

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202091496** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.09.30

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

(22) Дата подачи заявки
2012.04.04

(54) ВАРИАНТ ИНСЕКТИЦИДНОГО ГЕНА АХМ115 И СПОСОБЫ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **61/471,848**

(72) Изобретатель:

(32) **2011.04.05**

**Лехтинен Дуэйн, Дисэй Налини
Манодж, Хайнрихс Фолькер (US)**

(33) **US**

(62) **201391444; 2012.04.04**

(74) Представитель:

(71) Заявитель:

**БАСФ АГРИКАЛЧЕРАЛ
СОЛЮШНС СИД ЮС ЛЛК (US)**

**Веселицкий М.Б., Веселицкая И.А.,
Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов
Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В.,
Соколов Р.А., Кузнецова Т.В. (RU)**

(57) Изобретение предлагает композиции и способы, придающие пестицидную активность бактериям, растениям, растительным клеткам, тканям и семенам. Последовательности, кодирующие токсины, можно использовать в составе конструкций ДНК или экспрессионных кассет для экспрессии в растениях и бактериях. Композиции также включают в себя трансформированные бактерии, растения, растительные клетки, ткани и семена. В частности, изобретение предлагает полинуклеотидные последовательности и кодируемые ими токсичные белки. Изобретение также предлагает антитела, способные специфически связываться с указанными аминокислотными последовательностями. В частности, изобретение охватывает полинуклеотидные последовательности, кодирующие гибридные белки, а также их биологически активные варианты и фрагменты, где гибридный белок содержит С-концевой фрагмент SEQ ID NO:43. Гибридный белок также может содержать N-концевой фрагмент SEQ ID NO:45. Изобретение также включает в себя нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:47 и 1-14 или нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность, описанную в SEQ ID NO:48 и 15-31, в том числе ее биологически активные варианты и фрагменты.

A1

202091496

202091496

A1

ВАРИАНТ ИНСЕКТИЦИДНОГО ГЕНА АХМ115 И СПОСОБЫ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Данная заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки США № 61/471848, поданной 5 апреля 2011 года, содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки во всей полноте.

Ссылка на список последовательностей, представленный в электронном виде

Официальная копия списка последовательностей представлена в электронном виде через EFS-Web как ASCII-отформатированный список последовательностей в виде файла под названием "2916693-093977-SEQLIST.txt", созданного 2 апреля 2012 года и имеющего размер 241 килобайт, который подается одновременно с настоящим описанием. Список последовательностей, содержащийся в данном ASCII-отформатированном документе, является частью описания и полностью включен в него в качестве ссылки.

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к области молекулярной биологии. Изобретение предлагает новые гены, которые кодируют пестицидные белки. Указанные белки и кодирующие их нуклеотидные последовательности можно использовать для получения пестицидных композиций и трансгенных растений, устойчивых к вредителям.

Уровень техники изобретения

Bacillus thuringiensis представляет собой грам-положительную спорообразующую почвенную бактерию, характеризующуюся способностью продуцировать кристаллические включения, которые являются особо токсичными для некоторых отрядов и видов насекомых и безвредными для растений и других организмов, не являющихся мишенями. Поэтому композиции, содержащие штаммы *Bacillus thuringiensis* или их инсектицидные белки, можно использовать в качестве приемлемых для окружающей среды инсектицидов для подавления насекомых-сельскохозяйственных вредителей или насекомых, переносящих разные заболевания человека или животных.

Кристаллические (Cry) белки (дельта-эндотоксины) *Bacillus thuringiensis* обладают высокой инсектицидной активностью, в

основном по отношению к личинкам чешуекрылых, полужесткокрылых, двукрылых и жесткокрылых. Указанные белки также обладают активностью против отрядов вредителей Hymenoptera, Homoptera, Phthiraptera, Mallophaga и Acari, а также отрядов других беспозвоночных, таких как Nematelminthes, Platyhelminthes и Sarcomastigophora (Feitelson (1993) The Bacillus Thuringiensis family tree. In Advanced Engineered Pesticides, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.). Активность кристаллического белка не проявляется до проглатывания белка насекомым и его солюбилизации в средней кишке насекомого. Проглоченный протоксин гидролизуется под действием протеаз в пищеварительном тракте насекомого с образованием активной токсичной молекулы. (Hofte and Whiteley (1989) Microbiol. Rev. 53:242-255). Указанный токсин связывается с апикальными рецепторами щеточной каймы в средней кишке личинки-мишени и внедряется в апикальную мембрану, создавая ионные каналы или поры, приводящие к гибели личинки.

Помимо эндотоксинов *B. thuringiensis* также продуцирует секретлируемые инсектицидные белки на протяжении вегетативной стадии роста, а именно, вегетативные инсектицидные белки (Vip). После открытия первого токсина Vip в *B. thuringiensis* были идентифицированы две основные группы токсинов Vip. Одна группа токсинов Vip состоит из бинарных токсинов, содержащих два компонента, Vip1 и Vip2 (Warren (1997) In N. B. Carozzi and M. G. Koziel (ed.), Advances in insect control: the role of transgenic plants. Taylor & Francis, London, United Kingdom). Сочетание Vip1 и Vip2 обладает высокой инсектицидной активностью в отношении сельскохозяйственно важного насекомого, западного кукурузного жука (*Diabrotica virgifera*), но не проявляет никакой инсектицидной активности в отношении каких-либо насекомых чешуекрылые (Han et al. (1999) Nat. Struct. Biol. 6:932-936). Другая группа состоит из токсинов Vip3, последовательности которых не обладают подобием по отношению к последовательностям Vip1 или Vip2. Идентифицированный первым токсин Vip3, Vip3Aa1, обладает высокой инсектицидной активностью в отношении нескольких основных вредителей кукурузы

и хлопка, относящихся к чешуекрыльям, которые включают в себя совку травяную *Spodoptera frugiperda* и совку хлопковую *Helicoverpa zea*, но не проявляет активности в отношении мотылька кукурузного *Ostrinia nubilalis*, основного вредителя кукурузы (Estruch et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:5389-5394). Удаление гена *vip3Aa1* из штамма *B. thuringiensis* приводит к значительному уменьшению инсектицидной активности штамма *B. thuringiensis*, позволяя предположить, что *Vip3* вносит вклад в общую токсичность штаммов *B. thuringiensis* (Donovan et al. (2001) J. Invertebr. Pathol. 78:45-51). Также обнаружено, что *Vip3Aa1* убивает насекомого посредством лизиса клеток средней кишки (Yu et al. (1997) Appl. Environ. Microbiol. 63:532-536) в результате образования пор в клеточной мембране (Lee et al. (2003) Appl. Environ. Microbiol. 69:4648-4657).

Интенсивное применение инсектицидов на основе *B. thuringiensis* уже привело к развитию устойчивости в полевых популяциях моли капустной, *Plutella xylostella* (Ferre and Van Rie (2002) Annu. Rev. Entomol. 47:501-533). Наиболее распространенный механизм устойчивости включает в себя снижение связывания токсина со специфическим рецептором (рецепторами) средней кишки. Такой механизм также может приводить к развитию устойчивости к другим токсинам, имеющим этот же рецептор (Ferre and Van Rie (2002)).

Сущность изобретения

Изобретение предлагает композиции и способы, придающие пестицидную активность бактериям, растениям, растительным клеткам, тканям и семянам. Композиции включают в себя молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие последовательности пестицидных и инсектицидных полипептидов, векторы, содержащие указанные молекулы нуклеиновых кислот, и клетки-хозяева, содержащие такие векторы. Композиции также включают в себя последовательности пестицидных полипептидов и антитела к указанным полипептидам. Нуклеотидные последовательности можно использовать в составе конструкций ДНК или экспрессионных кассет для трансформации организмов, включающих в себя микроорганизмы и растения, и экспрессии в указанных организмах. Нуклеотидные или

аминокислотные последовательности могут представлять собой синтетические последовательности, сконструированные для экспрессии в организме, включающем в себя, без ограничения, микроорганизм или растение. Композиции также могут включать в себя бактерии, растения, клетки, ткани и семена растений, содержащие нуклеотидную последовательность настоящего изобретения.

В частности, изобретение предлагает выделенные молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют пестицидный белок. Кроме того, изобретение охватывает аминокислотные последовательности, соответствующие пестицидному белку. В частности, настоящее изобретение предлагает выделенную или рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую гибридный белок, а также ее биологически активные варианты и фрагменты, где гибридный белок содержит С-концевой фрагмент SEQ ID NO:43. В других воплощениях гибридный белок содержит N-концевой фрагмент SEQ ID NO:45. В конкретных воплощениях молекула нуклеиновой кислоты настоящего изобретения (а также векторы, клетки-хозяева, растения и семена, содержащие указанную молекулу нуклеиновой кислоты) содержит нуклеотидную последовательность, описанную в SEQ ID NO:47 и 1-14, или нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность, описанную в SEQ ID NO:48 и 15-31, в том числе ее биологически активные варианты и фрагменты. В объем настоящего изобретения также входят нуклеотидные последовательности, комплементарные нуклеотидной последовательности настоящего изобретения, или способные гибридизоваться с последовательностью настоящего изобретения, а также комплементарные им последовательности. Выделенные или рекомбинантные гибридные белки, кодируемые молекулой нуклеиновой кислоты настоящего изобретения, также входят в объем настоящего описания.

Изобретение предлагает способы получения полипептидов настоящего изобретения и применения указанных полипептидов для подавления или уничтожения вредителя отряда чешуекрылых, полужесткокрылых, жесткокрылых, нематод или двукрылых.

Изобретение также включает в себя способы и наборы, позволяющие детектировать нуклеиновые кислоты и полипептиды настоящего изобретения в образце.

Композиции и способы настоящего изобретения можно использовать для получения организмов с повышенной устойчивостью или толерантностью к вредителям. В сельском хозяйстве существует потребность в указанных организмах и содержащих их композициях. Композиции настоящего изобретения можно использовать для получения измененных или усовершенствованных белков, обладающих пестицидной активностью, или для детекции присутствия пестицидных белков или нуклеиновых кислот в продуктах или организмах.

Краткое описание рисунков

На фиг.1 показана диаграмма гибридных конструкций.

На фиг.2 показаны результаты биоанализа листового диска *in vitro*. рAG6585 содержит optAxmi115v01 (N=14), а рAG6141 содержит optAxmi115v02.01.01 (N=8).

Подробное описание

Настоящее изобретение относится к композициям и способам, позволяющим регулировать устойчивость или толерантность организмов, в частности растений или растительных клеток, к вредителям. Термин "устойчивость" означает, что вредитель (например насекомое) уничтожается при проглатывании или при другом контакте с полипептидами настоящего изобретения. Термин "толерантность" означает, что организм способен ухудшать или снижать двигательные, пищевые, репродуктивные или другие функции вредителя. Способы включают в себя трансформацию организмов нуклеотидной последовательностью, кодирующей пестицидный белок настоящего изобретения. В частности, нуклеотидные последовательности настоящего изобретения можно использовать для получения растений и микроорганизмов, обладающих пестицидной активностью. Таким образом, изобретение предлагает трансформированные бактерии, растения, клетки, ткани и семена растений. Композиции включают в себя пестицидные нуклеиновые кислоты и белки *Bacillus* или других видов. Последовательности можно использовать для конструирования

экспрессионных векторов с целью их последующего применения для трансформации представляющих интерес организмов, в качестве зондов для выделения других гомологичных (или частично гомологичных) генов, и для получения измененных пестицидных белков с помощью известных в данной области способов, таких как перестановка доменов или перестановка в ДНК, например, с использованием членов семейств токсинов Vip1, Vip2 или Vip3. Указанные белки можно использовать для подавления или уничтожения популяций вредителей отрядов чешуекрылых, полужесткокрылых, жесткокрылых, двукрылых и нематод, а также для получения композиций, обладающих пестицидной активностью.

Термин "пестицидный токсин" или "пестицидный белок" относится к токсину, который обладает токсической активностью в отношении одного или нескольких вредителей, включающих в себя, без ограничения, членов отрядов Lepidoptera, Diptera и Coleoptera или типа Nematoda, или к белку, гомологичному такому токсину. Пестицидные белки были выделены из таких организмов, как, например, *Bacillus sp.*, *Clostridium bifermentans* и *Raenibacillus popilliae*. Пестицидные белки включают в себя аминокислотные последовательности, полученные с использованием раскрытых здесь полноразмерных нуклеотидных последовательностей, и аминокислотные последовательности, более короткие, чем полноразмерные последовательности, полученные либо путем использования альтернативного старт-кодона, находящегося ниже по ходу считывания, либо в результате процессинга, который приводит к образованию более короткого белка, обладающего пестицидной активностью. Процессинг может протекать в организме, в котором экспрессируется белок, или в организме вредителя после проглатывания белка.

Таким образом, настоящее изобретение предлагает новые выделенные или рекомбинантные нуклеотидные последовательности, которые придают пестицидную активность. Указанные нуклеотидные последовательности кодируют полипептиды, гомологичные известным токсинам. Изобретение также предлагает аминокислотные последовательности пестицидных белков. Белок, образующийся в результате трансляции данного гена, позволяет клеткам подавлять

или уничтожать вредителей, проглатывающих его.

Выделенные молекулы нуклеиновых кислот, их варианты и фрагменты

Один аспект настоящего изобретения относится к выделенным или рекомбинантным молекулам нуклеиновых кислот, содержащим нуклеотидные последовательности, кодирующие пестицидные белки и полипептиды, или их биологически активные фрагменты, а также к молекулам нуклеиновых кислот, достаточным для применения в качестве гибридизационных зондов для идентификации молекул нуклеиновых кислот, кодирующих белки с участками, обладающими гомологией последовательностей. Кроме того, в объем настоящего изобретения также входят нуклеотидные последовательности, способные гибридизоваться с нуклеотидными последовательностями настоящего изобретения в жестких условиях, как описано в данном документе. В настоящем описании термин "молекула нуклеиновой кислоты" включает в себя молекулы ДНК (например рекомбинантной ДНК, кДНК или геномной ДНК) и молекулы РНК (например мРНК), а также аналоги ДНК или РНК, полученные с использованием аналогов нуклеотидов. Молекула нуклеиновой кислоты может быть одноцепочечной или двухцепочечной, однако предпочтительно она представляет собой двухцепочечную ДНК.

Термин "выделенная" или "рекомбинантная" нуклеотидная последовательность (или ДНК) в данном описании относится к нуклеотидной последовательности (или ДНК), которая находится не в своей природной среде, а, например, *in vitro* или в рекомбинантной бактериальной или растительной клетке-хозяине. В некоторых воплощениях выделенная или рекомбинантная нуклеиновая кислота не содержит последовательности (предпочтительно последовательности, кодирующие белок), которые в природе фланкируют нуклеиновую кислоту (т.е. последовательности, расположенные на 5'- и 3'-концах нуклеиновой кислоты), входящую в состав геномной ДНК организма, из которого получают нуклеиновую кислоту. В целях настоящего изобретения термин "выделенный", используемый в применении к молекулам нуклеиновых кислот, не включает в себя выделенные хромосомы. Например, в разных воплощениях выделенная молекула нуклеиновой кислоты,

кодирующая дельта-эндотоксин, может содержать нуклеотидные последовательности размером менее чем примерно 5, 4, 3, 2, 1, 0,5 или 0,1 т.о., которые в природе фланкируют молекулу нуклеиновой кислоты в геномной ДНК клетки, из которой получают нуклеиновую кислоту. В разных воплощениях белок дельта-эндотоксин, который практически не содержит клеточного вещества, включает в себя препараты белка, содержащие менее чем примерно 30%, 20%, 10% или 5% (по сухой массе) отличного от дельта-эндотоксина белка (также называемого здесь "загрязняющий белок").

Нуклеотидные последовательности, кодирующие белки настоящего изобретения, включают в себя последовательность, описанную в SEQ ID NO:47 и 1-14, а также ее варианты, фрагменты и комплементарные ей последовательности. Термин "комплементарная последовательность" относится к нуклеотидной последовательности, комплементарной конкретной нуклеотидной последовательности в степени, достаточной для того, чтобы она могла гибридизоваться с указанной нуклеотидной последовательностью с образованием стабильного дуплекса. Аминокислотные последовательности, соответствующие пестицидным белкам, кодируемым указанным нуклеотидным последовательностям, описаны в SEQ ID NO:48 и 15-31.

Молекулы нуклеиновых кислот, которые представляют собой фрагменты указанных нуклеотидных последовательностей, кодирующих пестицидные белки, также входят в объем настоящего изобретения. Под "фрагментом" подразумевается часть нуклеотидной последовательности, кодирующей пестицидный белок. Фрагмент нуклеотидной последовательности может кодировать биологически активный фрагмент пестицидного белка, или он может представлять собой фрагмент, который можно использовать в качестве гибридизационного зонда или праймера ПЦР с помощью описанных ниже способов. Число смежных нуклеотидов, входящих в состав молекул нуклеиновых кислот, которые представляют собой фрагменты нуклеотидной последовательности, кодирующей пестицидный белок, составляет, по меньшей мере, примерно 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200,

1300, 1350, 1400 и до числа нуклеотидов, присутствующих в полноразмерной нуклеотидной последовательности, кодирующей раскрытый здесь пестицидный белок, в зависимости от предполагаемого применения. Под "смежными" нуклеотидами подразумеваются нуклеотидные остатки, которые непосредственно примыкают друг к другу. Фрагменты нуклеотидных последовательностей настоящего изобретения кодируют белковые фрагменты, которые сохраняют биологическую активность пестицидного белка и, следовательно, сохраняют пестицидную активность. Таким образом, изобретение также охватывает биологически активные фрагменты раскрытых здесь полипептидов. Под термином "сохраняет активность" подразумевается, что активность фрагмента составляет, по меньшей мере, примерно 30%, по меньшей мере, примерно 50%, по меньшей мере, примерно 70%, 80%, 90%, 95% или более от пестицидной активности пестицидного белка. В разных воплощениях активность можно улучшить или повысить по сравнению с активностью исходного пестицидного белка (например, улучшить или повысить по сравнению с активностью SEQ ID NO:43 или 45), как указано в данном описании. В одном воплощении пестицидная активность направлена на жесткокрылых. В другом воплощении пестицидная активность направлена на чешуекрылых. В другом воплощении пестицидная активность направлена на нематод. В другом воплощении пестицидная активность направлена на двукрылых. В другом воплощении пестицидная активность направлена на полужесткокрылых. Способы измерения пестицидной активности хорошо известны в данной области. Смотрите, 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, включенные в настоящее описание в качестве ссылки во всей полноте.

