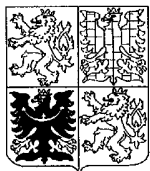


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: 27.09.1995

(32) Datum podání prioritní přihlášky: 28.09.1994 05.06.1995

(31) Číslo prioritní přihlášky: 1994/314594 1995/463483

(33) Země priority: US US

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: 16.02.2000
(Věstník č. 2/2000)

(86) PCT číslo: PCT/EP95/03826

(87) PCT číslo zveřejnění: WO96/10083

(21) Číslo dokumentu:

1997 - 908

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 15/32
C 12 N 15/62
C 12 N 15/82
C 12 N 1/21
C 07 K 14/32
C 07 K 14/325
C 12 Q 1/68
A 01 N 63/00
A 01 H 5/00
G 01 N 33/00

/(C 07 K 16/12, C 12 N 15/84, C 12 N 1/21, C 12 R 1:07, C 12 R 1:19, C 12 R 1:085, C 12 R 1:91)

(71) Přihlašovatel:

NOVARTIS AG, Basle, CH;

(72) Původce:

Warren Gregory Wayne, Cary, NC, US;
Koziel Michael Gene, Clive, IA, US;
Mullins Martha Alice, Cary, NC, US;
Nye Gordon James, Raleigh, NC, US;
Carr Brian, Cary, NC, US;
Desai Nalini Manoj, Cary, NC, US;
Kostichka Kristy, Durham, NC, US;
Duck Nicholas Brendan, Cary, NC, US;
Estruch Juan Jose, Durham, NC, US;

(74) Zástupce:

Kubát Jan Ing., Přístavní 24, Praha 7,
170 00;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Pesticidní kmeny rodu Bacillus, pesticidní proteiny a molekuly DNA, které je kódují

(57) Anotace:

Popisují se kmeny rodu Bacillus, které jsou schopné produkovat v průběhu vegetativního růstu pesticidní proteiny a pomocné proteiny. Dále se popisují tyto purifikované proteiny, molekuly DNA, které je kódují a způsoby použití těchto kmenů, proteinů a genů pro kontrolu škůdců.

PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ
PŘÍL.

ÚŘAD

TRAPLOVÁ, HAKR, KUBÁT
Advokátní a patentová kancelář
170 00 Praha 7, Pštávka 24
25. III. 97
Drošilo
33207
2. j.908/97
22204

Pesticidní kmeny rodu *Bacillus*, pesticidní proteiny a molekuly DNA, které je kódují

Oblast techniky

Vynález se týká způsobů a prostředků pro kontrolu škůdců rostlin a škůdců na jiných materiálech než rostlinách. Konkrétně jsou popsány nové pesticidní proteiny, které lze izolovat z bakterií rodu *Bacillus* ve stádiu vegetativního růstu. Popsány jsou kmeny rodu *Bacillus*, proteiny a geny, které tyto proteiny kódují. Způsoby a prostředky podle vynálezu lze použít v řadě systému pro kontrolu škůdců rostlin a škůdců na jiných materiálech než rostlinách.

Dosavadní stav techniky

Škůdci rostlin jsou hlavním faktorem způsobujícím ztráty světově komerčně významných zemědělských plodin. Používá se rozsáhlá řada chemických pesticidů pro kontrolu nebo hubení škůdců, kteří mají v zemědělství význam. Existuje však velký zájem na vyvinutí účinných alternativních pesticidů.

Jako alternativy k chemické kontrole škůdců hrají významnou roli mikrobiální pesticidy. Nejrozsáhleji používaný mikrobiální produkt je založen na bakterii *Bacillus thuringiensis* (Bt). *Bacillus thuringiensis* je gram-pozitivním druhem rodu *Bacillus* vytvářejícím spory, který produkuje během sporulace insekticidní krystalický protein (ICP).

Je známá řada variet *Bacillus thuringiensis*, které produkují více než 25 různých, avšak podobných insekticidních krystalických proteinů. Většina insekticidních krystalických proteinů produkovaných *Bacillus thuringiensis* je toxická pro larvy některých druhů hmyzu z řádů *Lepidoptera* (motýli), *Diptera* (dvoukřídli) a *Coleoptera* (brouci). Obecně se v

případě, že je insekticidní krystalický protein pozřen citlivým hmyzem, krystal solubilizuje a je přeměněn na toxický zbytek proteasami ve střevě hmyzu. Žádný z insekticidních krystalických proteinů účinných proti larvám brouků, jako je mandelinka bramborová (*Leptinotarsa decemlineata*) nebo potěmník moučný (*Tenebrio molitor*), nevykazoval podstatné účinky na členy rodu *Diabrotica*, zejména na *Diabrotica virgifera virgifera* nebo *Diabrotica longicornis barberi*.

Bacillus cereus (Bc) je blízce příbuzný *Bacillus thuringiensis*. Hlavním odlišným znakem mezi těmito druhy je nepřítomnost parasporálního krystalu u *Bacillus cereus*. *Bacillus cereus* je široce rozšířenou bakterií, která se běžně nachází v půdě a byla izolována z řady potravin a léčiv. Tento organismus se podílí na kažení potravin.

Ačkoli je *Bacillus thuringiensis* velmi užitečný při kontrole hmyzích škůdců, existuje potřeba rozšířit počet potenciálních biologických kontrolních činidel.

Podstata vynálezu

Vynález popisuje prostředky a způsoby pro kontrolu škůdců rostlin. Popisují se zejména nové pesticidní proteiny, které jsou produkovány během vegetativního růstu kmenů rodu *Bacillus*. Tyto proteiny jsou vhodné jako pesticidní činidla.

Konkrétněji se vynález týká v podstatě purifikovaného kmene rodu *Bacillus*, který produkuje v průběhu vegetativního růstu pesticidní protein, přičemž uvedeným kmenem rodu *Bacillus* není *Bacillus sphaericus* SSII-1. Výhodný je kmen *Bacillus cereus* s přírůstkovým číslem č. NRRL B-21058 a kmen *Bacillus thuringiensis* s přírůstkovým číslem č. NRRL B-21060. Výhodné jsou rovněž kmeny rodu *Bacillus* vybrané ze skupiny zahrnující kmeny s přírůstkovými čísly NRRL B-21224, NRRL B-21225, NRRL B-21226, NRRL B-21227, NRRL B-21228,

NRRL B-21229, NRRL B-21230 a NRRL B-21439.

Vynález se dále týká pro hmyz specifického proteinu, izolovatelného z *Bacillus* spp., výhodně však z kmene *Bacillus thuringiensis* nebo *Bacillus cereus*, během fáze vegetativního růstu, a jeho složek, přičemž uvedeným proteinem není toxin usmrcující komáry z *Bacillus sphaericus* SSII-1. Pro hmyz specifický protein podle vynálezu je výhodně toxický pro hmyz z řádů *Coleoptera* (brouci) nebo *Lepidoptera* (motýli) a má molekulovou hmotnost přibližně 30 kDa nebo větší, výhodně přibližně 60 až přibližně 100 kDa a ještě výhodněji přibližně 80 kDa.

Pro hmyz specifický protein podle vynálezu vykazuje zejména spektrum insekticidní účinnosti, které zahrnuje účinnost proti druhům rodu *Agrotis* nebo/a *Spodoptera*, výhodně však účinnost proti *Agrotis ipsilon* nebo/a *Spodoptera frugiperda* nebo/a *Spodoptera exigua* nebo/a *Heliothis virescens* nebo/a *Helicoverpa zea*.

Pro hmyz specifický protein podle vynálezu lze výhodně izolovat například z kmene *Bacillus cereus* s přírůstkovým číslem NRRL B-21058 nebo z kmene *Bacillus thuringiensis* s přírůstkovým číslem NRRL B-21060.

Pro hmyz specifický protein podle vynálezu lze rovněž výhodně izolovat z kmene *Bacillus* spp vybraného ze skupiny zahrnující kmeny s přírůstkovými čísly NRRL B-21224, NRRL B-21225, NRRL B-21226, NRRL B-21227, NRRL B-21228, NRRL B-21229, NRRL B-21230 a NRRL B-21439.

Vynález zejména zahrnuje pro hmyz specifické proteiny, které mají aminokyselinovou sekvenci vybranou ze skupiny zahrnující sekvence SEQ ID č. 5 a SEQ ID č. 7, včetně všech proteinů, které jsou s nimi strukturně nebo/a funkčně homologické.

Dále jsou výhodné pro hmyz specifické proteiny, které

mají sekvenci vybranou ze skupiny zahrnující sekvence SEQ ID č. 20, SEQ ID č. 21, SEQ ID č. 29, SEQ ID č. 32 a SEQ ID č. 2, včetně všech proteinů, které jsou s nimi strukturně nebo/a funkčně homologické.

Zejména výhodné jsou pro hmyz specifické proteiny, které mají sekvenci vybranou ze skupiny zahrnující sekvence SEQ ID č. 29 a SEQ ID č. 32, včetně všech proteinů, které jsou s nimi strukturně nebo/a funkčně homologické.

Dalším výhodným provedením vynálezu je pro hmyz specifický protein podle vynálezu, ze kterého byly odstraněny nebo ve kterém byly inaktivovány sekvence představující sekreční signál.

Vynález dále zahrnuje pomocné proteiny, které zvyšují pro hmyz specifickou účinnost pro hmyz specifického proteinu. Uvedené pomocné proteiny mají výhodně molekulovou hmotnost přibližně 50 kDa a lze je izolovat například z kmene *Bacillus cereus*, zejména však z kmene *Bacillus cereus* AB78, ve fázi vegetativního růstu.

Výhodné provedení vynálezu se týká pomocného proteinu, ze kterého byly odstraněny nebo ve kterém byly inaktivovány sekvence představující sekreční signál.

Vynález se dále týká pesticidních proteinů z více jednotek (multimerních pesticidních proteinů), které obsahují více než jeden polypeptidový řetězec a kde alespoň jedním z těchto polypeptidových řetězců je pro hmyz specifický protein podle vynálezu a alespoň jedním z těchto polypeptidových řetězců je pomocný protein podle vynálezu, který aktivuje nebo zvyšuje pesticidní účinnost uvedeného pro hmyz specifického proteinu.

Multimerní pesticidní proteiny podle vynálezu mají výhodně molekulovou hmotnost přibližně 50 kDa až přibližně 200 kDa.

Vynález zejména zahrnuje multimerní pesticidní proteiny, které obsahují pro hmyz specifický protein podle vynálezu a pomocný protein podle vynálezu, který aktivuje nebo zvyšuje pesticidní účinnost uvedeného pro hmyz specifického proteinu.

Vynález se dále týká fúzních proteinů, které obsahují několik proteinových domén včetně alespoň jednoho pro hmyz specifického proteinu podle vynálezu nebo/a pomocného proteinu podle vynálezu, vytvořených genetickými fúzemi ve stejném čtecím rámci, ze kterých se při translaci na ribozomech vytváří fúzní protein alespoň s kombinovanými vlastnostmi pro hmyz specifického proteinu podle vynálezu nebo/a pomocného proteinu podle vynálezu a popřípadě dalších složek použitých při fúzi.

Konkrétní provedení vynálezu se týká fúzního proteinu, který obsahuje ribonukleasový S-protein, pro hmyz specifický protein podle vynálezu a pomocný protein podle vynálezu.

Další konkrétní provedení vynálezu se týká fúzního proteinu, který obsahuje pro hmyz specifický protein podle vynálezu a pomocný protein podle vynálezu, kterýžto uvedený fúzní protein má na svém N-konci buď tento pro hmyz specifický protein nebo tento pomocný protein.

Výhodný je fúzní protein, který obsahuje pro hmyz specifický protein jak je uveden v sekvenci SEQ ID č. 5 a pomocný protein jak je uveden v sekvenci SEQ ID č. 2, přičemž vzniká protein uvedený v sekvenci SEQ ID č. 23, včetně všech proteinů, které jsou s ním strukturně nebo/a funkčně homologické.

Výhodný je rovněž fúzní protein, který obsahuje pro hmyz specifický protein jak je uveden v sekvenci SEQ ID č. 35 a pomocný protein jak je uveden v sekvenci SEQ ID č. 27, přičemž vzniká protein uvedený v sekvenci SEQ ID č. 50, včetně všech proteinů, které jsou s ním strukturně nebo/a

funkčně homologické.

Vynález se dále týká fúzních proteinů, které obsahují pro hmyz specifický protein podle vynálezu nebo/a pomocný protein podle vynálezu fúzovaný k signální sekvenci, výhodně sekreční signální sekvenci nebo sekvenci způsobující cílení (targeting sequence), která směřuje transgenický produkt do konkrétní organely nebo kompartmentu buňky, kterážto signální sekvence je heterologního původu vzhledem k proteinu, ke kterému je fúzována.

Zejména výhodný je v rámci vynálezu fúzní protein, který má sekvenci uvedenou v sekvenci SEQ ID č. 43 nebo SEQ ID č. 46, včetně všech proteinů, které jsou s ním strukturně nebo/a funkčně homologické.

Jak je tento termín používán v této přihlášce, označuje podstatná sekvenční homologie blízkou strukturní podobnost mezi sekvencemi aminokyselin. Podstatně homologické proteiny mohou být například homologické ze 40 %, výhodně z 50 % a nejvýhodněji homologické z 60 % nebo 80 % nebo více. Homologické jsou rovněž podobné sekvence, ve kterých chybí jedna nebo několik subsekvencí aminokyselin nebo jsou do nich vloženy subsekvence dalších aminokyselin.

Vynález se dále týká molekul DNA, které obsahují nukleotidovou sekvenci kódující pro hmyz specifický protein, který lze izolovat z *Bacillus* spp. během fáze vegetativního růstu, a jeho složky, přičemž uvedeným proteinem není toxin usmrcující komáry z *Bacillus sphaericus* SSII-1. Zejména se vynález týká molekul DNA, které obsahují nukleotidovou sekvenci kódující pro hmyz specifický protein, kde spektrum insekticidní účinnosti zahrnuje účinnost proti druhům rodu *Agrotis* nebo/a *Spodoptera*, výhodně však účinnost proti *Agrotis ipsilon* nebo/a *Spodoptera frugiperda* nebo/a *Spodoptera exigua* nebo/a *Heliothis virescens* nebo/a *Helicoverpa zea*.

Výhodné jsou molekuly DNA, které obsahují nukleotidovou

sekvenci uvedenou v SEQ ID č. 4 nebo SEQ ID č. 6, včetně všech molekul DNA, které jsou s nimi strukturně nebo/a funkčně homologické.

Výhodné jsou rovněž molekuly DNA, které obsahují nukleotidovou sekvenci uvedenou v SEQ ID č. 19, SEQ ID č. 28, SEQ ID č. 31 nebo SEQ ID č. 1, včetně všech molekul DNA, které jsou s nimi strukturně nebo/a funkčně homologické.

Vynález se dále týká molekul DNA, které obsahují nukleotidovou sekvenci kódující pomocný protein podle vynálezu, který zvyšuje pro hmyz specifickou účinnost pro hmyz specifického proteinu.

Výhodné jsou molekuly DNA, které obsahují nukleotidovou sekvenci uvedenou v SEQ ID č. 19, včetně všech molekul DNA, které jsou s nimi strukturně nebo/a funkčně homologické.

Dalším provedením vynálezu jsou molekuly DNA, které obsahují nukleotidovou sekvenci kódující pro hmyz specifický protein, který lze izolovat z *Bacillus* spp. během fáze vegetativního růstu, a jeho složky, přičemž uvedeným proteinem není toxin usmrcující komáry z *Bacillus sphaericus* SSII-1, kterážto nukleotidová sekvence byla optimalizována pro expresi v mikroorganismu nebo rostlině.

Výhodné jsou molekuly DNA, které obsahují nukleotidovou sekvenci uvedenou v SEQ ID č. 17 nebo SEQ ID č. 18, včetně všech molekul DNA, které jsou s nimi strukturně nebo/a funkčně homologické.

Výhodné jsou rovněž molekuly DNA, které obsahují nukleotidovou sekvenci uvedenou v SEQ ID č. 24, SEQ ID č. 26, SEQ ID č. 27 nebo SEQ ID č. 30, včetně všech molekul DNA, které jsou s nimi strukturně nebo/a funkčně homologické.

Vynález se dále týká molekul DNA, které obsahují nukleotidovou sekvenci kódující multimerní pesticidní protein, který obsahuje více než jeden polypeptidový řetězec

a kde alespoň jedním z těchto polypeptidových řetězců je pro hmyz specifický protein podle vynálezu a alespoň jedním z těchto polypeptidových řetězců je pomocný protein podle vynálezu, který aktivuje nebo zvyšuje pesticidní účinnost uvedeného pro hmyz specifického proteinu.

Výhodné jsou molekuly DNA, které obsahují nukleotidovou sekvenci kódující pro hmyz specifický protein podle vynálezu a pomocný protein podle vynálezu, který aktivuje nebo zvyšuje pesticidní účinnost uvedeného pro hmyz specifického proteinu.

Zejména výhodné jsou molekuly DNA, které obsahují nukleotidovou sekvenci uvedenou v SEQ ID č. 1 nebo SEQ ID č. 19, včetně všech nukleotidových sekvencí, které jsou s nimi strukturně nebo/a funkčně homologické.

Dalším provedením vynálezu jsou molekuly DNA, které obsahují nukleotidovou sekvenci kódující fúzní protein obsahující několik proteinových domén včetně alespoň jednoho pro hmyz specifického proteinu podle vynálezu nebo/a pomocného proteinu podle vynálezu, vytvořenou genetickými fúzemi ve stejném čtecím rámci, ze které se při translaci na ribozomech vytváří fúzní protein alespoň s kombinovanými vlastnostmi pro hmyz specifického proteinu podle vynálezu nebo/a pomocného proteinu podle vynálezu a popřípadě dalších složek použitých při fúzi.

Výhodným provedením vynálezu jsou molekuly DNA, které obsahují nukleotidovou sekvenci kódující fúzní protein obsahující pro hmyz specifický protein podle vynálezu a pomocný protein podle vynálezu, přičemž uvedený fúzní protein má na svém N-konci buď tento pro hmyz specifický protein nebo tento pomocný protein. Zejména výhodné jsou molekuly DNA, které obsahují nukleotidovou sekvenci uvedenou v SEQ ID č. 22, včetně všech molekul DNA, které jsou s nimi strukturně nebo/a funkčně homologické.

Vynález se dále týká molekul DNA, které obsahují

nukleotidovou sekvenci kódující fúzní protein obsahující pro hmyz specifický protein podle vynálezu nebo/a pomocný protein podle vynálezu fúzovaný k signální sekvenci, výhodně sekreční signální sekvenci nebo sekvenci způsobující cílení (targeting sequence), která směřuje transgenický produkt do konkrétní organely nebo kompartmentu buňky, kterážto signální sekvence je heterologního původu vzhledem k DNA, ke které je fúzována.

Vynález dále zahrnuje molekuly DNA, které obsahují nukleotidovou sekvenci kódující fúzní protein nebo multimerní protein podle vynálezu, které byly optimalizované pro expresi v mikroorganismu nebo rostlině.

Výhodné jsou optimalizované molekuly DNA, které obsahují nukleotidovou sekvenci uvedenou v SEQ ID č. 42, SEQ ID č. 45 nebo SEQ ID č. 49, včetně všech molekul DNA, které jsou s nimi strukturně nebo/a funkčně homologické.

Vynález se dále týká optimalizovaných molekul DNA, z jejichž 5'-konce byly odstraněny sekvence kódující sekreční signál, zejména však optimalizovaných molekul DNA, které obsahují nukleotidovou sekvenci uvedenou v SEQ ID č. 35 nebo SEQ ID č. 39, včetně všech molekul DNA, které jsou s nimi strukturně nebo/a funkčně homologické.

Jak je tento termín používán v této přihlášce, označuje podstatná sekvenční homologie blízkou strukturní podobnost mezi sekvencemi nukleotidů. Podstatně homologické molekuly DNA mohou být například homologické ze 60 %, výhodně z 80 % a nejvýhodněji homologické z 90 % nebo 95 % nebo více. Homologické jsou rovněž podobné sekvence, ve kterých chybí jedna nebo několik subsekvencí nukleotidů nebo aminokyselin nebo jsou do nich vloženy subsekvence dalších nukleotidů nebo aminokyselin.

Vynález rovněž zahrnuje molekuly DNA, které hybridizují s molekulami DNA podle vynálezu, jak jsou definovány výše,

výhodně však s oligonukleotidovou sondou, kterou lze získat z uvedených molekul DNA, která obsahuje souvislou část kódující sekvence uvedeného pro hmyz specifického proteinu o délce alespoň 10 nukleotidů, za mírně přísných podmínek, a kteréžto molekuly vykazují pro hmyz specifickou účinnost a rovněž jsou jimi kódovány pro hmyz specifické proteiny.

Výhodné jsou molekuly DNA, u kterých dochází k hybridizaci při teplotě 65 °C v pufru obsahujícím 7 % SDS (dodecylsulfátu sodného) a fosforečnan sodný v 0,5M koncentraci.

Zejména výhodné jsou molekuly DNA, které obsahují nukleotidovou sekvenci kódující pro hmyz specifický protein podle vynálezu, které lze získat způsobem který zahrnuje:

- (a) získání molekuly DNA, která obsahuje nukleotidovou sekvenci kódující pro hmyz specifický protein,
- (b) hybridizaci uvedené molekuly DNA s oligonukleotidovou sondou popsanou níže, získanou z molekuly DNA obsahující nukleotidovou sekvenci uvedenou v SEQ ID č. 28, SEQ ID č. 30 nebo SEQ ID č. 31, a
- (c) izolaci uvedené hybridizované DNA.

Vynález se dále týká pro hmyz specifických proteinů, které jsou kódovány molekulami DNA podle vynálezu.

Vynález rovněž zahrnuje expresivní kazetu, která obsahuje molekulu DNA podle vynálezu operabilně spojenou s expresivními sekvencemi včetně regulačních signálů pro transkripci a translaci, nutných pro expresi asociovaných DNA-konstruků v hostitelském organismu, výhodně mikro-organismu nebo rostlině, a popřípadě dalšími regulačními sekvencemi.

Vynález se dále týká vektorové molekuly obsahující expresivní kazetu podle vynálezu.

Expresivní kazeta nebo/a vektorová molekula podle vynálezu výhodně tvoří součást genomu rostliny.

Dalším provedením vynálezu je hostitelský organismus, výhodně organismus vybraný ze skupiny zahrnující buňky rostlin a hmyzu, bakterie, kvasinky, baculoviry, prvoky, hlísty a řasy, který obsahuje molekulu DNA podle vynálezu, expresivní kazetu obsahující uvedenou molekulu DNA nebo vektorovou molekulu obsahující uvedenou expresivní kazetu, výhodně stabilně začleněnou do genomu tohoto hostitelského organismu.

Vynález se dále týká transgenické rostliny, výhodně však rostliny kukuřice, včetně jejích částí jakož i potomstva a semen, která obsahuje molekulu DNA podle vynálezu, expresivní kazetu obsahující uvedenou molekulu DNA nebo vektorovou molekulu obsahující uvedenou expresivní kazetu, výhodně stabilně začleněnou do genomu této rostliny.

Výhodná je transgenická rostlina, včetně jejích částí jakož i potomstva a semen, která byla stabilně transformována molekulou DNA podle vynálezu, expresivní kazetou obsahující uvedenou molekulu DNA nebo vektorovou molekulou obsahující uvedenou expresivní kazetu.

Výhodná je rovněž transgenická rostlina, včetně jejích částí jakož i potomstva a semen, která exprimuje pro hmyz specifický protein podle vynálezu.

Vynález se dále týká transgenické rostliny, výhodně rostliny kukuřice, podle vynálezu, jak je definována výše, která dále exprimuje druhou odlišnou látku kontrolující hmyz, výhodně však δ -endotoxin z *Bacillus thuringiensis*. Uvedenou rostlinou je výhodně hybridní rostlina.

V rámci rozsahu vynálezu se rozumí, že mezi částí transgenických rostlin patří například rostlinné buňky, protoplasty, tkáně, kalus, embrya jakož i květy, stonky,

plody, listy a kořeny, které pocházejí z transgenických rostlin nebo jejich potomstva, dříve transformovaných molekulou DNA podle vynálezu, a které jsou tudíž alespoň z části tvořeny transgenickými buňkami. Tyto části jsou rovněž předmětem vynálezu.

Vynález se dále týká rostlinného propagačního materiálu rostlin podle vynálezu, který je ošetřen obalem chránícím semena.

Vynález dále zahrnuje mikroorganismus transformovaný molekulou DNA podle vynálezu, expresivní kazetou obsahující uvedenou molekulu DNA nebo vektorovou molekulou obsahující uvedenou expresivní kazetu, přičemž je tímto mikroorganismem výhodně mikroorganismus, který se množí na rostlinách a výhodněji bakterie kolonizující kořeny.

Vynález se dále týká enkapsulovaného pro hmyz specifického proteinu. Toto provedení zahrnuje mikroorganismus obsahující pro hmyz specifický protein podle vynálezu.

Vynález se rovněž týká insekticidního prostředku obsahujícího hostitelský organismus podle vynálezu, výhodně však purifikovaný kmen rodu *Bacillus*, v insekticidně účinném množství, spolu s vhodným nosičem.

Vynález dále zahrnuje insekticidní prostředek obsahující izolovanou molekulu proteinu podle vynálezu, samotnou nebo v kombinaci s hostitelským organismem podle vynálezu nebo/a enkapsulovaný pro hmyz specifický protein podle vynálezu, v insekticidně účinném množství, spolu s vhodným nosičem.

Vynález se dále týká způsobu získání purifikovaného pro hmyz specifického proteinu podle vynálezu, kterýžto způsob zahrnuje nanesení roztoku obsahujícího uvedený pro hmyz specifický protein na NAD-kolonu a eluci navázaného

proteinu.

Vynález zahrnuje rovněž způsob identifikace účinnosti pro hmyz specifického proteinu podle vynálezu na hmyz, kterýžto způsob zahrnuje:

pěstování kmene rodu *Bacillus* v kultuře,
získání supernatantu z uvedené kultury,
poskytnutí potravy s uvedeným supernatantem larvám hmyzu, a
vyhodnocení mortality.

Dalším provedením vynálezu je způsob izolace pro hmyz specifického proteinu podle vynálezu, kterýžto způsob zahrnuje:

pěstování kmene rodu *Bacillus* v kultuře,
získání supernatantu z uvedené kultury, a
izolaci uvedeného pro hmyz specifického proteinu z uvedeného
supernatantu.

Vynález rovněž zahrnuje způsob izolace molekuly DNA, která obsahuje nukleotidovou sekvenci kódující pro hmyz specifický protein vykazující insekticidní účinnost proteinů podle vynálezu, kterýžto způsob zahrnuje:

získání molekuly DNA, která obsahuje nukleotidovou sekvenci
kódující pro hmyz specifický protein,
hybridizaci uvedené molekuly DNA s DNA získanou z druhu rodu
Bacillus, a
izolaci uvedené hybridizované DNA.

Vynález se dále týká způsobu zvýšení rozsahu cílového hmyzu použitím pro hmyz specifického proteinu podle vynálezu v kombinaci s alespoň jedním dalším insekticidním proteinem, který se liší od tohoto pro hmyz specifického proteinu podle vynálezu, výhodně však s insekticidním proteinem vybraným ze skupiny zahrnující δ -endotoxiny z *Bacillus thuringiensis*, inhibitory proteas, lektiny, α -amylasy a peroxidasy.

Vynález rovněž zahrnuje způsob ochrany rostlin proti poškození způsobenému hmyzím škůdcem, výhodně však druhem rodu *Spodoptera* nebo/a *Agrotis*, a výhodněji hmyzím škůdcem vybraným ze skupiny zahrnující *Agrotis ipsilon*, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera exigua*, *Heliothis virescens* a *Helicoverpa zea*, při kterém se aplikuje na rostlinu nebo na plochu, na které tato rostlina roste, insekticidní prostředek nebo toxinový protein podle vynálezu.

Vynález se dále týká způsobu ochrany rostlin proti poškození způsobenému hmyzím škůdcem, výhodně však druhem rodu *Spodoptera* nebo/a *Agrotis*, a výhodněji hmyzím škůdcem vybraným ze skupiny zahrnující *Agrotis ipsilon*, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera exigua*, *Heliothis virescens* a *Helicoverpa zea*, který spočívá v tom, že se v oblasti, kde se může vyskytnout uvedený hmyzí škůdce, pěstuje transgenická rostlina exprimující pro hmyz specifický protein podle vynálezu.

Vynález rovněž zahrnuje způsob vytvoření hostitelského organismu, který obsahuje molekulu DNA podle vynálezu stabilně integrovanou do svého genomu a výhodně exprimuje pro hmyz specifický protein podle vynálezu, který spočívá v tom, že se uvedený hostitelský organismus transformuje molekulou DNA podle vynálezu, expresívní kazetou obsahující uvedenou molekulu DNA nebo vektorovou molekulou obsahující uvedenou expresívní kazetu.

Vynález se dále týká způsobu vytvoření transgenické rostliny nebo rostlinné buňky, která obsahuje molekulu DNA podle vynálezu stabilně integrovanou do rostlinného genomu a výhodně exprimuje pro hmyz specifický protein podle vynálezu, který spočívá v tom, že se uvedená rostlina respektive rostlinná buňka transformuje molekulou DNA podle vynálezu, expresívní kazetou obsahující uvedenou molekulu DNA nebo vektorovou molekulou obsahující uvedenou expresívní kazetu.

Vynález se rovněž týká způsobu přípravy insekticidního prostředku, který spočívá v tom, že se smíchá izolovaný kmen rodu *Bacillus* nebo/a hostitelský organismus nebo/a izolovaná molekula proteinu nebo/a enkapsulovaný protein podle vynálezu v insekticidně účinném množství s vhodným nosičem.

Vynález rovněž zahrnuje způsob vytvoření transgenického potomstva transgenické rodičovské rostliny, které obsahuje, stabilně začleněnou do rostlinného genomu, molekulu DNA obsahující nukleotidovou sekvenci která kóduje pro hmyz specifický protein podle vynálezu, který spočívá v tom, že se uvedená rodičovská rostlina transformuje molekulou DNA podle vynálezu, expresivní kazetou obsahující uvedenou molekulu DNA nebo vektorovou molekulou obsahující uvedenou expresivní kazetu a pesticidní znak se přenesse na potomstvo uvedené transgenické rodičovské rostliny za použití známých postupů množení rostlin.

Vynález rovněž zahrnuje oligonukleotidovou sondu schopnou specificky hybridizovat s nukleotidovou sekvencí kódující pro hmyz specifický protein, který lze izolovat z *Bacillus* spp. během fáze vegetativního růstu, a jeho složky, přičemž uvedeným proteinem není toxin usmrcující komáry z *Bacillus sphaericus* SSII-1, kterážto sonda obsahuje souvislou část kódující sekvence uvedeného pro hmyz specifického proteinu o délce alespoň 10 nukleotidů, a použití uvedené oligonukleotidové sondy pro screening libovolného kmene rodu *Bacillus* nebo jiných organismů pro stanovení, zda je v nich přirozeně přítomen pro hmyz specifický protein nebo zda konkrétní transformovaný organismus obsahuje tento gen.

Podle vynálezu bylo zjištěno, že v průběhu vegetativního růstu kmenů rodu *Bacillus* jsou produkovány pesticidní proteiny. Vzhledem k tomu, že bylo zjištěno, že existuje takováto skupina proteinů, zahrnuje vynález všechny vegetativní insekticidní proteiny, dále označované VIP, s

výjimkou toxinu usmrcujícího komáry z *Bacillus sphaericus*.

Vegetativní insekticidní proteiny podle vynálezu nejsou přítomné ve velkém množství po sporulaci a jsou zejména exprimovány během logaritmické fáze růstu před stacionární fází. Pro účely vynálezu je vegetativní růst definován jako období před nastoupením sporulace. Geny kódující takové vegetativní insekticidní proteiny lze izolovat, klonovat a transformovat do různých nosičů pro použití v programech pro kontrolu škůdců.

Pro účely vynálezu mezi škůdce patří hmyz, houby, bakterie, hádátka, roztoči, klíšťata, patogenní prvoci, motolice parazitující na zvířatech a podobně, aniž by se však jednalo o vyčerpávající výčet. Mezi hmyzí škůdce patří hmyz vybraný z řádů Coleoptera (brouci), Diptera (dvoukřídlí), Hymenoptera (blanokřídlí), Lepidoptera (motýli), Mallophaga (všenky), Homoptera (stejnokřídlí), Hemiptera, Orthoptera (rovnokřídlí), Thysanoptera (třásnokřídlí), Dermaptera (škvoři), Isoptera (všekazi), Anoplura (vši), Siphonaptera, Trichoptera (chrostíci) atd., zejména Coleoptera (brouci) a Lepidoptera (motýli).

Tabulky 1 až 10 uvádějí seznam škůdců na hlavních plodinách a škůdců s lékařským a veterinárním významem. Tito škůdci patří do rozsahu vynálezu.

Tabulka 1

Lepidoptera (motýli a můry)

Kukuřice

Ostrinia nubilalis

Agrotis ipsilon

Helicoverpa zea

Spodoptera frugiperda

Diatraea grandiosella

Pokračování Tabulky 1

Kukuřice

Elasmopalpus lignosellus
Diatraea saccharalis

Čirok

Chilo partellus
Spodoptera frugiperda
Helicoverpa zea
Elasmopalpus lignosellus
Feltia subterranea

Pšenice

Pseudaletia unipunctata
Spodoptera frugiperda
Elasmopalpus lignosellus
Agrotis orthogonia
Elasmopalpus lignosellus

Slunečnice

Suleima helianthana
Homoeosoma electellum

Bavlník

Heliothis virescens
Helicoverpa zea
Spodoptera exigua
Pectinophora gossypiella

Rýže

Diatraea saccharalis
Spodoptera frugiperda
Helicoverpa zea

Sója

Pseudoplusia includens
Anticarsia gemmatalis
Plathypena scabra

Pokračování Tabulky 1

Sója

Ostrinia nubilalis
Agrotis ipsilon
Spodoptera exigua
Heliothis virescens
Helicoverpa zea

Ječmen

Ostrinia nubilalis
Agrotis ipsilon

Tabulka 2

Coleoptera (brouci)

Kukuřice

Diabrotica virgifera virgifera
Diabrotica longicornis barberi
Diabrotica undecimpunctata howardi
Melanotus spp.
Cyclocephala borealis
Cyclocephala immaculata
Popilia japonica
Chaetocnema pulicaria
Sphenophorus maidis

Čirok

Phyllophaga crinita
Eleodes, *Conoderus* a *Aeolus* spp.
Oulema melanopus
Chaetocnema pulicaria
Sphenophorus maidis

Pšenice

Oulema melanopus
Hypera punctata

Pokračování Tabulky 2

Pšenice

Diabrotica undecimpunctata howardi

Slunečnice

Zygogramma exclamationis

Bothyrus gibbosus

Bavlník

Anthonomus grandis

Rýže

Colaspis brunnea

Lissorhoptrus oryzophilus

Sitophilus oryzae

Sója

Epilachna varivestis

Tabulka 3

Homoptera (molice, mšice apod.)

Kukuřice

Rhopalosiphum maidis

Anuraphis maidiradicis

Čirok

Rhopalosiphum maidis

Sipha flava

Pšenice

Diuraphis noxia

Schizaphis graminum

Macrosiphum avenae

Bavlník

Aphis gossypii

Pseudatomoscelis seriatus

Pokračování Tabulky 3

Bavlník

Trialeurodes abutilonea

Rýže

Nephotettis nigropictus

Sója

Myzus persicae

Empoasca fabae

Ječmen

Schizaphis graminum

Řepka olejka

Brevicoryne brassicae

Tabulka 4

Hemiptera (ploštice)

Kukuřice

Blissus leucopterus leucopterus

Čírok

Blissus leucopterus leucopterus

Bavlník

Lygus lineolaris

Rýže

Blissus leucopterus leucopterus

Acrosternum hilare

Sója

Acrosternum hilare

Ječmen

Blissus leucopterus leucopterus

Acrosternum hilare

Pokračování Tabulky 4

Ječmen

Euschistus servus

Tabulka 5

Orthoptera (kobylinky, cvrčci a švábi)

Kukuřice

Melanoplus femurrubrum

Melanoplus sanguinipes

Pšenice

Melanoplus femurrubrum

Melanoplus differentialis

Melanoplus sanguinipes

Bavlník

Melanoplus femurrubrum

Melanoplus differentialis

Sója

Melanoplus femurrubrum

Melanoplus differentialis

Stavby a domácnosti

Periplaneta americana

Blattella germanica

Blatta orientalis

Tabulka 6

Diptera (mouchy a komáři)

Kukuřice

Hylemya platura

Agromyza parvicornis

Pokračování Tabulky 6

Čirok

Contarinia sorghicola

Pšenice

Mayetiola destructor

Sitodiplosis mosellana

Meromyza americana

Hylemya coarctata

Slunečnice

Neolasioptera murtfeldtiana

Sója

Hylemya platura

Ječmen

Hylemya platura

Mayetiola destructor

Hmyz napadající člověka a zvířata a přenašeči nemocí

Aedes aegypti

Aedes albopictus

Phlebotomus papatasi

Musca domestica

Tabanus atratus

Cochliomyia hominivorax

Tabulka 7

Thysanoptera (třásněnky)

Kukuřice

Anaphothrips obscurus

Pšenice

Frankliniella fusca

Pokračování Tabulky 7

Bavlník

Thrips tabaci
Frankliniella fusca

Sója

Sericothrips variabilis
Thrips tabaci

Tabulka 8

Hymenoptera (pilatky, mravenci, vosy atd.)

Kukuřice

Solenopsis milesta

Pšenice

Cephus cinctus

Tabulka 9

Další řády a reprezentativní druhy

Dermatoptera (škvoři)

Forficula auricularia

Isoptera (termity)

Reticulitermes flavipes

Mallophaga (všenky)

Cuculotogaster heterographa

Bovicola bovis

Anoplura (vši)

Pediculus humanus

Siphonaptera (blechy)

Ctenocephalides felis

Tabulka 10

Acari (roztoči a klíšťata)

Kukuřice

Tetranychus urticae

Čirok

Tetranychus cinnabarinus

Tetranychus urticae

Pšenice

Aceria tulipae

Bavlník

Tetranychus cinnabarinus

Tetranychus urticae

Sója

Tetranychus turkestanii

Tetranychus urticae

Ječmen

Petrobia latens

Důležité roztoči škodící člověku a zvířatům

Demacentor variabilis

Argas persicus

Dermatophagoides farinae

Dermatophagoides pteronyssinus

Nyní, když bylo zjištěno, že lze izolovat pesticidní proteiny z druhů rodu *Bacillus* ve fázi vegetativního růstu, lze za použití standardních postupů izolovat jiné kmeny a testovat jejich účinnost proti konkrétním škůdcům rostlin a škůdcům na jiných materiálech než rostlinách. Obecně lze kmeny rodu *Bacillus* izolovat ze vzorku libovolného materiálu, ve kterém žijí, včetně půdy, rostlin, hmyzu, prachu ze zrnového dopravníku, a vzorků jiných materiálů, za použití

způsobů známých v oboru, viz například Travers a kol. (1987) Appl. Environ. Microbiol. 53: 1263 - 1266; Saleh a kol. (1969) Can J. Microbiol. 15: 1101 - 1104; DeLucca a kol. (1981) Can J. Microbiol. 27: 865 - 870; a Norris a kol. (1981) "The genera *Bacillus* and *Sporolactobacillus*" v Starr a kol. (editoři), The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria, svazek II, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Po izolaci je možné u kmenů testovat pesticidní účinnost v průběhu vegetativního růstu. Tímto způsobem lze identifikovat nové pesticidní proteiny a kmeny.

Mezi mikroorganismy rodu *Bacillus*, které nacházejí uplatnění ve vynálezu, patří *Bacillus cereus* a *Bacillus thuringiensis*, jakož i druhy rodu *Bacillus* uvedené v tabulce 11.

Tabulka 11

Seznam druhů rodu *Bacillus*

Morfologická skupina 1

- B. megaterium*
- B. cereus**
- B. cereus* var. *mycoides*
- B. thuringiensis**
- B. licheniformis*
- B. subtilis**
- B. pumilus*
- B. firmus**
- B. coagulans*

Morfologická skupina 2

- B. polymyxa*
- B. macerans*
- B. circulans*

Pokračování Tabulky 11

Morfologická skupina 2

- B. stearothermophilus
- B. alvei*
- B. laterosporus*
- B. brevis
- B. pulvifaciens
- B. popilliae*
- B. lentimorbus*
- B. larvae*

Morfologická skupina 3

- B. sphaericus*
- B. pasteurii

Nezařazené kmeny

Podskupina A

- B. apiarius*
- B. filicolonicus
- B. thiaminolyticus
- B. alcalophilus

Podskupina B

- B. cirroflagellosus
- B. chitinosporus
- B. lentus

Podskupina C

- B. badius
- B. aneurinolyticus
- B. macroides
- B. freundenreichii

Podskupina D

- B. pantothenicus
- B. epiphytus

Pokračování Tabulky 11

Podskupina E1

- B. aminovorans
- B. globisporus
- B. insolitus
- B. psychrophilus

Podskupina E2

- B. psychrosaccharolyticus
- B. macquariensis

Legenda k tabulce 11:

- * o těchto kmenech rodu *Bacillus* bylo dříve zjištěno, že souvisí s hmyzem

Rozdělení do skupin je provedeno podle práce Parry, J. M. a kol. (1983) *Color Atlas of Bacillus species*, Wolfe Medical Publications, Londýn

Podle vynálezu lze z druhů rodu *Bacillus* izolovat pesticidní proteiny produkované v průběhu vegetativního růstu. Podle jednoho provedení lze izolovat insekticidní proteiny produkované v průběhu vegetativního růstu. Způsoby izolace proteinů jsou v oboru známy. Obecně lze proteiny purifikovat pomocí běžných chromatografických postupů, včetně gelové filtrace, iontové výměny a imunoafinitní chromatografie, pomocí vysoceúčinné kapalinové chromatografie, jako je vysoceúčinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi, vysoceúčinná kapalinová chromatografie na iontoměničích, vytěsňovací vysoceúčinná kapalinová chromatografie, vysoceúčinný chromatofokusing a hydrofobní interakční chromatografie atd., pomocí elektroforetického rozdělení, jako je jednorozměrná gelová elektroforéza, dvourozměrná gelová elektroforéza atd. Tyto způsoby jsou známy v oboru, viz například Current Protocols in Molecular Biology, svazky

1 a 2, Ausubel a kol. (editoři), John Wiley and Sons, New York (1988). Dále lze připravit protilátky proti v podstatě čistým připraveným proteinům, viz například Radka a kol. (1983) J. Immunol. 128: 2804, a Radka a kol. (1984) Immunogenetics 19: 63. Pro purifikaci proteinu vykazujícího pesticidní vlastnosti lze použít libovolnou kombinaci způsobů. Při vytváření postupu se po každém purifikačním stupni stanovuje pesticidní účinnost.

Těmito purifikačními stupni se získá v podstatě purifikovaná proteinová frakce. Termín "v podstatě purifikovaný" nebo "v podstatě čistý" označuje protein, který v podstatě neobsahuje žádnou sloučeninu normálně doprovázející protein v jeho přírodním stavu. Skutečnost, že je připravený protein "v podstatě čistý" lze stanovit z nepřítomnosti jiných detekovatelných proteinových pásů po elektroforéze v SDS-polyakrylamidovém gelu, což se určí vizuálně nebo denzitometricky. Alternativně může být stupeň čistoty indikován nepřítomností jiných amino-koncových sekvencí nebo N-koncových zbytků v purifikované látce. Čistotu lze ověřit novou chromatografií "čistých" proteinů, kterou se zjistí nepřítomnost jiných píků při iontoměničové elektroforéze, elektroforéze s obrácenými fázemi nebo kapilární elektroforéze. Termíny "v podstatě čistý" nebo "v podstatě purifikovaný" nejsou míněny tak, že by vylučovaly umělé nebo syntetické směsi proteinů s jinými sloučeninami. Tyto termíny rovněž nejsou míněny tak, že by vylučovaly přítomnost malého množství nečistot, které nejsou na překážku biologické účinnosti proteinu, a které mohou být přítomny například v důsledku neúplné purifikace.

Jakmile je izolován purifikovaný protein, je možné tento protein, nebo polypeptidy, které jej tvoří, charakterizovat a sekvenovat pomocí standardních způsobů známých v oboru. Purifikovaný protein, nebo polypeptidy, které jej tvoří, lze například fragmentovat pomocí bromkyanu,

nebo proteasami jako je papain, chymotrypsin, trypsin, lysyl-C-endopeptidasa atd. (Oike a kol. (1982) J. Biol. Chem. 257: 9751 - 9758, Liu a kol. (1983) Int. J. Pept. Protein Res. 21: 209 - 215). Výsledné peptidy se oddělí, výhodně pomocí vysoceúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), nebo roztavením gelů a elektroblotováním na poly(vinylidenfluoridové) membrány (PVDF-membrány), a podrobí se sekvenování aminokyselin, při kterém se peptidy výhodně analyzují pomocí automatických sekvenátorů. Lze stanovit N-koncové, C-koncové nebo vnitřní aminokyselinové sekvence. Z aminokyselinové sekvence purifikovaného proteinu lze syntetizovat nukleotidovou sekvenci, kterou lze použít jako sondu při izolaci genu kódujícího pesticidní protein.

Pesticidní proteiny mohou být oligomerní a lišit se v molekulové hmotnosti, počtu protomerů, peptidech které je tvoří, účinnosti proti konkrétním škůdcům a dalších vlastnostech. Pomocí zde popsanych způsobů lze však izolovat a charakterizovat proteiny účinné proti řadě škůdců.

Jakmile je purifikovaný protein izolován a charakterizován, je možno jej měnit různými způsoby, včetně substitucí, delecí, zkracování a inzercí aminokyselin. Způsoby takových manipulací jsou obecně známé v oboru. Například lze připravit obměny pesticidních proteinů v aminokyselinové sekvenci pomocí mutací DNA. Takové obměny (varianty) vykazují požadovanou pesticidní účinnost. Mutace prováděné v DNA kódující variantu samozřejmě nesmí umístit sekvenci mimo čtecí rámec a výhodně nevytvářejí komplementární oblasti, které by mohly produkovat sekundární strukturu mRNA, viz evropská patentová přihláška zveřejněná pod číslem 75 444.

Vynález tedy zahrnuje pesticidní proteiny, jakož i jejich složky a fragmenty. Mohou být tedy vytvořeny složkové protomery, polypeptidy nebo fragmenty proteinů, které si zachovávají pesticidní účinnost. Mezi tyto fragmenty patří zkrácené sekvence, jakož i N-koncové, C-koncové, vnitřní a

vnitřně deletované aminokyselinové sekvence proteinů.

Očekává se, že většina delecí, inzercí a substitucí sekvence proteinů nezpůsobuje zásadní změny v charakteristice pesticidního proteinu. Pokud je však složité předvídat přesný vliv substituce, delece nebo inserce před jejím provedením, je odborníkovi známo, že se vliv vyhodnotí pomocí běžných vyhledávacích testů.

Proteiny nebo jiné složkové polypeptidy, jak jsou zde popsány, lze použít samotné nebo v kombinaci. To znamená, že je možné použít několik proteinů pro kontrolu různých hmyzích škůdců.

Některé proteiny jsou tvořeny jediným polypeptidovým řetězcem, zatímco mnohé proteiny jsou tvořeny více než jedním polypeptidovým řetězcem, jsou tedy oligomerní. Kromě toho jsou některé vegetativní insekticidní proteiny (VIP) pesticidně účinné jako oligomery. V těchto případech se používají další protomery pro zvýšení pesticidní účinnosti nebo aktivaci pesticidních proteinů. Ty protomery, které se používají pro zvýšení nebo aktivaci, jsou označovány jako pomocné proteiny. Pomocné proteiny aktivují nebo zvyšují účinnost pesticidního proteinu pomocí interakce s pesticidním proteinem za vzniku oligomerního proteinu se zvýšenou pesticidní účinností ve srovnání s účinností pozorovanou za nepřítomnosti pomocného proteinu.

Pomocné proteiny aktivují nebo zvyšují účinnost pesticidních proteinů jako je protein VIP 1 z AB78. Jako příklad takových pomocných proteinů lze uvést, aniž by se však na něj vynález jakkoli omezoval, protein VIP2 z AB78. Jak je demonstrováno v příkladech provedení vynálezu, mohou pomocné proteiny aktivovat řadu pesticidních proteinů. Podle jednoho provedení vynálezu lze tedy rodičovskou rostlinu 1 transformovat pomocným proteinem. Tuto rodičovskou rostlinu 1 lze křížít s řadou rodičovských rostlin 2 transformovaných

jedním nebo několika pesticidními proteiny, jejichž pesticidní účinnosti jsou aktivovány uvedeným pomocným proteinem.

V rámci rozsahu vynálezu lze mezi pesticidními proteiny podle vynálezu překvapivě identifikovat novou skupinu proteinů specifických pro hmyz. Tyto proteiny, které jsou označovány v tomto textu jako VIP3, lze získat z kmenů *Bacillus* spp, avšak výhodně z kmenů *Bacillus thuringiensis* a nejvýhodněji z kmenů *Bacillus thuringiensis* AB88 a AB424. Tyto uvedené vegetativní insekticidní proteiny jsou přítomné hlavně v supernatantech kultur rodu *Bacillus*, přičemž tvoří alespoň 75 % z celkového množství v případě kmene AB88. Proteiny VIP3 se dále vyznačují svým ojedinělým spektrem insekticidní účinnosti, která zahrnuje účinnost proti druhům rodu *Agrotis* nebo/a *Spodoptera*, avšak zejména proti *Agrotis ipsilon* nebo/a *Spodoptera frugiperda* nebo/a *Spodoptera exigua* nebo/a *Heliothis virescens* nebo/a *Helicoverpa zea*.

Agrotis ipsilon je agronomicky významným druhem hmyzu, který je značně rezistentní vůči δ -endotoxinům. MacIntosh a kol. (1990), J. Invertebr. Pahtol. 56, 258 - 266, uvádějí, že δ -endotoxiny CryIA(b) a CryIA(c) vykazují insekticidní vlastnosti vůči *Agrotis ipsilon* s hodnotami LC_{50} více než 80 μ g respektive 18 μ g / ml potravy. Pomocí insekticidních proteinů vip3A podle vynálezu se dosáhne více než 50% mortality při přidání proteinu v množství, které je alespoň desetkrát až pětsetkrát, výhodně padesátkrát až třistapadesátkrát a nejvýhodněji dvěstěkrát až třistakrát nižší než množství proteinů CryIA nutné pro dosažení právě 50% mortality. Zejména výhodné v rámci vynálezu jsou insekticidní proteiny vip3A, kterými se dosáhne 100% mortality při přidání proteinu v množství alespoň dvěstěšedesátkrát nižším než je množství proteinů CryIA nutné pro dosažení právě 50% mortality.

Insekticidní proteiny vip3 podle vynálezu jsou přítomné hlavně v supernatantech kultur a je tudíž potřeba

klasifikovat je jako sekretované proteiny. Výhodně obsahují v N-koncové sekvenci řadu kladně nabitých zbytků následovaných hydrofobní základní oblastí a nejsou v průběhu exportu upravovány na N-konci.

Stejně jako jiné pesticidní proteiny spadající do rozsahu vynálezu lze proteiny VIP3 detekovat v růstových stádiích před sporulací, což představuje další jasnou odlišnost od jiných proteinů, které patří do skupiny δ -endotoxinů. Výhodně začíná exprese proteinu specifického pro hmyz v průběhu střední logaritmické fáze (mid-log fáze) a pokračuje během sporulace. V důsledku specifického typu exprese v kombinaci s vysokou stabilitou proteinů VIP3 lze v supernatantech sporulujících kultur nalézt velká množství proteinů VIP3. Zejména výhodné jsou proteiny VIP3 uvedené v sekvencích SEQ ID č. 23 a SEQ ID č. 32 a odpovídající molekuly DNA, které obsahují nukleotidové sekvence kódující tyto proteiny, avšak zejména ty molekuly DNA, které obsahují nukleotidové sekvence uvedené v sekvencích SEQ ID č. 28, SEQ ID č. 30 a SEQ ID č. 31.

Pesticidní proteiny podle vynálezu lze použít v kombinaci s endotoxiny *Bacillus thuringiensis* nebo jinými insekticidními proteiny pro zvýšení rozsahu cílového hmyzu. Dále má použití vegetativních insekticidních proteinů podle vynálezu v kombinaci s δ -endotoxiny z *Bacillus thuringiensis* nebo jinými insekticidními látkami odlišné povahy výrazný význam pro prevenci nebo/a řízení rezistence hmyzu. Mezi jiné insekticidní látky patří inhibitory proteas (jak serinového tak cysteinového typu, lektiny, α -amylasy a peroxidasy. Podle jednoho výhodného provedení je exprese vegetativních insekticidních proteinů v transgenické rostlině doprovázena expresí jednoho nebo několika δ -endotoxinů z *Bacillus thuringiensis*. Této společné exprese (koexprese) více než jedné insekticidní látky v jediné transgenické rostlině lze dosáhnout modifikací rostliny pomocí genetického inženýrství

tak, že obsahuje a exprimuje všechny nutné geny. Alternativně lze rodičovskou rostlinu 1 geneticky modifikovat tak, že exprimuje vegetativní insekticidní proteiny a druhou rostlinu, rodičovskou rostlinu 2 geneticky modifikovat tak, že exprimuje δ -endotoxin z *Bacillus thuringiensis*. Křížením rodičovské rostliny 1 s rodičovskou rostlinou 2 se získají dceřinné rostliny (potomstvo), které exprimují všechny geny introdukované do rodičovských rostlin 1 a 2. Zejména výhodnými δ -endotoxiny z *Bacillus thuringiensis* jsou látky popsány v EP-A 0618976.

Podstatná část cytotoxických proteinů, ačkoli ne všechny, působí binárně. Binární toxiny jsou typicky tvořeny dvěma proteinovými doménami, z nichž se jedna označuje jako doména A a druhá jako doména B (viz Sourcebook of Bacterial Protein Toxins, J. E. Alouf a J. H. Freer, editoři, (1991) Academic Press). Doména A vykazuje silnou cytotoxickou účinnost. Doména B se váže na receptor na vnějším povrchu buňky před přenesením dovnitř buňky (internalizací). Typicky musí být cytotoxická doména A převáděna do cytoplazmy pomocí translokační domény. Často jsou doména A a doména B oddělenými polypeptidy nebo protomery, které jsou spojeny interakcí protein-protein nebo disulfidickou vazbou. Toxinem však může být i jediný polypeptid, který je v buňce proteolyticky upraven na dvě domény, jako je tomu v případě exotoxinu A z *Pseudomonas*. Lze shrnout, že binární toxiny mají typicky tři významné domény, cytotoxickou doménu A, doménu B vázající se na receptor a translokační doménu. Doména A a doména B jsou často spojeny doménami tvořícími interakce protein-protein.

Domény vázající se na receptor podle vynálezu jsou vhodné pro transport libovolného proteinu, toxinu, enzymu, transkripčního faktoru, nukleové kyseliny, chemikálie nebo libovolného jiného faktoru do cílového hmyzu, který má receptor rozpoznávaný doménou vázající se na receptor z

binárních toxinů zde popsaných. Jelikož mají binární toxiny translokační domény, které penetrují fosfolipidové dvouvrstevné membrány a převádějí cytotoxiny přes tyto membrány, mohou být tyto translokační domény podobně vhodné při převádění libovolného proteinu, toxinu, enzymu, transkripčního faktoru, nukleové kyseliny, chemikálie nebo libovolného jiného faktoru přes fosfolipidovou dvouvrstvu jako je plazmatická membrána nebo vesikulární membrána. Samotná translokační doména může perforovat membrány a tím vykazovat toxické nebo insekticidní vlastnosti. Všechny binární toxiny mají dále cytotoxické domény. Taková cytotoxická doména může být použitelná jako letální protein, buďto samotná nebo při dodání do libovolné cílové buňky nebo cílových buněk libovolným způsobem.

Konečně jelikož binární toxiny složené ze dvou polypeptidů často tvoří komplex, je pravděpodobné, že jsou ve složkách binárních toxinů podle vynálezu oblasti tvořící interakce protein-protein. Tyto domény tvořící interakce protein-protein mohou být vhodné pro vytváření spojení mezi libovolnými kombinacemi toxinů, enzymů, transkripčních faktorů, nukleových kyselin, protilátek, zbytků vázajících se na buňky nebo libovolných jiných chemikálií, faktorů, proteinů nebo proteinových domén.

Toxiny, enzymy, transkripční faktory, protilátky, zbytky vázající se na buňku nebo jiné proteinové domény lze fúzovat k pesticidním nebo pomocným proteinům za vzniku genetických fúzí ve stejném čtecím rámci, ze kterých se při translaci na ribozomech vytváří fúzní protein který kombinuje vlastnosti vegetativního insekticidního proteinu a dalších složek použitých při fúzi. Dále pokud vykazuje proteinová doména fúzovaná k vegetativnímu insekticidnímu proteinu afinitu k dalšímu proteinu, nukleové kyselině, glycidu, lipidu nebo jiné chemikálii nebo faktoru, lze vytvořit třísložkový komplex. Tento komplex bude mít vlastnosti všech

jeho složek. Podobnou úvahu lze použít pro přípravu čtyř- nebo vícesložkových komplexů. Tyto komplexy jsou vhodné jako insekticidní toxiny, léčiva, laboratorní činidla a diagnostická činidla atd. Takovéto komplexy se v současné době používají například jako fúzní toxiny pro potenciální terapie rakoviny, jako činidla v ELISA-testech a imunoblotačních analýzách.

Jednou ze strategií obměňování pesticidních nebo pomocných proteinů je fúzování "S-zbytku" ("S-tag") o délce 15 aminokyselin k proteinu bez zničení domény nebo domén vázajících se na buňku hmyzu, translokačních domén nebo domén vytvářejících interakce protein-protein přítomných v tomto proteinu. S-zbytek vykazuje vysokou afinitu ($K_d = 10^{-9}$ M) k ribonukleasovému S-proteinu, ze kterého se, je-li navázán na S-zbytek, vytváří aktivní ribonukleasa. (viz F. B. Richards a H. W. Wyckoff (1971) v "The Enzymes", svazek IV (Boyer, P. D., editor), str. 647 - 806, Academic Press, New York). Fúzi lze provést takovým způsobem, že se zničí nebo odstraní cytotoxická účinnost pesticidního nebo pomocného proteinu, čímž se nahradí cytotoxická účinnost vegetativního insekticidního proteinu novou cytotoxickou ribonukleasovou účinností. Výsledný toxin bude tvořen S-proteinem, pesticidním proteinem a pomocným proteinem, kde je buď pesticidní protein nebo pomocný protein produkován jako translační fúze s S-zbytkem. Podobných strategií lze použít pro fúzování jiných potenciálních cytotoxinů k pesticidním nebo pomocným proteinům, včetně, aniž by se však jednalo o omezující výčet, proteinů inaktivujících ribozomy, hormonů hmyzu, receptorů hormonů, transkripčních faktorů, proteas, fosfatas, exotoxinu A z *Pseudomonas*, nebo libovolných jiných proteinů nebo chemických faktorů, které jsou letální při dodání do buněk. Podobně lze do buněk dodávat proteiny, které nejsou letální, mohou však měnit buněčnou biochemii nebo fyziologii.

Spektrum toxicity pro různé druhy lze měnit tak, že se k pesticidním nebo pomocným proteinům fúzí domény, které rozpoznávají receptory na povrchu buněk jiných druhů. Mezi takovéto domény mohou patřit, aniž by se však jednalo o vyčerpávající výčet, protilátky, transferrin, hormony nebo peptidové sekvence izolované z fágem vytvářených afinitně selektovatelných knihoven (phage displayed affinity selectable libraries). Pro změnu spektra toxicity lze použít rovněž peptidové sekvence, které jsou navázány na živiny, vitaminy, hormony nebo jiné chemikálie, které jsou transportovány do buněk. Podobně lze pro změnu spektra účinnosti VIP1 a VIP2 použít libovolný jiný protein nebo chemikálii, který (která) se váže na receptor na povrchu buňky nebo membránu a může být přenesen(a) dovnitř buňky (internalizován(a)).

Pesticidními proteiny podle vynálezu jsou proteiny, které poskytují specifickou pesticidní vlastnost. Takovéto polypeptidy se mohou lišit molekulovou hmotností, přičemž jejich složkové polypeptidy mají molekulovou hmotnost nejméně 30 kDa nebo větší, výhodně přibližně 50 kDa nebo větší.

Pomocné proteiny podle vynálezu se mohou lišit molekulovou hmotností, přičemž mají molekulovou hmotnost nejméně přibližně 15 kDa nebo větší, výhodně přibližně 20 kDa nebo větší, a ještě výhodněji přibližně 30 kDa nebo větší. Pomocné proteiny jako takové se mohou skládat ze složkových polypeptidů.

Je možné, že pesticidní protein a pomocný protein jsou složkami multimerního pesticidního proteinu. Takovéto pesticidní proteiny, které obsahují pomocné proteiny jako jeden nebo několik ze svých složkových polypeptidů, se mohou lišit molekulovou hmotností, přičemž mají molekulovou hmotnost nejméně 50 kDa až do nejméně 200 kDa, výhodně přibližně 100 kDa až 150 kDa.

Pomocný protein lze použít v kombinaci s pesticidními proteiny podle vynálezu pro zvýšení účinnosti nebo aktivaci pesticidního proteinu. Pro stanovení, zda pomocný protein ovlivní účinnost, je možné pesticidní protein exprimovat samotný nebo v kombinaci s pomocným proteinem a jednotlivé účinnosti srovnat v požerových testech pesticidní účinnosti.

Při vyhledávání potenciální pesticidní účinnosti u kmenů může být výhodné testovat účinnost kmene samotného a v kombinaci s pomocným proteinem. V některých případech se kombinací pomocného proteinu s přirozenými proteiny kmenů dosáhne pesticidní účinnosti i tehdy, kdy za nepřítomnosti pomocného proteinu žádná účinnost není pozorována.

Pomocný protein je možné modifikovat, jak je popsáno výše, pomocí různých způsobů známých v oboru. Pro účely vynálezu tudíž termín "vegetativní insekticidní protein" (VIP) zahrnuje proteiny produkované v průběhu vegetativního růstu, které lze použít buďto samotné nebo v kombinaci k dosažení pesticidní účinnosti. Zahrnuje tedy pesticidní proteiny, pomocné proteiny a proteiny, které vykazují účinnost pouze za přítomnosti pomocného proteinu nebo polypeptidové složky těchto proteinů.

Je třeba vzít v úvahu, že pro získání nukleotidových a aminokyselinových sekvencí proteinů podle vynálezu jsou k dispozici i alternativní způsoby. Pro získání nukleotidové sekvence kódující pesticidní protein lze například izolovat z genomové knihovny kosmidové klony, které exprimují pesticidní protein. Z větších účinných kosmidových klonů lze připravit menší subklony a testovat jejich účinnost. Tímto způsobem lze sekvenovat pro stanovení nukleotidové sekvence genu klony, které exprimují účinný pesticidní protein. Poté lze odvodit aminokyselinovou sekvenci proteinu. Obecné metody molekulární biologie jsou uvedené například v Molecular Cloning, A Laboratory Manual, druhé vydání, svazky 1 - 3, Sambrook a kol. (editoři), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold

Spring Harbor, New York (1989) a v publikacích citovaných v této práci.

Vynález rovněž zahrnuje nukleotidové sekvence z organismů jiných než jsou druhy rodu *Bacillus*, kteréžto nukleotidové sekvence jsou izolovatelné hybridizací s nukleotidovými sekvencemi z kmenů *Bacillus* podle vynálezu. U proteinů kódovaných takovými nukleotidovými sekvencemi lze testovat jejich pesticidní účinnost. Vynález rovněž zahrnuje proteiny kódované těmito nukleotidovými sekvencemi. Vynález dále zahrnuje proteiny získané z organismů jiných než jsou druhy rodu *Bacillus*, kteréžto proteiny cross-reagují s protilátkami vytvořenými proti proteinům podle vynálezu. U izolovaných proteinů lze opět testovat jejich pesticidní účinnost pomocí zde popsaných způsobů nebo jiných způsobů známých v oboru.

Jakmile se izolují nukleotidové sekvence kódující pesticidní proteiny podle vynálezu, lze s nimi manipulovat a použít je pro expresi proteinu v řadě hostitelů, včetně jiných organismů, včetně mikroorganismů a rostlin.

Pesticidní geny podle vynálezu lze optimalizovat pro zvýšenou expresi v rostlinách, viz například EP-A 0618976, EP-A 0359472, EP-A 0385962, WO 91/16432, Perlak a kol. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 3324 - 3328, a Murray a kol. (1989) Nucleic Acids Research 17: 477 - 498. Tímto způsobem lze syntetizovat geny používající kodónů preferovaných rostlinami. Preferovaným kodónem pro konkrétního hostitele je jediný kodón, který nejčastěji kóduje v tomto hostiteli danou aminokyselinu. Například kodón preferovaný kukuřicí pro konkrétní aminokyselinu lze odvodit ze známých genových sekvencí kukuřice. Použití kodónů kukuřicí pro 28 genů z rostlin kukuřice se nachází v práci Murray a kol. (1989) Nucleic Acids Research 17: 477 - 498. Lze rovněž vytvořit syntetické geny na základě distribuce kodónů, kterou

konkrétní hostitel používá pro konkrétní aminokyselinu.

Tímto způsobem lze optimalizovat nukleotidové sekvence pro expresi v libovolné rostlině. Je třeba vzít v úvahu, že je možné, aby byla optimalizovaná nebo syntetická celá genová sekvence nebo libovolná její část. To znamená, že je možné použít rovněž syntetické nebo částečně optimalizované sekvence.

Podobným způsobem lze optimalizovat nukleotidové sekvence pro expresi v libovolném mikroorganismu. Preferované použití kodónů pro rod *Bacillus* je uvedeno například v patentu Spojených Států Amerických č. 5 024 837 a v práci Johansen a kol. (1988) Gene 65: 293 - 304.

Metody konstrukce expresivních kazet pro rostliny, jakož i zavedení cizí DNA do rostlin jsou popsány v oboru. Takovéto expresivní kazety mohou obsahovat promotory, terminátory, zesilovače, vedoucí sekvence, introny a jiné regulační sekvence operabilně spojené s kódující sekvencí pesticidního proteinu. Dále je třeba vzít v úvahu, že je možné použít v expresivních kazetách promotory nebo terminátory genů VIP.

Obecně se pro introdukci cizí DNA do rostlin používají vektory na bázi Ti-plazmidu, jakož i přímý příjem DNA, lipozómy, elektroporace, mikroiinjekce a vstřelování mikročástic. Takové způsoby jsou popsány v oboru, viz například Guerche a kol., (1987) Plant Science 52: 111 - 116; Neuhauser a kol., (1987) Theor. Appl. Genet. 75: 30 - 36; Klein a kol. (1987) Nature 327: 70 - 73; Howell a kol., (1980) Science 208: 1265; Horsch a kol., (1985) Science 227: 1229 - 1231; DeBlock a kol., (1989) Plant Physiology 91: 694 - 701; Methods for Plant Molecular Biology (Weissbach a Weissbach, editoři) Academic Press, Inc. (1988); a Methods in Plant Molecular Biology (Schuler a Zielinsku, editoři) Academic Press, Inc. (1989), viz rovněž patentová přihláška Spojených

Států Amerických č. 08/008 374, a rovněž EP-A 0193259 a EP-A 0451878. Je samozřejmé, že způsob transformace závisí na rostlinné buňce, která má být transformována.

Dále je možné složky expresivní kazety modifikovat pro zvýšení exprese. Lze například použít zkrácené sekvence, provést substituce nukleotidů nebo jiné modifikace, viz například Perlak a kol. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 3324 - 3328; Murray a kol. (1989) Nucleic Acids Research 17: 477 - 498; a WO 91/16432.

Konstrukt může rovněž obsahovat libovolné jiné nutné regulátory, jako jsou terminátory (Guerineau a kol., (1991), Mol. Gen. Genet., 226: 141 - 144; Proudfoot, (1991), Cell, 64: 671 - 674; Sanfacon a kol., (1991), Genes Dev., 5: 141 - 149; Mogen a kol., (1990), Plant Cell, 2: 1261 - 1272; Munroe a kol., (1990), Gene, 91: 151 - 158; Ballas a kol., (1989), Nucleic Acids Res., 17: 7891 - 7903; Joshi a kol., (1987), Nucleic Acid Res., 15: 9627 - 9639); rostlinné konvenční sekvence pro translaci (Joshi, C.P., (1987), Nucleic Acids Research, 15: 6643 - 6653), introny (Luehrsen a Walbot, (1991), Mol. Gen. Genet., 225: 81 - 93) a podobně, operabilně spojené s nukleotidovou sekvencí. Může být výhodné zařadit do konstruktů expresivní kazety 5'-vedoucí sekvenci. Takové vedoucí sekvence mohou působit tak, že zvyšují translaci. Translační vedoucí sekvence jsou v oboru známé a patří mezi ně:

vedoucí sekvence picornavirů, například vedoucí sekvence EMCV (5'-nekódující oblast encefalomyocarditis) (Elroy-Stein, O., Fuerst, T.R., a Moss, B. (1989) PNAS USA 86: 6126 - 6130);

vedoucí sekvence potyvirů, například vedoucí sekvence TEV (viru skvrnitosti tabáku Tobacco Etch Virus) (Allison a kol., (1986); vedoucí sekvence MDMV (viru zakrslé mozaiky kukuřice), Virology, 154: 9 - 20); a

protein vázající těžký řetězec lidského imunoglobulinu (BiP) (Macejak, D. G., a Sarnow, P., (1991), Nature 353: 90 - 94;

nepřekládaná vedoucí sekvence z mRNA obalového proteinu viru mozaiky vojštěšky (AMV RNA 4), (Jobling, S. A., a Gehrke, L., (1987), Nature, 325: 622 - 625;

vedoucí sekvence viru mozaiky tabáku (TMV), (Gallie, D. R. a kol., (1989), Molecular Biology of RNA, str. 237 - 256;
a

vedoucí sekvence viru chlorotické skvrnitosti kukuřice (MCMV) (Lommel, S. A. a kol., (1991), Virology, 81: 382 - 385, viz rovněž Della-Cioppa a kol., (1987), Plant Physiology, 84: 965 - 968.

V expresivní kazetě lze použít rostlinný terminátor, viz například Rosenberg a kol., (1987), Gene, 56: 125; Guerineau a kol., (1991), Mol. Gen. Genet., 226: 141 - 144; Proudfoot, (1991), Cell, 64: 671 - 674; Sanfacon a kol., (1991), Genes Dev., 5: 141 - 149; Mogen a kol., (1990), Plant Cell, 2: 1261 - 1272; Munroe a kol., (1990), Gene, 91: 151 - 158; Ballas a kol., (1989), Nucleic Acids Res., 17: 7891 - 7903; Joshi a kol., (1987), Nucleic Acid Res., 15: 9627 - 9639.

Pro tkáňově specifickou expresi lze nukleotidové sekvence podle vynálezu operabilně spojit s tkáňově specifickými promotory, viz například EP-A 0618976.

Do rozsahu vynálezu dále spadají transgenické rostliny, zejména transgenické fertilní rostliny transformované pomocí výše popsaných postupů a jejich asexuální nebo/a sexuální potomstvo, které obsahují a výhodně rovněž exprimují pesticidní protein podle vynálezu. Zejména výhodné jsou hybridní rostliny.

