



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0020760
(43) 공개일자 2017년02월24일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) A01N 37/46 (2006.01)
A01N 63/02 (2017.01) C07K 14/32 (2006.01)
C07K 14/325 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/8286 (2013.01)
A01N 37/46 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-7033870
- (22) 출원일자(국제) 2015년06월16일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2016년12월02일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2015/035914
- (87) 국제공개번호 WO 2015/195594
국제공개일자 2015년12월23일
- (30) 우선권주장
62/014,916 2014년06월20일 미국(US)

- (71) 출원인
다우 아그로사이언시즈 엘엘씨
미국 인디애나주 46268-1054 인디애나폴리스 자이언스빌 로드 9330
- (72) 발명자
압스트롱 잔나 마이
미국 46268 인디애나주 인디애나폴리스 자이언스빌 로드 9330
에데 오드리 제인
미국 46268 인디애나주 인디애나폴리스 자이언스빌 로드 9330
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
양영준, 류현경

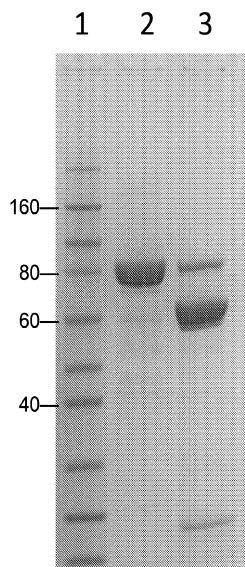
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **곤충 해충의 방제에 유용한 영양 살곤충 단백질**

(57) 요약

DIG-657 영양 살곤충 독소, 이러한 독소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 해충을 방제하기 위한 이러한 독소의 용도 및 이러한 독소를 생산하는 트랜스제닉 식물이 개시된다. 본 발명은 DIG-657 변이체, 단편 및 유사체를 포함한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A01N 63/02 (2013.01)

C07K 14/32 (2013.01)

C07K 14/325 (2013.01)

(72) 발명자

프레이 메간 엘 에프

미국 46268 인디애나주 인디애나폴리스 자이언즈빌
로드 9330

간드라 프렘찬드

미국 46268 인디애나주 인디애나폴리스 자이언즈빌
로드 9330

레더러 테드

미국 46268 인디애나주 인디애나폴리스 자이언즈빌
로드 9330

린 가오핑

미국 46077 인디애나주 자이언즈빌 프랭클린 트레
이스 981

마두리 크리쉬나 엠

미국 46268 인디애나주 인디애나폴리스 자이언즈빌
로드 9330

모워리 할리 알

미국 46239 인디애나주 인디애나폴리스 윈디 레인
10841

나르바 케네쓰

미국 46268 인디애나주 인디애나폴리스 자이언즈빌
로드 9330

시츠 조엘 제이

미국 93401 캘리포니아주 샌 루이스 오비스포 파크
테라스 2357

탄 셰크 이

미국 46268 인디애나주 인디애나폴리스 자이언즈빌
로드 9330

명세서

청구범위

청구항 1

DIG-657, DIG-657 변이체, DIG-657 단편 및 DIG-657 변이체 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된 살곤충 단백질을 코딩하는 핵산 서열의 발현을 유도하는 1종 이상의 이중 조절 서열을 포함하는 핵산 구축물.

청구항 2

제1항에 있어서, 서열식별번호: 1, 서열식별번호: 3, 서열식별번호: 4, 서열식별번호: 5, 서열식별번호: 6, 서열식별번호: 8, 서열식별번호: 9, 서열식별번호: 10, 서열식별번호: 12, 및 서열식별번호: 1에 대해 적어도 90 퍼센트 동일성을 갖는 핵산 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 핵산을 포함한 핵산 구축물.

청구항 3

DIG-657, DIG-657 변이체, DIG-657 단편 및 서열식별번호: 2의 잔기 206 내지 803을 포함하는 살곤충 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 단리된 살곤충 단백질.

청구항 4

제3항에 있어서, 서열식별번호: 2, 서열식별번호: 7, 서열식별번호: 11 및 서열식별번호: 13으로 이루어진 군으로부터 선택된 단리된 살곤충 단백질.

청구항 5

제1항의 핵산 서열을 포함하는 식물, 종자 또는 식물 부분.

청구항 6

제2항의 핵산 서열을 포함하는 식물, 종자 또는 식물 부분.

청구항 7

제3항의 살곤충 단백질을 포함하는 식물, 종자 또는 식물 부분.

청구항 8

제4항의 살곤충 단백질을 포함하는 식물, 종자 또는 식물 부분.

청구항 9

제5항에 있어서, 폴리펩티드가 유럽 옥수수 천공충(European Corn Borer), Cry1F 저항성 유럽 옥수수 천공충, 대두 자벌레(Soybean Looper), 벨벳빈 모충(Velvetbean Caterpillar), 회색담배나방(Tobacco Budworm), 목화다래벌레(Cotton Bollworm), 옥수수 이삭벌레(Corn Earworm) 및 배추좀나방(Diamondback Moth)으로 이루어진 군으로부터 선택된 곤충에 대한 살곤충 활성을 갖는 식물 또는 식물 부분.

청구항 10

제7항에 있어서, 폴리펩티드가 유럽 옥수수 천공충, Cry1F 저항성 유럽 옥수수 천공충, 대두 자벌레, 벨벳빈 모충, 회색담배나방, 목화다래벌레, 옥수수 이삭벌레 및 배추좀나방으로 이루어진 군으로부터 선택된 곤충에 대한 살곤충 활성을 갖는 식물 또는 식물 부분.

청구항 11

감수성 곤충을 유효량의 제3항의 단백질과 접촉시키는 단계를 포함하는, 감수성 곤충을 방제하는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 단백질이 서열식별번호: 2, 서열식별번호: 7, 서열식별번호: 11 및 서열식별번호: 13으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 13

제11항에 있어서, 감수성 곤충이 Cry1F 저항성 유럽 옥수수 천공충인 방법.

청구항 14

제11항에 있어서, 단백질이 서열식별번호: 2의 잔기 206 내지 803을 포함하는 것인 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 곤충 집단이 유럽 옥수수 천공충, Cry1F 저항성 유럽 옥수수 천공충, 대두 자벌레, 벨벳빈 모충, 회색담배나방, 목화다래벌레, 옥수수 이삭벌레 및 배추좀나방으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 16

비-트랜스제닉 식물을 곤충 저항성 식물 품종의 게놈 내로 안정하게 혼입된 DIG-657 독소의 발현을 유도하는 외래 DNA 구축물을 포함하는 트랜스제닉 식물을 사용하여 육종하는 단계 및 상기 곤충 저항성 식물로부터의 외래 DNA 구축물의 적어도 일부분을 분석함으로써 자손을 선택하는 단계를 포함하는, 곤충 저항성 식물 품종을 생산하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 관련 출원에 대한 상호 참조
- [0002] 본 출원은 2014년 6월 20일에 출원된 미국 가출원 62/014,916을 우선권 주장한다. 상기 가출원의 전체 내용은 본 출원에 참조로 포함된다.
- [0003] 발명의 분야
- [0004] 본 발명은 일반적으로 분자 생물학 분야에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 바실루스 투링기엔시스 (*Bacillus thuringiensis*)에서 발견된 새로운 영양 살곤충 단백질 독소로부터 개발된 새로운 살곤충 단백질 독소 및 곤충을 방제하기 위한 그의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

- [0005] 곤충 및 다른 해충으로 인해 농부는 작물 손실 및 이들 해충을 방제 하에 두기 위한 경비로 매년 수십억 달러의 비용을 지불한다. 재배지 작물의 손실에 추가로, 곤충 해충은 또한 채소 및 과일 재배자, 관상용 꽃의 생산자 및 가정 정원사에게도 부담이 된다. 농업 생산 환경에서 곤충 해충에 의해 야기된 손실은 작물 수확량의 감소, 작물 품질의 감소 및 수확 비용의 증가를 포함한다.
- [0006] 곤충 해충은 주로, 곤충 성장의 억제, 곤충 섭식 또는 생식의 방지, 또는 사멸 야기를 통해 활성을 갖는 화학적 살충제의 집중 적용에 의해 방제된다. 그에 따라 우수한 곤충 방제에 도달할 수 있지만, 이들 화학물질은 때때로 또한 다른 유익한 곤충에도 영향을 미칠 수 있다. 화학적 살충제의 폭넓은 사용으로부터 생성된 또 다른 문제는 저항성 곤충 집단의 출현이다. 이것은 다양한 저항성 관리 실시에 의해 부분적으로 완화되었지만, 대안적 해충 방제제에 대한 필요성이 증가하고 있다. 생물학적 해충 방제제, 예컨대 델타-내독소와 같은 살충 독소를 발현하는 바실루스 투링기엔시스 (Bt) 균주가 또한 작물 식물에 적용되어 만족스러운 결과를 가져왔으며, 화학적 살충제에 대한 대안 또는 보완을 제공하였다. 이들 델타-내독소의 일부를 코딩하는 유전자가 단리되었고, 이종 숙주에서의 그의 발현은 경제적으로 중요한 곤충 해충의 방제를 위한 또 다른 도구를 제공하는 것으로 제시되었다. 특히, 트랜스제닉 식물에서 살곤충 독소, 예컨대 바실루스 투링기엔시스 델타-내독소의 발현은 선택된 곤충 해충에 대하여 효율적인 보호를 제공하였고, 이러한 독소를 발현하는 트랜스제닉 식물은 상업화되어, 농부가 화학적 곤충 방제제의 적용을 줄이도록 하였다.
- [0007] 토양 미생물 바실루스 투링기엔시스는 부아포 결정질 단백질 봉입체를 특징으로 하는 그람-양성, 포자-형성 박

테리아이다. 바실루스 투린기엔시스는 계속해서 식물 혼입 살충제의 개발을 위한 신규 살곤충 단백질의 선두 공급원이다. 다양한 균주의 박테리아 단리물을 사용하여, 본 발명자들은 상업적으로 중요한 곤충 해충에 대하여 활성인 새로운 Bt 독소를 발명하였다. 북미 메이즈 곤충 저항성 시장에서는, 비록 다른 지리에서 다른 핵심 곤충 해충 (예를 들어, 헬리코베르파 아르미게라(*Helicoverpa armigera*) (목화다래벌레 "CBW" 또는 옥수수 이삭벌레 "CEW") 및 추가의 부수적이지만 중요한 곤충 해충 종이 있을 지라도, 스포도프테라 프루기페르다 (*Spodoptera frugiperda*) (가을 거염벌레 "FAW"), 오스트리니아 누빌랄리스 휘브너(*Ostrinia nubilalis* Hübner) (유럽 옥수수 천공충 "ECB") 및 헬리코베르파 제아 보디(*Helicoverpa zea* Boddie) (옥수수 이삭벌레 "CEW")가 핵심 유도 해충이다. Bt 독소는 생물살곤충제 시장의 90% 초과를 대표하고, 본질적으로 곤충 섭식에 대한 저항성을 제공하도록 개발된 트랜스제닉 작물을 위한 유전자의 전체 공급원을 대표한다. Bt 박테리아는 그의 유전자 및 단백질 구조에 따라 결정 (Cry), 세포독소 (Cyt) 및 영양 살곤충 단백질 (VIP) 독소를 포함한 살곤충 델타-내독소를 생산한다. Cry 독소는 포자 형성 동안에 불용성 결정 단백질로서 생산된다. 다른 한편으로, VIP 독소는 Bt 박테리아 성장의 영양 단계 동안에 가용성 단백질로서 생산된다. VIP 단백질은 Cry 단백질과 구조에 있어서 다르지만, 곤충 중장에 위치하는 세포에 작용하는 세공 형성체인 Cry 독소와 특성을 공유한다 (Yu, C.-G., et al., 1997 Appl. Environ. Microbiol. 63:532-536, Lee, M.K., et al., 2003, Appl. Environ. Microbiol. 69: 4648-4657, Shotkoski, F., et al., 2003, Proc. Beltwide Cotton Conf, 89-93). 본 발명자들은 현재 공지된 VIP 단백질 (Yu, C.-G., et al., 1997 Appl. Environ. Microbiol. 63:532-536)과 비교하여 특유한 것인, ECB에 대한 살곤충 활성을 포함한 광범위한 살곤충 활성을 갖는 새로운 VIP 독소의 발명을 본원에 기재한다.

[0008] 특허 문헌 WO2013/134523, WO 94/21795, WO 96/10083, 5,877,012, 6,107,279, 6,137,033 및 6,291,156, 뿐만 아니라 문헌 [Estruch et al. (1996, Proc. Natl. Acad. Sci. 93:5389-5394) 및 Yu et al. (1997, Appl. Environ. Microbiol. 63:532-536)]은 VIP3으로 불리는 살곤충 단백질의 부류를 기재한다. VIP3 유전자는 바실루스에 의해 그의 성장의 영양 단계 동안에 생산되고 분비되는 대략 88 kDa 단백질을 코딩한다. 이들 독소는 결정-형성 델타-내독소와는 다르다고 보고되었다. 이들 문헌은 VIP1A(a), VIP1A(b), VIP2A(a), VIP2A(b), VIP3A(a) 및 VIP3A(b)로 지정된 독소를 특허 참조한다. 또한, VIP 단백질의 작용 메카니즘 및 말단절단의 논의에 대해 문헌 [Lee et al., AEM vol. 69, no. 8 (August 2003), pages 4648-4657]을 참조한다.

[0009] VIP3A 단백질은 FAW, CEW, 아그로티스 입실론 후프나겔(*Agrotis ipsilon* Hufnagel) (검거세미밤나방 "BCW") 및 헬리오티스 비레센스 파브리시우스(*Heliothis virescens* Fabricius) (회색담배나방 "TBW")를 포함한 폭넓은 범위의 인시류 해충에 대한 살곤충 활성을 보유한다. 보다 최근에, VIP 단백질은 노린재류 곤충 해충의 특정 종에 대해 독성인 것으로 밝혀졌다 (Nanasaheb, P. et al., Toxins (Basel) vol. 4, no.6 (Jun 2012), pages 405-429, Sattar S. and Maiti M.K., J. Microbiol. Biotechnol. 2011, 21:937-946). 따라서, VIP 부류의 단백질은 고유한 범위의 살곤충 활성을 나타낸다. 다른 개시내용, WO 98/18932, WO 98/33991, WO 98/00546 및 WO 99/57282는 또한 현재 VIP3 부류의 단백질의 상동체를 확인시켜 주었다.

[0010] 곤충 해충을 방제하기 위한 화학적 및 생물학적 작용제의 계속된 사용은 곤충이 이러한 방제 조치에 대한 저항성을 발달시키도록 하는 기회를 높인다. 또한, 생물학적 방제제의 높은 선택성은 종종 단지 소수의 특정 곤충 해충만이 각각의 작용제에 의해 방제되도록 한다. ECB-저항성 트랜스제닉 옥수수의 성공에도 불구하고, 저항성 곤충 집단의 발달 가능성은 ECB 방제에서의 Cry 단백질의 장기 내구성을 위협하고, ECB 및 다른 해충을 방제하기 위한 새로운 Cry 또는 다른 유형의 생물학적 방제제를 발견 및 개발할 필요성을 창출한다. Bt Cry 단백질에 대한 곤충 저항성은 여러 메카니즘을 통해 발달할 수 있다 (Heckel et al., 2007, Pigott and Ellar, 2007). Cry 단백질에 대한 다수의 수용체 단백질 부류가 곤충들 내에서 확인되었으며, 다수의 예가 각각의 수용체 부류 내에 존재한다. 특정한 Cry 단백질에 대한 저항성은, 예를 들어 수용체 단백질의 카드헤린 도메인의 독소-결합 부분 내에서의 돌연변이에 의해 발생할 수 있다. 추가의 저항성 수단은 전독소-프로세싱 프로테아제를 통해 매개될 수 있다. 따라서, 인시류 종에서의 Cry 독소에 대한 저항성은 적어도 4종의 다른 주요 저항성 유전자에 의한 복잡한 유전적 기반을 갖는다. Cry 단백질에 대해 저항성을 갖는 인시류 곤충이 종 DBM (배추좀나방) (Tabashnik, 1994), 트리코플루시아 니 휘브너(*Trichoplusia ni* Hübner) (양배추 자벌레 "CL"; Janmaat and Myers 2003, 2005) 및 CEW (Tabashnik et al., 2008) 내의 분야에서 개발되었다. 따라서, 본원에 개시된 바와 같은 살충 단백질이 혼입된 새로운 고효력 식물의 개발 및 배포가 유용하면서도 필요하다.

[0011] 따라서, 농부에게 경제적 이익을 제공하며 환경적으로 허용되는 새롭고 효과적인 해충 방제제를 발견할 필요성이 남아있다. 기존 곤충 방제제 및 현재 방제제와 비교하여 동일하거나 증가된 효력을 갖는 방제제에 대해 저항성을 갖고 있거나 저항성을 갖게 될 수 있는 곤충 집단을 효율적으로 방제하는, 폭넓은 범위의 경제적으로 중

요한 곤충 해충을 표적화하는 방제제가 특히 필요하다.

발명의 내용

- [0012] 본 발명은 본원에서 DIG-657로 지정된 단백질 독소뿐만 아니라 DIG-657의 변이체를 포함한 살곤충 VIP 독소, 이들 독소를 코딩하는 핵산, 독소를 사용하여 해충을 방제하는 방법, 트랜스제닉 숙주 세포에서 독소를 생산하는 방법, 및 독소를 발현하는 트랜스제닉 식물을 제공한다. 본 발명은 DIG-657, DIG-657 변이체 및 DIG-657 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된 살곤충 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 구축물을 추가로 제공한다. DIG-657, DIG-657 변이체, DIG-657 단편 및 서열식별번호(SEQ ID NO): 2의 잔기 206 내지 803을 포함하는 살곤충 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 단리된 살곤충 단백질이 개시된다. DIG-657, DIG-657 변이체 및 DIG-657 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 식물, 식물 부분 및 종자가 또한 개시된다. 곤충 해충 집단에서의 개체를 살충 유효량의 서열식별번호: 2의 잔기 206 내지 803을 포함하는 폴리펩티드와 접촉시키는 단계를 포함하는, 상기 곤충 해충 집단을 방제하는 방법이 또한 개시된다.
- [0013] 한 실시양태에서, 본 발명은 (a) 서열식별번호: 2의 잔기 206 내지 803의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드; (b) 서열식별번호: 2의 잔기 206 내지 803의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드; (c) 서열식별번호: 2에 의해 코딩되는 독소의 발현 또는 활성에 불리한 영향을 미치지 않는 최대 20개의 아미노산 치환, 결실 또는 변형을 갖는 서열식별번호: 2의 잔기 206 내지 803의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드; 또는 그의 살곤충 활성 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된 코어 독소 절편을 포함하는 단리된 DIG-657 곤충 독소 폴리펩티드를 제공한다.
- [0014] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 (a) 서열식별번호: 2의 잔기 1 내지 803의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드; (b) 서열식별번호: 2의 잔기 1 내지 803의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 또는 96% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드; (c) 서열식별번호: 1에 의해 코딩되는 독소의 발현 또는 활성에 불리한 영향을 미치지 않는 최대 20개의 아미노산 치환, 결실 또는 변형을 갖는 서열식별번호: 2의 잔기 1 내지 803의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드; 또는 그의 살곤충 활성 단편; (d) 발현 또는 독소 활성에 불리한 영향을 미치지 않는 서열식별번호: 2의 잔기 206 내지 803의 아미노산 서열에 대해 적어도 93% 또는 94% 또는 95% 또는 96% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드로 이루어진 군으로부터 선택된 DIG-657 코어 독소 절편을 포함하는 단리된 DIG-657 곤충 독소 폴리펩티드를 제공한다.
- [0015] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 DIG-657 곤충 독소를 포함하는 생식력 있는 식물을 제공한다. 본 발명은 본 발명의 핵산 분자를 트랜스제닉 식물 내로 도입하는 단계를 포함하며, 여기서 핵산 분자는 곤충을 방제하는데 유효한 양으로 트랜스제닉 식물에서 발현가능한 것인, 곤충-저항성 또는 곤충 내성 트랜스제닉 식물을 생산하는 방법을 추가로 제공한다.
- [0016] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 해충 집단을 살충 유효량의 DIG-657 곤충 독소와 접촉시키는 단계를 포함하는, 해충 집단을 방제하는 방법을 제공한다.
- [0017] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본 발명의 DIG-657 독소를 코딩하는 단리된 핵산 분자를 제공한다. DIG-657 독소에 대한 아미노산 서열이 주어지면, 의도되는 숙주 식물에 바람직한 코돈을 사용하여 아미노산 서열을 역번역한 다음, 문제를 야기할 수 있는 서열을 제거하도록 및 비-코딩 리딩 프레임 내의 긴 오픈 코딩 서열을 제거하기 위한 주기적인 정지 코돈을 제공하도록, 대안적 코돈을 사용하여 서열을 개량함으로써, 코딩 서열이 설계될 수 있다.
- [0018] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 Bt로부터 유래되지 않고 식물에서의 발현을 유도할 수 있는 프로모터에 작동 가능하게 연결된 DIG-657 곤충 독소를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 DNA 구축물을 제공한다. 본 발명은 또한 계놈 내로 안정하게 혼입된 DNA 구축물을 포함하는 트랜스제닉 식물, 및 상기 식물 내로 구축물을 도입하는 단계를 포함하는, 해충으로부터 식물을 보호하는 방법을 제공한다.
- [0019] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 비-트랜스제닉 식물을 식물의 계놈 내로 안정하게 혼입된 DIG-657 독소를 발현시킬 수 있는 외래 DNA 구축물을 포함하는 트랜스제닉 식물을 사용하여 육종하는 단계 및 트랜스제닉 식물로부터 유래된 외래 DNA 구축물의 적어도 일부분을 분석함으로써 자손을 선택하는 단계를 포함하는, 곤충 저항성 또는 곤충 내성 식물을 생산하는 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 정제된 DIG-657의 SDS-PAGE의 이미지이다. 레인 1, 분자량 마커; 레인 2, 3 μg 의 정제된 전장 DIG-657; 레인 3, 정제된 전장 단백질을 트립신 (1:10 DIG-657 wt/트립신 wt)으로 1시간 동안 처리한 후 DIG-657의 반응 생성물.

