



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 130828

(13) C2

(51) МПК

C07K 14/195 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

A01N 63/25 (2020.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2021 02418	(72) Винахідник(и):	Боуен Девід Дж. (US), Чай Кетрін А. (US), Чень Даньці (US), Ціхе Тодд А. (US), Хау Арлін Р. (US), Лутке Дженніфер Л. (US), Віггінс Барбара Е. (US), Чжан Юаньцзі (US)
(22) Дата подання заявки:	21.01.2020	(73) Володілець (володільці):	МОНСАНТО ТЕКНОЛОДЖІ ЛЛС, 800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, Missouri 63167, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	28.05.2026	(74) Представник:	Петров Андрій Володимирович, реєстр. №139
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	62/795,066	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	US 10155960 B2, 18.12.2018 WO 2012/138703 A1, 11.10.2012 US 9567381 B2, 14.02.2017 US 2017/0058294 A1, 02.03.2017 UniProtKB. Database accession no. A0A3A3GLR0. CBM-cenC domain-containing protein (Panthera species). [Інтернет-публікація від 04.12.2018]. URL: https://www.uniprot.org/uniprot/A0A3A3GLR0.txt
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	22.01.2019		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	13.10.2021, Бюл.№ 41		
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію:	27.05.2026, Бюл.№ 21		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/US2020/014437, 21.01.2020		

(54) МОЛЕКУЛА РЕКОМБІНАНТНОЇ НУКЛЕЇНОВОЇ КИСЛОТИ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ІНСЕКТИЦИДНОГО БІЛКА, ЩО МАЄ АКТИВНІСТЬ ЩОДО ЛУСКОКРИЛИХ КОМАХ-ШКІДНИКІВ**(57) Реферат:**

Винахід розкриває молекулу рекомбінантної нуклеїнової кислоти для одержання інсектицидного білка, що має активність щодо лускокрилих комах-шкідників. Також винахід розкриває рослину, яка стійка до зараження лускокрилими комами-шкідниками або її частина, насіння для одержання рослини, композицію, що інгібує активність комах, що має інсектицидну активність щодо лускокрилих комах-шкідників, продовольчий товарний продукт, отриманий з рослини або її частини, спосіб боротьби зі шкідниками видів лускокрилих або із зараженням шкідниками, спосіб виявлення присутності молекули рекомбінантної нуклеїнової кислоти у зразку, що містить геномну ДНК рослини, спосіб виявлення присутності інсектицидного білка в зразку, що містить білок, молекули рекомбінантної ДНК, інсектицидного білка.

UA 130828 C2

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

5 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.

10 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 15 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 20 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 25 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 30 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*), 35 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 40 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 45 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 50 засіб боротьби зі шкідниками. Штами бактерій *Bacillus thuringiensis* (Bt) були використані в якості джерела пестицидних білків, оскільки було виявлено, що штамми Bt проявляють високу токсичність по відношенню до певних комах. Відомо, що штамми 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, 55 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* 60

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 комах-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 плазміди, фагміди, бакміди, косміди 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: (а) 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: (a) 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 (a) 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: (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. 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 послідовності, 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.

5 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.

10 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.

15 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.

20 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.

25 SEQ ID NO:15 являє собою синтетичну кодуючу послідовність (FAWPEPBIN_Vac), 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.

30 SEQ ID NO:16 являє собою синтетичну кодуючу 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.

35 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.

40 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.

45 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.

50 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 ВІНАХОДУ

55 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

60 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-інсілоном (*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 кодуючий 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 інгібванні (інгібванні 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 токсинного білка для шкідника, коли вплив токсинного білка на шкідника призводить до захворюваності, смертності, зниження плодючості або затримки
 5 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 токсинного білка ефективно інгібувати ріст, розвиток, життєздатність, харчову поведінку,
 10 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.
 15 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.
 20 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,
 25 неонікотиноїди 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
 30 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 (*Hypena scabra*), тютюнову листовійку (*Heliothis virescens*), совку бавовняну (*Agrotis subterranea*), совку лугову (*Pseudaletia unipuncta*), совку прямокутну (*Agrotis orthogonia*); бурильників, чехлоносок, гусениць, що випускають павутину, конусних хробаків, гусениць-капусниць і шкідників, що скелетують листя, із сімейства *Pyrallidae*, 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, плоджерок і гусениць-шкідників плодів з сімейства *Tortricidae*, наприклад, плоджерку яблуневу (*Cydia pomonella*), листовійку винограду (*Endopiza viteana*), плоджерку 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*),
 50 європейську листовійку (*Archips rosana*) та інші види *Archips*, (*Chilo suppressalis*, вогнівка
 60

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 licarsialis*), західну бобову совку (*Striacosta albicosta*), листовійку гронову винного винограду (*Lobesia botrana*), цитрусового листового мінера (*Phyllocnistis citrella*), капустяницю (*Pieris brassicae*), білану ріпову (*Pieris rapae*, також відому як ріпниця), совку малу (*Spodoptera exigua*), азіатську бавовняну совку (*Spodoptera litura*, також відому як гусінь гронова) 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 позакромосомному 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 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 читування (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 білкових 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 кодуючої послідовності токсинного білка, трансформованої в рослинній клітині, в іншу кодуючу послідовність токсину. Зокрема, за допомогою цих методів

один або кілька кодонів в кодуючій послідовності токсину змінюються для створення нової амінокислотної послідовності білка. Альтернативно фрагмент в кодуючій послідовності замінюється або видаляється, або додаткові фрагменти ДНК вставляються в кодуючу послідовність для створення нової кодуючої послідовності токсину. Нова кодуюча 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 кодуючу 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 сильноокислих 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 (соя), 2008/0280361A1 (соя), 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(-и) білок(-и) для здійснення сайт-спрямованої інтеграції. Ці касети, які експресують нуклеазу, можуть бути присутніми в тій же молекулі або векторі, що й донорна матриця (в *cis*), або в окремій молекулі або векторі (в *trans*). 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, введенного 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 Crpf1). Для способів з використанням РНК-направлених сайт-специфічних нуклеаз (наприклад, Cas9 або Crpf1) 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, енансери, 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 кодуєчими 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 кодованого 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 промистої, 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, насінневу коробочку, лист, квітку, стебло, корінь або будь-яку їх частину, або нерегенеровану частину цієї частини трансгенної рослини. В цьому контексті нерегенерована 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 нерегенерована частина цієї частини рослини є частиною трансгенного насіння, насінневої 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 заgonу 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 гібридується 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 кодуєчі 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 кодуєчих 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 кодуєчої 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 інгібує активність комах, що містить токсиновий 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 токсинового білка TIC7941. Можливі додаткові поліпептиди для такої композиції включають будь-який білок, що інгібує 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), AfIP-1A і його похідні (публікація патенту США 2014-0033361 A1), AfIP-1B і його похідні (публікація патенту США 2014-0033361 A1), PIP-1A/PIP-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 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 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, токсинів 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 ні інгібуються іншим білком, що інгібує 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), eNIP (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 α -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 інгібування активності комах або пестицидного інгібування, 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 RICS один ланцюг дуплексу малої РНК вибирається в якості направляючого ланцюга і включається в ARGONAUTE 1 (AGO1) для утворення функціонального RISC, тоді як інший ланцюг (супроводжуючий 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 Н-подібну складку РНКазиди 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/мішень 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 ARGO з утворенням комплексу сайленсингу, мікроРНК функціонують як сіквенс-специфічні провідники, направляючи комплекс сайленсингу до транскрипту 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 посилення, 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 кодувальної 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 кодувальної 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 споруляції *bacillus*. Крім того, кодувоча 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 кодувочими 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	<i>E. coli</i>

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.

5 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.

20 Клітини рослин кукурудзи трансформували бінарним вектором трансформації, як описано вище, з використанням методу трансформації, опосередкованої *Agrobacterium*. Трансформовані клітини індукували з утворенням рослин способами, відомими 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.

30 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
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

40 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 TIC7941PL₁

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 TIC7941PL₁, трансформовані кожною з чотирьох (4) конструкцій, продемонстрували високу стійкість з високим проявом гена до SAW, SBL і SPW. Стабільно трансформовані рослини сої, які експресують TIC7941PL₁, демонструють стійкість до видів лускокрилих шкідників і високоефективні проти SAW, SBL і SPW.

Приклад 5

Аналіз активності TIC7941PL₁ 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 TIC7941PL₁, 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 TIC7941PL₁, були сконструйовані з використанням способів, відомих в цій області техніки. Отримані в результаті вектори трансформації рослин містять першу трансгенну касету для експресії пестицидного білка TIC7941PL₁, 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 TIC7941PL₁, 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, відовими 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 TIC7941PL₁ 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 контролями, щоб визначити, чи забезпечує експресія TIC7941PL₁ 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_{Вас} (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 кодує послідовність FAWPEPBIN_Vас 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 кодує послідовності FAWPEPBIN_Vас 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, відовими 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 мішені 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 якби кожна окрема публікація або патентна заявка була конкретно і окремо вказана для включення шляхом посилання.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Монсанта Текнолоджі ЕлЕлСі

<120> НОВІ БІЛКИ, ЩО ІНГІБУЮТЬ АКТИВНІСТЬ КОМАХ

<130> MONS:469WO

<150> US 62/795,066

<151> 22.01.2019
 <160> 26
 5 <170> Версія PatentIn 3.5
 <210> 1
 <211> 2424
 <212> ДНК
 10 <213> *Paenibacillus lentimorbus*
 <220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (1)..(2424)
 <223> Послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує пестицидний білок
 TIC7941,
 отриманий з виду *Paenibacillus lentimorbus* DSC020651.
 20 <400> 1
 atgaagcaga ataataatth aagtgtgaaga gccttaccaa gttttattga tgtttttaat 60
 ggaatttatg gttttgccac tggatttcaa gatattttta acatgatttt tggaacagat 120
 25 acaggtgggtc taacactaga agaagtttta aaaaatcaag atttacttta tgagattttct 180
 ggtaaaacttg atgggattaa tggagaccta agtgagatta ttgcgcaggg aaatttgaat 240
 acagaattaa ctaaggaatt gctaaaaatc gctaattgagc agaacaatth attaactgat 300
 30 gttataaaca aactcaatgc gataaatgag atgctcaaca catatcttcc taaaattaca 360
 aatatgttaa gcgatattat gaaacaaaat tatgtcctga gtcttcaaat agaatatctc 420
 35 agtaaacaac tacaggagat ttcagataaa cttgatgtta ttaattttaa tgtactcatc 480
 aactctacac tcacagaaat cactcctgca tatcaacgta ttaaatatgt aaatgaaaaa 540
 tttgatgatt taactcttgc tacagaaaaa actctaagag caaaacaagg tagttctaac 600
 40 gaagatattt ttgataatga tactcttgaa aatttaactg agctaactga actagcgaaa 660
 agtgaacaa aaaatgatgt ggatagtttc gagttttatc tccatacatt ccatgatgta 720
 45 ttgattggca ataatttatt tggtcgttcg gctttaaaaa cagctgcaga attgattact 780
 aaagacgaga taaagacgag tggaagtga ataggaaaag tttatagttt ctttaattgta 840
 ctaacttgct tacaagcaaa agcctatctc actttaacgg catgccgaaa attattgggc 900
 50 ttatcagata ttgattatac gaatattcta aatcagcatc taaatgatga aaagaatgaa 960
 tttcgtgata acatacttcc tacactgtcc aataaattth ctaaccctaa ttatgcaaaa 1020
 55 actacaggaa gtgatgatga tgcagtagtt gtttttagagg ctgatctagg atatgcctta 1080
 attggatttg aaattattag tgatccaatc ccggtattaa agtatatca agctaagcta 1140
 aaacaaaatt atcaagttga cgagcagtcg ttaacagaga aggtgtatcg gaatatcaat 1200
 60 aaaatattth gtccagaaaa ttccgatcaa cgttattata ttaaagatat aacgtttcct 1260

```

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

```

```

<210> 2
<211> 807
45 <212> Білок
    <213> Paenibacillus lentimorbus

```

```

<220>
50 <221> misc_feature
    <222> (1)..(807)
    <223> Амінокислотна послідовність пестицидного білка TIC7941.

