



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **122657** (13) **C2**
(51) МПК (2021.01)
C12N 15/82 (2006.01)
C07K 14/325 (2006.01)
A01H 5/00

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

<p>(21) Номер заявки: а 2014 02007</p> <p>(22) Дата подання заявки: 27.07.2012</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 29.12.2020</p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 61/513,088</p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 29.07.2011</p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US</p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: 10.04.2014, Бюл.№ 7</p> <p>(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 28.12.2020, Бюл.№ 24</p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/US2012/048488, 27.07.2012</p>	<p>(72) Винахідник(и): Сампсон Кімберлі С. (US), Баласубраманіан Діпа (US), Лехтінен Двейн А. (US)</p> <p>(73) Володілець (володільці): АТЕНІКС КОРП., 3500 Paramount Parkway, Morrisville, NC 27560, United States of America (US)</p> <p>(74) Представник: Петров Андрій Володимирович, реєстр. №139</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: CAMPBELL C D ET AL, "NOVEL INSECTICIDAL PROTEINS", ANNALS OF THE ENTOMOLOGICAL SOCIETY OF AMERICA, ENTOMOLOGICAL SOCIETY OF AMERICA, COLLEGE PARK, MD, US, (20061210), vol. POSTER D0234, ISSN 0013-8746, page 1 P. A. W. MARTIN ET AL, "Chromobacterium subtsugae sp. nov., a betaproteobacterium toxic to Colorado potato beetle and other insect pests", INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY, (20070501), vol. 57, no. 5, doi:10.1099/ijs.0.64611-0, ISSN 1466-5026, pages 993 - 999 Stewart J Hinchcliffe ET AL, "Insecticidal Toxins from the Photorhabdus and Xenorhabdus Bacteria", The Open Toxinology Journal, (20100301), pages 101 - 118 PHYLLIS A W MARTIN ET AL, "Toxicity of Chromobacterium subtsugae to Southern Green Stink Bug (Heteroptera: Pentatomidae) and Corn Rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae)", JOURNAL OF ECONOMIC ENTOMOLOGY, ENTOMOLOGICAL SOCIETY OF AMERICA, LANDHAM, MD, US, (20070601), vol. 100, no. 3, doi:10.1603/0022-0493(2007)100[680:TOCSTS]2.0.CO;2, ISSN 0022-0493, pages 680 - 684 WO 2011/002992 A1, 06.01.2011</p>
---	---

(54) ГЕН ПЕСТИЦИДУ АХМІ279 ТА СПОСІБ ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ

UA 122657 C2

(57) Реферат:

Винахід стосується композиції та способу для надання пестицидної активності рослинам, рослинним клітинам, тканинам і насінню, а саме композиції, що містить кодуючі послідовності для пестицидних поліпептидів. Кодуючі послідовності можна застосовувати у ДНК-конструктах або експресійних касетах для трансформації та експресії у рослинах.

ПЕРЕХРЕСНЕ ПОСИЛАННЯ НА СПОРІДНЕНІ ЗАЯВКИ

Дана заявка заявляє пріоритет за попередньою заявкою на патент США з реєстраційним номером 61/513088, поданою 29 липня 2011 р., зміст якої включено у даний документ за допомогою посилання у всій своїй повноті.

5 ПОСИЛАННЯ НА ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ, НАДІСЛАНИЙ В ЕЛЕКТРОННОМУ ВИГЛЯДІ

Дану офіційну копію переліку послідовностей надіслано в електронному вигляді через EFS-Web як відформатований під ASCII перелік послідовностей у файлі з назвою "APA116004SEQLIST.txt", створеному 19 липня 2012 року та який має розмір 26,9 кілобайта, і подано одночасно з описом. Перелік послідовностей, що міститься в даному відформатованому під ASCII документі, є частиною опису, та його включено у даний документ за допомогою посилання у всій своїй повноті.

ГАЛУЗЬ ВИНАХОДУ

15 Даний винахід стосується галузі молекулярної біології. Забезпечуються нові гени, що кодують пестицидні білки. Ці білки та послідовності нуклеїнових кислот, які їх кодують, застосовні в отриманні пестицидних складів та в отриманні трансгенних рослин, стійких до шкідників.

ПЕРЕДУМОВИ ВИНАХОДУ

20 Впровадження DDT (дихлордифенілтрихлоретану) і наступний рух у напрямку до невибіркового застосування синтетичних хімічних інсектицидів призвели до забруднення водних і харчових джерел, до отруєння нецільових корисних комах і до розвитку комах-шкідників, стійких до дії хімічних інсектицидів. Підвищене суспільне занепокоєння щодо негативного впливу на довкілля невибіркового застосування хімічних інсектицидів спонукало до пошуку альтернативних способів боротьби з комахами-шкідниками.

25 Однією з перспективних альтернатив було застосування засобів біологічної боротьби. Існує переконливо підтверджена документальними доказами інформація про безпечне застосування Bt (*B. thuringiensis*, грампозитивної ґрунтової бактерії) як ефективних біопестицидів, а також низка повідомлень про експресію гена (генів) дельта-ендотоксину у сільськогосподарських культурах. Для трансгенних Bt-культур необхідно лише декілька інсектицидних розпорошуваних розчинів, що не тільки заощаджує ресурси і час, але також знижує ризики для здоров'я. У деяких випадках комахи можуть розвивати стійкість до різних інсектицидних сполук, що ставить питання необхідності ідентифікації альтернативних засобів біологічної боротьби для боротьби з шкідниками.

КОРОТКИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

35 Забезпечуються композиції та способи для надання пестицидної активності бактеріям, рослинам, рослинним кліткам, тканинам та насінню. Композиції містять молекули нуклеїнових кислот, що кодують послідовності пестицидних та інсектицидних поліпептидів, вектори, що містять такі молекули нуклеїнових кислот, і клітини-хазяїни, що містять ці вектори. Композиції також містять послідовності пестицидних поліпептидів та антитіла до таких поліпептидів. 40 Нуклеотидні послідовності можна застосовувати у ДНК-конструктах або експресійних касетах для трансформації та експресії в організмах, у тому числі у мікроорганізмах і рослинах. Нуклеотидні або амінокислотні послідовності можуть бути синтетичними послідовностями, призначеними для експресії в організмі, у тому числі, без обмежень, у мікроорганізмі або рослині. Композиції також містять трансформовані бактерії, рослини, рослинні клітки, тканини та насіння, що містять нуклеотидну послідовність за даним винаходом. 45

Зокрема, забезпечуються молекули виділених або рекомбінантних нуклеїнових кислот, які кодують пестицидний білок. Крім того, охоплено амінокислотні послідовності, що відповідають пестицидному білку. Зокрема, даний винахід забезпечує молекулу виділеної або рекомбінантної нуклеїнової кислоти, яка містить нуклеотидну послідовність, що кодує амінокислотну послідовність, показану в SEQ ID №: 2, 3 або 4, або нуклеотидну послідовність, наведену під SEQ ID №: 1, а також їх біологічно активні варіанти та фрагменти. Також охоплено нуклеотидні послідовності, комплементарні нуклеотидній послідовності за даним винаходом або такі, що гібридизуються з послідовністю за даним винаходом або комплементарною їй послідовністю. Додатково забезпечуються вектори, клітини-хазяїни, рослини та насіння, що містять нуклеотидні послідовності за даним винаходом, або нуклеотидні послідовності, які кодують амінокислотні послідовності за даним винаходом, а також їх біологічно активні варіанти та фрагменти. Також охоплено синтетичні нуклеотидні послідовності, які кодують поліпептиди, розкриті у даному документі. 50 55

60 Забезпечуються способи отримання поліпептидів за даним винаходом та застосування цих поліпептидів для боротьби зі шкідниками, що є лускокрилими, твердокрилими комахами,

нематодами або двокрилими комахами, або їх знищення. Також включено способи та набори для виявлення нуклеїнових кислот та поліпептидів за даним винаходом у зразку.

Композиції та способи за даним винаходом застосовні для отримання організмів з підвищеною стійкістю або толерантністю до шкідників. Ці організми та композиції, які містять організми, є бажаними для сільськогосподарських цілей. Композиції за даним винаходом також застосовні для утворення змінених або поліпшених білків, які мають пестицидну активність, або для виявлення наявності пестицидних білків або нуклеїнових кислот у продуктах або організмах.

ДОКЛАДНИЙ ОПИС

Даний винахід спрямовано на композиції та способи для регуляції стійкості або толерантності організмів, зокрема, рослин або рослинних клітин, до шкідників. Під "стійкістю" мається на увазі, що шкідник (наприклад, комаха) знищується під час поглинання поліпептидів за даним винаходом або під час іншого контакту з ними. Під "толерантністю" мається на увазі порушення або послаблення пересування, харчування, розмноження або інших функцій шкідника. Способи включають трансформацію організмів за допомогою нуклеотидної послідовності, яка кодує пестицидний білок за даним винаходом. Зокрема, нуклеотидні послідовності за даним винаходом застосовні для отримання рослин та мікроорганізмів, що мають пестицидну активність. Таким чином, забезпечуються трансформовані бактерії, рослини, рослинні клітини, тканини рослин та насіння. Композиції являють собою пестицидні нуклеїнові кислоти та білки видів бактерій. Послідовності знаходять застосування в конструюванні векторів експресії для наступного введення в організми, що становлять інтерес, шляхом трансформації як зондів для виділення інших гомологічних (або частково гомологічних) генів та для утворення змінених пестицидних білків за допомогою способів, відомих у даній галузі техніки, таких як перестановка доменів або ДНК-шафлінг. Білки знаходять застосування у боротьбі з популяцією шкідників, що є лускокрилими, твердокрилими, двокрилими комахами та нематодами, а також в отриманні композицій з пестицидною активністю.

Під "пестицидним токсином" або "пестицидним білком" мається на увазі токсин, який має токсичну активність проти одного або декількох шкідників, включаючи, без обмеження, представників рядів *Lepidoptera*, *Diptera* та *Coleoptera* або типу *Nematoda*, або білок, гомологічний такому білку. Пестицидні білки були виділені з організмів, у тому числі, наприклад, *Bacillus sp.*, *Clostridium bifermentans* та *Paenibacillus popilliae*. Пестицидні білки містять амінокислотні послідовності, розшифровані на основі нуклеотидних послідовностей повної довжини, розкритих у даному документі, і амінокислотні послідовності, які є коротшими, ніж послідовності повної довжини, внаслідок застосування альтернативного сайту ініціації, розташованого нижче, або внаслідок процесингу, за якого утворюється короткий білок, що має пестицидну активність. Процесинг може мати місце в організмі, у якому експресується білок, або в шкіднику після поглинання білка.

Таким чином, у даному документі представлено нові виділені або рекомбінантні нуклеотидні послідовності, що надають пестицидну активність. Також у даному документі представлено амінокислотні послідовності пестицидних білків. Білок, отримуваний у результаті трансляції цього гена, надає клітинам можливість боротьби зі шкідниками, які поглинають його, або знищення таких.

Молекули виділених нуклеїнових кислот, а також їх варіанти та фрагменти

Один аспект даного винаходу стосується молекул виділених або рекомбінантних нуклеїнових кислот, що містять нуклеотидні послідовності, які кодують пестицидні білки та поліпептиди або їх біологічно активні частини, а також належних молекул нуклеїнових кислот для застосування як гібридизаційних зондів для ідентифікації молекул нуклеїнових кислот, які кодують білки з ділянками гомології послідовностей. Також у даному документі охоплено нуклеотидні послідовності, здатні до гібридизації з нуклеотидними послідовностями за даним винаходом у жорстких умовах, як визначено в іншому місці в даному документі. Застосовуваний у даному документі вираз "молекула нуклеїнової кислоти" передбачає включення молекул ДНК (наприклад, рекомбінантних ДНК, кДНК або геномних ДНК) та молекул РНК (наприклад, мРНК), а також аналогів ДНК або РНК, утворених за допомогою аналогів нуклеотидів. Молекула нуклеїнової кислоти може бути одонитковою або двонитковою, але переважно є двонитковою ДНК.

"Виділена" або "рекомбінантна" послідовність нуклеїнової кислоти (або ДНК) застосовується у даному документі для позначення послідовності нуклеїнової кислоти (або ДНК), яка більше не перебуває у своєму природному середовищі, наприклад, перебуває в умовах *in vitro* або у рекомбінантній бактеріальній або рослинній клітині-хазяїні. У деяких варіантах здійснення виділена або рекомбінантна нуклеїнова кислота не містить послідовностей (переважно

послідовностей, які кодують білки), що зазвичай фланкують нуклеїнову кислоту (тобто послідовностей, розташованих на 5'- та 3'-кінцях нуклеїнової кислоти) у геномній ДНК організму, з якого отримана нуклеїнова кислота. Стосовно до даного винаходу вираз "виділена або рекомбінантна", застосований для позначення молекул нуклеїнових кислот, виключає виділені хромосоми. Наприклад, у різних варіантах здійснення молекула виділеної або рекомбінантної нуклеїнової кислоти, яка кодує пестицидний білок, може містити нуклеотидні послідовності завдовжки менше ніж приблизно 5 т.п.о., 4 т.п.о., 3 т.п.о., 2 т.п.о., 1 т.п.о., 0,5 т.п.о. або 0,1 т.п.о., які зазвичай фланкують молекулу нуклеїнової кислоти у геномній ДНК клітини, з якої отримана ця нуклеїнова кислота. У різних варіантах здійснення пестицидний білок, практично вільний від клітинного матеріалу, включає білкові препарати, що мають менше ніж приблизно 30 %, 20 %, 10 % або 5 % (у перерахунку на суху вагу) непестицидного білка (який також згадується в даному документі як "забруднювальний білок").

Нуклеотидні послідовності, які кодують білки, за даним винаходом включають послідовність, наведену під SEQ ID №: 1, та її варіанти, фрагменти та комплементарні їй послідовності. Під "комплементарною послідовністю" мається на увазі нуклеотидна послідовність, що є достатньою мірою комплементарною даній нуклеотидній послідовності, а отже, вона може гібридуватися з даною нуклеотидною послідовністю з формуванням, таким чином, стабільного дуплекса. Відповідні амінокислотні послідовності пестицидного білка, кодованого цими нуклеотидними послідовностями, наведено під SEQ ID №: 2, 3 або 4.

Молекули нуклеїнових кислот, які являють собою фрагменти цих нуклеотидних послідовностей, що кодують пестицидні білки, також охоплено даним винаходом. Під "фрагментом" мається на увазі частина нуклеотидної послідовності, яка кодує пестицидний білок. Фрагмент нуклеотидної послідовності може кодувати біологічно активну частину пестицидного білка, або він може являти собою фрагмент, який можна застосовувати як гібридизаційний зонд або праймер для ПЛР за допомогою способів, розкритих нижче. Молекули нуклеїнових кислот, що є фрагментами нуклеотидної послідовності, яка кодує пестицидний білок, містять щонайменше приблизно 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1350, 1400, 1450, 1500, 1550, 1600 суміжних нуклеотидів або кількість нуклеотидів аж до такої, у якій вони присутні в нуклеотидній послідовності повної довжини, яка кодує пестицидний білок, розкритий у даному документі, залежно від передбачуваного застосування. Під "суміжними" нуклеотидами маються на увазі нуклеотидні залишки, що безпосередньо прилягають один до одного. Фрагменти нуклеотидних послідовностей за даним винаходом будуть кодувати білкові фрагменти, які зберігають біологічну активність пестицидного білка і, таким чином, зберігають пестицидну активність. Таким чином, також охоплено біологічно активні фрагменти поліпептидів, розкриті у даному документі. Під виразом "зберігає активність" мається на увазі, що фрагмент буде мати пестицидну активність, що становить щонайменше приблизно 30 %, щонайменше приблизно 50 %, щонайменше приблизно 70 %, 80 %, 90 %, 95 % або вище від такої пестицидної активності білка. В одному варіанті здійснення пестицидна активність являє собою пестицидну активність проти твердокрилих комах. В іншому варіанті здійснення пестицидна активність являє собою пестицидну активність проти лускокрилих комах. В іншому варіанті здійснення пестицидна активність являє собою пестицидну активність проти нематод. В іншому варіанті здійснення пестицидна активність являє собою пестицидну активність проти двокрилих комах. Способи вимірювання пестицидної активності добре відомі в даній галузі техніки. Див., наприклад, Czaplak and Lang (1990) J. Econ. Entomol. 83:2480-2485; Andrews et al. (1988) Biochem. J. 252:199-206; Marrone et al. (1985) J. of Economic Entomology 78:290-293; та патент США № 5743477, усі з яких включено в даний документ за допомогою посилання у всій своїй повноті.

Фрагмент нуклеотидної послідовності, що кодує пестицидний білок, який кодує біологічно активну частину білка за даним винаходом, буде кодувати щонайменше приблизно 15, 25, 30, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550 або 600 суміжних амінокислот або кількість амінокислот аж до загальної такої, у якій вони присутні в пестицидному білку повної довжини за даним винаходом. У деяких варіантах здійснення фрагмент характеризується N-кінцевим або C-кінцевим усіканням щонайменше приблизно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25 або більше амінокислот порівняно з SEQ ID №: 2, 3 або 4. У деяких варіантах здійснення фрагменти, охоплювані у даному документі, отримують як результат видалення C-кінцевих 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25 або більше амінокислот, наприклад, шляхом протеолізу або шляхом вставки стоп-кодона в кодуючу послідовність.

Переважні пестицидні білки за даним винаходом кодуються нуклеотидною послідовністю, яка є достатньою мірою ідентичною стосовно нуклеотидної послідовності з SEQ ID №: 1, або

пестицидні білки є достатньою мірою ідентичними стосовно амінокислотної послідовності, наведеної під SEQ ID №: 2, 3 або 4. Під "достатньою мірою ідентичною" мається на увазі амінокислотна або нуклеотидна послідовність, яка має ідентичність послідовності, що становить щонайменше приблизно 60 % або 65 %, ідентичність послідовності, що становить приблизно 70 % або 75 %, ідентичність послідовності, що становить приблизно 80 % або 85 %, ідентичність послідовності, що становить приблизно 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або більше порівняно з еталонною послідовністю, визначену за допомогою однієї із програм вирівнювання, описаних у даному документі, із застосуванням стандартних параметрів. Фахівець у даній галузі візьме до уваги, що ці значення можна відповідним чином коригувати для визначення відповідної ідентичності білків, кодованих двома нуклеотидними послідовностями, з урахуванням виродженості кодонів, подібності амінокислот, положення рамки зчитування тощо.