[서열의 설명]

서열식별번호: 1 전장 DIG-657 곤충 독소를 코딩하는 DNA 서열.

서열식별번호: 2 추론된 DIG-657 단백질 서열.

서열식별번호: 3 DIG-657 변이체 1을 코딩하는 메이즈-최적화된 DNA 서열.

서열식별번호: 4 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*)에서의 발현을 위해 최적화된 코돈을 갖는 DIG-657 변이체 2.

서열식별번호: 5 DIG-657 v4, 메이즈 최적화된 높은 GC 함량을 갖는 것.

서열식별번호: 6 DIG-657 v5, 메이즈 최적화된 높은 GC 함량을 갖는, N-말단으로부터 205개의 아미노산이 말단 절단된 DIG-657.

서열식별번호: 7 서열식별번호: 6의 추론된 단백질 서열.

서열식별번호: 8 전장 DIG-657의 대두의 가장 바람직한 코돈 최적화된 버전.

서열식별번호: 9 말단절단된 DIG-657의 대두의 가장 바람직한 코돈 최적화된 버전.

서열식별번호: 10 전장 DIG-657의 대두의 가장 바람직한 코돈 최적화된 버전에 융합된 염록체 통과 펩티드 4 (Trap4)를 코딩하는 DNA.

서열식별번호: 11 TraP4 DIG-657 전장의 대두의 가장 바람직한 코돈의 추론된 단백질 서열.

서열식별번호: 12 말단절단된 DIG-657의 대두의 가장 바람직한 코돈 최적화된 버전에 융합된 Trap 4.

서열식별번호: 13 Trap4 DIG-657 말단절단된 버전의 추론된 단백질 서열.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 본 발명은 많은 목의 곤충, 바람직하게는 인시류 곤충에 대하여 기능적으로 활성이고 효과적인 살곤충 단백질 독소 및 독소를 전달하는 방법을 제공한다. "기능적 활성" (또는 "에 대한 활성")은 단백질이 경구 활성 독소 또는 곤충 방제제로서 기능하여, 단백질이 독성 효과를 가지고 있거나 곤충 성장 또는 섭식을 방해 또는 저지할 수 있다는 것을 의미한다. 곤충이 트랜스제닉 식물 발현, 제제화된 단백질 조성물(들), 분무가능한 단백질 조성물(들), 미끼 매트릭스 또는 다른 전달 시스템을 통해 전달된 유효량의 본 발명의 독소와 접촉하게 될 경우에, 그 결과는 전형적으로 곤충의 사멸, 곤충의 성장 또는 증식의 억제, 또는 곤충에 이용가능한 독소를 만드는 공급원, 바람직하게는 트랜스제닉 식물을 곤충이 섭식하는 것의 방지이다. 본 발명의 기능적 단백질은 또한 1종 이상의 다른 독소 단백질의 활성을 증진 또는 개선하기 위해 함께 또는 단독으로 작용할 수 있다. 용어 "독성인", "독성" 또는 "독소"는 대상 독소가 본원에 정의된 바와 같은 기능적 활성을 갖는다는 것을 전달함을 의미한다.

[0022] 섭식 곤충에 대한 완전한 치사가 바람직하지만, 기능적 활성을 달성하는데 요구되는 것은 아니다. 곤충이 독소를 회피하거나 섭식을 중지하는 경우에, 심지어 효과가 준치사이거나 또는 치사가 지연되거나 간접적인 경우라도, 그러한 회피가 일부 적용에서 유용할 것이다. 예를 들어, 곤충 저항성 트랜스제닉 식물이 요망되는 경우에, 궁극적인 목적이 곤충-유도된 식물 손상을 회피하는 것이기 때문에, 곤충의 식물 섭식 기피는 곤충에 대한 치사 독성만큼 유용하다.

[0023] DIG-657을 코딩하는 핵산이 발견되었고 Bt 균주 PS46L로부터 단리되었다. "단리된"에 관하여 본 출원인은 핵산 분자가 그의 천연 환경으로부터 제거되고 인공적으로 상이한 환경에 놓였다는 것을 의미한다. 유전자 코드의 축중성 때문에, 다양한 상이한 DNA 서열이 본원에 개시된 아미노산 서열을 코딩할 수 있다. 아미노산 서열이 공지되어 있다면 동일한 또는 본질적으로 동일한 독소를 코딩하는 이들 대안적 DNA 서열을 생성하는 것은 관련 기술분야의 통상의 기술자의 기술 내에 충분히 포함된다. DIG-657의 전장 코딩 영역에 대한 핵산 서열 (서열식별번호: 1)이 결정되었고, DIG-657의 전장 단백질 서열 (서열식별번호: 2)이 그 핵산 서열로부터 추론되었다. DIG-657 단백질 서열은 게놈퀘스트(GenomeQuest) 데이터베이스 "GQ-Pat 플래티늄(Platinum) 단백질" 및 "GQ-

Pat 골드플러스(GoldPlus) 단백질", 뿐만 아니라 진뱅크(GenBank) 비-중복 단백질 데이터베이스에서 조회하였다. 가장 근접한 공지 상동체는 XMI335 (94% 동일성, W02013134523-002) 및 Vip3Ba (74% 동일성, 수탁번호 AAV70653, Rang et al.)이다.

- [0024] DIG-657 독소의 곤충 활성 변이체가 또한 본원에 기재되어 있고, 집합적으로 DIG-657 곤충 독소 또는 변이체로서 지칭되며, 단편 및 말단절단된 형태를 포함한다. DIG-657의 개별 변이체는 특정 DIG-명명법에 의해 확인될 수 있다. DIG-657 독소는 인시류 해충을 방제하는데 사용하기 위한 이상적인 후보이다.
- [0025] DIG-657 및 그의 변이체 독소의 놀라운 특성은 그들이 Cry1F 및 Cry1A 독소에 대한 저항성을 갖는 ECB 및 DBM의 집단에 대하여 활성인 것으로 밝혀졌다는 것이다. 따라서, DIG-657 독소는 저항성 인시류 해충 집단의 방제 및 방지를 위한 이상적인 후보이다.
- [0026] 본 발명의 DIG-657 독소는 인시류 곤충, 바람직하게는 DBM, ECB, FAW, CEW, CBW 및 TBW에 대하여 활성이다. 살곤충 활성은 또한 BCW, CL, 스포도프테라 엑시구아(*Spodoptera exigua*) (비트 거염벌레 "BAW"), 펙티노포라 고시피엘라(*Pectinophora gossypiella*) (분홍솜벌레), 코킬리스 호스페스 월싱엄(*Cochylis hospes* Walsingham) (줄무늬형 해바라기 나방) 및 호모에오소마 엘렉텔룸(*Homoeosoma electellum*) (해바라기 머리 나방)에 대해 예상된다.
- [0027] 슈도모나스 플루오레센스에서 생산된 DIG-657의 살곤충 활성은 ECB; cry1F-저항성 ECB (rECB), DBM, cry1A-저항성 DBM (rDBM), CEW, BCW 및 TBW를 포함한 인시류 종에 대해 활성인 것으로 입증되었다. DIG-657 단백질은 또한 CBW, FAW 및 Cry1F-저항성 FAW (rFAW)에 대한 활성에 대해 시험되었다.
- [0028] 메이즈 및 대두의 곤충 해충 둘 다에 대한 이러한 생물학적 활성 범위는 대단히 유리하다. 트립신 말단절단된 독소 (서열식별번호: 7)는 생물검정에서 ECB에 대하여 시험되었고, 전장 DIG-657에 대한 활성에 있어서 대략 동일한 것으로 제시되었으며, 이는 단백질의 N-말단 상의 처음 205개 아미노산이 생물학적 활성에 요구되지 않는다는 것을 나타낸다.
- [0029] 전장 DIG-657은 무손상 N-말단을 갖고, 트립신 (1:10 트립신/DIG-657)으로 처리되는 경우에 그 단백질은 2개의 밴드로 절단된다 (하나는 대략 65 kDa이고 또 다른 하나는 약 18 kDa임) (도 1). 추가로, 작은 잔여 전장 DIG-657이 또한 존재하였다. DIG-657의 65 kDa의 절단된 생성물의 N-말단 아미노산 분석은 트립신 절단의 부위가 (205K/S206)이라는 것을 나타냈다.
- [0030] DIG-657, 그의 변이체, 말단절단물 및 단편을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 합성될 수 있고, 통상적인 수단에 의해 표준 플라스미드 벡터 내로 클로닝될 수 있거나 또는 뉴클레오티드 서열을 함유하는 다른 구축물의 표준 분자 생물학 조작에 의해 수득될 수 있다. DIG-657 코딩 영역에 대해 내부인 고유한 제한 부위가 확인될 수 있고, DIG-657 코딩 영역의 제한 부위 사이의 서열을 포함하는 DNA 단편이 합성될 수 있으며, 각각의 이러한 단편은 특정 결실, 삽입 또는 다른 DIG-657 변이를 코딩한다. 변형된 DIG-657 단편을 코딩하는 DNA 단편은 적절한 제한 부위에서 다른 DIG-657 코딩 영역 단편 또는 다른 Cry 또는 VIP 코딩 영역 단편에 연결되어 목적하는 전장 DIG-657 단백질, 결실된 또는 변이체 DIG-657 단백질을 코딩하는 코딩 영역이 수득될 수 있다. 예를 들어, 제1 DIG-657 코딩 영역의 시작부에서의 적절한 제한 인식 부위, 및 DIG-657 코딩 영역에 대해 내부인 제2 제한 부위를 확인할 수 있다. 이들 제한 부위에서의 제1 DIG-657 코딩 영역의 절단은 제1 DIG-657 코딩 영역의 일부를 포함하는 DNA 단편을 생성할 것이다. 또 다른 DIG-657 코딩 영역 또는 다른 VIP3 코딩 영역에 대해 특이적인 유사하게 위치하는 상용성 제한 부위가 플랭킹되어 있는 제2 DNA 단편이 변이체를 구축하도록 제1 DNA 제한 단편과 조합되어 사용될 수 있다.
- [0031] 항-독소 항체. 본원에 개시된 독소 또는 이들 독소의 단편에 대한 항체는 관련 기술분야에 널리 공지된 표준 절차를 사용하여 제조될 수 있다. 이러한 항체는 식물 조직 및 다양한 다른 물질에서 DIG-657 독소의 존재를 검출하는데 유용하다. 이러한 항체 및 항-혈청은 본 발명의 청구된 DIG-657 독소 및 그의 변이체 또는 단편을 검출하는 다양한 방법에 유용하다. 리포팅 기로 표지된 항체가 다양한 환경에서 항원의 존재를 확인하는데 사용될 수 있다는 것이 널리 공지되어 있다. 방사성동위원소로 표지된 항체는 다양한 생물학적 유체 중 항원의 존재를 큰 정밀도 및 감도로 확인하기 위해 방사성면역 검정에서 사용되었다. 보다 최근에는, 효소 표지된 항체가 ELISA 검정에서 방사성표지된 항체의 대용물로서 사용되었다. 추가로, 본 발명의 Bt 살곤충 독소에 대해 면역반응성인 항체는 고정화 물질, 예컨대 폴리스티렌 웰 또는 입자에 결합되어 면역검정에서 사용됨으로써 Bt 독소가 시험 샘플에 존재하는지 여부를 결정할 수 있다. 항-DIG-657 항체는 또한 재조합 생산 시스템 또는 자연 공급원으로부터 DIG-657 독소의 양을 단리하기 위해 사용된다.

- [0032] DIG-657의 트랜스제닉 발현. 대상 단백질 독소는 다양한 방식으로 표적 곤충과 접촉하도록 "적용"되거나 제공될 수 있다. 예를 들어, DIG-657 독소는 트랜스제닉 식물에서의 식물-혼입된 보호제 (식물에 의해 생산되고 식물에 존재함)로서 사용될 수 있고, 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 독소 유전자의 발현은 또한 식물의 특정 조직, 예컨대 뿌리, 잎 등에서의 선택성을 달성할 수 있다. 이것은 관련 기술분야에 널리 공지된 조직-특이적 프로모터의 사용을 통해 달성될 수 있다.
- [0033] 본 발명의 바람직한 실시양태는 대상 살곤충 단백질 또는 그의 변이체를 코딩하는 유전자를 사용한 식물의 형질 전환이다. 형질전환된 식물은 형질전환된 식물의 세포 내 방제량의 대상 살곤충 단백질 또는 그의 변이체의 존재에 의해 곤충 표적 해충에 의한 공격에 대해 저항성을 갖는다. DIG-657 독소를 코딩하는 유전 물질을 특정한 곤충 해충이 먹는 식물의 계놈 내로 혼입시키고 발현시킴으로써, 성충 또는 유충이 먹이 식물을 소모한 후에 사멸할 것이다. 단자엽 및 쌍자엽 분류의 수많은 구성원이 형질전환되었다. 트랜스제닉 농경학적 작물뿐만 아니라 과일 및 채소가 상업적 관심 대상이다. 이러한 작물은 메이즈, 벼, 대두, 카놀라, 해바라기, 알팔파, 수수, 밀, 목화, 땅콩, 토마토, 감자 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 외래 유전 물질을 단자엽 또는 쌍자엽 식물 세포 내로 도입하고 도입된 유전자를 안정하게 유지 및 발현하는 생식력 있는 식물을 수득하기 위한 수많은 널리 공지된 기술이 존재한다.
- [0034] 하나의 바람직한 실시양태에서, DIG-657 또는 변이체는 본 발명의 독소를 발현하는 핵산 서열을 포함하는 트랜스제닉 식물을 통해 경구로 전달된다. 본 발명은 본 발명의 핵산 분자를 식물 내로 도입하는 단계를 포함하며, 여기서 독소는 곤충을 방제하는데 유효한 양으로 트랜스제닉 식물에서 발현가능한 것인, 곤충-저항성 트랜스제닉 식물을 생산하는 방법을 제공한다. 비제한적 예로, 기본 클로닝 전략은 전장 또는 변형된 DIG-657 코딩 서열을 식물 발현 플라스미드 내 NcoI 및 SacI 제한 부위로 서브클로닝하는 것일 수 있다. 예를 들어, 게이트웨이(Gateway)® 기술 또는 표준 제한 효소 단편 클로닝 절차를 이용하여 식물 발현 요소 (예를 들어, 식물 발현 가능한 프로모터, 3' 말단 전사 종결 및 폴리아데닐레이트 부가 결정기 등)의 제어 하에 적절한 DIG-657 코딩 영역을 함유하는 생성된 식물 발현 카세트를 이원 벡터 플라스미드 내로 서브클로닝한다. 게이트웨이® 기술이 이용되는 경우에, 예를 들어 LR 클로나제(LR Clonase)™ (인비트로젠(Invitrogen), 캘리포니아주 칼스배드)가 전장 및 변형된 유전자 식물 발현 카세트를 이원 식물 형질전환 플라스미드 내로 재조합시키는데 사용될 수 있다. 플라스미드가 이. 콜라이(*E. coli*) 및 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 세포에 존재하는 경우에, 항생제 스펙티노마이신에 대한 저항성을 부여하는 박테리아 유전자를 보유하는 이원 식물 형질전환 벡터를 사용하는 것이 편리하다. 목적하는 숙주 식물에서 기능적인 식물-발현가능한 선택 마커 유전자를 함유하는 이원 벡터 플라스미드를 사용하는 것이 또한 편리하다. 식물-발현가능한 선택 마커 유전자의 예는 항생제 카나마이신, 네오마이신 및 G418에 대한 저항성을 부여하는, 트랜스포존 Tn5의 아미노글리코시드 포스포트랜스퍼라제 유전자 (aphI I)를 코딩하는 유전자, 뿐만 아니라 글리포세이트; 히그로마이신; 메토타렉세이트; 포스포노트리신 (비알라포스), 이미다졸리논, 술폰닐우레아 및 트리아졸로피리미딘 제조제, 예컨대 클로르수لف우론, 브로목시닐, 달라폰 등에 대한 저항성 또는 내성을 코딩하는 유전자를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0035] 대안적으로, DIG-657 유전자 삽입물을 함유하는 이원 식물 형질전환 벡터의 플라스미드 구조분석은 아그로박테리움 조작 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있는 표준 분자 생물학 방법에 의해 후보 아그로박테리움 단리물로부터 제조된 플라스미드 DNA의 제한 소화 핑거프린트 맵핑에 의해 수행된다.
- [0036] 아그로박테리움-매개된 형질전환 방법을 통해 형질전환된 식물을 수득하는 관련 기술분야의 통상의 기술자는 Z707S 이외의 다른 아그로박테리움 균주가 사용될 수 있다는 것 및 균주의 선택이 형질전환시키고자 하는 숙주 식물 종의 정체에 좌우될 수 있다는 것을 이해할 것이다.
- [0037] 트랜스제닉 아라비도시스(*Arabidopsis*)의 곤충 생물검정. 변형된 DIG-657 단백질을 발현하는 트랜스제닉 아라비도시스 계통이 인공 먹이 오버레이 검정에서 감수성 곤충 종에 대하여 활성이라는 것을 입증하는데 사용될 수 있다. 트랜스제닉 및 비-트랜스제닉 아라비도시스 계통으로부터 추출된 단백질이 적절한 방법에 의해 정량화되고, 샘플 부피가 단백질 농도를 정규화하기 위해 조정될 수 있다. 이어서 하기 기재된 바와 같이 인공 먹이에 대한 생물검정이 수행된다. 비-트랜스제닉 아라비도시스 및/또는 완충제 및 물은 배경 체크 처리군으로서 검정에 포함되어야 한다.
- [0038] 트랜스제닉 메이즈의 생물검정. 식물 세포에서 생산된 DIG-657 독소 및 변이체의 생물활성은 통상적인 생물검정 방법에 의해 입증될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Huang et al., 2006] 참조). 효능은 DIG-657 독소를 생산하는 식물로부터 유래된 다양한 식물 조직 또는 조직 조각을 제어된 섭식 환경에서 표적 곤충에게 섭식시키는 것에 의해 시험될 수 있다. 대안적으로, DIG-657 독소를 생산하는 식물로부터 유래된 다양한 식물 조직으로부

터 단백질 추출물을 제조하고, 그 추출된 단백질을 인공 먹이 생물검정에 혼입시킬 수 있다. 이러한 섭식 검정의 결과는 DIG-657 단백질 또는 변이체를 생산하지 않는 숙주 식물로부터의 적절한 대조군 조직을 사용하는 유사하게 수행된 생물검정, 또는 다른 대조군 샘플과 비교되어야 하는 것으로 이해된다.

[0039] DIG-657 독소 및 살곤충 활성 변이체. 서열식별번호: 2의 전장 DIG-657 독소에 추가로, 본 발명은 서열식별번호: 2, 서열식별번호: 11 또는 서열식별번호: 13의 살곤충 활성 변이체를 포괄한다. 용어 변이체에 관하여, 본 출원인은 특정 결실, 치환 및 삽입 돌연변이체를 포함하는 것으로 의도한다. DIG-657 단편은 전장보다 적은 DIG-657 아미노산 서열이며 살곤충 특성을 갖는, 서열식별번호: 2에서 발견된 임의의 단백질 서열이다. DIG-657 변이체 단편은 또한 본 발명의 일부로서 고려되고, 본원에 기재된 특정 결실, 치환 및 삽입 돌연변이체를 함유하며 살곤충 활성을 갖는 DIG-657의 단편으로서 정의된다. 본 발명에 포함되는 DIG-657 독소의 변이체를 기재하는 서문으로서, DIG-657 단백질 독소의 아키텍처를 간략하게 검토하는 것이 유용할 것이다.

[0040] 제한된 수의 아미노산 결실, 치환 또는 부가를 만듦으로써 생성된 DIG-657 변이체. 서열식별번호: 2의 아미노산 서열에 대한 아미노산 결실, 치환 및 부가가 순차적인 방식으로 용이하게 만들어질 수 있고, 살곤충 활성에 대한 이러한 변이의 효과는 생물검정에 의해 시험될 수 있다. 변화의 수가 수적인 면에서 제한된다면, 이러한 시험은 불합리한 실험을 수반하지 않는다. 본 발명은 또한 코어 독소 절편의 살곤충 활성 변이체 (서열식별번호: 2의 아미노산 206-803, 또는 10개 이하, 15개 이하 또는 20개 이하의 독립적인 아미노산 부가, 결실 또는 치환이 만들어진 것)를 포함한다.

[0041] 변이체는 무작위 돌연변이를 일으킴으로써 만들어질 수 있거나 또는 변이체는 설계될 수 있다. 설계된 돌연변이체의 경우에, 아미노산 동일성이 생물학적 활성을 설명하거나 궁극적으로 생물학적 활성의 원인이 되는 3차원 형상의 결정에 수반되는 중요한 독소 영역 내에서 유지될 때, 천연 독소와 유사한 활성을 갖는 변이체가 생성될 가능성이 높다. 높은 가능성의 활성 유지는 또한 치환이 보존적인 경우에 일어날 것이다. 아미노산은 하기 부류에 놓일 수 있다: 비-극성, 비하전된 극성, 염기성 및 산성. 한 부류의 아미노산이 동일한 유형의 또 다른 아미노산으로 대체되는 보존적 치환은 변이체의 생물학적 활성을 실질적으로 변경시킬 가능성이 가장 적다. 표 1은 각각의 부류에 속하는 아미노산의 예의 목록을 제공한다.

