



República Federativa do Brasil  
Ministério de Desenvolvimento, Indústria  
e Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(21) PI 0808895-0 A2**



\* B R P I 0 8 0 8 8 9 5 A 2 \*

(22) Data de Depósito: 03/03/2008

**(43) Data da Publicação: 02/09/2014**  
**(RPI 2278)**

**(51) Int.Cl.:**

C12N 15/29

A01N 63/00

A01N 65/00

A01P 7/04

C07K 14/415

C12N 1/15

C12N 1/19

C12N 1/21

C12N 5/10

**(54) Título:** PROTEÍNA DE RESISTÊNCIA A INSETOS DERIVADAS DE UMA PLANTA, GENE DE RESISTÊNCIA A INSETOS, VETOR RECOMBINANTE, CÉLULA HOSPEDEIRA, CÉLULA DE PLANTA, TRANSFORMANTE, MÉTODO PARA PRODUIR UM TRANSFORMANTE, PROTEÍNA E AGENTE DE RESISTÊNCIA A INSETOS **(57) Resumo:**

**(30) Prioridade Unionista:** 02/03/2007 JP JP2007-052798

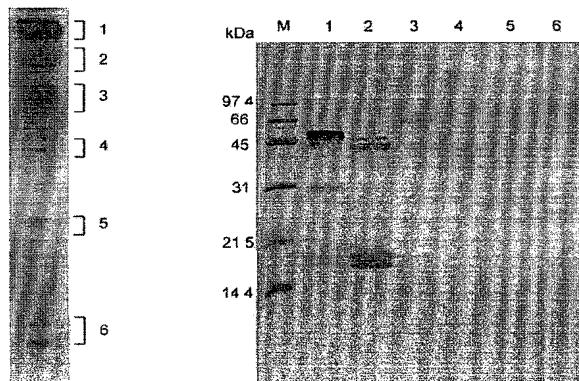
**(73) Titular(es):** NATIONAL INSTITUTE OF AGROBIOLOGICAL SCIENCES

**(72) Inventor(es):** KOTARO KONNO

**(74) Procurador(es):** Antonio Mauricio Pedras Arnaud

**(86) Pedido Internacional:** PCT JP2008053794 de 03/03/2008

**(87) Publicação Internacional:** WO 2008/108345de  
12/09/2008



“PROTEÍNA DE RESISTÊNCIA A INSETOS DERIVADAS DE UMA PLANTA, GENE DE RESISTÊNCIA A INSETOS, VETOR RECOMBINANTE, CÉLULA HOSPEDEIRA, CÉLULA DE PLANTA, TRANSFORMANTE, MÉTODO PARA PRODUZIR UM TRANSFORMANTE, 5 PROTEÍNA E AGENTE DE RESISTÊNCIA A INSETOS”.

Campo da invenção

A presente invenção refere-se a uma proteína resistente a insetos; um gene resistente aos insetos codificante da proteína resistente aos insetos; um vetor recombinante 10 contendo o gene resistente ao inseto; uma célula hospedeira e uma célula de planta transferida com o vetor recombinante; um transformante transformado pelo gene resistente ao inseto e um método para produzir o mesmo; uma proteína recuperada pelo mesmo; e um agente 15 resistente ao inseto compreendendo eles como ingrediente ativo.

Histórico da técnica anterior

Uma proteína tendo resistência a insetos (doravante denominada como “proteína resistente ao inseto”) é um 20 material essencial para transferência de genes dentro de uma planta para realizar a criação da hereditariedade de uma planta geneticamente resistente a insetos. Pode ser também utilizado como um novo agente resistente ao inseto tal como químicos agrícolas por pulverização de uma 25 proteína resistente a insetos expressos em microorganismos, células cultivadas e animais multicelulares individuais e plantas e recuperados.

As proteínas resistentes a insetos que são utilizados amplamente industrialmente incluem toxinas Bt (proteínas) 30 produzidas por *Bacillus thuringiensis* que é uma bactéria Gram-positiva.

A referida toxina Bt em concentrações baixas (cerca de 1 ppm) são conhecidas por exibir atividade de resistência a insetos e inseticidas (ver, por exemplo, os documentos 1 35 e 2 de não-patentes).

Entretanto, as toxinas Bt acima são derivadas a partir da bactéria e assim ter uma resistência profunda ao uso como

fontes genéticas para recombinantes, tais como recombinação gênica e, portanto, tem sido desejado detectar proteínas resistentes a insetos a partir de plantas.

5 Em contraste, como proteínas resistentes a insetos derivadas de plantas, os inibidores de proteases são obtidos de *Vigna sinensis* (por exemplo, ver o documento 3 de não-patente ou o documento de patente 1), os inibidores de amilase derivados de feijão (por exemplo,  
10 ver o documento 4 de não-patente) e lecitinas derivadas de *campanilla* branca (por exemplo, ver o documento 5 não-patente ou o documento de patente 2) são conhecidos.

Documento 1 de não patente: "Canadian Journal of Microbiology", 51, 988-995 (2005);

15 Documento 2 de não patente: "Journal of pesticide Reform", 14, 13-20 (1994);

Documento 3 de não patente: "Pest Management Science", 57, 57-65 (2001);

20 Documento 4 de não-patente: "Plant Physiology", 107, 1233-1239 (1995);

Documento 4 de não-patente: "Journal of Insecto Physiology", 43, 727-739 (1997);

Documento de Patente 1: Patente norte-americana No.: US 4,640,836; e

25 Documento de Patente 2: Patente norte-americana No.: US 5,545,820.

#### Descrição da invenção

##### Problema técnico

Entretanto, não pode ser dito que as toxinas Bt que são  
30 proteínas resistentes a insetos descritos nos documentos 1 e 2 de não-patente tenham suficiente resistência aos insetos. De fato, parece que os insetos têm resistência a toxinas Bt, tal como *Plutella xylostella* e *Ostrinia furnacalis*.

35 Os inibidores de protease descritos no documento 3 não-patente ou no documento 1 de patente, acima mencionados demonstrem apenas um certo grau de atividade de

resistência a insetos como reduzir o crescimento de larvas de teias por metade de duas semanas mesmo quando adicionados em altas concentrações alcançando 2% das proteínas totais.

5 Os inibidores de amilase descritos no documento 4 de não-patente acima mencionado, quando expressos em *Pisum sativum*, matam apenas 70% de vicia faba (Bruchidae) por elevada expressão de 2-3% das proteínas solúveis totais dos feijões, mas 30% cresce normalmente. Adicionalmente,  
10 a expressão de 1% mostra a referida atividade de resistência a inseto fraca e que 80% ou mais creste até a fase adulta normalmente.

As lecitinas descritas no documento 5 de não-patente ou no documento 2 de patente tem uma atividade de  
15 resistência a insetos extremamente fraca e que o peso de uma larva de teia alimentada com uma dieta artificial provida abundantemente com uma concentração de 2% das proteínas totais durante um mês é reduzida em cerca de 20%.

20 Em outras palavras, todos os inibidores de protease, inibidores de amilase e lecitinas descritos nos documentos 3-5 não-patentes e nos documentos 1 e 2 de patentes tem uma atividade de resistência a inseticida insuficiente.

25 Um objetivo da presente invenção é prover uma proteína de resistência a insetos apresentando uma resistência suficiente para insetos mesmo em pequenas quantidades; um gene de resistência a insetos codificando a referida proteína de resistência a insetos; um vetor recombinante  
30 contendo o referido gene de resistência a insetos; uma célula hospedeira e uma célula de planta transferida com o vetor recombinante; um transformante transformado pelo gene de resistência a insetos e um método para produzir o mesmo; uma proteína recuperada do mesmo; e um agente de  
35 resistência a insetos compreendendo eles como ingredientes ativos.

Solução do problema

Os inventores da presente solução entenderam através das pesquisas para resolver os problemas acima e descobriram assim que, as proteínas obtidas a partir de látex de planta, uma proteína tendo uma determinada seqüência de aminoácidos tem uma excelente resistência a insetos. Como resultado de uma pesquisa extensiva adicional, os presentes inventores descobriram que os problemas acima podem ser resolvidos, e a presente invenção foi assim completada.

10 Especificamente, a presente invenção refere-se a (1) uma proteína de resistência a insetos derivada de uma planta, compreendendo uma primeira seqüência de aminoácidos tendo uma homologia de 50% ou mais com uma seqüência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 1 na listagem de seqüências, uma segunda seqüência de aminoácidos tendo uma homologia de 50% ou mais com uma seqüência de aminoácidos representada pela SEQ.ID.NO:2 na listagem de seqüência e uma terceira seqüência de aminoácidos tendo uma homologia de 50% ou mais com uma seqüência de aminoácidos representada pela SEQ.ID.NO:3 na listagem de seqüências, onde a segunda seqüência de aminoácidos tem pelo menos uma seqüência spppp.

A presente invenção refere-se a (2) a proteínas resistentes a insetos de acordo com o item (1) acima, onde a segunda seqüência de aminoácidos está posicionada entre a primeira seqüência de aminoácidos e a terceira seqüência de aminoácidos.

A presente invenção refere-se a (3) uma proteína resistente a insetos derivada de uma planta, compreendendo uma quarta seqüência de aminoácidos tendo uma homologia de 50% ou mais com uma seqüência de aminoácidos representada pela SEQ.ID.NO.:4, na listagem de seqüências e pelo menos uma seqüência spppp.

A presente invenção refere-se a (4) uma proteína resistente a insetos derivada de uma planta, compreendendo uma quinta seqüência de aminoácidos tendo uma homologia de 50% ou mais com uma seqüência de

aminoácidos representada pela SEQ.ID.NO:5 na listagem de seqüências e pelo menos uma seqüência de spppp.

5 A presente invenção refere-se à (5) proteína resistente a insetos de acordo com o item (1) acima, onde a planta é uma planta morácea ("moraceous") e a proteína resistente a insetos sendo extraída a partir do látex da referida planta morácea.

10 A presente invenção refere-se a (6) uma proteína resistente a insetos obtida pela extração de um látex de uma planta morácea, centrifugação do referido látex para separar um sobrenadante, eletroforese do referido sobrenadante, e coleta da proteína resistente a insetos a partir de uma fração tendo um peso molecular de 50-60 kDa.

15 A presente invenção refere-se a (7) um gene de resistência a insetos codificando a proteína resistente a insetos de acordo com qualquer um dos itens (1) a (6) acima.

20 A presente invenção refere-se a (8) um gene de resistência a insetos, derivado de uma planta, compreendendo um sexto DNA tendo uma homologia de 50% ou mais com o DNA constitutivo de uma seqüência de bases representada pela SEQ.ID.NO:16 na listagem de seqüências e pelo menos uma seqüência de base codificando uma seqüência spppp.

A presente invenção refere-se a (9) o gene de resistência a insetos, de acordo com o item (8) acima, onde o sexto DNA é hibridizado com o DNA constitutivo de uma seqüência de base complementar sob condições limitadas.

30 A presente invenção refere-se a (10) um gene de resistência a insetos, derivado de uma planta, compreendendo um sétimo DNA tendo uma homologia de 50% ou mais como DNA constitutivo de uma seqüência de bases representada pela SEQ.ID.NO:7 na listagem de seqüências e pelo menos uma seqüência de bases codificando uma seqüência spppp.

A presente invenção refere-se ao (11) gene de resistência

a insetos de acordo com o item (10) acima, onde o sétimo DNA é hibridizado com o DNA constitutivo de uma seqüência de base complementar sob condições limitadas.