Фрагмент нуклеотидной последовательности, кодирующей пестицидный белок, который кодирует биологически активный фрагмент белка настоящего изобретения, кодирует, по меньшей мере, примерно 15, 25, 30, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200,

250, 300, 350, 400, 450 и до полного числа смежных аминокислот, присутствующих в полноразмерном пестицидном белке настоящего изобретения. В некоторых воплощениях фрагмент получают в результате протеолитического расщепления. Например, фрагмент, полученный в результате протеолитического расщепления, может быть укорочен по N-концу или C-концу, по меньшей мере, примерно на 100 аминокислот, примерно на 120, примерно на 130, примерно на 140, примерно на 150 или примерно на 160 аминокислот по сравнению с SEQ ID NO:48 и 15-31. В некоторых воплощениях фрагменты, входящие в объем настоящего изобретения, получают в результате удаления C-концевого домена кристаллизации, например, путем протеолиза или путем вставки стоп-кодона в кодирующую последовательность. В других воплощениях гибридный белок содержит фрагмент C-концевого домена SEQ ID NO:43 и/или фрагмент N-концевого домена SEQ ID NO:45.

Предпочтительные пестицидные белки настоящего изобретения кодируются нуклеотидной последовательностью, в достаточной степени идентичной нуклеотидным последовательностям SEQ ID NO:47 и 1-14, или пестицидные белки в достаточной степени идентичны аминокислотным последовательностям, описанным в SEQ ID NO:48 и 15-31. В другом воплощении нуклеотидная последовательность кодирует гибридный белок, в котором N-концевой фрагмент в достаточной степени идентичен N-концевому фрагменту SEQ ID NO:45, или N-концевой фрагмент в достаточной степени идентичен N-концевому фрагменту SEQ ID NO:45, а C-концевой фрагмент в достаточной степени идентичен SEQ ID NO:43. Термин "в достаточной степени идентичен" означает, что аминокислотная или нуклеотидная последовательность, по меньшей мере, примерно на 60% или 65%, примерно на 70% или 75%, примерно на 80% или 85%, примерно на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более процентов идентична исходной последовательности по результатам, полученным с помощью одной из описанных здесь программ выравнивания с использованием стандартных параметров. Специалисту в данной области известно, что указанные значения можно соответственным образом подгонять, чтобы определить соответствующую идентичность белков,

кодируемых двумя нуклеотидными последовательностями, с учетом вырожденности кодонов, подобия аминокислот, расположения рамки считывания и т.п.

Чтобы определить процент идентичности двух аминокислотных последовательностей или двух нуклеиновых кислот, последовательности выравнивают с целью оптимального сравнения. Процент идентичности двух последовательностей является функцией от числа идентичных положений в последовательностях (т.е. процент идентичности = число идентичных положений/общее число положений (например перекрывающихся положений)×100). В одном воплощении две последовательности имеют одинаковую длину. В другом воплощении процент идентичности рассчитывают на всем протяжении исходной последовательности (т.е. последовательности, раскрытой здесь как одна из SEQ ID NO: 1-31, 47 или 48). Процент идентичности двух последовательностей можно определить с помощью методов, подобных описанным ниже, в присутствии или в отсутствие разрешенных пробелов. При расчете процента идентичности, как правило, считают точные совпадения. Пробел, т.е. положение, в котором при выравнении в одной последовательности остаток присутствует, а в другой отсутствует, относят к положениям с неидентичными остатками.

Определение процента идентичности двух последовательностей можно проводить с помощью математического алгоритма. Неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения двух последовательностей является алгоритм Karlin and Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264, модифицированный в Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877. Такой алгоритм используется в программах BLASTN и BLASTX Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403. Нуклеотидный поиск в BLAST можно проводить с использованием программы BLASTN, сумма баллов равна 100, длина слова равна 12, с определением нуклеотидных последовательностей, гомологичных пестицид-подобным молекулам нуклеиновых кислот настоящего изобретения. Белковый поиск в BLAST можно проводить с использованием программы BLASTX, сумма баллов равна 50, длина слова равна 3, с определением

аминокислотных последовательностей, гомологичных молекулам пестицидных белков настоящего изобретения. Для выравнивания с использованием пробелов, в целях сравнения можно использовать Gapped BLAST (в BLAST 2.0), как описано в Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389. Альтернативно PSI-Blast можно использовать для проведения итеративного поиска, который позволяет детектировать дистанционные взаимоотношения между молекулами. Смотрите Altschul et al. (1997), выше. При использовании программ BLAST, Gapped BLAST и PSI-Blast, в соответствующих программах (например BLASTX и BLASTN) можно использовать параметры по умолчанию. Выравнивание также можно проводить вручную путем осмотра.

Другим неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения последовательностей, является алгоритм ClustalW (Higgins et al. (1994) *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680). ClustalW позволяет сравнивать и выравнивать аминокислотные последовательности и последовательности ДНК по всей длине, и следовательно, с помощью данного алгоритма можно получать данные о консервативности всей аминокислотной последовательности. Алгоритм ClustalW используют в некоторых коммерчески доступных пакетах программ для анализа ДНК/аминокислот, таких как модуль ALIGNX пакета программ Вектор NTI (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). После выравнивания аминокислотных последовательностей с помощью ClustalW, можно определить процент аминокислотной идентичности. Неограничивающим примером программного обеспечения, используемого для анализа выравниваний, проведенных с помощью ClustalW, является GENEDOC™. GENEDOC™ (Karl Nicholas) позволяет оценивать подобие аминокислотных последовательностей (или последовательностей ДНК) и степень идентичности для нескольких белков. Другим неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения последовательностей, является алгоритм Myers and Miller (1988) CABIOS 4:11-17. Такой алгоритм включен в программу ALIGN (версия 2.0), которая является частью пакета программ GCG Wisconsin Genetics, версия 10 (поставляемого Accelrys, Inc.,

9685 Scranton Rd., San Diego, CA, USA). При использовании программы ALIGN для сравнения аминокислотных последовательностей, можно использовать таблицу масс остатков PAM120, штраф за удлинение пробела 12 и штраф за пробел 4.

Если не указано иначе, при определении идентичности или подобия последовательностей с помощью GAP, версия 10, в которой используется алгоритм Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48(3):443-453, используют следующие параметры: для определения % идентичности и % подобия нуклеотидных последовательностей используют вес пробела 50, вес длины 3 и матрицу замен nwsgardna.cmp; для определения % идентичности и % подобия аминокислотных последовательностей используют вес пробела 8, вес длины 2 и матрицу замен BLOSUM62. Также можно использовать эквивалентные программы. Под "эквивалентной программой" подразумевается любая программа для сравнения последовательностей, которая для любых двух анализируемых последовательностей дает такое же число совпадений нуклеотидных остатков и такой же процент идентичности последовательностей, как соответствующее выравнивание, выполненное при помощи программы GAP, версия 10.

Изобретение также охватывает варианты молекулы нуклеиновых кислот. "Варианты" нуклеотидных последовательностей, кодирующих пестицидные белки, включают в себя последовательности, которые кодируют раскрытые здесь пестицидные белки, но имеют консервативные отличия вследствие вырожденности генетического кода, а также последовательности, обладающие достаточной степенью идентичности по отношению к исходным последовательностям, как описано выше. Встречающиеся в природе аллельные варианты можно идентифицировать с помощью хорошо известных методов молекулярной биологии, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР) и методы гибридизации, описанные ниже. Вариантные нуклеотидные последовательности также включают в себя синтетические нуклеотидные последовательности, полученные, например, путем сайт-направленного мутагенеза, которые сохраняют способность кодировать пестицидные белки, раскрытые в настоящем

изобретении, как описано ниже. Вариантные белки, входящие в объем настоящего изобретения, являются биологически активными, то есть они сохраняют желательную биологическую активность нативного белка, то есть пестицидную активность. Термин "сохраняет активность" означает, что активность варианта составляет, по меньшей мере, примерно 30%, по меньшей мере, примерно 50%, по меньшей мере, примерно 70% или, по меньшей мере, примерно 80% от пестицидной активности нативного белка. В некоторых воплощениях активность улучшается или увеличивается по сравнению с исходным белком, как указано в данном описании. Способы измерения пестицидной активности хорошо известны в данной области. Смотрите, 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, включенные в настоящее описание в качестве ссылки во всей полноте.

Опытным специалистам также известно, что изменения можно ввести путем введения в нуклеотидные последовательности настоящего изобретения мутаций, приводящих к изменениям аминокислотной последовательности кодируемых пестицидных белков, без изменения биологической активности белков. Таким образом, варианты выделенные молекулы нуклеиновых кислот можно получить путем введения одной или нескольких мутаций, включающих в себя нуклеотидные замены, добавления и делеции, в соответствующую нуклеотидную последовательность, раскрытую в настоящем описании, что приводит к введению в кодируемый белок одной или нескольких замен, добавлений или делеций. Мутации можно ввести с помощью стандартных методов, таких как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. Такие варианты нуклеотидные последовательности также входят в объем настоящего изобретения.

Например, консервативные аминокислотные замены можно осуществить по одному или нескольким вычисленным неэссенциальным аминокислотным остаткам. "Неэссенциальный" аминокислотный остаток представляет собой остаток последовательности пестицидного белка дикого типа, который

можно изменить, не оказывая влияния на биологическую активность, тогда как "эссенциальный" аминокислотный остаток необходим для проявления биологической активности. "Консервативная аминокислотная замена" представляет собой замену аминокислотного остатка другим остатком, содержащим подобную боковую цепь. В данной области известны семейства аминокислотных остатков, содержащих подобные боковые цепи. Указанные семейства включают в себя аминокислоты, содержащие основные боковые цепи (например, лизин, аргинин, гистидин), кислые боковые цепи (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин).

Аминокислотные замены можно осуществить в неконсервативных участках, которые отвечают за функционирование белка. Как правило, такие замены не проводят по консервативным аминокислотным остаткам или по аминокислотным остаткам, присутствующим в консервативном мотиве, где такие остатки необходимы для проявления активности белка. Примеры остатков, которые являются консервативными и которые могут быть необходимыми для проявления активности белка, включают в себя, например, остатки, которые являются одинаковыми у всех белков, участвующих в выравнивании токсинов, подобных или родственных последовательностям настоящего изобретения (например, остатки, которые являются одинаковыми при выравнивании гомологичных белков). Примеры остатков, которые являются консервативными, но по которым можно проводить консервативные аминокислотные замены с сохранением активности, включают в себя, например, остатки, отличающиеся только консервативными заменами среди всех белков, участвующих в выравнивании токсинов, подобных или родственных последовательностям настоящего изобретения (например, остатки, которые отличаются только консервативными заменами среди всех

белков, участвующих в выравнивании гомологичных белков). Однако специалисту в данной области известно, что функциональные варианты могут содержать минорные консервативные или неконсервативные изменения в консервативных остатках.

Альтернативно варианты нуклеотидные последовательности можно получить путем введения мутаций случайным образом по всей длине кодирующей последовательности или в ее части, например, путем насыщающего мутагенеза, после чего полученные мутанты можно подвергнуть скринингу на способность придавать пестицидную активность, чтобы идентифицировать мутанты, сохранившие активность. После проведения мутагенеза кодируемый белок можно экспрессировать рекомбинантными способами, а активность белка можно определить с помощью стандартных аналитических способов.

С помощью таких методов, как ПЦР, гибридизация и т.п. можно идентифицировать соответствующие пестицидные последовательности, в значительной степени идентичные последовательностям настоящего изобретения. Смотрите, например, Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) and Innis, et al. (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, NY).

Метод гибридизации включает в себя применение полноразмерной пестицидной нуклеотидной последовательности, или ее части, для скрининга библиотек кДНК или геномных библиотек. Способы конструирования таких библиотек кДНК и геномных библиотек, широко известные в данной области, раскрыты в Sambrook and Russell, 2001, выше. Так называемые гибридизационные зонды могут представлять собой фрагменты геномной ДНК, фрагменты кДНК, фрагменты РНК или другие олигонуклеотиды, и могут содержать в качестве метки детектируемую группу, такую как ^{32}P или любой другой детектируемый маркер, такой как другой радиоизотоп, флуоресцентное соединение, фермент или кофактор фермента. Зонды для гибридизации можно получить путем мечения синтетических олигонуклеотидов, в основе которых лежат раскрытые здесь

нуклеотидные последовательности, кодирующие пестицидные белки. Кроме того, можно использовать вырожденные праймеры, сконструированные с учетом консервативных нуклеотидов или аминокислотных остатков, которые могут входить в состав нуклеотидной последовательности или кодируемой ею аминокислотной последовательности. Как правило, зонд содержит участок нуклеотидной последовательности, который гибридизуется в жестких условиях, по меньшей мере, примерно с 12, по меньшей мере, примерно с 25, по меньшей мере, примерно с 50, 75, 100, 125, 150, 175 или 200 последовательными нуклеотидами нуклеотидной последовательности, кодирующей пестицидный белок настоящего изобретения, или ее фрагмента или варианта. Способы получения зондов для гибридизации широко известны в данной области и описаны в Sambrook and Russell, 2001, выше, включенном в настоящее описание в качестве ссылки.

Например, в качестве зонда, способного специфически гибридизоваться с соответствующими пестицидный белок-подобными последовательностями и матричными РНК, можно использовать раскрытую здесь полноразмерную пестицидную последовательность, или один или несколько ее фрагментов. Чтобы обеспечить специфическую гибридизацию в разных условиях, такие зонды содержат уникальные последовательности, длина которых составляет предпочтительно, по меньшей мере, примерно 10 нуклеотидов или, по меньшей мере, примерно 20 нуклеотидов. Такие зонды можно использовать для амплификации соответствующих пестицидных последовательностей из выбранного организма методом ПЦР. Данный метод можно использовать для выделения других кодирующих последовательностей из желательного организма, а также в качестве диагностического средства для определения присутствия кодирующей последовательности в организме. Гибридизационные методы включают в себя гибридизационный скрининг высеянных на чашки библиотек ДНК (в виде блюшек или колоний; смотрите, 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 гибридизоваться с полноразмерной нуклеотидной последовательностью настоящего изобретения, или ее фрагментом (например, содержащим, по меньшей мере, примерно 300 нуклеотидов, по меньшей мере, примерно 400, по меньшей мере, примерно 500, 1000, 1200, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500 нуклеотидов, или число нуклеотидов, составляющее раскрытую здесь полноразмерную нуклеотидную последовательность). Гибридизацию таких последовательностей можно проводить в жестких условиях. Под "жесткими условиями" или "жесткими условиями гибридизации" подразумеваются условия, в которых зонд гибридизуется с последовательностью-мишенью в заметно большей степени, чем с другими последовательностями (например, в степени, по меньшей мере, в 2 раза превосходящей уровень фона). Жесткие условия являются последовательность-зависимыми и различаются в разных случаях. Варьируя жесткость условий гибридизации и/или промывания можно идентифицировать последовательности-мишени, которые на 100% комплементарны зонду (гомологичное зондирование). Альтернативно, жесткость условий можно варьировать, допуская некоторые несовпадения в последовательностях, чтобы детектировать более низкую степень подобия (гетерологичное зондирование). Обычно длина зонда составляет менее чем примерно 1000 нуклеотидов, предпочтительно менее чем примерно 500 нуклеотидов.

Как правило, жесткие условия включают в себя концентрацию соли менее чем примерно 1,5 М иона Na, обычно концентрация иона Na (или другой соли) составляет от 0,01 до 1,0 М при pH от 7,0 до 8,3 и температуре, составляющей, по меньшей мере, примерно 30°C для коротких зондов (например, содержащих от 10 до 50 нуклеотидов) и, по меньшей мере, примерно 60°C для длинных зондов (например, содержащих более 50 нуклеотидов). Жестких условий можно достичь путем добавления дестабилизирующих средств, таких как формамид. Типичные условия низкой жесткости включают в себя гибридизацию с использованием буферного раствора, содержащего от 30 до 35% формамида, 1 М NaCl, 1% SDS (додецилсульфат натрия), при 37°C, и промывание с

использованием $1 \times -2 \times$ SSC ($20 \times$ SSC = 3,0 М NaCl/0,3 М тринатрия цитрат) при 50–55°C. Типичные условия средней жесткости включают в себя гибридизацию с использованием 40–45% формамида, 1,0 М NaCl, 1% SDS при 37°C, и промывание с использованием $0,5 \times -1 \times$ SSC при 55–60°C. Типичные условия высокой жесткости включают в себя гибридизацию с использованием 50% формамида, 1 М NaCl, 1% SDS при 37°C, и промывание с использованием $0,1 \times$ SSC при 60–65°C. Буферы для промывания могут необязательно содержать примерно от 0,1% до 1% SDS. Продолжительность гибридизации, как правило, составляет менее чем примерно 24 часа, обычно от примерно 4 до примерно 12 часов.

Специфичность обычно зависит от условий промывания после гибридизации, ключевыми факторами которых являются ионная сила и температура раствора для конечного промывания. Для гибридов ДНК–ДНК $T_{пл}$ можно приблизительно определить из уравнения Meinkoth and Wahl (1984) Anal. Biochem. 138:267–284: $T_{пл} = 81,5^\circ\text{C} + 16,6(\log M) + 0,41(\%GC) - 0,61(\% \text{ форм.}) - 500/L$; где M обозначает молярность моновалентных катионов, %GC обозначает процентное содержание нуклеотидов гуанозина и цитозина в ДНК, % форм. обозначает процентное содержание формамида в растворе для гибридизации, а L обозначает длину гибрида в парах оснований. $T_{пл}$ представляет собой температуру (при определенных значениях ионной силы и pH), при которой 50% молекул комплементарной последовательности-мишени гибридизуется с точно совпадающим зондом. $T_{пл}$ уменьшается примерно на 1°C для каждого 1% несовпадений; следовательно, $T_{пл}$, условия гибридизации и/или промывания можно регулировать, чтобы обеспечить гибридизацию с последовательностью, обладающей желательной степенью идентичности. Например, если проводят поиск по последовательностям с идентичностью больше 90%, $T_{пл}$ можно уменьшить на 10°C. Как правило, для конкретной последовательности и комплементарной ей последовательности выбирают жесткие условия, включающие в себя снижение температуры примерно на 5°C по сравнению с термальной точкой плавления ($T_{пл}$), при определенных значениях ионной силы и pH. Однако очень жесткие условия могут включать в себя проведение

гибридизации и/или промывания при температуре на 1, 2, 3 или 4°С ниже, чем термальная точка плавления ($T_{пл}$); умеренно жесткие условия могут включать в себя проведение гибридизации и/или промывания при температуре на 6, 7, 8, 9 или 10°С ниже, чем термальная точка плавления ($T_{пл}$); условия низкой жесткости могут включать в себя проведение гибридизации и/или промывания при температуре на 11, 12, 13, 14, 15 или 20°С ниже, чем термальная точка плавления ($T_{пл}$). Для рядовых специалистов в данной области очевидно, что в описание уравнений, композиций, используемых для гибридизации и промывания, и желательной $T_{пл}$, включены вариации по жесткости растворов для гибридизации и/или промывания. Если желательная степень несовпадений приводит к снижению $T_{пл}$ до значения менее чем 45°С (водный раствор), или 32°С (раствор формамида), предпочтительно увеличить концентрацию SSC так, чтобы можно было использовать более высокую температуру. Подробное руководство по гибридизации нуклеиновых кислот можно найти 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). Смотрите 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 входят в объем настоящего изобретения. Термин "пестицидный белок" относится к белку, содержащему аминокислотную последовательность, описанную в SEQ ID NO:48 и 15-31. Кроме того, изобретение предлагает фрагменты, биологически активные участки и их варианты, которые можно использовать при осуществлении способов настоящего изобретения. Термин "выделенный белок" или "рекомбинантный белок" используют для обозначения белка, который находится не в своей природной среде, а, например, *in vitro* или в рекомбинантной бактериальной или растительной клетке-хозяине.

