

ПОСИЛАННЯ НА СПОРІДНЕНУ ЗАЯВКУ

У цій заявці витребується перевага за попередньою заявкою США № 62/795066, поданою 22 січня 2019 р., яка повністю включена в цей документ шляхом посилання.

ВКЛЮЧЕННЯ СПИСКУ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

Файл під назвою "MONS469WO_ST25.txt", що містить машинозчитувану форму списку послідовностей, було створено 21 січня 2020 р. Цей файл має розмір 82,7 кілобайт (вимірюється в MS-Windows®), одночасно поданий в електронному вигляді (з використанням системи зберігання EFS-Web Патентного відомства США) і повністю включений за допомогою посилання.

ОБЛАСТЬ ТЕХНІКИ

Винахід в цілому відноситься до області білків, що інгібують активність комах. Розкрито новий клас білків, що проявляють інгібуючу активність проти значущих з точки зору сільського господарства комах-шкідників сільськогосподарських культур і насіння. Зокрема, описаний клас білків є інсектицидно активним відносно значущих з точки зору сільського господарства шкідників сільськогосподарських культур і насіння, особливо видів лускокрилих комах-шкідників. Надані рослини, частини рослин і насіння, що містять рекомбінантну поліпептидну конструкцію, що кодує один або кілька розкритих токсинів білків.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

Підвищення врожайності сільськогосподарських значущих культур, включаючи, серед іншого, кукурудзу, сою, цукрову тростину, рис, пшеницю, овочі і бавовну, стає все більш важливим. На додаток до зростаючої потреби в сільськогосподарських продуктах для харчування, одягу і забезпечення енергією зростаючого населення, очікується, що вплив клімату й інтенсивна експлуатація землі не для сільськогосподарських цілей з боку зростаючого населення зменшать кількість доступних орних земель для сільського господарства. Ці фактори призвели до негативних прогнозів продовольчої безпеки, особливо за відсутності значимих поліпшень в біотехнології рослин і агрономічній практиці. Через цю інтенсивну експлуатацію екологічно стійкі поліпшення в технологіях, методах ведення сільського господарства і боротьбі зі шкідниками є життєво важливими інструментами для розширення виробництва сільськогосподарських культур на обмеженій кількості орних земель, доступних для ведення сільського господарства.

Комахи, зокрема, комахи із загону *Lepidoptera* і *Coleoptera*, вважаються основною причиною пошкодження польових культур, що знижує врожайність на заражених територіях. Види лускокрилих шкідників, які негативно впливають на сільське господарство, включають, але не обмежуються ними, чорну совку лугову (*Spodoptera exempta*), совку-іпсилон (*Agrotis ipsilon*), совку бавовняну (*Helicoverpa zea*), совку бавовняну американську (*Alabama argillacea*), моль капустяну (*Plutella xylostella*), метелика кукурудзяного (*Ostrinia nubilalis*), совку трав'яну (*Spodoptera frugiperda*), стійку до Cry1Fa1 совку трав'яну (*Spodoptera frugiperda*), древнього коробкового хробака (OWB, *Helicoverpa armigera*), південну совку лугову (*Spodoptera eridania*), соєву совку (*Chrysodeixis includens*), совку плямисту (*Earias vittella*), вогнівку кукурудзяну південно-західну (*Diatraea grandiosella*), тютюнову листовійку (*Heliothis virescens*), азіатську бавовняну совку (*Spodoptera litura*, також відому як гусінь гронова), західну бобову совку (*Striacosta albicosta*) і гусеницю оксамитових бобів (*Anticarsia gemmatilis*).

Історично склалося так, що інтенсивне застосування синтетичних хімічних інсектицидів вважалося засобом боротьби зі шкідниками в сільському господарстві. Турбота про навколишнє середовище і здоров'я людини, на додаток до виникаючих проблем стійкості, сприяла дослідженням і розробці біологічних пестицидів. Ці дослідні роботи призвели до прогресивного відкриття та використання різних ентомопатогенних видів мікробів, включаючи бактерії.

Парадигма біологічного контролю змінилася, коли потенціал ентомопатогенних бактерій, зокрема, бактерій, що належать до роду *Bacillus*, був виявлений і розроблений як біологічний засіб боротьби зі шкідниками. Штами бактерій *Bacillus thuringiensis* (Bt) були використані в якості джерела пестицидних білків, оскільки було виявлено, що штами Bt проявляють високу токсичність по відношенню до певних комах. Відомо, що штами Bt продукують дельта-ендотоксини, які локалізуються всередині параспоральних кристалічних тілець включення на початку утворення спор і під час стаціонарної фази росту (наприклад, білки Cry), і також відомо, що вони продукують інсектицидний білок, що секретується. При потрапленні в організм чутливої комах дельта-ендотоксини, а також токсини, що секретуються, чинять свою дію на поверхню епітелію середньої кишки, руйнуючи клітинну мембрану, що призводить до руйнування і загибелі клітин. Гени, що кодують інсектицидні білки, також були ідентифіковані у інших видів бактерій, крім Bt, включаючи інші *Bacillus* і безліч додаткових видів бактерій, як-от *Brevibacillus laterosporus*, *Lysinibacillus sphaericus* ("Ls", раніше відома як *Bacillus sphaericus*), *Paenibacillus popilliae* і *Paenibacillus lentimorbus*.

Кристалічні і секретовані розчинні інсектицидні токсини високоспецифічні для своїх господарів і отримали всесвітнє визнання в якості альтернативи хімічним інсектицидам. Наприклад, інсектицидні токсинові білки застосовувалися в різних сільськогосподарських цілях для захисту важливих з точки зору сільського господарства рослин від зараження комахами, зменшення потреби в хімічних пестицидах і підвищення врожайності. Інсектицидні токсинові білки використовуються для боротьби зі

значущими з точки зору сільського господарства шкідниками сільськогосподарських культур за допомогою механічних методів, як-от розпорошення для поширення мікробних композицій, що містять різні штами бактерій, на поверхні рослин, а також з використанням методів генетичної трансформації для отримання трансгенних рослин і насіння, що експресують інсектицидний токсиновий білок.

Використання трансгенних рослин, які експресують інсектицидні токсинові білки, пристосовано у всьому світі. Наприклад, в 2016 році 23,1 мільйона гектарів були засіяні трансгенними культурами, експресуючими токсини Bt, і 75,4 мільйона гектарів були засіяні трансгенними культурами, експресуючими токсини Bt, що мають ознаки стійкості до гербіцидів (ISAAA. 2016. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2016. ISAAA Brief No. 52. ISAAA: Ithaca, NY). Всесвітнє використання трансгенних культур, захищених від комах, і обмеженої кількості інсектицидних токсинових білків, які використовуються в цих культурах, забезпечило еволюційний тиск для існуючих алелей комах, які надають стійкість до використовуваних в даний час інсектицидних білків.

Розвиток стійкості у цільових шкідників до інсектицидних токсинових білків створює постійну потребу у виявленні та розробці нових форм інсектицидних токсинових білків, які придатні для контролю підвищення стійкості комах до трансгенних культур, експресуючих інсектицидні токсинові білки. Нові білкові токсини з поліпшеною ефективністю, які демонструють контроль над більш широким спектром чутливих видів комах, зменшать кількість виживших комах, у яких можуть розвинути алелі стійкості. Крім того, використання в одній рослині двох або більше трансгенних інсектицидних токсинових білків, що токсичні для однієї і тієї ж комахи-шкідника і проявляють різні способи дії, знижує ймовірність стійкості у будь-якого окремого виду цільових шкідників.

Таким чином, автори винаходу розкривають в цьому документі нове сімейство білкових токсинів з *Paenibacillus lentimorbus*, поряд з аналогічними токсиновими білками, варіантними білками і ілюстративними рекомбінантними білками, які проявляють інсектицидну активність проти цільових видів лускокрилих.

СУТНІСТЬ ВИНАХОДУ

В цьому документі розкрита нова група пестицидних білків з інгібуючою активністю щодо комах (токсинів білки), які називаються в цьому документі TIC7941, що належать до класу білкових токсинів TIC7941, які, як показано, проявляють інгібуючу активність проти одного або більше шкідників сільськогосподарських культур. Білок TIC7941 і білки з класу білкових токсинів TIC7941 можуть використовуватися окремо або в комбінації з іншими інсектицидними білками і токсичними речовинами в композиціях і *in planta*, забезпечуючи тим самим альтернативу інсектицидним білкам і інсектицидним хімічним композиціям, які в даний час використовуються в сільськогосподарських системах.

В одному варіанті здійснення в цій заявці розкрита молекула рекомбінантної нуклеїнової кислоти, яка містить фрагмент гетерологічного промотора, функціонально пов'язаний з ділянкою полінуклеотида, що кодує пестицидний білок або його фрагмент, де (a) зазначений пестицидний білок містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6; SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12 або SEQ ID NO:14; або (b) зазначений пестицидний білок містить амінокислотну послідовність, що має щонайменше 80 %, або 85 %, або 90 %, або 95 %, або 98 %, або 99 %, або приблизно 100 % ідентичність амінокислотної послідовності з SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6; SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12 або SEQ ID NO:14; або (c) зазначена ділянка полінуклеотида гібридується з полінуклеотидом, що має нуклеотидну послідовність SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11 або SEQ ID NO:13; або (d) зазначена ділянка полінуклеотида, що кодує пестицидний білок або його фрагмент, містить полінуклеотидну послідовність, що має щонайменше 65 %, або 70 %, або 75 %, або 80 %, або 85 %, або 90 %, або 95 %, або 98 %, або 99 %, або приблизно 100 % ідентичність послідовності з нуклеотидною послідовністю SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11 або SEQ ID NO:13; або (e) зазначена молекула рекомбінантної нуклеїнової кислоти перебуває у функціональному зв'язку з вектором, і вказаний вектор вибраний з групи, що складається з плазмід, фагмід, бакмід, космід і бактеріальної або дріжджової штучної хромосоми. Молекула рекомбінантної нуклеїнової кислоти може містити послідовність, яка функціонує для експресії пестицидного білка в рослині; або експресується в рослинній клітині з утворенням пестицидно ефективною кількості пестицидного білка.

В іншому варіанті здійснення цієї заявки представлені клітини-господарі, що містять молекулу рекомбінантної нуклеїнової кислоти за цією заявкою, де клітина-господар вибрана з групи, що складається з бактеріальної та рослинної клітини. Передбачувані бактеріальні клітини-господарі включають *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Pantoea* і *Erwinia*. В окремих варіантах здійснення вказаний вид *Bacillus* являє собою *Bacillus cereus* або *Bacillus thuringiensis*, зазначений вид *Brevibacillus* являє собою *Brevibacillus laterosporus*, або вид *Escherichia* являє собою *Escherichia coli*. Передбачувані клітини-господарі рослини включають клітину дводольної рослини і клітину однодольної рослини. Передбачувані рослинні клітини додатково включають клітини люцерни, банана, ячменю, квасолі, броколі, капусти качанної, капусти, моркви,

маніока, рицини, цвітної капусти, селери, нуту, китайської капусти, цитрусових, кокоса, кави, кукурудзи, конюшини, бавовник (*Gossypium* sp.), кабачок, огірка, псевдотсуги, баклажана, евкаліпта, льону, часнику, винограду, хмелю, цибулі-порею, салату, сосни ладанної, проса, дині, горіха, вівса, оливки, цибулі, декоративних рослин, пальми, пасовищної трави, гороху, арахісу, перцю, голубиноного гороху, сосни, картоплі, тополі, гарбуза, сосни променистої, редису, ріпаку, рису, кореневища, жита, сафлору, чагарнику, сорго, південної сосни, сої, шпинату, гарбуза великоплідного, полуниці, цукрового буряка, цукрової тростини, соняшнику, солодкої кукурудзи, амбрового дерева, солодкої картоплі, проса стрижнеподібного, чаю, тютюну, помідору, тритикале, дереноутворюючої трави, кавуна і пшениці.

В іншому варіанті здійснення пестицидний білок проявляє активність відносно лускокрилих комах, включаючи гусеницю оксамитових бобів, точильника цукрової тростини, малого кукурудзяного точильника, совку бавовняну, тютюнову листовійку, соєву совку, чорну совку лугову, південну совку лугову, совку трав'яну, совку малу, древнього коробкового хробака, східну гусеницю, рожевого коробкового хробака, совку-іпсилон, вогнівку кукурудзяну південно-західну, совку бавовняну американську, моль капустяну, совку плямисту, азіатську бавовняну совку, західну бобову совку і метелика кукурудзяного.

У цій заявці також розглядаються рослини, що містять молекулу рекомбінантної нуклеїнової кислоти, яка містить фрагмент гетерологічного промотора, функціонально пов'язаний з ділянкою полінуклеотида, що кодує пестицидний білок або його фрагмент, де: (a) зазначений пестицидний білок містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:12 або SEQ ID NO:14; або (b) зазначений пестицидний білок містить амінокислотну послідовність, що має щонайменше 80 %, або 85 %, або 90 %, або 95 %, або 98 %, або 99 %, або приблизно 100 % ідентичність амінокислотної послідовності з SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:12 або SEQ ID NO:14; або (c) зазначену ділянку полінуклеотида гібридизують в жорстких умовах гібридизації з комплементом нуклеотидної послідовності SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:11 або SEQ ID NO:13; або (d) вказана рослина демонструє визначену кількість зазначеного пестицидного білка. У деяких варіантах здійснення пестицидний білок містить SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:12 або SEQ ID NO:14. В одному варіанті здійснення рослина є або дводольною, або однодольною рослиною. В іншому варіанті здійснення рослина додатково вибрана з групи, що складається з люцерни, банана, ячменю, квасолі, броколі, капусти качанної, капусти, моркви, маніока, рицини, цвітної капусти, селери, нуту, китайської капусти, цитрусових, кокоса, кави, кукурудзи, конюшини, бавовник, кабачок, огірка, псевдотсуги, баклажана, евкаліпта, льону, часнику, винограду, хмелю, цибулі-порею, салату, сосни ладанної, проса, дині, горіха, вівса, оливки, цибулі, декоративних рослин, пальми, пасовищної трави, гороху, арахісу, перцю, голубиноного гороху, сосни, картоплі, тополі, гарбуза, сосни променистої, редису, ріпаку, рису, кореневища, жита, сафлору, чагарнику, сорго, південної сосни, сої, шпинату, гарбуза великоплідного, полуниці, цукрових буряків, цукрової тростини, соняшнику, солодкої кукурудзи, амбрового дерева, солодкої картоплі, проса стрижнеподібного, чаю, тютюну, помідору, тритикале, дереноутворюючої трави, кавуна і пшениці.

У додаткових варіантах здійснення розкриті насіння, що містять молекули рекомбінантної нуклеїнової кислоти.

В іншому варіанті здійснення розглянута композиція, що інгібує активність комах, яка містить молекули рекомбінантної нуклеїнової кислоти, розкриті в цій заявці. Композиція, що інгібує активність комах, може додатково містити нуклеотидну послідовність, що кодує щонайменше один інший пестицидний засіб, який відрізняється від зазначеного пестицидного білка. У деяких варіантах здійснення щонайменше один інший пестицидний засіб вибрано з групи, що складається з білка, що інгібує активність комах, молекули дЛРНК, що інгібує активність комах, і допоміжного білка. Також передбачається, що щонайменше один інший пестицидний засіб в композиції, що інгібує активність комах, проявляє активність проти одного або декількох видів шкідників загонів *Lepidoptera*, *Coleoptera* або *Hemiptera*. Щонайменше один інший пестицидний засіб в композиції, що інгібує активність комах, в одному варіанті здійснення вибрано з групи, що складається з Cry1A, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1A.105, Cry1Ae, Cry1B, Cry1C, варіантів Cry1C, Cry1D, Cry1E, Cry1F, химер Cry1A/F, Cry1G, Cry1H, Cry1I, Cry1J, Cry1K, Cry1L, Cry2A, Cry2Ab, Cry2Ae, Cry3, варіантів Cry3A, Cry3B, Cry4B, Cry6, Cry7, Cry8, Cry9, Cry15, Cry34, Cry35, Cry43A, Cry43B, Cry51Aa1, ET29, ET33, ET34, ET35, ET66, ET70, TIC400, TIC407, TIC417, TIC431, TIC800, TIC807, TIC834, TIC853, TIC900, TIC901, TIC1201, TIC1415, TIC3131, TIC2160, VIP3A, VIP3B, VIP3Ab, AXMI-001, AXMI-002, AXMI-030, AXMI-035, AXMI-036, AXMI-045, Axmi52, Axmi58, Axmi88, Axmi97, Axmi102, Axmi112, Axmi117, Axmi100, AXMI-115, AXMI-113 і AXMI-005, AXMI134, AXMI-150, Axmi171, AXMI-184, axmi196, axmi204, axmi207, axmi209, Axmi205, AXMI218, AXMI220, AXMI221z, AXMI222z, AXMI223z, AXMI224z і AXMI225z, AXMI238, AXMI270, AXMI279, AXMI335, AXMI345, AXMI-R1 і його варіантів, IP 3 і його варіантів, DIG-3, DIG-5, DIG-10, DIG-11, білка DIG-657, варіантів PHI-4, варіантів PIP-72, варіантів PIP-45, варіантів PIP-64, варіантів PIP-74, варіантів PIP-77, DIG-305, варіантів PIP-47, DIG-17, DIG-90, DIG-79 і DIG-303.

Також розглядаються товарні продукти, що містять визначену кількість молекул рекомбінантної нуклеїнової кислоти, розкритих в цій заявці. Такі товарні продукти включають товарну кукурудзу,

упаковану в мішки зернопереробником, кукурудзяні пластівці, кукурудзяні млинці, кукурудзяне борошно, кукурудзяне борошно непросіяне, кукурудзяний сироп, кукурудзяну олію, кукурудзяний силос, кукурудзяний крохмаль, кукурудзяну крупу тощо, а також відповідні товарні продукти, отримані з соєвих бобів, рису, пшениці, сорго, голубиноного гороху, арахісу, фруктів, дині і овочів, включаючи, де це може бути застосовано, соки, концентрати, джеми, желе, мармелад та інші харчові форми таких товарних продуктів, що містять визначену кількість таких полінуклеотидів і/або поліпептидів за цією заявкою, ціле або перероблене насіння бавовни, бавовняну олію, пух, насіння і частини рослин, перероблені для корму або їжі, волокна, папір, біомаси і паливні продукти, як-от паливо, отримане з бавовняної олії, або гранули, отримані з відходів бавовноочищення, ціле або перероблене насіння сої, соєву олію, соєвий білок, соєвий шрот, соєве борошно, соєві пластівці, соєві висівки, соєве молоко, соєвий сир, соєве вино, корм для тварин, що містить сою, папір, що містить сою, вершки, що містять сою, біомасу сої і паливні продукти, отримані з використанням рослин сої і частин рослин сої.

У цій заявці також розглядається спосіб отримання насіння, що містить молекули рекомбінантної нуклеїнової кислоти, розкриті в цій заявці. Спосіб включає висадку щонайменше одного з насіння, що містить молекули рекомбінантної нуклеїнової кислоти, розкриті в цій заявці; вирощування рослини з насіння; і збір насіння рослин, при цьому зібране насіння містить молекули рекомбінантної нуклеїнової кислоти в цій заявці.

В іншому ілюстративному варіанті здійснення надано рослину, стійку до зараження комахами, де клітини зазначеної рослини містять: (а) молекулу рекомбінантної нуклеїнової кислоти, що кодує інсектицидно ефективну кількість пестицидного білка, як зазначено в SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:12 або SEQ ID NO:14; або (b) інсектицидно ефективну кількість білка, що містить амінокислотну послідовність, що має щонайменше 80 %, або 85 %, або 90 %, або 95 %, або приблизно 100 % ідентичність амінокислотної послідовності з SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:12 або SEQ ID NO:14.

У цій заявці також розкриті способи боротьби зі шкідниками виду лускокрилих комах і боротьби із зараженням рослин видами лускокрилих, зокрема, сільськогосподарських рослин. В одному варіанті здійснення спосіб включає (а) приведення в контакт шкідника з інсектицидно ефективною кількістю пестицидних білків, як зазначено в SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:12 або SEQ ID NO:14; або (b) приведення в контакт шкідника з інсектицидно ефективною кількістю одного або декількох пестицидних білків, що містять амінокислотну послідовність, що має щонайменше 80 %, 85 %, або 90 %, або 95 %, або приблизно 100 % ідентичність амінокислотної послідовності з SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:12 або SEQ ID NO:14.

Крім того, в цьому документі запропоновано спосіб виявлення присутності молекули рекомбінантної нуклеїнової кислоти, що містить ділянку полінуклеотида, що кодує пестицидний білок або його фрагмент, де: (а) зазначений пестицидний білок містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6; SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12 або SEQ ID NO:14; або (b) зазначений пестицидний білок містить амінокислотну послідовність, що має щонайменше 80 %, або 85 %, або 90 %, або 95 %, або 98 %, або 99 %, або приблизно 100 % ідентичність амінокислотної послідовності з SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6; SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12 або SEQ ID NO:14; або (c) зазначена ділянка полінуклеотида гібридується з полінуклеотидом, що має нуклеотидну послідовність SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11 або SEQ ID NO:13. В одному варіанті здійснення винаходу спосіб включає приведення в контакт зразка нуклеїнових кислот із зондом для нуклеїнових кислот, який гібридується в жорстких умовах гібридизації з геномною ДНК рослини, що містить ділянку полінуклеотида, що кодує пестицидний білок або його фрагмент, представлений в цьому документі, і не гібридується в таких умовах гібридизації з геномною ДНК іншої ізогенної рослини, що не містить ділянку, де зонд гомологічний або комплементарний SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:11 або SEQ ID NO:13, або послідовністю, яка кодує пестицидний білок, що містить амінокислотну послідовність, що має щонайменше 80 %, або 85 %, або 90 %, або 95 %, або 98 %, або 99 %, або приблизно 100 % ідентичність амінокислотної послідовності з SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:12 або SEQ ID NO:14. Спосіб може додатково включати (а) вплив на зразок і пробу жорстких умов гібридизації; і (b) виявлення гібридизації проби з ДНК зразка.

Винахід також відноситься до способів виявлення присутності пестицидного білка або його фрагмента в зразку, що містить білок, де вказаний пестицидний білок містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6; SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12 або SEQ ID NO:14; або вказаний пестицидний білок містить амінокислотну послідовність, що має щонайменше 80 %, або 85 %, або 90 %, або 95 %, або 98 %, або 99 %, або приблизно 100 % ідентичність амінокислотної послідовності з SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6; SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12 або SEQ ID NO:14. В одному варіанті здійснення спосіб включає: (а) приведення зразка в контакт з імунореактивним антитілом; і (b) виявлення присутності білка. У деяких варіантах здійснення стадія виявлення включає ІФА або вестерн-блот.

У цій заявці також розкрито спосіб поліпшення інсектицидної активності нативного інсектицидного

білка проти видів комах-шкідників, що включає: конструювання варіанта інсектицидного білка шляхом вставки фрагмента ДНК, що кодує пептид, що зв'язує рецептор в кишечнику комах, в кодуючу послідовність, яка кодує інсектицидний білок; де інсектицидна активність сконструйованого інсектицидного білка більше, ніж інсектицидна активність нативного інсектицидного білка по відношенню до зазначених видів комах-шкідників. В одному варіанті здійснення винаходу рецептор в кишечнику комах може являти собою кадгерин-подібний білок (CADR), GPI-заякорену амінопептидазу-N (APN), GPI-заякорену лужну фосфатазу, трансмембранний переносник ABC або ADAM-металопротеїназу. В іншому варіанті здійснення винаходу фрагмент ДНК, що кодує пептид, що зв'язує рецептор в кишечнику комах, вибраний з групи, що складається з SEQ ID NO:15 і SEQ ID NO:16, і кодує пептид, що зв'язує рецептор, представлений як SEQ ID NO:17.

В одному варіанті здійснення винаходу представлена молекула рекомбінантної нуклеїнової кислоти, яка містить гетерологічний промотор, функціонально пов'язаний з ділянкою полінуклеотида, що кодує пестицидний білок або його пестицидний фрагмент, функціонально пов'язаний з послідовністю ДНК, що містить елемент сайту зв'язування мішені мікроРНК, специфічною для тканини органів розмноження, при цьому зазначений елемент сайту зв'язування мішені мікроРНК є гетерологічним по відношенню до зазначеної ділянки полінуклеотида, що кодує пестицидний білок або його пестицидний фрагмент. Елементи сайту зв'язування мішені мікроРНК обрані з групи, що складається з SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22 і SEQ ID NO:23.

У ще одному варіанті здійснення винаходу запропоновано спосіб зниження експресії пестицидного білка в тканині органів розмноження трансгенної рослини, що включає експресію в зазначеній трансгенній рослині молекули рекомбінантної нуклеїнової кислоти, що містить гетерологічний промотор, функціонально пов'язаний з ділянкою полінуклеотида, що кодує пестицидний білок або його пестицидний фрагмент, функціонально пов'язаний з послідовністю ДНК, що містить елемент сайту зв'язування мішені мікроРНК, специфічною для тканини органів розмноження, причому зазначений елемент сайту зв'язування мішені мікроРНК є гетерологічним по відношенню до зазначеної ділянки полінуклеотида, що кодує пестицидний білок або його пестицидний фрагмент. Елементи сайту зв'язування мішені мікроРНК обрані з групи, що складається з SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22 і SEQ ID NO:23. Ще один варіант здійснення винаходу являє собою молекулу рекомбінантної ДНК, обрану з групи, що складається з SEQ ID NO:25 і SEQ ID NO:26.

КОРОТКИЙ ОПИС ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

SEQ ID NO:1 являє собою послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує пестицидний білок TIC7941, отриманий з *Paenibacillus lentimorbus*, виду DSC020651.

SEQ ID NO:2 являє собою амінокислотну послідовність пестицидного білка TIC7941.

SEQ ID NO:3 являє собою синтетичну кодуючу послідовність, яка кодує пестицидний білок TIC7941PL_1, призначений для експресії в рослинній клітині.

SEQ ID NO:4 являє собою амінокислотну послідовність білка TIC7941PL_1, в яку додаткова амінокислота аланін вставлена відразу після ініціюючого метіоніну.

SEQ ID NO:5 являє собою послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує пестицидний білок TIC7941_His, де послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує гістидинову мітку, функціонально пов'язана на 5'-кінці і в рамці з кодуючою послідовністю TIC7941.

SEQ ID NO:6 являє собою амінокислотну послідовність пестицидного білка TIC7941_His.

SEQ ID NO:7 являє собою послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує пестицидний білок TIC7941_2His, де послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує гістидинову мітку, функціонально пов'язана на 5'-кінці і в рамці.

SEQ ID NO:8 являє собою амінокислотну послідовність пестицидного білка TIC7941_2His.

SEQ ID NO:9 являє собою послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує пестицидний білок TIC7941_3His, де послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує гістидинову мітку, функціонально пов'язана на 5'-кінці і в рамці.

SEQ ID NO:10 являє собою амінокислотну послідовність пестицидного білка TIC7941_3His.

SEQ ID NO:11 являє собою синтетичну кодуючу послідовність, яка кодує пестицидний білок TIC7941PL_2, призначений для експресії в рослинній клітині.

SEQ ID NO:12 являє собою амінокислотну послідовність TIC7941PL_2, в яку додаткова амінокислота аланін вставлена відразу після ініціюючого метіоніну.

SEQ ID NO:13 являє собою синтетичну кодуючу послідовність, яка кодує пестицидний білок TIC7941PL_3, призначений для експресії в рослинній клітині.

SEQ ID NO:14 являє собою амінокислотну послідовність TIC7941PL_3, в яку додаткова амінокислота аланін вставлена відразу після ініціюючого метіоніну.