5 A presente invenção refere-se a (12) um vetor recombinante compreendendo o gene de resistência a insetos de acordo com qualquer um dos itens (8) a (11) acima.

10 A presente invenção refere-se a (13) uma célula hospedeira transferida com o vetor recombinante de acordo com o item (12) acima.

A presente invenção refere-se a (14) uma célula de planta transferida com o vetor recombinante de acordo com o item (12) acima.

15 A presente invenção refere-se a (15) um transformante transformado pelo gene de resistência a insetos, conforme definido em qualquer um dos itens (8) a (11) acima.

20 A presente invenção refere-se a (16) um método para produzir um transformante transformado pelo gene de resistência a insetos, definido de acordo com qualquer um dos itens (8) a (11) acima.

A presente invenção refere-se a (17) uma proteína recuperada pela célula hospedeira, definida de acordo com o item (13) acima.

25 A presente invenção refere-se a (18) uma proteína recuperada pela célula de planta, definida de acordo com o item (14) acima.

A presente invenção refere-se a (19) uma proteína recuperada pelo transformante definido de acordo com o item (15) ou o item (16) acima.

30 A presente invenção refere-se a (20) um agente resistente a insetos compreendendo como um ingrediente ativo a proteína de resistência insetos, definida de acordo com qualquer um dos itens de (1) a (6) acima.

35 A presente invenção refere-se a (21) um agente de resistência a insetos compreendendo como um ingrediente ativo o gene resistente a insetos, definido de acordo com qualquer um dos itens (8) a (11) acima.

Adicionalmente, uma configuração na qual os itens (1) a (21) possam ser apropriadamente combinados pode ser também adotada se servir ao objetivo da presente invenção.

5 Vantagens e efeitos

De acordo com uma proteína de resistência a insetos da presente invenção, uma suficiente resistência a insetos é mostrada mesmo em uma concentração extremamente baixa.

10 Adicionalmente, a proteína de resistência a insetos acima mencionada é derivada de uma planta e tem uma baixa toxicidade para humanos.

Além disso, a proteína de resistência a insetos acima, através de sua coexistência com alcalóides de imitação do açúcar ou outros fatores de resistência a insetos, tem  
15 uma ação de estímulo das funções dos referidos fatores de resistência a insetos.

A proteína de resistência acima, onde a planta é uma planta morácea e a proteína de resistência a insetos é extraída de um látex da referida planta morácea, está  
20 contida abundantemente no referido látex em uma das muitas porcentagens e, portanto, é purificado de forma relativamente fácil.

A proteína de resistência a insetos acima mencionada, quando utilizada como um agente de resistência a insetos,  
25 pode facilmente remove insetos que prejudicam humanos ou insetos que inibem o crescimento de plantas.

De acordo com o gene da presente invenção, o gene pode ser transferido para dentro de uma planta para realizar a criação da hereditariedade de uma planta geneticamente  
30 resistente a insetos geneticamente.

O vetor recombinante da presente invenção mostra a função de transmissão do gene acima dentro de um hospedeiro externo/exógeno. Desse modo, o gene acima pode ser integrado dentro de um outro gene.

35 Por exemplo, o vetor recombinante acima pode ser transferido dentro de células hospedeiras ou células de plantas.

De acordo com o transformante da presente invenção, nas plantas transformadas com o gene acima, a operação complicada de pulverização dos químicos agrícolas pode ser omitida, e um efeito pode ser facilmente produzido  
5 contra as pragas de insetos que se ficam ocultos nos tecidos das plantas tais como caules e são difíceis de serem exterminados.

De acordo com a proteína recuperada pela célula hospedeira, a célula de planta e o transformante,  
10 apresentam suficiente resistência a insetos.

A proteína de resistência acima mencionada e o gene de resistência a insetos são preferivelmente utilizados como ingredientes ativos de um agente de resistência a insetos.

15 Melhor forma de realização da invenção

Uma configuração preferida da presente invenção é descrita em detalhes.

(Proteína de resistência a insetos)

A proteína de resistência a insetos da presente invenção,  
20 derivada de uma planta, compreende uma primeira seqüência de aminoácidos tendo uma homologia de 50% ou mais com a seqüência de aminoácidos representada pela SEQ.ID.NO:1, na listagem de seqüências, (doravante também convenientemente relacionada como "primeiro fragmento de  
25 proteína"), uma segunda seqüência de aminoácidos tendo uma homologia de 50% ou mais com a seqüência de aminoácidos, representada pela SEQ.ID.NO:2, na listagem de seqüências, (daqui em diante também convenientemente referida como "segundo fragmento de proteína") e uma  
30 terceira seqüência de aminoácidos tendo uma homologia de 50% ou mais com a seqüência de aminoácidos representada pela SEQ.ID.NO:3, na listagem de seqüências, (daqui em diante também convenientemente relacionada como "terceiro fragmento de proteína"), onde as homologias acima são  
35 respectivamente independentes.

As proteínas resistentes aos insetos definidas acima têm a primeira seqüência de aminoácidos, a segunda seqüência

de aminoácidos e a terceira seqüência de aminoácidos, onde a segunda seqüência de aminoácidos tem pelo menos uma seqüência spppp e, portanto, mostra suficiente resistência a insetos mesmo em uma concentração  
5 extremamente baixa.

No caso de uma homologia de 100%, a seqüência de aminoácidos representada pela SEQ.ID.NO:1, na listagem de seqüências (primeiro fragmento de proteína) é a mesma que a primeira seqüência de aminoácidos, a seqüência de  
10 aminoácidos representada pela SEQ.ID.NO:2, na listagem de seqüências, (segundo fragmento de proteína) é o mesmo que a segunda seqüência de aminoácidos, e a seqüência de aminoácidos representada pela SEQ.ID.NO:3, na listagem de seqüências (terceiro fragmento de proteína) é o mesmo que  
15 a terceira seqüência de aminoácidos.

Consequentemente, no caso de uma homologia de 100%, a proteína resistente a insetos da presente invenção compreende a seqüência de amino ácidos representada pela SEQ.ID.NO:1, na listagem de seqüências, a seqüência de  
20 aminoácidos representada pela SEQ.ID.NO:2, na listagem de seqüências e a seqüência de aminoácidos representada pela SEQ.ID.NO:3, na listagem de seqüências.

O primeiro fragmento de proteína acima e o terceiro fragmento de proteína acima são porções de ligação de  
25 quitina e são observados por ter uma homologia com a proteína de ligação de quitina do tipo hevein derivados de borracha.

Como utilizado aqui, uma proteína de ligação da quitina imitando tipo-hevein significa uma proteína tendo uma  
30 propriedade de ligação para a quitina tendo uma única ou uma pluralidade de seqüências de aminoácidos constituídas de cerca de 40 aminoácidos, que é visto no tipo hevein e imitando um sítio de ligação de quitina dos quais o interior é reticulado por resíduos de cisteína, em  
35 moléculas.

Por outro lado, a repetição de uma seqüência específica spppp (SerProProProPro) é vista no segundo fragmento de

proteína acima. Adicionalmente, de acordo com a proteína de resistência da presente invenção, a segunda seqüência de aminoácidos tem pelo menos uma seqüência spppp.

5 Como utilizado aqui, a seqüência spppp significa uma seqüência na qual tipicamente 4, algumas vezes 3-7 resíduos Pro estão ligados juntos após Ser. A referida seqüência spppp são caracterizadas por geralmente uma pluralidade de repetições.

10 A proteína resistente a insetos da presente invenção compreende a primeira seqüência de aminoácidos, a segunda seqüência de aminoácidos e a terceira seqüência de aminoácidos e, portanto, apresenta uma excelente resistência aos insetos.

15 Como utilizado aqui, a resistência aos insetos significa uma propriedade inseticida ou a característica de inibir o crescimento dos insetos (daqui em diante relacionado como "propriedade de inibir o crescimento").

20 A ordem da seqüência da primeira seqüência de aminoácidos, a segunda seqüência de aminoácidos e a terceira seqüência de aminoácidos, não é particularmente limitada, mas, a segunda seqüência de aminoácidos é preferivelmente posicionada entre a primeira seqüência de aminoácidos e a terceira seqüência de aminoácidos.

Neste caso, mais resistência a insetos é demonstrada.

25 A proteína de resistência a insetos da presente invenção é constituída de, por exemplo, uma quarta seqüência de aminoácidos tendo uma homologia de 50% ou mais com a seqüência de aminoácidos representada pela SEQ.ID.NO:4, na listagem de seqüências (daqui em diante também referida como "seqüência de aminoácidos parcialmente  
30 ativa"). No caso de uma homologia de 100%, a seqüência de aminoácidos (seqüência de aminoácidos parcialmente ativa) representada pela SEQ.ID.NO:4, na listagem de seqüências é a mesma que a quarta seqüência de aminoácidos.

35 A referida quarta seqüência de aminoácidos tem pelo menos uma seqüência spppp, e a seqüência de aminoácidos é identificada pela reação da transcrição inversa do RNA

total derivado de um látex para um padrão.

Na seqüência de aminoácidos parcialmente ativa, o segundo  
fragmento de proteína é observado no aminoácido de número  
46-97, e o primeiro fragmento de proteína e o terceiro  
5 fragmento de proteína estão presentes no aminoácido de  
número 6-44, e o aminoácido de número 106-144,  
respectivamente, de modo a ter um sanduíche com o segundo  
fragmento de proteína. Adicionalmente, na seqüência de  
aminoácidos parcialmente ativo, a função da seqüência de  
10 aminoácidos iniciando no aminoácido de número 145 não é  
definitivo, mas acredita-se ter a informação de uma  
enzima para a decomposição da quitina.

De acordo com a proteína de resistência a insetos  
compreendendo a seqüência de aminoácidos parcialmente  
15 ativa, a resistência a insetos é seguramente demonstrada.  
A proteína de resistência aos insetos da presente  
invenção compreende, por exemplo, uma quinta seqüência de  
aminoácidos tendo uma homologia de 50% ou mais com a  
seqüência de aminoácidos representada pela SEQ.ID.NO:5,  
20 na listagem de seqüência (daqui em diante também referida  
como "seqüência de aminoácidos de extensão completa").  
Adicionalmente, no caso de uma homologia de 100%, a  
seqüência de aminoácidos representada pela SEQ.ID.NO:5 na  
listagem de seqüências (seqüência de aminoácidos de  
25 extensão completa) é a mesma que a quinta seqüência de  
aminoácidos.

A referida quinta seqüência de aminoácidos tem pelo menos  
uma seqüência spppp, e a seqüência de aminoácidos é  
identificada pela reação de transcrição inversa do RNA  
30 total, derivado de um látex para um padrão.

A seqüência de aminoácidos de extensão completa inclui  
uma seqüência de aminoácidos parcialmente ativa.  
Especificamente, o número do aminoácido é 1-21 da  
seqüência de aminoácidos de extensão completa é  
35 adicionado à seqüência de aminoácidos parcialmente ativa.  
Na seqüência de aminoácidos de extensão completa, o  
segundo fragmento de proteína é observado no aminoácido

número 67-118, e o primeiro fragmento de proteína e o terceiro fragmento de proteína estão presente no aminoácido de número 27-65 e no aminoácido número 127-165, respectivamente, de modo a ter um sanduíche do  
5 segundo fragmento de proteína.

