



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.04.28

(21) Номер заявки
201071323

(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) ИНСЕКТИЦИДНЫЙ ПОЛИПЕПТИД АХМИ-115 ДЕЛЬТА-ЭНДОТОКСИНА И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

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

(32) 2008.07.02; 2009.03.10

(33) US

(43) 2011.06.30

(86) PCT/US2009/049527

(87) WO 2010/003065 2010.01.07

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
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)

(56) US-B1-6570005
LIU J. ET AL.: "Identification of vip3A-type genes from Bacillus thuringiensis strains and characterization of a novel vip3A-type gene" LETTERS IN APPLIED MICROBIOLOGY, vol. 45, no. 4, October 2007 (2007-10), pages 432-438, XP002558332 ISSN: 0266-8254, page 435, column

1, paragraph 3 - column 2, last paragraph & DATABASE UniProt [Online] 13 November 2007 (2007-11-13), "SubName: Full=Insecticidal protein Vip3A"; retrieved from EBI accession no. UNIPROT:A8CQI3 Database accession no. A8CQI3 & DATABASE EMBL [Online] 1 October 2007 (2007-10-01), "Bacillus thuringiensis isolate BtAL insecticidal protein Vip3A (vip3A) gene, complete cds." retrieved from EBI accession no. EMBL:DQ241674 Database accession no. DQ241674 WO-A1-03080656

ESTRUCH J.J. ET AL.: "VIP3A, A NOVEL BACILLUS THURINGIENSIS VEGETATIVE INSECTICIDAL PROTEIN WITH A WIDE SPECTRUM OF ACTIVITIES AGAINST LEPIDOPTERAN INSECTS" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, US, vol. 93, 1 May 1996 (1996-05-01), pages 5389-5394, XP002071759 ISSN: 0027-8424 the whole document

LEE M.K. ET AL.: "The mode of action of the Bacillus thuringiensis vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab [delta]-endotoxin" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 69, no. 8, 1 August 2003 (2003-08-01), pages 4648-4657, XP002536190 ISSN: 0099-2240 the whole document

(57) Изобретение относится к инсектицидному полипептиду АХМИ-115 дельта-эндотоксина и кодирующей его нуклеиновой кислоте; экспрессионной кассете, включающей заявленную нуклеиновую кислоту; клетке-хозяину, содержащей заявленную экспрессионную кассету; растительной клетке, растению и его семени, включающим нуклеотидную последовательность, кодирующую заявленный полипептид. Изобретение также относится к антителу, специфичному к заявленному полипептиду; инсектицидной композиции, включающей заявленный полипептид. Также изобретение относится к способу получения заявленного полипептида, способу контроля или уничтожения популяции чешуекрылых или жесткокрылых насекомых-вредителей посредством заявленного полипептида, а также способу защиты растения от чешуекрылых или жесткокрылых насекомых-вредителей посредством экспрессионного вектора, кодирующего заявленный полипептид.

Область техники

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 организмами. 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 Nematelminthes, Platyhelminthes и Sarcomastigophora (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%-й 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 пищеварительном тракте насекомого до активной токсичной молекулы (Hofte 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 α -спиралей и вовлечен в мембранное встраивание и формирование поры. Домен II состоит из трех β -листов, образующих конфигурацию "греческого ключа", а домен III состоит из двух антипараллельных β -листов в форме "рулета с джемом" (de Maagd et al., 2001, выше). Домены II и III вовлечены в распознавание рецепторов и связывание, 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 ("A/B") токсинов. Токсины A/B, такие как VIP, C2, CDT, CST или токсины B. anthracis, вызывающие отек и гибель, первоначально взаимодействуют с клетками-мишенями посредством специфического, рецептор-опосредованного связывания B-компонентов в виде мономеров. Эти мономеры затем образуют гомогептамеры. Комплекс гептамер B-рецептор затем действует в качестве причальной платформы, которая впоследствии связывает и обеспечивает транслокацию ферментативного A-компонента(ов) в цитозоль посредством рецептор-обусловленного эндоцитоза. Оказавшись в цитозоле клетки, A-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 устойчи-

ности к полевым популяциям капустной моли, *Plutella xylostella* (Ferre 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.

Настоящее изобретение относится к выделенной или рекомбинантной молекуле нуклеиновой кислоты, которая включает нуклеотидную последовательность, кодирующую инсектицидный полипептид AXMI-115 дельта-эндотоксина, выбранную из

- a) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 3 или комплементарной ей последовательности;
- b) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 3 или комплементарной ей последовательности;
- c) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6;
- d) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид с аминокислотной последовательностью, идентичной по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO: 6;
- e) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид с вариантной аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6, образованной путем обмена одного или более доменов последовательностей SEQ ID NO: 4, 5, 13 или 14 с соответствующим доменом(ами) последовательности SEQ ID NO: 6, где указанные домены выбраны из доменов, обозначенных на фиг. 2; и
- f) нуклеотидной последовательности, способной гибридизоваться с нуклеотидной последовательностью, комплементарной последовательности по п.б) в жестких условиях, которые включают гибридизацию в 50% формамиде, 1M NaCl, 1% SDS при 37°C и промывку в 0,1×SSC при 60-65°C.

В одном из вариантов осуществления изобретения указанная нуклеотидная последовательность функционально связана с промотором, управляющим экспрессией нуклеотидной последовательности в клетке растения, в частности, указанная нуклеотидная последовательность представляет собой синтетическую последовательность, разработанную для экспрессии в растении.

