестабільності і деградації білка в еукаріотичних клітинах, коли вони експонуються як N-кінцевий залишок білка. Наприклад, дані, зібрані шляхом спостережень в клітинах дріжджів і ссавців вказують на те, що N-кінцевими дестабілізуючими амінокислотами є F, L, W, Y, R, K, H, I, N, Q, D, E і можливо P. В той час як особливості механізмів деградації білків можуть відрізнятися в деякій мірі між організмами, консервативність типу N-кінцевих дестабілізуючих амінокислот, вказаних вище, вказує на те, що в клітинах рослин можуть функціонувати схожі механізми. Наприклад, Worley et al. (1998) відкрили, що в рослинах правило N-кінця включає основні і ароматичні залишки. Можливо, що протеолітичне розщеплення протеазами рослин поблизу початку  $\alpha$ -спіралі 3 інсектицидних білків B.t., що розглядаються, може експонувати дестабілізуючу N-кінцеву амінокислоту. Такий процесинг може націлювати розщеплені білки на швидке розщеплення і обмежувати накопичення інсектицидних білків B.t. до рівнів, недостатніх для ефективної боротьби з комахами. Таким чином, для варіантів з N-кінцевою делецією, які починаються з однієї з дестабілізуючих амінокислот, заявники вважають за краще додати кодон, який визначає

амінокислоту G (гліцин), між метіоніном, що ініціює трансляцію, і дестабілізуючою амінокислотою.

У прикладах 13 і 14 наведені конкретні приклади варіантів з N-кінцевою делецією DIG-109 і DIG-152 згідно з винаходом. Додаткові придатні фрагменти можна ідентифікувати за допомогою біоаналізу на комах фрагментів, отриманих розщепленням трипсином або хімотрипсином повнорозмірного солубілізованого кристалічного білка, для визначення того, які фрагменти зберігають токсичність, або їх можна ідентифікувати шляхом визначення послідовності фрагмента токсичного білка, що кодується фрагментами ДНК кодуєчої області Cry-білка. Цей білок, головним чином, буде мати коротке N-кінцеве і довге C-кінцеве укорочення в порівнянні з протоксином. N-кінець найменшого токсичного фрагмента звичайно визначають визначенням N-кінцевої амінокислотної послідовності обробленого трипсином або хімотрипсином розчинного кристалічного білка способами, загальнодоступними в даній галузі.

Химерні токсини. Раніше були описані химерні білки, в яких використовується домен центрального токсину з одного токсину Cry, злитий з сегментом протоксину з іншого токсину Cry. Варіанти DIG-109 і DIG-152 включають токсини, що містять N-кінцевий центральний сегмент токсину з токсину Cry1Ca (який може бути повнорозмірним або має N-кінцеві делеції, описані вище), злитий з гетерологічним сегментом протоксину в точці закінчення сегмента центрального токсину. Перехід до гетерологічного сегмента протоксину може знаходитися приблизно в точці з'єднання центральний токсин/протоксин або, альтернативно, може бути збережена частина нативного протоксину (що продовжується після сегмента центрального токсину) з подальшим переходом до гетерологічного протоксину. Як приклад, химерний токсин за даним винаходом має повний сегмент центрального токсину Cry1Ca (амінокислоти 1-619) і гетерологічний протоксин (амінокислоти з 620 по C-кінець). У переважних варіантах здійснення гетерологічний сегмент протоксину походить з дельта-ендотоксину Cry1Ab, як проілюстровано в SEQ ID NO: 2 і SEQ ID NO: 4.

Чутливі до протеаз варіанти. Протеази кишечника комах, як правило, функціонують, сприяючи отриманню комахами необхідних амінокислот з харчового білка. Найбільш добре вивченими травними протеазами комах є серинові протеази, які, як виявилось, є найбільш поширеним типом (Englemann and Geraerts, 1980), зокрема, у видах *Lepidopteran*. Комахи *Coleopteran* мають кишечники, які є в більшій мірі нейтральними, ніж кислими, в порівнянні з кишечниками *Lepidopteran*. Більшість личинок і дорослих особин *Coleopteran*, наприклад, колорадський жук, мають середню кишку зі слабким кислим середовищем, і цистеїнові протеази забезпечують основну частину протеолітичної активності (Wolfson and Murdock, 1990). Точніше, Thie and Houseman (1990) ідентифікували і охарактеризували цистеїнові протеази, катепсин В-подібну і катепсин Н-подібну, і аспартильну протеазу, катепсин D-подібну, в колорадському жуку. Gillikin et al., (1992) охарактеризували протеолітичну активність в кишечниках личинок західного кукурудзяного кореневого жука і виявили, головним чином, цистеїнові протеази. У патенті США № 7230167 описано, що в західному кукурудзяному кореновому жуку є серинова протеаза, катепсин G. Різноманітність і різні рівні активності протеаз кишечника комах можуть впливати на чутливість комах до конкретного токсину B.t.

В іншому варіанті здійснення винаходу, в бажані області можуть бути вбудовані ділянки розщеплення протеазами для впливу на процесинг білка в середній кишці сприйнятливих личинок певних шкідливих комах (Walters et al., 2008). Ці ділянки розщеплення протеазами можна вносити способами, такими як хімічний синтез генів або ПЛР зі сплайсингом по послідовностях, що перекриваються (Horton et al., 1989). Наприклад, послідовності для розпізнавання сериновими протеазами необов'язково можна вбудовувати в конкретні ділянки в структурі Cry-білка для впливу на процесинг білка в бажаних точках делеції в середній кишці сприйнятливих личинок. Серинові протеази, які можна використовувати таким шляхом, включають серинові протеази середньої кишки *Lepidopteran*, такі як трипсин або трипсин-подібні ферменти, хімотрипсин, еластаза і т.д. (Christeller et al., 1992). Крім того, можна вбудовувати делеційні ділянки, ідентифіковані емпірично шляхом секвенування продуктів розщеплення Cry-білка, отриманих за допомогою нефракціонованих препаратів протеаз личинок середнього кишечника, або шляхом зв'язування з везикулами мембрани щіткової облямівки, для забезпечення активації білка. Модифіковані Cry-білки, отримані або шляхом делеції гену, або шляхом внесення ділянок розщеплення протеазами, мають збільшену активність відносно паразитів *Lepidopteran*, включаючи *Ostrinia nubilalis*, *Diatraea grandiosella*, *Helicoverpa zea*, *Agrotis ipsilon*, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera exigua*, *Diatraea saccharalis*, *Loxagrotis albicosta* та інших цільових паразитів.

Крім того, можна використовувати серинові протеази *Coleopteran*, такі як трипсин, хімотрипсин і катепсин G-подібна протеаза, цистеїнові протеази *Coleopteran*, такі як катепсини

(В-подібна, L-подібна, О-подібна і К-подібна протеази) (Koiwa et al., (2000) і Bown et al., (2004), металопротеази Coleoptera, такі як ADAM10 (Ochoa-Campuzano et al., (2007)), і аспарагінові протеази Coleoptera, такі як D-подібний і Е-подібний катепсини, пепсин, плазмепсин і хімоцин, шляхом вбудовування відповідних послідовностей для розпізнавання в бажаних ділянках процесингу для впливу на процесинг Cry-білка в середній кишці сприйнятливих личинок певних шкідливих комах.

Переважає область для внесення таких ділянок розщеплення протеазами може знаходитися в "спейсерній" області між  $\alpha$ -спіраллю 2В і  $\alpha$ -спіраллю 3, наприклад, в амінокислотах 85-90 білка центрального токсину Cry1Ca (SEQ ID NO: 1 і таблиця 1). Модифіковані Cry-білки, отримані або шляхом делеції гену, або шляхом внесення ділянок розщеплення протеазами, мають збільшену активність відносно шкідливих комах, включаючи, але не обмежуючись ними, совку трав'яну, очеретяну вогнівку і т. п.

Існують різні технології для визначення послідовностей амінокислот, які містять N-кінцеві або С-кінцеві залишки поліпептидів. Наприклад, можна використовувати технологію автоматизованої деградації Едмана послідовним чином для визначення N-кінцевої амінокислотної послідовності з аж до 30 амінокислотних залишків з точністю 98% на залишок. Крім того, також можливе визначення послідовності амінокислот, що містить С-кінець поліпептидів (Bailey et al., (1992); патент США № 6046053). Таким чином, в деяких варіантах здійснення можна охарактеризувати Cry-білки B.t., активовані шляхом протеолітичного процесингу, наприклад, протеазами, отриманими з кишечника комах, і ідентифікувати N-кінцеві або С-кінцеві амінокислоти активованого фрагмента токсину. В об'єм винаходу входять варіанти DIG-109 і DIG-152, що отримуються шляхом вбудовування або усунення ділянок процесингу протеазами у відповідних положеннях в кодуєчій послідовності для забезпечення або усунення протеолітичного розщеплення більш великого варіанту білка протеазами комах, рослини або мікроорганізму. Мається на увазі, що кінцевим результатом такого маніпулювання є отримання молекул фрагментів токсину, що мають таку ж або кращу активність, в порівнянні з незмінним (повнорозмірним) білком токсину.

Домені токсинів DIG-109 і DIG-152. Очікується, що окремі домені сегмента центрального токсину Cry1Ca, як проілюстровано в токсинах DIG-109 і DIG-152 (і варіанти, які на 90%, 95% або 97% ідентичні таким доменам), є придатними для утворення комбінацій з доменами з інших токсинів Cry для отримання нових токсинів із збільшеним спектром токсичності, збільшеною ефективністю або збільшеною стабільністю білка. Домен I білка центрального токсину Cry1Ca складається з амінокислотних залишків 36-254 SEQ ID NO: 1. Домен II білка центрального токсину Cry1Ca складається з амінокислотних залишків 262-458 SEQ ID NO: 1. Домен III білка центрального токсину Cry1Ca складається з амінокислотних залишків 468-617 SEQ ID NO: 1. Обмін або шафлінг доменів є механізмом для отримання змінених білків дельта-ендотоксину. Домені II і III можна міняти місцями в білках дельта-ендотоксину з отриманням гібридних або химерних токсинів з поліпшеною пестицидною активністю або спектром мішеней. Домен II залучений до зв'язування рецептора. Домен III зв'язує певні класи рецепторних білків і, можливо, бере участь у вбудовуванні препори олігомерного токсину. Було показано, що деякі заміни в домені III інших токсинів викликають більш високу токсичність відносно *Spodoptera exigua* (de Maagd et al., (1996)) і існує керівництво по конструюванню токсину Cry з обміном доменами (Knight et al., (2004)).

Способи отримання рекомбінантних білків і тестування їх відносно пестицидної активності добре відомі в даній галузі (див., наприклад, Naimov et al., (2001), de Maagd et al., (1996), Ge et al., (1991), Schnepf et al., (1990), Rang et al., (1999)). Домен I з білків Cry1A і Cry3A досліджували відносно здатності вбудовуватися в мембрани і утворювати пори в них. Альфа-спіралі 4 і 5 домену I відіграють ключові ролі у вбудовуванні в мембрану і утворенні пор (Walters et al., 1993, Gazit et al., 1998; Nunez-Valdez et al., 2001), в той час як передбачено, що інші спіралі контактують з поверхнею мембрани, такі як пруті парасольки (Bravo et al., (2007); Gazit et al., (1998)).

Варіанти DIG-109 і DIG-152, створені шляхом внесення обмеженої кількості амінокислотних делецій, заміни або вставок. Амінокислотні делеції, заміни і вставки до амінокислотної послідовності сегмента центрального токсину Cry1Ca SEQ ID NO: 1 можна легко вносити послідовно, і ефекти таких змін на інсектицидну активність можна тестувати за допомогою біоаналізу. Враховуючи, що кількість змін обмежена, таке тестування не залучає зайвого експериментування. Винахід включає інсектицидно активні варіанти центрального токсину (амінокислоти 1-619 SEQ ID NO: 1), в які внесено аж до 10, аж до 15 або аж до 20 незалежних амінокислотних вставок, делецій або заміни.



Винахід включає варіанти DIG-109 і DIG-152, що мають сегмент центрального токсину, який на 90%, 95% або 97% ідентичний амінокислотам 1-619 SEQ ID NO: 1. Варіанти можна отримувати шляхом внесення випадкових мутацій або варіанти можна конструювати. У разі мутантів, що конструюються, існує висока імовірність отримання варіантів з активністю, схожою з нативним токсином, коли ідентичність амінокислот зберігають у важливих областях токсину, які відповідають за біологічну активність або залучені до визначення тривимірної конфігурації, яка в кінцевому результаті відповідає за біологічну активність. Також є висока імовірність збереження активності, якщо заміни є консервативними. Амінокислоти можуть бути віднесені до наступних класів: неполярні, незаряджені полярні, основні і кислоти. Консервативні заміни, при яких амінокислота одного класу замінюється іншою амінокислотою того ж типу, з найменшою імовірністю змінюють біологічну активність варіанту. У таблиці 2 наведений перелік прикладів амінокислот, що стосуються кожного класу.

Таблиця 2

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

У деяких випадках також можна вносити неконсервативні заміни. Важливим чинником є те, що ці заміни не повинні значно знижувати біологічну активність токсину. Варіанти включають поліпептиди, які відрізняються по амінокислотній послідовності внаслідок мутагенезу. Варіанти білків, що охоплюються даним винаходом, є біологічно активними, тобто вони продовжують мати бажану біологічну активність нативного білка, тобто пестицидну активність.

Також можуть бути сконструйовані варіанти білків, які відрізняються на рівні послідовності, але зберігають ту ж або схожу загальну основну тривимірну структуру, розподіл поверхневого заряду і т. п. див., наприклад, патент США № 7058515; Larson et al., (2002); Stemmer (1994a, 1994b, 1995); і Cramer et al. (1996a, 1996b, 1997).

Нуклеїнові кислоти. Виділені нуклеїнові кислоти, що кодують токсин DIG-109 або що кодують токсин DIG-152, є одним з аспектів даного винаходу. Він включає нуклеїнові кислоти, що кодують SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 і SEQ ID NO: 5, і комплементарні ним послідовності, а також інші нуклеїнові кислоти, які кодують інсектицидні варіанти SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 і SEQ ID NO: 5. Під "виділеними" заявники мають на увазі, що молекули нуклеїнових кислот були витягнуті з їх природного оточення і вміщені в інше середовище людиною. Внаслідок надмірності генетичного коду, множина різних послідовностей ДНК можуть кодувати амінокислотні послідовності, описані в даному описі. Фахівець в даній галузі здатний створити ці альтернативні послідовності ДНК, що кодують ті ж або по суті ті ж токсини.

Аналіз генів. Гени, що кодують вдосконалені Cry-білки, описані в даному описі, можна отримувати різними способами, добре відомими в даній галузі. Наприклад, синтетичні сегменти генів і синтетичні гени можна отримувати за допомогою хімії складних триєфірів фосфітів і фосфорамідитів (Caruthers et al., 1987), і для проведення синтезу генів по запиті доступні комерційні постачальники. Повнорозмірні гени можна збирати різними шляхами, включаючи, наприклад, лігування фрагментів рестрикції або збирання за допомогою полімеразної ланцюгової реакції олігонуклеотидів, що перекриваються (Stewart and Burgin, 2005). Крім того, кінцеві делеції генів можна вносити ампліфікацією за допомогою ПЛР з використанням сайт-специфічних кінцевих олігонуклеотидів.

Нуклеїнові кислоти, що кодують токсин DIG-109 або токсин DIG-152, можна отримувати, наприклад, шляхом синтетичного конструювання способами, що застосовуються в даний час на практиці будь-яким з декількох комерційних постачальників. (Див. наприклад, патент США № 7482119B2). Ці гени або їх частини або варіанти також можна конструювати синтетично, наприклад, з використанням пристрою для синтезу генів і способів моделювання, наприклад,

згідно з патентом США № 5380831. Альтернативно варіанти синтетичних генів або генів, що зустрічаються в природі, можна легко конструювати з використанням стандартних способів молекулярної біології для внесення точкових мутацій. Фрагменти цих генів також можна отримувати з використанням комерційно доступних екзонуклеаз або ендонуклеаз згідно зі стандартними методиками. Наприклад, ферменти, такі як Bal31, або сайт-направлений мутагенез можна використовувати для систематичного вирізування нуклеотидів з кінців цих генів. Також фрагменти генів, які кодують активні фрагменти токсинів, можна отримувати з використанням різних ферментів рестрикції.

При наявності амінокислотної послідовності для токсину DIG-109 або токсину DIG-152 кодуючу послідовність можна конструювати зворотною трансляцією білкової послідовності з використанням кодонів, яким надає перевагу передбачуваний хазяїн, а потім коректування послідовностей з використанням альтернативних (надмірних) кодонів для видалення послідовностей, які можуть викликати проблеми. Крім того, в некодуючі рамки зчитування можна вбудовувати періодичні стоп-кодони для усунення довгих ненавмисних відкритих рамок зчитування.

Кількісне визначення ідентичності послідовностей. Для визначення процентної ідентичності двох амінокислотних послідовностей або двох послідовностей нуклеїнових кислот, послідовності вирівнюють для цілей оптимального порівняння. Процентна ідентичність між двома послідовностями є функцією кількості ідентичних положень, що є загальними для послідовностей (тобто процентна ідентичність = кількість ідентичних положень/загальна кількість положень (наприклад, положення, що перекриваються)×100). В одному варіанті здійснення дві послідовності мають однакову довжину. Процентну ідентичність між двома послідовностями можна визначати з використанням способів, схожих зі способами, описаними нижче, допускаючи або не допускаючи пропуски. При обчисленні процентної ідентичності, як правило, підраховують точні збіги.

Визначення процентної ідентичності між двома послідовностями можна провести з використанням математичного алгоритму. Необмежувальним прикладом такого алгоритму є BLAST (Altschul et al., 1990, і Karlin and Altschul, 1990), модифікований як в Karlin and Altschul (1993), і включений в програми BLASTN і BLASTX. Пошук в BLAST зручно використовувати для ідентифікації послідовностей, гомологічних (схожих) з послідовністю запиту в базах даних нуклеїнових кислот або білків. Пошук BLASTN можна провести (сума балів = 100, довжина слова = 12) для ідентифікації нуклеотидних послідовностей, що мають гомологію із заявленими молекулами нуклеїнових кислот за винаходом. Пошук BLASTX можна провести (сума балів = 50, довжина слова = 3) для ідентифікації амінокислотних послідовностей, що мають гомологію із заявленими інсектицидними білковими молекулами за винаходом.

Gapped BLAST Altschul et al., (1997) можна використовувати для проведення вирівнювання з пропусками для мети порівняння. Альтернативно можна використовувати PSI-Blast для проведення ітераційного пошуку для встановлення віддаленої спорідненості між молекулами, Altschul et al. (там же). При використанні програми BLAST, Gapped BLAST і PSI-Blast можна використовувати параметри за умовчанням для відповідних програм. Див. [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

Необмежувальним прикладом математичного алгоритму, що використовується для порівняння послідовностей, є алгоритм ClustalW (Thompson et al., 1994). ClustalW порівнює послідовності і вирівнює повну амінокислотну послідовність або послідовність ДНК, і, таким чином, може надати дані про консервативність послідовності для всієї амінокислотної послідовності або нуклеотидної послідовності. Алгоритм ClustalW використовується в декількох комерційно доступних пакетах програм для аналізу ДНК/амінокислота, таких як модуль ALIGNX пакету програм Vector NTI (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA). При вирівнюванні амінокислотних послідовностей за допомогою ALIGNX, зручно використовувати параметри за умовчанням з штрафом за внесення пропуску 10, штрафом за продовження пропуску 0,1 і матрицею порівняння blosum63mt2 для оцінки процентної схожості амінокислот (консенсус) або ідентичності між двома послідовностями. При вирівнюванні послідовностей ДНК за допомогою ALIGNX зручно використовувати параметри за умовчанням з штрафом за внесення пропуску 15, штрафом за продовження пропуску 6,6 і матрицею порівняння swgapdnamt для оцінки процентної ідентичності між двома послідовностями.

Іншим необмежувальним прикладом математичного алгоритму, що використовується для порівняння послідовностей, є алгоритм Myers and Miller (1988). Такий алгоритм включений в програму wSTRETCHER, яка є частиною пакету програм для вирівнювання послідовностей wEMBOSS (доступного на <http://emboss.sourceforge.net/>). wSTRETCHER проводить оптимальне глобальне вирівнювання двох послідовностей з використанням модифікації класичного динамічного алгоритму програмування, який використовує лінійний простір. Можна

встановлювати підстановочну матрицю, штраф за внесення пропуску і штраф за подовження пропуску, що використовується для проведення вирівнювання. При використанні програми wSTRETCHER для порівняння нуклеотидних послідовностей, можна використовувати штраф за внесення пропуску 16 і штраф за продовження пропуску 4 з файлом оцінної матриці EDNAFULL.

5 При використанні для порівняння амінокислотних послідовностей можна використовувати штраф за внесення пропуску 12 і штраф за продовження пропуску 2 з файлом оцінної матриці EBLOSUM62.

Наступним необмежувальним прикладом математичного алгоритму, що використовується для порівняння послідовностей, є алгоритм Needleman and Wunsch (1970), який включений в пакет програм для вирівнювання послідовностей GAP Version 10 і wNEEDLE (<http://emboss.sourceforge.net/>). GAP Version 10 можна використовувати для визначення ідентичності або схожості послідовностей з використанням наступних параметрів: для нуклеотидної послідовності % ідентичність і % схожість обчислюють з використанням ваги пропуску 50 і ваги продовження 3, і оцінної матриці nwsgapdna.cmp. Для порівняння амінокислотних послідовностей % ідентичність або % схожість визначають з використанням ваги пропуску 8 і ваги продовження 2, і оцінної програми BLOSUM62.

wNEEDLE зчитує дві введені послідовності, проводить оптимальне вирівнювання (включаючи пропуски) вздовж всієї довжини і записує їх оптимальне глобальне вирівнювання послідовностей в файл. Алгоритм досліджує всі можливі вирівнювання і вибирає найкраще з використанням оцінної матриці, яка містить значення для кожного можливого збігу залишку або нуклеотиду. wNEEDLE знаходить вирівнювання з максимальним можливим показником, де показник вирівнювання дорівнює сумі збігів, взятій з оцінної матриці, мінус штрафи внаслідок внесення і продовження пропусків в послідовностях, що вирівнюються. Підстановочна матриця і штрафи за внесення і продовження пропусків встановлюються користувачем. Коли порівнюють амінокислотні послідовності, використовують штраф за внесення пропуску 10, штраф за продовження пропуску 0,5 і матрицю порівняння EBLOSUM62 за умовчанням. При порівнянні послідовностей ДНК з використанням wNEEDLE, використовують штраф за внесення пропуску 10, штраф за продовження пропуску 0,5 і матрицю для порівняння EDNAFULL.

Також можна використовувати еквівалентні програми. Під "еквівалентною програмою" мають на увазі будь-яку програму порівняння послідовностей, яка для будь-яких послідовностей, що розглядаються, проводить вирівнювання, що має ідентичні збіги нуклеотидних або амінокислотних залишків і ідентичну процентну ідентичність послідовностей при порівнянні з відповідним вирівнюванням, проведеним ALIGNX, wNEEDLE або wSTRETCHER. % ідентичність являє собою процент ідентичних збігів між двома послідовностями протягом вказаної вирівнюваної області (включаючи пропуски будь-якої довжини) і % схожість являє собою процент збігів між двома послідовностями протягом вказаної вирівнюваної області (включаючи пропуски будь-якої довжини).

Вирівнювання також можна провести дослідженням вручну.

Рекомбінантні хазяїни. Гени, що кодують токсин за даним винаходом, можна вводити в широку множину мікробних або рослинних хазяїнів. Експресія гену токсину приводить, прямо або опосередковано, до внутрішньоклітинної продукції і підтримки пестицидного білка. У разі придатних мікробних хазяїнів, наприклад, *Pseudomonas*, мікроби можуть бути застосовані в навколишньому середовищі паразитів, де вони будуть проліферувати і поглинатися. Результатом є боротьба з паразитами. Альтернативно, мікроорганізм, що містить ген токсину, можна обробляти в умовах, які продовжують активність токсину і стабілізують клітину. Потім оброблена клітина, яка зберігає токсичну активність, може бути застосована в навколишньому середовищі паразита-мішені.

Коли ген токсину B.t. вводять через придатний вектор в мікробного хазяїна і вказаного хазяїна застосовують в навколишньому середовищі в живому стані, необхідно, щоб використовувалися певні мікроорганізми-хазяїни. Вибирають мікроорганізми-хазяїни, які відомі тим, що вони займають "фітосферу" (філоплан, філосферу, ризосферу і/або ризоплан) однієї або декількох культур, що представляють інтерес. Ці мікроорганізми вибирають так, щоб вони були здатні успішно конкурувати в конкретному середовищі (середовище проживання культури і інших комах) з місцевими мікроорганізмами дикого типу, при умові стабільної підтримки і експресії гену, що кодує поліпептидний пестицид, і, бажано, при умові поліпшеного захисту пестициду від зумовленої зовнішніми умовами деградації і інактивації.

Відомо, що велику кількість мікроорганізмів населяють філоплан (поверхня листя рослин) і/або ризосферу (ґрунт, що оточує коріння рослин) широкої множини важливих культур. Ці мікроорганізми включають бактерії, водорості і гриби. Особливий інтерес представляють мікроорганізми, такі як бактерії, наприклад, роду *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Serratia*, *Klebsiella*,

Xanthomonas, Streptomyces, Rhizobium, Sinorhizobium, Rhodopseudomonas, Methylophilus, Agrobacterium, Acetobacter, Lactobacillus, Arthrobacter, Azotobacter, Leuconostoc і Alcaligenes; гриби, зокрема, дріжджі, наприклад, родів Saccharomyces, Cryptococcus, Kluyveromyces, Sporobolomyces, Rhodotorula і Aureobasidium. Особливий інтерес представляють такі бактеріальні види фітосфери, як Pseudomonas syringae, Pseudomonas fluorescens, Serratia marcescens, Acetobacter xylinum, Agrobacterium tumefaciens, Agrobacterium radiobacter, Rhodopseudomonas spheroides, Xanthomonas campestris, Sinorhizobium meliloti (раніше Rhizobium meliloti), Alcaligenes eutrophus і Azotobacter vinelandii; і види дріжджів фітосфери, такі як Rhodotorula rubra, R. glutinis, R. marina, R. aurantiaca, Cryptococcus albidus, C. diffluens, C. laurentii, Saccharomyces rosei, S. pretoriensis, S. cerevisiae, Sporobolomyces roseus, S. odoratus, Kluyveromyces veronae і Aureobasidium pollulans. Особливий інтерес представляють пігментовані мікроорганізми.

Способи боротьби з шкідливими комахами

Коли комаха контактує з ефективною кількістю токсину, що доставляється за допомогою експресії в трансгенній рослині, приготованої композиції(ій) білка, композиції(ій) білка, що розпилюється, матриці з приманкою або іншої системи доставки, результатом, як правило, є загибель комахи або комахи не харчуються з джерела, яке робить токсини доступними для комах.

Білкові токсини, що розглядаються, можна "застосовувати" або надавати для контактування комахам-мішеням різними шляхами. Наприклад, можна використовувати трансгенні рослини (де білок продукується рослиною і присутній в рослині), і вони добре відомі в даній галузі. Експресії генів токсинів також можна досягати селективно в конкретних тканинах рослин, таких як коріння, листя і т. д. Це можна здійснювати шляхом використання, наприклад, тканиноспецифічних промоторів. Іншим прикладом є нанесення розпиленням, і воно також відоме в даній галузі. Білки, що розглядаються, можна відповідним чином виготовляти для бажаного кінцевого застосування, а потім розпилювати (або іншим чином наносити) на рослину і/або навколо рослини/поблизу рослини, що підлягає захисту - до виявлення зараження паразитами, після виявлення комах-мішеней, як до, так і після, і т. п. Також можна використовувати, наприклад, гранули з приманкою і вони відомі в даній галузі.