Transgenickými rostlinami podle vynálezu mohou být

dvouděložné nebo jednoděložné rostliny. Výhodné jsou jednoděložné rostliny z čeledi Graminaceae, včetně rostlin rodů *Lolium*, *Zea*, *Triticum*, *Triticale*, *Sorghum*, *Saccharum*, *Bromus*, *Oryzae*, *Avena*, *Hordeum*, *Secale* a *Setaria*.

Zejména výhodná je transgenická kukuřice, pšenice, ječmen, čirok, žito, oves, drnové trávy a rýže.

Z dvouděložných rostlin je zejména výhodná sója, bavlník, tabák, cukrová řepa, řepka olejka a slunečnice.

Rozumí se, že termín "potomstvo" zahrnuje jak "asexuálně" tak "sexuálně" vytvořené potomstvo transgenických rostlin. Rozumí se, že tato definice rovněž zahrnuje všechny mutanty a varianty získatelné pomocí známých způsobů, jako je například buněčná fúze nebo selekce mutantů, které stále vykazují charakteristické vlastnosti původně transformované rodičovské rostliny, spolu se všemi produkty křížení a fúzí transformovaného rostlinného materiálu.

Další předmět vynálezu se týká proliferačního materiálu transgenických rostlin.

Proliferační materiál transgenických rostlin je podle vynálezu definován jako jakýkoli rostlinný materiál, který lze množit sexuálně nebo asexuálně in vivo nebo in vitro. Zejména výhodné jsou v rámci rozsahu vynálezu protoplasty, buňky, kalus, tkáně, orgány, semena, embrya, pyl, vaječné buňky, zygoty, spolu s libovolným jiným propagačním materiálem získaným z transgenických rostlin.

Předmětem vynálezu jsou rovněž části rostlin, jako jsou například květy, stonky, plody, listy a kořeny, které pocházejí z transgenických rostlin nebo jejich potomstva, dříve transformovaných pomocí způsobů podle vynálezu, a které jsou tudíž alespoň z části tvořeny transgenickými buňkami.

Předtím než se rostlinný propagační materiál (plody, hlízy, zrna, semena), ale zejména semena, prodává jako

komerční produkt, opatřuje se obvykle ochranným obalem, který obsahuje herbicidy, insekticidy, fungicidy, baktericidy, nematocidy, moluskocidy nebo směsi několika těchto přípravků, pokud je to žádoucí spolu s dalšími nosiči, povrchově aktivními látkami nebo pomocnými látkami zlepšujícími aplikaci, běžně používanými v oboru, pro poskytnutí ochrany proti poškození způsobenému bakteriálními, houbovými nebo živočišnými škůdci.

Pro ochranu semen je možné ochranný obal aplikovat na semena buďto impregnací hlíz nebo zrn kapalnou formulací nebo jejich obalením smíchanou vlhkou nebo suchou formulací. Kromě toho jsou ve speciálních případech možné jiné způsoby aplikace na rostliny, například se může provádět ošetření směřované na květy nebo plody.

Semeno rostliny podle vynálezu, které obsahuje molekulu DNA obsahující nukleotidovou sekvenci která kóduje pesticidní protein podle vynálezu, lze ošetřit obalem chránícím semena obsahujícím sloučeninu na ošetření rostlin, jako je například captan, carboxin, thiram (TMTD), methalaxyl (Apron) a pirimifos-methyl (Actellic) a jiné sloučeniny, které se běžně používají na ošetření semen. V rámci rozsahu vynálezu jsou výhodné obaly chránící semena obsahující insekticidní prostředek podle vynálezu, a to buď samotný nebo v kombinaci s jedním z obalů chránících semena běžně používaných k ošetření semen.

Dalším předmětem vynálezu je tedy rostlinný propagační materiál kultivovaných rostlin, avšak zejména semeno rostlin, ošetřené obalem chránícím semena, jak je definován výše.

Geny kódující pesticidní proteiny lze použít pro transformaci organismů patogenních pro hmyz. Mezi takové organismy patří Baculoviry, houby, prvoci, bakterie a hádátka.

Kmeny *Bacillus* podle vynálezu lze použít na ochranu

zemědělských plodin a produktů před škůdci. Alternativně lze gen kódující pesticid introdukovat pomocí vhodného vektoru do mikrobiálního hostitele, a tohoto hostitele aplikovat na prostředí, rostliny nebo zvířata. Je možné vybrat jako hostitele mikroorganismy, o kterých je známo, že obsazují "fytosféru" (fyloplán, fylosféru, rhizosféru nebo/a rhizoplán) jedné nebo několika plodin, které jsou předmětem zájmu. Tyto mikroorganismy se vybírají tak, aby byly schopné úspěšně soutěžit v konkrétním prostředí s mikroorganismy divokého typu, aby v nich byl stabilně udržován a exprimován gen exprimující polypeptidový pesticid, a s výhodou aby zajišťovaly zlepšenou ochranu pesticidu před degradací a inaktivací způsobenou prostředím.

Mezi takového mikroorganismy patří bakterie, řasy a houby. Zejména zajímavými mikroorganismy jsou bakterie, například *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Xanthomonas*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Methylius*, *Agrobacterium*, *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Leuconostoc* a *Alcaligenes*, houby, zejména kvasinky, například *Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Sporobolomyces*, *Rhodotorula* a *Aureobasidium*. Zvláště zajímavé jsou takové fytoférní druhy bakterií, jako je *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Acetobacter xylinum*, *Agrobacteria*, *Rhodopseudomonas spheroides*, *Xanthomonas campestris*, *Rhizobium meliloti*, *Alcaligenes entrophus*, *Clavibacter xyli* a *Azotobacter vinlandii*, a fytoférní druhy kvasinek, jako je *Rhodotorula rubra*, *R. glutinis*, *R. marina*, *R. aurantiaca*, *Cryptococcus albidus*, *C. diffluens*, *C. laurentii*, *Saccharomyces rosei*, *S. pretoriensis*, *S. cerevisiae*, *Sporobolomyces rosues*, *S. odoratus*, *Kluyveromyces veronae*, a *Aureobasidium pollulans*. Obzvláště zajímavé jsou pigmentované mikroorganismy.

Je dostupná řada způsobů introdukce genu exprimujícího pesticidní protein do mikroorganismu jako hostitele za

podmínek, které umožňují stabilní udržení a expresi genu. Je například možné zkonstruovat expresivní kazety, které obsahují DNA-konstrukty, které jsou předmětem zájmu, operabilně spojené s transkripčními a translačními regulačními signály pro expresi DNA-konstruktů, a DNA-sekvenci homologickou se sekvencí v hostitelském organismu, jejímž prostřednictvím dojde k integraci, nebo/a replikační systém, který je funkční v hostiteli, jehož prostřednictvím dojde k integraci nebo stabilnímu udržení.

Mezi transkripční a translační regulační signály patří, aniž by se tím však jejich rozsah jakkoli omezoval, promotor, místo iniciace transkripce, operátory, aktivátory, enhancery, další regulační elementy, místa vázající se na ribozomy, iniciační kodón, terminační signály a podobně, viz například patent Spojených Států Amerických č. 5 039 523, patent Spojených Států Amerických č. 4 853 331, EPO 0480762A2, Sambrook a kol., viz výše; Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Maniatis a kol. (editoři), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1982); Advanced Bacterial Genetics, Davis a kol. (editoři), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1980), a v nich citované odkazy.

Mezi vhodné hostitelské buňky, v případě že se buňky obsahující pesticid budou ošetřovat pro prodloužení účinnosti toxinu v buňce když se poté ošetřené buňky aplikují na životní prostředí škůdce nebo škůdců, kteří mají být kontrolováni, mohou patřit buďto prokaryotní nebo eukaryotní hostitelské buňky, normálně s omezením na ty buňky, které neprodukují látky toxické pro vyšší organismy, jako jsou savci. Je však možné použít organismy produkující látky toxické pro vyšší organismy v případě, že toxin je nestabilní nebo aplikační množství dostatečně nízké, aby bylo možné vyhnout se možnosti toxicity pro savčího hostitele. Jako hostitelé jsou zejména zajímaví prokaryotní hostitelé a nižší

eukaryotní hostitelé, jako jsou houby. Mezi ilustrativní příklady prokaryotních hostitelů patří jak Gram-negativní tak Gram-pozitivní hostitelé, a patří mezi ně Enterobacteriaceae, jako je *Escherichia*, *Erwinia*, *Shigella*, *Salmonella*, a *Proteus*; Bacillaceae; Rhizobiaceae, jako je *Rhizobium*; Spirillaceae, jako je fotobakterium, *Zymomonas*, *Serratia*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Desulfovibrio*, *Spirillum*; Lactobacillaceae; Pseudomonadaceae, jako je *Pseudomonas* a *Acetobacter*; Azotobacteraceae a Nitrobacteraceae. Mezi eukaryotní hostitele patří houby, jako jsou Phycomycetes a Ascomycetes, mezi které patří kvasinky, jako jsou *Saccharomyces* a *Schizosaccharomyces*, a kvasinky z třídy Basidiomycetes, jako je *Rhodotorula*, *Aureobasidium*, *Sporobolomyces* a podobně.

Mezi zejména zajímavé charakteristiky při výběru hostitelské buňky pro účely produkce patří snadnost introdukce genu pro protein do hostitele, dostupnost systémů exprese, účinnost exprese, stabilita proteinu v hostiteli, a přítomnost pomocných genetických schopností. Mezi charakteristiky zajímavé při použití jako pesticidních mikrokapslí patří ochranné vlastnosti pro pesticid, jako jsou silné buněčné stěny, pigmentace a intracelulární packaging nebo vytváření inkluzních tělísek; afinita k listům; nepřítomnost toxicity pro savce; atraktivita pro požer škůdci; snadnost usmrcení a fixace bez poškození toxinu; a podobně. Dále je třeba brát v úvahu snadnost formulace a manipulace, ekonomická hlediska, stabilitu při skladování a podobně.

Mezi zejména zajímavé hostitelské organismy patří kvasinky, jako jsou *Rhodotorula* sp., *Aureobasidium* sp., *Saccharomyces* sp. a *Sporobolomyces* sp., fyloplánové organismy jako jsou *Pseudomonas* sp., *Erwinia* sp. a *Flavobacterium* sp., nebo jiné organismy jako jsou *Escherichia*, *Lactobacillus* sp., *Bacillus* sp., a podobně. Mezi konkrétní organismy patří *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus thuringiensis*, *Escherichia coli*,

Bacillus subtilis a podobně.

Geny VIP lze introdukovat do mikroorganismů, které se množí na rostlinách (epifytů) pro dodání vegetativních insekticidních proteinů potenciálním škůdcům, kteří mají být kontrolováni. Epifyty mohou být například Gram-pozitivní nebo Gram-negativní bakterie.

Z rostliny, která je předmětem zájmu, lze například izolovat pomocí způsobů známých v oboru bakterie kolonizující kořeny. Konkrétně lze z kořenů rostliny izolovat kmen *Bacillus cereus* kolonizující kořeny (například viz J. Handelsman, S. Raffel, E. Mester, L. Wunderlich a C. Grau, Appl. Environ. Microbiol. 56: 713 - 718, (1990)). VIP1 nebo/a VIP2 nebo/a VIP3 lze introdukovat do *Bacillus cereus* kolonizujícího kořeny pomocí standardních způsobů známých v oboru.

Konkrétně lze VIP1 nebo/a VIP2 získaný z kmene *Bacillus cereus* AB78 introdukovat do *Bacillus cereus* kolonizujícího kořeny pomocí konjugace za použití standardních metod (J. Gonzales, B. Brown a B. Carlton, Proc. Natl. Acad. Sci. 79: 6951 - 6955 (1982)).

VIP1 nebo/a VIP2 nebo/a VIP3 nebo jiné VIP podle vynálezu lze rovněž introdukovat do mikroorganismu rodu *Bacillus* kolonizujícího kořeny pomocí elektrotransformace. Konkrétně lze VIP klonovat do kyvadlového vektoru (shuttle vector), například pHT3101 (D. Lereclus a kol., FEMS Microbiol. Letts., 60: 211 - 218 (1989)), jak je popsáno v příkladu 10. Kyvadlový vektor pHT3101 obsahující kódující sekvenci konkrétního VIP lze poté transformovat do mikroorganismu rodu *Bacillus* kolonizujícího kořeny pomocí elektroporace (D. Lereclus a kol. 1989, FEMS Microbiol. Letts., 60: 211 - 218).

Expresivní systémy lze vytvořit tak, že jsou vegetativní insekticidní proteiny sekretovány vně cytoplazmy

například Gram-negativní bakterie *Escherichia coli*. Výhody toho, že jsou vegetativní insekticidní proteiny sekretovány, jsou následující:

- (1) zamezí se tím potenciálním toxickým účinkům exprimovaných vegetativních insekticidních proteinů v cytoplazmě,
- (2) může se zvýšit množství exprimovaného vegetativního insekticidního proteinu, a
- (3) může se usnadnit účinná purifikace vegetativního insekticidního proteinu.

Vegetativní insekticidní proteiny lze upravit tak, aby byly sekretovány *Escherichia coli*, například fúzí vhodného signálního peptidu *Escherichia coli* na N-konec signálního peptidu vegetativního insekticidního proteinu nebo nahrazením signálního peptidu vegetativního insekticidního proteinu signálním peptidem *Escherichia coli*. Signální peptidy rozpoznávané *Escherichia coli* lze nalézt v proteinech, o kterých je již známo, že jsou sekretovány *Escherichia coli*, jako je například protein OmpA (J. Ghrayeb, H. Kimura, M. Takahara, Y. Masui a M. Inouye, EMBO J., 3: 2437 - 2442 (1984)). OmpA je hlavním proteinem vnější membrány *Escherichia coli* a má se tedy za to, že je jeho signální peptid účinný v translokačním procesu. Signální peptid proteinu OmpA rovněž nemusí být modifikován před úpravou (processingem), jak tomu může být v případě jiných signálních peptidů, například lipoproteinového signálního peptidu (G. Duffaud, P. March a M. Inouye, Methods in Enzymology, 153: 492 (1987)).

Specificky lze na N-konce a C-konce kódujících sekvencí VIP za použití standardních způsobů známých v oboru zavést jedinečná restriční místa BamHI. Tyto BamHI-fragmenty lze klonovat, ve čtecím rámci, do vektoru pIN-III-ompA1, A2 nebo A3 (J. Ghrayeb, H. Kimura, M. Takahara, H. Hsiung, Y. Masui a

M. Inouye, EMBO J., 3: 2437 - 2442 (1984)), čímž se vytvoří fúzní gen ompA:VIP, který je sekretován do periplazmického prostoru. Další restrikční místa v polylinkeru pIN-III-ompA lze eliminovat pomocí standardních způsobů známých v oboru, takže sekvence kódující N-koncovou aminokyselinu vegetativního insekticidního proteinu následuje přímo po místu štěpení signálního peptidu ompA. Sekretovaná sekvence vegetativního insekticidního proteinu v *Escherichia coli* je tedy poté identická s nativní sekvencí vegetativního insekticidního proteinu.

Pokud není nativní signální peptid vegetativního insekticidního proteinu nutný pro vytvoření správné struktury (folding) maturovaného proteinu, lze takové signální sekvence odstranit a nahradit signální sekvencí ompA. Jedinečná restrikční místa BamHI lze zavést na N-konci kódující sekvence proproteinu bezprostředně za sekvenci kódující signální peptid VIP a na C-konci sekvence kódující VIP. Tyto BamHI-fragментy lze poté klonovat do vektorů pIN-III-ompA jak je popsáno výše.

Obecné způsoby pro použití kmenů podle vynálezu k pesticidní kontrole nebo vytváření jiných organismů jako pesticidních činidel jsou známy v oboru, viz například patent Spojených Států Amerických č. 5 039 523 a EP 0480762A2.

Vegetativní insekticidní proteiny lze fermentovat v bakteriálním hostiteli a výslednou bakterii zpracovat a použít jako mikrobiální postřik stejným způsobem jakým se používají jako insekticidní postřiky kmeny *Bacillus thuringiensis*. V případě vegetativního insekticidního proteinu nebo vegetativních insekticidních proteinů, sekretovaných z mikroorganismů rodu *Bacillus*, se sekreční signál odstraní nebo mutuje za použití postupů známých v oboru. Takovéto mutace nebo/a delece zabraňují sekreci vegetativního insekticidního proteinu nebo vegetativních insekticidních proteinů do růstového média během procesu fermentace.

Vegetativní insekticidní proteiny jsou uchovávány v buňce a buňky se poté zpracují za vzniku enkapsulovaných vegetativních insekticidních proteinů. Pro tento účel lze použít libovolných vhodných mikroorganismů. Pro expresi endotoxinů *Bacillus thuringiensis* jako enkapsulovaných proteinů se v současné době používají mikroorganismy rodu *Pseudomonas*, přičemž se výsledné buňky zpracují a použijí k postřiku jako insekticidy (H. Gaertner a kol. 1993, v *Advanced Engineered Pesticides*, editor L. Kim).

Tímto způsobem se používají různé kmeny *Bacillus thuringiensis*. Takovéto kmeny *Bacillus thuringiensis* produkují endotoxinový proteiny (nebo proteiny), jakož i vegetativní insekticidní proteiny. Alternativně mohou takové kmeny produkovat pouze vegetativní insekticidní proteiny. U nesporulujícího kmenu *Bacillus subtilis* bylo zjištěno, že produkuje vysoká množství endotoxinu CryIIIA z *Bacillus thuringiensis* (Agaisse, H. a Lereclus, D., "Expression in *Bacillus subtilis* of the *Bacillus thuringiensis* CryIIIA toxin gene is not dependent on a sporulation-specific sigma factor and is increased in a spoOA mutant", *J. Bacteriol.*, 176: 4734 - 4741 (1994)). Podobný spoOA mutant lze připravit v případě *Bacillus thuringiensis* a použít jej pro produkci enkapsulovaných vegetativních insekticidních proteinů, které nejsou sekretovány do média ale jsou uchovávány v buňce.

Pro uchování vegetativních insekticidních proteinů v buňce mikroorganismu *Bacillus* lze signální peptid změnit tak, že již nepůsobí jako sekreční signál. Konkrétně předpokládaný signální peptid pro VIP1 zahrnuje prvních 31 aminokyselin proteinu s předpokládaným konvenčním místem štěpení, Ala-X-Ala, na C-konci této sekvence (G. von Heijne, *J. Mol. Biol.* 184: 99 - 105 (1989)) a předpokládaný signální peptid pro VIP2 zahrnuje prvních 40 aminokyselin proteinu s předpokládaným místem štěpení za Ala40. Místa štěpení buď ve VIP1 nebo VIP2 lze mutovat pomocí způsobů známých v oboru pro

nahrazení konvenční sekvence místa štěpení alternativními aminokyselinami, které nejsou rozpoznávány signálními peptidasami.

Alternativně lze signální peptidy VIP1, VIP2 nebo/a jiných VIP podle vynálezu eliminovat ze sekvence, čímž se způsobí, že nejsou rozpoznatelné jako sekreční proteiny v mikroorganismech rodu *Bacillus*. Konkrétně lze za použití způsobů známých v oboru před proproteinovou sekvencí ve VIP1, začínající Asp32, nebo proproteinovou sekvencí ve VIP2, začínající Glu41, zařadit methioninové iniciační místo.

Geny pro vegetativní insekticidní proteiny lze introdukovat do mikroorganismů, které se rozmnožují na rostlinách (epifytů), pro dodání vegetativních insekticidních proteinů potenciálním škůdcům, kteří mají být kontrolováni. Epifyty mohou být například Gram-pozitivní nebo Gram-negativní bakterie.

Kmeny rodu *Bacillus* podle vynálezu, nebo mikroorganismy, které byly geneticky změněny tak, aby obsahovaly pesticidní gen a protein, lze použít na ochranu zemědělských plodin a produktů před škůdci. Podle jednoho provedení vynálezu se celé, t.j. nelyzované, buňky organismu produkujícího toxin (pesticid) ošetří činnidly, které prodlužují účinnost toxinu produkovaného v buňce když je buňka aplikována na životní prostředí škůdce nebo škůdců, kteří mají být kontrolováni.

Alternativně se pesticidy produkují pomocí introdukce heterologního genu do buněčného hostitele. Exprese heterologního genu způsobuje přímo nebo nepřímo intracelulární produkci a uchovávání pesticidu. Tyto buňky se poté ošetří za podmínek, které prodlužují účinnost toxinu produkovaného v buňce když je buňka aplikována na životní prostředí škůdce nebo škůdců, kteří mají být kontrolováni. Výsledný produkt si uchovává toxicitu toxinu. Takové přirozeně enkapsulované

pesticidy lze poté formulovat podle běžných technik pro aplikaci na prostředí obsahující škůdce, který má být kontrolován, například půdu, vodu, a listy rostlin, viz například EPA 0192319, a odkazy tam citované.

Účinné látky podle vynálezu se normálně aplikují ve formě prostředků, a lze je aplikovat na stanoviště plodiny nebo na rostlinu, která má být ošetřena, současně nebo postupně s jinými sloučeninami. Těmito sloučeninami mohou být hnojiva nebo látky dodávající mikroprvky nebo jiné přípravky, které ovlivňují růst rostlin. Může jít rovněž o selektivní herbicidy, insekticidy, fungicidy, baktericidy, nematocidy, moluskocidy nebo směsi několika z těchto přípravků, v případě potřeby spolu s dalšími zemědělsky přijatelnými nosiči, povrchově aktivními činidly nebo pomocnými látkami zlepšujícími aplikaci, běžně používanými při vytváření prostředků. Vhodné nosiče a pomocné látky mohou být pevné nebo kapalné a jsou jimi látky běžně používané při vytváření prostředků, například přírodní nebo regenerované minerální látky, rozpouštědla, dispergátory, smáčedla, látky způsobující lepivost, pojidla nebo hnojiva.

Výhodnými způsoby aplikace účinné látky podle vynálezu nebo agrochemického prostředku podle vynálezu, který obsahuje alespoň jeden z pro hmyz specifických proteinů produkovaných bakteriálními kmeny podle vynálezu, jsou aplikace na listy, obalování semen a půdní aplikace. Počet dávek a aplikační dávka závisí na intenzitě zamoření odpovídajícím škůdcem.

Vynález se tedy dále týká insekticidního prostředku, který obsahuje jako účinnou látku alespoň jeden z nových pro hmyz specifických proteinů podle vynálezu nebo/a rekombinantní mikroorganismus obsahující alespoň jednu molekulu DNA, která obsahuje nukleotidovou sekvenci kódující nové pro hmyz specifické proteiny v rekombinantní formě, zejména však rekombinantní kmen *Bacillus* spp, jako je *Bacillus cereus* nebo *Bacillus thuringiensis*, obsahující alespoň jednu molekulu

DNA, která obsahuje nukleotidovou sekvenci kódující nové pro hmyz specifické proteiny v rekombinantní formě, nebo jejich derivát nebo mutant, spolu se zemědělskou nosnou nebo pomocnou látkou, jako je nosič, ředidlo, povrchově aktivní látka nebo pomocná látka zlepšující aplikaci. Tento prostředek může rovněž obsahovat další biologicky účinnou sloučeninu. Uvedenými sloučeninami mohou být hnojiva nebo látky dodávající mikroprvky nebo jiné přípravky, které ovlivňují růst rostlin. Může jít rovněž o selektivní herbicidy, insekticidy, fungicidy, baktericidy, nematocidy, moluskocidy nebo směsi několika z těchto přípravků, v případě potřeby spolu s dalšími zemědělsky přijatelnými nosiči, povrchově aktivními činidly nebo pomocnými látkami zlepšujícími aplikaci, běžně používanými při vytváření prostředků. Vhodné nosiče a pomocné látky mohou být pevné nebo kapalné a jsou jimi látky běžně používané při vytváření prostředků, například přírodní nebo regenerované minerální látky, rozpouštědla, dispergátory, smáčedla, látky způsobující lepivost, pojidla nebo hnojiva.

Prostředek může obsahovat od 0,1 do 99 % hmot. účinné látky, od 1 do 99,9 % hmot. pevné nebo kapalné nosné nebo pomocné látky a od 0 do 25 % hmot. povrchově aktivní látky. Účinnou látku, která obsahuje alespoň jeden z nových pro hmyz specifických proteinů podle vynálezu nebo rekombinantní mikroorganismus obsahující alespoň jednu molekulu DNA, která obsahuje nukleotidovou sekvenci kódující nové pro hmyz specifické proteiny v rekombinantní formě, zejména však rekombinantní kmen *Bacillus* spp, jako je kmen *Bacillus cereus* nebo *Bacillus thuringiensis*, obsahující alespoň jednu molekulu DNA, která obsahuje nukleotidovou sekvenci kódující nové pro hmyz specifické proteiny v rekombinantní formě, nebo jejich derivát nebo mutant, nebo prostředek obsahující uvedenou účinnou látku, lze na rostliny nebo plodiny, které mají být chráněny, aplikovat spolu s určitými jinými insekticidy nebo chemikáliemi (1993 Crop Protection Chemicals

Reference, Chemical and Pharmaceutical Press, Kanada) bez ztráty účinnosti. Tyto látky a prostředky jsou kompatibilní s většinou jiných materiálů běžně používaných pro postřiky v zemědělství, neměly by však být používány v extrémně alkalických postřikových roztocích. Lze je aplikovat ve formě poprašků, suspenzí, smáčitelných prášků nebo v libovolné jiné formě vhodné pro použití v zemědělství.

Vynález dále popisuje způsoby kontroly nebo inhibice hmyzích škůdců, při kterých se aplikuje účinná látka, která obsahuje alespoň jeden z nových pro hmyz specifických proteinů podle vynálezu nebo rekombinantní mikroorganismus obsahující alespoň jednu molekulu DNA, která obsahuje nukleotidovou sekvenci kódující nové pro hmyz specifické proteiny v rekombinantní formě, nebo prostředek obsahující uvedenou účinnou látku, na

- (a) prostředí, ve kterém se může hmyzí škůdce vyskytovat,
- (b) rostlinu nebo část rostliny za účelem ochrany uvedené rostliny nebo části rostliny před poškozením způsobeným hmyzím škůdcem, nebo
- (c) semeno za účelem ochrany rostliny, které se z uvedeného semena vyvine, před poškozením způsobeným hmyzím škůdcem.

Výhodným způsobem aplikace v oboru ochrany rostlin je aplikace na listy rostlin (listová aplikace), přičemž počet dávek a aplikační dávka závisí na rostlině, která má být chráněna, a riziku napadení daným škůdcem. Účinná látka se však může dostat do rostliny rovněž kořenem (systémové působení), pokud se na stanoviště rostliny aplikuje kapalná formulace nebo pokud se účinná látka zapracuje v pevné formě na stanoviště rostliny, například do půdy, například ve formě granulí (půdní aplikace). Při záplavovém pěstování rýže lze takovéto granule aplikovat v odměřených množstvích na

zaplavené rýžové pole.

Prostředky podle vynálezu jsou rovněž vhodné na ochranu rostlinného rozmnožovacího materiálu, například semen, jako jsou plody, hlízy nebo zrna, nebo rostlinných řízků, proti živočišným škůdcům. Rozmnožovací materiál lze tímto prostředkem ošetřit před vysetím či vysázením, například semena lze obalovat před setím. Účinnou látku podle vynálezu lze rovněž aplikovat na zrní (obalování, moření), a to tak, že se na zrní buď aplikuje kapalný prostředek nebo se obalí pevným prostředkem. Prostředek lze rovněž aplikovat na místo setí nebo sázení ve chvíli setí nebo sázení rozmnožovacího materiálu, například do secí brázdy během setí. Vynález rovněž zahrnuje tyto způsoby ošetření rostlinného rozmnožovacího materiálu a rostlinný rozmnožovací materiál, který byl takto ošetřen.

Prostředky podle vynálezu, které obsahují jako účinnou látku rekombinantní mikroorganismus obsahující alespoň jeden z nových toxinových genů v rekombinantní formě, zejména však rekombinantní kmen *Bacillus* spp, jako je kmen *Bacillus cereus* nebo *Bacillus thuringiensis*, obsahující alespoň jednu molekulu DNA, která obsahuje nukleotidovou sekvenci kódující nové pro hmyz specifické proteiny v rekombinantní formě, nebo jejich derivát nebo mutant, lze aplikovat libovolným známým způsobem pro ošetření semen nebo půdy bakteriálními kmeny, viz například patent Spojených Států Amerických č. 4 863 866. Tyto kmeny poskytují účinnou biologickou ochranu dokonce i v případě, že mikroorganismus není živý. Výhodná je však aplikace živých mikroorganismů.

Mezi cílové plodiny, které mají být chráněny, patří v rámci vynálezu například následující druhy rostlin:

obiloviny (pšenice, ječmen, žito, oves, rýže, čirok a příbuzné plodiny), řepa (cukrová řepa a krmná řepa), trávy používané jako píce (srha říznačka, kostřavy a podobně),

ovocné plodiny rodící jádrové, peckové a měkké ovoce (jabloně, hrušně, švestky, broskvoně, mandloně, třešně, jahodník, maliník a ostružiník), luskoviny (fazol, čočka, hrách, soja), olejniný (řepka olejka, hořčice, mák, olivy, slunečnice, kokosovník, skočec, kakaovník, podzemnice olejná), tykvovité rostliny (okurky, dýně, melouny), přadné rostliny (bavlník, len, konopí, jutovník), rostliny produkující citrusové plody (pomeranče, citrony, grepy, mandarinky), zeleniny (špenát, hlávkový salát, chřest, zelí a jiné zeleniny z čeledi Brassicaceae, cibule, rajčata, brambory, paprika), vavřínovité rostliny (avokado, mrkev, skořicovník, kastrovník), opadavé stromy a konifery (například lípy, tisy, duby, olše, topoly, břízy, jedle, modřiny, borovice), a rostliny jako je kukuřice, tabák, ořešák, kávovník, cukrová třtina, čajovník, vinná réva, chmel, banánovník a kaučukovník, jakož i okrasné rostliny, včetně hvězdnicovitých (složnokvětých).

Rekombinantní kmen *Bacillus* spp, jako je kmen *Bacillus cereus* nebo *Bacillus thuringiensis*, obsahující alespoň jednu molekulu DNA, která obsahuje nukleotidovou sekvenci kódující nové pro hmyz specifické proteiny v rekombinantní formě, se obvykle aplikuje ve formě insekticidních prostředků, přičemž aplikaci lze provádět na pěstební plochu nebo rostlinu, která má být ošetřena, současně nebo postupně s dalšími biologicky účinnými sloučeninami. Těmito sloučeninami mohou být hnojiva nebo látky dodávající mikroprvky nebo jiné přípravky, které ovlivňují růst rostlin. Může jít rovněž o selektivní herbicidy, insekticidy, fungicidy, baktericidy, nematocidy, moluskocidy nebo směsi několika z těchto přípravků, v případě potřeby spolu s dalšími nosiči, povrchově aktivními činidly nebo pomocnými látkami zlepšujícími aplikaci, běžně používanými při vytváření prostředků.

Účinnou látku podle vynálezu lze použít v nemodifikované formě nebo spolu s libovolným vhodným zemědělsky

přijatelným nosičem. Takovýmito nosiči jsou nosné a pomocné látky obvykle používané při vytváření zemědělských prostředků, a účinné látky podle vynálezu se tedy formulují známým způsobem do formy emulgovatelných koncentrátů, roztíratelných past, roztoků pro přímý postřik nebo ředitelných roztoků, zředěných emulzí, smáčitelných prášků, rozpustných prášků, poprašků a granulí, a rovněž se mohou enkapsulovat, například do polymerních látek. Způsoby aplikace, jako postřik, zmlžování, poprašování, rozmetání nebo zalévání se, stejně jako typ prostředku, volí podle požadovaných výsledků a převládajících podmínek. Výhodné aplikační dávky se normálně pohybují od přibližně 50 g do přibližně 5 kg účinné látky na hektar, výhodně od přibližně 100 g do přibližně 2 kg účinné látky na hektar. Významné jsou aplikační dávky v rozmezí od přibližně 200 g do přibližně 1 kg účinné látky na hektar a od 200 g do 500 g účinné látky na hektar.

V případě obalování (moření) semen činí výhodné aplikační dávky 0,5 g až 1000 g účinné látky na 100 kg semen, výhodně 3 g až 100 g účinné látky na 100 kg semen nebo 10 g až 50 g účinné látky na 100 kg semen.

Vhodné nosiče a pomocné látky mohou být pevné nebo kapalné a jsou jimi látky běžně používané při vytváření prostředků, například přírodní nebo regenerované minerální látky, rozpouštědla, dispergátory, smáčedla, látky způsobující lepivost, pojidla nebo hnojiva. Formulace, t.j. insekticidní prostředky, přípravky nebo směsi obsahující rekombinantní kmen *Bacillus* spp, jako je kmen *Bacillus cereus* nebo *Bacillus thuringiensis*, obsahující alespoň jednu molekulu DNA, která obsahuje nukleotidovou sekvenci kódující nové pro hmyz specifické proteiny v rekombinantní formě, jako účinnou látku, nebo jeho kombinaci s jinými účinnými látkami, a popřípadě pevnou nebo kapalnou nosnou nebo pomocnou látku, se připraví známým způsobem, například homogenním mícháním nebo/a mletím účinných látek s aditivou, například rozpouš-

tědly, pevnými nosnými látkami a v některých případech povrchově aktivními sloučeninami (povrchově aktivními činidly, surfaktanty).

Jako rozpouštědla jsou vhodné následující látky: aromatické uhlovodíky, výhodně frakce obsahující 8 až 12 atomů uhlíku, například směsi xylenů nebo substituované naftaleny, ftaláty, jako je dibutylftalát nebo dioktylftalát, alifatické uhlovodíky, jako je cyklohexan nebo parafiny, alkoholy a glykoly a jejich ethery a estery, jako je ethanol, monomethyl- nebo monoethylether ethylenglykolu, ketony, jako je cyklohexanon, silně polární rozpouštědla, jako je N-methyl-2-pyrrolidon, dimethylsulfoxid nebo dimethylformamid, jakož i rostlinné oleje nebo epoxidované rostlinné oleje, jako je epoxidovaný kokosový olej nebo sojový olej, nebo voda.

Pevnými nosiči používanými například pro popraše a dispergovatelné prášky, jsou přírodní minerální plnidla, jako je kalcit, mastek, kaolin, montmorilonit nebo atapulgite. Pro zlepšení fyzikálních vlastností lze rovněž přidávat vysoko-disperzní kyselinu křemičitou nebo vysokodisperzní absorbující polymery. Vhodnými granulovanými adsorpčními nosiči jsou porézní typy materiálů, například pemza, cihlová drť, sepiolit nebo bentonit, a vhodnými nesorpčními nosiči jsou materiály jako je kalcit nebo písek. Kromě toho lze použít rovněž rozsáhlou řadu předem granulovaných materiálů anorganické nebo organické povahy, například zejména dolomit nebo rozmělněné rostlinné zbytky.

V závislosti na povaze účinné látky, která je začleňována do prostředku, jsou vhodnými povrchově aktivními sloučeninami neionogenní, kationická nebo/a anionická povrchově aktivní činidla, která vykazují dobré emulgační, dispergační a smáčivé vlastnosti. Rozumí se, že termín "povrchově aktivní činidlo" zahrnuje též směsi povrchově

aktivních činidel.

Vhodnými anionickými povrchově aktivními činidly mohou být jak ve vodě rozpustná mýdla tak ve vodě rozpustné syntetické povrchově aktivní sloučeniny. Vhodnými mýdly jsou soli alkalických kovů, soli kovů alkalických zemin nebo nesubstituované nebo substituované amoniové soli vyšších mastných kyselin (obsahujících 10 až 22 atomů uhlíku), například sodné nebo draselné soli olejové nebo stearové kyseliny, nebo přírodních směsí mastných kyselin, které lze získat například z kokosového oleje nebo lojového oleje. Dalšími vhodnými povrchově aktivními činidly jsou rovněž soli mastných kyselin a methyлтаaurinu, jakož i modifikované a nemodifikované fosfolipidy.

Častěji se však používají tak zvané syntetické povrchově aktivní látky, zejména mastné sulfonáty, mastné sulfáty, sulfonované benzimidazolderiváty nebo alkylarylsulfonáty. Mastné sulfonáty nebo sulfáty jsou zpravidla ve formě solí s alkalickými kovy, solí s kovy alkalických zemin nebo nesubstituovaných nebo substituovaných amoniových solí, a obecně obsahují alkylový zbytek s 8 až 22 atomy uhlíku, který zahrnuje rovněž alkylovou část acylových zbytků, například sem patří sodná nebo vápenatá sůl kyseliny lignosulfonové, dodecylsulfátů nebo směsí mastných alkoholsulfátů získaných z přírodních mastných kyselin. Mezi tyto sloučeniny patří rovněž soli esterů kyseliny sírové a sulfonové kyseliny adičních produktů mastných alkoholů s ethylenoxidem. Sulfonované benzimidazolderiváty výhodně obsahují dvě sulfonylové skupiny a jeden zbytek mastné kyseliny obsahující přibližně 8 až 22 atomů uhlíku. Mezi příklady alkylarylsulfonátů patří například sůl sodíku, vápníku nebo triethanolaminu a dodecylbenzensulfonové kyseliny, dibutylnaftalensulfonové kyseliny nebo kondenzačního produktu kyseliny naftalensulfonové a formaldehydu. Vhodné jsou rovněž odpovídající fosfáty, například soli

esterů kyseliny fosforečné a aduktů p-nonylphenolu se 4 až 14 mol ethylenoxidu.

Neionogenními povrchově aktivními látkami jsou výhodně polyglykoetherderiváty alifatických nebo cykloalifatických alkoholů, nasycených nebo nenasycených mastných kyselin a alkylfenolů, kteréžto deriváty obsahují 3 až 30 glykoetherových skupin a 8 až 20 atomů uhlíku v (alifatickém) uhlovodíkovém zbytku a 6 až 18 atomů uhlíku v alkylovém zbytku alkylfenolů.

Dalšími vhodnými neionogenními povrchově aktivními látkami jsou ve vodě rozpustné adiční produkty polyethylenoxidu s polypropylenglykolem, ethylendiaminopolypropylenglykolem a alkylpolypropylenglykolem s 1 až 10 atomy uhlíku v alkylovém řetězci, obsahující 20 až 250 ethylenglykoetherových skupin a 10 až 100 propylenglykoetherových skupin. Tyto sloučeniny obsahují obvykle na jednotku propylenglykolu 1 až 5 jednotek ethylenglykolu. Jako reprezentativní příklady neionogenních povrchově aktivních látek je možno uvést nonylphenolpolyethoxyethanoly, polyglykoethery ricinového oleje, adiční produkty polypropylenu a polyethylenoxidu, tributylfenoxypolyethoxyethanol, polyethylenglykol a oktylfenoxypolyethoxyethanol. Vhodnými neionogenními povrchově aktivními látkami jsou rovněž estery mastných kyselin a polyoxyethylensorbitanu, jako je polyoxyethylen-sorbitan-trioleát.

Kationickými povrchově aktivními látkami jsou výhodně kvarterní amoniové soli, které jako substituent dusíkového atomu obsahují alespoň jeden alkylový zbytek s 8 až 22 atomy uhlíku, a jako další substituenty nižší, nesubstituované nebo halogenované, alkylové skupiny, benzylové skupiny, nebo nižší hydroxyalkylové skupiny. Tyto soli jsou výhodně ve formě halogenidů, methylsulfátů nebo ethylsulfátů, jako je například stearyltrimethylamoniumchlorid nebo benzyldi(2-

-chlorethyl)ethylamoniumbromid.

Povrchově aktivní látky běžně používané při vytváření prostředků, jsou popsány například v publikacích "McCutcheon's Detergents and Emulsifiers Annual", MC Publishing Corp., Ridgewood, New Jersey, 1979, a Dr. Helmut Stache "Tensid Taschenbuch", Carl Hanser Verlag, Mnichov/Vídeň.

Další zejména výhodnou vlastností insekticidního prostředku podle vynálezu je stálost účinné látky pokud je aplikován na rostliny a půdu. Mezi možné příčiny ztráty účinnosti patří inaktivace ultrafialovým světlem, teplem, listovými exudáty a pH. Například při vysokém pH, zejména za přítomnosti redukčního činidla, krystaly δ -endotoxinů solubilizují a tím se stávají přístupnější proteolytické inaktivaci. Významné může být i vysoké pH listů, zejména pokud může mít povrch listů pH v rozmezí 8 - 10. U formulací insekticidního prostředku podle vynálezu je možné se s těmito problémy vypořádat buďto přidáním aditiv napomáhajících zabránění ztráty účinné látky nebo enkapsulací materiálu takovým způsobem, že je účinná látka chráněna proti inaktivaci. Enkapsulaci lze provést chemicky (McGuire a Shasha, J Econ Entomol 85: 1425 - 1433, 1992) nebo biologicky (Barnes a Cummings, 1986; EP-A 0 192 319). Mezi způsoby chemické enkapsulace patří postupy, při kterých je účinná látka obalena polymerem, zatímco biologická enkapsulace zahrnuje expresi genů δ -endotoxinů v mikrobech. V případě biologické enkapsulace se jako účinná složka formulace použije nepoškozený mikrob, který obsahuje alespoň jednu molekulu DNA obsahující nukleotidovou sekvenci, která kóduje nové pro hmyz specifické proteiny v rekombinantní formě. Přidáním činidel chránících proti účinkům UV-záření se může účinně snížit poškození zářením. Inaktivaci teplem lze rovněž kontrolovat přidáním vhodného aditiva.

Výhodné jsou v rámci vynálezu formulace, které obsahují jako účinnou složku živé mikroorganismy, buď ve formě

vegetativní buňky nebo výhodněji ve formě spor, pokud jsou v daném případě dostupné. Vhodné formulace mohou být tvořeny například polymerními gely, které jsou zesíťené polyvalentními kationty a obsahují uvedené mikroorganismy, jak popsali například D. R. Fravel a kol. v *Phytopathology*, svazek 75, č. 7, 774 - 777, 1985 za použití alginátu jako polymerního materiálu. Z této publikace je rovněž známo, že lze používat společně více nosných materiálů. Uvedené formulace se zpravidla připravují mícháním roztoků v přírodě se vyskytujících nebo syntetických polymerů tvořících gely, například alginátů, a vodných roztoků solí polyvalentních iontů kovů tak, že se vytvoří jednotlivé kapičky, přičemž mikroorganismy mohou být suspendovány v jednom ze dvou uvedených reakčních roztoků nebo v obou těchto roztocích. Tvorba gelu začíná při míchání ve formě kapiček. Tyto částice gelu lze následně vysušit. Tento proces se nazývá ionotropní gelovatění. V závislosti na stupni vysušení se vytvoří kompaktní a tvrdé částice polymerů, které jsou strukturně zesíťeny polyvalentními kationty a které obsahují mikroorganismy a nosič v převážně rovnoměrném rozmístění. Velikost částic může být až do 5 mm.

EP-A1-0 097 571 popisuje prostředky na bázi částečně zesíťených polysacharidů které, kromě toho že obsahují mikroorganismy, mohou obsahovat rovněž například jemně zrnitou kyselinu křemičitou jako nosný materiál a zesíťení lze provést například ionty Ca^{++} . Tyto prostředky vykazují vodní aktivitu nepřesahující hodnotu 0,3. Cornick a kol. popisují v shrnujícím článku (*New Directions in Biological Control: Alternatives for Suppressing Agricultural Pests and Diseases*, str. 345 - 372, Alan R. Liss, Inc. (1990)) různé formulační systémy, přičemž jsou zmíněny granule s vermikulitem jako nosičem a kompaktní alginátové kuličky připravené způsobem ionotropního gelovatění. Takové prostředky popsal rovněž D. R. Fravel v *Pesticide Formulations and Application Systems*: 11. svazek, ASTM STP 1112 American

Society for Testing and Materials, Philadelphia, 1992, str. 173 - 179 a lze je použít pro formulaci rekombinantních mikroorganismů podle vynálezu.

Insekticidní prostředky podle vynálezu obsahují obvykle od přibližně 0,1 do přibližně 99 %, výhodně přibližně 0,1 až přibližně 95 % a nejvýhodněji přibližně 3 až přibližně 90 % účinné látky, přibližně 1 až přibližně 99,9 %, výhodně přibližně 1 až přibližně 99 % a nejvýhodněji přibližně 5 až přibližně 95 % pevného nebo kapalného aditiva, a přibližně 0 až přibližně 25 %, výhodně přibližně 0,1 až přibližně 25 % a nejvýhodněji přibližně 0,1 až přibližně 20 % povrchově aktivního činidla.

Podle výhodného provedení vynálezu obsahují insekticidní prostředky obvykle 0,1 až 99 %, výhodně 0,1 až 95 % rekombinantního kmene *Bacillus* spp, jako je kmen *Bacillus cereus* nebo *Bacillus thuringiensis*, který obsahuje alespoň jednu molekulu DNA obsahující nukleotidovou sekvenci, která kóduje nové pro hmyz specifické proteiny v rekombinantní formě, nebo jeho kombinace s jinými účinnými látkami, 1 až 99,9 % pevného nebo kapalného aditiva, a 0 až 25 %, výhodně 0,1 až 20 % povrchově aktivního činidla.

Zatímco komerční produkty se obvykle vyrábějí jako koncentráty, konečný spotřebitel obvykle používá zředěné formulace s podstatně nižší koncentrací. Insekticidní prostředky mohou obsahovat také další složky, jako stabilizátory, činidla proti pění, látky regulující viskozitu, pojidla, činidla způsobující lepivost, jakož i hnojiva nebo jiné účinné látky pro dosažení speciálních efektů.

Podle jednoho provedení vynálezu byl izolován mikroorganismus *Bacillus cereus*, který je schopen usmrctvat *Diabrotica virgifera virgifera* a *Diabrotica longicornis barberi*. Nový kmen *Bacillus cereus* AB78 byl uložen v patentové sbírce kultur Agricultural Research Service, Patent

Culture Collection (NRRL), Northern Regional Research Center, 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604, USA, a bylo mu přiděleno přírůstkové číslo NRRL B-21058.

Z tohoto kmene *Bacillus cereus* byl v podstatě purifikován frakční protein. Tato purifikace proteinu byla ověřena pomocí elektroforézy v SDS-polyakrylamidovém gelu a biologické účinnosti. Protein má molekulovou hmotnost přibližně 60 až přibližně 100 kDa, zejména přibližně 70 až přibližně 90 kDa, obzvláště přibližně 80 kDa a je označován VIP.

Sekvenováním od konce s volnou aminoskupinou bylo zjištěno, že N-koncovou aminokyselinovou sekvencí je NH₂-Lys-Arg-Glu-Ile-Asp-Glu-Asp-Thr-Asp-Thr-Asx-Gly-Asp-Ser-Ile-Pro- (SEQ ID č. 8), kde zbytek Asx představuje buďto Asp nebo Asn. Celá aminokyselinová sekvence je uvedena v SEQ ID č. 7. DNA-sekvence, která kóduje aminokyselinovou sekvenci SEQ ID č. 7 je uvedena v SEQ ID č. 6.

Byla vytvořena oligonukleotidová sonda pro oblast genu kódující aminokyseliny 3 - 9 NH₂-konce. Sonda byla syntetizována na bázi použití kodónů genu pro δ -endotoxin z *Bacillus thuringiensis* (Bt). Nukleotidová sekvence oligonukleotidové sondy použité pro Southernovu hybridizaci byla následující:

5'-GAA ATT GAT CAA GAT ACN GAT-3' (SEQ ID č. 9)

kde N představuje libovolnou bázi.

Kromě toho, zde popsáná DNA-sonda pro gen Bc AB78 VIP1 umožňuje screening libovolného kmene *Bacillus* nebo jiných organismů pro stanovení, zda je v nich přirozeně přítomen gen VIP1 (nebo příbuzný gen), nebo zda konkrétní transformovaný organismus obsahuje gen VIP1.

Pro lepší pochopení vynálezu obecně popsaného výše slouží následující podrobné příklady, které jsou uvedeny

pouze pro ilustraci a vynález se jimi v žádném směru neomezuje, pokud není uvedeno jinak.

Byla vytvořena standardní nomenklatura založená na sekvenční identitě proteinů spadajících do rozsahu vynálezu. Níže jsou uvedena označení genů a proteinů používaná v následujících příkladech a jejich vztah k označením používaným v související základní přihlášce US 314594/08.

označení genu nebo proteinu podle standardní nomenklatury	označení genu nebo proteinu v základní přihlášce US 314594/08	popis proteinu
VIP1A(a)	VIP1	VIP1 z kmene AB78 uvede v sekvenci SEQ ID č. 5
VIP2A(a)	VIP2	VIP2 z kmene AB78 uvede v sekvenci SEQ ID č. 2
VIP1A(b)	homolog VIP1	VIP1 z <i>Bacillus</i> <i>thuringiensis</i> var. <i>tenebrionis</i> uvedený v sekvenci SEQ ID č. 21
VIP2A(b)	homolog VIP2	VIP2 z <i>Bacillus</i> <i>thuringiensis</i> var. <i>tenebrionis</i> uvedený v sekvenci SEQ ID č. 20
VIP3A(a)	-	VIP z kmene AB88 uvedený sekvenci SEQ ID č. 28 té přihlášky
VIP3A(b)	-	VIP z kmene AB424 uvede v sekvenci SEQ ID č. 3 této přihlášky

Příklady provedení vynálezu

Příklady formulací

Účinnými látkami používanými v následujících příkladech formulací jsou kmen *Bacillus cereus* s přírůstkovým číslem NRRL B-21058, kmeny *Bacillus thuringiensis* s přírůstkovými čísly NRRL B-21060, NRRL B-21224, NRRL B-21225, NRRL B-21226, NRRL B-21227 a NRRL B-21439, a kmeny *Bacillus* spp s přírůstkovými čísly NRRL B-21228, NRRL B-21229, NRRL B-21230. Všechny uvedené kmeny jsou kmeny izolovanými z přírody, které obsahují pro hmyz specifické proteiny podle vynálezu.

Alternativně se používají jako účinné látky izolované pro hmyz specifické proteiny samotné nebo v kombinaci s výše uvedenými kmeny rodu *Bacillus*.

A1. Smáčitelné prášky

	a)	b)	c)
spory <i>Bacillus thuringiensis</i>	25 %	50 %	75 %
lignosulfonát sodný	5 %	5 %	-
laurylsulfát sodný	3 %	-	5 %
diisobutylnaftalensulfonát sodný	-	6 %	10 %
oktylfenolpolyethylenglykolether (7 - 8 mol ethylenoxidu)	-	2 %	-
vysokodisperzní kyselina křemičitá	5 %	10 %	10 %
kaolin	62 %	27 %	-

Spory se důkladně promíchají s aditivou a směs se dobře rozemele ve vhodném mlýnu, čímž se získají smáčitelné prášky, které lze ředit vodou na suspenze libovolných požadovaných koncentrací.

A2. Emulgovatelný koncentrát

spory <i>Bacillus thuringiensis</i>	10 %
oktylfenolpolyethylenglykoether (4 - 5 mol ethylenoxidu)	3 %
dodecylbenzensulfonát vápenatý	3 %
polyglykoether ricinového oleje (35 mol ethylenoxidu)	4 %
cyklohexanon	30 %
směs xylenu	50 %

Z tohoto koncentrátu lze naředěním vodou získat emulze libovolné požadované koncentrace.

A3. Popraše

	a)	b)
spory <i>Bacillus thuringiensis</i>	5 %	8 %
mastek	95 %	-
kaolin	-	92 %

Popraše vhodné k okamžitému použití se získají smícháním účinné látky s nosiči a rozemletím směsi ve vhodném mlýnu.

A4. Vytlačované granule

spory <i>Bacillus thuringiensis</i>	10 %
lignosulfonát sodný	2 %
karboxymethylcelulosa	1 %
kaolin	87 %

Účinná látka nebo kombinace se smíchá a rozemele s aditivy, a směs se poté navlhčí vodou. Tato směs se vytlačuje, granuluje a poté se vysuší v proudu vzduchu.

A5. Obalované granule

spory <i>Bacillus thuringiensis</i>	3 %
polyethylenglykol o molekulové hmotnosti 200	3 %
kaolin	94 %

Účinná látka nebo kombinace se v míchačce rovnoměrně nanese na kaolin navlhčený polyethylenglykolem. Tímto způsobem se získá neprášící obalovaný granulát.

A6. Suspenzní koncentrát

spory <i>Bacillus thuringiensis</i>	40 %
ethylenglykol	10 %
nonylfenolpolyethylenglykoether (15 mol ethylenoxidu)	6 %
lignosulfonát sodný	10 %
karboxymethylcelulosa	1 %
37% vodný roztok formaldehydu	0,2 %
silikonový olej ve formě 75% vodného roztoku	0,8 %
voda	32 %

Účinná látka nebo kombinace se důkladně promíchá s aditivy, čímž se získá suspenzní koncentrát, ze kterého lze naředěním vodou připravit suspenze libovolné požadované koncentrace.

Příklad 1

Izolace a charakterizace AB78

Kmen *Bacillus cereus* AB78 byl izolován jako mikroorganismus kontaminující destičky v laboratoři na mediu T3 (na litr: 3 g tryptonu, 2 g tryptosu, 1,5 g kvasničného extraktu, 0,05 M fosforečnanu sodného (pH 6,8) a 0,005 g chloridu man-

ganatého; Travers, R. S., 1983). Během logaritmické fáze růstu vykazuje AB78 podstatnou účinnost proti *Diabrotica virgifera virgifera*. Byla rovněž zjištěna antibiotická aktivita proti Gram-pozitivnímu *Bacillus* spp. (tabulka 12).

Tabulka 12

Antibiotická aktivita supernatantu kultury AB78

Testovaná bakterie	zóna inhibice (v cm)	
	AB78	Streptomycin
<i>Escherichia coli</i>	0,0	3,0
<i>Bacillus megaterium</i>	1,1	2,2
<i>Bacillus mycoides</i>	1,3	2,1
<i>Bacillus cereus</i> CB	1,0	2,0
<i>Bacillus cereus</i> 11950	1,3	2,1
<i>Bacillus cereus</i> 14579	1,0	2,4
<i>Bacillus cereus</i> AB78	0,0	2,2
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	1,1	2,2
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>tenebrionis</i>	0,9	2,3

Morfologické charakteristiky AB78 jsou následující:

Vegetativní vlákna jsou rovná, dlouhá 3,1 - 5,0 mm a široká 0,5 - 2,0 mm. Buňky mají zakulacené konce, jsou jednotlivé v krátkých řetězcích. Na buňku se vytváří jediná subterminální válcovitě-oválná endospora. Nevytváří se parasporální krystal. Kolonie jsou neprůhledné, nepravidelně zoubkované, lalokovité a ploché. Nevytváří pigmenty. Buňky jsou pohyblivé. Jsou přítomné bičíky.

Růstové charakteristiky AB78 jsou následující:

Mikroorganismus je fakultativně anaerobní s optimální teplotou pro růst 21 - 30 °C. Roste při teplotě 15, 20, 25, 30 a 37 °C. Neroste při teplotě přes 40 °C. Rostě v 5 - 7% chloridu sodném.

Tabulka 13 obsahuje biochemické údaje o AB78.

Tabulka 13

Biochemické charakteristiky kmene *Bacillus cereus* AB78

kyselina z L-arabinosy	-	zpětná oxidace methylenové	
plyn z L-arabinosy	-	modři	+
kyselina z D-xylosy	-	redukce nitrátu	+
plyn z D-xyloxy	-	redukce NO ₃ na NO ₂	+
kyselina z D-glukosy	+	VP	+
plyn z D-glukosy	-	rozklad H ₂ O ₂	+
kyselina z laktosy	-	indol	-
plyn z laktosy	-	rozklad tyrosinu	+
kyselina ze sacharosy	-	dihydroxyaceton	-
plyn ze sacharosy	-	lakmusové mléko kyselé	-
kyselina z D-manitolu	-	lakmusové mléko koagulované	-
plyn z D-manitolu	-	lakmusové mléko alkalické	-
využití propionátu	+	lakmusové mléko peptonizované	-
využití citrátu	+	lakmusové mléko redukované	-
hydrolýza hippurátu	s	hydrolýza kaseinu	+
redukce methylenové modři	+	hydrolýza škrobu	+
produkce lecithinasy	s	zkapalnění želatiny	+

Legenda k tabulce 13:

s = slabá reakce

Příklad 2

Kultivace bakterií

Subkultura kmene *Bacillus cereus* AB78 byla použita k inokulaci následujícího media, známého jako TB-vývar (TB broth):

trypton	12 g / l
kvasničný extrakt	24 g / l
glycerol	4 ml / l
KH_2PO_4	2,1 g / l
K_2HPO_4	14,7 g / l
pH 7,4	

K autoklávovanému vývaru se po ochlazení přidá fosforečnan draselný. Baňky se inkubují při teplotě 30 °C na rotační třepačce při 250 otáčkách za minutu po dobu 24 hodin až 36 hodin, tedy do počáteční až střední logaritmické fáze růstu.

Výše uvedený postup lze za použití procedur známých v oboru snadno upravit do rozsahu potřebného pro velké fermentory.

V průběhu vegetativního růstu, obvykle 24 - 36 hodin po započetí kultivace, tedy do počáteční až střední logaritmické fáze růstu, byly bakterie AB78 centrifugovány ze supernatantu kultury. Supernatant kultury obsahující aktivní protein byl použit v biologických testech.

Příklad 3

Biologické testy na hmyzu

Kmen *Bacillus cereus* AB78 byl testován proti různým druhům hmyzu jak je popsáno níže.

Diabrotica virgifera virgifera, *Diabrotica longicornis barberi* respektive *Diabrotica undecimpunctata howardi*: připraví se ředění supernatantu kultury AB78 po 24- až 36-hodinové kultivaci, zředěný supernatant se smíchá s roztavenou umělou potravou (Marrone a kol. (1985) J. of Economic Entomology 78: 290 - 293) a nechá se ztuhnout. Ztuhlá potrava se nařeže a umístí se do misek. Čerstvě vylíhlé larvy se umístí na potravu a udržuje se teplota 30 °C. Mortalita se stanoví po uplynutí 6 dnů.

Biologické testy s klony *Escherichia coli*: buňky *Escherichia coli* se nechají růst přes noc ve vývaru obsahujícím 100 µg/ml ampicillinu při teplotě 37 °C. 10 ml kultury se sonikuje třikrát po dobu vždy 20 sekund. 500 µl sonikované kultury se přidá k roztavené potravě pro *Diabrotica virgifera virgifera*.

Leptinotarsa decemlineata: připraví se ředění supernatantu kultury AB78 pěstované po dobu 24 - 36 hodin v přípravku Triton X-100 tak, že konečná koncentrace činí 0,1 % TX-100. Kousky listů bramboru o ploše 5 cm² se ponoří do těchto roztoků, usuší se proudem vzduchu a umístí se na navlhčený filtrační papír v umělohmotových miskách. Čerstvě vylíhlé larvy se umístí na kousky listů a udržuje se teplota 30 °C. Mortalita se stanoví po uplynutí 3 - 5 dnů.

Tenebrio molitor: připraví se ředění supernatantu kultury AB78 po 24- až 36-hodinové kultivaci, zředěný

supernatant se smíchá s roztavenou umělou potravou (Bioserv č. F9240) a nechá se ztuhnout. Ztuhlá potrava se nařeže a umístí se do umělohmotových misek. Čerstvě vylíhlé larvy se umístí na potravu a udržuje se teplota 30 °C. Mortalita se stanoví po uplynutí 6 - 8 dnů.

Ostrinia nubilalis, *Agrotis ipsilon*, *Heliothis virescens*, *Maduca sexta* respektive *Spodoptera exigua*: připraví se ředění supernatantu kultury AB78 pěstované po dobu 24 - 36 hodin v přípravku Triton X-100 tak, že konečná koncentrace činí 0,1 % TX-100. 100 μ l se pipetuje na povrch 18 cm² ztuhlé umělé potravy (Bioserv č. F9240) a nechá se uschnout na vzduchu. Čerstvě vylíhlé larvy se poté umístí na povrch potravy a udržuje se teplota 30 °C. Mortalita se stanoví po uplynutí 3 - 6 dnů.

Culex pipiens: připraví se ředění supernatantu kultury AB78 po 24- až 36-hodinové kultivaci. 100 μ l se pipetuje do 10 ml vody v umělohmotové nádobě o objemu 30 ml. Do vody se přidají larvy ve stádiu třetího instaru a teplota se udržuje na teplotě místnosti. Mortalita se stanoví po uplynutí 24 - 48 dnů.

Spektrum insekticidní aktivity AB78 je uvedeno v tabulce 14

Tabulka 14

Účinnost supernatantu kultury AB78 proti různým hmyzím škůdcům

testovaný druh hmyzu	řád	účinnost
<i>Diabrotica virgifera virgifera</i>	Coleoptera	+++
<i>Diabrotica longicornis barberi</i>	Coleoptera	+++
<i>Diabrotica undecimpunctata howardi</i>	Coleoptera	-
<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Coleoptera	-
<i>Tenebrio molitor</i>	Coleoptera	-
<i>Ostrinia nubilalis</i>	Lepidoptera	-
<i>Heliothis virescens</i>	Lepidoptera	-
<i>Manduca sexta</i>	Lepidoptera	-
<i>Spodoptera exigua</i>	Lepidoptera	-
<i>Agrotis ipsilon</i>	Lepidoptera	-
<i>Culex pipiens</i>	Diptera	-

Nově nalezený kmen *Bacillus cereus* AB78 vykazuje podstatně odlišné spektrum insekticidní účinnosti ve srovnání se známými δ -endotoxiny z *Bacillus thuringiensis* účinnými proti broukům. AB78 zejména vykazuje selektivnější účinnost proti broukům než známé kmeny *Bacillus thuringiensis* účinné proti broukům, jelikož je specificky účinný proti *Diabrotica* spp. Přesněji, je nejúčinnější proti *Diabrotica virgifera virgifera* a *Diabrotica longicornis barberi*, ale nikoli proti *Diabrotica undecimpunctata howardi*.

U řady kmenů *Bacillus* byla biologicky testována jejich účinnost v průběhu vegetativního růstu proti *Diabrotica virgifera virgifera* - viz tabulka 15. Výsledky svědčí o tom,

že AB78 je jedinečný svou účinností proti *Diabrotica virgifera virgifera*, která není obecným jevem.

Tabulka 15

Účinnost supernatantů kultur různých kmenů *Bacillus* spp.
proti *Diabrotica virgifera virgifera*

kmen <i>Bacillus</i>	procento mortality <i>Diabrotica</i> <i>virgifera virgifera</i>
<i>Bacillus cereus</i> AB78 (Bat.1)	100
<i>Bacillus cereus</i> AB78 (Bat.2)	100
<i>Bacillus cereus</i> (Carolina Bio.)	12
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11950	12
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	8
<i>Bacillus mycoides</i> (Carolina Bio.)	30
<i>Bacillus popilliae</i>	28
<i>Bacillus thuringiensis</i> HD135	41
<i>Bacillus thuringiensis</i> HD191	9
<i>Bacillus thuringiensis</i> GC91	4
<i>Bacillus thuringiensis</i> israelensis	24
voda (kontrola)	4

Specifická účinnost AB78 proti *Diabrotica virgifera virgifera* je uvedena v tabulce 16.

Tabulka 16

Účinnost supernatantu kultury AB78 proti čerstvě narozeným
larvám *Diabrotica virgifera virgifera*

koncentrace supernatantu kultury (μ l / ml)	procento mortality <i>Diabrotica</i> <i>virgifera virgifera</i>
100	100
25	87
10	80
5	40
2,5	20
1	6
0	0

Bylo vypočítáno, že hodnota LC_{50} činí 6,2 μ l supernatantu kultury na ml potravy *Diabrotica virgifera virgifera*.

Byly prováděny rovněž biologické testy buněčné pelety a nebyla zjištěna žádná účinnost proti *Diabrotica virgifera virgifera*. Přítomnost účinnosti pouze v supernatantu tedy svědčí o tom, že tento vegetativní insekticidní protein je exotoxinem.

Příklad 4

Izolace a purifikace proteinů aktivních proti druhům rodu *Diabrotica* z AB78

Nasycení kultivačního media prostého buněk a zbytků buněk se upraví na 70 % přidáním 472 g / l pevného síranu amonného. Rozpuštění se provede při teplotě místnosti,

následuje ochlazení v ledové lázni a centrifugace při 10000 g po dobu 30 minut, čímž se získá peleta vysrážených proteinů. Supernatant se odstraní a peleta se rozpustí v jedné desetině původního objemu 20mM TRIS-HCl při pH 7,5. Rozpuštěná peleta se odsolí buďto dialýzou v 20mM TRIS-HCl při pH 7,5 nebo tak, že se nechá projít odsolovací kolonou.

Odsolený materiál se titruje na pH 3,5 za použití 20mM natirum-citrátu o pH 2,5. Po třicetiminutové inkubaci při teplotě místnosti se roztok centrifuguje při 3000 g po dobu 10 minut. Supernatant v této době obsahuje největší množství účinného proteinu.

Po neutralizaci pH na hodnotu 7,0 se supernatant nanese na anexovou kolonu Mono-Q ekvilibrovanou s 20mM TRIS o pH 7,5, s rychlostí průtoku 300 ml / min. Kolona se promývá postupným a lineárním gradientem za použití 400mM chloridu sodného v 20mM TRIS o pH 7,5.

Pro stanovení účinných frakcí se použijí biologické testy jednotlivých frakcí z kolony a elektroforéza v SDS-polyakrylamidovém gelu. Analýzou pomocí elektroforézy v SDS-polyakrylamidovém gelu se zjistí, že biologicky účinný protein má složky o molekulové hmotnosti v rozmezí přibližně 80 kDa a 50 kDa.

Příklad 5

Analýza sekvence proteinu účinného proti druhům rodu *Diabrotica*

Protein o molekulové hmotnosti 80 kDa izolovaný pomocí elektroforézy v SDS-polyakrylamidovém gelu se přenese na poly(vinylidenfluoridovou) membránu a podrobí se N-koncovému sekvenování prováděnému pomocí opakovaných Edmanových cyklů na sekvenátoru ABI 470 pulsed-liquid sequencer. Přenos se provádí v 10mM CAPS-pufu s 10 % methanolu o pH 11,0

následujícím způsobem:

Po dobu 5 minut se provádí inkubace gelu po elektroforéze v přenosovém pufu. Poly(vinylidenfluoridová) membrána ProBlott se krátce namočí 100% methanolem a poté se ekvilibruje v přenosovém pufu. Materiál se vrstevnatě uspořádá mezi pěnovými houbami a čtverečky filtračního papíru s uspořádáním katoda-gel-membrána-anoda.

Po dobu 1 hodiny se provádí přenos s konstantním napětím 70 V.

Po přenosu se membrána promyje vodou a barví se po dobu 2 minut 0,25% modří Coomassie Blue R-250 v 50% methanolu.

Odbarvení se provede několikerým promytím směsí obsahující 50 % methanolu, 40 % vody a 10 % kyseliny octové.

Po odbarvení se membrána usuší proudem vzduchu a poté se vyříznou pásy pro sekvenační analýzu. Pro dosažení maximální účinnosti a výtěžku se použije BlottCartridge a příslušné cykly. Provede se analýza údajů za použití softwaru model 610 Sequence Analysis pro identifikaci a kvantifikaci aminokyselin derivovaných fenylthiohydantoinem, v každém sekvenačním cyklu.

Bylo zjištěno, že N-koncová sekvence je následující:

NH₂-Lys-Arg-Glu-Ile-Asp-Glu-Asp-Thr-Asp-Thr-Asx-Gly-Asp-Ser-Ile-Pro- (SEQ ID č. 8), kde Asx znamená Asp nebo Asn. Úplná aminokyselinová sekvence složky o molekulové hmotnosti 80 kDa je uvedena v sekvenci SEQ ID č. 7. DNA-sekvence, která kóduje sekvenci SEQ ID č. 7 je uvedena v SEQ ID č. 6.

Příklad 6

Konstrukce DNA-sondy

Připraví se oligonukleotidová sonda pro oblast genu

kódující aminokyseliny 3 - 9 N-koncové sekvence (příklad 5). Sonda se syntetizuje na základě znalosti použití kodónů genu δ -endotoxinu z *Bacillus thuringiensis* (Bt). Jako sonda v Southernových hybridizacích se použije nukleotidová sekvence

5'-GAA ATT GAT CAA GAT ACN GAT-3' (SEQ ID č. 9)

Oligonukleotid se syntetizuje za použití standardních postupů a zařízení.

Příklad 7

Stanovení izoelektrického bodu proteinu účinného proti druhům rodu *Diabrotica*

Purifikovaný protein ze stupně 5 purifikačního postupu se analyzuje na 3 - 9 pI izoelektrickém fokusačním gelu za použití elektroforézního systému Phastgel (Pharmacia). Standardní postupy ovládání jednotky se použijí jak při separaci tak při vyvíjení obarvení stříbrem. Hodnota pI činí přibližně 4,9.

Příklad 8

Údaje o analýze AB78 pomocí polymerasové řetězové reakce (PCR)

Pro ověření, že kmen *Bacillus cereus* AB78 neobsahuje žádné geny insekticidních krystalických proteinů *Bacillus thuringiensis* nebo *Bacillus sphaericus* byla použita analýza pomocí polymerasové řetězové reakce (viz například patentová přihláška Spojených Států Amerických č. 08/008 006, a Carozzi a kol. (1991) Appl. Environ. Microbiol. 57 (11): 3057 až 3061). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 17.

Tabulka 17

Primery genů insekticidních krystalických proteinů *Bacillus*
testované pomocí polymerasové řetězové reakce proti
DNA z AB78

testované primery	produkován produkt
2 sady specifické pro CryIIIA	negativní
CryIIIB	negativní
2 sady specifické pro CryIA	negativní
CryIA(a)	negativní
specifický pro CryIA(b)	negativní
CryIB	negativní
specifický pro CryIC	negativní
specifický pro CryIE	negativní
2 sady specifické pro <i>Bacillus sphaericus</i>	negativní
2 sady specifické pro CryIV	negativní
kontrola <i>Bacillus</i> (PI-PLC)	pozitivní

Příklad 9

Klonování celkové DNA z kmene *Bacillus cereus* AB78 pomocí kosmidů

Gen VIP1A(a) byl klonován z celkové DNA připravené z kmene AB78 následujícím způsobem:

Izolace DNA z AB78 se provede následovně:

1. Bakterie se nechají růst přes noc v 10 ml media L-broth (za použití sterilní centrifugační zkumavky o objemu 50 ml).
2. Přidá se 25 ml čerstvého media L-broth a 30 μg / ml ampicillinu.
3. Buňky se nechají růst po dobu 2 - 6 hodin na třepačce při teplotě 30 °C.
4. Buňky se odstředí v polypropylenové kyvetě s oranžovým uzávěrem o objemu 50 ml ve stolní klinické centrifuze IEC při 3/4 rychlosti.
5. Peleta buněk se resuspenduje v 10 ml TES (TES = 50mM TRIS o pH 8,0, 100mM kyselina ethylendiamintetraoctová, 15mM chlorid sodný).
6. Přidá se 30 mg lysozymu a provede se inkubace po dobu 2 hodin při teplotě 37 °C.
7. Přidá se 200 μl 20% SDS (dodecylsulfátu sodného) a 400 μl zásobního roztoku Proteinasy K (20 mg / ml) a provádí se inkubace při teplotě 37 °C.
8. Přidá se 200 μl čerstvé Proteinasy K a provádí se inkubace po dobu 1 hodiny při teplotě 55 °C. Přidá se 5 ml TES pro dosažení konečného objemu 15 ml.
9. Provede se dvakrát fenolová extrakce (10 ml fenolu, centrifugace se provádí při teplotě místnosti při 3/4 rychlosti ve stolní klinické centrifuze IEC). Supernatant (vrchní část) se přenese do čisté zkumavky pomocí pipety s velkým průměrem.
10. Provede se jednou extrakce směsí, kterou tvoří v objemovém poměru 1 : 1 fenol a chloroform s isoamyl-

alkoholem (v poměru 24 : 1).