```

```

<400> 2
55 Met Lys Gln Asn Asn Asn Leu Ser Val Arg Ala Leu Pro Ser Phe Ile
    1              5              10              15

```

```

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

```

5	Phe	Asn	Met	Ile	Phe	Gly	Thr	Asp	Thr	Gly	Gly	Leu	Thr	Leu	Glu	Glu
			35					40					45			
10	Val	Leu	Lys	Asn	Gln	Asp	Leu	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ser	Gly	Lys	Leu	Asp
		50					55					60				
15	Gly	Ile	Asn	Gly	Asp	Leu	Ser	Glu	Ile	Ile	Ala	Gln	Gly	Asn	Leu	Asn
	65					70					75					80
20	Thr	Glu	Leu	Thr	Lys	Glu	Leu	Leu	Lys	Ile	Ala	Asn	Glu	Gln	Asn	Asn
					85					90					95	
25	Leu	Leu	Thr	Asp	Val	Asn	Asn	Lys	Leu	Asn	Ala	Ile	Asn	Ala	Met	Leu
				100					105					110		
30	Asn	Thr	Tyr	Leu	Pro	Lys	Ile	Thr	Asn	Met	Leu	Ser	Asp	Ile	Met	Lys
			115					120					125			
35	Gln	Asn	Tyr	Val	Leu	Ser	Leu	Gln	Ile	Glu	Tyr	Leu	Ser	Lys	Gln	Leu
		130					135					140				
40	Gln	Glu	Ile	Ser	Asp	Lys	Leu	Asp	Val	Ile	Asn	Leu	Asn	Val	Leu	Ile
	145					150					155					160
45	Asn	Ser	Thr	Leu	Thr	Glu	Ile	Thr	Pro	Ala	Tyr	Gln	Arg	Ile	Lys	Tyr
					165					170					175	
50	Val	Asn	Glu	Lys	Phe	Asp	Asp	Leu	Thr	Leu	Ala	Thr	Glu	Lys	Thr	Leu
				180					185					190		
55	Arg	Ala	Lys	Gln	Gly	Ser	Ser	Asn	Glu	Asp	Ile	Phe	Asp	Asn	Asp	Thr
			195					200					205			
60	Leu	Glu	Asn	Leu	Thr	Glu	Leu	Thr	Glu	Leu	Ala	Lys	Ser	Val	Thr	Lys
		210					215					220				
65	Asn	Asp	Val	Asp	Ser	Phe	Glu	Phe	Tyr	Leu	His	Thr	Phe	His	Asp	Val
	225					230					235					240
70	Leu	Ile	Gly	Asn	Asn	Leu	Phe	Gly	Arg	Ser	Ala	Leu	Lys	Thr	Ala	Ala
					245					250					255	
75	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				
5	Tyr	Leu	Thr	Leu	Thr	Ala	Cys	Arg	Lys	Leu	Leu	Gly	Leu	Ser	Asp	Ile	
		290					295					300					
10	Asp	Tyr	Thr	Asn	Ile	Leu	Asn	Gln	His	Leu	Asn	Asp	Glu	Lys	Asn	Glu	
	305					310					315					320	
15	Phe	Arg	Asp	Asn	Ile	Leu	Pro	Thr	Leu	Ser	Asn	Lys	Phe	Ser	Asn	Pro	
					325					330					335		
20	Asn	Tyr	Ala	Lys	Thr	Thr	Gly	Ser	Asp	Asp	Asp	Ala	Val	Val	Val	Leu	
				340					345					350			
25	Glu	Ala	Asp	Leu	Gly	Tyr	Ala	Leu	Ile	Gly	Phe	Glu	Ile	Ile	Ser	Asp	
			355					360					365				
30	Pro	Ile	Pro	Val	Leu	Lys	Val	Tyr	Gln	Ala	Lys	Leu	Lys	Gln	Asn	Tyr	
		370					375					380					
35	Gln	Val	Asp	Glu	Gln	Ser	Leu	Thr	Glu	Lys	Val	Tyr	Arg	Asn	Ile	Asn	
	385					390					395					400	
40	Lys	Ile	Phe	Cys	Pro	Glu	Asn	Ser	Asp	Gln	Arg	Tyr	Tyr	Ile	Lys	Asp	
					405					410					415		
45	Ile	Thr	Phe	Pro	Ile	Gly	Tyr	Val	Ile	Thr	Lys	Ile	Ile	Phe	Glu	Lys	
				420					425					430			
50	Lys	Tyr	Gln	Asn	Arg	Leu	Gly	Tyr	Leu	Val	Lys	Ala	Asn	Phe	Tyr	Asp	
			435					440					445				
55	Ser	Ser	Thr	Gly	Asp	Ile	Asp	Leu	Asn	Lys	Ser	Ile	Glu	Glu	Ser	Ser	
		450					455					460					
60	Gly	Asn	Leu	Leu	Ala	Trp	Pro	Pro	Asp	Ser	Ile	Ile	Ser	Ile	Ser	Lys	
	465					470					475					480	
65	Asp	Glu	Glu	Asp	Glu	Lys	Asp	Val	Tyr	Met	Pro	Leu	Gly	Val	Ile	Ser	
					485					490					495		
70	Glu	Thr	Phe	Leu	Thr	Pro	Ile	His	Ser	Phe	Gly	Leu	Lys	Val	Asp	Glu	
				500					505					510			

UA 130828 C2

	Glu	Ser	Arg	Ile	Ile	Thr	Leu	Thr	Gly	Lys	Ser	Tyr	Leu	Arg	Glu	Tyr	
			515					520					525				
5	Leu	Leu	Glu	Ser	Asp	Leu	Lys	Asn	Lys	Glu	Thr	Ser	Leu	Ile	Ala	Pro	
		530					535					540					
10	Pro	Asn	Val	Phe	Ile	Ser	Asn	Ile	Val	Glu	Asn	Trp	Asn	Ile	Glu	Ala	
	545					550					555					560	
15	Asp	Ser	Leu	Glu	Pro	Trp	Val	Ala	Asn	Asn	Lys	Asn	Ala	Tyr	Val	Asp	
					565					570					575		
20	Ser	Thr	Gly	Gly	Ile	Glu	Gly	Ser	Lys	Ala	Leu	Phe	Thr	Gln	Gly	Asp	
				580					585					590			
25	Gly	Glu	Phe	Ser	Gln	Phe	Ile	Gly	Asp	Lys	Leu	Lys	Pro	Asn	Thr	Asp	
			595					600					605				
30	Tyr	Met	Ile	Gln	Tyr	Thr	Val	Lys	Gly	Lys	Pro	Ala	Ile	Tyr	Leu	Lys	
		610					615					620					
35	His	Lys	Asp	Ala	Thr	Gly	Tyr	Ile	Met	Tyr	Glu	Asp	Thr	Asn	Gly	Asn	
	625					630					635					640	
40	Tyr	Glu	Asp	Phe	Gln	Thr	Arg	Ala	Val	Lys	Phe	Thr	Ser	Gly	Ala	Glu	
					645					650					655		
45	Pro	Ser	Gln	Ala	His	Leu	Ile	Phe	Lys	Ser	Gln	Ser	Gly	Tyr	Glu	Ala	
				660					665					670			
50	Trp	Gly	Asp	Asn	Phe	Ile	Ile	Leu	Glu	Ser	Lys	Ser	Val	Glu	Phe	Asp	
			675					680					685				
55	Gln	Lys	Leu	Glu	Ala	Pro	Glu	Val	Ile	Lys	Ser	Glu	Asn	Trp	Ile	Leu	
		690					695					700					
60	Thr	Gly	Asp	Ala	Lys	Leu	Glu	Gln	Asp	Gly	Gln	Ala	Leu	Arg	Ser	Val	
	705					710					715					720	
65	Ser	Gly	Asn	Gly	Ser	Phe	Lys	Gln	Phe	Leu	Gln	Leu	Lys	Ser	Asp	Ser	
				725						730					735		
70	Ile	Tyr	Phe	Met	Asn	Phe	His	Val	Val	Gly	Lys	Ala	Arg	Val	Thr	Ile	
				740					745					750			
75	Lys	Asn	Ser	His	Arg	Val	Leu	Phe	Glu	Lys	Asp	Tyr	Ser	Thr	Gln	Tyr	

	755	760	765
5	Arg Ile Val Asp Asp Glu Tyr Phe Thr Thr Val Ser Asp Ile Asp Gly 770 775 780		
10	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		
15	<210> 3 <211> 2427 <212> ДНК <213> Штучна		
20	<220> <223> Синтетична кодуюча послідовність, що кодує пестицидний білок TIC7941PL_1,		
25	призначений для експресії в рослинній клітині, де додатковий кодон аланіну вставляється відразу після кодону ініціюючого метіоніну.		
	<400> 3		
30	atggctaagc agaacaaca cctctccgtg cgcgcgctgc cgagcttcat cgacgtcttc	60	
	aacggcatct acgggttcgc cacgggcatc caggacatct tcaacatgat ctttgggact	120	
	gatacgggcg gcctgaccct ggaggaggtg ttaaagaacc aggatctcct ctacgagatt	180	
35	tcgggcaagc tggacgggat caacggcgac ctgagcgaga tcatcgccca gggcaacctc	240	
	aacaccgagc tcacgaaaga actactgaag attgccaacg agcagaacaa cctgctcacg	300	
40	gacgtgaaca acaagctgaa cgccatcaac gcgatgctga acacctacct gcccaagatc	360	
	accaacatgc tgagcgacat catgaagcag aactacgtcc tgtcccttca gatcgagtac	420	
	ctgtccaagc agctccagga gatctcggac aagttggacg tgatcaacct caacgtgctc	480	
45	atcaactcga ccctcaccga gatcactcca gcgtaccagc gcatcaagta cgtcaacgag	540	
	aagttcgacg acctgacgct ggccactgag aagaccctgc gcgcgaagca aggctcgtcc	600	
50	aacgaggaca tcttcgacaa cgacaccctg gagaacctca cggagctgac cgagctggcc	660	
	aagagcgtga cgaagaacga cgtggactcg ttcgagttct acctccacac tttccacgac	720	
	gtcctgatcg ggaacaacct ctttggtcgt tcggccctca agacggcggc ggagctcatc	780	
55	acaaaggacg agatcaagac ctctgggtct gagatcggca aggtgtactc gtttctcatt	840	
	gtcctgacgt gcctgcaagc gaaggcttac ctaacgtcga cggcgtgccg caagctgctg	900	
60	ggcctgtctg acatcgacta caccaacatc ctgaaccagc accttaacga cgagaagaac	960	
	gagttccggg acaacattct tcctaccctg tcgaacaagt tcagcaaccc gaactacgcg	1020	

	aagaccacgg gcagcgacga cgatgcggtg gtggtcctgg aggctgacct gggctacgcg	1080
5	ctgatcggct tcgagatcat cagcgaccct atcccagtgc tcaaggtgta ccaggcgaag	1140
	ctgaaacaga actaccaggt tgacgagcag tccctgacgg agaaggtgta ccggaacatc	1200
	aataagatct tctgcccgga gaactccgac cagcgggtact acatcaagga catcaccttc	1260
10	cctatcgggt acgtcatcac caagataatc ttcgagaaga agtaccagaa ccgactcggc	1320
	tacctggtga aggcgaaactt ctatgacagc tcgacgggcg acatcgacct caacaagtcc	1380
15	atcgaggaga gtagcgggaa tctgctggcg tggccgcccg acagcatcat ctccatctcc	1440
	aaggacgagg aagacgagaa ggatgtgtac atgccactag gcgtcatctc cgaaactttc	1500
	ctgacaccca tacacagctt cgggctcaag gtggacgagg agagccggat catcacgctg	1560
20	accggcaaga gctacctccg agagtacctg ctggagtcgg acctcaagaa caaggagacg	1620
	tcgctgatcg ctctcccaa cgtcttcac tccaacatcg tcgagaactg gaacatcgag	1680
25	gcggacagcc tggagccgtg ggtggcgaac aacaagaacg cttacgtgga ctcaaccggc	1740
	ggcattgagg gctccaaggc cctattcacg caaggcgacg gcgagttcag ccagttcatc	1800
	ggcgacaagc taaagcccaa cacggactac atgatccagt aactgtgaa gggcaagccc	1860
30	gcgatctacc tcaagcacia ggacgcaacc ggctacatca tgtacgagga caccaacggc	1920
	aactacgagg acttccagac gcgggcccgc aagttcacct cgggcgctga gccgtcccag	1980
35	gcccacttga tcttcaagtc ccagtcgggc tacgaggctt ggggcgacaa ctttatcatc	2040
	ctggagagca agtcggtgga gttcgaccag aaactcgagg ctccggaggt catcaagtcg	2100
	gagaactgga tactgactgg cgacgcgaag ctggaacagg acggccaggc cctgaggtcc	2160
40	gtgagcggga acggcagctt caagcagttc ctccagctca agtccgacag catctacttt	2220
	atgaacttcc acgtcgtggg caaggcgcgc gtgactatca agaacagcca ccgcgtcctc	2280
45	ttcgagaagg actacagcac gcagtatcg atagtcgatg atgaatactt caccaccgtc	2340
	tccgacatcg acggcgtgtt catcgagctg acgtcgcact ccgaggagtc ctccgagttc	2400
	ggcttctggg gcttcagcat caagtag	2427
50	<210> 4 <211> 808 <212> Білок <213> Штучний	
55	<220> <223> Амінокислотна послідовність TIC7941PL_1 і де додаткова амінокислота аланін вставлена безпосередньо після ініціюючого метіоніну.	
60	<400> 4	

UA 130828 C2

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

UA 130828 C2

	Val	Leu	Ile	Gly	Asn	Asn	Leu	Phe	Gly	Arg	Ser	Ala	Leu	Lys	Thr	Ala	
					245					250					255		
5	Ala	Glu	Leu	Ile	Thr	Lys	Asp	Glu	Ile	Lys	Thr	Ser	Gly	Ser	Glu	Ile	
				260					265					270			
10	Gly	Lys	Val	Tyr	Ser	Phe	Leu	Ile	Val	Leu	Thr	Cys	Leu	Gln	Ala	Lys	
			275					280					285				
15	Ala	Tyr	Leu	Thr	Leu	Thr	Ala	Cys	Arg	Lys	Leu	Leu	Gly	Leu	Ser	Asp	
		290					295					300					
20	Ile	Asp	Tyr	Thr	Asn	Ile	Leu	Asn	Gln	His	Leu	Asn	Asp	Glu	Lys	Asn	
	305					310					315					320	
25	Glu	Phe	Arg	Asp	Asn	Ile	Leu	Pro	Thr	Leu	Ser	Asn	Lys	Phe	Ser	Asn	
					325					330					335		
30	Pro	Asn	Tyr	Ala	Lys	Thr	Thr	Gly	Ser	Asp	Asp	Ala	Val	Val	Val		
				340					345				350				
35	Leu	Glu	Ala	Asp	Leu	Gly	Tyr	Ala	Leu	Ile	Gly	Phe	Glu	Ile	Ile	Ser	
			355					360					365				
40	Asp	Pro	Ile	Pro	Val	Leu	Lys	Val	Tyr	Gln	Ala	Lys	Leu	Lys	Gln	Asn	
		370					375					380					
45	Tyr	Gln	Val	Asp	Glu	Gln	Ser	Leu	Thr	Glu	Lys	Val	Tyr	Arg	Asn	Ile	
	385					390					395					400	
50	Asn	Lys	Ile	Phe	Cys	Pro	Glu	Asn	Ser	Asp	Gln	Arg	Tyr	Tyr	Ile	Lys	
					405					410					415		
55	Asp	Ile	Thr	Phe	Pro	Ile	Gly	Tyr	Val	Ile	Thr	Lys	Ile	Ile	Phe	Glu	
				420				425							430		
60	Lys	Lys	Tyr	Gln	Asn	Arg	Leu	Gly	Tyr	Leu	Val	Lys	Ala	Asn	Phe	Tyr	
			435					440					445				
65	Asp	Ser	Ser	Thr	Gly	Asp	Ile	Asp	Leu	Asn	Lys	Ser	Ile	Glu	Glu	Ser	
		450					455					460					
70	Ser	Gly	Asn	Leu	Leu	Ala	Trp	Pro	Pro	Asp	Ser	Ile	Ile	Ser	Ile	Ser	
	465					470					475					480	
75	Lys	Asp	Glu	Glu	Asp	Glu	Lys	Asp	Val	Tyr	Met	Pro	Leu	Gly	Val	Ile	