Для визначення відсоткової ідентичності двох амінокислотних послідовностей або двох нуклеїнових кислот послідовності вирівнюють з метою оптимального порівняння. Відсоткова ідентичність двох послідовностей залежить від кількості ідентичних положень, спільних для послідовностей (тобто відсоткова ідентичність = кількість ідентичних положень/загальна кількість положень (наприклад, положень, що перекриваються) x 100). В одному варіанті здійснення дві послідовності мають однакову довжину. В іншому варіанті здійснення відсоткову ідентичність розраховують по всій еталонній послідовності (наприклад, по всій SEQ ID №: 1 або по всій одній з SEQ ID №: 2, 3 або 4). Відсоткову ідентичність двох послідовностей можна визначити за допомогою методик, подібних до описаних нижче, дозволяючи або не дозволяючи гепи. Під час розрахунку відсоткової ідентичності зазвичай підраховують точні збіги. Геп, тобто положення у вирівнюванні, де залишок присутній в одній послідовності, але не в іншій, вважають положенням з неідентичними залишками.

Визначення відсоткової ідентичності двох послідовностей можна виконати із застосуванням математичного алгоритму. Необмежувальним прикладом математичного алгоритму, використуваного для порівняння двох послідовностей, є алгоритм за Karlin and Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264 у модифікації за Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877. Такий алгоритм включено у програми BLASTN та BLASTX за Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403. Операції пошуку нуклеотидів за допомогою BLAST можна здійснювати у програмі BLASTN, результат підрахунку = 100, довжина слова = 12, з отриманням нуклеотидних послідовностей, гомологічних молекулам нуклеїнових кислот, подібних пестицидним таким, за даним винаходом. Операції пошуку білків за допомогою BLAST можна здійснювати у програмі BLASTX, результат підрахунку = 50, довжина слова = 3, з отриманням амінокислотних послідовностей, гомологічних молекулам пестицидних білків за даним винаходом. Для отримання вирівнювання з гепами з метою порівняння можна використовувати BLAST з гепами (в BLAST 2.0) відповідно до описаного в Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389. Альтернативно, можна застосовувати PSI-Blast для здійснення ітеративного пошуку, який виявляє віддалену спорідненість між молекулами. Див. Altschul et al. (1997) supra. Використовуючи програми BLAST, BLAST з гепами та PSI-Blast, можна застосовувати параметри за замовчуванням відповідних програм (наприклад, BLASTX та BLASTN). Вирівнювання можна також здійснювати вручну шляхом добору.

Іншим необмежувальним прикладом математичного алгоритму, використуваного для порівняння послідовностей, є алгоритм ClustalW (Higgins et al. (1994) Nucleic Acids Res. 22:4673-4680). У ClustalW порівнюються послідовності та проводиться вирівнювання усієї амінокислотної послідовності або послідовності ДНК, і в ньому, таким чином, можуть забезпечуватися дані про консервативність послідовності, властиву усій амінокислотній послідовності. Алгоритм ClustalW застосовують у деяких комерційно доступних пакетах програмного забезпечення для аналізу ДНК/амінокислот, таких як модуль ALIGNX комплексу програм Vector NTI (Invitrogen Corporation, Карлсбад, Каліфорнія). Після вирівнювання амінокислотних послідовностей за допомогою ClustalW можна провести оцінку відсоткової ідентичності амінокислот. Необмежувальним прикладом програми із системи програмного забезпечення, застосовної в аналізі вирівнювань за допомогою ClustalW, є GENEDOC™. GENEDOC™ (Karl Nicholas) дозволяє проводити оцінку подібності та ідентичності амінокислот (або ДНК) між декількома білками. Іншим необмежувальним прикладом математичного алгоритму, використуваного для порівняння послідовностей, є алгоритм за Myers and Miller (1988) CABIOS 4:11-17. Такий алгоритм включено до програми ALIGN (версія 2.0), яка є частиною пакета програмного забезпечення GCG Wisconsin Genetics, версія 10 (доступного від Accelrys, Inc., 9685 Scranton Rd., Сан-Дієго, Каліфорнія, США). Використовуючи програму ALIGN для порівняння амінокислотних послідовностей, можна застосовувати таблицю ваг замінів

амінокислотних залишків PAM120, штраф за продовження гепа, що дорівнює 12, та штраф за відкриття гепа, що дорівнює 4.

5 Якщо не зазначене інше, буде застосовуватися GAP версії 10, у якому застосовується алгоритм за Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48(3):443-453, для визначення ідентичності або подібності послідовностей із застосуванням наступних параметрів: % ідентичності та % подібності для нуклеотидної послідовності із застосуванням ваги гепа, яка дорівнює 50, і ваги довжини, яка дорівнює 3, і матриці замін `nwsgardna.cmp`; % ідентичності або % подібності для амінокислотної послідовності із застосуванням ваги гепа, що дорівнює 8, і ваги довжини, що дорівнює 2, і програми підрахунку BLOSUM62. Також можна застосовувати еквівалентні програми. Під "еквівалентною програмою" мається на увазі будь-яка програма для порівняння послідовностей, у якій для будь-яких двох розглянутих послідовностей здійснюється побудова вирівнювання, яке характеризується ідентичними збігами нуклеотидних залишків та ідентичною відсотковою ідентичністю послідовностей порівняно з відповідними вирівнюваннями, побудова яких здійснюється в GAP версії 10. Даний винахід також охоплює молекули варіантів нуклеїнових кислот. "Варіанти" нуклеотидних послідовностей, які кодують пестицидні білки, включають послідовності, які кодують пестицидні білки, розкриті у даному документі, але які мають консервативні відмінності внаслідок виродженості генетичного коду, а також такі, що є достатньою мірою ідентичними, як обговорювалося вище. Алельні варіанти, що трапляються у природі, можуть бути ідентифіковані із застосуванням добре відомих методик молекулярної біології, таких як полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) та методики гібридизації, представлені у загальному вигляді нижче. Варіанти нуклеотидних послідовностей також включають нуклеотидні послідовності, отримані синтетично, які були утворені, наприклад, за допомогою застосування сайт-спрямованого мутагенезу, але які, як і раніше, кодують пестицидні білки, розкриті в даному винаході, як обговорюється нижче. Варіанти білків, охоплювані даним винаходом, є біологічно активними, тобто вони продовжують мати бажану біологічну активність нативного білка, тобто пестицидну активність. Під виразом "зберігає активність" мається на увазі, що варіант буде мати пестицидну активність, яка становить щонайменше приблизно 30 %, щонайменше приблизно 50 %, щонайменше приблизно 70 % або щонайменше приблизно 80 % від такої нативного білка. Способи вимірювання пестицидної активності добре відомі в даній галузі техніки. Див., наприклад, Czaplá and Lang (1990) *J. Econ. Entomol.* 83: 2480-2485; Andrews et al. (1988) *Biochem. J.* 252:199-206; Marrone et al. (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293; і патент США № 5743477, усі з яких включено в даний документ за допомогою посилання у всій своїй повноті.

35 Фахівець у даній галузі додатково визнає, що за допомогою мутації нуклеотидних послідовностей за даним винаходом можуть бути внесені зміни, що зумовлює, таким чином, зміни у амінокислотній послідовності кодованих пестицидних білків без зміни біологічної активності білків. Таким чином, молекули варіантів виділених нуклеїнових кислот можна створити шляхом впровадження одного або декількох з нуклеотидних замін, додавань або делецій у відповідну нуклеотидну послідовність, розкриту в даному документі, таким чином, що в кодований білок впроваджується одне або декілька з амінокислотних замін, додавань або делецій. Мутації можна впроваджувати за допомогою стандартних методик, таких як сайт-спрямований мутагенез та ПЛР-опосередкований мутагенез. Такі варіанти нуклеотидних послідовностей також охоплено даним винаходом.

45 Наприклад, консервативні амінокислотні заміни можна зробити стосовно одного або декількох передбачених несуттєвих амінокислотних залишків. "Несуттєвий" амінокислотний залишок являє собою залишок, який можна змінити в послідовності дикого типу пестицидного білка без зміни біологічної активності, у той час як "істотний" амінокислотний залишок є необхідним для біологічної активності. "Консервативна амінокислотна заміна" є такою, за якої амінокислотний залишок заміщають амінокислотним залишком, що має подібний бічний ланцюг. Родини амінокислотних залишків, які мають подібні бічні ланцюги, визначені у даній галузі техніки. Ці родини включають амінокислоти з основними бічними ланцюгами (наприклад, лізин, аргінін, гістидин), кислими бічними ланцюгами (наприклад, аспарагінова кислота, глутамінова кислота), незарядженими полярними бічними ланцюгами (наприклад, гліцин, аспарагін, глутамін, серин, треонін, тирозин, цистеїн), неполярними бічними ланцюгами (наприклад, аланін, валін, лейцин, ізолейцин, пролін, фенілаланін, метіонін, триптофан), бета-розгалуженими бічними ланцюгами (наприклад, треонін, валін, ізолейцин) та ароматичними бічними ланцюгами (наприклад, тирозин, фенілаланін, триптофан, гістидин).

60 Амінокислотні заміни можна зробити в неконсервативних ділянках, які зберігають свою функцію. Зазвичай такі заміни не можна зробити стосовно консервативних амінокислотних залишків або стосовно амінокислотних залишків, які розташовані у консервативному мотиві, де

такі залишки є істотними для активності білка. Приклади залишків, які є консервативними і які можуть бути істотними для активності білка, включають, наприклад, залишки, які є ідентичними серед усіх білків, що містяться у вирівнюванні токсинів, подібних або споріднених стосовно послідовностей за даним винаходом (наприклад, залишки, які є ідентичними у вирівнюванні 5 гомологічних білків). Приклади залишків, які є консервативними, але стосовно яких можна дозволяти консервативні амінокислотні заміни, і які, як і раніше, зберігають активність, включають, наприклад, залишки, що характеризуються тільки консервативними замінами серед усіх білків, що містяться у вирівнюванні токсинів, подібних або споріднених стосовно послідовностей за даним винаходом (наприклад, залишки, що характеризуються тільки консервативними замінами серед усіх білків, що містяться у вирівнюванні гомологічних білків). 10 Однак, фахівець у даній галузі зрозуміє, що функціональні варіанти можуть мати мінорні консервативні або неконсервативні зміни консервативних залишків.

Альтернативно, варіанти нуклеотидних послідовностей можна створити шляхом випадкового впровадження мутацій у всю кодуючу послідовність або її частину, як, наприклад, 15 шляхом насичувального мутагенезу, а отриманих мутантів можна піддавати скринінгу стосовно їх здатності надавати пестицидну активність, щоб ідентифікувати мутантів, які зберігають активність. Після мутагенезу кодований білок може експресуватися рекомбінантним шляхом, і активність білка можна визначити за допомогою стандартних методик аналізу.

Застосовуючи способи, такі як ПЛР, гібридизація тощо, можна ідентифікувати відповідні 20 пестицидні послідовності, при цьому такі послідовності мають істотну ідентичність стосовно послідовностей за даним винаходом. Див., наприклад, Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) та Innis, et al. (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, NY).

У способі гібридизації всю пестицидну нуклеотидну послідовність або її частину можна 25 застосовувати для скринінгу бібліотек кДНК або геномних бібліотек. Способи конструювання таких бібліотек кДНК та геномних бібліотек, як правило, відомі в даній галузі техніки та розкриті в Sambrook and Russell, 2001, *supra*. Так звані гібридизаційні зонди можуть бути фрагментами геномної ДНК, фрагментами кДНК, фрагментами РНК або іншими олігонуклеотидами та можуть бути міченими детективною групою, такою як ³²P, або будь-яким іншим детективним маркером, 30 таким як інший радіоактивний ізотоп, флуоресцентна сполука, фермент або кофактор ферменту. Зонди для гібридизації можна створити шляхом мічення синтетичних олігонуклеотидів на основі відомої нуклеотидної послідовності, яка кодує пестицидний білок, розкритої у даному документі. Додатково можна застосовувати вироджені праймери, розроблені на основі консервативних нуклеотидів або амінокислотних залишків у нуклеотидній 35 послідовності або кодованій амінокислотній послідовності. Зонд зазвичай містить ділянку нуклеотидної послідовності, яка гібридується в жорстких умовах щонайменше із приблизно 12, щонайменше із приблизно 25, щонайменше із приблизно 50, 75, 100, 125, 150, 175 або 200 послідовними нуклеотидами нуклеотидної послідовності, яка кодує пестицидний білок за даним винаходом, або її фрагмента або варіанта. Способи отримання зондів для гібридизації, як 40 правило, відомі в даній галузі техніки та розкриті в Sambrook and Russell, 2001, *supra*, включеному в даний документ за допомогою посилання.

Наприклад, усю пестицидну послідовність, розкрити в даному документі, або одну або декілька її частин можна застосовувати як зонд, здатний до специфічної гібридизації з 45 відповідними послідовностями, подібними до таких пестицидного білка, та матричними РНК. Для досягнення специфічної гібридизації в різних умовах такі зонди включають в себе послідовності, що є унікальними та переважно мають довжину щонайменше приблизно 10 нуклеотидів або мають довжину щонайменше приблизно 20 нуклеотидів. Такі зонди можна застосовувати для ампліфікації відповідних пестицидних послідовностей з вибраного організму за допомогою ПЛР. Дану методику можна застосовувати для виділення додаткових кодуючих 50 послідовностей з бажаного організму або як діагностичний аналіз для визначення наявності кодуючих послідовностей в організмі. Методики гібридизації включають гібридизаційний скринінг бібліотек ДНК, висіяних на чашки (бляшок або колоній; див., наприклад, Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York)).

Таким чином, даний винахід охоплює зонди для гібридизації, а також нуклеотидні 55 послідовності, здатні до гібридизації з усією нуклеотидною послідовністю за даним винаходом або з її частиною (довжина якої становить, наприклад, щонайменше приблизно 100 нуклеотидів, щонайменше приблизно 200, щонайменше приблизно 300, 400, 500, 600, 800, 1000, 1250, 1500 або аж до повної довжини нуклеотидної послідовності, розкритої в даному документі). 60 Гібридизація таких послідовностей може бути проведена в жорстких умовах. Під "жорсткими

умовами" або "жорсткими умовами гібридизації" маються на увазі умови, у яких зонд буде гібридизуватися з його цільовою послідовністю помітно більшою мірою, ніж з іншими послідовностями (наприклад, з перевищенням фонового рівня щонайменше у 2 рази). Жорсткі умови залежать від послідовності та будуть відрізнятися за різних обставин. Шляхом регуляції жорсткості гібридизації та/або умов промивання можна ідентифікувати цільові послідовності, на 100 % комплементарні стосовно зонда (застосування гомологічного зонда). Альтернативно, умови жорсткості можна коригувати для того, щоб дозволити певний незбіг у послідовностях таким чином, що будуть виявлятися нижчі ступені подібності (застосування гетерологічного зонда). Зонд звичайно має довжину, що становить менше ніж приблизно 1000 нуклеотидів, переважно має довжину, що становить менше ніж 500 нуклеотидів.

Жорсткі умови зазвичай будуть такими, у яких концентрація солі становить менше ніж приблизно 1,5 М іонів Na, звичайно будучи концентрацією іонів Na (або інших солей), яка становить від приблизно 0,01 до 1,0 М при pH від 7,0 до 8,3, а температура становить щонайменше приблизно 30 °C для коротких зондів (наприклад, від 10 до 50 нуклеотидів) та щонайменше приблизно 60 °C для довгих зондів (наприклад, більше 50 нуклеотидів). Жорстких умов також можна досягти шляхом додавання дестабілізуювальних засобів, таких як формамід. Ілюстративні умови зниженої жорсткості включають гібридизацію з буферним розчином, що містить 30-35 % формамід, 1 М NaCl, 1 % SDS (додецилсульфат натрію), при 37 °C та промивання в 1X-2X SSC (20X SSC=3,0 М NaCl/0,3 М цитрат тринатрію) при 50-55 °C. Ілюстративні умови помірної жорсткості включають гібридизацію в 40-45 % формаміді, 1,0 М NaCl, 1 % SDS при 37 °C та промивання в 0,5X-1X SSC при 55-60 °C. Ілюстративні умови підвищеної жорсткості включають гібридизацію в 50 % формаміді, 1 М NaCl, 1 % SDS при 37 °C та промивання в 0,1X SSC при 60-65 °C. Промивні буфери необов'язково можуть містити від приблизно 0,1 % до приблизно 1 % SDS. Тривалість гібридизації, як правило, становить менше ніж приблизно 24 години, звичайно від приблизно 4 до приблизно 12 годин.

Специфічність звичайно залежить від промивань після гібридизації, при цьому критичними чинниками є іонна сила та температура кінцевого промивного розчину. Для гібридів ДНК-ДНК T_m можна приблизно визначити з рівняння за Meinkoth and Wahl (1984) *Anal. Biochem.* 138:267-284: $T_m = 81,5 \text{ } ^\circ\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\%GC) - 0,61 (\% \text{ форм}) - 500/L$; де M являє собою молярну концентрацію моновалентних катіонів, %GC являє собою відсотковий вміст гуанозинових та цитозинових нуклеотидів у ДНК, % форм являє собою відсотковий вміст формаміду в гібридизаційному розчині, а L являє собою довжину гібрида в парах основ. T_m являє собою температуру (за певних іонної сили та pH), за якої 50 % комплементарної цільової послідовності гібридується із зондом, що абсолютно збігається. T_m знижують на приблизно 1 °C з кожним 1 % незбігу; таким чином, T_m , умови гібридизації та/або промивання можна відкоригувати для гібридизації з послідовностями, які мають бажану ідентичність. Наприклад, якщо проводять пошук послідовностей з ≥ 90 % ідентичністю, то T_m можна знизити на 10 °C. Зазвичай жорсткі умови вибирають так, щоб температура була на приблизно 5 °C нижче за точку плавлення (T_m) конкретної послідовності та комплементарної їй послідовності за певних іонної сили та pH. Однак, в умовах надзвичайної жорсткості можна використовувати температуру гібридизації та/або промивання, на 1, 2, 3 або 4 °C нижчу за точку плавлення (T_m); в умовах помірної жорсткості можна використовувати температуру гібридизації та/або промивання, на 6, 7, 8, 9 або 10 °C нижчу за точку плавлення (T_m); в умовах зниженої жорсткості можна використовувати температуру гібридизації та/або промивання, на 11, 12, 13, 14, 15 або 20 °C нижчу за точку плавлення (T_m). Застосовуючи рівняння, гібридизаційні та промивні композиції та бажану T_m , середній фахівець у даній галузі зрозуміє, що зміни жорсткості гібридизаційних та/або промивних розчинів описані по своїй суті. Якщо бажаний ступінь незбігу дає в результаті T_m менше 45 °C (водний розчин) або 32 °C (розчин формаміду), переважно підвищувати концентрацію SSC, так щоб можна було застосовувати вищу температуру. Великий посібник з гібридизації нуклеїнових кислот міститься в Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes, Part I, Chapter 2* (Elsevier, New York); та Ausubel et al., eds. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology, Chapter 2* (Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York). Див. Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York).

