

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **042693**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2023.03.15**

(21) Номер заявки  
**201991665**

(22) Дата подачи заявки  
**2014.12.08**

(51) Int. Cl. *C12N 15/82* (2006.01)  
*C07K 14/325* (2006.01)  
*A01N 63/23* (2020.01)  
*A01N 63/50* (2020.01)  
*A01N 63/60* (2020.01)  
*A01P 7/04* (2006.01)

---

**(54) ГЕНЫ ТОКСИНОВ АХМ1477, АХМ1482, АХМ1486 И АХМ1525 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

---

(31) **61/913,905; 61/913,911**

(32) **2013.12.09**

(33) **US**

(43) **2020.05.31**

(62) **201691192; 2014.12.08**

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

(72) Изобретатель:  
**Лехтинен Дуэйн Алан, Сэмпсон  
Кимберли С., Робертс Кира, Данн  
Итан, Шугюль Нана (US)**

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

(56) WO-A2-2007147096  
US-A1-20030119158  
WO-A2-2010003065  
WO-A2-2007027777

(57) Обеспечиваются композиции и способы для придания пестицидной активности бактериям, растениям, растительным клеткам, тканям и семенам. Обеспечиваются композиции, содержащие последовательность, кодирующую полипептид токсина. Кодированные последовательности можно применять в ДНК-конструктах или кассетах экспрессии для трансформации и экспрессии в растениях и бактериях. Композиции также содержат трансформированные бактерии, растения, растительные клетки, ткани и семена. В частности, обеспечиваются выделенные молекулы нуклеиновой кислоты токсина. Дополнительно охвачены аминокислотные последовательности, соответствующие данным полинуклеотидам, и антитела, специфически связывающиеся с данными аминокислотными последовательностями. В частности, в настоящем изобретении предложены выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, которые содержат нуклеотидные последовательности, кодирующие аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 5-26, или нуклеотидные последовательности, изложенные в SEQ ID NO: 1-4, а также их варианты и фрагменты.

**B1****042693****042693****B1**

### Ссылка на родственные заявки

Эта заявка испрашивает приоритет предварительной заявки США, порядковый номер 61/913905, поданной 9 декабря 2013 г., и предварительной заявки США, порядковый номер 61/913911, поданной 9 декабря 2013 г., содержание которых во всей своей полноте включено в данный документ ссылкой.

### Ссылка на перечень последовательностей, поданный электронным образом

Официальная копия перечня последовательностей подана на рассмотрение электронным образом через EFS-Web как перечень последовательностей в формате ASCII, причем файл размером 97 килобайт зарегистрирован 14 ноября 2014 г. под названием "APA136054\_ST25.txt" одновременно со спецификацией. Перечень последовательностей в этом документе в формате ASCII является частью спецификации и включен во всей своей полноте в данный документ ссылкой.

### Область изобретения

Настоящее изобретение относится к области молекулярной биологии. В настоящем документе обеспечиваются новые гены, которые кодируют пестицидные белки. Данные белки и кодирующие их нуклеотидные последовательности применяются для приготовления пестицидных составов и при получении трансгенных растений, устойчивых к сельскохозяйственным вредителям.

### Предпосылки изобретения

*Bacillus thuringiensis* является грамположительной спорообразующей почвенной бактерией, которая обладает способностью продуцировать кристаллические включения, проявляющие специфическую токсичность относительно некоторых отрядов и видов насекомых, но безвредны для растений и других нецелевых организмов. В связи с этим композиции, содержащие штаммы *Bacillus thuringiensis* или их инсектицидные белки, могут применяться в качестве экологически приемлемых инсектицидов для контроля сельскохозяйственных насекомых-вредителей или насекомых-переносчиков для лечения различных заболеваний человека и животных.

Кристаллические (Cry) белки (дельта-эндотоксины) из *Bacillus thuringiensis* обладают мощной инсектицидной активностью относительно личинок насекомых, относящихся преимущественно к отрядам чешуекрылые, полужесткокрылые, двукрылые и жесткокрылые. Данные белки также продемонстрировали активность относительно отрядов вредителей Hymenoptera, Homoptera, Phthiraptera, Mallophaga и Acari, а также других отрядов 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.) Данные белки изначально классифицировали как CryI-CryV, преимущественно на основе их инсектицидной активности. Основные классы были Lepidoptera-специфичны (I), Lepidoptera-специфичны и Diptera-специфичны (II), Coleoptera-специфичны (III), Diptera-специфичны (IV) и нематода-специфичны (V) и (VI). Белки дополнительно классифицировали в подсемейства; более близкородственным белкам в составе каждого семейства присвоили относящиеся к подгруппе буквы CryIA, CryIB, CryIC и т.д. Еще более близкородственные белки в рамках каждой подгруппы получали такие обозначения как CryIC1, CryIC2 и т.д.

Номенклатура для генов Cry была описана скорее на основе гомологии аминокислотных последовательностей, чем на основе целевой специфичности по отношению к насекомому (Crickmore et al. (1998) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:807-813). По этой классификации каждому токсину присваивается уникальное название, включающее первичную категорию (арабская цифра), вторичную категорию (заглавная буква), третичную категорию (строчная буква) и четвертичную категорию (вторая арабская цифра). Римские цифры были заменены арабскими цифрами в первичной категории. Белки с идентичностью последовательностей менее 45% имеют различные первичные категории, а критериями для вторичной и третичной категорий являются идентичность 78% и 95% соответственно.

Кристаллический белок не проявляет инсектицидной активности до того момента, пока он не будет поглощен насекомым и не раствориться в его средней кишке. Поглощенный протоксин подвергается гидролизу протеазами в пищеварительном тракте насекомых с образованием активных токсичных молекул. (Höfte and Whiteley (1989) *Microbiol. Rev.* 53:242-255). Данный токсин связывается с апикальными рецепторами щеточной каймы в средней кишке целевых личинок и встраивается в апикальную мембрану, создавая ионные каналы или поры, что в результате приводит к гибели личинки.

Дельта-эндотоксины в целом имеют пять консервативных доменов последовательностей и три консервативных структурных домена (см., например, de Maagd et al. (2001) *Trends Genetics* 17:193-199). Первый консервативный структурный домен состоит из семи альфа-спиралей и участвует в проникновении через мембрану и образовании пор. Домен II состоит из трех складчатых бета-слоев, которые упорядочены в структуре греческого ключа, а домен III состоит из двух анти-параллельных складчатых бета-слоев в структуре типа "jelly-roll" (de Maagd et al., 2001, см. выше). Домены II и III участвуют в узнавании и связывании рецепторов и поэтому считаются девыраженными специфичности токсина.

В связи с тем уроном, который могут нанести насекомые, и улучшением урожайности путем контроля над насекомыми-вредителями, существует постоянная потребность в открытии новых форм пестицидных токсинов.

### Краткое описание изобретения

Обеспечиваются композиции и способы придания пестицидной активности бактериям, растениям,

клеткам, тканям и семенам растений. Композиции включают молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие последовательности пестицидных и инсектицидных полипептидов, векторы, содержащие данные молекулы нуклеиновых кислот, и клетки-хозяева, содержащие такие векторы. Композиции также содержат последовательности пестицидных полипептидов и антитела к данным полипептидам. Нуклеотидные последовательности могут применяться в ДНК-конструктах или экспрессионных кассетах для трансформации и экспрессии в организмах, в том числе микроорганизмах и растениях. Нуклеотидные или аминокислотные последовательности могут представлять собой синтетические последовательности, которые были сконструированы для экспрессии в организме, включая, но без ограничений, микроорганизм или растение. Композиции также включают бактерии, растения, клетки, ткани и семена растений, содержащие нуклеотидную последовательность настоящего изобретения.

В частности, предложены выделенные или рекомбинантные молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют пестицидный белок. Кроме того, охвачены аминокислотные последовательности, соответствующие пестицидному белку. В частности, настоящее изобретение предлагает выделенную или рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5-26, или нуклеотидную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 1-4, а также их биологически-активные варианты и фрагменты. Нуклеотидные последовательности, которые комплементарны нуклеотидной последовательности настоящего изобретения, или которые гибридизуются с последовательностью настоящего изобретения или комплементарной им цепи, также охватываются. Дополнительно обеспечиваются векторы, клетки-хозяева, растения и семена, содержащие нуклеотидные последовательности настоящего изобретения, или нуклеотидные последовательности, кодирующие аминокислотные последовательности настоящего изобретения, а также их биологически-активные варианты и фрагменты.

Обеспечиваются способы получения полипептидов настоящего изобретения и применения данных полипептидов для контроля или уничтожения насекомых, относящихся к отрядам чешуекрылые, полужесткокрылые, жесткокрылые, нематоды или двукрылые. Также включены способы и наборы для обнаружения в образце нуклеиновых кислот и полипептидов настоящего изобретения.

Композиции и способы настоящего изобретения пригодны для получения организмов с повышенной устойчивостью или резистентностью к вредителям. Данные организмы и композиции, содержащие организмы, являются подходящими для сельскохозяйственных целей. Композиции настоящего изобретения также пригодны для создания измененных или улучшенных белков, которые обладают пестицидной активностью, или для обнаружения присутствия пестицидных белков или нуклеиновых кислот в продуктах или организмах.

### **Подробное описание**

Настоящее изобретение относится к композициям и способам регулирования устойчивости или резистентности к вредителям у организмов, в частности, растений или растительных клеток. Под "устойчивостью" подразумевают, что вредитель (например, насекомое) погибает после попадания внутрь него или другого контакта с полипептидами настоящего изобретения. Под "толерантностью" подразумевают нарушение или угнетение функций движения, питания, размножения или других функций организма вредителя. Способы включают трансформацию организмов с применением нуклеотидной последовательности, кодирующей пестицидный белок настоящего изобретения. В частности, нуклеотидные последовательности настоящего изобретения применяются для получения растений и микроорганизмов, которые обладают пестицидной активностью. Таким образом, обеспечиваются трансформированные бактерии, растения, растительные клетки, ткани и семена растений. Композиции представляют собой пестицидные нуклеиновые кислоты и белки из *Bacillus* или других видов. Последовательности находят применение в конструировании векторов экспрессии для последующей трансформации в организмы, представляющие интерес, в качестве зондов для выделения других гомологичных (или частично гомологичных) генов и для создания измененных пестицидных белков с применением способов, известных в данной области техники, таких как перестановка доменных блоков или перестановка в ДНК, например, с использованием представителей семейств эндотоксинов Cry1, Cry2 и Cry9. Белки находят применение в осуществлении контроля или индуцировании гибели популяций вредителей из отрядов чешуекрылые, полужесткокрылые, жесткокрылые, двукрылые и нематоды и для получения композиций с пестицидной активностью.

Под выражением "пестицидный токсин" или "пестицидный белок" подразумевают токсин, который обладает токсической активностью относительно одного или нескольких вредителей, включая, но без ограничений, представителей отрядов Lepidoptera, Diptera, Hemiptera и Coleoptera или типа Nematoda, или белок, который гомологичен к такому белку. Пестицидные белки были выделены из организмов, которые включают, например, *Bacillus* sp., *Clostridium bifermentans* и *Paenibacillus popilliae*. Пестицидные белки содержат аминокислотные последовательности, выведенные от нуклеотидных последовательностей полной длины, раскрываемых в настоящем документе, и аминокислотные последовательности, которые короче последовательностей полной длины либо за счет использования альтернативного ниже расположенного участка начала трансляции, либо за счет процессинга, который приводит к образованию более короткого белка, характеризующегося пестицидной активностью. Процессинг может иметь место в том организме, в котором экспрессируется белок, или в организме вредителя после поглощения белка.

Таким образом, в данном документе обеспечиваются новые выделенные или рекомбинантные нуклеотидные последовательности, которые обеспечивают пестицидную активность. Данные нуклеотидные последовательности кодируют полипептиды с гомологией к известным дельта-эндотоксинам или бинарным токсинам. Также в настоящем документе обеспечиваются аминокислотные последовательности пестицидных белков. Белок, синтезируемый в результате трансляции данного гена, позволяет клеткам контролировать или вызывать гибель вредителей при попадании в их пищеварительный тракт.

Выделенные молекулы нуклеиновых кислот и их варианты и фрагменты

Один аспект настоящего изобретения относится к выделенным или рекомбинантным молекулам нуклеиновых кислот, которые содержат нуклеотидные последовательности, кодирующие пестицидные белки и полипептиды или их биологически активные части, а также молекулы нуклеиновых кислот, подходящие для применения в качестве гибридизационных зондов для идентификации молекул нуклеиновых кислот, которые кодируют белки с участками гомологии последовательностей. Также в данном документе охвачены нуклеотидные последовательности, способные к гибридизации с нуклеотидными последовательностями настоящего изобретения в строгих условиях, как определено в другом разделе данного документа. Как используется в данном документе, выражение "молекула нуклеиновой кислоты" включает молекулы ДНК (например, рекомбинантную ДНК, кДНК или геномную ДНК) и молекулы РНК (например, иРНК) и аналоги ДНК или РНК, созданные с применением аналогов нуклеотидов. Молекула нуклеиновой кислоты может быть одноцепочечной или двухцепочечной, но предпочтительно является двухцепочечной ДНК.

Выражение "выделенная" или "рекомбинантная" нуклеотидная последовательность (или ДНК) используется в данном документе для обозначения нуклеотидной последовательности (или ДНК), которая более не находится в естественной для нее среде, например, находясь в системе *in vitro* или в рекомбинантной бактериальной или растительной клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления выделенная или рекомбинантная нуклеиновая кислота не содержит последовательностей (предпочтительно последовательностей, кодирующих белок), которые в естественных условиях фланкируют нуклеиновую кислоту (т.е. последовательностей, которые расположены в 5' и 3' концах нуклеиновой кислоты) в геномной ДНК организма, из которого получена нуклеиновая кислота. В контексте данного изобретения выражение "выделенные", при использовании в отношении молекул нуклеиновых кислот, исключает выделенные хромосомы. Например, в различных вариантах осуществления выделенный дельта-эндотоксин, кодирующий молекулу нуклеиновой кислоты, может содержать нуклеотидные последовательности длиной менее, чем примерно 5 тысяч пар оснований (т.п.о.), 4 т.п.о., 3 т.п.о., 2 т.п.о., 1 т.п.о., 0,5 т.п.о. или 0,1 т.п.о., которые в естественных условиях фланкируют молекулу нуклеиновой кислоты в геномной ДНК клетки, из которой была получена нуклеиновая кислота. В различных вариантах осуществления белок дельта-эндотоксин, который практически не содержит клеточного материала, включает составы белка, содержащие менее примерно 30, 20, 10 или на 5% (на сухую массу) белка дельта-эндотоксина (также называемого в данном документе "загрязняющий белок").

Нуклеотидные последовательности, кодирующие белки настоящего изобретения, включают последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 1-4, и ее варианты, фрагменты и комплементарные цепи. Под "комплементарной" подразумевают нуклеотидную последовательность, которая является достаточно комплементарной данной нуклеотидной последовательности, чтобы она могла гибридизоваться с заданной нуклеотидной последовательностью с образованием стабильного дуплекса. Соответствующие аминокислотные последовательности пестицидных белков, которые кодируются данными нуклеотидными последовательностями, изложены в SEQ ID NO: 5-26.

