



- (12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
(51)⁷ A01H 1/00; C07K 15/82; C07K 1/107; (13) B
C07K 14/325; A01H 5/10; A01N 37/18



1-0044720

-
- (21) 1-2019-02303 (22) 09/10/2017
(86) PCT/US2017/055731 09/10/2017 (87) WO2018/071324 19/04/2018
(30) 62/406,082 10/10/2016 US
(45) 25/04/2025 445 (43) 25/07/2019 376A
(71) MONSANTO TECHNOLOGY LLC (US)
800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, MO 63167, United States of America
(72) BOWEN, David, J. (US); CHAY, Catherine, A. (US); HOWE, Arlene, R. (US);
KESANAPALLI, Uma (US).
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)
-

- (54) PHÂN TỬ AXIT NUCLEIC TÁI TỔ HỢP MÃ HÓA PROTEIN DIỆT VẬT GÂY
HẠI, CHẾ PHẨM ỨC CHẾ CÔN TRÙNG VÀ PHƯƠNG PHÁP PHÒNG TRỪ SỰ
PHÁ HOẠI CỦA VẬT GÂY HẠI HOẶC LOÀI GÂY HẠI LEPIDOPTERAN

(21) 1-2019-02303

(57) Các protein diệt vật gây hại có tác dụng gây độc chống lại loài gây hại Lepidopteran được mô tả, và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613, và TIC2613PL. Các cấu trúc ADN được đề xuất chứa trình tự axit nucleic tái tổ hợp mã hóa một hoặc nhiều protein diệt vật gây hại đã mô tả. Thực vật chuyển gen, tế bào thực vật, hạt và các bộ phận của thực vật kháng lại sự gây hại của Lepidopteran được đề xuất chứa trình tự axit nucleic tái tổ hợp mã hóa protein diệt vật gây hại theo sáng chế. Quy trình phát hiện sự có mặt của các trình tự axit nucleic tái tổ hợp hoặc các protein theo sáng chế trong mẫu sinh học, và các quy trình kiểm soát các loài gây hại Lepidopteran bằng cách sử dụng bất kỳ trong số các protein diệt vật gây hại TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613, và TIC2613PL cũng được đề xuất.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập chung đến lĩnh vực protein ức chế côn trùng. Lớp protein mới thể hiện tác dụng ức chế côn trùng chống lại các loài vật gây hại gây hại cho cây trồng và hạt giống trong nông nghiệp được mô tả. Cụ thể là, lớp protein được mô tả có tác dụng diệt vật gây hại chống lại các loài vật gây hại gây hại cho cây trồng và hạt giống trong nông nghiệp, cụ thể là loài Lepidopteran trong số các côn trùng gây hại. Các cây trồng, các bộ phận của cây trồng và hạt giống chứa cấu trúc polynucleotit tái tổ hợp mã hóa một hoặc nhiều protein độc tố đã mô tả được đề xuất.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Việc cải thiện năng suất thu hoạch từ các cây trồng có ý nghĩa đối với nông nghiệp bao gồm, không kể các loại cây trồng khác, ngô, đậu tương, mía, lúa, lúa mỳ, rau và bông đã trở nên ngày càng quan trọng. Ngoài nhu cầu ngày càng tăng về các sản phẩm nông nghiệp để ăn, mặc, và cung cấp năng lượng cho dân số loài người ngày càng tăng, các tác động liên quan đến khí hậu và áp lực sử dụng đất hơn là thực hành nông nghiệp do dân số ngày càng tăng được dự đoán là làm giảm lượng đất trồng trọt sẵn có cho nông nghiệp. Các yếu tố này đã dẫn đến dự báo u ám về an ninh lương thực, đặc biệt là khi không có các cải tiến về công nghệ sinh học thực vật và thực hành nông nghiệp. Do các áp lực này, các cải tiến bền vững môi trường trong công nghệ, kỹ thuật nông nghiệp, và quản lý vật gây hại là công cụ quan trọng để mở rộng việc trồng trọt trên một lượng đất trồng hạn chế sẵn có cho nông nghiệp.

Côn trùng, cụ thể là côn trùng thuộc bộ Lepidoptera và Coleoptera, được xem là nguyên nhân chính gây hại cho mùa màng, do đó làm giảm năng suất cây trồng trên diện tích bị phá hoại. Loài vật gây hại Lepidopteran gây tác động tiêu cực đến nông nghiệp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, sâu xanh da láng ở cây củ cải đường (*Spodoptera exigua*), sâu đục bắp trên cây ngô (*Helicoverpa zea*), sâu lá bông (*Alabama argillacea*), sâu đục thân bắp Châu Âu (*Ostrinia nubilalis*), sâu xanh mùa thu (*Spodoptera frugiperda*), sâu đục quả Old World (*Helicoverpa armigera*), sâu lá Oriental (*Spodoptera litura*), sâu hồng hại bông (*Pectinophora gossypiella*), sâu hồng hại bông kháng Cry1Ac (*Pectinophora gossypiella*), sâu đo đậu tương (*Chrysodeixis includens*), sâu xanh Miền Nam (*Spodoptera*

eridania), sâu đục thân ngô Tây Nam (*Diatraea grandiosella*), sâu đốm đục quả (*Earias vittella*), sâu đục thân mía (*Diatraea saccharalis*), sâu đục chồi cây Thuộc lá (*Heliothis virescens*), và sâu bướm cây đậu mèo rừng (*Anticarsia gemmatilis*).

Về mặt lịch sử, việc sử dụng mạnh mẽ thuốc trừ sâu hóa học tổng hợp dựa vào chất kiểm soát vật gây hại trong nông nghiệp. Mỗi quan tâm đến môi trường và sức khỏe con người, cộng với các vấn đề kháng thuốc đang nổi lên, đã thúc đẩy việc nghiên cứu và phát triển thuốc trừ sâu sinh học. Nỗ lực nghiên cứu này dẫn đến việc phát hiện và sử dụng ngày càng nhiều các loài vi sinh vật ký sinh gây bệnh cho côn trùng khác nhau, bao gồm vi khuẩn.

Mô hình kiểm soát sinh học thay đổi khi hiệu quả của vi khuẩn ký sinh gây bệnh cho côn trùng, cụ thể là vi khuẩn thuộc chi *Bacillus*, đã được phát hiện ra và phát triển làm chất kiểm soát vật gây hại sinh học. Các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) đã được sử dụng làm nguồn protein diệt vật gây hại vì đã phát hiện ra là chủng *Bt* thể hiện độc tính cao chống lại các côn trùng cụ thể. Các chủng *Bt* đã được biết là sản sinh ra nội độc tố delta mà được khu trú trong thể vùi protein kết tinh quanh bào tử ở giai đoạn bắt đầu của sự hình thành bào tử và trong suốt pha sinh trưởng ổn định (ví dụ., các protein Cry), và còn được biết là sinh ra protein diệt vật gây hại được tiết ra. Khi được tiêu hóa bởi côn trùng nhạy cảm, các nội độc tố delta cũng như các độc tố được tiết ra gây ra tác dụng của chúng ở bề mặt của biểu mô trung tràng, phá vỡ màng tế bào, dẫn đến phá vỡ tế bào và chết. Các gen mã hóa các protein diệt vật gây hại cũng đã được nhận diện ở các loài vi khuẩn khác *Bt*, bao gồm *Bacillus* khác và nhiều loài vi khuẩn khác nhau, như *Brevibacillus laterosporus*, *Lysinibacillus sphaericus* ("Ls" trước đây được gọi là *Bacillus sphaericus*) và *Paenibacillus popilliae*.

Độc tố trừ sâu tinh thể và các độc tố trừ sâu hòa tan được tiết ra là đặc hiệu cao đối với vật chủ của chúng và đã được chấp nhận trên toàn thế giới là chất thay thế cho thuốc trừ sâu hóa học. Ví dụ, các protein độc tố trừ sâu đã được sử dụng cho nhiều ứng dụng trong nông nghiệp khác nhau để bảo vệ các cây trồng quan trọng đối với nông nghiệp khỏi sự phá hoại của côn trùng, làm giảm nhu cầu về các ứng dụng trừ sâu hóa học, và làm tăng năng suất. Các protein độc tố trừ sâu được sử dụng để kiểm soát vật gây hại phá hoại cây trồng trong nông nghiệp bằng các quy trình cơ học, như phun để phân tán các chế phẩm vi sinh vật chứa các chủng vi khuẩn khác nhau lên bề mặt cây trồng, và bằng cách sử dụng

các kỹ thuật biến nạp di truyền để tạo ra các thực vật và hạt giống chuyển gen biểu hiện protein độc tố trừ sâu.

Việc sử dụng các thực vật chuyển gen biểu hiện các protein độc tố trừ sâu đã được làm cho phù hợp trên toàn cầu. Ví dụ, vào năm 2012, 26,1 triệu hecta được trồng với các cây trồng chuyển gen biểu hiện độc tố *Bt* (James, C., Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops:2012. ISAAA Brief No. 44). Việc sử dụng toàn cầu cây trồng chuyển gen được bảo vệ khỏi côn trùng và số lượng giới hạn các protein độc tố trừ sâu được sử dụng trong các cây trồng này đã tạo ra áp lực chọn lọc đối với các alen côn trùng đang tồn tại mà gây ra tính kháng đối với các protein diệt vật gây hại đang được sử dụng hiện nay.

Sự phát triển tính kháng ở vật gây hại đích đối với các protein độc tố trừ sâu tạo ra nhu cầu liên tục về việc tìm ra và phát triển các dạng mới của protein độc tố trừ sâu mà hữu ích để quản lý sự gia tăng tính kháng của côn trùng với các cây trồng chuyển gen biểu hiện protein độc tố trừ sâu. Các độc tố protein mới có tác dụng cải thiện và thể hiện tác dụng kiểm soát trên một phổ rộng hơn các loài côn trùng nhạy cảm sẽ làm giảm số lượng côn trùng sống sót mà có thể phát triển các alen kháng. Ngoài ra, việc sử dụng trong cùng một cây trồng hai hoặc nhiều protein độc tố trừ sâu chuyển gen gây độc với cùng một loài sâu bọ và thể hiện các cơ chế tác dụng khác nhau làm giảm khả năng kháng ở các loài côn trùng đích đơn lẻ bất kỳ.

Do đó, tác giả sáng chế mô tả ở đây họ độc tố protein mới từ *Bacillus thuringiensis*, cùng với các protein độc tố tương tự, các protein biến thể, và các protein tái tổ hợp điển hình mà thể hiện tác dụng diệt vật gây hại chống lại loài đích Lepidopteran, cụ thể là chống lại sâu xanh da láng (*Spodoptera exigua*), sâu đục bắp trên cây ngô (*Helicoverpa zea*), sâu lá bông (*Alabama argillacea*), sâu đục thân bắp Châu Âu (*Ostrinia nubilalis*), sâu xanh mùa thu (*Spodoptera frugiperda*), sâu đục quả Old World (*Helicoverpa armigera*), sâu lá Oriental (*Spodoptera litura*), sâu hồng hại bông (*Pectinophora gossypiella*), sâu hồng hại bông kháng Cry1Ac (*Pectinophora gossypiella*), sâu đo đậu tương (*Chrysodeixis includens*), sâu xanh Miền Nam (*Spodoptera eridania*), sâu đục thân ngô Tây Nam (*Diatraea grandiosella*), sâu đốm đục quả (*Earias vittella*), sâu đục thân mía (*Diatraea saccharalis*), sâu đục chồi cây Thuộc lá (*Heliothis virescens*), và sâu bướm cây đậu mèo rừng (*Anticarsia gemmatilis*).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Được mô tả ở đây là nhóm các protein diệt vật gây hại mới có tác dụng ức chế côn trùng (protein độc tố), được gọi ở đây là TIC4472, TIC1425, và TIC2613 thuộc lớp độc tố protein TIC4472, được chỉ ra là thể hiện tác dụng ức chế chống lại một hoặc nhiều vật gây hại cây trồng. Protein TIC4472 và các protein trong lớp độc tố protein TIC4472 có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp với các protein diệt vật gây hại khác và các chất độc khác trong các chế phẩm và *in planta*, do đó cung cấp giải pháp thay thế cho các protein diệt vật gây hại và các hóa chất trừ sâu đang được sử dụng hiện nay trong hệ thống nông nghiệp.

Theo một phương án, được mô tả trong sáng chế là phân tử axit nucleic tái tổ hợp chứa đoạn trình tự khởi động khác loại được liên kết hoạt động với đoạn polynucleotit mã hóa protein diệt vật gây hại hoặc một đoạn của nó, trong đó (a) protein diệt vật gây hại này chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, hoặc SEQ ID NO:6; hoặc (b) protein diệt vật gây hại này chứa trình tự axit amin có: (i) tỷ lệ đồng nhất trình tự axit amin ít nhất là 93%, hoặc 95%, hoặc 98%, hoặc 99%, hoặc khoảng 100% với SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, hoặc SEQ ID NO:6; hoặc (ii) tỷ lệ đồng nhất trình tự axit amin ít nhất là 73%, hoặc 75%, hoặc 80%, hoặc 85%, hoặc 90%, hoặc 95%, hoặc khoảng 100% với SEQ ID NO:8 hoặc SEQ ID NO:10; hoặc (c) đoạn polynucleotit này lai với polynucleotit có trình tự nucleotit của SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, hoặc SEQ ID NO:9; hoặc (d) đoạn polynucleotit mã hóa protein diệt vật gây hại hoặc một đoạn của nó chứa trình tự polynucleotit có tỷ lệ đồng nhất trình tự ít nhất là 65%, hoặc 70%, hoặc 75%, hoặc 80%, hoặc 85%, hoặc 90%, hoặc 95%, hoặc 98%, hoặc 99%, hoặc khoảng 100% với trình tự nucleotit của SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, hoặc SEQ ID NO:9; hoặc (e) phân tử axit nucleic tái tổ hợp nằm trong môi liên kết hoạt động với vectơ, và vectơ này được chọn từ nhóm bao gồm plasmit, phagemid, bacmid, cosmid, và nhiễm sắc thể nhân tạo vi khuẩn hoặc nấm men. Phân tử axit nucleic tái tổ hợp này có thể chứa trình tự có chức năng biểu hiện protein diệt vật gây hại ở thực vật; hoặc được biểu hiện trong tế bào thực vật để sinh ra lượng có tác dụng diệt vật gây hại của protein diệt loài gây hại.

Trong một phương án khác của sáng chế, các tế bào chủ chứa phân tử axit nucleic tái tổ hợp theo sáng chế được đề xuất, trong đó các tế bào chủ này được chọn từ nhóm bao gồm tế bào vi khuẩn và thực vật. Các tế bào chủ vi khuẩn được đề xuất bao gồm

Agrobacterium, *Rhizobium*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Pantoec*, và *Erwinia*. Trong một số phương án, loài *Bacillus* này là *Bacillus cereus* hoặc *Bacillus thuringiensis*, *Brevibacillus* là *Brevibacillus laterosperous*, hoặc *Escherichia* là *Escherichia coli*. Các tế bào chủ thực vật được đề xuất bao gồm tế bào thực vật hai lá mầm và tế bào thực vật một lá mầm. Các tế bào thực vật được đề xuất bao gồm thêm tế bào cây cỏ linh lăng, chuối, lúa mạch, đậu, bông cải xanh, bắp cải, cải, cà rốt, sắn, thầu dầu, bông cải trắng, cần tây, đậu gà, cải thảo, cam, dừa, cà phê, ngô, cỏ ba lá, bông (*Gossypium* sp.), bầu bí, dưa chuột, gỗ linh sam, cà tím, bạch đàn, cây lanh, tỏi, nho, cây hublông, tỏi tây, rau diếp, thông trầm hương, kê, quả dưa, quả hạch, yến mạch, oliu, hành tây, cây cảnh, cò, cỏ, đậu Hà Lan, củ lạc, cây ớt, đậu triều, thông, khoai tây, bạch dương, bí đỏ, thông Radiata, củ cải, hạt cải dầu, lúa, cây thân rễ, lúa mạch đen, hồng hoa, cây bụi, cây cao lương, thông phương Nam, đậu tương, rau chân vịt, quả bí, dâu tây, củ cải đường, mía, hoa hướng dương, ngô ngọt, gỗ gôm, khoai lang, cỏ kê Mỹ, chè, thuốc lá, cà chua, tiểu hắc mạch, cỏ, dưa hấu, và lúa mì.

Trong một phương án khác, protein diệt vật gây hại thể hiện tác dụng chống côn trùng Lepidopteran, bao gồm sâu xanh da láng (*Spodoptera exigua*), sâu đục bắp trên cây ngô (*Helicoverpa zea*), sâu lá bông (*Alabama argillacea*), sâu đục thân bắp Châu Âu (*Ostrinia nubilalis*), sâu xanh mùa thu (*Spodoptera frugiperda*), sâu đục quả Old World (*Helicoverpa armigera*), sâu lá Oriental (*Spodoptera litura*), sâu hồng hại bông (*Pectinophora gossypiella*), sâu hồng hại bông kháng Cry1Ac (*Pectinophora gossypiella*), sâu đo đậu tương (*Chrysodeixis includens*), sâu xanh Miền Nam (*Spodoptera eridania*), sâu đục thân ngô Tây Nam (*Diatraea grandiosella*), sâu đốm đục quả (*Earias vittella*), sâu đục thân mía (*Diatraea saccharalis*), sâu đục chồi cây Thuốc lá (*Heliothis virescens*), và sâu bướm cây đậu mèo rừng (*Anticarsia gemmatilis*).