Além disso, na seqüência de aminoácidos de extensão completa, a seqüência de aminoácidos na base de número 1-21 é acreditada como tendo a informação posicional para integrar a proteína de resistência a inseticida acima  
10 dentro de uma posição apropriada.

Em adição, a função da seqüência de aminoácidos iniciando no aminoácido de número 165 não é definida, mas acredita-se ter a informação de uma enzima para decomposição da quitina.

15 De acordo com a proteína de resistência a insetos constituída de uma seqüência de aminoácidos de extensão completa, uma seqüência de aminoácidos irá integrar dentro de uma posição precisa e, portanto, a resistência a insetos é muito mais certamente demonstrada. Além  
20 disso, a proteína de resistência a insetos constituída desta seqüência de aminoácidos é excelente na resistência a insetos apesar de não exibir atividade de quitinase.

Os insetos contra os quais a proteína de resistência a insetos exibe atividade de resistência a insetos incluem  
25 insetos pertencentes a *Coleoptera*, *Lepidoptera*, *díptera*, *Hymenoptera*, *Hemiptera*, *Orthoptera*, *Odonata*, *etc.*, e artrópodes tais como ácaros.

Em adição, a proteína de resistência a insetos acima definida, derivada de uma planta tem, portanto, baixa  
30 resistência aos consumidores e baixa toxicidade para humanos em comparação com as proteínas derivadas de bactérias.

A referida planta não é particularmente limitada a, mas é preferivelmente, uma planta contendo um látex.

35 Exemplos específicos incluem plantas pertencentes à família das *Asteraceae*, a família das *Cmpanulaceae*, a família das *Convolvulaceae*, a família das *Moraceae*, a

família das *Euphorbiaceae*, a família das *Asclepiadaceae*, a família das *Apocynaceae*, a família das *Musaceae*, a família das *Papaveraceae*, a família das *Anacardiaceae*, a família das *Buttiferæ*, a família das *Leguminosae*, a  
5 família das *Cactaceae*, a família das *Liliaceae*, etc.

Destas, a planta acima é uma planta pertencente a família das *Moraceae*. Especificamente, a proteína de resistência a insetos acima é mais preferivelmente, extraída do látex de plantas moráceas.

10 Quando a proteína de resistência a insetos é extraída das plantas moráceas, ela está contida abundantemente no látex das plantas moráceas e, portanto, é facilmente purificada.

A proteína de resistência a insetos, por sua coexistência  
15 com os fatores de resistência a insetos tais como alcalóides de imitação do açúcar, tem uma ação de estimular as funções dos fatores de resistência a insetos.

Os alcalóides que imitam o açúcar, descritos acima  
20 incluem, 1,4-dideoxi-1,4-imino-D-arabinitol, 1-deoxinojirimicina, 1,4-dideoxi-1,4-imino-D-ribitol, etc. Para ambos os terminais da seqüência de aminoácidos representada pela SEQ.ID.NO:4 ou 5, na listagem de seqüências, outros aminoácidos podem ser ligados.

25 Neste caso, a partir do ponto de vista de demonstração de excelente resistência a insetos, 0,1% de massa ou mais da quantidade total da proteína contendo os outros aminoácidos acima é preferivelmente contido na seqüência de aminoácidos acima, e 0,2% de massa ou mais é mais  
30 preferivelmente contida na seqüência de aminoácidos acima.

A proteína de resistência a insetos acima é, preferivelmente, utilizada nos agentes de resistência a insetos tais como inseticidas, químicos agrícolas e iscas  
35 para insetos resistentes.

Como utilizado aqui, as iscas para insetos resistentes significam iscas que contenham uma substância de

resistência a insetos e apresente resistência a insetos por alimentação do inseto com esta. Especificamente, quando a proteína de resistência a insetos é utilizada como uma isca para insetos resistentes, por alimentação, 5 por exemplo, os insetos que prejudicam humanos ou inibem o crescimento de plantas a partir deste, o crescimento dos insetos é inibido ou os insetos são mortos e, portanto, os insetos podem ser facilmente removidos.

10 A homologia da proteína de resistência a insetos da presente invenção é descrita abaixo.

A proteína de resistência a insetos da presente invenção compreende uma primeira seqüência de aminoácidos tendo uma homologia de 50% ou mais com a seqüência de aminoácidos representada pela SEQ.ID.NO:1, na listagem de 15 seqüências, uma segunda seqüência de aminoácidos tendo uma homologia de 50% ou mais com a seqüência de aminoácidos representada pela SEQ.ID.NO:2, na listagem de seqüências e, uma terceira seqüência de aminoácidos tendo uma homologia de 50% ou mais com a seqüência de 20 aminoácidos representada pela SEQ.ID.NO:3, na listagem de seqüências.

Preferivelmente, a proteína de resistência a insetos da presente invenção também compreende uma quarta seqüência de aminoácidos tendo uma homologia de 50% ou mais com a 25 seqüência de aminoácidos representada por SEQ.ID.NO:4, na listagem de seqüências.

Mais preferivelmente, a proteína de resistência a insetos da presente invenção compreende ainda uma quinta seqüência de aminoácidos tendo uma homologia de 50% ou 30 mais com a seqüência de aminoácidos representada por SEQ.ID.NO:5, na listagem de seqüências.

Como utilizado aqui, uma homologia de 50% ou mais significa que, em uma determinada seqüência de aminoácidos (primeiro fragmento de proteína, segundo 35 fragmento de proteína, terceiro fragmento de proteína, seqüência de aminoácidos parcialmente ativa e seqüência de aminoácidos de extensão completa), 50% ou mais de

aminoácidos estão na mesma seqüência. Especificamente, isto significa que um ou uma pluralidade de aminoácidos de menos que 50% de uma determinada seqüência de aminoácidos pode ser alterado por substituição, deleção, 5  
adição, e/ou inserção.

A homologia acima é, preferivelmente, de 70% ou mais, mais preferivelmente de 80% ou mais, ainda mais preferivelmente de 90% ou mais, ainda mais preferivelmente de 95% ou mais, ainda mais preferivelmente de 98% ou mais, particularmente preferida 10  
99% ou mais, mais preferivelmente 100% ou mais.

Em uma determinada seqüência de aminoácidos (primeiro fragmento de proteína, segundo fragmento de proteína, terceiro fragmento de proteína, seqüência de aminoácidos 15  
parcialmente ativa, seqüência de aminoácidos de extensão completa), o número dos aminoácidos que são substituídos, deletados, adicionados e/ou inseridos não é particularmente limitado onde o DNA codificando a seqüência de aminoácidos tem uma resistência a insetos 20  
desejada, mas é preferivelmente nove ou menos, mais preferivelmente, quatro ou menos.

Se ela estiver nesta faixa, a resistência a insetos não é seguramente eliminada.

Adicionalmente, a proteína de resistência a insetos acima inclui, por exemplo, um mutante, um derivado, um alelo, 25  
uma variante, e um homólogo que codifica a proteína constituída da mesma seqüência de aminoácidos ilustrado na SEQ.ID.NO:4 ou 5 exceto que um ou uma pluralidade de aminoácidos são substituídos, deletados, adicionados e/ou 30  
inseridos.

Métodos para preparação do DNA de acordo com a referida seqüência de aminoácidos incluem, por exemplo, um mutagêneses sítio-direcionada (Kramer, W. & Fritz, H.-J. (1987), construção dirigida a oligonucleotídeo da via de 35  
mutagêneses do DNA de dupla hélice. Métodos de Enzimologia, 154:350-367).

A homologia de uma seqüência de aminoácidos pode ser

determinada usando o algoritmo BLAST por Carlin e Altschul (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 87:2264-2268, 1990, "Proc. Natl. Acad. Sci.", USA 90: 5873, 1993). Além disso, programas relacionados ao BLASTN e BLASTX com

5 base no algoritmo BLAST têm sido desenvolvidos (Altschul SF, et al.: "J. Mol. Biol.", 215:403, 1990). Quando uma seqüência de aminoácidos é analisada usando BLASTX, parâmetros são representados como, por exemplo, contagem=50 e comprimento=3. Quando os programas BLAST e

10 GAPPED BLAST são utilizados, os parâmetros de falha dos respectivos programas são utilizados. Além disso, os procedimentos específicos destes métodos de análise são bem conhecidos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

(Síntese da proteína de resistência a insetos)

15 A proteína de resistência a insetos da presente invenção pode ser sintetizada por um método de fase-sólida, um método de fase-líquida e uma síntese biológica. Como utilizado aqui, o método de fase sólido refere-se a um método compreendendo: o uso, como uma fase sólida, por

20 exemplo, gotas de gel de polímero de poliestireno tendo um diâmetro de cerca de 0,1 mm tendo superfícies modificadas com um grupo amino; cadeias de aminoácidos individualmente estendidas deste ponto por reação de desidratação; e corte de uma seqüência de peptídeo

25 completa de interesse a partir da superfície de fase sólida para obter uma substância de interesse. Em adição, o método de fase líquida compreende realizar a síntese de uma fase líquida sem a fixação de peptídeos a ser sintetizado em uma fase sólida, onde a purificação é

30 realizada quando um resíduo de aminoácido for estendido. A síntese biológica acima é um método de construção de um DNA artificial, no qual as regiões codificadoras tendo os códigos genéticos para os peptídeos a serem sintetizados são emparelhados, sob o controle de um promotor adequado

35 para expressão abundante, a ser sintetizado com as células de cultura de *E. coli*, leveduras, insetos ou animais invertebrados. Adicionalmente, as células vivas

podem não ser utilizada sempre, e o sistema de transcrição-tradução livre de células usando extrato de células contendo todos os fatores relacionados com a transcrição e a tradução de genes pode ser utilizada.

5 (Coleta da proteína de resistência a insetos)

A proteína de resistência a insetos da presente invenção é colhida como descrito abaixo.

Primeiro, o látex de plantas moráceas é extraído e é separado em uma camada de sobrenadante e uma camada de partícula. A separação significa então, não ser particularmente limitada a, mas incluindo, centrifugação, 10 filtragem, etc.

Quando a centrifugação for realizada como o meio de separação, a força centrífuga é preferivelmente de 15,000-20,0000 G e a rotação é, preferivelmente, 15 realizada por 1-60 minutos.

Portanto, um sobrenadante contendo pelo menos 5% (taxa de massa (g) para volume (ml)) de uma proteína desejada é obtido. Em adição, o sobrenadante obtido é, 20 preferivelmente, filtrado através de um filtro tendo um diâmetro de furo de 0,1-0,8  $\mu\text{m}$  após a centrifugação. Desse modo, as impurezas tais como contaminações podem ser seguramente removidas.

A proteína de resistência a insetos da presente invenção 25 é então extraída a partir do sobrenadante obtido. O referido meio de extração inclui cromatografia de filtragem em gel, eletroforese, cromatografia de troca iônica, etc.

Destes, a eletroforese é a preferida, e a eletroforese em 30 condição de não-denaturação (native\_PAGE) é a mais preferida.

Neste caso, tem uma vantagem de ser capaz de remover eficientemente outras proteínas. Adicionalmente, a eletroforese acima abrange a eletroforese livre de 35 veículo, eletroforese em papel, eletroforese usando gel de agarose ou de poliacrilamida, eletroforese de concentração isoelétrica, eletroforese bi-dimensional,

eletroforese capilar e eletroforese de campo pulsado.

