



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2001 00438

(22) Data de depozit: 21.08.2000

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: 30.04.2012 BOPI nr. 4/2012

(30) Prioritate:

20.08.1999 US 09/378,088

(41) Data publicării cererii:

30.10.2001 BOPI nr. 10/2001

(86) Cerere internațională PCT:

Nr. US 2000/22942

(87) Publicare internațională:

Nr. WO 01/14417 01.03.2001

(73) Titular:

• MYCOGEN CORPORATION, 9330  
ZIONSVILLE ROAD, INDIANAPOLIS, IN, US

(72) Inventatori:

• NARVA E. KENNETH, 12123 CAMINITO  
MIRA DEL MAR, SAN DIEGO, CA, US;  
• SCHNEPF H. ERNEST, 7954 HANDEL  
COURT, SAN DIEGO, CA, US;  
• KNUTH MARK, 16744 BALLE BERDA  
ROAD, POWAY, CA, US;  
• POLLARD R. MICHAEL, 4437 MAUMEE  
DRIVE, OKEMOS, MI, US;

• CARDINEAU A. GUY, 17041

CLOUDCROFT DRIVE, POWAY, CA, US;

• SCHWAB E. GEORGE, 1351

WALNUTVIEW, ENCINITAS, CA, US;

• MICHAELS TRACY ELLIS, 1110 FERN  
STREET, ESCONDIDO, CA, US;

• FINSTAD LEE STACY, 13831 PASEO

CARDIEL, SAN DIEGO, CA, US;

• DIEHL PAULA, P.O. BOX 2921, RAMONA,  
CA, US;

• DOJILLO JOANNA, 1190 ENCINITAS

BOULEVARD, APARTMENT 145K,

ENCINITAS, CA, US;

• STAMP LISA, 7330 BRODIAEA WAY,  
LA JOLLA, CA, US;

• HERMAN A. ROD, 11153 WEST 500

SOUTH, NEW ROSS, IN, US

(74) Mandatar:

CABINET ENPORA S.R.L., ȘOS. IANCOLUI  
NR.7, BLOC 109 B, SC.B,ET.1, AP.46,  
SECTOR 2, BUCUREȘTI

(56) Documente din stadiul tehnicii:

WO 94/16079 A2; WO 95/02694 A2

## (54) PROTEINE CU ACTIVITATE PESTICIDĂ

(57) Rezumat:

Invenția se referă la noi clase de proteine, active ca pesticide, și la secvențe de polinucleotide care codifică aceste proteine. Proteinele conform invenției au de preferință greutatea moleculară de aproximativ

40...50 kDa și de aproximativ 10...15 kDa.

Revendicări: 11

Figuri: 5

Examinator: biochimist EREMIJA LAURA



Orice persoană are dreptul să formuleze în scris și motivat, la OSIM, o cerere de revocare a brevetului de invenție, în termen de 6 luni de la publicarea mențiunii hotărârii de acordare a acesteia

# RO 123431 B1

1 Prezenta invenție se referă la o proteină și o polipeptidă cu activitate pesticidă.  
Este cunoscut faptul că, coleopterele sunt un grup semnificativ al dăunătorilor agricoli  
3 care provoacă distrugerii, de mari proporții, culturilor în fiecare an. Exemple de dăunători  
coleoptere includ omida porumbului și gărgărițele de lucernă.

5 Gărgărița de lucernă, *Hypera postica* și gărgărița de lucernă egipteană, foarte  
apropiată, *Hypera brunneipennis*, sunt cele mai importante insecte dăunătoare ale lucernei,  
7 care cresc în Statele Unite, unde în 1984 existau 2,9 milioane de acri infestați. Anual este  
cheltuită o sumă de 20 de milioane de dolari pentru controlul acestor dăunători. Gărgărița  
9 de lucernă egipteană este specia predominantă în sud-vestul Statelor Unite, unde trece prin  
estivație (adică hibernează) pe timpul lunilor fierbinți de vară. În toate celelalte privințe, este  
11 identică cu gărgărița de lucernă, care predomină în tot restul Statelor Unite.

Stadiul larval este cel mai distrugător din ciclul de viață al gărgăriței. Hrănindu-se pe  
13 vârfurile plantelor de lucernă în creștere, larva provoacă scheletizarea frunzelor, atrofierea,  
creșterea redusă a plantei, și în final, producții reduse. Infestările severe pot distruge o  
15 întreagă recoltă de fân. Adulții, care se hrănesc de asemenea cu frunze, provoacă pagube  
suplimentare, dar mai puțin semnificative.

17 Aproximativ 10 milioane de acri din porumbul din Statele Unite este infestat cu  
complexul de specii de omizi în fiecare an. Complexul de specii de omizi include omida  
19 porumbului *Diabrotica barberi*, omida porumbului *D. undecimpunctata howardi* și omida  
porumbului *D. virgifera virgifera*. Larvele cu localizare în sol a acestor specii *Diabrotica* se  
21 hrănesc cu rădăcina plantei de porumb, provocând culcarea plantelor. Culcarea reduce în  
final recolta de porumb și adesea are ca urmare moartea plantei. Hrănindu-se cu mătasea  
23 porumbului, gărgărițele adulte reduc polenizarea și, prin urmare, afectează negativ recolta  
de porumb per plantă. În plus, adulții și larvele din genul *Diabrotica* atacă culturile de  
25 cucurbitacee (castraveți, pepeni, dovleci, etc) și multe legume și lanuri de culturi din  
producția comercială cât și din cele crescute în grădini pe lângă casă.

27 Controlul omizii porumbului a fost îndreptat parțial către metodele de cultivare, cum  
ar fi rotația culturilor și aplicarea de niveluri ridicate de azot pentru a stimula creșterea unui  
29 sistem adventiv de rădăcini. Totuși, insecticidele chimice reușesc cu greu să garanteze  
nivelul dorit de control. Insecticidele sunt fie răspândite pe sol, fie sunt încorporate în acesta.  
31 Problemele asociate cu utilizarea unora dintre insecticidele chimice sunt contaminarea  
mediului și dezvoltarea rezistenței printre populațiile de insecte tratate.

33 Microbul de sol *Bacillus thuringiensis* (*B.t.*) este o bacterie Gram-pozitivă, formatoare  
de spori, caracterizată prin incluziuni proteice parasporale, care microscopic pot apărea ca  
35 niște cristale formate în mod distinct. Anumite tulpini de *B.t.* produc proteine care sunt toxice  
pentru anumite ordine specifice de dăunători. Anumite gene de toxine ale *B.t.* au fost izolate  
37 și secvențiate, și s-au produs și aprobat spre folosire produse pe bază de ADN recombinat  
din *B.t.* În plus, prin utilizarea tehnicilor de inginerie genetică, sunt în dezvoltare noi abordări  
39 pentru livrarea acestor endotoxine *B.t.* mediilor agricole, incluzând utilizarea de plante  
modificate prin inginerie genetică, cu gene de endotoxine pentru rezistența insectelor și  
41 utilizarea de celule microbiene intacte stabilizate ca purtători de livrare a endotoxinelor *B.t.*  
(Gaertner, F.H., L. Kim [1988] TIBTECH 6: S4-S7). Astfel, genele de endotoxine *B.t.* izolate  
43 încep să aibă valoare comercială.

Utilizarea comercială a pesticidelor *B.t.* a fost inițial limitată la un domeniu îngust de  
45 dăunători lepidoptere (omizi). Preparatele din spori și cristale din subspecia kurstaki a *B.*  
*thuringiensis* au fost folosite mulți ani drept insecticide comerciale pentru dăunătorii  
47 lepidoptere. De exemplu, *B. thuringiensis* varianta kurstaki HD-1 produce o δ-endotoxină  
cristalină care este toxică pentru larvele unui număr de insecte lepidoptere.

# RO 123431 B1

În ultimii ani, totuși, cercetătorii au descoperit pesticide *B.t.* cu specificități pentru un domeniu mai larg de dăunători. De exemplu, alte specii de *B. t.*, și anume *israelensis* și *tenebrionis* (cunoscute de asemenea și ca *B.t. M-7*, sau *B.t. san diego*), au fost utilizate comercial pentru controlul insectelor din ordinul *Diptera* și respectiv *Coleoptera* (Gaertner, F.H., [1989] "Cellular Delivery Systems for Insecticidal Proteins: Living and Non-Living Microorganisms", in Controlled delivery of Crop Protection Agents, R.M. Wilkins, editura Taylor and Francis, New York and London, 1990, pag. 245-255). A se vedea de asemenea Couch, T. L. (1980) "Mosquito Pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* varianta *israelensis*", *Developments in Industrial Microbiology* 22: 61-76; Beegle, CC, (1978) "Use of Entomogenous Bacteria in Agroecosystems," *Developments in Industrial Microbiology* 20: 97-104. Krieg, A., A.M. Huger, G.A. Langenbruch, W. Schnetter (1983) *Z. ang. Ent.* 96: 500-508, descriu *Bacillus thuringiensis* varianta *tenebrionis*, care s-a dovedit activă împotriva a doi gândaci din ordinul *Coleoptera*. Acestea sunt gândacul de Colorado al cartofului *Leptinotarsa decemlineata* și *Agelastica alni*.

Recent, au fost identificate noi subspecii de *B.t.* și au fost izolate gene responsabile pentru proteinele  $\delta$ -endotoxine active (Hofte, H., H.R. Whiteley [1989] *Microbiological Reviews* 52(2): 242-255). Hofte și Whiteley au clasificat genele de proteine cristaline *B.t.* în patru clase principale. Clasele au fost CryI (specifice pentru lepidoptere), CryII (specifice pentru lepidoptere și diptere), CryIII (specifice pentru coleoptere) și CryIV (specifice pentru diptere). S-a raportat descoperirea de tulpini toxic specifice pentru alți dăunători. (Feitelson, J.S., J. Payne, L. Kim [1992] *Bio/Technology* 10: 271-275).

Nomenclatorul din 1989 și schema de clasificare a lui Hofte și Whiteley pentru proteinele cristaline s-au bazat atât pe secvența de aminoacizi dedusă cât și pe domeniul gazdei al toxinei. Acest sistem a fost adaptat pentru a acoperi 14 tipuri diferite de gene de toxină care au fost împărțite în cinci clase principale. Deoarece au mai fost descoperite gene de toxine, acest sistem a început să fie greu de utilizat, deoarece s-a descoperit că genele cu secvențe similare au specificități ca insecticide semnificativ diferite. A fost propusă o schemă de nomenclură revizuită, care se bazează numai pe identitatea aminoacidului (Crickmore și col. [1996] *Society for Invertebrate Pathology, 29<sup>th</sup> Annual Meeting, 3<sup>rd</sup> Colloquium on *Bacillus thuringiensis**, University of Cordoba, Cordoba, Spain, September 1-6, rezumat). Mnemonica "cry" a fost păstrată pentru toate genele de toxină, cu excepția *cytA* și *cytB*, care rămân o clasă separată. Cifrele romane au fost schimbate cu cifre arabe în primul rang, iar parantezele din rangul trei au fost eliminate. Limitele curente reprezintă aproximativ 95% (rangul trei), 75% (rangul al doilea) și 48% (rangul primar) identitate de secvență. Multe dintre numele originale au fost păstrate, cu excepțiile amintite, deși un număr dintre acestea au fost reclasificate. A se vedea de asemenea, N. Crickmore, D.R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum și D.H. Dean (1998) "Revisions of the Nomenclatura for the *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Proteins", *Microbiology and Molecular Biology Reviews* vol. 62: 807-813; și Crickmore, Zeigler, Feitelson, Schnepf, Van Rie, Lereclus, Baum și Dean. "*Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature" (1999)

[http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/index.html](http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html).

Acest sistem utilizează aplicațiile software disponibile liber CLUSTAL W și pHYLIP. Aplicația NEIGHBQR din pachetul pHYLIP utilizează un algoritm de medii aritmetice (UF34A).

Clonarea și expresia unei gene de proteină cristalină *B.t.* în *Escherichia coli* a fost descrisă în literatura publicată (Schnepf, H.E., H.R. Whiteley [1981] *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 2893-2897). Brevetele **US 4448885** și **4467036** descriu amândouă expresia proteinei cristaline *B.t.* în *E. coli*.

# RO 123431 B1

1 Brevetele **US 4797276** și **4853331** descriu tulpina *tenebrionis* a *B. thuringiensis*  
(cunoscută de asemenea ca *M-7*, sau *B.t. san diego*), care poate fi utilizată pentru controlul  
3 dăunătorilor coleoptere în diverse medii. Brevetul **US 4918006** dezvăluie toxine *B.t.* care au  
activitate împotriva dipterelor. Brevetul **US 4849217** dezvăluie izolate *B.t.* care au activitate  
5 împotriva gărgăriței lucernei. Brevetul **US 5208077** dezvăluie izolate de *Bacillus thuringiensis*  
active împotriva coleopterelor. Brevetul **US 5632987** dezvăluie o toxină de 130 kDa din  
7 PS80JJ1 care are activitate împotriva omizii porumbului. **WO 94/40162**, care este înrudită  
cu prezenta cerere, descrie noi clase de proteine care sunt toxice pentru omida porumbului.

9 Brevetele **US 5151363** și **4948734** dezvăluie anumite izolate de *B.t.* care au activitate  
împotriva nematodelor.

11 Brevetul **US 6083499** și **WO 97/40162** dezvăluie "toxine binare". Obiectul invenției  
este distinct față de toxinele împotriva țânțarilor produse de *Bacillus sphaericus*. A se vedea  
13 **EP 454 485**; Davidson și col. (1990), "Interaction of the *Bacillus sphaericus* mosquito  
larvicidal proteins" Can. J. Microbiol 36(12): 870-8; Baumann și col. (1988), "Sequence  
15 analysis of the mosquitocidal toxin genes encoding 51.4- și 41.9-kilodalton proteins from  
*Bacillus sphaericus* 2362 and 2297", J. Bacteriol. 170: 2045-2050; Oei și col. (1992),  
17 "Binding of purified *Bacillus sphaericus* binary toxin and its deletion derivatives to *Culex*  
quinquefasciatus gut: elucidation of funcțional binding domains", Journal of General  
19 Microbiology 138(7): 1515-26.

21 Problema pe care o rezolvă invenția este de a prezenta o proteină cu activitate  
pesticidă, o polinucleotidă care codifică proteina și o celulă gazdă transgenică care o  
conține.

23 Polinucleotida conform invenției înlătură dezavantajele de mai sus, prin aceea că  
cuprinde o primă secvență de aminoacizi care codifică o polipeptidă de aproximativ 45 kDa  
25 și o a doua secvență de aminoacizi care codifică o polipeptidă de 15 kDa, în care  
polipeptidele menționate sunt toxice pentru dăunătorul, viermele rădăcinilor porumbului, care  
27 ingerează respectivele polipeptide, în care secvența de nucleotide care codifică prima  
secvență de aminoacizi hibridizează cu complementul unei secvențe de acizi nucleici  
29 selectată dintre SECV. ID. NR. 10, SECV ID Nr. 42 și SECV. ID NR. 45 și în care secvența  
de nucleotide care codifică a doua secvență de aminoacizi hibridizează, în prezența sau  
31 absența condițiilor stringente, cu complementul unei secvențe de acizi nucleici selectate  
dintre SECV. ID. NR. 31, SECV ID Nr. 40 și SECV. ID NR. 44.

33 Proteina conform invenției înlătură dezavantajele de mai sus, prin aceea că aceasta  
cuprinde o primă secvență de aminoacizi care este secvența unei polipeptide aproximativ  
35 45 kDa și o a doua secvență de aminoacizi este secvența unei polipeptide aproximativ 15  
kDa, în care polipeptidele menționate sunt toxice pentru dăunătorul, viermele rădăcinilor  
37 porumbului, care ingerează respectivele polipeptide, în care secvența de nucleotide care  
codifică prima secvență de aminoacizi hibridizează, în prezența condițiilor stringente, cu  
39 complementul unei secvențe de acizi nucleici selectată dintre SECV. ID. NR. 10, SECV ID  
Nr. 37, SECV ID Nr. 42 și SECV. ID NR. 45 și în care secvența de nucleotide care codifică  
41 a doua secvență de aminoacizi hibridizează, în prezența condițiilor stringente, cu  
complementul unei secvențe de acizi nucleici selectate dintre SECV. ID. NR. 31, SECV ID  
43 Nr. 35, SECV ID Nr. 40 și SECV. ID NR. 44.

45 Celulă gazdă transgenică conform invenției, înlătură dezavantajele de mai sus prin  
aceea că cuprinde polinucleotida cu activitate pesticidă definită în revendicarea 1, în care  
respectiva celulă gazdă este selectată din grupul alcătuit dintr-o celulă de plantă și o celulă  
47 bacteriană. Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

49 - mediul de cultură nu este contaminat, așa cum se întâmplă în cazul insecticidelor  
sau pesticidelor;



# RO 123431 B1

- celula gazdă care conține gena insecticid poate fi crescută în orice mediu nutritiv.	1
Prezenta invenție privește noi materiale și metode pentru controlul dăunătorilor care nu sunt mamifere. Într-o variantă preferată, invenția prezintă materiale și metode pentru controlul dăunătorilor coleoptere. În variante și mai preferate, materialele și metodele descrise aici sunt folosite pentru controlul omizii porumbului - în special omida porumbului <i>Diabrotica virgifera virgifera</i> . Dăunătorii lepidoptere (inclusiv sfredelitorul porumbului și <i>Helicoverpa zea</i> ) pot fi, de asemenea, controlați de proteinele cu activitate pesticidă ale prezentei invenții.	3 5 7
Prezenta invenție prezintă, în mod avantajos, polinucleotide și proteine cu activitate pesticidă, codificate de polinucleotide. În variantele preferate, sunt folosite împreună o proteină de 40-50 kDa și o proteină de 10-15 kDa, acestea având, în combinație, activitate pesticidă. Astfel, la cele două clase de proteine ale prezentei invenții se pot face referiri ca "toxine binare". Așa cum este utilizat aici, termenul "toxină" sau "proteină cu activitate pesticidă" include ambele clase ale acestor proteine. Folosirea unei proteine de 40-50 kDa cu o proteină de 10-15 kDa este preferată, dar nu neapărat necesară. O clasă de secvențe de polynucleotide, așa cum sunt descrise aici, codifică proteine care au o greutate moleculară a lungimi totale de aproximativ 40-50 kDa. Într-o variantă specifică, aceste proteine au o greutate moleculară de aproximativ 43-47 kDa. O a doua clasă de polinucleotide ale prezentei invenții codifică proteine cu activitate pesticidă de aproximativ 10-15 kDa. Într-o variantă specifică, aceste proteine au o greutate moleculară de aproximativ 13-14 kDa. Trebuie înțeles clar că fiecare tip de toxină/genă este o variantă a prezentei invenții. Într-o variantă preferată specifică, o proteină de 40-50 kDa din prezenta invenții este utilizată în combinație cu o proteină de 10-15 kDa. Astfel, proteinele prezentei invenții pot fi utilizate pentru a mări și/sau să ușureze activitatea altor toxine din proteine.	9 11 13 15 17 19 21 23
Prezenta invenție include polinucleotide care codifică toxinele de 40-50 kDa sau 10-15 kDa, polinucleotide care codifică porțiuni sau fragmente toxinelor cu lungime totală care mențin activitatea pesticidă (de preferință atunci când sunt utilizate în combinație) și polinucleotide care codifică ambele tipuri de toxine. Noile exemple de proteine de fuziune (o proteină de 40-50 kDa și o proteină de 10-15 kDa fuzionate împreună) și polinucleotidele care le codifică sunt de asemenea prezentate aici.	25 27 29
În anumite variante, toxinele <i>B.t.</i> utile în conformitate cu invenția includ toxine care pot fi obținute din noile izolate <i>B.t.</i> descrise aici. Trebuie înțeles foarte clar că, atunci când toxinele de 40-50 kDa și 10-15 kDa, de exemplu, sunt folosite împreună, un tip de toxină poate fi obținut dintr-un izolat, iar celălalt tip de toxină poate fi obținut din alt izolat.	31 33
Prezenta invenție include, de asemenea, utilizarea variantelor de izolate și toxine <i>B.t.</i> exemplificate care au, în mod substanțial, aceleași proprietăți de activitate împotriva coleoptelilor ca izolatele și toxinele <i>B.t.</i> specific exemplificate. Asemenea variante de izolate includ, de exemplu, mutanții. Procedurile pentru realizarea mutanților sunt binecunoscute în domeniul microbiologiei. Lumina ultravioletă și mutagenii chimici cum ar fi nitrozoguanidina, sunt folosite pe scară largă în acest scop.	35 37 39
În variante preferate, prezenta invenție se referă la plante și celule de plante care au cel puțin o polinucleotidă izolată a prezentei invenții. De preferință, celulele de plante transgenice exprimă toxine cu activitate pesticidă în țesuturile consumate de dăunătorii vizați.	41 43
În mod alternativ, izolatele <i>B.t.</i> ale prezentei invenții sau microbii recombinanți care exprimă toxinele descrise aici, pot fi utilizate pentru controlul dăunătorilor. În această privință, invenția include tratamentul celulelor <i>B.t.</i> substanțial intacte și/sau celule recombinate care conțin toxinele exprimate ale invenției, tratate pentru a prelungi activitatea pesticidă atunci când celulele substanțial intacte sunt aplicate mediului unui dăunător vizat. Celula tratată acționează ca un înveliș de protecție pentru toxina cu activitate pesticidă.	45 47 49

# RO 123431 B1

1 Toxinele prezentei invenții sunt intoxicanți orali care afectează celulele tractului  
digestiv mediu al insectei, după ingestia de către insecta vizată. Astfel, prin consumarea  
3 celulelor gazdă recombinat, de exemplu, care exprimă toxina, insecta vizată ia astfel  
contact cu proteinele prezentei invenții, care sunt toxice pentru dăunător. Acest lucru are ca  
5 urmare controlul dăunătorilor vizati.

Prezenta invenție se referă la două clase noi de secvențe de polinucleotide cât și la  
7 noi proteine cu activitate pesticidă codificate de aceste polinucleotide. Într-o variantă,  
proteinele de lungime totală au o greutate moleculară de aproximativ 40-50 kDa. În  
9 variantele specifice exemplificate aici, aceste proteine au o greutate moleculară de  
aproximativ 43-47 kDa. Într-o a doua variantă, proteinele cu activitate pesticidă au o greutate  
11 moleculară de aproximativ 10-15 kDa. În variante specifice exemplificate aici, aceste proteine  
au o greutate moleculară de aproximativ 13-14 kDa.

13 În variante preferate, sunt folosite împreună o proteină de 40-50 kDa și o proteină de  
10-15 kDa, iar proteinele au activitate pesticidă în combinație. Astfel, la cele două clase de  
15 proteine ale prezentei invenții se pot face referiri ca "toxine binare". Așa cum este folosit aici,  
termenul "toxină" include ambele clase de proteine cu activitate pesticidă. Prezenta invenție  
17 se referă la polinucleotide care codifică atât toxina de 40-50 kDa cât și toxina de 10-15 kDa,  
polinucleotide care codifică porțiuni sau fragmente ale toxinelor cu lungime totală care  
19 păstrează activitatea pesticidă atunci când sunt folosite în combinație și secvențe de  
polinucleotide care codifică ambele tipuri de toxine. Într-o alcătuire preferată, aceste toxine  
21 sunt active împotriva dăunătorilor coleoptere, în special omida porumbului și cel mai bine  
omida porumbului *Diabrotica virgifera virgifera*. Pot fi vizati, de asemenea, și dăunătorii  
23 lepidoptere.

Aici sunt exemplificate câteva toxine specifice. Pentru toxinele care au o secvență  
25 de aminoacizi cunoscută, greutatea moleculară este, de asemenea, cunoscută. Specialiștii  
în domeniu vor recunoaște că greutatea moleculară aparentă a unei proteine determinată  
27 prin electroforeză pe gel va diferi, uneori, de greutatea moleculară reală. Prin urmare,  
referirea de aici, de exemplu la o proteină de 45 kDa sau la o proteină de 14 kDa, este  
29 înțeleasă ca referirea la proteine, aproximativ de mărimea respectivă chiar dacă greutatea  
moleculară reală este întrucâtva diferită.

31 Prezenta invenție se referă nu numai la polinucleotide care codifică aceste clase de  
toxine, dar de asemenea la utilizarea acestor polinucleotide pentru producerea de gaze  
33 recombinat care exprimă toxina. Într-un alt aspect, prezenta invenție se referă la utilizarea  
combinată a unei toxine de aproximativ 40-50 kDa din prezenta invenție, împreună cu o  
35 toxină de aproximativ 10-15 kDa a prezentei invenții pentru a realiza un control de mare  
eficiență al dăunătorilor, inclusiv coleoptere cum ar fi omida porumbului. De exemplu,  
37 rădăcinile unei plante pot exprima ambele tipuri de toxine.

Astfel, controlul dăunătorilor folosind izolate, toxine și gene din prezenta invenție  
39 poate fi realizat printr-o varietate de metode cunoscute specialiștilor din domeniu. Aceste  
metode includ, de exemplu, aplicarea izolatelor de *B.t.* dăunătorilor (sau locației acestora),  
41 aplicarea de microbi recombinati dăunătorilor (sau locației acestora) și transformarea  
plantelor cu gene care codifică toxinele cu activitate pesticidă ale prezentei invenții. Microbii  
43 pentru utilizarea conform prezentei invenții pot fi de exemplu, *B.t.*, *E. coli* și/sau  
*Pseudomonas*. Gazdele recombinat pot fi realizate de specialiștii din domeniu folosind  
45 tehnici standard. Materialele necesare pentru aceste transformări sunt descrise aici sau sunt  
disponibile cu ușurință specialiștilor din domeniu. Controlul insectelor și a altor dăunători cum  
47 ar fi nematode și căpușe, poate fi realizat, de asemenea, de către specialiștii din domeniu  
folosind tehnici standard combinate cu-învățăturile furnizate aici.

# RO 123431 B1

Noile clase de toxine și secvențe de polinucleotide furnizate aici sunt definite conform mai multor parametri. O caracteristică critică a toxinelor descrise aici este activitatea pesticidă. Într-o alcătuire particulară, aceste toxine au activitate împotriva dăunătorilor coleoptere. Toxinele active împotriva lepidopterelor sunt, de asemenea, avute în vedere. Toxinele și genele prezentei invenții pot fi definite suplimentar de către secvențele lor de aminoacizi și de nucleotide. Secvențele moleculelor din fiecare clasă nouă pot fi identificate și definite în termenii similarității sau identității lor cu anumite secvențe exemplificate cât și în termenii capacității de a hibridiza cu, sau de a fi amplificate de anumite probe sau primeri exemplificați. Clasele de toxine furnizate aici pot fi identificate, de asemenea, pe baza imunoreactivității lor cu anumiți anticorpi și pe baza aderenței lor la o formulă generică.

Trebuie să fie evident unui specialist din domeniu că genele care codifică proteine cu activitate pesticidă conform prezentei invenții pot fi obținute prin mai multe mijloace. Genele specifice exemplificate aici pot fi obținute din izolate depozitate într-un depozit de culturi așa cum este descris aici. Aceste gene și toxine ale prezentei invenții pot fi de asemenea construite sintetic, de exemplu, prin utilizarea unui sintetizator de gene.

Secvența de trei toxine de 45 kDa de model, este furnizată ca SECV ID NR.: 11, 43 și 38. În variante preferate, toxinele acestei clase au o secvență care este conformă cu secvența generică prezentată drept SECV ID NR.: 28. În alcătuirii preferate, toxinele acestei clase vor fi conforme cu secvența de consens arătată în fig. 1.

Cu învățăturile furnizate aici, un specialist din domeniu poate produce ușor și folosi diverse toxine și secvențe de polinucleotide ale noilor clase descrise aici.

Microorganismele utile conform prezentei invenții au fost depozitate în colecția permanentă a Agricultural Research Service Patent-Culture Collection (NRRL), Northern Regional Research Center, 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604, S.U.A.

Numerele din depozitul de culturi ale tulpinilor depozitate sunt după cum urmează:

Cultură	Nr.depozit	Data depunerii
B.t. tulpina PS80JJ1	NRRL B-16679	17 iulie 1990
B.t. tulpina PS149B1	NRRL B-21553	28 martie 1996
B.t. tulpina PS167H2	NRBL B-21554	28 martie 1996
E. coli NM522 (pMYC2365)	NRRL B-21170	5 ianuarie 1994
E. coli NM522 (pMYC2382)	NRRL B-21329	28 septembrie 1994
E. coli NM522 (pMYC2379)	NRRL B-21155	3 noiembrie 1993
E. coli NM522 (pMYC2421)	NRRL B-21555	28 martie 1996
E. coli NM522 (pMYC2427)	NRRL B-21672	26 martie 1997
E. coli NM522 (pMYC2429)	NRRL B-21673	26 martie 1997
E. coli NM522 (pMYC2426)	NRRL B-21671	26 martie 1997
B.t. tulpina PS185GG	NRBL B-30175	19 august 1999
B.t. tulpina PS187G1	NRRL B-30185	19 august 1999
B.t. tulpina PS187Y2	NRRL B-30187	19 august 1999

# RO 123431 B1

Tabel (continuare)

1  
3  
5  
7  
9  
11  
13  
15  
17  
19  
21  
23  
25  
27  
29  
31

Cultură	Nr.depozit	Data depunerii
B.t. tulpina PS201G	NRRL B-30188	19 august 1999
B.t. tulpina PS201HH2	NRRL B-30190	19 august 1999
B.t. tulpina PS242K10	NRRL B-30195	19 august 1999
B.t. tulpina PS69Q	NRRL B-30175	19 august 1999
B.t. tulpina KB54A1-6	NRRL B-30197	19 august 1999
B.t. tulpina KR589	NRRL B-30198	19 august 1999
B.t. tulpina PS185L12	NRRL B-30179	19 august 1999
B.t. tulpina PS185W3	NRRL B-30180	19 august 1999
B.t. tulpina PS187L14	NRRL B-30186	19 august 1999
B.t. tulpina PS186FF	NRRL B-30182	19 august 1999
B.t. tulpina PS131W2	NRRL B-30176	19 august 1999
B.t. tulpina PS158T3	NRRL B-30177	19 august 1999
B.t. tulpina PS185X10	NRRL B-30178	19 august 1999
B.t. tulpina PS185FF	NRRL B-30182	19 august 1999
B.t. tulpina PS187F3	NRRL B-30184	19 august 1999
B.t. tulpina PS201L3	NRRL B-30189	19 august 1999
B.t. tulpina PS204C3	NRRL B-30191	19 august 1999
B.t. tulpina PS204G4	KRRL B-18685	17 iulie 1990
B.t. tulpina PS204I11	NRRL B-30192	19 august 1999
B.t. tulpina PS204J7	NRRL B-30193	19 august 1999
B.t. tulpina PS236B6	NRRL B-30194	19 august 1999
B.t. tulpina PS246P42	NRRL B-30196	19 august 1999
B.t. tulpina KR1209	NPRL B-30199	19 august 1999
B.t. tulpina KR1369	NRRL B-30200	19 august 1999
B.t. tulpina MR1506	NRRL B-30298	1 iunie 2000
B.t. tulpina MR1509	NRRL B-30330	8 august 2000
B.t. tulpina MR1510	NRRL B-30331	6 august 2000
B.t. tulpina MR1607	NBRL B-30332	6 august 2000

33  
35

    Izolatul PS80JJ1 este disponibil pentru public pe baza acordării brevetului US 5151363 și a altor brevete.

    Un alt aspect al prezentei invenții privește noi izolate și toxinele și genele care se pot obține din aceste izolate. Noile izolate au fost depuse și sunt incluse în lista de mai sus.

# RO 123431 B1

Aceste izolate au fost depozitate în condiții care asigură faptul că accesul la culturi va fi disponibil pe perioada cât această cerere de brevet va fi în examinare și până la obținerea unuia determinat de Comisarul de brevete și mărci conform 37 CFR 1.14 și 35 USC 122. Depozitele sunt disponibile așa cum este cerut de legile de brevete străine în țările în care sunt depuse cereri corespondente ale prezentei cereri sau descendenți ai acesteia. Totuși, trebuie înțeles că disponibilitatea depozitului nu constituie un permis pentru punerea în practică a prezentei invenții prin derogarea de la drepturile de brevet acordate prin acțiune guvernamentală.

În continuare, depozitele de cultură ale cererii vor fi depozitate și făcute disponibile publicului în conformitate cu prevederile Tratatului de la Budapesta pentru Depunerea de Microorganisme, adică ele vor fi depozitate cu toată grija necesară pentru a fi păstrate viabile și-necontaminate pentru o perioadă de cel puțin cinci ani după cea mai recentă cerere pentru furnizare unui eșantion a unui depozit și în orice caz, pentru o perioadă de cel puțin 30 de ani după data de depozitare sau pe perioada de aplicare a oricărui brevet care poate rezulta din dezvoltarea culturilor. Depozitarul va aduce la cunoștință datoria înlocuirii depozitului(elor) dacă depunătorul nu este capabil să furnizeze un eșantion la cerere, datorită stării depozitului(elor). Toate restricțiile referitoare la disponibilitatea pentru public ale depozitelor de culturi ale cererii vor fi irevocabil eliminate la acordarea unui brevet care le dezvoltă.

Mai jos este prezentat un tabel care prezintă caracteristicile unor anumite izolate de *B.t.* care sunt utile conform prezentei invenții.

Tabelul 1

Descrierea tulpinilor de *B.t.* toxice pentru coleoptere

Cultură	Descrierea cristalului	Greutate moleculară aproximativă (kDa)	Serotip	Depozit NBRL	Data de depunere
PS80JJ1	multiplu atașat	130, 90, 47, 37, 14	4a4b, sotto	B-18679	7-17-90
PS149B1		130, 47, 14		B-21553	3-2B-96
PS167H2		70, 47, 14		B-23554	3-26-96

Alte izolate ale prezentei invenții pot fi, de asemenea, caracterizate în termeni de formă și localizare a incluziunilor toxinei.

### Toxine, gene și probe

Polinucleotidele prezentei invenții pot fi folosite pentru a forma "gene" complete pentru a codifica proteine sau peptide într-o celulă gazdă dorită. De exemplu, așa cum vor recunoaște specialiștii din domeniu, unele dintre polinucleotidele din lista de secvențe atașată sunt arătate fără codoni stop. De asemenea, polinucleotidele din invenție pot fi plasate adecvat sub controlul unui promotor într-o gazdă de interes, așa cum se știe deja în domeniu.

Așa cum specialiștii din domeniu vor recunoaște ușor, ADN-ul există de obicei într-o formă dublu catenară. În această dispunere, o catenă este complementară celeilalte catene și vice-versa. Pe măsură ce ADN-ul este replicat într-o plantă (de exemplu), sunt produse catene suplimentare, complementare de ADN. "Catena de codificare" este adesea utilizată în domeniu pentru referirea la catena care se leagă cu catena anti-sens. ARN este transcris din catena "anti-sens" a ADN-ului. Catena "sens" sau "de codificare" are o serie de codoni

# RO 123431 B1

1 (un codon reprezintă trei nucleotide care pot fi citite trei odată pentru a rezulta un aminoacid  
particular) care pot fi citiți ca un cadru de citire deschis (ORF) pentru a forma o proteină sau  
3 peptidă de interes. Pentru a exprima o proteină *in vivo*, o catenă de ADN este de obicei  
transcrisă într-o catenă complementară de ARNm care este utilizat ca o matrice pentru  
5 proteină. Astfel, prezenta invenție include utilizarea polinucleotidelor arătate în lista de  
secvențe atașată și/sau catenele complementare. ARN și ANP (acid nucleic peptidic) care  
7 sunt funcțional echivalenți cu ADN-ul exemplificat sunt incluși în prezenta invenție.

Toxinele și genele prezentei invenții pot fi identificate și obținute prin utilizarea de  
9 exemplu, a probelor de oligonucleotide. Aceste probe sunt secvențe de nucleotide  
detectabile care pot fi detectabile în virtutea unei mărcări adecvate sau pot fi făcute inerent  
11 fluorescente așa cum este descris în cererea internațională **WO 93/16094**. Probele (și  
polinucleotidele prezentei invenții) pot fi ADN, ARN sau APN. În plus față de adenină (A),  
13 citozină (C), guanină (G), timină (T) și uracil (U); pentru moleculele ARN, probele sintetice  
(și polinucleotidele) prezentei invenții pot avea de asemenea inozină (o bază neutră capabilă  
15 de împerecherea cu toate patru bazele; uneori folosită în locul unui amestec de toate patru  
bazele în probele sintetice). Astfel, atunci când aici se face referire la o oligonucleotidă  
17 degenerată, sintetică și se utilizează în general "n", "n" poate fi G, A, T, C sau inozină.  
Codurile de ambiguitate așa cum sunt folosite aici sunt în concordanță cu standardul IUPAC  
19 pentru convenții de numire cât și cu depunerea prezentei cereri (de exemplu, R înseamnă  
A sau G, Y înseamnă C sau T, etc).

21 Așa cum este binecunoscut în domeniu, dacă molecula probă și eșantionul de acid  
nucleic hibridizează prin formarea unei legături puternice între cele două molecule, se poate  
23 presupune rezonabil că proba și eșantionul au substanțial omologie/similaritate/identitate. De  
preferință, hibridizarea este condusă în condiții stringente prin tehnici binecunoscute în  
25 domeniu, așa cum sunt descrise de exemplu în Keller, G.H., M.M., Manak (1987) DNA  
Probes, Stockton Press New York, NY, pag. 169-170. De exemplu, așa cum s-a afirmat aici,  
27 condițiile de înaltă stringență pot fi realizate printr-o primă spălare cu 2xSSC (citrat salin  
standard)/0,1% SDS (sulfat dodecil de sodiu) timp de 15 min la temperatura camerei. De  
29 obicei se realizează două spălări. Stringența ridicată poate fi apoi realizată prin  
reducerea concentrației de sare și/sau prin creșterea temperaturii. De exemplu, spălarea  
31 descrisă mai sus poate fi urmată de două spălări cu 0,1xSSC/0,1% SDS timp de 15 min,  
fiecare la temperatura camerei, urmate de spălări ulterioare cu 0,1xSSC/0,1% SDS timp de  
33 30 min, fiecare la 55°C. Aceste temperaturi pot fi utilizate cu alte protocoale de hibridizare  
și spălare explicate aici și care sunt cunoscute specialiștilor din domeniu (poate fi folosit  
35 SSPE ca sare în loc de SSC, de exemplu). 2xSSC/0,1% SDS poate fi preparat prin  
adăugarea de 50 ml de 20xSSC și 5 ml de 10% SDS la 445 ml de apă. 20xSSC poate fi  
37 preparat prin combinarea de NaCl (175,3 g/0,150 M), citrat de sodiu (88,2 g/0,015 M) și apă  
la un litru, urmată de ajustarea pH-ului la 7,0 cu NaOH 10 N. 10% SDS poate fi preparat prin  
39 dizolvarea a 10 g SDS în 50 ml de apă autoclavată, diluând la 100 ml și alicotare.

41 Detectarea probei asigură un mijloc pentru a determina într-un mod cunoscut dacă  
hibridizarea a avut loc. O asemenea analiză a probei furnizează o metodă rapidă de  
43 identificare a genelor care codifică toxinele prezentei invenții. Segmentele de nucleotide care  
sunt utilizate ca probe, conform invenției, pot fi sintetizate folosind un sintetizator de ADN și  
45 proceduri standard. Aceste secvențe de nucleotide pot fi, de asemenea, folosite ca primeri  
PCR pentru a amplifica genele prezentei invenții.

47 Caracteristicile de hibridizare ale unei molecule pot fi utilizate pentru a defini poli-  
nucleotidele prezentei invenții. Astfel, obiectul invenției include polinucleotide (și/sau com-  
plementele lor, de preferință complementele lor complete) care hibridizează cu o poli-  
49 nucleotida exemplificată aici (cum ar fi secvențele de ADN incluse în SECV ID NR.: 46-66).

# RO 123431 B1

Așa cum este utilizat aici, condiții "stringente" pentru hibridizare se referă la condiții care realizează același, sau aproape același, grad de specificitate al hibridizării ca și condițiile utilizate de prezenții solicitanți. În mod specific, hibridizarea ADN-ului imobilizat pe Southern blot cu probe specifice pentru gene marcate <sup>32</sup> P a fost realizată prin metode standard (Maniatis, T., E.F. Fritsch, J. Sambrook [1982] Molecular Cloning: A Laboratory Manual: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). În general, hibridizarea și spălările ulterioare au fost realizate în condiții stringente care au permis detectarea secvențelor țintă (cu omologie cu genele de toxine PS80JJ1, de exemplu). Pentru probele de gene ADN dublu catenar, hibridizarea a fost realizată peste noapte la 20-25°C sub temperatura de topire (T <sub>m</sub> ) a hibridului ADN în 6xSSPE, 5x soluție Denhardt, 0,1% SDS, 0,1 mg/ml AEN denaturat. Temperatura de topire este descrisă de următoarea formulă (Beltz, G. A., K.A. Jacobs, T.H. Eickbush, P.T. Cherbas și F.C. Kafatos [1983] Methods of Enzymology, R. Wu, L. Grossman and K. Moldave, Academic Press, New York 100: 266-285):	1
$T_m = 81, 5^\circ\text{C} + 16,6 \text{ Log}[\text{Na}^+] + 0,41 (\%G+C) - 0,61 (\% \text{formamidă}) - 600/\text{lungimea duplexului în perechi de baze}.$	15
Spălările sunt realizate de obicei după cum urmează:	17
(1) De două ori la temperatura camerei timp de 15 în 1xSSPE, 0,1% SDS (spălare de stringență redusă).	19
(2) O dată la T <sub>m</sub> -20°C timp de 15 min în 0,2xSSPE, 0,1% SDS (spălare de stringență moderată).	21
Pentru probele de oligonucleotide, hibridizarea a fost realizată peste noapte la 10-20°C sub temperatura de topire (T <sub>m</sub> ) a hibridului, în 6xSSPE, 5x soluție Denhardt, 0,1% SDS, 0,1 mg/ml ACN denaturat. T <sub>m</sub> pentru probele de oligonucleotide a fost determinată cu formula următoare:	23
$T_m(^{\circ}\text{C}) = 2 (\text{număr T/A perechi de baze}) + 4 (\text{număr G/C perechi de baze})$ (Suggs, S.V., T. Miyake, E.H. Kawashime, M.J. Johnson, K. Itakura și R.B. Wallace [1981] ICN-UCLA Syirp. Dev. Biol. Using Purified Genes, D.D. Brown, Academic Press, New York, 23: 683-693).	25
Spălările s-au realizat, în mod obișnuit, după cum urmează:	29
(1) De două ori la temperatura camerei timp de 15 în 1xSSPE, 0,1% SDS (spălare de stringență redusă).	31
(2) O dată la temperatura de hibridizare timp de 15 min în 1xSSPE, 0,1% SDS (spălare de stringență moderată).	33
Toxinele care pot fi obținute din izolate PS149B1, PS167H2 și PS80JJ1 au fost caracterizate ca având cel puțin una dintre caracteristicile următoare (noile toxine ale prezentei invenții pot fi în mod similar caracterizate cu acestea și alte informații de identificare prezentate aici):	35
(a) toxina menționată este codificată de o secvență de nucleotide care hibridizează în condiții stringente cu o secvență de nucleotide selectată din grupul care constă din: ADN care codifică SECV ID NR.: 2; ADN care codifică SECV ID NR.: 4; ADN care codifică SECV ID NR.: 6, SECV ID NR.: 8; SECV ID NR.: 10, ADN care codifică SECV ID NE: 11, SECV ID NR.: 12, ADN care codifică SECV ID NR.: 13, SECV ID NR.: 14, ADN care codifică SECV ID NR.: 15, ADN care codifică SECV ID NR.: 16, ADN care codifică SECV ID NR.: 17, ADN care codifică SECV ID NR.: 18, ADN care codifică SECV ID NR.: 19, SECV ID NR.: 20, SECV ID NR.: 21, SECV ID NR.: 22, SECV ID NR.: 23, SECV ID NR.: 24, SECV ID NR.: 25 SECV ID NR.: 26, SECV ID NR.: 27, ADN care codifică o porțiune cu activitate pesticidă a SECV ID NR.28, SECV ID NR.: 37, ADN care codifică SECV ID NR.: 38, SECV ID NR.: 42 și ADN care codifică SECV ID NR.: 43;	37
	39
	41
	43
	45
	47
	49

# RO 123431 B1

1 (b) toxina menționată imunoreacționează cu un anticorp la o toxină de aproximativ  
40-50 kDa, sau un fragment al acesteia, dintr-un izolat de *Bacillus thuringiensis* selectat din  
3 grupul care constă în PS80JJ1 având caracteristicile de identificare ale NRRL B-18679,  
PS149B1 având caracteristicile de identificare ale NRRL B-21553 și PS167H2 având  
5 caracteristicile de identificare ale NRRL B-21554;

7 (c) toxina menționată este codificată de o secvență de nucleotide în care o porțiune  
a secvenței de nucleotide menționată poate fi amplificată prin PCR folosind o pereche de  
9 primeri selectată din grupul care constă din SECV ID NR.-20 și 24 pentru a produce un  
fragment de aproximativ 495 bp, SECV ID NR.: 20 și 25 pentru a produce un fragment de  
11 aproximativ 594 bp, SECV ID NR.: 21 și 24 pentru a produce un fragment de aproximativ  
471 bp și SECV ID Nr.: 21 și 25 pentru a produce un fragment de aproximativ 580 bp;

13 (d) toxina menționată cuprinde o porțiune cu activitate pesticidă a secvenței de  
aminoacizi prezentată în SECV ID NR.: 28;

15 (e) toxina menționată cuprinde o secvență de aminoacizi care are cel puțin  
aproximativ 60% omologie cu o porțiune cu activitate pesticidă a unei secvențe de aminoacizi  
17 selectată din grupul care constă din SECV ID NR.: 11, SECV ID NR.: 13, SECV ID NR.: 15,  
SECV ID NR.: 38 și SECV ID NR.: 43;

19 (f) toxina respectivă este codificată de o secvență de nucleotide care hibridizează în  
condiții stringente cu o secvență de nucleotide selectată din grupul care constă din ADN care  
21 codifică SECV ID NR.: 3, ADN care codifică SECV ID NR.: 5, ADN care codifică SECV ID  
NR.: 7, ADN care codifică SECV ID NR.-32, ADN care codifică SECV ID NR.: 36 și ADN care  
codifică SECV ID NR.: 41;

23 (g) toxina respectivă reacționează imunologic cu un anticorp anti toxină cu  
activitate pesticidă de aproximativ 10-15 kDa sau un fragment al acesteia, de la un izolat de  
25 *Bacillus thuringiensis* selectat din grupul care constă din PS80JJ1 având caracteristicile de  
identificare ale NRRL B-18679, PS149B1 având caracteristicile de identificare ale NRRL B-  
27 21553 și PS167H2 având caracteristicile de identificare ale NRRL B21554;

29 (h) toxina respectivă este codificată de o secvență de nucleotide în care o porțiune  
a secvenței de nucleotide menționată poate fi amplificată prin PCR folosind perechea de  
primeri a SECV ID NR.: 29 și SECV ID KR: 33; și

31 (i) toxina menționată cuprinde o secvență de aminoacizi care are cel puțin 60%  
omologie cu o secvență de aminoacizi selectată din grupul care constă din SECV ID NR.:  
33 3, SECV ID NR.: 5, SECV ID NR.: 7, porțiuni cu activitate pesticidă ale SECV ID NR.: 32,  
porțiuni cu activitate pesticidă ale SECV ID NR.: 36 și porțiuni cu activitate pesticidă ale  
35 SECV ID NR.: 41.

## Modificarea genelor și toxinelor

37 Toxinele și genele utile conform prezentei invenții include, nu numai secvențele de  
lungime totală specific exemplificate, ci și porțiuni și/sau fragmente (inclusiv deleții interne  
39 și/sau terminale în comparație cu moleculele cu lungime totală) ale acestor secvențe/  
variante/mutanți/himere și fuziuni ale acestora. Proteinele din prezenta invenție pot avea  
41 aminoacizi substituiți atâta timp cât păstrează activitatea pesticidă caracteristică proteinelor  
exemplificate specific aici. Genele "variante" au secvențe de nucleotide care codifică  
43 aceleași toxine sau care codifică toxine care au activitate pesticidă echivalentă unei proteine  
exemplificate. Așa cum este utilizat aici, termenul "toxine echivalente" se referă la toxine care  
45 au aceeași sau esențial aceeași activitate biologică împotriva de dăunătorii vizați ca și  
toxinele exemplificate. Așa cum este utilizat aici, referirea la "esențial aceeași" secvență se  
47 face la secvențe care au substituții de aminoacizi, deleții/adiții sau inserții care nu afectează  
material activitatea pesticidă. Fragmentele care păstrează activitatea pesticidă sunt, de  
49 asemenea, incluse în această definiție. Fragmentele și echivalentele care păstrează  
activitatea pesticidă a toxinelor exemplificate vor fi în întinderea prezentei invenții.



# RO 123431 B1

Toxinele echivalente și/sau genele care codifică aceste toxine-echivalente pot fi derivate din izolate de tip spontan sau recombinante și/sau din alte organisme de tip spontan sau recombinante folosind învățăături furnizate aici. Alte specii de *Bacillus*, de exemplu, pot fi utilizate drept izolate sursă.

Variațiile de gene pot fi ușor construite folosind tehnici standard, pentru a face de exemplu mutații punctiforme. De asemenea, brevetul **US 5605793** de exemplu, descrie metode pentru obținerea unei diversități moleculare suplimentară prin folosirea adunării ADN după fragmentare aleatoare. Genele variante pot fi utilizate pentru producerea de proteine variante; gazdele recombinante pot fi folosite pentru a produce proteine variante. Fragmentele de gene cu lungime totală pot fi realizate utilizând exonucleaze sau endonucleaze disponibile comercial, conform procedurilor standard. De exemplu, enzimele cum ar fi Bal31 sau poate fi folosită mutagenază direcționată pe situs pentru a decupa nucleotide de la capetele acestor gene. De asemenea, genele care codifică fragmente active pot fi obținute folosind o diversitate de enzime de restricție. Proteazele pot fi folosite pentru a obține direct fragmente active ale acestor toxine.

Există un număr de metode pentru obținerea toxinelor cu activitate pesticidă ale prezentei invenții. De exemplu, anticorpii anti toxinelor cu activitate pesticidă descrise și revendicate aici pot fi folosiți pentru a identifica și izola alte toxine dintr-un amestec de proteine, în mod specific, anticorpii pot fi crescuți la porțiunile toxinelor care sunt cel mai constante și distincte din alte toxine *B. f.* Acești anticorpi pot fi apoi folosiți pentru a identifica, în mod specific, toxine echivalente cu activitate caracteristică prin imunoprecipitare, test cu anticorpi adsorbiți legați de enzime (ELISA) sau Western blotting. Anticorpii anti toxinelor dezvoltate aici, sau ai toxinelor echivalente, sau ale fragmentelor acestor toxine, pot fi preparați ușor folosind proceduri standard. Genele care codifică aceste toxine pot fi apoi obținute din microorganismul sursă.

Datorită redundanței codului genetic, o varietate de secvențe ADN diferite pot codifica secvențele de aminoacizi prezentate aici. Un specialist din domeniu poate crea aceste secvențe ADN alternative care codifică aceleași, sau esențial aceleași toxine. Aceste secvențe ADN variante sunt în întinderea prezentei invenții.

Anumite toxine ale prezentei invenții au fost exemplificate în mod specific aici. Deoarece aceste toxine sunt doar exemple ale toxinelor prezentei invenții, ar trebui să fie evident faptul că prezenta invenție cuprinde toxine variante sau echivalente (și secvențe de nucleotide care codifică toxinele echivalente) care au aceeași activitate pesticidă sau activitate pesticidă similară cu toxina exemplificată. Toxinele echivalente vor avea similaritate de aminoacizi (și/sau omologie) cu o toxină exemplificată. Identitatea de aminoacizi va fi în mod obișnuit mai mare de 60%, de preferință mai mare de 75%, și mai preferat mai mare de 80%, chiar și mai preferat mai mare de 90%, și poate fi mai mare de 95%. Polinucleotidele și proteinele preferate ale prezentei invenții pot fi, de asemenea, definite în termeni de identitate mai specifică și/sau domenii de similaritate. De exemplu, identitatea și/sau similaritatea pot fi 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 sau 99% comparativ cu o secvență exemplificată aici. Dacă nu se specifică altfel, așa cum este utilizat aici, procentul de identitate a secvenței și/sau similaritatea a doi acizi nucleici este determinat folosind algoritmul lui Karlin și Altschul (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-2268, modificat ca în Karlin și Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877. Un asemenea algoritm este încorporat în programele NBIASST și XBLAST ale lui Altschul și col. (1990), J. Mol. Biol. 215: 402-410.

# RO 123431 B1

1 Căutările de nucleotide BLAST sunt realizate cu programul NBLAST, scor=100, lungime  
cuvânt=12, pentru a obține secvențe de nucleotide cu procentul de identitate dorit. Pentru  
3 a obține alinieri întrerupte în scopuri comparative, se folosește Gapped BLAST așa cum este  
descriș în Altschul și col. (1997) Nucl. Acids Res. 25: 3389-3402. Atunci când se utilizează  
5 programele BLAST și Gapped Blast, sunt folosiți parametrii implicați ai programelor respective  
(NBLAST și XBLAST). A se vedea <http://www.ncbi.nih.gov>. Scorurile pot fi de asemenea  
7 calculate folosind metodele și algoritmiul lui Crickmore și col. așa cum este descriș mai sus.

Omologia aminoacizilor va fi cea mai ridicată în regiunile critice ale toxine care  
9 contează pentru activitatea biologică sau sunt implicate în determinarea configurației tri-  
dimensionale care, în ultimă instanță, este răspunzătoare pentru activitatea biologică. În  
11 această privință, sunt acceptabile anumite substituții de aminoacizi și pot fi de așteptat dacă  
aceste substituții sunt în regiuni care nu sunt critice pentru activitatea sau sunt substituții  
13 conservatoare de aminoacizi care nu afectează configurația tri-dimensională a moleculei. De  
exemplu, aminoacizii pot fi plasați în clasele următoare: non-polari, neîncărcați polar, bazici  
15 și acizi. Substituțiile conservatoare atunci când un aminoacid dintr-o clasă este înlocuit cu  
alt aminoacid de același tip sunt în întinderea prezentei invenției atâta timp cât substituția nu  
17 modifică material activitatea biologică a compusului. Tabelul 2 prezintă o listă de exemple  
de aminoacizi care aparțin fiecărei clase.

Tabelul 2

Clasa de aminoacid	Exemple de aminoacizi
Non-polari	Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, pHe, Trp
Neîncărcați polar	Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gin
Acizi	Asp, Glu
Bazici	Lys, Arg, His

27 În anumite exemple, se pot face de asemenea substituții neconservatoare. Factorul  
critic este acela că aceste substituții nu trebuie să devieze semnificativ de la activitatea  
29 biologică a toxinei.

Așa cum este folosit aici, referirea la polinucleotide "izolate" și/sau toxine "purificate"  
31 se referă la acele molecule atunci când ele nu sunt asociate cu alte molecule cu care ele ar  
fi găsite în natură; acești termeni vor include utilizarea lor în plante, astfel, referirea la  
33 "izolate" și/sau purificate semnifică implicarea mâinii omenești, așa cum s-a descriș aici.

Genele sintetice care sunt funcționale echivalent cu toxinele prezentei invenției pot fi  
35 de asemenea utilizate pentru a transforma gazdele. Metodele pentru producerea de gene  
sintetice pot fi găsite, de exemplu, în brevetul **US 5380831**.

## Gazde transgenice

Genele care codifică toxinele prezentei invenției pot fi introduse într-o largă varietate  
39 de gazde microbiene sau vegetale. În alcătuirile preferate, expresia genei toxinei are ca  
urmare direct sau indirect, producerea intracelulară și menținerea proteinelor cu activitate  
41 pesticidă. Atunci când celulele gazdă transgenice/recombinante/transformate sunt ingerate  
de dăunători, dăunătorii vor ingera toxina. Acesta este modul preferat în care se realizează  
43 contactul dintre dăunător și toxină. Rezultatul este un control (uciderea sau îmbolnăvirea)  
dăunătorului. Alternativ, pot fi aplicate zonei dăunătorilor, unde unele pot prolifera și sunt  
45 ingerate de dăunătorii vizați, gazde microbiene adecvate, de exemplu *Pseudomonas* cum  
ar fi *P. Fluorescens*. Microbul care găzduiește gena toxinei poate fi tratat în condiții care  
47 prelungesc activitatea toxinei și stabilizează celula. Celula tratată, care păstrează activitatea  
toxică, poate fi apoi aplicată mediului dăunătorului vizat.