Трансгенні рослини

Білки, що розглядаються, можна використовувати для захисту практично будь-якого типу рослин від пошкодження комахою Lepidopteran. Приклади таких рослин включають кукурудзу, соняшник, сою, бавовну, канолу, рис, сорго, тютюн, пшеницю, ячмінь, овочі, декоративні рослини, перець (включаючи гострий перець), цукровий буряк, плоди і трав'яний пласт, серед інших. Способи трансформації рослин добре відомі в даній галузі, і ілюстративні способи трансформації описані в прикладах.

Переважаючим варіантом здійснення винаходу, що розглядається, є трансформація рослин генами, що кодують інсектицидний білок, що розглядається, або його варіанти. Трансформовані рослини є стійкими до атаки шкідливими комахами-мішенями внаслідок присутності кількостей, що здійснюють боротьбу, інсектицидного білка, що розглядається, або його варіантів в клітинах трансформованої рослини. Шляхом включення генетичного матеріалу, який кодує інсектицидні властивості інсектицидних токсинів B.t. в геном рослини, яким харчується шкідлива комаха, дорослі особини або личинки гинуть після вживання рослини, що служить їжею. Були трансформовані численні представники груп однодольних і дводольних рослин. Також комерційний інтерес представляють трансгенні агрономічні культури, а також фрукти і овочі. Такі культури включають, але не обмежуються ними, кукурудзу, рис, сою, канолу, соняшник, люцерну, сорго, пшеницю, бавовну, арахіс, томат, картоплю і т. п. Існує декілька способів для введення чужорідного генетичного матеріалу в клітини рослин і для отримання рослин, які стабільно підтримують і експресують введений ген. Такі способи включають прискорення генетичного матеріалу, нанесеного на мікрочастинки, безпосередньо в клітини (патент США № 4945050 і патент США № 5141131). Рослини можна трансформувати з використанням технології Agrobacterium, див. патент США № 5177010, патент США № 5104310, патентну заявку Європи № 0131624B1, патентну заявку Європи № 120516, патентну заявку Європи № 159418B1, патентну заявку Європи № 176112, патент США № 5149645, патент США № 5469976, патент США № 5464763, патент США № 4940838, патент США № 4693976, патентну заявку Європи № 116718, патентну заявку Європи № 290799, патентну заявку Європи № 320500, патентну заявку Європи № 604662, патентну заявку Європи № 627752, патентну заявку Європи № 0267159, патентну заявку Європи № 0292435, патент США № 5231019, патент США № 5463174, патент США № 4762785, патент США № 5004863 і патент США № 5159135. Інша технологія трансформації включає технологію WHISKERSTM, див. патент США № 5302523 і патент США

№ 5464765. Також для трансформації рослин використовують технологію електропорації, див. WO 1987/06614, патент США № 5472869, патент США № 5384253, WO 1992/09696 і WO 1993/21335. Всі з цих патентів і публікацій по трансформації включені в даний опис як посилання. У доповнення до численних технологій трансформації рослин, також можна

варіювати тип тканини, який контактують з чужорідними генами. Така тканина може включати, але не обмежуватися ними, ембріогенну тканину, тканину калюсу типу I і II, гіпокотиль, меристему і т. п. Практичні всі тканини рослин можна трансформувати в процесі дедиференціювання з використанням відповідних способів, відомих фахівцеві в даній галузі.

Гени, що кодують токсини DIG-109 або DIG-152 або їх варіанти, можна вбудовувати в клітини рослин з використанням різних способів, які добре відомі в даній галузі, як описано вище. Наприклад, для отримання і модифікації чужорідних генів для введення у вищі рослини доступна велика кількість клонуючих векторів, що містять маркер, який дозволяє селекцію трансформованих мікробних клітин, і реплікаційну систему, функціональну в *Escherichia coli*. Такі маніпуляції можуть включати, наприклад, внесення мутацій, укорочень, вставок або замінів, бажаних для передбачуваного застосування. Вектори включають, наприклад, pBR322, серію pUC, серію M13mp, pACYC184 і т. д. Таким чином, послідовність, що кодує Сгу-білок або його варіанти, можна вбудовувати у вектор у відповідну ділянку рестрикції. Отриману плазмиду використовують для трансформації *E. coli*, клітини яких культивують в придатному поживному середовищі, потім збирають і лізують, так, щоб виділити застосовні кількості плазмиди. Як способи аналізу звичайно проводять аналіз послідовності, аналіз рестрикційних фрагментів, електрофорез і інші біохімічні і молекулярно-біологічні способи. Після кожного маніпулювання послідовність ДНК, що використовується, можна розщеплювати і зв'язувати з наступною послідовністю ДНК. Кожну піддану маніпулюванню послідовність ДНК можна клонувати в ту ж або інші плазмиди.

Застосування векторів, що містять Т-ДНК, для трансформації клітин рослин інтенсивно досліджується і в достатній мірі описано в патентній заявці Європи № 120516; Lee and Gelvin (2008), Fraley et al., (1986) і An et al., (1985), і є загальноприйнятим в даній галузі.

Після вбудовування вбудованої ДНК в геном рослин, вона є відносно стабільною протягом подальших поколінь. Вектор, що використовується для трансформації клітини рослин, звичайно містить ген селективного маркера, кодуючий білок, який надає трансформованим клітинам рослин стійкості до гербіциду або антибіотика, такого як біалафос, канаміцин, G418, блеоміцин або гігроміцин, серед інших. Таким чином, ген селективного маркера, що індивідуально використовується, повинен дозволяти селекцію трансформованих клітин, в той час як ріст клітин, які не містять вбудовану ДНК, пригнічується селективною сполукою.

Для введення ДНК в рослинну клітину-хазяїна доступна велика кількість способів. Ці способи включають трансформацію Т-ДНК, що доставляється *Agrobacterium tumefaciens* або *Agrobacterium rhizogenes* як агент для трансформації. Крім того, можна використовувати злиття протопластів рослин з ліпосомами, що містять ДНК, що підлягає доставці, пряму ін'єкцію ДНК, біолістичну трансформацію (бомбардування мікрочастинками) або електропорацію, а також інші можливі способи.

У переважному варіанті здійснення винаходу, що розглядається, рослини трансформують генами, де використання кодонів в кодуючій області білка оптимізоване для рослин. Див., наприклад, патент США № 5380831, який включений в даний опис як посилання. Також переважно використовують рослини, що кодують укорочений токсин. Укорочений токсин, як правило, кодує від приблизно 55% до приблизно 80% повнорозмірного токсину. Способи створення синтетичних генів *B.t.* для застосування в рослинах відомі в даній галузі (Stewart 2007).

Незалежно від способу трансформації, ген переважно включають у вектор для перенесення генів, адаптований для експресії генів інсектицидного токсину *B.t.* і їх варіантів в рослинній клітині шляхом включення у вектор рослинного промотору. У доповнення до рослинних промоторів, для експресії чужорідних генів в рослинних клітинах можна ефективно використовувати промотори з різних джерел. Наприклад, можна використовувати промотори бактеріального походження, такі як промотор октопінсинтази, промотор нопалінсинтази, промотор манопінсинтази; промотори вірусів рослин, такі як промотори 35S і 19S віруси мозаїки цвітної капусти і т. п. Рослинні промотори включають, але не обмежуються ними, промотор малої субодиниці (ssu) рибулозо-1,6-біфосфат (RUBP) карбоксилази, промотор бета-конглінініну, промотор фазеоліну, промотор ADH (алкогольдегідрогенази), промотори теплового шоку, промотор ADF (фактора деполімеризації актину) і тканиноспецифічні промотори. Промотори також можуть містити певні елементи енхансерної послідовності, які можуть збільшувати ефективність транскрипції. Типові енхансери включають, але не

обмежуються ними, ADH1-інтрон 1 і ADH1-інтрон 6. Можна використовувати конститутивні промотори. Конститутивні промотори визначають постійну експресію гену практично у всіх типах клітин і практично весь час (наприклад, актин, убіквітин, CaMV35S). Тканиноспецифічні промотори відповідають за експресію гену в конкретних типах клітин або тканин, таких як листя або насіння (наприклад, зеїн, олеозин, напін, ACP (ацил-переносний білок)), і ці промотори також можна використовувати. Також можна використовувати промотори, які є активними в ході певної стадії розвитку рослини, а також є активними в конкретних тканинах і органах рослини. Приклади таких промоторів включають, але не обмежуються ними, промотори, які є специфічними до коріння, специфічними до пилка, специфічними до зародків, специфічними до кукурудзяних рилець, специфічними до бавовняних волокон, специфічними до ендосперми насіння, специфічними до флоеми і т. п.

У певних випадках може бути бажаним використовувати індукцибельний промотор. Індукцибельний промотор відповідає за експресію генів у відповідь на специфічний сигнал, такий як: фізичний стимул (наприклад, гени теплового шоку); світло (наприклад, RUBP-карбоксилаза); гормон (наприклад, глюкокортикоїд); антибіотик (наприклад, тетрациклін); метаболіти; і стрес (наприклад, засуха). Можна використовувати інші бажані елементи транскрипції і трансляції, які функціонують в рослинах, такі як 5'-нетрансльовані лідерні послідовності, послідовності термінації транскрипції РНК і сигнальні послідовності поліаденілатної вставки. У даній галузі відомі численні специфічні для рослин вектори для перенесення генів.

Трансгенні культури, що містять ознаки стійкості до комах (IR), поширені в рослинах кукурудзи і бавовни вздовж Північної Америки, і використання цих ознак розповсюджується по всьому світу. Комерційні трансгенні культури, що поєднують ознаки IR і стійкість до гербіцидів (HT), були розроблені множиною компаній по виробництву насіння. Вони включають комбінації ознак IR, що забезпечуються інсектицидними білками B.t., і ознак HT, таких як стійкість до інгібіторів ацетолактатсинтази (ALS), таких як сульфонілсечовини, імідазолінони, триазолопіримідин, сульфоналіди і т. п., інгібітори глутамінсинтази (GS), такі як біалафос, глюфосинат і т. п., інгібітори 4-гідроксифенілпіруватдіоксигенази (HPPD), такі як мезотрион, ізоксафлутол і т. п., інгібітори 5-енолпірувілшикімат-3-фосфатсинтази (EPSPS), такі як гліфосат і т. п., і інгібітори ацетил-кофермент А-карбоксилази (ACCase), такі як галоксифоп, квізалофоп, диклофоп і т. п. Відомі інші приклади, в яких білки, що надаються трансгенно, забезпечують стійкість рослини до хімічних класів гербіцидів, таких як гербіциди на основі феноксикислот і гербіциди на основі піридилоксиацетатів ауксину (див. WO 2007/053482 A2), або гербіциди на основі феноксикислот і арилоксифеноксипропіонатні гербіциди (див. WO 2005107437 A2, A3). Можливість боротьби з множиною проблем, пов'язаних з паразитами, за допомогою ознак IR є цінною концепцією комерційного продукту, і зручність цієї концепції продукту збільшується, якщо ознаки боротьби з комахами і ознаки боротьби з бур'янами поєднуються в одній рослині. Крім того, збільшена корисність може бути досягнута за допомогою комбінацій в одній рослині ознак IR, що надаються інсектицидним білком B.t., таким як білок за даним винаходом, з одним або декількома додатковими ознаками HT, такими як ознаки, згадані вище, разом з однією або декількома додатковими внесеними ознаками (наприклад, стійкість до інших комах, що забезпечується білками, що походять з B.t., або іншими інсектицидними білками, стійкість до комах, що забезпечується механізмами, такими як РНК-і і т. п., стійкість до круглих черв'яків, що забезпечується білками, що походять з B.t., або іншими нематоцидними білками, стійкість до круглих черв'яків, що забезпечується механізмами, такими як РНК-і і т. п., стійкість до захворювання, стійкість до стресу, збільшене вживання азоту і т. п.), або ознаками продукції (наприклад, високий вміст масла, корисний склад масел, поліпшення поживних властивостей і т. п.). Такі комбінації можна отримувати або шляхом загальноприйнятого виведення (виведений набір), або спільно як нова трансформаційна подія, що залучає одночасне внесення множини генів (молекулярний набір). Переваги включають можливість контролю шкідливих комах і поліпшену боротьбу з бур'янами в культурній рослині, яка забезпечує повторну користь для виробника і/або споживача. Таким чином, даний винахід можна використовувати в комбінації з іншими ознаками для забезпечення повного агрономічного комплексу поліпшених якостей культури з можливістю універсально і економічно контролювати будь-яку кількість агрономічних проблем.

#### Паразити-мішені

Токсин DIG-109 і токсин DIG-152 за винаходом особливо придатні для застосування в боротьбі з комахами *Lepidopteran*. *Lepidopterans* є важливою групою сільськогосподарських, садівничих і побутових паразитів, які викликають дуже велику кількість пошкоджень кожний рік. Цей ряд комах охоплює личинки і дорослі особні, що харчуються листям і корінням. Шкідливі комахи *Lepidopteran* включають, але не обмежуються ними: *Achoria grisella*, *Acleris gloverana*,

*Acleris variana*, *Adoxophyes orana*, *Agrotis ipsilon* (совка-інсильон), *Alabama argillacea*, *Alsophila pometaria*, *Amyeloides transitella*, *Anagasta kuehniella*, *Anarsia lineatella*, *Anisota senatoria*, *Antheraea pernyi*, *Anticarsia gemmatalis*, *Archips* sp., *Argyrotaenia* sp., *Athetis mindara*, *Bombyx mori*, *Bucculatrix thurberiella*, *Cadra cautella*, *Choristoneura* sp., *Cochylis hospes*, *Colias eurytheme*, *Corcyra cephalonica*, *Cydia latiferreanus*, *Cydia pomonella*, *Datana integerrima*, *Dendrolimus sibericus*, *Desmia fernalis*, *Diaphania hyalinata*, *Diaphania nitidalis*, *Diatraea grandiosella* (південно-західна кукурудзяна вогнівка), *Diatraea saccharalis* (очеретяна вогнівка), *Ennomos subsignaria*, *Eoreuma loftini*, *Esphestia elutella*, *Erannis tiliaria*, *Estigmene acrea*, *Eulia salubricola*, *Eupocoellia ambiguella*, *Eupoecilia ambiguella*, *Euproctis chrysorrhoea*, *Euxoa messoria*, *Galleria mellonella*, *Grapholita molesta*, *Harrisina americana*, *Helicoverpa subflexa*, *Helicoverpa zea* (совка бавовняна), *Heliothis virescens*, *Hemileuca oliviae*, *Homoeosoma electellum*, *Hyphantia cunea*, *Keiferia lycopersicella*, *Lambdina fiscellaria fiscellaria*, *Lambdina fiscellaria lugubrosa*, *Leucoma salicis*, *Lobesia botrana*, *Loxagrotis albicosta* (західна бобова совка), *Loxostege sticticalis*, *Lymantria dispar*, *Macalla thyrsalis*, *Malacosoma* sp., *Mamestra brassicae*, *Mamestra configurata*, *Manduca quinque maculata*, *Manduca sexta*, *Maruca testulalis*, *Melanchra picta*, *Operophtera brumata*, *Orgyia* sp., *Ostrinia nubilalis* (європейський кукурудзяний метелик), *Paleacrita vernata*, *Papiapema nebris* (звичайний стеблевий метелик), *Papilio cresphontes*, *Pectinophora gossypiella*, *Phryganidia californica*, *Phyllonorycter blancardella*, *Pieris napi*, *Pieris rapae*, *Plathypena scabra*, *Platynota flouendana*, *Platynota stultana*, *Platyptilia carduidactyla*, *Plodia interpunctella*, *Plutella xylostella* (моль капустяна), *Pontia protodice*, *Pseudaletia unipuncta* (похідні черв'яки), *Pseudoplasia includens*, *Sabulodes aegrotata*, *Schizura concinna*, *Sitotroga cerealella*, *Spilonta ocellana*, *Spodoptera frugiperda* (совка трав'яна), *Spodoptera exigua* (совка мала), *Thaurnstopoea pityocampa*, *Ensula bisselliella*, *Trichoplusia ni*, *Udea rubigalis*, *Xylomyges curialis* і *Yponomeuta padella*.

Також передбачене застосування токсину DIG-109 і токсину DIG-152 і їх варіантів для боротьби з паразитами *Coleoptera* сільськогосподарських рослин. У деяких варіантах здійснення *Cru*-білки можна економічно використовувати для боротьби зі шкідливими комахами, які включають, але не обмежуються ними, наприклад, личинки, що пошкоджують коріння, такі як *Diabrotica undecimpunctata howardi* (південна блошка довговуса), *Diabrotica longicornis barberi* (північна блошка довговуса), і *Diabrotica virgifera* (західна блошка довговуса) і личинки, такі як *Cyclocephala borealis* (хрущик північний), *Cyclocephala immaculate* (хрущик південний) і *Popillia japonica* (хрущик японський).

Детекція токсинів DIG-109 і DIG-152 за допомогою антитіл

Антитіла проти токсинів. Антитіла до токсинів B.t., описаних в даному описі, або до еквівалентних токсинів або фрагментів цих токсинів, можна легко отримувати з використанням стандартних методик в даній галузі, як описано, наприклад, Coligan et al., 2007 і його доповнення. Такі антитіла придатні для детекції присутності токсину DIG-109, токсину DIG-152 і їх варіантів.

Після виділення інсектицидного токсину B.t. можна індукувати антитіла, специфічні до токсину, загальноприйнятими способами, які добре відомі в даній галузі. Повторювані ін'єкції вибраному хазяїну протягом періоду, що складає тижні або місяці, викликає імунну відповідь і приводить до значних сироваткових титрів антитіл проти B.t. Переважними хазяїнами є види ссавців і більш високо переважними видами є кролики, кози, вівці і миші. Взяття крові від таких імунізованих тварин можна провести будь-якими загальноприйнятими способами для отримання антисироватки (поліклональні антитіла), реактивної відносно інсектицидного токсину B.t. Потім антисироватку можна піддавати афінному очищенню шляхом адсорбції на токсин способами, відомими в даній галузі. Піддану афінному очищенню сироватку можна далі очищати шляхом виділення фракції імуноглобулінів в антисироватці з використанням методик, відомих в даній галузі. Отриманий матеріал являє собою гетерогенну популяцію імуноглобулінів, реактивних відносно інсектицидного токсину B.t.

Антитіла проти токсину B.t. також можна отримувати шляхом отримання напівсинтетичного імуногену, що складається з синтетичного пептидного фрагмента інсектицидного токсину B.t., кон'югованого з імуногенним носієм. Численні схеми і інструменти, придатні для отримання пептидних фрагментів, добре відомі в даній галузі. Також в даній галузі добре відомі багато які придатні імуногенні носії, такі як бичачий сироватковий альбумін або гемоціанін лімфи равлика, а також способи зв'язування імуногену і білків-переносників. Після конструювання напівсинтетичного імуногену методика отримання антитіл, специфічних до фрагмента інсектицидного токсину B.t., ідентична методиці, що використовується для отримання антитіл, реакційноздатних відносно природного токсину B.t.

Моноклональні антитіла (MAb) проти токсину B.t. легко отримувати з використанням очищеного інсектицидного токсину B.t. Способи отримання MAb застосовують на практиці

протягом понад 15 років, і вони добре відомі фахівцям в даній галузі. Повторювані внутрішньоочеревинні або підшкірні ін'єкції очищеного інсектицидного токсину B.t. в ад'юванті викличуть імунну відповідь у більшості тварин. Гіперімунізовані В-лімфоцити витягують з тварини і піддають злиттю з придатною для злиття клітинною лінією-партнером, здатною до

необмеженого культивування. Переважними тваринами, В-лімфоцити яких можна гіперімунізувати і використовувати для отримання MAb, є ссавці. Більш переважними тваринами є щури і миші і найбільш переважною є лінія мишей BALB/c.

Для отримання гібридом придатними партнерами по злиттю є численні клітинні лінії ссавців. Багато які такі лінії доступні від American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) і комерційних постачальників. Переважні клітинні лінії, що є партнером по злиттю, походять з мієлом миші, і найбільш переважною є клітинна лінія мієломи HL-1o Friendly myeloma-653 (Ventrex, Portland, ME). Після злиття отримані гібридами культивують в селективному середовищі для росту протягом від одного до двох тижнів. Доступні дві добре відомі системи селекції для усунення незлитих клітин мієломи, або злитих один з одним клітин мієломи, із змішаної культури гібридом. Вибір системи селекції залежить від імунізованої лінії мишей і мієломного партнера по злиттю, що використовується. Можна використовувати систему селекції aaT, описану Taggart and Samloff, (1983); однак переважною є система селекції HAT (гіпоксантин, аміноптерин, тимідин), описана Littlefield (1964), внаслідок її сумісності з переважною лінією миші і партнером по злиттю, згаданими вище. Потім відпрацьоване середовище для росту піддають скринінгу відносно секреції імуноспецифічних MAb. Для цього найбільш придатні методики твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA); хоч також прийнятні радіоімунні аналізи, адаптовані для скринінгу у великому об'ємі. Можна провести множинні скринінги, призначені для послідовного усунення значної кількості непотрібних або менш бажаних культур. Культури, які секретують MAb, реактивні відносно інсектицидного токсину B.t., можна піддавати скринінгу відносно перехресної реактивності з відомими інсектицидними токсинами. Переважними MAb є MAb класу IgG і більш високо переважними MAb є MAb субізотипів IgG1 і IgG2a.

Культури гібридом, які секретують переважні MAb, можна субклонувати декілька разів для забезпечення моноклональності і стабільності. Добре відомі способи субклонування еукаріотичних клітинних культур, що не прикріплюються, включають лімітуюче розведення, способи з м'якою агарозою і способи активованого флуоресценцією сортування клітин. Після кожного субклонування отримані культури переважно повторно аналізують відносно секреції антитіл і ізотипу, щоб пересвідчитися у встановленні стабільної переважної секретуючої MAb культури.

Антитіла проти токсину B.t. придатні в різних способах детекції заявленого інсектицидного токсину B.t. за даним винаходом і його варіантів або фрагментів. Добре відомо, що антитіла, мічені репортерною групою, можна використовувати для ідентифікації присутності антигенів в різному середовищі. Антитіла, мічені радіоізотопом, використовують протягом десятиріч в радіоімунних аналізах для ідентифікації з високою точністю і чутливістю присутності антигенів в різних біологічних рідинах. Пізніше стали використовувати мічені ферментом антитіла як субстрат для мічених радіоактивною міткою антитіл в аналізі ELISA. Крім того, антитіла, імунореактивні до інсектицидного токсину B.t. за даним винаходом, можна зв'язувати з імобілізуючою речовиною, такою як ямка планшета з полістиролу або частинка з полістиролу, і використовувати в імуноаналізах для визначення того, чи присутній токсин B.t. в зразку, що тестується.

#### Детекція з використанням зондів

Наступним способом для ідентифікації токсинів і генів за даним винаходом є ідентифікація з використанням олігонуклеотидних зондів. Ці зонди являють собою нуклеотидні послідовності, що піддаються детекції. Ці послідовності можна робити такими, що піддаються детекції, за допомогою прийнятної радіоактивної мітки або їх можна робити за своєю природою флуоресцентними, як описано в патенті США № 6268132. Як добре відомо в даній галузі, якщо молекула зонда і зразок нуклеїнової кислоти гібридизуються шляхом утворення сильних зв'язків спаровування основ між двома молекулами, можна обґрунтовано передбачити, що зонд і зразок мають істотну гомологію послідовностей. Переважно гібридизацію проводять в жорстких умовах способами, добре відомими в даній галузі, як описано, наприклад, в Keller and Manak (1993). Детекція зонду забезпечує засіб для визначення відомим чином того, чи сталася гібридизація. Такий аналіз зондів забезпечує швидкий спосіб для ідентифікації генів, що кодують токсин за даним винаходом. Нуклеотидні сегменти, які використовують як зонди згідно з винаходом, можна синтезувати з використанням пристрою для синтезу ДНК і стандартних методик. Ці



нуклеотидні послідовності також можна використовувати як праймери для ПЛР з метою ампліфікації генів за даним винаходом.

#### Гібридизація

Як добре відомо фахівцям в галузі молекулярної біології, схожість двох нуклеїнових кислот можна охарактеризувати за їх схильністю до гібридизації. Як використовують в рамках винаходу терміни "жорсткі умови" або "жорсткі умови гібридизації" стосуються умов, в яких зонд гібридується (піддається відпалу) з його послідовністю-мішенню в більшій мірі на рівні, що піддається детекції, ніж з іншими послідовностями (наприклад, щонайменше в 2-рази вище фонового рівня). Жорсткі умови залежать від послідовності і відрізняються в різних обставинах. Шляхом контролю жорсткості умов гібридизації і/або промивання, можна ідентифікувати послідовності-мішені, які на 100% комплементарні зонду (гомологічне дослідження). Альтернативно умови жорсткості можна коректувати, щоб дозволити деяку невідповідність послідовностей, так, щоб виявляти більш низький ступінь схожості (гетерологічне дослідження). Як правило, зонд має довжину менше ніж приблизно 1000 нуклеотидів, переважно менше ніж приблизно 500 нуклеотидів.

Як правило, жорсткі умови являють собою умови, в яких концентрація солі являє собою концентрацію меншу ніж приблизно 1,5 M іонів Na, як правило, приблизно 0,01-1,0 M іонів Na (або інших солей) при pH від 7,0 до 8,3, і температура становить щонайменше приблизно 30°C для коротких зондів (наприклад, від 10 до 50 нуклеотидів) і щонайменше приблизно 60°C для довгих зондів (наприклад, більш ніж приблизно 50 нуклеотидів). Жорсткі умови також можна забезпечувати додаванням дестабілізаторів, таких як формамід. Ілюстративні умови низької жорсткості включають гібридизацію з буферним розчином 30%-35% формаміду, 1 M NaCl, 1% SDS (додецилсульфат натрію) при 37°C і промивання в 1X-2X SSC (20X SSC=3,0 M NaCl/0,3 M трицитраті натрію) при 50°C-55°C. Ілюстративні умови помірної жорсткості включають гібридизацію в 40%-45% формаміді, 1,0 M NaCl, 1% SDS при 37°C і промивання в 0,5 X-1X SSC при 55°C-60°C. Ілюстративні умови високої жорсткості включають гібридизацію в 50% формаміді, 1 M NaCl, 1% SDS при 37°C і промивання в 0,1 X SSC при 60°C-65°C. Необов'язково, буфери для промивання можуть містити від приблизно 0,1% до приблизно 1% SDS. Тривалість гібридизації, як правило, складає менше ніж приблизно 24 години, звичайно від приблизно 4 до приблизно 12 годин.

Специфічність, як правило, залежить від промивань після гібридизації, причому найважливішими факторами є іонна сила і температура кінцевого розчину для промивання. Для гібридів ДНК/ДНК температура плавлення ( $T_m$ ) являє собою температуру (при певній іонній силі і pH), при якій 50% комплементарної послідовності-мішені гібридується з абсолютно відповідним зондом.  $T_m$  знижується приблизно на 1°C для кожної 1% невідповідності; таким чином,  $T_m$ , умови гібридизації і/або умови промивання можна коректувати для полегшення відпалу послідовностей з бажаною ідентичністю. Наприклад, якщо потрібні послідовності з >90% ідентичністю, температура може бути нижчою ніж  $T_m$  на 10°C. Як правило, жорсткі умови вибирають так, щоб температура складала на 5°C нижче ніж  $T_m$  для конкретної послідовності і комплементарної їй послідовності при певній іонній силі і pH. Однак в умовах високої жорсткості може використовуватися гібридизація і/або промивання при температурі, на 1°C, 2°C, 3°C або 4°C нижче ніж  $T_m$ ; в умовах помірної жорсткості може використовуватися гібридизація і/або промивання при температурі, на 6°C, 7°C, 8°C, 9°C або 10°C нижче ніж  $T_m$ , і в умовах низької жорсткості може використовуватися гібридизація і/або промивання при температурі, на 11°C, 12°C, 13°C, 14°C, 15°C або 20°C нижче ніж  $T_m$ .