В следующем варианте осуществления изобретения указанная нуклеотидная последовательность выбрана из SEQ ID NO: 15 или 16.

Настоящее изобретение также относится к экспрессионной кассете, включающей молекулу нуклеиновой кислоты по изобретению.

В одном из вариантов осуществления изобретения экспрессионная кассета дополнительно содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гетерологичный полипептид.

Настоящее изобретение также относится к бактериальной клетке-хозяину, содержащей экспрессионную кассету по изобретению.

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к выделенному полипептиду AXMI-115 дельта-эндотоксина с инсектицидной активностью, выбранному из

- a) полипептида с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6;
- b) полипептида с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 6;
- c) полипептида, который кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 3;
- d) полипептида, который кодируется нуклеотидной последовательностью, идентичной по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO: 3; и
- e) полипептида с вариантной аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6, образованной путем обмена одного или более доменов последовательностей SEQ ID NO: 4, 5, 13 или 14 с соответствующим доменом(ами) последовательности SEQ ID NO: 6, где указанные домены выбраны из доменов, обозначенных на фиг. 2.

Настоящее изобретение также относится к антителу, которое селективно связывается с полипептидом по изобретению.

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к инсектицидной композиции, включающей полипептид по изобретению, в частности к композиции, выполненной в форме порошка, присыпки, пеллеты, гранулы, спрея, эмульсии, коллоида или раствора.

Настоящее изобретение относится также к способу контроля или уничтожения популяции чешуекрылых или жесткокрылых насекомых-вредителей, включающему приведение указанной популяции в контакт с инсектицидно эффективным количеством полипептида по п.8, где указанное инсектицидно эффективное количество способно вызвать гибель по меньшей мере одного чешуекрылого или жесткокрылого насекомого-вредителя или способно заметно замедлить рост, питание или нормальное физиологическое развитие чешуекрылого или жесткокрылого насекомого-вредителя.

В одном из вариантов осуществления способ получения полипептида с инсектицидной активностью включает культивирование клетки-хозяина в условиях, при которых экспрессируется молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид с инсектицидной активностью.

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к растению или растительной клетке, содержащей стабильно встроенную в свой геном конструкцию ДНК, которая включает нуклеотидную последовательность, кодирующую инсектицидный полипептид, выбранную из

- a) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 3 или комплементарной ей последовательности;
- b) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 3, или комплементарной ей последовательности;
- c) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6;
- d) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид с аминокислотной последовательностью, идентичной по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO: 6;
- e) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид с вариантной аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6, образованной путем обмена одного или более доменов последовательностей SEQ ID NO: 4, 5, 13 или 14 с соответствующим доменом(ами) последовательности SEQ ID NO: 6, где указанные домены выбраны из доменов, обозначенных на фиг. 2; и
- f) нуклеотидной последовательности, способной гибридизоваться с нуклеотидной последовательностью, комплементарной последовательности по п.b) в жестких условиях, которые включают гибридизацию в 50% формамиде, 1M NaCl, 1% SDS при 37°C и промывку в 0,1×SSC при 60-65°C; где указанная нуклеотидная последовательность функционально связана с промотором, управляющим ее экспрессией в клетке растения.

В одном из вариантов осуществления изобретения трансгенное семя растения включает нуклеотидную последовательность, кодирующую инсектицидный полипептид, выбранную из

- a) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 3 или комплементарной ей последовательности;
- b) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 3, или комплементарной ей последовательности;
- c) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6;
- d) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид с аминокислотной последовательностью, идентичной по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO: 6;
- e) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид с вариантной аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6, образованной путем обмена одного или более доменов последовательностей SEQ ID NO: 4, 5, 13 или 14 с соответствующим доменом(ами) последовательности SEQ ID NO: 6, где указанные домены выбраны из доменов, обозначенных на фиг. 2; и
- f) нуклеотидной последовательности, способной гибридизоваться с нуклеотидной последовательностью, комплементарной последовательности по п.b) в жестких условиях, которые включают гибридизацию в 50% формамиде, 1M NaCl, 1% SDS при 37°C и промывку в 0,1×SSC при 60-65°C.

Указанное растение выбирают из кукурузы, сорго, пшеницы, капусты, подсолнечника, помидора, крестоцветных, перцев, картофеля, хлопка, риса, сои, сахарной свеклы, сахарного тростника, табака, ячменя и масличного рапса.

Настоящее изобретение также относится к способу защиты растения от чешуекрылых и жесткокрылых насекомых-вредителей, включающему введение в указанное растение или его клетку по меньшей мере одного экспрессионного вектора, который содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую инсектицидный полипептид, выбранную из

- a) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 3 или комплементарной ей последовательности;
- b) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 3, или комплементарной ей последовательности;
- c) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6;
- d) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид с аминокислотной последовательностью, идентичной по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO: 6;
- e) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид с вариантной аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6, образованной путем обмена одного или более доменов последовательностей SEQ ID NO: 4, 5, 13 или 14 с соответствующим доменом(ами) последовательности SEQ ID

NO: 6, где указанные домены выбраны из доменов, обозначенных на фиг. 2; и

f) нуклеотидной последовательности, способной гибридизоваться с нуклеотидной последовательностью, комплементарной последовательности по п.б) в жестких условиях, которые включают гибридизацию в 50% формамиде, 1M NaCl, 1% SDS при 37°C и промывку в 0,1×SSC при 60-65°C.