# RO 123431 B1

În variante preferate, sunt utilizate plante și celule recombinante de plante. Plantele preferate (și celulele de plante) sunt cerealele și/sau porumbul.	1
Acolo unde gena toxinei de <i>B.t.</i> este introdusă într-o gazdă microbiană prin intermediul unui vector adecvat, și gazda menționată este aplicată mediului într-o stare <i>in vivo</i> , trebuie utilizați anumiți microbi gazdă. Gazdele microorganismelor care sunt selectate sunt cunoscute ca ocupând "fitosfera" (filoplanul, filosfera, rizosfera și/sau-rizoplanul) uneia sau mai multora culturi de interes. Aceste microorganismele sunt selectate astfel încât să fie capabile să concureze cu succes în mediul particular (cultură și alte habitaturi ale insectelor) cu microorganismele de tip spontan, să asigure menținerea stabilă și expresia genei care exprimă pesticidul polipeptidic și este de dorit, să asigure protecție îmbunătățită a pesticidului față de degradarea și inactivarea mediului.	3 5 7 9 11
Este cunoscut un număr mare de microorganismele care trăiesc în filoplan (suprafața frunzei plantelor) și/sau rizosferă (solul care înconjoară rădăcinile plantelor) a unei mari varietăți de culturi importante. Aceste microorganismele includ bacterii, alge și ciuperci. De un interes particular sunt microorganismele cum ar fi bacteriile, de exemplu genurile <i>Pseudomonas</i> , <i>Erwinia</i> , <i>Serratia</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Xanthomonas</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Rhodopseudomonas</i> , <i>Methylophilus</i> , <i>Agrobacterium</i> , <i>Acetobacter</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Azotobacter</i> , <i>Leuconostoc</i> și <i>Alcaligenes</i> ; ciuperci, în particular drojdii, de exemplu genurile <i>Saccharomyces</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Kluyveromyces</i> , <i>Sporobolomyces</i> , <i>Rhodotorula</i> și <i>Aureobasidium</i> . De interes particular sunt acele specii de bacterii din fitosferă cum ar fi <i>Pseudomonas syringae</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Acetobacter xylinum</i> , <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , <i>Rhodopseudomonas spheroides</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> , <i>Rhizobium melioli</i> , <i>Alcaligenes entrophus</i> și <i>Azotobacter vinlandii</i> ; și specii de drojdii din fitosferă cum ar fi <i>Rhodotorula rubra</i> , <i>R. glutinis</i> , <i>R. marina</i> , <i>R. aurantiaca</i> , <i>Cryptococcus albidus</i> , <i>C. diffluens</i> , <i>C. laurentii</i> , <i>Saccharomyces rosei</i> , <i>S. pretoriensis</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>Sporobolomyces roseus</i> , <i>S. odoros</i> , <i>Kluyveromyces veronae</i> și <i>Aureobasidium pollulans</i> . De interes particular sunt microorganismele pigmentate.	13 15 17 19 21 23 25 27
O largă varietate de căi sunt disponibile pentru introducerea unei gene <i>B.t.</i> care codifică o toxină, în gazda vizată, în condiții care permit o menținere stabilă și expresia genei. Aceste metode sunt binecunoscute specialiștilor din domeniu și sunt descrise, de exemplu, în brevetul <b>US 5135867</b> , care este încorporat aici prin referință.	29 31
<b>Tratarea celulelor</b>	
Așa cum s-a menționat mai sus, celulele <i>B.t.</i> sau recombinante care exprimă o toxină <i>B.t.</i> pot fi tratate pentru a prelungi activitatea toxinei și pentru a stabiliza celula. Microcapsula de pesticid care se formează cuprinde toxina <i>B.t.</i> Într-o structură celulară care a fost stabilizată și va proteja toxina atunci când microcapsula este aplicată mediului dăunătorului vizat. Celulele gazdă adecvate includ atât procariote cât și eucariote, fiind limitate în mod normal la acele celule care nu produc substanțe toxice organismelor superioare, cum ar fi mamiferele. Totuși, organismele care produc substanțe toxice pentru organismele superioare pot fi folosite, acolo unde substanțele toxice sunt instabile sau nivelul de aplicare suficient de redus astfel încât să se evite posibilitatea de toxicitate pentru o gazdă mamifer. Drept gazde de interes, în particular vor fi procariotele și eucariotele inferioare, cum ar fi ciupercile.	33 35 37 39 41
Celulele vor fi, în mod obișnuit, intacte și vor fi substanțial în formă proliferativă atunci când vor fi tratate, doar în formă de spori, deși doar în anumite situații pot fi utilizați sporii.	43
Tratarea celulei microbiene, de exemplu un microb care conține gena toxinei <i>B.t.</i> poate fi făcută prin mijloace chimice sau fizice, sau printr-o combinație de mijloace fizice și/sau chimice, atâta timp cât tehnica nu afectează negativ proprietățile toxinei, nici nu diminuează capacitatea celulară de protecție a toxinei. Exemple de reactanți chimici sunt	45 47

1 agenții de halogenare, în particular halogenii cu număr atomic 17-80. Mai particular, poate  
2 fi folosit iod în condiții slabe și suficient timp pentru a realiza rezultatele dorite. Alte tehnici  
3 adecvate includ tratamentul cu aldehide, cum ar fi glutaraldehida; anti-infecțioase cum ar fi  
4 clorură de zefiran și clorură de cetilpiridin; alcooli, cum ar fi izopropil și etanol; diverși fixativi  
5 histologici, cum ar fi iod Lugol, fixativ Bouin, diverși acizi și fixativ Helly (a se vedea  
6 Humason, Gretchen L., Animal Tissue Techniques, W.H. Freeman și compania, 1967); sau  
7 o combinație de agenți fizici (căldura) și chimici care păstrează și prelungesc activitatea  
8 toxinei produsă în celulă atunci când celula este administrată mediului gazdă. Exemplu de  
9 mijloace fizice sunt radiația cu lungime de undă joasă, cum ar fi radiația gamma și radiația  
10 X, înghețarea, iradierea cu UV, liofilizarea și altele asemănătoare. Metodele pentru tratarea  
11 celulelor microbiene sunt prezentate în brevetele **US 4695455** și **4695462**, care sunt  
12 încorporate aici prin referință.

13 Celulele vor avea, în general, stabilitate structurală îmbunătățită ceea ce va  
14 îmbunătăți rezistența la condiții de mediu. Acolo unde pesticidul este într-o formă prematură,  
15 metoda de tratare a celulei trebuie selectată astfel încât să nu inhibe procesarea formei  
16 premature către forma matură a pesticidului prin patogenul dăunătorului vizat. De exemplu,  
17 formaldehida va lega proteine și ar putea inhiba procesarea formei premature a unui pesticid  
18 polipeptidic. Metoda de tratament trebuie să rețină cel puțin o porțiune substanțială din bio-  
19 disponibilitatea sau bio-activitatea toxinei.

20 Caracteristicile de interes particular în selectarea unei celule gazdă în scopul  
21 producției, includ ușurința introducerii genei *B.t.* în gazdă, disponibilitatea sistemelor de  
22 expresie, eficacitatea expresiei, stabilitatea pesticidului în gazdă și prezența capacităților  
23 genetice auxiliare. Caracteristicile de interes pentru utilizarea ca microcapsulă de pesticid  
24 includ calități protectoare pentru pesticid, cum ar fi pereți celulari groși, pigmentare și  
25 împachetare intracelulară sau formarea de corpuri de incluziune; supraviețuirea în medii  
26 apoase; lipsa toxicității față de mamifere; să fie atractive pentru dăunători în scopul ingestiei;  
27 ușurința de a ucide și fixare fără deteriorarea toxinei; și altele asemănătoare. Alte considerații  
28 includ ușurința formulării și manipulării, considerente economice, stabilitate de stocare și  
29 altele asemănătoare.

### **Creșterea celulelor**

30 Gazda celulară care conține gena insecticid *B.t.* poate fi crescută în orice mediu  
31 nutritiv convenabil, de preferință acolo unde construcția ADN asigură un avantaj selectiv,  
32 asigurând un mediu selectiv astfel încât substanțial toate sau chiar toate celulele păstreze  
33 gena *B.t.*. Aceste celule pot fi apoi recoltate în conformitate cu modurile convenționale. În  
34 mod alternativ, celulele pot fi tratate anterior recoltării.

35 Celulele *B.t.* ale invenției pot fi cultivate folosind medii și tehnici de fermentare  
36 standard în domeniu. La completarea ciclului de fermentare, bacteriile pot fi recoltate,  
37 separând mai întâi sporii *B.t.* și cristalele din bulionul de fermentare prin mijloace  
38 binecunoscute în domeniu. Sporii *B.t.* recuperați și cristalele pot fi formulate într-o pudră care  
39 prezintă capacitate de umezire, concentrat lichid, granule sau alte formulări prin adăugarea  
40 de surfactanți, dispersanți, purtători inerti și alte componente pentru a facilita manipularea  
41 și aplicarea pentru dăunători vizați particulari. Aceste formulări și proceduri de aplicare sunt  
42 binecunoscute în domeniu.

43 Formulări. Granulele formulate sub formă de momeală care conțin un element care  
44 le face atractive și spori și cristale de izolate *B.t.*, sau microbi recombinanți care cuprind  
45 genele ce pot fi obținute din izolate *B.t.* dezvoltate aici, pot fi aplicate pe sol. Produsul for-  
46 mulat poate fi, de asemenea, aplicat sub formă de înveliș al seminței sau tratament al  
47 rădăcinilor sau tratament total al plantei în stadii târzii ale ciclului de cultură. Tratamentele  
48 plantei și ale solului cu celule *B.t.* pot fi utilizate ca pudre cu capacitate de umezire, granule

# RO 123431 B1

sau prafuri, prin amestecarea cu diverse materiale inerte, cum ar fi minerale anorganice (filosilicați, carbonați, sulfați, fosfați și altele asemănătoare) sau materiale botanice (coceni măcinați, coji de orez, coji de nucă, și altele asemănătoare). Formulările pot include adjuvanți de împrăștiere și aderență, agenți de stabilizare alți aditivi cu activitate pesticidă, sau surfactanți. Formulările lichide pot fi apoase sau neapoase și utilizate ca spume, geluri, suspensii, concentrate emulsifiabile sau-altele asemănătoare. Ingredientele pot include agenți reologici, surfactanți, emulsifianți, dispersanți sau polimeri.

Așa cum va fi apreciat de către un specialist în domeniu, concentrația cu activitate pesticidă va putea varia larg în funcție de natura specifică a formulării, în particular dacă este un concentrat sau dacă se va utiliza direct. Pesticidul va fi prezent în cel puțin 1% în greutate și poate fi de 100% în greutate. Formulările uscate vor avea aproximativ 1-95% în greutate din pesticid în timp ce formulările lichide vor fi în general de aproximativ 1-60% în greutate din solide în fază lichidă. Formulările vor avea, în general, de la aproximativ  $10^2$  până la aproximativ  $10^4$  celule/mg. Aceste formulări vor fi administrate aproximativ 50 mg (lichid sau uscat) până la 1 kg sau mai mult la hectar.

Formulările pot fi aplicate mediului dăunătorului, de exemplu sol sau frunze, prin pulverizare, prăfuire, stropire sau altele asemănătoare.

## Mutanți

Mutanții izolatelor invenției pot fi realizați prin proceduri binecunoscute în domeniu. De exemplu, un mutant nesporogen poate fi obținut prin mutageneză cu etilmetan sulfonat (EMS) a unui izolat. Mutanții pot fi realizați folosind lumină ultravioletă și nitrozoguanidină prin proceduri binecunoscute în domeniu.

Un mic procent din mutanții nesporogeni vor rămâne intacti și nu vor liza pe perioade extinse de fermentație; aceste tulpini sunt desemnate liză minus (-). Tulpinile liză minus pot fi identificate prin sortarea mutanților nesporogeni în medii în recipiente agitate și selectarea acelor mutanți care sunt încă intacti și conțin cristalele de toxină la sfârșitul fermentației. Tulpinile liză minus sunt adecvate pentru un proces de tratare a celulelor care va produce o proteină de toxină, încapsulată, protejată.

Pentru a prepara o variantă rezistentă a fagului mutantului nesporogen menționat, o parte alicotă a lizatului fagului este împrăștiată pe agar nutritiv și este lăsat să se usuce. O alicotă a tulpinei bacteriene-sensibilă a fagului este apoi pusă direct peste lizatul uscat și este lăsată să se usuce. Plăcile sunt incubate la 30°C. Plăcile sunt incubate timp de 2 zile și, în acel moment, pe agar pot fi văzute crescând numeroase colonii. Unele dintre aceste colonii sunt adunate și subcultivate pe plăci de agar nutritiv. Aceste culturi aparent rezistente sunt testate la rezistență prin încrucișare cu lizatul de fag. O linie a lizatului fagului este întinsă pe placă și lăsată să se usuce. Culturile prezumtiv rezistente sunt întinse apoi încrucișat peste linia de fag. Culturile bacteriene rezistente nu vor prezenta liză nicăieri în linia încrucișată cu linia de fag după incubarea peste noapte la 30°C. Rezistența la fag este apoi reconfirmată prin placarea unui strat de cultură rezistentă pe o placă de agar nutritiv. Tulpina sensibilă este, de asemenea, placată în același mod, pentru a servi drept control pozitiv. După uscare, o picătură din lizatul de fag este plasată în centrul plăcii și lăsată să se usuce. Culturile rezistente nu au prezentat liză în zona unde lizatul de fag a fost plasat, după incubarea la 30°C timp de 24 h.

În continuare, se prezintă 28 de exemple de realizare a invenției, în legătură cu figurile și secvențele care reprezintă:

Fig. 1 arată trei exemple de toxine cu activitate pesticidă, de 43-47 kDa cât și o secvență de consens pentru aceste toxine cu activitate pesticidă.

Fig. 2 arată relațiile dintre secvențele de 14 și 45 kDa ale PS80JJ1 (SECV ID NR.: 31 și 10).

# RO 123431 B1

- 1 Fig. 3 arată o comparație a valorilor  $LC_{50}$  pentru studiul de amestec din exemplul 23.  
2 Fig. 4 arată alinierea proteinelor ale toxinelor și genelor de *Bacillus sphaericus* de 51  
3 și 42 kDa și genele și gena și toxina 149B1 de 45 kDa.  
4 Fig. 5 arată alinierea secvenței de nucleotide a toxinelor și genelor de *Bacillus*  
5 *sphaericus* de 51 și 42 kDa și toxina și gena 149B1 de 45 kDa.  
6 SECV ID NR.: 1 este o secvență N-terminală de 5 aminoacizi a toxinei de 80JJ1 de  
7 aproximativ 45 kDa.  
8 SECV ID NR.: 2 este o secvență N-terminală de 25 aminoacizi a toxinei de 80JJ1 de  
9 aproximativ 45 kDa.  
10 SECV ID NR.: 3 este o secvență N-terminală de 24 aminoacizi a toxinei de 80JJ1 de  
11 aproximativ 14 kDa.  
12 SECV ID NR.: 4 este o secvență N-terminală a toxinei de 149B1 de aproximativ 47  
13 kDa.  
14 SECV ID NR.: 5 este o secvență de aminoacizi N-terminală având 50 aminoacizi  
15 pentru proteina purificată de aproximativ 14 kDa din PS149B1.  
16 SECV ID NR.: 6 este o secvență N-terminală a toxinei din 167H2 de aproximativ 47  
17 kDa.  
18 SECV ID NR.: 7 este o secvență N-terminală de 25 aminoacizi pentru proteina  
19 purificată din PS167H2 de aproximativ 14 kDa.  
20 SECV ID NR.: 8 este o probă de oligonucleotidă pentru gena care codifică toxina  
21 PS80JJ1 de 44.3 kDa și este un primer cap-coadă pentru PS149B1 și PS167H2 folosit  
22 conform prezentei invenții.  
23 SECV ID NR.: 9 este un primer coadă-cap pentru PS149B1 și PS167H2 folosit  
24 conform prezentei invenții.  
25 SECV ID NR.: 10 este secvența de nucleotide a genei care codifică toxina PS80JJ1  
26 de aproximativ 45 kDa.  
27 SECV ID NR.: 11 este secvența de aminoacizi pentru toxina PS80JJ1 de aproximativ  
28 45 kDa.  
29 SECV ID NR.: 12 este secvența parțială de nucleotide a genei care codifică toxina  
30 PS149E1 de aproximativ 44 kDa.  
31 SECV ID NR.: 13 este secvența parțială de aminoacizi pentru toxina PS149B1 de  
32 aproximativ 44 kDa.  
33 SECV ID NR.: 14 este secvența parțială de nucleotide a genei care codifică toxina  
34 PS167H2 de aproximativ 44 kDa.  
35 SECV ID NR.: 15 este secvența parțială de aminoacizi pentru toxina PS167H2 de  
36 aproximativ 44 kDa.  
37 SECV ID NR.: 16 este o secvență de peptide utilizată în configurație de primer  
38 conform prezentei invenții.  
39 SECV ID NR.: 17 este o secvență de peptide utilizată în configurație de primer  
40 conform prezentei invenții.  
41 SECV ID NR.: 18 este o secvență de peptide utilizată în configurație de primer  
42 conform prezentei invenții.  
43 SECV ID NR.: 19 este o secvență de peptide utilizată în configurație de primer  
44 conform prezentei invenții.  
45 SECV ID NR.: 20 este o secvență de nucleotide care corespunde peptidei din SECV  
46 ID NR.: 16.  
47 SECV ID NR.: 21 este o secvență de nucleotide care corespunde peptidei din SECV  
ID NR.: 17.

# RO 123431 B1

SECV ID NR.: 22 este o secvență de nucleotide care corespunde-peptidei din SECV ID NR.: 18.	1
SECV ID NR.: 23 este o secvență de nucleotide care corespunde peptidei din SECV ID NR.: 19.	3
SECV ID NR.: 24 este un primer coadă-cap bazat pe complementul invers din SECV ID NR.: 22	5
SECV ID NR.: 25 este un primer coadă-cap bazat pe complementul invers din SECV ID NR.: 23.	7
SECV ID NR.: 26 este un primer cap-coadă bazat pe toxina PS80JJ1 de 44.3 kDa.	9
SECV ID NR.: 27 este un primer coadă-cap bazat pe toxina PS80JJ1 de 44.3 kDa.	
SECV ID NR.: 28 este o secvență generică care reprezintă o nouă clasă de toxine conform prezentei invenții.	11
SECV ID NR.: 29 este o probă de oligonucleotidă utilizată conform prezentei invenții.	13
SECV ID NR.: 30 este secvența de nucleotide a întregului loc genetic care conține cadre de citire deschise ale ambelor toxine PS80JJ1 de 14 și 45 kDa și secvențele de nucleotide de flancare.	15
SECV ID NR.: 31 este secvența de nucleotide a cadrului de citire deschis a toxinei PS80JJ1 de 14 kDa.	17
SECV ID NR.: 32 este secvența de aminoacizi dedusă a toxinei PS80JJ1 de 14 kDa.	19
SECV ID NR.: 33 este un primer coadă-cap oligonucleotidă utilizat conform prezentei invenții.	21
SECV ID NR.: 34 este secvența de nucleotide a întregului locus genetic care conține cadre de citire deschise ale ambelor toxine PS167H2 de 14 și 44 kDa și secvențele de nucleotide de flancare.	23
SECV ID NR.: 35 este secvența de nucleotide a genei care codifică toxina PS167H2 de aproximativ 14 kDa.	25
SECV ID NR.: 36 este secvența de aminoacizi pentru toxina PS167H2 de aproximativ 14 kDa.	27
SECV ID NR.: 37 este secvența de nucleotide a genei care codifică-toxina PS167H2 de aproximativ 44 kDa.	29
SECV ID NR.: 38 este secvența de nucleotide pentru toxina PS167H2 de aproximativ 44 kDa.	31
SECV ID NR.: 39 este secvența de nucleotide a întregului locus genetic care conține cadre de citire deschise ale ambelor toxine PS149B1 de 14 și 44 kDa și secvențele de nucleotide de flancare.	33
SECV ID NR.: 40 este secvența de nucleotide a genei care codifică toxina PS149B1 de aproximativ 14 kDa.	35
SECV ID NR.: 41 este secvența de aminoacizi pentru toxina PS149B1 de aproximativ 14 kDa.	37
SECV ID NR.: 42 este secvența de nucleotide a genei care codifică toxina PS149B1 de aproximativ 44 kDa.	39
SECV ID NR.: 43 este secvența de aminoacizi pentru toxina PS149B1 de aproximativ 44 kDa.	41
SECV ID NR.: 44 este o secvență de genă optimizată pentru porumb care codifică toxina de aproximativ 14 kDa a 80JJ1.	43
SECV ID NR.: 45 este o secvență de genă optimizată pentru porumb care codifică toxina de aproximativ 44 kDa a 80JJ1.	45
SECV ID NR.: 46 este secvența de ADN a unui primer coadă-cap utilizat în exemplul 15 de mai jos.	47
	49

# RO 123431 B1

- 1           SECV ID NR.: 47 este secvența de ADN a unui primer cap-coadă (vezi exemplul 16).  
2           SECV ID NR.: 48 este secvența de ADN a unui primer coadă-cap (vezi exemplul 16).
- 3           SECV ID NR.: 49 este secvența de ADN a unui primer cap-coadă (vezi exemplul 16).  
4           SECV ID NR.: 50 este secvența de ADN a unui primer coadă-cap (vezi exemplul 16).
- 5           SECV ID NR.: 51 este secvența ADN din PS131W2 care codifică proteina de 14 kDa.  
6           SECV ID NR.: 52 este secvența de aminoacizi a proteinei de 14 kDa a PS131W2.
- 7           SECV ID NR.: 53 este o secvență parțială de ACN din PS131W2 pentru proteina de  
8           44 kDa.
- 9           SECV ID NR.: 54 este o secvență parțială de aminoacizi pentru proteina de 44 kDa  
10          a PS131W2.
- 11          SECV ID NR.: 55 este secvența de ADN din PS158T3 care codifică proteina de  
12          14 kDa.
- 13          SECV ID NR.: 56 este secvența de aminoacizi a proteinei de 14 kDa a PS158T3.  
14          SECV ID NR.: 57 este o secvență parțială de ADN din PS158T3 pentru proteina de
- 15          44 kDa.
- 16          SECV ID NR.: 58 este o secvență parțială de aminoacizi pentru proteina de 44 kDa  
17          a PS158T3.
- 18          SECV ID NR.: 59 este secvența de ADN din PS158X10 care codifică proteina de
- 19          14 kDa.
- 20          SECV ID NR.: 60 este secvența de aminoacizi a proteinei de 14 kDa a PS158X10.
- 21          SECV ID NR.: 61 este secvența de ACN din PS185FF care codifică proteina de  
22          14 kDa.
- 23          SECV ID NR.: 62 este secvența de aminoacizi a proteinei de 14 kDa a PS185FF.  
24          SECV ID NR.: 63 este o secvență parțială de ADN din PS185FF pentru proteina de
- 25          44 kDa.
- 26          SECV ID NR.: 64 este o secvență parțială de aminoacizi pentru proteina de 44 kDa  
27          a PS185FF.
- 28          SECV ID NR.: 65 este secvența de ADN din PS185GG care codifică proteina de
- 29          14 kDa.
- 30          SECV ID NR.: 66 este secvența de aminoacizi a proteinei de 14 kDa a PS185GG.
- 31          SECV ID NR.: 67 este secvența de ADN din PS185GG pentru proteina de 44 kDa.  
32          SECV ID NR.: 68 este secvența de aminoacizi pentru proteina de 44 kDa a
- 33          PS185GG.
- 34          SECV ID NR.: 69 este secvența de ADN din PS185L12 care codifică proteina de
- 35          14 kDa.
- 36          SECV ID NR.: 70 este secvența de aminoacizi a proteinei de 14 kDa a PS185L12.
- 37          SECV ID NR.: 71 este secvența de AEN din PS185W3 care codifică proteina de  
38          14 kDa.
- 39          SECV ID NR.: 72 este secvența de aminoacizi a proteinei de 14 kDa a PS185W3.  
40          SECV ID NR.: 73 este secvența de A32J din PS186FF care codifică proteina de
- 41          14 kDa.
- 42          SECV ID NR.: 74 este secvența de aminoacizi a proteinei de 14 kDa a PS186FF.
- 43          SECV ID NR.: 75 este secvența de MW din PS187F3 care codifică proteina de  
44          14 kDa.
- 45          SECV ID NR.: 76 este secvența de aminoacizi a proteinei de 14 kDa a PS187F3.  
46          SECV ID NR.: 77 este o secvență parțială de ADN din PS187F3 pentru proteina
- 47          de 44 kDa.
- 48          SECV ID NR.: 78 este o secvență parțială de aminoacizi pentru proteina de 44 kDa  
49          a PS187F3.



# RO 123431 B1

SECV ID NR.: 79 este secvența de MN din PS187G1 care codifică proteina de 14 kDa.	1
SECV ID NR.: 80 este secvența de aminoacizi a proteinei de 14 kDa a PS187G1.	3
SECV ID NR.: 81 este o secvență parțială de ADN din PS187G1 pentru proteina de 44 kDa.	5
SECV ID NR.: 82 este o secvență parțială de aminoacizi pentru proteina de 44 kDa a PS187G1.	7
SECV ID NR.: 83 este secvența de ADN din PS187L14 care codifică proteina de 14 kDa.	9
SECV ID NR.: 84 este secvența de aminoacizi a proteinei de 14 kDa a PS187L14.	
SECV ID NR.: 85 este o secvență parțială de ADN din PS187L14 pentru proteina de 44 kDa.	11
SECV ID NR.: 86 este o secvență parțială de aminoacizi pentru proteina de 44 kDa a PS187L14.	13
SECV ID NR.: 87 este secvența de ADN din PS187Y2 care codifică proteina de 14 kDa.	15
SECV ID NR.: 88 este secvența de aminoacizi a proteinei de 14 kDa a PS187Y2.	17
SECV ID NR.: 89 este o secvență parțială de ADN din PS187Y2 pentru proteina de 44 kDa.	19
SECV ID NR.: 90 este o secvență parțială de ADN pentru proteina de 44 kDa a PS187Y2.	21
SECV ID NR.: 91 este secvența de ADN din PS201G care codifică proteina de 14 kDa.	23
SECV ID NR.: 92 este secvența de aminoacizi a proteinei de 14 kDa a PS201G.	
SECV ID NR.: 93 este secvența ADN din PS201HH care codifică proteina de 14 kDa.	25
SECV ID NR.: 94 este secvența de aminoacizi a proteinei de 14 kDa a PS201HH.	
SECV ID NR.: 95 este secvența de ADN din PS201L3 care codifică proteina de 14 kDa.	27
SECV ID NR.: 96 este secvența de aminoacizi a proteinei de 14 kDa a PS201L3.	29
SECV ID NR.: 97 este secvența de ADN din PS204C3 care codifică proteina de 14 kDa.	31
SECV ID NR.: 98 este secvența de aminoacizi a proteinei de 14 kDa a PS204C3.	
SECV ID NR.: 99 este secvența de ADN din PS204G4 care codifică proteina de 14 kDa.	33
SECV ID NR.: 100 este secvența de aminoacizi a proteinei de 14 kDa a PS204G4.	35
SECV ID NR.: 101 este secvența de ADN din PS204I11 care codifică proteina de 14 kDa.	37
SECV ID NR.: 102 este secvența de aminoacizi a proteinei de 14 kDa a PS204I11.	
SECV ID NR.: 103 este secvența de ADN din PS204J7 care codifică proteina de 14 kDa.	39
SECV ID NR.: 104 este secvența de aminoacizi a proteinei de 14 kDa a PS204J7.	41
SECV ID NR.: 105 este secvența de SDN din PS236B6 care codifică proteina de 14 kDa.	43
SECV ID NR.: 106 este secvența de aminoacizi a proteinei de 14 kDa a PS236B6.	
SECV ID NR.: 107 este secvența de MW din PS242K10 care codifică proteina de 14 kDa.	45
SECV ID NR.: 108 este secvența de aminoacizi a proteinei de 14 kDa a PS242KL0.	47
SECV ID NR.: 109 este o secvență parțială de ADN din PS242K10 pentru proteina de 44 kDa.	49

# RO 123431 B1

- 1           SECV ID NR.: 110 este o secvență parțială de aminoacizi pentru proteina de 44 kDa  
a PS242K10.
- 3           SECV ID NR.: 111 este secvența de ADN din PS246P42 care codifică proteina de  
14 kDa.
- 5           SECV ID NR.: 112 este secvența de aminoacizi a proteinei de 14 kDa a PS246P42.  
SECV ID NR.: 113 este secvența de AEN din PS69Q care codifica proteina de  
7           14 kDa.
- SECV ID NR.: 114 este secvența de aminoacizi a proteinei de 14 kDa a PS69Q.
- 9           SECV ID NR.: 115 este secvența de ADN din PS69Q pentru proteina de 44 kDa.  
SECV ID NR.: 116 este secvența de aminoacizi pentru proteina de 44 kDa a PS69Q.
- 11          SECV ID NR.: 117 este secvența de ADN pentru KB54 care codifică proteina de  
14 kDa.
- 13          SECV ID NR.: 118 este secvența de aminoacizi a proteinei de 14 kDa a KB54.  
SECV ID NR.: 119 este secvența de AEN din KR1209 care codifică proteina de  
15          14 kDa.
- SECV ID NR.: 120 este secvența de aminoacizi a proteinei de 14 kDa a KR1209.
- 17          SECV ID NR.: 121 este secvența de ADN din KR1369 care codifică proteina de  
14 kDa.
- 19          SECV ID NR.: 122 este secvența de aminoacizi a proteinei de 14 kDa a KR1369.  
SECV ID NR.: 123 este secvența de ADN din KR589 care codifică proteina de  
21          14 kDa.
- SECV ID NR.: 124 este secvența de aminoacizi a proteinei de 14 kDa a KR589.
- 23          SECV ID NR.: 125 este o secvență parțială de ADN din KR589 pentru proteina de  
44 kDa.
- 25          SECV ID NR.: 126 este o secvență parțială de aminoacizi pentru proteina de 44 kDa  
a KR589.
- 27          SECV ID NR.: 127 este o secvență de polinucleotide pentru o genă desemnată  
149B1-15-P0, care este optimizată pentru expresia în *Zea mays*. Această genă codifică o  
29          toxină de aproximativ 15 kDa ce poate fi obținută din PS149B1 care este dezvăluită în  
**WO 97/40162**.
- 31          SECV ID NR.: 128 este o secvență de polinucleotide pentru o genă desemnată  
149B1-45-PO, care este optimizată pentru expresia în *Zea mays*. Această genă codifică o  
33          toxină de aproximativ 45 kDa ce poate fi obținută din PS149B1 care este dezvăluită în  
**WO 97/40162**.
- 35          SECV ID NR.: 129 este o secvență de polinucleotide pentru o genă desemnată  
80JJ1-15-PO7, care este optimizată pentru expresia în porumb. Aceasta este o genă  
37          alternativă care codifică o toxină de aproximativ 15 kDa.
- SECV ID NR.; 130 este o secvență de aminoacizi pentru o toxină codificată de gena  
39          desemnată 80JJ1-15-PO7.
- SECV ID NR.: 131 este un primer oligonucleotidă (15kfor1) folosit conform prezentei  
41          invenții (vezi exemplul 20).
- SECV ID NR.: 132 este un prijner oligonucleotidă (45krev6) folosit conform prezentei  
43          invenții (vezi exemplul 20).
- SECV ID NR.: 133 este secvența de AEN din PS201L3 care codifică proteina de  
45          14 kDa.
- SECV ID NR.: 134 este secvența de aminoacizi a proteinei de 14 kDa a PS201L3.
- 47          SECV ID NR.: 135 este o secvență parțială de ADN din PS201L3 pentru proteina de  
44 kDa.

# RO 123431 B1

SECV ID NR.: 136 este o secvență parțială de aminoacizi pentru proteina de 44 kDa a PS201L3.	1
SECV ID NR.: 137 este secvența de KW din PS187G1 care codifică proteina de 14 kDa.	3
SECV ID NR.: 138 este secvența de aminoacizi a proteinei de 14 kDa a PS187G1.	5
SECV ID NR.: 139 este secvența de KW din PS187G1 care codifică proteina de 44 kDa.	7
SECV ID NR.: 140 este secvența de aminoacizi a proteinei de 44 kDa a PS187G1.	
SECV ID NR.: 141 este secvența de ADN din PS201HH2 care codifică proteina de 14 kDa.	9
SECV ID NR.: 142 este secvența de aminoacizi a proteinei de 14 kDa a PS201HH2.	11
SECV ID NR.: 143 este o secvență parțială de ADN din PS201HH2 pentru proteina de 44 kDa.	13
SECV ID NR.: 144 este o secvență parțială de aminoacizi pentru proteina de 44 kDa a PS201HH2.	15
SECV ID NR.: 145 este secvența de ADN din KR1369 care codifică proteina de 14 kDa.	17
SECV ID NR.: 146 este secvența de aminoacizi a proteinei de 14 kDa a KR1369.	
SECV ID NR.: 147 este secvența de ADN din KR1369 care codifică proteina de 44 kDa.	19
SECV ID NR.: 148 este secvența de aminoacizi a proteinei de 44 kDa a KR1369.	21
SECV ID NR.: 149 este secvența de ADN din PS137A care codifică proteina de 14 kDa.	23
SECV ID NR.: 150 este secvența de aminoacizi a proteinei de 14 kDa a PS137A.	
SECV ID NR.: 151 este secvența de ADN din PS201V2 care codifică proteina de 14 kDa.	25
SECV ID NR.: 152 este secvența de aminoacizi a proteinei de 14 kDa a PS201V2.	27
SECV ID NR.: 153 este secvența de ADN din PS207C3 care codifică proteina de 14 kDa.	29
SECV ID NR.: 154 este secvența de aminoacizi a proteinei de 14 kDa a PS207C3.	
SECV ID NR.: 155 este un primer oligonucleotidă (F1new) pentru utilizarea conform prezentei invenții (vezi exemplul 22).	31
SECV ID NR.: 156 este un primer oligonucleotidă (R1new) pentru utilizarea conform prezentei invenții (vezi exemplul 22).	33
SECV ID NR.: 157 este un primer oligonucleotidă (F2new) pentru utilizarea conform prezentei invenții (vezi exemplul 22).	35
SECV ID NR.: 158 este un primer oligonucleotidă (R2new) pentru utilizarea conform prezentei invenții (vezi exemplul 22).	37
SECV ID NR.: 159 este o proteină de fuziune de aproximativ 58 kDa.	39
SECV ID NR.: 160 este o genă de fuziune care codifică proteina din SECV ID NR.: 159.	41
SECV ID NR.: 161 este un primer 45kD5' pentru utilizarea conform prezentei invenții (vezi exemplul 27) .	43
SECV ID NR.: 162 este un primer 45kD3'rc pentru utilizarea conform prezentei invenții (vezi exemplul 27).	45
SECV ID NR.: 163 este un primer 45kD5'01 pentru utilizarea conform prezentei invenții (vezi exemplul 27) .	47
SECV ID NR.: 164 este un primer 45kD5'02 pentru utilizarea conform prezentei invenții (vezi exemplul 27).	49

# RO 123431 B1

1           SECV ID NR.: 165 este un primer 45kD3'03 pentru utilizarea conform prezentei  
invenții (vezi exemplul 27).

3           SECV ID NR.: 166 este un primer 45kD3'04 pentru utilizarea conform prezentei  
invenții (vezi exemplul 27).

5           Următoarele exemple ilustrează procedurile pentru punerea în practică a invenției.  
Aceste exemple nu trebuie considerate ca limitative. Toate procentele sunt în greutate și  
7           toate proporțiile amestecurilor sunt în volum, dacă nu se specifică altfel.

## Exemplul 1. Cultivarea izolatelor *B.t.* ale invenției

9           O subcultură de izolate *B.t.* sau mutații ai acestora pot fi folosiți pentru a inocula  
mediul următor, o peptonă, glucoză, mediu salin.

11

	Bacto peptonă	7,5 g/l
13	Glucoză	1,0 g/l
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,4 g/l
15	K <sub>2</sub> HP <sub>4</sub>	4,35 g/l
	Soluție salină	5,0 ml/l
17	Soluție CaCl <sub>2</sub>	5,0 ml/l
	pH	7,2

19

Soluție de săruri (100 ml)

21	Mg SO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2,46 g
	Mn SO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,04 g
23	Zn SO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,28 g
	Fe SO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,40 g

25

Soluție CaCl<sub>2</sub> (100 ml)

27	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	3,66 g
----	---------------------------------------	--------

29           Soluțiile saline și soluția de CaCl<sub>2</sub> sunt filtrate și sterilizate și adăugate la soluția  
autoclavată și fiartă la momentul inoculării. Recipientele sunt incubate la 30°C pe un agitator  
31           rotativ la 200 rpm timp de 64 h.

33           Procedura de mai sus poate fi scalată ușor pentru aparate de fermentat mari prin  
proceduri binecunoscute în domeniu.

35           Sporii *B.t.* și/sau cristalele obținute în fermentarea de mai sus pot fi izolate prin  
proceduri binecunoscute în domeniu. O procedură frecvent utilizată este de a supune soluția  
de fermentare recoltată unor tehnici de separare, de exemplu centrifugare.

37           **Exemplul 2. Activitatea culturilor de *Bacillus thuringiensis* cu spori asupra omizii  
porumbului**

39           Culturile lichide de PS80JJ1, PS149B1 sau PS167H2 au fost crescute pentru  
sporificare în recipiente agitate și peletul prin centrifugare. Peletele de cultură au fost  
41           resuspendate în apă și testate pentru activitate împotriva omizilor porumbului în dozări  
cantitative biologice așa cum se descrie mai jos. Cantitățile de proteine de 14 kDa și 44,3  
43           kDa prezente în peletele de cultură au fost estimate prin densitometrie și folosite pentru a  
calcula activitatea specifică exprimată ca LCM. Activitatea fiecărei tulpine native de *B.*  
45           *thuringiensis* este prezentată în tabelul 3 (Testarea biologică a tulpinilor *B.t.* pentru omida  
porumbului *Diabrotica virgifera virgifera*).

Testarea biologică a tulpinilor *B.t.* pentru omida porumbului *Diabrotica virgifera virgifera*

Tulpină <i>B.t.</i>	LC50 mg/cm <sup>2</sup> *	95% CL	Pantă
PS80JJ1	6	4-8	1,5
PS167H2	6	4-9	1,6
PS149B1	8	4-12	1,8
control de celulă CryB	4%	nedisponibil	nedisponibil
control apă	4%	nedisponibil	nedisponibil

\*Procentul mortalității la doze ridicate este furnizat pentru controale

### Exemplul 3. Purificarea proteinei pentru proteina P580JJ1 de 45 kDa

Un gram de pudră liofilizată de PS80JJ1 a fost suspendat în 40 ml de soluție tampon care conține 80 mM tris Cl pH 1,8, 5 mM EDTA, 100 mM EMSF 0,5 μg/ml Leupeptină, 0,7 μg/ml Pepstatină și 40 μg/ml Bestatină. Suspensia a fost centrifugată, iar supranatantul rezultat a fost eliminat. Peletele au fost spălate de cinci ori, folosind 35-40 ml din soluția tampon de mai sus la fiecare spălare. Peletul spălat a fost resuspendat în 10 ml de NaBr 40%, 5 nM EDTA, 100 μM FMSF, 0,5 μg/ml Leupeptină, 0,7 μg/ml Pepstatină și 40 μg/ml Bestatină și plasată pe o platformă oscilantă timp de 75 min. Suspensia NaBr a fost centrifugată, supranatantul eliminat, iar peletul a fost tratat a doua oară cu NaBr 40%, 5 nM EDTA, 100 μM FMSF, 0,5 μg/ml Leupeptină, 0,7 μg/ml Pepstatină și 40 μg/ml Bestatină ca mai sus. Supranatantii (NaBr 40% solubil) au fost combinați și dializați în 10 mM CAPS pH 10,0, 1 mM EDTA la 4°C. Extractele dializate au fost centrifugate, iar supranatantul rezultat a fost eliminat. Peletul (peletul de dializă a NaBr 40%) a fost suspendat în 5 ml de H<sub>2</sub>O și centrifugată. Supranatantul rezultat a fost îndepărtat și eliminat. Peletul spălat a fost spălat a doua oară în 10 ml H<sub>2</sub>O și centrifugat ca mai sus. Peletul spălat a fost suspendat în 1,5 ml de H<sub>2</sub>O și a conținut în principal trei benzi de proteină cu mobilități aparente de aproximativ 47 kDa, 45 kDa și 15 kDa atunci când a fost analizat folosind SDS-PAGE. La acest stadiu al purificării, peletul de dializă NaBr 40% a conținut aproximativ 21 mg/ml proteină determinată prin test Lowry.

Proteinele din suspensia de pelet au fost separate folosind SDS-FAGE (Laemmli, UK [1970] Nature 227: 680) în geluri acrilamidice 15%. Proteinele separate au fost apoi colorate prin electroforeză pe o membrană PVDF (Millipore Corp.) în 10 nM CAPS pH 11,0, MeOH 10% la 100 V constant. După o oră, membrana PVDF a fost clătită scurt în apă și plasată timp de 3 min în 0,25% albastru comasiv R-250, 50% metanol, 5% acid acetic. Membrana colorată a fost decolorată în 40% MeOH, 5% acid acetic. Membrana decolorată a fost uscată în aer la temperatura camerei (LeGendre și col L1989] în A Practical Guide to Protein Purification For Microsequencing, P. Matsudaira, editura Academic Press, New York, NY). Membrana a fost secvențiată folosind degradare Edman în fază gazoasă automată (Hunkapillar, M.W., R.M. Hewick, W.L. Dreyer, L.E. Hood [1983] Meth. Enzymol. 91: 399).

Analiza aminoacizilor a dezvăluit că secvența N-terminală a catenei de 45 kDa a fost după cum urmează: Met-Leu-Asp-Thr-Asn (SECV ID NR.: 1)

Catena de 47 kDa a fost, de asemenea, analizată și secvența N-terminală de aminoacizi a fost determinată a fi aceeași secvență de 5 aminoacizi ca SECV ID NR.: 1. Prin urmare, secvențele N-terminale de aminoacizi ale peptidei de 47 kDa și peptidei de 45 kDa au fost identice.

# RO 123431 B1

1 Această secvență de aminoacizi corespunde de asemenea unei secvențe obținută  
dintr-o peptidă de 45 kDa obținută din pudre-spori/cristale de PS80JJ1, folosind un alt  
3 protocol de purificare, cu secvența N-terminală după cum urmează: Met-Leu-Asp-Thr-Asn-  
Lys-Val-Tyr-Glu-Ile-Ser-Asn-Leu-Ala-Asn-Gly-Leu-Tyr-Thr-Ser-Thr-Tyr-Leu-Ser-Leu (SECV  
5 ID NR.: 2).

#### Exemplul 4. Purificarea peptidei de 14 kDa a PS80JJ1

7 0,8 ml din suspensia albă de dializă (aproximativ 21 mg/ml) care conțin peptidele de  
47 kDa, 45 kDa și 15 kDa, au fost dizolvați în 10 ml NaBr 40% și s-au adăugat 0,5 ml din  
9 EDTA, 100 mM. După 18 h (peste noapte), s-a obținut o suspensie opacă albă. Aceasta a  
fost colectată prin centrifugare și eliminată. Supranatantul a fost concentrat într-un aparat  
11 Centricon-30 (Amicon Corporation) până la un volum final de aproximativ 15 ml. Volumul  
filtrat a fost spălat cu apă prin dializă pe filtru și incubat pe gheață, formând în final o  
13 suspensie alb-lăptoasă. Suspensia a fost centrifugată, iar peletul și supranatantul au fost  
separate și reținute. Peletul a fost suspendat apoi în 1,0 ml apă (aproximativ 6 mg/ml).  
15 Peletul a conținut proteină de 15 kDa pură atunci când a fost analizată prin SDS-PAGE.

Secvența N-terminală de aminoacizi a fost determinată a fi: Ser-Ala-Arg-Glu-Val-His-  
17 Ile-Glu-Ile-Asn-Asn-Thr-Arg-His-Thr-Leu-Gln-Leu-Glu-Ala-Lys-Thr-Lys-Leu (SECV ID NR.: 3).

#### Exemplul 5. Testarea biologică a proteinei

19 Un preparat din fracția insolubilă din extractul de NaBr dializat al 80JJ1 care conține  
peptidele de 47 kDa, 45 kDa și 15 kDa au fost testate biologic împotriva omizii porumbului  
21 (*Diabrotica virgifera virgifera*) și au fost găsite ca prezentând activitate semnificativă ca  
toxină.

#### Exemplul 6. Purificarea proteinei și caracterizarea proteinei de 45 kDa a PS149B1

23 Peletul P1 a fost resuspendat cu două volume de apă deionizată pe unitate de  
greutate, iar la aceasta s-au adăugat 9 volume de bromură de sodiu apoasă 40% în greutate.  
25 Aceasta și toate operațiile următoare s-au efectuat pe gheață la 4-6°C. După 30 min,  
suspensia a fost diluată cu 36 volume de apă răcită și centrifugată la 25.000 g timp de 30  
27 min pentru a da un pelet și un supranatant.

29 Peletul rezultat a fost resuspendat în 1-2 volume de apă și întinsă pe un gradient  
de bromură de sodiu 20-40% (în greutate) și centrifugată la 8.000 g timp de 100 min. Stratul  
31 care determinat o stratificare de aproximativ 32% (în greutate) bromură de sodiu (incluziunile  
sau INC) a fost recuperat și dializat peste noapte în apă folosind o membrană de dializă cu  
33 un prag de greutate moleculară de 6-8 kDa. Materialul sub formă de particule a fost  
recuperat prin centrifugare la 25.000 g, resuspendat în apă și alicotat și testat pentru  
35 proteine prin metoda lui Lowry și prin SDS-PAGE.

Supranatantul rezultat a fost concentrat 3 până la 4 ori folosind concentratoare  
37 Centricon-10, apoi dializate peste noapte în apă folosind o membrană de dializă cu un prag  
cu greutate moleculară de 6-8 kDa. Materialul sub formă de particule a fost recuperat prin  
39 centrifugare la 25.000 g, resuspendat în apă și alicotat și testat pentru proteine prin metoda  
Lowry și prin SDS-PAGE. Această fracțiune a fost notată P1.P2.

41 Proteinele din suspensia peletei au fost separate folosind SDS-PAGE (Laemmli, U.K.,  
de mai sus) în geluri acrilamidice 15%. Proteinele separate au fost depuse prin electroforeză  
43 pe o membrană PVDF (Millipore Corp.) în CAPS 10 mM, pH 11,0, 10% MeOH la 100 V  
constant. După o oră membrana PVDF a fost clătită scurt în apă și plasată timp de 3 min în  
45 0,25% albastru comasiv R-250, 50% metanol, 5% acid acetic. Membrana colorată a fost  
decolorată în 40% MeOH, 5% acid acetic. Membrana decolorată a fost uscată la aer la  
47 temperatura camerei (LeGendre și col, supra). Membrana a fost secvențiată prin degradare  
Edman cu faza gazoasă automată (Hunkapillar și col., supra).

# RO 123431 B1

Analiza proteinelor a indicat prezența a două polipeptide majore, cu greutatea moleculară de 47 kDa și 14 kDa. Greutățile moleculare au fost măsurate față de polipeptidele standard de greutate moleculară știută. Procedul asigură numai o estimare a greutății moleculare reale. Banda de 47 kDa de la PS149B1 a migrat la SDS-PAGE într-un mod insesizabil la proteina de 47 kDa de la PS80JJ1. De asemenea, banda de 14 kDa de la PS149B1 a migrat la SDS-PAGE într-un mod insesizabil la benzile de 14kDa de la PS 167H2 și PS80JJ1. În afară de aceste două polipeptide, care s-a estimat că reprezintă 25-35% (47 kDa) și respectiv 33-35% (15 kDa) din materialul de colorare comasiv, au existat benzi minore, incluzând pe acelea de greutatea moleculară estimate la 46 kDa, 130 kDa și 70 kDa.

Analiza proteinelor a indicat că fracțiunea INC a conținut o singură polipeptidă cu greutatea moleculară a proteinei de 47 kDa, și că fracțiunea P1. P2 a conținut o singură polipeptidă cu greutatea moleculară a proteinei de 14 kDa. Aceste polipeptide au fost recuperate în cantități mai mari de 50% din P1.

Secvența N-terminală de aminoacizi pentru proteina purificată de 14 kDa din PS149B1 este: Met-Leu-Asp-Thr-Asn-Lys-Val-Tyr-Glu-Ile-Ser-Asn-His-Ala-Asn-Gly-Leu-Tyr-Ala-Ala-Thr-Tyr-Leu-Ser-Leu (SECV ID NR.: 4).

Secvența N-terminală de aminoacizi pentru proteina purificată de 14 kDa din PS149B1 este: Ser-Ala-Arg-Glu-Val-His-Ile-Asp-Val-Asn-Asn-Lys-Thr-Gly-His-Thr-Leu-Gln-Leu-Glu-Asp-Lys-Thr-Lys-Leu-Asp-Gly-Gly-Arg-Trp-Arg-Thr-Ser-Pro-Xaa-Asn-Val-Ala-Asn-Asp-Gln-1 le-Lys-Thr-Phe-Val-Ala-Glu-Ser-Asn (SECV ID NR.: 5).

**Exemplul 7.** Secvența de aminoacizi pentru toxinele de 45 kDa și 14 kDa din PS167H2

Secvența N-terminală de aminoacizi pentru proteina purificată de 45 kDa din PS167H2 este: Met-Leu-Asp-Thr-Asn-Lys-Ile-Tyr-Glu-Ile-Ser-Asn-Tyr-Ala-Asn-Gly-Leu-His-Ala-Ala-Thr-Tyr-Leu-Ser-Leu (SECV ID NR.: 6)

Secvența N-terminală de aminoacizi pentru proteina purificată de 14 kDa din PS 16VH2 este: Ser-Ala-Arg-Glu-Val-His-Ile-Asp-Val-Asn-Asn-Lys-Thr-Gly-His-Thr-Leu-Gln-Leu-Glu-Asp-Lys-Thr-Lys-Leu (SECV ID NR.: 7)

Aceste secvențe de aminoacizi pot fi comparate cu secvența obținută pentru peptida de 47 kDa obținută din pudrele de cristale sau spori de 80JJ1 cu secvența N-terminală (SECV ID NR.: 1) și cu secvența obținută pentru peptida de 14 kDa obținută din pudrele de cristale sau spori de 80JJ1 cu secvența terminală (SECV ID NR.: 3).

În mod clar, proteinele de 45-47 kDa sunt puternic înrudite, iar proteinele de 14 kDa sunt puternic înrudite.

**Exemplul 8.** Testarea biologică a proteinelor

Fracțiunile de proteine purificate din PS149B1 au fost testate biologic împotriva omizii porumbului (*Diabrotica virgifera virgifera*) și s-a observat că prezintă activitate semnificativă de toxină atunci când sunt combinate. De fapt, combinația a restaurat activitatea la aceea remarcată în prepararea originală (PI). Următoarele date de testare biologică prezintă mortalitatea în procente și demonstrează acest efect.

Tabelul 4

Concentrație ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	P1	INC	P1, P2	INC + P1, P2
300	88, 100, 94	19	13	100
100	94, 50, 63	31	38	94
33,3	19, 19, 44	38	13	50
11,1	13, 56, 25	12	31	13
3,7	0, 50, 0	0	31	13
1,2	13, 43, 12	0	12	19
0,4	6, 12, 6	2	19	6

# RO 123431 B1

1 **Exemplul 9.** *Clonare moleculară, expresie și analiza secvenței de ADN a unei noi*  
2 *gene de δ-endotoxină din tulpina PS80JJ1 de Bacillus thuringiensis*

3 ADN-ul celular total a fost preparat din celule de *Bacillus thuringiensis* (*B.t.*) crescute  
4 până la o densitate optică, la 600 nm, de 1,0. Celulele au fost peletulte prin centrifugare și  
5 resuspendate în soluție tampon protoplast (20 mg/ml lizozom în sucroză 0,3 M, 25 mM Tris  
6 Cl 25 mM [pH 8,0], 25 mM EDTA). După incubarea la 37°C timp de o oră, protoplaștii au fost  
7 lizați prin două cicluri de înghețare-dezghețare. S-au adăugat două volume dintr-o soluție de  
8 NaCl 0,1 M, 0,1% SDS, Tris Cl 0,1 M, pentru a încheia liza. Lizatul limpede a fost extras de  
9 două ori cu fenol: cloroform (1: 1). Acizii nucleici au fost precipitați cu două volume de etanol  
10 și peletulți prin centrifugare. Peletul a fost resuspendat în soluție tampon TE și s-a adăugat  
11 RNAază până la o concentrație finală de 50 μg/ml. După incubarea la 37°C timp de o oră,  
12 soluția a fost extrasă o dată cu fenol: cloroform (1: 1) și cloroform saturat cu TE. ADN-ul a  
13 fost precipitat din faza apoasă prin adăugarea de 1-10 volume de NaOAc 3M și două volume de  
14 etanol. ADN-ul a fost peletuit prin centrifugare, spălat cu 10% etanol, uscat și resuspendat  
15 în soluție tampon TE.

16 O probă de oligonucleotidă pentru gena care codifică toxina de 45 kDa a PS80JJ1  
17 a fost desemnată din datele secvenței de peptidă N-terminală. Secvența probei de  
18 oligonucleotidă de 29 baze a fost: 5'-ATG YTW GAT ACW AAT AAA GTW TAT GAA AT-3'  
19 (SECV ID NR.: 8). Această oligonucleotidă a fost amestecată la patru poziții așa cum este  
20 arătat. Această probă a fost radiomarcată cu <sup>32</sup>P și folosită în hibridizarea în condiții standard  
21 de Southern blot ale ADN-ului celular total digerat de PS80JJ1 cu diverse endonucleaze de  
22 restricție. Datele autoradiografice reprezentative de la aceste experimente care arată  
23 mărimile fragmentelor de restricție ACN care conțin omologia secvenței cu proba de  
24 oligonucleotidă a toxinei de 44,3 kDa a SECV ID NR.: 8 sunt prezentate în tabelul 5.

25  
26 *RFLP a fragmentelor de ADN celular a PS80JJ1 pe Southern blot care hibridizează în*  
27 *condiții standard cu probe de oligonucleotidă a-genei toxinei de 44,3 kDa*  
28 *(SECV ID NR.: 8)*

Tabelul 5

Enzimă de restricție	Mărimea aproximativă fragmentului (kbp)
EcdRI	6,0
HindIII	8,3
KpnI	7,4
PstI	11,5
XbaI	9,1

37 Aceste fragmente de ADN identificate în aceste analize, conțin toate segmentele sau  
38 doar un segment din gena toxinei de 45 kDa din PS80JJ1. Mărimile aproximative ale  
39 fragmentelor ADN de hibridizare din tabelul 5, sunt în acord rezonabil cu mărimile unui  
40 subset de fragmente PS80JJ1 care hibridizează cu o probă de subgenă a toxinei de 45 kDa  
41 din PS80JJ1 folosite în experimente separate, așa cum s-a prevăzut (a se vedea tabelul 6  
42 de mai jos)

43 O bancă de gene a fost construită din ADN de PS80JJ1 parțial digerat cu Sau3AI.  
44 Digeratele de restricție parțiale au fost fracționate prin electroforeză pe gel de agaroză.



# RO 123431 B1

Fragmente de ADN de mărime 9,3 până la 23 kbp au fost excizate de pe gel, electroeluate din porția de gel, purificată într-o coloană de schimb ionic Elutip D (Schleicher și Schuell, Keene, NH) și recuperate prin precipitare în etanol. Inserturile Sau3AI au fost ligate în LambdaGem-11 digerat cu BanBI (Promega, Madison, WI). Fagul recombinat a fost împachetat și pus pe plăci, pe celule de *E. coli* KW251. Plăcile au fost cercetate prin hibridizare cu proba de oligonucleotidă descrisă mai sus. Fagii de hibridizare au fost purificați pe placă și folosiți pentru a infecta culturile lichide de celule *E. coli* KW251 pentru izolarea de ADN prin proceduri standard (Maniatis și col, supra).

Analiza Southern blot a dezvăluit că unul dintre izolatele de fagi recombinati a conținut banda Xbal-Sacl de aproximativ 4,8 kbp care a hibridizat la proba genei toxinei PS80JJ1. Situsul Sacl de flancare a genei toxinei PS80JJ1 este un situs de donare a vectorului fagului, în timp ce situsul de flancare Xbal este localizat în insertul ADN PS80JJ1. Acest fragment de restricție ADN a fost subclonat prin metode standard în pBluescript S/K (Stratagene, San Diego, CA) pentru analiza secvenței. Plasmidul rezultat a fost desemnat pMYC2421. Insertul de ADN a fost, de asemenea, subclonat în pHTBluell (un vector purtător *E. coli/B. thuringiensis* care a cuprins pBluescript S/K [Stratagene, La Jolla, CA] și originea de replicare a unui plasmid *B.t.* rezident [D. Lereclus și col., (1989) FEMS Microbiology Letters 60: 211-218] pentru a produce FMYC2420.

O probă de oligonucleotidă pentru gena care codifică toxina de 14 kDa din PS80JJ1 a fost desemnată din datele secvenței de peptidă N-terminală. Secvența de probă de oligonucleotidă de 28 de baze a fost: 5' GW GAA GTW CAT ATW GAA ATW AAT AAT AC 3' (SECV ID NR.: 29). Această oligonucleotidă a fost amestecată la patru poziții așa cum este arătat. Proba a fost radiomarcată cu <sup>32</sup>P și folosită în hibridizarea în condiții standard de Southern blot a PS80JJ1 celular total și ADN pMTC2421 digerat cu diverse endonucleaze de restricție. Aceste experimente de cartare RFLP demonstrează că gena care codifică toxina de 14 kDa este situată pe același fragment genomic EcoRI care conține secvența N-terminală de codificare pentru toxina de 44.3 kDa.

Pentru a testa expresia genelor toxinei de PS80JJ1 în *B.t.*, pMYC2420 a fost transformat în gazda *B.t.* necristaliferă (Cry-), CryB (A. Aronson, Purdue University, West Lafayette, IN) prin electroporare. Expresia atât a toxinei de aproximativ 14 kDa cât și 44,3 kDa a PS80JJ1 codificate prin pMYC2420, a fost demonstrată prin analiza SDS-PAGE. Preparatele de cristale de toxină din tulpina recombinată CryB[pMYC2420], MR536, au fost analizate și s-a găsit că sunt active împotriva omizii porumbului *Diabrotica virgifera virgifera*.

Genele toxinei PS80JJ1 au fost secvențiate folosind programul de secvențiere automată ABI373 și softul asociat. Secvența întregului locus genetic care conține atât cadrele de citire deschise cât și secvențele de nucleotide de flancare sunt prezentate în SECV ID NR.: 30). Codonul de terminare al genei toxinei de 14 kDa este un codon cu 121 perechi de baze în avalul (5') codonului de inițiere al genei toxinei de 44 kDa (Figura 2). Secvența de nucleotide a cadrului de citire deschis al toxinei PS80JJKSECV ID NR.: 31), secvențe de nucleotide a cadrului de citire deschis (SECV ID NR.: 10) a toxinei de 44.3 kDa și respectivele secvențe de aminoacizi deduse (SECV ID NR.: 32 și SECV ID NR.: 11) sunt noi în comparație cu alte gene de toxine care codifică proteine cu acțiune pesticidă.

Astfel, secvența de nucleotide care codifică toxina de 14 kDa a PS80JJ1 este prezentată în SECV ID NR.: 31. Secvența de aminoacizi dedusă a toxinei de 14 kDa a PS80JJ1 este prezentată în SECV ID NR.: 32. Secvențele de nucleotide care codifică ambele toxine de 14 kDa de 45 kDa a PS80JJ1, cât și secvențele de flancare, sunt arătate în SECV NR.: 30. Relația dintre aceste secvențe este arătată în fig. 2.

# RO 123431 B1

1 O subcultură de *E. coli* NM522 care conține plasmida pMYC2421 a fost depozitată  
în colecția permanentă Patent Culture Collection (NRRL), Regional Research Center, 1815  
3 North University Street, Peoria, IL 61604 SUA pe 28 martie 1996. Numărul de acces este  
NRRL B-21555.