Cũng được đề xuất trong sáng chế là các thực vật chứa phân tử axit nucleic tái tổ hợp chứa đoạn trình tự khởi động khác loại liên kết hoạt động với đoạn polynucleotit mã hóa protein diệt vật gây hại hoặc một đoạn của nó, trong đó: (a) protein diệt vật gây hại này chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, hoặc SEQ ID NO:6; hoặc (b) protein diệt vật gây hại này chứa trình tự axit amin có: (i) tỷ lệ đồng nhất trình tự axit amin ít nhất là 93%, hoặc 95%, hoặc 98%, hoặc 99%, hoặc khoảng 100% với SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, hoặc SEQ ID NO:6; hoặc (ii) tỷ lệ đồng nhất trình tự axit amin ít nhất là 73%, hoặc 75%, hoặc 80%, hoặc 85%, hoặc 90%, hoặc 95%, hoặc khoảng 100%

với SEQ ID NO:8 hoặc SEQ ID NO:10; hoặc (c) đoạn polynucleotit này lai trong các điều kiện lai nghiêm ngặt với phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID NO:3 hoặc SEQ ID NO:9; hoặc (d) thực vật này thể hiện lượng phát hiện được của protein diệt vật gây hại này. Trong một số phương án, protein diệt vật gây hại này chứa SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, hoặc SEQ ID NO:10. Trong một phương án, thực vật này là cây hai lá mầm hoặc cây một lá mầm. Trong một phương án khác, thực vật này được chọn thêm từ nhóm bao gồm cỏ linh lăng, chuối, lúa mạch, đậu, bông cải xanh, bắp cải, cải, cà rốt, sắn, thầu dầu, bông cải trắng, cần tây, đậu gà, cải thảo, cam, dưa, cà phê, ngô, cỏ ba lá, bông, bầu bí, dưa chuột, gỗ linh sam, cà tím, bạch đàn, cây lanh, tỏi, nho, cây hublông, tỏi tây, rau diếp, thông trăm hương, kê, quả dưa, quả hạch, yến mạch, oliu, hành tây, cây cảnh, cò, cỏ, đậu Hà Lan, củ lạc, cây ớt, đậu triều, thông, khoai tây, bạch dương, bí đỏ, thông Radiata, củ cải, hạt cải dầu, lúa, cây thân rễ, lúa mạch đen, hồng hoa, cây bụi, cây cao lương, thông phương Nam, đậu tương, rau chân vịt, quả bí, dâu tây, củ cải đường, mía, hoa hướng dương, ngô ngọt, gỗ gôm, khoai lang, cỏ kê Mỹ, chè, thuốc lá, cà chua, tiểu hắc mạch, cỏ, dưa hấu, và lúa mì.

Trong các phương án khác, các hạt chứa các phân tử axit nucleic tái tổ hợp được mô tả.

Trong một phương án khác, chế phẩm ức chế côn trùng chứa các phân tử axit nucleic tái tổ hợp đã mô tả trong sáng chế được đề xuất. Chế phẩm ức chế côn trùng này có thể chứa thêm trình tự nucleotit mã hóa ít nhất một chất trừ sâu khác mà khác với protein diệt vật gây hại này. Trong một số phương án, ít nhất một chất trừ sâu khác được chọn từ nhóm bao gồm protein ức chế côn trùng, phân tử dsARN ức chế côn trùng, và protein phụ trợ. Cũng được đề xuất là ít nhất một chất trừ sâu khác trong chế phẩm ức chế côn trùng thể hiện tác dụng kháng lại một hoặc nhiều loài vật gây hại thuộc bộ Lepidoptera, Coleoptera, hoặc Hemiptera. Ít nhất một chất trừ sâu khác trong chế phẩm ức chế côn trùng nằm trong một phương án được chọn từ nhóm bao gồm Cry1A, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1A.105, Cry1Ae, Cry1B, Cry1C, biến thể Cry1C, Cry1D, Cry1E, Cry1F, thể khảm Cry1A/F, Cry1G, Cry1H, Cry1I, Cry1J, Cry1K, Cry1L, Cry2A, Cry2Ab, Cry2Ae, Cry3, các biến thể Cry3A, Cry3B, Cry4B, Cry6, Cry7, Cry8, Cry9, Cry15, Cry34, Cry35, Cry43A, Cry43B, Cry51Aa1, ET29, ET33, ET34, ET35, ET66, ET70, TIC400, TIC407, TIC417, TIC431, TIC800, TIC807, TIC834, TIC853, TIC900, TIC901, TIC1201, TIC1415, TIC2160, TIC3131, TIC836, TIC860, TIC867, TIC869, TIC1100, VIP3A, VIP3B, VIP3Ab, AXMI-

AXMI-, AXMI-88, AXMI-97, AXMI-102, AXMI-112, AXMI-117, AXMI-100, AXMI-115, AXMI-113, và AXMI-005, AXMI134, AXMI-150, AXMI-171, AXMI-184, AXMI-196, AXMI-204, AXMI-207, AXMI-209, AXMI-205, AXMI-218, AXMI-220, AXMI-221z, AXMI-222z, AXMI-223z, AXMI-224z và AXMI-225z, AXMI-238, AXMI-270, AXMI-279, AXMI-345, AXMI-335, AXMI-R1 và các biến thể của nó, IP3 và các biến thể của nó, DIG-3, DIG-5, DIG-10, DIG-657 và protein DIG-11.

Các thương phẩm chứa lượng phát hiện được của các phân tử axit nucleic tái tổ hợp đã mô tả trong sáng chế cũng được đề xuất. Các thương phẩm này bao gồm ngô thương phẩm được đóng gói bằng máy xử lý hạt, bông ngô, bánh ngô, bột ngô, bột ngô xay thô, xirô ngô, dầu ngô, thức ăn sẵn cho gia súc chứa ngô, tinh bột ngô, ngũ cốc chứa ngô, và các sản phẩm tương tự, và đậu tương tương ứng, lúa, lúa mỳ, cây cao lương, đậu triều, củ lạc, trái cây, quả dưa, và các sản phẩm rau thương phẩm bao gồm, nếu có thể, nước ép, dịch cô đặc, mứt, thạch, mứt cam, và các dạng ăn được khác của các thương phẩm này chứa lượng phát hiện được của các polynucleotit này và hoặc polypeptit theo sáng chế này, hạt bông nguyên chất hoặc đã xử lý, dầu bông, xơ vải, hạt và các bộ phận của cây trồng được xử lý để làm thực phẩm hoặc thức ăn cho gia súc, sợi, giấy, sinh khối, và các sản phẩm nhiên liệu như nhiên liệu thu được từ dầu bông hoặc pelet thu được từ phế phẩm của máy tách sợi bông, hạt đậu tương nguyên chất hoặc được xử lý, dầu đậu tương, protein đậu tương, bột thô đậu tương, bột đậu tương, vảy đậu tương, cám đậu tương, sữa đậu tương, pho mát đậu tương, rượu đậu tương, thực phẩm gia súc chứa đậu tương, giấy chứa đậu tương, kem chứa đậu tương, sinh khối đậu tương, và các sản phẩm nhiên liệu được sản xuất bằng cách sử dụng cây đậu tương và các bộ phận của cây đậu tương.

Cũng được đề xuất trong sáng chế là các quy trình sản xuất hạt giống chứa phân tử axit nucleic tái tổ hợp được mô tả trong sáng chế. Quy trình này bao gồm gieo ít nhất một hạt chứa các phân tử axit nucleic tái tổ hợp được mô tả trong sáng chế; trồng cây từ hạt này; và thu hoạch hạt từ các cây này, trong đó hạt thu hoạch được chứa các phân tử axit nucleic tái tổ hợp theo sáng chế.

Trong một phương án minh họa khác, thực vật kháng lại sự phá hoại của côn trùng, được đề xuất trong đó các tế bào của thực vật này chứa: (a) phân tử axit nucleic tái tổ hợp mã hóa lượng có tác dụng diệt vật gây hại của protein diệt vật gây hại như được chỉ ra trong SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, hoặc SEQ ID NO:6; hoặc (b) lượng có tác dụng diệt vật gây hại của protein chứa trình tự axit amin có: (i) tỷ lệ đồng nhất trình tự axit amin ít nhất là

93%, hoặc 95%, hoặc khoảng 100% với SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, hoặc SEQ ID NO:6; hoặc (ii) tỷ lệ đồng nhất trình tự axit amin ít nhất là 73%, hoặc 75%, hoặc 80%, hoặc 85%, hoặc 90%, hoặc 95%, hoặc khoảng 100% với SEQ ID NO:8 hoặc SEQ ID NO:10.

Cũng được mô tả trong sáng chế là các quy trình kiểm soát vật gây hại thuộc loài Lepidopteran, và kiểm soát sự gây hại của vật gây hại thuộc loài Lepidopteran trên thực vật, cụ thể là cây trồng. Quy trình này bao gồm, theo một phương án, (a) cho vật gây hại tiếp xúc với lượng có tác dụng diệt vật gây hại của các protein diệt vật gây hại như được chỉ ra trong SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, hoặc SEQ ID NO:6; hoặc (b) cho vật gây hại tiếp xúc với lượng có tác dụng diệt vật gây hại của một hoặc nhiều protein diệt vật gây hại chứa trình tự axit amin có: (i) tỷ lệ đồng nhất trình tự axit amin ít nhất là 93%, hoặc 95%, hoặc khoảng 100% với SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, hoặc SEQ ID NO:6; hoặc (ii) tỷ lệ đồng nhất trình tự axit amin ít nhất là 73%, hoặc 75%, hoặc 80%, hoặc 85%, hoặc 90%, hoặc 95%, hoặc khoảng 100% với SEQ ID NO:8 hoặc SEQ ID NO:10.

Được đề xuất thêm ở đây là quy trình phát hiện sự có mặt của phân tử axit nucleic tái tổ hợp chứa đoạn polynucleotit mã hóa protein diệt vật gây hại hoặc một đoạn của nó, trong đó: (a) protein diệt vật gây hại này chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, hoặc SEQ ID NO:6; hoặc (b) protein diệt vật gây hại này chứa trình tự axit amin có: (i) tỷ lệ đồng nhất trình tự axit amin ít nhất là 93%, hoặc 95%, hoặc 98%, hoặc 99%, hoặc khoảng 100% với SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, hoặc SEQ ID NO:6; hoặc (ii) tỷ lệ đồng nhất trình tự axit amin ít nhất là 73%, hoặc 75%, hoặc 80%, hoặc 85%, hoặc 90%, hoặc 95%, hoặc khoảng 100% với SEQ ID NO:8 hoặc SEQ ID NO:10; hoặc (c) đoạn polynucleotit này lai với polynucleotit có trình tự nucleotit của SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, hoặc SEQ ID NO:10. Theo một phương án của sáng chế, quy trình này bao gồm cho mẫu axit nucleic tiếp xúc với đoạn dò axit nucleic mà lai trong các điều kiện lai nghiêm ngặt với ADN bộ gen của thực vật chứa đoạn polynucleotit mã hóa protein diệt vật gây hại hoặc một đoạn của nó được đề xuất ở đây, và không lai trong các điều kiện lai như vậy với ADN bộ gen của thực vật đồng hợp tử khác mà không chứa đoạn này, trong đó đoạn dò này là tương đồng hoặc bổ sung với SEQ ID NO:3 hoặc SEQ ID NO:9, hoặc trình tự mã hóa protein diệt vật gây hại chứa trình tự axit amin có: (a) tỷ lệ đồng nhất trình tự axit amin ít nhất là 93%, hoặc 95%, hoặc 98%, hoặc 99%, hoặc khoảng 100% với SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, hoặc SEQ ID NO:6; hoặc (b) tỷ lệ đồng nhất trình tự axit amin ít nhất là 73%, hoặc 75%, hoặc 80%, hoặc 85%, hoặc 90%, hoặc

95%, hoặc khoảng 100% với SEQ ID NO:8 hoặc SEQ ID NO:10. Quy trình này có thể bao gồm thêm (a) đưa mẫu này và đoạn dò vào các điều kiện lai nghiêm ngặt; và (b) phát hiện sự lai của đoạn dò với ADN của mẫu này.

Cũng được đề xuất bởi sáng chế là các quy trình phát hiện sự có mặt của protein diệt vật gây hại hoặc một đoạn của nó trong mẫu chứa protein, trong đó protein diệt vật gây hại này chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, hoặc SEQ ID NO:10; hoặc protein diệt vật gây hại này chứa trình tự axit amin có: (a) tỷ lệ đồng nhất trình tự axit amin ít nhất là 93%, hoặc 95%, hoặc 98%, hoặc 99%, hoặc khoảng 100% với SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, hoặc SEQ ID NO:6; hoặc (b) tỷ lệ đồng nhất trình tự axit amin ít nhất là 73%, hoặc 75%, hoặc 80%, hoặc 85%, hoặc 90%, hoặc 95%, hoặc khoảng 100% với SEQ ID NO:8 hoặc SEQ ID NO:10. Trong một phương án, quy trình này bao gồm: (a) cho mẫu tiếp xúc với kháng thể phản ứng miễn dịch; và (b) phát hiện sự có mặt của protein này. Trong một số phương án bước phát hiện bao gồm ELISA, hoặc quy trình thẩm tách Tây.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

SEQ ID NO:1 là trình tự axit nucleic mã hóa protein diệt vật gây hại TIC4472 thu được từ loài *Bacillus thuringiensis* EG10742.

SEQ ID NO:2 là trình tự axit amin của protein diệt vật gây hại TIC4472.

SEQ ID NO:3 là trình tự mã hóa tổng hợp mã hóa protein diệt vật gây hại TIC4472PL được thiết kế để biểu hiện trong tế bào thực vật trong đó codon alanin bổ sung được gắn xen ngay sau codon methionin khởi đầu.

SEQ ID NO:4 là trình tự axit amin của TIC4472PL được mã hóa bởi trình tự mã hóa tổng hợp được thiết kế để biểu hiện trong tế bào thực vật (SEQ ID NO:3), và trong đó axit amin alanin bổ sung được gắn xen vào ngay sau methionin khởi đầu.

SEQ ID NO:5 là trình tự axit nucleic mã hóa protein diệt vật gây hại TIC1425 thu được từ loài *Bacillus thuringiensis* EG10731.

SEQ ID NO:6 là trình tự axit amin của protein diệt vật gây hại TIC1425.

SEQ ID NO:7 là trình tự axit nucleic mã hóa protein diệt vật gây hại TIC2613 thu được từ loài *Bacillus thuringiensis* EG5408.

SEQ ID NO:8 là trình tự axit amin của protein diệt vật gây hại TIC2613.

SEQ ID NO:9 là trình tự mã hóa tổng hợp mã hóa protein diệt vật gây hại TIC2613PL được thiết kế để biểu hiện trong tế bào thực vật trong đó codon alanin bổ sung được gắn xen ngay sau codon methionin khởi đầu.

SEQ ID NO:10 là trình tự axit amin của TIC2613PL được mã hóa bởi trình tự mã hóa tổng hợp được thiết kế để biểu hiện trong tế bào thực vật (SEQ ID NO:9), và trong đó axit amin alanin bổ sung được gắn xen vào ngay sau methionin khởi đầu.

Mô tả chi tiết sáng chế

Vấn đề trong lĩnh vực kiểm soát vật gây hại nông nghiệp có thể được mô tả là nhu cầu về các protein độc tố mới mà có tác dụng chống lại các vật gây hại đích, thể hiện tác dụng gây độc phổ rộng chống lại các loài vật gây hại đích, có khả năng được biểu hiện ở các thực vật mà không gây ra các vấn đề về nông học không mong muốn, và tạo ra cơ chế tác dụng khác so với các độc tố hiện nay mà đang được sử dụng thương mại trên thực vật.

Các protein diệt vật gây hại mới được đại diện bởi TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613, và TIC2613PL được mô tả ở đây, và giải quyết mỗi nhu cầu này, cụ thể là chống lại phổ rộng các côn trùng gây hại Lepidopteran, và cụ thể hơn là chống lại sâu xanh da láng (*Spodoptera exigua*), sâu đục bắp trên cây ngô (*Helicoverpa zea*), sâu lá bông (*Alabama argillacea*), sâu đục thân bắp Châu Âu (*Ostrinia nubilalis*), sâu xanh mùa thu (*Spodoptera frugiperda*), sâu đục quả Old World (*Helicoverpa armigera*), sâu lá Oriental (*Spodoptera litura*), sâu hồng hại bông (*Pectinophora gossypiella*), sâu hồng hại bông kháng Cry1Ac (*Pectinophora gossypiella*), sâu đo đậu tương (*Chrysodeixis includens*), sâu xanh Miền Nam (*Spodoptera eridania*), sâu đục thân ngô Tây Nam (*Diatraea grandiosella*), sâu đốm đục quả (*Earias vittella*), sâu đục thân mía (*Diatraea saccharalis*), sâu đục chồi cây Thuộc lá (*Heliothis virescens*), và sâu bướm cây đậu mèo rừng (*Anticarsia gemmatilis*).