Виділені білки, а також їх варіанти та фрагменти

Пестицидні білки також охоплено даним винаходом. Під "пестицидним білком" мається на увазі білок, що має амінокислотну послідовність, наведену під SEQ ID №: 2, 3 або 4. Також представлено фрагменти, біологічно активні частини та їх варіанти, і вони можуть бути використані для практичного здійснення способів даного винаходу. Вираз "виділений білок" або "рекомбінантний білок" застосовується для позначення білка, який більше не перебуває у

своєму природному середовищі, наприклад, перебуває в умовах *in vitro* або в рекомбінантній бактеріальній або рослинній клітині-хазяїні.

"Фрагменти" або "біологічно активні частини" включають фрагменти поліпептидів, які містять амінокислотні послідовності, достатньою мірою ідентичні стосовно амінокислотних послідовностей, наведених під SEQ ID №: 2, 3 або 4, та які проявляють пестицидну активність. Біологічно активна частина пестицидного білка може являти собою поліпептид завдовжки, наприклад, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 або більше амінокислот. Такі біологічно активні частини можна отримати за допомогою методик рекомбінантних молекул та оцінити стосовно пестицидної активності. Способи вимірювання пестицидної активності добре відомі в даній галузі техніки. Див., наприклад, Czapla and Lang (1990) *J. Econ. Entomol.* 83:2480-2485; Andrews et al. (1988) *Biochem. J.* 252:199-206; Marrone et al. (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293; та патент США № 5743477, усі з яких включено в даний документ за допомогою посилання у всій своїй повноті. Як застосовується в даному документі, фрагмент містить щонайменше 8 суміжних амінокислот SEQ ID №: 2, 3 або 4. Даний винахід охоплює, однак, інші фрагменти, як, наприклад, будь-який фрагмент білка завдовжки більше ніж приблизно 10, 20, 30, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 або більше амінокислот.

У деяких варіантах здійснення фрагмент характеризується N-кінцевим або C-кінцевим усіканням щонайменше приблизно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25 або більше амінокислот порівняно з SEQ ID №: 2, 3 або 4.

Під "варіантами" маються на увазі білки або поліпептиди, що мають амінокислотну послідовність, щонайменше на приблизно 60 %, 65 %, приблизно 70 %, 75 %, приблизно 80 %, 85 %, приблизно 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичну стосовно амінокислотної послідовності з SEQ ID №: 2, 3 або 4. Варіанти також включають поліпептиди, кодовані молекулою нуклеїнової кислоти, яка гібридується з молекулою нуклеїнової кислоти SEQ ID №: 1 або з комплементарною їй послідовністю у жорстких умовах. Варіанти включають поліпептиди, що відрізняються за амінокислотною послідовністю у зв'язку з мутагенезом. Варіанти білків, охоплювані даним винаходом, є біологічно активними, тобто вони продовжують мати бажану біологічну активність нативного білка, тобто зберігати пестицидну активність. У деяких варіантах здійснення варіанти мають поліпшену активність порівняно з нативним білком. Способи вимірювання пестицидної активності добре відомі в даній галузі техніки. Див., наприклад, Czapla and Lang (1990) *J. Econ. Entomol.* 83:2480-2485; Andrews et al. (1988) *Biochem. J.* 252:199-206; Marrone et al. (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293; та патент США № 5743477, усі з яких включено в даний документ за допомогою посилання у всій своїй повноті.

Гени бактерій, такі як гени ахті за даним винаходом, досить часто мають декілька метіонінових ініціаторних кодонів у безпосередній близькості від початку відкритої рамки зчитування. Часто ініціація трансляції на одному або декількох із цих стартових кодонів зумовлює утворення функціонального білка. Ці стартові кодони можуть включати ATG-кодони. Однак, бактерії, такі як *Bacillus sp.*, також розпізнають GTG-кодон як стартовий кодон, та білки, що ініціюють трансляцію на GTG-кодонах, містять амінокислоту метіонін у першому положенні. У рідкісних випадках трансляція у бактеріальних системах може ініціюватися на TTG-кодоні, хоча у цьому випадку TTG кодує метіонін. Крім того, часто не визначено а пріорі, який з цих кодонів застосовують у бактерії природним чином. Таким чином, зрозуміло, що застосування одного з альтернативних метіонінових кодонів також може зумовлювати утворення пестицидних білків. Ці пестицидні білки охоплено даним винаходом, і їх можна застосовувати в способах за даним винаходом. Буде зрозуміло, що у разі експресії в рослинах буде необхідно змінювати альтернативний стартовий кодон на ATG для належної трансляції.

У різних варіантах здійснення даного винаходу пестицидні білки містять амінокислотні послідовності, які розшифровано на базі нуклеотидних послідовностей повної довжини, розкритих у даному документі, та амінокислотні послідовності, які є коротшими, ніж послідовності повної довжини, у зв'язку із застосуванням альтернативного сайту ініціації, розташованого нижче. Таким чином, нуклеотидна послідовність за даним винаходом та/або вектори, клітини-хазяїни та рослини, які містять нуклеотидну послідовність за даним винаходом (і способи отримання та застосування нуклеотидної послідовності за даним винаходом), можуть містити нуклеотидну послідовність, яка кодує амінокислотну послідовність, що відповідає залишкам 19-536 SEQ ID №: 2 (наведеним під SEQ ID №: 3) або залишкам 21-536 SEQ ID №: 2 (наведеним під SEQ ID №: 4).

Також охоплено антитіла до поліпептидів за даним винаходом або до їх варіантів або фрагментів. Способи отримання антитіл добре відомі у даній галузі техніки (див., наприклад, Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold

Spring Harbor, NY; патент США № 4196265).

Таким чином, один аспект даного винаходу стосується антитіл, одноланцюгових антиген-зв'язувальних молекул або інших білків, що специфічно зв'язуються з однією або декількома молекулами білків або пептидів за даним винаходом та їх гомологами, молекулами злиття або
5 фрагментами. В особливо переважному варіанті здійснення антитіло специфічно зв'язується з білком, який має амінокислотну послідовність, наведену під SEQ ID №: 2, 3 або 4, або з його фрагментом. В іншому варіанті здійснення антитіло специфічно зв'язується з білком злиття, який містить амінокислотну послідовність, вибрану з амінокислотної послідовності, наведеної під SEQ ID №: 2, 3 або 4, або з його фрагментом.

Антитіла за даним винаходом можна застосовувати для кількісного або якісного виявлення молекул білків або пептидів за даним винаходом або для виявлення посттрансляційних модифікацій білків. Як застосовується у даному документі, кажуть, що антитіло або пептид "специфічно зв'язуються" з молекулою білка або пептиду за даним винаходом, якщо таке зв'язування не зазнає конкурентного інгібування завдяки наявності неспоріднених молекул.
10

Змінені або поліпшені варіанти

Вважається, що послідовності ДНК, які кодують пестицидний білок, можна змінювати за допомогою різних способів, і що ці зміни можуть давати в результаті послідовності ДНК, які кодують білки з амінокислотними послідовностями, відмінними від кодованих у пестицидному білку за даним винаходом. Цей білок можна змінювати в різні способи, включаючи
20 амінокислотні заміни, делеції, усікання та вставки однієї або декількох амінокислот SEQ ID №: 2, 3 або 4, включаючи до приблизно 2, приблизно 3, приблизно 4, приблизно 5, приблизно 6, приблизно 7, приблизно 8, приблизно 9, приблизно 10, приблизно 15, приблизно 20, приблизно 25, приблизно 30, приблизно 35, приблизно 40, приблизно 45, приблизно 50, приблизно 55, приблизно 60, приблизно 65, приблизно 70, приблизно 75, приблизно 80, приблизно 85,
25 приблизно 90, приблизно 100, приблизно 105, приблизно 110, приблизно 115, приблизно 120, приблизно 125, приблизно 130, приблизно 135, приблизно 140, приблизно 145, приблизно 150, приблизно 155 або більше амінокислотних замін, делецій або вставок. Способи таких дій добре відомі у даній галузі техніки. Наприклад, варіанти амінокислотних послідовностей пестицидного білка можна отримати за допомогою мутацій у ДНК. Це також може бути виконано за допомогою однієї або декількох форм мутагенезу та/або під час спрямованого розвитку. У деяких аспектах зміни, кодовані в амінокислотній послідовності, не будуть істотно впливати на функцію білка. Такі варіанти будуть мати бажану пестицидну активність. Проте зрозуміло, що здатність пестицидного білка до надання пестицидної активності можна поліпшити шляхом застосування таких методик стосовно композицій за даним винаходом. Наприклад, можна експресувати
35 пестицидний білок у клітинах-хазяїнах, які проявляють високі показники помилкового включення основ під час реплікації ДНК, таких як XL-1 Red (Stratagene, Ла-Хойя, Каліфорнія). Після розмноження таких штамів можна виділити ДНК (наприклад, шляхом отримання плазмідної ДНК або шляхом ампліфікації за допомогою ПЛР та клонування отриманого в результаті ПЛР фрагмента у вектор), підтримувати мутації пестицидних білків у культурі немутагенного штаму та ідентифікувати мутантні гени з пестицидною активністю, наприклад, шляхом здійснення аналізу для тестування щодо пестицидної активності. Як правило, білок змішують та застосовують в аналізах харчування. Див., наприклад, Marrone et al. (1985) J. of Economic Entomology 78:290-293. Такі аналізи можуть включати приведення рослин у контакт з одним або декількома шкідниками та визначення здатності рослини до виживання та/або викликання загибелі шкідників. Приклади мутацій, які зумовлюють підвищену токсичність, містяться у
45 Schnepf et al. (1998) Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62:775-806.

Альтернативно, в білкову послідовність багатьох білків можуть бути внесені зміни на аміно- або карбокси-кінці без істотного впливу на активність. Вони можуть включати вставки, делеції або зміни, впроваджені за допомогою сучасних молекулярних способів, таких як ПЛР, включаючи ПЛР-ампліфікації, які змінюють або подовжують послідовність, що кодує білок, за допомогою включення послідовностей, які кодують амінокислоти, в олігонуклеотиди, використовуваних в ПЛР-ампліфікації. Альтернативно, білкові послідовності, що додаються, можуть включати цілі послідовності, які кодують білки, такі як широко застосовувані у даній галузі техніки для утворення білків злиття. Такі білки злиття часто застосовують для (1) підвищення рівня експресії білка, що становить інтерес, (2) впровадження зв'язувального домену, ферментативної активності або епітопу для сприяння очищенню білка, виявленню білка або іншим шляхам експериментального застосування, відомим у даній галузі техніки, (3) цільової секреції або трансляції білка у субклітинну органелу, таку як периплазматичний простір грамнегативних бактерій або ендоплазматичний ретикулум еукаріотичних клітин, при цьому остання часто зумовлює глікозилювання білка.
60

Варіанти нуклеотидних та амінокислотних послідовностей за даним винаходом також охоплюють послідовності, отримані в результаті мутагенних та рекомбіногенних процедур, таких як ДНК-шафлінг. За допомогою такої процедури одну або декілька різних ділянок, які кодуєть пестицидний білок, можна застосовувати для створення нового пестицидного білка, який має бажані властивості. Таким чином, бібліотеки рекомбінантних полінуклеотидів утворюють із сукупності полінуклеотидів зі спорідненими послідовностями, які містять ділянки послідовностей, що мають значну ідентичність послідовностей та можуть бути піддані гомологічній рекомбінації в умовах *in vitro* або *in vivo*. Наприклад, використовуючи такий підхід, мотиви послідовностей, які кодуєть домен, що становить інтерес, можна піддати шафлінгу між пестицидним геном за даним винаходом та іншими відомими пестицидними генами з отриманням нового гена, який кодує білок з поліпшеною властивістю, що становить інтерес, такою як підвищена інсектицидна активність. Стратегії такого ДНК-шафлінгу відомі в даній галузі техніки. Див., наприклад, Stemmer (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-10751; Stemmer (1994) *Nature* 370:389-391; Cramer et al. (1997) *Nature Biotech.* 15:436-438; Moore et al. (1997) *J. Mol. Biol.* 272:336-347; Zhang et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4504-4509; Cramer et al. (1998) *Nature* 391:288-291; та патенти США №№ 5605793 та 5837458.

Перестановка або шафлінг доменів являє собою інший механізм для утворення змінених пестицидних білків. Домени можна піддати перестановці між пестицидними білками (у тому числі, наприклад, білком Axmi205, викладеним у публікації патенту США № 20110023184), що дає у результаті гібридні або химерні токсини з поліпшеними пестицидною активністю або спектром дії на цільові організми. Способи утворення рекомбінантних білків та їх тестування щодо пестицидної активності добре відомі у даній галузі техніки (див., наприклад, Naimov et al. (2001) *Appl. Environ. Microbiol.* 67:5328-5330; de Maagd et al. (1996) *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1537-1543; Ge et al. (1991) *J. Biol. Chem.* 266:17954-17958; Schnepf et al. (1990) *J. Biol. Chem.* 265:20923-20930; Rang et al. (1999) *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2918-2925).

Вектори

Пестицидну послідовність за даним винаходом можна забезпечити в експресійній касеті для експресії у рослині, яка становить інтерес. Під "експресійною касетою для рослини" мається на увазі ДНК-конструкт, здатний зумовлювати експресію білка з відкритої рамки зчитування в рослинній клітині. Він зазвичай містить промотор та кодуєчу послідовність. Такі конструкти також часто містять 3'-нетрансльовану ділянку. Такі конструкти можуть містити "сигнальну послідовність" або "лідерну послідовність", яка сприяє котрансляційному або посттрансляційному транспорту пептиду в певні внутрішньоклітинні структури, такі як хлоропласт (або інша пластида), ендоплазматичний ретикулум або апарат Гольджі.

Під "сигнальною послідовністю" мається на увазі послідовність, яка, як відомо або як припускають, зумовлює котрансляційний або посттрансляційний транспорт пептидів клітинною мембраною. В еукаріот він зазвичай включає секрецію в апарат Гольджі з певним глікозилюванням, яке відбувається у результаті. Інсектицидні токсини бактерій часто синтезуються як протоксини, які зазнають протеолітичної активації у кишці цільового шкідника (Chang (1987) *Methods Enzymol.* 153:507-516). У деяких варіантах здійснення даного винаходу сигнальна послідовність перебуває у нативній послідовності або може бути отримана з послідовності за даним винаходом. Під "лідерною послідовністю" мається на увазі будь-яка послідовність, яка під час трансляції дає в результаті амінокислотну послідовність, достатню для запуску котрансляційного транспорту пептидного ланцюга в субклітинну органелу. Таким чином, це поняття включає лідерні послідовності, які цілеспрямовано впливають на транспорт та/або глікозилювання шляхом проходження в ендоплазматичний ретикулум, проходження у вакуолі, пластиди, у тому числі хлоропласти, мітохондрії тощо.

Під "вектором для трансформації рослин" мається на увазі молекула ДНК, необхідна для ефективною трансформації рослинної клітини. Така молекула може складатися з однієї або декількох експресійних касет для рослин і може бути організованою в більш ніж одну "векторну" молекулу ДНК. Наприклад, бінарні вектори являють собою вектори для трансформації рослин, у яких використовуються два несуміжні ДНК-вектори, які кодуєть усі необхідні *cis*- та *trans*-діючі функції для трансформації рослинних клітин (Hellens and Mullineaux (2000) *Trends in Plant Science* 5:446-451). "Вектор" стосується конструкта нуклеїнової кислоти, призначеного для перенесення між різними клітинами-хазяїнами. "Вектор експресії" стосується вектора, що має здатність до включення, інтеграції та експресії гетерологічних послідовностей ДНК або фрагментів у чужорідній клітині. Касета буде включати 5'- та/або 3'-регуляторні послідовності, функціонально пов'язані з послідовностями за даним винаходом. Під "функціонально пов'язаним" мається на увазі функціональний зв'язок між промотором і другою послідовністю, де промоторна послідовність ініціює та опосередковує транскрипцію послідовності ДНК,

відповідної до другої послідовності. Зазвичай "функціонально пов'язаний" означає, що послідовності пов'язаних нуклеїнових кислот являються суміжними, та, якщо є необхідність з'єднати дві ділянки, що кодують білок, вони є суміжними та перебувають в одній і тій самій рамці читування. Касета може додатково містити щонайменше один додатковий ген для котрансформації в організм. Альтернативно, додатковий ген (гени) можна забезпечувати в декількох експресійних касетах.

У різних варіантах здійснення нуклеотидна послідовність за даним винаходом є функціонально пов'язаною з промотором, наприклад, з промотором рослини. "Промотор" стосується послідовності нуклеїнової кислоти, що функціонує для керування транскрипцією кодуючої послідовності, розташованої нижче. Промотор, а також інші послідовності нуклеїнових кислот, які регулюють транскрипцію та трансляцію (що також мають назву "контрольних послідовностей"), є необхідними для експресії послідовності ДНК, що становить інтерес.

Така експресійна касета забезпечується з багатьма сайтами рестрикції для вставки пестицидної послідовності, регуляцію транскрипції якої будуть здійснювати регуляторні ділянки.

Експресійна касета у напрямку транскрипції 5'-3' буде включати ділянку ініціації транскрипції та трансляції (тобто промотор), послідовність ДНК за даним винаходом та ділянку термінації транскрипції та трансляції (тобто ділянку термінації), що функціонують у рослинах. Промотор може бути нативним або аналогічним, або чужорідним або гетерологічним щодо рослини-хазяїна та/або послідовності ДНК за даним винаходом. Додатково, промотор може являти собою природну послідовність або, альтернативно, синтетичну послідовність. Якщо промотор є "нативним" або "гомологічним" стосовно рослини-хазяїна, мається на увазі, що промотор трапляється в нативній рослині, у яку вводять промотор. Якщо промотор є "чужорідним" або "гетерологічним" стосовно послідовності ДНК за даним винаходом, мається на увазі, що промотор не є нативним або таким, що трапляється у природі, промотором стосовно функціонально пов'язаної послідовності ДНК за даним винаходом.

Ділянка термінації може бути нативною стосовно ділянки ініціації транскрипції, може бути нативною стосовно функціонально зв'язаної послідовності ДНК, що становить інтерес, може бути нативною стосовно рослини-хазяїна або може походити з іншого джерела (тобто чужорідного або гетерологічного стосовно промотора, послідовності ДНК, що становить інтерес, рослини-хазяїна або будь-якої їх комбінації). Придатні ділянки термінації доступні з Ті-плазмиди *A. tumefaciens*, такі як ділянки термінації генів октопінсинтази та нопалінсинтази. Див. також Guerineau et al. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 262:141-144; Proudfoot (1991) *Cell* 64:671-674; Sanfacon et al. (1991) *Genes Dev.* 5:141-149; Mogen et al. (1990) *Plant Cell* 2:1261-1272; Munroe et al. (1990) *Gene* 91:151-158; Ballas et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:7891-7903; та Joshi et al. (1987) *Nucleic Acid Res.* 15:9627-9639.