SEQ ID NO:15 являє собою синтетичну кодуючу послідовність (FAWPEPBIN_Bac), яка кодує послідовність FAWPEPBIN пептиду, що зв'язує рецептор FAW ABCc4, для експресії в бактеріях. Синтетична послідовність знаходиться в положеннях нуклеотидів 2413-2448 TIC7941_2His і в положеннях нуклеотидів 2410-2445 TIC7941_3His.

SEQ ID NO:16 являє собою синтетичну кодуєчу послідовність (FAWPEPBIN_PL), яка кодує послідовність FAWPEPBIN пептиду, що зв'язує рецептор FAW ABCc4, для експресії в рослинній клітині. Синтетична послідовність знаходиться в положеннях нуклеотидів 2386-2421 TIC7941PL_2 і в положеннях нуклеотидів 2383-2418 TIC7941PL_3.

SEQ ID NO:17 являє собою послідовність (FAWPEPBIN) пептиду, що зв'язує рецептор FAW ABCc4, яка кодується SEQ ID NO:15 і SEQ ID NO:16, і розташована в положеннях амінокислот 805-816 TIC7941_2His, 804-815 TIC7941_3His, 796-807 TIC7941PL_2 і 795-806 TIC7941PL_3.

SEQ ID NO:18 являє собою послідовність ДНК, що кодує сайт зв'язування мішені мікроРНК Gm.miR395_1.

SEQ ID NO:19 являє собою послідовність ДНК, що кодує сайт зв'язування мішені мікроРНК Gm.miR395_2.

SEQ ID NO:20 являє собою послідовність ДНК (SUP-miR395), де сайти зв'язування мішені мікроРНК Gm.miR395_1 і Gm.miR395_2 пов'язані з використанням послідовності ДНК SP-ART.8a-1.

SEQ ID NO:21 являє собою послідовність ДНК, що кодує сайт зв'язування мішені мікроРНК Gm.miR4392_1.

SEQ ID NO:22 являє собою послідовність ДНК, що кодує сайт зв'язування мішені мікроРНК Gm.miR4392_2.

SEQ ID NO:23 являє собою послідовність ДНК (SUP-miR4392), де сайти зв'язування мішені мікроРНК Gm.miR4392_1 і Gm.miR4392_2 пов'язані з використанням послідовності ДНК SP-ART.8a-1.

SEQ ID NO:24 являє собою послідовність ДНК лінкера SP-ART.8a-1.

SEQ ID NO:25 являє собою послідовність ДНК (TIC7941PL_1-mi395), що кодує TIC7941PL_1, функціонально пов'язаний з SUP-miR395.

SEQ ID NO:26 являє собою послідовність ДНК (TIC7941PL_1-mi4392), що кодує TIC7941PL_1, функціонально пов'язаний з SUP-miR4392.

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС СУТНОСТІ ВИНАХОДУ

Проблему в області боротьби із сільськогосподарськими шкідниками можна охарактеризувати як потребу в нових токсинових білках, які ефективні проти цільових шкідників, проявляють токсичність широкого спектра проти видів цільових шкідників, здатні експресуватися в рослинах, не викликаючи небажаних агрономічних проблем, і забезпечують альтернативний спосіб дії в порівнянні з існуючими токсинами, які комерційно використовуються в рослинах.

Нові пестицидні білки, представлені TIC7941, TIC7941PL_1, TIC7941PL_2 і TIC7941PL_3, розкриті в цьому документі і призначені для задоволення кожної з цих потреб, зокрема, боротьби з широким спектром лускокрилих комах-шкідників і, зокрема, совкою-інцилоном (*Agrotis ipsilon*), совкою бавовняною (*Helicoverpa zea*), метеликом кукурудзяним (*Ostrinia nubilalis*), совкою трав'яною (*Spodoptera frugiperda*), південною совкою луговою (*Spodoptera eridania*), соєвою совкою (*Chrysodeixis includens*), вогнівкою кукурудзяною південно-західною (*Diatraea grandiosella*).

Посилання в цій заявці на TIC7941, "білок TIC7941", "білковий токсин TIC7941", "токсиновий білок TIC7941", "пестицидний білок TIC7941", "токсини, пов'язані з TIC7941", "токсинові білки, пов'язані з TIC7941", TIC7941PL_1, "білок TIC7941PL_1", "білковий токсин TIC7941PL_1", "токсиновий білок TIC7941PL_1", "пестицидний білок TIC7941PL_1", "токсини, пов'язані з TIC7941PL_1", "токсинові білки, пов'язані з TIC7941PL_1" тощо відносяться до будь-якого нового пестицидного білка або білка, інгібуючого активність комах, який містить, який складається з, який по суті гомологічний, який подібний до або який отриманий з будь-якого пестицидного білка або послідовності білка, інгібуючого активність комах, TIC7941 (SEQ ID NO:2), TIC7941PL_1 (SEQ ID NO:4), TIC7941PL_2 (SEQ ID NO:12) і TIC7941PL_3 (SEQ ID NO:14) і їх пестицидних або інгібуючих активність комах ділянок або їх комбінацій, які надають активність проти лускокрилих шкідників, включаючи будь-який білок, що проявляє пестицидну активність або інгібуючу активність комах, якщо вирівнювання такого білка з TIC7941, TIC7941PL_1, TIC7941PL_2 або TIC7941PL_3 призводить до ідентичності амінокислотної послідовності будь-відсоткової частки від близько 80 % до близько 100 % відсотків. Білки TIC7941, TIC7941PL_1, TIC7941PL_2 і TIC7941PL_3 включають як націлені на пластиди форми білків, так і ненацілені на пластиди форми білків.

Термін "ділянка" або "фрагмент" використовується в цій заявці для опису послідовних послідовностей амінокислот або нуклеїнових кислот, які коротше, ніж повна послідовність амінокислот або нуклеїнових кислот, що описують білок TIC7941. Ділянку або фрагмент, що демонструє інгібуючу активність щодо комах, також розкрито в цій заявці, якщо вирівнювання такої ділянки або фрагмента з відповідною ділянкою білка TIC7941, зазначеного в SEQ ID NO:2, або білка TIC7941PL_1, зазначеного в SEQ ID NO:4, або білка TIC7941PL_2, зазначеного в SEQ ID NO:12, або білка TIC7941PL_3, зазначеного в SEQ ID NO:14, призводить до ідентичності амінокислотної послідовності будь-якої частки відсотка від близько 80 до близько 100 відсотків між ділянкою або фрагментом і відповідною ділянкою білка TIC7941, TIC7941PL_1, TIC7941PL_2 або TIC7941PL_3.

В інших конкретних варіантах здійснення фрагмент білка TIC7941, TIC7941PL_1, TIC7941PL_2 або TIC7941PL_3 може бути визначений як проявляючий пестицидну активність, яку має вихідна молекула

білка, з якої він отриманий. Фрагмент послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує білок TIC7941, TIC7941PL_1, TIC7941PL_2 або TIC7941PL_3, може бути визначений як кодуєчий білок, що проявляє пестицидну активність, яку має молекула білка, що кодується вихідною послідовністю нуклеїнової кислоти, з якої вона отримана. Описаний в цьому документі фрагмент або варіант може додатково містити ідентифікований в цьому документі домен, який відповідає за пестицидну активність білка.

У конкретних варіантах здійснення запропоновані фрагменти білка TIC7941, TIC7941PL_1, TIC7941PL_2 або TIC7941PL_3, що містять щонайменше близько 50, щонайменше близько 75, щонайменше близько 95, щонайменше близько 100, щонайменше близько 125, щонайменше близько 150, щонайменше близько 175, щонайменше близько 200, щонайменше близько 225, щонайменше близько 250, щонайменше близько 275, щонайменше близько 300, щонайменше близько 500, щонайменше близько 600, щонайменше близько 700, щонайменше близько 750, щонайменше близько 800, щонайменше близько 900, щонайменше близько 1000, щонайменше близько 1100, щонайменше близько 1150 або щонайменше близько 1175 суміжних амінокислот або більше білка TIC7941, TIC7941PL_1, TIC7941PL_2 або TIC7941PL_3, що має пестицидну активність, як розкрито в цьому документі. В окремих варіантах здійснення у винаході передбачені фрагменти будь-якої з SEQ ID NO:2, 4, 12 або 14, що мають активність повнорозмірної послідовності. Способи отримання таких фрагментів з вихідної молекули добре відомі в цій області техніки.

Посилання в цій заявці на терміни "активний" або "активність", "пестицидна активність" або "пестицидний", або "інсектицидна активність", "інгібуючий активність комах" або "інсектицидний" відносяться до ефективності токсичної речовини, як-от білковий токсин, в інгібуванні (інгібуванні зростання, харчування, плодючості або життєздатності), пригніченні (пригніченні зростання, харчування, плодючості або життєздатності), боротьбі (боротьбі із зараженням шкідниками, боротьбі з активністю харчування шкідників на конкретній культурі, що містить ефективну кількість білка TIC7941) або знищенні (викликанні захворюваності, смертності або зниження плодючості) шкідника. Ці терміни призначені для включення результату забезпечення пестицидно ефективною кількістю токсинового білка для шкідника, коли вплив токсинового білка на шкідника призводить до захворюваності, смертності, зниження плодючості або затримки росту. Ці терміни також включають відштовхування шкідника від рослини, тканини рослини, частини рослини, насіння, рослинних клітин або від конкретного географічного місця, де рослина може рости, в результаті забезпечення пестицидно ефективною кількістю токсичного білка в рослині або на ній. Загалом, пестицидна активність відноситься до здатності токсинового білка ефективно інгібувати ріст, розвиток, життєздатність, харчову поведінку, поведінку при розмноженні, плодючість, або будь-якого вимірюваного зменшення несприятливих ефектів, що викликаються комахами, що харчуються цим білком, фрагментом білка, ділянкою білка або полінуклеотидом конкретного шкідника-мішені, включаючи, крім іншого, комах загону Lepidoptera. Токсичний білок може вироблятися рослиною або може бути внесений в рослину або в навколишнє середовище в тому місці, де знаходиться рослина. Терміни "біоактивність", "ефективний", "дієвий" або їх варіанти також є взаємозамінними термінами, які використовуються в цій заявці для опису ефектів білків за цим винаходом на цільових комах-шкідників.

Пестицидно ефективна кількість токсичної речовини, коли вона міститься в раціоні шкідника-мішені, проявляє пестицидну активність, коли токсична речовина контактує зі шкідником. Токсичною речовиною може бути пестицидний білок або один або кілька хімічних засобів, відомих в цій області техніки. Пестицидні або інсектицидні хімічні засоби і пестицидні або інсектицидні білкові засоби можна використовувати окремо або в комбінації один з одним. Хімічні засоби включають, крім іншого, молекули длРНК, націлені на конкретні гени для пригнічення у шкідника-мішені, хлорорганічні сполуки, органофосфати, карбамати, піретроїди, неонікотинноїди і ріаноїди. Пестицидні або інсектицидні білкові засоби включають білкові токсини, зазначені у цій заявці, а також інші білковоподібні токсичні речовини, в тому числі ті, які націлені на лускокрилих, а також білкові токсини, які використовуються для боротьби з іншими шкідниками рослин, як-от білки Cry і Cyt, доступні в області техніки для використання в боротьбі з видами жорсткокрилих, напівжорсткокрилих і рівнокрилих.

Мається на увазі, що посилання на шкідника, зокрема шкідника сільськогосподарських культур, означає комах-шкідників сільськогосподарських культур, зокрема, тих комах-шкідників Lepidoptera, які контролюються класом білкових токсинів TIC7941. Однак посилання на шкідника може також включати комах-шкідників рослин, жорсткокрилих, напівжорсткокрилих і рівнокрилих, а також нематод і грибків, коли токсичні речовини, націлені на цих шкідників, локалізовані або присутні разом з білком TIC7941 або білком, який має від 80 до близько 100 відсотків ідентичності з білком TIC7941.

Білки TIC7941 пов'язані спільною функцією і проявляють інсектицидну активність щодо комах-шкідників з видів комах Lepidoptera, включаючи дорослих особин, лялечок, личинок і новонароджених особин.

Комахи із загону Lepidoptera включають, але без обмеження, гусениць, совок, п'ядунів і геліотинових в сімействі Noctuidae, наприклад, совку трав'яну (*Spodoptera frugiperda*), совку малу (*Spodoptera exigua*), чорну совку лугову (*Spodoptera exempta*), південну совку лугову (*Spodoptera eridania*), гусінь берта (*Mamestra configurata*), совку-іпсилон (*Agrotis ipsilon*), совку капустяну

(*Trichoplusia ni*), соєву совку (*Pseudoplusia includens*), гусеницю оксамитових бобів (*Anticarsia gemmatilis*), совку конюшинову (*Hypera scabra*), тютюнову листовійку (*Heliothis virescens*), совку бавовняну (*Agrotis subterranea*), совку лугову (*Pseudaletia unipuncta*), совку прямокутну (*Agrotis orthogonia*); бурийників, чехлоносок, гусениць, що випускають павутину, конусних хробаків, гусениць-капустниць і шкідників, що скелетують листя, із сімейства *Pyralidae*, наприклад, метелика кукурудзяного (*Ostrinia nubilalis*), хробака пупкового апельсина (*Amyelois transitella*), злакового кореневого хробака, що випускає павутину (*Crambus caliginosellus*), лугового метелика (*Herpetogramma licarsisalis*), вогнівку соняшникову (*Homoeosoma electellum*), малого кукурудзяного точильника (*Elasmopalpus lignosellus*); листовійок, листовійок-брунькоїдів, плодожерок і гусениць-шкідників плодів з сімейства *Tortricidae*, наприклад, плодожерку яблуневу (*Cydia pomonella*), листовійку виноградну (*Endopiza viteana*), плодожерку східну персикову (*Grapholita molesta*), листовійку брунькову соняшникову (*Suleima helianthana*); і багатьох інших економічно важливих видів *Lepidoptera*, наприклад, моль капустяну (*Plutella xylostella*), рожевого коробкового хробака (*Pectinophora gossypiella*) і шовкопряда непарного (*Lymantria dispar*). Інші комахи-шкідники з загону *Lepidoptera* включають, наприклад, совку бавовняну американську (*Alabama argillacea*), листовійку плодових дерев (*Archips argyrospila*), європейську листовійку (*Archips rosana*) та інші види *Archips*, (*Chilo suppressalis*, вогнівка азіатська стеблова або свердлувальник рисовий стебловий), листовійку рисову (*Snaphalocrocis medinalis*), злакового кореневого хробака, що випускає павутину (*Crambus caliginosellus*), гусеницю мятлика лугового, що випускає павутину (*Crambus teterrellus*), вогнівку кукурудзяну південно-західну (*Diatraea grandiosella*), точильника цукрової тростини (*Diatraea saccharalis*), совку бавовняну єгипетську (*Earias insulana*), совку плямисту (*Earias vittella*), совку бавовняну (*Helicoverpa armigera*), совку бавовняну (*Helicoverpa zea*, також відому як соєвий коробковий хробак і бавовняний коробковий хробак), тютюнову листовійку (*Heliothis virescens*), лугового метелика (*Herpetogramma licarsisalis*), західну бобову совку (*Striacosta albicosta*), листовійку гронуvinного винограду (*Lobesia botrana*), цитрусового листового мінера (*Phyllocnistis citrella*), капустницю (*Pieris brassicae*), білану ріпову (*Pieris rapae*, також відому як ріпниця), совку малу (*Spodoptera exigua*), азіатську бавовняну совку (*Spodoptera litura*, також відому як гусінь гронува) і томатного мінера (*Tuta absoluta*).

Посилання в цій заявці на "виділену молекулу ДНК" або еквівалентний термін або фразу призначено для позначення того, що молекула ДНК являє собою молекулу, яка присутня сама по собі або в комбінації з іншими композиціями, але не в її природному середовищі. Наприклад, елементи нуклеїнової кислоти, як-то кодуєча послідовність, інтронна послідовність, нетрансльована лідерна послідовність, промоторна послідовність, послідовність термінації транскрипції і їм подібні, які в природі виявляються в ДНК генома організму, не вважаються "виділеними" доти, доки елемент знаходиться в геномі організму і в тому місці всередині генома, в якому він виявлений в природі. Однак кожен із цих елементів і підчастини цих елементів будуть "виділені" в рамках винаходу, поки елемент не знаходиться в геномі організму і в тому місці в геномі, в якому він виявлений в природі. Так само нуклеотидна послідовність, що кодує інсектицидний білок або будь-який інсектицидний варіант цього білка, що зустрічається в природі, буде виділеною нуклеотидною послідовністю за умови, що нуклеотидна послідовність не перебуває у ДНК бактерії, в якій в природних умовах знаходиться послідовність, що кодує білок. Синтетична нуклеотидна послідовність, яка кодує амінокислотну послідовність інсектицидного білка, що зустрічається в природі, буде вважатися виділеною для цілей цього винаходу. Для цілей цього винаходу будь-яка трансгенна нуклеотидна послідовність тобто, нуклеотидна послідовність ДНК, вставлена в геном клітин рослини чи бактерії або присутня у позахромосомному векторі, буде вважатися виділеною нуклеотидною послідовністю незалежно від того чи, присутня вона в плазміді або аналогічній структурі, що використовується для трансформації клітин, в геномі рослини або бактерії, або присутня в кількостях, що можуть бути виявлені, в тканинах, потомстві, біологічних зразках або товарних продуктах, отриманих з рослини або бактерії.

Як використовується в цьому документі, "молекула рекомбінантної ДНК" являє собою молекулу ДНК, що містить комбінацію молекул ДНК, які не могли б виникнути в природі в такій комбінації без втручання людини. Наприклад, молекула рекомбінантної ДНК може являти собою молекулу ДНК, яка складається щонайменше з двох молекул ДНК, гетерологічних стосовно одна одній, молекулу ДНК, яка містить послідовність ДНК, що відрізняється від послідовностей ДНК, що існують в природі, або молекулу ДНК, яка вставлена в ДНК клітини-господаря шляхом генетичної трансформації або редагування гена. Так само "молекула рекомбінантного білка" являє собою молекулу білка, що містить комбінацію амінокислот, які не могли б виникнути в природі в такій комбінації без втручання людини. Наприклад, молекула рекомбінантного білка може являти собою молекулу білка, яка складається з щонайменше двох гетерологічних по відношенню одна до одної молекул амінокислоти, молекулу білка, яка містить амінокислотну послідовність, що відрізняється від амінокислотних послідовностей, що існують в природі, або молекулу білка, яка експресується в клітині-господарі в результаті генетичної трансформації клітини-господаря або шляхом редагування гена в геномі клітини-господаря.

Як описано далі в цій заявці, відкрита рамка зчитування (ORF), що кодує TIC7941 (SEQ ID NO:2),

була виявлена в ДНК, отриманій зі штаму *Paenibacillus lentimorbus* DSC020651. Кодуючу послідовність клонували і експресували в мікробних клітинах-господарях для отримання рекомбінантних білків, які використовуються в біоаналізах. Біологічний аналіз з використанням білків TIC7941, отриманих з мікробних клітин-господарів, продемонстрував активність проти видів лускокрилих, совки-іпсилон (*Agrotis ipsilon*), совки бавовняної (*Helicoverpa zea*), метелика кукурудзяного (*Ostrinia nubilalis*), південної совки лугової (*Spodoptera eridania*), соєвої совки (*Chrysodeixis includens*) і вогнівки кукурудзяної південно-західної (*Diatraea grandiosella*).

Синтетичні послідовності, що кодують TIC7941 і варіанти TIC7941, були розроблені для експресії в рослинній клітині. Кодуюча послідовність TIC7941PL_1 (SEQ ID NO:3) кодує інсектицидний білок TIC7941PL_1, який ідентичний послідовності білка TIC7941, за винятком додаткової амінокислоти аланіну, вставленої після ініціюючого метіоніну для поліпшення експресії. При експресії в трансгенній кукурудзі TIC7941PL_1 продемонстрував інсектицидну активність проти совки-іпсилон (BCW, *Agrotis ipsilon*), совки бавовняної (CEW, *Helicoverpa zea*) і вогнівки кукурудзяної південно-західної (SWCB, *Diatraea grandiosella*) в аналізах листового диска. При експресії в трансгенних рослинах сої TIC7941PL_1 демонструє інсектицидну активність проти південної совки лугової (SAW, *Spodoptera eridania*), соєвої совки (SBL, *Chrysodeixis includens*) і соєвого коробкового хробака (SPW, *Helicoverpa zea*) в аналізах листового диска. Кодуюча послідовність TIC7941PL_2 (SEQ ID NO:11) і кодуюча послідовність TIC7941PL_3 (SEQ ID NO:13) кодують інсектицидні білки TIC7941PL_2 (SEQ ID NO:12) і TIC7941PL_3 (SEQ ID NO:14) відповідно. Вони містять додаткову амінокислоту аланін, вставлену після ініціюючого метіоніну для поліпшення експресії. І TIC7941PL_2, і TIC7941PL_3 також містять фрагмент пептиду, що зв'язує білок трансмембранного переносника ABC (ABCc4) совки трав'яної, вставлений в петлю домену 2 TIC7941. У TIC7941PL_2 фрагмент, що зв'язує білок ABCc4, розташований в положеннях 796-807 амінокислоти. У TIC7941PL_3 фрагмент, що зв'язує білок ABCc4, розташований в положеннях 795-806 амінокислоти.

Для експресії в рослинних клітинах білок TIC7941PL_1, TIC7941PL_2 або TIC7941PL_3 може експресуватися, щоб перебувати в цитоплазмі, або націлюватися на різні органели рослинної клітини. Наприклад, націлювання білка на хлоропласт може призвести до підвищених рівнів білка, що експресується, в трансгенній рослині, в той же час запобігаючи виникненню другорядних фенотипів. Націлювання також може призвести до підвищення ефективності стійкості до шкідників в трансгенному об'єкті. Пептид-мішень або транзитний пептид являє собою короткий (довжиною від 3 до 70 амінокислот) пептидний ланцюг, який направляє транспортування білка в конкретну область клітини, включаючи ядро, мітохондрії, ендоплазматичний ретикулум (ER), хлоропласт, апопласт, пероксисому і плазматичну мембрану. Деякі пептиди-мішені відщеплюються від білка сигнальними пептидазами після транспортування білків. Для націлювання на хлоропласт білки містять транзитні пептиди, що складаються з близько 40-50 амінокислот. Опис використання транзитних пептидів хлоропластів див. в патентах США №№ 5188642 і 5728925. Численні локалізовані в хлоропласті білки експресуються з ядерних генів в якості попередників і націлені на хлоропласт за допомогою транзитного пептида хлоропласта (CTP). Приклади таких виділених білків хлоропластів включають, крім іншого, білки, пов'язані з малою субодиницею (SSU) рибулоза-1,5-бісфосфаткарбоксилази, ферредоксину, ферредоксину оксидоредуктази, світлозбирального комплексу білка I і білка II, тіоредоксину F, енолпірувілшкімат-фосфатсинтази (EPSPS) і транзитних пептидів, описаних в патенті США № 7193133. Було продемонстровано *in vivo* і *in vitro*, що білки, які не відносяться до хлоропластів, можуть бути націлені на хлоропласт за допомогою злиття білків з гетерологічним CTP, і що CTP достатньо для націлювання білка на хлоропласт. Включення відповідного транзитного пептиду хлоропласта, як-от *Arabidopsis thaliana* EPSPS CTP (CTP2) (див. Klee et al., Mol. Gen. Genet. 210:437-442, 1987) або *Petunia hybrida* EPSPS CTP (CTP4) (див. della-Cioppa et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:6873-6877, 1986), продемонструвало націлювання гетерологічних білкових послідовностей EPSPS на хлоропласти трансгенних рослин (див. патент США №№ 5627061; 5633435 і 5312910; і EP 0218571; EP 189707; EP 508909 і EP 924299). Для націлювання токсинного білка TIC7941, TIC7941PL_1, TIC7941PL_2 або TIC7941PL_3 на хлоропласт послідовність, що кодує транзитний пептид хлоропласта, поміщається в 5'-положенні у функціональному зв'язку і в рамці з синтетичною кодуючою послідовністю, яка кодує токсинний білок TIC7941, TIC7941PL_1, TIC7941PL_2 або TIC7941PL_3, розроблений для оптимальної експресії в рослинних клітинах.

Передбачається, що додаткові послідовності токсинного білка, що відносяться до TIC7941, можуть бути створені з використанням амінокислотної послідовності TIC7941 для створення нових білків з новими властивостями. Токсинні білки TIC7941 можуть бути вирівняні для об'єднання відмінностей на рівні амінокислотної послідовності в нові варіанти амінокислотної послідовності і внесення відповідних змін до послідовностей рекомбінантної нуклеїнової кислоти, що кодує варіанти.

Це розкриття додатково передбачає, що поліпшені варіанти класу білків токсинів TIC7941 можуть бути створені *in planta* з використанням різних способів редагування генів, відомих в цій області техніки. Такі технології, використовувані для редагування генома, включають, крім іншого, ZFN (нуклеази білкового домену "цинкові пальці"), мегануклеази, TALEN (ефекторні нуклеази, подібні

активаторам транскрипції) і CRISPR (короткі паліндромні повтори, регулярно розташовані групами) / Cas-системи (пов'язані з CRISPR). Ці методи редагування генома можна використовувати для зміни кодуєчої послідовності токсинного білка, трансформованої в рослинній клітині, в іншу кодуєчу послідовність токсину. Зокрема, за допомогою цих методів один або кілька кодонів в кодуєчій послідовності токсину змінюються для створення нової амінокислотної послідовності білка. Альтернативно фрагмент в кодуєчій послідовності замінюється або видаляється, або додаткові фрагменти ДНК вставляються в кодуєчу послідовність для створення нової кодуєчої послідовності токсину. Нова кодуєча послідовність може кодувати токсинний білок з новими властивостями, як-от підвищена активність чи спектр проти комах-шкідників, а також забезпечувати активність проти видів комах-шкідників, у яких розвинулася стійкість до вихідного токсинного білка комах. Рослинна клітина, яка містить відредаговану геном кодуєчу послідовність токсину, може бути використана способами, відомими в цій галузі техніки, для створення цілих рослин, які експресують новий токсинний білок.

Також передбачається, що фрагменти TIC7941 або його варіантів білка можуть бути усіченими формами, в яких одна або кілька амінокислот видалені з N-кінцевої області, C-кінцевої області, середини білка, або їх комбінаціями, де фрагменти і варіанти зберігають інгібуючу активність щодо комах. Ці фрагменти можуть зустрічатися в природі або бути синтетичними варіантами TIC7941 або похідними варіантами білка, але повинні зберігати інгібуючу активність щодо комах щонайменше TIC7941. Описаний в цьому документі фрагмент або варіант може додатково містити ідентифікований в цьому документі домен, який відповідає за пестицидну активність білка.

Білки, які подібні до білків з класу білкових токсинів TIC7941, можна ідентифікувати і порівнювати один з одним з використанням різних комп'ютерних алгоритмів, відомих в цій області техніки (див. таблицю 1). Ідентичність амінокислотних послідовностей, представлена в цій заявці, є результатом вирівнювання за допомогою Clustal W з використанням наступних параметрів за замовчуванням: матриця порівняння: blosum, штраф на внесення делеції у вирівнювання: 10,0, штраф на продовження делеції: 0,05, гідрофільні залишки: включені, гідрофільні залишки: GPSNDQERK, штрафи за залишок конкретного гепта: включені (Thompson, et al (1994) Nucleic Acids Research, 22:4673-4680). Відсоток ідентичності амінокислот додатково розраховують як добуток 100 %-го множення на (ідентичність амінокислот/довжина досліджуваного білка). Інші алгоритми вирівнювання також доступні в цій області техніки і забезпечують результати, аналогічні результатам, отриманим з використанням вирівнювання Clustal W, і розглядаються в цьому документі.