11. DNA se vysráží stejným objemem studeného isopropanolu. Proveďte se centrifugace, kterou se vytvoří peleta DNA.
12. Peleta se resuspenduje v 5 ml TE.
13. DNA se vysráží 0,5 ml 3M octanu sodného o pH 5,2 a 11 ml 95% ethanolu. Směs se umístí na 2 hodiny do -20 °C.
14. DNA se vyjme ze zkumavky umělohmotovým očkem, přenese se do kyvety pro mikrocentrifugaci, odstředí se, odpipetuje se nadbytek ethanolu, a vysuší se ve vakuu.
15. DNA se resuspenduje v 0,5 ml TE. Proveďte se inkubace po dobu 90 minut při teplotě 65 °C, pro usnadnění převedení DNA zpět do roztoku.
16. Za použití standardních postupů se stanoví koncentrace.

Klonování AB78 pomocí kosmidů:

Všechny postupy, pokud není uvedeno jinak, se provádějí podle instrukčního manuálu firmy Stratagene (Stratagene Protocol, Supercos 1 Instruction Manual, kat. č. 251301).

Obecně se provedou následující kroky:

- A. DNA AB78 se částečně rozštěpí Sau 3A.
- B. Připraví se vektorová DNA.
- C. Proveďte se ligace a packaging (sbalení) DNA.
- D. Vytvoří se kosmidová knihovna:
 1. Vytvoří se kultura buněk HB101 tak, že se umístí 50 ml kultury pěstované přes noc do 5 ml TB s 0,2 % maltosy. Kultura se inkubuje po dobu 3,5

hodiny při teplotě 37 °C.

2. Buňky se odstředí a resuspendují v 0,5 ml 10mM síranu hořečnatého.
3. Smíchá se :
100 ml buněk,
100 ml naředěné směsi se sbalenou DNA,
100 ml 10mM síranu hořečnatého,
30 ml TB.
4. Proveďte se adsorbce při teplotě místnosti po dobu 30 minut, přičemž se směs nemíchá.
5. Přidá se 1 ml TB a směs se mírně míchá. Provádí se inkubace po dobu 30 minut při teplotě 37 °C.
6. 200 ml se nanese na destičky L-amp. Provádí se inkubace při teplotě 37 °C přes noc.

Alespoň 400 kosmidových klonů bylo náhodně vybráno a byla u nich zkoumána účinnost proti *Diabrotica virgifera virgifera* jak je popsáno v příkladu 3. DNA z 5 účinných klonů a 5 neúčinných klonů byla použita pro Southernovy hybridizace. Výsledky svědčí o tom, že hybridizace za použití výše popsané oligonukleotidové sondy je v korelaci s účinností proti *Diabrotica virgifera virgifera* (viz tabulka 18).

Kosmidové klony P3-12 a P5-4 byly uloženy v patentové sbírce kultur Agricultural Research Service Patent Culture Collection (NRRL) a byla jim přidělena přírůstková čísla NRRL B-21061 respektive NRRL B-21059.

Tabulka 18

Účinnost kosmidových klonů AB78
proti *Diabrotica virgifera virgifera*

klon	průměrné procento mortality (N=4)
klony které hybridizují se sondou	
P1-73	47
P1-83	64
P2-2	69
P3-12	85
P5-4	97
klony které nehybridizují se sondou	
P1-2	5
P3-8	4
P3-9	12
P3-18	0
P4-6	9

Příklad 10

Identifikace oblasti o velikosti 6 kb účinné proti *Diabrotica virgifera virgifera*

DNA z P3-12 byla částečně rozštěpena pomocí restriční-
ho enzymu *Sau* 3A a ligována do vektoru pUC19 pro *Escherichia coli*, jímž byla transformována *Escherichia coli*. DNA-sonda specifická pro protein VIP1A(a) o molekulové hmotnosti 80 kDa

byla syntetizována amplifikací části DNA P3-12 pomocí polymerasové řetězové reakce (PCR). Za použití částečné aminokyselinové sekvence proteinu o molekulové hmotnosti 80 kDa byly syntetizovány oligonukleotidy MK113 a MK117, které hybridizují s částmi VIP1A(a). Kolonovou hybridizací se sondou vytvořenou pomocí polymerasové řetězové reakce byly identifikovány plazmidové subklony a testována jejich účinnost proti *Diabrotica virgifera virgifera*. Jeden z těchto klonů, PL2, hybridizuje s fragmentem vytvořeným pomocí polymerasové řetězové reakce, a je v dříve popsaném testu účinný proti *Diabrotica virgifera virgifera*.

Restrikční fragment Cla I o velikosti 6 kb z pL2 byl klonován do místa Sma I kyvadlového vektoru (shuttle vector) pHT 3101 pro *Escherichia coli* - *Bacillus* (Lereclus, D. a kol., FEMS Microbiology Letters 60: 211 - 218 (1989)), čímž byl získán pCIB6201. Tento konstrukt propůjčuje účinnost proti *Diabrotica virgifera virgifera* jak kmenům *Bacillus* tak *Escherichia coli*, v libovolné orientaci. pCIB6022 obsahuje stejný fragment Cla I o velikosti 6 kb ve vektoru pBluescript SK(+) (Stratagene), produkuje ekvivalentní protein VIP1A(a) (stanoveno pomocí western blottingu) a je rovněž účinný proti *Diabrotica virgifera virgifera*.

Nukleotidová sekvence pCIB6022 byla určena pomocí postupu využívajícího dideoxyribonukleotidů jako terminátorů reakce, který popsali Sanger a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 5463 - 5467 (1977), za použití sekvenačních souprav PRISM Ready Reaction Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit a sekvenační soupravy PRISM Sequenase Terminator Double-Stranded DNA Sequencing Kit, a analyzována na automatickém sekvenátoru ABI 373. Sekvence je uvedena jako SEQ ID č. 1. Fragment o velikosti 6 kb kóduje jak VIP1A(a) tak VIP2A(a), jak je zřejmé z otevřených čtecích rámců popsaných v sekvenci SEQ ID č. 1. Sekvence kódující VIP2A(a) je dále uvedena v SEQ ID č. 4. Vzájemný vztah VIP1A(a) a VIP2A(a) v rámci fragmentu

o velikosti 6 kb nacházejícího se v pCIB6022 je uveden v tabulce 19. pCIB6022 byl uložen v patentové sbírce kultur Agricultural Research Service, Patent Culture Collection (NRRL), Northern Regional Research Center, 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604, USA, a bylo mu přiděleno přírůstkové číslo NRRL B-21222.

Příklad 11

Funkční štěpení oblasti DNA VIP1A(a)

Pro ověření, že je otevřený čtecí rámec (ORF) VIP1A(a) nutný pro insekticidní účinnost, byla v genu vytvořena mutace měnící translační rámec. Restrikční enzym Bgl II poznává jedinečné místo umístěné 857 bp v kódující oblasti VIP1A(a). pCIB6201 byl rozštěpen Bgl II a jednovlákné konce doplněny DNA-polymerasou (Klenow fragmentem) a dNTP. Plazmid byl zpětně ligován a transformován do *Escherichia coli*. Výsledný plazmid, pCIB6203, obsahuje čtyři nukleotidové inzerce v kódující oblasti VIP1A(a). pCIB6203 nedodává insekticidní účinnost proti *Diabrotica virgifera virgifera*, což potvrzuje, že VIP1A(a) je nezbytnou složkou účinnosti proti *Diabrotica virgifera virgifera*.

Pro další definování oblasti nutné pro kódování VIP1A(a) byly zkonstruovány subklony VIP1A(a) a VIP2A(a) (pomocný protein) a byla testována jejich schopnost doplnit mutaci v pCIB6203. pCIB6203 obsahuje fragment Xba I - EcoRV o velikosti 3,7 kb ve vektoru pBluescript SK(+) (Stratagene). Analýza pomocí western blottingu svědčí o tom, že pCIB6203 produkuje protein VIP1A(a) o stejné velikosti a ve stejném množství jako klony PL2 a pCIB6022. pCIB6203 obsahuje celý gen kódující protein o molekulové hmotnosti 80 kDa. pCIB6203 byl uložen v patentové sbírce kultur Agricultural Research Service, Patent Culture Collection (NRRL), Northern Regional Research Center, 1815 North University Street, Peoria,

Illinois 61604, USA, a bylo mu přiděleno přírůstkové číslo NRRL B-21223N. pCIB6206 obsahuje fragment Xba I - Cla I o velikosti 4,3 kb z pCIB6022 ve vektoru pBluescript SK(+) (Stratagene). pCIB6206 byl rovněž uložen v patentové sbírce kultur Agricultural Research Service, Patent Culture Collection (NRRL), Northern Regional Research Center, 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604, USA, a bylo mu přiděleno přírůstkové číslo NRRL B-21321.

pCIB6023, pCIB6206 a pCIB6203 nevykazují při odděleném testování detekovatelnou účinností proti *Diabrotica virgifera virgifera*. Avšak směs buněk obsahujících pCIB6203 (mutovaný VIP1A(a) plus VIP2A(a)) a buněk obsahujících pCIB6023 (pouze VIP1A(a)) vykazuje vysokou účinnost proti *Diabrotica virgifera virgifera*. Podobně vykazuje vysokou účinnost proti *Diabrotica virgifera virgifera* směs buněk obsahujících pCIB6206 a buněk obsahujících pCIB6203.

Pro další definování možností VIP2A(a) byl zkonstruován pCIB6024, který obsahuje celou oblast kódující VIP2A(a), ale postrádá většinu oblasti kódující VIP1A(a). pCIB6024 byl zkonstruován gelovou purifikací restričního fragmentu Cla I - Sca I o velikosti 2,2 kb z pCIB6022, doplněním jednovlákných konců DNA-polymerasou (Klenow fragmentem) a dNTP a ligací tohoto fragmentu do vektoru pBluescript SK(+) (Stratagene) rozštěpeného enzymem Eco RV. Buňky obsahující pCIB6024 nevykazují žádnou účinnost proti *Diabrotica virgifera virgifera*. Směs buněk obsahujících pCIB6024 a buněk obsahujících pCIB6023 však vykazuje vysokou účinnost proti *Diabrotica virgifera virgifera* (viz tabulka 19).

pCIB6023 a pCIB6206 tedy musí produkovat funkční produkt genu VIP1A(a), zatímco pCIB6203 a pCIB6204 musí produkovat funkční produkt genu VIP2A(a). Tyto výsledky svědčí o tom, že je pro dodání maximální účinnosti proti *Diabrotica virgifera virgifera* nutný genový produkt (nebo produkty) z oblasti VIP2A(a), v kombinaci s VIP1A(a) (viz

tabulka 19).

Tabulka 19

Charakterizace pCIB6022

	účinnost proti Dv
	pCIB6022 +++
	pCIB6203 -
	pCIB6023 -
	pCIB6206 -
	pCIB6024 -

Funkční komplementace vegetativních insekticidních proteinů
(VIP)

	účinnost proti Dv
	pCIB6203 +++
	pCIB6023 +++
	pCIB6203 +++
	pCIB6206 +++
	pCIB6023 +++
	pCIB6024 +++

Legenda k tabulce 19:

Dvv = *Diabrotica virgifera virgifera*

Oblasti v rámečcích představují rozsah VIP1A(a) a VIP2A(a). Bílý rámeček označuje oblast VIP1 kódující peptid o molekulové hmotnosti 80 kDa pozorovaný u *Bacillus*. Tmavý rámeček představuje N-koncový "propeptid" VIP1A(a) předpokládaný analýzou DNA-sekvence. Vytečkovaný rámeček představuje oblast kódující VIP2A(a). Velké "X" znázorňuje umístění mutace měnící čtecí rámec (posunové mutace) zavedené do VIP1A(a). Šipky představují konstrukty transkribované beta-galaktosidázovým promotorem. Restrikční místa: C - Cla I; X - Xba I; S - Sca I; RI - Eco RI; B - Bgl II; RV - Eco RV.

Příklad 12

Tvorba protilátek proti AB78

Ve 2 Lewisových krysách byla vyvolána tvorba protilátek jednak za účelem umožnit budoucí tvorbu hybridomových buněčných linií, jednak rovněž vytvořit dostatečné množství séra pro omezený screening genomové DNA-knihovny. Dalším faktorem bylo velmi omezené dostupné množství antigenu a skutečnost, že jej bylo možné produkovat v čisté formě pouze pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu a následného elektrotransferu na nitrocelulosu.

Vzhledem k omezené dostupnosti antigenu na nitrocelulose byla nitrocelulosa emulgována v dimethylsulfoxidu a injikována do zadních tlapek zvířat pro vyvolání produkce B-buněk v podkolenních mizních uzlinách bezprostředně proti proudu krve. Pomocí western-analýzy při prvním produkčním odběru krve bylo zjištěno, že je produkováno silně reagující sérum. Pomocí několika následných injekcí a odběrů krve bylo vytvořeno dostatečné množství séra pro provedení všech

požadovaných screeningů.

Poté byla u jedné z krys vyvolána tvorba hybridomu. Podkolenní mízní uzlina byla vyříznuta, macerována, a výsledné buňky fúzovány s myším myelomem P3x63Ag8.653. Následující vyhledávací test buněk byl proveden jak je popsáno níže. Čtyři původní jamky, které vykazovaly nejvyšší reakci na emulgovaný antigen, byly vybrány pro přenesení ke klonování v omezeném zředění. Dalších 10 jamek bylo vybráno pro expanzi a kryoprezervaci.

Postup emulgace AB78 na nitrocelulose v dimethylsulfoxidu pro screening pomocí ELISA-testu:

Po elektrotransferu vzorků AB78 rozdělených elektroforézou v polyakrylamidovém gelu na nitrocelulosu se použije pro vizualizaci veškerého přeneseného proteinu reverzibilní Ponceau S. Pás odpovídající toxinu AB78, dříve identifikovanému a sekvenovanému od N-konce, se identifikuje a vyřízne z nitrocelulosy. Každý pás má rozměry přibližně 1 mm x 5 mm za účelem minimalizace množství emulgované nitrocelulosy. Jediný pás se umístí do mikrocentrifugační kyvety s 250 μ l dimethylsulfoxidu a maceruje se za použití umělohmotového tloučku (Kontes, Vineland, New Jersey, USA). Pro usnadnění emulgace se směs s dimethylsulfoxidem zahřívá po dobu 2 až 3 minut na teplotu 37 °C až 45 °C. Po zahřátí může být nutná určitá další macerace, všechnu nitrocelulosu je však třeba emulgovat. Jakmile je vzorek AB78 emulgován, umístí se na led. Při přípravě k nanesení na mikrotitrační desky s emulgovaným antigenem se vzorek musí naředit v borátem pufrovaném fyziologickém roztoku v následujících poměrech: 1 : 5, 1 : 10, 1 : 15, 1 : 20, 1 : 30, 1 : 50, 1 : 100, a 0. Antigen pro nanesení na desky musí být připraven čerstvý bezprostředně před použitím.

Protokol ELISA-testu:

1. Nanese se AB78 v dimethylsulfoxidu naředěný v borátem pufrovaném fyziologickém roztoku. Proveďte se inkubace přes noc při teplotě 4 °C.
2. Desky se 3x omyjí 1x omývacím pufrem pro ELISA-test.
3. Provádí se blokování (1 % BSA a 0,05 % povrchově aktivního činidla Tween 20 ve fyziologickém roztoku pufrovaném fosfátovým pufrem) po dobu 30 minut při teplotě místnosti.
4. Desky se 3x omyjí 1x omývacím pufrem pro ELISA-test.
5. Přidá se krysí sérum a provede se inkubace po dobu 1,5 hodiny při teplotě 37 °C.
6. Desky se 3x omyjí 1x omývacím pufrem pro ELISA-test.
7. Přidá se kozí protikrysí v koncentraci 2 µg / ml v ředidle pro ELISA-test. Proveďte se inkubace po dobu 1 hodiny při teplotě 37 °C.
8. Desky se 3x omyjí 1x omývacím pufrem pro ELISA-test.
9. Přidá se králičí protikozí alkalická fosfatasa v koncentraci 2 µg / ml v ředidle pro ELISA-test. Proveďte se inkubace po dobu 1 hodiny při teplotě 37 °C.
10. Desky se 3x omyjí 1x omývacím pufrem pro ELISA-test.
11. Přidá se substrát a provede se inkubace po dobu 30 minut při teplotě místnosti.
12. Test se zastaví po 30 minutách 3N hydroxidem sodným.

Příprava antiséra proti VIP2A(a)

Částečně purifikovaný supernatant kultury AB78 se rozdělí nekontinuální elektroforesou v SDS-polyakrylamidovém gelu (Novex) podle pokynů výrobce. Rozdělené proteiny se

elektroforeticky přenesou na nitrocelulosu (S&S č. 21640), jak popsali Towbin a kol. (1979). Nitrocelulosa se obarví pomocí Ponceau S a identifikuje se pás VIP2A(a). Pás VIP2A(a) se vyřízne a emulguje v dimethylsulfoxidu bezprostředně před injekcí. Králík se nejprve imunizuje emulgovaným VIP2A(a) smíchaným v poměru přibližně 1 : 1 s Freundovými kompletním adjuvantem intramuskulární injekcí na čtyřech různých místech. Následné imunizace se provádějí v čtyřtýdenních intervalech a jsou identické jako první imunizace, s tím rozdílem, že se použije Freundovo nekompletní adjuvans. První sérum získané pro imunizaci reagovalo s proteinem VIP2A(a). Analýzou supernatantu kultury AB78 pomocí western blottingu za použití tohoto antiséra se identifikuje převážně protein VIP2A(a) o plné délce.

Příklad 13

Aktivace insekticidní účinnosti neúčinných kmenů *Bacillus thuringiensis* pomocí klonů VIP AB78

Přidání pCIB6203 spolu se supernatantem kultury rostoucí po dobu 24 hodin (počáteční až střední logaritmická fáze) z kmene *Bacillus thuringiensis* GC91 způsobuje 100% mortalitu u *Diabrotica virgifera virgifera*. Ani pCIB6203 ani GC91 není samotný účinný proti *Diabrotica virgifera virgifera*. Údaje jsou uvedeny níže:

testovaný materiál	procento mortality <i>Diabrotica</i>
pCIB6203	0
GC91	16
pCIB6203 + GC91	100
kontrola	0

Příklad 14

Izolace a biologická účinnost kmene *Bacillus cereus* AB81

Druhý kmen *Bacillus cereus*, označený AB81, byl izolován ze vzorků prachu z obilního zásobníku pomocí standardních postupů. Subkultura AB81 byla pěstována a připravena pro biologický test jak je popsáno v příkladu 2. Biologická účinnost byla stanovena jak je popsáno v příkladu 3. Výsledky jsou následující:

testované druhy hmyzu	procento mortality
<i>Ostrinia nubilalis</i>	0
<i>Agrotis ipsilon</i>	0
<i>Diabrotica virgifera virgifera</i>	55

Příklad 15

Izolace a biologická účinnost kmene *Bacillus thuringiensis* AB6

Kmen *Bacillus thuringiensis*, označený AB6, byl izolován ze vzorků prachu z obilního zásobníku pomocí standardních postupů známých v oboru. Subkultura AB6 byla pěstována a připravena pro biologický test jak je popsáno v příkladu 2. Polovina vzorku byla autoklávována po dobu 15 minut pro testování přítomnosti β -exotoxinu.

Biologická účinnost byla stanovena jak je popsáno v příkladu 3. Výsledky jsou následující:

testované druhy hmyzu	procento mortality
<i>Ostrinia nubilalis</i>	0
<i>Agrotis ipsilon</i>	100
<i>Agrotis ipsilon</i> (autoklávovaný vzorek)	0
<i>Diabrotica virgifera virgifera</i>	0

Snížení insekticidní účinnosti supernatantu kultury na nepodstatné hodnoty pomocí autoklávování svědčí o tom, že účinnou látkou není β -exotoxin.

Kmen AB6 byl uložen v patentové sbírce kultur Agricultural Research Service, Patent Culture Collection (NRRL), Northern Regional Research Center, 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604, USA, a bylo mu přiděleno přírůstkové číslo NRRL B-21060.

Příklad 16

Izolace a biologická charakterizace kmene *Bacillus thuringiensis* AB88

Kmen *Bacillus thuringiensis*, označený AB88, byl izolován ze vzorků prachu z obilního zásobníku pomocí standardních postupů. Subkultura AB88 byla pěstována a připravena pro biologický test jak je popsáno v příkladu 2. Polovina vzorku byla autoklávována po dobu 15 minut pro testování přítomnosti β -exotoxinu. Biologická účinnost proti řadě druhů hmyzu byla stanovena jak je popsáno v příkladu 3. Výsledky jsou následující:

testované druhy hmyzu	řád	procento mortality v případě supernatantu kultury	
		neautoklávova- ného	autoklávova- ného
Agrotis ipsilon	Lepidoptera	100	5
Ostrinia nubilalis	Lepidoptera	100	0
Spodoptera frugiperda	Lepidoptera	100	4
Helicoverpa zea	Lepidoptera	100	12
Heliothis virescens	Lepidoptera	100	12
Leptinotarsa			
decemlineata	Coleoptera	0	0
Diabrotica virgifera			
virgifera	Coleoptera	0	5

Snížení insekticidní účinnosti supernatantu kultury na nepodstatné hodnoty pomocí autoklávování svědčí o tom, že účinnou látkou není β -exotoxin.

Krystaly δ -endotoxinu byly purifikovány z kmene AB88 za použití standardních postupů. Při biologických testech proti *Agrotis ipsilon* nebyla u čistých krystalů pozorována žádná účinnost.

Příklad 17

Purifikace vegetativních insekticidních proteinů z kmene AB88

Kapalná kultura bakterií byla nechána růst přes noc při teplotě 30 °C v TB-mediu. Buňky byly odcentrifugovány při

5000 g za 20 minut a byl odebrán supernatant. Proteiny přítomné v supernatantu byly vysráženy síranem amonným (70% nasycení), centrifugovány při 5000 g po dobu 15 minut a byla odebrána peleta. Tato peleta byla resuspendována v původním objemu 20mM Tris o pH 7,5 a dialyzován přes noc proti stejnému pufru při teplotě 4 °C. Dialyzát AB88 byl zakalenější než srovnatelný materiál z AB78. Dialyzát byl titrován na pH 4,5 za použití 20mM natrium-citrátu o pH 2,5 a po 30-minutové inkubaci při teplotě místnosti byl roztok centrifugován při 3000 g po dobu 10 minut. Proteinová peleta byla znovu rozpuštěna ve 20mM Bis-Tris-propanu o pH 9,0.

Po vyčerpání byly separovány proteiny AB88 pomocí několika různých metod, včetně izoelektrické fokusace (Rotofor, BioRad, Hercules, Kalifornie, UDSA), precipitace při pH 4,5, chromatografie na iontoměničích, vytěšňovací chromatografie a ultrafiltrace.

Proteiny byly separovány na anexové koloně Poros HQ/N (PerSeptive Biosystems, Cambridge, MA, USA) za použití lineárního gradientu od 0 do 500mM chloridu sodného ve 20mM Bis-Tris-propanu o pH 9,0 s rychlostí průtoku 4 ml za minutu. Insekticidní protein se vymýval při 250mM koncentraci chloridu sodného.

Protein účinný proti *Ostrinia nubilalis* zůstal v peletě získané pomocí precipitace dialyzátu při pH 4,5. Po provedení preparativní izoelektrické fokusace dialyzátu za použití amfolytů pH 3 - 10 byla nalezena insekticidní účinnost proti *Ostrinia nubilalis* ve všech frakcích s pH 7 nebo vyšším. Pomocí elektroforézy těchto frakcí v SDS-polyakrylamidovém gelu byly nalezeny pásy proteinů o molekulové hmotnosti přibližně 60 kDa a přibližně 80 kDa. Pásy 60 kDa a 80 kDa byly odděleny pomocí anexové vysoceúčinné kapalinové chromatografie na koloně Poros-Q (PerSeptive Biosystems, Cambridge, MA, USA). N-koncová sekvence byla získána ze dvou

frakcí obsahujících proteiny které se mírně lišily molekulovou hmotností, oba však měly velikost přibližně 60 kDa. Získané sekvence si byly navzájem podobné a rovněž byly podobné některým δ -endotoxinům.

anexová frakce 23 (menší): xEPFVSAxxxQxxx (SEQ ID č. 10)

anexová frakce 28 (větší): xEYENVEPFVSAx (SEQ ID č. 11)

Pokud byla peleta účinná proti *Ostrinia nubilalis* získaná precipitací dialyzátu při pH 4,5 dále dělena pomocí anexové kolony Poros-Q, byla účinnost nalezena pouze ve frakcích s hlavním pásem o molekulové hmotnosti přibližně 60 kDa.

Protein účinný proti *Agrotis ipsilon* rovněž zůstával v peletě při okyselení dialyzátu AB88 na pH 4,5. Při preparativní isoelektrické fokusaci za použití amfolytů pH 3 - 10 nebyla účinnost zjištěna ve frakcích účinných proti *Ostrinia nubilalis*, místo toho byla nejvyšší ve frakci o pH 4,5 - 5,0. Její hlavní složky měly molekulovou hmotnost přibližně 35 kDa a přibližně 80 kDa.

Peleta s pH 4,5 byla rozdělena pomocí anexové vysoceúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), čímž byly získány frakce obsahující pouze materiál o molekulové hmotnosti 35 kDa a frakce obsahující jak pásy o molekulové hmotnosti 35 kDa tak 80 kDa.

Příklad 18

Charakterizace vegetativních insekticidních proteinů AB88

Frakce obsahující vegetativní proteiny účinné proti různým druhům motýlů byly vytvořeny jak je popsáno v příkladu 17. Frakce vykazující insekticidní účinnost byly rozděleny v 8 až 16% SDS-polyakrylamidových gelech a přeneseny na poly(vinylidenfluoridové) membrány (LeGendre a kol. (1989) v

A Practical Guide to Protein and Peptide Purification for Microsequencing, ed. Matsudaria PT (Academic Press Inc., New York, USA). Biologická analýza frakcí svědčí o tom, že za účinnost proti různým druhům z řádu motýlů jsou zodpovědné různé vegetativní insekticidní proteiny (VIP).

Účinnost proti *Agrotis ipsilon* je způsobena proteinem o molekulové hmotnosti 80 kDa nebo/a proteinem o molekulové hmotnosti 35 kDa, podanými buď jednotlivě nebo v kombinaci. Tyto proteiny nejsou příbuzné žádným δ -endotoxinům z *Bacillus thuringiensis*, což dokazuje neexistence sekvenční homologie se známými sekvencemi δ -endotoxinů z *Bacillus thuringiensis*. Insekticidní protein vip3A(a) z kmene AB88 je přítomen hlavně (alespoň 75 % z celkového množství) v supernatanech kultur AB88.

Tyto proteiny se rovněž nenacházejí v δ -endotoxinovém krystalu AB88. N-koncové sekvence hlavních δ -endotoxinových proteinů byly srovnány s N-koncovými sekvencemi vegetativních insekticidních proteinů o molekulové hmotnosti 80 kDa a 35 kDa a nevykazují žádnou sekvenční homologii. N-koncová sekvence insekticidního proteinu vip3A(a) obsahuje řadu kladně nabitých zbytků (od Asn2 do Asn7) následovaných hydrofobní základní oblastí (od Thr8 do Ile34). Na rozdíl od většiny známých sekrečních proteinů není insekticidní protein vip3A(a) z kmene AB88 v průběhu exportu upravován na N-konci.

Výsledky jsou shrnuty níže:

N-koncové sekvence vegetativních insekticidních proteinů z <i>Agrotis</i>	N-koncová sekvence hlavních δ-endotoxinových proteinů
	130 kDa MDNNPNINE (SEQ ID č. 14)
80 kDa MNKNNTKLPTRALP (SEQ ID č. 12)	80 kDa MDNNPNINE (SEQ ID č. 15)
	60kDa MNVLNSGRITTI (SEQ ID č. 16)
35 kDa ALSENTGKDGGYIVP (SEQ ID č. 13)	

Účinnost proti *Ostrinia nubilalis* je způsobena vegetativním insekticidním proteinem o molekulové hmotnosti 60 kDa a účinnost proti *Spodoptera frugiperda* je způsobena vegetativním insekticidním proteinem neznámé velikosti.

Kmen *Bacillus thuringiensis* AB88 byl uložen v patentové sbírce kultur Agricultural Research Service, Patent Culture Collection (NRRL), Northern Regional Research Center, 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604, USA, a bylo mu přiděleno přírůstkové číslo NRRL B-21225.

Příklad 18A

Izolace a biologická účinnost kmene *Bacillus thuringiensis* AB424

Kmen *Bacillus thuringiensis*, označený AB424, byl izolován z mechem porostlé borové šišky pomocí standardních postupů známých v oboru. Subkultura AB424 byla pěstována a připravena pro biologický test jak je popsáno v příkladu 2.

Biologická účinnost byla stanovena jak je popsáno v příkladu 3. Výsledky jsou následující:

č.j.	023207
Došlo	25. III. 97
URAD PRŮMYSLového VLASTNICTVÍ	Příl.

testované druhy hmyzu	procento mortality
<i>Ostrinia nubilalis</i>	100
<i>Agrotis ipsilon</i>	100
<i>Diabrotica virgifera virgifera</i>	0

Kmen AB424 byl uložen v patentové sbírce kultur Agricultural Research Service, Patent Culture Collection (NRRL), Northern Regional Research Center, 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604, USA, a bylo mu přiděleno přírůstkové číslo NRRL B-21439.

Příklad 18B

Klonování genů VIP3A(a) a VIP3A(b), které kódují proteinů účinné proti *Agrotis ipsilon*

Celková DNA z izolátů AB88 a AB424 byla izolována (Ausubel a kol. (1988), v: Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, New York, USA)), rozštěpena restričními enzymy XbaI (knihovna XbaI-fragmentů velikostně frakcionovaných na 4,0 až 5,0 kb z DNA *Bacillus thuringiensis* AB88) respektive EcoRI (knihovna EcoRI-fragmentů velikostně frakcionovaných na 4,5 až 6,0 kb z DNA *Bacillus thuringiensis* AB424), ligována do vektoru pBluescript předem linearizovaného stejnými enzymy a defosforylovaného, a transformována do kmene *Escherichia coli* DH5α. Rekombinantní klony byly blotovány na nitroceluloseové filtry, které byly následně analyzovány za použití sondy, kterou byl ³²P-značený oligonukleotid o délce 33 bází odpovídající 11 N-koncovým aminokyselinám proteinu o molekulové hmotnosti 80 kDa účinného proti *Agrotis ipsilon*. Hybridizace byla prováděna při teplotě 42 °C v 2x SSC s 0,1 % dodecylsulfátu sodného

(1x SSC = 0,15M chlorid sodný a 0,015M natrium-citrát, pH 7,4) po dobu 5 minut a dvakrát při teplotě 50 °C v 1x SSC s 0,1 % dodecylsulfátu sodného po dobu 10 minut. Čtyři ze 400 rekombinantních klonů byly pozitivní. V biologických testech na hmyzu vykazovaly pozitivní rekombinanty srovnatelnou toxicitu pro larvy *Agrotis ipsilon* jako supernatanty AB88 nebo AB424.

Plazmid pCIB7104 obsahuje XbaI-fragment z DNA AB88 o velikosti 4,5 kb. Byly zkonstruovány subklony pro stanovení oblasti kódující insekticidní protein.

Escherichia coli pCIB7105 byl zkonstruován klonováním fragmentu XbaI-AccI o velikosti 3,5 kb z pCIB7104 do vektoru pBluescript.

Plazmid pCIB7106 obsahoval EcoRI-fragment o velikosti 5,0 kb z DNA AB424. Tento fragment byl dále rozštěpen HincII za vzniku inzertu EcoRI-HincII o velikosti 2,8 kb (pCIB7107), který stále kódoval funkční insekticidní protein.

Nukleotidová sekvence pCIB7104, pozitivního rekombinantního klonu z AB88, a pCIB7107, pozitivního rekombinantního klonu z AB424, byla stanovena pomocí postupu využívajícího dideoxyribonukleotidů jako terminátorů reakce, který popsali Sanger a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 5463 - 5467 (1977), za použití sekvenačních souprav PRISM Ready Reaction Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit a sekvenační soupravy PRISM Sequenase Terminator Double-Stranded DNA Sequencing Kit, a analyzována na automatickém sekvenátoru ABI 373.

Klon pCIB7104 obsahuje gen VIP3A(a), jehož kódující oblast je uvedena v sekvenci SEQ ID č. 28. Sekvence kódovaného proteinu je uvedena v SEQ ID č. 29. Syntetická verze kódující oblasti vytvořená tak, aby byla vysoce exprimována v kukuřici, je uvedena v SEQ ID č. 30. Na základě aminokyselinové sekvence uvedeně v SEQ ID č. 29 lze vytvořit

libovolný počet syntetických genů.

Klon pCIB7107 obsahuje gen VIP3A(b), jehož kódující oblast je uvedena v sekvenci SEQ ID č. 31. Sekvence kódovaného proteinu je uvedena v SEQ ID č. 32.

Jak pCIB7104 tak pCIB7107 byl uložen v patentové sbírce kultur Agricultural Research Service Patent Culture Collection (NRRL), a byla jim přidělena přírůstková čísla NRRL B-21422 respektive B-21423.

Gen VIP3A(a) obsahuje otevřený čtecí rámec (ORF), který sahá od nukleotidu 732 do nukleotidu 3105. Tento otevřený čtecí rámec kóduje peptid o délce 791 aminokyselin, s molekulovou hmotností odpovídající 88500 daltonům. Shine-Dalgarnova sekvence (SD) je umístěna 6 bází před prvním methioninem a její sekvence svědčí o tom, že se jedná o silnou Shine-Dalgarnovu sekvenci pro *Bacillus*.

Gen VIP3A(b) je z 98 % identický s VIP3A(a).

Při zkoumání blotů celkové DNA izolované z buněk *Bacillus thuringiensis* AB88 pomocí sondy, kterou je fragment o velikosti 33 bází odpovídající N-koncové oblasti insekticidního proteinu VIP3A, lze ve vzorcích štěpených různými restrikcími enzymy pozorovat jediné pásy. Tento výsledek byl potvrzen za použití větších sond odpovídajících kódující oblasti genu. Rešerší v databázi GenBank nebyla zjištěna žádná homologie se známými proteiny.

Příklad 18C

Expresse insekticidních proteinů VIP3A

Časový průběh exprese insekticidního proteinu VIP3A(a) byl analyzován pomocí western blottingu. Vzorky kultur *Bacillus thuringiensis* AB88 byly odebírány během celé růstové křivky a sporulace. Insekticidní protein VIP3A(a) lze

detekovat v supernatantech kultur AB88 během logaritmické fáze, již 15 hodin po založení kultury. Jeho obsah dosahuje maximální hodnoty během počátečních stádií stacionární fáze a zůstává vysoký během sporulace a po ní. Podobných výsledků bylo dosaženo při použití supernatantů kultur *Bacillus cereus* AB424. Hladiny insekticidního proteinu VIP3A(a) odrážejí expresi genu VIP3A(a), jak se stanoví northern blottingem. Počátek sporulace byl stanoven přímým mikroskopickým pozorováním a analýzou přítomnosti δ -endotoxinů v buněčných peletách. Proteiny typu Cry-I lze detekovat v pozdních stádiích stacionární fáze, během sporulace a po ní.

Příklad 18D

Identifikace nových genů podobných VIP3 pomocí hybridizace

Pro identifikaci kmenů *Bacillus* obsahujících geny příbuzné VIP3A(a) z izolátu AB88 byla pomocí hybridizace zkoumána sada izolátů *Bacillus*. Kultury 463 kmenů rodu *Bacillus* byly pěstovány v mikrotitračních jamkách až do sporulace. Pro přenesení kultur na 150 mm desky obsahující L-agar bylo použito zařízení s 96 hroty. Inokulované desky byly uchovávány při teplotě 30 °C po dobu 10 hodin a poté při teplotě 4 °C přes noc. Kolonie byly přeneseny na nylonové filtry a analyzovány sondou, kterou byl HindIII-fragment o velikosti 1,2 kb získaný z VIP3A(a). Hybridizace byla prováděna přes noc při teplotě 62 °C za použití hybridizačních podmínek, které uvádějí Maniatis a kol. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982). Filtry byly promyty 2x SSC s 0,1 % dodecylsulfátu sodného (SDS) při teplotě 62 °C a exponovány na film citlivý na rentgenové záření.

Ze zkoumaných 463 kmenů rodu *Bacillus* obsahovalo 60 kmenů geny podobné VIP3, které bylo možné detekovat hybridizací. Další charakterizací některých z nich (AB6 a

AB426) se zjistilo, že jejich supernatanty obsahují insekticidní proteiny podobné proteinu VIP3, účinné proti *Agrotis ipsilon*.

Příklad 18E

Charakterizace kmene *Bacillus thuringiensis* M2194 obsahujícího kryptický gen podobný VIP3

O kmenu *Bacillus thuringiensis*, označeném M2194, bylo zjištěno, že obsahuje gen (nebo geny) podobné VIP3, pomocí kolonové hybridizace jak je popsána v příkladu 18C. Má se za to, že gen z M2194 podobný VIP3 je kryptický, jelikož během růstových fází bakterie nelze detekovat žádnou expresi, ať už pomocí imunoblotační analýzy za použití polyklonálních protilátek vytvořených proti proteinu VIP3A(a) izolovanému z AB88 nebo pomocí biologického testu, jak je popsán v příkladu 3.

Antisérum proti purifikovanému insekticidnímu proteinu VIP3A(a) bylo vytvořeno v králících. 50 μ g proteinu navázaného na nitrocelulosu bylo rozpuštěno v dimethylsulfoxidu a emulgováno s Freundovým kompletním adjuvans (Difco). Dvěma králíkům byly dávány subkutánní inekce každý měsíc po dobu 3 měsíců. Byla jim odebrána krev 10 dnů po druhé a třetí injekci a ze vzorku krve bylo získáno sérum (Harlow a kol. (1988) v: *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Lab Press, Plainview, New York, USA)).

Gen z M2194 podobný VIP3 byl klonován do pKS za použití postupu popsaného v příkladu 9, čímž byl získán pCIB7108. *Escherichia coli* obsahující pCIB7108, který obsahuje gen VIP3 z M2194, byla účinná proti *Agrotis ipsilon*, což svědčí o tom, že tento gen kóduje funkční protein s insekticidní účinností. Plazmid pCIB7108 byl uložen v patentové sbírce kultur Agricultural Research Service Patent Culture

Collection (NRRL), a bylo mu přiděleno přírůstkové číslo NRRL B-21438.

Příklad 18F

Insekticidní účinnost proteinů VIP3A

Spektrum účinnosti insekticidních proteinů VIP3A bylo kvalitativně stanoveno v biologických testech na hmyzu, ve kterých larvy pozřely rekombinantní *Escherichia coli* nesoucí geny VIP⁺A. V těchto testech byly buňky nesoucí geny VIP3A(a) a VIP3A(b) insekticidní pro *Agrotis ipsilon*, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera exigua*, *Heliothis virescens* a *Helicoverpa zea*. Za stejných pokusných podmínek nevykazovaly bakteriální extrakty obsahující proteiny VIP3A žádnou účinnost proti *Ostrinia nubilalis*.

Účinek insekticidních proteinů VIP⁺A na larvy *Agrotis ipsilon*

materiál použitý pro test	mortalita (v %)
TB-medium	5
supernatant AB88	100
supernatant AB424	100
pufr	7
<i>Escherichia coli</i> pKS	10
<i>Escherichia coli</i> pCIB7104 (AB88)	100
<i>Escherichia coli</i> pCIB7105 (AB88)	100
<i>Escherichia coli</i> pCIB7106 (AB424)	100
<i>Escherichia coli</i> pCIB7107 (AB424)	100

Účinek insekticidních proteinů VIP3A
na larvy hmyzu z řádu motýlů

materiál použitý pro test	hmyz	mortalita (%)
Escherichia coli pKS	AI	10
	SF	5
	SE	10
	HV	8
	HZ	10
	ON	5
Escherichia coli pCIB7105		
Escherichia coli pCIB7107	AI	100
	SF	100
	SE	100
	HV	100
	HZ	50
	ON	10

Legenda:

AI = Agrotis ipsilon, SF = Spodoptera frugiperda,
SE = Spodoptera exigua, HV = Heliothis virescens,
HZ = Helicoverpa zea, ON = Ostrinia nubilalis

Příklad 19

Izolace a biologická účinnost jiných druhů Bacillus sp.

Byly izolovány další druhy rodu Bacillus, které produkují v průběhu vegetativního růstu proteiny s insekticidní účinností. Tyto kmeny byly izolovány ze vzorků jejich životního prostředí pomocí standardních postupů. Byly

připraveny izoláty pro biologické testy a byly testovány jak je popsáno v příkladech 2 respektive 3. Izoláty, které produkovaly v průběhu vegetativního růstu insekticidní proteiny účinné v biologickém testu proti *Agrotis ipsilon* jsou uvedeny v tabulce níže. Nebyla pozorována žádná korelace mezi přítomností krystalu δ -endotoxinu a produkcí vegetativního insekticidního proteinu.

izolát <i>Bacillus</i>	přítomnost krystalu δ -endotoxinu	procento mortality
AB6	+	100
AB53	-	80
AB88	+	100
AB195	-	60
AB211	-	70
AB217	-	83
AB272	-	80
AB279	-	70
AB289	+	100
AB292	+	80
AB294	-	100
AB300	-	80
AB359	-	100

Izoláty AB289, AB294 a AB359 byly uloženy v patentové sbírce kultur Agricultural Research Service, Patent Culture Collection (NRRL), Northern Regional Research Center, 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604, USA, a byla jim přidělena přírůstková čísla NRRL B-21227, NRRL B-21229

respektive NRRL B-21226.

Izoláty *Bacillus*, které produkují v průběhu vegetativního růstu insekticidní proteiny účinné proti *Diabrotica virgifera virgifera* jsou uvedeny v tabulce níže

izolát <i>Bacillus</i>	přítomnost krystalu δ -endotoxinu	procento mortality
AB52	-	50
AB59	-	71
AB68	+	60
AB78	-	100
AB122	-	57
AB218	-	64
AB256	-	64

Izoláty AB59 a AB256 byly uloženy v patentové sbírce kultur Agricultural Research Service, Patent Culture Collection (NRRL), Northern Regional Research Center, 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604, USA, a byla jim přidělena přírůstková čísla NRRL B-21228 respektive B-21230.

Příklad 20

Identifikace nových genů podobných VIP1/VIP2 pomocí hybridizace

Pro identifikaci kmenů obsahujících geny příbuzné genům nacházejícím se v oblasti VIP1A(a)/VIP2A(a) v AB78 byla pomocí hybridizace zkoumána sada izolátů *Bacillus*. Nezávislé

kultury 463 kmenů rodu *Bacillus* byly pěstovány v jamkách mikrotitračních desek s 96 jamkami (celkem 5 desek) až do sporulace kultur. Z celkového počtu testovaných kmenů bylo 288 zařazeno jako *Bacillus thuringiensis* a 175 bylo zařazeno mezi jiné druhy rodu *Bacillus*, na základě přítomnosti nebo nepřítomnosti krystalů δ -endotoxinů. Pro každou mikrotitrační desku bylo použito zařízení s 96 hroty pro přenos přibližně 10 μ l kultury spor na dvě 150 mm desky obsahující L-agar. Na inokulovaných deskách byl umožněn růst při teplotě 30 °C po dobu 4 - 8 hodin a poté byly ochlazeny na teplotu 4 °C. Kolonie byly přeneseny na nylonové filtry a buňky byly lyzovány pomocí standardních způsobů známých v oboru. Filtry byly hybridizovány s DNA-sondou vytvořenou z DNA-fragmentů obsahujících DNA-sekvence jak VIP1A(a) tak VIP2A(a). Hybridizace byla prováděna přes noc při teplotě 65 °C za použití hybridizačních podmínek, které uvádějí Church a Gilbert (Church, G. M. a W. Gilbert, PNAS, 81: 1991 - 1995 (1984)). Filtry byly promyty 2x SSC s 0,1 % dodecylsulfátu sodného (SDS) při teplotě 65 °C a exponovány na film citlivý na rentgenové záření.

Ze zkoumaných 463 kmenů rodu *Bacillus* bylo u 55 kmenů zjištěno, že hybridizují s VIP1A(a)/VIP2A(a)-sondou. Z 22 z těchto kmenů byla izolována DNA a byla analyzována pomocí Southernova blottingu za použití DNA VIP1A(a)/VIP2A(a) jako sond. Tyto kmeny byly rozděleny do 8 skupin na základě toho, jak u nich proběhl Southernův blotting. Každá z těchto skupin se tím, jak u ní proběhl Southernův blotting, lišila od AB78. U jedné skupiny byl výsledek Southernova blottingu identický s výsledky získanými pro homology VIP1A(a)/VIP2A(a) z *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* (viz níže). U každého z těchto 22 kmenů byla testována jeho účinnost proti *Diabrotica virgifera virgifera*. Bylo zjištěno, že tři kmeny, AB433, AB434 a AB435, jsou účinné proti *Diabrotica virgifera virgifera*. Analýzou pomocí western blottingu za použití antiséra proti VIP2A(a) bylo zjištěno, že kmeny AB6, AB433,

AB434, AB435, AB444 a AB445 produkují protein (nebo proteiny) stejné velikosti jako je VIP2A(a).

Za zmínku stojí mezi identifikovanými kmeny kmen *Bacillus thuringiensis* AB6 (NRRL B-21060), který produkoval vegetativní insekticidní protein účinný proti *Agrotis ipsilon*, jak je popsáno v příkladu 15. Analýza pomocí western blottingu za použití polyklonálního antiséra proti VIP2A(a) a polyklonálního antiséra proti VIP1A(a) svědčí o tom, že AB6 produkuje proteiny podobné proteinům VIP2A(a) a VIP1A(a). AB6 tedy může obsahovat vegetativní insekticidní proteiny podobné VIP1A(a) a VIP2A(a), avšak s odlišným spektrem insekticidní účinnosti.

Příklad 21

Klonování homologů VIP1A(a)/VIP2A(a) z *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*

U několika dříve charakterizovaných kmenů rodu *Bacillus* bylo pomocí Southern blottingu testována přítomnost DNA podobné VIP1A(a)/VIP2A(a). U DNA z kmenů *Bacillus* AB78, AB88, GC91, HD-1 a ATCC 10876 bylo testováno, zda jsou přítomné sekvence podobné VIP1A(a)/VIP2A(a). DNA z kmenů *Bacillus thuringiensis* GC91 a HD-1 a kmene *Bacillus cereus* ATCC 10876 nehybridizovala s DNA VIP2A(a)/VIP1A(a), což svědčí o tom, že tyto kmeny neobsahují DNA-sekvence podobné genům VIP1A(a)/VIP2A(a). Podobně DNA z insekticidního kmene AB88 (příklad 16) nehybridizovala s oblastí DNA VIP1A(a)/VIP2A(a), což naznačuje, že účinnost VIP produkovaná tímto kmenem není důsledkem homologů VIP1A(a)/VIP2A(a). Naproti tomu, *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* (Btt) obsahoval sekvence, které hybridizovaly s oblastí VIP1A(a)/VIP2A(a). Další analýzy potvrdily, že *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* obsahuje sekvence podobné VIP1A(a)/VIP2A(a).

Pro charakterizaci homologů VIP2A(a) a VIP1A(a) z *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* byly klonovány geny kódující tyto proteiny. Pomocí Southernova blottingu byl identifikován restriční fragment o velikosti 9,5 kb získaný pomocí Eco RI, o kterém bylo pravděpodobné, že obsahuje kódující oblasti homologů. Genomová DNA byla rozštěpena Eco RI a fragmenty DNA o délce přibližně 9,5 kb byly purifikovány v gelu. Tato DNA byla ligována do vektoru pBluescript SK(+) rozštěpeného Eco RI a byla transformována do *Escherichia coli* pro vytvoření plazmidové knihovny. U přibližně 10000 kolonií bylo pomocí kolonové hybridizace zjišťováno, zda obsahují sekvence homologické s VIP2A(a). Bylo identifikováno 28 pozitivních kolonií. Všechny 28 klonů je identických a obsahují homology VIP1A(a)/VIP2A(a). Klon pCIB7100 byl uložen v patentové sbírce kultur Agricultural Research Service, Patent Culture Collection (NRRL), Northern Regional Research Center, 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604, USA, a bylo mu přiděleno přírůstkové číslo B-21322. Z pCIB7100 bylo zkonstruováno několik subklonů. Xba I-fragment o velikosti 3,8 kb z pCIB7100 byl klonován do vektoru pBluescript SK(+) pro získání pCIB7101. Hind III-fragment o velikosti 1,8 kb a Hind III-fragment o velikosti 1,4 kb z pCIB7100 byly klonovány do vektoru pBluescript SK(+) pro získání pCIB7102 respektive pCIB7103. Subklony pCIB7101, pCIB7102 a pCIB7103 byly uloženy v patentové sbírce kultur Agricultural Research Service, Patent Culture Collection (NRRL), Northern Regional Research Center, 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604, USA, a byla jim přidělena přírůstková čísla B-21323, B-21324 respektive B-21325.

DNA-sekvence oblasti pCIB7100 obsahující homology VIP2A(a)/VIP1A(a) byla určena pomocí postupu využívajícího dideoxyribonukleotidů jako terminátorů reakce, který popsali Sanger a kol., 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 5463 až 5467. Reakce byly provedeny za použití sekvenačních souprav

PRISM Ready Reaction Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit a sekvenačních souprav PRISM Sequenase Terminator Double-Stranded DNA Sequencing Kit, a analýza byla provedena na automatickém sekvenátoru ABI 373. Jako primery pro stanovení DNA-sekvence v určitých oblastech byly použity na zakázku vyrobené oligonukleotidy. DNA-sekvence této oblasti je uvedena v SEQ ID č. 19.

Oblast o velikosti 4 kb uvedená v SEQ ID č. 19 obsahuje dva otevřené čtecí rámce, které kódují proteiny vykazující vysoký stupeň podobnosti s proteiny VIP1A(a) a VIP2A(a) z kmene AB78. Aminokyselinová sekvence homologu VIP2A(a), označeného za použití standardizované nomenklatury jako VIP2A(b), je uvedena v SEQ ID č. 20 a aminokyselinová sekvence homologu VIP1A(a), označeného za použití standardizované nomenklatury jako VIP1A(b), je uvedena v SEQ ID č. 21. Protein VIP2A(b) vykazuje 91% aminokyselinovou identitu (totožnost) s VIP2A(a) z AB78. Srovnání aminokyselinových sekvencí těchto dvou proteinů VIP2 je uvedeno v tabulce 20. Protein VIP1A(b) vykazuje 77% aminokyselinovou identitu s VIP1A(a) z AB78. Srovnání těchto dvou proteinů VIP2 je uvedeno v tabulce 21. Srovnání uvedené v tabulce 21 svědčí o podobnosti mezi VIP1A(b) a VIP1A(a) z AB78. Toto srovnání svědčí o tom, že tyto dva proteiny VIP1 vykazují vyšší aminokyselinovou identitu v N-koncové oblasti než v C-koncové oblasti. Ve skutečnosti vykazují N-koncové dvě třetiny (do aminokyseliny 618 sekvence VIP1A(b) uvedené v tabulce 21) těchto proteinů 91% identitu, zatímco C-koncová třetina (od aminokyseliny 619 do 833 VIP1A(b)) vykazuje pouze 35% identitu.

Analýza pomocí western blottingu svědčí o tom, že *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* (Btt) produkuje jak proteiny podobné VIP1A(a) tak proteiny podobné VI2A(a). Zdá se však, že tyto proteiny nevykazují účinnosti proti *Diabrotica virgifera virgifera*. Biologický test účinnosti

proti *Diabrotica virgifera virgifera* byl prováděn buď za použití supernatantu 24 hodin staré kultury *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* (Btt) nebo klonu *Escherichia coli* pCIB7100 (který obsahuje celou oblast homologů VIP1A(a)/VIP2A(a)). V žádném z těchto případů nebyla zjištěna žádná účinnost proti *Diabrotica virgifera virgifera*.

Vzhledem k podobnosti mezi proteiny VIP2 z *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* a AB78 byla testována schopnost VIP2A(b) z *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* nahradit VIP2A(a) z AB78. Buňky obsahující pCIB6206 (který produkuje protein VIP1A(a) z AB78, ale neprodukuje protein VIP2A(a)) byly smíchány se supernatantem kultury *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* a byla testována jejich účinnosti proti *Diabrotica virgifera virgifera*. Zatímco ani supernatant kultury *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*, ani buňky obsahující pCIB6206 nevykazovaly účinnost proti *Diabrotica virgifera virgifera*, vykazovala směs *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* a pCIB6206 vysokou účinnost proti *Diabrotica virgifera virgifera*. Kromě toho bylo v dalším biologické testu zjištěno, že klon Btt pCIB7100, který obsahuje geny VIP1A(b)/VIP2A(b) v *Escherichia coli*, rovněž poskytuje účinnost proti *Diabrotica virgifera virgifera*, pokud je smíchán s pCIB6206. Protein VIP2A(b) produkováný *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* je tedy funkčně ekvivalentní s proteinem VIP2A(a) produkováným AB78.

Tímto byla demonstrována možnost identifikovat nové kmeny s insekticidní účinností za použití DNA vegetativních insekticidních proteinů jako hybridizačních sond. Dále, kmeny rodu *Bacillus*, které obsahují sekvence podobné VIP1A(a)/VIP2A(a) a produkují protein podobný VIP1A(a)/VIP2A(a), vykazují toxicitu vůči různým hmyzím škůdcům. Za použití podobných způsobů lze identifikovat mnoho dalších příslušníků rodiny VIP1/VIP2. Dále lze za použití podobných způsobů

Srovnání aminokyselinových sekvencí VIP2 z *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* - Btt (VIP2A(b))
a z AB78 (VIP2A(a))

Btt 1 MQRMEGKLFVVSKTQVVTTRTVLLSTVYSITLLNNVVIKADQLNINSQSK 50 SEQ ID č. 20
|.|||||:|.|.||||:|||||:|.|||| ||||:|||||

AB78 1 MKRMEGKLFMVSKKLQVVTKTIVLLSTVFSISLLNNEVIKAEQLNINSQSK 50 SEQ ID č. 2

51 YTNLQNLKIPDNAEDFKEDKGKAKEWKGKEGGEWRPPATEKGEMNNFLDN 100
|||||||.|.|||||:|||||||:|.||: .||||.|||||

51 YTNLQNLKITDKVEDFKEDKEKAKEWKGKEKEKWKLTATEKGKMNFLDN 100

101 KNDIKTNYKEITFSMAGSCEDIKDLLEEIDKIFDKANLSSSIITYKNVEP 150
|||| |||||||||||| |||||||.||||:|.|.|||||

101 KNDIXTNYKEITFSMAGSFEDIKDLKEIDKMFDKTNLSNSIITYKNVEP 150

151 ATIGFNKSLTEGNTINSDAMAQFKEQFLGKDMKFDSYLDTHLTAQQVSSK 200
.|||||:|.|.|||||

151 TTIGFNKSLTEGNTINSDAMAQFKEQFLDRDIKFDSYLDTHLTAQQVSSK 200

201 KRVILKVTVPSTGSGSTTPTKAGVILNNNEYKMLIDNGYVLHVDKVSQVVK 250
.|||||:|.|.|||||

201 ERVILKVTVPSTGSGSTTPTKAGVILNNSEYKMLIDNGYVMHVDKVSQVVK 250

251 KGMECLQVEGTLKKS LDFKNDINAEAHSWGMIYEDWAKNLTASQREALD 300
||:||||:||||| ||:||||:|.|.|||||

251 KGVECLQIEGTLKKS LDFKNDINAEAHSWGMIYEEWAKDLTDSQREALD 300

301 GYARQDYKEINNYLRNQGGSGNEKIDAQLKNISDALGKKPIPENITVYRW 350
 |||:|||||
 301 GYARQDYKEINNYLRNQGGSGNEKIDAQIKNISDALGKKPIPENITVYRW 350
 351 CGMPEFGYQISDPLPSLKDFFEQFLNTIKEDKGYMSTSLSSERLAAFGSR 400
 |||
 351 CGMPEFGYQISDPLPSLKDFFEQFLNTIKEDKGYMSTSLSSERLAAFGSR 400
 401 KIILRLQVPKGSTGAYLSAIGGFASEKEILLDKDSKYHIDKATEVVIKGV 450
 |||.|||
 401 KIILRLQVPKGSTGAYLSAIGGFASEKEILLDKDSKYHIDKVTEVVIKGV 450
 451 KRYVVDATLLTN 462
 |||
 451 KRYVVDATLLTN 462

Tabulka 21

Srovnání aminokyselinových sekvencí VIP1 z *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* - Btt (VIP1A(b))
 a z AB78 (VIP1A(a))

Btt 1 MKNMKKKLASVVTQMLLAPMFLNGNVNAVNDKINQISTTQENQQKEMD 50 SEQ ID č.21
 |||.|||
 Ab78 1 MKNMKKKLASVVTCTLLAPMFLNGNVNAVYADSKTNQISTTQKNQQKEMD 50 SEQ ID č.5
 51 RKGLLGYYFKGKDFNNLTMFAPTRDNTILMYDQQTANALLDKKQEQEYSIR 100
 |||.||:|||
 51 RKGLLGYYFKGKDFSNLTMFAPTRDSTLIYDQQTANKLLDKKQEQEYSIR 100
 101 WIGLIQRKETGDFTFNLSKDEQAIIEIDGKIISNKGKEQVHLEKEKLV 150
 |||.||:|||
 101 WIGLIQSKETGDFTFNLSEDEQAIIEINGKIISNKGKEQVHLEKGLV 150
 151 PIKIEYQSDTKFNIDSKTfKELKLFKIDSQNQSQQVQ...LRNPEFNKKE 197
 |||.|||

151 PIKIEYOSDTKFNIDSKTFKELKLFKIDSONOPOOVOODELRNPEFNKKE 200

198 SOEFLAKASKTNLFKOKMKRDIDEDTDTGDSSIPDLWEENGYTTIONKVAV 247

[illegible]

201 SOEFLAKPSKINLFTOKMKREIDEDTDTDGDSIPDLWEENGYTIONRIAV 250

248 KWDDSLASKGYTKFVSNPLDSHTVGDYPYTDYEKAARDLDLSNAKETFNPL 297

_____ :

251 KWDDSLASKGYTKFVSNPLESHTVGDPYTDYEKAARDLDLSNAKETENPL 300

298 VAAFPSVNVSMKVLSPNENLSNSVESHSSTNWSYTNTEGASIEAGGGP 347

||||| : |||||

301 VAAFPSVNVSMKVLSPNENLSNSVESHSSTNWSYTNTEGASVEAGIGP 350

348 LGLSFGVSVTYOHSETVAOEWTSTGNTSOFNTASAGYLNANVRYNNVGT 397

351 KGISFGVSVNYQHSETVAQEWGTSTGNTSOFNTASAGYLNANVRYNNVGT 400

398 GAIYDVKPTTSFVLNNNTIATITAKSNSTALRISPGDSYPEIGENAI AIT 447

| | | | | : | | | | . | | : | | . | : : | |

401 GAIYDVKPTTSFVLNNDTIATITAKSNSTALNISPGESYPKKGQNGIAIT 450

448 SMDDFNSHPITLNKQQVNQLINNKPIMLETDQTDGVYKIRDTHGNIIVTGG 497

||| ||| ||| ||| ||| ||| . ||| : . ||| : ||| ||| : ||| ||| : ||| ||| ||| :

451 SMDDFNSHPITLNKKOVDNLLNNKPMMLETNOTDGVYKIKDTHGNIIVTGG 500

498 EWNGVTQQIKAKTASIIIVDDGKQVAEKRVAAKDYGHPEDKTPPLTLKDTL 547

| | | | . | | | | | | | | . | | | | | | : | | | . | | |

501 EWNGVIQQIKAKTASIIVDDGERVAEKRVAAKDYENPEDKTPSLTLKDAL 550

548 KLSYPDEIKETNGLLYYDDKPIYESSVMTYLDENTAKEVKKQINDTTGKF 597

||||| .: |||| .: ||||| .: |||||

551 KLSYPDEIKEIEGLLYYKNKPIYESSVMTYLDENTAKEVTKQLNDTTGKF 600

```

... 598 KDVNHLVDVKLTPKMNFTIKMASLYDGAENNHNSLGTWYLTYNVAGGNTG 647
      |||.|||||||.|.|||. |||.|||.|||.|||. | |.||||.
.... 601 KDVSHLYDVKLTPKMNVTIKLSILYDNAESNDNSIGKWINTNIVSGGNG 650

648 KRQYRSAHSCAVALSSEAKKKLNQNANYYLSEMYMKADSTTEPTIEVAGE 697
      |:|||.|||. |||.|||.|||.|||. |||.|||.|||.|||.|||.|||.
651 KKQYSSNPDANLTLNTDAQEKLKKNRDYYISLYMKSEKNTQCEITIDGE 700

698 KSAITSKKVKLNNQNYQRVDILVKNSERNPMDKIYIRGNGTTNVDGDDVT 747
      :|||.|||.|||.|||.|||.|||. |||.|||.|||.|||.|||.|||.
701 IYPITTKTVNVNKDNYKRLDIIAHNIKSNPISSLHIKTNDEITLFWDDIS 750

748 IPEVSAINPASLSDEEIQEIFKSTIEYGNPSFVADAVTFK..... 788
      |:|||.|||.|||.|||.|||.|||. |||.|||. |||.|||.
751 ITDVASIKPENLTDSEIKQIYSRYGIKLEDGILIDKKGGIHYGEFINEAS 800

789 .NIKPLQNYVKEYEYIYHK.....SHRYEKKTVFDIMGVHYEYSIAREQ 830
      |||.|||||.|||.|||. |||. |||.|||. |||.|||. |||.
801 FNIEPLQNYVTKYKVITYSSELQNVSDTLESCKIYKDGTIKFDFTKYSKN 850

831 KKA 833
      ...
851 EQG 853

```

Příklad 22

Fúze proteinů VIP pro vytvoření jediného polypeptidu

Proteiny VIP se mohou v přírodě vyskytovat jako jednotlivé polypeptidy nebo jako dva nebo více interagujících polypeptidů. Pokud je účinný vegetativní insekticidní protein složen ze dvou nebo více interagujících proteinových řetězců, lze tyto proteinové řetězce produkovat jako jediný polypeptidový řetězec z genu vzniklého fúzí dvou (nebo více) oblastí kódujících VIP. Geny kódující tyto dva řetězce se fúzují spojením kódujících oblastí těchto genů za vytvoření

jediného otevřeného čtecího rámce kódujícího oba polypeptidy VIP. Složené polypeptidy lze fúzovat tak, že N-konec fúzního proteinu tvoří menší polypeptid nebo je lze fúzovat tak, že N-konec fúzního proteinu tvoří větší z polypeptidů. Mezi tyto dvě polypeptidové domény lze popřípadě zařadit linker. Takové linkery jsou v oboru známé. Linker může být popřípadě vytvořen tak, aby obsahoval taková místa štěpená proteasami, že jakmile je jediný fúzní polypeptid pozřen cílovým hmyzem, je rozštěpen v oblasti linkeru, čímž se uvolní dvě polypeptidové složky účinné molekuly VIP.

VIP1A(a) a VIP2A(a) z kmene *Bacillus cereus* AB78 se fúzují pro vytvoření jediného polypeptidu fúzováním jejich kódujících oblastí. Výsledná DNA obsahuje sekvenci uvedenou v SEQ ID č. 22. Sekvence kódovaného proteinu je uvedena v SIQ ID č. 23. Podobným způsobem lze produkovat jiné fúzní proteiny.

Fúze genů kódujících VIP1A(a) a VIP2A(a) se provede za použití standardních postupů molekulární biologie. Nukleotidy deletované mezi kódujícími oblastmi VIP1A(a) a VIP2A(a) se delterují za použití známých postupů mutagenese nebo se alternativně kódující oblasti fúzují za použití polymerasové řetězové reakce (PCR).

Fúzované polypeptidy VIP mohou být exprimovány v jiných organismech za použití syntetického genu, nebo částečně syntetického genu, optimalizovaného pro expresi v alternativním hostiteli. Například pro expresi výše popsaného fúzovaného polypeptidu VIP v kukuřici se připraví syntetický gen za použití kodónů preferovaných kukuřicí pro každou aminokyselinu, viz například EP-A 0618976. Syntetické DNA-sekvence vytvořené podle těchto způsobů jsou uvedeny v SEQ ID č. 17 (pro kukuřici optimalizovaná verze kódující sekvence VIP1A(a) o molekulové hmotnosti 100 kDa), SEQ ID č. 18 (pro kukuřici optimalizovaná verze kódující sekvence VIP1A(a) o molekulové hmotnosti 80 kDa) a SEQ ID č. 24 (pro

kukuřici optimalizovaná verze kódující sekvence VIP2A(a)).

Syntetické geny VIP1 a VIP2 optimalizované pro expresi v kukuřici lze fúzovat za použití polymerasové řetězové reakce, nebo lze syntetické geny vytvořit tak, že budou fúzovány na běžném restrikním místě. Alternativně lze syntetický fúzní gen vytvořit tak, aby kódoval jediný polypeptid obsahující domény jak VIP1 tak VIP2.

Přidání peptidového linkeru mezi domény VIP1 a VIP2 fúzního proteinu lze provést mutagenezí pomocí polymerasové řetězové reakce (PCR-mutagenezí), použitím syntetického DNA-linkeru kódujícího linkerový peptid, nebo za použití jiných způsobů známých v oboru.

Fúzované polypeptidy VIP mohou obsahovat jednu nebo několik vazebných domén (domén vázajících se na receptor). Pokud se při fúzi použije více než jedna vazebná doména, je za použití takového fúzního produktu kontrolováno více cílových druhů hmyzu. Další vazebné domény lze získat za použití jiných vegetativních insekticidních proteinů, a to buď celých nebo jejich částí, endotoxinů z *Bacillus thuringiensis* nebo jejich částí, nebo jiných proteinů schopných vazby na cílového škůdce nebo příslušných vazebných domén získaných z takto se vázajících proteinů.

Jedním z příkladů fúzního konstruktů obsahujícího DNA-sekvenci optimalizovanou pro kukuřici, která kóduje fúzní produkt kterým je jediný polypeptidový řetězec obsahující na N-konci VIP2A(a) a na C-konci VIP1A(a), je pCIB5531. Mezi dvě kódující oblasti byla vložena DNA-sekvence kódující linker s peptidovou sekvencí PSTPPTSPSTPPTPS (SEQ ID č. 47). Sekvence kódující linker a odpovídající klonovací místa je 5'-CCC GGG CCT TCT ACT CCC CCA ACT CCC TCT CCT AGC ACG CCT CCG ACA CCT AGC GAT ATC GGA TCC -3' (SEQ ID č. 48). Byly syntetizovány oligonukleotidy představující jak horní tak dolní řetězec a po hybridizaci a fosforylaci za použití standardních postupů

byly klonovány do vektoru pUC. Terminační kodón (stop kodón) ve VIP2A(a) byl odstraněn za použití polymerasové řetězové reakce a nahrazen restriční místem BglII s místem SmaI. Translační fúzní produkt byl vytvořen ligací fragmentu Bam HI/Pst I z genu VIP2A(a) z pCIB5522 (viz příklad 24), fragmentu získaného polymerasovou řetězovou reakcí obsahujícího PstI-koncový fragment genu VIP2A(a) (identického jako byl použit pro konstrukci pCIB5522), syntetického linkeru s konci, které ligují s tupým místem na 5'-konci a s BamHI na 3'-konci, a modifikovaného syntetického genu VIP1A(a) z pCIB5526 popsaného níže (viz SEQ ID č. 35). Fúzní produkt byl vytvořen ligací čtyř částí, čímž vznikl plazmid obsahující gen VIP2A(a) bez kodónu ukončujícího translaci (terminačního kodónu), spolu s linkerem a kódující oblasti VIP1A(a) bez sekrečního signálu pro *Bacillus*. DNA-sekvence tohoto konstruktu je uvedena v SEQ ID č. 49 a kóduje fúzní protein uvedený v SEQ ID č. 50. Fúzní produkt tvořený jediným polypeptidem, kde je VIP1A(a) na N-konci a VIP2A(a) na C-konci lze vytvořit podobným způsobem. Dále lze kterýkoli z těchto genů nebo oba tyto geny napojit za vzniku translační fúze, za použití nebo bez použití linkeru, buď na 5'-konec nebo na 3'-konec jiných molekul, jako jsou geny kódující toxiny nebo reportérové geny.

Příklad 23

Cílení VIP2 do rostlinných organel

Je známo, že v rostlinách existují různé mechanismy cílení genových produktů a do určité míry byly charakterizovány sekvence řídící fungování těchto mechanismů. Například cílení genových produktů do chloroplastu je řízeno signální sekvencí, která se nachází na N-konci různých proteinů. Tento signál se odštěpuje během importu do chloroplastu za vzniku maturovaného proteinu (například Comai

a kol., J. Biol. Chem. 263: 15104 - 15109 (1988)). Tyto signální sekvence lze fúzovat k heterologním genovým produktům, jako je VIP2, pro vyvolání importu těchto produktů do chloroplastu (van den Broeck a kol., Nature 313: 358 - 363 (1985)). DNA kódující příslušné signální sekvence lze izolovat z 5'-konce cDNA kódujících protein RUBISCO, protein CAB, enzym EPSP-synthasy, protein GS2 a mnoho dalších proteinů, o kterých je známo, že jsou lokalizovány do chloroplastů.

Jiné genové produkty jsou lokalizovány do jiných organel, jako jsou mitochondrie a peroxisomy (například Unger a kol., Plant Molec. Biol. 13: 411 - 418 (1989)). S cDNA kódujícími tyto produkty lze rovněž manipulovat pro dosažení cílení heterologních genových produktů, jako je VIP2, do těchto organel. Mezi příklady takových sekvencí patří nukleárně kódované ATPasy a specifické isoformy aspartát-b-aminotransferasy pro mitochondrie. Podobně cílení do celulárních proteinových tělísek popsali Rogers a kol. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 6512 - 6516 (1985)).

Fúzí příslušných sekvencí způsobujících cílení, jak jsou popsány výše, s kódujícími sekvencemi jež jsou předmětem zájmu, jako je VIP2, je možné řídit transgenický produkt do libovolné organely nebo kompartmentu buňky. Pro cílení do chloroplastu se například chloroplastová signální sekvence z genu RUBISCO, genu CAB, genu EPSP-synthasy nebo genu GS2 fúzuje ve stejném čtecím rámci s N-koncovým kodónem ATG transgenu. Vybraná signální sekvence by měla obsahovat známé místo štěpení a při konstruování fúzního produktu je třeba počítat s jakýmkoli aminokyselinami za místem štěpení, které jsou pro štěpení nutné. V některých případech lze tento požadavek splnit přidáním malého počtu aminokyselin mezi místo štěpení a startovací kodón ATG, nebo alternativně nahrazením některých aminokyselin v kódující sekvenci. U fúzních produktů zkonstruovaných pro import do chloroplastu

lze testovat účinnost příjmu chloroplastem pomocí in vitro translace in vitro transkribovaných konstruktů s následujícím příjmem do chloroplastů in vitro za použití postupů, které popsali Bartlett a kol. v: Edelman a kol. (editoři) *Methods in Chloroplast Molecular Biology*, Elsevier, str. 1081 - 1091 (1982), a Wasmann a kol., *Mol. Gen. Genet.* 205: 446 - 453 (1986). Tyto postupy konstruování jsou v oboru dobře známé a lze je rovněž použít pro mitochondrie a peroxisomy.