Việc đề cập trong sáng chế đến TIC4472, “protein TIC4472”, “độc tố protein TIC4472”, “protein độc tố TIC4472”, “protein diệt vật gây hại TIC4472”, “độc tố liên quan đến TIC4472”, “protein độc tố liên quan đến TIC4472”, TIC4472PL, “protein TIC4472PL”, “độc tố protein TIC4472PL”, “protein độc tố TIC4472PL”, “protein diệt vật gây hại TIC4472PL”, “độc tố liên quan đến TIC4472PL”, “protein độc tố liên quan đến TIC4472PL”, TIC1425, “protein TIC1425”, “độc tố protein TIC1425”, “protein độc tố TIC1425”, “protein diệt vật gây hại TIC1425”, “độc tố liên quan đến TIC1425”, “protein

độc tố liên quan đến TIC1425”, TIC2613, “protein TIC2613”, “độc tố protein TIC2613”, “protein độc tố TIC2613”, “protein diệt vật gây hại TIC2613”, “độc tố liên quan đến TIC2613”, “protein độc tố liên quan đến TIC2613”, TIC2613PL, “protein TIC2613PL”, “độc tố protein TIC2613PL”, “protein độc tố TIC2613PL”, “protein diệt vật gây hại TIC2613PL”, “độc tố liên quan đến TIC2613PL”, “protein độc tố liên quan đến TIC2613PL”, và các thuật ngữ tương tự, đề cập đến protein diệt vật gây hại mới bất kỳ hoặc protein ức chế côn trùng bất kỳ, mà chứa, bao gồm, gần như tương đồng với, tương tự với, hoặc thu được từ trình tự protein diệt vật gây hại hoặc protein ức chế côn trùng bất kỳ của TIC4472 (SEQ ID NO:2), TIC4472PL (SEQ ID NO:4), TIC1425 (SEQ ID NO:6), TIC2613 (SEQ ID NO:8), hoặc TIC2613PL (SEQ ID NO:10) và các đoạn có tác dụng diệt vật gây hại hoặc ức chế côn trùng của nó, hoặc tổ hợp của chúng, mà gây ra tác dụng chống vật gây hại Lepidopteran, bao gồm protein bất kỳ thể hiện tác dụng diệt vật gây hại hoặc ức chế côn trùng nếu việc sắp xếp thẳng hàng protein này với TIC4472, TIC4472PL, hoặc TIC1425 tạo ra tỷ lệ đồng nhất trình tự axit amin có tỷ lệ phần trăm bất kỳ từ khoảng 93% đến khoảng 100%; hoặc nếu việc sắp xếp thẳng hàng protein này với TIC2613 hoặc TIC2613PL tạo ra tỷ lệ đồng nhất trình tự axit amin có tỷ lệ phần trăm bất kỳ từ khoảng 73% đến khoảng 100%. Các protein TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613, hoặc TIC2613PL bao gồm cả dạng gắn đích lap thể và không gắn đích lap thể của các protein này.

Thuật ngữ “mảnh” hoặc “đoạn” được sử dụng trong sáng chế để mô tả các trình tự axit amin hoặc axit nucleic liên tục mà ngắn hơn trình tự axit amin hoặc axit nucleic hoàn chỉnh mô tả protein TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613, hoặc TIC2613PL. Mảnh hoặc đoạn thể hiện tác dụng ức chế côn trùng cũng được mô tả trong sáng chế nếu việc sắp xếp thẳng hàng mảnh hoặc đoạn này, với phần tương ứng của protein TIC4472 được chỉ ra trong SEQ ID NO:2, protein TIC4472PL được chỉ ra trong SEQ ID NO:4, protein TIC1425 được chỉ ra trong SEQ ID NO:6, tạo ra độ đồng nhất trình tự axit amin có tỷ lệ phần trăm bất kỳ từ khoảng 93 đến khoảng 100% giữa mảnh hoặc đoạn này và phần tương ứng của protein TIC4472, TIC4472PL, hoặc TIC1425; hoặc nếu việc sắp xếp thẳng hàng mảnh hoặc đoạn này, với phần tương ứng của TIC2613 được chỉ ra trong SEQ ID NO:8, hoặc protein TIC2613PL được chỉ ra trong SEQ ID NO:10, tạo ra độ đồng nhất trình tự axit amin có tỷ lệ phần trăm bất kỳ từ khoảng 73 đến khoảng 100 phần trăm giữa mảnh hoặc đoạn này và phần tương ứng của protein TIC2613 hoặc TIC2613PL.

Vẫn trong các phương án cụ thể khác, một đoạn của protein TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613, hoặc TIC2613PL có thể được xác định là thể hiện tác dụng diệt vật gây hại của phân tử protein khởi đầu mà từ đó thu được nó. Một đoạn của trình tự axit nucleic mã hóa protein TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613, hoặc TIC2613PL có thể được xác định là mã hóa protein thể hiện tác dụng diệt vật gây hại của phân tử protein được mã hóa bởi trình tự axit nucleic khởi đầu mà từ đó thu được nó. Đoạn hoặc biến thể được mô tả ở đây có thể chứa thêm miền được nhận diện ở đây mà chịu trách nhiệm về tác dụng diệt vật gây hại của protein.

Trong các phương án cụ thể, các đoạn của protein TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613, hoặc TIC2613PL được đề xuất chứa ít nhất khoảng 50, ít nhất khoảng 75, ít nhất khoảng 95, ít nhất khoảng 100, ít nhất khoảng 125, ít nhất khoảng 150, ít nhất khoảng 175, ít nhất khoảng 200, ít nhất khoảng 225, ít nhất khoảng 250, ít nhất khoảng 275, ít nhất khoảng 300, ít nhất khoảng 500, ít nhất khoảng 600, ít nhất khoảng 700, ít nhất khoảng 750, ít nhất khoảng 800, ít nhất khoảng 900, ít nhất khoảng 1000, ít nhất khoảng 1100, ít nhất khoảng 1150, hoặc ít nhất khoảng 1175 axit amin liên tục, hoặc dài hơn, của protein TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613, hoặc TIC2613PL có tác dụng diệt vật gây hại như được mô tả ở đây. Trong một số phương án, sáng chế đề xuất các đoạn thuộc bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, hoặc 10, có tác dụng của trình tự có độ dài đầy đủ. Các quy trình để tạo ra các đoạn này từ phân tử khởi đầu là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Việc đề cập trong sáng chế đến các thuật ngữ “hoạt tính” hoặc “tác dụng”, “tác dụng diệt loài gây hại” hoặc “trừ sâu” hoặc “hoạt tính trừ sâu”, “tác dụng ức chế côn trùng” hoặc “trừ sâu” dùng để chỉ hiệu quả của chất độc, như độc tố protein, trong việc ức chế (ức chế sự sinh trưởng, sự ăn, khả năng sinh sản, hoặc khả năng sống sót), ngăn chặn (ngăn chặn sự sinh trưởng, sự cho ăn, khả năng sinh sản hoặc khả năng sống sót), kiểm soát (kiểm soát sự gây hại của vật gây hại, kiểm soát các hoạt động ăn của vật gây hại trên cây trồng cụ thể chứa lượng hữu hiệu của protein TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613, hoặc TIC2613PL) hoặc tiêu diệt (gây bệnh, gây chết, hoặc làm giảm khả năng sinh sản) vật gây hại. Các thuật ngữ này được dự định bao gồm kết quả của việc cung cấp lượng có tác dụng diệt vật gây hại của protein độc tố cho vật gây hại, trong đó sự tiếp xúc của vật gây hại với protein độc tố gây bệnh, gây chết, làm giảm khả năng sinh sản, hoặc gây choáng. Các thuật ngữ này cũng bao gồm việc xua đuổi vật gây hại khỏi thực vật, mô của thực vật, bộ phận

của thực vật, hạt, tế bào thực vật, hoặc khỏi vị trí địa lý cụ thể, tại đó thực vật này có thể đang sinh trưởng, nhờ việc cung cấp lượng có tác dụng diệt vật gây hại của protein độc tố trong hoặc trên thực vật này. Nói chung, tác dụng diệt vật gây hại dùng để chỉ khả năng của protein độc tố hữu hiệu trong việc ức chế sự sinh trưởng, phát triển, khả năng sống, tập tính ăn, tập tính giao phối, khả năng sinh sản hoặc sự giảm có thể đo được bất kỳ về các tác dụng gây hại được gây ra bởi côn trùng được cho ăn protein, đoạn protein, mảnh protein này hoặc polynucleotit của vật gây hại mục tiêu cụ thể, bao gồm, nhưng không giới hạn ở các côn trùng thuộc bộ Lepidoptera. Protein độc tố có thể được sản sinh bởi thực vật này hoặc có thể được sử dụng cho thực vật này hoặc cho môi trường ở vị trí mà thực vật này được trồng. Các thuật ngữ “hoạt tính sinh học”, “có tác dụng”, “hữu hiệu” hoặc các biến thể của từ này cũng là các thuật ngữ được sử dụng thay thế cho nhau trong sáng chế để mô tả các tác dụng của các protein theo sáng chế trên sâu bọ đích.

Lượng có tác dụng diệt vật gây hại của chất độc, khi được cung cấp trong khẩu phần ăn của vật gây hại đích, thể hiện tác dụng diệt vật gây hại khi chất độc tiếp xúc với vật gây hại. Chất độc có thể là protein diệt vật gây hại hoặc một hoặc nhiều chất hóa học đã biết trong lĩnh vực này. Chất hóa học trừ dịch hoặc trừ sâu và chất protein diệt vật gây hại hoặc diệt côn trùng có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp với nhau. Chất hóa học bao gồm nhưng không giới hạn ở các phân tử dsARN gắn đích các gen cụ thể để ức chế ở vật gây hại đích, organoclorua, organophosphat, carbamat, pyrethroid, neonicotinoid, và ryanoid. Các chất protein diệt vật gây hại hoặc diệt côn trùng bao gồm các độc tố protein được chỉ ra trong sáng chế, cũng như các chất độc chứa protein khác bao gồm các chất gắn đích Lepidopteran, cũng như các độc tố protein được sử dụng để kiểm soát các vật gây hại thực vật khác như các protein Cry và Cyt sẵn có trong lĩnh vực này để sử dụng trong việc kiểm soát loài Coleopteran, Hemipteran và Homopteran.

Được dự định là việc đề cập đến vật gây hại, cụ thể là vật gây hại trên cây trồng, có nghĩa là côn trùng gây hại trên cây trồng, cụ thể là các côn trùng gây hại Lepidoptera mà được kiểm soát bởi lớp độc tố protein TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613, hoặc TIC2613PL. Tuy nhiên, việc đề cập đến vật gây hại cũng có thể bao gồm côn trùng gây hại thuộc phân bộ cánh cứng, phân bộ cánh nửa và phân bộ cánh giồng ở thực vật, cũng như giun tròn và nấm khi các chất độc gắn đích các vật gây hại này được đưa vào cùng hoặc có mặt cùng với protein TIC4472, TIC4472PL, hoặc TIC1425 hoặc protein mà đồng nhất 93 đến khoảng 100 phần trăm với TIC4472, TIC4472PL, hoặc TIC1425; hoặc protein

TIC2613, hoặc TIC2613PL hoặc protein mà đồng nhất từ 73 đến khoảng 100 phần trăm với TIC2613, hoặc TIC2613PL.

Các protein TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613, hoặc TIC2613PL có liên quan bởi chức năng chung và thể hiện tác dụng diệt vật gây hại đối với côn trùng gây hại thuộc loài côn trùng Lepidoptera, bao gồm con trưởng thành, nhộng, ấu trùng, và sơ sinh.

Các côn trùng thuộc bộ Lepidoptera bao gồm, nhưng không giới hạn ở, sâu khoang, sâu ngài đêm, sâu đo, và sâu xanh trong Họ Ngài đêm, ví dụ, sâu xanh mùa thu (*Spodoptera frugiperda*), sâu xanh da láng (*Spodoptera exigua*), sâu khoang đen (*Spodoptera exempta*), sâu khoang phương Nam (*Spodoptera eridania*), sâu khoang bertha (*Mamestra configurata*), sâu xám (*Agrotis ipsilon*), sâu đo bắp cải (*Trichoplusia ni*), sâu đo đậu tương (*Pseudoplusia includens*), sâu bướm đậu mèo (*Anticarsia gemmatilis*), sâu xanh (*Hypena scabra*), sâu chồi Thuốc lá (*Heliothis virescens*), sâu ngài đêm dạng hạt (*Agrotis subterranea*), sâu khoang (*Pseudaletia unipuncta*), sâu ngài đêm phương tây (*Agrotis orthogonia*); sâu đục thân, sâu túi, sâu kéo màng, sâu hình nón, sâu bắp cải và sâu gặm thịt lá thuộc Họ Pyralidae, ví dụ, sâu đục thân cây ngô Châu Âu (*Ostrinia nubilalis*), sâu cam navel (*Amyelois transitella*), sâu kéo màng rế ngô (*Crambus caliginosellus*), sâu kéo màng cỏ (*Herpetogramma licarsisalis*), sâu bướm hoa hướng dương (*Homoeosoma electellum*), sâu đục thân ngô Lesser (*Elasmopalpus lignosellus*); bướm cuốn lá, sâu chồi, sâu hạt, và sâu ăn quả thuộc Họ Tortricidae, ví dụ, sâu ngài codling (*Cydia pomonella*), sâu ngài hại nho (*Endopiza viteana*), sâu ngài đục trái phương Đông (*Grapholita molesta*), sâu chồi hoa hướng dương (*Suleima helianthana*); và nhiều loài Lepidoptera quan trọng về kinh tế khác, ví dụ, sâu tơ cải bắp (*Plutella xylostella*), sâu hồng hại bông (*Pectinophora gossypiella*), và sâu bướm gypsy (*Lymantria dispar*). Các côn trùng gây hại khác thuộc bộ Lepidoptera bao gồm, ví dụ, sâu lá bông (*Alabama argillacea*), bướm cuốn lá cây ăn quả (*Archips argyrospila*), bướm cuốn lá Châu Âu (*Archips rosana*) và loài *Archips* khác, (*Chilo suppressalis*, sâu đục thân lúa Châu Á, hoặc sâu đục thân lúa), bướm cuốn lá lúa (*Cnaphalocrocis medinalis*), sâu kéo màng rế ngô (*Crambus caliginosellus*), sâu kéo màng cỏ xanh (*Crambus teterrellus*), sâu đục thân ngô Tây Nam (*Diatraea grandiosella*), sâu đục thân cây mía (*Diatraea saccharalis*), ấu trùng của sâu bướm có gai (*Earias insulana*), sâu đốm đục quả (*Earias vittella*), sâu bướm Mỹ (*Helicoverpa armigera*), sâu đục bắp trên cây ngô (*Helicoverpa zea*, còn được gọi là sâu đục vỏ đậu tương và sâu bướm hại bông), sâu đục chồi cây Thuốc lá (*Heliothis virescens*), sâu kéo màng cỏ (*Herpetogramma*

licarsisalis), sâu ngài đêm trên cây đậu miền Tây (*Striacosta albicosta*), sâu bướm cây nho Châu Âu (*Lobesia botrana*), sâu ăn lá cam (*Phyllocnistis citrella*), bướm trắng lớn (*Pieris brassicae*), bướm trắng nhỏ (*Pieris rapae*, còn được biết là sâu bắp cải nhập), sâu xanh da láng (*Spodoptera exigua*), sâu ngài đêm thuốc lá (*Spodoptera litura*, còn được gọi là sâu bướm cụm), và sâu ăn lá khoai tây (*Tuta absoluta*).

Việc đề cập trong sáng chế đến “phân tử ADN đã phân lập” hoặc thuật ngữ hoặc cụm từ tương đương, được dự định có nghĩa là phân tử ADN này là phân tử xuất hiện một mình hoặc kết hợp với các thành phần khác, nhưng không nằm trong môi trường tự nhiên của nó. Ví dụ, các yếu tố axit nucleic như trình tự mã hóa, trình tự intron, trình tự dẫn đầu không được dịch mã, trình tự khởi động, trình tự kết thúc phiên mã, và tương tự, mà được tìm thấy tự nhiên trong ADN của bộ gen của sinh vật không được xem là được “phân lập” khi yếu tố này nằm trong bộ gen của sinh vật và ở vị trí trong bộ gen mà trong đó nó được tìm thấy một cách tự nhiên. Tuy nhiên, mỗi yếu tố này, và tiểu phần của các yếu tố này, sẽ là “được phân lập” trong phạm vi của phần mô tả này khi yếu tố này không nằm trong bộ gen của sinh vật và ở vị trí bên trong bộ gen mà trong đó nó được tìm thấy một cách tự nhiên. Tương tự, trình tự nucleotit mã hóa protein diệt vật gây hại hoặc biến thể trừ sâu tự nhiên bất kỳ của protein đó sẽ là trình tự nucleotit được phân lập với điều kiện là trình tự nucleotit này không nằm trong ADN của vi khuẩn mà từ đó trình tự mã hóa protein này được tìm thấy tự nhiên. Trình tự nucleotit tổng hợp mã hóa trình tự axit amin của protein diệt vật gây hại tự nhiên sẽ được coi là được phân lập với các mục đích của sáng chế. Với các mục đích của sáng chế, trình tự nucleotit chuyển gen bất kỳ, nghĩa là, trình tự nucleotit của ADN được gắn xen vào bộ gen của các tế bào của thực vật hoặc vi khuẩn, hoặc có mặt trong vectơ ngoài nhiễm sắc thể, sẽ được coi là trình tự nucleotit được phân lập dù nó xuất hiện trong plasmit hoặc cấu trúc tương tự được sử dụng để biến nạp các tế bào này, trong bộ gen của thực vật hoặc vi khuẩn, hay có mặt với lượng phát hiện được trong mô, dòng con, các mẫu sinh học hoặc các thương phẩm thu được từ thực vật hoặc vi khuẩn.