UA 130828 C2

				485					490					495			
5	Ser	Glu	Thr	Phe 500	Leu	Thr	Pro	Ile	His 505	Ser	Phe	Gly	Leu	Lys 510	Val	Asp	
10	Glu	Glu	Ser 515	Arg	Ile	Ile	Thr	Leu 520	Thr	Gly	Lys	Ser	Tyr 525	Leu	Arg	Glu	
15	Tyr 530	Leu	Leu	Glu	Ser	Asp	Leu 535	Lys	Asn	Lys	Glu	Thr 540	Ser	Leu	Ile	Ala	
20	Pro 545	Pro	Asn	Val	Phe	Ile 550	Ser	Asn	Ile	Val	Glu 555	Asn	Trp	Asn	Ile	Glu 560	
25	Ala	Asp	Ser	Leu	Glu 565	Pro	Trp	Val	Ala	Asn 570	Asn	Lys	Asn	Ala	Tyr 575	Val	
30	Asp	Ser	Thr	Gly 580	Gly	Ile	Glu	Gly	Ser 585	Lys	Ala	Leu	Phe	Thr 590	Gln	Gly	
35	Asp	Gly 595	Glu	Phe	Ser	Gln	Phe	Ile 600	Gly	Asp	Lys	Leu	Lys 605	Pro	Asn	Thr	
40	Asp	Tyr 610	Met	Ile	Gln	Tyr	Thr 615	Val	Lys	Gly	Lys	Pro 620	Ala	Ile	Tyr	Leu	
45	Lys 625	His	Lys	Asp	Ala	Thr	Gly 630	Tyr	Ile	Met	Tyr 635	Glu	Asp	Thr	Asn	Gly 640	
50	Asn	Tyr	Glu	Asp	Phe 645	Gln	Thr	Arg	Ala	Val 650	Lys	Phe	Thr	Ser	Gly 655	Ala	
55	Glu	Pro	Ser	Gln	Ala	His	Leu	Ile	Phe 665	Lys	Ser	Gln	Ser	Gly 670	Tyr	Glu	
60	Ala	Trp	Gly 675	Asp	Asn	Phe	Ile 680	Ile	Leu	Glu	Ser	Lys 685	Ser	Val	Glu	Phe	
65	Asp	Gln	Lys	Leu	Glu	Ala	Pro 695	Glu	Val	Ile	Lys	Ser 700	Glu	Asn	Trp	Ile	
70	Leu	Thr	Gly	Asp	Ala	Lys 710	Leu	Glu	Gln	Asp	Gly 715	Gln	Ala	Leu	Arg	Ser 720	
75	Val	Ser	Gly	Asn	Gly 725	Ser	Phe	Lys	Gln	Phe 730	Leu	Gln	Leu	Lys	Ser	Asp 735	

Ser Ile Tyr Phe Met Asn Phe His Val Val Gly Lys Ala Arg Val Thr
 740 745 750
 5
 Ile Lys Asn Ser His Arg Val Leu Phe Glu Lys Asp Tyr Ser Thr Gln
 755 760 765
 10
 Tyr Arg Ile Val Asp Asp Glu Tyr Phe Thr Thr Val Ser Asp Ile Asp
 770 775 780
 15
 Gly Val Phe Ile Glu Leu Thr Ser His Ser Glu Glu Ser Ser Glu Phe
 785 790 795 800
 20
 Gly Phe Trp Gly Phe Ser Ile Lys
 805
 <210> 5
 <211> 2481
 25 <212> ДНК
 <213> Штучна
 <220>
 <223> Послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує пестицидний білок
 30 TIC7941_His,
 де послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує гістидинову мітку
 функціонально пов'язана на 5'-кінці і в рамці з кодуючою
 послідовністю
 TIC7941.
 35
 <400> 5
 atgcatcacc atcaccatca ccatcaccat cacggtaccg agaccgtccg cttccaatcc 60
 aagcagaata ataatttaag tgtaagagcc ttaccaagtt ttattgatgt ttttaaatgga 120
 40 atttatgggtt ttgccactgg tattcaagat atttttaaca tgatttttgg aacagataca 180
 ggtggtctaa cactagaaga agttttaaaa aatcaagatt tactttatga gattttctggt 240
 45 aaacttgatg ggattaatgg agacctaatg gagattattg cgcagggaaa tttgaatata 300
 gaattaacta aggaattgct aaaaatcgct aatgagcaga acaatttatt aactgatggt 360
 aataacaaac tcaatgcgat aaatgcgatg ctcaacacat atcttcctaa aattacaaat 420
 50 atgttaagcg atattatgaa acaaaattat gtcctgagtc ttcaaataga atatctcagt 480
 aaacaactac aggagatttc agataaactt gatgttatta atttaaatgt actcatcaac 540
 55 tctacactca cagaaatcac tcctgcatat caacgtatta aatatgtaaa tgaaaaattt 600
 gatgatttaa ctcttgctac agaaaaaact ctaagagcaa aacaaggtag ttctaacgaa 660
 gatatttttg ataatgatac tcttgaaaat ttaactgagc taactgaact agcgaagaat 720
 60 gtaacaaaaa atgatgtgga tagtttcgag ttttatctcc atacattcca tgatgtattg 780

	attggcaata atttatttgg tcgttcggct ttaaaaacag ctgcagaatt gattactaaa	840
5	gacgagataa agacgagtgg aagtgagata ggaaaagttt atagtttctt aattgtacta	900
	acttgtctac aagcaaaagc ctatctcact ttaacggcat gccgaaaatt attgggctta	960
	tcagatattg attatacgaa tattctaaat cagcatctaa atgatgaaaa gaatgaattt	1020
10	cgtgataaca tacttcctac actgtccaat aaattttcta accctaatta tgcaaaaact	1080
	acaggaagtg atgatgatgc agtagttggt ttagaggctg atctaggata tgccttaatt	1140
15	ggatttgaaa ttattagtga tccaatcccg gtattaaaag tatatcaagc taagctaaaa	1200
	caaaattatc aagttgacga gcagtcgtta acagagaagg tgtatcggaa tatcaataaa	1260
	atattttgtc cagaaaattc cgatcaacgt tattatatta aagatataac gtttcctatt	1320
20	ggatatgtta ttactaaaat tatctttgaa aagaagtacc aaaaccgtct gggatatctg	1380
	gtaaaagcaa atttctatga ttcgtctaca ggagatattg atttgaataa gtcaatagag	1440
25	gaatcatcag gaaatttact tgcttggcct ccggattcta ttataagtat tagtaaggat	1500
	gaagaggatg aaaaggatgt ttatatgcca ttaggtgtta tcagcgaaac atttttgacc	1560
	ccaatccata gttttggatt aaaagttgat gaagaatcaa gaataataac cttaacaggt	1620
30	aaatcttatt tacgagaata tttattagaa tctgatttaa aaaataaaga gacaagcctg	1680
	attgctccgc ctaatgtttt tatcagtaat atcgtagaaa attggaacat agaagcggat	1740
35	agtctagaac catgggttgc aaataacaag aatgcgtatg tcgatagtac aggcggtata	1800
	gagggatcta aagctctatt tactcaaggt gatggggaat tttcacaatt tattggagat	1860
	aaattaaaac ctaacacaga ttatatgatt caatatactg taaaaggaaa accggccatt	1920
40	tatttgaaac acaaagatgc tactggatat attatgtacg aagatacaaa cggttaattat	1980
	gaagattttc aaactagagc tgtaaaattt acttcaggag ccgagccttc acaagcacat	2040
45	ttgattttta aaagtcaaag tggatatgag gcttgggggg acaactttat tattctagaa	2100
	agtaagtcag ttgaatttga tcaaaagctt gaggctccag aagtgataaa atctgaaaat	2160
	tggattttta ctggagatgc taaattagaa caagatgggc aggcgctcag aagtgtgtca	2220
50	ggaaatggta gttttaagca atttcttcaa ttaaaaagtg actcaattta ttttatgaat	2280
	ttccatgttg ttggaaaagc gagggtgacg ataaaaaatt cacacagagt attatttgaa	2340
55	aaggattatt caaccagta tcgtatcgtg gatgatgaat attttactac cgtatctgat	2400
	atagatgggg tcttcataga acttacttca cattctgagg aaagttcaga atttggtttt	2460
	tggggcttct ctataaagta a	2481

60 <210> 6

<211> 826
 <212> Білок
 <213> Штучна

5 <220>
 <223> Амінокислотна послідовність пестицидного білка TIC7941_His.

<400> 6

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

15 Arg Phe Gln Ser Lys Gln Asn Asn Asn Leu Ser Val Arg Ala Leu Pro
 20 25 30

20 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

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

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

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

40 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

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

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

55 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

60

UA 130828 C2

	Lys	Thr	Leu	Arg	Ala	Lys	Gln	Gly	Ser	Ser	Asn	Glu	Asp	Ile	Phe	Asp	
	210						215					220					
5	Asn	Asp	Thr	Leu	Glu	Asn	Leu	Thr	Glu	Leu	Thr	Glu	Leu	Ala	Lys	Ser	
	225					230					235					240	
10	Val	Thr	Lys	Asn	Asp	Val	Asp	Ser	Phe	Glu	Phe	Tyr	Leu	His	Thr	Phe	
					245					250					255		
15	His	Asp	Val	Leu	Ile	Gly	Asn	Asn	Leu	Phe	Gly	Arg	Ser	Ala	Leu	Lys	
				260					265					270			
20	Thr	Ala	Ala	Glu	Leu	Ile	Thr	Lys	Asp	Glu	Ile	Lys	Thr	Ser	Gly	Ser	
			275					280					285				
25	Glu	Ile	Gly	Lys	Val	Tyr	Ser	Phe	Leu	Ile	Val	Leu	Thr	Cys	Leu	Gln	
	290						295					300					
30	Ala	Lys	Ala	Tyr	Leu	Thr	Leu	Thr	Ala	Cys	Arg	Lys	Leu	Leu	Gly	Leu	
	305					310					315					320	
35	Ser	Asp	Ile	Asp	Tyr	Thr	Asn	Ile	Leu	Asn	Gln	His	Leu	Asn	Asp	Glu	
					325					330					335		
40	Lys	Asn	Glu	Phe	Arg	Asp	Asn	Ile	Leu	Pro	Thr	Leu	Ser	Asn	Lys	Phe	
				340					345					350			
45	Ser	Asn	Pro	Asn	Tyr	Ala	Lys	Thr	Thr	Gly	Ser	Asp	Asp	Asp	Ala	Val	
			355					360					365				
50	Val	Val	Leu	Glu	Ala	Asp	Leu	Gly	Tyr	Ala	Leu	Ile	Gly	Phe	Glu	Ile	
	370						375					380					
55	Ile	Ser	Asp	Pro	Ile	Pro	Val	Leu	Lys	Val	Tyr	Gln	Ala	Lys	Leu	Lys	
	385					390					395					400	
60	Gln	Asn	Tyr	Gln	Val	Asp	Glu	Gln	Ser	Leu	Thr	Glu	Lys	Val	Tyr	Arg	
					405					410					415		
65	Asn	Ile	Asn	Lys	Ile	Phe	Cys	Pro	Glu	Asn	Ser	Asp	Gln	Arg	Tyr	Tyr	
				420					425					430			
70	Ile	Lys	Asp	Ile	Thr	Phe	Pro	Ile	Gly	Tyr	Val	Ile	Thr	Lys	Ile	Ile	
			435					440					445				
75	Phe	Glu	Lys	Lys	Tyr	Gln	Asn	Arg	Leu	Gly	Tyr	Leu	Val	Lys	Ala	Asn	

UA 130828 C2

	450					455					460					
5	Phe 465	Tyr	Asp	Ser	Ser	Thr 470	Gly	Asp	Ile	Asp	Leu 475	Asn	Lys	Ser	Ile	Glu 480
10	Glu	Ser	Ser	Gly	Asn 485	Leu	Leu	Ala	Trp	Pro 490	Pro	Asp	Ser	Ile	Ile 495	Ser
15	Ile	Ser	Lys	Asp 500	Glu	Glu	Asp	Glu	Lys 505	Asp	Val	Tyr	Met	Pro 510	Leu	Gly
20	Val	Ile	Ser 515	Glu	Thr	Phe	Leu	Thr 520	Pro	Ile	His	Ser	Phe 525	Gly	Leu	Lys
25	Val	Asp 530	Glu	Glu	Ser	Arg	Ile 535	Ile	Thr	Leu	Thr	Gly 540	Lys	Ser	Tyr	Leu
30	Arg 545	Glu	Tyr	Leu	Leu	Glu 550	Ser	Asp	Leu	Lys	Asn 555	Lys	Glu	Thr	Ser	Leu 560
35	Ile	Ala	Pro	Pro	Asn 565	Val	Phe	Ile	Ser	Asn 570	Ile	Val	Glu	Asn	Trp 575	Asn
40	Ile	Glu	Ala	Asp 580	Ser	Leu	Glu	Pro	Trp 585	Val	Ala	Asn	Asn	Lys 590	Asn	Ala
45	Tyr	Val	Asp 595	Ser	Thr	Gly	Gly	Ile 600	Glu	Gly	Ser	Lys	Ala 605	Leu	Phe	Thr
50	Gln	Gly 610	Asp	Gly	Glu	Phe	Ser 615	Gln	Phe	Ile	Gly	Asp 620	Lys	Leu	Lys	Pro
55	Asn 625	Thr	Asp	Tyr	Met	Ile 630	Gln	Tyr	Thr	Val	Lys 635	Gly	Lys	Pro	Ala	Ile 640
60	Tyr	Leu	Lys	His	Lys 645	Asp	Ala	Thr	Gly	Tyr 650	Ile	Met	Tyr	Glu	Asp 655	Thr
65	Asn	Gly	Asn	Tyr 660	Glu	Asp	Phe	Gln	Thr	Arg	Ala	Val	Lys	Phe 670	Thr	Ser
70	Gly	Ala	Glu 675	Pro	Ser	Gln	Ala	His 680	Leu	Ile	Phe	Lys	Ser 685	Gln	Ser	Gly
75	Tyr	Glu 690	Ala	Trp	Gly	Asp	Asn 695	Phe	Ile	Ile	Leu	Glu 700	Ser	Lys	Ser	Val

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

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

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

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

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

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

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

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

35 <210> 7
 <211> 2481
 <212> ДНК
 <213> Штучна

40 <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.

