

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **035432**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2020.06.15**

(21) Номер заявки  
**201490374**

(22) Дата подачи заявки  
**2012.07.27**

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

(54) **ГЕН ПЕСТИЦИДА АХМІ279 И СПОСОБЫ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ**(31) **61/513,088**(32) **2011.07.29**(33) **US**(43) **2014.09.30**(86) **PCT/US2012/048488**(87) **WO 2013/019600 2013.02.07**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**БАСФ АГРИКАЛЧЕРАЛ  
СОЛЮШНС СИД ЮС ЛЛК (US)**

(72) Изобретатель:  
**Сэмпсон Кимберли С.,  
Баласубраманиан Дипа, Лехтинен  
Дуэйн А. (US)**

(74) Представитель:  
**Веселицкий М.Б., Веселицкая И.А.,  
Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов  
Ю.В., Куликов А.В. (RU)**

(56) WO-A1-2011002992  
CAMPBELL C.D. ET AL.: "NOVEL  
INSECTICIDAL PROTEINS", ANNALS OF THE  
ENTOMOLOGICAL SOCIETY OF AMERICA,  
ENTOMOLOGICAL SOCIETY OF AMERICA,  
COLLEGE PARK, MD, US, vol. POSTER D0234, 10

December 2006 (2006-12-10), page 1, XP002596246,  
ISSN: 0013-8746 the whole document

MARTIN P.A.W. ET AL.: "Chromobacterium  
subtsugae sp. nov., a betaproteobacterium toxic to  
Colorado potato beetle and other insect pests",  
INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC  
AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY, vol.  
57, no. 5, 1 May 2007 (2007-05-01), pages  
993-999, XP55040446, ISSN: 1466-5026, DOI:  
10.1099/ijs.0.64611-0

HINCHCHLIFFE Stewart J. et al.:  
"Insecticidal Toxins from the Photorhabdus and  
Xenorhabdus Bacteria", The Open Toxinology  
Journal, 1 March 2010 [2010-03-01], pages  
101-118, XP55011935, Retrieved from the Internet:  
URL: [http://www.benthamsience.com/open/totnj/art  
icles/V003/SI0082TOTNJ/101TOTNJ.pdf](http://www.benthamsience.com/open/totnj/articles/V003/SI0082TOTNJ/101TOTNJ.pdf) [retrieved  
on 2011-11-14]

MARTIN PHYLLIS A.W. ET AL.: "Toxicity of  
Chromobacterium subtsugae to Southern Green Stink  
Bug (Heteroptera: Pentatomidae) and Corn Rootworm  
(Coleoptera: Chrysomelidae)", JOURNAL OF  
ECONOMIC ENTOMOLOGY, ENTOMOLOGICAL  
SOCIETY OF AMERICA, LANDHAM, MD, US,  
vol. 100, no. 3, 1 June 2007 (2007-06-01), pages  
680-684, XP007921138, ISSN: 0022-0493, DOI:  
10.1603/0022-0493(2007)100[680:TOCSTS]2.0.CO;  
2

(57) Обеспечиваются композиции и способы для придания пестицидной активности бактериям, растениям, растительным клеткам, тканям и семенам. Обеспечиваются композиции, содержащие кодирующие последовательности для пестицидных полипептидов. Кодирующие последовательности можно применять в ДНК-конструктах или экспрессионных кассетах для трансформации и экспрессии в растениях и бактериях. Композиции также содержат трансформированные бактерии, растения, растительные клетки, ткани и семена. В частности, обеспечиваются молекулы выделенных нуклеиновых кислот, кодирующих пестицид. Кроме того, охвачены аминокислотные последовательности, соответствующие полинуклеотидам. В частности, настоящее изобретение обеспечивает молекулы нуклеиновых кислот, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 2, 3 или 4, или нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, а также их варианты и фрагменты.

**B1****035432****035432 B1**

### **Перекрестная ссылка на родственные заявки**

Настоящая заявка заявляет приоритет по предварительной заявке на патент США с регистрационным номером 61/513088, поданной 29 июля 2011 г., содержание которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

### **Ссылка на перечень последовательностей, отправленный в электронном виде**

Данная официальная копия перечня последовательностей отправлена в электронном виде через EFS-Web как отформатированный под ASCII перечень последовательностей в файле с названием "APA116004SEQLIST.txt", созданном 19 июля 2012 г. и имеющем размер 26,9 кбайта, и подана одновременно с описанием. Перечень последовательностей, содержащийся в данном отформатированном под ASCII документе, является частью описания и включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

### **Область изобретения**

Настоящее изобретение относится к области молекулярной биологии. Обеспечиваются новые гены, кодирующие пестицидные белки. Эти белки и последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие их, применимы в получении пестицидных составов и в получении трансгенных растений, устойчивых к вредителям.

### **Предпосылки изобретения**

Внедрение DDT (дихлордифенилтрихлорэтана) и последующее движение в сторону неизбирательного применения синтетических химических инсектицидов привело к загрязнению водных и пищевых источников, к отравлению нецелевых полезных насекомых и к развитию насекомых-вредителей, устойчивых к действию химических инсектицидов. Повышенное общественное беспокойство об отрицательном воздействии на окружающую среду неизбирательного применения химических инсектицидов побудило к поиску альтернативных способов борьбы с насекомыми-вредителями.

Одной из подающих надежд альтернатив было применение средств биологической борьбы. Существует убедительно подтвержденная документальными доказательствами информация о безопасном применении Bt (*B. thuringiensis*, грамположительной почвенной бактерии) в качестве эффективных биопестицидов, и имеется ряд сообщений об экспрессии гена(генов) дельта-эндотоксина у сельскохозяйственных культур. Для трансгенных Bt-культур необходимо лишь несколько инсектицидных распыляемых растворов, что не только экономит ресурсы и время, но также снижает риски для здоровья. В некоторых случаях насекомые могут развивать устойчивость к различным инсектицидным соединениям, что поднимает вопрос необходимости идентификации альтернативных средств биологической борьбы для борьбы с вредителями.

### **Краткое описание изобретения**

Обеспечиваются композиции и способы для придания пестицидной активности бактериям, растениям, растительным клеткам, тканям и семенам. Композиции содержат молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие последовательности пестицидных и инсектицидных полипептидов, векторы, содержащие такие молекулы нуклеиновых кислот, и клетки-хозяева, содержащие эти векторы. Композиции также содержат последовательности пестицидных полипептидов и антитела к таким полипептидам. Нуклеотидные последовательности можно применять в ДНК-конструктах или экспрессионных каскадах для трансформации и экспрессии в организмах, в том числе в микроорганизмах и растениях. Нуклеотидные или аминокислотные последовательности могут быть синтетическими последовательностями, предназначенными для экспрессии в организме, в том числе, без ограничений, в микроорганизме или растении. Композиции также содержат трансформированные бактерии, растения, растительные клетки, ткани и семена, содержащие нуклеотидную последовательность по настоящему изобретению.

В частности, обеспечиваются молекулы выделенных или рекомбинантных нуклеиновых кислот, которые кодируют пестицидный белок. Кроме того, охвачены аминокислотные последовательности, соответствующие пестицидному белку. В частности, настоящее изобретение обеспечивает молекулу выделенной или рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 2, 3 или 4, или нуклеотидную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 1, а также их биологически активные варианты и фрагменты. Также охвачены нуклеотидные последовательности, комплементарные нуклеотидной последовательности по настоящему изобретению или гибридизирующиеся с последовательностью по настоящему изобретению или комплементарной ей последовательностью. Дополнительно обеспечиваются векторы, клетки-хозяева, растения и семена, содержащие нуклеотидные последовательности по настоящему изобретению или нуклеотидные последовательности, кодирующие аминокислотные последовательности по настоящему изобретению, а также их биологически активные варианты и фрагменты. Также охватываются синтетические нуклеотидные последовательности, кодирующие полипептиды, раскрытые в данном документе.

Обеспечиваются способы получения полипептидов по настоящему изобретению и применения этих полипептидов для борьбы с вредителями, являющимися чешуекрылыми, жесткокрылыми насекомыми, нематодами или двукрылыми насекомыми, или их уничтожения. Также включены способы и наборы для выявления нуклеиновых кислот и полипептидов по настоящему изобретению в образце.

Композиции и способы по настоящему изобретению применимы для получения организмов с повышенной устойчивостью или толерантностью к вредителям. Эти организмы и композиции, содержащие организмы, являются желательными для сельскохозяйственных целей. Композиции по настоящему изобретению также применимы для образования измененных или улучшенных белков, которые обладают пестицидной активностью, или для выявления наличия пестицидных белков или нуклеиновых кислот в продуктах или организмах.

#### Подробное описание

Настоящее изобретение обращено к композициям и способам для регуляции устойчивости или толерантности организмов, в частности растений или растительных клеток, к вредителям. Под "устойчивостью" подразумевается, что вредитель (например, насекомое) уничтожается при поглощении полипептидов по настоящему изобретению или при другом контакте с ними. Под "толерантностью" подразумевается нарушение или ослабление передвижения, питания, размножения или других функций вредителя. Способы включают трансформацию организмов с помощью нуклеотидной последовательности, кодирующей пестицидный белок по настоящему изобретению. В частности, нуклеотидные последовательности по настоящему изобретению применимы для получения растений и микроорганизмов, обладающих пестицидной активностью. Таким образом, обеспечиваются трансформированные бактерии, растения, растительные клетки, ткани растений и семена. Композиции представляют собой пестицидные нуклеиновые кислоты и белки видов бактерий. Последовательности находят применение в конструировании векторов экспрессии для последующего введения в организмы, представляющие интерес, путем трансформации в качестве зондов для выделения других гомологичных (или частично гомологичных) генов и для образования измененных пестицидных белков с помощью способов, известных в данной области техники, таких как перестановка доменов или ДНК-шаффлинг. Белки находят применение в борьбе с популяцией вредителей, являющихся чешуекрылыми, жесткокрылыми, двукрылыми насекомыми и нематодами, или ее уничтожении, а также в получении композиций с пестицидной активностью.

Под "пестицидным токсином" или "пестицидным белком" подразумевается токсин, который обладает токсичной активностью против одного или нескольких вредителей, включая, но без ограничений, представителей отрядов Lepidoptera, Diptera и Coleoptera или типа Nematoda, или белок, гомологичный такому белку. Пестицидные белки были выделены из организмов, в том числе, например, *Bacillus* sp., *Clostridium bifermentans* и *Paenibacillus popilliae*. Пестицидные белки содержат аминокислотные последовательности, расшифрованные на основании нуклеотидных последовательностей полной длины, раскрытых в данном документе, и аминокислотные последовательности, которые являются более короткими, чем последовательности полной длины, либо в связи с применением альтернативного нижерасположенного сайта инициации, либо в связи с процессингом, при котором образуется более короткий белок, обладающий пестицидной активностью. Процессинг может иметь место в организме, в котором экспрессируется белок, или во вредителе после поглощения белка.

Таким образом, в данном документе представлены новые выделенные или рекомбинантные нуклеотидные последовательности, придающие пестицидную активность. Также в данном документе представлены аминокислотные последовательности пестицидных белков. Белок, получаемый в результате трансляции этого гена, обеспечивает клеткам возможность борьбы с вредителями, которые поглощают его, или уничтожения таковых.

Молекулы выделенных нуклеиновых кислот, а также их варианты и фрагменты.

Один аспект настоящего изобретения относится к молекулам выделенных или рекомбинантных нуклеиновых кислот, содержащим нуклеотидные последовательности, кодирующие пестицидные белки и полипептиды или их биологически активные части, а также к надлежащим молекулам нуклеиновых кислот для применения в качестве гибридационных зондов для идентификации молекул нуклеиновых кислот, кодирующих белки с областями гомологии последовательностей. Также в данном документе охватываются нуклеотидные последовательности, способные к гибридизации с нуклеотидными последовательностями по настоящему изобретению в жестких условиях, как определено в другом месте в данном документе. Применяемое в данном документе выражение "молекула нуклеиновой кислоты" подразумевает включение молекул ДНК (например, рекомбинантных ДНК, кДНК или геномных ДНК), и молекул РНК (например, мРНК), и аналогов ДНК или РНК, образованных при помощи аналогов нуклеотидов. Молекула нуклеиновой кислоты может быть одонитевой или двунитевой, но предпочтительно является двунитевой ДНК.

"Выделенная" или "рекомбинантная" последовательность нуклеиновой кислоты (или ДНК) применяется в данном документе для обозначения последовательности нуклеиновой кислоты (или ДНК), которая больше не находится в своей естественной среде, например находится в условиях *in vitro* или в рекомбинантной бактериальной или растительной клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления выделенная или рекомбинантная нуклеиновая кислота не содержит последовательностей (предпочтительно последовательностей, кодирующих белки), обычно фланкирующих нуклеиновую кислоту (т.е. последовательностей, расположенных на 5'- и 3'-концах нуклеиновой кислоты) в геномной ДНК организма, из которого получена нуклеиновая кислота. Применительно к настоящему изобретению выражение "выделенная или рекомбинантная", применяемое для обозначения молекул нуклеиновых кислот, ис-

ключает выделенные хромосомы. Например, в различных вариантах осуществления молекула выделенной или рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующая пестицидный белок, может содержать нуклеотидные последовательности длиной менее чем около 5 т.п.о., 4 т.п.о., 3 т.п.о., 2 т.п.о., 1 т.п.о., 0,5 т.п.о. или 0,1 т.п.о., которые обычно фланкируют молекулу нуклеиновой кислоты в геномной ДНК клетки, из которой получена эта нуклеиновая кислота. В различных вариантах осуществления пестицидный белок, практически свободный от клеточного материала, включает белковые препараты, имеющие менее чем около 30%, 20%, 10% или 5% (в пересчете на сухой вес) непестицидного белка (также упоминаемого в данном документе как "загрязняющий белок").

Нуклеотидные последовательности, кодирующие белки, по настоящему изобретению включают последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 1, и ее варианты, фрагменты и комплементарные ей последовательности. Под "комплементарной последовательностью" подразумевается нуклеотидная последовательность, в достаточной степени комплементарная данной нуклеотидной последовательности, так что она может гибридизироваться с данной нуклеотидной последовательностью с формированием, таким образом, стабильного дуплекса. Соответствующие аминокислотные последовательности пестицидного белка, кодируемого данной нуклеотидной последовательностью, приведены под SEQ ID NO: 2, 3 или 4.

