

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки:
2011.06.30

(22) Дата подачи заявки:
2009.07.02

(51) Int. Cl. C07K 14/325 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)

(54) АХМИ-115, АХМИ-113, АХМИ-005, АХМИ-163, АХМИ-184 ИНСЕКТИЦИДНЫЕ БЕЛКИ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 61/077,812; 61/158,953

(32) 2008.07.02; 2009.03.10

(33) US

(86) PCT/US2009/049527

(87) WO 2010/003065 2010.01.07

(88) 2010.05.20

(71) Заявитель:
АТЕНИКС КОРПОРЕЙШН (US)

(72) Изобретатель:
Сэмпсон Кимберли С., Агарвал Шрути,
Кэмпбелл Крис, МакНалти Брайан, Томсо
Дэниел Дж., Кароци Надин, Харджисс
Трейси, Козил Майкл Г., Дак Николас Б.,
Хайнрихс Фолькер (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Предоставлены композиции и способы придания инсектицидной активности клеткам хозяина. Предоставлены композиции, включающие кодирующую последовательность полипептида дельта-эндотоксина. Кодирующие последовательности могут использоваться в конструкциях ДНК или экспрессионных кассетах для трансформации и экспрессии в клетках хозяина. Композиции также включают трансформированные клетки хозяина. В частности, предоставлены выделенные молекулы нуклеиновой кислоты дельта-эндотоксина. Дополнительно охвачены аминокислотные последовательности, соответствующие полинуклеотидам, и антитела, специфически связывающиеся с этими аминокислотными последовательностями. В частности, настоящее изобретение предоставляет выделенные молекулы нуклеиновых кислот, включающие нуклеотидные последовательности, кодирующие аминокислотную последовательность, продемонстрированную в SEQ ID NO: 4, 5, 6, 13 или 14, или нуклеотидные последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 1, 2, 3, 11 или 12, а также их варианты и фрагменты.

201071323
A1

201071323
A1

АХМІ-115, АХМІ-113, АХМІ-005, АХМІ-163 и АХМІ-184:

ИНСЕКТИЦИДНЫЕ БЕЛКИ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Данное изобретение относится к области молекулярной биологии. Предоставлены новые гены, которые кодируют инсектицидные белки. Эти белки и последовательности нуклеиновых кислот, которые их кодируют, пригодны при подготовке инсектицидных составов и при получении трансгенных, устойчивых к поражению насекомыми-вредителями растений.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Bacillus thuringiensis представляет собой грамположительную спорогенную почвенную бактерию, характеризующуюся способностью продуцировать кристаллические включения, которые особенно токсичны для определенных родов и видов насекомых, но безопасны для растений и других не являющихся целевыми организмов. По этой причине композиции, включающие штаммы *Bacillus thuringiensis* или их инсектицидные белки, могут использоваться в качестве экологически приемлемых инсектицидов для осуществления контроля за сельскохозяйственными насекомыми-вредителями или векторами насекомых при множестве болезней животных или человека.

Кристаллические (Cry) белки (дельта-эндотоксины) *Bacillus thuringiensis* обладают потенциальной инсектицидной активностью, главным образом, по отношению к чешуекрылым, двукрылым и личинкам жесткокрылых. Также показано, что эти белки обладают активностью против насекомых-вредителей из отрядов *Hymenoptera*, *Homoptera*, *Phthiraptera*, *Mallophaga* и *Acari*, так же как и других родов беспозвоночных, таких как *Nemathelminthes*, *Platyhelminthes* и *Sarcostigophora* (Feitelson (1993) The *Bacillus Thuringiensis* family tree. In *Advanced Engineered Pesticides*, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.). Эти белки были первоначально классифицированы как белки от CryI до CryV на основании, прежде всего, их инсектицидной активности. Основные классы представляли собой *Lepidoptera*-специфический

(I), *Lepidoptera*- и *Diptera*-специфический (II), *Coleoptera*-специфический (III), *Diptera*-специфический (IV) и нематодоспецифические (V) и (VI). Белки были в дальнейшем классифицированы в подсемейства; более высокородственным белкам в пределах каждого семейства были присвоены подразделяющие символы, такие как *Cry1A*, *Cry1B*, *Cry1C* и т.д. Еще более близкородственным белкам в пределах каждого подразделения были присвоены названия, такие как *Cry1C1*, *Cry1C2* и т.д.

Недавно была описана новая система условных обозначений для генов *Cry*, основанная на гомологии аминокислотных последовательностей, а не специфичности нацеленности на насекомое (Crickmore et al. (1998) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:807-813). В новой классификации каждому токсину присвоено уникальное название, включающее первичный разряд (арабское число), вторичный разряд (прописная буква), третичный разряд (строчная буква) и четвертичный разряд (другое арабское число). В новой классификации римские цифры в первичном разряде были заменены на арабские цифры. Белки с менее чем 45%-ой идентичностью последовательности обладают различными первичными разрядами, а критерием для вторичных и третичных разрядов являются 78% и 95%, соответственно.

Кристаллический белок не проявляет инсектицидную активность до тех пор, пока не заглатывается и не становится растворимым в средней кишке насекомого. Проглоченный протоксин гидролизуется протеазами в пищеварительный трактате насекомого до активной токсичной молекулы (Höfte and Whiteley (1989) *Microbiol. Rev.* 53:242-255). Этот токсин связывается с апикальными рецепторами щеточной каймы в средней кишке личинок-мишеней и встраивается в апикальную мембрану, создавая ионные каналы или поры, что приводит к гибели личинок.

Как правило, дельта-эндотоксины имеют пять консервативных доменов последовательностей и три консервативных структурных домена (см., например, de Maagd et al. (2001) *Trends Genetics* 17:193-199). Первый консервативный структурный домен состоит из семи альфа-спиралей и вовлечен в мембранное встраивание и формирование поры. Домен II состоит из трех бета-листов,

образующих конфигурацию «греческого ключа», а домен III состоит из двух антипараллельных бета-листов в форме «рулета с джемом» (de Maagd et al., 2001, выше). Домены II и III вовлечены в распознавание рецепторов и связывание, и поэтому считаются детерминантами токсинной специфичности.

Кроме дельта-эндотоксинов существует несколько других известных классов пестицидных белковых токсинов. Токсины VIP1/VIP2 (см., например, патент США 5770696) являются бинарными пестицидными токсинами, которые оказывают сильное воздействие на насекомых на основе механизма, который, как полагают, включает рецептор-обусловленный эндоцитоз, сопровождаемый клеточной токсификацией, подобно способу действия других бинарных («А/В») токсинов. Токсины А/В, такие как VIP, C2, CDT, CST или токсины *B. anthracis*, вызывающие отек и гибель, первоначально взаимодействуют с клетками-мишенями посредством специфического, рецептор-опосредованного связывания «В»-компонентов в виде мономеров. Эти мономеры затем образуют гомогептамеры. Комплекс гептамер «В»-рецептор затем действует в качестве причальной платформы, которая впоследствии связывает и обеспечивает транслокацию ферментативного «А»-компонента(ов) в цитозоль посредством рецептор-обусловленного эндоцитоза. Оказавшись в цитозоле клетки, «А»-компоненты ингибируют нормальную функцию клетки путем, например, АДФ-рибозилирования G-актина или увеличения внутриклеточных уровней циклического АМФ (цАМФ). См. Barth et al. (2004) *Microbiol Mol Biol Rev* 68:373-402.

Интенсивное использование инсектицидов на основе *B. thuringiensis* уже дало увеличение устойчивости к полевым популяциям капустной моли, *Plutella xylostella* (Ferré and Van Rie (2002) *Annu. Rev. Entomol.* 47:501-533). Наиболее общим механизмом устойчивости является уменьшение связывания токсина с его специфическим рецептором(ами) средней кишки. Кроме того, это может приводить к перекрестной устойчивости к другим токсинам, которые также используют тот же самый рецептор (Ferre and Van Rie (2002)).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Предоставлены композиции и способы для придания бактериям, растениям, клеткам растений, тканям и семенам устойчивости к насекомым. Композиции включают молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие последовательности полипептидов дельта-эндотоксина, векторы, включающие такие молекулы нуклеиновых кислот, и клетки хозяев, содержащие векторы. Композиции также включают последовательности полипептида эндотоксина и антитела к этим полипептидам. Последовательности нуклеотидов могут использоваться в конструкциях ДНК или экспрессионных кассетах для трансформации и экспрессии в организмах, включая микроорганизмы и растения. Нуклеотидные или аминокислотные последовательности могут представлять собой синтетические последовательности, которые спланированы для экспрессии в организме, включая, но не ограничиваясь ими, микроорганизм или растение. Композиции также включают трансформированные бактерии, растения, клетки растений, ткани и семена.

В частности, предоставлены выделенные молекулы нуклеиновых кислот, соответствующие последовательностям нуклеиновых кислот дельта-эндотоксина. Дополнительно охвачены последовательности аминокислот, соответствующие полинуклеотидам. В частности, настоящее изобретение предоставляет выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, включающую нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность, продемонстрированную в любой из SEQ ID NO:4, 5, 6, 13 или 14, или нуклеотидную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:1, 2, 3, 11 или 12, а также их варианты и фрагменты. Также охвачены нуклеотидные последовательности, которые комплементарны нуклеотидной последовательности по изобретению, или нуклеотидные последовательности, гибридизующиеся с последовательностью по изобретению.

Композиции и способы по изобретению пригодны для получения организмов с инсектицидной устойчивостью, в особенности бактерий и растений. Такие организмы и композиции, полученные из них, являются желательными для сельскохозяйственных целей.

Композиции по изобретения также полезны для создания измененных или улучшенных белков дельта-эндотоксина, которые обладают инсектицидной активностью, или для детектирования присутствия белков или нуклеиновых кислот дельта-эндотоксина в продуктах или организмах.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фиг.1А и 1В демонстрируют сравнительный анализ первичных структур АХМІ-113 (SEQ ID NO:5), АХМІ-005 (SEQ ID NO:4) и АХМІ-115 (SEQ ID NO:6). Левые и правые стрелки отмечают границы области С-концевой трети белков.

Фиг.2 показывает домены в пределах АХМІ-005 и АХМІ-115, которые заменены для образования новых токсинов.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Настоящее изобретение относится к композициям и способам регулирования устойчивости к насекомым у организмов, особенно растений или клеток растений. Способы включают трансформацию организмов нуклеотидной последовательностью, кодирующей белок дельта-эндотоксина по изобретению. В частности, нуклеотидные последовательности по изобретению пригодны для подготовки растений и микроорганизмов, которые обладают инсектицидной активностью. Таким образом, предоставлены трансформированные бактерии, растения, клетки растений, растительные ткани и семена. Композиции представляют собой нуклеиновые кислоты и белки дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis*. Последовательности находят применение при конструировании экспрессионных векторов для последующей трансформации в представляющие интерес организмы, в качестве зондов для выделения других генов дельта-эндотоксина и для создания измененных инсектицидных белков при помощи способов, известных в данной области, таких как перестановка доменов или перетасовка ДНК. См., например, Таблицу 2 и Фиг.2. Белки находят применение при контролировании или уничтожении чешуекрылых, жесткокрылых и других популяций насекомых, и для получения композиций с инсектицидной активностью.

Под «дельта-эндотоксином» подразумевают токсин *Bacillus thuringiensis*, который обладает токсической активностью в

отношении одного или более вредителей, включая, но не ограничиваясь ими, представителей отрядов *Lepidoptera*, *Diptera* и *Coleoptera*, или белок, который обладает гомологией с таким белком. В некоторых случаях белки дельта-эндотоксина были выделены из других организмов, включая *Clostridium bifermentans* и *Paenibacillus popilliae*. Белки дельта-эндотоксина включают аминокислотные последовательности, выведенных на основании полноразмерных нуклеотидных последовательностей, раскрытых здесь, и аминокислотные последовательности, которые короче, чем полноразмерные последовательности, либо вследствие использования альтернативного нижерасположенного сайта инициации, либо вследствие процессинга, который приводит к образованию более короткого белка, имеющего инсектицидную активность. Процессинг может происходить в организме, в котором белок экспрессируется, или в насекомом-вредителе после заглатывания белка внутрь.

Дельта-эндотоксины включают белки, идентифицируемые как белки с *cry1* по *cry43*, *cyt1* и *cyt2*, и *Cyt*-подобный токсин. В настоящее время существует более чем 250 известных разновидностей дельта-эндотоксинов с широким диапазоном специфичностей и токсичностей. В качестве расширенного перечня см. Crickmore et al. (1998), *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:807-813, и для регулярных обновлений см. Crickmore et al. (2003) «*Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature,» на сайте www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.

Здесь предоставлены новые выделенные нуклеотидные последовательности, которые наделены инсектицидной активностью. Также предоставлены аминокислотные последовательности белков дельта-эндотоксина. Белок, образуемый в результате трансляции этого гена, позволяет клеткам контролировать или уничтожать насекомых, которые его заглатывают.

Выделенные молекулы нуклеиновых кислот и их варианты и фрагменты

Один аспект изобретения относится к выделенным или рекомбинантным молекулам нуклеиновых кислот, включающим нуклеотидные последовательности, кодирующие белки дельта-

эндотоксина и полипептиды или их биологически активные участки, а также молекулы нуклеиновых кислот, достаточные для использования в качестве гибридизационных зондов для идентификации кодирующих дельта-эндотоксин нуклеиновых кислот. Как используется здесь, термин «молекула нуклеиновой кислоты» предназначен для включения молекул ДНК (например, рекомбинантной ДНК, кДНК или геномной ДНК) и молекул РНК (например, мРНК) и аналогов ДНК или РНК, полученных с использованием аналогов нуклеотидов. Молекула нуклеиновой кислоты может являться одноцепочечной или двухцепочечной, однако предпочтительно представляет собой двухцепочечную ДНК.

«Выделенная» или «очищенная» молекула нуклеиновой кислоты или белок, или их биологически активная часть, в существенной степени свободна от другого клеточного материала или культуральной среды в случае, когда продуцируется рекомбинантными способами, или в существенной степени свободна от химических предшественников или других химических веществ в случае, когда синтезируется химически. Предпочтительно, «выделенная» нуклеиновая кислота свободна от последовательностей (предпочтительно кодирующих белок последовательностей), которые естественным образом фланкируют нуклеиновую кислоту (то есть, последовательности, расположенные на 5'- и 3'-концах нуклеиновой кислоты) в геномной ДНК организма, из которого получена нуклеиновая кислота. В целях изобретения «выделенный» при использовании в отношении молекул нуклеиновых кислот не относится к выделенным хромосомам. Например, в различных вариантах осуществления выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая дельта-эндотоксин, может содержать менее чем приблизительно 5 т.п.н., 4 т.п.н., 3 т.п.н., 2 т.п.н., 1 т.п.н., 0,5 т.п.н. или 0,1 т.п.н. нуклеотидных последовательностей, которые естественным образом фланкируют молекулу нуклеиновой кислоты в геномной ДНК клетки, из которой получена нуклеиновая кислота. Белок дельта-эндотоксин, который существенно свободен от клеточного материала, включает препараты белка, содержащие менее чем приблизительно 30%, 20%, 10%, или 5% (по сухой массе) белка,

«отличного от дельта-эндотоксина» (также упоминаемый здесь как «контаминантный белок»).

Нуклеотидные последовательности, кодирующие белки по настоящему изобретению, включают последовательность, приведенную в SEQ ID NO:1, 2, 3, 11 или 12, и ее вариантах, фрагментах, и их комплементы. Под «комплементом» подразумевают нуклеотидную последовательность, которая в существенной степени комплементарна данной нуклеотидной последовательности, так что она может гибридизоваться с данной нуклеотидной последовательностью с образованием вследствие этого стабильного дуплекса. Соответствующая аминокислотная последовательность белка дельта-эндотоксина, кодируемая этой нуклеотидной последовательностью, приведена в SEQ ID NO:4, 5, 6, 13 или 14.

Молекулы нуклеиновых кислот, которые являются фрагментами этих нуклеотидных последовательностей, кодирующих дельта-эндотоксин, также охвачены настоящим изобретением. Под «фрагментом» подразумевается часть нуклеотидной последовательности, кодирующей белок дельта-эндотоксина. Фрагмент нуклеотидной последовательности может кодировать биологически активную часть белка дельта-эндотоксина, или это может быть фрагмент, который может использоваться в качестве зонда для гибридизации или ПЦР-праймера с использованием раскрытых ниже способов. Молекулы нуклеиновых кислот, которые являются фрагментами нуклеотидной последовательности дельта-эндотоксина, включают, по меньшей мере, приблизительно 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350, 1400, 1450, 1500, 1550, 1600, 1650, 1700, 1750, 1800, 1850, 1900, 1950, 2000, 2050, 2100, 2150, 2200, 2250, 2300, 2350, 2400, 2450, 2500, 2550, 2600, 2650, 2700, 2750, 2800, 2850, 2900, 2950, 3000, 3050, 3100, 3150, 3200, 3250, 3300, 3350 смежных нуклеотидов, или вплоть до числа нуклеотидов, присутствующих в полноразмерной нуклеотидной последовательности, кодирующей дельта-эндотоксин, раскрытой здесь в зависимости от намеченного использования. Под «смежными» нуклеотидами подразумевают нуклеотидные остатки, которые непосредственно примыкают друг к другу. Фрагменты

нуклеотидных последовательностей по настоящему изобретению должны кодировать фрагменты белка, которые сохраняют биологическую активность белка дельта-эндотоксина и, следовательно, сохраняют инсектицидную активность. Под выражением «сохраняет активность» подразумевается, что фрагмент обладает, по меньшей мере, приблизительно 30%, по меньшей мере, приблизительно 50%, по меньшей мере, приблизительно 70%, 80%, 90%, 95% или более инсектицидной активности белка дельта-эндотоксина. Способы определения инсектицидной активности хорошо известны в данной области. См., например, 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; и Патент США № 5743477, каждая из которых включена здесь в качестве ссылки в полном объеме.

Фрагмент кодирующей дельта-эндотоксин нуклеотидной последовательности, которая кодирует биологически активную часть белка по изобретению, кодирует, по меньшей мере, приблизительно 15, 25, 30, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100 смежных аминокислот, или вплоть до общего количества аминокислот, присутствующих в полноразмерном белке дельта-эндотоксина по изобретению.

Предпочтительные белки дельта-эндотоксина по настоящему изобретению кодируются нуклеотидной последовательностью, достаточно идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1, 2, 3, 11 или 12. Под «достаточно идентичной» подразумевается аминокислотная или нуклеотидная последовательность, которая обладает, по меньшей мере, приблизительно 60%-ной или 65%-ной идентичностью последовательности, приблизительно 70%-ной или 75%-ной идентичностью последовательности, приблизительно 80%-ной или 85%-ной идентичностью последовательности, приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%-ной или более идентичностью последовательности по сравнению с последовательностью сравнения, с использованием одной из программ сравнительного анализа, описанных здесь при помощи

стандартных параметров. Любому специалисту в данной области понятно, что эти значения можно определенным образом скорректировать, чтобы выявить соответствующую идентичность белков, кодируемых двумя нуклеотидными последовательностями, принимая во внимание вырожденность кодонов, сходство аминокислот, положение рамки считывания и т.п.

Для определения процентной идентичности двух аминокислотных последовательностей или двух последовательностей нуклеиновых кислот последовательности накладывают в целях оптимального сравнения. Процентная идентичность между этими двумя последовательностями представляет собой функцию числа идентичных положений, разделенных последовательностями (то есть, процент идентичности = число идентичных положений/общее количество положений (например, перекрывающиеся положения) \times 100). В одном варианте осуществления эти две последовательности представляют собой последовательности одной и той же длины. В другом варианте осуществления сравнение проводится с последовательностью сравнения во всей ее полноте (например, во всей полноте таковой из SEQ ID NO:1, 2, 3, 11 или 12, или во всей полноте таковой из SEQ ID NO:4, 5, 6, 13 или 14). Процент идентичности между двумя последовательностями можно определить, используя методики, подобные нижеописанным, с допущением пропусков или без допущения пропусков. При расчете процента идентичности, как правило, учитываются точные совпадения.

Определение процента идентичности между двумя последовательностями можно достичь, используя математический алгоритм. Неограничивающий пример математического алгоритма, используемого для сравнения двух последовательностей, представляет собой алгоритм Karlin and Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264, модифицированный Karlin and Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877. Такой алгоритм включен в программы BLASTN и BLASTX от Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403. Нуклеотидные поиски BLAST можно выполнять при помощи программы BLASTN, при счете = 100, длине слов = 12, для выявления нуклеотидных последовательностей,

гомологичных дельта-эндотоксин-подобным молекулам нуклеиновых кислот по изобретению. Белковые поиски BLAST можно выполнять при помощи программы BLASTX, при счете = 50, длине слов = 3, чтобы получить последовательности аминокислот, гомологичные молекулам белка дельта-эндотоксина по изобретению. Для получения выравнивания с пропусками в целях сравнения можно использовать Gapped BLAST (в BLAST 2,0), как описано в Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389. Альтернативно, для проведения повторного поиска, который обнаруживает отдаленные взаимоотношения между молекулами, можно использовать PSI-Blast. См. Altschul et al. (1997) выше. При использовании программ BLAST, Gapped BLAST и PSI-Blast можно применять параметры по умолчанию соответствующих программ (например, BLASTX и BLASTN). Выравнивание также можно выполнять вручную с контролем.

Другим неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения последовательностей, является алгоритм ClustalW (Higgins et al. (1994) *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680). ClustalW сравнивает последовательности и выравнивает аминокислоты или последовательности ДНК во всей полноте, и таким образом может предоставить данные о консерватизме последовательности всей аминокислотной последовательности. Алгоритм ClustalW используется в нескольких коммерчески доступных пакетах программ для анализа ДНК/аминокислот, таких как модуль ALIGNX набора программ Vector NTI (Корпорация Invitrogen, Карлсбад, Калифорния). После выравнивания аминокислотных последовательностей при помощи ClustalW можно оценить процент аминокислотной идентичности. Неограничивающий пример программы, полезной для анализа выравниваний ClustalW, представляет собой GENEDOC™. GENEDOC™ (Karl Nicholas) позволяет оценивать сходство аминокислот (или ДНК) и идентичность многих белков. Другим неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения последовательностей, является алгоритм Myers and Miller (1988) *CABIOS* 4:11-17. Такой алгоритм содержится в программе ALIGN (версия 2.0), которая является частью пакета программ GCG Wisconsin Genetics, Версия 10 (доступный от корпорации

Accelrys, 9685 Scranton Rd., Сан-Диего, Калифорния, США). В случае использования программы ALIGN для сравнения последовательности аминокислот можно применять таблицу веса остатка PAM 120, штраф длины пропуска 12 и штраф пропуска 4.

Если не заявлено иначе, при определении идентичности или сходства последовательностей будет применяться версия 10 GAP, в которой применяется алгоритм Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48(3):443-453, с использованием следующих параметров: % идентичности и % сходства для нуклеотидной последовательности с использованием GAP Weight 50 и Length Weight 3, и матрицы подсчета nwsgapdna.cmp; % идентичности или % сходства для последовательности аминокислот с использованием GAP Weight 8 и Length Weight 2, и программы подсчета BLOSUM62. Также можно использовать эквивалентные программы. Под «эквивалентной программой» подразумевается любая программа для сравнения последовательностей, которая для любых двух рассматриваемых последовательностей производит выравнивание, имеющее пары идентичных нуклеотидных остатков и сходный процент идентичности последовательностей, по сравнению с соответствующим выравниванием, произведенным версией 10 GAP. Изобретение также охватывает варианты молекул нуклеиновых кислот. «Варианты» нуклеотидных последовательностей, кодирующих дельта-эндотоксин, включают те последовательности, которые кодируют белки дельта-эндотоксина, раскрытые здесь, но которые умеренно отличаются из-за вырожденности генетического кода, а также те, которые являются достаточно идентичными, как обсуждено выше. Встречающиеся в природе аллельные варианты можно идентифицировать с использованием известных методов молекулярной биологии, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР) и методики гибридизации, как обрисовано в общих чертах ниже. Вариантные нуклеотидные последовательности также включают синтетически полученные нуклеотидные последовательности, которые были образованы, например, с использованием сайт-направленного мутагенеза, но которые все еще кодируют белки дельта-эндотоксина, раскрытые в настоящем изобретении, как обсуждено ниже. Вариантные белки, охваченные настоящим

изобретением, являются биологически активными, то есть они продолжают обладать желательной биологической активностью нативного белка, то есть, сохраняют инсектицидную активность. Под «сохраняет активность» подразумевается, что вариант должен обладать, по меньшей мере, приблизительно 30%, по меньшей мере, приблизительно 50%, по меньшей мере, приблизительно 70% или, по меньшей мере, приблизительно 80% инсектицидной активностью нативного белка. Способы определения инсектицидной активности хорошо известны в данной области. См., например, 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; и патент США 5743477, каждая из которых включена здесь в качестве ссылки в полном объеме.

Любой специалист в данной области может оценить, что изменения могут быть внесены путем введения мутаций в нуклеотидные последовательности по изобретению, приводя тем самым к изменениям в аминокислотной последовательности кодируемых белков дельта-эндотоксина, без изменения биологической активности белков. Таким образом, вариантыные выделенные молекулы нуклеиновой кислоты можно создать путем введения одной или более нуклеотидных замен, вставок или делеций в соответствующую нуклеотидную последовательность, раскрытую здесь, так, что одна или более аминокислотных замен, вставок или делеций вводится в кодируемый белок. Мутации могут быть введены стандартными методами, такими как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. Такие вариантыные нуклеотидные последовательности также охвачены настоящим изобретением.

Например, консервативные аминокислотные замены можно проводить для одного или более предполагаемых, несущественных аминокислотных остатков. «Несущественный» аминокислотный остаток представляет собой остаток, который может быть изменен в последовательности белка дельта-эндотоксина дикого типа без изменения биологической активности, тогда как «существенный» аминокислотный остаток требуется для биологической активности. «Консервативная аминокислотная замена» представляет собой такую

замену, при которой аминокислотный остаток заменен аминокислотным остатком, имеющим сходную боковую цепь. В данной области были определены группы аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые цепи. Эти группы включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислыми боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). В большинстве случаев дельта-эндотоксины содержат пять доменов консервативных последовательностей и три консервативных структурных домена (см., например, de Maagd et al. (2001) *Trends Genetics* 17:193-199). Первый консервативный структурный домен состоит из семи альфа-спиралей и принимает участие в интеграции в мембрану и формирование поры. Домен II состоит из трех бета-листов, устроенных в конфигурации греческого ключа, а домен III состоит из двух антипараллельных бета-листов в виде «рулета с джемом» (de Maagd et al., 2001, выше). Домены II и III вовлечены в узнавание рецептора и связывание и поэтому считаются детерминантами токсинной специфичности.

Замены аминокислот могут быть сделаны в неконсервативных областях, которые сохраняют функцию. Вообще, такие замены не следует проводить для консервативных аминокислотных остатков или для аминокислотных остатков, расположенных в пределах консервативного мотива, где такие остатки являются существенными для активности белка. Примеры остатков, которые являются консервативными и которые могут быть существенными для активности белка, включают, например, остатки, которые идентичны у всех белков при выравнивании аминокислотных последовательностей по настоящему изобретению и известных последовательностей дельта-эндотоксина. Примеры остатков, которые являются консервативными, но которые могут допускать

замены консервативных аминокислот и все еще сохранять активность, включают, например, остатки, у которых есть только консервативные замены среди всех белков, содержащихся в выравнивании аминокислотных последовательностей по настоящему изобретению и известных последовательностей дельта-эндотоксина. Тем не менее, любому специалисту в данной области должно быть понятно, что функциональные варианты могут иметь незначительные консервативные или неконсервативные изменения в консервативных остатках.

Альтернативно можно получать варианты нуклеотидные последовательности путем введения случайным образом мутаций по всей длине кодирующей последовательности или ее части, такой как насыщающий мутагенез, и полученные мутанты можно скринировать на способность придавать активность дельта-эндотоксина, чтобы идентифицировать мутанты, которые сохраняют активность. После мутагенеза кодируемый белок можно экспрессировать рекомбинантным образом, и активность белка можно определить с использованием стандартных методов проверки.

С использованием способов, таких как ПЦР, гибридизация и т.п., можно идентифицировать соответствующие последовательности дельта-эндотоксина, последовательности, имеющие существенную идентичность с последовательностями по изобретению. См., например, Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) и Innis, et al. (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, NY).

В способе гибридизации можно использовать всю последовательность дельта-эндотоксина или ее часть для скрининга кДНК-овых или геномных библиотек. Способы конструирования таких кДНК-овых и геномных библиотек являются общеизвестными в данной области и раскрыты выше в Sambrook and Russell, 2001. Так называемые гибридизационные зонды могут представлять собой геномные фрагменты ДНК, фрагменты кДНК, фрагменты РНК или другие олигонуклеотиды, и могут быть мечены детектируемой группой, такой как ^{32}P , или любым другим детектируемым маркером, таким как другие радиоизотопы,

флуоресцентные соединения, фермент или кофактор фермента. Зонды для гибридизации могут быть получены путем мечения синтетических олигонуклеотидов на основе известной кодирующей дельта-эндотоксин нуклеотидной последовательности, раскрытой здесь. Дополнительно можно использовать вырожденные праймеры, спроектированные на основе консервативных нуклеотидов или аминокислотных остатков в нуклеотидную последовательность или кодируемую аминокислотную последовательность. Как правило, зонды включают область нуклеотидной последовательности, которая гибридизуется при жестких условиях с, по меньшей мере, приблизительно 12, по меньшей мере, приблизительно 25, по меньшей мере, приблизительно 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, или 400 последовательными нуклеотидами кодирующей дельта-эндотоксин нуклеотидной последовательности по изобретению или ее фрагмента или варианта. Способы получения зондов для гибридизации являются общеизвестными в данной области и раскрыты выше в Sambrook and Russell, 2001, включенной здесь в качестве ссылки.