45 <400> 7
 atgggcagca gccatcatca tcatcatcac cacaagcaga ataataattt aagtgtgaaga 60

50 gccttaccaa gttttattga tgtttttaaat ggaatttatg gttttgccac tggatttcaa 120

 gatattttta acatgatttt tggaacagat acaggtgggc taacactaga agaagtttta 180

 aaaaatcaag atttacttta tgagatttct ggtaaacttg atgggattaa tggagacctt 240

55 agtgagatta ttgcgcaggg aaatttgaat acagaattaa ctaaggaatt gctaaaaatc 300

 gctaattgagc agaacaattt attactgat gttaataaca aactcaatgc gataaatgcg 360

 atgctcaaca catatcttcc taaaattaca aatatgttaa gcgatattat gaaacaaaat 420

60 tatgtcctga gtcttcaaat agaatatctc agtaacaac tacaggagat ttcagataaa 480

	cttgatgtta ttaatttaaa tgtactcatc aactctacac tcacagaaat cactcctgca	540
5	tatcaacgta ttaaatatgt aaatgaaaaa tttgatgatt taactcttgc tacagaaaaa	600
	actctaagag caaaacaagg tagttctaac gaagatattt ttgataatga tactcttgaa	660
	aatttaactg agctaactga actagcgaaa agtgtaacaa aaaatgatgt ggatagtttc	720
10	gagttttatc tccatacatt ccatgatgta ttgattggca ataatttatt tggtcgttcg	780
	gctttaaaaa cagctgcaga attgattact aaagacgaga taaagacgag tggaagtgag	840
15	ataggaaaag tttatagttt cttaattgta ctaacttgtc tacaagcaaa agcctatctc	900
	actttaacgg catgccgaaa attattgggc ttatcagata ttgattatac gaatattcta	960
	aatcagcatc taaatgatga aaagaatgaa tttcgtgata acatacttcc tacactgtcc	1020
20	aataaatttt ctaaccctaa ttatgcaaaa actacaggaa gtgatgatga tgcagtagtt	1080
	gttttagagg ctgatctagg atatgcctta attggatttg aaattattag tgatccaatc	1140
25	ccggtattaa aagtatatca agctaagcta aaacaaaatt atcaagttga cgagcagtcg	1200
	ttaacagaga aggtgtatcg gaatatcaat aaaatatattt gtccagaaaa ttccgatcaa	1260
	cgttattata ttaaagatat aacgtttcct attggatatg ttattactaa aattatcttt	1320
30	gaaaagaagt accaaaaccg tctgggatat ctggtaaaaag caaatttcta tgattcgtct	1380
	acaggagata ttgatttgaa taagtcaata gaggaatcat caggaaattt acttgcttgg	1440
35	cctccggatt ctattataag tattagtaag gatgaagagg atgaaaagga tgtttatatg	1500
	ccattaggtg ttatcagcga aacatttttg accccaatcc atagtttttg attaaaagtt	1560
	gatgaagaat caagaataat aaccttaaca ggtaaatctt atctacgaga atatttatta	1620
40	gaatctgatt taaaaaataa agagacaagc ctgattgctc cgccaatgt ttttatcagt	1680
	aatatcgtag aaaattggaa catagaagcg gatagtctag aaccatgggt tgcaaataac	1740
45	aagaatgcgt atgtcgatag tacaggcggg atagagggat ctaaagctct atttactcaa	1800
	ggtgatgggg aattttcaca atttattgga gataaattaa aacctaacac agattatatg	1860
	attcaatata ctgtaaaagg aaaaccggcc atttatttga aacacaaaga tgctactgga	1920
50	tatattatgt acgaagatac aaacggtaat tatgaagatt ttcaaactag agctgtaaaa	1980
	tttacttcag gagccgagcc ttcacaagca catttgattt ttaaaagtca aagtggatat	2040
55	gaggcttggg gggacaactt tattattcta gaaagtaagt cagttgaatt tgatcaaaag	2100
	cttgaggctc cagaagtgat aaaatctgaa aattggattt taactggaga tgctaaatta	2160
	gaacaagatg ggcaggcgct cagaagtgtg tcaggaaatg gtagttttta gcaatttctt	2220
60	caattaaataa gtgactcaat ttattttatg aatttccatg ttgttggaag agcgagggtg	2280

```

acgataaaaa attcacacag agtattatattt gaaaaggatt attcaaccca gtatcgtatc      2340
gtggatgatg aatatttttac taccgtatct gatatagatg gggctttcat agaacttact      2400
5  tcacattctg agtcttcttt agcagatatt atgtctttat ggggagaaga atttggtttt      2460
   tggggcttct ctataaagta g                                             2481

10  <210>  8
    <211>  826
    <212>  Білок
    <213>  Штучна

15  <220>
    <223>  Амінокислотна послідовність пестицидного білка TIC7941PL_2His.

    <400>  8

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

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

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

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

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

45  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

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

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

60  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		
5																
	Asp	Leu	Thr	Leu	Ala	Thr	Glu	Lys	Thr	Leu	Arg	Ala	Lys	Gln	Gly	Ser
			195					200					205			
10																
	Ser	Asn	Glu	Asp	Ile	Phe	Asp	Asn	Asp	Thr	Leu	Glu	Asn	Leu	Thr	Glu
		210					215					220				
15																
	Leu	Thr	Glu	Leu	Ala	Lys	Ser	Val	Thr	Lys	Asn	Asp	Val	Asp	Ser	Phe
	225					230					235					240
20																
	Glu	Phe	Tyr	Leu	His	Thr	Phe	His	Asp	Val	Leu	Ile	Gly	Asn	Asn	Leu
					245					250					255	
25																
	Phe	Gly	Arg	Ser	Ala	Leu	Lys	Thr	Ala	Ala	Glu	Leu	Ile	Thr	Lys	Asp
				260					265					270		
30																
	Glu	Ile	Lys	Thr	Ser	Gly	Ser	Glu	Ile	Gly	Lys	Val	Tyr	Ser	Phe	Leu
			275					280					285			
35																
	Ile	Val	Leu	Thr	Cys	Leu	Gln	Ala	Lys	Ala	Tyr	Leu	Thr	Leu	Thr	Ala
		290					295					300				
40																
	Cys	Arg	Lys	Leu	Leu	Gly	Leu	Ser	Asp	Ile	Asp	Tyr	Thr	Asn	Ile	Leu
	305					310					315					320
45																
	Asn	Gln	His	Leu	Asn	Asp	Glu	Lys	Asn	Glu	Phe	Arg	Asp	Asn	Ile	Leu
					325					330					335	
50																
	Pro	Thr	Leu	Ser	Asn	Lys	Phe	Ser	Asn	Pro	Asn	Tyr	Ala	Lys	Thr	Thr
				340					345					350		
55																
	Gly	Ser	Asp	Asp	Asp	Ala	Val	Val	Val	Leu	Glu	Ala	Asp	Leu	Gly	Tyr
			355					360					365			
60																
	Ala	Leu	Ile	Gly	Phe	Glu	Ile	Ile	Ser	Asp	Pro	Ile	Pro	Val	Leu	Lys
		370					375					380				
65																
	Val	Tyr	Gln	Ala	Lys	Leu	Lys	Gln	Asn	Tyr	Gln	Val	Asp	Glu	Gln	Ser
	385					390					395					400
70																
	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			
5	Tyr	Val	Ile	Thr	Lys	Ile	Ile	Phe	Glu	Lys	Lys	Tyr	Gln	Asn	Arg	Leu	
			435					440					445				
10	Gly	Tyr	Leu	Val	Lys	Ala	Asn	Phe	Tyr	Asp	Ser	Ser	Thr	Gly	Asp	Ile	
		450					455					460					
15	Asp	Leu	Asn	Lys	Ser	Ile	Glu	Glu	Ser	Ser	Gly	Asn	Leu	Leu	Ala	Trp	
	465					470					475					480	
20	Pro	Pro	Asp	Ser	Ile	Ile	Ser	Ile	Ser	Lys	Asp	Glu	Glu	Asp	Glu	Lys	
					485					490					495		
25	Asp	Val	Tyr	Met	Pro	Leu	Gly	Val	Ile	Ser	Glu	Thr	Phe	Leu	Thr	Pro	
				500					505					510			
30	Ile	His	Ser	Phe	Gly	Leu	Lys	Val	Asp	Glu	Glu	Ser	Arg	Ile	Ile	Thr	
			515					520					525				
35	Leu	Thr	Gly	Lys	Ser	Tyr	Leu	Arg	Glu	Tyr	Leu	Leu	Glu	Ser	Asp	Leu	
		530					535					540					
40	Lys	Asn	Lys	Glu	Thr	Ser	Leu	Ile	Ala	Pro	Pro	Asn	Val	Phe	Ile	Ser	
	545					550					555					560	
45	Asn	Ile	Val	Glu	Asn	Trp	Asn	Ile	Glu	Ala	Asp	Ser	Leu	Glu	Pro	Trp	
					565				570						575		
50	Val	Ala	Asn	Asn	Lys	Asn	Ala	Tyr	Val	Asp	Ser	Thr	Gly	Gly	Ile	Glu	
				580					585					590			
55	Gly	Ser	Lys	Ala	Leu	Phe	Thr	Gln	Gly	Asp	Gly	Glu	Phe	Ser	Gln	Phe	
			595					600					605				
60	Ile	Gly	Asp	Lys	Leu	Lys	Pro	Asn	Thr	Asp	Tyr	Met	Ile	Gln	Tyr	Thr	
		610					615					620					
65	Val	Lys	Gly	Lys	Pro	Ala	Ile	Tyr	Leu	Lys	His	Lys	Asp	Ala	Thr	Gly	
	625					630					635					640	
70	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			
5	Ile	Phe	Lys	Ser	Gln	Ser	Gly	Tyr	Glu	Ala	Trp	Gly	Asp	Asn	Phe	Ile	
			675					680					685				
10	Ile	Leu	Glu	Ser	Lys	Ser	Val	Glu	Phe	Asp	Gln	Lys	Leu	Glu	Ala	Pro	
		690					695					700					
15	Glu	Val	Ile	Lys	Ser	Glu	Asn	Trp	Ile	Leu	Thr	Gly	Asp	Ala	Lys	Leu	
	705					710					715					720	
20	Glu	Gln	Asp	Gly	Gln	Ala	Leu	Arg	Ser	Val	Ser	Gly	Asn	Gly	Ser	Phe	
					725					730					735		
25	Lys	Gln	Phe	Leu	Gln	Leu	Lys	Ser	Asp	Ser	Ile	Tyr	Phe	Met	Asn	Phe	
				740					745					750			
30	His	Val	Val	Gly	Lys	Ala	Arg	Val	Thr	Ile	Lys	Asn	Ser	His	Arg	Val	
			755					760					765				
35	Leu	Phe	Glu	Lys	Asp	Tyr	Ser	Thr	Gln	Tyr	Arg	Ile	Val	Asp	Asp	Glu	
	770						775					780					
40	Tyr	Phe	Thr	Thr	Val	Ser	Asp	Ile	Asp	Gly	Val	Phe	Ile	Glu	Leu	Thr	
	785					790					795					800	
45	Ser	His	Ser	Glu	Ser	Ser	Leu	Ala	Asp	Ile	Met	Ser	Leu	Trp	Gly	Glu	
					805					810					815		
50	Glu	Phe	Gly	Phe	Trp	Gly	Phe	Ser	Ile	Lys							
				820					825								
55	<210>	9															
	<211>	2481															
	<212>	ДНК															
	<213>	Штучна															
60	<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.															
65	<400>	9															
	atgggcagca	gccatcatca	tcatcatcac	cacaagcaga	ataataattt	aagtgtgaaga										60	
	gccttaccaa	gttttattga	tgtttttaaat	ggaatttatg	gttttgccac	tggtattcaa										120	
	gatattttta	acatgatttt	tggaacagat	acaggtggtc	taacactaga	agaagtttta										180	

	aaaaatcaag atttacttta tgagatttct ggtaaacttg atgggattaa tggagaccta	240
5	agtgagatta ttgcgagagg aaatttgaat acagaattaa ctaaggaatt gctaaaaatc	300
	gctaattgagc agaacaattt attaactgat gttaataaca aactcaatgc gataaatgag	360
	atgctcaaca catatcttcc taaaattaca aatatgttaa gcgatattat gaaacaaaat	420
10	tatgtcctga gtcttcaaatt agaatatctc agtaaacaac tacaggagat ttcagataaa	480
	cttgatgtta ttaattttaa tgtactcatc aactctacac tcacagaaat cactcctgca	540
15	tatcaacgta ttaaatatgt aaatgaaaaa tttgatgatt taactcttgc tacagaaaaa	600
	actctaagag caaaacaagg tagttctaac gaagatattt ttgataatga tactcttgaa	660
	aatttaactg agctaactga actagcgaaa agtgtaacaa aaaatgatgt ggatagtttc	720
20	gagttttatc tccatacatt ccatgatgta ttgattggca ataatttatt tggctcgttcg	780
	gctttaaaaa cagctgcaga attgattact aaagacgaga taaagacgag tggaagtgag	840
25	ataggaaaag tttatagttt cttaattgta ctaacttgtc tacaagcaaa agcctatctc	900
	actttaacgg catgccgaaa attattgggc ttatcagata ttgattatac gaatattcta	960
	aatcagcatc taaatgatga aaagaatgaa tttcgtgata acatacttcc tacactgtcc	1020
30	aataaatttt ctaaccctaa ttatgcaaaa actacaggaa gtgatgatga tgcagtagtt	1080
	gttttagagg ctgatctagg atatgcctta attggatttg aaattattag tgatccaatc	1140
35	ccggtattaa aagtatatca agctaagcta aaacaaaatt atcaagttga cgagcagtcg	1200
	ttaacagaga aggtgtatcg gaatatcaat aaaatatttt gtccagaaaa ttccgatcaa	1260
	cgttattata ttaaagatat aacgtttcct attggatatg ttattactaa aattatcttt	1320
40	gaaaagaagt accaaaaccg tctgggatat ctggtaaaag caaatttcta tgattcgtct	1380
	acaggagata ttgatttgaa taagtcaata gaggaatcat caggaaattt acttgcttgg	1440
45	cctccggatt ctattataag tattagtaag gatgaagagg atgaaaagga tgtttatatg	1500
	ccattaggtg ttatcagcga aacatttttg accccaatcc atagttttgg attaaaagtt	1560
	gatgaagaat caagaataat aaccttaaca ggtaaactct atctacgaga atatttatta	1620
50	gaatctgatt taaaaaataa agagacaagc ctgattgctc cgctaattgt ttttatcagt	1680
	aatatcgtag aaaattggaa catagaagcg gatagtctag aaccatgggt tgcaaataac	1740
55	aagaatgcgt atgtcgatag tacaggcgggt atagagggat ctaaagctct atttactcaa	1800
	ggtgatgggg aattttcaca atttattgga gataaattaa aacctaacac agattatatg	1860
	attcaatata ctgtaaaagg aaaaccggcc atttatttga aacacaaaga tgctactgga	1920
60	tatattatgt acgaagatac aaacggtaat tatgaagatt ttcaaactag agctgtaaaa	1980