$T_m$  (в °C) можна експериментально визначати або можна приблизно обчислювати. Для гібридів ДНК-ДНК  $T_m$  може бути приблизно обчислена з рівняння Meinkoth і Wahl (1984):)

$$T_m (^{\circ}\text{C}) = 81,5^{\circ}\text{C} + 16,6(\log M) + 0,41(\% \text{GC}) - 0,61(\% \text{формамід}) - 500/L;$$

де M являє собою молярність одновалентних катіонів, %GC являє собою процент нуклеотидів гуанозину і цитозину в ДНК, % формамід являє собою процент формаміду в гібридизаційному розчині, і L являє собою довжину гібриду в парах основ.

Альтернативно  $T_m$  описується наступною формулою (Beltz et al., 1983).

$$T_m (^{\circ}\text{C}) = 81,5^{\circ}\text{C} + 16,6(\log [\text{Na}^+]) + 0,41(\% \text{GC}) - 0,61(\% \text{формамід}) - 600/L$$

де  $[\text{Na}^+]$  являє собою молярність іонів натрію, %GC являє собою процент нуклеотидів гуанозину і цитозину в ДНК, % формамід являє собою процент формаміду в розчині для гібридизації, і L являє собою довжину гібриду в парах основ.

Фахівцеві в даній галузі буде зрозуміло, що з використанням рівнянь, композицій для гібридизації і промивання і бажаною  $T_m$ , по суті описують варіювання жорсткості розчинів для гібридизації і/або промивання. Якщо бажаний ступінь невідповідності приводить до  $T_m$  менше за 45°C (водний розчин) або 32°C (розчин формаміду), переважно збільшити концентрацію SSC,

так, щоб використовувати більш високу температуру. Докладне керівництво по гібридизації нуклеїнових кислот може бути знайдене в Tijssen (1993) і Ausubel et al., 1995 і їх доповненнях). Також див. Sambrook et al., (1989) і його оновлення.

Гібридизацію іміобілізованої ДНК на саузерн-блотах з міченими радіоактивною міткою зондами можна провести стандартними способами Sambrook et al., вище. Радіоактивні ізотопи, що використовуються для мічення полінуклеотидних зондів, можуть включати  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^{14}\text{C}$  або  $^3\text{H}$ . Включення радіоактивних ізотопів в молекули полінуклеотидного зонда можна провести будь-яким з декількох способів, добре відомих фахівцям в галузі молекулярної біології. (Див., наприклад, Sambrook et al., вище.) Як правило, гібридизацію і подальші промивання можна провести в жорстких умовах, які дозволяють детекцію послідовностей-мішеней з гомологією заявленим генам, що кодують токсин. Для дволанцюгових генних ДНК-зондів гібридизацію можна провести протягом ночі при температурі на  $20\text{--}25^\circ\text{C}$  нижче ніж  $T_m$  ДНК-гібрида в 6X SSPE, 5X розчині Денхардта, 0,1% SDS, 0,1 мг/мл денатурованій ДНК [20X SSPE являє собою 3M NaCl, 0,2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  і 0,02 M EDTA (натрієва сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти); 100X розчин Денхардта являє собою 20 г/л полівінілпіролідону, 20 г/л Ficoll типу 400 і 20 г/л бичачого сироваткового альбуміну (фракція V)].

Промивання, як правило, можна провести таким чином:

Два рази при кімнатній температурі протягом 15 хвилин в 1X SSPE, 0,1% SDS (промивання більш низької жорсткості).

Один раз при  $T_m - 20^\circ\text{C}$  протягом 15 хвилин в 0,2 X SSPE, 0,1% SDS (промивання більш високої жорсткості).

Для олігонуклеотидних зондів гібридизацію можна проводити протягом ночі при температурі, на  $10\text{--}20^\circ\text{C}$  нижче ніж  $T_m$  гібриду в 6X SSPE, 5X розчині Денхардта, 0,1% SDS, 0,1 мг/мл денатурованій ДНК.  $T_m$  для олігонуклеотидних зондів можна визначати по наступній формулі (Suggs et al., 1981).

$$T_m(^{\circ}\text{C}) = 2(\text{число пар основ T/A}) + 4(\text{число пар основ G/C})$$

Промивання, як правило, можна провести таким чином:

Два рази при кімнатній температурі протягом 15 хвилин в 1X SSPE, 0,1% SDS (промивання нижчої жорсткості).

Один раз при температурі гібридизації протягом 15 хвилин в 1X SSPE, 0,1% SDS (промивання вищої жорсткості).

Деякі приклади комбінацій концентрацій солей і температури є наступними (в порядку збільшення жорсткості): 2X SSPE або SSC при кімнатній температурі; 1X SSPE або SSC при  $42^\circ\text{C}$ ; 0,1X SSPE або SSC при  $42^\circ\text{C}$ ; 0,1X SSPE або SSC при  $65^\circ\text{C}$ .

Молекули зондів для гібридизації і гібридні молекули, утворені між зондом і молекулами-мішенями, можна робити такими, що піддаються детекції, за допомогою засобів, відрізняються від мічення радіоактивною міткою. Мають на увазі, що такі альтернативні способи знаходяться в об'ємі цього винаходу.

Потрібно розуміти, що приклади і варіанти здійснення, описані в цьому документі, представлені тільки для ілюстративних цілей, і що різні модифікації або зміни, що враховують їх, можуть бути запропоновані фахівцям в даній галузі, і вони включені в суть і межі даної заявки і об'єм прикладеної формули винаходу.

Якщо немає інших конкретних вказівок або позначень форма однини означає "щонайменше один", як використовують в рамках винаходу.

Нижче представлені приклади, які ілюструють методики для застосування на практиці винаходу. Ці приклади не треба тлумачити як такі, що обмежують. Всі проценти надані по масі і всі співвідношення сумішей в розчиннику представлені по об'єму, якщо немає інших вказівок. Всі температури надані в градусах Цельсія.

#### ПРИКЛАД 1

Конструювання химерних центральних токсинів Cry1Ca і протоксинів Cry1Ab

Химерні токсини. Химерні білки, в яких використовується домен центрального токсину з одного токсину Cry, злитий з сегментом протоксину з іншого токсину Cry були описані раніше, наприклад, в патенті США № 5593881 і патенті США № 5932209. Послідовність білка дельта-ендотоксину Cry1Ca3 депонована з реєстраційним номером GenBank AAA22343 під застарілою назвою Cry1C(b).

Варіанти химерного білка Cry1Ca за винаходом включають токсини, що містять N-кінцевий сегмент центрального токсину, що походить з інсектицидного токсину Cry1Ca3, злитий з гетерологічним сегментом протоксину з дельта-ендотоксину в точці після закінчення сегмента центрального токсину. Перехід від центрального токсину до гетерологічного сегмента протоксину може відбуватися приблизно в точці з'єднання центральний токсин/протоксин або,

альтернативно, може бути збережена частина нативного протоксину (що продовжується після сегмента центрального токсину) з подальшим переходом до гетерологічного протоксину. Як варіант, центральний токсин і сегменти протоксину можуть містити точну амінокислотну послідовність нативних токсинів, з яких вони походять, або вони можуть включати амінокислотні вставки, делеції або заміни, які не знижують і можуть збільшувати біологічну функцію сегментів при їх злитті один з одним.

Наприклад, химерний токсин за даним винаходом містить сегмент центрального токсину, що походить з Cry1Ca3, і гетерологічний протоксин. У переважному варіанті здійснення винаходу сегмент центрального токсину, що походить з Cry1Ca3 і описаний як сегмент центрального токсину Cry1Ca в SEQ ID NO: 1 (619 амінокислот), є злитим з гетерологічним сегментом, що містить сегмент протоксину, що походить з дельта-ендотоксину Cry1Ab. У SEQ ID NO: 2 представлена послідовність з 545 амінокислот для одного сегмента протоксину, що походить з Cry1Ab і придатного у варіантах Cry1Ca за винаходом. Звертається увага на останні приблизно 100-150 амінокислот цього сегмента протоксину SEQ ID NO: 2, який є важливим для включення в химерний токсин за даним винаходом. Таким чином, переважний варіант здійснення винаходу включає химерний білок, в якому сегмент центрального токсину Cry1Ca, представлений як SEQ ID NO: 1, сполучений з сегментом протоксину, що походить з Cry1Ab, представленим в SEQ ID NO: 2. Послідовність химерного білка з 1164 амінокислот, що позначається в даному описі як DIG-152, представлена як SEQ ID NO: 3 (версія pMYC2547). Другий переважний варіант здійснення винаходу включає химерний білок, в якому сегмент центрального токсину Cry1Ca, описаний як SEQ ID NO: 1, сполучений з другим сегментом протоксину з 545 амінокислот, що походить з Cry1Ab, представленим в SEQ ID NO: 4. Звертається увага на останні приблизно 100-150 амінокислот цього сегмента протоксину, який є важливим для включення в химерний токсин за даним винаходом. Послідовність другого химерного білка з 1164 амінокислот, що позначається як DIG-109, описана як SEQ ID NO: 5 (оптимізована для кукурудзи версія). Потрібно розуміти, що в об'єм цього винаходу входять інші химерні злиті конструкції, що містять варіанти центрального токсину Cry1Ca і протоксини, що походять з Cry1Ab.

Потрібно зазначити, що сегменти протоксину, що походять з Cry1Ab, представлені в SEQ ID NO: 2 і SEQ ID NO: 4, є по суті функціональними еквівалентами один одного, що відрізняються по послідовності тільки в одному (першому) положенні.

#### ПРИКЛАД 2

Конструювання експресуючих плазмід, що кодують химерні білки центральної частини Cry1Ca/протоксин Cry1Ab, і експресія в *Pseudomonas*

Для конструювання експресуючої конструкції *Pseudomonas fluorescens* (Pf) pMYC2547, модифікованої способами інженерії для продукування повнорозмірного химерного білка, що містить центральну частину Cry1Ca, зливу з протоксином Cry1Ab (DIG-152; SEQ ID NO: 3), використовували стандартні способи клонування [як описано, наприклад, в Sambrook et al., (1989) і Ausubel et al., (1995), і їх доповнення]. Продукування білка проводили в штамі *Pseudomonas fluorescens* MB214 (похідне штаму MB101; *P. fluorescens* біовару I), що має інсерцію модифікованого lac-оперону, як описано в патенті США № 5169760. Основна стратегія клонування залучала субклонування фрагмента ДНК, що кодує DIG-152, в плазмідні вектори, за допомогою чого він вміщується під контроль експресії промотором P<sub>tac</sub> і термінатором trnBT1T2 з плазмиди pKK223-3 (PL Pharmacia, Milwaukee, WI). Одна така плазміда була названа pMYC2547, і ізолят MB214, що містить цю плазмиду, названий Dpf108.

Аналіз росту і експресії у обертових флаконах. Продукування білка DIG-152 для охарактеризації і біоаналізу на комах проводили за допомогою вирощеного у обертових флаконах штаму Dpf108 *P. fluorescens*. Продукування білка DIG-152, що запускається промотором P<sub>tac</sub>, проводили, як описано раніше в патенті США № 5527883. Експресію індукували додаванням ізопропіл-β-D-1-тіогалактопіранозиду (IPTG) після первинної інкубації протягом 24 годин при 30° при погоджуванні. Взяття зразків культур проводили під час індукції і в різні моменти часу після індукції. Щільність клітин вимірювали по оптичній густині при 600 нм (OD<sub>600</sub>).

Фракціонування клітин і аналіз SDS-PAGE зразків з обертових флаконів. В кожний момент часу взяття зразка, щільність клітин в зразках доводили до OD<sub>600</sub>=20 і аліквоти об'ємом 1 мл центрифугували при 14000×g протягом п'яти хвилин. Клітинні осади заморожували при -80°. Розчинні і нерозчинні фракції із заморожених зразків осаду з обертових флаконів отримували з використанням розчину для екстракції бактеріального білка EasyLyse™ (EPICENTRE® Biotechnologies, Madison, WI). Кожний клітинний осад ресуспендували в 1 мл розчину EasyLyse™ і далі розбавляли 1:4 в буфері для лізування і інкубували при обертанні при кімнатній температурі протягом 30 хвилин. Лізат центрифугували при 14000 об./хв. протягом 20

хвилин при 4° і супернатант виділяли як розчинну фракцію. Потім осад (нерозчинна фракція) ресуспендували в рівному об'ємі фосфатно-сольового буфера (PBS; 11,9 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, pH7,4).

Зразки змішували 1:1 з 2X буфером для зразка Laemmli, що містив β-меркаптоетанол (Sambrook et al., вище) і кип'ятили протягом 5 хвилин перед нанесенням на 12% Bis-Tris гелі Criterion XT (Bio-Rad Inc., Hercules, CA). Електрофорез проводили в рекомендованому буфері XT MOPS. Гелі забарвлювали барвником кумасі Bio-Safe згідно з протоколом виробника (Bio-Rad) і візуалізували з використанням системи для візуалізації Alpha Innotech Imaging system (San Leandro, CA).

Отримання тілець включення. Отримання тілець включення (IB) білка DIG-152 проводили на клітинах *P. fluorescens*, що культивуються, які продукували нерозчинний інсектицидний білок B.t., як було продемонстровано за допомогою SDS-PAGE і MALDI-MS (мас-спектрометрія з лазерною десорбцією/іонізацією в присутності матриці). Осідання культивованих *P. fluorescens* розморожували на водяній бані при 37°. Клітини ресуспендували до 25% мас./об. в буфері для лізування [50 мМ Tris, pH 7,5, 200 мМ NaCl, 20 мМ динатрієва сіль EDTA (етиленадіамінтетраоцтова кислота), 1% Triton X-100, і 5 мМ дитіотреїтол (DTT)]; 5 мл/л коктейля інгібіторів бактеріальних протеаз (каталожний номер P8465; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) додавали безпосередньо перед застосуванням]. Клітини суспендували з використанням переносного гомогенізатора при найнижчих параметрах (Tissue Tearor, BioSpec Products, Inc., Bartlesville, OK). До суспензії клітин додавали лізоцим (25 мг Sigma L7651, з яєчного білка курки) шляхом перемішування металевим шпателем, і суспензію інкубували при кімнатній температурі протягом однієї години. Суспензію охолоджували на льоду протягом 15 хвилин, потім обробляли ультразвуком з використанням Branson Sonifier 250 (дві сесії по 1 хвилині при 50% робочому циклі, 30% вихід). Лізис клітин перевіряв за допомогою мікроскопії. При необхідності додавали додаткові 25 мг лізоциму, і інкубацію і обробку ультразвуком повторювали. Після підтвердження лізису клітин за допомогою мікроскопії, лізат центрифугували при 11500×g протягом 25 хвилин (4°) до отримання осаду IB, і супернатант відкидали. Осад IB ресуспендували за допомогою 100 мл буфера для лізису, гомогенізували переносним змішувачем і центрифугували, як описано вище. Осад IB багато разів промивали шляхом ресуспендування (в 50 мл буферу для лізування), гомогенізації, обробки ультразвуком, і центрифугуванням доти, поки супернатант не ставав безбарвним і осад IB не ставав твердим і не набував не зовсім білого кольору. Для кінцевого промивання осад IB ресуспендували в стерилізованій фільтруванням (0,22 мкм) дистильованій воді, що містила 2 мМ EDTA, і центрифугували. Кінцевий осад ресуспендували в стерилізованій фільтруванням дистильованій воді, що містила 2 мМ EDTA, і зберігали 1-мл аліквотами при -80°.

Аналіз SDS-PAGE і кількісне визначення білка в препаратах IB проводили шляхом розмороження 1-мл аліквоти осаду IB і розбавлення його 1:20 стерилізованою фільтруванням дистильованою водою. Потім розбавлений зразок кип'ятили з 4X відновлювальним буфером для зразка [250 мМ Tris, pH 6,8, 40% гліцерин (об./об.), 0,4% бромфеноловий синій (мас./об.), 8% SDS (мас./об.) і 8% β-меркаптоетанол (мас./мас.)] і наносили на 4-20% Tris-гліциновий гель з 12+2 ямками Novex® (Invitrogen), проганяючи з 1X буфером Tris/гліцин/SDS (BioRad). Гель проганяли протягом 60 хв. при 200 Вольт, потім забарвлювали кумасі синім (50% G-250/50% R-250 в 45% метанолі, 10% оцтової кислоти), і видаляли барвник 7% оцтовою кислотою, 5% метанолом в дистильованій воді. Кількісне визначення намічених смуг проводили шляхом порівняння денситометричних величин для цих смуг проти стандартних зразків бичачого сироваткового альбуміну (BSA), прогнаних на тому ж гелі для отримання стандартної кривої.

Солюбілізація тілець включення. Шість мл суспензії тілець включення DIG-152 з Pf клону DPf108 центрифугували при найвищих параметрах на мікроцентрифузі Eppendorf моделі 5415C (приблизно 14000×g) для осадження тілець включення. Супернатант буфера для зберігання видаляли і замінювали 25 мл 100 мМ натрію-карбонатного буфера, pH11, в 50-мл конічній пробірці. Включення ресуспендували з використанням піпетки і струшували для ретельного перемішування. Пробірку вміщували на платформу, що злегка коливається, при 4° протягом ночі для екстракції білка-мішені. Екстракт центрифугували при 30000×g протягом 30 хв. при 4°, і отриманий супернатант концентрували 5 разів з використанням целюлозного фільтруючого пристрою, що регенерується, для центрифуги Amicon Ultra-15 (межа молекулярної маси 30000; Millipore). Потім буфер для зразка замінювали на 10 мМ CAPS [3-(циклогексаміно)-1-пропансульфонова кислота], pH 10, з використанням одноразових колонок PD-10 (GE Healthcare, Piscataway, NJ).

Солюбілізація і активація трипсином білка тілець включення. У деяких випадках суспензію тілець включення DIG-152 з Pf клону DPf108 центрифугували при найвищих параметрах

мікроцентрифуги Eppendorf моделі 5415C (приблизно 14000×g) для осадження тілець включення. Супернатант у вигляді буфера для зберігання видаляли і замінювали 100 mM CAPS, pH 11, з отриманням концентрації білка приблизно 50 мг/мл. Пробірку погойдували при кімнатній температурі протягом трьох годин до повної солюбілізації білка. Додавали трипсин в кількості, що дорівнює приблизно 5%-10%) (мас.:мас., з розрахунку на вихідну масу порошку IB) і розщеплення проводили шляхом інкубації при гоїданні протягом ночі при 4° або шляхом погойдування протягом 90-120 хвилин при кімнатній температурі. Нерозчинний матеріал видаляли центрифугуванням при 10000×g протягом 15 хвилин, і супернатант наносили на аніонообмінну колонку MonoQ (10 мм на 10 см). Активованій білок DIG-152 елюювали (як визначали за допомогою SDS-PAGE, див. нижче) за допомогою 0%-100% градієнта 1 M NaCl протягом 25 об'ємів колонки. Фракції, що містили активований білок, об'єднували і, коли необхідно, концентрували до менше ніж 10 мл з використанням целюлозного фільтруючого пристрою, що регенерується, для центрифуги Amicon Ultra-15, як указано вище. Потім матеріал пропускали через колонку Superdex 200 (16 мм на 60 см) в буфері, що містив 100 mM NaCl, 10% гліцерин, 0,5% Tween-20 і 1 mM EDTA. За допомогою аналізу SDS-PAGE було визначено, що активований (ферментативно укорочений) білок елюється при від 65 до 70 мл. Фракції, що містили активований білок, об'єднували і концентрували з використанням центрифугального концентратора, як описано вище.

Гель-електрофорез. Препарати концентрованого білка отримували для електрофорезу розбавленням 1:50 в буфері для зразка NuPAGE LDS (Invitrogen), що містив 5 mM DTT як відновник, і нагрівали при 95° протягом 4 хвилин. Зразок наносили в дубльовані доріжки 4-12% NuPAGE гелю разом з стандартами BSA в діапазоні від 0,2 мкг до 2 мкг/доріжку (для отримання стандартної кривої). Застосовували напругу 200 В з використанням SDS-буфера для прогону MOPS (Invitrogen) доти, поки барвник для відстеження не досягав нижньої частини гелю. Гель забарвлювали 0,2% кумасі синім G-250 в 45% метанолі, 10% оцтової кислоти, і барвник видаляли, спочатку короткочасною обробкою 45% метанолом, 10% оцтовою кислотою, а потім тривало 7% оцтовою кислотою, 5% метанолом доти, поки фон не прояснявся. Після видалення барвника гель сканували за допомогою BioRad Fluor-S Multimager. Програмне забезпечення пристрою Quantity One Software v.4.5.2 використовували для отримання величин з віднятим фоновим значенням для смуг забарвленого білка і для отримання стандартної кривої для BSA, яку використовували для обчислення концентрації химерного білка DIG-152 у вихідному розчині.

### ПРИКЛАД 3

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

Інсектицидна активність білка DIG-152 була продемонстрована на видах *Lepidopteran*, включаючи європейський кукурудзяний метелик (ECB; *Ostrinia nubilalis* (Hubner)), Cry1F-стійкий ECB (rECB), кукурудзяну совку (CEW; *Helicoverpa zea* (Boddie)), совку-іпсилон (BCW; *Agrotis ipsilon* (Hufnagel)), совку трав'яну (FAW, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)), стійку до Cry1F FAW (rFAW) і південний кукурудзяний метелик (SWCB, *Diatraea grandiosella*).

Готування зразка і біоаналіз. Препарати тілець включення (нативний повнорозмірний білок або активований трипсином білок) переносили в 10 мм буфер CAPS, pH 10, способами обміну, такими як діаліз або колонки PD-10. Потім зразки розбавляли відповідним чином у 10 мм CAPS pH 10, і всі біоаналізи включали контрольну обробку, що складається з цього буфера, що служила як перевірка фонового рівня відносно смертності або інгібування росту.

Концентрації білка в буфері для біоаналізу оцінювали за допомогою гель-електрофорезу з використанням BSA для одержання стандартної кривої для денситометрії в гелі, що проводили з використанням системи для візуалізації BioRad, як описано вище. Білки в гелевій матриці забарвлювали барвником на основі кумасі синього і перед зчитуванням даних барвник видаляли.

Очищені білки тестували відносно інсектицидної активності в біоаналізах, проведених з новонародженими личинками *Lepidopteran* на штучному раціоні для комах. Личинки ECB, CEW, BCW, FAW і SWCB виводили з яєць, отриманих з колонії, підтримуваної комерційним інсектарієм (Benzon Research Inc., Carlisle, PA). Личинки rECB і rFAW виводили з яєць, зібраних із власних колоній (Dow AgroSciences, Indianapolis, IN).

Біоаналізи проводили в пластмасових лотках з 128 ямками, спеціально призначених для біоаналізів на комах (C-D International, Pitman, NJ). Кожна ямка містила 1,0 мл раціону для множини видів *Lepidoptera* (Southland Products, Lake Village, AR). 40-мкл аліквоту зразка білка доставляли піпеткою на поверхню для харчування розміром 1,5 см<sup>2</sup> у кожній ямці (тобто 26,7 мкл/см<sup>2</sup>). Концентрації в раціоні обчислювали як кількість (нг) білка DIG-152 на квадратний

сантиметр площі поверхні ямки. Оброблені лотки тримали у витяжній шафі доти, поки рідина на поверхні для харчування не упарювалась або не абсорбувалась на їжу.

У межах декількох годин після вилуплення, окремі личинки відбирали за допомогою змоченої кисті з верблюжої вовни і поміщали на оброблену їжу, по одній личинці на ямку. Потім заражені ямки закривали адгезивними аркушами прозорої пластмаси, вентильовали для забезпечення газообміну (C-D International). Лотки для біоаналізу тримали в контрольованих умовах навколишнього середовища [28°, відносна вологість приблизно 40% (RH), 16 год.:8 год. (світло:темрява)] протягом 5 діб, після чого реєстрували загальне число комах, на яких впливали кожним зразком білка, кількість загинувших комах і масу комах, що вижили. Для кожної обробки обчислювали процентну смертність і процентне інгібування росту. Процентне інгібування росту (GI) обчислювали в такий спосіб:

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

де TWIT являє собою загальну масу оброблюваних комах,

TNIT являє собою загальну кількість оброблюваних комах

TWIBC являє собою загальну масу комах при перевірці фонового рівня (контроль з буфером), і

TNIBC являє собою загальну кількість комах при перевірці фонового рівня (контроль з буфером).

GI<sub>50</sub> визначали як концентрацію химерного білка DIG-152 у раціоні, при якій величина %GI складала 50. LC<sub>50</sub> (50% летальна концентрація) реєстрували як концентрацію білка DIG-152 у їжі, при якій 50% тестованих комах знищувалася. Статистичний аналіз (однобічний ANOVA) проводили з використанням програмного забезпечення JMP (SAS, Cary, NC).

У таблиці 3 представлені результати біоаналізів вживання білка DIG-152 на сімох типах протестованих личинок комах.

FAW		rFAW		SWCB		ECB		rECB		CEW		BCW	
GI <sub>50</sub>	LC <sub>50</sub>	GI <sub>50</sub>	LC <sub>50</sub>	GI <sub>50</sub>	LC <sub>50</sub>	GI <sub>50</sub>	LC <sub>50</sub>	GI <sub>50</sub>	LC <sub>50</sub>	GI <sub>50</sub>	LC <sub>50</sub>	GI <sub>50</sub>	LC <sub>50</sub>
38,1	2828,7	78,9	2210,9	<47	>3000	1069,0	>3000	>3000		2689,4	>3000	неактивний	

Ознакою білка DIG-152 за даним винаходом є те, що ріст новонароджених личинок совки трав'яної (*Spodoptera frugiperda*) і вогнівки кукурудзяної південно-західної (*Diatraea grandiosella*) інгібується після вживання білка DIG-152. Крім того, личинки совки трав'яної, котрі є стійкими до інтоксикації Cry1F, є настільки ж чутливими до активності DIG-152, як і личинки совки трав'яної дикого типу.

#### ПРИКЛАД 4

Додаткова інсектицидна активність білка DIG-152, продукованого в *Pseudomonas fluorescens* Інсектицидну активність відносно Lepidopteran білка DIG-152 (не активованого трипсином) далі демонстрували на новонароджених личинках очеретяної вогнівки (SCB; *Diatraea saccharalis*) і стійких до Cry1Ab SCB (rSCB) в експериментах доза-ефект із використанням методик включення в їжу. Тільки включення DIG-152 солюбілізували, м'яким колюванням при 4° протягом 4 год. у 7,5 мл 100 мМ CAPS рН 11, 1 мМ EDTA, куди було додано 200 мкл інгібітору бактеріальних протеаз (Sigma P4865; приготовлений відповідно до інструкцій постачальника). Після центрифугування для осадження нерозчинного матеріалу, вихідну концентрацію білка доводили до 4,0 мг/мл у 100 мМ CAPS, рН 11. Для біоаналізу на комах наготовлювали відповідних обсягів з денним раціоном (Bio-Serv, Frenchtown, NJ) безпосередньо перед розподілом приблизно 0,7 мл їжі в окремі ямки лотків з 128 ямками (Bio-Ba-128, C-D International).