5 **Exemplul 10. Analiza RFLP și PCR a genelor noi adiționale de 5-endotoxină din  
tulpinile PS149B1 și PS167H2 ale *Bacillus thuringiensis***

7 Două tulpini adiționale active împotriva omizii porumbului, PS149B1 și PS167H2  
produc, de asemenea, cristale de proteină parasporală, alcătuite în parte din polipeptide de  
9 mărime aproximativă de 14 și 45 kDa. Hibridizarea Southern și analiza secvenței ADN  
parțială au fost utilizate pentru a examina înrudirea acestor toxine cu toxinele 80JJ1. ADN-ul  
11 a fost extras din aceste tulpini de *B.t.* așa cum s-a descris mai sus și s-au realizat hibridizări  
Southern standard, folosindu-se proba de oligonucleotidă a toxinei de 14 kDa (SECV ID  
13 NR.: 29) și un fragment PCR de aproximativ 800 bp al secvenței de codificare a genei toxinei  
de 44.3 kDa a 80JJ1. Datele RFLP din aceste experimente care arată mărimile fragmentelor  
15 de restricție ADN care conțin omologia secvenței cu toxina de 44.3 kDa, sunt prezentate în  
tabelul 6. Datele RFLP din aceste experimente care arată mărimile fragmentelor de restricție  
17 ADN conținând omologia cu toxina de aproximativ 14 kDa sunt prezentate în tabelul 7.

19 *RFLP a fragmentelor de ADN celular de PS80JJ1, PS149B1 și PS167H2 la*  
*Southern blot care au hibridizat cu proba subgenei de aproximativ 800 bp a toxinei*  
21 *de 4,3 kDa a PS80JJ1*

Tabelul 6

Enzima de restricție	Tulpina		
	PS80JJ1	PS149B1	PS167H2
	Mărimea aproximativă a fragmentului (kbp)		
EcoRI	6,4	5,7	2,6
	1,3	2,8	
	0,6		
HindIII	8,2	6,2	4,4
KpnI	7,8	10,0	11,5
PstI	12,0	9,2	9,2
			8,2
XbaI	9,4	10,9	10,9
SacI	17,5	15,5	11,1
	13,1	10,5	6,3

37 Fiecare dintre cele trei tulpini au prezentat modele RFLP unice. Fragmentele ADN  
de hibridizare de la PS149B1 sau PS167H2 conțin toate sau o parte din genele toxinei cu  
39 omologie a secvenței cu toxina de 44,3 kDa a PS80JJ1.

# RO 123431 B1

Polimorfismele lungimii fragmentelor de restricție a fragmentelor de ADN celular de PS80JJ1, PS149B1 și PS167H2 pe Southern blot care au hibridizat cu proba de oligonucleotidă a toxinei de 14 kDa-a PS80JJ1 în condiții standard

Tabelul 7

Enzima de restricție	Tulpina		
	PS80JJ1	PS149B1	PS167H2
	Mărimea aproximativă a fragmentului (kbp)		
EcoRI	5,6	2,7	2,7
HindIII	7,1	6,0	4,7
XbaI	8,4	11,2	11,2

Fiecare dintre cele trei tulpini a prezentat modele RFLP unice. Fragmentele ADN de hibridizare de la PS149B1 sau PS167H2 conțin toate sau o parte din genele toxinei cu omologie a secvenței cu gena toxinei de 14 kDa a PS80JJ1.

Porțiuni din genele toxinei din PS149B1 sau PS167H2 au fost amplificate prin PCR folosind perechi de primeri de oligonucleotide cap-coadă și coadă-cap desemnați pe baza secvenței genei toxinei de 44,3 kDa a PS80JJ1. Pentru PS149B1, s-a folosit următoarea pereche de primeri:

cap-coadă:

5'-ATG YTW GAT ACW AAT ABA GTW TAT GAA AT-3' (SECV ID NR.: 8)

coadă-cap:

5' -GGA TTA TCT ATC TCT GSG TGT TCT TG-3' (SECV ID NR.: 9).

Pentru PS167H2, a fost folosită aceeași pereche de primeri. Aceste fragmente derivate din PCR au fost secvențiate folosind sistemul de secvențiere automată ABI373 și programul software asociat. Gena parțială și secvențele de peptide obținute sunt arătate în SECV ID NR.: 12-15. Aceste secvențe conțin porțiuni ale secvențelor de codificare a nucleotidelor și secvențele de peptide pentru noile toxine active împotriva omizii porumbului, prezente în tulpinile PS149B1 și PS167H2 ale *B.t.*

**Exemplul 11. Clonarea moleculară și analiza secvenței de ACM a noilor gene de δ-endotoxină din tulpinile PS149B1 și PS167H2 ale *Bacillus thuringiensis***

ADN-ul celular total a fost extras din tulpinile PS149B1 și PS167H2 așa cum s-a descris pentru PS80JJ1. S-au construit bănci de gene ale fragmentelor de restricție parțiale Sau3A fracționate după mărime, în Lambda-GemII pentru fiecare tulpină respectivă așa cum s-a descris anterior. Fagii recombinanți au fost împachetați și depuși pe plăci pe celule de *E. coli* KW251. Plăcile au fost cercetate prin hibridizare cu proba de oligonucleotidă specifică pentru gena toxinei de 44 kDa. Fagii de hibridizare au fost purificați pe placă și au fost folosiți pentru a infecta culturile lichide de celule de *E. coli* KW251 pentru izolarea de ADN prin proceduri standard (Maniatis și col., supra).

Pentru PS167H2, analiza Southern blot a dezvăluit că unul dintre izolatele de fagi recombinanți a conținut o bandă HindIII de aproximativ 4,0 până la 4,4 kbp care a hibridizat cu sonda de oligonucleotidă 5' a genei toxinei de 44 kDa a PS80JJ1 (SECV ID NR.: 8). Acest fragment de restricție ADN a fost subclonat prin metode standard în pBluescript S/K (Stratagene, San Diego, CA) pentru analiza secvențelor. Fragmentul a fost de asemenea subclonat în vectorul purtător cu număr mare de copii, pHT370 (Arantes, O., Lereclus [1991] Gene 108: 115-119) pentru analizele expresiei în *Bacillus thuringiensis* (a se vedea mai jos).

# RO 123431 B1

1 Plasmidul bifuncțional cu mare număr de copii, recombinat rezultat a fost desemnat PMYC2427.

3 Genele toxinei PS167H2 codificate de pMYC2427 au fost secvențiate folosind  
sistemul de secvențiere automată ABI și programul software asociat. Secvența întregului  
5 locus genetic care conține atât cadrele de citire deschise cât și secvențele nucleotidelor de  
flancare este arătată în SECV ID Nr.: 34. Codonul de terminalizare al genei toxinei de 14 kDa  
7 este la 107 baze perechi în aval (5') față de codonul de inițiere al genei toxinei de 44 kDa.  
Secvența de codificare a toxinei de 14 kDa a PS167H2 (SECV ID Nr.: 35), secvența de  
9 codificare a toxinei de 44 kDa (SECV ID NR.: 37) și respectivele secvențe de aminoacizi  
deduse SECV ID Nr.: 36 și SECV ID NR.: 38 sunt noi în comparație cu alte gene de toxine  
11 cunoscute care codifică proteine cu activitate pesticidă. Genele toxinei sunt aranjate într-un  
mod similar și au oarecare omologie cu toxinele de 14 și 44 kDa ale PS80JJ1.

13 O subcultură a *E. coli* NM522 care conține plasmidul pMYC2427 a fost depozitată în  
colecția permanentă a Patent Culture Collection (NRRL), Regional Research Center, 1815  
15 North University Street, Peoria, Illinois 61604 S.U.A. pe 26 martie 1997. Numărul de acces  
este NRRL B-21672.

17 Pentru PS149B1, analiza Southern Blot folosind proba 5' de oligonucleotidă de  
44 kDa a PS80JJ1 (SECV ID NR.: 8) a demonstrat hibridizarea unui fragment ADN dai de  
19 aproximativ 5,9 kbp. Digeratele complete de Clal ale PS149B1 au fost fracționate după  
mărime pe geluri de agaroză și clonate în pHTBluell. Fragmentul a fost de asemenea  
21 subclonat în vectorul purtător cu număr mare de copii, pHT370 (Arantes O., D. Lereclus  
[1991] Gene 108: 115-119) pentru analizele expresiei în *Bacillus thuringiensis* (a se vedea  
23 mai jos). Plasmidul bifuncțional, cu număr mare de copii, recombinat rezultat a fost  
desemnat pMTC2429.

25 Genele toxinei PS149B1 codificate de pMYC2429 au fost secvențiate folosind  
sistemul de secvențiere automată ABI și programul software asociat. Secvența întregului  
27 locus genetic, care conține atât cadrele de citire deschise, cât și secvențele nucleotidelor de  
flancare, este arătată în SECV ID NR.: 39. Codonul de terminalizare al genei toxinei de  
29 14 kDa este la 108 baze perechi în aval (5') față de codonul de inițiere al genei toxinei de  
44 kDa. Secvența de codificare a toxinei de 14 kDa a PS149B1 (SECV ID NR.: 40), secvența  
31 de codificare a toxinei de 44 kDa (SECV ID NR.: 42) și respectivele secvențe de aminoacizi  
deduse SECV ID NR.: 41 și SECV ID NR.: 43 sunt noi în comparație cu alte gene de toxine  
33 cunoscute care codifică proteine cu activitate pesticidă. Genele toxinei sunt aranjate într-un  
mod similar și au oarecare omologie cu toxinele de 14 și 44 kDa ale PS149B1 și PS167H2.  
35 Împreună, acești trei operoni de toxine cuprind o nouă familie de toxine cu activitate  
pesticidă.

37 O subcultură de *E. coli* NM522 care conține plasmidul pMTC2429 a fost depozitată  
în colecția permanentă a Patent Culture Collection (NRRL), Regional Research Center, 1815  
39 North University Street, Peoria, Illinois 61604 S.U.A. pe 26 martie 1997. Numărul de acces  
este NRRL B-21673.

41 **Exemplul 12. Amplificarea PCR pentru identificarea și clonarea noilor toxine active**  
*împotriva omizii porumbului*

43 Secvențele de SEN și peptide ale celor trei noi toxine active împotriva omizii  
porumbului de aproximativ 45 kDa din PS80JJ1, PS149B1 și PS167H2 (SECV ID NR.: 12-  
45 15) au fost aliniat cu programul Pileup pentru analiza secvențelor de la Genetics Computer  
Group folosind o greutate de gap de 3,00 și o greutate a lungimii de gap de 0,10. Alinierea  
47 secvențelor au fost folosite pentru identificarea secvențelor de peptide conservate la care  
primerii oligonucleotide au fost desemnați ca fiind posibil să hibridizeze la gene care codifică

# RO 123431 B1

membri ai acestei noi familii de toxine. Asemenea primeri pot fi utilizați în PCR pentru a amplifica fragmentele de ADN de diagnostic pentru acestea și pentru gene de toxine înrudite. Numeroase configurații de primeri pentru diverse secvențe sunt posibile, dintre care patru sunt descrise aici, pentru a furniza un exemplu. Aceste secvențe de peptide sunt:

Asp-Ile-Asp-Asp-Tyr-Asn-Leu (SECV ID Nr.: 16) 5

Trp-Phe-Leu-Phe-Pro-Ile-Ssp (SECV ID Nr.: 17)

Gln-Ile-Lys-Thr-Thr-Pro-Tyr-Tyr (SECV ID Nr.: 18) 7

Tyr-Glu-Trp-Gly-Thr-Glu (SECV ID Nr.: 19).

Secvențele de nucleotide corespunzătoare sunt: 9

5'GATATOGATGAYTAYBAYTTR-3' (SECV ID Nr.: 20)

5' -TGGTTTTTTRTTCCWATWGAY-3' (SECV ID Nr.: 21) 11

5' -CAAATHASAACWACWCCATATTAT-3' (SECV ID Nr.: 22)

5'-TAYGARTGGGGHftCAGAA-3' (SECV ID N.r: 23) 13

Primerii cap-coadă pentru amplificarea polimerazei în reacții termocidice au fost desemnați pe baza secvențelor de nucleotide ale SECV ID Nr.: 20 și 21. 15

Primerii coadă-cap au fost desemnați pe baza complementului invers al SECV ID NR.: 22 și 23: 17

5'-ATAATATGGWGTWGTTTTBATTTG-3' (SECV ID Nr.: 24)

5'-TTCTGTDCCCCAYTCTTA-3' (SECV ID Nr.: 25). 19

Acești primeri pot fi utilizați în combinație pentru a amplifica fragmentele ADN de mărimea următoare (tabelul 8) care identifică genele care codifică noile toxine pentru omida porumbului. 21

*Mărimi prevăzute pentru fragmente de ADN (perechi de baze) de diagnostic care pot fi amplificate cu primeri specifici pentru noile toxine active împotriva omizii porumbului* 25

Tabelul 8

Pereche de primari (SECV ID NR.: )	Mărimea fragmentului ADN (bp)	
20 + 24	495	27
20 + 25	594	29
21 + 24	471	
21 + 25	580	31

În mod similar, genele întregi care codifică noi toxine active împotriva omizii porumbului pot fi izolate prin amplificarea polimerazei în reacții termociclice folosind primeri desemnați pe baza secvențelor de ADN de flancare a cadrelor de citire deschise. Pentru toxina de 44.3 kDa a PS80JJ1, o asemenea pereche de primeri a fost desemnată, sintetizată și utilizată pentru a amplifica un fragment de ADN de diagnostic de 1613 bp care a inclus întreaga secvență de codificare a toxinei. Acești primeri sunt: 33

cap-coadă: 5'-CTCMAGCGGATCAGGAG-3' (SECV ID Nr.: 26) 39

coadă-cap: 5'-GCGTATTCGGATATGCTTGG-3' (SECV ID Nr.: 27).

Pentru amplificarea PCR a toxinei de 14 kDa a PS80JJ1, poate fi folosită oligonucleotida care codifică secvența de peptide N-terminală (SECV ID Nr.: 29) în combinație cu diverși primeri de oligonucleotidă pe baza secvențelor din locusul genei toxinei PS80JJ1. Un asemenea primer coadă-cap are următoarea secvență. 41

5'CATGAGATTTATCTCCTGATCCGC-3' (SECV ID Nr.: 33) 43

# RO 123431 B1

1 Atunci când este folosită în reacții PCR standard, această pereche de primeri a  
amplificat un fragment de ADN de diagnostic de 1390 bp care include întreaga secvență de  
3 codificare a toxinei de 14 kDa și câteva secvențe de flancare 3' care corespund spațiatorului  
intergenic de 121 baze și o porțiune din gena toxinei de 44.3 kDa. Atunci când este folosită  
5 în combinație cu primenii cap-coadă de 14 kDa, PCR va genera un fragment de ADN de  
diagnostic de 322 perechi de baze.

## 7 **Exemplul 13. Testarea biologică doză-răspuns a clonei**

9 Operonul toxinei PS80JJ1 a fost subclonat din pMTC2421 în pHT370 pentru  
comparația directă a bioactivității cu toxinele recombinante donate din PS149B1 și Psl67H2.  
Plasmidul bifuncțional, cu număr mare de copii, recombinat, rezultat a fost desemnat  
11 pMYC2426.

13 O subcultură a *E. coli* NM522 care conține plasmidul pMYC2426 a fost depozitată în  
colecția permanentă a Patent Culture Collection (NRRL), Regional Research Center, 1815  
North University Street, Peoria, Illinois 61604 SUA, pe 26 martie 1997. Numărul de acces  
15 este NRRL B-21671.

17 Pentru a testa expresia genei toxinei PS80JJ1, PS149B1 și PS167H2 în *B.t.*,  
pMYC2426, pMYC2427 și pMYC2429 au fost transformați separat în gazda *B.t.* necristaliferă  
(Cry-), CryB (A. Aronson, Purdue University, West Lafayette, IN) prin electroporare.

19 Tulpinile recombinante au fost desemnate MR543 (CryB [pMYC2426]), MR544 (CryB  
[pMYC2427]) și respectiv MR546 (CryB [pMYC2429]). Expresia ambelor toxine de  
21 aproximativ 14 kDa și 44 kDa a fost demonstrată prin analiza SDS-PAGE pentru fiecare  
tulpină recombinată.

23 Preparatele din cristale de toxină din tulpinile recombinante au fost analizate împotriva  
omizii porumbului. Dieta lor a fost amendată cu acid sorbic și SIGMA pen-strep-ampho-B.  
25 Materialul a fost adus la o rată de 50  $\mu$ l de suspensie per  $\text{cm}^2$  arie a suprafeței de dietă. S-au  
efectuat analize biologice cu larve neonate de omida porumbului (*Diabrotica virgifera*  
27 *virgifera*), timp de 4 zile, la aproximativ 25°C. Procentul de mortalitate și estimările  $\text{LC}_{50}$   
pentru clone (pelete) sunt prezentate în tabelul 9. Un control  $\text{dH}_2\text{O}$  a produs o mortalitate de  
29 7%.

Tabelul 9

31 Probă	33 Procentul de mortalitate la anumite concentrații ale proteinei ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )		
	50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	0,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$
35 pelet MR543	44%	19%	9%
pelet MR544	72%	32%	21%
37 pelet MR546	52%	32%	21%

39 Cantitățile de proteine de 14 kDa și 44.3 kDa prezente în preparatele cristaline au fost  
estimate prin densitometrie și folosite pentru a calcula activitatea specifică exprimată ca  $\text{LC}_{50}$ .  
41 Estimările  $\text{LC}_{50}$  pentru clone (pelete) sunt prezentate în tabelul 10 (testarea biologică a  
clonelor *B.t.* pentru omida porumbului *Diabrotica virgifera virgifera*).

# RO 123431 B1

Testarea biologică a clonelor *B.t.* pentru omida porumbului *Diabrotica virgifera virgifera*

Tabelul 10

Clonă B.t.	Tulpină parentală B.t.	LC <sub>50</sub> (µg/cm <sup>2</sup> )*	95% CL	Pantă
MR543	PS80JJ1	37	17-366*	0,79
MR544	PS167H2	10	6-14	1,6
MR546	PS149B1	8	4-12	1,5
nedisponibil	Control celulă CryB	4%	nedisponibil	nedisponibil
nedisponibil	Control apă	4%	nedisponibil	nedisponibil

\* Procentul de mortalitate la doza maximă este furnizat pentru controale

\*\* 90% CL

## Exemplul 14. Analiza mutațională a polipeptidelor de 14 kDa și 44 kDa în operonul toxinei binare PS80JJ1

Genele toxinelor binare ale prezentei invenții sunt, în starea lor naturală, aranjate în mod obișnuit într-un operon în care gena proteinei de 14 kDa este mai întâi transcrisă, urmată apoi de cea a genei proteinei de 45 kDa. Aceste gene sunt separate printr-o regiune relativ scurtă necodificatoare. ORF reprezentative sunt arătate în SECV ID NR.: 30, SECV ID NR.: 34 și SECV ID NR.: 39.

Pentru a investiga contribuția proteinelor cristaline individuale de 14 kDa și 44.3 kDa pentru activitatea împotriva omizii porumbului, fiecare genă din operonul PS80JJ1 a fost supusă mutației în experimente separate pentru a aboli expresia uneia dintre proteine. Gena intactă a fost apoi exprimată în *B.t.* și proteinele recombinante au fost testate pentru activitatea împotriva omizii porumbului.

Mai întâi, gena de 44.3 kDa codificată în pMTC2421 a fost supusă mutației prin trunchiere la situsul EcdRI la poziția bazei 387 a cadrului de citire deschis. Această trunchiere și ligare ulterioară cu secvențe de vector au avut ca rezultat un cadru de citire deschis care codifică o proteină de fuziune ipotetică de aproximativ 14 kDa. Operonul rezultat, care codifică gena intactă de 14 kDa și gena trunchiată de 45 kDa, a fost subclonat în vectorul purtător cu număr mare de copii, pHT370 (Arantes, O., D. Lereclus [1991] Gene 108: 115-119) pentru analizele expresiei în *Bacillus thuringiensis*. Plasmidul rezultat, pMYC2424 a fost transformat în gazda *B.t.* necristaliferă (Cry-), CryB (A. Aronson, Purdue University, West Lafayette, IN), prin electroporare. Tulpina recombinată rezultată a fost desemnată MR541. Doar proteina PS80JJ1 de 14 kDa a fost detectabilă prin analiza SDS-PAGE a culturilor de spori de MR541. În testele biologice împotriva omizii porumbului nu s-a observat mortalitate pentru preparatele de MR541 care exprimă doar proteina PS80JJ1 de 14 kDa.

Apoi, gena de 14 kDa codificată pe pMYC2421 a fost supusă mutației prin inserție pe un linker oligonucleotidă care conține codoni de terminalizare în toate cadrele de citire deschise posibile la situsul NruI la poziția bazei 11 a cadrului de citire deschis. Secvența acestui linker este 5'-TGAGTAACTAGATCTATTCAATTA. 3'. Linker-ul introduce un situs BgXII pentru confirmarea inserției prin digerarea restricției BgITL. Clonele plasmid care conțin linker-ul mutagen au fost identificate cu flgrJII și secvențiate pentru verificare. Inserțul operon care codifică mutațiile nonsens de 14 kDa a fost subclonat în pHT370, rezultând plasmidul pMYC2425. Acest plasmid a fost transformat în CryB prin electroporare pentru a produce tulpina *B.t.* recombinată MR542. Doar proteina PS80JJ1 de 44.3 kDa a fost exprimată în

# RO 123431 B1

1 culturile de spori de MR542 așa cum este arătat de analiza SDS-PAGE. Mortalitatea  
împotriva omizii porumbului nu a fost observată pentru preparatele de MR542 care exprimă  
3 doar proteina PS80JJ1 de 44.3 kDa.

**Exemplul 15.** *Expresia heterologă a unei singure gene, purificarea și testarea  
5 biologică a polipeptidelor de 14 și 44.3 kDa din PS149B1 în Pseudomonas fluorescens*

Genele polipeptidelor de 14 kDa și 44.3 kDa din PS149B1 au fost separate în vectorii  
7 pasmid prin metode standard de donare ADN și transformate în *Pseudomonas fluorescens*.  
Tulpina de *Pseudomonas fluorescens* recombinată care exprimă numai gena de 14 kDa a  
9 PS149B1 a fost desemnată MR1253. Tulpina de *Pseudomonas fluorescens* recombinată  
care exprimă numai gena de 44.3 kDa a PS149B1 a fost desemnată MR1256.

11 MR1253 și MR1256 exprimă fiecare individual una dintre cele două proteine binare,  
au fost crescute în cuve de fermentare de 1 l. O porțiune din fiecare cultură a fost apoi  
13 peletată prin centrifugare, lizată cu lizozom și tratată cu ADNază I pentru a obține incluziuni  
de proteine semipure. Aceste incluziuni au fost apoi solubilizate în citrat de sodiu 50 mM  
15 (pH 3,3) prin agitare ușoară la 4°C, timp de o oră.

Proteina de 14 kDa s-a dizolvat ușor în această soluție tampon, în timp ce proteina  
17 de 44.3 kDa a fost parțial solubilă. Frațiunile solubilizate au fost apoi centrifugate la  
15.000 g, timp de 20 min, iar supernatanții au fost reținuți.

19 Proteina de 14 kDa a fost suplimentar purificată prin cromatografie cu schimb de ioni.  
Proteina de 14 kDa solubilizată a fost legată la o coloană Econo-S și eluată cu clorură de  
21 sodiu gradient 0-1 M.

MR1253 (proteina de 14 kDa) pură din punct de vedere cromatografic și preparatul  
23 solubilizat de citrat de sodiu (pH 3,3) al MR1256 (proteina de 45 kDa) au fost apoi testate  
pentru activitate asupra omizii porumbului individual sau împreună, la un raport molar de 1  
25 până la 10 (proteina de 45 kDa față de proteina de 14 kDa). Mortalitatea observată pentru  
fiecare dintre proteinele singure nu a fost peste nivelurile de fond (ale probei apă/control),  
27 dar a avut ca urmare o mortalitate de 87% atunci când au fost combinate în raportul de mai  
sus (vezi tabelul 11).

29

Tabelul 11

Raport molar (45 kDa față de 14 kDa)	Volum de încărcare	ug 45 kD/godeu	ug 14 kD/godeu	Proteină totală ug	Mortalitate la omida porumbului
0 la 1	100 ul	0	260	260	13
1 la 0	200 ul	260	0	260	9
1 la 10	100 ul	65	195	260	87
apă	100 ul	0	0	0	11

39 **Exemplul 16.** *Identificarea noilor gene de toxine adiționale de 14 kDa și 44.3 kDa  
prin hibridizarea ADN genomic total de B.t. și prin RFLP*

41 ADN genomic total de la fiecare izolat a fost preparat folosind un kit Qiagen CNEasy  
cu 96 godeuri pentru țesuturi. ADN-ul din 96 godeuri a fost denaturat anterior colorării prin  
43 adăugarea de 10 ul din fiecare-mostră ADN și 10 ul de NaOH 4 M la 80 ul apă distilată  
sterilă. Mostrele au fost incubate la 70°C, timp de o oră, după care la fiecare godeu s-au  
45 adăugat 100 ul de 20xSSC. Cu fiecare set din 94 mostre s-a adăugat ADN genomic total de



# RO 123431 B1

PS149B1 ca un control pozitiv de hibridizare, iar ADN genomic total de cryB- a fost inclus în fiecare set din 94 de mostre ca un control negativ de hibridizare. Fiecare set din 96 de mostre a fost aplicat pe membrane de nailon Magnacharge folosind două distribuitoare cu 48 de godeuri (Hoefer Scientific), urmată de două spălări cu 10xSSC. Membranele au fost încălzite la 80°C timp de o oră și au fost păstrate uscate până la folosire. Membranele au fost prehibridizate și hibridizate în soluție standard de formamidă (50% formamidă, 5xSSPE, 5x soluție Denhardt, 2% SDS, 100 ug/ml ADN monocatenar) la 42°C. Membranele au fost spălate în două condiții: 2xSSC/0,1% SDS la 42°C (stringență redusă) și 0,2xSSC/0,1% SDS la 65°C (stringență moderată până la ridicată). Membranele au fost probate cu un fragment PCR de aproximativ 1,3 kbp al genei de 44.3 kDa al PS149B1 amplificat din pMTC2429, folosind primenii cap-coadă SECV ID NR.: 8 și un primer coadă-cap cu secvența 5'-GTAGAAGCAGAACAAGAAGGTATT 3'(SECV ID NR.: 46). Proba a fost marcată radioactiv folosind un Prime-it II (Stratagene) și 32-P-dCTP, purificată în coloane cu Sephadex, denaturată la 94°C și adăugată la soluția proaspătă de hibridizare. Tulpinile care conțin gene cu omologie cu proba PS149B1 au fost identificate prin expunerea membranelor la un film de radiații X.

Următoarele tulpini au fost identificate prin reacții de hibridizare pozitive: PS184M2, PS185GG, PS187G1, PS187Y2, PS201G, PS201HH2, PS242K10, PS69Q, KB54A1-6, KR136, KR589, PS185L12, PS185W3, PS18SZ11, PS186L9, PS187L14, PS186FF, PS131W2, PS14702, PS158T3, PS158X10, PS185FF, PS187F3, PS198H3, PS201H2, PS201L3, PS203G2, PS203J1, PS204C3, PS204G4, PS204I11, PS204J7, PS210B, PS213E8, PS223L2, PS224F2, PS236B6, PS246P42, PS247C16, KR200, KR331, KR625, KR707, KR959, KR1209, KR1369, KB2C-4, KB10H-S, KB456, KB42C17-13, KB45A43-3, KB54A33-1, -KB58A10-3, KB59A54-4, KB59A54-5, KB53B7-8, KB53B7-2, KB60F5-7, KB60F5-11, KB59A58-4, KB60F5-15, KB61A18-1, KB65A15-2, KB65A15-3, KB65A15-7, KB65A15-8, KB65A15-12, KB65A14-1, KB3F-3, T25, KB53A71-6, KB65A11-2, KB68B57-1, KB63A5-3, și KB71A118-6.

Identificarea suplimentară și clasificarea noilor gene de toxine în preparate de ADN genomic total a fost realizată folosind probele marcate cu <sup>32</sup>P și în condițiile de hibridizare descrise mai sus în acest exemplu. ADN-ul total genomic a fost preparat ca mai sus sau cu Qiagen Genamic-Tip 20/G și a fost folosit pentru analiza Southern Genomic DNA. Buffer Set conform protocolului pentru bacterii Gram-pozitive (Qiagen Inc.; Valencia, CA.). Pentru Southern blot, aproximativ 1-2 μg din ADN-ul genomic total de la fiecare tulpină identificat prin analiză slot blot a fost digerat cu enzime Dral și NdeI, supuse electroforezei pe gel de agaroză 0,8% și imobilizate pe o membrană de nailon folosind metode standard (Maniatis și col.). După hibridizare, membranele au fost spălate în condiții de stringență redusă (2xSSC/0,1% SDS la 42°C) și expuse la film. Mărimile fragmentelor de ADN au fost estimate folosind programul software BioRad Chemidoc. A fost utilizat polimorfismul lungimii fragmentelor de restricție pentru a clasifica (arbitrar) genele care codifică toxina de 44 kDa. Aceste clasificări sunt prezentate în tabelul 12.

# RO 123431 B1

Tabelul 12

Clasă RFLP (45 & 14 kD)	Numele tulpinei izolate
A	149B1
A'	KR331, KR1209, KR1369
B	167H2, 242K10
C	184M2, 201G, 201HH2
D	185GG, 187Y2, 185FF1, 187F3
E	187G1
F	80JJ1, 186FF, 246P42
G	69Q
H	KB54A1-6
I	KR136
J	KR589
K	185L12, 18SW3, 185Z11, 186L9, 187L14
L	147U2, 210B, KB10H-5, KB58A10-3, KB59A54-4, KB59A54-5, KB59A58-4, KB65A14-1
M	158T3, 158X10
N	201H2, 201L3, 203G2, 203J1, 204C3, 204G4, 204111, 204J7, 236B6
P	223L2, 224F2
P'	247C16, KB45A43-3, KB53B7-8, KB53B7-2, KB61A18-1, KB3F-3, KB53A71-6, KB65M1-2, KB68B57-1, KB63A5-3, KB71A118-6
Q	213E8, KB60F5-11, KB60F5-15
R	KR959
S	KB2C-4, KB46, KB42C17-13
T	KB54A33-1, KB60F5-7
U	T25
V	KB65A15-2, KB6SM5-3, KB65A15-7, KB65M5-8, KB65M5-12

### Exemplul 17. Secvențierea ADN a genelor toxinelor binare adiționale

Oligonucleotide degenerate au fost desemnate să amplifice toate sau o parte din genele de 14 și 44.3 kDa de la tulpini *B.f.* identificate prin hibridizare cu produsul PCR 149B1 descris mai sus. Oligonucleotidele au fost desemnate pe blocurile de secvențe conservate-identificate prin alinierea genelor de 14 kDa sau 44.3 kDa de la PS149B1, PS167H2 și PS80JJ1. Primeri cap-coadă pentru ambele gene au fost desemnați să înceapă la codonul de inițiere ATG. Primerii coadă-cap au fost desemnați pe cât posibil aproape de capătul 3' al fiecărei gene respective.

# RO 123431 B1

Primerii desemnați să amplifice gena de 14 kDa sunt după cum urmează:	1
149DEG1 (cap-coadă): 5'- ATG TCA GCW CGY GAA GTW CAY ATT G-3' (SECV ID NR.: 47)	3
149DEG2 (coadă-cap): 5'- GTY TGA ATH GTA TAH GTH ACA TG-3' (SECV ID NR.: 48)	5
Acești primeri amplifică un produs de aproximativ 340 perechi de baze.	
Primerii desemnați să amplifice gena de 44.3 kDa sunt după cum urmează:	7
149DEG3 (cap-coadă): 5'- ATG TTA GAT ACW AAT AAA RTW TAT G-3' (SECV ID NR.: 49)	9
149DEG4 (coadă-cap): 5'- GTW ATT TCT TCW ACT TCT TCA TAH GAA G-3' (SECV ID NR.: 50)	11
Acești primeri amplifică un produs de aproximativ 1.100 perechi de baze.	
Condițiile PCR utilizate pentru a amplifica produsele genetice sunt după cum urmează:	13
95°C, 1 min, un ciclu	15
95°C, 1 min	
50°C, 2 min, acest set este repetat 35 de cicluri	17
72°C, 2 min	
72°C, 10 min, un ciclu	19
Produsele PCR au fost fracționate pe geluri de agaroză 1% și purificate din masa de gel folosind un kit Qiaexll (Qiagen) . Fragmentele purificate rezultate au fost ligate în vectorul de clonare pCR-TOPO-folosind un kit de clonare TOPO TA (Invitrogen). După ligare, jumătate din reacția de ligare a fost transformată în celule ultracompetent XL10 Gold (Stratagene). Transformații au fost apoi cercetați prin PCR cu primerii vectori 1212 și 1233. Clonele care conțin inserțiile au fost crescute pe medii LB/carbenicilină pentru prepararea plasmidelor folosind un kit "Qiagen DNA plasmid miniprep".	
Fragmentele derivate din PCR clonate au fost apoi secvențiate folosind sistemul de secvențiere automată Applied Biosystems și programul software asociat. Secvențele de gene de toxine noi adiționale și polipeptidele înrudite cu toxinele holotip de 14 și 44.3 kDa de la PS80JJ1 și PS149B1 sunt listate ca SECV ID NR.: 51-126. Secțiunea de mai înainte cu descrierea pe scurt a secvențelor asigură explicații suplimentare ale acestor secvențe.	21
23	25
27	29
31	33
35	37
39	41
43	45
47	49
49	

# RO 123431 B1

## 1 Exemplul 18. *Transgene de toxină PS149B1 și transformarea plantelor*

3 Transgene sintetice separate optimizate pentru utilizarea cu codonul porumbului au  
4 fost desemnate atât pentru componentele toxinei de 14 kDa cât și pentru cea de 44.3 kDa.  
5 Versiunile sintetice au fost desemnate pentru a modifica codonul guaninei și citozinei către  
6 un nivel mai tipic pentru ADN de plante. Transgene preferate optimizate pentru plante sunt  
7 descrise în SECV ID NR.: 127-128. Regiunea promotor folosită pentru expresia ambelor  
8 transgene a fost promotorul ubiquitină *Zea mays* plus exonul 1 *Z. mays*. și intronul 1 *Z. mays*.  
9 (Christensen, A.H, și col. (1992) Plant Mol. Biol. 18: 675-689). Terminatorul de transcripție  
10 folosit pentru ambele transgene a fost terminatorul inhibitor II proteinază (Pinii) al cartofului  
11 (An, G, și col., 1989 Plant Cell 1: 115-22).

12 A fost folosită fosfinotricin acetiltransferaza (PAT) ca marker selectabil pentru  
13 transformarea plantei. Gena fosfinotricin acetiltransferaza (*pat*) a fost izolată din bacteria  
14 *Streptomyces viridochromogenes* (Eckes P. și col., 1989). Proteina PAT acetilează  
15 fosfinotricina, sau precursorul acesteia demetilfosfinotricina, conferind toleranță la o  
16 fosfinotricină sintetizată chimic cum ar fi erbicidul glufozinat de amoniu. Acetilarea  
17 convertește fosfinotricina la o formă inactivă care nu mai este toxică pentru plantele de  
18 porumb. Glufozinatul de amoniu este un erbicid neselectiv, nesistemic, de spectru larg.  
19 Ţesutul de regenerare al porumbului sau plantele individuale de porumb tolerante la erbicidul  
20 glufozinat de amoniu pot fi ușor identificate prin încorporarea PAT într-un mediu de  
21 regenerare sau prin aplicare prin pulverizare a erbicidului pe frunze.

22 Versiunea sintetică a genei *pat* a fost produsă pentru a modifica codonul guaninei și  
23 citozinei la un nivel mai tipic pentru ADN de-plante. Promotorul pentru gena *pat* este  
24 promotorul CaMV al transcriptului 35S de la virusul mozaic al conopidei (Pietrzak și col.,  
25 1986). Terminatorul de transcripție este terminatorul CaMV 35 S.

26 Pentru transformarea țesutului de porumb, a fost excizată dintr-un plasmid complet  
27 o porțiune liniară de ADN, care conține atât PS149 de 14 și 44.3 kDa și secvențele de  
28 codificare marker selectabil *pat*, cât și componentele de reglare necesare pentru expresie.  
29 Această porțiune liniară de ADN a desemnat un insert care a fost utilizat în procesul de  
30 transformare.

31 Plantele de porumb care conțin transgenele de 14 kDa și 44.3 kDa ale PS149B1 au  
32 fost obținute prin bombardament cu microproiectile folosind tunul de particule Biolistic®O  
33 PDS-1000He fabricat de Bio-Rad, descris în esență de Klein și col (1987). Embrionii imaturi,  
34 izolați din știuleți de porumb recoltați la aproximativ 15 zile după polenizare, au fost cultivați  
35 pe medii inițiator de calus timp de trei până la opt zile. O zi după transformare, particule  
36 microscopice de wolfram au fost acoperite cu ADN purificat și accelerate în embrionii  
37 cultivați, unde insertul ADN a fost încorporat în cromozomul celular. Șase zile după  
38 bombardament, embrionii bombardați au fost transferați pe mediul inițiator de calus care  
39 conține glufozinat (Bialaphos) ca agent de selecție. A fost obținut țesut de calus sănătos,  
40 rezistent și a fost transferat, în mod repetat, pe mediu de selecție proaspăt, timp de  
41 aproximativ 12 săptămâni. Plantele au fost regenerare și transferate în seră. A fost obținut  
42 un număr total de 436 plante regenerare. Eșantioane de frunze au fost prelevate pentru  
43 analiză moleculară, pentru a se verifica prezența transgenelor prin PCR și pentru a se  
44 confirma expresia proteinei străine prin ELISA. Plantele au fost apoi supuse unei testări  
45 biologice complete folosind omida porumbului *Diabrotica virgifera virgifera*. Plantele pozitive  
46 au fost încrucișate cu linii endogame pentru a se obține semințe de la plantele transformate  
47 inițial. S-a descoperit că aceste plante sunt rezistente la stricăciunile produse de omida  
porumbului la testele atât în seră, cât și pe câmp.

# RO 123431 B1

## Exemplul 19. Teste biologice suplimentare

Preparate proteice din tulpini identificate în exemplul 16 au fost testate pentru activitate împotriva omizii porumbului *Diabrotica virgifera virgifera* folosind metodele de testare de bază, așa cum au fost descrise în exemplul 13. Rezultatele sunt arătate în tabelul 13.

Tabelul 13

Tulpină	LC <sub>50</sub> (ug/cm <sup>2</sup> )	95% CI
KB45A43-3	9,48	6,58-15,27
213'E'8	10,24	7,50-19,87
KR707	11,17	8,27-22,54"
185GG	11,53	7,51-16,81
187Y2	13,82	11,08-17,67
149B1	14,77	4,91-27,34
69Q	27,52	117,28-114,77"
167H2	31,38	19,35-47,60
KB54A33-10	32,62	24,76-83,85
185Z11	34,47	nefăcut
KB60F5-7	34,67	19,15-124,29
242K10	34,73	21,08-58,25
201G	34,90	13,20-355,18"
204J7	38,57	29,83-48,82
KB60F5-15	38,62	15,00-2,59E03
80JJ1	41,96	27,35-139,43
203J1	43,85	23,18-69,51
KR589	47,28	29,83-230,71"
201HH2	49,94	23,83-351,77
KB60F5-11	51,84	19,38-1313,75"
158X10	52,25	43,13-77,84"
KB58A10-3	53,77	ne făcut
201L3	55,01	41,01-78,96
158T3	58,07	39,59-211,13
184M2	60,54	26,57-411,88
204G4	69,09	52,32-93,83

# RO 123431 B1

Tabelul 13 (continuare)

1  
3  
5  
7  
9  
11  
13  
15  
17  
19  
21  
23  
25  
27  
29  
31

Tulpină	LC <sub>50</sub> (ug/cm <sup>2</sup> )	95% CI
KB59A58-4	70,35	48,90-144,90
201H2	71,11	52,40-130,35
203G2	81,93	57,13-226,33
KBS9A54-4	82,03	38,50-1,63E03
204111	88,41	62,48-173,07
236B6	89,33	64,16-158,96
KR1369	93,25	71,97-205,04"
KB63A5-3	94,52	51,56-542,46
204C3	125,45	85,26-427,67"
KR1209	128,14	91,57-294,56
185W3	130,61	ne făcut
KR625	160,36	nefăcut
210B	201,26	48,51-0,14E+06"
KB10H-5	214,25	87,97-8,22E+03
KB68B57-1	264,30	48,51-8,95E+04"
223L2	3,81E+02	nefăcut
KR136	7,83E+02	-
T25	1,30E+03	nefăcut
KB61A18-1	2,58E+03	nefăcut
147U2	3,67E+03	nefăcut
KR200	2,14E+05	nefăcut
KB59A54-5	3,32E+05	nefăcut
KB3F-3	4,07E+05	nefăcut
187GI(bs)	3,50E+07	nefăcut
MR559	20***	nedisponibil
KB42C17-13	26%**	nedisponibil
224F2	33%**	nedisponibil
KR959	41%**	nedisponibil
KB2C-4	42%**	nedisponibil
198H3	46%**	nedisponibil

Tabelul 13 (continuare)

Tulpină	LC <sub>50</sub> (ug/cm <sup>2</sup> )	95% CI	
KR331	47%**	nedisponibil	3
KB46	55%**	nedisponibil	
KB71A118-6	71%**	nedisponibil	5
KB53B7-2	84%**	nedisponibil	
187Y2	nefăcut	nedisponibil	7
185L12	nefăcut	nefăcut	
186L9	nefăcut	nedisponibil	9
KB54A1-6	nefăcut	nedisponibil	
187L14	nefăcut	nedisponibil	11
187G1(b)	nt	nt	
187G1(s)	nt	nt	13

**Exemplul 20.** *Clonare moleculară, expresie și analiza secvențelor ADN ale unei noi endotoxine binare de la tulpina PS201L3 de Bacillus thuringiensis* 15

ADN-ul genomic de la PS201L3 a fost preparat din celule crescute în culturi în recipiente agitate folosind un kit Qiagen Genomic tip 500/G și Genomic DNA Buffer Set conform protocolului pentru bacterii Gram-pozitive (Qiagen Inc.; Valencia, CA). A fost construită o bancă de gene din ADN de PS201L3 parțial digerat cu Sau3AI. Digeratele de restricție parțiale au fost fracționate prin electroforeză pe gel de agaroză. Fragmentele ADN de mărime 9,3 până la 23 kbp au fost excizate din gel, electroeluate din porțiile de gel, purificate pe coloană de schimb ionic Elutin-D (Schleicher and Schuell, Keene, NH) și recuperate prin precipitare în etanol. Inserurile Sau3AI au fost ligate în LambdaGem-11 (Promega, Madison, WI) digerate în BanHI. Fagii recombinanți au fost împachetați folosind Gogapack III XL Packaging Extract (Stratagene La Jolla, CA) și placcate pe celule de *E. coli* KW251. Plăcile au fost ridicate pe membrane de transfer Nytran Nylon (Schleicher & Schuell, Keene, NH) și probate cu probă de genă marcată cu <sup>32</sup>P-dCTP pentru secvențele de codificare a toxinei binare. Această probă de genă a fost un produs PCR de aproximativ 1,0 kb amplificat folosind matrița de ADN genomic de PS201L3 și oligonucleotidele "15kfor1" și "45krev6". 17  
19  
21  
23  
25  
27  
29  
31

Aceste secvențe de nucleotide folosite pentru PCR și secvențiere sunt după cum urmează: 33

15kfor1 (SECV ID NR.: 131) ATGTCAGCTCGCGAAGTACAC  
45krev6 (SECV ID NR.: 132) GTCCATCCCATTAATTGAGGAG 35

Membranele au fost hibridizate cu proba peste noapte la 65°C apoi spălate de trei ori cu 1xSSPE și 0,1% SDS. Treisprezece plăci au fost identificate prin autoradiografie. Aceste plăci au fost ulterior adunate și înmuiate peste noapte în 1 ml 31 Buffer + 10 ul CH<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub>. Fagii au fost placcati pentru liză confluentă pe celule gazdă KW251; 6 plăci confluențe au fost îmbibate în SM și folosite pe scară largă pentru preparate ADN de fagi. ADN de fagi a fost digerat cu diverse enzime și pus pe geluri de agaroză 0,7%. Gelurile au fost transferate pe membrane Nytran prin Southern blotting și probate cu același fragment ADN amplificat prin 37  
39  
41

# RO 123431 B1

1 PCR ca mai sus. A fost identificată o catenă Xbal de hibridizare de aproximativ 6,0 kb și  
subclonată în pHT370, un vector purtător de *E. coli/Bacillus thuringiensis* (Arantes O, D.  
3 Lereclus [1991] Gene 108: 115-19) pentru a genera pMYC2476. Celulele de *E. coli* XL10  
Gold Ultracorapotent (Stratagene) transformate cu pMYC2476 au fost desemnate MR1506.  
5 pMYC2476 a fost transformat ulterior în celule CryB necristalifere prin electroporare și  
selecție pe plăci EM3+eritromicină (20 ug/ml) la 30°C. CryB[pMYC2476] recombinat a fost  
7 desemnat MR561.

O subcultură de MR1506 a fost depozitată în colecția permanentă a Patent Culture  
9 Collection (NRRL), Regional Research Center, 1815 North University Street, Peoria, Illinois  
61604 USA pe 1 iunie, 2000. Numărul de acces este B-30298.

11 Tulpina *B.t.* MR561 a fost examinată pentru expresia proteinelor toxine binare  
PS201L3 prin imunoblotting. Celulele au fost crescute în mediu lichid NYS-CAA +  
13 eritromicină (10 ug/ml) peste noapte, la 30°C. Cultura a fost apoi peletată prin centrifugare  
și o porțiune din peletele celulare au fost resuspendate și puse pe geluri SDS-PAGE. Ambele  
15 proteine de 14 kDa și 44 kDa au fost evidente prin analiză Western Blot atunci când au fost  
probate cu anticorpi specifici pentru ambele toxine de 14 kDa sau respectiv 44 kDa de  
17 PS149B1.

Secvențierea ADN a genelor de toxine codificate pe pMYC2476 a fost realizată  
19 folosind un secvențiator automat ABI377. Secvența de ADN pentru gena PS201L3 de  
14 kDa este arătată în SECV ID NR.: 133. Secvența de peptide dedusă pentru toxina de  
21 14 kDa a PS201L3 este arătată în SECV ID NR.: 134. Secvența de ADN pentru gena de  
44 kDa a PS201L3 este arătată în SECV ID NR.: 135. Secvența de peptide dedusă pentru  
23 toxina de 44 kDa a PS201L3 este arătată în SECV ID NR.: 136.

Tabelul următor arată similaritatea și identitatea de secvențe a genelor binare și  
25 proteinelor din 201L3 și 149B1. Pentru aceste comparații a fost folosit programul BESTFIT  
(parte din pachetul software GCG). BESTFIT folosește algoritmul omologiei locale a lui Smith  
27 și Waterman (Advances in Applied Mathematics 2: 482: 489(1981)).

29 Tabelul 14

201L3 față de 149B1	% similaritate	% identitate
31 secvența de nucleotide de 14 kDa	-	71,1
secvența de peptide de 14 kDa	63,9	54,1
33 secvența de nucleotide de 45 kDa	-	76,1
secvența de peptide de 45 kDa	70,9	62,7

35

**Exemplul 21.** Clonarea moleculară și analiza de secvențe ADN a noilor gene de  $\delta$ -  
37 endotoxine din tulpinile PS187G1, P3201HH2 și KR1369 de *Bacillus thuringiensis*

S-a preparat ADN celular total din tulpinile PS187G1, PS201HH2 și KR1369 de  
39 *Bacillus thuringiensis* crescute până la o densitate optică de 0,5-1,0 la lumină vizibilă de 600  
nm în bullion Luria Bertani (LB). ADN-ul a fost extras folosind un kit Qiagen Genomic-tip  
41 500/g și Genomic CNR. Buffer Set conform protocolului pentru bacteriile Gram-pozitive  
(Qiagen Inc.; Valencia, CA). Băncile de cosmide PS187G1, PS201HH2 și KR1369 au fost  
43 construite în vectorul SuperCOs1 (Stratagene) folosind inserturi de ADN celular total de  
PS187G1, PS201HH2 și KR1369, digerate parțial cu Nde II. Celulele XLI-Blue MR  
45 (Stratagene) au fost transfectate cu cosmidele împachetate pentru a obține clone rezistente



# RO 123431 B1

la carbenilicină și kanamicină. Pentru fiecare tulpină, au fost crescute 576 colonii de cosmide în blocuri de 96 de godeuri în 1 ml LB + carbenilicină (100 ug/ml) + kanamicină (50 ug/ml) la 37°C timp de 18 h și replicate pe filtre de nylon pentru screening prin hibridizare. 1  
3

Un amplicon PCR care conține aproximativ 1000 bp din operonul toxinei de 14 kDa și 44 kDa al PS187G1, PS201HH2 sau KR1369 a fost amplificat din ADN genomic de PS187G1, PS201HH2 sau KR1369 folosind primeri desemnați pentru a amplifica omologi binari: 5  
7

15kfor1: 5'-ATG TCA GCT CGC GAA GTA CAC-3' (SECV ID NR.: 131)

45krev6: 5'-GTC CAT CCC ATT AAT TGA GCA G-3' (SECV ID NR.: 132) 9

Fragmentul ADN a fost purificat pe gel folosind extracția QiaQuick (Qiagen). Proba a fost radiomarcată cu <sup>32</sup>P-dCTP folosind un kit Prime-It II (Stratagene) și folosită în soluție apoasă de hibridizare (6xSSPE, 5x soluție Denhardt, 0,1% SDS, 0,1 mg/ml ADN denaturat) cu filtrele de colonie la 65°C, timp de 16 h. Filtrele de colonie au fost spălate scurt, o dată în 0,5xSSC/0,1%SDS la temperatura camerei, urmată de două spălări adiționale timp de 10 min la 65°C în 0,5xSSC/0,1%SDS. Filtrele au fost apoi expuse la film de raze X timp de 20 min (PS187G1 și PS201HH2) și timp de o oră (KR1369). O clonă cosmid care a hibridizat puternic cu proba a fost selectată pentru analize suplimentare pentru fiecare tulpină. S-a confirmat că aceste clone cosmid conțin gena vizată de aproximativ 1000 bp a toxinei de 14 kDa și 44 kDa prin amplificare PCR cu primerii listați mai sus. Clona cosmid a PS187G1 a fost desemnată PMYC3106; celulele recombinante *E. coli* XLI-Blue MR care conțin pMYC3106 sunt desemnate MR1508. Clona cosmid a PS201HH2 a fost desemnată pMYC3107; celulele recombinante *E. coli* XLI-Blue MR care conțin pMYC3107 sunt desemnate MR1509. Clona cosmid a KR1369 a fost desemnată pMYC3108; celulele recombinante *E. coli* XLI-Blue MR care conțin pMYC3108 sunt desemnate MR1510. Subculturi de MR1509 și MR1510 au fost depozitate în colecția permanentă a Patent Culture Collection (NRRL), Regional Research Center, 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604 USA pe 8 august, 2000. Numerele de acces sunt NRRL B-30330 și respectiv NRRL-B 31331. 11  
13  
15  
17  
19  
21  
23  
25  
27

Genele toxinelor de 14 kDa și 44 kDa din PS187G1, PS201HH2 și KR1369 codificate de pMYC3106, pMYC3107 și respectiv pMYC3108 au fost secvențiate folosind sistemul automat de secvențiere ABI377 și programul software asociat. 29  
31

Secvențele de nucleotide de 14 kDa și 44 kDa din PS187G1 și secvențele de polipeptide deduse sunt arătate ca SECV ID NR.: 137-140. Ambele gene de toxine de 14 kDa și 44 kDa sunt cadre de citire deschise complet. Secvențele de nucleotide cadre de citire deschise ale toxinei de 14 kDa a PS187G1, secvențele de nucleotide cadre de citire deschise a toxinei de 44 kDa și respectivele secvențe de aminoacizi deduse sunt noi în comparație cu alte gene de toxine care codifică proteine cu activitate pesticidă. 33  
35  
37

Secvențele de nucleotide de 14 kDa și 44 kDa ale PS201HH2 și secvențele de polipeptide deduse sunt arătate ca SECV ID NR.: 41-144. Secvența genei toxinei de 14 kDa este cadrul de citire deschis complet. Secvența genei toxinei de 44 kDa este o secvența parțială a acestei gene. Secvența de nucleotide cadru de citire deschis al toxinei de 14 kDa a PS201HH2, secvența parțială de nucleotide cadru de citire deschis și respectivele secvențe de aminoacizi deduse sunt noi în comparație cu alte gene de toxine care codifică proteine cu activitate pesticidă. 39  
41  
43

Secvențele de nucleotide de 14 kDa și 44 kDa ale KR1369 și secvențele de polipeptide deduse sunt arătate ca SECV ID NR.: 145-148. Ambele secvențe de gene ale toxinei de 14 kDa și 44 kDa sunt cadre de citire deschise complete. Secvența de nucleotide cadru de citire a toxinei de 14 kDa a KR1369, secvențe de nucleotide cadru de citire a toxinei de 44 kDa și respectivele secvențe de aminoacizi deduse sunt noi în comparație cu alte gene de toxine care codifică proteine cu activitate pesticidă. 45  
47  
49

# RO 123431 B1

1           **Exemplul 22.** *Construcția și expresia unei gene hibride de fuziune care conține*  
2 *genele de toxine binare de 14 kDa și 44 kDa ale PS149B1.*

3           Primerii de oligonucleotide au fost desemnați la capetele 5' și 3' ale ambelor gene de  
4 14 kDa și 44 kDa de la PS149B1. Aceste oligonucleotide au fost desemnate pentru a crea  
5 o fuziune de genă prin SOE-PCR ("Gene Splicing By Overlap Extension: Tailor-made Genes  
6 Using PCR", *Biotechniques* 8: 528-535, May 1990). Cele două gene au fuzionat împreună  
7 în ordinea inversă găsită în operonul toxinei binare native (adică mai întâi gena de 44 kDa,  
8 urmată de gena de 14 kDa).

9           Secvențele oligonucleotidelor folosite pentru SOE-PCR au fost următoarele:  
10 F1new: AAATATTATTTTATGTCAGCSDSTGAAGTACaCATTG (SECV ID NR.: 155)  
11 R1new: tctctGGTACcTtaTTAtgatttatgccatcatcgtgagg (SECV ID NR.: 156)  
12 F2new: agagaACTAGTaaaaggagataaccATGttagatactaataaag (SECV ID NR.: 157)  
13 R2new: CGTGCTGACATAAAATAATATTTTTTTAATTTTTTTTAGTGTACTTT (SECV ID  
14 NR.: 158)

15           Oligonucleotida "F1new" a fost desemnată pentru amplificarea directă de la capătul  
16 5' al genei de 14 kDa și hibridizează la capătul 3' al genei de 44 kDa. Oligonucleotida  
17 "R1new" a fost desemnată pentru amplificarea directă de la capătul 3' al genei de 14 kDa.  
18 Acest primer a fost desemnat cu doi codoni stop pentru a asigura terminarea translației.  
19 Acesta a fost de asemenea desemnat cu un situs KpnI pentru clonarea direcțională într-un  
20 vector de expresie plasmidic pentru *Pseudomonas fluorescens*. Oligonucleotida "F2new" a  
21 fost desemnată pentru amplificarea directă de la capătul 5' al genei de 44 kDa. Acesta  
22 include de asemenea o secvență de legare a ribozomului și un situs de clonare-SpeI.  
23 Oligonucleotida "R2new" a fost desemnată pentru amplificarea directă de la capătul 3' al  
24 genei de 44 kDa și hibridizează la capătul 5' al genei de 14 kDa.

25           Cele două gene au fost mai întâi amplificate independent din ADN genomic de  
26 PS149B1; gena de 14 kDa folosind "F1new" și "R1new", iar gena de 44 kDa folosind  
27 „F2new” și "R2new”. Producții au fost apoi combinați într-un tub PCR și amplificați împreună  
28 folosind "R1new" și "F2new”. În acest moment, s-a folosit Herculase™ Enhanced  
29 Polymerase Blend (Stratagene, La Jolla, CA), la o temperatură de coacere de 48°C pentru  
30 a amplifica fragmentul de ADN de aproximativ 1,5 kb care conține gena de fuziune. Acest  
31 fragment ADN a fost digerat ulterior folosind KpnI și SpeI, fracționat pe geluri de agaroză și  
32 purificat prin electroeluție. Vectorul plasmidic a fost de asemenea digerat cu KpnI și SpeI,  
33 fracționat pe geluri de agaroză, purificat prin electroeluție și tratat cu fosfatază. Vectorul și  
34 insertul au fost apoi ligați împreună peste noapte la 14°C. Fragmentele ADN ligate au fost  
35 transformate în celule P.f. MB214 prin electroporare și selecție peste noapte pe plăci  
36 LB+tetraciclină (30 ug/ml). Tulpinile care conțin gena de fuziune au fost identificate prin  
37 diagnostic PCR și secvențiate pentru verificarea matisării cu succes a genelor. O tulpină  
38 reprezentativă care conține gena de fuziune clonată a fost desemnată MR1607; plasmidul  
39 recombinat a fost desemnat pMYC2475.

40           O subkultură de MR1607 a fost depozitată în colecția permanentă a Patent Culture  
41 Collection (NRRL), Regional Research Center, 1815 North University Street, Peoria, Illinois  
42 61604 SUA, pe 8 august 2000. Numărul de acces este NRRL B-30332. MR1607 a fost  
43 crescută, iar producția de proteină a fost verificată prin SDS-PAGE și imunoblotting. O catenă  
44 proteică de aproximativ 58 kDa care reprezintă produsul de fuziune 44 kDa + 14 kDa a fost  
45 identificat atunci când s-a analizat conform Western blotting cu anticorpi specifici atât toxinei  
46 de 14 kDa cât și toxinei de 44 kDa.

47           Secvența proteinei de fuziune de 58 kDa este furnizată în SECV ID NR.: 159.  
48 Secvența de ADN pentru gena de fuziune este prevăzută în SECV ID NR.: 160.