Như được mô tả thêm trong sáng chế, khung đọc mở (ORF) mã hóa TIC4747 (SEQ ID NO:1) được phát hiện ra trong ADN thu được từ *Bacillus thuringiensis* chủng EG10742. Trình tự mã hóa được tách dòng và được biểu hiện trong tế bào chủ vi khuẩn để sản sinh ra các protein tái tổ hợp được sử dụng trong thử nghiệm sinh học. Khung đọc mở (ORF) mã hóa TIC1425 (SEQ ID NO:5) được phát hiện ra trong ADN thu được từ *Bacillus thuringiensis* chủng EG10731. Khung đọc mở (ORF) mã hóa TIC2613 (SEQ ID NO:7)

được phát hiện ra trong ADN thu được từ *Bacillus thuringiensis* chủng EG5408. Thử nghiệm sinh học sử dụng các protein thu được từ tế bào chủ vi khuẩn của TIC4472 thể hiện tác dụng chống lại loài Lepidopteran sâu xanh da láng (*Spodoptera exigua*), sâu đục bắp trên cây ngô (*Helicoverpa zea*), sâu lá bông (*Alabama argillacea*), sâu đục thân bắp Châu Âu (*Ostrinia nubilalis*), sâu xanh mùa thu (*Spodoptera frugiperda*), sâu đục quả Old World (*Helicoverpa armigera*), sâu lá Oriental (*Spodoptera litura*), sâu hồng hại bông (*Pectinophora gossypiella*), sâu hồng hại bông kháng Cry1Ac (*Pectinophora gossypiella*), sâu đo đậu tương (*Chrysodeixis includens*), sâu xanh Miền Nam (*Spodoptera eridania*), sâu đục thân ngô Tây Nam (*Diatraea grandiosella*), sâu đốm đục quả (*Earias vittella*), sâu đục thân mía (*Diatraea saccharalis*), sâu đục chồi cây Thuốc lá (*Heliothis virescens*), và sâu bướm cây đậu mèo rừng (*Anticarsia gemmatilis*). Thêm vào đó, cũng quan sát thấy tác dụng chống lại muỗi gây bệnh sốt vàng (*Aedes aegypti*). Thử nghiệm sinh học sử dụng protein thu được từ tế bào chủ vi khuẩn của TIC1425 thể hiện tác dụng chống lại loài Lepidopteran sâu lá bông (*Alabama argillacea*), sâu đục thân bắp Châu Âu (*Ostrinia nubilalis*), sâu xanh mùa thu (*Spodoptera frugiperda*), sâu đục thân mía (*Diatraea saccharalis*), và sâu đục thân ngô Tây Nam (*Diatraea grandiosella*). Thử nghiệm sinh học sử dụng protein thu được từ tế bào chủ vi khuẩn của TIC2613 thể hiện tác dụng chống lại loài Lepidopteran sâu đục bắp trên cây ngô (*Helicoverpa zea*), sâu lá bông (*Alabama argillacea*), sâu đục thân bắp Châu Âu (*Ostrinia nubilalis*), sâu xanh mùa thu (*Spodoptera frugiperda*), sâu đo đậu tương (*Chrysodeixis includens*), sâu đục thân ngô Tây Nam (*Diatraea grandiosella*), và sâu đục chồi cây Thuốc lá (*Heliothis virescens*).

Để biểu hiện trong tế bào thực vật, protein TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613, hoặc TIC2613PL có thể được biểu hiện để nằm trong bào tương hoặc được gắn đích vào nhiều cơ quan bào khác nhau của tế bào thực vật. Ví dụ, việc gắn đích một protein vào lục lạp có thể làm tăng mức nồng độ protein được biểu hiện trong thực vật chuyển gen trong khi ngăn cản các kiểu hình không hoạt động xảy ra. Việc gắn đích cũng có thể gây ra sự tăng tác dụng kháng vật gây hại ở sự kiện chuyển gen. Peptit đích hoặc peptit chuyển là chuỗi peptit ngắn (dài 3-70 axit amin) điều khiển sự vận chuyển một protein đến vùng đặc hiệu trong tế bào, bao gồm nhân, ty thể, lưới nội chất (ER), lục lạp, không bào, peroxisome và màng sinh chất. Một số peptit đích được cắt ra khỏi protein này bởi peptidaza tín hiệu sau khi các protein này được vận chuyển. Để gắn đích vào lục lạp, các protein chứa các peptit chuyển chứa khoảng 40-50 axit amin. Đối với các mô tả về việc sử

dụng các peptit chuyển lục lạp, xem Patent Mỹ số 5,188,642 và 5,728,925. Nhiều protein nằm trong lục lạp được biểu hiện từ các gen nhân dưới dạng các tiền chất và được gắn đích vào lục lạp bởi peptit chuyển lục lạp (CTP). Ví dụ về các protein lục lạp được phân lập này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các protein được liên hợp với tiểu đơn vị nhỏ (SSU) của ribulose-1,5,-bisphosphat carboxylaza, ferredoxin, ferredoxin oxidoreductaza, phức hợp thu ánh sáng protein I và protein II, thioredoxin F, enolpyruvyl shikimate phosphat synthaza (EPSPS), và các peptit chuyển được mô tả trong Patent Mỹ số 7,193,133. Đã chứng minh được trên *in vivo* và *in vitro* là các protein không phải lục lạp có thể được gắn đích vào lục lạp bằng cách sử dụng các thể dung hợp protein với CTP khác loài và CTP này là đủ để gắn đích protein vào lục lạp. Việc đưa vào peptit chuyển lục lạp thích hợp như *Arabidopsis thaliana* EPSPS CTP (CTP2) (xem, Klee *et al.*, *Mol.Gen.Genet.*210:437-442, 1987) hoặc *Petunia hybrida* EPSPS CTP (CTP4) (xem, della-Cioppa *et al.*, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 83:6873-6877, 1986) đã được chỉ ra là gắn đích các trình tự protein EPSPS khác loài vào lục lạp ở các thực vật chuyển gen (xem, Patent Mỹ số 5,627,061; 5,633,435; và 5,312,910; và EP 0218571; EP 189707; EP 508909; và EP 924299). Để gắn đích protein độc tố TIC6757 hoặc TIC6757PL vào lục lạp, trình tự mã hóa peptit chuyển lục lạp được đặt 5' trong liên kết hoạt động và trong khung với trình tự mã hóa tổng hợp mã hóa protein độc tố TIC6757 hoặc TIC6757PL mà đã được thiết kế để biểu hiện tối ưu ở tế bào thực vật.

Được đề xuất là các trình tự protein độc tố bổ sung liên quan đến TIC4472, TIC1425, hoặc TIC2613 có thể được tạo ra bằng cách sử dụng trình tự axit amin của TIC4472, TIC1425, hoặc TIC2613 để tạo ra các protein mới với các đặc điểm mới. Các protein độc tố TIC4472, TIC1425, hoặc TIC2613 có thể được sắp xếp thẳng hàng để kết hợp các khác biệt ở mức độ trình tự axit amin vào các biến thể trình tự axit amin mới và tạo ra các thay đổi thích hợp cho trình tự axit nucleic tái tổ hợp mã hóa các biến thể này.

Sáng chế đề xuất thêm là các biến thể được cải tiến của lớp độc tố protein TIC4472 có thể được thao tác di truyền *in planta* bằng cách sử dụng nhiều quy trình biên tập gen khác nhau đã biết trong lĩnh vực này. Các công nghệ được sử dụng để biên tập gen này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ZFN (nucleaza ngón tay kềm), meganucleaza, TALEN (các nucleaza hiệu ứng tương tự chất hoạt hóa phiên mã), và hệ thống CRISPR (nhóm các trình tự tái nhiễm ngắn đối xứng lặp lại thường xuyên-Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)/Cas (được liên hợp CRISPR). Các quy trình biên tập gen này có thể

được sử dụng để làm biến đổi trình tự mã hóa protein độc tố đã được biến nạp vào tế bào thực vật thành trình tự mã hóa độc tố khác. Cụ thể là, nhờ các quy trình này, một hoặc nhiều codon trong trình tự mã hóa độc tố được thay đổi để tạo ra trình tự axit amin protein mới. Ngoài ra, đoạn nằm trong trình tự mã hóa được thay thế hoặc làm mất đoạn, hoặc các đoạn ADN bổ sung được gắn xen vào trình tự mã hóa, để tạo ra trình tự mã hóa độc tố mới. Trình tự mã hóa độc tố mới này có thể mã hóa protein độc tố có các đặc điểm mới như hoạt tính hoặc phổ kháng lại sâu bọ được gia tăng, cũng như cung cấp hoạt tính chống các loài sâu bọ mà đã phát triển khả năng kháng lại protein độc tố côn trùng ban đầu. Tế bào thực vật chứa trình tự mã hóa độc tố đã được biên tập gen có thể được sử dụng bằng các quy trình đã biết trong lĩnh vực này để tạo ra các thực vật hoàn chỉnh biểu hiện protein độc tố mới này.

Cũng được đề xuất là các đoạn của TIC4472, TIC1425, hoặc TIC2613 hoặc các biến thể protein của nó có thể là dạng được cắt, trong đó một hoặc nhiều axit amin bị loại bỏ từ đầu cùng N, đầu cùng C, giữa protein, hoặc tổ hợp của các vị trí này, trong đó các đoạn và các biến thể này vẫn giữ được hoạt tính ức chế côn trùng. Các đoạn này có thể là các biến thể tự nhiên hoặc tổng hợp của TIC4472, TIC1425, hoặc TIC2613 hoặc các biến thể protein thu được, nhưng nên giữ được tác dụng ức chế côn trùng của ít nhất là TIC4472, TIC1425, hoặc TIC2613. Đoạn hoặc biến thể được mô tả ở đây có thể chứa thêm miền được nhận diện ở đây mà chịu trách nhiệm về tác dụng diệt vật gây hại của protein.

Các protein mà tương tự với các protein TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613, và TIC2613PL có thể được nhận diện và được so sánh với nhau bằng cách sử dụng nhiều thuật toán dựa trên máy tính khác nhau đã biết trong lĩnh vực này (xem Bảng 1 và 2). Các tỉ lệ phần trăm đồng nhất trình tự axit amin được báo cáo trong sáng chế là kết quả của kỹ thuật sắp xếp thẳng hàng trình tự Clustal W sử dụng các tham số mặc định này: Ma trận khối lượng: blosum, Điểm phạt mở khoảng trống: 10,0, Điểm phạt kéo dài khoảng trống: 0,05, Khoảng trống ưa nước: On, các gốc ưa nước: GPSNDQERK, các điểm phạt khoảng trống đặc hiệu gốc: On (Thompson, *et al* (1994) *Nucleic Acids Research*, 22:4673-4680). Tỉ lệ phần trăm đồng nhất trình tự axit amin còn được tính toán bằng cách lấy 100% nhân với (số axit amin đồng nhất/độ dài protein). Các thuật toán sắp xếp thẳng hàng khác cũng sẵn có trong lĩnh vực này và cung cấp các kết quả tương tự với các kết quả thu được bằng cách sử dụng kỹ thuật sắp xếp thẳng hàng Clustal W và được đề xuất ở đây.

Được dự định là protein thể hiện tác dụng ức chế côn trùng kháng lại loài côn trùng Lepidopteran có liên quan đến TIC4472, TIC4472PL, hoặc TIC1425 nếu protein này được sử dụng trong truy vấn, *ví dụ*, trong sắp xếp thẳng hàng Clustal W, và các protein theo sáng chế như được chỉ ra trong SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, hoặc SEQ ID NO:6 được nhận diện là các cặp so khớp trong kỹ thuật sắp xếp thẳng hàng này, trong đó protein truy vấn thể hiện độ đồng nhất axit amin ít nhất là 93% đến khoảng 100% dọc theo chiều dài của protein truy vấn này, nghĩa là khoảng 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, hoặc tỷ lệ phần trăm bất kỳ thuộc khoảng này. Cũng được dự định là protein có tác dụng ức chế côn trùng chống lại loài côn trùng Lepidopteran có liên quan đến TIC2613 hoặc TIC2613PL nếu protein này được sử dụng trong truy vấn, *ví dụ*, trong sắp xếp thẳng hàng Clustal W, và các protein theo sáng chế như được chỉ ra trong SEQ ID NO:8, hoặc SEQ ID NO:10 được nhận diện là các cặp so khớp trong sắp xếp thẳng hàng trong đó protein truy vấn thể hiện tỷ lệ đồng nhất axit amin ít nhất là từ 73% đến khoảng 100% dọc theo chiều dài của protein truy vấn nghĩa là khoảng 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%, 99%, 100%, hoặc tỷ lệ phần trăm bất kỳ thuộc khoảng này.

Các protein điển hình TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613, và TIC2613PL được sắp xếp thẳng hàng với nhau bằng cách sử dụng thuật toán Clustal W. Ma trận từng cặp của các tỷ lệ phần trăm đồng nhất trình tự axit amin cho mỗi protein có độ dài đầy đủ được tạo ra, như được báo cáo trong Bảng 1.

Bảng 1. Thể hiện ma trận từng cặp của các protein điển hình TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613, và TIC2613PL.

Độc tố	TIC4472 (SEQ ID NO:2)	TIC4472PL (SEQ ID NO:4)	TIC1425 (SEQ ID NO:6)	TIC2613 (SEQ ID NO:8)	TIC2613PL (SEQ ID NO:10)
TIC4472 (SEQ ID NO:2)	-	99,9 (1186)	99,9 (1186)	68,1 (808)	68 (807)
TIC4472PL (SEQ ID NO:4)	99,8 (1186)	-	99,7 (1185)	67,9 (807)	68,1 (809)
TIC1425 (SEQ ID NO:6)	99,9 (1186)	99,8 (1185)	-	68,2 (809)	68,1 (808)
TIC2613 (SEQ ID NO:8)	68,6 (808)	68,5 (807)	68,7 (809)	-	99,9 (1177)
TIC2613PL (SEQ ID NO:10)	68,4 (807)	68,6 (809)	68,5 (808)	99,8 (1177)	-

Mô tả bảng: Sự sắp xếp thẳng hàng Clustal W giữa (X) và (Y) được báo cáo trong ma trận từng cặp. Tỷ lệ phần trăm đồng nhất axit amin giữa tất cả các cặp được tính toán và được thể hiện bằng số thứ nhất trong mỗi ô. Số thứ hai (trong dấu ngoặc đơn) trong mỗi ô thể hiện số lượng các axit amin giống nhau giữa một cặp.

Ngoài tỷ lệ phần trăm đồng nhất, TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613, và TIC2613PL và các protein liên quan cũng có thể có mối liên quan bởi cấu trúc bậc một (các motif axit amin được bảo tồn), bởi độ dài (khoảng 1187 axit amin), và bởi các đặc điểm khác. Các đặc điểm của độc tố protein TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613, và TIC2613PL được báo cáo trong Bảng 2.

Bảng 2. Các đặc điểm chọn lọc của protein TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613, và TIC2613PL.

<u>Protein</u>	<u>Khối lượng phân tử (theo Daltons)</u>	<u>Độ dài axit amin</u>	<u>Điểm đẳng điện</u>	<u>Điện tích ở độ PH=7,0</u>	<u>Số lượng các axit amin bazơ mạnh (-)</u>	<u>Số lượng các axit amin axit mạnh</u>	<u>Số lượng các axit amin kỵ nước</u>	<u>Số lượng các axit amin có cực</u>
TIC4472	134446,86	1187	4,7545	-36	137	162	611	576
TIC4472PL	134517,94	1188	4,7545	-36	137	162	612	576
TIC1425	134460,88	1187	4,7545	-36	137	162	611	576
TIC2613	134636,07	1178	4,6653	-42	132	162	588	590
TIC2613PL	134707,15	1179	4,6653	-42	132	162	589	590

Như được mô tả thêm trong phần Ví dụ của sáng chế, các trình tự phân tử axit nucleic tổng hợp mã hóa biến thể của TIC4472, TIC4472PL, và biến thể của TIC2613, TIC2613PL, được thiết kế để sử dụng ở thực vật. Trình tự phân tử axit nucleic tái tổ hợp điển hình mà được thiết kế để sử dụng ở thực vật mã hóa protein TIC4472PL được trình bày bằng SEQ ID NO:3. Trình tự phân tử axit nucleic tái tổ hợp điển hình mà được thiết kế để sử dụng ở thực vật mã hóa protein TIC2613PL được trình bày bằng SEQ ID NO:9. Các protein TIC4472PL và TIC2613PL có axit amin alanin bổ sung ngay sau methionin khởi đầu so với các protein TIC4472 và TIC2613, tương ứng. Gốc alanin bổ sung được gắn xen vào các trình tự axit amin TIC4472 và TIC2613 được cho là cải thiện sự biểu hiện của protein này *in planta*. Tương tự, các trình tự phân tử axit nucleic tổng hợp mã hóa các biến thể của TIC1425 và có thể được thiết kế để sử dụng ở thực vật.

Thử nghiệm đĩa lá sử dụng mô lá bông R₀ biểu hiện protein TIC4472PL chứng minh hoạt tính cao chống lại sâu đo đậu tương (*Chrysodeixis includens*) và sâu đục chồi cây Thuốc lá (*Heliothis virescens*) và hoạt tính thấp chống lại sâu đục quả cây bông (*Helicoverpa zea*) và sâu xanh mùa thu (*Spodoptera frugiperda*). Thử nghiệm đĩa lá sử dụng mô lá đậu tương R₀ biểu hiện protein TIC4472PL chứng minh hoạt tính chống lại sâu xanh Miền Nam (*Spodoptera eridania*) và sâu đo đậu tương (*Chrysodeixis includens*).

Các mẫu lá từ các cây đậu tương R₀ biểu hiện protein TIC4472PL và TIC2613PL chứng minh hoạt tính chống sâu xanh Miền Nam (*Spodoptera eridania*) và sâu đo đậu tương (*Chrysodeixis includens*).