Например, полная последовательность дельта-эндотоксина, раскрытая здесь, или одна или более ее частей, может использоваться в качестве зонда, обладающего способностью специфически гибридизоваться с соответствующими дельта-эндотоксин-подобными последовательностями и информационными РНК. Для достижения специфической гибридизации при множестве условий такие зонды включают последовательности, которые уникальны и представляют собой предпочтительно, по меньшей мере, приблизительно 10 нуклеотидов в длину, или, по меньшей мере, приблизительно 20 нуклеотидов в длину. Такие зонды можно использовать для амплификации соответствующих последовательностей дельта-эндотоксина из выбранного организма путем ПЦР. Эту методику можно применять для выделения дополнительных кодирующих последовательностей из требуемого организма или в качестве диагностического анализа для определения присутствия кодирующих последовательностей в организме. Способы гибридизации включают гибридизационное скринирование высевных на чашки библиотек ДНК (или бляшки, или

колонии; см., например, Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York).

Гибридизацию таких последовательностей можно проводить при жестких условиях. Под «жесткими условиями» или «жесткими условиями гибридизации» подразумеваются условия, при которых зонд должен гибридизоваться со своей последовательностью-мишенью в детектируемо большей степени, чем с другими последовательностями (например, по меньшей мере, с 2-кратным превышением фона). Жесткие условия зависят от последовательности и должны различаться в зависимости от обстоятельств. Контролируя жесткость гибридизации и/или условия отмывки, можно идентифицировать последовательности-мишени, которые на 100% комплементарны зонду (гомологичное зондирование). Альтернативно, можно адаптировать жесткость условий для допущения некоторого несоответствия в последовательностях для того, чтобы детектировать более низкие степени сходства (гетерологичное зондирование). Как правило, зонд составляет менее чем приблизительно 1000 нуклеотидов в длину, предпочтительно, менее чем 500 нуклеотидов в длину.

Как правило, жесткие условия должны представлять собой условия, при которых концентрация соли составляет менее чем приблизительно 1,5 М ионов Na, типично, приблизительно от 0,01 до 1 М концентрации ионов Na (или других солей) при pH от 7,0 до 8,3 и температуре, по меньшей мере, около 30°C для коротких зондов (например, от 10 до 50 нуклеотидов) и, по меньшей мере, около 60°C для длинных зондов (например, больше, чем 50 нуклеотидов). Жесткие условия также могут быть достигнуты добавлением дестабилизирующих веществ, таких как формамид. Типичные условия с низкой жесткостью включают гибридизацию в буферном растворе с 30-35% формамида, 1 М NaCl, 1% SDS (натрий додецилсульфат) при 37°C, и промывку в 1X-2X SSC (20X SSC = 3,0 NaCl/0,3 М тринатриевая соль лимонной кислоты) при температуре от 50 до 55°C. Типичные умеренно жесткие условия включают гибридизацию в 40-45% формамиде, 1,0 М NaCl, 1% SDS при 37°C, и промывку в 0,5X-1X SSC при температуре от 55 до 60°C. Типичные

условия с высокой жесткостью включают гибридизацию в 50% формамиде, 1,0 М NaCl, 1% SDS при 37°C, и промывку в 0,1X SSC при 60-65°C. Необязательно, отмывочные буферы могут включать от около 0,1% до около 1% SDS. Продолжительность гибридизации, как правило, составляет менее чем приблизительно 24 часа, обычно от около 4 до около 12 часов.

Специфичность, как правило, является функцией послегибридизационных отмывок, критических факторов, представляющих собой ионную силу и температуру конечного промывочного раствора. Для гибридов ДНК-ДНК T_m может быть аппроксимировано из уравнения Meinkoth и Wahl (1984) *Anal. Biochem.* 138:267-284: $T_m = 81,5^\circ\text{C} + 16,6(\log M) + 0,41(\%GC) - 0,61(\% \text{ форм}) - 500/L$; где M представляет собой молярность одновалентных катионов, %GC представляет собой процент гуанозиновых и цитозиновых нуклеотидов в ДНК, % форм представляет собой процентное содержание формамида в растворе для гибридизации, и L представляет собой длину гибрида в парах оснований. T_m представляет собой температуру (при определенной ионной силе и pH), при которой 50% комплементарной последовательности-мишени гибридизуется с идеально подобранным зондом. T_m уменьшается примерно на 1°C на каждый 1% несоответствия; таким образом, T_m гибридизации и/или условия отмывки можно адаптировать для гибридизации к последовательностям желательной идентичности. Например, если происходит поиск последовательностей с $\geq 90\%$ -ой идентичностью, T_m может быть уменьшена на 10°C. Как правило, жесткие условия подбирают на примерно 5°C ниже, чем тепловая точка плавления (T_m) для определенной последовательности и комплементарной ей при определенной ионной силе и pH. При этом очень жесткие условия можно использовать при гибридизации и/или промывке на 1, 2, 3 или 4°C ниже, чем тепловая точка плавления (T_m); умеренно жесткие условия можно использовать при гибридизации и/или промывке на 6, 7, 8, 9 или 10°C ниже, чем тепловая точка плавления (T_m); нежесткие условия можно использовать при гибридизации и/или промывке на 11, 12, 13, 14, 15 или 20°C ниже, чем тепловая точка плавления (T_m). С использованием уравнения, композиций гибридизации и отмывки и

желательной T_m , любой специалист в данной области поймет, что изменения в жесткости гибридизации и/или растворов для отмывки являются неотъемлемыми при описании. Если желательная степень несоответствия приводит к T_m меньше, чем 45°C (водный раствор) или 32°C (раствор формамида), предпочтительно увеличить концентрацию SSC так, чтобы можно было использовать более высокую температуру. Обширный справочник по гибридизации нуклеиновых кислот обнаруживается в Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Part I, Chapter 2 (Elsevier, New York); и Ausubel et al., eds. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 2 (Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York). См. Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York).

Выделенные белки и их варианты и фрагменты

Белки дельта-эндотоксина также охвачены в пределах настоящего изобретения. Под «белком дельта-эндотоксина» подразумевают белок, обладающий аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO:4 SEQ, 5, 6, 13 или 14. Также предоставлены его фрагменты, биологически активные части и варианты, и их можно использоваться при практиковании способов по настоящему изобретению.

«Фрагменты» или «биологически активные части» включают фрагменты полипептида, содержащие последовательности аминокислот, достаточно идентичные последовательности аминокислот, приведенной в любой из SEQ ID NO:4 SEQ, 5, 6, 13, или 14, и проявляющие инсектицидную активность. Биологически активная часть белка дельта-эндотоксина может представлять собой полипептид, то есть, например, 10, 25, 50, 100 или больше аминокислот в длину. Такие биологически активные части можно подготовить при помощи рекомбинантных методик и оценить по инсектицидной активности. Способы определения инсектицидной активности известны в данной области. См., например, 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; и Патент США № 5743477, каждая из которых включена здесь в качестве ссылки в полном объеме. Как используется здесь, фрагмент включает, по меньшей мере, 8 смежных аминокислот SEQ ID NO:4 SEQ, 5, 6, 13 или 14. Изобретение охватывает другие фрагменты, однако такие, как любой фрагмент в белке, больший, чем приблизительно 10, 20, 30, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, или 1300 аминокислот.

Под «вариантами» подразумевают белки или полипептиды, обладающие аминокислотной последовательностью, которая идентична, по меньшей мере, приблизительно на 60%, 65%, приблизительно на 70%, 75%, приблизительно на 80%, 85%, приблизительно на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% последовательности аминокислот любой из SEQ ID NO:4, 5, 6, 13 или 14. Варианты также включают полипептиды, кодируемые молекулой нуклеиновой кислоты, которая гибридизуется с молекулой нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO:1, 2, 3, 11 или 12, или ее комплементами, при жестких условиях. Варианты включают полипептиды, которые отличаются по аминокислотной последовательности вследствие мутагенеза. Различные белки, охваченные настоящим изобретением, являются биологически активными, то есть, они продолжают обладать желательной биологической активностью нативного белка, то есть, сохраняют инсектицидную активность. Способы определения инсектицидной активности известны в данной области. См., например, 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; и Патент США № 5743477, каждая из которых включена здесь в качестве ссылки в полном объеме.

Бактериальные гены, такие как гены *axm1* по этому изобретению, весьма часто обладают несколькими иницирующими кодонами метионина вблизи от начала открытой рамки считывания. Часто иницирование трансляции на одном или более из этих кодонов приводит к образованию функционального белка. Эти иницирующие кодоны могут включать кодоны ATG. Однако бактерии,

такие как *Bacillus sp.*, также распознают кодон GTG в качестве иницирующего кодона, и белки, которые иницируют трансляцию на кодонах GTG, первой аминокислотой, содержат метионин. Кроме того, *a priori* не часто определяется, какие из этих кодонов природно используются в бактерии. Таким образом, подразумевается, что использование одного из дополнительных кодонов метионина может также приводить к образованию белков дельта-эндотоксина, которые кодируют инсектицидную активность. Эти белки дельта-эндотоксина охватываются настоящим изобретением и могут использоваться в способах по настоящему изобретению.

Также охватываются антитела к полипептидам по настоящему изобретению или к их вариантам или фрагментам. Способы продуцирования антител известны в данной области (см., например, Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; U.S. Patent No. 4,196,265).

Измененные или улучшенные варианты

Общепризнанно, что последовательности ДНК дельта-эндотоксина могут быть изменены различными способами, и что эти изменения могут привести к последовательностям ДНК, кодирующим белки с аминокислотными последовательностями, отличными от последовательностей, кодируемых дельта-эндотоксином по настоящему изобретению. Этот белок может быть изменен различными способами, включая аминокислотные замены, делеции, укорочения и вставки одной или более аминокислот SEQ ID NO:4 SEQ, 5, 6, 13 или 14, включая вплоть до приблизительно 2, приблизительно 3, приблизительно 4, приблизительно 5, приблизительно 6, приблизительно 7, приблизительно 8, приблизительно 9, приблизительно 10, приблизительно 15, приблизительно 20, приблизительно 25, приблизительно 30, приблизительно 35, приблизительно 40, приблизительно 45, приблизительно 50, приблизительно 55, приблизительно 60, приблизительно 65, приблизительно 70, приблизительно 75, приблизительно 80, приблизительно 85, приблизительно 90, приблизительно 100, приблизительно 105, приблизительно 110,

приблизительно 115, приблизительно 120, приблизительно 125, приблизительно 130 или больше аминокислотных замен, делеций или вставок.

Способы таких манипуляций являются общеизвестными в данной области. Например, варианты аминокислотной последовательности белка дельта-эндотоксина можно получить путем мутаций в ДНК. Это также может выполняться путем одного из нескольких видов мутагенеза и/или направленного изменения. В некоторых аспектах изменения, кодируемые в аминокислотной последовательности, не будут существенно затрагивать функцию белка. Такие варианты будут обладать желательной инсектицидной активностью. Однако подразумевается, что способность дельта-эндотоксина обладать инсектицидной активностью может быть улучшена при помощи таких методик, исходя из композиций по данному изобретению. Например, можно экспрессировать дельта-эндотоксин в клетках хозяина, которые проявляют высокие уровни неправильного включения оснований во время репликации ДНК, таких как XL-1 Red (Stratagene). После наращивания таких штаммов можно выделить ДНК дельта-эндотоксина (например, путем подготовки плазмидной ДНК, или путем амплификации при помощи ПЦР и путем клонирования образующегося ПЦР-фрагмента в вектор), размножить мутации дельта-эндотоксина в немутагенном штамме и идентифицировать мутантные гены дельта-эндотоксина с инсектицидной активностью, например, путем проведения анализа по проверке инсектицидной активности. Обычно белок подмешивают и используют в испытаниях по кормлению. См., например Marrone et al. (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293. Такие испытания могут включать приведение растений в контакт с одним или более насекомыми и определение способности растений приводить к выживанию и/или вызывать гибель насекомых. Примеры мутаций, которые приводят к увеличенной токсичности, встречаются в Schnepf et al. (1998) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:775-806.

Альтернативно, можно провести изменения белковой последовательности многих белков на амино- или карбокси-конце без существенного влияния на активность. Это может включать вставки, делеции или изменения, введенные современными

молекулярными способами, такими как ПЦР, включая ПЦР-амплификации, которые изменяют или удлиняют кодирующую последовательность белка за счет включения кодирующих аминокислотных последовательностей в олигонуклеотиды, используемые при ПЦР-амплификации. Альтернативно, добавленные последовательности белка могут включать полные кодирующие белок последовательности, такие как используемые обычно в данной области для образования слитых белков. Такие слитые белки часто используются для (1) увеличения экспрессии представляющего интерес белка, (2) введения связывающего домена, ферментативной активности или эпитопа для облегчения либо очистки белка, обнаружения белка, либо другого экспериментального использования, известного в данной области, (3) направленной секреции или трансляции белка во внутриклеточную органеллу, такую как периплазматическое пространство грамотрицательных бактерий или эндоплазматический ретикулум эукариотических клеток, в последней из которых часто происходит гликозилирование белка.

Выриантные нуклеотидные и аминокислотные последовательности по настоящему изобретению также охватывают последовательности, полученные в результате мутагенных и рекомбинантных процедур, таких как перетасовка ДНК. При такой процедуре можно использовать один или более различных кодирующих области белков дельта-эндотоксина для создания нового белка дельта-эндотоксина, обладающего желательными свойствами. Таким способом получают библиотеки рекомбинантных полинуклеотидов из популяции полинуклеотидов с родственными последовательностями, включающих области последовательностей, которые имеют существенную идентичность последовательности и могут гомологично рекомбинировать *in vitro* или *in vivo*. Например, используя этот подход, мотивы последовательности, кодирующие представляющий интерес домен, могут быть перетасованы между геном дельта-эндотоксина по изобретению и другими известными генами дельта-эндотоксина, чтобы получить новый ген, кодирующий белок с улучшенным представляющим интерес свойством, таким как увеличенная инсектицидная активность.

Стратегии для такой перетасовки ДНК известны в данной области. См., например, Stemmer (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-10751; Stemmer (1994) *Nature* 370:389-391; Crameri 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; Crameri et al. (1998) *Nature* 391:288-291; и патенты США №№ 5605793 и 5837458.

Обмен или перестановка доменов представляет другой механизм образования измененных белков дельта-эндотоксина. Домены II и III могут быть обменяны между белками дельта-эндотоксина, что приводит к гибридным или химерным токсинам с улучшенной инсектицидной активностью или спектром мишеней. Способы образования рекомбинантных белков и проверки их на инсектицидную активность известны в данной области (см., например, 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).

Векторы

Последовательность дельта-эндотоксина по изобретению может быть предоставлена в экспрессионной кассете для экспрессии в представляющем интерес растении. Под «экспрессионной кассетой растения» подразумевают конструкцию ДНК, которая способна приводить к экспрессии белка с открытой рамки считывания в клетке растения. В основном они содержат промотор и кодирующую последовательность. Часто такие конструкции также содержат 3'-нетраслируемые области. Такие конструкции могут содержать «сигнальную последовательность» или «лидерную последовательность», чтобы способствовать котрансляционному или посттрансляционному транспорту пептида к определенным внутриклеточным структурам, таким как хлоропласт (или другая пластида), эндоплазматический ретикулум или аппарат Гольджи.

Под «сигнальной последовательностью» подразумевают последовательность, о которой известно или о которой предполагают, что она приводит к котрансляционному или

посттрансляционному транспорту пептида через клеточную мембрану. У эукариотов они, в основном, вовлечены в секрецию в аппарат Гольджи, с некоторым имеющим место гликозилированием. Под «лидерной последовательностью» подразумевают любую последовательность, которая в случае трансляции приводит к аминокислотной последовательности, достаточной для переключения котрансляционного транспорта пептидной цепи во внутриклеточную органеллу. Таким образом, это включает лидерные последовательности, направляющие транспорт и/или гликозилирование путем прохождения в эндоплазматический ретикулум, прохождения в вакуоли, пластиды, включая хлоропласты, митохондрии и т.п.

Под «вектором трансформации растения» подразумевают молекулу ДНК, которая необходима для эффективной трансформации клетки растения. Такая молекула может состоять из одной или более кассет для экспрессии в растении, и может быть организована в более чем одну «векторную» молекулу ДНК. Например, двойные векторы представляют собой векторы для трансформации растения, которые используют два несмежных ДНК-вектора, для кодирования всех необходимых функций, действующих как в цис-, так и в транс-положении, для трансформации клеток растения (Hellens and Mullineaux (2000) *Trends in Plant Science* 5:446-451). «Вектор» относится к конструкции нуклеиновой кислоты, разработанной для передачи между различными клетками хозяина. «Вектор экспрессии» относится к вектору, который обладает способностью включать, интегрировать и экспрессировать последовательности гетерологичной ДНК или фрагменты в чужеродной клетке. Кассета должна включать 5'- и 3'-регуляторные последовательности, функционально связанные с последовательностью по изобретению. Под «функционально связанный» подразумевают функциональную связь между промотором и второй последовательностью, где промоторная последовательность инициирует и опосредует транскрипцию последовательности ДНК, соответствующей второй последовательности. В общем смысле, "функционально связанный" означает, что последовательности нуклеиновых кислот, будучи

связанными, являются смежными и, в случае необходимости, связывают две смежные белок-кодирующие области в одной и той же рамке считывания. Кроме того, кассета может дополнительно содержать, по меньшей мере, один дополнительный ген, совместно передающийся и трансформирующий организм. Альтернативно, дополнительный ген(ы) может быть предоставлен в составе нескольких экспрессионных кассет.

«Промотор» относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая обеспечивает непосредственную транскрипцию расположенной ниже кодирующей последовательности. Промотор вместе с другими транскрипционными и трансляционными регуляторными последовательностями нуклеиновых кислот (также называемыми «контрольными последовательностями») необходим для экспрессии представляющей интерес последовательности ДНК.

Такая экспрессионная кассета снабжена множеством участков рестрикции для вставки последовательности дельта-эндотоксина для осуществления транскрипционной регуляции регулирующих областей.

Кассета экспрессии должна включать область инициации транскрипции и трансляции (то есть, промотор) в направлении транскрипции 5'-3', последовательность ДНК по изобретению и область терминации трансляции и транскрипции (то есть, область терминации), функционирующие в растениях. Промотор может являться нативным, или аналогичным, или чужеродным или гетерологичным по отношению к растению-хозяину и/или к последовательности ДНК по изобретению. Кроме того, промотор может являться природной последовательностью или, в качестве альтернативы, синтетической последовательностью. В случае, если промотор является «нативным» или «гомологичным» растению-хозяину, подразумевается, что промотор обнаружен в природном растении, в которое промотор вводится. В случае, если промотор является «чужеродным» или «гетерологичным» последовательности ДНК по изобретению, то подразумевается, что промотор не является нативным или природным промотором для функционально связанных последовательностей ДНК по изобретению.

Область терминации может являться нативной с областью

инициации транскрипции, может являться нативной с функционально связанной последовательностью ДНК, представляющей интерес, может являться нативной с растением-хозяином, или может быть получена из другого источника (то есть, чужеродной или гетерологичной промотору, представляющей интерес последовательности ДНК, растению-хозяину или любой их комбинации). Подходящие области терминации доступны из Ti-плазмиды *A. tumefaciens*, такие как области терминации октопинсинтазы и нопалинсинтазы. См. также 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; и Joshi et al. (1987) *Nucleic Acid Res.* 15:9627-9639.

Если целесообразно, ген(ы) можно оптимизировать для увеличения экспрессии в трансформированной клетке хозяина. То есть, для улучшения экспрессии гены можно синтезировать с использованием предпочтительных для клетки хозяина кодонов, или можно синтезировать с использованием кодонов с предпочтительной для хозяина частотой использования кодонов. Как правило, GC-состав гена бывает увеличен. См., например, Campbell and Gowri (1990) *Plant Physiol.* 92: 1-11 для обсуждения предпочтительного для хозяев использования кодонов. В данной области доступны способы синтеза предпочтительных для растений генов. См., например, Патенты США №№ 5380831 и 5436391, и Murray et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:477-498, включенные здесь в качестве ссылки.

В одном варианте осуществления дельта-эндотоксин предназначен для экспрессии в хлоропласте. Таким способом, в случае, где дельта-эндотоксин не встроен непосредственно в хлоропласт, экспрессионная кассета должна дополнительно содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую транспортный пептид, для направления дельта-эндотоксина к хлоропластам. Такие транспортные пептиды известны в данной области. См., например, 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; и Shah et al. (1986) *Science* 233:478-481.

Ген дельта-эндотоксина, предназначенный для хлоропластов, может быть оптимизирован для экспрессии в хлоропласте, с учетом различий в использовании кодонов между ядром растения и этой органеллой. Этим способом можно синтезировать представляющие интерес нуклеиновые кислоты с использованием кодонов, предпочтительных для хлоропластов. См., например, Патент США № 5380831, включенный здесь в качестве ссылки.

Трансформация растений

Способы по изобретению включают введение нуклеотидной конструкции в растение. Под «введением» подразумевается представление растению нуклеотидной конструкции таким образом, что конструкция получает доступ к внутреннему пространству клетки растения. Способы по изобретению не требуют, чтобы использовался конкретный способ введения нуклеотидной конструкции в растение, только чтобы нуклеотидная конструкция получала доступ к внутреннему пространству, по меньшей мере, одной клетки растения. Способы введения нуклеотидных конструкций в растения известны в данной области, включая, но не ограничиваясь ими, способы стабильной трансформации, способы транзиентной трансформации и вирус-опосредованные способы.

Под «растением» подразумеваются целые растения, органы растения (например, листья, стебли, корни и т.д.), семена, растительные клетки, побеги, эмбрионы и их потомство. Клетки растения могут быть дифференцированными или недифференцированными (например, каллус, суспензия клеток культуры, протопласты, клетки листьев, клетки корней, клетки флоэмы, пыльца).

«Трансгенные растения», или «трансформированные растения», или «стабильно трансформированные», растения, или клетки, или ткани относятся к растениям, которые встроили или интегрировали экзогенные последовательности нуклеиновых кислот или фрагменты ДНК в клетку растения. Эти последовательности нуклеиновых кислот включают последовательности, которые являются

экзогенными или не присутствуют в нетрансформированной клетке растения, а также последовательности, которые могут являться эндогенными или присутствовать в нетрансформированной клетке растения. Как правило, «гетерологичный» относится к последовательностям нуклеиновых кислот, которые не являются эндогенными для клетки или части нативного генома, в котором они присутствуют, и были добавлены к клетке путем инфицирования, трансфекции, микроинъекции, электропорации, микропроекции или подобного.

Трансформацию клеток растений можно проводить одним из нескольких способов, известных в данной области. Ген дельта-эндотоксина по изобретению можно изменить для получения или увеличения экспрессии в клетках растений. Обычно конструкция, которая экспрессирует такой белок, должна содержать промотор для управления транскрипцией гена, а также 3'-нетранслируемую область для обеспечения терминации транскрипции и полиаденилирования. Устройство таких конструкций известно в данной области. В некоторых случаях может быть полезно спроектировать ген таким образом, чтобы образующийся пептид секретировался или иным образом направлялся в пределах клетки растения. Например, ген может быть спроектирован, чтобы содержать сигнальный пептид для обеспечения переноса пептида в эндоплазматический ретикулум. Также может являться предпочтительным конструирование экспрессионной кассеты растения с содержанием интрона таким образом, чтобы для экспрессии был необходим мРНК-процессинг интрона.

Обычно такую «экспрессионную кассету растения» вставляют в «вектор трансформации растения». Этот вектор трансформации растения может содержать один или более ДНК-векторов, необходимых для достижения трансформации растения. Например, обычной практикой в данной области является использование векторов трансформации растения, которые состоят из более чем одного смежного сегмента ДНК. Эти векторы часто упоминаются в данной области как «бинарные векторы». Бинарные векторы, так же как векторы со вспомогательными плазмидами, чаще всего используются для *Agrobacterium*-опосредованной трансформации,

где размер и сложность сегментов ДНК, необходимых для достижения эффективной трансформации, являются весьма значительными, и представляется полезным распределение функции по разделенным молекулам ДНК.

Обычно бинарные векторы включают плазмидный вектор, который содержит цис-действующие последовательности, необходимые для переноса Т-ДНК (такие как левая граница и правая граница), селективный маркер, который спроектирован, чтобы быть способным к экспрессии в клетке растения, и «представляющий интерес ген» (ген, спроектированный, чтобы быть способным к экспрессии в клетке растения, для которой желательна генерация трансгенных растений). Также присутствующими на этом плазмидном векторе являются последовательности, необходимые для бактериальной репликации. Цис-действующие последовательности устроены таким образом, чтобы обеспечить эффективный перенос в клетки растения и экспрессию там. Например, ген селективного маркера и дельта-эндотоксин расположены между левой и правой границами. Часто второй плазмидный вектор содержит транс-действующие факторы, которые опосредуют перенос Т-ДНК от *Agrobacterium* в клетки растения. Эта плаزمид часто несет вирулентные функции (гены Vir), которые позволяют *Agrobacterium* инфицировать клетки растения и переносить ДНК путем расщепления по граничным последовательностям и vir-обусловленному переносу ДНК, как понимается в данной области (Hellens and Mullineaux (2000) *Trends in Plant Science* 5:446-451). Несколько типов штаммов *Agrobacterium* (например, LBA4404, GV3101, EHA101, EHA105 и т.д.) можно использовать для трансформации растений. Второй плазмидный вектор не является необходимым для трансформации растений другими способами, такими как микропроекция, микроинъекция, электропорация, с использованием полиэтиленгликоля и т.д.

Как правило, способы трансформации растений включают перенос гетерологичной ДНК в клетки-мишени растения (например, незрелые или зрелые эмбрионы, суспензионные культуры, недифференцированный каллус, протопласты и т.д.) с последующим

применением максимального порогового уровня соответствующей селекции (в зависимости от гена селективного маркера), чтобы отобрать трансформированные клетки растения из группы нетрансформированной клеточной массы. Как правило, эксплантаты переносят на новый источник той же среды и культивируют обычным способом. Впоследствии трансформированные клетки дифференцируются при всходах после перемещения на регенерирующую среду с добавлением максимального порогового уровня селективирующего вещества. Всходы затем переносят на селективную среду для укоренения для получения укорененных всходов или проростков. Трансгенный проросток затем превращается в зрелое растение и производит фертильные семена (например, Hiei *et al.* (1994) *The Plant Journal* 6:271-282; Ishida *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14:745-750). Как правило, эксплантаты переносят на новый источник той же среды и культивируют обычным способом. Общее описание методик и способов производства трансгенных растений можно встретить в Ayres and Park (1994) *Critical Reviews in Plant Science* 13:219-239 и Bommineni and Jauhar (1997) *Maydica* 42: 107-120. Так как трансформированный материал содержит много клеток, как трансформированные, так и нетрансформированные клетки присутствуют в любой части подвергнутого воздействию целевого каллюса или ткани, или группы клеток. Способность уничтожать нетрансформированные клетки и предоставлять возможность трансформированным клеткам пролиферировать приводит к образованию трансформированных культур растений. Часто способность удалять нетрансформированные клетки представляет собой ограничение для быстрого восстановления трансформированных клеток растения и успешной генерации трансгенных растений.

Протоколы трансформации, так же как и протоколы для введения нуклеотидных последовательностей в растения могут меняться в зависимости от типа растения или растительной клетки, то есть, однодольного или двудольного растения, предназначенного для трансформации. Генерацию трансгенных растений можно осуществить одним из нескольких способов,

включая, но не ограничиваясь ими, микроинъекцию, электропорацию, прямой генный перенос, введение гетерологичной ДНК при помощи *Agrobacterium* в клетки растения (*Agrobacterium*-обусловленная трансформация), бомбардировку клеток растения гетерологичной чужеродной ДНК, налипшей на частицы, баллистическое ускорение частиц, трансформацию аэрозольным пучком (опубликованная заявка США № 20010026941; Патент США № 4945050; международная публикация № WO 91/00915; опубликованная заявка США № 2002015066), *Lecl*-трансформацию и различные другие, отличные от прямых опосредованных частицами, способы переноса ДНК.

Способы трансформации хлоропластов известны в данной области. См., например, 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. Способ основывается на обусловленной обстрелом частицами доставке ДНК, содержащей селективный маркер, и направлении ДНК в геном пластиды посредством гомологичной рекомбинации. Дополнительно, пластидную трансформацию можно получить путем трансактивации молчащего присутствующего в пластиде трангена при помощи ткане-предпочтительной экспрессии ядерно кодируемой и пластид-направленной РНК-полимеразы. О такой системе сообщили в McBride et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:7301-7305.

После интеграции гетерологичной чужеродной ДНК в клетки растения применяют максимальный пороговый уровень соответствующей селекции в среде для уничтожения нетрансформированных клеток и отбора и пролиферации предполагаемых трансформированных клеток, которые выживают после этой селективной обработки, путем периодического переноса на новую среду. Путем непрерывного пассажа и проведения соответствующей селекции идентифицируют и размножают клетки, которые трансформированы плазмидным вектором. Затем можно использовать молекулярный и биохимические способы для подтверждения присутствия интегрированного, представляющего интерес гетерологичного гена в геном трансгенного растения.

Клетки, которые были трансформированы, можно вырастить в растения в соответствии с общепринятыми способами. См., например, McCormick *et al.* (1986) *Plant Cell Reports* 5:81-84. Эти растения можно затем вырастить и либо опылить тем же самым трансформированным штаммом, либо другими штаммами, и идентифицировать образующийся гибрид, конститутивно экспрессирующий желательную фенотипичную особенность. Можно вырастить два или более поколения, чтобы гарантировать, что экспрессия желательной фенотипичной особенности устойчиво поддерживается и наследуется, и затем отобрать собранное, чтобы гарантировать, что экспрессия желательной фенотипичной особенности была достигнута. Таким образом, настоящее изобретение предоставляет трансформированное семя (также называемое «трансгенным семенем»), обладающее нуклеотидной конструкцией по изобретению, например, экспрессионной кассетой по изобретению, устойчиво встроенной в его геном.

Оценка трансформации растения

После введения гетерологичной чужеродной ДНК в клетки растения трансформацию или интеграцию гетерологичного гена в геном растения подтверждают различными способами, такими как анализ нуклеиновых кислот, белков и метаболитов, связанных с интегрированным геном.