У разі необхідності ген (гени) можна оптимізувати для експресії у трансформованій клітині-хазяїні на підвищеному рівні. Це означає, що гени можна синтезувати за допомогою кодонів, переважних для клітини-хазяїна, для поліпшення експресії або можна синтезувати за допомогою кодонів з частотою використання кодона, переважною для хазяїна. Вміст GC у гені зазвичай буде підвищеним. Див., наприклад, Campbell and Gowri (1990) *Plant Physiol.* 92:1-11 щодо обговорення частоти використання кодона, переважної для хазяїна. Способи синтезу генів, переважних для рослин, доступні у даній галузі техніки. Див., наприклад, патенти США №№ 5380831 та 5436391, публікацію патенту США № 20090137409 та Murray et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:477-498, включені у даний документ за допомогою посилання.

В одному варіанті здійснення пестицидний білок націлений на хлоропласт для експресії. Таким чином, якщо пестицидний білок не є безпосередньо введеним у хлоропласт, то експресійна касета буде додатково містити нуклеїнову кислоту, яка кодує транзитний пептид для спрямування пестицидного білка у хлоропласти. Такі транзитні пептиди відомі в даній галузі техніки. Див., наприклад, Von Heijne et al. (1991) *Plant Mol. Biol. Rep.* 9:104-126; Clark et al. (1989) *J. Biol. Chem.* 264:17544-17550; Della-Cioppa et al. (1987) *Plant Physiol.* 84:965-968; Romer et al. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196:1414-1421; та Shah et al. (1986) *Science* 233:478-481.

Пестицидний ген, що підлягає націлюванню на хлоропласт, може бути оптимізованим для експресії у хлоропласті для підрахунку відмінностей у частоті використання кодона між рослинним ядром та цією органелою. Таким чином, нуклеїнові кислоти, які становлять інтерес, можна синтезувати за допомогою кодонів, переважних для хлоропластів. Див., наприклад, патент США № 5380831, включений у даний документ за допомогою посилання.

Трансформація рослин

Способи за даним винаходом включають введення нуклеотидного конструкта в рослину. Під "введенням" мається на увазі представлення нуклеотидного конструкта рослині таким чином, що конструкт отримує доступ до внутрішньої частини клітини рослини. Способи за даним

винаходом не вимагають того, щоб застосовували конкретний спосіб впровадження нуклеотидного конструкта у рослину, а тільки того, щоб нуклеотидний конструкт отримував доступ до внутрішньої частини щонайменше однієї клітини рослини. Способи введення нуклеотидних конструктів у рослини відомі у даній галузі техніки, у тому числі, без обмеження, способи стабільної трансформації, способи транз'єнтної трансформації та способи, опосередковані вірусами.

Під "рослиною" маються на увазі цілі рослини, органи рослин (наприклад, листя, стебла, коріння тощо), насіння, рослинні клітини, пагони, зародки та їх потомство. Рослинні клітини можуть бути диференційованими або недиференційованими (наприклад, калюс, клітини суспензійної культури, протопласти, клітини листка, клітини кореня, клітини флоєми, пиліок).

"Трансгенні рослини", або "трансформовані рослини", або "стабільно трансформовані" рослини, або клітини, або тканини стосуються рослин, що мають включені або інтегровані послідовності екзогенних нуклеїнових кислот або фрагменти ДНК у рослинній клітині. Ці послідовності нуклеїнових кислот включають такі, що є екзогенними або не є присутніми у нетрансформованій рослинній клітині, а також такі, які можуть бути ендогенними або присутніми у нетрансформованій рослинній клітині. "Гетерологічний", як правило, присутється послідовностей нуклеїнових кислот, які не є ендогенними стосовно клітини або частини нативного генома, в якому вони присутні, і додаються у клітину шляхом інфікування, трансфекції, мікроін'єкції, електропорації, мікропроекції або т. ін.

Трансгенні рослини за даним винаходом експресують одну або декілька послідовностей нового токсину, розкритих у даному документі. У різних варіантах здійснення трансгенна рослина додатково містить один або декілька додаткових генів стійкості до комах (наприклад, *Cry1*, такі як представники родин *Cry1A*, *Cry1B*, *Cry1C*, *Cry1D*, *Cry1E* та *Cry1F*; *Cry2*, такі як представники родини *Cry2A*; *Cry9*, такі як представники родин *Cry9A*, *Cry9B*, *Cry9C*, *Cry9D*, *Cry9E* та *Cry9F*; тощо). Фахівцеві у даній галузі буде зрозуміло, що трансгенна рослина може містити будь-який ген, який надає агрономічну ознаку, що становить інтерес.

Трансформацію рослинних клітин можна виконувати за допомогою однієї з декількох методик, відомих у даній галузі техніки. Пестицидний ген за даним винаходом можна модифікувати з отриманням або посиленням експресії у рослинних клітинах. Конструкт, який експресує такий білок, зазвичай буде містити промотор, що керує транскрипцією гена, а також 3'-нетрансльовану ділянку, яка забезпечує можливість термінації транскрипції та поліаденілювання. Організація таких конструктів добре відома у даній галузі техніки. У деяких випадках може бути корисним таке конструювання гена, що отримуваний у результаті пептид секретується або в інший спосіб націлюється у рослинній клітині. Наприклад, ген може бути сконструйований таким, що містить сигнальний пептид, який сприяє перенесенню пептиду в ендоплазматичний ретикулум. Також може бути переважним таке конструювання експресійної касети для рослини, яка містить інтрон, що для експресії потрібен процесинг мРНК стосовно інтрона.

Зазвичай цю "експресійну касету для рослини" будуть вставляти у "вектор для трансформації рослин". Цей вектор для трансформації рослин може містити один або декілька ДНК-векторів, необхідних для досягнення трансформації рослин. Наприклад, звичайною практикою у даній галузі техніки є використання векторів для трансформації рослин, які містять більше одного суміжного сегмента ДНК. Ці вектори у даній галузі техніки часто мають назву "бінарних векторів". Бінарні вектори, а також вектори з хелперними плазмідами найчастіше застосовують у трансформації, опосередкованій *Agrobacterium*, де розмір і складність сегментів ДНК, необхідних для досягнення ефективною трансформації, є досить великими, і переважним є розподіл функцій між окремими молекулами ДНК. Бінарні вектори зазвичай містять плазмідні вектори, які містять цис-діючі послідовності, необхідні для перенесення Т-ДНК (такі як ліва гранична та права гранична), селективний маркер, сконструйований здатним до експресії в рослинній клітині, і "ген, що становить інтерес" (ген, сконструйований здатним до експресії в рослинній клітині, створення трансгенних рослин за яким є бажаним). Також у цьому плазмідному векторі присутні послідовності, необхідні для реплікації в бактерій. Цис-діючі послідовності розташовуються таким чином, щоб забезпечити можливість ефективного перенесення в рослинні клітини та експресії в них. Наприклад, селективний маркерний ген і пестицидний ген розташовуються між лівою та правою границями. Часто другий плазмідний вектор містить транс-діючі фактори, які опосередковують перенесення Т-ДНК з *Agrobacterium* у рослинні клітини. Ця плазміда часто містить фактори вірулентності (гени *Vir*), що забезпечують можливість інфікування рослинних клітин за допомогою *Agrobacterium* та перенесення ДНК шляхом розщеплення за пограничними послідовностями та *vir*-опосередкованого перенесення ДНК, як розуміють у даній галузі техніки (Hellens and Mullineaux (2000) Trends in Plant Science

5:446-451). Для трансформації рослин можна застосовувати декілька типів штамів *Agrobacterium* (наприклад, LBA4404, GV3101, EHA101, EHA105 тощо). Другий плазмідний вектор не є необхідним для трансформації рослин за допомогою інших способів, таких як мікропроекція, мікроін'єкція, електропорація, застосування поліетиленгліколю тощо.

5 У цілому, способи трансформації рослин включають перенесення гетерологічної ДНК у цільові рослинні клітини (наприклад, незрілі або зрілі зародки, суспензійні культури, недиференційований калюс, протопласти тощо) з наступним застосуванням відповідної селекції на максимальному граничному рівні (залежно від селективного маркерного гена) для виділення трансформованих рослинних клітин з групи нетрансформованих клітин у масі. Експлантати зазвичай переносять у свіжоприготовлений запас того самого середовища та культивують згідно зі стандартною методикою. Згодом трансформовані клітини диференціюються у паростки після поміщення в регенераційне середовище, доповнене селективним засобом на максимальному граничному рівні. Паростки потім переносять у селективне середовище для вкорінення для витягнення вкоріненних паростків або проростків. З трансгенного проростка потім виростає зріла рослина та виробляє фертильне насіння (наприклад, Hiei et al. (1994) *The Plant Journal* 6:271-282; Ishida et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14:745-750). Експлантати зазвичай переносять у свіжоприготовлений запас того самого середовища та культивують згідно зі стандартною методикою. Загальний опис методик і способів створення трансгенних рослин міститься в Ayres and Park (1994) *Critical Reviews in Plant Science* 13:219-239 та в Bommineni and Jauhar (1997) *Maydica* 42:107-120. Оскільки трансформований матеріал містить багато клітин, то в будь-якій ділянці цільових калюсу, або тканини, або групи клітин, що зазнають впливу, присутні як трансформовані, так і нетрансформовані клітини. Здатність до знищення нетрансформованих клітин та забезпечення можливості проліферації трансформованих клітин дає у результаті культури трансформованих рослин. Здатність до видалення нетрансформованих клітин часто обмежує швидке витягнення трансформованих рослинних клітин і вдале створення трансгенних рослин.

Протоколи трансформації, а також протоколи введення нуклеотидних послідовностей у рослини можуть відрізнятися залежно від типу рослини або рослинної клітини, тобто однодольних або дводольних, призначених для трансформації. Створення трансгенних рослин можна здійснювати за допомогою одного з декількох способів, включаючи, без обмеження, мікроін'єкцію, електропорацію, пряме перенесення генів, впровадження гетерологічної ДНК за допомогою *Agrobacterium* у рослинні клітини (трансформація, опосередкована *Agrobacterium*), бомбардування рослинних клітин за допомогою гетерологічної чужорідної ДНК, що налипає на частинки, балістичне прискорення частинок, трансформацію за допомогою пучка аерозольних частинок (опублікована заявка на патент США № 20010026941; патент США № 4945050; міжнародна публікація № WO 91/00915; опублікована заявка на патент США № 2002015066), трансформацію за допомогою *Lec1* і різні інші способи прямого та опосередкованого перенесення ДНК без застосування частинок.

40 Способи трансформації хлоропластів добре відомі у даній галузі техніки. Див., наприклад, Svab et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:8526-8530; Svab and Maliga (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:913-917; Svab and Maliga (1993) *EMBO J.* 12:601-606. Спосіб базується на доставці ДНК, яка містить селективний маркер, за допомогою генної гармати та цілеспрямованому впливі ДНК на геном пластид за допомогою гомологічної рекомбінації. Додатково, трансформацію пластид можна виконувати шляхом трансактивації "мовчазного" пластидного трансгена за допомогою переважно для тканини експресії РНК-полімерази, кодованій у ядрі, яка спрямовується в пластиди. Про таку систему повідомлялося в McBride et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:7301-7305.

Після інтеграції гетерологічної чужорідної ДНК у рослинні клітини в середовищі можна застосовувати відповідну селекцію на максимальному граничному для знищення нетрансформованих клітин та відокремлення і забезпечення проліферації передбачуваних трансформованих клітин, що вижили після цієї обробки за типом селекції, шляхом регулярного перенесення у свіжоприготовлене середовище. Шляхом безперервного пасивування та випробування за допомогою відповідної селекції ідентифікують клітини, трансформовані за допомогою плазмідного вектора, і забезпечують їхню проліферацію. Потім можна застосовувати молекулярні та біохімічні способи для підтвердження наявності інтегрованого гетерологічного гена, що становить інтерес, у геномі трансгенної рослини.

3 трансформованих клітин можна вирощувати рослини відповідно до традиційних способів. Див., наприклад, McCormick et al. (1986) *Plant Cell Reports* 5:81-84. Ці рослини можна потім вирощувати та навіть запилювати тим самим трансформованим штамом або різними штамми, і можна ідентифікувати отриманий гібрид, що характеризується конститутивною експресією

бажаної фенотипової характеристики. Можна вирощувати дві або більше генерації для гарантування стабільної підтримки та наслідування експресії бажаної фенотипової характеристики та потім збирати врожай насіння для гарантування досягнення бажаної фенотипової характеристики. Таким чином, даний винахід забезпечує трансформоване насіння (яке також має назву "трансгенного насіння"), яке має нуклеотидний конструкт за даним винаходом, наприклад, експресійну касету за даним винаходом, стабільно включений у його геном.

Оцінювання трансформації рослин

Після введення гетерологічної чужорідної ДНК у рослинні клітини трансформацію або інтеграцію гетерологічного гена у геном рослин підтверджують за допомогою різних способів, таких як аналіз нуклеїнових кислот, білків та метаболітів, асоційованих з інтегрованим геном.

ПЛР-аналіз є швидким способом скринінгу трансформованих клітин, тканин або паростків щодо наявності включеного в них гена на ранній стадії перед пересаджуванням у ґрунт (Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). ПЛР проводять за допомогою олігонуклеотидних праймерів, специфічних щодо гена, що становить інтерес, або вектора в середовищі *Agrobacterium* тощо.

Трансформацію рослин можна підтвердити за допомогою Саузерн-блот-аналізу геномної ДНК (Sambrook and Russell, 2001, *supra*). У цілому, загальну ДНК екстрагують з трансформанту, розщеплюють за допомогою відповідних ферментів рестрикції, фракціонують в агарозному гелі та переносять на нітроцелюлозну або нейлонову мембрану. Мембрану або "блот" потім зондують за допомогою, наприклад, фрагмента цільової ДНК з радіоактивною міткою ³²P для підтвердження інтеграції уведенного гена в геном рослини згідно зі стандартними методиками (Sambrook and Russell, 2001, *supra*).

У нозерн-блот-аналізі РНК виділяють з конкретних тканин трансформанту, фракціонують в агарозному гелі, який містить формальдегід, та блотують на нейлоновому фільтрі згідно зі стандартними процедурами, зазвичай застосовуваними у даній галузі техніки (Sambrook and Russell, 2001, *supra*). Експресію РНК, кодованої пестицидним геном, потім тестують шляхом гібридизації фільтра з радіоактивним зондом, отриманим з пестицидного гена, за допомогою способів, відомих у даній галузі техніки (Sambrook and Russell, 2001, *supra*).

Вестерн-блотинг, біохімічні аналізи й таке інше можна проводити на трансгенних рослинах для підтвердження наявності білка, кодованого пестицидним геном, за допомогою стандартних процедур (Sambrook and Russell, 2001, *supra*), застосовуючи антитіла, які зв'язуються з одним або декількома епітопами, присутніми у пестицидному білку.

Пестицидна активність у рослин

В іншому аспекті даного винаходу можна створити трансгенні рослини, у яких експресується пестицидний білок, що має пестицидну активність. Способи, описані вище як приклад, можна використовувати для створення трансгенних рослин, але те, яким чином створюють трансгенні рослинні клітини, не є критично важливим для даного винаходу. Способи, відомі або описані в даній галузі техніки, такі як трансформація, опосередкована *Agrobacterium*, біобалістична трансформація та способи, не опосередковані частинками, можна застосовувати на розсуд експериментатора. Рослини, у яких експресується пестицидний білок, можна виділяти за допомогою відомих способів, описаних у даній галузі техніки, наприклад, за допомогою трансформації калюсу, селекції трансформованого калюсу та регенерації фертильних рослин з такого трансгенного калюсу. У такому способі можна застосовувати будь-який ген як селективний маркер, оскільки його експресія в рослинних клітинах забезпечує можливість ідентифікації або селекції трансформованих клітин.

Для застосування в рослинних клітинах була розроблена низка маркерів, таких як маркери стійкості до хлорамфеніколу, аміноглікозиду G418, гігromіцину тощо. Інші гени, які кодують продукт, залучений до метаболізму у хлоропластах, також можна застосовувати як селективні маркери. Наприклад, гени, які забезпечують стійкість до гербіцидів для рослин, таких як гліфосат, бромоксиніл або імідазолінон, можуть знаходити особливе застосування. Про такі гени повідомлялося в Stalker et al. (1985) *J. Biol. Chem.* 263:6310-6314 (ген нітрилази, що забезпечує стійкість до бромоксинілу) та Sathasivan et al. (1990) *Nucl. Acids Res.* 18:2188 (ген ANAS, що забезпечує стійкість до імідазолінону). Додатково, гени, розкриті у даному документі, є застосовними як маркери для оцінки трансформації бактеріальних або рослинних клітин. Способи виявлення наявності трансгена у рослинах, органах рослин (наприклад, у листі, стеблах, корінні тощо), насінні, рослинних клітинах, пагонах, зародках або їх потомстві добре відомі в даній галузі техніки. В одному варіанті здійснення наявність трансгена виявляють шляхом тестування щодо пестицидної активності.

Фертильні рослини, у яких експресується пестицидний білок, можна тестувати щодо пестицидної активності, а рослини, які показують оптимальну активність, відбирають для подальшого розведення. У даній галузі техніки доступні способи для проведення аналізу активності щодо шкідників. Як правило, білок змішують та застосовують в аналізах харчування.

5 Див., наприклад, Marrone et al. (1985) J. of Economic Entomology 78:290-293.

Даний винахід можна застосовувати для трансформації будь-яких видів рослин, включаючи, без обмеження, однодольні та дводольні. Приклади рослин, що становлять інтерес, включають, без обмеження, кукурудзу (маїс), сорго, пшеницю, соняшник, томат, хрестоцвіті, види перцю, картоплю, бавовник, рис, сою, цукровий буряк, цукрову тростину, тютюн, ячмінь та олійний рапс, Brassica sp., люцерну, жито, просо, сафлор, земляний горіх, солодку картоплю, маніок, кавове

10 дерево, кокосову пальму, ананас, цитрусові дерева, какао, чай, банан, авокадо, інжир, гуаяву, манго, маслину, папаю, кеш'ю, макадамію, мигдаль, овес, овочі, декоративні рослини та хвойні рослини.

Овочі включають, без обмеження, томат, латук, овочеву зеленостручкову квасолю, лімську квасолю, горох та представників роду *Cucurbitis*, таких як огірок, канталупа та мускусна диня. Декоративні рослини включають, без обмеження, азалию, гортензію, гібіскус, троянду, тюльпан, жовтий нарцис, петунію, гвоздику, пуансетію та хризантему. Рослини за даним винаходом переважно є культурними рослинами (наприклад, маїс, сорго, пшениця, соняшник, томат, хрестоцвіті, види перцю, картопля, бавовник, рис, соя, цукровий буряк, цукрова тростина, тютюн, ячмінь, олійний рапс тощо).