Молекулы нуклеиновых кислот, которые представляют собой фрагменты этих нуклеотидных последовательностей, кодирующих пестицидные белки, также охватываются настоящим изобретением. Под "фрагментом" подразумевается часть нуклеотидной последовательности, кодирующей пестицидный белок. Фрагмент нуклеотидной последовательности может кодировать биологически активную часть пестицидного белка, или он может представлять собой фрагмент, который можно применять в качестве гибридизационного зонда или праймера для ПЦР при помощи способов, раскрытых ниже. Молекулы нуклеиновых кислот, являющиеся фрагментами нуклеотидной последовательности, кодирующей пестицидный белок, содержат по меньшей мере около 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1350, 1400, 1450, 1500, 1550, 1600 смежных нуклеотидов или количество нуклеотидов вплоть до такого, в котором они присутствуют в нуклеотидной последовательности полной длины, кодирующей пестицидный белок, раскрытый в данном документе, в зависимости от предполагаемого применения. Под "смежными" нуклеотидами подразумеваются нуклеотидные остатки, непосредственно прилегающие друг к другу. Фрагменты нуклеотидных последовательностей по настоящему изобретению будут кодировать белковые фрагменты, которые сохраняют биологическую активность пестицидного белка и, таким образом, сохраняют пестицидную активность. Таким образом, также охватываются биологически активные фрагменты полипептидов, раскрытые в данном документе. Под выражением "сохраняет активность" подразумевается, что фрагмент будет обладать пестицидной активностью, составляющей по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 70%, 80%, 90%, 95% или выше от таковой пестицидного белка. В одном варианте осуществления пестицидная активность представляет собой пестицидную активность против жесткокрылых насекомых. В другом варианте осуществления пестицидная активность представляет собой пестицидную активность против чешуекрылых насекомых. В другом варианте осуществления пестицидная активность представляет собой пестицидную активность против нематод. В другом варианте осуществления пестицидная активность представляет собой пестицидную активность против двукрылых насекомых. Способы измерения пестицидной активности хорошо известны в данной области техники. 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, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Фрагмент нуклеотидной последовательности, кодирующей пестицидный белок, который кодирует биологически активную часть белка по настоящему изобретению, будет кодировать по меньшей мере около 15, 25, 30, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550 или 600 смежных аминокислот или количество аминокислот вплоть до общего такового, в котором они присутствуют в пестицидном белке полной длины по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления фрагмент характеризуется N-концевым или C-концевым усечением по меньшей мере около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25 или более аминокислот по сравнению с SEQ ID NO: 2, 3 или 4. В некоторых вариантах осуществления фрагменты, охватываемые в данном документе, получаются в результате удаления C-концевых 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25 или более аминокислот, например, путем протеолиза или путем вставки стоп-кодона в кодирующую последовательность.

Предпочтительные пестицидные белки по настоящему изобретению кодируются нуклеотидной последовательностью, в достаточной степени идентичной по отношению к нуклеотидной последовательности с SEQ ID NO: 1, или пестицидные белки в достаточной степени идентичны по отношению к аминокислотной последовательности, приведенной под SEQ ID NO: 2, 3 или 4. Под "в достаточной степени идентичной" подразумевается аминокислотная или нуклеотидная последовательность, обладающая идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере около 60 или 65%, идентичностью последовательности, составляющей около 70 или 75%, идентичностью последовательности, составляю-

шей около 80 или 85%, идентичностью последовательности, составляющей около 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более по сравнению с эталонной последовательностью, определенной при помощи одной из программ выравнивания, описанных в данном документе, с применением стандартных параметров. Специалист в данной области примет во внимание, что эти значения можно соответствующим образом корректировать для определения соответствующей идентичности белков, кодируемых двумя нуклеотидными последовательностями, учитывая вырожденность кодонов, подобие аминокислот, положение рамки считывания и т.п.

Для определения процентной идентичности двух аминокислотных последовательностей или двух нуклеиновых кислот последовательности выравнивают в целях оптимального сравнения. Процентная идентичность двух последовательностей зависит от количества идентичных положений, общих для последовательностей (т.е. процентная идентичность = количество идентичных положений / общее количество положений (например, перекрывающихся положений) × 100). В одном варианте осуществления две последовательности имеют одинаковую длину. В другом варианте осуществления процентную идентичность рассчитывают по всей эталонной последовательности (например, по всей SEQ ID NO: 1 или по всей одной из SEQ ID NO: 2, 3 или 4). Процентную идентичность двух последовательностей можно определить при помощи методики, подобных описанным ниже, допуская или не допуская гэпы. При расчете процентной идентичности обычно подсчитываются точные совпадения. Гэп, т.е. положение при выравнивании, где остаток присутствует в одной последовательности, но не в другой, считают положением с неидентичными остатками.

Определение процентной идентичности двух последовательностей можно выполнить с применением математического алгоритма. Неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения двух последовательностей, является алгоритм Карлина-Альтшуля (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264 в модификации Карлина и Альтшуля (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877. Такой алгоритм включен в программы BLASTN и BLASTX по Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403. Операции поиска нуклеотидов с помощью BLAST можно осуществлять в программе BLASTN, результат подсчета = 100, длина слова = 12, с получением нуклеотидных последовательностей, гомологичных молекулам нуклеиновых кислот, подобных пестицидным таковым, по настоящему изобретению. Операции поиска белков с помощью BLAST можно осуществлять в программе BLASTX, результат подсчета = 50, длина слова = 3, с получением аминокислотных последовательностей, гомологичных молекулам пестицидных белков по настоящему изобретению. Для получения выравнивания с гэпами в целях сравнения можно использовать BLAST с гэпами (в BLAST 2.0) согласно описанному в Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389. Альтернативно, можно применять PSI-Blast для осуществления итеративного поиска, выявляющего отдаленное родство между молекулами. См. Altschul et al. (1997) выше. При использовании программ BLAST, BLAST с гэпами и PSI-Blast можно применять параметры по умолчанию соответствующих программ (например, BLASTX и BLASTN). Выравнивание можно также осуществлять вручную путем подбора.

Другим неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения последовательностей, является алгоритм ClustalW (Higgins et al. (1994) *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680). В ClustalW сравниваются последовательности и производится выравнивание всей аминокислотной последовательности или последовательности ДНК, и в нем, таким образом, могут обеспечиваться данные о консервативности последовательности, присущей всей аминокислотной последовательности. Алгоритм ClustalW применяют в некоторых коммерчески доступных пакетах программного обеспечения для анализа ДНК/аминокислот, таких как модуль ALIGNX комплекта программ Vector NTI (Invitrogen Corporation, Карлсбад, Калифорния). После выравнивания аминокислотных последовательностей с помощью ClustalW можно провести оценку процентной идентичности аминокислот. Неограничивающим примером программы из системы программного обеспечения, применимой в анализе выравниваний с помощью ClustalW, является GENEDOC™. GENEDOC™ (Karl Nicholas) позволяет проводить оценку подобия и идентичности аминокислот (или ДНК) между несколькими белками. Другим неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения последовательностей, является алгоритм Майерса-Миллера (1988) *CABIOS* 4:11-17. Такой алгоритм включен в программу ALIGN (версия 2.0), которая является частью пакета программного обеспечения GCG Wisconsin Genetics, версия 10 (доступного от Accelrys, Inc., 9685 Scranton Rd., Сан-Диего, Калифорния, США). При использовании программы ALIGN для сравнения аминокислотных последовательностей можно применять таблицу весов замен аминокислотных остатков PAM120, штраф за продолжение гэпа, равный 12, и штраф за открытие гэпа, равный 4.

Если не указано иное, будет применяться GAP версии 10, в котором применяется алгоритм Нидмана-Вунша (1970) *J. Mol. Biol.* 48(3):443-453, для определения идентичности или подобия последовательностей с применением следующих параметров: % идентичности и % подобия для нуклеотидной последовательности с применением веса гэпа, равного 50, и веса длины, равного 3, и матрицы замен `nwsgardna.cmp`; % идентичности или % подобия для аминокислотной последовательности с применением веса гэпа, равного 8, и веса длины, равного 2, и программы подсчета BLOSUM62. Также можно приме-

нять эквивалентные программы. Под "эквивалентной программой" подразумевается любая программа для сравнения последовательностей, в которой для любых двух рассматриваемых последовательностей осуществляется построение выравнивания, характеризующегося идентичными совпадениями нуклеотидных остатков и идентичной процентной идентичностью последовательностей по сравнению с соответствующими выравниваниями, построение которых осуществляется в GAP версии 10. Настоящее изобретение также охватывает молекулы вариантов нуклеиновых кислот. "Варианты" нуклеотидных последовательностей, кодирующих пестицидные белки, включают последовательности, которые кодируют пестицидные белки, раскрытые в данном документе, но которые обладают консервативными различиями вследствие вырожденности генетического кода, а также таковые, являющиеся в достаточной степени идентичными, как обсуждалось выше. Аллельные варианты, встречающиеся в природе, могут быть идентифицированы с применением хорошо известных методик молекулярной биологии, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР) и методики гибридизации, представленные в общем виде ниже. Варианты нуклеотидных последовательностей также включают нуклеотидные последовательности, полученные синтетически, которые были образованы, например, путем применения сайт-направленного мутагенеза, но которые по-прежнему кодируют пестицидные белки, раскрытые в настоящем изобретении, как обсуждается ниже. Варианты белков, охватываемые настоящим изобретением, являются биологически активными, т.е. они продолжают обладать желаемой биологической активностью нативного белка, т.е. пестицидной активностью. Под выражением "сохраняет активность" подразумевается, что вариант будет обладать пестицидной активностью, составляющей по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 70% или по меньшей мере около 80% от таковой нативного белка. Способы измерения пестицидной активности хорошо известны в данной области техники. 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, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Специалист в данной области дополнительно признает, что с помощью мутации нуклеотидных последовательностей по настоящему изобретению могут быть внесены изменения, что приводит, таким образом, к изменениям в аминокислотной последовательности кодируемых пестицидных белков без изменения биологической активности белков. Таким образом, молекулы вариантов выделенных нуклеиновых кислот можно создать путем внедрения одного или нескольких из нуклеотидных замен, добавлений или делеций в соответствующую нуклеотидную последовательность, раскрытую в данном документе, таким образом, что в кодируемый белок внедряется одно или несколько из аминокислотных замен, добавлений или делеций. Мутации можно внедрять с помощью стандартных методик, таких как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. Такие варианты нуклеотидных последовательностей также охватываются настоящим изобретением.

Например, консервативные аминокислотные замены могут быть произведены в отношении одного или нескольких предсказанных несущественных аминокислотных остатков. "Несущественный" аминокислотный остаток представляет собой остаток, который можно изменить в последовательности дикого типа пестицидного белка без изменения биологической активности, тогда как "существенный" аминокислотный остаток является необходимым для биологической активности. "Консервативная аминокислотная замена" является таковой, при которой аминокислотный остаток замещают аминокислотным остатком, имеющим сходную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые цепи, определены в данной области техники. Эти семейства 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),  $\beta$ -разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин).

Аминокислотные замены могут быть произведены в неконсервативных областях, которые сохраняют свою функцию. Обычно такие замены не могут быть произведены в отношении консервативных аминокислотных остатков или в отношении аминокислотных остатков, которые находятся в консервативном мотиве, 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 являются идентичными среди всех белков, содержащихся в выравнивании токсинов, сходных или родственных в отношении последовательностей по настоящему изобретению (например, остатки, которые являются идентичными в выравнивании гомологичных белков). Примеры остатков, которые являются консервативными, но в отношении которых могут допускаться консервативные аминокислотные замены и которые по-прежнему сохраняют активность, включают, например, остатки, характеризующиеся только консервативными заменами среди всех белков, содержащихся в выравнивании токсинов, сходных или родственных в отношении последовательностей по настоящему изобретению (например, остатки, характеризующиеся только консервативными заменами среди всех белков, содержащихся в выравнивании гомологичных белков). Однако специалист в данной области поймет, что

функциональные варианты могут иметь минорные консервативные или неконсервативные изменения консервативных остатков.

Альтернативно, варианты нуклеотидных последовательностей можно создавать путем внедрения мутаций случайным образом во всей или части кодирующей последовательности, как, например, путем насыщающего мутагенеза, а полученных мутантов можно подвергать скринингу в отношении их способности придавать пестицидную активность, чтобы идентифицировать мутантов, которые сохраняют активность. После мутагенеза кодируемый белок может экспрессироваться рекомбинантным путем, и активность белка можно определить с помощью стандартных методик анализа.

При применении способов, таких как ПЦР, гибридизация и т.п., можно идентифицировать соответствующие пестицидные последовательности, при этом такие последовательности обладают существенной идентичностью по отношению к последовательностям по настоящему 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 всю пестицидную нуклеотидную последовательность или ее часть можно применять для скрининга библиотек кДНК или геномных библиотек. Способы конструирования таких библиотек кДНК и геномных библиотек, как правило, известны в данной области техники и раскрыты в Sambrook and Russell, 2001, выше. Так называемые гибридизационные зонды могут быть фрагментами геномной ДНК, фрагментами кДНК, фрагментами РНК или другими олигонуклеотидами и могут быть мечеными детектируемой группой, такой как  $^{32}\text{P}$ , или любым другим детектируемым маркером, таким как другой радиоактивный изотоп, флуоресцентное соединение, фермент или кофактор фермента. Зонды для гибридизации можно создать путем мечения синтетических олигонуклеотидов на основе известной нуклеотидной последовательности, кодирующей пестицидный белок, раскрытой в данном документе. Дополнительно можно применять вырожденные праймеры, разработанные на основе консервативных нуклеотидов или аминокислотных остатков в нуклеотидной последовательности или кодируемой аминокислотной последовательности. Зонд обычно содержит область нуклеотидной последовательности, которая гибридизируется в жестких условиях по меньшей мере с около 12, по меньшей мере с около 25, по меньшей мере с около 50, 75, 100, 125, 150, 175 или 200 последовательными нуклеотидами нуклеотидной последовательности, кодирующей пестицидный белок по настоящему изобретению, или ее фрагмента или варианта. Способы получения зондов для гибридизации, как правило, известны в данной области техники и раскрыты в Sambrook and Russell, 2001, выше, включенном в данный документ посредством ссылки.

Например, всю пестицидную последовательность, раскрытую в данном документе, или одну или несколько ее частей можно применять в качестве зонда, способного к специфической гибридизации с соответствующими последовательностями, подобными таковым пестицидного белка, и матричными РНК. Для достижения специфической гибридизации в различных условиях такие зонды включают последовательности, являющиеся уникальными и предпочтительно имеющими длину по меньшей мере около 10 нуклеотидов или имеющими длину по меньшей мере около 20 нуклеотидов. Такие зонды можно применять для амплификации соответствующих пестицидных последовательностей из выбранного организма с помощью ПЦР. Данную методику можно применять для выделения дополнительных кодирующих последовательностей из желаемого организма или в качестве диагностического анализа для определения наличия кодирующих последовательностей в организме. Методики гибридизации включают гибридизационный скрининг высевных на чашки библиотек ДНК (бляшек либо колоний; см., например, Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York).