ПЦР-анализ представляет собой быстрый способ скрининга трансформированных клеток, тканей или проростков на присутствие встроенного гена на более ранней стадии, чем пересадка в почву (Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). ПЦР выполняют с использованием олигонуклеотидных праймеров, специфических для представляющего интерес гена, или векторного окружения *Agrobacterium* и т.д.

Трансформация растения может быть подтверждена Саузерн-блот-анализом геномной ДНК (Sambrook and Russell, 2001, выше). Как правило, из трансформанта выделяют тотальную ДНК, расщепляют соответствующими ферментами рестрикции, разделяют в агарозном геле и переносят на нейлоновую или нитроцеллюлозную мембрану. Мембрану или «блот» затем зондируют, например,

меченным радиоактивным изотопом ^{32}P целевым фрагментом ДНК, чтобы подтвердить интеграцию введенного гена в геном растения, в соответствии со стандартными методиками (Sambrook and Russell, 2001, выше).

В Нозерн-блот-анализе из определенных тканей трансформанта выделяют РНК, фракционируют в формальдегидном агарозном геле и подвергают блоттингу на нейлоновом фильтре в соответствии со стандартными процедурами, которые обычно используются в данной области (Sambrook and Russell, 2001, выше). Экспрессию РНК, кодируемую дельта-эндотоксином, затем проверяют путем гибридизации фильтра с радиоактивным зондом, полученным из дельта-эндотоксина, при помощи способов, известных в данной области (Sambrook and Russell, 2001, выше).

Вестерн-блот, биохимические анализы и т.п. можно проводить на трансгенных растениях, чтобы подтвердить присутствие белка, кодируемого геном дельта-эндотоксина в соответствии со стандартными процедурами (Sambrook and Russell, 2001, выше), используя антитела, которые связываются с одним или более эпитопами, присутствующими в белке дельта-эндотоксина.

Инсектицидная активность в растениях

В другом аспекте изобретения можно создать трансгенные растения, экспрессирующие дельта-эндотоксин, которые обладают инсектицидной активностью. Способы, описанные выше посредством примера, могут быть использованы для создания трансгенных растений, однако метод, которым создаются трансгенные клетки растения, не являются критическим в отношении этого изобретения. Способы, известные или описанные в данной области, такие как *Agrobacterium*-обусловленная трансформация, биолистная трансформация, и способы, отличные от частице-обусловленных, могут использоваться на усмотрение экспериментатора. Растения, экспрессирующие дельта-эндотоксин, могут быть выделены общепринятыми способами, описанными в данной области, например, трансформацией каллюса, селекцией трансформированного каллюса и регенерацией фертильных растений из такого трансгенного каллюса. В таком процессе можно использовать любой ген в качестве селективного маркера, в случае, если его экспрессия в

клетках растения дает возможность идентифицировать или отбирать трансформированные клетки.

Для использования с клетками растений было разработано много маркеров, таких как устойчивость к хлорамфениколу, аминогликозид G418, гигромицин или подобное. Другие гены, которые кодируют продукт, вовлеченный в метаболизм хлоропластов, также могут использоваться в качестве селективных маркеров. Например гены, которые обеспечивают устойчивость к гербицидам растений, такие как глифосат, бромксинил или имидазолинон, могут найти специфическое применение. О таких генах сообщали Stalker *et al.* (1985) *J. Biol. Chem.* 263:6310-6314 (нитрилазный ген устойчивости к бромксинилу); и Sathasivan *et al.* (1990) *Nucl. Acids Res.* 18:2188 (ген устойчивости к имидазолинону ANAS). Кроме того, раскрытые здесь гены полезны в качестве маркеров для оценки трансформации бактериальных или растительных клеток. Способы детектирования присутствия трансгена в растении, органе растения (например, листья, стебли, корни и т.д.), семени, клетке растения, побеге, эмбрионе или их потомстве известны в данной области. В одном варианте осуществления присутствие трансгена детектируется путем тестирования в отношении инсектицидной активности.

Фертильные растения, экспрессирующие дельта-эндотоксин, могут быть проверены на инсектицидную активность, и растения, показавшие оптимальную активность, отобраны для дальнейшего размножения. Способы оценки активности на насекомых доступны в данной области. Как правило, белок подмешивают и используют в испытаниях с кормлением. См., например, Marrone *et al.* (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293.

Настоящее изобретение может использоваться для трансформации любых видов растений, включая, но не ограничиваясь ими, однодольные и двудольные растения. Примеры представляющих интерес растений включают, но не ограничиваясь ими, зерновые (кукурузу), сорго, пшеницу, подсолнечник, томаты, крестоцветные, перцы, картофель, хлопок, рис, сою, сахарную свеклу, сахарный тростник, табак, ячмень и масличный рапс, *Brassica sp.*, люцерну, рожь, просо, сафлор, арахисы, батат,

маниоку, кофе, кокосовый орех, ананас, деревья цитрусовых, какао, чай, банан, авокадо, инжир, гуаву, манго, оливу, папайю, анакард, макадамии, миндаль, овес, овощи, декоративные растения и хвойные.

Овощи включают, но не ограничиваясь ими, томаты, салат, зеленую фасоль, лимскую фасоль, горох, и представителей рода *Curcumis*, таких как огурец, канталупа и мускусная дыня. Декоративные растения включают, но не ограничиваясь ими, азалию, гортензию, гибискус, розы, тюльпаны, нарциссы, петунии, гвоздику, молочай и хризантему. Предпочтительно, растения по настоящему изобретению представляют собой хлебные злаки (например, кукурузу, сорго, пшеницу, подсолнечник, помидор, крестоцветные, перцы, картофель, хлопок, рис, сою, сахарную свеклу, сахарный тростник, табак, ячмень, масличный рапс и т.д.).

Применение при контроле насекомых

Общие способы применения штаммов, включающих нуклеотидную последовательность по настоящему изобретению, или ее вариант, при контроле насекомых или в разработке других организмов в качестве инсектицидных агентов известны в данной области. См., например Патент США № 5039523 и EP 0480762A2.

Штаммы *Bacillus*, включающие нуклеотидную последовательность по настоящему изобретению или ее вариант, или микроорганизмы, которые были генетически изменены, чтобы содержать инсектицидный ген и белок, могут использоваться для защиты сельскохозяйственных зерновых культур и продуктов от насекомых. В одном аспекте изобретения целые, то есть, нелизонованные, клетки продуцирующего токсин (инсектицид) организма обрабатывают реактивами, которые продлевают активность токсина, продуцируемого в клетке, в случае, когда клетку применяют в среде, окружающей целевое(ых) насекомое(ых).

Альтернативно, инсектицид продуцируют путем введения гена дельта-эндотоксина в клеточного хозяина. Экспрессия гена дельта-эндотоксина приводит, прямо или косвенно, к внутриклеточному продуцированию и поддержанию инсектицида. В одном аспекте этого изобретения данные клетки затем

обрабатывают при условиях, которые продлевают активность токсина, продуцируемого в клетке, когда клетку применяют в окружающей целевое насекомое(ых) среде. Образующийся продукт сохраняет токсичность токсина. Эти естественным образом инкапсулированные инсектициды можно затем сформулировать в соответствии с обычными способами для применения в окружающей среде, принимающей целевое насекомое, например, почве, воде и листе растений. См., например, ЕРА 0192319 и ссылки, процитированные там. Альтернативно, можно сформулировать клетки, экспрессирующие ген по данному изобретению, так, чтобы сделать возможным применение образующегося материала в качестве инсектицида.

Инсектицидные композиции

Активные компоненты по настоящему изобретению обычно применяются в виде композиций и могут быть нанесены на участок сельскохозяйственной культуры или растения, подлежащего обработке, одновременно или по очереди с другими соединениями. Эти композиции могут представлять собой удобрения, гербициды, криозащитные вещества, сурфактанты, детергенты, инсектицидные мыла, неактивные масла, полимеры, и/или композиции с пролонгированным действием или биоразлагаемые композиции, которые позволяют долговременно дозировать целевой участок после однократного нанесения состава. Они также могут являться селективными гербицидами, химическими инсектицидами, противовирусными препаратами, противомикробными средствами, противоамебными веществами, пестицидами, фунгицидами, бактерицидными средствами, нематоцидами, моллюскоцидами или смесями нескольких из этих препаратов, при необходимости, вместе с дополнительными агрономически приемлемыми носителями, сурфактантами или содействующими применению адъювантами, используемыми в соответствии с техническими условиями области составов. Подходящие носители и адъюванты могут быть твердыми или жидкими и соответствовать веществам, обычно используемым в технологии составов, например, натуральным или восстановленным минеральным веществам, растворителям, диспергаторам, смачивающим агентам, веществам для повышения клейкости,

связующим веществам или удобрениям. Аналогично могут быть подготовлены составы для съедобных «приманок» или приспособленные под вредителя «ловушки» для предоставления возможности целевому вредителю питаться или принимать в пищу инсектицидный состав.

Способы применения активного компонента по настоящему изобретению или агрохимической композиции по настоящему изобретению, которые содержат, по меньшей мере, один из инсектицидных белков, продуцированных бактериальными штаммами по настоящему изобретению, включают нанесение на листья, дражирование семян и нанесение на почву. Число нанесений и скорость нанесения зависит от плотности заражения соответствующим насекомым.

Композиция может быть составлена в виде порошка, пылевидного препарата, шарика, гранулы, спрея, эмульсии, коллоида, раствора или подобного, и может быть приготовлена такими общепринятыми способами, как сушка, лиофилизация, гомогенизирование, экстракция, фильтрация, центрифугирование, седиментация или концентрирование культуры клеток, включающих полипептид. Во всех таких композициях, которые содержат, по меньшей мере, один такой инсектицидный полипептид, полипептид может присутствовать в концентрации от приблизительно 1% до приблизительно 99% по массе.

Чешуекрылые, жесткокрылые или другие насекомые могут быть уничтожены или их число может быть уменьшено на заданной площади при помощи способов по изобретению, или способы можно применять в целях профилактики к области окружающей среды, чтобы предотвратить заражение чувствительным насекомым. Предпочтительно, насекомое заглатывает или контактирует с инсектицидно эффективным количеством полипептида. Под «инсектицидно эффективным количеством» подразумевают количество инсектицида, которое в состоянии вызвать гибель, по меньшей мере, одного насекомого или заметно замедлить рост, питание или нормальное физиологическое развитие насекомого. Это количество должно меняться в зависимости от таких факторов как, например, определенные подлежащие контролю целевые насекомые,

определенная окружающая среда, местоположение, растение, урожай или сельскохозяйственный участок для обработки, условия окружающей среды и способ, норма, концентрация, стабильность и количество нанесения инсектицидно эффективной полипептидной композиции. Составы также могут меняться в зависимости от климатических условий, экологических соображений и/или частоты нанесения и/или серьезности заражения насекомым.

Описанные инсектицидные композиции могут быть изготовлены в виде состава либо с бактериальной клеткой, кристаллом и/или суспензией спор, либо с выделенным белковым компонентом с желательным агрономически приемлемым носителем. Композиции могут быть составлены перед введением в соответствующих видах, таких как лиофилизированном, высушенном сублимацией, высушенном, или в водном носителе, среде или подходящем разбавителе, таком как физиологический раствор или другой буфер. Составленные композиции могут быть в виде пылевидного или гранулированного материала, или суспензии в масле (растительном или минеральном), или водных или масляно-водных эмульсий, или в качестве смачиваемого порошка, или в комбинации с любым другим материалом-носителем, подходящим для сельскохозяйственного применения. Подходящие для сельского хозяйства носители могут являться твердыми или жидкими и являться известными в данной области. Термин «агрономически приемлемый носитель» охватывает все адъюванты, инертные компоненты, диспергаторы, сурфактанты, вещества для повышения клейкости, связующие вещества и т.д., которые обычно используются в технологии инсектицидных составов; они хорошо известны специалистам по инсектицидным составам. Составы могут быть смешаны с одним или более твердым или жидким адъювантами и приготовлены различными способами, например, путем гомогенного смешивания, перемешивания и/или перемалывания инсектицидной композиции с подходящими адъювантами, используя обычные способы составления. Подходящие составы и способы применения описаны в Патенте США № 6468523, включенном здесь в качестве ссылки.

«Вредитель» включает, но не ограничиваясь ими, насекомых, грибы, бактерии, нематоды, клещей, зудней и т.п. Насекомые-

вредители включают насекомых, выбранных из отрядов *Coleoptera*, *Diptera*, *Hymenoptera*, *Lepidoptera*, *Mallophaga*, *Homoptera*, *Hemiptera*, *Orthoptera*, *Thysanoptera*, *Dermaptera*, *Isoptera*, *Anoplura*, *Siphonaptera*, *Trichoptera* и т.д., особенно *Coleoptera*, *Lepidoptera* и *Diptera*.

Отряд *Coleoptera* включает подотряды *Aderphaga* и *Polyphaga*. Подотряд *Aderphaga* включает суперсемейства *Caraboidea* и *Gyrinoidea*, в то время как подотряд *Polyphaga* включает суперсемейства *Hydrophiloidea*, *Staphylinoidea*, *Cantharoidea*, *Cleroidea*, *Elateroidea*, *Dascilloidea*, *Dryopoidea*, *Byrrhoidea*, *Cucujoidea*, *Meloidea*, *Mordelloidea*, *Tenebrionoidea*, *Bostrichoidea*, *Scarabaeoidea*, *Cerambycoidea*, *Chrysomeloidea* и *Curculionoidea*. Суперсемейство *Caraboidea* включает семейства *Cicindelidae*, *Carabidae* и *Dytiscidae*. Суперсемейство *Gyrinoidea* включает семейство *Gyrinidae*. Суперсемейство *Hydrophiloidea* включает семейство *Hydrophilidae*. Суперсемейство *Staphylinoidea* включает семейства *Silphidae* и *Staphylinidae*. Суперсемейство *Cantharoidea* включает семейства *Cantharidae* и *Lampyridae*. Суперсемейство *Cleroidea* включает семейства *Cleridae* и *Dermestidae*. Суперсемейство *Elateroidea* включает семейства *Elateridae* и *Vuprestidae*. Суперсемейство *Cucujoidea* включает семейство *Coccinellidae*. Суперсемейство *Meloidea* включает семейство *Meloidae*. Суперсемейство *Tenebrionoidea* включает семейство *Tenebrionidae*. Суперсемейство *Scarabaeoidea* включает семейства *Passalidae* и *Scarabaeidae*. Суперсемейство *Cerambycoidea* включает семейство *Cerambycidae*. Суперсемейство *Chrysomeloidea* включает семейство *Chrysomelidae*. Суперсемейство *Curculionoidea* включает семейства *Curculionidae* и *Scolytidae*.

Отряд *Diptera* включает подотряды *Nematocera*, *Brachycera* и *Cyclorrhapha*. Подотряд *Nematocera* включает семейства *Tipulidae*, *Psychodidae*, *Culicidae*, *Ceratopogonidae*, *Chironomidae*, *Simuliidae*, *Bibionidae* и *Cecidomyiidae*. Подотряд *Brachycera* включает семейства *Stratiomyidae*, *Tabanidae*, *Therevidae*, *Asilidae*, *Mydidae*, *Bombyliidae* и *Dolichopodidae*. Подотряд *Cyclorrhapha* включает разделы *Aschiza* и *Aschiza*. Раздел *Aschiza* включает семейства *Phoridae*, *Syrphidae* и *Conopidae*. Раздел

Aschiza включает секции *Acalyptratae* и *Calyptratae*. Секция *Acalyptratae* включает семейства *Otitidae*, *Tephritidae*, *Agromyzidae* и *Drosophilidae*. Секция *Calyptratae* включает семейства *Hippoboscidae*, *Oestridae*, *Tachinidae*, *Anthomyiidae*, *Muscidae*, *Calliphoridae* и *Sarcophagidae*.

Отряд *Lepidoptera* включает семейства *Papilionidae*, *Pieridae*, *Lycaenidae*, *Nymphalidae*, *Danaidae*, *Satyridae*, *Hesperiidae*, *Sphingidae*, *Saturniidae*, *Geometridae*, *Arctiidae*, *Noctuidae*, *Lymantriidae*, *Sesiidae*, *Crambidae* и *Tineidae*.

Нематоды включают паразитических нематод, таких как нематоды корневого нароста, кисты и повреждений, включая *Heterodera* spp., *Meloidogyne* spp. и *Globodera* spp.; в частности, члены нематод кисты, включая, но не ограничиваясь ими, *Heterodera glycines* (нематода кисты сои); *Heterodera schachtii* (нематода кисты свеклы); *Heterodera avenae* (нематода зерновой кисты); и *Globodera rostochiensis* и *Globodera pailida* (нематоды картофельной кисты). Нематоды повреждения включают *Pratylenchus* spp.

Насекомые-вредители по изобретению основных зерновых культур включают: Кукуруза: *Ostrinia nubilalis*, Европейский зерновой мотылек; *Agrotis ipsilon*, черная совка; *Helicoverpa zea*, кукурузная совка; *Spodoptera frugiperda*, падающие походные черви; *Diatraea grandiosella*, юго-западный кукурузный мотылек; *Elasmopalpus lignosellus*, малый точильщик стебля кукурузы; *Diatraea saccharalis*, точильщик сахарного тростника; *Diabrotica virgifera*, западная личинка, повреждающая корни кукурузы; *Diabrotica longicornis barberi*, северная личинка, повреждающая корни кукурузы; *Diabrotica undecimpunctata howardi*, южная личинка, повреждающая корни кукурузы; *Melanotus* spp., проволочники; *Cyclocephala borealis*, северный скрытый хрущ (белая личинка); *Cyclocephala immaculata*, южный скрытый хрущ (белая личинка); *Popillia japonica*, японский жук; *Chaetocnema pulicaria*, зерновая земляная блошка; *Sphenophorus maidis*, кукурузный долгоносик; *Rhopalosiphum maidis*, тля листьев кукурузы; *Anuraphis maidiradicis*, тля корня кукурузы; *Blissus leucopterus leucopterus*, клоп-черепашка; *Melanoplus*

femurrubrum, красноногий кузнечик; *Melanoplus sanguinipes*, мигрирующий кузнечик; *Hylemya platura*, зерновая безногая личинка; *Agromyza parvicornis*, пятнистый минер листвы зерновых; *Anaphothrips obscurus*, травяные трипсы; *Solenopsis milesta*, муравей-вор; *Tetranychus urticae*, двухпятнышковый паутинный клещ; Сорго: *Chilo partellus*, точильщик сорго; *Spodoptera frugiperda*, падающие «походные черви»; *Helicoverpa zea*, зерновая совка; *Elasmopalpus lignosellus*, малый точильщик стебля кукурузы; *Feltia subterranea*, зернистая совка; *Phyllophaga crinita*, белая личинка; *Eleodes*, *Conoderus* и *Aeolus* spp., проволочники; *Oulema melanopus*, жук листьев зерновых культур; *Chaetocnema pulicaria*, зерновой скрытый жук; *Sphenophorus maidis*, кукурузный долгоносик; *Rhopalosiphum maidis*, тля листьев зерновых культур; *Sipha flava*, желтая тля сахарного тростника; *Blissus leucopterus leucopterus*, клоп-черепашка; *Contarinia sorghicola*, мошка сорго; *Tetranychus cinnabarinus*, пунцовый паутинный клещ; *Tetranychus urticae*, двухпятнышковый паутинный клещ; Пшеница: *Pseudaletia unipunctata*, армейский червь; *Spodoptera frugiperda*, падающие «походные черви»; *Elasmopalpus lignosellus*, малый точильщик корня зерновых; *Agrotis orthogonia*, западная совка; *Elasmopalpus lignosellus*, малый точильщик корня зерновых; *Oulema melanopus*, жук листьев зерновых культур; *Hyper punctata*, долгоносик клеверного листа; *Diabrotica undecimpunctata howardi*, южная личинка, повреждающая корни зерновых культур; русская пшеничная тля; *Schizaphis graminum*, тля злаковая; *Macrosiphum avenae*, английская зерновая тля; *Melanoplus femurrubrum*, красноногий кузнечик; *Melanoplus differentialis*, отличительный кузнечик; *Melanoplus sanguinipes*, мигрирующий кузнечик; *Mayetiola destructor*, гессенская муха; *Sitodiplosis mosellana*, мошка пшеницы; *Meromyza americana*, безногая личинка стебля пшеницы; *Hylemya coarctata*, муха луковицы пшеницы; *Frankliniella fusca*, табачные трипсы; *Cephus cinctus*, пилильщик стебля пшеницы; *Aceria tulipae*, клещ завитка пшеницы; Подсолнечник: *Suleima helianthana*, моль зародыша подсолнечника; *Notioeosoma electellum*, моль подсолнечника; *Zygogramma*

exclamationis, жук подсолнечника; *Bothyrus gibbosus*, жук моркови; *Neolasioptera murtfeldtiana*, мошка семени подсолнечника; Хлопок: *Heliothis virescens*, хлопковая листовертка; *Helicoverpa zea*, хлопковый коробочный червь; *Spodoptera exigua*, свекольные «походные черви»; *Pectinophora gossypiella*, розовый коробочный червь; *Anthonomus grandis*, хлопковый долгоносик; *Aphis gossypii*, хлопковая тля; *Pseudatomoscelis seriatus*, хлопковая прыгающая блоха; *Trialeurodes abutilonea*, связаннокрылая белокрылка; *Lygus lineolaris*, тусклый слепняк; *Melanoplus femurrubrum*, красноногий кузнечик; *Melanoplus differentialis*, отличительный кузнечик; *Thrips tabaci*, луковые трипсы; *Frankliniella fusca*, табачные трипсы; *Tetranychus cinnabarinus*, пунцовый паутинный клещ; *Tetranychus urticae*, двухпятнышковый паутинный клещ; Рис: *Diatraea saccharalis*, точильщик сахарного тростника; *Spodoptera frugiperda*, падающие «походные черви»; *Helicoverpa zea*, зерновая совка; *Colaspis brunnea*, виноградный коласпис; *Lissorhoptrus oryzophilus*, рисовый водяной долгоносик; *Sitophilus oryzae*, долгоносик риса; *Nephotettix nigropictus*, блоха листьев риса; *Blissus leucopterus leucopterus*, клоп-черепашка; *Acrosternum hilare*, зеленый вонючий клоп; Соя: *Pseudoplusia includens*, пяденица сои; *Anticarsia gemmatalis*, вельветовая гусеница; *Plathypena scabra*, зеленый вредитель клевера; *Ostrinia nubilalis*, европейский точильщик зерновых; *Agrotis ipsilon*, черный совка; *Spodoptera exigua*, свекольные «походные черви»; *Heliothis virescens*, хлопковая листовертка; *Helicoverpa zea*, хлопковый коробочный червь; *Epilachna varivestis*, мексиканский бобовый жук; *Myzus persicae*, зеленая персиковая тля; *Empoasca fabae*, блоха картофельной листвы; *Acrosternum hilare*, зеленый вонючий клоп; *Melanoplus femurrubrum*, красноногий кузнечик; *Melanoplus differentialis*, отличительный кузнечик; *Hylemya platura*, зерновая безногая личинка; *Sericothrips variabilis*, соевые трипсы; *Thrips tabaci*, луковые трипсы; *Tetranychus turkestanii*, земляничный паутинный клещ; *Tetranychus urticae*, двухпятнышковый паутинный клещ; Ячмень: *Ostrinia nubilalis*, европейский кукурузный мотылек;

Agrotis ipsilon, черная совка; *Schizaphis graminum*, тля злаковая; *Blissus leucopterus leucopterus*, клопа-черепашка; *Acrosternum hilare*, зеленый вонючий клоп; *Euschistus servus*, коричневый вонючий клоп; *Delia platura*, зерновая безногая личинка; *Mayetiola destructor*, гессенская муха; *Petrobia latens*, коричневый клещ пшеницы; Папс: *Brevicoryne brassicae*, тля капусты; *Phyllotreta cruciferae*, скрытый жук; *Mamestra configurata*, «походные черви» Берта; *Plutella xylostella*, моль капустная; *Delia* spp., корневые безногие личинки.

Способы увеличения урожайности растений

Предоставлены способы увеличения урожайности растений. Способы включают введение в растение или клетку растения полинуклеотида, содержащего инсектицидную последовательность, раскрытую здесь. Как определено здесь, «урожайность» растения относится к качеству и/или количеству биомассы, произведенной растением. Под «биомассой» подразумевают любой измеряемый продукт растения. Увеличение производства биомассы представляет собой любое усовершенствование в урожайности измеряемого продукта растения. Увеличение урожайности растения имеет несколько коммерческих применений. Например, увеличение биомассы листьев растения может увеличить урожайность листовых овощей для потребления животными или человеком. Кроме того, увеличение биомассы листьев может использоваться для увеличения производства полученных из растения фармацевтических или промышленных продуктов. Увеличение урожайности может включать любое статистически значимое увеличение, но не ограничиваясь ими, по меньшей мере, 1% увеличение, по меньшей мере, 3% увеличение, по меньшей мере, 5% увеличение, по меньшей мере, 10% увеличение, по меньшей мере, 20% увеличение, по меньшей мере, 30%, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 100% или большее увеличение урожайности по сравнению с растением, не экспрессирующим инсектицидную последовательность.

В определенных способах урожайность растения увеличивается в результате улучшенной устойчивости растения к насекомым, экспрессирующего инсектицидный белок, раскрытый здесь.

Экспрессия инсектицидного белка приводит к уменьшенной способности насекомого заражать или питаться растением, улучшая таким образом урожайность растения.

Следующие примеры предлагаются в качестве иллюстрации, а не в качестве ограничения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Пример 1. Открытие нового гена токсина Axmi115 из штамма *Bacillus thuringiensis* ATX12983

Полная последовательность гена выбранного штамма была идентифицирована с помощью геномного подхода MiDAS следующим образом:

- Подготовка экстрахромосомной ДНК штамма.

Экстрахромосомная ДНК содержит смесь некоторых или всего из следующего: плазмиды различного размера; хромосомы фага; геномные фрагменты ДНК, не отделенные протоколом очистки; другие неохарактеризованные экстрахромосомные молекулы.

- Механическое или ферментативное разрезание экстрахромосомной ДНК для получения распределенных по размеру фрагментов.

- Секвенирование фрагментированной ДНК.

- Идентификация предполагаемых генов токсина по гомологии и/или путем других компьютерных исследований.

- При необходимости, завершение последовательности представляющего интерес гена путем одной из нескольких стратегий ПЦР или клонирования (например, TAIL-PCR).

Новый ген упоминается здесь как *axmi-115* (SEQ ID NO:3), и кодируемая аминокислота упоминается как AXMI-115 (SEQ ID NO:6). Синтетические нуклеотидные последовательности, кодирующие AXMI-115, приведены в SEQ ID NO:15 и 16.

Характеристики гена и белка

Длина гена, пары оснований ДНК: 2409

Длина белка, аминокислотные остатки: 803

Предполагаемая молекулярная массы белка, Да: 90877

Известные гомологи и приблизительная процентная идентичность:

Vip3Afl - 70,7%

Axmi005 - 70,4%

Axmi026 - 70,4%

Vip3Aa7 - 70,1%

Пример 2. Новый инсектицидный белок AXMI-005 из штамма ATX13002 *Bacillus thuringiensis*

Инсектицидный ген AXMI-005 был идентифицирован из штамма ATX13002 с использованием подхода MIDAS, как описано в Патентной публикации США № 20040014091, который включен здесь в полном объеме в качестве ссылки, с использованием следующих стадий:

Стадии, сделанные в текущей стратегии по открытию гена:

Стадия 1: Культуру штамма выращивали в больших количествах. Плазмидную ДНК затем отделяли от хромосомной ДНК при помощи градиента хлористого цезия, сформованного при ультрацентрифугировании. Очищенную плазмидную ДНК затем раздробляли в диапазоне размеров 5-10 т.п.н., соответствующему покрытию среднего размера кодирующей области. Концы фрагмента достраивали, затем лигировали в течение ночи в вектор, разрезанный ферментом рестрикции, образующим тупые концы.

Стадия 3: После проверки и подтверждения качества геномной библиотеки, колонии выращивали, подготавливали образцы и секвенировали в 96-луночном формате. Плашки библиотеки секвенировали с конца от векторной основы для начального скрининга.

Стадия 5: Все прочтения были собраны в единый проект и выровнены вместе, чтобы сформировать контиги. Эти контиги, наряду с любым индивидуальным прочтением, которое, возможно, не было добавлено к контиг, были проанализированы при помощи BLAST, используя формат партии, по отношению к внутренней базе данных, составленной из всех классов известных генов дельта-эндотоксина. Любые контиги или индивидуальные прочтения, которые проявляли какую-либо гомологию с известным геном, анализировались далее, путем отбора единственного клона из библиотеки, которая покрывала полную гипотетическую кодирующую область.

Стадия 6: индивидуальный клон, покрывающий представляющую

интерес область, затем прочитывали шагами с перекрытием при помощи разработанных праймеров для расширения последовательности. Это делалось до тех пор, пока прочтения с обоих концов клона не соединились, и перекрытие составило, по меньшей мере, 2X. Законченный контиг единственного клона затем анализировался при помощи BLAST (как blastn, так и blastx) в отношении общей базы данных всех известных инсектицидных генов. Лучшие варианты из обоих поисков затем извлекали из внутренней базы данных всех генов (лишь урезанных до кодирующей последовательности) и выравнивали с полной последовательностью клона из библиотеки, чтобы определить процент расхождения с известным геном.

Новый ген, упомянутый здесь как axmi-005 (SEQ ID NO:1), и кодируемая аминокислота, называемая AXMI-005 (SEQ ID NO:4), были идентифицированы при помощи этого подхода. Поиск по общедоступным базам данных последовательностей, включая базы данных GENBANK®, показал, что AXMI-005 представляет собой уникальный белок, который обладает самой высокой гомологией (94,9%) с инсектицидным белком vip3Aa (GenePept ID L48841).

Синтетическая последовательность, кодирующая белок AXMI-005, была разработана и названа optaxmi-005. Нуклеотидная последовательность изложена в SEQ ID NO:7 и кодирует аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO:9 (с дополнением С-концевого гистидинового тага). Ген optaxmi-005, раскрытый здесь, может использоваться с С-концевым гистидиновым тагом или без него.

Пример 3. Открытие нового гена токсина Axmi-113 штамма ATX12987 *Bacillus thuringiensis*

Полная геновая последовательность была идентифицирована из выбранного штамма посредством геномного подхода MiDAS следующим образом:

- Подготовка экстрахромосомной ДНК штамма.