15 20

Застосування у боротьбі за допомогою пестицидів

Загальні способи використання штамів, що містять нуклеотидну послідовність за даним винаходом або її варіант, у боротьбі зі шкідниками або в конструюванні інших організмів як пестицидних засобів відомі в даній галузі техніки. Див., наприклад, патент США № 5039523 та EP 0480762A2.

25

Штами *Bacillus*, що містять нуклеотидну послідовність за даним винаходом або її варіант, або мікроорганізми, які містять пестицидний ген за даним винаходом та білок як результат генної зміни, можна застосовувати у захисті сільськогосподарських культур та продуктів від шкідників. У одному аспекті даного винаходу цілі, тобто нелізовані, клітини організму, який виробляє токсин (пестицид), обробляють реагентами, що продовжують активність токсину, вироблюваного в клітині, у разі внесення клітини в середовище існування цільового шкідника (шкідників).

30

Альтернативно, пестицид виробляється завдяки впровадженню пестицидного гена в клітинного хазяїна. Експресія пестицидного гена прямо або непрямо зумовлює внутрішньоклітинне вироблення та підтримку рівня пестициду. У одному аспекті даного винаходу ці клітини потім обробляють в умовах, у яких продовжується активність токсину, вироблюваного в клітині, у разі внесення клітини в середовище існування цільового шкідника (шкідників). Отриманий продукт зберігає токсичність токсину. Ці пестициди, інкапсульовані природним чином, можна потім складати відповідно до традиційних методик для внесення в середовище існування, у якому перебуває цільовий шкідник, наприклад, у ґрунт, воду й листя рослин. Див., наприклад, EPA 0192319 та посилання, які наводяться там. Альтернативно, можна складати клітини, які експресують ген за даним винаходом, таким чином, щоб забезпечити можливість застосування отриманого матеріалу як пестициду.

35 40

Активні інгредієнти за даним винаходом зазвичай вносять у формі композицій, і їх можна вносити на посівну площу або рослину, що підлягають обробці, одночасно або послідовно з іншими сполуками. Ці сполуки можуть являти собою добрива, засоби боротьби з бур'янами, кріопротектори, поверхнево-активні речовини, мийні засоби, пестицидні мила, олії для внесення у період спокою, полімери та/або склади носіїв з уповільненим вивільненням або такі, що піддаються біологічному розкладанню, які дозволяють здійснювати тривале дробове внесення на цільову площу після одноразового внесення складу. Вони також можуть являти собою селективні гербіциди, хімічні інсектициди, віруліциди, мікробіциди, амебіциди, пестициди, фунгіциди, бактерициди, нематоциди, моллюскоциди або суміші деяких із цих препаратів, за бажання, разом з додатковими носіями, прийнятними у сільському господарстві, поверхнево-активними речовинами або допоміжними засобами, що стимулюють внесення, зазвичай використовуваними в галузі отримання складів. Придатні носії та допоміжні засоби можуть бути твердими або рідкими та відповідати речовинам, зазвичай використовуваним у технології отримання складів, наприклад, природним або регенованим мінеральним речовинам, розчинникам, диспергувальним засобам, змочувальним засобам, речовинам для підвищення клейкості, зв'язувальним речовинам або добривам. Подібним чином, склади можна отримати у формі їстівних "приманок" або надати їм вид "пасток" для шкідників, щоб дозволити

45 50 55 60

згодовування цільовому шкіднику або поглинання таким пестицидного складу.

Способи застосування активного інгредієнта за даним винаходом або агрохімічної композиції за даним винаходом, яка містить щонайменше один пестицидний білок, вироблюваний бактеріальними штамми за даним винаходом, включають внесення крізь листя, дражування насіння і внесення в ґрунт. Число внесень та норма внесення залежать від інтенсивності зараження відповідним шкідником.

Композицію можна скласти у формі порошку, пилоподібного препарату, пелети, гранули, розпорошеного розчину, емульсії, колоїдного розчину, істинного розчину або т. ін. і можна отримати за допомогою таких традиційних способів, як висушування, ліофілізація, гомогенізація, екстракція, фільтрація, центрифугування, седиментація або концентрування культури клітин, що містять поліпептид. У всіх таких композиціях, які містять щонайменше один такий пестицидний поліпептид, поліпептид може бути присутнім у концентрації від приблизно 1 % до приблизно 99 % за масою.

Шкідників, що є лускокрилими, двокрилими комахами, клопами, нематодами або твердокрилими комахами, можна знищити, або їх чисельність на даній площі можна скоротити за допомогою способів за даним винаходом, або можна здійснювати профілактичне застосування цих способів стосовно ділянки довкілля для попередження зараження сприйнятливим шкідником. Переважно, шкідник поглинає пестицидно ефективну кількість поліпептиду або контактує з нею. Під "пестицидно ефективною кількістю" мається на увазі кількість пестициду, здатна викликати загибель щонайменше одного шкідника або значно послаблювати ріст, харчування або нормальний фізіологічний розвиток шкідників. Ця кількість буде варіювати залежно від таких чинників, як, наприклад, конкретні цільові шкідники, з якими слід боротися, конкретне середовище існування, місце розташування, рослина, сільськогосподарська культура або сільськогосподарська ділянка, що підлягають обробці, умови довкілля та спосіб, норма, концентрація, стабільність і кількість внесень композиції пестицидно ефективного поліпептиду. Склади також можуть варіювати з урахуванням кліматичних умов, міркувань, пов'язаних із забрудненням довкілля, та/або частоти внесення, та/або тяжкості зараження шкідниками.

Розкриті пестицидні композиції можна отримувати шляхом складання або бактеріальної клітини, кристалічної суспензії та/або суспензії спор, або виділеного білкового компонента з бажаним носієм, прийнятним з точки зору сільського господарства. Композиції можна складати перед уведенням за допомогою відповідних способів, таких як ліофілізація, сублімаційне сушіння, висушування, або у водному носії, середовищі або придатному розріджувачі, такому як сольовий розчин або інший буфер. Складені композиції можуть бути у формі пилоподібного або гранулярного матеріалу, або суспензії в олії (рослинній або мінеральній), або водної емульсії, або емульсії типу "олія у воді", або у формі змочуваного порошку, або в комбінації з будь-яким іншим матеріалом-носієм, придатним для застосування в сільському господарстві. Придатні носії, застосовувані в сільському господарстві, можуть бути твердими або рідкими та добре відомі у даній галузі техніки. Вираз "носій, прийнятний з погляду сільського господарства" охоплює всі допоміжні засоби, інертні компоненти, диспергувальні засоби, поверхнево-активні речовини, речовини для підвищення клейкості, зв'язувальні речовини тощо, зазвичай застосовувані в технології складання пестицидів; вони добре відомі фахівцям в галузі складання пестицидів. Склади можна змішувати з одним або декількома твердими або рідкими допоміжними засобами та отримувати за допомогою різних способів, наприклад, шляхом гомогенного змішування, розмішування та/або подрібнювання пестицидної композиції з придатними допоміжними засобами за допомогою традиційних методик складання. Придатніклади та способи застосування описано у патенті США № 6468523, включеному у даний документ за допомогою посилання.

Рослини також можна обробляти за допомогою однієї або декількох хімічних композицій, у тому числі одним або декількома гербіцидами, інсектицидами та фунгіцидами. Ілюстративні хімічні композиції включають: гербіциди для фруктів/овочів: атразин, бромацил, діурон, гліфосат, лінурон, метрибузин, симазин, трифлуралін, флуазифоп, глюфосинат, галосульфурон Gowan, паракват, пропізамід, сетоксидим, бутафенацил, галосульфурон, індазифлам; інсектициди для фруктів/овочів: альдикарб, *Bacillus thuringiensis*, карбарил, карбофуран, хлорпірифос, циперметрин, дельтаметрин, абамектин, цифлутрин/бета-цифлутрин, есфенвалерат, лямбда-цигалотрин, ацеквіноцил, біфеназат, метоксифенозид, новалурон, хромафенозид, тіаклоприд, динотефуран, флуакрипірим, толфенпірад, клотіанідин, спіродиклофен, гамма-цигалотрин, спіромезифен, спіносад, ринаксіпир, ціазіпир, спінотерам, трифлумурон, спіротетрамат, імідаклоприд, флубендіамід, тіодикарб, метафлумізон, сульфоксафлор, цифлуметофен, ціанопірафен, імідаклоприд, клотіанідин, тіаметоксам,

спіноторам, тіодикарб, флонікамід, метіокарб, бензоат емаектину, індоксакарб, фозтіазат, фенаміфос, кадусафос, пірипроксифен, фенбутатиноксид, гекстіазокс, метоміл, 4-[[[(6-хлорпіридин-3-іл)метил](2,2-дифторфеніл)аміно]фуран-2(5H)-он; фунгіциди для фруктів/овочів: карбендазим, хлорталоніл, EBDC, сірку, тіофанат-метил, азоксистробін, цимоксаніл, 5 флуазинам, фосетил, іпродіон, крезоксим-метил, металаксил/мефеноксам, трифлуксистробін, етабоксам, іпровалікарб, трифлуксистробін, фенгексамід, фумарат окспоконазолу, ціазофамід, фенамідон, зоксамід, пікоксистробін, піраклостробін, цифлуфенамід, боскалід; гербіциди для злаків: ізопротурон, бромоксиніл, іюксиніл, феноксильні гербіциди, хлорсульфурун, клодинафоп, диклофоп, дифлуфенікан, феноксапроп, флорасулам, флуороксипір, метсульфурун, 10 триасульфурон, флукарбазон, йодсульфурун, пропоксикарбазон, піколінафен, мезосульфурон, бефлубутамід, піноксаден, амідосульфурон, тіфенсульфурун, трибенурон, флупірсульфурон, сульфосульфурон, пірасульфотол, піроксулам, флуфенацет, тралкоксидим, піроксасульфон; фунгіциди для злаків: карбендазим, хлорталоніл, азоксистробін, ципроконазол, ципродиніл, фенпропіморф, епоксиконазол, крезоксим-метил, квіноксифен, тебуконазол, трифлуксистробін, 15 симеконазол, пікоксистробін, піраклостробін, димоксистробін, протіоконазол, флуоксастробін; інсектициди для злаків: диметоат, лямбда-цигалотрин, дельтаметрин, альфа-циперметрин, β-цифлутрин, біфентрин, імідаклопрід, клотіанідин, тіаметоксам, тіаклопрід, ацетаміпрід, динетофуран, хлорпірифос, метамідофос, оксидеметон-метил, піримікарб, метіокарб; гербіциди для маїсу: атразин, алахлор, бромоксиніл, ацетохлор, дикамбу, клопіралід, (S-)диметенамід, 20 глюфосинат, гліфосат, ізоксафлютол, (S-)метолахлор, мезотріон, нікосульфурон, примісульфурун, римсульфурун, сулкотріон, форамсульфурун, топрамезон, темботріон, сафлуфенацил, тіенкарбазон, флуфенацет, піроксасульфон; інсектициди для маїсу: карбофуран, хлорпірифос, біфентрин, фіпроніл, імідаклопрід, лямбда-цигалотрин, тефлутрин, тербуфос, тіаметоксам, клотіанідин, спіромезифен, флубендіамід, трифлумурон, ринаксипір, 25 дельтаметрин, тіодикарб, β-цифлутрин, циперметрин, біфентрин, люфенурон, трифлуморон, тефлутрин, тебупірімфос, етіпрол, ціазипір, тіаклопрід, ацетаміпрід, динетофуран, авермектин, метіокарб, спіродиклофен, спіротетрамат; фунгіциди для маїсу: фенітропан, тірам, протіоконазол, тебуконазол, трифлуксистробін; гербіциди для рису: бугахлор, пропаніл, азимсульфурун, бенсульфурун, цигалофоп, даїмурон, фентразамід, імазосульфурон, 30 мефенацет, оксазикломефон, піразосульфурон, пірибутикарб, квінклолак, тіобенкарб, інданофан, флуфенацет, фентразамід, галосульфурон, оксазикломефон, бензобіциклон, пірифталід, пеноксиулам, біспірибак, оксadiaргіл, етоксисульфурон, претилахлор, мезотріон, тефурилтріон, оксadiaзон, феноксапроп, піримісульфан; інсектициди для рису: діазинон, фенітропіон, фенобукарб, монокротофос, бенфуракарб, бупрофезин, дінотефуран, фіпроніл, 35 імідаклопрід, ізопрокарб, тіаклопрід, хромафенозид, тіаклопрід, динотефуран, клотіанідин, етіпрол, флубендіамід, ринаксипір, дельтаметрин, ацетаміпрід, тіаметоксам, ціазипір, спіносад, спіноторам, бензоат емаектину, циперметрин, хлорпірифос, картап, метамідофос, етофенпрокс, триазофос, 4-[[[(6-хлорпіридин-3-іл)метил](2,2-дифторетил)аміно]фуран-2(5H)-он, карбофуран, бенфуракарб; фунгіциди для рису: тіофанат-метил, азоксистробін, карпропамід, 40 едифенфос, феримзон, іпробенфос, ізопротіолан, пенцикурон, пробеназол, піроквілон, трициклазол, трифлуксистробін, диклоцимет, феноксаніл, симеконазол, тіадиніл; гербіциди для бавовнику: діурон, флуометурон, MSMA, оксифлуорфен, прометрин, трифлуралін, карфентразон, клетодим, флуазифоп-бутил, гліфосат, норфлуразон, пендиметалін, піритіобакнатрій, трифлуксисульфурон, тепралоксидим, глюфосинат, флуміоксазин, тидіазурон; 45 інсектициди для бавовнику: ацефат, альдикарб, хлорпірифос, циперметрин, дельтаметрин, малатіон, монокротофос, абамектин, ацетаміпрід, бензоат емаектину, імідаклопрід, індоксакарб, лямбда-цигалотрин, спіносад, тіодикарб, гамма-цигалотрин, спіромезифен, піридаліл, флонікамід, флубендіамід, трифлумурон, ринаксипір, бета-цифлутрин, спіротетрамат, клотіанідин, тіаметоксам, тіаклопрід, динетофуран, флубендіамід, ціазипір, 50 спіносад, спіноторам, гамма-цигалотрин, 4-[[[(6-хлорпіридин-3-іл)метил](2,2-дифторетил)аміно]фуран-2(5H)-он, тіодикарб, авермектин, флонікамід, піридаліл, спіромезифен, сульфоксафлор, профенофос, триазофос, ендосульфан; фунгіциди для бавовнику: етрідіазол, металаксил, квінтозен; гербіциди для сої: алахлор, бентазон, трифлуралін, хлоримурон-етил, клорансулам-метил, феноксапроп, фомесафен, флуазифоп, гліфосат, імазамокс, імазаквін, імазетапір, (S-)метолахлор, метрибузин, пендиметалін, тепралоксидим, глюфосинат; інсектициди для сої: лямбда-цигалотрин, метоміл, паратіон, тіокарб, імідаклопрід, клотіанідин, тіаметоксам, тіаклопрід, ацетаміпрід, динетофуран, флубендіамід, ринаксипір, ціазипір, спіносад, спіноторам, бензоат емаектину, фіпроніл, етіпрол, дельтаметрин, β-цифлутрин, гамма- та лямбда-цигалотрин, 4-[[[(6-хлорпіридин-3-іл)метил](2,2-дифторетил)аміно]фуран-2(5H)-он, спіротетрамат, спіродиклофен, трифлумурон, 60

флонікамід, тіодикарб, бета-цифлутрин; фунгіциди для сої: азоксистробін, ципроконазол, епоксиконазол, флутриафол, піраклостробін, тебуконазол, трифлуксистробін, протіоконазол, тетраконазол; гербіциди для цукрового буряка: хлоридазон, десмедифам, етофумезат, фенмедифам, триалат, клопіралід, флуазифоп, ленацил, метамітрон, квінмерак, циклоксимид, трифлусульфурон, тепралоксидим, квізалофоп; інсектициди для цукрового буряка: імідаклоприд, клотіанідин, тіаметоксам, тіаклоприд, ацетаміприд, динетофуран, дельтаметрин, β-цифлутрин, гамма/лямбда-цигалотрин, 4-[[[(6-хлорпіридин-3-іл)метил](2,2-дифторетил)аміно]фуран-2(5H)-он, тefлутрин, ринаксіпір, ціаксіпір, фіпроніл, карбофуран; гербіциди для канолі: клопіралід, диклофоп, флуазифоп, глюфосинат, гліфосат, метазахлор, трифлуралін, етаметсульфурон, квінмерак, квізалофоп, клетодим, тепралоксидим; фунгіциди для канолі: азоксистробін, карбендазім, флудіоксоніл, іпродіон, прохлораз, вінклозолін; інсектициди для канолі: карбофуран, фосфорорганічні сполуки, піретроїди, тіаклоприд, дельтаметрин, імідаклоприд, клотіанідин, тіаметоксам, ацетаміприд, динетофуран, β-цифлутрин, гамма- та лямбда-цигалотрин, тау-флювалінат, етипрол, спіносад, спіноторам, флубендіамід, ринаксіпір, ціазіпір, 4-[[[(6-хлорпіридин-3-іл)метил](2,2-дифторетил)аміно]фуран-2(5H)-он.

"Шкідник" включає, без обмеження, комах, гриби, бактерії, нематод, кліщиків, іксодових кліщів тощо. Комахи-шкідники включають комах, вибраних з рядів Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Mallophaga, Homoptera, Hemiptera, Orthoptera, Thysanoptera, Dermaptera, Isoptera, Anoplura, Siphonaptera, Trichoptera тощо, зокрема, Coleoptera, Lepidoptera та Diptera.

Ряд Coleoptera включає підряди Adepnaga та Polyphaga. Підряд Adepnaga включає надродини Caraboidea та Gyrinoidea, а підряд Polyphaga включає надродини Hydrophiloidea, Staphylinidea, Cantharoidea, Cleroidea, Elateroidea, Dascilloidea, Dryopoidea, Byrrhoidea, Cucujoidea, Meloidea, Mordelloidea, Tenebrionoidea, Bostrichoidea, Scarabaeoidea, Cerambycoidea, Chrysomeloidea та Curculionoidea. Надродина Caraboidea включає родини Cicindelidae, Carabidae та Dytiscidae. Надродина Gyrinoidea включає родину Gyrinidae. Надродина Hydrophiloidea включає родину Hydrophilidae. Надродина Staphylinidea включає родини Silphidae та Staphylinidae. Надродина Cantharoidea включає родини Cantharidae та Lampyridae. Надродина Cleroidea включає родини Cleridae та Dermestidae. Надродина Elateroidea включає родини Elateridae та Vuprestidae. Надродина Cucujoidea включає родину Coccinellidae. Надродина Meloidea включає родину Meloidea. Надродина Tenebrionoidea включає родину Tenebrionidae. Надродина Scarabaeoidea включає родини Passalidae та Scarabaeidae. Надродина Cerambycoidea включає родину Cerambycidae. Надродина Chrysomeloidea включає родину Chrysomelidae. Надродина Curculionoidea включає родини Curculionidae та Scolytidae.

