



(19) **UA** (11) **75 317** (13) **C2**
(51)МПК

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
УКРАИНЫ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ УКРАИНЫ

(21), (22) Заявка: 99042264, 24.09.1997

(24) Дата начала действия патента: 17.04.2006

(30) Приоритет: 24.09.1996 US 08/718,905

(46) Дата публикации: 15.04.2006C12N 15/32
20060101CFI20051201RHUA C07K
14/325 20060101ALI20051201RHUA
C12N 15/82
20060101CLI20051201RHUA A01N
63/00 20060101CLI20051201RHUA
C07K 16/12
20060101CLI20051201RHUA C12Q
1/68 20060101CLI20051201RHUA
G01N 33/68
20060101CLI20051201RHUA C12N
1/21 20060101CLI20051201RHUA
C12R 1/07
20060101ALI20051201RHUA C12R
1/19 20060101ALI20051201RHUA
C12R 1/38
20060101ALI20051201RHUA

(86) Заявка PCT:
PCT/US97/17600, 19970924

(72) Изобретатель:

Донован Вилльям П., US,
Донован Джудит С., US,
Слейни Аннетт С., US

(73) Патентовладелец:

МОНСАНТО ТЕКНОЛОДЖИ, ЛЛС, США., US

(54) КОМПОЗИЦИИ, КОТОРЫЕ СОДЕРЖАТ CRYET33 И CRYET34 BACILLUS THURINGIENSIS, И ИХ
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

(57) Реферат:

Описаны штаммы *Bacillus thuringiensis*, которые содержат новые кристаллические белки, обладающие инсектицидной активностью против твердокрылых насекомых, включая майского жука каштанового (*Tribolium castaneum*) или японского жука (*Popillia japonica*). Описаны также гены нового кристаллического токсина *B. thuringiensis*, которые кодируют кристаллические белки, токсичные для твердокрылых насекомых, а именно, кристаллический белок (29 кДа) (SEQ ID N 3) и кристаллический белок (14 кДа) (SEQ ID N 4), соответственно. Кристаллические белки являются

токсичными также для личинок майского жука каштанового и для личинок японского жука. Кроме того, описаны способы получения и использования трансгенных клеток, которые содержат новые нуклеинокислотные последовательности данного изобретения.

Официальный бюлетень "Промышленная собственность". Книга 1 "Изобретения, полезные модели, топографии интегральных микросхем", 2006, N 4, 15.04.2006. Государственный департамент интеллектуальной собственности Министерства образования и науки Украины.



(19) **UA** (11) **75 317** (13) **C2**
(51) Int. Cl.

MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF
UKRAINE

STATE DEPARTMENT OF INTELLECTUAL
PROPERTY

(12) **DESCRIPTION OF PATENT OF UKRAINE FOR INVENTION**

(21), (22) Application: 99042264, 24.09.1997

(24) Effective date for property rights: 17.04.2006

(30) Priority: 24.09.1996 US 08/718,905

(46) Publication date: 15.04.2006C12N 15/32
20060101CFI20051201RHUA C07K
14/325 20060101ALI20051201RHUA
C12N 15/82
20060101CLI20051201RHUA A01N
63/00 20060101CLI20051201RHUA
C07K 16/12
20060101CLI20051201RHUA C12Q
1/68 20060101CLI20051201RHUA
G01N 33/68
20060101CLI20051201RHUA C12N
1/21 20060101CLI20051201RHUA
C12R 1/07
20060101ALI20051201RHUA C12R
1/19 20060101ALI20051201RHUA
C12R 1/38
20060101ALI20051201RHUA

(86) PCT application:
PCT/US97/17600, 19970924

(72) Inventor:

DONOVAN WILLIAM P., US,
DONOVAN JUDITH C., US,
SLANEY ANNETTE C., US

(73) Proprietor:

MONSANTO TECHNOLOGY, LLC, USA, US

(54) **COMPOSITIONS CONTAINING CRYET33 AND CRYET34 BACILLUS THURINGIENSIS, AND USE THEREOF**

(57) Abstract:

Disclosed are cultures of *Bacillus thuringiensis*, containing new crystalline proteins, having insecticide activity against hard-wing insects, including the chestnut may-bug (*Tribolium castaneum*) or Japanese bug (*Popillia japonica*). Disclosed are also genes of new crystalline toxin of *B. thuringiensis*, which encode crystalline proteins, toxic for hard-wing insects, in particular, crystalline protein (29 kDa) (SEQ ID N 3) and crystalline protein (14 kDa) (SEQ ID N 4), respectively. Crystalline

proteins are also toxic for the larvae of chestnut may-bug and for larvae of Japanese bug. In addition, methods for preparing and use of transgenic cells which contain new nucleic acid sequences of this invention are disclosed.

Official bulletin "Industrial property". Book 1 "Inventions, utility models, topographies of integrated circuits", 2006, N 4, 15.04.2006. State Department of Intellectual Property of the Ministry of Education and Science of Ukraine.



(19) **UA** (11) **75 317** (13) **C2**
(51)МПК

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ

(12) ОПИС ВИНАХОДУ ДО ПАТЕНТУ УКРАЇНИ

(21), (22) Дані стосовно заявки:
99042264, 24.09.1997

(24) Дата набуття чинності: 17.04.2006

(30) Дані стосовно пріоритету відповідно до Паризької конвенції : 24.09.1996 US 08/718,905

(46) Публікація відомостей про видачу патенту (деклараційного патенту): 15.04.2006C12N 15/32
20060101CFI20051201RHUA C07K
14/325 20060101ALI20051201RHUA
C12N 15/82
20060101CLI20051201RHUA A01N
63/00 20060101CLI20051201RHUA
C07K 16/12
20060101CLI20051201RHUA C12Q
1/68 20060101CLI20051201RHUA
G01N 33/68
20060101CLI20051201RHUA C12N
1/21 20060101CLI20051201RHUA
C12R 1/07
20060101ALI20051201RHUA C12R
1/19 20060101ALI20051201RHUA
C12R 1/38
20060101ALI20051201RHUA

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки відповідно до договору PCT:
PCT/US97/17600, 19970924

(72) Винахідник(и):
Донован Вільям П. , US,
Донован Джудіт С. , US,
Слейні Аннетт С. , US

(73) Власник(и):
МОНСАНТО ТЕКНОЛОДЖІ, ЛЛС, США., US

(54) КОМПОЗИЦІЇ, ЩО МІСТЯТЬ CRYET33 І CRYET34 BACILLUS THURINGIENSIS, І ЇХ ВИКОРИСТАННЯ

(57) Реферат:

Описані штами *Bacillus thuringiensis*, які містять нові кристалічні білки, що мають інсектицидну активність проти твердокрилих комах, включаючи хруща каштанового (*Tribolium castaneum*) або японського жука (*Popillia japonica*). Описані також гени нового кристалічного токсину *B. thuringiensis*, які кодують кристалічні білки, токсичні для

твердокрилих комах, а саме, кристалічний білок (29 кДа) (SEQ ID N 3) і кристалічний білок (14 кДа) (SEQ ID N 4), відповідно. Кристалічні білки є токсичними також для личинок хруща каштанового і для личинок японського жука. Крім того, описані способи одержання і використання трансгенних клітин, що містять нові нуклеїнокислотні послідовності даного винаходу.

Опис винаходу

Ця заявка є частковим продовженням [заявки США №08/718905 від 24 вересня 1996], що цілком включена в даний опис у виді посилання.

Даний винахід стосується області молекулярної біології. Більш конкретно, у деяких варіантах свого здійснення, даний винахід стосується способів і композицій, що включають ДНК-сегменти і білки, які походять від бактерій. Ще більш конкретно, даний винахід стосується нових генів *cryET33* і *cryET34*, які походять від *Bacillus thuringiensis*, і кодують кристалічні білки, що є токсичними для твердокрилих комах. Описані різні способи одержання і використання зазначених ДНК-сегментів; ДНК-сегментів, що кодують синтетично модифіковані білки *Cry*; і нативних і синтетичних кристалічних білків, наприклад, використання ДНК-сегментів у якості діагностичних зондів і матриць для продукування білків; і використання білків, гібридних білків-носіїв і пептидів у різних імунологічних і діагностичних цілях. У даний заявці також описані способи одержання і використання нуклеїнокислотних сегментів для продукування трансгенних рослинних клітин, що містять ДНК-сегменти, описані в даний заявці.

Кристалічні білки *Bacillus thuringiensis*

Одним з унікальних відмітних ознак бактерії *B.thuringiensis* є продукування нею кристалічних білків у процесі споруляції, які мають специфічну токсичність для деяких загонів і видів комах. Було показано, що багато різних штамів *B.thuringiensis* продукують інсектицидні кристалічні білки. Композиції, що включають штами *B.thuringiensis*, які продукують білки, що мають інсектицидну активність проти лускокрилих і двокрилих комах, виготовляються промисловістю, і використовуються у якості екологічно прийнятних інсектицидів, оскільки, вони є абсолютно токсичними тільки для конкретних видів комах, на які спрямована їхня дія, але не роблять несприятливого впливу на рослини й інші організми, на які дія цих інсектицидів не спрямована.

Механізм інсектицидної активності кристалічних білків *B.thuringiensis* був особливо широко досліджуваний за останнє десятиліття. Було показано, що кристалічні білки є токсичними для комах тільки після того, як цей білок ковтається комахою. Завдяки лужному рН і присутності протеолітичних ферментів у середній кишці комах, ці білки солюбілізуються, у результаті чого звільняються компоненти, токсичні для даної комах. Ці токсичні компоненти руйнують клітини середньої кишки комах, приводять до припинення її харчування, а в деяких випадках, і до загибелі комах. Виходячи з цього, було показано, що *B.thuringiensis* є ефективним і екологічно безпечним інсектицидом, що може бути використаний для боротьби з різними комахо-шкідниками.

Як указувалося Hofte et al., (1989), більшість інсектицидних штамів *B.thuringiensis* мають активність проти комах загону Лускокрилих, тобто, комах-гусениць. Інші штами *B.thuringiensis* мають інсектицидну активність проти загону Двокрилих, тобто, мух і комарів, або проти лускокрилих і двокрилих комах. За останні роки, було встановлено, що декілька штамів *B.thuringiensis*, які продукують кристалічні білки, є токсичними для комах загону Твердокрилих, тобто, жуків [Krieg et al., 1982; Sick et al., 1990; Lambert et al., 1992].

Генетика кристалічних білків

Ряд генів, що кодують кристалічні білки, були клоновані з декількох штамів *B.thuringiensis*. В огляді Hofte et al., (1989) обговорюються гени і білки, що були ідентифіковані в штамів *B.thuringiensis* до 1990 року, і подана номенклатура і схема класифікації, що традиційно застосовується до генів і білків *B.thuringiensis*. Гени *cryI* кодують білки *Cry I*, які є токсичними для лускокрилих комах. Гени *cry II* кодують білки *Cry II*, що є токсичними як для лускокрилих, так і для двокрилих комах. Гени *cry III* кодують білки *Cry III*, які є токсичними для твердокрилих комах, а гени *cry IV* кодують білки *Cry IV*, що є токсичними для двокрилих комах.

Недавно була запропонована нова номенклатура, яка являє собою систематичну класифікацію генів *cry*, засновану не на специфічності до комах, а на гомологи їхніх ДНК-последовательностей. Ця схема класифікації подана в таблиці 1.

Таблица 1		
Переглянута номенклатура δ -ендотоксину <i>B.thuringiensis</i>		
Нова	Стара	# Доступу банку генів
<i>Cry1Aa</i>	<i>CryIA(a)</i>	M11250
<i>Cry1Ab</i>	<i>CryIA(b)</i>	M13898
<i>Cry1Ac</i>	<i>CryIA(c)</i>	M11068
<i>Cry1Ad</i>	<i>CryIA(d)</i>	M73250
<i>Cry1Ae</i>	<i>CryIA(e)</i>	M65252
<i>Cry1Ba</i>	<i>CryIB</i>	X06711
<i>Cry1Bb</i>	ET5	L32020
<i>Cry1Be</i>	PEG5	Z46442
<i>Cry1Bd</i>	<i>CryEI</i>	U70726
<i>Cry1Ca</i>	<i>CryIC</i>	X07518
<i>Cry1Cb</i>	<i>CryIC(b)</i>	M97880
<i>Cry1Da</i>	<i>CryID</i>	X54160
<i>CryDb</i>	Prt	Z22511
<i>Cry1Ea</i>	<i>CryI</i>	X53985
<i>Cry1Eb</i>	<i>CryIE(b)</i>	M73253

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Cry1Fa	CryIF	M63897
Cry1iFb	PrtD	Z22512
Cry1Ga	PrtA	Z22510
CryGb	CryH2	U70725
Cry1Ha	PrtC	Z22513
Cry1Hb		U35780
Cry1Ia	CryV	X62821
Cry1Ib	CryV	U07642
Cry1Ja	ET4	L32019
Cry1Jb	ET1	U31527
Cry1K		U28801
Cry2Aa	CryIIA	M31738
Cry2Ab	CryIIB	M23724
Cry2Ac	CryIIC	X57252
Cry3A	CryIIIA	M22472
Cry3Ba	CryIIIB	X17123
Cry3Bb	CryIIIB2	M89794
Cry3C	CryIIID	X59797
Cry4A	CryIVA	Y00423
Cry4B	CryIVB	X07423
Cry5Aa	CryVA(a)	L07025
Cry5Ab	CryVA(b)	L07026
Cry5B		U19725
Cry6A	Cry VIA	L07022
Cry6B	CryVIB	L07024
Cry7Aa	CryIIIC	M64478
Cry7Ab	CryIIICb	U04367
Cry8A	CryIIIE	U04364
Cry8B	CryIIIG	U04365
Cry8C	CryIIIF	U04366
Cry9A	CryIG	X58120
Cry9B	CryIX	X75019
Cry9C	CryIH	Z37527
Cry10A	CryIVC	M12662
Cry11A	CryIVD	M31737
Cry11B	Jeg80	X86902
Cry12A	CryVB	L07027
Cry13A	CryVC	L07023
Cry14A	CryVD	U13955
Cry15A	34kDa	M76442
Cry16A	cbm71	X94146
Cry17A	cbm71	X99478
Cry18A	CryBPI	X99049
Cry19A	Jeg65	Y08920
Cyt1Aa	CytA	X03182
Cyt1Ab	CytM	X98793
Cyt1B		U37196
Cyt2A	CytB	Z14147
Cyt2B	CytB	U52043
а Адаптовано з: http://epunix.biol.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html		

Ідентифікація кристалічних білків, що є токсичними для твердокрилих комах

Бактеріальні кристалічні білки стали широко використовуватися у якості інсектицидів відтоді, коли було повідомлено про перше виділення токсичного для твердокрилих комах штаму *B.thuringiensis* (Krieg et al., 1983; 1984). Повідомлялося, що цей штам [описаний у патенті США. №4766203], що уводиться в даний час у опис за допомогою посилання, іменований *B.thuringiensis* типовий вид *tenebrionis*, є токсичним для личинок твердокрилих комах *Agelastica aini* (листоїда вільхового) і *Leptinotarsa decemlineata* (колорадського жука).

[У патенті США №4766203] (який уводиться в даний опис за допомогою посилання) описаний інсектицидний кристалічний білок розміром 65-70 кілодальтонів (кДа), ідентифікований як *B.thuringiensis tenebrionis* (див. також, Bernhard, 1986). Sekar і ін. (1987) повідомляють про клонування і характеризацію гена, який кодує кристалічний білок, що походить від *B.thuringiensis tenebrionis*, і токсичний для твердокрилих комах.

Передбачений розмір цього поліпептиду (установленого виходячи з генної послідовності) складає 73кДа, однак,

виділений білок складається, в основному, із 65кДа-компоненту. Hofte й ін. (1987) також описують ДНК-послідовність клонованого гена з *B.thuringiensis tenebrionis*, причому, цій послідовності ідентична послідовності, описаній Sekar і ін. (1987).

McPherson і ін. (1988) описують ДНК-послідовність для клонованого гена інсектицидного білка з *B.thuringiensis tenebrionis*; причому, послідовність цього гена ідентична послідовності, описаній Sekar і ін. (1987). Було виявлено, що клітини *E.coli* і клітини *Pseudomonas fluorescens* містять клонований ген, що є токсичним для личинок колорадського жука.

[У Міжнародній патентній заявці №WO 91/07481, опублікованій 30 травня 1991], описані мутанти *B.thuringiensis*, що продукують високі рівні тих же самих інсектицидних білків, які продукуються вихідними батьківськими штамми, але на більш низьких рівнях. Були описані мутанти штаму *B.thuringiensis tenebrionis*, токсичного для твердокрилих комах.

Herrnstadt і ін. (1986) описують токсичний для твердокрилих комах штам, позначений *B.thuringiensis* типовий вид *san diego*, що продукує кристалічний 64кДа-білок, який є токсичним для деяких твердокрилих комах, включаючи *Pyrrhalta luteola* (листоїд в'язовий); *Anthono-mus gradis* (довгоносик бавовняний); *Leptinotarsa decemlineata* (колорадський жук); *Osiornynchus silcatus* (скосарь борознистий); *Tenebrio molitor* (борошняний хрущак великий), *Haltica zom-bacina*; і *Diabrotica undecimpunctata* (блошка західна одинадцятикрапка).

ДНК-послідовність гена токсину, токсичного для твердокрилих, що походить від *B.thuringiensis san diego*, була встановлена Herrnstadt і ін. (1987) і описана [в патенті США №4771131]. Послідовність гена токсину *B.thuringiensis san diego* ідентична послідовності, описаній Sekar і ін. (1987) для клонованого гена токсину, токсичного для твердокрилих *B.thuringiensis tenebrionis*. За допомогою різних діагностичних тестів, Krieg і ін. (1987) продемонстрували, що штам *B.thuringiensis san diego* ідентичний штаму *B.thuringiensis tenebrionis*.

Інший штам *B.thuringiensis*, EG2158, був виявлений Donovan і ін. (1988) і описаний [у патенті США №5024807]. Штам EG2158 продукує кристалічний 73кДа-білок CryC, що має інсектицидну активність проти твердокрилих комах. Його ДНК-послідовність ідентична послідовності, описаній Sekar і ін. (1987) для клонованого гена токсину *B.thuringiensis tenebrionis*. Цей ген токсину для твердокрилих був позначений Hofte і ін. (1989) геном cryIIA. Для цього штаму також були виявлені два більш дрібних білки розміром 30- і 29-кДа, але вони не були охарактеризовані (Donovan et al., 1988).

[У патенті США №5024837] також описаний гібрид штамів *B.thuringiensis* типовий вид *kurstaki*, що виявляв активність як проти лускокрилих, так і проти твердокрилих комах. [У патенті США №4797279 (відповідному EP 0221024)] описаний гібрид *B.thuringiensis*, трансформований плазмідом, що походить від *B.thuringiensis* типового виду *kurstaki*, і містить ген, який кодує кристалічний білок, токсичний для лускокрилих; і плазмідом, що походить від *B.thuringiensis tenebrionis*, і містить ген, що кодує кристалічний білок, токсичний для твердокрилих. Гібридний штам *B.thuringiensis* продукує кристалічні білки, що мають як властивості білків, які походять від *B.thuringiensis kurstaki*, так і властивості білків, які походять від *B.thuringiensis tenebrionis*. [У патенті США №4910016 (відповідному EP 0303379)] описаний ізолят *B.thuringiensis*, ідентифікований як *B.thuringiensis MT 104*, який має інсектицидну активність проти твердокрилих і лускокрилих комах.

[В опублікованій Європейській патентній заявці №0318143] описаний інтактний частково модифікований ген від *B.thuringiensis tenebrionis*, і рекомбінантні вектори, що містять цей ген, і здатні до спрямованої експресії білка, який має токсичність для твердокрилих комах; а [в опублікованій Європейській патентній заявці №0324254] описаний штам *B.thuringiensis A30*, що має інсектицидну активність проти твердокрилих комах, включаючи личинки колорадського жука, личинки блішки довговусої, і довгоносика бавовняного.

[У патенті США №4999192 (відповідному EP 0328383)] описаний штам *B.thuringiensis PS40D1*, що має інсектицидну активність проти личинок колорадського жука. Цей штам був також ідентифікований за допомогою сіротипування як сіротип 8a8b, morrisoni. [У патенті США №5006336 (відповідному EP 0346114)] описаний ізолят *B.thuringiensis*, позначений PS122D3, що був сіротипований як сіротип 8a8b, morrisoni, і який має інсектицидну активність проти личинок колорадського жука. [У патенті США №4966765 (відповідному EP 0346114)] описаний штам *B.thuringiensis*, PS86B1 (ідентифікований за допомогою сіротипування як сіротип *tolworthi*), що має інсектицидну активність проти колорадського жука.

Нуклеотидні послідовності гена cryIIIB і білок, що кодується ним, який є токсичним для твердокрилих комах, були описані Sick і ін. (1990), однак, штам-джерело *B.thuringiensis* був ідентифікований лише шляхом сіротипування як сіротип *tolworthi*. [У патенті США №4966156, виданому 26 лютого 1991р. Sick і ін. (відповідному EP 0337604)], описаний ген токсину *B.thuringiensis*, отриманий із штаму 43F *B.thuringiensis*, що має активність проти твердокрилих комах, і його генна послідовність виявилась ідентичною гену cryIIIB. Повідомлялося, що штам 43F *B.thuringiensis* має активність проти колорадського жука і *Leptino-tarsa texana*.

[В опублікованій Європейській патентній заявці №0382990] описані два штаму *B.thuringiensis*, btPGS1208 і btPGS1245, що продукують кристалічні білки розміром 74 і 129кДа, відповідно, що мають інсектицидну активність проти личинок колорадського жука. Виявилось, що ДНК-послідовність, встановлена для гена токсину, який продукує 74кДа-білок, є родинною гену cryIIIB, описаному Sick і ін. (1990).

[В опублікованій Міжнародній патентній заявці PCT WO 90/13651] описані штами *B.thuringiensis*, що містять ген токсину, який кодує 81кДа-білок, що, як вказується, є токсичним як для лускокрилих, так і для твердокрилих комах. [У патенті США №5055293] описане використання *B.laterosporous* для боротьби з блошкою довговусою (*Diabrotica*).

Даний винахід різко відрізняється від попередніх робіт тим, що він стосується нових кристалічних білків CryET33 і CryET34, і нових ДНК-послідовностей, які кодують ці білки, що представляють новий клас кристалічних

білків *B.thuringiensis*, і не мають загальної гомології послідовностей із жодним зі штамів, описаних у вищевказаній літературі. Ізолят *B.thuringiensis*, описаний і заявлений у даному винаході, являє собою перший із виявлених штамів *B.thuringiensis* *kurstaki*, що, як було показано, має токсичність для твердокрилих комах. Штами *B.thuringiensis* даного винаходу містять нові гени *cry*, що експресують білкові токсини, які мають інсектицидну активність проти твердокрилих комах, таких як, комахи роду *Popillia* і *Tribolium*.

В одному зі своїх аспектів даний винахід стосується нових нуклеїнокислотних сегментів, які містять два гени токсичного для твердокрилих комах 5-ендотоксину, що мають нуклеотидні послідовності і виведені амінокислотні послідовності, проілюстровані на Фіг.1а, Фіг.1в і Фіг.1с. Далі, ці гени будуть позначатися *cryET33* (SEQ ID №1) і *cryET34* (SEQ ID №2). Ген *cryET33* має кодуючу область, що простирається від нуклеотидної основи 136 до основи 939, як показано на Фіг.1А, Фіг.1В і Фіг.1С; а ген *cryET34* має кодуючу область, що простирається від нуклеотидної основи 969 до основи 1349, як показано на Фіг.1А, Фіг.1В і Фіг.1С.

В іншому своєму аспекті, даний винахід стосується інсектицидних білків, що кодуються новими генами *cryET33* і *cryET34*. Виведена амінокислотна послідовність білка *CryET33* (SEQ ID №3), кодована геном *cryET33*, що простирається від нуклеотидної основи 136 до основи 936, показана на Фіг.1А, Фіг.1В і Фіг.1С. Виведена амінокислотна послідовність білка *CryET34* (SEQ ID №4), кодована геном *cryET34*, що простирається від нуклеотидної основи 969 до основи 1346, також показана на Фіг.1А, Фіг.1В і Фіг.1С. Ці білки мають інсектицидну активність проти комах загону твердокрилих, а зокрема, проти довгоносика бавовняного, хрущака каштанового і хрущака японського (японського жука).

В іншому своєму аспекті даний винахід стосується біологічно чистої культури природного штаму EG10327 бактерії *B.thuringiensis* дикого типу, депонованого 14 грудня 1994р. Науково-дослідною колекцією сільськогосподарських культур. Північною регіональною дослідницькою лабораторією (Northern Regional Research Laboratory, NRRL) під номером доступу № NRRL B-21365. Штам EG10327 *B.thuringiensis* являє собою природний штам *B.thuringiensis*, що містить гени, які є родинними або ідентичними генам *cryET33* і *cryET34* даного винаходу. Штам EG10327 продукує інсектицидні 29кДа- і 14кДа-білки, які є родинними або ідентичними білкам *CryET33* і *CryET34*, описаним у даній заявці.

В іншому своєму аспекті, даний винахід стосується рекомбінантного вектора, що містить один або обидва нових гени *cryET33* і *cryET34*; рекомбінантної клітини-хазяїна, трансформованої таким рекомбінантним вектором; і біологічно чистої культури рекомбінантної бактерії, трансформованої зазначеним вектором. У кращих варіантах здійснення винаходу, кращою бактерією є *B.thuringiensis*, така як, рекомбінантний штам EG11402 (депонований 14 грудня 1994р. NRRL під номером доступу B-21366), описаний у прикладі 8, і рекомбінантний штам EG11403 (депонований 14 грудня 1994р. NRRL під номером доступу B-21367), описаний у прикладі 7. В іншому кращому варіанті здійснення даного винаходу кращою є бактерія *E.coli*, така як, рекомбінантні штами EG11460 (депоновані 14 грудня 1994р. NRRL під номером доступу B-21364). Усі штами, депоновані NRRL, були депоновані Колекцією патентних культур відповідно до Будапештського договору, і було отримано депозитне свідчення про життєздатність штамів відповідно до встановленої Міжнародної форми про депонування BP/4.

ДНК-сегменти генів *cryET33* і *cryET34*

Даний винахід також стосується ДНК-сегментів, що можуть бути виділені практично з будь-якого джерела; які не містять повної геномної ДНК; і які кодують нові пептиди, описані в даній заявці. Було показано, що ДНК-сегменти, що кодують пептиди цього виду, можуть кодувати білки, поліпептиди, субодиниці, функціональні домени і т.і. родинних кристалічним білкам Продуктів або інших неродинних генних продуктів. Крім того, ці ДНК-сегменти можуть бути цілком синтезовані *in vitro* із використанням методів, добре відомих фахівцям.

Ген *cryET33* має нуклеотидну послідовність, показану на Фіг.1А, Фіг.1В і Фіг.1С. Ген *cryET33* (SEQ ID №1) кодує 29кДа-білок *cryET33*, що має амінокислотну послідовність, показану на Фіг.1А, Фіг.1В і Фіг.1С (SEQ ID №3). Ген *cryET34* (SEQ ID №2) кодує 14кДа-білок *CryET34*, що має амінокислотну послідовність, показану на Фіг.1А, Фіг.1В і Фіг.1С (SEQ ID №4).

Використовуваний у даному описі термін "ДНК-сегмент" стосується виділеної ДНК-молекули, що не містить повної геномної ДНК даного виду. Тому, "ДНК-сегмент, що кодує кристалічний білок або пептид" означає ДНК-сегмент, що містить кодуючі послідовності кристалічного білка, вже виділені або очищені з повної геномної ДНК бактеріального виду, від якого був отриманий цей ДНК-сегмент, і який, у даному випадку, є грам-позитивною бактерією роду *Bacillus*, а зокрема, виду *Bacillus*, відомого як *B.thuringiensis*. Термін "ДНК-сегмент" включає ДНК-сегменти і більш дрібні фрагменти цих сегментів, а також рекомбінантні вектори, включаючи, наприклад, плазміди, косміди, фагміди, фаги, віруси і т.і.