Таким образом, настоящее изобретение охватывает зонды для гибридизации, а также нуклеотидные последовательности, способные к гибридизации со всей нуклеотидной последовательностью по настоящему изобретению или с ее частью (длина которой составляет, например, по меньшей мере около 100 нуклеотидов, по меньшей мере около 200, по меньшей мере около 300, 400, 500, 600, 800, 1000, 1250, 1500 или вплоть до полной длины нуклеотидной последовательности, раскрытой в данном документе). Гибридизация таких последовательностей может быть проведена в жестких условиях. Под "жесткими условиями" или "жесткими условиями гибридизации" подразумеваются условия, в которых зонд будет гибридизоваться с его целевой последовательностью в заметно большей степени, чем с другими последовательностями (например, с превышением фонового уровня по меньшей мере в 2 раза). Жесткие условия зависят от последовательности и будут различаться в различных обстоятельствах. Путем регуляции жесткости гибридизации и/или условий промывки можно идентифицировать целевые последовательности, на 100% комплементарные по отношению к зонду (применение гомологичного зонда). Альтернативно, условия жесткости можно корректировать для того, чтобы допустить некоторое несовпадение в последовательностях таким образом, что будут выявляться более низкие степени подобия (применение гетерологичного зонда). Зонд обычно имеет длину, составляющую менее чем около 1000 нуклеотидов, предпочтительно имеет длину, составляющую менее 500 нуклеотидов.

Жесткие условия обычно будут такими, при которых концентрация соли составляет менее чем око-

ло 1,5М ионов Na, обычно являясь концентрацией ионов Na (или других солей), составляющей от около 0,01 до 1,0М при pH от 7,0 до 8,3, а температура составляет 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, более чем 50 нуклеотидов). Жестких условий также можно достичь путем добавления дестабилизирующих средств, таких как формамид. Иллюстративные условия пониженной жесткости включают гибридизацию с буферным раствором, содержащим 30-35% формамид, 1М NaCl, 1% SDS (додецилсульфат натрия), при 37°C и промывку в 1X-2X SSC (20X SSC = 3,0М NaCl/0,3М цитрат тринатрия) при 50-55°C. Иллюстративные условия умеренной жесткости включают гибридизацию в 40-45% формамиде, 1,0М NaCl, 1% SDS при 37°C и промывку в 0,5X-1X SSC при 55-60°C. Иллюстративные условия повышенной жесткости включают гибридизацию в 50% формамиде, 1М NaCl, 1% SDS при 37°C и промывку в 0,1X SSC при 60-65°C. Промывочные буферы необязательно могут содержать от около 0,1% до около 1% SDS. Продолжительность гибридизации, как правило, составляет менее чем около 24 ч, обычно от около 4 до около 12 ч. Специфичность обычно зависит от промывок после гибридизации, при этом критическими факторами являются ионная сила и температура конечного промывочного раствора. Для гибридов ДНК-ДНК  $T_m$  можно приблизительно определить из уравнения Майнкота-Валя (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 молярную концентрацию моновалентных катионов, % GC представляет собой процентное содержание гуанозиновых и цитозиновых нуклеотидов в ДНК, % форм представляет собой процентное содержание формамида в гибридизационном растворе, а L представляет собой длину гибрида в парах оснований.  $T_m$  представляет собой температуру (при определенных ионной силе и pH), при которой 50% комплементарной целевой последовательности гибридизируется с абсолютно совпадающим зондом.  $T_m$  снижают на около 1°C с каждым 1% несовпадения; таким образом,  $T_m$ , условия гибридизации и/или промывки можно откорректировать для гибридизации с последовательностями, обладающими желаемой идентичностью. Например, если проводят поиск последовательностей с  $\geq 90\%$  идентичностью, то  $T_m$  можно снизить на 10°C. Обычно жесткие условия выбирают так, чтобы температура была на около 5°C ниже, чем точка плавления ( $T_m$ ) конкретной последовательности и комплементарной ей последовательности при определенных ионной силе и pH. Однако в условиях чрезвычайной жесткости можно использовать температуру гибридизации и/или промывки, на 1, 2, 3 или 4°C более низкую, чем точка плавления ( $T_m$ ); в условиях умеренной жесткости можно использовать температуру гибридизации и/или промывки, на 6, 7, 8, 9 или 10°C более низкую, чем точка плавления ( $T_m$ ); в условиях пониженной жесткости можно использовать температуру гибридизации и/или промывки, на 11, 12, 13, 14, 15 или 20°C более низкую, чем точка плавления ( $T_m$ ). Применяя уравнение, гибридизационные и промывочные композиции и желаемую  $T_m$ , средний специалист в данной области поймет, что изменения жесткости гибридизационных и/или промывочных растворов описаны по своей сути. Если желаемая степень несовпадения дает в результате  $T_m$  менее 45°C (водный раствор) или 32°C (раствор формамида), предпочтительно повышать концентрацию SSC так, чтобы можно было применять более высокую температуру. Обширное руководство по гибридизации нуклеиновых кислот находится 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, а также их варианты и фрагменты.

Пестицидные белки также охватываются настоящим изобретением. Под "пестицидным белком" подразумевается белок, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 2, 3 или 4. Также представлены фрагменты, биологически активные части и их варианты, и они могут быть использованы для практического осуществления способов настоящего изобретения. Выражение "выделенный белок" или "рекомбинантный белок" применяется для обозначения белка, который больше не находится в своей естественной среде, например находится в условиях *in vitro* или в рекомбинантной бактериальной или растительной клетке-хозяине.

"Фрагменты" или "биологически активные части" включают фрагменты полипептидов, содержащие аминокислотные последовательности, в достаточной степени идентичные по отношению к аминокислотным последовательностям, приведенным под SEQ ID NO: 2, 3 или 4, и проявляющие пестицидную активность. Биологически активная часть пестицидного белка может представлять собой полипептид, имеющий длину, например, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 или более аминокислот. Такие биологически активные части можно получить с помощью методик рекомбинантных молекул и оценить в отношении пестицидной активности. Способы измерения пестицидной активности хорошо известны в данной области техники. 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, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Как применяется в данном документе, фрагмент содержит по меньшей мере 8 смежных аминокислот SEQ ID NO: 2, 3 или 4. Настоящее изобретение охватывает, однако, другие фрагменты, как, например, любой фрагмент белка, имеющий длину, превышающую около 10, 20, 30, 50, 100,

150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 или более аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент характеризуется N-концевым или C-концевым усечением по меньшей мере около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25 или более аминокислот по сравнению с SEQ ID NO: 2, 3 или 4.

Под "вариантами" подразумеваются белки или полипептиды, имеющие аминокислотную последовательность, по меньшей мере на около 60, 65, около 70, 75, около 80, 85, около 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную по отношению к аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 2, 3 или 4. Варианты также включают полипептиды, кодируемые молекулой нуклеиновой кислоты, которая гибридизируется с молекулой нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1 или с комплементарной ей последовательностью в жестких условиях. Варианты включают полипептиды, различающиеся по аминокислотной последовательности в связи с мутагенезом. Варианты белков, охватываемые настоящим изобретением, являются биологически активными, т.е. они продолжают обладать желаемой биологической активностью нативного белка, т.е. сохранять пестицидную активность. В некоторых вариантах осуществления варианты обладают улучшенной активностью по сравнению с нативным белком. Способы измерения пестицидной активности хорошо известны в данной области техники. См., например, Czapla and Lang (1990) *J. Econ. Entomol.* 83:2480-2485; Andrews et al. (1988) *Biochem. J.* 252:199-206; Marrone et al. (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293 и патент США № 5743477, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Гены бактерий, такие как гены *axm1* по настоящему изобретению, довольно часто имеют несколько метиониновых инициаторных кодонов в непосредственной близости от начала открытой рамки считывания. Часто инициация трансляции на одном или нескольких из этих стартовых кодонов приводит к образованию функционального белка. Эти стартовые кодоны могут включать ATG-кодоны. Однако бактерии, такие как *Bacillus sp.*, также распознают GTG-кодон как стартовый кодон, и белки, иницирующие трансляцию на GTG-кодонах, содержат аминокислоту метионин в первом положении. В редких случаях трансляция в бактериальных системах может иницироваться на TTG-кодоне, хотя в этом случае TTG кодирует метионин. Кроме того, часто не определено *arg101*, какой из этих кодонов применяют в бактерии естественным образом. Таким образом, понятно, что применение одного из альтернативных метиониновых кодонов также может приводить к образованию пестицидных белков. Эти пестицидные белки охватываются настоящим изобретением, и их можно применять в способах по настоящему изобретению. Будет понятно, что при экспрессии в растениях будет необходимо изменять альтернативный стартовый кодон на ATG для надлежащей трансляции.

В различных вариантах осуществления настоящего изобретения пестицидные белки содержат аминокислотные последовательности, расшифрованные на основании нуклеотидных последовательностей полной длины, раскрытых в данном документе, и аминокислотные последовательности, которые являются более короткими, чем последовательности полной длины, в связи с применением альтернативного нижерасположенного сайта инициации. Таким образом, нуклеотидная последовательность по настоящему изобретению и/или векторы, клетки-хозяева и растения, содержащие нуклеотидную последовательность по настоящему изобретению (и способы получения и применения нуклеотидной последовательности по настоящему изобретению), могут содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность, соответствующую остаткам 19-536 SEQ ID NO: 2 (приведенным под SEQ ID NO: 3) или остаткам 21-536 SEQ ID NO: 2 (приведенным под SEQ ID NO: 4).

Также охватываются антитела к полипептидам по настоящему изобретению или к их вариантам или фрагментам. Способы получения антител хорошо известны в данной области техники (см., например, Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; патент США № 4196265).

Таким образом, один аспект настоящего изобретения относится к антителам, одноцепочечным антиген-связывающим молекулам или другим белкам, специфически связывающимся с одной или несколькими молекулами белков или пептидов по настоящему изобретению и их гомологами, молекулами слияния или фрагментами. В особенно предпочтительном варианте осуществления антитело специфически связывается с белком, имеющим аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 2, 3 или 4, или с его фрагментом. В другом варианте осуществления антитело специфически связывается с белком слияния, содержащим аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотной последовательности, приведенной под SEQ ID NO: 2, 3 или 4, или с его фрагментом.

Антитела по настоящему изобретению можно применять для количественного или качественного выявления молекул белков или пептидов по настоящему изобретению или для выявления посттрансляционных модификаций белков. Как применяется в данном документе, говорят, что антитело или пептид "специфически связываются" с молекулой белка или пептида по настоящему изобретению, если такое связывание не подвергается конкурентному ингибированию благодаря наличию неродственных молекул.

Измененные или улучшенные варианты.

Считается, что последовательности ДНК, кодирующие пестицидный белок, можно изменять с помощью различных способов, и что эти изменения могут давать в результате последовательности ДНК, кодирующие белки с аминокислотными последовательностями, отличными от кодируемых в пестицид-

ном белке по настоящему изобретению. Этот белок можно изменять различными способами, включая аминокислотные замены, делеции, усечения и вставки одной или нескольких аминокислот SEQ ID NO: 2, 3 или 4, включая до около 2, около 3, около 4, около 5, около 6, около 7, около 8, около 9, около 10, около 15, около 20, около 25, около 30, около 35, около 40, около 45, около 50, около 55, около 60, около 65, около 70, около 75, около 80, около 85, около 90, около 100, около 105, около 110, около 115, около 120, около 125, около 130, около 135, около 140, около 145, около 150, около 155 или более аминокислотных замен, делеций или вставок. Способы таких действий хорошо известны в данной области техники. Например, варианты аминокислотных последовательностей пестицидного белка можно получить с помощью мутаций в ДНК. Это также может быть выполнено с помощью одной или нескольких форм мутагенеза и/или при направленном развитии. В некоторых аспектах изменения кодируемые в аминокислотной последовательности, не будут существенно влиять на функцию белка. Такие варианты будут обладать желаемой пестицидной активностью. Тем не менее, понятно, что способность пестицидного белка к приданию пестицидной активности может быть улучшена путем применения таких методик в отношении композиций по настоящему изобретению. Например, можно экспрессировать пестицидный белок в клетках-хозяевах, которые проявляют высокие показатели ошибочного включения оснований при репликации ДНК, таких как XL-1 Red (Stratagene, Ла-Хойя, Калифорния). После размножения таких штаммов можно выделить ДНК (например, путем получения плазмидной ДНК или путем амплификации с помощью ПНР и клонирования полученного в результате ПЦР фрагмента в вектор), поддерживать мутации пестицидных белков в культуре немутагенного штамма и идентифицировать мутантные гены с пестицидной активностью, например, путем осуществления анализа для тестирования в отношении пестицидной активности. Как правило, белок смешивают и применяют в анализах питания. См., например, Margone et al. (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293. Такие анализы могут включать приведение растений в контакт с одним или несколькими вредителями и определение способности растения к выживанию и/или вызыванию гибели вредителей. Примеры мутаций, приводящих в результате к повышенной токсичности, находятся в Schnepf et al. (1998) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:775-806.

Альтернативно, в белковую последовательность многих белков могут быть внесены изменения на amino- или карбоксиконце без существенного влияния на активность. Они могут включать вставки, делеции или изменения, внедряемые с помощью современных молекулярных способов, таких как ПЦР, включая ПЦР-амплификации, изменяющие или удлиняющие последовательность, кодирующую белок, посредством включения последовательностей, кодирующих аминокислоты, в олигонуклеотиды, используемые в ПЦР-амплификации. Альтернативно, добавляемые белковые последовательности могут включать целые последовательности, кодирующие белки, такие как широко применяемые в данной области техники для образования белков слияния. Такие белки слияния часто применяют для (1) повышения уровня экспрессии белка, представляющего интерес, (2) внедрения связывающего домена, ферментативной активности или эпитопа для способствования очищению белка, выявлению белка либо другим путем экспериментального применения, известным в данной области техники, (3) целевой секреции или трансляции белка в субклеточную органеллу, такую как периплазматическое пространство грамотрицательных бактерий или эндоплазматический ретикулум эукариотических клеток, причем последняя часто приводит в результате к гликозилированию белка.

Варианты нуклеотидных и аминокислотных последовательностей по настоящему изобретению также охватывают последовательности, полученные в результате мутагенных и рекомбиногенных процедур, таких как ДНК-шаффлинг. С помощью такой процедуры одну или несколько различных областей, кодирующих пестицидный белок, можно применять для создания нового пестицидного белка, обладающего желаемыми свойствами. Таким образом, библиотеки рекомбинантных полинуклеотидов образуют из совокупности полинуклеотидов с родственными последовательностями, содержащих области последовательностей, обладающие значительной идентичностью последовательностей и могущие быть подвергнутыми гомологичной рекомбинации в условиях *in vitro* или *in vivo*. Например, при использовании такого подхода мотивы последовательностей, кодирующие домен, представляющий интерес, можно подвергнуть шаффлингу между пестицидным геном по настоящему изобретению и другими известными пестицидными генами с получением нового гена, кодирующего белок с улучшенным свойством, представляющим интерес, таким как повышенная инсектицидная активность. Стратегии такого ДНК-шаффлинга известны в данной области техники. См., например, Stemmer (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-10751; Stemmer (1994) *Nature* 370:389-391; Crameri et al. (1997) *Nature Biotech.* 15:436-438; Moore et al. (1997) *J. Mol. Biol.* 272:336-347; Zhang et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4504-4509; Crameri et al. (1998) *Nature* 391:288-291 и патенты США №№ 5605793 и 5837458.