[0042] <표 1>

아미노산의 부류	아미노산의 예
비극성 측쇄	Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Met (M), Phe (F), Trp (W)
비하전된 극성 측쇄	Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)
산성 측쇄	Asp (D), Glu (E)
염기성 측쇄	Lys (K), Arg (R), His (H)
베타-분지형 측쇄	Thr, Val, Ile
방향족 측쇄	Tyr, Phe, Trp, His

[0043] 본 발명의 살충 단백질은 서열식별번호: 1의 뉴클레오티드 서열과 충분히 동일한 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되거나 또는 살충 단백질은 서열식별번호: 2에 제시된 아미노산 서열과 충분히 동일하다. "충분히 동일한"은 아미노산 또는 뉴클레오티드 서열이 표준 파라미터를 사용하여 본원에 기재된 정렬 프로그램 중 하나를 사용하여 참조 서열과 비교하였을 때 적어도 약 60% 또는 65% 서열 동일성, 약 70% 또는 75% 서열 동일성, 약 80% 또는 85% 서열 동일성, 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과인 서열 동일성을 갖는 것을 의도한다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 이들 값이 2개의 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된 단백질의 상응하는 동일성을 결정하기 위해 코돈 축중성, 아미노산 유사성, 리딩 프레임 위치설정 등을 고려함으로써 적절하게 조정될 수 있다는 것을 인식할 것이다.

[0045] 2개의 아미노산 서열 또는 2개의 핵산의 퍼센트 동일성을 결정하기 위해, 서열은 최적의 비교 목적으로 정렬된다. 2개의 서열 사이의 퍼센트 동일성은 서열에 의해 공유되는 동일한 위치의 수의 함수이다 (즉, 퍼센트 동일성 = 동일한 위치의 수/위치의 총수 (예를 들어, 중첩 위치) x 100). 한 실시양태에서, 2개의 서열은 길이가 동일하다. 또 다른 실시양태에서, 퍼센트 동일성은 참조 서열의 전체에 걸쳐 계산된다. 2개의 서열 사이의 퍼센트 동일성은 갭을 허용하거나 허용하지 않으면서, 하기 기재된 것과 유사한 기술을 사용하여 결정될 수 있다. 퍼센트 동일성의 계산에 있어서, 전형적으로 정확한 매치가 계수된다. 갭 (잔기가 하나의 서열에는 존재하지만

다른 서열에는 존재하지 않는 정렬 내의 위치)은 비-동일 잔기를 갖는 위치로서 간주된다.

[0046] 2개의 서열 사이의 퍼센트 동일성의 결정은 수학적 알고리즘을 사용하여 달성될 수 있다. 2개의 서열의 비교를 위해 이용되는 수학적 알고리즘의 비제한적 예는 문헌 [Karlín and Altschul (1993) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90:5873-5877]에서와 같이 변형된 [Karlín and Altschul (1990) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 87:2264]의 알고리즘이다. 이러한 알고리즘은 문헌 [Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403]의 BLASTN 및 BLASTX 프로그램 내로 혼입된다. BLAST 뉴클레오티드 검색이 BLASTN 프로그램, 점수 = 100, 워드 길이 = 12로 수행되어, 본 발명의 살충-유사 핵산 분자에 상동인 뉴클레오티드 서열이 수득될 수 있다. BLAST 단백질 검색이 BLASTX 프로그램, 점수 = 50, 워드 길이 = 3으로 수행되어, 본 발명의 살충 단백질 분자에 상동인 아미노산 서열이 수득될 수 있다. 비교 목적으로 갭이 있는 정렬을 수득하기 위해, 갭드(Gapped) BLAST (BLAST 2.0)가 문헌 [Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389]에 기재된 바와 같이 이용될 수 있다. 대안적으로, PSI-Blast가 분자 사이의 거리 관계를 검출하는 반복 검색을 수행하는데 사용될 수 있다. 상기 문헌 [Altschul et al. (1997)]을 참조한다. BLAST, 갭드 BLAST 및 PSI-Blast 프로그램을 이용하는 경우에, 각 프로그램 (예를 들어, BLASTX 및 BLASTN)의 디폴트 파라미터가 사용될 수 있다. 정렬은 또한 검사에 의해 수동으로 수행될 수 있다.

[0047] 서열의 비교에 이용된 수학적 알고리즘의 또 다른 비제한적 예는 클러스탈W(ClustalW) 알고리즘이다 (Higgins et al. (1994) Nucleic Acids Res. 22:4673-4680). 클러스탈W는 서열을 비교하고, 아미노산 또는 DNA 서열의 전체를 정렬시켜, 전체 아미노산 서열의 서열 보존에 관한 데이터를 제공할 수 있다. 클러스탈W 알고리즘은 여러 상업적으로 입수가 가능한 DNA/아미노산 분석 소프트웨어 패키지, 예컨대 벡터 NTI 프로그램 모음의 ALIGNX 모듈 (인비트로젠 코포레이션, 캘리포니아주 칼스배드)에 사용된다. 클러스탈W를 사용한 아미노산 서열의 정렬 후에, 퍼센트 아미노산 동일성이 평가될 수 있다. 클러스탈W 정렬의 분석에 유용한 소프트웨어 프로그램의 비제한적 예는 GENEDOC™이다. GENEDOC™ (칼 니콜라스(Karl Nicholas))에 의해 다수의 단백질 사이의 아미노산 (또는 DNA) 유사성 및 동일성의 평가가 가능하다. 서열의 비교에 이용된 수학적 알고리즘의 또 다른 비제한적 예는 문헌 [Myers and Miller (1988) CABIOS 4(1):11-17]의 알고리즘이다. 이러한 알고리즘은 GCG 위스콘신 제네틱스 소프트웨어 패키지(GCG Wisconsin Genetics Software Package), 버전 10 (미국 캘리포니아주 샌디에고 소재 엑셀리시, 인크.(Accelrys, Inc.)로부터 입수가 가능함)의 일부인 ALIGN 프로그램 (버전 2.0) 내로 혼입된다. 아미노산 서열을 비교하기 위한 ALIGN 프로그램을 이용하는 경우에, PAM120 가중치 잔기 표, 갭 길이 페널티 12 및 갭 페널티 4가 사용될 수 있다. 달리 언급되지 않는 한, 문헌 [Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48(3):443-453]의 알고리즘을 사용하는 GAP 버전 10이 하기 파라미터를 사용하여 서열 동일성 또는 유사성을 결정하는데 사용될 것이다: GAP 가중치 50 및 길이 가중치 3 및 nwsgapdna.cmp 점수화 매트릭스를 사용하여 뉴클레오티드 서열에 대한 % 동일성 및 % 유사성; GAP 가중치 8 및 길이 가중치의 2 및 BLOSUM62 점수화 프로그램을 사용하여 아미노산 서열에 대한 % 동일성 또는 % 유사성. "등가 프로그램"은 해당 임의의 2개의 서열에 대해, GAP 버전 10에 의해 생성된 상응하는 정렬과 비교하였을 때 동일한 뉴클레오티드 잔기 매치 및 동일한 퍼센트 서열 동일성을 갖는 정렬을 생성하는 임의의 서열 비교 프로그램인 것으로 의도된다.

[0048] 프로테아제 감수성 변이체. DIG-657을 비롯한 VIP3 단백질은 약 88 kDa 크기로부터 약 66 kDa 크기의 생성물로 단백질분해적으로 말단절단될 수 있다. 66 kDa 단백질은 아미노산 잔기 206-803을 포함한다. 곤충 장 프로테아제는 전형적으로 곤충이 먹이 단백질로부터 필요한 아미노산을 수득하는 것을 보조하는 기능을 한다. 가장 잘 이해된 곤충 소화 프로테아제는 세린 프로테아제고, 이는 특히 인시류 중에서 가장 통상적인 유형인 것으로 보인다 (Englemann and Geraerts (1980)). 딱정벌레류 곤충은 인시류 장보다 더 중성 내지 산성인 장을 갖는다. 대다수의 딱정벌레류 유충 및 성충, 예를 들어 콜로라도(Colorado) 감자 딱정벌레 (CPB)는 약간 산성인 중장을 갖고, 시스테인 프로테아제는 주요 단백질분해 활성을 제공한다 (Wolfson and Murdock, 1990). 보다 정확하게, 문헌 [Thie and Houseman (1990)]에서는 CPB에서 시스테인 프로테아제, 카텡신 B-유사 및 카텡신 H-유사, 및 아스파르트릴 프로테아제, 카텡신 D-유사를 확인 및 특징화하였다. 문헌 [Gillikin et al. (1992)]에서는 WCR 유충의 장에서의 단백질분해 활성을 특징화하였고 주로 시스테인 프로테아제를 발견하였다. 미국 특허 번호 7,230,167에서는 카텡신 G에 기인하는 프로테아제 활성이 WCR에 존재한다는 것을 개시하였다. 곤충 장 프로테아제의 다양성 및 상이한 활성 수준은 특정한 Bt 독소에 대한 곤충의 감수성에 영향을 미칠 수 있다.

[0049] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 프로테아제 절단 부위는 특정 곤충 해충의 감수성 유충의 중장 내에서의 단백질 프로세싱에 영향을 미치도록 목적하는 위치에서 조작될 수 있다. 이들 프로테아제 절단 부위는 화학적 유전자 합성 또는 스플라이스 중첩 PCR과 같은 방법에 의해 도입될 수 있다 (Horton et al., 1989). 예를 들어 세

린 프로테아제 인식 서열이 감수성 유충의 중장 내에서 목적하는 결실 지점에서의 단백질 프로세싱에 영향을 미치도록 Cry 단백질 구조 내의 특정 부위에 임의로 삽입될 수 있다. 이러한 방식으로 이용될 수 있는 세린 프로테아제는 인시류 중장 세린 프로테아제, 예컨대 트립신 또는 트립신-유사 효소, 키모트립신, 엘라스타제 등을 포함한다 (Christeller et al., 1992). 추가로, 비분획화 유충 중장 프로테아제 제제를 사용하여 생성한 Cry 단백질 소화 생성물을 서열분석함으로써 또는 술가장자리 막 소포에 결합시킴으로써 실험적으로 확인된 결실 부위가 단백질 활성화를 일으키도록 조작될 수 있다. ECB, CEW, CBW, BCW, FAW, BAW, 디아트라에아 그란디오셀라 (*Diatraea grandiosella*), 디아트라에아 사카랄리스(*Diatraea saccharalis*), 록사그로티스 알비코스타 (*Loxagrotis albicosta*) 및 다른 표적 해충을 포함한 인시류 해충에 대해 개선된 활성을 갖는 변형된 Cry 또는 VIP3 단백질은 프로테아제 절단 부위의 도입에 의해 또는 유전자 결실에 의해 생성되었다.

[0050] 인시류 및 딱정벌레류 세린 프로테아제, 예컨대 트립신, 키모트립신 및 카텝신 G-유사 프로테아제, 인시류 및 딱정벌레류 시스템인 프로테아제, 예컨대 카텝신 (B-유사, L-유사, O-유사 및 K-유사 프로테아제) (Koiwa et al., (2000) and Bown et al., (2004)), 인시류 및 딱정벌레류 메탈로프로테아제, 예컨대 ADAM10 (Ochoa-Campuzano et al., (2007)), 및 인시류 및 딱정벌레류 아스파르트산 프로테아제, 예컨대 카텝신 D-유사 및 E-유사, 펩신, 플라세틴 및 키모신은 특정 곤충 해충의 감수성 유충의 중장 내에서의 Cry 단백질 프로세싱에 영향을 미치도록 및 아마도 또한 비-감수성 곤충 해충에 대한 활성을 제공하기 위해 기능하도록 목적하는 프로세싱 부위에서의 적절한 인식 서열을 조작함으로써 추가로 이용될 수 있다.

[0051] 곤충, 식물 또는 미생물 프로테아제에 의한 보다 큰 변이체 단백질의 단백질분해적 절단을 허용 또는 제거하도록 코딩 서열 내의 적절한 위치에의 프로테아제 프로세싱 부위의 도입 또는 제거에 의해 생산된 DIG-657 변이체가 본 발명의 범주 내에 속한다. 이러한 조작의 최종 결과는 무손상 (전장) 독소 단백질과 동일하거나 그보다 더 우수한 활성을 갖는 독소 단편 분자의 생성인 것으로 이해된다.

[0052] 스프레이-온(Spray-on) 적용이 또 다른 예이고, 이는 또한 관련 기술분야에 공지되어 있다. 대상 단백질은 목적하는 최종 용도를 위해 적절하게 제제화된 다음, - 침입이 발견되기 전에, 표적 곤충이 발견된 후에, 그 전 및 그 후 둘 다 등에서 - 보호할 식물 상에 및/또는 식물 주위에 및/또는 식물 부근에 분무 (또는 다르게는 적용)될 수 있다. 예를 들어 미끼 과립이 또한 사용될 수 있고, 이는 관련 기술분야에 공지되어 있다.

[0053] 곤충이 트랜스제닉 식물 발현, 제제화된 단백질 조성물(들), 분무가능한 단백질 조성물(들), 미끼 매트릭스 또는 다른 전달 시스템을 통해 전달되는 유효량의 독소와 접촉하게 되는 경우에, 그 결과는 전형적으로 곤충의 사멸이거나 또는 곤충에 이용가능한 독소를 만드는 공급원을 곤충이 섭식하지 않는 것이다.

[0054] 적합한 미생물 숙주, 예를 들어 슈도모나스를 사용하는 경우에, 미생물은 그가 증식하고 섭취될 해충 환경에 적용될 수 있다. 그 결과는 해충의 방제이다. 대안적으로, 독소 유전자의 숙주인 미생물은 독소의 활성을 연장시키고 세포를 안정화시키는 조건 하에서 처리될 수 있다. 이어서, 독성 활성을 유지하는 처리된 세포는 표적 해충의 환경에 적용될 수 있다.

[0055] 올리고뉴클레오티드 프로브의 개발. 본 발명의 독소 및 유전자를 확인하는 추가의 방법은 올리고뉴클레오티드 프로브의 사용을 통한 것이다. 이들 프로브는 검출가능한 뉴클레오티드 서열이다. 이들 서열은 적절한 방사성 표지에 의해 검출가능하게 될 수 있거나 또는 예를 들어 미국 특허 번호 6,268,132에 기재된 바와 같이 본래 형광으로 제조될 수 있다. 관련 기술분야에 널리 공지된 바와 같이, 프로브 분자 및 핵산 샘플이 두 분자 사이에 강한 염기-쌍형성 결합을 형성함으로써 혼성화되는 경우에, 프로브 및 샘플은 상당한 서열 상동성을 갖는 것으로 합리적으로 가정될 수 있다. 바람직하게는, 혼성화는, 예를 들어 문헌 [Keller and Manak (1993)]에 기재된 바와 같은, 관련 기술분야에 널리 공지된 기술에 의해 엄격한 조건 하에서 수행된다. 프로브의 검출은 혼성화가 일어났는지 여부를 공지된 방식으로 결정하기 위한 수단을 제공한다. 이러한 프로브 분석은 본 발명의 독소-코딩 유전자를 확인하는 신속한 방법을 제공한다. 본 발명에 따라 프로브로서 사용되는 뉴클레오티드 절편은 DNA 합성기 및 표준 절차를 사용하여 합성될 수 있다. 이들 뉴클레오티드 서열은 또한 본 발명의 유전자를 증폭시키기 위한 PCR 프라이머로서 사용될 수 있다.

[0056] 핵산 혼성화. 분자 생물학에서의 통상의 기술자에게 널리 공지된 바와 같이, 두 핵산의 유사성은 이들의 혼성화되는 경향에 의해 특징화될 수 있다. 본원에 사용된 용어 "엄격한 조건" 또는 "엄격한 혼성화 조건"은 프로브가 다른 서열에 혼성화되는 것보다 검출가능하게 더 큰 정도로 (예를 들어, 배경에 비해 적어도 2배) 그의 표적 서열에 혼성화될 (어닐링될) 조건을 지칭하는 것으로 의도된다. 엄격한 조건은 서열-의존적이며, 상이한 상황에 따라 상이할 것이다. 혼성화 및/또는 세척 조건의 엄격도를 제어함으로써, 프로브에 100% 상보적인 표적 서열이 확인될 수 있다 (상동 프로빙). 대안적으로, 엄격도 조건을 조정하여 서열에서의 일부 미스매칭을 가능

하게 함으로써 보다 낮은 정도의 유사성이 검출되도록 한다 (이중 프로빙). 일반적으로, 프로브는 길이가 약 1000개 뉴클레오티드 미만, 바람직하게는 길이가 500개 뉴클레오티드 미만이다.

[0057] 전형적으로, 엄격한 조건은 염 농도가 pH 7.0 내지 pH 8.3에서 Na 이온 약 1.5 M 미만, 전형적으로는 Na 이온 농도 (또는 다른 염) 약 0.01 내지 1.0 M이고, 온도가 짧은 프로브 (예를 들어, 10 내지 50개의 뉴클레오티드)에 대해서는 적어도 약 30°C이고, 긴 프로브 (예를 들어, 50개 초과 뉴클레오티드)에 대해서는 적어도 약 60°C인 조건일 것이다. 엄격한 조건은 또한 탈안정화제, 예컨대 포름아미드의 첨가로 달성될 수 있다. 예시적인 저 엄격도 조건은 37°C에서 30% 내지 35% 포름아미드, 1 M NaCl, 1% SDS (소듐 도데실 황산염)의 완충제 용액을 사용한 혼성화, 및 50°C 내지 55°C에서 1X 내지 2X SSC (20X SSC = 3.0 M NaCl/0.3 M 시트르산나트륨)에서의 세척을 포함한다. 예시적인 중간 정도의 엄격도 조건은 37°C에서 40% 내지 45% 포름아미드, 1.0 M NaCl, 1% SDS에서의 혼성화, 및 55°C 내지 60°C에서 0.5X 내지 1X SSC에서의 세척을 포함한다. 예시적인 고 엄격도 조건은 37°C에서 50% 포름아미드, 1 M NaCl, 1% SDS에서의 혼성화, 및 60°C 내지 65°C에서 0.1X SSC에서의 세척을 포함한다. 임의로, 세척 완충제는 약 0.1% 내지 약 1% SDS를 포함할 수 있다. 혼성화의 지속시간은 일반적으로 약 24시간 미만, 통상적으로는 약 4 내지 12시간이다.

[0058] 특이성은 전형적으로 혼성화후 세척의 함수이며, 결정적인 인자는 이온 강도 및 최종 세척 용액의 온도이다. DNA/DNA 하이브리드에 있어서, 열융점 (T_m)은 상보적 표적 서열의 50%가 완벽 매칭 프로브에 혼성화되는 온도 (정의된 이온 강도 및 pH 하에서)이다. T_m 은 각각의 1%의 미스매칭에 대해 약 1°C만큼 감소하며; 따라서, T_m , 혼성화 조건 및/또는 세척 조건을 조정하여 목적하는 동일성의 서열들의 어닐링을 용이하게 할 수 있다. 예를 들어, >90% 동일성을 갖는 서열이 추구되는 경우에, T_m 은 10°C 감소할 수 있다. 일반적으로, 엄격한 조건은 정의된 이온 강도 및 pH에서 특정 서열 및 그의 상보체에 대해 T_m 보다 약 5°C 더 낮도록 선택된다. 그러나, 고도로 엄격한 조건은 T_m 보다 1°C, 2°C, 3°C 또는 4°C 더 낮은 온도에서 혼성화 및/또는 세척을 이용할 수 있고; 중간 정도의 엄격한 조건은 T_m 보다 6°C, 7°C, 8°C, 9°C 또는 10°C 더 낮은 온도에서 혼성화 및/또는 세척을 이용할 수 있고; 저 엄격도 조건은 T_m 보다 11°C, 12°C, 13°C, 14°C, 15°C 또는 20°C 더 낮은 온도에서 혼성화 및/또는 세척을 이용할 수 있다.

[0059] T_m (°C)은 실험적으로 결정될 수 있거나 또는 계산에 의해 근사화될 수 있다. DNA-DNA 하이브리드에 있어서, T_m 은 문헌 [Meinkoth and Wahl (1984)]의 다음 방정식으로부터 근사화될 수 있다: $T_m(°C) = 81.5°C + 16.6(\log M) + 0.41(\%GC) - 0.61(\% \text{포름아미드}) - 500/L$; 여기서 M은 1가 양이온의 몰농도이고, %GC는 DNA 내 구아노신 및 시토신 뉴클레오티드의 백분율이고, % 포름아미드는 혼성화 용액 중 포름아미드의 백분율이고, L은 염기쌍 내 하이브리드의 길이이다. 대안적으로, T_m 은 하기 식에 의해 기재된다 (Beltz et al., 1983): $T_m(°C) = 81.5°C + 16.6(\log[Na^+]) + 0.41(\%GC) - 0.61(\% \text{포름아미드}) - 600/L$; 여기서 [Na⁺]은 나트륨 이온의 몰농도이고, %GC는 DNA 내 구아노신 및 시토신 뉴클레오티드의 백분율이고, % 포름아미드는 혼성화 용액 중 포름아미드의 백분율이고, L은 염기쌍 내 하이브리드의 길이이다.