Аналогічно, ДНК-сегмент, що містить виділений або очищений ген, який кодує кристалічний білок, означає ДНК-сегмент, що може, крім того, включати послідовності, що кодують пептид, деякі інші елементи, такі як, регуляторні послідовності, відділені, в основному, від інших природних генів; або послідовності, що кодують білок. У цьому зв'язку, термін "ген" використовують просто для позначення одиниці, що кодує функціональний білок, поліпептид або пептид. При цьому, слід також відзначити, що цей функціональний термін включає обидві геномні послідовності, послідовності оперону і більш дрібні сконструйовані генні сегменти, які експресують білки, поліпептиди або пептиди, або можуть бути адаптовані для їхньої експресії.

Термін "виділений, в основному, з інших послідовностей, що кодують", - означає, що потрібний ген, а в даному випадку, ген, який кодує бактеріальний кристалічний білок, складає значну частину кодуючої області ДНК-сегмента, і що цей ДНК-сегмент не містить великих ділянок природної кодуючої ДНК, таких як великі хромосомні фрагменти або інші функціональні гени або кодуючі області оперону. Саме собою зрозуміло, що цей термін включає спочатку виділений ДНК-сегмент, і не виключає гени, рекомбінантні гени, синтетичні лінкери, або області, що кодують, які були пізніше штучно додані до сегмента.

У конкретних варіантах свого здійснення даний винахід стосується виділених ДНК-сегментів і рекомбінантних векторів, що включають ДНК-послідовності, що кодують пептид виду Cru, амінокислотна послідовність якого включає амінокислотну послідовність, в основному, подану в SEQ ID №3 або SEQ ID №4.

Термін "амінокислотна послідовність, в основному, подана в SEQ ID №3 або SEQ ID №4" означає, що ця послідовність відповідає, в основному, частини послідовності або SEQ ID №3, або SEQ ID №4, і має відносно невелике число амінокислот, що не є ідентичними або біологічно функціонально еквівалентними амінокислотам будь-якій із зазначених послідовностей. Термін "біологічно функціонально еквівалентний" добре зрозумілий будь-якому фахівцю, і, крім того, він точно визначений у даному описі (див., наприклад, "Ілюстративні варіанти здійснення винаходу"). Відповідно до цього, амінокислотні послідовності, що мають ідентичність або функціональну еквівалентність з амінокислотами SEQ ID №3 або SEQ ID №4 від біля 70% до біля 80%, або переважно, від біля 81% до біля 90%, а більш переважно, від біля 91% до біля 99%, будуть вважатися послідовностями, що, в основному, подані в SEQ ID №3 або SEQ ID №4.

Слід також відзначити, що амінокислотні і нуклеїнокислотні послідовності можуть включати додаткові залишки, такі як додаткові N- або C-кінцеві амінокислотні послідовності або 5'- або 3'-послідовності, але, при цьому, вони будуть вважатися, в основному, такими, як послідовності, подані в одній із вищеписаних послідовностей, за умови, що ці послідовності задовольняють критеріям, викладеним вище, включаючи збереження біологічної активності білка, у тому випадку, якщо це стосується експресії білка. Зокрема, до нуклеїнокислотних послідовностей можуть бути додані кінцеві послідовності, і вони можуть, наприклад, включати різні некодуючі послідовності, що фланкують або 5'-, або 3'-частини кодуєчої області або вони можуть включати різні внутрішні послідовності, тобто, інтрони, що як відомо, присутні усередині генів.

Нуклеїнокислотні сегменти даного винаходу, незалежно від довжини самої кодуєчої послідовності можуть бути об'єднані з іншими ДНК-послідовностями, такими як промотори, сигнали поліаденілування, додаткові сайти ферментів, що рестрикують, сайти множинного клонування, інші сегменти, що кодують, і т.і. так, що їхня повна довжина може значно варіюватися. А тому, якщо взяти до уваги той факт, що може бути використаний нуклеїнокислотний фрагмент майже будь-якої довжини, то повна довжина, переважно, обмежується просто шляхом розробки або використання відповідного протоколу техніки рекомбінантних ДНК. Так, наприклад, можуть бути отримані нуклеїнокислотні фрагменти, що включають коротку безупинну ділянку, що кодує або пептидні послідовності, описані в SEQ ID №3 або SEQ ID №4, або фрагменти, що ідентичні або комплементарні ДНК-послідовностям, що кодують будь-який пептид у послідовності SEQ ID №3 або SEQ ID №4, а зокрема, ДНК-сегменти, описані в SEQ ID №1 або SEQ ID №2. Так, наприклад, можуть бути також використані ДНК-послідовності, такі як, послідовності у біля 18 нуклеотидів, і послідовності, що складають аж до біля 10000, біля 5000, біля 3000, біля 2000, біля 1000, біля 500, біля 200, біля 100, біля 50, і біля 14 пар основ у довжину (включаючи усі фрагменти з проміжними довжинами).

Для кожного фахівця зовсім очевидно, що, у даному контексті, термін "проміжні довжини" означає будь-яку довжину, що складає проміжне значення між вищевказаними інтервалами, таку як, 18, 19, 20, 21, 22, 23 і т.д.; 30, 31, 32 і т.д.; 50, 51, 52, 53, і т.д.; 100, 101, 102, 103, і т.д.; 150, 151, 152, 153 і т.д.; включаючи всі цілі числа 200-500; 500-1000; 1000-2000; 2000-3000; 3000-5000; і аж до цих значень, а також включаючи послідовності приблизно в 5200 нуклеотидів і т.і.

Слід також відзначити, що даний винахід не обмежується конкретними нуклеїнокислотними послідовностями, що кодують пептиди даного винаходу або які кодують амінокислотні послідовності SEQ ID №3 або SEQ ID №4, включаючи ті ДНК-послідовності, що, зокрема, описані в SEQ ID №1 або SEQ ID №2. Тому, рекомбінантні вектори і виділені ДНК-сегменти можуть, так чи інакше, включати самі пептид-кодуєчі області; кодуєчі ділянки, несучі обрані зміни або модифікації в основній області, що кодує; або вони можуть кодувати більш великі поліпептиди, що, при цьому, включають ці пептид-кодуєчі області; або вони можуть кодувати біологічно функціонально еквівалентні білки або пептиди, що мають варіантні амінокислотні послідовності.

ДНК-сегменти даного винаходу включають біологічно функціональні еквівалентні пептиди. Такі послідовності можуть продукуватися в результаті виродженості кодонів і функціональної еквівалентності пептидів, які кодуються, що, як відомо, властиво природним нуклеїнокислотним послідовностям і білкам, що кодовані ними. Альтернативно, функціонально еквівалентні білки або пептиди можуть бути сконструйовані з використанням техніки рекомбінантних ДНК, де модифікації можуть бути внесені в структуру білка виходячи з властивостей амінокислотних послідовностей, що повинні бути змінені. Потрібні модифікації можуть бути штучно введені з використанням техніки сайт-направленого мутагенезу, наприклад, для внесення змін в антигенність білка або для тестування мутантів із метою оцінки їхньої активності на молекулярному рівні.

Якщо необхідно, то можуть бути також отримані гібридні білки і пептиди, у яких, наприклад, первинна структура областей, які кодують пептид, у тій же самій одиниці, що експресує, порівнюється з іншими білками або пептидами, які мають потрібні функції, наприклад, із метою очищення або імунодетекції (наприклад, білки, що можуть бути очищені за допомогою афінної хроматографії; і області, що кодують ферментну мітку, відповідно).

У ще одному своєму аспекті, даний винахід стосується рекомбінантних векторів. Особливо кращими є вектори, у яких кодуєча частина ДНК-сегмента, незалежно від того, кодує вона повнорозмірний білок чи більш дрібний пептид, знаходиться під контролем промотору. Цей промотор може бути промотором, що у природних умовах асоціюється з геном, який кодує пептиди даного винаходу, і може бути отриманий шляхом виділення 5'-некодуючих послідовностей, розташованих вище сегмента, що кодує, або екзону, наприклад, із використанням техніки рекомбінантного клонування і/або РСК™-технології, описаній в даній заявці у зв'язку з одержанням композицій.

СгуЕТ33- і сгуЕТ34-ДНК-сегменти, використовувані у якості гібридизаційних зондів і праймерів

Крім використання для регулювання експресії кристалічних білків або пептидів даного винаходу, розглянуті вище нуклеїно кислотні послідовності також використовуються у ряді інших цілей. (Наприклад, вони можуть бути також використані у якості зондів або праймерів в експериментах по гібридизації нуклеїнової кислоти. Власне кажучи, передбачається, що особливе застосування можуть знайти нуклеїно кислотні сегменти, що містять область послідовності, яка складається, принаймні, із послідовності довжиною в 14 безперервно слідуєчих один за одним нуклеотидів, що мають ту ж послідовність, або послідовність, комплементарну послідовності ДНК-сегмента довжиною в 14 безперервно слідуєчих один за одним нуклеотидів у SEQ ID №1 або SEQ ID №2. У деяких варіантах здійснення даного винаходу, можуть бути використані більш довгі ідентичні або комплементарні послідовності із суміжних безперервно слідуєчих один за одним нуклеотидів, наприклад, послідовності, що складаються із біля 20, 30, 40, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000 п.о., і т.д. (включаючи всі проміжні довжини і вище, і включаючи повнорозмірну послідовність із 5200 пар основ).

Здатність таких нуклеїно кислотних зондів специфічно гібридуватися з послідовностями, що кодують кристалічний білок, дозволяє використовувати ці зонди для виявлення присутності комплементарних послідовностей у даному зразку. Однак, вони можуть бути використані й в інших цілях, включаючи використання даних про послідовність для одержання праймерів мутантних видів, або праймерів, використовуваних для одержання інших генетичних конструкцій.

Передбачається, що нуклеїно кислотні молекули, які мають області послідовності, що складаються із ділянок із 10-14, 15-20, 30, 50, або навіть 100-200 безперервно слідуєчих один за одним нуклеотидів або т.і., ідентичних або комплементарних ДНК-послідовностям SEQ ID №1 або SEQ ID №2, є особливо придатними для використання у якості гібридизаційних зондів, наприклад, у Саузерн- і Нозерн-блотінгу. Більш дрібні фрагменти, в основному, можуть бути використані при здійсненні гібридизації, де довжина безперервної комплементарної області може варіюватися, наприклад, від біля 10-14 і до біля 100 або 200 нуклеотидів, але для детекції, якщо це необхідно, можуть бути також використані і більш великі безперервні комплементарні ділянки, відповідно до довжини комплементарних послідовностей.

Очевидно, що фрагменти можуть бути також отримані іншими методами, такими як, наприклад, метод механічної фрагментації або гідроліз ферментами, що рестрикують. Невеликі нуклеїно кислотні сегменти або фрагменти можуть бути легко отримані, наприклад, методом прямого синтезу фрагмента хімічними способами, як це звичайно робиться, із використанням автоматичного олігонуклеотидного синтезатора. Крім того, фрагменти можуть бути отримані шляхом застосування технології репродукування нуклеїнової кислоти, такої як технологія PCR™, описана [в заявках на Патент США №4683195 і 4683202] (кожна з яких вводиться в даний винахід за допомогою посилання), шляхом вбудовування обраних послідовностей у рекомбінантні вектори для рекомбінантного продукування, або шляхом застосування інших технологій рекомбінантних ДНК, в основному, відомих фахівцям в області молекулярної біології.

Відповідно до цього, нуклеотидні послідовності даного винаходу можуть бути використані за їхню здатністю до селективного утворення дуплексних молекул із комплементарними ділянками ДНК-фрагментів. У залежності від розглянутого застосування, може статися бажаним використовувати різні умови гібридизації для досягнення різних Ступенів селективності зонда стосовно послідовності-мішені. Для застосувань, що вимагають високої селективності, звичайно/ із метою одержання гібридів, може статися бажаним використовувати відносно жорсткі умови, наприклад, можуть бути обрані умови з відносно низькою концентрацією солі і/або високою температурою, наприклад, такі як, присутність від біля 0,02M до біля 0,15M NaCl при температурі від біля 50°C до біля 70°C. Такі селективні умови майже не допускають, або взагалі не допускають, невідповідності між зондом і матрицею або ланцюгом-мішенню, і повинні бути особливо відповідними для виділення ДНК-сегментів, що кодують кристалічний білок. Детекція ДНК-сегментів за допомогою гібридизації добре відома фахівцям, і приклади методів гібридизаційного аналізу наводяться [в патентах США №4965188 і 5176995] (кожний із яких вводиться в даний опис за допомогою посилання). Особливо підхожий опис цієї техніки можна також знайти [в роботах Maloy et al., 1993; Segal 1976; Prokop, 1991; і Kuby, 1991].

Саме собою зрозуміло, що для деяких застосувань, наприклад, там, де для одержання мутантів бажано використовувати ланцюг мутантного праймера, гібридизований з нижчезрештованою матрицею, або там, де необхідно знайти і виділити послідовності, що кодують кристалічний білок, і походять від родинних штамів, функціональних еквівалентів, або т.і., звичайно вимагаються менше жорсткі умови гібридизації для того, щоб міг утворитися гетеродуплекс. У цих випадках, може статися кращим використовувати такі умови, як присутність від біля 0,15M до біля 0,9M солі, при температурі від біля 20 °C до біля 55 °C. Перехресно види, що гібридизуються, можуть бути, тим самим, легко ідентифіковані, як сигнали позитивної гібридизації у порівнянні з контрольними гібридизаціями. У будь-якому випадку, можна загалом відзначити, що умови можуть бути зроблені більш жорсткими шляхом додавання зростаючих кількостей формаміду, який служить для дестабілізації гібридного дуплекса так само, як і підвищена температура. Таким чином, умови гібридизації можуть бути легко змінені, і обраний метод залежить від бажаних результатів.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу, для оцінки гібридизації може статися переважним використовувати нуклеїно кислотні послідовності даного винаходу в комбінації з відповідними засобами, такими як, мітка. Фахівцям відомий широкий ряд індикаторних засобів, включаючи флуоресцентні, радіоактивні, ферментативні і інші ліганди, такі як, авідин/біотин, які здатні давати сигнал, що детектується. У кращих варіантах здійснення винаходу, замість радіоактивних або інших небажаних з екологічної точки зору реагентів, переважно, використовувати флуоресцентну мітку або ферментну мітку, таку як, уреазу, лужну фосфатазу або пероксидазу. Стосовно ферментних міток, відомо, що в цьому випадку, для забезпечення їхньої візуалізації як

людським оком, так і спектрофотометричним прибором, можуть бути використані колометричні індикаторні субстрати, які дозволяють ідентифікувати специфічну гібридизацію з використанням зразків, що містять комплементарні нуклеїнові кислоти.

Взагалі, вважається, що гібридизаційні зонди, описані у даній заявці, можуть бути використані у якості реагентів для гібридизації у розчині, а у деяких варіантах, може бути також використана тверда фаза. У тих варіантах даного винаходу, де використовується тверда фаза, ДНК, що тестується, (або РНК) адсорбують або як-небудь інакше приєднують до обраної матриці або до поверхні. Потім, цю фіксовану одноланцюжну нуклеїнову кислоту піддають специфічній гібридизації з обраними зондами у відповідних умовах. Вибір умов залежить від конкретних обставин, і визначається виходячи з конкретно необхідних критеріїв (наприклад, у залежності від вмісту G+C, типу нуклеїнової кислоти-мішені, джерела нуклеїнової кислоти, розміру гібридизаційного зонда і т.і.). Після промивання гібридизованої поверхні так, щоб були віддалені неспецифічно зв'язані молекули-зонди, специфічну гібридизацію детектують, або навіть оцінюють кількісно за допомогою мітки.

Рекомбінантні вектори й експресія кристалічних білків

В інших варіантах здійснення даного винаходу, передбачається, що деякі переваги можуть бути досягнуті шляхом приміщення ДНК-сегмента, що кодує, під контроль рекомбінантного або гетерологічного промотору. Використовуваний у даному описі термін "рекомбінантний або гетерологічний промотор" означає промотор, який у природних умовах звичайно не асоціюється з ДНК-сегментом, що кодує кристалічний білок або пептид. Такими промоторами можуть бути промотори, які звичайно асоціюються з іншими генами, і/або промотори, виділені з будь-яких бактеріальних, вірусних, еукаріотичних або рослинних клітин. В основному, дуже важливо використовувати промотор, який ефективно направляє експресію ДНК-сегмента в тип клітини, організм, або навіть тварину, обрані для експресії. Використання промоторів і комбінацій типів клітин для експресії білка, в основному, відомо кожному фахівцю в області молекулярної біології, [див., наприклад, Sambrook et al., 1989]. Відповідними промоторами можуть бути конститутивні або індукцйбельні промотори, що можуть бути використані у відповідних умовах для досягнення високих рівнів експресії убудованого ДНК-сегмента, так, щоб їх можна було застосовувати для великомасштабного продукування рекомбінантних білків і пептидів. Відповідними промоторними системами, що можуть бути використані для експресії високих рівнів білка, є, але не обмежуються ними, векторна система експресії Pichia (Pharmacia LKB Biotechnology).

Що стосується варіантів здійснення експресії для одержання рекомбінантних білків і пептидів, то вважається, що в більшості випадків можуть бути використані більш довгі ДНК-сегменти; при цьому, найбільш кращими є ДНК-сегменти, що кодують повну пептидну послідовність. Однак, слід зазначити, що даний винахід також передбачає використання більш коротких ДНК-сегментів для спрямованої експресії кристалічних пептидів, або епітопних корових областей, таких, які можуть бути використані для генерування антитіл проти кристалічного білка. Особливо відповідними вважаються ДНК-сегменти, що кодують пептидні антигени довжиною від біля 8 до біля 50 амінокислот, або більш переважно від біля 8 до біля 30 амінокислот, або навіть більш переважно, від біля 8 до біля 20 амінокислот. Такими пептидними епітопами можуть бути амінокислотні послідовності, що включають безперервні амінокислотні послідовності з SEQ ID №3 або SEQ ID №4.

Трансгени кристалічних білків і трансгенні рослини

У ще одному своєму аспекті даний винахід стосується способів продукування трансгенної рослини, що експресує нуклеїноокислотний сегмент, який кодує новий кристалічний білок даного винаходу. Спосіб продукування трансгенних рослин добре відомий фахівцям. Загалом, цей спосіб передбачає трансформацію відповідної клітини-хазяїна ДНК-сегментом, що містить промотор, правильно приєднаний до кодуючої області, яка кодує кристалічний білок CryET33 або CryET34 B.thuringiensis. Така кодуюча область, звичайно правильно з'єднана з областю термінації транскрипції, завдяки чому зазначений промотор здатний регулювати транскрипцію кодуючої області у клітині, забезпечуючи, тим самим, здатність клітини продукувати рекомбінантний білок in vivo. Альтернативно, у тих випадках, коли бажано здійснювати контроль, регуляцію або зниження кількості рекомбінантного кристалічного білка, що конкретно експресується в конкретній трансгенній клітині, даний винахід також передбачає експресію антисмислової мРНК кристалічного білка. Використання антисмислової мРНК як засобу для регулювання або зниження кількості даного потрібного білка в клітині добре відомо фахівцям.

В іншому своєму аспекті даний винахід стосується трансгенних рослин, що експресують ген або генний сегмент, який кодує одну або декілька нових поліпептидних композицій, описаних у даній заявці. Використовуваний у даному описі термін "трансгенна рослина" означає рослину, що містить убудовані ДНК-послідовності, включаючи, але не обмежуючись ними, гени, які, цілком ймовірно, не існують у природі; ДНК-послідовності, що як правило, не транскрибуються в РНК, або не транслюються ("експресуються") з творенням білка; або будь-які інші гени або ДНК-послідовності, які бажано ввести в нетрансформовану рослину, такі як, гени, що, в основному, можуть бути присутніми у нетрансформованій рослині, але які бажано або сконструювати методами генної інженерії, або модифікувати так, щоб вони мали змінену експресію.

У деяких випадках, необхідно, щоб геном трансгенної рослини даного винаходу був збільшений за допомогою стабільного введення одного або декількох трансгенів cryET33 або cryET34, які можуть бути нативними, синтетично модифікованими, або мутантними. У деяких випадках, у геном трансформованої рослинної клітини-хазяїна може бути введене більш одного трансгена. Таким випадком є, наприклад, випадок, коли в геном рослини вводять ДНК-сегмент, що кодує більш, ніж один кристалічний білок. У деяких ситуаціях, може статися бажаним мати один, два, три, чотири або навіть більш кристалічні білки B.thuringiensis (або нативних, або рекомбінантно сконструйованих), включених і таких, що стабільно експресуються у трансформованій трансгенній рослині.

Кращим геном, що може бути убудований, є, наприклад, ДНК-послідовність, яка кодує кристалічний білок, і походить від бактерії, а зокрема, один або декілька генів, що описані в даний заявці, і які були отримані від видів *Bacillus*. У високому ступені кращими нуклеїнокислотними послідовностями є послідовності, отримані від *B.thuringiensis*, або будь-яка з цих послідовностей, яка була генетично сконструйована для зниження або збільшення інсектицидної активності кристалічного білка в такій трансформованій клітині-хазяїні.

Засоби, використовувані для трансформації рослинної клітини і для одержання трансгенної клітинної лінії, добре відомі фахівцям, і обговорюються у даному описі. Вектори, плазміди, косміди, YAC (штучні дріжджові хромосоми) і ДНК-сегменти, використовувані для трансформації таких клітин, містять, зрозуміло, в основному, оперони, гени, або послідовності даного винаходу, що походять від генів, або нативні або синтетично сконструйовані послідовності, а зокрема, послідовності, які кодують кристалічні білки, що описуються. Ці ДНК-конструкції можуть, крім того, включати структури, такі як, промотори, енхансери, полілінкери, або навіть генні послідовності, що мають позитивно або негативно-регуляторну активність стосовно конкретних генів, які представляють інтерес. ДНК-сегмент або ген може кодувати або нативний, або модифікований кристалічний білок, що може бути експресований в отриманих рекомбінантних клітинах, і/або який може забезпечувати поліпшений фенотип генерованій клітині.

Такими трансгенними рослинами можуть бути, переважно, однодольні або дводольні рослини, що мають підвищену резистентність до інсектициду, завдяки введенню в ці рослини трансгенного ДНК-сегмента, який кодує один або декілька кристалічних білків CryET33 і/або CryET34, що є токсичними для твердокрилих комах. Особливо кращими рослинами є трави, які утворюють дерн, пшениця, овочеві рослини, декоративні рослини, плодові дерева, і т.і.

У своєму родинному аспекті даний винахід також стосується насіння, продукovanого трансформованою рослиною; потомства, отриманого від цього насіння; і насіння, продукovanого потомством вихідної трансгенної рослини, отриманої відповідно до вищевказаного способу. Таке потомство і насіння будуть містити трансген, що кодує кристалічний білок, і стабільно убудований у їхнім геном, і ці потомствени рослини будуть успадковувати ознаки, повідомлені їм шляхом уведення стабільного трансгена методами менделівської генетики. Усі зазначені трансгенні рослини, що мають убудовані в їхній геном трансгенні ДНК-сегменти, які кодують один або декілька кристалічних білків або поліпептидів CryET33 і/або CryET34, являють собою аспекти даного винаходу.

Сайт-специфічний мутагенез

Сайт-специфічний мутагенез являє собою техніку, використовувану для одержання окремих пептидів, або біологічно функціональних еквівалентних білків або пептидів за допомогою специфічного мутагенезу на основі ДНК. Крім того, ця техніка дозволяє легко одержати і проаналізувати варіанти послідовностей, наприклад, приймаючи до уваги одне або декілька з вищевказаних посилай, шляхом введення однієї або декількох модифікацій нуклеотидної послідовності в ДНК. Сайт-специфічний мутагенез дозволяє продукувати мутанти за допомогою використання специфічних олігонуклеотидних послідовностей, що містять ДНК-послідовність із потрібною мутацією, а також достатнє число суміжних нуклеотидів, і одержувати праймерну послідовність потрібного розміру і з потрібною варіабельністю послідовностей для утворення стабільного дуплекса, що простирається по обидві сторони від делеційного стику. Звичайно, кращим є праймер довжиною від біля 13, або біля 14, або біля 16, або біля 17 включно, і включаючи, до біля 18, або біля 19, або біля 20, або біля 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, або навіть до біля 30, 40, або біля 50 або т.і. нуклеотидів, де біля 5-10 залишків на обох сторонах від стику послідовності є зміненими.

В основному, техніка сайт-специфічного мутагенезу добре відома фахівцям, і описана в різних публікаціях. Слід зазначити, що звичайно, у цій техніці використовують фаговий вектор, що є присутнім як в одноланцюжній, так і в дволанцюжній формі. Типовими векторами, використовуваними в сайт-специфічному мутагенезі, є такі вектори, як фаг M13. Цей фаг є комерційно доступним і його використання, в основному, добре відомо фахівцям. Дволанцюжні плазміди також традиційно використовуються в сайт-специфічному мутагенезі, що дозволяє виключити стадію переносу потрібного гена з плазміди у фаг.

В основному, відповідно до даного винаходу, сайт-специфічний мутагенез здійснюють спочатку шляхом одержання одноланцюжного вектора або дисоціації шляхом плавлення дволанцюжного вектора, що у своїй послідовності містить ДНК-послідовність, яка кодує потрібний пептид. Олігонуклеотидний праймер, що несе потрібну мутовану послідовність, одержують, в основному, синтетично. Потім цей праймер гібридизують з одноланцюжним вектором, і піддають обробці ферментами, що полімеризують ДНК, такими як фрагмент Кленова полімерази I *E.coli*, для завершення повного синтезу ланцюга, що несе мутацію. У такий спосіб утворюється гетеродуплекс, де один ланцюг кодує вихідну немутовану послідовність, а другий ланцюг несе потрібну мутацію. Потім, цей гетеродуплексний вектор використовують для трансформації відповідних клітин, таких як, клітини *E.coli*, і відбирають клони, що містять рекомбінантні вектори, які несуть відповідним чином розташовану мутовану послідовність.

Одержання варіантів послідовності обраних ДНК-сегментів, що кодують пептид, із використанням сайт-направленого мутагенезу, є одним із способів продукування потенційно корисних видів, але цей спосіб не повинний розглядатися як деяке обмеження, оскільки можуть бути використані й інші способи, що передбачають одержання варіантів послідовностей пептидів і ДНК-послідовностей, що кодують ці пептиди. Так, наприклад, для одержання варіантних послідовностей, рекомбінантні вектори, що кодують потрібну пептидну послідовність, можуть бути оброблені мутагенними агентами, такими як, гідроксиламін.

Композиції, що включають антитіло проти CryET33 і CryET34, і способи їх одержання

У конкретних варіантах здійснення винаходу, автори даного винаходу використовували антитіла, або моноклональні, або поліклональні, що зв'язуються з кристалічними білками, описаними в даний заявці. Способи

УА 75317 С2
одержання і характеристики антитіл добре відомі фахівцям [див., наприклад, Antibody: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988]; цей опис вводиться в дану заявку за допомогою посилання). У способах генерування моноклональних антитіл (mAb) звичайно використовуються ті ж самі лінії, що використовуються для одержання поліклональних антитіл. Інакше кажучи, поліклональне антитіло продукується шляхом імунізації тварини імуногенною композицією даного винаходу, і від імунізованої тварини беруть антисироватку. Для продукування антисироватки можуть бути використані тварини широкого ряду. Звичайно, тваринами, використовуваними для продукування антисироватки, є кролики, миші, пацюки, хом'ячки, морські свинки, або кози. Для продукування поліклональних антитіл, кращими є кролики, оскільки вони мають відносно великий об'єм крові.