```

tttacttcag gagccgagcc ttcacaagca catttgattt ttaaaagtca aagtggatat      2040
gaggcttggg gggacaactt tattattcta gaaagtaagt cagttgaatt tgatcaaaag      2100
5  cttgaggctc cagaagtgat aaaatctgaa aattggattt taactggaga tgctaaatta      2160
gaacaagatg ggcaggcgct cagaagtgtg tcaggaaatg gtagttttta gcaatttctt      2220
caattaaataa gtgactcaat ttattttatg aatttccatg ttgttggaag agcgaggggtg      2280
10 acgataaaaa attcacacag agtattatct gaaaaggatt attcaaccac gtatcgatatc      2340
gtggatgatg aatattttac taccgtatct gatatagatg gggctttcat agaacttact      2400
15 tcacattctt cttcttttagc agatattatg tctttatggg gagaatcaga atttggtttt      2460
tggggcttct ctataaagta g      2481

```

```

20 <210> 10
    <211> 826
    <212> Білок
    <213> Штучна

25 <220>
    <223> Амінокислотна послідовність пестицидного білка TIC7941PL_3His.

    <400> 10

```

```

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

```

```

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

```

```

40 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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

UA 130828 C2

	Ile	Thr	Asn	Met	Leu	Ser	Asp	Ile	Met	Lys	Gln	Asn	Tyr	Val	Leu	Ser	
	130						135					140					
5	Leu	Gln	Ile	Glu	Tyr	Leu	Ser	Lys	Gln	Leu	Gln	Glu	Ile	Ser	Asp	Lys	
	145					150					155					160	
10	Leu	Asp	Val	Ile	Asn	Leu	Asn	Val	Leu	Ile	Asn	Ser	Thr	Leu	Thr	Glu	
					165					170					175		
15	Ile	Thr	Pro	Ala	Tyr	Gln	Arg	Ile	Lys	Tyr	Val	Asn	Glu	Lys	Phe	Asp	
				180					185					190			
20	Asp	Leu	Thr	Leu	Ala	Thr	Glu	Lys	Thr	Leu	Arg	Ala	Lys	Gln	Gly	Ser	
			195					200					205				
25	Ser	Asn	Glu	Asp	Ile	Phe	Asp	Asn	Asp	Thr	Leu	Glu	Asn	Leu	Thr	Glu	
	210						215					220					
30	Glu	Phe	Tyr	Leu	His	Thr	Phe	His	Asp	Val	Leu	Ile	Gly	Asn	Asn	Leu	
					245					250					255		
35	Phe	Gly	Arg	Ser	Ala	Leu	Lys	Thr	Ala	Ala	Glu	Leu	Ile	Thr	Lys	Asp	
				260					265					270			
40	Glu	Ile	Lys	Thr	Ser	Gly	Ser	Glu	Ile	Gly	Lys	Val	Tyr	Ser	Phe	Leu	
			275					280					285				
45	Ile	Val	Leu	Thr	Cys	Leu	Gln	Ala	Lys	Ala	Tyr	Leu	Thr	Leu	Thr	Ala	
	290						295					300					
50	Cys	Arg	Lys	Leu	Leu	Gly	Leu	Ser	Asp	Ile	Asp	Tyr	Thr	Asn	Ile	Leu	
	305					310					315					320	
55	Asn	Gln	His	Leu	Asn	Asp	Glu	Lys	Asn	Glu	Phe	Arg	Asp	Asn	Ile	Leu	
					325					330					335		
60	Pro	Thr	Leu	Ser	Asn	Lys	Phe	Ser	Asn	Pro	Asn	Tyr	Ala	Lys	Thr	Thr	
				340					345					350			
65	Gly	Ser	Asp	Asp	Asp	Ala	Val	Val	Val	Leu	Glu	Ala	Asp	Leu	Gly	Tyr	
			355					360					365				
70	Ala	Leu	Ile	Gly	Phe	Glu	Ile	Ile	Ser	Asp	Pro	Ile	Pro	Val	Leu	Lys	

UA 130828 C2

	370					375					380					
5	Val 385	Tyr	Gln	Ala	Lys	Leu 390	Lys	Gln	Asn	Tyr	Gln 395	Val	Asp	Glu	Gln	Ser 400
10	Leu	Thr	Glu	Lys	Val 405	Tyr	Arg	Asn	Ile	Asn 410	Lys	Ile	Phe	Cys	Pro 415	Glu
15	Asn	Ser	Asp	Gln 420	Arg	Tyr	Tyr	Ile	Lys 425	Asp	Ile	Thr	Phe	Pro 430	Ile	Gly
20	Tyr	Val	Ile 435	Thr	Lys	Ile	Ile	Phe 440	Glu	Lys	Lys	Tyr	Gln 445	Asn	Arg	Leu
25	Gly 450	Tyr	Leu	Val	Lys	Ala	Asn 455	Phe	Tyr	Asp	Ser	Ser 460	Thr	Gly	Asp	Ile
30	Asp 465	Leu	Asn	Lys	Ser	Ile 470	Glu	Glu	Ser	Ser	Gly 475	Asn	Leu	Leu	Ala	Trp 480
35	Pro	Pro	Asp	Ser	Ile 485	Ile	Ser	Ile	Ser	Lys 490	Asp	Glu	Glu	Asp	Glu 495	Lys
40	Asp	Val	Tyr	Met 500	Pro	Leu	Gly	Val	Ile 505	Ser	Glu	Thr	Phe	Leu 510	Thr	Pro
45	Ile	His	Ser 515	Phe	Gly	Leu	Lys	Val 520	Asp	Glu	Glu	Ser	Arg 525	Ile	Ile	Thr
50	Leu	Thr 530	Gly	Lys	Ser	Tyr	Leu 535	Arg	Glu	Tyr	Leu	Leu 540	Glu	Ser	Asp	Leu
55	Lys 545	Asn	Lys	Glu	Thr	Ser	Leu 550	Ile	Ala	Pro	Pro 555	Asn	Val	Phe	Ile	Ser 560
60	Asn	Ile	Val	Glu	Asn 565	Trp	Asn	Ile	Glu	Ala 570	Asp	Ser	Leu	Glu	Pro 575	Trp
65	Val	Ala	Asn	Asn 580	Lys	Asn	Ala	Tyr	Val 585	Asp	Ser	Thr	Gly	Gly 590	Ile	Glu
70	Gly	Ser	Lys 595	Ala	Leu	Phe	Thr	Gln 600	Gly	Asp	Gly	Glu	Phe 605	Ser	Gln	Phe
75	Ile	Gly 610	Asp	Lys	Leu	Lys	Pro 615	Asn	Thr	Asp	Tyr	Met 620	Ile	Gln	Tyr	Thr

5 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
 10 Arg Ala Val Lys Phe Thr Ser Gly Ala Glu Pro Ser Gln Ala His Leu
 660 665 670
 15 Ile Phe Lys Ser Gln Ser Gly Tyr Glu Ala Trp Gly Asp Asn Phe Ile
 675 680 685
 20 Ile Leu Glu Ser Lys Ser Val Glu Phe Asp Gln Lys Leu Glu Ala Pro
 690 695 700
 25 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
 30 Lys Gln Phe Leu Gln Leu Lys Ser Asp Ser Ile Tyr Phe Met Asn Phe
 740 745 750
 35 His Val Val Gly Lys Ala Arg Val Thr Ile Lys Asn Ser His Arg Val
 755 760 765
 40 Leu Phe Glu Lys Asp Tyr Ser Thr Gln Tyr Arg Ile Val Asp Asp Glu
 770 775 780
 45 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
 50 Glu Phe Gly Phe Trp Gly Phe Ser Ile Lys
 820 825
 55 <210> 11
 <211> 2454
 <212> ДНК
 <213> Штучна
 60 <220>

<223> Синтетична кодуюча послідовність, що кодує пестицидний білок TIC7941PL_2,

5 призначений для експресії в рослинній клітині, де
 додатковий кодон аланіну вставляється відразу після
 кодону ініціюючого метіоніну.

<400> 11

	atggctaagc agaacaacaa cctctccgtg cgcgcgctgc cgagcttcat cgacgtcttc	60
10	aacggcatct acgggttcgc cacgggcatc caggacatct tcaacatgat ctttgggact	120
	gatacgggcg gcctgaccct ggaggaggtg ttaaagaacc aggatctcct ctacgagatt	180
	tcgggcaagc tggacgggat caacggcgac ctgagcgaga tcatcgccca gggcaacctc	240
15	aacaccgagc tcacgaaaga actactgaag attgccaacg agcagaacaa cctgctcagc	300
	gacgtgaaca acaagctgaa cgccatcaac gcgatgctga acacctacct gcccaagatc	360
20	accaacatgc tgagcgacat catgaagcag aactacgtcc tgtcccttca gatcgagtac	420
	ctgtccaagc agctccagga gatctcggac aagttggacg tgatcaacct caacgtgctc	480
	atcaactcga ccctcaccga gatcactcca gcgtaccagc gcatcaagta cgtcaacgag	540
25	aagttcgacg acctgacgct ggccactgag aagaccctgc gcgcgaagca aggctcgtcc	600
	aacgaggaca tcttcgacaa cgacaccctg gagaacctca cggagctgac cgagctggcc	660
30	aagagcgtga cgaagaacga cgtggactcg ttcgagttct acctccacac tttccacgac	720
	gtcctgatcg ggaacaacct ctttggctgt tcggccctca agacggcggc ggagctcatc	780
	acaaaggacg agatcaagac ctctgggtct gagatcggca aggtgtactc gtttctcatt	840
35	gtcctgacgt gcctgcaagc gaaggcttac ctaacgctca cggcgtgccg caagctgctg	900
	ggcctgtctg acatcgacta caccaacatc ctgaaccagc accttaacga cgagaagaac	960
40	gagttccggg acaacattct tcctaccctg tcgaacaagt tcagcaaccc gaactacgcg	1020
	aagaccacgg gcagcgacga cgatgcggtg gtggtcctgg aggctgacct gggctacgcg	1080
	ctgatcggct tcgagatcat cagcgacct atcccagtgc tcaaggtgta ccaggcgaag	1140
45	ctgaaacaga actaccaggt tgacgagcag tccctgacgg agaaggtgta ccggaacatc	1200
	aataagatct tctgcccgga gaactccgac cagcgggtact acatcaagga catcaccttc	1260
50	cctatcgggt acgtcatcac caagataatc ttcgagaaga agtaccagaa ccgactcggc	1320
	tacctggtga aggcgaactt ctatgacagc tcgacgggcg acatcgacct caacaagtcc	1380
	atcgaggaga gtagcgggaa tctgctggcg tggccgcccg acagcatcat ctccatctcc	1440
55	aaggacgagg aagacgagaa ggatgtgtac atgccactag gcgtcatctc cgaaactttc	1500
	ctgacaccca tacacagctt cgggctcaag gtggacgagg agagccggat catcacgctg	1560
60	accggcaaga gctacctccg agagtacctg ctggagtcgg acctcaagaa caaggagacg	1620

	tcgctgatcg ctctcccaa cgtcttcacg tccaacatcg tcgagaactg gaacatcgag	1680
	gcggacagcc tggagccgtg ggtggcgaac aacaagaacg cttacgtgga ctcaaccggc	1740
5	ggcattgagg gctccaaggc cctattcacg caaggcgacg gcgagttcag ccagttcatc	1800
	ggcgacaagc taaagcccaa cacggactac atgatccagt aactgtgaa gggcaagccc	1860
10	gcgatctacc tcaagcacia ggacgcaacc ggctacatca tgtacgagga caccaacggc	1920
	aactacgagg acttcagac gcgggcccgc aagttcacct cgggcccgtga gccgtcccag	1980
	gcccaattga tcttcaagtc ccagtcgggc tacgaggctt ggggcgacia ctttatcatc	2040
15	ctggagagca agtcggtgga gttcgaccag aaactcgagg ctccggagggt catcaagtcg	2100
	gagaactgga tactgactgg cgacgcgaag ctggaacagg acggccaggc cctgaggtcc	2160
20	gtgagcggga acggcagctt caagcagttc ctccagctca agtccgacag catctacttt	2220
	atgaacttcc acgtcgtggg caaggcgcgc gtgactatca agaacagcca ccgcgtcctc	2280
	ttcgagaagg actacagcac gcagtatcgc atagtcgatg atgaatactt caccaccgtc	2340
25	tccgacatcg acggcgtggt catcgagctg acgtcgact ccgagagctc gctggcggac	2400
	attatgtcgc tgtggggcga agagttcggc ttctggggct tcagcatcaa gtag	2454
30	<210> 12 <211> 817 <212> Білок <213> Штучна	
35	<220> <223> Амінокислотна послідовність TIC7941PL_2 і де додаткова амінокислота аланін вставлена безпосередньо після ініціюючого метіоніну.	
40	<400> 12 Met Ala Lys Gln Asn Asn Asn Leu Ser Val Arg Ala Leu Pro Ser Phe 1 5 10 15	
45	Ile Asp Val Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Gln Asp 20 25 30	
50	Ile Phe Asn Met Ile Phe Gly Thr Asp Thr Gly Gly Leu Thr Leu Glu 35 40 45	
55	Glu Val Leu Lys Asn Gln Asp Leu Leu Tyr Glu Ile Ser Gly Lys Leu 50 55 60	
60	Asp Gly Ile Asn Gly Asp Leu Ser Glu Ile Ile Ala Gln Gly Asn Leu 65 70 75 80	