Термин "фрагменты" или "биологически активные фрагменты"

относится к полипептидным фрагментам, содержащим аминокислотные последовательности, в достаточной степени идентичные аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO:48 и 15-31, и обладающие пестицидной активностью. Биологически активный фрагмент пестицидного белка может представлять собой полипептид, длина которого составляет, например, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350 или более аминокислот. Такие биологически активные фрагменты можно получить с помощью рекомбинантных методов и подвергнуть анализу на пестицидную активность. Способы измерения пестицидной активности хорошо известны в данной области. Смотрите, 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, которые включены в настоящее описание в качестве ссылки во всей полноте. В соответствии с настоящим описанием фрагмент содержит, по меньшей мере, 8 смежных аминокислот SEQ ID NO:48 и 15-31. Однако изобретение охватывает и другие фрагменты, например, любые фрагменты белка, длина которых превышает примерно 10, 20, 30, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350 или более аминокислот.

Термин "варианты" относится к белкам или полипептидам, содержащим аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, примерно на 60%, 65%, примерно на 70%, 75%, примерно на 80%, 85%, примерно на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична одной из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:48 и 15-31. Варианты также включают в себя полипептиды, кодируемые молекулой нуклеиновой кислоты, которая гибридизуется с молекулой нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:47 и 1-14, или с комплементарной ей последовательностью в жестких условиях. Варианты включают в себя полипептиды, которые отличаются по аминокислотной последовательности вследствие мутагенеза. Вариантные белки,

входящие в объем настоящего изобретения, являются биологически активными, то есть они продолжают проявлять желательную биологическую активность нативного белка, то есть сохраняют пестицидную активность. В некоторых воплощениях варианты обладают улучшенной активностью по сравнению с нативным белком. Способы измерения пестицидной активности хорошо известны в данной области. Смотрите, 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, которые включены в настоящее описание в качестве ссылки во всей полноте.

Бактериальные гены, такие как гены *axm1* настоящего изобретения, очень часто содержат несколько метиониновых иницирующих кодонов в непосредственной близости к старт-кодону открытой рамки считывания. Зачастую инициация трансляции по одному или нескольким из указанных старт-кодонов приводит к образованию функционального белка. Указанные старт-кодоны могут включать в себя кодоны ATG. Однако бактерии, такие как *Bacillus* sp., также распознают кодон GTG как старт-кодон, а белки, которые иницируют трансляцию по кодонам GTG, содержат метионин в первом аминокислотном положении. В редких случаях трансляция в бактериальных системах может иницироваться по кодону TTG, хотя в данном событии TTG кодирует метионин. Кроме того, часто заранее определяют, какой из указанных кодонов используется бактерией в природе. Таким образом, следует понимать, что применение одного из дополнительных метиониновых кодонов также может привести к образованию пестицидных белков. Указанные пестицидные белки входят в объем настоящего изобретения и могут использоваться в способах настоящего изобретения. Следует понимать, что при экспрессии в растениях для соответствующей трансляции нужно изменить дополнительный старт-кодон на ATG.

В объем изобретения также входят антитела против полипептидов настоящего изобретения или их вариантов или фрагментов. Способы получения антител хорошо известны в данной области (смотрите, например, Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring

Harbor, NY; патент США № 4196265).

Измененные или усовершенствованные варианты

Известно, что последовательности ДНК, кодирующие пестицидный белок, можно изменить с помощью разных методов, и что указанные изменения могут привести к получению последовательностей ДНК, кодирующих белки, аминокислотные последовательности которых отличаются от последовательностей пестицидного белка настоящего изобретения. Указанный белок можно изменить разными способами, включающими в себя аминокислотные замены и делеции, а также удаления и вставки одной или нескольких аминокислот в SEQ ID NO:48 и 15-31, например, они включают в себя примерно 2, примерно 3, примерно 4, примерно 5, примерно 6, примерно 7, примерно 8, примерно 9, примерно 10, примерно 15, примерно 20, примерно 25, примерно 30, примерно 35, примерно 40, примерно 45, примерно 50, примерно 55, примерно 60, примерно 65, примерно 70, примерно 75, примерно 80, примерно 85, примерно 90, примерно 100, примерно 105, примерно 110, примерно 115, примерно 120, примерно 125, примерно 130, примерно 135, примерно 140, примерно 145, примерно 150, примерно 155 или более аминокислотных замен, делеций или вставок на С-концевом фрагменте или на N-концевом фрагменте, или на том и другом. Способы проведения таких манипуляций широко известны в данной области. Например, варианты аминокислотной последовательности пестицидного белка можно получить путем введения мутаций в ДНК. Введение мутаций можно проводить с использованием одного из нескольких видов мутагенеза и/или в результате направленной эволюции. В некоторых аспектах кодируемые изменения аминокислотной последовательности не влияют на функцию белка. Такие варианты обладают желательной пестицидной активностью. Однако следует понимать, что способность пестицидного белка придавать пестицидную активность можно улучшить путем применения таких методов с использованием композиций данного изобретения. Например, пестицидный белок можно экспрессировать в клетке-хозяине, которая характеризуется высокой частотой пропуска оснований в процессе репликации ДНК, такой как XL-1

Red (Stratagene, La Jolla, CA). После размножения таких штаммов можно выделить ДНК (например, путем получения плазмидной ДНК, или путем амплификации методом ПЦР и клонирования полученного фрагмента ПЦР в векторе), культивировать мутантные пестицидные белки в немутагенном штамме, и идентифицировать мутантные гены, характеризующиеся пестицидной активностью, например, путем проведения анализа с целью тестирования пестицидной активности. Как правило, белок смешивают и используют в пищевых анализах. Смотрите, например, Marrone et al. (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293. Такие анализы могут включать в себя приведение растений в контакт с одним или несколькими вредителями и определение способности растения выживать и/или вызывать гибель вредителей. Примеры мутаций, которые приводят к повышению токсичности, можно найти в Schnepf et al. (1998) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:775-806.

Альтернативно, изменения можно внести в последовательность многих белков по amino- или карбокси-концу, не оказывая существенного влияния на активность. Такие изменения можно осуществить путем введения вставок, делеций или замен с помощью современных молекулярных методов, таких как ПЦР, в том числе ПЦР-амплификации, которые позволяют изменить или удлинить белок-кодирующую последовательность посредством включения последовательностей, кодирующих аминокислоты, в олигонуклеотиды, используемые в ПЦР-амплификации. Альтернативно, добавленные белковые последовательности могут содержать полноразмерные белок-кодирующие последовательности, такие как традиционно используемые в данной области для получения гибридных белков. Такие гибридные белки часто используют для (1) повышения экспрессии представляющего интерес белка, (2) введения связывающего домена, ферментативной активности или эпитопа для облегчения очистки белка, детекции белка или других экспериментальных применений, известных в данной области; (3) специфической секреции или трансляции белка во внутриклеточной органелле, такой как периплазматическое пространство грам-отрицательной бактерии, или эндоплазматический ретикулум эукариотических клеток, причем в

последнем часто происходит гликозилирование белка.

Вариантные нуклеотидные и аминокислотные последовательности настоящего изобретения также включают в себя последовательности, полученные в результате мутагенных и рекомбиногенных процедур, таких как перестановка в ДНК. Такая процедура с использованием одного или нескольких участков, кодирующих пестицидные белки, позволяет получать новые пестицидные белки, обладающие желательными свойствами. В данном способе библиотеки рекомбинантных полинуклеотидов получают из популяции полинуклеотидов с родственными последовательностями, которые содержат участки последовательностей, обладающих значительной степенью идентичности последовательностей, и могут подвергаться гомологичной рекомбинации *in vitro* или *in vivo*. Например, с помощью данного способа можно переставлять мотивы последовательностей, кодирующие представляющие интерес домены, которые находятся в пестицидном гене настоящего изобретения и в других известных пестицидных генах, с получением нового гена, кодирующего белок с улучшенным целевым свойством, таким как расширенная инсектицидная активность. Стратегии проведения таких перестановок в ДНК известны в данной области. Смотрите, например, Stemmer (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 10747-10751; Stemmer (1994) Nature 370: 389-391; Cramer et al. (1997) Nature Biotech. 15: 436-438; Moore et al. (1997) J. Mol. Biol. 272: 336-347; Zhang et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 4504-4509; Cramer et al. (1998) Nature 391: 288-291; и патенты США №№ 5605793 и 5837458.

Другим механизмом получения измененных пестицидных белков является обмен или перестановка доменов. Обмен доменами среди пестицидных белков может приводить к получению гибридных или химерных токсинов с улучшенной пестицидной активностью или целевым спектром. Способы получения рекомбинантных белков и их тестирования на пестицидную активность хорошо известны в данной области (смотрите, 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) Biol. Chem. 265:

20923-20930; Rang et al. 1999) Appl. Environ. Microbiol. 65: 2918-2925).

Таким образом, в разных воплощениях настоящего изобретения описанные здесь нуклеотидные последовательности (а также композиции, векторы, клетки-хозяева, растения и семена, содержащие указанные нуклеотидные последовательности) содержат фрагмент одного или нескольких токсинов и фрагмент одного или нескольких других токсинов. В одном воплощении нуклеотидная последовательность включает в себя нуклеотидную последовательность, кодирующую N-концевой фрагмент Ахmi005 (описанный в SEQ ID NO:45) и C-концевой фрагмент Ахmi115 (описанный в SEQ ID NO:43). В конкретных воплощениях N-концевой фрагмент Ахmi005 содержит аминокислотные остатки Ахmi005 примерно от 1 до 173, или примерно от 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 до 150, 155, 160, 165, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 250, 300, 325 или 350, а C-концевой фрагмент Ахmi115 содержит аминокислотные остатки Ахmi115 примерно от 174 до 803, или примерно от 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 250, 300, 325 или 350 до 600, 650, 700, 750, 760, 770, 780, 790, 795, 796, 797, 798, 799, 800, 801, 802 или 803. Специалисту в данной области известно, что в каждую аминокислотную последовательность можно внести минорные изменения и делеции с сохранением (или улучшением) активности гибридного белка. В некоторых воплощениях нуклеотидные последовательности настоящего изобретения кодируют гибридный белок Ахmi005/Ахmi115, содержащий мутацию (по сравнению с соответствующим участком исходного белка Ахmi005 или Ахmi115) по одному или нескольким положениям, соответствующим аминокислотным положениям 584, 588 и 771 последовательности SEQ ID NO:43 (смотрите, например, варианты гибридных последовательности, описанные в SEQ ID NO:18-22). В других воплощениях нуклеотидная последовательность настоящего изобретения описана в одной из SEQ ID NO:47 и 1-14, а аминокислотную последовательность описана в одной из SEQ ID

NO:48 и 15-31.

В разных воплощениях гибрид Ахmi005 с Ахmi115 содержит аминокислотную последовательность, обладающую улучшенной или расширенной активностью по сравнению с активностью отдельно взятого Ахmi005 или Ахmi115. Под "улучшенной" активностью подразумевается увеличение смертности, по меньшей мере, одного вредителя, или увеличение степени снижения роста, питания или нормального физиологического развития по сравнению с нативным белком. Под "расширенной" активностью подразумевается активность в отношении вредителя, которую не проявляют Ахmi005 и Ахmi115. Например, гибрид, содержащий фрагмент Ахmi005 и фрагмент Ахmi115, может представлять собой один белок, обладающий профилем активности, который включает в себя активность как Ахmi005, так и Ахmi115. В некоторых воплощениях гибридный белок обладает улучшенной активностью в отношении отдельного вредителя по сравнению с одним из Ахmi005 и Ахmi115, или обоими указанными белками.

Векторы

Пестицидную последовательность настоящего изобретения можно вставить в экспрессионную кассету с целью экспрессии в представляющем интерес растении. Под "растительной экспрессионной кассетой" подразумевается конструкция ДНК, способная обеспечивать экспрессию белка из открытой рамки считывания в растительной клетке. Как правило, такая конструкция содержит промотор и кодирующую последовательность. Обычно такие конструкции также содержат 3'-нетранслируемый участок. Такие конструкции могут содержать "сигнальную последовательность" или "лидерную последовательность", чтобы обеспечить совместную трансляцию или после трансляционный транспорт пептида в определенные внутриклеточные структуры, такие как хлоропласт (или другая пластида), эндоплазматический ретикулум или аппарат Гольджи.

Под "сигнальной последовательностью" подразумевается последовательность, которая заведомо или предположительно приводит к одновременному с трансляцией или посттрансляционному транспорту пептида через клеточную мембрану. У эукариотов такой

транспорт обычно включает в себя секрецию в аппарат Гольджи, что в некоторых случаях сопровождается гликозилированием. Инсектицидные токсины бактерий часто синтезируются в виде протоксинов, которые в результате протеолиза активируются в кишечнике вредителя-мишени (Chang (1987) *Methods Enzymol.* 153: 507-516). В некоторых воплощениях настоящего изобретения сигнальная последовательность находится в нативной последовательности или она может быть получена из последовательности настоящего изобретения. Под "лидерной последовательностью" подразумевается любая последовательность, которая после трансляции приводит к образованию аминокислотной последовательности, достаточной для инициации совместного с трансляцией транспорта пептидной цепи во внутриклеточную органеллу. Таким образом, данный термин включает в себя лидерные последовательности, определяющие транспорт и/или гликозилирование в результате поступления в эндоплазматический ретикулум, прохождение в вакуоли, пластиды, в том числе хлоропласты, митохондрии и т.п.

Под "вектором для трансформации растения" подразумевается молекула ДНК, необходимая для эффективной трансформации растительной клетки. Такая молекула может состоять из одной или нескольких растительных экспрессионных кассет, и может быть организована в несколько "векторных" молекул ДНК. Например, в качестве векторов для трансформации растений можно использовать бинарные векторы, состоящие из двух несмежных векторов ДНК, которые кодируют все цис- и транс-действующие функции, необходимые для трансформации растительных клеток (Hellens and Mullineaux (2000) *Trends in Plant Science* 5: 446-451). Термин "вектор" относится к нуклеотидной конструкции, сконструированной так, чтобы можно было осуществлять перенос среди разных клеток-хозяев. Термин "экспрессионный вектор" относится к вектору, который может обеспечивать встраивание, интеграцию и экспрессию гетерологичных последовательностей ДНК или их фрагментов в чужеродной клетке. Кассета содержит 5'-и/или 3'-регуляторные последовательности, функционально связанные с последовательностью настоящего изобретения. Под

термином "функционально связанный" подразумевается функциональная связь между промотором и второй последовательностью, где промоторная последовательность инициирует и опосредует транскрипцию последовательности ДНК, соответствующей второй последовательности. Как правило, термин функционально связанный означает, что нуклеотидные последовательности, находящиеся в такой связи, являются смежными, кроме того, если нужно соединить два белок-кодирующих участка, они являются смежными и находятся в одной рамке считывания. Кассета может дополнительно содержать, по меньшей мере, один другой ген, предназначенный для совместной трансформации организма. Альтернативно, другой ген (гены) может присутствовать на другой экспрессионной кассете.

В разных воплощениях нуклеотидная последовательность настоящего изобретения функционально связана с промотором, например, с растительным промотором. Термин "промотор" относится к нуклеотидной последовательности, способной управлять транскрипцией нижележащей кодирующей последовательности. Промоторы вместе с другими нуклеотидными последовательностями, регулирующими транскрипцию и трансляцию (также называемыми "регуляторные последовательности"), необходимы для экспрессии представляющей интерес последовательности ДНК.

Такая экспрессионная кассета содержит несколько участков рестрикции для вставки пестицидной последовательности таким образом, чтобы ее транскрипция находилась под управлением регуляторных участков.

Экспрессионная кассета содержит в 5'-3' направлении транскрипции участок инициации транскрипции и трансляции (т.е. промотор), последовательность ДНК настоящего изобретения и участок терминации транскрипции и трансляции (т.е. терминирующий участок), способные функционировать в растении. Промотор может быть нативным или гомологичным, или чужеродным или гетерологичным по отношению к растению-хозяину и/или к последовательности ДНК настоящего изобретения. Кроме того, последовательность промотора может быть природной или,

альтернативно, синтетической. Если промотор является "нативным" или "гомологичным" по отношению к растению-хозяину, подразумевается, что промотор, который вводят в растение, можно обнаружить в данном растении в его нативном состоянии. Если промотор является "чужеродным" или "гетерологичным" по отношению к последовательности ДНК настоящего изобретения, подразумевается, что промотор не является нативным или в природе не находится в функциональной связи с последовательностью ДНК настоящего изобретения.

Терминирующий участок может быть нативным по отношению к участку инициации транскрипции, по отношению к представляющей интерес последовательности ДНК, находящейся с ним в функциональной связи, по отношению к растению-хозяину, или он может быть получен из другого источника (т.е. он может быть чужеродным или гетерологичным по отношению к промотору, представляющей интерес последовательности ДНК, растению-хозяину, или к любому сочетанию указанных элементов). Подходящие терминирующие участки, которые можно получить из *Ti*-плазмиды *A. tumefaciens*, включают в себя участки терминации октопинсинтазы и нопалинсинтазы. Смотрите также Guerineau et al. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 262: 141-144; Proudfoot (1991) *Cell* 64: 671-674; Sanfacon et al. (1991) *Genes Dev.* 5: 141-149; Mogen et al. (1990) *Plant Cell* 2: 1261-1272; Munroe et al. (1990) *Gene* 91: 151-158; Ballas et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17: 7891-7903; и Joshi et al. (1987) *Nucleic Acid Res.* 15: 9627-9639.

Если это целесообразно, ген (гены) можно оптимизировать с целью увеличения экспрессии в трансформированной клетке-хозяине. То есть для повышения экспрессии гены можно синтезировать с использованием предпочтительных для клетки-хозяина кодонов, или их можно синтезировать с использованием предпочтительной для хозяина частотой использования кодонов. Как правило, содержание GC в гене можно увеличить. Описание предпочтительных для хозяина частот использования кодонов можно найти, например, в Campbell and Gowri (1990) *Plant Physiol.* 92: 1-11. Способы синтеза предпочтительных для растения генов

известны в данной области. Смотрите, например, патенты США №№ 5380831 и 5436391, U.S. Patent Publication No. 20090137409, and Murray et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:477-498, включенные в настоящее описание в качестве ссылки.

В одном воплощении пестицидный белок направляется в хлоропласт для экспрессии. В данном способе, если пестицидный белок не вставляется непосредственно в хлоропласт, экспрессионная кассета дополнительно содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую транзитный пептид, обеспечивающий направление пестицидного белка в хлоропласты. Такие транзитные пептиды известны в данной области. Смотрите, 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, направляемый в хлоропласт, можно оптимизировать по экспрессии в хлоропластах с учетом различий в использовании кодонов ядром растения и его органеллами. В данном случае представляющие интерес нуклеиновые кислоты можно синтезировать с использованием хлоропласт-предпочтительных кодонов. Смотрите, например, патент США № 5380831, включенный в настоящее описание в качестве ссылки.