Молекулы нуклеиновых кислот, которые представляют собой фрагменты данных нуклеотидных последовательностей, кодирующих пестицидные белки, также включены в настоящее изобретение. Под "фрагментом" подразумевают часть нуклеотидной последовательности, кодирующей пестицидный белок. Фрагмент нуклеотидной последовательности может кодировать биологически активную часть пестицидного белка, или это может быть фрагмент, который может использоваться в качестве гибридизационного зонда или ПЦР-праймера с применением способов, которые раскрыты ниже. Молекулы нуклеиновых кислот, которые представляют собой фрагменты нуклеотидной последовательности, кодирующей пестицидный белок, содержат по меньшей мере примерно 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1350, 1400 смежных нуклеотидов, или число нуклеотидов, достигающее числа нуклеотидов, присутствующих в нуклеотидной последовательности полной длины, кодирующей пестицидный белок, раскрытый в данном документе, в зависимости от предполагаемого применения. Под "смежными" нуклеотидами подразумевают нуклеотидные остатки, которые непосредственно прилегают друг к другу. Фрагменты нуклеотидных последовательностей настоящего изобретения будут кодировать фрагменты белков, которые сохраняют биологическую активность пестицидного белка и, следовательно, сохраняют пестицидную активность. Таким образом, биологически-активные фрагменты полипептидов, раскрытых в данном документе, также включены в настоящее изобретение. Под выражением "сохраняет активность" подразумевают, что фрагмент будет обладать по меньшей мере примерно 30%, по меньшей мере примерно 50%, по меньшей мере примерно 70, 80, 90, 95% или более высокой пестицидной активностью пестицидного белка. В одном варианте осуществления пестицидная активность представляет

собой активность относительно жесткокрылых. В другом варианте осуществления пестицидная активность представляет собой активность относительно чешуекрылых. В другом варианте осуществления пестицидная активность представляет собой активность относительно нематод. В другом варианте осуществления пестицидная активность представляет собой активность относительно двукрылых. В другом варианте осуществления пестицидная активность представляет собой активность относительно полужесткокрылых. Способы измерения пестицидной активности хорошо известны в данной области техники. См., например, Czapla and Lang (1990) *J. Econ. Entomol.* 83:2480-2485; Andrews et al. (1988) *Biochem. J.* 252:199-206; Marrone et al. (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293; и патент США № 5743477, все из которых включены в данный документ во всей полноте посредством ссылки.

Фрагмент нуклеотидной последовательности, кодирующей пестицидный белок, который кодирует биологически активную часть белка данного изобретения, будет кодировать по меньшей мере примерно 15, 25, 30, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050 смежных аминокислот или вплоть до всего количества аминокислот, присутствующих в белке полной длины пестицидного белка данного изобретения. В некоторых вариантах осуществления фрагмент представляет собой фрагмент, образующийся в результате протеолитического расщепления. Например, фрагмент, образующийся в результате протеолитического расщепления, может иметь N-концевое или C-концевое усечение длиной по меньшей мере примерно 30 аминокислот, по меньшей мере примерно 40 аминокислот, по меньшей мере примерно 50, по меньшей мере примерно 100 аминокислот, примерно 120, примерно 130, примерно 140, примерно 150, примерно 160, примерно 170, примерно 180, примерно 190, примерно 200, примерно 210, примерно 220, примерно 230, примерно 240, примерно 250, примерно 275, примерно 300, примерно 350, примерно 400, примерно 450, примерно 500 или примерно 550 аминокислот относительно SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, или 7. В некоторых вариантах осуществления фрагменты, которые включены в данный документ, образованы в результате удаления C-концевого домена кристаллизации, например, путем протеолиза или путем вставки стоп-кодона в кодирующую последовательность. В некоторых вариантах осуществления фрагменты, которые включены в данный документ, образованы в результате удаления N-концевого сигнального пептида. N-концевые усеечения могут дополнительно включать в себя остаток метионина на N-конце.

Предпочтительные пестицидные белки настоящего изобретения кодируются нуклеотидной последовательностью, которая в достаточной степени идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1-4, или пестицидные белки в достаточной степени идентичны аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 5-26. Под выражением "в достаточной степени идентична" подразумевают аминокислотную или нуклеотидную последовательность, которая обладает по меньшей мере примерно 60% или 65% идентичностью последовательности, примерно 70% или 75% идентичностью последовательности, примерно 80% или 85% идентичностью последовательности, примерно 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более высокой идентичностью последовательности по сравнению с эталонной последовательностью, как показано с применением одной из программ выравнивания, описанных в данном документе, с применением стандартных параметров. Специалисту в данной области техники будет понятно, что эти значения могут быть соответствующим образом скорректированы для определения соответствующей идентичности белков, которые кодируются двумя нуклеотидными последовательностями, с учетом вырожденности кодонов, сходства аминокислот, позиционирования рамки считывания и т.п.

Для определения процента идентичности двух аминокислотных последовательностей или двух нуклеиновых кислот, последовательности выравнивают в целях оптимального сравнения. Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией от числа идентичных положений, общих для последовательностей (т.е. процент идентичности = число идентичных положений/общее число положений (например, перекрывающиеся положения)×100). В одном варианте осуществления две последовательности имеют одинаковую длину. В другом варианте осуществления процент идентичности рассчитывается по всей протяженности эталонной последовательности (т.е. последовательности, раскрываемой в данном документе, как любой из последовательностей SEQ ID NO: 1-26). Процент идентичности между двумя последовательностями может быть определен с применением методик, сходных с теми, которые описаны ниже, допуская гэпы в последовательности или не допуская их. При расчете процента идентичности, обычно подсчитывается число точных совпадений. Пропуск, т.е. положение при выравнивании, в котором остаток присутствует в одной последовательности, но не в другой, рассматривается как положение с неидентичными остатками.

Определение процента идентичности между двумя последовательностями может быть достигнуто с использованием математического алгоритма. Неограничивающим примером математического алгоритма, примененного для сравнения двух последовательностей является алгоритм, приведенный в публикации Karlin and Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264, модифицированный как в публикации Karlin and Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877. Такой алгоритм встроен в программы BLASTN и BLASTX по Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403. Поиски нуклеотидов BLAST могут осуществляться при помощи программы BLASTN, оценка = 100, длина слова = 12, для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных пестицидо-подобным молекулам нуклеиновых кислот настоящего изобретения. Поиски белков BLAST могут осуществляться при помощи программы

BLASTX, оценка = 50, длина слова = 3, для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных молекулам пестицидных белков настоящего изобретения. Для получения выравниваний с гэпами в целях сравнения, может применяться программа Gapped BLAST (в BLAST 2.0) как описано в Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389. В качестве альтернативы может применяться программа PSI-Blast для того, чтобы провести повторный поиск, который обнаруживает отдаленные связи между молекулами. См. Altschul et al. (1997) *supra*. При работе с программами BLAST, Gapped BLAST и PSI-Blast, могут применяться параметры по умолчанию, установленные для соответствующих программ (например, BLASTX и BLASTN). Выравнивание может также проводиться вручную путем сверки.

Другим неограничивающим примером математического алгоритма, используемым для сравнения последовательности, является алгоритм ClustalW (Higgins et al. (1994) *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680). ClustalW сравнивает последовательности и выравнивает всю протяженность последовательности аминокислоты или ДНК и таким образом может предоставить данные о консервативности для всей аминокислотной последовательности. Алгоритм ClustalW применяется в нескольких имеющихся на рынке пакетах программного обеспечения для анализа ДНК/аминокислот, в таких как модуль ALIGNX, входящий в пакет программ Vector NTI (Invitrogen Corporation, Карлсбад, штат Калифорния). После выравнивания аминокислотных последовательностей при помощи программы ClustalW, может быть оценен процент идентичности аминокислот. Неограничивающий пример компьютерных программ, которые применяются для анализа выравниваний ClustalW, включает GENEDOC™. GENEDOC™ (Karl Nicholas) позволяет провести оценку сходства и идентичности аминокислот (или ДНК) у многочисленных белков. Другим неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения последовательности, является алгоритм Myers and Miller (1988) CABIOS 4:11-17. Такой алгоритм интегрирован в программу ALIGN (версия 2.0), которая является частью пакета программ GCG Wisconsin Genetics, Версия 10 (может быть приобретена у Accelrys, Inc., 9685 Scranton Rd., Сан-Диего, Калифорния, США). При работе с программой ALIGN для сравнения аминокислотных последовательностей могут использоваться таблица замен остатков PAM120, штраф за продолжение гэпа, равный 12, и штраф за открытие гэпа, равный 4.

Если не указано иное, GAP Версия 10, которая использует алгоритм, описанный у Needleman и Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48(3):443-453, будет использована для определения идентичности или сходства последовательности, с использованием следующих параметров: % идентичности и % сходства для нуклеотидной последовательности с применением штрафа за открытие разрыва, равного 50 и штрафа за продолжение, равного 3, и матрицы весов выравнивания nwsgapdna.cmp; % идентичности или % сходства для аминокислотной последовательности с применением штрафа за открытие разрыва, равного 8, и штрафа за продолжение, равного 2, и программы BLOSUM62 программы подсчета баллов. Также могут использоваться эквивалентные программы. Под "эквивалентной программой" подразумевают любую программу для сравнения последовательностей, которая для любых двух сравниваемых последовательностей производит выравнивание, имеющее идентичные совпадения нуклеотидных остатков и идентичный процент идентичности последовательностей по сравнению с соответствующим выравниванием, полученным с использованием GAP Version 10.

Настоящее изобретение также охватывает варианты молекул нуклеиновых кислот. "Варианты" нуклеотидных последовательностей, кодирующих пестицидные белки, включают те последовательности, которые кодируют пестицидные белки, раскрываемые в данном документе, но которые различаются консервативно в связи с вырожденностью генетического кода, а также те последовательности, которые являются в достаточной степени идентичными, как обсуждалось выше. Аллельные варианты, возникающие в естественных условиях, могут быть идентифицированы с применением хорошо известных молекулярно-биологических методик, таких как методики полимеразной цепной реакции (ПЦР) и гибридизации, которые описаны ниже. Варианты нуклеотидных последовательностей также включают полученные синтетическим путем нуклеотидные последовательности, которые были созданы, например, с применением сайт-специфического мутагенеза, но которые еще кодируют пестицидные белки, раскрываемые в данном документе, как обсуждается ниже. Варианты белков, которые включены в настоящее изобретение, являются биологически активными, что означает, что они продолжают проявлять требуемую биологическую активность нативного белка, то есть, пестицидную активность. Под выражением "сохраняет активность" подразумевают, что вариант будет обладать по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 70% или по меньшей мере приблизительно 80% пестицидной активностью нативного белка. Способы измерения пестицидной активности хорошо известны в данной области техники. См., например, Czapla and Lang (1990) *J. Econ. Entomol.* 83: 2480-2485; Andrews et al. (1988) *Biochem. J.* 252:199-206; Marrone et al. (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293; и Патент США № 5743477, все из которых включены в данный документ во всей полноте посредством ссылки.

Опытному специалисту также будет понятно, что изменения могут быть внесены за счет мутаций нуклеотидных последовательностей настоящего изобретения, что тем самым приведет к изменениям в аминокислотной последовательности, кодирующей пестицидные белки, не изменяя биологической активности белков. Следовательно, варианты выделенных молекул нуклеиновых кислот могут быть созданы путем введения одной или нескольких нуклеотидных замен, вставок или делеций в соответствующей

нуклеотидной последовательности, раскрываемой в данном документе, таким образом, чтобы одна или несколько замен, вставок или делеций аминокислот были введены в кодируемый белок. Мутации могут вызываться с применением стандартных методик, таких как сайт-специфический мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. Такие варианты нуклеотидных последовательностей также включены в настоящее изобретение.

Например, консервативные аминокислотные замены могут быть осуществлены в одном или нескольких, предсказанных, заменимых аминокислотных остатках. "Заменимый" аминокислотный остаток представляет собой остаток, который может быть изменен по сравнению с последовательностью пестицидного белка дикого типа без изменений биологической активности, тогда как "незаменимый" аминокислотный остаток необходим для осуществления биологической активности. "Консервативная аминокислотная замена" является таковой, если аминокислотный остаток заменяется аминокислотным остатком, имеющим сходную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, обладающих сходными боковыми цепями, были определены в данной области техники. Данные семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин).

Дельта-эндотоксины, как правило, имеют пять консервативных доменов последовательностей и три консервативных структурных домена (см., например, de Maagd et al. (2001) *Trends Genetics* 17:193-199). Первый консервативный структурный домен содержит семь альфа-спиралей и связан со встраиванием в мембрану и образованием пор.

Домен II состоит из трех складчатых бета-слоев, которые упорядочены в структуре греческого ключа, а домен III состоит из двух анти-параллельных складчатых бета-слоев в структуре типа "jelly-roll" (de Maagd et al, 2001, см. выше). Домены II и III участвуют в узнавании и связывании рецепторов и, следовательно, считаются детерминантами специфичности токсина.

Аминокислотные замены могут быть осуществлены в неконсервативных участках, которые сохраняют функцию. В целом, такие замены не осуществляют для консервативных аминокислотных остатков, или для аминокислотных остатков, находящихся внутри консервативного мотива, где такие остатки являются незаменимыми для активности белка. Примеры остатков, которые являются консервативными и которые могут быть незаменимы для активности белка, включают, например, остатки, которые являются идентичными для всех белков, включенных в выравнивание последовательностей сходных или родственных токсинов, по отношению к последовательности настоящего изобретения (например, остатки, которые идентичны при выравнивании гомологичных белков). Примеры остатков, которые являются консервативными, но которые могут позволять консервативные аминокислотные замены и при этом сохранять активность, включают, например, остатки, которые имеют только консервативные замены для всех белков, включенных в выравнивание последовательностей сходных или родственных токсинов, по отношению к последовательности настоящего изобретения (например, остатки, которые имеют только консервативные замены для всех включенных в выравнивание гомологичных белков). Однако специалисту в данной области техники будет понятно, что функциональные варианты могут иметь незначительные консервативные или неконсервативные различия в консервативных остатках.

В качестве альтернативы, варианты нуклеотидных последовательностей могут быть получены путем индуцирования мутаций случайным образом по всей протяженности или части кодирующей последовательности, как, например, с применением насыщающего мутагенеза, и полученные в результате мутанты могут быть скринированы в отношении их способности обеспечивать пестицидную активность для выявления мутантов, сохраняющих активность. После индукции мутагенеза кодируемый белок может экспрессироваться рекомбинантно, а активность этого белка можно определить с использованием стандартных методик анализа.

С применением таких способов как ПЦР, гибридизация и т.п. можно идентифицировать соответствующие пестицидные последовательности, такие последовательности, которые обладают значительной идентичностью к последовательности настоящего изобретения. См., например, Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) и Innis, et al. (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, NY).

При использовании способа гибридизации вся пестицидная нуклеотидная последовательность или ее часть могут использоваться для скрининга кДНК или геномных библиотек. Способы конструирования такой кДНК и геномных библиотек в целом известны в данной области техники и раскрыты в Sambrook and Russell, 2001, *supra*. В качестве так называемых гибридизационных зондов могут выступать фрагменты геномной ДНК, фрагменты кДНК, фрагменты РНК или другие олигонуклеотиды, и они могут быть мечены детектируемой группой, такой как 32Р, или любым другим детектируемым маркером, таким как другие радиоактивные изотопы, флуоресцентное соединение, фермент или кофактор фермента. Зонды для гибридизации могут быть получены путем введения метки в синтетические олигонуклеотиды на ос-

нове известной нуклеотидной последовательности, кодирующей пестицидный белок, раскрываемой в данном документе. Дополнительно могут использоваться вырожденные праймеры, сконструированные на основе консервативных нуклеотидов или аминокислотных остатков в нуклеотидной последовательности или кодируемой аминокислотной последовательности. Зонд обычно содержит участок нуклеотидной последовательности, который гибридизируется в жестких условиях по меньшей мере с примерно 12, по меньшей мере примерно 25, по меньшей мере примерно 50, 75, 100, 125, 150, 175 или 200 последовательными нуклеотидами нуклеотидной последовательности, кодирующей пестицидный белок настоящего изобретения или его фрагмент или вариант. Способы получения зондов для гибридизации в целом известны в данной области техники и раскрыты в Sambrook and Russell, 2001, *supra*, включены в данном документе посредством ссылки.

Например, целая пестицидная последовательность, раскрываемая в данном документе, или одна или несколько ее частей, могут использоваться в качестве зонда, способного к специфической гибридизации с соответствующими последовательностями, подобным последовательностям пестицидного белка, и молекулами информационных РНК. Для достижения специфической гибридизации при различных условиях, такие зонды содержат последовательности, которые являются уникальными и предпочтительно имеют в длину по меньшей мере примерно 10 нуклеотидов или по меньшей мере примерно 20 нуклеотидов. Такие зонды могут использоваться для амплификации соответствующих пестицидных последовательностей из выбранного организма с помощью ПЦР. Данную методику можно применять для выделения дополнительных кодирующих последовательностей из требуемого организма или в качестве диагностического анализа для определения присутствия кодирующей последовательности в организме. Методики гибридизации включают гибридизационный скрининг высевных на чашки библиотек ДНК (в виде бляшек или колоний; см., например, Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York).