Фахівцям добре відомо, що дана композиція може варіюватися за своєю імуногенністю. Тому, часто виявляється необхідним додатково стимулювати імунну систему хазяїна, що може бути досягнуте шляхом зв'язування пептидного або поліпептидного імуногена з носієм. Прикладами кращих носіїв є гемоціанін лімфи равлика (KLN) і альбумін бичачої сироватки (BSA). У якості носіїв можуть бути також використані й інші альбуміни, такі як овальбумін, альбумін мишиної сироватки, або альбумін кролячої сироватки. Кон'югування поліпептиду з білком-носієм може бути здійснено способами, добре відомими фахівцям, наприклад, із використанням глутаральдегіду, м-малеїмідобенної-N-гідроксисукцинімідоєфіру, карбодіміду, і біс-біазотованого бензидину.

Фахівцям також добре відомо, що імуногенність конкретної імуногенної композиції може бути посилена шляхом використання неспецифічних стимуляторів імунної відповіді, відомих як ад'юванти. Типовими і кращими ад'ювантами є повний ад'ювант Фрейнда (неспецифічний стимулятор імунної відповіді, що містить "убиту" бактерію *Mycobacterium tuberculosis*), неповний ад'ювант Фрейнда, і ад'ювант на основі гідроксиду алюмінію.

Кількість імуногенної композиції, використовуваної для продукування поліклональних антитіл, варіюється в залежності від природи імуногена, а також від тварини, використовуваної для імунізації. Для введення імуногена можуть бути використані різні способи (підшкірний, внутрішньом'язовий, чре́зшкірний, внутрішньовенний і внутрішньоочеревинний). Продукування поліклональних антитіл може бути простежене шляхом узяття проб крові від імунізованої тварини в різних ділянках організму тварини після його імунізації. Може бути також уведена друга (бустер)-ін'єкція. Процес введення бустер-ін'єкцій і титрування повторюють доти, поки не буде отриманий відповідний титр. При досягненні потрібного рівня імуногенності, кров імунізованої тварини може бути зібрана, а сироватка може бути виділена і збережена, і/або ця тварина може бути використана для продукування моноклональних антитіл (mAb).

Моноклональні антитіла (mAb) можуть бути легко отримані з використанням добре відомої техніки, [наприклад, описаної в патенті США №419626], що вводиться в даний опис за допомогою посилання. Звичайно ця техніка передбачає імунізацію відповідної тварини обраною імуногенною композицією, наприклад, очищеним або частково очищеним кристалічним білком, поліпептидом або пептидом. Композицію, яка імунізує, вводять способом, ефективним для стимуляції клітин, що продукують антитіло. Кращими тваринами є гризуни, такі як, миші і пацюки, однак, можуть бути також використані клітини кроликів, овець або жаб. Використання пацюків може мати деякі переваги (Coding, 1986, pp.60-61), але краще використовувати мишей, особливо кращими є миші BALB/c, оскільки вони використовуються найбільш часто, і дають, в основному, найбільш високий відсоток стабільних гібридів.

Після імунізації, для генерування mAb відповідно до звичайної схеми, відбирають соматичні клітини, здатні продукувати антитіло, зокрема, лімфоцити В (В-клітини). Ці клітини можуть бути отримані шляхом біопсії із селезінки, мигдалин або лімфатичних вузлів, або зі зразків периферійної крові. Клітини селезінки і клітини периферійної крові є кращими, перші, тому, що вони являють собою багате джерело клітин, які продукують антитіло, що знаходяться в стадії лімфобластів, які діляться, а другі - тому що, периферійна кров є легко доступним джерелом. Часто імунізують ряд різних тварин, після чого селезінку з найбільш високим титром видаляють, і лімфоцити селезінки одержують шляхом гомогенізації селезінки шприцом. Звичайно селезінка імунізованої миші містить приблизно 5×10^7 - 2×10^8 лімфоцитів.

Потім В-лімфоцити, що продукують антитіло, отримані від імунізованої тварини, піддають злиттю з імірталізованими мієломними клітинами, звичайно, клітинами тварини того ж виду, який було імунізовано. Кращими мієломними лініями, що підходять для використання в процедурах злиття з метою продукування гібридом, є клітини, що не продукують антитіл, мають високу ефективність злиття, і не містять ферментів, що повідомляють цим клітинам нездатність зростати у визначених селективних середовищах, які підтримують ріст тільки потрібних злитих клітин (гібридом).

Може бути використаний будь-який вид з ряду існуючих мієломних клітин, відомих фахівцям [Coding, pp.65-66, 1986; Campbell, pp.75-83, 1984]. Так, наприклад, якщо імунізованою твариною є миша, то можуть бути використані P3-X63/Ag8, X63-Ag8.653, NS1/1-Ag41, Sp210-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1,7 і S194/5XXO Bul; якщо імунізованими тваринами є пацюки, то можуть бути використані R210.RCY3, Y3-Ag1.2.3, IR983F і 4B210; а якщо для злиття використовуються клітини людини, то можуть бути використані усі U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 і UC729-6.

Однією з кращих мієломних клітин миші є мієломна клітинна лінія NS-1 (що позначається також P3-NS-1-Ag4-1), яка легко може бути отримана зі сховища генетичних мутантних клітин людини (Human Genetic Mutant Cell Repository, NIGMS) шляхом запиту в цьому сховищі клітинної лінії GM3573. Іншою мієломною мишиною клітинною лінією, що може бути використана, є резистентна до 8-азагуаніну непродукує клітинна лінія, мишиної мієломи SP2/0.

Методи генерації гібридів клітин що продукують антитіло селезінки, або лімфовузлів і мієломних клітин

звичайно передбачають змішування соматичних клітин із міеломними клітинами у відношенні 2:1, хоча це відношення може варіюватися в межах від біля 20:1 до біля 1:1, відповідно, у присутності агента або агентів (хімічних або електричних), що стимулюють злиття клітинних мембран. Були описані методи злиття з використанням віпусу Сендай (Kohler & Milstein, 1975; 1976), і з використанням поліетиленгліколю (ПЕГ), такого як 37% (об/об) ПЕГ (Geffer et al., 1977). Відповідними для використання є також методи електрично індукваного злиття (Goding, 1986, pp.71-74).

Процедури злиття звичайно продукують життєздатні гібриди при низькій частоті, біля 1×10^{-6} - 1×10^{-8} . Однак, у цьому зв'язку не виникає ніяких проблем, оскільки життєздатні злиті гібриди можуть бути диференційовані від батьківських незлитих клітин (зокрема, від незлитих міеломних клітин, що звичайно, повинні безперервно ділитися) шляхом культивування в селективному середовищі. Таким селективним середовищем звичайно є середовище, що містить агент, який блокує *de novo* синтез нуклеотидів у середовищі для культивування тканин. Типовими і кращими агентами є аміноптерин, метотрексат і азасерин. Аміноптерин і метотрексат блокують *de novo* синтез як пуринів, так і піримідинів, тоді як азасерин блокує тільки синтез пуринів. Якщо використовується аміноптерин або метотрексат, то в середовище додають гіпоксантин і тимідин як джерело нуклеотидів (середовище НАТ). Якщо використовується азасерин, то в середовище додають гіпоксантин.

Кращим селективним середовищем є НАТ. У середовищі НАТ можуть виживати тільки клітини, здатні діяти шляхом "реутилізації" нуклеотидів. Міеломні клітини є дефіцитними по Ключових ферментах "реутилізаційного" шляху, наприклад, по гіпоксантин-фосфоріозилтрансферазі (Hprt), і вони не можуть виживати в цьому середовищі. В-клітини можуть діяти цим шляхом, але вони мають обмежений життєвий цикл у культурі, і звичайно гинуть приблизно через два тижні. Тому, тільки клітини, що можуть виживати в селективних середовищах, є гібридами, утвореними від міеломи і В-клітин.

Це культивування дає популяцію гібридом, із якої відбирають специфічні гібридами. Звичайно, добір гібридом здійснюють шляхом культивування клітин методом одноклонового розведення в планшетах для мікротитрування з наступним аналізом окремих клональних супернатантів (приблизно через 2-3 тижні) для одержання потрібної реактивності. Цей аналіз повинний бути чутливим, простим і швидким, таким як, радіоімунаналізи, імуноферментні аналізи, аналізи на цитотоксичність, аналізи методом бляшок, дот-блот-імуноаналізи на зв'язування, і т.і.

Потім відібрані гібридами піддають серійному розведенню і клонують в окремі клітинні лінії, що продукують антитіло, клони яких можуть бути потім розмножені до нескінченності з продукуванням mAb. Ці клітинні лінії можуть бути використані для продукування mAb двома основними способами. Зразок гібридом може бути ін'єкційований (часто в черевну порожнину) гістосумісній тварині того типу, що був використаний для продукування соматичних і міеломних клітин для початкового злиття. У ін'єкційованої тварини розвивається пухлина, що секретує специфічні моноклональні антитіла, продукує гібридними злитими клітинами. Потім, фізіологічні рідини тварини, такі як, сироватка або асцитна рідина, можуть бути віддалені з одержанням mAb високої концентрації. Окремі клітинні лінії можуть бути також культивовані *in vitro*, де mAb звичайно секретуються в культуральне середовище, із якого вони можуть бути легко отримані у високих концентраціях. Якщо необхідно, продуковані mAb можуть бути потім очищені методом фільтрації, центрифугування, і різними хроматографічними методами, такими як, ВЕЖХ або афінна хроматографія.

ELISA і імунопреципітація

З метою даного винаходу можуть бути використані аналізи ELISA. В аналізі ELISA, білки або пептиди, що включають послідовності антигенних кристалічних білків, імобілізують на обраній поверхні, переважно, на поверхні, що має спорідненість до даного білка, такий як, лунки полістиролового планшета для мікротитрування. Після відмивання для видалення неповністю адсорбованого матеріалу лунки аналітичного планшета, переважно, зв'язують із неспецифічним білком, або сенсibiliзують неспецифічним білком, який, як відомо, є антигенно нейтральним стосовно антисироватки, що тестується, таким як, альбумін бичачої сироватки (BSA), казеїн або розчини сухого молока. Ця процедура дозволяє блокувати ділянки неспецифічної адсорбції на поверхні, що імобілізує, і, тим самим, сприяє зниженню фону, обумовленого неспецифічним зв'язуванням антисироватки на поверхні лунок.

Після зв'язування антигенного матеріалу з лункою, сенсibiliзації нереакційноздатним матеріалом для зниження фону, і промивання для видалення незв'язаного матеріалу, поверхню, що імобілізує, піддають контакту з антисироваткою або з досліджуванним клінічним або біологічним екстрактом способом, що сприяє утворенню імунного комплексу (антиген/антитіло). Ці умови передбачають, переважно, розведення антисироватки розріджувачами, такими як, BSA, бичачий гама-глобулін (BGG), і забуферений фосфатом фізіологічний розчин (PB3)/Твін®. Ці додані агенти також сприяють зниженню неспецифічного зв'язування. Потім нанесений шар антисироватки залишають для інкубування протягом від біля 2 до біля 4 години, при температурі, переважно, порядку від біля 25°C до біля 27°C. Після інкубування, поверхню, яка контактує з антисироваткою, промивають для видалення матеріалу, який не утворив імунокомплекс. Краща процедура промивання передбачає промивання таким розчином, як PBS/Твін®, або боратним буфером.

Після утворення специфічних імунних комплексів між зразком, що тестується, і зв'язаним антигеном, і після наступного промивання, поява цього імунокомплексу і навіть його кількості можуть бути визначені за допомогою взаємодії, якій піддають цей імунокомплекс із "другим" антитілом, що має специфічність до першого антитіла. Для здійснення цього Способу виявлення, "друге" антитіло переважно, кон'югують із ферментом, що генерує колірне фарбування після його інкубування з відповідним хромогенним субстратом. Так, наприклад, необхідно, щоб зв'язана з антисироваткою поверхня контактувала або була інкубована з антитілом, що кон'юговане з уреазою або пероксидазою проти імуноглобулінів людини IgG протягом такого періоду часу й у таких умовах, які

сприяють прояву фарбування, зв'язаному з утворенням імуноткомплексу (наприклад, інкубування протягом 2 годин при кімнатній температурі в розчині, що містить PBS, такому як, PBS-Твін®).

Після інкубування з "другим" антитілом, міченим ферментом, і наступним відмиванням для видалення незв'язаного матеріалу, кількість мітки може бути оцінена шляхом інкубування з хромогенним субстратом, таким як, сечовина і бромкрезоловий пурпурний або 2,2'-азино-ди-(3-етил-бензтіазолін)-6-сульфонова кислота (ABTS) і H_2O_2 , у випадку, якщо у якості ферментної мітки використовується пероксидаза. Потім, кількісна оцінка може бути проведена шляхом виміру ступеня продукування фарбування, наприклад, із використанням спектрофотометру у візуальній області спектрів.

Антитіла проти кристалічних білків даного винаходу можуть бути, зокрема, використані для виділення інших кристалічних білкових антигенів шляхом імунореципітації. Імунореципітація передбачає виділення цільового антигенного компонента із суміші комплексу, і використовується для розпізнавання або виділення невеликих кількостей білка. Для виділення мембрани, білкові клітини повинні бути солюбілізовані в міцели детергента. Кращими є неіоногенні солі, оскільки інші агенти, такі як солі жовчних кислот, осаджуються при кислотному pH або у присутності двовалентних катіонів.

В альтернативному експерименті, антитіла даного винаходу можуть бути використані для замикання місцеположення двох антигенів. Цей метод є особливо ефективним для підвищення локалізованої концентрації антигенів, наприклад, пар "фермент-субстрат".

Вестерн-блотінг

Композиції даного винаходу можуть бути широко використані в імуноблот-аналізі або Вестерн-блот-аналізі. Антитіла проти пептидів можуть бути використані у якості високоафінних первинних реагентів для ідентифікації білків, імобілізованих на твердій матриці-носії, такий як нітроцелюлоза, нейлон, або їхні комбінації. У сполученні з імунореципітацією із наступним гель-електрофорезом, вони можуть бути використані у якості реагенту для одностадійної детекції антигенів, проти яких вторинні реагенти, використовувані для детекції антигену, дають небажаний фон. Їхнє використання є особливо кращим у тому випадку, коли досліджуваними антигенами є імуноглобуліни (що дозволяє уникнути використання імуноглобулінів, які зв'язуються з компонентами клітинної стінки бактерій), і в цьому випадку досліджувані антигени перехресно реагують з агентом, що детектує, або вони мігрують при тій же самій відносній молекулярній масі, що і сигнал, який реагує перехресно.

Вважається, що особливо цінними в цьому відношенні є методи імунологічної детекції, що проводяться в сполученні з Вестерн-блотінгом, і передбачають використання мічених ферментами, радіоактивно мічених, або флуоресцентно-мічених "інших" антитіл проти молекули токсину.

Набори для скринінгу і детекції кристалічних білків

У даному винаході описані методи і набори для скринінгу зразків, що приблизно містять поліпептиди кристалічного білка або поліпептиди, що походять від кристалічного білка, або клітини, що продукують такі поліпептиди. Набір може містити одне або декілька антитіл даного винаходу, і може також містити реагент(и) для детекції взаємодії між зразком і антитілом Даного винаходу. Отриманий реагент(и) може бути радіоактивно-, флуоресцентно-, або ферментативно-міченим. Цей набір може містити відомий радіоактивно мічений агент, здатний зв'язувати або взаємодіяти з нуклеїновою кислотою або антитілом даного винаходу.

Реагент(и) цього набору може бути виготовлений у виді рідкого розчину, у виді матеріалу, зв'язаного з твердим носієм, або у виді сухого порошку. Переважно, щоб реагент(и) був виготовлений у виді рідкого розчину, який є водяним розчином. Якщо реагенти зв'язують із твердим носієм, то кращим твердим носієм може бути хроматографічне середовище, тест-планшет, що має безліч лунок, або предметне скло для мікроскопа. Якщо реагенти виготовляють у виді сухого порошку, то цей порошок може бути розведений з одержанням розчину шляхом додавання відповідного розчинника, який може бути підготовлений заздалегідь.

В інших варіантах свого здійснення, даний винахід стосується способів імунодетекції і асоційованих з ними наборів. Було припущено, що кристалічні білки або пептиди даного винаходу можуть бути використані для детекції антитіл, які зв'язуються з ними; або, альтернативно, антитіла, отримані відповідно до даного винаходу, можуть бути використані для детекції кристалічних білків або пептидів, що містять епітоп родинного кристалічного білка. Загалом, у цих способах, спочатку одержують зразок, що, приблизно, містить зазначений білок, пептид або антитіло, а потім, цей зразок піддають контакту з антитілом або пептидом даного винаходу в умовах, ефективних для утворення імуноткомплексу, і якщо це утворення мало місце, то здійснюють детектування присутності цього імуноткомплексу.

В основному, процедура детекції утворення імуноткомплексу добре відома фахівцям і може бути здійснена різними способами. Так, наприклад, для цієї мети, даний винахід передбачає проведення аналізів ELISA, PIA, імуноблотінгу (наприклад, дот-блот-аналізу), непрямого імунотфлуоресцентного аналізу т.і. В основному, утворення імуноткомплексу може бути виявлене; за допомогою мітки, такої як, радіоактивна мітка або ферментна мітка (така як, лужна фосфатаза, пероксидаза хрину, або т.і.). Зрозуміло, може статися кращим використовувати вторинний ліганд для зв'язування, таких як, "друге" антитіло або система біотин/авідинового ліганду для зв'язування, добре відома фахівцям.

Було припущено, що для аналізу може бути використаний практично будь-який досліджуваний зразок, що, приблизно, містить або кристалічний білок або пептид, або пептид, родинний кристалічному білку, або антитіло проти цього білка, як розглядається в даному випадку. При цьому, передбачається, що ці варіанти здійснення винаходу можуть знайти застосування при титруванні зразків антигену або антитіла, при добірї гібридом, і т.і.

У родинних варіантах свого здійснення, даний винахід стосується виготовлення наборів, що можуть бути використані для виявлення присутності кристалічних білків або родинних білків, і/або антитіл у зразку. У

якості прикладів можуть служити клітини, супернатанти клітин, клітинні екстракти, ферментні фракції, білкові екстракти, або інші безклітинні композиції, що, приблизно, містять кристалічні білки або пептиди. Узагалі говорячи, набори даного винаходу можуть включати відповідний кристалічний білок, пептид, або антитіло, спрямоване проти такого білка або пептиду, разом із реагентом для імунодетекції, і тарою для утримування антитіла або антигену і реагенту. Реагент, що імунодетектує, звичайно включає мітку, асоційовану з антитілом або антигеном, або мітку, асоційовану з вторинним зв'язуючим лігандом. Прикладами таких лігандів є "друге" антитіло, спрямоване проти "першого" антитіла або антигену, або біотиновий або авідиновий (або стрептавідиновий) ліганд, що має асоційовану мітку. Як вказувалося вище, мабуть, що для цілей даного винаходу може бути використаний цілий ряд традиційних міток, добре відомих фахівцям.

У якості тари звичайно використовується посуд, у який можуть бути поміщені антитіло, антиген або реагент, що детектує, а переважно, їхні аліквати. Набори даного винаходу звичайно також включають засоби для утримування тари з антитілами, антигенами, і реагентами в герметично закритому виді для комерційної реалізації. Такою тарою можуть бути видувні пластикові контейнери, у яких зберігаються потрібний посуд.

Епітопні корові послідовності

Даний винахід також стосується білкових або пептидних композицій, що не містять інтактних клітин і інших пептидів, і містять очищений білок або пептид, який має епітоп, що імунологічно перехресно реагує з одним або декількома антитілами проти кристалічного білка. Зокрема, даний винахід стосується епітопних корових послідовностей, що походять від білків або пептидів Сгу.

Використовуваний у даному описі термін " що містить епітоп, який імунологічно перехресно реагує з одним або декількома антитілами проти кристалічного білка" стосується пептиду або білкового антигену, який має первинну, вторинну або третинну структуру, аналогічну епітопу, локалізованому усередині кристалічного білка або поліпептиду. При цьому, ступінь подібності є, в основному, такою, що моноклональні або поліклональні антитіла, спрямовані проти кристалічного білка або поліпептиду, будуть також зв'язуватися, реагувати, або як-небудь інакше розпізнавати перехресно-реактивний пептидний або білковий антиген. У сполученні з такими антитілами можуть бути використані різні методи імуноаналізу, наприклад, такі як, Вестерн-блотінг, ELISA, RIA, і т.і., усі з яких добре відомі фахівцям.

Ідентифікація імунодомінантних епітопів Сгу, і/або їх функціональних еквівалентів, що підходять для використання у вакцинах, є відносно прямим методом. Так, наприклад, можуть бути використані методи Норр, [описані в патенті США №4554101], що вводиться в даний опис за допомогою посилання, і в якому описана ідентифікація й одержання епітопів з амінокислотної послідовності на основі її гідрофільності. Ці методи описані в деяких інших роботах, і для ідентифікації епітопних корових послідовностей можуть бути також використані комп'ютерні програми, розроблені на основі цих методів [див., наприклад, Jameson & Wolf, 1988; Wolf et al., 1988; патент США №4554101]. Амінокислотна послідовність цих "епітопних корових послідовностей" може бути потім легко введена в пептиди з використанням методу пептидного синтезу або з використанням техніки рекомбінантних ДНК.

Кращими пептидами для використання в даному винаході є пептиди, що мають довжину порядку від біля 8 до біля 20 амінокислот, а більш переважно від біля 8 до біля 15 амінокислот. Було припущено, що більш короткі пептиди, що походять від антигенного кристалічного білка, мають, у деяких випадках, більше переваг, наприклад, при проведенні імунологічного аналізу. Прикладами таких переваг є легке одержання й очищення, відносно низька вартість і краща відтвореність продуктів, і кращий біологічний розподіл.

Було припущено, що конкретні переваги даного винаходу можуть бути реалізовані шляхом одержання синтетичних пептидів, що включають модифіковані і/або подовжені епітопні/імуногенні корові послідовності, що дозволяють одержати "універсальний" епітопний пептид, спрямований на кристалічні білки, а зокрема, на Сгу-послідовності або Сгу-родинні послідовності. У конкретному аспекті даного винаходу, ці епітопні послідовності ідентифікують як гідрофільні області конкретного поліпептидного антигену. Було припущено, що ці області являють собою ділянки, що, цілком ймовірно, індують Т-клітинну або В-клітинну стимуляцію, а, отже, дозволяють виявити продукування специфічного антитіла.

Використовувані в даному винаході епітопні корові послідовності являють собою відносно коротку ділянку, що складається з амінокислот, що є "комплементарними" антигензв'язуючим сайтам або зв'язуються з цими сайтами на антитілах, спрямованих проти кристалічного білка, і описаних у даній заявці. Крім того, або альтернативно, епітопна корова послідовність являє собою послідовність, що виявляє антитіла, які перехресно реагують з антитілами, спрямованими проти пептидних композицій даного винаходу. При цьому, слід зазначити, що в контексті даного опису, термін "комплементарний" стосується амінокислот або пептидів, що мають здатність зв'язуватися один з одним. Таким чином, деякі епітопні корові послідовності даного винаходу можуть бути чітко визначені за їхню здатністю конкурувати за зв'язування або, мабуть, витискати зв'язування потрібного білкового антигену з антисироваткою, спрямованою на відповідний білок.

При цьому, очевидно, що розмір поліпептидного антигену, в основному, не грає вирішальної ролі, за умови, що він має довжину, принаймні, достатню для здійснення ідентифікації корової послідовності або послідовностей. Очевидно, найменшою коровою послідовністю, що може бути використана в даному винаході, є послідовність, що має довжину приблизно біля 8 амінокислот, а більш переважно, приблизно від 10 до 20 амінокислот. Таким чином, цей розмір звичайно відповідає самим дрібним пептидним антигенам, отриманим відповідно до даного винаходу. Однак, якщо необхідно, цей антиген може мати більш великий розмір за умови, що він містить основну епітопну корову послідовність.

Ідентифікація епітопних корових послідовностей відома фахівцям, і описана, [наприклад, у патенті США №4554101], що вводиться в даний опис за допомогою посилання, і в якому описана ідентифікація й одержання

епітопів з амінокислотної послідовності виходячи з гідрофільності. Крім того, можуть бути використані численні комп'ютерні програми, призначені для визначення антигенних ділянок білків [див., наприклад, Jameson & Wolf, 1988; Wolf et al., 1988]. Програми для комп'ютеризованого аналізу пептидних послідовностей (наприклад, DNASTar® software, DNASTar, Inc., Madison, WI) можуть бути також використані для конструювання синтетичних пептидів відповідно до даного опису.

Синтез епітопних послідовностей або пептидів, що містять у своїй послідовності антигенний епітоп, може бути легко здійснений із використанням стандартної техніки синтезу, такої як, метод твердофазного синтезу (наприклад, із використанням комерційно доступного синтезатора, такого як Applied Biosystems Model 430A Peptide Synthesizer). Потім синтезовані в такий спосіб пептидні послідовності розділяють на аліквоти з заздалегідь визначеною кількістю, і зберігають відповідним чином, наприклад, у виді водяних розчинів, або навіть, більш переважно, у виді порошку або в ліофілізованому стані, аж до їхнього використання.

Узагалі говорячи, завдяки відносній стабільності пептидів, вони можуть легко зберігатися, якщо це необхідно, у водяних розчинах протягом досить тривалого часу, наприклад, до 6 місяців або більш, практично в будь-якому водяному розчині, не виявляючи, при цьому, помітного розкладання, або не утрачаючи своєї антигенної активності. Однак, якщо передбачається більш тривале збереження у водяному розчині, то в цьому випадку, звичайно, кращими є агенти, що включають буфери, такі як, Тріс або фосфатні буфери, у яких рН підтримується від біля 7,0 до біля 7,5. Крім того, може статися кращим використовувати агенти, що інгібують ріст мікробів, такі як, азид натрію або Мертіолат. Для тривалого збереження у водяному стані, розчини бажано берегти при біля 4 °С, а більш переважно, у замороженому стані. Зрозуміло, якщо пептиди зберігаються в ліофілізованому або порошкоподібному стані, то вони можуть зберігатися, практично, нескінченно, наприклад, у заздалегідь визначених аліквотах, що, перед їхнім застосуванням, можуть бути повторно гідратовані з використанням попередньо визначеної кількості води (переважно, дистильованої) або буфера.

Біологічно функціональні еквіваленти

У структуру пептидів даного винаходу і ДНК-сегментів, що кодують ці пептиди, можуть бути внесені модифікації і зміни, у результаті чого може бути отримана функціональна молекула, яка кодує білок або пептид із потрібними властивостями. Нижче наводиться обговорення, що стосується заміни амінокислот білка з метою створення еквівалента, або навіть поліпшення молекули другої генерації. У конкретних варіантах здійснення даного винаходу, передбачається, що мутовані кристалічні білки можуть бути використані для підвищення інсектицидної активності білка, і отже, для підвищення інсектицидної активності і/або експресії рекомбінантного трансгена в рослинній клітині. Заміни амінокислот можуть бути здійснені шляхом заміни кодонів ДНК-послідовності на відповідні кодони, подані в таблиці 2.