Экстрахромосомная ДНК содержит смесь некоторых или всех из следующего: плазмиды различного размера; хромосомы фага; геномные фрагменты ДНК, не отделенные протоколом очистки; другие неохарактеризованные экстрахромосомные молекулы.

- Механическое или ферментативное разрезание экстрахромосомной ДНК для получения распределенных по размеру фрагментов.

- Секвенирование фрагментированной ДНК.

- Идентификация предполагаемых генов токсина по гомологии и/или путем других компьютерных исследований.

- При необходимости, завершение последовательности представляющего интерес гена путем одной из нескольких стратегий ПЦР или клонирования (например, TAIL-PCR).

Новый ген упоминается здесь как *axmi-113* (SEQ ID NO:2), и кодируемая аминокислота упоминается как AXMI-113 (SEQ ID NO:5).

Характеристики гена и белка

Длина гена, пары оснований ДНК: 2385

Длина белка, аминокислотные остатки: 795

Предполагаемая молекулярная массы белка, Да: 89475

Известные гомологи и приблизительная процентная идентичность:

Vip3Ah - 99%

Vip3Aa18 - 79,8%

Axmi005 - 79%

Синтетическая последовательность, кодирующая белок AXMI-113, была разработана и названа *optaxmi-113*. Нуклеотидная последовательность приведена в SEQ ID NO:8, и кодирует последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO:4 или 14 (с добавлением С-концевого гистидинового тага). Ген *optaxmi-113*, раскрытый здесь, может использоваться с С-концевым гистидиновым тагом или без него.

Пример 4. Открытие новых генов токсина Axmi-163 и Axmi-184 штамма ATX14775 *Bacillus thuringiensis*

Полная генная последовательность была идентифицирована из выбранного штамма посредством геномного подхода MiDAS следующим образом:

- Подготовка экстрахромосомной ДНК штамма.

Экстрахромосомная ДНК содержит смесь некоторых или всех из следующего: плазмиды различного размера; хромосомы фага; геномные фрагменты ДНК, не отделенные протоколом очистки;

другие неохарактеризованные экстрахромосомные молекулы.

- Механическое или ферментативное разрезание экстрахромосомной ДНК для получения распределенных по размеру фрагментов.

- Секвенирование фрагментированной ДНК.

- Идентификация предполагаемых генов токсина по гомологии и/или путем других компьютерных исследований.

- При необходимости, завершение последовательности представляющего интерес гена путем одной из нескольких стратегий ПЦР или клонирования (например, TAIL-PCR).

Новый ген упоминается здесь как *axmi-163* и приведен в SEQ ID NO:6, и кодируемая аминокислота упоминается как AXMI-163 и приведена в SEQ ID NO:13.

Характеристики гена и белка

Длина гена, пары оснований ДНК: 2370

Длина белка, аминокислотные остатки: 790

Предполагаемая молекулярная массы белка, Да: 88700

Известные гомологи и приблизительная процентная идентичность:

SEQ ID NO:17 из Патента США 7129212 - 98%

Axmi005 - 78%

Новый ген, упомянутый здесь как *axmi-184*, приведен в SEQ ID NO:12, и кодируемая аминокислота, называемая AXMI-184, приведена в SEQ ID NO:14.

Синтетические нуклеотидные последовательности, кодирующие AXMI-184, приведены в SEQ ID NO:17 и 18.

Характеристики гена и белка

Длина гена, пары оснований ДНК: 2370

Длина белка, аминокислотные остатки: 790

Предполагаемая молекулярная массы белка, Да: 88300

Известные гомологи и приблизительная процентная идентичность:

Vip3Afl - 93%

Axmi005 - 86%

Пример 5. Конструирование синтетических последовательностей

В одном аспекте изобретения созданы синтетические последовательности *axmi*. Эти синтетические последовательности имеют измененную последовательность ДНК относительно родительской последовательности *axmi*, и кодируют белок, который коллинеарен с родительским белком АХМІ, которому она соответствует, но не содержит С-концевой «кристаллический домен», присутствующий во многих белках дельта-эндотоксина.

В другом аспекте изобретения измененные версии синтетических генов разработаны таким образом, чтобы образующийся пептид направлялся к органоиду растения, такому как эндоплазматический ретикулум или апопласт. Пептидные последовательности, известные тем, что могут привести к нацеливанию слитых белков в органеллы растения, известны в данной области. Например, N-концевая область гена фосфатазы из белого люпина *Lupinus albus* (Genebank ID GI: 14276838; Miller *et al.* (2001) *Plant Physiology* 127: 594-606), как известно в данной области, приводит к направлению гетерологичных белков в эндоплазматический ретикулум. Если образующийся слитый белок также содержит последовательность задержки в эндоплазматическом ретикулуме, включающую пептид N-конец-лизин-аспарагиновая кислота-глутаминовая кислота-лейцин (то есть мотив «KDEL» (SEQ ID SEQ NO: 19)) на С-конце, слитый белок будет направляться в эндоплазматический ретикулум. Если на С-конце слитого белка отсутствует последовательность направления в эндоплазматический ретикулум, то белок будет направляться в эндоплазматический ретикулум, однако в конечном счете будет выделен в апопласт.

Пример 6. Экспрессия в *Bacillus*

В качестве примера экспрессии генов и белков по изобретению в видах *Bacillus* инсектицидные ген, раскрытый здесь, амплифицируют путем ПЦР, и продукт ПЦР клонируют в вектор экспрессии рАХ916 *Bacillus* или другой подходящий вектор способами, известными в данной области. Получившийся штамм *Bacillus*, содержащий вектор с геном *axmi*, культивируют на традиционной среде роста, такой как среда CYS (10 г/л Vasto-

казитона; 3 г/л дрожжевого экстракта; 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), до тех пор, пока путем микроскопического исследования не будет очевидна споруляция. Образцы приготавливают и проверяют на активность в биопробах.

Пример 7. Экспрессия в *E. coli*

В качестве примера способа экспрессии генов и белков по изобретению в системах на основе *E. coli*, полную открытую рамку считывания каждого гена *axmi* клонируют в вектор экспрессии *E. coli*, основанный на pRSF1b. Образующиеся клоны подтверждают рестрикционным анализом и наконец, полным секвенированием клонированного гена.

Для экспрессии в *E. coli* BL21*DE3 трансформируют вектором, экспрессирующим ген *axmi*. Отдельные колонии инокулируют в LB с добавлением канамицина и выращивают в течение ночи при 37°C. На следующий день новую среду инокулируют в двойном экземпляре 1% ночной культурой и выращивают при 37°C до логарифмической фазы. Впоследствии культуры индуцируют 1 мМ изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозидом (IPTG) в течение 3 часов при 37°C или в течение ночи при 20°C. Каждый клеточный осадок суспендируют в 50 мМ буфере карбоната натрия, pH=10,5 с добавлением 1 мМ DTT (дитиотреитол) и озвучивают. Образцы подготавливают и проверяют на активность в биопробах.

Пример 8. Экспрессия AXMI-115, AXMI-113 и AXMI-005 в *E. coli*

Были получены клоны *E. coli*, которые включали сегменты ДНК, содержащие полную открытую рамку считывания, а также часть области ДНК, природно расположенной "выше по течению" и смежной с каждым геном. Этот сегмент ДНК для каждого из *axmi-113* (SEQ ID NO:5), *axmi-115* (SEQ ID NO:6) или *axmi-005* (SEQ ID NO:4) был амплифицирован и клонирован в вектор pAX916 с образованием клонов pAX5463, pAX5464 и pAX5465, соответственно. Получившиеся клоны были подтверждены рестрикционным анализом и полным секвенированием клонированных фрагментов.

Клетки *E. coli* были трансформированы каждым из клонов pAX5463, pAX5464 и pAX5465.

Гены *axmi005*, *axmi113* и *axmi115*, у которых кодоны были оптимизированы для экспрессии в зерновых и которые имели добавленный С-концевой 6-гистидиновый таг, также экспрессировали в векторе экспрессии *E. coli*, используя промотор T7. Кроме того, также были произведены конструкции, которые экспрессировали версии *optaxmi005* (pAX5475, pAX5478) и *optaxmi115* (pAX5476, pAX5477) с N-концевым 6-гистидиновым тагом или без него.

Отдельные колонии *E. coli axmi-115*, *axmi-113* и *axmi-005*-экспрессирующих клонов затем выращивали в течение ночи при 37°C в среде LB. На следующий день новую среду инокулируют в двойном экземпляре 1% ночной культурой и выращивают при 37°C до логарифмической фазы. Впоследствии культуры индуцируют 1 mM IPTG в течение ночи при 20°C. Получившиеся клетки собирали центрифугированием и суспендировали либо в 50 mM буфере карбоната натрия, pH 10,5 с добавлением с 1 mM DTT, либо в 50 mM буфере Трис-HCl, pH 8 с 1 mM DTT перед обработкой ультразвуком. Анализ методом электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия продемонстрировал экспрессию белка массой ~90 кДа во всех образцах.

Пример 9. Биопробы на насекомых экспрессированных в *E. coli* белков

Растворимые экстракты, содержащие AXMI-005, AXMI-113 или AXMI-115, были проверены в испытаниях на насекомых с соответствующими контролями. В двадцатичетырехлуночные планшеты для культур тканей (Corning) вносили по 1 мл мультивидовой диеты (Bio-Serv) и давали возможность затвердеть. После затвердевания 40 мкл образца белка помещали на диетическую поверхность каждой лунки и давали возможность впитаться/подсохнуть при комнатной температуре. В зависимости от эксперимента в каждую лунку помещали либо яичные массы, либо новорожденные личинки. Планшеты запечатывали газопроницаемыми мембранами (Research Products International) и инкубировали при 25°C и 90%-ой относительной влажности. После пяти или семи дней образцы подсчитывали визуально по сравнению образцом, содержащим только буфер, или контролем с нетрансформированным

экстрактом.

Сильную активность экстрактов АХМИ-005 наблюдали относительно *Helicoverpa zea* (HZ), *Heliothis virescens* (HV), падающих «походных червей» (FAW), черной совки (BCW), точильщика сахарного тростника (SCB) и бархатной бобовой гусеницы (VBC). АХМИ-005 также продемонстрировал активность на юго-западном кукурузном мотыльке (SWCB).

Сильная активность экстрактов АХМИ-115 наблюдалась относительно *Heliothis virescens*, падающих «походных червей», черной совки и бархатной бобовой гусеницы. АХМИ-115 также продемонстрировал активность по отношению к европейскому кукурузному мотыльку (ECB), SCB, SWCB и капустной моли (DBM). Активность АХМИ-115 на *Helicoverpa zea* (HZ) была менее отчетливой, чем для других проверенных насекомых, но все еще являлась существенной.

Активность каждого из экстрактов АХМИ-005 и АХМИ-115 подсчитывали, и на основании относительной активности в испытании присваивали оценку от 1 до 5. Итог подсчетов в специфических тестах приведен в Таблице 1.

АХМИ-005 продемонстрировал некоторую активность по отношению к SWCB (оценка 2) и высокие уровни активности по отношению к HZ, HV, FAW, BCW и VBC (оценки 4-5). АХМИ-115 показал высокие уровни активности по отношению к SWCB (80%-ая смертность), ECB, FAW и VBC (оценки 4-5) и меньшие активности по отношению к HZ и HV. АХМИ-113 также показал высокую активность по отношению к SWCB (оценка 4 с 20%-ой смертностью) и по отношению к SCB. На других проверенных насекомых не было отмечено никакой активности.

Таблица 1

Инсектицидная активность АХМИ-115, АХМИ-113 и АХМИ-005*

	Ахmi115 (pH 10,5)	Ахmi115 (pH 8)	Ахmi005 (pH 10,5)	Ахmi005 (pH 8)	Ахmi113 (pH 10,5)
HZ	0	0	4	4	0

ECB живое насекомое	2	4	0	0	0
Hv	0	0	4	4/5	0
FAW	4	2	4/5	4/5	0
BCW	0	0	3/4	4	0
VBC	4	3	4	4/5	0
SWCB	4; 80% смертность	3; 50% смертность	2	ND	4; 20% смертность
SCB	ND	3; 25% смертность	ND	4; 100% смертность	3; 50% смертность
DBM	ND	2/3	0	0	0

* = представлена как остановка в росте и процент смертности, где остановку в росте подсчитывают в соответствии со следующей шкалой:

Оценка	Определение
0	Отсутствие активности
1	Слабая, неоднородная остановка в росте
2	Неоднородная остановка в росте
3	Однородная остановка в росте
4	Однородная остановка в росте со смертностью (выраженная в процентах)
5	Однородная остановка в росте со 100%-ой смертностью

Пример 10. Биотестирование Aхm184

Экспрессия гена и очистка

- Область ДНК, кодирующая домен токсина Aхm184, была клонирована в вектор экспрессии рMAL-C4х *E. coli* после гена *malE*, кодирующего мальтоза-связывающий белок (MBP). Это сливание в рамке привело к экспрессии слитого белка MBP-Aхm184 в *E. coli*.

- Для экспрессии в *E. coli*, BL21*DE3 был трансформирован индивидуальными плазмидами. Отдельную колонию заседали в LB с добавлением карбенициллина и глюкозы и выращивали в течение

ночи при 37°C. На следующий день новую среду засеивали 1% ночной культурой и выращивали при 37°C до логарифмической фазы. Впоследствии культуры индуцировали 0,3 мМ IPTG в течение ночи при 20°C. Каждый осадок клеток суспендировали в 20 мМ буфере Трис-НСl, рН 7,4 + 200 мМ NaCl + 1 мМ DTT + ингибиторы протеаз и обрабатывали ультразвуком. Анализ методом электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия подтвердил экспрессию слитых белков.

- Полные бесклеточные экстракты разделяли на амилозной колонке, присоединенной к прибору для жидкостной хроматографии быстрого разрешения (FPLC) для аффинной очистки слитого белка МВР-АХМl184. Связанный слитый белок элюировали со смолы с 10 мМ-ным раствором мальтозы. Очищенные слитые белки затем расщепляли либо фактором Ха, либо трипсином, чтобы удалить аминоконцевой МВР-таг из белка АХМl184. Расщепление и растворимость белков были определены методом электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE).

- Расщепленные белки были проверены в испытании на насекомых с соответствующими контролями. Прочтение планшетов через 5 дней продемонстрировало следующие активности АХМl-184 против капустной моли.

Пример 11. Замена доменов

Гены *axmi005*, *axmi113* и *axmi115*, которые содержат кодоны, оптимизированные для экспрессии в зерновых, использовали в этом примере. Плазмиды, экспрессирующие бестаговые версии *optaxmi005* (рАХ5478), *optaxmi113* (рАХ5493) и *optaxmi115* (рАХ5477), использовали для планирования конструкций ДНК с заменами, как описано здесь.

АХМl-005, АХМl-113 и АХМl-115 обладают существенной идентичностью/сходством последовательностей, представляющих собой области в 2/3 с их N-конца. Оставшийся домен в 1/3 на их С-концах (СТ) показывает существенное расхождение последовательностей, как видно из выравнивания белковых последовательностей, представленного на Фиг.1А и 1В.

Область белка АХМl-113 между прямой и обратной стрелками, показанными на Фиг.1, была заменена соответствующим фрагментом

либо АХМІ-005 (с образованием рАХ5492), либо АХМІ-115 (рАХ5494).

Для экспрессии в *E. coli* BL21*DE3 был трансформирован индивидуальными конструкциями. Отдельную колонию засеивали в LB с добавлением канамицина глюкозы и выращивали в течение ночи при 37°C. На следующий день новую среду засеивали в двойном экземпляре 1% ночной культурой и выращивали при 37°C до логарифмической фазы. Впоследствии культуры индуцировали 1 мМ IPTG в течение ночи при 20°C. Осадок клеток суспендировали в 50 мМ буфере карбоната натрия, рН 10,5 с добавлением 1 мМ DTT и обрабатывали ультразвуком. Анализ методом электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия показал чрезвычайно хорошую экспрессию всех белков в растворимом виде.

Стерилизованные фильтрованием растворимые экстракты с экспрессией OptAxmi005, 113, 115, Optaxmil 13+CT Optaxmi005 и Optaxmi113+CT Optaxmi115 были проверены в испытании на насекомых с соответствующими контролями. Как показано в Примере 9, АХМІ-113 показал высокую активность по отношению к SWCB (25%-ая смертность). Он продемонстрировал дополнительную активность по отношению к SCB (50%-ая смертность).

Также, как показано в Примере 9, АХМІ-005 продемонстрировал активность по отношению к SWCB, Hz, Hv, FAW, BSW и VBC. Он показал дополнительную активность по отношению к SCB (25%-ая смертность). Было обнаружено, что АХМІ-115 также обладает некоторой активностью по отношению к SCB.

Гибрид АХМІ-113+CT АХМІ-005 продемонстрировал все активности на насекомых, замеченные для АХМІ-005. Другими словами, замена С-концевого фрагмента АХМІ-113 таковым из АХМІ-005 придавало ему активности в отношении насекомых, которые отсутствовали в его естественной форме.

Дополнительные последовательности белка токсина можно получить путем замены доменов из одного белка в другом. Например, один или более доменов АХМІ-005, показанных на фиг.2, вводят в АХМІ-115. Домены вводят при помощи смысловых («s») и антисмысловых («a») олигонуклеотидов, приведенных в Таблице 2. Часть последовательности *axmi-005*, которая вводится в

последовательность *axmi-115*, выделена жирным шрифтом. Фланкирующие последовательности в каждом олигонуклеотиде представляют собой последовательности *axmi-115*, которые используются для отжига олигонуклеотидов на матрицу *axmi-115*. Число после термина «sub» в каждом названии праймера соответствует пронумерованным блокам на Фиг.2. Подобные олигонуклеотиды можно разработать для обмена доменов между разнообразными последовательностями, например, между последовательностями АХМІ-005, АХМІ-113, АХМІ-115, АХМІ-163 и АХМІ-184, описанными здесь.

Таблица 2

Олигонуклеотидный праймер	Последовательность	SEQ ID NO:
<i>axmi115sub1 s</i>	AAC ACC GGC GGC GTC AAT GGA ACA AGG GCG CTC TTC ACC CA	20
<i>axmi115sub1 a</i>	TGG GTG AAG AGC GCC CTT GTT CCA TTG ACG CCG CCG GTG TT	21
<i>axmi115sub10 s</i>	GCC CGG AGC TCA TCA ATG TCA ACA ACT GGA TCA GAA CTG GCA CCA CCT ACA TCA C	22
<i>axmi115sub10 a</i>	GTG ATG TAG GTG GTG CCA GTT CTG ATC CAG TTG TTG ACA TTG ATG AGC TCC GGG C	23
<i>axmi115sub11 s</i>	ATG ATT GGG AGA GGT TCG GAA GCA CCC ACA TCA GCG GCA ATG AGC TGA GG	24
<i>axmi115sub11 a</i>	CCT CAG CTC ATT GCC GCT GAT GTG GGT GCT TCC GAA CCT CTC CCA ATC AT	25
<i>axmi115sub12 s</i>	CTA CAT CAC CGG CAA TAC CTT GAC GCT CTA CCA AGG AGG AGG AGG CTA CTT CCG C	26
<i>axmi115sub12 a</i>	GCG GAA GTA GCC TCC TCC TCC TTG GTA GAG CGT CAA GGT ATT GCC GGT GAT GTA G	27
<i>axmi115sub14 s</i>	CGA CAG CTA CAG CAC CTA CAG GGT GAA CTT CTC CGT CAC CGG CTG GGC CAA GGT GAT	28
<i>axmi115sub14 a</i>	ATC ACC TTG GCC CAG CCG GTG ACG GAG AAG TTC ACC CTG TAG GTG CTG TAG CTG TCG	29

axmi115sub15 s	GCT TCA GCG GCC TCG ACG CCA ATG TGA GGA TCA GAA ACA GCC GCG GC	30
axmi115sub15 a	GCC GCG GCT GTT TCT GAT CCT CAC ATT GGC GTC GAG GCC GCT GAA GC	31
axmi115sub16 s	GTG AAG AAC AGC CGC GAG GTG CTC TTC GAG AAG AGA TAC ATG AAT GGA AGC AGC TAT GA	32
axmi115sub16 a	TCA TAG CTG CTT CCA TTC ATG TAT CTC TTC TCG AAG AGC ACC TCG CGG CTG TTC TTC AC	33
axmi115sub17 s	TTC GAG AAG GTG AAG AAC AGC GGC GCC AAG GAT GTT TCA GAG AGC TTC ACC ACC	34
axmi115sub17 a	GGT GGT GAA GCT CTC TGA AAC ATC CTT GGC GCC GCT GTT CTT CAC CTT CTC GAA	35
axmi115sub19 s	GCT TCT TCA TCG AGC TCA GCC AAG GCA ACA ACC TCT ATA GCA GCA CCT TCC AC	36
axmi115sub19 a	GTG GAA GGT GCT GCT ATA GAG GTT GTT GCC TTG GCT GAG CTC GAT GAA GAA GC	37
axmi115sub2 s	GAA GCA AGG CGC TCT ATG TTC ACA AGG ATG GAG GCT TCA GCC AGT TCA TCG	38
axmi115sub2 a	CGA TGA ACT GGC TGA AGC CTC CAT CCT TGT GAA CAT AGA GCG CCT TGC TTC	39
axmi115sub20 s	CCG CCG AGA GGA CAG GAG GGC CGC TGG TGA AGT TCA GAG ACA TCA GCA TC	40
axmi115sub20 a	GAT GCT GAT GTC TCT GAA CTT CAC CAG CGG CCC TCC TGT CCT CTC GGC GG	41
axmi115sub21 s	AGC ACC TTC CAC AGC TTC AAT GAT GTG AGC ATC AAG TAA GGC GCG CCG	42
axmi115sub21 a	CGG CGC GCC TTA CTT GAT GCT CAC ATC ATT GAA GCT GTG GAA GGT GCT	43
axmi115sub3 s	CGA CAA GCT AAA GCC CAA GAC AGA ATA TGT CAT CCA GTA CAC CGT CAA G	44
axmi115sub3 a	CTT GAC GGT GTA CTG GAT GAC ATA TTC TGT CTT GGG CTT TAG CTT GTC G	45
axmi115sub5 s	CCT ACG AGG ACA CCA ATA ACA ACA ACC TGG AGG ACT ACC AAA CAA TTG CTG TGA AG	46

axmi115sub5 a	CTT CAC AGC AAT TGT TTG GTA GTC CTC CAG GTT GTT GTT ATT GGT GTC CTC GTA GG	47
axmi115sub6 s	GAG GAG TTC CAA ACA ATT ACC AAG AGG TTC ACC ACC GGC ACA GAT TTG AGC CAG ACC	48
axmi115sub6 a	GGT CTG GCT CAA ATC TGT GCC GGT GGT GAA CCT CTT GGT AAT TGT TTG GAA CTC CTC	49
axmi115sub7 s	CAC CTC AGA AAC AGA TTT GAA GGG CGT CTA CCT CAT CTT GAA GAG CCA AAA TGG ATA T	50
axmi115sub7 a	ATA TCC ATT TTG GCT CTT CAA GAT GAG GTA GAC GCC CTT CAA ATC TGT TTC TGA GGT G	51
axmi115sub9 s	TCC TGG AGG CCA AGC CAT CAG AGA AGC TGC TCA GCC CGG AGC TCA	52
axmi115sub9 a	TGA GCT CCG GGC TGA GCA GCT TCT CTG ATG GCT TGG CCT CCA GGA	53
axmi115sub13 s	ATC ATT CAA GAG GAG GCA ACC TCA AGC AGA ACC TCC AGC TTG ACA GCT TCA GCA CCT ACG ACC TCA G	54
axmi115sub13 a	CTG AGG TCG TAG GTG CTG AAG CTG TCA AGC TGG AGG TTC TGC TTG AGG TTG CCT CCT CTT GAA TGA T	55
axmi115sub18 s	GCT ATG AGG ACA TCT CAG AGA TCT TCA CCA CCA AGC TGG GCA AGG ACA ACT TC TAC A TCG AGC TCA CCG C	56
axmi115sub18 a	GCG GTG AGC TCG AT GTA G AAG TTG TCC TTG CCC AGC TTG GTG GTG AAG ATC TCT GAG ATG TCC TCA TAG C	57
axmi115sub4 s	CAA GGG CAA GCC GTC AAT CCA CCT CAA GAA TGA GAA CAC CGG CTA CAT CCA CTAC GA GGA CAC CAA TGG	58
axmi115sub4 a	CCA TTG GTG TCC TCG TAG TGG ATG TAG CCG GTG TTC TCA TTC TTG AGG TGG ATT GAC GGC TTG CCC TTG	59
axmi115sub8 s	CAA GAG CCA AAA TGG AGA TGA AGC ATG GGG AGA CAA CTT CAC CAT CCT GGA GAT CTC GCT CTT CGA GAC ACC AGA A	60

axmi115sub8 a	TTC TGG TGT CTC GAA GAG CGA GAT CTC CAG GAT GGT GAA GTT GTC TCC CCA TGC TTC ATC TCC ATT TTG GCT CTT G	61
---------------	---	----

Пример 12. Дополнительные исследования пестицидной активности

Способность инсектицидных белков действовать в качестве пестицида по отношению к вредителю часто оценивается многими способами. Один путь, известный в данной области, состоит в проведении испытания на кормление. В таком испытании на кормление, вредителя оставляют на образце, содержащем либо тестируемые композиции, либо контрольные образцы. Часто это осуществляют путем помещения материала, который следует проверить, или подходящим образом разведенного материала, на материал, который вредитель будет заглатывать, такой как искусственный рацион. Материал, который будет проверяться, может быть в жидкой, твердой форме или в виде суспензии. Материал, который будет проверяться, можно поместить на поверхность и затем предоставить ему возможность высохнуть или соединиться с пищей. Альтернативно материал, который будет проверяться, можно смешать с жидкой искусственной пищей, затем распределить в ячейки для испытания. Ячейка для испытания может представлять собой, например, чашку, блюдце или лунку планшета для микротитрования.

Испытания для сосущих вредителей (например, тли) может включать отделение проверяемого материала от насекомого путем отделения, в идеале, части, в которую могут проникнуть сосущие части рта сосущего насекомого, для предоставления возможности заглатывания исследуемого материала. Часто исследуемый материал смешивают со стимулятором питания, таким как сахароза, для стимулирования приема в пищу исследуемого соединения.

Другие типы испытаний могут включать микроинъекцию исследуемого материала в рот или кишку вредителя, а также разработку трансгенных растений с последующим тестированием способности вредителя питаться на трансгенном растении. Тестирование растения может включать выделение обычно

потребляемых частей растения, например, маленькие клетки, присоединенные к листьям, или выделение растений целиком в клетках, содержащих насекомых.

Другие способы и подходы проверки вредителей известны в данной области, и могут быть найдены, например в Robertson, J. L. & H. K. Preisler. 1992. *Pesticide bioassays with arthropods*. CRC, Boca Raton, FL. Альтернативно, испытания обычно описываются в журналах «Arthropod Management Tests» и «Journal of Economic Entomology» или путем обсуждения с членами Энтомологического общества Америки (ESA).

Пример 13. Адаптация инсектицидных генов по изобретению для экспрессии в растениях

Каждая из кодирующих областей генов по изобретению независимо связана с соответствующими промоторными и терминаторными последовательностями для экспрессии на растениях. Такие последовательности известны в данной области и могут включать промотор актина риса или промотор убиквитина кукурузы для экспрессии в однодольных растениях, промотор UBQ3 *Arabidopsis* или промотор 35S CaMV для экспрессии в двудольных растениях, терминаторы nos или PinII. Способы получения и подтверждения конструкций промотор-ген-терминатор также известны в данной области.

Пример 14. Трансформация генов по изобретению в клетки растений путем *Agrobacterium*-обусловленной трансформации

Колосья собирают спустя 8-12 дней после опыления. Зародыши отделяют от колосьев, и зародыши размером в 0,8-1,5 мм используют для трансформации. Зародыши помещают щитком вверх на подходящую среду для инкубации и инкубируют в течение ночи при 25°C в темноте. Впрочем, нет необходимости *per se* инкубировать зародыши в течение ночи. Зародыши контактируют со штаммом *Agrobacterium*, содержащим соответствующие векторы для Ti-плазмид-обусловленного переноса в течение 5-10 минут, и затем помещают на среду для совместного культивирования в течение 3 дней (25°C в темноте). После совместного культивирования эксплантаты пересаживают на среду для периода восстановления в течение пяти дней (при 25°C в темноте). Эксплантаты инкубируют

в селективной среде в течение времени вплоть до восьми недель, в зависимости от природы и особенностей используемой специфической селекции. После периода селекции получившийся каллюс перемещают на среду для созревания зародышей до тех пор, пока не будет наблюдаться формирование зрелых соматических зародышей. Образующиеся зрелые соматические зародыши затем помещают под низким светом и начинают процесс регенерации, как известно в данной области. Образующимся проросткам предоставляют возможность укорениться на среде для укоренения, и получившиеся растения переносят в горшочки для рассады и размножают как трансгенные растения.

Пример 15. Трансформация клеток кукурузы инсектицидными генами по изобретению

Початки кукурузы собирают спустя 8-12 дней после опыления. Зародыши отделяют от колосьев, и зародыши размером в 0,8-1,5 мм используют для трансформации. Зародыши помещают щитком вверх на подходящую среду для инкубации, такую как среда DN62A5S (3,98 г/л солей N6; 1 мл/л (1000х сток) витаминов N6; 800 мг/л L-аспарагина; 100 мг/л миоинозитола; 1,4 г/л L-пролина; 100 мг/л казаминовых кислот; 50 г/л сахарозы; 1 мл/л (из стока 1 мг/мл) 2,4-D) и инкубируют в течение ночи при 25°C в темноте.

Образующиеся эксплантаты переносят на сетчатые квадратные чашки (30-40 на чашку), переносят на осмотическую среду на 30-45 минут, затем переносят на пластину для облучения (См., например, патентную публикацию РСТ № WO/0138514 и Патент США № 5240842).