Таким образом, настоящее изобретение включает зонды для гибридизации, а также нуклеотидные последовательности способные к гибридизации всей или части нуклеотидной последовательности настоящего изобретения (например, длиной по меньшей мере примерно 300 нуклеотидов, по меньшей мере примерно 400, по меньшей мере примерно 500, 1000, 1200, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500 или до полной длины нуклеотидной последовательности, раскрываемой в данном документе). Гибридизация таких последовательностей может осуществляться в строгих условиях. Под выражением "жесткие условия" или "жесткие условия гибридизации" подразумевают условия, при которых зонд будет гибридизоваться со своей целевой последовательностью до более высокой детектируемой степени, чем с другими последовательностями (например, по меньшей мере в 2 раза выше фонового уровня). Строгие условия зависят от последовательности и будут различаться при разных обстоятельствах. Контролируя строгость условий гибридизации и/или отмывания, могут быть идентифицированы целевые последовательности, которые на 100% комплементарны зонду (гомологичное зондирование). В качестве альтернативы, условия жесткости могут быть скорректированы для предоставления возможности возникновения несоответствия в последовательности для того, чтобы более низкие степени сходства могли быть детектированы (гетерологичное зондирование). В целом, зонд имеет длину менее примерно 1000 нуклеотидов, предпочтительно менее 500 нуклеотидов.

Как правило, жесткими условиями будут такие, в которых концентрация солей составляет менее примерно 1,5 М ионов Na, обычно от примерно 0,01 до 1,0 М ионов Na (или других солей) при pH от 7,0 до 8,3, а температура составляет по меньшей мере примерно 30°C для коротких зондов (например, от 10 до 50 нуклеотидов) и по меньшей мере примерно 60°C для длинных зондов (например, более 50 нуклеотидов). Строгих условий можно также достичь добавлением дестабилизирующих средств, таких как формамид. Иллюстративные условия низкой жесткости включают гибридизацию с буферным раствором, содержащим от 30 до 35% формамида, 1М NaCl, 1% SDS (додецилсульфат натрия) при 37°C, и отмывание в SSC от 1X до 2X (20X SSC = 3,0М NaCl/0,3 М тринатрийцитрат) при 50-55°C. Иллюстративные условия средней жесткости включают гибридизацию с раствором, содержащим от 40 до 45% формамида, 1,0М NaCl, 1% SDS при 37°C, и отмывание в SSC от 0,5X до 1X SSC при 55-60°C. Типичные условия высокой жесткости включают гибридизацию с раствором, содержащим 50% формамида, 1М NaCl, 1% SDS при температуре 37°C, и отмывание в 0,1X SSC при 60-65°C. Необязательно, буферы для отмывания могут включать от примерно 0,1% до примерно 1% SDS. Продолжительность гибридизации составляет в целом менее примерно 24 ч, обычно от примерно 4 до примерно 12 ч.

Специфичность, как правило, зависит от отмываний после гибридизации, при которых наиболее важными факторами являются ионная сила и температура конечного раствора для отмывания. Для ДНК-ДНК гибридов, значение  $T_m$  может быть аппроксимировано из уравнения Meinkoth and Wahl (1984) *Anal. Biochem.* 138:267-284:  $T_m = 81,5^\circ\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\%GC) - 0,61 (\% \text{ form}) - 500/L$ ; где M - это молярность моновалентных катионов, %GC - это процентное содержание гуанозин-содержащих и цитозин-содержащих нуклеотидов в ДНК, % form - это процентное содержание формамида в растворе для гибридизации, а L - длина гибрида в паре оснований.  $T_m$  - это температура (при заданной ионной силе и pH), при которой 50% комплементарной целевой последовательности гибридизуется с идеально соответствующим зондом.  $T_m$  снижается примерно на 1°C при нарушении соответствия на каждый 1%; таким



образом,  $T_m$ , условия гибридизации и/или отмывания могут быть скорректированы для гибридизации с последовательностями с требуемой степенью идентичности. Например, при проведении поиска последовательностей с >90% идентичностью,  $T_m$  может быть снижена на 10°C. В целом, жесткие условия выбирают таким образом, чтобы температура была примерно на 5°C ниже точки плавления ( $T_m$ ) для конкретной последовательности и комплементарной ей цепи при заданных значениях ионной силы и pH. Однако очень жесткие условия могут использовать гибридизацию и/или отмывание при температуре на 1, 2, 3 или 4°C ниже точки плавления ( $T_m$ ); условия средней жесткости могут использовать гибридизацию и/или отмывание при температуре на 6, 7, 8, 9 или 10°C ниже точки плавления ( $T_m$ ); условия низкой степени строгости могут использовать гибридизацию и/или отмывание при температуре на 11, 12, 13, 14, 15 или 20°C ниже точки плавления ( $T_m$ ). С применением уравнения, композиций для гибридизации и отмывания и требуемой  $T_m$ , среднему специалисту в данной области техники будет понятно, что вариации в степени жесткости условий гибридизации и/или растворов для отмывания в сущности описаны. Если требуемая степень несоответствия приводит к  $T_m$  менее 45°C (водный раствор) или 32°C (раствор формамида), то предпочтительным является повышение концентрации с тем, чтобы могла использоваться более высокая температура. Подробное руководство по гибридизации нуклеиновых кислот приведено в Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Part I, Chapter 2 (Elsevier, New York); и Ausubel et al., eds. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 2 (Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York). См. Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York).

#### Выделенные белки и их варианты и фрагменты

Пестицидные белки также охвачены в настоящем изобретении. Под "пестицидным белком" подразумевают белок, имеющий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 5-26. Их фрагменты, биологически активные части и варианты также представлены и могут использоваться для осуществления на практике способов настоящего изобретения. Выражение "выделенный белок" или "рекомбинантный белок" применяют в отношении белка, который более не находится в своих естественных условиях, а находится, например, в системе *in vitro* или в рекомбинантной бактериальной или растительной клетке-хозяине.

"Фрагменты" или "биологически активные части" включают фрагменты полипептида, который содержит аминокислотные последовательности, в достаточной степени идентичные аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 5-26, и проявляющие пестицидную активность. Биологически активной частью пестицидного белка может быть полипептид длиной, 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 части могут быть получены с использованием рекомбинантных методик и оценены в отношении пестицидной активности. Способы измерения пестицидной активности хорошо известны в данной области техники. См., например, Czapla and Lang (1990) *J. Econ. Entomol.* 83:2480-2485; Andrews et al. (1988) *Biochem. J.* 252:199-206; Marrone et al. (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293; и патент США № 5743477, все из которых включены в данный документ во всей полноте посредством ссылки. Как используется в данном документе, фрагмент содержит по меньшей мере 8 смежных аминокислот из SEQ ID NO: 5-26. Вместе с тем, настоящее изобретение охватывает другие фрагменты, такие как любой фрагмент в белке, длиной более 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.

Под "вариантами" подразумевают белки или полипептиды, имеющие аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 60%, 65%, приблизительно на 70%, 75%, приблизительно на 80%, 85%, приблизительно на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности любой из последовательностей SEQ ID NO: 5-26. Варианты также включают полипептиды, кодируемые молекулой нуклеиновой кислоты, которая гибридизируется с молекулой нуклеиновой кислоты из SEQ ID NO: 1-4 или комплементарной ей цепью в жестких условиях. Варианты включают полипептиды, которые различаются аминокислотными последовательностями в результате мутагенеза. Варианты белков, которые охвачены в настоящем изобретении, являются биологически активными, то есть они продолжают сохранять требуемую биологическую активность нативного белка, то есть, сохраняют пестицидную активность. В некоторых вариантах осуществления варианты обладают улучшенной активностью относительно нативного белка. Способы измерения пестицидной активности хорошо известны в данной области техники. См., например, Czapla and Lang (1990) *J. Econ. Entomol.* 83:2480-2485; Andrews et al. (1988) *Biochem. J.* 252:199-206; Marrone et al. (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293; и патент США № 5743477, все из которых включены в данный документ во всей полноте посредством ссылки.

Гены бактерий, такие как гены *ahp1* данного изобретения, довольно часто имеют несколько метионинных инициаторных кодонов, расположенных в близости к началу открытой рамки считывания. Часто инициация трансляции в одном или нескольких из данных стартовых кодонов будет приводить к образованию функционального белка. Данные стартовые кодоны могут включать в своем составе ATG-кодона. Однако бактерии, такие как *Bacillus* sp. также узнают кодон GTG в качестве стартового кодона,

и белки, которые инициируют трансляцию в GTG-кодонах, содержат метионин в качестве первой аминокислоты. В редких случаях трансляция в бактериальных системах может начинаться в TTG-кодоне, хотя в данном случае TTG кодирует метионин. Кроме того, часто не определено изначально какие из данных кодонов используются в естественных условиях в бактерии. Таким образом, понятно, что применение одного из альтернативных метиониновых кодонов может также приводить к созданию пестицидных белков. Эти пестицидные белки охвачены в настоящем изобретении и могут применяться в способах настоящего изобретения. Будет понятно, что при экспрессии в растениях, необходимо будет изменить альтернативный стартовый кодон на ATG для прохождения трансляции соответствующим образом.

В различных вариантах осуществления настоящего изобретения пестицидные белки содержат последовательности, выведенные от нуклеотидных последовательностей полной длины, раскрываемых в данном документе, и аминокислотные последовательности, которые короче последовательностей полной длины за счет использования расположенного ниже альтернативного участка начала трансляции. Таким образом, нуклеотидная последовательность настоящего изобретения и/или векторы, клетки-хозяева и растения, содержащие нуклеотидную последовательность настоящего изобретения (и способы получения и применения нуклеотидной последовательности настоящего изобретения) могут содержать нуклеотидную последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 24, 25 и 26.

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

Таким образом, один аспект настоящего изобретения касается антител, одноцепочечных антиген-связывающих молекул или других белков, которые специфически связываются с одним или несколькими белками или пептидными молекулами настоящего изобретения и их гомологами, слияния или фрагментами. В особенно предпочтительном варианте осуществления, антитело специфично связывается с белком, имеющим аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 5-26, или ее фрагментом. В другом варианте осуществления антитело специфично связывается с белком слияния, содержащим аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 5-26, или ее фрагмент.

Антитела настоящего изобретения могут применяться для количественного или качественного определения содержания белка или пептидной молекулы настоящего изобретения или обнаружения пост-трансляционных модификаций белков. Как используется в данном документе, об антителе или пептиде сказано, что они "специфично связываются" с молекулой белка или пептида настоящего изобретения, если такое связывание не полностью ингибируется присутствием неродственных молекул.

Антитела настоящего изобретения могут содержаться в наборе, применяемом для обнаружения молекул белка или пептида данного изобретения. Изобретение дополнительно охватывает способ обнаружения молекулы белка или пептида данного изобретения (в частности, белка, кодируемого аминокислотной последовательностью, изложенной в SEQ ID NO: 5-26, включая его варианты или фрагменты, способные специфично связываться с антителом данного изобретения), включающий в себя приведение в контакт образца с антителом данного изобретения и определение того, содержит ли образец молекулу белка или пептида данного изобретения. Способ применения антител для обнаружения интересующего белка или пептида известны в данной области техники.

#### Измененные или улучшенные варианты

Известно, что последовательности ДНК пестицидного белка могут быть изменены с использованием различных способов, и что эти изменения могут привести к образованию последовательности ДНК, кодирующей белки с аминокислотными последовательностями, отличающимися от тех, которые кодируют пестицидные белки настоящего изобретения. Данный белок может быть изменен различными способами, включая аминокислотные замены, делеции, усечения и вставки одной или нескольких аминокислотных последовательностей из SEQ ID NO: 5-26, включая до 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. Способы проведения таких манипуляций в целом известны в данной области техники. Например, варианты аминокислотной последовательности пестицидного белка могут быть получены с применением мутаций в ДНК. Это может также быть достигнуто с применением одной из нескольких разновидностей мутагенеза и/или путем направленного развития. В некоторых аспектах изменения, кодируемые аминокислотными последовательностями, не будут оказывать существенного влияния на функцию белка. Такие варианты будут обладать требуемой пестицидной активностью. Однако понятно, что способность пестицидного белка обеспечивать пестицидную активность может быть улучшена путем применения таких методик к композициям настоящего изобретения. Например, можно экспрессировать

пестицидный белок в клетках-хозяевах, которые проявляют высокие уровни ошибок встраивания оснований при репликации ДНК, такие как XL-1 Red (Stratagene, Ла-Хойя, Калифорния). После размножения в таких штаммах, можно выделить ДНК (например, путем получения плазмидной ДНК или путем амплифицирования с помощью ПЦР и клонирования полученного в результате ПЦР-фрагмента в вектор), провести культивирование пестицидного белка с мутациями в немутагенном штамме, и идентифицировать мутировавшие гены с пестицидной активностью, например путем проведения анализа для исследования пестицидной активности. В целом, белок смешивается и применяется в анализах скармливания. См., например Marrone et al. (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293. Такие анализы могут включать приведения растения в контакт с одним или несколькими вредителями и определение способности растения к выживанию и/или способности вызывать гибель вредителей. Примеры мутаций, которые приводят к повышению токсичности, обнаруживаются в Schnepf et al. (1998) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:775-806.

В качестве альтернативы могут быть внесены изменения в последовательность многих белков в области amino- или карбокси-конца, не оказывая при этом существенного влияния на активность. Такие изменения могут включать вставки, делеции или изменения, индуцированные с применением современных молекулярных способов, таких как ПЦР, в том числе ПЦР-амплификации, которые изменяют или удлиняют последовательность, кодирующую белок, за счет вставок последовательностей, кодирующих аминокислоты, в олигонуклеотиды, используемые в ПЦР-амплификации. В качестве альтернативы, добавленные последовательности белков могут содержать целые последовательности, кодирующие белок, такие как те, которые обычно применяются в данной области техники для получения белков слияния. Такие белки слияния часто используют (1) для повышения экспрессии белка, представляющего интерес, (2) введения домен связывания, ферментативной активности или эпитопа для того, чтобы облегчить очистку белка, детектирование белка или для других целей экспериментального применения, известных в данной области техники, (3) направления секреции или трансляции белка в субклеточную органеллу, такую как периплазматическое пространство грамотрицательных бактерий, эндоплазматический ретикулум эукариотических клеток, при этом последнее часто приводит к гликозилированию белка.

Варианты нуклеотидных и аминокислотных последовательностей настоящего изобретения также охватывают последовательности полученные с применением процедур, приводящих к рекомбинации, и вызывающих образование мутаций, таких как перестановка в ДНК. При выполнении такой методики могут использоваться один или несколько различных участков, кодирующих пестицидные белки, для создания нового пестицидного белка, обладающего требуемыми свойствами. Таким образом, библиотеки рекомбинантных полинуклеотидов создают из популяции родственных последовательностей полинуклеотидов, которые содержат участки последовательности, обладающей существенной идентичностью и могут быть гомологично рекомбинированы *in vitro* или *in vivo*. Например, с применением данного подхода мотивы последовательностей, кодирующие домен, представляющий интерес, могут быть подвергнуты перестановке между геном, определяющим пестицидную активность, настоящего изобретения и другими известными пестицидными генами для получения нового гена, кодирующего последовательность белка интереса с улучшенным свойством, как, например, с повышенной инсектицидной активностью. Стратегии такой перестановки в ДНК известны в данной области техники. См., например, Stemmer (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-10751; Stemmer (1994) *Nature* 370:389-391; Cramer et al. (1997) *Nature Biotech.* 15:436-438; Moore et al. (1997) *J. Mol. Biol.* 272:336-347; Zhang et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4504-4509; Cramer et al. (1998) *Nature* 391:288-291; и патенты США № 5605793 и № 5837458.

Перемещение или перестановка доменов является еще одним механизмом создания измененных пестицидных белков. Домены могут перемещаться между пестицидными белками, приводя к образованию гибридных или химерных токсинов с улучшенной пестицидной активностью или различными целевыми характеристиками. Способы создания рекомбинантных белков и их исследования в отношении пестицидной активности хорошо известны в данной области техники (см., например, Naimov et al. (2001) *Appl. Environ. Microbiol.* 67:5328-5330; de Maagd et al. (1996) *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1537-1543; Geetal. (1991) *J. Biol. Chem.* 266:17954-17958; Schnepf et al. (1990) *J. Biol. Chem.* 265:20923-20930; Rang et al. 91999) *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2918-2925).

#### Векторы

Пестицидная последовательность настоящего изобретения, может быть представлена в экспрессионной кассете для экспрессии в растении, представляющем интерес. Под "растительной экспрессионной кассетой" подразумевают ДНК-конструкцию, которая способна приводить к экспрессии белка из открытой рамки считывания в клетке растения. Обычно они содержат промотор и кодирующую последовательность. Часто такие конструкции будут также содержать а 3'-нетранслируемый участок. Такие конструкции могут содержать "сигнальную последовательность" или "лидерную последовательность" для облегчения котрансляционного или посттрансляционного транспорта пептида к определенным внутриклеточным структурам, таким как хлоропласт (или другая пластида), эндоплазматический ретикулум или комплекс Гольджи.