Активованій трипсином білок Cry1Ab (використаний як позитивний контроль інсектицидної активності тестували в діапазоні від 0,03125 мкг до 32 мкг/г їжі (отриманий змішуванням ліофілізованого порошку з відповідними кількостями дистильованої води перед готуванням їжі).

Їжу, отриману з дистильованою водою (порожній контроль, для тестів Cry1Ab) або тільки буфером (100 мМ CAPS рН 11, для тестів DIG-152) використовували як контрольну обробку. У кожну ямку поміщали одну новонароджену личинку *D. saccharalis* (<24 год. після вилуплення) на поверхню для харчування. Після інокуляції личинок ямку накривали вентильованими кришками (C-D International) і лотки для біоаналізу поміщали в камеру штучного клімату при 28°, 50% RH, і світловому періоді 16 год.:8 год. (світло:темрява). На сьому добу після інокуляції реєстрували смертність личинок, масу личинок і кількість личинок, що вижили, що не продемонстрували збільшення маси (<0,1 мг на личинку). Кожну комбінацію ліній комах/концентрації Cry-білка повторювали чотири рази по 16-32 личинок у кожному повторі.

Критерії смертності личинок вимірювали як "реальну" смертність, при якій враховували як загиблих (хворих) личинок, так і личинок, що вижили (малорослих, що не харчуються), що не демонстрували істотного збільшення маси тіла (тобто <0,1 мг на личинку). Реальну смертність личинок при обробці обчислювали з використанням рівняння:

5 Реальна смертність (%)=[TDS/TNIT]×100,

де TDS являє собою загальну кількість загиблих личинок плюс кількість малорослих личинок, і

TNIT являє собою загальну кількість комах при обробці

10 "Реальну" смертність (далі спрощено смертність) кожної лінії *D. saccharalis* коректували по смертності личинок, що спостерігається на раціоні з порожнім контролем на воді для аналізу результатів після обробки Cry1Ab, або на раціоні з обробкою тільки буфером для обробки DIG-152.

Результати експериментів доза-ефект далі аналізували для визначення величини GI<sub>50</sub>, [тобто концентрація білка B.t. у раціоні, при якому величина інгібування росту личинок (%GI) складала 50]. Величину %GI для личинок на раціоні, що містив білок Cry1Ab, обчислювали з використанням формули:

%GI=[TWC-TWT]/TWC×100,

де TWC являє собою загальну масу тіла личинок, яких годували контрольним раціоном на воді, і

20 TWT являє собою загальну масу тіла личинок, яких годували раціоном, обробленим Cry1Ab у той час як для аналізу %GI личинок у результаті вживання білка DIG-152, його обчислювали з використанням формули:

%GI=[TWB-TWT]/TWB×100,

25 де TWB являє собою загальну масу тіла личинок, яких годували контрольним раціоном, обробленим тільки буфером, і

TWT являє собою загальну масу тіла личинок, яких годували раціоном, обробленим DIG-152.

Інгібування росту личинок, що дорівнює 100%, приписували репліці, якщо не було личинок, що мали істотне збільшення маси (<0,1 мг на личинку). Дані інгібування росту аналізували з використанням двостороннього ANOVA з лінією комах і концентрацією Cry-білка як двох основних факторів. Критерії LSMEANS використовували для визначення відмінностей у лікуванні при рівні α=0,05.

Результати біоаналізу включення в раціон на личинках *Diatraea saccharalis* наведені в таблиці 4.

Таблиця 4

Ефект дози на смертність личинок і інгібування росту (% середнє значення±sem) чутливих до Cry1Ab (SCB) і стійкого до Cry1Ab (rSCB) *Diatraea saccharalis*, яких годували раціоном, що містив білки<sup>a</sup> Cry1Ab або DIG-152

Комаха	Білок Cry1Ab				DIG-152			
	Концентрація білка	личинок	Смертність	% GI <sup>d</sup>	Концентрація білка	личинок	Смертність	% GI <sup>e</sup>
SCB	Порожній	126	3,2±1,3 a	---	Порожній	124	10,4±3,2 b	5,9±4,8 a
rSCB	Порожній	128	4,7±2,0 a	---	Порожній	125	4,1±2,5 a	3,1±5,5 a
SCB	Буфер	NT <sup>f</sup>			Буфер	121	10,9±3,9 b	---

Продовження таблиці 4

rSCB	Буфер	NT			Буфер	127	1,6±0,9 a	---
SCB	0,03125	124	38,6±4,8 з	90,7±1,6 <sub>ef</sub>	0,03	126	53,1±2,3 c	69,5±6,5 з
rSCB	0,03125	123	8,3±3,2 ab	-15,9±4,6 <sub>a</sub>	0,03	127	3,2±0,0 a	8,0±5,1 a
SCB	0,125	128	34,3±7,9 з	87,4±2,5 c	0,1	127	88,2±3,5 d	100±0,0 d
rSCB	0,125	126	8,6±2,3 ab	10,0±5,3 <sub>b</sub>	0,1	127	11,8±0,8 b	49,0±3,5 <sub>b</sub>
SCB	0,5	119	75,6±2,9 e	94,3±1,0 <sub>fg</sub>	0,4	130	96,2±1,9 e	100±0,0 d
rSCB	0,5	128	5,5±1,5 a	26,7±3,1 з	0,4	125	91,2±2,0 d	100±0,0 d
SCB	2	125	93,6±2,2 f	100±0,0 g	1,6	122	100±0,0 f	100±0,0 d
rSCB	2	128	14,8±2,7 b	67,5±1,5 <sub>d</sub>	1,6	127	100±0,0 f	100±0,0 d
SCB	8	122	95,9±1,6 fg	100±0,0 g	6,4	125	100±0,0 f	100±0,0 d
rSCB	8	120	40,6±5,1 з	85,2±1,9 <sub>e</sub>	6,4	128	100±0,0 f	100±0,0 d
SCB	32	126	99,2±0,8 g	100±0,0 g	25,6	78	100±0,0 f	100±0,0 d
rSCB	32	128	60,9±5,8 d	90,3±2,2 <sub>ef</sub>	25,6	119	100±0,0 f	100±0,0 d
SCB					102	60	100±0,0 f	100±0,0 d
rSCB					102	126	100±0,0 f	100±0,0 d

<sup>a</sup> Середні величини в колонку для всіх обробок, за якими йдуть зазначена буква, значимо не відрізняються ( $P < 0,05$ ; тест LSMEANS), sem = стандартна помилка середнього значення

<sup>b</sup> мкг білка/г їжі

<sup>c</sup> Показник смертності личинок був таким, як визначено в тексті.

<sup>d</sup> Ці процентні величини обчислювали з використанням формули, описаної в тексті.

<sup>e</sup> Ці процентні величини обчислювали з використанням формули, описаної в тексті.

<sup>f</sup> NT = не тестували

- Аналіз даних. Скоректовані дані дози/смертності потім піддавали пробіт-аналізу для визначення концентрацій білка при обробці, що приводили до величини 50 % смертності ( $LC_{50}$ ), і відповідних 95 % довірчих інтервалів (CI). Обробки, використані для пробіт-аналізу, включали найвищу концентрацію, що приводила до нульової смертності, найнижчу концентрацію, що приводила до 100 % смертності, і всі результати між цими крайніми значеннями. Відношення стійкості обчислювали розподілом величини  $LC_{50}$  лінії rSCB на цю величину для комах SCB. Критерій співвідношення летальних доз використовували для визначення того, чи були відношення стійкості значимими при рівні  $\alpha=0,05$ . Двосторонній ANOVA також використовували для аналізу даних смертності, а потім використовували критерій LSMEANS при  $\alpha=0,05$  для визначення розходжень в обробці. Результати аналізів представлені в таблиці 5.



Таблиця 5

Узагальнення тестів біоаналізу на личинках SCB і rSCB з використанням раціону для комах, у який був включений білок DIG-152 або білок Cry1Ab

	Комаха	протестованих личинок	LC <sub>50</sub> (95 % CI) (мкг/г) <sup>a</sup>	RR <sup>b</sup>
DIG-152	SCB	505	0,03 (0,02-0,03)	6,0 NS
	rSCB	506	0,18 (0,15-0,24)	
Cry1Ab	SCB	744	0,13 (0,08-0,20)	142S
	rSCB	440	18,46 (13,93-26,29)	

<sup>a</sup> Показник смертності личинок визначали так, як описано в тексті.

<sup>b</sup> Відношення стійкості з буквою "S" є значимими, у той час як відношення стійкості з буквами "NS" є незначущими при 5 % рівні, виходячи з тестів летальної дози.

Ознакою білка DIG-152 за даним винаходом є те, що ріст новонароджених личинок очеретяної вогнівки (*Diatraea saccharalis*) інгібується, або личинки знищуються, після вживання білка DIG-152 на рівнях, подібних з рівнями для активованого білка Cry1Ab, що дає ту ж біологічну відповідь. Наступною ознакою білка DIG-152 є те, що личинки *Diatraea saccharalis*, що є стійкими до токсичних ефектів білка Cry1Ab, проте, є чутливими до токсичної дії білка DIG-152.

#### ПРИКЛАД 5

Продуктування поліклональних антитіл кролика і моноклональних антитіл миші, реактивних відносно химерних білків Cry1Ca

Розробляли антитіла для детекції і кількісного визначення білків Cry1Ca і варіантів химерних білків Cry1Ca, наприклад, в екстрактах, отриманих із трансгенних рослин, що продукують білки за даним винаходом. Для охарактеризації антитіл і для детекції білка *B.t.* використовували стандартні способи готування/аналізу імуноблотів і способи ELISA (наприклад, як описано в Coligan et al., 2007 і його доповненнях).

Продуктування поліклональних антитіл. Білковий антиген, використаний для поліклональної імунізації, являв собою укорочений трипсином центральний токсин, отриманий з білка DIG-152, продукowanego в клітинах *P. fluorescens*, як описано в прикладі 2. Крім того, два пептиди, специфічних до сегмента центрального токсину Cry1Ca, кон'югували з гемоціаніном лімфи равлика і використовували як імуногени. Розглянуті пептиди відповідають амінокислотам 436-445 (VQRSGTPFLT; Cry1Ca436; SEQ ID NO: 6) і амінокислотам 591-600 (SEQPLFGAGS; Cry1Ca591; SEQ ID NO: 7) SEQ ID NO: 1. Ці пептидні послідовності ідентифікували як унікальні для Cry1Ca, коли білкову послідовність Cry1Ca порівнювали з послідовностями деяких інших класів Cry1-білків *B.t.* Крім того, очікувалося, що пептиди будуть експонуватися на поверхні нативного білка Cry1Ca.

Імунізація й забір сироватки проводилися стандартними методиками постачальниками на замовлення. Поліклональні антитіла одержували від Covance (Princeton, NJ). Для одержання поліклональних антитіл проти активованого трипсином білка DIG-152 використовували новозеландських білих кроликів. Між імунізаціями й заборами сироваток використовували період часу, що складав 14 діб. Дозування починали з повного ад'юванта Фрейнда, що містили 0,5 мг білка або кон'югованого пептиду. Наступні ін'єкції проводили з неповним ад'ювантом Фрейнда.

Сироватки від двох кроликів поєднували з одержанням однієї партії очищеного за допомогою білка А антитіла (називаного DIG152RPC1), реактивно відносно білка центрального токсину Cry1Ca. Як добре відомо фахівцю в галузі охарактеризації антитіл, поліклональні антитіла, отримані до незміненого білка, звичайно не є високо специфічними і часто виявляють багато епітопів на білку, що імунізує, а також інших споріднених білках. Таким чином, імуноблот-аналіз показав, що DIG152RPC1 детектує інші токсини *B.t.* класу Cry1, зокрема, активовані трипсином Cry1Ab, Cry1Da і Cry1Fa, і активовані хімотрипсином Cry1Be і Cry1Ea. Слід зазначити, що в промислових умовах, культурні рослини можуть продукувати інші білки класу Cry1, і, таким чином, DIG152RPC1 є придатним реагентом для детекції цих білків, включаючи укорочення й інші форми цих білків.

Були розроблені дві специфічних до кон'югованого пептиду партії поліклонального антитіла до Cry1Ca. Для кожного пептиду використовували двох новозеландських білих кроликів і для

- 5 кожного пептиду сироватки поєднували; одержуючи одну партію антитіла проти пептиду для кожного з двох пептидів. Імунізації й забір сироватки проводили стандартними методиками з циклом з 14 діб між імунізаціями й заборами сироватки. Кінцеву партію сироватки піддавали афінному очищенню з відповідним пептидом. Оцінка за допомогою прямого ELISA обох специфічних і пептидам антитіл показала, що антитіло проти пептиду Cry1Ca591 специфічно виявляє Cry1Ca у порівнянні з реакцією з іншими білками класу Cry1, у той час як антитіло проти пептиду Cry1Ca436 не було настільки ж специфічним (таблиця 6).

Таблиця 6

Дані оптичної густини прямого ELISA, отримані для двох специфічних до пептиду Cry1Ca антитіл після реакції з різними антигенами білка Cry1 B.t., представленими в концентрації 1 мкг/мл

	Cry1Ca	Cry1Ad	Cry1Fa	Cry1Be	Cry1Da	Cry2Aa	Cry1Ab	Cry1Ea
Антитіло проти Cry1Ca591	1,36	0,32	0,27	0,27	0,3	0,2	0,51	0,23
Антитіло проти Cry1Ca436	0,39	0,32	0,41	0,42	0,54	0,32	0,81	0,38

- 10 Продукування моноклональних антитіл. Моноклональні антитіла одержували від Open Bio Systems/Thermo Fisher Scientific (Huntsville, AL). Для розробки моноклонального антитіла миші проти Cry1Ca використовували укорочений трипсином центральний токсин, отриманий з білка DIG-152, продукovanого в клітинах *P.fluorescens*, як описано в прикладі 2. Імунізацію і розробку клітинної лінії проводили за допомогою стандартних способів розробки антитіл у клітинній культурі, але не способами продукування за допомогою асцитичних рідин. Моноклональні
- 15 клітинні лінії розробляли за допомогою стандартних методик шляхом злиття клітин селезінки імунізованих мишей із сумісною клітинною лінією міеломи миші ND4.
- Скринінг способом ELISA прямого зв'язування ідентифікував сироватки M4 миші як такі, що мають істотну специфічність до білка Cry1Ca (таблиця 7).

20

Таблиця 7

Кінцеві титри реакції ELISA прямого зв'язування для сироватки M4 миші (імунізованої активованим трипсином Cry1Ca) проти декількох білків класу Cry1)

Антиген	Cry1Ca	Cry1Da	Cry1Ac	Cry1F	Cry1Be	Cry1Ab
Кінцевий титр	312500	62500	500	12500	<100	500

- 25 Усі моноклональні лінії, що походять з M4, тестували за допомогою ELISA прямого зв'язування відносно зв'язування з Cry1Ca, Cry1Da, Cry1Ac, Cry1Fa, Cry1Be і Cry1Ab. Лінії M4-34 і M4-23, що продемонстрували здатність виявляти Cry1Ca [тобто дали високі дані оптичної густини (OD)], і не виявляли інші білки класу Cry1 [тобто дали нульові або дуже низькі дані OD], становлять особливий інтерес (таблиця 8). Моноклональні антитіла з переважної лінії M4-34 називають антитілом DIG152Mab4-34.

Таблиця 8

Дані оптичної густини ELISA прямого зв'язування для моноклональних клітинних ліній, що походять з M4, які прореагували з активованим трипсином білком Cry1Ca-мішень і білками класу Cry1, що не є мішенню

Антиген	Cry1Ca	Cry1Be	Cry1Ac	Cry1F	Cry1Ab	Cry1Da
Лінія M4-34	2,024	0,029	0,105	-0,013	-0,008	0,03
Лінія M4-23	1,799	0,07	0,095	0,061	0,043	0,064

- 30 Таким чином, об'єктом даного винаходу є надання моноклональних антитіл, що специфічно розпізнають укорочений білок Cry1Ca B.t.

## ПРИКЛАД 6

Конструювання кодон-оптимізованої для кукурудзи послідовності, що кодує білок DIG-109

Фахівцю в галузі молекулярної біології рослин буде зрозуміло, що можна конструювати множинну послідовностей ДНК, що кодують одну амінокислотну послідовність. Розповсюдженням способом збільшення експресії кодуєчої області білка, що представляє інтерес, є коректування кодуєчої області, так, щоб її склад кодонів нагадував загальний склад кодонів хазяїна, призначеного для експресії цього гену. Керівництво відносно конструювання і продукування синтетичних генів може бути знайдене, наприклад, у WO 1997/13402 і патенті США № 5380831.

Послідовність ДНК, що має кращі для кукурудзи кодони, моделювали і синтезували для продукування химерного інсектицидного білка DIG-109 у трансгенних однодольних рослинах. Таблиця використання кодонів для кукурудзи (*Zea mays* L.) була обчислена з кодуєщою послідовностей для 706 білка, отриманих з послідовностей, депонованих у GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Середньозважений показник набору кодонів для кукурудзи обчислювали після усунення яких-небудь зайвих кодонів, використовуваних на рівні менше ніж приблизно 10 % від загального використання кодонів для цієї амінокислоти. Середньозважене представлення для кожного кодону обчислювали з використанням формули:

Середньозважений показник  $\% C1 = 1 / (\% C1 + \% C2 + \% C3 + \dots) \times \% C1 \times 100$ ,

де C1 являє собою кодон, що розглядається, і %C2, %C3, і т. д. являють собою середні величини % використання кодонів для інших синонімічних кодонів.

Для встановлення кодон-оптимізованої для кукурудзи послідовності ДНК, що кодує білок DIG-109 з 1164 амінокислот SEQ ID NO: 5, проводили заміни кодонів у нативній послідовності ДНК *cry1Ca*, що кодує сегмент центрального токсину *Cry1Ca*, так, щоб отримана послідовність ДНК мала загальну склад кодонів відповідно до таблиці переважних оптимізованих для кукурудзи кодонів. Аналогічно, проводили заміни кодонів у нативній послідовності ДНК *cry1Ab*, що кодує сегмент протоксину *Cry1Ab* SEQ ID NO: 4, так щоб отримана послідовність ДНК мала загальний склад кодонів відповідно до таблиці переважних оптимізованих для кукурудзи кодонів. Подальші поліпшення послідовностей проводили для усунення небажаних ділянок розпізнавання ферментами рестрикції, потенційних ділянок сплайсингу інтронів рослин, довгих фрагментів залишків А/Т або С/Г, і інших мотивів, що можуть порушувати стабільність РНК, транскрипцію або трансляцію кодуєчої області у клітинах рослин. Інші зміни проводили для внесення бажаних ділянок розпізнавання ферментом рестрикції і для усунення довгих внутрішніх відкритих рамок зчитування (рамки, що відрізняються від +1). Усі ці зміни проводили в межах збереження приблизно переважного для кукурудзи складу кодонів. Повна кодон-оптимізована для кукурудзи послідовність, що кодує білок DIG-109, представлена як SEQ ID NO: 8. Синтез фрагмента ДНК, що відповідає SEQ ID NO: 8, проводився комерційним постачальником (DNA2.0, Menlo Park, CA).

## ПРИКЛАД 7

Конструювання векторів для трансформації рослин, що містять експресовані в рослині гени, що кодують білки DIG-109

Традиційно для трансформації однодольних рослин-хазяїнів використовують супербінарну систему *Agrobacterium* (Japan Tobacco, Tokyo, JP). У супербінарній системі використовується човниковий плазмідний вектор pSB11, що містить послідовності для правого прикордонного повтору (RB) Т-ДНК і лівого прикордонного повтору (LB) Т-ДНК, розділені ділянкою множинного клонування. Похідне pSB11 (назване pDAB7691) було отримане стандартними способами клонування ДНК. Плазмідна pDAB7691 містить оптимізовану для кукурудзи послідовність, що кодує, DIG-109 (CDS; тобто SEQ ID NO: 8) під транскрипційним контролем промотору убіквітину 1 кукурудзи зі зв'язаним з ним інтроном 1 (патент США № 5510474), і 3'-нетрансльовану область (3' UTR) *Per5* кукурудзи (патент США № 7179902). Крім того, pDAB7691 містить ген селективного маркера рослин, що містить CDS DSM2 Dow AgroSciences (WO 2008/070845 A2) під транскрипційним контролем промотору актину 1 рису зі зв'язаним з ним інтроном 1 (патент США № 5641876) і 3' UTR ліпази кукурудзи (патент США № 7179902). Фізичне розташування компонентів Т-області pDAB7691 зручно ілюструється в такий спосіб:

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

Друге похідне pSB11 (що називається pDAB100276) одержували стандартними способами клонування ДНК. Плазмідна pDAB 100276 містить оптимізовану для кукурудзи кодуєчу послідовність DIG-109 (CDS; тобто SEQ ID NO: 8) під транскрипційним контролем промотору убіквітину 1 кукурудзи і 3'UTR *Per5* кукурудзи. Крім того, pDAB100276 містить ген селективного маркера рослин, що містить CDS AAD1 Dow AgroSciences (патентна заявка США № 20090093366), під транскрипційним контролем промотору убіквітину 1 кукурудзи зі зв'язаним з

ним інтроном 1, і 3'UTR ліпази кукурудзи. Фізичне розташування компонентів Т-області рDAB100276 зручно ілюструється в такий спосіб:

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

- 5 Для підготовки до трансформації *Agrobacterium*, клітини *Escherichia coli*, клонуючий штам DH5а, що містять плазмиду рDAB7691 або плазмиду рDAB100276, вирощували при 37° протягом ночі на середовищі з LB-агаром (г/л: триптон Bacto, 10; дріжджовий екстракт Bacto, 5; NaCl, 10; агар, 15), що містив спектиноміцин (100 мкг/мл). Клітини штаму DH5, що містили плазмиду рRK2013, що мобілізує кон'югацію, вирощували на агарі LB, що містив канаміцин (50 мкг/мл).
- 10 Після інкубації планшети поміщали на 4° для очікування приступності *Agrobacterium tumefaciens* штаму LBA4404, що містив плазмиду рSB1.

#### ПРИКЛАД 8

Трансформація *Agrobacterium* для отримання супербінарних векторів

- 15 Для трансформації однодольних рослин-хазяїнів зручно використовувати супербінарну систему *Agrobacterium*, для якої використовуються *Agrobacterium tumefaciens* штаму LBA4404, що містять плазмиду рSB1. Технології конструювання і перевірки супербінарних векторів є загальноновизнаними, як представлено в керівництві по використанню для рSB1 (Japan Tobacco). Для отримання і перевірки супербінарної плазмиди рDAS5162, яка являє собою об'єднану плазмиду, що містить плазмиди рSB1 і рDAB7691, і супербінарної плазмиди рDAS5848, яка являє
- 20 собою об'єднану плазмиду, що містить плазмиди рSB1 і рDAB 100276, використовували стандартні мікробіологічні і молекулярно-біологічні способи.

#### ПРИКЛАД 9

Продуктування білка DIG-109 в рослини кукурудзи

- 25 Опосередковувана *Agrobacterium* трансформація кукурудзи. Насіння кукурудзи від схрещування Hi-II F1 (Armstrong et al., 1991) висівало в горщики об'ємом 5 галонів (19 л), що містили суміш 95 % безґрунтового середовища для росту Metro-Mix 360 (Sun Gro Horticulture, Bellevue, WA) і 5 % ґрунту глина/суглинок. Рослини вирощували в теплиці з використанням комбінації натрієвих ламп високого тиску і ламп галогенідів металів зі світловим періодом 16 год. світло: 8 год. темрява. Контрольовані споріднені запилення проводили для отримання
- 30 зародків F2 для трансформації. Качани кукурудзи збирали приблизно через 8-10 діб після запилення, коли розмір незрілих зародків складав від 1,0 мм до 2,0 мм.

- Інфікування і кокультивування. Качани кукурудзи очищали, і їх поверхню стерилізували розтиранням з рідким милом, зануренням в 20 % комерційний відбілювач (що містить 5 % гіпохлорит натрію) протягом приблизно 20 хвилин, потім промиванням три рази стерильною
- 35 водою. Суспензію клітин *Agrobacterium tumefaciens*, що містили рDAS5162, супербінарний вектор, що містить ген, що кодує білок DIG-109 і містить ген селективного маркера рослин DSM2, отримували перенесенням 1 або 2 петель бактерій [що вирощуються протягом 2-3 діб при 28° на твердому середовищі YEP (г/л: дріжджовий екстракт Bacto, 10; пептон Bacto, 10; NaCl, 5; агар, 15), 100, що містила мг/л спектиноміцину, 10 мг/л тетрацикліну і 250 мг/л стрептоміцину] в 5 мл рідкого середовища для інфікування [мінімальне середовище LS (Linsmaier and Skoog, 1965), вітаміни N6 (Chu et al., 1975), 1,5 мг/л 2,4-дихлорфеноксіоцтової
- 40 кислоти (2,4-D), 68,5 г/л сахарози, 36,0 г/л глюкози, 6 мМ L-проліну, рН 5,2], 100, що містила мкМ ацетосірингон.

- Альтернативно приготувляли суспензію клітин *Agrobacterium tumefaciens*, що містила рDAS5848, супербінарний вектор, що містить ген, що кодує білок DIG-109 і містить ген селективного маркера рослин AAD-1, шляхом перенесення 1 або 2 петель бактерій, вирощених як описано вище, в 5 мл рідкого середовища для інфікування, що містила від 100 до 200 мкМ ацетосірингон.

- В обох випадках розчин струшували до досягнення однорідної суспензії і концентрацію доводили до кінцевої густини 200 одиниць Клетт з використанням колориметра Klett-Summerson з фіолетовим фільтром (для трансформацій рDAS5162), або до оптичної густини 1,2 при 550 нм (для трансформацій рDAS5848). Незрілі ембріони виділяли безпосередньо в мікроцентрифугальній пробірці, що містила 2 мл середовища для інфікування. Середовище видаляли і замінювали 1 мл розчину *Agrobacterium* і розчин з *Agrobacterium*/зародок інкубували
- 55 протягом 5-10 хвилин при кімнатній температурі. Потім зародки переносили в середовище для кокультивування [мінімальне середовище LS, вітаміни N6, 1,5 мг/л 2,4-D, 30,0 г/л сахарози, 6 мМ L-пролін, 0,85 мг/л AgNO<sub>3</sub>, 2,8 г/л геланової камеді (PhytoTechnology Laboratories, Lenexa, KS), рН 5,8], що містила 100 мкМ ацетосірингон (для трансформантів рDAS5162) або 100-200, що містила мкМ ацетосірингон (для трансформантів рDAS5848), і кокультивували протягом 3-4
- 60 діб при 20° в темряві.

Після кокультивування ембріони переносили в середовище спокою, що містила солі MS і вітаміни, 6 мМ L-пролін, 100 мг/л міоїнозиту, 500 мг/л MES, 30 г/л сахарози, 1,5 мг/л 2,4-D, 0,85 мг/л AgNO<sub>3</sub>, 250 мг/л цефотаксиму, 2,8 г/л геланової камеді, рН 5,8. Приблизно через 7 діб ембріони переносили в те ж середовище, доповнене 3 мг/л біолафосу (для трансформантів рDAS5162) або доповнену 100 нМ галоксифопом (для трансформантів рDAS5848) (середовище для селекції). Трансформовані ізоляти ідентифікували приблизно через 8 тижнів і об'єднували шляхом перенесення в свіже селективне середовище з 2-тижневими інтервалами для регенерації і аналізу.