# RO 123431 B1

## Exemplul 23. Studiul amestecului omolog binar al creșterii tulpinilor omoloage 1

Au fost selectate patru tulpini, una din fiecare familie majoră de toxine binare-149B1, 80JJ1, 210L3 și 167H2. Pentru a reduce timpul pierdut cu purificarea proteinelor de toxine individuale, au fost crescute următoarele clone de *Pseudomonas fluorescens* (P.f.): MR1253 (14 kDa de 149B1) și MEU256 (44 kDa de 149B1). În mod similar, s-au folosit clonele *B.t.* MR541 (care exprimă 14 kDa de 80JJ1) și MR542 (44 kDa de 80JJ1). Tulpinile *B.t.* au fost crescute așa cum s-a descris în exemplul 1. Peletele au fost spălate de 3 ori cu apă și stocate la -20°C până când a fost nevoie. Tulpinile de P.f. au fost crescute în loturi de 10 l în fermentatoare Biolafitte folosind proceduri standard. Peletele au fost depozitate la -80°C până când a fost nevoie. 3  
5  
7  
9

## Extracția și purificarea toxinelor 11

Purificarea 167H2, MR541, MR542, 201L3. Extracțiile peletelor celulare au fost făcute folosind soluție tampon de citrat de sodiu 100 mM la un pH care a variat de la 3,0 până la 5,5. Într-o extracție tipică, peletele au fost extrase cu un volum de soluție tampon de 1/10 până la 1/3x din volumul de cultură original. Peletele au fost suspendate în soluție tampon și plasate pe o platformă oscilantă la 4°C pe perioade de timp variind de la 2,5 h până la o noapte întreagă. Extractele au fost centrifugate, iar supranatanții au fost reținuți. Această procedură a fost repetată cu fiecare tulpină până când s-a obținut cel puțin 10 mg din fiecare proteină. SDS-PAGE a confirmat prezența/absența proteinelor de toxine în extracte folosind sistemul cu gel NuPAGE Bis/Tris (Invitrogen). Au fost preparate eșantioane conform instrucțiunilor fabricantului și au fost încărcate pe geluri 4-12%, iar electroforetogrammele au fost dezvoltate cu tampoane MES. Excepția de la această procedură a fost prepararea tuturor eșantioanelor 201L3. Aceste eșantioane au fost preparate prin diluarea 1/2x cu soluție tampon de eșantion Laemmli de la BioRad și încălzirea la 95°C, timp de 4 min. Dozarea proteinelor a fost făcută prin densitometrie pe gel cu scanare laser cu BSA drept standard (Molecular Dynamics Personal Densitometer SI). Extractele au fost limpezite prin filtrare printr-un filtru membrană de 0,2 μm și depozitate la 4°C. 13  
15  
17  
19  
21  
23  
25  
27

Purificarea MR1253 și MR1256. Proteinele recombinat MR1253 și MR1256 corespunzând proteinelor de 14 kDa și respectiv 44 kDa ale 149B1, au fost preparate ca incluziuni solubilizate. Corpii de incluziune au fost preparați folosind proceduri standard. Corpii de incluziune au fost solubilizați în EDTA 10 mM, citrat de sodiu 50 mM, pH 3,5. 29  
31

Purificarea toxinelor individuale 167H2 și 201L3. Toate extractele cunoscute că ar conține fie 14 kDa fie 44 kDa, fie pe ambele, au fost combinate. Extractul combinat a fost dializat în citrat de sodiu 100 mM, NaCl 150 mM, pH 4. Tubul de dializă a fost de la Pierce (Snakeskin 10K MWCO). Eșantioanele au fost dializate de obicei timp de aproximativ 6 h și apoi din nou peste noapte în soluție tampon proaspătă. 33  
35

Extractele au fost apoi concentrate de obicei fie cu dispozitive de filtrare centrifugale Centriprep 10, fie cu Centricon Plus-20 (Biomax-5, 5000 NMWL), dozate pentru ambele proteine de 14 kDa și 44 kDa și supuse la cromoatografie de filtrare pe gel. 37  
39

În prepararea pentru cromatografie, toate eșantioanele și soluțiile tampon au fost filtrate prin filtre de 0,2 μm și degazate. Eșantioanele au fost apoi aplicate pe coloane de filtrare cu gel HiPrep 26/60 Sephacryl care au fost echilibrate cu două volume de soluții tampon de separare, citrat de sodiu 100 mM, pH 4,0. Volumele de eșantioane au variat de la 5 până la 10 ml. Testele au fost controlate de un purificator AKTA sistem 100 FPLC (Amersham pHarmacia). Cromatografia a fost realizată la temperatura ambiantă. Soluția tampon care a curs prin coloană pe timpul procedurii a fost menținută la 0,7 ml/min. Proteinele au fost detectate prin monitorizarea absorbției UV la 280 nm. Frațiunile au fost colectate și depozitate la 4°C. Frațiunile care conțin atât proteina de 14 kDa cât și pe cea de 44 kDa au fost adunate și verificate pentru puritate prin SDS-PAGE așa cum s-a descris mai sus. 41  
43  
45  
47  
49

# RO 123431 B1

1 Pentru eșantioanele 167H2, s-au detectat două maxime mari și au fost separate unul  
de celălalt în godeuri la referință. SDS-PAGE aplicat fracțiunilor a arătat că fiecare maxim  
3 a reprezentat una dintre proteinele toxinelor.

În eșantionul 201L3, trei godeuri au definit maxime și s-a detectat un maxim rotunjit.  
5 SDS-PAGE a dezvăluit că primul maxim a reprezentat o proteină de 100 kDa plus o proteină  
de 80 kDa. Al doilea maxim a reprezentat proteina de 44 kDa, în timp ce maximul rotunjit a  
7 fost o proteină de 40 kDa. Al treilea maxim a fost proteina de 14 kDa. Frajeciunile cu proteina  
de 44 kDa din ambele eșantioane au fost combinate, așa cum au fost și toate fracjeciunile care  
9 conțin proteina de 14 kDa.

Proteinele 149B1 fuseseră obținute individual din clonele Pf MR1253 și MR1256 și  
11 prin urmare, nu a mai fost necesară purificarea suplimentară. În mod similar, recombinajii  
80JJ1, MR541 și MR542 au produs proteinele individuale de 14 kDa și 44 kDa, în felul  
13 acesta eliminând purificarea suplimentară.

**Prepararea eșantioanelor pentru testarea biologică LC<sub>50</sub> pentru omida  
15 porumbului *Diabrotica virgifera virgifera***

*Dializă.* Eșantioane din toxinele binare individuale au fost dializate în 6 l de citrat de  
17 sodiu 20 mM, pH 4,0. Prima dializă a durat mai multe ore, eșantioanele au fost transferate  
în soluție tampon proaspătă și au fost lăsate să dializeze pentru noapte. În final,  
19 eșantioanele au fost transferate în soluție tampon proaspătă și dializate încă câteva ore.  
Sursele de eșantioane de proteine au fost fie fracjeciunile adunate de la filtrarea pe gel (167H2,  
21 201L3), extractele de pelete (MR541, MR542), fie extractele de pelete de incluziune  
(MR1253, MR1256). Toate eșantioanele au fost filtrate prin membrane de 0,2 μm pentru  
23 sterilizare.

*Concentrație.* Eșantioanele au fost concentrate cu dispozitive de filtrare centrifugale  
25 Centricon Plus-20 (Biomax-5, 5000 ÎMWL) (Millipore).

*Dozare.* Eșantioanele au fost dozate pentru proteine ca mai sus. Pentru a întruni  
27 cerințele testării biologice LC<sub>50</sub>, a fost nevoie de un minimum de 6,3 mg din fiecare proteină  
de toxină, la o concentrație variind între 0,316 până la 1,36 mg/ml pentru diverse combinații.  
29 Dacă a fost necesar, eșantioanele au fost concentrate ca mai sus, sau au fost diluate cu  
soluție tampon (citrat de sodiu 20 mM, pH 4,0) și redozate.

*Mixarea testării biologice LC<sub>50</sub>/binare.* Pentru fiecare dintre cele patru tulpini,  
31 proteina de 14 kDa a fost combinată cu o cantitate de 44 kDa din fiecare tulpină, pentru a  
33 da un raport de masă de 1/1. Doza extremă a fost de 50 ug/cm<sup>2</sup> pentru amestecuri, cu  
excepția amestecurilor cu proteina de 14 kDa a 203J1. Dozele extreme ale amestecurilor cu  
35 această proteină au fost doar de 44 ug/cm<sup>2</sup>. Pentru controale, fiecare proteină a fost supusă  
individual, cum a fost și soluția tampon de extracție, citrat de sodiu 20 mM pH 4,0.  
37 Combinațiile native au fost de asemenea testate (adică 14 kDa + 44 kDa ale 149B1). Toate  
combinațiile de toxine și soluții tampon de control au fost evaluate de trei ori prin testare  
39 biologică împotriva omizii porumbului *Diabrotica virgifera virgifera*, în timp ce toxinele  
individuale au fost testate doar o dată.

41 Rezultatele sunt prezentate mai jos în tabelul 15 (Rezultatele LC<sub>50</sub> pentru combinațiile  
de toxine) și tabelul 16 (Compararea potențelor tulpinilor cu 149B1).

# RO 123431 B1

Tabelul 15

Combinatia de toxine	Încărcarea extremă ul/godeu	LC <sub>50</sub> (ug/cm <sup>2</sup> )
80JJ1 14 + 80JJ1 44	96	28(19-44 C.I.)
167H2 44	159	> doza extremă
201L3 44	172	fără răspuns la doză
149B1 44	78	fără răspuns la doză
167H2 14 + 167H2 44	161	19 (13-27 C.I.)
80JJ1 44	97	fără răspuns la doză
201L3 44	174	14 (10-22 C.I.)
149B1 44	80	fără răspuns la doză
201L3 14 + 201L3 44	193	fără răspuns la doză
80JJ1 44	116	fără răspuns la doză
167H2 44	180	fără răspuns la doză
149B1 44	99	fără răspuns la doză
149B1 14 + 149B1 44	45	10 (7-15 C.I.)
80JJ1 44	63	11 (8-16 C.I.)
167H2 44	126	8 (6-11 C.I.)
201L3 44	139	18 (13-27 C.I.)

Tabelul 16

Comparația potențelor tulpinilor cu 149B1

Combinatia de toxine	Potență relativă
149B1 14 + 149B1 44	cu care sunt comparate toate celelalte
149B1 14 + 80JJ1 44	0,9
149B1 14 + 167H2 44	1,3
149B1 14 + 201L3 44	0,5
80JJ1 14 + 80JJ1 44	0,4
167H2 14 + 167H2 44	0,5
167H2 14 + 201L3 44	0,7

Rezultatele sunt afișate de asemenea grafic în fig. 3.

Combinatiile native au fost puternic active împotriva omizii porumbului *Diabrotica virgifera virgifera* mai puțin pentru 201L3. Totuși, 44 kDa din 201L3 a fost activă atunci când a fost combinată fie cu 14 kDa de 167H2 sau 149B1. Alte combinații active au fost 14 kDa de 149B1 cu 44 kDa de 80JJ1 sau 167H2, cea din urmă părând să fie mai activă decât amestecul nativ 149B1. Nu s-a înregistrat răspuns la doză pentru ambele proteine individuale, soluția tampon și controalele apă.

# RO 123431 B1

1 **Exemplul 24.** Controlul omizii porumbului *Diabrotica undecimpunctata howardi* cu  
proteina de 14 kDa a PS149B1.

3 O pudră care conține aproximativ 50%, în greutate, dintr-o  $\delta$ -endotoxină de 14 kDa,  
descoperită la origine în tulpina PS149B1 de *Bacillus thuringiensis*, a fost izolată din tulpina  
5 recombinată MR1253 de *Pseudomonas fluorescens*. Această pudră a fost evaluată pentru  
activitatea insecticidă folosind procedura următoare.

7 O dietă artificială pentru insecte (R. I. Rose și J. M. McCabe (1973) "Laboratory rearing  
techniques for rearing corn rootworm" J. Econ. Entomol. 66(2): 398-400 a fost dispersată la  
9 aproximativ 0,5 ml/eprubetă în tăvi de testare biologică, cu 128 de godeuri (C-D International,  
Pitman, NJ) pentru a produce o arie a suprafeței de aproximativ 1,5 cm<sup>2</sup>. Suspensii de soluții  
11 tampon (fosfat de potasiu 10 mM, pH 7,5) ale pudrei de proteină de 14 kDa au fost aplicate  
pe suprafața dietei artificiale pentru insecte la 50  $\mu$ l/godeu, iar suprafața dietei a fost lăsată  
13 să se usuce. Controalele soluției tampon au fost, de asemenea, incluse în fiecare test. Un  
singur neonat de omida porumbului de *Diabrotica undecimpunctata howardi*, a fost plasat  
15 în fiecare godeu, iar godeurile au fost capsulate cu capacele care au fost prevăzute  
împreună cu tăvile. Probele au fost menținute timp de 6 zile la 28°C, timp după care larvele  
17 vii au fost cântărite ca un grup pentru fiecare tratament. Procentul de inhibare a creșterii a  
fost calculat prin scăderea greutatei insectelor vii din fiecare tratament din greutatea  
19 insectelor vii de control, și apoi împărțirea cu greutatea controlului. Acest rezultat a fost  
înmulțit cu 100 pentru a converti numărul la un procent. Inhibarea creșterii a fost calculată  
21 pentru fiecare dintre cele 5 teste care au conținut fiecare 16 insecte pe tratament, iar  
inhibarea creșterii a fost mediată pe teste.

23 Rezultatele demonstrează că proteina de 14 kDa a inhibat creșterea omizii  
porumbului *Diabrotica undecimpunctata howardi* într-o manieră dependentă de concen-  
25 trație. Tabelul 17 arată inhibarea creșterii omizii porumbului *Diabrotica undecimpunctata  
howardi* cu proteina de 14 kDa.

27 Tabelul 17

Tratament	Concentrație în $\mu$ g	ia/cm <sup>2</sup>	% inhibare creștere
proteina de 14 kDa	1		32
proteina de 14 kDa	3		55
proteina de 14 kDa	9		78

29 ia = ingredient activ

33 **Exemplul 25.** Controlul sfredelitorului porumbului și a omizii porumbului *Helicoverpa  
35 Zea cu toxinele binare PS149B1*

37 O pudră care conține 54% dintr-o  $\delta$ -endotoxină de 14 kDa, și altă pudră care conține  
37% dintr-o  $\delta$ -endotoxină de 44 kDa, ambele descoperite la origine în tulpina PS149B1 de  
*Bacillus thuringiensis*, au fost izolate din tulpinile recombinante MR1253 și respectiv MR1256  
39 de *Pseudomonas fluorescens*. Amestecuri ale acestor pudre au fost evaluate pentru  
activitate insecticidă folosind următoarea procedură.

41 Dieta artificială pentru insecte (R. I. Rose and J. M. McCabe (1973), "Laboratory  
rearing techniques for rearing corn rootworm" J. Econ. Entomol. 66(2): 398-400 au fost  
43 dispersate la aproximativ 0,5 ml/godeu în tăvi testare biologică cu 128 de godeuri (C-D  
International, Pitman, NJ) pentru a produce o arie a suprafeței de aproximativ 1,5 cm<sup>2</sup>.  
45 Suspensii de soluții tampon (fosfat de potasiu 10 mM, pH 7,5) ale pudrelor de proteine au fost  
amestecate și au fost aplicate pe suprafața dietei artificiale pentru insecte la 50  $\mu$ l/eprubetă.  
47 Suprafața dietei a fost lăsată să se usuce. Controalele soluției tampon au fost de asemenea  
incluse în fiecare test. O singură larvă neonată a fost plasată în fiecare eprubetă, iar epru-  
49 beteile au fost capsulate cu capacele care au prevăzute împreună cu tăvile. Testele au fost  
realizate cu sfredelitorul porumbului *Ostrinia Nubiledis* și omida porumbului *Helicoverpa zea*

# RO 123431 B1

(ambii fiind lepidoptere) Probele au fost menținute timp de 6 zile la 28°C, timp după care larvele vii au fost cântărite ca un grup pentru fiecare tratament. Procentul de inhibare a creșterii a fost calculat prin scăderea greutății insectelor vii din fiecare tratament din greutatea insectelor vii de control, și apoi împărțirea cu greutatea controlului. Acest rezultat a fost înmulțit cu 100 pentru a converti numărul la un procent. Inhibarea creșterii a fost calculată pentru fiecare dintre cele 4 teste, care au conținut fiecare 14 până la 16 insecte pe tratament, iar inhibarea creșterii a fost mediată pe teste.

Rezultatele demonstrează că proteina de 14 kDa a inhibat creșterea sfredelitorului porumbului și a omizii porumbului *Helicoverpa Zea* într-o manieră dependentă de concentrație. Tabelul 18 arată inhibarea creșterii sfredelitorului porumbului (ECB) și a omizii porumbului *Helicoverpa Zea* (CEW) cu amestecurile de proteine PS149B1.

Tabelul 18

proteina de 14 kDa + proteina 44 kDa concentrația în µg ia/cm <sup>2</sup>	% inhibare creștere	
	CEW	ECB
3,7 + 11	42	59
11 + 33	57	77
33 + 100	61	89

ia= ingredient activ

## Exemplul 26. Caracterizarea suplimentară a proteinelor de 45 kDa și configurația primer pentru identificarea proteinelor și polinucleotidelor adiționale

Prezenta invenție nu include numai secvențele exemplificate în mod specific. Porțiuni din genele și toxinele prezenței invenției pot fi utilizate pentru a identifica alte gene și toxine înrudite. Astfel, prezenta invenție include polinucleotide care codifică proteine sau polipeptide care cuprind cel puțin zece aminoacizi adiacenți, de exemplu, ale oricăreia dintre proteinele de tip binar sau polipeptide incluse în lista de secvențe atașată și descrise aici. Alte alcătuirii includ polinucleotide care codifică de exemplu, cel puțin 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 și 100 de aminoacizi adiacenți, ai unei proteine exemplificate aici; aceste numere se aplică, în mod similar, și nucleotidelor adiacente ale unei proteine exemplificate aici. Proteinele codificate, de asemenea, polinucleotide sunt incluse în prezenta invenție. Asemenea, polinucleotide care cuprind nucleotide adiacente (care codifică proteine sau polipeptide ce cuprind peptide de aceste mărimi aproximative) sunt incluse în prezenta invenție.

Deși diferite cele mai "aproprate" toxine de cele ale prezentei invenții, se crede că sunt proteinele de 51 și 42 kDa cu acțiune împotriva țânțarilor ale *Bacillus sphaericus*. Atașate drept figurile 4 și 5 sunt alinieri de proteine și alinieri de secvențe de nucleotide ale toxinelor și genelor *sphaericus* de 51 și 42 kDa și toxina și gena de 45 kDa a 149B1.

În alinierea nucleotidelor sunt subliniate două blocuri de secvențe, la care pot fi făcuți primeri. O pereche de primeri PCR de exemplu, este inclusă mai jos, și în orientarea 5'-3' (45kD3'rc) este arătat drept complement). Acești primeri au fost folosiți cu succes pentru a identifica membri adiționali ai familiei binare de 45 kDa. Secvențe complet redundante și o pereche profetică sunt de asemenea incluse mai jos.

45kD5': GAT RAT RAT CAA TAT ATT ATT AC (SECV ID NR.: 161)

45kD3'rc: CAA GGT ART AAT GTC CAT CC (SECV ID NR.: 162)

Aceste secvențe sunt utile atât ca secvențe scrise cât și ca niște complemenți inverși (03 și 04 sunt complementari lui 45kD3'rc, primenii coadă-cap exemplificați).

45kD5'01: GAT GATGrTmrAk wwATTATTTrC A (SECV ID NR.: 163)

45kD5'02: GAT GATGrTmrAT ATATTATTTrC A (SECV ID NR.: 164)

45kD3'03: GGAwG krCdyTwdTm CCwTGTAT (SECV ID NR.: 165)

45kD3'04: GGAwG kACryTAdTA CCTTGTAT (SECV ID NR.: 166)

# RO 123431 B1

1 Referitor la modul în care au fost identificate toxinele *sphaericus*, o căutare în baza  
de date BLAST (Altschul și col, (1997) "Gapped BLAST și PSI-BLAST: a new generation of  
3 protein database search programs" Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402) folosind proteina de  
45 kDa a 149B1 a găsit potriviri la proteina de incluziune cristalină de 42 kDa a *B. sphaericus*  
5 (scor de așteptare  $3 \cdot 10^{-14}$ ) și proteina de incluziune cristalină de 51 kDa a *B. sphaericus*  
(scor de așteptare  $3 \cdot 10^{-9}$ ).

7 O aliniere a secvenței peptidei de 45 kDa a 149B1 cu proteina de incluziune cristalină  
de 42 kDa a *B. sphaericus* a avut drept rezultat o aliniere care are 26% identitate în peste  
9 325 reziduuri. Scorul de aliniere este 27,2 sd peste scorul mediu a 100 alinieri aleatoare. O  
analiză similară a secvenței peptidei de 45 kDa a 149B1 la proteina de incluziune cristalină  
11 de 42 kDa a *B. sphaericus* are ca rezultat o aliniere ce are 29% identitate peste 229  
reziduuri. Scorul de aliniere este 23,4 sd peste scorul mediu a 100 de alinieri aleatoare.  
13 Scorurile de aliniere > 10 sd peste media alinierilor aleatoare au fost considerate semnifi-  
cative (Lipman, D.J. și Pearson, W.R. (1985) "Rapid and sensitive similarity searches"  
15 Science 227: 1435-1441; Doolittle, R.F. (1987), Of URFs and ORFs: a primer on how to  
analyze derived amino acid sequences, University Science Books, Mill Valley, CA).

17 Pentru referință, secvențele de proteine similare structural CryIAa, Cry2Aa și Cry3Aa  
au fost comparate în același fel. Cry2Aa față de CryIAa și Cry2Aa față de Cry3Aa partajează  
19 29% și 27% identitate peste 214 și respectiv 213 reziduuri, cu scoruri de aliniere 32,2 sd și  
29,5 sd peste scorul mediu a 100 de alinieri aleatoare. O aliniere a secvenței proteinei de  
21 45 kDa a 149B1 și secvența proteinei Cry2Aa a avut ca rezultat un scor de aliniere în 1 sd  
al mediei a 100 de alinieri aleatoare.

23 Sunt reținute, de asemenea, următoarele comparații:

Tabelul 19

Comparație	Calitate	Lungime	Raport	Spații	Similaritate	Identitate	Calitate medie*
ps149b1-45.pep x 07712	189	325	0,612	12	35,135	26,351	39,4 ± 5,5
ps149b1-45.pep x 07711	161	229	0,742	9	36,019	28,910	39,3 ± 5,2
cry2aal.pep x cry1aal.pep	182	214	0,888	6	37,688	28,643	43,5 ± 4,3
cry3aal.pep x cry2aal.pep	187	213	0,926	6	40,500	27,000	42,3 ± 4,9
ps149b1-45.pep x cry2aal.pep	40	28	1,429	0	42,857	35,714	41,6 ± 5,6

31 \* pe baza a 100 randomizări

33 Pentru comparații suplimentare și pentru configurații primer suplimentare, sunt notate  
următoarele referințe:

35 Oei și col., "Binding of purified *Bacillus sphaericus* binary toxin and its deletion  
derivatives to *Culex quinquefasciatus* gut: elucidation of funcțional bindings domains"  
37 Jouxnal of General Microbiology 138(7): 1512-26.

Pentru 51 kDa: 35-448 este activă; 45-448 nu este; 4-396 este activă; 4-392 nu este.

39 Pentru 42 kDa: 18-370 este activă; 35-370 nu este; 4-358 este activă; 4-349 nu este.

41 Lucrarea a fost făcută cu fuziuni G5T purificate și clivate cu trombină. Toate trun-  
chierile au fost testate cu ale altor subunități intacte. Toate delețiile au avut anumite pierderi  
de activitate. P51deltaC56 se leagă, dar nu internalizează 42. P51delta N45 nu se leagă.  
43 Doar 42 kDa + 41 kDa sunt internalizate. Ambele proteine netoxice N-terminale și C-  
terminale eșuează în legarea la proteina de 51 kDa sau la complexul receptor 51 kDa.

45 Davidson și col., (1990) "Interaction of the *Bacillus sphaericus* mosquito larvicidal  
proteins" Can. J, Microbiol. 36(12): 870-8. Terminalele N ale proteinelor purificate prin SDS-  
47 PAGE obținute de la *B. sphaericus*. S29 și N31 ale 51 kDa și S9 a 42 kDa în complexe 68-  
74 kDa (neredus). S9 și S29 ale 51 și N31 a catenei de la 42 la 51 kDa (neredusă). În geluri  
49 reduse catena de 45 kDa a avut S29 și N31 ale 51 kDa, iar catena de 39 kDa a conținut S9  
a proteinei de 42 kDa.



# RO 123431 B1

Baumann și col. (1988) "Sequence analysis of the mosquitocidal toxin genes encoding 51.4- și 41.9 -kilodalton proteins from *Bacillus sphaericus* 2362 and 2297, J. Bacteriol. 17: 2045-2050. Terminalul de 41.9 kDa la D5 de la protează de *B. sphaericus* și 111 de la chimotripsină; C-terminus urmează după R349 cu tripsină. Regiunile de similaritate îmbunătățită au fost identificate ca fiind corespunzătoare multora dintre cele de mai sus. Blocuri de secvențe similare A până la D între proteinele de 51 și 42 kDa.

În sumar, toxinele de *sphaericus* discutate mai sus nu se intenționează să fie incluse în întinderea prezentei invenții (de fapt, acestea sunt excluse în mod specific). În această privință, secvențele adiacente divergente, așa cum au fost exemplificate în alinieri (figurile 4 și 5) discutate mai sus, pot fi folosite ca primeri pentru a identifica toxine unice care sunt sugerate, dar nu exemplificate în mod specific aici. Totuși, secvențele adiacente conservate, așa cum sunt prezentate în alinieri, pot fi de asemenea utilizate conform prezentei invenții pentru a identifica toxine binare de tip 14/45 kDa noi (active împotriva omizii porumbului și a altor dăunători).

## **Exemplul 27. Inserția și expresia genelor de toxine în plante**

Un aspect al prezentei invenții este transformarea plantelor cu polinucleotide ale prezentei invenții, care exprimă proteine ale prezentei invenții. Plantele transformate sunt rezistente la atacul dăunătorilor vizați.

Noile gene active împotriva omizii porumbului descrise aici pot fi optimizate pentru expresia în alte organisme. De exemplu, secvențe de gene optimizate pentru porumb care codifică toxinele PS80JJ1 de 14 kDa și 44 kDa sunt prezentate în SECV ID NR.: 44 și respectiv SECV ID NR.: 45.

Genele care codifică proteine cu activitate pesticidă, așa cum sunt prezentate aici, pot fi inserate în celule de plante folosind o diversitate de tehnici care sunt binecunoscute în domeniu. De exemplu, un mare număr de vectori de clonare care cuprind un sistem de replicare în *E. coli*. și un marker ce permite selecția celulelor transformate sunt disponibile pentru prepararea și inserția genelor străine în plantele superioare. Vectorii cuprind, de exemplu, pBR322, serii pUC, serii M13mp, pACYC184, etc. În consecință, secvența care codifică toxina *B.t.* poate fi inserată în vector la un situs de restricție adecvat. Plasmidul rezultat este folosit pentru transformarea în *E. coli*. Celulele de *E. coli* sunt cultivate într-un mediu nutritiv adecvat, apoi sunt recoltate și lizate. Plasmidul este recuperat. Analiza secvențelor, analiza restricției, electroforeza și alte metode biologice de biochimie moleculară sunt folosite, în general, ca metode de analiză. După fiecare manipulare, secvența ADN folosită poate fi clivată și unită la secvența ADN următoare. Fiecare secvență de plasmid poate fi clonată în același plasmid sau în alte plasraide. Depinzând de metoda de inserție a genelor dorite în plantă, pot fi necesare alte secvențe de ADN. Dacă, de exemplu, este folosit plasmidul Ti sau Ri pentru transformarea celeulei plantei, atunci cel puțin la marginea dreaptă, dar adesea la marginea dreaptă și stângă a ADN-T a plasmidului Ri sau Ti trebuie unită ca regiune de flancare a genelor care se inserează.

Utilizarea ADN-T pentru transformarea celulelor de plante a fost cercetată intensiv și descrisă suficient în EP 120 516; Hoekema (1985): The Binary Plant Vector System, Offset-durkkerij Kanters B.V. Alblaserdam, capitol 5; Fraley și col. Cric. Rev. Plant Sci. 4: 1-46 și An și col. (1985) EMBO J. 4: 277-287.

Odată ce ADN-ul inserat a fost integrat în genom, acesta este relativ stabil acolo și ca regulă, nu mai iese afară. Acesta conține în mod normal un marker de selecție care conferă celulelor de plante transformate rezistență la un biocid sau un antibiotic cum ar fi kanamicina, G 418, bleomicina, higromicina sau cloramfenicol, inter alia. Markerul utilizat individual trebuie în consecință să permită mai degrabă selecția celulelor transformate decât a celulelor care nu conțin ADN-ul inserat.

Sunt disponibile un număr mare de tehnici pentru inserarea de ADN într-o celulă gazdă vegetală. Aceste tehnici includ transformarea cu ADN-T folosind *Agrobacterium tumefaciens* sau *Agrobacterium rhizogenes* ca agent de transformare, fuziune, injecție,

1 biolistică (bombardament cu microparticule) sau electroporare cât și alte metode posibile.  
2 Dacă se folosește *Agrobacteria* pentru transformare, ADN-ul de inserat trebuie clonat în  
3 plasmide speciale, și anume fie într-un vector intermediar, fie într-un vector binar. Vectorii  
intermediari pot fi integrați în plasmidele Ti sau Ri prin recombinarea omoloagă ce conține  
5 secvențele care sunt omologe secvențelor din ADN-T. Plasmidele Ti sau Ri cuprind, de  
6 asemenea, regiunea vir necesară pentru transferul ADN-T. Vectorii intermediari nu se pot  
7 replica ei înșiși în *Agrobacteria*. Vectorul intermediar poate fi transferat în *Agrobacterium*  
*tumefaciens* prin intermediul unei plasmide helper (conjugare). Vectorii binari se pot replica  
9 ei înșiși atât în *E. coli* cât și în *Agrobacteria*. Aceștia cuprind o genă marker de selecție și un  
linker sau poli-linker care este încadrat de regiunile de margine ADN-T stângă și dreaptă.  
11 Aceștia pot fi transformați direct în *Agrobacteria* (Holsters și col. [1978] Mol. Gen. Genet 163:  
181-187). *Agrobacterium* folosite ca celulă gazda trebuie să cuprindă un plasmid care poartă  
13 regiunea vir. Regiunea vir este necesară pentru transferul ADN-T în celula de plantă. Poate  
fi conținut ADN-T suplimentar. Bacteria transformată astfel este folosită pentru transformarea  
15 celulelor de plantă. Plantele explantate pot fi cultivate în mod avantajos cu *Agrobacterium*  
*tumefaciens* sau *Agrobacterium rhizogenes* pentru transferul ADN în celula plantei. Plante  
17 întregi pot fi apoi regenerate din materialul vegetal infectat, (de exemplu, bucăți de frunză,  
segmente de tulpină, rădăcini, dar de asemenea protoplaști sau celule cultivate în suspensie)  
19 într-un mediu adecvat, care poate conține antibiotice sau biocide pentru selecție. Plantele  
obținute astfel pot fi testate pentru prezența ADN-ului inserat. Nu sunt condiții speciale pentru  
21 plasmide în cazul injectării și electroporării. Este posibil să se folosească plasmide obișnuite  
cum ar fi, de exemplu, derivați pUC.

23 Celulele transformate cresc în interiorul plantei în modul obișnuit. Acestea pot forma  
celule germinative și transmit trăsătura(ile) plantelor urmașe. Asemenea plante pot fi  
25 crescute în modul normal și încrucișate cu plante care au aceiași factori ereditari transformați  
sau alți factori ereditari. Indivizii hibridi rezultați au proprietățile fenotipice corespunzătoare.

27 Într-o alcătuire preferată a prezentei invenții, plantele vor fi transformate cu gene în  
care utilizarea codonului a fost optimizată pentru plante. A se vedea de exemplu, brevetul  
29 **US 5380831**, care este încorporat aici prin referință. De asemenea, vor fi utilizate în mod  
avantajos plantele care codifică o toxină trunchiată. Toxina trunchiată va codifica de obicei  
31 aproximativ 55 până la aproximativ 80% din toxina cu lungime totală. Metodele pentru  
crearea de gene *B.t.* sintetice pentru utilizarea în plante sunt cunoscute în domeniu.

### 33 **Exemplul 28. Clonarea genelor *B.t.* în virusuri ai insectelor**

35 Este cunoscut un număr de virusuri care infectează insectele. Aceste virusuri includ,  
de exemplu, baculovirusuri și entomopoxvirusuri. Într-o alcătuire a prezentei invenții, genele  
care codifică toxine cu activitate insecticidă, așa cum au fost descrise aici, pot fi plasate  
37 în genomul virusului insectei, astfel îmbunătățind patogenicitatea virusului. Metodele pentru  
construirea de virusuri pentru insecte care cuprind gene de toxine *B.t.* sunt binecunoscute  
39 și practicate ușor de către specialiștii din domeniu, aceste proceduri sunt descrise de  
exemplu, în Merryweather și col. (Merryweather, A.T., U. Weyer, M.P.G. Harris, M. Hirst, T.  
41 Booth, R.D. Possee (1990) J. Gen. Virol 71:1535-1544) și Martens și col. (Martens, J.W.M.,  
G. Honee, D. Zuidema, J.W.M van Lent, B. Visser, J.M. Vlak (1990)/Lpl. Environmental  
43 Microbiol. 56(9):2764-2770).

45 Toate brevetele, cererile de brevet, aplicații tranzitorii și publicații referite sau citate  
aici sunt încorporate prin referință în întregime în măsura în care nu sunt nepotrivite față de  
învățăturile explicite ale acestei descrieri.

47 Trebuie înțeles că exemplele și alcătuirile descrise aici sunt doar în scopuri ilustrative  
și că diverse modificări sau schimbări în lumina acestora vor fi sugerate de specialiști din  
49 domeniu și trebuie incluse în spiritul și domeniul acestei cereri și întinderea revendicărilor  
anexate.

# RO 123431 B1

## LISTA DE SECVENȚE

	1
	3
<110> MYCOGEN CORPORATION	5
<120> Toxine pesticide	7
<130> MA-703C3	9
<140> 09/378.088	
<141> 1999-08-20	11
<160> 166	13
<170> PatentIn Ver. 2.1	15
<210> 1	
<211> 5	17
<212> PRT	
<213> Organism necunoscut	19
<220>	
<223> Descrierea organismului necunoscut: peptidă	21
<400> 1	23
Met Leu Asp Thr Asn	25
1 5	
<210> 2:	27
<211> : 25	29
<212> PRT	
<213> organism necunoscut	31
<220>	
<223> Descrierea organismului necunoscut: proteină	33
<400> 2:	35
Met Leu Asp Thr Asn Lys Val Tyr Glu Ile Ser Asn Leu Ala Asn Gly	37
1 5 10 15	
Leu Tyr Thr Ser Thr Tyr Leu Ser Leu	39
20 25	
<210> 3:	41
	43

# RO 123431 B1

1 <211> 24  
<212> PRT  
3 <213> organism necunoscut

5 <220>  
<223> Descrierea organismului necunoscut: proteină

7 <400> 3:

9 Ser Ala Arg Glu Val His Ile Glu Ile Asn Asn Thr Arg His Thr Leu  
1 5 10 15

11 Gln Leu Glu Ala Lys Thr Lys Leu  
13 20

15 <210> 4:

17 <211> 25  
<212> PRT  
19 <213> organism necunoscut

21 <220>  
23 <223> Descrierea organismului necunoscut: proteină

25 <400> 4:

27 Met Leu Asp Thr Asn Lys Val Tyr Glu Ile Ser Asn His Ala Asn Gly  
1 5 10 15

29 Leu Tyr Ala Ala Thr Tyr Leu Ser Leu  
20 25

31 <210> 5:

33 <211> 50  
<212> PRT  
37 <213> organism necunoscut

39 <220>  
<221> NESIGUR  
<222> (35)  
41 <223> Aminoacid nedeterminat

43 <400> 5:

# RO 123431 B1

Ser Ala Arg Glu Val His Ile Asp Val Asn Asn Lys Thr Gly His Thr	1	5	10	15	1
Leu Gln Leu Glu Asp Lys Thr Lys Leu Asp Gly Gly Arg Trp Arg Thr	20	25	30		3
Ser Pro Xaa Asn Val Ala Asn Asp Gln Ile Lys Thr Phe Val Ala Glu	35	40	45		5
Ser Asn	50				7
<210> 6:					9
<211> 25					11
<212> PRT					13
<213> organism necunoscut					15
<220>					17
<223> Descrierea organismului necunoscut: proteină					19
<400> 6:					21
Met Leu Asp Thr Asn Lys Ile Tyr Glu Ile Ser Asn Tyr Ala Asn Gly	1	5	10	15	23
Leu His Ala Ala Thr Tyr Leu Ser Leu	20	25			25
<210> 7:					27
<211> 25					29
<212> PRT					31
<213> organism necunoscut					33
<220>					35
<223> Descrierea organismului necunoscut: proteină					37
<400> 7:					39
Ser Ala Arg Glu Val His Ile Asp Val Asn Asn Lys Thr Gly His Thr	1	5	10	15	41
Leu Gln Leu Glu Asp Lys Thr Lys Leu	20	25			43

# RO 123431 B1

1 <210> 8:  
<211> : 29  
3 <212> ADN  
<213> Secvență artificială  
5 <220>  
7 <223> Descrierea secvenței artificiale: AND sintetic  
9 <220>  
<221> caracteristici diverse  
11 <222> (4)  
<223> orice nucleotidă  
13 <220>  
<221> caracteristici diverse  
15 <222> (6)  
<223> orice nucleotidă  
17 <220>  
<221> caracteristici diverse  
19 <222> (12)  
<223> orice nucleotidă  
21 <220>  
<221> caracteristici diverse  
23 <222> (21)  
<223> orice nucleotidă  
25 <220>  
<221> caracteristici diverse  
27 <222> (21)  
<223> orice nucleotidă  
29 <400> 8:  
ATGNTNGATA CNAATAAAGT NTATGAAAT 29  
31 <210> 9:  
33 <211> 26  
<212> PRT  
<213> Secvență artificială  
35 <220>  
37 <223> Descrierea secvenței artificiale: AND sintetic  
39 <400> 9:  
41 GGATTATCTA TCTCTGAGTG TTCTTG 26  
43 <210> 10:  
<211> 1158  
<212> ADN  
45 <213> Bacillus thuringiensis

# RO 123431 B1

(xi) <400> 10:

ATGTTAGATA CTAATAAAGT TTATGAAATA AGCAATCTTG CTAATGGATT ATATACATCA	60	1
ACTTATTTAA GTCTTGATGA TTCAGGTGTT AGTTTAAATGA GTAAAAAGGA TGAAGATATT	120	3
GATGATTACA ATTTAAAATG GTTTTTATTT CCTATTGATA ATAATCAATA TATTATTACA	180	5
AGCTATGGAG CTAATAAATTG TAAAGTTTGG AATGTTAAAA ATGATAAAAAT AAATGTTTCA	240	7
ACTTATTCTT CAACAAACTC TGTACAAAAA TGGCAAATAA AAGCTAAAGA TTCTTCATAT	300	9
ATAATACAAA GTGATAATGG AAAGGTCTTA ACAGCAGGAG TAGGTCAATC TCTTGGGAATA	360	11
GTACGCCTAA CTGATGAATT TCCAGAGAAT TCTAACCAAC AATGGAATTT AACTCCTGTA	420	13
CAAACAATTC AACTCCCACA AAAACCTAAA ATAGATGAAA AATFAAAAGA TCATCCTGAA	480	15
TATTCAGAAA CCGGAAATAT AAATCCTAAA ACAACTCCTC AATTAATGGG ATGGACATTA	540	17
GTACCTTGTA TTATGGTAAA TGATTCAAAA ATAGATAAAA AACTCCAAAT TAAACTACT	600	19
CCATATTATA TTTTAAAAA ATATAAATAC TGGAACTTAG CAAAAGGAAG TAATGTATCT	660	21
TTACTTCCAC ATCAAAAAAG ATCATATGAT TATGAATGGG GTACAGAAAA AATCAAAAA	720	23
ACAACATTA TTAATACAGT AGGATTGCAA ATTAATATAG ATTCAGGAAT GAAATTTGAA	780	25
GTACCAGAAG TAGGAGGAGG TACAGAAGAC ATAAAAACAC AATTAAGTGA AGAATTTAAA	840	27
GTTGAATATA GCACTGAAAC CAAAATAATG ACGAAATATC AAGAACACTC AGAGATAGAT	900	29
AATCCAACTA ATCAACCAAT GAATTCTATA GGACTTCTTA TTTATACTTC TTTAGAATTA	960	31
TATCGATATA ACGGTACAGA AATTAAGATA ATGGACATAG AACTTCAGA TCATGATACT	1020	
TACACTCTTA CTTCCTATCC AAATCATAAA GAAGCATTAT TACTTCTCAC AAACCATTCC	1080	
TATGAAGAAG TAGAAGAAAT AACAAAAATA CCTAAGCATA CACTTATAAA ATTGAAAAAA	1140	
CATTATTTTA AAAAAATA	1158	

<210> 11:

<211> 385

<212> PRT

<213> *Bacillus thuringiensis*

<400> 11

33  
35  
37  
39

# RO 123431 B1

1 Met Leu Asp Thr Asn Lys Val Tyr Glu Ile Ser Asn Leu Ala Asn Gly  
 1 5 10 15  
 3 Leu Tyr Thr Ser Thr Tyr Leu Ser Leu Asp Asp Ser Gly Val Ser Leu  
 20 25 30  
 5 Met Ser Lys Lys Asp Glu Asp Ile Asp Asp Tyr Asn Leu Lys Trp Phe  
 35 40 45  
 7 Leu Phe Pro Ile Asp Asn Asn Gln Tyr Ile Ile Thr Ser Tyr Gly Ala  
 50 55 60  
 9 Asn Asn Cys Lys Val Trp Asn Val Lys Asn Asp Lys Ile Asn Val Ser  
 65 70 75 80  
 11 Thr Tyr Ser Ser Thr Asn Ser Val Gln Lys Trp Gln Ile Lys Ala Lys  
 85 90 95  
 13 Asp Ser Ser Tyr Ile Ile Gln Ser Asp Asn Gly Lys Val Leu Thr Ala  
 100 105 110  
 15 Gly Val Gly Gln Ser Leu Gly Ile Val Arg Leu Thr Asp Glu Phe Pro  
 115 120 125  
 17 Glu Asn Ser Asn Gln Gln Trp Asn Leu Thr Pro Val Gln Thr Ile Gln  
 130 135 140  
 19 Leu Pro Gln Lys Pro Lys Ile Asp Glu Lys Leu Lys Asp His Pro Glu  
 145 150 155 160  
 21 Tyr Ser Glu Thr Gly Asn Ile Asn Pro Lys Thr Thr Pro Gln Leu Met  
 165 170 175  
 23 Gly Trp Thr Leu Val Pro Cys Ile Met Val Asn Asp Ser Lys Ile Asp  
 180 185 190  
 25 Lys Asn Thr Gln Ile Lys Thr Thr Pro Tyr Tyr Ile Phe Lys Lys Tyr  
 195 200 205  
 27 Lys Tyr Trp Asn Leu Ala Lys Gly Ser Asn Val Ser Leu Leu Pro His  
 210 215 220  
 29 Gln Lys Arg Ser Tyr Asp Tyr Glu Trp Gly Thr Glu Lys Asn Gln Lys  
 225 230 235 240  
 31 Thr Thr Ile Ile Asn Thr Val Gly Leu Gln Ile Asn Ile Asp Ser Gly  
 245 250 255  
 33 Met Lys Phe Glu Val Pro Glu Val Gly Gly Gly Thr Glu Asp Ile Lys  
 260 265 270  
 35 Thr Gln Leu Thr Glu Glu Leu Lys Val Glu Tyr Ser Thr Glu Thr Lys  
 275 280 285  
 37 Ile Met Thr Lys Tyr Gln Glu His Ser Glu Ile Asp Asn Pro Thr Asn  
 290 295 300  
 39 Gln Pro Met Asn Ser Ile Gly Leu Leu Ile Tyr Thr Ser Leu Glu Leu  
 305 310 315 320



# RO 123431 B1

Tyr Arg Tyr Asn Gly Thr Glu Ile Lys Ile Met Asp Ile Glu Thr Ser		1
325 330 335		
Asp His Asp Thr Tyr Thr Leu Thr Ser Tyr Pro Asn His Lys Glu Ala		3
340 345 350		
Leu Leu Leu Leu Thr Asn His Ser Tyr Glu Glu Val Glu Glu Ile Thr		5
355 360 365		
Lys Ile Pro Lys His Thr Leu Ile Lys Leu Lys Lys His Tyr Phe Lys		7
370 375 380		
Lys		9
385		
<210> 12		11
<211> 834		13
<212> ADN		
<213> Bacillus thuringiensis		15
<400> 12		17
GGACTATATG CAGCAACTTA TTAAAGTTTA GATGATTCAG GTGTTAGTTT AATGAATAAA	60	19
AATGATGATG ATATTGATGA TTATAACTTA AAATGGTTTT TATTCCTAT TGATGATGAT	120	21
CAATATATTA TTACAAGCTA TGCAGCAAAT AATTCTAAAG TTTGGAATGT TAATAATGAT	180	
AAAATAAATG TTTCGACTTA TTCTTCAACA AATTCAATAC AAAAATGGCA AATAAAAGCT	240	23
AATGGTICTT CATATGTAAT ACAAAGTGAT AATGGAAAAG TCTTAACAGC AGGAACCGGT	300	25
CAAGCTCTTG GATTGATACG TTAACTGAT GAATCCTCAA ATAATCCCAA TCAACAATGG	360	27
AATTTAACTT CTGTACAAAC AATTCAACTT CCACAAAAC CTATAATAGA TACAAAATTA	420	
AAAGATATC CCAAATATTC ACCAACTGGA AATATAGATA ATGGAACATC TCCTCAATTA	480	29
ATGGGATGGA CATTAGTACC TTGTATTATG GTAAATGATC CAAATATAGA TAAAAATACT	540	31
CAAATTAATA CTACTCCATA TTATATTTTA AAAAAATATC AATATTGGCA ACGAGCAGTA	600	33
GGAAGTAATG TAGCTTTACG TCCACATGAA AAAAAATCAT AACTTATGA ATGGGGCACA	660	
GAAATAGATC AAAAAACAAC AATTATAAAT ACATTAGGAT TTCAAATCAA TATAGATTCA	720	35
GGAATGAAAT TTGATATACC AGAAGTAGGT GGAGSTACAG ATGAAATAAA AACACAATA	780	37
AATGAAGAAT TAAAAATAGA ATATAGTCAT GAACTAAAA TAATGGAAAA ATAT	834	39
<210> 13:		41
<211> 278		
<212> PRT		43
<213> Organism necunoscut		45
		47

# RO 123431 B1

1 <220>

3 <223> Descrierea organismului necunoscut: ADN sintetic

5 <400> 13:

7 Gly Leu Tyr Ala Ala Thr Tyr Leu Ser Leu Asp Asp Ser Gly Val Ser  
1 5 10 15

9 Leu Met Asn Lys Asn Asp Asp Asp Ile Asp Asp Tyr Asn Leu Lys Trp  
20 25 30

11 Phe Leu Phe Pro Ile Asp Asp Asp Gln Tyr Ile Ile Thr Ser Tyr Ala  
35 40 45

13 Ala Asn Asn Cys Lys Val Trp Asn Val Asn Asn Asp Lys Ile Asn Val  
50 55 60

15 Ser Thr Tyr Ser Ser Thr Asn Ser Ile Gln Lys Trp Gln Ile Lys Ala  
65 70 75 80

17 Asn Gly Ser Ser Tyr Val Ile Gln Ser Asp Asn Gly Lys Val Leu Thr  
85 90 95

19 Ala Gly Thr Gly Gln Ala Leu Gly Leu Ile Arg Leu Thr Asp Glu Ser  
100 105 110

21 Ser Asn Asn Pro Asn Gln Gln Trp Asn Leu Thr Ser Val Gln Thr Ile  
115 120 125

23 Gln Leu Pro Gln Lys Pro Ile Ile Asp Thr Lys Leu Lys Asp Tyr Pro  
130 135 140

25 Lys Tyr Ser Pro Thr Gly Asn Ile Asp Asn Gly Thr Ser Pro Gln Leu  
145 150 155 160

27 Met Gly Trp Thr Leu Val Pro Cys Ile Met Val Asn Asp Pro Asn Ile  
165 170 175

29 Asp Lys Asn Thr Gln Ile Lys Thr Thr Pro Tyr Tyr Ile Leu Lys Lys  
180 185 190

31 Tyr Gln Tyr Trp Gln Arg Ala Val Gly Ser Asn Val Ala Leu Arg Pro  
195 200 205

33 His Glu Lys Lys Ser Tyr Thr Tyr Glu Trp Gly Thr Glu Ile Asp Gln  
210 215 220

35 Lys Thr Thr Ile Ile Asn Thr Leu Gly Phe Gln Ile Asn Ile Asp Ser  
225 230 235 240

37

39



# RO 123431 B1

1 His Ala Ala Thr Tyr Leu Ser Leu Asp Asp Ser Gly Val Ser Leu Met  
 1 5 10 15  
 3 Asn Lys Asn Asp Asp Asp Ile Asp Asp Tyr Asn Leu Arg Trp Phe Leu  
 20 25 30  
 5 Phe Pro Ile Asp Asp Asn Gln Tyr Ile Ile Thr Ser Tyr Ala Ala Asn  
 35 40 45  
 7 Asn Cys Lys Val Trp Asn Val Asn Asn Asp Lys Ile Asn Val Ser Thr  
 50 55 60  
 9 Tyr Ser Ser Thr Asn Ser Ile Gln Lys Trp Gln Ile Lys Ala Asn Ala  
 65 70 75 80  
 11 Ser Ser Tyr Val Ile Gln Ser Asn Asn Gly Lys Val Leu Thr Ala Gly  
 85 90 95  
 13 Thr Gly Gln Ser Leu Gly Leu Ile Arg Leu Thr Asp Glu Ser Pro Asp  
 100 105 110  
 15 Asn Pro Asn Gln Gln Trp Asn Leu Thr Pro Val Gln Thr Ile Gln Leu  
 115 120 125  
 17 Pro Pro Lys Pro Thr Ile Asp Thr Lys Leu Lys Asp Tyr Pro Lys Tyr  
 130 135 140  
 19 Ser Gln Thr Gly Asn Ile Asp Lys Gly Thr Pro Pro Gln Leu Met Gly  
 145 150 155 160  
 21 Trp Thr Leu Ile Pro Cys Ile Met Val Asn Asp Pro Asn Ile Asp Lys  
 165 170 175  
 23 Asn Thr Gln Ile Lys Thr Thr Pro Tyr Tyr Ile Leu Lys Lys Tyr Gln  
 180 185 190  
 25 Tyr Trp Gln Gln Ala Val Gly Ser Asn Val Ala Leu Arg Pro His Glu  
 195 200 205  
 27 Lys Lys Ser Tyr Ala Tyr Glu Trp Gly Thr Glu Ile Asp Gln Lys Thr  
 210 215 220  
 29 Thr Ile Ile Asn Thr Leu Gly Phe Gln Ile Asn Ile Asp Ser Gly Met  
 225 230 235 240  
 31 Lys Phe Asp Ile Pro Glu Val Gly Gly Gly Thr Asp Glu Ile Lys Thr  
 245 250 255  
 33 Gln Leu Asn Glu Glu Leu Lys Ile Glu Tyr Ser Arg Glu Thr Lys Ile  
 260 265 270  
 35 Met Glu Lys Tyr  
 275

41 <210> 16  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 43 <213> Organism necunoscut  
 45 <220>

# RO 123431 B1

<223> Descrierea organismului necunoscut: proteină	1
<400> 16:	3
Asp Ile Asp Asp Tyr Asn Leu	5
1 5	7
<210> 17	9
<211> 7	
<212> PRT	11
<213> Organism necunoscut	13
<220>	
<223> Descrierea organismului necunoscut: proteină	15
<400> 17:	17
Trp Phe Leu Phe Pro Ile Asp	19
1 5	21
<210> 18	
<211> 8	23
<212> PRT	
<213> Organism necunoscut	25
<220>	
<223> Descrierea organismului necunoscut: proteină	27
<400> 18:	29
Gln Ile Lys Thr Thr Pro Tyr Tyr	31
1 5	33
<210> 19	35
<211> 6	
<212> PRT	37
<213> Organism necunoscut	39
<220>	
<223> Descrierea organismului necunoscut: proteină	41
<400> 19:	43
Tyr Glu Trp Gly Thr Glu	45
1 5	

# RO 123431 B1

- 1 <210> 20  
<211> 21
- 3 <212> ADN  
<213> Secvență artificială
- 5 <220>  
<223> Descrierea secvenței artificiale: ADN sintetic
- 7 <220>
- 9 <221> caracteristici diverse  
<212> (6)  
<213> orice nucleotidă
- 11 <220>
- 13 <221> caracteristici diverse  
<212> (21)  
<213> orice nucleotidă
- 15 <220>
- 17 <400> 20
- 19 GATATNGATG ANTAYAAAYTT N 21
- 21 <210> 21  
<211> 21
- 23 <212> ADN  
<213> Secvență artificială
- 25 <220>  
<223> Descrierea secvenței artificiale: ADN sintetic
- 27 <220>
- 29 <221> caracteristici diverse  
<212> (9)  
<213> orice nucleotidă
- 31 <220>
- 33 <221> caracteristici diverse  
<212> (15)  
<213> orice nucleotidă
- 35 <220>
- 37 <221> caracteristici diverse  
<212> (21)  
<213> orice nucleotidă
- 39 <220>
- 41 <221> caracteristici diverse  
<212> (21)  
<213> orice nucleotidă
- 43 <220>
- 45 <221> caracteristici diverse  
<212> (21)  
<213> orice nucleotidă

# RO 123431 B1

<400> 21		1
TGGTTTTTNT TTCCNATNGA N	21	3
<210> 22		5
<211> 24		
<212> ADN		7
<213> Secvență artificială		9
<220>		9
<223> Descrierea secvenței artificiale: ADN sintetic		11
<220>		11
<221> caracteristici diverse		13
<212> (6)		
<213> orice nucleotidă		15
<220>		17
<221> caracteristici diverse		17
<212> (12)		
<213> orice nucleotidă		19
<220>		21
<221> caracteristici diverse		21
<212> (15)		23
<213> orice nucleotidă		25
<400> 22		25
CAAATNAAAA CNACNCCATA TTAT	24	27
<210> 23		29
<211> 18		
<212> ADN		31
<213> Secvență artificială		33
<220>		33
<223> Descrierea secvenței artificiale: ADN sintetic		35
<220>		37
<221> caracteristici diverse		37
<212> (3)		
<213> orice nucleotidă		39
<220>		41
<221> caracteristici diverse		41
<212> (6)		43
<213> orice nucleotidă		45
		45
		47

# RO 123431 B1

1 <220>  
<221> caracteristici diverse  
3 <212> (12)  
<213> orice nucleotidă  
5 <400> 23  
7 TANGANTGGG GNACAGAA 18  
9 <210> 24  
<211> 24  
11 <212> ADN  
<213> Secvență artificială  
13 <220>  
15 <223> Descrierea secvenței artificiale: ADN sintetic  
17 <220>  
<221> caracteristici diverse  
19 <212> (10)  
<213> orice nucleotidă  
21 <220>  
<221> caracteristici diverse  
23 <212> (13)  
<213> orice nucleotidă  
25 <220>  
<221> caracteristici diverse  
27 <212> (19)  
<213> orice nucleotidă  
29 <400> 24  
31 ATAATATGGN GTNGTTTTNA TTTG 24  
33 <210> 25  
35 <211> 18  
<212> ADN  
37 <213> Secvență artificială  
39 <220>  
<223> Descrierea secvenței artificiale: ADN sintetic  
41 <220>  
<221> caracteristici diverse  
43 <212> (7)  
<213> orice nucleotidă



# RO 123431 B1

<220>		1
<221> caracteristici diverse		
<212> (13)		3
<213> orice nucleotidă		
<220>		5
<221> caracteristici diverse		
<212> (16)		7
<213> orice nucleotidă		
<400> 25		9
TTCTGTNCCC CANTCNTA	18	11
<210> 26		13
<211> 18		
<212> ADN		15
<213> Secvență artificială		17
<220>		
<223> Descrierea secvenței artificiale: ADN sintetic		19
<400> 26:		21
CTCAAAGCGG ATCAGGAG	18	23
<210> 27		25
<211> 20		
<212> ADN		27
<213> Secvență artificială		
<220>		29
<223> Descrierea secvenței artificiale: ADN sintetic		
<400> 27		31
GCGTATTCGG ATATGCTTGG	20	33
<210> 28		35
<211> 386		37
<212> PRT		
<213> organism necunoscut		39
<220>		
<223> Descrierea organismului necunoscut: proteină		41
<220>		43
<221> NESIGUR		
<212> (1)...(20)		45

# RO 123431 B1

1 <213> orice aminoacid

3 <220>  
<221> NESIGUR

5 <212> (34)  
<213> orice aminoacid

7 <220>  
<221> NESIGUR

9 <212> (36)  
<213> orice aminoacid

11 <220>  
<221> NESIGUR

13 <212> (38)  
<213> orice aminoacid

15 <220>  
<221> NESIGUR

17 <212> (46)  
<213> orice aminoacid

19 <220>  
<221> NESIGUR

21 <212> (54)...(55)  
<213> orice aminoacid

23 <220>  
<221> NESIGUR

25 <212> (63)  
<213> orice aminoacid

27 <220>  
<221> NESIGUR

29 <212> (73)  
<213> orice aminoacid

31 <220>  
<221> NESIGUR

33 <212> (88)  
<213> orice aminoacid

35 <220>  
<221> NESIGUR

37 <212> (96)...(97)  
<213> orice aminoacid

39 <220>  
<221> NESIGUR

41 <212> (96)...(97)  
<213> orice aminoacid

43 <220>  
<221> NESIGUR

45 <212> (96)...(97)  
<213> orice aminoacid

# RO 123431 B1

<212> (101)	1
<213> orice aminoacid	
<220>	3
<221> NESIGUR	
<212> (105)	5
<213> orice aminoacid	
<220>	7
<221> NESIGUR	
<212> (114)	9
<213> orice aminoacid	
<220>	11
<221> NESIGUR	
<212> (117)	13
<213> orice aminoacid	
<220>	15
<221> NESIGUR	
<212> (120)...(121)	17
<213> orice aminoacid	
<220>	19
<221> NESIGUR	
<212> (127)...(129)	21
<213> orice aminoacid	
<220>	23
<221> NESIGUR	
<212> (131)	25
<213> orice aminoacid	
<220>	27
<221> NESIGUR	
<212> (139)	29
<213> orice aminoacid	
<220>	31
<221> NESIGUR	
<212> (147)	33
<213> orice aminoacid	
<220>	35
<221> NESIGUR	
<212> (150)	37
<213> orice aminoacid	
<220>	39
<221> NESIGUR	
<212> (150)	41
<213> orice aminoacid	
<220>	43
<221> NESIGUR	
<212> (150)	45
<213> orice aminoacid	