Под "сигнальной последовательностью" подразумевают последовательность, для которой известно или предполагается, что она приводит к ко-трансляционному или посттрансляционному транспорту пеп-

тидов через клеточную мембрану. У эукариот она обычно связана с секрецией в аппарате Гольджи, с некоторой степенью имеющего в результате место гликозилирования. Инсектицидные токсины бактерий часто синтезируются в качестве протоксина, которые протеолитически активируются в кишечнике целевого насекомого (Chang (1987) *Methods Enzymol.* 153:507-516). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сигнальная последовательность локализована в нативной последовательности, или может быть получена из последовательности настоящего изобретения. Под "лидерной последовательностью" подразумевают любую последовательность, которая при трансляции приводит к образованию аминокислотной последовательности, достаточной для запуска котрансляционного транспорта пептидной цепи к субклеточной органелле. Таким образом, лидерные последовательности включают в своем составе лидерные последовательности, оказывающие направленное воздействие на транспорт и/или гликозилирование за счет прохождения в эндоплазматический ретикулум, прохождения в вакуоли, пластиды, в том числе хлоропласты, митохондрии и подобные.

Под "растительным трансформационным вектором" подразумевают молекулу ДНК, которая необходима для эффективной трансформации клетки растения. Такая молекула может содержать одну или несколько растительных экспрессионных кассет и может быть организована в более чем одну "векторную" молекулу ДНК. Например, бинарные векторы представляют собой растительные трансформационные векторы, которые используют два несмежных ДНК-вектора для кодирования всех требуемых функций с активностью в цис- и транс-положениях для трансформации растительных клеток (Hellens и Mullineaux (2000) *Trends in Plant Science* 5:446-451). Выражение "вектор" относится к конструкции нуклеиновой кислоты, предназначенной для переноса между разными клетками-хозяевами. "Вектором экспрессии" называется вектор, который обладает способностью вводить, интегрировать и экспрессировать последовательности гетерологичной ДНК или ее фрагменты в чужеродной клетке. Кассета будет иметь в своем составе 5' и/или 3' регуляторные последовательности, функционально связанные с последовательностью настоящего изобретения. Под "функционально связанным" подразумевают функциональное сцепление между последовательностью промотора и второй последовательностью, где последовательность промотора инициирует и опосредует транскрипцию последовательности ДНК, соответствующей второй последовательности. В целом, выражение "функционально связанный" означает, что сцепленные нуклеотидные последовательности являются смежными и, в тех случаях, когда необходимо объединить два участка, кодирующие белок, они являются смежными и находятся в одной и той же рамке считывания. Кассета может дополнительно содержать по меньшей мере один дополнительный ген, подлежащий котрансформации в организм. В качестве альтернативы, дополнительный ген(ы) могут доставлять множеством экспрессионных кассет.

В различных вариантах осуществления нуклеотидная последовательность настоящего изобретения является функционально связанный с промотором, например, с растительным промотором. "Промотором" называется нуклеотидная последовательность, функция которой заключается в управлении транскрипцией нижележащей кодирующей последовательности. Промотор вместе с другими транскрипционными и трансляционными регуляторными нуклеотидными последовательностями (которые также называются "контрольными последовательностями") необходимы для экспрессии последовательности ДНК, представляющей интерес.

Такая экспрессионная кассета обеспечивается множеством участков рестрикции для вставки пестицидной последовательности, подлежащей транскрипционной регуляции регуляторными участками.

Экспрессионная кассета будет иметь в своем составе в 5'-3' направлении транскрипции участок инициации транскрипции и трансляции (т.е. промотор), ДНК-последовательность настоящего изобретения и участок терминации трансляции и транскрипции (т.е. участок терминации), функционирующий в растении. Промотор может быть нативным или аналогичным, или может быть чужеродным или гетерологичным по отношению к растению-хозяину и/или к последовательности ДНК настоящего изобретения. Дополнительно, промотор может представлять собой естественную последовательность или, в качестве альтернативы, синтетическую последовательность. Там, где промотор является "нативным" или "гомологичным" по отношению к растению-хозяину, подразумевают, что промотор обнаруживается в нативном растении, в которое вводят этот промотор. Там, где промотор является "чужеродным" или "гетерологичным" по отношению к последовательности ДНК настоящего изобретения, подразумевают, что промотор не является нативным или возникающим в естественных условиях для функционально связанной последовательности ДНК настоящего изобретения.

Участок выражения может быть нативным с участком инициации транскрипции, может быть нативным с функционально связанной последовательностью ДНК, представляющей интерес, может быть нативным с растением-хозяином, или может быть получен из другого источника (т.е. чужеродным или гетерологичным по отношению к промотору, последовательности ДНК, представляющей интерес, растению-хозяину или любой их комбинации). Подходящие участки терминации могут быть получены из *Ti*-плазмиды *A. tumefaciens*, такие как участки терминации октопинсинтазы и нопаинсинтазы. См. также Guerin et al. (1991) *Mol. 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.

В требуемых случаях ген(ы) могут быть оптимизированы для повышения экспрессии в трансформированной клетке-хозяине. Таким образом, гены могут быть синтезированы с использованием предпочтительных для клетки-хозяина кодонов для улучшения экспрессии, или могут быть синтезированы с использованием кодонов при частоте использования кодонов, предпочтительных для клетки-хозяина. В целом, содержание GC в гене повысится. См., например, Campbell and Gowri (1990) *PlantPhysiol.* 92:1-11, где приводятся обсуждения применения предпочтительных для клетки-хозяина кодонов. В данной области техники существуют способы синтеза предпочтительных для растения генов. См., например, патенты США № 5380831 и № 5436391, публикацию патента США № 20090137409 и Murray et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:477-498, которые включены в данный документ посредством ссылки.

В одном варианте осуществления пестицидный белок направляют в хлоропласт для экспрессии. Таким образом, в тех случаях, где пестицидный белок не вводится непосредственно в хлоропласт, экспрессионная кассета будет дополнительно содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую транзитный пептид, направляющий пестицидный белок в хлоропласты. Такие транзитные пептиды известны в данной области техники. См., например, Von Heijne et al. (1991) *Plant Mol. Biol. Rep.* 9:104-126; Clark et al. (1989) *J. Biol. Chem.* 264:17544-17550; Della-Cioppa et al. (1987) *Plant Physiol.* 84:965-968; Romer et al. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196:1414-1421; и Shah et al. (1986) *Science* 233:478-481.

Ген, определяющий пестицидную активность, который должен быть направлен в хлоропласт, может быть оптимизирован для экспрессии в хлоропласте для учета различия в использовании кодона в ядре растения и этой органелле. Таким образом, нуклеиновые кислоты, представляющие интерес, могут быть синтезированы с использованием кодонов, предпочтительных для хлоропластов. См., например, патент США № 5380831, который включен в данный документ посредством ссылки.

#### Трансформация растений

Способы настоящего изобретения включают введение нуклеотидного конструкта в растение. Под "введением" подразумевают обеспечение растения нуклеотидной конструкцией таким образом, чтобы конструкция получила доступ к внутреннему пространству клетки растения. Способы настоящего изобретения не требуют применения конкретного способа введения нуклеотидной конструкции в растение, а лишь для того, чтобы нуклеотидная конструкция получила доступ к внутреннему пространству по меньшей мере одной клетки растения. В данной области техники известны способы введения нуклеотидных конструкций в растения, включая, но без ограничений, способы стабильной трансформации, способы временной трансформации и способы, опосредованные вирусами.

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

"Трансгенные растения" или "трансформированные растения" или "стабильно трансформированные" растения или клетки или ткани относятся к растениям, которые имеют введенные или интегрированные в растительную клетку экзогенные нуклеотидные последовательности или фрагменты ДНК. Данные нуклеотидные последовательности имеют в своем составе такие, которые являются экзогенными, или не представлены в нетрансформированной растительной клетке, а также такие, которые могут быть эндогенными, или присутствовать в нетрансформированной растительной клетке. Выражение "гетерологичный" в целом относится к нуклеотидным последовательностям, которые не являются эндогенными по отношению к клетке или не являются частью нативного генома, в котором они присутствуют, и которые были внесены в клетку путем заражения, трансфекции, микроинъекции, электропорации, бомбардировки микрочастицами и т.п.

Трансгенные растения настоящего изобретения экспрессируют одну или несколько новых последовательностей токсинов, раскрываемых в данном документе. В различных вариантах осуществления трансгенное растение дополнительно содержит один или несколько дополнительных генов устойчивости к насекомым (например, Cry1, такие как представители семейств Cry1A, Cry1B, Cry1C, Cry1D, Cry1E и Cry1F; Cry2, такой как представитель семейства Cry2A; Cry9, такие как представители семейств Cry9A, Cry9B, Cry9C, Cry9D, Cry9E и Cry9F и т.д.). Специалисту в данной области техники будет понятно, что трансгенное растение может содержать любой ген, сообщающий сельскохозяйственный признак, представляющий интерес.

Трансформация растительных клеток может быть осуществлена с применением одного или нескольких методов, известных в данной области техники. Ген, определяющий пестицидную активность, настоящего изобретения может быть модифицирован для получения или повышения экспрессии в клетках растений. Как правило, конструкт, который экспрессирует такой белок, содержит промотор, регулирующий транскрипцию гена, а также 3' нетранслируемый участок, который обеспечивает терминирование транскрипции и полиаденилирование. Структура таких конструктов хорошо известна в данной области техники. В некоторых случаях, целесообразным может быть конструирование гена таким образом, что будет приводить к секреции синтезируемого в результате пептида или другому направленному действию в клетке растения. Например, ген может быть сконструирован таким образом, чтобы содержать сигналь-

ный пептид для облегчения переноса пептида в эндоплазматический ретикулум. Также предпочтительным может быть конструирование содержащей интрон экспрессионной кассеты таким образом, что иРНК-процессинг данного интрона требуется для экспрессии.

Как правило, данная "растительная экспрессионная кассета" будет введена в "растительный трансформирующий вектор". Данный растительный трансформирующий вектор может содержать один или несколько ДНК-векторов, необходимых для достижения трансформации растения. Например, обычной практикой в данной области техники является использование растительных трансформирующих векторов, которые содержат более одного смежного сегмента ДНК. В данной области техники эти векторы часто называют "бинарными векторами." Бинарные векторы, также как векторы с хелперными плазмидами наиболее часто используются для *Agrobacterium*-опосредованной трансформации, где размер и суммарная длина сегментов ДНК, необходимых для достижения эффективной трансформации, являются достаточно большими, и целесообразно разделить функции по отдельным молекулам ДНК. Бинарные векторы, как правило, содержат плазмидный вектор, который содержит действующие в цис-положении последовательности, необходимые для переноса Т-ДНК (такие как расположенные на левой границе и на правой границе фрагмента), селективируемый маркер, который сконструирован таким образом, чтобы быть способным к экспрессии в клетке растения, и "ген, представляющий интерес," (ген, сконструированный таким образом, чтобы быть способным к экспрессии в растительной клетке, для которой требуется создание трансгенных растений). Также в данном плазмидном векторе присутствуют последовательности, необходимые для репликации бактерий. Действующие в цис-положении последовательности организованы таким образом, который обеспечивает эффективный перенос в растительные клетки и экспрессии в них. Например, ген селективируемого маркера и ген, определяющий пестицидную активность, локализованы между левой и правой границами. Часто второй плазмидный вектор содержит действующие в транс-положении факторы, которые опосредуют перенос Т-ДНК из *Agrobacterium* в растительные клетки. Плазмида часто содержит гены вирулентности (гены *Vir*), которые обеспечивают инфицирование растительных клеток *Agrobacterium* и перенос ДНК путем расщепления в области пограничных последовательностей и *vir*-опосредованный перенос ДНК, как известно в данной области техники (Hellens and Mullineaux (2000) *Trends in Plant Science* 5:446-451). Несколько типов штаммов *Agrobacterium* (например, LBA4404, GV3101, EHA101, EHA105 и т.д.) могут быть использованы для трансформации растений. Второй плазмидный вектор не является необходимым для трансформации растения с применением других способов, таких как бомбардировка микрочастицами, микроинъекция, электропорация, трансфекция с помощью полиэтиленгликоля и т.д.

В целом, способы трансформации растений включают перенос гетерологичной ДНК в целевые растительные клетки (например, в незрелые или зрелые зародыши, суспензионные культуры, недифференцированный каллус, протопласты и т.д.), с последующим применением соответствующего отбора с максимальным пороговым уровнем соответствующего отбора (в зависимости от селективируемого маркерного гена) для того, чтобы выделить трансформированные растительные клетки из группы нетрансформированной клеточной массы. Эксплантаты обычно переносят в свежую порцию такой же культуральной среды и культивируют стандартно. Далее трансформированные клетки дифференцируются в побеги после помещения их на регенерационную среду, в которую добавлено средство для селекции в концентрации максимального порогового уровня. Побеги затем переносят на селективный субстрат для укоренения растений для укоренения побега или саженца. Трансгенный саженец затем вырастает в зрелое растение и производит фертильные семена (например, Hiei et al. (1994) *The Plant Journal* 6:271-282; Ishida et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14:745-750). Эксплантаты, как правило, переносят в свежую порцию такой же культуральной среды и стандартно культивируют. Общее описание методик и способов получения трансгенных растений приведено в Ayres and Park (1994) *Critical Reviews in Plant Science* 13:219-239 и Bommineni and Jauhar (1997) *Maydica* 42:107-120. Поскольку трансформированный материал содержит многочисленные клетки; как трансформированные, так и нетрансформированные клетки присутствуют в любой части обработанного целевого каллуса или ткани или группы клеток. Способность вызывать гибель нетрансформированных клеток и позволять пролиферацию трансформированных клеток позволяет получить культуры трансформированных растений. Часто, способность к удалению нетрансформированных клеток является ограничением для быстрого выделения трансформированных растительных клеток и успешного создания трансгенных растений.

Протоколы трансформации, а также протоколы для введения нуклеотидных последовательностей в растения могут варьировать в зависимости от типа растения или клетки растения, т.е. однодольные или двудольные, предназначенных для трансформации. Создание трансгенных растений можно осуществлять с применением одного из нескольких способов, включая, но без ограничений, микроинъекцию, электропорацию, направленный перенос генов, введение гетерологичной ДНК с помощью *Agrobacterium* в растительные клетки (*Agrobacterium*-опосредованная трансформация), бомбардировка растительных клеток конъюгированной с частицами гетерологичной чужеродной ДНК, способом ускоренных частиц, трансформация с применением аэрозольного пучкового инжектора (опубликованная заявка на патент США № 20010026941; патент США № 4945050; международная публикация № WO 91/00915; опубликованная заявка на патент США № 2002015066), *Lec1*-трансформация и различные другие способы переноса ДНК,

не опосредованные прямым введением частиц.

Способы для трансформации хлоропластов известны в данной области техники. См., например, Svab et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:8526-8530; Svab and Maliga (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:913-917; Svab and Maliga (1993) *EMBO J.* 12:601-606. Данный способ основан на использовании генной пушки для доставки ДНК, содержащей селективируемый маркер, и направленного введения ДНК в геном пластиды посредством гомологичной рекомбинации. Дополнительно, трансформация пластид может быть достигнута с помощью транс-активации молчащего, пластидного трансгена за счет ткане-предпочтительной экспрессии пластидной, ядерной РНК-полимеразы. Такая система описана в McBride et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:7301-7305.

После интеграции гетерологичной чужеродной ДНК в растительные клетки используют соответствующий отбор с максимальным пороговым уровнем соответствующего отбора в среде, чтобы вызвать гибель нетрансформированных клеток и отделить, а также вызвать пролиферацию предположительно трансформированных клеток, которые выживают в результате данной селекционной обработки, производя регулярный перенос клеток в свежую среду. Посредством непрерывного пассажа и введения соответствующего средства для отбора идентифицируют и стимулируют пролиферацию клеток, которые были трансформированы с помощью плазмидного вектора. Молекулярные и биохимические способы затем могут быть использованы для подтверждения присутствия интегрированного гетерологичного гена, представляющего интерес, в геноме трансгенного растения.