Трансформация растений

Способы настоящего изобретения включают в себя введение нуклеотидной конструкции в растение. Под "введением" подразумевается такое предоставление растению нуклеотидной конструкции, что конструкция получает доступ ко внутреннему пространству клетки растения. Способы настоящего изобретения, независимо от того, какой конкретно способ используется для введения нуклеотидной конструкции в растение, обеспечивают нуклеотидной конструкции доступ к внутреннему пространству, по меньшей мере, одной клетки растения. Способы введения нуклеотидных конструкций в растения известны в данной области и включают в себя, без ограничения, способы стабильной трансформации, способы транзитной трансформации и вирус-

опосредованные способы.

Термин "растение" включает в себя целые растения, органы растений (например, листья, стебли, корни и др.), семена, растительные клетки, ростки, зародыши, а также их потомство. Растительные клетки могут быть дифференцированными или недифференцированными (например, каллус, клетки суспензионной культуры, протопласты, клетки листьев, клетки корней, клетки флоэмы, пыльца).

Термины "трансгенные растения" или "трансформированные растения", или "стабильно трансформированные" растения, или клетки, или ткани относятся к растениям, которые содержат экзогенные нуклеотидные последовательности или фрагменты ДНК, внедренные или интегрированные в клетку растения. Указанные нуклеотидные последовательности включают в себя экзогенные или не присутствующие в нетрансформированной растительной клетке последовательности, а также последовательности, которые могут быть эндогенными, то есть которые могут присутствовать в нетрансформированной растительной клетке. Термин "гетерологичные", как правило, относится к нуклеотидным последовательностям, которые не являются эндогенными по отношению к клетке или части нативного генома, в котором они присутствуют, и были добавлены в клетку путем инфекции, трансфекции, микроинъекции, электропорации, микропроекции и т.п.

Трансгенные растения настоящего изобретения экспрессируют одну или несколько раскрытых здесь последовательностей новых токсинов. В разных воплощениях трансгенное растение дополнительно содержит один или несколько других генов, отвечающих за устойчивость к насекомым (например, Cry1, включающий в себя членов семейств Cry1A, Cry1B, Cry1C, Cry1D, Cry1E и Cry1F; Cry2, включающий в себя членов семейства Cry2A; Cry9, включающий в себя членов семейств Cry9A, Cry9B, Cry9C, Cry9D, Cry9E и Cry9F; и др.). Специалисту в данной области следует понимать, что трансгенное растение может содержать любой ген, отвечающий за представляющий интерес агрономический признак.

Трансформацию растительных клеток можно проводить с помощью одного из нескольких методов, известных в данной области. Пестицидный ген настоящего изобретения можно модифицировать с достижением или повышением экспрессии в растительных клетках. Как правило, конструкция, которая экспрессирует такой белок, содержит промотор, управляющий транскрипцией гена, а также 3'-нетранслируемый участок, обеспечивающий терминацию транскрипции и полиаденилирование. Схема построения таких конструкций хорошо известна в данной области. В некоторых случаях полезно сконструировать ген так, чтобы обеспечить секрецию образующегося пептида, или, в других случаях, направление указанного пептида в растительную клетку. Например, ген можно сконструировать так, чтобы он содержал сигнальный пептид, обеспечивающий транспортировку пептида в эндоплазматический ретикулум. Предпочтительно растительную экспрессионную кассету конструируют так, чтобы она содержала интрон, в этом случае для экспрессии требуется процессинг мРНК с удалением интрона.

Как правило, упомянутую "растительную экспрессионную кассету" вставляют в "вектор для трансформации растений". Указанный вектор для трансформации растений может состоять из одного или нескольких векторов ДНК, необходимых для достижения трансформации растения. Например, обычной практикой в данной области является применение векторов для трансформации растений, которые состоят из нескольких смежных сегментов ДНК. Указанные векторы в данной области часто называют "бинарные векторы". Бинарные векторы, а также векторы, содержащие хелперные плазмиды, чаще всего используют для трансформации, опосредуемой *Agrobacterium*, где размер и сложность сегментов ДНК, необходимых для достижения эффективной трансформации, является очень большим, и предпочтительно распределять функции на разные молекулы ДНК. Бинарные векторы обычно содержат плазмидный вектор, который включает в себя цис-действующие последовательности, необходимые для переноса Т-ДНК (такие как левый бордюр и правый бордюр), селективируемый маркер, сконструированный для экспрессии в растительной клетке, и

"представляющий интерес ген" (ген, сконструированный для экспрессии в растительной клетке, из которой желательно получить трансгенные растения). На указанном плазмидном векторе также присутствуют последовательности, необходимые для репликации бактерий. Цис-действующие последовательности располагают таким образом, чтобы обеспечить эффективный перенос в растительные клетки и экспрессию в них. Например, ген селектируемого маркера и пестицидный ген располагают между левым и правым бордюрами. Второй плазмидный вектор обычно содержит транс-действующие факторы, которые опосредуют перенос Т-ДНК из *Agrobacterium* в растительные клетки. Указанная плазмида зачастую содержит вирулентные элементы (гены Vir), которые обеспечивают инфицирование растительных клеток *Agrobacterium*, перенос ДНК путем расщепления по бордюрным последовательностям и vir-опосредованный перенос ДНК, как известно в данной области (Hellens and Mullineaux (2000) Trends in Plant Science 5: 446-451). Некоторые типы штаммов *Agrobacterium* (например LBA4404, GV3101, EHA101, EHA105 и др.) можно использовать для трансформации растений. Второй плазмидный вектор не является необходимым для трансформации растений с помощью других способов, таких как микропроекция, микроинъекция, электропорация, применение полиэтиленгликоля и др.

Как правило, способы трансформации растений включают в себя перенос гетерологичных ДНК в растительные клетки-мишени (такие как клетки незрелых или зрелых зародышей, суспензионных культур, недифференцированного каллуса, протопласты и др.) с последующей соответствующей селекцией с применением максимального порогового уровня (в зависимости от гена селектируемого маркера), чтобы отделить трансформированные растительные клетки от массы нетрансформированных клеток. Эксплантаты обычно переносят в свежую порцию той же среды и культивируют рутинным способом. Трансформированным клеткам дают дифференцироваться с образованием побегов после помещения на среду для регенерации, содержащую максимальный пороговый уровень селективного средства. Затем побеги переносят на

селективный субстрат для выращивания растений, чтобы получить укоренившийся побег или саженец. Трансгенный саженец выращивают до зрелого растения и получают фертильные семена (например, Hiei et al. (1994) *Plant Journal* 6: 271-282; Ishida et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 745-750). Эксплантаты обычно переносят в свежую порцию той же среды и культивируют рутинным способом. Общее описание методов и способов получения трансгенных растений можно найти в Ayres and Park (1994) *Critical Reviews in Plant Science* 13: 219-239 и Bommineni and Jauhar (1997) *Maydica* 42: 107-120. Поскольку трансформированное вещество содержит много клеток, в любой части подвергнутых воздействию каллюса, ткани или группы клеток присутствуют как трансформированные, так и нетрансформированные клетки. Трансформированные растительные культуры получают путем уничтожения нетрансформированных клеток и оставления трансформированных клеток для пролиферации. Зачастую возможность удаления нетрансформированных клеток является ограничительным фактором для быстрого извлечения трансформированных растительных клеток и успешного получения трансгенных растений.

Методы трансформации и методы введения нуклеотидных последовательностей в растения могут варьировать в зависимости от типа предназначенных для трансформации растений или растительных клеток, где тип включает в себя однодольные или двудольные. Получение трансгенных растений можно проводить с помощью одного из нескольких способов, включающих в себя, без ограничения, микроинъекцию, электропорацию, прямой перенос гена, введение гетерологичных ДНК в растительные клетки с использованием *Agrobacterium* (*Agrobacterium*-опосредованная трансформация), бомбардировку растительных клеток частицами, содержащими на поверхности гетерологичные чужеродные молекулы ДНК, баллистическое ускорение частиц, трансформацию с использованием аэрозольного луча (опубликованная заявка США № 20010026941; патент США № 4945050; международная публикация № WO 91/00915; опубликованная заявка США № 2002015066), трансформацию с применением *Lec1*, а также разные другие методы

переноса ДНК, не опосредуемые частицами.

Способы трансформации хлоропластов известны в данной области. Смотрите, 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 с помощью генной пушки ДНК, содержащей селективируемый маркер, и направлении ДНК в плазмидный геном посредством гомологичной рекомбинации. Кроме того, можно использовать пластидную трансформацию путем трансактивации полученного с использованием молчащей пластиды трансгена с помощью тканеспецифической экспрессии кодируемой в ядре и пластида-направленной РНК-полимеразы. Такой способ описан в McBride et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 7301-7305.

После интеграции гетерологичной чужеродной ДНК в растительные клетки можно провести в среде соответствующую селекцию с максимальным пороговым уровнем, которая позволяет уничтожить нетрансформированные клетки и отделить с последующей пролиферацией предположительно трансформированные клетки, которые выжили после проведения указанной селекционной обработки, путем регулярного переноса в свежую среду. Путем непрерывных пассажей и обработки соответствующим средством селекции можно идентифицировать клетки, трансформированные плазмидным вектором и обеспечить их пролиферацию. Затем с помощью молекулярных и биохимических методов можно подтвердить присутствие интегрированного представляющего интерес гетерологичного гена в геноме трансгенного растения.

Трансформированные клетки можно выращивать традиционными способами с получением растений. Смотрите, например, McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5: 81-84. После выращивания указанные растения можно опылить либо таким же трансформированным штаммом, либо другими штаммами, и идентифицировать полученный гибрид, обладающий конститутивной экспрессией желательной фенотипической характеристики. Можно вырастить два или более поколений, чтобы удостовериться, что экспрессия желательной фенотипической характеристики стабильно

поддерживается и наследуется, после чего собирают семена и подтверждают наличие экспрессии желательной фенотипической характеристики. Таким образом, настоящее изобретение предлагает трансформированное семя (также называемое "трансгенное семя"), содержащее нуклеотидную конструкцию настоящего изобретения, например, экспрессионную кассету настоящего изобретения, стабильно внедренную в геном.

Анализ трансформации растений

После введения гетерологичной чужеродной ДНК в растительные клетки, трансформацию или интеграцию гетерологичного гена в геном растения подтверждают разными способами, такими как анализы нуклеиновых кислот, белков и метаболитов, ассоциированных с интегрированным геном.

Анализ методом ПЦР представляет собой быстрый способ скрининга трансформированных клеток, тканей или побегов на присутствие внедренного гена на ранней стадии перед пересаживанием в почву (Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). ПЦР проводят с использованием олигонуклеотидных праймеров, специфичных к представляющему интерес гену, к фону вектора *Agrobacterium* и др.

Трансформацию растения можно подтвердить путем анализа геномной ДНК методом саузерн-блоттинга (Sambrook and Russell, 2001, выше). В большинстве случаев общую ДНК экстрагируют из трансформанта, расщепляют соответствующими рестрикционными ферментами, фракционируют в агарозном геле и переносят на нитроцеллюлозную или нейлоновую мембрану. Затем мембрану или "блот" зондируют с помощью стандартных методов, например, фрагментом целевой ДНК, меченным радиоактивным изотопом ^{32}P , чтобы подтвердить интеграцию введенного гена в геном растения (Sambrook and Russell, 2001, выше).

Для проведения анализа методом нозерн-блоттинга РНК выделяют из конкретных тканей или трансформантов, фракционируют в формальдегид-содержащем агарозном геле и помещают на нейлоновый фильтр в соответствии со стандартными процедурами, широко используемыми в данной области (Sambrook and Russell,

2001, выше). Экспрессию РНК, кодируемой пестицидным геном, тестируют путем гибридизации фильтра с радиоактивным зондом, полученным из пестицидного гена, с помощью способов, известных в данной области (Sambrook and Russell, 2001, выше).

Присутствие в трансгенных растениях белка, кодируемого пестицидным геном, можно подтвердить с помощью стандартных процедур вестерн-блоттинга, биохимических анализов и т.п. (Sambrook and Russell, 2001, выше), используя антитела, которые связываются с одним или несколькими эпитопами пестицидного белка.

Пестицидная активность в растениях

В другом аспекте настоящего изобретения можно получить трансгенные растения, которые экспрессируют пестицидный белок, обладающий пестицидной активностью. Для получения трансгенных растений можно использовать описанные выше иллюстративные способы, однако способ получения трансгенных растительных клеток не является критичным для данного изобретения. Известные или описанные в данной области способы, такие как *Agrobacterium*-опосредованная трансформация, биолистическая трансформация и способы, в которых не применяются частицы, экспериментатор может использовать по своему усмотрению. Растения, экспрессирующие пестицидный белок, можно получить с помощью традиционных способов, описанных в данной области, например путем трансформации каллюса, селекции трансформированного каллюса и регенерации фертильных растений из полученного трансгенного каллюса. В таком способе в качестве селектируемого маркера можно использовать любой ген при условии, что его экспрессия в растительных клетках позволит идентифицировать или выбрать трансформированные клетки.

Для растительных клеток разработан ряд маркеров, таких как гены устойчивости к хлорамфениколу, аминогликозиду G418, гигромицину и т.п. В качестве селектируемых маркеров также можно использовать гены, кодирующие продукт, участвующий в метаболизме хлоропластов. Например, гены, отвечающие за устойчивость к растительным гербицидам, таким как глифосат, бромоксинил или имидазолинон, могут найти конкретное

применение. Такие гены описаны Stalker et al. (1985) J. Biol. Chem. 263: 6310-6314 (ген нитрилазы, обеспечивающий устойчивость к бромоксилилу); и Sathasivan et al. (1990) Nucl. Acids Res. 18: 2188 (ген устойчивости к имидазолинону AHAS). Кроме того, раскрытые здесь гены можно использовать в качестве маркеров для анализа трансформации бактериальных или растительных клеток. Способы определения присутствия трансгена в растении, органе растения (например, в листьях, стеблях, корнях и др.), семени, растительной клетке, побеге, зародыше, или в их потомстве, известны в данной области. В одном воплощении присутствие трансгена детектируют путем тестирования пестицидной активности.

Фертильные растения, экспрессирующие пестицидный белок, можно тестировать на пестицидную активность, после чего растения, характеризующиеся оптимальной активностью, выбирают для последующей селекции. В данной области существуют методы анализа пестицидной активности. Как правило, белок смешивают и используют в пищевых анализах. Смотрите, например, Marrone et al. (1985) J. of Economic Entomology 78: 290-293.

Настоящее изобретение можно использовать для трансформации растений любых видов, относящихся, без ограничения, к однодольным и двудольным. Примеры представляющих интерес растений включают в себя, без ограничения, кукурузу (маис), сорго, пшеницу, подсолнечник, томат, крестоцветные, перцы, картофель, хлопок, рис, соевые бобы, сахарную свеклу, сахарный тростник, табак, ячмень и масличный рапс, Brassica sp., люцерну, рожь, просо, сафлор, арахис, батат, маниоку, кофе, кокос, ананас, цитрусовые деревья, какао, чай, банан, авокадо, фиговое дерево, гуаву, манго, оливковые деревья, папайю, кешью, макадамиию, миндаль, овес, овощи, декоративные растения и хвойные деревья.

Овощи включают в себя, без ограничения, томаты, латук, зеленую фасоль, лимскую фасоль, горох и членов рода *Cucumis*, таких как огурец, канталупа и мускусная дыня. Декоративные растения включают в себя, без ограничения, азалию, гортензию, гибискус, розы, тюльпан, нарцисс желтый, петунию, гвоздику,

пуансеттию и хризантему. Предпочтительно, растения настоящего изобретения относятся к сельскохозяйственным культурам (таким как маис, сорго, пшеница, подсолнечник, томат, крестоцветные, перцы, картофель, хлопок, рис, соевые бобы, сахарная свекла, сахарный тростник, табак, ячмень, масличный рапс и др.).

Применение для пестицидного контроля

Общие способы применения штаммов, содержащих нуклеотидную последовательность настоящего изобретения, или ее вариант, для подавления вредителей или для получения рекомбинантными методами других организмов, используемых в качестве пестицидных средств, известны в данной области. Смотрите, например, патент США № 5039523 и EP 0480762A2.

Штаммы *Bacillus*, содержащие нуклеотидную последовательность настоящего изобретения или ее вариант, или микроорганизмы, которые в результате генетического изменения содержат пестицидный ген настоящего изобретения и белок, можно использовать для защиты сельскохозяйственных культур и продуктов от вредителей. В одном аспекте настоящего изобретения целые, т.е. не лизированные, клетки токсина (пестицид)-продуцирующего организма обрабатывают реагентами, продлевающими активность токсина, продуцируемого клетками, после чего клетки вносят в среду обитания целевого вредителя (вредителей).

Альтернативно, пестицид продуцируется в результате введения пестицидного гена в клетку-хозяина. Экспрессия пестицидного гена приводит, непосредственно или косвенно, к внутриклеточной продукции и поддержанию пестицида. В одном аспекте настоящего изобретения указанные клетки обрабатывают в условиях, продлевающих активность токсина, продуцируемого клетками, после чего клетки вносят в среду обитания целевого вредителя (вредителей). Полученный продукт сохраняет токсичность токсина. Указанные естественным образом инкапсулированные пестициды можно затем использовать для получения композиции в соответствии с традиционными методами для внесения в среду обитания целевого вредителя, такую как почва, вода и листва растений. Смотрите, например, EPA 0192319, а также ссылки, упоминающиеся в указанном документе.

Альтернативно клетки, экспрессирующие ген настоящего изобретения, можно использовать для получения композиции, подходящей для применения в качестве пестицида.

Активные ингредиенты настоящего изобретения обычно используют в виде композиций, которые можно наносить на посевную площадь или растения, подлежащие обработке, одновременно или поочередно с другими средствами. Указанные средства могут включать в себя удобрения, гербициды, средства, защищающие от переохлаждения, поверхностно-активные вещества, детергенты, пестицидные мыла, масла для обработки растений, полимеры и/или композиции с замедленным высвобождением или композиции, содержащие биоразлагаемый носитель, которые обеспечивают длительное высвобождение средства на целевой площади после однократного нанесения композиции. Они также могут включать в себя селективные гербициды, химические инсектициды, противовирусные средства, бактерицидные средства, противоамебные средства, пестициды, фунгициды, бактерицидные средства, нематоциды, моллюскоциды или смеси нескольких из указанных препаратов, при необходимости вместе с другими сельскохозяйственно приемлемыми носителями, поверхностно-активными веществами или вспомогательными средствами, облегчающими нанесение, традиционно используемыми для получения композиций. Подходящие носители и адъюванты могут быть твердыми или жидкими и могут включать в себя вещества, традиционно используемые для получения композиций, такие как природные или регенерированные минеральные вещества, растворители, диспергирующие средства, увлажняющие средства, средства, придающие клейкость, связующие средства или удобрения. Подобным образом, композиции можно использовать для получения пищевых "приманок" или "ловушек" для вредителей, которые способствуют потреблению или проглатыванию целевым вредителем пестицидной композиции.