[0060] 상기 방정식, 혼성화 및 세척 조성물, 및 목적하는 T_m 을 사용하여, 통상의 기술자는 혼성화 및/또는 세척 용액의 엄격도의 변동이 내재적으로 기재된다는 것을 이해할 것이다. 목적하는 정도의 미스매칭이 45°C 미만의 T_m (수용액) 또는 32°C 미만의 T_m (포름아미드 용액)을 유발하는 경우에, 보다 높은 온도가 사용될 수 있도록 SSC 농도를 증가시키는 것이 바람직하다. 핵산의 혼성화에 대한 광범위한 안내는 문헌 [Hybridization with Nucleic Acid Probes Vol.1 by P. Tijssen (1993, ISBN-10: 0444898840, ISBN-13: 9780444898845 Hardcover) and Ausubel et al. (1995)]에서 발견된다. 또한, 문헌 [Sambrook et al. (1989)]을 참조한다.

[0061] 실시예

[0062] 실시예 1

[0063] DIG-657 살균증 독소를 코딩하는 발현 플라스미드의 구축 및 박테리아 숙주에서의 발현. 식물-최적화된 코딩 영역에 의해 코딩되는 전장 DIG-657 단백질을 생산하도록 조작된 슈도모나스 플루오레센스 (Pf) 발현 플라스미드의 구축에 표준 클로닝 방법을 사용하였다. 각각 제한 소화 및 DNA 라이게이션을 위한 제한 엔도뉴클리아제 및 T4 DNA 리가제를 뉴잉글랜드 바이오랩스(New England BioLabs) (NEB; 매사추세츠주 입스위치)로부터 입수하였다. 저-카피 플라스미드 정제를 위해 뉴클레오스핀(NucleoSpin)® 플라스미드 키트 (마쉴레이-나겔 인크

(Macherey-Nagel Inc), 펜실베이니아주 베슬리햄)를 사용하여 공급업체의 지침서에 따라 플라스미드 제조를 수행하였다. 아가로스 트리스-아세이트 겔 전기영동 후 퀴아퀵(QIAquick)® 겔 추출 키트 (퀴아젠(Qiagen), 림부르흐 펜로)를 사용하여 DNA 단편을 정제하였다.

- [0064] DIG-657을 코딩하는 유전자는 클로닝을 위한 특이적 제한 부위를 함유하는 유전자 특이적 프라이머를 사용하여 모 Bt 균주 PS46L/DBt11889에서 증폭시켰다. 이어서, 생성된 DIG-657 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR) 생성물을 전통적인 라이게이션 클로닝 방법을 사용하여 슈도모나스 플루오레센스 발현 벡터 pDOW1169 내로 클로닝하였다.
- [0065] 기본 클로닝 전략은 DIG-657 독소 코딩 서열 (CDS) (서열식별번호: 1)을 pDOW1169 내로 SpeI 및 SalI 제한 부위에 서브클로닝하는 것을 수반하였으며, 이로써 플라스미드 pKK223-3 (피엘 파마시아(PL Pharmacia), 위스콘신주 밀워키)으로부터의 Ptac 프로모터 및 rrnBT12 종결인자의 발현 제어 하에 놓인다. pDOW1169는 RSF1010 복제 기점, pyrF 유전자, 및 단백질 코딩 영역 함유 DNA 단편이 도입될 수 있는 제한 효소 인식 부위에 선행하는 리보솜 결합 부위를 갖는 중간 카피 플라스미드이다 (미국 출원 20080193974). pDOW1169로 지정된 발현 플라스미드에 의해 DC454 (돌연변이 델타pyrF 및 lsc::lacI⁰¹를 갖는 거의 야생형인 피. 플루오레센스 균주) 또는 그의 유도체를 전기천공에 의해 형질전환시키고, SOC-콩 가수분해물 배지에서 회수하고, 선택 배지 (우라실이 결여된 M9 글루코스 한천, [Sambrook et al., 상기 문헌]) 상에 플레이팅하였다. 미생물학적 조작에 관한 상세한 내용은 문헌 [Squires et al., (2004)], 미국 특허 출원 20060008877, 미국 특허 출원 20080193974 및 미국 특허 출원 20080058262로부터 이용가능하며, 이들은 본원에 참조로 포함된다. 콜로니를 먼저 미니프렙 플라스미드 DNA의 제한 소화에 의해 스크리닝하였다. 선택된 DIG-657 독소 함유 클론의 플라스미드 DNA를 4종의 제한 효소로 소화시키고 서열 확인하여 삽입물의 존재에 대해 추가로 검증하였다.
- [0066] 실시예 2
- [0067] 진탕 플라스크에서의 성장 및 발현 분석. 특징화 및 곤충 생물검정을 위한 DIG-657 독소의 생산은, 발현 구축물 (pDOW1169)을 보유하는 진탕-플라스크-성장된 피. 플루오레센스 균주에 의해 달성하였다. DIG-657 배양물의 글리세롤 스톱 (0.5 mL)을 9.5% 글리세롤이 존재하는 한정된 생산 배지 50 mL (테크노바(Teknova) 카탈로그 번호 3D7426, 캘리포니아주 홀리스터) 내로 접종하였다. 진탕하면서 30°C에서 24시간 동안 초기 인큐베이션한 후에 이소프로필-β-D-1-티오갈락토피라노시드 (IPTG)의 첨가에 의해 Ptac 프로모터를 통한 DIG-657 독소 유전자의 발현을 유도하였다. 배양물을 유도 시점에 및 유도후 다양한 시점에 샘플링하였다. 세포 밀도를 600 nm에서의 광학 밀도 (OD₆₀₀)에 의해 측정하였다. 예를 들어, 문헌 [Huang et al. (2007)] 및 미국 특허 출원 20060008877에 기재된 바와 같이, 슈도모나스 플루오레센스의 성장에 적합한 다른 배양 배지를 또한 이용할 수 있다.
- [0068] 실시예 3
- [0069] 아그로박테리움 형질전환. 이원 식물 형질전환 및 발현 플라스미드의 구축에 표준 클로닝 방법을 사용하였다. 제한 엔도뉴클레아제 및 T4 DNA 리가제는 NEB로부터 입수하였다. 뉴클레오스핀® 플라스미드 제조 키트 또는 뉴클레오본드(NucleoBond)® AX 엑스트라 미디 키트 (둘 다 독일 듀렌 소재 마쉴레이-나겔로부터의 것)를 사용하여 제조업체의 지침서에 따라 플라스미드 제조를 수행하였다. 퀴아퀵® PCR 정제 키트 또는 겔 단리 후 QIAEX II® 겔 추출 키트 (둘 다 림부르흐 펜로 소재의 퀴아젠으로부터의 것)를 사용하여 DNA 단편을 정제하였다.
- [0070] 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) 균주 Z707S (Z707의 스트렙토마이신-저항성 유도체; 문헌 [Hepburn et al., 1985])의 전기-적격 세포를 제조하고, 전기천공을 사용하여 형질전환시켰다 (Weigel and Glazebrook, 2002). 전기천공 후에, 1 mL의 효모 추출물 펩톤 (YEP) 브로쓰 (10 gm/L 효모 추출물, 10 gm/L 펩톤 및 5 gm/L NaCl)를 큐벳에 첨가하고, 세포-YEP 현탁액을 15 mL 배양 튜브로 옮겨 4시간 동안 계속 교반하면서 수조에서 28°C에서 인큐베이션하였다. 세포를 스펙티노마이신 (200 μg/mL) 및 스트렙토마이신 (250 μg/mL)이 존재하는 YEP 플러스 한천 (25 gm/L) 상에 플레이팅하고, 플레이트를 28°C에서 2-4일 동안 인큐베이션하였다. 잘 분리된 단일 콜로니를 선택하고, 상기 기재된 바와 같은 스펙티노마이신 및 스트렙토마이신이 존재하는 신선한 YEP + 한천 플레이트 상에 스트리킹하고, 28°C에서 1-3일 동안 인큐베이션하였다.
- [0071] 이원 식물 형질전환 벡터 중 DIG-657 유전자 삽입물의 존재에 대해, 선택된 아그로박테리움 콜로니로부터 제조된 주형 플라스미드 DNA와 함께 벡터-특이적 프라이머를 사용하여 PCR 분석을 수행하였다. 상기와 같이 스펙티노마이신 및 스트렙토마이신이 존재하는 YEP에서 밤새 성장시킨 15 mL 배양물 중 4 mL 분취물로부터의 세포 펠릿을 제조업체의 지침서에 따라 수행되는 퀴아젠 (네덜란드 림부르흐 펜로) 스피ن(Spin)® 미니 프렙을 사용하여

추출하였다. 아그로박테리움 전기천공 형질전환에 사용된 이원 벡터로부터의 플라스미드 DNA를 대조군으로서 포함시켰다. 인비트로젠 (캘리포니아주 칼스배드)으로부터의 Taq DNA 폴리머라제를 제조업체의 지침서에 따라 0.5X 농도로 사용하여 PCR 반응을 완료하였다. 하기 조건으로 프로그래밍된 MJ 리서치 펠티에 써멀 사이클러 (MJ Research Peltier Thermal Cycler)에서 PCR 반응을 수행하였다: 단계 1) 94°C에서 3분 동안; 단계 2) 94°C에서 45초 동안; 단계 3) 55°C에서 30초 동안; 단계 4) 72°C에서 예상되는 생성물 길이 kb당 1분씩; 단계 5) 단계 2까지 29회; 단계 6) 72°C에서 10분 동안. 사이클링 후 4°C에서 반응을 유지하였다. 증폭 생성물을 아가로스 겔 전기영동 (예를 들어 0.7% 내지 1% 아가로스, w/v)에 의해 분석하고, 에티뉼 브로마이드 염색에 의해 시각화하였다. PCR 생성물이 플라스미드 대조군과 동일한 콜로니를 선택하였다.

[0072] 실시예 4

[0073] DIG-657의 생산. 발현 구축물 (pDOW1169)을 보유하는 진탕-플라스크-성장된 피. 플루오레센스 균주의 세포를 원심분리에 의해 단리하고, 생성된 세포 펠릿을 -80°C에서 동결시켰다. 동결된 진탕 플라스크 세포 펠릿 샘플로부터의 가용성 및 불용성 분획을 이지라이즈(EasyLyse)TM 박테리아 단백질 추출 용액 (에피센트레(EPICENTRE)[®] 바이오테크놀로지스, 위스콘신주 매디슨)을 사용하여 생성하였다. 각각의 세포 펠릿을 1 mL 이지라이즈TM 용액 중에 현탁시키고, 용해 완충제 중에 1:4로 추가로 희석하고, 진탕하면서 실온에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 용해물을 14,000 rpm으로 4°C에서 20분 동안 원심분리하고, 상청액을 가용성 분획으로서 회수하였다. 이어서, 펠릿 (불용성 분획)을 동일한 부피의 포스페이트 완충 염수 (PBS; 11.9 mM Na₂HPO₄, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4) 중에 현탁시켰다.

[0074] 샘플을 β-메르캅토에탄올을 함유하는 2X 램리(Laemmli) 샘플 완충제와 1:1 혼합하고 (Sambrook et al., 상기 문헌), 5분 동안 비등시킨 후 크리테리온 XT(Criterion XT)[®] 비스-트리스 12% 겔 (바이오-라드 인크.(Bio-Rad Inc.), 캘리포니아주 허클레스) 상에 로딩하였다. 전기영동을 권고된 XT MOPS 완충제에서 수행하였다. 겔을 바이오-세이프 쿠마시 스테인(Bio-Safe Coomassie Stain) (바이오-라드, 캘리포니아주 리치몬드)을 사용하여 제조업체의 프로토콜에 따라 염색하고, 알파 이노테크 이미징 시스템(Alpha Innotech Imaging system) (캘리포니아주 샌 레안드로)을 사용하여 영상화하였다.

[0075] 실시예 5

[0076] 봉입체 제조. DIG-657은 일반적으로 DIG-657에 대한 유전자를 함유하는 피. 플루오레센스 세포의 가용성 분획 내에 위치하였다. 일부 경우에서, SDS-PAGE 및 MALDI-MS (매트릭스 보조 레이저 탈착/이온화 질량 분광측정법)에 의해 입증된 바와 같이, 가변 백분율의 DIG-657 단백질이 단백질 봉입체 (IB) 체제 내에 위치하는 것으로 밝혀졌다. 이러한 분획으로부터 상기 단백질을 단리하기 위해, 피. 플루오레센스 발효 펠릿을 37°C 수조에서 해동시켰다. 세포를 용해 완충제 (50 mM 트리스, pH 7.5, 200 mM NaCl, 20 mM EDTA 이나트륨 염 (에틸렌디아민테트라아세트산), 1% 트리톤 X-100, 및 5 mM 디티오트레이톨 (DTT)) 중에 25% w/v로 재현탁시키고; 5 mL/L의 박테리아 프로테아제 억제제 콕테일 (P8465 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich), 미주리주 세인트 루이스)을 사용 직전에 첨가하였다. 핸드-헬드 균질화기를 최저 설정으로 사용하여 세포를 현탁시켰다 (티슈 티어러(Tissue Tearor), 바이오스펙 프로덕츠, 인크.(BioSpec Products, Inc.), 오클라호마주 바틀스빌). 리소자임 (25 mg, 미주리주 세인트루이스 소재 시그마의 닭 난백 유래 L7651)을 금속 스페툴라를 사용하여 혼합함으로써 세포 현탁액에 첨가하고, 현탁액을 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 현탁액을 얼음 상에서 15분 동안 냉각시킨 다음, 브랜슨(Branson) (코네티컷주 덴버리) 소니파이어 250 (2회의 1분 기간, 50% 듀티 사이클, 30% 출력)을 사용하여 초음파처리하였다. 세포 용해를 현미경검사에 의해 체크하였다. 필요한 경우 추가의 25 mg의 리소자임을 첨가하고, 인큐베이션 및 초음파처리 단계를 반복하였다. 세포 용해를 현미경검사에 의해 확인하였을 때, 용해물을 11,500 x g로 25분 동안 (4°C) 원심분리하여 IB 펠릿을 형성시키고, 상청액을 폐기하였다. IB 펠릿을 100 mL 용해 완충제로 재현탁시키고, 핸드-헬드 혼합기로 균질화하고, 상기와 같이 원심분리하였다. 상청액이 무색이 되며 IB 펠릿이 단단해지고 회백색 색상이 될 때까지, IB 펠릿을 재현탁 (50 mL 용해 완충제 중), 균질화, 초음파처리 및 원심분리에 의해 반복적으로 세척하였다. 최종 세척의 경우에, IB 펠릿을 2 mM EDTA를 함유하는 멸균-여과된 (0.22 μm) 증류수 중에 재현탁시키고, 원심분리하였다. 최종 펠릿을 2 mM EDTA를 함유하는 멸균-여과된 증류수 중에 재현탁시키고, 1 mL 분취물로 -80°C에서 저장하였다.

[0077] IB 체제 중 단백질의 SDS-PAGE 분석 및 정량화는, IB 펠릿의 1 mL 분취물을 해동시키고, 멸균-여과된 증류수로 1:20 희석함으로써 수행하였다. 이어서 희석된 샘플을 4X 환원 샘플 완충제 [250 mM 트리스, pH 6.8, 40% 글리세롤 (v/v), 0.4%의 브로모페놀 블루(Bromophenol Blue) (w/v), 8% SDS (w/v) 및 8% β-메르캅토-에탄올 (v/v)]를 사용하여 비등시키고, 노박스(Novex)[®] 4-20% 트리스-글리신 상에 로딩하고, 12+2 웰 겔 (인비트로젠,

캘리포니아주 칼스배드)을 1X 트리스/글리신/SDS 완충제 (바이오라드, 캘리포니아주 리치몬드)를 사용하여 전개시켰다. 겔을 200 볼트에서 60분 동안 전개시킨 다음, 쿠마시 블루(Coomassie Blue) (45% 메탄올, 10% 아세트산 중 50% G-250/50% R-250)로 염색하고, 증류수 중 7% 아세트산, 5% 메탄올로 탈염색하였다. 표적 밴드의 정량화는, 밴드에 대한 밀도측정 값을 동일한 겔 상에서 전개시킨 소 혈청 알부민 (BSA) 샘플에 대하여 비교함으로써 수행하여, 표준 곡선을 생성하였다.

[0078] 실시예 6

[0079] 봉입체의 가용화. 6 mL의 봉입체 현탁액 (32 mg/mL의 DIG-657 단백질 함유)을 에펜도르프(Eppendorf) 모델 5415C 미세원심분리기 (대략 14,000 x g)의 최고 세팅에서 원심분리하여, 봉입체를 펠트화하였다. 저장 완충제 상청액을 제거하고, 50 mL 원추형 튜브 내에서 25 mL의 100 mM 탄산나트륨 완충제 (pH 11)로 대체하였다. 봉입체를 피펫을 사용하여 재현탁시키고, 볼텍싱하여 철저히 혼합하였다. 튜브를 완만한 요동 플랫폼 상에 4°C에서 밤새 배치하여 표적 단백질을 추출하였다. 추출물을 30,000 x g로 4°C에서 30분 동안 원심분리하고, 생성된 상청액을 아미콘 울트라(Amicon Ultra)-15 재생 셀룰로스 원심분리 필터 장치 (30,000 분자량 컷오프; 밀리포어 (Millipore), 매사추세츠주 빌러리카)를 사용하여 5배 농축시켰다. 이어서, 샘플 완충제를 일회용 PD-10 칼럼 (지이 헬스케어(GE Healthcare), 뉴저지주 피스카타웨이)을 사용하여 10 mM CAPS [3-(시클로헥사미노)1-프로판술포산] (pH 10)으로 변경하였다.

[0080] 실시예 7

[0081] 겔 전기영동. 농축된 추출물을 환원제로서 5 mM 디티오프레이톨을 함유하는 누페이지(NuPAGE)® LDS 샘플 완충제 (인비트로젠, 캘리포니아주 칼스배드) 중에 1:50 희석함으로써 전기영동을 위해 제조하고, 4분 동안 95°C에서 가열하였다. 샘플을 (표준 곡선 생성을 위해) 0.2 내지 2 µg/레인 범위의 5개의 BSA 표준물과 함께 4-12% 누페이지® 겔의 이중 레인에 로딩하였다. 추적 염료가 겔의 바닥에 도달할 때까지 MOPS SDS 전개 완충제 (인비트로젠, 캘리포니아주 칼스배드)를 사용하면서 200V에서 전압을 인가하였다. 겔을 45% 메탄올, 10% 아세트산 중 0.2% 쿠마시 블루 G-250으로 염색하고, 배경이 투명해질 때까지 처음에는 간단하게 45% 메탄올, 10% 아세트산으로 탈염색하고 다음에 길게 7% 아세트산, 5% 메탄올로 탈염색하였다. 탈염색 후에, 겔을 바이오라드 플루오르-S 멀티이미저(Fluor-S MultiImager)로 스캐닝하였다. 기기의 퀴터티 원(Quantity One) v.4.5.2 소프트웨어를 사용하여, 염색된 단백질 밴드의 배경-차감 부피를 획득하고 BSA 표준 곡선을 생성하였으며, 이를 모액 중 DIG-657 단백질의 농도를 계산하는데 사용하였다.

[0082] 실시예 8

[0083] DIG-657 정제. DIG-657의 정제를 문헌 [Lee, M.K., et al. (2003)]에 기재된 바와 같이 VIP3와 유사하게 수행하였으며, 여기서 DIG-657 유전자에 의해 형질전환된 Pf로부터의 세포를 해동시키고, 0.5 ml 프로테아제 억제제 카테일 (시그마, 미주리주 세인트 루이스)의 존재 하에 추출 완충제 (10 mM 트리스-HCl, 2 mM EDTA, 2 mM DTT) 내로 현탁시키고, 각각 1분씩 5회 초음파처리하고, 각각의 초음파처리 사이클 사이에 1분 동안 얼음 상에 두었다. 용액을 20,000 x g로 10분 동안 원심분리하고, 상청액을 수집하여 모노큐(MonoQ) 이온 교환 칼럼 (1 cm 직경 X 10 cm 길이)에 적용하였다. 단백질 정제를 순차적으로 이온 교환 크로마토그래피 (모노큐 1010, 지이 헬스케어, 뉴저지주 피스카타웨이), 소수성 크로마토그래피 및 크기 배제 크로마토그래피에 의해 달성하였다. 최종 제제는 약 90 kDa의 겔보기 분자량으로 이동하는 단백질의 단일 밴드를 보여주었다.

[0084] 실시예 9

[0085] 샘플 제조 및 생물검정. DIG-657의 정제된 제제를 10 mM CAPS (pH 10) 중에 적절하게 희석하였으며, 모든 생물검정은 사멸 및/또는 성장 억제에 대한 배경 체크로서의 역할을 하는 상기 완충제로 이루어진 대조군 처리를 함유하였다. 생물검정 완충제 중 단백질 농도를 겔 전기영동에 의해 소 혈청 알부민 (BSA)을 사용하여 추정함으로써 겔 밀도측정법을 위한 표준 곡선을 생성하였으며, 이는 바이오라드 (캘리포니아주 리치몬드) 영상화 시스템 (플루오르-S 멀티이미저 + 퀴터티 원 소프트웨어 버전 4.5.2)을 사용하여 측정하였다. 겔 매트릭스 중 단백질을 쿠마시 블루-기반 염색으로 염색하고, 관독 전에 탈염색하였다.

[0086] 정제된 단백질을 인공 곤충 먹이 상에서 1-2일령 신생 인시류 유충을 사용하여 수행한 생물검정에서 살곤충 활성에 대해 시험하였다. CEW, SBL, DBM, VBC, ECB, FAW 및 TBW의 유충을 상업적 곤충실험실 (벤존 리서치 인크.(Benzon Research Inc.), 펜실베이니아주 칼라일)에 의해 유지되는 콜로니로부터 수득한 알로부터 부화시켰다. rECB 및 rFAW의 유충을 독점적 콜로니 (다우 아그로사이언시즈 엘엘씨(Dow AgroSciences LLC), 인디애나주 인디애나폴리스)로부터 수거한 알로부터 부화시켰다.