Таблиця 2								
Амінокислоти	Кодони							
Аланін	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU		
Цистеїн	Cys	C	UGC	UGU				
Аспаргінова кислота	Asp	D	GAC	GAU				
Глутамінова кислота	Glu	E	GAA	GAG				
Фенілаланін	Phe	F	UUC	UUU				
Гліцин	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU		
Гістидин	His	H	CAC	CAU				
Ізолейцин	Ile	I	AUA	AUC	AUU			
Лізин	Lys	K	AAA	AAG				
Лейцин	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU
Метіонін	Met	M	AUG					
Аспаргін	Asn	N	AAC	AAU				
Пролін	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU		
Глутамін	Gln	Q	CAA	CAG				
Аргінін	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU
Серин	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU
Треонін	Thr	T	ACA	ACG	ACU			
Валін	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU		
Триптофан	Trp	W	UGG					
Тирозин	Tyr	Y	UAC	UAU				

Наприклад, деякі амінокислоти в структурі білка можуть бути замінені іншими амінокислотами без значної втрати здатності зв'язування з такими структурами, як, наприклад області антитілу, що зв'язують антиген, або сайтів зв'язування на молекулах субстрату. Оскільки саме здатність зв'язувати і природа білка визначає біологічну функціональну активність цього білка, то в послідовності білка можуть зроблені деякі амінокислотні заміни, і, саме собою зрозуміло, ці заміни можуть бути зроблені в його ДНК-послідовності, що кодує, але, при цьому, може бути отриманий білок із подібними властивостями. Тому, автори даного винаходу вважають, що в пептидних послідовностях описаних композицій або у відповідних ДНК-послідовностях, що кодують зазначені пептиди, можуть бути зроблені різні заміни без втрати їхньої біологічної цінності або активності.

Проведення таких заміни може бути здійснено з урахуванням гідропатичного індексу. Важливість цього гідропатичного індексу амінокислот у повідомленні даному білку інтерактивної біологічної функції, в

основному, відома фахівцям (Kyte & Doolittle, 1982, ця робота вводиться в даний опис за допомогою посилання). Вважається, що відносний гідропатичний характер амінокислоти повідомляється вторинній структурі отриманого білка, що, у свою чергу, визначає взаємодію білка з іншими молекулами, наприклад, із ферментами, субстратами, рецепторами, ДНК, антитілами, антигенами, і т.і.

Кожній амінокислоті приписують гідропатичний індекс виходячи з її гідрофобності і зарядної характеристики (Kyte & Doolittle, 1982), так, наприклад, ізолейцин (+4,5); валін (+4,2); лейцин (+3,8); фенілаланін (+2,8); цистеїн/цистин (+2,5); метіонін (+1,9); аланін (+1,8); гліцин (-0,4); треонін (-0,7); серин (-0,8); триптофан (-0,9); тірозин (-1,3); пролін (-1,6); гістидин (-3,2); глутамат (-3,5); глутамін (-3,5); аспартат (-3,5); аспаргін (-3,5); лізин (-3,9); і аргінін (-4,5).

Відомо, що деякі амінокислоти можуть бути замінені іншими амінокислотами, що мають аналогічний гідропатичний індекс або оцінку, і ця заміна, проте, приводить до одержання білка з аналогічною біологічною активністю, тобто, до одержання білка з біологічно еквівалентною функцією. При проведенні таких заміन, переважно здійснювати заміну амінокислот, гідропатичний індекс яких складає в межах ± 2 , більш переважно, у межах ± 1 , а ще більш переважно, у межах $\pm 0,5$.

Фахівцям також відомо, що заміна еквівалентних амінокислот може бути ефективно здійснена виходячи з гідрофільності. [У патенті США №4554101], що вводиться в даний опис за допомогою посилання, указується, що найбільше значення локальної середньої гідрофільності білка, що визначається гідрофільністю його суміжних амінокислот, корелює з біологічною властивістю цього білка.

Як докладно описано [в патенті США №4554101], амінокислотним залишкам були приписані наступні значення гідрофільності: аргінін (+3,0); лізин (+3,0); аспартат (+3,0 ± 1); глутамат (+3,0 ± 1); серин (+0,3); аспаргін (+0,2); глутамін (+0,2); гліцин (0); треонін (-0,4); пролін (-0,5 ± 1); аланін (-0,5); гістидин (-0,5); цистеїн (-1,0); метіонін (-1,3); валін (-1,5); лейцин (-1,8); ізолейцин (-1,8); тірозин (-2,3); фенілаланін (-2,5); триптофан (-3,4).

Слід зазначити, що деякі амінокислоти можуть бути замінені іншими амінокислотами, що мають аналогічне значення ліпофільності, і ця заміна, проте, приводить до одержання білка з аналогічною біологічною активністю, тобто до одержання білка з біологічно еквівалентною функцією. При проведенні таких замін, переважно здійснювати заміну амінокислот, значення ліпофільності яких складає порядку ± 2 , більш переважно, порядку ± 1 , а ще більш переважно, порядку $\pm 0,5$.

Як указувалося вище, амінокислотні заміни проводять, в основному, виходячи з відносної подібності замісників бокових ланцюгів амінокислот, наприклад, їхньої гідрофобності, гідрофільності, заряду, розміру, і т.і. Характерні заміни, що здійснюються з обліком різних вищевказаних характеристик, добре відомі фахівцям, і такими замінами є: аргінін і лізин; глутамат і аспартат; серин і треонін; глутамін і аспаргін; і валін, лейцин і ізолейцин.

Композиції кристалічних білків у якості інсектицидів і способи їхнього використання

Автори даного винаходу вважають, що композиції кристалічних білків, описані в даний заявці, є особливо цінними при їхньому використанні у якості інсектицидів для місцевої і/або системної обробки польових культур, трав, фруктів і овочів, і декоративних рослин. У кращому варіанті здійснення винаходу, біоінсектицидна композиція містить масляну текучу суспензію бактеріальних клітин, що експресують новий кристалічний білок, описаний у даний заявці. Кращими клітинами є клітини EG10327 *B.thuringiensis* однак, у даному винаході може бути використана будь-яка бактеріальна клітина, що експресує нові нуклеїно кислотні сегменти, описані в даний заявці, які продукують кристалічний білок, наприклад, така клітина, як *B.thuringiensis*, *B.megaterium*, *B.subtilis*, *E.coli*, або *Pseudomonas spp.*

В іншому важливому варіанті даного винаходу, біоінсектицидна композиція включає гранули, що вододиспергуються. Ці гранули містять бактеріальні клітини, які експресують новий кристалічний білок, описаний у даний заявці. Кращими бактеріальними клітинами є клітини EG10327 *B.thuringiensis*, однак, у даному винаході можуть бути також використані бактеріальні клітини, такі як, *B.thuringiensis*, *B.megaterium*, *B.subtilis*, *E.coli*, або *Pseudomonas spp.*, трансформовані ДНК-сегментом, описаним у даний заявці, і такі, що експресують кристалічний білок.

У третьому, важливому варіанті даного винаходу, біоінсектицидна композиція містить дуст, порошок, що змочується, гранули, або колоїдальний концентрат. Вищезгаданий порошок містить бактеріальні клітини, що експресують новий кристалічний білок, описаний у даний заявці. Кращими бактеріальними клітинами є клітини EF10327 *B.thuringiensis*, однак, у даному винаході можуть бути також використані бактеріальні клітини, такі як, *B.thuringiensis*, *B.megaterium*, *B.subtilis*, *E.coli*, або *Pseudomonas spp.*, трансформовані ДНК-сегментом, описаним у даний заявці, і такі, що експресують кристалічний білок. Такі сухі форми інсектицидних композицій можуть бути виготовлені так, щоб вони відразу розчинялися після їхньої змочування; або альтернативно, вони можуть бути виготовлені у виді композицій із регульованим вивільненням, із пролонгованим вивільненням, або з яким-небудь іншим залежним від часу вивільненням.

У четвертому важливому варіанті здійснення даного винаходу, біоінсектицидна композиція містить водяну суспензію бактеріальних клітин, описаних вище, що експресують кристалічний білок. Такі водяні суспензії можуть бути виготовлені у виді маткового концентрованого розчину, що розводять безпосередньо перед застосуванням, або альтернативно, вони можуть бути виготовлені у виді готового розведеного розчину.

У цих способах, що передбачають використання бактеріальних клітин, клітини-хазяїни, що містять ген(и) кристалічного білка, можуть бути культивовані в будь-якому стандартному живильному середовищі, у якому ДНК-конструкція має селективну перевагу для даного селективного середовища, так, щоб, в основному, усі, або абсолютно всі клітини містили ген *B.thuringiensis*. Ці клітини можуть бути потім зібрані стандартним способом.

Альтернативно, ці клітини можуть бути оброблені до їхнього збору.

Якщо інсектицидні композиції містять інтактні клітини *B.thuringiensis*, що експресують потрібний білок, то такі бактерії можуть бути отримані декількома шляхами. Вони можуть бути отримані у виді порошків, що змочуються, гранул або дуетів шляхом їхнього змішування з різними інертними матеріалами, такими як, неорганічні мінерали (філосилікати, карбонати, сульфати, фосфати, і т.і.) або з рослинними матеріалами (здрібненими кукурудзяними початками, рисовою лушпайкою, горіховою шкаралупою, і т.і.). Ці композиції можуть включати адгезивні добавки, що стабілізують агенти, інші пестициди добавки, або поверхнево-активні речовини. Рідкі композиції можуть бути виготовлені на водяній основі, або вони можуть бути безводними і використані у виді піни, суспензій, концентратів, що емульгуються, або т.і. Інгредієнтами цих композицій можуть бути реологічні агенти, поверхнево-активні речовини, емульгатори, що диспергують агенти, або полімери.

Альтернативно, нові білки CryET33 і/або CryET34 можуть бути отримані за допомогою нативних або рекомбінантних систем, що експресують, *in vitro* і виділені для наступного застосування на полях. Такий білок може бути присутнім у неочищених клітинних лізатах, суспензіях, колоїдах, і т.і., або альтернативно, перед введенням в активний біоцидний препарат, він може бути виділений, очищений, забуферений, і/або підданий якійсь додатковій обробці. Аналогічним способом, у деяких випадках, може статися бажаним виділити кристали і/або спори з бактеріальних культур, що експресують кристалічний білок, і використовувати розчини, суспензії, колоїдні препарати, що містять ці кристали і/або спори, у якості активної біоінсектицидної композиції.

Незалежно від способу застосування, кількість активного компонента (компонентів) є інсектицидно-ефективною кількістю, що може варіюватися в залежності від таких чинників, як наприклад, конкретний вид твердокрилої комах, проти якого спрямований інсектицид; конкретний вид оброблюваної рослини або культури; умови навколишнього середовища, а також спосіб, норма, і кількість інсектицидно активної композиції, що наноситься.

Описані інсектицидні композиції можуть бути виготовлені з використанням бактеріальних клітин, суспензій кристалів і/або спор, або виділених білкових компонентів у сполученні з агрономічно прийнятним носієм. Перед застосуванням, ці композиції можуть бути виготовлені у відповідному виді, наприклад, у ліофілізованому, осушеному шляхом виморожування, осушеному в десікаторі, або у водяному носії, у середовищі або у відповідному розріджувачі, такому як, фізіологічний розчин або інший буфер. Отримані композиції можуть бути виготовлені у виді дусту або гранульованого матеріалу, або суспензії в маслі (рослинному або мінеральному), або у виді водяних емульсій або емульсій типу "вода/масло", або у виді порошку, що змочується, або в комбінації з будь-яким іншим матеріалом-носієм, що підходить для застосування в агрономічних цілях. Відповідні агрономічні носії можуть бути твердими або рідкими, і добре відомі фахівцям. Термін "агрономічно прийнятний носій" включає всі ад'юванти, наприклад, інертні компоненти, що диспергують агенти, поверхнево-активні речовини, адгезивні агенти, зв'язувальні речовини, і т.і., що звичайно використовуються в технології виготовлення інсектицидних препаратів, і який добре відомі фахівцям в області виготовлення інсектицидних препаратів. Ці композиції можуть бути змішані з одним або декількома твердими або рідкими ад'ювантами, і отримані різними способами, наприклад, шляхом гомогенного змішування, змішування і/або здрібнювання інсектицидної композиції з відповідними ад'ювантами, із використанням стандартної техніки виготовлення інсектицидних препаратів.

Інсектицидні композиції даного винаходу наносять на ділянки, що уражаються цільовими твердокрилими комахами, звичайно на листи потребує захисту рослин або культур, стандартними способами, переважно, шляхом оприскування. Інтенсивність і тривалість обробки залежить від умов, характерних для конкретного виду шкідника (шкідників), оброблюваної культури (культур) і конкретних умов навколишнього середовища. Співвідношення між кількостями активного інгредієнта і носія звичайно залежить від хімічної природи, розчинності і стабільності інсектицидної композиції, а також від конкретно використовуваної композиції.

Може також статися доцільним, а в деяких випадках і необхідним, наприклад, у випадку комах, що уражають корені або стебла, або для обробки овочів-делікатесів або декоративних рослин, використовувати іншу техніку нанесення композиції, наприклад, запилення, розбризкування, пропитку, зрошення ґрунту, нанесення на насіння (протравка), нанесення на сход, оприскування, розбризкування з літака (аерація), аерозольне дощування, дрібнодисперсне оприскування, і т.і. Ці способи нанесення інсектицидів також добре відомі фахівцям.

Інсектицидна композиція даного винаходу може бути використана в способі даного винаходу як окремо, так і в сполученні з іншими сполуками, включаючи (але не обмежуючись ними) інші пестициди. Спосіб даного винаходу може бути також використаний у сполученні з обробкою іншими засобами, такими як, поверхнево-активні речовини, детергенти, полімери, або препарати з пролонгованим вивільненням. Інсектицидні композиції даного винаходу можуть бути виготовлені для системного або для місцевого застосування.

Концентрація інсектицидної композиції, що використовується для нанесення на ділянки, які оточують дану рослину, для системного внесення, або для нанесення на листи рослини, може широко варіюватися в залежності від природи конкретної композиції, способу обробки, умов навколишнього середовища, і ступеню біологічної активності композиції. Звичайно, біоінсектицидна композиція присутня у препараті, що наноситься, в концентрації, яка становить, принаймні, біля 1% мас, і може доходити аж до біля 99% мас, включно. Сухі препарати можуть містити від біля 1% до біля 99%, або більш по масі композиції, а рідкі препарати можуть містити від біля 1% до біля 99% мас. або більш активного інгредієнта. Препарати, що включають інтактні бактеріальні клітини, звичайно містять від біля 10^4 до біля 10^7 клітин/мг.

Інсектицидна композиція може бути нанесена на конкретну рослину або на потрібну ділянку шляхом одного або декількох обробок, якщо це необхідно; при цьому, при звичайній польовій обробці, норма внесення на один гектар складає порядку від біля 50г до біля 500г активного інгредієнта, або від біля 500г до біля 1000г, або

від біля 1000г до біля 5000г або більш активного інгредієнта.

Малюнки складають частину опису даного винаходу і додатково ілюструють деякі аспекти даного винаходу. Для кращого розуміння даного винаходу нижче наводиться більш докладний опис конкретних варіантів його здійснення з посиланнями на один або декілька з цих малюнків.

На Фіг.1А, Фіг.1В і Фіг.1С показані нуклеотидні послідовності гена *cryET33* (SEQ ID №1) і гена *cryET34* (SEQ ID №2), і виведені амінокислотні послідовності білка *CryET33* (SEQ ID №3) і білка *CryET34* (SEQ ID №4).

На Фіг.2 показана рестрикційна карта плазмиди *pEG246*. Розташування й орієнтація гена *cryET33* (SEQ ID №1) і гена *cryET34* (SEQ ID №2) показані стрілками. Плазміда *pEG246* є функціональною в *E.coli*, оскільки вона походить від *pBR322*, і резистентна до ампіциліну (Amp^R). Для сайтів розщеплення ендонуклеазами, що рестрикують, були використані наступні скорочення: R=*EcoRI*, B=*BamHI*. На Фіг.2 також показаний маркер розміру в одну тисячу пар основ (1kb).

На Фіг.3, де також приведені первинні структури й у тому ж масштабі, що на Фіг.2, показана рестрикційна карта плазмиди *pEG1246*. Розташування й орієнтація гена *cryET33* (SEQ ID №1) і гена *cryET34* (SEQ ID №2) зазначені стрілками. Плазміда *pEG1246* походить від плазмиди *pEG246* (Фіг.2) і містить плазмиду *pNN101 Bacillus spp* (який експресує ген резистентності до хлорамфеніколу [*Cam*^R] і ген резистентності до тетрацикліну [*Tet*^R], вставлену в *BamHI*-сайт плазмиди *pEG246*. Плазміда *pEG1246* є функціональною як у *E.coli*, так і в *B.thuringiensis*. На цьому малюнку були використані ті ж самі скорочення, що і на Фіг.2.

Опис ілюстративних варіантів здійснення винаходу

Деякі переваги даного винаходу

Штам EG 10327 *B.thuringiensis* є природним штамом, що має інсектицидну активність проти твердокрилих комах, включаючи довгоносика бавовняного, личинки хруща каштанового (*Tribolium castaneum*), і личинки японського жука (*Popillia japonica*). Штам EG2158 *B.thuringiensis* містить гени кристалічного білка, токсичного для твердокрилих комах, що аналогічні або ідентичні генам кристалічного білка штаму EG10327. Два гени нових кристалічних токсинів, позначені *cryET33* і *cryET34*, були клоновані з EG2158. Ген *CryET33* кодує кристалічний білок *CryET33* розміром 29кДа, а ген *cryET34* кодує кристалічний білок *CryET34* розміром 14кДа. Кристалічні білки *CryET33* і *CryET34* є токсичними для личинки хруща каштанового, личинки довгоносика бавовняного, і личинки японського жука.

Визначення

Нижче визначені значення наступних термінів і понять:

Експресія: комбінація внутрішньоклітинних процесів, включаючи транскрипцію і трансляцію, яким піддається кодуюча ДНК-молекула, така як, структурний ген, для продукування поліпептиду.

Промотор: сайт розпізнавання на ДНК-послідовності або групи ДНК-послідовностей, що забезпечує регуляцію експресії структурного гена, і з яким специфічно зв'язується РНК-полімераза, ініціюючи синтез РНК (транскрипцію) цього гена.

Регенерація: процес вирощування рослини з рослинної клітини (наприклад, із протопласту або експлантату рослини).

Структурний ген: ген, що експресується з продукуванням поліпептиду.

Трансформація: процес введення екзогенної ДНК-послідовності (наприклад, вектори, рекомбінантної ДНК-молекули) у клітину або протопласт, у якій (або в якому) ця екзогенна ДНК вбудовується в хромосому цієї клітини і має здатність реплікуватися.

Трансформована клітина: клітина, ДНК якої модифікована шляхом введення в цю клітину молекули екзогенної ДНК.

Трансгенна клітина: будь-яка клітина, що походить, або регенерована, з трансформованої клітини, або походить з трансгенної клітини. Прикладами трансгенних клітин є калюси рослин, що походять від трансформованої рослинної клітини, а зокрема, від такої клітини, як клітина листа, кореню, стебла, наприклад, соматичні клітини або репродуктивні клітини, отримані від трансгенної рослини.

Трансгенна рослина: рослина або її потомство, що походить від трансформованої рослинної клітини або протопласта, де ДНК цієї рослини містить уведену екзогенну ДНК-молекулу, що не присутня у нативній нетрансгенній рослині того ж самого виду. Терміни "трансгенна рослина" і "трансформована рослина" іноді використовуються фахівцями як синоніми для визначення рослини, ДНК який містить екзогенну ДНК-молекулу. Однак, зовсім очевидно, що більш правильним із наукового погляду визначенням терміна "трансгенна рослина" є "регенерована рослина або калюс, отримані з трансформованої рослинної клітини або протопласта", і нижче, при використанні цього терміна буде матися на увазі саме цей зміст.

Вектор: ДНК-молекула, здатна реплікуватися у клітині -хазяїні, і/або ДНК-молекула, до якої може бути правильно приєднаний інший ДНК-сегмент так, щоб це приєднання забезпечувало реплікацію приєднаного сегмент. Типовим вектором є плазміда.

Зонди і праймери

В іншому аспекті даного винаходу, інформація про ДНК-послідовність, отримана завдяки даному винаходу, дозволяє одержувати відносно короткі ДНК (або РНК)-послідовності, що володіють здатністю специфічно гібридизуватися з генними послідовностями обраних поліолігонуклеотидів, описаних у даний заявці. У цих аспектах, нуклеїнокислотні зонди відповідної довжини одержують виходячи з генної послідовності обраного кристалічного білка, наприклад, такої послідовності, як показана в SEQ ID №1 або SEQ ID №2. Здатність таких ДНК і нуклеїнокислотних зондів специфічно гібридизуватися з послідовністю гена, який кодує кристалічний білок, робить їх особливо цінними для використання в різних цілях. Найбільш важливо, що ці зонди можуть бути використані в ряді аналізів для виявлення присутності комплементарних послідовностей у даному зразку.

У деяких варіантах даного винаходу, переважно використовувати олігонуклеотидні праймери. Послідовність таких праймерів конструюють із використанням полінуклеотиду даного винаходу для детекції, ампліфікації або мутації визначеного сегмента гена кристалічного білка *B.thuringiensis* із використанням Рск™-технології. З використанням таких праймерів за допомогою PCR™ можуть бути також ампліфіковані сегменти генів родинних кристалічних білків, що походять від інших видів.

Для досягнення визначених переваг даного винаходу, кращими нуклеїнокислотними послідовностями для досліджень або аналізів, проведених методом гібридизації, є послідовності, які комплементарні, принаймні, ділянці, що складається з 14-30 нуклеотидів, або більш довгій ділянці послідовності, що кодує кристалічний білок, такий як, послідовність, показана в SEQ ID №1 або SEQ ID №2. Розмір фрагмента, принаймні, у 14 нуклеотидів, дає гарантію того, що цей фрагмент буде мати довжину, достатню для утворення як стабільної, так і селективної дуплексної молекули. Молекули, що мають комплементарні послідовності більшої довжини, чим у 14 основ, звичайно є більш кращими, хоча б для підвищення стабільності і селективності гібриду, і тим самим для підвищення якості і ступеню специфічності отриманих гібридних молекул. В основному, переважно сконструювати нуклеїнокислотні молекули, що мають комплементарні ділянки генів довжиною 14-20 нуклеотидів, або навіть більш довгі ділянки. Такі фрагменти можуть бути легко отримані, наприклад, шляхом прямого синтезу фрагмента хімічними методами, шляхом застосування техніки репродукування нуклеїнових кислот, такої як, PCR™-технологія, [описана в патентах США №4683195 і 4683202], які вводяться в даний опис за допомогою посилання, або шляхом вирізання обраних ДНК-фрагментів із рекомбінантних плазмід, що містять відповідні вставки і відповідні рестрикційні сайти.

Вектори, що експресують

У даному винаході розглядається вектор, що експресує, який містить полінуклеотид даного винаходу. Таким чином, в одному з варіантів даного винаходу, вектором що експресує, є виділена й очищена ДНК-молекула, яка містить промотор, правильно приєднаний до кодуючої області, що кодує поліпептид даного винаходу, і яка правильно з'єднана з областю термінації транскрипції, у результаті чого зазначений промотор регулює транскрипцію області, що кодує.

Використовуваний у даний заявці термін "правильно приєднаний" означає, що промотор з'єднаний з областю, що кодує, таким чином, що транскрипція цієї кодуючої області контролюється і регулюється цим промотором. Способи правильного приєднання промотору до області, що кодує, добре відомі фахівцям.

У кращому варіанті здійснення винаходу, рекомбінантна експресія ДНК, що кодують кристалічні білки даного винаходу, відбувається, переважно, у клітинах-хазяїнах *Bacillus*. Кращими клітинами-хазяїнами є *B.thuringiensis*, *B.megaterium*, *B.subtilis* і інші бацили, а найбільш кращими клітинами-хазяїнами є клітини *B.thuringiensis*. Промотори, що функціонують у бактеріях, добре відомі фахівцям. Типовим і кращим промотором для кристалічних білків *Bacillus* є будь-який із відомих промоторів генів кристалічних білків, включаючи промотори генів *cruET33* і *cruET34*. Альтернативно, промотори мутованого або рекомбінантного гена, що кодує кристалічний білок, можуть бути штучно сконструйовані фахівцем і використані для стимуляції експресії нових генних сегментів, описаних у даний заявці.

В альтернативному варіанті здійснення винаходу, рекомбінантну експресію ДНК, що кодують кристалічний білок даного винаходу, здійснюють із використанням трансформованої грам-негативної бактерії, такої як, клітина-хазяїн бактерії *E.coli* або *Pseudomonas spp.* Промотори, що функціонують із високим рівнем експресії цільових поліпептидів у *E.coli* і в інших грам-негативних клітинах-хазяїнах, також добре відомі фахівцям.

У випадку, коли вектор даного винаходу, що експресує, використовується для трансформації рослини, вибирають такий промотор, який здатний регулювати експресію в рослинах. Промотори, що функціонують у рослинах також добре відомі фахівцям. Промоторами, що підходять для експресії поліпептиду в рослинах, є індукцйбельні, вірусні, синтетичні, і конститутивні промотори, описані в літературі [Poszkowski et al., 1989; Odell et al., 1985], і промотори з тимчасовою регуляцією, просторовою регуляцією, і з просторово-тимчасовою регуляцією [Spaї et al., 1989].

Промотор вибирають також за його здатністю направляти транскрипційну активність трансформованих рослинних клітин або трансгенних рослин в область, що кодує. Структурні гени можуть знаходитися під контролем ряду промоторів у тканинах рослин. Промотори можуть бути майже-конститутивними промоторами, такі як, як промотор 35S CaMV, або ткане-специфічними або стадієспецифічними промоторами, що функціонують у дводольних або однодольних рослинах.

Якщо промотором є майже-конститутивний промотор, такий як, промотор 35S CaMV, то посилення експресії поліпептиду спостерігається в ряді тканин трансформованої рослини (наприклад, у кал юсі, листах, насіннях і в корені). Дія, що альтернативно трансформує, може бути спрямована на специфічні тканини рослин шляхом використання вектора рослини, що інтегрує, який містить тканеспецифічний промотор.

Прикладами тканеспецифічного промотору є промотор лектину, що є специфічним для тканини насіння. Білок лектин у бобах сої кодується єдиним геном (*Lei*), що експресується тільки під час дозрівання, і становить від біля 2 до біля 5% від загальної мРНК насіння. Ген лектину і сім'яспецифічний промотор цілком охарактеризовані і використовуються для напрямку специфічної експресії в трансгенні рослини тютюну [Vodkin et al., 1983; Lindstrom et al., 1990].

Вектор, що експресує, який містить область, що кодує потрібний поліпептид, конструюють так, щоб ця область, яка кодує, знаходилася під контролем промотору лектину, і цей вектор вводять у рослини з використанням, наприклад, методу трансформації протопластів [Dhir et al., 1991]. Експресія поліпептиду специфічно направляється в насіння трансгенної рослини.

Трансгенна рослина даного винаходу, що продукується із рослинної клітини, трансформованої

тканеспецифічним промотором, може бути схрещена з іншою трансгенною рослиною, вирощеною із рослинної клітини, трансформованої іншим тканеспецифічним промотором, з одержанням гібридної трансгенної рослини, що виявляє ефекти трансформації в більш, ніж одній специфічній тканині.

Прикладами тканеспецифічних промоторів є промотор сахарозо-синтетази 1 кукурудзи [Yang et al., 1990], промотор алкоголь-дегідрогенази 1 кукурудзи [Vogel et al., 1989], промотор світлозбираючого комплексу кукурудзи [Simpson, 1986], промотор білка теплового шоку кукурудзи [Odell et al., 1985], промотор невеликої суб'єдиниці карбоксилази RuPB гороху [Poulsen et al., 1986; Cashmore et al., 1983], промотор манопінсинтази плазмиди Ti [Langridge et al., 1989], промотор нопалінсинтази плазмиди Ti [Langridge et al., 1989], промотор халкон-ізомерази петунії [Van Tunen et al], промотор багатого гліцином білка 1 бобів [Keller et al., 1989], промотор транскрипту 35S CaMV [Odell et al., 1985] і промотор пататину картоплі [Wenzler et al., 1989]. Кращими промоторами є промотор вірусу мозаїки кольорової капусти (CaMV 35S) і промотор невеликої суб'єдиниці S-E9 карбоксилази RuPB.