Aqui, um caso de realização de eletroforese em gel de poliacrilamida na condição de não-denaturação é descrita. Primeiro, uma solução tampão ajustada a um pH de 6,8-8,8 com um tampão tal como um tampão TBS, um tampão PBS, um

5 tampão TE, um tampão TAE ou um tampão TBE. O gel de poliacrilamida é então introduzido de modo que a taxa de mistura seja de 12,5% (taxa de massa (g) para volume (ml)). Em adição, o sobrenadante acima é

10 introduzido para realização de eletroforese. Então, o sobrenadante é fracionado dentro de várias bandas. Uma fração tendo um peso molecular de 50-60 kDa é coletada a partir desta e cultivada para obter a proteína de resistência a insetos da presente invenção.

15 (Gene)

O gene da presente invenção codifica a proteína de resistência insetos acima mencionada.

Especificamente, o gene de resistência a insetos, que é derivado de uma planta, tem o sexto DNA tendo uma

20 homologia de 50% ou mais, com o DNA constituído da seqüência de base mostrada na SEQ.ID.NO:6, na listagem de seqüências. Adicionalmente, a seqüência de base mostrada na SEQ.ID.NO:6, codifica a seqüência de aminoácidos mostrada na SEQ.ID.NO:4.

25 Em adição, o gene de resistência a insetos, que é derivado de uma planta, tem o sétimo DNA tendo uma homologia de 50% ou mais com o DNA constituído da seqüência de base mostrada na SEQ.ID.NO:7, na listagem de seqüências. Além disso, a seqüência de base mostrada na

30 SEQ.ID.NO:7, codifica a seqüência de aminoácidos mostrada na SEQ.ID.NO:5. Adicionalmente, os genes de resistência a insetos têm pelo menos uma seqüência de base codificando a seqüência spppp acima mencionada.

35 Como usado aqui, o gene de resistência a insetos, mencionado acima se refere a um fator de especificação do caráter genético. Tipicamente, o gene é seqüenciado em um

cromossomo.

Em adição, o DNA acima abrange o DNA genômico, o cDNA e o DNA quimiosintético. Adicionalmente, o DNA genômico e o cDNA podem ser preparados por um método bem conhecido.

5 No caso de uma homologia de 100%, o DNA constituído da seqüência de base mostrado na SEQ.ID.NO:6, na listagem de seqüência, e o sexto DNA têm a mesma seqüência, e o DNA constituído da seqüência de base mostrada na SEQ.ID.NO:7, na listagem de seqüências e o sétimo DNA tem a mesma a  
10 seqüência.

Conseqüentemente, no caso de uma homologia de 100%, o gene de resistência a insetos da presente invenção tem o DNA constituído da seqüência de base mostrada na SEQ.ID.NO:6, na listagem de seqüências ou o DNA  
15 constituído da seqüência de base mostrado na SEQ.ID.NO: 7, na listagem de seqüências.

A seqüência de base mostrada na SEQ.ID.NO:6 ou 7, na listagem de seqüências é identificada por PCR utilizando um primer de degeneração construído a partir da seqüência  
20 de aminoácidos N-terminal identificada a partir da proteína purificada usando cDNA obtido por reação de transcrição inversa usando o RNA total derivado do látex de amora como um padrão.

De acordo com o gene de resistência a insetos da presente  
25 invenção, genes são transferidos dentro dos organismos tais como as plantas, microorganismos, células cultivadas, animais multicelulares e plantas e insetos para permitir a geração de hereditariedade dos organismos com o gene de resistência a insetos.

30 A homologia do gene de resistência a insetos da presente invenção está descrita abaixo.

O gene de resistência a insetos da presente invenção tem o DNA tendo 50% ou mais de homologia com o DNA constituído da seqüência de base mostrado na SEQ.ID.NO:6,  
35 na listagem de seqüências, ou a seqüência de base mostrado na SEQ.ID.NO:7, na listagem de seqüências.

Como utilizado aqui, uma homologia de 50% ou mais

significa que, em uma determinada seqüência de base (SEQ.ID.NO: 6 ou 7), 50% ou mais das bases estão na mesma seqüência. Especificamente, isto significa que uma ou uma pluralidade de bases de menos que 50% de uma determinada  
5 seqüência de base pode ser alterada por substituição, deleção, adição e/ou inserção.

A homologia acima é preferivelmente de 70% ou mais, mais preferivelmente, 80% ou mais, ainda mais preferivelmente 90% ou mais, ainda mais preferivelmente 95% ou mais,  
10 ainda mais preferivelmente 98% ou mais, particularmente mais preferivelmente 99% ou mais, mais preferivelmente 100%.

Na seqüência base do gene de resistência a insetos da presente invenção, o número dos nucleotídeos (genes) que  
15 são substituídos, deletados, adicionados e/ou inseridos não está particularmente limitado a, onde o DNA constituído da seqüência de base tem a desejada resistência a insetos, mas é preferivelmente nove ou menos, mais preferivelmente quatro ou menos.

20 Se ele está na faixa, a resistência a insetos não é eliminada seguramente.

Adicionalmente, o gene de resistência a insetos inclui, por exemplo, um mutante, um derivado, uma alelo, um variante e uma homologia que são constituídos da  
25 seqüência de base mostrado na SEQ.ID.NO:6 ou 7 exceto que um ou uma pluralidade de bases são substituídas, deletadas, adicionadas e/ou inseridas.

Os métodos para preparação do DNA de acordo com a referida seqüência de base, que são bem conhecidas dos  
30 técnicos no assunto, incluem, por exemplo, mutagêneses sítio-direcionadas (Kramer, W. & Fritz, H. - J., (1987), construção dirigida a oligonucleotídeos da via mutagêneses do DNA de dupla hélice. Os métodos em Enzimologia, 154:350-367).

35 A homologia de uma seqüência de base pode ser determinada usando o algoritmo BLAST por Carlin e Altschul ("Proc. Natl. Acad. Sci.", USA 87:2264-2268, 1990, "Proc. Natl.

Acad. Sci.", USA 90: 5878, 1993).

Quando uma seqüência de base é analisada usando BLASTX, os parâmetros são representados como, por exemplo, contagem=100 e comprimento =12. Quando os programas BLAST e GAPPED BLAST são utilizados, os parâmetros de falha dos  
5 respectivos programas são utilizados.

Por exemplo, de modo a preparar o DNA tendo uma homologia de 50% ou mais com o DNA constituído da seqüência de base mostrada na SEQ.ID.NO: 6 ou 7, uma técnica de  
10 hibridização (Southern, E.M. (1975) "Journal of Molecular Biology, 98, 503), ou uma técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) (Saiki, R. K., et al., (1985) "Science", 230, 1350-1354, Saiki, R. K. et al., (1988), "Science", 239, 487-491), pode ser utilizada.

Especificamente, o DNA constituído de uma seqüência de base tendo uma elevada homologia com a seqüência de base mostrada na SEQ.ID.NOs: 6 ou 7 pode ser isolada por hibridização sob condições severas usando o DNA constituído de uma seqüência de base complementar à  
20 seqüência de base mostrada na SEQ.ID.NO: 6 ou 7 como um primer.

O gene de resistência a insetos da presente invenção também abrange o DNA codificando uma proteína tendo equivalente resistência a insetos para uma proteína de  
25 resistência a insetos que pode ser isolada por uma técnica de hibridização ou PCR da mesma maneira.

Como utilizado aqui, a hibridização sob condições severas significa condições de, 6M de uréia, 0,4% de SDS e 0,5 x SSC ou condições de hibridização tendo equivalente  
30 severidade para o mesmo. Adicionalmente, o DNA tendo uma homologia maior, de modo que as condições de 6M uréia, 0,4% de SDS e 0,1 x SSC. Além disso, a temperatura pode ser de cerca de 40°C ou maior de acordo com as condições; se as condições tendo maior severidade são requeridas, a  
35 temperatura pode ser de cerca de 50°C ou mesmo cerca de 65°C.

O gene de resistência a insetos acima é preferivelmente

utilizado em agentes de resistência a insetos tal como inseticidas, químicos agrícolas, e iscas para insetos resistentes.

Como utilizado aqui, as iscas para insetos resistentes significam iscas que contém uma substância de resistência a insetos e apresenta resistência a insetos por alimentação dos insetos com as mesmas. Especificamente, quando o gene de resistência a insetos acima é utilizado como uma isca para insetos resistente, por alimentação, por exemplo, os insetos que prejudicam humanos ou inibem o crescimento de plantas, com isto, o crescimento dos insetos é inibido ou os insetos são mortos e, portanto, os insetos podem ser facilmente removidos.

(Vetor recombinante)

O vetor recombinante da presente invenção contém o gene de resistência a insetos mencionados acima.

O vetor recombinante da presente invenção mostra a função de carregar o gene de resistência a insetos, acima mencionado, para uma célula externa.

Desse modo, o gene de resistência a insetos acima, pode ser integrado dentro de outros genes de resistência a insetos.

Um vetor de transferência de *E. coli*-*Agrobacterium* ou do gênero é usado como o vetor recombinante acima mencionado.

(Célula hospedeira)

O vetor recombinante acima é transferido para dentro da célula hospedeira da presente invenção.

As células hospedeiras não são particularmente limitadas a, sendo células apropriadas para expressão de proteínas recombinantes, mas incluem, por exemplo, leveduras, células de vários animais, células de plantas e células de insetos, bem como *E. coli*.

Métodos bem conhecidos podem ser utilizados para transferência de um vetor recombinante dentro de uma célula hospedeira.

Por exemplo, métodos para transferência dentro de *E. coli*

incluem um método de transferência usando íons de cálcio (Mandel, M. & Higa, A. (1970) "Journal of Molecular Biology", 53, 158-162, Hanahan, d. (1983), "Journal of Molecular Biology", 166, 557-580), etc.

5 (Célula de Planta)

O vetor recombinante acima é transferido para dentro da célula de planta da presente invenção.

As células de planta incluem as células de plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas.

10 As plantas monocotiledôneas incluem, plantas *Gramineae* e plantas *Liliaceae*.

As plantas *Gramineae* incluem *Oryza sativa*, *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare*, milho (*Zeamays*), *Avena sativa*, *Sorghum bicolor*, *Secale cereale*, semente Foxtail, *Saccharum officinarum*, etc.

15 As plantas *Liliaceae* incluem *Allium fistulosum*, *Asparagus officinalis*, etc.

As plantas dicotiledôneas incluem plantas crucíferas, plantas leguminosas, plantas solanáceas, plantas curcubitáceas, plantas convolvuláceas, plantas rosáceas, plantas moráceas, plantas malváceas, etc.

20 As plantas crucíferas incluem *Arabidopsis thaliana*, *Brassica campestris*, rapé, *Brassica oleracea*, couve-flor, etc.

25 Plantas leguminosas incluem *Glycine Max*, *Phaseolus angularis*, *Phaseolus vulgaris*, *vigna sinensis*, etc.

As plantas solanáceas incluem *Lycopesicon esculentum*, *Solanum melongena*, *Solanum tuberosum*, *Nicotiana tabacum*, *Capsicum annum*, etc.

30 Plantas cucurbitáceas incluem *Cucumis melo acidulus*, *Cucumis sativus*, *Cucumis melo*, *citrullus*, etc.

Plantas convolvuláceas incluem *Pharbitis nil*, batata doce, *Calystegia*, etc.