Перестановка или шаффлинг доменов представляет собой другой механизм образования измененных пестицидных белков. Домены можно подвергнуть перестановке между пестицидными белками (в том числе, например, белком Axtm205, изложенным в публикации патента США № 20110023184), что дает в результате гибридные или химерные токсины с улучшенными пестицидной активностью или спектром действия на целевые организмы. Способы образования рекомбинантных белков и их тестирования в отношении пестицидной активности хорошо известны в данной области техники (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.

Пестицидную последовательность по настоящему изобретению можно обеспечить в экспрессионной кассете для экспрессии в растении, представляющем интерес. Под "экспрессионной кассетой для растения" подразумевается ДНК-конструкт, способный обуславливать экспрессию белка с открытой рамки считывания в растительной клетке. Он обычно содержит промотор и кодирующую последовательность. Такие конструкты также часто содержат 3'-нетранслируемую область. Такие конструкты могут содержать "сигнальную последовательность" или "лидерную последовательность", способствующую котрансляционному или посттрансляционному транспорту пептида в определенные внутриклеточные структуры, такие как хлоропласт (или другая пластида), эндоплазматический ретикулум или аппарат Гольджи.

Под "сигнальной последовательностью" подразумевается последовательность, которая, как известно или как предполагают, обуславливает котрансляционный или посттрансляционный транспорт пептидов по клеточной мембране. У эукариот он обычно включает секрецию в аппарат Гольджи с некоторым происходящим в результате гликозилированием. Инсектицидные токсины бактерий часто синтезируются как протоксины, которые подвергаются протеолитической активации в кишке целевого вредителя (Chang (1987) *Methods Enzymol.* 153:507-516). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сигнальная последовательность расположена в нативной последовательности или может быть получена из последовательности по настоящему изобретению. Под "лидерной последовательностью" подразумевается любая последовательность, которая при трансляции дает в результате аминокислотную последовательность, достаточную для запуска котрансляционного транспорта пептидной цепи в субклеточную органеллу. Таким образом, это понятие включает лидерные последовательности, целенаправленно воздействующие на транспорт и/или гликозилирование путем прохождения в эндоплазматический ретикулум, прохождения в вакуоли, пластиды, включая хлоропласты, митохондрии и т.п.

Под "вектором для трансформации растений" подразумевается молекула ДНК, необходимая для эффективной трансформации растительной клетки. Такая молекула может состоять из одной или нескольких экспрессионных кассет для растений и может быть организована в более чем одну "векторную" молекулу ДНК. Например, бинарные векторы представляют собой векторы для трансформации растений, в которых используются два несмежных ДНК-вектора, кодирующих все необходимые цис- и трансдействующие функции для трансформации растительных клеток (Hellens and Mullineaux (2000) *Trends in Plant Science* 5:446-451). "Вектор" относится к конструкту нуклеиновой кислоты, предназначенному для переноса между различными клетками-хозяевами. "Вектор экспрессии" относится к вектору, имеющему способность к включению, интеграции и экспрессии гетерологичных последовательностей ДНК или фрагментов в чужеродной клетке. Кассета будет включать 5'- и/или 3'-регуляторные последовательности, функционально связанные с последовательностями по настоящему изобретению. Под "функционально связанным" подразумевается функциональная связь между промотором и второй последовательностью, где промоторная последовательность инициирует и опосредует транскрипцию последовательности ДНК, соответствующей второй последовательности. Обычно "функционально связанный" означает, что последовательности связанных нуклеиновых кислот являются смежными, и, если есть необходимость соединить две области, кодирующие белок, они являются смежными и находятся в одной и той же рамке считывания. Кассета может дополнительно содержать по меньшей мере один дополнительный ген для котрансформации в организм. Альтернативно, дополнительный ген (гены) можно обеспечивать в нескольких экспрессионных кассетах.

В различных вариантах осуществления нуклеотидная последовательность по настоящему изобретению функционально связана с промотором, например, с промотором растения. "Промотор" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, функционирующей для управления транскрипцией нижерасположенной кодирующей последовательности. Промотор, а также другие последовательности нуклеиновых кислот, регулирующие транскрипцию и трансляцию (также называемые "контрольными последовательностями"), необходимы для экспрессии последовательности ДНК, представляющей интерес.

Такая экспрессионная кассета обеспечивается со множеством сайтов рестрикции для вставки пестицидной последовательности, регуляцию транскрипции которой будут осуществлять регуляторные области.

Экспрессионная кассета в направлении транскрипции 5'-3' будет включать область инициации транскрипции и трансляции (т.е. промотор), последовательность ДНК по настоящему изобретению и область терминации транскрипции и трансляции (т.е. область терминации), функционирующие в растениях. Промотор может быть нативным или аналогичным, или чужеродным или гетерологичным по отношению к растению-хозяину и/или последовательности ДНК по настоящему изобретению. Дополнительно промотор может представлять собой природную последовательность или, альтернативно, синтетическую последовательность. Если промотор является "нативным" или "гомологичным" по отношению к растению-хозяину, подразумевается, что промотор встречается в нативном растении, в которое внедряют промотор. Если промотор является "чужеродным" или "гетерологичным" по отношению к после-

довательности ДНК по настоящему изобретению, подразумевается, что промотор не является нативным или встречающимся в природе промотором по отношению к функционально связанной последовательности ДНК по настоящему изобретению.

Область терминации может быть нативной по отношению к области инициации транскрипции, может быть нативной по отношению к функционально связанной последовательности ДНК, представляющей интерес, может быть нативной по отношению к растению-хозяину или может происходить из другого источника (т.е. чужеродного или гетерологичного по отношению к промотору, последовательности ДНК, представляющей интерес, растению-хозяину или любой их комбинации). Подходящие области терминации доступны из Ti-плазмиды *A tumefaciens*, такие как области терминации генов 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.

При необходимости ген(ы) можно оптимизировать для экспрессии в трансформированной клетке-хозяине на повышенном уровне. Это значит, что гены можно синтезировать при помощи кодонов, предпочтительных для клетки-хозяина, для улучшения экспрессии или можно синтезировать при помощи кодонов при частоте использования кодона, предпочтительной для хозяина. Обычно содержание GC в гене будет повышенным. См., например, Campbell and Gowri (1990) *Plant Physiol.* 92:1-11 относительно обсуждения частоты использования кодона, предпочтительной для хозяина.

Способы синтеза генов, предпочтительных для растений, доступны в данной области техники. См., например, патенты США №№ 5380831 и 5436391, публикацию патента США № 20090137409 и Murray et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:477-498, включенные в данный документ посредством ссылки.

В одном варианте осуществления пестицидный белок нацелен на хлоропласт для экспрессии. Таким образом, если пестицидный белок не является непосредственно введенным в хлоропласт, то экспрессионная кассета будет дополнительно содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую транзитный пептид для направления пестицидного белка к хлоропластам. Такие транзитные пептиды известны в данной области техники. 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.

Пестицидный ген, подлежащий нацеливанию на хлоропласт, может быть оптимизирован для экспрессии в хлоропласте для подсчета отличий в частоте использования кодона между растительным ядром и этой органеллой. Таким образом, нуклеиновые кислоты, представляющие интерес, можно синтезировать при помощи кодонов, предпочтительных для хлоропластов. См., например, патент США № 5380831, включенный в данный документ посредством ссылки.

#### Трансформация растений.

Способы по настоящему изобретению включают внедрение нуклеотидного конструкта в растение. Под "внедрением" подразумевается представление нуклеотидного конструкта растению таким образом, что конструкт получает доступ к внутренней части клетки растения. Способы по настоящему изобретению не требуют того, чтобы применяли конкретный способ внедрения нуклеотидного конструкта в растение, а только того, чтобы нуклеотидный конструкт получал доступ к внутренней части по меньшей мере одной клетки растения. Способы внедрения нуклеотидных конструктов в растения известны в данной области техники, в том числе, но без ограничений, способы стабильной трансформации, способы транзиентной трансформации и способы, опосредованные вирусами.

Под "растением" подразумеваются целые растения, органы растений (например, листья, стебли, корни и т.д.), семена, растительные клетки, побеги, зародыши и их потомство. Растительные клетки могут быть дифференцированными или недифференцированными (например, каллус, клетки суспензионной культуры, протопласты, клетки листа, клетки корня, клетки флоэмы, пыльца).

"Трансгенные растения", или "трансформированные растения", или "стабильно трансформированные" растения, или клетки, или ткани относятся к растениям, имеющим включенные или интегрированные последовательности экзогенных нуклеиновых кислот или фрагменты ДНК в растительной клетке. Эти последовательности нуклеиновых кислот включают таковые, являющиеся экзогенными или не присутствующими в нетрансформированной растительной клетке, а также таковые, которые могут быть эндогенными или присутствующими в нетрансформированной растительной клетке. "Гетерологичный", как правило, относится к последовательностям нуклеиновых кислот, не являющимся эндогенными по отношению к клетке или части нативного генома, в котором они присутствуют, и добавляемым в клетку путем инфицирования, трансфекции, микроинъекции, электропорации, микропроекции или т.п.

Трансгенные растения по настоящему изобретению экспрессируют одну или несколько последовательностей нового токсина, раскрытых в данном документе. В различных вариантах осуществления трансгенное растение дополнительно содержит один или несколько дополнительных генов устойчивости к насекомым (например, *Cry1*, такие как представители семейств *Cry1A*, *Cry1B*, *Cry1C*, *Cry1D*, *Cry1E* и *Cry1F*; *Cry2*, такие как представители семейства *Cry2A*; *Cry9*, такие как представители семейств *Cry9A*, *Cry9B*, *Cry9C*, *Cry9D*, *Cry9E* и *Cry9F* и т.д.). Специалисту в данной области будет понятно, что трансген-

ное растение может содержать любой ген, придающий агрономический признак, представляющий интерес.

Трансформацию растительных клеток можно выполнять с помощью одной из нескольких методик, известных в данной области техники. Пестицидный ген по настоящему изобретению можно модифицировать с получением или усилением экспрессии в растительных клетках. Конструкт, экспрессирующий такой белок, обычно будет содержать промотор, управляющий транскрипцией гена, а также 3'-нетранслируемую область, обеспечивающую возможность терминации транскрипции и полиаденилирования. Организация таких конструктов хорошо известна в данной области техники. В некоторых случаях может быть полезным такое конструирование гена, что получаемый в результате пептид секретируется или иным образом нацеливается в растительной клетке. Например, ген может быть сконструирован содержащим сигнальный пептид, способствующий переносу пептида в эндоплазматический ретикулум. Также может быть предпочтительным такое конструирование экспрессионной кассеты для растения, содержащей интрон, что для экспрессии требуется процессинг мРНК в отношении интрона.

Обычно эту "экспрессионную кассету для растений" будут вставлять в "вектор для трансформации растений". Этот вектор для трансформации растений может содержать один или несколько ДНК-векторов, необходимых для достижения трансформации растений. Например, обычной практикой в данной области техники является использование векторов для трансформации растений, содержащих более одного смежного сегмента ДНК. Эти векторы часто называют в данной области техники "бинарными векторами". Бинарные векторы, а также векторы с хелперными плазмидами наиболее часто применяют в трансформации, опосредованной *Agrobacterium*, где размер и сложность сегментов ДНК, необходимых для достижения эффективной трансформации, являются достаточно большими, и преимущественным является разделение функций между отдельными молекулами ДНК. Бинарные векторы обычно содержат плазмидные векторы, содержащие цис-действующие последовательности, требуемые для переноса Т-ДНК (такие как левая пограничная и правая пограничная), селективируемый маркер, сконструированный способным к экспрессии в растительной клетке, и "ген, представляющий интерес" (ген, сконструированный способным к экспрессии в растительной клетке, создание трансгенных растений по которому является желаемым). Также в этом плазмидном векторе присутствуют последовательности, требуемые для репликации у бактерий. Цис-действующие последовательности размещаются таким образом, чтобы обеспечить возможность эффективного переноса в растительные клетки и экспрессии в них. Например, селективируемый маркерный ген и пестицидный ген располагаются между левой и правой границами. Часто второй плазмидный вектор содержит транс-действующие факторы, которые опосредуют перенос Т-ДНК из *Agrobacterium* в растительные клетки. Эта плаزمида часто содержит факторы вирулентности (гены *Vir*), обеспечивающие возможность инфицирования растительных клеток с помощью *Agrobacterium* и переноса ДНК путем расщепления по пограничным последовательностям и *vir*-опосредованного переноса ДНК, как понимают в данной области техники (Hellens and Mullineaux (2000) *Trends in Plant Science* 5:446-451). Для трансформации растений можно применять несколько типов штаммов *Agrobacterium* (например, LBA4404, GV3101, EHA101, EHA105 и т.п.). Второй плазмидный вектор не является необходимым для трансформации растений с помощью других способов, таких как микропроекция, микроинъекция, электропорация, применение полиэтиленгликоля и т.д.

В целом, способы трансформации растений включают перенос гетерологичной ДНК в целевые растительные клетки (например, незрелые или зрелые зародыши, суспензионные культуры, недифференцированный каллус, протопласты и т.д.) с последующим применением соответствующей селекции на максимальном пороговом уровне (в зависимости от селективируемого маркерного гена) для извлечения трансформированных растительных клеток из группы нетрансформированных клеток в массе. Эксплантаты обычно переносят в свежеприготовленный запас той же среды и культивируют по стандартной методике. Впоследствии трансформированные клетки дифференцируются в ростки после помещения в регенерационную среду, дополненную селективным средством на максимальном пороговом уровне. Ростки затем переносят в селективную среду для укоренения для извлечения укоренившихся ростков или проростков. Из трансгенного проростка затем вырастает 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). Эксплантаты обычно переносят в свежеприготовленный запас той же среды и культивируют по стандартной методике. Общее описание методик и способов создания трансгенных растений находится в Ayres and Park (1994) *Critical Reviews in Plant Science* 13:219-239 и в Bommineni and Jauhar (1997) *Maydica* 42:107-120. Поскольку трансформированный материал содержит много клеток, то в любом участке подвергаемых воздействию целевых каллуса, или ткани, или группы клеток присутствуют как трансформированные, так и нетрансформированные клетки. Способность к уничтожению нетрансформированных клеток и обеспечению возможности пролиферации трансформированных клеток дает в результате культуры трансформированных растений. Способность к удалению нетрансформированных клеток часто ограничивает быстрое извлечение трансформированных растительных клеток и удачное создание трансгенных растений.