В одном из вариантов осуществления способа указанное растение выбирают из кукурузы, сорго, пшеницы, капусты, подсолнечника, помидора, крестоцветных, перцев, картофеля, хлопка, риса, сои, сахарной свеклы, сахарного тростника, табака, ячменя и масличного рапса.

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

Фиг. 2 показывает домены в пределах AXMI-005 и AXMI-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, табл. 2 и фиг. 2. Белки находят применение при контроле 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, выведенные 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 (т.е. 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, Czaplak and Lang (1990) *J. Econ. Entomol.* 83:2480-2485; Andrews et al. (1988) *Biochem. J.* 252:199-206; Marrone et al. (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293 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 или 65%-ной идентичностью последовательности, приблизительно 70 или 75%-ной идентичностью последовательности, приблизительно 80 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 (т.е. 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 87:22 64, 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-эндотоксинподобным 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 (1910) 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 nws-gapdna.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 молекулы нуклеиновых кислот. "Варианты" нуклеотидных последовательностей, кодирующих дельта-эндотоксин, включают те последовательности, которые кодируют белки дельта-эндотоксина, раскрытые здесь, но которые умеренно отличаются из-за вырожденно-

сти 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, т.е. они продолжают обладать желательной биологической активностью нативного белка, т.е. 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, Czaplak and Lang (1990) *J. Econ. Entomol.* 83: 2480-2485; Andrews et al. (1988) *Biochem. J.* 252:199-206; Marrone et al. (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293 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, варианты 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 варианты 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), β -разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). В большинстве случаев дельта-эндотоксина 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 α -спиралей и принимает участие в интеграции в мембрану и формирование поры. Домен II состоит из трех β -листов, устроенных в конфигурации греческого ключа, а домен III состоит из двух антипараллельных β -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 известным последовательностям 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 известным последовательностям 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 актив-

ность 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-вых или геномных библиотек. Способы конструирования таких кДНК-вых 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 по меньшей мере с 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-эндотоксинподобными 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 высеянных 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 1,5М ионов Na, типично, приблизительно от 0,01 до 1М 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, 1М NaCl, 1% SDS (натрий додецилсульфат) при 37°C и промывку в 1X-2X SSC (20X SSC = 3,0 NaCl/0,3М тринатриевая соль лимонной кислоты) при температуре от 50 до 55°C. Типичные умеренно жесткие условия включают гибридизацию в 40-45% формамиде, 1,0М 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, 1,0М NaCl, 1% SDS при 37°C и промывку в 0,1X SSC при 60-65°C. Необязательно, отмывочные буферы могут вклю-

часть от около 0,1 до около 1% SDS. Продолжительность гибридизации, как правило, составляет менее чем приблизительно 24 ч, обычно от около 4 до около 12 ч.

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: $T_m = 81,5^\circ\text{C} + 16,6(\log M) + 0,41(\% \text{ GC}) - 0,61(\% \text{ форм}) - 500/L$; 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 $\geq 90\%$ -й 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, 5, 6, 13 или 14. Также предоставлены его фрагменты, биологически активные части и варианты, и их можно использовать 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, 5, 6, 13 или 14, и проявляющие инсектицидную активность. Биологически активная часть белка дельта-эндотоксина может представлять собой полипептид, т.е. 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, Czaplá and Lang (1990) *J. Econ. Entomol.* 83:2480-2485; Andrews et al. (1988) *Biochem. J.* 252:199-206; Marrone et al. (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293 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, 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, 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 компонентами, при жестких условиях. Варианты включают полипептиды, которые отличаются по аминокислотной последовательности вследствие мутагенеза. Различные белки, охваченные настоящим изобретением, являются биологически активными, т.е. они продолжают обладать желательной биологической активностью нативного белка, т.е. сохраняют инсектицидную активность. Способы определения инсектицидной активности известны в данной области. См., например, Czaplá and Lang (1990) *J. Econ. Entomol.* 83:2480-2485; Andrews et al. (1988) *Biochem. J.* 252:199-206; Marrone et al. (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293 и патент США № 5743477, каждая из которых включена здесь в качестве ссылки в полном объеме.

Бактериальные гены, такие как гены АХМІ 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 АТG. 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, а 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 № 4196265).

Измененные или улучшенные варианты.

Общепризнано, 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, 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 выполнить 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 методов, 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 выделитель 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 аминокислотном 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.

Вариантные 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; Cramer et al. (1997) *Nature Biotech.* 15:436-438; Moore et al. (1997) *J. Mol. Biol.* 272:336-347; Zhang et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4504-4509; Cramer et al. (1998) *Nature* 391 :288-291 и патенты США №№ 5605793 и 5837458.

Обмен или перестановка доменов представляет другой механизм образования измененных белков дельта-эндотоксина. Домены II и III могут быть обменены 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 *cis*-, так и в *trans*-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 непо-

средственную 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 (т.е. промотор) в направлении транскрипции 5'-3', последовательность ДНК по изобретению и область терминации трансляции и транскрипции (т.е. 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 котором 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 (т.е. 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-хозяине. 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 предназначается 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 экзо-

генные 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 функций 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 плаزمида 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, ЕНА101, ЕНА105 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 каллуса, или ткани, или группы клеток. Способность уничтожать нетрансформированные клетки и предоставлять возможность трансформированным клеткам пролиферировать приводит к образованию транс-