Вибір вектора, що експресує, і, у кінцевому рахунку, промотору кодуючої області поліпептиду, правильно приєднаного до цієї області, залежить безпосередньо від потрібних функціональних властивостей, наприклад, від розташування і часу експресії білка, і від клітини-хазяїна, що трансформується. Ці обмеження добре відомі фахівцям в області конструювання рекомбінантних молекул ДНК. Однак, вектором, що підходить для використання в даному винаході, є вектор, здатний регулювати експресію області поліпептиду, що кодує, до якої він правильно приєднаний.

Типові вектори, використовувані для експресії генів у вищих рослинах, добре відомі фахівцям, і такими векторами є вектори, що походять від плазмиди *Agrobacterium tumefaciens* (Ti), що індукуює пухлини [описаний Roger et al., 1987]. Однак, відомі і деякі інтегруючі векторні системи рослин, що функціонують у рослинах, включаючи плазмідний вектор регуляції переносу pCaMV CN, описаний у літературі (Fromm et al., 1985). Плазміда pCaMV CN (що постачається фірмою Pharmacia, Piscataway, NJ) включає промотор 353 вірусу мозаїки кольорової капусти CaMV.

У кращому варіанті здійснення винаходу, вектор, використовуваний для експресії поліпептиду, включає селективний маркер, що є ефективним у рослинній клітині, переважно, селективний маркер резистентності до лікарського засобу. Кращим маркером селективності до лікарського засобу є ген, експресія якого приводить до резистентності до канаміцину, тобто, химерний ген, що містить промотор нопалін-синтази, неоміцин-фосфотрансферази II Tn5 (nptII), і 3'-область нопалін-синтази, що не транскрибується, [описану Rogers et al., 1988].

РНК-полімераза транскрибує ДНК-послідовність, яка кодує, за допомогою сайту поліаденілування. Звичайно, ДНК-послідовності, розташовані на декілька сотень пар основ нижче сайту поліаденілування, служать для термінації транскрипції. Ці ДНК-послідовності називаються областями термінації транскрипції. Ці області необхідні для ефективного поліаденілування транскрибованої матричної РНК (мРНК).

Способи одержання векторів, що експресують, добре відомі фахівцям. Вектори, що експресують (що трансформують), використовувані для трансформації рослин, і методи одержання цих векторів [описані в патентах США №№4971908, 4940835, 4769061 і 4757011], які вводяться в даний опис за допомогою посилання. Ці вектори можуть бути модифіковані так, щоб вони включали кодуючу послідовність даного винаходу.

Були розроблені різні методи для правильного з'єднання ДНК із векторами за допомогою комплементарних липких кінців або тупих кінців. Так, наприклад, комплементарні гомополімерні ділянки можуть бути додані до ДНК-сегмента, що вставляється, і до векторного ДНК. Потім вектор і ДНК-сегмент з'єднують за допомогою водневого зв'язку між гомополімерними "хвостами" з утворенням рекомбінантних ДНК-молекул.

Кодуючою областю, що кодує поліпептид, яка має здатність забезпечувати інсектицидну активність клітині, є переважно, ген, що кодує кристалічний білок CryET33 і CryET34 *B.thuringiensis*. У кращих варіантах здійснення винаходу, такий поліпептид має амінокислотну послідовність SEQ ID №3 або SEQ ID №4, або функціональний еквівалент цих послідовностей. Відповідно до таких варіантів, кращою є також кодуюча область, що містить ДНК-послідовність SEQ ID №1 або ДНК-послідовність SEQ ID №2.

Характеризація нових кристалічних білків

Даний винахід стосується нових поліпептидів, що складають весь або частину кристалічного білка CryET33 або CryET34 *B.thuringiensis*.

У кращому варіанті даного винаходу описаний і заявлений виділений і очищений білок CryET33. Білок CryET33 включає послідовність із 267 амінокислот, і має обчислену молекулярну масу 29,216Да. Білок CryET33 має обчислену ізоелектричну константу (pI), рівну 4/78. Амінокислотний склад білка CryET33 наводиться в таблиці 3.

Таблиця 3					
Амінокислотний склад білка CryET33					
Амінокислота	# Залишки	% усіх залишків	Амінокислота	# Залишки	% усіх залишків
Ala	14	(5,2)	Leu	12	(4,5)
Arg	5	(1,9)	Lys	14	(5,2)
Asn	22	(8,2)	Met	3	(1,1)
Asp	12	(4,5)	Phe	11	(4,1)
Cys	2	(0,7)	Pro	12	(4,5)
Gln	7	(2,6)	Ser	22	(8,2)
Glu	15	(5,6)	Thr	39	(14/5)

Gly	18	(6,7)	Trp	2	(0,7)
His	3	(1,1)	Tyr	14	(5,2)
Ile	17	(6,3)	Val	23	(8,6)
Кислотна	(Asp+Glu)			27	(10,0)
Основа	(Arg+Lys)			19	(7,1)
Ароматична	(Phe+Trp+Tyr)			27	(10,0)
Гідрофобна	(Ароматична-Ile+Leu+Met+Val)			82	(30,5)

В іншому кращому варіанті даного винаходу описаний і заявлений виділений і очищений білок CryET34. Білок CryET34 включає послідовність із 126 амінокислот, і має обчислену молекулярну масу 14,182 Так. Білок CryET34 має обчислену ізоелектричну константу (pI), рівну 4,26. Амінокислотний склад білка CryET34 наводиться в таблиці 4.

Таблиця 4					
Амінокислотний склад білка CryET34					
Амінокислота	# Залишки	% усіх залишків	Амінокислота	# Залишки	% усіх залишків
Ala	5	(3,9)	Leu	4	(3,1)
Arg	2	(1,6)	Lys	8	(6,3)
Asn	6	(4,7)	Met	2	(1,6)
Asp	11	(8,7)	Phe	4	(3,1)
Cys	2	(1,6)	Pro	8	(6,3)
Gln	4	(3,1)	Ser	9	(7,1)
Glu	ξ	(5,5)	Thr	13	(10,2)
Gly	11	(8,7)	Trp	3	(2,4)
His	1	(0,8)	Tyrr	11	(8,7)
Ile	8	(6,3)	Val	7	(5,5)
Кислотна	(Asp+Glu)			18	(14,2)
Основа	(Arg+Lys)			10	(7/9)
Ароматична	(Phe+Trp+Tyr)			18	(14,2)
Гідрофобна	(Ароматична-Ile+Leu+Met+Val)			39	(30,7)

Номенклатура нових білків

Автори даного винаходу довільно позначили нові білки CryET33 і CryET34. Аналогічним способом, нові нуклеїнокислотні послідовності, що кодують ці поліпептиди, були довільно позначені cryET33 і cryET34, відповідно. Формальне надання позначення гену і білку засновано на переглянутій номенклатурі ендотоксинів кристалічних білків (таблиця 1) відповідно до рішення Комітету по номенклатурі *B.thuringiensis*, створеного для систематичної класифікації кристалічних білків *B.thuringiensis*. Автори даного винаходу вважають, що ці довільно привласнені позначення будуть замінені офіційною номенклатурою, установленою для цих послідовностей.

Трансформовані клітини-хазяїни і трансгенні рослини

До інших аспектів даного опису відносяться способи і композиції для трансформації бактерії, дріжджової клітини, рослинної клітини, або цілої рослини одним або декількома векторами, що експресують, які містять генний сегмент, що кодує кристалічний білок. Ще одним варіантом даного винаходу є трансгенна бактерія, дріжджова клітина, рослинна клітина або рослина, отримана в результаті такого процесу трансформації, або потомство і насіння, що походять від такої трансгенної рослини.

Методи трансформації бактеріальних і дріжджових клітин добре відомі фахівцям. Звичайно, використовувані способи трансформації аналогічні добре відомим способам, застосовуваним для трансформації інших бактерій або дріжджів, таких, як *E.coli* або *Saccharomyces cerevisiae*. Методи трансформації ДНК рослинної клітини включають *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію, трансформацію протопластів, перенос гена в пилкок, ін'єкцію в репродуктивні органи, ін'єкцію в незрілі ембріони і бомбардування частками. Кожний метод має свої особливі переваги і недоліки. Так, наприклад, один конкретний метод введення генів у конкретний вид рослини не обов'язково повинний бути найефективнішим для введення гена в інший вид рослини; однак, фахівцям добре відомо, які із цих методів можуть бути використані для даного конкретного виду рослини.

Існує багато методів введення ДНК-сегментів, що трансформують, у клітини, але не усі вони є відповідними для доставки ДНК у рослинні клітини. Відповідним методом є, мабуть, практично будь-який метод, за допомогою якого ДНК може бути введена в клітину, наприклад, такий як, інфікування агробактерією *Agrobacterium*, пряма доставка ДНК, наприклад, така як, ПЕГ-опосередкована трансформація протопластів [Omirulh et al., 1993], упродовження ДНК шляхом висушування/інгібування, електропорація, шляхом розмішування з волокнами з карбиду кремнію, шляхом прискорення ДНК-покритих часток, і т.і. У деяких варіантах здійснення винаходу, кращими методами є, наприклад, бомбардування мікрочастинками, і т.і. Техніка введення ДНК у клітини добре відома фахівцям. Були описані чотири загальних методи доставки гена в клітини: (1) хімічні методи [Graham & van der Eb, 1973; Zatloukal et al./ 1992]; (2) фізичні методи, такі як, мікроінжекція (Сарессі, 1980), електропорація [Wong & Neumann, 1982; Fromm et al., 1985; патент США №5 384253] і "метод пострілу з дробовика" [Johnston & Tang, 1994; Fynan et al., 1993]; (3) методи з використанням вірусних векторів [Clapp, 1993; Lu et al., 1993; Eglitis & Anderson, 1988a; 1988b]; і (4) методи на основі опосередкованих рецепторами

механізмів [Curiel et al., 1991; 1992; Wagner et al., 1992].

Електропорація

Додавання коротких електричних імпульсів високої напруги до ряду клітин тварин і рослин приводить до утворення пір нанометрового розміру в плазматичній мембрані. ДНК уводиться прямо в цитоплазму клітини або через ці пори, або в результаті перерозподілу мембранних компонентів, що супроводжує закриття пір. Електропорація може бути винятково ефективною, і може бути використана як для короточасної експресії генів клонів, так і для одержання клітинних ліній, що несуть інтегровані копії потрібного гена. На відміну від трансфекції, проведеної з використанням фосфату кальцію, і за допомогою злиття протопластів, електропорація часто дозволяє одержувати клітинні лінії, що несуть одну, або, у більшості випадків, декілька інтегрованих копій чужорідної ДНК.

Метод уведення ДНК у клітину шляхом, електропорації добре відомий фахівцям. У цьому методі, деякі ферменти, що руйнують клітинну стінку, такі як, ферменти, що розкладають пектин, використовують для того, щоб зробити реципієнтні клітини-мішені більш сприйнятливими для трансформації шляхом електропорації, чим неопрацьовані клітини. Альтернативно, клітини-реципієнти роблять більш сприйнятливими до трансформації шляхом механічного uszkodження. Для здійснення трансформації шляхом електропорації можна використовувати або більш тендітні тканини, такі як, суспензійна культура клітин, або ембріонний калюс; або альтернативно, можна безпосередньо трансформувати незрілі ембріони, або інші організовані тканини. Для цього, стінку потрібної клітини піддають частковій деградації шляхом її обробки ферментами, що розкладають пектин, (пектолазами), або механічному uszkodженню регульованим способом. Після цього такі uszkodжені клітини стають реципієнтами для переносу ДНК шляхом електропорації, що може бути здійснена на цій стадії, а потім трансформовані клітини ідентифікують шляхом відповідного добору або відповідно до протоколу скринінгу в залежності від природи нововведеної ДНК.

Бомбардування мікрочастинками

Більш кращим методом упровадження ДНК-сегментів, що трансформують, у рослинні клітини є бомбардування цих клітин мікрочастинками. У цьому методі, частки можуть бути покриті нуклеїновими кислотами і введені в клітини за допомогою сили, що прискорює. Прикладами таких часток є частки, що складаються із вольфраму, золота, платини, і т.і.

Перевага методу бомбардування мікрочастинками, крім того, що він є ефективним способом здійснення стабільної щодо відтворення трансформації однодольних рослин, полягає ще й у тому, що для нього не потрібно ні виділення протопластів [Cristou et al., 1988], ні повідомлення клітинам сприйнятливості до *Agrobacterium*-інфекції. Ілюстративним прикладом методу доставки ДНК у клітини кукурудзи шляхом прискорення часток є біобалістична система доставки часток (Biolistics Particle Delivery System), яка може бути використана для проштовхування часток, покритих ДНК, або клітин через екран, що загороджує, такий як, як екран із нержавіючої сталі або екран Nyltex, на поверхню фільтра, покритого клітинами кукурудзи, культивованими в суспензії. Цей екран диспергує частки так, що вони не можуть бути доставлені в клітини-реципієнти у виді великих агрегатів. Очевидно, що це загородження, яке знаходиться між апаратом для "пострілу", і клітинами, що бомбардуються, сприяє зниженню розміру агрегатів часток, що бомбардують, і може забезпечувати більш високу частоту трансформації шляхом зменшення uszkodження, яке наноситься клітинам-реципієнтам занадто великими частками, що бомбардують.

Для здійснення бомбардування, переважно, щоб клітини в суспензії були сконцентровані на фільтрах або на твердому культуральному середовищі. Альтернативно, незрілі ембріони або інші клітини-мішені можуть бути поміщені на тверде культуральне середовище. Клітини, що бомбардуються, поміщують на відповідній відстані нижче пластини, що загороджує, яка перешкоджає проходженню "макровибухівки". Якщо необхідно, то між пристроєм, який прискорює, і клітинами, що бомбардуються, може бути поміщений один або декілька екранів, які загороджують. За допомогою використання техніки, описаної вище, можна одержати до 1000 або більш фокусів клітин, що короточасно експресують маркерний ген. Число клітин у фокусі, що експресує продукт екзогенного гена через 48 годин після бомбардування, часто становить від 1 до 10, а в середньому, 1-3.

При трансформації шляхом бомбардування, для одержання максимального числа стабільних трансформантів можна оптимізувати умови культивування перед бомбардуванням. У цій технології є дуже важливими як фізичні, так і біологічні параметри бомбардування. Фізичними чинниками є параметри, що відносяться до маніпуляції ДНК/осажденню мікрочастинок, або параметри, що впливають на траєкторію польоту і швидкість або макро-, або мікрочастинок. Біологічними чинниками є всі стадії здійснення маніпуляцій із клітинами перед і безпосередньо після бомбардування, осмотичне коректування клітин-мішеней для ослаблення uszkodження клітин, зв'язаних із бомбардуванням, а також природа що трансформує ДНК, така як, лінеаризована ДНК або інтактна суперспіральна плазмід. Очевидно, що маніпуляції, проведені перед бомбардуванням, мають особливо важливе значення для успішної трансформації незрілих ембріонів.

У зв'язку з цим, вважається, що для повної оптимізації умов може статися бажаним провести коректування різних параметрів бомбардування в маломасштабних дослідженнях. Може статися особливо кращим провести коректування таких фізичних параметрів, як розмір зазору, траєкторія польоту, товщина тканини, тиск гелію. Можна також мінімізувати чинники, що редукують пошкодження, (TRF), шляхом модифікації умов, які впливають на фізіологічний стан клітин-реципієнтів, і які можуть, тому, впливати на ефективність трансформації й інтеграції. Так, наприклад, осмотичний стан, гідратація тканини, і стан субкультури або клітинного циклу клітини-реципієнта можуть бути скоректовані для здійснення оптимальної трансформації. Здійснення інших рутинних маніпуляцій будуть легко зрозумілі кожному фахівцю виходячи з опису даного винаходу.

Agrobacterium-опосередкований перенос

Agrobacterium-опосередкований перенос являє собою широко використовувану систему для впровадження генів у рослинні клітини, оскільки в цьому випадку, ДНК може бути введена в тканині цілої рослини, що дозволяє уникнути необхідності регенерувати інтактну рослину з протопласту. Використання векторів для Agrobacterium-опосередкованого інтегрування з метою введення ДНК у рослинні клітини добре відомо фахівцям. Див., наприклад, методи, [описані Fraley et al., 1985; Roger et al., 1987]. Крім того, інтеграція Ті-ДНК є відносно точним способом, що приводить до декількох реаранжировок. Область прийнятної ДНК визначається прикордонними послідовностями, а інтрон звичайно вбудовується в геном рослини, [як описано Spielmann et al., 1986; Jorgensen et al., (1987)].

Існуючі в даний час вектори для трансформації агробактерією (Agrobacterium) здатні до реплікації в E.coli також добре, як і в Agrobacterium, що дозволяє проводити стандартні маніпуляції, [описані Klee et al., (1985)]. Крім того, недавні успіхи в одержанні векторів для Agrobacterium-опосередкованого переносу генів, дозволили удосконалити методи вбудовування генів і рестрикційних сайтів у вектори, що полегшило конструювання векторів, здатних експресувати гени, що кодують різні поліпептиди. Ці описані вектори [Rogers et al., 1987] мають стандартні мультілінкernі області, фланковані промотором і сайтом поліаденілування для прямої експресії інсертованих генів, що кодують поліпептид, і можуть бути використані з метою даного винаходу. Крім того, для трансформації може бути використана бактерія Agrobacterium, що містить гени активованої або інактивованої Ті. Завдяки тому, що цей метод забезпечує легкий і точний перенос генів, він може бути обраний для трансформації тих рослинних штамів, де Agrobacterium-опосередкована трансформація є ефективною.

Agrobacterium-опосередкована трансформація дисків листів і інших тканин, таких як, сім'ядоля і гіпокотиль (підсім'ядове коліно), мабуть, обмежена рослинами, що звичайно уражаються агробактерією. Agrobacterium-опосередкована трансформація є найбільш ефективною для дводольних рослин. Деякі однодольні рослини є, мабуть, природними хазяїнами для Agrobacterium, хоча були продуковані трансгенні рослини спаржі з використанням векторів на основі Agrobacterium, як [описано Bytebier et al. (1987)]. Тому, комерційно важливі зернові культури, такі як, рис, кукурудза, і пшениця, в основному, повинні бути трансформовані з використанням альтернативних методів. Однак, як було згадано вище, із використанням Agro-bacterium може бути також здійснена трансформація спаржі [див., наприклад, Bytebier et al., 1987].

Трансгенна рослина, продукована методами з використанням Agrobacterium, звичайно містить один ген на одній хромосомі. Можна сказати, що такі трансгенні рослини є гетерозиготними за доданим геном. Однак, оскільки використання слова "гетерозиготний" звичайно припускає присутність комплементарного гена в тому ж самому локусі другої хромосоми хромосомної пари, а в рослині, що містить один вищевказаний додатковий ген, такого гена немає, то, мабуть, що більш точним визначенням для такої рослини буде "незалежний сегрегант", оскільки доданий екзогенний ген незалежно сегрегує під час мітозу і мейозу.

Більш кращою трансгенною рослиною є рослина, гомозиготна за доданим структурним геном, тобто, трансгенна рослина, що містить два доданих гени: за одним геном в тому самому локусі на кожній хромосомі хромосомної пари. Гомозиготна трансгенна рослина може бути отримана шляхом статевого розмноження (самозапилення) трансгенної рослини незалежного сегреганту, що містить один доданий ген, а потім пророщування деяких з продукованих насіннь, і аналізу продукованих рослин на підвищену карбоксилазну активність у порівнянні з контрольною (нативною, нетрансгенною) або трансгенною рослиною незалежного сегреганту.

При цьому, слід зазначити, що дві різних трансгенних рослини можуть бути також схрещені для продукування потомства, що містить два сегрегуючих незалежно доданих екзогенних гени. Шляхом самозапилення відповідного потомства можна продукувати рослини, що є гомозиготними за обома доданими екзогенними генами, що кодують потрібний поліпептид. Передбачається також поворотне схрещування (бекросінг) із батьківською рослиною й ауткросінг із нетрансгенною рослиною.

Інші методи трансформації

Трансформація протопластів рослин може бути здійснена з використанням методів, заснованих на осадженні фосфатом кальцію, обробці поліетиленгліколем, електропорації, і комбінації цих обробок [див., наприклад, Potrykus et al., 1985; Lorz et al., 1985; Fromm et al., 1986; Uchimiya et al., 1986; Callis et al., 1987; Marcotte et al., 1988].

Застосування цих систем до різних видів рослин залежить від здатності даного виду рослини до регенерації з протопластів. Ілюстративні методи регенерації злакових культур із протопластів описані в літературі [Fujimura et al., 1985; Toriyama et al., 1986; Yamada et al., 1986; Ab-dullah et al., 1986].

Для трансформації тих видів рослин, що не можуть бути успішно регенеровані з протопластів, можуть бути використані інші методи впровадження ДНК у інтактні клітини або тканини. Так, наприклад, регенерація злаків із незрілих ембріонів або експлантатів може бути здійснена [як описано Vasil (1988)]. Крім цього, може бути використана техніка "вистрілювання часток" або високошвидкісна технологія з застосуванням мікрочастинок [Vasil, 1992].

З використанням останньої технології, ДНК упродовжують через клітинну стінку в цитоплазму шляхом її нанесення на поверхню дрібних металевих часток [як описане Klein et al., (1987); Klein et al., (1988); McCabe et al., (1988)]. Ці металеві частки проникають через шари клітин, а тому дають можливість здійснювати трансформацію клітин усередині експлантатів тканин.

Способи продукування резистентних до комах трансгенних рослин

Шляхом трансформації відповідної клітини-хазяїна, такої як, рослинна клітина, рекомбінантним сегментом, що містить ген *cryET33* і/або *cryET34*, експресія кристалічного білка, що кодується, (тобто, бактеріального

кристалічного білка або поліпептиду, що має інсектицидну активність проти твердокрилих комах) може приводити до продукування резистентних до комах рослин.

Так, наприклад, для трансформації суспензії ембріонних рослинних клітин, таких як, пшениця або кукурудза, методом бомбардування часток [Maddock et al., 1991; Vasil et al., 1992] для доставки нанесеної на мікрочастинки ДНК у клітини-реципієнти, може бути використаний експресуючий вектор, що містить кодуючу область кристалічного білка *B.thuringiensis*, і відповідний селективний маркер. Потім трансгенні рослини регенерують із трансформованих ембріонних калюсів, що експресують інсектицидні білки.

Продукування трансгенних рослин може бути також здійснене з використанням інших методів трансформації клітини, відомих фахівцям, таких як, *Agrobacterium*-опосередкований перенос ДНК [Fraley et al., 1983]. Альтернативно, ДНК може бути введена в рослини шляхом прямого переносу ДНК у пилос [Znou et al., 1983; Hess, 1987; Luo et al., 1988] шляхом ін'єкції ДНК у репродуктивні органи рослини [Реп'яха et al., 1987], або шляхом прямої ін'єкції ДНК у клітини незрілих ембріонів із наступною повторною гідратацією осушених ембріонів [Neuhaus et al., 1987; Benbrook et al., 1986].

Регенерація, вирощування і культивування рослин із трансформантів-протопластів однієї рослини або з різних трансформованих експлантатів добре відомі фахівцям (Weissbach & Weissbach, 1988). Цей процес регенерації і вирощування звичайно включає стадії добору трансформованих клітин, культивування цих окремо обраних клітин із здійсненням проміжних стадій вирощування ембріонів і висаджування паростків що пустили корені. Трансгенні ембріони і насіння регенерують аналогічним способом. Отримані трансгенні укорінені пагони потім висаджують у відповідне середовище для вирощування рослин, таке як, фунт.

Вирощування або регенерація рослин, що містять чужорідний екзогенний ген, що кодує потрібний поліпептид, уведений за допомогою *Agrobacterium*, із експлантатів листів можуть бути здійснені методами, добре відомими фахівцям і [описаними в літературі Horsch et al., 1985]. У цих методах, трансформанти культивують у присутності обраного агента й у середовищі, що індукуює регенерацію пагонів у трансформовану лінію рослини, [як описано Fraley et al., 1983].

Цей метод звичайно дозволяє продукувати пагони через 2-4 місяця, після чого ці пагони переносять у відповідне середовище, що стимулює утворення коренів і містить селективний агент й антибіотик для попередження росту бактерій. Потім, пагони, що утворюють корені в присутності селективного агента з утворенням паростків, пересаджують у ґрунт або інше середовище, що стимулює утворення коренів. Ці процедури варіюються в залежності від конкретно використовуваної лінії рослини, і такі варіанти добре відомі фахівцям.

Як обговорювалося вище, для одержання гомозіготних трансгенних рослин, переважно, щоб регенеровані рослини були самопильними. У будь-якому випадку, пилос, отриманий від регенерованих рослин піддають перехресному схрещуванню з вирощеними з насіння рослинами, що представляють агрономічну цінність, переважно інбредної лінії. І навпаки, пилос, отриманий від рослин цих цінних ліній, використовують для запилення регенерованих рослин. Трансгенну рослину даного винаходу, що містить потрібний поліпептид, культивують із використанням методики, добре відомої фахівцям.

Таким чином, трансгенна рослина даного винаходу має підвищену кількість кодуючої області, (наприклад, гена *cry*), яка кодує потрібний поліпептид *Cry*. Кращою трансгенною рослиною є незалежний сегрегант, і ця рослина може передавати зазначений ген і його активність потомству. Більш кращою є трансгенна рослина, гомозіготна за цим геном, і така, що передає цей ген усьому своєму потомству після статевого розмноження. Семена, отримані від трансгенної рослини, можуть бути вирощені в полі або в теплиці, і отримані зрілі трансгенні рослини піддають самозапиленню, у результаті чого продукуються рослини чистої генеалогічної лінії. Потомство цих рослин стає рослинами чистої генеалогічної лінії, що оцінюють, наприклад, на підвищену інсектицидну активність проти твердокрилих комах, переважно, у польових умовах, у визначеному інтервалі умов навколишнього середовища. Автори даного винаходу вважають, що особливо перспективним є створення трансгенних рослин, які представляють комерційну цінність, включаючи різні трави, що утворюють дерн, пшеницю, кукурудзу, рис, ячмінь, овес, ряд декоративних рослин і овочевих рослин, а також ряд горіхових і плодових дерев і рослин.

ПРИКЛАДИ

Нижченаведені приклади ілюструють кращі варіанти здійснення винаходу. При цьому, слід зазначити, що методи, описані в цих прикладах, ілюструють методику, розроблену автором даного винаходу для практичного здійснення винаходу, а тому можна вважати, що вони являють собою кращі способи його здійснення. Однак, у зв'язку з описом даного винаходу, варто врахувати, що в конкретних варіантах його здійснення може бути зроблена безліч змін з одержанням такого ж або схожого результату, але, при цьому, зазначені зміни не повинні виходити за рамки суті й об'єму даного винаходу.

ПРИКЛАД 1

Виділення EG10327 *B.thuringiensis*

Порошкоподібні зразки культури були отримані з різних джерел у регіонах США і за їхніми межами, звичайно з зернохосвищ. Зразки культури обробляли і розподіляли по чашках з агаром для виділення окремих колоній типу *Bacillus*, [як описано в патенті США №5264364].

Клонований ген *cry111A*, відомий, головним чином, як ген *cryC* штаму EG2158 *B.thuringiensis*, описаний Dono-van і ін. (1988), і клонований ген *cry111B2*, відомий, головним чином, як ген *cry111C* штаму EG4961 *B.thuringiensis*, описаний Donovan і ін. (1992), використовували у якості зондів у процедурах по гібридизації колоній. Зонд гена *cry111A* складався із радіоактивно міченого 2,0 т.і.о.-Hind111-XbaI-рестрикційного фрагмента ДНК, описаного Dono-van і ін. (1988). Зонд гена *cry111B2* складався із радіоактивно міченого 2,4

Т.п.о-Sspl-рестрикційного фрагмента ДНК, описаного Donovan і ін. (1992). Процедури по гібридизації колоній здійснювали як [описані в Патенті США. №5264364].