[0087] 생물검정은 곤충 생물검정을 위해 특이적으로 설계된 128-웰 플라스틱 트레이 (씨-디 인터내셔널(C-D INTERNATIONAL), 뉴저지주 피트만)에서 수행하였다. 각각의 웰은 2.0 mL의 다중-중 인시류 먹이 (사우스랜드 프로덕츠(Southland Products), 아칸소주 레이크 빌리지)를 함유하였다. 단백질 샘플의 40 µL 분취물을 피펫으로 각각의 웰의 2.0 cm² 먹이 표면 상에 전달하였다 (20 µL/cm²). 웰 내 표면적 제곱 센티미터 (cm²)당 DIG-657 단백질의 양 (ng)으로서 먹이 농도를 계산하였다. 9개의 용량 농도 범위를 9,000 내지 3 ng/cm²로 사용하였으며, 용량당 16마리의 유충을 시험하였다. 처리된 트레이를 먹이 표면 상의 액체가 증발하거나 먹이 내로 흡수될 때까지 흡 후드에서 유지하였다.

[0088] 우화로부터 24-48시간 이내에, 개별 유충을 젖은 낙타털 브러시로 채집하여, 처리된 먹이 상에 웰당 1마리의 유충으로 침착시켰다. 이어서, 침입된 웰을 기체 교환이 가능하도록 통기되어 있는 투명 플라스틱의 접착제 시트 (씨-디 인터내셔널, 뉴저지주 피트만)로 밀봉하였다. 생물검정 트레이를 제어된 환경 조건 (28°C, ~60% 상대 습도, 16:8 [명:암]) 하에서 5일 동안 유지한 후에, 각각의 단백질 샘플에 노출된 곤충의 총수, 사멸 곤충의 수 및 생존 곤충의 중량을 기록하였다. 퍼센트 사멸률 및 퍼센트 성장 억제를 각각의 처리에 대해 계산하였다. 성장 억제 (GI)는 하기 화학식을 사용하여 계산하였다:

[0089] $GI = [1 - (TWIT/TNIT)/(TWIBC/TNIBC)]$

[0090] 여기서 TWIT는 처리에 있어서의 곤충의 총 중량이고, TNIT는 처리에 있어서의 곤충의 총수이고, TWIBC는 배경 체크 (완충제 대조군)에 있어서의 곤충의 총 중량이고, TNIBC는 배경 체크 (완충제 대조군)에 있어서의 곤충의 총수이다.

[0091] GI₅₀은 GI 값이 50%인 먹이 내의 DIG-657 단백질의 농도인 것으로 결정되었다. 50% 치사 농도 (LC₅₀)는 시험 곤충의 50%가 사멸한 먹이 내의 DIG-657 단백질의 농도로서 기록되었다. 성장 억제 농도-반응 곡선을 JMP 프로, 버전 9.0.3, 소프트웨어 (에스에이에스 인스티튜트 인크.(SAS Institute Inc.), 노스캐롤라이나주 캐리)를 통해 비선형 로지스틱 3-파라미터를 사용하여 결정하였다. 치사 농도-반응 곡선을 모은 사멸률 데이터의 프로빗 (Probit) 분석 (Finney, 1971)에 의해 분석하고, POLO-PC (레오라 소프트웨어(LeOra Software))를 사용하여 수행하였다.

[0092] 표 2는 ECB, rECB, TBW, 슈도플루시아 인클루덴스(*Pseudoplusia includens*) (워커(Walker)) (대두 자벌레, "SBL"), 안티카르시아 겐탈리스(*Anticarsia gemmatilis*) (휘브너(Huebner)) (벨벳빈 모충, "VBC"), CEW, FAW, rFAW 및 DBM에 대한 DIG-657 단백질의 생물검정 시험의 결과를 제시한다. 예상밖의 놀라운 발견은 rECB 시험 곤충이 ECB 곤충의 감수성 균주와 마찬가지로 DIG-657 단백질의 작용에 대해 더 많이는 아니지만 감수성이었다는 것이다.

[0093] <표 2>

[0094] 인공 먹이-오버레이 생물검정에서 시험된 다중 곤충 종에 대한 정제된 DIG-657의 효능 (ng/cm²).

곤충	LC ₅₀ (CI 95%)(ng/cm ²)	GI ₅₀ (CI 95%) (ng/cm ²)
ECB	281 (166-470)	8.6 (6.6-11.1)
rECB	37 (17-74)	8.1 (4.2-15.9)
TBW	608 (311-1,432)	12.9 (5.9-28.1)
SBL	80 (50-120)	5.4 (4.3-6.7)
VBC	66 (45-95)	18.9 (12.2-29.3)
CEW	>9,000	17.5 (10.9-28.2)
FAW	>9,000	563 (398-796)
rFAW	~9,000	2,651 (1,030-6,822)
DBM	6.3 (1.6-11.8)	3.7 (3.0-4.6)

[0095]

[0096] 헬리코베르파 아르미게라(*Helicoverpa armigera*) 생물검정은 신생 유충을 사용하여 표면 오염에 의해 수행하였

다. 독성 시험을 각각의 셀이 2 cm²인 128-셀 트레이에서 수행하였다. 25 및 2500 ng/cm²의 농도를 단지 완충제 대조군과 함께 사용하여 퍼센트 사멸률을 결정하였다 (표 3). LC₅₀ 값을 결정하기 위한 시험은 7개의 상이한 농도의 정제된 전독소를 단지 완충제 대조군과 함께 사용하여 수행하였다 (표 4). 사멸률 및 정지를 16:8 명:암 조건으로 25℃에서 7일 후에 평가하였다. "기능적 사멸률"은 사멸 및 L1 정지 유충을 점수화하여 수득하였다. 결과는 헬리코베르과 아르미게라에 대한 DIG-657 활성을 제시하였다.

[0097] <표 3>

[0098] 인공 먹이 생물검정에서 시험된 헬리코베르과 아르미게라에 대한 DIG-657의 퍼센트 사멸률.

	사멸률 %		기능적 사멸률 %	
	25 ng/cm ²	2500 ng/cm ²	25 ng/cm ²	2500 ng/cm ²
Cry1Ac	28	92	33	100
Cry1Fa	6	21	6	21
DIG-657	38	79	38	93

[0099]

[0100] <표 4>

[0101] 인공 먹이 생물검정에서 시험된 헬리코베르과 아르미게라에 대한 DIG-657의 LC₅₀ (ng/cm²).

독소	반복	사멸률		기능적 사멸률	
		LC ₅₀ *	기울기	LC ₅₀ *	기울기
Cry1Ac	3	13.6 (0.3-44.9)	0.65 ± 0.12	5.05 (0.02-19.27)	0.87 ± 0.16
DIG-657	5	3389 (963-79246)	0.56 ± 0.08	301 (183-541)	0.84 ± 0.08

[0102]

[0103] *()의 값은 0.95 신뢰 한계임

[0104] 실시예 10

[0105] 쌍자엽 식물에서의 DIG-657 Bt 살균충 단백질 및 변이체의 생산.

[0106] 아라비도시스 형질전환. 아라비도시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*) Col-01을 꽃 침지 방법을 사용하여 형질전환시켰다 (Weigel and Glazebrook, 2002). 선택된 아그로박테리움 콜로니를 사용하여 적절한 선택용 항생제를 함유하는 YEP 브로쓰의 배양물 1 mL 내지 15 mL에 접종하였다. 배양물을 220 rpm으로 계속 교반하면서 28℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 각각의 배양물을 사용하여 적절한 선택용 항생제를 함유하는 YEP 브로쓰의 500 mL 배양물 2개에 접종하고, 새로운 배양물을 계속 교반하면서 28℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 세포를 실온에서 10분 동안 대략 8,700 x g로 펠릿화하고, 생성된 상청액을 폐기하였다. 세포 펠릿을 다음을 함유하는 침윤 배지 500 mL 중에 서서히 재현탁시켰다: 1/2x 무라쉬게 및 스쿠그(Murashige and Skoog) 염 (시그마-알드리치)/겔보르그(Gamborg) B5 비타민 (골드 바이오테크놀로지(Gold BioTechnology), 미주리주 세인트 루이스), 10% (w/v) 수크로스, 0.044 μM 벤질아미노퓨린 (DMSO 중 1 mg/mL 스톡 L당 10 μL) 및 300 μL/L 실웁(Silwet) L-77. 대략 1개월 된 식물을 15초 동안 상기 배지 중에 침지시켰으며, 가장 최근 화서가 확실히 잠기도록 주의를 기울였다. 이어서, 식물을 옆으로 눕혀 놓고, 24시간 동안 (투명 또는 불투명) 덮개로 덮고, 물로 세척하고, 똑바로 세워 놓았다. 식물을 16:8 명:암 광주기로 22℃에서 성장시켰다. 침지로부터 대략 4주 후에 종자를 수확하였다.

[0107] 아라비도시스 성장 및 선택. 새로 수확한 T1 종자를 건조제의 존재 하에 실온에서 적어도 7일 동안 건조되도록 하였다. 종자를 0.1% 한천/물 (시그마-알드리치) 용액 중에 현탁시킨 다음, 4℃에서 2일 동안 계층화하였다. 식재를 준비하기 위해, 10.5 인치 x 21 인치 발아 트레이 (티.오. 플라스틱스 인크.(T.O. Plastics Inc.), 미네소타주 클리어워터) 내 선샤인 믹스 LP5(Sunshine Mix LP5) (선 그로 홀티컬처 인크.(Sun Gro Horticulture Inc.), 워싱턴주 벨뷰)를 미세 질석으로 덮고, 습윤될 때까지 호글랜드(Hoagland) 용액 (Hoagland and Arnon, 1950)으로 지하-관개한 다음, 24시간 동안 배수시켰다. 계층화된 종자를 질석 상에 파종하고, 7일 동안 습도 돔 (케이오알디 프로덕츠(KORD Products), 캐나다 온타리오주 브라말리)으로 덮었다. 종자를 발아시키고, 식물

을 콘비론(Conviron) (모델 CMP4030 또는 CMP3244; 컨트롤드 인바이런먼츠 리미티드(Controlled Environments Limited), 캐나다 마니토바주 윈니펙)에서 일정한 온도 (22℃) 및 습도 (40-50%) 하에 120-150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sec}$ 의 광 강도로 긴 낮 조건 (16:8 명/암 광주기) 하에 성장시켰다. 식물에 처음에는 호글랜드 용액으로 급수하고, 이후에는 탈이온수로 급수하여, 토양이 습윤 상태는 아니지만 젖은 상태로 유지되도록 하였다.

- [0108] 파종 5-6일 후에 흙을 제거하고, 비형질전환 종자로부터 발아한 식물은 사멸시키기 위해서 화학적 선택제를 식물에 분무하였다. 예를 들어, 이원 식물 형질전환 벡터에 의해 제공되는 식물 발현가능한 선택 마커 유전자가 pat 또는 bar 유전자인 경우에 (Wehrmann et al., 1996), 형질전환된 식물에 피날레(Finale) (5.78% 글루포시네이트 암모늄, 파르남 캄파니즈 인크.(Farnam Companies Inc.), 아리조나주 피닉스)의 1000X 용액을 분무함으로써 선택할 수 있었다. 5-7일 간격으로 2회의 순차적 분무를 수행하였다. 최종 분무로부터 7-10일 후에 생존물 (활발하게 성장하는 식물)을 확인하고, 선샤인 믹스 LP5가 준비된 포트 내로 이식하였다. 이식한 식물을 3-4일 동안 습도 돔으로 덮고, 상기 언급된 성장 조건 하에서 콘비론 내에 배치하였다.
- [0109] 쌍자엽 식물 형질전환 분야의 통상의 기술자는 다른 식물 발현가능한 선택 마커 유전자 (예를 들어, 제초제 내성 유전자)가 사용되는 경우에 형질전환된 식물의 다른 선택 방법도 이용가능하다는 것을 이해할 것이다.
- [0110] 실시예 11
- [0111] DIG-657을 포함하는 트랜스제닉 글리신 맥스(*Glycine max*). DIG-657을 포함하는 핵산에 대한 발현 벡터를 보유하는 10 내지 20종의 트랜스제닉 T₀ 글리신 맥스 식물을 관련 기술분야에 공지된 바와 같이, 예를 들어 아그로박테리움-매개된 형질전환에 의해 생성하였다. 성숙 대두 (글리신 맥스) 종자를 16시간 동안 염소 기체로 밤새 멸균하였다. 염소 기체로 멸균한 후에, 종자를 라미나르(LAMINAR)TM 유동 후드 내 개방 용기에 배치하여 염소 기체를 없앴다. 그 다음, 멸균한 종자를 24℃에서 흑색 상자를 사용하여 암실에서 16시간 동안 멸균 H₂O를 흡수하게 하였다.
- [0112] 분할-종자 대두의 제조. 배축 프로토콜의 일부분을 포함하는 분할 대두 종자는, 종피를 분리하고 제거하며 종자를 2개의 자엽 부분으로 분할하기 위해 종자의 꼭지를 따라, 스칼펠에 고정된 #10 블레이드를 사용하여 세로로 절단되는 대두 종자 물질의 제조에 요구되었다. 배축을 부분적으로 제거하는데 세심한 주의를 기울여야 하며, 여기서 배축의 약 1/2 - 1/3이 자엽의 마디 끝에 여전히 부착된 채로 남아있다.
- [0113] 접종. 이어서, 배축의 일부 부분을 포함하는 분할 대두 종자를 DIG-657을 포함하는 이원 플라스미드를 함유하는 아그로박테리움 투메파시엔스 (예를 들어, 균주 EHA 101 또는 EHA 105)의 용액 중에 약 30분 동안 침지시켰다. 아그로박테리움 투메파시엔스 용액을 희석하여 $\lambda=0.6 \text{ OD}_{650}$ 의 최종 농도가 되도록 한 후에 배축을 포함하는 자엽을 침지시켰다.
- [0114] 공동-배양. 접종 후에, 분할 대두 종자를 한 장의 여과지로 덮인 페트리(Petri) 디쉬 내 공동-배양 배지 (Wang, Kan, *Agrobacterium Protocols*. 2. 1. New Jersey: Humana Press, 2006. Print.) 상에서 5일 동안 아그로박테리움 투메파시엔스 균주와 공동-배양되도록 하였다.
- [0115] 싹 유도. 공동-배양 5일 후에, 분할 대두 종자를 B5 염, B5 비타민, 28 mg/L 철, 38 mg/L Na₂EDTA, 30 g/L 수크로스, 0.6 g/L MES, 1.11 mg/L BAP, 100 mg/L 티멘틴(TIMENTIN)TM, 200 mg/L 세포탁심 및 50 mg/L 반코마이신 (pH 5.7)으로 이루어진 액체 싹 유도 (SI) 배지에서 세척하였다. 이어서, 분할 대두 종자를 B5 염, B5 비타민, 7 g/L 노블(Noble) 한천, 28 mg/L 철, 38 mg/L Na₂EDTA, 30 g/L 수크로스, 0.6 g/L MES, 1.11 mg/L BAP, 50 mg/L 티멘틴TM, 200 mg/L 세포탁심, 50 mg/L 반코마이신 (pH 5.7)으로 이루어진 싹 유도 I (SI I) 배지 상에서 배양하였으며, 자엽의 편평한 면은 위를 향해 있고 자엽의 마디 끝은 배지 내로 박혀있었다. 배양 2주 후에, 형질전환된 분할 대두 종자로부터의 외식편을, 6 mg/L 글루포시네이트 (리버티(LIBERTY)[®])를 보충한 SI I 배지를 함유하는 싹 유도 II (SI II) 배지로 옮겼다.
- [0116] 싹 신장. SI II 배지 상에서의 배양 2주 후에, 외식편으로부터 자엽을 제거하고, 자엽의 기저에서 절단을 수행함으로써, 배축을 함유하는 플러시 싹 패드를 절제하였다. 자엽으로부터 단리된 싹 패드를 싹 신장 (SE) 배지로 옮겼다. SE 배지는 MS 염, 28 mg/L 철, 38 mg/L Na₂EDTA, 30 g/L 수크로스 및 0.6 g/L MES, 50 mg/L 아스파라긴, 100 mg/L L-피로글루탐산, 0.1 mg/L IAA, 0.5 mg/L GA3, 1 mg/L 제아틴 리보시드, 50 mg/L 티멘틴TM, 200 mg/L 세포탁심, 50 mg/L 반코마이신, 6 mg/L 글루포시네이트, 7 g/L 노블 한천 (pH 5.7)으로 이루어졌다. 배양물을 2주마다 신선한 SE 배지로 옮겼다. 배양물을 80-90 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sec}$ 의 광 강도에서 18시간 광주기를 사용

하여 24℃에서 콘비론™ 성장 챔버 내에서 성장시켰다.

- [0117] 발근. 자엽 싹 패드로부터 발생된 신장된 싹은 자엽 싹 패드의 기저에서 신장된 싹을 절단하고, 신장된 싹을 1-3분 동안 1 mg/L IBA (인돌 3-부티르산)에 침지시켜 발근을 촉진시킴으로써 단리하였다. 그 다음, 신장된 싹을 피타 트레이 내 발근 배지 (MS 염, B5 비타민, 28 mg/L 철, 38 mg/L Na₂EDTA, 20 g/L 수크로스 및 0.59 g/L MES, 50 mg/L 아스파라긴, 100 mg/L L-피로글루탐산, 7 g/L 노블 한천, pH 5.6)로 옮겼다.
- [0118] 배양. 1-2주 동안 24℃, 18시간 광주기에서 콘비론™ 성장 챔버 내에서 배양한 후에, 뿌리가 발생한 싹을, 달은 선데이 컵 내의 토양 혼합물로 옮기고, 소식물체의 적응을 위해 일정한 온도 (22℃) 및 습도 (40-50%) 하에 120 내지 150 μmol/m²sec의 광 강도에서 긴 낮 조건 (16시간 명기/8시간 암기) 하에 콘비론™ 성장 챔버 (모델 CMP4030 및 CMP3244, 컨트롤드 인바이런먼츠 리미티드, 캐나다 마니토바주 윈니펙)에 배치하였다. 발근 소식물체를 선데이 컵에서 수 주 동안 적응시킨 후에, 강건한 트랜스제닉 대두 식물의 향후 적응 및 정착을 위해 온실로 옮겼다.
- [0119] 트랜스제닉 계통의 발생 및 형태학적 특징을 비형질전환 식물과 비교하였다. 식물 뿌리, 싹, 잎 및 생식 특징을 비교하였다. 트랜스제닉 식물과 비형질전환 식물의 뿌리 길이 및 성장 패턴에 있어서는 어떠한 차이도 관찰 가능하지 않았다. 식물 싹 특징, 예컨대 높이, 잎 수 및 크기, 개화의 시기, 꽃 크기 및 외관은 유사하였다. 일반적으로, 시편관내 및 온실 내 토양에서 배양하였을 때, 트랜스제닉 계통과 DIG 단백질이 발현되지 않은 것 사이에는 어떠한 형태학적 차이도 관찰가능하지 않았다.
- [0120] 실시예 12
- [0121] 단자엽 식물에서의 DIG-657 Bt 살균증 단백질 및 변이체의 생산
- [0122] 메이즈의 아그로박테리움-매개된 형질전환. 하이 II 또는 B-104 F₁ 교배 (Armstrong et al., 1991)로부터의 종자를 95%의 메트로-믹스(Metro-Mix) 360 무토양 성장 배지 (선 그로 홀티컬처, 워싱턴주 벨뷰) 및 5% 점토/양토의 혼합물을 함유하는 5-겔린-포트에 식재하였다. 16:8시간 명:암 광주기로 고압 나트륨 및 금속 할라리드 램프의 조합을 사용하여 온실에서 식물을 성장시켰다. 형질전환을 위한 미성숙 F₂ 배아를 수득하기 위해, 제어된 형태-수분을 수행하였다. 수분후 8-10일에 배아가 대략 1.0 내지 2.0 mm 크기일 때 미성숙 배아를 단리하였다.
- [0123] 감염 및 공동-배양. 메이즈 이삭을, 액체 비누로 문지르고, 2분 동안 70% 에탄올 중에 침지시킨 다음, 멸균수로 행구기 전 30분 동안 20% 상업용 표백제 (0.1% 차아염소산나트륨) 중에 침지시켜 멸균하였다. 100 mg/L 스펙티노마이신, 10 mg/L 테트라시클린 및 250 mg/L 스트렙토마이신을 함유하는 YEP 고체 배지 상에서 28℃에서 2-3일 동안 성장시킨 1-2루프의 박테리아를 100 μM 아세트시린곤을 함유하는 5 mL의 액체 감염 배지 (LS 기본 배지 (Linsmaier and Skoog, 1965), N6 비타민 (Chu et al., 1975), 1.5 mg/L 2,4-디클로로페녹시아세트산 (2,4-D), 68.5 gm/L 수크로스, 36.0 gm/L 글루코스, 6 mM L-프롤린, pH 5.2) 내로 옮김으로써 초이원 벡터를 함유하는 아그로박테리움 세포의 현탁액을 제조하였다. 균일한 현탁액이 달성될 때까지 용액을 볼텍싱하고, 퍼플 필터가 구비된 클렛-서머슨(Klett-Summerson) 비색계를 사용하여 최종 밀도가 약 200 클렛 단위가 되거나 또는 550 nm에서의 광학 밀도가 대략 0.4가 되도록 농도를 조정하였다. 미성숙 배아를 2 mL의 감염 배지를 함유하는 미세 원심분리 튜브 내로 직접 단리하였다. 배지를 제거하고, 밀도가 200 클렛 단위인 아그로박테리움 용액 1 mL로 대체하고, 아그로박테리움 및 배아 용액을 실온에서 5분 동안 인큐베이션한 다음, 암 조건 하에 25℃에서 5일 동안의 공동-배양 배지 (LS 기본 배지, N6 비타민, 1.5 mg/L 2,4-D, 30.0 gm/L 수크로스, 6 mM L-프롤린, 0.85 mg/L AgNO₃, 100 μM 아세트시린곤 및 3.0 gm/L 겔란(Gellan) 겜 (피토테크놀로지 래보러토리즈 (PhytoTechnology Laboratories), 캔자스주 레넥사) 함유, pH 5.8)로 옮겼다.
- [0124] 공동-배양 후에, 배아를 선택 배지로 옮기고, 이후에 대략 8주 동안에 걸쳐 형질전환된 단리물을 수득하였다. 식물 발현가능한 pat 또는 bar 선택 마커 유전자를 함유하는 초이원 플라스미드로 형질전환된 메이즈 조직의 선택을 위해, LS계 배지 (LS 기본 배지, 1X N6 비타민, 1.5 mg/L 2,4-D, 0.5 gm/L MES (2-(N-모르폴리노)에탄숴론산 1수화물; 피토테크놀로지 래보러토리즈, 캔자스주 레넥사), 30.0 gm/L 수크로스, 6 mM L-프롤린, 1.0 mg/L AgNO₃, 250 mg/L 세포탁심, 2.5 gm/L 겔란 겜, pH 5.7)를 비알라포스(Bialaphos) (골드 바이오테크놀로지, 미주리주 세인트 루이스)와 함께 사용하였다. 배아발생 단리물을 수득할 때까지 3 mg/L 비알라포스를 함유하는 선택 배지로 배아를 옮겼다. 회수된 단리물을 재생 및 추가 분석을 위해 2주 간격으로 신선한 선택 배지로 옮김으로써 벌크 업시켰다. 메이즈 형질전환 분야의 통상의 기술자는 다른 식물 발현가능한 선택 마커 유전자 (예를 들어, 제조제 내성 유전자)가 사용되는 경우에 형질전환된 식물의 다른 선택 방법도 이용가능하다는 것을 이

해할 것이다.