Ряд Diptera включає підряди Nematocera, Brachycera та Cyclorrhapha. Підряд Nematocera включає родини Tipulidae, Psychodidae, Culicidae, Ceratopogonidae, Chironomidae, Simuliidae, Bibionidae та Cecidomyiidae. Підряд Brachycera включає родини Stratiomyidae, Tabanidae, Therevidae, Asilidae, Mydidae, Bombyliidae та Dolichopodidae. Підряд Cyclorrhapha включає секції Aschiza та Aschiza. Секція Aschiza включає родини Phoridae, Syrphidae та Conopidae. Секція Aschiza включає родини Phoridae, Syrphidae та Conopidae. Секція Aschiza включає підсекції Acalyptratae та Calyptratae. Підсекція Acalyptratae включає родини Otitidae, Tephritidae, Agromyzidae та Drosophilidae. Підсекція Calyptratae включає родини Hippoboscidae, Oestridae, Tachinidae, Anthomyiidae, Muscidae, Calliphoridae та Sarcophagidae.

Ряд Lepidoptera включає родини Papilionidae, Pieridae, Lycaenidae, Nymphalidae, Danaidae, Satyridae, Hesperidae, Sphingidae, Saturniidae, Geometridae, Arctiidae, Noctuidae, Lymantriidae, Sesiidae та Tineidae.

Комахи-шкідники за даним винаходом, які пошкоджують основні сільськогосподарські культури, включають: маїс: *Ostrinia nubilalis*, кукурудзяного метелика; *Agrotis ipsilon*, совку-іпсилон; *Helicoverpa zea*, кукурудзяну совку; *Spodoptera frugiperda*, кукурудзяну листяну совку; *Diatraea grandiosella*, південно-західну кукурудзяну вогнівку; *Elasmopalpus lignosellus*, кукурудзяну стеблову вогнівку; *Diatraea saccharalis*, стеблового точильника цукрової тростини; *Diabrotica virgifera*, західного кукурудзяного жука; *Diabrotica longicornis barberi*, північного кукурудзяного жука; *Diabrotica undecimpunctata howardi*, південного кукурудзяного жука; *Melanotus* spp., дротяників; дупляка *Cyclocephala borealis* (личинку хруща); дупляка *Cyclocephala immaculata* (личинку хруща); *Popillia japonica*, японського жука; *Chaetocnema pulicaria*, земляну білшку; *Sphenophorus maidis*, кукурудзяного довгоносика; *Rhopalosiphum maidis*, соргову попелицю; *Anuraphis maidiradicis*, кукурудзяну кореневу попелицю; *Blissus leucopterus leucopterus*, північноамериканського пшеничного клопа-черепашку; *Melanoplus femurrubrum*, червононогу кобилку; *Melanoplus sanguinipes*, перелітну кобилку; *Hylemya platura*, паросткову

муху; *Agromyza parvicornis*, кукурудзяну мінуючу муху; *Anaphothrips obscurus*, злакового трипса; *Solenopsis milesta*, мурашку-злодія; *Tetranychus urticae*, звичайного павутинного кліща; сорго: вогнівку-трав'янку *Chilo partellus*, *Spodoptera frugiperda*, кукурудзяну листяну совку; *Helicoverpa zea*, кукурудзяну совку; *Elasmopalpus lignosellus*, кукурудзяну стеблову вогнівку; совку *Feltia subterranea*; *Phyllophaga crinita*, личинку хруща; *Eleodes*, *Conoderus* та *Aeolus* spp., дротяників; *Oulema melanopus*, червоногруду п'явицю; *Chaetocnema pulicaria*, земляну блішку; *Sphenophorus maidis*, кукурудзяного довгоносика; *Rhopalosiphum maidis*, соргову попелицю; *Sipha flava*, жовту попелицю цукрової тростини; *Blissus leucopterus leucopterus*, північноамериканського пшеничного клопа-черепашку; *Contarinia sorghicola*, соргову галицю; *Tetranychus cinnabarinus*, червоного павутинного кліща; *Tetranychus urticae*, звичайного павутинного кліща; пшениця: *Pseudaletia unipunctata*, лугову совку; *Spodoptera frugiperda*, кукурудзяну листяну совку; *Elasmopalpus lignosellus*, малого стеблового точильника кукурудзи; *Agrotis orthogonia*, личинку західної озимої совки; *Elasmopalpus lignosellus*, малого стеблового точильника кукурудзи; *Oulema melanopus*, червоногруду п'явицю; *Hypera punctata*, листового бобового довгоносика; *Diabrotica undecimpunctata howardi*, південного кукурудзяного жука; російську пшеничну попелицю; *Schizaphis graminum*, звичайну злакову попелицю; *Macrosiphum avenae*, велику злакову попелицю; *Melanoplus femurrubrum*, червононогу кобилку; *Melanoplus differentialis*, відмітну кобилку; *Melanoplus sanguinipes*, перелітну кобилку; *Mayetiola destructor*, гессенську муху; *Sitodiplosis mosellana*, помаранчевого злакового комарика; *Meromyza americana*, личинку американської меромізи; *Hylemya coarctata*, озиму муху; *Frankliniella fusca*, тютюнового трипса; *Cephus cinctus*, американського пшеничного пильщика; *Aceria tulipae*, кореневого цибулевого кліща; соняшник: *Suleima helianthana*, соняшникову брунькову листокрутку; *Homoeosoma electellum*, соняшникову вогнівку; *Zygotogramma exclamationis*, соняшникову окличну совку; *Bothyrus gibbosus*, морквяного жука; *Neolasioptera murfeldtiana*, соняшникову галицю; бавовник: *Heliothis virescens*, бавовникову совку; *Helicoverpa zea*, бавовникового коробочкового черв'яка; *Spodoptera exigua*, наземну малу совку; *Pectinophora gossypiella*, бавовняну міль; *Anthonomus grandis*, бавовняного довгоносика; *Aphis gossypii*, баштанну попелицю; *Pseudatomoscelis seriatus*, блошицю бавовни; *Trialeurodes abutilonea*, облямовану білокрилку; *Lygus lineolaris*, польового клопа; *Melanoplus femurrubrum*, червононогу кобилку; *Melanoplus differentialis*, відмітну кобилку; *Thrips tabaci*, цибулевого трипса; *Frankliniella fusca*, тютюнового трипса; *Tetranychus cinnabarinus*, червоного павутинного кліща; *Tetranychus urticae*, звичайного павутинного кліща; рис: *Diatraea saccharalis*, стеблового точильника цукрової тростини; *Spodoptera frugiperda*, кукурудзяну листяну совку; *Helicoverpa zea*, кукурудзяну совку; *Colaspis brunnea*, виноградного коласписа; *Lissorhoptrus oryzophilus*, рисового водяного довгоносика; *Sitophilus oryzae*, рисового довгоносика; *Nephotettix nigropictus*, рисову цикадку; *Blissus leucopterus leucopterus*, північноамериканського пшеничного клопа-черепашку; *Acrosternum hilare*, звичайного щитника; соя: *Pseudoplusia includens*, соєву совку; гусінь совки *Anticarsia gemmatalis*; вусатку *Plathyrena scabra*; *Ostrinia nubilalis*, кукурудзяного метелика; *Agrotis ipsilon*, совку-іпсилон; *Spodoptera exigua*, наземну малу совку; *Heliothis virescens*, бавовникову совку; *Helicoverpa zea*, бавовникового коробочкового черв'яка; *Epilachna varivestis*, мексиканську бобову зернівку; *Myzus persicae*, персикову попелицю; *Empoasca fabae*, картопляну цикадку; *Acrosternum hilare*, звичайного щитника; *Melanoplus femurrubrum*, червононогу кобилку; *Melanoplus differentialis*, відмітну кобилку; *Hylemya platura*, паросткову муху; *Sericothrips variabilis*, соєвого трипса; *Thrips tabaci*, цибулевого трипса; *Tetranychus turkestani*, суничного кліща; *Tetranychus urticae*, звичайного павутинного кліща; ячмінь: *Ostrinia nubilalis*, кукурудзяного метелика; *Agrotis ipsilon*, совку-іпсилон; *Schizaphis graminum*, звичайну злакову попелицю; *Blissus leucopterus leucopterus*, північноамериканського пшеничного клопа-черепашку; *Acrosternum hilare*, звичайного щитника; *Euschistus servus*, коричневого щитника; *Delia platura*, паросткову муху; *Mayetiola destructor*, гессенську муху; *Petrobia latens*, коричневого пшеничного кліща; олійний рапс: *Brevicoryne brassicae*, капустиану попелицю; *Phyllotreta cruciferae*, звичайну хрестоцвіту блішку; *Mamestra configurata*, латукову совку; *Plutella xylostella*, капустиану міль; *Delia* spp., личинок кореневих мух.

Нематоди включають паразитичних нематод, таких як бульбочкові, цистоутворювальні та кореневі нематоди, включаючи *Heterodera* spp., *Meloidogyne* spp. та *Globodera* spp.; зокрема, представників цистоутворювальних нематод, включаючи, без обмежень, *Heterodera glycines* (соєву цистоутворювальну нематоду); *Heterodera schachtii* (бурякову цистоутворювальну нематоду); *Heterodera avenae* (злакову цистоутворювальну нематоду) та *Globodera rostochiensis* і *Globodera pallida* (картопляних цистоутворювальних нематод). Кореневі нематоди включають *Pratylenchus* spp.

60 Способи збільшення врожайності рослин

Забезпечуються способи збільшення врожайності рослин. Способи включають забезпечення рослини або рослинної клітини, у яких відбувається експресія поліпептиду, який кодує послідовність пестицидного поліпептиду, розкрити у даному документі, та вирощування рослини або її насіння у полі, зараженому (або сприйнятливому до зараження) шкідником, пестицидну активність проти якого має зазначений поліпептид. У деяких варіантах здійснення поліпептид має пестицидну активність проти шкідника, що є лускокрилою, твердокрилою, двокрилою, напівтвердокрилою комахою або нематодою, і зазначене поле заражене шкідником, що є лускокрилою, напівтвердокрилою, твердокрилою, двокрилою комахою або нематодою.

Як визначено в даному документі, "врожайність" рослини стосується якості та/або кількості біомаси, вироблюваної рослиною. Під "біомасою" мається на увазі будь-який вимірюваний продукт рослини. Збільшення виробництва біомаси являє собою будь-яке поліпшення врожаю вимірюваного продукту рослини. Збільшення врожайності рослин має декілька шляхів комерційного застосування. Наприклад, збільшення біомаси листя рослин може збільшувати врожай листових овочів, споживаних людиною або тваринами. Додатково, збільшення біомаси листя можна застосовувати для збільшення виробництва рослинних фармацевтичних або промислових продуктів. Збільшення врожайності може включати будь-яке статистично значуще збільшення, у тому числі, без обмеження, збільшення щонайменше на 1 %, збільшення щонайменше на 3 %, збільшення щонайменше на 5 %, збільшення щонайменше на 10 %, збільшення щонайменше на 20 %, щонайменше на 30 %, щонайменше на 50 %, щонайменше на 70 %, щонайменше на 100 % або більше збільшення врожайності порівняно з такою рослиною, у якій не відбувається експресія пестицидної послідовності.

У конкретних способах врожайність рослини збільшується як результат поліпшення стійкості рослини, у якій відбувається експресія пестицидного білка, розкритого в даному документі, до шкідників. Експресія пестицидного білка у результаті зумовлює послаблення здатності шкідника до зараження або харчування рослиною, що, таким чином, поліпшує врожайність рослин.

Наступні приклади пропонуються як ілюстрація, а не як обмеження.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Приклад 1. Ідентифікація білка, активного стосовно західного кукурудзяного жука, зі штаму ATX54858.

Пестицидний ген ідентифікували з бактеріального штаму ATX54858 за допомогою наступних етапів:

- Отримання загальної ДНК зі штаму. Загальна ДНК містить як геномну ДНК, так і позахромосомну ДНК. Позахромосомна ДНК містить суміш деяких або усіх з наступного: плазміди різного розміру; фагові хромосоми; інші несхарактеризовані позахромосомні молекули.

- Секвенування ДНК. Загальну ДНК секвенують за допомогою способів секвенування наступного покоління.

- Ідентифікація передбачуваних генів токсинів за допомогою аналізів гомології та/або інших обчислювальних аналізів.

- Отримання остаточної уточненої послідовності гена, що становить інтерес, за допомогою однієї з декількох стратегій ПЛР або клонування (наприклад, TAIL-PCR), якщо необхідно.

Бактеріальний штам ATX54858 отримували від Leibniz Institute DSMZ з позначкою DSM-23278 (Kampfer, P., Busse, H.J. & Scholz, H.C. (2009) *Chromobacterium piscinae* sp. nov. and *Chromobacterium pseudoviolaceum* sp. nov., from environmental samples, *Int J Syst Evol Microbiol* 59(Pt 10):2486-2490). Штам спочатку виділяли зі ставкової води у Малайзії, Сунгей Булох.

Нуклеотидна послідовність нового гена Axmi279, який ідентифікували з ATX54858, наведена під SEQ ID №: 1. Амінокислотна послідовність AXMI279 наведена під SEQ ID №: 2. AXMI279 являє собою білок завважки 58,9 кДа, який характеризується 97,9 % ідентичністю послідовності стосовно Axmi205 (публікація патенту США № 20110023184) та 21,7 % ідентичністю послідовності стосовно перфोरину *Clavibacter*.

Розкритий у даному документі ген токсину ампліфікують за допомогою ПЛР з рAX980, і продукт ПЛР клонують у вектор експресії у *Bacillus* рAX916 або у інший придатний вектор за допомогою способів, добре відомих у даній галузі техніки. Отриманий у результаті штам *Bacillus*, який містить вектор з геном ахмі, культивують у традиційних ростових середовищах, таких як середовище CYS (10 г/л бакто-казитону; 3 г/л дріжджового екстракту; 6 г/л KH_2PO_4 ; 14 г/л K_2HPO_4 ; 0,5 мМ MgSO_4 ; 0,05 мМ MnCl_2 ; 0,05 мМ FeSO_4), поки під час мікроскопічного дослідження не буде видимим спороутворення. Зразки отримують та тестують щодо активності у біологічних аналізах.

Приклад 2. Аналізи пестицидної активності

Нуклеотидні послідовності за даним винаходом можна тестувати щодо їх здатності виробляти пестицидні білки. Здатність пестицидного білка діяти на шкідника як пестицид часто оцінюють за допомогою низки способів. Одним способом, добре відомим у даній галузі техніки, є здійснення аналізу харчування. У такому аналізі харчування шкідника піддають впливу зразка, який містить сполуки, що підлягають тестуванню, або контрольні зразки. Часто його здійснюють шляхом поміщення матеріалу, який необхідно досліджувати, або такого матеріалу в придатному розведенні на матеріал, який буде поглинений шкідником, такий як штучне поживне середовище. Матеріал, що підлягає тестуванню, може складатися з рідини, твердої речовини або кашки. Матеріал, що підлягає тестуванню, можна помістити на поверхню, а потім дозволити йому висохнути. Альтернативно, матеріал, що підлягає тестуванню, можна змішати з розплавленим штучним поживним середовищем і потім розподілити у камеру для аналізу. Камера для аналізу може, наприклад, являти собою склянку, чашку або лунку титраційного мікропланшета.

Аналізи стосовно сисних шкідників (наприклад, попелиць) можуть включати відокремлення тестованого матеріалу від комахи перегородкою, в ідеальному варіанті секцією, яку може проколоти сисний ротовий апарат сисної комахи, щоб забезпечити можливість поглинання тестованого матеріалу. Часто тестований матеріал змішують зі стимулятором харчування, таким як сахароза, для стимуляції поглинання тестованої сполуки.

Інші типи аналізів можуть включати мікроін'єкцію тестованого матеріалу в рот або кишку шкідника, а також розвиток трансгенних рослин з наступним тестуванням здатності шкідника до харчування трансгенною рослиною. Тестування рослин може включати ізолювання зазвичай споживаних частин рослини, наприклад, за допомогою невеликих кошиків, що прикріплюються до листка, або ізолювання цілих рослин у кошиках, що містять комах.

Інші способи та підходи для оцінки шкідників відомі в даній галузі техніки і містяться, наприклад, у Robertson and Preisler, eds. (1992) *Pesticide bioassays with arthropods*, CRC, Boca Raton, FL. Альтернативно, аналізи в загальному вигляді описані в журналах *Arthropod Management Tests* та *Journal of Economic Entomology* або шляхом обговорення членами Ентомологічного товариства Америки (ESA).

У деяких варіантах здійснення ділянки ДНК, що кодують ділянки пестицидних білків, розкритих у даному документі, які відповідають за токсичність, клонують у вектор експресії pMAL-C4x в *E. coli* позаду гена *malE*, який кодує мальтоза-зв'язувальний білок (MBP). Ці внутрішньорамкові злиття дають у результаті експресію білків злиття MBP-Ахті в *E. coli*.

Для експресії в *E. coli* BL21*DE3 трансформують за допомогою окремих плазмід. Окремі колонії інокують в LB, доповнений карбеніциліном та глюкозою, і вирощують протягом ночі при 37 °C. Наступного дня у свіжоприготовлене середовище інокують 1 % добову культуру та вирощують її при 37 °C до досягнення логарифмічної фази росту. Потім культури індують за допомогою 0,3 mM IPTG протягом ночі при 20 °C. Кожний дебріс суспендують у 20 mM буфері Tris-Cl, pH 7,4, доповненому 200 mM NaCl, 1 mM DTT та інгібіторами протеаз, і обробляють ультразвуком. Для підтвердження експресії білків злиття можна застосовувати аналіз за допомогою SDS-PAGE.

Загальні екстракти, що не містять клітин, потім проганяють крізь колонку з амілозою, приєднану до системи рідинної експрес-хроматографії білків (FPLC), для афінного очищення білків злиття MBP-ахті. Зв'язані білки злиття елюють зі смоли за допомогою 10 mM розчину мальтози. Очищені білки злиття потім розщеплюють за допомогою фактора Ха або трипсину для видалення аміно-кінцевої MBP-мітки з білка Ахті. Розщеплення та розчинність білків можна визначити за допомогою SDS-PAGE.

Приклад 3. Експресія та очищення

Ахті279 (SEQ ID №:1) клонували у вектор експресії в *E. coli* pMAL-C4x позаду гена *malE*, який кодує мальтоза-зв'язувальний білок (MBP). Послідовність отриманої плазміді наведена під SEQ ID №: 6. Це внутрішньорамкове злиття дає у результаті експресію білка злиття MBP-Ахті в *E. coli*. Експресію отриманого у результаті білка злиття індкували за допомогою IPTG. Білок потім очищували за допомогою колонки з мальтозою та розщеплювали за допомогою протеази фактора Ха або трипсину з отриманням неміченого очищеного білка. Розщеплення та розчинність білків визначали за допомогою SDS-PAGE.