Передбачається, що білок, що проявляє інгібуючу активність проти видів комах-лускокрилих, пов'язаний з членом класу білкових токсинів TIC7941, якщо білок використовується в запиті, наприклад, у вирівнюванні Clustal W, і білки за цим винаходом, як зазначено в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:8 або SEQ ID NO:10, ідентифіковані як збіги в такому вирівнюванні, в якому запитуваний білок демонструє від щонайменше 80 % до близько 100 % ідентичність амінокислотної послідовності по довжині запитуваного білка, яка становить близько 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 % або будь-який відсоток в цьому діапазоні.

Крім відсотка ідентичності білки TIC7941 також можуть бути пов'язані за первинною структурою (консервативні амінокислотні мотиви), за довжиною (близько 807 амінокислот) і за іншими характеристиками. Характеристики білкових токсинів TIC7941 наведені в таблиці 1.

Таблиця 1

Вибрані характеристики класу білкових токсинів TIC7941

Білок	Молекулярна маса (в Дальтонах)	Довжина амінокислоти	Ізоелектрична точка	Заряд при pH 7,0	Кількість сильноосновних (-) амінокислот	Кількість сильнокислих амінокислот	Кількість гідрофобних амінокислот	Кількість полярних амінокислот
TIC7941	91187,48	807	4,4561	-35,5	87	118	394	413
TIC7941PL_1	91258,56	808	4,4561	-35,5	87	118	395	413
TIC7941PL_2	92245,74	817	4,4414	-36,5	87	119	402	415
TIC7941PL_3	92203,70	817	4,4544	-35,5	87	118	402	415

Як описано далі в прикладах, послідовності молекул синтетичних нуклеїнових кислот, що кодують варіанти TIC7941, були розроблені для використання в рослинах. Типові послідовності молекул рекомбінантних нуклеїнових кислот, які були розроблені для використання в рослинах, що кодують білки TIC7941PL_1, TIC7941PL_2 і TIC7941PL_3, представлені SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:11 і SEQ ID NO:13 відповідно. Білки TIC7941PL_1, TIC7941PL_2 і TIC7941PL_3 мають додаткову амінокислоту

аланін відразу після ініціюючого метіоніну в порівнянні з білком TIC7941. Вважається, що цей додатковий залишок аланін покращує експресію білка in planta. Білки TIC7941PL_2 і TIC7941PL_3 також містять фрагмент, що зв'язує пептид ABCc4, для підвищення ефективності білків проти совки трав'яної (*Spodoptera frugiperda*).

Касети експресії і вектори, що містять послідовність молекули рекомбінантної нуклеїнової кислоти, можуть бути сконструйовані і введені в клітини рослин кукурудзи, сої або бавовни у відповідності зі способами і методами трансформації, відомими в цій галузі техніки. Наприклад, *Agrobacterium*-опосередкована трансформація описана в публікаціях заявок на патент США 2009/0138985A1 (соє), 2008/0280361A1 (соє), 2009/0142837A1 (кукурудза), 2008/0282432 (бавовна), 2008/0256667 (бавовна), 2003/0110531 (пшениця), 2001/0042257 A1 (цукрові буряки), в патентах США №№ 5750871 (канола), 7026528 (пшениця) і 6365807 (рис), і у Arencibia et al. (1998) Transgenic Res. 7:213-222 (цукрова тростина), всі з яких повністю включені в цей документ шляхом посилання. Трансформовані клітини можна регенерувати в трансформовані рослини, які експресують білок TIC7941PL_1, TIC7941PL_2 або TIC7941PL_3 і демонструють пестицидну активність за допомогою біологічних аналізів, проведених в присутності личинок лускокрилих шкідників з використанням листових дисків рослин, отриманих з трансформованих рослин. Рослини можуть бути отримані з рослинних клітин методами регенерації, посіву, пилку або трансформації меристеми. Способи трансформації рослин відомі в цій галузі техніки.

В якості альтернативи традиційним методам трансформації послідовність ДНК, як-от трансген, касета(-и) експресії тощо, може бути вставлена або інтегрована в конкретний сайт або локус в геномі рослини або рослинної клітини за допомогою сайт-спрямованої інтеграції. Конструкція(-ї) і молекула(-и) рекомбінантної ДНК за цим винаходом можуть, таким чином, включати донорську матричну послідовність, що містить щонайменше один трансген, касету експресії або іншу послідовність ДНК для вставки в геном рослини або рослинної клітини. Така донорна матриця для сайт-спрямованої інтеграції може додатково включати одне або два плеча гомології, що фланкують послідовність вставки (тобто послідовність, трансген, касету тощо, які повинні бути вставлені в геном рослини). Конструкція(-ї) рекомбінантної ДНК за цим винаходом може додатково містити касету(-и) експресії, що кодує сайт-специфічну нуклеазу і/або будь-який пов'язаний(-і) білок(-ки) для здійснення сайт-спрямованої інтеграції. Ці касети, які експресують нуклеазу, можуть бути присутніми в тій же молекулі або векторі, що й донорна матриця (в цис), або в окремій молекулі або векторі (в транс). В цьому рівні техніки відомо декілька способів сайт-спрямованої інтеграції, що включають різні білки (або комплекси білків і/або направляючу РНК), які розрізають геномну ДНК з утворенням дволанцюгового розриву (DSB) або одностанцюгового розриву в бажаному сайті або локусі генома. Якщо коротко, як відомо в цій області техніки, в процесі репарації DSB або одностанцюгового розриву, введеного ферментом нуклеазою, донорна матрична ДНК може інтегруватися в геном сайту DSB або одностанцюгового розриву. Присутність плечей гомології в донорній матриці може сприяти засвоєнню і націлюванню послідовності вставки в геном рослини під час процесу репарації за допомогою гомологічної рекомбінації, хоча подія вставки може відбуватися через негомологічне з'єднання кінців (NHEJ). Приклади сайт-специфічних нуклеаз, які можна використовувати, включають нуклеази цинкових пальців, сконструйовані або нативні мегануклеази, TALE-ендонуклеази і РНК-направлені ендонуклеази (наприклад, Cas9 або Cpf1). Для способів з використанням РНК-направлених сайт-специфічних нуклеаз (наприклад, Cas9 або Cpf1) рекомбінантна ДНК-конструкція(-ї) також буде містити послідовність, що кодує одну або кілька напрямних РНК, щоб направляти нуклеазу в необхідний сайт в геномі рослини.

Передбачені композиції молекул рекомбінантних нуклеїнових кислот, які кодують білки TIC7941. Наприклад, білки TIC7941, TIC7941PL_1, TIC7941PL_2 і TIC7941PL_3 можуть експресуватися за допомогою конструкцій рекомбінантних ДНК, в яких молекула полінуклеотида з ORF, що кодує білок, функціонально пов'язана з елементами експресії гена, як-от промотор і будь-який інший регуляторний елемент, необхідний для експресії в системі, для якої призначена конструкція. Необмежуючі приклади включають функціональний промотор рослини, функціонально пов'язаний з послідовністю, що кодує білок TIC7941, для експресії білка в рослинах, або функціональний промотор Bt, функціонально пов'язаний з послідовністю, що кодує білок TIC7941, для експресії білка в бактерії Bt або іншому виді *Bacillus*. Інші елементи можуть бути функціонально пов'язані з послідовністю, що кодує білок TIC7941, включаючи, але не обмежуючись ними, енхансери, інтрони, нетрансльовані лідери, мітки іммобілізації кодованих білків (HIS-мітка), транслокаційні пептиди (тобто плазмідні транзитні пептиди, сигнальні пептиди), поліпептидні послідовності для посттрансляційних модифікуючих ферментів, сайтів зв'язування рибосом і сайтів-мішеней RNAi. Ілюстративні молекули рекомбінантного полінуклеотида, представлені в цьому документі, включають, але не обмежуються ними, гетерологічний промотор, функціонально пов'язаний з полінуклеотидом, як-от SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11 і SEQ ID NO:13, які кодують відповідні поліпептиди або білки, які мають амінокислотну послідовність, вказану в SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12 і SEQ ID NO:14. Гетерологічний промотор також може бути функціонально пов'язаний з кодуючими послідовностями синтетичної ДНК, які кодують націлений на

пластид TIC7941PL_1, TIC7941PL_2 або TIC7941PL_3 або ненацілений TIC7941PL_1, TIC7941PL_2 або TIC7941PL_3. Кодони молекули рекомбінантної нуклеїнової кислоти, що кодує описані в цьому документі білки, можуть бути замінені синонімічними кодонами (відомими в цій галузі техніки як "прихована заміна").

Конструкція рекомбінантної ДНК, що містить послідовність, що кодує білок TIC7941, може додатково містити область ДНК, яка кодує один або кілька агентів, що інгібують активність комах, яка може бути пристосована для одночасної експресії або спільної експресії з послідовністю ДНК, що кодує білок TIC7941, білок, відмінний від білка TIC7941, молекулу длРНК, інгібуючу активність комах, або допоміжний білок. Допоміжні білки включають, але не обмежуються ними, кофактори, ферменти, партнери по зв'язуванню або інші речовини, які діють для підвищення ефективності речовини, інгібуючої активність комах, наприклад, сприяючи її експресії, впливаючи на її стабільність в рослинах, оптимізуючи вільну енергію для олігомеризації, збільшуючи її токсичність і збільшуючи спектр дії. Допоміжний білок може полегшити поглинання однієї або декількох речовин, що інгібують активність комах, наприклад, або посилити токсичні ефекти токсичної речовини.

Конструкція рекомбінантної ДНК може бути зібрана так, щоб всі білки або молекули длРНК експресувалися з одного промотора, або кожна молекула білка або длРНК перебувала під контролем окремого промотора або деякої їх комбінації. Білки за цим винаходом можуть експресуватися з системи експресії великої кількості генів, в якій один або кілька білків з класу білкових токсинів TIC7941 експресуються із загальної нуклеотидної ділянки, яка також містить інші відкриті рамки зчитування і промотори, залежно від типу обраної системи експресії. Наприклад, система експресії великої кількості генів бактерій може використовувати один промотор для керування експресією багаторазово-пов'язаних/тандемних відкритих рамок зчитування з одного оперону (тобто, поліцистронна експресія). В іншому прикладі система експресії великої кількості генів рослин може використовувати багаторазово-незв'язані або пов'язані касети експресії, причому кожна касета експресує різний білок або іншу речовину, як-от одна або кілька молекул длРНК.

Рекомбінантні полінуклеотиди або конструкції рекомбінантної ДНК, що містять послідовність, що кодує білок TIC7941, можуть бути доставлені в клітини-господарі за допомогою векторів, наприклад, плазміди, бакуловірусу, синтетичної хромосоми, віріону, косміди, фагміди, фага або вірусного вектора. Такі вектори можна використовувати для досягнення стабільної або тимчасової експресії послідовності, що кодує білок TIC7941, в клітині-господарі або подальшої експресії кодового поліпептиду. Екзогенний рекомбінантний полінуклеотид або конструкція рекомбінантної ДНК, яка містить послідовність, що кодує білок TIC7941 і введена в клітину-господаря, називається в цій заявці "трансгеном".

В цьому документі представлені трансгенні бактерії, трансгенні рослинні клітини, трансгенні рослини і частини трансгенних рослин, які містять рекомбінантний полінуклеотид, який експресує послідовність, що кодує білок TIC7941, TIC7941_His, TIC7941PL_1, TIC7941PL_2 або TIC7941PL_3. Термін "бактеріальна клітина" або "бактерія" може включати, але не обмежується ними, клітину *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Brevibacillus*, *Klebsiella*, *Erwinia* або *Rhizobium*. Термін "рослинна клітина" або "рослина" може включати, але не обмежується ними, дводольні або однодольні рослини. Термін "рослинна клітина" або "рослина" може також включати, але без обмеження, клітини або рослину люцерни, банана, ячменю, квасолі, броколі, капусти качанної, капусти, моркви, маніока, рицини, цвітної капусти, селери, нуту, китайської капусти, цитрусових, кокоса, кави, кукурудзи, конюшини, бавовник, кабачок, огірка, псевдотсуги, баклажана, евкаліпта, льону, часнику, винограду, хмелю, цибулі-порей, салату, сосни ладанної, проса, дині, горіха, вівса, оливки, лука, декоративних рослин, пальми, пасовищної трави, гороху, арахісу, перцю, голубиноного гороху, сосни, картоплі, тополі, гарбуза, сосни променистої, редису, ріпаку, рису, кореневища, жита, сафлору, чагарнику, сорго, південної сосни, сої, шпинату, гарбуза великоплідного, полуниці, цукрових буряків, цукрової тростини, соняшнику, солодкої кукурудзи, амбрового дерева, солодкої картоплі, проса стрижнеподібного, чаю, тютюну, помідору, тритикале, дереноутворюючої трави, кавуна і пшениці. У деяких варіантах здійснення передбачені трансгенні рослини і частини трансгенних рослин, одержані з клітини трансгенної рослини. У деяких варіантах здійснення трансгенні рослини можуть бути отримані з трансгенного насіння шляхом розрізання, надрізання, подрібнення або іншого відділення частини від рослини. У деяких варіантах здійснення частина рослини може являти собою насіння, насіннєву коробочку, лист, квітку, стебло, корінь або будь-яку їх частину, або нерегеноеровану частину цієї частини трансгенної рослини. В цьому контексті нерегеноерована частина цієї частини трансгенної рослини являє собою частину, яка не може бути використана для утворення цілої рослини або яка не може бути використана для утворення цілої рослини, здатної до статевого і/або безстатевого розмноження. У деяких варіантах здійснення нерегеноерована частина цієї частини рослини є частиною трансгенного насіння, насіннєвої коробочки, листа, квітки, стебла або кореня.

Передбачені способи отримання трансгенних рослин, що містять кількості білка TIC7941, інгібуючі активність лускокрилих комах. Такі рослини можуть бути отримані шляхом введення рекомбінантного полінуклеотида, який кодує будь-який з білків, представлених в цій заявці, в рослинну клітину і вибору

рослини, отриманої з вказаної рослинної клітини, яка експресує кількість білків, що інгібують активність комах із загалу *Lepidoptera*. Рослини можуть бути отримані з рослинних клітин методами регенерації, посіву, пилку або трансформації меристеми. Способи трансформації рослин відомі в цій галузі техніки.

Оброблені рослинні продукти, в яких оброблений продукт містить кількість білка TIC7941, ділянку або його фрагмент, що інгібує активність комах, або будь-яку їх відмінну частину, також розкриті в цьому документі. У деяких варіантах здійснення оброблений продукт вибраний з групи, що складається з частин рослин, рослинної біомаси, олії, борошна грубого помелу, цукру, корму для тварин, борошна, пластівців, висівок, ворсу, лушпиння, обробленого насіння й насіння. У деяких варіантах здійснення оброблений продукт не підлягає регенерації. Рослинний продукт може включати товар або інші комерційні продукти, отримані з трансгенної рослини або частини трансгенної рослини, де товар або інші продукти можна відстежувати за допомогою торгівлі шляхом виявлення нуклеотидних ділянок або експресованої РНК або білків, які кодують або містять відмінні частини білка TIC7941.

Рослини, які експресують білок TIC7941, можна схрещувати шляхом схрещування з трансгенними об'єктами, експресуючими інші токсинові білки і/або експресуючими інші трансгенні ознаки, як-от гени стійкості до гербіцидів, гени, які надають врожайність, або ознаки стійкості до стресу тощо, або такі ознаки можуть бути об'єднані в один вектор, щоб всі ознаки були пов'язані.

Як додатково описано в прикладах, клас білкового токсину TIC7941 і послідовності, які мають значну відсоткову ідентичність з членом класу білкового токсину TIC7941, можуть бути ідентифіковані з використанням методів, відомих фахівцям в цій області техніки, як-от полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), термічна ампліфікація і гібридизація. Наприклад, білки з класу білкових токсинів TIC7941 можуть використовуватися для отримання антитіл, які специфічно зв'язуються зі спорідненими білками, і можуть використовуватися для скринінгу і пошуку інших членів білків, які тісно пов'язані.

Крім того, нуклеотидні послідовності, що кодують токсинові білки TIC7941, можна використовувати в якості зондів і праймерів для скринінгу для ідентифікації інших членів цього класу з використанням методів термічної або ізотермічної ампліфікації і гібридизації. Наприклад, олігонуклеотиди, отримані з послідовностей, зазначених в SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:11 і SEQ ID NO:13, можна використовувати для визначення присутності або відсутності трансгена TIC7941 в зразку дезоксирибонуклеїнової кислоти, отриманому з товарного продукту. З огляду на чутливість певних методів виявлення нуклеїнових кислот, в яких використовуються олігонуклеотиди, очікується, що олігонуклеотиди, отримані з послідовностей, зазначених в SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:11 і SEQ ID NO:13, можуть бути використані для виявлення трансгена TIC7941PL_1, TIC7941PL_2 і TIC7941PL_3 в товарних продуктах, отриманих з об'єднаних джерел, де тільки частина товарного продукту отримана з трансгенної рослини, що містить будь-який з трансгенів. Крім того, відомо, що такі олігонуклеотиди можна використовувати для введення варіації нуклеотидної послідовності в кожен з SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:11 і SEQ ID NO:13. Такі олігонуклеотиди "мутагенезу" підходять для ідентифікації варіантів амінокислотної послідовності класу білкових токсинів TIC7941, що проявляють діапазон інгібуючої активності відносно комах або різної експресії в клітинах-господарях трансгенних рослин.

Гомологи нуклеотидних послідовностей, наприклад, інсектицидні білки, які кодуються нуклеотидними послідовностями, які гібридизуються з кожною або будь-якою з послідовностей, розкритих у цій заявці, в жорстких умовах гібридизації, також є варіантом здійснення цього винаходу. Винахід також забезпечує спосіб виявлення першої нуклеотидної послідовності, яка гібридизується з другою нуклеотидною послідовністю, де перша нуклеотидна послідовність (або її зворотна послідовність комплементу) кодує пестицидний білок або його пестицидний фрагмент і гібридизується з другою нуклеотидною послідовністю. В такому випадку друга нуклеотидна послідовність може бути будь-якою з нуклеотидних послідовностей, представлених як SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:11 і SEQ ID NO:13 в жорстких умовах гібридизації. Нуклеотидні кодуючі послідовності гібридизуються одна з одною у відповідних умовах гібридизації, як-от жорсткі умови гібридизації, і білки, які кодуються цими нуклеотидними послідовностями, перехресно реагують з антисироваткою, отриманою щодо будь-якого з інших білків. Жорсткі умови гібридизації, як визначено в цьому документі, включають щонайменше гібридизацію при 42 °C з подальшими двома промиваннями по п'ять хвилин кожне при кімнатній температурі за допомогою 2X SSC, 0,1 % SDS, з подальшими двома промиваннями по 30 хвилин кожне при 65 °C в 0,5X SSC, 0,1 % SDS. Промивання при ще більш високих температурах являють собою ще більш жорсткі умови, наприклад, умови гібридизації 68 °C з подальшим промиванням при 68 °C в 2xSSC, що містить 0,1 % SDS.

Фахівець у цій галузі техніки зрозуміє, що через надмірність генетичного коду багато інших послідовностей здатні кодувати такі споріднені білки, і ці послідовності в тій мірі, в якій вони функціонують для експресії пестицидних білків або в штаммах *Bacillus*, або в рослинних клітинах, є варіантами здійснення цього винаходу, враховуючи, звичайно, що багато таких надлишкових кодуючих послідовностей не будуть гібридизуватися в цих умовах з нативними послідовностями

Bacillus або Paenibacillus, що кодують TIC7941. Ця заявка передбачає використання цих та інших методів ідентифікації, відомих фахівцям в цій області техніки, для ідентифікації послідовностей, що кодують білок TIC7941, і послідовностей, що мають суттєву відсоткову ідентичність з послідовностями, що кодують білок TIC7941.

Цей винахід також передбачає використання молекулярних методів, відомих в цій області техніки, для конструювання і клонування комерційно придатних білків, що містять химери білків з пестицидних білків; наприклад, химери можуть бути зібрані з ділянок білків, пов'язаних з TIC7941, для отримання додаткових відповідних варіантів здійснення, включаючи збірку ділянок TIC7941, TIC7941PL_1, TIC7941PL_2 і TIC7941PL_3 з ділянками різних білків, відмінних від TIC7941, TIC7941PL_1, TIC7941PL_2 і TIC7941PL_3; і споріднених білків. Білки TIC7941 можуть бути піддані вирівнюванню один з одним і з іншими Bacillus, Paenibacillus або іншими пестицидними білками (незалежно від того, чи є вони тісно або віддалено спорідненими філогенетично), і ділянки кожного такого білка можуть бути ідентифіковані як придатні для заміни між вирівняними білками, що призводить до створення химерних білків. Такі химерні білки можна піддати біоаналізу щодо шкідників і охарактеризувати на наявність або відсутність підвищеної біоактивності або розширеного спектру цільових шкідників в порівнянні з батьківськими білками, з яких було отримано кожен таку ділянку в химері. Пестицидна активність поліпептидів може бути додатково сконструйована для активності щодо конкретного шкідника або більш широкого спектру шкідників шляхом заміни доменів або ділянок іншими білками або з використанням методів спрямованої еволюції, відомих в цій області техніки.

Крім того, цей винахід передбачає конструювання варіанту пестицидного білка шляхом вставки пептидних послідовностей в нативний пестицидний білок, який може поліпшити пестицидну активність щодо конкретних видів комах-шкідників. Вставлений пептид зв'язується з рецептором в середній кишці комах. Специфічне зв'язування ендотоксину зі специфічними рецепторами, розташованими в середній кишці комах, є однією зі стадій пестицидної дії пестицидного білка. Було описано, що щонайменше п'ять різних рецепторів білка беруть участь у взаємодіях, що призводять до загибелі комах: кадгерин-подібний білок (CADR), глікозилфосфатидилінозит-(GPI) -заякоренна амінопептидаза-N (APN), GPI-заякоренна лужна фосфатаза (ALP), трансмембранний переносник ABC і "дезінтегрин і металопротеїназа" або ADAM-металопротеїназа. Крім того, передбачається, що гліколіпіди також є важливими молекулами Cry-рецепторів у комах і нематод (Pigott et al. (2007) Role of Receptors in Bacillus thuringiensis Crystal Toxin Activity. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 71(2): 255-281; Ochoa-Campuzano et al. (2007) An ADAM metalloprotease is a Cry3Aa Bacillus thuringiensis toxin receptor. Biochemical and Biophysical Research Communication, 362(2): 437-442). Фрагмент пептиду FAWPEPBIN зв'язується з трансмембранним переносником ABC ABCc4 совки трав'яної (FAW). Вставка кодує послідовності FAWPEPBIN_Bac (SEQ ID NO:15), що кодує пептид FAWPEPBIN (SEQ ID NO:17), в петлю домену 2 TIC7941 збільшувала пестицидну активність проти FAW в деяких варіантах. Зокрема, вставка FAWPEPBIN в амінокислотні положення 805-816 в TIC7941_2His призвела до незначної активності проти FAW або до її відсутності, тоді як вставка FAWPEPBIN в амінокислотні положення 804-815 TIC7941_3His продемонструвала активність проти FAW.

Синтетична послідовність ДНК, що кодує пептид FAWPEPBIN, FAWPEPBIN_PL (SEQ ID NO:16), була розроблена для експресії в рослинній клітині. FAWPEPBIN_PL знаходиться між положеннями нуклеотидів 2386 і 2421 синтетичної кодуєчої послідовності TIC7941PL_2 і в положеннях нуклеотидів 2383-2418 синтетичної кодуєчої послідовності TIC7941PL_3. Фрагмент пептиду FAWPEPBIN розташований в амінокислотних положеннях 796-807 TIC7941PL_2 і 795-806 TIC7941PL_3. Рослини кукурудзи трансформували бінарними векторами, що містять трансгенні касети, використовувані для експресії TIC7941PL_2 і TIC7941PL_3. Рослини, які експресують TIC7941PL_2 і TIC7941PL_3, будуть використовуватися для аналізу пестицидної активності сконструйованих токсинів проти FAW.

У цій заявці також розкриті способи боротьби з комахами, зокрема з зараженнями Lepidoptera сільськогосподарських рослин, за допомогою білків TIC7941. Такі способи можуть включати вирощування рослини, що містить кількість токсинового білка TIC7941, інгібуючого активність комах або лускокрилих. У деяких варіантах здійснення такі способи можуть додатково включати будь-яке одне або декілька з: (i) нанесення будь-якої композиції, що містить або кодує токсиновий білок TIC7941, на рослину або насіння, з якого виростає рослина; і (ii) трансформації рослини або рослинної клітини, з яких виростає рослина, полінуклеотидом, що кодує токсиновий білок TIC7941. Загалом, передбачається, що токсиновий білок TIC7941 може бути надано в композиції, надано в мікроорганізмі або надано в трансгенній рослині для додання інгібуючої активності проти лускокрилих комах.

У деяких варіантах здійснення молекула рекомбінантної нуклеїнової кислоти токсинового білка TIC7941 являє собою пестицидно активний інгредієнт композиції, інгібуючої активність комах, отриманої шляхом культивування рекомбінантної клітини Bacillus або будь-якої іншої рекомбінантної бактеріальної клітини, трансформованої для експресії токсинового білка TIC7941 в умовах, що підходять для експресії токсинового білка TIC7941. Така композиція може бути складена шляхом сушіння, ліофілізації, гомогенізації, екстракції, фільтрації, центрифугування, седиментації або концентрування культури таких рекомбінантних клітин, що експресують/продукують вказаний

рекомбінантний поліпептид. Такий процес може призвести до отримання *Bacillus* або іншого екстракту ентомопатогенних бактеріальних клітин, клітинної суспензії, клітинного гомогенату, клітинного лізату, клітинного супернатанту, клітинного фільтрату або клітинного осаду. Шляхом отримання рекомбінантних поліпептидів, отриманих таким чином, композиція, яка містить рекомбінантні поліпептиди, може містити бактеріальні клітини, бактеріальні спори і параспоральні тільця включення і може бути складена для різних застосувань, в тому числі у вигляді продуктів для обприскування сільськогосподарських комах або у вигляді композицій, що інгібують активність комах, в біопробах харчування.