# RO 123431 B1

1 <221> NESIGUR  
<212> (153)  
3 <213> orice aminoacid

5 <220>  
<221> NESIGUR  
<212> (158)  
7 <213> orice aminoacid

9 <220>  
<221> NESIGUR  
11 <212> (160)  
<213> orice aminoacid

13 <220>  
<221> NESIGUR  
15 <212> (163)  
<213> orice aminoacid  
17

19 <220>  
<221> NESIGUR  
<212> (168)...(170)  
21 <213> orice aminoacid

23 <220>  
<221> NESIGUR  
25 <212> (172)  
<213> orice aminoacid

27 <220>  
<221> NESIGUR  
29 <212> (181)  
<213> orice aminoacid

31 <220>  
33 <221> NESIGUR  
<212> (189)...(190)  
35 <213> orice aminoacid

37 <220>  
<221> NESIGUR  
<212> (205)  
39 <213> orice aminoacid

41 <220>  
<221> NESIGUR  
43 <212> (209)  
<213> orice aminoacid

# RO 123431 B1

<220>	1
<221> NESIGUR	
<212> (212)...(213)	3
<213> orice aminoacid	
<220>	5
<221> NESIGUR	
<212> (215)	7
<213> orice aminoacid	
<220>	9
<221> NESIGUR	
<212> (220)	11
<213> orice aminoacid	
<220>	13
<221> NESIGUR	
<212> (222)	15
<213> orice aminoacid	
<220>	17
<221> NESIGUR	
<212> (225)	19
<213> orice aminoacid	
<220>	21
<221> NESIGUR	
<212> (227)	23
<213> orice aminoacid	
<220>	25
<221> NESIGUR	
<212> (230)	27
<213> orice aminoacid	
<220>	29
<221> NESIGUR	
<212> (237)...(238)	31
<213> orice aminoacid	
<220>	33
<221> NESIGUR	
<212> (247)	35
<213> orice aminoacid	
<220>	37
<221> NESIGUR	
<212> (249)	39
<213> orice aminoacid	
<220>	41
<221> NESIGUR	
<212> (247)	43
<213> orice aminoacid	
<220>	45
<221> NESIGUR	
<212> (249)	
<213> orice aminoacid	

# RO 123431 B1

1 <220>  
<221> NESIGUR  
3 <212> (260)...(261)  
<213> orice aminoacid

5 <220>  
<221> NESIGUR  
7 <212> (269)...(270)  
<213> orice aminoacid

9 <220>  
<221> NESIGUR  
11 <212> (276)  
<213> orice aminoacid

13 <220>  
<221> NESIGUR  
15 <212> (281)  
<213> orice aminoacid

17 <220>  
<221> NESIGUR  
19 <212> (285)  
<213> orice aminoacid

21 <220>  
<221> NESIGUR  
23 <212> (291)  
<213> orice aminoacid

25 <220>  
<221> NESIGUR  
27 <212> (294)...(386)  
<213> orice aminoacid

31 <400> 28

33 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5 10 15

35 Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Tyr Leu Ser Leu Asp Asp Ser Gly Val Ser Leu  
20 25 30

37 Met Xaa Lys Xaa Asp Xaa Asp Ile Asp Asp Tyr Asn Leu Xaa Trp Phe  
35 40 45

39 Leu Phe Pro Ile Asp Xaa Xaa Gln Tyr Ile Ile Thr Ser Tyr Xaa Ala  
50 55 60

41 Asn Asn Cys Lys Val Trp Asn Val Xaa Asn Asp Lys Ile Asn Val Ser  
65 70 75 80

43 Thr Tyr Ser Ser Thr Asn Ser Xaa Gln Lys Trp Gln Ile Lys Ala Xaa  
85 90 95

45 Xaa Ser Ser Tyr Xaa Ile Gln Ser Xaa Asn Gly Lys Val Leu Thr Ala  
100 105 110

47 Gly Xaa Gly Gln Xaa Leu Gly Xaa Xaa Arg Leu Thr Asp Glu Xaa Xaa  
115 120 125

# RO 123431 B1

Xaa	Asn	Xaa	Asn	Gln	Gln	Trp	Asn	Leu	Thr	Xaa	Val	Gln	Thr	Ile	Gln		1
	130					135					140						
Leu	Pro	Xaa	Lys	Pro	Xaa	Ile	Asp	Xaa	Lys	Leu	Lys	Asp	Xaa	Pro	Xaa		3
145					150					155					160		
Tyr	Ser	Xaa	Thr	Gly	Asn	Ile	Xaa	Xaa	Xaa	Thr	Xaa	Pro	Gln	Leu	Met		5
				165						170				175			7
Gly	Trp	Thr	Leu	Xaa	Pro	Cys	Ile	Met	Val	Asn	Asp	Xaa	Xaa	Ile	Asp		9
			180					185					190				
Lys	Asn	Thr	Gln	Ile	Lys	Thr	Thr	Pro	Tyr	Tyr	Ile	Xaa	Lys	Lys	Tyr		11
		195					200					205					
Xaa	Tyr	Trp	Xaa	Xaa	Ala	Xaa	Gly	Ser	Asn	Val	Xaa	Leu	Xaa	Pro	His		13
	210					215					220						
Xaa	Lys	Xaa	Ser	Tyr	Xaa	Tyr	Glu	Trp	Gly	Thr	Glu	Xaa	Xaa	Gln	Lys		15
225				230						235					240		
Thr	Thr	Ile	Ile	Asn	Thr	Xaa	Gly	Xaa	Gln	Ile	Asn	Ile	Asp	Ser	Gly		17
				245					250					255			19
Met	Lys	Phe	Xaa	Xaa	Pro	Glu	Val	Gly	Gly	Gly	Thr	Xaa	Xaa	Ile	Lys		21
			260					265					270				23
Thr	Gln	Leu	Xaa	Glu	Glu	Leu	Lys	Xaa	Glu	Tyr	Ser	Xaa	Glu	Thr	Lys		25
		275					280					285					
Ile	Met	Xaa	Lys	Tyr	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa		27
	290					295						300					
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa		29
305					310						315				320		
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa		31
				325					330					335			
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa		33
				340				345					350				
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa		35
		355				360						365					
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa		37
		370				375						380					
Xaa	Xaa																39
385																	
<210>	29																41
<211>	28																
<212>	ADN																43
<213>	Secvență artificială																

# RO 123431 B1

1 <220>  
<223> Descrierea secvenței artificiale: ADN sintetic

3 <220>  
<221> caracteristici diverse  
<212> (2)  
5 <213> orice nucleotidă

7 <220>  
<221> caracteristici diverse  
<212> (8)  
9 <213> orice nucleotidă

11 <220>  
<221> caracteristici diverse  
<212> (14)  
13 <213> orice nucleotidă

15 <220>  
<221> caracteristici diverse  
<212> (20)  
<213> orice nucleotidă

17 <400> 29

19 GNGAAGTNCA TATNGAAATN AATAATAC 28

21 <210> 30  
<211> 2015  
<212>  
23 <213> Bacillus thuringiensis

25 <400> 30

27 ATTAATTTTA TGGAGGTTGA TATTTATGTC AGCTCGCGAA GTACACATTG AAATAAACAA 60

TAAAACACGT CATACATTAC AATTAGAGGA TAAAACATAA CTTAGCGGCG GTAGATGGCG 120

29 AACATCACCT ACAAATGTTG CTCGTGATAC AATTAACA TTTGTAGCAG AATCACATGG 180

TTTTATGACA GGAGTAGAAG GTATTATATA TTTTAGTGTA AACGGAGACG CAGAAATTAG 240

31 TTTACATTTT GACAATCCTT ATATAGGTTT TAATAAATGT GATGGTTCTT CTGATAAACC 300

33 TGAATATGAA GTTATTACTC AAAGCGGATC AGGAGATAAA TCTCATGTGA CATATACTAT 360

TCAGACAGTA TCTTTACGAT TATAAGGAAA ATTTATAAAA ACTGTATTTT TTACTAAAAT 420

35 ACCAAAAAAT ACATATTTAT TTTTGGTAT TTTCTAATAT GAAATATGAA TTATAAAAAT 480

37 ATTAATAAAA AAGGTGATAA AAATTATGTT AGATACTAAT AAAGTTTATG AAATAAGCAA 540

TCTTGCTAAT GGATTATATA CATCAACTTA TTTAAGTCTT GATGATCAG GTGTTAGTTT 600

39 AATGAGTAAA AAGGATGAAG ATATTGATGA TTACAATTTA AAATGGTTTT TATTTCTTAT 660

TGATAATAAT CAATATATTA TTACAAGCTA TGGAGCTAAT AATTGTAAAG TTTGGAATGT 720

41 TAAAAATGAT AAAATAAATG TTTCAACTTA TTCTTCAACA AACTCTGTAC AAAAAATGGCA 780

43 AATAAAAGCT AAAGATTCTT CATATATAAT ACAAAAGTAT AATGGAAAAG TCTTAACAGC 840

AGGAGTAGGT CAATCTCTTG GAATAGTACG CCTAAGTAT GAATTTCCAG AGAATTCTAA 900

45 CCAACAATGG AATTTAAGTC CTGTACAAAC AATCAAGTC CCACAAAAAC CTAAAATAGA 960

47 TGAAAAATTA AAAGATCATC CTGAATATTC AGAAACCGGA AATATAAATC CTAAAACAAC 1020

TCCTCAATTA ATGGGATGGA CATTAGTACC TTGTATTATG GTAAATGATT CAAAAATAGA 1080



# RO 123431 B1

TAAAAACACT CAAATTAATA CTACTCCATA TTATATTTTT AAAAAATATA AATACTGGAA	1140	1
TCTAGCAAAA GGAAGTAATG TATCTTTACT TCCACATCAA AAAAGATCAT ATGATTATGA	1200	3
ATGGGGTACA GAAAAAATC AAAAAACAAC TATTATTAAT ACAGTAGGAT TGCAAATTAA	1260	
TATAGATTCA GGAATGAAAT TTGAAGTACC AGAAGTAGGA GGAGGTACAG AAGACATAAA	1320	5
AACACAATTA ACTGAAGAAT TAAAAGTTGA ATATAGCACT GAAACCAAAA TAATGACGAA	1380	7
ATATCAAGAA CACTCAGAGA TAGATAATCC AACTAATCAA CCAATGAATT CTATAGGACT	1440	9
TCTTATTTAT ACTTCTTTAG AATTATATCG ATATAACGGT ACAGAAAATA AGATAATGGA	1500	
CATAGAAACT TCAGATCATG ATACTTACAC TCTTACTTCT TATCCAAATC ATAAAGAAGC	1560	11
ATTATTACTT CTCACAAACC ATTTCGTATGA AGAAGTAGAA GAAATAACAA AAATACCTAA	1620	13
GCATACACTT ATAAAATTGA AAAACATTA TTTTAAAAA TAAAAACAT AATATATAAA	1680	
TGACTGATTA ATATCTCTCG AAAAGTTTCT GGTGCAAAAA TAGTGGGATA TGAAAAAAGC	1740	15
AAAAGATTCC TAACGGAATG GAACATTAGG CTGTTAAATC AAAAAAGTTA TTGATAAAAT	1800	17
ATATCTGCCT TTGGACAGAC TTCTCCCCTT GGAGAGTTTG TCCTTTTTTG ACCATATGCA	1860	
TAGCTTCTAT TCCGGCAATC AFTTTTGTAG CTGTTTGCAA GGATTTAAT CCAAGCATAT	1920	19
CCGAATACGC TTTTGTAFAA CCGATGTCTT GTTCAATGAT ATTGTTAAT ATTTTCACAC	1980	21
GAATTGGCTA CTGTGCGGTA TCCTGTCTCC TTAT	2015	
		23
<210> 31		25
<211> 360		
<212> ADN		
<213> <i>Bacillus thuringiensis</i>		27
<400> 31		29
ATGTCAGCTC GCGAAGTACA CATTGAAATA AACAAATAAA CACGTCATAC ATTACAATTA	60	31
GAGGATAAAA CTAAACTTAG CGGCGGTAGA TGGCGAACAT CACCTACAAA TGTTGCTCGT	120	33
GATACAATTA AAACATTTGT AGCAGAATCA CATGGTTTTA TGACAGGAGT AGAAGGTATT	180	
ATATATTTTA GTGTAAACGG AGACGCAGAA ATTAGTTTAC ATTTTGACAA TCCTTATATA	240	35
GGTTCTAATA AATGTGATGG TTCTTCTGAT AAACCTGAAT ATGAAGTTAT TACTCAAAGC	300	37
GGATCAGGAG ATAAATCTCA TGTGACATAT ACTATTCAGA CAGTATCTT ACGATTATAA	360	39
<210> 32		41
<211> 119		
<212> PRT		
<213> <i>Bacillus thuringiensis</i>		43
<400> 32		45

# RO 123431 B1

1 Met Ser Ala Arg Glu Val His Ile Glu Ile Asn Asn Lys Thr Arg His  
3 1 5 10 15  
5 Thr Leu Gln Leu Glu Asp Lys Thr Lys Leu Ser Gly Gly Arg Trp Arg  
20 25 30  
7 Thr Ser Pro Thr Asn Val Ala Arg Asp Thr Ile Lys Thr Phe Val Ala  
35 40 45  
9 Glu Ser His Gly Phe Met Thr Gly Val Glu Gly Ile Ile Tyr Phe Ser  
50 55 60  
11 Val Asn Gly Asp Ala Glu Ile Ser Leu His Phe Asp Asn Pro Tyr Ile  
65 70 75 80  
13 Gly Ser Asn Lys Cys Asp Gly Ser Ser Asp Lys Pro Glu Tyr Glu Val  
85 90 95  
15 Ile Thr Gln Ser Gly Ser Gly Asp Lys Ser His Val Thr Tyr Thr Ile  
100 105 110  
17 Gln Thr Val Ser Leu Arg Leu  
115  
19

21 <210> 33  
<211> 24  
<212> ADN  
23 <213> Secvență artificială  
25 <210>  
<211> Descrierea secvenței artificiale: Secvență ADN  
27  
29 <400> 33  
CATGAGATTT ATCTCCTGAT CCGC 24  
31 <210> 34  
<211> 2240  
33 <212> ADN  
<213> Bacillus thuringiensis  
35  
37 <400> 34

# RO 123431 B1

ACTATGACAA	TGATTATGAC	TGCTGATGAA	TTAGCTTTAT	CAATACCAGG	ATATTCTAAA	60	1
CCATCAAATA	TAACAGGAGA	TAAAAGTAAA	CATACATTAT	TTACTAATAT	AATTGGAGAT	120	3
ATTCAAATAA	AAGATCAAGC	AACATTGCGG	GTTGTTTTTG	ATCCCCCTCT	TAATCGTATT	180	5
TCAGGGGCTG	AAGAATCAAG	TAAGTTTATT	GATGTATATT	ATCCTTCTGA	AGATAGTAAC	240	7
CTTAAATATT	ATCAATTTAT	AAAAGTAGCA	ATTGATTTTG	ATATTAATGA	AGATTTTATT	300	9
AATTTTAATA	ATCATGACAA	TATAGGGATA	TTTAATTTTG	TTACACGAAA	TTTTTTATTA	360	11
AATAATGAAA	ATGATTAATA	AAAAATTTAA	TTTGATAAAT	ATGTTTATTT	TTTGAAAATT	420	13
GAATGCATAT	ATTAATCGAG	TATGTGTAAT	AAATTTTAAT	TTTATGGAGG	TTGATATTTA	480	15
TGTCAGCACG	TGAAGTACAC	ATTGATGTAA	ATAATAAGAC	AGGTCATACA	TTACAATTAG	540	17
AAGATAAAAC	AAAACCTGAT	GGTGGTAGAT	GGCGAACATC	ACCTACAAAT	GTTGCTAATG	600	19
ATCAAATTA	AACATTTGTA	GCAGAATCAC	ATGGTTTTAT	GACAGGTACA	GAAGGTACTA	660	21
TATATTATAG	TATAAATGGA	GAAGCAGAAA	TTAGTTTATA	TTTTGACAAT	CCTTATTCAG	720	23
GTTCTAATAA	ATATGATGGG	CATTCCAATA	AAAATCAATA	TGAAGTTATT	ACCCAAGGAG	780	25
GATCAGGAAA	TCAATCTCAT	GTTACGTATA	CTATTCAAAC	TGTATCTTCA	CGATATGGGA	840	27
ATAATTCATA	AAAAAATATT	TTTTTTTACG	AAAATACCAA	AAAAATTTTT	TTGGTATTTT	900	29
CTAATATAAT	TCATAAATAT	TTTAATAATA	AAATTATAAG	AAAAGGTGAT	AAATATTATG	960	31
TTAGATACTA	ATAAAATTTA	TGAATAAAGT	AATTATGCTA	ATGGATTACA	TGCAGCAACT	1020	33
TATTTAAGTT	TAGATGATTC	AGGTGTTAGT	TTAATGAATA	AAAATGATGA	TGATATTGAT	1080	35
GACTATAAAT	TAAGGTGGTT	TTTATTTTCT	ATTGATGATA	ATCAATATAT	TATTACAAGC	1140	37
TACGCAGCGA	ATAATTGTAA	GGTTTGGAAAT	GTTAATAATG	ATAAAAATAAA	TGTTTCAACT	1200	
TATTCTTCAA	CAAACCTCGAT	ACAGAAATGG	CAAATAAAAG	CTAATGCTTC	TTCGTATGTA	1260	
ATACAAAGTA	ATAATGGGAA	AGTTCTAACA	GCAGGAACCG	GTCAATCTCT	TGGATTAATA	1320	
CGTTTAACGG	ATGAATCACC	AGATAATCCC	AATCAACAAT	GGAATTTAAC	TCCTGTACAA	1380	
ACAATTCAAC	TCCCACCAAA	ACCTACAATA	GATACAAAGT	TAAAAGATTA	CCCCAAATAT	1440	
TCACAAACTG	GCAATATAGA	CAAGGGAACA	CCTCCTCAAT	TAATGGGATG	GACATTAATA	1500	

# RO 123431 B1

1 CCTTGTATTA TGGTAAATGA TCCAATATA GATAAAAACA CTCAAATCAA AACTACTCCA 1560  
 3 TATTATATTT TAAAAAATA TCAATATTGG CAACAAGCAG TAGGAAGTAA TGTAGCTTTA 1620  
 5 CGTCCGCATG AAAAAAATC ATATGCTTAT GAGTGGGGTA CAGAAATAGA TCAAAAAACA 1680  
 7 ACTATCATT AATACATTAGG ATTTAGATG AATATAGATT CGGGAATGAA ATTTGATATA 1740  
 9 CCAGAAGTAG GTGGAGGTAC AGATGAAATA AAAACACAAT TAAACGAAGA ATTAAAAATA 1800  
 11 GAATATAGCC GTGAAACCAA AATAATGGAA AAATATCAGG AACAATCAGA GATAGATAAT 1860  
 13 CCAACTGATC AATCAATGAA TTCTATAGGA TTCCTCACTA TTACTTCTTT AGAATTATAT 1920  
 15 CGATATAATG GTTCGGAAAT TAGTGTAAATG AAAATTCAAA CTCAGATAA TGATACTTAC 1980  
 17 AATGTGACCT CTTATCCAGA TCATCAACAA GCTCTATTAC TTCTTACAAA TCATTCATAT 2040  
 19 GAAGAAGTAG AAGAAATAAC AAATATTCCC AAAATATCAC TGAAAAAATT AAAAAAATAT 2100  
 21 TATTTTAAA ACATAATTAT ATTTTGATAG CTTTTTAAA A'AAAAGATTG TTCAAAAGTAA 2160  
 23 AATGAAAGAA AATCTTTTAT GAAACTTTAA TACAATAAAA GAGGAATATT TTCTTATAAG 2220  
 25 TACTTCCTTG 2230

<210> 35  
 <211> 372  
 <212> ADN  
 <213> *Bacillus thuringiensis*

<400> 35

27 ATGTCAGCAC GTGAAGTACA CATTGATGTA AATAATAAGA CAGGTCATAC ATTACAATTA 60  
 29 GAAGATAAAA CAAAACCTGA TGGTGGTAGA TGGCGAACAT CACCTACAAA TGTTGCTAAT 120  
 31 GATCAAATTA AACATTTGT AGCAGAATCA CATGGTTTTA TGACAGGTAC AGAAGGTACT 180  
 33 ATATATTATA GTATAAATGG AGAAGCAGAA ATTAGTTTAT ATTTTGACAA TCCTTATTCA 240  
 35 GGTCTAATA AATATGATGG GCATTCCAAT AAAATCAAT ATGAAGTTAT TACCCAAGGA 300  
 37 GGATCAGGAA ATCAATCTCA TGTTACGTAT ACTATTCAAA CTGTATCTTC ACGATATGGG 360  
 39 AATAATTCAT AA 372

<210> 36  
 <211> 123  
 <212> PRT  
 <213> *Bacillus thuringiensis*

<400> 36

# RO 123431 B1

Met	Ser	Ala	Arg	Glu	Val	His	Ile	Asp	Val	Asn	Asn	Lys	Thr	Gly	His		1
1				5					10					15			
Thr	Leu	Gln	Leu	Glu	Asp	Lys	Thr	Lys	Leu	Asp	Gly	Gly	Arg	Trp	Arg		3
			20					25					30				
Thr	Ser	Pro	Thr	Asn	Val	Ala	Asn	Asp	Gln	Ile	Lys	Thr	Phe	Val	Ala		5
		35					40					45					
Glu	Ser	His	Gly	Phe	Met	Thr	Gly	Thr	Glu	Gly	Thr	Ile	Tyr	Tyr	Ser		7
	50					55					60						
Ile	Asn	Gly	Glu	Ala	Glu	Ile	Ser	Leu	Tyr	Phe	Asp	Asn	Pro	Tyr	Ser		9
65					70					75					80		
Gly	Ser	Asn	Lys	Tyr	Asp	Gly	His	Ser	Asn	Lys	Asn	Gln	Tyr	Glu	Val		11
				85					90					95			
Ile	Thr	Gln	Gly	Gly	Ser	Gly	Asn	Gln	Ser	His	Val	Thr	Tyr	Thr	Ile		13
			100					105						110			
Gln	Thr	Val	Ser	Ser	Arg	Tyr	Gly	Asn	Asn	Ser							15
		115						120									

<210> 37

<211> 1152

<212> ADN

<213> Bacillus thuringiensis

<400> 37

17  
19  
21  
23

# RO 123431 B1

```

1      ATGTTAGATA CTAATAAAAT TTATGAAATA AGTAATTATG CTAATGGATT ACATGCAGCA      60
3      ACTTATTTAA GTTTAGATGA TTCAGGTGTT AGTTTAATGA ATAAAAATGA TGATGATATT      120
      GATGACTATA ATTTAAGGTG GTTTTTATTT CCTATTGATG ATAATCAATA TATTATTACA      180
5      AGCTACGCAG CGAATAATTG TAAGSTTTGG AATGTTAATA ATGATAAAAT AAATGTTTCA      240
7      ACTTATTCTT CAACAAACTC GATACAGAAA TGGCAAATAA AAGCTAATGC TTCTTCGTAT      300
      GTAATACAAA GTAATAATGG GAAAGTTCTA ACAGCAGGAA CCGSTCAATC TCTTGGATTA      360
9      ATACGTTTAA CGGATGAATC ACCAGATAAT CCCAATCAAC AATGGAATTT AACTCCTGTA      420
11     CAAACAATTC AACTCCCACC AAAACCTACA ATAGATACAA AGTTAAAAGA TTACCCCAAA      480
      TATTCACAAA CTGGCAATAT AGACAAGGGA ACACCTCCTC AATTAATGGG ATGGACATTA      540
13     ATACCTTGTA TTATGGTAAA TGATCCAAAT ATAGATAAAA ACACTCAAAT CAAAACACT      600
15     CCTATTATA TTTTAAAAAA ATATCAATAT TGGCAACAAG CAGTAGGAAG TAATGTAGCT      660
17     TTACGTCCGC ATGAAAAAAA ATCATATGCT TATGAGTGGG GTACAGAAAT AGATCAAAAA      720
      ACAACTATCA TTAATACATT AGGATTTTCA ATTAATATAG ATTTCGGAAT GAAATTTGAT      780
19     ATACCAGAAG TAGGTGGAGG TACAGATGAA ATAAAAACAC AATTAACGA AGAATTAAAA      840
21     ATAGAATATA GCCGTGAAAC CAAAATAATG GAAAAATATC AGGAACAATC AGAGATAGAT      900
      AATCCAAC TG AATCAATCAAT GAATTTCTATA GGATTCCTCA CTATTACTTC TTTAGAATTA      960
23     TATCGATATA ATGGTTCGGA AATTAGTGTA ATGAAAATTC AAACTTCAGA TAATGATACT      1020
25     TACAATGTGA CCTCTTATCC AGATCATCAA CAAGCTCTAT TACTTCTTAC AAATCATTCA      1080
      TATGAAGAAG TAGAAGAAAT AACAAATATT CCCAAAATAT CACTGAAAAA ATTAAAAAAA      1140
27     TATTATTTTT AA      1152

```

```

29     <210> 38
31     <211> 383
33     <212> PRT
35     <213> Bacillus thuringiensis

```

```

37     Met Leu Asp Thr Asn Lys Ile Tyr Glu Ile Ser Asn Tyr Ala Asn Gly
      1           5           10           15
39     Leu His Ala Ala Thr Tyr Leu Ser Leu Asp Asp Ser Gly Val Ser Leu
      20           25           30
41     Met Asn Lys Asn Asp Asp Asp Ile Asp Asp Tyr Asn Leu Arg Trp Phe
      35           40           45
43     Leu Phe Pro Ile Asp Asp Asn Gln Tyr Ile Ile Thr Ser Tyr Ala Ala
      50           55           60
45     Asn Asn Cys Lys Val Trp Asn Val Asn Asn Asp Lys Ile Asn Val Ser
      65           70           75           80

```

# RO 123431 B1

Thr Tyr Ser Ser Thr Asn Ser Ile Gln Lys Trp Gln Ile Lys Ala Asn	1
85 90 95	
Ala Ser Ser Tyr Val Ile Gln Ser Asn Asn Gly Lys Val Leu Thr Ala	3
100 105 110	
Gly Thr Gly Gln Ser Leu Gly Leu Ile Arg Leu Thr Asp Glu Ser Pro	5
115 120 125	
Asp Asn Pro Asn Gln Gln Trp Asn Leu Thr Pro Val Gln Thr Ile Gln	7
130 135 140	
Leu Pro Pro Lys Pro Thr Ile Asp Thr Lys Leu Lys Asp Tyr Pro Lys	9
145 150 155 160	
Tyr Ser Gln Thr Gly Asn Ile Asp Lys Gly Thr Pro Pro Gln Leu Met	11
165 170 175	
Gly Trp Thr Leu Ile Pro Cys Ile Met Val Asn Asp Pro Asn Ile Asp	13
180 185 190	
Lys Asn Thr Gln Ile Lys Thr Thr Pro Tyr Tyr Ile Leu Lys Lys Tyr	15
195 200 205	
Gln Tyr Trp Gln Gln Ala Val Gly Ser Asn Val Ala Leu Arg Pro His	17
210 215 220	
Glu Lys Lys Ser Tyr Ala Tyr Glu Trp Gly Thr Glu Ile Asp Gln Lys	19
225 230 235 240	
Thr Thr Ile Ile Asn Thr Leu Gly Phe Gln Ile Asn Ile Asp Ser Gly	21
245 250 255	
Met Lys Phe Asp Ile Pro Glu Val Gly Gly Gly Thr Asp Glu Ile Lys	23
260 265 270	
Thr Gln Leu Asn Glu Glu Leu Lys Ile Glu Tyr Ser Arg Glu Thr Lys	25
275 280 285	
Ile Met Glu Lys Tyr Gln Glu Gln Ser Glu Ile Asp Asn Pro Thr Asp	27
290 295 300	
Gln Ser Met Asn Ser Ile Gly Phe Leu Thr Ile Thr Ser Leu Glu Leu	29
305 310 315 320	
Tyr Arg Tyr Asn Gly Ser Glu Ile Ser Val Met Lys Ile Gln Thr Ser	31
325 330 335	
Asp Asn Asp Thr Tyr Asn Val Thr Ser Tyr Pro Asp His Gln Gln Ala	33
340 345 350	
Leu Leu Leu Leu Thr Asn His Ser Tyr Glu Glu Val Glu Glu Ile Thr	35
355 360 365	
Asn Ile Pro Lys Ile Ser Leu Lys Lys Leu Lys Lys Tyr Tyr Phe	37
370 375 380	
<210> 39	39
<211> 2132	41
<212> ADN	43
	45

# RO 123431 B1

1 <213> *Bacillus thuringiensis*

3 <400> 39

5 GTATTCAGG GGGTGAAGAT TCAAGTAAGT TTATTGATGT ATATTATCCT TTTGAAGATA 60  
7 GTAATTTTAA ATATTATCAA TTTATAAAAG TAGCAATTGA TTTTGATATT AATGAAGATT 120  
9 TTATTAATTT TAATAATCAT GACAATATAG GGATATTTAA TTTTGTTACA CGAAATTTTT 180  
11 TATTAATAAA TGAAAATGAT GAATAAAAAA TTAATTTGT TTATTATGTT TATTTTTTGA 240  
13 AAATGAATG CATATATTAA TCGAGTATGT ATAATAAATT TTAATTTTAT GGAGGTTGAT 300  
15 ATTTATGTCA GCACGTGAAG TACACATTGA TGTAATAAAT AAGACAGGTC ATACATTACA 360  
17 ATTAGAAGAT AAAACAAAAC TTGATGGTGG TAGATGGCGA ACATCACCTA CAAATGTTGC 420  
19 TAATGATCAA ATTA AACAT TGTAGCAGA ATCAAATGGT TTTATGACAG GTACAGAAGG 480  
21 TACTATATAT TATAGTATAA ATGGAGAAGC AGAAATTAGT TTATATTTTG ACAATCCTTT 540  
23 TGCAGGTTCT AATAAATATG ATGGACATTC CAATAAATCT CAATATGAAA TTATTACCCA 600  
25 AGGAGGATCA GGAAATCAAT CTCATGTTAC GTATACTATT CAAACCACAT CCTCACGATA 660  
27 TGGGCATAAA TCATAACAAA TAATTTTTTA CGAAAATACC AAAAAATAAA TATTTTTTGG 720  
29 TATTFICTAA TATAAATTAC AAATATATTA ATAATAAAAT TATAAGAAAA GGTGATAAAG 780  
31 ATTATGTTAG ATACTAATAA AGTTTATGAA ATAAGCAATC ATGCTAATGG ACTATATGCA 840  
33 GCAACTTATT TAAGTTTAGA TGATTCAGGT GTTAGTTTAA TGAATAAAAA TGATGATGAT 900  
35 ATTGATGATT ATAACCTTAA ATGGTTTTTA TTTCTATTG ATGATGATCA ATATATTATT 960  
37 ACAAGCTATG CAGCAAATAA TTGTAAAGTT TGGAAATGTTA ATAATGATAA AATAAATGTT 1020  
39 TCGACTTATT CTTCAACAAA TTCAATACAA AAATGGCAA TAAAAGCTAA TGGTTCTTCA 1080  
TATGTAATAC AAAGTGATAA TGAAAAAGTC TTAACAGCAG GAACCGGTCA AGCTCTTGG 1140  
TTGATACGTT TAACTGATGA ATCCTCAAAT AATCCCAATC AACCAATGGAA TTTAACTTCT 1200  
GTACAAACAA TTCAACTTCC AAAAAACCT ATAATAGATA CAAAATTAAG AGATTATCCC 1260  
AAATATTCAC CAACTGGAAA TATAGATAAT GGAACATCTC CTCAATTAAT GGGATGGACA 1320  
TTAGTACCTT GTATTATGGT AAATGATCCA AATATAGATA AAAATACTCA AATTAAAACT 1380



# RO 123431 B1

ACTCCATATT ATATTTTAAA AAAATATCAA TATTGGCAAC GAGCAGTAGG AAGTAATGTA	1440	1
GCTTTACGTC CACATGAAAA AAAATCATAT ACTTATGAAT GGGGCACAGA AATAGATCAA	1500	3
AAAACAACAA TTATAAATAC ATTAGGATTT CAAATCAATA TAGATTCAGG AATGAAATTT	1560	5
GATATACCAG AAGTAGGTGG AGGTACAGAT GAAATAAAAA CACAACATAA TGAAGAATTA	1620	7
AAAATAGAAT ATAGTCATGA AACTAAAATA ATGGAAAAAT ATCAAGAACA ATCTGAAATA	1680	9
GATAATCCAA CTGATCAATC AATGAATTCT ATAGGATTTT TACTATTAC TTCCTTAGAA	1740	11
TTATATAGAT ATAATGGCTC AGAAATTCGT ATAATGCAAA TTCAAACCTC AGATAATGAT	1800	13
ACTTATAATG TTAATTCTTA TCCAAATCAT CAACAAGCTT TATTACTTCT TACAAATCAT	1860	15
TCATATGAAG AAGTAGAAGA AATAACAAAT ATTCCTAAAA GTACACTAAA AAAATTAAAA	1920	17
AAATATTATT TTTAAATAT T GAAATTAGAA ATTATCTAAA ACAAACGAA AGATAATTTA	1980	19
ATCTTAAAT ATTTGTAAGA TAATCGTATT TTATTTGTAT TAATTTTTAT ACAATATAAA	2040	21
GTAATATCTG TACGTGAAAT TGGTTTCGCT TCAATATCTA ATCTCATCTC ATGTATTACA	2100	23
TGCGTAATAC CTTCTTGTTT TGCTTCTACA AG	2132	25
<210> 40		27
<211> 372		29
<212> ADN		31
<213> <i>Bacillus thuringiensis</i>		33
<400> 40		35
ATGTCAGCAC GTGAAGTACA CATTGATGTA AATAATAAGA CAGGTCATAC ATTACAATTA	60	37
GAAGATAAAA CAAAACCTGA TGGTGGTAGA TGGCGAACAT CACCTACAAA TGTTGCTAAT	120	39
GATCAAATTA AAACATTTGT AGCAGAATCA AATGGTTTTA TGACAGGTAC AGAAGGTACT	180	41
ATATATTATA GTATAAATGG AGAAGCAGAA ATTAGTTTAT ATTTTGACAA TCCTTTTGCA	240	43
GGTTCTAATA AATATGATGG ACATTCCAAT AAATCTCAAT ATGAAATTAT TACCCAAGGA	300	45
GGATCAGGAA ATCAATCTCA TGTTACGTAT ACTATTCAAAA CCACATCCTC ACGATATGGG	360	
CATAAATCAT AA	372	
<210> 41		43
<211> 123		45
<212> PRT		47
<213> Organism necunoscut		49
<220> 40		51
<223> Descrierea organismului necunoscut: proteină		53

# RO 123431 B1

1 <400> 41

3 Met Ser Ala Arg Glu Val His Ile Asp Val Asn Asn Lys Thr Gly His  
1 5 10 15

5 Thr Leu Gln Leu Glu Asp Lys Thr Lys Leu Asp Gly Gly Arg Trp Arg  
20 25 30

7 Thr Ser Pro Thr Asn Val Ala Asn Asp Gln Ile Lys Thr Phe Val Ala  
35 40 45

9 Glu Ser Asn Gly Phe Met Thr Gly Thr Glu Gly Thr Ile Tyr Tyr Ser  
50 55 60

11 Ile Asn Gly Glu Ala Glu Ile Ser Leu Tyr Phe Asp Asn Pro Phe Ala  
65 70 75 80

13 Gly Ser Asn Lys Tyr Asp Gly His Ser Asn Lys Ser Gln Tyr Glu Ile  
85 90 95

15 Ile Thr Gln Gly Gly Ser Gly Asn Gln Ser His Val Thr Tyr Thr Ile  
100 105 110

17 Gln Thr Thr Ser Ser Arg Tyr Gly His Lys Ser  
115 120

19

21 <210> 42

<211> 124128

23 <212> ADN

<213> Bacillus thuringiensis

25 <220>

<221> caracteristici diverse

27 <212> (53)

<213> orice nucleotidă

29

<220>

31 <221> caracteristici diverse

<212> (61)

33 <213> orice nucleotidă

<220>

35 <221> caracteristici diverse

<212> (68)

37 <213> orice nucleotidă

39

<220>

<221> caracteristici diverse

41 <212> (73)

<213> orice nucleotidă

43

<220>

45 <221> caracteristici diverse

# RO 123431 B1

<212> (81)	1
<213> orice nucleotidă	
<220>	3
<221> caracteristici diverse	
<212> (18)	5
<213> orice nucleotidă	
	7
ATGTTAGATA CTAATAAAGT TTATGAAATA AGCAATCATG CTAATGGACT ATATGCAGCA 60	
ACTTATTAA GTTTAGATGA TTCAGGTGTT AGTTAATGA ATAAAAATGA TGATGATATT 120	9
GATGATTATA ACTTAAAATG GTTTTTATTT CCTATTGATG ATGATCAATA TATTATTACA 180	
AGCTATGCAG CAAATAATTG TAAAGTTTGG AATGTTAATA ATGATAAAAT AAATGTTTCG 240	11
ACTTATICTT CAACAAATTC AATACAAAAA TGGCAAATAA AAGCTAATGG TTCTTCATAT 300	13
GTAATACAAA GTGATAATGG AAAACTCTTA ACAGCAGGAA CCGTCAAGC TCTTGGATTG 360	
	15
ATACGTTTAA CTGATGAATC CTCAAATAAT CCCAATCAAC AATGGAATTT AACTTCTGTA 420	
CAAACAATTC AACTTCCACA AAAACCTATA ATAGATACAA AATTAAAAGA TTATCCCAAA 480	17
TATTCACCAA CTGGAAATAT AGATAATGGA ACATCTCCTC AATTAATGGG ATGGACATTA 540	
GTACCTTGTA TTATGGTAAA TGATCCAAAT ATAGATAAAA ATACTCAAAT TAAAACACT 600	19
CCATATTATA TTTTAAAAAA ATATCAATAT TGGCAACGAG CAGTAGGAAG TAATGTAGCT 660	21
TTACGTCCAC ATGAAAAAAA ATCATATACT TATGAATGGG GCACAGAAAT AGATCAAAAA 720	
ACAACAATTA TAAATACATT AGGATTTCAA ATCAATATAG ATTCAGGAAT GAAATTTGAT 780	23
ATACCAGAAG TAGGTGGAGG TACAGATGAA ATAAAAACAC AACTAAATGA AGAATTAAAA 840	25
ATAGAATATA GTCATGAAAC TAAATAATG GAAAAATATC AAGAACAATC TGAATAGAT 900	
AATCCAAC TG ATCAATCAAT GAATTCTATA GGATTTCTTA CTATTACTTC CTTAGAATTA 960	27
TATAGATATA ATGGCTCAGA AATTCGTATA ATGCAAATTC AAACCTCAGA TAATGATACT 1020	
TATAATGTTA CTTCITATCC AAATCATCAA CAAGCTTTAT TACTTCTTAC AAATCATTCA 1080	29
TATGAAGAAG TAGAAGAAAT AACAAATATT CCTAAAAGTA CACTAAAAAA ATAAAAAAA 1140	31
TATTATTTTT AA 1152	
	33
<210> 43	
<211> 383	
<212> PRT	35
<213> Bacillus thuringiensis	
	37
<400> 43	
	39
Met Leu Asp Thr Asn Lys Val Tyr Glu Ile Ser Asn His Ala Asn Gly 1 5 10 15	
Leu Tyr Ala Ala Thr Tyr Leu Ser Leu Asp Asp Ser Gly Val Ser Leu 20 25 30	41
Met Asn Lys Asn Asp Asp Asp Ile Asp Asp Tyr Asn Leu Lys Trp Phe 35 40 45	43
Leu Phe Pro Ile Asp Asp Asp Gln Tyr Ile Ile Thr Ser Tyr Ala Ala 50 55 60	45
Asn Asn Cys Lys Val Trp Asn Val Asn Asn Asp Lys Ile Asn Val Ser 65 70 75 80	47

# RO 123431 B1

1 Thr Tyr Ser Ser Thr Asn Ser Ile Gln Lys Trp Gln Ile Lys Ala Asn  
85 90 95

3 Gly Ser Ser Tyr Val Ile Gln Ser Asp Asn Gly Lys Val Leu Thr Ala  
100 105 110

5 Gly Thr Gly Gln Ala Leu Gly Leu Ile Arg Leu Thr Asp Glu Ser Ser  
115 120 125

7 Asn Asn Pro Asn Gln Gln Trp Asn Leu Thr Ser Val Gln Thr Ile Gln  
130 135 140

9 Leu Pro Gln Lys Pro Ile Ile Asp Thr Lys Leu Lys Asp Tyr Pro Lys  
145 150 155 160

11 Tyr Ser Pro Thr Gly Asn Ile Asp Asn Gly Thr Ser Pro Gln Leu Met  
165 170 175

13 Gly Trp Thr Leu Val Pro Cys Ile Met Val Asn Asp Pro Asn Ile Asp  
180 185 190

15 Lys Asn Thr Gln Ile Lys Thr Thr Pro Tyr Tyr Ile Leu Lys Lys Tyr  
195 200 205

17 Gln Tyr Trp Gln Arg Ala Val Gly Ser Asn Val Ala Leu Arg Pro His  
210 215 220

19 Glu Lys Lys Ser Tyr Thr Tyr Glu Trp Gly Thr Glu Ile Asp Gln Lys  
225 230 235 240

21 Thr Thr Ile Ile Asn Thr Leu Gly Phe Gln Ile Asn Ile Asp Ser Gly  
245 250 255

23 Met Lys Phe Asp Ile Pro Glu Val Gly Gly Gly Thr Asp Glu Ile Lys  
260 265 270

25 Thr Gln Leu Asn Glu Glu Leu Lys Ile Glu Tyr Ser His Glu Thr Lys  
275 280 285

27 Ile Met Glu Lys Tyr Gln Glu Gln Ser Glu Ile Asp Asn Pro Thr Asp  
290 295 300

29 Gln Ser Met Asn Ser Ile Gly Phe Leu Thr Ile Thr Ser Leu Glu Leu  
305 310 315 320

31 Tyr Arg Tyr Asn Gly Ser Glu Ile Arg Ile Met Gln Ile Gln Thr Ser  
325 330 335

33 Asp Asn Asp Thr Tyr Asn Val Thr Ser Tyr Pro Asn His Gln Gln Ala  
340 345 350

35 Leu Leu Leu Leu Thr Asn His Ser Tyr Glu Glu Val Glu Glu Ile Thr  
355 360 365

37 Asn Ile Pro Lys Ser Thr Leu Lys Lys Leu Lys Lys Tyr Tyr Phe  
370 375 380

41 <210> 44  
43 <211> 360  
<212> ADN  
45 <213> Bacillus thuringiensis

# RO 123431 B1

<400> 44

ATGTCGGCCC GCGAGGTGCA CATCGAGATC AACAAACAAGA CCCGCCACAC CCTCCAGCTC 60  
 GAGGACAAGA CCAAGCTCTC CGGCGGCAGG TGGCGCACCT CCCCACCAA CGTGGCCCGC 120  
 GACACCATCA AGACGTTTCGT GCGGGAGTCC CACGGCTTCA TGACCGGCCT CGAGGGCATC 180  
 ATCTACTTCT CCGTGAACGG CGACGCCGAG ATCTCCCTCC ACTTCGACAA CCGTACATC 240  
 GGCTCCAACA AGTGCGACGG CTCCTCCGAC AAGCCCGAGT ACGAGGTGAT CACCCAGTCC 300  
 GGCTCCGGCG ACAAGTCCCA CGTGACCTAC ACCATCCAGA CCGTGTCCCT CCGCCTCTGA 360

<210> 45

<211> 1158

<212> ADN

<213> Bacillus thuringiensis

<400> 45

<400> 52

Met Ser Gly Arg Glu Val His Ile Glu Ile Asn Asn Lys Thr Arg His  
 1 5 10 15

Thr Leu Gln Leu Glu Asp Lys Thr Lys Leu Ser Gly Gly Arg Trp Arg  
 20 25 30

Thr Ser Pro Thr Asn Val Ala Arg Asp Thr Ile Lys Thr Phe Val Ala  
 35 40 45

Glu Ser His Gly Phe Met Thr Gly Val Glu Gly Ile Ile Tyr Phe Ser  
 50 55 60

Val Asn Gly Asp Ala Glu Ile Ser Leu His Phe Asp Asn Pro Tyr Ile  
 65 70 75 80

Gly Ser Asn Lys Cys Asp Gly Ser Ser Asp Lys Pro Glu Tyr Glu Val  
 85 90 95

Ile Thr Gln Ser Gly Ser Gly Asp Lys Ser His Val Thr Tyr Thr Ile  
 100 105 110

Gln

<210> 53

<211> 1103

<212> ADN

<213> Bacillus thuringiensis

<400> 53

# RO 123431 B1

1 ATGCTCGACA CCAACAAGGT GTACGAGATC TCCAACCTCG CCAACGGCCT CTACACCTCC 60  
 ACCTACCTCF CCCTCGACGA CTCGGCGTG TCCCTCATGT CCAAGAAGGA CGAGGACATC 120  
 3 GACGACTACA ACCTCAAGTG GTTCTCTTTC CCGATCGACA ACAACCAGTA CATCATCACC 180  
 TCCTACGGCG CCAACAAC TG AAGGTGTGG AACGTGAAGA ACGACAAGAT CAACGTGTCC 240  
 5 ACCTACTCCT CCACCAACTC CGTGCAGAAG TGGCAGATCA AGGCCAAGGA CTCCTCCTAC 300  
 7 ATCATCCAGT CCGACAACGG CAAGGTGCTC ACCGCGGGCG TGGGCCAGTC CCTCGGCATC 360  
 GTGCGCCTCA CCGACGAGTT CCCGAGAAC TCCAACCAGC AATGGAACCT CACCCCGGTG 420  
 9 CAGACCATCC AGCTCCCGCA GAAGCCGAG ATCGACGAGA AGCTCAAGGA CCACCCGGAG 480  
 11 TACTCCGAGA CCGGCAACAT CAACCCGAG ACCACCCCGC AGCTCATGGG CTGGACCCTC 540  
 GTGCGGTGCA TCATGTTGAA CGACTCCAAG ATCGACAAGA ACACCCAGAT CAAGACCACC 600  
 13  
 CCGTACTACA TCTTCAAGAA ATACAAGTAC TGGAACCTCG CCAAGGGCTC CAACGTGTCC 660  
 15 CTCCTCCCGC ACCAGAAGCG CAGCTACGAC TACGAGTGGG GCACCGAGAA GAACCAGAAG 720  
 ACCACCATCA TCAACACCGT GGGCCTGCAG ATCAACATCG ACTCGGGGAT GAAGTTCGAG 780  
 17 GTGCGGGAGG TGGCGGGGG CACCGAGGAC ATCAAGACC AGCTCACCGA GGAGCTGAAG 840  
 19 GTGGAGTACT CCACCGAGAC CAAGATCATG ACCAAGTACC AGGAGCACTC CGAGATCGAC 900  
 AACCCGACCA ACCAGCCGAT GAACTCCATC GGCCTCCTCA TCTACACCTC CCTCGAGCTG 960  
 21 TACCCTACA ACGGCACCGA GATCAAGATC ATGGACATCG AGACCTCCGA CCACGACACC 1020  
 TACACCCTCA CCTCTACCC GAACCACAAG GAGGGCTGTC TGCTGCTGAC CAACCACTCC 1080  
 23 TACGAGGAGG TGGAGGAGAT CACCAAGATC CCGAAGCACA CCCTCATCAA GCTCAAGAAG 1140  
 25 CACTACTTCA AGAAGTGA 1158  
 27  
 <210> 46  
 <211> 24  
 29 <212> ADN  
 <213> Bacillus thuringiensis  
 31  
 <400> 46  
 33 gtagaagcag aacaagaagg tatt 24  
 35  
 <210> 47  
 <211> 25  
 37 <212> ADN  
 <213> Bacillus thuringiensis  
 39  
 <400> 47

# RO 123431 B1

atgtcagcwc gygaagtwca yattg	25	1
<210> 48		3
<211> 238		
<212> ADN		5
<213> Bacillus thuringiensis		
<400> 48		7
gtytgaathg tatahgthac atg	23	9
<210> 49		11
<211> 25		
<212> ADN		13
<213> Bacillus thuringiensis		
<400> 49		15
atgttagata cwaataaart wtatg	25	17
<210> 50		19
<211> 29		
<212> ADN		21
<213> Bacillus thuringiensis		
<400> 50		23
gtwatttett cwacttcttc atahgaatg	29	25
<210> 51		27
<211> 341		
<212> ADN		29
<213> Bacillus thuringiensis		
<400> 51		31
atgtcaggtc gagaagtaca tattgaaata aacaataaaa cacgtcatac attacaatta 60		
gaggataaaa ctaaacttag cggcggtaga tggcgaacat caoctacaaa tgttgctcgt 120		33
gatacaatta aacattttgt agcagaatca catggtttta tgacaggagt agaaggatt 180		
atatatttta gtgtaaacgg agacgcagaa attagtttac attttgacaa tccttatata 240		
ggttctaata aatgtgatgg ttcttctgat aaacotgaat atgaagttat tactcaaagc 300		35
ggatcaggag ataaatctca tgtaacatat actattcaga c 341		
<210> 52		37
<211> 113		
<212> PRT		39
<213> Organism necunoscut		

# RO 123431 B1

```
1 atgtagata caaataaagt ttatgaaata agcaatcttg ctaatggatt atatacatcm 60
acttatttaa gtcttgatga ttcagggtgtt agtttaatga gtaaaaagga tgaagatatt 120
3 gatgattaca atttaaaatg gtttttattt cctattgata ataatacaata tattattaca 180
agctatggag ctaataattg taaagtttgg aatgttaaaa atgataaaat aaatgtttca 240
5 acttattctt caacaaactc tgtacaaaaa tggcaataa aagctaaaga ttcttcatat 300
ataatacaaa gtgataatgg aaaggcttta acagcaggag taggtcaatc tcttggaata 360
gtacgcctaa ctgatgaatt tccagagaat tctaaccaac aatggaattt aactcctgta 420
7 caacaattc aactcccaca aaaacctaaa atagatgaaa aattaaaaga tcatcctgaa 480
tattcagaaa ccggaatat aaatcctaaa acaactcctc aattaatggg atggacatta 540
9 gtaccttgta ttatggtaaa tgattcaaaa atagataaaa aactcaaat taaaactact 600
ccatattata tttttaaaaa atataaatac tggaatctag caaaaggaag taatgtatct 660
ttacttccac atcaaaaaag atcatatgat tatgaatggg gtacagaaaa aaatcaaaaa 720
11 acamctatta ttaatacagt aggattgcaa attaatatag actcaggaat gaaatttgaa 780
gtaccagaag taggaggagg tacagaagac ataaaaacac aattaactga agaattaaaa 840
13 gttgaatata gcactgaaac caaataatg acgaaatctc aagaacactc agagatagat 900
aatccaacta atcaaccaat gaattctata ggacttctta tttacacttc tttagaatta 960
15 tatcgatata acggtacaga aattaagata atggacatag aaacttcaga tcatgatact 1020
tacactctta cttcttatcc aaatcataaa gaagcattat tacttctcac aaaccattca 1080
17 tatgaagaag tagaagaat aac 1103
```

<210> 54

19 <211> 367

<212> PRT

21 <213> Organism necunoscut

<220>

23 <221> NESIGUR

<212> (242)

25 <213> Nedeterminat în secvența de aminoacizi dedusă

27 <400> 54



# RO 123431 B1

Met	Leu	Asp	Thr	Asn	Lys	Val	Tyr	Glu	Ile	Ser	Asn	Leu	Ala	Asn	Gly	1
1				5					10					15		3
Leu	Tyr	Thr	Ser	Thr	Tyr	Leu	Ser	Leu	Asp	Asp	Ser	Gly	Val	Ser	Leu	5
			20						25				30			
Met	Ser	Lys	Lys	Asp	Glu	Asp	Ile	Asp	Asp	Tyr	Asn	Leu	Lys	Trp	Phe	7
		35					40					45				
Leu	Phe	Pro	Ile	Asp	Asn	Asn	Gln	Tyr	Ile	Ile	Thr	Ser	Tyr	Gly	Ala	9
	50					55					60					
Asn	Asn	Cys	Lys	Val	Trp	Asn	Val	Lys	Asn	Asp	Lys	Ile	Asn	Val	Ser	11
65					70					75					80	13
Thr	Tyr	Ser	Ser	Thr	Asn	Ser	Val	Gln	Lys	Trp	Gln	Ile	Lys	Ala	Lys	15
				85					90					95		
Asp	Ser	Ser	Tyr	Ile	Ile	Gln	Ser	Asp	Asn	Gly	Lys	Val	Leu	Thr	Ala	17
			100					105					110			
Gly	Val	Gly	Gln	Ser	Leu	Gly	Ile	Val	Arg	Leu	Thr	Asp	Glu	Phe	Pro	19
		115					120					125				
Glu	Asn	Ser	Asn	Gln	Gln	Trp	Asn	Leu	Thr	Pro	Val	Gln	Thr	Ile	Gln	21
	130					135					140					
Leu	Pro	Gln	Lys	Pro	Lys	Ile	Asp	Glu	Lys	Leu	Lys	Asp	His	Pro	Glu	23
145					150					155					160	25
Tyr	Ser	Glu	Thr	Gly	Asn	Ile	Asn	Pro	Lys	Thr	Thr	Pro	Gln	Leu	Met	27
				165					170					175		
Gly	Trp	Thr	Leu	Val	Pro	Cys	Ile	Met	Val	Asn	Asp	Ser	Lys	Ile	Asp	29
			180					185					190			
Lys	Asn	Thr	Gln	Ile	Lys	Thr	Thr	Pro	Tyr	Tyr	Ile	Phe	Lys	Lys	Tyr	31
		195					200					205				
Lys	Tyr	Trp	Asn	Leu	Ala	Lys	Gly	Ser	Asn	Val	Ser	Leu	Leu	Pro	His	33
	210					215					220					

# RO 123431 B1

1	Gln Lys Arg Ser Tyr	Asp Tyr Glu Trp Gly Thr Glu Lys Asn Gln Lys	225	230	235	240
3	Thr Xaa Ile Ile Asn Thr Val Gly Leu Gln Ile Asn Ile Asp Ser Gly		245	250	255	
5	Met Lys Phe Glu Val Pro Glu Val Gly Gly Gly Thr Glu Asp Ile Lys		260	265	270	
7	Thr Gln Leu Thr Glu Glu Leu Lys Val Glu Tyr Ser Thr Glu Thr Lys		275	280	285	
9	Ile Met Thr Lys Tyr Gln Glu His Ser Glu Ile Asp Asn Pro Thr Asn		290	295	300	
11	Gln Pro Met Asn Ser Ile Gly Leu Leu Ile Tyr Thr Ser Leu Glu Leu		305	310	315	320
13	Tyr Arg Tyr Asn Gly Thr Glu Ile Lys Ile Met Asp Ile Glu Thr Ser		325	330	335	
15	Asp His Asp Thr Tyr Thr Leu Thr Ser Tyr Pro Asn His Lys Glu Ala		340	345	350	
17	Leu Leu Leu Leu Thr Asn His Ser Tyr Glu Glu Val Glu Glu Ile		355	360	365	
19	<210> 55					
21	<211> 341					
23	<212> ADN					
25	<213> Bacillus thuringiensis					
27	<400> 55					
29	atgtcagctc	gtgaagtaca	tattgatgta	aataataaga	caggtcatac	attacaatta 60
31	gaagataaaa	caaaacttga	tggtggtaga	tggcgaacat	cacctacaaa	tgttgctaatt 120
33	gatcaaatta	aaacatttgt	agcagaatca	catggtttta	tgacaggtac	agaaggtcat 180
35	atatattata	gtataaatgg	agaagcagaa	attagtttat	atthtgataa	tccttattca 240
37	ggtttctaata	aatatgatgg	ggattccaat	aaacctcaat	atgaagttac	tacccaagga 300
	ggatcaggaa	atcaatctca	tgtaacatat	acgattcaaa	c	341

# RO 123431 B1

<210> 56	1
<211> 113	
<212> PRT	
<213> Organism necunoscut	3
<400> 56	5
Met Ser Ala Arg Glu Val His Ile Asp Val Asn Asn Lys Thr Gly His	
1 5 10 15	7
Thr Leu Gln Leu Glu Asp Lys Thr Lys Leu Asp Gly Gly Arg Trp Arg	
20 25 30	9
Thr Ser Pro Thr Asn Val Ala Asn Asp Gln Ile Lys Thr Phe Val Ala	
35 40 45	11
Glu Ser His Gly Phe Met Thr Gly Thr Glu Gly His Ile Tyr Tyr Ser	
50 55 60	13
Ile Asn Gly Glu Ala Glu Ile Ser Leu Tyr Phe Asp Asn Pro Tyr Ser	
65 70 75 80	15
Gly Ser Asn Lys Tyr Asp Gly Asp Ser Asn Lys Pro Gln Tyr Glu Val	
85 90 95	17
Thr Thr Gln Gly Gly Ser Gly Asn Gln Ser His Val Thr Tyr Thr Ile	
100 105 110	19
Gln	21
<210> 57	23
<211> 1103	
<212> ADN	
<213> Bacillus thuringiensis	25
<400> 57	27
atgttagata ctaataaagt ttatgaaata agtaatcatg ctaatggact atatgcagca 60	
acttatttaa gtttagatga ttcagggtgt agttaaataga ataaaaatga tgatgatatt 120	
gatgattaca acttaaaatg gtttttattt cctattgatg atgatcaata tattattaca 180	29
agctatgcag caaataaattg taaagtttgg aatgtaata atgataaaat aaatgtttcg 240	
acttattcct taacaaattc aatacaaaaa tggcaaataa aagctaattg ttcttcatat 300	
gtaatacaaa gtgataatgg aaaagtctta acagcaggaa cgggtcaagc tcttggattg 360	31
atacgtttaa ctgatgaatc ttcaaataat cccaatcaac aatggaattt aacttctgta 420	
caaacaattc aacttccaca aaaacctata atagatacaa aattaaaga ttatoccaa 480	33
tattcaccia ctggaaatat agataatgga acatctctc aattaatggg atggacatta 540	
gtaccttgta ttatggttaa tgatccaaat atagataaaa atactcaaat taaactact 600	
ccatattata ttttaaaaaa atatcaatat tggcaacgag cagtaggaag taatgtagct 660	35
ttacgtccac atgaaaaaaa atcatatact tatgaatggg gaacagaaat agatcaaaaa 720	
acaacaatca taaatacatt aggatttcaa atcaatatag attcaggaat gaaatttgat 780	
ataccagaag taggtggagg tacagatgaa ataaaaacac aactaaatga agaattaa 840	37
atagaatata gtcgtgaaac taaaataatg gaaaaatata aagaacaatc tgaaatagat 900	
aatccaactg atcaaccaat gaattctata ggatttctta ctattacttc tttagaatta 960	39
tatagatata atggctcaga aattcgtata atgcaaattc aaacctcaga taatgatact 1020	
tataatgnta cttcttacc agatcatcaa caagctttat tactttctac aaatcattca 1080	
tatgaagaac tagaagaat aac 1103	41
<210> 58	43
<211> 367	
<212> PRT	
<213> Bacillus thuringiensis	45
<400> 58	47
Met Leu Asp Thr Asn Lys Val Tyr Glu Ile Ser Asn His Ala Asn Gly	
1 5 10 15	