35 Plantas rosáceas incluem rosas, morangueiros, *Malus domestica*, etc.

Plantas moráceas incluem amora, *Ficus carica*, *Ficus elastic*, etc.

Plantas malváceas incluem *Gossypium*, *kenaf*, etc.

As células da presente invenção também incluem células em corpo de plantas bem como células cultivadas. Em adição, protoplastos, ramos primários, ramos múltiplos, e raízes em cabeleira estão incluídos.

Métodos bem conhecidos podem ser utilizados para transferência do vetor recombinante dentro das células de plantas.

Por exemplo, um método de polietileno glicol, eletroporação, um método via *Agrobacterium*, um método de partícula carregada e do gênero está incluído.

(Transformante)

O transformante da presente invenção é transformado pelo gene acima mencionado.

O transformante pode ser produzido por métodos bem conhecidos dependendo do tipo da planta. Adicionalmente, as referidas plantas, as plantas monocotiledôneas acima mencionadas e plantas dicotiledôneas são usadas.

Por exemplo, um método de transferência de um gene dentro de um protoplasto por polietileno glicol para regenerar um corpo de planta (Datta, S.K. (1995) "In Gene Transfer to Plants (Potrykus I and Spangenberg Eds), PP 66-74), um método de transferência de um gene dentro de um protoplasto por pulsos elétricos para regenerar um corpo de planta (Toki et al, (1992) "Plant Physiol"., 100, 1503-1507), um método de transferência de um gene dentro de uma célula ou tecido por descompressão ou tratamento por pressão e eletroporação para regenerar um corpo de planta (método de eletroporação compreendendo o uso de descompressão/tratamento por pressão (Pedido de Patente Japonês publicado não examinado) (Tradução do pedido internacional No. 2005-534299), um método de transferência direta de um gene dentro de uma célula por um método de partícula carregada para regenerar um corpo de planta (Christous et al., (1991) Bio/technology, 9:957-962) e um método de transferência de um gene via *Agrobacterium* para regenerar um corpo de planta (método

de transformação de monocotiledôneas ultra-rápido - Patente No:3141042) está incluído.

A re-diferenciação das células de planta transformadas capazes de regeneração de um corpo de planta.

5 Os métodos de re-diferenciação, que depende do tipo de célula de planta, incluem, por exemplo, um método por Akama et al., ("Plant Cell Reports", 12:7-11 (1992)), para *Arabidopsis thaliana* e um método por Fujimura et al., ("Plant Tissue Culture Lett.", 2:74 (1995)) para  
10 *Oryza sativa*.

Se um corpo de planta transformado no qual o gene de resistência a insetos da presente invenção ou DNA suprimir a expressão do gene de resistência a insetos da presente invenção é transferido dentro de um genoma é  
15 obtido, um descendente pode ser provido a partir do corpo de planta transformado por reprodução sexual ou assexuada.

Os corpos de plantas transformados podem ser também baseados na produção em massa nos materiais de geração  
20 (por exemplo, sementes, frutas, ceras, bulbos, tubérculos, tronco, calo, protoplastos, etc.) obtidos a partir dos corpos de plantas transformadas, bem como descendentes ou clones dos mesmos. Adicionalmente, os corpos de plantas transformadas incluem não apenas os  
25 corpos de plantas transferidas com gene de resistência a insetos, mas também os corpos de planta transferidos com o gene de resistência a insetos para preparar uma proteína de resistência a insetos.

As células da planta transferidas com o gene de  
30 resistência a insetos da presente invenção, os corpos de planta incluindo a referida célula de planta, descendente e clones dos referidos corpos de plantas, descendentes e clones dos mesmos, também estão incluídos nos transformantes acima.

35 Por exemplo, no caso de um inseto (bicho-da-seda), um vetor recombinante produzido com base no piggyBac pode ser transformado utilizando um método de Tamura et al.,

(Nat. Biotechnol. 18, 81-84, 2000).

De acordo com o transformante da presente invenção, nas plantas transformadas com o gene acima, a operação complicada de pulverização dos químicos agrícolas pode ser omitida, e um efeito pode ser facilmente produzido  
5 contra pragas de insetos que ficam escondidos nos tecidos das plantas tais como caules e são difíceis para pulverizar os químicos agrícolas.

(Proteína recuperada)

10 A proteína da presente invenção é recuperada a partir das células hospedeiras acima, das células de plantas acima e dos transformantes acima mencionados.

Por exemplo, as proteínas recombinantes expressas em células hospedeiras podem ser purificadas a partir das  
15 células hospedeiras ou cultura de sobrenadante por métodos bem conhecidos para recuperar as proteínas. Além disso, quando uma proteína recombinante é expressa como uma proteína de fusão com a proteína de ligação a maltose acima mencionada, a purificação por afinidade pode ser  
20 facilmente realizada.

Os microorganismos, células cultivadas, animais multicelulares e plantas, e insetos, que são transformantes transferidos com o gene de resistência a insetos da presente invenção, são produzidas, e proteínas  
25 expressas nos transformantes podem ser recuperados.

As referidas proteínas recuperadas podem ser utilizadas como um agente de resistência a insetos tais como químicos agrícolas tendo resistência a insetos por  
pulverização.

30 (Agente de resistência a insetos)

O agente de resistência a insetos da presente invenção contém a proteína de resistência a insetos acima-mencionada ou o gene de resistência a insetos acima-mencionados como um ingrediente ativo.

35 Quando a proteína de resistência a insetos acima mencionada é utilizada como um agente de resistência a insetos, grosso modo purificada ou organismos purificados

tais como microorganismos, plantas e animais incluindo a proteína de resistência a insetos ou a proteína de resistência a insetos rudemente purificada ou purificada por um procedimento bioquímico a partir da proteína de  
5 resistência a insetos expressa nos organismos é utilizada. A proteína purificada ou rudemente purificada está relacionada como uma proteína de resistência a insetos purificada.

Como forma da proteína de resistência a insetos purificada, pode ser utilizada a líquida, o pó ou a forma  
10 granular, um tablete ou do gênero. Adicionalmente, um agente de extensão, um agente de dilatação ou do gênero pode ser apropriadamente adicionado aos agentes de resistência a insetos.

15 A taxa de conteúdo da proteína de resistência a insetos purificados incluída em um agente de resistência a insetos pode ser de 0,01% de massa ou mais com relação à quantidade total do agente de resistência a insetos, preferivelmente 0,02% de massa ou mais a partir do ponto  
20 de vista de confiança.

Como descrito acima, a proteína de resistência a insetos da presente invenção mostra suficiente resistência a insetos mesmo em quantidade pequena.

Quando o gene de resistência a insetos acima é utilizado  
25 como um agente de resistência a insetos, um organismo purificado ou rudemente purificado tal como microorganismos, plantas e animais incluindo o gene de resistência a insetos ou o gene de resistência a insetos rudemente purificados ou purificados por um procedimento  
30 bioquímico a partir do gene de resistência a insetos expressos nos organismos é utilizado.

O gene rudemente purificado ou purificado é relacionado como um gene de resistência a insetos purificados.

Como a forma do gene de resistência a insetos purificados, pode ser utilizada na forma líquida, em pó,  
35 ou a forma de grânulos, um tablete ou do gênero. Adicionalmente, um agente de extensão, um agente de

dilatação ou do gênero pode ser apropriadamente adicionado aos agentes de resistência a insetos.

A taxa de conteúdo do gene de resistência a insetos purificados, incluída em um agente de resistência a insetos pode ser de 0,01% de massa ou mais com relação à quantidade total do agente de resistência a insetos, preferivelmente, 0,02% de massa ou mais a partir do ponto de vista de confiança.

Como descrito acima, o gene de resistência a insetos da presente invenção mostra suficiente resistência a insetos em uma quantidade pequena.

Exemplos:

A presente invenção é descrita abaixo com relação aos exemplos, mas não está limitada aos mesmos.

(Coleta da proteína de resistência a insetos)

Um látex extraído (500  $\mu$ l) a partir de uma planta morácea (espécies: *Shin-ichinose*) foi centrifugado com uma centrífuga (nome do produto: KUBOTA Inverter Micro Refrigerated Centrifuge 1920, feito por Kubota Corporation), onde as condições da centrifugação são a velocidade de rotação de 13,000 rps e 15 minutos.

Em adição, um sobrenadante separado foi tomado e filtrado através de um filtro de 0,45  $\mu$ m.

Subseqüentemente, a eletroforese foi realizada.

Na eletroforese, 400  $\mu$ l do sobrenadante foi misturado com uma quantidade igual do tampão Native-PAGE, um gel de poliamida foi adicionado dentro da mistura de modo a ter 12,5% (taxa de massa por volume), e eletroforese Native-PAGE foi realizada nas condições de não-denaturação (temperatura ambiente de 25°C e pH 6,8-8,8).

Os resultados obtidos são mostrados na figura 1 (a).

Em adição, os géis das porções de banda No.: 1-6, mostrada na figura 1 (a) foram respectivamente cortadas, imersas em 1,0 ml do TBS (Salina Tris-tamponada) tampão (pH 6,8) e cultivado a 4°C durante a noite para prover as soluções de proteína.

As soluções de proteína resultante No.1-6 estão

relacionadas como as frações 1-6, respectivamente, abaixo.

Adicionalmente, a fração 1 contendo as proteínas a partir das bandas de 50-60 kDa; a fração 2 contendo as proteínas a partir das bandas de 44, 18 kDa; a fração 3 contendo uma proteína com uma banda de 60 kDa; uma fração 4 contendo a proteína a partir de uma banda de 43 kDa; uma fração 5 contendo quase nenhuma proteína; e a fração 6 contendo proteínas com bandas de 30, 25 kDa.

10 (Descrição do Experimento)

(Exame da fração principal)

A determinação da proteína das frações de 1-6 foi realizada por um método de ácido bicincônico (Análise de proteína BCA, Kit de reagente, corporação PERCE), a purificação foi realizada, e a eletroforese SDS-PAGE (15% de gel, 15 µl/coluna) foi realizada para as respectivas frações.

As imagens de migração dos resultados obtidos são mostradas na figura 1(b). Adicionalmente M na figura 1(b) significa um marcador molecular.

Os resultados revelaram que as frações 1-3 foram as frações principais das proteínas dos látex.

(Avaliação da resistência a insetos 1)

Os tampões de proteína (30 µl) das respectivas frações 1-6 foram misturados com 100 mg de L4M (dieta úmida preparada por adição de pó seco e água (1:2,5) para dieta artificial para insetos *Euryphagous* e vaporização da mistura; feito pela Nosan Corporation), as misturas foram alimentada para as larvas incubadas do bicho-da-seda Eri (Inseto lepidóptera *Euryphagous saturniid*), e seus pesos foram medidos após 2 dias e 4 dias. Adicionalmente, as concentrações de proteína da fração 1 e da fração 2 neste caso foram 1mg/ml, e a concentração da proteína da fração 3 foi de 0,4 mg/ml.

Os gráficos dos resultados obtidos das frações 1-3 estão ilustrados na figura 2. Além disso, na figura 2, o eixo geométrico vertical representa os pesos das larvas

incubadas e o eixo geométrico horizontal representa os dias.

Como mostrado na figura 2, a atividade resistente a insetos extraordinária (atividade de inibição de crescimento) foi vista na fração 1 que é uma fração tendo um peso molecular de 50-60 kDa. Em contrapartida, nenhuma atividade de resistência a insetos (atividade de inibição de crescimento) foi vista nas frações 2 e 3.