UA 130828 C2

	Asn	Thr	Glu	Leu	Thr	Lys	Glu	Leu	Leu	Lys	Ile	Ala	Asn	Glu	Gln	Asn	
					85					90					95		
5	Asn	Leu	Leu	Thr	Asp	Val	Asn	Asn	Lys	Leu	Asn	Ala	Ile	Asn	Ala	Met	
				100					105					110			
10	Leu	Asn	Thr	Tyr	Leu	Pro	Lys	Ile	Thr	Asn	Met	Leu	Ser	Asp	Ile	Met	
			115					120					125				
15	Lys	Gln	Asn	Tyr	Val	Leu	Ser	Leu	Gln	Ile	Glu	Tyr	Leu	Ser	Lys	Gln	
		130					135					140					
20	Leu	Gln	Glu	Ile	Ser	Asp	Lys	Leu	Asp	Val	Ile	Asn	Leu	Asn	Val	Leu	
	145					150					155					160	
25	Ile	Asn	Ser	Thr	Leu	Thr	Glu	Ile	Thr	Pro	Ala	Tyr	Gln	Arg	Ile	Lys	
					165					170					175		
30	Tyr	Val	Asn	Glu	Lys	Phe	Asp	Asp	Leu	Thr	Leu	Ala	Thr	Glu	Lys	Thr	
				180					185					190			
35	Leu	Arg	Ala	Lys	Gln	Gly	Ser	Ser	Asn	Glu	Asp	Ile	Phe	Asp	Asn	Asp	
			195					200					205				
40	Thr	Leu	Glu	Asn	Leu	Thr	Glu	Leu	Thr	Glu	Leu	Ala	Lys	Ser	Val	Thr	
		210					215					220					
45	Lys	Asn	Asp	Val	Asp	Ser	Phe	Glu	Phe	Tyr	Leu	His	Thr	Phe	His	Asp	
	225					230					235					240	
50	Val	Leu	Ile	Gly	Asn	Asn	Leu	Phe	Gly	Arg	Ser	Ala	Leu	Lys	Thr	Ala	
					245					250					255		
55	Ala	Glu	Leu	Ile	Thr	Lys	Asp	Glu	Ile	Lys	Thr	Ser	Gly	Ser	Glu	Ile	
				260					265					270			
60	Gly	Lys	Val	Tyr	Ser	Phe	Leu	Ile	Val	Leu	Thr	Cys	Leu	Gln	Ala	Lys	
			275					280					285				
65	Ala	Tyr	Leu	Thr	Leu	Thr	Ala	Cys	Arg	Lys	Leu	Leu	Gly	Leu	Ser	Asp	
		290					295					300					
70	Ile	Asp	Tyr	Thr	Asn	Ile	Leu	Asn	Gln	His	Leu	Asn	Asp	Glu	Lys	Asn	
	305					310					315					320	
75	Glu	Phe	Arg	Asp	Asn	Ile	Leu	Pro	Thr	Leu	Ser	Asn	Lys	Phe	Ser	Asn	

UA 130828 C2

					325					330						335	
5	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	
10			355					360					365				
	Asp	Pro	Ile	Pro	Val	Leu	Lys	Val	Tyr	Gln	Ala	Lys	Leu	Lys	Gln	Asn	
		370					375					380					
15	Tyr	Gln	Val	Asp	Glu	Gln	Ser	Leu	Thr	Glu	Lys	Val	Tyr	Arg	Asn	Ile	
	385					390					395					400	
20	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	
25				420					425					430			
	Lys	Lys	Tyr	Gln	Asn	Arg	Leu	Gly	Tyr	Leu	Val	Lys	Ala	Asn	Phe	Tyr	
30			435					440					445				
	Asp	Ser	Ser	Thr	Gly	Asp	Ile	Asp	Leu	Asn	Lys	Ser	Ile	Glu	Glu	Ser	
		450					455					460					
35	Ser	Gly	Asn	Leu	Leu	Ala	Trp	Pro	Pro	Asp	Ser	Ile	Ile	Ser	Ile	Ser	
	465					470					475					480	
40	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	
45				500					505					510			
	Glu	Glu	Ser	Arg	Ile	Ile	Thr	Leu	Thr	Gly	Lys	Ser	Tyr	Leu	Arg	Glu	
50			515					520					525				
	Tyr	Leu	Leu	Glu	Ser	Asp	Leu	Lys	Asn	Lys	Glu	Thr	Ser	Leu	Ile	Ala	
		530					535					540					
55	Pro	Pro	Asn	Val	Phe	Ile	Ser	Asn	Ile	Val	Glu	Asn	Trp	Asn	Ile	Glu	
	545					550					555					560	
60	Ala	Asp	Ser	Leu	Glu	Pro	Trp	Val	Ala	Asn	Asn	Lys	Asn	Ala	Tyr	Val	
				565						570					575		

5	Asp	Ser	Thr	Gly	Gly	Ile	Glu	Gly	Ser	Lys	Ala	Leu	Phe	Thr	Gln	Gly	580	585	590
10	Asp	Gly	Glu	Phe	Ser	Gln	Phe	Ile	Gly	Asp	Lys	Leu	Lys	Pro	Asn	Thr	595	600	605
15	Asp	Tyr	Met	Ile	Gln	Tyr	Thr	Val	Lys	Gly	Lys	Pro	Ala	Ile	Tyr	Leu	610	615	620
20	Lys	His	Lys	Asp	Ala	Thr	Gly	Tyr	Ile	Met	Tyr	Glu	Asp	Thr	Asn	Gly	625	630	635
25	Asn	Tyr	Glu	Asp	Phe	Gln	Thr	Arg	Ala	Val	Lys	Phe	Thr	Ser	Gly	Ala	645	650	655
30	Glu	Pro	Ser	Gln	Ala	His	Leu	Ile	Phe	Lys	Ser	Gln	Ser	Gly	Tyr	Glu	660	665	670
35	Ala	Trp	Gly	Asp	Asn	Phe	Ile	Ile	Leu	Glu	Ser	Lys	Ser	Val	Glu	Phe	675	680	685
40	Asp	Gln	Lys	Leu	Glu	Ala	Pro	Glu	Val	Ile	Lys	Ser	Glu	Asn	Trp	Ile	690	695	700
45	Leu	Thr	Gly	Asp	Ala	Lys	Leu	Glu	Gln	Asp	Gly	Gln	Ala	Leu	Arg	Ser	705	710	715
50	Val	Ser	Gly	Asn	Gly	Ser	Phe	Lys	Gln	Phe	Leu	Gln	Leu	Lys	Ser	Asp	725	730	735
55	Ser	Ile	Tyr	Phe	Met	Asn	Phe	His	Val	Val	Gly	Lys	Ala	Arg	Val	Thr	740	745	750
60	Ile	Lys	Asn	Ser	His	Arg	Val	Leu	Phe	Glu	Lys	Asp	Tyr	Ser	Thr	Gln	755	760	765
65	Tyr	Arg	Ile	Val	Asp	Asp	Glu	Tyr	Phe	Thr	Thr	Val	Ser	Asp	Ile	Asp	770	775	780
70	Gly	Val	Phe	Ile	Glu	Leu	Thr	Ser	His	Ser	Glu	Ser	Ser	Leu	Ala	Asp	785	790	795
75	Ile	Met	Ser	Leu	Trp	Gly	Glu	Glu	Phe	Gly	Phe	Trp	Gly	Phe	Ser	Ile	805	810	815

Lys

5
 <210> 13
 <211> 2454
 <212> ДНК
 <213> Штучна

10
 <220>
 <223> Синтетична кодуєча послідовність, що кодує пестицидний білок
 TIC7941PL_3,
 призначений для експресії в рослинній клітині, де
 додатковий кодон аланіну вставляється відразу після
 кодону ініціюючого метіоніну.

15
 <400> 13
 atggctaagc agaacaacaa cctctccgtg cgcgcgctgc cgagcttcat cgacgtcttc 60
 20
 aacggcatct acgggttcgc cacgggcatc caggacatct tcaacatgat ctttgggact 120
 gatacgggcg gcctgaccct ggaggaggtg ttaaagaacc aggatctcct ctacgagatt 180
 25
 tcgggcaagc tggacgggat caacggcgac ctgagcgaga tcatcgccca gggcaacctc 240
 aacaccgagc tcacgaaaga actactgaag attgccaacg agcagaacaa cctgctcacg 300
 gacgtgaaca acaagctgaa cgccatcaac gcgatgctga acacctacct gcccaagatc 360
 30
 accaacatgc tgagcgacat catgaagcag aactacgtcc tgtcccttca gatcgagtac 420
 ctgtccaagc agctccagga gatctcggac aagttggacg tgatcaacct caacgtgctc 480
 35
 atcaactcga ccctcaccga gatcactcca gcgtaccagc gcatcaagta cgtcaacgag 540
 aagttcgacg acctgacgct ggccactgag aagaccctgc gcgcgaagca aggctcgtcc 600
 aacgaggaca tcttcgacaa cgacaccctg gagaacctca cggagctgac cgagctggcc 660
 40
 aagagcgtga cgaagaacga cgtggactcg ttcgagttct acctccacac tttccacgac 720
 gtcctgatcg ggaacaacct ctttggtcgt tcggccctca agacggcggc ggagctcatc 780
 45
 acaaaggacg agatcaagac ctctgggtct gagatcggca aggtgtactc gtttctcatt 840
 gtcctgacgt gcctgcaagc gaaggcttac ctaacgctca cggcgtgccg caagctgctg 900
 ggctgtctg acatcgacta caccaacatc ctgaaccagc accttaacga cgagaagaac 960
 50
 gagttccggg acaacattct tcctaccctg tcgaacaagt tcagcaaccc gaactacgcg 1020
 aagaccacgg gcagcgacga cgatgcggtg gtggtcctgg aggctgacct gggctacgcg 1080
 55
 ctgatcggct tcgagatcat cagcgaccct atcccagtgc tcaaggtgta ccaggcgaag 1140
 ctgaaacaga actaccaggt tgacgagcag tccctgacgg agaaggtgta ccggaacatc 1200
 aataagatct tctgcccgga gaactccgac cagcgggtact acatcaagga catcaccttc 1260
 60
 cctatcgggt acgtcatcac caagataatc ttcgagaaga agtaccagaa ccgactcggc 1320

	tacctggtga aggcgaactt ctatgacagc tgcacgggcg acatcgacct caacaagtcc	1380
5	atcgaggaga gtagcgggaa tctgctggcg tggccgcccg acagcatcat ctccatctcc	1440
	aaggacgagg aagacgagaa ggatgtgtac atgccactag gcgatcatctc cgaaactttc	1500
	ctgacacca tacacagctt cgggctcaag gtggacgagg agagccgat catcacgctg	1560
10	accggcaaga gctacctccg agagtacctg ctggagtcgg acctcaagaa caaggagacg	1620
	tcgctgatcg ctctcccaa cgtcttcac tccaacatcg tcgagaactg gaacatcgag	1680
	gcggacagcc tggagccgtg ggtggcgaac aacaagaacg cttacgtgga ctcaaccggc	1740
15	ggcattgagg gctccaaggc cctattcacg caaggcgacg gcgagttcag ccagttcatc	1800
	ggcgacaagc taaagcccaa cacggactac atgatccagt aactgtgaa gggcaagccc	1860
20	gcgatctacc tcaagcacia ggacgcaacc ggctacatca tgtacgagga caccaacggc	1920
	aactacgagg acttccagac gcgggcccgc aagttcacct cgggcgctga gccgtcccag	1980
	gcccaacttga tcttcaagtc ccagtcgggc tacgaggctt ggggcgacaa ctttatcatc	2040
25	ctggagagca agtcggtgga gttcgaccag aaactcgagg ctccggaggt catcaagtcg	2100
	gagaactgga tactgactgg cgacgcgaag ctggaacagg acggccaggc cctgaggtcc	2160
30	gtgagcggga acggcagctt caagcagttc ctccagctca agtccgacag catctacttt	2220
	atgaacttcc acgtcgtggg caaggcgcgc gtgactatca agaacagcca ccgcgtcctc	2280
	ttcgagaagg actacagcac gcagtatcgc atagtcgatg atgaatactt caccaccgtc	2340
35	tccgacatcg acggcgtgtt catcgagctg acgtcgcact ccagctcgct ggcggacatt	2400
	atgtcgtgtt ggggcgaatc cgagttcggc ttctggggct tcagcatcaa gtag	2454
40	<210> 14	
	<211> 817	
	<212> Білок	
	<213> Штучний	
45	<220>	
	<223> Амінокислотна послідовність TIC7941PL_3 і де додаткова	
	амінокислота аланін вставлена безпосередньо після	
	ініціюючого метіоніну.	
50	<400> 14	
	Met Ala Lys Gln Asn Asn Leu Ser Val Arg Ala Leu Pro Ser Phe	
55	1 5 10 15	
	Ile Asp Val Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Gln Asp	
	20 25 30	
60	Ile Phe Asn Met Ile Phe Gly Thr Asp Thr Gly Gly Leu Thr Leu Glu	