# RO 123431 B1

1 Leu Tyr Ala Ala Thr Tyr Leu Ser Leu Asp Asp Ser Gly Val Ser Leu  
                                   20                                  25                                  30  
 3  
 5 Met Asn Lys Asn Asp Asp Asp Ile Asp Asp Tyr Asn Leu Lys Trp Phe  
                                   35                                  40                                  45  
 7 Leu Phe Pro Ile Asp Asp Asp Gln Tyr Ile Ile Thr Ser Tyr Ala Ala  
                                   50                                  55                                  60  
 9 Asn Asn Cys Lys Val Trp Asn Val Asn Asn Asp Lys Ile Asn Val Ser  
   65                                  70                                  75                                  80  
 11 Thr Tyr Ser Leu Thr Asn Ser Ile Gln Lys Trp Gln Ile Lys Ala Asn  
                                   85                                  90                                  95  
 13  
 15 Gly Ser Ser Tyr Val Ile Gln Ser Asp Asn Gly Lys Val Leu Thr Ala  
                                   100                                  105                                  110  
 17 Gly Thr Gly Gln Ala Leu Gly Leu Ile Arg Leu Thr Asp Glu Ser Ser  
                                   115                                  120                                  125  
 19 Asn Asn Pro Asn Gln Gln Trp Asn Leu Thr Ser Val Gln Thr Ile Gln  
   130                                  135                                  140  
 21  
 23 Leu Pro Gln Lys Pro Ile Ile Asp Thr Lys Leu Lys Asp Tyr Pro Lys  
   145                                  150                                  155                                  160  
 25 Tyr Ser Pro Thr Gly Asn Ile Asp Asn Gly Thr Ser Pro Gln Leu Met  
                                   165                                  170                                  175  
 27 Gly Trp Thr Leu Val Pro Cys Ile Met Val Asn Asp Pro Asn Ile Asp  
                                   180                                  185                                  190  
 29 Lys Asn Thr Gln Ile Lys Thr Thr Pro Tyr Tyr Ile Leu Lys Lys Tyr  
                                   195                                  200                                  205  
 31  
 33 Gln Tyr Trp Gln Arg Ala Val Gly Ser Asn Val Ala Leu Arg Pro His  
                                   210                                  215                                  220  
 35 Glu Lys Lys Ser Tyr Thr Tyr Glu Trp Gly Thr Glu Ile Asp Gln Lys  
   225                                  230                                  235                                  240  
 37 Thr Thr Ile Ile Asn Thr Leu Gly Phe Gln Ile Asn Ile Asp Ser Gly  
                                   245                                  250                                  255  
 39 Met Lys Phe Asp Ile Pro Glu Val Gly Gly Gly Thr Asp Glu Ile Lys  
                                   260                                  265                                  270  
 41  
 43 Thr Gln Leu Asn Glu Glu Leu Lys Ile Glu Tyr Ser Arg Glu Thr Lys  
                                   275                                  280                                  285  
 45 Ile Met Glu Lys Tyr Gln Glu Gln Ser Glu Ile Asp Asn Pro Thr Asp  
   290                                  295                                  300



# RO 123431 B1

1 Met Ser Ala Gly Glu Val His Ile Asp Ala Asn Asn Lys Thr Gly His  
    1                  5                  10                  15  
 3 Thr Leu Gln Leu Glu Asp Lys Thr Lys Leu Asp Gly Gly Arg Trp Arg  
                   20                  25                  30  
 5 Thr Ser Pro Thr Asn Val Ala Asn Asp Gln Ile Lys Thr Phe Val Ala  
                   35                  40                  45  
 7 Thr Ser Pro Thr Asn Val Ala Asn Asp Gln Ile Lys Thr Phe Val Ala  
                   35                  40                  45  
 9 Glu Ser His Gly Phe Met Thr Gly Thr Glu Gly His Ile Tyr Tyr Ser  
           50                  55                  60  
 11 Ile Asn Gly Glu Ala Glu Ile Ser Leu Tyr Phe Asp Asn Pro Tyr Ser  
    65                  70                  75                  80  
 13 Gly Ser Asn Lys Tyr Asp Gly Asp Ser Asn Lys Pro Gln Tyr Glu Val  
                   85                  90                  95  
 15 Thr Thr Gln Gly Gly Ser Gly Asn Gln Ser His Val Thr Tyr Thr Ile  
                   100                  105                  110  
 17 Thr Thr Gln Gly Gly Ser Gly Asn Gln Ser His Val Thr Tyr Thr Ile  
                   100                  105                  110  
 19 Gln

21 <210> 61  
    <211> 340  
 23 <212> ADN  
    <213> Bacillus thuringiensis

25 <400> 61  
 27 tgtcagcagc tgaagtacat attgaaataa acaataaaac acgtcataca ttacaattag 60  
    aggataaaac taaacttagc ggcggtagat ggcgaacatc acctacaaat gttgctcgtg 120  
 29 atacaattaa aacatttgta gcagaatcac atggttttat gacaggagta gaaggtatta 180  
    tatatttttag tgtaaacgga gacgcagaaa ttagtttaca ttttgacaat ccttatatag 240  
    gttctaataa atgtgatggt tcttctgata aacctgaata tgaagttatt actcaaagcg 300  
 31 gatcaggaga taaatctcat gtgacatata cgattcagac                  340

33 <210> 62  
    <211> 112  
    <212> PRT  
 35 <213> Bacillus thuringiensis  
 37 <400> 62

# RO 123431 B1

Ser	Ala	Arg	Glu	Val	His	Ile	Glu	Ile	Asn	Asn	Lys	Thr	Arg	His	Thr	1
1				5					10					15		3
Leu	Gln	Leu	Glu	Asp	Lys	Thr	Lys	Leu	Ser	Gly	Gly	Arg	Trp	Arg	Thr	5
			20					25					30			7
Ser	Pro	Thr	Asn	Val	Ala	Arg	Asp	Thr	Ile	Lys	Thr	Phe	Val	Ala	Glu	9
		35					40					45				11
Ser	His	Gly	Phe	Met	Thr	Gly	Val	Glu	Gly	Ile	Ile	Tyr	Phe	Ser	Val	13
	50					55					60					15
Asn	Gly	Asp	Ala	Glu	Ile	Ser	Leu	His	Phe	Asp	Asn	Pro	Tyr	Ile	Gly	17
65					70					75					80	19
Ser	Asn	Lys	Cys	Asp	Gly	Ser	Ser	Asp	Lys	Pro	Glu	Tyr	Glu	Val	Ile	21
			85						90					95		23
Thr	Gln	Ser	Gly	Ser	Gly	Asp	Lys	Ser	His	Val	Thr	Tyr	Thr	Ile	Gln	25
			100					105						110		27
<210> 63																29
<211> 1114																31
<212> ADN																33
<213> Bacillus thuringiensis																35
<400> 63																37
atg	ttagata	ctaataaaat	ttatgaaata	agcaatcttg	ctaattggatt	atatacatca	60	39								
act	tatttaa	gtcttgatga	ttcaggtggt	agtttaatga	gtaaaaagga	tgaagatatt	120									
gat	gattaca	atttaaaatg	gtttttattt	cctattgata	ataatcaata	tattattaca	180									
agc	tatggag	ctaataattg	taaagtttgg	aatgttaaaa	atgataaaat	aaatgtttca	240									
act	tatttctt	caacaaactc	tgtacaaaaa	tggaataaa	aagctaaaga	ttcttcatat	300									
ata	atacaaaa	gtgataatgg	aaaggtctta	acagcaggag	taggtcaatc	tcttggaata	360									
gtac	gcctaa	ctgatgaatt	tccagagaat	tctaaccaac	aatggaattt	aactcctgta	420									
caa	acaattc	aactcccaca	aaaacctaaa	atagatgaaa	aattaaaaga	tcatcctgaa	480									
tatt	cagaaa	ocggaaatat	aaatcctaaa	acaactcctc	aattaatggg	atggacatta	540									
gtac	cttgta	ttatggtaaa	tgattcaaaa	atagataaaa	acactcaaat	taaaactact	600									
coat	attata	tttttaaaaa	atataaatac	tggaatctag	caaaaggaag	taatgtatct	660									
ttact	tccac	atcaaaaaag	atcatatgat	tatgaatggg	gtacagaaaa	aaatcaaaaa	720									
aca	actatta	ttaatacagt	aggattgcaa	attaatatag	atcaggaat	gaaatttgaa	780									
gtac	cagaag	taggaggagg	tacagaagac	ataaaaaacac	aattaactga	agaattaaaa	840									
gtt	gaatata	gcactgaaac	caaaataatg	acgaaatatac	aagaacactc	agagatagat	900									
aat	ccaacta	atcaaccaat	gaattctata	ggacttctta	tttatacttc	tttagaatta	960									
tat	ogatata	acggtacaga	aattaagata	atggacatag	aaacttcaga	tcatgatact	1020									
tac	actotta	cttcttatcc	aatcataaa	gaagcattat	tacttctcac	aaaccattct	1080									
tat	gaagaac	tagaacaat	tacaagggcg	aatt			1114									

# RO 123431 B1

1 <210> 64  
<211> 371  
3 <212> PRT  
<213> Bacillus thuringiensis  
5 <220>  
<221> NESIGUR  
7 <212> (242)  
<213> Nedeterminat în secvența de aminoacizi dedusă  
9 <400> 64  
11 Met Leu Asp Thr Asn Lys Ile Tyr Glu Ile Ser Asn Leu Ala Asn Gly  
1 5 10 15  
13 Leu Tyr Thr Ser Thr Tyr Leu Ser Leu Asp Asp Ser Gly Val Ser Leu  
15 20 25 30  
17 Met Ser Lys Lys Asp Glu Asp Ile Asp Asp Tyr Asn Leu Lys Trp Phe  
35 40 45  
19 Leu Phe Pro Ile Asp Asn Asn Gln Tyr Ile Ile Thr Ser Tyr Gly Ala  
50 55 60  
21 Asn Asn Cys Lys Val Trp Asn Val Lys Asn Asp Lys Ile Asn Val Ser  
23 65 70 75 80  
25 Thr Tyr Ser Ser Thr Asn Ser Val Gln Lys Trp Gln Ile Lys Ala Lys  
85 90 95  
27 Asp Ser Ser Tyr Ile Ile Gln Ser Asp Asn Gly Lys Val Leu Thr Ala  
100 105 110



# RO 123431 B1

Gly	Val	Gly	Gln	Ser	Leu	Gly	Ile	Val	Arg	Leu	Thr	Asp	Glu	Phe	Pro	1
	115					120						125				3
Glu	Asn	Ser	Asn	Gln	Gln	Trp	Asn	Leu	Thr	Pro	Val	Gln	Thr	Ile	Gln	5
	130					135					140					
Leu	Pro	Gln	Lys	Pro	Lys	Ile	Asp	Glu	Lys	Leu	Lys	Asp	His	Pro	Glu	7
145					150					155					160	
Tyr	Ser	Glu	Thr	Gly	Asn	Ile	Asn	Pro	Lys	Thr	Thr	Pro	Gln	Leu	Met	9
				165					170					175		11
Gly	Trp	Thr	Leu	Val	Pro	Cys	Ile	Met	Val	Asn	Asp	Ser	Lys	Ile	Asp	13
			180					185					190			
Lys	Asn	Thr	Gln	Ile	Lys	Thr	Thr	Pro	Tyr	Tyr	Ile	Phe	Lys	Lys	Tyr	15
		195					200					205				17
Lys	Tyr	Trp	Asn	Leu	Ala	Lys	Gly	Ser	Asn	Val	Ser	Leu	Leu	Pro	His	19
	210					215					220					21
Gln	Lys	Arg	Ser	Tyr	Asp	Tyr	Glu	Trp	Gly	Thr	Glu	Lys	Asn	Gln	Lys	23
225					230					235					240	
Thr	Thr	Ile	Ile	Asn	Thr	Val	Gly	Leu	Gln	Ile	Asn	Ile	Asp	Ser	Gly	25
				245					250					255		27
Met	Lys	Phe	Glu	Val	Pro	Glu	Val	Gly	Gly	Gly	Thr	Glu	Asp	Ile	Lys	29
			260					265					270			31
Thr	Gln	Leu	Thr	Glu	Glu	Leu	Lys	Val	Glu	Tyr	Ser	Thr	Glu	Thr	Lys	33
		275					280					285				35
Ile	Met	Thr	Lys	Tyr	Gln	Glu	His	Ser	Glu	Ile	Asp	Asn	Pro	Thr	Asn	37
	290					295					300					39
Gln	Pro	Met	Asn	Ser	Ile	Gly	Leu	Leu	Ile	Tyr	Thr	Ser	Leu	Glu	Leu	41
305					310					315					320	43
Tyr	Arg	Tyr	Asn	Gly	Thr	Glu	Ile	Lys	Ile	Met	Asp	Ile	Glu	Thr	Ser	45
				325					330					335		
Asp	His	Asp	Thr	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ser	Tyr	Pro	Asn	His	Lys	Glu	Ala	47
			340					345					350			49
Leu	Leu	Leu	Leu	Thr	Asn	His	Ser	Tyr	Glu	Glu	Leu	Glu	Gln	Ile	Thr	51
		355						360				365				53
Arg	Ala	Asn														55
	370															

# RO 123431 B1

1 <212> ADN  
<213> Bacillus thuringiensis

3 <400> 67

5 atgttagata ctaataaaagt ttatgaaata agcaatcttg ctaatggatt atatacatca 60  
acttatttaa gtcttgatga ttcaggtggt agtttaatga gtaaaaagga tgaagatatt 120  
gatgattaca atttaaaatg gtttttattt cctattgata ataatacaata tattattaca 180  
7 agctatggag ctaataattg taaagtttgg aatgttataaa atgataaaat aaatgtttca 240  
acttattcctt caacaaaactc tgtacaaaaa tggcaaaataa aagctaaaga ttcttcatat 300  
9 ataatacaaaa gtgataatgg aaaggtctta acagcaggag taggtcaatc tcttgggaata 360  
gtacgcctaa ctgatgaatt tccagagaat tctaaccaac aatggaattt aactcctgta 420  
caaaccaattc aactcccaca aaaacctaata atagatgaaa aattaaaga tcatcctgaa 480  
tattcagaaa coggaaatat aaatcctaaa acaactcctc aattaatggg atggacatta 540  
11 gtaccttgta ttatggtaaa tgattcaaaa atagataaaa acactcaaat taaaactact 600  
ccatattata tttttaaaaa atataaatac tggaatctag caaaaggaag taatgtatct 660  
13 ttacttccac atcaaaaaag atcatatgat tatgaatggg gtacagaaaa aaatcaaaaa 720  
acaactatta ttaatacagt aggattgcaa attaatatag attcaggaat gaaatttgaa 780  
gtaccagaag taggaggagg tacagaagac ataaaaacac aattaactga agaattaaaa 840  
15 gttgaatata gcactgaaac caaataatg acgaaatate aagaacactc agagatagat 900  
aatccaacta atcaaccaat gaattctata ggacttctta tttatacttc tttagaatta 960  
tatcgatata acggtacaga aattaagata atggacatag aaacttcaga tcatgatact 1020  
17 tacactctta ctcttatcc aaatcataaa gaagcattat tacttctcac aaaccattcg 1080  
tatgaagaag tagaagaat acaaaaaata cctaagcata cacttataaa attgaaaaaa 1140  
cattatttta aaaaaata 1158

19 <210> 68  
<211> 385

21 <212> PRT  
<213> Bacillus thuringiensis

23 <400> 68

25 <210> 65  
<211> 360  
<212> ADN  
<213> Bacillus thuringiensis

27 <400> 65

29 atgtcagctc gcgaagtaca cattgaaata aacaataaaa cacgtcatac attacaatta 60  
gaggataaaa ctaaaacttag cggcggtaga tggcgaacat cacctacaaa tgyttgctcg 120  
gatacaatta aaacatttgt agcagaatca catggtttta tgacaggagt agaaggtatt 180  
atatatttta gtgtaaacgg agacgcagaa attagtttac attttgacaa tccttatata 240  
ggttctaata aatgtgatgg ttctctgat aaacctgaat atgaagttat tactcaaacg 300  
ggatcaggag ataaatctca tgtgacatat actattcaga cagtatcttt acgattataa 360

31 <210> 66  
<211> 119

33 <212> PRT  
<213> Bacillus thuringiensis

35 <400> 66  
Met Ser Ala Arg Glu Val His Ile Glu Ile Asn Asn Lys Thr Arg His  
1 5 10 15

37 Thr Leu Gln Leu Glu Asp Lys Thr Lys Leu Ser Gly Gly Arg Trp Arg  
20 25 30

39 Thr Ser Pro Thr Asn Val Ala Arg Asp Thr Ile Lys Thr Phe Val Ala  
35 40 45

41 Glu Ser His Gly Phe Met Thr Gly Val Glu Gly Ile Ile Tyr Phe Ser  
50 55 60

43 Val Asn Gly Asp Ala Glu Ile Ser Leu His Phe Asp Asn Pro Tyr Ile  
65 70 75 80

45 Gly Ser Asn Lys Cys Asp Gly Ser Ser Asp Lys Pro Glu Tyr Glu Val  
85 90 95

47 Ile Thr Gln Ser Gly Ser Gly Asp Lys Ser His Val Thr Tyr Thr Ile  
100 105 110  
Gln Thr Val Ser Leu Arg Leu  
115

<210> 67  
<211> 1158

# RO 123431 B1

Met	Leu	Asp	Thr	Asn	Lys	Val	Tyr	Glu	Ile	Ser	Asn	Leu	Ala	Asn	Gly	1
1				5				10						15		3
Leu	Tyr	Thr	Ser	Thr	Tyr	Leu	Ser	Leu	Asp	Asp	Ser	Gly	Val	Ser	Leu	5
			20					25					30			7
Met	Ser	Lys	Lys	Asp	Glu	Asp	Ile	Asp	Asp	Tyr	Asn	Leu	Lys	Trp	Phe	9
		35					40					45				11
Leu	Phe	Pro	Ile	Asp	Asn	Asn	Gln	Tyr	Ile	Ile	Thr	Ser	Tyr	Gly	Ala	13
	50					55					60					15
Asn	Asn	Cys	Lys	Val	Trp	Asn	Val	Lys	Asn	Asp	Lys	Ile	Asn	Val	Ser	17
65					70					75					80	19
Thr	Tyr	Ser	Ser	Thr	Asn	Ser	Val	Gln	Lys	Trp	Gln	Ile	Lys	Ala	Lys	21
				85					90					95		23
Asp	Ser	Ser	Tyr	Ile	Ile	Gln	Ser	Asp	Asn	Gly	Lys	Val	Leu	Thr	Ala	25
			100					105					110			27
Gly	Val	Gly	Gln	Ser	Leu	Gly	Ile	Val	Arg	Leu	Thr	Asp	Glu	Phe	Pro	29
		115					120					125				31
Glu	Asn	Ser	Asn	Gln	Gln	Trp	Asn	Leu	Thr	Pro	Val	Gln	Thr	Ile	Gln	33
	130					135					140					35
Leu	Pro	Gln	Lys	Pro	Lys	Ile	Asp	Glu	Lys	Leu	Lys	Asp	His	Pro	Glu	37
145					150					155					160	39

# RO 123431 B1

1 atgtcagctc gcgaagtwea tattgaaata aacaataaaa cacgtcatac attacaatta 60  
 gaggataaaa ctaaacttag cggcggtaga tggcgaacat cacctacaaa tgttgctcgt 120  
 3 gatacaatta aaacatttgt agcagaatca catggtttta tgacaggagt agaaggtatt 180  
 atatatttta gtgtaaacgg agacgcagaa attagtttac attttgacaa tocttatata 240  
 5 ggttctaata aatgtgatgg ttcttctgat aaacctgaat atgaagttat tactcaaagc 300  
 ggatcaggag ataaatctca tgtgacatat accattcaaa 340

7 <210> 74  
 9 <211> 113  
 <212> PRT  
 11 <213> Bacillus thuringiensis

<400> 74  
 13 Met Ser Ala Arg Glu Val His Ile Glu Ile Asn Asn Lys Thr Arg His  
 15 1 5 10 15  
 17 Thr Leu Gln Leu Glu Asp Lys Thr Lys Leu Ser Gly Gly Arg Trp Arg  
 20 25 30  
 19 Thr Ser Pro Thr Asn Val Ala Arg Asp Thr Ile Lys Thr Phe Val Ala  
 35 40 45  
 21 Glu Ser His Gly Phe Met Thr Gly Val Glu Gly Ile Ile Tyr Phe Ser  
 50 55 60  
 23 Val Asn Gly Asp Ala Glu Ile Ser Leu His Phe Asp Asn Pro Tyr Ile  
 25 65 70 75 80  
 27 Gly Ser Asn Lys Cys Asp Gly Ser Ser Asp Lys Pro Glu Tyr Glu Val  
 85 90 95  
 29 Ile Thr Gln Ser Gly Ser Gly Asp Lys Ser His Val Thr Tyr Thr Ile  
 31 100 105 110

33 Gln  
 35 <210> 75  
 <211> 341  
 37 <212> ADN  
 <213> Bacillus thuringiensis  
 39 <400> 75

# RO 123431 B1

Tyr	Ser	Glu	Thr	Gly	Asn	Ile	Asn	Pro	Lys	Thr	Thr	Pro	Gln	Leu	Met	1
				165					170					175		
																3
Gly	Trp	Thr	Leu	Val	Pro	Cys	Ile	Met	Val	Asn	Asp	Ser	Lys	Ile	Asp	5
			180					185					190			
																7
Lys	Asn	Thr	Gln	Ile	Lys	Thr	Thr	Pro	Tyr	Tyr	Ile	Phe	Lys	Lys	Tyr	
		195					200					205				
																9
Lys	Tyr	Trp	Asn	Leu	Ala	Lys	Gly	Ser	Asn	Val	Ser	Leu	Leu	Pro	His	
	210					215					220					
																11
Gln	Lys	Arg	Ser	Tyr	Asp	Tyr	Glu	Trp	Gly	Thr	Glu	Lys	Asn	Gln	Lys	
225					230					235					240	
																13
Thr	Thr	Ile	Ile	Asn	Thr	Val	Gly	Leu	Gln	Ile	Asn	Ile	Asp	Ser	Gly	
				245					250					255		15
																17
Met	Lys	Phe	Glu	Val	Pro	Glu	Val	Gly	Gly	Gly	Thr	Glu	Asp	Ile	Lys	
			260					265					270			
																19
Thr	Gln	Leu	Thr	Glu	Glu	Leu	Lys	Val	Glu	Tyr	Ser	Thr	Glu	Thr	Lys	
		275					280					285				
																21
Ile	Met	Thr	Lys	Tyr	Gln	Glu	His	Ser	Glu	Ile	Asp	Asn	Pro	Thr	Asn	
	290					295					300					23
																25
Gln	Pro	Met	Asn	Ser	Ile	Gly	Leu	Leu	Ile	Tyr	Thr	Ser	Leu	Glu	Leu	
305					310					315					320	
																27
Tyr	Arg	Tyr	Asn	Gly	Thr	Glu	Ile	Lys	Ile	Met	Asp	Ile	Glu	Thr	Ser	
				325					330					335		
																29
Asp	His	Asp	Thr	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ser	Tyr	Pro	Asn	His	Lys	Glu	Ala	
			340					345					350			
																31
Leu	Leu	Leu	Leu	Thr	Asn	His	Ser	Tyr	Glu	Glu	Val	Glu	Glu	Ile	Thr	
		355					360					365				33
																35
Lys	Ile	Pro	Lys	His	Thr	Leu	Ile	Lys	Leu	Lys	Lys	His	Tyr	Phe	Lys	
	370					375					380					
																37
Lys																39
385																
																39

<210> 69

# RO 123431 B1

1 <211> 341  
<212> ADN  
3 <213> Bacillus thuringiensis

5 <400> 69

atgtcagcac gagaagtaca cattgatgta aataataaga caggtcatac attacaatta 60  
7 gaagataaaa caaaacttga tgggtggtaga tggcgaacat cacctacaaa tggttgcta 120  
gatcaaatta aaacatctgt agcagaatca aatggtttta tgacaggta cagaaggta 180  
9 atatattata gtataaatgg agaagcagaa attagtttat attttgacaa tcottttgca 240  
ggttctaata aatatgatgg acattccaat aaatctcaat atgaaattat tacccaagga 300  
ggatcaggaa atcaatctca tggtaacttat acaattcaga c 341

11 <210> 70  
13 <211> 113  
<212> PRT  
15 <213> Bacillus thuringiensis

<400> 70

17 Met Ser Ala Arg Glu Val His Ile Asp Val Asn Asn Lys Thr Gly His  
1 5 10 15  
19 Thr Leu Gln Leu Glu Asp Lys Thr Lys Leu Asp Gly Gly Arg Trp Arg  
20 25 30  
21 Thr Ser Pro Thr Asn Val Ala Asn Asp Gln Ile Lys Thr Ser Val Ala  
23 35 40 45  
25 Glu Ser Asn Gly Phe Met Thr Gly Thr Glu Gly Thr Ile Tyr Tyr Ser  
50 55 60  
27 Ile Asn Gly Glu Ala Glu Ile Ser Leu Tyr Phe Asp Asn Pro Phe Ala  
65 70 75 80  
29 Gly Ser Asn Lys Tyr Asp Gly His Ser Asn Lys Ser Gln Tyr Glu Ile  
31 85 90 95  
33 Ile Thr Gln Gly Gly Ser Gly Asn Gln Ser His Val Thr Tyr Thr Ile  
100 105 110  
35 Gln

37 <210> 71  
<211> 340  
<212> ADN  
39 <213> Bacillus thuringiensis

# RO 123431 B1

<400> 71		1
atgtcagcag gogaagttca tattgatgta aataataaga caggtcatac attacaatta	60	3
gaagataaaa caaaacttga tgggtgtaga tggogaacat cacctacaaa tgttgcta	120	
gatcaaatta aacatttgt agcagaatca aatggtttta tgacaggtac agaaggtact	180	5
atatattata gtataaatgg agaagcagaa attagtttat attttgacaa tccttttgca	240	
ggttctaata aatatgatgg acattccaat aaatctcaat atgaaattat tacccaagga	300	
ggatcaggaa atcaatctca tgtaacgtat acaattcaaa	340	7
<210> 72		9
<211> 113		
<212> PRT		11
<213> Bacillus thuringiensis		
<400> 72		13
Met Ser Ala Gly Glu Val His Ile Asp Val Asn Asn Lys Thr Gly His		15
1 5 10 15		
Thr Leu Gln Leu Glu Asp Lys Thr Lys Leu Asp Gly Gly Arg Trp Arg		17
20 25 30		
Thr Ser Pro Thr Asn Val Ala Asn Asp Gln Ile Lys Thr Phe Val Ala		19
35 40 45		
Glu Ser Asn Gly Phe Met Thr Gly Thr Glu Gly Thr Ile Tyr Tyr Ser		21
50 55 60		
Ile Asn Gly Glu Ala Glu Ile Ser Leu Tyr Phe Asp Asn Pro Phe Ala		23
65 70 75 80		
Gly Ser Asn Lys Tyr Asp Gly His Ser Asn Lys Ser Gln Tyr Glu Ile		25
85 90 95		
Ile Thr Gln Gly Gly Ser Gly Asn Gln Ser His Val Thr Tyr Thr Ile		27
100 105 110		
Gln		29
<210> 73		31
<211> 340		33
<212> ADN		35
<213> Bacillus thuringiensis		37
<400> 73		39

# RO 123431 B1

1 atgtcagctc gcgaagttca tattgaaata aataataaaa cacgtcatac attacaatta 60  
 3 gaggataaaa ctaaacttac cagtggtaga tggcgaacat cacctacaaa tgttgctcgt 120  
 5 gatacaatta aaacatttgt agcagaatca catggtttta tgacaggaat agaaggtatt 180  
 7 atatatttta gcgtaaacgg agaagcagaa attagtttac attttgacaa tccttatgta 240  
 9 ggttotaata aatatgatgg ttcttctgat aaagctgcat acgaagttat tgctcaaggt 300  
 11 ggatcagggg atatatctca tgtaacttat acaattcaaa c 341

7 <210> 76  
 <211> 113  
 9 <212> PRT  
 <213> Bacillus thuringiensis

11 <400> 76  
 13 Met Ser Ala Arg Glu Val His Ile Glu Ile Asn Asn Lys Thr Arg His  
 15 Thr Leu Gln Leu Glu Asp Lys Thr Lys Leu Thr Ser Gly Arg Trp Arg  
 17 Thr Ser Pro Thr Asn Val Ala Arg Asp Thr Ile Lys Thr Phe Val Ala  
 19 Glu Ser His Gly Phe Met Thr Gly Ile Glu Gly Ile Ile Tyr Phe Ser  
 21 Val Asn Gly Glu Ala Glu Ile Ser Leu His Phe Asp Asn Pro Tyr Val  
 23 Gly Ser Asn Lys Tyr Asp Gly Ser Ser Asp Lys Ala Ala Tyr Glu Val  
 25 Ile Ala Gln Gly Gly Ser Gly Asp Ile Ser His Val Thr Tyr Thr Ile  
 27 Gln

33 <210> 77  
 <211> 1175  
 35 <212> ADN  
 <213> Bacillus thuringiensis

37 <400> 77



# RO 123431 B1

```

atgttagata ctaataaagt ttatgaaata agcaatcatg ctaatggatt atatacatca 60      1
acttatttaa gtctggatga ttcaggtggt agtttaatgg gtcaaaatga tgaggatata 120
gatgaatmca atttaaagtg gttcttattt ccaatagata ataatacaata tattattaca 180      3
agctatggag cgaataattg taaagtttgg aatgttaaaa atgataaagt aaatgtttca 240
acgtattctc caacaaactc agtacaaaaa tggcaaataa aagctaaaaa ttcttcatat 300
ataatacaaaa gtgagaatgg aaaagtotta acagcaggaa taggtcaatc tcctggaata 360      5
gtacgcttaa ccgatgaatc atcagagagt tctaaccaac aatggaattt aatccctgta 420
caaacaattt cactcccaca aaaacctaaa atagataaaa aattaaaga tcatcctgaa 480      7
tattcagaaa ccggaaatat agctactgga acaattcctc aattaatggg atggacatta 540
gtaccttgta ttatggtaaa tgatccaaaa atagataaaa acactcaaat taaaactact 600
ccatattata tttttaaaaa atatcaatac tggaaaacgag caataggaag taatgtatct 660      9
ttacttccac atcaaaaaaa atcatatgat tatgagtggg gtacagaaga aatcaaaaa 720
acaactatta ttaatacagt aggatttcaa attaatgtag attcaggaat gaagtttgag 780      11
gtaccagaag taggaggagg tacagaagaa ataaaaacac aattaaatga agaattaa 840
gttgaatata gcactgacac caaataaatg aaaaaatatc aagaacactc agagatagat 900
aatccaacta atcaacaat  gaattctata ggatttctta cttttacttc tttagaatta 960      13
tategatata acggttcgga aattcgtata atgagaatgg aaacttcaga taatgatact 1020
tatactctga cctcttatcc aatcataga gaagcattat tacttctcac aatcattca 1080      15
tatcaagaag tacmagaat  tacaagggcg aattcttgca gatatccatc acactggcgg 1140
gccggtcgag ccttgcctct agagggggccc caatt 1175      17

```

```

<210> 78
<211> 391      19
<212> PRT
<213> Bacillus thuringiensis      21

```

```

<220>      23
<211> NESIGUR
<212> (242)      25
<213> Nedeterminat în secvența de aminoacizi dedusă

```

```

<400> 78      27

```

```

Met Leu Asp Thr Asn Lys Val Tyr Glu Ile Ser Asn His Ala Asn Gly      29
  1           5           10           15

```

```

Leu Tyr Thr Ser Thr Tyr Leu Ser Leu Asp Asp Ser Gly Val Ser Leu      31
           20           25           30

```

33



# RO 123431 B1

Tyr Arg Tyr Asn Gly Ser Glu Ile Arg Ile Met Arg Met Glu Thr Ser	1
325 330 335	
Asp Asn Asp Thr Tyr Thr Leu Thr Ser Tyr Pro Asn His Arg Glu Ala	3
340 345 350	5
Leu Leu Leu Leu Thr Asn His Ser Tyr Gln Glu Val Xaa Glu Ile Thr	7
355 360 365	
Arg Ala Asn Ser Cys Arg Tyr Pro Ser His Trp Arg Ala Gly Arg Ala	9
370 375 380	
Leu His Leu Glu Gly Pro Gln	11
385 390	13
<210> 79	
<211> 341	15
<212> ADN	
<213> Bacillus thuringiensis	17
<400> 79	19
atgtcagcag gtgaagttca tattgaaata aataataaaa caogtcatac attacaatta 60	21
gaggataaaa ctaaacttac cagtggtaga tggcgaacat cacctacaaa tgttgctcgt 120	
gatacaatta aaacatttgt agcagaatca catggtttta tgacaggaat agaaggtatt 180	23
atatatttta gcgtaaacgg agaagcagaa attagtttac attttgacaa tccttatgta 240	
ggttctaata aatatgatgg ttcttctgat aaagctgcat acgaagttat tgctcaaggt 300	
ggatcagggg atatatctca tctaacatat acaattcaaa c 341	25
<210> 80	
<211> 113	27
<212> PRT	
<213> Bacillus thuringiensis	29
<400> 80	31

# RO 123431 B1

1 Met Ser Ala Gly Glu Val His Ile Glu Ile Asn Asn Lys Thr Arg His  
    1                  5                  10                  15  
 3 Thr Leu Gln Leu Glu Asp Lys Thr Lys Leu Thr Ser Gly Arg Trp Arg  
    20                  25                  30  
 5 Thr Ser Pro Thr Asn Val Ala Arg Asp Thr Ile Lys Thr Phe Val Ala  
    35                  40                  45  
 7 Thr Ser His Gly Phe Met Thr Gly Ile Glu Gly Ile Ile Tyr Phe Ser  
    50                  55                  60  
 9 Val Asn Gly Glu Ala Glu Ile Ser Leu His Phe Asp Asn Pro Tyr Val  
    65                  70                  75                  80  
 11 Gly Ser Asn Lys Tyr Asp Gly Ser Ser Asp Lys Ala Ala Tyr Glu Val  
    85                  90                  95  
 13 Ile Ala Gln Gly Gly Ser Gly Asp Ile Ser His Leu Thr Tyr Thr Ile  
    100                  105                  110  
 15  
 17 Gln  
 19  
 21  
 23 <210> 81  
    <211> 1410  
    <212> ADN  
 25 <213> Bacillus thuringiensis  
 27 <400> 81

# RO 123431 B1

```

atgttagata ctaataaaat ttatgaaata agcaatcatg ctaatggatt atatacatca 60      1
acttatttaa gtctggatga ttcaggtggt agtttaatgg gtcaaaatga tgaggatata 120
gatgaataca atttaaagtg gttcttattt ccaatagata ataatacaata tattattaca 180      3
agctatggag cgaataaattg taaagtttgg aatgttaaaa atgataaagt aaatgtttca 240
acgtattctc caacaaaactc agtacaaaaa tggcaaaaaa aagctaaaaa ttcttcatat 300      5
ataatacaaa gtgagaatgg aaaagtctta acagcaggaa taggtcaatc tcttggaata 360
gtacgcttaa cggatgaatc atcagagagt tctaaccaac aatggaattt aatcctgtga 420      7
caaacaattt cactcccaca aaaacctaaa atagataaaa aattaaaga tcatcctgaa 480
tattcagaaa cgggaaatat agctactgga acaattcctc aattaatggg atggacatta 540
gtaccttgta ttatggtaaa tgatccaaaa ataggtaaaa aactcfaat taaaactact 600      9
ccatattata tttttaaaaa atatcaatac tggaaacgag caataggaag taatgtatct 660
ttacttccac atcaaaaaaa atcatatgat tatgagtggg gtacagaaga aaatcaaaaa 720
acaactatta ttaatacagt aggatttcaa attaatgtag attcaggaat gaagtttgag 780      11
gtaccagaag taggaggagg tacagaagaa ataaaaacac aattaaatga agaattaaaa 840
gttgaatata gcactgacac caaaataatg aaaaaatata aagaacactc agagatagat 900      13
aatccaacta atcaaacac gaattctata ggatttctta cttttacttc tttagaatta 960
tatcgatata acggttcgga aattcgtata atgagaatgg aaacttcaga taatgatact 1020
tatactctga cctcttatcc aaatcataga gaagcattat tacttctcac aaatcattct 1080      15
tatcaagaag taagccgaat tccagcacac tggcgccgt tactagtgga tccgagctcg 1140
gtaccaagct tggcgtaatc atggtcatag stgtttcctg tgtgaaattg ttatccgctc 1200      17
acaattccac acaacatcgc agccggaagc ataaagtgtg aagcctgggg tgcctaata 1260
gtgagctaac tcacattaat tgcgttgccg tcaactgccg cttccagtc gggaaacctg 1320      19
tcgtgccagc tgcattaatg aatcggccaa cgcgcgggga gaggcgggtt gcgtattggg 1380
cgctcttccg ctctctcgct cactgactcg                                     1410

```

```

<210> 82
<211> 462
<212> PRT
<213> Bacillus thuringiensis

```

```

<400> 82

```

```

Met Leu Asp Thr Asn Lys Ile Tyr Glu Ile Ser Asn His Ala Asn Gly
  1                   5                   10                   15

```

```

Leu Tyr Thr Ser Thr Tyr Leu Ser Leu Asp Asp Ser Gly Val Ser Leu
                   20                   25                   30

```

```

Met Gly Gln Asn Asp Glu Asp Ile Asp Glu Tyr Asn Leu Lys Trp Phe
                   35                   40                   45

```



# RO 123431 B1

Asp Asn Asp Thr Tyr Thr Leu Thr Ser Tyr Pro Asn His Arg Glu Ala	1
340 345 350	
Leu Leu Leu Leu Thr Asn His Ser Tyr Gln Glu Val Ser Arg Ile Pro	3
355 360 365	
Ala His Trp Arg Pro Leu Leu Val Asp Pro Ser Ser Val Pro Ser Leu	5
370 375 380	
Ala Ser Trp Ser Xaa Phe Pro Val Asn Cys Tyr Pro Leu Thr Ile Pro	7
385 390 395 400	
His Asn Ile Arg Ala Gly Ser Ile Lys Cys Lys Ala Trp Gly Ala Val	9
405 410 415	
Ser Leu Thr Leu Ile Ala Leu Arg Ser Leu Pro Ala Phe Gln Ser Gly	11
420 425 430	
Asn Leu Ser Cys Gln Leu His Ile Gly Gln Arg Ala Gly Arg Gly Gly	13
435 440 445	
Leu Arg Ile Gly Arg Ser Ser Ala Ser Ser Leu Thr Asp Ser	15
450 455 460	
<210> 83	17
<211> 340	19
<212> ADN	21
<213> Bacillus thuringiensis	23
<400> 83	25
tgtcagcaac tgaagtacat attgatgtaa ataataagac aggtcataca ttacaattag 60	
aagataaaac aaaacttgat ggtggtgat ggogaacatc acctacaaat gttgctaata 120	27
atcaaattaa aacatttgta gcagaatcaa atggttttat gacaggtaca gaaggacta 180	
tatattatag tataaatgga gaagcagaaa ttagttttata ttttgacaat ccttttgcag 240	29
gttctaataa atatgatgga cattccaata aatctcaata tgaattatt acccaaggag 300	
gatcaggaaa tcaatctcat gtgacatata ctattcaaac 340	31
<210> 84	33
<211> 112	35
<212> PRT	37
<213> Bacillus thuringiensis	
<400> 84	

# RO 123431 B1

1 Ser Ala Arg Glu Val His Ile Asp Val Asn Asn Lys Thr Gly His Thr  
1 5 10 15  
3 Leu Gln Leu Glu Asp Lys Thr Lys Leu Asp Gly Gly Arg Trp Arg Thr  
5 20 25 30  
7 Ser Pro Thr Asn Val Ala Asn Asp Gln Ile Lys Thr Phe Val Ala Glu  
35 40 45  
9 Ser Asn Gly Phe Met Thr Gly Thr Glu Gly Thr Ile Tyr Tyr Ser Ile  
50 55 60  
11 Asn Gly Glu Ala Glu Ile Ser Leu Tyr Phe Asp Asn Pro Phe Ala Gly  
13 65 70 75 80  
15 Ser Asn Lys Tyr Asp Gly His Ser Asn Lys Ser Gln Tyr Glu Ile Ile  
85 90 95  
17 Thr Gln Gly Gly Ser Gly Asn Gln Ser His Val Thr Tyr Thr Ile Gln  
100 105 110  
19

<210> 85

<211> 1114

<212> ADN

<213> Bacillus thuringiensis

23

<400> 85

25

atgtagata ctaataaagt ttatgaaata agcaatcatg ctaatggact atatgcagca 60  
acttatttaa gtttagatga ttcagggtgt agttaaata ataaaaatga tgatgatatt 120  
gatgattata acttaaaatg gtttttattt cctattgatg atgatcaata tattattaca 180  
agctatgcag caaataattg taaagtttgg aatgtaaata atgataaaat aaatgtttcg 240  
acttattctt caacaaattc aatacaaaaa tggcaaaata aagctaattg ttcttcatat 300  
gtaatacaaa gtgataatgg aaaagtotta acagcaggaa ccggtcaagc tcttggattg 360  
atagctttaa ctgatgaatc ctcaaataat cccaatcaac aatggaattt aacttctgta 420  
caaacaattc aacttccacg aaaacctata atagatacaa aattaaaga ttatcccaaa 480  
tattcaccaa ctggaaatat agataatgga acatctcttc aattaatggg atggacatta 540  
gtaccttgta ttatggtaaa tgatccaaat atagataaaa atactcaaact taaaactact 600  
ccatattata ttttaaaaaa atatcaatat tggcaacgag cagtaggaag taatgtagct 660  
ttacgtccac atgaaaaaaa atcatatact tatgaatggg gcacagaaat agatcaaaaa 720  
acaacaatta taatacatt aggatttcaa atcaatatag attcaggaat gaaatttgat 780  
ataccagaag taggtggagg tacagatgaa ataaaaaac aactaaatga agaattaaa 840  
atagaatata gtcatgaaac taaaataatg gaaaaatata aagaacaatc tgaaatagat 900  
aatccaactg atcaatcaat gaattctata ggatttotta ctattacttc cttagaatta 960  
tatagatata atggctcaga aattcgtata atgcaaatc aaacctcaga taatgatact 1020  
tataatgta cttcttatcc aatcatcaa caagctttat tacttcttac aatcattca 1080  
tatgaagaag ttgaagaat aacaagggcg aatt 1114

41

43

<210> 86

<211> 371

45

<212> PRT

<213> Bacillus thuringiensis

47

<400> 86



# RO 123431 B1

Met	Leu	Asp	Thr	Asn	Lys	Val	Tyr	Glu	Ile	Ser	Asn	His	Ala	Asn	Gly	1
1				5				10						15		3
Leu	Tyr	Ala	Ala	Thr	Tyr	Leu	Ser	Leu	Asp	Asp	Ser	Gly	Val	Ser	Leu	5
			20					25					30			7
Met	Asn	Lys	Asn	Asp	Asp	Asp	Ile	Asp	Asp	Tyr	Asn	Leu	Lys	Trp	Phe	9
		35					40					45				11
Leu	Phe	Pro	Ile	Asp	Asp	Asp	Gln	Tyr	Ile	Ile	Thr	Ser	Tyr	Ala	Ala	13
	50					55					60					15
Asn	Asn	Cys	Lys	Val	Trp	Asn	Val	Asn	Asn	Asp	Lys	Ile	Asn	Val	Ser	17
65					70					75					80	19
Thr	Tyr	Ser	Ser	Thr	Asn	Ser	Ile	Gln	Lys	Trp	Gln	Ile	Lys	Ala	Asn	21
				85					90					95		23
Gly	Ser	Ser	Tyr	Val	Ile	Gln	Ser	Asp	Asn	Gly	Lys	Val	Leu	Thr	Ala	25
			100					105					110			27
Gly	Thr	Gly	Gln	Ala	Leu	Gly	Leu	Ile	Arg	Leu	Thr	Asp	Glu	Ser	Ser	29
							120					125				31
Asn	Asn	Pro	Asn	Gln	Gln	Trp	Asn	Leu	Thr	Ser	Val	Gln	Thr	Ile	Gln	33
						135					140					35
Leu	Pro	Arg	Lys	Pro	Ile	Ile	Asp	Thr	Lys	Leu	Lys	Asp	Tyr	Pro	Lys	37
145					150					155					160	39
Tyr	Ser	Pro	Thr	Gly	Asn	Ile	Asp	Asn	Gly	Thr	Ser	Pro	Gln	Leu	Met	41
				165					170					175		43
Gly	Trp	Thr	Leu	Val	Pro	Cys	Ile	Met	Val	Asn	Asp	Pro	Asn	Ile	Asp	45
			180					185					190			47
Lys	Asn	Thr	Gln	Ile	Lys	Thr	Thr	Pro	Tyr	Tyr	Ile	Leu	Lys	Lys	Tyr	49
							200					205				51
Gln	Tyr	Trp	Gln	Arg	Ala	Val	Gly	Ser	Asn	Val	Ala	Leu	Arg	Pro	His	53
						215					220					55
Glu	Lys	Lys	Ser	Tyr	Thr	Tyr	Glu	Trp	Gly	Thr	Glu	Ile	Asp	Gln	Lys	57
225					230					235				240		59
Thr	Thr	Ile	Ile	Asn	Thr	Leu	Gly	Phe	Gln	Ile	Asn	Ile	Asp	Ser	Gly	61
				245					250					255		63
Met	Lys	Phe	Asp	Ile	Pro	Glu	Val	Gly	Gly	Gly	Thr	Asp	Glu	Ile	Lys	65
			260					265					270			67
Thr	Gln	Leu	Asn	Glu	Glu	Leu	Lys	Ile	Glu	Tyr	Ser	His	Glu	Thr	Lys	69
							280					285				71
Ile	Met	Glu	Lys	Tyr	Gln	Glu	Gln	Ser	Glu	Ile	Asp	Asn	Pro	Thr	Asp	73
	290				295						300					75
Gln	Ser	Met	Asn	Ser	Ile	Gly	Phe	Leu	Thr	Ile	Thr	Ser	Leu	Glu	Leu	77
305					310					315					320	79

# RO 123431 B1

1 Tyr Arg Tyr Asn Gly Ser Glu Ile Arg Ile Met Gln Ile Gln Thr Ser  
                                   325                                  330                                  335  
 3 Asp Asn Asp Thr Tyr Asn Val Thr Ser Tyr Pro Asn His Gln Gln Ala  
                                   340                                  345                                  350  
 5 Leu Leu Leu Leu Thr Asn His Ser Tyr Glu Glu Val Glu Glu Ile Thr  
                                   355                                  360                                  365  
 7  
 9 Arg Ala Asn  
           370  
 11 <210> 87  
       <211> 341  
       <212> ADN  
 13 <213> Bacillus thuringiensis  
 15 <400> 87  
 17 atgtcagctg gcgaagttca tattgaaata aacaataaaa cacgtcatac attacaatta 60  
       gaggataaaa ctaaacttag cggcggtaga tggcgaacat cacctacaaa tgttgctogt 120  
       gatacaatta aaacatttgt agcagaatca catggtttta tgacaggagt agaaggtatt 180  
       atatatttta gtgtaaacgg agacgcagaa attagtttac attttgacaa tccttatata 240  
 19 ggttctaata aatgtgatgg ttcttctgat aaacctgaat atgaagttat tactcaaagc 300  
       ggatcaggag ataaatctca tgtcacttat acaattcaaa c                                  341  
 21  
 23 <210> 88  
       <211> 113  
       <212> PRT  
       <213> Bacillus thuringiensis  
 25 <400> 88  
 27 Met Ser Ala Gly Glu Val His Ile Glu Ile Asn Asn Lys Thr Arg His  
       1                                  5                                  10                                  15  
 29 Thr Leu Gln Leu Glu Asp Lys Thr Lys Leu Ser Gly Gly Arg Trp Arg  
                                   20                                  25                                  30  
 31 Thr Ser Pro Thr Asn Val Ala Arg Asp Thr Ile Lys Thr Phe Val Ala  
                                   35                                  40                                  45  
 33 Glu Ser His Gly Phe Met Thr Gly Val Glu Gly Ile Ile Tyr Phe Ser  
                                   50                                  55                                  60  
 37 Val Asn Gly Asp Ala Glu Ile Ser Leu His Phe Asp Asn Pro Tyr Ile  
                                   65                                  70                                  75                                  80  
 39 Gly Ser Asn Lys Cys Asp Gly Ser Ser Asp Lys Pro Glu Tyr Glu Val  
                                   85                                  90                                  95  
 41 Ile Thr Gln Ser Gly Ser Gly Asp Lys Ser His Val Thr Tyr Thr Ile  
                                   100                                  105                                  110  
 43 Gln  
 45 <210> 89  
       <211> 1186  
       <212> ADN  
 47 <213> Bacillus thuringiensis  
 <400> 89

# RO 123431 B1

atgttagata	caaataaagt	ttatgaaata	agcaatcttg	ctaattggatt	atatacatca	60	1									
acttatttaa	gtcttgatga	ttcaggtggt	agtttaatga	gtaaaaagga	tgaagatatt	120										
gatgattaca	atttaaaatg	gtttttattt	cctattgata	ataatcaata	tattattaca	180	3									
agctatggag	ctaataattg	taaagtttgg	aatgttaaaa	atgataaaaat	aaatgtttca	240										
acttattcct	caacaaaact	tgtacaaaaa	tggcaataaa	aagctaaaga	ttcttcatat	300	5									
ataatacaaa	gtgataatgg	aaaggtctta	acagcaggag	taggtcaatc	tcttgggaata	360										
gtacgcctaa	ctgatgaatt	tccagagaaat	tctaaccaac	aatggaattt	aactcctgta	420										
caaacaattc	aactcccaca	aaaacctaaa	atagatgaaa	aattaaaga	tcctcctgaa	480	7									
tattcagaaa	cgggaaatat	aaatcctaaa	acaactcctc	aattaatggg	atggacatta	540										
gtaccttgta	ttatggtaaa	tgattcaaaa	atagataaaa	acactcaaat	taaaactact	600	9									
ccatattata	tttttaaaaa	atataaatac	tggaatctag	caaaaggaag	taatgtatct	660										
ttacttccac	atcaaaaaag	atcatatgat	tatgaatggg	gtacagaaaa	aaatcaaaaa	720										
acaactatta	ttaatacagt	aggattgcaa	attaatatag	attcaggaat	gaaatttgaa	780	11									
gtaccagaag	taggaggagg	tacagaagac	ataaaaacac	aattaactga	agaattaaaa	840										
gttgaatata	gcaactgaaac	caaaataatg	acgaaatata	aagaacactc	agagatagat	900	13									
aatccaacta	atcaaccaat	gaattctata	ggacttctta	tttatacttc	ttttagaatta	960										
tatcgatata	acggrcagaa	attaagataa	tggacataga	aacttcagat	catgatactt	1020										
acactcttac	ttcttatcca	aatcataaag	aagcattatt	acttctcaca	aaccattctt	1080	15									
atgaagaagt	agaagaaatt	acaagggcga	attccagcac	actggcggcc	gttactagtg	1140										
gatccgagct	cggtagcaag	cttggcgtgt	caggtcaaaag	ggttca		1186	17									
<210> 90							19									
<211> 392																
<212> PRT																
<213> Bacillus thuringiensis							21									
<400> 90							23									
Met	Leu	Asp	Thr	Asn	Lys	Val	Tyr	Glu	Ile	Ser	Asn	Leu	Ala	Asn	Gly	25
1				5					10					15		
Leu Tyr Thr Ser Thr Tyr Leu Ser Leu Asp Asp Ser Gly Val Ser Leu							27									
			20					25					30			29
Met	Ser	Lys	Lys	Asp	Glu	Asp	Ile	Asp	Asp	Tyr	Asn	Leu	Lys	Trp	Phe	31
		35					40					45				
Leu Phe Pro Ile Asp Asn Asn Gln Tyr Ile Ile Thr Ser Tyr Gly Ala							33									
	50					55				60						35
Asn Asn Cys Lys Val Trp Asn Val Lys Asn Asp Lys Ile Asn Val Ser							37									
65					70				75						80	



# RO 123431 B1

Pro Ala His Trp Arg Pro Leu Leu Val Asp Pro Ser Ser Val Pro Ser	1
370 375 380	3
Leu Ala Cys Gln Val Lys Gly Phe	5
385 390	
<210> 91	7
<211> 341	
<212> ADN	9
<213> Bacillus thuringiensis	
<400> 91	11
atgtcagcag ccgaagtaca tattgaaata ataaatcata caggtcatac cttacaaatg 60	13
gataaaagaa ctagacttgc acatggtgaa tggattatta caccogtgaa tgttccaaat 120	
aattcttctg atttatttca agcaggttct gatggagttt tgacaggagt agaaggaata 180	15
ataatttata ctataaatgg agaaatagaa attaccttac attttgacaa tccttatgca 240	
ggttctaata aatattctgg acgttctagt gatgatgatt ataaagttat aactgaagca 300	17
agagcagaac atagagctaa taatcatgat catgtaactt a 341	
<210> 92	19
<211> 113	
<212> PRT	21
<213> Bacillus thuringiensis	
<400> 92	23

# RO 123431 B1

1 Met Ser Ala Ala Glu Val His Ile Glu Ile Ile Asn His Thr Gly His  
 1 5 10 15  
 3 Thr Leu Gln Met Asp Lys Arg Thr Arg Leu Ala His Gly Glu Trp Ile  
 5 20 25 30  
 7 Ile Thr Pro Val Asn Val Pro Asn Asn Ser Ser Asp Leu Phe Gln Ala  
 7 35 40 45  
 9 Gly Ser Asp Gly Val Leu Thr Gly Val Glu Gly Ile Ile Ile Tyr Thr  
 9 50 55 60  
 11 Ile Asn Gly Glu Ile Glu Ile Thr Leu His Phe Asp Asn Pro Tyr Ala  
 11 65 70 75 80  
 13 Gly Ser Asn Lys Tyr Ser Gly Arg Ser Ser Asp Asp Asp Tyr Lys Val  
 13 85 90 95  
 15 Ile Thr Glu Ala Arg Ala Glu His Arg Ala Asn Asn His Asp His Val  
 15 100 105 110  
 17  
 19 Thr

21 <210> 93  
 <211> 341  
 23 <212> ADN  
 <213> Bacillus thuringiensis

25 <400> 93

27 atgtcagatc gcgaagtaca tattgaaata ataaatcata caggtcatac ottacaaatg 60  
 gataaaagaa ctagacttgc acatggtgaa tggattatta caccctgtaa tggcccaaat 120  
 29 aattcttctg atttatttca agcaggttct gatggagttt tgacaggagt agaaggaata 180  
 ataatttata ctataaatgg agaaatagaa attaccttac attttgacaa tccttatgca 240  
 ggttctaata aatattctgg acgttctagt gatgatgatt ataaagttat aactgaagca 300  
 31 agagcagaac atagagctaa taatcatgat catgtaactt a 341

33 <210> 94  
 <211> 113  
 35 <212> PRT  
 <213> Bacillus thuringiensis

37 <220>  
 <211> NESIGUR  
 39 <212> (242)  
 <213> Nedeterminat în secvența de aminoacizi dedusă

41 <400> 94

43

# RO 123431 B1

Met	Ser	Asp	Arg	Glu	Val	His	Ile	Glu	Ile	Ile	Asn	His	Thr	Gly	His		1
1				5					10					15			3
Thr	Leu	Gln	Met	Asp	Lys	Arg	Thr	Arg	Leu	Ala	His	Gly	Glu	Trp	Ile		5
			20					25					30				7
Ile	Thr	Pro	Val	Asn	Val	Pro	Asn	Asn	Ser	Ser	Asp	Leu	Phe	Gln	Ala		9
		35					40					45					11
Gly	Ser	Asp	Gly	Val	Leu	Thr	Gly	Val	Glu	Gly	Ile	Ile	Ile	Tyr	Thr		13
	50					55					60						15
Ile	Asn	Gly	Glu	Ile	Glu	Ile	Thr	Leu	His	Phe	Asp	Asn	Pro	Tyr	Ala		17
65					70					75					80		19
Gly	Ser	Asn	Lys	Tyr	Ser	Gly	Arg	Ser	Ser	Asp	Asp	Asp	Tyr	Lys	Val		21
			85						90					95			23
Ile	Thr	Glu	Ala	Arg	Ala	Glu	His	Arg	Ala	Asn	Asn	His	Asp	His	Val		25
		100						105					110				27
Thr																	29
<210>	95																31
<211>	353																33
<212>	ADN																35
<213>	Bacillus thuringiensis																37
<400>	95																39
atgtcagcac	gtgaagtaca	tattgaaata	ataaatcata	caggtcatac	cttacaaatg	60											29
gataaaagaa	ctagacttgc	acatggtgaa	tggattatta	caccctgtaa	tggtccaaat	120											31
aattcttctg	atttatttca	agcaggttct	gatggagttt	tgacaggagt	agaaggaata	180											33
ataatttata	ctataaatgg	agaaatagaa	attaccttac	atcttgacaa	tccttatgca	240											35
ggttctaata	aatattctgg	acgttctagt	gatgatgatt	ataaagttat	aactgaagca	300											37
agagcagaac	atagagctaa	taatcatgat	catgtaacat	atagattca	aac	353											39
<210>	96																35
<211>	117																37
<212>	PRT																39
<213>	Bacillus thuringiensis																39
<400>	96																39

# RO 123431 B1

1 Met Ser Ala Arg Glu Val His Ile Glu Ile Ile Asn His Thr Gly His  
    1                  5                  10                  15  
 3  
 5 Thr Leu Gln Met Asp Lys Arg Thr Arg Leu Ala His Gly Glu Trp Ile  
           20                  25                  30  
 7 Ile Thr Pro Val Asn Val Pro Asn Asn Ser Ser Asp Leu Phe Gln Ala  
           35                  40                  45  
 9 Gly Ser Asp Gly Val Leu Thr Gly Val Glu Gly Ile Ile Ile Tyr Thr  
 11          50                  55                  60  
 13 Ile Asn Gly Glu Ile Glu Ile Thr Leu His Phe Asp Asn Pro Tyr Ala  
       65                  70                  75                  80  
 15 Gly Ser Asn Lys Tyr Ser Gly Arg Ser Ser Asp Asp Asp Tyr Lys Val  
                   85                  90                  95  
 17  
 19 Ile Thr Glu Ala Arg Ala Glu His Arg Ala Asn Asn His Asp His Val  
           100                  105                  110  
 21 Thr Tyr Thr Ile Gln  
       115