Nas frações 4-6, nenhuma atividade de resistência a insetos foi vista também em todas (não ilustrado).

(Avaliação 2 de resistência a insetos)

Soluções da proteína da fração 1 foram misturadas com 1g de L4M de modo a se ter 0 (controle), 90, 180 e 270  $\mu\text{g}$ , as misturas foram alimentadas às larvas incubadas do bicho da seda Eri, e seus pesos foram medidos após 2 dias e 4 dias.

Os gráficos dos resultados obtidos estão ilustrados na figura 3. Além disso, na figura 3, o eixo geométrico vertical representa o peso das larvas incubadas e o eixo geométrico horizontal representa os dias.

Como é aparente a partir da figura 3, a proteína contida na fração 1, de acordo com a presente invenção foi confirmada por permitir a redução no aumento de crescimento (aumento de peso) em baixas concentrações de 90 e 180  $\mu\text{g/g}$  (0,01-0,02% de massa por dieta de umidade, 0,03-0,06% massa por dieta seca, 0,1-0,2% por dieta de proteína), na metade.

A inibição efetiva do crescimento também foi notavelmente mostrada após 2 dias, um aumento de peso também foi reduzido na metade após 2 dias, etc., (o aumento foi ainda reduzido após 4 dias), e ele também foi descoberto assim que a proteína teve um efeito de inibição do crescimento notável em curto tempo.

As concentrações acima mencionadas são de 10-100 vezes menores do que àquelas das proteínas descobertas até agora e pesquisadas para uso prático, e esta proteína é assim considerada por ter um efeito por unidade de peso,

que é de 10-100 vezes maior do que àquelas das proteínas de resistência a insetos que têm sido utilizadas (inibidores de amilase, lecitinas e inibidores de protease).

5 (Avaliação 3 da resistência a insetos)

As soluções de proteína da fração 1 foram misturadas com 1 g de L4M de modo a ter 0 (controle), 120 e 300 mg, as misturas foram alimentadas às larvas incubadas de *Mamestra brassicae* pertencente ao gênero *Mamestra*, e seus  
10 pesos foram medidos após 6 dias e 10 dias.

Os gráficos dos resultados obtidos estão ilustrados na figura 4. Adicionalmente, na figura 4, o eixo geométrico vertical representa o peso das larvas incubadas e o eixo geométrico horizontal representa os dias.

15 Como é aparente a partir da figura 4, a proteína contida na fração 1, de acordo com a presente invenção foi confirmado pro permitir a redução no aumento do crescimento (aumento de peso) em concentrações baixas de 120 e 300 µg/g na metade ou menos.

20 (Resistência a protease)

As soluções de proteínas da fração 1 foram misturadas e tratadas com proteases ou suco digestivo de insetos nas referidas misturas de proporções como mostrado na Tabela 1, e resistência à protease foram examinadas pela  
25 eletroforese de SDS-poliacrilamida dos resultados das amostras.

Adicionalmente, o referido exame foi realizado nas condições do pH 8,8, 37°C e 24 horas.

As imagens de migração dos resultados obtidos são  
30 mostradas na figura 5.

TABELA 1

| No.: | Quantidade do tampão da proteína misturada | Protease                            | Quantidade da protease misturada |
|------|--------------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|
| 1    | 150 µg/ml<br>(concentração final)          | N/A                                 | 0                                |
| 2    | 150 µg/ml<br>(concentração final)          | Quimotripsina                       | 1 mg/ml<br>(concentração final)  |
| 3    | 150 µg/ml<br>(concentração final)          | Tripsina                            | 1 mg/ml<br>(concentração final)  |
| 4    | 0                                          | Quimotripsina                       | 1 mg/ml<br>(concentração final)  |
| 5    | 0                                          | Tripsina                            | 1 mg/ml<br>(concentração final)  |
| 6    | 150 µg/ml<br>(concentração final)          | Suco digestivo do bicho-da-seda Eri | 20% (diluída 5 vezes)            |
| 7    | 150 µg/ml<br>(concentração final)          | Suco digestivo do bicho-da-seda Eri | 20% (diluída 5 vezes)            |
| 8    | 0                                          | Suco digestivo do bicho-da-seda Eri | 20% (diluída 5 vezes)            |
| 9    | 0                                          | Suco digestivo do bicho-da-seda Eri | 20% (diluída 5 vezes)            |

Como será aparente a partir de 2, 3, 6 e 7 na figura 7, foi descoberto que a proteína contida na fração 1 de acordo com a presente invenção não é decomposta por várias enzimas proteolíticas (proteases) incluindo uma enzima proteolítica do suco digestivo dos insetos em todas, uma vez que as bandas são vistas nas posições de 50-60 kDa. Adicionalmente, os Nos.: 4, 5, 8 e 9, na figura 5 revelaram que as bandas não estão baseadas em proteases.

Isto indica que a proteína de resistência a insetos da presente invenção pode manter e efetuar a atividade mesmo no trato digestivo do inseto tendo alta atividade de protease.

Foi confirmado a partir dos resultados acima que a proteína de resistência a insetos da presente invenção apresenta suficiente resistência a insetos contra os

insetos mesmo em pequenas quantidades.

#### Aplicabilidade industrial

A proteína de resistência a insetos e o gene de resistência a insetos da presente invenção mostra  
5 suficiente resistência aos insetos mesmo em pequenas quantidades. Consequentemente, estes são preferivelmente utilizados nos agentes de resistência a insetos tais como inseticidas, químicos agrícolas e iscas para insetos resistentes.

#### 10 Breve descrição dos desenhos

A figura 1(a) representa uma vista ilustrativa dos resultados da eletroforese Native-PAGE nos Exemplos da presente invenção; e 1(b) representa uma fotografia  
15 indicando os resultados da eletroforese SDS-PAGE nos Exemplos da presente invenção;

A figura 2 representa um gráfico indicando os resultados da avaliação 1 da resistência a insetos, nos exemplos da presente invenção;

A figura 3 representa um gráfico indicando os resultados  
20 da avaliação 2 da resistência a insetos, nos exemplos da presente invenção;

A figura 4 representa um gráfico indicando os resultados da avaliação 3 da resistência a insetos nos exemplos da presente invenção; e

25 A figura 5 representa uma fotografia indicando os resultados da resistência a protease nos exemplos da presente invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. Proteína de resistência a insetos derivadas de uma planta, caracterizada pelo fato de compreender:
- 5 - uma primeira seqüência de aminoácidos tendo 50% ou mais de homologia com uma seqüência de aminoácidos representados pela SEQ.ID.NO.: 1 na listagem de seqüências;
  - uma segunda seqüência de aminoácidos tendo 50% ou mais de homologia com uma seqüência de aminoácidos representada pela SEQ.ID.NO.:2 na listagem de seqüências;
  - 10 e
  - uma terceira seqüência de aminoácidos tendo 50% ou mais de homologia com uma seqüência de aminoácidos representada pela SEQ.ID.NO.:3 na listagem de seqüências;
  - 15 onde a segunda seqüência de aminoácidos tem pelo menos uma seqüência spppp.
2. Proteína de resistência a insetos, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de a segunda seqüência de aminoácidos estar posicionada entre a
- 20 primeira seqüência de aminoácidos e a terceira seqüência de aminoácidos.
3. Proteína de resistência a insetos derivada de uma planta, caracterizada pelo fato de compreender:
- 25 - uma quarta seqüência de aminoácidos tendo 50% ou mais de homologia com uma seqüência de aminoácidos representada pela SEQ.ID.NO.: 4 na listagem de seqüências; e
  - pelo menos uma seqüência spppp.
4. Proteína de resistência a insetos derivada de uma
- 30 planta, caracterizada pelo fato de compreender:
- uma quinta seqüência de aminoácidos tendo 50% ou mais de homologia com uma seqüência de aminoácidos representada pela SEQ.ID.NO.: 5 na listagem de seqüências; e
  - 35 - pelo menos uma seqüência spppp.
5. Proteína de resistência a insetos, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de a planta ser

uma planta morácea; e a proteína de resistência a insetos ser extraída a partir do látex da referida planta morácea.

6. Proteína de resistência a insetos, caracterizada pelo fato de ser obtida por extração do látex de uma planta morácea, centrifugação do referido látex para separar um sobrenadante, eletroporação do referido sobrenadante em condições não-denaturantes para fracionar o sobrenadante, e colher a proteína de resistência a insetos a partir de uma fração tendo um peso molecular de 50-60 kDa.

7. Gene de resistência a insetos, caracterizado pelo fato de ser codificante da proteína de resistência a insetos, conforme definida em qualquer uma das reivindicações de 1 a 6.

8. Gene de resistência a insetos, derivado de uma planta, caracterizado pelo fato de compreender:

- uma sexta seqüência de DNA tendo 50% ou mais de homologia com o DNA constituído de uma seqüência de base representada pela SEQ.ID.NO.:6 na listagem de seqüências; e

- pelo menos uma seqüência de base codificante de uma seqüência spppp.

9. Gene de resistência a insetos, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de o sexto DNA ser hibridizada com o DNA constituído de uma seqüência de base complementar sob condições severas.

10. Gene de resistência a insetos, derivados de uma planta, caracterizado pelo fato de compreender:

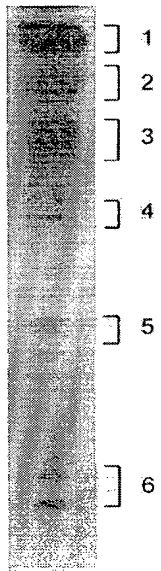
- uma sétima seqüência de DNA tendo 50% ou mais de homologia com o DNA constituído de uma seqüência de base representada pela SEQ.ID.NO.:6 na listagem de seqüências; e

- pelo menos uma seqüência de base codificante de uma seqüência spppp.

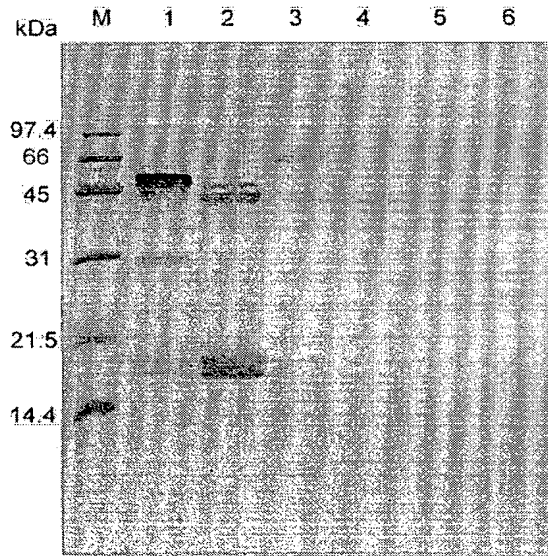
11. Gene de resistência a insetos, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de a sétima seqüência de DNA ser hibridizada com o DNA constituído de

- uma seqüência de base complementar sob condições severas.
12. Vetor recombinante, caracterizado pelo fato de compreender o gene de resistência a insetos, conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 8 a 11.
- 5 13. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de ser transferida com o vetor recombinante, conforme definido na reivindicação 12.
14. Célula de planta, caracterizada pelo fato de ser transferida como vetor recombinante, conforme definido na  
10 reivindicação 12.
15. Transformante, caracterizado pelo fato de ser transformado através do gene de resistência a insetos conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 8 a 11.
- 15 16. Método para produzir um transformante, caracterizado pelo fato de ser transformado pelo gene de resistência a insetos conforme definido em qualquer uma das reivindicações 8 a 11.
- 20 17. Proteína, caracterizada pelo fato de ser recuperada pela célula hospedeira conforme definida na reivindicação 13.
18. Proteína, caracterizada pelo fato de ser recuperada através da célula de planta conforme definida na reivindicação 14.
- 25 19. Proteína, caracterizada pelo fato de ser recuperada através do transformante definido conforme as reivindicações 15 ou 16.
20. Agente de resistência a insetos, caracterizado pelo fato de compreender como um ingrediente ativo a proteína  
30 de resistência a insetos conforme definida em qualquer uma das reivindicações de 1 a 6.
21. Agente de resistência a insetos, caracterizado pelo fato de compreender como um ingrediente ativo o gene de resistência a insetos conforme definido em qualquer uma  
35 das reivindicações de 8 a 11.