Caxet biểu hiện và các vector chứa trình tự phân tử axit nucleic tái tổ hợp có thể được tạo ra và được đưa vào tế bào ngô, đậu tương, bông hoặc các tế bào thực vật khác theo các quy trình biến nạp và các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, quy trình biến nạp qua trung gian *Agrobacterium* được mô tả trong Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ 2009/0138985A1 (đậu tương), 2008/0280361A1 (đậu tương), 2009/0142837A1 (ngô), 2008/0282432 (bông), 2008/0256667 (bông), 2003/0110531 (lúa mỳ), 2001/0042257 A1 (củ cải đường), Patent Mỹ số 5,750,871 (cây cải dầu), 7,026,528 (lúa mỳ), và 6,365,807 (lúa), và trong Arencibia *et al.* (1998) Transgenic Res. 7:213-222 (mía) toàn bộ các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ. Các tế bào đã biến nạp có thể được tái sinh vào các thực vật đã được biến nạp mà biểu hiện các protein TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613, và TIC2613PL và thể hiện tác dụng diệt vật gây hại qua các thử nghiệm sinh học được thực hiện khi có mặt ấu trùng vật gây hại Lepidopteran bằng cách sử dụng các đĩa lá cây thu được từ thực vật đã biến nạp. Các cây có thể thu được từ các tế bào thực vật này bằng cách tái sinh, gieo hạt, thụ phấn hoặc các kỹ thuật biến nạp mô phân sinh. Các quy trình để biến nạp thực vật là đã biết trong lĩnh vực này.

Ngoài các quy trình biến nạp truyền thống, trình tự ADN, như gen chuyển, (các) caxet biểu hiện, v.v. có thể được gắn xen hoặc được tích hợp vào một vị trí cụ thể hoặc locus trong bộ gen của thực vật hoặc tế bào thực vật bằng cách tích hợp định hướng vị trí. (Các) phân tử và cấu trúc ADN tái tổ hợp theo sáng chế do đó có thể bao gồm trình tự khuôn cho chứa ít nhất một gen chuyển, caxet biểu hiện, hoặc trình tự ADN khác để gắn xen vào bộ gen của thực vật hoặc tế bào thực vật. Khuôn cho để tích hợp định hướng vị trí có thể bao gồm thêm một hoặc hai nhánh tương đồng nằm bên sườn trình tự gắn xen (nghĩa là, trình tự, gen chuyển, caxet, v.v. để được gắn xen vào bộ gen thực vật). (Các) cấu trúc ADN tái tổ hợp theo sáng chế có thể chứa thêm (các) caxet biểu hiện mã hóa nucleaza đặc hiệu vị trí và/hoặc (các) protein liên hợp bất kỳ để thực hiện sự tích hợp định hướng vị trí. (Các) caxet biểu hiện nucleaza này có thể có mặt trong cùng một phân tử hoặc vector với khuôn cho (ở vị trí cis) hoặc trên phân tử hoặc vector riêng biệt (ở vị trí trans). Một số quy trình để tích hợp định hướng vị trí đã biết trong lĩnh vực này bao gồm các protein khác nhau (hoặc phức hợp của các protein và/hoặc ARN hướng dẫn) cắt ADN bộ gen để tạo ra

sự đứt hoặc gãy chuỗi kép (DSB) ở vị trí hoặc locut mong muốn trong bộ gen. Nói ngắn gọn như được hiểu trong lĩnh vực này, trong quá trình sửa DSB hoặc chỗ đứt được gây ra bởi enzym nucleaza, ADN khuôn cho có thể được tích hợp vào bộ gen ở vị trí của DSB hoặc chỗ đứt. Sự có mặt của (các) nhánh tương đồng trong khuôn cho có thể thúc đẩy sự thu nhận và gắn đích của trình tự gắn xen vào bộ gen thực vật trong quá trình sửa nhờ sự tái tổ hợp tương đồng, mặc dù hiện tượng gắn xen có thể xảy ra do việc nối đầu không tương đồng (NHEJ). Ví dụ về các nucleaza đặc hiệu vị trí có thể được sử dụng bao gồm nucleaza ngón tay kẽm, meganucleaza được thao tác di truyền hoặc tự nhiên, các TALE-endonucleaza, và các endonucleaza được hướng dẫn bởi ARN (ví dụ, Cas9 hoặc Cpf1). Đối với các quy trình sử dụng các nucleaza đặc hiệu vị trí được hướng dẫn bởi ARN (ví dụ, Cas9 hoặc Cpf1), (các) cấu trúc ADN tái tổ hợp cũng sẽ bao gồm trình tự mã hóa một hoặc nhiều ARN hướng dẫn để điều khiển nucleaza này đến vị trí mong muốn trong bộ gen thực vật.

Như được sử dụng ở đây, “phân tử ADN tái tổ hợp” là phân tử ADN chứa tổ hợp của các phân tử ADN mà không xuất hiện tự nhiên cùng nhau nếu không có sự can thiệp của con người. Ví dụ, phân tử ADN tái tổ hợp có thể là phân tử ADN mà bao gồm ít nhất hai phân tử ADN khác loại với nhau, một phân tử ADN chứa trình tự ADN mà có nguồn gốc từ các trình tự ADN tồn tại trong tự nhiên, hoặc một phân tử ADN được đưa vào ADN của tế bào chủ bằng kỹ thuật biến nạp di truyền hoặc biên tập gen. Tương tự, “phân tử protein tái tổ hợp” là phân tử protein chứa tổ hợp của các axit amin mà không xuất hiện tự nhiên cùng nhau nếu không có sự can thiệp của con người. Ví dụ, phân tử protein tái tổ hợp có thể là phân tử protein mà bao gồm ít nhất hai phân tử axit amin khác loại đối với nhau, phân tử protein mà chứa trình tự axit amin có nguồn gốc từ các trình tự axit amin tồn tại trong tự nhiên, hoặc phân tử protein mà được biểu hiện trong tế bào chủ nhờ kỹ thuật biến nạp di truyền tế bào chủ hoặc bằng cách biên tập gen bộ gen tế bào chủ.

Chế phẩm phân tử axit nucleic tái tổ hợp mã hóa TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613, và TIC2613PL được đề xuất. Ví dụ, các protein TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613, và TIC2613PL có thể được biểu hiện với các cấu trúc ADN tái tổ hợp, trong đó phân tử polynucleotit với ORF mã hóa protein được liên kết hoạt động với các yếu tố biểu hiện di truyền như trình tự khởi động và yếu tố điều hòa khác bất kỳ cần thiết cho sự biểu hiện trong hệ thống mà cấu trúc này được dự kiến cho nó. Các ví dụ không giới hạn bao gồm trình tự khởi động hoạt động ở thực vật được liên kết hoạt động với trình tự mã hóa

protein TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613, hoặc TIC2613PL để biểu hiện protein này ở thực vật hoặc trình tự khởi động hoạt động *Bt* liên kết hoạt động với trình tự mã hóa protein TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613, hoặc TIC2613PL để biểu hiện protein này ở vi khuẩn *Bt* hoặc loài *Bacillus* khác. Các yếu tố khác có thể được liên kết hoạt động với trình tự mã hóa protein TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613, hoặc TIC2613PL bao gồm, nhưng không giới hạn ở, yếu tố tăng cường, intron, các trình tự dẫn đầu không được dịch mã, các đuôi cố định protein được mã hóa (đuôi HIS), các peptit hoán vị (nghĩa là, các peptit chuyển lập thể, các peptit tín hiệu), các trình tự polypeptit cho các enzym biến đổi sau dịch mã, các vị trí liên kết ribosom, và các vị trí đích ARNi. Các phân tử polynucleotit tái tổ hợp điển hình được đề xuất ở đây bao gồm, nhưng không giới hạn ở, trình tự khởi động khác loại liên kết hoạt động với polynucleotit như SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, và SEQ ID NO:9 mã hóa các polypeptit hoặc protein tương ứng có trình tự axit amin như được chỉ ra trong SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, và SEQ ID NO:10. Trình tự khởi động khác loại cũng có thể được liên kết hoạt động với các trình tự mã hóa ADN tổng hợp mã hóa TIC4472PL, hoặc TIC2613PL được gắn đích lập thể; hoặc TIC4472PL, hoặc TIC2613PL không được gắn đích. Các codon của phân tử axit nucleic tái tổ hợp mã hóa các protein được mô tả ở đây có thể được thay thế bằng các codon cùng nghĩa (đã biết trong lĩnh vực này là đột biến im lặng).

Cấu trúc ADN tái tổ hợp chứa trình tự mã hóa protein TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613, hoặc TIC2613PL có thể chứa thêm vùng ADN mã hóa một hoặc nhiều chất ức chế côn trùng mà có thể được cấu tạo để biểu hiện đồng thời hoặc đồng biểu hiện với trình tự ADN mã hóa protein TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613, hoặc TIC2613PL, protein khác với protein TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613, hoặc TIC2613PL, phân tử dsARN ức chế côn trùng, hoặc protein phụ trợ. Các protein phụ trợ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, đồng yếu tố (co-factor), enzym, đối tác liên kết, hoặc các chất khác có chức năng hỗ trợ cho tác dụng của chất ức chế côn trùng, ví dụ, bằng cách hỗ trợ sự biểu hiện của nó, tác động đến độ ổn định của nó ở thực vật, tối ưu hóa năng lượng tự do để oligome hóa, làm tăng độc tính của nó, và làm tăng phổ hoạt tính của nó. Protein phụ trợ có thể tạo thuận lợi cho sự hấp thu của một hoặc nhiều chất ức chế côn trùng, ví dụ, hoặc tăng cường tác dụng gây độc của chất độc.

Cấu trúc ADN tái tổ hợp có thể được lắp ráp nhờ đó toàn bộ các protein hoặc các phân tử dsARN được biểu hiện từ một trình tự khởi động hoặc mỗi protein hoặc các phân tử dsARN là dưới sự kiểm soát của các trình tự khởi động riêng biệt hoặc một số tổ hợp của chúng. Protein theo sáng chế có thể được biểu hiện từ hệ biểu hiện nhiều gen trong đó một hoặc nhiều protein trong số TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613, hoặc TIC2613PL được biểu hiện từ một đoạn nucleotit chung mà cũng chứa các khung đọc mở và các trình tự khởi động khác, tùy theo loại hệ biểu hiện được lựa chọn. Ví dụ, hệ biểu hiện nhiều gen vi khuẩn có thể sử dụng một trình tự khởi động duy nhất để điều khiển sự biểu hiện của các khung đọc mở liên kết bội/nối tiếp từ bên trong một operon duy nhất (nghĩa là, biểu hiện đa xitron). Trong một ví dụ khác, hệ biểu hiện nhiều gen thực vật có thể sử dụng caxet biểu hiện được liên kết hoặc không được liên kết bội, mỗi caxet biểu hiện protein khác nhau hoặc chất khác như một hoặc nhiều phân tử dsARN.

Các polynucleotit tái tổ hợp hoặc các cấu trúc ADN tái tổ hợp chứa trình tự mã hóa protein TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613, hoặc TIC2613PL có thể được phân phối cho các tế bào chủ bằng các vector, ví dụ, plasmit, baculovirut, nhiễm sắc thể tổng hợp, virion, cosmid, phagemid, thể thực khuẩn hoặc vector virut. Các vector này có thể được sử dụng để đạt được sự biểu hiện ổn định hoặc tạm thời trình tự mã hóa protein TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613, hoặc TIC2613PL trong tế bào chủ, hoặc sự biểu hiện tiếp của polypeptit được mã hóa này. Cấu trúc polynucleotit tái tổ hợp hoặc ADN tái tổ hợp ngoại sinh mà chứa trình tự mã hóa protein TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613, hoặc TIC2613PL và được đưa vào tế bào chủ được đề cập trong sáng chế là “gen chuyển”.

Các tế bào vi khuẩn chuyển gen, tế bào thực vật chuyển gen, các thực vật chuyển gen, và các bộ phận của thực vật chuyển gen mà chứa polynucleotit tái tổ hợp biểu hiện bất kỳ một hoặc nhiều trong số TIC4472 hoặc họ trình tự mã hóa protein độc tố liên quan được đề xuất ở đây. Thuật ngữ “tế bào vi khuẩn” hoặc “vi khuẩn” có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tế bào *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Brevibacillus*, *Klebsiella*, *Erwinia*, hoặc *Rhizobium*. Thuật ngữ “tế bào thực vật” hoặc “thực vật” có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở cây hai lá mầm hoặc cây một lá mầm. Thuật ngữ “tế bào thực vật” hoặc “thực vật” cũng có thể bao gồm nhưng không giới hạn ở, cây hoặc tế bào của cây cỏ linh lăng, chuối, lúa mạch, đậu, bông cải xanh, bắp cải, cải, cà rốt, sắn, thầu dầu, bông cải trắng, cần tây, đậu gà, cải thảo, cam, dưa, cà phê, ngô, cỏ ba lá, bông, bầu bí, dưa chuột, gỗ linh sam, cà tím, bạch đàn, cây lanh, tỏi, nho, cây hublông, tỏi

tây, rau diếp, thông trăm hương, kê, quả dưa, quả hạch, yến mạch, oliu, hành tây, cây cảnh, cò, cỏ, đậu Hà Lan, củ lạc, cây ớt, đậu triều, thông, khoai tây, bạch dương, bí đỏ, thông Radiata, củ cải, hạt cải dầu, lúa, cây thân rễ, lúa mạch đen, hồng hoa, cây bụi, cây cao lương, thông phương Nam, đậu tương, rau chân vịt, quả bí, dâu tây, củ cải đường, mía, hoa hướng dương, ngô ngọt, gỗ gôm, khoai lang, củ kê Mỹ, chè, thuốc lá, cà chua, tiêu hắc mạch, cỏ, dưa hấu, và lúa mì. Trong một số phương án, thực vật chuyển gen và các bộ phận của thực vật chuyển gen được tái sinh từ tế bào thực vật chuyển gen được đề xuất. Trong một số phương án, thực vật chuyển gen có thể thu được từ hạt chuyển gen, bằng cách cắt, bẻ gãy, nghiền hoặc cách khác để tách bộ phận này ra khỏi thực vật. Trong một số phương án, bộ phận của thực vật có thể là hạt, quả nang, lá, hoa, thân, rễ hoặc phần bất kỳ của chúng, hoặc phần không thể tái sinh của bộ phận của thực vật chuyển gen. Như được sử dụng trong ngữ cảnh này, phần “không thể tái sinh” của bộ phận của thực vật chuyển gen là phần mà không thể được cảm ứng để tạo ra thực vật hoàn chỉnh hoặc phần không thể được cảm ứng để tạo ra thực vật hoàn chỉnh có khả năng sinh sản hữu tính và/hoặc vô tính. Trong một số phương án, phần không tái sinh được của bộ phận thực vật là một phần của hạt, quả nang, lá, hoa, thân hoặc rễ chuyển gen.

Quy trình tạo ra cây chuyển gen chứa lượng ức chế côn trùng, Lepidoptera của protein TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613, hoặc TIC2613PL được đề xuất. Các thực vật này có thể được tạo ra bằng cách đưa polynucleotit tái tổ hợp mà mã hóa bất kỳ trong số các protein được đề xuất theo sáng chế vào tế bào thực vật, và chọn thực vật thu được từ tế bào thực vật này mà biểu hiện các protein này với lượng ức chế côn trùng, Lepidoptera. Các cây có thể thu được từ các tế bào thực vật này bằng cách tái sinh, gieo hạt, thụ phấn hoặc các kỹ thuật biến nạp mô phân sinh. Các quy trình để biến nạp thực vật là đã biết trong lĩnh vực này.

Các sản phẩm thực vật đã xử lý, trong đó sản phẩm đã xử lý này chứa lượng phát hiện được của protein TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613, hoặc TIC2613PL, đoạn ức chế côn trùng hoặc một đoạn của nó, hoặc phần phân biệt bất kỳ của nó, cũng được mô tả ở đây. Trong một số phương án, sản phẩm đã xử lý này được chọn từ nhóm bao gồm các bộ phận của thực vật, sinh khối thực vật, dầu, bột thô, đường, thức ăn gia súc, tinh bột, tấm, cám, xơ vải, vỏ, hạt đã xử lý và hạt. Trong một số phương án, sản phẩm đã xử lý này là không thể tái sinh được. Sản phẩm thực vật này có thể bao gồm các thương phẩm hoặc các sản phẩm thương mại khác thu được từ thực vật chuyển gen hoặc bộ phận của thực vật

chuyển gen, trong đó thương phẩm hoặc các sản phẩm khác có thể được theo dõi qua thương mại bằng cách phát hiện các đoạn nucleotit hoặc ARN được biểu hiện hoặc các protein mà mã hóa hoặc chứa các phần phân biệt của protein TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613, hoặc TIC2613PL.

Các thực vật biểu hiện các protein TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613, hoặc TIC2613PL có thể được lai bằng cách gây giống với các sự kiện chuyển gen biểu hiện các protein độc tố khác và/hoặc biểu hiện các tính trạng chuyển gen khác như gen dung nạp thuốc diệt cỏ, gen gây ra các tính trạng về sản lượng hoặc dung nạp stress và tương tự, hoặc các tính trạng này có thể được kết hợp vào một vector duy nhất nhờ đó các tính trạng này được liên kết toàn bộ.