23 <210> 97  
 25 <211> 353  
 <212> ADN  
 <213> Bacillus thuringiensis

27 <400> 97  
 29 atgtcagctc gtgaagtaca tattgaaata ataaatcata caggtcatac cttacaaatg 60  
 gataaaagaa ctagacttgc acatgggtgaa tggattatta caccctgtaa tgttccaaat 120  
 31 aattcttctg atttatttca agcagggttct gatggagttt tgacaggagt agaaggaata 180  
 ataatttata ctataaatgg agaaatagaa attaccttac atttgacaa tccttatgca 240  
 33 ggttctaata aatattctgg acgttctagt gatgatgatt ataaagttat aactgaagca 300  
 agagcagaac atagagctaa taatcatgat catgtgacat atacaattca aac 353

35 <210> 98  
 37 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Bacillus thuringiensis

39 <400> 98  
 41



# RO 123431 B1

Met	Ser	Ala	Arg	Glu	Val	His	Ile	Glu	Ile	Ile	Asn	His	Thr	Gly	His	1
1				5				10						15		
																3
Thr	Leu	Gln	Met	Asp	Lys	Arg	Thr	Arg	Leu	Ala	His	Gly	Glu	Trp	Ile	5
			20					25					30			
																7
Ile	Thr	Pro	Val	Asn	Val	Pro	Asn	Asn	Ser	Ser	Asp	Leu	Phe	Gln	Ala	9
		35					40					45				
																11
Gly	Ser	Asp	Gly	Val	Leu	Thr	Gly	Val	Glu	Gly	Ile	Ile	Ile	Tyr	Thr	13
	50					55					60					
																15
Ile	Asn	Gly	Glu	Ile	Glu	Ile	Thr	Leu	His	Phe	Asp	Asn	Pro	Tyr	Ala	17
65					70					75					80	
																19
Gly	Ser	Asn	Lys	Tyr	Ser	Gly	Arg	Ser	Ser	Asp	Asp	Asp	Tyr	Lys	Val	21
			85						90					95		
																23
Ile	Thr	Glu	Ala	Arg	Ala	Glu	His	Arg	Ala	Asn	Asn	His	Asp	His	Val	25
			100					105					110			
																27
Thr	Tyr	Thr	Ile	Gln												29
		115														
																31
<210>	99															33
<211>	353															35
<212>	ADN															37
<213>	Bacillus thuringiensis															39
<400>	99															
atg	tcaggtc	gcgaagttca	tattgaaata	ataaatcata	caggtcatac	cttacaaatg	60									29
gataaaagaa	ctagacttgc	acatggtgaa	tggattatta	caccegtgaa	tgttccaaat	120										
aattcttctg	atttatttca	agcaggttct	gatggagttt	tgacaggagt	agaaggaata	180										31
ataatttata	ctataaatgg	agaaatagaa	attacottac	atthtgacaa	tccttatgca	240										
ggttctaata	aatattctgg	acgttctagt	gatgatgatt	ataaagttat	aactgaagca	300										33
agagcagaac	atagagctaa	taatcatgat	catgtaacat	atacgattca	aac	353										
																35
<210>	100															
<211>	117															
<212>	PRT															
<213>	Bacillus thuringiensis															
<400>	100															



# RO 123431 B1

<400> 102		1
Met Ser Ala Arg Glu Val His Ile Glu Ile Ile Asn His Thr Gly His		3
1 5 10 15		
Thr Leu Gln Met Asp Lys Arg Thr Arg Leu Ala His Gly Glu Trp Ile		5
20 25 30		
Ile Thr Pro Val Asn Val Pro Asn Asn Ser Ser Asp Leu Phe Gln Ala		7
35 40 45		
Gly Ser Asp Gly Val Leu Thr Gly Val Glu Gly Ile Ile Ile Tyr Thr		9
50 55 60		11
Ile Asn Gly Glu Ile Glu Ile Thr Leu His Phe Asp Asn Pro Tyr Ala		13
65 70 75 80		
Gly Ser Asn Lys Tyr Ser Gly Arg Ser Ser Asp Asp Asp Tyr Lys Val		15
85 90 95		17
Ile Thr Glu Ala Arg Ala Glu His Arg Ala Asn Asn His Asp His Val		19
100 105 110		
Thr Tyr Thr Ile Gln		21
115		
<210> 103		23
<211> 353		25
<212> ADN		27
<213> Bacillus thuringiensis		29
<400> 103		31
atgtcaggtc gcgaaagtaga tattgaaata ataaatcata caggtcatac cttacaaatg 60		
gataaaagaa ctagacttgc acatggtgaa tggattatta caccctgtaa tgttccaaat 120		
aattcttctg atttatttca agcaggttct gatggagttt tgacaggagt agaaggaata 180		
ataatttata ctataaatgg agaaatagaa attaccttac attttgacaa tccttatgca 240		
ggttctaata aatattctgg acgttctagt gatgatgatt ataaagttat aactgaagcg 300		
agagcagaac atagagctaa taatcatgat catgtaacat atactattca gac 353		
<210> 104		35
<211> 117		37
<212> PRT		39
<213> Bacillus thuringiensis		41
<400> 104		

# RO 123431 B1

1 Met Ser Gly Arg Glu Val Asp Ile Glu Ile Ile Asn His Thr Gly His  
    1                                  5                                  10                                  15  
 3 Thr Leu Gln Met Asp Lys Arg Thr Arg Leu Ala His Gly Glu Trp Ile  
                                   20                                  25                                  30  
 7 Ile Thr Pro Val Asn Val Pro Asn Asn Ser Ser Asp Leu Phe Gln Ala  
                                   35                                  40                                  45  
 9 Gly Ser Asp Gly Val Leu Thr Gly Val Glu Gly Ile Ile Ile Tyr Thr  
                   50                                  55                                  60  
 11  
 13 Ile Asn Gly Glu Ile Glu Ile Thr Leu His Phe Asp Asn Pro Tyr Ala  
       65                                  70                                  75                                  80  
 15 Gly Ser Asn Lys Tyr Ser Gly Arg Ser Ser Asp Asp Asp Tyr Lys Val  
                                   85                                  90                                  95  
 17 Ile Thr Glu Ala Arg Ala Glu His Arg Ala Asn Asn His Asp His Val  
                                   100                                  105                                  110  
 19  
 21 Thr Tyr Thr Ile Gln  
                   115  
 23 <210> 105  
       <211> 353  
       <212> ADN  
 25 <213> Bacillus thuringiensis  
 27 <400> 105  
 29 atgtcagcac gtgaagtaca tattgaaata ataaatcata caggtcatac cttacaaatg 60  
   gataaaaagaa ctagacttgc acatggtgaa tggattatta cacccgtgaa tgttccaaat 120  
 31 aattcttctg atttatttca agcaggttct gatggagttt tgacaggagt agaaggaata 180  
   ataatttata ctataaatgg agaaatagaa attaccttac attttgacaa tccttatgca 240  
   ggttctaata aatattctgg acgttctagt gatgatgatt ataaagttat aactgaagca 300  
 33 agagcagaac atagagctaa taatcatgat catgtaacat ataccattca aac 353  
 35 <210> 106  
       <211> 117  
 37 <212> PRT  
       <213> Bacillus thuringiensis  
 39 <400> 106

# RO 123431 B1

Met	Ser	Ala	Arg	Glu	Val	His	Ile	Glu	Ile	Ile	Asn	His	Thr	Gly	His		1
1				5				10						15			3
Thr	Leu	Gln	Met	Asp	Lys	Arg	Thr	Arg	Leu	Ala	His	Gly	Glu	Trp	Ile		5
			20					25					30				7
Ile	Thr	Pro	Val	Asn	Val	Pro	Asn	Asn	Ser	Ser	Asp	Leu	Phe	Gln	Ala		9
		35					40					45					11
Gly	Ser	Asp	Gly	Val	Leu	Thr	Gly	Val	Glu	Gly	Ile	Ile	Ile	Tyr	Thr		13
	50					55					60						15
Ile	Asn	Gly	Glu	Ile	Glu	Ile	Thr	Leu	His	Phe	Asp	Asn	Pro	Tyr	Ala		17
65					70					75					80		19
Gly	Ser	Asn	Lys	Tyr	Ser	Gly	Arg	Ser	Ser	Asp	Asp	Asp	Tyr	Lys	Val		21
			85						90					95			23
Ile	Thr	Glu	Ala	Arg	Ala	Glu	His	Arg	Ala	Asn	Asn	His	Asp	His	Val		25
			100					105					110				27
Thr	Tyr	Thr	Ile	Gln													29
		115															31
<210>	107																33
<211>	341																35
<212>	ADN																37
<213>	Bacillus thuringiensis																39
<400>	107																31
		atgtcaggtc	gcgaagttca	tattgatgta	aataataaga	caggtcatac	attacaatta	60									29
		gaagataaaa	caagacttga	tggtggtaga	tggcgaacat	cacctacaaa	tgttgcta	120									31
		gatcaaatta	aacatttgt	agcagaatca	catggtttta	tgacaggtag	agaaggtag	180									33
		atatattata	gtataaatgg	agaagcagaa	attagtttat	atggaagttat	tacccaagga	240									35
		ggttctaata	aatatgatgg	gcattccaat	aaaaatcaat	atgaagttat	tacccaagga	300									37
		ggatcaggaa	atcaatctca	tctgacgtat	acaattcaaa	c		341									39
<210>	108																35
<211>	113																37
<212>	PRT																39
<213>	Bacillus thuringiensis																31
<400>	108																33

# RO 123431 B1

1 Met Ser Gly Arg Glu Val His Ile Asp Val Asn Asn Lys Thr Gly His  
 1 5 10 15

3 Thr Leu Gln Leu Glu Asp Lys Thr Arg Leu Asp Gly Gly Arg Trp Arg  
 20 25 30

5 Thr Ser Pro Thr Asn Val Ala Asn Asp Gln Ile Lys Thr Phe Val Ala  
 35 40 45

7

9 Glu Ser His Gly Phe Met Thr Gly Thr Glu Gly Thr Ile Tyr Tyr Ser  
 50 55 60

11 Ile Asn Gly Glu Ala Glu Ile Ser Leu Tyr Phe Asp Asn Pro Tyr Ser  
 65 70 75 80

13 Gly Ser Asn Lys Tyr Asp Gly His Ser Asn Lys Asn Gln Tyr Glu Val  
 85 90 95

15

17 Ile Thr Gln Gly Gly Ser Gly Asn Gln Ser His Leu Thr Tyr Thr Ile  
 100 105 110

Gln

19

21 <210> 109  
 <211> 1114  
 <212> ADN  
 <213> Bacillus thuringiensis

23

25 <400> 109

27 atggttagata ctaataaagt atatgaaata agtaattatg ctaatggatt acatgcagca 60  
 acttatttaa gtttagatga ttcaggtggt agtttaatga ataaaaatga tgatgatatt 120

29 gatgactata atttaaggtg gtttttattt cctattgatg ataatacaata tattattaca 180  
 agctacgcag cgaataattg taaggtttgg aatgttaata atgataaaat aaatgtttca 240  
 31 acttattcct caacaaactc gatacagaaa tggcaaaataa aagctaatgc ttcttcgat 300  
 gtaatacaaa gtaataatgg gaaagttcta acagcaggaa ccggtcaatc tcttggatta 360  
 atacgtttta cggatgaatc accagataat cccaatcaac aatggaattt aactcctgta 420  
 33 caaacaattc aactcccacc aaaacctaca atagatacaa agttaaaaga ttaccccaaa 480  
 tattcacaaa ctggcaatat agacaagggg acacctcctc aattaatggg atggacatta 540  
 35 ataccttgta ttatggtaaa tgatccaaat atagataaaa acactcaaat caaaactact 600  
 ccatattata ttttaaaaaa atatcaatat tggcaacaag cagtaggaag taatgtagct 660  
 ttacgtcogc atgaaaaaaaa atcatatgct tatgagtggg gtacagaaat agatcaaaaa 720  
 37 acaactatca ttaatacatt aggatttcag attaatatag attcgggaat ggaatttgat 780  
 ataccagaag taggtggagg tacagatgaa ataaaaacac aattaaacga agaattaaaa 840  
 atagaatata gccgtgaaac caaataatg gaaaaatc aggaacaatc agagatagat 900  
 39 aatccaactg atcaatcaat gaattctata ggattcctca ctattacttc tttagaatta 960  
 tatcgatata atggttcggg aattagtgta atgaaaatc aaacttcaga taatgatact 1020  
 41 tacaatgtga cctcttatcc agatcatcaa caagctctat tacttcttac aaatcattca 1080  
 tatgaacaag tacaagaat aacaagggcg aatt 1114

43 <210> 110  
 <211> 371  
 45 <212> PRT  
 <213> Bacillus thuringiensis

47 <400> 110

# RO 123431 B1

Met	Leu	Asp	Thr	Asn	Lys	Val	Tyr	Glu	Ile	Ser	Asn	Tyr	Ala	Asn	Gly	1
1				5					10					15		3
Leu	His	Ala	Ala	Thr	Tyr	Leu	Ser	Leu	Asp	Asp	Ser	Gly	Val	Ser	Leu	5
		20						25					30			7
Met	Asn	Lys	Asn	Asp	Asp	Asp	Ile	Asp	Asp	Tyr	Asn	Leu	Arg	Trp	Phe	9
		35					40					45				11
Leu	Phe	Pro	Ile	Asp	Asp	Asn	Gln	Tyr	Ile	Ile	Thr	Ser	Tyr	Ala	Ala	13
	50					55					60					15
Asn	Asn	Cys	Lys	Val	Trp	Asn	Val	Asn	Asn	Asp	Lys	Ile	Asn	Val	Ser	17
65					70					75					80	19
Thr	Tyr	Ser	Ser	Thr	Asn	Ser	Ile	Gln	Lys	Trp	Gln	Ile	Lys	Ala	Asn	21
				85					90					95		23
Ala	Ser	Ser	Tyr	Val	Ile	Gln	Ser	Asn	Asn	Gly	Lys	Val	Leu	Thr	Ala	25
			100					105					110			27
Gly	Thr	Gly	Gln	Ser	Leu	Gly	Leu	Ile	Arg	Leu	Thr	Asp	Glu	Ser	Pro	
		115					120					125				
Asp	Asn	Pro	Asn	Gln	Gln	Trp	Asn	Leu	Thr	Pro	Val	Gln	Thr	Ile	Gln	
	130					135					140					
Leu	Pro	Pro	Lys	Pro	Thr	Ile	Asp	Thr	Lys	Leu	Lys	Asp	Tyr	Pro	Lys	
145					150					155					160	

# RO 123431 B1

1 Tyr Ser Gln Thr Gly Asn Ile Asp Lys Gly Thr Pro Pro Gln Leu Met  
                                   165                                  170                                  175  
 3 Gly Trp Thr Leu Ile Pro Cys Ile Met Val Asn Asp Pro Asn Ile Asp  
                                   180                                  185                                  190  
 5  
 7 Lys Asn Thr Gln Ile Lys Thr Thr Pro Tyr Tyr Ile Leu Lys Lys Tyr  
                                   195                                  200                                  205  
 9  
 11 Gln Tyr Trp Gln Gln Ala Val Gly Ser Asn Val Ala Leu Arg Pro His  
                                   210                                  215                                  220  
 13  
 15 Glu Lys Lys Ser Tyr Ala Tyr Glu Trp Gly Thr Glu Ile Asp Gln Lys  
                                   225                                  230                                  235                                  240  
 17  
 19 Thr Thr Ile Ile Asn Thr Leu Gly Phe Gln Ile Asn Ile Asp Ser Gly  
                                   245                                  250                                  255  
 21  
 23 Met Glu Phe Asp Ile Pro Glu Val Gly Gly Gly Thr Asp Glu Ile Lys  
                                   260                                  265                                  270  
 25  
 27 Thr Gln Leu Asn Glu Glu Leu Lys Ile Glu Tyr Ser Arg Glu Thr Lys  
                                   275                                  280                                  285  
 29  
 31 Ile Met Glu Lys Tyr Gln Glu Gln Ser Glu Ile Asp Asn Pro Thr Asp  
                                   290                                  295                                  300  
 33  
 35 Gln Ser Met Asn Ser Ile Gly Phe Leu Thr Ile Thr Ser Leu Glu Leu  
                                   305                                  310                                  315                                  320  
 37  
 39 Tyr Arg Tyr Asn Gly Ser Glu Ile Ser Val Met Lys Ile Gln Thr Ser  
                                   325                                  330                                  335  
 41  
 43 Asp Asn Asp Thr Tyr Asn Val Thr Ser Tyr Pro Asp His Gln Gln Ala  
                                   340                                  345                                  350  
                                   355                                  360                                  365  
                                   370  
 <210> 111  
 <211> 341  
 <212> ADN  
 <213> Bacillus thuringiensis



# RO 123431 B1

<code>&lt;400&gt; 111</code>	1
<code>atgtcagctc gtgaagtaca tattgaaata aacaataaaa cacgtcatac attacaatta 60</code>	3
<code>gaggataaaa ctaaacttag cggcggtaga tggcgaacat cacctacaaa tgttgctcgt 120</code>	
<code>gatacaatta aacatttgt agcagaatca catggtttta tgacaggagt agaaggatt 180</code>	5
<code>atatatttta gtgtaaacgg agacgcagaa attagtttac attttgacaa tccttatata 240</code>	
<code>ggttctaata aatgtgatgg ttcttctgat aaacctgaat atgaagttat tactcaaagc 300</code>	7
<code>ggatcaggag ataaatctca tgttacatat acaattcaga c 341</code>	
<code>&lt;210&gt; 112</code>	9
<code>&lt;211&gt; 113</code>	
<code>&lt;212&gt; PRT</code>	11
<code>&lt;213&gt; Bacillus thuringiensis</code>	
<code>&lt;400&gt; 112</code>	13
<code>Met Ser Ala Arg Glu Val His Ile Glu Ile Asn Asn Lys Thr Arg His</code>	15
<code>1 5 10 15</code>	17
<code>Thr Leu Gln Leu Glu Asp Lys Thr Lys Leu Ser Gly Gly Arg Trp Arg</code>	19
<code>20 25 30</code>	
<code>Thr Ser Pro Thr Asn Val Ala Arg Asp Thr Ile Lys Thr Phe Val Ala</code>	21
<code>35 40 45</code>	23
<code>Glu Ser His Gly Phe Met Thr Gly Val Glu Gly Ile Ile Tyr Phe Ser</code>	25
<code>50 55 60</code>	
<code>Val Asn Gly Asp Ala Glu Ile Ser Leu His Phe Asp Asn Pro Tyr Ile</code>	27
<code>65 70 75 80</code>	
<code>Gly Ser Asn Lys Cys Asp Gly Ser Ser Asp Lys Pro Glu Tyr Glu Val</code>	29
<code>85 90 95</code>	31
<code>Ile Thr Gln Ser Gly Ser Gly Asp Lys Ser His Val Thr Tyr Thr Ile</code>	33
<code>100 105 110</code>	
<code>Gln</code>	35
<code>&lt;210&gt; 113</code>	37
<code>&lt;211&gt; 360</code>	
<code>&lt;212&gt; ADN</code>	39
<code>&lt;213&gt; Bacillus thuringiensis</code>	
<code>&lt;400&gt; 113</code>	41

# RO 123431 B1

1 atgtcagctc gCGaagtaca cattgaaata aacaataaaa cacgtcatac attacaatta 60  
 2 gaggataaaa ctaaacttag cggcggtaga tggcgaacat cacctacaaa tgttgctcgt 120  
 3 gatacaatta aaacattttgt agcagaatca catggtttta tgacaggagt agaaggtatt 180  
 4 atatatttta gtgtaaacgg agacgcagaa attagtttac attttgacaa tccttatata 240  
 5 ggttctaata aatgtgatgg ttcttctgat aaacctgaat atgaagttat tactcaaagc 300  
 6 ggatcaggag ataaatctca tgtgacatat actattcaga cagtatcttt acgattataa 360

7 <210> 114  
 8 <211> 119  
 9 <212> PRT  
 10 <213> Bacillus thuringiensis

11 <400> 114  
 12 Met Ser Ala Arg Glu Val His Ile Glu Ile Asn Asn Lys Thr Arg His  
 13 1 5 10 15  
 14 Thr Leu Gln Leu Glu Asp Lys Thr Lys Leu Ser Gly Gly Arg Trp Arg  
 15 20 25 30  
 16 Thr Ser Pro Thr Asn Val Ala Arg Asp Thr Ile Lys Thr Phe Val Ala  
 17 35 40 45  
 18 Glu Ser His Gly Phe Met Thr Gly Val Glu Gly Ile Ile Tyr Phe Ser  
 19 50 55 60  
 20 Val Asn Gly Asp Ala Glu Ile Ser Leu His Phe Asp Asn Pro Tyr Ile  
 21 65 70 75 80  
 22 Gly Ser Asn Lys Cys Asp Gly Ser Ser Asp Lys Pro Glu Tyr Glu Val  
 23 85 90 95  
 24 Ile Thr Gln Ser Gly Ser Gly Asp Lys Ser His Val Thr Tyr Thr Ile  
 25 100 105 110  
 26 Gln Thr Val Ser Leu Arg Leu  
 27 115

28 <210> 115  
 29 <211> 1158  
 30 <212> ADN  
 31 <213> Bacillus thuringiensis  
 32 <400> 115

# RO 123431 B1

atgttagata	ctaataaagt	ttatgaaata	agcaatcttg	ctaattggatt	atatacatca	60	1
acttatttaa	gtcttgatga	ttcaggtggt	agtttaatga	gtaaaaagga	tgaagatatt	120	
gatgattaca	atttaaaatg	gtttttatgt	cctattgata	ataatcaata	tattattaca	180	3
agctatggag	ctaataattg	taaagtttgg	aatgttaaaa	atgataaaat	aatgttttca	240	
acttattctt	caacaaactc	tgtacaaaaa	tggcaataaa	aagctaaaga	ttcttcatat	300	5
ataatacaaa	gtgataatgg	aaaggtetta	acagcaggag	taggtgaatc	tcttggataa	360	
gtacgcctaa	ctgatgaatt	tccagagaa	tctaaccaac	aatggaattt	aactcctgta	420	
caaacaattc	aactcccaca	aaaacctaaa	atagatgaaa	aattaaaga	tcctcctgaa	480	7
tattcagaaa	ccggaaatat	aaatcctaaa	acaactcctc	aattaatggg	atggacatta	540	
gtaccttgta	ttatggtaaa	tgattcagga	atagataaaa	acactcaa	taaaactact	600	9
ccatattata	tttttaaaaa	atataaatac	tggaaatctag	caaaaggaag	taatgtatct	660	
ttacttccac	atcaaaaaag	atcatatgat	tatgaatggg	gtacagaaaa	aatcaaaaa	720	
acatctatta	ttaatacagt	aggattgcaa	attaatatag	attcaggaat	gaaatttgaa	780	11
gtaccagaag	taggaggagg	tacagaagac	ataaaaaaac	aattaactga	agaattaaaa	840	
gttgaatata	gcactgaaac	caaaataatg	acgaaatatc	aagaacactc	agagatagat	900	13
aatccaacta	atcaaccaat	gaattctata	ggacttctta	tttatacttc	tttagaatta	960	
tatcgatata	acggtacaga	aattaagata	atggacatag	aaacttcaga	tcatgatact	1020	15
tacactctta	cttcttatcc	aatcataaa	gaagcattat	tacttctcac	aaaccattcg	1080	
tatgaagaag	tagaagaaat	aacaaaaata	cctaagcata	cacttataaa	attgaaaaaa	1140	17
cattatttta	aaaaataa					1158	
<210>	116						19
<211>	385						
<212>	PRT						21
<213>	Bacillus thuringiensis						
<400>	116						23

# RO 123431 B1

1	Met	Leu	Asp	Thr	Asn	Lys	Val	Tyr	Glu	Ile	Ser	Asn	Leu	Ala	Asn	Gly
	1				5				10						15	
3																
5	Leu	Tyr	Thr	Ser	Thr	Tyr	Leu	Ser	Leu	Asp	Asp	Ser	Gly	Val	Ser	Leu
				20					25					30		
7	Met	Ser	Lys	Lys	Asp	Glu	Asp	Ile	Asp	Asp	Tyr	Asn	Leu	Lys	Trp	Phe
			35					40					45			
9																
11	Leu	Phe	Pro	Ile	Asp	Asn	Asn	Gln	Tyr	Ile	Ile	Thr	Ser	Tyr	Gly	Ala
		50					55					60				
13	Asn	Asn	Cys	Lys	Val	Trp	Asn	Val	Lys	Asn	Asp	Lys	Ile	Asn	Val	Ser
	65					70					75					80
15																
17	Thr	Tyr	Ser	Ser	Thr	Asn	Ser	Val	Gln	Lys	Trp	Gln	Ile	Lys	Ala	Lys
					85					90					95	
19	Asp	Ser	Ser	Tyr	Ile	Ile	Gln	Ser	Asp	Asn	Gly	Lys	Val	Leu	Thr	Ala
				100					105					110		
21	Gly	Val	Gly	Glu	Ser	Leu	Gly	Ile	Val	Arg	Leu	Thr	Asp	Glu	Phe	Pro
			115					120					125			
23																
25	Glu	Asn	Ser	Asn	Gln	Gln	Trp	Asn	Leu	Thr	Pro	Val	Gln	Thr	Ile	Gln
	130						135					140				
27	Leu	Pro	Gln	Lys	Pro	Lys	Ile	Asp	Glu	Lys	Leu	Lys	Asp	His	Pro	Glu
	145					150					155					160
29																
31	Tyr	Ser	Glu	Thr	Gly	Asn	Ile	Asn	Pro	Lys	Thr	Thr	Pro	Gln	Leu	Met
					165					170					175	
33	Gly	Trp	Thr	Leu	Val	Pro	Cys	Ile	Met	Val	Asn	Asp	Ser	Gly	Ile	Asp
				180					185					190		
35	Lys	Asn	Thr	Gln	Ile	Lys	Thr	Thr	Pro	Tyr	Tyr	Ile	Phe	Lys	Lys	Tyr
			195					200					205			
37																
39	Lys	Tyr	Trp	Asn	Leu	Ala	Lys	Gly	Ser	Asn	Val	Ser	Leu	Leu	Pro	His
	210						215					220				
41	Gln	Lys	Arg	Ser	Tyr	Asp	Tyr	Glu	Trp	Gly	Thr	Glu	Lys	Asn	Gln	Lys
	225					230					235					240
43	Thr	Ser	Ile	Ile	Asn	Thr	Val	Gly	Leu	Gln	Ile	Asn	Ile	Asp	Ser	Gly
					245					250					255	

# RO 123431 B1

Met	Lys	Phe	Glu	Val	Pro	Glu	Val	Gly	Gly	Gly	Thr	Glu	Asp	Ile	Lys		1
			260					265					270				3
Thr	Gln	Leu	Thr	Glu	Glu	Leu	Lys	Val	Glu	Tyr	Ser	Thr	Glu	Thr	Lys		5
		275					280					285					7
Ile	Met	Thr	Lys	Tyr	Gln	Glu	His	Ser	Glu	Ile	Asp	Asn	Pro	Thr	Asn		9
	290					295					300						11
Gln	Pro	Met	Asn	Ser	Ile	Gly	Leu	Leu	Ile	Tyr	Thr	Ser	Leu	Glu	Leu		13
305					310					315					320		15
Tyr	Arg	Tyr	Asn	Gly	Thr	Glu	Ile	Lys	Ile	Met	Asp	Ile	Glu	Thr	Ser		17
				325					330					335			19
Asp	His	Asp	Thr	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ser	Tyr	Pro	Asn	His	Lys	Glu	Ala		21
			340					345					350				23
Leu	Leu	Leu	Leu	Thr	Asn	His	Ser	Tyr	Glu	Glu	Val	Glu	Glu	Ile	Thr		25
		355					360					365					27
Lys	Ile	Pro	Lys	His	Thr	Leu	Ile	Lys	Leu	Lys	Lys	His	Tyr	Phe	Lys		29
	370					375					380						31
Lys																	33
385																	35
<210>	117																37
<211>	341																39
<212>	ADN																41
<213>	Bacillus thuringiensis																
<400>	117																
atgtcagcac	gccaaacttca	tattgatgta	aataataaga	caggtcatac	attacaatta	60											
gaagataaaa	caaaacttga	tggtggtaga	tggcgaacat	cacctacaaa	tgttgctaata	120											
gatcaaat	aaacatttgt	agcagaatca	catggtttta	tgacaggtac	agaaggtact	180											
atatattata	gtataaatgg	agaagcagaa	attagtttat	attttgacaa	tcottattca	240											
ggttctaata	aatatgatgg	gcattctaata	aaaaatcaat	atgaagttat	taccaagga	300											
ggatcaggaa	atcaatctca	tgtgacttat	acgattcaca	c		341											
<210>	118																
<211>	113																
<212>	PRT																
<213>	Bacillus thuringiensis																

# RO 123431 B1

1 <220>

<211> NESIGUR

3 <212> (242)

<213> Nedeterminat în secvența de aminoacizi dedusă

5 <400> 118

7 Met Ser Ala Arg Gln Leu His Ile Asp Val Asn Asn Lys Thr Gly His  
1 5 10 15

9 Thr Leu Gln Leu Glu Asp Lys Thr Lys Leu Asp Gly Gly Arg Trp Arg  
11 20 25 30

13 Thr Ser Pro Thr Asn Val Ala Asn Asp Gln Ile Lys Thr Phe Val Ala  
35 40 45

15 Glu Ser His Gly Phe Met Thr Gly Thr Glu Gly Thr Ile Tyr Tyr Ser  
50 55 60

17 Ile Asn Gly Glu Ala Glu Ile Ser Leu Tyr Phe Asp Asn Pro Tyr Ser  
19 65 70 75 80

21 Gly Ser Asn Lys Tyr Asp Gly His Ser Asn Lys Asn Gln Tyr Glu Val  
85 90 95

23 Ile Thr Gln Gly Gly Ser Gly Asn Gln Ser His Val Thr Tyr Thr Ile  
25 100 105 110

His

27

<210> 119

29 <211> 341

<212> PRT

31 <213> Bacillus thuringiensis

33 <400> 119

35 atgtcaggtc gtgaagttca tattgatgta aataataaga caggtcatac attacaatta 60  
gaagataaaa caaaaacttga tgggtgtaga tggcgaacat cacctacaaa tgttgctaata 120  
gatcaaatta aaacatttgt agcagaatca catggtttta tgacaggtagc agaaggtagc 180  
37 atatattata gtataaatgg agaagcagaa attagtttat attttgataa tccttattca 240  
ggtttctaata aatatgatgg gcattccaat aaacctcaat atgaagttac tacccaagga 300  
39 ggatcaggaa atcaatctca tgtaacgtat actattcaaaa c 341

41 <210> 120

<211> 113

# RO 123431 B1

<212> PRT	1
<213> Bacillus thuringiensis	
<400> 120	3
Met Ser Gly Arg Glu Val His Ile Asp Val Asn Asn Lys Thr Gly His	5
1 5 10 15	7
Thr Leu Gln Leu Glu Asp Lys Thr Lys Leu Asp Gly Gly Arg Trp Arg	9
20 25 30	
Thr Ser Pro Thr Asn Val Ala Asn Asp Gln Ile Lys Thr Phe Val Ala	11
35 40 45	
Glu Ser His Gly Phe Met Thr Gly Thr Glu Gly Thr Ile Tyr Tyr Ser	13
50 55 60	
Ile Asn Gly Glu Ala Glu Ile Ser Leu Tyr Phe Asp Asn Pro Tyr Ser	15
65 70 75 80	
Gly Ser Asn Lys Tyr Asp Gly His Ser Asn Lys Pro Gln Tyr Glu Val	17
85 90 95	19
Thr Thr Gln Gly Gly Ser Gly Asn Gln Ser His Val Thr Tyr Thr Ile	21
100 105 110	
Gln	23
<210> 121	25
<211> 341	
<212> ADN	27
<213> Bacillus thuringiensis	
<400> 121	29
atgtcagggtc gCGaagttga cattgatgta aataataaga caggtcatac attacaatta 60	31
gaagataaaa caaaacttga tgggtggtaga tggcgaacat cacctacaaa tgttgctaat 120	
gatcaaatta aacatttgt agcagaatca catggtttta tgacagggtac agaaggtact 180	33
atatattata gtataaatgg agaagcagaa attagtttat attttgataa tccttattca 240	
ggttctaata aatatgatgg gcattccaat aaacctcaat atgaagttac tacccaagga 300	
ggatcaggaa atcaatctca tgteacatat acgattcaaa c 341	35
<210> 122	37
<211> 113	
<212> PRT	39
<213> Bacillus thuringiensis	
<400> 122	41

# RO 123431 B1

1 Met Ser Gly Arg Glu Val Asp Ile Asp Val Asn Asn Lys Thr Gly His  
    1                  5                  10                  15  
 3 Thr Leu Gln Leu Glu Asp Lys Thr Lys Leu Asp Gly Gly Arg Trp Arg  
    20                  25                  30  
 7 Thr Ser Pro Thr Asn Val Ala Asn Asp Gln Ile Lys Thr Phe Val Ala  
    35                  40                  45  
 9 Glu Ser His Gly Phe Met Thr Gly Thr Glu Gly Thr Ile Tyr Tyr Ser  
    50                  55                  60  
 11  
 13 Ile Asn Gly Glu Ala Glu Ile Ser Leu Tyr Phe Asp Asn Pro Tyr Ser  
    65                  70                  75                  80  
 15 Gly Ser Asn Lys Tyr Asp Gly His Ser Asn Lys Pro Gln Tyr Glu Val  
    85                  90                  95  
 17 Thr Thr Gln Gly Gly Ser Gly Asn Gln Ser His Val Thr Tyr Thr Ile  
    100                  105                  110  
 19  
 21 Gln  
 23 <210> 123  
    <211> 341  
    <212> ADN  
 25 <213> Bacillus thuringiensis  
 27 <400> 123  
 29 atgtcagcac gtgaagtaga tattgatgta aataataaga caggtcatac attacaatta 60  
    gaagataaaa caaaacttga tggtagtaga tggcgaacat cacctacaaa tgttgctaata 120  
    gatcaaatta aaacatttgt agcagaatca catggtttta tgacagggtac agaagggtact 180  
 31 atatattata gtataaatgg agaagcagaa attagtttat attttgataa tctttattca 240  
    ggtttctaata aatatgatgg gcattccaat aaacctcaat atgaaggtac tacccaagga 300  
 33 ggatcaggaa atcaatctca tgtaacgtat acgattcaaa c                  341  
 35 <210> 124  
    <211> 113  
    <212> PRT  
 37 <213> Bacillus thuringiensis  
 39 <400> 124



# RO 123431 B1

Met	Ser	Ala	Arg	Glu	Val	Asp	Ile	Asp	Val	Asn	Asn	Lys	Thr	Gly	His	1												
1				5					10					15														
Thr	Leu	Gln	Leu	Glu	Asp	Lys	Thr	Lys	Leu	Asp	Gly	Gly	Arg	Trp	Arg	3												
			20					25					30			5												
Thr	Ser	Pro	Thr	Asn	Val	Ala	Asn	Asp	Gln	Ile	Lys	Thr	Phe	Val	Ala	7												
		35					40					45																
Glu	Ser	His	Gly	Phe	Met	Thr	Gly	Thr	Glu	Gly	Thr	Ile	Tyr	Tyr	Ser	9												
	50					55					60					11												
Ile	Asn	Gly	Glu	Ala	Glu	Ile	Ser	Leu	Tyr	Phe	Asp	Asn	Pro	Tyr	Ser	13												
65					70					75					80													
Gly	Ser	Asn	Lys	Tyr	Asp	Gly	His	Ser	Asn	Lys	Pro	Gln	Tyr	Glu	Val	15												
				85					90					95														
Thr	Thr	Gln	Gly	Gly	Ser	Gly	Asn	Gln	Ser	His	Val	Thr	Tyr	Thr	Ile	17												
			100				105						110			19												
Gln																21												
<210>	125															23												
<211>	1103															25												
<212>	ADN															27												
<213>	Bacillus thuringiensis															29												
<400>	125															31												
atg	ttagata	cta	ataa	agt	ttat	gaa	ata	ag	ta	at	cat	g	cta	at	g	g	act	at	at	g	c	g	c	a	g	c	a	60
act	tatt	taa	gtt	tag	at	g	at	g	tt	a	at	g	a	t	a	a	a	a	a	a	t	g	a	t	g	a	t	120
gat	gatt	tata	act	t	a	a	a	a	g	t	t	t	a	t	t	t	c	c	t	a	t	t	g	a	t	g	a	180
ag	ct	at	g	c	a	a	a	a	t	t	g	t	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	240
act	tatt	tctt	ca	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	300
g	t	a	a	t	a	c	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	360
at	ac	g	t	t	t	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	420
ca	a	a	c	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	480
t	a	t	c	a	c	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	540
g	t	a	c	t	t	g	t	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	600
cc	a	t	a	t	t	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	660
tt	ac	g	t	o	c	a	c	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	720
ac	a	a	c	a	a	t	c	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	780
at	ac	c	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	840
at	a	a	a	t	a	t	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	900
a	a	t	c	c	a	a	c	t	g	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	960
t	a	t	a	g	a	t	a	t	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	1020
t	a	t	a	a	t	g	t	t	a	t	c	c	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	1080
t	a	t	a	g	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	1103
<210>	126															45												
<211>	367															47												
<212>	PRT															49												
<213>	Bacillus thuringiensis															51												
<400>	126															53												

# RO 123431 B1

1 Met Leu Asp Thr Asn Lys Val Tyr Glu Ile Ser Asn His Ala Asn Gly  
3 1 5 10 15  
5 Leu Tyr Ala Ala Thr Tyr Leu Ser Leu Asp Asp Ser Gly Val Ser Leu  
20 25 30  
7 Met Asn Lys Asn Asp Asp Asp Ile Asp Asp Tyr Asn Leu Lys Trp Phe  
9 35 40 45  
11 Leu Phe Pro Ile Asp Asp Asp Gln Tyr Ile Ile Thr Ser Tyr Ala Ala  
50 55 60  
13 Asn Asn Cys Lys Val Trp Asn Val Asn Asn Asp Lys Ile Asn Val Ser  
15 65 70 75 80  
17 Thr Tyr Ser Ser Thr Asn Ser Ile Gln Lys Trp Gln Ile Lys Ala Asn  
85 90 95  
19 Gly Ser Ser Tyr Val Ile Gln Ser Asp Asn Gly Lys Val Leu Thr Ala  
21 100 105 110  
23 Gly Thr Gly Gln Ala Leu Gly Leu Ile Arg Leu Thr Asp Glu Ser Ser  
115 120 125  
25

# RO 123431 B1

Asn	Asn	Pro	Asn	Gln	Gln	Trp	Asn	Leu	Thr	Ser	Val	Gln	Thr	Ile	Gln	
	130					135					140					1
																3
Leu	Pro	Gln	Lys	Pro	Ile	Ile	Asp	Thr	Lys	Leu	Lys	Asp	Tyr	Pro	Lys	5
145					150					155					160	
																7
Tyr	Ser	Pro	Thr	Gly	Asn	Ile	Asp	Asn	Gly	Thr	Ser	Pro	Gln	Leu	Met	9
				165					170					175		9
																11
Gly	Trp	Thr	Leu	Val	Pro	Cys	Ile	Met	Val	Asn	Asp	Pro	Asn	Ile	Asp	11
			180					185					190			11
																13
Lys	Asn	Thr	Gln	Ile	Lys	Thr	Thr	Pro	Tyr	Tyr	Ile	Leu	Lys	Lys	Tyr	13
		195					200					205				13
																15
Gln	Tyr	Trp	Gln	Arg	Ala	Val	Gly	Ser	Asn	Val	Ala	Leu	Arg	Pro	His	17
	210					215					220					17
																19
Glu	Glu	Lys	Ser	Tyr	Thr	Tyr	Glu	Trp	Gly	Thr	Glu	Ile	Asp	Gln	Lys	19
225					230					235					240	19
																21
Thr	Thr	Ile	Ile	Asn	Thr	Leu	Gly	Phe	Gln	Ile	Asn	Ile	Asp	Ser	Gly	21
				245					250					255		21
																23
Met	Lys	Phe	Asp	Ile	Pro	Glu	Val	Gly	Gly	Gly	Thr	Asp	Glu	Ile	Lys	25
			260					265					270			25
																27
Thr	Gln	Leu	Asn	Glu	Glu	Leu	Lys	Ile	Glu	Tyr	Ser	Arg	Glu	Thr	Lys	27
		275					280					285				27
																29
Ile	Met	Glu	Lys	Tyr	Gln	Glu	Gln	Ser	Glu	Ile	Asp	Asn	Pro	Thr	Asp	29
	290					295					300					29
																31
																33
Gln	Pro	Met	Asn	Ser	Ile	Gly	Phe	Leu	Thr	Ile	Thr	Ser	Leu	Glu	Leu	33
305					310					315					320	33
																35
Tyr	Arg	Tyr	Asn	Gly	Ser	Glu	Ile	Arg	Ile	Met	Gln	Ile	Gln	Thr	Ser	35
				325					330					335		35
																37
																39
Asp	Asn	Asp	Thr	Tyr	Asn	Val	Thr	Ser	Tyr	Pro	Asp	His	Gln	Gln	Ala	39
			340					345					350			39
																41
Leu	Leu	Leu	Leu	Thr	Asn	His	Ser	Tyr	Glu	Glu	Leu	Glu	Glu	Ile		41
		355					360					365				41

# RO 123431 B1

1 <210> 127  
<211> 369  
3 <212> ADN  
<213> Bacillus thuringiensis  
5 <400> 127  
7 atgtccgccc gcgaggtgca catcgaogtg aacaacaaga cgggccacac cctccagctg 60  
gaggacaaga ccaagctcga cggcggcagg tggcgcacct ccccgaccaa cgtggccaac 120  
9 gaccagatca agaccttcgt ggccgaatcc aacggcttca tgaccggcac cgagggcacc 180  
atctactact ccatcaacgg cgaggccgag atcagcctct acttcgacaa cccgttcgcc 240  
11 ggctccaaca aatacgacgg ccactccaac aagtcccagt acgagatcat caccagggc 300  
ggctccggca accagtccca cgtgacctac accatccaga ccacctctc ccgctacggc 360  
cacaagtcc 369  
13  
<210> 128  
15 <211> 1149  
<212> PRT  
17 <213> Bacillus thuringiensis  
19 <400> 128  
21 atgctcgaca ccaacaaggt gtacgagatc agcaaccacg ccaacggcct ctacgccgcc 60  
acctaectct ccctcgacga ctccggcgtg tccctcatga acaagaacga cgacgacatc 120  
gacgactaca acctcaagtg gtctctcttc ccgatcgacg acgaccagta catcatcacc 180  
23 tctactgccc ccaacaactg caaggtgtgg aacgtgaaca acgacaagat caacgtgtcc 240  
acctactcct ccaccaactc catccagaag tggcagatca aggccaacgg ctctctctac 300  
gtgatccagt ccgacaacgg caaggtgtct accgccggca cgggccaggc cctcggcctc 360  
25 atccgectca ccgacgagtc ctccaacaac ccgaaccagc aatggaacct gacgtccgtg 420  
cagaccatcc agtcccgcga gaagccgatc atcgacacca agtcaagga ctaccogaag 480  
tactccccga ccggcaacat cgacaacggc acctccccgc agtcatggg ctggaccctc 540  
27 gtgcctgtgca tcatggtgaa cgaccogaac atcgacaaga acaccagat caagaccacc 600  
ccgtactaca tctcaagaa gtaccagtac tggcagaggg ccgtgggctc caacgtcgcg 660  
29 ctccgcccgc acgagaagaa gtctacacc tacgagtggg gcaccgagat cgaccagaag 720  
accaccatca tcaacacct cggcttcag atcaacatcg acagcggcat gaagtccgac 780  
31 atcccgagg tgggcggcgg taccgacgag atcaagacc agtcaacga ggagctcaag 840  
atcgagtact ccacgagac gaagatcatg gagaagtacc aggagcagtc cgagatcgac 900  
aaccgaccg accagtccat gaactccatc ggcttctca ccatcacctc cctggagctc 960  
33 taccgctaca accgctccga gatccgcatc atgcagatcc agaactcoga caacgacacc 1020  
tacaacgtga cctctaccc gaaccaaccag caggccctgc tgctgctgac caaccctcc 1080  
35 tacgaggagg tggaggagat caccaacatc ccgaagtcca cctcaagaa gctcaagaag 1140  
tactacttc 1149  
37 <210> 129  
<211> 357  
39 <212> ADN  
<213> Bacillus thuringiensis



# RO 123431 B1

1 atgtcagctc gccaagtaca c 21

3 <210> 132  
<211> 22

5 <212> ADN  
<213> Bacillus thuringiensis

7 <400> 132

9 gtccatocca ttaattgagg ag 22

11 <210> 133  
<211> 399  
<212> ADN  
<213> Bacillus thuringiensis

17 <400> 133

19 atgtcagcac gtgaagtaca cattgaaata ataaatcata caggtcatac cttacaaatg 60  
gataaaagaa ctagacttgc acatggtgaa tggattatta cacccgtgaa tgttccaaat 120  
aattcttctg atttatttca agcaggttct gatggagttt tgacaggagt agaaggaata 180  
21 ataatttata ctataaatgg agaaatagaa attoccttac attttgacaa tccttatgca 240  
ggttctaata aatattctgg acgttctagt gatgatgatt ataaagttat aactgaagca 300  
23 agagcagaac atagagctaa taatcatgat catgtaacat atacagttca aagaaacata 360  
tcacgatata ccaataaatt atgttctaata aactcctaa 399

25 <210> 134  
27 <211> 132  
<212> PRT  
29 <213> Bacillus thuringiensis

31 <400> 134

# RO 123431 B1

Met	Ser	Ala	Arg	Glu	Val	His	Ile	Glu	Ile	Ile	Asn	His	Thr	Gly	His		1
1				5				10						15			3
Thr	Leu	Gln	Met	Asp	Lys	Arg	Thr	Arg	Leu	Ala	His	Gly	Glu	Trp	Ile		5
			20					25					30				7
Ile	Thr	Pro	Val	Asn	Val	Pro	Asn	Asn	Ser	Ser	Asp	Leu	Phe	Gln	Ala		9
		35					40					45					11
Gly	Ser	Asp	Gly	Val	Leu	Thr	Gly	Val	Glu	Gly	Ile	Ile	Ile	Tyr	Thr		13
	50					55					60						15
Ile	Asn	Gly	Glu	Ile	Glu	Ile	Pro	Leu	His	Phe	Asp	Asn	Pro	Tyr	Ala		17
65					70					75					80		19
Gly	Ser	Asn	Lys	Tyr	Ser	Gly	Arg	Ser	Ser	Asp	Asp	Asp	Tyr	Lys	Val		21
			85						90					95			23
Ile	Thr	Glu	Ala	Arg	Ala	Glu	His	Arg	Ala	Asn	Asn	His	Asp	His	Val		25
			100					105					110				27
Thr	Tyr	Thr	Val	Gln	Arg	Asn	Ile	Ser	Arg	Tyr	Thr	Asn	Lys	Leu	Cys		29
		115					120					125					31
Ser	Asn	Asn	Ser														33
130																	35
<210>	135																37
<211>	1164																39
<212>	ADN																
<213>	Bacillus thuringiensis																
<400>	135																
atgatagaaa	ctaataagat	atatgaaata	agcaataaag	ctaattggatt	atatgcaact	60											
acttatttaa	gttttgataa	ttcaggtggt	agtttattaa	ataaaaatga	atctgatatt	120											
aatgattata	atttgaaatg	gtttttattt	cctattgata	ataatcagta	tattattaca	180											
agttatggag	taaataaaaa	taaggtttgg	actgctaata	gtaataaaaat	aatggttaca	240											
acatattccg	cagaaaattc	agcacaacaa	tggcaaataa	gaaacagttc	ttctggatat	300											
ataatagaaa	ataataatgg	gaaaatttta	acggcaggaa	caggccaatc	attaggttta	360											
ttatatttaa	ctgatgaaat	acctgaagat	tctaatacaac	aatggaattt	aacttcaata	420											
caaacaattt	cacttccttc	acaaccaata	attgatacaa	cattagtaga	ttaccctaaa	480											
tattcaacga	ccggtagtat	aaattataat	ggtacagcac	ttcaattaat	gggatggaca	540											
ctcataccat	gtattatggt	atacgataaa	acgatagctt	ctacacacac	tcaaattaca	600											

# RO 123431 B1

```

1  acaaccocctt attatatttt gaaaaaatat caacgttggg tacttgcaac aggaagtggg 660
   ctatctgtac ctgcacatgt caaatcaact ttcgaatagc aatggggaac agacacagat 720
3  caaaaaacca gtgtaataaa tacattaggt tttcaaatta atacagatac aaaattaata 780
   gctactgtac cagaagtagg tggaggtaca acagatataa gaacacaaat cactgaagaa 840
   cttaaagtag aatatagtag tgaataataa gaaatgcgaa aatataaaca aagctttgac 900
5  gtagacaact taaattatga tgaagcacta aatgctgtag gatttattgt tgaaacttca 960
   ttcgaattat atcgaatgaa tggaaatgtc cttataacaa gtataaaaac taaaaataaa 1020
   gacacctata atacagttac ttatccaaat cataaagaag ttttattact tttacaaat 1080
7  cattcttatg aagaagtaac agcactaact ggcatttcca aagaaagact tcaaaatctt 1140
   aaaaaaattt ggaaaaaaag ataa                                     1164

```

```

9
11 <210> 136
    <211> 387
    <212> PRT
13 <213> Bacillus thuringiensis
15 <400> 136

```

```

17 Met Ile Glu Thr Asn Lys Ile Tyr Glu Ile Ser Asn Lys Ala Asn Gly
    1           5           10           15
19 Leu Tyr Ala Thr Thr Tyr Leu Ser Phe Asp Asn Ser Gly Val Ser Leu
    20           25           30
21 Leu Asn Lys Asn Glu Ser Asp Ile Asn Asp Tyr Asn Leu Lys Trp Phe
    35           40           45
25 Leu Phe Pro Ile Asp Asn Asn Gln Tyr Ile Ile Thr Ser Tyr Gly Val
    50           55           60
27 Asn Lys Asn Lys Val Trp Thr Ala Asn Gly Asn Lys Ile Asn Val Thr
    65           70           75           80
29 Thr Tyr Ser Ala Glu Asn Ser Ala Gln Gln Trp Gln Ile Arg Asn Ser
    85           90           95
33 Ser Ser Gly Tyr Ile Ile Glu Asn Asn Asn Gly Lys Ile Leu Thr Ala
    100          105          110
35 Gly Thr Gly Gln Ser Leu Gly Leu Leu Tyr Leu Thr Asp Glu Ile Pro
    115          120          125
37 Glu Asp Ser Asn Gln Gln Trp Asn Leu Thr Ser Ile Gln Thr Ile Ser
    130          135          140
41 Leu Pro Ser Gln Pro Ile Ile Asp Thr Thr Leu Val Asp Tyr Pro Lys
    145          150          155          160
43 Tyr Ser Thr Thr Gly Ser Ile Asn Tyr Asn Gly Thr Ala Leu Gln Leu
    165          170          175
45 Met Gly Trp Thr Leu Ile Pro Cys Ile Met Val Tyr Asp Lys Thr Ile
    180          185          190

```





# RO 123431 B1

1 atgtcagcag gtgaagttca tattgaaata aataataaaa cacgtcatac attacaatta 60  
 2 gaggataaaa ctaaacttac cagtggtaga tggcgaacat cacctacaaa tgttgctcgt 120  
 3 gatacaatta aacatttgt agcagaatca catggtttta tgacaggaat agaaggtatt 180  
 4 atatatttta gcgtaaacgg agaagcagaa attagtttac attttgacaa tccttatgta 240  
 5 ggttctaata aatatgatgg ttctttctgat aaagctgcat acgaagttat tgctcaaggt 300  
 ggatcagggg atatatctca totaacatat acaattcaaa c 341

7 <210> 138  
 <211> 113  
 9 <212> PRT  
 <213> Bacillus thuringiensis

11 <400> 138

13	Met	Ser	Ala	Gly	Glu	Val	His	Ile	Glu	Ile	Asn	Asn	Lys	Thr	Arg	His
15	1				5					10					15	
17	Thr	Leu	Gln	Leu	Glu	Asp	Lys	Thr	Lys	Leu	Thr	Ser	Gly	Arg	Trp	Arg
			20						25					30		
19	Thr	Ser	Pro	Thr	Asn	Val	Ala	Arg	Asp	Thr	Ile	Lys	Thr	Phe	Val	Ala
			35					40					45			
21	Glu	Ser	His	Gly	Phe	Met	Thr	Gly	Ile	Glu	Gly	Ile	Ile	Tyr	Phe	Ser
23		50					55					60				
25	Val	Asn	Gly	Glu	Ala	Glu	Ile	Ser	Leu	His	Phe	Asp	Asn	Pro	Tyr	Val
	65					70					75					80
27	Gly	Ser	Asn	Lys	Tyr	Asp	Gly	Ser	Ser	Asp	Lys	Ala	Ala	Tyr	Glu	Val
					85					90					95	
29	Ile	Ala	Gln	Gly	Gly	Ser	Gly	Asp	Ile	Ser	His	Leu	Thr	Tyr	Thr	Ile
31			100						105					110		

33 Gln  
 35 <210> 139  
 <211> 1158  
 <212> ADN  
 37 <213> Bacillus thuringiensis  
 39 <400> 139

# RO 123431 B1

atgttagata	ctaataaaat	ttatgaaata	agcaatcatg	ctaattggatt	atatacatca	60	1
acttatttaa	gtctggatga	ttcaggtggt	agtttaattg	gtcaaaatga	tgaggatata	120	
gatgaataca	atttaaagtg	gttcttattt	ccaatagata	ataatcaata	tattattaca	180	3
agctatggag	ogaataattg	taaagtttgg	aatgttaaaa	atgataaagt	aaatgtttca	240	
acgtattctc	caacaaactc	agtacaaaaa	tggcaataaa	aagctaaaaa	ttcttcatat	300	5
ataatacaaa	gtgagaatgg	aaaagtctta	acagcaggaa	taggtcaatc	tcttggaata	360	
gtacgcttaa	ccgatgaatc	atcagagagt	tctaaccaac	aatggaattt	aatccctgta	420	
caaacaattt	cactcccaca	aaaacctaaa	atagataaaa	aattaaaaga	tcctcctgaa	480	7
tattcagaaa	ccggaaatat	agctactgga	acaattcctc	aattaatggg	atggacatta	540	
gtaccttgta	ttatggtaaa	tgatccaaaa	ataggtaaaa	acactcaaat	taaaactact	600	9
ccatattata	tttttaaaaa	atatcaatac	tggaaacgag	caataggaag	taatgtatct	660	
ttacttccac	atcaaaaaaa	atcatatgat	tatgagtggg	gtacagaaga	aatcaaaaa	720	11
acaactatta	ttaatacagt	aggatttcaa	attaatgtag	atcaggaat	gaagtttgag	780	
gtaccagaag	taggaggagg	tacagaagaa	ataaaaacac	aattaatga	agaattaaaa	840	13
gttgaatata	gcactgacac	caaaataatg	aaaaaatatc	aagaacactc	agagatagat	900	
aatccaacta	atcaaacac	gaattctata	ggatttotta	cttttacttc	tttagaatta	960	
tatcgatata	acggttcgga	aattcgtata	atgagaatgg	aaacttcaga	taatgatact	1020	15
tatactctga	cctcttatcc	aaatcataga	gaagcattat	tacttctcac	aatcattct	1080	17
tatcaagaag	taagccgaat	tccagcacac	tggcggccgt	tactagtgga	tccgagctcg	1140	
gtaccaagct	tggcgtaa					1158	
							19
<210>	140						
<211>	385						21
<212>	PRT						
<213>	Bacillus thuringiensis						23
<400>	140						

# RO 123431 B1

1	Met	Leu	Asp	Thr	Asn	Lys	Ile	Tyr	Glu	Ile	Ser	Asn	His	Ala	Asn	Gly
	1				5				10						15	
3	Leu	Tyr	Thr	Ser	Thr	Tyr	Leu	Ser	Leu	Asp	Asp	Ser	Gly	Val	Ser	Leu
5				20					25					30		
7	Met	Gly	Gln	Asn	Asp	Glu	Asp	Ile	Asp	Glu	Tyr	Asn	Leu	Lys	Trp	Phe
			35					40					45			
9	Leu	Phe	Pro	Ile	Asp	Asn	Asn	Gln	Tyr	Ile	Ile	Thr	Ser	Tyr	Gly	Ala
11		50					55					60				
13	Asn	Asn	Cys	Lys	Val	Trp	Asn	Val	Lys	Asn	Asp	Lys	Val	Asn	Val	Ser
	65					70					75					80
15	Thr	Tyr	Ser	Pro	Thr	Asn	Ser	Val	Gln	Lys	Trp	Gln	Ile	Lys	Ala	Lys
					85					90					95	
17	Asn	Ser	Ser	Tyr	Ile	Ile	Gln	Ser	Glu	Asn	Gly	Lys	Val	Leu	Thr	Ala
19				100					105					110		
21	Gly	Ile	Gly	Gln	Ser	Leu	Gly	Ile	Val	Arg	Leu	Thr	Asp	Glu	Ser	Ser
			115					120					125			
23	Glu	Ser	Ser	Asn	Gln	Gln	Trp	Asn	Leu	Ile	Pro	Val	Gln	Thr	Ile	Ser
25		130					135					140				
27	Leu	Pro	Gln	Lys	Pro	Lys	Ile	Asp	Lys	Lys	Leu	Lys	Asp	His	Pro	Glu
	145					150					155					160
29	Tyr	Ser	Glu	Thr	Gly	Asn	Ile	Ala	Thr	Gly	Thr	Ile	Pro	Gln	Leu	Met
					165					170					175	
31	Gly	Trp	Thr	Leu	Val	Pro	Cys	Ile	Met	Val	Asn	Asp	Pro	Lys	Ile	Gly
33				180					185					190		
35	Lys	Asn	Thr	Gln	Ile	Lys	Thr	Thr	Pro	Tyr	Tyr	Ile	Phe	Lys	Lys	Tyr
			195					200					205			
37	Gln	Tyr	Trp	Lys	Arg	Ala	Ile	Gly	Ser	Asn	Val	Ser	Leu	Leu	Pro	His
39		210						215				220				
41	Gln	Lys	Lys	Ser	Tyr	Asp	Tyr	Glu	Trp	Gly	Thr	Glu	Glu	Asn	Gln	Lys
	225					230					235					240