В одному варіанті здійснення для зниження ймовірності розвитку стійкості композиція, що інгібуює активність комах, що містить токсинний білок TIC7941, може додатково містити щонайменше один додатковий поліпептид, який проявляє інгібуючу активність відносно комах щодо того ж виду лускокрилих комах, але який відрізняється від токсинного білка TIC7941. Можливі додаткові поліпептиди для такої композиції включають будь-який білок, що інгібуює активність комах, або молекулу дЛРНК, інгібуючу активність комах, відомі середньому фахівцю в цій області техніки. Один приклад використання таких рибонуклеотидних послідовностей для боротьби з комахами-шкідниками описаний в Baum, et al. (публікація патенту США 2006/0021087 A1). Такий додатковий поліпептид для боротьби з лускокрилими шкідниками може бути вибраний з групи, що складається з білка, інгібуючого активність комах, як-от, але без обмеження, Cry1A (патент США № 5880275), Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1A.105, Cry1Ae, Cry1B (публікація патенту США № 10/525318), Cry1C (патент США № 6033874), Cry1D, Cry1Da і його варіанти, Cry1E, Cry1F, і химери Cry1A/F (патенти США №№ 7070982; 6962705 і 6713063), Cry1G, Cry1H, Cry1I, Cry1J, Cry1K, Cry1L, химери Cry1-типу, як-от, але без обмеження, TIC836, TIC860, TIC867, TIC869 і TIC1100 (публікація міжнародної заявки WO2016/061391 (A2)), TIC2160 (публікація міжнародної заявки WO2016/061392(A2)), Cry2A, Cry2Ab (патент США № 7064249), Cry2Ae, Cry4B, Cry6, Cry7, Cry8, Cry9, Cry15, Cry43A, Cry43B, Cry51Aa1, ET66, TIC400, TIC800, TIC834, TIC1415, Vip3A, Vip3Ab, Vip3B, AXMI-001, AXMI-002, AXMI-030, AXMI-035 і AXMI-045 (публікація патенту США 2013-0117884 A1), AXMI-52, AXMI-58, AXMI-88, AXMI-97, AXMI-102, AXMI-112, AXMI-117, AXMI-100 (публікація патенту США 2013-0310543 A1), AXMI-115, AXMI-113, AXMI-005 (публікація патенту США 2013-0104259 A1), AXMI-134 (публікація патенту США 2013-0167264 A1), AXMI-150 (публікація патенту США 2010-0160231 A1), AXMI-184 (публікація патенту США 2010-0004176 A1), AXMI-196, AXMI-204, AXMI-207, AXMI-209 (публікація патенту США 2011-0030096 A1), AXMI-218, AXMI-220 (публікація патенту США 2014-0245491 A1), AXMI-221z, AXMI-222z, AXMI-223z, AXMI-224z, AXMI-225z (публікація патенту США 2014-0196175 A1), AXMI-238 (публікація патенту США 2014-0033363 A1), AXMI-270 (публікація патенту США 2014-0223598 A1), AXMI-345 (публікація патенту США 2014-0373195 A1), AXMI-335 (публікація міжнародної заявки WO2013/134523(A2)), DIG-3 (публікація патенту США 2013-0219570 A1), DIG-5 (публікація патенту США 2010-0317569 A1), DIG-11 (публікація патенту США 2010-0319093 A1), AflP-1A і його похідні (публікація патенту США 2014-0033361 A1), AflP-1B і його похідні (публікація патенту США 2014-0033361 A1), PIP-1A/PI-1B (публікація патенту США 2014-0007292 A1), PSEEN3174 (публікація патенту США 2014-0007292 A1), AECFG-592740 (публікація патенту США 2014-0007292 A1), Pput_1063 (публікація патенту США 2014-0007292 A1), DIG-657 (публікація міжнародної заявки WO2015/195594 A2), Pput_1064 (публікація патенту США 2014-0007292 A1), GS-135 і його похідні (публікація патенту США 2012-0233726 A1), GS153 і його похідні (публікація патенту США 2012-0192310 A1), GS154 і його похідні (публікація патенту США 2012-0192310 A1), GS155 і його похідні (публікація патенту США 2012-0192310 A1), SEQ ID NO:2 і її похідні, як описано в публікації патенту США 2012-0167259 A1, SEQ ID NO:2 і її похідні, як описано в публікації патенту США 2012-0047606 A1, SEQ ID NO:2 і її похідні, як описано в публікації патенту США 2011-0154536 A1, SEQ ID NO:2 і її похідні, як описано в публікації патенту США 2011-0112013 A1, SEQ ID NO:2 і 4 і їхні похідні, як описано в публікації патенту США 2010-0192256 A1, SEQ ID NO:2 і її похідні, як описано в публікації патенту США 2010-0077507 A1, SEQ ID NO:2 і її похідні, як описано в публікації патенту США 2010-0077508 A1, SEQ ID NO:2 і її похідні, як описано в публікації патенту США 2009-0313721 A1, SEQ ID NO:2 або 4 і їхні похідні, як описано в публікації патенту США 2010-0269221 A1, SEQ ID NO:2 і її похідні, як описано в патенті США № 7772465 (B2), CF161_0085 і його похідні, як описано в WO2014/008054 A2, токсинні білки лускокрилих і їхні похідні, як описано в публікаціях патентів США US2008-0172762 A1, US2011-0055968 A1 і US2012-0117690 A1; SEQ ID NO:2 і її похідні, як описано в US7510878(B2), SEQ ID NO:2 і її похідні, як описано в патенті США № 7812129(B1), DIG-911 і DIG-180, як описано в публікації патенту США № 2015-0264940A1 тощо.

В інших варіантах здійснення така композиція може додатково містити щонайменше один додатковий поліпептид, який проявляє інгібуючу активність відносно комах, які не інгібуються іншим білком, що інгібуює активність комах, за цим винаходом, для розширення спектру отриманого інгібування активності комах. Наприклад, для боротьби з напівжорсткокрилими шкідниками комбінації білків, що інгібують активність комах, за цим винаходом можуть бути використані з білками, активними для напівжорсткокрилих комах, як-от TIC1415 (публікація патенту США 2013-0097735 A1), TIC807 (патент США № 8609936), TIC834 (публікація патенту США 2013-0269060 A1), AXMI-036 (публікація

патенту США 2010-0137216 A1) і AXMI-171 (публікація патенту США 2013-0055469 A1). Крім того, поліпептид для боротьби з жорсткокрилими шкідниками може бути вибраний з групи, що складається з білка, інгібуючого активність комах, як-от, але не обмежуючись ними, Cry3Bb (патент США № 6501009), варіанти Cry1C, варіанти Cry3A, Cry3, Cry3B, Cry34/35, 5307, AXMI134 (публікація патенту США 2013-0167264 A1), AXMI-184 (публікація патенту США 2010-0004176 A1), AXMI-205 (публікація патенту США 2014-0298538 A1), AXMI-207 (публікація патенту США 2013-0303440 A1), AXMI-218, AXMI-220 (публікація патенту США 20140245491A1), AXMI-221z, AXMI-223z (публікація патенту США 2014-0196175 A1), AXMI-279 (публікація патенту США 2014-0223599 A1), AXMI-R1 і його варіанти (публікація патенту США 2010-0197592 A1, TIC407, TIC417, TIC431, TIC807, TIC853, TIC901, TIC1201, TIC3131, DIG-10 (публікація патенту США 2010-0319092 A1), eHIP (публікація заявки на патент США № 2010/0017914), IP3 і його варіанти (публікація патенту США 2012-0210462 A1), варіанти PHI-4 (публікація заявки на патент США 2016-0281105 A1), варіанти PIP-72 (WO 2016-144688 A1), варіанти PIP-45, варіанти PIP-64, варіанти PIP-74, варіанти PIP-75 і варіанти PIP-77 (WO 2016-144686 A1), DIG-305 (WO 2016109214 A1), варіанти PIP-47 (публікація патенту США 2016-0186204 A1), DIG-17, DIG-90, DIG-79 (WO 2016-057123 A1), DIG-303 (WO 2016-070079 A1) і □-гексатоксин-Hv1a (публікація заявки на патент США US2014-0366227 A1).

Додаткові поліпептиди для боротьби з жорсткокрилими, лускокрилими і напівжорсткокрилими комахами-шкідниками можна знайти на веб-сайті номенклатури токсинів *Bacillus thuringiensis*, підтримуваному Нілом Крікмором (доступний в інтернеті за посиланням www.btnomenclature.info).

Можливість розвитку у комах стійкості до певних інсектицидів документально підтверджена в цій області техніки. Одна зі стратегій боротьби зі стійкістю комах полягає у використанні трансгенних культур, які експресують дві різні речовини, що інгібують активність комах, які мають різні способи дії. Отже, з будь-якими комахами зі стійкістю до будь-якої з речовин, що інгібують активність комах, можна боротися за допомогою іншої речовини, інгібуючої активність комах. Інша стратегія боротьби зі стійкістю комах передбачає використання рослин, які не захищені від цільових видів лускокрилих, щоб забезпечити притулок для таких незахищених рослин. Один конкретний приклад описаний у патенті США № 6551962, який повністю включений шляхом посилання.

Інші варіанти здійснення, як-от місцево застосовні пестицидні хімічні речовини, розроблені для боротьби зі шкідниками, з якими також борються описаними в цьому документі білками, для використання з білками в композиціях для обробки насіння, обприскування, капання або протирання, можуть бути внесені безпосередньо в ґрунт (просочення ґрунту), застосовані до зростаючих рослин, які експресують описані в цьому документі білки, або складені для нанесення на насіння, що містить один або кілька трансгенів, що кодують один або кілька розкритих білків. Такі композиції для використання при обробці насіння можна наносити з різними клейкими речовинами і речовинами для підвищення клейкості, відомими в цій галузі техніки. Такі композиції можуть містити пестициди, які є синергетичними за способом дії з розкритими білками так, що пестициди в композиції діють за допомогою іншого механізму дії для боротьби з тими ж або подібними шкідниками, які можуть контролюватися розкритими білками, або що такі пестициди діють для боротьби зі шкідниками в більш широкому діапазоні господарів або видів шкідників рослин, з якими не можна ефективно боротися за допомогою пестицидних білків TIC7941.

Вищезазначена композиція може додатково містити прийнятний з точки зору сільського господарства носій, як-от приманка, порошок, пил, пелет, гранула, спрей, емульсія, колоїдна суспензія, водний розчин, спори *Bacillus*/препарат кристалів, обробка насіння, рекомбінантна рослинна клітина/рослинна тканина/насіння/рослина, трансформовані для експресії одного або декількох білків, чи бактерія, трансформована для експресії одного або декількох білків. Залежно від рівня інгібуння активності комах або пестицидного інгібуння, властивого рекомбінантному поліпептиду, і рівня композиції, що застосовується в рослинному аналізі або аналізі раціону, композиція може включати різні за масою кількості рекомбінантного поліпептиду, наприклад, від 0,0001 % до 0,001 %, до 0,01 %, до 1 %, до 99 % за масою рекомбінантного поліпептиду.

Цей винахід також розглядає композиції і способи зниження експресії пестицидного білка в тканинах органів розмноження трансгенної рослини за допомогою використання мікроРНК (мікроРНК). мікроРНК є важливими компонентами механізму сайленсингу генів у рослин. У рослин вироблення мікроРНК є тканиноспецифічним процесом, тісно пов'язане з транскрипцією і сплайсингом і навіть варіюється між попередниками мікроРНК. мікроРНК, що кодуються ядерною ДНК в рослинах, функціонують за рахунок спарювання основ з комплементарними послідовностями в молекулах мРНК (Achkar et al. (2016) *miRNA Biogenesis: A Dynamic Pathway*, Trends in Plant Science. 21(12): 1034-1044). мікроРНК продукуються з первинного транскрипту мікроРНК (при-мікроРНК). Виникаючі ргі-мікроРНК кепіровані на 5'-кінці і поліаденільовані на 3'-кінці, а ргі-мікроРНК, що містять інтрон, сплайсуються або альтернативно сплайсуються. ргі-мікроРНК обробляються комплексом дайсера, який містить ядерну РНКазу DICER-LIKE 1 (DCL1) і її допоміжні білки SERRATE (SE) і HYPONASTIC LEAVES (HYL1) в якості основних компонентів, з утворенням зрілого дуплексу мікроРНК/мікроРНК* з двадцяти одного (21) нуклеотиду. Дуплекс мікроРНК/мікроРНК* стабілізується за допомогою 3'-кінцевого 2'-О-

метилування за допомогою HUA ENHANCER 1 (HEN1). HEN1 також вносить вклад в експорт дуплексу мікроРНК/мікроРНК* з ядра клітини і в збірку РНК-індукованого комплексу сайленсингу (RISC). Під час завантаження RISC один ланцюг дуплексу малої РНК вибирається в якості направляючого ланцюга і включається в ARGONAUTE 1 (AGO1) для утворення функціонального RISC, тоді як інший ланцюг (супроводжувачий ланцюг) видаляється й руйнується. На завантаження мікроРНК в AGO-білки впливають петлі в дуплексах мікроРНК/мікроРНК*, викликані розбіжністю пар основ. AGO1 надає перевагу дуплексам з центральними розбіжностями (Yu et al. (2017) The "how" and "where" of plant microRNAs. New Phytologist, 216: 1002-1017).

мікроРНК рослин регулюють гени-мішені на посттранскрипційному рівні за допомогою двох основних механізмів: розщеплення транскрипта і репресії трансляції. У рослин репресія трансляції спостерігається рідше, ніж розщеплення транскрипта. мікроРНК-направлене розщеплення РНК відбувається в точному положенні в цільовій мРНК. Розщеплення здійснюється доменом PIWI AGO-білків, який утворює H-подібну складку РНКаз і проявляє ендонуклеазну активність. Фрагменти розщеплення на 5'-кінці і 3'-кінці згодом розщеплюються екзонуклеазами. Відомі фактори, необхідні для інгібування трансляції, опосередкованої мікроРНК, включають фермент, що розділяє мікротрубочки KATANIN 1 (KTN1), компонент тіла процесингу (Р-тіла) VARICOSE (VCS), GW-повторюваний білок SUO і мембранний білок ER ALTERED MERISTEM PROGRAM 1 (AMP1). Мутації в цих генах селективно перешкоджають мікроРНК-направленій репресії на рівні білка, припускаючи, що розщеплення транскрипта і репресія трансляції є двома незалежними способами дії. Молекулярний механізм, що лежить в основі мікроРНК-опосередкованої репресії трансляції, мало зрозумілий. Аналіз *in vitro* передбачає, що мікроРНК рослин можуть інгібувати ініціацію трансляції або перешкоджати переміщенню рибосом (Yu et al. (2017) The "how" and "where" of plant microRNAs. New Phytologist, 216: 1002-1017).

Крім розщеплення мРНК і репресії трансляції, деякі мікроРНК також запускають вироблення вторинних коротких інтерферуючих РНК (міРНК) зі своїх транскриптів, і це широко поширене і консервативне явище у рослин (Yu et al. (2017) The "how" and "where" of plant microRNAs. New Phytologist, 216: 1002-1017). мікроРНК, які зазвичай запускають вироблення цих вторинних міРНК, мають довжину двадцять два (22) нуклеотиди, на відміну від мікроРНК з двадцяти одного (21) нуклеотиду, описаних вище. Цільова РНК перетворюється в дволанцюгову РНК (длРНК) за допомогою РНК-залежної РНК-полімерази (RdRp), яка потім розщеплюється на міРНК DCL-нуклеазами. Як правило, один ланцюг дуплексу переважно зв'язується з AGO-білком з утворенням ефекторного комплексу (РНК-індукований комплекс сайленсингу або RISC), який націлений на транскрипти і пригнічує їх на основі комплементарності послідовностей. У *Arabidopsis* після AGO1-опосередкованого розщеплення цільової РНК, що спрямовується мікроРНК, фрагмент розщеплення в 5' або 3' положенні стабілізується за допомогою супресора сайленсингу генів 3 (SGS3), який зв'язується з RISC, розпізнаючи особливості дуплексу мікроРНК/мішені з двадцяти двох (22) нуклеотидів для захисту розщеплення. РНК-залежна РНК-полімераза 6 (RDR6) залучається для перетворення розщепленого фрагмента в длРНК, яка пізніше розщеплюється на міРНК з фрагментом з двадцяти одного (21) нуклеотиду від моменту розпаду. У рослин цей процес може бути посилений за рахунок вироблення вторинних міРНК після транскрипції РНК-залежною РНК-полімеразою (RdRp) на первинній цільовій РНК (Cuperus et al., (2010) Unique Functionality of 22 nt microRNAs in Triggering RDR6-Dependent miRNA Biogenesis from Target Transcripts in *Arabidopsis*. Nat Struct Mol Biol, 17(8): 997-1003; Chen et al., (2010) 22-Nucleotide RNAs trigger secondary miRNA biogenesis in Plants. Proceedings of the National Academy of Sciences, 107: 15269-15274; Yu et al. (2017) The "how" and "where" of plant microRNAs. New Phytologist, 216: 1002-1017).

Шляхом збору даних про мікроРНК в різних тканинах сої були ідентифіковані дві мікроРНК, які були надмірно представлені в тканинах органів розмноження в порівнянні з тканинами з рослинних волокон; miR395 і miR4392. miR395 процесується в дуплекс мікроРНК/мікроРНК* з двадцяти одного (21) нуклеотиду і експресується в основному в тичинках квіток сої. miR4392 процесується в дуплекс мікроРНК/мікроРНК* з двадцяти двох (22) нуклеотидів і запускає вироблення вторинних міРНК зі своїх транскриптів, посилюючи сигнал пригнічення. miR4392 високо збагачена в пильовиках квіток сої. Пов'язані з білком AGO з утворенням комплексу сайленсингу, мікроРНК функціонують як сіквенс-специфічні провідники, направляючи комплекс сайленсингу до транскрипта за допомогою спарювання основ між мікроРНК і комплементарними сайтами, що називаються в цьому документі "сайтами зв'язування мішеней мікроРНК", в межах 3'-нетрансльованої області (3' UTR) цільових РНК. Сайти зв'язування мішеней мікроРНК, відповідні miR395 (Gm.miR395_1 (SEQ ID NO:18) і Gm.miR395_2 (SEQ ID NO:19)) і miR4392 (Gm.miR4392_1 (SEQ ID NO:21) і Gm.miR4392_2 (SEQ ID NO:22)), були функціонально пов'язані з використанням ДНК-спейсера (SP-ART.8a-1, SEQ ID NO:24) для конструювання SUP-miR395 (SEQ ID NO:20) і SUP-miR4392 (SEQ ID NO:23) відповідно. SUP-miR395 і SUP-miR4392, в свою чергу, функціонально пов'язані з 3'-кодуючою послідовністю TIC7941PL_1 після стоп-кодону, що продукує трансгени, TIC7941PL_1-miR395 (SEQ ID NO:25) і TIC7941PL_1-miR4392 (SEQ ID NO:26) відповідно. Експресія TIC7941PL_1-miR395 і TIC7941PL_1-miR4392 не впливала на

пестицидну активність TIC7941PL_1. І TIC7941PL_1-miR395, і TIC7941PL_1-miR4392 продемонстрували аналогічну пестицидну активність проти південної совки лугової (SAW, *Spodoptera eridania*), соєвої совки (SBL, *Chrysodeixis includens*) і соєвого коробкового хробака (SPW, *Helicoverpa zea*) в порівнянні з TIC7941PL_1 в аналізі листового диска. Функціональне зв'язування сайтів-мішеней miR395 і miR4392 з кодуючою послідовністю TIC7941PL_1 призначене для зниження експресії пестицидного білка TIC7941PL_1 в тканинах органів розмноження трансгенної сої, що експресує TIC7941PL_1-miR395 або TIC7941PL_1-miR4392.

Беручи до уваги вищевикладене, фахівці в цій області техніки повинні розуміти, що в конкретні розкриті аспекти можуть бути внесені зміни, і при цьому все ще можна отримати подібний або аналогічний результат без відхилення від суті і об'єму винаходу. Таким чином, конкретні структурні і функціональні подробиці, розкриті в цьому документі, не слід інтерпретувати як обмежуючі. Слід розуміти, що повне розкриття кожного посилання, цитованого в цьому документі, включено в розкриття цієї заявки.

ПРИКЛАДИ

Приклад 1

Відкриття, клонування й експресія TIC7941

Послідовність, що кодує новий пестицидний білок *Paenibacillus lentimorbus*, ідентифікували, клонували, підтверджували послідовність і тестували в біоаналізі комах. Пестицидний білок TIC7941, виділений з виду *Paenibacillus lentimorbus* DSC020651, являє собою новий Vip3C-подібний білок. Віддалено пов'язані послідовності з TIC7941 являють собою Vip3Ca1 (ідентичність 72,43 %, найближча відома споріднена послідовність), Vip3Aa1 (ідентичність 64,45 %) і Vip3B-подібний білок (ідентичність 59 %).

Повнорозмірна копія кодуючої області для TIC7941 і версія TIC7941 (TIC7941_His) з His-міткою були синтезовані способами, відомими в цій галузі техніки, і містять кодони ініціації і термінації трансляції кожної кодуючої послідовності. Кодуючу послідовність TIC7941 клонували з використанням способів, відомих в цій області техніки, у вектор експресії Bt у функціональному зв'язуванні з промотором, що експресується Bt. Вектор експресії Bt містив промотор, діючий на стадії спорудження *bacillus*. Крім того, кодуюча послідовність TIC7941_His була клонована у вектор, який використовується для експресії білка в *Escherichia coli* (E. coli). Для виділення експресованих білків E. coli гістидинову мітку функціонально пов'язували з експресованими кодуючими послідовностями для полегшення очищення білка на колонії. Кодуючі послідовності і відповідні їм білкові послідовності, використовувані для бактеріальної експресії, представлені в таблиці 2.

Таблиця 2

Кодуючі послідовності токсину і відповідні послідовності білків, які використовуються для експресії в Bt і E. coli

Токсин	Кодуюча послідовність ДНК SEQ ID NO:	Білок SEQ ID NO:	Бактерія-господар для експресії
TIC7941	1	2	Bt
TIC7941_His	5	6	E. coli

Приклад 2

TIC7941 демонструє активність проти лускокрилих в біоаналізі комах

Пестицидний білок TIC7941 був експресований в Bt і E. coli і проаналізований на токсичність для різних видів *Lepidoptera*, *Coleoptera*, *Hemiptera* і *Diptera*. Отримання TIC7941 і TIC7941_His з Bt і E. coli оцінювали щодо видів лускокрилих, совки-іпсилон (BCW, *Agrotis ipsilon*), совки бавовняної (CEW, також відомої як соєвий коробковий черв'як (SPW), *Helicoverpa zea*), метелика кукурудзяного (ECB, *Ostrinia nubilalis*), совки трав'яної (FAW, *Spodoptera frugiperda*), південної совки лугової (SAW, *Spodoptera eridania*), соєвої совки (SBL, *Chrysodeixis includens*), вогнівки кукурудзяної південно-західної (SWCB, *Diatraea grandiosella*), тютюнової листовійки (TBW, *Heliothis virescens*) і гусениці оксамитових бобів (VBW, *Anticarsia gemmatilis*); видів жорсткокрилих, колорадського жука (CPB, *Leptinotarsa decemlineata*) і західного кукурудзяного жука (WCB, *Diabrotica virgifera virgifera*); і видів напівжорсткокрилих, клопа трав'яного (TPB, *Lygus lineolaris*) і західного клопа трав'яного (WTP, *Lygus hesperus*); і видів двокрилих, жовтолихоманкового комара (YFM, *Aedes aegypti*).

Для продукування TIC7941 в Bt-господарях штам Bt, експресуючий TIC7941, вирощували протягом двадцяти чотирьох (24) годин, а потім цю культуру додавали в раціон комах. Смертність і затримку росту оцінювали шляхом порівняння зростання і розвитку комах з раціоном, що включає культуру зі штаму Bt, експресуючого TIC7941, з комахами з раціоном, що включає необроблену контрольну

культуру.

Штам *E. coli*, експресуючий TIC7941_His, обробляли аналогічно штаму Bt і вводили в раціон комах після очищення білка і порівнювали з ростом і розвитком комах з раціоном з необробленою контрольною культурою. TIC7941 продемонстрував пестицидну активність проти видів лускокрилих комах-шкідників: совки-іпсилон, совки бавовняної, метелика кукурудзяного, південної совки лугової, соєвої совки і вогнівки кукурудзяної південно-західної. Зокрема, активність була високою проти соєвої совки.

Приклад 3

Аналіз активності TIC7941PL_1 проти лускокрилих шкідників в стабільно трансформованих рослинах кукурудзи

Бінарний вектор трансформації рослин, що містить трансгенну касету, призначену для експресії ненаціленого пестицидного білка TIC7941PL_1, клонували з використанням способів, відомих в цій області техніки. Отриманий вектор використовували для стабільної трансформації рослин кукурудзи. Тканини збирали з трансформантів і використовували в біоаналізі комах проти різних лускокрилих комах-шкідників.

Синтетична кодуюча послідовність була сконструйована для використання в експресії TIC7941 в рослинах, клонована в бінарний вектор трансформації рослин і використана для трансформації клітин рослин кукурудзи. Синтетична послідовність була синтезована відповідно до методів, схематично описаних у патенті США 5500365, щоб уникнути деяких невідповідних проблемних послідовностей, як-от послідовності поліаденілювання рослин, збагачених АТТТА і А/Т, при збереженні амінокислотної послідовності нативного білка *Paenibacillus*. Синтетична кодуюча послідовність (SEQ ID NO: 3) кодує білок TIC7941PL_1 (SEQ ID NO: 4), який містить додатковий залишок аланіну відразу після ініціюючого метіоніну щодо білка TIC7941. Отриманий вектор трансформації рослин містив першу трансгенну касету для експресії пестицидного білка TIC7941PL_1, яка містила конститутивний промотор, функціонально пов'язаний на 5'-кінці з лідером, функціонально пов'язаний на 5'-кінці з інтроном, функціонально пов'язаний на 5'-кінці з синтетичною кодуючою послідовністю, що кодує ненацілений білок TIC7941PL_1 (SEQ ID NO:4), яка, в свою чергу, функціонально пов'язана на 5'-кінці з 3'-UTR; і другу трансгенну касету для відбору трансформованих рослинних клітин з використанням відбору гліфосатом.

Клітини рослин кукурудзи трансформували бінарним вектором трансформації, як описано вище, з використанням методу трансформації, опосередкованої *Agrobacterium*. Трансформовані клітини індукували з утворенням рослин способами, відовими в цій галузі техніки. Біологічні аналізи з використанням дисків листя рослин були виконані аналогічно описаним в патенті США № 8344207. Одну новонароджену личинку, яка щойно вилупилася, молодше одного дня поміщали на кожен зразок листового диска і давали харчуватися протягом приблизно чотирьох днів. Нетрансформовану рослину кукурудзи використовували для отримання тканини, яка буде використовуватися в якості негативного контролю. Об'єкти вставки однієї копії R₀ з множинною трансформацією з кожного бінарного вектора оцінювали щодо BCW, CEW, FAW і SWCB.

Дванадцять трансформованих об'єктів R₀ оцінювали з використанням листових дисків рослини. Оцінка пошкодження листя (LDR), що дорівнює одному, трьом або чотирьом, була присвоєна кожному об'єкту для кожного досліджуваного виду комах-шкідників. LDR, що дорівнює 1 (одиниці), еквівалентна пошкодженню, яке менше або дорівнює тридцяти відсоткам. LDR, що дорівнює 3 (трьом), еквівалентна пошкодженню, яке менше або дорівнює п'ятдесяти відсоткам. LDR, що дорівнює 4 (чотирьом), еквівалентна пошкодженню, яке більше п'ятдесяти відсотків. Бали LDR для кожного об'єкта і кожного виду комах-шкідників представлені в таблиці 3.

Таблиця 3

Оцінки пошкодження листя (LDR) для трансформованих об'єктів R₀ кукурудзи, що експресують TIC7941PL_1

Об'єкт	Оцінки пошкодження листя R ₀			
	BCW	CEW	FAW	SWCB
Об'єкт 1	1	1	4	3
Об'єкт 2	1	1	4	1
Об'єкт 3	4	4	4	4
Об'єкт 4	4	4	4	4
Об'єкт 5	1	1	4	3
Об'єкт 6	1	1	4	1
Об'єкт 7	4	4	4	4
Об'єкт 8	4	4	4	4

Таблиця 3

Оцінки пошкодження листя (LDR) для трансформованих об'єктів R₀ кукурудзи, що експресують TIC7941PL₁

Об'єкт	Оцінки пошкодження листя R ₀			
	BCW	CEW	FAW	SWCB
Об'єкт 9	1	1	4	4
Об'єкт 10	4	4	4	4
Об'єкт 11	1	1	4	3
Об'єкт 12	1	1	4	1

Як видно з таблиці 3, сім з дванадцяти проаналізованих трансформованих об'єктів R₀ продемонстрували стійкість до BCW і CEW. Три з семи об'єктів також продемонстрували стійкість до SWCB.