[0125] 플라스미드 pDAB114534 및 pDAB114535에 함유된 DIG-657의 두 상이한 구축물 (서열식별번호: 5 및 서열식별번호: 6) (표 5)에 의해 메이즈를 형질전환시켰다. T₀ 식물을 재생시키고, 표적 곤충 해충을 방제하기 위한 그의 능력에 대해 시험하였다. 구축물 pDAB115782는 비-살곤충 유전자에 의해 형질전환된 식물에 대한 음성 대조군으로서 사용되는 YFP (황색 형광 단백질)에 대한 유전자를 함유하는 플라스미드이다.

[0126] <표 5>

[0127] 메이즈 식물을 형질전환시키는 상이한 DIG-657 구축물을 함유하는 플라스미드의 설명.

플라스미드:	설명:	특색
pDAB114534	보더 B::ZmUbi1/IRDIG9931.4/ZmPer5::ZCZ018::SCB V(MAM)/AAD-1/ZmLip::3x 보더 A	DIG-657 전장 (SEQ ID NO:5)
pDAB114535	보더 B::ZmUbi1/IRDIG9931.5/ZmPer5::ZCZ018::SCB V(MAM)/AAD-1/ZmLip::3x 보더 A	DIG-657 말단절단 (SEQ ID NO:6)
pDAB115782	보더 B::ZmUbi1/PhiYFP v3/ZmPer5::ZCZ018::SCBV(MAM)/AAD-1/ZmLip::3x 보더 A	PhiYFP

[0128]

[0129] 1.0 x 0.5 제곱 인치의 잎 절단물을 V5 T₀ 트랜스제닉 식물의 V3 또는 V4 잎으로부터 이중으로 취하였다. 각각의 시험에 대해, 먼저 야생형 식물 잎 조직을 샘플링하여 잎 가장자리 상에서의 Bt 독소의 교차 오염을 방지한 후에, 형질전환된 식물이 이어진다. 각각의 생물검정 트레이 웰 (32-웰 트레이 및 뚜껑, 씨디 인터내셔널, 뉴저지주 피트만)에서, 1개의 잎 절단물을 2% 물-한천 (피셔 사이언티픽(Fisher Scientific), 뉴저지주 페어 론) 상에 배치하고, 이것을 곤충 종당, 사건당 및 구축물당 2회 반복하였다. 각각의 웰을 10마리의 ECB 또는 디아트라에아 사카랄리스(*Diatraea saccharalis*) (파브리시우스(Fabricius)) (사탕수수 천공충 "SCB") 신생벌레 (24-48시간령)로 침입시키고, 공기 교환이 가능하도록 플라스틱 천공 뚜껑으로 밀봉하였다. 트레이를 28°C (16:8시간 명:암, 40% RH)에서 배치하고, 3일 후 퍼센트 잎 손상에 대해 등급화하였다. 퍼센트 잎 손상 데이터를 JMP® 프로 9.0.1 (2010 에스에이에스 인스티튜트 인크., 노스캐롤라이나주 캐리)을 사용하여 ANOVA, 및 터키-크레이머(Tukey-Kramer) 검정으로의 평균 분리 (분산이 상동인 경우)로 분석하였다. 트랜스제닉 식물 물질 상의 각각의 곤충 종에 의해 관찰된 잎 손상의 수준은 표 6에 제시되어 있다.

[0130] <표 6>

[0131] 구축물 114534, 114535 또는 115782로부터의 T₀ 메이즈 잎 조직을 섭식하는 ECB 또는 SCB 유충에 의해 야기된 평균 퍼센트 잎 손상.

구축물	ECB에 의한 평균 % 잎 손상	표준 편차	SCB에 의한 평균 % 잎 손상	표준 편차
pDAB114534 (FL DIG-657)	14.4	15.3	8.7	2.9
pDAB114535 (Tr DIG-657)	71.8	26.9	93.3	9.3
115782 (YFP)	90.8	8.5	98.8	3.1

[0132]

[0133] * 표준 편차 (n=10)

[0134] 두 구축물 114534 및 114535는 YFP 음성 대조군 구축물 (115782)과 비교하여 보다 적은 평균 손상을 유발하였다. 전장 DIG-657 단백질을 발현하는 구축물 114534는 말단절단된 DIG-657 단백질을 발현하는 구축물 114535에 비해 더 큰 곤충 활성을 나타냈다.

[0135] 실시예 13

[0136] 재생 및 종자 생산. 재생을 위해, 배양물을 "28" 유도 배지 (MS 염 및 비타민, 30 gm/L 수크로스, 5 mg/L 벤질 아미노퓨린, 0.25 mg/L 2,4-D, 3 mg/L 비알라프스, 250 mg/L 세포탁심, 2.5 gm/L 겔란 검, pH 5.7)로 1주일 동

안 저-명 조건 ($14 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$) 하에, 이어서 1주일 동안 고-명 조건 (대략 $89 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$) 하에 옮겼다. 이후, 조식을 "36" 재생 배지 (유도 배지와 동일하되, 예외적으로 식물 성장 조절제가 결여되어 있음)로 옮겼다. 3-5 cm 길이의 소식물체를 SHGA 배지 (문헌 [Schenk and Hildebrandt salts and vitamins (1972)]; 피토테크놀로지 래보러토리즈, 캔자스주 레벡사), 1.0 gm/L 미오-이노시톨, 10 gm/L 슈크로스 및 2.0 gm/L 겔란 검, pH 5.8)를 함유하는 유리 배양 튜브로 옮겨 싹 및 뿌리가 추가로 성장 및 발생되도록 하였다. 본원에 앞서 기재된 바와 동일한 토양 혼합물에 식물을 이식하고, 온실에서 개화까지 성장시켰다. 종자 생산을 위해 제어된 수분을 수행하였다.

[0137] 실시예 14

[0138] DIG-657 Bt 살균제 단백질에 대한 코딩 서열의 식물-최적화된 버전의 설계. 트랜스제닉 단자엽 및 쌍자엽 식물에서 DIG-657 단백질을 생산하기 위해 식물 코돈 편향을 갖는 DNA 서열을 설계하고 합성하였다. 메이즈 (제아 메이즈 엘.)에 대한 코돈 용법 표를 진뱅크에 기탁된 서열로부터 수득된 706개의 단백질 코딩 서열 (CD)로부터 계산하였다. 담배 (니코티아나 타바쿰(*Nicotiana tabacum*), 1268개의 CD), 카놀라 (브라시카 나푸스(*Brassica napus*), 530개의 CD), 목화 (고시피움 히르수툼(*Gossypium hirsutum*), 197개의 CD) 및 대두 (글리신 맥스; 약 1000개의 CD)에 대한 코돈 용법 표는 웹사이트 <http://www.kazusa.or.jp/codon/>의 데이터로부터 다운로드받았다. 한쪽 식물 유형에서 아미노산에 대해 총 코돈 사용의 약 10% 미만으로 사용된 임의의 여분 코돈을 생략한 후에, 적절한 가중 평균 상대량으로 메이즈 및 쌍자엽 데이터세트 둘 다에 공통인 고도로 사용된 코돈을 포함하는 편향 코돈 세트를 계산하였다. DIG-657 단백질을 코딩하는 식물 최적화된 서열을 유도하기 위해, 실험적으로 결정된 DIG-657 DNA 서열에 대한 코돈 치환이, 생성된 DNA 서열이 식물-최적화된 코돈 편향 표의 전체 코돈 조성을 갖도록 이루어졌다. 바람직하지 않은 제한 효소 인식 부위, 잠재적인 식물 인트론 스플라이스 부위, A/T 또는 C/G 잔기가 길게 이어지는 것, 및 식물 세포에서의 코딩 영역의 RNA 안정성, 전사 또는 번역을 방해할 수 있는 다른 모티프를 제거하도록 서열의 추가의 개량이 이루어졌다. 다른 변화를 수행하여, 목적하는 제한 효소 인식 부위를 도입하였고, 긴 내부 오픈 리딩 프레임 (+1 이외의 프레임)을 제거하였다. 이들 변화는 모두 식물-편향된 코돈 조성을 유지하는 제약 내에서 이루어졌다. 설계된 서열의 합성은 상업적 공급자 (DNA2.0, 캘리포니아주 멘로 파크)에 의해 수행되었다. 합성 유전자의 생산에 관한 추가의 지침을, 예를 들어 WO 97/13402 및 미국 특허 번호 5,380,831에서 찾아볼 수 있다.

[0139] DIG-657 변이체1을 코딩하는 메이즈-최적화된 DNA 서열은 서열식별번호: 3에 주어진다. DIG-657 변이체2를 코딩하는 슈도모나스 플루오레센스 최적화된 DNA 서열은 서열식별번호: 4에 주어진다. DIG-657을 코딩하는 메이즈-최적화된 고 GC DNA 서열은 서열식별번호: 5에 주어진다. N-말단으로부터 204개의 아미노산이 말단절단된 DIG-657 유전자를 코딩하는 메이즈-최적화된 고 GC DNA 서열은 서열식별번호: 6에 주어진다. 전장 DIG-657을 코딩하는 쌍자엽-최적화된 DNA 서열은 서열식별번호: 8로서 개시된다. 말단절단된 DIG-657을 코딩하는 쌍자엽-최적화된 DNA 서열은 서열식별번호: 9로서 개시된다.

[0140] 서던 블롯 상에서 고정화된 DNA가 방사성으로 표지된 유전자-특이적 프로브와 혼성화되는 것을 표준 방법에 의해 수행하였다 (Sambrook et al., 상기 문헌). 폴리뉴클레오티드 프로브를 표지하는데 사용되는 방사능 동위원소는 ^{32}P , ^{33}P , ^{14}C 또는 ^3H 를 포함하였다. 폴리뉴클레오티드 프로브 분자 내의 방사성 동위원소의 혼입을 분자 생물학 분야의 통상의 기술자에게 널리 공지된 여러 방법 중 임의의 것에 의해 수행하였다. (예를 들어, [Sambrook et al., 상기 문헌] 참조). 일반적으로, 혼성화 및 후속 세척은 청구된 독소 코딩 유전자에 대해 상동성을 갖는 표적 서열의 검출을 허용하는 엄격한 조건 하에 수행하였다. 이중-가닥 DNA 유전자 프로브에 대해, 6X SSPE, 5X 덴하르트(Denhardt) 용액, 0.1% SDS, 0.1 mg/mL 변성 DNA에서 DNA 하이브리드의 T_m 보다 20 °C 내지 25 °C 낮은 온도에서 밤새 혼성화를 수행하였다 [20X SSPE는 3M NaCl, 0.2 M NaH_2PO_4 및 0.02M EDTA (에틸렌디아민 테트라-아세트산 나트륨 염)이고; 100X 덴하르트 용액은 20 gm/L 폴리비닐피롤리돈, 20 gm/L 피콜 (Ficoll) 타입 400 및 20 gm/L BSA-분획 V임].

[0141] 세척을 전형적으로 하기와 같이 수행하였다:

[0142] a. 실온에서 15분 동안 1X SSPE, 0.1% SDS에서 2회 (저 엄격도 세척).

[0143] b. T_m 보다 20 °C 낮은 온도에서 15분 동안 0.2X SSPE, 0.1% SDS에서 1회 (중간 정도의 엄격도 세척).

[0144] 올리고뉴클레오티드 프로브에 대해, 6X SSPE, 5X 덴하르트 용액, 0.1% SDS, 0.1 mg/mL 변성 DNA에서 하이브리드의 T_m 보다 10 °C 내지 20 °C 낮은 온도에서 밤새 혼성화를 수행할 수 있다. 올리고뉴클레오티드 프로브에 대한 T_m

은 하기 식에 의해 결정할 수 있다 (Suggs et al., 1981).

[0145] $T_m(^\circ\text{C}) = 2(T/A \text{ 염기 쌍의 수}) + 4(G/C \text{ 염기 쌍의 수})$

[0146] 세척을 전형적으로 하기와 같이 수행하였다:

[0147] a. 실온에서 15분 동안 1X SSPE, 0.1% SDS에서 2회 (저 엄격도 세척).

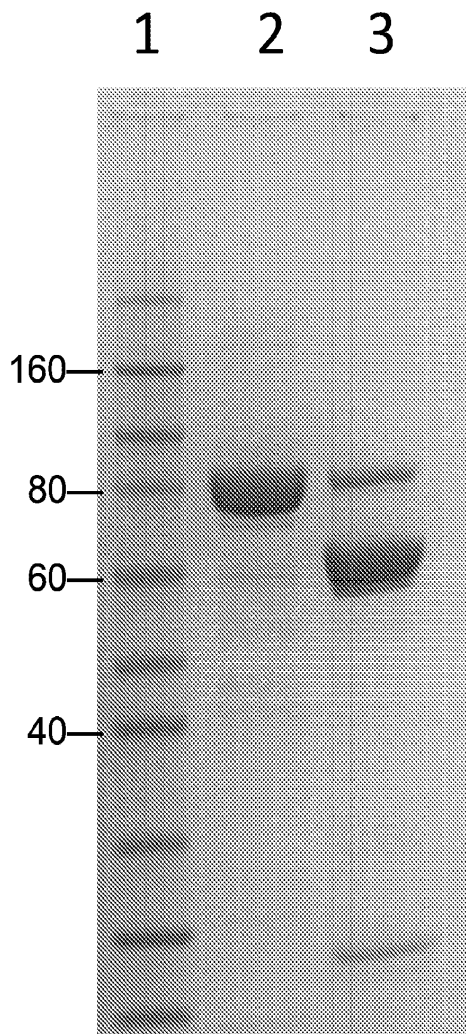
[0148] b. 혼성화 온도에서 15분 동안 1X SSPE, 0.1% SDS에서 1회 (중간 정도의 엄격도 세척).

[0149] 혼성화를 위한 프로브 분자 및 프로브와 표적 분자 사이에 형성된 하이브리드 분자는 방사성 표지 이외의 수단에 의해 검출가능하게 될 수 있다. 이러한 대안적 방법은 본 발명의 범주 내에 있는 것으로 의도된다.

[0150] 본 개시내용은 다양한 변형 및 대안적 형태가 가능할 수 있지만, 본원에서는 구체적 실시양태를 예로서 상세히 기재하였다. 그러나, 본 개시내용이 개시된 특정한 형태에 제한되도록 의도되지는 않는 것으로 이해되어야 한다. 오히려, 본 개시내용은 하기 첨부된 청구범위 및 그의 합법적 등가물에 의해 정의된 바와 같은 본 개시내용의 범주 내에 속하는 모든 변형, 등가물 및 대안물을 포괄하는 것이다.

도면

도면1



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Dow AgroSciences LLC
 Armstrong, Janna M.
 Etter, Audrey J.
 Frey, Meghan L.
 Gandra, Premchand
 Letherer, Ted
 Lin, Gaofeng
 Madduri, Krishna M.
 Mowery, Haley R.
 Narva, Kenneth E.
 Sheets, Joel J.
 Tan, Sek Yee

<120> VEGETATIVE INSECTICIDAL PROTEINS USEFUL FOR CONTROL OF INSECT
 PESTS

<130> 74948

<160> 13

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2412

<212> DNA

<213> Bacillus thuringiensis

<400> 1

atggtacaaa aatggatgca aaggatgata attgtggata ataataaatt aatgtaaga	60
gctttaccaa gctttattga ttattttaac ggtatttatg gatttgccac tggatcaaa	120
gatattatgg gaatgatttt taaaacagat acaggtggta gtaatttaac attagatgag	180
attttaaga atcaaaatit actaaatgat atctcaggta agctcgatgg aattaatgga	240
gatttagggg atcttattgc acaagggaac ttgaattcag aattagctaa ggaattgcta	300
aaaatctcta atgagcagaa tcaaatgtta aatcatgtta atgctcaact taatgcaatc	360
aattcaacac ttaatatata tcttcaaaa attacatcta tgttaaatga ggtgatgaag	420
caaaaccatg ttttaagtct acaaatagaa tttcttagta agcaattgca ggaatttca	480
gataaacttg atattatcaa cttaaactgta ttgattaact ctacattaac agagattact	540

cctgcttata aacgtattaa atatgtaaac gaaaaatttg atgaattgac ttctactgta 600
 gagaaaaatc caaaatcata tcaagataac gttactaaag aagtattga aaacttaaat 660
 gagctaactg agttggcgaa aagtgttacc aaaaatgata tggatagttt tgaatttat 720
 cttcaaaactt tccatgatgt aatgactgga aataatttat tcggccgctc agcattaaaa 780

 actgcttcag aattaattac aaaagaaaat gtcacgacaa ggggaagtga gataggaaaa 840
 gtttataatt tcttaattgt ttttaacttct ttacaagcaa aagcttttct cactttaact 900
 gcatgtcgaa agttattagg tttaacagat atcgattata ctcaaattat gaatcatcat 960
 atagatggtc aaaaaagaga atttcgtatt aatattcttc caacactttc taataatfff 1020
 tctaactcta gttattcaaa aaatagagga agtgatatcg atgatccaat tgttgtgtta 1080
 gaagcagcac ctggatatgc cttaatagga tttgaaattc taaacgatcc acttccaatt 1140
 ttaaaaggat atcaggctag gttaaaacca aattatcaag ttgacaggga gtcgatgtca 1200

 gaaacgattt atggggacat tcataaatta ttttgcccaa aacagctgga gcaaaaatat 1260
 tatattaaag atattgaatt tcttgagggc tatgtaatta ctaaaatcgt ttttgaaaaa 1320
 aggctaaate aattggggta tgaggttaaca gcaaatffff atgaccctgc tacaggaagt 1380
 atcgatttaa ataaggttaa agtagaatct tggaaggaaa agtcttgca ggaggattcc 1440
 tgcgaagatg agtatagtat tataaaggcc gaaacggatg gcatttatat gccattagcc 1500
 gtagtaagtg agactfffft aaccctatt tatggttttg gattaacagt tgacgaaaaa 1560
 aatcaaaaaa taactttaac aggtaaatcc tatttactgt aatccttact agaaacagac 1620

 ttacttaaca atgaaacata ttttaattgct tcaccagacg gttatattag tagtattgta 1680
 gaaaactgga atataacatc agataaactt gggctttgga gagcaaataa taataatgca 1740
 tttgtcgata aggcagatc tataaaagga tcaagtctc tgtatactca taaagatggg 1800
 gaattctcgc aatttattgg aaataagcta aaacctaaaa ctaattatgt tattcaatat 1860
 gttataaaag gaagacctgc tatttattta aaaaataata aagatacttt atttaggat 1920
 accaaaaata actttagcga ttttcagact gtaactaaaa aattcaattc aggagtaaat 1980
 ccttcggaaa tttatttctt ttttaaaaat caaagtgaat acgaagcctg gggaaataac 2040

 tttattattt tagaaattaa atcgcttgaa ttcttgccac aaatgctgaa gcctgaggat 2100
 tggataccat caggaaaatg gcaaatgaaa gatggaggac gcctagagat tttgggagat 2160
 ggttatttta aacaattcat taaattgaa aatgattcaa cctatcatct aagattatct 2220
 gttaagggaa caggtagggt atctataatt gatgaatcta aatatttact ttttgtaaat 2280
 gttaaggatg aagatcttac tagagttatt aaaaatacct cttcaaaggg tgagtgtttt 2340
 atagctcttg agggacttta tgtagaaaat tcaagtacta ttttctctaa tgtatctatt 2400

gttaaagagt ag

2412

<210> 2

<211> 803

<212> PRT

<213> Bacillus thuringiensis

<400> 2

Met Val Gln Lys Trp Met Gln Arg Met Ile Ile Val Asp Asn Asn Lys

1 5 10 15

Leu Asn Val Arg Ala Leu Pro Ser Phe Ile Asp Tyr Phe Asn Gly Ile

 20 25 30

Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Lys Asp Ile Met Gly Met Ile Phe Lys