UA 130828 C2

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

5	Ala	Tyr	Leu	Thr	Leu	Thr	Ala	Cys	Arg	Lys	Leu	Leu	Gly	Leu	Ser	Asp	290	295	300	
10	Ile	Asp	Tyr	Thr	Asn	Ile	Leu	Asn	Gln	His	Leu	Asn	Asp	Glu	Lys	Asn	305	310	315	320
15	Glu	Phe	Arg	Asp	Asn	Ile	Leu	Pro	Thr	Leu	Ser	Asn	Lys	Phe	Ser	Asn	325	330	335	
20	Pro	Asn	Tyr	Ala	Lys	Thr	Thr	Gly	Ser	Asp	Asp	Asp	Ala	Val	Val	Val	340	345	350	
25	Leu	Glu	Ala	Asp	Leu	Gly	Tyr	Ala	Leu	Ile	Gly	Phe	Glu	Ile	Ile	Ser	355	360	365	
30	Asp	Pro	Ile	Pro	Val	Leu	Lys	Val	Tyr	Gln	Ala	Lys	Leu	Lys	Gln	Asn	370	375	380	
35	Tyr	Gln	Val	Asp	Glu	Gln	Ser	Leu	Thr	Glu	Lys	Val	Tyr	Arg	Asn	Ile	385	390	395	400
40	Asn	Lys	Ile	Phe	Cys	Pro	Glu	Asn	Ser	Asp	Gln	Arg	Tyr	Tyr	Ile	Lys	405	410	415	
45	Asp	Ile	Thr	Phe	Pro	Ile	Gly	Tyr	Val	Ile	Thr	Lys	Ile	Ile	Phe	Glu	420	425	430	
50	Lys	Lys	Tyr	Gln	Asn	Arg	Leu	Gly	Tyr	Leu	Val	Lys	Ala	Asn	Phe	Tyr	435	440	445	
55	Asp	Ser	Ser	Thr	Gly	Asp	Ile	Asp	Leu	Asn	Lys	Ser	Ile	Glu	Glu	Ser	450	455	460	
60	Ser	Gly	Asn	Leu	Leu	Ala	Trp	Pro	Pro	Asp	Ser	Ile	Ile	Ser	Ile	Ser	465	470	475	480
65	Lys	Asp	Glu	Glu	Asp	Glu	Lys	Asp	Val	Tyr	Met	Pro	Leu	Gly	Val	Ile	485	490	495	
70	Ser	Glu	Thr	Phe	Leu	Thr	Pro	Ile	His	Ser	Phe	Gly	Leu	Lys	Val	Asp	500	505	510	
75	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					
5	Pro	Pro	Asn	Val	Phe	Ile	Ser	Asn	Ile	Val	Glu	Asn	Trp	Asn	Ile	Glu	
	545					550					555					560	
10	Ala	Asp	Ser	Leu	Glu	Pro	Trp	Val	Ala	Asn	Asn	Lys	Asn	Ala	Tyr	Val	
					565					570					575		
15	Asp	Ser	Thr	Gly	Gly	Ile	Glu	Gly	Ser	Lys	Ala	Leu	Phe	Thr	Gln	Gly	
				580					585					590			
20	Asp	Gly	Glu	Phe	Ser	Gln	Phe	Ile	Gly	Asp	Lys	Leu	Lys	Pro	Asn	Thr	
		595						600					605				
25	Asp	Tyr	Met	Ile	Gln	Tyr	Thr	Val	Lys	Gly	Lys	Pro	Ala	Ile	Tyr	Leu	
	610						615					620					
30	Lys	His	Lys	Asp	Ala	Thr	Gly	Tyr	Ile	Met	Tyr	Glu	Asp	Thr	Asn	Gly	
	625					630					635					640	
35	Asn	Tyr	Glu	Asp	Phe	Gln	Thr	Arg	Ala	Val	Lys	Phe	Thr	Ser	Gly	Ala	
					645					650					655		
40	Glu	Pro	Ser	Gln	Ala	His	Leu	Ile	Phe	Lys	Ser	Gln	Ser	Gly	Tyr	Glu	
				660					665					670			
45	Ala	Trp	Gly	Asp	Asn	Phe	Ile	Ile	Leu	Glu	Ser	Lys	Ser	Val	Glu	Phe	
			675					680					685				
50	Asp	Gln	Lys	Leu	Glu	Ala	Pro	Glu	Val	Ile	Lys	Ser	Glu	Asn	Trp	Ile	
	690						695					700					
55	Leu	Thr	Gly	Asp	Ala	Lys	Leu	Glu	Gln	Asp	Gly	Gln	Ala	Leu	Arg	Ser	
	705					710					715					720	
60	Val	Ser	Gly	Asn	Gly	Ser	Phe	Lys	Gln	Phe	Leu	Gln	Leu	Lys	Ser	Asp	
				725					730					735			
65	Ser	Ile	Tyr	Phe	Met	Asn	Phe	His	Val	Val	Gly	Lys	Ala	Arg	Val	Thr	
				740				745						750			
70	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

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

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

Lys

15

<210> 15
<211> 36
<212> ДНК
20 <213> Штучна

<220>
<223> Синтетична кодуюча послідовність (FAWPERBIN_Вас), яка кодує пептид,
що зв'язує
25 рецептор FAW ABCc4.

<400> 15
tcttcttttag cagatattat gtcttttatgg ggagaa 36

30

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

35

<220>
<223> Синтетична кодуюча послідовність (FAWPERBIN_PL), яка кодує пептид, що
зв'язує
рецептор FAW ABCc4.

40

<400> 16
agctcgctgg cggacattat gtcgctgtgg ggcgaa 36

45

<210> 17
<211> 12
<212> Білок
<213> Штучний

50

<220>
<223> Послідовність пептиду, що зв'язує рецептор FAW ABCc4 (FAWPERBIN),
яка кодується SEQ ID NO:15 і SEQ ID NO:16.

<400> 17

55

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

60

<210> 18
<211> 21

	<212>	ДНК	
	<213>	Штучна	
	<220>		
5	<223>	Послідовність ДНК, що кодує сайт зв'язування мішені miRNA, Gm.miR395_1.	
	<400>	18	
10		tgaagtgttt gggggaactt c	21
	<210>	19	
	<211>	21	
	<212>	ДНК	
15	<213>	Штучна	
	<220>		
	<223>	Послідовність ДНК, що кодує сайт зв'язування мішені miRNA, Gm.miR395_2.	
20	<400>	19	
		tgaagtgttt gggggaactt g	21
	<210>	20	
25	<211>	62	
	<212>	ДНК	
	<213>	Штучна	
	<220>		
30	<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.	
35	<400>	20	
		gaagttcccc saaacacttc aaagtactgc gatcgcgtta acaagttccc csaaacactt	60
		ca	62
40	<210>	21	
	<211>	22	
	<212>	ДНК	
	<213>	Штучна	
45	<220>		
	<223>	Послідовність ДНК, що кодує сайт зв'язування мішені miRNA, Gm.miR4392_1.	
50	<400>	21	
		tctgcgaaaa tgtgatttcg gc	22
	<210>	22	
55	<211>	22	
	<212>	ДНК	
	<213>	Штучна	
	<220>		
60	<223>	Послідовність ДНК, що кодує сайт зв'язування мішені miRNA, Gm.miR4392_2.	

	<400> 22	
	tgaagtgttt gggggaactt gg	22
5		
	<210> 23	
	<211> 64	
	<212> ДНК	
	<213> Штучна	
10		
	<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.	
15		
	<400> 23	
	gccgaaatca catttttcgca gaaagtactg cgatcgcggtt aaccsgaaat cacatttttcg	60
	сaga	64
20		
	<210> 24	
	<211> 20	
	<212> ДНК	
25	<213> Штучна	
	<220>	
	<223> Послідовність ДНК лінкера, SP-ART.8a-1.	
30		
	<400> 24	
	aagtactgcg atcgcggttaa	20
	<210> 25	
35	<211> 2490	
	<212> ДНК	
	<213> Штучна	
	<220>	
40	<223> Послідовність ДНК (TIC7941PL_1-mi395), що кодує TIC7941PL_1, функціонально пов'язаний з SUP-miR395.	
	<400> 25	
45	atggctaagc agaacaaca cctctccgtg cgcgcgctgc cgagcttcat cgacgtcttc	60
	aacggcatct acgggttcgc cacgggcatc caggacatct tcaacatgat ctttgggact	120
	gatacgggcg gcctgaccct ggaggaggtg ttaaagaacc aggatctcct ctacgagatt	180
50	tcgggcaagc tggacgggat caacggcgac ctgagcgaga tcatcgccca gggcaacctc	240
	aacaccgagc tcacgaaaga actactgaag attgccaaacg agcagaacaa cctgctcacg	300
55	gacgtgaaca acaagctgaa cgccatcaac gcgatgctga acacctacct gcccaagatc	360
	accaacatgc tgagcgacat catgaagcag aactacgtcc tgtcccttca gatcgagtac	420
	ctgtccaagc agctccagga gatctcggac aagttggacg tgatcaacct caacgtgctc	480
60	atcaactcga ccctcaccga gatcactcca gcgtaccagc gcatcaagta cgtcaacgag	540

	aagttcgacg	acctgacgct	ggccactgag	aagaccctgc	gcgcgaagca	aggctcgtcc	600
5	aacgaggaca	tcttcgacaa	cgacaccctg	gagaacctca	cggagctgac	cgagctggcc	660
	aagagcgtga	cgaagaacga	cgtggactcg	ttcgagttct	acctccacac	tttccacgac	720
	gtcctgatcg	ggaacaacct	ctttggtcgt	tcggccctca	agacggcggc	ggagctcatc	780
10	acaaaggacg	agatcaagac	ctctgggtct	gagatcggca	aggtgtactc	gtttctcatt	840
	gtcctgacgt	gcctgcaagc	gaaggcttac	ctaacgctca	cggcgtgccg	caagctgctg	900
15	ggcctgtctg	acatcgacta	caccaacatc	ctgaaccagc	accttaacga	cgagaagaac	960
	gagttccggg	acaacattct	tcctaccctg	tcgaacaagt	tcagcaaccc	gaactacgcg	1020
	aagaccacgg	gcagcgacga	cgatgcggtg	gtggtcctgg	aggctgacct	gggctacgcg	1080
20	ctgatcggct	tcgagatcat	cagcgaccct	atcccagtgc	tcaaggtgta	ccaggcgaag	1140
	ctgaaacaga	actaccaggt	tgacgagcag	tccctgacgg	agaaggtgta	ccggaacatc	1200
25	aataagatct	tctgcccggg	gaactccgac	cagcgggtact	acatcaagga	catcaccttc	1260
	cctatcgggt	acgtcatcac	caagataatc	ttcgagaaga	agtaccagaa	ccgactcggc	1320
	tacctggtga	aggcgaactt	ctatgacagc	tcgacgggcg	acatcgacct	caacaagtcc	1380
30	atcgaggaga	gtagcgggaa	tctgctggcg	tggccgcccg	acagcatcat	ctccatctcc	1440
	aaggacgagg	aagacgagaa	ggatgtgtac	atgccactag	gcgtcatctc	cgaaactttc	1500
35	ctgacaccca	tacacagctt	cgggctcaag	gtggacgagg	agagccggat	catcacgctg	1560
	accggcaaga	gctacctccg	agagtacctg	ctggagtcgg	acctcaagaa	caaggagacg	1620
	tcgctgatcg	ctcctcccaa	cgtcttcata	tccaacatcg	tcgagaactg	gaacatcgag	1680
40	gcggacagcc	tggagccgtg	ggtggcgaac	aacaagaacg	cttacgtgga	ctcaaccggc	1740
	ggcattgagg	gctccaaggc	cctattcacg	caaggcgacg	gcgagttcag	ccagttcatc	1800
45	ggcgacaagc	taaagcccaa	cacggactac	atgatccagt	acactgtgaa	gggcaagccc	1860
	gcgatctacc	tcaagcacia	ggacgcaacc	ggctacatca	tgtacgagga	caccaacggc	1920
	aactacgagg	acttccagac	gcgggcccgc	aagttcacct	cgggcgctga	gccgtcccag	1980
50	gcccacttga	tcttcaagtc	ccagtcgggc	tacgaggctt	ggggcgacaa	ctttatcatc	2040
	ctggagagca	agtcggtgga	gttcgaccag	aaactcgagg	ctccggaggt	catcaagtcg	2100
55	gagaactgga	tactgactgg	cgacgcgaag	ctggaacagg	acggccaggc	cctgaggtcc	2160
	gtgagcggga	acggcagctt	caagcagttc	ctccagctca	agtccgacag	catctacttt	2220
	atgaacttcc	acgtcgtggg	caaggcgcgc	gtgactatca	agaacagcca	ccgcgtcctc	2280
60	ttcgagaagg	actacagcac	gcagtatcgc	atagtcgatg	atgaatactt	caccaccgtc	2340