Способы применения активного ингредиента настоящего изобретения или агрохимической композиции настоящего изобретения, которая содержит, по меньшей мере, один из пестицидных белков, продуцируемых бактериальными штаммами

настоящего изобретения, включают в себя нанесение на листья, покрытие семян и нанесение на почву. Число и частота нанесений зависит от интенсивности заражения соответствующим вредителем.

Композицию можно получить в виде порошка, пылевидного препарата, шариков, гранул, спрея, эмульсии, коллоидного вещества, раствора и т.п., с помощью традиционных способов, таких как сушка, лиофилизация, гомогенизация, экстракция, фильтрация, центрифугирование, седиментация или концентрирование культуры клеток, содержащих полипептид. Во всех таких композициях, которые содержат, по меньшей мере, один такой пестицидный полипептид, полипептид может присутствовать в концентрации, составляющей от примерно 1% до примерно 99% по массе.

С помощью способов настоящего изобретения можно уничтожать или уменьшать численность чешуекрылых, полужесткокрылых, двукрылых или жесткокрылых вредителей в конкретном районе, или указанные способы можно профилактически применять к району окружающей среды для предотвращения заражения чувствительным вредителем. Предпочтительно вредитель проглатывает пестицидно эффективное количество полипептида, или контактирует с ним. Под "пестицидно эффективным количеством" подразумевается количество пестицида, способное вызвать гибель, по меньшей мере, одного вредителя, или в заметной степени уменьшить рост вредителя, потребление пищи вредителем или нормальное физиологическое развитие вредителя. Данное количество варьирует в зависимости от таких факторов, как, например, конкретные целевые вредители, подлежащие подавлению, конкретная окружающая среда, местонахождение, растение, сельскохозяйственная культура или земельный участок, подлежащие обработке, условия окружающей среды, а также способ и частота нанесения пестицидно эффективной полипептидной композиции, ее концентрация, стабильность и количество. Композиции также могут варьировать в зависимости от климатических условий, экологических факторов, частоты нанесения и/или степени заражения вредителем.

Описанные пестицидные композиции можно получить путем смешивания бактериальной клетки, суспензии кристаллов и/или

спор, или выделенного белкового компонента с желательным сельскохозяйственным носителем. Перед введением композиции можно поместить в подходящую среду, включающую в себя лиофилизированные, высушенные из замороженного состояния, обезвоженные или водные носители, среды или подходящие разбавители, такие как физиологический раствор или другой буфер. Полученные композиции могут находиться в виде пылевидного или гранулированного вещества, суспензии в масле (растительном или минеральном), воде или масляно/водных эмульсиях, в виде смачиваемого порошка, или в виде сочетания с любыми другими веществами-носителями, подходящими для применения в сельском хозяйстве. Подходящие для применения в сельском хозяйстве носители, которые могут быть твердыми или жидкими, хорошо известны в данной области. Термин "сельскохозяйственно приемлемый носитель" охватывает все вспомогательные средства, инертные компоненты, диспергирующие средства, поверхностно-активные средства, средства, придающие клейкость, связующие средства и др., традиционно используемые для получения пестицидных композиций; они хорошо известны специалистам в области пестицидных композиций. Композиции можно смешивать с одним или несколькими твердыми или жидкими вспомогательными средствами с помощью разных способов, включающих в себя, например, гомогенное смешивание, перемешивание и/или размалывание пестицидных композиций с подходящими адъювантами, с использованием традиционных методов получения композиций. Подходящие композиции и способы их применения описаны в патенте США № 6468523, включенном в настоящее описание в качестве ссылки.

Термин "вредитель" включает в себя, без ограничения, насекомых, грибов, бактерий, нематод, клещей, зудней и т.п. Вредители-насекомые включают в себя членов отрядов Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Mallophaga, Homoptera, Hemiptera, Orthoptera, Thysanoptera, Dermaptera, Isoptera, Anoplura, Siphonaptera, Trichoptera, etc., в особенности Coleoptera, Lepidoptera и Diptera.

Отряд Coleoptera включает в себя подотряды Adephaga и

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

Отряд Diptera включает в себя подотряды Nematocera, Brachycera и Cyclorrhapha. Подотряд Nematocera включает в себя семейства Tipulidae, Psychodidae, Culicidae, Ceratopogonidae, Chironomidae, Simuliidae, Bibionidae и Cecidomyiidae. Подотряд Brachycera включает в себя семейства Stratiomyidae, Tabanidae, Therevidae, Asilidae, Mydidae, Bombyliidae и Dolichopodidae. Подотряд Cyclorrhapha включает в себя группы Aschiza и Aschiza. Группа Aschiza включает в себя семейства Phoridae, Syrphidae и Conopidae. Группа Aschiza включает в себя разделы Acalyptratae и Calyptratae. Раздел Acalyptratae включает в себя семейства Otitidae, Tephritidae, Agromyzidae и Drosophilidae. Раздел Calyptratae включает в себя семейства Hippoboscidae, Oestridae,

Tachinidae, Anthomyiidae, Muscidae, Calliphoridae и Sarcophagidae.

Отряд Lepidoptera включает в себя семейства Papilionidae, Pieridae, Lycaenidae, Nymphalidae, Danaidae, Satyridae, Hesperidae, Sphingidae, Saturniidae, Geometridae, Arctiidae, Noctuidae, Lymantriidae, Sesiidae и Tineidae.

Насекомые настоящего изобретения, являющиеся вредителями основных сельскохозяйственных культур, включают в себя: маис: *Ostrinia nubilalis*, мотылек кукурузный; *Agrotis ipsilon*, совка-ипсилон; *Helicoverpa zea*, совка хлопковая; *Spodoptera frugiperda*, совка травяная; *Diatraea grandiosella*, огневка кукурузная юго-западная; *Elasmopalpus lignosellus*, малый кукурузный точильщик; *Diatraea saccharalis*, огневка сахарного тростника; *Diabrotica virgifera*, западный кукурузный жук; *Diabrotica longicornis barberi*, блошка длинноусая; *Diabrotica undecimpunctata howardi*, блошка 11-точечная Говарда; *Melanotus* spp., проволочники; *Cyclocephala borealis*, северный скрытый майский жук (личинка майского хруща); *Cyclocephala immaculata*, южный скрытый майский жук (личинка майского хруща); *Popillia japonica*, хрущик японский; *Chaetocnema pulicaria*, блошка стеблевая хлебная; *Sphenophorus maidis*, долгоносик кукурузный; *Rhopalosiphum maidis*, тля кукурузная; *Anuraphis maidiradicis*, тля кукурузная корневая; *Blissus leucopterus leucopterus*, клоп-черепашка пшеничный североамериканский; *Melanoplus femurrubrum*, кобылка красноногая; *Melanoplus sanguinipes*, кобылка мексиканская; *Hylemya platura*, личинка мухи ростковой; *Agromyza parvicornis*, кукурузная минирующая мушка; *Anaphothrips obscurus*, трипс злаковый; *Solenopsis milesta*, муравей-вор; *Tetranychus urticae*, обыкновенный паутиный клещ; сорго: *Chilo partellus*, сорговый точильщик; *Spodoptera frugiperda*, совка травяная; *Helicoverpa zea*, совка хлопковая; *Elasmopalpus lignosellus*, малый кукурузный точильщик; *Feltia subterranea*, зернистая совка; *Phyllophaga crinita*, личинка майского хруща; *Eleodes*, *Conoderus*, and *Aeolus* spp., проволочники; *Oulema melanopus*, пьявица красногрудая; *Chaetocnema pulicaria*, блошка стеблевая хлебная; *Sphenophorus maidis*, долгоносик кукурузный;

Rhopalosiphum maidis; тля кукурузная; *Sipha flava*, тля желтая сахарного тростника; *Blissus leucopterus leucopterus*, клоп-черепашка пшеничный североамериканский; *Contarinia sorghicola*, галлица сорговая; *Tetranychus cinnabarinus*, красный паутинный клещ; *Tetranychus urticae*, обыкновенный паутинный клещ; пшеница: *Pseudaletia unipunctata*, совка; *Spodoptera frugiperda*, совка травяная; *Elasmopalpus lignosellus*, малый кукурузный точильщик; *Agrotis orthogonia*, западная совка; *Elasmopalpus lignosellus*, малый кукурузный точильщик; *Oulema melanopus*, пьявица красногрудая; *Hypera punctata*, долгоносик листовой клеверный; *Diabrotica undecimpunctata howardi*, блошка 11-точечная Говарда; русская пшеничная тля; *Schizaphis graminum*, злаковая тля; *Macrosiphum avenae*, тля листовая; *Melanoplus femurrubrum*, кобылка красноногая; *Melanoplus differ entialis*, кобылка отличительная; *Melanoplus sanguinipes*, кобылка мексиканская; *Mayetiola destructor*, гессенская мушка; *Sitodiplosis mosellana*, комарик пшеничный; *Meromyza americana*, личинка американской меромизы; *Hylemya coarctata*, муха озимая; *Frankliniella fusca*, табачный трипс; *Cephus cinctus*, пилильщик хлебный американский; *Aceria tulipae*, луковичный клещ тюльпанов; подсолнечник: *Suleima helianthana*, почковая листовертка подсолнечника; *Homoeosoma electellum*, огневка подсолнечниковая; *zygogramma exclamationis*, совка подсолнечниковая; *Bothyrus gibbosus*, жук морковный; *Neolasioptera murtfeldtiana*, подсолнечниковая галлица; **Хлопок**: *Heliothis virescens*, хлопковая совка; *Helicoverpa zea*, коробочный червь; *Spodoptera exigua*, совка малая; *Pectinophora gossypiella*, розовый коробочный червь; *Anthonomus grandis*, долгоносик хлопковый; *Aphis gossypii*, тля хлопковая; *Pseudatomoscelis seriatus*, марокканская кобылка; *Trialeurodes abutilonea*, полосатокрылая белокрылка; *Lygus lineolaris*, клоп травяной; *Melanoplus femurrubrum*, краснобедрая кобылка; *Melanoplus differ entialis*, кобылка отличительная; *Thrips tabaci*, трипс луковый; *Franklinkiella fusca*, трипс табачный; *Tetranychus cinnabarinus*, красный паутинный клещ; *Tetranychus urticae*, обыкновенный паутинный клещ; рис: *Diatraea*

saccharalis, огневка сахарного тростника; *Spodoptera frugiperda*, совка травяная; *Helicoverpa zea*, совка хлопковая; *Colaspis brunnea*, *grape colaspis*; *Lissorhoptrus oryzophilus*, долгоносик рисовый водяной; *Sitophilus oryzae*, долгоносик рисовый; *Nephotettix nigropictus*, рисовая цикадка; *Blissus leucopterus leucopterus*, клоп-черепашка пшеничный североамериканский; *Acrosternum hilare*, щитник; соевые бобы: *Pseudoplusia includens*, соевая пяденица; *Anticarsia gemmatalis*, ложногусеница бархатных бобов; *Plathypena scabra*, зеленый вредитель клевера; *Ostrinia nubilalis*, мотылек кукурузный; *Agrotis ipsilon*, совка-ипсилон; *Spodoptera exigua*, совка малая; *Heliothis virescens*, хлопковая совка; *Helicoverpa zea*, коробочный червь; *Epilachna varivestis*, мексиканская зерновка бобовая; *Myzus persicae*, тля персиковая зеленая; *Empoasca fabae*, цикадка картофельная; *Acrosternum hilare*, щитник; *Melanoplus femurrubrum*, кобылка красноногая; *Melanoplus differentialis*, кобылка отличительная; *Hylemya platura*, личинка мухи ростковой; *Sericothrips variabilis*, соевые трипсы; *Thrips tabaci*, луковые трипсы; *Tetranychus turkestanii*, клещик паутиный атлантический; *Tetranychus urticae*, обыкновенный паутиный клещ; ячмень: *Ostrinia nubilalis*, мотылек кукурузный; *Agrotis ipsilon*, совка-ипсилон; *Schizaphis graminum*, злаковая тля; *Blissus leucopterus leucopterus*, клоп-черепашка пшеничный североамериканский; *Acrosternum hilare*, щитник; *Euschistus servus*, коричневый щитник; *Delia platura*, личинка мухи ростковой; *Mayetiola destructor*, гессенская мушка; *Petrobia latens*, коричневый пшеничный клещ; рапс: *Brevicoryne brassicae*, капустная тля; *Phyllotreta cruciferae*, картофельные жуки; *Mamestra configurata*, гусеница *Bertha*; *Plutella xylostella*, моль капустная; *Delia ssp.*, корневые личинки.

Нематоды включают в себя паразитические нематоды, такие как нематоды, образующие корневые наросты, и цистообразующие нематоды, а также нематоды-вредители, такие как *Heterodera ssp.*, *Meloidogyne ssp.* и *Globodera ssp.*; в особенности цистообразующие нематоды, которые включают в себя, без ограничения, *Heterodera glycines* (соевые цистообразующие

нематоды); *Heterodera schachtii* (свекловичные цистообразующие нематоды); *Heterodera avenae* (злаковые цистообразующие нематоды); а также *Globodera rostochiensis* и *Globodera pallida* (картофельные цистообразующие нематоды). Нематоды-вредители включают в себя *Pratylenchus* spp.

Способы повышения урожая растений

Изобретение предлагает способы повышения урожая растений. Указанные способы включают в себя получение растений или растительных клеток, экспрессирующих раскрытый здесь полинуклеотид, кодирующий последовательность пестицидного полипептида, и выращивание растения или его семени на поле, зараженном (или подверженном заражению) вредителем, против которого направлена пестицидная активность указанного полипептида. В некоторых воплощениях полипептид обладает пестицидной активностью в отношении чешуекрылых, жесткокрылых, двукрылых, полужесткокрылых или нематод, а указанное поле заражено вредителем, относящимся к чешуекрылым, полужесткокрылым, жесткокрылым, двукрылым или нематодам. В настоящем описании термин "урожай" растения относится к качеству и/или количеству биомассы, продуцируемой растением. Под термином "биомасса" подразумевается любой измеримый растительный продукт. Повышение продукции биомассы означает улучшение урожая измеряемого растительного продукта. Повышение урожая растения имеет несколько коммерческих применений. Например, увеличение биомассы листьев растения может соответствовать увеличению урожая листовых овощей, предназначенных для потребления человеком или животными. Кроме того, увеличение биомассы листьев можно использовать для повышения продукции получаемых из растения фармацевтических или промышленных продуктов. Увеличение урожайности может включать в себя любое статистически значимое увеличение, которое составляет, без ограничения, например, по меньшей мере 1%, по меньшей мере 3%, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 100% или больше по сравнению с растением, не экспрессирующим пестицидную последовательность.

В конкретных способах урожай растения увеличивается в результате повышения устойчивости растения, экспрессирующего раскрытый здесь пестицидный белок, к вредителю. Экспрессия пестицидного белка приводит к снижению способности вредителя к заражению или поглощению пищи.

Растения также можно обрабатывать химическими композициями, содержащими один или несколько гербицидов, инсектицидов или фунгицидов. Типичные химические композиции содержат: гербициды для защиты фруктов/овощей: Атразин, Бромацил, Диурон, Глифосат, Линурон, Метрибузин, Симазин, Трифлуралин, Флуазифоп, Глифосинат, Галосульфурон Гована, Паракват, Пропизамид, Сетоксидим, Бутафенацил, Галосульфурон, Индазифлам; инсектициды для защиты фруктов/овощей: Алдикарб, *Bacillus thuriangiensis*, Карбарил, Карбофуран, Хлорпирифос, Циперметрин, Дельтаметрин, Абаментин, Цифлутрин/бета-цифлутрин, Эсфенвалерат, Лямбда-цигалотрин, Ацеквиноцил, Бифеназат, Метоксифенозид, Новалурон, Хромафенозид, Тиаклоприд, Динотефуран, Флуакрипирим, Спиродиклофен, Гамма-цигалотрин, Спиромесифен, Спиносад, Ринахипир, Циазипир, Трифлумурон, Спиротетрамат, Имидаклоприд, Флубендиамид, Тиодикарб, Метафлумизон, Сульфоксафлор, Цифлуметофен, Цитанопирафен, Клотианидин, Тиаметоксам, Спиноторам, Тиодикарб, Флоникамид, Метиокарб, Эмаментин-бензоат, Индоксакарб, Фенамифос, Пирипроксифен, Фенбутатин-оксид; фунгициды для защиты фруктов/овощей: Аметоктрадин, Азоксистробин, Бентиаваликарб, Воскалид, Каптан, Карбендазим, Хлорталонил, Медь, Циазофамид, Цифлуфенамид, Цимоксанил, Ципроконазол, Ципродинил, Дифенокконазол, Диметоморф, Дитианон, Фенамидон, Фенгексамид, Флуазинам, Флудиоксонил, Флуопиколид, Флуопирам, Флуоксастробин, Флуксапироксад, Фолпет, Фосетил, Ипродион, Ипроваликарб, Изопиразам, Кресоксим-метил, Манкозеп, Мандипропамид, Металаксил/мефеноксам, Метирам, Метрафенон, Миклобутанил, Пенконазол, Пентиопирад, Пикоксистробин, Пропамокарб, Пропиконазол, Пропинеп, Проквиназид, Протиокконазол, Пираклостробин, Пириметанил, Квиноксифен, Сироксамин, Сульфур, Тебуконазол, Тиофанат-метил,

Трифлуксистробин; гербициды для защиты зерновых: 2,4-D, Амидосульфурон, Бромксинил, Карфентразон-Е, Хлортолурон, Хлоросульфурон, Клодинафоп-Р, Клопиралид, Дикамба, Диклофоп-М, Дифлуфеницан, Феноксапроп, Флорасулам, Флукарбазон-НА, Флуфенацет, Флупиросульфурон-М, Флуроксипир, Флуртамон, Глифосат, Иодосульфурон, Иоксинил, Изопротурон, МЦПА, Мезосульфурон, Метсульфурон, Пендиметалин, Пиноксаден, Пропоксикарбазон, Просульфокарб, Пироксулам, Сульфосульфурон, Тифенсульфурон, Тралкоксидим, Триасульфурон, Трибенурон, Трифлуралин, Тритосульфурон; фунгициды для защиты зерновых: Азоксистробин, Биксафен, Боскалид, Карбендазим, Хлорталонил, Цифлуфенамид, Ципроконазол, Ципродинил, Димоксистробин, Эпоксиконазол, Фенпропидин, Фенпропиморф, Флуопирам, Флуоксастробин, Флуквинконазол, Флуксапироксад, Изопиразам, Кресоксим-метил, Метконазол, Метрафенон, Пентиопирад, Пикоксистробин, Прокслораз, Пропиконазол, Проквиназид, Протиоконазол, Пиракlostробин, Квиноксифен, Спироксамин, Тебуконазол, Тиофанат-метил, Трифлуксистробин; инсектициды для защиты зерновых: Диметоат, Лямбда-цихалтрин, Дельтаметрин, алфа-Циперметрин, β -цифлутрин, Бифентрин, Имидаклоприд, Клотианидин, Тиаметоксам, Тиаклоприд, Ацетамиприд, Динетофуран, Хлорпирифос, Пиримикарб, Метиокарб, Сульфоксафлор; гербициды для защиты маиса: Атразин, Алахлор, Бромксинил, Ацетохлор, Дицамба, Клопиралид, (S-)Диметенамид, Глуфосинат, Глифосат, Изоксафлутол, (S-)Метолахлор, Месотрион, Никосульфурон, Примисульфурон, Римсульфурон, Сулкотрион, Форамсульфурон, Топрамезон, Темботрион, Сафлуфенацил, Тиенкарбазон, Флуфенацет, Пироксасульфон; инсектициды для защиты маиса: Карбофуран, Хлорпирифос, Бифентрин, Фипронил, Имидаклоприд, Лямбда-Цигалотрин, Тефлутрин, Тербуфос, Тиаметоксам, Клотианидин, Спиромесифен, Флубендиамид, Трифлумурон, Ринаксипир, Дельтаметрин, Тиодикарб, β -Цифлутрин, Циперметрин, Бифентрин, Луфенурон, Тебупиримфос, Этипрол, Циазипир, Тиаклоприд, Ацетамиприд, Динетофуран, Авермецтин; фунгициды для защиты маиса: Азоксистробин, Биксафен, Боскалид, Ципроконазол, Димоксистробин, Эпоксиконазол, Фенитропан, Флуопирам,