формированных 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, т.е. 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), *Lec1*-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 трансгена при помощи тканепредпочтительной 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 фенотипическую особенность. Можно вырастить два или более поколения, чтобы гарантировать, что экспрессия желательной фенотипической особенности устойчиво поддерживается и наследуется, и затем отобрать собранное, чтобы гарантировать, что экспрессия желательной фенотипической особенности была достигнута. Таким образом, настоящее изобретение представляет 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, меченым радиоактивным изотопом ³²P 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 является критическим в отношении этого изобретения. Способы, известные или описанные в данной области, такие как *Agrobacterium*-обусловленная трансформация, биолистная трансформация, и способы, отличные от частицеобусловленных, 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, бромоксинил или имидазолинон, могут найти специфическое применение. О таких генах сообщали Stalker et al. (1985) *J. Biol. Chem.* 263:6310-6314 (нитрилазный ген устойчивости к бромоксинилу) и Sathasivan et al. (1990) *Nucl. Acids Res.* 18:2188 (ген устойчивости к имидазолинону AHAS). 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, ананас, макадамии, миндаль, овес, овощи, декоративные растения и хвойные.

Овощи включают, но не ограничиваясь ими, томаты, салат, зеленую фасоль, лимскую фасоль, горох, и представителей рода *Cucumis*, 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, т.е. нелизированные, 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 об-

рабатывают 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 одновременно дозировать целевой участок после однократного нанесения состава. Они также могут являться селективными гербицидами, химическими инсектицидами, противовирусными препаратами, противомикробными средствами, противомембранными 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, присыпки, пеллеты, 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 мас. %.

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, веще-

ства 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 адьювантом и приготовлены различными способами, например путем гомогенного смешивания, перемешивания и/или перемальвания инсектицидной композиции с подходящими адьювантами, 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 Gyrimoidea, 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 Gyrimoidea включает семейство Gyrimidae. 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 Cyclorhapha. 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 Cyclorhapha 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, Hesperidae, Sphingidae, Saturniidae, Geometridae, Arctiidae, Noctuidae, Lymantriidae, Sesiidae, Crambidae и Tineidae.

Нематоды включают паразитических нематод, таких как нематоды корневого нароста, кисты и повреждения, 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 листы 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 sorghi*

cola, 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; *Cerphus cinctus*, пилильщик стебля пшеницы; *Aceria tulipae*, клещ завитка пшеницы;

подсолнечник: *Suleima helianthana*, моль зародыша подсолнечника; *Homoeosoma electellum*, моль подсолнечника; *Zygotogramma exclamationis*, жук подсолнечника; *Bothyrus gibbosus*, жук моркови; *Neolasiotera 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;

рапс: *Brevicoryne brassicae*, тля капусты; *Phyllotreta cruel ferae*, скрытый жук; *Mamestra configurata*, "походные черви" Берта; *Plutella xylostella*, моль капустная; *Delia ssp.*, корневые безногие личинки.

Способы увеличения урожайности растений.

Предоставлены способы увеличения урожайности растений. Способы включают введение в растение или клетку растения полинуклеотид, содержащий 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 Axmi-115 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%,

Axmi-005 - 70,4%,

Axmi-026 - 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., соответствующем 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 контигам, 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 перекрыванием 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 орtaxmi-005. Нуклеотидная последовательность изложена в SEQ ID NO: 7 и кодирует аминокислотную по-

следовательность, приведенную в SEQ ID NO: 9 (с дополнением С-концевого гистидинового тага). Ген ортахmi-005, раскрытый здесь, может использоваться с С-концевым гистидиновым тагом или без него.

Пример 3. Открытие нового гена токсина Ахmi-113 штамма АТХ12987 *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 ахmi-113 (SEQ ID NO: 2), и кодируемая аминокислота упоминается как АХМИ-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%,

Ахmi-005 - 79%.

Синтетическая последовательность, кодирующая белок АХМИ-113, была разработана и названа ортахmi-113. Нуклеотидная последовательность приведена в SEQ ID NO: 8 и кодирует последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 5 или 10 (с добавлением С-концевого гистидинового тага). Ген ортахmi-113, раскрытый здесь, может использоваться с С-концевым гистидиновым тагом или без него.

Пример 4. Открытие новых генов токсина Ахmi-163 и Ахmi-184 штамма АТХ14775 *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 ахmi-163 и приведен в SEQ ID NO: 11, и кодируемая аминокислота упоминается как АХМИ-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%,

Ахmi-005 - 78%.

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

Синтетические нуклеотидные последовательности, кодирующие АХМИ-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%,
Axmi-005 - 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 AXMI, 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 (т.е. 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* инсектицидный ген, раскрытый здесь, амплифицируют путем ПЦР и продукт ПЦР клонируют в вектор экспрессии pAX916 *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 Васто-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 ч 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: 2), axmi-115 (SEQ ID NO: 3) или axmi-005 (SEQ ID NO: 1) 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 axmi-005, axmi-113 и axmi-115, 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 орtaxmi005 (pAX5475, pAX5478) и орtaxmi115 (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 мМ IPTG в течение ночи при 20°C. Получившиеся клетки собирали центрифугированием и суспендировали либо в 50 мМ буфере карбоната натрия, pH 10,5 с добавлением с 1 мМ DTT, либо в 50 мМ буфере Трис-НСI, pH 8 с 1 мМ 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 АХМИ-005, АХМИ-113 или АХМИ-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%-й 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 табл. 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%-ная 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%-й 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 Ахmi-184.

Экспрессия гена и очистка.