Регенерація і продукування насіння. Для регенерації культури переносили в середовище для індукції "28" (солі MS і вітаміни, 30 г/л сахарози, 5 мг/л бензиламінопурину, 0,25 мг/л 2,4-D, 250 мг/л цефотаксиму, 2,5 г/л геланової камеді, рН 5,7), доповнену 3 мг/л біолафосу (для трансформантів рDAS5162) або доповнену 100 мМ галоксифопом (для трансформантів рDAS5848). Інкубацію проводили протягом 1 тижня в умовах низького освітлення (14 мкЕм<sup>-2</sup>с<sup>-1</sup>), потім протягом 1 тижня в умовах високого освітлення (приблизно 89 мкЕм<sup>-2</sup>с<sup>-1</sup>). Потім тканини переносили в середовище для регенерації "36" (те ж, що і середовище для індукції, за винятком відсутності регуляторів росту рослин). Коли проростки мали довжину 3-5 см, їх переносили в скляні пробірки для культивування, солі, що містили середовище SHGA [(і вітаміни Schenk and Hildebrandt (1972); PhytoTechnologies Labr.), 1,0 г/л міоїнозиту, 10 г/л сахарози і 2,0 г/л геланової камеді, рН 5,8] для забезпечення подальшого росту і розвитку пагонів і коріння. Рослини переносили в ту ж ґрунтову суміш, яка описана раніше, і вирощували до цвітіння в теплиці. Проводили контрольоване запилення для отримання насіння.

Фахівцям в галузі трансформації кукурудзи буде зрозуміло, що для трансформації кукурудзи і для селекції трансформованих рослин доступні інші способи, коли використовують інші експресовані в рослинах гени селективних маркерів (наприклад, гени стійкості до гербіцидів).

#### ПРИКЛАД 10

Біохімічний аналіз і біоаналізи на комах рослин кукурудзи, що продукують білок DIG-109

Продукування білка DIG-109 в трансгенних рослинах кукурудзи досліджували в білках, екстрагованих з листя молодих рослин (покоління T0). Два диски з листя діаметром 6 мм вміщували в пробірку для зразка з коробки з 96 пробірками з глибокими ямками (Costar каталожний номер 3957) і заморожували при -80° до дня аналізу. У цей час в кожну (заморожену) пробірку додавали два 4,5-мм покритих цинком BB Daisy<sup>TM</sup>, разом з 200 мкл буфера для екстракції, що складався з PBS (фосфатно-сольовий буфер; Fisher, каталожний номер BP665-1) і 0,05 % Tween 20. Кожну пробірку закривали і коробку вміщували в кульовий млин (Kleco<sup>TM</sup> 4-96 Pulverizer; Garcia Manufacturing, Visalia, CA) при максимальних параметрах на три хвилини. Подрібнені зразки центрифугували протягом 5 хвилин при 2500×g і супернатант, що містив розчинні білки, використовували в імуноаналізах.

Імуноблот-аналізи екстрагованих з листя кукурудзи білків показали, що поліклональне антитіло DIG152RPC1 не реагує перехресно з білками, екстрагованими з листя нетрансгенних рослин. В екстрактах рослин, трансформованих рDAS5162, за допомогою антитіла DIG152RPC1 було виявлено декілька типів білків. Як правило, виявлялося щонайменше чотири основні імунореактивні смуги. У багатьох випадках спостерігали тип білка, що часто зустрічається, який мігрував з рухливістю, що відповідає білку розміром приблизно 70 кДа. Інші основні типи білків мали молекулярні розміри, оцінені як 65 кДа, які були такими ж, як і розміри пептиду, отриманого розщепленням DIG-152 трипсином, з Dpf108 в прикладі 2), 60 кДа і 55 кДа. Коли екстракти листя трансгенної кукурудзи з рDAS5162 досліджували за допомогою імуноблоттингу з використанням поліклонального антитіла проти DIG-152, в деяких рослинах типи розміром 60 кДа і 55 кДа були найбільш поширеними. У разі будь-якого антитіла було виявлено, що тільки мало рослин мають повнорозмірний білок DIG-109 (130 кДа), і, коли він був виявлений, він був представлений як неосновний тип.

Очевидно, що, хоч трансген, введений в кукурудзу шляхом трансформації рDAS5162, кодує повнорозмірний білок DIG-109, протеолітична активність в клітинах кукурудзи здійснює процесинг білка, що з'являється, у велику кількість стабільних типів з меншою молекулярною масою.

Токсичність листя для комах, зібраних з незалежно вибраних трансгенних рослин кукурудзи, трансформованих конструкцією рDAS5162, тестували *in vitro* з використанням новонароджених личинок совки трав'яної (FAW, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)) і стійких до Cry1F личинок FAW (rFAW). Яйця FAW отримували з комерційного інсектарію (Benzon), і яйця rFAW були отримані з власної популяції (Dow AgroSciences). Зразки сегментів листя відбирали для біоаналізів на комах з вирощених в теплиці рослин T0 приблизно через 2 тижні після перенесення рослин з лабораторії в теплицю. Два фрагменти листя від кожної рослини (кожний

приблизно 1 квадратний дюйм (6,5 см<sup>2</sup>)) вміщували в окремі ямки лотка з 32 ямками (CD International) зверху приблизно 3 мл застиглому 2 % агару. Яйця виводили на раціоні *Lepidopteran* для множини видів (Southland Products) і відбирали новонароджених личинок у віці менше 24 годин.

Приблизно 10 личинок на сегмент листа обережно вміщували в кожну ямку з використанням кисті з верблюжої вовни. Заражені лотки закривали перфорованими кришками, що надаються з лотками, потім тримали при 28°, 40 % RH, 16 год. світло:8 год. темрява на протязі трьох діб. Після завершення тесту реєстрували процентне пошкодження (% DAM) кожного фрагмента листа. Показники пошкодження усереднювали і використали для визначення того, які рослини мали найменше пошкодження від кожного типу протестованих комах. Тести повторювали декілька разів для всіх комах.

Дані аналізували з використанням статистичного програмного забезпечення JMP (SAS, Cary, NC), що усереднює показники % DAM для кожної рослини, для кожного типу комах. Для односторонніх аналізів ANOVA використовували модель "приведення у відповідність Y по X". При необхідності використовували розбиття середніх значень Тьюкі-Крамера для аналізу значущих відмінностей серед середніх показників %DAM для кожної обробки. Порівняння проводили з показниками %DAM, отриманими від контрольних рослин схожого віку. Рослини позитивного контролю вирощували з насіння комерційного гібриду *Herculex I*<sup>TM</sup>, який продукує токсин Cry1Fa B.t. Негативні контролю (тобто нетрансформовані рослини) були представлені лініями Hill і B104, і ізолією *Herculex I*<sup>TM</sup> (Cry батько гібрида *Herculex I*<sup>TM</sup>, що не містить).

На фіг. 1 узагальнено представлені результати, отримані в таких тестах з біоаналізами на комах. Несподіваним відкриттям є те, що існує позитивна кореляція між продукуванням DIG-109 в трансгенному листі і показником %DAM. Для FAW, F=35,3; d.f.=1,33; P<0,0001; r<sup>2</sup>=0,52, і для rFAW, F=25,3; d.f.=1,33; P<0,0001; r<sup>2</sup>=0,43. Крім того, несподіваним і новим є відкриття, що личинки совки трав'яної, які є стійкими до інтоксикації токсином Cry1Fa B.t., проте, інгібуються при харчуванні з токсином DIG-109 B.t.

Зрозуміло, що аналогічним чином можна тестувати інших шкідливих комах для кукурудзи. Ці паразити включають, але не обмежуються ними: *Agromyza parvicornis* (моль-пістрянка кукурудзяна), *Agrotis ipsilon* (совка-іпсилон), *Anticarsia gemmatilis* (гусениця оксамитових бобів), *Diatraea grandiosella* (вогнівка кукурудзяна південно-західна), *Diatraea saccharalis* (очеретяна вогнівка), *Elasmopalpus lignosellus* (малий кукурудзяний стебловий метелик), *Helicoverpa zea* (совка бавовняна), *Heliothis virescens*, (листовійка тютюну), *Ostrinia nubilalis* (вогнівка кукурудзяна європейська), стійкі до Cry1F *O. nubilalis*, *Plutella xylostella* (моль капустяна), стійкі до Cry 1 P. *xylostella*, *Spodoptera exigua* (совка мала) і *Trichoplusia ni* (совка капустяна).

Трансгенні рослини кукурудзи, трансформовані pDAS5848 (покоління T0) також досліджували біоаналізом на комах і імуноаналізами. Кількість білка DIG-109 в екстрактах листя кількісно визначали з використанням комерційно доступного набору для детекції Cry1C ELISA (Envirologix<sup>TM</sup>, Portland, MA; каталожний номер AP007), і виявлений рівень білка DIG-109 виражали в мільйонних частинках (м. ч.; 1 м. ч. відповідає 1 нг білка DIG-109 на мг загального розчинного білка в екстракті). Пошкодження при харчуванні FAW і rFAW кодифікували таким чином: 0 = немає пошкодження або невеликі мітки годування у вигляді отвору з шпилькову голівку, 1 = від 25 % до 50 % листа з'їдене, і 2 = практично весь лист з'їдений або листа не залишилося. Захищена рослина являє собою рослину, показник пошкодження якої становить 0,67 або нижче.

Дані в таблиці 9 демонструють, що існує позитивна кореляція між присутністю типів білка DIG-109, що виявляються в ELISA в рослинах T0, і контролем у вигляді пошкодження при харчуванні, зробленим личинками совки трав'яної в біоаналізах *in vitro*. Рослина з найвищим виявленим рівнем білка DIG-109 (рослина 5848-005.4) мала найнижчий показник пошкодження листя при годуванні. Листя від рослин з більш низькими рівнями білка, що виявляється, DIG-109 в діапазоні від 190 до 230 м. ч. також піддавалося меншому пошкодженню при годуванні, ніж спостерігалось у випадку листя з рослин негативного контролю (тобто нетрансформовані контролю B104 і Hill), які мали середні показники пошкодження 1,7 і 1,8. У всьому дослідженому листі pDAS5848, переважні виявлені типи білка DIG-109, включали дублети пептидів приблизного розміру 60 кДа і 55 кДа.

Таблиця 9

Рівні білка DIG-109 в екстрактах листя трансформованої pDAS5848 трансгенної кукурудзи і зниження пошкодження при годуванні від совки трав'яної

Ідентифікатор рослини	DIG-109 м. ч.	Пошкодження 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 (Кількість протестованих)	DIG-109 м. ч.	Пошкодження 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)

<sup>a</sup> NA - Не застосовно;

<sup>b</sup> SD = Стандартне відхилення середнього значення

Таким чином, ознакою даного винаходу є те, що білок DIG-109 при продукуванні в рослинах кукурудзи, надає рослинам стійкості до пошкодження при годуванні личинок совки трав'яної і стійких до Cry1F личинок совки трав'яної.

#### 5 ПРИКЛАД 11

Молекулярний аналіз рослин кукурудзи, що продукують білок DIG-109

Екстракція тканин. Геномну ДНК виділяли з листя трансформованих pDAS5162 і pDAS5848 трансгенних рослин T0. Зразки тканин збирали в 96-ямкові планшети для збору (Qiagen, каталожний номер 19560) і ліофілізували протягом 2 діб. Руйнування тканин проводили за допомогою подрібнювача тканин Клекско™ і вольфрамових гранул, по суті як описано в прикладі 10. Для аналізів зондами (НР), що гідролізуються, геномну ДНК виділяли у високопродуктивному форматі з використанням набору для рослин DNeasy™ 96 Plant kit (Qiagen) згідно з протоколом, запропонованим виготівником. Для саузерн-блот-аналізу геномну ДНК виділяли у високопродуктивному форматі з використанням модифікацій протоколу екстракції ДНК СТАВ від Murray and Thompson (1980). Murray, M. G, Thompson, W. F. (1980) Rapid isolation of high molecular plant DNA. Nucl. Acids Res. 8:4321-4325.

Екстраговану за допомогою будь-якого з протоколів ДНК кількісно визначали за допомогою набору Quant-IT Pico Green DNA assay kit (Molecular Probes, Invitrogen, каталожний номер P7589). У цій методиці 88 невідомих зразків аналізували в 96-ямковому форматі, де перший стовпчик містив 2-кратні серійно розведені стандарти в діапазоні від 20 нг/мкл до 1,25 нг/мкл, плюс пустий зразок з буфером, пустий зразок з водою і пуста ямка. Потім зразки ДНК, що тестуються, 5 розведення від 1:5 до 1:40 (залежно від очікуваної вихідної концентрації) змішували з відповідним чином розбавленим забуференим інтеркалюючим барвником і інкубували в реакційній суміші об'ємом 105 мкл протягом десяти хвилин в темряві. Після інкубації флуоресценцію реєстрували з використанням пристрою для зчитування планшетів Synergy2 (BioTek, Winooski, VT). Концентрацію геномної ДНК оцінювали з стандартної кривої, обчисленої після корекції по фоновій флуоресценції.

Отримання саузерн-блотів. Десять мкг геномної ДНК з десяти трансформованих pDAS5848 ліній кукурудзи розщеплювали ферментом рестрикції Bsm I протягом ночі при 37°. Фрагменти розщеплених зразків ДНК розділяли гелі-електрофорезом через 1 % агарозні гелі (SAS, Cary, NC) і переносили на нейлонову мембрану (INVC00010 IMMOBILON-NY+, Millipore). Саузерн-блот гібридизували з міченим дигоксигеніном (набір для синтезу зондів DIG PCR Probe Synthesis Kit; Roche Applied Science, Indianapolis, IN) ампліфікованим способом ПЛР зондом, що відповідає основам 251-630 SEQ ID NO: 8. Гібридизацію і детекцію проводили згідно з протоколами постачальника. ДНК з трансформованих ліній pDAS5848, для якої було підтверджено саузерн-блоттингом, що вона містить одну копію кодуєчого DIG-109, використовували як еталонні контролю для аналізу числа піків за допомогою кількісної ПЛР.

Аналізи за допомогою зонда, що гідролізується. Визначення числа піків трансгену шляхом аналізу за допомогою зонда (HP), що гідролізується, проводили способом ПЛР в реальному часі з використанням системи LightCycler480 (Roche Applied Science). Для розробки аналізу для детекції генів селективних маркерів DSM2 і AAD-1, еталонних генів GLP1 (гермін-подібний білок кукурудзи 1; реєстраційний номер GenBank AY394010) і INV (інвертаза кукурудзи; реєстраційний номер GenBank U16123), і гену, що кодує DIG-109, використовували програмне забезпечення LightCycler® Probe Design Software v 2.0. Для ампліфікації приготували основну суміш із зондами LightCycler®480 в 1× кінцевій концентрації в 10 об'ємах мультиплексної реакційної суміші, що містила 0,4 мкМ кожного праймера і 0,2 мкМ кожного зонду (послідовності олігонуклеотидів і флуоресцентних міток наведені в таблиці 10). Проводили двостадійну реакцію ампліфікації з подовженням при 56° протягом 40 секунд з отриманням даних про флуоресценцію. Всі зразки аналізували в трьох примірниках і усереднені величини Ct використовували для визначення категорії кожного зразка.

Таблиця 10

Олігонуклеотиди, використані в аналізах ПЛР з зондом (HP), що гідролізується

Назва	Послідовність	Функція	SEQ ID NO:
ZGP3S	CCT GCTCC ACT ACC AGT AC AA	HP PCR	SEQ ID NO:9
ZGP3A	GTCCAAGAAGGTGACCTTCTC	HP PCR	SEQ ID NO:10
TQZGP3	6F AM-AGATCACCGACTTTGCGCTCTTT-BHQ1	Зонд 6Fam	SEQ ID NO: 11
DSM2S	CCTCCCTCTTTGACGCC	HP PCR	SEQ ID NO: 12
DSM2A	AGCCACATCCCAGTAACGA	HP PCR	SEQ ID NO: 13
DSM2FQ	CY5-CAGCCCAATGAGGCATGAGC-BHQ2	Зонд CY5	SEQ ID NO:14
CRY1CaS	TGTGTTGAGUAGGAGGTC	HP PCR	SEQ ID NO: 15
CRY1CaA	CCTTCTCTTCGTAAGCCG	HP PCR	SEQ ID NO:16
Cry1Ca	6FAM-TCAAGAGGAGTACGAGGGCACTT-BHQ1	Зонд-6FAM	SEQ ID NO:17
AAD1S	TGTTCCGGTTCCCTCTACCAA	HP PCR	SEQ ID NO: 18
AAD1A	CAACATCCATCACCTTGACTGA	HP PCR	SEQ ID NO:19
AAD1a	CACAGAACCGTCGCTTCAGCAACA	Зонд	SEQ ID NO:20
Y1CAS	TGTGTTGAGGAGGAGGTC	HP PCR	SEQ ID NO:21
Y1CAR	CCTTCTCTTCGTAAGCCG	HP PCR	SEQ ID NO:22
F6Y1CA	6FAM-TCAAGAGGAGTACGAGGGCACTT-BHQ1	Зонд 6FAM	SEQ ID NO:23
IVF-Taq	TGGCGGACGACGACTTGT	HP PCR	SEQ ID NO:24
rVR-Taq	AAAGTTTGGAGGCTGCCGT	HP PCR	SEQ ID NO:25
IV-Зонд	CY5-CGAGCAGACCGCCGTGTACTTCTACC-BHQ2	Зонд CY5	SEQ ID NO:26

<sup>a</sup>Зонд AAD1 являє собою зонд TaqMan® MGB, що поставляється ABI (Invitrogen)

Аналіз HP для DSM2 проводили на 36 трансформованих рDAS5162 лініях. Проста подія вбудовування, що визначається як 1-2 копії гену, була виявлена в 95 % (34 події) зразків.

Аналіз HP для AAD-1 і DIG-109 проводили на 13 трансформованих рDAS5848 лініях. Проста подія вбудовування була виявлена в 93 % (12 ліній) зразків для AAD-1 і 54 % (7 ліній) для DIG-109. 54 % ліній (7 ліній) містили прості події вбудовування для обох генів.

#### ПРИКЛАД 12

Біохімічна охарактеризація укорочених типів DIG-109 з кукурудзи

Більш детальний аналіз проводили на білках, екстрагованих з листя рослини кукурудзи T0, трансформованої рDAS5162. Імуноблотинг екстракту білків, оброблений поліклональним антитілом DIG152RPC1, виявив присутність п'яти типів білків DIG-109. Виходячи з відносної рухливості цих пептидів, були привласнені наступні позначення: Тип 1 відповідає повнорозмірному білку DIG-109 (130 кДа), як указано в SEQ ID NO: 5; тип 2 відповідає продукту DIG-109 масою 70 кДа. Пептид з тією ж рухливістю зустрічається в екстрактах бактеріальних клітин, що експресують ген, що кодує повнорозмірний білок DIG-152. Отримання цих фрагментів масою приблизно 70 кДа вказує на присутність переважаючих ділянок розщеплення на повнорозмірному білку, який піддається впливу протеаз, що зустрічаються як в кукурудзі, так і в бактеріях. Тип 3 відповідає по розміру розщепленому трипсином пептиду DIG-152, як отримують в прикладі 2, з розміром приблизно 65 кДа; Тип 4 відповідає укороченому продукту DIG-109 розміром приблизно 60 кДа; Тип 5 відповідає укороченому продукту DIG-109 масою приблизно



55 кДа. Пептиди масою приблизно 70 кДа, 60 кДа і 55 кДа, крім того, охарактеризовані в прикладі 14.

#### ПРИКЛАД 13

Конструювання генів, що кодують варіанти DIG-109 і делецію  $\alpha$ -спіралей домену I

Для поліпшення інсектицидних властивостей білка DIG-109, проводять серійні покрокові делеції, кожна з яких видаляє частину N-кінця білка DIG-109, як описано в SEQ ID NO: 5. Делеції видаляють частину або всю  $\alpha$ -спіраль 1 і частину або всю  $\alpha$ -спіраль 2 в домені I, при підтримці структурної цілісності з  $\alpha$ -спіралі 3 по  $\alpha$ -спіраль 7. Автори винаходу встановили початок і кінець  $\alpha$ -спіралі 1,  $\alpha$ -спіралі 2A,  $\alpha$ -спіралі 2B,  $\alpha$ -спіралі 3 і  $\alpha$ -спіралі 4, і положення спейсерних областей між ними в домені I центрального токсину Cry1Ca шляхом порівняння амінокислотної послідовності центрального токсину Cry1Ca з амінокислотою послідовністю білка Cry1Aa (реєстраційний номер GenBank № AAA22353), для якого структура відома [номер білкової структури в базі даних RGSB: CRYIA(A); Grochulski et al., (1995)]. Ці положення описані в таблиці 1.

При конструюванні кодуючих послідовностей для варіантів з N-кінцевою делецією, що ініціює кодон ATG, що кодує метіонін, вбудовують на 5'-кінці нуклеотидної послідовності, призначеної для експресії варіанту з делецією. Для послідовностей, призначених для застосування в трансгенних рослинах, може бути корисним дотримуватися "правила N-кінця" Varshavsky (1997). Воно свідчить, що деякі амінокислоти можуть брати участь в нестабільності і деградації білка в еукаріотичних клітинах, коли вони експонуються як N-кінцевий залишок білка. Наприклад, дані, зібрані шляхом спостережень в клітинах дріжджів і ссавців вказують на те, що N-кінцевими дестабілізуючими амінокислотами є F, L, W, Y, R, K, H, I, N, Q, D, E і можливо P. В той час як особливості механізмів деградації білків можуть відрізнятися в деякій мірі між організмами, консервативність типу N-кінцевих дестабілізуючих амінокислот, вказаних вище, вказує на те, що в клітинах рослин можуть функціонувати схожі механізми. Наприклад, Worley et al. (1998) відкрили, що в рослинах правило N-кінця включає основні і ароматичні залишки. Можливо, що протеолітичне розщеплення протеазами рослин поблизу початку  $\alpha$ -спіралі 3 інсектицидних білків B.t., що розглядаються, може експонувати дестабілізуючу N-кінцеву амінокислоту. Такий процесинг може націлювати розщеплені білки на швидке розщеплення і обмежувати накопичення інсектицидних білків B.t. до рівнів, недостатніх для ефективної боротьби з комахами. Таким чином, для варіантів з N-кінцевою делецією, які починаються з однієї з дестабілізуючих амінокислот, заявники вважають за краще додати кодон, який визначає амінокислоту G (гліцин), між метіоніном ініціації трансляції і дестабілізуючою амінокислотою.

Делеції вносять таким чином. У цьому прикладі використовується кодон-оптимізована для кукурудзи повнорозмірна послідовність ДНК з 3492 п. о. (тобто SEQ ID NO: 8), що кодує повнорозмірний химерний білок DIG-109 з 1164 амінокислот (тобто SEQ ID NO: 5) для ілюстрації принципів конструювання 65 конкретних варіантів. Фахівцеві в даній галузі буде зрозуміло, що інші послідовності ДНК, що кодують весь або N-кінцеву частину сегмента центрального токсину Cry1Ca, можна аналогічно піддавати маніпулюванню для досягнення бажаного результату. Для розробки першого варіанту кодуючої послідовності з делецією, всі з основ, які кодують  $\alpha$ -спіраль 1, включаючи кодон залишку лізину поблизу початку  $\alpha$ -спіралі 2A (тобто видалення основ 1-153 SEQ ID NO: 8 видаляє кодуючу послідовність для амінокислот 1-51 SEQ ID NO: 5). Повторне вбудовування кодону ініціації трансляції ATG (метіоніну) на початку (тобто перед кодоном, що відповідає амінокислоті 52 повнорозмірного білка) забезпечує варіант кодуючої послідовності з делецією, що містить відкриту рамку зчитування з 3342 основ, яка кодує варіант білка DIG-109 з делецією, що містить 1114 амінокислот (тобто метіонін плюс амінокислоти 52-1164 повнорозмірного білка DIG-109). Серійні покрокові делеції, які видаляють додаткові кодони для однієї амінокислоти, що відповідає залишкам 52-91 повнорозмірного білка DIG-109 SEQ ID NO: 5, забезпечують варіанти, в яких відсутня частина або вся  $\alpha$ -спіраль 2A і  $\alpha$ -спіраль 2B. Таким чином, другий сконструйований варіант кодуючої послідовності з делецією вимагає усунення основ 1-156 SEQ ID NO: 8, тим самим усуваючи кодуючу послідовність для амінокислот 1-52. Відновлення функціональної відкритої рамки зчитування знову проводять шляхом повторного вбудовування кодону ініціації трансляції для метіоніну на початку частини, що залишилася, що кодує послідовність, таким чином, забезпечуючи другий варіант кодуючої послідовності з делецією, що має відкриту рамку зчитування з 3339 основ, що кодує варіант білка DIG-109 з делецією, що містить 1113 амінокислот (тобто метіонін плюс амінокислоти 53-1164 повнорозмірного білка DIG-109). Останній сконструйований варіант кодуючої послідовності з делецією вимагає видалення основ 1-273 SEQ ID NO: 8, таким чином, видалення кодуючої послідовності для амінокислот 1-91, і, після повторного внесення кодону ініціації трансляції для метіоніну, отримання варіанту з делецією, що кодує послідовність, що має відкриту рамку

- зчитування з 3222 основ, яка кодує варіант з делецією для білка DIG-109 з 1074 амінокислот (тобто метіонін плюс амінокислоти 92-1164 повнорозмірного білка DIG-109). Як проілюстровано, після видалення послідовності делеції, до початку іншої кодуєчої послідовності додають ініціюючий кодон метіоніну для відновлення функціональної відкритої рамки зчитування. Також як описано, додатковий кодон для гліцину додають між кодоном метіоніну і кодоном амінокислоти, що визначає нестабільність, в тому випадку, коли видалення послідовності делеції залишає експоновану на N-кінці іншої частини повнорозмірного білка одну з амінокислот, що визначає нестабільність, наведених вище.

У таблиці 11 описані конкретні варіанти, сконструйовані згідно з стратегією, описаною вище.

Таблиця 11

Варіанти послідовності повнорозмірного білка DIG-109 SEQ ID NO:5 з делецією

Варіант DIG-109 з делецією	Залишки, додані на NH <sub>2</sub> -кінці	Залишки SEQ ID NO: 5	Варіант DIG-109 з делецією	Залишки, додані на NH <sub>2</sub> -кінці	Залишки SEQ ID NO: 5
1	M	52-1164	34	M	75-1164
2	MG	52-1164	35	M	76-1164
3	M	53-1164	36	MG	76-1164
4	M	54-1164	37	M	77-1164
5	M	55-1164	38	MG	77-1164
6	M	56-1164	39	M	78-1164
7	M	57-1164	40	M	79-1164
8	MG	57-1164	41	MG	79-1164
9	M	58-1164	42	M	80-1164
10	M	59-1164	43	MG	80-1164
11	M	60-1164	44	M	81-1164
12	M	61-1164	45	MG	81-1164
13	MG	61-1164	46	M	82-1164
14	M	62-1164	47	MG	82-1164
15	MG	62-1164	48	M	83-1164
16	M	63-1164	49	MG	83-1164
17	MG	63-1164	50	M	84-1164
18	M	64-1164	51	MG	84-1164
19	M	65-1164	52	M	85-1164
20	MG	65-1164	53	MG	85-1164
21	M	66-1164	54	M	86-1164
22	M	67-1164	55	MG	86-1164
23	M	68-1164	56	M	87-1164
24	M	69-1164	57	MG	87-1164
25	M	70-1164	58	M	88-1164
26	M	71-1164	59	MG	88-1164 (DIG-110)
27	MG	71-1164	60	M	89-1164
28	M	72-1164	61	M	90-1164
29	MG	72-1164	62	MG	90-1164
30	M	73-1164	63	M	91-1164
31	MG	73-1164	64	MG	91-1164
32	M	74-1164	65	M	92-1164
33	MG	74-1164	---	---	---

Додаткові нуклеїнові кислоти, що кодують варіанти білка DIG-109, описані в таблиці 11, сконструйовані згідно із загальними принципами синтетичних генів, призначених для експресії рослин, як описано в прикладі 6.