1/5



**FIG.1a**



**FIG.1b**

2/5

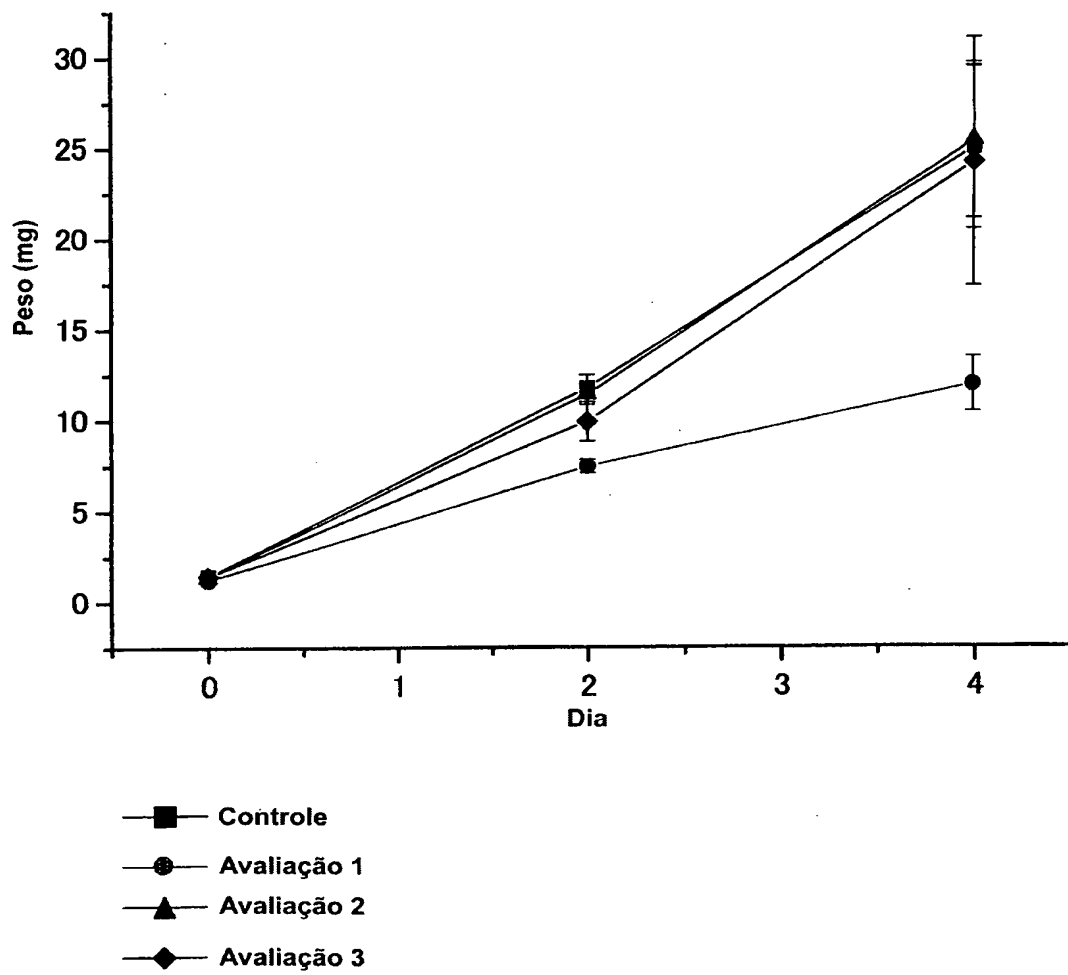
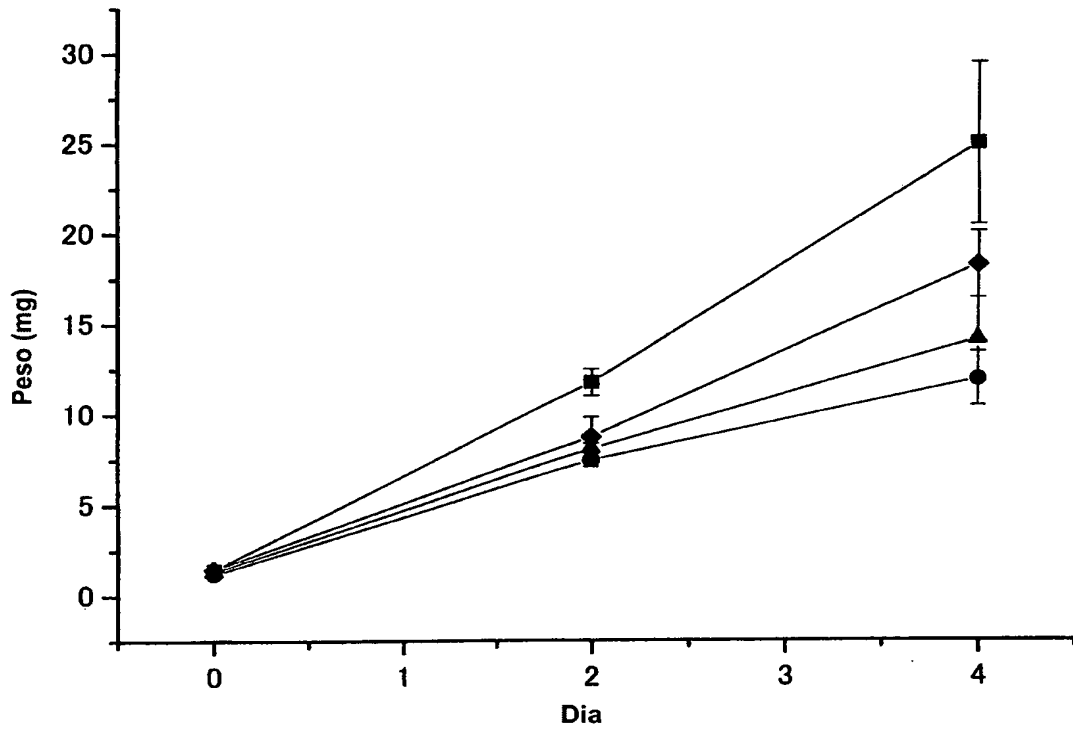


FIG.2

3/5



- Controle
- ◆— 90 µg/g dieta
- ▲— 180 µg/g dieta
- 270 µg/g dieta

FIG.3

4/5

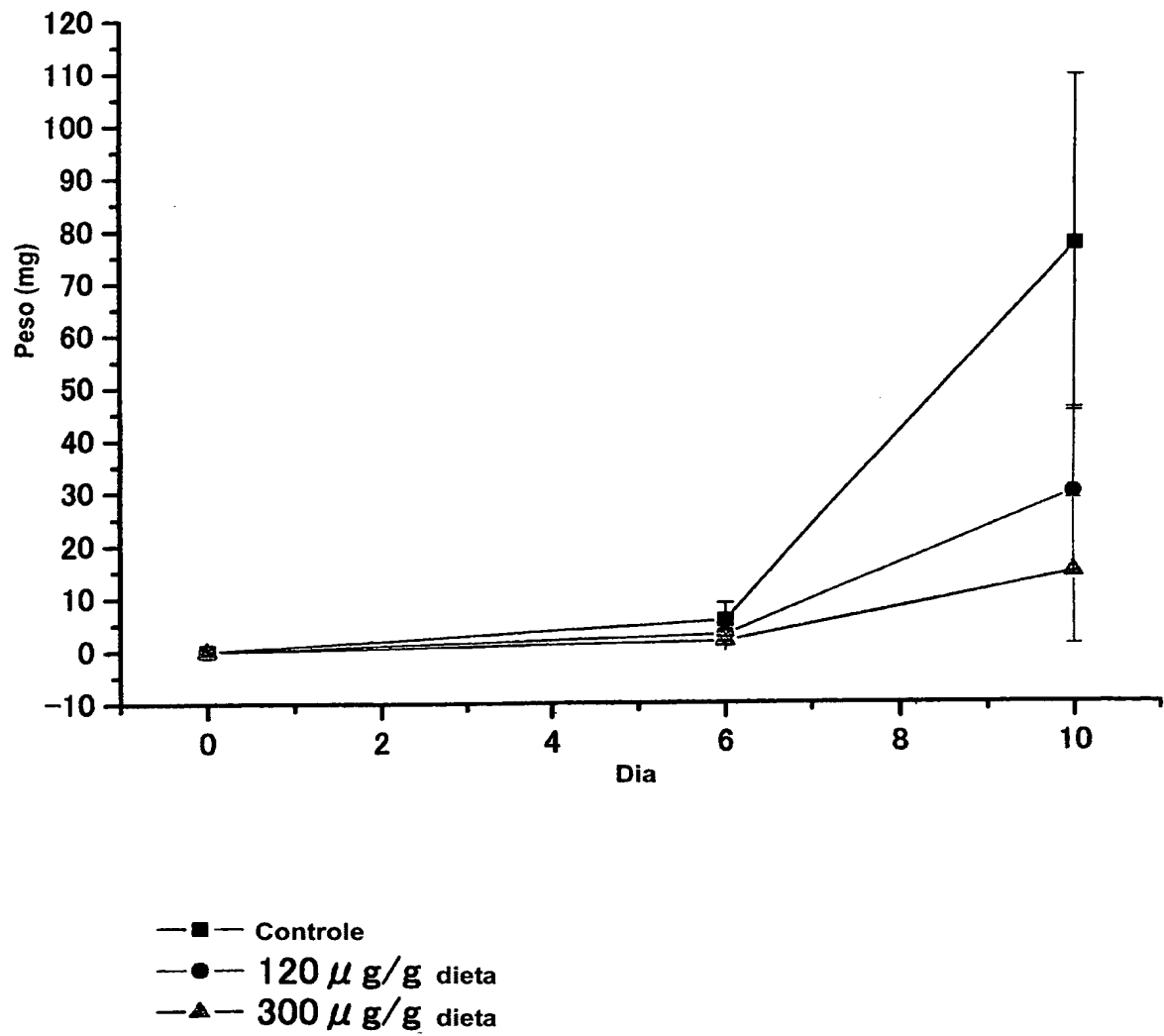
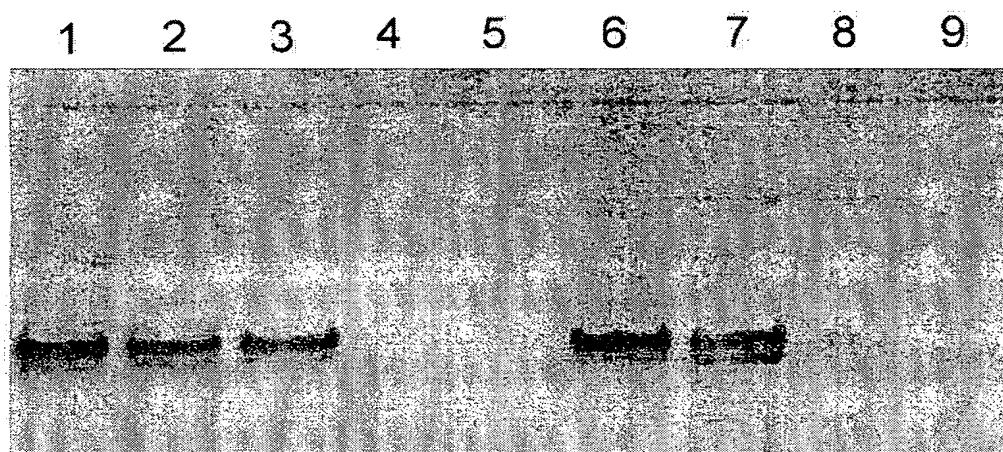


FIG.4

**5/5**



**FIG.5**

RESUMO

“PROTEÍNA DE RESISTÊNCIA A INSETOS DERIVADAS DE UMA PLANTA, GENE DE RESISTÊNCIA A INSETOS, VETOR RECOMBINANTE, CÉLULA HOSPEDEIRA, CÉLULA DE PLANTA, TRANSFORMANTE, MÉTODO PARA PRODUZIR UM TRANSFORMANTE, PROTEÍNA E AGENTE DE RESISTÊNCIA A INSETOS”.