Протоколы трансформации, а также протоколы внедрения нуклеотидных последовательностей в растения могут различаться в зависимости от типа растения или растительной клетки, т.е. однодольных

или двудольных, намеченных для трансформации. Создание трансгенных растений можно осуществлять с помощью одного из нескольких способов, включая, но без ограничений, микроинъекцию, электропорацию, прямой перенос генов, внедрение гетерологичной ДНК с помощью *Agrobacterium* в растительные клетки (трансформация, опосредованная *Agrobacterium*), бомбардировку растительных клеток с помощью гетерологичной чужеродной ДНК, налипающей на частицы, баллистическое ускорение частиц, трансформацию с помощью пучка аэрозольных частиц (опубликованная заявка на патент США № 20010026941; патент США № 4945050; международная публикация № WO 91/00915; опубликованная заявка на патент США № 2002015066), трансформацию с помощью *Lec1* и различные другие способы прямого и опосредованного переноса ДНК без применения частиц.

Способы трансформации хлоропластов хорошо известны в данной области техники. 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 основан на доставке ДНК, содержащей селектируемый маркер, с помощью генной пушки и целенаправленном воздействии ДНК на геном пластид посредством гомологичной рекомбинации. Дополнительно, трансформацию пластид можно выполнять посредством трансактивации "молчащего" пластидного трансгена с помощью предпочтительной для ткани экспрессии РНК-полимеразы, кодируемой в ядре и направляемой в пластиды. О такой системе сообщалось в McBride et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:7301-7305.

После интеграции гетерологичной чужеродной ДНК в растительные клетки в среде можно применять соответствующую селекцию на максимальном пороговом уровне для уничтожения нетрансформированных клеток и отделения и обеспечения пролиферации предполагаемых трансформированных клеток, выживших после этой обработки по типу селекции, путем регулярного переноса в свежеприготовленную среду. Путем непрерывного пассирования и испытания с помощью соответствующей селекции идентифицируют клетки, трансформированные с помощью плазмидного вектора, и обеспечивают их пролиферацию. Затем можно применять молекулярные и биохимические способы для подтверждения наличия интегрированного гетерологичного гена, представляющего интерес, в геноме трансгенного растения.

Из трансформированных клеток можно выращивать растения в соответствии с традиционными способами. См., например, McCormick et al. (1986) *Plant Cell Reports* 5:81-84. Эти растения можно затем выращивать и даже опылять одним и тем же трансформированным штаммом или различными штаммами, и можно идентифицировать полученный гибрид, характеризующийся конститутивной экспрессией желаемой фенотипической характеристики. Можно выращивать два или более поколений для гарантирования стабильного поддержания и наследования экспрессии желаемой фенотипической характеристики и затем собирать урожай семян для гарантирования достижения желаемой фенотипической характеристики. Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает трансформированные семена (также называемые "трансгенными семенами"), имеющие нуклеотидный конструктор по настоящему изобретению, например экспрессионную кассету по настоящему изобретению, стабильно включенный в их геном.

Оценивание трансформации растений.

После внедрения гетерологичной чужеродной ДНК в растительные клетки трансформацию или интеграцию гетерологичного гена в геном растений подтверждают с помощью различных способов, таких как анализ нуклеиновых кислот, белков и метаболитов, ассоциированных с интегрированным геном.

ПЦР-анализ является быстрым способом скрининга трансформированных клеток, тканей или ростков в отношении наличия включенного в них гена на ранней стадии перед пересадкой в почву (Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). ПЦР проводят при помощи олигонуклеотидных праймеров, специфичных по отношению к гену, представляющему интерес, или вектору в среде *Agrobacterium*, и т.д.

Трансформацию растений можно подтвердить с помощью Саузерн-блот-анализа геномной ДНК (Sambrook and Russell, 2001, выше). В целом, общую ДНК экстрагируют из трансформанта, расщепляют с помощью соответствующих ферментов рестрикции, фракционируют в агарозном геле и переносят на нитроцеллюлозную или нейлоновую мембрану. Мембрану или "блот" затем зондируют с помощью, например, фрагмента целевой ДНК с радиоактивной меткой <sup>32</sup>P для подтверждения интеграции внедренного гена в геном растения согласно стандартным методикам (Sambrook and Russell, 2001, выше).

В нозерн-блот-анализе РНК выделяют из конкретных тканей трансформанта, фракционируют в агарозном геле, содержащем формальдегид, и блотируют на нейлоновом фильтре согласно стандартным процедурам, обычно применяемым в данной области техники (Sambrook and Russell, 2001, выше). Экспрессию РНК, кодируемой пестицидным геном, затем тестируют путем гибридизации фильтра с радиоактивным зондом, полученным из пестицидного гена, с помощью способов, известных в данной области техники (Sambrook and Russell, 2001, выше).

Вестерн-блоттинг, биохимические анализы и подобное можно проводить на трансгенных растениях для подтверждения наличия белка, кодируемого пестицидным геном, с помощью стандартных процедур (Sambrook and Russell, 2001, выше), применяя антитела, которые связываются с одним или несколькими эпитопами, присутствующими в пестицидном белке.

Пестицидная активность у растений.

В другом аспекте данного изобретения можно создать трансгенные растения, в которых экспрессируется пестицидный белок, обладающий пестицидной активностью. Способы, описанные выше в качестве примера, можно использовать для создания трансгенных растений, но то, каким образом создают трансгенные растительные клетки, не является критически важным для настоящего изобретения. Способы, известные или описанные в данной области техники, такие как трансформация, опосредованная *Agrobacterium*, биобаллистическая трансформация и способы, не опосредованные частицами, можно применять на усмотрение экспериментатора. Растения, в которых экспрессируется пестицидный белок, можно выделять с помощью известных способов, описанных в данной области техники, например, с помощью трансформации каллуса, селекции трансформированного каллуса и регенерации фертильных растений из такого трансгенного каллуса. В таком способе можно применять любой ген в качестве селектируемого маркера, поскольку его экспрессия в растительных клетках обеспечивает возможность идентификации или селекции трансформированных клеток.

Для применения в растительных клетках был разработан ряд маркеров, таких как маркеры устойчивости к хлорамфениколу, аминогликозиду G418, гигромицину и т.п. Другие гены, кодирующие продукт, вовлеченный в метаболизм в хлоропластах, также можно применять в качестве селектируемых маркеров. Например, гены, обеспечивающие устойчивость к гербицидам для растений, таким как глифосат, бромоксинил или имидазолинон, могут находить особенное применение. О таких генах сообщалось в Stalker et al. (1985) *J. Biol. Chem.* 263:6310-6314 (ген нитрилазы, обеспечивающей устойчивость к бромоксинилу); и Sathasivan et al. (1990) *Nucl. Acids Res.* 18:2188 (ген AHAS, обеспечивающей устойчивость к имидазолинону). Дополнительно гены, раскрытые в данном документе, применимы в качестве маркеров для оценки трансформации бактериальных или растительных клеток. Способы выявления наличия трансгена в растениях, органах растений (например, в листьях, стеблях, корнях и т.д.), семенах, растительных клетках, побегах, зародышах или их потомстве хорошо известны в данной области техники. В одном варианте осуществления наличие трансгена выявляют путем тестирования в отношении пестицидной активности.

Фертильные растения, в которых экспрессируется пестицидный белок, можно тестировать в отношении пестицидной активности, а растения, показывающие оптимальную активность, отбирают для дальнейшего разведения. В данной области техники доступны способы для проведения анализа активности в отношении вредителей. Как правило, белок смешивают и применяют в анализах питания. См., например, Marrone et al. (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293.

Настоящее изобретение можно применять для трансформации любых видов растений, включая, но без ограничений, однодольные и двудольные. Примеры растений, представляющих интерес, включают, но без ограничений, кукурузу (маис), сорго, пшеницу, подсолнечник, томат, крестоцветные, виды перца, картофель, хлопчатник, рис, сою, сахарную свеклу, сахарный тростник, табак, ячмень и масличный рапс, *Brassica* sp., люцерну, рожь, просо, сафлор, земляной орех, сладкий картофель, маниок, кофейное дерево, кокосовую пальму, ананас, цитрусовые деревья, какао, чай, банан, авокадо, инжир, гуаву, манго, маслину, папайю, кешью, макадамиию, миндаль, овес, овощи, декоративные растения и хвойные растения.

Овощи включают, но без ограничений, томат, латук, овощную зеленостручковую фасоль, лимскую фасоль, горох и представителей рода *Cucumis*, таких как огурец, канталупа и мускусная дыня. Декоративные растения включают, но без ограничений, азалию, гортензию, гибискус, розу, тюльпан, желтый нарцисс, петунию, гвоздику, пуансетию и хризантему. Предпочтительно растения по настоящему изобретению являются культурными растениями (например, маис, сорго, пшеница, подсолнечник, томат, крестоцветные, виды перца, картофель, хлопчатник, рис, соя, сахарная свекла, сахарный тростник, табак, ячмень, масличный рапс и т.д.).

Применение в борьбе с помощью пестицидов.

Общие способы использования штаммов, содержащих нуклеотидную последовательность по настоящему изобретению или ее вариант, в борьбе с вредителями или в конструировании других организмов в качестве пестицидных средств известны в данной области техники. См., например, патент США № 5039523 и EP 0480762 A2.

Штаммы *Bacillus*, содержащие нуклеотидную последовательность по настоящему изобретению или ее вариант, или микроорганизмы, в результате генного изменения содержащие пестицидный ген по настоящему изобретению и белок, можно применять в защите сельскохозяйственных культур и продуктов от вредителей. В одном аспекте настоящего изобретения целые, т.е. нелизированные, клетки организма, вырабатывающего токсин (пестицид), обрабатывают реагентами, продлевающими активность токсина, вырабатываемого в клетке, при внесении клетки в среду обитания целевого вредителя (вредителей).

Альтернативно, пестицид вырабатывается благодаря внедрению пестицидного гена в клеточного хозяина. Экспрессия пестицидного гена прямо или косвенно приводит в результате к внутриклеточной выработке и поддержанию уровня пестицида. В одном аспекте настоящего изобретения эти клетки затем обрабатывают в условиях, в которых продлевается активность токсина, вырабатываемого в клетке, при внесении клетки в среду обитания целевого вредителя (вредителей). Полученный продукт сохраняет токсичность токсина. Эти пестициды, инкапсулированные естественным образом, можно затем составлять в

соответствии с традиционными методиками для внесения в среду обитания, в которой находится целевой вредитель, например, в почву, воду и листву растений. См., например, EP-A-0192319 и ссылки, которые приводятся там. Альтернативно, можно составлять клетки, экспрессирующие ген по настоящему изобретению, таким образом, чтобы обеспечить возможность применения получаемого материала в качестве пестицида.

Активные ингредиенты по настоящему изобретению обычно вносят в виде композиций, и их можно вносить на посевную площадь или растение, подлежащие обработке, одновременно или последовательно с другими соединениями. Эти соединения могут представлять собой удобрения, средства борьбы с сорняками, криопротекторы, поверхностно-активные вещества, моющие средства, пестицидные мыла, масла для внесения в период покоя, полимеры и/или составы носителей с замедленным высвобождением или биоразлагаемые таковые, позволяющие осуществлять длительное дробное внесение на целевую площадь после однократного внесения состава. Они также могут представлять собой селективные гербициды, химические инсектициды, вирулициды, микробициды, амебициды, пестициды, фунгициды, бактерициды, нематоциды, моллюскоциды или смеси некоторых из этих препаратов, при желании, вместе с дополнительными носителями, приемлемыми с точки зрения сельского хозяйства, поверхностно-активными веществами или вспомогательными средствами, стимулирующими внесение, обычно используемыми в области получения составов. Подходящие носители и вспомогательные средства могут быть твердыми или жидкими и соответствовать веществам, обыкновенно используемым в технологии получения составов, например, природным или регенерированным минеральным веществам, растворителям, диспергирующим средствам, смачивающим средствам, веществам для повышения клейкости, связующим веществам или удобрениям. Подобным образом, составы можно получить в виде съедобных "приманок" или придать им вид "ловушек" для вредителей, чтобы позволить скормливание целевому вредителю или поглощение таковым пестицидного состава.

Способы применения активного ингредиента по настоящему изобретению или агрохимической композиции по настоящему изобретению, содержащей по меньшей мере один пестицидный белок, вырабатываемый бактериальными штаммами по настоящему изобретению, включают внесение через листья, дражирование семян и внесение в почву. Число внесений и норма внесения зависят от интенсивности заражения соответствующим вредителем.

Композицию можно составить в виде порошка, пылевидного препарата, пеллеты, гранулы, распыляемого раствора, эмульсии, коллоидного раствора, истинного раствора или т.п. и можно получить с помощью таких традиционных способов, как высушивание, лиофилизация, гомогенизация, экстракция, фильтрация, центрифугирование, седиментация или концентрирование культуры клеток, содержащих полипептид. Во всех таких композициях, содержащих по меньшей мере один такой пестицидный полипептид, полипептид может присутствовать в концентрации от около 1 до около 99 по вес. %.

Вредителей, являющихся чешуекрылыми, двукрылыми насекомыми, клопами, нематодами или жесткокрылыми насекомыми, можно уничтожить, или их численность на данной площади можно сократить с помощью способов по настоящему изобретению, или можно осуществлять профилактическое применение этих способов в отношении участка окружающей среды для предупреждения заражения восприимчивым вредителем. Предпочтительно вредитель поглощает пестицидно эффективное количество полипептида или контактирует с ним. Под "пестицидно эффективным количеством" подразумевается количество пестицида, способное вызывать гибель по меньшей мере одного вредителя или значительно ослаблять рост, питание или нормальное физиологическое развитие вредителей. Это количество будет варьировать в зависимости от таких факторов, как, например, конкретные целевые вредители, с которыми надлежит бороться, конкретная среда обитания, местоположение, растение, сельскохозяйственная культура или сельскохозяйственный участок, подлежащие обработке, условия окружающей среды и способ, норма, концентрация, стабильность и количество внесений композиции пестицидно эффективного полипептида. Составы также могут варьировать с учетом климатических условий, соображений, связанных с загрязнением окружающей среды, и/или частоты внесения, и/или тяжести заражения вредителями.