## ПРИКЛАД 14

Конструювання додаткових варіантів білка DIG-109

Як описано в прикладі 12, первинний продукт трансляції, що містить повнорозмірний білок DIG-109, процесується в різній мірі в рослинах, і один з продуктів відповідає по розміру укороченому трипсином пептиду центрального токсину масою 65 кДа. Цей центральний токсин вважається активованою формою токсину, яка зв'язується з рецепторами в середній кишці

5 комах і приводить до токсичності.

Трипсини являють собою ендopeптидази, які розщеплюють білки на С-кінці залишків аргініну (R) або лізину (K). Таким чином, пептид DIG-109 масою 65 кДа, що спостерігається в кукурудзі, може відповідати фрагменту масою 65 кДа, отриманому розщепленням після залишків R28 і R628 SEQ ID NO: 5 трипсин-подібною протеазою кукурудзи. Потрібно зазначити, що цей пептид

10 центрального токсину масою 65 кДа може містити амінокислоти 28-619 сегмента центрального токсину Cry1Ca SEQ ID NO: 1 і амінокислоти 1-9 сегмента протоксину Cry1Ab SEQ ID NO: 4. Однак потрібно розуміти, що точний С-кінець продукту укорочення розміром 65 кДа або інших продуктів укорочення, що спостерігаються в трансгенній кукурудзі і що обговорюються нижче, не був експериментально визначений. Таким чином, конструкції варіантів білків DIG-109,

15 розглянутих в даному описі, є ілюстративними і в об'єм цього винаходу входять інші укорочені варіанти білка DIG-109, які зберігають інсектицидну активність.

Було визначено, що концентрація пептидних продуктів DIG-109, присутніх в більшості трансгенних рослин кукурудзи, становить приблизно 200 м.д. Таким чином, для очищення з

20 тканин рослин вручну доступно недостатньо матеріалу для визначення амінокислотних послідовностей пептидів DIG-109. З використанням протеаз для розщеплення повнорозмірного білка DIG-152 отримували заміщувальні пептиди, які схожі по розміру з укороченими продуктами, виявленими в кукурудзі.

Ідентифікація пептиду масою 70 кДа. Профіль SDS-PAGE для повнорозмірного DIG-152, продукованого як тільки включення в *Pseudomonas fluorescens* (Pf) виявив значну кількість

25 білка, що має уявний молекулярний розмір 70 кДа і який був відносно стабільний при обробці трипсином. Після очищення від солюбілізованих повнорозмірних тілець включення DIG-152 за допомогою комбінації аніонообмінної і ексклюзійної хроматографії, цей пептид мав ідентичну рухливість на SDS-PAGE з пептидом DIG-109 масою приблизно 70 кДа, виявленим в екстрактах з трансгенних рослин кукурудзи. Обидва пептиди розпізнавалися поліклональним антитілом,

30 направленим проти DIG-152, і аналіз амінокислотної послідовності продукованого пептиду ідентифікував MDNNP як N-кінцеву послідовність (залишки 1-5 DIG-109, SEQ ID NO: 5). Таким чином, пептид масою 70 кДа містить нативний N-кінець повнорозмірного білка DIG-109. Розщеплення трипсином на передбачуваній С-кінцевій ділянці розщеплення центрального токсину (R628), при збереженні незмінними перших 28 залишків, які звичайно видаляються з

35 білка DIG-109 розщепленням трипсином по R28 з отриманням центрального токсину, приводить до пептиду (що складається із залишків 1-628 DIG-109) з обчисленим розміром 70,5 кДа, практично ідентичного уявній молекулярній масі пептидів DIG-152, виділених з тілець включення Pf і виявлених в трансгенних рослинах кукурудзи. Таким чином, було передбачено, що білок 70 кДа відповідає укороченому пептиду DIG-109, що складається з амінокислот 1-628.

Ідентифікація пептидів 60 кДа і 55 кДа. Було виявлено, що трансформовані pDAS5162 і pDAS5848 рослини кукурудзи також продукують білки, що походять з DIG-109, з рухливістю, що

40 відповідає 60 кДа і 55 кДа. Пептиди цих розмірів продукували експериментально, спочатку шляхом розщеплення повнорозмірного білка DIG-152 трипсином, а потім шляхом обробки розщеплених трипсином продуктів хімотрипсином. [Обробка повнорозмірного білка DIG-152 хімотрипсином окремо приводила до множини укорочених продуктів трохи більше 60 кДа.] Розщеплені трипсином/хімотрипсином продукти приготували разом, а потім очищали аніонообмінною хроматографією, а потім ексклюзійною хроматографією Superose 200. На стадії ексклюзійної хроматографії спостерігали три основних піки, що елюються в сукупних об'ємах

45 12,5 мл, 18,3 мл і 20 мл. Перший основний пік (12,5 мл) містив високомолекулярні (від 700 кДа до 1000 кДа) агрегати білків DIG-152, і третій основний пік (20 мл) містив надлишок хімотрипсину. Фракція 12,5 мл також містила смуги, що мають рухливість, яка відповідала продуктам DIG-152 масою 65 кДа і 60 кДа; таким чином, виявилось, що олігомеризація або агрегація пептидів, що походять з DIG-152, є оборотною.

Білки піку, що відповідає 18,3 мл, разом з білком DIG-152, розщепленим тільки трипсином,

55 аналізували SDS-PAGE у відновлювальних і денатуруючих умовах. Ці білки містили два основних типи з рухливістю, що відповідає 60 кДа і 55 кДа. Також були виявлені білки менших розмірів 14 кДа і 9 кДа і вони були ідентифіковані як хімотрипсин, який, очевидно, був зв'язаний з пептидами DIG-152 в процесі очищення. Крім того, спостерігали високомолекулярну смугу з рухливістю, що відповідає 240 кДа. Білки в цій смузі розпізнавалися антитілом DIG152RPC1, що

вказувало на те, що вони, найбільш ймовірно, являли собою олігомер (тетрамер) продуктів розщеплення DIG-152.

Білки в екстрактах з рослин, які продукують DIG-109, розділяли SDS-PAGE, а потім піддавали електроблотингу на нітроцелюлозу, разом із зразками очищеного розщепленого трипсином білка DIG-152 і білка DIG-152, розщепленого трипсином, а потім хімотрипсином. Смуги, що відповідали пептидам DIG-109 або DIG-152, візуалізували з використанням посиленої хемілюмінесценції, що створюється комбінацією первинного антитіла кролика DIG152RPC1 і вторинного міченого пероксидазою хрому антитіла проти антитіл кролика. Оброблений трипсином зразок DIG-152 виявляв одну смугу з рухливістю приблизно 65 кДа. Екстракт з рослин, які продукують пептиди DIG-109, виявляв чотири смуги: одну з рухливістю, що відповідає 130 кДа (відображає повнорозмірний білок DIG-109), смуги з рухливістю, що відповідає 60 кДа і 55 кДа, і смугу з рухливістю, що відповідає приблизно 20 кДа. Продукт розщеплення DIG-109 масою 20 кДа далі не охарактеризували. Білок DIG-152, який був оброблений трипсином, а потім хімотрипсином, виявляв дві смуги, які мали рухливість, що спостерігаються в екстрактах рослин. Також була високомолекулярна смуга з рухливістю, що відповідає приблизно 240 кДа, в зразку білка DIG-152, який був оброблений трипсином, а потім хімотрипсином.

Таким чином, основні продукти розщеплення DIG-109, які продукуються в кукурудзі, відповідають по розміру двом продуктам, які отримують, коли повнорозмірний білок DIG-152 спочатку розщеплюють трипсином, потім далі розщеплюють хімотрипсином. Було визначено, що перші п'ять N-кінцевих залишків з продукованих ферментативно пептидів масою 60 кДа і 55 кДа, являють собою DAFLV (відповідають залишкам 74-78 білка DIG-109, SEQ ID NO: 5). Потрібно зазначити, що таке розщеплення повнорозмірного білка DIG-109 після W73 приводить до видалення  $\alpha$ -спіралі 1,  $\alpha$ -спіралі 2A і частини  $\alpha$ -спіралі 2B (таблиця 1).

Крім того, потрібно зазначити, що, оскільки як пептиди масою 60 кДа, так і пептиди масою 55 кДа мають однакову N-кінцеву послідовність, сегмент масою 5 кДа, який віддаляється при продукуванні меншого (55 кДа) пептиду, повинен відповідати подальшому процесингу на C-кінці пептиду масою 60 кДа.

Передбачувані координати амінокислот п'яти основних пептидів DIG-109, продукованих в трансформованих рDAS5162 і рDAS5848 рослинах кукурудзи, узагальнено представлені в таблиці 12. Точні C-кінці цих типів не були визначені. Потрібно зазначити, що розщеплення трипсином типу 4 масою 60 кДа після R568 привело б до пептиду масою 56 кДа, (тобто близької до маси типу 5).

Таблиця 12

Передбачувана ідентифікація процесованих пептидів, що походять з білків DIG-109 і DIG-152.

Приблизні C-кінцеві положення встановлювали з приблизною ММ на гелях. Кількості амінокислот є включними

Пептид DIG-109 і DIG-152	Залишки SEQ ID NO: 5
Тип 1 (130 кДа)	1-1164 (обчислена ММ 131,7)
Тип 2 (70 кДа)	1-628 (обчислена ММ 70,59)
Тип 3 (отримана обробкою трипсином центральна частина; 65 кДа)	28-628 (600 залишків, обчислена ММ 67,4)
Тип 4 (60 кДа)	74-628 (555 залишків, обчислена ММ 62,7)
Тип 5 (55 кДа)	74-568 (495 залишків, обчислена ММ 56,1)

35

Конструювання варіантів DIG-109 з укороченням. Як указано в таблиці 1, з  $\alpha$ -спіралі 1 по  $\alpha$ -спіраль 4 центрального токсину DIG-109 знаходяться в межах перших 145 амінокислот білка DIG-109. Розщеплення в першій потенційній ділянці на N-кінці центрального токсину DIG-109 (R87 в DIG-109; R59 в центральному токсині) видалило б 59 амінокислот з центральної частини DIG-109, і привело б до білка, що має молекулярну масу 61,02 кДа з видаленими  $\alpha$ -спіраллю 1,  $\alpha$ -спіраллю 2A і  $\alpha$ -спіраллю 2B. Видалення  $\alpha$ -спіралі 1 Cry1Ab залучено до забезпечення того, що білок мине зв'язування з рецептором кадгерину, що приводить до утворення олігомерної

40

структури препори перед вбудовуванням в клітинні мембрани середньої кишки, і в кінцевому результаті приводить до утворення пори. Аналогічно з цими дослідженнями, передбачено, що видалення N-кінцевої частини укороченої трипсином центральної частини DIG-109, що приводить до втрати  $\alpha$ -спіралі 1, є необхідною стадією для забезпечення утворення олігомерів і для зв'язування з вторинним рецептором амінопептидази N, що приводить до утворення функціональної пори. Таким чином, розщеплення білка DIG-109 в рослинах може привести до пептиду токсину DIG-109, який при вживанні комахами минає необхідність в зв'язуванні рецептора кадгерину. Було показано, що такий ефект приводить до подолання стійкості до інтоксикації білком Bt у комах, що мають мутантні білки рецептора кадгерину.

Пептиди меншого розміру (60 кДа і 55 кДа), знайдені в трансгенних по pDAS5162 і pDAS5848 рослинах кукурудзи, можуть відповідати продуктам подальшого розщеплення трипсин-подібною протеазою. Оскільки ці пептиди тільки на від 5 кДа до 10 кДа менше, ніж центральний пептид 65 кДа, таке подальше розщеплення видалило б всього менше ніж приблизно 80 залишків з будь-якого з кінців центрального токсину. У межах перших 130 залишків з N-кінця білка DIG-109, потенційні ділянки розщеплення трипсином розташовані на R28 (R-1 центрального токсину), R87 (R59 центрального токсину), R93 (R65 центрального токсину), K115 (K87 центрального токсину), K122 (K94 центрального токсину), R127 (R99 центрального токсину) і R129 (R101 центрального токсину). У межах останніх 100 амінокислот C-кінцевого центрального токсину, потенційні ділянки розщеплення трипсином розташовані на R530 (R502 центрального токсину), R533 (R505 центрального токсину), K557 (K529 центрального токсину), R568 (R540 центрального токсину), R571 (R543 центрального токсину), R582 (R554 центрального токсину) і K610 (K582 центрального токсину).

З використанням положень вказаних вище ділянок розщеплення протеазою як орієнтир, конструювали послідовності ДНК, що походить з оптимізованої для кукурудзи кодуєчої послідовності DIG-109, представленої в SEQ ID NO: 8, щоб вони кодували генетично укорочені варіанти білка DIG-109. Також для цих конструкцій використовували вказівки по додаванню 5'-кінцевих кодонів метіоніну і гліцину, щоб вони починали укорочені кодуєчі області, як описано в прикладі 13. Перший такий варіант здійснення DIG-110, представлений як SEQ ID NO: 27, містить амінокислоти 88-1164 білка DIG-109 з N-кінцевою вставкою метіоніну і гліцину. Оптимізована для кукурудзи послідовність ДНК, що кодує DIG-110, представлена як SEQ ID NO: 28. Другий варіант здійснення, DIG-111, представлений як SEQ ID NO: 29, містить амінокислоти 88-628 білка DIG-109 з N-кінцевою вставкою метіоніну і гліцину. Оптимізована для кукурудзи послідовність ДНК, що кодує DIG-111, представлена як SEQ ID NO: 30. Третій варіант здійснення, DIG-112, представлений як SEQ ID NO: 31, містить амінокислоти 123-1164 білка DIG-109 з N-кінцевою вставкою метіоніну і гліцину. Оптимізована для кукурудзи послідовність ДНК, що кодує DIG-112, представлена як SEQ ID NO: 32. Четвертий варіант здійснення, DIG-113, представлений як SEQ ID NO: 33, містить амінокислоти 123-628 білка DIG-109 з N-кінцевою вставкою метіоніну і гліцину. Оптимізована для кукурудзи послідовність ДНК, що кодує DIG-113, представлена як SEQ ID NO: 34. П'ятий варіант здійснення, DIG-114, описаний як SEQ ID NO: 35, містить амінокислоти 1-582 білка DIG-109. Оптимізована для кукурудзи послідовність ДНК, що кодує DIG-114, описана як SEQ ID NO: 36.

Потрібно зазначити, що білки DIG-110 і DIG-112 включають сегмент протоксину Cry1Ab, представлений в SEQ ID NO: 4. Вважають, що цей C-кінцевий сегмент протоксину може функціонувати в деяких випадках, стабілізуючи білок в рослині або роблячи його більш розчинним. Розщеплення в ділянці трипсину R543 в DIG-110, таким чином, що видаляє велику частину сегмента протоксину, привело б до пептиду з обчисленим розміром 61,2 кДа, який у високій мірі близький до розміру укороченого пептиду DIG-109 масою 60 кДа, що спостерігається в трансформованих pDAS5162 і pDAS5848 рослинах кукурудзи. Білок DIG-111 (який позбавлений всього сегмента протоксину Cry1Ab, за винятком перших 9 амінокислот) містить сегмент DIG-110, який був би результатом такого розщеплення (тобто амінокислоти 1-543 DIG-110; обчислений розмір 61,2 кДа).

Аналогічно, розщеплення в аналогічній ділянці R508 DIG-112 привело б до пептиду з обчисленим розміром 57,2 кДа, який у високій мірі близький розміру пептиду DIG-109 масою 55 кДа, що спостерігається в трансформованих pDAS5162 і pDAS5848 рослинах кукурудзи. Білок DIG-113 (який позбавлений всього сегмента протоксину Cry1Ab, за винятком перших 9 амінокислот) містить сегмент DIG-112, який був би результатом такого розщеплення (тобто амінокислоти 1-508 DIG-112; обчислений розмір 57,2 кДа).

Білок DIG-114 зберігає амінокислоти 1-28 білка DIG-109 (ці залишки можуть ферментативно віддалятися в клітинах рослин або в середній кишці комах) і завершується потенційною ділянкою розщеплення трипсином на R582 білка DIG-109. Таким чином, цей варіант DIG-109

може існувати як білок масою 65,7 кДа, або як пептид масою 62,6 кДа, залежно від того, чи видалені N-кінцеві 28 амінокислот *in vivo*.

Можна конструювати додаткові оптимізовані для кукурудзи кодуючі послідовності, щоб вони кодували інші варіанти білка DIG-109, згідно з принципами, описаними в даному описі.

#### 5 ПРИКЛАД 15

Конструювання експресуючих плазмід, що кодують варіанти білків DIG-109 і DIG-109 і експресія в *Pseudomonas*

Для конструювання експресуючих конструкцій *Pseudomonas fluorescens* (Pf), модифікованих для продукування білка DIG-109 або білка DIG-110, DIG-111, DIG-112, DIG-113 або DIG-114 (в сукупності званих варіантами білків DIG-109) використовували стандартні способи клонування [як описано, наприклад, в Sambrook et al., (1989) і Ausubel et al., (1995), і їх доповненнях]. Продукування білка проводили в *Pseudomonas fluorescens* штаму MB214 (похідне штаму MB101; *P. fluorescens* біовару I), що має інсерцію модифікованого *lac*-оперона, як описано в патенті США № 5169760. Основна стратегія клонування включала субклонування фрагмента ДНК, що кодує варіант білка DIG-109 або DIG-109, в плазмиду рDOW1169, за допомогою чого його вміщували під контроль експресії промотора P<sub>tac</sub> і термінатора rrnBT1T2 з плазмиди рKK223-3 (PL Pharmacia, Milwaukee, WI). рDOW1169 являє собою плазмиду середнього числа піків з ориджином реплікації RSF1010, геном *purF* і ділянкою зв'язування рибосом, попередньою ділянкою розпізнавання ферментами рестрикції, в які можна вбудовувати фрагменти ДНК, що містять кодуючі області білків (патентна заявка США № 20080193974). Експресуючу плазмиду трансформували електропорацією в DC454 (близький до дикого типу штам *P. fluorescens*, що має мутації *A<sub>purF</sub>* і *Isc:lacIQ1*), або його похідні, виділяли в середовищі з гідролізатом сої SOC і висівали на селективне середовище (агар з глюкозою M9, позбавлений урацилу, Sambrook et al., вище). Докладний опис мікробіологічних маніпуляцій доступний в Squires et al., (2004), патентній заявці США № 20060008877, патентній заявці США № 20080193974 і патентній заявці США № 20080058262, включеній в даний опис як посилання. Колонії спочатку піддавали скринінгу способом ПЛР, а потім позитивні колонії аналізували рестрикційним розщепленням плазмідної ДНК *mini*prep. Плазмідну ДНК вибраних клонів, що містили вставки, секвенували на замовлення в комерційній компанії, що здійснює секвенування, такий як MWG Biotech (Huntsville, AL). Дані про послідовність отримували і аналізували з використанням програмного забезпечення Sequencher™ (Gene Codes Corp., Ann Arbor, MI).

Аналіз росту і експресії у обертових флаконах. Продукування білка DIG-109 або варіантів білка DIG-109 для охарактеризації і біоаналізу на комах проводили за допомогою вирощених у обертових флаконах штамів *P. fluorescens*, що містили відповідні експресуючі плазмиди. Продукування білка DIG-109 або варіантів білка DIG-109 направлялось промотором P<sub>tac</sub> і його проводили, як описано раніше в патенті США № 5527883. Експресію індукували додаванням ізопропіл-*P*-D-1-тіогалактопіранозиду (IPTG) після первинної інкубації протягом 24 годин при 30° при коливанні. Взяття зразків культури проводили під час індукції і в різні моменти часу після індукції. Щільність клітин вимірювали по оптичній густині при 600 нм (OD<sub>600</sub>). У кожний момент часу взяття зразка клітинну щільність зразків доводили до OD<sub>600</sub>=20 і аліквоти об'ємом 1 мл центрифугували при 14000×g протягом п'яти хвилин. Клітинні осадки заморожували при -80°.

#### ПРИКЛАД 16

Фракціонування клітин і аналіз SDS-PAGE зразків у обертових колбах відносно продукування *Pseudomonas* DIG-109 і варіантів білків DIG-109

Розчинні і нерозчинні фракції із зразків клітинного осаду з обертових флаконів отримували з використанням розчину для екстракції бактеріального білка EasyLyse™ (EPICENTRE® Biotechnologies, Madison, WI). Використовували способи і вказівки, описані в прикладі 2.

#### ПРИКЛАД 17

Інсектицидна активність варіантів білків DIG-109, продукованих в *Pseudomonas fluorescens* Інсектицидна активність варіантів білків DIG-109 продемонстрована на видах *Lepidopteran*, включаючи європейського кукурудзяного метелика (ECB; *Ostrinia nubilalis* (Hubner)), стійкого до Cry1F ECB (rECB), кукурудзяної совки (CEW; *Helicoverpa zea* (Boddie)), совки-інсиглон (BCW; *Agrotis ipsilon* (Hufnagel)), совки трав'яної (FAW, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)), стійкої до Cry1F FAW (rFAW), південного кукурудзяного метелика (SWCB, *Diatraea grandiosella*), очеретяної вогнівки (SCB; *Diatraea saccharalis*) і стійкої до Cry1Ab SCB (rSCB).

Слідували способам, вказівкам і аналізу даних, представленим в прикладі 3 і прикладі 4.

#### ПРИКЛАД 18

Конструювання векторів для трансформації рослин, що містять гени, що експресуються в рослині, що кодують варіанти білків DIG-109

Для трансформації однодольних рослин-хазяїнів зручно використовувати супербінарну систему *Agrobacterium* (Japan Tobacco, Токуо, JP). Конструювання експресуючих векторів для рослин, і створення супербінарних плазмід і їх перевірку проводять способами, описаними в прикладі 7 і прикладі 8. Фізичне розташування компонентів Т-ДНК в похідному плазміді рSB11 зручно ілюструється таким чином:

RB>промотор Ubi1 кукурудзи:CDS варіанту DIG-109: 3'UTR Per5 кукурудзи> промотор Act1  
рису: CDS DSM2: 3'UTR Lip кукурудзи >LB, або

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

#### ПРИКЛАД 19

Продуктування варіантів білка DIG-109 в рослини кукурудзи

Опосередковувана *Agrobacterium* трансформація кукурудзи. Трансгенні рослини кукурудзи, які продукують варіанти білків DIG-109, отримують способами, описаними в прикладі 9.

Фахівцям в галузі трансформації кукурудзи буде зрозуміло, що для трансформації кукурудзи і для селекції трансформованих рослин доступні інші способи, коли використовують інші гени селективних маркерів, що експресуються в рослинах (наприклад, гени стійкості до гербіцидів).

#### ПРИКЛАД 20

Біохімічний і молекулярний аналіз і біоаналіз на комахах трансгенних рослин кукурудзи, що експресують гени, які кодують варіанти білка DIG-109

Біохімічну охарактеризацію варіантів білків DIG-109, що продукуються трансгенними рослинами кукурудзи, які містять і експресують гени, що кодують варіанти білка DIG-109, проводять способами і з використанням реагентів згідно з прикладом 10 і прикладом 12. Аналіз трансгенів для генів, що кодують варіанти білка DIG-109, проводять згідно зі способами і з використанням реагентів, описаних в прикладі 11. Біоаналіз на комахах фрагментів листя, отриманих з трансгенних рослин кукурудзи, які містять і експресують гени, що кодують варіанти білка DIG-109, проводять способами, описаними в прикладі 10.

## СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Dow AgroSciences  
Narva, Ken  
Hey, Tim  
Sheets, Joel  
Larrinua, Iggy  
Burton, Stephanie

<120> Укорочений CrylCa

<130> IDM 68342

<160> 36

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 619

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Що походять з CrylCa3

<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  
610 615

<210> 2

<211> 545

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Що походять з Cry1Ab

&lt;400&gt; 2

Phe Glu Ala Glu Ser Asp Leu Glu Arg Ala Gln Lys Ala Val Asn Ala  
1 5 10 15

Leu Phe Thr Ser Ser Asn Gln Ile Gly Leu Lys Thr Asp Val Thr Asp  
20 25 30

Tyr His Ile Asp Arg Val Ser Asn Leu Val Glu Cys Leu Ser Asp Glu  
35 40 45

Phe Cys Leu Asp Glu Lys Lys Glu Leu Ser Glu Lys Val Lys His Ala  
50 55 60

Lys Arg Leu Ser Asp Glu Arg Asn Leu Leu Gln Asp Pro Asn Phe Arg  
65 70 75 80

Gly Ile Asn Arg Gln Leu Asp Arg Gly Trp Arg Gly Ser Thr Asp Ile  
85 90 95

Thr Ile Gln Gly Gly Asp Asp Val Phe Lys Glu Asn Tyr Val Thr Leu  
100 105 110

Leu Gly Thr Phe Asp Glu Cys Tyr Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln Lys Ile  
115 120 125

Asp Glu Ser Lys Leu Lys Ala Tyr Thr Arg Tyr Gln Leu Arg Gly Tyr  
130 135 140

Ile Glu Asp Ser Gln Asp Leu Glu Ile Tyr Leu Ile Arg Tyr Asn Ala  
145 150 155 160

Lys His Glu Thr Val Asn Val Pro Gly Thr Gly Ser Leu Trp Pro Leu  
165 170 175

Ser Ala Pro Ser Pro Ile Gly Lys Cys Ala His His Ser His His Phe  
180 185 190

Ser Leu Asp Ile Asp Val Gly Cys Thr Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly  
195 200 205

Val Trp Val Ile Phe Lys Ile Lys Thr Gln Asp Gly His Ala Arg Leu  
210 215 220

Gly Asn Leu Glu Phe Leu Glu Glu Lys Pro Leu Val Gly Glu Ala Leu  
225 230 235 240

Ala Arg Val Lys Arg Ala Glu Lys Lys Trp Arg Asp Lys Arg Glu Lys  
245 250 255

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

Leu Glu Tyr Phe Pro Glu Thr Asp Lys Val Trp Ile Glu Ile Gly Glu  
515 520 525

Thr Glu Gly Thr Phe Ile Val Asp Ser Val Glu Leu Leu Leu Met Glu  
530 535 540

Glu  
545

<210> 3  
<211> 1164  
<212> БІЛОК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Химерний білок DIG-152

<400> 3

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

Ser Asn Pro Glu 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> 4  
 <211> 545  
 <212> БІЛЛОК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Що походять з Cry1Ab

<400> 4

Leu Glu Ala Glu Ser Asp Leu Glu Arg Ala Gln Lys Ala Val Asn Ala  
 1 5 10 15

Leu Phe Thr Ser Ser Asn Gln Ile Gly Leu Lys Thr Asp Val Thr Asp  
 20 25 30

Tyr His Ile Asp Arg Val Ser Asn Leu Val Glu Cys Leu Ser Asp Glu  
 35 40 45

Phe Cys Leu Asp Glu Lys Lys Glu Leu Ser Glu Lys Val Lys His Ala  
 50 55 60

Lys Arg Leu Ser Asp Glu Arg Asn Leu Leu Gln Asp Pro Asn Phe Arg  
 65 70 75 80

Gly Ile Asn Arg Gln Leu Asp Arg Gly Trp Arg Gly Ser Thr Asp Ile  
 85 90 95

Thr Ile Gln Gly Gly Asp Asp Val Phe Lys Glu Asn Tyr Val Thr Leu  
 100 105 110

Leu Gly Thr Phe Asp Glu Cys Tyr Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln Lys Ile  
 115 120 125

Asp Glu Ser Lys Leu Lys Ala Tyr Thr Arg Tyr Gln Leu Arg Gly Tyr  
 130 135 140

Ile Glu Asp Ser Gln Asp Leu Glu Ile Tyr Leu Ile Arg Tyr Asn Ala  
 145 150 155 160

Lys His Glu Thr Val Asn Val Pro Gly Thr Gly Ser Leu Trp Pro Leu  
 165 170 175

Ser Ala Pro Ser Pro Ile Gly Lys Cys Ala His His Ser His His Phe  
 180 185 190

Ser Leu Asp Ile Asp Val Gly Cys Thr Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly  
 195 200 205

Val Trp Val Ile Phe Lys Ile Lys Thr Gln Asp Gly His Ala Arg Leu  
 210 215 220

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

Lys Ala Tyr Thr Asp Gly Arg Arg Asp Asn Pro Cys Glu Ser Asn Arg  
485 490 495

Gly Tyr Gly Asp Tyr Thr Pro Leu Pro Ala Gly Tyr Val Thr Lys Glu  
500 505 510

Leu Glu Tyr Phe Pro Glu Thr Asp Lys Val Trp Ile Glu Ile Gly Glu  
515 520 525

Thr Glu Gly Thr Phe Ile Val Asp Ser Val Glu Leu Leu Leu Met Glu  
530 535 540

Glu  
545

<210> 5  
<211> 1164  
<212> БІЛОК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Химерний білок DIG-109

<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  
145 150 155 160

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  
 705 710 715 720  
 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> 6  
<211> 10  
<212> БІЛОК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> імуногенний пептид

<400> 6

Val Gln Arg Ser Gly Thr Pro Phe Leu Thr  
1 5 10

<210> 7  
<211> 10  
<212> БІЛОК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> імуногенний пептид

<400> 7

Ser Glu Gln Pro Leu Phe Gly Ala Gly Ser  
1 5 10

<210> 8  
<211> 3492  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Оптимізована для кукурудзи кодуюча область DIG-109

<400> 8

atggataaca accccaacat taacgagtgc atcccgatca actgcctctc gaatccagaa	60
gaagtgcctct tggatggcga gaggatttcg actggcaaca gctccatcga catttccttc	120
tccttggttc agttccttgt gtctaacttc gtccctggcg gtggcttctt tgttggcctt	180
atcgacttcg tctggggaat tgcgggaccc tccagtgagg atgcgtttct ggtgcagata	240
gagcagctga tcaacgagag gatcgctgag ttccgcgagaa atgctgcaat cgccaacctt	300
gaagggcttg gcaacaactt caacatctac gtggaggcgt tcaaggagtg ggaagaggac	360
cctaagaatc cagcgaccag aacgagggtt atagatcggt tccgcatect cgatggcctt	420
ttggagaggg acatcccgag ctccgcatt tcgggatttg aggttctctt gctctcagtc	480
tacgtcaag ctgctaattt gcattctggc atcttgaggg attcagtcatt ctttggcgaa	540
cgctgggggtc ttacgactat caacgtgaac gagaactaca atcggttgat tcgggcacata	600

gacgagtatg cagaccactg tgctaacacc tacaataggg gtctgaacaa tctgccaaag	660
tcaacgtatc aagactggat aacctacaat aggetcagac gggacctcac tctcacctg	720
ctggacatag ctgccttctt tccgaactac gacaaccgga gatatactat tcaaccctgt	780
ggtcagctca ctgcgaggt ctacaccgat cccctcatca acttcaatcc ccagctgcaa	840
tgggtcgcac agctgccac cttcaatgtg atggaaaact cagcgatccg gaatccccat	900
ctgtttgaca tacttaacaa cctcactatc ttcaccgatt ggttttcagt tggacgcaac	960
ttctactggg gagggcacag agtgatttca agcctcattg gaggagggaa cattacatcg	1020
cctatctatg gaaggaggc caaccaagag ccaccaaggt ctttcacctt caacggtcg	1080
gtgttcagaa cacttagcaa tcccacattg cgcttgctgc aacagccgtg gccagacca	1140
ccattcaatc tgaggggagt ggaggggtgtg gagttctcga cgcctacaaa ctccctttacg	1200
tacagaggca gagggacagt ggactcactg acagaactcc cacctgagga caactctgtt	1260
cctccgaggg agggctactc gcaccggctt tgccatgcc ccttcgtcca gaggtctggc	1320
acgccttttc tgaccactgg ggttgctctt agctggactc accgctcagc gacgtgacc	1380
aacacaatcg acccagagag gatcaatcag atccctctgg tgaagggtt tcgcgtttgg	1440
gggtggcacia gogtgatcac cggacctggg ttcactgggtg gggatatact cagacgcaat	1500
acgtttggcg atttcgtgag ccttcaagtc aacatcaatt ccccaatcac ccagagatat	1560
cggctccgct tcagatacgc ctcatccaga gacgcaaggg tcacgtcctt tactggagca	1620
gccagcaccg gagtcggagg ccaagttagc gtcaacatgc cgttgacagaa aacgatggaa	1680
atcggtgaaa acctcaccag cagaaccttt cgtatacag atttcagcaa cctttctctc	1740
ttcagagcca atccggacat aatcggcata tccgagcagc ccttgttcgg tgctgggtcc	1800
atctctctctg gcgagctgta catcgacaag attgagatca ttctcgcaga tgcgactctc	1860
gaggctgaat cggatcttga aagggcacag aaggcagtca acgctctctt caccagctca	1920
aatcagattg gccttaagac cgatgttact gactatcata tcgacagagt ttctaacctt	1980
gtcgagtgc tctccgacga gttctgtctc gacgaaaaga aggaactctc cgagaaagt	2040
aagcacgcga aacgcctctc ggatgaacgg aacttgctgc aagatccgaa cttcagaggc	2100
atcaatcgcc agttggatag aggctggagg ggatcaaccg acataaccat tcaagggtgg	2160
gatgatgtgt tcaaggaaaa ctacgtgaca ttgctgggca ccttcgacga gtgctatccc	2220
acgtatctct atcagaagat tgacgagtcc aagctcaaag cctacacacg ctatcagctc	2280
agaggctaca ttgaggactc tcaagacctc gaaatctact tgatcagata caacgccaa	2340
cacgagacgg tgaacgtccc tgggactggg tcaactgtggc cactgtcggc accctcgcca	2400
atcggaaagt gcgctacca cagccaccac ttctcccttg acatagatgt tgggtgtacg	2460
gacttgaatg aggatctggg tgtgtgggtg atctttaaga tcaagacca agatggtcat	2520

gcgaggcttg gcaaccttga gttccttgaa gagaagcctt tggtcggaga ggcaactggct 2580  
 cgcgtaaga gggctgagaa gaaatggagg gacaagagg agaaactgga gtgggagacc 2640  
 aacatagtgt acaaggaggg caaggagtca gtggacgcac tgtttgtcaa ttcccagtat 2700  
 gataggctcc aagcggacac gaacatcgcc atgatccatg cagcggacaa gagggttcac 2760  
 tccataaggg aggcctatct tccggagctg tcagtgatcc ctgggggtcaa cgcagccatc 2820  
 tttgaggaat tggaaggagg gatcttcacc gctttctctc tgtacgacgc tcggaacgtc 2880  
 atcaagaatg gtgatttcaa caatggactc agctgctgga acgtgaaagg gcatgtcgat 2940  
 gttgaagaac agaacaatca cgcagcgtg ctggtggttc cggagtggga agccgaggtc 3000  
 tcacaagaag tcagagtgtg ccctgggagg gggtacatct tgcgggtcac agcctacaag 3060  
 gaaggttatg gcgaaggctg tgtcacgata catgagatcg aaaacaacac agacgagctg 3120  
 aagttttcca actgtgttga ggaggaggtc tatectaaca atactgttac gtgcaacgac 3180  
 tacacagcca ctcaagagga gtacgagggc acttacacct ctgcacacag aggtacgac 3240  
 ggtgcctacg agtcaaacag ctccgtgcca gcggactacg cctcggctta cgaagagaag 3300  
 gcgtacaccg acggtcggag ggataaccgg tgcgagagca atagaggcta tggcgactac 3360  
 actcctctcc cagctggcta cgtgaccaag gagttggagt actttccgga gacagacaaa 3420  
 gtctggattg agattggaga gacagaaggc acgttcatcg tggactctgt tgaactcttg 3480  
 ctgatggagg ag 3492

<210> 9  
 <211> 21  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> олігонуклеотид

<400> 9  
 cctgctccac taccagtaca a 21

<210> 10  
 <211> 21  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> олігонуклеотид

<400> 10  
 gtccaagaag gtgaccttct c 21

<210> 11  
 <211> 23  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> олігонуклеотид  
  
 <400> 11  
 agatcaccga ctttgcgctc ttt 23  
  
 <210> 12  
 <211> 17  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> олігонуклеотид  
  
 <400> 12  
 cctccctctt tgacgac 17  
  
 <210> 13  
 <211> 19  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> олігонуклеотид  
  
 <400> 13  
 agccacatcc cagtaacga 19  
  
 <210> 14  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> олігонуклеотид  
  
 <400> 14  
 cagcccaatg aggcatagc 20  
  
 <210> 15  
 <211> 18  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> олігонуклеотид  
  
 <400> 15  
 tgtgttgagg aggcagtc 18  
  
 <210> 16  
 <211> 18  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> олігонуклеотид

<400> 16	
ccttctcttc gtaagccg	18
<210> 17	
<211> 23	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> олігонуклеотид	
<400> 17	
tcaagaggag tacgagggca ctt	23
<210> 18	
<211> 20	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> олігонуклеотид	
<400> 18	
tggttcggttc cctctacca	20
<210> 19	
<211> 22	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> олігонуклеотид	
<400> 19	
caacatccat caccttgact ga	22
<210> 20	
<211> 24	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> олігонуклеотид	
<400> 20	
cacagaaccg tcgcttcagc aaca	24
<210> 21	
<211> 18	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> олігонуклеотид	
<400> 21	
tgtgttgagg aggaggtc	18

<210> 22  
 <211> 18  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> олігонуклеотид  
  
 <400> 22  
 ccttctcttc gtaagccg 18

<210> 23  
 <211> 23  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> олігонуклеотид  
  
 <400> 23  
 tcaagaggag tacgagggca ctt 23

<210> 24  
 <211> 18  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> олігонуклеотид  
  
 <400> 24  
 tggcggacga cgacttgt 18

<210> 25  
 <211> 19  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> олігонуклеотид  
  
 <400> 25  
 aaagtttgga ggctgccgt 19

<210> 26  
 <211> 26  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> олігонуклеотид  
  
 <400> 26  
 cgagcagacc gccgtgtact tctacc 26

<210> 27  
 <211> 1079  
 <212> БІЛОК  
 <213> Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Химерний білок DIG-110

&lt;400&gt; 27

Met Gly Ile Ala Glu Phe Ala Arg Asn Ala Ala Ile Ala Asn Leu Glu  
 1 5 10 15

Gly Leu Gly Asn Asn Phe Asn Ile Tyr Val Glu Ala Phe Lys Glu Trp  
 20 25 30

Glu Glu Asp Pro Lys Asn Pro Ala Thr Arg Thr Arg Val Ile Asp Arg  
 35 40 45

Phe Arg Ile Leu Asp Gly Leu Leu Glu Arg Asp Ile Pro Ser Phe Arg  
 50 55 60

Ile Ser Gly Phe Glu Val Pro Leu Leu Ser Val Tyr Ala Gln Ala Ala  
 65 70 75 80

Asn Leu His Leu Ala Ile Leu Arg Asp Ser Val Ile Phe Gly Glu Arg  
 85 90 95

Trp Gly Leu Thr Thr Ile Asn Val Asn Glu Asn Tyr Asn Arg Leu Ile  
 100 105 110

Arg His Ile Asp Glu Tyr Ala Asp His Cys Ala Asn Thr Tyr Asn Arg  
 115 120 125

Gly Leu Asn Asn Leu Pro Lys Ser Thr Tyr Gln Asp Trp Ile Thr Tyr  
 130 135 140

Asn Arg Leu Arg Arg Asp Leu Thr Leu Thr Val Leu Asp Ile Ala Ala  
 145 150 155 160

Phe Phe Pro Asn Tyr Asp Asn Arg Arg Tyr Pro Ile Gln Pro Val Gly  
 165 170 175

Gln Leu Thr Arg Glu Val Tyr Thr Asp Pro Leu Ile Asn Phe Asn Pro  
 180 185 190

Gln Leu Gln Ser Val Ala Gln Leu Pro Thr Phe Asn Val Met Glu Asn  
 195 200 205

Ser Ala Ile Arg Asn Pro His Leu Phe Asp Ile Leu Asn Asn Leu Thr  
 210 215 220

Ile Phe Thr Asp Trp Phe Ser Val Gly Arg Asn Phe Tyr Trp Gly Gly  
 225 230 235 240



His Arg Val Ile Ser Ser Leu Ile Gly Gly Gly Asn Ile Thr Ser Pro  
245 250 255

Ile Tyr Gly Arg Glu Ala Asn Gln Glu Pro Pro Arg Ser Phe Thr Phe  
260 265 270

Asn Gly Pro Val Phe Arg Thr Leu Ser Asn Pro Thr Leu Arg Leu Leu  
275 280 285

Gln Gln Pro Trp Pro Ala Pro Pro Phe Asn Leu Arg Gly Val Glu Gly  
290 295 300

Val Glu Phe Ser Thr Pro Thr Asn Ser Phe Thr Tyr Arg Gly Arg Gly  
305 310 315 320

Thr Val Asp Ser Leu Thr Glu Leu Pro Pro Glu Asp Asn Ser Val Pro  
325 330 335

Pro Arg Glu Gly Tyr Ser His Arg Leu Cys His Ala Thr Phe Val Gln  
340 345 350

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

His Arg Ser Ala Thr Leu Thr Asn Thr Ile Asp Pro Glu Arg Ile Asn  
370 375 380

Gln Ile Pro Leu Val Lys Gly Phe Arg Val Trp Gly Gly Thr Ser Val  
385 390 395 400

Ile Thr Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu Arg Arg Asn Thr  
405 410 415

Phe Gly Asp Phe Val Ser Leu Gln Val Asn Ile Asn Ser Pro Ile Thr  
420 425 430

Gln Arg Tyr Arg Leu Arg Phe Arg Tyr Ala Ser Ser Arg Asp Ala Arg  
435 440 445

Val Ile Val Leu Thr Gly Ala Ala Ser Thr Gly Val Gly Gly Gln Val  
450 455 460

Ser Val Asn Met Pro Leu Gln Lys Thr Met Glu Ile Gly Glu Asn Leu  
465 470 475 480

Thr Ser Arg Thr Phe Arg Tyr Thr Asp Phe Ser Asn Pro Phe Ser Phe  
485 490 495



Arg Ala Asn Pro Asp Ile Ile Gly Ile Ser Glu Gln Pro Leu Phe Gly  
500 505 510

Ala Gly Ser Ile Ser Ser Gly Glu Leu Tyr Ile Asp Lys Ile Glu Ile  
515 520 525

Ile Leu Ala Asp Ala Thr Leu Glu Ala Glu Ser Asp Leu Glu Arg Ala  
530 535 540

Gln Lys Ala Val Asn Ala Leu Phe Thr Ser Ser Asn Gln Ile Gly Leu  
545 550 555 560

Lys Thr Asp Val Thr Asp Tyr His Ile Asp Arg Val Ser Asn Leu Val  
565 570 575

Glu Cys Leu Ser Asp Glu Phe Cys Leu Asp Glu Lys Lys Glu Leu Ser  
580 585 590

Glu Lys Val Lys His Ala Lys Arg Leu Ser Asp Glu Arg Asn Leu Leu  
595 600 605

Gln Asp Pro Asn Phe Arg Gly Ile Asn Arg Gln Leu Asp Arg Gly Trp  
610 615 620

Arg Gly Ser Thr Asp Ile Thr Ile Gln Gly Gly Asp Asp Val Phe Lys  
625 630 635 640

Glu Asn Tyr Val Thr Leu Leu Gly Thr Phe Asp Glu Cys Tyr Pro Thr  
645 650 655

Tyr Leu Tyr Gln Lys Ile Asp Glu Ser Lys Leu Lys Ala Tyr Thr Arg  
660 665 670

Tyr Gln Leu Arg Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln Asp Leu Glu Ile Tyr  
675 680 685

Leu Ile Arg Tyr Asn Ala Lys His Glu Thr Val Asn Val Pro Gly Thr  
690 695 700

Gly Ser Leu Trp Pro Leu Ser Ala Pro Ser Pro Ile Gly Lys Cys Ala  
705 710 715 720

His His Ser His His Phe Ser Leu Asp Ile Asp Val Gly Cys Thr Asp  
725 730 735

Leu Asn Glu Asp Leu Gly Val Trp Val Ile Phe Lys Ile Lys Thr Gln  
740 745 750

Asp Gly His Ala Arg Leu Gly Asn Leu Glu Phe Leu Glu Glu Lys Pro	755	760	765
Leu Val Gly Glu Ala Leu Ala Arg Val Lys Arg Ala Glu Lys Lys Trp	770	775	780
Arg Asp Lys Arg Glu Lys Leu Glu Trp Glu Thr Asn Ile Val Tyr Lys	785	790	795 800
Glu Ala Lys Glu Ser Val Asp Ala Leu Phe Val Asn Ser Gln Tyr Asp	805	810	815
Arg Leu Gln Ala Asp Thr Asn Ile Ala Met Ile His Ala Ala Asp Lys	820	825	830
Arg Val His Ser Ile Arg Glu Ala Tyr Leu Pro Glu Leu Ser Val Ile	835	840	845
Pro Gly Val Asn Ala Ala Ile Phe Glu Glu Leu Glu Gly Arg Ile Phe	850	855	860
Thr Ala Phe Ser Leu Tyr Asp Ala Arg Asn Val Ile Lys Asn Gly Asp	865	870	875 880
Phe Asn Asn Gly Leu Ser Cys Trp Asn Val Lys Gly His Val Asp Val	885	890	895
Glu Glu Gln Asn Asn His Arg Ser Val Leu Val Val Pro Glu Trp Glu	900	905	910
Ala Glu Val Ser Gln Glu Val Arg Val Cys Pro Gly Arg Gly Tyr Ile	915	920	925
Leu Arg Val Thr Ala Tyr Lys Glu Gly Tyr Gly Glu Gly Cys Val Thr	930	935	940
Ile His Glu Ile Glu Asn Asn Thr Asp Glu Leu Lys Phe Ser Asn Cys	945	950	955 960
Val Glu Glu Glu Val Tyr Pro Asn Asn Thr Val Thr Cys Asn Asp Tyr	965	970	975
Thr Ala Thr Gln Glu Glu Tyr Glu Gly Thr Tyr Thr Ser Arg Asn Arg	980	985	990
Gly Tyr Asp Gly Ala Tyr Glu Ser Asn Ser Ser Val Pro Ala Asp Tyr	995	1000	1005

Ala Ser Ala Tyr Glu Glu Lys Ala Tyr Thr Asp Gly Arg Arg Asp  
1010 1015 1020

Asn Pro Cys Glu Ser Asn Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Thr Pro Leu  
1025 1030 1035

Pro Ala Gly Tyr Val Thr Lys Glu Leu Glu Tyr Phe Pro Glu Thr  
1040 1045 1050

Asp Lys Val Trp Ile Glu Ile Gly Glu Thr Glu Gly Thr Phe Ile  
1055 1060 1065

Val Asp Ser Val Glu Leu Leu Leu Met Glu Glu  
1070 1075

<210> 28  
<211> 3237  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Оптимізована для кукурудзи кодуєча область DIG-110

<400> 28  
atgggcatcg ctgagttcgc gagaaatgct gcaatcgcca accttgaagg gcttggcaac 60  
aacttcaaca tctacgtgga ggcgttcaag gagtgggaag aggacctaa gaatccagcg 120  
accagaacga gggttataga tcggttcgcg atctctgatg gccttttgga gagggacatc 180  
ccgagcttcc gcatttcggg atttgagggt cctctgctct cagtctacgc tcaagctgct 240  
aatctgcacg tggccatctt gagggattca gtcattcttg gcgaacgctg ggggtcttacg 300  
actatcaacg tgaacgagaa ctacaatcgg ttgattcggc acatagacga gtatgccgac 360  
cactgtgcta acacctacaa taggggtctg aacaatctgc caaagtcaac gtatcaagac 420  
tggataacct acaataggct cagacgggac ctactctca ccgtgctgga catagctgcc 480  
ttctttccga actacgacaa ccggagatat cctattcaac ccgttggtca gctcactcgc 540  
gaggtctaca ccgatccct catcaacttc aatcccagc tgcaatcggg cgcacagctg 600  
cccaccttca atgtgatgga aaactcagcg atccggaatc cccatctggt tgacatactt 660  
aacaacctca ctatcttcac cgattgggtt tcagttggac gcaacttcta ctggggaggg 720  
cacagagtga tttcaagcct cattggagga gggaacatta catcgctat ctatggaagg 780  
gaggccaacc aagagccacc aaggctcttc accttcaacg gtccggtggt cagaacactt 840  
agcaatccca cattgcgctt gctgcaacag ccgtggccag caccaccatt caatctgagg 900  
ggagtggagg gtgtggagtt ctgcacgctt acaaactcct ttacgtacag aggcagaggg 960  
acagtggact cactgacaga actcccaact gaggacaact ctgttctctc gagggagggc 1020

tactgcacc ggctttgcc	tgccaccttc gtccagaggt	ctggcacgcc tttctgacc	1080
actgggggttg tctttagctg	gactcaccgc tcagcgacgc	tgaccaaacac aatcgacca	1140
gagaggatca atcagatccc	tctggtgaag ggctttcgcg	tttgggggtgg cacaagcgtg	1200
atcacgggac ctggtttcac	tggtggggat atcctcagac	gcaatacgtt tggcgatttc	1260
gtgagccttc aagtcaacat	caattcccca atcaccaga	gatatcggct ccgcttcaga	1320
tacgcctcat ccagagacgc	aagggtcatc gtccttactg	gagcagccag caccggaagtc	1380
ggaggccaag ttagcgtcaa	catgcggttg cagaaaacga	tggaaatcgg tgaaaacctc	1440
accagcagaa cctttcgcta	tacagatttc agcaacctt	tctccttcag agccaatccg	1500
gacataatcg gcatatccga	gcagcccttg ttcggtgctg	ggtccatctc ttctggcgag	1560
ctgtacatcg acaagattga	gatcattctc gcagatgcga	ctctcgaggc tgaatcggat	1620
cttgaaaggg cacagaaggc	agtcaacgct ctcttcacca	gctcaaatca gattggcctt	1680
aagaccgatg ttactgacta	tcatatcgac agagtttcta	accttgctga gtgcctctcc	1740
gacgagttct gtctcgacga	aaagaaggaa ctctccgaga	aagtgaagca cgcgaaacgc	1800
ctctcggatg aacggaactt	gctgcaagat ccgaacttca	gaggcatcaa tcgccagttg	1860
gatagaggct ggaggggatc	aaccgacata accattcaag	gtggggatga tgtgttcaag	1920
gaaaactacg tgacattgct	gggcaccttc gacgagtgc	atcccacgta tctctatcag	1980
aagattgacg agtccaagct	caaagcctac acacgctatc	agctcagagg ctacattgag	2040
gactctcaag acctcgaaat	ctacttgatc agatacaacg	ccaagcacga gacggtgaac	2100
gtccctggga ctgggtcact	gtggccactg tcggcaccct	cgccaatcgg aaagtgcgct	2160
caccacagcc accacttctc	ccttgacata gatgttgggt	gtacggactt gaatgaggat	2220
ctgggtgtgt ggggtgatctt	taagatcaag acccaagatg	gtcatgcgag gcttggaac	2280
cttgagtctc ttgaagagaa	gcctttggtc ggagaggcac	tggctcgcgt gaagagggtc	2340
gagaagaaat ggagggacaa	gagggagaaa ctggagtggg	agaccaacat agtgtacaag	2400
gaggccaagg agtcagtga	cgcactgttt gtcaattccc	agtatgatag gctccaagcg	2460
gacaogaaca tcgccatgat	ccatgcagcg gacaagagg	ttcactccat aagggaggcc	2520
tatcttcggy agctgtcagt	gattcctggg gtcaacgcag	ccatctttga ggaattggaa	2580
gggaggatct tcaccgcttt	ctctctgtac gacgctcgga	acgtcatcaa gaatggtgat	2640
ttcaacaatg gactcagctg	ctggaacgtg aaagggcatg	tcgatgttga agaacagaac	2700
aatcacgcga gcgtgctgg	ggttcgggag tgggaagccg	aggtctcaca agaagtcaga	2760
gtgtgcctcg ggaggggtta	catcttgccg gtccacagct	acaaggaagg ttatggcgaa	2820
ggctgtgtca cgatccatga	gatcgaaaac aacacagacg	agctgaagtt ttccaactgt	2880
gttgaggagg aggtctatcc	taacaatact gttacgtgca	acgactacac agccactcaa	2940

gaggagtacg agggcactta cacctctcgc aacagaggct acgacggtgc ctacgagtca 3000  
aacagctccg tgccagcgga ctacgcctcg gcttacgaag agaaggcgta caccgacggt 3060  
cggagggata acccgtgcca gagcaataga ggctatggcg actacactcc tctcccagct 3120  
ggctacgtga ccaaggagtt ggagtacttt ccggagacag acaaagtctg gattgagatt 3180  
ggagagacag aaggcacgtt catcgtggac tctgttgaac tcttgctgat ggaggag 3237

<210> 29  
<211> 543  
<212> БІЛОК  
<213> Штучна послідовність  
<220>  
<223> Укорочений білок DIG-111  
<400> 29

Met Gly Ile Ala Glu Phe Ala Arg Asn Ala Ala Ile Ala Asn Leu Glu  
1 5 10 15

Gly Leu Gly Asn Asn Phe Asn Ile Tyr Val Glu Ala Phe Lys Glu Trp  
20 25 30

Glu Glu Asp Pro Lys Asn Pro Ala Thr Arg Thr Arg Val Ile Asp Arg  
35 40 45

Phe Arg Ile Leu Asp Gly Leu Leu Glu Arg Asp Ile Pro Ser Phe Arg  
50 55 60

Ile Ser Gly Phe Glu Val Pro Leu Leu Ser Val Tyr Ala Gln Ala Ala  
65 70 75 80

Asn Leu His Leu Ala Ile Leu Arg Asp Ser Val Ile Phe Gly Glu Arg  
85 90 95

Trp Gly Leu Thr Thr Ile Asn Val Asn Glu Asn Tyr Asn Arg Leu Ile  
100 105 110

Arg His Ile Asp Glu Tyr Ala Asp His Cys Ala Asn Thr Tyr Asn Arg  
115 120 125

Gly Leu Asn Asn Leu Pro Lys Ser Thr Tyr Gln Asp Trp Ile Thr Tyr  
130 135 140

Asn Arg Leu Arg Arg Asp Leu Thr Leu Thr Val Leu Asp Ile Ala Ala  
145 150 155 160

Phe Phe Pro Asn Tyr Asp Asn Arg Arg Tyr Pro Ile Gln Pro Val Gly  
165 170 175



Gln Leu Thr Arg Glu Val Tyr Thr Asp Pro Leu Ile Asn Phe Asn Pro  
180 185 190

Gln Leu Gln Ser Val Ala Gln Leu Pro Thr Phe Asn Val Met Glu Asn  
195 200 205

Ser Ala Ile Arg Asn Pro His Leu Phe Asp Ile Leu Asn Asn Leu Thr  
210 215 220

Ile Phe Thr Asp Trp Phe Ser Val Gly Arg Asn Phe Tyr Trp Gly Gly  
225 230 235 240