Область ДНК, кодирующая домен токсина Ахmi-184, была клонирована в вектор экспрессии рMAL-C4х E.coli после гена malE, кодирующего мальтоза-связывающий белок (МБР). Это слияние в рамке привело к экспрессии слитого белка МБР-Ахmi-084 в E.coli.

Для экспрессии в E.coli, BL21*DE3 был трансформирован индивидуальными плазмидами. Отдельную колонию засеивали 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-HCl, pH 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 МБР-АХМИ-184. Связанный слитый белок элюировали со смолы с 10 мМ-м раствором мальтозы. Очищенные слитые белки затем расщепляли либо фактором Ха, либо трипсином, чтобы удалить аминоконцевой МБР-таг из белка АХМИ-184. 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 АХМИ-184 против капустной моли.

Пример 11. Замена доменов.

Гены ахmi-005, ахmi-113 и ахmi-115, которые содержат кодоны, оптимизированные для экспрессии в зерновых, использовали в этом примере. Плазмиды, экспрессирующие бестаговые версии optaxmi005 (рAX5478), optaxmi113 (рAX5493) и optaxmi115 (рAX5477), использовали для планирования конструкций ДНК с заменами, как описано здесь.

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

Область белка АХМИ-113 между прямой и обратной стрелками, показанными на фиг. 1, была заменена соответствующим фрагментом либо АХМИ-005 (с образованием рAX5492), либо АХМИ-115 (рAX5494).

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, pH 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, Optaxmi113+СТ Optaxmi005 и Optaxmi113+СТ Optaxmi115 были проверены в испытании на насекомых с соответствующими контролями. Как показано в примере 9, АХМИ-113 показал высокую активность по отношению к SWCB (25%-ная смертность). Он продемонстрировал дополнительную активность по отношению к SCB (50%-ная смертность).

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

нию к SCB.

Гибрид АХМІ-113+СТ АХМІ-005 продемонстрировал все активности на насекомых, замеченные для АХМІ-005. Другими словами, замена С-концевого фрагмента АХМІ-113 таковым из АХМІ-005 придало 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 табл. 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:
axmi115sub1 s	AAC ACC GGC GGC GTC AAT GGA ACA AGG GCG CTC TTC ACC CA	20
axmi115sub1 a	TGG GTG AAG AGC GCC CTT GTT CCA TTG ACG CCG CCG GTG TT	21
axmi115sub10 s	GCC CGG AGC TCA TCA ATG TCA ACA ACT GGA TCA GAA CTG GCA CCA CCT ACA TCA C	22
axmi115sub10 a	GTG ATG TAG GTG GTG CCA GTT CTG ATC CAG TTG TTG ACA TTG ATG AGC TCC GGG C	23
axmi115sub11 s	ATG ATT GGG AGA GGT TCG GAA GCA CCC ACA TCA GCG GCA ATG AGC TGA GG	24
axmi115sub11 a	CCT CAG CTC ATT GCC GCT GAT GTG GGT GCT TCC GAA CCT CTC CCA ATC AT	25
axmi115sub12 s	CTA CAT CAC CGG CAA TAC CTT GAC GCT CTA CCA AGG AGG AGG AGG CTA CTT CCG C	26
axmi115sub12 a	GCG GAA GTA GCC TCC TCC TCC TTG GTA GAG CGT CAA GGT ATT GCC GGT GAT GTA G	27
axmi115sub14 s	CGA CAG CTA CAG CAC CTA CAG GGT GAA CTT CTC CGT CAC CGG CTG GGC CAA GGT GAT	28
axmi115sub14 a	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 CTC 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, блюдо 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 мин, 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 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.

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 (1000x сток) витаминов N6; 800 мг/л L-аспарагина; 100 мг/л миоинозитола; 1,4 г/л L-пролина; 100 мг/л казामीновых 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 мин, затем переносят на пластину для облучения (См., например, патентную публикацию PCT № 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 PCT № WO/0138514. После облучения зародыши инкубируют в течение 30 мин 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 ч 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.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенная или рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты, которая включает нуклеотидную последовательность, кодирующую инсектицидный полипептид AXMI-115 дельта-эндотоксина, выбранную из

- а) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 3 или комплементарной ей последовательности;
- б) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 3, или комплементарной ей последовательности;
- в) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6;
- г) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид с аминокислотной последовательностью, идентичной по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO: 6;
- д) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6, образованной путем обмена одного или более доменов последовательностей SEQ ID NO: 4, 5, 13 или 14 с соответствующим доменом(ами) последовательности SEQ ID NO: 6, где указанные домены выбраны из доменов, обозначенных на фиг. 2; и
- е) нуклеотидной последовательности, способной гибридизоваться с нуклеотидной последовательностью, комплементарной последовательности по п.б), в жестких условиях, которые включают гибридизацию в 50% формамиде, 1M NaCl, 1% SDS при 37°C и промывку в 0,1×SSC при 60-65°C.

2. Выделенная или рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по п.1, в которой указанная нуклеотидная последовательность функционально связана с промотором, управляющим экспрессией нуклеотидной последовательности в клетке растения.

3. Выделенная или рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по п.1 или 2, в которой указанная нуклеотидная последовательность представляет собой синтетическую последовательность, разработанную для экспрессии в растении.

4. Выделенная или рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по п.1, в которой указанная нуклеотидная последовательность выбрана из SEQ ID NO: 15 или 16.

5. Экспрессионная кассета, включающая молекулу нуклеиновой кислоты по п.1 или 2.

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

7. Бактериальная клетка-хозяин, содержащая экспрессионную кассету по п.5.