Раскрытые пестицидные композиции можно получать путем составления либо бактериальной клетки, кристаллической суспензии и/или суспензии спор, либо выделенного белкового компонента с желаемым носителем, приемлемым с точки зрения сельского хозяйства. Композиции можно составлять перед введением с помощью соответствующих способов, таких как лиофилизация, сублимационная сушка, высушивание, или в водном носителе, среде или подходящем разбавителе, таком как солевой раствор или другой буфер. Составленные композиции могут быть в виде пылевидного или гранулярного материала, или суспензии в масле (растительном или минеральном), или водной эмульсии, или эмульсии типа "масло в воде", или в виде смачиваемого порошка, или в комбинации с любым другим материалом-носителем, подходящим для применения в сельском хозяйстве. Подходящие носители, применяемые в сельском хозяйстве, могут быть твердыми или жидкими и хорошо известны в данной области техники. Выражение "носитель, приемлемый с точки зрения сельского хозяйства" охватывает все вспомогательные средства, инертные компоненты, диспергирующие средства, поверхностно-активные вещества, вещества для повышения клейкости, связующие вещества и т.д., обычно применяемые в технологии составления пестицидов; они хорошо известны специалисту в области составления пестицидов. Составы

можно смешивать с одним или несколькими твердыми или жидкими вспомогательными средствами и получать с помощью различных способов, например, путем гомогенного смешивания, размешивания и/или измельчения пестицидной композиции с подходящими вспомогательными средствами при помощи традиционных методик составления. Подходящие составы и способы применения описаны в патенте США № 6468523, включенном в данный документ посредством ссылки.

Растения также можно обрабатывать с помощью одной или нескольких химических композиций, включая один или несколько гербицидов, инсектицидов и фунгицидов. Иллюстративные химические композиции включают гербициды для фруктов/овощей: атразин, бромацил, диурон, глифосат, линурон, метрибузин, симазин, трифлуралин, флуазифоп, глюфосинат, галосульфурон Gowan, паракват, пропизамид, сетоксидим, бутафенацил, галосульфурон, индазифлам; инсектициды для фруктов/овощей: альдикарб, *Bacillus thuringiensis*, карбарил, карбофуран, хлорпирифос, циперметрин, дельтаметрин, диазинон, малатион, абамектин, цифлутрин/бета-цифлутрин, эсфенвалерат, лямбда-цигалотрин, ацеквиноцил, бифеназат, метоксифенозид, новалурон, хромафенозид, тиаклоприд, динотефуран, флуакрипирим, толфепирад, клотианидин, спиродиклофен, гамма-цигалотрин, спиромезифен, спиносид, ринаксипир, циазипир, спиноторам, трифлумурон, спиротетрамат, имидаклоприд, флубендиамид, тиодикарб, метафлумизон, сульфоксафлор, цифлуметофен, цианопирафен, имидаклоприд, клотианидин, тиаметоксам, спиноторам, тиодикарб, флониамид, метиокарб, бензоат эмаектина, индоксакарб, фозтиазат, фенамифос, кадусафос, пирипроксифен, фенбутатиноксид, гекстиазокс, метомил, 4-[[[(6-хлорпиридин-3-ил)метил](2,2-дифторфенил)амино]фуран-2(5H)-он]; фунгициды для фруктов/овощей: карбендазим, хлорталонил, EBDC, серу, тиофанат-метил, азоксистробин, цимоксанил, флуазинам, фосетил, ипродион, крезоксимметил, металаксил/мефеноксам, трифлуксистробин, этабоксам, ипроваликарб, трифлуксистробин, фенгексамид, фумарат окспоконазола, циазофамид, фенамидон, зоксамид, пикоксистробин, пиракlostробин, цифлуфенамид, боскалид; гербициды для злаков: изопротурон, бромоксинил, иоксинил, феноксильные гербициды, хлорсульфурон, клодинафоп, диклофоп, дифлуфеникан, феноксапроп, флорасулам, флуороксипир, метсульфурон, триасульфурон, флукарбазон, йодсульфурон, пропоксикарбазон, пиколинафен, мезосульфурон, бефлубутамид, пиноксаден, амидосульфурон, тифенсульфурон, трибенурон, флупирсульфурон, сульфосульфурон, пирасульфотол, пироксулам, флуфенацет, тралкоксидим, пироксасульфон; фунгициды для злаков: карбендазим, хлорталонил, азоксистробин, ципроконазол, ципродинил, фенпропиморф, эпоксиконазол, крезоксим-метил, квиноксифен, тебуконазол, трифлуксистробин, симеконазол, пикоксистробин, пиракlostробин, димоксистробин, протиоконазол, флуоксастробин; инсектициды для злаков: диметоат, лямбда-цигалотрин, дельтаметрин,  $\alpha$ -циперметрин,  $\beta$ -цифлутрин, бифентрин, имидаклоприд, клотианидин, тиаметоксам, тиаклоприд, ацетамиприд, динетофуран, хлорпирифос, метамидофос, оксидеметон-метил, пиримикарб, метиокарб; гербициды для маиса: атразин, алахлор, бромоксинил, ацетохлор, дикамбу, клопиралид, (S-)диметенамид, глюфосинат, глифосат, изоксафлютол, (S-)метолахлор, мезотрион, никосульфурон, примисульфурон, римсульфурон, сулкотрион, форамсульфурон, топ-рамезон, темботрион, сафлуфенацил, тиенкарбазон, флуфенацет, пироксасульфон; инсектициды для маиса: карбофуран, хлорпирифос, бифентрин, фипронил, имидаклоприд, лямбда-цигалотрин, тефлутрин, тербуфос, тиаметоксам, клотианидин, спиромезифен, флубендиамид, трифлумурон, ринаксипир, дельтаметрин, тиодикарб,  $\beta$ -цифлутрин, циперметрин, бифентрин, люфенурон, трифлумурон, тефлутрин, тебу-пиримфос, этипрол, циазипир, тиаклоприд, ацетамиприд, динетофуран, авермектин, метиокарб, спиро-диклофен, спиротетрамат; фунгициды для маиса: фенитропан, тирам, протиоконазол, тебуконазол, триф-луксистробин; гербициды для риса: бутахлор, пропанил, азимсульфурон, бенсульфурон, цигалофоп, даимурон, фентразамид, имазосульфурон, мефенацет, оксазикломефон, пиразосульфурон, пирибутикарб, квинклолак, тиобенкарб, инданофан, флуфенацет, фентразамид, галосульфурон, оксазикломефон, бензо-бициклон, пирифталид, пеноксулам, биспирибак, оксадиаргил, этоксисульфурон, претилахлор, мезотри-он, тефурилтрион, оксадиазон, феноксапроп, пиримисульфурон; инсектициды для риса: диазинон, фенит-ротрион, фенобукарб, монокротофос, бенфуракарб, бупрофезин, динотефуран, фипронил, имидаклоприд, изопрокарб, тиаклоприд, хромафенозид, тиаклоприд, динотефуран, клотианидин, этипрол, флубенди-амид, ринаксипир, дельтаметрин, ацетамиприд, тиаметоксам, циазипир, спиносид, спиноторам, бензоат эмаектина, циперметрин, хлорпирифос, картап, метамидофос, этофенпрокс, триазофос, 4-[[[(6-хлорпиридин-3-ил)метил](2,2-дифторэтил)амино]фуран-2(5H)-он, карбофуран, бенфуракарб; фунгициды для риса: тиофанат-метил, азоксистробин, карпропамид, эдифенфос, феримзон, ипробенфос, изопротио-лан, пенцикурон, пробеназол, пироквилон, трициклазол, трифлуксистробин, диклоцимет, феноксанил, симеконазол, тиадинил; гербициды для хлопчатника: диурон, флуометурон, MSMA, оксифлуорфен, про-метрин, трифлуралин, карфентразон, клетодим, флуазифоп-бутил, глифосат, норфлуразон, пендимета-лин, пиритиобак-натрий, трифлуксисульфурон, тепралоксидим, глюфосинат, флумиоксазин, тидиазурон; инсектициды для хлопчатника: ацефат, альдикарб, хлорпирифос, циперметрин, дельтаметрин, малатион, монокротофос, абамектин, ацетамиприд, бензоат эмаектина, имидаклоприд, индоксакарб, лямбда-цигалотрин, спиносид, тиодикарб,  $\gamma$ -цигалотрин, спиромезифен, пиридалил, флониамид, флубендиамид, трифлумурон, ринаксипир,  $\beta$ -цифлутрин, спиротетрамат, клотианидин, тиаметоксам, тиаклоприд, дине-тофуран, флубендиамид, циазипир, спиносид, спиноторам,  $\gamma$ -цигалотрин, 4-[[[(6-хлорпиридин-3-

ил)метил](2,2-дифторэтил)амино]фуран-2(5H)-он, тиодикарб, авермектин, флониламид, пиридалил, спиромезифен, сульфоксафлор, профенофос, триазофос, эндосульфат; фунгициды для хлопчатника: этридазол, металаксил, квинтозен; гербициды для сои: алахлор, бентазон, трифлуралин, хлоримурон-этил, клорансулам-метил, феноксапроп, фомесафен, флуазифоп, глифосат, имазамокс, имазаквин, имазетапир, (S-)метолахлор, метрибузин, пендиметалин, тепралоксидим, глюфосинат; инсектициды для сои: лямбда-цигалотрин, метомил, паратион, тиокарб, имидаклоприд, клотианидин, тиаметоксам, тиаклоприд, ацетамиприд, динетофуран, флубендиамид, ринаксипир, циазипир, спиносид, спиноторам, бензоат эмаметина, фипронил, этипрол, дельтаметрин,  $\beta$ -цифлутрин,  $\gamma$ - и  $\lambda$ -цигалотрин, 4-[[[(6-хлорпиридин-3-ил)метил](2,2-дифторэтил)амино]фуран-2(5H)-он, спиротетрамат, спиноклофен, трифлумурон, флониламид, тиодикарб,  $\beta$ -цифлутрин; фунгициды для сои: азоксистробин, ципроконазол, эпоксиконазол, флутриафол, пираклостробин, тебуконазол, трифлуксистробин, протиоконазол, тетраконазол; гербициды для сахарной свеклы: хлоридазон, десмедифам, этофумезат, фенмедифам, триаллат, клопиралид, флуазифоп, ленацил, метамитрон, квинмерак, циклоксидим, трифлусульфурон, тепралоксидим, квизалофоп; инсектициды для сахарной свеклы: имидаклоприд, клотианидин, тиаметоксам, тиаклоприд, ацетамиприд, динетофуран, дельтаметрин,  $\beta$ -цифлутрин,  $\gamma/\lambda$ -цигалотрин, 4-[[[(6-хлорпиридин-3-ил)метил](2,2-дифторэтил)амино]фуран-2(5H)-он, тефлутрин, ринаксипир, циаксипир, фипронил, карбофуран; гербициды для канолы: клопиралид, диклофоп, флуазифоп, глюфосинат, глифосат, метазахлор, трифлуралин, этаметсульфурон, квинмерак, квизалофоп, клетодим, тепралоксидим; фунгициды для канолы: азоксистробин, карбендазим, флудиоксонил, ипродион, прохлораз, винклозолин; инсектициды для канолы: карбофуран, фосфорорганические соединения, пиретроиды, тиаклоприд, дельтаметрин, имидаклоприд, клотианидин, тиаметоксам, ацетамиприд, динетофуран,  $\beta$ -цифлутрин,  $\gamma$ - и  $\lambda$ -цигалотрин, тау-флювалинат, этипрол, спиносид, спиноторам, флубендиамид, ринаксипир, циазипир, 4-[[[(6-хлорпиридин-3-ил)метил](2,2-дифторэтил)амино]фуран-2(5H)-он.

"Вредитель" включает, но без ограничений, насекомых, грибы, бактерии, нематод, клещиков, иксодовых клещей 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.п., в частности, Coleoptera, Lepidoptera и Diptera.

Отряд Coleoptera включает подотряды Aderphaga и Polyphaga. Подотряд Aderphaga включает надсемейства Caraboidea и Gyrimoidea, а подотряд Polyphaga включает надсемейства Hydrophiloidea, Staphylinoidae, Cantharoidea, Cleroidea, Elateroidea, Dascilloidea, Dryopoidea, Byrrhoidea, Cucujoidea, Meloidea, Mordelloidea, Tenebrionoidea, Bostrichoidea, Scarabaeoidea, Cerambycoidea, Chrysomeloidea и Curculionoidae. Надсемейство Caraboidea включает семейства Cicindelidae, Carabidae и Dytiscidae. Надсемейство Gyrimoidea включает семейство Gyrimidae. Надсемейство Hydrophiloidea включает семейство Hydrophilidae. Надсемейство Staphylinoidae включает семейства Silphidae и Staphylinidae. Надсемейство Cantharoidea включает семейства Cantharidae и Lampyridae. Надсемейство Cleroidea включает семейства Cleridae и Dermestidae. Надсемейство Elateroidea включает семейства Elateridae и Vuprestidae. Надсемейство Cucujoidea включает семейство Coccinellidae. Надсемейство Meloidea включает семейство Meloidea. Надсемейство Tenebrionoidea включает семейство Tenebrionidae. Надсемейство Scarabaeoidea включает семейства Passalidae и Scarabaeidae. Надсемейство Cerambycoidea включает семейство Cerambycidae. Надсемейство Chrysomeloidea включает семейство Chrysomelidae. Надсемейство Curculionoidae включает семейства Curculionidae и Scolytidae.

Отряд Diptera включает подотряды Nematocera, Brachycera и Cyclorrhapha. Подотряд Nematocera включает семейства Tipulidae, Psychodidae, Culicidae, Ceratopogonidae, Chironomidae, Simuliidae, Bibionidae и Cecidomyiidae. Подотряд Brachycera включает семейства Stratiomyidae, Tabanidae, Therevidae, Asilidae, Mydidae, Bombyliidae и Dolichopodidae. Подотряд Cyclorrhapha включает секции Aschiza и Aschiza. Секция Aschiza включает семейства Phoridae, Syrphidae и Conopidae. Секция Aschiza включает подсекции Acalyptratae и Calyptratae. Подсекция Acalyptratae включает семейства Otitidae, Tephritidae, Agromyzidae и Drosophilidae. Подсекция 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 и Tineidae.