Флуоксастробин, Флуксапироксад, Изопиразам, Метконазол, Пентиопирад, Пикоксистробин, Пропиконазол, Протиоконазол, Пиракlostробин, Тебуконазол, Трифлуксистробин; гербициды для защиты риса: Бутахлор, Пропанил, Азимсульфурон, Бенсульфурон, Цигалофоп, Даимурон, Фентразамид, Имазосульфурон, Мефенацет, Оксацикломефон, Пиразосульфурон, Пирибутикарб, Квинклорак, Тиобенкарб, Инданофан, Флуфенацет, Фентразамид, Галосульфурон, Оксацикломефон, Бензобициклон, Пирифталид, Пеноксулам, Биспирибак, Оксадиаргил, Этоксисульфурон, Претилахлор, Месотрион, Тефурилтрион, Оксадиазон, Феноксапроп, Примисульфан; инсектициды для защиты риса: Диазинон, Фенобукарб, Бенфуракарб, Бупрофезин, Динотефуран, Фипронил, Имидаклоприд, Изопрокарб, Тиаклоприд, Хромафенозид, Клотиаинидин, Этипрол, Флубендиамид, Ринаксипир, Дельтаметрин, Ацетамиприд, Тиаметоксам, Циазипир, Спиносад, Спиноторам, Эмамецтин-Бензоат, Циперметрин, Хлорпирифос, Этофенпрокс, Карбофуран, Бенфуракарб, Сульфоксафлор; фунгициды для защиты риса: Азоксистробин, Карбендазим, Карпропамид, Диклоцимет, Дифенокконазол, Эдифенфос, Феримзон, Гентамицин, Гексаконазол, Гимексазол, Ипробенфос (ИБП), Изопротиолан, Изотианил, Касугамицин, Манкозеп, Метоминостробин, Орисастробин, Пенцикурон, Пробеназол, Пропиконазол, Пропинеб, Пироквилон, Тебуконазол, Тиофанат-метил, Тиадинил, Трициклазол, Трифлуксистробин, Валидамицин; гербициды для защиты хлопка: Диурон, Флуометурон, MSMA, Оксифлуорфен, Прометрин, Трифлуралин, Карфентразон, Клетодим, Флуазифоп-бутил, Глифосат, Норфлуразон, Пендиметалин, Пиритиобак натрия, Трифлуксисульфурон, Тепралоксидим, Глуфосинат, Флумиоксазин, Тидиазурон; инсектициды для защиты хлопка: Ацефат, Алдикарб, Хлорпирифос, Циперметрин, Дельтаметрин, Абамецтин, Ацетамиприд, Эмамектина бензоат, Имидаклоприд, Индоксакарб, Лямбда-Цигалотрин, Спиносад, Тиодикарб, Гамма-Цигалотрин, Спиромецифен, Пиридалил, Флониамид, Флубендиамид, Трифлумурон, Ринаксипир, Бета-Цифлутрин, Спиротетрамат, Клотиаинидин, Тиаметоксам, Тиаклоприд, Динетофуран, Флубендиамид, Циазипир, Спиносад, Спиноторам, гамма-Цигалотрин, 4-[[(6-Хлорпиридин-3-

ил) метил] (2,2-дифторэтил) амино] фуран-2 (5X) -он, Тиодикарб, Авермецтин, Флоницамид, Пиридалил, Спиромесифен, Сульфоксафлор; фунгициды для защиты хлопка: Азоксистробин, Биксафен, Воскалид, Карбендазим, Хлорталонил, Медь, Ципроконазол, Дифеноконазол, Димоксистробин, Эпоксиконазол, Фенамидон, Флуазинам, Флуопирам, Флуоксастробин, Флуксапироксад, Ипродион, Изопиразам, Изотианил, Манкозоб, Манеб, Метоминостробин, Пентиопирад, Пикоксистробин, Пропинеб, Протиоконазол, Пиракlostробин, Квинтозен, Тебуконазол, Тетраконазол, Тиофанат-метил, Трифлуксистробин; гербициды для защиты соевых бобов: Алахлор, Бентазон, Трифлуралин, Хлоримурон-этил, Клорансулам-метил, Феноксапроп, Фомесафен, Флуазифоп, Глифосат, Имазамокс, Имазаквин, Имазетапир, (С-)Метолахлор, Метрибузин, Пендиметалин, Тепралоксидим, Глуфосинат; инсектициды для защиты соевых бобов: Лямбда-цигалотрин, Метомил, Имидаклоприд, Клотианидин, Тиаметоксам, Тиаклоприд, Ацетамиприд, Динетофуран, Флубендиамид, Ринакспир, Циазипир, Спиносад, Спиноторам, Эмамецтин-бензоат, Фипронил, Этипрол, Дельтаметрин, β -Цифлутрин, гамма- и лямбда-Цигалотрин, 4-[[(6-Хлорпиридин-3-ил) метил] (2,2-дифторэтил) амино] фуран-2 (5X) -он, Спиротетрамат, Спинодиклофен, Трифлумурон, Флоницамид, Тиодикарб, бета-Цифлутрин; фунгициды для защиты соевых бобов: Азоксистробин, Биксафен, Воскалид, Карбендазим, Хлорталонил, Медь, Ципроконазол, Дифеноконазол, Димоксистробин, Эпоксиконазол, Флуазинам, Флуопирам, Флуоксастробин, Флутриафол, Флуксапироксад, Изопиразам, Ипродион, Изотианил, Манкозоб, Манеб, Метконазол, Метоминостробин, Миклобутанил, Пентиопирад, Пикоксистробин, Пропиконазол, Пропинеб, Протиоконазол, Пиракlostробин, Тебуконазол, Тетраконазол, Тиофанат-метил, Трифлуксистробин; гербициды для защиты сахарной свеклы: Хлоридазон, Десмедифам, Этофумесат, Фенмедифам, Триаллат, Клопиралид, Флуазифоп, Ленацил, Метамитрон, Квинмерак, Циклоксидим, Трифлусульфурон, Тепралоксидим, Квизалофоп; инсектициды для защиты сахарной свеклы: Имидаклоприд, Клотианидин, Тиаметоксам, Тиаклоприд, Ацетамиприд, Динетофуран, Дельтаметрин, β -Цифлутрин, гамма/лямбда-Цигалотрин, 4-[[(6-

Хлорпиридин-3-ил) метил] (2,2-дифторэтил) амино] фуран-2 (5X) -он, Тефлутрин, Ринаксипир, Циаксипир, Фипронил, Карбофуран; гербициды для защиты канолы: Клопиралид, Диклофоп, Флуазифоп, Глуфосинат, Глифосат, Метазахлор, Трифлуралин этаметсульфуран, Квинмерак, Квизалофоп, Цлетодим, Тепралоксидим; фунгициды для защиты канолы: Азоксистробин, Биксафен, Воскалид, Карбендазим, Ципроконазол, Дифеноконазол, Димоксистробин, Эпоксиконазол, Флуазинам, Флуопирам, Флуоксастробин, Флусилазол, Флуксапироксад, Ипродион, Изопиразам, Мепикват-хлорид, Метконазол, Метоминостробин, Паклобутразол, Пентиопирад, Пикоксистробин, Прохлораз, Протиоконазол, Пиракlostробин, Тебуконазол, Тиофанате-метил, Трифлуксистробин, Винклозолин; инсектициды для защиты канолы: Карбофуран, Тиаклоприд, Дельтаметрин, Имидаклоприд, Клотианидин, Тиаметоксам, Ацетамиприд, Динетофуран, β -Цифлутрин, гамма- и лямбда-Цигалотрин, тау-Флувалериат, Этипрол, Спиносад, Спиноторам, Флубендиамид, Ринаксипир, Циазипир, 4- [(6-Хлорпиридин-3-ил) метил] (2,2-дифлуоретил) амино] фуран-2 (5X) -он.

Нижеследующие примеры предлагаются для иллюстрации, но не для ограничения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ПРИМЕРЫ

Пример 1. Получение и тестирование гибридных белков Ахmi115

Ахmi115 описан в патентной публикации США 20100004176 (аминокислотная последовательность приведена здесь как SEQ ID NO:43). Указанный ген на 70% гомологичен последовательности Vip3Aa. Оптимизированную по кодонам версию Ахmi115 (в данном документе ее также называют Ахmi115v01 и описывают как SEQ ID NO:42) клонируют и экспрессируют, используя вектор экспрессии E coli. Биоанализ *in vitro* демонстрирует, что полученный белок обладает пестицидной активностью в отношении разных насекомых-вредителей, таких как мотылек кукурузный (ECW), совка хлопковая (CEW), совка травяная (FAW) и совка-ипсилон (BCW).

Ахmi005 также описан в патентной публикации США 20100004176. Указанный ген на 94% гомологичен последовательности Vip3Aa. Оптимизированную по кодонам версию

Ахmi005 (optАхmi005, описанную здесь как SEQ ID NO:44) клонируют и экспрессируют, используя вектор экспрессии E coli. Биоанализ in vitro демонстрирует, что полученный белок обладает пестицидной активностью в отношении разных насекомых-вредителей, таких как Helicoverpa zea (Hz), Heliothis virescens (Hv), FAW, BCW, огневка сахарного тростника (SCB) и ложногусеница бархатных бобов (VBC).

Относительная активность Ахmi115 является низкой в отношении Hz и FAW по сравнению с Ахmi005. Кроме того, как отмечено выше, Ахmi005 не обладает активностью в отношении ECB. Чтобы идентифицировать домены, отвечающие за характерную специфичность и активность двух белков, получают конструкции, обеспечивающие экспрессию гибридов optАхmi005 и кодон-оптимизированной версии Ахmi115 (optАхmi115v01), как описано ниже и показано на фиг.1. Белок экспрессируют в E. coli и тестируют против ECB, Hz, FAW и BCW с помощью биоанализа in vitro. Белок, экспрессированный с использованием рАХ6307 (Ахmi115v02.01, описанный здесь как SEQ ID NO:1) обладает повышенной активностью по сравнению с белком, экспрессированным с использованием рАХ5477 (Ахmi115v01, описанный здесь как SEQ ID NO:42), в отношении всех четырех участвующих в тестировании вредителей.

Ген, экспрессированный в рАХ6307 (Ахmi115v02.01), помещают в растительный вектор экспрессии рAG6141, в котором экспрессия белка находится под управлением промотора убихитина сахарного тростника.

Образцы листьев трансгенных растений, экспрессирующих Ахmi115v01 и Ахmi115v02.01, тестируют с помощью лабораторного биоанализа с использованием насекомых против ECB, Hz, FAW и BCW и с помощью полевого анализа против ECB, Hz и FAW. Результаты показывают, что усовершенствованный ген Ахmi115v02.01 обладает более высокой эффективностью в отношении всех участвующих в тестировании вредителей.

Описание конструкций

Аминокислотные последовательности, полученные путем компьютерного моделирования трансляции последовательностей ДНК

Vip3Aa, Axmi005, Axmi115v01, Axmi163 и Axmi184, выравнивают, чтобы идентифицировать консервативные аминокислоты во всех гомологах (Axmi163 и Axmi184 описаны в патентной публикации США 20100004176).

Праймеры ПЦР конструируют для трех консервативных участков Axmi005 и Axmi115v01, используя последовательность optAxmi005, присутствующую в рAX5478 (который содержит кодон-оптимизированную версию Axmi005, описанную в SEQ ID NO:44), и последовательность optAxmi115, присутствующую в рAX5477 (который содержит кодон-оптимизированную версию Axmi115). Три гибридных гена получают методом ПЦР с перекрыванием (смотрите фиг.1).

ДНК гибридных генов, полученных с помощью указанных реакций ПЦР, клонируют в векторе экспрессии *E. coli* pRSf1b. Полученные векторы экспрессии показаны в таблице 1. Белок экспрессируют с помощью известных методов и экстракт *E. coli* тестируют, используя биоанализ *in vitro*.

Таблица 1

Конструкции гибридного гена

Название конструкции	Вставка последовательности	Нуклеотидная последовательность SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность SEQ ID NO:
рAX6307	Axmi005/Axmi115 гибрид А	1	15
рAX6308	Axmi005/Axmi115 гибрид В	2	16
рAX6309	Axmi005/Axmi115 гибрид D	3	17
рAX5478	optAxmi005	44	45
рAX5477	Axmi115v01	42	43
рRSf1b	векторный контроль	---	---

Биоанализ *in vitro*

Неочищенные экстракты *E. coli* после экспрессии векторов анализируют против Hz, ECB, FAW и BCW. Результаты показаны в таблице 2 (замедление роста) и в таблице 3 (смертность).

Таблица 2

Оценка задержки роста

ECB			Гц			FAW			BCW		
	ave*	SD		ave*	SD		ave*	SD		ave*	SD
pAX6307 (гибрид А)	2,2	0,3	pAX6307	1,8	0,3	pAX6307	3	0	pAX6307	0,8	0,3
pAX6308 (гибрид В)	0,5	0,5	pAX6308	0,3	0,4	pAX6308	1,3	1,3	pAX6308	0	0
pAX6309 (гибрид D)	1,2	0,3	pAX6309	0,2	0,3	pAX6309	0,7	0,7	pAX6309	0	0
pRSf1b (векторный контроль)	0,3	0,4	pRSf1b	0	0	pRSf1b	0,5	0,5	pRSf1b	0	0
pAX5478 (Axmi005)	0	0	pAX5478	1,8	0,3	pAX5478	3	0	pAX5478	1,7	0,7
pAX5477 (Axmi115v01)	0,2	0,3	pAX5477	0,5	0,5	pAX5477	1,5	1,5	pAX5477	0,2	0,3

* Система оценки:

0 = эффект не наблюдается

1 = легкое неравномерное замедление роста

2 = умеренное неравномерное замедление роста

3 = равномерное замедление роста от умеренного до тяжелого

4 = смертность (<100%) с равномерным замедлением роста

5 = полная смертность

Таблица 3

Процент смертности

	Гц	ECB	FAW	BCW
pAX6307 (гибрид А)	50	50	75	25
pAX6308 (гибрид В)	0	0	0	0
pAX6309 (гибрид D)	0	25	25	0
pRSf1b (векторный контроль)	0	0	0	0
pAX5478 (optAxmi005)	50	0	75	25

рAX5477 (Ахmi115v01)	0	0	0	0
-------------------------	---	---	---	---

Белок, экспрессированный из вектора рAX6307 (гибрид А) и отличающийся шестью аминокислотами, обозначают Ахmi115v02.01. Аминокислотная последовательность данного гибридного белка описана в SEQ ID NO:15.

Векторы, обеспечивающие экспрессию Ахmi115v01 (рAX5476) и Ахmi115v02.01 (рAX6307) в *E. coli*, содержат N-концевые маркеры 6× His. Два белка очищают, используя никель-связывающие свойства маркера 6× His. Разные концентрации очищенного белка анализируют с помощью биоанализа *in vitro* против ЕСВ, FAW, BCW и совки малой (BAW). Результаты показывают, что во всех случаях Ахmi115v02.01 обладает повышенной активностью по сравнению с Ахmi115v01 (таблицы 4 и 5).

Таблица 4

Оценка замедления роста

	мкг/мл	BAW	FAW	ECB	BCW
Ахmi115v01	40	4	4	3	0
Ахmi115v01	10	2	3	0	0
Ахmi115v01	1	0	0	0	0
Ахmi115v01	0,1	0	0	0	0
Ахmi115v01	0,01	0	1	0	0
Ахmi115v02	40	4	4	3	3
Ахmi115v02	10	4	4	3	1
Ахmi115v02	1	4	4	3	0
Ахmi115v02	0,1	2	1	2	0
Ахmi115v02	0,01	0	2	1	0

Таблица 5

Оценка смертности

	мкг/мл	BAW	FAW	ECB	BCW
Ахmi115v01	40	75%	0%	0%	0%
Ахmi115v01	10	0%	25%	0%	0%
Ахmi115v01	1	0%	0%	0%	0%
Ахmi115v01	0,1	0%	0%	0%	0%

Axmi115v01	0,01	0%	0%	0%	0%
Axmi115v02	40	75%	50%	0%	0%
Axmi115v02	10	0%	25%	50%	0%
Axmi115v02	1	0%	25%	0%	0%
Axmi115v02	0,1	0%	0%	0%	0%
Axmi115v02	0,01	0%	0%	0%	0%

Дисковый биоанализ листьев растений

Axmi115v01 (SEQ ID NO:42) и Axmi115v02.01 (SEQ ID NO:1) клонируют в растительных векторах экспрессии pAG6585 и pAG6141, соответственно, и получают трансгенные растения маиса. Берут образцы для анализа методом ПЦР и вестерн-блоттинга, а также для дискового биоанализа листьев *in vitro* против Hz, ECB, FAW и BCW. Оценка результатов биоанализа включает в себя отсутствие повреждений, низкую степень повреждений (1 - несколько дыр), умеренную степень повреждений и тяжелую степень повреждений. Неповрежденные и слабоповрежденные растения рассматривают как положительный результат, а умеренно- или сильноповрежденные растения рассматривают как отрицательный результат.

Вещество листьев растений, положительных по результатам ПЦР и вестерн-блоттинга, подвергают дисковому биоанализу *in vitro*. На фиг.2А для каждой конструкции показан процент ПЦР-положительных растений, которые по результатам биоанализа имеют оценку неповрежденные, слабоповрежденные, умеренноповрежденные или сильноповрежденные. Результаты вестерн-блоттинга демонстрируют, что уровень экспрессии белка в растениях, экспрессирующих optAxmi115v02.01, как правило, выше, чем в растениях, экспрессирующих Axmi115v01.