Об'єкти з першого по шостий були обрані для аналізу в поколінні F₁. У таблиці 4 показані оцінки LDR для кожного з шести об'єктів, проаналізованих проти чотирьох видів комах-шкідників.

Таблиця 4

Оцінки пошкодження листя (LDR) для трансформованих об'єктів F₁ кукурудзи, що експресують TIC7941PL₁

Об'єкт	Оцінки пошкодження листя F ₁			
	BCW	CEW	FAW	SWCB
Об'єкт 1	1	1	4	1
Об'єкт 2	1	3	4	1
Об'єкт 3	1	1	4	3
Об'єкт 4	1	1	4	3
Об'єкт 5	1	1	4	3
Об'єкт 6	1	1	4	3

Як видно з таблиці 4, всі шість об'єктів продемонстрували стійкість до BCW, п'ять з шести об'єктів продемонстрували стійкість до CEW, а два з шести об'єктів продемонстрували стійкість до SWCB. Рослини кукурудзи, стабільно трансформовані трансгенною касетою для експресії TIC7941, демонструють стійкість до видів лускокрилих шкідників, як-от BCW, CEW і SWCB.

Приклад 4

Аналіз активності TIC7941PL₁ проти лускокрилих шкідників в стабільно трансформованих рослинах сої

Бінарні вектори трансформації рослин, що містять трансгенні касети, призначені для експресії нецільового пестицидного білка TIC7941PL₁, клонували з використанням способів, відомих в цій області техніки. Отримані вектори використовували для стабільної трансформації рослин сої. Тканини збирали з трансформантів і використовували в біоаналізі комах проти різних лускокрилих комах-шкідників.

Синтетична кодуюча послідовність TIC7941PL₁, призначена для експресії рослин, як описано в прикладі 3, була клонована в бінарні вектори трансформації рослин і використана для трансформації клітин рослин сої. Бінарні вектори, що містять нецільову кодуючу послідовність TIC7941PL₁, були сконструйовані з використанням способів, відомих в цій області техніки. Отримані в результаті вектори трансформації рослин містили першу трансгенну касету для експресії пестицидного білка TIC7941PL₁, яка містила експресований рослиною промотор, функціонально пов'язаний на 5'-кінці з лідером, функціонально пов'язаний на 5'-кінці з синтетичною кодуючою послідовністю, яка кодує ненацілений білок TIC7941PL₁ (SEQ ID NO: 4), який, в свою чергу, функціонально пов'язаний на 5'-кінці з 3'-UTR, і другу трансгенну касету для відбору трансформованих рослинних клітин з використанням селекції спектиноміцином. Чотири (4) бінарних вектори трансформації були сконструйовані, як описано вище. Кожна конструкція містила касету експресії TIC7941PL₁, що містить різні промотори і 3'-UTR.

Трансформовані клітини сої індукували з утворенням рослин способами, відовими в цій галузі техніки. Біоаналізи з використанням дисків листя рослин були виконані аналогічно описаним в патенті США № 8344207. Нетрансформовану рослину сої використовували для отримання тканини, яка буде використовуватися в якості негативного контролю. Об'єкти з множинною трансформацією з кожного бінарного вектора оцінювали щодо SAW, SBL, SPW і VBW.

Об'єкти R₀, отримані в результаті трансформацій з використанням чотирьох різних бінарних конструкцій, оцінювали з використанням листових дисків рослини. Оцінка пошкодження листя (LDR) від одного до чотирьох була присвоєна кожному об'єкту для кожного аналізованого виду комах-шкідників. LDR, що дорівнює 1 (одиниці), еквівалентна пошкодженню, яке менше або дорівнює двадцяти відсоткам. LDR, що дорівнює (2), еквівалентна двадцяти відсоткам і менше або дорівнює тридцяти п'яти відсоткам пошкодження. LDR, що дорівнює 3 (трьом), еквівалентна тридцяти п'яти відсоткам пошкодження, яке менше або дорівнює сімдесяти відсоткам. LDR, що дорівнює чотирьом (4), еквівалентна пошкодженню понад сімдесят відсотків. Оцінки LDR для кожної конструкції і кожного виду комах-шкідників представлені в таблиці 5. Також представлено кількість об'єктів, які демонструють оцінку LDR (спостережувану) по відношенню до кількості проаналізованих об'єктів. Високий рівень прояву гена ознаки стійкості визначається як оцінка LDR, що дорівнює одиниці (1), де понад п'ятдесят відсотків (50 %) об'єктів демонструють LDR, що дорівнює одиниці (1).

Таблиця 5

Оцінки пошкодження листя (LDR) і прояв гена для трансформованих об'єктів R₀ сої, що експресують TIC7941PL_1

Конструкція	LDR (спостережувана/що аналізується)			
	SAW	SBL	SPW	VBC
Конструкція 1	1 (12/14)	1 (13/14)	1 (12/14)	2 (1/13)
Конструкція 2	1 (14/14)	1 (14/14)	1 (13/14)	3 (9/14)
Конструкція 3	1 (12/12)	1 (12/12)	1 (12/12)	3 (5/12)
Конструкція 4	1 (12/15)	1 (15/15)	1 (12/15)	3 (10/15)

Як видно з таблиці 5, об'єкти сої R₀, які експресують TIC7941PL_1, трансформовані кожною з чотирьох (4) конструкцій, продемонстрували високу стійкість з високим проявом гена до SAW, SBL і SPW. Стабільно трансформовані рослини сої, які експресують TIC7941PL_1, демонструють стійкість до видів лускокрилих шкідників і високоефективні проти SAW, SBL і SPW.

Приклад 5

Аналіз активності TIC7941PL_1 проти лускокрилих шкідників в стабільно трансформованих рослинах бавовнику

Бінарні вектори трансформації рослин, що містять трансгенні касети, призначені для експресії як націленого на пластиди, так і нецільового пестицидного білка TIC7941PL_1, клонують з використанням способів, відомих в цій області техніки. Отримані вектори використовують для стабільної трансформації рослин бавовнику. Тканини збирали з трансформантів і використовували в біоаналізі комах проти різних лускокрилих комах-шкідників.

Синтетична кодуюча послідовність, призначена для експресії рослин, як описано в прикладі 3, клонована в бінарні вектори трансформації рослин і використана для трансформації клітин рослин бавовнику. Бінарні вектори, що містять націлену на пластид і ненацілену кодуючі послідовності TIC7941PL_1, були сконструйовані з використанням способів, відомих в цій області техніки. Отримані в результаті вектори трансформації рослин містять першу трансгенну касету для експресії пестицидного білка TIC7941PL_1, яка містить конститутивний промотор, функціонально пов'язаний на 5'-кінці з лідером, функціонально пов'язаний на 5'-кінці з синтетичною кодуючою послідовністю, яка кодує націлений на пластид або ненацілений білок TIC7941PL_1, який, в свою чергу, функціонально пов'язаний на 5'-кінці з 3'-UTR, і другу трансгенну касету для відбору трансформованих рослинних клітин з використанням селекції спектиноміцину.

Трансформовані клітини бавовнику індукували з утворенням рослин способами, відомими в цій галузі техніки. Біоаналізи з використанням дисків листя рослин були виконані аналогічно описаним в патенті США № 8344207. Нетрансформовану рослину бавовнику використовують для отримання тканини, яка буде використовуватися в якості негативного контролю. Об'єкти з множинною трансформацією з кожного бінарного вектора оцінюються щодо CBW, FAW, SBL і TBW, а також будь-яких інших видів лускокрилих комах-шкідників, які, як відомо, заподіюють агрономічну шкоду врожаю бавовни.

Крім листових дисків, інші тканини також можуть бути використані для оцінки стійкості, обумовленої експресією токсинного білка TIC7941PL_1 в трансгенних рослинах бавовнику, як-от клітини і насінні коробки. Оцінки пошкодження застосовуються до кожного зразка, що відповідає кожній комасі-шкіднику, і порівнюються з негативними контролюями, щоб визначити, чи забезпечує експресія TIC7941PL_1 стійкість до конкретних видів комах-шкідників.

Приклад 6

Поліпшення пестицидної активності TIC7941 проти совки трав'яної

Цей приклад ілюструє поліпшення пестицидної активності TIC7941 проти совки трав'яної за рахунок вставки пептиду, який зв'язує трансмембранний переносник ABC (ABCc4) FAW в послідовність білка TIC7941.

Фрагмент пептиду FAWPEPBIN (представлений як SEQ ID NO:17) зв'язується з трансмембранним переносником ABC FAW ABCc4. FAWPEPBIN_Bac (SEQ ID NO:15) являє собою синтетичну кодуючу послідовність, яка кодує FAWPEPBIN (SEQ ID NO:17) для експресії пептиду FAWPEPBIN в бактеріях.

Сконструйовані His-мічені білки TIC7941 з пептидом FAWPEPBIN, вставленим в різні положення в петлі домену 2 білка, порівнювали в біоаналізі комах. Кодуюча послідовність TIC7941_2His (SEQ ID NO:7) кодує пестицидний білок TIC7941_2His (SEQ ID NO:8). Кодуюча послідовність TIC7941_3His (SEQ ID NO:9) кодує пестицидний білок TIC7941_3His (SEQ ID NO:10). Синтетична кодуюча послідовність FAWPEPBIN_Bac знаходиться в положеннях нуклеотидів 2413-2448 TIC7941_2His і в положеннях 2410-2445 TIC7941_3His. Пептидна послідовність FAWPEPBIN розташована в положеннях амінокислот з 805 по 816 TIC7941_2His і в положеннях амінокислот з 804 по 815 TIC7941_3His.

Пестицидну активність пестицидних білків TIC7941_His, TIC7941_2His і TIC7941_3His аналізували щодо FAW. І TIC7941_His, і TIC7941_2His продемонстрували незначну активність щодо FAW або її відсутність. Однак TIC7941_3His продемонстрував поліпшену пестицидну активність щодо FAW. Таким чином, вставка синтетичної кодуючої послідовності FAWPEPBIN_Bac в амінокислотні положення 804-815 TIC7941_3His покращувала пестицидну активність білка TIC7941 щодо FAW.

Приклад 7

Аналіз активності TIC7941PL_2 і TIC7941PL_3 проти совки трав'яної в стабільно трансформованих рослинах кукурудзи

Бінарні вектори трансформації рослин, що містять трансгенні касети, призначені для експресії пестицидних білків TIC7941PL_2 і TIC7941PL_3, клонують з використанням способів, відомих в цій області техніки. Отримані вектори використовують для стабільної трансформації рослин кукурудзи. Тканини збирали з трансформантів і використовували в біоаналізі комах проти FAW і інших лускокрилих комах-шкідників.

Бінарні вектори трансформації рослин конструюють, як описано раніше в прикладі 3. Бінарні вектори містять трансгенну касету, яка використовується для експресії TIC7941PL_2 або TIC7941PL_3. TIC7941PL_2 і TIC7941PL_3 містять пептид, що зв'язує рецептор ABCc4, FAWPEPBIN. Синтетична послідовність ДНК (FAWPEPBIN_PL, SEQ ID NO:16), яка використовується для експресії в рослинній клітині і кодує трансмембранний переносник ABC совки трав'яної, ABCc4-зв'язуючий пептид FAWPEPBIN, вставляється в токсинний білок TIC7941PL_1. Фрагмент ДНК, що кодує FAWPEPBIN_PL, знаходиться в положеннях нуклеотидів 2386-2421 TIC7941PL_2 і в межах 2383-2418 TIC7941PL_3. Фрагмент пептиду FAWPEPBIN розташований в амінокислотних положеннях 796-807 TIC7941PL_2 і 795-806 TIC7941PL_3.

Клітини рослин кукурудзи трансформують бінарними векторами трансформації, як описано вище, з використанням методу трансформації, опосередкованої *Agrobacterium*. Трансформовані клітини індукували з утворенням рослин способами, відомими в цій галузі техніки. Біоаналізи з використанням дисків листя рослин були виконані аналогічно описаним в патенті США № 8344207. Нетрансформовану рослину кукурудзи використовували для отримання тканини, яка буде використовуватися в якості негативного контролю. Об'єкти вставки однієї копії R₀ з множинною трансформацією з кожного бінарного вектора оцінюють щодо FAW і порівнюють з TIC7941PL_1, щоб визначити, чи збільшує вставка пептиду FAWPEPBIN інсектицидну активність TIC7941PL_1 щодо FAW.

Приклад 8

Зниження експресії TIC7941PL_1 в тканині органів розмноження стабільно трансформованих рослин сої за рахунок використання сайтів-мішеней мікроРНК

Цей приклад ілюструє зниження експресії TIC7941PL_1 в тканинах органів розмноження стабільно трансформованих рослин сої за рахунок використання функціонально пов'язаних сайтів розпізнавання мікроРНК.

мікроРНК рослин регулюють гени-мішені на посттранскрипційному рівні за допомогою двох основних механізмів: розщеплення транскрипта і репресії трансляції. Крім того, деякі мікроРНК також запускають вироблення вторинних малих інтерферуючих РНК (міРНК) зі своїх транскриптів, посилюючи вплив мікроРНК на експресію. мікроРНК зазвичай мають довжину двадцять один (21) нуклеотид, але ті, які запускають вироблення вторинних міРНК, мають довжину двадцять два (22) нуклеотиди. Шляхом збору даних про мікроРНК в різних тканинах сої були ідентифіковані дві мікроРНК, які були надмірно представлені в тканинах органів розмноження в порівнянні з тканинами з рослинних волокон; miR395 і miR4392. miR395 процесується в дуплекс мікроРНК/мікроРНК* з двадцяти одного (21) нуклеотиду і експресується в основному в тичинках квіток сої. miR4392 процесується в дуплекс мікроРНК/мікроРНК* з двадцяти двох (22) нуклеотидів і запускає вироблення вторинних міРНК зі своїх транскриптів, посилюючи сигнал пригнічення. miR4392 високо збагачена в

пильовиках квіток сої. Пов'язані з білком ARGO з утворенням комплексу сайленсингу, мікроРНК функціонують як сіквенс-специфічні провідники, направляючи комплекс сайленсингу до транскрипту за допомогою спарювання основ між мікроРНК і сайтами зв'язування мішеней мікроРНК в 3'-нетрансльованій області (3'-UTR) цільових РНК.

Сайти-мішені, що відповідають miR395 (Gm.miR395_1 (SEQ ID NO: 18) і Gm.miR395_2 (SEQ ID NO: 19)), були функціонально пов'язані з використанням ДНК-спейсера (SP-ART.8a-1, SEQ ID NO:24) для конструювання SUP-miR395 (SEQ ID NO:20). Сайти-мішені, що відповідають miR4392 (Gm.miR4392_1 (SEQ ID NO: 21) і Gm.miR4392_2 (SEQ ID NO: 22)), були функціонально пов'язані з використанням ДНК-спейсера (SP-ART.8a-1, SEQ ID NO:24) для конструювання SUP-miR4392 (SEQ ID NO:23). SUP-miR395 і SUP-miR4392 були функціонально пов'язані з 3'-кодуючою послідовністю TIC7941PL_1 після стоп-кодону, що продукує трансгени, TIC7941PL_1-miR395 (SEQ ID NO:25) і TIC7941PL_1-miR4392 (SEQ ID NO:26) відповідно.

Бінарні вектори трансформації рослин, що містять трансгенні касети, розроблені для експресії нецільових TIC7941PL_1-miR395 і TIC7941PL_1-miR4392, були сконструйовані з використанням способів, відомих в цій області техніки, і були аналогічні тим, які описані в прикладі 4. Дві конструкції були сконструйовані з використанням одного і того ж промотора, лідера і 3'-UTR елементів в якості конструкції 3 в прикладі 4 і містили послідовності ДНК TIC7941PL_1-miR395 і TIC7941PL_1-miR4392. Безліч подій трансформації з кожного бінарного вектора оцінювали з використанням листових дисків проти SAW, SBL, SPW і VBW, як описано в прикладі 4. Конструкція 3, TIC7941PL_1, слугувала контролем для порівняння інсектицидної активності конструкцій, що містять нецільові TIC7941PL_1-miR395 і TIC7941PL_1-miR4392.

Таблиця 6

Оцінки пошкодження листа (LDR) і прояв гена для трансформованих об'єктів R₀ сої, що експресують TIC7941PL_1

Конструкція	Композиція TIC7941	LDR (спостережувана/що аналізується)			
		SAW	SBL	SPW	VBC
Конструкція 3	TIC7941PL_1	1 (12/12)	1 (12/12)	1 (12/12)	3 (5/12)
Конструкція 5	TIC7941PL_1-mi395	1 (20/20)	1 (20/20)	1 (20/20)	3 (9/20)
Конструкція 6	TIC7941PL_1-mi4392	1 (17/19)	1 (17/19)	1 (16/19)	3 (3/19)

Як видно з таблиці 6, функціональне зв'язування сайтів зв'язування мішеней мікроРНК з кодуючою послідовністю TIC7941PL_1 не впливає на інсектицидну активність TIC7941PL_1. Дві конструкції сайту зв'язування мішеней мікроРНК продемонстрували однаковий рівень інсектицидної активності щодо SAW, SBL, SPW і VBC. Як раніше спостерігалось в прикладі 4, TIC7941PL_1 продемонстрував високу стійкість з високою проникаючою здатністю щодо SAW, SBL і SPW.

Всі композиції, розкриті й заявлені в цьому документі, можуть бути виготовлені та виконані без зайвих експериментів в світлі цього винаходу. Хоча композиції за цим винаходом були описані відносно вищезазначених ілюстративних варіантів здійснення, фахівцям в цій області техніки буде очевидно, що до описаної в цьому документі композиції можуть застосовуватися варіації, зміни, модифікації і виправлення без відступу від істинної ідеї, сутності та обсягу винаходу. Більш конкретно, буде очевидно, що певні речовини, які є як хімічно, так і фізіологічно спорідненими, можуть бути замінені речовинами, описаними в цьому документі, при цьому можуть бути досягнуті такі ж або аналогічні результати. Вважається, що всі такі аналогічні заміни й модифікації, очевидні для фахівців в цій області техніки, знаходяться в межах сутності, обсягу і ідеї винаходу, визначених поданою формулою винаходу.

Всі публікації та опубліковані патентні документи, цитовані в описі, включені в цей документ шляхом посилання тією ж мірою, як яби кожна окрема публікація або патентна заявка була конкретно і окремо вказана для включення шляхом посилання.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Монсанто Текнолоджі ЕлЕлСі

<120> НОВІ БІЛКИ, ЩО ІНГІБУЮТЬ АКТИВНІСТЬ КОМАХ

<130> MONS:469WO

<150> US 62/795,066

<151> 22.01.2019

<160> 26

<170> Версія PatentIn 3.5

<210> 1

<211> 2424

<212> ДНК

<213> *Paenibacillus lentimorbus*

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(2424)

<223> Послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує пестицидний білок TIC7941, отриманий з виду *Paenibacillus lentimorbus* DSC020651.

<400> 1

atgaagcaga ataataat	ttt aagtgt	aaga gccttac	caa gttttatt	ga tg	ttttta	aat	60
ggaatttatg gttttgcc	ac tggtatt	caa gatatt	tttta acatgat	ttt	tggaac	agat	120
acaggtggtc taacacta	ga agaagt	tttta aaaaat	caag atttact	ttta	tgagatt	tct	180
ggtaaacttg atgggatta	a tg	gagacct agtgag	atta ttgcgc	aggg	aaattt	gaat	240
acagaattaa ctaagga	att gctaaaa	atc gcta	atgagc agaaca	at	ttt	attaact	300
gatgatactg gataaat	gcg atgctca	aca catatc	ttcc	taaa	attaca		360
aatatgttaa gcgatatt	at gaaacaaa	at tatgtc	cctga gtcttca	aat	agaata	tctc	420
agtaaacaac tacaggag	at ttcagata	aaa cttgat	gtta ttaatt	taaa	tgtact	catc	480
aactctacac tcacagaa	at cactcct	gca tatca	acgta ttaa	at	atgt	aaatgaaaa	540
tttgatgatt taactctt	gc tacagaaaa	actcta	agag caaa	acaagg	tagttc	taac	600
gaagatat	ttt ttgata	atga tactc	ttgaa aattta	actg agcta	actg	cga	660
aaatgatga	aaaatgat	gt ggatag	tttc gagttt	tatc tccata	catt	ccatgat	720
gtga	ataat	ttatt tggtc	gttcg gcttt	aaaaa cagctg	caga	attgatt	780
act	taaagac	gag tgga	agtga atagg	aaaag	tttatag	ttt	840
cttaatt	gtga	ctaact	gtgc taca	agcaa agcct	atctc	acttta	900
acgg catg	ccgaaa	attatt	gggc	ttatc	agata	ttgatt	960
tatac	gaatatt	ccta aatc	agcatc	taaat	gatga	aaaga	1020
aatgaa	tttcgt	gata acata	cttcc	tacact	gtcc	aataa	1080
at	ttt	ctagagg	ctgat	ctagg	atatg	cctta	1140
attg	gatttg	aaattatt	ag tgatc	caatc	ccggtatt	aa	1200
ag	tatatca	agcta	agcta				1260

```

attggatatg ttattactaa aattatcttt gaaaagaagt accaaaaccg tctgggatat 1320
ctggtaaaag caaatctcta tgattcgtct acaggagata ttgatttgaa taagtcaata 1380
gaggaatcat caggaaatct acttgcttgg cctccggatt ctattataag tattagtaag 1440
gatgaagagg atgaaaagga tgtttatatg ccattaggtg ttatcagcga aacatttttg 1500
acccaatcc atagtcttgg attaaaagt gatgaagaat caagaataat aaccttaaca 1560
ggtaaactct atctacgaga atatttatta gaatctgatt taaaaaataa agagacaagc 1620
ctgattgctc cgcctaattg ttttatcagt aatatcgtag aaaattggaa catagaagcg 1680
gatagtctag aaccatgggt tgcaaataac aagaatgcgt atgtcgatag tacaggcggt 1740
atagagggat ctaaagctct atttactcaa ggtgatgggg aattttcaca atttattgga 1800
gataaattaa aacctaacac agattatatg attcaatata ctgtaaaagg aaaaccggcc 1860
atttatttga aacacaaaga tgctactgga tatattatgt acgaagatac aaacggtaat 1920
tatgaagatt ttcaaactag agctgtaaaa tttacttcag gagccgagcc ttcacaagca 1980
catttgattt ttaaaagtca aagtggatat gaggcttggg gggacaactt tattattcta 2040
gaaagtaagt cagttgaatt tgatcaaaag cttgaggctc cagaagtgat aaaatctgaa 2100
aattggattt taactggaga tgctaaatta gaacaagatg ggcaggcgct cagaagtgtg 2160
tcaggaaatg gtagtctttaa gcaatttctt caattaataa gtgactcaat ttattttatg 2220
aatttccatg ttgttggaag agcgagggtg acgataaaaa attcacacag agtattattt 2280
gaaaaggatt attcaacca gtatcgtatc gtggatgatg aatattttac taccgtatct 2340
gatatagatg gggctctcat agaacttact tcacattctg aggaaagttc agaatttgg 2400
ttttggggct tctctataaa gtaa 2424

```

<210> 2

<211> 807

<212> Білок

<213> *Paenibacillus lentimorbus*

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(807)

<223> Амінокислотна послідовність пестицидного білка TIC7941.

<400> 2

```

Met Lys Gln Asn Asn Asn Leu Ser Val Arg Ala Leu Pro Ser Phe Ile
1           5           10          15

```

```

Asp Val Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Gln Asp Ile
          20          25          30

```

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

Tyr Leu Thr Leu Thr Ala Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ser Asp Ile
290 295 300

Asp Tyr Thr Asn Ile Leu Asn Gln His Leu Asn Asp Glu Lys Asn Glu
305 310 315 320

Phe Arg Asp Asn Ile Leu Pro Thr Leu Ser Asn Lys Phe Ser Asn Pro
325 330 335

Asn Tyr Ala Lys Thr Thr Gly Ser Asp Asp Asp Ala Val Val Val Leu
340 345 350

Glu Ala Asp Leu Gly Tyr Ala Leu Ile Gly Phe Glu Ile Ile Ser Asp
355 360 365

Pro Ile Pro Val Leu Lys Val Tyr Gln Ala Lys Leu Lys Gln Asn Tyr
370 375 380

Gln Val Asp Glu Gln Ser Leu Thr Glu Lys Val Tyr Arg Asn Ile Asn
385 390 395 400

Lys Ile Phe Cys Pro Glu Asn Ser Asp Gln Arg Tyr Tyr Ile Lys Asp
405 410 415

Ile Thr Phe Pro Ile Gly Tyr Val Ile Thr Lys Ile Ile Phe Glu Lys
420 425 430

Lys Tyr Gln Asn Arg Leu Gly Tyr Leu Val Lys Ala Asn Phe Tyr Asp
435 440 445

Ser Ser Thr Gly Asp Ile Asp Leu Asn Lys Ser Ile Glu Glu Ser Ser
450 455 460

Gly Asn Leu Leu Ala Trp Pro Pro Asp Ser Ile Ile Ser Ile Ser Lys
465 470 475 480

Asp Glu Glu Asp Glu Lys Asp Val Tyr Met Pro Leu Gly Val Ile Ser
485 490 495

Glu Thr Phe Leu Thr Pro Ile His Ser Phe Gly Leu Lys Val Asp Glu
500 505 510

Glu Ser Arg Ile Ile Thr Leu Thr Gly Lys Ser Tyr Leu Arg Glu Tyr
515 520 525

Leu Leu Glu Ser Asp Leu Lys Asn Lys Glu Thr Ser Leu Ile Ala Pro
 530 535 540

Pro Asn Val Phe Ile Ser Asn Ile Val Glu Asn Trp Asn Ile Glu Ala
 545 550 555 560

Asp Ser Leu Glu Pro Trp Val Ala Asn Asn Lys Asn Ala Tyr Val Asp
 565 570 575

Ser Thr Gly Gly Ile Glu Gly Ser Lys Ala Leu Phe Thr Gln Gly Asp
 580 585 590

Gly Glu Phe Ser Gln Phe Ile Gly Asp Lys Leu Lys Pro Asn Thr Asp
 595 600 605

Tyr Met Ile Gln Tyr Thr Val Lys Gly Lys Pro Ala Ile Tyr Leu Lys
 610 615 620

His Lys Asp Ala Thr Gly Tyr Ile Met Tyr Glu Asp Thr Asn Gly Asn
 625 630 635 640

Tyr Glu Asp Phe Gln Thr Arg Ala Val Lys Phe Thr Ser Gly Ala Glu
 645 650 655

Pro Ser Gln Ala His Leu Ile Phe Lys Ser Gln Ser Gly Tyr Glu Ala
 660 665 670

Trp Gly Asp Asn Phe Ile Ile Leu Glu Ser Lys Ser Val Glu Phe Asp
 675 680 685

Gln Lys Leu Glu Ala Pro Glu Val Ile Lys Ser Glu Asn Trp Ile Leu
 690 695 700

Thr Gly Asp Ala Lys Leu Glu Gln Asp Gly Gln Ala Leu Arg Ser Val
 705 710 715 720

Ser Gly Asn Gly Ser Phe Lys Gln Phe Leu Gln Leu Lys Ser Asp Ser
 725 730 735

Ile Tyr Phe Met Asn Phe His Val Val Gly Lys Ala Arg Val Thr Ile
 740 745 750

Lys Asn Ser His Arg Val Leu Phe Glu Lys Asp Tyr Ser Thr Gln Tyr
 755 760 765

Arg Ile Val Asp Asp Glu Tyr Phe Thr Thr Val Ser Asp Ile Asp Gly
 770 775 780

Val	Phe	Ile	Glu	Leu	Thr	Ser	His	Ser	Glu	Glu	Ser	Ser	Glu	Phe	Gly
785					790				795						800

Phe	Trp	Gly	Phe	Ser	Ile	Lys
				805		

<210> 3
 <211> 2427
 <212> ДНК
 <213> Штучна

<220>
 <223> Синтетична кодуюча послідовність, що кодує пестицидний білок TIC7941PL_1, призначений для експресії в рослинній клітині, де додатковий кодон аланіну вставляється відразу після кодону ініціюючого метіоніну.