Біологічний аналіз виділеного білка показував інсектицидну активність проти західного кукурудзяного жука (WCRW) (таблиця 1).

Результати біологічного аналізу

Зразок	Зупинка росту WCRW	Смертність WCRW
MBP-Ахмі279 ¹ (7 мг/мл)	4,0	75 %
MBP-Ахмі279 Ха ² (3,5 мг/мл)	3,0	25 %
MBP-Ахмі279 Ха (1,75 мг/мл)	1,0	25 %
50 мМ TRIS 8,0, буферний контроль	0,0	0,0

¹MBP-Ахмі279 являє собою білок злиття, який містить мальтоза-зв'язувальний білок та Ахмі279 повної довжини.

²MBP-Ахмі279 Ха являє собою білок злиття, розщеплений фактором Ха.

За результатами визначення LC₅₀ для Ахмі279 становила 32 мкг/мл.

Приклад 4. Уведення генів у вектори для експресії у рослинах

5 Кодуючі ділянки за даним винаходом з'єднують із відповідними промоторними та термінаторними послідовностями для експресії в рослинах. Такі послідовності добре відомі в даній галузі техніки та можуть включати в себе промотор гена актину рису або промотор гена убіквітину маїсу для експресії в однодольних рослинах, промотор UBQ3 Arabidopsis або промотор 35S CaMV для експресії у дводольних рослинах та термінатори nos або PinII.

10 Методики отримання та підтвердження конструктів промотор-ген-термінатор також добре відомі в даній галузі техніки.

В одному аспекті даного винаходу розробляють і створюють синтетичні послідовності ДНК. Ці синтетичні послідовності є зміненими нуклеотидними послідовностями порівняно з вихідною послідовністю, але кодують білки, які є практично ідентичними стосовно вихідного білка.

15 В іншому аспекті даного винаходу модифіковані варіанти синтетичних генів розробляють таким чином, що отримуваний у результаті пептид націлюється на рослинні органели, такі як ендоплазматичний ретикулум та апопласт. Послідовності пептидів, про які відомо, що вони зумовлюють націлювання білків злиття на рослинні органели, відомі в даній галузі техніки. Наприклад, у даній галузі техніки відомо, що N-кінцева ділянка гена кислої фосфатази білого люпину *Lupinus albus* (GENBANK® ID GI:14276838, Miller et al. (2001) Plant Physiology 127: 594-606) зумовлює націлювання гетерологічних білків на ендоплазматичний ретикулум. Якщо отриманий білок злиття також містить послідовність, відповідальну за утримання в ендоплазматичному ретикулумі, яка містить пептид N-кінець-лізин-аспарагінова кислота-глутамінова кислота-лейцин (тобто мотив "KDEL", SEQ ID №:5) на С-кінці, то білок злиття буде націлено на ендоплазматичний ретикулум. Якщо у білку злиття немає послідовності, яка націлюється на ендоплазматичний ретикулум, на С-кінці, білок буде націлено на ендоплазматичний ретикулум, але в кінцевому підсумку буде секвестровано в апопласті.

20 Таким чином, цей ген кодує білок злиття, що містить тридцять одну N-кінцеву амінокислоту гена кислої фосфатази білого люпину *Lupinus albus* (GENBANK® ID GI:14276838, Miller et al., 2001, supra), зливу з N-кінцем амінокислотної послідовності за даним винаходом, а також послідовність KDEL на С-кінці. Таким чином, передбачається, що отриманий білок націлюється на ендоплазматичний ретикулум рослини під час експресії в рослинній клітині.

35 Експресійні касети для рослин, описані вище, поєднують з відповідним селективним маркером для рослин для сприяння селекції трансформованих рослинних клітин і тканин та лігують у вектори для трансформації рослин. Вони можуть містити бінарні вектори для трансформації, опосередкованої *Agrobacterium*, або прості плазмідні вектори для трансформації за допомогою аерозолу або біобалістичної трансформації.

Приклад 5. Трансформація клітин маїсу за допомогою генів, що кодують пестицидні білки, описаних у даному документі

40 Качани маїсу найкраще збирати через 8-12 днів після запилення. Зародки виділяють із качанів, і такі зародки розміром 0,8-1,5 мм є переважними для застосування в трансформації. Зародки висівають щитком догори на придатне інкубаційне середовище, таке як середовище DN62A5S (3,98 г/л солей N6; 1 мл/л (з 1000х вихідного розчину) вітамінів N6; 800 мг/л L-аспарагіну; 100 мг/л міоїнозиту; 1,4 г/л L-проліну; 100 мг/л казамінових кислот; 50 г/л сахарози; 1 мл/л (з 1 мг/мл вихідного розчину) 2,4-D). Середовища та солі, відмінні від

DN62A5S, однак, є придатними та відомі в даній галузі техніки. Зародки інкубують протягом ночі при 25 °C у темряві. Однак, інкубування зародків протягом ночі як таке не є необхідним.

Отримані експлантати переносять на сітку із квадратними отворами (30-40 на пластину), переносять в осмотичне середовище на близько 30-45 хвилин, потім переносять на пластину для інжекції (див., наприклад, публікацію згідно з РСТ № WO/0138514 та патент США № 5240842).

ДНК-конструкти, призначені для генів за даним винаходом в рослинних клітинах, прискорюють у напрямку тканин рослини за допомогою прискорювача пучка аерозольних частинок із застосуванням умов, переважно описаних у публікації згідно з РСТ № WO/0138514. Після інжекції зародки інкубують протягом приблизно 30 хв. в осмотичному середовищі та поміщають в інкубаційне середовище, витримуючи протягом ночі при 25 °C у темряві. Щоб уникнути надмірного uszkodження експлантатів, які зазнають інжекції, їх інкубують протягом щонайменше 24 годин перед перенесенням у відновне середовище. Зародки потім вносять у відновне середовище на період, що становить приблизно 5 днів, при 25 °C у темряві, а потім переносять на селективне середовище. Експлантати інкубують у селективному середовищі протягом до восьми тижнів залежно від природи та характеристик конкретного використовуваного методу селекції. Після періоду селекції отриманий калюс переносять у середовище для дозрівання зародків, поки не буде спостерігатися утворення зрілих соматичних зародків. Отримані зрілі соматичні зародки потім поміщають в умови слабкого освітлення, і процес регенерації ініціюють за допомогою способів, відомих у даній галузі техніки. Отриманим паросткам дозволяють вкоренитися в середовищі для вкорінення, і отримані рослини переносять в касети для розсади і розмножують як трансгенні рослини.

Матеріали

Середовище DN62A5S

Компоненти	На літр	Постачальник
Базова суміш солей Чу N6 (номер продукту С 416)	3,98 г/л	Phytotechnology Labs
Розчин вітамінів Чу N6 (номер продукту С 149)	1 мл/л (з 1000х вихідного розчину)	Phytotechnology Labs
L-аспарагін	800 мг/л	Phytotechnology Labs
Міоїнозитол	100 мг/л	Sigma
L-пролін	1,4 г/л	Phytotechnology Labs
Казамінові кислоти	100 мг/л	Fisher Scientific
Сахароза	50 г/л	Phytotechnology Labs
2,4-D (номер продукту D-7299)	1 мл/л (з 1 мг/мл вихідного розчину)	Sigma

Значення рН розчину доводять до рН 5,8 за допомогою 1 н КОН/1 н КСІ, додають Gelrite (Sigma) у концентрації до 3 г/л, і середовище автоклавують. Після охолодження до 50 °C додають 2 мл/л нітрату срібла з 5 мг/мл вихідного розчину (Phytotechnology Labs).

Приклад 6. Трансформація генів за даним винаходом у рослинних клітинах за допомогою трансформації, опосередкованої *Agrobacterium*

Качани найкраще збирати через 8-12 днів після запилення. Зародки виділяють із качанів, і такі зародки розміром 0,8-1,5 мм є переважними для застосування в трансформації. Зародки висівають щитком догори на придатне інкубаційне середовище та інкубують протягом ночі при 25 °C у темряві. Однак, інкубування зародків протягом ночі як таке не є необхідним. Зародки приводять у контакт зі штамом *Agrobacterium*, який містить відповідні вектори для перенесення, опосередкованого Ті-плазмідом, на приблизно 5-10 хвилин, а потім висівають на середовище для спільного культивування протягом приблизно 3 днів (25 °C у темряві). Після спільного культивування експлантати переносять у відновне середовище на період, що становить приблизно п'ять днів (при 25 °C у темряві). Експлантати інкубують у селективному середовищі протягом до восьми тижнів залежно від природи та характеристик конкретного використовуваного методу селекції. Після періоду селекції отриманий калюс переносять у середовище для дозрівання зародків, поки не буде спостерігатися утворення зрілих соматичних зародків. Отримані зрілі соматичні зародки потім поміщають в умови слабкого освітлення, і процес регенерації ініціюють так, як відомо в даній галузі техніки.

Усі публікації та заявки на патенти, що згадуються в даному описі, свідчать про рівень

компетентності фахівців у галузі, до якої належить даний винахід. Усі публікації та заявки на патенти включено в даний документ за допомогою посилання такою ж мірою, як якби кожна конкретну публікацію або заявку на патент було конкретно й окремо зазначено як включену за допомогою посилання.

- 5 Хоча викладений вище винахід був достатньо докладно описаний за допомогою ілюстрації та прикладів з метою ясності розуміння, буде очевидно, що в межах обсягу прикладеної формули винаходу можна на практиці здійснювати певні зміни та модифікації.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Сампсон, Кімберлі
 Баласубраманіан, Діпа
 Лехтінен, Двейн

<120> ГЕН ПЕСТИЦИДУ АХМІЗ79 ТА СПОСОБИ ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ

<130> АРА116004

<150> 61/513088
 <151> 2011-07-29

<160> 6

<170> PatentIn verсія 3.5

<210> 1
 <211> 1608
 <212> ДНК
 <213> *Chromobacterium piscinae*

<400> 1
 atggcatccg cagcaaatgc aggtcagctt ggcaacctcc cgggcggtac ttccatgggc 60
 atgggttatg acgtgaatgg tttgtacgcc agccccgaaa gcctgcttgg ccaacccttg 120
 ttcgatttcg gggcgagct ggacaccatc gaaatcgagg gccgcagcta cacctttccc 180
 cgtgcgatgc atgtacacac ctatttcac tccgacttca aacagyatgt cagcaaggaa 240
 atcgaagaat atcgggagaa aatgagccag catgtggcgc tgtccggccg ttacaagctg 300
 ttcagcctt cgtcagcgt ggatttcacc accacggacc agcagetaac cagagatcacc 360
 tacagctcca cccgcgaagc ccattgtgtg tggtagatca gcctgcccgg cggcgcccacg 420
 ctgcgttcga tgetgcgcgc gacttcgcgc gacgatctga acaatcccaa gatgcggccc 480
 atggagctgt tcaagccta tggtccttac tacatatcgg aagcggcagt gggcgcccgg 540
 ctggactaca gcgcggccag caagaccttg aagatggaca gcagccagtc gctgtccacc 600
 accgccgaaa tgtcctacaa ggcgctgggt ggcgagatca agatcgagca tggctcggaa 660
 atggyaaaagc aggtcaacag cttccgcagc aactccacca tccgtctcac cggcaccggc 720
 ggcaaacccg gcattgaccg tgcatactg cacggcccgg attcgcagca ggcgttctcg 780
 caatgggcgg aatcctctgt cgaactatgc acgctgatgg attctccac cgaagcctg 840
 caaccgatct gggcgctggc cgaacaacc gagcgcgcgc tcgagcttga ggatgccttc 900
 cctgaattca tgaagcagtc gcagcagtc atccccaaagg tggacaagggt gctgctgatg 960
 gatgcgcggc cggcgatggt gaaggetggg gaggacagcg gctccggcgc gtcgggaagat 1020
 ctggcggtat tcaatcccag cacctccaac ggctacaaga tggltggcca gttcggcccag 1080
 cgcaaccatg ccagcgtggc ggatggccat gcgcagatct tcaaggatct gttcgatctg 1140
 ggcgtgctga aggcgcgggt gggttggcag cgggtgtggg acgacgcggc ctccggcag 1200
 tccaaggact acgcgtgctg gcgcgcgatt ccgccgcagg gctaccgcgc gctgggcgac 1260

gtgatgatgt tggccaccag cggctataac ccgcccgaatc tggcccgaacta tgtttgctgt 1320
 catcaaagcc tgtgcccggg tgtgcagacg ctgcaaaacc ggggtgtggtg ggacaagggc 1380
 accggcggcg gcaaggatgt cagcctgtgg caacctgggt cygcccggggc tgtggcgtcg 1440
 tcttgctttg tggggtgcn gaactacaac aaccgcacca actccggcga cctcgagcgt 1500
 ctgcccggca gcatcgcatg cgtgaagacc agcgcgatcg cgtccacgca ggagatgaag 1560
 tccatgctca gccaacatca gggcatggag gaactggcgg ccaagctc 1608

<210> 2
 <211> 536
 <212> B120K
 <213> Chromobacterium piscinae

<400> 2

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

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

Asn Leu Pro Asp Tyr Val Cys Val His Gln Ser Leu Cys Ala Asp Val
 433 440 445

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

Lys Asp Val Ser Leu Trp Gln Pro Gly Ser Ala Gly Ala Val Ala Ser
 465 470 475 480

Ser Cys Phe Val Gly Val Pro Asn Tyr Asn Asn Pro Pro Asn Ser Gly
 485 490 495

Asp Leu Glu Arg Leu Arg Gly Ser Ile Ala Cys Val Lys Thr Ser Ala
 500 505 510

Ile Ala Ser Thr Gln Glu Met Lys Ser Met Leu Ser Gln His Gln Gly
 515 520 525

Met Glu Glu Leu Ala Ala Lys Leu
 530 535

- <210> 3
- <211> 517
- <212> EINHOK
- <213> Chromobacterium piscinae
- <400> 3

Met Gly Met Gly Tyr Asp Val Asn Gly Leu Tyr Ala Ser Pro Glu Ser
 1 5 10 15

Leu Leu Gly Gln Pro Leu Phe Asp Phe Gly Gly Glu Leu Asp Thr Ile
 20 25 30

Glu Ile Glu Gly Arg Ser Tyr Thr Phe Pro Arg Cys Met His Val His
 35 40 45

Thr Tyr Phe His Ser Asp Phe Lys Gln Asp Val Ser Lys Glu Ile Glu
 50 55 60

Glu Tyr Arg Glu Lys Met Ser Gln His Val Gly Val Ser Gly Arg Tyr
 65 70 75 80

Lys Leu Phe Ser Ala Ser Leu Ser Val Asp Phe Thr Thr Thr Asp Gln
 85 90 95

Gln Leu Thr Glu Ile Thr Tyr Ser Ser Thr Arg Glu Ala His Val Leu
 100 105 110

Trp Tyr Ile Ser Leu Pro Gly Ala Ala Thr Leu Arg Ser Met Leu Arg

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

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

Gln Phe Gly Gln Arg Asn His Ala Ser Val Ala Asp Gly His Ala Pro
 340 345 350

Ile Phe Lys Asp Leu Phe Asp Leu Gly Val Leu Lys Ala Pro Val Gly
 355 360 365

Trp Gln Arg Val Trp Asp Asp Ala Gly Ser Gly Lys Ser Lys Asp Tyr
 370 375 380

Ala Cys Trp Arg Ala Ile Pro Pro Gln Gly Tyr Arg Ala Leu Gly Asp
 385 390 395 400

Val Met Met Leu Ala Thr Ser Gly Tyr Asn Pro Pro Asn Leu Pro Asp
 405 410 415

Tyr Val Cys Val His Gln Ser Leu Cys Ala Asp Val Gln Thr Leu Gln
 420 425 430

Asn Arg Val Trp Trp Asp Lys Gly Thr Gly Ala Arg Lys Asp Val Ser
 435 440 445

Leu Trp Gln Pro Gly Ser Ala Gly Ala Val Ala Ser Ser Cys Phe Val
 450 455 460

Gly Val Pro Asn Tyr Asn Asn Pro Pro Asn Ser Gly Asp Leu Glu Arg
 465 470 475 480

Leu Arg Gly Ser Ile Ala Cys Val Lys Thr Ser Ala Ile Ala Ser Thr
 485 490 495

Gln Glu Met Lys Ser Met Leu Ser Gln His Gln Gly Met Glu Glu Leu
 500 505 510

Ala Ala Lys
 515

- <210> 5
- <211> 4
- <212> БІЛОК
- <213> Штучна послідовність

- <220>
- <223> Пептид, що націлюється на ендоплазматичний ретикулум

<400> 5

Lys Asp Glu Leu
 1

```

<210> 6
<211> 8264
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> конструкт нуклеїнової кислоти, що містить Axmi279

<220>
<221> інша_ознака
<222> (1)..(1530)
<223> послідовність кістяка black-pMAL-C4x

<220>
<221> інша_ознака
<222> (1531)..(1551)
<223> ристидинова мітка

<220>
<221> інший_сайт зв'язування
<222> (1552)..(2712)
<223> малакса-зв'язувальний білок

<220>
<221> ген
<222> (2713)..(4323)
<223> кодуєча послідовність для Axmi279

<220>
<221> інша_ознака
<222> (4324)..(8264)
<223> послідовність кістяка black-pMAL-C4x
<400> 6
ccgacaccat cgaatggtgc aaaaccttc gcggtatggc atgatagcgc ccggaagaga      60
gtcaattcag ggtggtgaat gtgaaaccag taacgttata cgatgtcgca gagtatgccg      120
gtgtctotta tcagaccggt tcccgcgtgg tgaaccaggc cagccacggt tctgcgaaaa      180
cgcgggaaaa agtggaaagcg gcgatggcgg agctgaatta cattcccaac cgcgtggcac      240
aacaactggc gggcaaacag tcggttctga ttggcgttgc cacctccagt ctggccctgc      300
acgcgcgcgc gcaaatctgc gcggcgatta aatctcgcgc cgatcaactg ggtgccagcg      360
tggtggtgtc gatggtagaa cgaagcggcg tcgaagcctg taaagcggcg gtgcacaatc      420
ttctcgcgca acgcgtcagc gggctgatca ttaactatcc gctggatgac caggatgccg      480
ttgctgtgga agctgcctgc actaatgttc cggcgttatt tcttgatgtc tctgaccaga      540
caccatcaa cagtattatt ttctcccatg aagacgytac gcgactgggc gtggagcatc      600
tggctgcatt gggtcaccag caaatcgcgc tgttagcggg ccattaagt tctgtctcgg      660
cgcgtctcgc tctggctggc tggcataaat atctcactcg caatcaaatt cagccgatag      720
cggaacggga aggcgactgg agtgccatgt cgggttttca acaaaccatg caaatgctga      780
atgagggcat cgttcccact gcgatgctgg ttgccaacga tcagatggcg ctgggcgcaa      840
tgcgcgccat taccgagtc cggctgcgcg ttggtgcgga tatctcggtg gtgggatacg      900