Насекомые-вредители по настоящему изобретению, повреждающие основные сельскохозяйственные культуры, включают маис: *Ostrinia nubilalis*, кукурузного мотылька; *Agrotis ipsilon*, совку-ипсилон; *Helicoverpa zea*, хлопковую совку; *Spodoptera frugiperda*, травяную совку; *Diatraea grandiosella*, юго-западную кукурузную огневку; *Elasmopalpus lignosellus*, кукурузную стеблевую огневку; *Diatraea saccharalis*, точильщика стеблей сахарного тростника; *Diabrotica virgifera*, западного кукурузного жука; *Diabrotica longicornis barberi*, длинноусую блошку; *Diabrotica undecimpunctata howardi*, 11-точечную блошку Говарда; *Melanotus* spp., проволочников; дупляка *Cyclocephala borealis* (личинку хруща); дупляка *Cyclocephala immaculata* (личинку хруща); *Popillia japonica*, японского хрущика; *Chaetocnema pulicaria*, стеблевую блошку; *Sphenophorus maidis*, кукурузного долгоносика; *Rhopalosiphum maidis*, кукурузную листо-

вую тлю; *Anuraphis maidiradicis*, кукурузную корневую тлю; *Blissus leucopterus leucopterus*, североамериканского пшеничного клопа-черепашку; *Melanoplus femurrubrum*, краснобедрую кобылку; *Melanoplus sanguinipes*, мигрирующую кобылку; *Hylemya platura*, ростковую муху; *Agromyza parvicornis*, кукурузную минирующую муху; *Anaphothrips obscurus*, злакового трипса; *Solenopsis milesta*, муравья-вора; *Tetranychus urticae*, двупятнистого паутинного клещика; сорго: огневку-травянку *Chilo partellus*; *Spodoptera frugiperda*, травяную совку; *Helicoverpa zea*, хлопковую совку; *Elasmopalpus lignosellus*, кукурузную стеблевую огневку; совку *Feltia subterranea*; *Phyllophaga crinita*, личинку хруща; *Eleodes*, *Conoderus* и *Aeolus* spp., проволочников; *Oulema melanopus*, красногрудую пьявицу; *Chaetocnema pulicaria*, стеблевую блошку; *Sphenophorus maidis*, кукурузного долгоносика; *Rhopalosiphum maidis*, кукурузную листовую тлю; *Sipha flava*, желтую тлю сахарного тростника; *Blissus leucopterus leucopterus*, североамериканского пшеничного клопа-черепашку; *Contarinia sorghicola*, сорговую галлицу; *Tetranychus cinnabarinus*, красного паутинного клеща; *Tetranychus urticae*, двупятнистого паутинного клещика; пшеница: *Pseudaletia unipunctata*, луговую совку; *Spodoptera frugiperda*, травяную совку; *Elasmopalpus lignosellus*, маленького точильщика стеблей кукурузы; *Agrotis orthogonia*, личинку западной озимой совки; *Elasmopalpus lignosellus*, маленького точильщика стеблей кукурузы; *Oulema melanopus*, красногрудую пьявицу; *Hypera punctata*, листового бобового слоника; *Diabrotica undecimpunctata howardi*, 11-точечную блошку Говарда; русскую пшеничную тлю; *Schizaphis graminum*, обыкновенную злаковую тлю; *Macrosiphum avenae*, листовую тлю; *Melanoplus femurrubrum*, краснобедрую кобылку; *Melanoplus differentialis*, отличительную кобылку; *Melanoplus sanguinipes*, мигрирующую кобылку; *Mayetiola destructor*, гессенскую мушку; *Sitodiplosis mosellana*, злаковую оранжевую галлицу; *Meromyza americana*, личинку американской меромизы; *Hylemya coarctata*, озимую муху;

*Frankliniella fusca*, табачного трипса; *Cephus cinctus*, хлебного пилильщика; *Aceria tulipae*, луковичного клеща тюльпанов; подсолнечник: *Suleima helianthana*, подсолнечниковую почковую листовертку; *Homoeosoma electellum*, подсолнечниковую огневку; *Zygomma exclamationis*, подсолнечниковую восклицательную совку; *Bothyrus gibbosus*, морковного жука; *Neolasioptera murtfeldiana*, подсолнечниковую галлицу; хлопчатник: *Heliothis virescens*, хлопковую совку; *Helicoverpa zea*, американскую хлопковую совку; *Spodoptera exigua*, маленькую совку; *Pectinophora gossypiella*, розового коробочного червя хлопчатника; *Anthonomus grandis*, хлопкового долгоносика; *Aphis gossypii*, бахчевую тлю; *Pseudatomoscelis seriatus*, хлопкового слепняка; *Trialeurodes abutilonea*, летающую белокрылку; *Lygus lineolaris*, полевого клопа; *Melanoplus femurrubrum*, краснобедрую кобылку; *Melanoplus differentialis*, отличительную кобылку; *Thrips tabaci*, лукового трипса; *Frankliniella fusca*, табачного трипса; *Tetranychus cinnabarinus*, красного паутинного клеща; *Tetranychus urticae*, двупятнистого паутинного клещика; рис: *Diatraea saccharalis*, точильщика стеблей сахарного тростника; *Spodoptera frugiperda*, травяную совку; *Helicoverpa zea*, гусеницу американской хлопковой совки; *Colaspis brunnea*, виноградного коласписа; *Lissorhoptus oryzophilus*, рисового водного долгоносика; *Sitophilus oryzae*, рисового долгоносика; *Nephotettix nigropictus*, рисовую цикадку; *Blissus leucopterus leucopterus*, североамериканского пшеничного клопа-черепашку; *Acrosternum hilare*, зеленого щитника; соя: *Pseudoplusia includens*, соевую совку; гусеницу совки *Anticarsia gemmatalis*; усатку *Plathyrena scabra*; *Ostrinia nubilalis*, кукурузного мотылька; *Agrotis ipsilon*, совку-ипсилон; *Spodoptera exigua*, малую совку; *Heliothis virescens*, хлопковую совку; *Helicoverpa zea*, американскую хлопковую совку; *Epilachna varivestis*, мексиканскую бобовую зерновку; *Myzus persicae*, персиковую зеленую тлю; *Empoasca fabae*, картофельную цикадку; *Acrosternum hilare*, зеленого щитника; *Melanoplus femurrubrum*, краснобедрую кобылку; *Melanoplus differentialis*, отличительную кобылку; *Hylemya platura*, ростковую муху; *Sericothrips variabilis*, соевого трипса; *Thrips tabaci*, лукового трипса; *Tetranychus turkestanus*, туркестанского паутинного клеща; *Tetranychus urticae*, двупятнистого паутинного клещика; ячмень: *Ostrinia nubilalis*, кукурузного мотылька; *Agrotis ipsilon*, совку-ипсилон; *Schizaphis graminum*, обыкновенную злаковую тлю; *Blissus leucopterus leucopterus*, североамериканского пшеничного клопа-черепашку; *Acrosternum hilare*, зеленого щитника; *Euschistus servus*, коричневого щитника; *Delia platura*, ростковую муху; *Mayetiola destructor*, гессенскую мушку; *Petrobia latens*, коричневого пшеничного клещика; масличный рапс: *Brevicoryne brassicae*, капустную тлю; *Phyllotreta cruciferae*, земляную блошку; *Mamestra configurata*, кружевную совку; *Plutella xylostella*, капустную моль; *Delia* spp., личинки корневых мух.

Нематоды включают паразитических нематод, таких как клубеньковые, цистообразующие и ранящие нематоды, включая *Heterodera* spp., *Meloidogyne* spp. и *Globodera* spp.; в частности представителей цистообразующих нематод, включая, но без ограничений, *Heterodera glycines* (соевая цистообразующая нематода); *Heterodera schachtii* (свекловичная цистообразующая нематода); *Heterodera avenae* (злаковая цистообразующая нематода) и *Globodera rostochiensis* и *Globodera pallida* (картофельные цистообразующие нематоды). Ранящие нематоды включают *Pratylenchus* spp.

Способы увеличения урожайности растений.

Обеспечиваются способы увеличения урожайности растений. Способы включают обеспечение растения или растительной клетки, в которых происходит экспрессия полинуклеотида, кодирующего последовательность пестицидного полипептида, раскрытую в данном документе, и выращивание растения или его семян в поле, зараженном (или восприимчивом к заражению) вредителем, пестицидной активностью против которого обладает указанный полипептид. В некоторых вариантах осуществления полипептид

обладает пестицидной активностью против вредителя, являющегося чешуекрылым, жесткокрылым, двукрылым, полужесткокрылым насекомым или нематодой, и указанное поле заражено вредителем, являющимся чешуекрылым, полужесткокрылым, жесткокрылым, двукрылым насекомым или нематодой.

Как определено в данном документе, "урожайность" растения относится к качеству и/или количеству биомассы, производимой растением. Под "биомассой" подразумевается любой измеряемый продукт растения. Увеличение производства биомассы представляет собой любое улучшение урожая измеряемого продукта растения. Увеличение урожайности растений имеет несколько путей коммерческого применения. Например, увеличение биомассы листьев растений может увеличивать урожай листовых овощей, потребляемых человеком или животными. Дополнительно увеличение биомассы листьев можно применять для увеличения производства растительных фармацевтических или промышленных продуктов. Увеличение урожайности может включать любое статистически значимое увеличение, в том числе, но без ограничений, увеличение по меньшей мере на 1%, увеличение по меньшей мере на 3%, увеличение по меньшей мере на 5%, увеличение по меньшей мере на 10%, увеличение по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 100% или большее увеличение урожайности по сравнению с таковой растения, в котором не происходит экспрессия пестицидной последовательности.

В конкретных способах урожайность растения увеличивается в результате улучшения устойчивости растения, в котором происходит экспрессия пестицидного белка, раскрытого в данном документе, к вредителям. Экспрессия пестицидного белка в результате приводит к ослаблению способности вредителя к заражению или питанию растением, что, таким образом, улучшает урожайность растения.

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

#### **Экспериментальная часть**

Пример 1. Идентификация белка, активного в отношении западного кукурузного жука, из штамма ATX54858.

Пестицидный ген идентифицировали из бактериального штамма ATX54858 с помощью следующих этапов.

Получение общей ДНК из штамма. Общая ДНК содержит как геномную ДНК, так и внехромосомную ДНК. Внехромосомная ДНК содержит смесь из нескольких или всех из следующего: плазмиды различного размера; фаговые хромосомы; другие неохарактеризованные внехромосомные молекулы.

Секвенирование ДНК. Общую ДНК секвенировали с помощью способов секвенирования следующего поколения.

Идентификация предполагаемых генов токсинов с помощью анализов гомологии и/или других вычислительных анализов.

При необходимости, получение окончательной уточненной последовательности гена, представляющего интерес, с помощью одной из нескольких стратегий ПЦР или клонирования (например, TAIL-PCR).

Бактериальный штамм ATX54858 получали из Leibniz Institute DSMZ под обозначением DSM-23278 (Kampfer, P., Busse, H.J. & Scholz, H.C. (2009) *Chromobacterium piscinae* sp. nov. and *Chromobacterium pseudoviolaceum* sp. nov., from environmental samples, *Int J Syst Evol Microbiol* 59(Pt 10):2486-2490). Штамм изначально выделяли из прудовой воды в Малайзии, Сунгей Булох.

Нуклеотидная последовательность нового гена Axmi279, который идентифицировали из ATX54858, приведена под SEQ ID NO: 1. Аминокислотная последовательность AXMI279 приведена под SEQ ID NO: 2. AXMI279 представляет собой белок массой 58,9 кДа, который характеризуется 97,9% идентичностью последовательности по отношению к Axmi205 (публикация патента США № 20110023184) и 21,7% идентичностью последовательности по отношению к перфоруину *Clavibacter*.

Раскрытый в данном документе ген токсина амплифицируют с помощью ПЦР из рAX980, и продукт ПЦР клонируют в вектор экспрессии в *Bacillus* рAX916 или в другой подходящий вектор с помощью способов, хорошо известных в данной области техники. Полученный штамм *Bacillus*, содержащий вектор с геном axmi, культивируют в традиционных питательных средах, таких как среда CYS (10 г/л бактоказитона; 3 г/л экстракта дрожжей; 6 г/л  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 14 г/л  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,5 мМ  $\text{MgSO}_4$ ; 0,05 мМ  $\text{MnCl}_2$ ; 0,05 мМ  $\text{FeSO}_4$ ), пока при микроскопическом исследовании не станет видимым спорообразование. Образцы получают и тестируют в отношении активности в биологических анализах.

Пример 2. Анализы пестицидной активности.

Нуклеотидные последовательности по настоящему изобретению можно тестировать в отношении их способности вырабатывать пестицидные белки. Способность пестицидного белка действовать на вредителя в качестве пестицида часто оценивается с помощью ряда способов. Одним способом, хорошо известным в данной области техники, является осуществление анализа питания. В таком анализе питания вредителя подвергают воздействию образца, который содержит соединения, подлежащие тестированию, либо контрольные образцы. Часто его осуществляют путем помещения материала, подлежащего тестированию, или такого материала в подходящем разведении на материал, который будет поглощен вредителем, такой как искусственная питательная среда. Материал, подлежащий тестированию, может состоять из жидкости, твердого вещества или кашицы. Материал, подлежащий тестированию, можно помес-

тить на поверхность, а затем позволить ему высохнуть. Альтернативно, материал, подлежащий тестированию, можно смешать с расплавленной искусственной питательной средой и затем распределить в камере для анализа. Камера для анализа может, например, представлять собой стакан, чашку или лунку титрационного микропланшета.

Анализы в отношении сосущих вредителей (например, тлей) могут включать отделение тестируемого материала от насекомого перегородкой, в идеальном варианте секцией, которую может проколоть сосущий ротовой аппарат сосущего насекомого, чтобы обеспечить возможность поглощения тестируемого материала. Часто тестируемый материал смешивают со стимулятором питания, таким как сахароза, для стимуляции поглощения тестируемого соединения.

Другие типы анализов могут включать микроинъекцию тестируемого материала в рот или кишку вредителя, а также развитие трансгенных растений с последующим тестированием способности вредителя к питанию трансгенным растением. Тестирование растений может включать изолирование обычно потребляемых частей растения, например, с помощью небольших корзинок, прикрепляемых к листу, или изолирование целых растений в корзинах, содержащих насекомых.

Другие способы и подходы для оценки вредителей известны в данной области техники и могут быть найдены, например, в Robertson and Preisler, eds. (1992) *Pesticide bioassays with arthropods*, CRC, Boca Raton, FL. Альтернативно, анализы в общем виде описаны в журналах *Arthropod Management Tests* и *Journal of Economic Entomology* или путем обсуждения членами Энтомологического общества Америки (ESA).

В некоторых вариантах осуществления области ДНК, кодирующие области пестицидных белков, раскрытых в данном документе, отвечающие за токсичность, клонируют в вектор экспрессии в *E. coli* pMAL-C4x позади гена *malE*, кодирующего мальтоза-связывающий белок (MBP). Эти внутриклеточные слияния дают в результате экспрессию белков слияния MBP-Axmi в *E. coli*.

Для экспрессии в *E. coli* BL21\*DE3 трансформируют с помощью отдельных плазмид. Отдельные колонии инокулируют в LB, дополненный карбенициллином и глюкозой, и выращивают в течение ночи при 37°C. На следующий день в свежеприготовленную среду инокулируют 1% суточную культуру и выращивают ее при 37°C до достижения логарифмической фазы роста. Затем культуры индуцируют с помощью 0,3 мМ IPTG в течение ночи при 20°C. Каждый дебрис суспендируют в 20 мМ буфере Tris-Cl, pH 7,4, дополненном 200 мМ NaCl, 1 мМ DTT и ингибиторами протеаз, и обрабатывают ультразвуком. Для подтверждения экспрессии белков слияния можно применять анализ с помощью SDS-PAGE.