Конструкции ДНК, разработанные для экспрессии генов по изобретению в клетках растений, проникают в растительную ткань при помощи аэрозольного лучевого акселератора с использованием условий, по существу, как описано в патентной публикации РСТ № WO/0138514. После облучения зародыши инкубируют в течение 30 минут на осмотической среде, затем помещают на среду для инкубации на ночь при 25°C в темноте. Для отделения неправильно поврежденных облученных эксплантатов, их инкубируют в течение, по меньшей мере, 24 часов до передачи на восстановительную

среду. Зародыши затем распределяют на среде периода восстановления, в течение 5 дней, при 25°C в темноте, затем переносят на селективную среду. Эксплантаты инкубируют на селективной среде в течение восьми недель, в зависимости от природы и особенностей используемой специфической селекции. После периода селекции получившийся каллус перемещают на среду для созревания зародышей до тех пор, пока не будет наблюдаться формирование зрелых соматических зародышей. Образующиеся зрелые соматические зародыши затем помещают под низким светом и начинают процесс регенерации, как известно в данной области. Образующимся проросткам предоставляют возможность укорениться на среде для укоренения, и получившиеся растения переносят в горшочки для рассады и размножают как трансгенные растения.

Материалы

Среда DN62A5S

Компоненты	на литр	Источник
Chu'S N6 основная смесь солей (Кат. Номер С 416)	3,98 г/л	Phytotechnology Labs
Chu's N6 раствор витаминов (Кат. Номер С 149)	1 мл/л (1000× сток)	Phytotechnology Labs
L-Аспарагин	800 мг/л	Phytotechnology Labs
Мио-инозитол	100 мг/л	Sigma
L-Пролин	1,4 г/л	Phytotechnology Labs
Казаминовые кислоты	100 мг/л	Fisher Scientific
Сахароза	50 г/л	Phytotechnology Labs
2,4-D (Кат. Номер D-7299)	1 мл/л (из стока 1 мг/мл)	Sigma

pH раствора доводят до 5,8 при помощи 1N KOH/1N KCl, добавляют Gelrite (Sigma) до 3 г/л и автоклавируют. После охлаждения до 50°C добавляют 2 мл/л стокового раствора с 5

мг/мл Silver Nitrate (Phytotechnology Labs). Эта пропись позволяет изготовить приблизительно 20 плашек.

Все публикации и патентные заявки, упомянутые в спецификации, показывают уровень квалификации специалистов в данной области, к которой принадлежит это изобретение. Все публикации и патентные заявки включены здесь в качестве ссылки в той же самой степени, как если бы каждая отдельная публикация или патентная заявка была конкретно и индивидуально обозначены, чтобы быть включенной в качестве ссылки.

Несмотря на то, что предшествующее изобретение было описано в некоторых деталях посредством иллюстрации и примера в целях ясности понимания, должно быть очевидным, что определенные изменения и модификации могут быть осуществлены в рамках прилагаемых пунктов формулы изобретения.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Kimberly S. Sampson
 Daniel J. Tomso
 Nadine Carozzi
 Tracy Hargiss
 Michael G. Koziel
 Nicholas B. Duck
 Shruti Agarwal
 Brian McNulty
 Chris Campbell
 Volker Heinrichs

<120> AXMI-115, AXMI-113, AXMI-005, AXMI-163
 И AXMI-184: ИНСЕКТИЦИДНЫЕ БЕЛКИ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

<130> 045600/374397

<150> 61/158,953

<151> 2009-03-10

<150> 61/077,812

<151> 2008-07-02

<160> 61

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 2370

<212> ДНК

<213> *Bacillus thuringiensis*

<400> 1
 atgaatatga ataatactaa attaaacgca agggccctac cgagttttat tgattatttt 60
 aatggcattt atggatttgc cactgggtatc aaagacatta tgaatatgat ttttaaaacg 120
 gatacagggtg gtaatctaac cttagacgaa atcctaaaaga atcagcagtt actaaatgag 180
 atttctggta aattggatgg ggtaaattggg agcttaaattg atcttatcgc acagggaaac 240
 ttaaatacag aattatctaa ggaaatctta aaaattgcaa atgaacagaa tcaagtctta 300
 aatgatgtta ataacaaact cgatgcgata aatacgtgc ttcataatata tctacctaaa 360
 attacatcta tgtaagtga tgtaatgaag caaaattatg cgctaagtct gcaaatagaa 420
 tacttaagta agcaattgca agaaatttct gataaattag atattattaa cgtaaattgt 480
 cttattaact ctacacttac tgaattaca cctgcatac aacggattaa atatgtgaat 540
 gaaaaatttg aagaattaac ttttgctaca gaaaccactt taaaagtaaa aaaggatagc 600
 tcgctgctg atattcttga tgagttaact gaattaactg aactagcgaa aagtgttaca 660
 aaaaatgacg ttgatggttt tgaattttac cttaatacat tccacgatgt aatggtagga 720
 aataatttat tcgggcgttc agctttaaaa actgcttcag aattaattgc taaagaaaat 780
 gtgaaaacaa gtggcagtga agtaggaaat gtttataatt tcttaattgt attaacagct 840
 ctacaagcaa aagcttttct tactttaaca acatgccgaa aattattagg cttagcagat 900
 attgattata cttctattat gaatgaacat ttaaataagg aaaaagagga atttagagta 960
 aacatccttc ctacactttc taatactttt totaatccta attatgcaa agttaaagga 1020
 agtgatgaag atgcaaagat gattgtggaa gctaaaccag gacatgcatt ggttgggttt 1080
 gaaatgagca atgattcaat cacagtatta aaagtatatg aggctaagct aaaacaaaat 1140
 tatcaagttg ataaggattc cttatcggag gttattttat gtgatatgga taaattattg 1200
 tgtccagatc aatctgaaca aatttattat acaataata tagtatttcc aatgaatat 1260
 gtaattacta aaattgattt tactaagaaa atgaagactt taagatatga ggtaacagct 1320
 aattcttatg attcttctac aggagaaatt gacttaaata agaagaaagt agaatcaagt 1380
 gaagcggagt ataggacgtt aagtgtctaaa gatgatggag tgtatatgcc gttagggtgc 1440
 atcagtgaaa catttttgac tccgattaat gggtttggcc tccaagctga tgaaaattca 1500
 agattaatta ctttaacatg taaatcatat ttaagagaac tactgttagc aacagactta 1560
 agcaataaag aaactaaatt gatcgtcccg ccaagtgggt ttattagtaa tattgtagaa 1620
 aatgggaact tagagggaga aaacttagag ccgtggatag caaataataa gaatgcgtat 1680
 gtagatcata caggcggagt gaatgggtact agagctttat atgttcataa ggacggagga 1740
 ttttcacaat ttattggaga taagttaaaa ccgaaaactg agtatgtaat ccaatatact 1800

gttaaaggaa	aaccttctat	tcatttaaaa	aatgaaaata	ctggatata	tcattatgaa	1860
gatacaaaata	acaatttaga	agattatcaa	actattacta	aacgttttac	tacaggaact	1920
gattttaaagg	gagtgatatt	aattttaaaa	agtcaaaatg	gagatgaagc	ctgggggagat	1980
aactttacaa	ttttggaaat	tagtccttct	gaaaagttat	taagtccaga	attaatcaat	2040
gtaaataatt	ggattcgcac	gggatcaact	catattagcg	gtaatacact	cactctctat	2100
caggaggag	gggaaatct	aaaacaaaac	cttcaattag	acagtttttc	aacttataga	2160
gtgaattttt	ctgtgaccgg	agatgcta	gtaaggatta	gaaattctag	ggaagtgtta	2220
tttggaaaac	gatatatgag	cggtgctaaa	gatgtttctg	aaattttcac	tacaaaattg	2280
gggaaagata	acttttatat	agagctttct	caagggaata	atttatatgg	tggtcctctt	2340
gtaaagtta	acgatgtctc	aattaagtaa				2370

<210> 2

<211> 2385

<212> ДНК

<213> *Bacillus thuringiensis*

<400> 2

atgaacatga	ataatactaa	attaagcaca	agagccttac	caagttttat	tgattatfff	60
aatggcattt	atggatttgc	cactgggtatc	aaagacatta	tgaacatgat	ttttaaaacg	120
gatacagggtg	gtgatctaac	cctagacgaa	atftttaaaga	atcagcagtt	actaaatgaa	180
atttctggta	aattggatgg	ggtaaagtga	agctttaaag	atcttatcgc	acaggggaaac	240
ttaaatacag	aattatctaa	ggaaatatta	aaaattgcaa	atgaacaaaa	tcaagtttta	300
aatgatgtta	ataacaaact	tgatgcgata	aatacagatgc	tgcatatata	tctacctaaa	360
attacctcta	tgtaagtga	tgtaatgaaa	caaaattatg	cgctaagtct	gcaaatagaa	420
tacctaaagta	aacagttgca	agaaatttct	gataaattgg	atattattaa	cgtaaagtga	480
cttattaact	ctacacttac	tgaaattaca	cctgcgtatc	aacggattaa	atatgtgaa	540
gaaaaatttg	aggaattaac	ttttgctaca	gaaactaatt	taaaagtaaa	aaaggatggc	600
tctcctgcag	atattcttga	tgagttaact	gagttactg	aactagcga	aagtgtaa	660
aaaaatgatg	tgatgggtt	tgaattttat	cttaatacat	tccacgatgt	aatggtaggg	720
aataattttat	tggggcgttc	agcttttaaaa	actgcatcgg	aattaattac	taaagaaaat	780
gtgaaaacaa	gtggcagtg	ggtcggaaat	gtttataact	tcttaattgt	attaacagct	840
ctgcaagcaa	aagcttttct	tactttaaca	acatgccgaa	aattattagg	cttagcagat	900
attgattata	cttctattat	gaatgaacat	ttaaataaag	aaaaagagga	atttagagta	960
aacatccttc	ctacactttc	taatactttt	tctaactccta	attatataaa	aactaaagga	1020
agcgatgagg	atgcggaagt	gattattcaa	gctgaaccag	gacatgcttt	ggtagggatt	1080
gaaatgatta	atgatccaag	tccagcggtta	aaagtgtatc	aggctaaact	aacaacaaat	1140
tatcaagttg	ataagcagtc	attatctgaa	actgtgtatg	gtgatagga	taaaatatta	1200
tgtccagata	aatctcaaca	aatgtattat	ctgcataata	taacattccc	aatgaatat	1260
gtgattacag	aaattatfff	tacaaagaaa	aagaacagtt	taaggatga	ggtagtagca	1320
aattattatg	agttctcttc	aggagatata	gacttaaaata	agaagttagt	aaaatcaagt	1380
gaagcagagt	atagtacggt	aagtgttagt	aacgatgcta	tttatatgcc	gctaggtggt	1440
atcagtga	catttttgac	cccaattaaa	ggattcggac	taacagtga	tgaaagttca	1500
agactggtaa	ctttaacgtg	taaatcatat	ttaagggaaa	ttctgttagc	aacagattta	1560
agcaataaag	caacaaaatt	aattgtccca	cctaattggt	ttattagtaa	tttgggtgaa	1620
aatggggata	ttgaggctga	caacatagaa	ccatggaagg	gaaataataa	aatgagctat	1680
gttgatcata	cagggtgggg	gaatggaact	aaagctctgt	acactcaaga	tgatggggaa	1740
ttttcacaat	ttattggaga	taagttgaaa	tcgaaaactg	agtatataat	tcaatataat	1800
gtaaaaggaa	atacttctat	ttatttgaaa	gataaaaaaa	atgaaaatgt	tatttatgaa	1860
gataaaaaata	ataatttaga	ggcttttcaa	actattacta	aaaggtttac	tacagaattg	1920
gattcttcag	atgtttactt	agtgtttaaa	tgcaaaaatg	gctataaagc	ttggggagac	1980
aactttctaa	ttacagaaat	taggcctaag	gaagtggtaa	gccagaatt	gataaaagta	2040
gaaaattgga	ttggaatggg	tggtagtaat	catgtaaacc	ctgattcact	tttgcctttt	2100
acaggtggga	ggtcaatttt	aaaacaaaat	ctccaattag	atagttattc	aacctataga	2160
gtaagatttt	ctttaatggt	aattggtaag	gctaaggtta	ttataaggaa	ttcaagtga	2220
gtactgtttg	aaaaaagtta	tgtgaatgat	tctgaaggtg	ttttagaagg	tgtttctgaa	2280
acttttacta	caaaatcgat	tcaagataac	ttctatgtag	aactttctaa	tgagggcact	2340
tttggaaagta	aagatgttgc	atacttttat	aatttttcta	ttaga		2385

<210> 3

<211> 2409

<212> ДНК

<213> *Bacillus thuringiensis*

<400> 3

atgaacatga ataatactaa attaaacgca agggccttac caagttttat tgattatfff 60
 aatggcattt atggatttgc cactggatc aaagacatta tgaacatgat ttttaaacg 120
 gatacagggtg gtgatctaac cctagacgaa attttaaaaga atcagcagtt actaaatgaa 180
 atttctggta aattggatgg ggtaaatggg agcttaaagt atcttatcgc acagggaaac 240
 ttaaatacag aattatctaa ggaaatctta aaaattgcaa atgaacaaaa tcaagtttta 300
 aatgatgtta ataacaaact agatgcgata aatagatgc ttaacatata tctacctaaa 360
 attacatcta tgtaagcga tgtaatgaaa caaaattatg cgctaagtct gcagatagaa 420
 tacctaagta gacagttaca ggaaatttca gataagttag atgttattaa tttaaatggt 480
 ttaattaatt ctactcttac tgaaatcaca ccttcatac aacgtattaa atatgtaaat 540
 gagaaatttg ataaattaac atttgccaca gaaagcactc taagagcaaa acaaggaatt 600
 tttaacgagg atagttttga taataatact cttgaaaatt taactgatct agctgaacta 660
 gctaaaagta taaccaaaaa tgatgtggat agtttcgaat tttatcttca cacatttcat 720
 gatgtattaa ttggaaataa tttatttggg cगतcggtt taaaaacagc ttcagaatta 780
 attactaaag acgagataaa gacaagtggg agtgagattg gaaaagttta tagtttctta 840
 attgtgctaa cttctttaca agctaaagcc tttctcactt taacaacatg tagaaaatta 900
 ttgggcttat cagatattga ttatacttct attatgaatg aacatctaaa taatgaaaaa 960
 aatgaatttc gtgataacat acttctgca ctgtcgaata agttttctaa ccctagctac 1020
 gcaaaaacta taggtagtga caattatgca aaagttattt tagaatctga accaggttat 1080
 gcttttagtc gattcgaat tattaatgac ccaatcccgg tattaaaagc gtataaagca 1140
 aaactaaaac aaaattatca agttgataat cagtctgtat cagagattgt ttatttagat 1200
 atcgataaac tattttgtcc ggaaaattca gaacaaaaat attatactaa aaatctgaca 1260
 tttctgatg gctatgttat tactaaaatt acctttgaaa aaaaactgaa caacctaat 1320
 tatgaagcaa cagcaaat tttatgacca tctacaggag atattgactt aaataagaag 1380
 caagtggaa ctactttcc tcaaacggat tatattacta tggatatagg tgatgatgat 1440
 ggtatttata tgccgttagg cgttatcagt gaaacgtttt tgactcctat taatagtttt 1500
 ggattagaag ttgacgcaa atcgaaaaca ttaaccttaa aatgtaaate ttacctgca 1560
 gaatatttat tagagtccga tctaaaaaat aaagaaacag gcttgattgc cccgccaaat 1620
 gtttttatta gtaatgttgt gaaaaattgg gatatagagg aagatagtct agaaccatgg 1680
 gtagcaaaata acaaaaatgc ctatgttgat aatacaggcg gtatagaaag atctaaagcc 1740
 ctctttactc aaggtgacgg ggaattctca caatttattg gtgataaatt aaaacctaate 1800
 acagattata ttattcaata tactgtaaaa ggaaaaccag ccatttattt aaaaaataaa 1860
 agtactggat atattacgta cgaggataca aacggtaatt ctgaagaatt tcaaactata 1920
 gctgtaaaat tcacttcaga aactgatctt tcacaaactc atttagtttt taaaagtcaa 1980
 aatggttatg aggcttgggg agacaatttt attattttag aagctaagct atttgaaact 2040
 cctgaaagtc cagaattgat aaaatttaate gattgggaaa gatttggtae tacttacatt 2100
 acaggaaatg agcttagaat cgatcatagt cgtggaggtt attttagaca atctcttaate 2160
 atagacagtt attcaactta tgatttgagc ttttctttta gtggattatg ggctaaggtt 2220
 attgtgaaaa attcccaggg ggtagtattg tttgaaaaag tgaaaaacaa cggttcatca 2280
 tatgaagata ttagtgaag ttttactacc gcatcaaaata aggatggatt ttttatagaa 2340
 ctaacagccg aaagaacgag ctcaactttc catagctttc gtgatatttc tattaaggaa 2400
 aagattgaa 2409

<210> 4

<211> 789

<212> PRT

<213> *Bacillus thuringiensis*

<400> 4

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

Met Lys Gln Asn Tyr Ala Leu Ser Leu Gln Ile Glu Tyr Leu Ser Lys
 130 135 140
 Gln Leu Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Ile Ile Asn Val Asn Val
 145 150 155 160
 Leu Ile Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ala Tyr Gln Arg Ile
 165 170 175
 Lys Tyr Val Asn Glu Lys Phe Glu Glu Leu Thr Phe Ala Thr Glu Thr
 180 185 190
 Thr Leu Lys Val Lys Lys Asp Ser Ser Pro Ala Asp Ile Leu Asp Glu
 195 200 205
 Leu Thr Glu Leu Thr Glu Leu Ala Lys Ser Val Thr Lys Asn Asp Val
 210 215 220
 Asp Gly Phe Glu Phe Tyr Leu Asn Thr Phe His Asp Val Met Val Gly
 225 230 235 240
 Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr Ala Ser Glu Leu Ile
 245 250 255
 Ala Lys Glu Asn Val Lys Thr Ser Gly Ser Glu Val Gly Asn Val Tyr
 260 265 270
 Asn Phe Leu Ile Val Leu Thr Ala Leu Gln Ala Lys Ala Phe Leu Thr
 275 280 285
 Leu Thr Thr Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ala Asp Ile Asp Tyr Thr
 290 295 300
 Ser Ile Met Asn Glu His Leu Asn Lys Glu Lys Glu Glu Phe Arg Val
 305 310 315 320
 Asn Ile Leu Pro Thr Leu Ser Asn Thr Phe Ser Asn Pro Asn Tyr Ala
 325 330 335
 Lys Val Lys Gly Ser Asp Glu Asp Ala Lys Met Ile Val Glu Ala Lys
 340 345 350
 Pro Gly His Ala Leu Val Gly Phe Glu Met Ser Asn Asp Ser Ile Thr
 355 360 365
 Val Leu Lys Val Tyr Glu Ala Lys Leu Lys Gln Asn Tyr Gln Val Asp
 370 375 380
 Lys Asp Ser Leu Ser Glu Val Ile Tyr Gly Asp Met Asp Lys Leu Leu
 385 390 395 400
 Cys Pro Asp Gln Ser Glu Gln Ile Tyr Tyr Thr Asn Asn Ile Val Phe
 405 410 415
 Pro Asn Glu Tyr Val Ile Thr Lys Ile Asp Phe Thr Lys Lys Met Lys
 420 425 430
 Thr Leu Arg Tyr Glu Val Thr Ala Asn Ser Tyr Asp Ser Ser Thr Gly
 435 440 445
 Glu Ile Asp Leu Asn Lys Lys Lys Val Glu Ser Ser Glu Ala Glu Tyr
 450 455 460
 Arg Thr Leu Ser Ala Lys Asp Asp Gly Val Tyr Met Pro Leu Gly Val
 465 470 475 480
 Ile Ser Glu Thr Phe Leu Thr Pro Ile Asn Gly Phe Gly Leu Gln Ala
 485 490 495
 Asp Glu Asn Ser Arg Leu Ile Thr Leu Thr Cys Lys Ser Tyr Leu Arg
 500 505 510
 Glu Leu Leu Ala Thr Asp Leu Ser Asn Lys Glu Thr Lys Leu Ile
 515 520 525
 Val Pro Pro Ser Gly Phe Ile Ser Asn Ile Val Glu Asn Gly Asn Leu
 530 535 540
 Glu Gly Glu Asn Leu Glu Pro Trp Ile Ala Asn Asn Lys Asn Ala Tyr
 545 550 555 560
 Val Asp His Thr Gly Gly Val Asn Gly Thr Arg Ala Leu Tyr Val His
 565 570 575
 Lys Asp Gly Gly Phe Ser Gln Phe Ile Gly Asp Lys Leu Lys Pro Lys
 580 585 590
 Thr Glu Tyr Val Ile Gln Tyr Thr Val Lys Gly Lys Pro Ser Ile His
 595 600 605
 Leu Lys Asn Glu Asn Thr Gly Tyr Ile His Tyr Glu Asp Thr Asn Asn
 610 615 620
 Asn Leu Glu Asp Tyr Gln Thr Ile Thr Lys Arg Phe Thr Thr Gly Thr
 625 630 635 640

Asp Leu Lys Gly Val Tyr Leu Ile Leu Lys Ser Gln Asn Gly Asp Glu
 645 650 655
 Ala Trp Gly Asp Asn Phe Thr Ile Leu Glu Ile Ser Pro Ser Glu Lys
 660 665 670
 Leu Leu Ser Pro Glu Leu Ile Asn Val Asn Asn Trp Ile Arg Thr Gly
 675 680 685
 Ser Thr His Ile Ser Gly Asn Thr Leu Thr Leu Tyr Gln Gly Gly Gly
 690 695 700
 Gly Asn Leu Lys Gln Asn Leu Gln Leu Asp Ser Phe Ser Thr Tyr Arg
 705 710 715 720
 Val Asn Phe Ser Val Thr Gly Asp Ala Asn Val Arg Ile Arg Asn Ser
 725 730 735
 Arg Glu Val Leu Phe Glu Lys Arg Tyr Met Ser Gly Ala Lys Asp Val
 740 745 750
 Ser Glu Ile Phe Thr Thr Lys Leu Gly Lys Asp Asn Phe Tyr Ile Glu
 755 760 765
 Leu Ser Gln Gly Asn Asn Leu Tyr Gly Gly Pro Leu Val Lys Phe Asn
 770 775 780
 Asp Val Ser Ile Lys
 785

<210> 5
 <211> 795
 <212> PRT
 <213> Bacillus thuringiensis

<400> 5
 Met Asn Met Asn Asn Thr Lys Leu Ser Thr Arg Ala Leu Pro Ser Phe
 1 5 10 15
 Ile Asp Tyr Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Lys Asp
 20 25 30
 Ile Met Asn Met Ile Phe Lys Thr Asp Thr Gly Gly Asp Leu Thr Leu
 35 40 45
 Asp Glu Ile Leu Lys Asn Gln Gln Leu Leu Asn Glu Ile Ser Gly Lys
 50 55 60
 Leu Asp Gly Val Asn Gly Ser Leu Asn Asp Leu Ile Ala Gln Gly Asn
 65 70 75 80
 Leu Asn Thr Glu Leu Ser Lys Glu Ile Leu Lys Ile Ala Asn Glu Gln
 85 90 95
 Asn Gln Val Leu Asn Asp Val Asn Asn Lys Leu Asp Ala Ile Asn Thr
 100 105 110
 Met Leu His Ile Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Ser Met Leu Ser Asp Val
 115 120 125
 Met Lys Gln Asn Tyr Ala Leu Ser Leu Gln Ile Glu Tyr Leu Ser Lys
 130 135 140
 Gln Leu Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Ile Ile Asn Val Asn Val
 145 150 155 160
 Leu Ile Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ala Tyr Gln Arg Ile
 165 170 175
 Lys Tyr Val Asn Glu Lys Phe Glu Glu Leu Thr Phe Ala Thr Glu Thr
 180 185 190
 Asn Leu Lys Val Lys Lys Asp Gly Ser Pro Ala Asp Ile Leu Asp Glu
 195 200 205
 Leu Thr Glu Leu Thr Glu Leu Ala Lys Ser Val Thr Lys Asn Asp Val
 210 215 220
 Asp Gly Phe Glu Phe Tyr Leu Asn Thr Phe His Asp Val Met Val Gly
 225 230 235 240
 Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr Ala Ser Glu Leu Ile
 245 250 255
 Thr Lys Glu Asn Val Lys Thr Ser Gly Ser Glu Val Gly Asn Val Tyr
 260 265 270
 Asn Phe Leu Ile Val Leu Thr Ala Leu Gln Ala Lys Ala Phe Leu Thr
 275 280 285

Leu Thr Thr Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ala Asp Ile Asp Tyr Thr
 290 295 300
 Ser Ile Met Asn Glu His Leu Asn Lys Glu Lys Glu Glu Phe Arg Val
 305 310 315 320
 Asn Ile Leu Pro Thr Leu Ser Asn Thr Phe Ser Asn Pro Asn Tyr Ile
 325 330 335
 Lys Thr Lys Gly Ser Asp Glu Asp Ala Glu Val Ile Ile Gln Ala Glu
 340 345 350
 Pro Gly His Ala Leu Val Gly Phe Glu Met Ile Asn Asp Pro Ser Pro
 355 360 365
 Ala Leu Lys Val Tyr Gln Ala Lys Leu Thr Thr Asn Tyr Gln Val Asp
 370 375 380
 Lys Gln Ser Leu Ser Glu Thr Val Tyr Gly Asp Met Asp Lys Ile Leu
 385 390 395 400
 Cys Pro Asp Lys Ser Gln Gln Met Tyr Tyr Leu His Asn Ile Thr Phe
 405 410 415
 Pro Asn Glu Tyr Val Ile Thr Glu Ile Ile Phe Thr Lys Lys Lys Asn
 420 425 430
 Ser Leu Arg Tyr Glu Val Ile Ala Asn Tyr Tyr Glu Phe Ser Ser Gly
 435 440 445
 Asp Ile Asp Leu Asn Lys Lys Leu Val Lys Ser Ser Glu Ala Glu Tyr
 450 455 460
 Ser Thr Leu Ser Val Ser Asn Asp Ala Ile Tyr Met Pro Leu Gly Val
 465 470 475 480
 Ile Ser Glu Thr Phe Leu Thr Pro Ile Lys Gly Phe Gly Leu Thr Val
 485 490 495
 Asp Glu Ser Ser Arg Leu Val Thr Leu Thr Cys Lys Ser Tyr Leu Arg
 500 505 510
 Glu Ile Leu Leu Ala Thr Asp Leu Ser Asn Lys Ala Thr Lys Leu Ile
 515 520 525
 Val Pro Pro Asn Gly Phe Ile Ser Asn Leu Val Glu Asn Gly Asp Ile
 530 535 540
 Glu Ala Asp Asn Ile Glu Pro Trp Lys Gly Asn Asn Lys Asn Ala Tyr
 545 550 555 560
 Val Asp His Thr Gly Gly Val Asn Gly Thr Lys Ala Leu Tyr Thr Gln
 565 570 575
 Asp Asp Gly Glu Phe Ser Gln Phe Ile Gly Asp Lys Leu Lys Ser Lys
 580 585 590
 Thr Glu Tyr Ile Ile Gln Tyr Thr Val Lys Gly Asn Thr Ser Ile Tyr
 595 600 605
 Leu Lys Asp Lys Lys Asn Glu Asn Val Ile Tyr Glu Asp Lys Asn Asn
 610 615 620
 Asn Leu Glu Ala Phe Gln Thr Ile Thr Lys Arg Phe Thr Thr Glu Leu
 625 630 635 640
 Asp Ser Ser Asp Val Tyr Leu Val Phe Lys Cys Lys Asn Gly Tyr Lys
 645 650 655
 Ala Trp Gly Asp Asn Phe Leu Ile Thr Glu Ile Arg Pro Lys Glu Val
 660 665 670
 Val Ser Pro Glu Leu Ile Lys Val Glu Asn Trp Ile Gly Met Gly Gly
 675 680 685
 Ser Asn His Val Asn Pro Asp Ser Leu Leu Leu Phe Thr Gly Gly Arg
 690 695 700
 Ser Ile Leu Lys Gln Asn Leu Gln Leu Asp Ser Tyr Ser Thr Tyr Arg
 705 710 715 720
 Val Arg Phe Ser Leu Met Val Ile Gly Lys Ala Lys Val Ile Ile Arg
 725 730 735
 Asn Ser Ser Glu Val Leu Phe Glu Lys Ser Tyr Val Asn Asp Ser Glu
 740 745 750
 Gly Val Leu Glu Gly Val Ser Glu Thr Phe Thr Thr Lys Ser Ile Gln
 755 760 765
 Asp Asn Phe Tyr Val Glu Leu Ser Asn Glu Gly Thr Phe Gly Ser Lys
 770 775 780
 Asp Val Ala Tyr Phe Tyr Asn Phe Ser Ile Arg
 785 790 795