His Arg Val Ile Ser Ser Leu Ile Gly Gly Gly Asn Ile Thr Ser Pro  
245 250 255

Ile Tyr Gly Arg Glu Ala Asn Gln Glu Pro Pro Arg Ser Phe Thr Phe  
260 265 270

Asn Gly Pro Val Phe Arg Thr Leu Ser Asn Pro Thr Leu Arg Leu Leu  
275 280 285

Gln Gln Pro Trp Pro Ala Pro Pro Phe Asn Leu Arg Gly Val Glu Gly  
290 295 300

Val Glu Phe Ser Thr Pro Thr Asn Ser Phe Thr Tyr Arg Gly Arg Gly  
305 310 315 320

Thr Val Asp Ser Leu Thr Glu Leu Pro Pro Glu Asp Asn Ser Val Pro  
325 330 335

Pro Arg Glu Gly Tyr Ser His Arg Leu Cys His Ala Thr Phe Val Gln  
340 345 350

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

His Arg Ser Ala Thr Leu Thr Asn Thr Ile Asp Pro Glu Arg Ile Asn  
370 375 380

Gln Ile Pro Leu Val Lys Gly Phe Arg Val Trp Gly Gly Thr Ser Val  
385 390 395 400

Ile Thr Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu Arg Arg Asn Thr  
405 410 415

Phe Gly Asp Phe Val Ser Leu Gln Val Asn Ile Asn Ser Pro Ile Thr  
420 425 430

Gln Arg Tyr Arg Leu Arg Phe Arg Tyr Ala Ser Ser Arg Asp Ala Arg  
435 440 445

Val Ile Val Leu Thr Gly Ala Ala Ser Thr Gly Val Gly Gly Gln Val  
450 455 460

Ser Val Asn Met Pro Leu Gln Lys Thr Met Glu Ile Gly Glu Asn Leu  
465 470 475 480

Thr Ser Arg Thr Phe Arg Tyr Thr Asp Phe Ser Asn Pro Phe Ser Phe  
485 490 495

Arg Ala Asn Pro Asp Ile Ile Gly Ile Ser Glu Gln Pro Leu Phe Gly  
500 505 510

Ala Gly Ser Ile Ser Ser Gly Glu Leu Tyr Ile Asp Lys Ile Glu Ile  
515 520 525

Ile Leu Ala Asp Ala Thr Leu Glu Ala Glu Ser Asp Leu Glu Arg  
530 535 540

<210> 30

<211> 1629

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Оптимізована для кукурудзи кодуєча область DIG-111

<400> 30

atgggcatcg ctgagttcgc gagaaatgct gcaatcgcca accttgaagg gcttggcaac	60
aacttcaaca tctacgtgga ggcgttcaag gagggggaag aggaccctaa gaatccagcg	120
accagaacga gggttataga tcggttccgc atcctcgatg gccttttgga gagggaacac	180
ccgagcttcc gcatttcggg atttgaggtt cctctgctct cagtctacgc tcaagctgct	240
aatctgcac tgcccatctt gagggattca gtcattcttg gcgaacgctg ggggtcttacg	300
actatcaacg tgaacgagaa ctacaatcgg ttgattcggc acatagacga gtatgccgac	360
cactgtgcta acacctacaa taggggtctg aacaatctgc caaagtcaac gtatcaagac	420
tggataacct acaataggct cagacgggac ctcactctca ccgtgctgga catagctgcc	480
ttctttccga actacgacaa ccggagatat cctattcaac ccgttggtca gctcactcgc	540
gagggtctaca ccgacccct catcaacttc aatccccagc tgcaatcggg cgcacagctg	600
cccaccttca atgtgatgga aaactcagcg atccggaatc cccatctggt tgacataactt	660
aacaacctca ctatcttcac cgattgggtt tcagttggac gcaacttcta ctggggaggg	720
cacagagtga tttcaagcct cattggagga gggaacatta catcgccctat ctatggaagg	780

gaggccaaacc aagagccacc aaggtctttc accttcaacg gtccggtgtt cagaacactt 840  
 agcaatccca cattgcgctt gctgcaacag ccgtggccag caccaccatt caatctgagg 900  
 ggagtggagg gtgtggagtt ctgacgcct acaaaactcct ttacgtacag aggcagaggg 960  
 acagtggact cactgacaga actccacct gaggacaact ctgttctec gaggagggc 1020  
 tactgcacc ggctttgcca tgccacctc gtccagaggt ctggcacgcc tttctgacc 1080  
 actgggggtg tcttttagtg gactcacgc tcagcgacgc tgaccaacac aatcgacca 1140  
 gagaggatca atcagatccc tctggtgaag ggctttcgcg tttggggtgg cacaagcgtg 1200  
 atcaccggac ctggtttcac tgggtgggat atcctcagac gcaatacgtt tggcgatttc 1260  
 gtgagccttc aagtcaacat caattcccca atcaccaga gatatcggtt ccgcttcaga 1320  
 tacgcctcat ccagagacgc aagggtcatc gtcttactg gagcagccag caccggagtc 1380  
 ggaggccaag ttagcgtcaa catgccgttg cagaaaacga tggaaatcgg tgaaaacctc 1440  
 accagcagaa cctttcgcta tacagatttc agcaacctt tctcttcag agccaatcgg 1500  
 gacataatcg gcatatcga gcagcccttg ttcggtgtg ggtccatctc ttctggcgag 1560  
 ctgtacatcg acaagattga gatcattctc gcagatgca ctctcgaggc tgaatcgat 1620  
 cttgaaagg 1629

<210> 31  
 <211> 1044  
 <212> БІЛОК  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Химерний білок DIG-112  
 <400> 31

Met Gly Asn Pro Ala Thr Arg Thr Arg Val Ile Asp Arg Phe Arg Ile  
 1 5 10 15

Leu Asp Gly Leu Leu Glu Arg Asp Ile Pro Ser Phe Arg Ile Ser Gly  
 20 25 30

Phe Glu Val Pro Leu Leu Ser Val Tyr Ala Gln Ala Ala Asn Leu His  
 35 40 45

Leu Ala Ile Leu Arg Asp Ser Val Ile Phe Gly Glu Arg Trp Gly Leu  
 50 55 60

Thr Thr Ile Asn Val Asn Glu Asn Tyr Asn Arg Leu Ile Arg His Ile  
 65 70 75 80

Asp Glu Tyr Ala Asp His Cys Ala Asn Thr Tyr Asn Arg Gly Leu Asn  
 85 90 95



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

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

Val Thr Leu Leu Gly Thr Phe Asp Glu Cys Tyr Pro Thr Tyr Leu Tyr  
610 615 620

Gln Lys Ile Asp Glu Ser Lys Leu Lys Ala Tyr Thr Arg Tyr Gln Leu  
625 630 635 640

Arg Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln Asp Leu Glu Ile Tyr Leu Ile Arg  
645 650 655

Tyr Asn Ala Lys His Glu Thr Val Asn Val Pro Gly Thr Gly Ser Leu  
660 665 670

Trp Pro Leu Ser Ala Pro Ser Pro Ile Gly Lys Cys Ala His His Ser  
675 680 685

His His Phe Ser Leu Asp Ile Asp Val Gly Cys Thr Asp Leu Asn Glu  
690 695 700

Asp Leu Gly Val Trp Val Ile Phe Lys Ile Lys Thr Gln Asp Gly His  
705 710 715 720

Ala Arg Leu Gly Asn Leu Glu Phe Leu Glu Glu Lys Pro Leu Val Gly  
725 730 735

Glu Ala Leu Ala Arg Val Lys Arg Ala Glu Lys Lys Trp Arg Asp Lys  
740 745 750

Arg Glu Lys Leu Glu Trp Glu Thr Asn Ile Val Tyr Lys Glu Ala Lys  
755 760 765

Glu Ser Val Asp Ala Leu Phe Val Asn Ser Gln Tyr Asp Arg Leu Gln  
770 775 780

Ala Asp Thr Asn Ile Ala Met Ile His Ala Ala Asp Lys Arg Val His  
785 790 795 800

Ser Ile Arg Glu Ala Tyr Leu Pro Glu Leu Ser Val Ile Pro Gly Val  
805 810 815

Asn Ala Ala Ile Phe Glu Glu Leu Glu Gly Arg Ile Phe Thr Ala Phe  
820 825 830

Ser Leu Tyr Asp Ala Arg Asn Val Ile Lys Asn Gly Asp Phe Asn Asn  
835 840 845

Gly Leu Ser Cys Trp Asn Val Lys Gly His Val Asp Val Glu Glu Gln  
850 855 860

Asn Asn His Arg Ser Val Leu Val Val Pro Glu Trp Glu Ala Glu Val  
865 870 875 880

Ser Gln Glu Val Arg Val Cys Pro Gly Arg Gly Tyr Ile Leu Arg Val  
885 890 895

Thr Ala Tyr Lys Glu Gly Tyr Gly Glu Gly Cys Val Thr Ile His Glu  
900 905 910

Ile Glu Asn Asn Thr Asp Glu Leu Lys Phe Ser Asn Cys Val Glu Glu  
915 920 925

Glu Val Tyr Pro Asn Asn Thr Val Thr Cys Asn Asp Tyr Thr Ala Thr  
930 935 940

Gln Glu Glu Tyr Glu Gly Thr Tyr Thr Ser Arg Asn Arg Gly Tyr Asp  
945 950 955 960

Gly Ala Tyr Glu Ser Asn Ser Ser Val Pro Ala Asp Tyr Ala Ser Ala  
965 970 975

Tyr Glu Glu Lys Ala Tyr Thr Asp Gly Arg Arg Asp Asn Pro Cys Glu  
980 985 990

Ser Asn Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Thr Pro Leu Pro Ala Gly Tyr Val  
995 1000 1005

Thr Lys Glu Leu Glu Tyr Phe Pro Glu Thr Asp Lys Val Trp Ile  
1010 1015 1020

Glu Ile Gly Glu Thr Glu Gly Thr Phe Ile Val Asp Ser Val Glu  
1025 1030 1035

Leu Leu Leu Met Glu Glu  
1040

<210> 32

<211> 3132

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Оптимізована для кукурудзи кодуюча область DIG-112

<400> 32

atgggcaatc cagcgaccag aacgaggggt atagatcggg tccgcacccg cgatggcctt 60

ttggagaggg acatcccgag cttccgcatt tccggatttg aggttccctc gctctcagtc 120

tacgctcaag ctgctaactc gcatctggcc atcttgaggg attcagtcac ctttggcgaa 180

cgctggggtc ttacgactat caacgtgaac gagaactaca atcggttgat tcggcacata	240
gacgagtatg ccgaccactg tgctaacacc tacaataggg gtctgaacaa tctgccaaag	300
tcaacgtatc aagactggat aacctacaat aggcctcagac gggacctcac tctcacctg	360
ctggacatag ctgccttctt tcogaactac gacaaccgga gatatactat tcaaccggtt	420
ggtcagctca ctgcgaggt ctacaccgat cccctcatca acttcaatcc ccagctgcaa	480
tcggctgcac agctgccac ctccaatgtg atggaaaact cagcgatccg gaatcccat	540
ctggttgaca tacttaacaa cctcactatc ttcaccgatt ggttttcagt tggacgcaac	600
ttctactggg gagggcacag agtgatttca agcctcattg gagggaggaa cattacatcg	660
cctatctatg gaagggaggc caaccaagag ccaccaaggt ctttcacctt caacggtccg	720
gtgttcagaa cacttagcaa tcccacattg cgtttgctgc aacagccgtg gccagcacca	780
ccattcaatc tgaggggagt ggaggggtg gagttctcga cgcctacaaa ctcccttacg	840
tacagaggca gagggacagt ggactcactg acagaactcc cacctgagga caactctgtt	900
cctccgaggg agggctactc gcaccggctt tgccatgcc a ccttcgtcca gaggtctggc	960
acgccttttc tgaccactgg ggttgtcttt agctggactc accgctcagc gacgtgacc	1020
aacacaatcg acccagagag gatcaatcag atccctctgg tgaagggctt tcgcgtttgg	1080
ggtggcacaa gcgtgatcac cggacctggg ttactggtg gggatatcct cagacgcaat	1140
acgtttggcg atttcgtgag ccttcaagtc aacatcaatt cccaatcac ccagagatat	1200
cggctccgct tcagatacgc ctcatccaga gacgcaaggg tcatcgctct tactggagca	1260
gccagcaccg gagtcggagg ccaagttagc gtcaacatgc cgttgacagaa aacgatggaa	1320
atcggtgaaa acctcaccag cagaaccttt cgtatacag atttcagcaa ccctttctcc	1380
ttcagagcca atccggacat aatcggcata tccagcagc ccttggtcgg tgctgggtcc	1440
atctctctctg gcgagctgta catcgacaag attgagatca ttctcgaga tgogactctc	1500
gaggctgaat cggatcttga aagggcacag aaggcagtc acgctctctt caccagctca	1560
aatcagattg gccttaagac cgatgttact gactatcata tcgacagagt ttctaacott	1620
gtcgagtgcc totccgacga gttctgtctc gacgaaaaga aggaactctc cgagaaagt	1680
aagcacgcga aacgcctctc ggatgaacgg aacttgctgc aagatccgaa cttcagaggc	1740
atcaatcgcc agttggatag aggctggagg ggatcaaccg acataaccat tcaaggtggg	1800
gatgatgtgt tcaaggaaaa ctacgtgaca ttgctgggca ccttcgacga gtgctatccc	1860
acgtatctct atcagaagat tgacgagtcc aagctcaaag cctacacacg ctatcagctc	1920
agaggctaca ttgaggactc tcaagacctc gaaatctact tgatcagata caacgccaa	1980
cacgagacgg tgaacgtccc tgggactggg tcaactgtggc cactgtcggc accctcgcca	2040
atcggaaggt gcgctcacca cagccaccac ttctcccttg acatagatgt tgggtgtacg	2100



```

gacttgaatg aggatctggg tgtgtgggtg atctttaaga tcaagaccca agatgggtcat 2160
gcgaggcttg gcaaccttga gttccttgaa gagaagcctt tggtcggaga ggcactggct 2220
cgcgtaaga gggctgagaa gaaatggagg gacaagaggg agaaactgga gtgggagacc 2280
aacatagtgt acaaggaggc caaggagtca gtggacgcac tgtttgtcaa ttcccagtat 2340
gataggctcc aagcggacac gaacatcgcc atgatccatg cagcggacaa gagggttcac 2400
tccataaggg aggcctatct tccggagctg tcagtgatcc ctgggggtcaa cgcagccatc 2460
tttgaggaat tggaaggag gatcttcacc gctttctctc tgtacgacgc tcggaacgtc 2520
atcaagaatg gtgatttcaa caatggactc agctgctgga acgtgaaagg gcatgtcgat 2580
gttgaagaac agaacaatca ccgcagcgtg ctggtgggtc cggagtggga agccgaggtc 2640
tcacaagaag tcagagtgtg ccttgggagg gggtacatct tgcgggtcac agcctacaag 2700
gaaggttatg gcgaaggctg tgtcacgata catgagatcg aaaacaacac agacgagctg 2760
aagttttcca actgtgttga ggaggaggct taccetaaca atactgttac gtgcaacgac 2820
tacacagcca ctcaagagga gtacgagggc acttacacct ctgcaacag aggctacgac 2880
ggtgccatcg agtcaaacag ctccgtgcc a gggactacg cctcggctta cgaagagaag 2940
gcgtacaccg acggtcggag ggataacccg tgcgagagca atagaggcta tggcgactac 3000
actcctctcc cagctggcta cgtgaccaag gagttggagt actttccgga gacagacaaa 3060
gtctggattg agattggaga gacagaaggc acgttcacatg tggactctgt tgaactcttg 3120
ctgatggagg ag 3132

```

<210> 33  
 <211> 508  
 <212> БІЛОК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Укорочений білок DIG-113

<400> 33

```

Met Gly Asn Pro Ala Thr Arg Thr Arg Val Ile Asp Arg Phe Arg Ile
1           5           10           15

```

```

Leu Asp Gly Leu Leu Glu Arg Asp Ile Pro Ser Phe Arg Ile Ser Gly
          20           25           30

```

```

Phe Glu Val Pro Leu Leu Ser Val Tyr Ala Gln Ala Ala Asn Leu His
          35           40           45

```

```

Leu Ala Ile Leu Arg Asp Ser Val Ile Phe Gly Glu Arg Trp Gly Leu
          50           55           60

```

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

Thr Pro Phe Leu Thr Thr Gly Val Val Phe Ser Trp Thr His Arg Ser  
325 330 335

Ala Thr Leu Thr Asn Thr Ile Asp Pro Glu Arg Ile Asn Gln Ile Pro  
340 345 350

Leu Val Lys Gly Phe Arg Val Trp Gly Gly Thr Ser Val Ile Thr Gly  
355 360 365

Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu Arg Arg Asn Thr Phe Gly Asp  
370 375 380

Phe Val Ser Leu Gln Val Asn Ile Asn Ser Pro Ile Thr Gln Arg Tyr  
385 390 395 400

Arg Leu Arg Phe Arg Tyr Ala Ser Ser Arg Asp Ala Arg Val Ile Val  
405 410 415

Leu Thr Gly Ala Ala Ser Thr Gly Val Gly Gly Gln Val Ser Val Asn  
420 425 430

Met Pro Leu Gln Lys Thr Met Glu Ile Gly Glu Asn Leu Thr Ser Arg  
435 440 445

Thr Phe Arg Tyr Thr Asp Phe Ser Asn Pro Phe Ser Phe Arg Ala Asn  
450 455 460

Pro Asp Ile Ile Gly Ile Ser Glu Gln Pro Leu Phe Gly Ala Gly Ser  
465 470 475 480

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

Asp Ala Thr Leu Glu Ala Glu Ser Asp Leu Glu Arg  
500 505

<210> 34

<211> 1524

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Оптимізована для кукурудзи кодуєча область DIG-113

<400> 34

atgggcaatc cagcgaccag aacgaggggt atagatcggt tccgcatcct cgatggcctt 60

ttggagaggg acatcccgag ctcccgcat tccggatttg aggttcctct gctctcagtc 120

tacgctcaag ctgctaactc gcattctggc atcttgaggg attcagtcac ctttgcgcaa 180

cgctgggggtc ttacgactat caacgtgaac gagaactaca atcggttgat tcggcacata 240



```

gacgagtatg cgcaccactg tgctaacacc tacaataggg gtctgaacaa tctgccaaag      300
tcaacgtatc aagactggat aacctacaat aggcctcagac gggacctcac tctcacctgt      360
ctggacatag ctgccttctt tccgaactac gacaaccgga gatatactat tcaaccctgt      420
ggtcagctca ctgcgagagt ctacaccgat cccctcatca acttcaatcc ccagctgcaa      480
tcggtegcac agctgccac cttcaatgtg atggaaaact cagcgatccg gaatccccat      540
ctgtttgaca tacttaacaa cctcactatc ttcaccgatt ggttttcagt tggacgcaac      600
ttctactggg gagggcacag agtgatttca agcctcattg gagggaggaa cattacatcg      660
cctatctatg gaagggaggc caaccaagag ccaccaaggt ctttcacett caacgggtccg      720
gtgttcagaa cacttagcaa tcccacattg cgcttgctgc aacagccgtg gccagcacca      780
ccattcaatc tgaggggagt ggaggggtgtg gaggttctga cgcctacaaa ctccctttacg      840
tacagaggca gagggacagt ggactcactg acagaactcc cacctgagga caactctgtt      900
cctccgaggg agggctactc gcaccggctt tgccatgcc aettcgtcca gaggtctggc      960
acgccttttc tgaccactgg ggttgtcttt agctggactc accgctcagc gacgctgacc     1020
aacacaatcg acccagagag gatcaatcag atccctctgg tgaagggtct tgcggtttgg     1080
ggtggcacia gcgatgacac cggacctggt ttcactgggt gggatatcct cagacgcaat     1140
acgtttggcg atttcgtgag cettcaagtc aacatcaatt cccaatcac ccagagatat     1200
cggctccgct tcagatacgc ctcatccaga gacgcaaggg tcatcgtcct tactggagca     1260
gccagcaccg gagtggagg ccaagttagc gtcaacatgc cgttcgagaa aacgatggaa     1320
atcggtgaaa acctcaccag cagaaccttt cgctatacag atttcagcaa cccctttctcc     1380
ttcagagcca atccggacat aatcggcata tccgagcagc ccttggtcgg tgetgggtcc     1440
atctcttctg gcgagctgta catcgacaag attgagatca ttctcgcaga tgcgactctc     1500
gaggctgaat cggatcttga aagg                                         1524

```

<210> 35

<211> 582

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Укорочений білок DIG-114

<400> 35

```

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  
580

<210> 36  
<211> 1746  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Оптимізована для кукурудзи кодуюча область DIG-114

<400> 36  
atggataaca accccaacat taacgagtgc atcccgtaga actgcctctc gaatccagaa 60  
gaagtgcctct tggatggcga gaggatttcg actggcaaca gctccatcga catttccttc 120  
tccttggttc agttccttgc gtctaacttc gtccctggcg gtggttcctt tgttgccctt 180  
atcgacttcg tctggggaat tgcgggaccc tccagtgagg atgcgtttct ggtgcagata 240  
gagcagctga tcaacgagag gatcgctgag ttccgcgagaa atgctgcaat cgccaacctt 300  
gaagggcttg gcaacaactt caacatctac gtggaggcgt tcaaggagtg ggaagaggac 360  
cctaagaatc cagcgaccag aacgaggggt atagatcggg tccgcctcct cgatggcctt 420  
ttggagaggg acatcccgag cttccgcatt tggggatttg aggttcctct gctctcagtc 480  
tacgctcaag ctgctaattc gcatctggcc atcttgaggg attcagtcac ctttggcgaa 540  
cgctgggggc ttacgactat caacgtgaac gagaactaca atcggttgat tcggcacata 600  
gacgagtatg ccgaccactg tgctaacacc tacaataggg gtctgaacaa tctgccaag 660  
tcaacgtatc aagactggat aacctacaat aggcctcagac gggacctcac tctcaccgtg 720  
ctggacatag ctgccttctt tccgaactac gacaaccgga gatatcctat tcaaccggtt 780  
ggtcagctca ctgcgaggt ctacaccgat cccctcatca acttcaatcc ccagctgcaa 840  
tcggtcgcac agctgccac cttcaatgtg atggaaaact cagcgatccg gaatcccat 900  
ctgtttgaca tacttaacaa cctcactatc ttcaccgatt ggttttcagt tggacgcaac 960  
ttctactggg gagggcacag agtgatttca agcctcattg gaggagggaa cattacatcg 1020  
cctatctatg gaagggaggc caaccaagag ccaccaagggt ctttcacctt caacggtcgg 1080  
gtgttcagaa cacttagcaa tcccacattg cgcttgctgc aacagccgtg gccagcacca 1140  
ccattcaatc tgaggggagt ggaggggtgt gagttctcga cgcctacaaa ctcccttacg 1200  
tacagaggca gagggacagt ggactcactg acagaactcc cacttgagga caactctgtt 1260  
cctccgaggg agggctactc gcaccggctt tgccatgcca ccttcgtcca gaggtctggc 1320

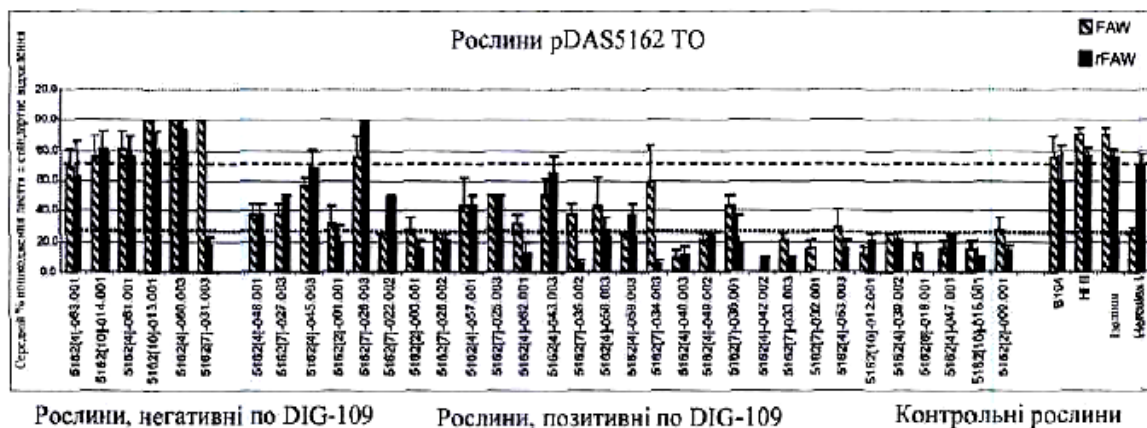
acgccttttc tgaccactgg ggttggtcttt agctggactc accgctcagc gacgctgacc	1380
aacacaatcg acccagagag gatcaatcag atccctctgg tgaagggttt tcgcgttttg	1440
ggtggcacaa gcgtgatcac cggacctggt ttcactgggtg gggatatact cagacgcaat	1500
acgtttggcg atttcgtgag ctttcaagtc aacatcaatt cccaatcac ccagagatat	1560
cggtccgct tcagatacgc ctcatacaga gacgcaaggg tcatactcct tactggagca	1620
gccagcaccg gagtcggagg ccaagttagc gtcaacatgc cgttgacaga aacgatggaa	1680
atcggtgaaa acctcaccag cagaaccttt cgctatacag atttcagcaa cctttctctc	1740
ttcaga	1746

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Виділений білок, причому вказаний білок щонайменше на 90 % ідентичний SEQ ID NO:31.
2. Виділений білок, який містить послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:35 і SEQ ID NO:1.
- 10 3. Виділений полінуклеотид, який кодує білок за п. 1 або 2.
4. Полінуклеотид за п. 3, де вказаний полінуклеотид щонайменше на 90 % ідентичний послідовності, вибраній з групи, що складається з SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:36.
5. Спосіб боротьби з комахою *Lepidopteran*, причому вказаний спосіб включає контактування
- 15 вказаної комахи з білком за п. 1 або 2.
6. Клітина рослини, яка продукує білок за п. 1 або 2.
7. Мікробна клітина, що містить полінуклеотид за п. 3.
8. Рослина, що містить множину клітин за п. 6.
9. Білок за п. 1, де вказаний білок щонайменше на 99 % ідентичний SEQ ID NO:31.



Показники пошкодження при харчуванні для фрагментів листя, заражених *in vitro* новонародженими личинками совки трав'яної (FAW) і совки трав'яної, стійкої до CryII (rFAW). Трансгенні рослини TE, вибрані після трансформації pDAS5162, поділяли на дві групи за допомогою скринінгу шляхом імуноблотингу з використанням антитіла DIG152RPC1: рослини, які не продукують DIG-109 (зліва на фігурі), і рослини, які мають рівні DIG-109, що піддаються детекції (в центрі фігури). Позитивні по DIG-109 рослини ранжовані по рівню експресії (зліва направо; від найбільш нижчого до найвищого). Аналіз НР для DSM2 проводили на 36 трансформованих pDAS5162 лініях. Проста подія вбудовування, що визначається як 1-2 копії гену, виявлялася в 95% зразків. Результати біоаналізу для рослини позитивного і негативного контролю представлені праворуч на фігурі.



Фіг. 1

Комп'ютерна верстка О. Гергіль

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