Общие экстракты, не содержащие клеток, затем прогоняют через колонку с амилозой, присоединенную к системе жидкостной экспресс-хроматографии белков (FPLC), для аффинного очищения белков слияния MBP-axmi. Связанные белки слияния элюируют из смолы с помощью 10 мМ раствора мальтозы. Очищенные белки слияния затем расщепляют с помощью фактора Ха либо трипсина для удаления аминоконцевой MBP-метки из белка Axmi. Расщепление и растворимость белков можно определить с помощью SDS-PAGE.

Пример 3. Экспрессия и очистка.

Axmi279 (SEQ ID NO: 1) клонировали в вектор экспрессии в *E. coli* pMAL-C4x позади гена *malE*, кодирующего мальтоза-связывающий белок (MBP).

Последовательность полученной плазмиды приведена под SEQ ID NO: 6. Это внутриклеточное слияние давало в результате экспрессию белка слияния MBP-AXMI в *E. coli*. Экспрессию полученного в результате белка слияния индуцировали с помощью IPTG. Белок затем очищали с помощью колонки с мальтозой и расщепляли с помощью протеазы фактора Ха или трипсина с получением немеченого очищенного белка. Расщепление и растворимость белков определяли с помощью SDS-PAGE.

Биологический анализ выделенного белка показывал инсектицидную активность против западного кукурузного жука (WCRW) (табл. 1).

Таблица 1

Результаты биологического анализа

Образец	Остановка роста WCRW	Смертность WCRW
MBP-Axmi279 <sup>1</sup> (7 мг/мл)	4,0	75%
MBP-Axmi279 Ха <sup>2</sup> (3,5 мг/мл)	3,0	25%
MBP-Axmi279 Ха (1,75 мг/мл)	1,0	25%
50 мМ TRIS 8,0, буферный контроль	0,0	0,0

<sup>1</sup> MBP-Axmi279 представляет собой белок слияния, содержащий мальтоза-связывающий белок и Axmi279 полной длины.

<sup>2</sup> MBP-Axmi279 Ха представляет собой белок слияния, расщепленный фактором Ха. Согласно результатам определения LC<sub>50</sub> для Axmi279 составляла 32 мкг/мл.

Пример 4. Введение генов в векторы для экспрессии в растениях.

Кодирующие области по настоящему изобретению соединяют с соответствующими промоторными и терминаторными последовательностями для экспрессии в растениях. Такие последовательности хоро-

шо известны в данной области техники и могут включать в себя промотор гена актина риса или промотор гена убиквитина маиса для экспрессии в однодольных растениях, промотор UBQ3 *Arabidopsis* или промотор 35S CaMV для экспрессии в двудольных растениях и терминаторы nos или PinII. Методики получения и подтверждения конструкторов промотор - ген - терминатор также хорошо известны в данной области техники.

В одном аспекте настоящего изобретения разрабатывают и создают синтетические последовательности ДНК. Эти синтетические последовательности являются измененными нуклеотидными последовательностями по сравнению с исходной последовательностью, но кодируют белки, которые являются практически идентичными по отношению к исходному белку.

В другом аспекте настоящего изобретения модифицированные варианты синтетических генов разрабатывают таким образом, что получаемый в результате пептид нацеливается на растительные органеллы, такие как эндоплазматический ретикулум и апопласт. Последовательности пептидов, о которых известно, что они обуславливают нацеливание белков слияния на растительные органеллы, известны в данной области техники. Например, в данной области техники известно, что N-концевая область гена кислой фосфатазы белого люпина *Lupinus albus* (GENBANK® ID GI: 14276838, Miller et al. (2001) *Plant Physiology* 127: 594-606) обуславливает нацеливание гетерологичных белков на эндоплазматический ретикулум. Если полученный белок слияния также содержит последовательность, отвечающую за удержание в эндоплазматическом ретикулуме, которая содержит пептид N-конец-лизин-аспарагиновая кислота-глутаминовая кислота-лейцин (т.е. мотив "KDEL", SEQ ID NO: 5) на C-конце, то белок слияния будет нацелен на эндоплазматический ретикулум. Если белку слияния недостает последовательности, нацеливающейся на эндоплазматический ретикулум, на C-конце, белок будет нацелен на эндоплазматический ретикулум, но в конечном счете будет секвестрирован в апопласте.

Таким образом, этот ген кодирует белок слияния, содержащий тридцать одну N-концевую аминокислоту гена кислой фосфатазы белого люпина *Lupinus albus* (GENBANK® ID GI: 14276838, Miller et al., 2001, выше), слитую с N-концом аминокислотной последовательности по настоящему изобретению, а также последовательность KDEL на C-конце. Таким образом, предполагается, что полученный белок нацеливается на эндоплазматический ретикулум растения при экспрессии в растительной клетке.

Экспрессионные кассеты для растений, описанные выше, объединяют с соответствующим селективируемым маркером для растений для содействия селекции трансформированных растительных клеток и тканей и лигируют в векторы для трансформации растений. Они могут содержать бинарные векторы для трансформации, опосредованной *Agrobacterium*, или простые плазмидные векторы для трансформации с помощью аэрозоля или биобаллистической трансформации.

Пример 5. Трансформация клеток маиса с помощью генов, кодирующих пестицидные белки, описанных в данном документе.

Початки маиса лучше всего собирать через 8-12 дней после опыления. Зародышей выделяют из початков, и таковые зародыши размером 0,8-1,5 мм являются предпочтительными для применения в трансформации. Зародышей высевают щитком вверх на подходящую инкубационную среду, такую как среда DN62A5S (3,98 г/л солей N6; 1 мл/л (из 1000× исходного раствора) витаминов N6; 800 мг/л L-аспарагина; 100 мг/л миоинозитола; 1,4 г/л L-пролина; 100 мг/л казаминовых кислот; 50 г/л сахарозы; 1 мл/л (из 1 мг/мл исходного раствора) 2,4-D). Среды и соли, отличные от DN62A5S, однако являются подходящими и известны в данной области техники. Зародышей инкубируют в течение ночи при 25°C в темноте. Однако инкубирование зародышей в течение ночи как таковое не является необходимым.

Полученные эксплантаты переносят на сетку с квадратными отверстиями (30-40 на пластину), переносят в осмотическую среду на около 30-45 мин, потом переносят на пластину для инъекции (см., например, публикацию по РСТ № WO/0138514 и патент США № 5240842).

ДНК-конструкторы, предназначенные для генов по настоящему изобретению в растительных клетках, ускоряют в направлении тканей растения при помощи ускорителя пучка аэрозольных частиц с применением условий, преимущественно описанных в публикации по РСТ № WO/0138514. После инъекции зародышей инкубируют в течение около 30 мин в осмотической среде и помещают в инкубационную среду, выдерживая в течение ночи при 25°C в темноте. Во избежание чрезмерного повреждения эксплантатов, подвергаемых инъекции, их инкубируют в течение по меньшей мере 24 ч перед переносом в восстановительную среду. Зародышей затем вносят в восстановительную среду на период, составляющий около 5 дней, при 25°C в темноте, а затем переносят на селективную среду. Эксплантаты инкубируют в селективной среде в течение до восьми недель в зависимости от природы и характеристик конкретного используемого метода селекции. После периода селекции полученный каллус переносят в среду для созревания зародышей, пока не будет наблюдаться образование зрелых соматических зародышей. Полученных зрелых соматических зародышей затем помещают в условия слабого освещения, и процесс регенерации иницируют с помощью способов, известных в данной области техники. Полученным росткам позволяют укорениться в среде для укоренения, и полученные растения переносят в кассеты для рассады и размножают как трансгенные растения.

Материалы.

## Среда DN62A5S

Компоненты	На литр	Поставщик
Базовая смесь солей Чу N6 (номер продукта С 416)	3,98 г/л	Phytotechnology Labs
Раствор витаминов Чу N6 (номер продукта С 149)	1 мл/л (из 1000х исходного раствора)	Phytotechnology Labs
L-Аспарагин	800 мг/л	Phytotechnology Labs
Миоинозитол	100 мг/л	Sigma
Компоненты	На литр	Поставщик
L-Пролин	1,4 г/л	Phytotechnology Labs
Казаминовые кислоты	100 мг/л	Fisher Scientific
Сахароза	50 г/л	Phytotechnology Labs
2,4-D (номер продукта D-7299)	1 мл/л (из 1 мг/мл исходного раствора)	Sigma

Значение pH раствора доводят до pH 5,8 при помощи 1н. КОН/1н. KCl, добавляют Gelrite (Sigma) в концентрации до 3 г/л и среду автоклавируют. После охлаждения до 50°C добавляют 2 мл/л нитрата серебра из 5 мг/мл исходного раствора (Phytotechnology Labs).

Пример 6. Трансформация генов по настоящему изобретению в растительных клетках с помощью трансформации, опосредованной Agrobacterium.

Початки лучше всего собирать через 8-12 дней после опыления. Зародышей выделяют из початков, и таковые зародыши размером 0,8-1,5 мм являются предпочтительными для применения в трансформации. Зародышей высевают щитком вверх на подходящую инкубационную среду и инкубируют в течение ночи при 25°C в темноте. Однако инкубирование зародышей в течение ночи как таковое не является необходимым. Зародышей приводят в контакт со штаммом Agrobacterium, содержащим соответствующие векторы для переноса, опосредованного Ti-плазмидой, на около 5-10 мин, а затем высевают на среду для совместного культивирования в течение около 3 дней (25°C в темноте). После совместного культивирования эксплантаты переносят в восстановительную среду на период, составляющий около пяти дней (при 25°C в темноте). Эксплантаты инкубируют в селективной среде в течение до восьми недель в зависимости от природы и характеристик конкретного используемого метода селекции. После периода селекции полученный каллус переносят в среду для созревания зародышей, пока не будет наблюдаться образование зрелых соматических зародышей. Полученных зрелых соматических зародышей затем помещают в условия слабого освещения, и процесс регенерации инициируют так, как известно в данной области техники.

Все публикации и заявки на патенты, упоминаемые в настоящем описании, свидетельствуют об уровне компетентности специалистов в области, к которой относится настоящее изобретение. Все публикации и заявки на патенты включены в данный документ посредством ссылки в такой же степени, как если бы каждая конкретная публикация или заявка на патент была конкретно и отдельно указана как включенная посредством ссылки.

Хотя вышеизложенное изобретение было достаточно подробно описано посредством иллюстрации и примеров в целях ясности понимания, будет очевидно, что в пределах объема прилагаемой формулы изобретения можно на практике осуществлять определенные изменения и модификации.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид с пестицидной активностью, где рекомбинантная нуклеиновая кислота выбирается из группы, состоящей из

- a) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 или комплементарной ей последовательности и
- b) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2, 3 или 4.

2. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п.1, где указанная нуклеотидная последовательность представляет собой синтетическую последовательность, предназначенную для экспрессии в растении.

3. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п.1, где указанная нуклеотидная последовательность функционально связана с промотором, способным управлять экспрессией указанной нуклеотидной последовательности в растительной клетке.

4. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п.3, дополнительно содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный полипептид.

5. Клетка-хозяин, содержащая молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п.1.

6. Клетка-хозяин по п.5, являющаяся бактериальной клеткой-хозяином.

7. Клетка-хозяин по п.5, являющаяся растительной клеткой.

8. Трансгенное растение с пестицидной активностью, содержащее клетку-хозяин по п.7.

9. Трансгенное растение по п.8, отличающееся тем, что указанное растение выбрано из группы, состоящей из маиса, сорго, пшеницы, капусты, подсолнечника, томата, крестоцветных, видов перца, картофеля, хлопчатника, риса, сои, сахарной свеклы, сахарного тростника, табака, ячменя и масличного рапса.

10. Рекомбинантный полипептид с пестицидной активностью, выбранный из группы, состоящей из
- а) полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2, 3 или 4; и
  - б) полипептида, кодируемого нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 1.
11. Полипептид по п.10, дополнительно содержащий гетерологичные аминокислотные последовательности.
12. Антитело для количественного или качественного выявления полипептида по п.10 или 11 в растении, избирательно связывающееся с полипептидом по п.10.
13. Композиция с пестицидной активностью, содержащая полипептид по п.10.
14. Композиция по п.13, приготовленная в форме порошка, пылевидного препарата, пеллеты, гранулы, распыляемого раствора, эмульсии, коллоидного или истинного раствора.
15. Композиция по п.13, отличающаяся тем, что получена путем высушивания, лиофилизации, гомогенизации, экстракции, фильтрации, центрифугирования, седиментации или концентрирования культуры клеток *Bacillus thuringiensis*.
16. Композиция по п.13, содержащая от около 1 до около 99 вес.% указанного полипептида.
17. Способ борьбы с популяцией вредителей, являющихся чешуекрылыми или жесткокрылыми насекомыми, включающий приведение указанной популяции в контакт с пестицидно эффективным количеством полипептида по п.10.
18. Способ уничтожения вредителя, являющегося чешуекрылым или жесткокрылым насекомым, включающий приведение указанного вредителя в контакт с пестицидно эффективным количеством полипептида по п.10.
19. Способ получения полипептида с пестицидной активностью, включающий культивирование клетки-хозяина по п.5 в условиях, обеспечивающих экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид.
20. Растение, имеющее в своем геноме стабильно встроенную ДНК-конструкцию, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид с пестицидной активностью, отличающееся тем, что указанная нуклеотидная последовательность выбрана из группы, состоящей из
- а) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 и
  - б) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2, 3 или 4, где указанная нуклеотидная последовательность функционально связана с промотором, управляющим экспрессией кодирующей последовательности в растительной клетке.
21. Клетка растения по п.20.
22. Трансгенное семя растения по п.20, отличающееся тем, что указанное семя содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид с пестицидной активностью и выбранную из группы, состоящей из
- а) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 и
  - б) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2, 3 или 4.
23. Способ защиты растения от насекомого-вредителя, включающий обеспечение экспрессии в растении или его клетке нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид с пестицидной активностью, отличающийся тем, что указанную нуклеотидную последовательность выбирают из группы, состоящей из
- а) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 и
  - б) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2, 3 или 4.
24. Способ по п.23, отличающийся тем, что указанное растение продуцирует полипептид с пестицидной активностью против вредителя, являющегося чешуекрылым насекомым.
25. Способ увеличения урожайности растения, включающий выращивание в поле растения или его семени, имеющих в своем геноме стабильно встроенную ДНК-конструкцию, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид с пестицидной активностью, отличающийся тем, что указанную нуклеотидную последовательность выбирают из группы, состоящей из
- а) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 и
  - б) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2, 3 или 4, где указанное поле заражено вредителем, против которого направлена пестицидная активность указанного полипептида.