# RO 123431 B1

Thr Thr Ile Ile Asn Thr Val Gly Phe Gln Ile Asn Val Asp Ser Gly	1
245 250 255	
Met Lys Phe Glu Val Pro Glu Val Gly Gly Gly Thr Glu Glu Ile Lys	3
260 265 270	5
Thr Gln Leu Asn Glu Glu Leu Lys Val Glu Tyr Ser Thr Asp Thr Lys	7
275 280 285	
Ile Met Lys Lys Tyr Gln Glu His Ser Glu Ile Asp Asn Pro Thr Asn	9
290 295 300	11
Gln Thr Thr Asn Ser Ile Gly Phe Leu Thr Phe Thr Ser Leu Glu Leu	13
305 310 315 320	
Tyr Arg Tyr Asn Gly Ser Glu Ile Arg Ile Met Arg Met Glu Thr Ser	15
325 330 335	
Asp Asn Asp Thr Tyr Thr Leu Thr Ser Tyr Pro Asn His Arg Glu Ala	17
340 345 350	19
Leu Leu Leu Leu Thr Asn His Ser Tyr Gln Glu Val Ser Arg Ile Pro	21
355 360 365	
Ala His Trp Arg Pro Leu Leu Val Asp Pro Ser Ser Val Pro Ser Leu	23
370 375 380	
Ala	25
385	
<210> 141	27
<211> 399	29
<212> ADN	
<213> Bacillus thuringiensis	31
<400> 141	33
atgtcagatc gogaagtaca tattgaaata ataaatcata caggtcatac cttacaaatg 60	
gataaaagaa ctagacttgc acatgggtgaa tggattatta caccogtgaa tgttccaaat 120	35
aattcttctg atttatttca agcaggttct gatggagttt tgacaggagt agaaggaata 180	
ataatttata ctataaatgg agaaatagaa attaccttac attttgacaa tccttatgca 240	37
ggttctaata aatattctgg acgttctagt gatgatgatt ataaagttat aactgaagca 300	
agagcagaac atagagctaa taatcatgat catgtaacat atacagttca aagaaacata 360	39
tcacgatata ccaataaatt atgttctaata aactcctaa 399	
<210> 142	41

# RO 123431 B1

1 <211> 132  
 <212> PRT  
 <213> Bacillus thuringiensis

3  
 <400> 142

5 Met Ser Asp Arg Glu Val His Ile Glu Ile Ile Asn His Thr Gly His  
 1 5 10 15  
 7 Thr Leu Gln Met Asp Lys Arg Thr Arg Leu Ala His Gly Glu Trp Ile  
 20 25 30  
 9 Ile Thr Pro Val Asn Val Pro Asn Asn Ser Ser Asp Leu Phe Gln Ala  
 35 40 45  
 11 Gly Ser Asp Gly Val Leu Thr Gly Val Glu Gly Ile Ile Ile Tyr Thr  
 50 55 60  
 13 Ile Asn Gly Glu Ile Glu Ile Thr Leu His Phe Asp Asn Pro Tyr Ala  
 65 70 75 80  
 15 Gly Ser Asn Lys Tyr Ser Gly Arg Ser Ser Asp Asp Asp Tyr Lys Val  
 17 85 90 95  
 19 Ile Thr Glu Ala Arg Ala Glu His Arg Ala Asn Asn His Asp His Val  
 100 105 110  
 21 Thr Tyr Thr Val Gln Arg Asn Ile Ser Arg Tyr Thr Asn Lys Leu Cys  
 115 120 125  
 23 Ser Asn Asn Ser  
 130

25 <210> 143  
 <211> 871  
 27 <212> ADN  
 <213> Bacillus thuringiensis

29 <400> 143

31 atgatagaaa ctaataagat atatgaaata agcaataaag ctaatggatt atatgcaact 60  
 acttatitaa gttttgataa ttcagggtgtt agttttattaa ataaaaatga atctgatatt 120  
 aatgattata atttgaaatg gtttttattt cctattgata ataatacagta tattattaca 180  
 33 agttatggag taaataaaaa taagggttgg actgctaattg gtaataaaat aaatgttaca 240  
 acatattccg cagaaaatcc agcacaacaa tggcaataaa gaaacagttc ttctggatat 300  
 ataataagaaa ataataatgg gaaaatttta acggcaggaa caggccaatc attaggttta 360  
 35 ttatatitaa ctgatgaaat acctgaagat tctaatacaac aatggaattt aacttcaata 420  
 caaacaattt cacttccttc acaaccaata attgatacaa cattagtaga ttaccctaaa 480  
 37 tattcaacga ccggtagtag aaattataat ggtacagcac ttcaattaat gggatggaca 540  
 ctcataccat gtattatggg atacgataaa acgatagctt ctacacacac tcaaattaca 600  
 acaaccctt atttatattt gaaaaaatat caacgttggg tacttgcaac aggaagtggg 660  
 39 ctatctgtac ctgcacatgt caaatcaact ttcgaatagc aatggggaac agacacagat 720  
 caaaaaacca gtgtaataaa tacattaggt tttcaatta atacagatac aaaattaaaa 780  
 41 gctactgtac cagaagtagg tggagggtaca acagatataa gaacacaaat cactgaagaa 840  
 cttaaagtag aatatagtag tgaataaaa g 871

43 <210> 144  
 45 <211> 290  
 <212> PRT  
 <213> Bacillus thuringiensis

47  
 <400> 144

# RO 123431 B1

Met	Ile	Glu	Thr	Asn	Lys	Ile	Tyr	Glu	Ile	Ser	Asn	Lys	Ala	Asn	Gly	1
1				5				10						15		
Leu	Tyr	Ala	Thr	Thr	Tyr	Leu	Ser	Phe	Asp	Asn	Ser	Gly	Val	Ser	Leu	3
			20					25					30			5
Leu	Asn	Lys	Asn	Glu	Ser	Asp	Ile	Asn	Asp	Tyr	Asn	Leu	Lys	Trp	Phe	7
		35					40					45				9
Leu	Phe	Pro	Ile	Asp	Asn	Asn	Gln	Tyr	Ile	Ile	Thr	Ser	Tyr	Gly	Val	11
	50					55					60					13
Asn	Lys	Asn	Lys	Val	Trp	Thr	Ala	Asn	Gly	Asn	Lys	Ile	Asn	Val	Thr	15
65					70					75					80	17
Thr	Tyr	Ser	Ala	Glu	Asn	Ser	Ala	Gln	Gln	Trp	Gln	Ile	Arg	Asn	Ser	19
				85					90					95		21
Ser	Ser	Gly	Tyr	Ile	Ile	Glu	Asn	Asn	Asn	Gly	Lys	Ile	Leu	Thr	Ala	23
			100					105					110			25
Gly	Thr	Gly	Gln	Ser	Leu	Gly	Leu	Leu	Tyr	Leu	Thr	Asp	Glu	Ile	Pro	27
		115					120					125				29
Glu	Asp	Ser	Asn	Gln	Gln	Trp	Asn	Leu	Thr	Ser	Ile	Gln	Thr	Ile	Ser	31
	130						135				140					33
Leu	Pro	Ser	Gln	Pro	Ile	Ile	Asp	Thr	Thr	Leu	Val	Asp	Tyr	Pro	Lys	35
145					150					155					160	37
Tyr	Ser	Thr	Thr	Gly	Ser	Ile	Asn	Tyr	Asn	Gly	Thr	Ala	Leu	Gln	Leu	39
				165					170					175		41
Met	Gly	Trp	Thr	Leu	Ile	Pro	Cys	Ile	Met	Val	Tyr	Asp	Lys	Thr	Ile	43
			180					185					190			45
Ala	Ser	Thr	His	Thr	Gln	Ile	Thr	Thr	Thr	Pro	Tyr	Tyr	Ile	Leu	Lys	31
		195					200					205				33
Lys	Tyr	Gln	Arg	Trp	Val	Leu	Ala	Thr	Gly	Ser	Gly	Leu	Ser	Val	Pro	35
	210					215					220					37
Ala	His	Val	Lys	Ser	Thr	Phe	Glu	Tyr	Glu	Trp	Gly	Thr	Asp	Thr	Asp	39
225					230					235				240		41
Gln	Lys	Thr	Ser	Val	Ile	Asn	Thr	Leu	Gly	Phe	Gln	Ile	Asn	Thr	Asp	43
				245					250					255		45
Thr	Lys	Leu	Lys	Ala	Thr	Val	Pro	Glu	Val	Gly	Gly	Gly	Thr	Thr	Asp	31
			260					265					270			33
Ile	Arg	Thr	Gln	Ile	Thr	Glu	Glu	Leu	Lys	Val	Glu	Tyr	Ser	Ser	Glu	35
		275					280					285				37

# RO 123431 B1

1 Asn Lys  
290

3  
4 <210> 145  
5 <211> 372  
6 <212> ADN  
7 <213> Bacillus thuringiensis

9  
10 atgtcagcac gtgaagtaca cattgatgta aataataaga caggtcatac attacaatta 60  
11 gaagataaaa caaaacttga tgggtgtaga tggcgaacat cacctacaaa tgttgctaata 120  
12 gatcaaatta aaacatttgt agcagaatca catgggttta tgacagggtac agaagggtact 180  
13 atatattata gtataaatgg agaagcagaa attagtttat attttgataa tccttattca 240  
14 ggttctaata aatatgatgg gcattccaat aaacctcaat atgaagttac tacccaagga 300  
15 ggatcagga atcaatctca tgttacgtat actattcaaa ctgcatcttc acgatatggg 360  
aataactcat aa 372

17  
18 <210> 146  
19 <211> 123  
20 <212> PRT  
21 <213> Bacillus thuringiensis

23  
24 Met Ser Ala Arg Glu Val His Ile Asp Val Asn Asn Lys Thr Gly His  
1 5 10 15  
25  
26 Thr Leu Gln Leu Glu Asp Lys Thr Lys Leu Asp Gly Gly Arg Trp Arg  
20 25 30  
27  
28 Thr Ser Pro Thr Asn Val Ala Asn Asp Gln Ile Lys Thr Phe Val Ala  
35 40 45  
29  
30 Glu Ser His Gly Phe Met Thr Gly Thr Glu Gly Thr Ile Tyr Tyr Ser  
50 55 60  
31  
32 Ile Asn Gly Glu Ala Glu Ile Ser Leu Tyr Phe Asp Asn Pro Tyr Ser  
65 70 75 80  
33  
34 Gly Ser Asn Lys Tyr Asp Gly His Ser Asn Lys Pro Gln Tyr Glu Val  
85 90 95  
35  
36 Thr Thr Gln Gly Gly Ser Gly Asn Gln Ser His Val Thr Tyr Thr Ile  
100 105 110  
37  
38 Gln Thr Ala Ser Ser Arg Tyr Gly Asn Asn Ser  
115 120

45  
46 <210>147  
47 <211> 1152  
<212> ADN  
<213> Bacillus thuringiensis

<400> 147



# RO 123431 B1

```

atgtagata ctaataaagt ttatgaaata agtaatcatg ctaatggact atatgcagca 60
acttatttaa gtttagatga ttcaggtggt agttaaata ataaaaatga tgatgatatt 120
gatgattata acttaaaatg gtttttattt cctattgatg atgatcaata tattattaca 180
agctatgcag caaataaattg taaagtttgg aatgttaata atgataaaat aaatgtttcg 240
acttattott caacaaattc aatacaaaaa tggcaataa aagctaattg ttcttcatat 300
gtaatacaaa gtgataatgg aaaagtctta acagcaggaa ccggtcaagc tcttgattg 360
atacgtttaa ctgatgaatc ctcaaataat cccaatcaac aatggaattt aacttctgta 420
caacaattc aacttcacac aaaacctata atagatacaa aattaaaga ttatcccaa 480
tattcaccaa ctggaaatat agataatgga acatctctc aattaatggg atggacatta 540
gtaccttgta ttatggtaaa tgatccaaat atagataaaa atactcaaat taaaactact 600
ccatattata ttttaaaaaa atatcaatat tggcaacgag cagtaggaag taatgtagct 660
ttacgtccac atgaaaaaaaa atcatatact tatgaatggg gaacagaaat agatcaaaaa 720
acaacaatca taaatacatt aggatttcaa atcaatatag attcaggaat gaaatttgat 780
ataccagaag taggtggagg tacagatgaa ataaaaacac aactaaatga agaattaa 840
atagaatata gtogtgaac taaaataatg gaaaaatc aagaacaatc tgaaatagat 900
aatccaactg atcaaccaat gaattctata ggatttctta ctattacttc tttagaatta 960
tatagatata atggctcaga aattcgtata atgcaattc aaacctcaga taatgatact 1020
tataatgtta cttcttatcc agatcatcaa caagctttat tacttcttac aaatcattca 1080
tatgaagaag tagaagaaat aacaaatatt cctaaaagta cactaaaaaa attaaaaaaa 1140
tattattttt aa 1152

```

<210> 148

<211> 383

<212> PRT

<213> *Bacillus thuringiensis*

<400> 148

```

Met Leu Asp Thr Asn Lys Val Tyr Glu Ile Ser Asn His Ala Asn Gly
  1             5             10             15

```

```

Leu Tyr Ala Ala Thr Tyr Leu Ser Leu Asp Asp Ser Gly Val Ser Leu
          20             25             30

```

```

Met Asn Lys Asn Asp Asp Asp Ile Asp Asp Tyr Asn Leu Lys Trp Phe
      35             40             45

```

```

Leu Phe Pro Ile Asp Asp Asp Gln Tyr Ile Ile Thr Ser Tyr Ala Ala
  50             55             60

```

```

Asn Asn Cys Lys Val Trp Asn Val Asn Asn Asp Lys Ile Asn Val Ser
  65             70             75             80

```

```

Thr Tyr Ser Ser Thr Asn Ser Ile Gln Lys Trp Gln Ile Lys Ala Asn
          85             90             95

```

```

Gly Ser Ser Tyr Val Ile Gln Ser Asp Asn Gly Lys Val Leu Thr Ala
          100             105             110

```

```

Gly Thr Gly Gln Ala Leu Gly Leu Ile Arg Leu Thr Asp Glu Ser Ser
  115             120             125

```

# RO 123431 B1

1	Asn	Asn	Pro	Asn	Gln	Gln	Trp	Asn	Leu	Thr	Ser	Val	Gln	Thr	Ile	Gln
	130						135					140				
3																
5	Leu	Pro	Gln	Lys	Pro	Ile	Ile	Asp	Thr	Lys	Leu	Lys	Asp	Tyr	Pro	Lys
	145					150					155					160
7	Tyr	Ser	Pro	Thr	Gly	Asn	Ile	Asp	Asn	Gly	Thr	Ser	Pro	Gln	Leu	Met
					165					170					175	
9																
11	Gly	Trp	Thr	Leu	Val	Pro	Cys	Ile	Met	Val	Asn	Asp	Pro	Asn	Ile	Asp
				180					185					190		
13	Lys	Asn	Thr	Gln	Ile	Lys	Thr	Thr	Pro	Tyr	Tyr	Ile	Leu	Lys	Lys	Tyr
			195					200					205			
15																
17	Gln	Tyr	Trp	Gln	Arg	Ala	Val	Gly	Ser	Asn	Val	Ala	Leu	Arg	Pro	His
	210						215					220				
19	Glu	Lys	Lys	Ser	Tyr	Thr	Tyr	Glu	Trp	Gly	Thr	Glu	Ile	Asp	Gln	Lys
	225					230					235					240
21	Thr	Thr	Ile	Ile	Asn	Thr	Leu	Gly	Phe	Gln	Ile	Asn	Ile	Asp	Ser	Gly
					245					250					255	
23																
25	Met	Lys	Phe	Asp	Ile	Pro	Glu	Val	Gly	Gly	Gly	Thr	Asp	Glu	Ile	Lys
				260					265					270		
27	Thr	Gln	Leu	Asn	Glu	Glu	Leu	Lys	Ile	Glu	Tyr	Ser	Arg	Glu	Thr	Lys
			275					280					285			
29	Ile	Met	Glu	Lys	Tyr	Gln	Glu	Gln	Ser	Glu	Ile	Asp	Asn	Pro	Thr	Asp
	290						295					300				
31																
33	Gln	Pro	Met	Asn	Ser	Ile	Gly	Phe	Leu	Thr	Ile	Thr	Ser	Leu	Glu	Leu
	305					310					315					320
35	Tyr	Arg	Tyr	Asn	Gly	Ser	Glu	Ile	Arg	Ile	Met	Gln	Ile	Gln	Thr	Ser
					325					330					335	
37																
39	Asp	Asn	Asp	Thr	Tyr	Asn	Val	Thr	Ser	Tyr	Pro	Asp	His	Gln	Gln	Ala
				340					345					350		
41	Leu	Leu	Leu	Leu	Thr	Asn	His	Ser	Tyr	Glu	Glu	Val	Glu	Glu	Ile	Thr
			355					360					365			
43	Asn	Ile	Pro	Lys	Ser	Thr	Leu	Lys	Lys	Leu	Lys	Lys	Tyr	Tyr	Phe	
	370						375					380				
45																

# RO 123431 B1

<210> 149	1
<211> 354	
<212> ADN	3
<213> Bacillus thuringiensis	
<400> 149	5
atgtcagctc gogaagttca tattgaaata ataaatcata caggtcatac cttacaaatg 60	7
gataaaagaa ctagacttgc acatgggtgaa tggattatta caccctgtaa tgttccaaat 120	
aattcttctg atttatttca agcagggttct gatggagttt tgacaggagt agaaggaata 180	9
ataatttata ctataaatgg agaaatagaa attaccttac attttgacaa tccttatgca 240	
ggttctaata aatattctgg acgttctagt gatgatgatt ataaagttat aactgaagca 300	11
agagcagaac atagagctaa taatcatgat catgtgacat atacaattca aaca 354	
<210> 150	13
<211> 113	
<212> PRT	15
<213> Bacillus thuringiensis	
<400> 150	17
Met Ser Ala Arg Glu Val His Ile Glu Ile Ile Asn His Thr Gly His	19
1 5 10 15	
Thr Leu Gln Met Asp Lys Arg Thr Arg Leu Ala His Gly Glu Trp Ile	21
20 25 30	21
Ile Thr Pro Val Asn Val Pro Asn Asn Ser Ser Asp Leu Phe Gln Ala	23
35 40 45	23
Gly Ser Asp Gly Val Leu Thr Gly Val Glu Gly Ile Ile Ile Tyr Thr	25
50 55 60	25
Ile Asn Gly Glu Ile Glu Ile Thr Leu His Phe Asp Asn Pro Tyr Ala	27
65 70 75 80	27
Gly Ser Asn Lys Tyr Ser Gly Arg Ser Ser Asp Asp Asp Tyr Lys Val	29
85 90 95	29
Ile Thr Glu Ala Arg Ala Glu His Arg Ala Asn Asn His Asp His Val	31
100 105 110	31
Thr	33
	35
<210> 151	37
<211> 353	
<212> ADN	39
	41

# RO 123431 B1

1 <213> Bacillus thuringiensis  
3 <400> 151  
5 atgtcagctc gtgaagttca tattgaaata ataatcata caggtcatac cttacaaatg 60  
gataaaaagaa ctagacttgc acatggtgaa tggattatta caccocgtgaa tgttccaaat 120  
7 aattcttctg atttatttca agcaggttct gatggagttt tgacaggagt agaaggaata 180  
ataatttata ctataaatgg agaaatagaa attaccttac attttgacaa tccttatgca 240  
9 ggttctaata aatattctgg acgttctagt gatgatgatt ataaagttat aactgaagca 300  
agagcagaac atagagctaa taatcatgat catgtaacat atacaattca aac 353  
11 <210> 152  
<211> 113  
13 <212> PRT  
<213> Bacillus thuringiensis  
15 <400> 152  
17 Met Ser Ala Arg Glu Val His Ile Glu Ile Ile Asn His Thr Gly His  
1 5 10 15  
19 Thr Leu Gln Met Asp Lys Arg Thr Arg Leu Ala His Gly Glu Trp Ile  
20 25 30  
21 Ile Thr Pro Val Asn Val Pro Asn Asn Ser Ser Asp Leu Phe Gln Ala  
23 35 40 45  
25 Gly Ser Asp Gly Val Leu Thr Gly Val Glu Gly Ile Ile Ile Tyr Thr  
50 55 60  
27 Ile Asn Gly Glu Ile Glu Ile Thr Leu His Phe Asp Asn Pro Tyr Ala  
65 70 75 80  
29 Gly Ser Asn Lys Tyr Ser Gly Arg Ser Ser Asp Asp Asp Tyr Lys Val  
31 85 90 95  
33 Ile Thr Glu Ala Arg Ala Glu His Arg Ala Asn Asn His Asp His Val  
100 105 110  
35 Thr  
37 <210> 153  
<211> 353  
39 <212> ADN  
<213> Bacillus thuringiensis  
41 <400> 153

# RO 123431 B1

atgtcagcac gccaagtaga tattgaaata ataaatcata caggtcatac ottacaaatg 60 1  
 gataaaagaa ctagacttgc acatggtgaa tggattatta cacccgtgaa tgttccaaat 120  
 aattcttctg atttatttca agcaggttct gatggagttt tgacaggagt agaaggaata 180 3  
 ataatttata ctataaatgg agaaatagaa attaccttac attttgacaa tccttatgca 240  
 ggttctaata aatattctgg acgttctagt gatgatgatt ataaagttat aactgaagca 300 5  
 agagcagaac atagagctaa taatcatgat catgtgactt atacaattca aac 353

<210> 154 7  
 <211> 113  
 <212> PRT 9  
 <213> Bacillus thuringiensis

<400> 154 11

Met Ser Ala Arg Glu Val Asp Ile Glu Ile Ile Asn His Thr Gly His 13  
 1 5 10 15

Thr Leu Gln Met Asp Lys Arg Thr Arg Leu Ala His Gly Glu Trp Ile 15  
 20 25 30 17

Ile Thr Pro Val Asn Val Pro Asn Asn Ser Ser Asp Leu Phe Gln Ala 19  
 35 40 45

Gly Ser Asp Gly Val Leu Thr Gly Val Glu Gly Ile Ile Ile Tyr Thr 21  
 50 55 60 23

Ile Asn Gly Glu Ile Glu Ile Thr Leu His Phe Asp Asn Pro Tyr Ala 25  
 65 70 75 80

Gly Ser Asn Lys Tyr Ser Gly Arg Ser Ser Asp Asp Asp Tyr Lys Val 27  
 85 90 95

Ile Thr Glu Ala Arg Ala Glu His Arg Ala Asn Asn His Asp His Val 29  
 100 105 110 31

Thr 33

<210> 155 33  
 <211> 37  
 <212> ADN 35  
 <213> Bacillus thuringiensis 37

<400> 155 39

aaatattatt ttatgtcagc acgtgaagta cacattg 37

# RO 123431 B1

1 <210> 156  
<211> 40  
3 <212> ADN  
<213> Bacillus thuringiensis  
5 <400> 156  
7 tctctggtac cttattatga tttatgcca tatcgtgagg 40  
9 <210> 157  
<211> 45  
<212> ADN  
11 <213> Bacillus thuringiensis  
13 <400> 157  
15 agagaactag taaaaggag ataaccatgt tagatactaa taaag 45  
17 <210> 158  
<211> 46  
<212> PRT  
19 <213> Bacillus thuringiensis  
21 <400> 158  
23 cgtgctgaca taaaataata tttttttaat ttttttagtg tacttt 46  
25 <210> 159  
<211> 506  
<212> PRT  
27 <213> Bacillus thuringiensis  
29 <400> 159

# RO 123431 B1

Met	Leu	Asp	Thr	Asn	Lys	Val	Tyr	Glu	Ile	Ser	Asn	His	Ala	Asn	Gly	1
1				5				10						15		3
Leu	Tyr	Ala	Ala	Thr	Tyr	Leu	Ser	Leu	Asp	Asp	Ser	Gly	Val	Ser	Leu	5
		20						25					30			7
Met	Asn	Lys	Asn	Asp	Asp	Asp	Ile	Asp	Asp	Tyr	Asn	Leu	Lys	Trp	Phe	9
		35					40					45				11
Leu	Phe	Pro	Ile	Asp	Asp	Asp	Gln	Tyr	Ile	Ile	Thr	Ser	Tyr	Ala	Ala	13
	50					55					60					15
Asn	Asn	Cys	Lys	Val	Trp	Asn	Val	Asn	Asn	Asp	Lys	Ile	Asn	Val	Ser	17
65					70					75					80	19
Thr	Tyr	Ser	Ser	Thr	Asn	Ser	Ile	Gln	Lys	Trp	Gln	Ile	Lys	Ala	Asn	21
				85					90					95		23
Gly	Ser	Ser	Tyr	Val	Ile	Gln	Ser	Asp	Asn	Gly	Lys	Val	Leu	Thr	Ala	25
			100					105					110			27
Gly	Thr	Gly	Gln	Ala	Leu	Gly	Leu	Ile	Arg	Leu	Thr	Asp	Glu	Ser	Ser	29
		115					120					125				31
Asn	Asn	Pro	Asn	Gln	Gln	Trp	Asn	Leu	Thr	Ser	Val	Gln	Thr	Ile	Gln	33
130						135					140					35
Leu	Pro	Gln	Lys	Pro	Ile	Ile	Asp	Thr	Lys	Leu	Lys	Asp	Tyr	Pro	Lys	37
145					150				155						160	39
Tyr	Ser	Pro	Thr	Gly	Asn	Ile	Asp	Asn	Gly	Thr	Ser	Pro	Gln	Leu	Met	41
				165					170					175		43
Gly	Trp	Thr	Leu	Val	Pro	Cys	Ile	Met	Val	Asn	Asp	Pro	Asn	Ile	Asp	45
			180					185					190			47
Lys	Asn	Thr	Gln	Ile	Lys	Thr	Thr	Pro	Tyr	Tyr	Ile	Leu	Lys	Lys	Tyr	49
		195					200					205				51
Gln	Tyr	Trp	Gln	Arg	Ala	Val	Gly	Ser	Asn	Val	Ala	Leu	Arg	Pro	His	53
	210					215					220					55
Glu	Lys	Lys	Ser	Tyr	Thr	Tyr	Glu	Trp	Gly	Thr	Glu	Ile	Asp	Gln	Lys	57
225					230					235					240	59





# RO 123431 B1

<210> 160	1
<211> 1521	
<212> ADN	3
<213> <i>Bacillus thuringiensis</i>	
<400> 160	5
	7
atgttagata ctaataaagt ttatgaaata agcaatcatg ctaatggact atatgcagca 60	
acttatttaa gtttagatga ttcaggtggt agtttaatga ataaaaatga tgatgatatt 120	9
gatgattata acttaaaatg gtttttattt cctattgatg atgatcaata tattattaca 180	
agctatgcag caaataattg taaagtttgg aatgttaata atgataaaat aaatgtttcg 240	11
acttattcct caacaaattc aatacaaaaa tggcaaataa aagctaattg ttcttcatat 300	
gtaatacaaa gtgataatgg aaaagtctta acagcaggaa cgggtcaagc tcttggattg 360	13
atagctttaa ctgatgaatc ctcaaataat cccaatcaac aatggaattt aactttctgta 420	
caaacaattc aacttcocaca aaaacctata atagatacaa aattaaaga ttatcccaaa 480	15
tattcaccaa ctggaaatat agataatgga acatctcctc aattaatggg atggacatta 540	
gtaccttgta ttatggtaaa tgatccaaat atagataaaa atactcaaat taaaactact 600	17
ccatattata ttttaaaaaa atatcaatat tggcaacgag cagtaggaag taatgtagct 660	
ttacgtccac atgaaaaaaaa atcatatact tatgaatggg gcacagaaat agatcaaaaa 720	19
acaacaatta taaatacatt aggatttcaa atcaatatag attcaggaat gaaatttgat 780	
ataccagaag taggtggagg tacagatgaa ataaaaacac aactaaatga agaattaaaa 840	21
atagaatata gtcatgaaac taaaataatg gaaaaatatc aagaacaatc tgaaatagat 900	
aatccaactg atcaatcaat gaattctata ggattttctta ctattacttc cttagaatta 960	23
tatagatata atggctcaga aattcgtata atgcaaattc aaacctcaga taatgatact 1020	
tataatgta cttcttatcc aaatcatcaa caagctttat tactttctac aaatcattca 1080	25
tatgaagaag tagaagaaat aacaaatatt cctaaaagta cactaaaaaaaa attaaaaaaaa 1140	
tattatttta tgcagcacg tgaagtacac attgatgtaa ataataagac aggtcataca 1200	27
ttacaattag aagataaaac aaaacttgat ggtggtagat ggogaacatc acctacaaat 1260	
gttgctaatg atcaaattaa aacatttgta gcagaatcaa atggttttat gacaggtaca 1320	29
gaaggtracta tatattatag tataaatgga gaagcagaaa ttagtttata ttttgacaat 1380	
ccttttgtag gttctaataa atatgatgga cattccaata aatctcaata tgaaattatt 1440	31
acccaaggag gatcaggaaa tcaatctcat gttaogtata ctattcaaac cacatcctca 1500	
cgatatgggc ataaatcata a	1521
	33
<210> 161	
<211> 23	
<212> PRT	33
<213> <i>Bacillus thuringiensis</i>	
<400> 161	35
	37
gatratrarc aatatattat tac	23
	39
<210> 162	
<211> 20	
<212> ADN	41
<213> <i>Bacillus thuringiensis</i>	
<400> 162	43
	45

# RO 123431 B1

1	caaggtarta atgtccatcc	20
3	<210> 163 <211> 24 <212> ADN	
5	<213> Bacillus thuringiensis	
7	<400> 163	
9	gatgatgrtm rakwwattat trca	24
11	<210> 164 <211> 24 <212> ADN	
13	<213> Bacillus thuringiensis	
15	<400> 164	
17	gatgatgrtm ratatattat trca	24
19	<210> 165 <211> 23 <212> PRT	
21	<213> Bacillus thuringiensis	
23	<400> 165	
25	ggawgkrcdy twdtmccwtg tat	23
27	<210> 166 <211> 23 <212> ADN	
29	<213> Bacillus thuringiensis	
31	<400> 166	
33	ggawgkacry tadtaccttg tat	23

1. Polinucleotidă izolată care codifică o proteină de fuziune care cuprinde o primă secvență de aminoacizi care codifică o polipeptidă de aproximativ 45 kDa și o a doua secvență de aminoacizi care codifică o polipeptidă de 15 kDa, în care polipeptidele menționate sunt toxice pentru dăunătorul, viermele rădăcinilor porumbului, care ingerează respectivele polipeptide, în care secvența de nucleotide care codifică prima secvență de aminoacizi hibridizează cu complementul unei secvențe de acizi nucleici selectată dintre SECV. ID. NR. 10, SECV ID Nr. 42 și SECV. ID NR. 45 și în care secvența de nucleotide care codifică a doua secvență de aminoacizi hibridizează, în prezența sau absența condițiilor stringente, cu complementul unei secvențe de acizi nucleici selectate dintre SECV. ID. NR. 31, SECV ID Nr. 40 și SECV. ID NR. 44. 1
2. Polinucleotidă izolată conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** aceasta codifică o proteină de fuziune care cuprinde o primă secvență de aminoacizi care codifică o polipeptidă de aproximativ 45 kDa și o a doua secvență de aminoacizi care codifică o polipeptidă de 15 kDa, în care polipeptidele menționate sunt toxice pentru dăunătorul, viermele rădăcinilor porumbului, care ingerează respectivele polipeptide, în care secvența de nucleotide care codifică prima secvență de aminoacizi hibridizează cu complementul unei secvențe de acizi nucleici selectată dintre SECV. ID. NR. 10, și în care secvența de nucleotide care codifică a doua secvență de aminoacizi hibridizează cu complementul unei secvențe de acid nucleic cu SECV. ID. NR. 31. 3
3. Polinucleotidă conform revendicării 1, în care polinucleotida menționată codifică o proteină de fuziune ce cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID. Nr. 159. 5
4. Polinucleotidă conform revendicării 1, care cuprinde un prim segment și un al doilea segment, în care primul segment care codifică prima secvență de aminoacizi și al doilea segment codifică al doilea segment de aminoacizi și în care al doilea segment este în poziție 5' față de primul segment. 7
5. Polinucleotidă conform revendicării 1, în care a doua secvență de aminoacizi este la capătul carboxi al respectivei proteine, iar prima secvență de aminoacizi este la capătul amino al respectivei proteinei. 9
6. Proteină de fuziune care cuprinde o primă secvență de aminoacizi care este secvența unei polipeptide aproximativ 45 kDa și o a doua secvență de aminoacizi este secvența unei polipeptide aproximativ 15 kDa, în care polipeptidele menționate sunt toxice pentru dăunătorul, viermele rădăcinilor porumbului, care ingerează respectivele polipeptide, în care secvența de nucleotide care codifică prima secvență de aminoacizi hibridizează, în prezența condițiilor stringente, cu complementul unei secvențe de acizi nucleici selectată dintre SECV. ID. NR. 10, SECV ID Nr. 37, SECV ID Nr. 42 și SECV. ID NR. 45 și în care secvența de nucleotide care codifică a doua secvență de aminoacizi hibridizează, în prezența condițiilor stringente, cu complementul unei secvențe de acizi nucleici selectate dintre SECV. ID. NR. 31, SECV ID Nr. 35, SECV ID Nr. 40 și SECV. ID NR. 44. 11
7. Proteină de fuziune, conform revendicării 6, care cuprinde o primă secvență de aminoacizi care este secvența unei polipeptide aproximativ 45 kDa și o a doua secvență de aminoacizi este secvența unei polipeptide aproximativ 15 kDa, în care polipeptidele menționate sunt toxice pentru dăunătorul, viermele rădăcinilor porumbului, care ingerează respectivele polipeptide, în care secvența de nucleotide care codifică prima secvență de aminoacizi hibridizează, în prezența condițiilor stringente, cu complementul unei secvențe de acid nucleic SECV. ID. NR. 10 și în care secvența de nucleotide care codifică a doua secvență de aminoacizi hibridizează, în prezența condițiilor stringente, cu complementul unei secvențe de acizi nucleici cu SECV. ID. NR. 31. 13

# RO 123431 B1

- 1           8. Proteină conform revendicării 6, în care proteina de fuziune menționată cuprinde  
secvența de aminoacizi din SECV. ID. Nr. 159.
- 3           9. Proteină conform revendicării 6, care cuprinde un prim segment și un al doilea  
5 segment, în care primul segment care codifică prima secvență de aminoacizi și al doilea  
segment care codifică al doilea segment de aminoacizi și în care al doilea segment este în  
7 poziție 5' față de primul segment.
- 7           10. Proteină conform revendicării 6, în care a doua secvență de aminoacizi este la  
capătul carboxi al respectivei proteine, iar prima secvență de aminoacizi este la capătul  
9 amino al respectivei proteinei.
- 11          11. Celulă gazdă transgenică care cuprinde polinucleotida definită în revendicarea  
1, în care respectiva celulă gazdă este selectată din grupul alcătuit dintr-o celulă de plantă  
și o celulă bacteriană.

(51) Int.Cl.  
 C07K 14/00 (2006.01),  
 A01N 33/00 (2006.01)

{149b145k} {167h245k} {80jj145k} Consensus	1 ..... ..... MLDTNKVYEI -----	.....GLYAA .....HAA SNLANGLYTS -----	TYLSLDDSGV TYLSLDDSGV TYLSLDDSGV TYLSLDDSGV	50 DDYNLKWFLF DDYNLKWFLF DDYNLKWFLF DDYNLKWFLF	SLMNKNDDDI SLMNKNDDDI SLMNKNDDDI SLMNKNDDDI	SLM-K-D-DI
{149b145k} {167h245k} {80jj145k} Consensus	51 PIDDDQYIIT PIDDNQYIIT PIDNNQYIIT PID--QYIIT	SYAANNCKVW SYAANNCKVW SYGANNCKVW SY-ANNCKVW	NVNNDKINVS NVNNDKINVS NVNNDKINVS NV-NDKINVS	100 WQIKANGSSY WQIKANASSY WQIKAKDSSY WQIKA--SSY	TYSSTNSIQK TYSSTNSIQK TYSSTNSVQK TYSSTNS-QK	TYSSTNS-QK
{149b145k} {167h245k} {80jj145k} Consensus	101 VIQSDNGKVL VIQSNNGKVL IIQSDNGKVL -IQS-NGKVL	TAGTGQALGL TAGTGQSLGL TAGVGQSLGI TAG-GQ-LG-	IRLTDESSNN IRLTDESPDN VRLTDEFPEN -RLTDE--N	150 QTIQLPQKPI QTIQLPQKPT QTIQLPQKPK QTIQLP-KP-	PNQQWNLTSV PNQQWNLTVP SNQQWNLTVP -NQQWNLT-V	-NQQWNLT-V
{149b145k} {167h245k} {80jj145k} Consensus	151 IDTKLKDYPK IDTKLKDYPK IDEKLDHPE ID-KLKD-P-	YSPTGNIDNG YSQTCNIDKG YSETGNINPK YS-TGNI---	TSPQLMGWTL TPPQLMGWTL TTPQLMGWTL T-PQLMGWTL	200 IDKNTQIKTT IDKNTQIKTT IDKNTQIKTT IDKNTQIKTT	VPCIMVNDPN IPCIMVNDPN VPCIMVNDSK -PCIMVND-	-PCIMVND-

Fig. 1A

(51) Int.Cl.  
 C07K 14/00 (2006.01),  
 A01N 33/00 (2006.01)

{149b145k}	201	PYYILKKYQY	WQRAVGSNVA	LRPHEKKSYSY	YEWGTEIDQK	250	TTIINTLGFQ
{167h245k}		PYYILKKYQY	WQAVGSNVA	LRPHEKKSVA	YEWGTEIDQK		TTIINTLGFQ
{80jj145k}		PYYIFKKYKY	WNLAKGSNVS	LLPHQKRSD	YEWGTEKNQK		TTIINTVGLQ
Consensus		PYYI-KKY-Y	W--A-GSNV-	L-PH-K-SY-	YEWGTE--QK		TTIINT-G-Q
{149b145k}	251	INIDSGMKFD	IPEVGGGTDE	IKTQLNEELK	IEYSHETKIM	300	EKY.....
{167h245k}		INIDSGMKFD	IPEVGGGTDE	IKTQLNEELK	IEYSRETKIM		EKY.....
{80jj145k}		INIDSGMKFE	VPEVGGGTED	IKTQLTEELK	VEYSTETKIM		TKYQEHSEID
Consensus		INIDSGMKF-	-PEVGGGT-	IKTQL-EELK	-EYS-ETKIM		-KY-----
{149b145k}	301	.....	.....	.....	.....	350	.....
{167h245k}		.....	.....	.....	.....		.....
{80jj145k}		NPTNQPMNSI	GLLIYTSLEL	YRYNGTEIKI	MDIETSDHDT		YTLTSYPNHK
Consensus		-----	-----	-----	-----		-----
{149b145k}	351	.....	.....	.....	.....	386	.....
{167h245k}		.....	.....	.....	.....		.....
{80jj145k}		EALLLLTNHS	YEEVEEITKI	PKHTLIKLKK	HYFKK		.....
Consensus		-----	-----	-----	-----		-----

Fig. 1B

(51) Int.Cl.  
C07K 14/00 (2006.01),  
A01N 33/00 (2006.01)

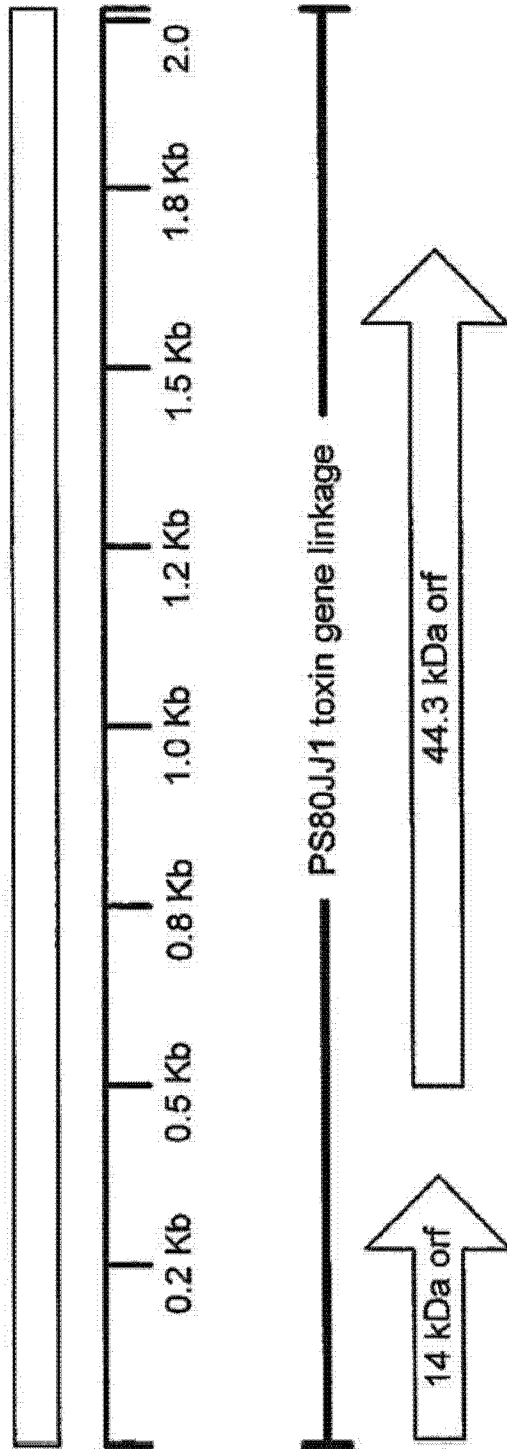


Fig. 2

(51) Int.Cl.  
C07K 14/00 (2006.01),  
A01N 33/00 (2006.01)

Compararea LC50-urilor

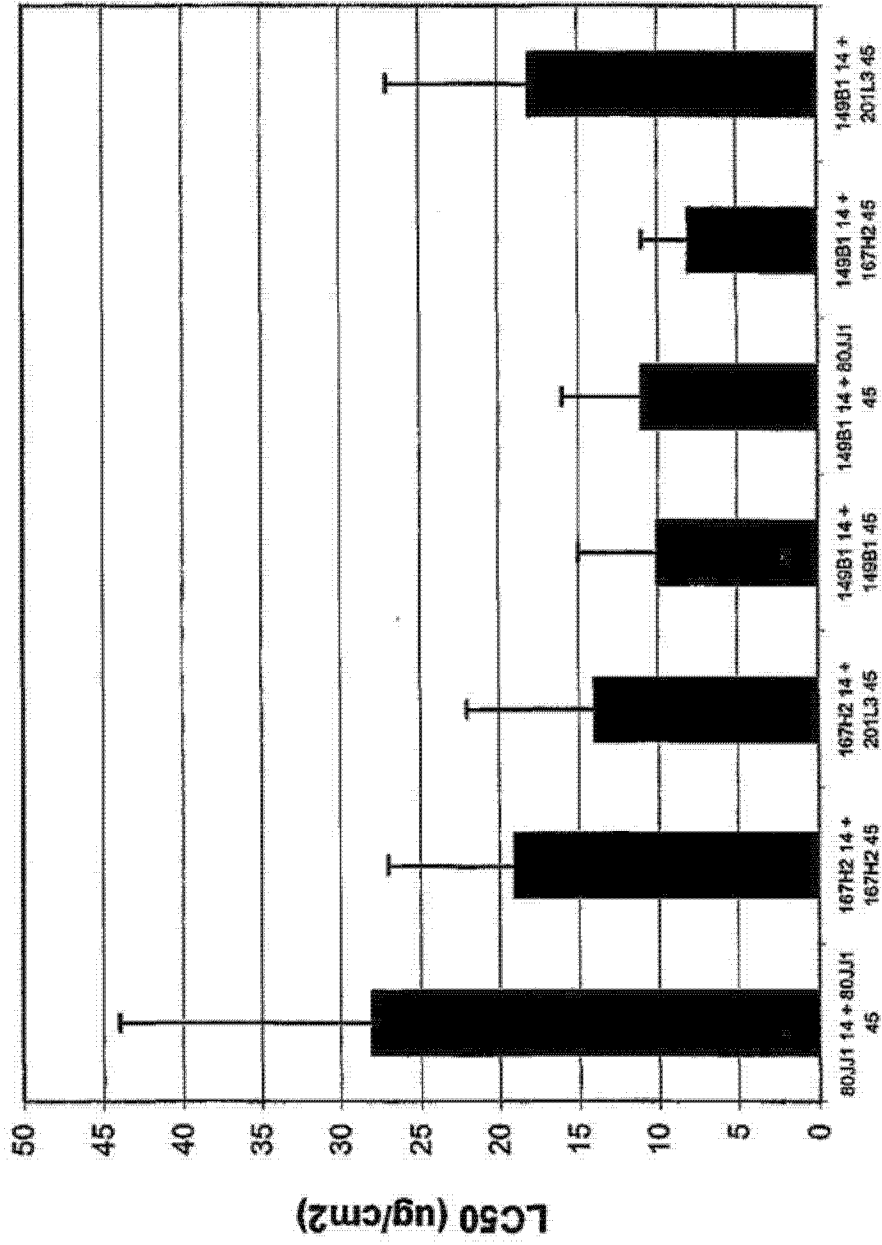


Fig. 3



(51) Int.Cl.  
C07K 14/00 (2006.01).  
A01N 33/00 (2006.01)

```

1
S07711 MCDSKDNSGV SEKCGKKFTN YPLNTTPTSI NYNLPEESKK FYNEKNKY..
S07712 ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ MRNDFI.S FIPTEGKY..
ps149b1-45 ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ MLDTNKVYEI

51
S07711 SRNGYGLSKT EFPSSIENCP AKEYSIMYD. .NKDPRFLI RFLIDDGRYI
S07712 ERVMDDEYNS EYFEGTHAPS APNGDIMTEI CSRENNQYFI FFPTDDGRVI
ps149b1-45 SNHANGLYAA TY.LSLDDSG VSLMKNKDDD IDDYNLKWFL .FPIDDDOYI

101
S07711 IADRDDGEVF DEAPIYLDNN NHPIISRHYT GEERQKFE.Q VGSGDYITGE
S07712 IANRHNGSVF .....TGE ATSVVSDIYT GSPLQFFR.E VKR....TME
ps149b1-45 IIS....YAA NNCKVWNVNN DKINVSTYSS TNSIQKWQIK ANGSSYVIOQ
---A---

151
S07711 QFFQFYTQNK TRVLSNCRAL DSRTILLSTA KIFPIYPPAS ETQLTAFV.N
S07712 TYY.LAIQNP ESA.TDVRAL EPHSHEL.PS RLY..YTNNI ENNSNILISN
ps149b1-45 DNGKVLTAGT GOALGLIRLT DESSNN.... .PNQQWNL TSVQTIQLPQ

201
S07711 S5FYAAAIPO LPQTSLENI PEPTSLDDSG VLPKDAVRAV KGSALLFCII
S07712 KEQIYLTLPF LPENEQYPKT PVLSGIDDIG ..PNQSEKSI IGSTLIFCIM
ps149b1-45 KPIIDTKLKD YPKYS..... ..PTGNIDNG TSPQ.....L MGWTLVFCIM
-----B-----

251
S07711 VHEPNLNNSD KMKFNTYYLL EYKEYWHOLW SQ .IIPAHQ TVKIQERTGI
S07712 VSE.FISLGE RMKTTPIYYV KHTQYWQSMW SA .LPPPGS KETKTEKSGI
ps149b1-45 VNEPNIDKNT QIKTTPIYIL KKYQYQORAV GS VALRPHE KKSYYTEWGT

301
S07711 SEVVQNSMIE DLNMYIGADE GMHBYLRSSG .....FKEQI TRGLNRPLSQ
S07712 TDTSQISMTD GINVSIGADE GLRFGNKTFG .....IKGGF TYDTKTQITN
ps149b1-45 EIDQKTTIIN TLGFOINIDS GMKEDIPEVG GGTDEIKTQL NEELKIEYSH
-----C-----

351
S07711 TTTQLGERVE EMEYNSNDL DVRYVKYALA REFTLKRNG EIVKN..WVA
S07712 TSQLLIETTY TREYTNTEF PVRYTGYVLA SEFTLHRSDG TQVNTIPWVA
ps149b1-45 ETRIMEKYQE QSEIDNPTDQ SMNSIGFLTI TSLELYRYNG SEIRIMQIOT
-----D-----

401
S07711 VDYRLAGIOS YENAPITNPL TLTK..HTII RCENSYDGIH FKPLIFKNG
S07712 LNDNYTTIAR YEHFVASEPE LGNT..KIIT DDQN~~~~~
ps149b1-45 SDNDTYNVTS YPNHQALLL LTNHSYEEVE EITNIPKSTL KKLKYYF~~

451 466
S07711 EVIVKTNEEL IPKINQ
S07712 ~~~~~~ ~~~~~~
ps149b1-45 ~~~~~~ ~~~~~~

```

Fig. 4

# RO 123431 B1

(51) Int.Cl.  
**C07K 14/00** (2006.01),  
**A01N 33/00** (2006.01)

```

51                                                    100
  x14964 ~~~~~~ .....ATG AGAAATTTGG
  x14964-2 ATTTACTAAT TACCCGCTAA ATACTACTCC TACAAGCCTA AATTATAACC
  psl149b1-45 ~~~~~~ .....

101                                                    150
  x14964 ATTTTATTGA TTCTTTTATA CCCACAGAAG GAAAGTACAT TCGCGTTATG
  x14964-2 TTCCAGAAAT ATCAAAAAAA TTTTATAACC TTAAGAATAA ATATTCACGG
  psl149b1-45 ~~~~~~ ~-ATGTTAGAT ACTAATAAAG TTTATGAAAT AAGCAATCAT

151                                                    200
  x14964 GATTTTATA ATAGCGAGTA TCCTTCTGT ATACATGCAC CCTCAGCCCC
  x14964-2 AATGGTTATG GTTTATCAA AACCGAATTT CCTTCAAGTA TCGAAAATTG
  psl149b1-45 GCTAATGGAC TATATGCAGC AACTTATTTA AGTTTAGATG ATTCAGGTGT

201                                                    250
  x14964 TAATGGGGAT ATCATGACAG AAATCTGTAG CAGAGAAAAT AATCAATATT
  x14964-2 CCCAGCTAAA GAATATTCAA TAATGTATGA TAATAAAGAT CCTCGATTCT
  psl149b1-45 TAGTTTAATG AATAAAAATG ATGATGATAT TGATGATTAT AACTTAAAAT

251                                                    300
  x14964 TTATTTTATT TCCTACTGAT GATGGTCGAG TAATTATTGC AAATAGGCAT
  x14964-2 TGATTCGGTT TTTATTAGAT GATGGTAGAT ATATTATTGC AGATAGAGAC
  psl149b1-45 GGTTTTTATT TCCTATTGAT GATGATCAAT ATATTATTAC AAGCTATGCA
                                     GAT GATGrTmrAk wwATTATTc A
                                     GAT GATGrTmrAT ATATTATTc A
45kd5': GAT RATRATCAAT ATATTATTAC

301                                                    350
  x14964 AATGGGTCCG TTTTACCAGG AGAAGCCACA AGTGTAGTAT CAGATATCTA
  x14964-2 GATGGAGAAG TTTTGTATGA AGCACCTATT TATTTGGATA ATAACAATCA
  psl149b1-45 GCAAATAATT GTAAAGTTTG GAATGTTAAT AATGATAAAA TAAATGTTTC

351                                                    400
  x14964 T.....ACT
  x14964-2 CCCTATCATA AGTAGACATT ATACCGGAGA AGAGAGACAA AAGTTTGAGC
  psl149b1-45 G.....

401                                                    450
  x14964 GGTAGCCCAT TACAGTTTTT TAGAGAGGTC AAAAGAACTA TGGAAACTTA
  x14964-2 AGGTAGGTAG TGGAGATTAT ATTACGGGAG AGCAATTTTT TCAATTCTAT
  psl149b1-45 .....ACT TATTCTTCAA CAAATTCAAT ACAAATGG

451                                                    500
  x14964 TTATTTAGCG ATACAAAATC CTGAATCCGC AACAGATGTG AGAGCTCTAG
  x14964-2 ACACAAAACA AAACACGTGT ATTGTCAAAT TGTAGGGCGC TTGACAGTAG
  psl149b1-45 CAAATAAAG CTAATGGTTC TTCATATGTA ATACAAAGTG ATAATGGAAA

```

Fig. 5A

(51) Int.Cl.  
 C07K 14/00 (2006.01),  
 A01N 33/00 (2006.01)

	501		550
x14964	AACCGCATT	CCATGAGCTG	CCATCTCGCC
x14964-2	GACAATATTA	CTATCTACTG	CAAAAATCTT
ps149b1-45	AGTCTTAACA	GCAGGAACCG	GTCAGCTCT
			TGGATTGATA
			CGTTTAACTG
	551		600
x14964	GAAAATAATA	GCAACATATT	AATTTCTAAT
x14964-2	CTGAAACTCA	ACTA.ACAGC	TTTCGTTAAT
ps149b1-45	ATGAATCCTC	AAATAATCCC	AATCAACAAT
			GGAATTTAAC
			TTCTGTACAA
	601		650
x14964	ACCTTGCCCTT	CACTTCCAGA	AAACGAGCAA
x14964-2	GCAATTCCCTC	AATTACCCCA	AACATCCTTA
ps149b1-45	ACAATTTCAAC	TTCCACAAAA	ACCTATAATA
			GATACAAAAT
			TAAAAGATTA
	651		700
x14964	AAGCGGTATC	GATGAT....	..ATAGGACC
x14964-2	TACTAGTCTC	GATGATTCTG	GAGTATTACC
ps149b1-45	TCCCAAATAT	TCACCAACTG	GAAATATAGA
			TAATGGAACA
			TCTCCTCAAT
	701		750
x14964	TAATAGGAAG	TACTCTTATC	CCATGTATAA
x14964-2	TTAAAGGAAG	TGCGCTATTA	CCTTGTATAA
ps149b1-45	TAATGGGATG	GACATTAGTA	CCTTGTATTA
			TGGTAAATGA
			TCCAAATATA
			GGAwG
			krCdyTwdTm
			CCwTGTATwA
			TrGTwhmkGA
			T
			GGAwG
			kACwyTwrTm
			CCwTGTATwA
			TGGTwwmkGA
			T
			GGAwG
			krCryTAdTA
			CCTTGTATwA
			TrGTAmATGA
			T
			GGAwG
			kACryTAdTA
			CCTTGTATwA
			TGGTAmATGA
			T
			GGATG
			GACATTAYTA
			CCTTG: 45kD3'rc:
	751		800
x14964	AGTTTGGGGG	AGAGAATGAA	AACCACTCCA
x14964-2	AACAATCCG	ATAAAATGAA	ATTTAATACC
ps149b1-45	GATAAAAATA	CTCAAATTA	AACCACTCCA
			TATTATATTT
			TAAAAAATA
	801		850
x14964	TCAATATTGG	CAAAGCATGT	GGTCCGCGCT
x14964-2	AGAATACTGG	CATCAATTAT	GGTCACAAAT
ps149b1-45	TCAATATTGG	CAACGAGCAG	TAGGAAGTAA
			TGTAGCTTTA
			CGTCCACATG
	851		900
x14964	AGACAAAAC	TGAGAAATCA	GGTATCACTG
x14964-2	TAAAAATACA	GGAACGAACA	GGAATATCTG
ps149b1-45	AAAAAAATC	ATA.TACTTA	TGAATGGGGC
			ACAGAAATAG
			ATCAAAAAC
	901		950
x14964	ACTGACGGGA	TTAATGTTTC	AATCGGAGCA
x14964-2	ATTGAAGATT	TAAATATGTA	TATTGGAGCA
ps149b1-45	AACAATTATA	AATACAATTAG	GATTTCAAAT
			CAATATAGAT
			TCAGGAATGA

Fig. 5B

(51) Int.Cl.

C07K 14/00 (2006.01),

A01N 33/00 (2006.01)

	951		1000
x14964	AAATAAAACG	TTTGGAAATTA	AGGGGGGGT CACCTATGAT
x14964-2	TTTGAGATCT	AGCGGATTTA	AGGAACAAAT AACAGGGGG
ps149b1-45	AATTTGATAT	ACCAGAAGTA	GGTGGAGGTA CAGATGAAAT
			AAAAACACAA
	1001		1050
x14964	AAATAACTAA	TACCTCCCAA	TTGTTA.ATA GAAACAACCTT
x14964-2	CTTTATCCCA	AACGACCACT	CAGTTA.GGA GAAAGAGTAG
ps149b1-45	CTAAATGAAG	AATTA AAAAT	AGAATATAGT CATGAAACTA
			AAATAATGGA
	1051		1100
x14964	ATACACAAAT	ACAGAAAATT	TTCCTGTTAG ATATACAGGC
x14964-2	GTATTATAAT	TCTAATGATT	TGGATGTTAG ATATGTGAAA
ps149b1-45	AAAATATCAA	GAACAATCTG	AAATAGATAA TCCAACGTAT
			CAATCAATGA
	1101		1150
x14964	CGTCAGAATT	TACTTTACAT	CGTAGTGATG GAACTCAGGT
x14964-2	CTAGAGAATT	CACACTAAAA	CGCGTTAATG GTGAAATTGT
ps149b1-45	ATTCTATAGG	ATTTCTTACT	ATTACTTCCT TAGAATTATA
			TAGATATAAT
	1151		1200
x14964	CCATGGGTTG	CTTTAAACGA	TAACATACAA ACAATAGCAA
x14964-2	GTTGCTGTAG	ATTATCGATT	GGCAGGTATA CAATCGTATC
ps149b1-45	GGCTCAGAAA	TTCGTATAAT	GCAAATTCAA ACCTCAGATA
			ATGATACTTA
	1201		1250
x14964	TTTTGCAAGT	GAACCTTTAC	TAGGAAATAC AAAGATTATT
x14964-2	TATAACTAAT	CCACTTACGC	TAACAAAACA TACAATTATT
ps149b1-45	TAATGTTACT	TCTTATCCAA	ATCATCAACA AGCTTTATTA
			CTTCTTACAA
	1251		1300
x14964	AAAACATAA	~~~~~	~~~~~
x14964-2	ATAGTTACGA	TGGACACATA	TTTAAAACAC
ps149b1-45	ATCATTCCATA	TGAAGAAGTA	GAAGAAATAA
			CAAATATTCC
			TAAAAGTACA
	1301		1350
x14964	~~~~~	~~~~~	~~~~~
x14964-2	GAAGTTATTG	TAAAACGAA	TGAAGAATTA
ps149b1-45	CTAAAAAAT	TAAAAAATA	TTATTTTAA
			~~~~~
			~~~~~
	1351		
x14964	~		
x14964-2	A		
ps149b1-45	~		

Fig. 5C



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM  
 Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci  
 sub comanda nr. 205/2012