Приблизно 43000 колоній типу *Bacillus* від 54 порошкоподібних зразків культури, узятих із різних ділянок, зондували радіоактивно міченими зондами *cry111A* і *cry111B2*. Один порошкоподібний зразок культури від *Greece* містив приблизно 100 природних колоній типу *Bacillus*, що гібридизувались із зондами *cry111B2* і *cry111A*. Аналіз деяких із цих природних колоній дикого типу вказував на те, що вони були ідентичні колоніям *B.thuringiensis*, і одну колонію, позначену EG 10327, відбирали для подальшого дослідження. Штам EG10327 *B.thuringiensis* був депонований 14 грудня 1994 року під номером доступу №NRRL B-21365 відповідно до Будапештським договору про депонування культур.

Потім приблизно 84000 колоній типу *Bacillus* від 105 порошкоподібних зразків культур, узятих із різних ділянок, були також скриновані з використанням радіоактивно-мічених зондів *cry111B2* і *cry IIIA*, але ідентифікація яких-небудь інших штамів, що містять нові гени типу *cry111* виявилась безуспішною.

Було виявлено, що штам EG10327 *B.thuringiensis* мав інсектицидну дію проти личинок твердокрилих комах, особливо, хрущака каштанового, довгоносики бавовняного і японського жука. Штам EG10327 не мав інсектицидної дії проти Блошки длинновусої або колорадського жука яку можна виявити в умовах проведеного аналізу. Ген, названий "сry111A-усіченим" геном, виділяли зі штаму EG10327, і визначали його нуклеотидну послідовність. Було виявлено, що *cry111A*-усічений ген був ідентичний першим 2/3 гена *cryIIIa* (описаного Donovan і ін. (1988) як ген *cryC*), але не містив кінцеву 1/3 гена *cry111A*. Усічений ген *cry111A* штаму EG10327 продукував дуже невелику кількість (якщо взагалі продукував) інсектицидного білка і, крім того, не був охарактеризований.

ПРИКЛАД 2

Оцінка флагелярного серотипу штаму EG10327

Для характеристики штаму EG10327 були проведені деякі дослідження. Одне дослідження було проведено для характеристики його флагелярного серотипу. Отримані дані подані нижче:

флагелярний серотип штаму EG10327 визначали в лабораторії Dr.M-M.Lecadet в Інституті Пастера, Париж, Франція. Серотип EG10327 визначали методами, описаними H.de Barjac (1981), і було виявлено, що цим серотипом є *Bacillus thuringiensis* *kurstaki* (H3a, 3b, 3c). Було виявлено, що попередньо описані штами *B.thuringiensis*, що містять *cryIII*-родинні гени, являють собою серотип *morrisoni* (штам EG2158, що містить *cry111A*); серотип *tol-worthi* (штам EG2838, що містить *cry111B*); і штам *kumamotoensis* (штам EG4961, що містить *cry111B2*) (Rupar et al., 1991). EG10327 являє собою перший із виявлених штамів *B.thuringiensis* *kurstaki*, що є токсичним для твердокрилих.

ПРИКЛАД 3

Оцінка кристалічних білків штаму EG10327

Штам EG10327, крім того, оцінювали шляхом характеристики кристалічних білків, що він продукує. Ці дослідження здійснювали шляхом культивування штаму EG10327 у середовищі для споруляції DSG [0,8% (мас./об.) живильний бульйон Difco, 0,5% (мас./об.) глюкоза, 10мМ K_2HPO_4 , 10мМ KH_2PO_4 , 1мМ $Ca(NO_3)_2$, 0,5мМ $MgSO_4$, 10мМ $MnCl_2$, 10мМ $FeSO_4$]. Після цього, споруловану культуру, що містить спори і кристалічні білки, збирали шляхом центрифугування, і суспендували в деіонізованій воді. Кристалічні білки солюбілізували із суспензії спор і кристалів EG10327 шляхом інкубування суспензії в буфері для солюбілізації [0,14М Tris, pH8,0, 2% (мас./об.) додецилсульфату натрію (ДСН), 5% (об./об.) 2-меркаптоетанолу, 10% (об./об.) гліцерину, і 0,1% (мас./об.) бромфенолового синього] при 100°C протягом 5 хвилин.

Солюбілізовані кристалічні білки були фракціоновані за розміром за допомогою електрофорезу на акриламідному гелі (ДСН-ПААГ-аналіз). Після фракціонування за розміром, білки візуалізували шляхом фарбування барвником кумаси. ДСН-ПААГ-аналіз показав, що зі спорулованої культури EG10327 були солюбілізовані мажорний кристалічний білок розміром приблизно 29кДа, називаний далі білком CryET33, і мажорний кристалічний білок розміром приблизно 14кДа, називаний далі білком CryET34.

Потім, 29кДа-білок CryET33 і 14кДа-білок CryET34 штаму EG10327 були охарактеризовані шляхом визначення їх NH_2 -кінцевих амінокислотних послідовностей, як описано нижче. Спорувовану культуру EG10327 інкубували з буфером для солюбілізації і солюбілізовані кристалічні білки фракціонували за розміром на акриламідному гелі шляхом аналізу, проведеного за допомогою ДСН-ПААГ-електрофорезу. Білки переносили з гелю на нітроцелюлозний фільтр за допомогою стандартної техніки електроблотінгу. Білок CryET33 і білок CryET34, що переносили на фільтр методом електроблотінгу, візуалізували шляхом фарбування фільтра барвником кумаси. Частини фільтра, що містять білок CryET33 і білок CryET34, вирізували лезом бритви. У цьому способі, білки CryET33 і CryET34 були отримані в чистому виді як білки, перенесені методом блотінгу на окремі частини нітроцелюлозного фільтра.

З метою визначення NH_2 -кінцевої амінокислотної послідовності кожного білка, очищені білки CryET33 і CryET34, що містяться на частинах нітроцелюлозного фільтра, піддавали стандартній автоматизованій процедурі деградації за Едманом.

Було встановлено, що NH_2 -кінцевою послідовністю білка CryET33 штаму EG10327 є послідовність:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

GlyllelleAsnilleGlnAspGlulleAsnAsnTyrMetLysGluValTyrGlyAlaThr

(SEQ ID NO:5)

Було встановлено, що NH₂-кінцевою послідовністю білка CryET34 штаму EG10327 є послідовність:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

ThrValTyrAsnValThrPheThrIleLysPheTyrAsnGluGlyGluTrpGlyGlyPro

(Ala)

(Asn)

(SEQ ID NO:6)

Амінокислотні залишки, зазначені в дужках нижче послідовності білка CryET34, являють собою можливі альтернативні амінокислоти, що можуть бути присутні у білку CryET34 у даному положенні. Присутність альтернативних амінокислот можливо через неточність, що має місце при використанні автоматичної процедури деградації за Едманом при визначенні амінокислотних послідовностей білка.

Комп'ютерні алгоритми (Korn & Queen, 1984) використовували для порівняння N-кінцевих послідовностей білків CryET33 і CryET34 з амінокислотними послідовностями всіх кристалічних білків B.thuringiensis, що відомі авторам винаходу, включаючи послідовності всіх кристалічних білків B.thuringiensis, що були опубліковані в науковій літературі, міжнародних патентних заявках, або виданих патентах. Перелік кристалічних білків, послідовності яких опубліковані, а також джерела публікацій подані в таблиці 5.

Таблиця 5	
Кристалічні білка B.thuringiensis, описані в літературі	
Кристалічний білок	Джерело або посилання
CryIA(a)	J. Biol. Chem., 260:6264-6272
CryIA(b)	DNA, 5:305-314
CryIA(c)	Gene, 36:289-300
CryIB	Nucl. Acids Res., 16:4168-4169
CryIC	Nucl. Acids Res., 16:6240
CryICb	Appl. Environ. Micro., 59:1131-1137
CryIC(b)	Nucl. Acids Res., 18:7443
CryID	Nucl. Acids Res., 18:5545
CryIE	EPO 358 557 A2
CryIF	J. Bacteriol., 173:3966-3976
CryIG	FEBS, 293:25-28
CryV	WO 90/13651
Cry2A	J.Biol. Chem., 263:561-567
Cry2B	J. Bacteriol., 171:965-974
Cry2C	FEMS Microbiol. Lett. ,81:31-36
Cry3A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:7036-7040
Cry3B	Nucl. Acids Res., 18:1305
Cry3B2	Appl. Environ. Microbiol., 58:3921-3927
Cry3B3	U. S. 5,378,625
Cry3C	Appl. Environ. Microbiol., 58:2536-2542
Cry3D	Gene, 110:131-132
Cry4A	Nucl. Acids Res., 15:7195
Cry4B	EP0308,199
Cry4C	J. Bacteriol., 166:801-811
Cry4D	J. Bacteriol., 170:4732, 1988
Cry5	Molec. Micro., 6:1211-1217
Cry33AkD	WO 94/13785
Cry33BkD	WO 94/13785
Cry34kD	J. Bacteriol., 174:549-557

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Cry40kD	J. Bacteriol., 174:549-557
Cry201T635	WO 95/02693
Cry517	J. Gen. Micro., 138:55-62
Crya7A021	EPO 256,553B1
CryAB780RF1	WO 94/21795
CryAB780RF2	WO 94/21795
CryAB78100kD	WO 94/21795
Crybtpgs1208	EPO 382 990
Crybtpgs1245	EPO 382 990
Crybts02618A	WO 94/05771
CryBuibui	WO 93/03154
CryET4	U. S. 5,322,687
CryET5	U. S. 5,322,687
CryGei87	EPO 238,441
CryHD511	U. S. 5,286,486
CryHD867	U. S. 6,286,486
CryIPL	U.S. 5,231,008
CryMITS	JP 6000084
CryPS17A	WO 92/19739
CryPS17B	U. S. 5,350,576 and U. S. 5,424,410
CryP16	WO 95/00639
CryP18	WO 95/00639
C17P66	WO 95/00639
CryPS33F2	WO 92/19739 and U. S. 5,424,410
CryPS40D1	U. S. 5,273,746
CryPS43F	WO 93/04587
CryPS50Ca	WO 93/04587 and EPO 498,537 A2
CryPS50Cb	WO 93/15206
Cryps52A1	U.S. 4,849,217
CryPS63B	WO 92/1973 9
CryPS69D1	U. S. 5,424,410
Cryps71M3	WO 95/02694
CryPS80JJ1	WO 94/16079
CryPS811A	U. S. 5,273,746
CryPS811A2	EPO 405 810
Cryps81A2	EPO 401 979
CryPS811B	WO 93/14641
CryPS811B2	U. S. 5,273,746
Cryps81f	U. S. 5,045,469
Cryps81gg	U. S. 5,273,746
Cryps81rrl	EPO 401 979
Cryps86A1	U. S. 5,468,636
CryX	FEBSLett., 336:79-82
CryXenA24	WO 95/00647
CrycytA	Nucl. Acids Res., 13:8207-8217

Було виявлено, що N-кінцева послідовність білка CryET34 штаму EG10327 не має гомології з якими відомими кристалічними білками *B.thuringiensis*, ідентифікованими в таблиці 5.

ПРИКЛАД 4

Характеризація кристалічного білка cryET33 штаму EG2159

Було попередньо визначено, що 68кДа-cryIIIA-білок EG2159 (називаний білком CryC у роботі Donovan і ін., 1988) є токсичним для колорадського жука, але цей білок не був ідентифікований у штамі, що має інсектицидну активність для лускокрилих або двокрилих комах.

Штам EG2159 був отриманий із штаму EG2158 *B.thuringiensis* шляхом відпалення 150МДа-плазміді зі штаму EG2158 [як описане в роботі Donovan і ін., 1988]. Штам EG2159 був ідентичний штаму EG2158, за винятком того, що штам EG2159 не містив 150МДа-плазміді, яка присутня у штамі EG2158. Був виділений один із двох кристалічних білків, продукованих штамом EG2159, а саме, 68кДа-CryIIIA-білок, і був клонований і секвенований ген, що кодує цей білок. Ці результати були раніше описані авторами (Donovan і ін., 1988). Крім того, вид мінорного білка, 29кДа-білка EG2159, не був охарактеризований.

У цьому прикладі описана характеристика зазначеного кристалічного 29кДа-білка CryET33 від EG2159 *B.thuringiensis*.

Виділення кристалічних білків із EG2159

Кристалічні білки EG2159 були солюбілізовані шляхом суспендування споруюваної культури штаму EG2159, що містить спори і кристалічні білки, у буфері для солюбілізації білка при 80 °C протягом 3 хвилин.

Солюбілізовані кристалічні білки фракціонували за розміром шляхом електрофорезу в ПААГ із ДСН, і білки в ДСН-ПААГ-гелі візуалізували шляхом фарбування барвником кумаси. Гелеві зрізи, що містять 29кДа-білок, вирізували з ДСН-ПААГ-гелю лезом бритви, а білки виділяли з гелевих зрізів за допомогою стандартних процедур електроелекції. У результаті цих досліджень був отриманий очищений препарат білка CryET33 із штаму EG2159 *B.thuringiensis*.

NH₂-кінцеве секвенування 29кДа-білка

NH₂-кінцеву амінокислотну послідовність очищеного білка CryET33 визначали автоматичним методом деградації за Едманом. Як було визначено, Амінокислотою послідовністю NH₂-кінцевої частини 29кДа-білка є послідовність:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

Met Gly Ile Ile Asn Ile Gln Asp Glu Ile Asn ---

Tyr Met LysGluVal Tyr Gly Ala

(SEQ ID NO:7)

(SEQ ID NO:8)

Пунктирна лінія (---) у положенні 12 указує на те, що амінокислотний залишок не може бути визначений для білка CryET33 штаму EG2159.

Результати

Порівняння послідовності білка CryET33 штаму EG10327 (SEQ ID №5) із NH₂-кінцевою послідовністю раніше неохарактеризованого 29кДа-білка (Donovan і ін., 1988), що спостерігається в EG2159 (SEQ ID №7, SEQ ID №8), дало підставу припустити, що NH₂-кінець 29кДа-білка EG2159 ідентичний білку CryET33 штаму EG10327, за винятком початкового метіонінового (Met) залишку, що присутній у білку CryET33 штаму EG2159.

ПРИКЛАД 5

Виділення ДНК-фрагмента, що включає гени cryET33 і cryET34, із штаму EG2158

Як описано вище, штам EG2159 походив від штаму EG2158. Отже, EG2158 містить ген, ідентичний гену білка CryET33, називаний далі геном cryET33, як і штам EG2159. Для клонування гена cryET33 була використана "зворотна генетика". Був синтезований 33-мірний олігонуклеотидний зонд (позначений WD68), що кодує амінокислоти 1-11 NH₂-кінця білка CryET33. Нижче подана послідовність WD68:

5'-ATGGGAATTATTAATATTCAAGATGAAATTAAT-3' (SEQ ID № 9)

Послідовність WD68 використовували у якості зонда для Саузерн-гібридизації, як описано нижче, із метою ідентифікації ДНК-фрагмента від штаму EG2158, що містив ген cryET33 для 29кДа-білка cryET33. Повну ДНК екстрагували з EG2158 стандартним методом із використанням лізоциму/фенолу. Екстраговану ДНК гідролізували ферментами, що рестрикують ДНК, HindIII і EcoRI, і гідролізовану ДНК фракціонували за розміром шляхом електрофорезу в агарозному гелі. ДНК-фрагменти переносили методом блотінгу з гелю на нітроцелюлозний фільтр із використанням описаних раніше методів (Southern, 1975), і цей фільтр інкубували з олігонуклеотидом WD68, що був радіоактивно позначений кіназою T4 і [γ-³²P]-АТР. Якогось унікального рестрикційного ДНК-фрагмента від EG2158, що специфічно гібридизувався б із зондом WD68, виявлено не було.

Потім використовували різні методи ідентифікації ДНК-рестрикційного фрагмента, що містив ген cryET33. Був синтезований 56-мірний олігонуклеотидний зонд (позначений WD73), що кодує амінокислоти 1-19 NH₂-кінця білка CryET33. Послідовність WD73 являє собою:

5'-ATGGGAATTATTAATATTCAAGATGAAATTAATNNNTATATGAAAGAAGTATATGG-3'

(SEQ ID № 10)

де ділянка в три "N" відповідають амінокислоті 12 послідовності WD73, що представляє три інозинових нуклеотиди. Інозинові залишки були використані в цьому положенні для кодування відповідної невідомої амінокислоти в положенні 12 у NH₂-кінцевої послідовності білка CryET33. Вважається, що інозин є нейтральним нуклеотидом, і не один із промоторів не перешкоджає його зв'язуванню з ДНК-ланцюгами. WD73 радіоактивно мітили кіназою T4 і [γ-³²P]-АТР, і використовували для зондування нітроцелюлозного фільтра, що містить фракціоновані за розміром рестрикційні HindIII і EcoRI-фрагменти повної ДНК штаму EG2158. WD73 специфічно гібридизувався з HindIII-фрагментом приблизно в 7,9т.і.о., і з EcoRI-фрагментом приблизно в 5,2т.і.о., ДНК штаму EG2158.

ПРИКЛАД 6

Клонування генів cryET33 і cryET34 із штаму EG2158

Для виділення 5,2т.і.о.-EcoRI-фрагмента, описаного в попередньому прикладі. Плазмідну бібліотеку штаму EG2158 конструювали шляхом легування відібраних за розміром рестрикційних EcoRI-ДНК-фрагментів від штаму EG2158 у вектор pBR322 *E.coli*. Ця процедура включала спочатку одержання повної ДНК із штаму EG2158 шляхом лізису клітин, із наступною екстракцією ДНК фенолом, а потім проводили гідроліз повної ДНК

ферментом, що рестрикує, EcoRI, електрофорез гідролізованої ДНК у агарозному гелі, вирізання гелевого зрізу, що містить EcoRI-ДНК-фрагменти розміром у межах приблизно від 4,0 до 6,0т.і.о, і нарешті, електроелекцію відібраних за розміром рестрикційних EcoRI-фрагментів із зрізу агарозного гелю. Ці фрагменти змішували з плазмідним вектором pRB322 E.coli, що також був гідролізований ферментом EcoRI. Вектор pRB322 несе ген резистентності до ампіциліну (Amp^R) і цей вектор реплікувався в E.coli. Для легування вектора pRB322 із рестрикційними фрагментами штаму EG2158, до суміші відібраних за розміром рестрикційних фрагментів ДНК від штаму EG2158 і гідролізованого вектора pRB322 добавляли ДНК-лігазу T4 і АТР.

Потім, плазмідну бібліотеку трансформували в клітини мікроорганізму-хазяїна E.coli, що не містить потрібні гени cryET33 і cryET34, як описано нижче. Після легування, ДНК-суміш інкубували з мікроорганізмом-хазяїном Amp^S-E.coli, HB101, що був зроблений компетентним із використанням стандартних СаCl₂-процедур. Штам HB101 E.coli був використаний у якості штаму-хазяїна, оскільки ці клітини легко трансформуються рекомбінантними плазмідами, і оскільки, природний штам HB101 не містить генів кристалічних білків B.thuringiensis. Оскільки, pRB322 експресує Amp^R то всі клітини-хазяїни, що одержали рекомбінантну плазмиду, є резистентними до ампіциліну (Amp^R). Після трансформації клітин-хазяїв рекомбінантними плазмідами, клітини розсіювали на агарове середовище, що містило Amp. Після інкубування протягом ночі при температурі 37°C, на агарі, що містив Amp, було вирощено декілька тисяч колоній E.coli, після чого, ці колони блотували на нітроцелюлозні фільтри для наступного зондування.

Потім, радіоактивно мічений олігонуклеотид WD73 використовували у якості ДНК-зонду в умовах, що дозволяли зондувати специфічне зв'язування трансформованих колоній-хазяїнів, що містять 5,2т.і.о.-EcoRI-фрагмент ДНК штаму EG2158. Декілька колоній E.coli специфічно гібридизувались із зондом WD73. Крім того, було проведено дослідження однієї колонії, що гібридизує WD73, позначеної EG11460 E.coli. EG11460 E.coli містив рекомбінантну плазмиду, позначену pEG246, що складалася з pRB322 і введеного рестрикційного EcoRI-фрагмента ДНК від штаму EG2158 розміром приблизно 5,2т.і.о. Рестрикційна карта pEG246 показана на Фіг.2. Штам EG11460 E.coli, що містить pEG246, був депонований у Науково-дослідній колекції сільськогосподарських культур, Північної регіональної науково-дослідної лабораторії (NRRL) відповідно до Будапештському договору про депонування мікроорганізмів під номером доступу NRRL B-21364.

Нуклеотидну послідовність, що становить приблизно одну третину від клонованого 5,2т.і.о.-EcoRI-фрагмента pEG246, визначали з використанням стандартного дідезокси-методу Сенгера. Секвенування виявило, що 5,2т.і.о.-фрагмент містив дві суміжні відкриті рамки зчитування, що кодують білки, а, зокрема, два нових гени кристалічного токсину. Вище розташована відкрита рамка зчитування, позначена cryET33, кодувала білок, NH₂-кінцева послідовність якого відповідала NH₂-кінцевм послідовності 29кДа-білка CryET33 штамів EG2159 і EG10327. Нижчезрозташований ген, позначений cryET34, кодував білок, амінокислотна послідовність якого відповідала NH₂-кінцевій амінокислотній послідовності, визначеній для 14кДа-білка CryET34 штаму EG10327. ДНК-послідовності цих нових генів значно відрізнялися від послідовностей відомих генів кристалічних токсинів B.thuringiensis, перерахованих у таблиці 5.

ДНК-послідовність гена cryET33 (SEQ ID №1) і виведена амінокислотна послідовність білка CryET33 (SEQ ID №3), кодованого геном cryET33, показані на Фіг.1А, Фіг.1В і Фіг.1С. Частина гена, що кодує білок, cryET33 (SEQ ID №1) визначали по нуклеотидам, починаючи з положення 136 і кінчаючи положенням 936. Розмір білка CryET33 (SEQ ID №3) як білка, виведеного з гена cryET33 (SEQ ID №1), становив 29216 Так (267 амінокислот). Як показано на Фіг.1А, Фіг.1В і Фіг.1С, цими послідовностями є ДНК-послідовність гена cryET34 (SEQ ID №2) і виведена амінокислотна послідовність білка CryET34 (SEQ ID №4), кодована геном cryET34. Частина гена, що кодує білок, cryET34 (SEQ ID №2) визначали по нуклеотидам, починаючи з положення 969 і кінчаючи положенням 1346. Розмір білка CryET34 (SEQ ID №4) як білка, виведеного з гена cryET34 (SEQ ID №2), становив 14182кДа (126 амінокислот).

Для порівняння ДНК-послідовностей генів cryET33 і cryET34 і виведених амінокислотних послідовностей білків CryET33 і CryET34 із послідовностями всіх генів B.thuringiensis cry і кристалічних білків, відомих авторам винаходу (описаних у розділі 5.3 приклада 3, і перерахованих у таблиці 5), і з послідовностями всіх генів і білків, наявних у базі даних геномних послідовностей (National Center for Genome Resources, Santa Fe, NM) використовували комп'ютерні алгоритми [Korn & Queen, 1984; Altschul et al., 1990]. Якоїсь подібності відомих генів або білків із послідовністю гена cryET34 (SEQ ID №2) і виведеною послідовністю білка CryET34 (SEQ ID №4), відповідно, виявлено не було. Було встановлено, що послідовність гена cryET33 (SEQ ID №1) ідентична тільки послідовності одного відомого гена, і ідентичність цієї послідовності дуже низка. Послідовність гена cryET33 (801 нуклеотид) була на 38% ідентична послідовності гена B.thuringiensis підвиду thompsoni (1020 нуклеотидів), [описаного Brown & Whiteley (1992)]. Було виявлено, що виведена послідовність білка cryET33 (SEQ ID №3) має послідовність, ідентичну тільки одній відомій білку, і ця ідентичність дуже низка. Було виявлено, що повна амінокислотна послідовність білка CryET33 (267 амінокислот) на 27% ідентична повній амінокислотній послідовності кристалічного білка B.thuringiensis підвиду thompsoni (340 амінокислот), [описаного Brown & Whiteley, 1992], який є токсичним для гусениць.

ДНК-послідовність, розташовану безпосередньо вище гена cryET33 (Фіг.1А, 1В і 1С, нуклеотиди 1-135), досліджували на гомологію з усіма відовими вищезрозташованими ДНК-послідовностями генів кристалічних білків, і з ДНК-послідовностями усіх відомих генів у базі даних геномних послідовностей (таблиця 5). ДНК-послідовності, розташовані безпосередньо вище областей генів, що кодують, часто містять промотори для експресії відповідних генів. Якоїсь гомології в результаті цього дослідження виявлено не було.

ПРИКЛАД 7

Експресія рекомбінантних генів cryET33 і cryET34

Експеримент показав, що клоновані гени кристалічного токсину *B.thuringiensis* слабо експресувались у *E.coli*, але в більшості випадків, добре експресувались у рекомбінантних штаммах *B.thuringiensis*. рEG246, яка містить гени cryET33 і cryET34 (Фіг.2), здатна реплікуватися в *E.coli*, але не реплікується в *B.thuringiensis*. Для одержання плазмід, що містить гени cryET33 і cryET34, і здатної реплікуватися в *B.thuringiensis*, плазмиду *Bacillus* spp. вводили в рEG246, як описано нижче.

Плазмиду рNN101 *Bacillus* spp. (Norton et al., 1985), здатну реплікуватися в *B.thuringiensis*, і таку, що має резистентність до хлорамфеніколу (Cam^R) і резистентністю до тетрацикліну (Tet^R), гідролізували ферментом BamHI, і цю гідролізовану плазмиду змішували з плазмидою рEG246, що була гідролізована ферментом BamHI. Дві плазмиди легували разом із лігазою T4+ATP. Потім леговану суміш використовували для трансформації компетентних клітин DH5A *E.coli*. Після інкубування із сумішню плазмід, клітини висівали на чашки з агаром, що містять тетрациклін. Як і очікувалося, клітини, у які була включена плазміда, яка складається з рNN101, лігваної із рEG246, були резистентними до тетрацикліну (Tet^R). Після інкубування приблизно протягом 20 годин, декілька резистентних до тетрацикліну (Tet^R) колоній *E.coli* вирощували на чашках з агаром, що містять тетрациклін.

Плазмідну ДНК виділяли з однієї Tet^R-колонії. Плазмиду гідролізували ферментом BamHI і піддавали електрофорезу у агарозному гелі. Плазміда, позначена рEG1246, складалася з двох BamHI-фрагментів ДНК розміром 5,8т.і.о і 9,6т.і.о., що відповідають плазмідам рNN101 і рEG246, відповідно. Рестрикційна карта рEG1246 показана на Фіг.3.

Потім, штам EG10368 *B.thuringiensis* трансформували шляхом електропорації плазмидою рEG1246 із використанням описаних раніше методів [Macaluso & Mettus, 1991]. Нетрансформовані клітини штаму-хазяїна EG10368 є негативними по кристалічному білку (Cry) і сприйнятливими до хлорамфеніколу (Cam^s). Після електропорації, суміш для трансформації розподіляли на агарове середовище, що містить Cam, і інкубували приблизно протягом 16 годин при температурі 30 °С. рEG-1246-трансформовані клітини повинні бути резистентними до хлорамфеніколу. Одна Cam^R-колонія, позначена штамом EG11403 *B.thuringiensis*, містила плазмиду, рестрикційна карта якої була ідентична рестрикційній карті плазмиди рEG1246.