	tccgacatcg acggcggtgtt catcgagctg acgtcgcaact ccgaggagtc ctccgagttc	2400
	ggcttctggtt gcttcagcat caagtagtga agttccccc aacacttcaa agtactgcga	2460
5	tcgcggttaac aagttccccc aaacacttca	2490
	<210> 26	
	<211> 2493	
10	<212> ДНК	
	<213> Штучна	
	<220>	
15	<223> Послідовність ДНК (TIC7941PL_1-mi4392), що кодує TIC7941PL_1, функціонально пов'язаний з SUP-miR4392.	
	<400> 26	
20	atggctaagc agaacaacaa cctctccgtg cgcgcgctgc cgagcttcat cgacgtcttc	60
	aacggcatct acgggttcgc cacgggcatc caggacatct tcaacatgat ctttgggact	120
	gatacgggag gcctgaccct ggaggaggtg ttaaagaacc aggatctcct ctacgagatt	180
25	tcgggcaagc tggacgggat caacggcgac ctgagcgaga tcatcgccca gggcaacctc	240
	aacaccgagc tcacgaaaga actactgaag attgccaacg agcagaacaa cctgctcacg	300
	gacgtgaaca acaagctgaa cgccatcaac gcgatgctga acacctacct gcccaagatc	360
30	accaacatgc tgagcgacat catgaagcag aactacgtcc tgtcccttca gatcgagtac	420
	ctgtccaagc agtccagga gatctcggac aagttggacg tgatcaacct caacgtgctc	480
35	atcaactcga ccctcaccga gatcactcca gcgtaccagc gcatcaagta cgtcaacgag	540
	aagttcgacg acctgacgct ggccactgag aagaccctgc gcgcgaagca aggctcgtcc	600
	aacgaggaca tcttcgacaa cgacaccctg gagaacctca cggagctgac cgagctggcc	660
40	aagagcgtga cgaagaacga cgtggactcg ttcgagttct acctccacac tttccacgac	720
	gtcctgatcg ggaacaacct ctttggtcgt tcggccctca agacggcggc ggagctcatc	780
45	acaaaggacg agatcaagac ctctgggtct gagatcgga aggtgtactc gtttctcatt	840
	gtcctgacgt gcctgcaagc gaaggcttac ctaacgctca cggcgtgccg caagctgctg	900
	ggcctgtctg acatcgacta caccaacatc ctgaaccagc accttaacga cgagaagaac	960
50	gagttccggg acaacattct tcctaccctg tcgaacaagt tcagcaaccc gaactacgag	1020
	aagaccacgg gcagcgacga cgatgcggtg gtggtcctgg aggctgacct gggctacgag	1080
55	ctgatcggct tcgagatcat cagcgaccct atcccagtgc tcaaggtgta ccaggcgaag	1140
	ctgaaacaga actaccaggt tgacgagcag tccctgacgg agaaggtgta ccggaacatc	1200
	aataagatct tctgcccggg gaactccgac cagcgggtact acatcaagga catcaccttc	1260
60	cctatcgggt acgtcatcac caagataatc ttcgagaaga agtaccagaa ccgactcggc	1320

	tacctggtga aggcgaactt ctatgacagc tcgacgggcg acatcgacct caacaagtcc	1380
5	atcgaggaga gtagcgggaa tctgctggcg tggccgcccc acagcatcat ctccatctcc	1440
	aaggacgagg aagacgagaa ggatgtgtac atgccactag gcgtcatctc cgaaactttc	1500
	ctgacaccca tacacagctt cgggctcaag gtggacgagg agagccggat catcacgctg	1560
10	accggcaaga gctacctccg agagtacctg ctggagtcgg acctcaagaa caaggagacg	1620
	tcgctgatcg ctccctccaa cgtcttcac tccaacatcg tcgagaactg gaacatcgag	1680
15	gcggacagcc tggagccgtg ggtggcgaac aacaagaacg cttacgtgga ctcaaccggc	1740
	ggcattgagg gctccaaggc cctattcacg caaggcgacg gcgagttcag ccagttcatc	1800
	ggcgacaagc taaagcccaa cacggactac atgatccagt aactgtgaa gggcaagccc	1860
20	gcgatctacc tcaagcacia ggacgcaacc ggctacatca tgtacgagga caccaacggc	1920
	aactacgagg acttccagac gcgggcccgc aagttcacct cgggcgctga gccgtcccag	1980
25	gcccaattga tcttcaagtc ccagtcgggc tacgaggctt ggggagacaa ctttatcatc	2040
	ctggagagca agtcggtgga gttcgaccag aaactcgagg ctccggaggt catcaagtcg	2100
	gagaactgga tactgactgg cgacgcgaag ctggaacagg acggccaggc cctgaggtcc	2160
30	gtgagcggga acggcagctt caagcagttc ctccagctca agtccgacag catctacttt	2220
	atgaacttcc acgtcgtggg caaggcgcg cgtgactatca agaacagcca ccgcttctc	2280
35	ttcgagaagg actacagcac gcagtatcgc atagtcgatg atgaatactt caccaccgtc	2340
	tccgacatcg acggcggtgt catcgagctg acgtcgact ccgaggagtc ctccgagttc	2400
	ggcttctggg gcttcagcat caagtagtag ccgaaatcac attttcgcag aaagtactgc	2460
40	gatcgcgta acccgaaatc acattttcgc aga	2493

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Молекула рекомбінантної нуклеїнової кислоти для одержання інсектицидного білка, що має активність щодо лускокрилих комах-шкідників, де молекула рекомбінантної нуклеїнової кислоти містить гетерологічний промотор, функціонально пов'язаний з ділянкою полінуклеотиду, що кодує інсектицидний білок, причому:
- а) зазначений інсектицидний 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
- б) зазначений інсектицидний білок містить амінокислотну послідовність, що має щонайменше 95 % ідентичність амінокислотної послідовності з повною послідовністю 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
- в) зазначена ділянка полінуклеотиду 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.
2. Молекула рекомбінантної нуклеїнової кислоти за п. 1, яка **відрізняється** тим, що:
- а) зазначена молекула рекомбінантної нуклеїнової кислоти містить послідовність, яка функціонує для експресії інсектицидного білка в рослині; або
- б) зазначена молекула рекомбінантної нуклеїнової кислоти експресується в рослинній клітині з отриманням інсектицидно ефективної кількості інсектицидного білка; або
- в) зазначена молекула рекомбінантної нуклеїнової кислоти перебуває у функціональному зв'язку з вектором, і вказаний вектор вибраний з групи, що складається з плазміди, фагміди,

бакміди, косміди і бактеріальної або дріжджової штучної хромосоми.

3. Молекула рекомбінантної нуклеїнової кислоти за п. 1, визначена як присутня в клітині-хазяїні, причому зазначена клітина-хазяїн вибрана з групи, що складається з бактеріальної клітини і рослинної клітини.

5 4. Молекула рекомбінантної нуклеїнової кислоти за п. 3, причому зазначена бактеріальна клітина-хазяїн належить до роду бактерій, вибраних з групи, що складається з: *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Pantoea* і *Erwinia*.

10 5. Молекула рекомбінантної нуклеїнової кислоти за п. 4, причому зазначений вид *Bacillus* являє собою *Bacillus cereus* або *Bacillus thuringiensis*, зазначений вид *Brevibacillus* являє собою *Brevibacillus laterosperous* і зазначений вид *Escherichia* являє собою *Escherichia coli*.

6. Рекомбінантна нуклеїнова кислота за п. 2, причому зазначена рослинна клітина являє собою клітину дводольної або однодольної рослини.

15 7. Рекомбінантна нуклеїнова кислота за п. 6, причому зазначена рослинна клітина вибрана з групи, що складається з клітин люцерни, банана, ячменю, квасолі, броколі, капусти качанної, капусти, моркви, маніоку, рицини, цвітної капусти, селери, нуту, китайської капусти, цитрусових, кокоса, кави, кукурудзи, конюшини, бавовнику, кабачка, 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, соняшника, солодкої кукурудзи, амбрового дерева, солодкої картоплі, проса стрижнеподібного, чаю, тютюну, помідора, тритикале, дереноутворюючої трави, кавуна і пшениці.

25 8. Молекула рекомбінантної нуклеїнової кислоти за п. 1, причому вказаний білок проявляє активність щодо лускокрилих комах.

9. Молекула рекомбінантної нуклеїнової кислоти за п. 8, причому вказану лускокрилу комаху вибрано з групи, що складається з: гусениці оксамитових бобів, точильника цукрової тростини, малого кукурудзяного точильника, совки бавовняної, тютюнової листовійки, соєвої совки, чорної совки лугової, південної совки лугової, совки трав'яної, совки малої, совки бавовняної, східної гусениці, рожевого коробкового хробака, совки-іпсилон, вогнівки кукурудзяної південно-західної, совки бавовняної американської, молі капустяної, совки плямистої, азійської бавовняної совки, західної бобової совки і метелика кукурудзяного.

10. Рослина, яка стійка до зараження лускокрилими комахами-шкідниками, або її частина, що містить молекулу рекомбінантної нуклеїнової кислоти за п. 1.

35 11. Рослина або її частина за п. 10, причому вказана рослина являє собою однодольну рослину або дводольну рослину.

40 12. Рослина за п. 10, причому вказана рослина вибрана з групи, що складається з люцерни, банана, ячменю, квасолі, броколі, капусти качанної, капусти, моркви, маніоку, рицини, цвітної капусти, селери, нуту, китайської капусти, цитрусових, кокоса, кави, кукурудзи, конюшини, бавовнику, кабачка, 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, соняшника, солодкої кукурудзи, амбрового дерева, солодкої картоплі, проса стрижнеподібного, чаю, тютюну, помідора, тритикале, дереноутворюючої трави, кавуна і пшениці.

13. Насіння для одержання рослини за п. 10, причому вказане насіння містить молекулу рекомбінантної нуклеїнової кислоти.

50 14. Композиція, що інгібує активність комах, що має інсектицидну активність щодо лускокрилих комах-шкідників, яка містить молекулу рекомбінантної нуклеїнової кислоти за п. 1 та сількогосподарськоприйнятний носій.

15. Композиція, що інгібує активність комах, за п. 14, яка додатково містить нуклеотидну послідовність, що кодує щонайменше одну іншу інсектицидну речовину, яка відрізняється від зазначеного інсектицидного білка.

55 16. Композиція, що інгібує активність комах, за п. 15, причому вказана щонайменше одна інша інсектицидна речовина вибрана з групи, що складається з білка, інгібуючого активність комах, молекули длРНК, інгібуючої активність комах, і допоміжного білка.

60 17. Композиція, що інгібує активність комах, за п. 15, причому вказана щонайменше одна інша інсектицидна речовина проявляє активність проти одного або декількох видів шкідників із рядів

Lepidoptera, Coleoptera або Hemiptera.

18. Композиція, що інгібує активність комах, за п. 15, причому вказаний щонайменше один інший інсектицидний білок вибраний з групи, що складається з Cry1A, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1A.105, Cry1Ae, Cry1B, Cry1C, Cry1D, Cry1E, Cry1F, Cry1A/F, Cry1G, Cry1H, Cry1I, Cry1J, Cry1K, Cry1L, Cry2A, Cry2Ab, Cry2Ae, Cry3, 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, AXMI-005, AXMI134, AXMI-150, Axmi171, AXMI-184, axmi196, axmi204, axmi207, axmi209, Axmi205, AXMI218, AXMI220, AXMI221z, AXMI222z, AXMI223z, AXMI224z, AXMI225z, AXMI238, AXMI270, AXMI279, AXMI335, AXMI345, AXMI-R1, IP3, DIG-3, DIG-5, DIG-10, DIG-11, DIG-657, PHI-4, PIP-72, PIP-45, PIP-64, PIP-74, PIP-77, DIG-305, PIP-47, DIG-17, DIG-90, DIG-79 і DIG-303.

19. Композиція, що інгібує активність комах, за п. 14, яка визначається як така, що містить рослинну клітину, яка експресує зазначену молекулу рекомбінантної нуклеїнової кислоти за п. 1.

20. Продовольчий товарний продукт, отриманий з рослини або її частини, за п. 10, причому зазначений товарний продукт містить визначену кількість зазначеної молекули рекомбінантної нуклеїнової кислоти або кодованого нею інсектицидного білка, причому товарний продукт є переробленим продуктом, вибраним із групи, що складається з пластівців, борошна грубого помелу, борошна, олії та клітковини.

21. Спосіб боротьби зі шкідниками видів лускокрилих або із зараженням шкідниками, при цьому вказаний спосіб включає:

а) приведення в контакт шкідника з інсектицидно ефективною кількістю інсектицидного білка, зазначеного 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 або SEQ ID NO: 14; або

б) приведення в контакт шкідника з інсектицидно ефективною кількістю одного або декількох білків, що містять амінокислотну послідовність, що має щонайменше 95 % ідентичність амінокислотної послідовності з повною послідовністю 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.

22. Спосіб виявлення присутності молекули рекомбінантної нуклеїнової кислоти за п. 1 у зразку, що містить геномну ДНК рослини, що включає:

а) гібридизацію зазначеного зразка з зондом нуклеїнової кислоти, що містить або комплементарний до SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 11 або SEQ ID NO: 13, або послідовності, яка кодує інсектицидний білок, що містить амінокислотну послідовність, що має щонайменше 95 % ідентичність амінокислотної послідовності з повною послідовністю SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 12 або SEQ ID NO: 14;

б) гібридизацію зазначеного зразка та зазначеного зонду; та

с) виявлення гібридизації зазначеного зонда нуклеїнової кислоти з вказаною геномною ДНК рослини зазначеного зразка.

23. Спосіб виявлення присутності інсектицидного білка в зразку, що містить білок, причому вказаний інсектицидний 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 інсектицидний білок містить амінокислотну послідовність, що має щонайменше 95 % ідентичність амінокислотної послідовності з повною послідовністю 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, що включає:

а) приведення в контакт зазначеного зразка з імунореактивним антитілом; і

б) виявлення присутності зазначеного інсектицидного білка.

24. Спосіб за п. 23, за яким стадія виявлення включає ІФА або вестерн-блот.

25. Молекула рекомбінантної ДНК, вибрана з групи, що складається з SEQ ID NO: 25 і SEQ ID NO: 26.

26. Інсектицидний білок, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 4.