```

acgataccga agacagctca tgttatatcc cgcggttaac caccatcaaa caggattttc 960
 gcctgctggg gcaaacccagc gtggaccgct tgetgcaact ctctcagggc caggcgggtga 1020
 agggcaatca getgttgcce gtctcactgg tgaanaaaaa aaccaccctg gcgcccataa 1080
 cgeaaaaccgc ctctccccgc gcgttgcccg attcattaat gcagctggca cgacaggttt 1140
 cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaatg taagttagct cactcattag 1200
 gcacaattct catgtttgac agcttatcat cgaactgcag gtgcaccaat gcttctggcg 1260
 tcaggcagcc atcggaaact gtggtatggc tgtgcaggtc gtaaatcact gcataattcg 1320
 tgtcgcctca ggcgcactcc cgttctggat aatgtttttt gcgcccacat cataaccggt 1380
 ctggcaataa ttctgaaatg agctgttgac aattaatcat cggctcgtat aatgtgtgga 1440
 attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagccagt ccgtttaggt gtttccagca 1500
 gcacttcacc aacaaggacc atagcatatg caccaccacc accaccacca tatgaaaaac 1560
 gaagaaggta aactggtaat ctggattaac ggcgataaag gctataacgg tctcgcctgaa 1620
 gtccgtaaga aattcgagaa agataccgga attaaagtca ccgttgagca tccggataaa 1680
 ctggaagaga aattcccaca ggttgccgca actggcgatg gccctgacat tatctctctg 1740
 gcacacgacc gctttggtgg ctacgctcaa tctggcctgt tggctgaaat caccocggac 1800
 aaagcgttcc aggacaagct gtatecgttt acctgggatg ccgtaogtta caacggcaag 1860
 ctgattgctt acccgatcgc tgttgaagcg ttatcgctga ttataacaa agatctgctg 1920
 ccgaaccgcg caaaaacctg ggaagagatc ccggcgctgg ataaagaact gaaagcgaaa 1980
 ggtaaqagcg cgcctgatgt caacctgcaa gaacccgtact tcacctggcc gctgattgct 2040
 gctgaocggg gttatgcgtt caagtatgaa aacggcaagt acgacattaa agacgtgggc 2100
 gtggataacg ctggcgcgaa agcgggtctg accttccctg ttgacctgat taanaacaaa 2160
 cacatgaatg cagacaccga ttactccatc gcagaagctg cctttaataa aggcgaaaca 2220
 gcgatgacca tcaacggccc gtgggcatgg tccaacatcg acaccagcaa agtgaattat 2280
 ggtgtaacgg tactgccgac ctteaaggtt caaccatcca aaccgttcgt tggcgtgctg 2340
 agcgcaggta ttaacgcgcg cagtcgcaac aaagagctgg caaaagagtt cctcgaasac 2400
 tatctgctga ctgatgaagg tctggaagcg gtaataaag acaaacccgt ggggtgcgta 2460
 gcgctgaagt cttaagagga agagttgggt aaagatccgc ggattgcgcg cactatgga 2520
 aacgcccaga aaggtgaaat catgccgaac atccgcgaga tctccgcttt ctggtatgcc 2580
 gtgcgtactg cggtgatcaa cgcgccagc ggtcgtcaga ctgctgatga agcctgaaa 2640
 gacgcgcaga daatttcgag ctccaacaac aacaacaata acaataacaa caacctcggg 2700
 atcgagggaa ggatggcatc cgcagcaaat gcaggtcagc ttggcaacct ccccgcgctt 2760
 acctccatgg gcattgggtta tgacgtgaat ggtttgtacg ccagcccgga aagcctgctt 2820

ggccaaccct tgttcgattt cggcggcgag ctggacacca tcgaaatcga gggcgcgagc 2880
 tacacetttc cccgctgcct gcatgtacac acctatttcc actccgactt caaacaggat 2940
 gtcagcaagg aaatcgaaga atatcgggag aaaatgagcc agcatgtggg cgtgtccggc 3000
 cgttacaagc tgttcagcgc ttcgctgagc gtggatttca ccaccacgga ccagcagpta 3060
 accgagatca cctacagctc caccgcgcaa gcccatgtgc tgtggtadat cagcctgcgc 3120
 ggcgcggcca cgtgcgcttc gatgctgccc cgcgacttcc gcgacgatct gaacaatccc 3180
 aagatgcccg ccatggagct gttcaagcgc tatggtccct actacatata ggaagcggca 3240
 gtggggggcc ggctggacta cagcgcggcc agcaagacct tgaagatgga cagcagccag 3300
 tcgctgtcca ccaccgcccga aatgtcctac aaggcgcctgg tgggcgagat caagatcggg 3360
 catggctcgg aaatggaaaa gcgggtcaac agcttccgca gcaactccac catecgtctc 3420
 accgccaccg gcggcaaaac gggcatgacc gatcgcatac tgcacggccc ggattcgcag 3480
 caggcgttct cgcaatgggc ggaatcgctg ctcgactatg cgacgctgat ggatttctcc 3540
 accgaaagcc tcgaaccgat ctggggcgctg gccgacaaac ccgagcgcgc cgtcagacct 3600
 gaggatgctt tccctgaatt catgaagcag tcgcagcagt ccatacccaa ggtggacaag 3660
 gtgctgctga tggatgcgcg gccgcggatg gtgaagcctg gggaggacag cggctccggc 3720
 gcgctcgaag atctggcggc attcaatccc agcactcca acggctacaa gatggttggc 3780
 cagttcggcc agcgcacaacca tgcacgcgtg gcggatggcc atgcgcgat tttcaaggat 3840
 ctgttcgata tgggcgtgct gaagggcggc gtgggttggc agcgggtgtg ggaacgagcc 3900
 ggctccggca agtccaagga ctacgcgtgc tggcgcgcga ttccgcgcga gggctaccgc 3960
 gcgctggggc acgtgatgat gttggccacc agcggctata acccgcggaa tctgcccgat 4020
 tatgtttgcg tgcataaaaag cctgtgcgcg gatgtgcaga cgtcgcacaa ccgggtgtgg 4080
 tgggacaagg gcaccggcgc gcgcaaggat gtcagcctgt ggcaacctgg ttcggcgggg 4140
 gctgtggcgt cgtcttgcct tgtcggcgtg ccgaactaca acaaccggcc caactccggc 4200
 gacctcagc gtctgcgcgg cagcatcgca tgcgtgaaga ccagcgcgat cgcgtccagc 4260
 caggagatga agtccatgct cagccaacat cagggcctgg aggaactggc ggccaagctc 4320
 tgaggcgcgc cgtcgaacct caggcaagct tggcaactgg cgtcgtttta caacgtcgtg 4380
 actgggaaaa ccctggcgtt acccaactta atgccttgc agcacatccc cctttcgcga 4440
 gctggcgtaa tagcgaagag gccgcaccgc atgcacctc ccaacagttg cgcagcctga 4500
 atggcgaatg gcagcttggc tgttttggcg gatgagataa gattttcagc ctgatacaga 4560
 ttaaatacaga acgcagaagc ggtctgataa aacagaatct gcctgggggc agtagcgcgg 4620
 tggccccacc tgaccccatg ccgaactcag aagtgaaacg ccgtagcgc cgtggttagtg 4680
 tggggtctcc ccatgcgaga gtagggaact gccagcctc aaataaaacg aaaggctcag 4740

tegaaagact gggcctttcg ttttatctgt tgtttgtcgg tgaacgctct cctgagtagg 4800
 acaaatccgc cgggagcggg tttgaacggt gcaagcaac ggcocggagg gtggcgggca 4860
 ggacgcocgc cataaactgc caggcatcaa attaagcaga aggcacatcct gacggatggc 4920
 ctttttgogt ttctacaaac tcttttggtt atttttctaa atacattcaa atatgtatcc 4980
 gctcatgaga caataaccct gataaatgct tcaataatat tgaanaagga agagtatgag 5040
 tattcaacat ttccgtgtcg cctttattcc cttttttgcg gcattttgoc ttccgtgttt 5100
 tgetcaccoc gaaacgctgg tgaagtaaa agatgctgaa gatcagttgg gtgcacaggt 5160
 gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg taagatcctt gagagttttc gccccgaga 5220
 acgtttccca atgatgagca cttttaaagt tctgctatgt ggcgcggtat tatcccggt 5280
 tgacgcocgg caagagcaac tcggtcgccg catacactat tctcagaatg acttggttga 5340
 gtactcacca gtcaocagaaa agcatcttac ggatggcatg acagtaagag aatttatcag 5400
 tgetgccata accatgagtg ataacactgc ggccaactta cttctgacaa cgatecggag 5460
 accgaaggag ctaaccgctt ttttgcacaa catgggggat catgtaactc gccttgatcg 5520
 ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca cgatecctgt 5580
 agcaatggca acaacgttgc gcaaacctatt aactygcgaa ctacttactc tagcttcccg 5640
 gcaacaatta atagaotgga tggaggcggg taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc 5700
 ccttccggct ggctgggtta ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcggcg 5760
 tctcattgca gcaactgggc cagatggtaa gccctcccgat atcgtagtta tctacacgac 5820
 ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag gtgcctcact 5880
 gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt ttactcatat atactttaga ttgatttacc 5940
 ccggttgata atcagaaaaag ccccaaaaac aggaagattg tataagcaaa tatttaaat 6000
 gtaaacgtta atattttggt aaaattcggc ttaaattttt gttaaatcag ctcarttttt 6060
 aaccaatagg ccgaaatcgg caaaatccct tataaatcaa aagaatagac cgaqataggg 6120
 ttgagtggtt ttccagtttg gaacaagagt ccactattaa agaacgtgga ctccaacgtc 6180
 aaagggcgaa aaaccgtcta tcagggcgat ggcccactac gtgaaccatc acccaaatca 6240
 agtttttttg ggtcagagtg ccgtaaaagca ctaaactcga accctaaagc gagccccga 6300
 tttagagctt gacggggaaa gccggcgaac gtggcgagaa aggaagggaa gaaagcgaaa 6360
 ggagcggggc ctagggcgct ggcaagtata gcggtcagc tgcgctaac caccacacc 6420
 gccgcgctta atgcgccgct acagggcgcg taaaaggatc taggtgaaga tcccttttga 6480
 kaatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt cagaccccg 6540
 agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc tttttctctg cgcgtaatct gctgcttga 6600
 aacaaaaaaaa ccaccgctac cagcgggtgt ttgtttgocg gatcaagagc taccactct 6660

ttttcogaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc ttctagtgta 6720
 gccgtagtta ggccaccaact tcaagaacte tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct 6780
 aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcc tgtcttaccg ggttggactc 6840
 aagaccgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acggggggtt cgtgcacaca 6900
 gccacgcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg agctatgaga 6960
 aagcgcaccg cttccogaag ggagaaaggc ggacaggat cggtaagcg gcagggtcgg 7020
 aacagggagc cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggatccttt atagtctgt 7080
 cgggtttcgc caactctgac ttgagcgtcc atttttctga tgcctctcag gggggcggag 7140
 cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt tttacggctc ctggcctttt gctggccttt 7200
 tgetcaccatg ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta ttaccgcctt 7260
 tgagtgagct gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag cgcagcaggt cagtggcga 7320
 ggaagcggaa gagcgcctga tgcggatatt tctccttaag catctgtcgc gtatctcaca 7380
 ccgcatatat ggtgcactct cagtacaatc tgcctctgat ccgcatagtt aagccagtat 7440
 aactccgct atcgctacgt gactgggtca tggctgcgcc ccgacaccgc ccaacaccgc 7500
 ctgacgcgcc ctgacgggct tgtctgtccc cggcatccgc ttacagacaa gctgtgaccg 7560
 tctccgggag ctgcatgtgt cagaggtttt caccgtcacc accgaaacgc gcgaggcagc 7620
 tgcggtaaaag ctcatcagcg tggctcgtca gcgatcaca gatgtctgcc tgttcatccg 7680
 cgtccagctc gttgagtttc tccagaagcg ttaatgtctg gcttctgata aagcggggcca 7740
 tgttaagggc ggttttttcc tgtttgtca ctgatgcctc cgtgtaaggg ggatttctgt 7800
 tcatgggggt aatgataccg atgaaacgag agaggatgct caccatacgg gttactgatg 7860
 atgaaacatgc ccggttactg gaacgktgtg agggtaaaca actggcggta tggatgcggc 7920
 gggaccagag aaaaatcact cagggtcaat gccagcgtt cgttaataca gatgtaggctg 7980
 ttccacaggg tagccagcag catcctgcca tgcagatccg gaacataatg gtgcaggcgc 8040
 ctgacttccg cgtttccaga ctttacgaaa cacggaaacc gaagaccatt catgttcttg 8100
 ctccggctgc agacgttttg cagcagcagt cgttccactg tcgctcgcgt atcgggtgatt 8160
 cattctgcta accagtaagg caaccccgcc agcctagccg ggtectcaac gacaggagca 8220
 cgatcatgcg caccctggc caggacccaa cgtgcccga aatt 8264

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Конструкт, який містить молекулу рекомбінантної нуклеїнової кислоти, що містить нуклеотидну послідовність, вибрану з групи, яка складається з:
- а) нуклеотидної послідовності SEQ ID NO: 1; та
 - б) нуклеотидної послідовності, яка кодує поліпептид, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, 3 або 4,
- де зазначена нуклеотидна послідовність є функціонально зв'язаною з гетерологічним промотором, і поліпептид, який вона кодує, проявляє інсектицидну активність, яка ідентична до активності поліпептиду, як вказано в SEQ ID NO: 6, проти західного кукурудзяного жука (WCRW).
2. Конструкт за п. 1, де зазначена нуклеотидна послідовність являє собою синтетичну послідовність, призначену для експресії у рослині.
3. Конструкт за п. 1, де зазначений промотор здатний керувати експресією зазначеної нуклеотидної послідовності у рослинній клітині.
4. Конструкт за п. 3, який додатково містить нуклеотидну послідовність, що кодує гетерологічний поліпептид.
5. Клітина-хазяїн, яка містить конструкт за п. 1.
6. Клітина-хазяїн за п. 5, яка є бактеріальною клітиною-хазяїном.
7. Клітина-хазяїн за п. 5, яка є рослинною клітиною.
8. Трансгенна рослина кукурудзи, яка містить клітину-хазяїна за п. 7.
9. Рекомбінантний поліпептид з інсектицидною активністю, яка ідентична до активності поліпептиду, як вказано в SEQ ID NO: 6, проти західного кукурудзяного жука (WCRW), вибраний з групи, яка складається з:
- а) поліпептиду, який містить амінокислотну послідовність будь-якої з SEQ ID NO: 2, 3 або 4; та
 - б) поліпептиду, кодованого нуклеотидною послідовністю з SEQ ID NO: 1,
- де зазначений поліпептид є функціонально зв'язаним з гетерологічним транзитним пептидом, лідерною послідовністю або сигнальною послідовністю.
10. Поліпептид за п. 9, який додатково містить гетерологічні амінокислотні послідовності.
11. Композиція, яка містить поліпептид за п. 9.
12. Композиція за п. 11, яка **відрізняється** тим, що зазначена композиція вибрана з групи, яка складається з порошку, пилоподібного препарату, пелети, гранули, розпорошеного розчину, емульсії, колоїдного розчину та істинного розчину.
13. Композиція за п. 11, яка **відрізняється** тим, що зазначена композиція отримана шляхом висушування, ліофілізації, гомогенізації, екстракції, фільтрації, центрифугування, седиментації або концентрування культури клітин *Bacillus thuringiensis*.
14. Композиція за п. 11, яка містить від приблизно 1 % до приблизно 99 % за масою зазначеного поліпептиду.
15. Спосіб боротьби з популяцією західного кукурудзяного жука (WCRW), який включає надання в раціон зазначеній популяції інсектицидно ефективної кількості поліпептиду за п. 9.
16. Спосіб знищення західного кукурудзяного жука (WCRW), який включає надання в раціон зазначеному жуку інсектицидно ефективної кількості поліпептиду за п. 9 або згодовування зазначеному жуку такої.
17. Спосіб отримання поліпептиду з інсектицидною активністю, який включає культивування клітини-хазяїна за п. 5 в умовах, у яких експресується молекула нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид.
18. Рослина кукурудзи, яка має у своєму геномі стабільно включений ДНК-конструкт, що містить нуклеотидну послідовність, яка кодує білок, що має інсектицидну активність, яка ідентична до активності поліпептиду, як вказано в SEQ ID NO: 6, проти західного кукурудзяного жука (WCRW), яка **відрізняється** тим, що зазначена нуклеотидна послідовність вибрана з групи, що складається з:
- а) нуклеотидної послідовності з SEQ ID NO: 1; та
 - б) нуклеотидної послідовності, яка кодує поліпептид, що містить амінокислотну послідовність за будь-яким з SEQ ID NO: 2, 3 або 4,
- де зазначена нуклеотидна послідовність є функціонально зв'язаною з промотором, який керує експресією кодуючої послідовності у рослинній клітині.
19. Трансгенна насінина рослини кукурудзи за п. 18, яка **відрізняється** тим, що зазначена насінина містить нуклеотидну послідовність, вибрану з групи, яка складається з:
- а) нуклеотидної послідовності з SEQ ID NO: 1; та

b) нуклеотидної послідовності, яка кодує поліпептид, що містить амінокислотну послідовність будь-якої з SEQ ID NO: 2, 3 або 4.

5 20. Спосіб захисту кукурудзи від західного кукурудзяного жука (WCRW), який включає експресію у рослині або її клітині нуклеотидної послідовності, що кодує інсектицидний поліпептид, що має інсектицидну активність, яка ідентична до активності поліпептиду, як вказано в SEQ ID NO: 6, проти західного кукурудзяного жука (WCRW), який **відрізняється** тим, що зазначену нуклеотидну послідовність вибирають з групи, яка складається з:

a) нуклеотидної послідовності з SEQ ID NO: 1; та

10 b) нуклеотидної послідовності, яка кодує поліпептид, що містить амінокислотну послідовність будь-якої з SEQ ID NO: 2, 3 або 4.

21. Спосіб збільшення врожайності кукурудзи, який включає вирощування у полі кукурудзи або її насінини, що мають у своєму геномі стабільно включений ДНК-конструкт, який містить нуклеотидну послідовність, що кодує білок, який має інсектицидну активність, яка ідентична до активності поліпептиду, як вказано в SEQ ID NO: 6, проти західного кукурудзяного жука (WCRW), який **відрізняється** тим, що зазначену нуклеотидну послідовність вибирають з групи, яка складається з:

15 a) нуклеотидної послідовності, наведеної в SEQ ID NO: 1; та

b) нуклеотидної послідовності, яка кодує поліпептид, що містить амінокислотну послідовність будь-якої з SEQ ID NO: 2, 3 або 4.

20