Výše popsané mechanismy cílení v buňce lze použít nejen ve spojení s jejich příbuznými promotory, ale rovněž ve spojení s heterologními promotory, pro dosažení specifického cílení v buňce za regulace transkripce promotorem který vykazuje model exprese odlišující se od modelu vykazovaného promotorem od kterého je získán signál způsobující cílení.

V nativním genu VIP2 z mikroorganismů *Bacillus* je přítomná DNA-sekvence kódující sekreční signál. Tento signál není přítomen v maturovaném proteinu, který má N-koncovou sekvenci LKITDKVEDF (aminokyselinové zbytky 57 až 66 v SEQ ID č. 2). Je možné pomocí genového inženýrství modifikovat VIP2 tak, aby byl vylučován z rostlinné buňky nebo aby byl cílen do subcelulárních organel, jako je endoplazmatické retikulum, vakuola, mitochondrie a plastidy včetně chloroplastů. Hybridní proteiny připravené fúzí sekrečního signálu s markerovým genem byly úspěšně cíleny do sekreční dráhy (Itirriaga G. a kol., *The Plant Cell*, 1: 381 - 390 (1989), Denecke a kol. *The Plant Cell*, 2: 51 - 59 (1990)). Byly identifikovány N-koncové sekvence, které jsou zodpovědné za cílení do endoplazmatického retikula, do apoplastu a za extracelulární sekreci z aleuronových buněk (Koehler a Ho, *Plant Cell* 2: 769 - 783 (1990)).

Pro zadržení proteinu v endoplazmatickém retikulu nebo vakuole je nutná přítomnost dalších signálů. Pro zadržení proteinu v endoplazmatickém retikulu je nutná peptidová sekvence KDEL/HDEL na C-konci tohoto proteinu (jak shrnul

Pelham, Annual Review Cell Biol., 5: 1 - 23 (1989)). Signály pro zadržení proteinů ve vakuole byly rovněž charakterizovány. Signály způsobující cílení do vakuoly mohou být přítomné buď na N-koncové části (Holwerda a kol., The Plant Cell, 4: 307 - 318 (1992), Nakamura a kol., Plant Physiol., 101: 1 - 5 (1993)), C-koncové části nebo ve vnitřní sekvenci cíleného proteinu (Tague a kol., The Plant Cell, 4: 307 - 318 (1992), Saalbach a kol., The Plant Cell, 3: 695 - 708 (1991)). Kromě toho jsou za cílení genových produktů do vakuoly zodpovědné N-koncové sekvence ve spojení s C-koncovými sekvencemi (Shinshi a kol., Plant Molec. Biol., 14: 357 - 368 (1990)). Podobně mohou být proteiny cíleny do mitochondrií nebo plastidů za použití fúzí se specifickými C-koncovými signálními peptidy (Heijne a kol., Eur. J. Biochem., 180: 535 - 545 (1989), Archer a Keegstra, Plant Molecular Biology, 23: 1105 - 1115 (1993)).

Pro cílení VIP2, buďto pro sekreci nebo do různých subcelulárních organel, může být na 5'-konec nebo 3'-konec genu, jak je potřeba, zařazena DNA-sekvence kódující známý signální peptid (nebo peptidy) optimalizovaná pro kukuřici. Pro sekreci VIP2 z buňky lze na 5'-konec buďto úplné sekvence genu VIP2 nebo zkrácené sekvence kódující maturovaný protein nebo genu zkráceného až k nukleotidu 286 nebo kódujícího protein počínaje aminokyselinovým zbytkem 94 (methioninem) přidat DNA-sekvenci kódující eukaryotický sekreční signál MGWSWIFLFLLSGAAGVHCL (SEQ ID č. 25) z PCT-přihlášky č. IB95/00497 nebo libovolný jiný sekreční signál popsany v literatuře (Itirriaga a kol., The Plant Cell, 1: 381 - 390 (1989), Denecke a kol., The Plant Cell, 2: 51 - 59 (1990)). Pro cílení VIP2 tak, aby byl zadržen v endoplazmatickém retikulu, lze na 3'-konec genu, kromě sekrečního signálu, přidat DNA-sekvenci kódující signální peptid pro endoplazmatické retikulum KDEL/HDEL. Pro cílení do vakuoly lze umístit vedle sekrečního signálu DNA-sekvenci kódující signální peptid SSSSFADSNPIRVTDRRAAST (SEQ ID č. 3, Holwerda a kol.,

The Plant Cell, 4: 307 - 318 (1992)) nebo vložit na 3'-konec genu sekvenci kódující karboxylový signální peptid, jak ji popsali Dombrowski a kol., The Plant Cell, 5: 587 - 596 (1993) nebo její funkční variantu. Podobně lze VIP2 modifikovat tak, aby byl cílen buď do mitochondrií nebo plastidů, včetně chloroplastů, tím, že se do popsané sekvence VIP2 vloží sekvence kódující požadované signály způsobující cílení. Bakteriální sekreční signál přítomný ve VIP2 může být ve výsledném konstruktu zachován nebo z něj může být odstraněn.

Jedním z příkladů konstruktů, který obsahuje eukaryotický sekreční signál fúzovaný s kódující sekvencí VIP, je pCIB5528. Byly syntetizovány oligonukleotidy odpovídající jak hornímu tak dolnímu řetězci sekvencí kódujících sekreční signál uvedený v SEQ ID č. 25, mající sekvenci 5'-GGATCCACC ATG GGC TGG AGC TGG ATC TTC CTG TTC CTG CTG AGC GGC GCC GCG GGC GTG CAC TGC CTGCAG-3' (SEQ ID č. 41). Po hybridizaci se 5'-konec sekrečního signálu podobá "lepivým koncům" odpovídajícím restrikním místům BamHI a PstI. Oligonukleotid byl hybridizován a fosforylován a ligován do pCIB5527 (konstruování je popsáno v příkladu 23A), který byl rozštěpen BamHI a PstI za použití standardních postupů. Výsledná kódující sekvence optimalizovaná pro kukuřici je uvedena v SEQ ID č. 42 a kóduje protein uvedený v SEQ ID č. 43. Kódovaný protein obsahuje eukaryotický sekreční signál místo sekrečního signálu mikroorganismu *Bacillus*.

Jedním z příkladů konstruktů, který obsahuje signál způsobující cílení do vakuoly fúzovaný s kódující sekvencí VIP, je pCIB5533. Byly syntetizovány oligonukleotidy odpovídající jak hornímu tak dolnímu řetězci sekvencí kódujících peptid způsobující cílení do vakuoly uvedený v SEQ ID č. 3, mající sekvenci 5'-CCG CGG GCG TGC ACT GCC TCA GCA GCA GCA GCT TCG CCG ACA GCA ACC CCA TCC GCG TGA CCG ACC GCG CCG CCA GCA CCC TCG AG-3' (SEQ ID č. 44). Po hybridizaci se 5'-konec

signálu způsobujícího cílení do vakuoly podobá "lepivým koncům" odpovídajícím restričními místům SacII a PstI. Oligonukleotid byl hybridizován a fosforylován a ligován do pCIB5528 (konstruování je popsáno výše), který byl rozštěpen SacII a PstI za použití standardních postupů. Výsledná kódující sekvence optimalizovaná pro kukuřici je uvedena v SEQ ID č. 45 a kóduje protein uvedený v SEQ ID č. 46. Kódovaný protein obsahuje kromě eukaryotického sekrečního signálu peptid způsobující cílení do vakuoly.

Gen VIP1 lze pomocí podobných postupů rovněž upravit tak, aby byl sekretován nebo cílen do subcelulárních organel.

Příklad 23A

Odstranění sekrečního signálu mikroorganismu *Bacillus* z VIP1A(a) a VIP2A(a)

VIP1A(a) a VIP2A(a) jsou sekretovány během růstu kmene AB78. Povaha peptidových sekvencí, které působí jako sekreční signály, byla popsána v literatuře (Simonen a Palva, *Microbiological reviews*, str. 109 - 137 (1993)). Na základě informací z výše uvedené publikace byl v obou genech identifikován předpokládaný sekreční signál. Ve VIP1A(a) je tento signál tvořen aminokyselinami 1 - 33 (viz SEQ ID č. 5). K odštěpení sekrečního signálu pravděpodobně dochází za serinem, který je aminokyselinou 33. Jako sekreční signál ve VIP2A(a) byly identifikovány aminokyseliny 1 - 49 (viz SEQ ID č. 2). Analýzou N-koncového peptidu sekretovaného maturovaného proteinu VIP2A(a) bylo zjištěno, že N-koncová sekvence je LKITDKVEDFKEDK. Tato sekvence začíná aminokyselinou 57 v SEQ ID č. 2. Geny kódující tyto proteiny byly modifikovány tak, že byly odstraněny sekreční signály mikroorganismu *Bacillus*.

Byla zkonstruována kódující oblast VIP1A(a) optimalizo-

vaná pro kukuřici, z jejíhož 5'-konce byly odstraněny sekvence kódující prvních 33 aminokyselin, t.j. sekreční signál. Tato modifikace byla provedena pomocí polymerasové řetězové reakce za použití dopředného primeru který obsahoval sekvenci 5'-GGA TCC ACC ATG AAG ACC AAC CAG ATC AGC-3' (SEQ ID č. 33), který hybridizuje s genem optimalizovaným pro kukuřici (SEQ ID č. 26) v nukleotidové poloze 100, a přidával restriční místo BamHI a konvenční eukaryotické místo počátku translace včetně startovacího kodónu. Zpětný primer, který obsahoval sekvenci 5'-AAG CTT CAG CTC CTT G-3' (SEQ ID č. 34), hybridizuje s komplementárním vláknem v nukleotidové poloze 507. Byl získán amplifikační produkt o velikosti 527 bp, který obsahuje restriční místa BamHI na 5'-konci a místo HindIII na 3'-konci. Amplifikační produkt byl klonován do T-vektoru (popsaného níže v příkladu 24) a sekvenován pro zajištění správné DNA-sekvence. Poté byl restričním štěpením získán fragment BamHI/HindIII, který byl použit pro nahrazení fragmentu BamHI/HindIII genu VIP1A(a) optimalizovaného pro kukuřici, klonovaného do kořenky preferované promotorové kazety. Získaný konstrukt byl označen pCIB5526. Kódující oblast VIP1A(a) optimalizovaná pro kukuřici, ze které byl odstraněn sekreční signál mikroorganismu Bacillus, je uvedena jako SEQ ID č. 35. Kódovaný protein je uveden jako SEQ ID č. 36.

Gen který kóduje upravenou formu VIP2A(a), tedy kódující oblast ze které byl odstraněn sekreční signál, byla zkonstruována podobným způsobem jako je popsán výše pro zkonstruování upravené formy VIP1A(a). Modifikace byla provedena pomocí polymerasové řetězové reakce za použití dopředného primeru 5'-GGA TCC ACC ATG CTG CAG AAC CTG AAG ATC AC-3' (SEQ ID č. 37). Tento primer hybridizuje s genem VIP2A(a) optimalizovaným pro kukuřici (SEQ ID č. 27) v nukleotidové poloze 150. V nukleotidové poloze 15 tohoto primeru byla provedena tichá mutace pro získání restričního místa PstI. Zpětný primer má sekvenci 5'-AAG CTT CCA CTC CTT

CTC-3' (SEQ ID č. 38). Byl získán produkt o velikosti 259 bp s restrikčním místem HindIII na 3'-konci. Amplifikační produkt byl klonován do T-vektoru, sekvenován a ligován do kořeny preferované promotorové kazety obsahující VIP2A(a) optimalizovaný pro kukuřici, kterážto kazeta byla rozštěpena BamHI/HindIII. Získaný konstrukt byl označen pCIB5527. Kódující oblast VIP2A(a) optimalizovaná pro kukuřici, ze které byl odstraněn sekreční signál mikroorganismu *Bacillus*, je uvedena jako SEQ ID č. 39. Kódovaný protein je uveden jako SEQ ID č. 40.

Příklad 24

Konstrukce a klonování genů VIP1A(a) a VIP2A(a) optimalizovaných pro kukuřici

Konstruování: Geny optimalizované pro kukuřici byly sestaveny pomocí reverzní translace nativních proteinových sekvencí VIP1A(a) a VIP2A(a) za použití kodónů, které jsou v kukuřici nejčastěji používány (Murray a kol., Nucleic Acid Research, 17: 477 - 498 (1989)). Pro usnadnění klonování byla DNA-sekvence dále modifikována začleněním jedinečných restrikčních míst ve vzdálenostech každých 200 - 360 nukleotidů. VIP1A(a) byl zkonstruován tak, aby byl klonován v 11 takových fragmentech a VIP2A(a) byl klonován v 5 fragmentech. Po klonování jednotlivých fragmentů byly sousedící fragmenty spojeny za použití restrikčních míst společných oběma fragmentům, za vzniku kompletního genu. Pro klonování každého fragmentu byly zkonstruovány oligonukleotidy o délce 50 - 85 nukleotidů představující jak horní tak dolní řetězec DNA. Horní oligonukleotid prvního páru oligonukleotidů byl zkonstruován tak, že měl na 3'-konci jednořetězcovou oblast o délce 15 bp, která byla homologická s podobnou jednořetězcovou oblastí dolního řetězce následujícího páru oligonukleotidů, pro řízení orientace a pořadí

různých párů oligonukleotidů v daném fragmentu. Oligonukleotidy byly rovněž zkonstruovány tak, že v případě, že jsou všechny oligonukleotidy představující fragment hybridizovány, jsou na koncích jednořetězcové oblasti odpovídající konkrétním restrikním místům, která mají být vytvořena. Struktura každého oligomeru byla zkoumána pokud jde o stabilní sekundární struktury, jako jsou vlásenkové smyčky, za použití programu OLIGO firmy NBI Inc. Kdekoli to bylo nutné, byly nukleotidy změněny pro snížení stability sekundární struktury aniž by došlo ke změně aminokyselinové sekvence proteinu. Na místo kodónu startujícího translaci v genu byla vložena rostlinná konvenční sekvence místa vázajícího se na ribozomy, TAAACAATG (Joshi a kol., Nucleic Acid Res., 15: 6643 - 6653 (1987)) nebo eukaryotická konvenční sekvence místa vázajícího se na ribozomy, CCACCATG (Kozak, Nucleic Acid Research, 12: 857 - 872 (1984)).

Klonování: Oligonukleotidy byly syntetizovány firmou IDT Inc., a byly dodány ve formě lyofilizovaných prášků. Byly resuspendovány ve 200 μ M koncentraci. Ke 30 μ l každého oligonukleotidu byl přidán formamid na konečnou koncentraci 25 - 50 % a vzorek byl vařen po dobu 2 minut před separací na předem připraveném 10% polyakrylamid/močovinovém gelu získaném od firmy Novex. Po elektroforéze byl oligomer detekován za použití ultrafialového světla pomocí umístění gelu na desku pro chromatografii na tenké vrstvě obsahující fluorescenční indikátor a osvětlení ultrafialovým světlem. Oblast obsahující DNA o správné velikosti byla vyříznuta a extrahována z polyakrylamidu inkubací rozkouskovaného fragmentu gelu přes noc v pufru obsahujícím 0,4M chlorid lithný a 0,1mM kyselinu ethylendiamintetraoctovou. DNA byla separována ze zbytků gelu centrifugací přes filtr Millipore UFMC. Extrahovaná DNA byla vysrážena ethanolom pomocí přidání dvou objemu absolutního alkoholu. Po centrifugaci byl precipitát resuspendován v dH₂O v koncentraci 2,5 μ mol. Fragmenty byly klonovány buďto hybridizací oligonukleotidů a

ligací s vhodným vektorem nebo amplifikací hybridizovaného fragmentu za použití ekvimolární směsi všech oligonukleotidů pro konkrétní fragment jako matrice a koncově specifických primerů pro polymerasovou řetězovou reakci.

Klonování pomocí hybridizace a ligace: Homologické dvouřetězové páry oligonukleotidů byly získány smícháním 5 μ l horního a dolního oligomeru pro každý pár oligonukleotidů s pufrem obsahujícím 1x polynukleotid-kinasový pufr (PNK-pufr) (70mM Tris-HCl o pH 7,6, 10mM chlorid hořečnatý, 5mM dithiothreitol (DTT)), 50mM chlorid draselný a 5 % formamidu, na konečný objem 50 μ l. Oligonukleotidy byly vařeny po dobu 10 minut a pomalu ochlazeny na teplotu 37 °C nebo na teplotu místnosti. 10 μ l bylo odebráno pro analýzu na 4% agarose v pufračním systému TAE (Metaphore, FMC). Každý z hybridizovaných párů oligonukleotidů byl kinasován přidáním ATP na konečnou koncentraci 1 mmol, BSA na konečnou koncentraci 100 μ g na ml, 200 jednotek polynukleotid-kinasy a 1 μ l 10x PNK-pufu, v objemu 10 μ l. Po hybridizaci a fosforylaci byla reakční směs inkubována při teplotě 37 °C po dobu 2 hodin přes noc. 10 μ l každého párů oligonukleotidů pro konkrétní fragment bylo smícháno na konečný objem 50 μ l. Páry oligonukleotidů byly hybridizovány zahřátím na teplotu 80 °C na dobu 10 minut a poté pomalým ochlazením na 37 °C. 2 μ l oligonukleotidů byly smíchány s přibližně 100 ng příslušného vektoru a ligovány za použití pufru obsahujícího 50mM Tris-HCl o pH 7,8, 10mM chlorid hořečnatý, 10mM dithiothreitol a 1 mM ATP. Reakční směs byla inkubována při teplotě místnosti po dobu 2 hodin až přes noc a transformována do kmene Escherichia coli DH5 α , který byl nanesen na L-desky obsahující ampicillin v koncentraci 100 μ g/ml za použití standardních postupů. Pozitivní klony byly dále charakterizovány a jejich struktura potvrzena za použití miniscreeningu pomocí polymerasové řetězové reakce, podrobně popsáno v EP-A 0618976, přičemž byly jako primery použity univerzální primery "Reverse" a M13"-20". Pozitivní klony byly identifikovány pomocí

rozštěpení DNA příslušnými enzymy a následným sekvenováním. Rekombinantní klony, které obsahovaly očekávanou DNA-sekvenci, byly poté vybrány pro další práci.

Amplifikace pomocí polymerasové řetězové reakce a klonování do T-vektoru: Amplifikace pomocí polymerasové řetězové reakce byla prováděna za použití směsi všech oligomerů, které představovaly horní a dolní řetězec konkrétního fragmentu (konečná koncentrace 5 mmol každého z nich) jako matrice, specifických koncových primerů pro konkrétní fragment (konečná koncentrace 2 μ mol), 200 μ M každého z dATP, dTTP, dCTP a dGTP, 10mM Tris-HCl o pH 8,3, 50mM chloridu draselného, 1,5mM chloridu hořečnatého, 0,01% želatiny a 5 jednotek Taq-polymerasy v konečném objemu 50 μ l. Amplifikační reakce byla prováděna v přístroji Perkin Elmer thermocycler 9600 inkubací při teplotě 95 °C po dobu 1 minuty (1 cyklus), s následujícími 20 cykly 95 °C po dobu 45 sekund, 50 °C po dobu 45 sekund a 72 °C po dobu 30 sekund. Nakonec byla před analýzou produktu reakční směs inkubována po dobu 5 minut při teplotě 72 °C. 10 μ l reakční směsi bylo analyzováno na 2,5% agarosovém gelu Nusieve (FMC) v pufrčním systému TAE. Fragment o správné velikosti byl purifikován v gelu a použit pro klonování do klonovacího vektoru pro polymerasovou řetězovou reakci nebo T-vektoru. Zkonstruování T-vektoru bylo provedeno jak popsali Marchuk a kol., Nucleic Acid Research, 19: 1154 (1991). Jako rodičovský vektor byl použit pBluescriptsk+ (Stratagene, Kalifornie, USA). Transformace a identifikace správného klonu byla prováděna jak je popsáno výše.

Fragmenty VIP1A(a) č. 1, 3, 4, 5, 6, 8 a 9 a fragmenty VIP2A(a) č. 2 a 4 byly získány klonováním amplifikačních produktů polymerasové řetězové reakce, zatímco fragmenty VIP1A(a) č. 2, 7, 10 a 11 a fragmenty VIP2A(a) č. 1, 3 a 5 byly získány pomocí hybridizace a ligace.

Jakmile byly získány fragmenty s požadovanou sekvencí,

byl sestaven kompletní gen klonováním sousedících fragmentů dohromady. Kompletní gen byl znovu sekvenován a byla testována jeho účinnost proti *Diabrotica virgifera virgifera* před přenosem do expresivních vektorů pro rostliny obsahujících kořeny preferovaný promotor (popsaný v patentové přihlášce Spojených Států Amerických č. 08/017 209) a actin-promotor z rýže.

Jedním z takových expresivních vektorů pro rostliny je pCIB5521. Kódující oblast VIP1A(a) optimalizovaná pro kukuřici (SEQ ID č. 26) byla klonována do expresivního vektoru pro rostliny, obsahujícího kořeny preferovaný promotor na 5'-konci genu, s PEP-karboxylasovým intronem č. 9 následovaným 35S-terminátorem na 3'-konci. Tento plazmid rovněž obsahuje sekvence rezistence vůči ampicillinu z plazmidu pUC 19. Dalším expresivním vektorem pro rostliny je pCIB5522, který obsahuje kódující oblast VIP2A(a) optimalizovanou pro kukuřici (SEQ ID č. 27), fúzovanou s kořeny preferovaným promotorem na 5'-konci genu, s PEP-karboxylasovým intronem č. 9 následovaným 35S-terminátorem na 3'-konci.

Příklad 25

NAD-afinitní chromatografie

Byla použita purifikační strategie založená na afinitě VIP2 k substrátu NAD (nikotinamidadeninukleotidu). Supernatant ze směsi, jejíž pH bylo upraveno natrium-citrátovým pufrem na hodnotu 3,5, popsáný v příkladu 4, byl dialyzován ve 20mM TRIS (tris(hydroxymethyl)aminomethanu) o pH 7,5 přes noc. Neutralizovaný supernatant byl přidán ke stejnému objemu promyté NAD-agarosy a inkubován za mírného třepání při teplotě 4 °C přes noc. Pryskyřice a proteinový roztok byly vneseny do polypropylenové kolony o objemu 10 ml a bylo umožněno, aby proteinový roztok vytekl. Kolona byla promyta

20mM TRIS o pH 7,5 v objemu rovnajícím se pětinasobku objemu kolony, 20mM TRIS o pH 7,5 se 100mM chloridem sodným v objemu rovnajícím se dvou- až pětinasobku objemu kolony a poté 20mM TRIS o pH 7,5 v objemu rovnajícím se dvou- až pětinasobku objemu kolony. Proteiny VIP byly vymyty 20mM TRIS o pH 7,5 doplněným 5mM NAD. Byly odebrány promývací kapaliny o objemu rovnajícím se přibližně trojnásobku objemu kolony a byly zahuštěny na přístroji Centricon -10. Výtěžek typicky činí přibližně 7 - 15 μ g proteinu na ml pryskyřice.

Při analýze purifikovaných proteinů pomocí elektroforézy v SDS-polyakrylamidovém gelu s následujícím obarvením stříbrem byly viditelné dva polypeptidy, jeden o molekulové hmotnosti přibližně 80000 a druhý o molekulové hmotnosti přibližně 45000. N-koncovým sekvenováním bylo zjištěno, že protein o molekulové hmotnosti 80000 odpovídá proteolyticky upravené formě VIP1A(a) a protein o molekulové hmotnosti 45000 odpovídá proteolyticky upravené formě VIP2A(a). Společná purifikace VIP1A(a) s VIP2A(a) svědčí o tom, že tyto dva proteiny pravděpodobně tvoří komplex a obsahují oblasti tvořící interakce protein-protein. Proteiny VIP1A(a) a VIP2A(a) purifikované tímto způsobem byly biologicky účinné proti *Diabrotica virgifera virgifera*.

Příklad 26

Exprese VIP1A(a) a VIP2A(a) optimalizovaných pro kukuřici

U kmenů *Escherichia coli* obsahujících různé plazmidy, které obsahují geny VIP, byla zkoumána exprese vegetativních insekticidních proteinů. Kmeny *Escherichia coli* obsahující jednotlivé plazmidy byly pěstovány přes noc v L-vývaru a exprimovaný protein byl extrahován z kultury jak je popsáno výše v příkladu 3. Exprimované proteiny byly zkoumány pomocí western blottingu za použití protilátek vytvořených pomocí standardních způsobů známých v oboru, podobných jako jsou

popsány výše v příkladu 12. Byla rovněž testována insekticidní účinnost exprimovaných proteinů proti *Diabrotica virgifera virgifera*, podle způsobu popsaného výše v příkladu 3. Výsledky testů exprese v *Escherichia coli* jsou uvedeny níže.

Expres vegetativních insekticidních proteinů
v *Escherichia coli*

extrakt kmene <i>Escherichia coli</i> obsahujícího uvedený plazmid	test č. 1 % mortality	test č. 2	detekován protein
kontrola	0	0	ne
pCIB5521 (VIP1A(a) optima- lizovaný pro kukuřici)	47	27	ano
pCIB5522 (VIP2A(a) optima- lizovaný pro kukuřici)	7	7	ano
pCIB6024 (nativní VIP2A(a))	13	13	ano
pCIB6206 (nativní VIP1A(a))	27	40	ano
kombinované extrakty pCIB5521 + pCIB5522	87	47	
kombinované extrakty pCIB5521 + pCIB6024	93	100	
kombinované extrakty pCIB5522 + pCIB6206	100	100	
kombinované extrakty pCIB6024 + pCIB6206	100	100	

DNA z těchto plazmidů byla použita pro dočasnou expresi vegetativních insekticidních proteinů pomocí expresivního systému pro protoplasty kukuřice. Protoplasty byly izolovány ze suspenzních kultur kukuřičné linie 2717 Line 6 pomocí rozštěpení buněčných stěn za použití enzymů Cellulase RS a

Macerase R10 v příslušném pufru. Protoplasty byly izolovány na sítích a centrifugací. Protoplasty byly transformovány pomocí standardního způsobu přímého přenosu genů za použití přibližně 75 µg plazmidové DNA a polyethylenglykolu PEG-40. Ošetřené protoplasty byly inkubovány přes noc ve tmě při teplotě místnosti. Pomocí western blottingu byla na protoplastových explantátech provedena analýza exprese vegetativních insekticidních proteinů a insekticidní účinnost proti *Diabrotica virgifera virgifera* byla analyzována jak je popsáno výše v případě exprese v *Escherichia coli*. Výsledky testů exprese v kukuřičných protoplastech jsou uvedeny níže.

Expresa vegetativních insekticidních proteinů
v rostlinných protoplastech

testovaný extrakt	test č. 1	test č. 2	detekován
	% mortality		protein
kontrola bez DNA	27	10	ne
pCIB5521 (p) (VIP1A(a) optimalizovaný pro kukuřici)	20 (0)	30	ano
pCIB5522 (p) (VIP2A(a) optimalizovaný pro kukuřici)	20 (0)	20	ano
kombinované extrakty pCIB5521 (p) + pCIB5522 (p)	87 (82)	90	
kombinované extrakty pCIB5521 (p) + pCIB5522 (e)	100	-	
kombinované extrakty pCIB5522 (p) + pCIB5521 (p)	53 (36)	-	
kombinované extrakty pCIB5521 (p) + pCIB6024 (e)	100	-	

testovaný extrakt	test č. 1 % mortality	test č. 2	detekován protein
kombinované extrakty pCIB5522 (p) + pCIB6206 (e)	100	-	
pCIB6024 (e) (nativní VIP2A(a))	0	-	ano
pCIB6206 (e) (nativní VIP1A(a))	20	-	ano
pCIB5521 + pCIB5522 (plazmidy dodané kotransformací)	100	100	ano

Legenda:

(p) = extrakt protoplastové kultury transformované uvedeným plazmidem

(e) = extrakt kmene *Escherichia coli* obsahujícího uvedený plazmid

Údaje o expresi získané jak s *Escherichia coli* tak s kukuřičnými protoplasty svědčí o tom, že geny VIP1A(a) a VIP2A(a) optimalizované pro kukuřici tvoří stejný protein jako nativní geny VIP1A(a) respektive VIP2A(a), a že proteiny kódované geny optimalizovanými pro kukuřici jsou funkčně ekvivalentní s proteiny, které jsou kódované nativními geny.

Všechny publikace a patentové přihlášky uvedené v tomto popisu určují úroveň odborníka v oboru, kterého se tento vynález týká. Obsah všech citovaných publikací a patentových přihlášek se považuje za odkazem začleněný do této přihlášky.

V patentové sbírce kultur Agricultural Research Service, Patent Culture Collection (NRRL), Northern Regional Research Center, 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604, USA byly uloženy následující kultury:

označení kmene	číslo uložení	datum uložení
1. Escherichia coli PL2	NRRL B-21221	9. března 199
2. Escherichia coli PL2	NRRL B-21221N	2. září 1994
3. Escherichia coli pCIB6022	NRRL B-21222	9. března 199
4. Escherichia coli pCIB6023	NRRL B-21223	9. března 199
5. Escherichia coli pCIB6022	NRRL B-21223N	2. září 1994
6. Bacillus thuringiensis HD73-78VIP	NRRL B-21224	9. března 199
7. Bacillus thuringiensis AB88	NRRL B-21225	9. března 199
8. Bacillus thuringiensis AB359	NRRL B-21226	9. března 199
9. Bacillus thuringiensis AB289	NRRL B-21227	9. března 199
10. Bacillus sp. AB59	NRRL B-21228	9. března 199
11. Bacillus sp. AB294	NRRL B-21229	9. března 199
12. Bacillus sp. AB256	NRRL B-21230	9. března 199
13. Escherichia coli P5-4	NRRL B-21059	18. března 199
14. Escherichia coli P3-12	NRRL B-21061	18. března 199
15. Bacillus cereus AB78	NRRL B-21058	18. března 199
16. Bacillus thuringiensis AB6	NRRL B-21060	18. března 199
17. Escherichia coli pCIB6202	NRRL B-21321	2. září 1994
18. Escherichia coli pCIB7100	NRRL B-21322	2. září 1994
19. Escherichia coli pCIB7101	NRRL B-21323	2. září 1994
20. Escherichia coli pCIB7102	NRRL B-21324	2. září 1994
21. Escherichia coli pCIB7103	NRRL B-21325	2. září 1994
22. Escherichia coli pCIB7104	NRRL B-21422	24. března 199
23. Escherichia coli pCIB7107	NRRL B-21423	24. března 199
24. Escherichia coli pCIB7108	NRRL B-21438	5. května 199
25. Bacillus thuringiensis AB424	NRRL B-21439	5. května 199

Ačkoli byl vynález v příkladech výše popsán detailně z důvodů ilustrace a jasnosti, je zřejmé, že je možné provést určité změny a modifikace v rámci připojených nároků.

Zobrazení sekvencí

Informace o sekvenci SEQ ID č. 1:

- (i) charakteristiky sekvence:
 - (A) délka: 6049 párů bází
 - (B) typ: nukleová kyselina
 - (C) počet řetězců: jednořetězcová
 - (D) topologie: lineární
- (ii) typ molekuly: DNA (genomová)
- (vi) původní zdroj:
 - (A) organismus: *Bacillus cereus*
 - (B) kmen: AB78
 - (C) konkrétní izolát: NRRL B-21058
- (ix) vlastnosti:
 - (A) jméno / klíč: CDS
 - (B) lokace: 1082..2467
 - (D) další informace: produkt = "VIP-2A(a)"
- (ix) vlastnosti:
 - (A) jméno / klíč: různá vlastnost
 - (B) lokace: 2475..5126
 - (D) další informace: poznámka = "kódující sekvence proteinu VIP1A(a) o velikosti 100 kDa. Tato kódující sekvence se opakuje v SEQ ID č. 4 a translatuje se odděleně."
- (xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 1:

ATCGATACAA TGTTGTTTTA CTTAGACCGG TAGTCTCTGT AATTGTGTTA ATGCTATATT	60
CTTTACTTTG ATACATTTTA ATAGCCATTT CAACCTTATC AGTATGTTTT TGTGGTCTTC	120
CTCCTTTTTT TCCACGAGCT CTAGCTGCGT TTAATCCTGT TTTGSTACGT TCGCTAATAA	180
TATCTCTTTC TAATTCTGCA AACTTGCCA TCATTGAAA GAAGAATTTC CCCATAGCAT	240
TAGAGGTATC AATGTTGTCA TGAATAGAAA TAAAATCTAC ACCTAGCTCT TTGAATTTTT	300
CACTTAACTC AATTAGGTGT TTTGTAGAGC GAGAAATTCG ATCAAGTTTG TAAACAATA	360

TCTTATCGGC TTTACGTAAT ACTTTTAGCA ACTCTTCGAG TTGAGGGGCGC TCTTTTTTTTA	420
TTCTGTAT TTTCTCCTGA TATAGCCTTT CTACACCATA TTGTTGCAAA GCATCTATTT	480
GCATATCGAG ATTTTGTCT TCTGTGCTGA CACGAGCATA ACCAAAAATC AAATTGGTTT	540
CACTTCCTAT CTAAATATAT CTATTAAAAT AGCACCAAAA ACCTTATTAA ATTAAAATAA	600
GGAACTTTGT TTTTGGATAT GGATTTTGGT ACTCAATATG GATGAGTTTT TAACGCTTTT	660
GTTAAAAAAC AAACAAGTGC CATAAACGGT CGTTTTTGGG ATGACATAAT AAATAATCTG	720
TTTGATTAAC CTAACCTTGT ATCCTTACAG CCCAGTTTTA TTTGTACTTC AACTGACTGA	780
ATATGAAAAC AACATGAAGG TTTCATAAAA TTTATATATT TTCCATAACG GATGCTCTAT	840
CTTTAGGTTA TAGTTAAATT ATAAGAAAAA AACAAACGGA GGGAGTGAAA AAAAGCATCT	900
TCTCTATAAT TTTACAGGCT CTTTAATAAG AAGGGGGGAG ATTAGATAAT AAATATGAAT	960
ATCTATCTAT AATTGTTTGC TTCTACAATA ACTTATCTAA CTTTCATATA CAACAACAAA	1020
ACAGACTAAA TCCAGATTGT ATATTCAATT TCAGTTGTTC CTTTATAAAA TAATTTTATA	1080
A ATG AAA AGA ATG GAG GGA AAG TTG TTT ATG GTG TCA AAA AAA TTA	1126
Met Lys Arg Met Glu Gly Lys Leu Phe Met Val Ser Lys Lys Leu	
1 5 10 15	
CAA GTA GTT ACT AAA ACT GTA TTG CTT AGT ACA GTT TTC TCT ATA TCT	1174
Gln Val Val Thr Lys Thr Val Leu Leu Ser Thr Val Phe Ser Ile Ser	
20 25 30	
TTA TTA AAT AAT GAA GTG ATA AAA GCT GAA CAA TTA AAT ATA AAT TCT	1222
Leu Leu Asn Asn Glu Val Ile Lys Ala Glu Gln Leu Asn Ile Asn Ser	
35 40 45	
CAA AGT AAA TAT ACT AAC TTG CAA AAT CTA AAA ATC ACT GAC AAG GTA	1270
Gln Ser Lys Tyr Thr Asn Leu Gln Asn Leu Lys Ile Thr Asp Lys Val	
50 55 60	
GAG GAT TTT AAA GAA GAT AAG GAA AAA GCG AAA GAA TGG GGG AAA GAA	1318
Glu Asp Phe Lys Glu Asp Lys Glu Lys Ala Lys Glu Trp Gly Lys Glu	
65 70 75	
AAA GAA AAA GAG TGG AAA CTA ACT GCT ACT GAA AAA GGA AAA ATG AAT	1366
Lys Glu Lys Glu Trp Lys Leu Thr Ala Thr Glu Lys Gly Lys Met Asn	
80 85 90 95	
AAT TTT TTA GAT AAT AAA AAT GAT ATA AAG ACA AAT TAT AAA GAA ATT	1414
Asn Phe Leu Asp Asn Lys Asn Asp Ile Lys Thr Asn Tyr Lys Glu Ile	
100 105 110	

ACT TTT TCT ATG GCA GGC TCA TTT GAA GAT GAA ATA AAA GAT TTA AAA	1462
Thr Phe Ser Met Ala Gly Ser Phe Glu Asp Glu Ile Lys Asp Leu Lys	
115 120 125	
GAA ATT GAT AAG ATG TTT GAT AAA ACC AAT CTA TCA AAT TCT ATT ATC	1510
Glu Ile Asp Lys Met Phe Asp Lys Thr Asn Leu Ser Asn Ser Ile Ile	
130 135 140	
ACC TAT AAA AAT GTG GAA CCG ACA ACA ATT GGA TTT AAT AAA TCT TTA	1558
Thr Tyr Lys Asn Val Glu Pro Thr Thr Ile Gly Phe Asn Lys Ser Leu	
145 150 155	
ACA GAA GGT AAT ACG ATT AAT TCT GAT GCA ATG GCA CAG TTT AAA GAA	1606
Thr Glu Gly Asn Thr Ile Asn Ser Asp Ala Met Ala Gln Phe Lys Glu	
160 165 170 175	
CAA TTT TTA GAT AGG GAT ATT AAG TTT GAT AGT TAT CTA GAT ACG CAT	1654
Gln Phe Leu Asp Arg Asp Ile Lys Phe Asp Ser Tyr Leu Asp Thr His	
180 185 190	
TTA ACT GCT CAA CAA GTT TCC AGT AAA GAA AGA GTT ATT TTG AAG GTT	1702
Leu Thr Ala Gln Gln Val Ser Ser Lys Glu Arg Val Ile Leu Lys Val	
195 200 205	
ACG GTT CCG AGT GGG AAA GGT TCT ACT ACT CCA ACA AAA GCA GGT GTC	1750
Thr Val Pro Ser Gly Lys Gly Ser Thr Thr Pro Thr Lys Ala Gly Val	
210 215 220	
ATT TTA AAT AAT AGT GAA TAC AAA ATG CTC ATT GAT AAT GGG TAT ATG	1798
Ile Leu Asn Asn Ser Glu Tyr Lys Met Leu Ile Asp Asn Gly Tyr Met	
225 230 235	
GTC CAT GTA GAT AAG GTA TCA AAA GTG GTG AAA AAA GGG GTG GAG TGC	1846
Val His Val Asp Lys Val Ser Lys Val Val Lys Lys Gly Val Glu Cys	
240 245 250 255	
TTA CAA ATT GAA GGG ACT TTA AAA AAG AGT CTT GAC TTT AAA AAT GAT	1894
Leu Gln Ile Glu Gly Thr Leu Lys Lys Ser Leu Asp Phe Lys Asn Asp	
260 265 270	
ATA AAT GCT GAA GCG CAT AGC TGG GGT ATG AAG AAT TAT GAA GAG TGG	1942
Ile Asn Ala Glu Ala His Ser Trp Gly Met Lys Asn Tyr Glu Glu Trp	
275 280 285	
GCT AAA GAT TTA ACC GAT TCG CAA AGG GAA GCT TTA GAT GGG TAT GCT	1990
Ala Lys Asp Leu Thr Asp Ser Gln Arg Glu Ala Leu Asp Gly Tyr Ala	
290 295 300	
AGG CAA GAT TAT AAA GAA ATC AAT AAT TAT TTA AGA AAT CAA GGC GGA	2038
Arg Gln Asp Tyr Lys Glu Ile Asn Asn Tyr Leu Arg Asn Gln Gly Gly	
305 310 315	
AGT GGA AAT GAA AAA CTA GAT GCT CAA ATA AAA AAT ATT TCT GAT GCT	2086
Ser Gly Asn Glu Lys Leu Asp Ala Gln Ile Lys Asn Ile Ser Asp Ala	
320 325 330 335	

TTA GGG AAG AAA CCA ATA CCG GAA AAT ATT ACT GTG TAT AGA TGG TGT Leu Gly Lys Lys Pro Ile Pro Glu Asn Ile Thr Val Tyr Arg Trp Cys 340 345 350	2134
GGC ATG CCG GAA TTT GGT TAT CAA ATT AGT GAT CCG TTA CCT TCT TTA Gly Met Pro Glu Phe Gly Tyr Gln Ile Ser Asp Pro Leu Pro Ser Leu 355 360 365	2182
AAA GAT TTT GAA GAA CAA TTT TTA AAT ACA ATC AAA GAA GAC AAA GGA Lys Asp Phe Glu Glu Gln Phe Leu Asn Thr Ile Lys Glu Asp Lys Gly 370 375 380	2230
TAT ATG AGT ACA AGC TTA TCG AGT GAA CGT CTT GCA GCT TTT GGA TCT Tyr Met Ser Thr Ser Leu Ser Ser Glu Arg Leu Ala Ala Phe Gly Ser 385 390 395	2278
AGA AAA ATT ATA TTA CGA TTA CAA GTT CCG AAA GGA AGT ACG GGT GCG Arg Lys Ile Ile Leu Arg Leu Gln Val Pro Lys Gly Ser Thr Gly Ala 400 405 410 415	2326
TAT TTA AGT GCC ATT GGT GGA TTT GCA AGT GAA AAA GAG ATC CTA CTT Tyr Leu Ser Ala Ile Gly Gly Phe Ala Ser Glu Lys Glu Ile Leu Leu 420 425 430	2374
GAT AAA GAT AGT AAA TAT CAT ATT GAT AAA GTA ACA GAG GTA ATT ATT Asp Lys Asp Ser Lys Tyr His Ile Asp Lys Val Thr Glu Val Ile Ile 435 440 445	2422
AAA GGT GTT AAG CGA TAT GTA GTG GAT GCA ACA TTA TTA ACA AAT Lys Gly Val Lys Arg Tyr Val Val Asp Ala Thr Leu Leu Thr Asn 450 455 460	2467
TAAGGAGATG AAAAATATGA AGAAAAAGTT AGCAAGTGTT GTAACGTGTA CGTTATTAGC	2527
TCCTATGTTT TTGAATGGAA ATGTGAATGC TGTTTACGCA GACAGCAAAA CAAATCAAAT	2587
TTCTACAACA CAGAAAAATC AACAGAAAGA GATGGACCGA AAAGGATTAC TTGGGTATTA	2647
TTTCAAAGGA AAAGATTTTA GTAATCTTAC TATGTTTGCA CCGACACGTG ATAGTACTCT	2707
TATTTATGAT CAACAAACAG CAAATAAACT ATTAGATAAA AAACAACAAG AATATCAGTC	2767
TATTCGTTGG ATTGGTTTGA TTCAGAGTAA AGAAACGGGA GATTTCACAT TTAACCTATC	2827
TGAGGATGAA CAGGCAATTA TAGAAATCAA TGGGAAAATT ATTTCTAATA AAGGGAAAGA	2887
AAAGCAAGTT GTCCATTTAG AAAAAGGAAA ATTAGTTCCA ATCAAAATAG AGTATCAATC	2947
AGATACAAAA TTTAATATTG ACAGTAAAC ATTTAAAGAA CTAAATTAT TTAATATAGA	3007
TAGTCAAAAC CAACCCAGC AAGTCCAGCA AGATGAACTG AGAAATCCTG AATTTAACAA	3067
GAAAGAATCA CAGGAATTCT TAGCGAAACC ATCGAAAATA AATCTTTTCA CTCAAAAAAT	3127
GAAAAGGGAA ATTGATGAAG ACACGGATAC GGATGGGGAC TCTATTCCTG ACCTTTGGGA	3187

AGAAAATGGG	TATACGATTC	ACAATAGAAT	CGCTGTAAAG	TGGGACGATT	CTCTAGCAAG	3247
TAAAGGGTAT	ACGAAATTTG	TTTCAAATCC	ACTAGAAAGT	CACACAGTTG	GTGATCCTTA	3307
TACAGATTAT	GAAAAGGCAG	CAAGAGATCT	AGATTTGTCA	AATGCAAAGG	AAACGTTTAA	3367
CCCATTGGTA	GCTGCTTTTC	CAAGTGTGAA	TGTTAGTATG	GAAAAGGTGA	TATTATCACC	3427
AAATGAAAAT	TTATCCAATA	GTGTAGAGTC	TCATTCATCC	ACGAATTGGT	CTTATACAAA	3487
TACAGAAGGT	GCTTCTGTTG	AAGCGGGGAT	TGGACCAAAA	GGTATTTTCGT	TCGGAGTTAG	3547
CGTAAACTAT	CAACACTCTG	AAACAGTTGC	ACAAGAATGG	GGAACATCTA	CAGGAAATAC	3607
TTGCAATTC	AATACGGCTT	CAGCGGGATA	TTTAAATGCA	AATGTTTCGAT	ATAACAATGT	3667
AGSAACTGGT	GCCATCTACG	ATGTAAAACC	TACAACAAGT	TTTGTATTAA	ATAACGATAC	3727
TATCGCAACT	ATTACGGCGA	AATCTAATTC	TACAGCCTTA	AATATATCTC	CTGGAGAAAG	3787
TTACCCGAAA	AAAGGACAAA	ATGGAATCGC	AATAACATCA	ATGGATGATT	TTAATTCCCA	3847
TCCGATTACA	TTAAATAAAA	AACAAGTAGA	TAATCTGCTA	AATAATAAAC	CTATGATGTT	3907
GGAAACAAAC	CAAACAGATG	GTGTTTATAA	GATAAAAGAT	ACACATGGAA	ATATAGTAAC	3967
TGGCGGAGAA	TGGAATGGTG	TCATACAACA	AATCAAGGCT	AAAACAGCGT	CTATTATTGT	4027
GGATGATGGG	GAACGTGTAG	CAGAAAAACG	TGTAGCGGCA	AAAGATTATG	AAAATCCAGA	4087
AGATAAAACA	CCGTCTTTAA	CTTTAAAAGA	TGCCCTGAAG	CTTTCATATC	CAGATGAAAT	4147
AAAAGAAATA	GAGGGATTAT	TATATTATAA	AAACAAACCG	ATATACGAAT	CGAGCGTTAT	4207
GACTTACTTA	GATGAAAATA	CAGCAAAAAGA	AGTGACCAAA	CAATTAAATG	ATACCACTGG	4267
GAAATTTAAA	GATGTAAGTC	ATTTATATGA	TGTAAAACTG	ACTCCAAAAA	TGAATGTTAC	4327
AATCAAATTG	TCTATACTTT	ATGATAATGC	TGAGTCTAAT	GATAACTCAA	TTGGTAAATG	4387
GACAAACACA	AATATTGTTT	CAGGTGGAAA	TAACGGAAAA	AAACAATATT	CTTCTAATAA	4447
TCCGGATGCT	AATTTGACAT	TAAATACAGA	TGCTCAAGAA	AAATTAAATA	AAAATCGTGA	4507
CTATTATATA	AGTTTATATA	TGAAGTCAGA	AAAAAACACA	CAATGTGAGA	TTACTATAGA	4567
TGGGGAGATT	TATCCGATCA	CTACAAAAAC	AGTGAATGTG	AATAAAGACA	ATTACAAAAG	4627
ATTAGATATT	ATAGCTCATA	ATATAAAAAG	TAATCCAATT	TCTTCACTTC	ATATTAAAAC	4687
GAATGATGAA	ATAACTTTAT	TTTGGGATGA	TATTTCTATA	ACAGATGTAG	CATCAATAAA	4747
ACCGGAAAT	TTAACAGATT	CAGAAATTAA	ACAGATTTAT	AGTAGGTATG	GTATTAAGTT	4807

AGAAGATGGA ATCCTTATTG ATAAAAAAGG TGGGATTCAT TATGGTGAAT TTATTAATGA	4867
AGCTAGTTTT AATATTGAAC CATTGCAAAA TTATGTGACC AAATATGAAG TTAATTATAG	4927
TAGTGAGTTA GGACCAAACG TGAGTGACAC ACTTGAAAGT GATAAAATTT ACAAGGATGG	4987
GACAATTAAA TTTGATTTTA CCAAATATAG TAAAAATGAA CAAGGATTAT TTTATGACAG	5047
TGGATTAAAT TGGGACTTTA AAATTAATGC TATTACTTAT GATGGTAAAG AGATGAATGT	5107
TTTTCATAGA TATAATAAAT AGTTATTATA TCTATGAAGC TGGTGCTAAA GATAGTGTAA	5167
AAGTTAATAT ACTGTAGGAT TGTAATAAAA GTAATGGAAT TGATATCGTA CTTTGGAGTG	5227
GGGGATACTT TGTAAATAGT TCTATCAGAA ACATTAGACT AAGAAAAGTT ACTACCCCCA	5287
CTTGAAAATG AAGATTCAAC TGATTACAAA CAACCTGTTA AATATTATAA GGTPTTAACA	5347
AAATATTAAA CTCTTTATGT TAATACTGTA ATATAAAGAG TTTAATTGTA TTCAAATGAA	5407
GCTTTCCAC AAAATTAGAC TGATTATCTA ATGAAATAAT CAGTCTAATT TTGTAGAACA	5467
GGTCTGGTAT TATTGTACGT GGTCACTAAA AGATATCTAA TATTATTGGG CAAGGCGTTC	5527
CATGATTGAA TCCTCGAATG TCTTGCCCTT TTCATTTATT TAAGAAGGAT TGTGGAGAAA	5587
TTATGGTTTA GATAATGAAG AAAGACTTCA CTTCTAATTT TTGATGTTAA ATAAATCAAA	5647
ATTTGGCGAT TCACATTGTT TAATCCACTG ATAAAACATA CTGGAGTGTT CTTAAAAAAT	5707
CAGCTTTTTT CTTTATAAAA TTTTGCTTAG CGTACGAAAT TCGTGTTTTG TTGGTGGGAC	5767
CCCATGCCCA TCAACTTAAG AGTAAATTAG TAATGAACTT TCGTTCATCT GGATTAAAAT	5827
AACCTCAAAT TAGGACATGT TTTTAAAAAT AAGCAGACCA AATAAGCCTA GAATAGGTAT	5887
CATTTTTTAA AATTATGCTG CTTTCTTTTG TTTTCCAAAT CCATTATACT CATAAGCAAC	5947
ACCCATAATG TCAAAGACTG TTTTGTCTC ATATCGATAA GCTTGATATC GAATTCCTGC	6007
AGCCCGGGG ATCCACTAGT TCTAGAGCGG CCGCCACCGC GG	6049

Informace o sekvenci SEQ ID č. 2:

(i) charakteristiky sekvence:

(A) délka: 462 aminokyselin

(B) typ: aminokyselinová

(D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: protein

(xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 2:

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

Lys Asp Leu Thr Asp Ser Gln Arg Glu Ala Leu Asp Gly Tyr Ala Arg
290 295 300

Gln Asp Tyr Lys Glu Ile Asn Asn Tyr Leu Arg Asn Gln Gly Gly Ser
305 310 315 320

Gly Asn Glu Lys Leu Asp Ala Gln Ile Lys Asn Ile Ser Asp Ala Leu
325 330 335

Gly Lys Lys Pro Ile Pro Glu Asn Ile Thr Val Tyr Arg Trp Cys Gly
340 345 350

Met Pro Glu Phe Gly Tyr Gln Ile Ser Asp Pro Leu Pro Ser Leu Lys
355 360 365

Asp Phe Glu Glu Gln Phe Leu Asn Thr Ile Lys Glu Asp Lys Gly Tyr
370 375 380

Met Ser Thr Ser Leu Ser Ser Glu Arg Leu Ala Ala Phe Gly Ser Arg
385 390 395 400

Lys Ile Ile Leu Arg Leu Gln Val Pro Lys Gly Ser Thr Gly Ala Tyr
405 410 415

Leu Ser Ala Ile Gly Gly Phe Ala Ser Glu Lys Glu Ile Leu Leu Asp
420 425 430

Lys Asp Ser Lys Tyr His Ile Asp Lys Val Thr Glu Val Ile Ile Lys
435 440 445

Gly Val Lys Arg Tyr Val Val Asp Ala Thr Leu Leu Thr Asn
450 455 460

Informace o sekvenci SEQ ID č. 3:

(i) charakteristiky sekvence:

- (A) délka: 20 aminokyselin
- (B) typ: aminokyselinová
- (C) počet řetězců: jednořetězcová
- (D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: peptid

(ix) vlastnosti:

- (A) jméno / klíč: peptid
- (B) lokace: 1..20
- (D) další informace: poznámka = "signální"

peptid pro cílení do vakuoly"

(xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 3:

Ser	Ser	Ser	Ser	Phe	Ala	Asp	Ser	Asn	Pro	Ile	Arg	Val	Thr	Asp	Arg
1				5				10						15	
Ala	Ala	Ser	Thr												
			20												

Informace o sekvenci SEQ ID č. 4:

- (i) charakteristiky sekvence:
 - (A) délka: 2655 párů bází
 - (B) typ: nukleová kyselina
 - (C) počet řetězců: jednořetězcová
 - (D) topologie: lineární
- (ii) typ molekuly: DNA (genomová)
- (iii) hypotetická: není
- (iv) anti-sense: není
- (vi) původní zdroj:
 - (A) organismus: *Bacillus cereus*
 - (B) kmen: AB78
 - (C) konkrétní izolát: NRRL B-21058
- (ix) vlastnosti:
 - (A) jméno / klíč: CDS
 - (B) lokace: 1..2652
 - (D) další informace: produkt = "protein VIP1A(a) o velikosti 100 kDa", poznámka = "Tato sekvence je identická s částí SEQ ID č. 1 mezi nukleotidy 2475 a 5126 včetně."

(xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 4:

ATG	AAA	AAT	ATG	AAG	AAA	AAG	TTA	GCA	AGT	GTT	GTA	ACG	TGT	ACG	TTA
Met	Lys	Asn	Met	Lys	Lys	Lys	Leu	Ala	Ser	Val	Val	Thr	Cys	Thr	Leu
		465					470					475			

TTA GCT CCT ATG TTT TTG AAT GGA AAT GTG AAT GCT GTT TAC GCA GAC Leu Ala Pro Met Phe Leu Asn Gly Asn Val Asn Ala Val Tyr Ala Asp 480 485 490	96
AGC AAA ACA AAT CAA ATT TCT ACA ACA CAG AAA AAT CAA CAG AAA GAG Ser Lys Thr Asn Gln Ile Ser Thr Thr Gln Lys Asn Gln Gln Lys Glu 495 500 505 510	144
ATG GAC CGA AAA GGA TTA CTT GGG TAT TAT TTC AAA GGA AAA GAT TTT Met Asp Arg Lys Gly Leu Leu Gly Tyr Tyr Phe Lys Gly Lys Asp Phe 515 520 525	192
AGT AAT CTT ACT ATG TTT GCA CCG ACA CGT GAT AGT ACT CTT ATT TAT Ser Asn Leu Thr Met Phe Ala Pro Thr Arg Asp Ser Thr Leu Ile Tyr 530 535 540	240
GAT CAA CAA ACA GCA AAT AAA CTA TTA GAT AAA AAA CAA CAA GAA TAT Asp Gln Gln Thr Ala Asn Lys Leu Leu Asp Lys Lys Gln Gln Glu Tyr 545 550 555	288
CAG TCT ATT CGT TGG ATT GGT TTG ATT CAG AGT AAA GAA ACG GGA GAT Gln Ser Ile Arg Trp Ile Gly Leu Ile Gln Ser Lys Glu Thr Gly Asp 560 565 570	336
TTC ACA TTT AAC TTA TCT GAG GAT GAA CAG GCA ATT ATA GAA ATC AAT Phe Thr Phe Asn Leu Ser Glu Asp Glu Gln Ala Ile Ile Glu Ile Asn 575 580 585 590	384
GGG AAA ATT ATT TCT AAT AAA GGG AAA GAA AAG CAA GTT GTC CAT TTA Gly Lys Ile Ile Ser Asn Lys Gly Lys Glu Lys Gln Val Val His Leu 595 600 605	432
GAA AAA GGA AAA TTA GTT CCA ATC AAA ATA GAG TAT CAA TCA GAT ACA Glu Lys Gly Lys Leu Val Pro Ile Lys Ile Glu Tyr Gln Ser Asp Thr 610 615 620	480
AAA TTT AAT ATT GAC AGT AAA ACA TTT AAA GAA CTT AAA TTA TTT AAA Lys Phe Asn Ile Asp Ser Lys Thr Phe Lys Glu Leu Lys Leu Phe Lys 625 630 635	528
ATA GAT AGT CAA AAC CAA CCC CAG CAA GTC CAG CAA GAT GAA CTG AGA Ile Asp Ser Gln Asn Gln Pro Gln Gln Val Gln Gln Asp Glu Leu Arg 640 645 650	576
AAT CCT GAA TTT AAC AAG AAA GAA TCA CAG GAA TTC TTA GCG AAA CCA Asn Pro Glu Phe Asn Lys Lys Glu Ser Gln Glu Phe Leu Ala Lys Pro 655 660 665 670	624
TCG AAA ATA AAT CTT TTC ACT CAA AAA ATG AAA AGG GAA ATT GAT GAA Ser Lys Ile Asn Leu Phe Thr Gln Lys Met Lys Arg Glu Ile Asp Glu 675 680 685	672
GAC ACG GAT ACG GAT GGG GAC TCT ATT CCT GAC CTT TGG GAA GAA AAT Asp Thr Asp Thr Asp Gly Asp Ser Ile Pro Asp Leu Trp Glu Glu Asn 690 695 700	720

GGG TAT ACG ATT CAA AAT AGA ATC GCT GTA AAG TGG GAC GAT TCT CTA Gly Tyr Thr Ile Gln Asn Arg Ile Ala Val Lys Trp Asp Asp Ser Leu 705 710 715	768
GCA AGT AAA GGG TAT ACG AAA TTT GTT TCA AAT CCA CTA GAA AGT CAC Ala Ser Lys Gly Tyr Thr Lys Phe Val Ser Asn Pro Leu Glu Ser His 720 725 730	816
ACA GTT GGT GAT CCT TAT ACA GAT TAT GAA AAG GCA GCA AGA GAT CTA Thr Val Gly Asp Pro Tyr Thr Asp Tyr Glu Lys Ala Ala Arg Asp Leu 735 740 745 750	864
GAT TTG TCA AAT GCA AAG GAA ACG TTT AAC CCA TTG GTA GCT GCT TTT Asp Leu Ser Asn Ala Lys Glu Thr Phe Asn Pro Leu Val Ala Ala Phe 755 760 765	912
CCA AGT GTG AAT GTT AGT ATG GAA AAG GTG ATA TTA TCA CCA AAT GAA Pro Ser Val Asn Val Ser Met Glu Lys Val Ile Leu Ser Pro Asn Glu 770 775 780	960
AAT TTA TCC AAT AGT GTA GAG TCT CAT TCA TCC ACG AAT TGG TCT TAT Asn Leu Ser Asn Ser Val Glu Ser His Ser Ser Thr Asn Trp Ser Tyr 785 790 795	1008
ACA AAT ACA GAA GGT GCT TCT GTT GAA GCG GGG ATT GGA CCA AAA GGT Thr Asn Thr Glu Gly Ala Ser Val Glu Ala Gly Ile Gly Pro Lys Gly 800 805 810	1056
ATT TCG TTC GGA GTT AGC GTA AAC TAT CAA CAC TCT GAA ACA GTT GCA Ile Ser Phe Gly Val Ser Val Asn Tyr Gln His Ser Glu Thr Val Ala 815 820 825 830	1104
CAA GAA TGG GGA ACA TCT ACA GGA AAT ACT TCG CAA TTC AAT ACG GCT Gln Glu Trp Gly Thr Ser Thr Gly Asn Thr Ser Gln Phe Asn Thr Ala 835 840 845	1152
TCA GCG GGA TAT TTA AAT GCA AAT GTT CGA TAT AAC AAT GTA GGA ACT Ser Ala Gly Tyr Leu Asn Ala Asn Val Arg Tyr Asn Asn Val Gly Thr 850 855 860	1200
GGT GCC ATC TAC GAT GTA AAA CCT ACA ACA AGT TTT GTA TTA AAT AAC Gly Ala Ile Tyr Asp Val Lys Pro Thr Thr Ser Phe Val Leu Asn Asn 865 870 875	1248
GAT ACT ATC GCA ACT ATT ACG GCG AAA TCT AAT TCT ACA GCC TTA AAT Asp Thr Ile Ala Thr Ile Thr Ala Lys Ser Asn Ser Thr Ala Leu Asn 880 885 890	1296
ATA TCT CCT GGA GAA AGT TAC CCG AAA AAA GGA CAA AAT GGA ATC GCA Ile Ser Pro Gly Glu Ser Tyr Pro Lys Lys Gly Gln Asn Gly Ile Ala 895 900 905 910	1344
ATA ACA TCA ATG GAT GAT TTT AAT TCC CAT CCG ATT ACA TTA AAT AAA Ile Thr Ser Met Asp Asp Phe Asn Ser His Pro Ile Thr Leu Asn Lys 915 920 925	1392

AAA CAA GTA GAT AAT CTG CTA AAT AAT AAA CCT ATG ATG TTG GAA ACA Lys Gln Val Asp Asn Leu Leu Asn Asn Lys Pro Met Met Leu Glu Thr 930 935 940	1440
AAC CAA ACA GAT GGT GTT TAT AAG ATA AAA GAT ACA CAT GGA AAT ATA Asn Gln Thr Asp Gly Val Tyr Lys Ile Lys Asp Thr His Gly Asn Ile 945 950 955	1488
GTA ACT GGC GGA GAA TGG AAT GGT GTC ATA CAA CAA ATC AAG GCT AAA Val Thr Gly Gly Glu Trp Asn Gly Val Ile Gln Gln Ile Lys Ala Lys 960 965 970	1536
ACA GCG TCT ATT ATT GTG GAT GAT GGG GAA CGT GTA GCA GAA AAA CGT Thr Ala Ser Ile Ile Val Asp Asp Gly Glu Arg Val Ala Glu Lys Arg 975 980 985 990	1584
GTA GCG GCA AAA GAT TAT GAA AAT CCA GAA GAT AAA ACA CCG TCT TTA Val Ala Ala Lys Asp Tyr Glu Asn Pro Glu Asp Lys Thr Pro Ser Leu 995 1000 1005	1632
ACT TTA AAA GAT GCC CTG AAG CTT TCA TAT CCA GAT GAA ATA AAA GAA Thr Leu Lys Asp Ala Leu Lys Leu Ser Tyr Pro Asp Glu Ile Lys Glu 1010 1015 1020	1680
ATA GAG GGA TTA TTA TAT TAT AAA AAC AAA CCG ATA TAC GAA TCG AGC Ile Glu Gly Leu Leu Tyr Tyr Lys Asn Lys Pro Ile Tyr Glu Ser Ser 1025 1030 1035	1728
GTT ATG ACT TAC TTA GAT GAA AAT ACA GCA AAA GAA GTG ACC AAA CAA Val Met Thr Tyr Leu Asp Glu Asn Thr Ala Lys Glu Val Thr Lys Gln 1040 1045 1050	1776
TTA AAT GAT ACC ACT GGG AAA TTT AAA GAT GTA AGT CAT TTA TAT GAT Leu Asn Asp Thr Thr Gly Lys Phe Lys Asp Val Ser His Leu Tyr Asp 1055 1060 1065 1070	1824
GTA AAA CTG ACT CCA AAA ATG AAT GTT ACA ATC AAA TTG TCT ATA CTT Val Lys Leu Thr Pro Lys Met Asn Val Thr Ile Lys Leu Ser Ile Leu 1075 1080 1085	1872
TAT GAT AAT GCT GAG TCT AAT GAT AAC TCA ATT GGT AAA TGG ACA AAC Tyr Asp Asn Ala Glu Ser Asn Asp Asn Ser Ile Gly Lys Trp Thr Asn 1090 1095 1100	1920
ACA AAT ATT GTT TCA GGT GGA AAT AAC GGA AAA AAA CAA TAT TCT TCT Thr Asn Ile Val Ser Gly Gly Asn Asn Gly Lys Lys Gln Tyr Ser Ser 1105 1110 1115	1968
AAT AAT CCG GAT GCT AAT TTG ACA TTA AAT ACA GAT GCT CAA GAA AAA Asn Asn Pro Asp Ala Asn Leu Thr Leu Asn Thr Asp Ala Gln Glu Lys 1120 1125 1130	2016

TTA AAT AAA AAT CGT GAC TAT TAT ATA AGT TTA TAT ATG AAG TCA GAA Leu Asn Lys Asn Arg Asp Tyr Tyr Ile Ser Leu Tyr Met Lys Ser Glu 1135 1140 1145 1150	2064
AAA AAC ACA CAA TGT GAG ATT ACT ATA GAT GGG GAG ATT TAT CCG ATC Lys Asn Thr Gln Cys Glu Ile Thr Ile Asp Gly Glu Ile Tyr Pro Ile 1155 1160 1165	2112
ACT ACA AAA ACA GTG AAT GTG AAT AAA GAC AAT TAC AAA AGA TTA GAT Thr Thr Lys Thr Val Asn Val Asn Lys Asp Asn Tyr Lys Arg Leu Asp 1170 1175 1180	2160
ATT ATA GCT CAT AAT ATA AAA AGT AAT CCA ATT TCT TCA CTT CAT ATT Ile Ile Ala His Asn Ile Lys Ser Asn Pro Ile Ser Ser Leu His Ile 1185 1190 1195	2208
AAA ACG AAT GAT GAA ATA ACT TTA TTT TGG GAT GAT ATT TCT ATA ACA Lys Thr Asn Asp Glu Ile Thr Leu Phe Trp Asp Asp Ile Ser Ile Thr 1200 1205 1210	2256
GAT GTA GCA TCA ATA AAA CCG GAA AAT TTA ACA GAT TCA GAA ATT AAA Asp Val Ala Ser Ile Lys Pro Glu Asn Leu Thr Asp Ser Glu Ile Lys 1215 1220 1225 1230	2304
CAG ATT TAT AGT AGG TAT GGT ATT AAG TTA GAA GAT GGA ATC CTT ATT Gln Ile Tyr Ser Arg Tyr Gly Ile Lys Leu Glu Asp Gly Ile Leu Ile 1235 1240 1245	2352
GAT AAA AAA GGT GGG ATT CAT TAT GGT GAA TTT ATT AAT GAA GCT AGT Asp Lys Lys Gly Gly Ile His Tyr Gly Glu Phe Ile Asn Glu Ala Ser 1250 1255 1260	2400
TTT AAT ATT GAA CCA TTG CAA AAT TAT GTG ACC AAA TAT GAA GTT ACT Phe Asn Ile Glu Pro Leu Gln Asn Tyr Val Thr Lys Tyr Glu Val Thr 1265 1270 1275	2448
TAT AGT AGT GAG TTA GGA CCA AAC GTG AGT GAC ACA CTT GAA AGT GAT Tyr Ser Ser Glu Leu Gly Pro Asn Val Ser Asp Thr Leu Glu Ser Asp 1280 1285 1290	2496
AAA ATT TAC AAG GAT GGG ACA ATT AAA TTT GAT TTT ACC AAA TAT AGT Lys Ile Tyr Lys Asp Gly Thr Ile Lys Phe Asp Phe Thr Lys Tyr Ser 1295 1300 1305 1310	2544
AAA AAT GAA CAA GGA TTA TTT TAT GAC AGT GGA TTA AAT TGG GAC TTT Lys Asn Glu Gln Gly Leu Phe Tyr Asp Ser Gly Leu Asn Trp Asp Phe 1315 1320 1325	2592
AAA ATT AAT GCT ATT ACT TAT GAT GGT AAA GAG ATG AAT GTT TTT CAT Lys Ile Asn Ala Ile Thr Tyr Asp Gly Lys Glu Met Asn Val Phe His 1330 1335 1340	2640
AGA TAT AAT AAA TAG Arg Tyr Asn Lys 1345	2655

Informace o sekvenci SEQ ID č. 5:

- (i) charakteristiky sekvence:
 - (A) délka: 884 aminokyselin
 - (B) typ: aminokyselinová
 - (D) topologie: lineární
- (ii) typ molekuly: protein
- (xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 5:

Met	Lys	Asn	Met	Lys	Lys	Lys	Leu	Ala	Ser	Val	Val	Thr	Cys	Thr	Leu	
1				5					10					15		
Leu	Ala	Pro	Met	Phe	Leu	Asn	Gly	Asn	Val	Asn	Ala	Val	Tyr	Ala	Asp	
			20				25						30			
Ser	Lys	Thr	Asn	Gln	Ile	Ser	Thr	Thr	Gln	Lys	Asn	Gln	Gln	Lys	Glu	
		35					40					45				
Met	Asp	Arg	Lys	Gly	Leu	Leu	Gly	Tyr	Tyr	Phe	Lys	Gly	Lys	Asp	Phe	
	50					55					60					
Ser	Asn	Leu	Thr	Met	Phe	Ala	Pro	Thr	Arg	Asp	Ser	Thr	Leu	Ile	Tyr	
	65				70					75					80	
Asp	Gln	Gln	Thr	Ala	Asn	Lys	Leu	Leu	Asp	Lys	Lys	Gln	Gln	Glu	Tyr	
				85					90					95		
Gln	Ser	Ile	Arg	Trp	Ile	Gly	Leu	Ile	Gln	Ser	Lys	Glu	Thr	Gly	Asp	
			100				105						110			
Phe	Thr	Phe	Asn	Leu	Ser	Glu	Asp	Glu	Gln	Ala	Ile	Ile	Glu	Ile	Asn	
		115					120					125				
Gly	Lys	Ile	Ile	Ser	Asn	Lys	Gly	Lys	Glu	Lys	Gln	Val	Val	His	Leu	
	130					135					140					
Glu	Lys	Gly	Lys	Leu	Val	Pro	Ile	Lys	Ile	Glu	Tyr	Gln	Ser	Asp	Thr	
	145				150					155					160	
Lys	Phe	Asn	Ile	Asp	Ser	Lys	Thr	Phe	Lys	Glu	Leu	Lys	Leu	Phe	Lys	
				165					170					175		
Ile	Asp	Ser	Gln	Asn	Gln	Pro	Gln	Gln	Val	Gln	Gln	Asp	Glu	Leu	Arg	
			180				185						190			
Asn	Pro	Glu	Phe	Asn	Lys	Lys	Glu	Ser	Gln	Glu	Phe	Leu	Ala	Lys	Pro	
		195					200					205				
Ser	Lys	Ile	Asn	Leu	Phe	Thr	Gln	Lys	Met	Lys	Arg	Glu	Ile	Asp	Glu	
	210					215					220					

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

Val	Ala	Ala	Lys	Asp	Tyr	Glu	Asn	Pro	Glu	Asp	Lys	Thr	Pro	Ser	Leu	530	535	540	
Thr	Leu	Lys	Asp	Ala	Leu	Lys	Leu	Ser	Tyr	Pro	Asp	Glu	Ile	Lys	Glu	545	550	555	560
Ile	Glu	Gly	Leu	Leu	Tyr	Tyr	Lys	Asn	Lys	Pro	Ile	Tyr	Glu	Ser	Ser	565	570	575	
Val	Met	Thr	Tyr	Leu	Asp	Glu	Asn	Thr	Ala	Lys	Glu	Val	Thr	Lys	Gln	580	585	590	
Leu	Asn	Asp	Thr	Thr	Gly	Lys	Phe	Lys	Asp	Val	Ser	His	Leu	Tyr	Asp	595	600	605	
Val	Lys	Leu	Thr	Pro	Lys	Met	Asn	Val	Thr	Ile	Lys	Leu	Ser	Ile	Leu	610	615	620	
Tyr	Asp	Asn	Ala	Glu	Ser	Asn	Asp	Asn	Ser	Ile	Gly	Lys	Trp	Thr	Asn	625	630	635	640
Thr	Asn	Ile	Val	Ser	Gly	Gly	Asn	Asn	Gly	Lys	Lys	Gln	Tyr	Ser	Ser	645	650	655	
Asn	Asn	Pro	Asp	Ala	Asn	Leu	Thr	Leu	Asn	Thr	Asp	Ala	Gln	Glu	Lys	660	665	670	
Leu	Asn	Lys	Asn	Arg	Asp	Tyr	Tyr	Ile	Ser	Leu	Tyr	Met	Lys	Ser	Glu	675	680	685	
Lys	Asn	Thr	Gln	Cys	Glu	Ile	Thr	Ile	Asp	Gly	Glu	Ile	Tyr	Pro	Ile	690	695	700	
Thr	Thr	Lys	Thr	Val	Asn	Val	Asn	Lys	Asp	Asn	Tyr	Lys	Arg	Leu	Asp	705	710	715	720
Ile	Ile	Ala	His	Asn	Ile	Lys	Ser	Asn	Pro	Ile	Ser	Ser	Leu	His	Ile	725	730	735	
Lys	Thr	Asn	Asp	Glu	Ile	Thr	Leu	Phe	Trp	Asp	Asp	Ile	Ser	Ile	Thr	740	745	750	
Asp	Val	Ala	Ser	Ile	Lys	Pro	Glu	Asn	Leu	Thr	Asp	Ser	Glu	Ile	Lys	755	760	765	
Gln	Ile	Tyr	Ser	Arg	Tyr	Gly	Ile	Lys	Leu	Glu	Asp	Gly	Ile	Leu	Ile	770	775	780	
Asp	Lys	Lys	Gly	Gly	Ile	His	Tyr	Gly	Glu	Phe	Ile	Asn	Glu	Ala	Ser	785	790	795	800
Phe	Asn	Ile	Glu	Pro	Leu	Gln	Asn	Tyr	Val	Thr	Lys	Tyr	Glu	Val	Thr	805	810	815	
Tyr	Ser	Ser	Glu	Leu	Gly	Pro	Asn	Val	Ser	Asp	Thr	Leu	Glu	Ser	Asp	820	825	830	

Lys Ile Tyr Lys Asp Gly Thr Ile Lys Phe Asp Phe Thr Lys Tyr Ser
835 840 845

Lys Asn Glu Gln Gly Leu Phe Tyr Asp Ser Gly Leu Asn Trp Asp Phe
850 855 860

Lys Ile Asn Ala Ile Thr Tyr Asp Gly Lys Glu Met Asn Val Phe His
865 870 875 880

Arg Tyr Asn Lys

Informace o sekvenci SEQ ID č. 6:

- (i) charakteristiky sekvence:
 - (A) délka: 2004 párů bází
 - (B) typ: nukleová kyselina
 - (C) počet řetězců: jednořetězcová
 - (D) topologie: lineární
- (ii) typ molekuly: DNA (genomová)
- (iii) hypotetická: není
- (iv) anti-sense: není
- (vi) původní zdroj:
 - (A) organismus: Bacillus cereus
 - (B) kmen: AB78
 - (C) konkrétní izolát: NRRL B-21058
- (ix) vlastnosti:
 - (A) jméno / klíč: CDS
 - (B) lokace: 1..2001
 - (D) další informace: produkt = "protein VIP1A(a) o velikosti 80 kDa", poznámka = "Tato sekvence je identická se sekvencí SEQ ID č. 1 mezi nukleotidy 3126 a 5126 včetně."

(xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 6:

ATG AAA AGG GAA ATT GAT GAA GAC ACG GAT ACG GAT GGG GAC TCT ATT	48
Met Lys Arg Glu Ile Asp Glu Asp Thr Asp Thr Asp Gly Asp Ser Ile	
885 890 895 900	
CCT GAC CTT TGG GAA GAA AAT GGG TAT ACG ATT CAA AAT AGA ATC GCT	96
Pro Asp Leu Trp Glu Glu Asn Gly Tyr Thr Ile Gln Asn Arg Ile Ala	
905 910 915	
GTA AAG TGG GAC GAT TCT CTA GCA AGT AAA GGG TAT ACG AAA TTT GTT	144
Val Lys Trp Asp Asp Ser Leu Ala Ser Lys Gly Tyr Thr Lys Phe Val	
920 925 930	
TCA AAT CCA CTA GAA AGT CAC ACA GTT GGT GAT CCT TAT ACA GAT TAT	192
Ser Asn Pro Leu Glu Ser His Thr Val Gly Asp Pro Tyr Thr Asp Tyr	
935 940 945	
GAA AAG GCA GCA AGA GAT CTA GAT TTG TCA AAT GCA AAG GAA ACG TTT	240
Glu Lys Ala Ala Arg Asp Leu Asp Leu Ser Asn Ala Lys Glu Thr Phe	
950 955 960	
AAC CCA TTG GTA GCT GCT TTT CCA AGT GTG AAT GTT AGT ATG GAA AAG	288
Asn Pro Leu Val Ala Ala Phe Pro Ser Val Asn Val Ser Met Glu Lys	
965 970 975 980	
GTG ATA TTA TCA CCA AAT GAA AAT TTA TCC AAT AGT GTA GAG TCT CAT	336
Val Ile Leu Ser Pro Asn Glu Asn Leu Ser Asn Ser Val Glu Ser His	
985 990 995	
TCA TCC ACG AAT TGG TCT TAT ACA AAT ACA GAA GGT GCT TCT GTT GAA	384
Ser Ser Thr Asn Trp Ser Tyr Thr Asn Thr Glu Gly Ala Ser Val Glu	
1000 1005 1010	
GCG GGG ATT GGA CCA AAA GGT ATT TCG TTC GGA GTT AGC GTA AAC TAT	432
Ala Gly Ile Gly Pro Lys Gly Ile Ser Phe Gly Val Ser Val Asn Tyr	
1015 1020 1025	
CAA CAC TCT GAA ACA GTT GCA CAA GAA TGG GGA ACA TCT ACA GGA AAT	480
Gln His Ser Glu Thr Val Ala Gln Glu Trp Gly Thr Ser Thr Gly Asn	
1030 1035 1040	
ACT TCG CAA TTC AAT ACG GCT TCA GCG GGA TAT TTA AAT GCA AAT GTT	528
Thr Ser Gln Phe Asn Thr Ala Ser Ala Gly Tyr Leu Asn Ala Asn Val	
1045 1050 1055 1060	
CGA TAT AAC AAT GTA GGA ACT GGT GCC ATC TAC GAT GTA AAA CCT ACA	576
Arg Tyr Asn Asn Val Gly Thr Gly Ala Ile Tyr Asp Val Lys Pro Thr	
1065 1070 1075	
ACA AGT TTT GTA TTA AAT AAC GAT ACT ATC GCA ACT ATT ACG GCG AAA	624
Thr Ser Phe Val Leu Asn Asn Asp Thr Ile Ala Thr Ile Thr Ala Lys	
1080 1085 1090	

TCT AAT TCT ACA GCC TTA AAT ATA TCT CCT GGA GAA AGT TAC CCG AAA Ser Asn Ser Thr Ala Leu Asn Ile Ser Pro Gly Glu Ser Tyr Pro Lys 1095 1100 1105	672
AAA GGA CAA AAT GGA ATC GCA ATA ACA TCA ATG GAT GAT TTT AAT TCC Lys Gly Gln Asn Gly Ile Ala Ile Thr Ser Met Asp Asp Phe Asn Ser 1110 1115 1120	720
CAT CCG ATT ACA TTA AAT AAA AAA CAA GTA GAT AAT CTG CTA AAT AAT His Pro Ile Thr Leu Asn Lys Lys Gln Val Asp Asn Leu Leu Asn Asn 1125 1130 1135 1140	768
AAA CCT ATG ATG TTG GAA ACA AAC CAA ACA GAT GGT GTT TAT AAG ATA Lys Pro Met Met Leu Glu Thr Asn Gln Thr Asp Gly Val Tyr Lys Ile 1145 1150 1155	816
AAA GAT ACA CAT GGA AAT ATA GTA ACT GGC GGA GAA TGG AAT GGT GTC Lys Asp Thr His Gly Asn Ile Val Thr Gly Gly Glu Trp Asn Gly Val 1160 1165 1170	864
ATA CAA CAA ATC AAG GCT AAA ACA GCG TCT ATT ATT GTG GAT GAT GGG Ile Gln Gln Ile Lys Ala Lys Thr Ala Ser Ile Ile Val Asp Asp Gly 1175 1180 1185	912
GAA CGT GTA GCA GAA AAA CGT GTA GCG GCA AAA GAT TAT GAA AAT CCA Glu Arg Val Ala Glu Lys Arg Val Ala Ala Lys Asp Tyr Glu Asn Pro 1190 1195 1200	960
GAA GAT AAA ACA CCG TCT TTA ACT TTA AAA GAT GCC CTG AAG CTT TCA Glu Asp Lys Thr Pro Ser Leu Thr Leu Lys Asp Ala Leu Lys Leu Ser 1205 1210 1215 1220	1008
TAT CCA GAT GAA ATA AAA GAA ATA GAG GGA TTA TTA TAT TAT AAA AAC Tyr Pro Asp Glu Ile Lys Glu Ile Glu Gly Leu Leu Tyr Tyr Lys Asn 1225 1230 1235	1056
AAA CCG ATA TAC GAA TCG AGC GTT ATG ACT TAC TTA GAT GAA AAT ACA Lys Pro Ile Tyr Glu Ser Ser Val Met Thr Tyr Leu Asp Glu Asn Thr 1240 1245 1250	1104
GCA AAA GAA GTG ACC AAA CAA TTA AAT GAT ACC ACT GGG AAA TTT AAA Ala Lys Glu Val Thr Lys Gln Leu Asn Asp Thr Thr Gly Lys Phe Lys 1255 1260 1265	1152
GAT GTA AGT CAT TTA TAT GAT GTA AAA CTG ACT CCA AAA ATG AAT GTT Asp Val Ser His Leu Tyr Asp Val Lys Leu Thr Pro Lys Met Asn Val 1270 1275 1280	1200
ACA ATC AAA TTG TCT ATA CTT TAT GAT AAT GCT GAG TCT AAT GAT AAC Thr Ile Lys Leu Ser Ile Leu Tyr Asp Asn Ala Glu Ser Asn Asp Asn 1285 1290 1295 1300	1248
TCA ATT GGT AAA TGG ACA AAC ACA AAT ATT GTT TCA GGT GGA AAT AAC Ser Ile Gly Lys Trp Thr Asn Thr Asn Ile Val Ser Gly Gly Asn Asn 1305 1310 1315	1296

GGA AAA AAA CAA TAT TCT TCT AAT AAT CCG GAT GCT AAT TTG ACA TTA Gly Lys Lys Gln Tyr Ser Ser Asn Asn Pro Asp Ala Asn Leu Thr Leu 1320 1325 1330	1344
AAT ACA GAT GCT CAA GAA AAA TTA AAT AAA AAT CGT GAC TAT TAT ATA Asn Thr Asp Ala Gln Glu Lys Leu Asn Lys Asn Arg Asp Tyr Tyr Ile 1335 1340 1345	1392
AGT TTA TAT ATG AAG TCA GAA AAA AAC ACA CAA TGT GAG ATT ACT ATA Ser Leu Tyr Met Lys Ser Glu Lys Asn Thr Gln Cys Glu Ile Thr Ile 1350 1355 1360	1440
GAT GGG GAG ATT TAT CCG ATC ACT ACA AAA ACA GTG AAT GTG AAT AAA Asp Gly Glu Ile Tyr Pro Ile Thr Thr Lys Thr Val Asn Val Asn Lys 1365 1370 1375 1380	1488
GAC AAT TAC AAA AGA TTA GAT ATT ATA GCT CAT AAT ATA AAA AGT AAT Asp Asn Tyr Lys Arg Leu Asp Ile Ile Ala His Asn Ile Lys Ser Asn 1385 1390 1395	1536
CCA ATT TCT TCA CTT CAT ATT AAA ACG AAT GAT GAA ATA ACT TTA TTT Pro Ile Ser Ser Leu His Ile Lys Thr Asn Asp Glu Ile Thr Leu Phe 1400 1405 1410	1584
TGG GAT GAT ATT TCT ATA ACA GAT GTA GCA TCA ATA AAA CCG GAA AAT Trp Asp Asp Ile Ser Ile Thr Asp Val Ala Ser Ile Lys Pro Glu Asn 1415 1420 1425	1632
TTA ACA GAT TCA GAA ATT AAA CAG ATT TAT AGT AGG TAT GGT ATT AAG Leu Thr Asp Ser Glu Ile Lys Gln Ile Tyr Ser Arg Tyr Gly Ile Lys 1430 1435 1440	1680
TTA GAA GAT GGA ATC CTT ATT GAT AAA AAA GGT GGG ATT CAT TAT GGT Leu Glu Asp Gly Ile Leu Ile Asp Lys Lys Gly Gly Ile His Tyr Gly 1445 1450 1455 1460	1728
GAA TTT ATT AAT GAA GCT AGT TTT AAT ATT GAA CCA TTG CCA AAT TAT Glu Phe Ile Asn Glu Ala Ser Phe Asn Ile Glu Pro Leu Pro Asn Tyr 1465 1470 1475	1776
GTG ACC AAA TAT GAA GTT ACT TAT AGT AGT GAG TTA GGA CCA AAC GTG Val Thr Lys Tyr Glu Val Thr Tyr Ser Ser Glu Leu Gly Pro Asn Val 1480 1485 1490	1824
AGT GAC ACA CTT GAA AGT GAT AAA ATT TAC AAG GAT GGG ACA ATT AAA Ser Asp Thr Leu Glu Ser Asp Lys Ile Tyr Lys Asp Gly Thr Ile Lys 1495 1500 1505	1872
TTT GAT TTT ACC AAA TAT AGT AAA AAT GAA CAA GGA TTA TTT TAT GAC Phe Asp Phe Thr Lys Tyr Ser Lys Asn Glu Gln Gly Leu Phe Tyr Asp 1510 1515 1520	1920
AGT GGA TTA AAT TGG GAC TTT AAA ATT AAT GCT ATT ACT TAT GAT GGT Ser Gly Leu Asn Trp Asp Phe Lys Ile Asn Ala Ile Thr Tyr Asp Gly 1525 1530 1535 1540	1968

AAA GAG ATG AAT GTT TTT CAT AGA TAT AAT AAA TAG
Lys Glu Met Asn Val Phe His Arg Tyr Asn Lys
1545 1550

2004

Informace o sekvenci SEQ ID č. 7:

- (i) charakteristiky sekvence:
 - (A) délka: 667 aminokyselin
 - (B) typ: aminokyselinová
 - (D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: protein

(xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 7:

Met Lys Arg Glu Ile Asp Glu Asp Thr Asp Thr Asp Gly Asp Ser Ile
1 5 10 15
Pro Asp Leu Trp Glu Glu Asn Gly Tyr Thr Ile Gln Asn Arg Ile Ala
20 25 30
Val Lys Trp Asp Asp Ser Leu Ala Ser Lys Gly Tyr Thr Lys Phe Val
35 40 45
Ser Asn Pro Leu Glu Ser His Thr Val Gly Asp Pro Tyr Thr Asp Tyr
50 55 60
Glu Lys Ala Ala Arg Asp Leu Asp Leu Ser Asn Ala Lys Glu Thr Phe
65 70 75 80
Asn Pro Leu Val Ala Ala Phe Pro Ser Val Asn Val Ser Met Glu Lys
85 90 95
Val Ile Leu Ser Pro Asn Glu Asn Leu Ser Asn Ser Val Glu Ser His
100 105 110
Ser Ser Thr Asn Trp Ser Tyr Thr Asn Thr Glu Gly Ala Ser Val Glu
115 120 125
Ala Gly Ile Gly Pro Lys Gly Ile Ser Phe Gly Val Ser Val Asn Tyr
130 135 140
Gln His Ser Glu Thr Val Ala Gln Glu Trp Gly Thr Ser Thr Gly Asn
145 150 155 160
Thr Ser Gln Phe Asn Thr Ala Ser Ala Gly Tyr Leu Asn Ala Asn Val
165 170 175

Arg	Tyr	Asn	Asn	Val	Gly	Thr	Gly	Ala	Ile	Tyr	Asp	Val	Lys	Pro	Thr	180	185	190	
Thr	Ser	Phe	Val	Leu	Asn	Asn	Asp	Thr	Ile	Ala	Thr	Ile	Thr	Ala	Lys	195	200	205	
Ser	Asn	Ser	Thr	Ala	Leu	Asn	Ile	Ser	Pro	Gly	Glu	Ser	Tyr	Pro	Lys	210	215	220	
Lys	Gly	Gln	Asn	Gly	Ile	Ala	Ile	Thr	Ser	Met	Asp	Asp	Phe	Asn	Ser	225	230	235	240
His	Pro	Ile	Thr	Leu	Asn	Lys	Lys	Gln	Val	Asp	Asn	Leu	Leu	Asn	Asn	245	250	255	
Lys	Pro	Met	Met	Leu	Glu	Thr	Asn	Gln	Thr	Asp	Gly	Val	Tyr	Lys	Ile	260	265	270	
Lys	Asp	Thr	His	Gly	Asn	Ile	Val	Thr	Gly	Gly	Glu	Trp	Asn	Gly	Val	275	280	285	
Ile	Gln	Gln	Ile	Lys	Ala	Lys	Thr	Ala	Ser	Ile	Ile	Val	Asp	Asp	Gly	290	295	300	
Glu	Arg	Val	Ala	Glu	Lys	Arg	Val	Ala	Ala	Lys	Asp	Tyr	Glu	Asn	Pro	305	310	315	320
Glu	Asp	Lys	Thr	Pro	Ser	Leu	Thr	Leu	Lys	Asp	Ala	Leu	Lys	Leu	Ser	325	330	335	
Tyr	Pro	Asp	Glu	Ile	Lys	Glu	Ile	Glu	Gly	Leu	Leu	Tyr	Tyr	Lys	Asn	340	345	350	
Lys	Pro	Ile	Tyr	Glu	Ser	Ser	Val	Met	Thr	Tyr	Leu	Asp	Glu	Asn	Thr	355	360	365	
Ala	Lys	Glu	Val	Thr	Lys	Gln	Leu	Asn	Asp	Thr	Thr	Gly	Lys	Phe	Lys	370	375	380	
Asp	Val	Ser	His	Leu	Tyr	Asp	Val	Lys	Leu	Thr	Pro	Lys	Met	Asn	Val	385	390	395	400
Thr	Ile	Lys	Leu	Ser	Ile	Leu	Tyr	Asp	Asn	Ala	Glu	Ser	Asn	Asp	Asn	405	410	415	
Ser	Ile	Gly	Lys	Trp	Thr	Asn	Thr	Asn	Ile	Val	Ser	Gly	Gly	Asn	Asn	420	425	430	
Gly	Lys	Lys	Gln	Tyr	Ser	Ser	Asn	Asn	Pro	Asp	Ala	Asn	Leu	Thr	Leu	435	440	445	
Asn	Thr	Asp	Ala	Gln	Glu	Lys	Leu	Asn	Lys	Asn	Arg	Asp	Tyr	Tyr	Ile	450	455	460	
Ser	Leu	Tyr	Met	Lys	Ser	Glu	Lys	Asn	Thr	Gln	Cys	Glu	Ile	Thr	Ile	465	470	475	480

Asp Gly Glu Ile Tyr Pro Ile Thr Thr Lys Thr Val Asn Val Asn Lys
485 490 495

Asp Asn Tyr Lys Arg Leu Asp Ile Ile Ala His Asn Ile Lys Ser Asn
500 505 510

Pro Ile Ser Ser Leu His Ile Lys Thr Asn Asp Glu Ile Thr Leu Phe
515 520 525

Trp Asp Asp Ile Ser Ile Thr Asp Val Ala Ser Ile Lys Pro Glu Asn
530 535 540

Leu Thr Asp Ser Glu Ile Lys Gln Ile Tyr Ser Arg Tyr Gly Ile Lys
545 550 555 560

Leu Glu Asp Gly Ile Leu Ile Asp Lys Lys Gly Gly Ile His Tyr Gly
565 570 575

Glu Phe Ile Asn Glu Ala Ser Phe Asn Ile Glu Pro Leu Pro Asn Tyr
580 585 590

Val Thr Lys Tyr Glu Val Thr Tyr Ser Ser Glu Leu Gly Pro Asn Val
595 600 605

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

Phe Asp Phe Thr Lys Tyr Ser Lys Asn Glu Gln Gly Leu Phe Tyr Asp
625 630 635 640

Ser Gly Leu Asn Trp Asp Phe Lys Ile Asn Ala Ile Thr Tyr Asp Gly
645 650 655

Lys Glu Met Asn Val Phe His Arg Tyr Asn Lys
660 665

Informace o sekvenci SEQ ID č. 8:

- (i) charakteristiky sekvence:
 - (A) délka: 16 aminokyselin
 - (B) typ: aminokyselinová
 - (C) počet řetězců: jednořetězcová
 - (D) topologie: lineární
- (ii) typ molekuly: peptid
- (iii) hypotetická: není

- (v) typ fragmentu: N-koncový
- (vi) původní zdroj:
 - (A) organismus: *Bacillus cereus*
 - (B) kmen: AB78
 - (C) konkrétní izolát: NRRL B-21058
- (ix) vlastnosti:
 - (A) jméno / klíč: peptid
 - (B) lokace: 1..16
 - (D) další informace: poznámka = "N-koncová sek-
vence proteinu purifikovaného z kmene AB78"
- (xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 8:

Lys	Arg	Glu	Ile	Asp	Glu	Asp	Thr	Asp	Thr	Asx	Gly	Asp	Ser	Ile	Pro
1				5					10					15	

Informace o sekvenci SEQ ID č. 9:

- (i) charakteristiky sekvence:
 - (A) délka: 21 párů bází
 - (B) typ: nukleová kyselina
 - (C) počet řetězců: jednořetězcová
 - (D) topologie: lineární
- (ii) typ molekuly: DNA (genomová)
- (iii) hypotetická: není
- (iv) anti-sense: není
- (ix) vlastnosti:
 - (A) jméno / klíč: různá vlastnost
 - (B) lokace: 1..21
 - (D) další informace: poznámka = "oligonukleoti-
dová sonda na bázi aminokyselin 3 až 9 v
SEQ ID č. 8, s využitím znalosti použití
kodónů *Bacillus thuringiensis*"

(xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 9:

GAAATTGATC AAGATACNGA T

21

Informace o sekvenci SEQ ID č. 10:

- (i) charakteristiky sekvence:
 - (A) délka: 14 aminokyselin
 - (B) typ: aminokyselinová
 - (C) počet řetězců: jednořetězcová
 - (D) topologie: lineární
- (ii) typ molekuly: peptid
- (iii) hypotetická: není
- (v) typ fragmentu: N-koncový
- (vi) původní zdroj:
 - (A) organismus: Bacillus thuringiensis
 - (B) kmen: AB88
- (ix) vlastnosti:
 - (A) jméno / klíč: peptid
 - (B) lokace: 1..14
 - (D) další informace: poznámka = "N-koncová aminokyselinová sekvence proteinu známého jako anexová frakce 23 (menší)"

(xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 10:

Xaa	Glu	Pro	Phe	Val	Ser	Ala	Xaa	Xaa	Xaa	Gln	Xaa	Xaa	Xaa
1				5					10				

Informace o sekvenci SEQ ID č. 11:

- (i) charakteristiky sekvence:
 - (A) délka: 13 aminokyselin
 - (B) typ: aminokyselinová
 - (C) počet řetězců: jednořetězcová

(D) topologie: N-koncová

(vi) původní zdroj:

(A) organismus: *Bacillus thuringiensis*

(xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 11:

Xaa	Glu	Tyr	Glu	Asn	Val	Glu	Pro	Phe	Val	Ser	Ala	Xaa
1				5					10			

Informace o sekvenci SEQ ID č. 12:

(i) charakteristiky sekvence:

(A) délka: 14 aminokyselin

(B) typ: aminokyselinová

(C) počet řetězců: jednořetězcová

(D) topologie: N-koncová

(vi) původní zdroj:

(A) organismus: *Bacillus thuringiensis*

(xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 12:

Met	Asn	Lys	Asn	Asn	Thr	Lys	Leu	Pro	Thr	Arg	Ala	Leu	Pro
1				5					10				

Informace o sekvenci SEQ ID č. 13:

(i) charakteristiky sekvence:

(A) délka: 15 aminokyselin

(B) typ: aminokyselinová

(C) počet řetězců: jednořetězcová

(D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: peptid

(iii) hypotetická: není

(v) typ fragmentu: N-koncový

(vi) původní zdroj:

(A) organismus: *Bacillus thuringiensis*

(B) kmen: AB88

(ix) vlastnosti:

(A) jméno / klíč: peptid

(B) lokace: 1..15

(D) další informace: poznámka = "N-koncová aminokyselinová sekvence VIP o velikosti 35 kDa účinného proti Agrotis ipsilon"

(xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 13:

Ala	Leu	Ser	Glu	Asn	Thr	Gly	Lys	Asp	Gly	Gly	Tyr	Ile	Val	Pro
1				5					10					15

Informace o sekvenci SEQ ID č. 14:

(i) charakteristiky sekvence:

(A) délka: 9 aminokyselin

(B) typ: aminokyselinová

(C) počet řetězců: jednořetězcová

(D) topologie: N-koncová

(vi) původní zdroj:

(A) organismus: Bacillus thuringiensis

(xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 14:

Met	Asp	Asn	Asn	Pro	Asn	Ile	Asn	Glu
1				5				

Informace o sekvenci SEQ ID č. 15:

(i) charakteristiky sekvence:

(A) délka: 9 aminokyselin

(B) typ: aminokyselinová

(C) počet řetězců: jednořetězcová

(D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: peptid

(iii) hypotetická: není

(v) typ fragmentu: N-koncový

(ix) vlastnosti:

(A) jméno / klíč: peptid

(B) lokace: 1..9

(D) další informace: poznámka = "N-koncová sekvence δ -endotoxinu o velikosti 80 kDa"

(xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 15:

Met Asp Asn Asn Pro Asn Ile Asn Glu
1 5

Informace o sekvenci SEQ ID č. 16:

(i) charakteristiky sekvence:

(A) délka: 11 aminokyselin

(B) typ: aminokyselinová

(C) počet řetězců: jednořetězcová

(D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: peptid

(iii) hypotetická: není

(v) typ fragmentu: N-koncový

(vi) původní zdroj:

(A) organismus: *Bacillus thuringiensis*

(ix) vlastnosti:

(A) jméno / klíč: peptid

(B) lokace: 1..11

(D) další informace: poznámka = "N-koncová sekvence δ -endotoxinu o velikosti 60 kDa"

(xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 16:

Met Asn Val Leu Asn Ser Gly Arg Thr Thr Ile
1 5 10

Informace o sekvenci SEQ ID č. 17:

- (i) charakteristiky sekvence:
 - (A) délka: 2655 párů bází
 - (B) typ: nukleová kyselina
 - (C) počet řetězců: jednořetězcová
 - (D) topologie: lineární
- (ii) typ molekuly: DNA (genomová)
- (iii) hypotetická: není
- (iv) anti-sense: není
- (ix) vlastnosti:
 - (A) jméno/klíč: různá vlastnost
 - (B) lokace: 1..2652
 - (D) další informace: poznámka = "DNA-sekvence proteinu VIP1A(a) o velikosti 100 kDa z AB78 optimalizovaná pro kukuřici"
- (xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 17:

ATGAAGAACA TGAAGAAGAA GCTGGCCAGC GTGGTGACCT GCACCCTGCT GGCCCCCATG	60
TTCTTGAACG GCAACGTGAA CGCCGTGTAC GCCGACAGCA AGACCAACCA GATCAGCACC	120
ACCCAGAAGA ACCAGCAGAA GGAGATGGAC CGCAAGGGCC TGCTGGGCTA CTACTTCAAG	180
GGCAAGGACT TCAGCAACCT GACCATGTTC GCCCCACGC GTGACAGCAC CCTGATCTAC	240
GACCAGCAGA CCGCCAACAA GCTGCTGGAC AAGAAGCAGC AGGAGTACCA GAGCATCOGC	300
TGGATCGGCC TGATCCAGAG CAAGGAGACC GGCGACTTCA CCTTCAACCT GAGCGAGGAC	360
GAGCAGGCCA TCATCGAGAT CAACGGCAAG ATCATCAGCA ACAAGGGCAA GGAGAAGCAG	420
GTGGTGACCC TGGAGAAGGG CAAGCTGGTG CCCATCAAGA TCGAGTACCA GAGCGACACC	480
AAGTTCAACA TCGACAGCAA GACCTTCAAG GAGCTGAAGC TTTTCAAGAT CGACAGCCAG	540
AACCAGCCCC AGCAGGTGCA GCAGGACGAG CTGCGCAACC CCGAGTTCAA CAAGAAGGAG	600
AGCCAGGAGT TCCTGGCCAA GCCCAGCAAG ATCAACCTGT TCACCCAGCA GATGAAGGCG	660
GAGATCGACG AGGACACCGA CACCGACGGC GACAGCATCC CCGACCTGTG GGAGGAGAAC	720

GGCTACACCA TCCAGAACCG CATCGCCGTG AAGTGGGACG ACAGCCTGGC TAGCAAGGGC	780
TACACCAAGT TCGTGAGCAA CCCCCTGGAG AGCCACACCG TGGGCGACCC CTACACCGAC	840
TACGAGAAGG CCGCCCGCGA CCTGGACCTG AGCAACGCCA AGGAGACCTT CAACCCCCTG	900
GTGGCCGCCT TCCCCAGCGT GAACGTGAGC ATGGAGAAGG TGATCCTGAG CCCCACGAG	960
AACCTGAGCA ACAGCGTGGA GAGCCACTCG AGCACCAACT GGAGCTACAC CAACACCGAG	1020
GGCGCCAGCG TGGAGGCCGG CATCGGTCCC AAGGGCATCA GCTTCGGCGT GAGCGTGAAC	1080
TACCAGCACA GCGAGACCGT GGCCCAGGAG TGGGGCACCA GCACCGGCAA CACCAGCCAG	1140
TTCAACACCG CCAGCGCCGG CTACCTGAAC GCCAACGTGC GCTACAACAA CGTGGGCACC	1200
GGCGCCATCT ACGACGTGAA GCCCACCACC AGCTTCGTGC TGAACAACGA CACCATCGCC	1260
ACCATCACCG CCAAGTCGAA TTCCACCGCC CTGAACATCA GCCCCGGCGA GAGCTACCCC	1320
AAGAAGGGCC AGAACGGCAT CGCCATCACC AGCATGGACG ACTTCAACAG CCACCCCATC	1380
ACCTGAACA AGAAGCAGGT GGACAACCTG CTGAACAACA AGCCCATGAT GCTGGAGACC	1440
AACCAGACCG ACGGCGTCTA CAAGATCAAG GACACCCACG GCAACATCGT GACCGGCGGC	1500
GAGTGGAACG GCGTGATCCA GCAGATCAAG GCCAAGACCG CCAGCATCAT CGTCGACGAC	1560
GGCGAGCGCG TGGCCGAGAA GCGCGTGGCC GCCAAGGACT ACGAGAACCC CGAGGACAAG	1620
ACCCCCAGCC TGACCCTGAA GGACGCCCTG AAGCTGAGCT ACCCGACGA GATCAAGGAG	1680
ATCGAGGGCC TGCTGTACTA CAAGAACAAG CCCATCTACG AGAGCAGCGT GATGACCTAT	1740
CTAGACGAGA ACACCGCCAA GGAGGTGACC AAGCAGCTGA ACGACACCAC CGGCAAGTTC	1800
AAGGACGTGA GCCACCTGTA CGACGTGAAG CTGACCCCCA AGATGAACGT GACCATCAAG	1860
CTGAGCATCC TGTACGACAA CGCCGAGAGC AACGACAACA GCATCGGCAA GTGGACCAAC	1920
ACCAACATCG TGAGCGGCGG CAACAACGGC AAGAAGCAGT ACAGCAGCAA CAACCCCGAC	1980
GCCAACCTGA CCCTGAACAC CGACGCCCAG GAGAAGCTGA ACAAGAACCG CGACTACTAC	2040
ATCAGCCTGT ACATGAAGAG CGAGAAGAAC ACCCAGTGCG AGATCACCAT CGACGGCGAG	2100
ATATACCCCA TCACCACCAA GACCGTGAAC GTGAACAAGG ACAACTACAA GCGCCTGGAC	2160
ATCATCGCCC ACAACATCAA GAGCAACCCC ATCAGCAGCC TGCACATCAA GACCAACGAC	2220
GAGATCACCC TGTCTGGGA CGACATATCG ATTACCGACG TCGCCAGCAT CAAGCCCGAG	2280
AACCTGACCG ACAGCGAGAT CAAGCAGATA TACAGTCGCT ACGGCATCAA GCTGGAGGAC	2340
GGCATCCTGA TCGACAAGAA GGGCGGCATC CACTACGGCG AGTTCATCAA CGAGGCCAGC	2400

TTCAACATCG AGCCCCTGCA GAACTACGTG ACCAAGTACG AGGTGACCTA CAGCAGCGAG	2460
CTGGGCCCCA ACGTGAGCGA CACCCTGGAG AGCGACAAGA TTTACAAGGA CGGCACCATC	2520
AAGTTCTGACT TCACCAAGTA CAGCAAGAAC GAGCAGGGCC TGTTCTACGA CAGCGGCCTG	2580
AACTGGGACT TCAAGATCAA CGCCATCACC TACGACGGCA AGGAGATGAA CGTGTTCAC	2640
CGCTACAACA AGTAG	2655

Informace o sekvenci SEQ ID č. 18:

- (i) charakteristiky sekvence:
 - (A) délka: 2004 párů bází
 - (B) typ: nukleová kyselina
 - (C) počet řetězců: jednořetězcová
 - (D) topologie: lineární
- (ii) typ molekuly: DNA (genomová)
- (iii) hypotetická: není
- (iv) anti-sense: není
- (ix) vlastnosti:
 - (A) jméno/klíč: různá vlastnost
 - (B) lokace: 1..2004
 - (D) další informace: poznámka = "DNA-sekvence proteinu VIP1A(a) o velikosti 80 kDa z AB78 optimalizovaná pro kukuřici"
- (xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 18:

ATGAAGCGCG AGATCGACGA GGACACCGAC ACCGACGGCG ACAGCATCCC CGACCTGTGG	60
GAGGAGAACG GCTACACCAT CCAGAACCGC ATCGCCGTGA AGTGGGACGA CAGCCTGGCT	120
AGCAAGGGCT ACACCAAGTT CGTGAGCAAC CCCCTGGAGA GCCACACCGT GGGCGACCCC	180
TACACCGACT ACGAGAAGGC CGCCCGCGAC CTGGACCTGA GCAACGCCAA GGAGACCTTC	240
AACCCCTGG TGGCCGCCTT CCCCAGCGTG AACGTGAGCA TGGAGAAGGT GATCCTGAGC	300
CCCAACGAGA ACCTGAGCAA CAGCGTGGAG AGCCACTCGA GCACCAACTG GAGCTACACC	360
AACACCGAGG GCGCCAGCGT GGAGGCCGGC ATCGGTCCCA AGGGCATCAG CTTCGGCGTG	420
AGCGTGAACCT ACCAGCACAG CGAGACCGTG GCCCAGGAGT GGGGCACCAG CACCGGCAAC	480
ACCAGCCAGT TCAACACCGC CAGCGCCGGC TACCTGAACG CCAACGTGCG CTACAACAAC	540

GTGGGCACCG GCGCCATCTA CGACGTGAAG CCCACCACCA GCTTCGTGCT GAACAACGAC	600
ACCATCGCCA CCATCACC GC CAAGTCGAAT TCCACCGCCC TGAACATCAG CCCC GGCGAG	660
AGTACCCCA AGAAGGGCCA GAACGGCATC GCCATCACCA GCATGGACGA CTTCAACAGC	720
CACCCCATCA CCCTGAACAA GAAGCAGGTG GACAACCTGC TGAACAACAA GCCCATGATG	780
CTGGAGACCA ACCAGACCGA CGGCGTCTAC AAGATCAAGG ACACCCACGG CAACATCGTG	840
ACCGGGCGCG AGTGGAACGG CGTGATCCAG CAGATCAAGG CCAAGACCGC CAGCATCATC	900
GTCGACGACG GCGAGCGCGT GGCCGAGAAG CGCGTGGCCG CCAAGGACTA CGAGAACCCC	960
GAGGACAAGA CCCCAGCCT GACCCTGAAG GACGCCCTGA AGCTGAGCTA CCCC GACGAG	1020
ATCAAGGAGA TCGAGGGCCT GCTGTACTAC AAGAACAAGC CCATCTACGA GAGCAGCGTG	1080
ATGACCTATC TAGACGAGAA CACCGCCAAG GAGGTGACCA AGCAGCTGAA CGACACCACC	1140
GGCAAGTTCA AGGACGTGAG CCACCTGTAC GACGTGAAGC TGACCCCCAA GATGAACGTG	1200
ACCATCAAGC TGAGCATCCT GTACGACAAC GCCGAGAGCA ACGACAACAG CATCGGCAAG	1260
TGGACCAACA CCAACATCGT GAGCGGCGGC AACAAACGGCA AGAAGCAGTA CAGCAGCAAC	1320
AACCCCGACG CCAACCTGAC CCTGAACACC GACGCCCAGG AGAAGCTGAA CAAGAACCGC	1380
GACTACTACA TCAGCCTGTA CATGAAGAGC GAGAAGAACA CCCAGTGCGA GATCACCATC	1440
GACGGCGAGA TATACCCCAT CACCACCAAG ACCGTGAACG TGAACAAGGA CAACTACAAG	1500
CGCCTGGACA TCATCGCCCA CAACATCAAG AGCAACCCCA TCAGCAGCCT GCACATCAAG	1560
ACCAACGACG AGATCACCCCT GTTCTGGGAC GACATATCGA TTACCGACGT CGCCAGCATC	1620
AAGCCCGAGA ACCTGACCGA CAGCGAGATC AAGCAGATAT ACAGTCGCTA CGGCATCAAG	1680
CTGGAGGACG GCATCCTGAT CGACAAGAAG GGCGGCATCC ACTACGGCGA GTTCATCAAC	1740
GAGGCCAGCT TCAACATCGA GCCCCTGCAG AACTACGTGA CCAAGTACGA GGTGACCTAC	1800
AGCAGCGAGC TGGGCCCCAA CGTGAGCGAC ACCCTGGAGA GCGACAAGAT TTACAAGGAC	1860
GGCACCATCA AGTTCGACTT CACCAAGTAC AGCAAGAAGC AGCAGGGCCT GTTCTACGAC	1920
AGCGGCCTGA ACTGGGACTT CAAGATCAAC GCCATCACCT ACGACGGCAA GGAGATGAAC	1980
GTGTTCCACC GCTACAACAA GTAG	2004

Informace o sekvenci SEQ ID č. 19:

(i) charakteristiky sekvence:

- (A) délka: 4074 párů bází
 - (B) typ: nukleová kyselina
 - (C) počet řetězců: jednořetězcová
 - (D) topologie: lineární
- (ii) typ molekuly: DNA (genomová)
- (ix) vlastnosti:
- (A) jméno/klíč: CDS
 - (B) lokace: 1..1386
 - (D) další informace: produkt = "VIP2A(b) z Bacillus thuringiensis var. tenebrionis"
- (ix) vlastnosti:
- (A) jméno/klíč: CDS
 - (B) lokace: 1394..3895
 - (D) další informace: produkt = "VIP1A(b) z Bacillus thuringiensis var. tenebrionis"
- (ix) vlastnosti:
- (A) jméno/klíč: různá vlastnost
 - (B) lokace: 1..4074
 - (D) další informace: poznámka = "klonovaná DNA-sekvence z Bacillus thuringiensis var. tenebrionis, která obsahuje gen jak pro VIP1A(b) tak VIP2A(b)"
- (xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 19:

ATG CAA AGA ATG GAG GGA AAG TTG TTT GTG GTG TCA AAA ACA TTA CAA	48
Met Gln Arg Met Glu Gly Lys Leu Phe Val Val Ser Lys Thr Leu Gln	
670 675 680	
GTA GTT ACT AGA ACT GTA TTG CTT AGT ACA GTT TAC TCT ATA ACT TTA	96
Val Val Thr Arg Thr Val Leu Leu Ser Thr Val Tyr Ser Ile Thr Leu	
685 690 695	
TTA AAT AAT GTA GTG ATA AAA GCT GAC CAA TTA AAT ATA AAT TCT CAA	144
Leu Asn Asn Val Val Ile Lys Ala Asp Gln Leu Asn Ile Asn Ser Gln	
700 705 710 715	
AGT AAA TAT ACT AAC TTG CAA AAT CTA AAA ATC CCT GAT AAT GCA GAG	192
Ser Lys Tyr Thr Asn Leu Gln Asn Leu Lys Ile Pro Asp Asn Ala Glu	

	720	725	730	
GAT TTT AAA GAA GAT AAG GGG AAA GCG AAA GAA TGG GGG AAA GAG AAA				240
Asp Phe Lys Glu Asp Lys Gly Lys Ala Lys Glu Trp Gly Lys Glu Lys	735	740	745	
GGG GAA GAG TGG AGG CCT CCT GCT ACT GAG AAA GGA GAA ATG AAT AAT				288
Gly Glu Glu Trp Arg Pro Pro Ala Thr Glu Lys Gly Glu Met Asn Asn	750	755	760	
TTT TTA GAT AAT AAA AAT GAT ATA AAG ACC AAT TAT AAA GAA ATT ACT				336
Phe Leu Asp Asn Lys Asn Asp Ile Lys Thr Asn Tyr Lys Glu Ile Thr	765	770	775	
TTT TCT ATG GCA GGT TCA TGT GAA GAT GAA ATA AAA GAT TTA GAA GAA				384
Phe Ser Met Ala Gly Ser Cys Glu Asp Glu Ile Lys Asp Leu Glu Glu	780	785	790	795
ATT GAT AAG ATC TTT GAT AAA GCC AAT CTC TCG AGT TCT ATT ATC ACC				432
Ile Asp Lys Ile Phe Asp Lys Ala Asn Leu Ser Ser Ser Ile Ile Thr	800	805	810	
TAT AAA AAT GTG GAA CCA GCA ACA ATT GGA TTT AAT AAA TCT TTA ACA				480
Tyr Lys Asn Val Glu Pro Ala Thr Ile Gly Phe Asn Lys Ser Leu Thr	815	820	825	
GAA GGT AAT ACG ATT AAT TCT GAT GCA ATG GCA CAG TTT AAA GAA CAA				528
Glu Gly Asn Thr Ile Asn Ser Asp Ala Met Ala Gln Phe Lys Glu Gln	830	835	840	
TTT TTA GGT AAG GAT ATG AAG TTT GAT AGT TAT CTA GAT ACT CAT TTA				576
Phe Leu Gly Lys Asp Met Lys Phe Asp Ser Tyr Leu Asp Thr His Leu	845	850	855	
ACT GCT CAA CAA GTT TCC AGT AAA AAA AGA GTT ATT TTG AAG GTT ACG				624
Thr Ala Gln Gln Val Ser Ser Lys Lys Arg Val Ile Leu Lys Val Thr	860	865	870	875
GTT CCG AGT GGG AAA GGT TCT ACT ACT CCA ACA AAA GCA GGT GTC ATT				672
Val Pro Ser Gly Lys Gly Ser Thr Thr Pro Thr Lys Ala Gly Val Ile	880	885	890	
TTA AAC AAT AAT GAA TAC AAA ATG CTC ATT GAT AAT GGG TAT GTG CTC				720
Leu Asn Asn Asn Glu Tyr Lys Met Leu Ile Asp Asn Gly Tyr Val Leu	895	900	905	
CAT GTA GAT AAG GTA TCA AAA GTA GTA AAA AAA GGG ATG GAG TGC TTA				768
His Val Asp Lys Val Ser Lys Val Val Lys Lys Gly Met Glu Cys Leu	910	915	920	
CAA GTT GAA GGG ACT TTA AAA AAG AGT CTC GAC TTT AAA AAT GAT ATA				816
Gln Val Glu Gly Thr Leu Lys Lys Ser Leu Asp Phe Lys Asn Asp Ile	925	930	935	
AAT GCT GAA GCG CAT AGC TGG GGG ATG AAA ATT TAT GAA GAC TGG GCT				864

CAA GAT TAT AAA GAA ATC AAT AAT TAT TTG CGC AAT CAA GGC GGG AGT 960
Gln Asp Tyr Lys Glu Ile Asn Asn Tyr Leu Arg Asn Gln Gly Gly Ser
975 980 985

GGG AAG AAA CCC ATA CCA GAA AAT ATT ACC GTG TAT AGA TGG TGT GGC 1056
Gly Lys Lys Pro Ile Pro Glu Asn Ile Thr Val Tyr Arg Trp Cys Gly
1005 1010 1015

GAT TTT GAA GAA CAA TTT TTA AAT ACA ATT AAA GAA GAC AAA GGG TAT 1152
Asp Phe Glu Glu Gln Phe Leu Asn Thr Ile Lys Glu Asp Lys Gly Tyr
1040 1045 1050

AAA ATT ATA TTA CGC TTA CAA GTT CCG AAA GGA AGT ACG GGG GCG TAT 1248
Lys Ile Ile Leu Arg Leu Gln Val Pro Lys Gly Ser Thr Gly Ala Tyr
1070 1075 1080

AAA GAT AGT AAA TAT CAT ATT GAT AAA GCA ACA GAG GTA ATC ATT AAA 1344
Lys Asp Ser Lys Tyr His Ile Asp Lys Ala Thr Glu Val Ile Ile Lys
1100 1105 1110 1115

TAAGGAG ATG AAA AAT ATG AAG AAA AAG TTA GCA AGT GTT GTA ACC TGT 1435
Met Lys Asn Met Lys Lys Lys Leu Ala Ser Val Val Thr Cys
1 5 10

ATG TTA TTA GCT CCT ATG TTT TTG AAT GGA AAT GTG AAT GCT GTT AAC 1483
Met Leu Leu Ala Pro Met Phe Leu Asn Gly Asn Val Asn Ala Val Asn
15 20 25 30

GCG GAT AGT AAA ATA AAT CAG ATT TCT ACA ACG CAG GAA AAC CAA CAG Ala Asp Ser Lys Ile Asn Gln Ile Ser Thr Thr Gln Glu Asn Gln Gln 35 40 45	1531
AAA GAG ATG GAC CGA AAG GGA TTA TTG GGA TAT TAT TTC AAA GGA AAA Lys Glu Met Asp Arg Lys Gly Leu Leu Gly Tyr Tyr Phe Lys Gly Lys 50 55 60	1579
GAT TTT AAT AAT CTT ACT ATG TTT GCA CCG ACA CGT GAT AAT ACC CTT Asp Phe Asn Asn Leu Thr Met Phe Ala Pro Thr Arg Asp Asn Thr Leu 65 70 75	1627
ATG TAT GAC CAA CAA ACA GCG AAT GCA TTA TTA GAT AAA AAA CAA CAA Met Tyr Asp Gln Gln Thr Ala Asn Ala Leu Leu Asp Lys Lys Gln Gln 80 85 90	1675
GAA TAT CAG TCC ATT CGT TGG ATT GGT TTG ATT CAG CGT AAA GAA ACG Glu Tyr Gln Ser Ile Arg Trp Ile Gly Leu Ile Gln Arg Lys Glu Thr 95 100 105 110	1723
GGC GAT TTC ACA TTT AAC TTA TCA AAG GAT GAA CAG GCA ATT ATA GAA Gly Asp Phe Thr Phe Asn Leu Ser Lys Asp Glu Gln Ala Ile Ile Glu 115 120 125	1771
ATC GAT GGG AAA ATC ATT TCT AAT AAA GGG AAA GAA AAG CAA GTT GTC Ile Asp Gly Lys Ile Ile Ser Asn Lys Gly Lys Glu Lys Gln Val Val 130 135 140	1819
CAT TTA GAA AAA GAA AAA TTA GTT CCA ATC AAA ATA GAG TAT CAA TCA His Leu Glu Lys Glu Lys Leu Val Pro Ile Lys Ile Glu Tyr Gln Ser 145 150 155	1867
GAT ACG AAA TTT AAT ATT GAT AGT AAA ACA TTT AAA GAA CTT AAA TTA Asp Thr Lys Phe Asn Ile Asp Ser Lys Thr Phe Lys Glu Leu Lys Leu 160 165 170	1915
TTT AAA ATA GAT AGT CAA AAC CAA TCT CAA CAA GTT CAA CTG AGA AAC Phe Lys Ile Asp Ser Gln Asn Gln Ser Gln Gln Val Gln Leu Arg Asn 175 180 185 190	1963
CCT GAA TTT AAC AAA AAA GAA TCA CAG GAA TTT TTA GCA AAA GCA TCA Pro Glu Phe Asn Lys Lys Glu Ser Gln Glu Phe Leu Ala Lys Ala Ser 195 200 205	2011
AAA ACA AAC CTT TTT AAG CAA AAA ATG AAA AGA GAT ATT GAT GAA GAT Lys Thr Asn Leu Phe Lys Gln Lys Met Lys Arg Asp Ile Asp Glu Asp 210 215 220	2059
ACG GAT ACA GAT GGA GAC TCC ATT CCT GAT CTT TGG GAA GAA AAT GGG Thr Asp Thr Asp Gly Asp Ser Ile Pro Asp Leu Trp Glu Glu Asn Gly 225 230 235	2107
TAC ACG ATT CAA AAT AAA GTT GCT GTC AAA TGG GAT GAT TCG CTA GCA Tyr Thr Ile Gln Asn Lys Val Ala Val Lys Trp Asp Asp Ser Leu Ala 240 245 250	2155

AGT AAG GGA TAT ACA AAA TTT GTT TCG AAT CCA TTA GAC AGC CAC ACA Ser Lys Gly Tyr Thr Lys Phe Val Ser Asn Pro Leu Asp Ser His Thr 255 260 265 270	2203
GTT GGC GAT CCC TAT ACT GAT TAT GAA AAG GCC GCA AGG GAT TTA GAT Val Gly Asp Pro Tyr Thr Asp Tyr Glu Lys Ala Ala Arg Asp Leu Asp 275 280 285	2251
TTA TCA AAT GCA AAG GAA ACG TTC AAC CCA TTG GTA GCT GCT TTT CCA Leu Ser Asn Ala Lys Glu Thr Phe Asn Pro Leu Val Ala Ala Phe Pro 290 295 300	2299
AGT GTG AAT GTT AGT ATG GAA AAG GTG ATA TTA TCA CCA AAT GAA AAT Ser Val Asn Val Ser Met Glu Lys Val Ile Leu Ser Pro Asn Glu Asn 305 310 315	2347
TTA TCC AAT AGT GTA GAG TCT CAT TCA TCC ACG AAT TGG TCT TAT ACG Leu Ser Asn Ser Val Glu Ser His Ser Ser Thr Asn Trp Ser Tyr Thr 320 325 330	2395
AAT ACA GAA GGA GCT TCC ATT GAA GCT GGT GGC GGT CCA TTA GGC CTT Asn Thr Glu Gly Ala Ser Ile Glu Ala Gly Gly Gly Pro Leu Gly Leu 335 340 345 350	2443
TCT TTT GGC GTG AGT GTT ACT TAT CAA CAC TCT GAA ACA GTT GCA CAA Ser Phe Gly Val Ser Val Thr Tyr Gln His Ser Glu Thr Val Ala Gln 355 360 365	2491
GAA TGG GGA ACA TCT ACA GGA AAT ACT TCA CAA TTC AAT ACG GCT TCA Glu Trp Gly Thr Ser Thr Gly Asn Thr Ser Gln Phe Asn Thr Ala Ser 370 375 380	2539
GCG GGA TAT TTA AAT GCA AAT GTT CGG TAT AAC AAT GTA GGG ACT GGT Ala Gly Tyr Leu Asn Ala Asn Val Arg Tyr Asn Asn Val Gly Thr Gly 385 390 395	2587
GCC ATC TAT GAT GTA AAA CCT ACA ACA AGT TTT GTA TTA AAT AAC AAT Ala Ile Tyr Asp Val Lys Pro Thr Thr Ser Phe Val Leu Asn Asn Asn 400 405 410	2635
ACC ATC GCA ACG ATT ACA GCA AAA TCA AAT TCA ACA GCT TTA CGT ATA Thr Ile Ala Thr Ile Thr Ala Lys Ser Asn Ser Thr Ala Leu Arg Ile 415 420 425 430	2683
TCT CCG GGG GAT AGT TAT CCA GAA ATA GGA GAA AAC GCT ATT GCG ATT Ser Pro Gly Asp Ser Tyr Pro Glu Ile Gly Glu Asn Ala Ile Ala Ile 435 440 445	2731
ACA TCT ATG GAT GAT TTT AAT TCT CAT CCA ATT ACA TTA AAT AAA CAA Thr Ser Met Asp Asp Phe Asn Ser His Pro Ile Thr Leu Asn Lys Gln 450 455 460	2779
CAG GTA AAT CAA TTG ATA AAT AAT AAG CCA ATT ATG CTA GAG ACA GAC Gln Val Asn Gln Leu Ile Asn Asn Lys Pro Ile Met Leu Glu Thr Asp	2827

465	470	475	
CAA ACA GAT GGT GTT TAT AAA ATA AGA GAT ACA CAT GGA AAT ATT GTA Gln Thr Asp Gly Val Tyr Lys Ile Arg Asp Thr His Gly Asn Ile Val 480 485 490			2875
ACT GGT GGA GAA TGG AAT GGT GTA ACA CAA CAA ATT AAA GCA AAA ACA Thr Gly Gly Glu Trp Asn Gly Val Thr Gln Gln Ile Lys Ala Lys Thr 495 500 505 510			2923
GCG TCT ATT ATT GTG GAT GAC GGG AAA CAG GTA GCA GAA AAA CGT GTG Ala Ser Ile Ile Val Asp Asp Gly Lys Gln Val Ala Glu Lys Arg Val 515 520 525			2971
GCG GCA AAA GAT TAT GGT CAT CCA GAA GAT AAA ACA CCA CCT TTA ACT Ala Ala Lys Asp Tyr Gly His Pro Glu Asp Lys Thr Pro Pro Leu Thr 530 535 540			3019
TTA AAA GAT ACC CTG AAG CTT TCA TAC CCA GAT GAA ATA AAA GAA ACT Leu Lys Asp Thr Leu Lys Leu Ser Tyr Pro Asp Glu Ile Lys Glu Thr 545 550 555			3067
AAT GGA TTG TTG TAC TAT GAT GAC AAA CCA ATC TAT GAA TCG AGT GTC Asn Gly Leu Leu Tyr Tyr Asp Asp Lys Pro Ile Tyr Glu Ser Ser Val 560 565 570			3115
ATG ACT TAT CTG GAT GAA AAT ACG GCA AAA GAA GTC AAA AAA CAA ATA Met Thr Tyr Leu Asp Glu Asn Thr Ala Lys Glu Val Lys Lys Gln Ile 575 580 585 590			3163
AAT GAT ACA ACC GGA AAA TTT AAG GAT GTA AAT CAC TTA TAT GAT GTA Asn Asp Thr Thr Gly Lys Phe Lys Asp Val Asn His Leu Tyr Asp Val 595 600 605			3211
AAA CTG ACT CCA AAA ATG AAT TTT ACG ATT AAA ATG GCT TCC TTG TAT Lys Leu Thr Pro Lys Met Asn Phe Thr Ile Lys Met Ala Ser Leu Tyr 610 615 620			3259
GAT GGG GCT GAA AAT AAT CAT AAC TCT TTA GGA ACC TGG TAT TTA ACA Asp Gly Ala Glu Asn Asn His Asn Ser Leu Gly Thr Trp Tyr Leu Thr 625 630 635			3307
TAT AAT GTT GCT GGT GGA AAT ACT GGG AAG AGA CAA TAT CGT TCA GCT Tyr Asn Val Ala Gly Gly Asn Thr Gly Lys Arg Gln Tyr Arg Ser Ala 640 645 650			3355
CAT TCT TGT GCA CAT GTA GCT CTA TCT TCA GAA GCG AAA AAG AAA CTA His Ser Cys Ala His Val Ala Leu Ser Ser Glu Ala Lys Lys Lys Leu 655 660 665 670			3403
AAT CAA AAT GCG AAT TAC TAT CTT AGC ATG TAT ATG AAG GCT GAT TCT Asn Gln Asn Ala Asn Tyr Tyr Leu Ser Met Tyr Met Lys Ala Asp Ser 675 680 685			3451
ACT ACG GAA CCT ACA ATA GAA GTA GCT GGG GAA AAA TCT GCA ATA ACA			3499

Thr Thr Glu Pro Thr Ile Glu Val Ala Gly Glu Lys Ser Ala Ile Thr	
690 695 700	
AGT AAA AAA GTA AAA TTA AAT AAT CAA AAT TAT CAA AGA GTT GAT ATT	3547
Ser Lys Lys Val Lys Leu Asn Asn Gln Asn Tyr Gln Arg Val Asp Ile	
705 710 715	
TTA GTG AAA AAT TCT GAA AGA AAT CCA ATG GAT AAA ATA TAT ATA AGA	3595
Leu Val Lys Asn Ser Glu Arg Asn Pro Met Asp Lys Ile Tyr Ile Arg	
720 725 730	
GGA AAT GGC ACG ACA AAT GTT TAT GGG GAT GAT GTT ACT ATC CCA GAG	3643
Gly Asn Gly Thr Thr Asn Val Tyr Gly Asp Asp Val Thr Ile Pro Glu	
735 740 745 750	
GTA TCA GCT ATA AAT CCG GCT AGT CTA TCA GAT GAA GAA ATT CAA GAA	3691
Val Ser Ala Ile Asn Pro Ala Ser Leu Ser Asp Glu Glu Ile Gln Glu	
755 760 765	
ATA TTT AAA GAC TCA ACT ATT GAA TAT GGA AAT CCT AGT TTC GTT GCT	3739
Ile Phe Lys Asp Ser Thr Ile Glu Tyr Gly Asn Pro Ser Phe Val Ala	
770 775 780	
GAT GCC GTA ACA TTT AAA AAT ATA AAA CCT TTA CAA AAT TAT GTA AAG	3787
Asp Ala Val Thr Phe Lys Asn Ile Lys Pro Leu Gln Asn Tyr Val Lys	
785 790 795	
GAA TAT GAA ATA TAT CAT AAA TCT CAT CGA TAT GAA AAG AAA ACG GTC	3835
Glu Tyr Glu Ile Tyr His Lys Ser His Arg Tyr Glu Lys Lys Thr Val	
800 805 810	
TTT GAT ATC ATG GGT GTT CAT TAT GAG TAT AGT ATA GCT AGG GAA CAA	3883
Phe Asp Ile Met Gly Val His Tyr Glu Tyr Ser Ile Ala Arg Glu Gln	
815 820 825 830	
AAG AAA GCC GCA TAATTTTAAA AATAAACTC GTTAGAGTTT ATTTAGCATG	3935
Lys Lys Ala Ala	
GTATTTTAA GAATAATCAA TATGTTGAAC CGTTTGTAGC TGTTTTGGAA GGAATTTCA	3995
TTTTATTTGG TCTCTTAAGT TGATGGGCAT GGGATATGTT CAGCATCCAA GCGTTTNGGG	4055
GGTTANAAAA TCCAATTTT	4074

Informace o sekvenci SEQ ID č. 20:

- (i) charakteristiky sekvence:
 - (A) délka: 462 aminokyselin
 - (B) typ: aminokyselinová
 - (D) topologie: lineární
- (ii) typ molekuly: protein

(xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 20:

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

Lys Asn Leu Thr Ala Ser Gln Arg Glu Ala Leu Asp Gly Tyr Ala Arg
290 295 300

Gln Asp Tyr Lys Glu Ile Asn Asn Tyr Leu Arg Asn Gln Gly Gly Ser
305 310 315 320

Gly Asn Glu Lys Leu Asp Ala Gln Leu Lys Asn Ile Ser Asp Ala Leu
325 330 335

Gly Lys Lys Pro Ile Pro Glu Asn Ile Thr Val Tyr Arg Trp Cys Gly
340 345 350

Met Pro Glu Phe Gly Tyr Gln Ile Ser Asp Pro Leu Pro Ser Leu Lys
355 360 365

Asp Phe Glu Glu Gln Phe Leu Asn Thr Ile Lys Glu Asp Lys Gly Tyr
370 375 380

Met Ser Thr Ser Leu Ser Ser Glu Arg Leu Ala Ala Phe Gly Ser Arg
385 390 395 400

Lys Ile Ile Leu Arg Leu Gln Val Pro Lys Gly Ser Thr Gly Ala Tyr
405 410 415

Leu Ser Ala Ile Gly Gly Phe Ala Ser Glu Lys Glu Ile Leu Leu Asp
420 425 430

Lys Asp Ser Lys Tyr His Ile Asp Lys Ala Thr Glu Val Ile Ile Lys
435 440 445

Gly Val Lys Arg Tyr Val Val Asp Ala Thr Leu Leu Thr Asn
450 455 460

Informace o sekvenci SEQ ID č. 21:

- (i) charakteristiky sekvence:
 - (A) délka: 834 aminokyselin
 - (B) typ: aminokyselinová
 - (D) topologie: lineární
- (ii) typ molekuly: protein
- (xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 21:

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

Leu Ala Pro Met Phe Leu Asn Gly Asn Val Asn Ala Val Asn Ala Asp
20 25 30

Ser Lys Ile Asn Gln Ile Ser Thr Thr Gln Glu Asn Gln Gln Lys Glu
35 40 45

Met Asp Arg Lys Gly Leu Leu Gly Tyr Tyr Phe Lys Gly Lys Asp Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Thr Met Phe Ala Pro Thr Arg Asp Asn Thr Leu Met Tyr
65 70 75 80

Asp Gln Gln Thr Ala Asn Ala Leu Leu Asp Lys Lys Gln Gln Glu Tyr
85 90 95

Gln Ser Ile Arg Trp Ile Gly Leu Ile Gln Arg Lys Glu Thr Gly Asp
100 105 110

Phe Thr Phe Asn Leu Ser Lys Asp Glu Gln Ala Ile Ile Glu Ile Asp
115 120 125

Gly Lys Ile Ile Ser Asn Lys Gly Lys Glu Lys Gln Val Val His Leu
130 135 140

Glu Lys Glu Lys Leu Val Pro Ile Lys Ile Glu Tyr Gln Ser Asp Thr
145 150 155 160

Lys Phe Asn Ile Asp Ser Lys Thr Phe Lys Glu Leu Lys Leu Phe Lys
165 170 175

Ile Asp Ser Gln Asn Gln Ser Gln Gln Val Gln Leu Arg Asn Pro Glu
180 185 190

Phe Asn Lys Lys Glu Ser Gln Glu Phe Leu Ala Lys Ala Ser Lys Thr
195 200 205

Asn Leu Phe Lys Gln Lys Met Lys Arg Asp Ile Asp Glu Asp Thr Asp
210 215 220

Thr Asp Gly Asp Ser Ile Pro Asp Leu Trp Glu Glu Asn Gly Tyr Thr
225 230 235 240

Ile Gln Asn Lys Val Ala Val Lys Trp Asp Asp Ser Leu Ala Ser Lys
245 250 255

Gly Tyr Thr Lys Phe Val Ser Asn Pro Leu Asp Ser His Thr Val Gly
260 265 270

Asp Pro Tyr Thr Asp Tyr Glu Lys Ala Ala Arg Asp Leu Asp Leu Ser
275 280 285

Asn Ala Lys Glu Thr Phe Asn Pro Leu Val Ala Ala Phe Pro Ser Val
290 295 300

Asn Val Ser Met Glu Lys Val Ile Leu Ser Pro Asn Glu Asn Leu Ser
305 310 315 320

Asn Ser Val Glu Ser His Ser Ser Thr Asn Trp Ser Tyr Thr Asn Thr
325 330 335

Glu Gly Ala Ser Ile Glu Ala Gly Gly Gly Pro Leu Gly Leu Ser Phe

340	345	350
Gly Val Ser Val Thr Tyr Gln His Ser Glu Thr Val Ala Gln Glu Trp		
355	360	365
Gly Thr Ser Thr Gly Asn Thr Ser Gln Phe Asn Thr Ala Ser Ala Gly		
370	375	380
Tyr Leu Asn Ala Asn Val Arg Tyr Asn Asn Val Gly Thr Gly Ala Ile		
385	390	395
Tyr Asp Val Lys Pro Thr Thr Ser Phe Val Leu Asn Asn Asn Thr Ile		
405	410	415
Ala Thr Ile Thr Ala Lys Ser Asn Ser Thr Ala Leu Arg Ile Ser Pro		
420	425	430
Gly Asp Ser Tyr Pro Glu Ile Gly Glu Asn Ala Ile Ala Ile Thr Ser		
435	440	445
Met Asp Asp Phe Asn Ser His Pro Ile Thr Leu Asn Lys Gln Gln Val		
450	455	460
Asn Gln Leu Ile Asn Asn Lys Pro Ile Met Leu Glu Thr Asp Gln Thr		
465	470	475
Asp Gly Val Tyr Lys Ile Arg Asp Thr His Gly Asn Ile Val Thr Gly		
485	490	495
Gly Glu Trp Asn Gly Val Thr Gln Gln Ile Lys Ala Lys Thr Ala Ser		
500	505	510
Ile Ile Val Asp Asp Gly Lys Gln Val Ala Glu Lys Arg Val Ala Ala		
515	520	525
Lys Asp Tyr Gly His Pro Glu Asp Lys Thr Pro Pro Leu Thr Leu Lys		
530	535	540
Asp Thr Leu Lys Leu Ser Tyr Pro Asp Glu Ile Lys Glu Thr Asn Gly		
545	550	555
Leu Leu Tyr Tyr Asp Asp Lys Pro Ile Tyr Glu Ser Ser Val Met Thr		
565	570	575
Tyr Leu Asp Glu Asn Thr Ala Lys Glu Val Lys Lys Gln Ile Asn Asp		
580	585	590
Thr Thr Gly Lys Phe Lys Asp Val Asn His Leu Tyr Asp Val Lys Leu		
595	600	605
Thr Pro Lys Met Asn Phe Thr Ile Lys Met Ala Ser Leu Tyr Asp Gly		
610	615	620
Ala Glu Asn Asn His Asn Ser Leu Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Tyr Asn		
625	630	635
		640

Val Ala Gly Gly Asn Thr Gly Lys Arg Gln Tyr Arg Ser Ala His Ser
645 650 655

Cys Ala His Val Ala Leu Ser Ser Glu Ala Lys Lys Lys Leu Asn Gln
660 665 670

Asn Ala Asn Tyr Tyr Leu Ser Met Tyr Met Lys Ala Asp Ser Thr Thr
675 680 685

Glu Pro Thr Ile Glu Val Ala Gly Glu Lys Ser Ala Ile Thr Ser Lys
690 695 700

Lys Val Lys Leu Asn Asn Gln Asn Tyr Gln Arg Val Asp Ile Leu Val
705 710 715 720

Lys Asn Ser Glu Arg Asn Pro Met Asp Lys Ile Tyr Ile Arg Gly Asn
725 730 735

Gly Thr Thr Asn Val Tyr Gly Asp Asp Val Thr Ile Pro Glu Val Ser
740 745 750

Ala Ile Asn Pro Ala Ser Leu Ser Asp Glu Glu Ile Gln Glu Ile Phe
755 760 765

Lys Asp Ser Thr Ile Glu Tyr Gly Asn Pro Ser Phe Val Ala Asp Ala
770 775 780

Val Thr Phe Lys Asn Ile Lys Pro Leu Gln Asn Tyr Val Lys Glu Tyr
785 790 795 800

Glu Ile Tyr His Lys Ser His Arg Tyr Glu Lys Lys Thr Val Phe Asp
805 810 815

Ile Met Gly Val His Tyr Glu Tyr Ser Ile Ala Arg Glu Gln Lys Lys
820 825 830

Ala Ala

Informace o sekvenci SEQ ID č. 22:

(i) charakteristiky sekvence:

- (A) délka: 4041 párů bází
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) počet řetězců: jednořetězcová
- (D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: DNA (genomová)

(ix) vlastnosti:

- (A) jméno/klíč: CDS
- (B) lokace: 1..4038

(D) další informace: produkt = "fúzní produkt
VIP1A(a)/VIP2A(a) "

(xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 22:

ATG AAA AGA ATG GAG GGA AAG TTG TTT ATG GTG TCA AAA AAA TTA CAA	48
Met Lys Arg Met Glu Gly Lys Leu Phe Met Val Ser Lys Lys Leu Gln	
835 840 845 850	
GTA GTT ACT AAA ACT GTA TTG CTT AGT ACA GTT TTC TCT ATA TCT TTA	96
Val Val Thr Lys Thr Val Leu Leu Ser Thr Val Phe Ser Ile Ser Leu	
855 860 865	
TTA AAT AAT GAA GTG ATA AAA GCT GAA CAA TTA AAT ATA AAT TCT CAA	144
Leu Asn Asn Glu Val Ile Lys Ala Glu Gln Leu Asn Ile Asn Ser Gln	
870 875 880	
AGT AAA TAT ACT AAC TTG CAA AAT CTA AAA ATC ACT GAC AAG GTA GAG	192
Ser Lys Tyr Thr Asn Leu Gln Asn Leu Lys Ile Thr Asp Lys Val Glu	
885 890 895	
GAT TTT AAA GAA GAT AAG GAA AAA GCG AAA GAA TGG GGG AAA GAA AAA	240
Asp Phe Lys Glu Asp Lys Glu Lys Ala Lys Glu Trp Gly Lys Glu Lys	
900 905 910	
GAA AAA GAG TGG AAA CTA ACT GCT ACT GAA AAA GGA AAA ATG AAT AAT	288
Glu Lys Glu Trp Lys Leu Thr Ala Thr Glu Lys Gly Lys Met Asn Asn	
915 920 925 930	
TTT TTA GAT AAT AAA AAT GAT ATA AAG ACA AAT TAT AAA GAA ATT ACT	336
Phe Leu Asp Asn Lys Asn Asp Ile Lys Thr Asn Tyr Lys Glu Ile Thr	
935 940 945	
TTT TCT ATG GCA GGC TCA TTT GAA GAT GAA ATA AAA GAT TTA AAA GAA	384
Phe Ser Met Ala Gly Ser Phe Glu Asp Glu Ile Lys Asp Leu Lys Glu	
950 955 960	
ATT GAT AAG ATG TTT GAT AAA ACC AAT CTA TCA AAT TCT ATT ATC ACC	432
Ile Asp Lys Met Phe Asp Lys Thr Asn Leu Ser Asn Ser Ile Ile Thr	
965 970 975	
TAT AAA AAT GTG GAA CCG ACA ACA ATT GGA TTT AAT AAA TCT TTA ACA	480
Tyr Lys Asn Val Glu Pro Thr Thr Ile Gly Phe Asn Lys Ser Leu Thr	
980 985 990	
GAA GGT AAT ACG ATT AAT TCT GAT GCA ATG GCA CAG TTT AAA GAA CAA	528
Glu Gly Asn Thr Ile Asn Ser Asp Ala Met Ala Gln Phe Lys Glu Gln	
995 1000 1005 1010	
TTT TTA GAT AGG GAT ATT AAG TTT GAT AGT TAT CTA GAT ACG CAT TTA	576
Phe Leu Asp Arg Asp Ile Lys Phe Asp Ser Tyr Leu Asp Thr His Leu	
1015 1020 1025	
ACT GCT CAA CAA GTT TCC AGT AAA GAA AGA GTT ATT TTG AAG GTT ACG	624
Thr Ala Gln Gln Val Ser Ser Lys Glu Arg Val Ile Leu Lys Val Thr	