8. Выделенный полипептид AXMI-115 дельта-эндотоксина с инсектицидной активностью, выбранный из

а) полипептида с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6;

б) полипептида с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 6;

в) полипептида, который кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 3;

д) полипептида, который кодируется нуклеотидной последовательностью, идентичной по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO: 3; и

е) полипептида с вариантной аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6, образованной путем обмена одного или более доменов последовательностей SEQ ID NO: 4, 5, 13 или 14 с соответствующим доменом(ами) последовательности SEQ ID NO: 6, где указанные домены выбраны из доменов, обозначенных на фиг. 2.

9. Антитело, которое селективно связывается с полипептидом по п.8.

10. Инсектицидная композиция, включающая полипептид по п.8.

11. Композиция по п.10, выполненная в форме порошка, присыпки, пеллеты, гранулы, спрея, эмульсии, коллоида или раствора.

12. Способ контроля или уничтожения популяции чешуекрылых или жесткокрылых насекомых-вредителей, включающий приведение указанной популяции в контакт с инсектицидно эффективным количеством полипептида по п.8, где указанное инсектицидно эффективное количество способно вызвать гибель по меньшей мере одного чешуекрылого или жесткокрылого насекомого-вредителя или способно заметно замедлить рост, питание или нормальное физиологическое развитие чешуекрылого или жесткокрылого насекомого-вредителя.

13. Способ получения полипептида с инсектицидной активностью, включающий культивирование клетки-хозяина по п.7 в условиях, при которых экспрессируется молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид с инсектицидной активностью.

14. Растение или растительная клетка, содержащие стабильно встроенную в свой геном конструкцию ДНК, которая включает нуклеотидную последовательность, кодирующую инсектицидный полипептид, выбранную из

а) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 3 или комплементарной ей последовательности;

б) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 3, или комплементарной ей последовательности;

в) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6;

д) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид с аминокислотной последовательностью, идентичной по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO: 6;

е) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид с вариантной аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6, образованной путем обмена одного или более доменов последовательностей SEQ ID NO: 4, 5, 13 или 14 с соответствующим доменом(ами) последовательности SEQ ID NO: 6, где указанные домены выбраны из доменов, обозначенных на фиг. 2; и

ф) нуклеотидной последовательности, способной гибридизоваться с нуклеотидной последовательностью, комплементарной последовательности по п/п.б), в жестких условиях, которые включают гибридизацию в 50% формамиде, 1M NaCl, 1% SDS при 37°C и промывку в 0,1×SSC при 60-65°C;

где указанная нуклеотидная последовательность функционально связана с промотором, управляющим ее экспрессией в клетке растения.

15. Трансгенное семя растения по п.14, включающее нуклеотидную последовательность, кодирующую инсектицидный полипептид, выбранную из

а) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 3 или комплементарной ей последовательности;

б) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 3, или комплементарной ей последовательности;

в) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6;

д) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид с аминокислотной последовательностью, идентичной по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO: 6;

е) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид с вариантной аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6, образованной путем обмена одного или более доменов последовательностей SEQ ID NO: 4, 5, 13 или 14 с соответствующим доменом(ами) последовательности SEQ ID

NO: 6, где указанные домены выбраны из доменов, обозначенных на фиг. 2; и

f) нуклеотидной последовательности, способной гибридизоваться с нуклеотидной последовательностью, комплементарной последовательности по п.п.b), в жестких условиях, которые включают гибридизацию в 50% формамиде, 1M NaCl, 1% SDS при 37°C и промывку в 0,1×SSC при 60-65°C.

16. Растение или растительная клетка по п.14 либо трансгенное семя растения по п.15, где указанное растение выбрано из кукурузы, сорго, пшеницы, капусты, подсолнечника, помидора, крестоцветных, перцев, картофеля, хлопка, риса, сои, сахарной свеклы, сахарного тростника, табака, ячменя и масличного рапса.

17. Способ защиты растения от чешуекрылых и жесткокрылых насекомых-вредителей, включающий введение в указанное растение или его клетку по меньшей мере один экспрессионный вектор, который содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую инсектицидный полипептид, выбранную из

- a) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 3 или комплементарной ей последовательности;
- b) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 3, или комплементарной ей последовательности;
- c) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6;
- d) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид с аминокислотной последовательностью, идентичной по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO: 6;
- e) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид с вариантной аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6, образованной путем обмена одного или более доменов последовательностей SEQ ID NO: 4, 5, 13 или 14 с соответствующим доменом(ами) последовательности SEQ ID NO: 6, где указанные домены выбраны из доменов, обозначенных на фиг. 2; и
- f) нуклеотидной последовательности, способной гибридизоваться с нуклеотидной последовательностью, комплементарной последовательности по п.п.b), в жестких условиях, которые включают гибридизацию в 50% формамиде, 1M NaCl, 1% SDS при 37°C и промывку в 0,1×SSC при 60-65°C.

18. Способ по п.17, где указанное растение выбрано из кукурузы, сорго, пшеницы, капусты, подсолнечника, помидора, крестоцветных, перцев, картофеля, хлопка, риса, сои, сахарной свеклы, сахарного тростника, табака, ячменя и масличного рапса.