 35 40 45

Thr Asp Thr Gly Gly Ser Asn Leu Thr Leu Asp Glu Ile Leu Lys Asn

 50 55 60

Gln Asn Leu Leu Asn Asp Ile Ser Gly Lys Leu Asp Gly Ile Asn Gly

65 70 75 80

Asp Leu Gly Asp Leu Ile Ala Gln Gly Asn Leu Asn Ser Glu Leu Ala

 85 90 95

Lys Glu Leu Leu Lys Ile Ser Asn Glu Gln Asn Gln Met Leu Asn His

 100 105 110

Val Asn Ala Gln Leu Asn Ala Ile Asn Ser Thr Leu Asn Ile Tyr Leu

 115 120 125

Pro Lys Ile Thr Ser Met Leu Asn Glu Val Met Lys Gln Asn His Val

 130 135 140

Leu Ser Leu Gln Ile Glu Phe Leu Ser Lys Gln Leu Gln Glu Ile Ser

145 150 155 160

Asp Lys Leu Asp Ile Ile Asn Leu Asn Val Leu Ile Asn Ser Thr Leu

 165 170 175

Thr Glu Ile Thr Pro Ala Tyr Gln Arg Ile Lys Tyr Val Asn Glu Lys

 180 185 190

Phe Asp Glu Leu Thr Ser Thr Val Glu Lys Asn Pro Lys Ser Tyr Gln

Val Thr Ala Asn Phe Tyr Asp Pro Ser Thr Gly Ser Ile Asp Leu Asn
 450 455 460

Lys Val Lys Val Glu Ser Trp Lys Glu Lys Ser Cys Glu Glu Asp Ser
 465 470 475 480

Cys Glu Asp Glu Tyr Ser Ile Ile Lys Ala Glu Thr Asp Gly Ile Tyr
 485 490 495

Met Pro Leu Gly Val Val Ser Glu Thr Phe Leu Thr Pro Ile Tyr Gly
 500 505 510

Phe Gly Leu Thr Val Asp Glu Lys Asn Gln Lys Ile Thr Leu Thr Gly
 515 520 525

Lys Ser Tyr Leu Arg Glu Ser Leu Leu Glu Thr Asp Leu Leu Asn Asn
 530 535 540

Glu Thr Tyr Leu Ile Ala Ser Pro Asp Gly Tyr Ile Ser Ser Ile Val
 545 550 555 560

Glu Asn Trp Asn Ile Thr Ser Asp Asn Thr Gly Ser Trp Arg Ala Asn
 565 570 575

Asn Asn Asn Ala Phe Val Asp Lys Ala Asp Thr Ile Lys Gly Ser Ser
 580 585 590

Ser Leu Tyr Thr His Lys Asp Gly Glu Phe Ser Gln Phe Ile Gly Asn
 595 600 605

Lys Leu Lys Pro Lys Thr Asn Tyr Val Ile Gln Tyr Val Ile Lys Gly
 610 615 620

Arg Pro Ala Ile Tyr Leu Lys Asn Asn Lys Asp Thr Leu Phe Glu Asp
 625 630 635 640

Thr Lys Asn Asn Phe Ser Asp Phe Gln Thr Val Thr Lys Lys Phe Asn
 645 650 655

Ser Gly Val Asn Pro Ser Glu Ile Tyr Phe Leu Phe Lys Asn Gln Ser
 660 665 670

Glu Tyr Glu Ala Trp Gly Asn Asn Phe Ile Ile Leu Glu Ile Lys Ser
 675 680 685

Leu Glu Phe Leu Pro Gln Met Leu Lys Pro Glu Asp Trp Ile Pro Ser

gagcttacgg agctggcgaa aagcgtgacg aaaaacgata tggatagctt cgagttttac 720
 ctccaaacct tccatgacgt aatgaccggg aacaacctct tcgggaggtc agcgctcaag 780
 acagcctccg agttaatcac gaaggagaac gtcacaaccc ggggttcaga aattgggaag 840
 gtatacaact tcctaactgt gcttacgagc cttcaagcta aagctttcct cacactgacg 900

 gcctgccgga aactacttgg gctgaccgac atcgactata ctcagattat gaatcaccac 960
 atcgacggtc aaaagagaga gtttcgcatt aacattctcc caacgctcag taacaacttc 1020
 tccaatccgt cgtattccaa aaaccgaggc tcagatattg acgatcctat tgtcgtcttg 1080
 gaggcagcgc cagggtacgc actcatcggc ttcgaaatct taaacgacc gctgcccac 1140
 ctttaagggtt atcaggccag gctgaagccg aactaccagg tggaccgca atccatgtcc 1200
 gaaacgatct acggcgacat ccacaagctg tctgtccga agcagctcga aaaaagtac 1260
 tacattaaag acatcgagtt cccagaggga tatgtgatta cgaaaattgt gttcgaaaag 1320

 aggctcaacc aacttggata tgaggtcaca gctaatttct acgatccttc gactggctct 1380
 atcgatttga ataaggtgaa ggttgaatcg tggaaggaga aaagctgtga ggaagatagt 1440
 tgcgaggatg aatattcaat cataaaggcg gaaacagatg gaatatacat gccgctcggc 1500
 gttgtcagcg agacttttct gaccctatc tacggttttg gtctaacagt cgacgagaaa 1560
 aaccagaaga tcaactctgac cggtaaaagt taccttcgcg agtcgctgct ggagactgac 1620
 ctgctgaaca acgagactta cttgatcgtc agcccagacg ggtacattag ctctatcgtc 1680
 gaaaactgga atatcacctc tgataatact ggctcgtgga gggccaataa caacaatgcg 1740

 tttgtggata aagcagatac aatcaaaggc tcaagcagcc tctacacgca caaggatgga 1800
 gagttttccc agtttatagg caacaagttg aagccaaaga cgaattacgt tatacagtac 1860
 gfgatcaagg gcaggccagc cataacttgg aaaaacaata aggacacgct tttcgaagat 1920
 acgaagaata acttctccga tttccaaacc gttacaaaga agttcaatag tggagtgaat 1980
 cctagcgaga tctactttct gttcaaaaac caatctgagt acgaggcttg gggcaacaac 2040
 ttcataatc tagagataaa gtccttggag tttctgcccc agatgctgaa gcccgaggat 2100
 tggatcccct cgggcaatgt acagatgaag gacggcggac gcctagagat tctcggcgac 2160

 ggctacttta agcagttcat caagttagag aacgactcga cttatcacct tcgtctctca 2220
 gtgaagggtc cagggagagt cagcatcctc gacgagtcga agtacctttt gttcgtcaac 2280
 gttaaggacg aggacctgac acgagtcata aagaatacca gcagtaaggc cgagtgtttt 2340
 atcgcttttg agggcactta tgttgagaac tcctctacca tattctcaa tgtttctata 2400
 gtgaaggagt ga 2412

<210> 4

<211> 2412

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized full length coding region

<400> 4

```

atggcccaga agtggatgca acgcatgata atcgtggata acaacaagct gaacgtccgt      60
gccctgccga gcttcatcga ctacttcaac ggcatctacg gcttcgcgac cggcattaaa      120
gacattatgg gcatgatctt caagaccgac acgggcggtg gcaacttgac cctggacgaa      180
attctgaaga atcagaatct gctcaacgat atcagcggca agctcgacgg cattaacggg      240
gatctgggcg acctgatcgc ccaagggaac ctgaacagcg agctggcgaa agagctgttg      300
aagatctcca acgaacagaa ccagatgctg aaccacgtga atgcccaact gaacgccatc      360
aactcgacce tgaacatcta ctgcccgaag atcacctcga tgttgaacga ggtgatgaag      420

cagaaccatg tgctgagcct gcagattgag ttcttgagca agcagctgca ggaaatctcc      480
gacaagctgg atatcatcaa cctgaatgtg ctgatcaata gcaccttgac cgagatcacc      540
ccggcctatc agcgcaccaa gtacgtgaac gagaagtctg acgaactgac cagcaccgtc      600
gaaaagaatc ccaagtcgta ccaggacaat gtcaccaaag aagtgatcga gaacttgaac      660
gagctcaccg aactggccaa atcggtgacg aagaacgaca tggactcgtt cgaattctat      720
ctgcagacct tccacgacgt gatgaccggc aacaacctgt tcggccgcag cgcctgaaa      780
accgcctcgg aactgatcac gaaagagaat gtgaccacc gtggctccga gatcggaag      840

gtgtacaact tctgattgt cctgacctcg ctgcaggcga aggcgtttct gaccttgacg      900
gcctgccgta agctgttggg cctgaccgac attgactaca cgcagatcat gaatcaccac      960
atcgacggtc agaagcggga attccgcac aacatcctgc cgacctgag caataacttc      1020
tccaacccca gctacagcaa gaaccggggc agcgatatcg acgaccgat cgtggctctc      1080
gaagcggcgc cggctacgc cctgatcggc ttcgagatcc tgaacgacce gttgccgatc      1140
ctgaaagggt accaagcgcg cctgaagccg aattaccagg tggatcgca gtcgatgagc      1200
gaaaccattt acggcgacat tcacaagctg ttctgcccc aagcaactcga acagaagtac      1260

tatatcaagg acatcgaatt cccggaagc tacgtgatta ccaagatcgt ctttgaagaa      1320
cgctgaacc agctgggtta tgaggtcacc gccaaactct acgaccgag cacgggttagc      1380
atcgacctga ataaggtgaa ggtgaaaagc tggaaaagaga agtcgtcga agaggattcg      1440
tgcgaggacg agtatagcat catcaaggcg gaaaccgatg gcatctacat gccgctcggc      1500
gtcgtcagcg aaacctttct caccctgatc tacgggtttg gcttgaccgt ggatgaaaag      1560

```

aaccagaaaa tcacctgac cggtaagagc tatctccgcg agtccttgct ggaacggac 1620
ctgttgaaca acgaaaccta cctgattgcc agccccgatg gttatatctc gtcgattgtg 1680

gagaactgga acatcaccag cgacaacacc ggtcctgggc gtgccaacaa taacaatgcc 1740
ttcgtcgaca aggccgatac gatcaagggt agtccagcc tgtacacca caaagacggt 1800
gaatttagcc agtttattgg caataagtgg aagcccaaga ccaattacgt catccaatac 1860
gtcattaagg gccgtccggc gatctatctg aaaaacaaca aggacaccct cttcgaggat 1920
accaagaaca acttcagcga cttccagacc gtgaccaaga aattcaattc cgggtgtaac 1980
ccgtccgaaa tctatttctt gttcaaaaac cagtcggaat acgaggcctg gggcaacaac 2040
tttatcatcc tggagatcaa gagcctggag tttctgccgc aaatgctgaa acccgaggat 2100

tggattccca gcgggaactg gcagatgaag gatggtggcc gcctcgaaat cttgggcgac 2160
ggctacttca agcagttcat caagttggaa aacgacagca cctaccatct gcggtgtcc 2220
gtcaagggca ccggccgtgt gtccatcatc gacgagtcca agtatctgct cttcgtgaac 2280
gtgaaggatg aggatctgac ccgctgatc aagaacacca gcagcaaagg ggaatgtttc 2340
atgcacctgg aaggcacgta cgtcgagaac tccagcacca tcttcagcaa cgtgtccatc 2400
gtgaaagagt ga 2412

<210> 5
<211> 2412
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized full length coding region

<400> 5

atggtgcaga agtggatgca gaggatgata atcgttgaca ataataaatt aaacgtgagg 60
gcactgccga gcttcatcga ctacttcaac ggcatctacg gcttcgccac cggcatcaag 120
gacatcatgg gcatgatctt caagaccgac accggaggca gcaacctgac cctggacgag 180
atcctcaaga atcaaaacct cctgaacgac atcagcggga agctggacgg aattaatggc 240
gatcttggag acctgatcgc ccaaggcaac ctcaactccg agctggccaa ggagctgctg 300
aagatttcca acgagcagaa tcaaatgctg aaccacgtga acgctcagct gaacgcaatc 360

aactcaacc tgaacatcta cctgcccaag atcacgtcca tgctgaacga ggtgatgaag 420
cagaacctag tgctgtccct ccagatagag ttcttgagca agcagctgca agagatatcc 480
gacaagctgg acatcatcaa cctcaacgtg ctgatcaaca gcaccctcac cgagatcacc 540
cctgcgtacc agaggattaa atacgtgaac gagaagttcg acgaactgac ctccaccgtg 600

gagaagaacc ccaaatccta ccaagacaac gtaccaagg aggtgatcga gaacctgaac 660
 gagctgacgg agctggcgaa gagcgtcacc aagaacgaca tggactcctt cgagtcttac 720
 ctccagacct tccacgacgt gatgaccggg aataatctgt tcgggcgctc agcattaaag 780

 accgcgagcg aattaatcac caaggagaac gtgaccacca gaggtccga gatcgcaag 840
 gtgtacaact tctgatcgt gctcacctcc ctgcaagcga aggcgttcct caccctgacc 900
 gcgtgtagga agctgctggg cctgaccgac atcgattaca cccagatcat gaaccaccac 960
 atcgacggcc agaagagggg gtttaggatt aatctctgc cgaccctgtc caataatttc 1020
 tccaaccgga gctactcaa aatagaggc tcggacatcg acgacccat cgtggtgctg 1080
 gaggcagccc ctggctacgc cctgatcggc ttcgagatcc tgaacgacc gctgccgatc 1140
 ctcaagggtt accaagcgag gctgaaacca aactaccaag tggataggga gagcatgtca 1200

 gagaccatct acggggacat ccataaactg ttctgcccga agcagctgga gcaaaaatat 1260
 tacattaaag atatcgagtt cccggagggc tacgtgatca ccaagatcgt gttcgagaag 1320
 aggtgaatc aactgggcta cgaagtgacc gccaacttct acgacccgag caccggtccc 1380
 atcgacctga acaaggtgaa ggtggagagc tggaggaga agtctctgta ggaggactcc 1440
 tgcgaggacg agtactccat catcaaggcc gagaccgacg ggatctacat gccgctgggc 1500
 gtggtgagcg agaccttct gaccccgatc tacgggtttg gcctcaccgt ggacgagaaa 1560
 aatcaaaaaa taacctgac cggcaagtcc tacctgaggg agtcctgct ggagaccgac 1620

 ctgctgaaca atgaaaccta cctcatcgcc agcccagacg gctacatcag cagcatcgtc 1680
 gagaactgga atataacctc cgacaacacc gggagctgga gggccaataa taataatgcc 1740
 ttcgtggaca aggcggatac tataaaaggc tcaagcagcc tgtacacca taaagacggc 1800
 gagttctcgc agttcatcgg caacaagtg aagcccaaga ccaactacgt catccagtac 1860
 gttataaaag gaaggcctgc gatctacctg aaaaataata aagacacct gttcgaggac 1920
 accaaaaata acttcagcga cttccagacc gtgaccaaga agttcaactc tggcgtgaac 1980
 ccgagcgaat tctacttctt gttcaagaat caatccgagt acgaggcctg gggcaacaac 2040

 ttcacatcctc tggaaattaa atccctggag ttctgcccgc agatgctgaa gccggaggac 2100
 tggataccga gcggcaactg gcagatgaaa gacggtggaa ggctggagat cctgggcgac 2160
 ggctacttca agcagttcat taaactggag aacgacagca cctaccacct gaggtgagc 2220
 gtgaaggga ctgggaggtt gtcgatcatc gacgagtcca agtacctgct gttcgtgaac 2280
 gtgaaggacg aggacctgac gaggtgatc aaaaataact cctccaaggc cgagtcttc 2340
 atcgcgctgg aaggcaccta cgtggagaac agctcaacca tcttctcaa cgtgagcatc 2400

gtgaaggagt ga 2412

<210> 6

<211> 1800

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized full length coding region

<400> 6

atgtcctacc aagacaacgt caccaaggag gtgatcgaga acctgaacga gctgacggag 60

ctggcgaaga gcgtcaccaa gaacgacatg gactccttcg agttctacct ccagaccttc 120

cacgacgtga tgaccgggaa taatctgttc gggcgcctcag cattaaagac cgcgagcgaa 180

ttaatcacca aggagaacgt gaccaccaga ggctccgaga tcggcaaggt gtacaacttc 240

ctgatcgtgc tcacctcct gcaagcgaag gcgttcctca ccctgaccgc gtgtaggaag 300

ctgctgggcc tgaccgacat cgattacacc cagatcatga accaccacat cgacggccag 360

aagagggagt ttaggattaa tatcctgccg acctgtcca ataatttctc caacccgagc 420

tactcaaaa atagaggctc ggacatcgac gaccccatcg tggtgctgga ggcagccct 480

ggctacgcc tgatcggctt cgagatcctg aacgaccgc tgccgatcct caagggtac 540

caagcgagge tgaacacaaa ctaccaagtg gatagggaga gcatgtcaga gaccatctac 600

ggggacatcc ataaactgtt ctgcccacaa cagctggagc aaaaatatta cattaagat 660

atcgagtcc cggagggcta cgtgatcacc aagatcgtgt tcgagaagag gctgaatcaa 720

ctgggctacg aagtgaccgc caacttctac gacccgagca ccggctccat cgacctgaac 780

aaggtgaagg tggagagctg gaaggagaag tcctgtgagg aggactcctg cgaggacgag 840

tactccatca tcaaggccga gaccgacggg atctacatgc cgctgggctg gctgagcgag 900

accttctga ccccgatcta cgggtttggc ctaccctgg acgagaaaa tcaaaaata 960

acctgaccg gcaagtctca cctgagggag tcctgtctgg agaccgacct gctgaacaat 1020

gaaacctacc tcacgccag cccagaccgc tacatcagca gcatcgtcga gaactggaat 1080

ataacctccg acaacaccgg gagctggagg gccaaataata ataatgcctt cgtggacaag 1140

gcggatacta taaaaggctc aagcagcctg tacaccata aagacggcga gttctcgag 1200

ttcatcggca acaagctgaa gcccaagacc aactacgtca tccagtacgt tataaaagga 1260

aggcctgcga tctacctgaa aaataataaa gacacctgt tcgaggacac caaaaataac 1320

ttcagcgact tccagaccgt gaccaagaag ttcaactctg gcgtgaacc gagcgaaatc 1380

tacttctgt tcaagaatca atccgagtac gaggcctggg gcaacaactt catcatcctg 1440

gaaattaaat ccctggagtt cctgccgcag atgctgaagc cggaggactg gataccgagc 1500
 ggcaactgtc agatgaaaga cgggtggaagg ctggagatcc tgggcgacgg ctacttcaag 1560

cagttcatta aactggagaa cgacagcacc taccacctga ggctgagcgt gaagggaact 1620
 gggagggtgt cgatcatcga cgagtccaag tacctgctgt tcgtgaacgt gaaggacgag 1680
 gacctgacga ggggtattaa aaatacctcc tccaagggcg agtgcttcat cgcgctggaa 1740
 ggcacctacg tggagaacag ctcaaccatc ttctccaacg tgagcatcgt gaaggagtga 1800

<210> 7

<211> 599

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> translated from synthesized full length coding region

<400> 7

Met Ser Tyr Gln Asp Asn Val Thr Lys Glu Val Ile Glu Asn Leu Asn

1 5 10 15
 Glu Leu Thr Glu Leu Ala Lys Ser Val Thr Lys Asn Asp Met Asp Ser

20 25 30
 Phe Glu Phe Tyr Leu Gln Thr Phe His Asp Val Met Thr Gly Asn Asn

35 40 45
 Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr Ala Ser Glu Leu Ile Thr Lys

50 55 60
 Glu Asn Val Thr Thr Arg Gly Ser Glu Ile Gly Lys Val Tyr Asn Phe

65 70 75 80
 Leu Ile Val Leu Thr Ser Leu Gln Ala Lys Ala Phe Leu Thr Leu Thr

85 90 95
 Ala Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Thr Asp Ile Asp Tyr Thr Gln Ile