<400> 3	
atgggctaagc agaacaacaa cctctccgtg cgcgcgctgc cgagcttcat cgacgtcttc	60
aacggcatct acgggttcgc cacgggcatc caggacatct tcaacatgat ctttgggact	120
gatacgggcg gcctgaccct ggaggaggtg ttaaagaacc aggatctcct ctacgagatt	180
tcgggcaagc tggacgggat caacggcgac ctgagcgaga tcatcgccca gggcaacctc	240
aacaccgagc tcacgaaaga actactgaag attgccaacg agcagaacaa cctgctcacg	300
gacgtgaaca acaagctgaa cgccatcaac gcgatgctga acacctacct gcccaagatc	360
accaacatgc tgagcgacat catgaagcag aactacgtcc tgtcccttca gatcgagtac	420
ctgtccaagc agctccagga gatctcggac aagttggacg tgatcaacct caacgtgctc	480
atcaactcga ccctcaccga gatcactcca gcgtaccagc gcatcaagta cgtcaacgag	540
aagttcgacg acctgacgct ggccactgag aagaccctgc gcgcgaagca aggctcgtcc	600
aacgaggaca tcttcgacaa cgacaccctg gagaacctca cggagctgac cgagctggcc	660
aagagcgtga cgaagaacga cgtggactcg ttcgagttct acctccacac tttccacgac	720
gtcctgatcg ggaacaacct ctttggtcgt tcggccctca agacggcggc ggagctcatc	780
acaaaggacg agatcaagac ctctgggtct gagatcggca aggtgtactc gtttctcatt	840
gtcctgacgt gcctgcaagc gaaggcttac ctaacgctca cggcgtgccg caagctgctg	900
ggcctgtctg acatcgacta caccaacatc ctgaaccagc accttaacga cgagaagaac	960
gagttccggg acaacattct tcctaccctg tcgaacaagt tcagcaaccc gaactacgcg	1020
aagaccacgg gcagcgacga cgatgcggtg gtggtcctgg aggctgacct gggctacgcg	1080
ctgatcgggt tcgagatcat cagcgaccct atcccagtgc tcaaggtgta ccaggcgaag	1140
ctgaaacaga actaccaggt tgacgagcag tccctgacgg agaaggtgta ccggaacatc	1200

aataagatct tctgcccgga gaactccgac cagcgggtact acatcaagga catcaccttc	1260
cctatcgggt acgtcatcac caagataatc ttcgagaaga agtaccagaa ccgactcggc	1320
tacctggtga aggcgaactt ctatgacagc tcgacgggcg acatcgacct caacaagtcc	1380
atcgaggaga gtagcgggaa tctgctggcg tggccgcccg acagcatcat ctccatctcc	1440
aaggacgagg aagacgagaa ggatgtgtac atgccactag gcgtcatctc cgaaactttc	1500
ctgacaccca tacacagctt cgggctcaag gtggacgagg agagccggat catcacgctg	1560
accggcaaga gctacctccg agagtacctg ctggagtcgg acctcaagaa caaggagacg	1620
tcgctgatcg ctctcccaa cgtcttcac tccaacatcg tcgagaactg gaacatcgag	1680
gcggacagcc tggagccgtg ggtggcgaac aacaagaacg cttacgtgga ctcaaccggc	1740
ggcattgagg gctccaaggc cctattcacg caaggcgacg gcgagttcag ccagttcatc	1800
ggcgacaagc taaagcccaa cacggactac atgatccagt aactgtgaa gggcaagccc	1860
gcgatctacc tcaagcaca ggacgcaacc ggctacatca tgtacgagga caccaacggc	1920
aactacgagg acttccagac gcggggccgtc aagttcacct cgggcgctga gccgtcccag	1980
gcccacttga tcttcaagtc ccagtcgggc tacgaggctt ggggcgacaa ctttatcatc	2040
ctggagagca agtcggtgga gttcgaccag aaactcgagg ctccggaggt catcaagtcg	2100
gagaactgga tactgactgg cgacgcgaag ctggaacagg acggccaggc cctgaggtcc	2160
gtgagcggga acggcagctt caagcagttc ctccagctca agtccgacag catctacttt	2220
atgaacttcc acgtcgtggg caaggcgcg gtgactatca agaacagcca ccgcgtctc	2280
ttcgagaagg actacagcac gcagtatcg atagtcgatg atgaatactt caccaccgtc	2340
tccgacatcg acggcgtggt catcgagctg acgtcgact ccgaggagtc ctccgagttc	2400
ggcttctggg gcttcagcat caagtag	2427

<210> 4

<211> 808

<212> Білок

<213> Штучний

<220>

<223> Амінокислотна послідовність TIC7941PL_1 і де додаткова амінокислота аланін вставлена безпосередньо після ініціюючого метіоніну.

<400> 4

Met	Ala	Lys	Gln	Asn	Asn	Asn	Leu	Ser	Val	Arg	Ala	Leu	Pro	Ser	Phe
1				5				10						15	

Ile	Asp	Val	Phe	Asn	Gly	Ile	Tyr	Gly	Phe	Ala	Thr	Gly	Ile	Gln	Asp
			20					25					30		

Ile Phe Asn Met Ile Phe Gly Thr Asp Thr Gly Gly Leu Thr Leu Glu
 35 40 45

Glu Val Leu Lys Asn Gln Asp Leu Leu Tyr Glu Ile Ser Gly Lys Leu
 50 55 60

Asp Gly Ile Asn Gly Asp Leu Ser Glu Ile Ile Ala Gln Gly Asn Leu
 65 70 75 80

Asn Thr Glu Leu Thr Lys Glu Leu Leu Lys Ile Ala Asn Glu Gln Asn
 85 90 95

Asn Leu Leu Thr Asp Val Asn Asn Lys Leu Asn Ala Ile Asn Ala Met
 100 105 110

Leu Asn Thr Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Asn Met Leu Ser Asp Ile Met
 115 120 125

Lys Gln Asn Tyr Val Leu Ser Leu Gln Ile Glu Tyr Leu Ser Lys Gln
 130 135 140

Leu Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Val Ile Asn Leu Asn Val Leu
 145 150 155 160

Ile Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ala Tyr Gln Arg Ile Lys
 165 170 175

Tyr Val Asn Glu Lys Phe Asp Asp Leu Thr Leu Ala Thr Glu Lys Thr
 180 185 190

Leu Arg Ala Lys Gln Gly Ser Ser Asn Glu Asp Ile Phe Asp Asn Asp
 195 200 205

Thr Leu Glu Asn Leu Thr Glu Leu Thr Glu Leu Ala Lys Ser Val Thr
 210 215 220

Lys Asn Asp Val Asp Ser Phe Glu Phe Tyr Leu His Thr Phe His Asp
 225 230 235 240

Val Leu Ile Gly Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr Ala
 245 250 255

Ala Glu Leu Ile Thr Lys Asp Glu Ile Lys Thr Ser Gly Ser Glu Ile
 260 265 270

Gly Lys Val Tyr Ser Phe Leu Ile Val Leu Thr Cys Leu Gln Ala Lys

275

280

285

Ala Tyr Leu Thr Leu Thr Ala Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ser Asp
 290 295 300

Ile Asp Tyr Thr Asn Ile Leu Asn Gln His Leu Asn Asp Glu Lys Asn
 305 310 315 320

Glu Phe Arg Asp Asn Ile Leu Pro Thr Leu Ser Asn Lys Phe Ser Asn
 325 330 335

Pro Asn Tyr Ala Lys Thr Thr Gly Ser Asp Asp Asp Ala Val Val Val
 340 345 350

Leu Glu Ala Asp Leu Gly Tyr Ala Leu Ile Gly Phe Glu Ile Ile Ser
 355 360 365

Asp Pro Ile Pro Val Leu Lys Val Tyr Gln Ala Lys Leu Lys Gln Asn
 370 375 380

Tyr Gln Val Asp Glu Gln Ser Leu Thr Glu Lys Val Tyr Arg Asn Ile
 385 390 395 400

Asn Lys Ile Phe Cys Pro Glu Asn Ser Asp Gln Arg Tyr Tyr Ile Lys
 405 410 415

Asp Ile Thr Phe Pro Ile Gly Tyr Val Ile Thr Lys Ile Ile Phe Glu
 420 425 430

Lys Lys Tyr Gln Asn Arg Leu Gly Tyr Leu Val Lys Ala Asn Phe Tyr
 435 440 445

Asp Ser Ser Thr Gly Asp Ile Asp Leu Asn Lys Ser Ile Glu Glu Ser
 450 455 460

Ser Gly Asn Leu Leu Ala Trp Pro Pro Asp Ser Ile Ile Ser Ile Ser
 465 470 475 480

Lys Asp Glu Glu Asp Glu Lys Asp Val Tyr Met Pro Leu Gly Val Ile
 485 490 495

Ser Glu Thr Phe Leu Thr Pro Ile His Ser Phe Gly Leu Lys Val Asp
 500 505 510

Glu Glu Ser Arg Ile Ile Thr Leu Thr Gly Lys Ser Tyr Leu Arg Glu
 515 520 525

Tyr	Leu	Leu	Glu	Ser	Asp	Leu	Lys	Asn	Lys	Glu	Thr	Ser	Leu	Ile	Ala	530	535	540	
Pro	Pro	Asn	Val	Phe	Ile	Ser	Asn	Ile	Val	Glu	Asn	Trp	Asn	Ile	Glu	545	550	555	560
Ala	Asp	Ser	Leu	Glu	Pro	Trp	Val	Ala	Asn	Asn	Lys	Asn	Ala	Tyr	Val	565	570	575	
Asp	Ser	Thr	Gly	Gly	Ile	Glu	Gly	Ser	Lys	Ala	Leu	Phe	Thr	Gln	Gly	580	585	590	
Asp	Gly	Glu	Phe	Ser	Gln	Phe	Ile	Gly	Asp	Lys	Leu	Lys	Pro	Asn	Thr	595	600	605	
Asp	Tyr	Met	Ile	Gln	Tyr	Thr	Val	Lys	Gly	Lys	Pro	Ala	Ile	Tyr	Leu	610	615	620	
Lys	His	Lys	Asp	Ala	Thr	Gly	Tyr	Ile	Met	Tyr	Glu	Asp	Thr	Asn	Gly	625	630	635	640
Asn	Tyr	Glu	Asp	Phe	Gln	Thr	Arg	Ala	Val	Lys	Phe	Thr	Ser	Gly	Ala	645	650	655	
Glu	Pro	Ser	Gln	Ala	His	Leu	Ile	Phe	Lys	Ser	Gln	Ser	Gly	Tyr	Glu	660	665	670	
Ala	Trp	Gly	Asp	Asn	Phe	Ile	Ile	Leu	Glu	Ser	Lys	Ser	Val	Glu	Phe	675	680	685	
Asp	Gln	Lys	Leu	Glu	Ala	Pro	Glu	Val	Ile	Lys	Ser	Glu	Asn	Trp	Ile	690	695	700	
Leu	Thr	Gly	Asp	Ala	Lys	Leu	Glu	Gln	Asp	Gly	Gln	Ala	Leu	Arg	Ser	705	710	715	720
Val	Ser	Gly	Asn	Gly	Ser	Phe	Lys	Gln	Phe	Leu	Gln	Leu	Lys	Ser	Asp	725	730	735	
Ser	Ile	Tyr	Phe	Met	Asn	Phe	His	Val	Val	Gly	Lys	Ala	Arg	Val	Thr	740	745	750	
Ile	Lys	Asn	Ser	His	Arg	Val	Leu	Phe	Glu	Lys	Asp	Tyr	Ser	Thr	Gln	755	760	765	
Tyr	Arg	Ile	Val	Asp	Asp	Glu	Tyr	Phe	Thr	Thr	Val	Ser	Asp	Ile	Asp				

Gly Val Phe Ile Glu Leu Thr Ser His Ser Glu Glu Ser Ser Glu Phe
 785 790 795 800

Gly Phe Trp Gly Phe Ser Ile Lys
 805

<210> 5

<211> 2481

<212> ДНК

<213> Штучна

<220>

<223> Послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує пестицидний білок

TIC7941_His,

де послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує гістидинову мітку
 функціонально пов'язана на 5'-кінці і в рамці з кодуючою послідовністю
 TIC7941.

<400> 5

atgcatcacc atcaccatca ccatcaccat cacggtaccg agaccgtccg cttccaatcc	60
aagcagaata ataatttaag tgtaagagcc ttaccaagtt ttattgatgt ttttaatgga	120
atztatgggtt ttgccactgg tattcaagat atttttaaca tgatttttgg aacagataca	180
gggtggtctaa cactagaaga agttttaaaa aatcaagatt tactttatga gatttctggt	240
aaacttgatg ggattaatgg agacctaatg gagattattg cgcagggaaa tttgaataca	300
gaattaacta aggaattgct aaaaatcgct aatgagcaga acaatttatt aactgatgtt	360
aataacaaac tcaatgcgat aaatgcgat ctcaacacat atcttcctaa aattacaaat	420
atgttaagcg atattatgaa acaaaattat gtcctgagtc ttcaaataga atatctcagt	480
aaacaactac aggagatttc agataaactt gatgttatta atttaaagt actcatcaac	540
tctacactca cagaaatcac tcctgcatat caacgtatta aatatgtaaa tgaaaaat	600
gatgatttaa ctcttgctac agaaaaaact ctaagagcaa aacaaggtag ttctaacgaa	660
gatatttttg ataatgatac tcttgaaaat ttaactgagc taactgaact agcgaaaagt	720
gtaacaaaaa atgatgtgga tagtttcgag ttttatctcc atacattcca tgatgtattg	780
attggcaata atttatttgg tcgttcggct ttaaaaacag ctgcagaatt gattactaaa	840
gacgagataa agacgagtgg aagtgagata ggaaaagttt atagtttctt aattgtacta	900
acttgtctac aagcaaaagc ctatctcact ttaacggcat gccgaaaatt attgggctta	960
tcagatattg attatacgaa tattctaaat cagcatctaa atgatgaaaa gaatgaattt	1020
cgtgataaca tacttcctac actgtccaat aaattttcta accctaatta tgcaaaaact	1080
acaggaagtg atgatgatgc agtagttggt ttagaggctg atctaggata tgccttaatt	1140

ggatttgaaa ttattagtga tccaatcccg gtattaaaag tatatcaagc taagctaaaa	1200
caaaattatc aagttgacga gcagtcgtta acagagaagg tgtatcggaa tatcaataaa	1260
atattttgtc cagaaaattc cgatcaacgt tattatatta aagatataac gtttcctatt	1320
ggatatgtta ttactaaaat tatctttgaa aagaagtacc aaaaccgtct gggatatctg	1380
gtaaaagcaa atttctatga ttcgtctaca ggagatattg atttgaataa gtcaatagag	1440
gaatcatcag gaaatttact tgcttggcct ccggattcta ttataagtat tagtaaggat	1500
gaagaggatg aaaaggatgt ttatatgcca ttaggtgtta tcagcgaaac atttttgacc	1560
ccaatccata gttttggatt aaaagttgat gaagaatcaa gaataataac cttaacaggt	1620
aaatcttatt tacgagaata tttattagaa tctgatttaa aaaataaaga gacaagcctg	1680
attgctccgc ctaatgtttt tatcagtaat atcgtagaaa attggaacat agaagcggat	1740
agtctagaac catgggttgc aaataacaag aatgcgtatg tcgatagtac aggcggtata	1800
gagggatcta aagctctatt tactcaaggt gatggggaat tttcacaatt tattggagat	1860
aaattaaaac ctaacacaga ttatatgatt caatatactg taaaaggaaa accggccatt	1920
tatttgaaac acaaagatgc tactggatat attatgtacg aagatacaaa cggtaattat	1980
gaagattttc aaactagagc tgtaaaattt acttcaggag ccgagccttc acaagcacat	2040
ttgattttta aaagtcaaag tggatatgag gcttgggggg acaactttat tattctagaa	2100
agtaagtcag ttgaatttga tcaaaaagctt gaggctccag aagtgataaa atctgaaaat	2160
tggattttta ctggagatgc taaattagaa caagatgggc aggcgctcag aagtgtgtca	2220
ggaaatggta gttttaagca atttcttcaa ttaaaaagtg actcaattta ttttatgaat	2280
ttccatgttg ttggaaaagc gagggtgacg ataaaaaatt cacacagagt attatttgaa	2340
aaggattatt caaccagta tcgtatcgtg gatgatgaat attttactac cgtatctgat	2400
atagatgggg tcttcataga acttacttca cattctgagg aaagttcaga atttggtttt	2460
tggggcttct ctataaagta a	2481

<210> 6

<211> 826

<212> Білок

<213> Штучна

<220>

<223> Амінокислотна послідовність пестицидного білка TIC7941_His.

<400> 6

Met	His	His	His	His	His	His	His	His	His	His	His	Gly	Thr	Glu	Thr	Val
1				5						10					15	

Arg	Phe	Gln	Ser	Lys	Gln	Asn	Asn	Asn	Leu	Ser	Val	Arg	Ala	Leu	Pro
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

20

25

30

Ser Phe Ile Asp Val Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile
 35 40 45

Gln Asp Ile Phe Asn Met Ile Phe Gly Thr Asp Thr Gly Gly Leu Thr
 50 55 60

Leu Glu Glu Val Leu Lys Asn Gln Asp Leu Leu Tyr Glu Ile Ser Gly
 65 70 75 80

Lys Leu Asp Gly Ile Asn Gly Asp Leu Ser Glu Ile Ile Ala Gln Gly
 85 90 95

Asn Leu Asn Thr Glu Leu Thr Lys Glu Leu Leu Lys Ile Ala Asn Glu
 100 105 110

Gln Asn Asn Leu Leu Thr Asp Val Asn Asn Lys Leu Asn Ala Ile Asn
 115 120 125

Ala Met Leu Asn Thr Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Asn Met Leu Ser Asp
 130 135 140

Ile Met Lys Gln Asn Tyr Val Leu Ser Leu Gln Ile Glu Tyr Leu Ser
 145 150 155 160

Lys Gln Leu Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Val Ile Asn Leu Asn
 165 170 175

Val Leu Ile Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ala Tyr Gln Arg
 180 185 190

Ile Lys Tyr Val Asn Glu Lys Phe Asp Asp Leu Thr Leu Ala Thr Glu
 195 200 205

Lys Thr Leu Arg Ala Lys Gln Gly Ser Ser Asn Glu Asp Ile Phe Asp
 210 215 220

Asn Asp Thr Leu Glu Asn Leu Thr Glu Leu Thr Glu Leu Ala Lys Ser
 225 230 235 240

Val Thr Lys Asn Asp Val Asp Ser Phe Glu Phe Tyr Leu His Thr Phe
 245 250 255

His Asp Val Leu Ile Gly Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys
 260 265 270

Thr	Ala	Ala	Glu	Leu	Ile	Thr	Lys	Asp	Glu	Ile	Lys	Thr	Ser	Gly	Ser	275	280	285
Glu	Ile	Gly	Lys	Val	Tyr	Ser	Phe	Leu	Ile	Val	Leu	Thr	Cys	Leu	Gln	290	295	300
Ala	Lys	Ala	Tyr	Leu	Thr	Leu	Thr	Ala	Cys	Arg	Lys	Leu	Leu	Gly	Leu	305	310	315
Ser	Asp	Ile	Asp	Tyr	Thr	Asn	Ile	Leu	Asn	Gln	His	Leu	Asn	Asp	Glu	325	330	335
Lys	Asn	Glu	Phe	Arg	Asp	Asn	Ile	Leu	Pro	Thr	Leu	Ser	Asn	Lys	Phe	340	345	350
Ser	Asn	Pro	Asn	Tyr	Ala	Lys	Thr	Thr	Gly	Ser	Asp	Asp	Asp	Ala	Val	355	360	365
Val	Val	Leu	Glu	Ala	Asp	Leu	Gly	Tyr	Ala	Leu	Ile	Gly	Phe	Glu	Ile	370	375	380
Ile	Ser	Asp	Pro	Ile	Pro	Val	Leu	Lys	Val	Tyr	Gln	Ala	Lys	Leu	Lys	385	390	395
Gln	Asn	Tyr	Gln	Val	Asp	Glu	Gln	Ser	Leu	Thr	Glu	Lys	Val	Tyr	Arg	405	410	415
Asn	Ile	Asn	Lys	Ile	Phe	Cys	Pro	Glu	Asn	Ser	Asp	Gln	Arg	Tyr	Tyr	420	425	430
Ile	Lys	Asp	Ile	Thr	Phe	Pro	Ile	Gly	Tyr	Val	Ile	Thr	Lys	Ile	Ile	435	440	445
Phe	Glu	Lys	Lys	Tyr	Gln	Asn	Arg	Leu	Gly	Tyr	Leu	Val	Lys	Ala	Asn	450	455	460
Phe	Tyr	Asp	Ser	Ser	Thr	Gly	Asp	Ile	Asp	Leu	Asn	Lys	Ser	Ile	Glu	465	470	475
Glu	Ser	Ser	Gly	Asn	Leu	Leu	Ala	Trp	Pro	Pro	Asp	Ser	Ile	Ile	Ser	485	490	495
Ile	Ser	Lys	Asp	Glu	Glu	Asp	Glu	Lys	Asp	Val	Tyr	Met	Pro	Leu	Gly	500	505	510
Val	Ile	Ser	Glu	Thr	Phe	Leu	Thr	Pro	Ile	His	Ser	Phe	Gly	Leu	Lys			

515

520

525

Val Asp Glu Glu Ser Arg Ile Ile Thr Leu Thr Gly Lys Ser Tyr Leu
530 535 540

Arg Glu Tyr Leu Leu Glu Ser Asp Leu Lys Asn Lys Glu Thr Ser Leu
545 550 555 560

Ile Ala Pro Pro Asn Val Phe Ile Ser Asn Ile Val Glu Asn Trp Asn
565 570 575

Ile Glu Ala Asp Ser Leu Glu Pro Trp Val Ala Asn Asn Lys Asn Ala
580 585 590

Tyr Val Asp Ser Thr Gly Gly Ile Glu Gly Ser Lys Ala Leu Phe Thr
595 600 605

Gln Gly Asp Gly Glu Phe Ser Gln Phe Ile Gly Asp Lys Leu Lys Pro
610 615 620

Asn Thr Asp Tyr Met Ile Gln Tyr Thr Val Lys Gly Lys Pro Ala Ile
625 630 635 640

Tyr Leu Lys His Lys Asp Ala Thr Gly Tyr Ile Met Tyr Glu Asp Thr
645 650 655

Asn Gly Asn Tyr Glu Asp Phe Gln Thr Arg Ala Val Lys Phe Thr Ser
660 665 670

Gly Ala Glu Pro Ser Gln Ala His Leu Ile Phe Lys Ser Gln Ser Gly
675 680 685

Tyr Glu Ala Trp Gly Asp Asn Phe Ile Ile Leu Glu Ser Lys Ser Val
690 695 700

Glu Phe Asp Gln Lys Leu Glu Ala Pro Glu Val Ile Lys Ser Glu Asn
705 710 715 720

Trp Ile Leu Thr Gly Asp Ala Lys Leu Glu Gln Asp Gly Gln Ala Leu
725 730 735

Arg Ser Val Ser Gly Asn Gly Ser Phe Lys Gln Phe Leu Gln Leu Lys
740 745 750

Ser Asp Ser Ile Tyr Phe Met Asn Phe His Val Val Gly Lys Ala Arg
755 760 765

Val Thr Ile Lys Asn Ser His Arg Val Leu Phe Glu Lys Asp Tyr Ser
770 775 780

Thr Gln Tyr Arg Ile Val Asp Asp Glu Tyr Phe Thr Thr Val Ser Asp
785 790 795 800

Ile Asp Gly Val Phe Ile Glu Leu Thr Ser His Ser Glu Glu Ser Ser
805 810 815

Glu Phe Gly Phe Trp Gly Phe Ser Ile Lys
820 825

<210> 7
<211> 2481
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує пестицидний білок
TIC7941PL_2His,
де послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує гістидинову мітку,
функціонально пов'язана на 5'-кінці і в рамці.

<400> 7
atgggagcga gccatcatca tcatcatcac cacaagcaga ataataattht aagtgtgaaga 60
gccttaccaa gttttattga tgtttttaat ggaatttatg gttttgccac tgggtattcaa 120
gatatttttta acatgattht tggaacagat acagggtggc taacactaga agaagtttta 180
aaaaatcaag atttacttta tgagatttct ggtaaaacttg atgggattaa tggagaccta 240
agtgagatta ttgcgcaggg aaatttgaat acagaattaa ctaaggaatt gctaaaaatc 300
gctaattgagc agaacaattht attaactgat gttaataaca aactcaatgc gataaatgag 360
atgctcaaca catatcttcc taaaattaca aatatgttaa gcgatattat gaaacaaaat 420
tatgtcctga gtcttcaaat agaatatctc agtaaacaaac tacaggagat ttcagataaa 480
cttgatgtta ttaattttaa tgtactcatc aactctacac tcacagaaat cactcctgca 540
tatcaacgta ttaaatatgt aaatgaaaaa tttgatgatt taactcttgc tacagaaaaa 600
actctaagag caaaacaagg tagttctaac gaagatattht ttgataatga tactcttgaa 660
aatttaactg agctaactga actagcgaaa agtgtaacaa aaaatgatgt ggatagtttc 720
gagttttatc tccatacatt ccatgatgta ttgattggca ataatttatt tggtcgttcg 780
gcttttaaaaa cagctgcaga attgattact aaagacgaga taaagacgag tggaagtga 840
ataggaaaag tttatagtht cttaattgta ctaacttgtc tacaagcaaa agcctatctc 900
actttaacgg catgccgaaa attattgggc ttatcagata ttgattatac gaatattcta 960
aatcagcatc taaatgatga aaagaatgaa tttcgtgata acatacttcc tacactgtcc 1020

aataaatttt ctaaccctaa ttatgcaaaa actacaggaa gtgatgatga tgcagtagtt	1080
gttttagagg ctgatctagg atatgcctta attggatttg aaattattag tgatccaatc	1140
ccggtattaa aagtatatca agctaagcta aaacaaaatt atcaagttga cgagcagtcg	1200
ttaacagaga aggtgtatcg gaatatcaat aaaatatttt gtccagaaaa ttccgatcaa	1260
cgttattata ttaaagatat aacgtttcct attggatatg ttattactaa aattatcttt	1320
gaaaagaagt accaaaaccg tctgggatat ctggtaaaag caaattttcta tgattcgtct	1380
acaggagata ttgatttgaa taagtcaata gaggaatcat caggaaattt acttgcttgg	1440
cctccggatt ctattataag tattagtaag gatgaagagg atgaaaagga tgtttatatg	1500
ccattaggtg ttatcagcga aacatTTTTg accccaatcc atagtTTTtg attaaaagtt	1560
gatgaagaat caagaataat aaccttaaca ggtaaactct atctacgaga atatttatta	1620
gaatctgatt taaaaataa agagacaagc ctgattgctc cgcctaattg ttttatcagt	1680
aatatcgtag aaaattggaa catagaagcg gatagtctag aacctgggt tgcaaataac	1740
aagaatgcgt atgtcgatag tacaggcggg atagagggat ctaaagctct atttactcaa	1800
ggtgatgggg aattttcaca atttattgga gataaattaa aacctaacac agatttatg	1860
attcaatata ctgtaaaagg aaaaccggcc atttatttga aacacaaaga tgctactgga	1920
tatattatgt acgaagatac aaacggtaat tatgaagatt ttcaaactag agctgtaaaa	1980
tttacttcag gagccgagcc ttcacaagca catttgattt ttaaaagtca aagtggatat	2040
gaggcttggg gggacaactt tattattcta gaaagtaagt cagttgaatt tgatcaaaag	2100
cttgaggctc cagaagtgat aaaatctgaa aattggattt taactggaga tgctaaatta	2160
gaacaagatg ggcaggcgct cagaagtgtg tcaggaaatg gtagttttaa gcaatttctt	2220
caattaaaaa gtgactcaat ttattttatg aatttccatg ttgttggaag agcgagggtg	2280
acgataaaaa attcacacag agtattatTT gaaaaggatt attcaaccca gtatcgtatc	2340
gtggatgatg aatattttac taccgtatct gatatagatg gggcttctcat agaacttact	2400
tcacattctg agtcttcttt agcagatatt atgtctttat ggggagaaga atttggtttt	2460
tggggcttct ctataaagta g	2481

<210> 8

<211> 826

<212> Білок

<213> Штучна

<220>

<223> Амінокислотна послідовність пестицидного білка TIC7941PL_2His.