Клетки, которые были трансформированы, могут быть выращены в растения в соответствии с общепринятыми способами. См., например, McCormick et al. (1986) *Plant Cell Reports* 5:81-84. Данные растения затем можно выращивать и либо опылять такой же трансформированной линией, либо другой линией, и полученный в результате гибрид, обладающий конститутивной экспрессией требуемой фенотипической характеристики, может быть идентифицирован. Два или более поколений могут быть выращены для того, чтобы удостовериться, что экспрессия требуемого фенотипического признака стабильно сохраняется и наследуется, а затем семена собирают для того, чтобы удостовериться, что экспрессия желаемого фенотипического признака была достигнута. Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает трансформированные семена (также называемые "трансгенные семена"), содержащие нуклеотидную конструкцию настоящего изобретения, например, экспрессионную кассету настоящего изобретения, стабильно встроенную в их геном.

#### Оценка трансформации растений

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

ПЦР-анализ представляет собой экспресс-методику скрининга трансформированных клеток, ткани или побегов на присутствие введенного гена на более ранней стадии до пересаживания в почву (Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). ПНР осуществляют с использованием олигонуклеотидных праймеров, специфичных к гену, представляющему интерес, или фону вектора *Agrobacterium* и т.д.

Трансформацию растений можно подтвердить с помощью Саузерн-блот анализа геномной ДНК (Sambrook and Russell, 2001, *supra*). В целом, общую ДНК экстрагируют из трансформанта, расщепляют с помощью соответствующих рестрикционных ферментов, фракционируют в агарозном геле и переносят на нитроцеллюлозную или нейлоновую мембрану. Мембрану или "блот" далее исследуют с помощью, например, меченого радиоактивным Р фрагментом целевой ДНК для подтверждения интеграции введенного гена в геном растений согласно стандартным методикам (Sambrook and Russell, 2001, *см. выше*).

В ходе нозерн-блот анализа выделяют РНК из специальных тканей трансформанта, фракционируют в агарозном геле, содержащем формальдегид, и переносят на нейлоновый фильтр согласно стандартным методам, которые регулярно используют в данной области техники (Sambrook and Russell, 2001, *supra*). Затем исследуют экспрессию РНК, кодируемую геном, определяющим пестицидную активность, путем гибридизации на фильтре с радиоактивным зондом, полученной из пестицидного гена, посредством способов, известных в данной области техники (Sambrook and Russell, 2001, *supra*).

Подтверждение присутствия белка, кодируемого геном, определяющим пестицидную активность, можно осуществлять на трансгенных растениях с использованием стандартных процедур вестерн-блота, биохимических анализов и им подобных на трансгенных растениях (Sambrook and Russell, 2001, *supra*) с использованием антител, которые связываются с одним или несколькими эпитопами, присутствующими на пестицидном белке.

#### Пестицидная активность у растений

В другом аспекте настоящего изобретения можно создать трансгенные растения, в которых экспрессируется пестицидный белок, который обладает пестицидной активностью. Для создания трансгенных растений можно использовать способы, описанные выше в качестве примера, но способ, по которому получают трансгенные растительные клетки, не является критически важным для настоящего изобретения. На усмотрение экспериментатора можно применять способы, известные или описанные в данной области техники, такие как *Agrobacterium*-опосредованная трансформация, биолистическая трансформа-

ция и способы, не опосредованные частицами. Растения, экспрессирующие пестицидный белок, можно выделить посредством общеизвестных способов, описанных в данной области техники, например, посредством трансформации каллюса, отбора трансформированного каллюса и регенерации плодоносного растения из такого трансгенного каллюса. В ходе такого способа можно использовать любой ген в качестве селективируемого маркера при условии, что его экспрессия в растительных клетках предоставит возможность для идентификации или селекции трансформированных клеток.

Для применения в растительных клетках был разработан целый ряд маркеров, таких, как устойчивость к хлорамфениколу, аминогликозиду G418, гигромицину или им подобным. Также в качестве селективируемых маркеров можно использовать другие гены, которые кодируют продукт, вовлеченный в метаболизм хлоропластов. Например, отдельное использование могут найти гены, которые обеспечивают устойчивость к гербицидам для растений, таким как глифосат, бромоксинил или имидазолинон. Такие гены были описаны в литературе (Stalker et al. (1985) *J. Biol. Chem.* 263:6310-6314 (нитрилазный ген устойчивости к бромоксинилу); и Sathasivan et al. *Acids Res.* 18:2188 (AHAS imidazolinone resistance gene)). Дополнительно гены, раскрытые в данном документе, являются пригодными в качестве маркеров для оценки трансформации бактериальных или растительных клеток. Способы обнаружения присутствия трансгена в растении, органе растения (например, листьях, стеблях, корнях и т.д.), семени, растительной клетке, ростке, зародыше или их потомстве хорошо известны в данной области техники. В одном варианте осуществления присутствие трансгена обнаруживают путем исследования пестицидной активности.

Плодоносные растения, в которых экспрессируется пестицидный белок, можно исследовать на пестицидную активность, и для дальнейшего скрещивания можно проводить селекцию растений, в которых проявляется оптимальная активность. В данной области техники доступны способы анализа на пестицидную активность. Обычно белок перемешивают и используют в анализах скармливания. Смотрите, например Marrone et al. (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293.

Настоящее изобретение можно применять для трансформации любого вида растений, включая, но без ограничений, однодольные и двудольные растения. Примеры представляющих интерес растений включают, но без ограничений, кукурузу (маис), сорго, пшеницу, подсолнечник, помидор, крестоцветные, перцевые, картофель, хлопчатник, рис, сою, сахарную свеклу, сахарный тростник, табак, ячмень и масличный рапс, *Brassica* sp., люцерну, рожь, просо, сафлор, земляные орехи, сладкий картофель, маниок, кофейное дерево, кокос, ананас, цитрусовые деревья, дерево какао, чайный куст, банан, авокадо, фиговое дерево, гуаву, манговое дерево, маслину, папайю, кешью, макадамию, миндаль, овсяные, овощи, декоративные растения и хвойные.

Овощи включают, но без ограничений, помидоры, латук, зеленую фасоль, фасоль лима, виды гороха и представителей рода *Cucumis*, таких как огурец, канталупа и мускусная дыня. Декоративные растения включают, но без ограничений, азалию, гортензию, гибискус, розы, тюльпаны, желтые нарциссы, петунию, гвоздику, пуансеттию и хризантему. Предпочтительно растения настоящего изобретения представляют собой культурные растения (например, маис, сорго, пшеницу, подсолнечник, помидор, крестоцветные, перцевые, картофель, хлопчатник, рис, сою, сахарную свеклу, сахарный тростник, табак, ячмень, масличный рапс и т.д.).

#### Применение в борьбе с вредителями

В данной области техники известны общие способы использования штаммов, содержащих нуклеотидную последовательность настоящего изобретения или ее вариант, в качестве пестицидных средств в борьбе с вредителями или при создании других организмов. Смотрите, например, патент США № 5039523 и EP 0480762 A2.

Штаммы *Bacillus*, содержащие нуклеотидную последовательность настоящего изобретения или ее вариант, или микроорганизмы, которые генетически изменяли таким образом, чтобы они содержали ген, определяющий пестицидную активность, по настоящему изобретению и белок, можно применять для защиты сельскохозяйственных культур и продуктов от вредителей. В одном аспекте настоящего изобретения, цельные, т.е. нелизированные клетки организма, продуцирующего токсин (пестицид), обрабатывают реактивами, которые пролонгируют активность токсина, продуцируемого в клетке, когда клетку помещают в среду целевого вредителя (вредителей).

В качестве альтернативы, пестицид получают за счет введения гена, определяющего пестицидную активность, в клетку-хозяина. Экспрессия гена, определяющего пестицидную активность, прямо или косвенно приводит к внутриклеточной продукции и поддержанию уровня пестицида. В одном аспекте настоящего изобретения данные клетки затем обрабатывают в условиях, которые пролонгируют активность токсина, продуцируемого в клетке, когда клетку помещают в среду целевого вредителя (вредителей). Полученный в результате продукт сохраняет токсичность, характерную для токсина. Из этих инкапсулированных естественным образом пестицидов можно затем составить препарат в соответствии с традиционными методиками для внесения в среду обитания целевого вредителя, например, почву, воду и на листву растений. Смотрите, например, EPA 0192319 и ссылки, цитируемые в нем. В качестве альтернативы, можно составить препарат из клеток, экспрессирующих ген данного изобретения, таким образом, чтобы обеспечить применение полученного в результате материала в качестве пестицида.

Активные ингредиенты настоящего изобретения обычно наносят в форме композиций, и их можно



наносить одновременно или последовательно с другими соединениями на посевную площадь или растение, подлежащее обработке. Этими соединениями могут быть удобрения, гербициды, криопротекторы, поверхностно-активные вещества, детергенты, пестицидные мыла, масла, используемые в период покоя, полимеры и/или составы из медленно высвобождающихся или биоразлагаемых носителей, которые дают возможность долгосрочного дозированного высвобождения в целевой области после разового внесения состава. Они также могут представлять собой селективные гербициды, химические инсектициды, вируциды, микробициды, амебициды, пестициды, фунгициды, бактерициды, нематоциды, моллюскоциды или смеси нескольких из данных препаратов, если требуется, вместе с дополнительными сельскохозяйственно-приемлемыми носителями, поверхностно-активными веществами или вспомогательными веществами, способствующими нанесению, которые обычно используют в данной области составления. Подходящие носители и вспомогательные вещества могут быть твердыми или жидкими и соответствуют веществам, которые обычно используют в технологии составления, например, натуральные или восстановленные минеральные вещества, растворители, диспергирующие вещества, смачивающие средства, вещества, придающие липкость, связывающие вещества или удобрения. Подобным образом, составы можно получить в форме съедобных "приманок", или им можно придать форму "ловушек" для вредителей, чтобы обеспечить возможность скормливания целевому вредителю или попадания внутрь него пестицидного состава.

Способы нанесения активного ингредиента настоящего изобретения или агрохимической композиции настоящего изобретения, которая содержит по меньшей мере один из пестицидных белков, продуцируемых бактериальными штаммами настоящего изобретения, включают нанесение на листья, покрытие семян и внесение в почву. Количество нанесений и норма нанесения зависит от интенсивности заражения соответствующим вредителем.

Композицию можно составлять в виде порошка, дуста, пеллеты, гранулы, аэрозоля эмульсии, коллоида, раствора или им подобных и можно получить посредством таких традиционных способов, как сушка, лиофилизация, гомогенизация, экстракция, фильтрация, центрифугирование, осаждение или концентрирование культуры клеток, включающих полипептид. Во всех таких композициях, которые содержат по меньшей мере один такой пестицидный полипептид, данный полипептид может присутствовать в концентрации (в массовых долях) от примерно 1% до примерно 99%.

С помощью способов настоящего изобретения на данной площади можно уничтожить или снизить количества чешуекрылых, полужесткокрылых, двукрылых или жесткокрылых вредителей, или могут быть использованы профилактически в окружающей среде для предотвращения заражения чувствительным вредителем. Предпочтительно вредитель проглатывает или контактирует с пестицидно-эффективным количеством полипептида. Под "пестицидно-эффективным количеством" подразумевают количество пестицида, которое способно вызывать гибель по меньшей мере одного вредителя или заметно ограничивать рост вредителя, питание или нормальное физиологическое развитие. Данное количество будет изменяться в зависимости от таких факторов как, например, конкретные целевые вредители, подлежащими контролю, конкретная окружающая среда, местонахождение, растение, культура или сельскохозяйственный участок, подлежащий обработке, условия окружающей среды и способ, норма, концентрация, стабильность и количество нанесения полипептидной композиции, обеспечивающей пестицидный эффект. Составы можно также изменять с учетом климатических условий, воздействия на окружающую среду и/или частоты нанесения и/или тяжести заражения вредителями.

Описанные пестицидные композиции можно приготовить путем составления препарата либо из бактериальной клетки, кристалла и/или суспензии спор, либо из выделенного белкового компонента с требуемым сельскохозяйственно-приемлемым носителем. Композиции могут быть составлены до введения с помощью соответствующих способов, таких как лиофилизация, высушивание сублимацией, сушка, или в водном носителе, среде или подходящем разбавителе, таком как солевой раствор или другой буфер. Составленные композиции могут быть в форме дуста или гранулированного материала, или суспензии в масле (растительном или минеральном), или водных, или масляных/водных эмульсий, или в качестве смачивающегося порошка, или в комбинации с любым другим веществом-носителем, подходящим для применения в области сельского хозяйства. Подходящие носители для сельского хозяйства могут быть твердыми или жидкими, и они хорошо известны в данной области техники. Выражение "сельскохозяйственно-приемлемый носитель" охватывает все вспомогательные вещества инертные компоненты, диспергирующие вещества, поверхностно-активные вещества, вещества, придающие липкость, связывающие вещества и т.д., которые обычно применяют в технологии составления пестицидных препаратов; они хорошо известны специалистам в данной области составления пестицидных препаратов. Данные составы можно смешивать с одним или несколькими твердыми или жидкими вспомогательными веществами и получать различными способами, например, путем равномерного смешивания, перемешивания и/или измельчения пестицидной композиции с подходящими вспомогательными веществами с применением традиционных методик составления. Подходящие составы и способы нанесения описаны в патенте США № 6468523, который включен в данный документ посредством ссылки.

"Вредитель" включает, но без ограничений, насекомых, грибы, бактерии, нематод, клещей, иксодовых клещей и им подобных. Насекомые-вредители включают насекомых, выбранных из отрядов Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Mallophaga, Homoptera, Hemiptera, Orthoptera, Thysanoptera, Der-

maptera, Isoptera, Anoplura, Siphonaptera, Trichoptera и т.д., в частности, Coleoptera, Lepidoptera и Diptera.

Отряд Coleoptera включает подотряды Adepaga и Polyphaga. Подотряд Adepaga включает надсемейства Caraboidea и Gyrimoidea, в то время как подотряд Polyphaga включает надсемейства Hydrophiloidea, Staphylinioidea, Cantharoidea, Cleroidea, Elateroidea, Dascilloidea, Dryopoidea, Byrrhoidea, Cucujoidea, Meloidea, Mordelloidea, Tenebrionoidea, Bostrichoidea, Scarabaeoidea, Cerambycoidea, Chrysomeloidea и Curculionoidea. Надсемейство Caraboidea включает семейства Cicindelidae, Carabidae и Dytiscidae. Надсемейство Gyrimoidea включает семейство Gyrimidae. Надсемейство Hydrophiloidea включает семейство Hydrophilidae. Надсемейство Staphylinioidea включает семейства Silphidae и Staphylinidae. Надсемейство Cantharoidea включает семейства Cantharidae и Lampyridae. Надсемейство Cleroidea включает семейства Cleridae и Dermestidae. Надсемейство Elateroidea включает семейства Elateridae и Buprestidae. Надсемейство Cucujoidea включает семейство Coccinellidae. Надсемейство Meloidea включает семейство Meloidae. Надсемейство Tenebrionoidea включает семейство Tenebrionidae. Надсемейство Scarabaeoidea включает семейства Passalidae и Scarabaeidae. Надсемейство Cerambycoidea включает семейство Cerambycidae. Надсемейство Chrysomeloidea включает семейство Chrysomelidae. Надсемейство Curculionoidea включает семейства Curculionidae и Scolytidae.

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

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

Нематоды включают паразитические нематоды, такие как клубеньковые, цистообразующие и поражающие нематоды, включающие Heterodera spp., Meloidogyne spp. и Globodera spp.; в частности, представителей цистообразующих нематод, включая, но без ограничений, Heterodera glycines (соевую цистообразующую нематоду); Heterodera schachtii (свекловичную цистообразующую нематоду); Heterodera avenae (зерновую цистообразующую нематоду); и Globodera rostochiensis и Globodera pallida (картофельные цистообразующие нематоды). Поражающие нематоды включают Pratylenchus spp.

Полужесткокрылые вредители (которые включают виды, обозначаемые как Hemiptera, Homoptera или Heteroptera) включают, но без ограничений, Lygus spp., такие как западный луговой клоп (Lygus hesperus), клоп луговой (Lygus lineolaris) и люцерновый клоп (Lygus elisus); тлю растительную, такую как зеленая персиковая тля (Myzus persicae), хлопковая тля (Aphis gossypii), вишневая тля или черешневая тля (Myzus cerasi), соевая тля (Aphis glycines Matsumura); цикадку темную (Nilaparvata lugens) и рисовую зеленую цикадку (Nephotettix spp.); и щитников, таких как зеленый щитник (Acrosternum hilare), клоп-щитник мраморный (Halyomorpha halys), южный зеленый щитник (Nezara viridula), рисовый щитник (Oebalus pugnax), щитник красноногий (Pentatoma rufipes), европейский щитник (Rhopalosiphum maidis) и щитник троилус Troilus luridus.