Việc đề cập trong sáng chế đến phân tử ADN hoặc phân tử axit amin “được phân lập”, hoặc thuật ngữ hoặc mệnh đề tương đương, được dự định có nghĩa là phân tử ADN hoặc phân tử axit amin này là phân tử mà có mặt một mình hoặc kết hợp với các thành phần khác, nhưng không phải là trong môi trường tự nhiên của nó. Ví dụ, phân tử ADN hoặc phân tử axit amin được “phân lập” trong phạm vi của sáng chế khi mà phân tử này không nằm trong bộ gen của sinh vật và ở vị trí trong bộ gen mà trong đó nó được tìm thấy một cách tự nhiên. Với mục đích của phần mô tả này, trình tự nucleotit chuyển gen bất kỳ, nghĩa là, trình tự nucleotit của ADN được gắn xen vào bộ gen của các tế bào thực vật hoặc vi khuẩn, hoặc có mặt trong vector ngoài nhiễm sắc thể, sẽ được xem là trình tự nucleotit được phân lập dù nó có mặt trong lap thể hay cấu trúc tương tự được sử dụng để biến nạp các tế bào này, trong bộ gen của thực vật hoặc vi khuẩn, hay có mặt với lượng phát hiện được trong mô, dòng con, các mẫu sinh học hoặc các thương phẩm thu được từ thực vật hoặc vi khuẩn này.

Như được mô tả thêm trong phần Ví dụ, các trình tự mã hóa protein TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613, hoặc TIC2613PL và các trình tự có tỷ lệ phần trăm đồng nhất đáng kể với TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613, hoặc TIC2613PL có thể được nhận diện bằng cách sử dụng các quy trình đã biết đối với người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực này như phản ứng chuỗi polymeraza (PCR), khuếch đại nhiệt và lai. Ví dụ, các protein TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613, hoặc TIC2613PL có thể được sử dụng để sản sinh ra các kháng thể liên kết đặc hiệu với các protein liên quan, và có thể được sử dụng để sàng lọc và phát hiện các thành viên protein khác có quan hệ gần.

Ngoài ra, các trình tự nucleotit mã hóa protein độc tố TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613, và TIC2613PL có thể được sử dụng làm đoạn dò và đoạn mồi để sàng lọc để nhận diện các thành viên khác của lớp này bằng cách sử dụng quy trình khuếch đại chu trình nhiệt hoặc khuếch đại đẳng nhiệt và quy trình lai. Ví dụ, các oligonucleotit thu được từ trình tự như được chỉ ra trong SEQ ID NO:3 có thể được sử dụng để xác định sự có mặt hoặc vắng mặt của gen chuyển TIC4472PL trong mẫu axit deoxyribonucleic thu được từ thương phẩm. Các oligonucleotit thu được từ trình tự như được chỉ ra trong SEQ ID NO:7 có thể được sử dụng để xác định sự có mặt hoặc vắng mặt của gen chuyển TIC2613PL trong mẫu axit deoxyribonucleic thu được từ thương phẩm. Với độ nhạy của một số quy trình phát hiện axit nucleic sử dụng các oligonucleotit, được dự đoán là các oligonucleotit thu được từ các trình tự như được chỉ ra trong SEQ ID NO:3 hoặc SEQ ID NO:9 có thể được sử dụng để phát hiện gen chuyển TIC4472PL hoặc TIC2613PL trong thương phẩm thu được từ các nguồn gộp trong đó chỉ một phần của thương phẩm này là thu được từ thực vật chuyển gen chứa bất kỳ trong số các gen chuyển. Còn được công nhận là các oligonucleotit này có thể được sử dụng để đưa biến đổi trình tự nucleotit vào trong mỗi SEQ ID NO:3 và SEQ ID NO:9. Các oligonucleotit “đột biến” là hữu ích để nhận diện các biến thể trình tự axit amin TIC4472PL và TIC2613PL thể hiện khoảng hoạt tính ức chế côn trùng hoặc sự biểu hiện thay đổi ở tế bào chủ thực vật chuyển gen.

Thể tương đồng trình tự nucleotit, ví dụ, các protein diệt vật gây hại được mã hóa bởi các trình tự nucleotit lai với một trong số hoặc bất kỳ trong số các trình tự được mô tả trong sáng chế trong các điều kiện lai nghiêm ngặt, cũng là một phương án của sáng chế. Sáng chế cũng đề xuất quy trình phát hiện trình tự nucleotit thứ nhất mà lai với trình tự nucleotit thứ hai, trong đó trình tự nucleotit thứ nhất (hoặc trình tự bổ sung đảo của nó) mã hóa protein diệt vật gây hại hoặc đoạn có tác dụng diệt vật gây hại của nó và lai với trình tự nucleotit thứ hai. Trong trường hợp này, trình tự nucleotit thứ hai có thể là bất kỳ trong số các trình tự nucleotit được chỉ ra trong SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, hoặc SEQ ID NO:9 trong các điều kiện lai nghiêm ngặt. Các trình tự mã hóa nucleotit lai với nhau trong các điều kiện lai thích hợp, như các điều kiện lai nghiêm ngặt, và các protein được mã hóa bởi các trình tự nucleotit này phản ứng chéo với kháng huyết thanh được làm cho kháng lại bất kỳ một trong số các protein còn lại. Các điều kiện lai nghiêm ngặt, như được xác định ở đây, bao gồm ít nhất phép lai ở 42°C sau đó là hai lần rửa trong năm phút mỗi lần ở nhiệt độ phòng với 2X SSC, 0,1% SDS, sau đó là hai lần

rửa trong ba mươi phút mỗi lần ở 65°C trong 0,5X SSC, 0,1% SDS. Các lần rửa ở nhiệt độ thậm chí cao hơn tạo ra các điều kiện thậm chí nghiêm ngặt hơn, ví dụ, các điều kiện lai là 68°C, sau đó rửa ở 68°C, trong 2xSSC chứa 0,1% SDS.

Người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực này sẽ nhận ra là, do sự dư thừa mã di truyền, nhiều trình tự khác có khả năng mã hóa các protein liên quan này và các trình tự đó, ở mức độ mà chúng hoạt động để biểu hiện các protein diệt vật gây hại ở chủng *Bacillus* hoặc trong tế bào thực vật, là các phương án của sáng chế, nhận ra là nhiều trình tự mã hóa dư thừa này sẽ không lai trong các điều kiện này với các trình tự *Bacillus* tự nhiên mã hóa TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613, và TIC2613PL. Sáng chế đề xuất việc sử dụng các quy trình nhận diện này và các quy trình khác đã biết đối với người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực này, để nhận diện trình tự mã hóa protein TIC4472, TIC1425, và TIC2613 và các trình tự có tỉ lệ phần trăm đồng nhất trình tự đáng kể với các trình tự mã hóa protein TIC4472, TIC1425, và TIC2613.

Sáng chế cũng đề xuất việc sử dụng các quy trình phân tử đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này để thao tác di truyền và tách dòng các protein hữu ích về thương mại chứa các thể khảm của các protein từ protein diệt loài gây hại; ví dụ, các thể khảm này có thể được lắp ráp từ các đoạn của các protein TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613, hoặc TIC2613PL để thu được các phương án hữu ích bổ sung bao gồm tổ hợp của các đoạn của protein TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613, và TIC2613PL với các đoạn của các protein đa dạng khác với TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613, và TIC2613PL và các protein liên quan. Các protein TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613, và TIC2613PL có thể được sắp xếp thẳng hàng với nhau và với *Bacillus thuringiensis* khác hoặc các protein diệt vật gây hại khác (dù các trình tự này có liên quan gần hay xa về phát sinh loài), và các đoạn của mỗi protein này có thể được xác định là hữu ích cho sự thể giữa các protein được sắp xếp thẳng hàng, dẫn đến việc tạo ra các protein khảm. Các protein khảm này có thể được đưa vào phân tích thử nghiệm sinh học vật gây hại và được mô tả về sự có mặt hoặc vắng mặt của hoạt tính sinh học tăng cường hoặc phổ vật gây hại đích được mở rộng so với các protein mẹ mà từ đó mỗi đoạn trong thể khảm thu được. Hoạt tính trừ sâu của các polypeptit có thể được thao tác di truyền thêm về hoạt tính đối với vật gây hại cụ thể hoặc về phổ vật gây hại rộng hơn bằng cách hoán đổi các miền hoặc các đoạn với các protein khác hoặc bằng cách sử dụng các quy trình tiên hóa có định hướng đã biết trong lĩnh vực này.

Các quy trình kiểm soát côn trùng, cụ thể là sự gây hại của Lepidoptera trên cây trồng, bằng các protein TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613 và TIC2613PL cũng được mô tả trong sáng chế. Các quy trình này có thể bao gồm trồng thực vật chứa lượng ức chế côn trùng hoặc Lepidoptera của protein độc tố TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613 và TIC2613PL. Trong một số phương án, các quy trình này có thể bao gồm thêm bất kỳ một hoặc nhiều trong số: (i) sử dụng chế phẩm bất kỳ chứa hoặc mã hóa protein độc tố TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613, và TIC2613PL cho thực vật hoặc hạt mà sẽ phát triển thành cây; và (ii) biến nạp thực vật hoặc tế bào thực vật mà sẽ phát triển thành cây với polynucleotit mã hóa protein độc tố TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613, và TIC2613PL. Nói chung, được đề xuất là protein độc tố TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613, và TIC2613PL có thể được cung cấp trong chế phẩm, được cung cấp trong vi sinh vật, hoặc được cung cấp trong thực vật chuyển gen để gây ra hoạt tính ức chế côn trùng chống lại các côn trùng Lepidopteran.

Trong một số phương án, phân tử axit nucleic tái tổ hợp của các protein độc tố TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613, và TIC2613PL là thành phần có tác dụng diệt vật gây hại của chế phẩm ức chế côn trùng được tạo ra bằng cách nuôi cấy *Bacillus* tái tổ hợp hoặc tế bào vi khuẩn tái tổ hợp bất kỳ khác đã được biến nạp để biểu hiện protein độc tố TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613, và TIC2613PL trong các điều kiện thích hợp cho sự biểu hiện protein độc tố TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613, và TIC2613PL. Chế phẩm này có thể được bào chế bằng cách hút ẩm, làm đông khô, đông nhất, chiết, lọc, ly tâm, làm lắng, hoặc cô đặc môi trường nuôi cấy của các tế bào tái tổ hợp biểu hiện/sản sinh ra polypeptit tái tổ hợp này. Quy trình này có thể tạo ra *Bacillus* hoặc dịch chiết tế bào vi khuẩn ký sinh và gây bệnh cho côn trùng khác, huyền phù tế bào, dịch đồng nhất tế bào, dịch dung giải tế bào, hỗn dịch tế bào, dịch lọc tế bào, hoặc pelet tế bào. Bằng cách thu được polypeptit tái tổ hợp được sản xuất như vậy, chế phẩm chứa polypeptit tái tổ hợp này có thể bao gồm các tế bào vi khuẩn, các bào tử vi khuẩn, và các thể vùi bào tử vỏ và có thể được bào chế cho nhiều đường sử dụng khác nhau, bao gồm dưới dạng sản phẩm xịt ức chế côn trùng nông nghiệp hoặc dưới dạng chế phẩm ức chế côn trùng trong thử nghiệm sinh học chế độ ăn.

Trong một phương án, để làm giảm khả năng phát triển sự kháng, chế phẩm ức chế côn trùng chứa TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613, và TIC2613PL có thể chứa thêm ít nhất một polypeptit bổ sung thể hiện hoạt tính ức chế côn trùng kháng lại cùng một

loài côn trùng Lepidopteran, nhưng khác với protein độc tố TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613, hoặc TIC2613PL. Các polypeptit bổ sung cho chế phẩm này có thể bao gồm protein ức chế côn trùng và phân tử dsARN ức chế côn trùng. Một ví dụ về việc sử dụng các trình tự ribonucleotit này để kiểm soát sâu bọ được mô tả trong Baum, *et al.* (Công bố patent Mỹ 2006/0021087 A1). Polypeptit bổ sung này để kiểm soát vật gây hại Lepidopteran có thể được chọn từ nhóm bao gồm protein ức chế côn trùng, như, nhưng không giới hạn ở, Cry1A (Patent Mỹ số 5,880,275), Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1A. 105, Cry1Ae, Cry1B (Công bố patent Mỹ số 10/525,318), Cry1C (Patent Mỹ số 6,033,874), Cry1D, Cry1Da và các biến thể của nó, Cry1E, Cry1F, và thể khảm Cry1A/F (Công bố patent Mỹ số 7,070,982; 6,962,705; và 6,713,063), Cry1G, Cry1H, Cry1I, Cry1J, Cry1K, Cry1L, thể khảm loại Cry1 như, nhưng không giới hạn ở, TIC836, TIC860, TIC867, TIC869, và TIC1100 (công bố đơn quốc tế WO2016/061391 (A2)), TIC2160 (công bố đơn quốc tế WO2016/061392(A2)), Cry2A, Cry2Ab (Patent Mỹ số 7,064,249), Cry2Ae, Cry4B, Cry6, Cry7, Cry8, Cry9, Cry15, Cry43A, Cry43B, Cry51Aa1, ET66, TIC400, TIC800, TIC834, TIC1415, Vip3A, VIP3Ab, VIP3B, AXMI-001, AXMI-002, AXMI-030, AXMI-035, và AXMI-045 (công bố patent Mỹ 2013-0117884 A1), AXMI-52, AXMI-58, AXMI-88, AXMI-97, AXMI-102, AXMI-112, AXMI-117, AXMI-100 (công bố patent Mỹ 2013-0310543 A1), AXMI-115, AXMI-113, AXMI-005 (công bố patent Mỹ 2013-0104259 A1), AXMI-134 (công bố patent Mỹ 2013-0167264 A1), AXMI-150 (công bố patent Mỹ 2010-0160231 A1), AXMI-184 (công bố patent Mỹ 2010-0004176 A1), AXMI-196, AXMI-204, AXMI-207, axmi209 (công bố patent Mỹ 2011-0030096 A1), AXMI-218, AXMI-220 (công bố patent Mỹ 2014-0245491 A1), AXMI-221z, AXMI-222z, AXMI-223z, AXMI-224z, AXMI-225z (công bố patent Mỹ 2014-0196175 A1), AXMI-238 (công bố patent Mỹ 2014-0033363 A1), AXMI-270 (công bố patent Mỹ 2014-0223598 A1), AXMI-345 (công bố patent Mỹ 2014-0373195 A1), AXMI-335 (công bố đơn quốc tế WO2013/134523(A2)), DIG-3 (công bố patent Mỹ 2013-0219570 A1), DIG-5 (công bố patent Mỹ 2010-0317569 A1), DIG-11 (công bố patent Mỹ 2010-0319093 A1), AfIP-1A và các dẫn xuất của nó (công bố patent Mỹ 2014-0033361 A1), AfIP-1B và các dẫn xuất của nó (công bố patent Mỹ 2014-0033361 A1), PIP-1APIP-1B (công bố patent Mỹ 2014-0007292 A1), PSEEN3174 (công bố patent Mỹ 2014-0007292 A1), AECFG-592740 (công bố patent Mỹ 2014-0007292 A1), Pput_1063 (công bố patent Mỹ 2014-0007292 A1), DIG-657 (công bố đơn quốc tế WO2015/195594 (A2)), Pput_1064 (công bố patent Mỹ 2014-

0007292 A1), GS-135 và các dẫn xuất của nó (công bố patent Mỹ 2012-0233726 A1), GS153 và các dẫn xuất của nó (công bố patent Mỹ 2012-0192310 A1), GS154 và các dẫn xuất của nó (công bố patent Mỹ 2012-0192310 A1), GS155 và các dẫn xuất của nó (công bố patent Mỹ 2012-0192310 A1), SEQ ID NO:2 và các dẫn xuất của nó như được mô tả trong công bố patent Mỹ 2012-0167259 A1, SEQ ID NO:2 và các dẫn xuất của nó như được mô tả trong công bố patent Mỹ 2012-0047606 A1, SEQ ID NO:2 và các dẫn xuất của nó như được mô tả trong công bố patent Mỹ 2011-0154536 A1, SEQ ID NO:2 và các dẫn xuất của nó như được mô tả trong công bố patent Mỹ 2011-0112013 A1, SEQ ID NO:2 và 4 và các dẫn xuất của nó như được mô tả trong công bố patent Mỹ 2010-0192256 A1, SEQ ID NO:2 và các dẫn xuất của nó như được mô tả trong công bố patent Mỹ 2010-0077507 A1, SEQ ID NO:2 và các dẫn xuất của nó như được mô tả trong công bố patent Mỹ 2010-0077508 A1, SEQ ID NO:2 và các dẫn xuất của nó như được mô tả trong công bố patent Mỹ 2009-0313721 A1, SEQ ID NO:2 hoặc 4 và các dẫn xuất của nó như được mô tả trong công bố patent Mỹ 2010-0269221 A1, SEQ ID NO:2 và các dẫn xuất của nó như được mô tả trong Patent Mỹ số 7,772,465 (B2), CF161_0085 và các dẫn xuất của nó như được mô tả trong WO2014/008054 A2, các protein độc tố Lepidopteran và các dẫn xuất của chúng như được mô tả trong các công bố Patent Mỹ US2008-0172762 A1, US2011-0055968 A1, và US2012-0117690 A1; SEQ ID NO:2 và các dẫn xuất của nó như được mô tả trong US7510878(B2), SEQ ID NO:2 và các dẫn xuất của nó như được mô tả trong Patent Mỹ số 7812129(B1); và tương tự.