Клітини штаму EG11403 культивували в середовищі для споруючії DSG, що містить Cam, при температурі від 22 до 25°C, доти, поки не відбувалася споруючія і клітинний лізис (4-5 днів). Оцінка за допомогою мікроскопа виявила, що спорильована культура штаму EG11403 містила спори і невеликі кристали веретеноподібної форми, що переміщаються вільно, і неправильної форми. Ці кристали були подібні з кристалами, що спостерігаються у споруюльованої культури штаму EG10327.

Спори, кристали і клітинний дебрис із споруюльованої культури штаму EG11403 збирали шляхом центрифугування. Осад після центрифугування один раз промивали деіонізованою водою, і цей осад суспендували в деіонізованій воді.

Кристалічні білки в суспензії EG11403 охарактеризовували шляхом солюбілізації й аналізу за допомогою електрофорезу в ПААГ із ДСН. ДСН-ПААГ-аналіз виявив, що штам EG11403 продукував два мажорних білки 29кДа і 14кДа. Як і очікувалося, 29кДа-білок і 14кДа-білок штаму EG11403 були ідентичні за розміром з 29кДа-білком CryET33 і 14кДа-білком CryET34, відповідно, продукованими штамом EG10327. Штам EG11403 був депонований 14 грудня 1994 року під номером доступу №NRRL У-21367 у Науково-дослідній колекції сільськогосподарських культур Північної регіональної науково-дослідної лабораторії (NRRL) відповідно до Будапештському договору про депонування мікроорганізмів.

Геном, що кодує 29кДа-білок CryET33 штаму EG11403, є ген cryET33, а геном, що кодує 14кДа-білок CryET34 штаму EG11403, є ген cryET34. Штам EG11403 і штам EG10327 *B.thuringiensis* продукували приблизно рівні кількості білка CryET33. На відміну від цього, штам EG2158 *B.thuringiensis* продукував приблизно 1/10 кількості білка CryET33, як і штам EG10327 або штам EG11403.

ПРИКЛАД 8

Штам EG11402 *B.thuringiensis*, що містить cryIIIB3, cryET33 і cryET34

Раніше було виявлено, що кристалічний білок *B.thuringiensis*, позначений cryIIIB3, є токсичним для личинок японського жука [Патент США №5264364]. У нижченаведеному прикладі було виявлено, що білки CryET33 і CryET34 є токсичними для личинок довгоноса бавовняного і личинок японського жука. Білок Cry3B3 не має загальної амінокислотної послідовності, гомологічної або з білком CryET33, або з білком CryET34. У спробі продукування штаму, що має підвищену токсичність для японського жука, ген Cry3B3, ген cryET33 і cryET34 об'єднували в один штам, як описано нижче.

Штам EG10364 є штамом *B.thuringiensis* дикого типу, що містить ген cryIIIB3. Штам EG10364 продукує білок Cry3B3, токсичний для личинок японського жука. рEG1246 (Фіг.3), що містить гени cryET33 і cryET34, використовували для трансформації EG10364 шляхом електропорації з одержанням штаму EG11402. Штам EG11402 ідентичний штаму EG10364, за винятком того, що EG11402 також містить плазмиду рEG1246 (несучу клоновані гени cryET33 і cryET34), і отже, має резистентність до Cam (Cam^R).

Штам EG11402 вирощували на середовищі для споруючії DSG+Cam при кімнатній температурі доти, поки не відбувалася споруючія і клітинний лізис (4-5 днів). Кристалічні білки солюбілізували зі споруюльованої культури EG11402, і ці Солюбілізовані білки фракціонували за розміром шляхом електрофорезу в ПААГ із ДСН. Цей аналіз виявив, що штам EG11402 продукував три кристалічних білка: кристалічний 70кДа-білок, що відповідає білку CryIIIB3, кристалічний 29кДа-білок, що відповідає білку CryET33, і кристалічний 14кДа-білок, що відповідає білку CryET34. Аналіз, проведений за допомогою електрофорезу в ПААГ із ДСН показав, що штам

EG10364, який був вирощений тим же способом, що і EG11402, але без хлорамфеніколу, продукував 70кДа-білок CryIIIВ3 у кількостях, аналогічних кількостям, що продукуються штамом EG11402. Штам EG11402 був депонований 14 грудня 1994 Науково-дослідною колекцією сільськогосподарських культур Північною регіональною науково-дослідною лабораторією (NRRL) під номером доступу №NRRL У-21366.

ПРИКЛАД 9

Токсичність CryET33 і CryET34 для личинок японського жука

Токсичність для личинок японського жука (*Popillia japonica*) визначали для трьох штамів *B.thuringiensis*: (1) для штаму EG10327, що продукує кристалічні білки CryET33 і CryET34; (2) штаму EG10364, що продукує кристалічний білок Cry3В3; і (3) штаму EG11402, що продукує кристалічні білки CryET33, CryET34 і Cry3В3.

Штами EG10327, EG10364 і EG11402 вирощували в середовищі для споруляції DSG при кімнатній температурі (20-23°C) до тих пір, поки не відбувалася споруляція і клітинний лізис (4-5 днів). Для штаму EG11402, середовище містило 5мкг/мл Сам. Бульйон для ферментації концентрували шляхом центрифугування, і осад, що містить спори, кристалічні білки, і клітинний дебрис, або ліофілізували з одержанням порошків, або ресуспендували в деіонізованій воді з одержанням водяних суспензій. Кількості кристалічних білків CryET33 і Cry3В3 у ліофілізованих порошках і в суспензіях кількісно оцінювали за допомогою електрофорезу в ПААГ із ДСН, і простежували за допомогою денситометра кумаси-забарвлених ДСН-ПААГ-гелей з очищеним і кількісно оціненим білком Cry3А, використовуваним у якості стандарту. Кількість білка CryET34 оцінювали шляхом візуальної оцінки Кумаси-забарвлених ДСН-ПААГ-гелей. Ця оцінка вказувала на те, що кількість білка CryET34 приблизно еквівалентна кількості білка CryET34 у штамів EG10327 і EG11402.

Процедуру біоаналізу для личинки японського жука здійснювали наступним способом. Ліофілізовані порошки кожного штаму, що тестується, суспендували в розріджувачі (водяному розчині, що містить 0,005% Тритону Х-100®), і вводили в 100мл гарячого (50-60 °C) рідкого штучного корму, отриманого на основі попередньо розробленого раціону (Ladd, 1986). Ці суміші залишали для ствердження в чашках Петрі, а потім диски отвердженого корму діаметром 19мм поміщали в пластикові чашки ємністю 5/8 унцій. У кожен чашку вводили одну личинку японського жука, після чого чашки закривали кришкою і витримували протягом чотирнадцятих днів при 25°C, а потім оцінювали відсоток загибелі личинок. Це дослідження проводили в двох дублікатах із шістнадцятих личинок кожний.

Результати цього тесту на токсичність подані нижче в таблиці 6, де інсектицидна активність виражена у відсотках загиблих личинок; при цьому, відсоток загибелі личинок був скоректований на загибель контрольних личинок, а в контрольний корм був уведений тільки розріджувач.

Таблиця 6			
Активність CryET33, CryET34 і Cry3В3 для личинок японського жука			
Штам	Присутній білок	Доза білка	% загибелі комах
EG10327	cryET33	~4000мл.д.	95%
	cryET34	ND ^a	
EG10364	cry3В3	500мл.д.	38%
EG11402	cry3В3	560мл.д.	58%
	cryET33	~1000мл.д.	
	cryET34	ND	
^a ND=не визначали.			

Результати, подані в таблиці 6, показали, що білки CryET33 і CryET34 мають значну токсичність для личинки японського жука. EG10327, що продукує білки CryET33 і CryET34, є також токсичним для личинки японського жука. Якщо в EG 10327 додати гени cryET33 і cryET34, то це приведе до одержання EG11402, що, крім білка Cry3В3, продукує білки CryET33 і CryET34 і, як спостерігалось, має підвищену токсичність для личинки японського жука.

ПРИКЛАД 10

Токсичність CryET33 і CryET34 для личинки хрущака каштанового

Токсичність для личинок хрущака каштанового (*Tribolium castaneum*) визначали для трьох штамів *B.thuringiensis*: (1) для штаму EG10327, що продукує кристалічні білки CryET33 і CryET34; (2) штаму EG10364, що продукує кристалічний білок Cry3В3; і (3) штаму EG11402, що продукує кристалічні білки CryET33, CryET34 і Cry3В3. Чотири штамів вирощували в середовищі для споруляції DSG при кімнатній температурі (20-23°C) доти, поки не відбувалася споруляція і клітинний лізис, після чого одержували водяні суспензії або ліофілізовані порошки, як описано в прикладі 9. Токсичність кожного штаму проти личинок хрущака каштанового визначали шляхом нанесення відомої кількості кожного препарату штаму на штучний корм і цей корм згодовували личинкам хрущака каштанового.

Результати цього тесту на токсичність подані нижче в таблиці 7, де інсектицидна активність виражена у відсотках загиблих личинок; при цьому, відсоток загибелі личинок був скоректований на загибель контрольних личинок, а в контрольний корм був уведений тільки розріджувач.

Таблиця 7

Активність CryET33, CryET34 і Cry3B3 для личинок хрущака каштанового			
Штам	Присутній білок	Доза білка	% загибелі комах
EG10327	cryET33	~2000мл.д.	100%
	cryET34	Nd ^a	
EG10364	cry3B3	448мл.д.	74%
EG11402	cry3B3	448мл.д.	97%
	cryET33	~2000мл.д.	
	cryET34	ND	
EG11403	cryET33	~2000мл.д.	39%
	cryET34	ND	
^a ND=не визначали			

Результати, подані в таблиці 7, показали, що білки CryET33 і CryET34 мають значну токсичність для личинки хрущака каштанового. Природний штам EG 10327, що продукує білки CryET33 і CryET34, є у високому ступені токсичним для личинок хрущака каштанового. EG10364, що продукує білок Cry3B3, є токсичним для личинок хрущака каштанового. EG11403, що продукує білок CryET33 і CryET34, є токсичним для личинок хрущака каштанового. Якщо в EG10327 додати гени cryET33 і cryET34, то це приведе до одержання штаму EG11402, що, продукує білки CryET33, CryET34 і Cry3B3, і, як спостерігалось, має підвищену токсичність для личинок хрущака каштанового.

ПРИКЛАД 11

Токсичність CryET33 і CryET34 для личинок довгоносика бавовняного

Штам EG11403, що продукує білки CryET33 і CryET34, був вирощений як описано вище. Кристали білка промивали, солюбілізували в карбонатному буфері, діалізували і фільтрували через 0,2мкм. акродиску. Потім визначали токсичність солюбілізованих білків шляхом додавання відомої кількості білків до штучного корму, і цей кормом годували личинкам довгоносика бавовняного. Результати тесту на токсичність подана нижче, де інсектицидна активність виражена або як (1) відсоток загибелі личинок, де цей відсоток загибелі личинок був скоректований на розмір загибелі контрольних личинок із використанням контрольного буфера; або як (2) відсоток загибелі личинок+ відсоток личинок, що не розвивалися після досягнення ними першої вікової стадії; де цей відсоток загибелі був скоректований на розмір загибелі контрольних личинок із використанням контрольного буфера.

Результати, подані в таблиці 8 і в таблиці 9, показали, що білки CryET33 і CryET34 мають значний рівень токсичності для личинок довгоносика бавовняного.

Таблиця 8	
(1) Відсоток загибелі личинок довгоносика бавовняного	
мкг/мл	% загибелі
40	50
20	46,67
10	11,76
5	6,67
2,5	0
1,25	6,67
0,31	0
0,08	10

Таблиця 9	
(2) Відсоток загибелі личинок+ личинки 1-ої вікової стадії	
мкг/мл	% загибелі
40	100
20	93,33
10	64,71
5	40
2,5	11,11
1,25	6,67
0,31	5,88
0,08	10

Посилання

Нижченаведені посилання, що можуть служити, деякою мірою, прикладом способів і інших процедур, докладно описаних у даній заявці, вводяться в даний опис за допомогою посилання:

Патент США №4196265, виданий 1 квіт. 1980.

- Патент США №4554101, виданий 19 листоп. 1985.
- Патент США №4683195, виданий 28 липня 1987.
- Патент США №4683202, виданий 28 липня 1987.
- 5 Патент США №4757011, виданий 12 липня 1988.
- Патент США №4766203, виданий 23 серп. 1988.
- Патент США №4769061, виданий 6 верес. 1988.
- Патент США №4771131, виданий 13 верес. 1988.
- Патент США №4797279, виданий 10 січн. 1989.
- 10 Патент США №4910016, виданий 20 березня 1990.
- Патент США №4940835, виданий 23 лют. 1990.
- Патент США №4965188, виданий 23 жовт. 1990.
- Патент США №4966765, виданий 30 жовт. 1990.
- Патент США №4971908, виданий 20 листоп. 1990.
- 15 Патент США №4996155, виданий 26 лют. 1991.
- Патент США №4999192, виданий 12 березня 1991.
- Патент США №5006336, виданий 9 квіт. 1991.
- Патент США №5024837, виданий 18 червня 1991.
- Патент США №5055293, виданий 8 жовт. 1991.
- 20 Патент США №5055294, виданий 8 жовт. 1991.
- Патент США №5128130, виданий 15 жовт. 1991.
- Патент США №5176995, виданий 15 жовт. 1991.
- Патент США №5187091, виданий 15 жовт. 1991.
- Патент США №5264364, виданий 23 листоп. 1993.
- 25 Патент США №5286486, виданий 15 лют. 1994.
- Патент США №5384253, виданий 24 січн. 1995.
- Патент США №5441884, виданий 15 серп. 1995.
- Євр. патент №0308199, опублікований 22 березня 1989.
- Євр. патент №0318143, опублікований 31 травня 1989.
- 30 Євр. патент №0324254, опублікований 19 липня 1989.
- Євр. патент №0382990, опублікований 22 серп. 1990.
- Між. публ. пат. заяв. №WO 90/13651, опубл. 15 листопад. 1990.
- Між. публ. пат. заяв. №WO 91/07481, опубл. 30 травня 1991.
- Між. публ. пат. заяв. №WO 91/10725, опубл. 25 липня 1991.
- 35 Між. публ. пат. заяв. №WO 91/16433, опубл. 31 жовт. 1991.
- Між. публ. пат. заяв. №WO 93/03154, опубл. 18 лют. 1993.
- Між. публ. пат. заяв. №WO 94/13785, опубл. 23 червня 1994.
- Між. публ. пат. заяв. №WO 94/16079, опубл. 21 липня 1994.
- Між. публ. пат. заяв. №WO 95/02693, опубл. 26 січн. 1995.
- 40 Між. публ. пат. заяв. №WO 95/06730, опубл. 9 березня 1995.
- Між. публ. пат. заяв. №WO 95/30752, опубл. 16 лист. 1995.
- Між. публ. пат. заяв. №WO 95/30753, опубл. 16 лист. 1995.
- Abdullah et al., *Biotechnology*, 4:1087, 1986.
- Adelman et al., *DNA*, 2/3:183-193, 1983.
- 45 Alien and Choun, "Large unilamellar liposomes with low uptake into the reticuloendothelial system," *FEES Lett.*, 223:42-46, 1987.
- Altschul et al., "Basic local alignment search tool," *J. Mol. Biol.*, 215:403-410, 1990.
- Arvidson et al., *Mol. Biol.*, 3:1533-1534, 1989.
- Baum et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 56:3420-3428, 1990.
- 50 Benbrook et al., In: *Proceedings Bio Expo 1986*, Butterworth, Stoneham, MA, pp.27-54, 1986.
- Bernhard, *FEMS Microbiol. Lett.*, 33:261-265, 1986.
- Bolivar et al., *Gene*, 2:95, 1977.
- Brown and Whiteley, *J. Bacteriol.*, 174:549-557, 1992.
- Bytebier et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:5345, 1987.
- 55 Callis et al., *Genes and Development*, 1:1183, 1987.
- Campbell, In: *Monoclonal Antibody Technology, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol.13, Burden and Von Knippenberg, Eds. pp.75-83, Elsevier, Amsterdam, 1984.
- Capecchi, "High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells," *Cell*, 22(2):479-488, 1980.
- 60 Cashmore et al., *Gen. Eng. of Plants*, Plenum Press, New York, 29-38, 1983.
- Chambers et al., *J. Bacteriol.*, 173:3966-3976, 1991.
- Chang et al., *Nature*, 375:615, 1978.
- Chau et al., *Science*, 244:174-181, 1989.
- Clapp, "Somatic gene therapy into hematopoietic cells. Current status and future implications," *Clin. Perinatal.*, 20(1): 155-168, 1993.
- 65 Couvreur et al., "Nanocapsules, a new lysosomotropic carrier," *FEBS Lett.*, 84:323-326, 1977.

- Couvreur, "Polyalkyleanoacrylates as colloidal drug carriers," Crit Rev. Ther. Drug Carrier Syst., 5:1-20, 1988.
- Crickmore et al., Abstr. 28th Annu. Meet. Soc. Invert. Pathol., Cornell University, Ithaca, NY, 1995.
- Cristou et al., Plant Physiol, 87:671-674, 1988.
- 5 Curiel, Agarwal, Wagner, Gotten, "Adenovirus enhancement of transferrin-polylysine-mediated gene delivery," Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88(19):8850-8854, 1991.
- Curiel, Wagner, Gotten, Bimstiel, Agarwal, Li, Loechel, Hu, "High-efficiency gene transfer mediated by adenovirus coupled to DNA-polylysine complexes," Hum. Gen. Ther., 3(2): 147-154, 1992.
- 10 De Barjac, In: Microbial Control of Pests and Plant Diseases, H. D. Burges, ed., Academic Press, London, 36-43, 1981.
- Donovan et al., Appl. Environ. Microbio. 58:3921-3927, 1992.
- Donovan et al., Mol. Gen. Genet., 214:365-372, 1988.
- Eglitis and Anderson, "Retro viral vectors for introduction of genes into mammalian cells," Biotechniques. 6(7):608-614, 1988.
- 15 Eglitis, Kantoff, Kohn, Karson, Moen, Lothrop, Blaese, Anderson, "Retroviral-mediated gene transfer into hemopoietic cells," Adv. Exp. Med. Biol., 241:19-27, 1988.
- Eichenlaub, J. Bacteriol., 138(2):559-566, 1979. Fiers et al., Nature, 273:113, 1978. Fraley et al., Biotechnology, 3:629, 1985. Fraley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:4803, 1983. Fromm, Taylor, Walbot, "Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82(17):5824-5828, 1985.
- 20 Fujimura et al., Plant Tissue Culture Letters, 2:74, 1985.
- Fynan, Webster, Fuller, Haynes, Santoro, Robinson, "DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene gun inoculations," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(24):11478-11482, 1993.
- Gawron-Burke and Baum, Genet. Engineer., 13:237-263, 1991.
- 25 Geffer et al., Somat. Cell Genet. 3:231-236, 1977.
- Gill et al., J. Biol. Chem., 270:27277-27282, 1995.
- Coding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.60-74. 2nd Edition, Academic Press, Orlando, FL, 1986.
- Goeddel et al., Nature, 281:544, 1979.
- Goeddel et al., Nucl. Acids Res., 8:4057, 1980.
- 30 Graham and van der Eb, "Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5," Virology, 54(2):536-539, 1973.
- Green, Nucl. Acids Res. 16(1):369, 1988. Grochulski et al., J. Mol. Biol., 254:447-464, 1995.
- Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1988.
- Henry-Michelland et al., "Attachment of antibiotics to nanoparticles; Preparation, drug-release and antimicrobial activity in vitro," Int. J. Pharm., 35:121-127, 1987.
- 35 Hermstadt et al., Bio/Technology, 4:305-308, 1986.
- Herrnstadt et al., Gene, 57:37-46, 1987.
- Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg., 7:149, 1968.
- Hess, Intern Rev. Cytol., 107:367, 1987.
- 40 Hilber, Bodmer, Smith, Koller, "Biolistic transformation of conidia of Botryotinia fuckeliana", Hitzeman et al, J. Biol. Chem., 255:2073, 1980.
- Hofte and Whiteley, Microbiol. Rev., 53:242-255, 1989.
- Hofte et al., Nucl. Acids Res., 15:7183, 1987.
- Holland et al., Biochemistry, 17:4900, 1978.
- 45 Honee et al., Mol. Microbiol., 5:2799-2806, 1991.
- Hoover et al., (Eds.), Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Edition, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1975.
- Horton et al., Gene, 77:61-68, 1989.
- Itakura et al., Science, 198:1056, 1977.
- Jameson and Wolf, "The Antigenic Index: A Novel Algorithm for Predicting Antigenic Determinants," J. Mol. Biol., 43(1): 181-6, 1988.
- 50 Johnstons and Tang, "Gene gun transfection of animal cells and genetic immunization," Methods Cell. Biol., 43(A):353-365, 1994.
- Jones, Genetics, 85:12, 1977.
- Jorgensen et al., Mol. Gen. Genet., 207:471, 1987.
- 55 Keller et al., EMBOJ., 8:1309-14, 1989.
- Kingsman et al., Gene. 7:141, 1979.
- Klein et al., Nature, 327:70, 1987.
- Klein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:8502-8505, 1988.
- Knight et al., J. Biol. Chem., 270:17765-17770, 1995.
- 60 Kohler and Milstein, Eur. J. Immunol., 6:511-519, 1976.
- Kohler and Milstein, Nature, 256:495-497, 1975.
- Kom and Queen, DNA, 3:421-436, 1984.
- Kreig et al., AnzSchaed. lingskde, Pflanzenschutz, Um-welrschuiz, 57:145-150, 1984.
- Kreig et al., In: Zangew Ent., 96:500-508, 1983.
- 65 Krieg et al., J. Appl. Ent., 104:417-424, 1987.
- Kuby, In: Immunology 2nd Edition, W. H. Freeman & Company, New York, 1994.

- Kyte and Doolittle, "A simple method for displaying the hydropathic character of a protein," J. Mol. Biol., 157(1): 105-132, 1982.
- Ladd Jr., J. Econ. Entomol., 79:00668-671, 1986.
- Lambert et al., Appl. Environ. Microbiol., 58:2536-2642, 1992b.
- Lambert et al., Gene, 110:131-132, 1992a.
- Langridge et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:3219-3223, 1989.
- Lee et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 216:306-312, 1995.
- Lindstrom et al., Developmental Genetics, 11:160, 1990.
- Lorz et al., Mol. Gen. Genet, 199:178, 1985.
- Lu, Xiao, Clapp, Li, Broxmeyer, "High efficiency retroviral mediated gene transduction into single isolated immature and replatable CD34(3+) hematopoietic stem/progenitor cells from human umbilical cord blood," J. Exp. Med. 178(6):2089-2096, 1993.
- Luo et al., Plant Mol. Biol. Reporter, 6:165, 1988.
- Macaluso and Mettus, 7. Bacterial., 173:1353-1356, 1991.
- Maddock et al., Third International Congress of Plant Molecular Biology, Abstract 372, 1991.
- Maloy et al., "Microbial Genetics" 2nd Edition. Jones and Barlett Publishers, Boston, MA, 1994.
- Maloy, "Experimental Techniques in Bacterial Genetics" Jones and Bartlett Prokop, A., and Bajpai, R. K. "Recombinant DNA Technology I" Ann. N.Y. Acad. Sci, Vol. 646, 1991. Maniatis et al., In: Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1982.
- Marcotte et al., Nature, 335:454, 1988.
- Masson et al., J. Biol. Chem., 270:20309-20315, 1995.
- McCabe et al., Biotechnology, 6:923, 1988.
- McPherson et al., Bio/Technology, 6:61-66, 1988.
- Mettus and Macaluso, Appl. Environ. Microbiol., 56:1128-1134, 1990.
- Neuhaus et al., Theor. Appl. Genet, 75:30, 1987.
- Norton et al., Plasmid, 13:211-214, 1985.
- Odell et al., Nature, 313:810, 1985.
- Omirulleh et al., Plant Molecular Biology, 21:415-428, 1993.
- Pena et al., Nature, 325:274, 1987.
- Poszkowski et al., EMBOJ., 3:2719, 1989.
- Potrykus et al., Mol. Gen. Genet, 199:183, 1985.
- Poulsen et al., Mol. Gen. Genet, 205:193-200, 1986.
- Prokop and Bajpai, Ann. N. Y. Acad. Sci. 646, 1991.
- Rogers et al., In: Methods For Plant Molecular Biology, A. Weissbach and H. Weissbach, eds., Academic Press Inc., San Diego, CA 1988.
- Rogers et al., Meth. In Enzymol., 153:253-277, 1987.
- Rupar et al., App. Environ. Microbiol., 57:3337-3344, 1991.
- Sambrook et al., In: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- Segal, Biochemical Calculations, 2nd Edition. John Wiley & Sons, New York, 1976.
- Sekar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:7036-7040, 1987.
- Sick et al., Nucl. Acids Res., 18:1305, 1990.
- Simpson, Science, 233:34, 1986.
- Southern, J. Mol. Biol., 98:503-517, 1975.
- Spielmann et al., Mol. Gen. Genet, 205:34, 1986.
- Toriyama et al., Theor Appl. Genet, 73:16, 1986.
- Uchimiya et al., Mol. Gen. Genet, 204:204, 1986.
- Van Tunen et al., EMBOJ., 7:1257, 1988.
- Vasil et al., "Herbicide-resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus," Biotechnology, 10:667-674, 1992.
- Vasil, Biotechnology, 6:397, 1988.
- Vodkin et al., Cell, 34:1023, 1983.
- Wagner et al., "Coupling of adeno virus to transferrin-polylysine/DNA complexes greatly enhances receptor-mediated gene delivery and expression of transfected genes," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89 (13):6099-6103, 1992.
- Weissbach and Weissbach, Methods for Plant Molecular Biology, (eds.). Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1988.
- Wenzler et al., Plant Mol. Biol., 12:41-50, 1989.
- Wolf et al., 3. Impu. Appl. Biosci., 4(1): 187-91 1988.
- Wong and Neumann, "Electric field mediated gene transfer," Biochim. Biophys. Res. Commun. 107(2):584-587, 1982.
- Yamada et al., Plant Cell Rep., 4:85, 1986.
- Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:4144-48, 1990.
- Zatloukal, Wagner, Cotten, Phillips, Plank, Steinlein, Curiel, Bimstiel, "Transferrinfection: a highly efficient way to express gene constructs in eukaryotic cells," Ann. N. Y. Acad. Sci., 660:136-153, 1992.

Zhou et al., Methods in Enzymology, 101:433, 1983.

Список последовательностей

(1) Загальна інформація:

(1) Заявник:

(A) Ім'я, прізвище: EGOGEN, INC.