<210> 6
 <211> 803
 <212> PRT
 <213> Bacillus thuringiensis

<400> 6
 Met Asn Met Asn Asn Thr Lys Leu Asn Ala Arg Ala Leu Pro Ser Phe
 1 5 10 15
 Ile Asp Tyr Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Lys Asp
 20 25 30
 Ile Met Asn Met Ile Phe Lys Thr Asp Thr Gly Gly Asp Leu Thr Leu
 35 40 45
 Asp Glu Ile Leu Lys Asn Gln Gln Leu Leu Asn Glu Ile Ser Gly Lys
 50 55 60
 Leu Asp Gly Val Asn Gly Ser Leu Asn Asp Leu Ile Ala Gln Gly Asn
 65 70 75 80
 Leu Asn Thr Glu Leu Ser Lys Glu Ile Leu Lys Ile Ala Asn Glu Gln
 85 90 95
 Asn Gln Val Leu Asn Asp Val Asn Asn Lys Leu Asp Ala Ile Asn Thr
 100 105 110
 Met Leu Asn Ile Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Ser Met Leu Ser Asp Val
 115 120 125
 Met Lys Gln Asn Tyr Ala Leu Ser Leu Gln Ile Glu Tyr Leu Ser Arg
 130 135 140
 Gln Leu Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Val Ile Asn Leu Asn Val
 145 150 155 160
 Leu Ile Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ser Tyr Gln Arg Ile
 165 170 175
 Lys Tyr Val Asn Glu Lys Phe Asp Lys Leu Thr Phe Ala Thr Glu Ser
 180 185 190
 Thr Leu Arg Ala Lys Gln Gly Ile Phe Asn Glu Asp Ser Phe Asp Asn
 195 200 205
 Asn Thr Leu Glu Asn Leu Thr Asp Leu Ala Glu Leu Ala Lys Ser Ile
 210 215 220
 Thr Lys Asn Asp Val Asp Ser Phe Glu Phe Tyr Leu His Thr Phe His
 225 230 235 240
 Asp Val Leu Ile Gly Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr
 245 250 255
 Ala Ser Glu Leu Ile Thr Lys Asp Glu Ile Lys Thr Ser Gly Ser Glu
 260 265 270
 Ile Gly Lys Val Tyr Ser Phe Leu Ile Val Leu Thr Ser Leu Gln Ala
 275 280 285
 Lys Ala Phe Leu Thr Leu Thr Thr Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ser
 290 295 300
 Asp Ile Asp Tyr Thr Ser Ile Met Asn Glu His Leu Asn Asn Glu Lys
 305 310 315 320
 Asn Glu Phe Arg Asp Asn Ile Leu Pro Ala Leu Ser Asn Lys Phe Ser
 325 330 335
 Asn Pro Ser Tyr Ala Lys Thr Ile Gly Ser Asp Asn Tyr Ala Lys Val
 340 345 350
 Ile Leu Glu Ser Glu Pro Gly Tyr Ala Leu Val Gly Phe Glu Ile Ile
 355 360 365
 Asn Asp Pro Ile Pro Val Leu Lys Ala Tyr Lys Ala Lys Leu Lys Gln
 370 375 380
 Asn Tyr Gln Val Asp Asn Gln Ser Leu Ser Glu Ile Val Tyr Leu Asp
 385 390 395 400
 Ile Asp Lys Leu Phe Cys Pro Glu Asn Ser Glu Gln Lys Tyr Tyr Thr
 405 410 415
 Lys Asn Leu Thr Phe Pro Asp Gly Tyr Val Ile Thr Lys Ile Thr Phe
 420 425 430
 Glu Lys Lys Leu Asn Asn Leu Ile Tyr Glu Ala Thr Ala Asn Phe Tyr
 435 440 445

Asp Pro Ser Thr Gly Asp Ile Asp Leu Asn Lys Lys Gln Val Glu Ser
 450 455 460
 Thr Phe Pro Gln Thr Asp Tyr Ile Thr Met Asp Ile Gly Asp Asp Asp
 465 470 475 480
 Gly Ile Tyr Met Pro Leu Gly Val Ile Ser Glu Thr Phe Leu Thr Pro
 485 490 495
 Ile Asn Ser Phe Gly Leu Glu Val Asp Ala Lys Ser Lys Thr Leu Thr
 500 505 510
 Leu Lys Cys Lys Ser Tyr Leu Arg Glu Tyr Leu Leu Glu Ser Asp Leu
 515 520 525
 Lys Asn Lys Glu Thr Gly Leu Ile Ala Pro Pro Asn Val Phe Ile Ser
 530 535 540
 Asn Val Val Lys Asn Trp Asp Ile Glu Glu Asp Ser Leu Glu Pro Trp
 545 550 555 560
 Val Ala Asn Asn Lys Asn Ala Tyr Val Asp Asn Thr Gly Gly Ile Glu
 565 570 575
 Arg Ser Lys Ala Leu Phe Thr Gln Gly Asp Gly Glu Phe Ser Gln Phe
 580 585 590
 Ile Gly Asp Lys Leu Lys Pro Asn Thr Asp Tyr Ile Ile Gln Tyr Thr
 595 600 605
 Val Lys Gly Lys Pro Ala Ile Tyr Leu Lys Asn Lys Ser Thr Gly Tyr
 610 615 620
 Ile Thr Tyr Glu Asp Thr Asn Gly Asn Ser Glu Glu Phe Gln Thr Ile
 625 630 635 640
 Ala Val Lys Phe Thr Ser Glu Thr Asp Leu Ser Gln Thr His Leu Val
 645 650 655
 Phe Lys Ser Gln Asn Gly Tyr Glu Ala Trp Gly Asp Asn Phe Ile Ile
 660 665 670
 Leu Glu Ala Lys Leu Phe Glu Thr Pro Glu Ser Pro Glu Leu Ile Lys
 675 680 685
 Phe Asn Asp Trp Glu Arg Phe Gly Thr Thr Tyr Ile Thr Gly Asn Glu
 690 695 700
 Leu Arg Ile Asp His Ser Arg Gly Gly Tyr Phe Arg Gln Ser Leu Asn
 705 710 715 720
 Ile Asp Ser Tyr Ser Thr Tyr Asp Leu Ser Phe Ser Phe Ser Gly Leu
 725 730 735
 Trp Ala Lys Val Ile Val Lys Asn Ser Arg Gly Val Val Leu Phe Glu
 740 745 750
 Lys Val Lys Asn Asn Gly Ser Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Glu Ser Phe
 755 760 765
 Thr Thr Ala Ser Asn Lys Asp Gly Phe Phe Ile Glu Leu Thr Ala Glu
 770 775 780
 Arg Thr Ser Ser Thr Phe His Ser Phe Arg Asp Ile Ser Ile Lys Glu
 785 790 795 800
 Lys Ile Glu

<210> 7

<211> 2388

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая нуклеотидная последовательность, кодирующая AXMI-005 w/
с-концевое расширение

<400> 7

atgaacatga acaacaccaa gctcaatgca agggcgctgc cgagcttcat cgactacttc 60
 aatggcatct atggcttcgc caccggcatc aaggacatca tgaacatgat cttcaagacc 120
 gacaccggcg gcaacctcac cttgatgag atcctcaaga accagcagct gctgaatgag 180
 atctcaggca agctggacgg cgtcaatgga agcctcaacg acctcattgc tcaaggcaac 240
 ctcaacaccg agctgagcaa ggagatcctc aagattgcaa atgagcagaa ccagggtgctg 300

aatgatgtca	acaacaagct	ggacgccatc	aacaccatgc	tgacatcta	cctgccaaaag	360
atcacctcaa	tgctctctga	tgtgatgaag	cagaactacg	cgctgagcct	ccagattgag	420
tacctctcaa	agcagctgca	agagatctcc	gacaagctgg	acatcatcaa	tgtcaatgtg	480
ctcatcaaca	gcaccttgac	agagatcaag	ccggcctacc	agaggatcaa	gtatgtcaat	540
gagaagtttg	aggagctcac	cttcgccacc	gagacaacat	tgaaggtgaa	gaaggacagc	600
tcgccggcgg	acatectgga	tgagctcacc	gagctaacag	agctggccaa	gagcgtcacc	660
aagaatgatg	ttgatggctt	cgagttctac	ctcaacacct	tccatgatgt	gatgggtggc	720
aacaacctct	tcggcgcctc	ggcgtcaag	acggcgtcgg	agctgatcgc	caaggagaat	780
gtcaagacaa	gtggatcaga	gggtggcaat	gtctacaact	tcctcatcgt	gctgacggcg	840
ctgcaagcca	aggccttcct	caccttgaca	acctgccgca	agttgctggg	cctcggccgac	900
atcgactaca	cctccatcat	gaatgagcac	ctcaacaagg	agaaggagga	gttccgcgtc	960
aacatcctgc	caacattgag	caacaccttc	agcaacocca	actacgcaa	ggtgaagggc	1020
tcagatgaag	atgccaagat	gattgtggag	gccaaagcctg	gccatgctct	ggtgggcttc	1080
gagatgagca	acgacagcat	caccgtgctg	aaggctctacg	aggccaagct	gaagcagaac	1140
taccaggtgg	acaaggacag	cttgtctgag	gtgatctacg	gcgacatgga	caagctgcta	1200
tgtccagatc	aaagcgagca	gatctactac	accaacaaca	tcgtctttcc	aatgaatat	1260
gtcatcacca	agatcgactt	caccaagaag	atgaaaacat	tgagatatga	ggtgacggcc	1320
aacagctacg	acagcagcac	cggcgagatc	gacctcaaca	agaagaaggt	ggagagctca	1380
gaagctgagt	acaggacgct	ctccgccaaag	gatgatggcg	tctacatgcc	gctcggcgtc	1440
atctcagaaa	ccttcttgac	gcccatacat	ggcttcggcc	tccaagctga	tgagaacagc	1500
aggctcatca	ccttgacctg	caagagctac	ctcaggagc	tgctgctggc	caccgacctc	1560
agcaacaagg	agacaaagct	catcgtgccc	ccatcaggct	tcatcagcaa	catcgtggag	1620
aatggcaacc	tggaaggaga	gaacctggag	ccatggatag	ccaacaaca	gaatgcttat	1680
gttgatcaca	ccggcggcgt	caatggaaca	agggcgctct	atggtcaca	ggatggaggc	1740
ttcagccagt	tcatcggcga	caagctgaag	ccaagacag	aatatgtcat	ccagtacacc	1800
gtcaagggca	agccatcaat	ccacctcaag	aatgagaaca	ccggctacat	ccactacgag	1860
gacaccaaca	acaacctgga	ggactaccag	accatcacca	agaggttac	caccggcacc	1920
gacctcaagg	gcgtctacct	catcttgaag	agccaaaatg	gagatgaagc	atggggagac	1980
aacttcacca	tcctggagat	ctcgccatca	gagaagctgc	tctcggcggg	gctcatcaat	2040
gtcaacaact	ggatcagaac	tggaagcacc	catatcagcg	gcaacacctt	gacgctctac	2100
caaggaggag	gaggcaacct	caagcagaac	ctccagcttg	acagcttctc	cacctacagg	2160
gtgaacttct	ccgtcaccgg	cgacgccaat	gtgaggatca	gaaattcaag	ggaggtgctc	2220
ttcgagaaga	gatacatgag	cggcgccaaag	gatgtttctg	agatcttcac	caccaagctg	2280
ggcaaggaca	acttctacat	cgagctgagc	caaggcaaca	acctctatgg	agggccgctg	2340
gtgaagttca	atgatgtgag	catcaagcat	caccaccatc	atcactaa		2388

<210> 8

<211> 2430

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая нуклеотидная последовательность, кодирующая АХМ1-113 w/
с-концевое расширение

<400> 8

atgaacatga	acaacacca	gctcaatgca	agggcgctgc	cgagcttcat	cgactacttc	60
aatggcatct	atggcttcgc	caccggcatc	aaggacatca	tgaacatgat	cttcaagacc	120
gacaccggcg	gcgacctcac	cttgatgag	atcctcaaga	accagcagct	gctgaatgag	180
atctcaggca	agctggacgg	cgtcaatgga	agcctcaacg	acctcattgc	tcaaggcaac	240
ctcaacaccg	agctgagcaa	ggagatcctc	aagattgcaa	atgagcagaa	ccaggtgctg	300
aatgatgtca	acaacaagct	ggacgccatc	aacaccatgc	tcaacatcta	cctgccaaaag	360
atcacctcaa	tgctctctga	tgtgatgaag	cagaactacg	cgctgagcct	ccagattgag	420
tacctctcaa	ggcagctgca	agagatctcc	gacaagctgg	atgtcatcaa	cctcaatgtg	480
ctcatcaaca	gcaccttgac	agagatcaag	ccaagctacc	agaggatcaa	gtatgtcaat	540
gagaagtctg	acaagctcac	cttcgccacc	gagagcacc	tcggcgcaa	gcaaggcatc	600
ttcaatgaag	attcatttga	caacaacacc	ttggagaact	tgacagacct	gcggagctg	660
gccaagagca	tcaccaagaa	tgatgtggag	agcttcgagt	tctacctcca	caccttccat	720
gatgtgctca	tcggcaacaa	cctctttgga	agaagcgcgc	tcaagacggc	atcagagctc	780
atcaccaagg	atgagatcaa	gacaagcggc	agcgagatcg	gcaaggtcta	cagcttctc	840
atcgtgctga	catcattgca	agccaaggcc	ttcctcacct	tgacaacctg	ccgcaagttg	900
ctgggcctct	ccgacatcga	ctacacctcc	atcatgaatg	agcacctcaa	caatgagaag	960

```

aatgagttca gagacaacat cctgcccggcg ctgagcaaca agttcagcaa cccaagctac 1020
gccaaagacca tcggctcaga caactacgcc aaggtgatcc tggagagcga gcctggctac 1080
gcgctgggtgg gcttcgagat catcaatgat ccaattcctg ttctcaaggc ctacaaggcc 1140
aagctgaagc agaactacca ggtggacaac cagagcttga gcgagatcgt ctacctggac 1200
atcgacaagc tcttctgccc ggagaactca gagcagaagt actacaccaa gaacctcacc 1260
ttccctgatg gatatgtcat caccaagatc accttcgaga agaagctgaa caacctcatc 1320
tacgaggcca ccgccaactt ctatgatcca tcaacaggag acatcgacct caacaagaag 1380
caagtggaga gcaccttccc tcaaacagac tacatcacca tggacattgg agatgatgat 1440
ggcatctaca tgccgctcgg cgtcattctca gaaaccttct tgacgcccac caacagcttc 1500
ggcctggagg tggacgccaa gagcaagacc ttgacgctca agtgcaagag ctacctcagg 1560
gagtacctgc tggagagtga tttgaagaac aaggagacag ggctgatcgc gccgccaat 1620
gtgttcatca gcaatgtggt gaagaactgg gacatcgagg aggattcatt ggagccatgg 1680
gtggccaaca acaagaatgc ttatgtggac aacaccggcg gcattgaaag aagcaaggcg 1740
ctcttcacc aaggagatgg agagttcagc cagttcatcg gcgacaagct aaagcccaac 1800
accgactaca tcatccagta caccgtcaag ggcaagccgg ccatctacct caagaacaag 1860
agcaccggct acatcaccta cgaggacacc aatggaaatt ctgaggagtt ccaaacaatt 1920
gctgtgaagt tcacctcaga aacagatttg agccagacc acctgggtgtt caagagccaa 1980
aatggatatg aagcatgggg agacaacttc atcatcctgg aggccaagct cttcgagaca 2040
ccagaaagcc cggagctcat caagttcaat gattgggaga ggttcggcac cacctacatc 2100
accggcaatg agctgaggat tgatcattca agaggaggct acttccgcca aagcctcaac 2160
atcgacagct acagcaccta cgacctcagc ttcagcttca gcggcctctg ggccaagggtg 2220
attgtgaaga acagccgcg cgtggtgctc ttcgagaagg tgaagaaca tggaagcagc 2280
tatgaggaca tctcagagag cttcaccacc gccagcaaca aggatggctt cttcatcgag 2340
ctcaccgccc agaggacaag cagcaccttc cacagcttca gagacatcag catcaaggag 2400
aagattgaac atcaccacca tcatcactaa 2430

```

<210> 9
 <211> 795
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> AXMI-005 w/ с-концевое расширение

```

<400> 9
Met Asn Met Asn Asn Thr Lys Leu Asn Ala Arg Ala Leu Pro Ser Phe
 1          5          10          15
Ile Asp Tyr Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Lys Asp
 20          25          30
Ile Met Asn Met Ile Phe Lys Thr Asp Thr Gly Gly Asn Leu Thr Leu
 35          40          45
Asp Glu Ile Leu Lys Asn Gln Gln Leu Leu Asn Glu Ile Ser Gly Lys
 50          55          60
Leu Asp Gly Val Asn Gly Ser Leu Asn Asp Leu Ile Ala Gln Gly Asn
 65          70          75          80
Leu Asn Thr Glu Leu Ser Lys Glu Ile Leu Lys Ile Ala Asn Glu Gln
 85          90          95
Asn Gln Val Leu Asn Asp Val Asn Asn Lys Leu Asp Ala Ile Asn Thr
 100         105         110
Met Leu His Ile Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Ser Met Leu Ser Asp Val
 115         120         125
Met Lys Gln Asn Tyr Ala Leu Ser Leu Gln Ile Glu Tyr Leu Ser Lys
 130         135         140
Gln Leu Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Ile Ile Asn Val Asn Val
 145         150         155         160
Leu Ile Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ala Tyr Gln Arg Ile
 165         170         175
Lys Tyr Val Asn Glu Lys Phe Glu Glu Leu Thr Phe Ala Thr Glu Thr
 180         185         190
Thr Leu Lys Val Lys Lys Asp Ser Ser Pro Ala Asp Ile Leu Asp Glu
 195         200         205
Leu Thr Glu Leu Thr Glu Leu Ala Lys Ser Val Thr Lys Asn Asp Val

```

210
 Asp Gly Phe Glu Phe Tyr
 225
 Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr Ala Ser Glu Leu Ile
 245
 Ala Lys Glu Asn Val Lys Thr Ser Gly Ser Glu Val Gly Asn Val Tyr
 260
 Asn Phe Leu Ile Val Leu Thr Ala Leu Gln Ala Lys Ala Phe Leu Thr
 275
 Leu Thr Thr Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ala Asp Ile Asp Tyr Thr
 290
 Ser Ile Met Asn Glu His Leu Asn Lys Glu Lys Glu Glu Phe Arg Val
 305
 Asn Ile Leu Pro Thr Leu Ser Asn Thr Phe Ser Asn Pro Asn Tyr Ala
 325
 Lys Val Lys Gly Ser Asp Glu Asp Ala Lys Met Ile Val Glu Ala Lys
 340
 Pro Gly His Ala Leu Val Gly Phe Glu Met Ser Asn Asp Ser Ile Thr
 355
 Val Leu Lys Val Tyr Glu Ala Lys Leu Lys Gln Asn Tyr Gln Val Asp
 370
 Lys Asp Ser Leu Ser Glu Val Ile Tyr Gly Asp Met Asp Lys Leu Leu
 385
 Cys Pro Asp Gln Ser Glu Gln Ile Tyr Tyr Thr Asn Asn Ile Val Phe
 405
 Pro Asn Glu Tyr Val Ile Thr Lys Ile Asp Phe Thr Lys Lys Met Lys
 420
 Thr Leu Arg Tyr Glu Val Thr Ala Asn Ser Tyr Asp Ser Ser Thr Gly
 435
 Glu Ile Asp Leu Asn Lys Lys Val Glu Ser Ser Glu Ala Glu Tyr
 450
 Arg Thr Leu Ser Ala Lys Asp Asp Gly Val Tyr Met Pro Leu Gly Val
 465
 Ile Ser Glu Thr Phe Leu Thr Pro Ile Asn Gly Phe Gly Leu Gln Ala
 485
 Asp Glu Asn Ser Arg Leu Ile Thr Leu Thr Cys Lys Ser Tyr Leu Arg
 500
 Glu Leu Leu Leu Ala Thr Asp Leu Ser Asn Lys Glu Thr Lys Leu Ile
 515
 Val Pro Pro Ser Gly Phe Ile Ser Asn Ile Val Glu Asn Gly Asn Leu
 530
 Glu Gly Glu Asn Leu Glu Pro Trp Ile Ala Asn Asn Lys Asn Ala Tyr
 545
 Val Asp His Thr Gly Gly Val Asn Gly Thr Arg Ala Leu Tyr Val His
 565
 Lys Asp Gly Gly Phe Ser Gln Phe Ile Gly Asp Lys Leu Lys Pro Lys
 580
 Thr Glu Tyr Val Ile Gln Tyr Thr Val Lys Gly Lys Pro Ser Ile His
 595
 Leu Lys Asn Glu Asn Thr Gly Tyr Ile His Tyr Glu Asp Thr Asn Asn
 610
 Asn Leu Glu Asp Tyr Gln Thr Ile Thr Lys Arg Phe Thr Thr Gly Thr
 625
 Asp Leu Lys Gly Val Tyr Leu Ile Leu Lys Ser Gln Asn Gly Asp Glu
 645
 Ala Trp Gly Asp Asn Phe Thr Ile Leu Glu Ile Ser Pro Ser Glu Lys
 660
 Leu Leu Ser Pro Glu Leu Ile Asn Val Asn Asn Trp Ile Arg Thr Gly
 675
 Ser Thr His Ile Ser Gly Asn Thr Leu Thr Leu Tyr Gln Gly Gly Gly
 690
 Gly Asn Leu Lys Gln Asn Leu Gln Leu Asp Ser Phe Ser Thr Tyr Arg
 705
 Val Asn Phe Ser Val Thr Gly Asp Ala Asn Val Arg Ile Arg Asn Ser
 710
 715
 720

Asn Pro Ser Tyr Ala Lys Thr Ile Gly Ser Asp Asn Tyr Ala Lys Val
 340 350
 Ile Leu Glu Ser Glu Pro Gly Tyr Ala Leu Val Gly Phe Glu Ile Ile
 355 360 365
 Asn Asp Pro Ile Pro Val Leu Lys Ala Tyr Lys Ala Lys Leu Lys Gln
 370 375 380
 Asn Tyr Gln Val Asp Asn Gln Ser Leu Ser Glu Ile Val Tyr Leu Asp
 385 390 395 400
 Ile Asp Lys Leu Phe Cys Pro Glu Asn Ser Glu Gln Lys Tyr Tyr Thr
 405 410 415
 Lys Asn Leu Thr Phe Pro Asp Gly Tyr Val Ile Thr Lys Ile Thr Phe
 420 425 430
 Glu Lys Lys Leu Asn Asn Leu Ile Tyr Glu Ala Thr Ala Asn Phe Tyr
 435 440 445
 Asp Pro Ser Thr Gly Asp Ile Asp Leu Asn Lys Lys Gln Val Glu Ser
 450 455 460
 Thr Phe Pro Gln Thr Asp Tyr Ile Thr Met Asp Ile Gly Asp Asp Asp
 465 470 475 480
 Gly Ile Tyr Met Pro Leu Gly Val Ile Ser Glu Thr Phe Leu Thr Pro
 485 490 495
 Ile Asn Ser Phe Gly Leu Glu Val Asp Ala Lys Ser Lys Thr Leu Thr
 500 505 510
 Leu Lys Cys Lys Ser Tyr Leu Arg Glu Tyr Leu Leu Glu Ser Asp Leu
 515 520 525
 Lys Asn Lys Glu Thr Gly Leu Ile Ala Pro Pro Asn Val Phe Ile Ser
 530 535 540
 Asn Val Val Lys Asn Trp Asp Ile Glu Glu Asp Ser Leu Glu Pro Trp
 545 550 555 560
 Val Ala Asn Asn Lys Asn Ala Tyr Val Asp Asn Thr Gly Gly Ile Glu
 565 570 575
 Arg Ser Lys Ala Leu Phe Thr Gln Gly Asp Gly Glu Phe Ser Gln Phe
 580 585 590
 Ile Gly Asp Lys Leu Lys Pro Asn Thr Asp Tyr Ile Ile Gln Tyr Thr
 595 600 605
 Val Lys Gly Lys Pro Ala Ile Tyr Leu Lys Asn Lys Ser Thr Gly Tyr
 610 615 620
 Ile Thr Tyr Glu Asp Thr Asn Gly Asn Ser Glu Glu Phe Gln Thr Ile
 625 630 635 640
 Ala Val Lys Phe Thr Ser Glu Thr Asp Leu Ser Gln Thr His Leu Val
 645 650 655
 Phe Lys Ser Gln Asn Gly Tyr Glu Ala Trp Gly Asp Asn Phe Ile Ile
 660 665 670
 Leu Glu Ala Lys Leu Phe Glu Thr Pro Glu Ser Pro Glu Leu Ile Lys
 675 680 685
 Phe Asn Asp Trp Glu Arg Phe Gly Thr Thr Tyr Ile Thr Gly Asn Glu
 690 695 700
 Leu Arg Ile Asp His Ser Arg Gly Gly Tyr Phe Arg Gln Ser Leu Asn
 705 710 715 720
 Ile Asp Ser Tyr Ser Thr Tyr Asp Leu Ser Phe Ser Phe Ser Gly Leu
 725 730 735
 Trp Ala Lys Val Ile Val Lys Asn Ser Arg Gly Val Val Leu Phe Glu
 740 745 750
 Lys Val Lys Asn Asn Gly Ser Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Glu Ser Phe
 755 760 765
 Thr Thr Ala Ser Asn Lys Asp Gly Phe Phe Ile Glu Leu Thr Ala Glu
 770 775 780
 Arg Thr Ser Ser Thr Phe His Ser Phe Arg Asp Ile Ser Ile Lys Glu
 785 790 795 800
 Lys Ile Glu His His His His His His

<210> 11

<211> 2370

<212> ДНК

<213> *Bacillus thuringiensis*

<400> 11

gtgagggtaa acatgcagaa aaataataaa ttaagtgtaa gggctttacc aagtttcatt 60
 gattatttta atgggattta cggattcgcc actggtatca aagatattat gaacatgatt 120
 tttaaaacga atacaggagg ggatctaacc ttagacgaaa tattaaaaaa tcaacagtta 180
 cttaatgaga tttctggcaa actggatgga gtgaatggca gcttaaatga tcttctcgca 240
 caaggaaact tgaatactga attatctaag gaaatattaa aaattgcaaa tgaacagaat 300
 agggttttta atgatgtaaa tacaaaagctt gatgcgataa atttaatgct taacacatat 360
 ttacctaaaa ttacttctat gttaagtgat gtaatgaagc aaaattatgc attagggtttg 420
 cagatagaat acctaagcaa acaattaaag gaaatttcag ataagctaga tgttattaat 480
 gtaaatgtac tcattaactt tacacttact gaaattacac ctgcctatca aaggattaaa 540
 tatgtaaagt aaaaatttga agcattaacc tctgctacag aaaccaattt aaaaacaaaa 600
 caagatagct ctcatacaga tattcttgat gagttaacag agctaacgga actagcgaaa 660
 agtgtaacaa aaaatgacgt ggatggcttt gaattttacc ttaatacatt ccacgatgta 720
 atgattggga ataatctatt tggacgttca gctttaaaaa cagcctcgga attaattgcy 780
 aaagaaaatt tgaacaacag tggcagtgag gtaggaaatg tttataattt ctttaattgta 840
 ttaacagctc tgcaagcaaa agcttttctt actttaacta catgccggaa attattgggc 900
 ttagcagata ttgattatac tcttattatg aatgaacacc taaataaaga aaaagaggaa 960
 ttttagagtga acatccttcc tacactttct aatacttttt ctaatcctaa ttatgaaaaa 1020
 gctagaggga gtgataagga tgcgaaaatc attatggaag ctaaacctgg atatgcttta 1080
 gttggatttg aaataagtaa ggattcaatt gcagatttaa aagtttatca ggcaaagcta 1140
 aaacacaact atcaaattga taaggattcg ttatcagaaa ttgtttatgg tgatatagat 1200
 aaattattat gtccggatca atctgaacaa atgtattata caaataaaat agcatttcca 1260
 aatgaatatg ttatcactaa aattgctttt actaaaaaac tgaacagttt aagatatgag 1320
 gtcacagcga atttttatga ctcttctaca ggagatattg atctaaataa gaaaaaata 1380
 gaatcaagtg aggcggagtt tagtatgcta aatgctaata atgaggggtg ttatatgccg 1440
 ataggtacta taagtgaaac atttttgact ccaattaatg gatttggcct cgtagtcgat 1500
 gaaaattcaa gactagtaac tttgacatgt aaatcatatt taagagagac attggttagca 1560
 acagacttaa gtaataaaga aactaaactg atgtcccac ctaatggttt tattagcaat 1620
 attgtagaaa atgggaactt agagggagaa aacttagagc cgtggaaagc aaataacaaa 1680
 aatgcgtatg tagatcatac cggaggtgta aatggaacta aagttttata tghtcatgag 1740
 gatggtgagt tctcacaaat tattggggaa aaattgaaat tgaaaacaga atatgtaatt 1800
 caatatattg taaagggaaa agctgctatt tatttaaaag atgaaaaaaa tggggattac 1860
 atttatgaag aaacaaataa tgaattagaa gattttcaaa ctgttactaa acgttttatt 1920
 acgggaacag attcttcaag agttcattta atttttacca gtcaaaatgg cgaggaagca 1980
 tttggaggaa actttattat ttcagaaatt aggccatccg aagagttatt aagtccagaa 2040
 ttgattaagt tggatgcttg ggttggatct cagggaaact ggatctcagg aaattctctc 2100
 aatattaata gtaatgtaaa tggaaacctt cgacaaaacc tttcgttaga aagttattca 2160
 acctatagta tgaactttaa tgtgaatgga tttggcaagg tgacaataag aaattctcgt 2220
 gaagtagtat ttgaaaggag ttatctacag ttttctctta aatatatttc agaaaaattc 2280
 acaacaacaa ccaataatac tgggttatat gtgaaacttt ctctgcttcc gtctggggga 2340
 gttataaatt tcggagattt ttcaatcaag 2370