1030	1035	1040	
GTT CCG AGT GGG AAA GGT TCT ACT ACT CCA ACA AAA GCA GGT GTC ATT Val Pro Ser Gly Lys Gly Ser Thr Thr Pro Thr Lys Ala Gly Val Ile 1045 1050 1055			672
TTA AAT AAT AGT GAA TAC AAA ATG CTC ATT GAT AAT GGG TAT ATG GTC Leu Asn Asn Ser Glu Tyr Lys Met Leu Ile Asp Asn Gly Tyr Met Val 1060 1065 1070			720
CAT GTA GAT AAG GTA TCA AAA GTG GTG AAA AAA GGG GTG GAG TGC TTA His Val Asp Lys Val Ser Lys Val Val Lys Lys Gly Val Glu Cys Leu 1075 1080 1085 1090			768
CAA ATT GAA GGG ACT TTA AAA AAG AGT CTT GAC TTT AAA AAT GAT ATA Gln Ile Glu Gly Thr Leu Lys Lys Ser Leu Asp Phe Lys Asn Asp Ile 1095 1100 1105			816
AAT GCT GAA GCG CAT AGC TGG GGT ATG AAG AAT TAT GAA GAG TGG GCT Asn Ala Glu Ala His Ser Trp Gly Met Lys Asn Tyr Glu Glu Trp Ala 1110 1115 1120			864
AAA GAT TTA ACC GAT TCG CAA AGG GAA GCT TTA GAT GGG TAT GCT AGG Lys Asp Leu Thr Asp Ser Gln Arg Glu Ala Leu Asp Gly Tyr Ala Arg 1125 1130 1135			912
CAA GAT TAT AAA GAA ATC AAT AAT TAT TTA AGA AAT CAA GGC GGA AGT Gln Asp Tyr Lys Glu Ile Asn Asn Tyr Leu Arg Asn Gln Gly Gly Ser 1140 1145 1150			960
GGA AAT GAA AAA CTA GAT GCT CAA ATA AAA AAT ATT TCT GAT GCT TTA Gly Asn Glu Lys Leu Asp Ala Gln Ile Lys Asn Ile Ser Asp Ala Leu 1155 1160 1165 1170			1008
GGG AAG AAA CCA ATA CCG GAA AAT ATT ACT GTG TAT AGA TGG TGT GGC Gly Lys Lys Pro Ile Pro Glu Asn Ile Thr Val Tyr Arg Trp Cys Gly 1175 1180 1185			1056
ATG CCG GAA TTT GGT TAT CAA ATT AGT GAT CCG TTA CCT TCT TTA AAA Met Pro Glu Phe Gly Tyr Gln Ile Ser Asp Pro Leu Pro Ser Leu Lys 1190 1195 1200			1104
GAT TTT GAA GAA CAA TTT TTA AAT ACA ATC AAA GAA GAC AAA GGA TAT Asp Phe Glu Glu Gln Phe Leu Asn Thr Ile Lys Glu Asp Lys Gly Tyr 1205 1210 1215			1152
ATG AGT ACA AGC TTA TCG AGT GAA CGT CTT GCA GCT TTT GGA TCT AGA Met Ser Thr Ser Leu Ser Ser Glu Arg Leu Ala Ala Phe Gly Ser Arg 1220 1225 1230			1200
AAA ATT ATA TTA CGA TTA CAA GTT CCG AAA GGA AGT ACG GGT GCG TAT Lys Ile Ile Leu Arg Leu Gln Val Pro Lys Gly Ser Thr Gly Ala Tyr 1235 1240 1245 1250			1248
TTA AGT GCC ATT GGT GGA TTT GCA AGT GAA AAA GAG ATC CTA CTT GAT			1296

Leu Ser Ala Ile Gly Gly Phe Ala Ser Glu Lys Glu Ile Leu Leu Asp	
1255 1260 1265	
AAA GAT AGT AAA TAT CAT ATT GAT AAA GTA ACA GAG GTA ATT ATT AAA	1344
Lys Asp Ser Lys Tyr His Ile Asp Lys Val Thr Glu Val Ile Ile Lys	
1270 1275 1280	
GGT GTT AAG CGA TAT GTA GTG GAT GCA ACA TTA TTA ACA AAT ATG AAA	1392
Gly Val Lys Arg Tyr Val Val Asp Ala Thr Leu Leu Thr Asn Met Lys	
1285 1290 1295	
AAT ATG AAG AAA AAG TTA GCA AGT GTT GTA ACG TGT ACG TTA TTA GCT	1440
Asn Met Lys Lys Lys Leu Ala Ser Val Val Thr Cys Thr Leu Leu Ala	
1300 1305 1310	
CCT ATG TTT TTG AAT GGA AAT GTG AAT GCT GTT TAC GCA GAC AGC AAA	1488
Pro Met Phe Leu Asn Gly Asn Val Asn Ala Val Tyr Ala Asp Ser Lys	
1315 1320 1325 1330	
ACA AAT CAA ATT TCT ACA ACA CAG AAA AAT CAA CAG AAA GAG ATG GAC	1536
Thr Asn Gln Ile Ser Thr Thr Gln Lys Asn Gln Gln Lys Glu Met Asp	
1335 1340 1345	
CGA AAA GGA TTA CTT GGG TAT TAT TTC AAA GGA AAA GAT TTT AGT AAT	1584
Arg Lys Gly Leu Leu Gly Tyr Tyr Phe Lys Gly Lys Asp Phe Ser Asn	
1350 1355 1360	
CTT ACT ATG TTT GCA CCG ACA CGT GAT AGT ACT CTT ATT TAT GAT CAA	1632
Leu Thr Met Phe Ala Pro Thr Arg Asp Ser Thr Leu Ile Tyr Asp Gln	
1365 1370 1375	
CAA ACA GCA AAT AAA CTA TTA GAT AAA AAA CAA CAA GAA TAT CAG TCT	1680
Gln Thr Ala Asn Lys Leu Leu Asp Lys Lys Gln Gln Glu Tyr Gln Ser	
1380 1385 1390	
ATT CGT TGG ATT GGT TTG ATT CAG AGT AAA GAA ACG GGA GAT TTC ACA	1728
Ile Arg Trp Ile Gly Leu Ile Gln Ser Lys Glu Thr Gly Asp Phe Thr	
1395 1400 1405 1410	
TTT AAC TTA TCT GAG GAT GAA CAG GCA ATT ATA GAA ATC AAT GGG AAA	1776
Phe Asn Leu Ser Glu Asp Glu Gln Ala Ile Ile Glu Ile Asn Gly Lys	
1415 1420 1425	
ATT ATT TCT AAT AAA GGG AAA GAA AAG CAA GTT GTC CAT TTA GAA AAA	1824
Ile Ile Ser Asn Lys Gly Lys Glu Lys Gln Val Val His Leu Glu Lys	
1430 1435 1440	
GGA AAA TTA GTT CCA ATC AAA ATA GAG TAT CAA TCA GAT ACA AAA TTT	1872
Gly Lys Leu Val Pro Ile Lys Ile Glu Tyr Gln Ser Asp Thr Lys Phe	
1445 1450 1455	
AAT ATT GAC AGT AAA ACA TTT AAA GAA CTT AAA TTA TTT AAA ATA GAT	1920
Asn Ile Asp Ser Lys Thr Phe Lys Glu Leu Lys Leu Phe Lys Ile Asp	
1460 1465 1470	

AGT CAA AAC CAA CCC CAG CAA GTC CAG CAA GAT GAA CTG AGA AAT CCT Ser Gln Asn Gln Pro Gln Gln Val Gln Gln Asp Glu Leu Arg Asn Pro 1475 1480 1485 1490	1968
GAA TTT AAC AAG AAA GAA TCA CAG GAA TTC TTA GCG AAA CCA TCG AAA Glu Phe Asn Lys Lys Glu Ser Gln Glu Phe Leu Ala Lys Pro Ser Lys 1495 1500 1505	2016
ATA AAT CTT TTC ACT CAA AAA ATG AAA AGG GAA ATT GAT GAA GAC ACG Ile Asn Leu Phe Thr Gln Lys Met Lys Arg Glu Ile Asp Glu Asp Thr 1510 1515 1520	2064
GAT ACG GAT GGG GAC TCT ATT CCT GAC CTT TGG GAA GAA AAT GGG TAT Asp Thr Asp Gly Asp Ser Ile Pro Asp Leu Trp Glu Glu Asn Gly Tyr 1525 1530 1535	2112
ACG ATT CAA AAT AGA ATC GCT GTA AAG TGG GAC GAT TCT CTA GCA AGT Thr Ile Gln Asn Arg Ile Ala Val Lys Trp Asp Asp Ser Leu Ala Ser 1540 1545 1550	2160
AAA GGG TAT ACG AAA TTT GTT TCA AAT CCA CTA GAA AGT CAC ACA GTT Lys Gly Tyr Thr Lys Phe Val Ser Asn Pro Leu Glu Ser His Thr Val 1555 1560 1565 1570	2208
GGT GAT CCT TAT ACA GAT TAT GAA AAG GCA GCA AGA GAT CTA GAT TTG Gly Asp Pro Tyr Thr Asp Tyr Glu Lys Ala Ala Arg Asp Leu Asp Leu 1575 1580 1585	2256
TCA AAT GCA AAG GAA ACG TTT AAC CCA TTG GTA GCT GCT TTT CCA AGT Ser Asn Ala Lys Glu Thr Phe Asn Pro Leu Val Ala Ala Phe Pro Ser 1590 1595 1600	2304
GTG AAT GTT AGT ATG GAA AAG GTG ATA TTA TCA CCA AAT GAA AAT TTA Val Asn Val Ser Met Glu Lys Val Ile Leu Ser Pro Asn Glu Asn Leu 1605 1610 1615	2352
TCC AAT AGT GTA GAG TCT CAT TCA TCC ACG AAT TGG TCT TAT ACA AAT Ser Asn Ser Val Glu Ser His Ser Ser Thr Asn Trp Ser Tyr Thr Asn 1620 1625 1630	2400
ACA GAA GGT GCT TCT GTT GAA GCG GGG ATT GGA CCA AAA GGT ATT TCG Thr Glu Gly Ala Ser Val Glu Ala Gly Ile Gly Pro Lys Gly Ile Ser 1635 1640 1645 1650	2448
TTC GGA GTT AGC GTA AAC TAT CAA CAC TCT GAA ACA GTT GCA CAA GAA Phe Gly Val Ser Val Asn Tyr Gln His Ser Glu Thr Val Ala Gln Glu 1655 1660 1665	2496
TGG GGA ACA TCT ACA GGA AAT ACT TCG CAA TTC AAT ACG GCT TCA GCG Trp Gly Thr Ser Thr Gly Asn Thr Ser Gln Phe Asn Thr Ala Ser Ala 1670 1675 1680	2544
GGA TAT TTA AAT GCA AAT GTT CGA TAT AAC AAT GTA GGA ACT GGT GCC Gly Tyr Leu Asn Ala Asn Val Arg Tyr Asn Asn Val Gly Thr Gly Ala 1685 1690 1695	2592

ATC TAC GAT GTA AAA CCT ACA ACA AGT TTT GTA TTA AAT AAC GAT ACT Ile Tyr Asp Val Lys Pro Thr Thr Ser Phe Val Leu Asn Asn Asp Thr 1700 1705 1710	2640
ATC GCA ACT ATT ACG GCG AAA TCT AAT TCT ACA GCC TTA AAT ATA TCT Ile Ala Thr Ile Thr Ala Lys Ser Asn Ser Thr Ala Leu Asn Ile Ser 1715 1720 1725 1730	2688
CCT GGA GAA AGT TAC CCG AAA AAA GGA CAA AAT GGA ATC GCA ATA ACA Pro Gly Glu Ser Tyr Pro Lys Lys Gly Gln Asn Gly Ile Ala Ile Thr 1735 1740 1745	2736
TCA ATG GAT GAT TTT AAT TCC CAT CCG ATT ACA TTA AAT AAA AAA CAA Ser Met Asp Asp Phe Asn Ser His Pro Ile Thr Leu Asn Lys Lys Gln 1750 1755 1760	2784
GTA GAT AAT CTG CTA AAT AAT AAA CCT ATG ATG TTG GAA ACA AAC CAA Val Asp Asn Leu Leu Asn Asn Lys Pro Met Met Leu Glu Thr Asn Gln 1765 1770 1775	2832
ACA GAT GGT GTT TAT AAG ATA AAA GAT ACA CAT GGA AAT ATA GTA ACT Thr Asp Gly Val Tyr Lys Ile Lys Asp Thr His Gly Asn Ile Val Thr 1780 1785 1790	2880
GGC GGA GAA TGG AAT GGT GTC ATA CAA CAA ATC AAG GCT AAA ACA GCG Gly Gly Glu Trp Asn Gly Val Ile Gln Gln Ile Lys Ala Lys Thr Ala 1795 1800 1805 1810	2928
TCT ATT ATT GTG GAT GAT GGG GAA CGT GTA GCA GAA AAA CGT GTA GCG Ser Ile Ile Val Asp Asp Gly Glu Arg Val Ala Glu Lys Arg Val Ala 1815 1820 1825	2976
GCA AAA GAT TAT GAA AAT CCA GAA GAT AAA ACA CCG TCT TTA ACT TTA Ala Lys Asp Tyr Glu Asn Pro Glu Asp Lys Thr Pro Ser Leu Thr Leu 1830 1835 1840	3024
AAA GAT GCC CTG AAG CTT TCA TAT CCA GAT GAA ATA AAA GAA ATA GAG Lys Asp Ala Leu Lys Leu Ser Tyr Pro Asp Glu Ile Lys Glu Ile Glu 1845 1850 1855	3072
GGA TTA TTA TAT TAT AAA AAC AAA CCG ATA TAC GAA TCG AGC GTT ATG Gly Leu Leu Tyr Tyr Lys Asn Lys Pro Ile Tyr Glu Ser Ser Val Met 1860 1865 1870	3120
ACT TAC TTA GAT GAA AAT ACA GCA AAA GAA GTG ACC AAA CAA TTA AAT Thr Tyr Leu Asp Glu Asn Thr Ala Lys Glu Val Thr Lys Gln Leu Asn 1875 1880 1885 1890	3168
GAT ACC ACT GGG AAA TTT AAA GAT GTA AGT CAT TTA TAT GAT GTA AAA Asp Thr Thr Gly Lys Phe Lys Asp Val Ser His Leu Tyr Asp Val Lys 1895 1900 1905	3216
CTG ACT CCA AAA ATG AAT GTT ACA ATC AAA TTG TCT ATA CTT TAT GAT Leu Thr Pro Lys Met Asn Val Thr Ile Lys Leu Ser Ile Leu Tyr Asp 1910 1915 1920 1925 1930 1935 1940	3264

1910	1915	1920	
AAT GCT GAG TCT AAT GAT AAC TCA ATT GGT AAA TGG ACA AAC ACA AAT Asn Ala Glu Ser Asn Asp Asn Ser Ile Gly Lys Trp Thr Asn Thr Asn 1925 1930 1935			3312
ATT GTT TCA GGT GGA AAT AAC GGA AAA AAA CAA TAT TCT TCT AAT AAT Ile Val Ser Gly Gly Asn Asn Gly Lys Lys Gln Tyr Ser Ser Asn Asn 1940 1945 1950			3360
CCG GAT GCT AAT TTG ACA TTA AAT ACA GAT GCT CAA GAA AAA TTA AAT Pro Asp Ala Asn Leu Thr Leu Asn Thr Asp Ala Gln Glu Lys Leu Asn 1955 1960 1965 1970			3408
AAA AAT CGT GAC TAT TAT ATA AGT TTA TAT ATG AAG TCA GAA AAA AAC Lys Asn Arg Asp Tyr Tyr Ile Ser Leu Tyr Met Lys Ser Glu Lys Asn 1975 1980 1985			3456
ACA CAA TGT GAG ATT ACT ATA GAT GGG GAG ATT TAT CCG ATC ACT ACA Thr Gln Cys Glu Ile Thr Ile Asp Gly Glu Ile Tyr Pro Ile Thr Thr 1990 1995 2000			3504
AAA ACA GTG AAT GTG AAT AAA GAC AAT TAC AAA AGA TTA GAT ATT ATA Lys Thr Val Asn Val Asn Lys Asp Asn Tyr Lys Arg Leu Asp Ile Ile 2005 2010 2015			3552
GCT CAT AAT ATA AAA AGT AAT CCA ATT TCT TCA CTT CAT ATT AAA ACG Ala His Asn Ile Lys Ser Asn Pro Ile Ser Ser Leu His Ile Lys Thr 2020 2025 2030			3600
AAT GAT GAA ATA ACT TTA TTT TGG GAT GAT ATT TCT ATA ACA GAT GTA Asn Asp Glu Ile Thr Leu Phe Trp Asp Asp Ile Ser Ile Thr Asp Val 2035 2040 2045 2050			3648
GCA TCA ATA AAA CCG GAA AAT TTA ACA GAT TCA GAA ATT AAA CAG ATT Ala Ser Ile Lys Pro Glu Asn Leu Thr Asp Ser Glu Ile Lys Gln Ile 2055 2060 2065			3696
TAT AGT AGG TAT GGT ATT AAG TTA GAA GAT GGA ATC CTT ATT GAT AAA Tyr Ser Arg Tyr Gly Ile Lys Leu Glu Asp Gly Ile Leu Ile Asp Lys 2070 2075 2080			3744
AAA GGT GGG ATT CAT TAT GGT GAA TTT ATT AAT GAA GCT AGT TTT AAT Lys Gly Gly Ile His Tyr Gly Glu Phe Ile Asn Glu Ala Ser Phe Asn 2085 2090 2095			3792
ATT GAA CCA TTG CAA AAT TAT GTG ACC AAA TAT GAA GTT ACT TAT AGT Ile Glu Pro Leu Gln Asn Tyr Val Thr Lys Tyr Glu Val Thr Tyr Ser 2100 2105 2110			3840
AGT GAG TTA GGA CCA AAC GTG AGT GAC ACA CTT GAA AGT GAT AAA ATT Ser Glu Leu Gly Pro Asn Val Ser Asp Thr Leu Glu Ser Asp Lys Ile 2115 2120 2125 2130			3888
TAC AAG GAT GGG ACA ATT AAA TTT GAT TTT ACC AAA TAT AGT AAA AAT			3936

Tyr Lys Asp Gly Thr Ile Lys Phe Asp Phe Thr Lys Tyr Ser Lys Asn	
2135 2140 2145	
GAA CAA GGA TTA TTT TAT GAC AGT GGA TTA AAT TGG GAC TTT AAA ATT	3984
Glu Gln Gly Leu Phe Tyr Asp Ser Gly Leu Asn Trp Asp Phe Lys Ile	
2150 2155 2160	
AAT GCT ATT ACT TAT GAT GGT AAA GAG ATG AAT GTT TTT CAT AGA TAT	4032
Asn Ala Ile Thr Tyr Asp Gly Lys Glu Met Asn Val Phe His Arg Tyr	
2165 2170 2175	
AAT AAA TAG	4041
Asn Lys	
2180	

Informace o sekvenci SEQ ID č. 23:

- (i) charakteristiky sekvence:
 - (A) délka: 1346 aminokyselin
 - (B) typ: aminokyselinová
 - (D) topologie: lineární
- (ii) typ molekuly: protein
- (xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 23:

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

145	150	155	160
Glu Gly Asn Thr	Ile Asn Ser Asp Ala Met Ala Gln Phe Lys Glu Gln		
	165	170	175
Phe Leu Asp Arg Asp Ile Lys Phe Asp Ser Tyr Leu Asp Thr His Leu			
	180	185	190
Thr Ala Gln Gln Val Ser Ser Lys Glu Arg Val Ile Leu Lys Val Thr			
	195	200	205
Val Pro Ser Gly Lys Gly Ser Thr Thr Pro Thr Lys Ala Gly Val Ile			
	210	215	220
Leu Asn Asn Ser Glu Tyr Lys Met Leu Ile Asp Asn Gly Tyr Met Val			
	225	230	235
His Val Asp Lys Val Ser Lys Val Val Lys Lys Gly Val Glu Cys Leu			
	245	250	255
Gln Ile Glu Gly Thr Leu Lys Lys Ser Leu Asp Phe Lys Asn Asp Ile			
	260	265	270
Asn Ala Glu Ala His Ser Trp Gly Met Lys Asn Tyr Glu Glu Trp Ala			
	275	280	285
Lys Asp Leu Thr Asp Ser Gln Arg Glu Ala Leu Asp Gly Tyr Ala Arg			
	290	295	300
Gln Asp Tyr Lys Glu Ile Asn Asn Tyr Leu Arg Asn Gln Gly Gly Ser			
	305	310	315
Gly Asn Glu Lys Leu Asp Ala Gln Ile Lys Asn Ile Ser Asp Ala Leu			
	325	330	335
Gly Lys Lys Pro Ile Pro Glu Asn Ile Thr Val Tyr Arg Trp Cys Gly			
	340	345	350
Met Pro Glu Phe Gly Tyr Gln Ile Ser Asp Pro Leu Pro Ser Leu Lys			
	355	360	365
Asp Phe Glu Glu Gln Phe Leu Asn Thr Ile Lys Glu Asp Lys Gly Tyr			
	370	375	380
Met Ser Thr Ser Leu Ser Ser Glu Arg Leu Ala Ala Phe Gly Ser Arg			
	385	390	395
Lys Ile Ile Leu Arg Leu Gln Val Pro Lys Gly Ser Thr Gly Ala Tyr			
	405	410	415
Leu Ser Ala Ile Gly Gly Phe Ala Ser Glu Lys Glu Ile Leu Leu Asp			
	420	425	430
Lys Asp Ser Lys Tyr His Ile Asp Lys Val Thr Glu Val Ile Ile Lys			
	435	440	445

Gly Val Lys Arg Tyr Val Val Asp Ala Thr Leu Leu Thr Asn Met Lys
450 455 460

Asn Met Lys Lys Lys Leu Ala Ser Val Val Thr Cys Thr Leu Leu Ala
465 470 475 480

Pro Met Phe Leu Asn Gly Asn Val Asn Ala Val Tyr Ala Asp Ser Lys
485 490 495

Thr Asn Gln Ile Ser Thr Thr Gln Lys Asn Gln Gln Lys Glu Met Asp
500 505 510

Arg Lys Gly Leu Leu Gly Tyr Tyr Phe Lys Gly Lys Asp Phe Ser Asn
515 520 525

Leu Thr Met Phe Ala Pro Thr Arg Asp Ser Thr Leu Ile Tyr Asp Gln
530 535 540

Gln Thr Ala Asn Lys Leu Leu Asp Lys Lys Gln Gln Glu Tyr Gln Ser
545 550 555 560

Ile Arg Trp Ile Gly Leu Ile Gln Ser Lys Glu Thr Gly Asp Phe Thr
565 570 575

Phe Asn Leu Ser Glu Asp Glu Gln Ala Ile Ile Glu Ile Asn Gly Lys
580 585 590

Ile Ile Ser Asn Lys Gly Lys Glu Lys Gln Val Val His Leu Glu Lys
595 600 605

Gly Lys Leu Val Pro Ile Lys Ile Glu Tyr Gln Ser Asp Thr Lys Phe
610 615 620

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

Ser Gln Asn Gln Pro Gln Gln Val Gln Gln Asp Glu Leu Arg Asn Pro
645 650 655

Glu Phe Asn Lys Lys Glu Ser Gln Glu Phe Leu Ala Lys Pro Ser Lys
660 665 670

Ile Asn Leu Phe Thr Gln Lys Met Lys Arg Glu Ile Asp Glu Asp Thr
675 680 685

Asp Thr Asp Gly Asp Ser Ile Pro Asp Leu Trp Glu Glu Asn Gly Tyr
690 695 700

Thr Ile Gln Asn Arg Ile Ala Val Lys Trp Asp Asp Ser Leu Ala Ser
705 710 715 720

Lys Gly Tyr Thr Lys Phe Val Ser Asn Pro Leu Glu Ser His Thr Val
725 730 735

Gly Asp Pro Tyr Thr Asp Tyr Glu Lys Ala Ala Arg Asp Leu Asp Leu
740 745 750

Ser Asn Ala Lys Glu Thr Phe Asn Pro Leu Val Ala Ala Phe Pro Ser
755 760 765

Val Asn Val Ser Met Glu Lys Val Ile Leu Ser Pro Asn Glu Asn Leu
770 775 780

Ser Asn Ser Val Glu Ser His Ser Ser Thr Asn Trp Ser Tyr Thr Asn
785 790 795 800

Thr Glu Gly Ala Ser Val Glu Ala Gly Ile Gly Pro Lys Gly Ile Ser
805 810 815

Phe Gly Val Ser Val Asn Tyr Gln His Ser Glu Thr Val Ala Gln Glu
820 825 830

Trp Gly Thr Ser Thr Gly Asn Thr Ser Gln Phe Asn Thr Ala Ser Ala
835 840 845

Gly Tyr Leu Asn Ala Asn Val Arg Tyr Asn Asn Val Gly Thr Gly Ala
850 855 860

Ile Tyr Asp Val Lys Pro Thr Thr Ser Phe Val Leu Asn Asn Asp Thr
865 870 875 880

Ile Ala Thr Ile Thr Ala Lys Ser Asn Ser Thr Ala Leu Asn Ile Ser
885 890 895

Pro Gly Glu Ser Tyr Pro Lys Lys Gly Gln Asn Gly Ile Ala Ile Thr
900 905 910

Ser Met Asp Asp Phe Asn Ser His Pro Ile Thr Leu Asn Lys Lys Gln
915 920 925

Val Asp Asn Leu Leu Asn Asn Lys Pro Met Met Leu Glu Thr Asn Gln
930 935 940

Thr Asp Gly Val Tyr Lys Ile Lys Asp Thr His Gly Asn Ile Val Thr
945 950 955 960

Gly Gly Glu Trp Asn Gly Val Ile Gln Gln Ile Lys Ala Lys Thr Ala
965 970 975

Ser Ile Ile Val Asp Asp Gly Glu Arg Val Ala Glu Lys Arg Val Ala
980 985 990

Ala Lys Asp Tyr Glu Asn Pro Glu Asp Lys Thr Pro Ser Leu Thr Leu
995 1000 1005

Lys Asp Ala Leu Lys Leu Ser Tyr Pro Asp Glu Ile Lys Glu Ile Glu
1010 1015 1020

Gly Leu Leu Tyr Tyr Lys Asn Lys Pro Ile Tyr Glu Ser Ser Val Met

1025	1030	1035	1040
Thr Tyr Leu Asp Glu Asn Thr Ala Lys Glu Val Thr Lys Gln Leu Asn	1045	1050	1055
Asp Thr Thr Gly Lys Phe Lys Asp Val Ser His Leu Tyr Asp Val Lys	1060	1065	1070
Leu Thr Pro Lys Met Asn Val Thr Ile Lys Leu Ser Ile Leu Tyr Asp	1075	1080	1085
Asn Ala Glu Ser Asn Asp Asn Ser Ile Gly Lys Trp Thr Asn Thr Asn	1090	1095	1100
Ile Val Ser Gly Gly Asn Asn Gly Lys Lys Gln Tyr Ser Ser Asn Asn	1105	1110	1115
Pro Asp Ala Asn Leu Thr Leu Asn Thr Asp Ala Gln Glu Lys Leu Asn	1125	1130	1135
Lys Asn Arg Asp Tyr Tyr Ile Ser Leu Tyr Met Lys Ser Glu Lys Asn	1140	1145	1150
Thr Gln Cys Glu Ile Thr Ile Asp Gly Glu Ile Tyr Pro Ile Thr Thr	1155	1160	1165
Lys Thr Val Asn Val Asn Lys Asp Asn Tyr Lys Arg Leu Asp Ile Ile	1170	1175	1180
Ala His Asn Ile Lys Ser Asn Pro Ile Ser Ser Leu His Ile Lys Thr	1185	1190	1195
Asn Asp Glu Ile Thr Leu Phe Trp Asp Asp Ile Ser Ile Thr Asp Val	1205	1210	1215
Ala Ser Ile Lys Pro Glu Asn Leu Thr Asp Ser Glu Ile Lys Gln Ile	1220	1225	1230
Tyr Ser Arg Tyr Gly Ile Lys Leu Glu Asp Gly Ile Leu Ile Asp Lys	1235	1240	1245
Lys Gly Gly Ile His Tyr Gly Glu Phe Ile Asn Glu Ala Ser Phe Asn	1250	1255	1260
Ile Glu Pro Leu Gln Asn Tyr Val Thr Lys Tyr Glu Val Thr Tyr Ser	1265	1270	1275
Ser Glu Leu Gly Pro Asn Val Ser Asp Thr Leu Glu Ser Asp Lys Ile	1285	1290	1295
Tyr Lys Asp Gly Thr Ile Lys Phe Asp Phe Thr Lys Tyr Ser Lys Asn	1300	1305	1310
Glu Gln Gly Leu Phe Tyr Asp Ser Gly Leu Asn Trp Asp Phe Lys Ile	1315	1320	1325

Asn Ala Ile Thr Tyr Asp Gly Lys Glu Met Asn Val Phe His Arg Tyr
1330 1335 1340

Asn Lys
1345

Informace o sekvenci SEQ ID č. 24:

- (i) charakteristiky sekvence:
 - (A) délka: 1399 párů bází
 - (B) typ: nukleová kyselina
 - (C) počet řetězců: jednořetězcová
 - (D) topologie: lineární
- (ii) typ molekuly: DNA (genomová)
- (ix) vlastnosti:
 - (A) jméno/klíč: různá vlastnost
 - (B) lokace: 1..1386
 - (D) další informace: poznámka = "DNA-sekvence proteinu VIP2A(a) z AB78 optimalizovaná pro kukuřici"
- (xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 24:

ATGAAGCGCA TGGAGGGCAA GCTGTTTCATG GTGAGCAAGA AGCTCCAGGT GGTGACCAAG	60
ACCGTGCTGC TGAGCACCGT GTTCAGCATC AGCCTGCTGA ACAACGAGGT GATCAAGGCC	120
GAGCAGCTGA ACATCAACAG CCAGAGCAAG TACACCAACC TCCAGAACCT GAAGATCACC	180
GACAAGGTGG AGGACTTCAA GGAGGACAAG GAGAAGGCCA AGGAGTGGGG CAAGGAGAAG	240
GAGAAGGAGT GGAAGCTTAC CGCCACCGAG AAGGGCAAGA TGAACAACCTT CCTGGACAAC	300
AAGAACGACA TCAAGACCAA CTACAAGGAG ATCACCTTCA GCATGGCCGG CAGCTTCGAG	360
GACGAGATCA AGGACCTGAA GGAGATCGAC AAGATGTTCTG ACAAGACCAA CCTGAGCAAC	420
AGCATCATCA CCTACAAGAA CGTGGAGCCC ACCACCATCG GCTTCAACAA GAGCCTGACC	480
GAGGGCAACA CCATCAACAG CGACGCCATG GCCCAGTTCA AGGAGCAGTT CCTGGACCGC	540
GACATCAAGT TCGACAGCTA CCTGGACACC CACCTGACCG CCCAGCAGGT GAGCAGCAAG	600
GAGCGCGTGA TCCTGAAGGT GACCGTCCCC AGCGGCAAGG GCAGCACCAC CCCCACCAAG	660
GCCGGCGTGA TCCTGAACAA CAGCGAGTAC AAGATGCTGA TCGACAACGG CTACATGGTG	720
CACGTGGACA AGGTGAGCAA GGTGGTGAAG AAGGGCGTGG AGTGCCTCCA GATCGAGGGC	780
ACCCTGAAGA AGAGTCTAGA CTTCAAGAAC GACATCAACG CCGAGGCCCA CAGCTGGGGC	840

ATGAAGAACT ACGAGGAGTG GGCCAAGGAC CTGACCGACA GCCAGCGCGA GGCCCTGGAC 900
GGCTACGCCC GCCAGGACTA CAAGGAGATC AACAACTACC TGC GCAACCA GGGCGGCAGC 960
GGCAACGAGA AGCTGGACGC CCAGATCAAG AACATCAGCG ACGCCCTGGG CAAGAAGCCC 1020
ATCCCCGAGA ACATCACCCT GTACCGCTGG TCGGCATGC CCGAGTTCGG CTACCAGATC 1080
AGCGACCCCC TGCCAGCCT GAAGGACTTC GAGGAGCAGT TCCTGAACAC CATCAAGGAG 1140
GACAAGGGCT ACATGAGCAC CAGCCTGAGC AGCGAGCGCC TGGCCGCCTT CGGCAGCCGC 1200
AAGATCATCC TCGCCTGCA GGTGCCCAAG GGCAGCACCG GCGCCTACCT GAGCGCCATC 1260
GGCGGCTTCG CCAGCGAGAA GGAGATCCTG CTGGACAAGG ACAGCAAGTA CCACATCGAC 1320
AAGGTGACCG AGGTGATCAT CAAGGGCGTG AAGCGCTACG TGGTGGACGC CACCCTGCTG 1380
ACCAACTAGA TCTGAGCTC 1399

Informace o sekvenci SEQ ID č. 25:

- (i) charakteristiky sekvence:
 - (A) délka: 19 aminokyselin
 - (B) typ: aminokyselinová
 - (C) počet řetězců: jednořetězcová
 - (D) topologie: lineární
- (ii) typ molekuly: peptid
- (ix) vlastnosti:
 - (A) jméno/klíč: peptid
 - (B) lokace: 1..19
 - (D) další informace: poznámka = "sekreční
signální peptid pro sekreci VIP2 z buňky"
- (xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 25:

Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Ala Ala Gly Val
1 5 10 15
His Cys Leu

Informace o sekvenci SEQ ID č. 26:

- (i) charakteristiky sekvence:

- (A) délka: 2655 párů bází
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) počet řetězců: jednořetězcová
- (D) topologie: lineární
- (ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina
 - (A) popis: syntetická DNA
- (iii) hypotetická: není
- (ix) vlastnosti:
 - (A) jméno/klíč: různá vlastnost
 - (B) lokace: 1..2655
 - (D) další informace: poznámka = "DNA-sekvence kódující VIP1A(a) optimalizovaná pro kukuřici"
- (xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 26:

ATGAAGAACA TGAAGAAGAA GCTGGCCAGC GTGGTGACCT GCACCCTGCT GGCCCCCATG	60
TTCCTGAACG GCAACGTGAA CGCCGTGTAC GCCGACAGCA AGACCAACCA GATCAGCACC	120
ACCCAGAAGA ACCAGCAGAA GGAGATGGAC CGCAAGGGCC TGCTGGGCTA CTACTTCAAG	180
GGCAAGGACT TCAGCAACCT GACCATGTTC GCCCCACGC GTGACAGCAC CCTGATCTAC	240
GACCAGCAGA CCGCCAACAA GCTGCTGGAC AAGAAGCAGC AGGAGTACCA GAGCATCCGC	300
TGGATCGGCC TGATCCAGAG CAAGGAGACC GGCGACTTCA CCTTCAACCT GAGCGAGGAC	360
GAGCAGGCCA TCATCGAGAT CAACGGCAAG ATCATCAGCA ACAAGGGCAA GGAGAAGCAG	420
GTGGTGCAAC TGGAGAAGGG CAAGCTGGTG CCCATCAAGA TCGAGTACCA GAGCGACACC	480
AAGTTCAACA TCGACAGCAA GACCTTCAAG GAGCTGAAGC TTTTCAAGAT CGACAGCCAG	540
AACCAGCCCC AGCAGGTGCA GCAGGACGAG CTGCGCAACC CCGAGTTCAA CAAGAAGGAG	600
AGCCAGGAGT TCCTGGCCAA GCCCAGCAAG ATCAACCTGT TCACCCAGCA GATGAAGCGC	660
GAGATCGACG AGGACACCGA CACCGACGGC GACAGCATCC CCGACCTGTG GGAGGAGAAC	720
GGCTACACCA TCCAGAACCG CATCGCCGTG AAGTGGGACG ACAGCCTGGC TAGCAAGGGC	780
TACACCAAGT TCGTGAGCAA CCCCCTGGAG AGCCACACCG TGGGCGACCC CTACACCGAC	840
TACGAGAAGG CCGCCCGCGA CCTGGACCTG AGCAACGCCA AGGAGACCTT CAACCCCTG	900

GTGGCCGCCT TCCCCAGCGT GAACGTGAGC ATGGAGAAGG TGATCCTGAG CCCC AACGAG	960
AACCTGAGCA ACAGCGTGGA GAGCCACTCG AGCACCAACT GGAGCTACAC CAACACCGAG	1020
GGCGCCAGCG TGGAGGCCGG CATCGGTCCC AAGGGCATCA GCTTCGGCGT GAGCGTGAAC	1080
TACCAGCACA GCGAGACCGT GGCCCAGGAG TGGGGCACCA GCACCGGCAA CACCAGCCAG	1140
TTCAACACCG CCAGCGCCGG CTACCTGAAC GCCAACGTGC GCTACAACAA CGTGGGCACC	1200
GGCGCCATCT ACGACGTGAA GCCCACCACC AGCTTCGTGC TGAACAACGA CACCATCGCC	1260
ACCATCACCG CCAAGTCGAA TTCCACCGCC CTGAACATCA GCCCCGGCGA GAGCTACCCC	1320
AAGAAGGGCC AGAACGGCAT CGCCATCACC AGCATGGACG ACTTCAACAG CCACCCCATC	1380
ACCCTGAACA AGAAGCAGGT GGACAACCTG CTGAACAACA AGCCCATGAT GCTGGAGACC	1440
AACCAGACCG ACGGCGTCTA CAAGATCAAG GACACCCACG GCAACATCGT GACGGGCGGC	1500
GAGTGAACG GCGTGATCCA GCAGATCAAG GCCAAGACCG CCAGCATCAT CGTCGACGAC	1560
GGCGAGCGCG TGGCCGAGAA GCGCGTGGCC GCCAAGGACT ACGAGAACCC CGAGGACAAG	1620
ACCCCCAGCC TGACCCTGAA GGACGCCCTG AAGCTGAGCT ACCCCGACGA GATCAAGGAG	1680
ATCGAGGGCT TGCTGTACTA CAAGAACAAG CCCATCTACG AGAGCAGCGT GATGACCTAT	1740
CTAGACGAGA ACACCGCCAA GGAGGTGACC AAGCAGCTGA ACGACACCAC CGGCAAGTTC	1800
AAGGACGTGA GCCACCTGTA CGACGTGAAG CTGACCCCCA AGATGAACGT GACCATCAAG	1860
CTGAGCATCC TGTACGACAA CGCCGAGAGC AACGACAACA GCATCGGCAA GTGGACCAAC	1920
ACCAACATCG TGAGCGGCGG CAACAACGGC AAGAAGCAGT ACAGCAGCAA CAACCCCGAC	1980
GCCAACCTGA CCCTGAACAC CGACGCCAG GAGAAGCTGA ACAAGAACCG CGACTACTAC	2040
ATCAGCCTGT ACATGAAGAG CGAGAAGAAC ACCCAGTGCG AGATCACCAT CGACGGCGAG	2100
ATATACCCCA TCACCACCAA GACCGTGAAC GTGAACAAGG ACAACTACAA GCGCCTGGAC	2160
ATCATCGCCC ACAACATCAA GAGCAACCCC ATCAGCAGCC TGCACATCAA GACCAACGAC	2220
GAGATCACCC TGTTCTGGGA CGACATATCG ATTACCGACG TCGCCAGCAT CAAGCCCGAG	2280
AACCTGACCG ACAGCGAGAT CAAGCAGATA TACAGTCGCT ACGGCATCAA GCTGGAGGAC	2340
GGCATCCTGA TCGACAAGAA AGGCGGCATC CACTACGGCG AGTTCATCAA CGAGGCCAGC	2400
TTCAACATCG AGCCCCTGCA GAACTACGTG ACCAAGTACG AGGTGACCTA CAGCAGCGAG	2460
CTGGGCCCCA ACGTGAGCGA CACCCTGGAG AGCGACAAGA TTTACAAGGA CGGCACCATC	2520
AAGTTGCACT TCACCAAGTA CAGCAAGAAC GAGCAGGGCC TGTCTACGA CAGCGGCCTG	2580

AACTGGGACT TCAAGATCAA CGCCATCACC TACGACGGCA AGGAGATGAA CGTGTTCAC 2640
CGCTACAACA AGTAG 2655

Informace o sekvenci SEQ ID č. 27:

- (i) charakteristiky sekvence:
 - (A) délka: 1389 párů bází
 - (B) typ: nukleová kyselina
 - (C) počet řetězců: jednořetězcová
 - (D) topologie: lineární
- (ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina
 - (A) popis: syntetická DNA
- (iii) hypotetická: není
- (ix) vlastnosti:
 - (A) jméno/klíč: různá vlastnost
 - (B) lokace: 1..1389
 - (D) další informace: poznámka = "DNA-sekvence kódující VIP2A(a) optimalizovaná pro kukuřici"
- (xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 27:

ATGAAGCGCA TGGAGGGCAA GCTGTTCATG GTGAGCAAGA AGCTCCAGGT GGTGACCAAG 60
ACCGTGCTGC TGAGCACCGT GTTCAGCATC AGCCTGCTGA ACAACGAGGT GATCAAGGCC 120
GAGCAGCTGA ACATCAACAG CCAGAGCAAG TACACCAACC TCCAGAACCT GAAGATCACC 180
GACAAGGTGG AGGACTTCAA GGAGGACAAG GAGAAGGCCA AGGAGTGGGG CAAGGAGAAG 240
GAGAAGGAGT GGAAGCTTAC CGCCACCGAG AAGGGCAAGA TGAACAACCT CCTGGACAAC 300
AAGAACGACA TCAAGACCAA CTACAAGGAG ATCACCTTCA GCATAGCCGG CAGCTTCGAG 360
GACGAGATCA AGGACCTGAA GGAGATCGAC AAGATGTTTCG ACAAGACCAA CCTGAGCAAC 420
AGCATCATCA CCTACAAGAA CGTGGAGCCC ACCACCATCG GCTTCAACAA GAGCCTGACC 480
GAGGGCAACA CCATCAACAG CGACGCCATG GCCCAGTTCA AGGAGCAGTT CCTGGACCGC 540
GACATCAAGT TCGACAGCTA CCTGGACACC CACCTGACCG CCCAGCAGGT GAGCAGCAAG 600
GAGCGCGTGA TCCTGAAGGT GACCGTCCCC AGCGGCAAGG GCAGCACCAC CCCCACCAAG 660

GCCGGCGTGA TCCTGAACAA CAGCGAGTAC AAGATGCTGA TCGACAACGG CTACATGGTG	720
CACGTGGACA AGGTGAGCAA GGTGGTGAAG AAGGGCGTGG AGTGCCTCCA GATCGAGGGC	780
ACCCTGAAGA AGAGTCTAGA CTTCAAGAAC GACATCAACG CCGAGGCCCA CAGCTGGGGC	840
ATGAAGAACT ACGAGGAGTG GGCCAAGGAC CTGACCGACA GCCAGCGCGA GGCCCTGGAC	900
GGCTACGCCC GCCAGGACTA CAAGGAGATC AACAACTACC TGCGCAACCA GGGCGGCAGC	960
GGCAACGAGA AGCTGGACGC CCAGATCAAG AACATCAGCG ACGCCCTGGG CAAGAAGCCC	1020
ATCCCCGAGA ACATCACCGT GTACCGCTGG TCGGGCATGC CCGAGTTCGG CTACCAGATC	1080
AGCGACCCCC TGCCAGCCT GAAGGACTTC GAGGAGCAGT TCCTGAACAC CATCAAGGAG	1140
GACAAGGGCT ACATGAGCAC CAGCCTGAGC AGCGAGCGCC TGGCCGCCTT CGGCAGCCGC	1200
AAGATCATCC TCGCCTGCA GGTGCCCAAG GGCAGCACTG GTGCCTACCT GAGCGCCATC	1260
GGCGGCTTCG CCAGCGAGAA GGAGATCCTG CTGGATAAGG ACAGCAAGTA CCACATCGAC	1320
AAGGTGACCG AGGTGATCAT CAAGGGCGTG AAGCGCTACG TGGTGGACGC CACCCTGCTG	1380
ACCAACTAG	1389

Informace o sekvenci SEQ ID č. 28:

- (i) charakteristiky sekvence:
 - (A) délka: 2378 párů bází
 - (B) typ: nukleová kyselina
 - (C) počet řetězců: jednořetězcová
 - (D) topologie: lineární
- (ii) typ molekuly: DNA (genomová)
- (iii) hypotetická: není
- (ix) vlastnosti:
 - (A) jméno/klíč: CDS
 - (B) lokace: 9..2375
 - (D) další informace: poznámka = "nativní DNA-sekvence kódující protein VIP3A(a) z AB88, jak je obsažena v pCIB7104"

(xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 28:

AGATGAAC ATG AAC AAG AAT AAT ACT AAA TTA AGC ACA AGA GCC TTA CCA	50
Met Asn Lys Asn Asn Thr Lys Leu Ser Thr Arg Ala Leu Pro	
1 5 10	
AGT TTT ATT GAT TAT TTT AAT GGC ATT TAT GGA TTT GCC ACT GGT ATC	98
Ser Phe Ile Asp Tyr Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile	
15 20 25 30	
AAA GAC ATT ATG AAC ATG ATT TTT AAA ACG GAT ACA GGT GGT GAT CTA	146
Lys Asp Ile Met Asn Met Ile Phe Lys Thr Asp Thr Gly Gly Asp Leu	
35 40 45	
ACC CTA GAC GAA ATT TTA AAG AAT CAG CAG TTA CTA AAT GAT ATT TCT	194
Thr Leu Asp Glu Ile Leu Lys Asn Gln Gln Leu Leu Asn Asp Ile Ser	
50 55 60	
GGT AAA TTG GAT GGG GTG AAT GGA AGC TTA AAT GAT CTT ATC GCA CAG	242
Gly Lys Leu Asp Gly Val Asn Gly Ser Leu Asn Asp Leu Ile Ala Gln	
65 70 75	
GGA AAC TTA AAT ACA GAA TTA TCT AAG GAA ATA TTA AAA ATT GCA AAT	290
Gly Asn Leu Asn Thr Glu Leu Ser Lys Glu Ile Leu Lys Ile Ala Asn	
80 85 90	
GAA CAA AAT CAA GTT TTA AAT GAT GTT AAT AAC AAA CTC GAT GCG ATA	338
Glu Gln Asn Gln Val Leu Asn Asp Val Asn Asn Lys Leu Asp Ala Ile	
95 100 105 110	
AAT ACG ATG CTT CGG GTA TAT CTA CCT AAA ATT ACC TCT ATG TTG AGT	386
Asn Thr Met Leu Arg Val Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Ser Met Leu Ser	
115 120 125	
GAT GTA ATG AAA CAA AAT TAT GCG CTA AGT CTG CAA ATA GAA TAC TTA	434
Asp Val Met Lys Gln Asn Tyr Ala Leu Ser Leu Gln Ile Glu Tyr Leu	
130 135 140	
AGT AAA CAA TTG CAA GAG ATT TCT GAT AAG TTG GAT ATT ATT AAT GTA	482
Ser Lys Gln Leu Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Ile Ile Asn Val	
145 150 155	
AAT GTA CTT ATT AAC TCT ACA CTT ACT GAA ATT ACA CCT GCG TAT CAA	530
Asn Val Leu Ile Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ala Tyr Gln	
160 165 170	
AGG ATT AAA TAT GTG AAC GAA AAA TTT GAG GAA TTA ACT TTT GCT ACA	578
Arg Ile Lys Tyr Val Asn Glu Lys Phe Glu Glu Leu Thr Phe Ala Thr	
175 180 185 190	
GAA ACT AGT TCA AAA GTA AAA AAG GAT GGC TCT CCT GCA GAT ATT CTT	626
Glu Thr Ser Ser Lys Val Lys Lys Asp Gly Ser Pro Ala Asp Ile Leu	
195 200 205	

GAT GAG TTA ACT GAG TTA ACT GAA CTA GCG AAA AGT GTA ACA AAA AAT Asp Glu Leu Thr Glu Leu Thr Glu Leu Ala Lys Ser Val Thr Lys Asn 210 215 220	674
GAT GTG GAT GGT TTT GAA TTT TAC CTT AAT ACA TTC CAC GAT GTA ATG Asp Val Asp Gly Phe Glu Phe Tyr Leu Asn Thr Phe His Asp Val Met 225 230 235	722
GTA GGA AAT AAT TTA TTC GGG CGT TCA GCT TTA AAA ACT GCA TCG GAA Val Gly Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr Ala Ser Glu 240 245 250	770
TTA ATT ACT AAA GAA AAT GTG AAA ACA AGT GGC AGT GAG GTC GGA AAT Leu Ile Thr Lys Glu Asn Val Lys Thr Ser Gly Ser Glu Val Gly Asn 255 260 265 270	818
GTT TAT AAC TTC TTA ATT GTA TTA ACA GCT CTG CAA GCC CAA GCT TTT Val Tyr Asn Phe Leu Ile Val Leu Thr Ala Leu Gln Ala Gln Ala Phe 275 280 285	866
CTT ACT TTA ACA ACA TGC CGA AAA TTA TTA GGC TTA GCA GAT ATT GAT Leu Thr Leu Thr Thr Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ala Asp Ile Asp 290 295 300	914
TAT ACT TCT ATT ATG AAT GAA CAT TTA AAT AAG GAA AAA GAG GAA TTT Tyr Thr Ser Ile Met Asn Glu His Leu Asn Lys Glu Lys Glu Glu Phe 305 310 315	962
AGA GTA AAC ATC CTC CCT ACA CTT TCT AAT ACT TTT TCT AAT CCT AAT Arg Val Asn Ile Leu Pro Thr Leu Ser Asn Thr Phe Ser Asn Pro Asn 320 325 330	1010
TAT GCA AAA GTT AAA GGA AGT GAT GAA GAT GCA AAG ATG ATT GTG GAA Tyr Ala Lys Val Lys Gly Ser Asp Glu Asp Ala Lys Met Ile Val Glu 335 340 345 350	1058
GCT AAA CCA GGA CAT GCA TTG ATT GGG TTT GAA ATT AGT AAT GAT TCA Ala Lys Pro Gly His Ala Leu Ile Gly Phe Glu Ile Ser Asn Asp Ser 355 360 365	1106
ATT ACA GTA TTA AAA GTA TAT GAG GCT AAG CTA AAA CAA AAT TAT CAA Ile Thr Val Leu Lys Val Tyr Glu Ala Lys Leu Lys Gln Asn Tyr Gln 370 375 380	1154
GTC GAT AAG GAT TCC TTA TCG GAA GTT ATT TAT GGT GAT ATG GAT AAA Val Asp Lys Asp Ser Leu Ser Glu Val Ile Tyr Gly Asp Met Asp Lys 385 390 395	1202
TTA TTG TGC CCA GAT CAA TCT GAA CAA ATC TAT TAT ACA AAT AAC ATA Leu Leu Cys Pro Asp Gln Ser Glu Gln Ile Tyr Tyr Thr Asn Asn Ile 400 405 410	1250
GTA TTT CCA AAT GAA TAT GTA ATT ACT AAA ATT GAT TTC ACT AAA AAA Val Phe Pro Asn Glu Tyr Val Ile Thr Lys Ile Asp Phe Thr Lys Lys 415 420 425 430	1298

ATG AAA ACT TTA AGA TAT GAG GTA ACA GCG AAT TTT TAT GAT TCT TCT Met Lys Thr Leu Arg Tyr Glu Val Thr Ala Asn Phe Tyr Asp Ser Ser 435 440 445	1346
ACA GGA GAA ATT GAC TTA AAT AAG AAA AAA GTA GAA TCA AGT GAA GCG Thr Gly Glu Ile Asp Leu Asn Lys Lys Lys Val Glu Ser Ser Glu Ala 450 455 460	1394
GAG TAT AGA ACG TTA AGT GCT AAT GAT GAT GGG GTG TAT ATG CCG TTA Glu Tyr Arg Thr Leu Ser Ala Asn Asp Asp Gly Val Tyr Met Pro Leu 465 470 475	1442
GGT GTC ATC AGT GAA ACA TTT TTG ACT CCG ATT AAT GGG TTT GGC CTC Gly Val Ile Ser Glu Thr Phe Leu Thr Pro Ile Asn Gly Phe Gly Leu 480 485 490	1490
CAA GCT GAT GAA AAT TCA AGA TTA ATT ACT TTA ACA TGT AAA TCA TAT Gln Ala Asp Glu Asn Ser Arg Leu Ile Thr Leu Thr Cys Lys Ser Tyr 495 500 505 510	1538
TTA AGA GAA CTA CTG CTA GCA ACA GAC TTA AGC AAT AAA GAA ACT AAA Leu Arg Glu Leu Leu Leu Ala Thr Asp Leu Ser Asn Lys Glu Thr Lys 515 520 525	1586
TTG ATC GTC CCG CCA AGT GGT TTT ATT AGC AAT ATT GTA GAG AAC GGG Leu Ile Val Pro Pro Ser Gly Phe Ile Ser Asn Ile Val Glu Asn Gly 530 535 540	1634
TCC ATA GAA GAG GAC AAT TTA GAG CCG TGG AAA GCA AAT AAT AAG AAT Ser Ile Glu Glu Asp Asn Leu Glu Pro Trp Lys Ala Asn Asn Lys Asn 545 550 555	1682
GCG TAT GTA GAT CAT ACA GGC GGA GTG AAT GGA ACT AAA GCT TTA TAT Ala Tyr Val Asp His Thr Gly Gly Val Asn Gly Thr Lys Ala Leu Tyr 560 565 570	1730
GTT CAT AAG GAC GGA GGA ATT TCA CAA TTT ATT GGA GAT AAG TTA AAA Val His Lys Asp Gly Gly Ile Ser Gln Phe Ile Gly Asp Lys Leu Lys 575 580 585 590	1778
CCG AAA ACT GAG TAT GTA ATC CAA TAT ACT GTT AAA GGA AAA CCT TCT Pro Lys Thr Glu Tyr Val Ile Gln Tyr Thr Val Lys Gly Lys Pro Ser 595 600 605	1826
ATT CAT TTA AAA GAT GAA AAT ACT GGA TAT ATT CAT TAT GAA GAT ACA Ile His Leu Lys Asp Glu Asn Thr Gly Tyr Ile His Tyr Glu Asp Thr 610 615 620	1874
AAT AAT AAT TTA GAA GAT TAT CAA ACT ATT AAT AAA CGT TTT ACT ACA Asn Asn Asn Leu Glu Asp Tyr Gln Thr Ile Asn Lys Arg Phe Thr Thr 625 630 635	1922

GGA ACT GAT TTA AAG GGA GTG TAT TTA ATT TTA AAA AGT CAA AAT GGA Gly Thr Asp Leu Lys Gly Val Tyr Leu Ile Leu Lys Ser Gln Asn Gly 640 645 650	1970
GAT GAA GCT TGG GGA GAT AAC TTT ATT ATT TTG GAA ATT AGT CCT TCT Asp Glu Ala Trp Gly Asp Asn Phe Ile Ile Leu Glu Ile Ser Pro Ser 655 660 665 670	2018
GAA AAG TTA TTA AGT CCA GAA TTA ATT AAT ACA AAT AAT TGG ACG AGT Glu Lys Leu Leu Ser Pro Glu Leu Ile Asn Thr Asn Asn Trp Thr Ser 675 680 685	2066
ACG GGA TCA ACT AAT ATT AGC GGT AAT ACA CTC ACT CTT TAT CAG GGA Thr Gly Ser Thr Asn Ile Ser Gly Asn Thr Leu Thr Leu Tyr Gln Gly 690 695 700	2114
GGA CGA GGG ATT CTA AAA CAA AAC CTT CAA TTA GAT AGT TTT TCA ACT Gly Arg Gly Ile Leu Lys Gln Asn Leu Gln Leu Asp Ser Phe Ser Thr 705 710 715	2162
TAT AGA GTG TAT TTT TCT GTG TCC GGA GAT GCT AAT GTA AGG ATT AGA Tyr Arg Val Tyr Phe Ser Val Ser Gly Asp Ala Asn Val Arg Ile Arg 720 725 730	2210
AAT TCT AGG GAA GTG TTA TTT GAA AAA AGA TAT ATG AGC GGT GCT AAA Asn Ser Arg Glu Val Leu Phe Glu Lys Arg Tyr Met Ser Gly Ala Lys 735 740 745 750	2258
GAT GTT TCT GAA ATG TTC ACT ACA AAA TTT GAG AAA GAT AAC TTT TAT Asp Val Ser Glu Met Phe Thr Thr Lys Phe Glu Lys Asp Asn Phe Tyr 755 760 765	2306
ATA GAG CTT TCT CAA GGG AAT AAT TTA TAT GGT GGT CCT ATT GTA CAT Ile Glu Leu Ser Gln Gly Asn Asn Leu Tyr Gly Gly Pro Ile Val His 770 775 780	2354
TTT TAC GAT GTC TCT ATT AAG TAA Phe Tyr Asp Val Ser Ile Lys 785	2378

Informace o sekvenci SEQ ID č. 29:

- (i) charakteristiky sekvence:
 - (A) délka: 789 aminokyselin
 - (B) typ: aminokyselinová
 - (D) topologie: lineární
- (ii) typ molekuly: protein

(xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 29:

Met Asn Lys Asn Asn Thr Lys Leu Ser Thr Arg Ala Leu Pro Ser Phe
1 5 10 15
Ile Asp Tyr Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Lys Asp
20 25 30
Ile Met Asn Met Ile Phe Lys Thr Asp Thr Gly Gly Asp Leu Thr Leu
35 40 45
Asp Glu Ile Leu Lys Asn Gln Gln Leu Leu Asn Asp Ile Ser Gly Lys
50 55 60
Leu Asp Gly Val Asn Gly Ser Leu Asn Asp Leu Ile Ala Gln Gly Asn
65 70 75 80
Leu Asn Thr Glu Leu Ser Lys Glu Ile Leu Lys Ile Ala Asn Glu Gln
85 90 95
Asn Gln Val Leu Asn Asp Val Asn Asn Lys Leu Asp Ala Ile Asn Thr
100 105 110
Met Leu Arg Val Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Ser Met Leu Ser Asp Val
115 120 125
Met Lys Gln Asn Tyr Ala Leu Ser Leu Gln Ile Glu Tyr Leu Ser Lys
130 135 140
Gln Leu Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Ile Ile Asn Val Asn Val
145 150 155 160
Leu Ile Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ala Tyr Gln Arg Ile
165 170 175
Lys Tyr Val Asn Glu Lys Phe Glu Glu Leu Thr Phe Ala Thr Glu Thr
180 185 190
Ser Ser Lys Val Lys Lys Asp Gly Ser Pro Ala Asp Ile Leu Asp Glu
195 200 205
Leu Thr Glu Leu Thr Glu Leu Ala Lys Ser Val Thr Lys Asn Asp Val
210 215 220
Asp Gly Phe Glu Phe Tyr Leu Asn Thr Phe His Asp Val Met Val Gly
225 230 235 240
Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr Ala Ser Glu Leu Ile
245 250 255
Thr Lys Glu Asn Val Lys Thr Ser Gly Ser Glu Val Gly Asn Val Tyr
260 265 270

Asn Phe Leu Ile Val Leu Thr Ala Leu Gln Ala Gln Ala Phe Leu Thr
 275 280 285
 Leu Thr Thr Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ala Asp Ile Asp Tyr Thr
 290 295 300
 Ser Ile Met Asn Glu His Leu Asn Lys Glu Lys Glu Glu Phe Arg Val
 305 310 315 320
 Asn Ile Leu Pro Thr Leu Ser Asn Thr Phe Ser Asn Pro Asn Tyr Ala
 325 330 335
 Lys Val Lys Gly Ser Asp Glu Asp Ala Lys Met Ile Val Glu Ala Lys
 340 345 350
 Pro Gly His Ala Leu Ile Gly Phe Glu Ile Ser Asn Asp Ser Ile Thr
 355 360 365
 Val Leu Lys Val Tyr Glu Ala Lys Leu Lys Gln Asn Tyr Gln Val Asp
 370 375 380
 Lys Asp Ser Leu Ser Glu Val Ile Tyr Gly Asp Met Asp Lys Leu Leu
 385 390 395 400
 Cys Pro Asp Gln Ser Glu Gln Ile Tyr Tyr Thr Asn Asn Ile Val Phe
 405 410 415
 Pro Asn Glu Tyr Val Ile Thr Lys Ile Asp Phe Thr Lys Lys Met Lys
 420 425 430
 Thr Leu Arg Tyr Glu Val Thr Ala Asn Phe Tyr Asp Ser Ser Thr Gly
 435 440 445
 Glu Ile Asp Leu Asn Lys Lys Lys Val Glu Ser Ser Glu Ala Glu Tyr
 450 455 460
 Arg Thr Leu Ser Ala Asn Asp Asp Gly Val Tyr Met Pro Leu Gly Val
 465 470 475 480
 Ile Ser Glu Thr Phe Leu Thr Pro Ile Asn Gly Phe Gly Leu Gln Ala
 485 490 495
 Asp Glu Asn Ser Arg Leu Ile Thr Leu Thr Cys Lys Ser Tyr Leu Arg
 500 505 510
 Glu Leu Leu Leu Ala Thr Asp Leu Ser Asn Lys Glu Thr Lys Leu Ile
 515 520 525
 Val Pro Pro Ser Gly Phe Ile Ser Asn Ile Val Glu Asn Gly Ser Ile
 530 535 540
 Glu Glu Asp Asn Leu Glu Pro Trp Lys Ala Asn Asn Lys Asn Ala Tyr
 545 550 555 560
 Val Asp His Thr Gly Gly Val Asn Gly Thr Lys Ala Leu Tyr Val His
 565 570 575

Lys Asp Gly Gly Ile Ser Gln Phe Ile Gly Asp Lys Leu Lys Pro Lys
 580 585 590
 Thr Glu Tyr Val Ile Gln Tyr Thr Val Lys Gly Lys Pro Ser Ile His
 595 600 605
 Leu Lys Asp Glu Asn Thr Gly Tyr Ile His Tyr Glu Asp Thr Asn Asn
 610 615 620
 Asn Leu Glu Asp Tyr Gln Thr Ile Asn Lys Arg Phe Thr Thr Gly Thr
 625 630 635 640
 Asp Leu Lys Gly Val Tyr Leu Ile Leu Lys Ser Gln Asn Gly Asp Glu
 645 650 655
 Ala Trp Gly Asp Asn Phe Ile Ile Leu Glu Ile Ser Pro Ser Glu Lys
 660 665 670
 Leu Leu Ser Pro Glu Leu Ile Asn Thr Asn Asn Trp Thr Ser Thr Gly
 675 680 685
 Ser Thr Asn Ile Ser Gly Asn Thr Leu Thr Leu Tyr Gln Gly Gly Arg
 690 695 700
 Gly Ile Leu Lys Gln Asn Leu Gln Leu Asp Ser Phe Ser Thr Tyr Arg
 705 710 715 720
 Val Tyr Phe Ser Val Ser Gly Asp Ala Asn Val Arg Ile Arg Asn Ser
 725 730 735
 Arg Glu Val Leu Phe Glu Lys Arg Tyr Met Ser Gly Ala Lys Asp Val
 740 745 750
 Ser Glu Met Phe Thr Thr Lys Phe Glu Lys Asp Asn Phe Tyr Ile Glu
 755 760 765
 Leu Ser Gln Gly Asn Asn Leu Tyr Gly Gly Pro Ile Val His Phe Tyr
 770 775 780
 Asp Val Ser Ile Lys
 785

Informace o sekvenci SEQ ID č. 30:

(i) charakteristiky sekvence:

- (A) délka: 2403 párů bází
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) počet řetězců: jednořetězcová
- (D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) popis: syntetická DNA

(iii) hypotetická: není

(ix) vlastnosti:

(A) jméno/klíč: různá vlastnost

(B) lokace: 11..2389

(D) další informace: poznámka = "DNA-sekvence
kódující VIP3A(a) optimalizovaná pro kuku-
řici"

(xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 30:

GGATCCACCA ATGAACATGA ACAAGAACAA CACCAAGCTG AGCACCOCGG CCCTGCCGAG	60
CTTCATCGAC TACTTCAACG GCATCTACGG CTTCGCCACC GGCATCAAGG ACATCATGAA	120
CATGATCTTC AAGACCGACA CCGGCGGCGA CCTGACCCTG GACGAGATCC TGAAGAACCA	180
GCAGCTGCTG AACGACATCA GCGGCAAGCT GGACGGCGTG AACGGCAGCC TGAACGACCT	240
GATCGCCCAG GGCAACCTGA ACACCGAGCT GAGCAAGGAG ATCCTTAAGA TCGCCAACGA	300
GCAGAACCGAG GTGCTGAACG ACGTGAACAA CAAGCTGGAC GCCATCAACA CCATGCTGCG	360
CGTGTACCTG CCGAAGATCA CCAGCATGCT GAGCGACGTG ATGAAGCAGA ACTACGCCCT	420
GAGCCTGCAG ATCGAGTACC TGAGCAAGCA GCTGCAGGAG ATCAGCGACA AGCTGGACAT	480
CATCAACGTG AACGTCCTGA TCAACAGCAC CCTGACCGAG ATCACCOCGG CCTACCAGCG	540
CATCAAGTAC GTGAACGAGA AGTTCAAGA GCTGACCTTC GCCACCGAGA CCAGCAGCAA	600
GGTGAAGAAG GACGGCAGCC CGGCCGACAT CCTGGACGAG CTGACCGAGC TGACCGAGCT	660
GGCCAAGAGC GTGACCAAGA ACGACGTGGA CGGCTTCGAG TTCTACCTGA ACACCTTCCA	720
CGACGTGATG GTGGGCAACA ACCTGTTTCGG CCGCAGCGCC CTGAAGACCG CCAGCGAGCT	780
GATCACCAAG GAGAACGTGA AGACCAGCGG CAGCGAGGTG GGCAACGTGT ACAACTTCCT	840
GATCGTGCTG ACCGCCCTGC AGGCCAGGC CTTCTGACC CTGACCACCT GTCGCAAGCT	900
GCTGGGCCTG GCGACATCG ACTACACCAG CATCATGAAC GAGCACTTGA ACAAGGAGAA	960

GGAGGAGTTC CGCGTGAACA TCCTGCCGAC CCTGAGCAAC ACCTTCAGCA ACCCGAACTA	1020
CGCCAAGGTG AAGGGCAGCG ACGAGGACGC CAAGATGATC GTGGAGGCTA AGCCGGGCCA	1080
CGCGTTGATC GGCTTCGAGA TCAGCAACGA CAGCATCACC GTGCTGAAGG TGTACGAGGC	1140
CAAGCTGAAG CAGAACTACC AGGTGGACAA GGACAGCTTG AGCGAGGTGA TCTACGGCGA	1200
CATGGACAAG CTGCTGTGTC CGGACCAGAG CGAGCAAATC TACTACACCA ACAACATCGT	1260
GTTCCCGAAC GAGTACGTGA TCACCAAGAT CGACTTCACC AAGAAGATGA AGACCCTGCG	1320
CTACGAGGTG ACCGCCAACT TCTACGACAG CAGCACC GGC GAGATCGACC TGAACAAGAA	1380
GAAGGTGGAG AGCAGCGAGG CCGAGTACCG CACCCTGAGC GCGAACGACG ACGGCGTCTA	1440
CATGCCACTG GCGGTGATCA GCGAGACCTT CCTGACCCCG ATCAACGGCT TTGGCCTGCA	1500
GGCCGACGAG AACAGCCGCC TGATCACCCCT GACCTGTAAG AGCTACCTGC GCGAGCTGCT	1560
GCTAGCCACC GACCTGAGCA ACAAGGAGAC CAAGCTGATC GTGCCACCGA GCGGCTTCAT	1620
CAGCAACATC GTGGAGAACG GCAGCATCGA GGAGGACAAC CTGGAGCCGT GGAAGGCCAA	1680
CAACAAGAAC GCCTACGTGG ACCACACCGG CGGCGTGAAC GGCACCAAGG CCCTGTACGT	1740
GCACAAGGAC GGCGGCATCA GCCAGTTCAT CGGCGACAAG CTGAAGCCGA AGACCGAGTA	1800
CGTGATCCAG TACACCGTGA AGGGCAAGCC ATCGATTAC CTGAAGGACG AGAACACCGG	1860
CTACATCCAC TACGAGGACA CCAACAACAA CCTGGAGGAC TACCAGACCA TCAACAAGCG	1920
CTTCACCACC GGCACCGACC TGAAGGGCGT GTACCTGATC CTGAAGAGCC AGAACGGCGA	1980
CGAGGCCTGG GGCGACAACT TCATCATCCT GGAGATCAGC CCGAGCGAGA AGCTGCTGAG	2040
CCCGGAGCTG ATCAACACCA ACAACTGGAC CAGCACC GGC AGCACCAACA TCAGCGGCAA	2100
CACCCTGACC CTGTACCAGG GCGGCCGCGG CATCCTGAAG CAGAACCTGC AGCTGGACAG	2160
CTTCAGCACC TACCGCGTGT ACTTCAGCGT GAGCGGCGAC GCCAACGTGC GCATCCGCAA	2220
CAGCCGCGAG GTGCTGTTTG AGAAGAGGTA CATGAGCGGC GCCAAGGACG TGAGCGAGAT	2280
GTTCAACCACC AAGTTCGAGA AGGACAACTT CTACATCGAG CTGAGCCAGG GCAACAACCT	2340
GTACGGCGGC CCGATCGTGC ACTTCTACGA CGTGAGCATC AAGTTAACGT AGAGCTCAGA	2400
TCT	2403

Informace o sekvenci SEQ ID č. 31:

- (i) charakteristiky sekvence:
 - (A) délka: 2612 párů bází
 - (B) typ: nukleová kyselina
 - (C) počet řetězců: jednořetězcová
 - (D) topologie: lineární
- (ii) typ molekuly: DNA (genomová)
- (iii) hypotetická: není
- (ix) vlastnosti:
 - (A) jméno/klíč: CDS
 - (B) lokace: 118..2484
 - (D) další informace: poznámka = "nativní DNA-sekvence kódující VIP3A(b) z AB424"
- (xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 31:

ATTGAAATTG ATAAAAAGTT ATGAGTGTTC AATAATCAGT AATTACCAAT AAAGAATTAA	60
GAATACAAGT TTACAAGAAA TAAGTGTTAC AAAAAATAGC TGAAAAGGAA GATGAAC	117
ATG AAC AAG AAT AAT ACT AAA TTA AGC ACA AGA GCC TTA CCA AGT TTT	165
Met Asn Lys Asn Asn Thr Lys Leu Ser Thr Arg Ala Leu Pro Ser Phe	
790 795 800 805	
ATT GAT TAT TTC AAT GGC ATT TAT GGA TTT GCC ACT GGT ATC AAA GAC	213
Ile Asp Tyr Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Lys Asp	
810 815 820	
ATT ATG AAC ATG ATT TTT AAA ACG GAT ACA GGT GGT GAT CTA ACC CTA	261
Ile Met Asn Met Ile Phe Lys Thr Asp Thr Gly Gly Asp Leu Thr Leu	
825 830 835	
GAC GAA ATT TTA AAG AAT CAG CAG CTA CTA AAT GAT ATT TCT GGT AAA	309
Asp Glu Ile Leu Lys Asn Gln Gln Leu Leu Asn Asp Ile Ser Gly Lys	
840 845 850	
TTG GAT GGG GTG AAT GGA AGC TTA AAT GAT CTT ATC GCA CAG GGA AAC	357
Leu Asp Gly Val Asn Gly Ser Leu Asn Asp Leu Ile Ala Gln Gly Asn	
855 860 865	
TTA AAT ACA GAA TTA TCT AAG GAA ATA TTA AAA ATT GCA AAT GAA CAA	405
Leu Asn Thr Glu Leu Ser Lys Glu Ile Leu Lys Ile Ala Asn Glu Gln	
870 875 880 885	
AAT CAA GTT TTA AAT GAT GTT AAT AAC AAA CTC GAT GCG ATA AAT ACG	453