Насекомые-вредители по настоящему настоящего изобретению для основных культур включают: маис: Ostrinia nubilalis, европейского кукурузного мотылька; Agrotis ipsilon, совку-ипсилон; Helicoverpa zea, кукурузную совку; Spodoptera frugiperda, совку травяную; Diatraea grandiosella, огневку кукурузную юго-западную; Elasmopalpus lignosellus, зернового точильщика; Diatraea saccharalis, огневку сахарного тростника; Diabrotica virgifera, западного кукурузного корневого жука; Diabrotica longicornis barberi, северного кукурузного корневого жука; Diabrotica undecimpunctata howardi, южного кукурузного корневого жука; Melanotus spp., жуков-щелкунов; Cyclocephala borealis, хрущика северного (личинку хруща); Cyclocephala immaculata, хрущика южного (личинку хруща); Popillia japonica, хрущика японского; Chaetocnema pulicaria, земляную кукурузную блошку; Sphenophorus maidis, кукурузного долгоносика; Rhopalosiphum maidis, кукурузную листовую тлю; Anuraphis maidiradicis, кукурузную корневую тлю; Blissus leucopterus leucopterus, клопа-черепашку пшеничного североамериканского; Melanoplus femurrubrum, красноногую кобылку; Melanoplus sanguinipes, мигрирующую кобылку; Hylemya platura, личинку ростковой мухи; Agromyza parvicornis, моль-пестрянку кукурузную; Anaphothrips obscurus, трипса злакового; Solenopsis milesta, муравья-вора; Tetranychus urticae, обыкновенного паутиного клеща; Сорго: Chilo partellus, соргового точильщика; Spodoptera frugiperda, совку травяную; Helicoverpa zea, кукурузную совку; Elasmopalpus lignosellus, маленького точильщика стебля кукурузы; Feltia subterranea, гусеницу озимой совки; Phyllophaga crinita, личинку майского жука; Eleodes, Conoderus и Aeolus spp., проволочников; Oulema melanopus, пшеницу красногрудую; Chaetocnema pulicaria, кукурузную блошку; Sphenophorus maidis, кукурузного долгоносика; Rhopalosiphum maidis, кукурузную листовую тлю; Siphia flava, желтую тлю сахарного тростника; Blissus leucopterus leucopterus, клопа-черепашку пшеничного североамериканского; Contarinia sorghicola, галлицу сорговую; Tetranychus cinnabarinus, красного паутиного клеща;

*Tetranychus urticae*, обыкновенного паутинного клеща; пшеница: *Pseudaletia unipunctata*, совку луговую; *Spodoptera frugiperda*, совку травяную; *Elasmopalpus lignosellus*, маленького точильщика стебля кукурузы; *Agrotis orthogonia*, прямоугольную совку; *Elasmopalpus lignosellus*, маленького точильщика стебля кукурузы; *Oulema melanopus*, пьявицу краснотелую; *Hypera punctata*, долгоносика листового клеверного; *Diabrotica undecimpunctata howardi*, южного кукурузного корневого жука; русскую пшеничную тлю; *Schizaphis graminum*, обыкновенную злаковую тлю; *Macrosiphum avenae*, большую злаковую тлю; *Melanoplus femurrubrum*, красноногую кобылку; *Melanoplus differentialis*, отличительную кобылку; *Melanoplus sanguinipes*, мигрирующую кобылку; *Mayetiola destructor*, гессенскую муху; *Sitodiplosis mosellana*, оранжевую злаковую галлицу; *Meromyza americana*, личинку американской меромизы; *Hylemya coarctata*, озимую муху; *Frankliniella fusca*, табачного трипса; *Cephus cinctus*, хлебного пилильщика; *Aceria tulipae*, луковичного клеща тюльпанов; Подсолнечник: *Suleima helianthana*, подсолнечниковую почковую листовертку; *Homoeosoma electellum*, подсолнечниковую огневку; *zygogramma exclamationis*, подсолнечниковую восклицательную совку; *Bothyrus gibbosus*, морковного жука; *Neolasioptera murtfeldtiana*, галлицу семян подсолнечника; Хлопчатник: *Heliothis virescens*, хлопчатниковую листовертку; *Helicoverpa zea*, хлопковую совку; *Spodoptera exigua*, совку малую; *Pectinophora gossypiella*, розового коробочного червя хлопчатника; *Anthonomus grandis*, хлопкового долгоносика; *Aphis gossypii*, хлопковую тлю; *Pseudatomoscelis seriatus*, хлопкового слепняка; *Trialeurodes abutilonea*, хлопковую белокрылку; *Lycus lineolaris*, травяного клопа; *Melanoplus femurrubrum*, красноногую кобылку; *Melanoplus differentialis*, отличительную кобылку; *Thrips tabaci*, трипса табачного; *Frankliniella fusca*, табачного трипса; *Tetranychus cinnabarinus*, красного паутинного клеща; *Tetranychus urticae*, обыкновенного паутинного клеща; рис: *Diatraea saccharalis*, точильщика сахарного тростника; *Spodoptera frugiperda*, совку травяную; *Helicoverpa zea*, кукурузную совку; листогрыза вида *Colaspis brunnea*; *Lissorhoptrus oryzophilus*, рисового водяного долгоносика; *Sitophilus oryzae*, рисового долгоносика; *Nephotettix nigropictus*, рисовую цикадку; *Blissus leucopterus leucopterus*, клопа-черепашку пшеничного североамериканского; *Acrosternum hilare*, зеленого клопа-щитника; соя: *Pseudoplusia includens*, соевую пяденицу; *Anticarsia gemmatilis*, гусеницу совки бархатных бобов; *Plathypena scabra*, зеленого вредителя клевера; *Ostrinia nubilalis*, европейского кукурузного мотылька; *Agrotis ipsilon*, совку-ипсилон; *Spodoptera exigua*, совку малую; *Heliothis virescens*, хлопковую листовертку; *Helicoverpa zea*, кукурузную совку; *Epilachna varivestis*, мексиканскую бобовую зерновку; *Myzus persicae*, зеленую персиковую тлю; *Empoasca fabae*, цикадку картофельную; *Acrosternum hilare*, зеленого клопа-щитника; *Melanoplus femurrubrum*, красноногую кобылку; *Melanoplus differentialis*, отличительную кобылку; *Hylemya platura*, личинку ростковой мухи; *Sericothrips variabilis*, трипса соевого; *Thrips tabaci*, трипса лукового; *Tetranychus turkestanii*, туркестанского паутинного клеща; *Tetranychus urticae*, обыкновенного паутинного клеща; ячмень: *Ostrinia nubilalis*, европейского кукурузного мотылька; *Agrotis ipsilon*, совку-ипсилон; *Schizaphis graminum*, обыкновенную злаковую тлю; *Blissus leucopterus leucopterus*, клопа-черепашку пшеничного североамериканского; *Acrosternum hilare*, зеленого клопа-щитника; *Euschistus servus*, коричневого клопа-щитника; *Delia platura*, личинку ростковой мухи; *Mayetiola destructor*, гессенскую муху; *Petrobia latens*, петровию многоядную; масляный рапс: *Brevicoryne brassicae*, капустную тлю; *Phyllotreta cruciferae*, блошку крестоцветную; *Mamestra configurata*, совку латуковую; *Plutella xylostella*, капустную совку; *Delia* spp., личинок весенней капустной мухи.

Нематоды включают паразитические нематоды, такие как клубеньковые, цистообразующие и поражающие нематоды, включающие *Heterodera* spp., *Meloidogyne* spp. и *Globodera* spp.; в частности, представителей цистообразующих нематод, включая, но без ограничений, *Heterodera glycines* (соевую цистообразующую нематоду); *Heterodera schachtii* (свекловичную цистообразующую нематоду); *Heterodera avenae* (зерновую цистообразующую нематоду); и *Globodera rostochiensis* и *Globodera pailida* (картофельные цистообразующие нематоды). Поражающие нематоды включают *Pratylenchus* spp.

#### Способы повышения урожайности растений

Обеспечиваются способы повышения урожайности растений. Способы включают обеспечение растения или растительной клетки, которые экспрессируют полинуклеотид, кодирующий последовательность пестицидного полипептида, раскрытого в данном документе, и выращивание растения или полученного из него семени в поле, зараженном (или подверженном заражению) вредителем, относительно которого указанный полипептид обладает пестицидной активностью. В некоторых вариантах осуществления полипептид обладает пестицидной активностью относительно чешуекрылого, жесткокрылого, двукрылого, полужесткокрылого или нематоды вредителя, а указанное поле заражено чешуекрылым, полужесткокрылым, жесткокрылым, двукрылым или нематодой вредителем. Как определено в данном документе, "урожайность" растения относится к качеству и/или количеству биомассы, производимой растением. Под "биомассой" подразумевают любой оцениваемый продукт растительного происхождения. Повышение продукции биомассы представляет собой любое улучшение измеряемого выхода продукта растительного происхождения. Повышение урожайности растений имеет несколько коммерческих применений. Например, повышение биомассы листьев растений может повысить урожайность листовых овощей для потребления людьми или животными. Дополнительно повышение биомассы листьев можно применять для повышения производства фармацевтических или промышленных продуктов растительного происхождения. Повышение урожайности может включать любое статистически значимое повышение

ние, включая, но без ограничений, повышение по меньшей мере на 1%, повышение по меньшей мере на 3%, повышение по меньшей мере на 5%, повышение по меньшей мере на 10%, повышение по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 100% или более значительное повышение урожайности по сравнению с растением, в котором не экспрессируется последовательность пестицидного белка. При использовании конкретных способов урожайность растений повышается в результате повышения устойчивости к вредителям растения, в котором экспрессируется пестицидный белок, раскрытый в данном документе. Экспрессия пестицидного белка приводит к снижению способности вредителя к заражению или поеданию.

Растения можно также обрабатывать одним или несколькими химическими композициями, содержащими один или несколько гербицидов, инсектицидов или фунгицидов. Иллюстративные химические композиции включают: гербициды для фруктов/овощей: атразин, бромацил, диурон, глифосат, линурон, метрибузин, симазин, трифлуралин, флуазифоп, глюфосинат, галосульфурон Gowan, паракват, пропизамид, сетоксидим, бутафенацил, галосульфурон, индазифлам; инсектициды для фруктов/овощей: алдикарб, *Bacillus thuringiensis*, карбарил, карбофуран, хлорпирифос, циперметрин, дельтаметрин, абамектин, цифлутрин/бета-цифлутрин, эсфенвалерат, лямбда-цигалотрин, ацеквиноцил, бифеназат, метоксифенозид, новалурон, хромафенозид, тиаклоприд, динотефуран, флуащрипирим, спиродиклофен, гамма-цигалотрин, спиромезифен, спиносад, ринаксипир, циазипир, трифлумурон, спиротетрамат, имидаклоприд, флубендиамид, тиодикарб, метафлумизон, сульфосафлор, цифлуметофен, цианопирафен, клотианидин, тиаметоксам, спинеторам, тиодикарб, флониамид, метиокарб, эмаектин бензоат, индоксакарб, фенамифос, пирипроксифен, фенбутатин оксид; фунгициды для фруктов/овощей: аметоктрадин, азокси-стробин, бентиаваликарб, боскалид, каптан, карбендазим, хлороталонил, медь, циазофамид, цифлufenамид, цимоксанил, ципроконазол, ципродинил, дифеноконазол, диметоморф, дитианон, фенамидон, фенгексамид, флуазинам, флудиоксонил, флуопиколид, флуопирам, флуоксастробин, флуксапироксад, фолпет, фосетил, ипродион, ипроваликарб, изопиразам, крезоксим-метил, манкоцеб, мандипропамид, металаксил/мефеноксам, метирам, метрафенон, миклобутанил, пенконазол, пентиопирад, пикоксистробин, пропамокарб, пропиконазол, пропинеб, проквиназид, протиоконазол, пираклостробин, пириметанил, квиноксифен, спирокамин, сера, тебуконазол, тиофанат-метил, трифлуксистробин; гербициды для зерновых: 2,4-D, амидосульфурон, бромоксинил, карфентразон-этил, хлоротолурон, хлорсульфурон, клодинафоп-, клопиралид, дикамба, диклофоп-метил, дифлufenикан, феноксапроп, флорасулам, флукарбазон-натрий, флуфенацет, флупиросульфурон-М, флуороксипир, флуртамон, глифосат, йодосульфурон, иоксинил, изопротурон, МСРА, месосульфурон, метсульфурон, пендиметалин, пиноксаден, пропоксикарбазон, просульфокарб, пироксулам, сульфосульфурон, тифенсульфурон, тралоксидим, триасульфурон, трибенурон, трифлуралин, тритосульфурон; фунгициды для зерновых: азоксистробин, бикафен, боскалид, карбендазим, хлороталонил, цифлufenамид, ципроконазол, ципродинил, димоксистробин, эпоксиконазол, фенпропидин, фенпропиморф, флуопирам, флуоксастробин, флуковинконазол, флуксапироксад, изопиразам, крезоксим-метил, метконазол, метрафенон, пентиопирад, пикоксистробин, прохлораз, пропиконазол, проквиназид, протиоконазол, пираклостробин, квиноксифен, спирокамин, тебуконазол, тиофанат-метил, трифлуксистробин; инсектициды для зерновых: диметоат, лямбда-цигалотрин, дельтаметрин, альфа-циперметрин, бифентрин, имидаклоприд, клотианидин, тиаметоксам, тиаклоприд, ацетамиприд, динетофуран, хлорпирифос, пиримикарб, метиокарб, сульфосафлор; гербициды для маиса: атразин, алахлор, бромоксинил, ацетохлор, дикамба, клопиралид, (S-)диметенамид, глюфосинат, глифосат, изоксафлютол, (S-)метолахлор, мезотрион, никосульфурон, примисульфурон, римсульфурон, сулкотрион, форамсульфурон, топрамезон, темботрион, сафлufenацил, тиенкарбазон, флуфенацет, пироксасульфен; инсектициды для маиса: карбофуран, хлорпирифос, бифентрин, фипронил, имидаклоприд, лямбда-цигалотрин, тефлутрин, тербуфос, тиаметоксам, клотианидин, спиромезифен, флубендиамид, трифлумурон, ринаксипир, дельтаметрин, тиодикарб, б-цифлутрин, циперметрин, бифентрин, люфенурон, тебупиримфос, этипрол, циазипир, тиаклоприд, ацетамиприд, динетофуран, авермектин; фунгициды для маиса: азоксистробин, бикафен, боскалид, ципроконазол, димоксистробин, эпоксиконазол, фенитропан, флуопирам, флуоксастробин, флуксапироксад, изопиразам, метконазол, пентиопирад, пикоксистробин, пропиконазол, протиоконазол, пираклостробин, тебуконазол, трифлуксистробин; гербициды для риса: бутахлор, пропанил, азимсульфурон, бенсульфурон, цигалофоп, даимурон, фентразамид, имазосульфурон, мефенацет, оксазикломефон, пиразосульфурон, пирибутикарб, квинклолак, тиобенкарб, инданофан, флуфенацет, фентразамид, галосульфурон, оксазикломефон, бензобициклон, пирифталид, пеноксулам, биспирибак, оксадиаргил, этоксисульфурон, претилахлор, мезотрион, тефурилтрион, оксадиазон, феноксапроп, пиримисульфен; инсектициды для риса: диазинон, фенобукарб, бенфуракарб, бупрофезин, динотефуран, фипронил, имидаклоприд, изопрокарб, тиаклоприд, хромафенозид, клотианидин, этипрол, флубендиамид, ринаксипир, дельтаметрин, ацетамиприд, тиаметоксам, циазипир, спиносад, спинеторам, эмаектин-бензоат, циперметрин, хлорпирифос, этофенпрокс, карбофуран, бенфуракарб, сульфосафлор; фунгициды для риса: азоксистробин, карбендазим, карпропамид, диклоцимет, дифеноконазол, эдифенфос, феримзон, гентамицин, гексаконазол, гимексазол, ипробенфос (IBP), изопропиолан, изотианил, касугамицин, манкоцеб, метоминостробин, орикастробин, пенцикурон, пробена-