100 105 110
 Met Asn His His Ile Asp Gly Gln Lys Arg Glu Phe Arg Ile Asn Ile

115 120 125
 Leu Pro Thr Leu Ser Asn Asn Phe Ser Asn Pro Ser Tyr Ser Lys Asn

130 135 140
 Arg Gly Ser Asp Ile Asp Asp Pro Ile Val Val Leu Glu Ala Ala Pro

atggttcaaa agtggatgca aagaatgata attggtgaca ataataaatt aaatgttaga 60
 gcacttccat ctttcattga ttactttaac ggaatctatg gatttgctac tgggattaag 120
 gatatcatgg gaatgatctt taagactgat actggtgggtt ctaatcttac tcttgatgag 180
 atattgaaga atcaaaaattt gcttaatgac atttctggca agctggatgg aattaatgga 240

 gaccttgggtg atcttattgc tcaaggaaac cftaactctg aacttgctaa ggaacttctt 300
 aagatttcaa atgagcaaaa tcaaatgttg aaccatgtta acgctcaact taacgcaatc 360
 aactctacac ttaacatcta tcttccaaag attacttcaa tgcttaatga ggttatgaag 420
 caaaaccacg ttctttctct tcaaatgaa tttctttcta agcaacttca agagatttct 480
 gataagctgg atatcattaa ccttaacggt ctcattaact ctactttgac tgagattact 540
 cctgcttacc aaaggattaa atacgttaac gaaaagtctg atgaactgac ttctactggt 600
 gagaagaacc caaagtctta ccaagataac gttactaagg aagtattga aaaccttaat 660

 gagcttactg agcttgctaa gtctgttaca aagaacgaca tggattcatt cgagtctat 720
 cttcaaactt tccatgatgt tatgactggg aataatcttt tcgggaggtc tgcattaaag 780
 actgcttctg aattaatcac taaggaaaac gtaactacta gaggttctga gattggaaag 840
 gtgtataact ttcttattgt tcttacttca cttcaagcta aggctttctt tactcttact 900
 gcttgtagaa agctccttgg tcttactgac attgattaca ctcagattat gaacatcat 960
 attgatggtc aaaagagaga gtttaggatt aatatecttc caactcttct taataatttc 1020
 tcaaatccat ctactctaa aaatagaggt tctgatattg atgatcctat tgtagtctt 1080

 gaagctgctc ctggatacgc tcttattgga tttgagatac ttaacgatcc acttcttatt 1140
 ctttaagggtt atcaagctag acttaaacca aactatcaag ttgatagaga gtctatgtca 1200
 gagactatct acggagatat tcataaactc ttttgcccaa agcaacttga gcaaaaatat 1260
 tacattaaag atattgaatt tcttgaggga tacgtcatta ctaagatagt ttttggaaaag 1320
 agacttaate aacttgggta cgaggttact gctaactttt acgatccatc taccggatct 1380
 attgatctta acaaggftaa ggttgaatct tggaaagaaa agtcttgcga ggaggattct 1440
 tgccaagatg agtattcaat cattaagget gaaacagatg gcactctat gccacttggga 1500

 gtggtttctg aaacttttct tactcctatc tafggtttcg gacttactgt tgatgagaag 1560
 aatcaaaaaa taactttgac tgggaagtct tatcttagag aatctcttct tgaactgat 1620
 cttcttaaca atgaaactta ccttattgct tctccagacg gttacatttc ttctattggt 1680
 gagaactgga atataacttc tgacaatact ggatcttggga gagctataaa taataatgct 1740
 tttgtggata aggctgatac tataaaaggt tcttcatctc ttactactca taaagatggt 1800
 gagttttctc aattcattgg aaacaaactt aagcctaaga ccaattacgt tattcaatat 1860

gttataaaag ggagacctgc tatctatcct aaaaataata aagatactct tttcgaggat 1920

accaaaaata acTTTTctga ttttcaaact gttactaaga aattcaattc tggagttaat 1980

ccttctgaaa tctacttctt tttcaagaat caatctgaat acgaggcatg gggaaacaac 2040

tttatcattt tggaaattaa atcacttgag ttcttccac aaatgcttaa gcctgaggat 2100

tggattcctt ctggaaacgt tcagatgaaa gacggaggca gacttgagat tcttgagat 2160

ggttacttta agcaattcat taaattggag aatgattcaa cttaccatct gagactttct 2220

gttaagggaa ctggcagagt ttctatcatt gatgaatcta agtatcttct ttttgtaaat 2280

gttaaggatg aggatctgac tagagtcatt aaaaataactt cttctaaggg tgagtgttc 2340

atgctcttg agggaactta cgttgaaaac tcttctacca ttttctctaa tgtttcaata 2400

gttaaggagt ga 2412

<210> 9

<211> 1800

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized full length coding region

<400> 9

atgtcttacc aagataacgt tactaaggaa gttattgaaa accttaatga gcttactgag 60

cttgctaagt ctgttacaaa gaacgacatg gattcattcg agttctatct tcaaactttc 120

catgatgtta tgactgggaa taatcttttc gggaggctcg cattaagac tgcttctgaa 180

ttaatcacta aggaaaacgt aactactaga ggttctgaga ttggaaaggt gtataacttt 240

cttattgttc ttacttcaat tcaagctaa gctttcctta ctcttactgc ttgtagaaag 300

ctccttggtc ttactgacat tgattacact cagattatga accatcatat tgatggtcaa 360

aagagagagt ttaggattaa taccctcca actctttcta ataatttctc aaatccatct 420

tactctaaaa atagaggttc tgatattgat gatcctattg tagttcttga agctgctcct 480

ggatacgctc ttattggatt tgagatactt aacgatecac ttctattct taagggttat 540

caagctagac ttaaaccaaa ctatcaagtt gatagagagt ctatgtcaga gactatctac 600

ggagatattc ataaactctt ttgcccagg caacttgagc aaaaatatta cattaagat 660

attgaatttc ctgagggata cgtcattact aagatagttt ttgaaaagag acttaatcaa 720

cttggttacg aggttactgc taacttttac gatccatcta ccggatctat tgatctaac 780

aaggttaagg ttgaactctg gaaggaaaag tcttgcgagg aggattcttg cgaagatgag 840

tattcaatca ttaaggctga aacagatggc atctatatgc cacttggagt ggtttctgaa 900

acttttctta ctctatcta tggtttcgga cttactgttg atgagaagaa tcaaaaaata 960
actttgactg ggaagtctta tcttagagaa tctcttcttg aaactgatct tcttaacaat 1020

gaaacttacc ttattgettc tccagacggt tacatttctt ctattgttga gaactggaat 1080
ataacttctg acaatactgg atcttggaga gctaataata ataatgcttt tgtggataag 1140
gctgatacta taaaaggttc ttcactctct tacactcata aagatggtga gttttctcaa 1200
ttcattggaa acaaacttaa gcctaagacc aattacgtta ttcaatatgt tataaaaggg 1260
agacctgcta tctatcttaa aaataataaa gatactcttt tcgaggatac caaaaataac 1320
ttttctgatt ttcaactgt tactaagaaa ttcaattctg gagttaatcc ttctgaaatc 1380
tacttccttt tcaagaatca atctgaatac gaggcattggg gaaacaactt tatcattttg 1440

gaaattaaat cacttgagtt cttccacaa atgcttaagc ctgaggattg gattccttct 1500
ggaaacgttc agatgaaaga cggaggcaga cttgagattc ttggagatgg ttactttaag 1560
caattcatta aattggagaa tgattcaact taccatctga gactttctgt taagggaact 1620
ggcagagttt ctatcattga tgaatctaag tatcttcttt ttgtaaatgt taaggatgag 1680
gatctgacta gactcattaa aaatacttct tctaagggtg agtgtttcat tgctcttgag 1740
ggaacttacg ttgaaaactc ttctaccatt ttctctaag tttcaatagt taaggagtga 1800

<210> 10
<211> 2625
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized full length coding region

<400> 10

atgttagcta gacaaggtgg atctcttaga gcttctcaat gtaacgctgg acttgctaga 60
agagttgagg ttggtgctct tgttgttctt agaccaattt ctgttaacga cgttgttcca 120
cacgtctatt ctgctctctt ttctgttgct agacgttctt gctctaagtc ctctattaga 180
agtactagaa ggettcaaac tactgtttgc tcaatggttc aaaagtggat gcaaagaatg 240
ataattgttg acaataataa attaaatgtt agagcacttc catctttcat tgattacttt 300
aacggaatct atggatttgc tactgggatt aaggatatca tgggaatgat ctttaagact 360

gatactggtg gtictaatct tactcttgat gagatattga agaatcaaaa ttgcttaat 420
gacatttctg gcaagctgga tggaattaat ggagaccttg gtgatcttat tgctcaagga 480
aaccttaact ctgaacttgc taaggaactt cttaagattt caaatgagca aatcaaatg 540
ttgaaccatg ttaacgtcca acttaacgca atcaactcta cacitaaat ctatcttcca 600

aagattactt caatgcttaa tgaggttatg aagcaaaacc acgttctttc tcttcaaatt 660
gaatttcttt ctaagcaact tcaagagatt tctgataagc tggatatcat taacctaac 720
gttctcatta actctacttt gactgagatt actcctgctt accaaaggat taaatacgtt 780

aacgaaaagt tcgatgaact gacttctact gttgagaaga acccaaagtc ttaccaagat 840
aacgttacta aggaagttaa tgaaaacctt aatgagctta ctgagcttgc taagtctgtt 900
acaaagaacg acatggattc attcgagttc tatcttcaaa ctttccatga tgttatgact 960
gggaataatc ttttcgggag gtctgcatta aagactgctt ctgaattaat cactaaggaa 1020
aacgtaacta ctagaggttc tgagattgga aaggtgtata actttcttat tgttcttact 1080
tcacttcaag ctaaggcttt ccttactcct actgcttgta gaaagctcct tggcttact 1140
gacattgatt aactcagat tatgaacat catattgatg gtcaaaagag agagtttagg 1200

attaatatcc ttccaactct ttctaataat ttctcaaate catcttactc taaaaataga 1260
ggttctgata ttgatgatcc tattttagtt cttgaagctg ctcttgata cgctcttatt 1320
ggatttgaga tacttaacga tccacttctt attcttaagg gttatcaagc tagacttaaa 1380
ccaaactate aagttgatag agagtctatg tcagagacta tctacggaga tattcataaa 1440
ctcttttggc caagcaact tgagcaaaaa tattacatta aagatattga atttctgag 1500
ggatacgtca ttactaagat agtttttgaa aagagactta atcaacttgg ttacagaggt 1560
actgctaact ttacgatcc atctaccgga tctattgate ttaacaaggt taaggttgaa 1620

tcttgggaagg aaaagtcttg cgaggaggat tcttgcgaag atgagtattc aatcattaag 1680
gctgaaacag atggcatcta tatgccactt ggagtggttt ctgaaacttt tcttactcct 1740
atctatggtt tcggacttac tgttgatgag aagaatcaaa aaataacttt gactgggaag 1800
tcttatctta gagaatctct tcttgaact gatcttctta acaatgaaac ttacctatt 1860
gcttctccag acggttacct ttcttctatt gttgagaact ggaatataac ttctgacaat 1920
actggatcct ggagagctaa taataataat gcttttgtgg ataaggctga tactataaaa 1980
ggttcttcat ctctttacac tcataaagat ggtgagtttt ctcaattcat tggaaacaaa 2040

cttaagccta agaccaatta cgttattcaa tatgttataa aaggagacc tgctatctat 2100
cttaaaaata ataaagatac tcttttcgag gataccaaaa ataacttttc tgattttcaa 2160
actgttacta agaaattcaa ttctggagtt aatcctctg aaatctactt cttttcaag 2220
aatcaatctg aatcagagc atgggaaac aactttatca ttttgaaat taaatcactt 2280
gagttcctc cacaaatgct taagcctgag gattggattc cttctgaaa cgttcagatg 2340
aaagacggag gcagacttga gattcttggg gatggttact ttaagcaatt cattaattg 2400

gagaatgatt caacttacca tctgagactt tctgttaagg gaactggcag agtttctatc 2460

atgatgaat ctaagtatct tctttttgta aatgttaagg atgaggatct gactagagtc 2520

attaaaaata cttcttctaa gggtgagtgt ttcattgctc ttgaggaac ttacgttgaa 2580

aactcttcta ccattttctc taatgtttca atagttaagg agtga 2625

<210> 11

<211> 874

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> translated from synthesized full length coding region

<400> 11

Met Leu Ala Arg Gln Gly Gly Ser Leu Arg Ala Ser Gln Cys Asn Ala

1 5 10 15

Gly Leu Ala Arg Arg Val Glu Val Gly Ala Leu Val Val Pro Arg Pro

20 25 30

Ile Ser Val Asn Asp Val Val Pro His Val Tyr Ser Ala Pro Leu Ser

35 40 45

Val Ala Arg Arg Ser Cys Ser Lys Ser Ser Ile Arg Ser Thr Arg Arg

50 55 60

Leu Gln Thr Thr Val Cys Ser Met Val Gln Lys Trp Met Gln Arg Met

65 70 75 80

Ile Ile Val Asp Asn Asn Lys Leu Asn Val Arg Ala Leu Pro Ser Phe

85 90 95

Ile Asp Tyr Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Lys Asp

100 105 110

Ile Met Gly Met Ile Phe Lys Thr Asp Thr Gly Gly Ser Asn Leu Thr

115 120 125

Leu Asp Glu Ile Leu Lys Asn Gln Asn Leu Leu Asn Asp Ile Ser Gly

130 135 140

Lys Leu Asp Gly Ile Asn Gly Asp Leu Gly Asp Leu Ile Ala Gln Gly

145 150 155 160

Asn Leu Asn Ser Glu Leu Ala Lys Glu Leu Leu Lys Ile Ser Asn Glu

Ser Lys Asn Arg Gly Ser Asp Ile Asp Asp Pro Ile Val Val Leu Glu
 420 425 430
 Ala Ala Pro Gly Tyr Ala Leu Ile Gly Phe Glu Ile Leu Asn Asp Pro
 435 440 445
 Leu Pro Ile Leu Lys Gly Tyr Gln Ala Arg Leu Lys Pro Asn Tyr Gln
 450 455 460
 Val Asp Arg Glu Ser Met Ser Glu Thr Ile Tyr Gly Asp Ile His Lys

 465 470 475 480
 Leu Phe Cys Pro Lys Gln Leu Glu Gln Lys Tyr Tyr Ile Lys Asp Ile
 485 490 495
 Glu Phe Pro Glu Gly Tyr Val Ile Thr Lys Ile Val Phe Glu Lys Arg
 500 505 510
 Leu Asn Gln Leu Gly Tyr Glu Val Thr Ala Asn Phe Tyr Asp Pro Ser
 515 520 525
 Thr Gly Ser Ile Asp Leu Asn Lys Val Lys Val Glu Ser Trp Lys Glu

 530 535 540
 Lys Ser Cys Glu Glu Asp Ser Cys Glu Asp Glu Tyr Ser Ile Ile Lys
 545 550 555 560
 Ala Glu Thr Asp Gly Ile Tyr Met Pro Leu Gly Val Val Ser Glu Thr
 565 570 575
 Phe Leu Thr Pro Ile Tyr Gly Phe Gly Leu Thr Val Asp Glu Lys Asn
 580 585 590
 Gln Lys Ile Thr Leu Thr Gly Lys Ser Tyr Leu Arg Glu Ser Leu Leu

 595 600 605
 Glu Thr Asp Leu Leu Asn Asn Glu Thr Tyr Leu Ile Ala Ser Pro Asp
 610 615 620
 Gly Tyr Ile Ser Ser Ile Val Glu Asn Trp Asn Ile Thr Ser Asp Asn
 625 630 635 640
 Thr Gly Ser Trp Arg Ala Asn Asn Asn Asn Ala Phe Val Asp Lys Ala
 645 650 655
 Asp Thr Ile Lys Gly Ser Ser Ser Leu Tyr Thr His Lys Asp Gly Glu

<400> 12

atgtagcta gacaaggtag atctcttaga gcttctcaat gtaacgctgg acttgctaga 60
 agagttgagg ttggtagctct tgttgttctct agaccaatct ctgtaacga cgttgttcca 120
 cacgtctatt ctgctcctct ttctgttgct agacgttctt gctctaagtc ctctattaga 180

agtactagaa ggcttcaaac tactgtttgc tcaatgtctt accaagataa cgttactaag 240
 gaagttattg aaaaccttaa tgagettact gagcttgcta agtctgttac aaagaacgac 300
 atggattcat tcgagttcta tcttcaaact ttccatgatg ttatgactgg gaataatctt 360
 ttcgggagggt ctgcattaaa gactgcttct gaattaatca ctaaggaaaa cgtaactact 420
 agaggttctg agattggaaa ggtgtataac ttctttattg ttcttacttc acttcaagct 480
 aaggctttcc ttactcttac tgctttaga aagctccttg gtcttactga cattgattac 540
 actcagatta tgaacctca tattgatggt caaaagagag agtttaggat taatatcctt 600

ccaactcttt ctaataatct ctcaaatcca tcttactcta aaaatagagg ttctgatatt 660
 gatgatccta ttgtagtctt tgaagctgct cctggatagc ctcttattgg atttgagata 720
 cttaacgate cacttccat tcttaagggt tatcaagcta gacttaaac aactatcaa 780
 gttgatagag agtctatgtc agagactatc tacggagata ttcataaact cttttgcca 840
 aagcaacttg agcaaaaata ttacattaaa gatattgaat ttcttgaggg atacgtcatt 900
 actaagatag tttttgaaa gagacttaat caacttgggt acgaggttac tgctaacttt 960
 tacgatccat ctaccggatc tattgatctt aacaaggtta aggttgaatc ttggaaggaa 1020

aagtcttgcg aggaggattc ttgcaagat gagtattcaa tcattaaggc tgaacacagat 1080
 ggcatctata tgccacttgg agtggtttct gaaacttttc ttactcctat ctatggttcc 1140
 ggacttactg ttgatgagaa gaatcaaaaa ataactttga ctgggaagtc ttatcttaga 1200
 gaatctcttc ttgaaactga tcttcttaac aatgaaactt accttattgc ttctccagac 1260
 ggttacattt ctctattgt tgagaactgg aatataactt ctgacaatac tggatcttgg 1320
 agagctaata ataataatgc ttttgggat aaggctgata ctataaaagg ttcttcatct 1380
 ctttactc ataagatgg tgagtcttct caattcattg gaaacaaact taagcctaag 1440

accaattacg ttattcaata tgttataaaa gggagacctg ctatctatct taaaaaat 1500
 aaagatactc ttttcgagga taccaaaaat aacttttctg attttcaaac tgttactaag 1560
 aaattcaatt ctggagttaa tcttctgaa atctacttcc ttttcaagaa tcaatctgaa 1620
 tacgaggcat ggggaaacaa ctttatcatt ttggaaatta aatcacttga gttccttcca 1680
 caaatgctta agcctgagga ttggattcct tctggaaacg ttcagatgaa agacggagge 1740
 agacttgaga ttcttgaga tggttacttt aagcaattca ttaaattgga gaatgattca 1800

acttaccatc tgagactttc tgттаaggga actggcagag tttctatcat tgatgaatct 1860

aagtatcttc tttttgtaaa tgттаaggat gaggatctga ctagagtcac taaaaatact 1920

tcttctaagg gtgagtgttt cattgctctt gagggaactt acgttgaaaa ctcttctacc 1980

atcttctcta atgtttcaat agttaaggag tga 2013

<210> 13

<211> 670

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> translated from synthesized full length coding region

<400> 13

Met Leu Ala Arg Gln Gly Gly Ser Leu Arg Ala Ser Gln Cys Asn Ala

1 5 10 15

Gly Leu Ala Arg Arg Val Glu Val Gly Ala Leu Val Val Pro Arg Pro

20 25 30

Ile Ser Val Asn Asp Val Val Pro His Val Tyr Ser Ala Pro Leu Ser

35 40 45

Val Ala Arg Arg Ser Cys Ser Lys Ser Ser Ile Arg Ser Thr Arg Arg

50 55 60

Leu Gln Thr Thr Val Cys Ser Met Ser Tyr Gln Asp Asn Val Thr Lys

65 70 75 80

Glu Val Ile Glu Asn Leu Asn Glu Leu Thr Glu Leu Ala Lys Ser Val

85 90 95

Thr Lys Asn Asp Met Asp Ser Phe Glu Phe Tyr Leu Gln Thr Phe His

100 105 110

Asp Val Met Thr Gly Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr

115 120 125

Ala Ser Glu Leu Ile Thr Lys Glu Asn Val Thr Thr Arg Gly Ser Glu

130 135 140

Ile Gly Lys Val Tyr Asn Phe Leu Ile Val Leu Thr Ser Leu Gln Ala

145 150 155 160

Lys Ala Phe Leu Thr Leu Thr Ala Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Thr

Ala Ser Pro Asp Gly Tyr Ile Ser Ser Ile Val Glu Asn Trp Asn Ile
 420 425 430

Thr Ser Asp Asn Thr Gly Ser Trp Arg Ala Asn Asn Asn Asn Ala Phe
 435 440 445

Val Asp Lys Ala Asp Thr Ile Lys Gly Ser Ser Ser Leu Tyr Thr His
 450 455 460

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

Thr Asn Tyr Val Ile Gln Tyr Val Ile Lys Gly Arg Pro Ala Ile Tyr
 485 490 495

Leu Lys Asn Asn Lys Asp Thr Leu Phe Glu Asp Thr Lys Asn Asn Phe
 500 505 510

Ser Asp Phe Gln Thr Val Thr Lys Lys Phe Asn Ser Gly Val Asn Pro
 515 520 525

Ser Glu Ile Tyr Phe Leu Phe Lys Asn Gln Ser Glu Tyr Glu Ala Trp
 530 535 540

Gly Asn Asn Phe Ile Ile Leu Glu Ile Lys Ser Leu Glu Phe Leu Pro
 545 550 555 560

Gln Met Leu Lys Pro Glu Asp Trp Ile Pro Ser Gly Asn Val Gln Met
 565 570 575

Lys Asp Gly Gly Arg Leu Glu Ile Leu Gly Asp Gly Tyr Phe Lys Gln
 580 585 590

Phe Ile Lys Leu Glu Asn Asp Ser Thr Tyr His Leu Arg Leu Ser Val
 595 600 605

Lys Gly Thr Gly Arg Val Ser Ile Ile Asp Glu Ser Lys Tyr Leu Leu
 610 615 620

Phe Val Asn Val Lys Asp Glu Asp Leu Thr Arg Val Ile Lys Asn Thr
 625 630 635 640

Ser Ser Lys Gly Glu Cys Phe Ile Ala Leu Glu Gly Thr Tyr Val Glu
 645 650 655

Asn Ser Ser Thr Ile Phe Ser Asn Val Ser Ile Val Lys Glu

660

665

670