Asn Gln Val Leu Asn Asp Val Asn Asn Lys Leu Asp Ala Ile Asn Thr	
890 895 900	
ATG CTT CGG GTA TAT CTA CCT AAA ATT ACC TCT ATG TTG AGT GAT GTA	501
Met Leu Arg Val Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Ser Met Leu Ser Asp Val	
905 910 915	
ATG AAA CAA AAT TAT GCG CTA AGT CTG CAA ATA GAA TAC TTA AGT AAA	549
Met Lys Gln Asn Tyr Ala Leu Ser Leu Gln Ile Glu Tyr Leu Ser Lys	
920 925 930	
CAA TTG CAA GAG ATT TCT GAT AAG TTG GAT ATT ATT AAT GTA AAT GTA	597
Gln Leu Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Ile Ile Asn Val Asn Val	
935 940 945	
CTT ATT AAC TCT ACA CTT ACT GAA ATT ACA CCT GCG TAT CAA AGG ATT	645
Leu Ile Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ala Tyr Gln Arg Ile	
950 955 960 965	
AAA TAT GTG AAC GAA AAA TTT GAG GAA TTA ACT TTT GCT ACA GAA ACT	693
Lys Tyr Val Asn Glu Lys Phe Glu Glu Leu Thr Phe Ala Thr Glu Thr	
970 975 980	
AGT TCA AAA GTA AAA AAG GAT GGC TCT CCT GCA GAT ATT CGT GAT GAG	741
Ser Ser Lys Val Lys Lys Asp Gly Ser Pro Ala Asp Ile Arg Asp Glu	
985 990 995	
TTA ACT GAG TTA ACT GAA CTA GCG AAA AGT GTA ACA AAA AAT GAT GTG	789
Leu Thr Glu Leu Thr Glu Leu Ala Lys Ser Val Thr Lys Asn Asp Val	
1000 1005 1010	
GAT GGT TTT GAA TTT TAC CTT AAT ACA TTC CAC GAT GTA ATG GTA GGA	837
Asp Gly Phe Glu Phe Tyr Leu Asn Thr Phe His Asp Val Met Val Gly	
1015 1020 1025	
AAT AAT TTA TTC GGG CGT TCA GCT TTA AAA ACT GCA TCG GAA TTA ATT	885
Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr Ala Ser Glu Leu Ile	
1030 1035 1040 1045	
ACT AAA GAA AAT GTG AAA ACA AGT GGC AGT GAG GTC GGA AAT GTT TAT	933
Thr Lys Glu Asn Val Lys Thr Ser Gly Ser Glu Val Gly Asn Val Tyr	
1050 1055 1060	
AAC TTC CTA ATT GTA TTA ACA GCT CTG CAA GCA AAA GCT TTT CTT ACT	981
Asn Phe Leu Ile Val Leu Thr Ala Leu Gln Ala Lys Ala Phe Leu Thr	
1065 1070 1075	
TTA ACA CCA TGC CGA AAA TTA TTA GGC TTA GCA GAT ATT GAT TAT ACT	1029
Leu Thr Pro Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ala Asp Ile Asp Tyr Thr	
1080 1085 1090	
TCT ATT ATG AAT GAA CAT TTA AAT AAG GAA AAA GAG GAA TTT AGA GTA	1077
Ser Ile Met Asn Glu His Leu Asn Lys Glu Lys Glu Glu Phe Arg Val	
1095 1100 1105	

AAC ATC CTC CCT ACA CTT TCT AAT ACT TTT TCT AAT CCT AAT TAT GCA Asn Ile Leu Pro Thr Leu Ser Asn Thr Phe Ser Asn Pro Asn Tyr Ala 1110 1115 1120 1125	1125
AAA GTT AAA GGA AGT GAT GAA GAT GCA AAG ATG ATT GTG GAA GCT AAA Lys Val Lys Gly Ser Asp Glu Asp Ala Lys Met Ile Val Glu Ala Lys 1130 1135 1140	1173
CCA GGA CAT GCA TTG ATT GGG TTT GAA ATT AGT AAT GAT TCA ATT ACA Pro Gly His Ala Leu Ile Gly Phe Glu Ile Ser Asn Asp Ser Ile Thr 1145 1150 1155	1221
GTA TTA AAA GTA TAT GAG GCT AAG CTA AAA CAA AAT TAT CAA GTC GAT Val Leu Lys Val Tyr Glu Ala Lys Leu Lys Gln Asn Tyr Gln Val Asp 1160 1165 1170	1269
AAG GAT TCC TTA TCG GAA GTT ATT TAT GGC GAT ATG GAT AAA TTA TTG Lys Asp Ser Leu Ser Glu Val Ile Tyr Gly Asp Met Asp Lys Leu Leu 1175 1180 1185	1317
TGC CCA GAT CAA TCT GGA CAA ATC TAT TAT ACA AAT AAC ATA GTA TTT Cys Pro Asp Gln Ser Gly Gln Ile Tyr Tyr Thr Asn Asn Ile Val Phe 1190 1195 1200 1205	1365
CCA AAT GAA TAT GTA ATT ACT AAA ATT GAT TTC ACT AAA AAA ATG AAA Pro Asn Glu Tyr Val Ile Thr Lys Ile Asp Phe Thr Lys Lys Met Lys 1210 1215 1220	1413
ACT TTA AGA TAT GAG GTA ACA GCG AAT TTT TAT GAT TCT TCT ACA GGA Thr Leu Arg Tyr Glu Val Thr Ala Asn Phe Tyr Asp Ser Ser Thr Gly 1225 1230 1235	1461
GAA ATT GAC TTA AAT AAG AAA AAA GTA GAA TCA AGT GAA GCG GAG TAT Glu Ile Asp Leu Asn Lys Lys Lys Val Glu Ser Ser Glu Ala Glu Tyr 1240 1245 1250	1509
AGA ACG TTA AGT GCT AAT GAT GAT GGG GTG TAT ATG CCG TTA GGT GTC Arg Thr Leu Ser Ala Asn Asp Asp Gly Val Tyr Met Pro Leu Gly Val 1255 1260 1265	1557
ATC AGT GAA ACA TTT TTG ACT CCG ATT AAT GGG TTT GGC CTC CAA GCT Ile Ser Glu Thr Phe Leu Thr Pro Ile Asn Gly Phe Gly Leu Gln Ala 1270 1275 1280 1285	1605
GAT GAA AAT TCA AGA TTA ATT ACT TTA ACA TGT AAA TCA TAT TTA AGA Asp Glu Asn Ser Arg Leu Ile Thr Leu Thr Cys Lys Ser Tyr Leu Arg 1290 1295 1300	1653
GAA CTA CTG CTA GCA ACA GAC TTA AGC AAT AAA GAA ACT AAA TTG ATC Glu Leu Leu Leu Ala Thr Asp Leu Ser Asn Lys Glu Thr Lys Leu Ile 1305 1310 1315	1701
GTC CCG CCA AGT GGT TTT ATT AGC AAT ATT GTA GAG AAC GGG TCC ATA Val Pro Pro Ser Gly Phe Ile Ser Asn Ile Val Glu Asn Gly Ser Ile 1320 1325 1330	1749

GAA GAG GAC AAT TTA GAG CCG TGG AAA GCA AAT AAT AAG AAT GCG TAT Glu Glu Asp Asn Leu Glu Pro Trp Lys Ala Asn Asn Lys Asn Ala Tyr 1335 1340 1345	1797
GTA GAT CAT ACA GGC GGA GTG AAT GGA ACT AAA GCT TTA TAT GTT CAT Val Asp His Thr Gly Gly Val Asn Gly Thr Lys Ala Leu Tyr Val His 1350 1355 1360 1365	1845
AAG GAC GGA GGA ATT TCA CAA TTT ATT GGA GAT AAG TTA AAA CCG AAA Lys Asp Gly Gly Ile Ser Gln Phe Ile Gly Asp Lys Leu Lys Pro Lys 1370 1375 1380	1893
ACT GAG TAT GTA ATC CAA TAT ACT GTT AAA GGA AAA CCT TCT ATT CAT Thr Glu Tyr Val Ile Gln Tyr Thr Val Lys Gly Lys Pro Ser Ile His 1385 1390 1395	1941
TTA AAA GAT GAA AAT ACT GGA TAT ATT CAT TAT GAA GAT ACA AAT AAT Leu Lys Asp Glu Asn Thr Gly Tyr Ile His Tyr Glu Asp Thr Asn Asn 1400 1405 1410	1989
AAT TTA GAA GAT TAT CAA ACT ATT AAT AAA CGT TTT ACT ACA GGA ACT Asn Leu Glu Asp Tyr Gln Thr Ile Asn Lys Arg Phe Thr Thr Gly Thr 1415 1420 1425	2037
GAT TTA AAG GGA GTG TAT TTA ATT TTA AAA AGT CAA AAT GGA GAT GAA Asp Leu Lys Gly Val Tyr Leu Ile Leu Lys Ser Gln Asn Gly Asp Glu 1430 1435 1440 1445	2085
GCT TGG GGA GAT AAC TTT ATT ATT TTG GAA ATT AGT CCT TCT GAA AAG Ala Trp Gly Asp Asn Phe Ile Ile Leu Glu Ile Ser Pro Ser Glu Lys 1450 1455 1460	2133
TTA TTA AGT CCA GAA TTA ATT AAT ACA AAT AAT TGG ACG AGT ACG GGA Leu Leu Ser Pro Glu Leu Ile Asn Thr Asn Asn Trp Thr Ser Thr Gly 1465 1470 1475	2181
TCA ACT AAT ATT AGC GGT AAT ACA CTC ACT CTT TAT CAG GGA GGA CGA Ser Thr Asn Ile Ser Gly Asn Thr Leu Thr Leu Tyr Gln Gly Gly Arg 1480 1485 1490	2229
GGG ATT CTA AAA CAA AAC CTT CAA TTA GAT AGT TTT TCA ACT TAT AGA Gly Ile Leu Lys Gln Asn Leu Gln Leu Asp Ser Phe Ser Thr Tyr Arg 1495 1500 1505	2277
GTG TAT TTC TCT GTG TCC GGA GAT GCT AAT GTA AGG ATT AGA AAT TCT Val Tyr Phe Ser Val Ser Gly Asp Ala Asn Val Arg Ile Arg Asn Ser 1510 1515 1520 1525	2325
AGG GAA GTG TTA TTT GAA AAA AGA TAT ATG AGC GGT GCT AAA GAT GTT Arg Glu Val Leu Phe Glu Lys Arg Tyr Met Ser Gly Ala Lys Asp Val 1530 1535 1540	2373
TCT GAA ATG TTC ACT ACA AAA TTT GAG AAA GAT AAC TTC TAT ATA GAG Ser Glu Met Phe Thr Thr Lys Phe Glu Lys Asp Asn Phe Tyr Ile Glu	2421

1545	1550	1555	
CTT TCT CAA GGG AAT AAT TTA TAT GGT GGT CCT ATT GTA CAT TTT TAC			2469
Leu Ser Gln Gly Asn Asn Leu Tyr Gly Gly Pro Ile Val His Phe Tyr			
1560	1565	1570	
GAT GTC TCT ATT AAG TAAGATCGGG ATCTAATATT AACAGTTTTT AGAAGCTAAT			2524
Asp Val Ser Ile Lys			
1575			
TCTTGATATAA TGTCCTTGAT TATGGAAAAA CACAATTTTG TTTGCTAAGA TGTATATATA			2584
GCTCACTCAT TAAAAGGCAA TCAAGCTT			2612

Informace o sekvenci SEQ ID č. 32:

- (i) charakteristiky sekvence:
 - (A) délka: 789 aminokyselin
 - (B) typ: aminokyselinová
 - (D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: protein

(xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 32:

Met	Asn	Lys	Asn	Asn	Thr	Lys	Leu	Ser	Thr	Arg	Ala	Leu	Pro	Ser	Phe	1	5	10	15
Ile	Asp	Tyr	Phe	Asn	Gly	Ile	Tyr	Gly	Phe	Ala	Thr	Gly	Ile	Lys	Asp	20	25	30	
Ile	Met	Asn	Met	Ile	Phe	Lys	Thr	Asp	Thr	Gly	Gly	Asp	Leu	Thr	Leu	35	40	45	
Asp	Glu	Ile	Leu	Lys	Asn	Gln	Gln	Leu	Leu	Asn	Asp	Ile	Ser	Gly	Lys	50	55	60	
Leu	Asp	Gly	Val	Asn	Gly	Ser	Leu	Asn	Asp	Leu	Ile	Ala	Gln	Gly	Asn	65	70	75	80
Leu	Asn	Thr	Glu	Leu	Ser	Lys	Glu	Ile	Leu	Lys	Ile	Ala	Asn	Glu	Gln	85	90	95	
Asn	Gln	Val	Leu	Asn	Asp	Val	Asn	Asn	Lys	Leu	Asp	Ala	Ile	Asn	Thr	100	105	110	
Met	Leu	Arg	Val	Tyr	Leu	Pro	Lys	Ile	Thr	Ser	Met	Leu	Ser	Asp	Val	115	120	125	
Met	Lys	Gln	Asn	Tyr	Ala	Leu	Ser	Leu	Gln	Ile	Glu	Tyr	Leu	Ser	Lys	130	135	140	
Gln	Leu	Gln	Glu	Ile	Ser	Asp	Lys	Leu	Asp	Ile	Ile	Asn	Val	Asn	Val	145	150	155	160

Leu	Ile	Asn	Ser	Thr	Leu	Thr	Glu	Ile	Thr	Pro	Ala	Tyr	Gln	Arg	Ile		
				165					170					175			
Lys	Tyr	Val	Asn	Glu	Lys	Phe	Glu	Glu	Leu	Thr	Phe	Ala	Thr	Glu	Thr		
			180					185					190				
Ser	Ser	Lys	Val	Lys	Lys	Asp	Gly	Ser	Pro	Ala	Asp	Ile	Arg	Asp	Glu		
		195					200					205					
Leu	Thr	Glu	Leu	Thr	Glu	Leu	Ala	Lys	Ser	Val	Thr	Lys	Asn	Asp	Val		
	210					215					220						
Asp	Gly	Phe	Glu	Phe	Tyr	Leu	Asn	Thr	Phe	His	Asp	Val	Met	Val	Gly		
225					230					235					240		
Asn	Asn	Leu	Phe	Gly	Arg	Ser	Ala	Leu	Lys	Thr	Ala	Ser	Glu	Leu	Ile		
				245					250						255		
Thr	Lys	Glu	Asn	Val	Lys	Thr	Ser	Gly	Ser	Glu	Val	Gly	Asn	Val	Tyr		
			260					265					270				
Asn	Phe	Leu	Ile	Val	Leu	Thr	Ala	Leu	Gln	Ala	Lys	Ala	Phe	Leu	Thr		
		275					280					285					
Leu	Thr	Pro	Cys	Arg	Lys	Leu	Leu	Gly	Leu	Ala	Asp	Ile	Asp	Tyr	Thr		
	290					295					300						
Ser	Ile	Met	Asn	Glu	His	Leu	Asn	Lys	Glu	Lys	Glu	Glu	Phe	Arg	Val		
305					310					315					320		
Asn	Ile	Leu	Pro	Thr	Leu	Ser	Asn	Thr	Phe	Ser	Asn	Pro	Asn	Tyr	Ala		
				325					330					335			
Lys	Val	Lys	Gly	Ser	Asp	Glu	Asp	Ala	Lys	Met	Ile	Val	Glu	Ala	Lys		
			340					345					350				
Pro	Gly	His	Ala	Leu	Ile	Gly	Phe	Glu	Ile	Ser	Asn	Asp	Ser	Ile	Thr		
		355					360					365					
Val	Leu	Lys	Val	Tyr	Glu	Ala	Lys	Leu	Lys	Gln	Asn	Tyr	Gln	Val	Asp		
	370					375					380						
Lys	Asp	Ser	Leu	Ser	Glu	Val	Ile	Tyr	Gly	Asp	Met	Asp	Lys	Leu	Leu		
385					390					395					400		
Cys	Pro	Asp	Gln	Ser	Gly	Gln	Ile	Tyr	Tyr	Thr	Asn	Asn	Ile	Val	Phe		
			405						410					415			
Pro	Asn	Glu	Tyr	Val	Ile	Thr	Lys	Ile	Asp	Phe	Thr	Lys	Lys	Met	Lys		
		420						425					430				
Thr	Leu	Arg	Tyr	Glu	Val	Thr	Ala	Asn	Phe	Tyr	Asp	Ser	Ser	Thr	Gly		
		435					440						445				

Glu Ile Asp Leu Asn Lys Lys Lys Val Glu Ser Ser Glu Ala Glu Tyr
 450 455 460
 Arg Thr Leu Ser Ala Asn Asp Asp Gly Val Tyr Met Pro Leu Gly Val
 465 470 475 480
 Ile Ser Glu Thr Phe Leu Thr Pro Ile Asn Gly Phe Gly Leu Gln Ala
 485 490 495
 Asp Glu Asn Ser Arg Leu Ile Thr Leu Thr Cys Lys Ser Tyr Leu Arg
 500 505 510
 Glu Leu Leu Leu Ala Thr Asp Leu Ser Asn Lys Glu Thr Lys Leu Ile
 515 520 525
 Val Pro Pro Ser Gly Phe Ile Ser Asn Ile Val Glu Asn Gly Ser Ile
 530 535 540
 Glu Glu Asp Asn Leu Glu Pro Trp Lys Ala Asn Asn Lys Asn Ala Tyr
 545 550 555 560
 Val Asp His Thr Gly Gly Val Asn Gly Thr Lys Ala Leu Tyr Val His
 565 570 575
 Lys Asp Gly Gly Ile Ser Gln Phe Ile Gly Asp Lys Leu Lys Pro Lys
 580 585 590
 Thr Glu Tyr Val Ile Gln Tyr Thr Val Lys Gly Lys Pro Ser Ile His
 595 600 605
 Leu Lys Asp Glu Asn Thr Gly Tyr Ile His Tyr Glu Asp Thr Asn Asn
 610 615 620
 Asn Leu Glu Asp Tyr Gln Thr Ile Asn Lys Arg Phe Thr Thr Gly Thr
 625 630 635 640
 Asp Leu Lys Gly Val Tyr Leu Ile Leu Lys Ser Gln Asn Gly Asp Glu
 645 650 655
 Ala Trp Gly Asp Asn Phe Ile Ile Leu Glu Ile Ser Pro Ser Glu Lys
 660 665 670
 Leu Leu Ser Pro Glu Leu Ile Asn Thr Asn Asn Trp Thr Ser Thr Gly
 675 680 685
 Ser Thr Asn Ile Ser Gly Asn Thr Leu Thr Leu Tyr Gln Gly Gly Arg
 690 695 700
 Gly Ile Leu Lys Gln Asn Leu Gln Leu Asp Ser Phe Ser Thr Tyr Arg
 705 710 715 720
 Val Tyr Phe Ser Val Ser Gly Asp Ala Asn Val Arg Ile Arg Asn Ser
 725 730 735
 Arg Glu Val Leu Phe Glu Lys Arg Tyr Met Ser Gly Ala Lys Asp Val

740		745		750
Ser Glu Met Phe Thr Thr Lys Phe Glu Lys Asp Asn Phe Tyr Ile Glu				
755		760		765
Leu Ser Gln Gly Asn Asn Leu Tyr Gly Gly Pro Ile Val His Phe Tyr				
770		775		780
Asp Val Ser Ile Lys				
785				

Informace o sekvenci SEQ ID č. 33:

- (i) charakteristiky sekvence:
 - (A) délka: 30 párů bází
 - (B) typ: nukleová kyselina
 - (C) počet řetězců: jednořetězcová
 - (D) topologie: lineární
- (ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina
 - (A) popis: dopředný primer použitý pro vytvoření pCIB5526
- (iii) hypotetická: není
- (xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 33:

GGATCCACCA TGAAGACCAA CCAGATCAGC

30

Informace o sekvenci SEQ ID č. 34:

- (i) charakteristiky sekvence:
 - (A) délka: 15 párů bází
 - (B) typ: nukleová kyselina
 - (C) počet řetězců: jednořetězcová
 - (D) topologie: lineární
- (ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina
 - (A) popis: zpětný primer použitý pro vytvoření pCIB5526
- (iii) hypotetická: není

(xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 34:

AAGCTTCAGC TCCTT

15

Informace o sekvenci SEQ ID č. 35:

- (i) charakteristiky sekvence:
 - (A) délka: 2576 párů bází
 - (B) typ: nukleová kyselina
 - (C) počet řetězců: jednořetězcová
 - (D) topologie: lineární
- (ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina
 - (A) popis: syntetická DNA
- (iii) hypotetická: není
- (ix) vlastnosti:
 - (A) jméno/klíč: CDS
 - (B) lokace: 9..2564
 - (D) další informace: poznámka = "sekvence kódující VIP1A(a) ze které byl odstraněn sekreční signál mikroorganismu Bacillus, optimalizovaná pro kukuřici, jak je obsažena v pCIB5526"

(xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 35:

GATCCACC ATG AAG ACC AAC CAG ATC AGC ACC ACC CAG AAG AAC CAG CAG	50
Met Lys Thr Asn Gln Ile Ser Thr Thr Gln Lys Asn Gln Gln	
825 830 835	
AAG GAG ATG GAC CGC AAG GGC CTG CTG GGC TAC TAC TTC AAG GGC AAG	98
Lys Glu Met Asp Arg Lys Gly Leu Leu Gly Tyr Tyr Phe Lys Gly Lys	
840 845 850	
GAC TTC AGC AAC CTG ACC ATG TTC GCC CCC ACG CGT GAC AGC ACC CTG	146
Asp Phe Ser Asn Leu Thr Met Phe Ala Pro Thr Arg Asp Ser Thr Leu	
855 860 865	
ATC TAC GAC CAG CAG ACC GCC AAC AAG CTG CTG GAC AAG AAG CAG CAG	194
Ile Tyr Asp Gln Gln Thr Ala Asn Lys Leu Leu Asp Lys Lys Gln Gln	
870 875 880	
GAG TAC CAG AGC ATC CGC TGG ATC GGC CTG ATC CAG AGC AAG GAG ACC	242
Glu Tyr Gln Ser Ile Arg Trp Ile Gly Leu Ile Gln Ser Lys Glu Thr	
885 890 895	

GGC GAC TTC ACC TTC AAC CTG AGC GAG GAC GAG CAG GCC ATC ATC GAG Gly Asp Phe Thr Phe Asn Leu Ser Glu Asp Glu Gln Ala Ile Ile Glu 900 905 910 915	290
ATC AAC GGC AAG ATC ATC AGC AAC AAG GGC AAG GAG AAG CAG GTG GTG Ile Asn Gly Lys Ile Ile Ser Asn Lys Gly Lys Glu Lys Gln Val Val 920 925 930	338
CAC CTG GAG AAG GGC AAG CTG GTG CCC ATC AAG ATC GAG TAC CAG AGC His Leu Glu Lys Gly Lys Leu Val Pro Ile Lys Ile Glu Tyr Gln Ser 935 940 945	386
GAC ACC AAG TTC AAC ATC GAC AGC AAG ACC TTC AAG GAG CTG AAG CTT Asp Thr Lys Phe Asn Ile Asp Ser Lys Thr Phe Lys Glu Leu Lys Leu 950 955 960	434
TTC AAG ATC GAC AGC CAG AAC CAG CCC CAG CAG GTG CAG CAG GAC GAG Phe Lys Ile Asp Ser Gln Asn Gln Pro Gln Gln Val Gln Gln Asp Glu 965 970 975	482
CTG CGC AAC CCC GAG TTC AAC AAG AAG GAG AGC CAG GAG TTC CTG GCC Leu Arg Asn Pro Glu Phe Asn Lys Lys Glu Ser Gln Glu Phe Leu Ala 980 985 990 995	530
AAG CCC AGC AAG ATC AAC CTG TTC ACC CAG CAG ATG AAG CGC GAG ATC Lys Pro Ser Lys Ile Asn Leu Phe Thr Gln Gln Met Lys Arg Glu Ile 1000 1005 1010	578
GAC GAG GAC ACC GAC ACC GAC GGC GAC AGC ATC CCC GAC CTG TGG GAG Asp Glu Asp Thr Asp Thr Asp Gly Asp Ser Ile Pro Asp Leu Trp Glu 1015 1020 1025	626
GAG AAC GGC TAC ACC ATC CAG AAC CGC ATC GCC GTG AAG TGG GAC GAC Glu Asn Gly Tyr Thr Ile Gln Asn Arg Ile Ala Val Lys Trp Asp Asp 1030 1035 1040	674
AGC CTG GCT AGC AAG GGC TAC ACC AAG TTC GTG AGC AAC CCC CTG GAG Ser Leu Ala Ser Lys Gly Tyr Thr Lys Phe Val Ser Asn Pro Leu Glu 1045 1050 1055	722
AGC CAC ACC GTG GGC GAC CCC TAC ACC GAC TAC GAG AAG GCC GCC CGC Ser His Thr Val Gly Asp Pro Tyr Thr Asp Tyr Glu Lys Ala Ala Arg 1060 1065 1070 1075	770
GAC CTG GAC CTG AGC AAC GCC AAG GAG ACC TTC AAC CCC CTG GTG GCC Asp Leu Asp Leu Ser Asn Ala Lys Glu Thr Phe Asn Pro Leu Val Ala 1080 1085 1090	818
GCC TTC CCC AGC GTG AAC GTG AGC ATG GAG AAG GTG ATC CTG AGC CCC Ala Phe Pro Ser Val Asn Val Ser Met Glu Lys Val Ile Leu Ser Pro 1095 1100 1105	866
AAC GAG AAC CTG AGC AAC AGC GTG GAG AGC CAC TCG AGC ACC AAC TGG Asn Glu Asn Leu Ser Asn Ser Val Glu Ser His Ser Ser Thr Asn Trp 1110 1115 1120	914

AGC TAC ACC AAC ACC GAG GGC GCC AGC GTG GAG GCC GGC ATC GGT CCC Ser Tyr Thr Asn Thr Glu Gly Ala Ser Val Glu Ala Gly Ile Gly Pro 1125 1130 1135	962
AAG GGC ATC AGC TTC GGC GTG AGC GTG AAC TAC CAG CAC AGC GAG ACC Lys Gly Ile Ser Phe Gly Val Ser Val Asn Tyr Gln His Ser Glu Thr 1140 1145 1150 1155	1010
GTG GCC CAG GAG TGG GGC ACC AGC ACC GGC AAC ACC AGC CAG TTC AAC Val Ala Gln Glu Trp Gly Thr Ser Thr Gly Asn Thr Ser Gln Phe Asn 1160 1165 1170	1058
ACC GCC AGC GCC GGC TAC CTG AAC GCC AAC GTG CGC TAC AAC AAC GTG Thr Ala Ser Ala Gly Tyr Leu Asn Ala Asn Val Arg Tyr Asn Asn Val 1175 1180 1185	1106
GGC ACC GGC GCC ATC TAC GAC GTG AAG CCC ACC ACC AGC TTC GTG CTG Gly Thr Gly Ala Ile Tyr Asp Val Lys Pro Thr Thr Ser Phe Val Leu 1190 1195 1200	1154
AAC AAC GAC ACC ATC GCC ACC ATC ACC GCC AAG TCG AAT TCC ACC GCC Asn Asn Asp Thr Ile Ala Thr Ile Thr Ala Lys Ser Asn Ser Thr Ala 1205 1210 1215	1202
CTG AAC ATC AGC CCC GGC GAG AGC TAC CCC AAG AAG GGC CAG AAC GGC Leu Asn Ile Ser Pro Gly Glu Ser Tyr Pro Lys Lys Gly Gln Asn Gly 1220 1225 1230 1235	1250
ATC GCC ATC ACC AGC ATG GAC GAC TTC AAC AGC CAC CCC ATC ACC CTG Ile Ala Ile Thr Ser Met Asp Asp Phe Asn Ser His Pro Ile Thr Leu 1240 1245 1250	1298
AAC AAG AAG CAG GTG GAC AAC CTG CTG AAC AAC AAG CCC ATG ATG CTG Asn Lys Lys Gln Val Asp Asn Leu Leu Asn Asn Lys Pro Met Met Leu 1255 1260 1265	1346
GAG ACC AAC CAG ACC GAC GGC GTC TAC AAG ATC AAG GAC ACC CAC GGC Glu Thr Asn Gln Thr Asp Gly Val Tyr Lys Ile Lys Asp Thr His Gly 1270 1275 1280	1394
AAC ATC GTG ACG GGC GGC GAG TGG AAC GGC GTG ATC CAG CAG ATC AAG Asn Ile Val Thr Gly Gly Glu Trp Asn Gly Val Ile Gln Gln Ile Lys 1285 1290 1295	1442
GCC AAG ACC GCC AGC ATC ATC GTC GAC GAC GGC GAG CGC GTG GCC GAG Ala Lys Thr Ala Ser Ile Ile Val Asp Asp Gly Glu Arg Val Ala Glu 1300 1305 1310 1315	1490
AAG CGC GTG GCC GCC AAG GAC TAC GAG AAC CCC GAG GAC AAG ACC CCC Lys Arg Val Ala Ala Lys Asp Tyr Glu Asn Pro Glu Asp Lys Thr Pro 1320 1325 1330	1538
AGC CTG ACC CTG AAG GAC GCC CTG AAG CTG AGC TAC CCC GAC GAG ATC Ser Leu Thr Leu Lys Asp Ala Leu Lys Leu Ser Tyr Pro Asp Glu Ile 1335 1340 1345	1586

AAG GAG ATC GAG GGC TTG CTG TAC TAC AAG AAC AAG CCC ATC TAC GAG Lys Glu Ile Glu Gly Leu Leu Tyr Tyr Lys Asn Lys Pro Ile Tyr Glu 1350 1355 1360	1634
AGC AGC GTG ATG ACC TAT CTA GAC GAG AAC ACC GCC AAG GAG GTG ACC Ser Ser Val Met Thr Tyr Leu Asp Glu Asn Thr Ala Lys Glu Val Thr 1365 1370 1375	1682
AAG CAG CTG AAC GAC ACC ACC GGC AAG TTC AAG GAC GTG AGC CAC CTG Lys Gln Leu Asn Asp Thr Thr Gly Lys Phe Lys Asp Val Ser His Leu 1380 1385 1390 1395	1730
TAC GAC GTG AAG CTG ACC CCC AAG ATG AAC GTG ACC ATC AAG CTG AGC Tyr Asp Val Lys Leu Thr Pro Lys Met Asn Val Thr Ile Lys Leu Ser 1400 1405 1410	1778
ATC CTG TAC GAC AAC GCC GAG AGC AAC GAC AAC AGC ATC GGC AAG TGG Ile Leu Tyr Asp Asn Ala Glu Ser Asn Asp Asn Ser Ile Gly Lys Trp 1415 1420 1425	1826
ACC AAC ACC AAC ATC GTG AGC GGC GGC AAC AAC GGC AAG AAG CAG TAC Thr Asn Thr Asn Ile Val Ser Gly Gly Asn Asn Gly Lys Lys Gln Tyr 1430 1435 1440	1874
AGC AGC AAC AAC CCC GAC GCC AAC CTG ACC CTG AAC ACC GAC GCC CAG Ser Ser Asn Asn Pro Asp Ala Asn Leu Thr Leu Asn Thr Asp Ala Gln 1445 1450 1455	1922
GAG AAG CTG AAC AAG AAC CGC GAC TAC TAC ATC AGC CTG TAC ATG AAG Glu Lys Leu Asn Lys Asn Arg Asp Tyr Tyr Ile Ser Leu Tyr Met Lys 1460 1465 1470 1475	1970
AGC GAG AAG AAC ACC CAG TGC GAG ATC ACC ATC GAC GGC GAG ATA TAC Ser Glu Lys Asn Thr Gln Cys Glu Ile Thr Ile Asp Gly Glu Ile Tyr 1480 1485 1490	2018
CCC ATC ACC ACC AAG ACC GTG AAC GTG AAC AAG GAC AAC TAC AAG CGC Pro Ile Thr Thr Lys Thr Val Asn Val Asn Lys Asp Asn Tyr Lys Arg 1495 1500 1505	2066
CTG GAC ATC ATC GCC CAC AAC ATC AAG AGC AAC CCC ATC AGC AGC CTG Leu Asp Ile Ile Ala His Asn Ile Lys Ser Asn Pro Ile Ser Ser Leu 1510 1515 1520	2114
CAC ATC AAG ACC AAC GAC GAG ATC ACC CTG TTC TGG GAC GAC ATA TCG His Ile Lys Thr Asn Asp Glu Ile Thr Leu Phe Trp Asp Asp Ile Ser 1525 1530 1535	2162
ATT ACC GAC GTC GCC AGC ATC AAG CCC GAG AAC CTG ACC GAC AGC GAG Ile Thr Asp Val Ala Ser Ile Lys Pro Glu Asn Leu Thr Asp Ser Glu 1540 1545 1550 1555	2210
ATC AAG CAG ATA TAC AGT CGC TAC GGC ATC AAG CTG GAG GAC GGC ATC Ile Lys Gln Ile Tyr Ser Arg Tyr Gly Ile Lys Leu Glu Asp Gly Ile 1560 1565 1570	2258

CTG ATC GAC AAG AAA GGC GGC ATC CAC TAC GGC GAG TTC ATC AAC GAG Leu Ile Asp Lys Lys Gly Gly Ile His Tyr Gly Glu Phe Ile Asn Glu 1575 1580 1585	2306
GCC AGC TTC AAC ATC GAG CCC CTG CAG AAC TAC GTG ACC AAG TAC GAG Ala Ser Phe Asn Ile Glu Pro Leu Gln Asn Tyr Val Thr Lys Tyr Glu 1590 1595 1600	2354
GTG ACC TAC AGC AGC GAG CTG GGC CCC AAC GTG AGC GAC ACC CTG GAG Val Thr Tyr Ser Ser Glu Leu Gly Pro Asn Val Ser Asp Thr Leu Glu 1605 1610 1615	2402
AGC GAC AAG ATT TAC AAG GAC GGC ACC ATC AAG TTC GAC TTC ACC AAG Ser Asp Lys Ile Tyr Lys Asp Gly Thr Ile Lys Phe Asp Phe Thr Lys 1620 1625 1630 1635	2450
TAC AGC AAG AAC GAG CAG GGC CTG TTC TAC GAC AGC GGC CTG AAC TGG Tyr Ser Lys Asn Glu Gln Gly Leu Phe Tyr Asp Ser Gly Leu Asn Trp 1640 1645 1650	2498
GAC TTC AAG ATC AAC GCC ATC ACC TAC GAC GGC AAG GAG ATG AAC GTG Asp Phe Lys Ile Asn Ala Ile Thr Tyr Asp Gly Lys Glu Met Asn Val 1655 1660 1665	2546
TTC CAC CGC TAC AAC AAG TAGATCTGAG CT Phe His Arg Tyr Asn Lys 1670	2576

Informace o sekvenci SEQ ID č. 36:

- (i) charakteristiky sekvence:
 - (A) délka: 852 aminokyselin
 - (B) typ: aminokyselinová
 - (D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: protein

(xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 36:

Met Lys Thr Asn Gln Ile Ser Thr Thr Gln Lys Asn Gln Gln Lys Glu 1 5 10 15
Met Asp Arg Lys Gly Leu Leu Gly Tyr Tyr Phe Lys Gly Lys Asp Phe 20 25 30
Ser Asn Leu Thr Met Phe Ala Pro Thr Arg Asp Ser Thr Leu Ile Tyr 35 40 45

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

Gly Ala Ile Tyr Asp Val Lys Pro Thr Thr Ser Phe Val Leu Asn Asn
370 375 380

Asp Thr Ile Ala Thr Ile Thr Ala Lys Ser Asn Ser Thr Ala Leu Asn
385 390 395 400

Ile Ser Pro Gly Glu Ser Tyr Pro Lys Lys Gly Gln Asn Gly Ile Ala
405 410 415

Ile Thr Ser Met Asp Asp Phe Asn Ser His Pro Ile Thr Leu Asn Lys
420 425 430

Lys Gln Val Asp Asn Leu Leu Asn Asn Lys Pro Met Met Leu Glu Thr
435 440 445

Asn Gln Thr Asp Gly Val Tyr Lys Ile Lys Asp Thr His Gly Asn Ile
450 455 460

Val Thr Gly Gly Glu Trp Asn Gly Val Ile Gln Gln Ile Lys Ala Lys
465 470 475 480

Thr Ala Ser Ile Ile Val Asp Asp Gly Glu Arg Val Ala Glu Lys Arg
485 490 495

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

Thr Leu Lys Asp Ala Leu Lys Leu Ser Tyr Pro Asp Glu Ile Lys Glu
515 520 525

Ile Glu Gly Leu Leu Tyr Tyr Lys Asn Lys Pro Ile Tyr Glu Ser Ser
530 535 540

Val Met Thr Tyr Leu Asp Glu Asn Thr Ala Lys Glu Val Thr Lys Gln
545 550 555 560

Leu Asn Asp Thr Thr Gly Lys Phe Lys Asp Val Ser His Leu Tyr Asp
565 570 575

Val Lys Leu Thr Pro Lys Met Asn Val Thr Ile Lys Leu Ser Ile Leu
580 585 590

Tyr Asp Asn Ala Glu Ser Asn Asp Asn Ser Ile Gly Lys Trp Thr Asn
595 600 605

Thr Asn Ile Val Ser Gly Gly Asn Asn Gly Lys Lys Gln Tyr Ser Ser
610 615 620

Asn Asn Pro Asp Ala Asn Leu Thr Leu Asn Thr Asp Ala Gln Glu Lys
625 630 635 640

Leu Asn Lys Asn Arg Asp Tyr Tyr Ile Ser Leu Tyr Met Lys Ser Glu
645 650 655

Lys Asn Thr Gln Cys Glu Ile Thr Ile Asp Gly Glu Ile Tyr Pro Ile
660 665 670

Thr Thr Lys Thr Val Asn Val Asn Lys Asp Asn Tyr Lys Arg Leu Asp
675 680 685

Ile	Ile	Ala	His	Asn	Ile	Lys	Ser	Asn	Pro	Ile	Ser	Ser	Leu	His	Ile	690	695	700	
Lys	Thr	Asn	Asp	Glu	Ile	Thr	Leu	Phe	Trp	Asp	Asp	Ile	Ser	Ile	Thr	705	710	715	720
Asp	Val	Ala	Ser	Ile	Lys	Pro	Glu	Asn	Leu	Thr	Asp	Ser	Glu	Ile	Lys	725	730	735	
Gln	Ile	Tyr	Ser	Arg	Tyr	Gly	Ile	Lys	Leu	Glu	Asp	Gly	Ile	Leu	Ile	740	745	750	
Asp	Lys	Lys	Gly	Gly	Ile	His	Tyr	Gly	Glu	Phe	Ile	Asn	Glu	Ala	Ser	755	760	765	
Phe	Asn	Ile	Glu	Pro	Leu	Gln	Asn	Tyr	Val	Thr	Lys	Tyr	Glu	Val	Thr	770	775	780	
Tyr	Ser	Ser	Glu	Leu	Gly	Pro	Asn	Val	Ser	Asp	Thr	Leu	Glu	Ser	Asp	785	790	795	800
Lys	Ile	Tyr	Lys	Asp	Gly	Thr	Ile	Lys	Phe	Asp	Phe	Thr	Lys	Tyr	Ser	805	810	815	
Lys	Asn	Glu	Gln	Gly	Leu	Phe	Tyr	Asp	Ser	Gly	Leu	Asn	Trp	Asp	Phe	820	825	830	
Lys	Ile	Asn	Ala	Ile	Thr	Tyr	Asp	Gly	Lys	Glu	Met	Asn	Val	Phe	His	835	840	845	
Arg	Tyr	Asn	Lys													850			

Informace o sekvenci SEQ ID č. 37:

- (i) charakteristiky sekvence:
 - (A) délka: 32 párů bází
 - (B) typ: nukleová kyselina
 - (C) počet řetězců: jednořetězcová
 - (D) topologie: lineární
- (ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina
 - (A) popis: dopředný prumer použitý pro vytvoření pCIB5527
- (iii) hypotetická: není
- (xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 37:

GGATCCACCA TGCTGCAGAA CCTGAAGATC AC

Informace o sekvenci SEQ ID č. 38:

- (i) charakteristiky sekvence:
 - (A) délka: 18 párů bází
 - (B) typ: nukleová kyselina
 - (C) počet řetězců: jednořetězcová
 - (D) topologie: lineární
- (ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina
 - (A) popis: zpětný primer použitý pro vytvoření pCIB5527
- (iii) hypotetická: není
- (xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 38:

AAGCTTCCAC TCCTTCTC

18

Informace o sekvenci SEQ ID č. 39:

- (i) charakteristiky sekvence:
 - (A) délka: 1241 párů bází
 - (B) typ: nukleová kyselina
 - (C) počet řetězců: jednořetězcová
 - (D) topologie: lineární
- (ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina
 - (A) popis: syntetická DNA
- (iii) hypotetická: není
- (ix) vlastnosti:
 - (A) jméno/klíč: CDS
 - (B) lokace: 9..1238
 - (D) další informace: poznámka = "DNA-sekvence kódující VIP2A(a) ze které byl odstraněn sekreční signál mikroorganismu Bacillus, optimalizovaná pro kukuřici, jak je obsažena v pCIB5527"

(xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 39:

GATCCACC ATG CTG CAG AAC CTG AAG ATC ACC GAC AAG GTG GAG GAC TTC Met Leu Gln Asn Leu Lys Ile Thr Asp Lys Val Glu Asp Phe 855 860 865	50
AAG GAG GAC AAG GAG AAG GCC AAG GAG TGG GGC AAG GAG AAG GAG AAG Lys Glu Asp Lys Glu Lys Ala Lys Glu Trp Gly Lys Glu Lys Glu Lys 870 875 880	98
GAG TGG AAG CTT ACC GCC ACC GAG AAG GGC AAG ATG AAC AAC TTC CTG Glu Trp Lys Leu Thr Ala Thr Glu Lys Gly Lys Met Asn Asn Phe Leu 885 890 895	146
GAC AAC AAG AAC GAC ATC AAG ACC AAC TAC AAG GAG ATC ACC TTC AGC Asp Asn Lys Asn Asp Ile Lys Thr Asn Tyr Lys Glu Ile Thr Phe Ser 900 905 910	194
ATA GCC GGC AGC TTC GAG GAC GAG ATC AAG GAC CTG AAG GAG ATC GAC Ile Ala Gly Ser Phe Glu Asp Glu Ile Lys Asp Leu Lys Glu Ile Asp 915 920 925 930	242
AAG ATG TTC GAC AAG ACC AAC CTG AGC AAC AGC ATC ATC ACC TAC AAG Lys Met Phe Asp Lys Thr Asn Leu Ser Asn Ser Ile Ile Thr Tyr Lys 935 940 945	290
AAC GTG GAG CCC ACC ACC ATC GGC TTC AAC AAG AGC CTG ACC GAG GGC Asn Val Glu Pro Thr Thr Ile Gly Phe Asn Lys Ser Leu Thr Glu Gly 950 955 960	338
AAC ACC ATC AAC AGC GAC GCC ATG GCC CAG TTC AAG GAG CAG TTC CTG Asn Thr Ile Asn Ser Asp Ala Met Ala Gln Phe Lys Glu Gln Phe Leu 965 970 975	386
GAC CGC GAC ATC AAG TTC GAC AGC TAC CTG GAC ACC CAC CTG ACC GCC Asp Arg Asp Ile Lys Phe Asp Ser Tyr Leu Asp Thr His Leu Thr Ala 980 985 990	434
CAG CAG GTG AGC AGC AAG GAG CGC GTG ATC CTG AAG GTG ACC GTC CCC Gln Gln Val Ser Ser Lys Glu Arg Val Ile Leu Lys Val Thr Val Pro 995 1000 1005 1010	482
AGC GGC AAG GGC AGC ACC ACC CCC ACC AAG GCC GGC GTG ATC CTG AAC Ser Gly Lys Gly Ser Thr Thr Pro Thr Lys Ala Gly Val Ile Leu Asn 1015 1020 1025	530
AAC AGC GAG TAC AAG ATG CTG ATC GAC AAC GGC TAC ATG GTG CAC GTG Asn Ser Glu Tyr Lys Met Leu Ile Asp Asn Gly Tyr Met Val His Val 1030 1035 1040	578

GAC AAG GTG AGC AAG GTG GTG AAG AAG GGC GTG GAG TGC CTC CAG ATC Asp Lys Val Ser Lys Val Val Lys Lys Gly Val Glu Cys Leu Gln Ile 1045 1050 1055	626
GAG GGC ACC CTG AAG AAG AGT CTA GAC TTC AAG AAC GAC ATC AAC GCC Glu Gly Thr Leu Lys Lys Ser Leu Asp Phe Lys Asn Asp Ile Asn Ala 1060 1065 1070	674
GAG GCC CAC AGC TGG GGC ATG AAG AAC TAC GAG GAG TGG GCC AAG GAC Glu Ala His Ser Trp Gly Met Lys Asn Tyr Glu Glu Trp Ala Lys Asp 1075 1080 1085 1090	722
CTG ACC GAC AGC CAG CGC GAG GCC CTG GAC GGC TAC GCC CGC CAG GAC Leu Thr Asp Ser Gln Arg Glu Ala Leu Asp Gly Tyr Ala Arg Gln Asp 1095 1100 1105	770
TAC AAG GAG ATC AAC AAC TAC CTG CGC AAC CAG GGC GGC AGC GGC AAC Tyr Lys Glu Ile Asn Asn Tyr Leu Arg Asn Gln Gly Gly Ser Gly Asn 1110 1115 1120	818
GAG AAG CTG GAC GCC CAG ATC AAG AAC ATC AGC GAC GCC CTG GGC AAG Glu Lys Leu Asp Ala Gln Ile Lys Asn Ile Ser Asp Ala Leu Gly Lys 1125 1130 1135	866
AAG CCC ATC CCC GAG AAC ATC ACC GTG TAC CGC TGG TGC GGC ATG CCC Lys Pro Ile Pro Glu Asn Ile Thr Val Tyr Arg Trp Cys Gly Met Pro 1140 1145 1150	914
GAG TTC GGC TAC CAG ATC AGC GAC CCC CTG CCC AGC CTG AAG GAC TTC Glu Phe Gly Tyr Gln Ile Ser Asp Pro Leu Pro Ser Leu Lys Asp Phe 1155 1160 1165 1170	962
GAG GAG CAG TTC CTG AAC ACC ATC AAG GAG GAC AAG GGC TAC ATG AGC Glu Glu Gln Phe Leu Asn Thr Ile Lys Glu Asp Lys Gly Tyr Met Ser 1175 1180 1185	1010
ACC AGC CTG AGC AGC GAG CGC CTG GCC GCC TTC GGC AGC CGC AAG ATC Thr Ser Leu Ser Ser Glu Arg Leu Ala Ala Phe Gly Ser Arg Lys Ile 1190 1195 1200	1058
ATC CTG CGC CTG CAG GTG CCC AAG GGC AGC ACT GGT GCC TAC CTG AGC Ile Leu Arg Leu Gln Val Pro Lys Gly Ser Thr Gly Ala Tyr Leu Ser 1205 1210 1215	1106
GCC ATC GGC GGC TTC GCC AGC GAG AAG GAG ATC CTG CTG GAT AAG GAC Ala Ile Gly Gly Phe Ala Ser Glu Lys Glu Ile Leu Leu Asp Lys Asp 1220 1225 1230	1154
AGC AAG TAC CAC ATC GAC AAG GTG ACC GAG GTG ATC ATC AAG GGC GTG Ser Lys Tyr His Ile Asp Lys Val Thr Glu Val Ile Ile Lys Gly Val 1235 1240 1245 1250	1202
AAG CGC TAC GTG GTG GAC GCC ACC CTG CTG ACC AAC TAG Lys Arg Tyr Val Val Asp Ala Thr Leu Leu Thr Asn 1255 1260	1241

Informace o sekvenci SEQ ID č. 40:

- (i) charakteristiky sekvence:
 - (A) délka: 410 aminokyselin
 - (B) typ: aminokyselinová
 - (D) topologie: lineární
- (ii) typ molekuly: protein
- (xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 40:

Met	Leu	Gln	Asn	Leu	Lys	Ile	Thr	Asp	Lys	Val	Glu	Asp	Phe	Lys	Glu	
1				5					10					15		
Asp	Lys	Glu	Lys	Ala	Lys	Glu	Trp	Gly	Lys	Glu	Lys	Glu	Lys	Glu	Trp	
			20					25						30		
Lys	Leu	Thr	Ala	Thr	Glu	Lys	Gly	Lys	Met	Asn	Asn	Phe	Leu	Asp	Asn	
		35					40					45				
Lys	Asn	Asp	Ile	Lys	Thr	Asn	Tyr	Lys	Glu	Ile	Thr	Phe	Ser	Ile	Ala	
	50					55					60					
Gly	Ser	Phe	Glu	Asp	Glu	Ile	Lys	Asp	Leu	Lys	Glu	Ile	Asp	Lys	Met	
65					70					75					80	
Phe	Asp	Lys	Thr	Asn	Leu	Ser	Asn	Ser	Ile	Ile	Thr	Tyr	Lys	Asn	Val	
				85					90					95		
Glu	Pro	Thr	Thr	Ile	Gly	Phe	Asn	Lys	Ser	Leu	Thr	Glu	Gly	Asn	Thr	
			100					105						110		
Ile	Asn	Ser	Asp	Ala	Met	Ala	Gln	Phe	Lys	Glu	Gln	Phe	Leu	Asp	Arg	
		115					120					125				
Asp	Ile	Lys	Phe	Asp	Ser	Tyr	Leu	Asp	Thr	His	Leu	Thr	Ala	Gln	Gln	
	130					135					140					
Val	Ser	Ser	Lys	Glu	Arg	Val	Ile	Leu	Lys	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Gly	
145					150					155					160	
Lys	Gly	Ser	Thr	Thr	Pro	Thr	Lys	Ala	Gly	Val	Ile	Leu	Asn	Asn	Ser	
				165					170					175		
Glu	Tyr	Lys	Met	Leu	Ile	Asp	Asn	Gly	Tyr	Met	Val	His	Val	Asp	Lys	
			180					185					190			
Val	Ser	Lys	Val	Val	Lys	Lys	Gly	Val	Glu	Cys	Leu	Gln	Ile	Glu	Gly	
		195					200					205				
Thr	Leu	Lys	Lys	Ser	Leu	Asp	Phe	Lys	Asn	Asp	Ile	Asn	Ala	Glu	Ala	
	210					215					220					

His	Ser	Trp	Gly	Met	Lys	Asn	Tyr	Glu	Glu	Trp	Ala	Lys	Asp	Leu	Thr	225					230					235					240
Asp	Ser	Gln	Arg	Glu	Ala	Leu	Asp	Gly	Tyr	Ala	Arg	Gln	Asp	Tyr	Lys		245							250					255		
Glu	Ile	Asn	Asn	Tyr	Leu	Arg	Asn	Gln	Gly	Gly	Ser	Gly	Asn	Glu	Lys			260							265				270		
Leu	Asp	Ala	Gln	Ile	Lys	Asn	Ile	Ser	Asp	Ala	Leu	Gly	Lys	Lys	Pro		275								280				285		
Ile	Pro	Glu	Asn	Ile	Thr	Val	Tyr	Arg	Trp	Cys	Gly	Met	Pro	Glu	Phe			290								295			300		
Gly	Tyr	Gln	Ile	Ser	Asp	Pro	Leu	Pro	Ser	Leu	Lys	Asp	Phe	Glu	Glu									310				315		320	
Gln	Phe	Leu	Asn	Thr	Ile	Lys	Glu	Asp	Lys	Gly	Tyr	Met	Ser	Thr	Ser				325							330			335		
Leu	Ser	Ser	Glu	Arg	Leu	Ala	Ala	Phe	Gly	Ser	Arg	Lys	Ile	Ile	Leu				340							345			350		
Arg	Leu	Gln	Val	Pro	Lys	Gly	Ser	Thr	Gly	Ala	Tyr	Leu	Ser	Ala	Ile					355						360			365		
Gly	Gly	Phe	Ala	Ser	Glu	Lys	Glu	Ile	Leu	Leu	Asp	Lys	Asp	Ser	Lys										375				380		
Tyr	His	Ile	Asp	Lys	Val	Thr	Glu	Val	Ile	Ile	Lys	Gly	Val	Lys	Arg											390			395		400
Tyr	Val	Val	Asp	Ala	Thr	Leu	Leu	Thr	Asn											405								410			

Informace o sekvenci SEQ ID č. 41:

- (i) charakteristiky sekvence:
 - (A) délka: 72 párů bází
 - (B) typ: nukleová kyselina
 - (C) počet řetězců: jednořetězcová
 - (D) topologie: lineární
- (ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina
 - (A) popis: oligonukleotid kódující eukaryotický sekreční signál použitý pro zkonstruování

pCIB5527

(iii) hypotetická: není

(xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 41:

GGATCCACCA TGGGCTGGAG CTGGATCTTC CTGTTCCTGC TGAGCGGCGC CGCGGGCGTG	60
CACTGCCTGC AG	72

Informace o sekvenci SEQ ID č. 42:

(i) charakteristiky sekvence:

- (A) délka: 1241 párů bází
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) počet řetězců: jednořetězcová
- (D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) popis: syntetická DNA

(iii) hypotetická: není

(ix) vlastnosti:

- (A) jméno/klíč: CDS
- (B) lokace: 9..1238
- (D) další informace: poznámka = "DNA-sekvence kódující VIP2A(a) ze které byl odstraněn sekreční signál mikroorganismu Bacillus a do které byl zařazen eukaryotický sekreční signál, optimalizovaná pro kukuřici, jak je obsažena v pCIB5528"

(xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 42:

GATCCACC ATG CTG CAG AAC CTG AAG ATC ACC GAC AAG GTG GAG GAC TTC	50
Met Leu Gln Asn Leu Lys Ile Thr Asp Lys Val Glu Asp Phe	
415 420	
AAG GAG GAC AAG GAG AAG GCC AAG GAG TGG GGC AAG GAG AAG GAG AAG	98
Lys Glu Asp Lys Glu Lys Ala Lys Glu Trp Gly Lys Glu Lys Glu Lys	
425 430 435 440	
GAG TGG AAG CTT ACC GCC ACC GAG AAG GGC AAG ATG AAC AAC TTC CTG	146
Glu Trp Lys Leu Thr Ala Thr Glu Lys Gly Lys Met Asn Asn Phe Leu	
445 450 455	

GAC AAC AAG AAC GAC ATC AAG ACC AAC TAC AAG GAG ATC ACC TTC AGC Asp Asn Lys Asn Asp Ile Lys Thr Asn Tyr Lys Glu Ile Thr Phe Ser 460 465 470	194
ATA GCC GGC AGC TTC GAG GAC GAG ATC AAG GAC CTG AAG GAG ATC GAC Ile Ala Gly Ser Phe Glu Asp Glu Ile Lys Asp Leu Lys Glu Ile Asp 475 480 485	242
AAG ATG TTC GAC AAG ACC AAC CTG AGC AAC AGC ATC ATC ACC TAC AAG Lys Met Phe Asp Lys Thr Asn Leu Ser Asn Ser Ile Ile Thr Tyr Lys 490 495 500	290
AAC GTG GAG CCC ACC ACC ATC GGC TTC AAC AAG AGC CTG ACC GAG GGC Asn Val Glu Pro Thr Thr Ile Gly Phe Asn Lys Ser Leu Thr Glu Gly 505 510 515 520	338
AAC ACC ATC AAC AGC GAC GCC ATG GCC CAG TTC AAG GAG CAG TTC CTG Asn Thr Ile Asn Ser Asp Ala Met Ala Gln Phe Lys Glu Gln Phe Leu 525 530 535	386
GAC CGC GAC ATC AAG TTC GAC AGC TAC CTG GAC ACC CAC CTG ACC GCC Asp Arg Asp Ile Lys Phe Asp Ser Tyr Leu Asp Thr His Leu Thr Ala 540 545 550	434
CAG CAG GTG AGC AGC AAG GAG CGC GTG ATC CTG AAG GTG ACC GTC CCC Gln Gln Val Ser Ser Lys Glu Arg Val Ile Leu Lys Val Thr Val Pro 555 560 565	482
AGC GGC AAG GGC AGC ACC ACC CCC ACC AAG GCC GGC GTG ATC CTG AAC Ser Gly Lys Gly Ser Thr Thr Pro Thr Lys Ala Gly Val Ile Leu Asn 570 575 580	530
AAC AGC GAG TAC AAG ATG CTG ATC GAC AAC GGC TAC ATG GTG CAC GTG Asn Ser Glu Tyr Lys Met Leu Ile Asp Asn Gly Tyr Met Val His Val 585 590 595 600	578
GAC AAG GTG AGC AAG GTG GTG AAG AAG GGC GTG GAG TGC CTC CAG ATC Asp Lys Val Ser Lys Val Val Lys Lys Gly Val Glu Cys Leu Gln Ile 605 610 615	626
GAG GGC ACC CTG AAG AAG AGT CTA GAC TTC AAG AAC GAC ATC AAC GCC Glu Gly Thr Leu Lys Lys Ser Leu Asp Phe Lys Asn Asp Ile Asn Ala 620 625 630	674
GAG GCC CAC AGC TGG GGC ATG AAG AAC TAC GAG GAG TGG GCC AAG GAC Glu Ala His Ser Trp Gly Met Lys Asn Tyr Glu Glu Trp Ala Lys Asp 635 640 645	722
CTG ACC GAC AGC CAG CGC GAG GCC CTG GAC GGC TAC GCC CGC CAG GAC Leu Thr Asp Ser Gln Arg Glu Ala Leu Asp Gly Tyr Ala Arg Gln Asp 650 655 660	770
TAC AAG GAG ATC AAC AAC TAC CTG CGC AAC CAG GGC GGC AGC GGC AAC Tyr Lys Glu Ile Asn Asn Tyr Leu Arg Asn Gln Gly Gly Ser Gly Asn 665 670 675 680	818

GAG AAG CTG GAC GCC CAG ATC AAG AAC ATC AGC GAC GCC CTG GGC AAG Glu Lys Leu Asp Ala Gln Ile Lys Asn Ile Ser Asp Ala Leu Gly Lys 685 690 695	866
AAG CCC ATC CCC GAG AAC ATC ACC GTG TAC CGC TGG TGC GGC ATG CCC Lys Pro Ile Pro Glu Asn Ile Thr Val Tyr Arg Trp Cys Gly Met Pro 700 705 710	914
GAG TTC GGC TAC CAG ATC AGC GAC CCC CTG CCC AGC CTG AAG GAC TTC Glu Phe Gly Tyr Gln Ile Ser Asp Pro Leu Pro Ser Leu Lys Asp Phe 715 720 725	962
GAG GAG CAG TTC CTG AAC ACC ATC AAG GAG GAC AAG GGC TAC ATG AGC Glu Glu Gln Phe Leu Asn Thr Ile Lys Glu Asp Lys Gly Tyr Met Ser 730 735 740	1010
ACC AGC CTG AGC AGC GAG CGC CTG GCC GCC TTC GGC AGC CGC AAG ATC Thr Ser Leu Ser Ser Glu Arg Leu Ala Ala Phe Gly Ser Arg Lys Ile 745 750 755 760	1058
ATC CTG CGC CTG CAG GTG CCC AAG GGC AGC ACT GGT GCC TAC CTG AGC Ile Leu Arg Leu Gln Val Pro Lys Gly Ser Thr Gly Ala Tyr Leu Ser 765 770 775	1106
GCC ATC GGC GGC TTC GCC AGC GAG AAG GAG ATC CTG CTG GAT AAG GAC Ala Ile Gly Gly Phe Ala Ser Glu Lys Glu Ile Leu Leu Asp Lys Asp 780 785 790	1154
AGC AAG TAC CAC ATC GAC AAG GTG ACC GAG GTG ATC ATC AAG GGC GTG Ser Lys Tyr His Ile Asp Lys Val Thr Glu Val Ile Ile Lys Gly Val 795 800 805	1202
AAG CGC TAC GTG GTG GAC GCC ACC CTG CTG ACC AAC TAG Lys Arg Tyr Val Val Asp Ala Thr Leu Leu Thr Asn 810 815 820	1241

Informace o sekvenci SEQ ID č. 43:

- (i) charakteristiky sekvence:
 - (A) délka: 410 aminokyselin
 - (B) typ: aminokyselinová
 - (D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: protein

(xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 43:

Met Leu Gln Asn Leu Lys Ile Thr Asp Lys Val Glu Asp Phe Lys Glu
1 5 10 15

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

Gly	Tyr	Gln	Ile	Ser	Asp	Pro	Leu	Pro	Ser	Leu	Lys	Asp	Phe	Glu	Glu	
305					310					315					320	
Gln	Phe	Leu	Asn	Thr	Ile	Lys	Glu	Asp	Lys	Gly	Tyr	Met	Ser	Thr	Ser	
			325						330					335		
Leu	Ser	Ser	Glu	Arg	Leu	Ala	Ala	Phe	Gly	Ser	Arg	Lys	Ile	Ile	Leu	
			340					345					350			
Arg	Leu	Gln	Val	Pro	Lys	Gly	Ser	Thr	Gly	Ala	Tyr	Leu	Ser	Ala	Ile	
		355				360						365				
Gly	Gly	Phe	Ala	Ser	Glu	Lys	Glu	Ile	Leu	Leu	Asp	Lys	Asp	Ser	Lys	
	370					375					380					
Tyr	His	Ile	Asp	Lys	Val	Thr	Glu	Val	Ile	Ile	Lys	Gly	Val	Lys	Arg	
385				390						395					400	
Tyr	Val	Val	Asp	Ala	Thr	Leu	Leu	Thr	Asn							
				405					410							

Informace o sekvenci SEQ ID č. 44:

- (i) charakteristiky sekvence:
 - (A) délka: 86 párů bází
 - (B) typ: nukleová kyselina
 - (C) počet řetězců: jednořetězcová
 - (D) topologie: lineární
- (ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina
 - (A) popis: oligonukleotid kódující peptid způsobující cílení do vakuoly, použitý pro zkonstruování pCIB5533
- (iii) hypotetická: není
- (xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 44:

CCGCGGGCGT	GCACTGCCTC	AGCAGCAGCA	GCTTCGCCGA	CAGCAACCCC	ATCCGCGTGA	60
CCGACCGCGC	CGCCAGCACC	CTGCAG				86

Informace o sekvenci SEQ ID č. 45:

- (i) charakteristiky sekvence:
 - (A) délka: 1358 párů bází
 - (B) typ: nukleová kyselina

- (C) počet řetězců: jednořetězcová
 (D) topologie: lineární
- (ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina
 (A) popis: syntetická DNA
- (iii) hypotetická: není
- (ix) vlastnosti:
 (A) jméno/klíč: CDS
 (B) lokace: 9..1355
 (D) další informace: poznámka = "DNA-sekvence
 kódující VIP2A(a) ze které byl odstraněn
 sekreční signál mikroorganismu Bacillus a
 do které byl zařazen signál způsobující
 cílení do vakuoly, optimalizovaná pro kuku-
 řici, jak je obsažena v pCIB5533"
- (xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 45:

GATCCACC ATG GGC TGG AGC TGG ATC TTC CTG TTC CTG CTG AGC GGC GCC	50
Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Ala	
415 420	
GCG GGC GTG CAC TGC CTC AGC AGC AGC AGC TTC GCC GAC AGC AAC CCC	98
Ala Gly Val His Cys Leu Ser Ser Ser Ser Phe Ala Asp Ser Asn Pro	
425 430 435 440	
ATC CGC GTG ACC GAC CGC GCC GCC AGC ACC CTG CAG AAC CTG AAG ATC	146
Ile Arg Val Thr Asp Arg Ala Ala Ser Thr Leu Gln Asn Leu Lys Ile	
445 450 455	
ACC GAC AAG GTG GAG GAC TTC AAG GAG GAC AAG GAG AAG GCC AAG GAG	194
Thr Asp Lys Val Glu Asp Phe Lys Glu Asp Lys Glu Lys Ala Lys Glu	
460 465 470	
TGG GGC AAG GAG AAG GAG AAG GAG TGG AAG CTT ACC GCC ACC GAG AAG	242
Trp Gly Lys Glu Lys Glu Lys Glu Trp Lys Leu Thr Ala Thr Glu Lys	
475 480 485	
GGC AAG ATG AAC AAC TTC CTG GAC AAC AAG AAC GAC ATC AAG ACC AAC	290
Gly Lys Met Asn Asn Phe Leu Asp Asn Lys Asn Asp Ile Lys Thr Asn	
490 495 500	
TAC AAG GAG ATC ACC TTC AGC ATA GCC GGC AGC TTC GAG GAC GAG ATC	338
Tyr Lys Glu Ile Thr Phe Ser Ile Ala Gly Ser Phe Glu Asp Glu Ile	
505 510 515 520	
AAG GAC CTG AAG GAG ATC GAC AAG ATG TTC GAC AAG ACC AAC CTG AGC	386

Lys Asp Leu Lys Glu Ile Asp Lys Met Phe Asp Lys Thr Asn Leu Ser	
525 530 535	
AAC AGC ATC ATC ACC TAC AAG AAC GTG GAG CCC ACC ACC ATC GGC TTC	434
Asn Ser Ile Ile Thr Tyr Lys Asn Val Glu Pro Thr Thr Ile Gly Phe	
540 545 550	
AAC AAG AGC CTG ACC GAG GGC AAC ACC ATC AAC AGC GAC GCC ATG GCC	482
Asn Lys Ser Leu Thr Glu Gly Asn Thr Ile Asn Ser Asp Ala Met Ala	
555 560 565	
CAG TTC AAG GAG CAG TTC CTG GAC CGC GAC ATC AAG TTC GAC AGC TAC	530
Gln Phe Lys Glu Gln Phe Leu Asp Arg Asp Ile Lys Phe Asp Ser Tyr	
570 575 580	
CTG GAC ACC CAC CTG ACC GCC CAG CAG GTG AGC AGC AAG GAG CGC GTG	578
Leu Asp Thr His Leu Thr Ala Gln Gln Val Ser Ser Lys Glu Arg Val	
585 590 595 600	
ATC CTG AAG GTG ACC GTC CCC AGC GGC AAG GGC AGC ACC ACC CCC ACC	626
Ile Leu Lys Val Thr Val Pro Ser Gly Lys Gly Ser Thr Thr Pro Thr	
605 610 615	
AAG GCC GGC GTG ATC CTG AAC AAC AGC GAG TAC AAG ATG CTG ATC GAC	674
Lys Ala Gly Val Ile Leu Asn Asn Ser Glu Tyr Lys Met Leu Ile Asp	
620 625 630	
AAC GGC TAC ATG GTG CAC GTG GAC AAG GTG AGC AAG GTG GTG AAG AAG	722
Asn Gly Tyr Met Val His Val Asp Lys Val Ser Lys Val Val Lys Lys	
635 640 645	
GGC GTG GAG TGC CTC CAG ATC GAG GGC ACC CTG AAG AAG AGT CTA GAC	770
Gly Val Glu Cys Leu Gln Ile Glu Gly Thr Leu Lys Lys Ser Leu Asp	
650 655 660	
TTC AAG AAC GAC ATC AAC GCC GAG GCC CAC AGC TGG GGC ATG AAG AAC	818
Phe Lys Asn Asp Ile Asn Ala Glu Ala His Ser Trp Gly Met Lys Asn	
665 670 675 680	
TAC GAG GAG TGG GCC AAG GAC CTG ACC GAC AGC CAG CGC GAG GCC CTG	866
Tyr Glu Glu Trp Ala Lys Asp Leu Thr Asp Ser Gln Arg Glu Ala Leu	
685 690 695	
GAC GGC TAC GCC CGC CAG GAC TAC AAG GAG ATC AAC AAC TAC CTG CGC	914
Asp Gly Tyr Ala Arg Gln Asp Tyr Lys Glu Ile Asn Asn Tyr Leu Arg	
700 705 710	
AAC CAG GGC GGC AGC GGC AAC GAG AAG CTG GAC GCC CAG ATC AAG AAC	962
Asn Gln Gly Gly Ser Gly Asn Glu Lys Leu Asp Ala Gln Ile Lys Asn	
715 720 725	
ATC AGC GAC GCC CTG GGC AAG AAG CCC ATC CCC GAG AAC ATC ACC GTG	1010
Ile Ser Asp Ala Leu Gly Lys Lys Pro Ile Pro Glu Asn Ile Thr Val	
730 735 740	

TAC CGC TGG TGC GGC ATG CCC GAG TTC GGC TAC CAG ATC AGC GAC CCC Tyr Arg Trp Cys Gly Met Pro Glu Phe Gly Tyr Gln Ile Ser Asp Pro 745 750 755 760	1058
CTG CCC AGC CTG AAG GAC TTC GAG GAG CAG TTC CTG AAC ACC ATC AAG Leu Pro Ser Leu Lys Asp Phe Glu Glu Gln Phe Leu Asn Thr Ile Lys 765 770 775	1106
GAG GAC AAG GGC TAC ATG AGC ACC AGC CTG AGC AGC GAG CGC CTG GCC Glu Asp Lys Gly Tyr Met Ser Thr Ser Leu Ser Ser Glu Arg Leu Ala 780 785 790	1154
GCC TTC GGC AGC CGC AAG ATC ATC CTG CGC CTG CAG GTG CCC AAG GGC Ala Phe Gly Ser Arg Lys Ile Ile Leu Arg Leu Gln Val Pro Lys Gly 795 800 805	1202
AGC ACT GGT GCC TAC CTG AGC GCC ATC GGC GGC TTC GCC AGC GAG AAG Ser Thr Gly Ala Tyr Leu Ser Ala Ile Gly Gly Phe Ala Ser Glu Lys 810 815 820	1250
GAG ATC CTG CTG GAT AAG GAC AGC AAG TAC CAC ATC GAC AAG GTG ACC Glu Ile Leu Leu Asp Lys Asp Ser Lys Tyr His Ile Asp Lys Val Thr 825 830 835 840	1298
GAG GTG ATC ATC AAG GGC GTG AAG CGC TAC GTG GTG GAC GCC ACC CTG Glu Val Ile Ile Lys Gly Val Lys Arg Tyr Val Val Asp Ala Thr Leu 845 850 855	1346
CTG ACC AAC TAG Leu Thr Asn	1358

Informace o sekvenci SEQ ID č. 46:

- (i) charakteristiky sekvence:
 - (A) délka: 449 aminokyselin
 - (B) typ: aminokyselinová
 - (D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: protein

(xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 46:

Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Ala Ala Gly
1 5 10 15

Val His Cys Leu Ser Ser Ser Ser Phe Ala Asp Ser Asn Pro Ile Arg
20 25 30

Val Thr Asp Arg Ala Ala Ser Thr Leu Gln Asn Leu Lys Ile Thr Asp
35 40 45

Lys Val Glu Asp Phe Lys Glu Asp Lys Glu Lys Ala Lys Glu Trp Gly
50 55 60

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

Ser Leu Lys Asp Phe Glu Glu Gln Phe Leu Asn Thr Ile Lys Glu Asp
 355 360 365

Lys Gly Tyr Met Ser Thr Ser Leu Ser Ser Glu Arg Leu Ala Ala Phe
 370 375 380

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

Gly Ala Tyr Leu Ser Ala Ile Gly Gly Phe Ala Ser Glu Lys Glu Ile
 405 410 415

Leu Leu Asp Lys Asp Ser Lys Tyr His Ile Asp Lys Val Thr Glu Val
 420 425 430

Ile Ile Lys Gly Val Lys Arg Tyr Val Val Asp Ala Thr Leu Leu Thr
 435 440 445

Asn

Informace o sekvenci SEQ ID č. 47:

- (i) charakteristiky sekvence:
 - (A) délka: 16 aminokyselin
 - (B) typ: aminokyselinová
 - (C) počet řetězců: jednořetězcová
 - (D) topologie: lineární
- (ii) typ molekuly: peptid
- (iii) hypotetická: není
- (ix) vlastnosti:
 - (A) jméno/klíč: peptid
 - (B) lokace: 1..16
 - (D) další informace: poznámka = "linkerový
 peptid pro fúzi VIP1A(a) a VIP2A(a) použitý
 pro zkonstruování pCIB5533"
- (xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 47:

Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser
 1 5 10 15

Informace o sekvenci SEQ ID č. 48:

- (i) charakteristiky sekvence:
 - (A) délka: 66 párů bází
 - (B) typ: nukleová kyselina
 - (C) počet řetězců: jednořetězcová
 - (D) topologie: lineární
- (ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina
 - (A) popis: DNA kódující linkerový peptid použitá pro zkonstruování pCIB5533
- (iii) hypotetická: není
- (xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 48:

CCCGGGCCTT CTACTCCCC AACTCCCTCT CCTAGCACGC CTCCGACACC TAGCGATATC	60
GGATCC	66

Informace o sekvenci SEQ ID č. 49:

- (i) charakteristiky sekvence:
 - (A) délka: 4031 párů bází
 - (B) typ: nukleová kyselina
 - (C) počet řetězců: jednořetězcová
 - (D) topologie: lineární
- (ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina
 - (A) popis: syntetická DNA
- (iii) hypotetická: není
- (ix) vlastnosti:
 - (A) jméno/klíč: CDS
 - (B) lokace: 6..4019
 - (D) další informace: poznámka = "DNA-sekvence kódující fúzní protein VIP2A(a) - VIP1A(a) optimalizovaná pro kukuřici, jak je obsažena v pCIB5531"

(xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 49:

GATCC ATG AAG CGC ATG GAG GGC AAG CTG TTC ATG GTG AGC AAG AAG Met Lys Arg Met Glu Gly Lys Leu Phe Met Val Ser Lys Lys 450 455 460	47
CTC CAG GTG GTG ACC AAG ACC GTG CTG CTG AGC ACC GTG TTC AGC ATC Leu Gln Val Val Thr Lys Thr Val Leu Leu Ser Thr Val Phe Ser Ile 465 470 475	95
AGC CTG CTG AAC AAC GAG GTG ATC AAG GCC GAG CAG CTG AAC ATC AAC Ser Leu Leu Asn Asn Glu Val Ile Lys Ala Glu Gln Leu Asn Ile Asn 480 485 490 495	143
AGC CAG AGC AAG TAC ACC AAC CTC CAG AAC CTG AAG ATC ACC GAC AAG Ser Gln Ser Lys Tyr Thr Asn Leu Gln Asn Leu Lys Ile Thr Asp Lys 500 505 510	191
GTG GAG GAC TTC AAG GAG GAC AAG GAG AAG GCC AAG GAG TGG GGC AAG Val Glu Asp Phe Lys Glu Asp Lys Glu Lys Ala Lys Glu Trp Gly Lys 515 520 525	239
GAG AAG GAG AAG GAG TGG AAG CTT ACC GCC ACC GAG AAG GGC AAG ATG Glu Lys Glu Lys Glu Trp Lys Leu Thr Ala Thr Glu Lys Gly Lys Met 530 535 540	287
AAC AAC TTC CTG GAC AAC AAG AAC GAC ATC AAG ACC AAC TAC AAG GAG Asn Asn Phe Leu Asp Asn Lys Asn Asp Ile Lys Thr Asn Tyr Lys Glu 545 550 555	335
ATC ACC TTC AGC ATA GCC GGC AGC TTC GAG GAC GAG ATC AAG GAC CTG Ile Thr Phe Ser Ile Ala Gly Ser Phe Glu Asp Glu Ile Lys Asp Leu 560 565 570 575	383
AAG GAG ATC GAC AAG ATG TTC GAC AAG ACC AAC CTG AGC AAC AGC ATC Lys Glu Ile Asp Lys Met Phe Asp Lys Thr Asn Leu Ser Asn Ser Ile 580 585 590	431
ATC ACC TAC AAG AAC GTG GAG CCC ACC ACC ATC GGC TTC AAC AAG AGC Ile Thr Tyr Lys Asn Val Glu Pro Thr Thr Ile Gly Phe Asn Lys Ser 595 600 605	479
CTG ACC GAG GGC AAC ACC ATC AAC AGC GAC GCC ATG GCC CAG TTC AAG Leu Thr Glu Gly Asn Thr Ile Asn Ser Asp Ala Met Ala Gln Phe Lys 610 615 620	527
GAG CAG TTC CTG GAC CGC GAC ATC AAG TTC GAC AGC TAC CTG GAC ACC Glu Gln Phe Leu Asp Arg Asp Ile Lys Phe Asp Ser Tyr Leu Asp Thr 625 630 635	575
CAC CTG ACC GCC CAG CAG GTG AGC AGC AAG GAG CGC GTG ATC CTG AAG His Leu Thr Ala Gln Gln Val Ser Ser Lys Glu Arg Val Ile Leu Lys 640 645 650 655	623
GTG ACC GTC CCC AGC GGC AAG GGC AGC ACC ACC CCC ACC AAG GCC GGC Val Thr Val Pro Ser Gly Lys Gly Ser Thr Thr Pro Thr Lys Ala Gly 660 665 670	671

GTG ATC CTG AAC AAC AGC GAG TAC AAG ATG CTG ATC GAC AAC GGC TAC Val Ile Leu Asn Asn Ser Glu Tyr Lys Met Leu Ile Asp Asn Gly Tyr 675 680 685	719
ATG GTG CAC GTG GAC AAG GTG AGC AAG GTG GTG AAG AAG GGC GTG GAG Met Val His Val Asp Lys Val Ser Lys Val Val Lys Lys Gly Val Glu 690 695 700	767
TGC CTC CAG ATC GAG GGC ACC CTG AAG AAG AGT CTA GAC TTC AAG AAC Cys Leu Gln Ile Glu Gly Thr Leu Lys Lys Ser Leu Asp Phe Lys Asn 705 710 715	815
GAC ATC AAC GCC GAG GCC CAC AGC TGG GGC ATG AAG AAC TAC GAG GAG Asp Ile Asn Ala Glu Ala His Ser Trp Gly Met Lys Asn Tyr Glu Glu 720 725 730 735	863
TGG GCC AAG GAC CTG ACC GAC AGC CAG CGC GAG GCC CTG GAC GGC TAC Trp Ala Lys Asp Leu Thr Asp Ser Gln Arg Glu Ala Leu Asp Gly Tyr 740 745 750	911
GCC CGC CAG GAC TAC AAG GAG ATC AAC AAC TAC CTG CGC AAC CAG GGC Ala Arg Gln Asp Tyr Lys Glu Ile Asn Asn Tyr Leu Arg Asn Gln Gly 755 760 765	959
GGC AGC GGC AAC GAG AAG CTG GAC GCC CAG ATC AAG AAC ATC AGC GAC Gly Ser Gly Asn Glu Lys Leu Asp Ala Gln Ile Lys Asn Ile Ser Asp 770 775 780	1007
GCC CTG GGC AAG AAG CCC ATC CCC GAG AAC ATC ACC GTG TAC CGC TGG Ala Leu Gly Lys Lys Pro Ile Pro Glu Asn Ile Thr Val Tyr Arg Trp 785 790 795	1055
TGC GGC ATG CCC GAG TTC GGC TAC CAG ATC AGC GAC CCC CTG CCC AGC Cys Gly Met Pro Glu Phe Gly Tyr Gln Ile Ser Asp Pro Leu Pro Ser 800 805 810 815	1103
CTG AAG GAC TTC GAG GAG CAG TTC CTG AAC ACC ATC AAG GAG GAC AAG Leu Lys Asp Phe Glu Glu Gln Phe Leu Asn Thr Ile Lys Glu Asp Lys 820 825 830	1151
GGC TAC ATG AGC ACC AGC CTG AGC AGC GAG CGC CTG GCC GCC TTC GGC Gly Tyr Met Ser Thr Ser Leu Ser Ser Glu Arg Leu Ala Ala Phe Gly 835 840 845	1199
AGC CGC AAG ATC ATC CTG CGC CTG CAG GTG CCC AAG GGC AGC ACT GGT Ser Arg Lys Ile Ile Leu Arg Leu Gln Val Pro Lys Gly Ser Thr Gly 850 855 860	1247
GCC TAC CTG AGC GCC ATC GGC GGC TTC GCC AGC GAG AAG GAG ATC CTG Ala Tyr Leu Ser Ala Ile Gly Gly Phe Ala Ser Glu Lys Glu Ile Leu 865 870 875	1295
CTG GAT AAG GAC AGC AAG TAC CAC ATC GAC AAG GTG ACC GAG GTG ATC Leu Asp Lys Asp Ser Lys Tyr His Ile Asp Lys Val Thr Glu Val Ile 880 885 890 895	1343

ATC AAG GGC GTG AAG CGC TAC GTG GTG GAC GCC ACC CTG CTG ACC AAC Ile Lys Gly Val Lys Arg Tyr Val Val Asp Ala Thr Leu Leu Thr Asn 900 905 910	1391
TCC CGG GGG CCT TCT ACT CCC CCA ACT CCC TCT CCT AGC ACG CCT CCG Ser Arg Gly Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro 915 920 925	1439
ACA CCT AGC GAT ATC GGA TCC ACC ATG AAG ACC AAC CAG ATC AGC ACC Thr Pro Ser Asp Ile Gly Ser Thr Met Lys Thr Asn Gln Ile Ser Thr 930 935 940	1487
ACC CAG AAG AAC CAG CAG AAG GAG ATG GAC CGC AAG GGC CTG CTG GGC Thr Gln Lys Asn Gln Gln Lys Glu Met Asp Arg Lys Gly Leu Leu Gly 945 950 955	1535
TAC TAC TTC AAG GGC AAG GAC TTC AGC AAC CTG ACC ATG TTC GCC CCC Tyr Tyr Phe Lys Gly Lys Asp Phe Ser Asn Leu Thr Met Phe Ala Pro 960 965 970 975	1583
ACG CGT GAC AGC ACC CTG ATC TAC GAC CAG CAG ACC GCC AAC AAG CTG Thr Arg Asp Ser Thr Leu Ile Tyr Asp Gln Gln Thr Ala Asn Lys Leu 980 985 990	1631
CTG GAC AAG AAG CAG CAG GAG TAC CAG AGC ATC CGC TGG ATC GGC CTG Leu Asp Lys Lys Gln Gln Glu Tyr Gln Ser Ile Arg Trp Ile Gly Leu 995 1000 1005	1679
ATC CAG AGC AAG GAG ACC GGC GAC TTC ACC TTC AAC CTG AGC GAG GAC Ile Gln Ser Lys Glu Thr Gly Asp Phe Thr Phe Asn Leu Ser Glu Asp 1010 1015 1020	1727
GAG CAG GCC ATC ATC GAG ATC AAC GGC AAG ATC ATC AGC AAC AAG GGC Glu Gln Ala Ile Ile Glu Ile Asn Gly Lys Ile Ile Ser Asn Lys Gly 1025 1030 1035	1775
AAG GAG AAG CAG GTG GTG CAC CTG GAG AAG GGC AAG CTG GTG CCC ATC Lys Glu Lys Gln Val Val His Leu Glu Lys Gly Lys Leu Val Pro Ile 1040 1045 1050 1055	1823
AAG ATC GAG TAC CAG AGC GAC ACC AAG TTC AAC ATC GAC AGC AAG ACC Lys Ile Glu Tyr Gln Ser Asp Thr Lys Phe Asn Ile Asp Ser Lys Thr 1060 1065 1070	1871
TTC AAG GAG CTG AAG CTT TTC AAG ATC GAC AGC CAG AAC CAG CCC CAG Phe Lys Glu Leu Lys Leu Phe Lys Ile Asp Ser Gln Asn Gln Pro Gln 1075 1080 1085	1919
CAG GTG CAG CAG GAC GAG CTG CGC AAC CCC GAG TTC AAC AAG AAG GAG Gln Val Gln Gln Asp Glu Leu Arg Asn Pro Glu Phe Asn Lys Lys Glu 1090 1095 1100	1967
AGC CAG GAG TTC CTG GCC AAG CCC AGC AAG ATC AAC CTG TTC ACC CAG Ser Gln Glu Phe Leu Ala Lys Pro Ser Lys Ile Asn Leu Phe Thr Gln 1105 1110 1115	2015

CAG ATG AAG CGC GAG ATC GAC GAG GAC ACC GAC ACC GAC GGC GAC AGC Gln Met Lys Arg Glu Ile Asp Glu Asp Thr Asp Thr Asp Gly Asp Ser 1120 1125 1130 1135	2063
ATC CCC GAC CTG TGG GAG GAG AAC GGC TAC ACC ATC CAG AAC CGC ATC Ile Pro Asp Leu Trp Glu Glu Asn Gly Tyr Thr Ile Gln Asn Arg Ile 1140 1145 1150	2111
GCC GTG AAG TGG GAC GAC AGC CTG GCT AGC AAG GGC TAC ACC AAG TTC Ala Val Lys Trp Asp Asp Ser Leu Ala Ser Lys Gly Tyr Thr Lys Phe 1155 1160 1165	2159
GTG AGC AAC CCC CTG GAG AGC CAC ACC GTG GGC GAC CCC TAC ACC GAC Val Ser Asn Pro Leu Glu Ser His Thr Val Gly Asp Pro Tyr Thr Asp 1170 1175 1180	2207
TAC GAG AAG GCC GCC CGC GAC CTG GAC CTG AGC AAC GCC AAG GAG ACC Tyr Glu Lys Ala Ala Arg Asp Leu Asp Leu Ser Asn Ala Lys Glu Thr 1185 1190 1195	2255
TTC AAC CCC CTG GTG GCC GCC TTC CCC AGC GTG AAC GTG AGC ATG GAG Phe Asn Pro Leu Val Ala Ala Phe Pro Ser Val Asn Val Ser Met Glu 1200 1205 1210 1215	2303
AAG GTG ATC CTG AGC CCC AAC GAG AAC CTG AGC AAC AGC GTG GAG AGC Lys Val Ile Leu Ser Pro Asn Glu Asn Leu Ser Asn Ser Val Glu Ser 1220 1225 1230	2351
CAC TCG AGC ACC AAC TGG AGC TAC ACC AAC ACC GAG GGC GCC AGC GTG His Ser Ser Thr Asn Trp Ser Tyr Thr Asn Thr Glu Gly Ala Ser Val 1235 1240 1245	2399
GAG GCC GGC ATC GGT CCC AAG GGC ATC AGC TTC GGC GTG AGC GTG AAC Glu Ala Gly Ile Gly Pro Lys Gly Ile Ser Phe Gly Val Ser Val Asn 1250 1255 1260	2447
TAC CAG CAC AGC GAG ACC GTG GCC CAG GAG TGG GGC ACC AGC ACC GGC Tyr Gln His Ser Glu Thr Val Ala Gln Glu Trp Gly Thr Ser Thr Gly 1265 1270 1275	2495
AAC ACC AGC CAG TTC AAC ACC GCC AGC GCC GGC TAC CTG AAC GCC AAC Asn Thr Ser Gln Phe Asn Thr Ala Ser Ala Gly Tyr Leu Asn Ala Asn 1280 1285 1290 1295	2543
GTG CGC TAC AAC AAC GTG GGC ACC GGC GCC ATC TAC GAC GTG AAG CCC Val Arg Tyr Asn Asn Val Gly Thr Gly Ala Ile Tyr Asp Val Lys Pro 1300 1305 1310	2591
ACC ACC AGC TTC GTG CTG AAC AAC GAC ACC ATC GCC ACC ATC ACC GCC Thr Thr Ser Phe Val Leu Asn Asn Asp Thr Ile Ala Thr Ile Thr Ala 1315 1320 1325	2639
AAG TCG AAT TCC ACC GCC CTG AAC ATC AGC CCC GGC GAG AGC TAC CCC Lys Ser Asn Ser Thr Ala Leu Asn Ile Ser Pro Gly Glu Ser Tyr Pro 1330 1335 1340	2687

AAG AAG GGC CAG AAC GGC ATC GCC ATC ACC AGC ATG GAC GAC TTC AAC Lys Lys Gly Gln Asn Gly Ile Ala Ile Thr Ser Met Asp Asp Phe Asn 1345 1350 1355	2735
AGC CAC CCC ATC ACC CTG AAC AAG AAG CAG GTG GAC AAC CTG CTG AAC Ser His Pro Ile Thr Leu Asn Lys Lys Gln Val Asp Asn Leu Leu Asn 1360 1365 1370 1375	2783
AAC AAG CCC ATG ATG CTG GAG ACC AAC CAG ACC GAC GGC GTC TAC AAG Asn Lys Pro Met Met Leu Glu Thr Asn Gln Thr Asp Gly Val Tyr Lys 1380 1385 1390	2831
ATC AAG GAC ACC CAC GGC AAC ATC GTG ACG GGC GGC GAG TGG AAC GGC Ile Lys Asp Thr His Gly Asn Ile Val Thr Gly Gly Glu Trp Asn Gly 1395 1400 1405	2879
GTG ATC CAG CAG ATC AAG GCC AAG ACC GCC AGC ATC ATC GTC GAC GAC Val Ile Gln Gln Ile Lys Ala Lys Thr Ala Ser Ile Ile Val Asp Asp 1410 1415 1420	2927
GGC GAG CGC GTG GCC GAG AAG CGC GTG GCC GCC AAG GAC TAC GAG AAC Gly Glu Arg Val Ala Glu Lys Arg Val Ala Ala Lys Asp Tyr Glu Asn 1425 1430 1435	2975
CCC GAG GAC AAG ACC CCC AGC CTG ACC CTG AAG GAC GCC CTG AAG CTG Pro Glu Asp Lys Thr Pro Ser Leu Thr Leu Lys Asp Ala Leu Lys Leu 1440 1445 1450 1455	3023
AGC TAC CCC GAC GAG ATC AAG GAG ATC GAG GGC TTG CTG TAC TAC AAG Ser Tyr Pro Asp Glu Ile Lys Glu Ile Glu Gly Leu Leu Tyr Tyr Lys 1460 1465 1470	3071
AAC AAG CCC ATC TAC GAG AGC AGC GTG ATG ACC TAT CTA GAC GAG AAC Asn Lys Pro Ile Tyr Glu Ser Ser Val Met Thr Tyr Leu Asp Glu Asn 1475 1480 1485	3119
ACC GCC AAG GAG GTG ACC AAG CAG CTG AAC GAC ACC ACC GGC AAG TTC Thr Ala Lys Glu Val Thr Lys Gln Leu Asn Asp Thr Thr Gly Lys Phe 1490 1495 1500	3167
AAG GAC GTG AGC CAC CTG TAC GAC GTG AAG CTG ACC CCC AAG ATG AAC Lys Asp Val Ser His Leu Tyr Asp Val Lys Leu Thr Pro Lys Met Asn 1505 1510 1515	3215
GTG ACC ATC AAG CTG AGC ATC CTG TAC GAC AAC GCC GAG AGC AAC GAC Val Thr Ile Lys Leu Ser Ile Leu Tyr Asp Asn Ala Glu Ser Asn Asp 1520 1525 1530 1535	3263
AAC AGC ATC GGC AAG TGG ACC AAC ACC AAC ATC GTG AGC GGC GGC AAC Asn Ser Ile Gly Lys Trp Thr Asn Thr Asn Ile Val Ser Gly Gly Asn 1540 1545 1550	3311

AAC GGC AAG AAG CAG TAC AGC AGC AAC AAC CCC GAC GCC AAC CTG ACC Asn Gly Lys Lys Gln Tyr Ser Ser Asn Asn Pro Asp Ala Asn Leu Thr 1555 1560 1565	3359
CTG AAC ACC GAC GCC CAG GAG AAG CTG AAC AAG AAC CGC GAC TAC TAC Leu Asn Thr Asp Ala Gln Glu Lys Leu Asn Lys Asn Arg Asp Tyr Tyr 1570 1575 1580	3407
ATC AGC CTG TAC ATG AAG AGC GAG AAG AAC ACC CAG TGC GAG ATC ACC Ile Ser Leu Tyr Met Lys Ser Glu Lys Asn Thr Gln Cys Glu Ile Thr 1585 1590 1595	3455
ATC GAC GGC GAG ATA TAC CCC ATC ACC ACC AAG ACC GTG AAC GTG AAC Ile Asp Gly Glu Ile Tyr Pro Ile Thr Thr Lys Thr Val Asn Val Asn 1600 1605 1610 1615	3503
AAG GAC AAC TAC AAG CGC CTG GAC ATC ATC GCC CAC AAC ATC AAG AGC Lys Asp Asn Tyr Lys Arg Leu Asp Ile Ile Ala His Asn Ile Lys Ser 1620 1625 1630	3551
AAC CCC ATC AGC AGC CTG CAC ATC AAG ACC AAC GAC GAG ATC ACC CTG Asn Pro Ile Ser Ser Leu His Ile Lys Thr Asn Asp Glu Ile Thr Leu 1635 1640 1645	3599
TTC TGG GAC GAC ATA TCG ATT ACC GAC GTC GCC AGC ATC AAG CCC GAG Phe Trp Asp Asp Ile Ser Ile Thr Asp Val Ala Ser Ile Lys Pro Glu 1650 1655 1660	3647
AAC CTG ACC GAC AGC GAG ATC AAG CAG ATA TAC AGT CGC TAC GGC ATC Asn Leu Thr Asp Ser Glu Ile Lys Gln Ile Tyr Ser Arg Tyr Gly Ile 1665 1670 1675	3695
AAG CTG GAG GAC GGC ATC CTG ATC GAC AAG AAA GGC GGC ATC CAC TAC Lys Leu Glu Asp Gly Ile Leu Ile Asp Lys Lys Gly Gly Ile His Tyr 1680 1685 1690 1695	3743
GGC GAG TTC ATC AAC GAG GCC AGC TTC AAC ATC GAG CCC CTG CAG AAC Gly Glu Phe Ile Asn Glu Ala Ser Phe Asn Ile Glu Pro Leu Gln Asn 1700 1705 1710	3791
TAC GTG ACC AAG TAC GAG GTG ACC TAC AGC AGC GAG CTG GGC CCC AAC Tyr Val Thr Lys Tyr Glu Val Thr Tyr Ser Ser Glu Leu Gly Pro Asn 1715 1720 1725	3839
GTG AGC GAC ACC CTG GAG AGC GAC AAG ATT TAC AAG GAC GGC ACC ATC Val Ser Asp Thr Leu Glu Ser Asp Lys Ile Tyr Lys Asp Gly Thr Ile 1730 1735 1740	3887
AAG TTC GAC TTC ACC AAG TAC AGC AAG AAC GAG CAG GGC CTG TTC TAC Lys Phe Asp Phe Thr Lys Tyr Ser Lys Asn Glu Gln Gly Leu Phe Tyr 1745 1750 1755	3935
GAC AGC GGC CTG AAC TGG GAC TTC AAG ATC AAC GCC ATC ACC TAC GAC Asp Ser Gly Leu Asn Trp Asp Phe Lys Ile Asn Ala Ile Thr Tyr Asp 1760 1765 1770 1775	3983

GGC AAG GAG ATG AAC GTG TTC CAC CGC TAC AAC AAG TAGATCTGAG 4029
Gly Lys Glu Met Asn Val Phe His Arg Tyr Asn Lys
1780 1785

CT 4031

Informace o sekvenci SEQ ID č. 50:

- (i) charakteristiky sekvence:
 - (A) délka: 1338 aminokyselin
 - (B) typ: aminokyselinová
 - (D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: protein

(xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 50:

Met	Lys	Arg	Met	Glu	Gly	Lys	Leu	Phe	Met	Val	Ser	Lys	Lys	Leu	Gln
1				5					10					15	
Val	Val	Thr	Lys	Thr	Val	Leu	Leu	Ser	Thr	Val	Phe	Ser	Ile	Ser	Leu
			20					25					30		
Leu	Asn	Asn	Glu	Val	Ile	Lys	Ala	Glu	Gln	Leu	Asn	Ile	Asn	Ser	Gln
	35					40					45				
Ser	Lys	Tyr	Thr	Asn	Leu	Gln	Asn	Leu	Lys	Ile	Thr	Asp	Lys	Val	Glu
	50				55						60				
Asp	Phe	Lys	Glu	Asp	Lys	Glu	Lys	Ala	Lys	Glu	Trp	Gly	Lys	Glu	Lys
65				70					75					80	
Glu	Lys	Glu	Trp	Lys	Leu	Thr	Ala	Thr	Glu	Lys	Gly	Lys	Met	Asn	Asn
			85					90						95	
Phe	Leu	Asp	Asn	Lys	Asn	Asp	Ile	Lys	Thr	Asn	Tyr	Lys	Glu	Ile	Thr
		100					105						110		
Phe	Ser	Ile	Ala	Gly	Ser	Phe	Glu	Asp	Glu	Ile	Lys	Asp	Leu	Lys	Glu
		115				120						125			
Ile	Asp	Lys	Met	Phe	Asp	Lys	Thr	Asn	Leu	Ser	Asn	Ser	Ile	Ile	Thr
	130					135					140				
Tyr	Lys	Asn	Val	Glu	Pro	Thr	Thr	Ile	Gly	Phe	Asn	Lys	Ser	Leu	Thr
145				150						155				160	
Glu	Gly	Asn	Thr	Ile	Asn	Ser	Asp	Ala	Met	Ala	Gln	Phe	Lys	Glu	Gln
			165					170						175	

Phe Leu Asp Arg Asp Ile Lys Phe Asp Ser Tyr Leu Asp Thr His Leu
 180 185 190
 Thr Ala Gln Gln Val Ser Ser Lys Glu Arg Val Ile Leu Lys Val Thr
 195 200 205
 Val Pro Ser Gly Lys Gly Ser Thr Thr Pro Thr Lys Ala Gly Val Ile
 210 215 220
 Leu Asn Asn Ser Glu Tyr Lys Met Leu Ile Asp Asn Gly Tyr Met Val
 225 230 235 240
 His Val Asp Lys Val Ser Lys Val Val Lys Lys Gly Val Glu Cys Leu
 245 250 255
 Gln Ile Glu Gly Thr Leu Lys Lys Ser Leu Asp Phe Lys Asn Asp Ile
 260 265 270
 Asn Ala Glu Ala His Ser Trp Gly Met Lys Asn Tyr Glu Glu Trp Ala
 275 280 285
 Lys Asp Leu Thr Asp Ser Gln Arg Glu Ala Leu Asp Gly Tyr Ala Arg
 290 295 300
 Gln Asp Tyr Lys Glu Ile Asn Asn Tyr Leu Arg Asn Gln Gly Gly Ser
 305 310 315 320
 Gly Asn Glu Lys Leu Asp Ala Gln Ile Lys Asn Ile Ser Asp Ala Leu
 325 330 335
 Gly Lys Lys Pro Ile Pro Glu Asn Ile Thr Val Tyr Arg Trp Cys Gly
 340 345 350
 Met Pro Glu Phe Gly Tyr Gln Ile Ser Asp Pro Leu Pro Ser Leu Lys
 355 360 365
 Asp Phe Glu Glu Gln Phe Leu Asn Thr Ile Lys Glu Asp Lys Gly Tyr
 370 375 380
 Met Ser Thr Ser Leu Ser Ser Glu Arg Leu Ala Ala Phe Gly Ser Arg
 385 390 395 400
 Lys Ile Ile Leu Arg Leu Gln Val Pro Lys Gly Ser Thr Gly Ala Tyr
 405 410 415
 Leu Ser Ala Ile Gly Gly Phe Ala Ser Glu Lys Glu Ile Leu Leu Asp
 420 425 430
 Lys Asp Ser Lys Tyr His Ile Asp Lys Val Thr Glu Val Ile Ile Lys
 435 440 445
 Gly Val Lys Arg Tyr Val Val Asp Ala Thr Leu Leu Thr Asn Ser Arg
 450 455 460

Gly Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro
465 470 475 480

Ser Asp Ile Gly Ser Thr Met Lys Thr Asn Gln Ile Ser Thr Thr Gln
485 490 495

Lys Asn Gln Gln Lys Glu Met Asp Arg Lys Gly Leu Leu Gly Tyr Tyr
500 505 510

Phe Lys Gly Lys Asp Phe Ser Asn Leu Thr Met Phe Ala Pro Thr Arg
515 520 525

Asp Ser Thr Leu Ile Tyr Asp Gln Gln Thr Ala Asn Lys Leu Leu Asp
530 535 540

Lys Lys Gln Gln Glu Tyr Gln Ser Ile Arg Trp Ile Gly Leu Ile Gln
545 550 555 560

Ser Lys Glu Thr Gly Asp Phe Thr Phe Asn Leu Ser Glu Asp Glu Gln
565 570 575

Ala Ile Ile Glu Ile Asn Gly Lys Ile Ile Ser Asn Lys Gly Lys Glu
580 585 590

Lys Gln Val Val His Leu Glu Lys Gly Lys Leu Val Pro Ile Lys Ile
595 600 605

Glu Tyr Gln Ser Asp Thr Lys Phe Asn Ile Asp Ser Lys Thr Phe Lys
610 615 620

Glu Leu Lys Leu Phe Lys Ile Asp Ser Gln Asn Gln Pro Gln Gln Val
625 630 635 640

Gln Gln Asp Glu Leu Arg Asn Pro Glu Phe Asn Lys Lys Glu Ser Gln
645 650 655

Glu Phe Leu Ala Lys Pro Ser Lys Ile Asn Leu Phe Thr Gln Gln Met
660 665 670

Lys Arg Glu Ile Asp Glu Asp Thr Asp Thr Asp Gly Asp Ser Ile Pro
675 680 685

Asp Leu Trp Glu Glu Asn Gly Tyr Thr Ile Gln Asn Arg Ile Ala Val
690 695 700

Lys Trp Asp Asp Ser Leu Ala Ser Lys Gly Tyr Thr Lys Phe Val Ser
705 710 715 720

Asn Pro Leu Glu Ser His Thr Val Gly Asp Pro Tyr Thr Asp Tyr Glu
725 730 735

Lys Ala Ala Arg Asp Leu Asp Leu Ser Asn Ala Lys Glu Thr Phe Asn
740 745 750

Pro Leu Val Ala Ala Phe Pro Ser Val Asn Val Ser Met Glu Lys Val
755 760 765

Ile Leu Ser Pro Asn Glu Asn Leu Ser Asn Ser Val Glu Ser His Ser
770 775 780

Ser Thr Asn Trp Ser Tyr Thr Asn Thr Glu Gly Ala Ser Val Glu Ala
785 790 795 800

Gly Ile Gly Pro Lys Gly Ile Ser Phe Gly Val Ser Val Asn Tyr Gln
805 810 815

His Ser Glu Thr Val Ala Gln Glu Trp Gly Thr Ser Thr Gly Asn Thr
820 825 830

Ser Gln Phe Asn Thr Ala Ser Ala Gly Tyr Leu Asn Ala Asn Val Arg
835 840 845

Tyr Asn Asn Val Gly Thr Gly Ala Ile Tyr Asp Val Lys Pro Thr Thr
850 855 860

Ser Phe Val Leu Asn Asn Asp Thr Ile Ala Thr Ile Thr Ala Lys Ser
865 870 875 880

Asn Ser Thr Ala Leu Asn Ile Ser Pro Gly Glu Ser Tyr Pro Lys Lys
885 890 895

Gly Gln Asn Gly Ile Ala Ile Thr Ser Met Asp Asp Phe Asn Ser His
900 905 910

Pro Ile Thr Leu Asn Lys Lys Gln Val Asp Asn Leu Leu Asn Asn Lys
915 920 925

Pro Met Met Leu Glu Thr Asn Gln Thr Asp Gly Val Tyr Lys Ile Lys
930 935 940

Asp Thr His Gly Asn Ile Val Thr Gly Gly Glu Trp Asn Gly Val Ile
945 950 955 960

Gln Gln Ile Lys Ala Lys Thr Ala Ser Ile Ile Val Asp Asp Gly Glu
965 970 975

Arg Val Ala Glu Lys Arg Val Ala Ala Lys Asp Tyr Glu Asn Pro Glu
980 985 990

Asp Lys Thr Pro Ser Leu Thr Leu Lys Asp Ala Leu Lys Leu Ser Tyr
995 1000 1005

Pro Asp Glu Ile Lys Glu Ile Glu Gly Leu Leu Tyr Tyr Lys Asn Lys
1010 1015 1020

Pro Ile Tyr Glu Ser Ser Val Met Thr Tyr Leu Asp Glu Asn Thr Ala
1025 1030 1035 1040

Lys Glu Val Thr Lys Gln Leu Asn Asp Thr Thr Gly Lys Phe Lys Asp
1045 1050 1055

Val Ser His Leu Tyr Asp Val Lys Leu Thr Pro Lys Met Asn Val Thr
1060 1065 1070

Ile Lys Leu Ser Ile Leu Tyr Asp Asn Ala Glu Ser Asn Asp Asn Ser
1075 1080 1085

Ile Gly Lys Trp Thr Asn Thr Asn Ile Val Ser Gly Gly Asn Asn Gly
1090 1095 1100

Lys Lys Gln Tyr Ser Ser Asn Asn Pro Asp Ala Asn Leu Thr Leu Asn
1105 1110 1115 1120

Thr Asp Ala Gln Glu Lys Leu Asn Lys Asn Arg Asp Tyr Tyr Ile Ser
1125 1130 1135

Leu Tyr Met Lys Ser Glu Lys Asn Thr Gln Cys Glu Ile Thr Ile Asp
1140 1145 1150

Gly Glu Ile Tyr Pro Ile Thr Thr Lys Thr Val Asn Val Asn Lys Asp
1155 1160 1165

Asn Tyr Lys Arg Leu Asp Ile Ile Ala His Asn Ile Lys Ser Asn Pro
1170 1175 1180

Ile Ser Ser Leu His Ile Lys Thr Asn Asp Glu Ile Thr Leu Phe Trp
1185 1190 1195 1200

Asp Asp Ile Ser Ile Thr Asp Val Ala Ser Ile Lys Pro Glu Asn Leu
1205 1210 1215

Thr Asp Ser Glu Ile Lys Gln Ile Tyr Ser Arg Tyr Gly Ile Lys Leu
1220 1225 1230

Glu Asp Gly Ile Leu Ile Asp Lys Lys Gly Gly Ile His Tyr Gly Glu
1235 1240 1245

Phe Ile Asn Glu Ala Ser Phe Asn Ile Glu Pro Leu Gln Asn Tyr Val
1250 1255 1260

Thr Lys Tyr Glu Val Thr Tyr Ser Ser Glu Leu Gly Pro Asn Val Ser
1265 1270 1275 1280

Asp Thr Leu Glu Ser Asp Lys Ile Tyr Lys Asp Gly Thr Ile Lys Phe
1285 1290 1295

Asp Phe Thr Lys Tyr Ser Lys Asn Glu Gln Gly Leu Phe Tyr Asp Ser
1300 1305 1310

Gly Leu Asn Trp Asp Phe Lys Ile Asn Ala Ile Thr Tyr Asp Gly Lys
1315 1320 1325

Glu Met Asn Val Phe His Arg Tyr Asn Lys
1330 1335

Informace o sekvenci SEQ ID č. 51:

- (i) charakteristiky sekvence:
 - (A) délka: 2444 párů bází
 - (B) typ: nukleová kyselina
 - (C) počet řetězců: jednořetězcová
 - (D) topologie: lineární
- (ii) typ molekuly: DNA (genomová)
- (iii) hypotetická: není
- (ix) vlastnosti:
 - (A) jméno/klíč: CDS
 - (B) lokace: 17..2444
 - (D) další informace: produkt = "fúze 3A(a)
syntetický:nativní"
- (xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 51:

GGATCCACCA ATGAAC ATG AAC AAG AAC AAC ACC AAG CTG AGC ACC CGC	49
Met Asn Lys Asn Asn Thr Lys Leu Ser Thr Arg	
1 5 10	
GCC CTG CCG AGC TTC ATC GAC TAC TTC AAC GGC ATC TAC GGC TTC GCC	97
Ala Leu Pro Ser Phe Ile Asp Tyr Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala	
15 20 25	
ACC GGC ATC AAG GAC ATC ATG AAC ATG ATC TTC AAG ACC GAC ACC GGC	145
Thr Gly Ile Lys Asp Ile Met Asn Met Ile Phe Lys Thr Asp Thr Gly	
30 35 40	
GGC GAC CTG ACC CTG GAC GAG ATC CTG AAG AAC CAG CAG CTG CTG AAC	193
Gly Asp Leu Thr Leu Asp Glu Ile Leu Lys Asn Gln Gln Leu Leu Asn	
45 50 55	
GAC ATC AGC GGC AAG CTG GAC GGC GTG AAC GGC AGC CTG AAC GAC CTG	241
Asp Ile Ser Gly Lys Leu Asp Gly Val Asn Gly Ser Leu Asn Asp Leu	
60 65 70 75	
ATC GCC CAG GGC AAC CTG AAC ACC GAG CTG AGC AAG GAG ATC CTT AAG	289
Ile Ala Gln Gly Asn Leu Asn Thr Glu Leu Ser Lys Glu Ile Leu Lys	
80 85 90	
ATC GCC AAC GAG CAG AAC CAG GTG CTG AAC GAC GTG AAC AAC AAG CTG	337
Ile Ala Asn Glu Gln Asn Gln Val Leu Asn Asp Val Asn Asn Lys Leu	
95 100 105	
GAC GCC ATC AAC ACC ATG CTG CGC GTG TAC CTG CCG AAG ATC ACC AGC	385
Asp Ala Ile Asn Thr Met Leu Arg Val Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Ser	
110 115 120	

ATG CTG AGC GAC GTG ATG AAG CAG AAC TAC GCC CTG AGC CTG CAG ATC Met Leu Ser Asp Val Met Lys Gln Asn Tyr Ala Leu Ser Leu Gln Ile 125 130 135	433
GAG TAC CTG AGC AAG CAG CTG CAG GAG ATC AGC GAC AAG CTG GAC ATC Glu Tyr Leu Ser Lys Gln Leu Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Ile 140 145 150 155	481
ATC AAC GTG AAC GTC CTG ATC AAC AGC ACC CTG ACC GAG ATC ACC CCG Ile Asn Val Asn Val Leu Ile Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro 160 165 170	529
GCC TAC CAG CGC ATC AAG TAC GTG AAC GAG AAG TTC GAA GAG CTG ACC Ala Tyr Gln Arg Ile Lys Tyr Val Asn Glu Lys Phe Glu Glu Leu Thr 175 180 185	577
TTC GCC ACC GAG ACC AGC AGC AAG GTG AAG AAG GAC GGC AGC CCG GCC Phe Ala Thr Glu Thr Ser Ser Lys Val Lys Lys Asp Gly Ser Pro Ala 190 195 200	625
GAC ATC CTG GAC GAG CTG ACC GAG CTG ACC GAG CTG GCC AAG AGC GTG Asp Ile Leu Asp Glu Leu Thr Glu Leu Thr Glu Leu Ala Lys Ser Val 205 210 215	673
ACC AAG AAC GAC GTG GAC GGC TTC GAG TTC TAC CTG AAC ACC TTC CAC Thr Lys Asn Asp Val Asp Gly Phe Glu Phe Tyr Leu Asn Thr Phe His 220 225 230 235	721
GAC GTG ATG GTG GGC AAC AAC CTG TTC GGC CGC AGC GCC CTG AAG ACC Asp Val Met Val Gly Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr 240 245 250	769
GCC AGC GAG CTG ATC ACC AAG GAG AAC GTG AAG ACC AGC GGC AGC GAG Ala Ser Glu Leu Ile Thr Lys Glu Asn Val Lys Thr Ser Gly Ser Glu 255 260 265	817
GTG GGC AAC GTG TAC AAC TTC CTG ATC GTG CTG ACC GCC CTG CAG GCC Val Gly Asn Val Tyr Asn Phe Leu Ile Val Leu Thr Ala Leu Gln Ala 270 275 280	865
CAG GCC TTC CTG ACC CTG ACC ACC TGT CGC AAG CTG CTG GGC CTG GCC Gln Ala Phe Leu Thr Leu Thr Thr Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ala 285 290 295	913
GAC ATC GAC TAC ACC AGC ATC ATG AAC GAG CAC TTG AAC AAG GAG AAG Asp Ile Asp Tyr Thr Ser Ile Met Asn Glu His Leu Asn Lys Glu Lys 300 305 310 315	961
GAG GAG TTC CGC GTG AAC ATC CTG CCG ACC CTG AGC AAC ACC TTC AGC Glu Glu Phe Arg Val Asn Ile Leu Pro Thr Leu Ser Asn Thr Phe Ser 320 325 330	1009
AAC CCG AAC TAC GCC AAG GTG AAG GGC AGC GAC GAG GAC GCC AAG ATG Asn Pro Asn Tyr Ala Lys Val Lys Gly Ser Asp Glu Asp Ala Lys Met 335 340 345	1057

ATC GTG GAG GCT AAG CCG GGC CAC GCG TTG ATC GGC TTC GAG ATC AGC Ile Val Glu Ala Lys Pro Gly His Ala Leu Ile Gly Phe Glu Ile Ser 350 355 360	1105
AAC GAC AGC ATC ACC GTG CTG AAG GTG TAC GAG GCC AAG CTG AAG CAG Asn Asp Ser Ile Thr Val Leu Lys Val Tyr Glu Ala Lys Leu Lys Gln 365 370 375	1153
AAC TAC CAG GTG GAC AAG GAC AGC TTG AGC GAG GTG ATC TAC GGC GAC Asn Tyr Gln Val Asp Lys Asp Ser Leu Ser Glu Val Ile Tyr Gly Asp 380 385 390 395	1201
ATG GAC AAG CTG CTG TGT CCG GAC CAG AGC GAG CAA ATC TAC TAC ACC Met Asp Lys Leu Leu Cys Pro Asp Gln Ser Glu Gln Ile Tyr Tyr Thr 400 405 410	1249
AAC AAC ATC GTG TTC CCG AAC GAG TAC GTG ATC ACC AAG ATC GAC TTC Asn Asn Ile Val Phe Pro Asn Glu Tyr Val Ile Thr Lys Ile Asp Phe 415 420 425	1297
ACC AAG AAG ATG AAG ACC CTG CGC TAC GAG GTG ACC GCC AAC TTC TAC Thr Lys Lys Met Lys Thr Leu Arg Tyr Glu Val Thr Ala Asn Phe Tyr 430 435 440	1345
GAC AGC AGC ACC GGC GAG ATC GAC CTG AAC AAG AAG AAG GTG GAG AGC Asp Ser Ser Thr Gly Glu Ile Asp Leu Asn Lys Lys Lys Val Glu Ser 445 450 455	1393
AGC GAG GCC GAG TAC CGC ACC CTG AGC GCG AAC GAC GAC GGC GTC TAC Ser Glu Ala Glu Tyr Arg Thr Leu Ser Ala Asn Asp Asp Gly Val Tyr 460 465 470 475	1441
ATG CCA CTG GGC GTG ATC AGC GAG ACC TTC CTG ACC CCG ATC AAC GGC Met Pro Leu Gly Val Ile Ser Glu Thr Phe Leu Thr Pro Ile Asn Gly 480 485 490	1489
TTT GGC CTG CAG GCC GAC GAG AAC AGC CGC CTG ATC ACC CTG ACC TGT Phe Gly Leu Gln Ala Asp Glu Asn Ser Arg Leu Ile Thr Leu Thr Cys 495 500 505	1537
AAG AGC TAC CTG CGC GAG CTG CTG CTA GCC ACC GAC CTG AGC AAC AAG Lys Ser Tyr Leu Arg Glu Leu Leu Leu Ala Thr Asp Leu Ser Asn Lys 510 515 520	1585
GAG ACC AAG CTG ATC GTG CCA CCG AGC GGC TTC ATC AGC AAC ATC GTG Glu Thr Lys Leu Ile Val Pro Pro Ser Gly Phe Ile Ser Asn Ile Val 525 530 535	1633
GAG AAC GGC AGC ATC GAG GAG GAC AAC CTG GAG CCG TGG AAG GCC AAC Glu Asn Gly Ser Ile Glu Glu Asp Asn Leu Glu Pro Trp Lys Ala Asn 540 545 550 555	1681
AAC AAG AAC GCC TAC GTG GAC CAC ACC GGC GGC GTG AAC GGC ACC AAG Asn Lys Asn Ala Tyr Val Asp His Thr Gly Gly Val Asn Gly Thr Lys 560 565 570	1729
GCC CTG TAC GTG CAC AAG GAC GGC GGC ATC AGC CAG TTC ATC GGC GAC Ala Leu Tyr Val His Lys Asp Gly Gly Ile Ser Gln Phe Ile Gly Asp 575 580 585	1777

AAG CTG AAG CCG AAG ACC GAG TAC GTG ATC CAG TAC ACC GTG AAG GGC Lys Leu Lys Pro Lys Thr Glu Tyr Val Ile Gln Tyr Thr Val Lys Gly 590 595 600	1825
AAG CCA TCG ATT CAC CTG AAG GAC GAG AAC ACC GGC TAC ATC CAC TAC Lys Pro Ser Ile His Leu Lys Asp Glu Asn Thr Gly Tyr Ile His Tyr 605 610 615	1873
GAG GAC ACC AAC AAC AAC CTG GAG GAC TAC CAG ACC ATC AAC AAG CGC Glu Asp Thr Asn Asn Asn Leu Glu Asp Tyr Gln Thr Ile Asn Lys Arg 620 625 630 635	1921
TTC ACC ACC GGC ACC GAC CTG AAG GGC GTG TAC CTG ATC CTG AAG AGC Phe Thr Thr Gly Thr Asp Leu Lys Gly Val Tyr Leu Ile Leu Lys Ser 640 645 650	1969
CAG AAC GGC GAC GAG GCC TGG GGC GAC AAC TTC ATC ATC CTG GAG ATC Gln Asn Gly Asp Glu Ala Trp Gly Asp Asn Phe Ile Ile Leu Glu Ile 655 660 665	2017
AGC CCG AGC GAG AAG CTG CTG AGC CCG GAG CTG ATC AAC ACC AAC AAC Ser Pro Ser Glu Lys Leu Leu Ser Pro Glu Leu Ile Asn Thr Asn Asn 670 675 680	2065
TGG ACC AGC ACC GGC AGC ACC AAC ATC AGC GGC AAC ACC CTG ACC CTG Trp Thr Ser Thr Gly Ser Thr Asn Ile Ser Gly Asn Thr Leu Thr Leu 685 690 695	2113
TAC CAG GGC GGC CGG GGG ATT CTA AAA CAA AAC CTT CAA TTA GAT AGT Tyr Gln Gly Gly Arg Gly Ile Leu Lys Gln Asn Leu Gln Leu Asp Ser 700 705 710 715	2161
TTT TCA ACT TAT AGA GTG TAT TTT TCT GTG TCC GGA GAT GCT AAT GTA Phe Ser Thr Tyr Arg Val Tyr Phe Ser Val Ser Gly Asp Ala Asn Val 720 725 730	2209
AGG ATT AGA AAT TCT AGG GAA GTG TTA TTT GAA AAA AGA TAT ATG AGC Arg Ile Arg Asn Ser Arg Glu Val Leu Phe Glu Lys Arg Tyr Met Ser 735 740 745	2257
GGT GCT AAA GAT GTT TCT GAA ATG TTC ACT ACA AAA TTT GAG AAA GAT Gly Ala Lys Asp Val Ser Glu Met Phe Thr Thr Lys Phe Glu Lys Asp 750 755 760	2305
AAC TTT TAT ATA GAG CTT TCT CAA GGG AAT AAT TTA TAT GGT GGT CCT Asn Phe Tyr Ile Glu Leu Ser Gln Gly Asn Asn Leu Tyr Gly Gly Pro 765 770 775	2353
ATT GTA CAT TTT TAC GAT GTC TCT ATT AAG NAA GAT CGG GAT CTA ATA Ile Val His Phe Tyr Asp Val Ser Ile Lys Xaa Asp Arg Asp Leu Ile 780 785 790 795	2401
TTA ACA GTT TTT AAA AGC NAA TTC TTG TAT AAT GTC CTT GAT T Leu Thr Val Phe Lys Ser Xaa Phe Leu Tyr Asn Val Leu Asp 800 805	2444

Informace o sekvenci SEQ ID č. 52:

- (i) charakteristiky sekvence:
 - (A) délka: 809 aminokyselin
 - (B) typ: aminokyselinová
 - (D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: protein

(xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 52:

```
Met Asn Lys Asn Asn Thr Lys Leu Ser Thr Arg Ala Leu Pro Ser Phe
 1              5              10              15

Ile Asp Tyr Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Lys Asp
      20              25              30

Ile Met Asn Met Ile Phe Lys Thr Asp Thr Gly Gly Asp Leu Thr Leu
      35              40              45

Asp Glu Ile Leu Lys Asn Gln Gln Leu Leu Asn Asp Ile Ser Gly Lys
      50              55              60

Leu Asp Gly Val Asn Gly Ser Leu Asn Asp Leu Ile Ala Gln Gly Asn
      65              70              75              80

Leu Asn Thr Glu Leu Ser Lys Glu Ile Leu Lys Ile Ala Asn Glu Gln
      85              90              95

Asn Gln Val Leu Asn Asp Val Asn Asn Lys Leu Asp Ala Ile Asn Thr
      100              105              110

Met Leu Arg Val Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Ser Met Leu Ser Asp Val
      115              120              125

Met Lys Gln Asn Tyr Ala Leu Ser Leu Gln Ile Glu Tyr Leu Ser Lys
      130              135              140

Gln Leu Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Ile Ile Asn Val Asn Val
      145              150              155              160

Leu Ile Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ala Tyr Gln Arg Ile
      165              170              175

Lys Tyr Val Asn Glu Lys Phe Glu Glu Leu Thr Phe Ala Thr Glu Thr
      180              185              190

Ser Ser Lys Val Lys Lys Asp Gly Ser Pro Ala Asp Ile Leu Asp Glu
      195              200              205

Leu Thr Glu Leu Thr Glu Leu Ala Lys Ser Val Thr Lys Asn Asp Val
      210              215              220
```

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

Val Pro Pro Ser Gly Phe Ile Ser Asn Ile Val Glu Asn Gly Ser Ile
530 535 540

Glu Glu Asp Asn Leu Glu Pro Trp Lys Ala Asn Asn Lys Asn Ala Tyr
545 550 555 560

Val Asp His Thr Gly Gly Val Asn Gly Thr Lys Ala Leu Tyr Val His
565 570 575

Lys Asp Gly Gly Ile Ser Gln Phe Ile Gly Asp Lys Leu Lys Pro Lys
580 585 590

Thr Glu Tyr Val Ile Gln Tyr Thr Val Lys Gly Lys Pro Ser Ile His
595 600 605

Leu Lys Asp Glu Asn Thr Gly Tyr Ile His Tyr Glu Asp Thr Asn Asn
610 615 620

Asn Leu Glu Asp Tyr Gln Thr Ile Asn Lys Arg Phe Thr Thr Gly Thr
625 630 635 640

Asp Leu Lys Gly Val Tyr Leu Ile Leu Lys Ser Gln Asn Gly Asp Glu
645 650 655

Ala Trp Gly Asp Asn Phe Ile Ile Leu Glu Ile Ser Pro Ser Glu Lys
660 665 670

Leu Leu Ser Pro Glu Leu Ile Asn Thr Asn Asn Trp Thr Ser Thr Gly
675 680 685

Ser Thr Asn Ile Ser Gly Asn Thr Leu Thr Leu Tyr Gln Gly Gly Arg
690 695 700

Gly Ile Leu Lys Gln Asn Leu Gln Leu Asp Ser Phe Ser Thr Tyr Arg
705 710 715 720

Val Tyr Phe Ser Val Ser Gly Asp Ala Asn Val Arg Ile Arg Asn Ser
725 730 735

Arg Glu Val Leu Phe Glu Lys Arg Tyr Met Ser Gly Ala Lys Asp Val
740 745 750

Ser Glu Met Phe Thr Thr Lys Phe Glu Lys Asp Asn Phe Tyr Ile Glu
755 760 765

Leu Ser Gln Gly Asn Asn Leu Tyr Gly Gly Pro Ile Val His Phe Tyr
770 775 780

Asp Val Ser Ile Lys Xaa Asp Arg Asp Leu Ile Leu Thr Val Phe Lys
785 790 795 800

Ser Xaa Phe Leu Tyr Asn Val Leu Asp
805

28.08.98

- 257 -

PV 708-97

52263

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Pro hmyz specifický sekretovaný protein, izolovatelný z *Bacillus* spp. během fáze vegetativního růstu, a jeho složky, přičemž uvedeným proteinem není toxin usmrcující komáry z *Bacillus sphaericus* SSII-1.

2. Pro hmyz specifický sekretovaný protein podle nároku 1 a jeho složky, kterýžto protein

- a) je izolovatelný z *Bacillus* spp. během fáze vegetativního růstu, a
- b) vykazuje specifické spektrum insekticidní účinnosti, které zahrnuje účinnost proti druhům rodu *Agrotis* nebo/a *Spodoptera*, výhodně však účinnost proti *Agrotis ipsilon* nebo/a *Spodoptera frugiperda* nebo/a *Spodoptera exigua* nebo/a *Heliothis virescens* nebo/a *Helicoverpa zea*.

3. Pro hmyz specifický sekretovaný protein podle nároku 1 a jeho složky, kterýžto protein obsahuje v N-koncové sekvenci řadu kladně nabitých zbytků následovaných hydrofobní základní oblastí a není v průběhu exportu upravován na N-konci.

4. Pro hmyz specifický protein podle nároku 1, kde uvedený *Bacillus* je vybrán ze skupiny zahrnující kmeny s přírůstkovými čísly NRRL B-21224, NRRL B-21225, NRRL B-21226, NRRL B-21227, NRRL B-21228, NRRL B-21229, NRRL B-21230 a NRRL B-21439.

5. Pro hmyz specifický protein podle libovolného z nároků 1 až 4, který má molekulovou hmotnost přibližně 30 kDa nebo větší, výhodně přibližně 60 až přibližně 100 kDa a ještě výhodněji přibližně 80 kDa.

6. Pro hmyz specifický protein podle libovolného z nároků 1 až 5, který má sekvenci vybranou ze skupiny zahrnující sekvence SEQ ID č. 29, SEQ ID č. 32 a SEQ ID č. 52, včetně jeho homologů.

7. Pro hmyz specifický protein podle nároku 1, který má sekvenci vybranou ze skupiny zahrnující sekvence SEQ ID č. 2, SEQ ID č. 20 a SEQ ID č. 21.

8. Multimerní pesticidní protein, který obsahuje více než jeden polypeptidový řetězec a kde alespoň jedním z těchto polypeptidových řetězců je pro hmyz specifický sekretovaný protein izolovatelný z *Bacillus* spp. během fáze vegetativního růstu a alespoň jedním z těchto polypeptidových řetězců je pomocný protein, který aktivuje nebo zvyšuje pesticidní účinnost uvedeného pro hmyz specifického proteinu.

9. Multimerní pesticidní protein podle nároku 8, který obsahuje pro hmyz specifický protein podle libovolného z nároků 2, 3, 5 nebo 6 a pomocný protein, který aktivuje nebo zvyšuje pesticidní účinnost uvedeného pro hmyz specifického proteinu.

10. Fúzní protein, který obsahuje několik proteinových domén včetně alespoň jednoho sekretovaného pro hmyz specifického proteinu izolovatelného z *Bacillus* spp. během fáze vegetativního růstu nebo/a pomocného proteinu, vytvořený genetickými fúzemi ve stejném čtecím rámci, ze kterých se při translaci na ribozomech vytváří fúzní protein alespoň s kombinovanými vlastnostmi pro hmyz specifického proteinu nebo/a pomocného proteinu a popřípadě dalších složek použitých při fúzi.

11. Fúzní protein podle nároku 10, který obsahuje ribonukleasový S-protein, sekretovaný pro hmyz specifický

protein izolovatelný z *Bacillus* spp. během fáze vegetativního růstu a pomocný protein.

12. Fúzní protein podle nároku 10, který má na svém N-konci buď uvedený pro hmyz specifický protein nebo uvedený pomocný protein.

13. Fúzní protein podle libovolného z nároků 10 až 12, kde pro hmyz specifickým proteinem je protein podle libovolného z nároků 2, 3, 5 nebo 6.

14. Multimerní protein podle libovolného z nároků 8 nebo 9 nebo fúzní protein podle libovolného z nároků 10 až 13, kde uvedený pomocný protein má molekulovou hmotnost přibližně 50 kDa a lze jej získat z *Bacillus cereus*.

15. Multimerní protein podle libovolného z nároků 8 nebo 9 nebo fúzní protein podle libovolného z nároků 10 až 12, kde jak uvedený pomocný protein tak uvedený pro hmyz specifický protein lze získat z kmene AB78.

16. Insekticidní protein podle libovolného z nároků 1 až 7, multimerní protein podle libovolného z nároků 8 až 9 a 14 až 15 nebo fúzní protein podle libovolného z nároků 10 až 15, ve kterém byly sekvence představující sekreční signál

- a) odstraněny nebo inaktivovány,
- b) nahrazeny sekrečním signálem heterologního původu,
- c) nahrazeny sekvencí způsobující cílení, která směřuje transgenický produkt do konkrétní organely nebo kompartmentu buňky.

17. Fúzní protein podle nároku 15, který má sekvenci vybranou ze skupiny zahrnující sekvence SEQ ID č. 23 a SEQ ID č. 50, včetně jeho homologů.

18. Insekticidní sekretovaný protein izolovatelný z *Bacillus* spp. během fáze vegetativního růstu, ve kterém byly sekvence představující sekreční signál

- a) odstraněny nebo inaktivovány,
- b) nahrazeny sekrečním signálem heterologního původu,
- c) nahrazeny sekvencí způsobující cílení, která směřuje transgenický produkt do konkrétní organely nebo kompartmentu buňky.

19. Insekticidní protein podle nároku 18, který má sekvenci vybranou ze skupiny zahrnující sekvence SEQ ID č. 36, SEQ ID č. 40, SEQ ID č. 43 a SEQ ID č. 46.

20. Molekula DNA, která obsahuje nukleotidovou sekvenci kódující protein podle libovolného z nároků 1 až 19.

21. Molekula DNA podle nároku 20, která obsahuje nukleotidovou sekvenci uvedenou v SEQ ID č. 28, SEQ ID č. 30, SEQ ID č. 31 nebo SEQ ID č. 51, včetně jejích homologů.

22. Molekula DNA podle nároku 20, která obsahuje nukleotidovou sekvenci uvedenou v SEQ ID č. 1, SEQ ID č. 19, SEQ ID č. 24, SEQ ID č. 26 nebo SEQ ID č. 27, včetně jejích homologů.

23. Molekula DNA podle nároku 20, která obsahuje nukleotidovou sekvenci uvedenou v SEQ ID č. 22 nebo SEQ ID č. 49, včetně jejích homologů.

24. Molekula DNA podle nároku 20, která obsahuje nukleotidovou sekvenci uvedenou v SEQ ID č. 35, SEQ ID č. 39, SEQ ID č. 42 nebo SEQ ID č. 45, včetně jejích homologů.

25. Molekula DNA podle libovolného z nároků 20 až 24, která obsahuje nukleotidovou sekvenci, která byla zcela nebo

zčásti optimalizována pro expresi v mikroorganismu nebo rostlině.

26. Molekula DNA podle nároku 25, která obsahuje nukleotidovou sekvenci uvedenou v SEQ ID č. 24, SEQ ID č. 26, SEQ ID č. 27, SEQ ID č. 35, SEQ ID č. 39, SEQ ID č. 42 nebo SEQ ID č. 45, včetně jejích homologů.

27. Molekula DNA podle nároku 25, která obsahuje nukleotidovou sekvenci uvedenou v SEQ ID č. 30 nebo SEQ ID č. 51, včetně jejích homologů.

28. Molekula DNA, která hybridizuje s molekulou DNA podle libovolného z nároků 20 až 27 za mírně přísných podmínek, a která vykazuje pro hmyz specifickou účinnost.

29. Pro hmyz specifický protein, který je kódován molekulou DNA podle nároku 28.

30. Expresivní kazeta, která obsahuje molekulu DNA podle libovolného z nároků 20 až 28, operabilně spojenou s rostlinnými expresivními sekvencemi včetně regulačních signálů pro transkripci a translaci, nutných pro expresi asociovaných DNA-konstruků v hostitelském organismu, a popřípadě dalšími regulačními sekvencemi.

31. Expresivní kazeta, která obsahuje molekulu DNA podle libovolného z nároků 20, 21, 25, 27 a 28, operabilně spojenou s rostlinnými expresivními sekvencemi včetně regulačních signálů pro transkripci a translaci, nutných pro expresi asociovaných DNA-konstruků v hostitelském organismu, a popřípadě dalšími regulačními sekvencemi.

32. Expresivní kazeta podle nároků 30 a 31, kde je uvedeným hostitelským organismem rostlina.

33. Vektorová molekula obsahující expresivní kazetu podle nároků 30 až 32.

34. Expresivní kazeta podle nároků 30 až 32 nebo vektorová molekula podle nároku 33, která tvoří součást genomu rostliny.

35. Hostitelský organismus, který obsahuje molekulu DNA podle libovolného z nároků 20 až 28, expresivní kazetu obsahující uvedenou molekulu DNA nebo vektorovou molekulu obsahující uvedenou expresivní kazetu, výhodně stabilně začleněnou do genomu tohoto hostitelského organismu.

36. Hostitelský organismus, který obsahuje molekulu DNA podle libovolného z nároků 20, 21, 25, 27 a 28, expresivní kazetu obsahující uvedenou molekulu DNA nebo vektorovou molekulu obsahující uvedenou expresivní kazetu, výhodně stabilně začleněnou do genomu tohoto hostitelského organismu.

37. Hostitelský organismus podle nároku 36, který je vybrán ze skupiny zahrnující buňky rostlin a hmyzu, bakterie, kvasinky, baculoviry, prvoky, hlísty a řasy.

38. Transgenická rostlina, včetně jejích částí jakož i potomstva a semen, která obsahuje stabilně začleněnou do jejího genomu molekulu DNA podle libovolného z nároků 20 až 28, expresivní kazetu obsahující uvedenou molekulu DNA nebo vektorovou molekulu obsahující uvedenou expresivní kazetu, výhodně stabilně začleněnou do genomu této rostliny.

39. Transgenická rostlina, včetně jejích částí jakož i potomstva a semen, která obsahuje stabilně začleněnou do jejího genomu molekulu DNA podle libovolného z nároků 20, 21, 25, 27 a 28, expresivní kazetu obsahující uvedenou molekulu DNA nebo vektorovou molekulu obsahující uvedenou expresivní

kazetu, výhodně stabilně začleněnou do genomu této rostliny.

40. Transgenická rostlina, včetně jejích částí jakož i potomstva a semen, která exprimuje pro hmyz specifický protein podle libovolného z nároků 1 až 19 a 29.

41. Transgenická rostlina, včetně jejích částí jakož i potomstva a semen, která exprimuje pro hmyz specifický protein podle libovolného z nároků 2, 3, 5, 6, 9 a 13.

42. Transgenická rostlina podle nároku 40 nebo 41, která dále exprimuje druhou odlišnou látku kontrolující hmyz, výhodně δ -endotoxin z *Bacillus thuringiensis*.

43. Rostlinný propagační materiál rostliny podle libovolného z nároků 37 až 42, který je ošetřen obalem chránícím semena.

44. Transgenická rostlina podle libovolného z nároků 37 až 42, kterou je dvouděložná nebo jednoděložná rostlina.

45. Transgenická rostlina podle nároku 44, kterou je rostlina vybraná ze skupiny zahrnující rostliny rodů *Lolium*, *Zea*, *Triticum*, *Triticale*, *Sorghum*, *Saccharum*, *Bromus*, *Oryzae*, *Avena*, *Hordeum*, *Secale* a *Setaria*.

46. Hostitelský organismus podle nároků 35 až 37, kterým je mikroorganismus, který se množí na rostlinách, jako je bakterie kolonizující kořeny.

47. Kmen rodu *Bacillus*, který produkuje během vegetativního růstu pesticidní protein, kterým je *Bacillus* vybraný ze skupiny zahrnující kmeny s přírůstkovými čísly NRRL B-21224, NRRL B-21225, NRRL B-21226, NRRL B-21227, NRRL B-21228, NRRL B-21229, NRRL B-21230 a NRRL B-21439.

48. Insekticidní prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje kmen rodu Bacillus podle nároku 47 nebo hostitelský organismus podle libovolného z nároků 35 až 37 a 46, v insekticidně účinném množství, spolu s vhodným nosičem.

49. Insekticidní prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje izolovanou molekulu proteinu podle libovolného z nároků 1 až 19 a 29, samotnou nebo v kombinaci s kmenem rodu Bacillus podle nároku 47 nebo hostitelským organismem podle libovolného z nároků 35 až 37 a 46, v insekticidně účinném množství, spolu s vhodným nosičem.

50. Způsob identifikace účinnosti pro hmyz specifického proteinu podle libovolného z nároků 1 až 19 a 29 na hmyz, v y z n a č u j í c í s e t í m , že zahrnuje

- (a) pěstování kmene rodu Bacillus v kultuře,
- (b) získání supernatantu z uvedené kultury,
- (c) poskytnutí potravy s uvedeným supernatantem larvám hmyzu, a
- (d) stanovení mortality.

51. Způsob izolace pro hmyz specifického proteinu podle libovolného z nároků 1 až 19 a 29, v y z n a č u j í c í s e t í m , že zahrnuje

- (a) pěstování kmene rodu Bacillus exprimujícího uvedený pro hmyz specifický protein v kultuře,
- (b) získání supernatantu z uvedené kultury, a
- (c) izolaci uvedeného pro hmyz specifického proteinu z uvedeného supernatantu.

52. Způsob izolace molekuly DNA, která obsahuje nukleotidovou sekvenci kódující pro hmyz specifický protein vykazující insekticidní účinnost proteinů podle libovolného z nároků 1 až 19 a 29, v y z n a č u j í c í s e t í m ,

že zahrnuje

- (a) získání molekuly DNA, která obsahuje nukleotidovou sekvenci kódující pro hmyz specifický protein,
- (b) hybridizaci uvedené molekuly DNA s DNA získanou z druhu rodu *Bacillus*, a
- (c) izolaci uvedené hybridizované DNA.

53. Způsob zvýšení rozsahu cílového hmyzu u hostitelského organismu, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se k němu použije první pro hmyz specifický protein podle libovolného z nároků 1 až 19 a 29 v kombinaci s alespoň jedním druhým insekticidním proteinem, který se liší od uvedeného prvního pro hmyz specifického proteinu.

54. Způsob podle nároku 53, v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedený druhý insekticidní protein je vybrán ze skupiny zahrnující δ -endotoxiny z *Bacillus thuringiensis*, inhibitory proteas, lektiny, α -amylasy a peroxidasy.

55. Způsob ochrany rostlin proti poškození způsobenému hmyzím škůdcem, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se na rostlinu nebo na plochu, na které tato rostlina roste, aplikuje, nebo že se v této rostlině exprimuje, insekticidní protein podle libovolného z nároků 1 až 19 a 29.

56. Způsob vytvoření hostitelského organismu podle libovolného z nároků 35 až 37 a 46, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se uvedený hostitelský organismus transformuje molekulou DNA podle libovolného z nároků 20 až 28, expresivní kazetou podle libovolného z nároků 30 až 32 a 34 nebo vektorovou molekulou podle libovolného z nároků 33 až 35.

57. Způsob přípravy insekticidního prostředku podle libovolného z nároků 48 nebo 49, v y z n a č u j í c í s e

t í m , že se smíchá kmen rodu *Bacillus* podle nároku 47 nebo/a hostitelský organismus podle libovolného z nároků 35 až 37 a 46 nebo/a izolovaná molekula proteinu podle libovolného z nároků 1 až 19 a 29, v insekticidně účinném množství, s vhodným nosičem.

58. Způsob vytvoření transgenického potomstva transgenické rodičovské rostliny, které obsahuje, stabilně začleněnou do rostlinného genomu, molekulu DNA obsahující nukleotidovou sekvenci která kóduje pro hmyz specifický protein podle libovolného z nároků 1 až 19 a 29, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se uvedená rodičovská rostlina transformuje expresivní kazetou podle libovolného z nároků 30 až 32 a 34 nebo vektorovou molekulou podle libovolného z nároků 33 až 35 a pesticidní znak se přenesse na potomstvo uvedené transgenické rodičovské rostliny za použití známých postupů množení rostlin.

59. Oligonukleotidová sonda schopná specificky hybridizovat s nukleotidovou sekvencí kódující pro hmyz specifický protein, který lze izolovat z *Bacillus* spp. během fáze vegetativního růstu, a jeho složky, přičemž uvedeným proteinem není toxin usmrcující komáry z *Bacillus sphaericus* SSII-1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje souvislou část kódující sekvence uvedeného pro hmyz specifického proteinu o délce alespoň 10 nukleotidů.

60. Použití oligonukleotidové sondy pro screening libovolného kmene rodu *Bacillus* nebo jiných organismů pro stanovení, zda je v nich přirozeně přítomen pro hmyz specifický protein nebo zda konkrétní transformovaný organismus obsahuje tento gen.

61. Molekula DNA, která obsahuje nukleotidovou sekvenci kódující protein podle libovolného z nároků 1 až 6, kterou

lze získat způsobem který zahrnuje

- (a) získání molekuly DNA, která obsahuje nukleotidovou sekvenci kódující pro hmyz specifický protein,
- (b) hybridizaci uvedené molekuly DNA s oligonukleotidovou sondou podle nároku 60, získanou z molekuly DNA obsahující nukleotidovou sekvenci uvedenou v SEQ ID č. 19, SEQ ID č. 28, SEQ ID č. 30, SEQ ID č. 31 nebo SEQ ID č. 51, a
- (c) izolaci uvedené hybridizované DNA.

62. Molekula DNA, která obsahuje nukleotidovou sekvenci kódující protein podle libovolného z nároků 2, 3, 5 a 6, kterou lze získat způsobem který zahrnuje

- (a) získání molekuly DNA, která obsahuje nukleotidovou sekvenci kódující pro hmyz specifický protein,
- (b) hybridizaci uvedené molekuly DNA s oligonukleotidovou sondou podle nároku 60, získanou z molekuly DNA obsahující nukleotidovou sekvenci uvedenou v SEQ ID č. 28, SEQ ID č. 30, SEQ ID č. 31 nebo SEQ ID č. 51, a
- (c) izolaci uvedené hybridizované DNA.