<210> 12

<211> 2370

<212> ДНК

<213> *Bacillus thuringiensis*

<400> 12

atgaacatga acaagaataa tactaaatta agcgcaagag ctttaccag ttttattgat 60
 tattttaatg gcatttatgg atttgccact ggcacaaag atattatgaa catgattttt 120
 aaaacggata cagggtggtga tctaacccta gacgaaattt taaagaatca gcagttacta 180
 aatgatattt ctggtaaatt ggatgggggtg aatggaagct taaatgatct tatcgcacag 240
 ggaaacttaa atacagaatt atctaaggaa atattaaaaa ttgcaaatga acaaaatcaa 300
 gttttaaatg atgttaataa caaactcgat cgcataaata cgatgcttca tgtatatcta 360
 cctaaaatta cctctatggt aagtgatgta atgaaaccaa attatgctt aagtatgcaa 420
 atagaatacc taagtagaca attacaagaa atttcagata agctagatat tatcaacgta 480
 aatgtactta ttaactctac acttactgaa attacacctg cgtatcaatg gattaaatat 540
 gtgaacgaaa aatttgaaga attaactttt gctacagaaa ctacttttaa agtaaaaaat 600
 gatagcgctt ctgcagatat tcttgatgag ttaacggagt taactgaact tgcgaaaagt 660
 gtaacaaaaa atgatgtgga tggttttgaa ttttacctta atacattcca cgatgtaatg 720
 gtaggaaata atttattcgg cgttctgact ttaaaaactg cttcggaaat aattgctaaa 780

gaaaatgtga aaacaagtgg cagtggaggta ggaaatgttt ataatttctt agttgtatta 840
 acagctctac aagcaaaagc ttttcttact ttaacaacat gccgaaaatt attaggccta 900
 gcagatattg attatacatc tattatgaat gaacatttaa ataaggaaaa agaggaattt 960
 agagtaaaca tccttctat acttttcta acttttcta atcctaatta tgcaaaagt 1020
 aaaggaagtg atgaagatgc aaagatgatt gtggaagcta aaccaggaca tgcattgggt 1080
 gggtttgaaa ttagtaatga ttcaatgaca gtattaaaag tatatgaagc taagctaaaa 1140
 caaaattacc aagttgataa ggattcctta tcggaagtca tttatgggtga tatggataaa 1200
 ttattgtgcc cagatcaatc tgaaaaaatt tattatacaa ataatatagt atttccaaat 1260
 gaatatgtaa ttactaaaat tgattttact aagaaaatga aaactttaag atatgaggta 1320
 acagctaatt cttatgattc ttctacagga gaaattgact taaataaaaa gaaagtagaa 1380
 tcaagtaaag cggagtatag gacgttaagt gctaataatg atggagtata tatgccgtta 1440
 ggtgtcatca gtgaaacatt tttgactcca attaatggat ttggcctcca agctgatgaa 1500
 aattcaagat taattacttt aacgtgtaaa tcatatttaa gggaactact actagcgaca 1560
 gacttaagca ataaagaaac taaattgatt gtcccgccaa atagttttat tagcaatatt 1620
 gtagagaatg ggtccataga agagggccac tttagacctt ggaaagcaaa taataagaac 1680
 gcttatgtag atcatacagg cggagtgaat ggtactaaag ctctatatgt tcatgaggat 1740
 gggggggttt cacaaatatt gggagataaa ttaaaaccga aaactgagta tgtaattcaa 1800
 tatactgtta aaggaaaacc ttctattcat ttaaaagatg aaaatactgg atataattct 1860
 tatgaagata caaataatga tttagaagat ttccaaacta taactaaaag gttcacaaca 1920
 ggaactgatt taatgagagt gtatttaatt ttaaaaagtc aaagtgggtca cgaagcttgg 1980
 ggagataact ttacaatttt ggaaattaag cctgctgagg ctttagtaag cccagaattg 2040
 attaatccga attcttggat tacaactcaa cgggctagca tttcaggaga taaacttttt 2100
 attagcttgg ggacaaatgg gacctttaga caaaatcttt cattaacag ttattcaact 2160
 tatagtataa gctttactgc atcgggacca tttaatgtga cggtaagaaa ttctagggaa 2220
 gtattatatg aacgaaacaa ccttatgtct tcaactagtc atatttctgg ggaattcaaa 2280
 actgaaatcca ataataccgg atttatatgta gaactttccc gtcgttctgg tgggtgctggt 2340
 catatatcat ttgaaaacat ttctattaaa 2370

<210> 13

<211> 790

<212> PRT

<213> *Bacillus thuringiensis*

<400> 13

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

Met Ile Gly Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr Ala Ser
 245 250 255
 Glu Leu Ile Ala Lys Glu Asn Leu Lys Thr Ser Gly Ser Glu Val Gly
 260 265 270
 Asn Val Tyr Asn Phe Leu Ile Val Leu Thr Ala Leu Gln Ala Lys Ala
 275 280 285
 Phe Leu Thr Leu Thr Thr Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ala Asp Ile
 290 295 300
 Asp Tyr Thr Pro Ile Met Asn Glu His Leu Asn Lys Glu Lys Glu Glu
 305 310 315 320
 Phe Arg Val Asn Ile Leu Pro Thr Leu Ser Asn Thr Phe Ser Asn Pro
 325 330 335
 Asn Tyr Glu Lys Ala Arg Gly Ser Asp Lys Asp Ala Lys Ile Ile Met
 340 345 350
 Glu Ala Lys Pro Gly Tyr Ala Leu Val Gly Phe Glu Ile Ser Lys Asp
 355 360 365
 Ser Ile Ala Val Leu Lys Val Tyr Gln Ala Lys Leu Lys His Asn Tyr
 370 375 380
 Gln Ile Asp Lys Asp Ser Leu Ser Glu Ile Val Tyr Gly Asp Ile Asp
 385 390 395 400
 Lys Leu Leu Cys Pro Asp Gln Ser Glu Gln Met Tyr Tyr Thr Asn Lys
 405 410 415
 Ile Ala Phe Pro Asn Glu Tyr Val Ile Thr Lys Ile Ala Phe Thr Lys
 420 425 430
 Lys Leu Asn Ser Leu Arg Tyr Glu Val Thr Ala Asn Phe Tyr Asp Ser
 435 440 445
 Ser Thr Gly Asp Ile Asp Leu Asn Lys Lys Lys Ile Glu Ser Ser Glu
 450 455 460
 Ala Glu Phe Ser Met Leu Asn Ala Asn Asn Glu Gly Val Tyr Met Pro
 465 470 475 480
 Ile Gly Thr Ile Ser Glu Thr Phe Leu Thr Pro Ile Asn Gly Phe Gly
 485 490 495
 Leu Val Val Asp Glu Asn Ser Arg Leu Val Thr Leu Thr Cys Lys Ser
 500 505 510
 Tyr Leu Arg Glu Thr Leu Leu Ala Thr Asp Leu Ser Asn Lys Glu Thr
 515 520 525
 Lys Leu Ile Val Pro Pro Asn Gly Phe Ile Ser Asn Ile Val Glu Asn
 530 535 540
 Gly Asn Leu Glu Gly Glu Asn Leu Glu Pro Trp Lys Ala Asn Asn Lys
 545 550 555 560
 Asn Ala Tyr Val Asp His Thr Gly Gly Val Asn Gly Thr Lys Val Leu
 565 570 575
 Tyr Val His Glu Asp Gly Glu Phe Ser Gln Phe Ile Gly Glu Lys Leu
 580 585 590
 Lys Leu Lys Thr Glu Tyr Val Ile Gln Tyr Ile Val Lys Gly Lys Ala
 595 600 605
 Ala Ile Tyr Leu Lys Asp Glu Lys Asn Gly Asp Tyr Ile Tyr Glu Glu
 610 615 620
 Thr Asn Asn Glu Leu Glu Asp Phe Gln Thr Val Thr Lys Arg Phe Ile
 625 630 635 640
 Thr Gly Thr Asp Ser Ser Arg Val His Leu Ile Phe Thr Ser Gln Asn
 645 650 655
 Gly Glu Glu Ala Phe Gly Gly Asn Phe Ile Ile Ser Glu Ile Arg Pro
 660 665 670
 Ser Glu Glu Leu Leu Ser Pro Glu Leu Ile Lys Leu Asp Ala Trp Val
 675 680 685
 Gly Ser Gln Gly Thr Trp Ile Ser Gly Asn Ser Leu Asn Ile Asn Ser
 690 695 700
 Asn Val Asn Gly Thr Phe Arg Gln Asn Leu Ser Leu Glu Ser Tyr Ser
 705 710 715 720
 Thr Tyr Ser Met Asn Phe Asn Val Asn Gly Phe Gly Lys Val Thr Ile
 725 730 735
 Arg Asn Ser Arg Glu Val Val Phe Glu Arg Ser Tyr Leu Gln Phe Ser
 740 745 750

Ser Lys Tyr Ile Ser Glu Lys Phe Thr Thr Thr Thr Asn Asn Thr Gly
 755 760 765
 Leu Tyr Val Glu Leu Ser Arg Ala Ser Ser Gly Gly Val Ile Asn Phe
 770 775 780
 Gly Asp Phe Ser Ile Lys
 785 790

<210> 14

<211> 790

<212> PRT

<213> Bacillus thuringiensis

<400> 14

Met Asn Met Asn Lys Asn Asn Thr Lys Leu Ser Ala Arg Ala Leu Pro
 1 5 10 15
 Ser Phe Ile Asp Tyr Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile
 20 25 30
 Lys Asp Ile Met Asn Met Ile Phe Lys Thr Asp Thr Gly Gly Asp Leu
 35 40 45
 Thr Leu Asp Glu Ile Leu Lys Asn Gln Gln Leu Leu Asn Asp Ile Ser
 50 55 60
 Gly Lys Leu Asp Gly Val Asn Gly Ser Leu Asn Asp Leu Ile Ala Gln
 65 70 75 80
 Gly Asn Leu Asn Thr Glu Leu Ser Lys Glu Ile Leu Lys Ile Ala Asn
 85 90 95
 Glu Gln Asn Gln Val Leu Asn Asp Val Asn Asn Lys Leu Asp Ala Ile
 100 105 110
 Asn Thr Met Leu His Val Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Ser Met Leu Ser
 115 120 125
 Asp Val Met Lys Pro Asn Tyr Ala Leu Ser Met Gln Ile Glu Tyr Leu
 130 135 140
 Ser Arg Gln Leu Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Ile Ile Asn Val
 145 150 155 160
 Asn Val Leu Ile Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ala Tyr Gln
 165 170 175
 Trp Ile Lys Tyr Val Asn Glu Lys Phe Glu Glu Leu Thr Phe Ala Thr
 180 185 190
 Glu Thr Thr Leu Lys Val Lys Asn Asp Ser Ala Ser Ala Asp Ile Leu
 195 200 205
 Asp Glu Leu Thr Glu Leu Thr Glu Leu Ala Lys Ser Val Thr Lys Asn
 210 215 220
 Asp Val Asp Gly Phe Glu Phe Tyr Leu Asn Thr Phe His Asp Val Met
 225 230 235 240
 Val Gly Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Thr Leu Lys Thr Ala Ser Glu
 245 250 255
 Leu Ile Ala Lys Glu Asn Val Lys Thr Ser Gly Ser Glu Val Gly Asn
 260 265 270
 Val Tyr Asn Phe Leu Val Val Leu Thr Ala Leu Gln Ala Lys Ala Phe
 275 280 285
 Leu Thr Leu Thr Thr Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ala Asp Ile Asp
 290 295 300
 Tyr Thr Ser Ile Met Asn Glu His Leu Asn Lys Glu Lys Glu Glu Phe
 305 310 315 320
 Arg Val Asn Ile Leu Pro Ile Leu Ser Asn Thr Phe Ser Asn Pro Asn
 325 330 335
 Tyr Ala Lys Val Lys Gly Ser Asp Glu Asp Ala Lys Met Ile Val Glu
 340 345 350
 Ala Lys Pro Gly His Ala Leu Val Gly Phe Glu Ile Ser Asn Asp Ser
 355 360 365
 Met Thr Val Leu Lys Val Tyr Glu Ala Lys Leu Lys Gln Asn Tyr Gln
 370 375 380
 Val Asp Lys Asp Ser Leu Ser Glu Val Ile Tyr Gly Asp Met Asp Lys
 385 390 395 400

Leu Leu Cys Pro Asp Gln Ser Glu Lys Ile Tyr Tyr Thr Asn Asn Ile
 405 410 415
 Val Phe Pro Asn Glu Tyr Val Ile Thr Lys Ile Asp Phe Thr Lys Lys
 420 425 430
 Met Lys Thr Leu Arg Tyr Glu Val Thr Ala Asn Ser Tyr Asp Ser Ser
 435 440 445
 Thr Gly Glu Ile Asp Leu Asn Lys Lys Lys Val Glu Ser Ser Lys Ala
 450 455 460
 Glu Tyr Arg Thr Leu Ser Ala Asn Asn Asp Gly Val Tyr Met Pro Leu
 465 470 480
 Gly Val Ile Ser Glu Thr Phe Leu Thr Pro Ile Asn Gly Phe Gly Leu
 485 490 495
 Gln Ala Asp Glu Asn Ser Arg Leu Ile Thr Leu Thr Cys Lys Ser Tyr
 500 505 510
 Leu Arg Glu Leu Leu Leu Ala Thr Asp Leu Ser Asn Lys Glu Thr Lys
 515 520 525
 Leu Ile Val Pro Pro Asn Ser Phe Ile Ser Asn Ile Val Glu Asn Gly
 530 535 540
 Ser Ile Glu Glu Gly His Leu Glu Pro Trp Lys Ala Asn Asn Lys Asn
 545 550 555 560
 Ala Tyr Val Asp His Thr Gly Gly Val Asn Gly Thr Lys Ala Leu Tyr
 565 570 575
 Val His Glu Asp Gly Gly Val Ser Gln Phe Met Gly Asp Lys Leu Lys
 580 585 590
 Pro Lys Thr Glu Tyr Val Ile Gln Tyr Thr Val Lys Gly Lys Pro Ser
 595 600 605
 Ile His Leu Lys Asp Glu Asn Thr Gly Tyr Ile Leu Tyr Glu Asp Thr
 610 615 620
 Asn Asn Asp Leu Glu Asp Phe Gln Thr Ile Thr Lys Arg Phe Thr Thr
 625 630 635 640
 Gly Thr Asp Leu Met Arg Val Tyr Leu Ile Leu Lys Ser Gln Ser Gly
 645 650 655
 His Glu Ala Trp Gly Asp Asn Phe Thr Ile Leu Glu Ile Lys Pro Ala
 660 665 670
 Glu Ala Leu Val Ser Pro Glu Leu Ile Asn Pro Asn Ser Trp Ile Thr
 675 680 685
 Thr Gln Gly Ala Ser Ile Ser Gly Asp Lys Leu Phe Ile Ser Leu Gly
 690 695 700
 Thr Asn Gly Thr Phe Arg Gln Asn Leu Ser Leu Asn Ser Tyr Ser Thr
 705 710 715 720
 Tyr Ser Ile Ser Phe Thr Ala Ser Gly Pro Phe Asn Val Thr Val Arg
 725 730 735
 Asn Ser Arg Glu Val Leu Tyr Glu Arg Asn Asn Leu Met Ser Ser Thr
 740 745 750
 Ser His Ile Ser Gly Glu Phe Lys Thr Glu Ser Asn Asn Thr Gly Leu
 755 760 765
 Tyr Val Glu Leu Ser Arg Arg Ser Gly Gly Ala Gly His Ile Ser Phe
 770 775 780
 Glu Asn Ile Ser Ile Lys
 785 790

<210> 15

<211> 2409

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность, кодирующая AXMI-115

<400> 15

atgaacatga acaacacca gctcaatgca agagctcttc cttccttcat cgactacttc 60

aatggcatct atggcttcgc caccggcatc aaggacatca tgaacatgat cttcaagaca 120
gacactggag gagatctcac cttggatgag atcctcaaga accagcagct gctgaatgag 180
atctcagggg agctggatgg cgtcaatgga agcctcaatg atctcattgc tcaaggaaac 240
ctcaacacag agctctccaa ggagatcctc aagatcgcca atgagcagaa ccaggtgctg 300
aatgatgtca acaacaagct ggatgccatc aacaccatgc tgaacatcta cctccccaag 360
atcacctcaa tgctctctga tgtgatgaag cagaactatg ctctctccct ccagatcgag 420
tacctctcaa ggcagctgca agagatctcc gacaagctgg atgtcatcaa cctcaatgtg 480
ctgatcaaca gcaccttgac agagatcacc ccaagctacc agaggatcaa atatgtcaat 540
gagaagtctg acaagctcac cttcgccaca gaatcaaccc tccgcgccaa gcaaggcatc 600
ttcaatgagg acagcttcga caacaacacc ttggagaact tgacagatct tgctgagctg 660
gccaaagagca tcaccaagaa tgatgtggac agcttcgagt tctacctcca caccttccat 720
gatgtgctga ttggcaacaa cctctttgga agaagcgcgc tcaagacagc ttcagagctc 780
atcaccaagg atgagatcaa gacatctgga tcagagattg gcaaggtgta cagcttccct 840
atcgtctctca ccagcctcca ggccaaggcc ttctcacc caccacctg ccggaagctg 900
ctgggctctc ccgacatcga ctacacctcc atcatgaatg agcacctcaa caatgagaag 960
aatgagtcca gagacaacat cctgcccggc ctctccaaca agttcagcaa ccttccat 1020
gcaaaaacca tcggcagcga caactacgcc aaggtgatcc tggagagcga gcttgat 1080
gctctggtgg gcttcgagat catcaatgat cccatccccg tgctgaaggc ctacaaggcc 1140
aagctgaagc agaactacca ggtggacaac cagagcctct cagagatcgt ctacctggac 1200
atcgacaagc tcttctgccc agagaacagc gagcagaagt actacaccaa gaacctcacc 1260
ttcctgatg gatatgtcat caccaagatc accttcgaga agaagctcaa caacctcacc 1320
tatgaagcca ccgccaactt ctatgatcca tcaactggag acatcgacct gaacaagaag 1380
caggtggaga gcaccttccc tcaaacagac tacatcacca tggacattgg agatgatgat 1440
ggcatctaca tgccgctcgg cgctcatctca gaaaccttcc tcacccccat caacagctc 1500
ggcctggagg tggatgcca gagcaagacc ctcaccttga aatgcaagag ctacctcagg 1560
gagtacctgc tggagagtga tctgaagaac aaggaaacag ggctgatcgc gccgccaat 1620
gttttcatca gcaatgtggg gaagaactgg gacattgaag aagattcatt ggagccatgg 1680
gtggccaaca acaagaatgc ttatgtggac aacaccggcg gcattgaaag aagcaaggcg 1740
ctcttcccc aaggagatgg agagtctca cagttcatcg gcgacaagct gaagccaaac 1800
accgactaca tcatccagta caccgtcaag ggcaagccgg ccatctacct caagaacaag 1860
agcaccggct acatcacata tgaggacacc aatggcaaca gcgaggagt ccaaacatt 1920
gctgtgaagt tcacctcaga aacagatctc tcccaaacc acctgggtgt caagagccaa 1980
aatggatatg aagcatgggg agacaacttc atcatctgg aggccaaagct ctttgaaca 2040
ccagaatctc cagagctcat caagttcaat gattgggaga gatttggcac cacctacatc 2100
actgaaatg agctgaggat tgatcattca agaggagget acttccgcca gagcttgaac 2160
atcgacagct acagcacata tgatctctcc ttctccttct ccggcctctg ggccaaggct 2220
atcgtcaaga acagcagagg agtgggtgctc ttcgagaagg tgaagaacaa tggaagcagc 2280
tatgaggaca tctcagagag cttcaccacc gccagcaaca aggatggctt cttcatcgag 2340
ctcaccgccc agaggacaag cagcaccttc cacagcttca gagacatctc catcaaggag 2400
aagatcgag 2409

<210> 16

<211> 2409

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность, кодирующая АХМІ-115

<400> 16

atgaacatga acaacacca gctcaatgca agagctcttc cttccttcat cgactacttc 60
aatggcatct atggcttcgc caccggcatc aaggacatca tgaacatgat cttcaagaca 120
gacactggag gagatctcac cttggatgag atcctcaaga accagcagct gctgaatgag 180
atctcagggg agctggatgg cgtcaatgga agcctcaatg atctcattgc tcaaggaaac 240
ctcaacacag agctctccaa ggagatcctc aagattgcaa atgagcagaa ccaggtgctg 300
aatgatgtca acaacaagct ggatgccatc aacaccatgc tgaacatcta cctccccaag 360
atcacctcaa tgctctctga tgtgatgaag cagaactatg ctctctccct ccagatcgag 420
tacctctcaa ggcagctgca agagatctcc gacaagctgg atgtcatcaa cctcaatgtg 480
ctgatcaaca gcaccttgac agagatcacc ccaagctacc aaaggatcaa atatgtcaat 540
gagaagtctg acaagctcac cttcgccaca gaatcaaccc tccgcgccaa gcaaggcatc 600
ttcaatgagg acagcttcga caacaacacc ttggagaact tgacagatct tgctgagctg 660
gccaaagagca tcaccaagaa tgatgtggac agcttcgagt tctacctcca caccttccat 720

gatgtgctga	ttggcaacaa	cctctttgga	agaagcgcgc	tcaagacagc	ttcagagctc	780
atcaccaagg	atgagatcaa	gacatctgga	tcagaaattg	gcaaggtgta	cagcttcctc	840
atcgtcctca	ccagcctcca	ggccaaggcc	ttcctcacc	tcaccacctg	ccggaagctg	900
ctgggcctct	ccgacatcga	ctacacctcc	atcatgaaatg	agcacctcaa	caatgagaag	960
aatgagttca	gagacaacat	cctgcccggc	ctctccaaca	agttcagcaa	cccttcata	1020
gcaaaaacca	tcggcagcga	caactatgcc	aaggtgatcc	tggagagcga	gcctggatat	1080
gctctgggtg	gcttcgagat	catcaatgat	cccacccctg	tgctgaaggc	ctacaaggcc	1140
aagctgaagc	agaactacca	ggtggacaac	caaagcctct	cagagatcgt	ctacctggac	1200
atcgacaagc	tcttctgccc	agagaacagc	gagcagaagt	actacaccaa	gaacctcacc	1260
ttccctgatg	gatatgtcat	caccaagatc	accttcgaga	agaagctcaa	caacctcatc	1320
tatgaagcca	ccgccaactt	ctatgatcca	tcaactggag	acattgatct	gaacaagaag	1380
caggtggaga	gcaccttccc	tcaaacagat	tacatcacca	tggacattgg	agatgatgat	1440
ggcatctaca	tgccgctcgg	cgatcatctca	gaaaccttcc	tcacccccat	caacagcttc	1500
ggcctggagg	tggatgcaa	gagcaagacc	ctcaccttga	aatgcaagag	ctacttgagg	1560
gagtacctgc	tggaaatcaga	tctgaagaac	aaggaaacag	ggctgatcgc	gccgccaat	1620
gttttcatca	gcaatgtggt	gaagaactgg	gacattgaag	aagattcatt	ggagccatgg	1680
gtggccaaca	acaagaatgc	ttatgtggac	aacaccggcg	gcattgaaag	aagcaaggcg	1740
ctcttcacc	aaggagatgg	agagttctca	cagttcatcg	gcgacaagct	gaagccaac	1800
accgactaca	tcatccagta	caccgtcaag	ggcaagccgg	ccatctacct	caagaacaag	1860
agcactggct	acatcacata	tgaggacacc	aatggcaaca	gcgaggagtt	ccaacaatt	1920
gctgtgaagt	tcacctcaga	aacagatctc	tcccaaacc	acctggtggt	caagagccaa	1980
aatggatgatg	aagcatgggg	agacaacttc	atcatcctgg	aggccaagct	ctttgaaaca	2040
ccagaatctc	cagagctcat	caagttcaat	gattgggaaa	gatttggcac	cacctacatc	2100
actggaaatg	agctgaggat	tgatcattca	agaggaggct	acttccgcc	gagcttgaac	2160
atcgacagct	acagcacata	tgatctctcc	ttctccttct	ccggcctctg	ggccaaggtc	2220
atcgtaaga	acagcagagg	agtggtgctc	ttcgagaagg	tgaagaacaa	tggaagcagc	2280
tatgaggaca	tctcagagag	cttcaccacc	gccagcaaca	aggatggctt	cttcacagag	2340
ctcaccgccc	agaggacaag	cagcaccttc	cacagcttca	gagacatctc	catcaaggag	2400
aagattgaa						2409

<210> 17

<211> 2364

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность, кодирующая АХМІ-184

<400> 17

atgaacaaga	acaacaccaa	gctctccggc	cgcgcgctgc	cctccttcat	cgactacttc	60
aatggcatct	atggcttcgc	caccggcatc	aaggacatca	tgaacatgat	cttcaagaca	120
gacactggag	gagatctcac	cttggatgag	atcctcaaga	accagcagct	gctgaaatgac	180
atctcagggg	agctggatgg	cgtaaatgga	agcctcaatg	atctcattgc	tcaaggaac	240
ctcaacacag	agctctccaa	ggagatcctc	aagatcgcca	atgagcagaa	ccaggtgctg	300
aatgatgtca	acaacaagct	ggatgccatc	aacaccatgc	tgcatgtcta	cctcccgaag	360
atcacctcaa	tgctctctga	tgtgatgaag	ccaaactatg	ctctctccat	gcaaattgag	420
tacctctcaa	ggcagctgca	agagatctcc	gacaagctgg	acatcatcaa	tgtcaatgtg	480
ctgatcaaca	gcaccttgac	agagatcacg	ccggcctacc	aatggatcaa	atatgtcaat	540
gagaagtttg	aggagctcac	cttcgccaca	gaaacaacct	tgaaggtgaa	gaatgattca	600
gcttctgctg	acatcctgga	tgagctgaca	gagctgacag	agctggccaa	gagcgtcacc	660
aagaatgatg	ttgatggctt	cgagttctac	ctcaaacctt	tccatgatgt	gatggtgggc	720
aacaacctct	ttggaagaag	cacctcaag	acagcttcag	agctgatcgc	caaggagaat	780
gtcaagacat	ctggaagcga	ggtgggaaat	gtctacaact	tcctggtggt	gctgacggcg	840
ctgcaagcaa	aggccttctt	cacctcacc	acctgccgga	agctgctggg	cctcgccgac	900
atcgactaca	cctcaatcat	gaatgagcac	ctcaacaagg	agaaggagga	gttcagagt	960
aacatcctcc	ccatcctctc	caacaccttc	agcaacccca	actacgccaa	ggtgaagggc	1020
tcagatgaag	atgccaaagt	gattgtggag	gccaagcctg	gccatgctct	ggtgggcttc	1080
gagatcagca	atgacagcat	gacggtgctg	aaggtgtatg	aagcaaagct	gaagcagaac	1140
taccaggtgg	acaaggacag	cctctccgag	tgatctatg	gagacatgga	caagctgctc	1200
tgcccagatc	aatcagagaa	gatctactac	accaacaaca	tcgtctttcc	aaatgaatat	1260
gtcatcacca	agatcgactt	caccaagaag	atgaaaacct	tgagatatga	agtcaccgccc	1320
aacagctatg	attcttcaac	tggagagatc	gacctcaaca	agaagaaggt	ggagagcagc	1380

aaggcagagt acaggacgct ctccgccaac aatgatggcg tctacatgcc gctcggcgtc 1440
atctcagaaa ctttcttgac gcccatcaat ggcttoggcc tccaagctga tgagaacagc 1500
aggetcatca ccctcacctg caagagctac ctcaaggagc tgctgctggc caccgacctc 1560
tccaacaagg aaacaaagct gattgttcct ccaaacagct tcatcagcaa catcgtggag 1620
aatggaagca ttgaagaagg ccacctagag ccatggaagg ccaacaacaa gaatgcatat 1680
gtggaccaca ccggcggcgt caatggcacc aaggcgctct atgttcatga agatggagga 1740
gtttcacagt tcatgggaga caagctgaag ccaaaaacag aatatgtcat ccagtacacc 1800
gtcaagggca agccaagcat ccacctcaag gatgagaaca ccggctacat cctctacgag 1860
gacaccaaca atgattttaga agatttccaa accatcacca agaggttcac cactggaaca 1920
gatctgatga ggggttacct catcctcaag agccaaagtg gtcataagc atggggagac 1980
aacttcacca tcctggagat caagccagca gaagctctgg tgcgcccgga gctcatcaac 2040
cccaacagct ggataacaac acaaggagct tcaatttctg gtgacaagct cttcatctcc 2100
cttggaaaca atggcacctt ccgcccagaac ctctccctca acagctacag cacctacagc 2160
atcagcttca ccgctcagg ccccttcaat gtcaccgtca ggaacagcag ggaggtgctg 2220
tatgaaagga acaacttgat gagcagcacc agccacatct ctggagagtt caagacagaa 2280
agcaacaaca ccggcctcta tgtggagctc tcaagaagaa gcggcggcgc cggccacatc 2340
agcttcgaga acatctccat caag 2364

<210> 18

<211> 2364

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность, кодирующая АХМІ-184

<400> 18

atgaacaaga acaacacca gctctccgcg cgcgcgctgc catccttcat cgactacttc 60
aatggcatct atggcttgc caccggcatc aaggacatca tgaacatgat cttcaagaca 120
gacactggag gagatctac cttggatgag atcctcaaga accagcagct gctgaatgac 180
atctcagggg agctggatgg cgtcaatgga agcctcaatg atctcattgc tcaaggaaac 240
ctcaacacag agctctccaa ggagatcctc aagattgcaa atgagcagaa ccaggtgctg 300
aatgatgtca acaacaagct ggatgccatc aacaccatgc tgcattgcta cctccccaag 360
atcacctcaa tgctctctga tgtgatgaag ccaaattatg ctctctccat gcaaattgag 420
tacctctcaa ggcagctgca agagatctcc gacaagctgg acatcatcaa tgtcaatggt 480
ctcatcaaca gcaccttgac agagatcacg ccggcctacc aatggatcaa atagtcaat 540
gagaagttg aggagctcac cttcggcaca gaaacaacat tgaaggtgaa gaatgattca 600
gcttctgctg acatcctgga tgagctgaca gagctgacag agctggccaa gagcgtcacc 660
aagaatgatg ttgatggcct cgagttctac ctcaacacct tccatgatgt gatggggggc 720
aacaacctct ttggaagaag caccctcacc acagcttcag agctgatcgc caaggaaaat 780
gtcaagacat ctggatcaga ggttggaat gtctacaact tcttggtggt gctgacggcg 840
ctgcaagcaa aggccttcc caccctcacc acctgcccga agctgctggg cctcggccgac 900
atcgactaca cctcaatcat gaatgagcac ctcaacaagg agaaggagga gttcagagtg 960
aacatcctcc ccatcctctc caacaccttc agcaacccca actatgcca ggtgaagggc 1020
tcagatgaag atgccaagat gattgtggag gccaaagcct gccatgctct ggtgggcttc 1080
gagatcagca atgacagcat gacagtgctg aaggtttatg aagcaaagct gaagcagaac 1140
taccaggtgg acaaggacag cctctcagag gtgatctatg gagacatgga caagctgctc 1200
tgcccagatc aatcagagaa gatctactac accaacaaca tcgtttttcc aatgaatat 1260
gtcatcacca agatcgactt caccaagaag atgaaaacat tgagatatga agtcaccgcc 1320
aacagctatg attcttcaac tggagagatc gacctcaaca agaagaaggt ggagagcagc 1380
aaggcagagt acaggacgct ctccgccaac aatgatggcg tctacatgcc gctcggcgtc 1440
atctcagaaa ctttcttgac gcccatcaat ggcttoggcc tccaagctga tgaaaacagc 1500
aggctcatca ccctcacctg caagagctac ttgagggagc tgctgctggc caccgacctc 1560
tccaacaagg aaacaaagct gattgttcct ccaaacagct tcatcagcaa cattgtggag 1620
aatggaagca ttgaagaagg ccacctagag ccatggaagg ccaacaacaa gaatgcatat 1680
gttgatcaca ccggcggcgt caatggcacc aaggcgctct atgttcatga agatggagga 1740
gtttcacagt tcatgggaga caagctgaag ccaaaaacag aatatgtcat ccagtacacc 1800
gtcaagggca agccaagcat ccacctcaag gatgagaaca ctggctacat cctctatgag 1860
gacaccaaca atgattttaga agatttccaa accatcacca agaggttcac cactggaaca 1920
gatctgatga ggggttacct catcctcaag agccaaagtg gtcataagc atggggagac 1980
aacttcacca tcctggagat caagccagca gaagctctgg tgcgcccgga gctcatcaac 2040
cccaacagct ggataacaac acaaggagct tcaatttctg gtgacaagct cttcatctcc 2100

cttgaacaa atggcacctt cgcgcaaac ctctccctca acagctacag cacctacagc 2160
 atcagcttca ccgcctcagg acccttcaat gtcaccgtca ggaacagcag ggaggtgctg 2220
 tatgaaagga acaacttgat gagcagcacc agccacatct ctggagagtt caagacagaa 2280
 agcaacaaca ccggcctcta tgtggagctc tcaagaagaa gcggcggcgc cggccacatc 2340
 agcttcgaga acatctccat caag 2364