Optaxmi113	MNNNTKLSRALPSFDIYFNGIYGFATGIKDIMNMIFKTDTGGDLTLDEILKNQQLLNE	60
Optaxmi005	MNNNTKLNARALPSFDIYFNGIYGFATGIKDIMNMIFKTDTGGDLTLDEILKNQQLLNE	60
Optaxmi115	MNNNTKLNARALPSFDIYFNGIYGFATGIKDIMNMIFKTDTGGDLTLDEILKNQQLLNE	60
Optaxmi113	ISGKLDGVNGSLNDLIAQGNLNTLSKEILKIANEQGNVLDVNNKLDIAINTMLHIYLPK	120
Optaxmi005	ISGKLDGVNGSLNDLIAQGNLNTLSKEILKIANEQGNVLDVNNKLDIAINTMLHIYLPK	120
Optaxmi115	ISGKLDGVNGSLNDLIAQGNLNTLSKEILKIANEQGNVLDVNNKLDIAINTMLHIYLPK	120
Optaxmi113	ITSMESDVMKQNVALSQIEYLSKQLQIEISDKLDIINVAVLINSTLLETIPYQRIKYVN	180
Optaxmi005	ITSMESDVMKQNVALSQIEYLSKQLQIEISDKLDIINVAVLINSTLLETIPYQRIKYVN	180
Optaxmi115	ITSMESDVMKQNVALSQIEYLSKQLQIEISDKLDIINVAVLINSTLLETIPYQRIKYVN	180
Optaxmi113	EKFEELTFATETNLKVKK----DGSPADILDELTELAKSVTKNDVDGFEFYLTFFH	235
Optaxmi005	EKFEELTFATETNLKVKK----DSSPADILDELTELAKSVTKNDVDGFEFYLTFFH	235
Optaxmi115	EKFDKLTFAESTLRAKQGFENEDSFDNNTLENLTLAELAKSITKNDVDSFEFYLTFFH	240
Optaxmi113	DVMVGNLFRSALKTASELITKENVKTSGSEVGNVYVFLVLTALQAKAFLTLTTCRKL	295
Optaxmi005	DVMVGNLFRSALKTASELITAKENVKTSGSEVGNVYVFLVLTALQAKAFLTLTTCRKL	295
Optaxmi115	DVLIGNLFRSALKTASELITKDEIKTSGSEIGKVYSFLVLTALQAKAFLTLTTCRKL	300
Optaxmi113	LGLADIDYTSIMNEHLNKEEFRVNIPLTSLNFTSNPNYIKTKGSDEDAQVIQAEPPGH	355
Optaxmi005	LGLADIDYTSIMNEHLNKEEFRVNIPLTSLNFTSNPNYIKTKGSDEDAQVIQAEPPGH	355
Optaxmi115	LGLSDIDYTSIMNEHLNKEEFRDNLPLALSNKFNPNYAKTIGSDNYAKVILESEPGY	360
Optaxmi113	ALVGFEMINDPSPALKVYQAKLTTNYQVDRKQSLSETVYVGMDBKLLCPDKSQMYLHNIT	415
Optaxmi005	ALVGFEMNSDITVLRVYEAALQKQNYQVDRKQSLSEVIYVGMDBKLLCPDQSEQIYYTNNIV	415
Optaxmi115	ALVGFEEINDPIVLRKAYKALQKQNYQVDRKQSLSEIVVLDIKLFCPENSEQKYYTKNLT	420
Optaxmi113	FFNEYVITEIIFTKKNSLRVEVIANYYEFSSGIDILNKKLVKS--SEAEYSTLSVSNDD	472
Optaxmi005	FFNEYVITKIDFTKMKRTLRYEVYVANSYDSTGEIDLNKKRVES--SEAEYRSLAKDD	472
Optaxmi115	FPDGVITKITEFKLNLIYEATANFYDFPSTGIDILNKKQVESTFPQDTYITMDIGDD	480
Optaxmi113	AIYMPGVISSETFLTPKGFGLTVDESSRLVLTCKSYLREILLATDLSNKATKLIIVPPN	532
Optaxmi005	GVYMPGVISSETFLTPINGFGLQADENSRLITLTKSYLRELLATDLSNKETKLIIVPPS	532
Optaxmi115	GIYMPGVISSETFLTPINSFGLVDAKSKTLTLKCKSYLREYLLSGLKKNKETGLIAPPN	540
Optaxmi113	GFISNLVENGDI EADNIEPWKGNKNAYVDHTGGVNTKALYTDQDGEFSQPIGDKLKS	592
Optaxmi005	GFISNIVENGLLEGENLEPWIANKNAYVDHTGGVNTALYVHKDGGFSQPIGDKLKP	592
Optaxmi115	VFISNVVKNWDIEEDLEPWANNKNAYVDNTGGIERSKALFTQDGEFSQPIGDKLKP	600
Optaxmi113	TEYIIQYTVKNGTSIYLKDKKNENVIYEDKNNLEAFQTITKRFITLEDSSDVYLVFRCK	652
Optaxmi005	TEYVIQYTVKGPSTIHLKKNENTGYIHYEDTNNLEDYQTITKRFITGDLKGVYLLKSK	652
Optaxmi115	TDYIIQYTVKGPALYLNKNTSTGYITTEDTNGNSEFQTIKRVKSETDLSQTHLVFRSK	660