Trong các phương án khác, chế phẩm/sản phẩm này có thể chứa thêm ít nhất một polypeptit bổ sung thể hiện hoạt tính ức chế côn trùng đối với côn trùng không bị ức chế bởi protein ức chế côn trùng khác theo sáng chế để mở rộng phổ ức chế côn trùng thu được. Ví dụ, để kiểm soát vật gây hại Hemipteran, hỗn hợp protein ức chế côn trùng theo sáng chế có thể được sử dụng với các protein có tác dụng trên Hemipteran như TIC1415 (công bố Patent Mỹ 2013-0097735 A1), TIC807 (Patent Mỹ số 8609936), TIC834 (công bố patent Mỹ 2013-0269060 A1), AXMI-036 (công bố patent Mỹ 2010-0137216 A1), và AXMI-171 (công bố patent Mỹ 2013-0055469 A1). Ngoài ra, polypeptit để kiểm soát vật gây hại Coleopteran có thể được chọn từ nhóm bao gồm protein ức chế côn trùng, như, nhưng không giới hạn ở, Cry3Bb (Patent Mỹ số 6,501,009), các biến thể Cry1C, các biến thể Cry3A, Cry3, Cry3B, Cry34/35, 5307, AXMI134 (công bố patent Mỹ 2013-0167264 A1) AXMI-184 (công bố patent Mỹ 2010-0004176 A1), AXMI-205 (công bố patent Mỹ

2014-0298538 A1), axmi207 (công bố patent Mỹ 2013-0303440 A1), AXMI-218, AXMI-220 (công bố patent Mỹ 20140245491A1), AXMI-221z, AXMI-223z (công bố patent Mỹ 2014-0196175 A1), AXMI-279 (công bố patent Mỹ 2014-0223599 A1), AXMI-R1 và các biến thể của nó (công bố patent Mỹ 2010-0197592 A1, TIC407, TIC417, TIC431, TIC807, TIC853, TIC901, TIC1201, TIC3131, DIG-10 (công bố patent Mỹ 2010-0319092 A1), eHIPs (Công bố đơn Patent Mỹ số 2010/0017914), IP3 và các biến thể của nó (công bố patent Mỹ 2012-0210462 A1), và □-Hexatoxin-Hv1a (công bố đơn Patent Mỹ US2014-0366227 A1).

Các polypeptit bổ sung để kiểm soát sâu bọ Coleopteran, Lepidopteran, và Hemipteran có thể được tìm thấy trên trang web danh pháp độc tố *Bacillus thuringiensis* được duy trì bởi Neil Crickmore (trên world wide web tại btnomenclature.info).

Khả năng phát triển tính kháng của côn trùng với một số thuốc trừ sâu đã được ghi lại trong lĩnh vực này. Một chiến lược quản lý tính kháng của côn trùng là sử dụng cây trồng chuyển gen biểu hiện hai chất ức chế côn trùng khác nhau mà hoạt động nhờ các cơ chế hoạt động khác nhau. Do đó, côn trùng bất kỳ có khả năng kháng lại một trong các chất ức chế côn trùng có thể được kiểm soát bởi chất ức chế côn trùng còn lại. Chiến lược quản lý tính kháng của côn trùng khác sử dụng ứng dụng của các thực vật không được bảo vệ cho các loài vật gây hại Lepidopteran đích để cung cấp nơi ẩn náu cho các thực vật chưa được bảo vệ này. Một ví dụ cụ thể được mô tả trong Patent Mỹ số 6,551,962, được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn.

Các phương án khác như các hóa chất trừ sâu sử dụng tại chỗ được thiết kế để kiểm soát vật gây hại mà cũng được kiểm soát bởi các protein được mô tả ở đây để được sử dụng cùng với các protein trong chế phẩm xử lý hạt, chế phẩm phun lên, nhỏ giọt lên hoặc lau có thể được sử dụng trực tiếp cho đất (thấm ướt đất), được sử dụng cho cây đang phát triển biểu hiện các protein được mô tả ở đây, hoặc được bào chế để sử dụng được cho hạt chứa một hoặc nhiều gen chuyển mã hóa một hoặc nhiều protein đã được mô tả. Các chế phẩm để sử dụng trong các quy trình xử lý hạt có thể được sử dụng cùng với nhiều nhãn dính và chất kết dính đã biết trong lĩnh vực này. Các chế phẩm này có thể chứa các thuốc trừ sâu mà là hiệp đồng về cơ chế tác dụng với các protein được mô tả, nhờ đó chế phẩm trừ sâu này tác dụng bằng cơ chế tác dụng khác để kiểm soát loại vật gây hại giống hoặc tương tự mà có thể được kiểm soát bởi các protein được mô tả, hoặc các thuốc trừ sâu này có tác dụng kiểm soát vật gây hại trong phạm vi vật chủ rộng hơn hoặc kiểm soát được các loài

vật gây hại trên thực vật mà chưa được kiểm soát hiệu quả bởi các protein diệt vật gây hại TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613 và TIC2613PL.

Chế phẩm/công thức đã đề cập trên đây có thể chứa thêm chất mang được chấp nhận trong nông nghiệp, như môi, bột, bụi, pelet, bụi nước, nhũ tương, huyền phù keo, dung dịch nước, chế phẩm tinh thể/bào tử *Bacillus*, chất xử lý hạt, tế bào thực vật/mô thực vật/thực vật tái tổ hợp đã được biến nạp để biểu hiện một hoặc nhiều protein này, hoặc vi khuẩn đã được biến nạp để biểu hiện một hoặc nhiều protein này. Tùy theo mức độ ức chế côn trùng hoặc tác dụng ức chế trừ sâu vốn có ở polypeptit tái tổ hợp này và mức độ mà chế phẩm được sử dụng cho thực vật hoặc thử nghiệm chế độ ăn, chế phẩm/công thức này có thể bao gồm nhiều khối lượng khác nhau của polypeptit tái tổ hợp này, ví dụ, từ 0,0001% đến 0,001% đến 0,01% đến 1% đến 99% theo khối lượng polypeptit tái tổ hợp này.

Trên cơ sở trên đây, người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực này nên hiểu rõ là các thay đổi có thể được tạo ra ở các khía cạnh cụ thể đã được mô tả và vẫn thu được kết quả giống hoặc tương tự mà không vượt ra khỏi tinh thần và phạm vi của sáng chế. Do đó các chi tiết về cấu trúc và chức năng được mô tả ở đây không được hiểu là làm giới hạn. Nên được hiểu là toàn bộ phần mô tả của mỗi tài liệu tham khảo được trích dẫn ở đây được đưa vào phần mô tả của đơn này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Phát hiện, tách dòng, và biểu hiện TIC4472, TIC1425, và TIC2613

Các trình tự mã hóa ba protein diệt vật gây hại *Bacillus thuringiensis* mới được nhận diện, tách dòng, xác nhận trình tự, và được kiểm tra trong thử nghiệm sinh học côn trùng. Các protein diệt loài gây hại, TIC4472, TIC1425 và TIC2613, được phân lập từ các chủng *Bacillus thuringiensis* EG10742, EG10731, và EG5408, tương ứng, là các protein tương tự Cry1Ca mới.

Các đoạn môi phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) được thiết kế để khuếch đại bản sao có độ dài đầy đủ của vùng mã hóa cho TIC4472, TIC1425 và TIC2613 từ toàn bộ ADN bộ gen được phân lập lần lượt từ các chủng *Bacillus thuringiensis* EG10742, EG10731, và EG5408. Các đơn vị siêu sao chép PCR cũng bao gồm các codon khởi đầu dịch mã và kết thúc dịch mã của mỗi trình tự mã hóa.

Mỗi đơn vị siêu sao chép này được tách dòng bằng cách sử dụng quy trình đã biết trong lĩnh vực này vào các vector biểu hiện *Bt* (*Bacillus thuringiensis*) nằm trong môi liên kết hoạt động với trình tự khởi động biểu hiện được *Bt*.

Ví dụ 2

TIC4472, TIC1425, và TIC2613 thể hiện tác dụng đối với Lepidopteran trong thử nghiệm sinh học côn trùng

Hoạt tính sinh học của các protein diệt vật gây hại TIC4472, TIC1425 và TIC2613 được đánh giá bằng cách sản sinh protein này trong vật chủ biểu hiện *Bt*. Chủng *Bt* biểu hiện TIC4472, TIC1425 và TIC2613 được nuôi trong hai mươi tư (24) giờ và sau đó chế phẩm tinh thể bào tử hoặc chế phẩm protein hòa tan được bổ sung vào khẩu phần ăn cho côn trùng. Sự chết và choáng được đánh giá bằng cách so sánh sự sinh trưởng và phát triển của côn trùng trên chế độ ăn với môi trường nuôi cấy từ chủng *Bt* biểu hiện TIC4472, TIC1425 và TIC2613 với côn trùng trên chế độ ăn với môi trường nuôi cấy đối chứng không được xử lý.

Các chế phẩm TIC4472 được thử nghiệm chống lại loài Lepidopteran sâu đục bắp trên cây ngô (hai bầy (CEW và CEWUC), *Helicoverpa zea*, còn được gọi ở đây là sâu đục quả cây bông và sâu đục quả đậu tương), sâu lá bông (CLW, *Alabama argillacea*), sâu đục thân bắp Châu Âu (ECB, *Ostrinia nubilalis*), sâu xanh mùa thu (FAW, *Spodoptera frugiperda*), sâu đo đậu tương (SBL, *Chrysodeixis includens*), sâu xanh Miền Nam (SAW, *Spodoptera eridania*), sâu đục thân ngô Tây Nam (SWCB, *Diatraea grandiosella*), sâu đục thân mía (SCB, *Diatraea saccharalis*), bầy sâu đục thân mía kháng Cry2Ab (SCB2R), sâu đục chồi cây Thuộc lá (TBW, *Heliothis virescens*), và sâu bướm cây đậu mè rừng (VBW, *Anticarsia gemmatilis*); loài Coleopteran bộ cánh cứng khoai tây Colorado (CPB, *Leptinotarsa decemlineata*) và sâu hại rễ ngô Miền Tây (WCB, *Diabrotica virgifera virgifera*); loài Hemipteran bộ cánh cứng ăn thực vật xín màu (TPB, *Lygus lineolaris*), bộ cánh cứng ăn thực vật xín màu miền Tây (WTP, *Lygus hesperus*); và loài Dipteran muỗi gây bệnh sốt Vàng (*Aedes aegypti*). Các chế phẩm chứa TIC1425 được thử nghiệm chống lại loài Lepidopteran sâu xám (BCW, *Agrotis ipsilon*), sâu lá bông (CLW, *Alabama argillacea*), sâu đục thân bắp Châu Âu (ECB, *Ostrinia nubilalis*), sâu xanh mùa thu (FAW, *Spodoptera frugiperda*), sâu xám (BCW, *Agrotis ipsilon*), sâu đục thân ngô Tây Nam (SWCB, *Diatraea grandiosella*), và sâu đục thân mía (SCB, *Diatraea saccharalis*); và loài

Coleopteran sâu hại rễ ngô miền Tây (WCB, *Diabrotica virgifera virgifera*) và sâu hại rễ ngô miền Nam (*Diabrotica undecimpunctata howardi*). Các chế phẩm chứa TIC2613 được thử nghiệm chống lại loài Lepidopteran sâu đục bắp trên cây ngô (hai bầy (CEW và CEWUC), *Helicoverpa zea*, còn được gọi ở đây là sâu đục quả cây bông và sâu đục quả đậu tương), sâu lá bông (CLW, *Alabama argillacea*), sâu đục thân bắp Châu Âu (ECB, *Ostrinia nubilalis*), sâu xanh mùa thu (FAW, *Spodoptera frugiperda*), sâu đo đậu tương (SBL, *Chrysodeixis includens*), sâu xanh Miền Nam (SAW, *Spodoptera eridania*), sâu xám (BCW, *Agrotis ipsilon*), sâu đục thân ngô Tây Nam (SWCB, *Diatraea grandiosella*), sâu đục chồi cây Thuộc lá (TBW, *Heliothis virescens*), và sâu bướm cây đậu mèo rừng (VBW, *Anticarsia gemmatilis*); loài Coleopteran bộ cánh cứng cây khoai tây Colorado (CPB, *Leptinotarsa decemlineata*); sâu hại rễ ngô miền Tây (WCB, *Diabrotica virgifera virgifera*) và sâu hại rễ ngô miền Nam (*Diabrotica undecimpunctata howardi*); và loài Hemipteran bộ cánh cứng ăn thực vật xỉn màu (TPB, *Lygus lineolaris*), bộ cánh cứng ăn thực vật xỉn màu miền Tây (WTP, *Lygus hesperus*).

Hoạt tính thử nghiệm sinh học được quan sát cho mỗi protein được nuôi trong vật chủ *Bt* được trình bày trong Bảng 3 và 4 dưới đây, trong đó “+” thể hiện hoạt tính, “NT” thể hiện độc tố này không được thử nghiệm chống lại loài côn trùng gây hại cụ thể, “S” chỉ ra là choáng, và “M” chỉ ra là chết. Các chế phẩm chứa TIC4472, TIC1425, và TIC2613 không thể hiện hoạt tính chống lại Coleopteran hoặc côn trùng gây hại Hemipteran được thử nghiệm cho mỗi protein. TIC4472 cũng thể hiện hoạt tính chống lại muỗi gây bệnh sốt Vàng (*Aedes aegypti*). Cả ba độc tố đều thể hiện tác dụng chống nhiều côn trùng gây hại Lepidopteran như được thể hiện trong Bảng 3 và 4.

Bảng 3. Hoạt tính thử nghiệm sinh học của TIC4472, TIC1425, và TIC2613 chống lại sâu bộ.

	CEW		CEWUC		CLW		ECB		FAW		SBL		SAW	
Độc tố	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M
TIC4472	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+
TIC1425	NT	NT				+	+	+	+		NT	NT		
TIC2613	+				+	+	+	+	+	+	+	+	+	

Bảng 4. Hoạt tính thử nghiệm sinh học của TIC4472, TIC1425, và TIC2613 chống lại sâu bọ.

	BCW		SCB		SCB2R		SWCB		TBW		VBC		YFM	
Độc tố	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M
TIC4472	NT	NT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+
TIC1425				+	NT	NT		+	NT	NT	NT	NT	NT	NT
TIC2613			+	+	NT	NT	+	+	+		+		NT	NT

Như có thể thấy trong Bảng 3 và 4 trên đây, độc tố côn trùng TIC4472 thể hiện hoạt tính chống lại tất cả các côn trùng gây hại Lepidopteran được thử nghiệm (CEW, CEWUC, CLW, ECB, FAW, SBL, SAW, SCB, SCB2R, SWCB, TBW, và VBC); cũng như YFM. Độc tố côn trùng TIC1425 thể hiện hoạt tính chống lại CLW, ECB, FAW, SCB, và SWCB. Độc tố côn trùng TIC2613 thể hiện hoạt tính chống lại CEW, CLW, ECB, FAW, SBL, SAW, SCB, SWCB, TBW, và VBC. Hoạt tính không được quan sát thấy đối với TIC1425 và TIC2613 khi được thử nghiệm chống lại BCW.

Trong một loạt thử nghiệm riêng biệt, các chế phẩm protein chứa TIC4472 được thử nghiệm bằng cách sử dụng thử nghiệm chông chế độ ăn chống lại côn trùng gây hại Lepidopteran sâu xanh da láng (BAW, *Spodoptera exigua*), sâu hồng hại bông (PBW, *Pectinophora gossypiella*), sâu hồng hại bông kháng Cry1Ac (PBW_Cry1Ac^r, *Pectinophora gossypiella*), sâu đục quả Old World (OWB, *Helicoverpa armigera*), sâu lá Oriental (OLW, *Spodoptera litura*), và sâu đóm đục quả (SBW, *Earias vittella*). Bảng 5 thể hiện hoạt tính được quan sát thấy chống lại mỗi côn trùng gây hại trong số các côn trùng gây hại Lepidopteran được thử nghiệm trong thử nghiệm sinh học chông chế độ ăn, trong đó “+” thể hiện hoạt tính.

Bảng 5. Hoạt tính thử nghiệm sinh học của TIC4472 chống lại côn trùng gây hại Lepidopteran.

Côn trùng gây hại Lepidopteran					
BAW	PBW	PBW_Cry1Ac ^r	OWB	OLW	SBW
+	+	+	+	+	+

Như có thể được thấy trong Bảng 5 trên đây, TIC4472 thể hiện hoạt tính chống lại tất cả các côn trùng gây hại Lepidopteran được thử nghiệm trong thử nghiệm sinh học chông chế độ ăn, bao gồm bầy sâu hồng hại bông kháng Cry1Ac.

Như được thể hiện trong các Bảng 3-5, TIC4472, TIC1425, và TIC2613 thể hiện hoạt tính trên một phạm vi rộng các loài côn trùng gây hại Lepidopteran.

Ví dụ 3

Thiết kế trình tự mã hóa tổng hợp mã hóa TIC4472PL và TIC2613PL để biểu hiện trong tế bào thực vật

Các trình tự mã hóa tổng hợp được cấu trúc để sử dụng trong việc biểu hiện protein được mã hóa ở thực vật, được tách dòng vào vector biến nạp thực vật nhị thể, và được sử dụng để biến nạp các tế bào thực vật. Các trình tự tổng hợp được tổng hợp theo các quy trình thường được mô tả trong Patent Mỹ 5,500,365, tránh một số trình tự có vấn đề về độc hại như các trình tự polyadenyl hóa thực vật giàu ATTTA và A/T. Các trình tự mã hóa tổng hợp mã hóa các protein TIC4472PL và TIC2613PL chứa gốc alanin bổ sung ngay sau methionin khởi đầu so với các protein TIC4472 và TIC2613, tương ứng. Gốc alanin bổ sung được đưa vào trình tự mã hóa tổng hợp để cải thiện sự biểu hiện của protein độc tố côn trùng này.