зол, пропиконазол, пропинеб, пироквилон, тебуконазол, тиофанат-метил, тиадинил, трициклазол, трифлуксистробин, валидамицин; гербициды для хлопчатника: диурон, флуометурон, MSMA, оксифлуорфен, прометрин, трифлуралин, карфентразон, клетодим, флуазифоп-бутил, глифосат, норфлуразон, пендиметалин, пиритиобак-натрий, трифлуксисульфурон, тепралоксидим, глюфосинат, флумиоксазин, тидиазурон; инсектициды для хлопчатника: ацефат, алдикарб, хлорпирифос, циперметрин, дельтаметрин, абамектин, ацетамиприд, эмаектин бензоат, имидаклоприд, индоксакарб, лямбда-цигалотрин, спиносад, тиодикарб, гамма-цигалотрин, спиромесифен, пиридалил, флониамид, флубендиамид, трифлумурон, ринакиспир, бета-цифлутрин, спиротетрамат, клотианидин, тиаметоксам, тиаклоприд, динетофуран, флубендиамид, циазипир, спиносад, спиноторам, гамма-цигалотрин, 4-[[[(6-хлорпиридин-3-ил)метил](2,2-дифторэтил)амино]фуран-2(5H)-он, тиокарб, авермектин, флониамид, пиридалил, спиромесифен, сульфоксафлор; фунгициды для хлопчатника: азоксистробин, биксафен, боскалид, карбендазим, хлороталонил, медь, ципроконазол, дифеноконазол, димоксистробин, эпоксиконазол, фенамидон, флуазилам, флуопирам, флуоксастробин, флуксапироксад, ипродион, изопиразам, изотианил, манкоцеб, манеб, метоминостробин, пентиопирад, пикоксистробин, пропинеб, протиоконазол, пираклостробин, квинтозен, тебуконазол, тетраконазол, тиофанат-метил, трифлуксистробин; гербициды для сои: алахлор, бентазон, трифлуралин, хлоримурон-этил, хлорансулам-метил, феноксапроп, фомесафен, флуазифоп, глифосат, имазамокс, имазаквин, имазетапир, (S-)метолахлор, метрибузин, пендиметалин, тепралоксидим, глюфосинат; инсектициды для сои: лямбда-цигалотрин, метомил, имидаклоприд, клотианидин, тиаметоксам, тиаклоприд, ацетамиприд, динетофуран, флубендиамид, ринакиспир, циазипир, спиносад, спиноторам, эмаектин-бензоат, фипронил, этипрол, дельтаметрин,  $\beta$ -цифлутрин, гамма- и лямбда-цигалотрин, 4-[[[(6-хлорпиридин-3-ил)метил](2,2-дифторэтил)амино]фуран-2(5H)-он, спиротетрамат, спинодиклофен, трифлумурон, флониамид, тиодикарб, бета-цифлутрин; фунгициды для сои: азоксистробин, биксафен, боскалид, карбендазим, хлороталонил, медь, ципроконазол, дифеноконазол, димоксистробин, эпоксиконазол, флуазилам, флуопирам, флуоксастробин, флутриафол, флуксапироксад, изопиразам, ипродион, изотианил, манкоцеб, манеб, метконазол, метоминостробин, миклобутанил, пентиопирад, пикоксистробин, пропиконазол, пропинеб, протиоконазол, пираклостробин, тебуконазол, тетраконазол, тиофанат-метил, трифлуксистробин; гербициды для сахарной свеклы: хлоридазон, десмедифам, этофумезат, фенмедифам, триаллат, клопиралид, флуазифоп, ленацил, метамитрон, квинмерак, циклоксидим, трифлусульфурон, тепралоксидим, хизалофоп; инсектициды для сахарной свеклы: имидаклоприд, клотианидин, тиаметоксам, тиаклоприд, ацетамиприд, динетофуран, дельтаметрин,  $\beta$ -цифлутрин, гамма/лямбда-цигалотрин, 4-[[[(6-хлорпиридин-3-ил)метил](2,2-дифторэтил)амино]фуран-2(5H)-он, тефлутрин, ринакиспир, циакиспир, фипронил, карбофуран; гербициды для канолы: клопиралид, диклофоп, флуазифоп, глюфосинат, глифосат, метазаклор, трифлуралин этаметсульфурон, квинмерак, хизалофоп, Clethodim, тепралоксидим; фунгициды для канолы: азоксистробин, биксафен, боскалид, карбендазим, ципроконазол, дифеноконазол, димоксистробин, эпоксиконазол, флуазилам, флуопирам, флуоксастробин, флусилазол, флуксапироксад, ипродион, изопиразам, мепикват-хлорид, метконазол, метоминостробин, паклобутразол, пентиопирад, пикоксистробин, прохлораз, протиоконазол, пираклостробин, тебуконазол, тиофанат-метил, трифлуксистробин, винклозолин; инсектициды для канолы: карбофуран, тиаклоприд, дельтаметрин, имидаклоприд, клотианидин, тиаметоксам, ацетамиприд, динетофуран, В-цифлутрин, гамма- и лямбда-цигалотрин, тау-флувалериат, этипрол, спиносад, спиноторам, флубендиамид, ринакиспир, циазипир, 4-[[[(6-хлорпиридин-3-ил)метил](2,2-дифторэтил)амино]фуран-2(5H)-он.

Следующие примеры предложены с целью иллюстрации, а не с целью ограничения.

#### Экспериментальные примеры

Пример 1. Обнаружение новых генов, определяющих пестицидную активность, у *Bacillus thuringiensis*.

Новые пестицидные гены были идентифицированы из бактериальных штаммов ATX47307 и ATX56002, используя следующие этапы.

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

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

Идентификация предполагаемых генов токсина посредством анализов гомологии и/или других вычислительных анализов.

Получение окончательной уточненной последовательности представляющего интерес гена по одной из нескольких стратегий ПЦР или клонирования (например, TAIL-PCR), если необходимо.

Таблица 1

Новый ген, идентифицированный у штамма АТХ47307

| Название гена    | Молекулярная масса (кДа) | Ближайший гомолог                        | Нуклеотидная SEQ ID NO | Аминокислотная SEQ ID NO |
|------------------|--------------------------|------------------------------------------|------------------------|--------------------------|
| Axmi477          | 132                      | 75% Cry9Ba1<br><br>60%<br>Cry9Ba1(усеч.) | 1                      | 5                        |
| Axmi477.2        |                          |                                          |                        | 6                        |
| Axmi477.3        |                          |                                          |                        | 7                        |
| Axmi477(усеч.)   |                          |                                          |                        | 8                        |
| Axmi477.2(усеч.) |                          |                                          |                        | 9                        |
| Axmi477.3(усеч.) |                          |                                          |                        | 10                       |

Axmi477.2 и Axmi477.3 представляют собой белки, кодируемые из нижележащего относительно Axmi477 участка начала трансляции.

Таблица 2

Новый ген, идентифицированный у штамма АТХ47307

| Название гена | Молекулярная масса (кДа) | Ближайший гомолог     | Нуклеотидная SEQ ID NO | Аминокислотная SEQ ID NO |
|---------------|--------------------------|-----------------------|------------------------|--------------------------|
| Axmi482       | 37                       | 94% Axmi486; 51% Mtx3 | 2                      | 11                       |
| Axmi482.2     |                          |                       |                        | 12                       |
| Axmi482.3     |                          |                       |                        | 13                       |
| Axmi482.4     |                          |                       |                        | 14                       |

Axmi482.2, Axmi482.3 и Axmi482.4 представляют собой белки, кодируемые из нижележащего относительно Axmi482 участка начала трансляции.

Таблица 3

Новый ген, идентифицированный у штамма АТХ65002

| Название гена | Молекулярная масса (кДа) | Ближайший гомолог     | Нуклеотидная SEQ ID NO | Аминокислотная SEQ ID NO |
|---------------|--------------------------|-----------------------|------------------------|--------------------------|
| Axmi486       | 38                       | 94% Axmi482; 49% Mtx3 | 3                      | 15                       |
| Axmi486.2     |                          |                       |                        | 16                       |
| Axmi486.3     |                          |                       |                        | 17                       |
| Axmi486.4     |                          |                       |                        | 18                       |
| Axmi486.5     |                          |                       |                        | 19                       |

Axmi486.2, Axmi486.3, Axmi486.4 и Axmi486.5 представляют собой белки, кодируемые из нижележащего относительно Axmi486 участка начала трансляции.

Таблица 4

Новый ген, идентифицированный у штамма АТХ65002

| Название гена | Молекулярная масса (кДа) | Ближайший гомолог     | Нуклеотидная SEQ ID NO | Аминокислотная SEQ ID NO |
|---------------|--------------------------|-----------------------|------------------------|--------------------------|
| >Axmi525      | 38                       | 97% Axmi486; 51% Mtx3 | 4                      | 20                       |
| >Axmi525.2    |                          |                       |                        | 21                       |
| >Axmi525.3    |                          |                       |                        | 22                       |
| >Axmi525.4    |                          |                       |                        | 23                       |
| >Axmi525.5    |                          |                       |                        | 24                       |
| >Axmi525.6    |                          |                       |                        | 25                       |
| >Axmi525.7    |                          |                       |                        | 26                       |

Axmi525.2, Axmi525.3, Axmi525.4, Axmi525.5, Axmi525.6 и Axmi525.7 представляют собой белки, кодируемые из нижележащего относительно Axmi525 участка начала трансляции.

Пример 2. Анализы пестицидной активности.

Нуклеотидные последовательности согласно настоящему изобретению можно исследовать в отношении их способности вырабатывать пестицидные белки. Способность пестицидного белка действовать на вредителя в качестве пестицида часто анализируют с помощью ряда методов. Один метод, хорошо известный в данной области техники, заключается в осуществлении анализа со скормливанием. В ходе такого анализа со скормливанием вредителя подвергают воздействию образца, содержащего либо соединения, которые необходимо исследовать, либо контрольные образцы. Часто его осуществляют при помещении материала, который необходимо исследовать, или подходящего раствора такого материала на материал, который вредитель будет поглощать, как например, искусственная питательная среда. Материал, который необходимо исследовать, может состоять из жидкости, твердого вещества или взвеси. Материал, который необходимо исследовать, можно поместить на поверхность и затем дать ему возможность высохнуть. В качестве альтернативы, материал, который необходимо исследовать, можно смешать с рас-

плавленной искусственной питательной средой и затем распределить в камере для анализа. Камерой для анализа может быть, например, чашка, тарелка или лунка микротитровального планшета.

Анализы с сосущими вредителями (например, тлей) могут включать отделение тестируемого материала от насекомого перегородкой, в идеальном случае секцией, которую сосущее насекомое может проколоть частями сосущего ротового аппарата, чтобы обеспечить поглощение исследуемого материала. Часто исследуемый материал смешивают со стимулятором поедания, таким как сахароза, чтобы способствовать поглощению исследуемого соединения.

Другие типы анализов могут включать микроинъекцию исследуемого материала в ротовую полость или кишечник вредителя, а также разработку трансгенных растений с последующим исследованием способности вредителя питаться на трансгенном растении. Исследование растений может включать изоляцию частей растений, которые обычно потребляются, например, в небольшие камеры, прикрепленные к листу, или изоляцию целых растений в камерах, в которых содержатся насекомые.

Другие способы и подходы для оценки вредителей известны в данной области техники и могут быть найдены, например, у Robertson and Preisler, eds. (1992) *Pesticide bioassays with arthropods* CRC, Boca Raton, FL. В качестве альтернативы, анализы обычно описаны в журналах *Arthropod Management Tests* и *Journal of Economic Entomology* или их обсуждают с членами Энтомологического общества Америки (ESA).

В некоторых вариантах осуществления участки ДНК, кодирующие участок токсина в пестицидных белках, раскрытых в данном документе, клонируют в вектор экспрессии pMAL-C4x *E. coli* за геном malE, кодирующим мальтоза-связывающий белок (MBP). Эти слияния внутри рамки приводят в результате к экспрессии гибридных белков MBP-Axmi в *E. coli*.

Для экспрессии в *E. coli* BL21\*DE3 трансформируют отдельными плазмидами. Отдельные колонии инокулируют в среду Лурия-Бертани, дополненную карбенициллином и глюкозой, и выращивают в течение ночи при 37°C. На следующие сутки свежую среду инокулируют 1% суточной культуры и выращивают при 37°C до логарифмической фазы роста. Затем культуры индуцируют 0,3 mM IPTG в течение ночи при 20°C. Каждый осадок клеток суспендируют в 20 mM буфере Tris-Cl, pH 7,4+200 mM NaCl+1 mM DTT + ингибиторы протеаз и разрушают ультразвуком. Для подтверждения экспрессии гибридных белков можно применять анализ с помощью SDS-PAGE.

Все бесклеточные экстракты затем прогоняют через колонку с амилозой, присоединенную к хроматографу для жидкостной экспресс-хроматографии белков (FPLC) для аффинной очистки гибридных белков MBP-axmi. Связавшиеся гибридные белки элюируют из смолы с помощью 10 mM раствора мальтозы. Очищенные гибридные белки затем расщепляют либо фактором Ха, либо трипсином для удаления аминоконцевой MBP-метки с белка Axmi. Расщепление и растворимость белков можно определить с помощью SDS-PAGE.

Пример 3. Экспрессия и очистка.

Усеченные варианты Axmi477 (который изложен в данном документе как SEQ ID NO: 8), Axmi482 (который изложен в данном документе как SEQ ID NO: 13), Axmi486 (который изложен в данном документе как SEQ ID NO: 16) и Axmi525 (который изложен в данном документе как SEQ ID NO: 26) экспрессировали и анализировали в отношении биологической активности. Гены амплифицировали с помощью ПЦР из их соответствующих штаммов, используя полимеразу слитой ДНК HERCULASE® II с праймерами со встроенными AscI линкерами в 3'-конце. Амплифицированный ПЦР-продукт расщепляли с помощью AscI и лигировали в вектор pMalC4X. Клонирования подтверждали путем секвенирования и трансформировали в компетентные клетки B121. Каждую отдельную колонию инокулировали в среду Лурия-Бертани, и выращивали при 37°C до log-фазы, и индуцировали 0,5 mM IPTG при 20°C в течение 18 ч. Очищенный белок расщепляли с помощью фактора Ха при соотношении 1:50 при комнатной температуре в течение ночи. Очищенный белок подвергли анализу биологической активности против отобранных насекомых-вредителей согласно стандартному протоколу. Результаты приведены в табл. 5-8.