Фиг. 1А

```

Optaxmi113  NGYKAWGDNFLITEIRPKE--VVSPELIKVENWIGMGSSNHVNFDSLLLFQGGRSILKQNL 711
Optaxmi005  NGDEAWGDNFTILEISFSEKLLSPELINVNNWIRTG--STHISGNTLTLYQGGGGLKQNL 711
Optaxmi115  NGYEAWGDNFILLEAKLFETPESEPELIKFNVDWERFG--TTYITGNELRIDHSRGGYFRQSL 719
*:***** * * * *****:!* * !:!. : * : . : . :!*:*

Optaxmi113  QLDSYSTYRVRFSLMVGKAKVII RNSS--EVLFEKSYVNDSEGVLEGVSETFTTKSIQDN 770
Optaxmi005  QLDSFSTYRVNFS--VTGDANVRI RNSR--EVLFEKRYMSG---AKDVSEI FTTKLGRDN 764
Optaxmi115  NIDSYSTYDLDFS--FSLGAKVIVNNGRQVLEKVKNNGSS--YEDLSSESFTTASNRDG 776
!:*:*:* * * * * !:* * * * * !:* * * * * !:* * * * * !:*

Optaxmi113  FVVELSNEGTFGSKDVAYFYNSIR--- 795
Optaxmi005  FYIELSQGNLNGGLVKNFNDVSIK--- 789
Optaxmi115  FFIELTAER--TSSTPHFSFRDISIKKIE 803
*:!*:* . . * !:*: ←

```

Фиг. 1B

```

* 20 * 40 * 60 * 80 *
αXmi-005 : NHNNTKLNAPALPFSFIDVFNQIYGFATQIRIHNHIFKTDQGNLTLEILKQQLLNEISQELDQVHOSLNDLIAQGNLNTLSKEL : 90
αXmi-115 : NHNNTKLNAPALPFSFIDVFNQIYGFATQIRIHNHIFKTDQGNLTLEILKQQLLNEISQELDQVHOSLNDLIAQGNLNTLSKEL : 90

* 100 * 120 * 140 * 160 * 180 *
αXmi-005 : KLANEQGVNDVNNKLDANTMLNIVLPKITSMLSDVVKQNYALSQIEYLSQLOEISDKLDINRQPLINSTLITFPAYQRIKYN : 180
αXmi-115 : KLANEQGVNDVNNKLDANTMLNIVLPKITSMLSDVVKQNYALSQIEYLSQLOEISDKLDINRQPLINSTLITFPAYQRIKYN : 180

* 200 * 220 * 240 * 260 *
αXmi-005 : EKFEELTFATEITLKVK---DSSPADILDELTELAKSVTQNDVGFYLNTPFHVVGNLFGRSALKTASELIAKENVTSG : 265
αXmi-115 : ENFDLTFATEITLAKGQIFNEDSFNNLENLTLAELAKSITSNVDSFEFYLTFHVVGNLFGRSALKTASELITKDEIKTSG : 270

* 300 * 320 * 340 * 360 *
αXmi-005 : SEVQRPVNLIVLTALQAKAFLITTCRKLGLADIDYTSINNEHLNKEKEEFPVNILPILMNTFSNPNVYKRVKSDDEAKNIVFAKPGH : 365
αXmi-115 : SEIGVYSFLIVLTLQAKAFLITTCRKLGLSDIDYTSINNEHLNKEKEEFPVNILPILMNTFSNPNVYKRVKSDDEAKNIVFAKPGH : 360

* 380 * 400 * 420 * 440 *
αXmi-005 : ALVGFENMSGITVLEVEAKLQNVQVQVDSLSEVIGDHDKLLCPDQSEQIYTDNIVFMEVITRIDEFKKMLLYEVVTANSYDS : 445
αXmi-115 : ALVGFELIMPVLPVLEKAYKALQNVQVQVDSLSEVIGDHDKLLCPDQSEQIYTDNIVFMEVITRIDEFKKMLNLYEVATANFYDP : 450

* 460 * 480 * 500 * 520 * 540 *
αXmi-005 : STGEIDLKKNKVES--SEAEYRSLA--KDDGVYVPLGVISEFTLTPINGQLQADENSRLITLTKSYLRELLATDLSHKETLIVPFS : 532
αXmi-115 : STGDIDLKKNKVESTFPQTDYITNDIGDDGVIYVPLGVISEFTLTPINSFGLVDAKSRITLTKCSYLYRELLSDLNKREGLIAPPN : 540

* 560 * 580 * 600 * 620 *
αXmi-005 : QFISNIVEMNLEGENLEPHIANNNAVVDTCQNDTQALVVRKQDQFQIQDLKRFTEYVQVYVQFSLRHEMTCYIIRHET : 622
αXmi-115 : VPISNVQVNDIEETQLEPHVANNNAVVDTCQNDTQALVVRKQDQFQIQDLKRFTEYVQVYVQFSLRHEMTCYIIRHET : 630

* 640 * 660 * 680 * 700 * 720 *
αXmi-005 : NNLELQITKFFFTQDQKGVYLIDKSNQDQEAAGNFTILEIFSEKLLPELVNANNIETSTHISENFTLTYGQDQVNLKQNL : 712
αXmi-115 : NNSEEFQITKFFFTQDQKGVYLIDKSNQDQEAAGNFTILEIFSEKLLPELVNANNIETSTHISENFTLTYGQDQVNLKQNL : 720

* 740 * 760 * 780 * 800 *
αXmi-005 : LDFSSTYRVNFSVTC--DANVRIRNS--EVLFEKRYMSG--AKDVSEI FTTKLGRDNFYIELSQGNLNGGLVKNFNDVSIK--- : 789
αXmi-115 : LDFSSTYRVNFSVTC--DANVRIRNS--EVLFEKRYMSG--AKDVSEI FTTKLGRDNFYIELSQGNLNGGLVKNFNDVSIK--- : 803

```

Фиг. 2



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2