<400> 8

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

Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr Ala Ala Glu Leu Ile Thr Lys Asp
260 265 270

Glu Ile Lys Thr Ser Gly Ser Glu Ile Gly Lys Val Tyr Ser Phe Leu
275 280 285

Ile Val Leu Thr Cys Leu Gln Ala Lys Ala Tyr Leu Thr Leu Thr Ala
290 295 300

Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ser Asp Ile Asp Tyr Thr Asn Ile Leu
305 310 315 320

Asn Gln His Leu Asn Asp Glu Lys Asn Glu Phe Arg Asp Asn Ile Leu
325 330 335

Pro Thr Leu Ser Asn Lys Phe Ser Asn Pro Asn Tyr Ala Lys Thr Thr
340 345 350

Gly Ser Asp Asp Asp Ala Val Val Val Leu Glu Ala Asp Leu Gly Tyr
355 360 365

Ala Leu Ile Gly Phe Glu Ile Ile Ser Asp Pro Ile Pro Val Leu Lys
370 375 380

Val Tyr Gln Ala Lys Leu Lys Gln Asn Tyr Gln Val Asp Glu Gln Ser
385 390 395 400

Leu Thr Glu Lys Val Tyr Arg Asn Ile Asn Lys Ile Phe Cys Pro Glu
405 410 415

Asn Ser Asp Gln Arg Tyr Tyr Ile Lys Asp Ile Thr Phe Pro Ile Gly
420 425 430

Tyr Val Ile Thr Lys Ile Ile Phe Glu Lys Lys Tyr Gln Asn Arg Leu
435 440 445

Gly Tyr Leu Val Lys Ala Asn Phe Tyr Asp Ser Ser Thr Gly Asp Ile
450 455 460

Asp Leu Asn Lys Ser Ile Glu Glu Ser Ser Gly Asn Leu Leu Ala Trp
465 470 475 480

Pro Pro Asp Ser Ile Ile Ser Ile Ser Lys Asp Glu Glu Asp Glu Lys
485 490 495

Asp	Val	Tyr	Met	Pro	Leu	Gly	Val	Ile	Ser	Glu	Thr	Phe	Leu	Thr	Pro
			500						505			510			
Ile	His	Ser	Phe	Gly	Leu	Lys	Val	Asp	Glu	Glu	Ser	Arg	Ile	Ile	Thr
			515			520			525						
Leu	Thr	Gly	Lys	Ser	Tyr	Leu	Arg	Glu	Tyr	Leu	Leu	Glu	Ser	Asp	Leu
			530			535			540						
Lys	Asn	Lys	Glu	Thr	Ser	Leu	Ile	Ala	Pro	Pro	Asn	Val	Phe	Ile	Ser
545			550			555			560						
Asn	Ile	Val	Glu	Asn	Trp	Asn	Ile	Glu	Ala	Asp	Ser	Leu	Glu	Pro	Trp
			565			570			575						
Val	Ala	Asn	Asn	Lys	Asn	Ala	Tyr	Val	Asp	Ser	Thr	Gly	Gly	Ile	Glu
			580			585			590						
Gly	Ser	Lys	Ala	Leu	Phe	Thr	Gln	Gly	Asp	Gly	Glu	Phe	Ser	Gln	Phe
			595			600			605						
Ile	Gly	Asp	Lys	Leu	Lys	Pro	Asn	Thr	Asp	Tyr	Met	Ile	Gln	Tyr	Thr
			610			615			620						
Val	Lys	Gly	Lys	Pro	Ala	Ile	Tyr	Leu	Lys	His	Lys	Asp	Ala	Thr	Gly
625			630			635			640						
Tyr	Ile	Met	Tyr	Glu	Asp	Thr	Asn	Gly	Asn	Tyr	Glu	Asp	Phe	Gln	Thr
			645			650			655						
Arg	Ala	Val	Lys	Phe	Thr	Ser	Gly	Ala	Glu	Pro	Ser	Gln	Ala	His	Leu
			660			665			670						
Ile	Phe	Lys	Ser	Gln	Ser	Gly	Tyr	Glu	Ala	Trp	Gly	Asp	Asn	Phe	Ile
			675			680			685						
Ile	Leu	Glu	Ser	Lys	Ser	Val	Glu	Phe	Asp	Gln	Lys	Leu	Glu	Ala	Pro
			690			695			700						
Glu	Val	Ile	Lys	Ser	Glu	Asn	Trp	Ile	Leu	Thr	Gly	Asp	Ala	Lys	Leu
705			710			715			720						
Glu	Gln	Asp	Gly	Gln	Ala	Leu	Arg	Ser	Val	Ser	Gly	Asn	Gly	Ser	Phe
			725			730			735						
Lys	Gln	Phe	Leu	Gln	Leu	Lys	Ser	Asp	Ser	Ile	Tyr	Phe	Met	Asn	Phe
			740			745			750						

His Val Val Gly Lys Ala Arg Val Thr Ile Lys Asn Ser His Arg Val
755 760 765

Leu Phe Glu Lys Asp Tyr Ser Thr Gln Tyr Arg Ile Val Asp Asp Glu
770 775 780

Tyr Phe Thr Thr Val Ser Asp Ile Asp Gly Val Phe Ile Glu Leu Thr
785 790 795 800

Ser His Ser Glu Ser Ser Leu Ala Asp Ile Met Ser Leu Trp Gly Glu
805 810 815

Glu Phe Gly Phe Trp Gly Phe Ser Ile Lys
820 825

<210> 9
<211> 2481
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує пестицидний білок
TIC7941PL_3His,
де послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує гістидинову мітку,
функціонально пов'язана на 5'-кінці і в рамці.

<400> 9
atgggagcga gccatcatca tcatcatcac cacaagcaga ataataattt aagtgtgaaga 60
gccttaccaa gttttattga tgtttttaat ggaatttatg gttttgccac tggatttcaa 120
gatattttta acatgatttt tggaacagat acagggtggc taacactaga agaagtttta 180
aaaaatcaag atttacttta tgagatttct ggtaaacttg atgggattaa tggagaccta 240
agtgagatta ttgcgcaggg aaatttgaat acagaattaa ctaaggaatt gctaaaaatc 300
gctaattgagc agaacaattt attaactgat gttaataaca aactcaatgc gataaatgag 360
atgctcaaca catatcttcc taaaattaca aatatgttaa gcgatattat gaaacaaaat 420
tatgtcctga gtcttcaaat agaatatctc agtaaacaac tacaggagat ttcagataaa 480
cttgatgtta ttaattttaa tgtactcatc aactctacac tcacagaaat cactcctgca 540
tatcaacgta ttaaatatgt aaatgaaaaa tttgatgatt taactcttgc tacagaaaaa 600
actctaagag caaaacaagg tagttctaac gaagatattt ttgataatga tactcttgaa 660
aatttaactg agctaactga actagcgaaa agtgtaacaa aaaatgatgt ggatagtttc 720
gagttttatc tccatacatt ccatgatgta ttgattggca ataatttatt tggtcgttcg 780
gcttttaaaa cagctgcaga attgattact aaagacgaga taaagacgag tggaagtga 840

ataggaaaag tttatagttt ctttaattgta ctaacttgtc tacaagcaaa agcctatctc	900
actttaacgg catgccgaaa attattgggc ttatcagata ttgattatac gaatattcta	960
aatcagcatc taaatgatga aaagaatgaa tttcgtgata acatacttcc tacactgtcc	1020
aataaatttt ctaaccctaa ttatgcaaaa actacaggaa gtgatgatga tgcagtagtt	1080
gttttagagg ctgatctagg atatgcctta attggatttg aaattattag tgatccaatc	1140
ccggtattaa aagtatatca agctaagcta aaacaaaatt atcaagttga cgagcagtcg	1200
ttaacagaga aggtgtatcg gaatatcaat aaaatatatt gtccagaaaa ttccgatcaa	1260
cgttattata ttaaagatat aacgtttcct attggatatg ttattactaa aattatcttt	1320
gaaaagaagt accaaaaccg tctgggatat ctggtaaaaag caaatttcta tgattcgtct	1380
acaggagata ttgatttgaa taagtcaata gaggaatcat caggaaattt acttgcttgg	1440
cctccggatt ctattataag tattagtaag gatgaagagg atgaaaagga tgtttatatg	1500
ccattaggtg ttatcagcga aacatttttg accccaatcc atagttttgg attaaaagtt	1560
gatgaagaat caagaataat aaccttaaca ggtaaatcct atctacgaga atatttatta	1620
gaatctgatt taaaaaataa agagacaagc ctgattgctc cgcctaattgt ttttatcagt	1680
aatatcgtag aaaattggaa catagaagcg gatagtctag aaccatgggt tgcaaataac	1740
aagaatgcgt atgtcgatag tacaggcgggt atagagggat ctaaagctct atttactcaa	1800
ggatgatgggg aattttcaca atttattgga gataaattaa aacctaacac agattatatg	1860
attcaatata ctgtaaaagg aaaaccggcc atttatattga aacacaaaaga tgctactgga	1920
tatattatgt acgaagatac aaacggtaat tatgaagatt ttcaaactag agctgtaaaa	1980
tttacttcag gagccgagcc ttcacaagca catttgattt ttaaaagtca aagtggatat	2040
gaggcttggg gggacaactt tattattcta gaaagtaagt cagttgaatt tgatcaaaag	2100
cttgaggctc cagaagtgat aaaatctgaa aattggattt taactggaga tgctaaatta	2160
gaacaagatg ggcaggcgct cagaagtgtg tcaggaaaatg gtagttttta gcaatttctt	2220
caattaaaaa gtgactcaat ttattttatg aatttccatg ttgttggaag agcgagggtg	2280
acgataaaaa attcacacag agtattattt gaaaaggatt attcaacca gtatcgtatc	2340
gtggatgatg aatattttac taccgtatct gatatagatg gggcttctcat agaacttact	2400
tcacattctt cttcttttagc agatattatg tctttatggg gagaatcaga atttggtttt	2460
tggggcttct ctataaagta g	2481

<210> 10

<211> 826

<212> Білок

<213> Штучна

<220>

<223> Амінокислотна послідовність пестицидного білка TIC7941PL_3His.

<400> 10

Met Gly Ser Ser His His His His His His His Lys Gln Asn Asn Asn
1 5 10 15

Leu Ser Val Arg Ala Leu Pro Ser Phe Ile Asp Val Phe Asn Gly Ile
20 25 30

Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Gln Asp Ile Phe Asn Met Ile Phe Gly
35 40 45

Thr Asp Thr Gly Gly Leu Thr Leu Glu Glu Val Leu Lys Asn Gln Asp
50 55 60

Leu Leu Tyr Glu Ile Ser Gly Lys Leu Asp Gly Ile Asn Gly Asp Leu
65 70 75 80

Ser Glu Ile Ile Ala Gln Gly Asn Leu Asn Thr Glu Leu Thr Lys Glu
85 90 95

Leu Leu Lys Ile Ala Asn Glu Gln Asn Asn Leu Leu Thr Asp Val Asn
100 105 110

Asn Lys Leu Asn Ala Ile Asn Ala Met Leu Asn Thr Tyr Leu Pro Lys
115 120 125

Ile Thr Asn Met Leu Ser Asp Ile Met Lys Gln Asn Tyr Val Leu Ser
130 135 140

Leu Gln Ile Glu Tyr Leu Ser Lys Gln Leu Gln Glu Ile Ser Asp Lys
145 150 155 160

Leu Asp Val Ile Asn Leu Asn Val Leu Ile Asn Ser Thr Leu Thr Glu
165 170 175

Ile Thr Pro Ala Tyr Gln Arg Ile Lys Tyr Val Asn Glu Lys Phe Asp
180 185 190

Asp Leu Thr Leu Ala Thr Glu Lys Thr Leu Arg Ala Lys Gln Gly Ser
195 200 205

Ser Asn Glu Asp Ile Phe Asp Asn Asp Thr Leu Glu Asn Leu Thr Glu
210 215 220

Leu Thr Glu Leu Ala Lys Ser Val Thr Lys Asn Asp Val Asp Ser Phe

225	230	235	240
Glu Phe Tyr Leu His Thr Phe His Asp Val Leu Ile Gly Asn Asn Leu	245	250	255
Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr Ala Ala Glu Leu Ile Thr Lys Asp	260	265	270
Glu Ile Lys Thr Ser Gly Ser Glu Ile Gly Lys Val Tyr Ser Phe Leu	275	280	285
Ile Val Leu Thr Cys Leu Gln Ala Lys Ala Tyr Leu Thr Leu Thr Ala	290	295	300
Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ser Asp Ile Asp Tyr Thr Asn Ile Leu	305	310	315
Asn Gln His Leu Asn Asp Glu Lys Asn Glu Phe Arg Asp Asn Ile Leu	325	330	335
Pro Thr Leu Ser Asn Lys Phe Ser Asn Pro Asn Tyr Ala Lys Thr Thr	340	345	350
Gly Ser Asp Asp Asp Ala Val Val Val Leu Glu Ala Asp Leu Gly Tyr	355	360	365
Ala Leu Ile Gly Phe Glu Ile Ile Ser Asp Pro Ile Pro Val Leu Lys	370	375	380
Val Tyr Gln Ala Lys Leu Lys Gln Asn Tyr Gln Val Asp Glu Gln Ser	385	390	395
Leu Thr Glu Lys Val Tyr Arg Asn Ile Asn Lys Ile Phe Cys Pro Glu	405	410	415
Asn Ser Asp Gln Arg Tyr Tyr Ile Lys Asp Ile Thr Phe Pro Ile Gly	420	425	430
Tyr Val Ile Thr Lys Ile Ile Phe Glu Lys Lys Tyr Gln Asn Arg Leu	435	440	445
Gly Tyr Leu Val Lys Ala Asn Phe Tyr Asp Ser Ser Thr Gly Asp Ile	450	455	460
Asp Leu Asn Lys Ser Ile Glu Glu Ser Ser Gly Asn Leu Leu Ala Trp	465	470	475
			480

Pro Pro Asp Ser Ile Ile Ser Ile Ser Lys Asp Glu Glu Asp Glu Lys
 485 490 495

Asp Val Tyr Met Pro Leu Gly Val Ile Ser Glu Thr Phe Leu Thr Pro
 500 505 510

Ile His Ser Phe Gly Leu Lys Val Asp Glu Glu Ser Arg Ile Ile Thr
 515 520 525

Leu Thr Gly Lys Ser Tyr Leu Arg Glu Tyr Leu Leu Glu Ser Asp Leu
 530 535 540

Lys Asn Lys Glu Thr Ser Leu Ile Ala Pro Pro Asn Val Phe Ile Ser
 545 550 555 560

Asn Ile Val Glu Asn Trp Asn Ile Glu Ala Asp Ser Leu Glu Pro Trp
 565 570 575

Val Ala Asn Asn Lys Asn Ala Tyr Val Asp Ser Thr Gly Gly Ile Glu
 580 585 590

Gly Ser Lys Ala Leu Phe Thr Gln Gly Asp Gly Glu Phe Ser Gln Phe
 595 600 605

Ile Gly Asp Lys Leu Lys Pro Asn Thr Asp Tyr Met Ile Gln Tyr Thr
 610 615 620

Val Lys Gly Lys Pro Ala Ile Tyr Leu Lys His Lys Asp Ala Thr Gly
 625 630 635 640

Tyr Ile Met Tyr Glu Asp Thr Asn Gly Asn Tyr Glu Asp Phe Gln Thr
 645 650 655

Arg Ala Val Lys Phe Thr Ser Gly Ala Glu Pro Ser Gln Ala His Leu
 660 665 670

Ile Phe Lys Ser Gln Ser Gly Tyr Glu Ala Trp Gly Asp Asn Phe Ile
 675 680 685

Ile Leu Glu Ser Lys Ser Val Glu Phe Asp Gln Lys Leu Glu Ala Pro
 690 695 700

Glu Val Ile Lys Ser Glu Asn Trp Ile Leu Thr Gly Asp Ala Lys Leu
 705 710 715 720

Glu Gln Asp Gly Gln Ala Leu Arg Ser Val Ser Gly Asn Gly Ser Phe

725

730

735

Lys Gln Phe Leu Gln Leu Lys Ser Asp Ser Ile Tyr Phe Met Asn Phe
740 745 750

His Val Val Gly Lys Ala Arg Val Thr Ile Lys Asn Ser His Arg Val
755 760 765

Leu Phe Glu Lys Asp Tyr Ser Thr Gln Tyr Arg Ile Val Asp Asp Glu
770 775 780

Tyr Phe Thr Thr Val Ser Asp Ile Asp Gly Val Phe Ile Glu Leu Thr
785 790 795 800

Ser His Ser Ser Ser Leu Ala Asp Ile Met Ser Leu Trp Gly Glu Ser
805 810 815

Glu Phe Gly Phe Trp Gly Phe Ser Ile Lys
820 825

<210> 11

<211> 2454

<212> ДНК

<213> Штучна

<220>

<223> Синтетична кодуєча послідовність, що кодує пестицидний білок TIC7941PL_2, призначений для експресії в рослинній клітині, де додатковий кодон аланіну вставляється відразу після кодону ініціюючого метіоніну.

<400> 11

atgggctaagc agaacaacaa cctctccgtg cgcgcgctgc cgagcttcat cgacgtcttc	60
aacggcatct acgggttcgc cacgggcatc caggacatct tcaacatgat ctttgggact	120
gatacgggacg gcctgaccct ggaggagggtg ttaaagaacc aggatctcct ctacgagatt	180
tcggggcaagc tggacgggat caacggcgac ctgagcgaga tcatcgccca gggcaacctc	240
aacaccgagc tcacgaaaga actactgaag attgccaacg agcagaacaa cctgctcacg	300
gacgtgaaca acaagctgaa cgccatcaac gcgatgctga acacctacct gcccaagatc	360
accaacatgc tgagcgacat catgaagcag aactacgtcc tgtcccttca gatcgagtac	420
ctgtccaagc agctccagga gatctcggac aagttggacg tgatcaacct caacgtgctc	480
atcaactcga cctcaccga gatcactcca gcgtaccagc gcatcaagta cgtcaacgag	540
aagttcgacg acctgacgct ggccactgag aagaccctgc gcgcgaagca aggctcgtcc	600
aacgaggaca tcttcgacaa cgacaccctg gagaacctca cggagctgac cgagctggcc	660
aagagcgtga cgaagaacga cgtggactcg ttcgagttct acctccacac tttccacgac	720

gtcctgatcg ggaacaacct ctttggtcgt tcggccctca agacggcggc ggagctcatc	780
acaaaggacg agatcaagac ctctgggtct gagatcggca aggtgtactc gtttctcatt	840
gtcctgacgt gcctgcaagc gaaggcttac ctaacgctca cggcgtgccg caagctgctg	900
ggcctgtctg acatcgacta caccaacatc ctgaaccagc accttaacga cgagaagaac	960
gagttccggg acaacattct tcctaccctg tcgaacaagt tcagcaaccc gaactacgcg	1020
aagaccacgg gcagcgacga cgatgcggtg gtggtcctgg aggctgacct gggctacgcg	1080
ctgatcgggt tcgagatcat cagcgaccct atcccagtgc tcaaggtgta ccaggcgaag	1140
ctgaaacaga actaccaggt tgacgagcag tccctgacgg agaaggtgta ccggaacatc	1200
aataagatct tctgcccga gaactccgac cagcggctact acatcaagga catcaccttc	1260
cctatcgggt acgtcatcac caagataatc ttcgagaaga agtaccagaa ccgactcggc	1320
tacctggtga aggcgaactt ctatgacagc tcgacgggcg acatcgacct caacaagtcc	1380
atcgaggaga gtagcgggaa tctgctggcg tggccgcccg acagcatcat ctccatctcc	1440
aaggacgagg aagacgagaa ggatgtgtac atgccactag gcgtcatctc cgaaactttc	1500
ctgacaccca tacacagctt cgggctcaag gtggacgagg agagccggat catcacgctg	1560
accggcaaga gctacctccg agagtacctg ctggagtcgg acctcaagaa caaggagacg	1620
tcgctgatcg ctctcccaa cgtcttcatc tccaacatcg tcgagaactg gaacatcgag	1680
gcggacagcc tggagccgtg ggtggcgaac aacaagaacg cttacgtgga ctcaaccggc	1740
ggcattgagg gctccaaggc cctattcacg caaggcgacg gcgagttcag ccagttcatc	1800
ggcgacaagc taaagcccaa cacggactac atgatccagt aactgtgaa gggcaagccc	1860
gcgatctacc tcaagcaca ggacgcaacc ggctacatca tgtacgagga caccaacggc	1920
aactacgagg acttcagac gcggggccgtc aagttcacct cgggcgctga gccgtcccag	1980
gcccacttga tcttcaagtc ccagtcgggc tacgaggctt ggggcgacaa ctttatcatc	2040
ctggagagca agtcggtgga gttcgaccag aaactcgagg ctccggaggt catcaagtcg	2100
gagaactgga tactgactgg cgacgcgaag ctggaacagg acggccaggc cctgaggtcc	2160
gtgagcggga acggcagctt caagcagttc ctccagctca agtccgacag catctacttt	2220
atgaacttcc acgtcgtggg caaggcgcgc gtgactatca agaacagcca ccgcgtcctc	2280
ttcgagaagg actacagcac gcagtatcg atagtcgatg atgaatactt caccaccgtc	2340
tccgacatcg acggcgtggt catcgagctg acgtcgact ccgagagctc gctggcggac	2400
attatgtcgc tgtggggcga agagttcggc ttctggggct tcagcatcaa gtag	2454

<210> 12
<211> 817

<212> Білок
<213> Штучна

<220>

<223> Амінокислотна послідовність TIC7941PL_2 і де додаткова амінокислота аланін вставлена безпосередньо після ініціюючого метіоніну.

<400> 12

Met Ala Lys Gln Asn Asn Asn Leu Ser Val Arg Ala Leu Pro Ser Phe
1 5 10 15

Ile Asp Val Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Gln Asp
20 25 30

Ile Phe Asn Met Ile Phe Gly Thr Asp Thr Gly Gly Leu Thr Leu Glu
35 40 45

Glu Val Leu Lys Asn Gln Asp Leu Leu Tyr Glu Ile Ser Gly Lys Leu
50 55 60

Asp Gly Ile Asn Gly Asp Leu Ser Glu Ile Ile Ala Gln Gly Asn Leu
65 70 75 80

Asn Thr Glu Leu Thr Lys Glu Leu Leu Lys Ile Ala Asn Glu Gln Asn
85 90 95

Asn Leu Leu Thr Asp Val Asn Asn Lys Leu Asn Ala Ile Asn Ala Met
100 105 110

Leu Asn Thr Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Asn Met Leu Ser Asp Ile Met
115 120 125

Lys Gln Asn Tyr Val Leu Ser Leu Gln Ile Glu Tyr Leu Ser Lys Gln
130 135 140

Leu Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Val Ile Asn Leu Asn Val Leu
145 150 155 160

Ile Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ala Tyr Gln Arg Ile Lys
165 170 175

Tyr Val Asn Glu Lys Phe Asp Asp Leu Thr Leu Ala Thr Glu Lys Thr
180 185 190

Leu Arg Ala Lys Gln Gly Ser Ser Asn Glu Asp Ile Phe Asp Asn Asp
195 200 205

Thr	Leu	Glu	Asn	Leu	Thr	Glu	Leu	Thr	Glu	Leu	Ala	Lys	Ser	Val	Thr	210	215	220
Lys	Asn	Asp	Val	Asp	Ser	Phe	Glu	Phe	Tyr	Leu	His	Thr	Phe	His	Asp	225	230	235
Val	Leu	Ile	Gly	Asn	Asn	Leu	Phe	Gly	Arg	Ser	Ala	Leu	Lys	Thr	Ala	245	250	255
Ala	Glu	Leu	Ile	Thr	Lys	Asp	Glu	Ile	Lys	Thr	Ser	Gly	Ser	Glu	Ile	260	265	270
Gly	Lys	Val	Tyr	Ser	Phe	Leu	Ile	Val	Leu	Thr	Cys	Leu	Gln	Ala	Lys	275	280	285
Ala	Tyr	Leu	Thr	Leu	Thr	Ala	Cys	Arg	Lys	Leu	Leu	Gly	Leu	Ser	Asp	290	295	300
Ile	Asp	Tyr	Thr	Asn	Ile	Leu	Asn	Gln	His	Leu	Asn	Asp	Glu	Lys	Asn	305	310	315
Glu	Phe	Arg	Asp	Asn	Ile	Leu	Pro	Thr	Leu	Ser	Asn	Lys	Phe	Ser	Asn	325	330	335
Pro	Asn	Tyr	Ala	Lys	Thr	Thr	Gly	Ser	Asp	Asp	Asp	Ala	Val	Val	Val	340	345	350
Leu	Glu	Ala	Asp	Leu	Gly	Tyr	Ala	Leu	Ile	Gly	Phe	Glu	Ile	Ile	Ser	355	360	365
Asp	Pro	Ile	Pro	Val	Leu	Lys	Val	Tyr	Gln	Ala	Lys	Leu	Lys	Gln	Asn	370	375	380
Tyr	Gln	Val	Asp	Glu	Gln	Ser	Leu	Thr	Glu	Lys	Val	Tyr	Arg	Asn	Ile	385	390	395
Asn	Lys	Ile	Phe	Cys	Pro	Glu	Asn	Ser	Asp	Gln	Arg	Tyr	Tyr	Ile	Lys	405	410	415
Asp	Ile	Thr	Phe	Pro	Ile	Gly	Tyr	Val	Ile	Thr	Lys	Ile	Ile	Phe	Glu	420	425	430
Lys	Lys	Tyr	Gln	Asn	Arg	Leu	Gly	Tyr	Leu	Val	Lys	Ala	Asn	Phe	Tyr	435	440	445
Asp	Ser	Ser	Thr	Gly	Asp	Ile	Asp	Leu	Asn	Lys	Ser	Ile	Glu	Glu	Ser	450	455	460

Ser Gly Asn Leu Leu Ala Trp Pro Pro Asp Ser Ile Ile Ser Ile Ser
465 470 475 480

Lys Asp Glu Glu Asp Glu Lys Asp Val Tyr Met Pro Leu Gly Val Ile
485 490 495

Ser Glu Thr Phe Leu Thr Pro Ile His Ser Phe Gly Leu Lys Val Asp
500 505 510

Glu Glu Ser Arg Ile Ile Thr Leu Thr Gly Lys Ser Tyr Leu Arg Glu
515 520 525

Tyr Leu Leu Glu Ser Asp Leu Lys Asn Lys Glu Thr Ser Leu Ile Ala
530 535 540

Pro Pro Asn Val Phe Ile Ser Asn Ile Val Glu Asn Trp Asn Ile Glu
545 550 555 560

Ala Asp Ser Leu Glu Pro Trp Val Ala Asn Asn Lys Asn Ala Tyr Val
565 570 575

Asp Ser Thr Gly Gly Ile Glu Gly Ser Lys Ala Leu Phe Thr Gln Gly
580 585 590

Asp Gly Glu Phe Ser Gln Phe Ile Gly Asp Lys Leu Lys Pro Asn Thr
595 600 605

Asp Tyr Met Ile Gln Tyr Thr Val Lys Gly Lys Pro Ala Ile Tyr Leu
610 615 620

Lys His Lys Asp Ala Thr Gly Tyr Ile Met Tyr Glu Asp Thr Asn Gly
625 630 635 640

Asn Tyr Glu Asp Phe Gln Thr Arg Ala Val Lys Phe Thr Ser Gly Ala
645 650 655

Glu Pro Ser Gln Ala His Leu Ile Phe Lys Ser Gln Ser Gly Tyr Glu
660 665 670

Ala Trp Gly Asp Asn Phe Ile Ile Leu Glu Ser Lys Ser Val Glu Phe
675 680 685

Asp Gln Lys Leu Glu Ala Pro Glu Val Ile Lys Ser Glu Asn Trp Ile
690 695 700

Leu Thr Gly Asp Ala Lys Leu Glu Gln Asp Gly Gln Ala Leu Arg Ser
705 710 715 720

Val Ser Gly Asn Gly Ser Phe Lys Gln Phe Leu Gln Leu Lys Ser Asp
725 730 735

Ser Ile Tyr Phe Met Asn Phe His Val Val Gly Lys Ala Arg Val Thr
740 745 750

Ile Lys Asn Ser His Arg Val Leu Phe Glu Lys Asp Tyr Ser Thr Gln
755 760 765

Tyr Arg Ile Val Asp Asp Glu Tyr Phe Thr Thr Val Ser Asp Ile Asp
770 775 780

Gly Val Phe Ile Glu Leu Thr Ser His Ser Glu Ser Ser Leu Ala Asp
785 790 795 800

Ile Met Ser Leu Trp Gly Glu Glu Phe Gly Phe Trp Gly Phe Ser Ile
805 810 815

Lys

<210> 13
<211> 2454
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Синтетична кодуюча послідовність, що кодує пестицидний білок TIC7941PL_3, призначений для експресії в рослинній клітині, де додатковий кодон аланіну вставляється відразу після кодону ініціюючого метіоніну.