Получают другие трансгенные растения, экспрессирующие Axmi115v02.01. Вещество листьев растений, положительных по результатам ПЦР и вестерн-блоттинга, подвергают дисковому биоанализу *in vitro* против Hz, ECB, FAW и BCW. Результаты приведены на фиг.2b.

Полевые испытания растений

Растения, экспрессирующие гены, показанные в таблице 6, выращивают на опытном участке Polk County, IA. Отрицательные

сегрегаты идентифицируют и удаляют путем применения 1× глифосата (20 унций (567 г)/A Bussaneer 5, Tenkoz, Inc.), когда растения находятся на стадии развития листьев V3-V4. Нагрузку насекомыми обеспечивают путем заражения ECB, Hz и FAW вручную.

Заражения ECB имитируют природную встречаемость первого и второго поколений. Всего примерно 340 личинок ECB наносят либо на пучки листьев (первое поколение, ECB1), либо в пазухи листьев (второе поколение, ECB2) каждого растения. ECB1 оценивают по шкале Гутри, включающей в себя оценки 1-9. ECB2 используют для измерения общей длины стеблевого канала в см.

Двадцать личинок Hz наносят на верхушки колосков каждого растения. В природе также существует умеренное заражение Hz, которое дополнит указанные ручные заражения. Повреждение колосков измеряют в кв. см.

Примерно 60 личинок FAW наносят на пучки листьев. Повреждение измеряют по модифицированной оценочной шкале Дэвиса, включающей в себя оценки 1-9, как описано ниже.

Результаты указанных полевых испытаний приведены в таблице 6.

Таблица 6

Результаты полевых испытаний

	FAW (1-9)		Гц (sq, см)		ECB2 (см)	
	Средняя оценка	SD	Средняя оценка	SD	Средняя оценка	SD
Axmi115v02,01	1,20	0,48	0,12	0,15	0,00	0,00
Axmi115v01	1,92	1,18	1,96	1,40	0,83	НО
Axmi005	1,75	0,97	4,12	2,06	НО	НО
отрицательный контроль	6,42	0,74	7,06	1,61	9,65	1,66

FAW - Описание модифицированной оценочной шкалы Дэвиса, включающей в себя оценки 1-9.

1. Видимые повреждения отсутствуют или присутствуют только крошечные отверстия на завитых листьях.

2. Присутствуют крошечные отверстия и небольшие круглые повреждения на завитых листьях.

3. Небольшие круглые повреждения и несколько мелких

удлиненных (прямоугольной формы) повреждений длиной до 1,3 см (1/2 дюйма) присутствуют на завитых и скрученных листьях.

4. Несколько удлиненных повреждений размером от маленьких до средних, составляющих в длину от 1,3 до 2,5 см (от 1/2 до 1 дюйма), присутствуют на нескольких завитых и скрученных листьях.

5. Несколько крупных удлиненных повреждений длиной более 2,5 см (1 дюйм) присутствуют на нескольких завитых и скрученных листьях и/или несколько отверстий правильной или неправильной формы (съедена базальная мембрана) выедены в завитых и скрученных листьях.

6. Несколько крупных удлиненных повреждений присутствуют на нескольких завитых и скрученных листьях и/или несколько крупных отверстий правильной или неправильной формы выедены в завитых/скрученных листьях.

7. Большое число удлиненных повреждений всех размеров присутствует на нескольких завитых и скрученных листьях плюс несколько крупных отверстий правильной или неправильной формы выедены в завитых и скрученных листьях.

8. Большое число удлиненных повреждений всех размеров присутствует на большей части завитых и скрученных листьев плюс много отверстий размером от среднего до крупного правильной или неправильной формы выедены в завитых и скрученных листьях.

9. Завитые и скрученные листья почти полностью разрушены.

Davis, F. M., S. S. Ng, and W.P. Williams. 1992. Visual rating scales for screening whorl-stage corn for resistance to fall armyworm. Miss. Agric. Forestry Exp. Stn. Tech. Bull. 186.

ЕСВ - Описание оценочной шкалы Гутри, включающей в себя оценки 1-9.

1. Отсутствие видимого повреждения листа.

2. Немного червоточин на небольшом количестве листьев.

3. Червоточины присутствуют на нескольких листьях.

4. Несколько листьев с червоточинами и продолговатыми повреждениями.

5. Несколько листьев с продолговатыми повреждениями.

6. Несколько листьев с продолговатыми повреждениями длиной

примерно 2,5 см.

7. Длинные повреждения, присутствующие примерно на половине листьев.

8. Длинные повреждения, присутствующие примерно на двух третях листьев.

9. Длинные повреждения на большей части листьев.

Guthrie, W. D., F. F. Dicke, and C. R. Neiswander. 1960. Leaf and sheath feeding resistance to the European corn borer in eight inbred lines of dent corn. Ohio. Agric. Exp. Sta. Res. Bull. 860.

Пример 2. Направленное развитие Aхmi115v02

Метод направленного развития используют для улучшения профиля эффективности и активности Aхmi115 против ECB, Hz, FAW, BCW и VBC. Чтобы идентифицировать Aхmi115, участвующий в обеспечении токсичности против насекомых, получают ряд вариантов последовательностей Aхmi115/Aхmi005 путем перестановок в С-концевой части Aхmi115. Определяют двадцать один блок различающихся последовательностей Aхmi115 и Aхmi005 (смотрите патентную публикацию США № 20100004176, которая включена в настоящий документ в качестве ссылки во всей полноте), после чего указанные блоки последовательности Aхmi115 заменяют соответствующими блоками последовательности Aхmi005. Биоанализы гибридных белков показывают, что замены блоков 2, 3, 10 и 18 связаны с повышением токсичности в отношении насекомых.

Получают библиотеки точечных мутаций для конкретных положений в блоках 2, 3, 10 и 18. Указанные библиотеки точечных мутаций анализируют против ECB, Hz, FAW, BCW и VBC с 1,5× охватом и 4 повторами. Повторные анализы проводят с 4 повторами и затем масштабируют до 16 повторов. Следующие точечные мутации соответствуют улучшенной активности против одного или нескольких вредителей:

Указанные варианты содержат мутации в С-концевой области. Чтобы отследить улучшения, синергические с Aхmi115v02 (рAХ6307), С-концевую часть нескольких из вышеуказанных мутантов клонируют в Aхmi115v02 (рAХ6307). Проводят анализы с масштабированием и идентифицируют варианты, обладающие

улучшенной активностью по сравнению с Axmi115v02.

Таблица 7

Активность точечных мутантов Axmi115

	Нуклеотидная последовательность SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность SEQ ID NO:	Улучшенная активность в отношении	Небольшое улучшение активности в отношении
Блок 2 L11C7	9	23	FAW	Hz, ECB, BCW
Блок 2 L11H6		24	FAW	Hz, ECB
Блок 2 L11H7	10	25	FAW	Hz, ECB, BCW
Блок 2 L11A9	11	26	FAW	ECB, BCW
Блок 2 L11F9		27	ECB	BCW, FAW
Блок 2 L11G10	12	28	Гц, FAW	
Блок 2 L12C3	13	29	Гц, FAW	
Блок 18 L12A10	14	30	FAW	ECB, VBC
Блок 18 L12B10		31	FAW	ECB

Таблица 8

Активность мутантов Axmi115v02

Ген	ECB		FAW		VBC		Гц		BCW	
	Замедление роста	% смертности								
axmi-115 v02	3,50	14,84	3,75	45,31	4,00	72,27	4,00	16,67	2,08	4,17
115B2L11H6 (v02)– evo27	3,67	13,02	3,67	52,08	4,00	84,38	4,00	35,16	1,50	0,00
115B18L12B10 (v02)– evo28	3,33	15,63	3,67	26,56	4,00	60,94	4,00	1,56	2,25	0,00
115B2L11H7 (v02)	3,33	10,94	3,67	33,33	4,00	56,77	4,00	3,91	2,00	0,00
115B18L12A10 (v02)	3,33	16,15	3,67	27,08	4,00	60,94	4,00	0,78	2,13	0,00
115B2L11F9 (v02)– evo29	3,67	6,88	3,67	54,17	4,00	86,98	4,00	34,38	1,38	3,13

Вариант Ахmi115 В2L11Н6 (v02) обладает улучшенной активностью против *H. zea*, VBC, FAW. Его обозначают Ахmi115v02(evo27). Нуклеотидная последовательность Ахmi115v02(evo27) описана в SEQ ID NO:4, а кодируемая ею аминокислотная последовательность описана в SEQ ID NO:18.

Вариант Ахmi115 В18L12В10 (v02) обладает улучшенной активностью против ЕСВ. Его обозначают Ахmi115v02(evo28). Нуклеотидная последовательность Ахmi115v02(evo28) описана в SEQ ID NO:5, а кодируемая ею аминокислотная последовательность описана в SEQ ID NO:19.

Вариант Ахmi115 В2L11F9 (v02) обладает улучшенной активностью против *H. zea*, VBC, FAW. Его обозначают Ахmi115v02(evo29). Нуклеотидная последовательность Ахmi115v02(evo29) описана в SEQ ID NO:6, а кодируемая ею аминокислотная последовательность описана в SEQ ID NO:20.

В С-концевой участок последовательности Ахmi115v02 вводят и другие мутации. Идентифицируют три варианта с улучшенной активностью по сравнению с Ахmi115v02 (таблица 9). Определяют значения LC₅₀ и EC₅₀ для двух из указанных С-концевых мутантов (таблица 10).

Ахmi115v02(EVO31) обуславливает более высокую смертность у FAW, пяденицы соевых бобов (SBL) и VBC, чем Ахmi115v02. Нуклеотидная последовательность Ахmi115v02(evo31) описана в SEQ ID NO:7, а аминокислотная последовательность описана в SEQ ID NO:21.

Ахmi115v02(EVO32) обуславливает более высокую смертность у ЕСВ и *H. Zea*, чем Ахmi115v02. Нуклеотидная последовательность Ахmi115v02(evo32) описана в SEQ ID NO:8, а аминокислотная последовательность описана в SEQ ID NO:22.

Ахmi115v02(EVO38) обуславливает более высокую смертность у BCW, чем Ахmi115v02. Нуклеотидная последовательность Ахmi115v02(evo38) описана в SEQ ID NO:47, а аминокислотная последовательность описана в SEQ ID NO:48.

Таблица 9

Активность С-концевых мутантов Axmi115v02

Ген	ECB		FAW		VBC		Гц		BCW	
	Замедление роста	% смертности								
Axmi115v02	3,3	11,5	4,0	16,5	4,0	80,2	4,0	13,8	2,8	1,1
Axmi115v02(evo31)	3,4	28,6	4,0	20,7	4,0	81,4	4,0	14,3	2,4	0,0
Axmi115v02(evo32)	3,4	30,0	4,0	18,2	4,0	94,4	4,0	35,0	3,0	0,0
Axmi115v02(evo38)	0,2	0,0	4,0	15,7	4,0	87,1	4,0	10,5	3,6	6,6

Таблица 10

LC₅₀ и EC₅₀ С-концевых мутантов

Ген	ECB		FAW		VBC	SBL	Гц		BCW
	LC ₅₀	EC ₅₀	LC ₅₀	EC ₅₀	LC ₅₀	LC ₅₀	LC ₅₀	EC ₅₀	LC ₅₀
Axmi115v02	20 мкг/мл	3 мкг/мл	6,3 мкг/мл	1,3 мкг/мл	400 нг/мл	280 нг/мл	339 мкг/мл	14,3 мкг/мл	7,6 мкг/мл
Axmi115v02 (evo31)	18 мкг/мл	4,5 мкг/мл	2,4 мкг/мл	240 нг/мл	120 нг/мл	80 нг/мл	185 мкг/мл	12 мкг/мл	27,3 мкг/мл
Axmi115v02 (evo32)	12,3 мкг/мл	4,3 мкг/мл	6 мкг/мл	400 нг/мл	520 нг/мл	520 нг/мл	42,5 мкг/мл	13,3 мкг/мл	16,6 мкг/мл

SBL = Пяденица соевых бобов

Пример 3. Дополнительные анализы пестицидной активности

Нуклеотидные последовательности настоящего изобретения можно тестировать на способность продуцировать пестицидные белки. Способность пестицидного белка действовать на вредителя как пестицид часто анализируют с помощью ряда способов. Один хорошо известный в данной области способ включает в себя проведение пищевого анализа. В таком пищевом анализе вредителя подвергают либо воздействию образца, содержащего соединения, подлежащие тестированию, либо воздействию контрольного образца. Обычно такой анализ проводят путем помещения тестируемого вещества или подходящего разведения такого вещества на материал, проглатываемый вредителем, такой как искусственная питательная среда. Тестируемое вещество может представлять собой жидкое вещество, твердое вещество или взвесь. Подлежащее тестированию вещество можно поместить на поверхность и затем оставить сохнуть. Альтернативно, тестируемое вещество можно смешать с жидкой искусственной питательной средой и затем распылить в аналитической камере. Аналитическая камера может представлять собой, например, чашку, блюдо или лунку титрационного микропланшета.

В анализах с использованием сосущих вредителей (таких как тли) тестируемое вещество можно отделить от насекомого перегородкой, в идеале используют перегородку, которую могут проткнуть сосущие части рта сосущего насекомого, чтобы обеспечить проглатывание тестируемого вещества. Обычно тестируемое вещество смешивают со средством, стимулирующим потребление пищи, таким как сахароза, чтобы обеспечить проглатывание тестируемого соединения.

Другие типы анализов могут включать в себя микроинъекцию тестируемого вещества в рот или кишку вредителя, а также получение трансгенных растений с последующим тестированием способности вредителя кормиться на трансгенном растении. Тестирование растений может включать в себя заключение обычно потребляемых частей растений, например, в маленькие клетки, присоединенные к листьям, или заключение целых растений в клетки, содержащие насекомых.

В данной области также известны другие способы и подходы к анализам, в которых используются вредители, они описаны, например, в Robertson and Preisler, eds. (1992) *Pesticide bioassays with arthropods*, CRC, Boca Raton, FL. Альтернативно, такие анализы часто описываются в журналах *Arthropod Management Tests* и *Journal of Economic Entomology*, или обсуждаются членами Энтомологического общества Америки (ESA).

В некоторых воплощениях участки ДНК, кодирующие токсичные участки раскрытых здесь пестицидных белков, клонируют в векторе pMAL-C4x, обеспечивающем экспрессию в *E. Coli*, после гена malE, кодирующего белок, связывающий мальтозу (MBP). Указанное объединение в одной рамке считывания приводит к экспрессии в *E. coli* гибридных белков MBP-Axmi.

Для проведения экспрессии в *E. coli* BL21*DE3 трансформируют отдельными плазмидами. Отдельные колонии инокулируют в LB, содержащий карбенициллин и глюкозу, и выращивают в течение ночи при 37°C. На следующий день в свежую среду вносят 1% культивируемой в течение ночи культуры и выращивают при 37°C до достижения логарифмической фазы роста. Затем культуры индуцируют 0,3 mM IPTG в течение ночи при 20°C. Каждый клеточный осадок суспендируют в 20 mM буфере Tris-HCl, pH 7,4 плюс 200 mM NaCl, плюс 1 mM DTT, плюс ингибиторы протеаз, и обрабатывают ультразвуком. Экспрессию гибридных белков можно подтвердить методом SDS-PAGE.

Затем все не содержащие клеток экстракты пропускают через амилозную колонку, присоединенную к системе жидкостной экспресс-хроматографии белков (FPLC), где происходит афинная очистка гибридных белков MBP-axmi. Связанные гибридные белки элюируют со смолы 10 mM раствором мальтозы. Затем очищенные гибридные белки расщепляют либо фактором Ха, либо трипсином, чтобы удалить амино-концевой маркер MBP из белка Axmi. Расщепление и растворимость белков можно определить методом SDS-PAGE

Пример 4. Конструирование синтетических последовательностей

В одном аспекте настоящего изобретения получают

синтетические последовательности ахmі. Указанные синтетические последовательности содержат измененные последовательности ДНК по сравнению с исходной последовательностью ахmі и кодируют белок, коллинеарный исходному белку АХMІ, которому он соответствует, но утративший С-концевой "кристаллический домен", присутствующий во многих дельта-эндотоксинах.

В другом аспекте настоящего изобретения модифицированные версии синтетических генов конструируют так, чтобы направить полученный пептид в органеллу растения, такую как эндоплазматический ретикулум или апопласт. Пептидные последовательности, которые заведомо обеспечивают направление гибридных белков в растительные органеллы, известны в данной области. Например, в данной области известно, что N-концевой участок гена кислой фосфатазы белого люпина *Lupinus albus* (Genbank ID GI: 14276838; Miller et al. (2001) *Plant Physiology* 127: 594-606) обеспечивает направление гетерологичных белков в эндоплазматический ретикулум. Если полученный гибридный белок также содержит последовательность удерживания в эндоплазматическом ретикулуме, содержащую пептид N-конец-лизин-аспарагиновая кислота-глутаминовая кислота-лейцин (т.е. мотив "KDEL" (SEQ ID NO:46)) на С-конце, гибридный белок направляется в эндоплазматический ретикулум. Если гибридный белок не содержит последовательность, обеспечивающую направление в эндоплазматический ретикулум, на С-конце, этот белок будет направляться в эндоплазматический ретикулум, но затем он будет удаляться в апопласт.

Пример 5. Трансформация клеток маиса описанными здесь генами пестицидных белков

Початки кукурузы предпочитают собирать через 8-12 дней после опыления. Из початков выделяют зародыши, причем для трансформации предпочитают использовать зародыши размером 0,8-1,5 мм. Зародыши помещают щитком вверх на подходящую инкубационную среду, такую как среда DN62A5S (3,98 г/л солей N6; 1 мл/л (1000× разведение 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

(1 мг/мл исходного раствора) 2,4-D). Однако можно использовать известные в данной области среду и соли, отличные от DN62A5S. Зародыши инкубируют в течение ночи при 25°C в темноте. Однако инкубация зародышей в течение ночи не является необходимой как таковая.

Полученные эксплантаты переносят на планшеты с отверстиями (30-40 на планшет), затем на осмотическую среду в течение примерно 30-45 минут, и затем на планшет для облучения (смотрите, например, публикацию РСТ № WO/0138514 и патент США № 5240842).

Конструкции ДНК, сконструированные для переноса генов настоящего изобретения в растительные клетки, внедряют в ткань растения с помощью аэрозольного лазерного ускорителя, по существу в условиях, описанных в публикации РСТ № WO/0138514. После облучения зародыши инкубируют в течение примерно 30 мин на осмотической среде, затем помещают в среду для инкубации и инкубируют в течение ночи при 25°C в темноте. Чтобы избежать излишнего повреждения облученных эксплантатов, их инкубируют в течение, по меньшей мере, 24 часов перед переносом в среду для регенерации. Затем зародыши распределяют на периодической среде для регенерации в течение примерно 5 дней, при 25°C, в темноте, после чего переносят в среду для селекции. Эксплантаты инкубируют в среде для селекции до восьми недель, в зависимости от типа и характеристик конкретного используемого способа селекции. По окончании периода селекции полученный каллус переносят на среду для созревания зародышей, где его держат до визуального подтверждения образования зрелых соматических зародышей. Затем полученные зрелые соматические зародыши помещают в условия слабой освещенности и инициируют процесс регенерации с помощью известных в данной области способов. Полученные побеги оставляют укореняться на среде для укоренения, после чего полученные растения переносят в горшки для рассады и выращивают трансгенные растения.