São providos pela presente invenção uma proteína de resistência a insetos apresentando uma resistência suficiente aos insetos mesmo em pequenas quantidades; um gene de resistência a insetos codificante da referida proteína de resistência a insetos; um vetor recombinante contendo o referido gene de resistência a insetos; uma célula hospedeira e uma célula de planta tendo o vetor recombinante transferido para dentro de dela; um transformante transformado pelo gene de resistência a insetos e um método para produzir o mesmo; uma proteína recuperada através deste; e um agente de resistência a insetos compreendendo eles como ingredientes ativos. De acordo com a presente invenção, a proteína de resistência a insetos derivada de uma planta, compreende uma primeira seqüência de aminoácidos tendo 50% ou mais de homologia com a seqüência de aminoácidos representada pela SEQ.ID.NO:1, na listagem de seqüências; uma segunda seqüência de aminoácidos tendo 50% ou mais de homologia com a seqüência de aminoácidos representada pela SEQ.ID.NO:2, na listagem de seqüências; e uma terceira seqüência de aminoácidos tendo 50% ou mais de homologia com a seqüência de aminoácidos representada pela SEQ.ID.NO:3, na listagem de seqüências; onde a segunda seqüência de aminoácidos tem pelo menos uma seqüência spppp.





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

<210> 5  
 <211> 415  
 <212> PRT  
 <213> Amora

<400> 5

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

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Arg | Ala | Leu | Gly | Asn | Pro | Pro | Cys | Asn | Pro | Gly | Arg | Cys | Cys | Ser |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Ile | His | Asn | Trp | Cys | Gly | Ser | Thr | Ala | Ala | Tyr | Cys | Arg | Gly | Ser | Ser |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Cys | Gln | Tyr | Gln | Cys | Trp | Asn | Ser | Leu | Leu | Ser | Ala | Leu | Ile | Ser | Asn |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Gly | Asn | Asn | Ala | Ile | Ser | Lys | Ile | Ile | Ser | Lys | Ser | Val | Phe | Asp | Glu |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Met | Phe | Lys | His | Met | Lys | Asp | Cys | Pro | Ser | Lys | Gly | Phe | Tyr | Ser | Tyr |
|     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Asp | Ala | Phe | Ile | Ile | Ala | Thr | Thr | Ser | Phe | Pro | His | Phe | Gly | Thr | Thr |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Gly | Asp | Ile | Thr | Thr | Arg | Lys | Arg | Glu | Leu | Ala | Ala | Phe | Phe | Ala | Gln |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Thr | Ser | Leu | Ala | Thr | Thr | Gly | Gln | Arg | Phe | Asp | Ser | Gln | Asp | Leu | Tyr |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Val | Trp | Gly | Tyr | Cys | His | Ile | Asn | Glu | Thr | Thr | Asn | Gly | Asn | Asp | Asn |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Asp | Tyr | Cys | Thr | Ser | Ala | His | Trp | Pro | Cys | Pro | Ser | Gly | Lys | Lys | Tyr |
|     | 275 |     |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| Asn | Ser | Arg | Gly | Ala | Val | Gln | Leu | Thr | His | Asn | Tyr | Asn | Tyr | Gly | Leu |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
| Ala | Gly | Glu | Ala | Leu | Gly | Leu | Asp | Leu | Ile | Asn | Asn | Pro | Asp | Leu | Val |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |
| Ala | Thr | Asp | Pro | Val | Ile | Ser | Phe | Lys | Thr | Ala | Ile | Trp | Phe | Trp | Met |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |
| Ala | Gln | His | Asp | Asn | Lys | Leu | Ser | Cys | His | Asp | Ile | Leu | Ile | Asn | Ala |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |
| Asn | Ser | Gly | Tyr | Val | Ile | Gly | Asn | Ile | Ile | Lys | Asn | Ser | Gly | Tyr | Gln |
|     | 355 |     |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |
| Asn | Gly | Leu | Ile | Thr | Asn | Thr | Ile | Ser | Thr | Met | Arg | Gly | Ile | Gly | Tyr |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     | 380 |     |     |     |     |     |
| Tyr | Lys | Arg | Tyr | Cys | Asp | Met | Leu | Gly | Val | Ser | Tyr | Gly | Asp | Asn | Leu |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |
| Asp | Ser | Trp | Tyr | Asp | Gln | Thr | His | Phe | Ser | Glu | Val | Ala | Arg | Met |     |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |

<210> 6  
 <211> 1175  
 <212> DNA  
 <213> Amora

<400> 6  
 cacaatgtgg aagggatgca ggaggtgcct tatgccatgg caacttgtgt tgtagccatt 60  
 ggggtttttg tggtagcaca gccatctatt gtgacgttga tcaaggttgc caaagccaat 120  
 ttggagttc accacctcca ccaagcccac ctctcctcc accaagcccg cctccaccaa 180  
 gcccgcctcc accaagtcca cctccaccaa gcccgcctcc accaagtcca cctccaccaa 240  
 gtccgcctcc accaagtccg cctccaccaa gtccgcctcc cccaggcggc ccagaaagac 300  
 ccgatcaccg atgtggaaga gccctcggaa accctccatg taatccagga aggtgttcta 360  
 gtatccataa ttggtgtggc agtacagccg cttattgtag agggtaagc tgccaatacc 420  
 aatgttgga aattctctctt tctgctctaa tttcaaatgg caataatgct attagcaaga 480  
 tcattagtaa atccgttttc gatgaaatgt ttaagcacat gaaagattgt ccaagtaagg 540

|            |            |            |            |             |            |      |
|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------|
| gattttacag | ttatgatgct | ttcatcattg | ctactacatc | tttccctcat  | tttggtagta | 600  |
| ctggtgatat | tacaaccgct | aagagggagc | ttgctgcttt | ctttgctcaa  | acctctctag | 660  |
| caacaacagg | tcaacgtttt | gattcacaag | atctatatgt | ctggggatat  | tgtcatatca | 720  |
| atgagaccac | taatgggaat | gacaatgatt | attgtacatc | tgctcattgg  | ccatgtcctt | 780  |
| ctggcaaaaa | atataatagt | cgaggagccg | tgagctaac  | tcacaattac  | aattacggac | 840  |
| ttgccggtga | agctcttggg | ttagatttga | taaacaatcc | ggacttgggtg | gctacagacc | 900  |
| cagttatata | atttaagacc | gccataggtt | tttggatggc | tcaacacgac  | aataaacttt | 960  |
| cctgccatga | tattctcatc | aatgctaatt | ctggatatgt | gattggtaac  | ataatcaaaa | 1020 |
| attctggata | tcaaaatggc | cttattacca | atactattag | tactatgaga  | ggtattgggt | 1080 |
| actataagag | gtatttgtat | atgttgggtg | tgagctatgg | agataattta  | gattcttggg | 1140 |
| atgatcaaac | gcatttctcg | gaagttgctc | gaatg      |             |            | 1175 |

<210> 7  
 <211> 1245  
 <212> DNA  
 <213> Amora

|             |            |            |            |            |             |      |
|-------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------|
| <400> 7     |            |            |            |            |             |      |
| atgaagttta  | gaactctttt | aatcatcttc | tctcttgttt | ttctgctaga | aattgtctct  | 60   |
| gcaagtggagc | cacaatgtgg | aagggatgca | ggaggtgcct | tatgccatgg | caacttgtgt  | 120  |
| tgtagccatt  | gggtttttg  | tggtaccaca | gccatctatt | gtgacgttga | tcaaggttgc  | 180  |
| caaagccaat  | ggtggagttc | accacctcca | ccaagccac  | ctcctcctcc | accaagcccg  | 240  |
| cctccacca   | gcccgcctcc | accaagtcca | cctccacca  | gcccgcctcc | accaagtcca  | 300  |
| cctccacca   | gtccgcctcc | accaagtccg | cctccacca  | gtccgcctcc | cccaggcggc  | 360  |
| ccagaaagac  | ccgatcaccg | atgtggaaga | gccctcggaa | accctccatg | taatccagga  | 420  |
| aggtgttgta  | gtatccataa | ttggtgtggc | agtacagccg | cttattgtag | aggttcaagc  | 480  |
| tgccaatacc  | aatgttgga  | ttctctcctt | tctgctctaa | tttcaaatgg | caataatgct  | 540  |
| attagcaaga  | tcattagtaa | atccgttttc | gatgaaatgt | ttaagcacat | gaaagattgt  | 600  |
| ccaagtaagg  | gattttacag | ttatgatgct | ttcatcattg | ctactacatc | tttccctcat  | 660  |
| tttggtagta  | ctggtgatat | tacaaccgct | aagagggagc | ttgctgcttt | ctttgctcaa  | 720  |
| acctctctag  | caacaacagg | tcaacgtttt | gattcacaag | atctatatgt | ctggggatat  | 780  |
| tgtcatatca  | atgagaccac | taatgggaat | gacaatgatt | attgtacatc | tgctcattgg  | 840  |
| ccatgtcctt  | ctggcaaaaa | atataatagt | cgaggagccg | tgagctaac  | tcacaattac  | 900  |
| aattacggac  | ttgccggtga | agctcttggg | ttagatttga | taaacaatcc | ggacttgggtg | 960  |
| gctacagacc  | cagttatata | atttaagacc | gccataggtt | tttggatggc | tcaacacgac  | 1020 |
| aataaacttt  | cctgccatga | tattctcatc | aatgctaatt | ctggatatgt | gattggtaac  | 1080 |
| ataatcaaaa  | attctggata | tcaaaatggc | cttattacca | atactattag | tactatgaga  | 1140 |
| ggtattgggt  | actataagag | gtatttgtat | atgttgggtg | tgagctatgg | agataattta  | 1200 |
| gattcttggg  | atgatcaaac | gcatttctcg | gaagttgctc | gaatg      |             | 1245 |