Таблица 5

Показатели смертности и задержки роста для Ахмі477

| Группа вредителей                   | Показатель задержки роста | Смертность, в процентах |
|-------------------------------------|---------------------------|-------------------------|
| <i>Plutella xylostella</i> (DBM)    | 4                         | 100                     |
| <i>Anticarsia gemmatilis</i> (VBC)  | 4                         | 100                     |
| <i>Diatraea grandiosella</i> (SWCB) | 3,5                       | 25                      |
| <i>Diatraea saccharalis</i> (SCB)   | 3,5                       | 0                       |
| <i>Heliothis virescens</i> (Hv)     | 4                         | 75                      |
| <i>Heliocoverpa zea</i> (Hz)        | 2                         | 25                      |
| <i>Ostrinia nubilalis</i> (ECB)     | 3                         | 25                      |
| <i>Spodoptera frugiperda</i> (FAW)  | 1                         | 0                       |
| <i>Spodoptera exigua</i> (BAW)      | 3                         | 0                       |
| <i>Agrotis ipsilon</i> (BCW)        | 4                         | 0                       |
| <i>Pseudoplusia includens</i> (SBL) | 4                         | 100                     |

Таблица 6

Показатели смертности и задержки роста для Ахмі482

| Группа вредителей                   | Показатель задержки роста | Смертность, в процентах |
|-------------------------------------|---------------------------|-------------------------|
| <i>Plutella xylostella</i> (DBM)    | 4                         | 100                     |
| <i>Anticarsia gemmatilis</i> (VBC)  | 4                         | 75                      |
| <i>Diatraea grandiosella</i> (SWCB) | 4                         | 50                      |
| <i>Diatraea saccharalis</i> (SCB)   | 3                         | 0                       |
| <i>Heliothis virescens</i> (Hv)     | 1                         | 0                       |
| <i>Heliocoverpa zea</i> (Hz)        | 4                         | 0                       |
| <i>Ostrinia nubilalis</i> (ECB)     | 3                         | 1                       |
| <i>Spodoptera frugiperda</i> (FAW)  | 3                         | 0                       |

Таблица 7

Показатели смертности и задержки роста для Ахмі486

| Группа вредителей                   | Показатель задержки роста | Смертность, в процентах |
|-------------------------------------|---------------------------|-------------------------|
| <i>Plutella xylostella</i> (DBM)    | 4                         | 100                     |
| <i>Anticarsia gemmatilis</i> (VBC)  | 4                         | 37                      |
| <i>Diatraea grandiosella</i> (SWCB) | 3,5                       | 50                      |
| <i>Diatraea saccharalis</i> (SCB)   | 2,5                       | 25                      |
| <i>Heliothis virescens</i> (Hv)     | 3,5                       | 0                       |
| <i>Heliocoverpa zea</i> (Hz)        | 3                         | 0                       |
| <i>Pseudoplusia includens</i> (SBL) | 1                         | 0                       |

Таблица 8

Показатели смертности и задержки роста для Ахмі525

| Группа вредителей                   | Показатель задержки роста | Смертность, в процентах |
|-------------------------------------|---------------------------|-------------------------|
| <i>Spodoptera frugiperda</i> (FAW)  | 1                         | 0%                      |
| <i>Heliothis virescens</i> (Hv)     | 1,5                       | 0%                      |
| <i>Helicoverpa zea</i> (Hz)         | 3                         | 0%                      |
| <i>Anticarsia gemmatilis</i> (VBC)  | 4                         | 42%                     |
| <i>Spodoptera eridania</i> (SAW)    | 3,2                       | 70%                     |
| <i>Plutella xylostella</i> (DBM)    | 4                         | 100%                    |
| <i>Diatraea grandiosella</i> (SWCB) | 4                         | 83%                     |
| <i>Diatraea crambidoides</i> (SCB)  | 4                         | 66%                     |

Показатель задержки роста:

0 - активность отсутствует;

1 - неоднородная задержка роста;

2 - незначительная задержка роста;

3 - сильная задержка роста;

4 - резкая задержка роста.

Пример 4. Vectoring of Genes for Plant Expression.

Кодирующие участки согласно настоящему изобретению соединяют с соответствующими последовательностями промоторов и терминаторов для экспрессии в растениях. Такие последовательности хорошо известны из уровня техники и могут включать актиновый промотор риса или убиквитиновый промотор маиса для экспрессии в однодольных растениях, промотор UBQ3 *Arabidopsis* или промотор CaMV



35S для экспрессии в двудольных растениях и терминаторы pos или PinII. Методики получения и подтверждения конструкторов промотор - ген - терминатор также хорошо известны из уровня техники.

В одном аспекте настоящего изобретения конструируют и создают синтетические последовательности ДНК. Эти синтетические последовательности имеют измененную нуклеотидную последовательность в сравнении с исходной последовательностью, но кодируют белки, которые, по существу, идентичны исходной последовательности.

В другом аспекте настоящего изобретения конструируют модифицированные варианты синтетических генов таким образом, чтобы полученный в результате пептид был нацелен на органеллу растения, такую как эндоплазматический ретикулум или апопласт. Из уровня техники известны последовательности пептидов, которые, как известно, приводят к нацеливанию гибридных белков на органеллу растения. Например, из уровня техники известно, что N-концевой участок белка, кодируемого геном кислой фосфатазы белого люпина *Lupinus albus* (GENBANK® ID GI: 14276838, Miller et al. (2001) Plant Physiology 127: 594-606), приводит к нацеливанию гетерологичных белков на эндоплазматический ретикулум. Если полученный в результате гибридный белок также содержит на C-конце последовательность для удержания в эндоплазматическом ретикулуме, содержащую с N-конца пептида лизин-аспарагиновую кислоту-глутаминовую кислоту-лейцин (т.е. мотив "KDEL", SEQ ID NO: 27), то гибридный белок будет нацелен на эндоплазматический ретикулум. Если в гибридном белке на C-конце отсутствует последовательность, нацеливающая на эндоплазматический ретикулум, белок будет нацелен на эндоплазматический ретикулум, но в конечном итоге будет связан в апопласте.

Таким образом, данный ген кодирует гибридный белок, который содержит на N-конце тридцать одну аминокислоту из гена кислой фосфатазы белого люпина *Lupinus albus* (GENBANK® ID GI:14276838, Miller et al, 2001, см. выше), слитую с N-концом аминокислотной последовательности настоящего изобретения, а также последовательность KDEL (SEQ ID NO: 27) на C-конце. Таким образом, предполагается, что полученный в результате белок нацелен на эндоплазматический ретикулум растения при экспрессии в растительной клетке.

Кассеты для экспрессии в растениях, описанные выше, объединяют с подходящим для растения селектируемым маркером, чтобы облегчить отбор трансформированных клеток и тканей, и лигируют в векторы для трансформации растений. Они могут включать бинарные векторы для опосредованной *Agrobacterium* трансформации или простые плазмидные векторы для трансформации с использованием аэрозоля или биолистической трансформации.

Пример 5. Трансформация клеток маиса генами пестицидного белка, описанными в данном документе.

Початки маиса лучше всего собирать через 8-12 суток после опыления. Зародыши выделяют из початков и при трансформации предпочтительно применяют зародыши размером 0,8-1,5 мм. Зародыши высаживают щитком вверх в подходящую среду для инкубации, такую как среда DN62A5S (3,98 г/л солей N6; 1 мл/л (1000× маточного раствора), витамины N6; 800 мг/л L-аспарагина; 100 мг/л миоинозита; 1,4 г/л L-пролина; 100 мг/л казаминовых кислот; 50 г/л сахарозы; 1 мл/л (маточного раствора с концентрацией 1 мг/мл) 2,4-D). Тем не менее, подходят среды и соли, отличные от DN62A5S и известные из уровня техники. Зародыши инкубируют в течение ночи при 25°C в темноте. Тем не менее, инкубация зародышей в течение ночи как таковая не является необходимой.

Полученные в результате эксплантаты переносят в ячейки сетки (30-40 на чашку), переносят на осмотическую среду примерно на 30-45 мин, затем переносят на чашку для воздействия пучка (см., например, РСТ публикацию № WO/0138514 и патент США № 5240842).

ДНК-конструкты, сконструированные для экспрессии генов согласно настоящему изобретению в растительных клетках, попадают за счет ускорения в растительную ткань с применением ускорителя на основе пучка аэрозоля, с применением условий, которые, по существу, описаны в РСТ публикации № WO/0138514. После воздействия пучка зародыши инкубируют в течение примерно 30 мин на осмотической среде и помещают в инкубационную среду на ночь при 25°C в темноте. Во избежание излишнего повреждения эксплантов, подвергнутых воздействию пучка, их инкубируют в течение по меньшей мере 24 ч до переноса в среду для восстановления. Зародыши затем распределяют в среде на период восстановления длительностью примерно 5 суток при 25°C в темноте, затем переносят на селективную среду. Эксплантаты инкубируют в селективной среде в течение периода длительностью до восьми недель в зависимости от природы и характеристик конкретного используемого метода отбора. После периода отбора полученный в результате каллус переносят на среду для созревания зародышей и культивируют до тех пор, пока не наблюдается образование зрелых соматических зародышей. Полученные в результате зрелые соматические зародыши затем помещают в условия с низким уровнем освещенности и иницируют процесс регенерации с помощью способов, известных из уровня техники. Полученным в результате побегам дают возможность укорениться на среде для укоренения, а полученные в результате растения переносят в горшки для рассады и размножают как трансгенные растения.

Материалы  
Среда DN62A5S

| Компоненты                                            | На литр                                           | Источник             |
|-------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|----------------------|
| Смесь основных солей N6 по Chu (номер продукта C 416) | 3,98 г/л                                          | Phytotechnology Labs |
| Раствор витаминов N6 по Chu (продукт № C 149)         | 1 мл/л (1000х маточного раствора)                 | Phytotechnology Labs |
| L-аспарагин                                           | 800 мг/л                                          | Phytotechnology Labs |
| миоинозит                                             | 100 мг/л                                          | Sigma                |
| L-пролин                                              | 1,4 г/л                                           | Phytotechnology Labs |
| казаминовые кислоты                                   | 100 мг/л                                          | Fisher Scientific    |
| сахароза                                              | 50 г/л                                            | Phytotechnology Labs |
| 2,4-D (номер продукта D-7299)                         | 1 мл/л (маточный раствор с концентрацией 1 мг/мл) | Sigma                |

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

Пример 6. Трансформация генами согласно настоящему изобретению растительных клеток путем опосредованной *Agrobacterium* трансформации.

Початки лучше всего собирать через 8-12 суток после опыления. Зародыши выделяют из початков и при трансформации предпочтительно применяют зародыши размером 0,8-1,5 мм. Зародыши высаживают щитком вверх в подходящую среду для инкубации и инкубируют в течение ночи при 25°C в темноте. Тем не менее, инкубация зародышей в течение ночи как таковая не является необходимой. Зародыши приводят в контакт со штаммом *Agrobacterium*, содержащим векторы, подходящие для опосредованного Ti-плазмидой переноса, в течение примерно 5-10 мин и затем помещают в среду для совместного культивирования примерно на 3 суток (25°C в темноте). После кокультивирования экспланты переносят в среду на период восстановления длительностью примерно пять суток (при 25°C в темноте). Экспланты инкубируют в селективной среде в течение периода длительностью восемь недель в зависимости от природы и характеристик конкретного используемого метода отбора. После периода отбора полученный в результате каллус переносят среду для созревания зародыша и культивируют до тех пор, пока не наблюдается образование зрелых соматических зародышей. Полученные в результате зрелые соматические зародыши затем помещают в условия с низким уровнем освещенности и иницируют процесс регенерации, как известно из уровня техники.

Все публикации и заявки на патент, упомянутые в данном описании, свидетельствуют о квалификации специалистов в данной области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение. Все публикации и заявки на патент включены в данный документ с помощью ссылки в той же степени, как если бы подразумевалось, что каждая отдельная публикация или заявка на патент конкретно и отдельно включена с помощью ссылки.

Хотя вышеизложенное изобретение было довольно подробно описано с целью иллюстрации, а также в качестве примера для ясности понимания, очевидно, что при практическом осуществлении можно вносить определенные изменения и модификации в пределах объема прилагаемой формулы изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность, которая обладает пестицидной активностью, отличающаяся тем, что указанная нуклеотидная последовательность выбрана из группы, состоящей из

- a) нуклеотидной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 3;
- b) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 15-19;
- c) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере с 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, изложенной в SEQ ID NO: 15.

2. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность, которая обладает пестицидной активностью, отличающаяся тем, что указанная нуклеотидная последовательность выбрана из группы, состоящей из

- a) нуклеотидной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 4;
- b) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 20-26;
- c) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере с 95% идентичностью последовательности с аминокислотной по-

следовательностью любой из SEQ ID NO: 20-26.

3. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п.1 или 2, отличающаяся тем, что указанная нуклеотидная последовательность представляет собой синтетическую последовательность, которая была сконструирована для экспрессии в растении.

4. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п.1 или 2, отличающаяся тем, что указанная нуклеотидная последовательность функционально связана с промотором, способным управлять экспрессией указанной нуклеотидной последовательности в растительной клетке.

5. Вектор, содержащий молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п.1 или 2.

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

7. Клетка-хозяин, которая содержит рекомбинантную нуклеиновую кислоту по п.1 или 2.

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

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

10. Трансгенное растение, которое содержит клетку-хозяин по п.9.

11. Трансгенное растение по п.10, отличающееся тем, что указанное растение выбрано из группы, состоящей из маиса, сорго, пшеницы, капусты, подсолнечника, помидора, крестоцветных, перцевых, картофеля, хлопчатника, риса, сои, сахарной свеклы, сахарного тростника, табака, ячменя и масличного рапса.

12. Трансгенное семя, содержащее молекулу нуклеиновой кислоты по п.1 или 2.

13. Рекомбинантный полипептид с пестицидной активностью, выбранный из группы, состоящей из  
а) полипептида, содержащего аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 15-19, и  
б) полипептида, содержащего аминокислотную последовательность по меньшей мере с 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, изложенной в SEQ ID NO: 15.

14. Рекомбинантный полипептид с пестицидной активностью, выбранный из группы, состоящей из  
а) полипептида, содержащего аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 20-26, и  
б) полипептида, содержащего аминокислотную последовательность по меньшей мере с 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO: 20-26.

15. Полипептид по п.13 или 14, который дополнительно содержит гетерологичные аминокислотные последовательности.

16. Пестицидная композиция, содержащая полипептид по п.13 или 14.

17. Композиция по п.16, отличающаяся тем, что указанная композиция выбрана из группы, состоящей из порошка, дуста, пеллеты, гранулы, аэрозоля, эмульсии, коллоида и раствора.

18. Композиция по п.16, отличающаяся тем, что указанная композиция получена с помощью сушки, лиофилизации, гомогенизации, экстракции, фильтрации, центрифугирования, осаждения или концентрирования культуры бактериальных клеток.

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

20. Способ контроля популяции чешуекрылого, полужесткокрылого, жесткокрылого, нематоды или двукрылого вредителя, включающий приведение указанной популяции в контакт с пестицидно-эффективным количеством полипептида по п.13 или 14.

21. Способ уничтожения чешуекрылого, полужесткокрылого, жесткокрылого, нематоды или двукрылого вредителя, включающий приведение указанного вредителя в контакт с или скормливание указанному вредителю пестицидно-эффективного количества полипептида по п.13 или 14.

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

23. Клетка растения со стабильно встроенной в его геном ДНК-конструкцией, содержащей нуклеотидную последовательность, которая кодирует белок, обладающий пестицидной активностью, отличающаяся тем, что указанная нуклеотидная последовательность выбрана из группы, состоящей из

а) нуклеотидной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 3;

б) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 15-19; и

с) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере с 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, изложенной в SEQ ID NO: 15.

24. Клетка растения со стабильно встроенной в его геном ДНК-конструкцией, содержащей нуклеотидную последовательность, которая кодирует белок, обладающий пестицидной активностью, отличающаяся тем, что указанная нуклеотидная последовательность выбрана из группы, состоящей из

а) нуклеотидной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 4;

б) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 20-26; и

с) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную

последовательность по меньшей мере с 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO: 20-26.

25. Способ защиты растения от вредителя, включающий экспрессию в растении или его клетке нуклеотидной последовательности, которая кодирует пестицидный полипептид, отличающийся тем, что указанную нуклеотидную последовательность выбирают из группы, состоящей из

- a) нуклеотидной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 3;
- b) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 15-19; и
- c) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере с 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, изложенной в SEQ ID NO: 15.

26. Способ защиты растения от вредителя, включающий экспрессию в растении или его клетке нуклеотидной последовательности, которая кодирует пестицидный полипептид, отличающийся тем, что указанную нуклеотидную последовательность выбирают из группы, состоящей из

- a) нуклеотидной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 4;
- b) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 20-26; и
- c) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере с 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO: 20-26.

27. Способ по п.25 или 26, отличающийся тем, что указанное растение продуцирует пестицидный полипептид, обладающий пестицидной активностью относительно чешуекрылого, полужесткокрылого, жесткокрылого вредителя, вредителя-нематоды или двукрылого вредителя.

28. Способ повышения урожайности растения, включающий выращивание в поле растения или его семени со стабильно встроенным в его геном ДНК-конструктом, содержащим нуклеотидную последовательность, которая кодирует белок, обладающий пестицидной активностью, отличающийся тем, что указанная нуклеотидная последовательность выбрана из группы, состоящей из

- a) нуклеотидной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 3;
- b) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 15-19; и
- c) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере с 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, изложенной в SEQ ID NO: 15,

причем указанное поле заражено вредителем, относительно которого указанный полипептид проявляет пестицидную активность.

29. Способ повышения урожайности растения, включающий выращивание в поле растения или его семени со стабильно встроенным в его геном ДНК-конструктом, содержащим нуклеотидную последовательность, которая кодирует белок, обладающий пестицидной активностью, отличающийся тем, что указанная нуклеотидная последовательность выбрана из группы, состоящей из

- a) нуклеотидной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 4;
- b) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 20-26; и
- c) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере с 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO: 20-26,

причем указанное поле заражено вредителем, относительно которого указанный полипептид проявляет пестицидную активность.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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

---