(B) Вулиця: 2005 Cabot Boulevard West

(C) Місто: Langhorne

(D) Штат: Пенсільванія

(E) Країна: США

(F) Поштовий індекс: 19047-3032

(II) Назва винаходу: композиції білків CryET33 і CryET34 B.thuringiensis і їхнє використання

(III) Число последовательностей: 10

(IV) Форма комп'ютерного зчитування:

(A) Тип носія: гнучкий диск

(B) Комп'ютер: PC сумісна з IBM

(C) Операційна система: PC-DOS/MS-DOS

(O) Програмне забезпечення: Patentin Release ft 1,0, Version #1,30 (EPO)

(VI) Дані попередньої заявки:

(A) Номер заявки: US 08/718905

(B) Дата подачі: 24 верес. 1996

(2) Дані последовательності SEQ ID №1:

(I) Характеристики последовательності:

(A) Довжина: 807 пар основ

(B) Тип: нуклеїнова кислота

(C) Число ланцюгів: один

(D) Топологія: лінійна

(XI) Опис последовательності SEQ ID №1:

ATGGGAATTA TTAATATCCA AGATGAAAT AATAATTACA TGAAAGAGGT ATATGGTGCA 60
ACAACGTGTA AAAGCAGATA CGATCCCTCA TTCAAAGTAT TTAATGAATC TGTGACACCC 120
CAATTCACCTG AAATCCCAAC AGAACCTGTA AATAATCAAT TAACTACAAA AAGAGTAGAT 180
AATACGGGTA GTTACCCAGT AGAAAGTACT GTATCGTTCA CATGGACGGA AACCCATACA 240
GAACACAAGTG CAGTAAGTGA GGGAGTGAAG GCGGGCAGCT CATAAGTAC TAAACAATCT 300
TTTAAATTTG GTTTGTGTA CTCTGATGTT ACTTTAAGCG TATCAGCAGA ATATAATTAT 360
AGTACAACAA ATACAAGTAC AACACAGAA ACACACACCT GGTGAGATTG AACAAAGTA 420
ACTATTCCTC CCAAACTTA TGTGGAGGCT GCATACATTA TCCAAAATGG AACATATAAT 480
GTTCCGGGTA ATGTAGAATG TGATATGAGT GGRACCTTAT TTGTAGAGG GATAGAGAT 540
GGTGGGCTTA TTGCAGCAGT TTATGTTCT GTAGCGGATT TAGCAGATTA CATCCCAAT 600
TTAAATCTTA CAAATAAAGG CGATGGAAT GCTCAGTTTA AAGGTTCCGG TTTTATAGAG 660
GGTGCACAAG GCTTGGGAAG CATTAATCAG GTTACAGAT ATCCACTAGA TGATAAATAA 720
GGTGGCTCGA CACCAATAAC TAAATTAATA AATGGTTCTT TAGCACCATA TGTACATTA 780
AAAAATAGCA ACATAAAAT TAAATA 807

(2) Дані последовательності SEQ ID №2:

(I) Характеристики последовательності:

(A) Довжина: 381 пари основ

(B) Тип: нуклеїнова кислота

(C) Ланцюжність: одноланцюжна

(D) Топологія: лінійна

(XI) Опис последовательності SEQ ID №2:

5
10
15

ATGACAGTAT	ATAACGCAAC	TTTCACCAT	AATCTCTATA	ATGAAGGAGA	ATGGGGGGGG	60
CCAGAACCAT	ATGGTTATAT	AAAAGCATAT	CTTACAAATC	CAGATCATGA	TTTTGAAATT	120
TGGAAACAAG	ATGATTGGGG	GAAAATGACT	CCTGAGAGAA	GTACTTATAC	GCAAAACGATT	180
AAATAAGTAA	GCGACACTGG	TTCCCTTATA	AACCAATGT	GTTTTATGCG	TGATGTGAAA	240
GAATACCAAG	TAGGAAATGC	AGATGATATT	CTCGCTTATC	CAAGTCAAAA	AGTATGCCAT	300
ACACTGGTGC	TAAAGTACCG	ACTTGATGGC	GATGAGAAAG	GTCTTATGT	GACAATTAAG	360
TATTCCTTGA	CTCCAGCATA	A				381

(2) Дані послідовності SEQ ID №3:
 (I) Характеристики послідовності:
 (A) Довжина: 267 амінокислот
 (B) Тип: Амінокислотна
 (C) Ланцюжність: одноланцюжна
 (D) Топологія: лінійна
 (XI) Опис послідовності SEQ ID №3

25
30
35
40
45
50
55
60
65

Met Gly Ile Ile Asn Ile Gln Asp Glu Ile Asn Asn Tyr Met Lys Glu
1 5 10 15

Val Tyr Gly Ala Thr Thr Val Lys Ser Thr Tyr Asp Pro Ser Phe Lys
20 25 30

Val Phe Asn Glu Ser Val Thr Pro Gln Phe Thr Glu Ile Pro Thr Glu
15 40 45

Pro Val Asn Asn Gln Leu Thr Thr Lys Arg Val Asp Asn Thr Gly Ser
50 55 60

Tyr Pro Val Glu Ser Thr Val Ser Phe Thr Trp Thr Glu Thr His Thr
65 70 75 80

Glu Thr Ser Ala Val Thr Glu Gly Val Lys Ala Gly Thr Ser Ile Ser
85 90 95

Thr Lys Gln Ser Phe Lys Phe Gly Phe Val Asn Ser Asp Val Thr Leu
100 105 110

Thr Val Ser Ala Glu Tyr Asn Tyr Ser Thr Thr Asn Thr Thr Thr Thr
115 120 125

Thr Glu Thr His Thr Trp Ser Asp Ser Thr Lys Val Thr Ile Pro Pro
130 135 140

Lys Thr Tyr Val Glu Ala Ala Tyr Ile Ile Gln Asn Gly Thr Tyr Asn
145 150 155 160

Val Pro Val Asn Val Glu Cys Asp Met Ser Gly Thr Leu Phe Cys Arg
165 170 175

Met Thr Val Tyr Asn Ala Thr Phe Thr Ile Asn Phe Tyr Asn Glu Gly
1 5 10 15

Glu Trp Gly Gly Pro Glu Pro Tyr Gly Tyr Ile Lys Ala Tyr Leu Thr
20 25 30

Asn Pro Asp His Asp Phe Glu Ile Trp Lys Gln Asp Asp Trp Gly Lys
35 40 45

Ser Thr Pro Glu Arg Ser Thr Tyr Thr Gln Thr Ile Lys Ile Ser Ser
50 55 60

Asp Thr Gly Ser Pro Ile Asn Gln Met Cys Phe Tyr Gly Asp Val Lys
65 70 75 80

Glu Tyr Asp Val Gly Asn Ala Asp Asp Ile Leu Ala Tyr Pro Ser Gln
85 90 95

- (2) Дані послідовності SEQ ID №4:
(I) Характеристики послідовності:
(A) Довжина: 126 амінокислот
(B) Тип: Амінокислотна
(C) Ланцюжність: одноланцюжна
(D) Топологія: лінійна
(XI) Опис послідовності SEQ ID №4:

Met Thr Val Tyr Asn Ala Thr Phe Thr Ile Asn Phe Tyr Asn Glu Gly
1 5 10 15

Glu Trp Gly Gly Pro Glu Pro Tyr Gly Tyr Ile Lys Ala Tyr Leu Thr
20 25 30

Asn Pro Asp His Asp Phe Glu Ile Trp Lys Gln Asp Asp Trp Gly Lys
35 40 45

Ser Thr Pro Glu Arg Ser Thr Tyr Thr Gln Thr Ile Lys Ile Ser Ser
50 55 60

Asp Thr Gly Ser Pro Ile Asn Gln Met Cys Phe Tyr Gly Asp Val Lys
65 70 75 80

Glu Tyr Asp Val Gly Asn Ala Asp Asp Ile Leu Ala Tyr Pro Ser Gln
85 90 95

Lys Val Cys Ser Thr Pro Gly Val Thr Val Arg Leu Asp Gly Asp Glu
100 105 110

Lys Gly Ser Tyr Val Thr Ile Lys Tyr Ser Leu Thr Pro Ala
115 120 125

(2) Дані послідовності SEQ ID №5:

(I) Характеристики послідовності:

(A) Довжина: 20 амінокислот

(B) Тип: Амінокислотна

(C) Ланцюжність: одноланцюжна

(D) Топологія: лінійна

(XI) Опис послідовності SEQ ID №5:

Gly Ile Ile Asn Ile Gln Asp Glu Ile Asn Asn Tyr Met Lys Glu Val

1 5 10 15

Tyr Gly Ala Thr

20

(2) Дані послідовності SEQ ID №6:

(I) Характеристики послідовності:

(A) Довжина: 20 амінокислот

(B) Тип: Амінокислотна

(C) Ланцюжність: одноланцюжна

(D) Топологія: лінійна

(XI) Опис послідовності SEQ ID №6:

Thr Val Tyr Asn Val Thr Phe Thr Ile Lys Phe Tyr Asn Glu Gly Glu

1 5 10 15

Trp Gly Gly Pro

20

(2) Дані послідовності SEQ ID №7:

(I) Характеристики послідовності:

- (A) Довжина: 11 амінокислот
(B) Тип: Амінокислотна
(C) Ланцюжність: одноланцюжна
(D) Топологія: лінійна
(XI) Опис послідовності SEQ ID №7:

Met Gly Ile Ile Asn Ile Gln Asp Glu Ile Asn

1 5 10

- (2) Дані послідовності SEQ ID №8:
(I) Характеристики послідовності:
(A) Довжина: 8 амінокислот
(B) Тип: Амінокислотна
(C) Ланцюжність: одноланцюжна
(D) Топологія: лінійна
(XI) Опис послідовності SEQ ID №8:

Tyr Met Lys Glu Val Tyr Gly Ala

1 5

- (2) Дані послідовності SEQ ID №9:
(I) Характеристики послідовності:
(A) Довжина: 33 пари основ
(B) Тип: нуклеїнова кислота
(C) Ланцюжність: одноланцюжна
(D) Топологія: лінійна
(XI) Опис послідовності SEQ ID №9:

ATGGGAATTA TTAATATTCA AGATGAAATT AAT

- (2) Дані послідовності SEQ ID №10:
(I) Характеристики послідовності:
(A) Довжина: 56 пар основ
(B) Тип: нуклеїнова кислота
(C) Ланцюжність: одноланцюжна
(D) Топологія: лінійна
(IX) Відмінна риса:
(A) Назва/Ключ: модифікована основа
(B) Локалізація: 34..36
(D) Додаткова інформація:/мод.основа = Доповн./прим.="N=інозин"
(XI) Опис послідовності SEQ ID №10:

ATGGGAATTA TTAATATTCA AGATGAAATT AATNNNTATA

TGAAAGAAGT ATATGG

Усі композиції і методи, описані і заявлені в даній заявці можуть бути здійснені виходячи з даного опису без зайвого експериментування. Хоча композиції і методи даного винаходу були описані на кращих прикладах його здійснення, однак, для кожного фахівця очевидно, що в композиціях, методах і в стадіях або в послідовності стадій здійснення описаних методів можуть бути внесені зміни, що не виходять за рамки суті й об'єму винаходу. Більш конкретно, слід зазначити, що ті ж самі або схожі результати повинні досягатися при заміні деяких агентів, використовуваних у даному винаході, іншими агентами, які мають подібні хімічні і фізичні властивості. При цьому, для кожного спеціаліста очевидно, що всі такі заміни і модифікації не повинні виходити за рамки суті й об'єму даного винаходу, визначеного в його формулі. Тому очевидно, що ексклюзивні права на патентування визначені в поданій нижче формулі винаходу.

Формула винаходу

1. Виділений і очищений кристалічний білок *Bacillus thuringiensis*, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID № 3 або SEQ ID № 4.

2. Білок за п. 1, який відрізняється тим, що вказаний кристалічний білок виділяють із *Bacillus thuringiensis* EG10327 (NRRL B-21365), EG11402 (NRRL B-21366) або EG11403 (NRRL B-21367).

3. Білок за п. 2, який відрізняється тим, що вказаний кристалічний білок має розмір приблизно 29 кДа або приблизно 14 кДа, як було визначено методом електрофорезу в ПААГ із ДСН.

4. Білок за п. 1, який відрізняється тим, що включений у композицію, яка містить від приблизно 1 % до приблизно 50 % мас. вказаного кристалічного білка.

5. Білок за п. 1, який відрізняється тим, що включений у композицію, отриманий способом, що включає наступні стадії:

(а) культивування клітини штаму *Bacillus thuringiensis*, що містить сегмент нуклеїнової кислоти, який кодує кристалічний білок, що відповідає амінокислотним послідовностям SEQ ID № 3 або SEQ ID № 4, або обом в умовах, ефективних для продукування вказаного кристалічного білка; і

(b) одержання із вказаної клітини вказаного кристалічного білка.

6. Білок за п. 5, який відрізняється тим, що стадія (b) включає, крім того, одержання вказаного кристалічного білка у кількості від приблизно 1 % до приблизно 50 % мас.

7. Композиція кристалічного білка за п. 1, який відрізняється тим, що містить білки з амінокислотними послідовностями SEQ ID № 3 та SEQ ID № 4 і має інсектицидну активність проти довгоносіка бавовняного, японського жука (*Popillia japonica*) або хруща каштанового (*Tribolium castaneum*).

8. Очищений сегмент нуклеїнової кислоти, який кодує кристалічний білок SEQ ID № 3 або SEQ ID № 4.

9. Сегмент нуклеїнової кислоти за п. 8, який відрізняється тим, що додатково визначений як такий, що включає послідовність нуклеїнової кислоти SEQ ID № 1 або комплементарну їй послідовність, або послідовність, що гібридується в жорстких умовах в присутності від близько 0,02 М до близько 0,15 М NaCl і температурі від близько 50°C до близько 70°C з послідовністю SEQ ID №1, або послідовність нуклеїнової кислоти SEQ ID № 2 або комплементарну їй послідовність, або послідовність, що гібридується в жорстких умовах в присутності від близько 0,02 М до близько 0,15 М NaCl і температурі від близько 50°C до близько 70°C з послідовністю SEQ ID №2.

10. Сегмент нуклеїнової кислоти за п. 8, який відрізняється тим, що визначений як РНК-сегмент.

11. Сегмент нуклеїнової кислоти за п. 8, який відрізняється тим, що кодує кристалічний білок, який має довжину приблизно 267 амінокислот, або кодує кристалічний білок, який має довжину приблизно 126 амінокислот.

12. Сегмент нуклеїнової кислоти за п. 8, який відрізняється тим, що включений в рекомбінантний вектор.

13. Сегмент нуклеїнової кислоти за п. 12, який відрізняється тим, що вказаний рекомбінантний вектор являє собою pEG246 і знаходиться в клітині-хазяїні NRRL B-21364 або являє собою pEG1246 і знаходиться в клітині-хазяїні NRRL B-21367.

14. Сегмент нуклеїнової кислоти за п. 12, який відрізняється тим, що вказаний сегмент нуклеїнової кислоти функціонально зв'язаний із промотором.

15. Сегмент нуклеїнової кислоти за п. 12, який відрізняється тим, що вбудований в рекомбінантну клітину-хазяїн.

16. Сегмент нуклеїнової кислоти за п. 15, який відрізняється тим, що вказана клітина-хазяїн є прокаріотичною клітиною.

17. Сегмент нуклеїнової кислоти за п. 16, який відрізняється тим, що вказана клітина-хазяїн є бактеріальною клітиною.

18. Сегмент нуклеїнової кислоти за п. 17, який відрізняється тим, що вказаною бактеріальною клітиною є клітина виду *E.coli*, *B.thuringiensis*, *B.subtilis*, *B.megaterium*, або *Pseudomonas*.

19. Сегмент нуклеїнової кислоти за п. 18, який відрізняється тим, що вказаною бактеріальною клітиною є *E.coli* NRRL B-21364, *B.thuringiensis* NRRL B-21365, *B.thuringiensis* NRRL B-21366, або *B.thuringiensis* NRRL B-21367.

20. Сегмент нуклеїнової кислоти за п. 15, який відрізняється тим, що вказана клітина-хазяїн є еукаріотичною клітиною.

21. Сегмент нуклеїнової кислоти за п. 20, який відрізняється тим, що вказана клітина-хазяїн є рослинною клітиною.

22. Сегмент нуклеїнової кислоти за п. 21, який відрізняється тим, що вказаною рослинною клітиною є клітина кукурудзи, пшениці, рослини, що утворює дерн, овочевої рослини, плодового дерева або декоративної рослини.

23. Сегмент нуклеїнової кислоти за п. 15, який відрізняється тим, що вказана клітина-хазяїн експресує сегмент нуклеїнової кислоти для продукування вказаного кристалічного білка.

24. Сегмент нуклеїнової кислоти по п. 8, який відрізняється тим, що вбудований у трансгенну рослину.

25. Сегмент нуклеїнової кислоти за п. 24, який відрізняється тим, що вказаний сегмент нуклеїнової кислоти включений у потомство трансгенної рослини.

26. Сегмент нуклеїнової кислоти за п. 24, який відрізняється тим, що вказаний сегмент нуклеїнової кислоти включений у насіння трансгенної рослини.

27. Спосіб застосування сегмента нуклеїнової кислоти, що кодує кристалічний білок, як визначено в

послідовності SEQ ID № 3 або SEQ ID № 4 для експресії білка, який включає наступні стадії:

(а) одержання рекомбінантного вектора, що включає сегмент нуклеїнової кислоти згідно з п. 8, який знаходиться під контролем промотору;

(b) введення вказаного рекомбінантного вектора в клітину-хазяїн;

(с) культивування вказаної клітини-хазяїна для експресії вказаного білка і

(d) відокремлення вказаного експресованого білка.

28. Спосіб за п. 27, який відрізняється тим, що вказаним рекомбінантним вектором є рEG246, що знаходиться в клітині-хазяїні NRRL B-21364, або є рEG1246, що знаходиться в клітині-хазяїні NRRL B-21367.

29. Виділений сегмент нуклеїнової кислоти, охарактеризований як сегмент нуклеїнової кислоти, який включає область послідовності, що складається принаймні із 18 суміжних нуклеотидів послідовності SEQ ID № 1 або SEQ ID № 2, або комплементарної їм.

30. Виділений сегмент нуклеїнової кислоти за п. 29, який відрізняється тим, що включений в набір для визначення наявності нуклеїнової кислоти, що включає у відповідному контейнері виділену нуклеїнову кислоту і реагент для детекції.

31. Виділений сегмент нуклеїнової кислоти за п. 30, який відрізняється тим, що містить послідовності SEQ ID № 1, SEQ ID № 2 або комплементарні їм.

32. Спосіб виявлення послідовності нуклеїнових кислот, що кодує кристалічний білок, де вказаний білок містить послідовності SEQ ID № 3 або SEQ ID № 4, який включає наступні стадії:

(а) одержання зразка нуклеїнових кислот, що, ймовірно, кодують кристалічний білок послідовності SEQ ID № 3 або SEQ ID № 4;

(b) контактування вказаного зразка нуклеїнових кислот із виділеним сегментом нуклеїнової кислоти, що кодує вказаний кристалічний білок в жорстких умовах в присутності від близько 0,02 М до близько 0,15М NaCl і температурі від близько 50°C до близько 70°C, ефективних для гібридизації в основному комплементарних нуклеїнових кислот; і

(с) виявлення отриманих у такий спосіб гібридизованих комплементарних нуклеїнових кислот.

33. Спосіб за п. 32, який відрізняється тим, що виділений сегмент нуклеїнової кислоти включає мітку, що детектується, і де вказані гібридизовані комплементарні нуклеїнові кислоти виявляються за допомогою цієї мітки.

34. Очищене антитіло, яке генероване шляхом використання білка за п. 1 як імуногена.

35. Антитіло за п. 34, яке включене в набір для імунодетекції, що містить у відповідному контейнері антитіло і реагент для імунодетекції.

36. Спосіб виявлення кристалічного білка, що містить послідовності SEQ ID № 3 або SEQ ID № 4 у біологічному зразку, який включає стадії:

(а) одержання біологічного зразка, що, ймовірно, містить вказаний кристалічний білок;

(b) контактування зазначеного зразка з антитілом згідно з п. 34, в умовах, ефективних для утворення імунокомплексів; і

(с) виявлення утворених у такий спосіб імунокомплексів.

37. Штам клітин *Bacillus thuringiensis*, що містить сегмент нуклеїнової кислоти, що кодує кристалічний білок, який містить амінокислотні послідовності SEQ ID № 3 або SEQ ID № 4, або обидві.

38. Штам клітин *Bacillus thuringiensis* згідно з п. 37, який відрізняється тим, що клітини мають NRRL номер доступу B-21365, B-21366 або B-21367.

39. Спосіб одержання кристалічного білка, який містить амінокислотні послідовності SEQ ID № 3 або SEQ ID № 4, що включає:

(а) культивування клітини *Bacillus thuringiensis* за п. 37 в умовах, ефективних для продукування вказаного кристалічного білка; і

(b) одержання із вказаної клітини вказаного кристалічного білка.

40. Білок за п.4, одержаний способом за п.39.

41. Інсектицидна композиція, яка містить кристалічний білок з амінокислотними послідовностями SEQ ID № 3 або SEQ ID № 4, що має інсектицидну активність проти довгоносики бавовняного, японського жука (*Popillia japonica*) або хруща каштанового (*Tribolium castaneum*).

42. Інсектицидна композиція за п. 41, яка відрізняється тим, що містить від близько 1% до близько 50% мас. кристалічного білка SEQ ID №3 або SEQ ID № 4.

10 20 30 40 50 60
 TGTAAAATTTTATAAATCTTAACATTTGATGTTCAAGTAAGAATTACATTGAACCTT
 60 70 80 90 100 120
 AATTGTATACATCATTGTGTTAGAATTAATCCAACACTACTTAAGTTGGTAAATAAAATAC
 130 140 150 160 170 180
 AGGAGGTATTTAAATATGGGAATTATTAATATCCAAGATGAAATTAATAATTACATGAAA
 MetGlyIleIleAsnIleGlnAspGluIleAsnAsnTyrMetLys
 190 200 210 220 230 240
 GAGGTATATGGTGCAACAACTGTTAAAAGCACATACGATCCCTCATTCAAAGTATTTAAT
 GluValTyrGlyAlaThrThrValLysSerThrTyrAspProSerPheLysValPheAsn
 250 260 270 280 290 300
 GAATCTGTGACACCCCAATTCAGTAAATTCCAACAGAACCTGTAAATAATCAATTAAC
 GluSerValThrProGlnPheThrGluIleProThrGluProValAsnAsnGlnLeuThr
 310 320 330 340 350 360
 ACAAAAAGAGTAGATAATACGGGTAGTTACCCAGTAGAAAGTACTGTATCGTTCACATGG
 ThrLysArgValAspAsnThrGlySerTyrProValGluSerThrValSerPheThrTrp
 370 380 390 400 410 420
 ACGGAAACCCATACAGAAACAAGTGCAGTAACAGGGAGTGAAAGCCGGCACCTCAATA
 ThrGluThrHisThrGluThrSerAlaValThrGluGlyValLysAlaGlyThrSerIle
 430 440 450 460 470 480
 AGTACTAAACAATCTTTAAATTTGGTTTTGTAACTCTGATGTTACTTTAACGGTATCA
 SerThrLysGlnSerPheLysPheGlyPheValAsnSerAspValThrLeuThrValSer
 490 500 510 520 530 540
 GCAGAAATATAATTATAGTACAACAAATACAACACTACAACAACAGAAACACACACCTGGTCA
 AlaGluTyrAsnTyrSerThrThrAsnThrThrThrThrThrGluThrHisThrTrpSer
 550 560 570 580 590 600
 GATTCAACAAAAGTAACTATTCTCCCAAACCTTATGTGGAGGCTGCATACATTATCCAA
 AspSerThrLysValThrIleProProLysThrTyrValGluAlaAlaTyrIleIleGln

Fig. 1A

610 620 630 640 650 660
 AATGGAACATATAATGTTCCGGTTAATGTAGAATGTGATATGAGTGGAACTTTATTTTGT
 AsnGlyThrTyrAsnValProValAsnValGluCysAspMetSerGlyThrLeuPheCys

670 680 690 700 710 720
 AGAGGGTATAGAGATGGTGGCTTATTGCAGCAGTTTATGTTTCTGTAGCGGATTTAGCA
 ArgGlyTyrArgAspGlyAlaLeuIleAlaAlaValTyrValSerValAlaAspLeuAla

730 740 750 760 770 780
 GATTACAATCCAAATTTAAATCTTACAAATAAAGGGGATGGAATTGCTCACTTTAAAGGT
 AspTyrAsnProAsnLeuAsnLeuThrAsnLysGlyAspGlyIleAlaHisPheLysGly

790 800 810 820 830 840
 TCGGGTTTTATAGAGGGTGCACAAGGCTTGCGAAGCATTATTCAGGTTACAGAATATCCA
 SerGlyPheIleGluGlyAlaGlnGlyLeuArgSerIleIleGlnValThrGluTyrPro

850 860 870 880 890 900
 CTAGATGATAATAAAGGTCGCTCGACACCAATAACTTATTTAATAAATGGTTCATTAGCA
 LeuAspAspAsnLysGlyArgSerThrProIleThrTyrLeuIleAsnGlySerLeuAla

910 920 930 940 950 960
 CCAAATGTTACATTAAAAATAGCAACATAAAATTTTAATAAATAACAAAAAAGGAAGGT
 ProAsnValThrLeuLysAsnSerAsnIleLysPheEndEnd

970 980 990 1000 1010 1020
 TGATAAAATGACAGTATATAACGCAACTTTCACCATTAAATTTCTATAATGAAGGAGAAT
 MetThrValTyrAsnAlaThrPheThrIleAsnPheTyrAsnGluGlyGluT

1030 1040 1050 1060 1070 1080
 GGGGGGGGCCAGAACCATATGGTTATATAAAAGCATATCTTACAAATCCAGATCATGATT
 rpGlyGlyProGluProTyrGlyTyrIleLysAlaTyrLeuThrAsnProAspHisAspP

1090 1100 1110 1120 1130 1140
 TTGAAATTTGGAAACAAGATGATTGGGGGAAAAGTACTCCTGAGAGAAGTACTTATACGC
 heGluIleTrpLysGlnAspAspTrpGlyLysSerThrProGluArgSerThrTyrThrG

1150 1160 1170 1180 1190 1200
 AAACGATTAAAAATAAGTAGCGACACTGGTTCCCTTATAAACCAATGTGTTTTATGGTG
 InThrIleLysIleSerSerAspThrGlySerProIleAsnGlnMetCysPheTyrGlyA

Fig. 1B

1210 1220 1230 1240 1250 1260
 ATGTGAAAGAATACGACGTAGGAAATGCAGATGATATTCTCGCTTATCCAAGTCAAAAAG
 spValLysGluTyrAspValGlyAsnAlaAspAspIleLeuAlaTyrProSerGlnLysV

 1270 1280 1290 1300 1310 1320
 TATGCAGTACACCTGGTGTAAACAGTACGACTTGATGGCGATGAGAAAGGTTCTTATGTGA
 alCysSerThrProGlyValThrValArgLeuAspGlyAspGluLysGlySerTyrValT

 1330 1340 1350 1360 1370 1380
 CAATTAAGTATTCCTTGACTCCAGCATAAATTTCAAATAAATCATTGCTTAACATATTG
 hrIleLysTyrSerLeuThrProAlaEnd

 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 AGGACCATATCTTTCCTGAAATGCTAGCTCTATCTTTTACAACCTTCAATCCTCAAATT

 1450 1460 1470 1480 1490 1500
 CTCTAAACTAGAAATCATAAAATTTTATATTCTCTTATTATGTTGCACTATTCTAAATGGG

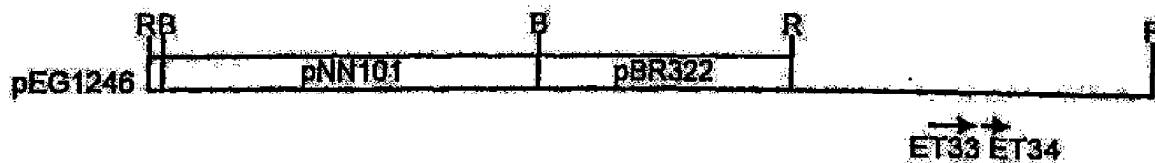
 1510 1520 1530 1540 1550 1560
 GAATCCAACATGCTCATCTTCAAAAATAATAAAAACTTTCAATCTATTTAGAAATGC

 1570 1580 1590
 AACGAATCATTAAATACGCATTATATATAGT

Фиг. 1С



Фиг. 2



Фиг. 3

Офіційний бюлетень "Промислова власність". Книга 1 "Винаходи, корисні моделі, топографії інтегральних мікросхем", 2006, N 4, 15.04.2006. Державний департамент інтелектуальної власності Міністерства освіти і науки України.