<210> 19
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> пептид, направляющий в эндоплазматический ретикулум

<400> 19
 Lys Asp Glu Leu
 1

<210> 20
 <211> 41
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> олигонуклеотидный праймер для замены домена

<400> 20 41
 aacaccggcg gcgtcaatgg aacaagggcg ctcttcaccs a

<210> 21
 <211> 41
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> олигонуклеотидный праймер для замены домена

<400> 21 41
 tgggtgaaga gcgccccttgt tccattgacg ccgcccgtgt t

<210> 22
 <211> 55
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> олигонуклеотидный праймер для замены домена

<400> 22 55
 gccccgagct catcaatgtc aacaactgga tcagaactgg caccacctac atcac

<210> 23
 <211> 55
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> олигонуклеотидный праймер для замены домена

<400> 23 55
 gtgatgtagg tggtgccagt tctgatccag ttgttgacat tgatgagctc cgggc

<210> 24
 <211> 50
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> олигонуклеотидный праймер для замены домена

<400> 24 50
 atgattggga gaggttcgga agcaccsaca tcagcggcaa tgagctgagg

<210> 25
 <211> 50
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> олигонуклеотидный праймер для замены домена

<400> 25 50
 cctcagctca ttgccgctga tgtgggtgct tccgaacctc tcccaatcat

<210> 26
 <211> 55
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> олигонуклеотидный праймер для замены домена

<400> 26 55
 ctacatcacc ggsaatacct tgacgctcta csaaggagga ggaggctact tccgc

<210> 27
 <211> 55
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> олигонуклеотидный праймер для замены домена

<400> 27 55
 gcggaagtag cctcctcctc cttggtagag cgtcaaggta ttgccggtga tgtag

<210> 28
 <211> 57
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> олигонуклеотидный праймер для замены домена

<400> 28 57
 cgsacgstac agsacstaca gggtagaactt ctccgtcacc ggctgggcca aggtgat

<210> 29
 <211> 57
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> олигонуклеотидный праймер для замены домена

<400> 29
atcaccttgg cccagccggt gacggagaag ttcaccctgt aggtgctgta gctgtcgc 57

<210> 30
<211> 47
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> олигонуклеотидный праймер для замены домена

<400> 30
gcttcagcgg cctcagcgc aatgtgagga tcagaacag ccgcggc 47

<210> 31
<211> 47
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> олигонуклеотидный праймер для замены домена

<400> 31
gcccggcgtg tttctgatcc tcacattggc gtcgagggccg ctgaagc 47

<210> 32
<211> 59
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> олигонуклеотидный праймер для замены домена

<400> 32
gtgaagaaca gcccagcggg gctcttcgag aagagatasa tgaatggaag cagctatga 59

<210> 33
<211> 59
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> олигонуклеотидный праймер для замены домена

<400> 33
tcatagctgc ttccattcat gtatctcttc tcgaagagca cctcgcgggt gttcttcac 59

<210> 34
<211> 54
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> олигонуклеотидный праймер для замены домена

<400> 34
ttcgaagaag tgaagaacag ccgcgccaag gatgtttcag agagcttcac cacc 54

<210> 35
<211> 54
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> олигонуклеотидный праймер для замены домена

<400> 35
gggtggtgaag ctctctgaaa catccttggc gccgctgttc ttcaccttct cga 54

<210> 36
<211> 53
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> олигонуклеотидный праймер для замены домена

<400> 36
gcttcttcat cgaactcagc caaggsaaca acctctatag cagcaccttc cac 53

<210> 37
<211> 53
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> олигонуклеотидный праймер для замены домена

<400> 37
gtggaaggtg ctgctataga ggttggtgsc ttggctgagc tccgatgaaga agc 53

<210> 38
<211> 51
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> олигонуклеотидный праймер для замены домена

<400> 38
gaagsaagcc gctctatggt cacaaggatg gaggcttcag ccagttcatc g 51

<210> 39
<211> 51
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> олигонуклеотидный праймер для замены домена

<400> 39
cgaatgaactg gctgaagcct ccacccctgt gaacatagag cgccttgctt c 51

<210> 40
<211> 50
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> олигонуклеотидный праймер для замены домена

<400> 40
ccgcccagag gacagggagg ccgctggtga agttcagaga catcagcatc 50

<210> 41
<211> 50
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> олигонуклеотидный праймер для замены домена

<400> 41 50
 gatgctgatg tctctgaact tcaccagcgg ccctcctgtc ctctcggcgg

<210> 42
 <211> 48
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> олигонуклеотидный праймер для замены домена

<400> 42 48
 agcaccttcc acagcttcaa tgatgtgagc atcaagtaag gcgcgscg

<210> 43
 <211> 48
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> олигонуклеотидный праймер для замены домена

<400> 43 48
 cggcgcgcct tacttgatgc tcacatcatt gaagctgtgg aaggtgct

<210> 44
 <211> 49
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> олигонуклеотидный праймер для замены домена

<400> 44 49
 cgsaaagsta aagsssaaga sagaatatgt catccagtac accgtcaag

<210> 45
 <211> 49
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> олигонуклеотидный праймер для замены домена

<400> 45 49
 cttgacggtg tactggatga catattctgt cttgggcttt agcttgctcg

<210> 46
 <211> 56
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> олигонуклеотидный праймер для замены домена

<400> 46 56
 cctacgagga cassaataac aacaacstgg aggactacca aacaattgct gtgaag

<210> 47
 <211> 56

<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> олигонуклеотидный праймер для замены домена

<400> 47
cttcacagca attgtttggt agtcctccag gttggtgta ttggtgtcct cgtagg 56

<210> 48
<211> 57
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> олигонуклеотидный праймер для замены домена

<400> 48
gaggagtcc aaacaattac saagaggttc ассассггса сaгatttgag ссаgacc 57

<210> 49
<211> 57
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> олигонуклеотидный праймер для замены домена

<400> 49
ggtctggctc aaatctgtgc cggtggtgaa cctcttggtta attgtttggga actcctc 57

<210> 50
<211> 58
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> олигонуклеотидный праймер для замены домена

<400> 50
сacstcagaа асаgatttgа agggcgtcta cctcatcttg ааgаgссaaа atggatat 58

<210> 51
<211> 58
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> олигонуклеотидный праймер для замены домена

<400> 51
atatccattt tggctcttca agatgaggta gacgccttc aaatctgttt ctgaggtg 58

<210> 52
<211> 45
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> олигонуклеотидный праймер для замены домена

<400> 52
tcctggaggc сааgссatca gаgаagctgc tcagсссgga gctca 45

<210> 53
 <211> 45
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> олигонуклеотидный праймер для замены домена

<400> 53 45
 tgagctccgg gctgagcagc ttctctgatg gcttggcctc cagga

<210> 54
 <211> 67
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> олигонуклеотидный праймер для замены домена

<400> 54 60
 atcattsaag aggaggсаас ctсаagsага асtссagct tgacagcttc agсасстасg 60
 асtсag 67

<210> 55
 <211> 67
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> олигонуклеотидный праймер для замены домена

<400> 55 60
 ctgaggctcgt aggtgctgaa gctgtсаags tggaggttct gcttgaggtt gcctcctctt 60
 gaatgat 67

<210> 56
 <211> 70
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> олигонуклеотидный праймер для замены домена

<400> 56 60
 gctatgagga catctcagag atcttcacca cсаagctggg саaggасаас ttctacatcg 60
 agctcaccgc 70

<210> 57
 <211> 70
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> олигонуклеотидный праймер для замены домена

<400> 57 60
 gcggtgagct cgatgtagaa gttgtccttg cccagcttgg tgggгаagat ctctgagatg 60
 tcctcatagc 70

<210> 58
 <211> 69
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> олигонуклеотидный праймер для замены домена

<400> 58

сааgggсааg ссgтсаатсс асстсаагаа тgаgаасасс ggтсатсc асасgаgга 60
 сассаатgg 69

<210> 59

<211> 69

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> олигонуклеотидный праймер для замены домена

<400> 59

сcаттggтgt ссtсgtagtg gatgtagccg gtgttctcat tcttgaggтg gattgacggc 60
 ttgссcttg 69

<210> 60

<211> 76

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> олигонуклеотидный праймер для замены домена

<400> 60

сааgаgссaa аатggаgаtg ааgсатgggg аgасаасcttc ассатсctgg агатctcgct 60
 сttсgаgаса ссагаа 76

<210> 61

<211> 76

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> олигонуклеотидный праймер для замены домена

<400> 61

ttctggтgtc тсgааgаgсg агатctccag gatggтgааg ttgtctcccc атgcttcатс 60
 тсcатттtg ctcttg 76

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, включающая нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

а) нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO:1, 2, 3, 11 или 12 или ее комплемента;

б) нуклеотидной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 96%-ную идентичность последовательности с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:1 или 12, где указанная нуклеотидная последовательность кодирует белок, обладающий инсектицидной активностью, или ее комплемента;

с) нуклеотидной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 90%-ную идентичность последовательности с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:3, где указанная нуклеотидная последовательность кодирует белок, обладающий инсектицидной активностью, или ее комплемента;

д) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид, включающий аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:4, 5, 6, 13 или 14;

е) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид, включающий аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 96%-ую идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:4 или 14, где указанная аминокислотная последовательность обладает инсектицидной активностью;

ф) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид, включающий аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%-ую идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:6, где указанная аминокислотная последовательность обладает инсектицидной активностью; и

г) нуклеотидной последовательности, кодирующей инсектицидный полипептид, который представляет собой вариант SEQ ID NO:4, 5, 6, 13 или 14, где указанный вариант является результатом обмена одного или более доменов SEQ ID NO:4, 5, 6, 13 или 14 с соответствующим доменом(ами) SEQ ID NO:4, 5, 6, 13

или 14.

2. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п.1, где указанная нуклеотидная последовательность представляет собой синтетическую последовательность, которая была разработана для экспрессии в растении.

3. Молекула нуклеиновой кислоты по п.2, где указанная синтетическая последовательность выбрана из любой из SEQ ID NO:15, 16, 17 или 18.

4. Экспрессионная кассета, включающая молекулу нуклеиновой кислоты по п.1.

5. Экспрессионная кассета по п.4, дополнительно содержащая молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гетерологичный полипептид.

6. Растение или бактериальная клетка-хозяин, которые содержат экспрессионную кассету по п.4.

7. Выделенный полипептид с инсектицидной активностью, выбранный из группы, состоящей из:

a) полипептида, включающего аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:4, 5, 6, 13 или 14;

b) полипептида, включающего аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 96%-ую идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:4 или 14, где указанная аминокислотная последовательность обладает инсектицидной активностью;

c) полипептида, включающего аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%-ую идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:6, где указанная аминокислотная последовательность обладает инсектицидной активностью;

d) полипептида, который кодируется любой нуклеотидной последовательностью из SEQ ID NO:1, 2, 3, 11 или 12;

e) полипептида, который кодируется нуклеотидной последовательностью, которая, по меньшей мере, на 96% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1 или 12, где указанный полипептид обладает инсектицидной активностью;

f) полипептида, который кодируется нуклеотидной последовательностью, которая, по меньшей мере, на 90% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:3, где указанный полипептид обладает инсектицидной активностью; и

g) полипептида, который представляет собой вариант SEQ ID NO:4, 5, 6, 13 или 14, где указанный вариант является результатом обмена одного или более доменов SEQ ID NO:4, 5, 6, 13 или 14 с соответствующим доменом(ами) SEQ ID NO:4, 5, 6, 13 или 14, где указанный полипептид обладает инсектицидной активностью.

8. Полипептид по п.7, дополнительно включающий гетерологичные аминокислотные последовательности.

9. Антитело, которое селективно связывается с полипептидом по п.7.

10. Композиция, включающая полипептид по п.7.

11. Композиция по п.10, где указанная композиция выбрана из группы, состоящей из порошка, пылевидного препарата, шарика, гранулы, спрея, эмульсии, коллоида и раствора, и где указанную композицию необязательно приготавливают при помощи сушки, лиофильной сушки, гомогенизации, экстракции, фильтрации, центрифугирования, седиментации или концентрации культуры клеток *Bacillus thuringiensis*.

12. Способ контролирования или уничтожения популяции чешуекрылых или жесткокрылых насекомых-вредителей, включающий приведение указанной популяции в контакт с инсектицидно эффективным количеством полипептида по п.7.

13. Способ продуцирования полипептида с инсектицидной активностью, включающий культивирование клеток-хозяев по п.6 в условиях, при которых экспрессируется молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид.

14. Растение, имеющее стабильно встроенную в свой геном конструкцию ДНК, включающую нуклеотидную последовательность, которая кодирует белок, обладающий инсектицидной активностью, где указанную нуклеотидную последовательность выбирают из группы, состоящей из:

а) нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO:1,

2, 3, 11 или 12;

b) нуклеотидной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 96%-ую идентичность последовательности с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:1 или 12, где указанная нуклеотидная последовательность кодирует белок, обладающий инсектицидной активностью;

c) нуклеотидной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 90%-ую идентичность последовательности с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:3, где указанная нуклеотидная последовательность кодирует белок, обладающий инсектицидной активностью;

d) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид, включающий аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:4, 5, 6, 13 или 14;

e) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид, включающий аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 96%-ую идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:4 или 14, где указанная аминокислотная последовательность обладает инсектицидной активностью;

f) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид, включающий аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%-ую идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:6, где указанная аминокислотная последовательность обладает инсектицидной активностью; и

g) нуклеотидной последовательности, кодирующей инсектицидный полипептид, который представляет собой вариант SEQ ID NO:4, 5, 6, 13 или 14, где указанный вариант является результатом обмена одного или более доменов SEQ ID NO:4, 5, 6, 13 или 14 с соответствующим доменом(ами) SEQ ID NO:4, 5, 6, 13 или 14;

где указанная нуклеотидная последовательность является функционально связанной с промотором, который направляет экспрессию кодирующей последовательности в клетке растения.

15. Растение по п.14, где указанное растение представляет

собой клетку растения.

16. Трансгенное семя растения по п.14, где указанное семя включает нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

а) нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO:1, 2, 3, 11 или 12;

б) нуклеотидной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 96%-ую идентичность последовательности с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:1 или 12, где указанная нуклеотидная последовательность кодирует белок, обладающий инсектицидной активностью;

с) нуклеотидной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 90%-ую идентичность последовательности с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:3, где указанная нуклеотидная последовательность кодирует белок, обладающий инсектицидной активностью;

д) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид, включающий аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:4, 5, 6, 13 или 14;

е) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид, включающий аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 96%-ую идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:4 или 14, где указанная аминокислотная последовательность обладает инсектицидной активностью;

ф) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид, включающий аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%-ую идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:6, где указанная аминокислотная последовательность обладает инсектицидной активностью; и

г) нуклеотидной последовательности, кодирующей инсектицидный полипептид, который представляет собой вариант SEQ ID NO:4, 5, 6, 13 или 14, где указанный вариант является результатом обмена одного или более доменов SEQ ID NO:4, 5, 6, 13 или 14 с соответствующим доменом(ами) SEQ ID NO:4, 5, 6, 13

или 14.

17. Способ защиты растения от насекомого-вредителя, включающий введение в указанное растение или его клетку, по меньшей мере, одного экспрессионного вектора, содержащего нуклеотидную последовательность, которая кодирует инсектицидный полипептид, где указанная нуклеотидная последовательность выбрана из группы, состоящей из:

a) нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO:1, 2, 3, 11 или 12;

b) нуклеотидной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 96%-ую идентичность последовательности с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:1 или 12, где указанная нуклеотидная последовательность кодирует белок, обладающий инсектицидной активностью;

c) нуклеотидной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 90%-ую идентичность последовательности с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:3, где указанная нуклеотидная последовательность кодирует белок, обладающий инсектицидной активностью;

d) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид, включающий аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:4, 5, 6, 13 или 14;

e) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид, включающий аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 96%-ую идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:4 или 14, где указанная аминокислотная последовательность обладает инсектицидной активностью; и

f) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид, включающий аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%-ую идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:6, где указанная аминокислотная последовательность обладает инсектицидной активностью;

g) нуклеотидной последовательности, кодирующей инсектицидный полипептид, который представляет собой вариант

SEQ ID NO:4, 5, 6, 13 или 14, где указанный вариант является результатом обмена одного или более доменов SEQ ID NO:4, 5, 6, 13 или 14 с соответствующим доменом(ами) SEQ ID NO:4, 5, 6, 13 или 14.

18. Выделенная последовательность нуклеиновой кислоты по п.1, полипептид по п.7, растение по п.14, клетка растения по п.15, семя по п.16 или способ по п.17, где указанные один или более доменов выбраны из доменов, охарактеризованных на Фигуре 2.

19. Растение по п.14, клетка растения по п.17, семя растения по п.18 или способ по п.19, где указанное растение выбрано из группы, состоящей из кукурузы, сорго, пшеницы, капусты, подсолнечника, помидора, крестоцветных, перцев, картофеля, хлопка, риса, сои, сахарной свеклы, сахарного тростника, табака, ячменя и масличного рапса.

По доверенности

Optaxmi113 MNMNTKLSRALPSFIDYFNIGYGFATGIKDIMNMI FKTD TGDLTLEILKNQQLLNE 60
 Optaxmi005 MNMNTKLNARALPSFIDYFNIGYGFATGIKDIMNMI FKTD TGDLTLEILKNQQLLNE 60
 Optaxmi115 MNMNTKLNARALPSFIDYFNIGYGFATGIKDIMNMI FKTD TGDLTLEILKNQQLLNE 60
 *****:*****

Optaxmi113 ISGKLDGVNGSLNDLIAQGNLNTSEIKELKIANEQVNLNDVNNKLD AINTMLHIYLPK 120
 Optaxmi005 ISGKLDGVNGSLNDLIAQGNLNTSEIKELKIANEQVNLNDVNNKLD AINTMLHIYLPK 120
 Optaxmi115 ISGKLDGVNGSLNDLIAQGNLNTSEIKELKIANEQVNLNDVNNKLD AINTMLNIYLPK 120
 *****:*****

Optaxmi113 ITSM LSDVMKQNYALS LQIEYLSKQLQEISDKLDI INVNLINSTL TEITPAYQRIKYVN 180
 Optaxmi005 ITSM LSDVMKQNYALS LQIEYLSKQLQEISDKLDI INVNLINSTL TEITPAYQRIKYVN 180
 Optaxmi115 ITSM LSDVMKQNYALS LQIEYLSRQLQEISDKLDVINLNLINSTL TEITPSYQRIKYVN 180
 *****:*****:*****:*****

Optaxmi113 EKFEELTFATETNLKVKK-----DGSPADILDELTELELAKSVTKNDVDGF E FYLNTFH 235
 Optaxmi005 EKFEELTFATETTLKVKK-----DSSPADILDELTELELAKSVTKNDVDGF E FYLNTFH 235
 Optaxmi115 EKFDKLT FATESTLR AKQGF NEDSFDNNTLENLTDLAE LAKSITKNDVDSFE FYLHTFH 240
 *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

Optaxmi113 DVMVGNLFLGRSALKTASELITKENVKTSGSEVGNVYNFLIVLTALQAKAFLTLTTCRKL 295
 Optaxmi005 DVMVGNLFLGRSALKTASELIAKENVKTSGSEVGNVYNFLIVLTALQAKAFLTLTTCRKL 295
 Optaxmi115 DVLIGNLFLGRSALKTASELITKDEIKTSGSEIGKVYSFLIVLTSLQAKAFLTLTTCRKL 300
 *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

Optaxmi113 LGLADIDYTSIMNEHLNKEKEEFRVNI LPTLSNTF SNP NYIKTKGSDEDAEVI IQAEPGH 355
 Optaxmi005 LGLADIDYTSIMNEHLNKEKEEFRVNI LPTLSNTF SNP NYAKVKGSD EDAKMI VEAKPGH 355
 Optaxmi115 LGLSDIDYTSIMNEHLNKEKNEFRDNI LPA LSNKFSNP SYAKTIGSDNYAKVILESEPGY 360
 *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

Optaxmi113 ALVGFEMINDPSPALKVYQAKLT TNYQVDKQSLSETVYGDMDKLLCPDKSQMYYLHNIT 415
 Optaxmi005 ALVGFEMSNDSITVLKVYEA K LKQNYQVDKDSLSEVIYGDMDKLLCPDQSEIYYTNNIV 415
 Optaxmi115 ALVGF EI INDP I PV LKAYKAKLQNYQVDNQSLS EIVYLDIDK LFCPENSEQY YTKNLT 420
 *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

Optaxmi113 FPNEYVITEIIFTKKNSLR YEVIANYEFSSGDI DLNKKLVKS--SEA EYSTLSVSN D- 472
 Optaxmi005 FPNEYVITKIDFTKMKTLRYEVTANSYDSSTGEIDLNKKKVES--SEA EYRTLSAKDD- 472
 Optaxmi115 FPDGYVITKITFEKLNLI YEATANFYDPSTGDI DLNKKQVESTFPQTDYITMDIGDDD 480
 *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

Optaxmi113 AIYMP LGVISEFTLPIKGFGLTVDESSRLVTLTCKSYLREILLATDLSNKATKLI VPPN 532
 Optaxmi005 GVYMP LGVISEFTLPIKGFGLTVDESSRLVTLTCKSYLRELLLATDLSNKETKLI VPPS 532
 Optaxmi115 GIYMP LGVISEFTLPIKGFGLTVDESSRLVTLTCKSYLREYLLS DLKNKETGLIAPPN 540
 *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

Optaxmi113 GFISNLVENGDI EADNIEPWKGNKNKAYVDHTGGVNGTKALY TQDDGEFSQFIGDKLKS 592
 Optaxmi005 GFISNIVENG NLEGENLEPWIANKNKAYVDHTGGVNGTRALYVHKDGGFSQFIGDKLKP 592
 Optaxmi115 VFISNVVKNWDIEEDSLEPWVANNKAYVDNTGGIERSKALFTQDGEFSQFIGDKLKP 600
 *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

Optaxmi113 TEYIIQYTVKGNTSIY LKDKKNENVIYEDKNNNLEAFQITIKRFTTELDSSDVYL VFKCK 652
 Optaxmi005 TEYVIQYTVKGKPSIHLKNENTGYIHYEDTNNNLEDYQITIKRFTTGTDLKG VYLILKSQ 652
 Optaxmi115 TDYIIQYTVKGKPAIYLKNKSTGYITIEDTNGNSEEFQTI AVKFTSETDLSQTHLVFKSQ 660
 *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

Optaxmi113 NGYKAWGDNFLITEIRPKE-VVSPelikVENWIGMGGSNHVNPDSLLLFTGGRSILKQNL 711
Optaxmi005 NGDEAWGDNFTILEISPSEKLLSPELINVNNWIRTG-STHISGNTLTLYQGGGNLQNL 711
Optaxmi115 NGYEAUGDNFIILEAKLFETPESPELIKFNWERFG-TTYITGNELRIDHSRGGYFRQSL 719
** :***** * * * *****:.* * :.:. : * : . . :.*

Optaxmi113 QLDSYSTYRVRFSLMVGKAKVIIRNSS-EVLFESYVNDSEGVLEGVSETFTTKSIQDN 770
Optaxmi005 QLDSFSTYRVNFS--VTGDANVRIRNSR-EVLFEKRYMSG---AKDVSEIFTTKLGKDN 764
Optaxmi115 NIDSYSTYDLSFS-FSGLWAKVIVKNSRGVVLFEKVKNNSS--YEDISESFTTASNKDG 776
:.*:*** : ** *.* :.* ***** .. :.* ** :*

Optaxmi113 FYVELSNEGTFGSKDVAYFYNFSIR---- 795
Optaxmi005 FYIELSQGNNLYGGPLVKFNDVSIK---- 789
Optaxmi115 FFIELTAER--TSSTPHSFRDISIKEIE 803
*.:** : . . * :.*: ←

ФИГ.1В

ΦΠΓ.2

	(1)	1	10	20	30	40	50	60	70	80		
axmi005	(1)	MNNHNTKLNARALPSYIDYFNGIYGFATGIRKINHHIIRKTDTCGNLTLDEILENQQLLNEISGKLDGVNGSLNDLTAQGNLNTLSKEI										
axmi115	(1)	MNNHNTKLNARALPSYIDYFNGIYGFATGIRKINHHIIRKTDTCGNLTLDEILENQQLLNEISGKLDGVNGSLNDLTAQGNLNTLSKEI										
		(90)	90	100	110	120	130	140	150	178		
axmi005	(90)	LKIANEQNGVINDVNNKLDALNTHLNHLVLPKITSMLSDVHKQNYALSGLQIEVLSRGLQEISDKLDHINHHYLNSTLLETTPAYORIKY										
axmi115	(90)	LKIANEQNGVINDVNNKLDALNTHLNHLVLPKITSMLSDVHKQNYALSGLQIEVLSRGLQEISDKLDHINHHYLNSTLLETTPAYORIKY										
		(179)	179	180	200	210	220	230	240	250	267	
axmi005	(179)	VNEKFEELTFATELTKVKK-----DSSPADILDELTELELAKSITKNDVDCFEFYLNTHFDVHGGNLFGRSALRTASELTAKENYK										
axmi115	(179)	VNEKFEELTFATELTKVKK-----DSSPADILDELTELELAKSITKNDVDCFEFYLNTHFDVHGGNLFGRSALRTASELTAKENYK										
		(269)	269	280	290	300	310	320	330	340	356	
axmi005	(269)	TSGSENGHVYVNFLLVLTALQAKAFLTLTTCRKLGLSDIDYTSINNEHLNKEKESFRVNHLPFLSNTFSNPNYAKYKGSDEDAKNIVEK										
axmi115	(269)	TSGSENGHVYVNFLLVLTALQAKAFLTLTTCRKLGLSDIDYTSINNEHLNKEKESFRVNHLPFLSNTFSNPNYAKYKGSDEDAKNIVEK										
		(357)	357	370	380	390	400	410	420	430	446	
axmi005	(357)	KPCHALVGFERNSDSITVLEKVEAKLKQNYQVDKDSLSEVEYGDIDKLLCPDUSEQIYYINHHVFPNEYVITKIDFTEKHKTLRYEVTI										
axmi115	(357)	KPCHALVGFERNSDSITVLEKVEAKLKQNYQVDKDSLSEVEYGDIDKLLCPDUSEQIYYINHHVFPNEYVITKIDFTEKHKTLRYEVTI										
		(446)	446	460	470	480	490	500	510	520	534	
axmi005	(446)	NSYDSSYQIDLNKKKVES--SEAEYRTISA-KDDGVYHPLOWISHTFLTPINGFGLQADENSRLTLTKCYLRELLIATDLSNKETK										
axmi115	(446)	NSYDSSYQIDLNKKKVES--SEAEYRTISA-KDDGVYHPLOWISHTFLTPINGFGLQADENSRLTLTKCYLRELLIATDLSNKETK										
		(535)	535	540	550	560	570	580	590	600	610	622
axmi005	(535)	LIVPPSGFISDVEVNGNLEGENLEPVIANNKMAVVDHTGVNCTALVYHKDGGFSQFIGDLEKTEYVQYTVKGRHVIHLKNENTG										
axmi115	(535)	LIVPPSGFISDVEVNGNLEGENLEPVIANNKMAVVDHTGVNCTALVYHKDGGFSQFIGDLEKTEYVQYTVKGRHVIHLKNENTG										
		(624)	624	630	640	650	660	670	680	690	700	712
axmi005	(624)	YIHFERTHNNLENYITTKRFFITGFRKGVYLLKSONGDEAUGDNFTILEISFSEKLEPELINVNNVIRTESHISNNTLTYQGGG										
axmi115	(624)	YIHFERTHNNLENYITTKRFFITGFRKGVYLLKSONGDEAUGDNFTILEISFSEKLEPELINVNNVIRTESHISNNTLTYQGGG										
		(713)	713	720	730	740	750	760	770	780	790	804
axmi005	(713)	GNLKNLGNSSSTYRNNYSVTC-DANVRNHSI-EVLFKRYNCG--AKVYRIFFTKLGKDNFIIELGCGNLYGGLVHFNDVSIK										
axmi115	(713)	GNLKNLGNSSSTYRNNYSVTC-DANVRNHSI-EVLFKRYNCG--AKVYRIFFTKLGKDNFIIELGCGNLYGGLVHFNDVSIK										
		(802)	802	805								
axmi005	(802)	-----										
axmi115	(802)	EKIE										

3/3