<400> 13
atggctaagc agaacaacaa cctctccgtg cgcgcgctgc cgagcttcat cgacgtcttc 60
aacggcatct acgggttcgc cacgggcatc caggacatct tcaacatgat ctttgggact 120
gatacgggcg gcctgaccct ggaggaggtg ttaaagaacc aggatctcct ctacgagatt 180
tcgggcaagc tggacgggat caacggcgac ctgagcgaga tcatcgccca gggcaacctc 240
aacaccgagc tcacgaaaga actactgaag attgccaacg agcagaacaa cctgctcacg 300
gacgtgaaca acaagctgaa cgccatcaac gcgatgctga acacctacct gcccaagatc 360
accaacatgc tgagcgacat catgaagcag aactacgtcc tgtcccttca gatcgagtac 420
ctgtccaagc agctccagga gatctcggac aagttggacg tgatcaacct caacgtgctc 480
atcaactcga ccctcaccga gatcactcca gcgtaccagc gcatcaagta cgtcaacgag 540

aagttcgacg	acctgacgct	ggccactgag	aagaccctgc	gcgcgaaagca	aggctcgtcc	600
aacgaggaca	tcttcgacaa	cgacaccctg	gagaacctca	cggagctgac	cgagctggcc	660
aagagcgtga	cgaagaacga	cgtggactcg	ttcgagttct	acctccacac	tttccacgac	720
gtcctgatcg	ggaacaacct	ctttggtcgt	tcggccctca	agacggcggc	ggagctcatc	780
acaaaggacg	agatcaagac	ctctgggtct	gagatcggca	agggtgtactc	gtttctcatt	840
gtcctgacgt	gcctgcaagc	gaaggcttac	ctaacgctca	cggcgtgccg	caagctgctg	900
ggcctgtctg	acatcgacta	caccaacatc	ctgaaccagc	accttaacga	cgagaagaac	960
gagttccggg	acaacattct	tcctaccctg	tcgaacaagt	tcagcaaccc	gaactacgcg	1020
aagaccacgg	gcagcgacga	cgatgcggtg	gtggtcctgg	aggctgacct	gggctacgcg	1080
ctgatcgggt	tcgagatcat	cagcgaccct	atcccagtg	tcaagggtga	ccaggcgaag	1140
ctgaaacaga	actaccaggt	tgacgagcag	tccctgacgg	agaagggtga	ccggaacatc	1200
aataagatct	tctgcccgga	gaactccgac	cagcgggtact	acatcaagga	catcaccttc	1260
cctatcgggt	acgtcatcac	caagataatc	ttcgagaaga	agtaccagaa	ccgactcggc	1320
tacctggtga	aggcgaactt	ctatgacagc	tcgacggg	acatcgacct	caacaagtcc	1380
atcgaggaga	gtagcgggaa	tctgctggcg	tggccgccc	acagcatcat	ctccatctcc	1440
aaggacgagg	aagacgagaa	ggatgtgtac	atgccactag	gcgtcatctc	cgaaactttc	1500
ctgacaccca	tacacagctt	cgggctcaag	gtggacgagg	agagccggat	catcacgctg	1560
accggcaaga	gtacctccg	agagtacctg	ctggagtcgg	acctcaagaa	caaggagacg	1620
tcgctgatcg	ctcctcccaa	cgtcttcatc	tccaacatcg	tcgagaactg	gaacatcgag	1680
gcggacagcc	tggagccgtg	ggtggcgaac	aacaagaacg	cttacgtgga	ctcaaccggc	1740
ggcattgagg	gctccaaggc	cctattcacg	caaggcgacg	gcgagttcag	ccagttcatc	1800
ggcgacaagc	taaagcccaa	cacggactac	atgatccagt	acactgtgaa	gggcaagccc	1860
gcgatctacc	tcaagcacia	ggacgcaacc	ggctacatca	tgtacgagga	caccaacggc	1920
aactacgagg	acttccagac	gcggggccgtc	aagttcacct	cgggcgctga	gccgtcccag	1980
gcccacttga	tcttcaagtc	ccagtcgggc	tacgaggctt	ggggcgacaa	ctttatcatc	2040
ctggagagca	agtcggtgga	gttcgaccag	aaactcgagg	ctccggagggt	catcaagtgc	2100
gagaactgga	tactgactgg	cgacgcgaag	ctggaacagg	acggccaggc	cctgagggtcc	2160
gtgagcggga	acggcagctt	caagcagttc	ctccagctca	agtccgacag	catctacttt	2220
atgaacttcc	acgtcgtggg	caaggcgcgc	gtgactatca	agaacagcca	ccgcgtcctc	2280
ttcgagaagg	actacagcac	gcagtatcgc	atagtcgatg	atgaatactt	caccaccgtc	2340
tccgacatcg	acggcgtggt	catcgagctg	acgtcgcact	ccagctcgct	ggcggacatt	2400

atgtcgctgt ggggcgaatc cgagttcggc ttctggggct tcagcatcaa gtag

2454

<210> 14

<211> 817

<212> Білок

<213> Штучний

<220>

<223> Амінокислотна послідовність TIC7941PL_3 і де додаткова амінокислота аланін вставлена безпосередньо після ініціюючого метіоніну.

<400> 14

Met Ala Lys Gln Asn Asn Asn Leu Ser Val Arg Ala Leu Pro Ser Phe
1 5 10 15

Ile Asp Val Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Gln Asp
20 25 30

Ile Phe Asn Met Ile Phe Gly Thr Asp Thr Gly Gly Leu Thr Leu Glu
35 40 45

Glu Val Leu Lys Asn Gln Asp Leu Leu Tyr Glu Ile Ser Gly Lys Leu
50 55 60

Asp Gly Ile Asn Gly Asp Leu Ser Glu Ile Ile Ala Gln Gly Asn Leu
65 70 75 80

Asn Thr Glu Leu Thr Lys Glu Leu Leu Lys Ile Ala Asn Glu Gln Asn
85 90 95

Asn Leu Leu Thr Asp Val Asn Asn Lys Leu Asn Ala Ile Asn Ala Met
100 105 110

Leu Asn Thr Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Asn Met Leu Ser Asp Ile Met
115 120 125

Lys Gln Asn Tyr Val Leu Ser Leu Gln Ile Glu Tyr Leu Ser Lys Gln
130 135 140

Leu Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Val Ile Asn Leu Asn Val Leu
145 150 155 160

Ile Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ala Tyr Gln Arg Ile Lys
165 170 175

Tyr Val Asn Glu Lys Phe Asp Asp Leu Thr Leu Ala Thr Glu Lys Thr
180 185 190

Leu	Arg	Ala	Lys	Gln	Gly	Ser	Ser	Asn	Glu	Asp	Ile	Phe	Asp	Asn	Asp	195	200	205
Thr	Leu	Glu	Asn	Leu	Thr	Glu	Leu	Thr	Glu	Leu	Ala	Lys	Ser	Val	Thr	210	215	220
Lys	Asn	Asp	Val	Asp	Ser	Phe	Glu	Phe	Tyr	Leu	His	Thr	Phe	His	Asp	225	230	235
Val	Leu	Ile	Gly	Asn	Asn	Leu	Phe	Gly	Arg	Ser	Ala	Leu	Lys	Thr	Ala	245	250	255
Ala	Glu	Leu	Ile	Thr	Lys	Asp	Glu	Ile	Lys	Thr	Ser	Gly	Ser	Glu	Ile	260	265	270
Gly	Lys	Val	Tyr	Ser	Phe	Leu	Ile	Val	Leu	Thr	Cys	Leu	Gln	Ala	Lys	275	280	285
Ala	Tyr	Leu	Thr	Leu	Thr	Ala	Cys	Arg	Lys	Leu	Leu	Gly	Leu	Ser	Asp	290	295	300
Ile	Asp	Tyr	Thr	Asn	Ile	Leu	Asn	Gln	His	Leu	Asn	Asp	Glu	Lys	Asn	305	310	315
Glu	Phe	Arg	Asp	Asn	Ile	Leu	Pro	Thr	Leu	Ser	Asn	Lys	Phe	Ser	Asn	325	330	335
Pro	Asn	Tyr	Ala	Lys	Thr	Thr	Gly	Ser	Asp	Asp	Asp	Ala	Val	Val	Val	340	345	350
Leu	Glu	Ala	Asp	Leu	Gly	Tyr	Ala	Leu	Ile	Gly	Phe	Glu	Ile	Ile	Ser	355	360	365
Asp	Pro	Ile	Pro	Val	Leu	Lys	Val	Tyr	Gln	Ala	Lys	Leu	Lys	Gln	Asn	370	375	380
Tyr	Gln	Val	Asp	Glu	Gln	Ser	Leu	Thr	Glu	Lys	Val	Tyr	Arg	Asn	Ile	385	390	395
Asn	Lys	Ile	Phe	Cys	Pro	Glu	Asn	Ser	Asp	Gln	Arg	Tyr	Tyr	Ile	Lys	405	410	415
Asp	Ile	Thr	Phe	Pro	Ile	Gly	Tyr	Val	Ile	Thr	Lys	Ile	Ile	Phe	Glu	420	425	430
Lys	Lys	Tyr	Gln	Asn	Arg	Leu	Gly	Tyr	Leu	Val	Lys	Ala	Asn	Phe	Tyr			

435

440

445

Asp Ser Ser Thr Gly Asp Ile Asp Leu Asn Lys Ser Ile Glu Glu Ser
 450 455 460

Ser Gly Asn Leu Leu Ala Trp Pro Pro Asp Ser Ile Ile Ser Ile Ser
 465 470 475 480

Lys Asp Glu Glu Asp Glu Lys Asp Val Tyr Met Pro Leu Gly Val Ile
 485 490 495

Ser Glu Thr Phe Leu Thr Pro Ile His Ser Phe Gly Leu Lys Val Asp
 500 505 510

Glu Glu Ser Arg Ile Ile Thr Leu Thr Gly Lys Ser Tyr Leu Arg Glu
 515 520 525

Tyr Leu Leu Glu Ser Asp Leu Lys Asn Lys Glu Thr Ser Leu Ile Ala
 530 535 540

Pro Pro Asn Val Phe Ile Ser Asn Ile Val Glu Asn Trp Asn Ile Glu
 545 550 555 560

Ala Asp Ser Leu Glu Pro Trp Val Ala Asn Asn Lys Asn Ala Tyr Val
 565 570 575

Asp Ser Thr Gly Gly Ile Glu Gly Ser Lys Ala Leu Phe Thr Gln Gly
 580 585 590

Asp Gly Glu Phe Ser Gln Phe Ile Gly Asp Lys Leu Lys Pro Asn Thr
 595 600 605

Asp Tyr Met Ile Gln Tyr Thr Val Lys Gly Lys Pro Ala Ile Tyr Leu
 610 615 620

Lys His Lys Asp Ala Thr Gly Tyr Ile Met Tyr Glu Asp Thr Asn Gly
 625 630 635 640

Asn Tyr Glu Asp Phe Gln Thr Arg Ala Val Lys Phe Thr Ser Gly Ala
 645 650 655

Glu Pro Ser Gln Ala His Leu Ile Phe Lys Ser Gln Ser Gly Tyr Glu
 660 665 670

Ala Trp Gly Asp Asn Phe Ile Ile Leu Glu Ser Lys Ser Val Glu Phe
 675 680 685

Asp Gln Lys Leu Glu Ala Pro Glu Val Ile Lys Ser Glu Asn Trp Ile
 690 695 700
 Leu Thr Gly Asp Ala Lys Leu Glu Gln Asp Gly Gln Ala Leu Arg Ser
 705 710 715 720
 Val Ser Gly Asn Gly Ser Phe Lys Gln Phe Leu Gln Leu Lys Ser Asp
 725 730 735
 Ser Ile Tyr Phe Met Asn Phe His Val Val Gly Lys Ala Arg Val Thr
 740 745 750
 Ile Lys Asn Ser His Arg Val Leu Phe Glu Lys Asp Tyr Ser Thr Gln
 755 760 765
 Tyr Arg Ile Val Asp Asp Glu Tyr Phe Thr Thr Val Ser Asp Ile Asp
 770 775 780
 Gly Val Phe Ile Glu Leu Thr Ser His Ser Ser Ser Leu Ala Asp Ile
 785 790 795 800
 Met Ser Leu Trp Gly Glu Ser Glu Phe Gly Phe Trp Gly Phe Ser Ile
 805 810 815

Lys

<210> 15
 <211> 36
 <212> ДНК
 <213> Штучна

<220>

<223> Синтетична кодуєча послідовність (FAWPEPBIN_Вас), яка кодує пептид, що зв'язує рецептор FAW ABCc4.

<400> 15
 tcttctttag cagatattat gtcttttatgg ggagaa

36

<210> 16
 <211> 36
 <212> ДНК
 <213> Штучна

<220>

<223> Синтетична кодуєча послідовність (FAWPEPBIN_PL), яка кодує пептид, що зв'язує рецептор FAW ABCc4.

<400> 16

agctcgctgg cggacattat gtcgctgtgg ggcgaa

36

<210> 17

<211> 12

<212> Білок

<213> Штучний

<220>

<223> Послідовність пептиду, що зв'язує рецептор FAW ABCc4 (FAWPEPBIN), яка кодується SEQ ID NO:15 і SEQ ID NO:16.

<400> 17

Ser Ser Leu Ala Asp Ile Met Ser Leu Trp Gly Glu
1 5 10

<210> 18

<211> 21

<212> ДНК

<213> Штучна

<220>

<223> Послідовність ДНК, що кодує сайт зв'язування мішені miRNA, Gm.miR395_1.

<400> 18

tgaagtgttt gggggaactt c

21

<210> 19

<211> 21

<212> ДНК

<213> Штучна

<220>

<223> Послідовність ДНК, що кодує сайт зв'язування мішені miRNA, Gm.miR395_2.

<400> 19

tgaagtgttt gggggaactt g

21

<210> 20

<211> 62

<212> ДНК

<213> Штучна

<220>

<223> Послідовність ДНК (SUP-miR395), де сайти зв'язування мішені miRNA, Gm.miR395_1 і Gm.miR395_2, пов'язані з використанням послідовності ДНК, SP-ART.8a-1.

<400> 20

gaagttcccc caaacacttc aaagtactgc gatcgcggtta acaagttccc ccaaacactt

60

ca

62

<210> 21

<211> 22

<212> ДНК
 <213> Штучна

<220>
 <223> Послідовність ДНК, що кодує сайт зв'язування мішені miRNA,
 Gm.miR4392_1.

<400> 21
 tctgcgaaaa tgtgatttcg gc 22

<210> 22
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Штучна

<220>
 <223> Послідовність ДНК, що кодує сайт зв'язування мішені miRNA,
 Gm.miR4392_2.

<400> 22
 tgaagtgttt gggggaactt gg 22

<210> 23
 <211> 64
 <212> ДНК
 <213> Штучна

<220>
 <223> Послідовність ДНК (SUP-miR4392), де сайти зв'язування мішені miRNA,
 Gm.miR4392_1 і Gm.miR4392_2, пов'язані з використанням послідовності
 ДНК, SP-ART.8a-1.

<400> 23
 gccgaaatca catttttcgca gaaagtactg cgatcgcggtt aacccgaaat cacatttttcg 60
 saga 64

<210> 24
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна

<220>
 <223> Послідовність ДНК лінкера, SP-ART.8a-1.

<400> 24
 aagtactgscg atcgcgttaa 20

<210> 25
 <211> 2490
 <212> ДНК
 <213> Штучна

<220>
 <223> Послідовність ДНК (TIC7941PL_1-mi395), що кодує TIC7941PL_1,
 функціонально
 пов'язаний з SUP-miR395.

<400> 25	
atggctaagc agaacaacaa cctctccgtg cgcgcgctgc cgagcttcat cgacgtcttc	60
aacggcatct acgggttcgc cacgggcatc caggacatct tcaacatgat ctttgggact	120
gatacggggcg gcctgaccct ggaggaggtg ttaaagaacc aggatctcct ctacgagatt	180
tcgggcaagc tggacgggat caacggcgac ctgagcgaga tcatcgcca gggcaacctc	240
aacaccgagc tcacgaaaga actactgaag attgccaacg agcagaacaa cctgctcacg	300
gacgtgaaca acaagctgaa cgccatcaac gcgatgctga acacctacct gcccaagatc	360
accaacatgc tgagcgacat catgaagcag aactacgtcc tgtcccttca gatcgagtac	420
ctgtccaagc agctccagga gatctcggac aagttggacg tgatcaacct caacgtgctc	480
atcaactcga ccctcaccga gatcactcca gcgtaccagc gcatcaagta cgtcaacgag	540
aagttcgacg acctgacgct ggccactgag aagaccctgc gcgcgaagca aggctcgtcc	600
aacgaggaca tcttcgacaa cgacaccctg gagaacctca cggagctgac cgagctggcc	660
aagagcgtga cgaagaacga cgtggactcg ttcgagttct acctccacac tttccacgac	720
gtcctgatcg ggaacaacct ctttggtcgt tcggccctca agacggcggc ggagctcatc	780
acaaaggacg agatcaagac ctctgggtct gagatcggca aggtgtactc gtttctcatt	840
gtcctgacgt gcctgcaagc gaaggcttac ctaacgctca cggcgtgccg caagctgctg	900
ggcctgtctg acatcgacta caccaacatc ctgaaccagc accttaacga cgagaagaac	960
gagttccggg acaacattct tcctaccctg tcgaacaagt tcagcaaccc gaactacgcg	1020
aagaccacgg gcagcgacga cgatgcggtg gtggtcctgg aggctgacct gggctacgcg	1080
ctgatcggct tcgagatcat cagcgaccct atcccagtgc tcaaggtgta ccaggcgaag	1140
ctgaaacaga actaccaggt tgacgagcag tccctgacgg agaaggtgta ccggaacatc	1200
aataagatct tctgcccgga gaactccgac cagcgggtact acatcaagga catcaccttc	1260
cctatcgggt acgtcatcac caagataatc ttcgagaaga agtaccagaa ccgactcggc	1320
tacctggtga aggcgaactt ctatgacagc tcgacgggcg acatcgacct caacaagtcc	1380
atcgaggaga gtagcgggaa tctgctggcg tggccgcccg acagcatcat ctccatctcc	1440
aaggacgagg aagacgagaa ggatgtgtac atgccactag gcgtcatctc cgaaactttc	1500
ctgacaccca tacacagctt cgggctcaag gtggacgagg agagccggat catcacgctg	1560
accggcaaga gctacctccg agagtacctg ctggagtcgg acctcaagaa caaggagacg	1620
tcgctgatcg ctctcccaa cgtcttcatc tccaacatcg tcgagaactg gaacatcgag	1680
gcggacagcc tggagccgtg ggtggcgaac aacaagaacg cttacgtgga ctcaaccggc	1740
ggcattgagg gctccaaggc cctattcacg caaggcgacg gcgagttcag ccagttcatc	1800
ggcgacaagc taaagcccaa cacggactac atgatccagt aactgtgaa gggcaagccc	1860

gcgatctacc tcaagcaca	ggacgcaacc ggctacatca	tgtacgagga caccaacggc	1920
aactacgagg acttccagac	gcgggccgctc aagttcacct	cgggcgctga gccgtcccag	1980
gcccacttga tcttcaagtc	ccagtcggggc tacgaggcctt	ggggcgacaa ctttatcatc	2040
ctggagagca agtcggtgga	gttcgaccag aaactcgagg	ctccggagggt catcaagtcg	2100
gagaactgga tactgactgg	cgacgcgaag ctggaacagg	acggccaggc cctgagggtcc	2160
gtgagcggga acggcagctt	caagcagttc ctccagctca	agtccgacag catctacttt	2220
atgaacttcc acgtcgtggg	caaggcgcgc gtgactatca	agaacagcca ccgcgtcctc	2280
ttcgagaagg actacagcac	gcagtatcgc atagtcgatg	atgaatactt caccaccgtc	2340
tccgacatcg acggcgtggt	catcgagctg acgtcgcact	ccgaggagtc ctccgagttc	2400
ggcttctggg gcttcagcat	caagtagtga agttcccca	aacacttcaa agtactgcga	2460
tcgcgttaac aagttcccc	aaacacttca		2490

<210> 26

<211> 2493

<212> ДНК

<213> Штучна

<220>

<223> Послідовність ДНК (TIC7941PL_1-mi4392), що кодує TIC7941PL_1, функціонально пов'язаний з SUP-miR4392.

<400> 26

atggctaagc agaacaaca	cctctccgtg cgcgcgctgc	cgagcttcat cgacgtcttc	60
aacggcatct acgggttcgc	cacgggcacac caggacatct	tcaacatgat ctttgggact	120
gatacgggcg gcctgaccct	ggaggagggtg ttaaagaacc	aggatctcct ctacgagatt	180
tcgggcaagc tggacgggat	caacggcgac ctgagcgaga	tcatcgcca gggcaacctc	240
aacaccgagc tcacgaaga	actactgaag attgccaacg	agcagaacaa cctgctcacg	300
gacgtgaaca acaagctgaa	cgccatcaac gcgatgctga	acacctacct gcccagatc	360
accaacatgc tgagcgacat	catgaagcag aactacgtcc	tgtcccttca gatcgagtac	420
ctgtccaagc agctccagga	gatctcggac aagttggacg	tgatcaacct caacgtgctc	480
atcaactcga ccctcacga	gatcactcca gcgtaccagc	gcatcaagta cgtcaacgag	540
aagttcgacg acctgacgct	ggccactgag aagaccctgc	gcgcgaagca aggctcgtcc	600
aacgaggaca tcttcgacaa	cgacaccctg gagaacctca	cggagctgac cgagctggcc	660
aagagcgtga cgaagaacga	cgtggactcg ttcgagttct	acctccacac tttccacgac	720
gtcctgatcg ggaacaacct	ctttggctgt tcggccctca	agacggcggc ggagctcatc	780
acaaaggacg agatcaagac	ctctgggtct gagatcggca	aggtgtactc gtttctcatt	840

gtcctgacgt gcttgaagc gaaggcttac ctaacgctca cggcgtgccg caagctgctg	900
ggcctgtctg acatcgacta caccaacatc ctgaaccagc accttaacga cgagaagaac	960
gagttccggg acaacattct tcctaccctg tcgaacaagt tcagcaaccc gaactacgcg	1020
aagaccacgg gcagcgacga cgatgcggtg gtggtccttg aggctgacct gggctacgcg	1080
ctgatcgggt tcgagatcat cagcgacct atcccagtgc tcaaggtgta ccaggcgaag	1140
ctgaaacaga actaccaggt tgacgagcag tccctgacgg agaaggtgta ccggaacatc	1200
aataagatct tctgcccga gaactccgac cagcgggtact acatcaagga catcaccttc	1260
cctatcgggt acgtcatcac caagataatc ttcgagaaga agtaccagaa ccgactcggc	1320
tacctggtga aggcgaactt ctatgacagc tcgacgggcg acatcgacct caacaagtcc	1380
atcgaggaga gtagcgggaa tctgctggcg tggccgcccg acagcatcat ctccatctcc	1440
aaggacgagg aagacgagaa ggatgtgtac atgccactag gcgtcatctc cgaaactttc	1500
ctgacacca tacacagctt cgggctcaag gtggacgagg agagccggat catcacgctg	1560
accggcaaga gctacctcg agagtacctg ctggagtcgg acctcaagaa caaggagacg	1620
tcgctgatcg ctctcccaa cgtcttcac tccaacatcg tcgagaactg gaacatcgag	1680
gcggacagcc tggagccgtg ggtggcgaac aacaagaacg cttacgtgga ctcaaccggc	1740
ggcattgagg gctccaaggc cctattcacg caaggcgacg gcgagttcag ccagttcatc	1800
ggcgacaagc taaagcccaa cacggactac atgatccagt aactgtgaa gggcaagccc	1860
gcgatctacc tcaagcaca ggacgcaacc ggctacatca tgtacgagga caccaacggc	1920
aactacgagg acttccagac gcgggcccgtc aagttcacct cgggcgctga gccgtcccag	1980
gccacttga tcttcaagtc ccagtcgggc tacgaggctt ggggcgacaa ctttatcatc	2040
ctggagagca agtcggtgga gttcgaccag aaactcgagg ctccggagggt catcaagtcg	2100
gagaactgga tactgactgg cgacgcgaag ctggaacagg acggccaggc cctgaggtcc	2160
gtgagcggga acggcagctt caagcagttc ctccagctca agtccgacag catctacttt	2220
atgaacttcc acgtcgtggg caaggcgcgc gtgactatca agaacagcca ccgcgtcctc	2280
ttcgagaagg actacagcac gcagtatcgc atagtcgatg atgaatactt caccaccgtc	2340
tccgacatcg acggcgtggt catcgagctg acgtcgcact ccgaggagtc ctccgagttc	2400
ggcttctggg gcttcagcat caagtagtag ccgaaatcac attttcgcag aaagtactgc	2460
gatcgcgtta acccgaaatc acattttcgc aga	2493