Материалы

Среда DN62A5S

Компоненты	На литр	Источник
Основная солевая смесь Chu's № 6 (№ продукта С 416)	3,98 г/л	Phytotechnology Labs
Витаминный раствор Chu's № 6 (№ продукта С 149)	1 мл/л (1000-кратное разведение исходного раствора)	Phytotechnology Labs
L-Аспарагин	800 мг/мл	Phytotechnology Labs
Миоинозитол	100 мг/мл	Sigma
L-Пролин	1,4 г/л	Phytotechnology Labs
Казаминовые кислоты	100 мг/мл	Fisher Scientific
Сахароза	50 г/л	Phytotechnology Labs
2,4-D (№ продукта D-7299)	1 мл/л (1 мг/мл исходного раствора)	Sigma

pH раствора доводят до 5,8 используя 1 н. KOH/1 н. KCl, добавляют гелрит (Sigma) в концентрации до 3 г/л и затем среду автоклавируют. После охлаждения до 50°C добавляют 2 мл/л исходного раствора нитрата серебра с концентрацией 5 мг/мл (Phytotechnology Labs).

Пример 6. Трансформация растительных клеток генами настоящего изобретения методом Agrobacterium-опосредованной трансформации

Початки предпочтительно собирают через 8-12 дней после опыления. Из початков выделяют зародыши, причем для трансформации предпочтительно используют зародыши размером 0,8-1,5 мм. Зародыши помещают щитком вверх на подходящую инкубационную среду и инкубируют в течение ночи при 25°C в темноте. Однако инкубация зародышей в течение ночи не является необходимой как таковая. Зародыши приводят в контакт со штаммом Agrobacterium, содержащим векторы, подходящие для Ti-плазмида-опосредованного переноса в течение примерно 5-10 мин, после чего их помещают на чашки, содержащие среду для совместного

культивирования, где держат в течение примерно 3 дней (25°C в темноте). После совместного культивирования эксплантаты переносят на периодическую среду для регенерации и держат в ней в течение примерно пяти дней (при 25°C в темноте). Эксплантаты инкубируют в среде для селекции до восьми недель, в зависимости от типа и характеристик конкретного используемого способа селекции. По окончании периода селекции полученный каллюс переносят на среду для созревания зародышей, где его держат до визуального подтверждения образования зрелых соматических зародышей. Затем полученные зрелые соматические зародыши помещают в условия слабой освещенности и инициируют процесс регенерации с помощью известных в данной области способов.

Все публикации и патентные заявки, упомянутые в данном описании, свидетельствуют об уровне специалистов в области, к которой принадлежит настоящее изобретение. Все публикации и патентные заявки включены в данный документ в качестве ссылки в такой степени, как если бы для каждой отдельной публикации или патентной заявки было бы специально и отдельно указано, что она включена в данный документ в качестве ссылки.

Хотя вышеприведенное изобретение описано с некоторыми подробностями, приведенными для иллюстрации и примера с целью улучшения понимания, очевидно, что можно внести определенные изменения и модификации в пределах объема приложенной формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, обладающий пестицидной активностью, где указанная нуклеотидная последовательность выбрана из группы, состоящей из:

а) нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:6;

б) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 или SEQ ID NO:20 и

в) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид, содержащий от одной до пяти консервативных аминокислотных замен, делеций или вставок относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 или SEQ ID NO:20, где пестицидная активность полипептида улучшена по сравнению с пестицидной активностью последовательности SEQ ID NO: 43.

2. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по п.1, где указанная нуклеотидная последовательность выбрана из группы, состоящей из:

а) нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:6; и

б) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 или SEQ ID NO:20.

3. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по п.1, где указанная нуклеотидная последовательность представляет собой синтетическую последовательность, сконструированную для экспрессии в растении.

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

5. Вектор, содержащий рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты по п.1.

6. Вектор по п. 5, дополнительно содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гетерологичный полипептид.

7. Клетка-хозяин, которая содержит рекомбинантную нуклеиновую кислоту по п.1.

8. Клетка-хозяин по п.7, которая представляет собой бактериальную клетку-хозяина.

9. Клетка-хозяин по п.7, которая представляет собой растительную клетку.

10. Трансгенное растение, содержащее клетку-хозяина по п.9.

11. Трансгенное растение по п.10, где указанное растение выбрано из группы, включающей в себя кукурузу, сорго, пшеницу, капусту, подсолнечник, томат, крестоцветные, перцы, картофель, хлопок, рис, соевые бобы, сахарную свеклу, сахарный тростник, табак, ячмень и масличные культуры.

12. Трансгенное семя, содержащее молекулу нуклеиновой кислоты по п.1.

13. Рекомбинантный полипептид, обладающий пестицидной активностью, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

а) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 или SEQ ID NO:20; и

б) аминокислотной последовательности, содержащей от одной до пяти аминокислотных замен, делеций, вставок относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:18,

SEQ ID NO:19 или SEQ ID NO:20, где пестицидная активность полипептида улучшена по сравнению с пестицидной активностью последовательности SEQ ID NO: 43 .

14. Рекомбинантный полипептид по п.13, где указанный полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 или SEQ ID NO:20.

15. Полипептид по п. 13, которой дополнительно содержит гетерологичные аминокислотные последовательности.

16. Композиция, содержащая полипептид по п.13.

17. Композиция по п.16, где указанная композиция находится в виде порошка, пылевидного препарата, шариков, гранул, спрея, эмульсии, коллоидного вещества и раствора.

18. Композиция по п.16, где указанную композицию получают путем сушки, лиофилизации, гомогенизации, экстракции, фильтрации, центрифугирования, осаждения или концентрирования культуры бактериальных клеток.

19. Композиция по п.16, содержащая от примерно 1% до примерно 99% по массе указанного полипептида.

20. Способ борьбы с вредителем, относящегося к чешуекрылым, полужесткокрылым, жесткокрылым, нематодам или двукрылым, где указанный способ включает приведение указанной популяции в контакт с пестицидно-эффективным количеством полипептида по п.13.

21. Способ уничтожения вредителя, относящегося к чешуекрылым, полужесткокрылым, жесткокрылым, нематодам или двукрылым, где указанный способ включает приведение указанного вредителя в контакт с пестицидно-эффективным количеством или скармливание указанному вредителю пестицидно-эффективного

количества полипептида по п.13.

22. Способ получения полипептида, обладающего пестицидной активностью, где указанный способ включает культивирование клетки-хозяина по п.7 в условиях, обеспечивающих экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид.

23. Растение, которое содержит стабильно внедренную в его геном конструкцию ДНК, содержащую рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид с пестицидной активностью, где указанная нуклеотидная последовательность выбрана из группы, состоящей из:

а) нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:6;

б) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 или SEQ ID NO:20; и

с) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид, содержащий от одной до пяти консервативных аминокислотных замен, делеций или вставок относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 или SEQ ID NO:20, где пестицидная активность полипептида улучшена по сравнению с пестицидной активностью последовательности SEQ ID NO: 43.

24. Растение по п.23, где указанная нуклеотидная последовательность выбрана из группы, включающей:

а) нуклеотидную последовательность, представленной в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:6;

б) нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 или SEQ ID NO:20.

25. Растение по п. 24, где указанное растение представляет собой клетку растения.

26. Способ защиты растения от вредителя, где указанный

способ включает экспрессию в растении или его клетке молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид с пестицидной активностью, где указанная нуклеотидная последовательность выбрана из группы, состоящей из:

а) нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:6;

б) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 или SEQ ID NO:20; и

в) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид, содержащий от одной до пяти консервативных аминокислотных замен, делеций или вставок относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 или SEQ ID NO:20, где пестицидная активность полипептида улучшена по сравнению с пестицидной активностью последовательности SEQ ID NO: 43.

27. Способ по п.26, где указанная нуклеотидная последовательность выбрана из группы, состоящей из:

а) нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:6; и

б) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 или SEQ ID NO:20.

28. Способ по п.26, где вредители относятся к чешуекрылым, полужесткокрылым, жесткокрылым, нематодам или двукрылым.

29. Способ повышения урожая растения, включающий выращивание в полевых условиях растения или его семени, содержащих стабильно внедренную в геном конструкцию ДНК, несущую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид с пестицидной активностью, где указанная нуклеотидная последовательность выбрана из группы, состоящей из:

а) нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:6;

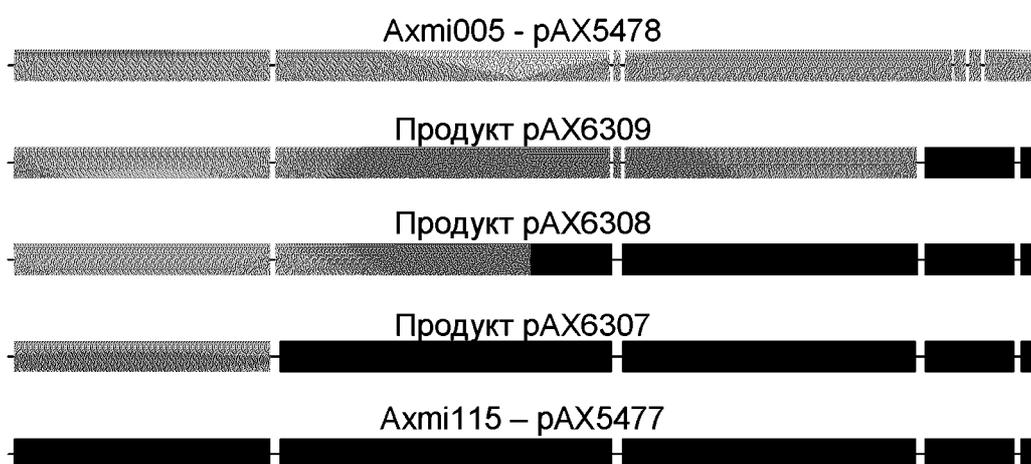
б) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 или SEQ ID NO:20; и

с) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид, содержащий от одной до пяти консервативных аминокислотных замен, делеций или вставок относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 или SEQ ID NO:20, где пестицидная активность полипептида улучшена по сравнению с пестицидной активностью последовательности SEQ ID NO: 43.

30. Способ по п.29, где указанная нуклеотидная последовательность выбрана из группы, состоящей из:

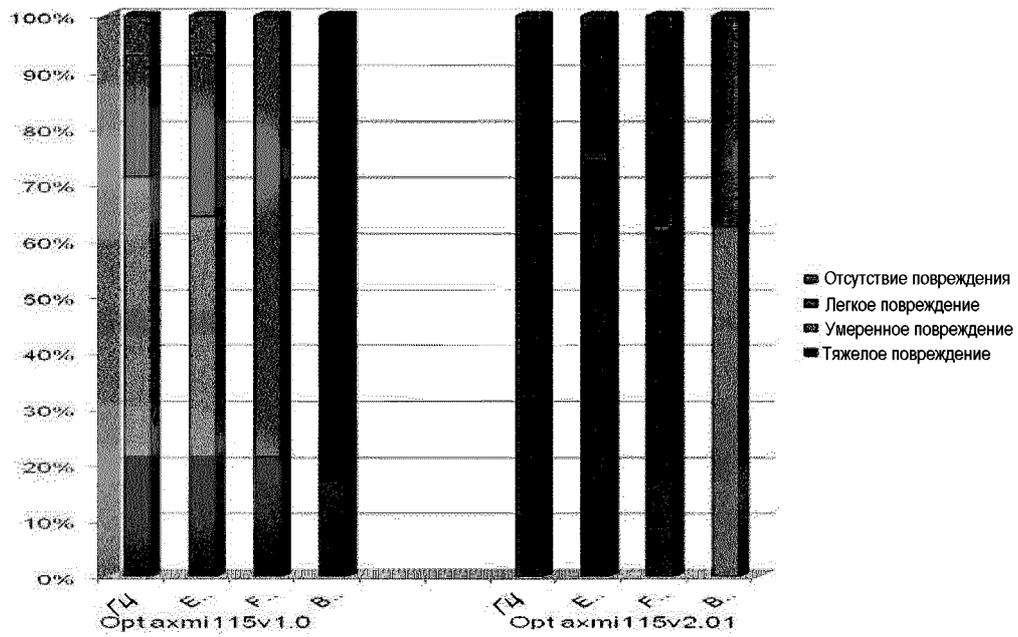
а) нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:6; и

б) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 или SEQ ID NO:20.

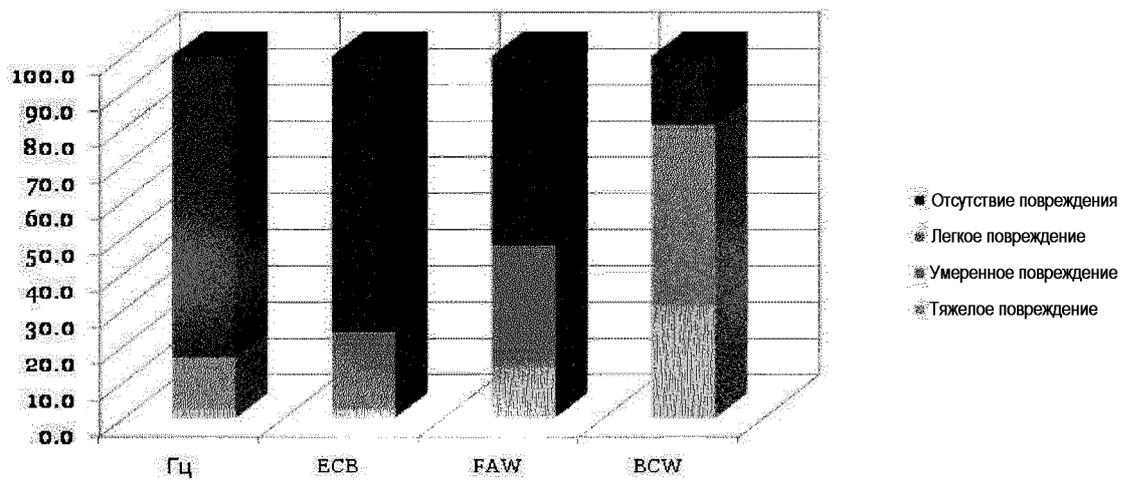


ФИГ. 1

A.



B.



ФИГ. 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2012/032086

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/82 C07K14/325 A01H5/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010/003065 A2 (ATHENIX CORP) 7 January 2010 (2010-01-07)	1,2,4, 6-17,19, 21-30, 32, 34-36, 38, 40-42,44
Y	the whole document	3,18,31, 37,43,45
	----- -/--	

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family.

Date of the actual completion of the international search

21 June 2012

Date of mailing of the international search report

02/07/2012

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Puonti-Kaerlas, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/032086

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JUN FANG ET AL: "Characterization of chimeric Bacillus thuringiensis Vip3 toxins", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US vol. 73, no. 3 1 February 2007 (2007-02-01), pages 956-961, XP002670816, ISSN: 0099-2240, DOI: 10.1128/AEM.02079-06 Retrieved from the Internet: URL:http://aem.asm.org/content/73/3/956 [retrieved on 2006-11-01]	2,4,5, 7-13,17, 19-24, 26-28, 30, 32-34, 36,38-40
Y	the whole document	3,18,31, 37,43,45
A	----- F. S. WALTERS ET AL: "Lepidopteran-Active Variable-Region Sequence Imparts Coleopteran Activity in eCry3.1Ab, an Engineered Bacillus thuringiensis Hybrid Insecticidal Protein", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 76, no. 10, 15 May 2010 (2010-05-15), pages 3082-3088, XP55008307, ISSN: 0099-2240, DOI: 10.1128/AEM.00155-10 -----	1-45
A	WO 2007/147096 A2 (ATHENIX CORP [US]; KOZIEL MICHAEL G [US]; DESAI NALINI [US]; DETER REB) 21 December 2007 (2007-12-21) -----	1-45
A	US 5 840 868 A (WARREN GREGORY W [US] ET AL) 24 November 1998 (1998-11-24) -----	1-45
A	WO 2011/014749 A1 (ATHENIX CORP [US]; SAMPSON KIMBERLY S [US]; TOMSO DANIEL JOHN [US]; GU) 3 February 2011 (2011-02-03) -----	1-45

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2012/032086

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
WO 2010003065	A2	07-01-2010	AR 072680 A1 15-09-2010		
			AU 2009266906 A1 07-01-2010		
			CA 2728622 A1 07-01-2010		
			CN 102076709 A 25-05-2011		
			CO 6341638 A2 21-11-2011		
			EA 201071323 A1 30-06-2011		
			EP 2297190 A2 23-03-2011		
			JP 2011526791 A 20-10-2011		
			PE 03102011 A1 29-05-2011		
			US 2010004176 A1 07-01-2010		
			WO 2010003065 A2 07-01-2010		

			WO 2007147096	A2	21-12-2007
EP 2041163 A2 01-04-2009					
EP 2455391 A2 23-05-2012					
EP 2455392 A2 23-05-2012					
EP 2455393 A2 23-05-2012					
EP 2455394 A2 23-05-2012					
US 2008070829 A1 20-03-2008					
US 2011263488 A1 27-10-2011					
WO 2007147096 A2 21-12-2007					

US 5840868	A	24-11-1998	AT 256743 T 15-01-2004		
			AU 692934 B2 18-06-1998		
			BG 101384 A 31-10-1997		
			BR 9509099 A 30-09-1997		
			CA 2199049 A1 04-04-1996		
			CN 1160420 A 24-09-1997		
			CZ 9700908 A3 16-02-2000		
			DE 69532333 D1 29-01-2004		
			DE 69532333 T2 07-10-2004		
			DK 0792363 T3 26-04-2004		
			EP 0792363 A1 03-09-1997		
			EP 1382611 A2 21-01-2004		
			EP 1754789 A2 21-02-2007		
			ES 2213162 T3 16-08-2004		
			HU 222264 B1 28-05-2003		
			IL 115382 A 16-06-2010		
			JP H10506532 A 30-06-1998		
			MX 228013 B 25-05-2005		
			PT 792363 E 31-05-2004		
			RO 119835 B1 29-04-2005		
			RU 2196824 C2 20-01-2003		
			SI 792363 T1 30-04-2004		
			TR 960263 A2 21-06-1996		
			US 5770696 A 23-06-1998		
			US 5840868 A 24-11-1998		
			US 5849870 A 15-12-1998		
			US 5866326 A 02-02-1999		
			US 5872212 A 16-02-1999		
			US 5888801 A 30-03-1999		
			US 5889174 A 30-03-1999		
			US 5990383 A 23-11-1999		
			WO 9610083 A1 04-04-1996		

			WO 2011014749	A1	03-02-2011
AU 2010278843 A1 16-02-2012					
CA 2769643 A1 03-02-2011					

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2012/032086

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		EP 2459587 A1	06-06-2012
		US 2011030096 A1	03-02-2011
		WO 2011014749 A1	03-02-2011