Trình tự mã hóa tổng hợp mã hóa TIC4472PL (SEQ ID NO:4) được trình bày ở đây là SEQ ID NO:3. Trình tự mã hóa tổng hợp mã hóa TIC2613PL (SEQ ID NO:10) được trình bày ở đây là SEQ ID NO:9. Các trình tự mã hóa tổng hợp được sử dụng trong vector biến nạp thực vật nhị thể để tạo ra thực vật chuyển gen biểu hiện protein TIC4472PL và TIC2613PL và được thử nghiệm về hoạt tính chống lại côn trùng gây hại Lepidopteran.

Ví dụ 4

Thử nghiệm về hoạt tính TIC4472PL chống lại côn trùng gây hại Lepidopteran ở cây bông biến nạp ổn định

Các vector biến nạp thực vật nhị thể chứa các casset gen chuyển được thiết kế để biểu hiện protein diệt vật gây hại TIC4472PL không được gắn đích được tách dòng bằng cách sử dụng các quy trình đã biết trong lĩnh vực này. Các vector tạo thành được sử dụng để biến nạp ổn định cây bông. Các mô được thu hoạch từ các thể biến nạp và được sử dụng trong thử nghiệm sinh học côn trùng chống lại các sâu bọ Lepidopteran khác nhau.

Các trình tự mã hóa tổng hợp được cấu trúc để sử dụng trong việc biểu hiện protein được mã hóa ở thực vật, được tách dòng vào vector biến nạp thực vật nhị thể, và được sử dụng để biến nạp các tế bào cây bông. Các vector biến nạp thực vật thu được chứa casset

gen chuyển thứ nhất để biểu hiện protein diệt vật gây hại TIC4472PL chứa trình tự khởi động cơ định, được liên kết hoạt động 5' với trình tự dẫn đầu, được liên kết hoạt động 5' với trình tự mã hóa tổng hợp mã hóa protein TIC4472PL không gắn đích, mà trình tự này lại được liên kết hoạt động 5' với 3' UTR; và caxet gen chuyển thứ hai để chọn lọc các tế bào thực vật biến nạp bằng cách sử dụng kỹ thuật chọn lọc spectinomycin.

Ba cấu trúc vectơ biến nạp thực vật nhị thể được cấu trúc như được mô tả trên đây và chứa các trình tự khởi động cơ định khác nhau. Hai cấu trúc, Cấu trúc 1 và Cấu trúc 3 còn chứa trình tự intron được liên kết hoạt động 3' với trình tự dẫn đầu và 5' với trình tự mã hóa tổng hợp mã hóa protein TIC4472PL không gắn đích. Cấu trúc 2 là không có intron. Các cây bông được biến nạp với ba vectơ biến nạp nhị thể khác nhau sử dụng quy trình biến nạp qua trung gian *Agrobacterium*. Các tế bào đã biến nạp được cảm ứng để tạo ra thực vật bằng các quy trình đã biết trong lĩnh vực này. Các thử nghiệm sinh học sử dụng các đĩa lá cây được thực hiện tương tự các quy trình được mô tả trong Patent Mỹ số 8,344,207. Các ấu trùng sơ sinh mới nở đơn ít hơn một ngày tuổi được đặt lên mỗi mẫu đĩa lá và được cho ăn trong khoảng bốn ngày. Cây bông chưa biến nạp được sử dụng để thu được mô để sử dụng làm đối chứng âm. Nhiều sự kiện biến nạp gắn xen bản sao đơn R₀ từ mỗi vectơ nhị thể được đánh giá chống lại sâu đục quả cây bông (CBW, *Helicoverpa zea*), sâu xanh mùa thu (FAW, *Spodoptera frugiperda*), sâu đo đậu tương (SBL, *Chrysodeixis includens*), và sâu đục chồi cây Thuốc lá (TBW, *Heliothis virescens*). Điểm đánh giá hư hại lá (LDR) nằm trong khoảng từ một (1) đến bốn (4) được áp dụng cho sự kiện. Các điểm LDR là dựa vào tỷ lệ phần trăm hư hại quan sát thấy cho mỗi đĩa lá. Bảng 6 dưới đây thể hiện điểm số LDR và khoảng tỷ lệ phần trăm hư hại tương ứng liên quan đến mỗi điểm số. Đối với các điểm số LDR là một (1), độ thâm nhập của tình trạng cũng được đánh giá. Độ thâm nhập cao (như được chỉ ra bởi "(H)") được xác định là lớn hơn năm mươi (50) phần trăm các sự kiện được thử nghiệm cho mỗi cấu trúc có ít hơn hoặc bằng mười (10) phần trăm hư hại lá. Độ thâm nhập thấp (được thể hiện bằng "(L)") được xác định là nhỏ hơn hoặc bằng năm mươi (50) phần trăm các sự kiện thử nghiệm cho mỗi cấu trúc có ít hơn hoặc bằng mười (10) phần trăm hư hại lá. Độ thâm nhập không được áp dụng cho điểm số LDR lớn hơn một (1).

Bảng 6. Điểm số đánh giá hư hại lá cây bông (LDR) và tỷ lệ phần trăm hư hại tương ứng và độ thâm nhập.

Điểm LDR	Khoảng đánh giá hư hại lá (LDR)	Độ thâm nhập
1	$LDR \leq 10\%$	Cao = > 50% các sự kiện
1		Thấp = < 50% các sự kiện
2	$10\% < LDR \leq 17,5\%$	n/a
3	$17,5\% < LDR \leq 35\%$	n/a
4	$LDR > 35\%$	n/a

Điểm số đánh giá hư hại lá cho các cây bông R_0 đã biến nạp biểu hiện TIC4472PL được trình bày trong Bảng 7 dưới đây. Số lượng các sự kiện thể hiện điểm số LDR trong tổng số sự kiện được thử nghiệm được chỉ ra trong dấu ngoặc đơn, sau đó là độ thâm nhập cho các điểm LDR là một (1).

Bảng 7. Điểm số đánh giá hư hại lá (LDR), số lượng sự kiện thể hiện LDR, và độ thâm nhập đối với các cây bông R_0 đã biến nạp biểu hiện TIC4472PL.

Cấu trúc	CBW	FAW	SBL	TBW
Cấu trúc 1	3 (1/25)	2 (2/25)	1 (25/25) H	1 (24/25) H
Cấu trúc 2	3 (3/25)	2 (1/25)	1 (24/25) H	1 (16/25) H
Cấu trúc 3	4 (23/23)	1 (1/23) L	1 (21/23) H	1 (6/23) L

Các cây bông R_0 đã biến nạp biểu hiện TIC4472PL là hiệu quả cao (được xác định là có nhỏ hơn hoặc bằng mười phần trăm hư hại lá) chống lại SBL và TBW như được thể hiện trong Bảng 7. Tác dụng chống lại CBW và FAW cũng được quan sát thấy trong một số sự kiện.

Các sự kiện bông R_1 được chọn từ cây bông R_0 đã biến nạp được thử nghiệm trên đây và được sử dụng trong thử nghiệm đĩa lá chống lại FAW, SBL, và TBW. Bảng 8 thể hiện điểm số đánh giá sự hư hại lá cho các cây bông R_1 đã biến nạp biểu hiện TIC4472PL.

Bảng 8. Điểm số đánh giá hư hại lá (LDR), số lượng sự kiện thể hiện LDR, và độ thâm nhập đối với các cây bông R_1 đã biến nạp biểu hiện TIC4472PL.

Cấu trúc	FAW	SBL	TBW
Cấu trúc 1	1 (3/4) H	1 (4/4) H	1 (4/4) H
Cấu trúc 2	1 (1/4) L	1 (4/4) H	1 (1/4) L

Như có thể thấy trong Bảng 8 trên đây, các sự kiện đã chọn thể hiện hiệu quả cao chống lại FAW, SBL, và TBW. Độ thâm nhập là cao đối với sự kiện được biến nạp Cấu trúc 1 cho cả ba loài côn trùng gây hại. Đối với các sự kiện được biến nạp Cấu trúc 2, độ thâm nhập là cao đối với SBL.

Trên đây chứng minh là cây bông đã biến nạp biểu hiện protein TIC4472PL tạo ra tác dụng chống sâu xanh mùa thu (FAW, *Spodoptera frugiperda*), sâu đo đậu tương (SBL, *Chrysodeixis includens*) và sâu đục chồi cây Thuốc lá (TBW, *Heliothis virescens*).

Ví dụ 5

Thử nghiệm hoạt tính TIC4472PL và TIC2613PL chống lại côn trùng gây bệnh Lepidopteran ở cây đậu tương được biến nạp ổn định

Vector biến nạp thực vật nhị thể chứa caxet gen chuyển được thiết kế để biểu hiện protein diệt vật gây hại không được gắn đích TIC2613PL hoặc TIC4472PL được gắn đích lập thể được tách dòng bằng cách sử dụng quy trình đã biết trong lĩnh vực này. Vector thu được được sử dụng để biến nạp ổn định các cây đậu tương. Các mô được thu hoạch từ các thể biến nạp và được sử dụng trong thử nghiệm sinh học côn trùng chống lại các sâu bộ Lepidopteran khác nhau.

Các trình tự mã hóa tổng hợp được thiết kế để biểu hiện ở thực vật được mô tả trong Ví dụ 3 được tách dòng vào các cấu trúc vector biến nạp thực vật nhị thể, và được sử dụng để biến nạp các tế bào cây đậu tương. Ba cấu trúc vector nhị thể được cấu trúc bằng cách sử dụng các quy trình đã biết trong lĩnh vực này để biểu hiện TIC4472PL không gắn đích và được gắn đích lập thể. Cấu trúc 4 chứa caxet gen chuyển thứ nhất để biểu hiện TIC4472PL không gắn đích mà chứa trình tự khởi động cơ định, được liên kết hoạt động 5' với trình tự dẫn đầu, được liên kết hoạt động 5' với trình tự mã hóa tổng hợp mã hóa protein TIC4472PL không được gắn đích, mà trình tự này lại liên kết hoạt động 5' với 3' UTR và; caxet gen chuyển thứ hai để chọn lọc các tế bào thực vật đã biến nạp sử dụng kỹ thuật chọn lọc spectinomycin. Cấu trúc 5 chứa caxet gen chuyển thứ nhất để biểu hiện TIC4472PL gắn đích mà chứa trình tự khởi động cơ định, được liên kết hoạt động 5' với trình tự dẫn đầu, được liên kết hoạt động 5' với intron, được liên kết hoạt động 5' với trình tự mã hóa tổng hợp mã hóa protein TIC4472PL gắn đích lập thể, mà trình tự này lại được liên kết hoạt động 5' với 3' UTR và; caxet gen chuyển thứ hai để chọn lọc các tế bào thực vật đã biến nạp sử dụng kỹ thuật chọn lọc spectinomycin. Cấu trúc 6 chứa caxet gen chuyển

thứ nhất để biểu hiện TIC4472PL không gắn đích mà chứa trình tự khởi động cơ định, được liên kết hoạt động 5' với trình tự dẫn đầu, được liên kết hoạt động 5' với intron, được liên kết hoạt động 5' với trình tự mã hóa tổng hợp mã hóa protein TIC4472PL không gắn đích, mà trình tự này lại được liên kết hoạt động 5' với 3' UTR và; caxet gen chuyển thứ hai để chọn lọc các tế bào thực vật đã biến nạp sử dụng kỹ thuật chọn lọc spectinomycin.

Hai cấu trúc vector nhị thể được cấu trúc bằng cách sử dụng các quy trình đã biết trong lĩnh vực này để biểu hiện TIC2613PL không gắn đích. Cấu trúc 7 chứa caxet gen chuyển thứ nhất để biểu hiện TIC2613PL không gắn đích mà chứa trình tự khởi động cơ định, được liên kết hoạt động 5' với trình tự dẫn đầu, được liên kết hoạt động 5' với trình tự mã hóa tổng hợp mã hóa protein TIC2613PL không được gắn đích, mà trình tự này lại liên kết hoạt động 5' với 3' UTR và; caxet gen chuyển thứ hai để chọn lọc các tế bào thực vật đã biến nạp sử dụng kỹ thuật chọn lọc spectinomycin. Cấu trúc 8 chứa caxet gen chuyển thứ nhất để biểu hiện TIC2613PL không gắn đích mà chứa trình tự khởi động cơ định, được liên kết hoạt động 5' với trình tự dẫn đầu, được liên kết hoạt động 5' với intron, được liên kết hoạt động 5' với trình tự mã hóa tổng hợp mã hóa protein TIC2613PL không gắn đích, mà trình tự này lại được liên kết hoạt động 5' với 3' UTR và; caxet gen chuyển thứ hai để chọn lọc các tế bào thực vật đã biến nạp sử dụng kỹ thuật chọn lọc spectinomycin.

Cấu trúc vector biến nạp nhị thể thu được được sử dụng để biến nạp tế bào cây đậu tương sử dụng quy trình biến nạp qua trung gian *Agrobacterium*. Các tế bào đậu tương đã biến nạp được cảm ứng để tạo ra cây bằng các quy trình đã biết trong lĩnh vực này. Các thử nghiệm sinh học sử dụng các đĩa lá cây được thực hiện tương tự các quy trình được mô tả trong Patent Mỹ số 8,344,207. Cây đậu tương chưa biến nạp được sử dụng để thu được mô để sử dụng làm đối chứng âm. Nhiều sự kiện biến nạp đậu tương R₀ thu được từ các vector nhị thể được đánh giá chống lại sâu xanh Miền Nam (SAW, *Spodoptera eridania*), sâu đo đậu tương (SBL, *Chrysodeixis includens*), và sâu đục quả cây đậu tương (SPW, *Helicoverpa zea*). Điểm số đánh giá hư hại lá (LDR) là tương tự với các điểm số như đối với cây bông nhưng khác nhau ở khoảng tỷ lệ phần trăm hư hại được sử dụng để xác định điểm số này. Điểm số đánh giá hư hại lá và khoảng đánh giá hư hại lá theo tỷ lệ phần trăm được trình bày trong Bảng 9 dưới đây.

Bảng 9. Điểm số đánh giá hư hại lá (LDR) cây đậu tương và khoảng tỷ lệ phần trăm hư hại tương ứng.

Điểm LDR	Khoảng đánh giá hư hại lá (LDR)
1	$LDR \leq 20\%$
2	$20\% < LDR \leq 35\%$
3	$35\% < LDR \leq 70\%$
4	$LDR > 70\%$

Điểm số đánh giá hư hại lá cho các cây bông R_0 đã biến nạp biểu hiện TIC4472PL và TIC2613PL được trình bày trong Bảng 10 dưới đây. Số lượng các sự kiện thể hiện điểm số LDR trong tổng số sự kiện được thử nghiệm được chỉ ra trong dấu ngoặc đơn.

Bảng 10. Điểm số đánh giá hư hại lá (LDR) và số lượng sự kiện thể hiện LDR đối với các cây đậu tương R_0 đã biến nạp biểu hiện TIC4472PL và TIC2613PL.

Độc tố	Cấu trúc	SAW	SBL	SPW
TIC4472PL	Cấu trúc 4	1 (23/29)	1 (29/29)	3 (8/29)
TIC4472PL	Cấu trúc 5	1 (20/29)	1 (28/29)	1 (1/29)
TIC4472PL	Cấu trúc 6	1 (10/29)	1 (15/15)	3 (3/15)
TIC2613PL	Cấu trúc 7	1 (22/30)	1 (24/30)	3 (1/30)
TIC2613PL	Cấu trúc 8	1 (14/25)	1 (22/25)	2 (2/25)

Như có thể thấy trong Bảng 10 trên đây, cả sự biểu hiện của TIC4472PL và TIC2613PL đều thể hiện hiệu quả cao chống lại SAW và SBL. Hoạt tính là thấp hơn đối với cả hai protein chống lại SPW.

Các sự kiện đậu tương R_1 được chọn từ các cây đậu tương R_0 đã biến nạp biểu hiện TIC4472PL và TIC2613PL được thử nghiệm trên đây và được sử dụng trong thử nghiệm đĩa lá chống lại SAW, SBL, và SPW. Sự kiện đậu tương R_1 biểu hiện TIC4472PL cũng được đánh giá chống lại sâu bướm cây đậu mè rừng (VBW, *Anticarsia gemmatalis*). Bảng 11 thể hiện điểm số đánh giá hư hại lá cho cây đậu tương R_1 đã được biến nạp biểu hiện TIC4472PL và TIC2613PL.

Bảng 11. Điểm số đánh giá hư hại lá (LDR) và số lượng sự kiện thể hiện LDR đối với các cây đậu tương R₁ đã biến nạp biểu hiện TIC4472PL và TIC2613PL.

Độc tố	Cấu trúc	SAW	SBL	SPW	VBC
TIC4472PL	Cấu trúc 5	1 (3/8)	1 (5/8)	3 (2/8)	
TIC4472PL	Cấu trúc 6	1 (1/9)	1 (6/9)	3 (1/9)	1 (3/9)
TIC2613PL	Cấu trúc 8	2 (2/10)	1 (9/10)	4 (4/10)	

Như có thể thấy trong Bảng 11, số lượng sự kiện đậu tương R₁ được biến nạp với TIC4472PL thể hiện hiệu lực cao chống lại SAW và SBL. Ngoài ra, một số sự kiện đậu tương R₁ được biến nạp bằng cách sử dụng Cấu trúc 6 thể hiện hiệu lực cao chống lại VBC. Các sự kiện đậu tương R₁ được biến nạp với TIC2613PL thể hiện hiệu lực cao chống lại SBL.

Các số liệu trên đây chứng minh rằng các cây đậu tương đã biến nạp biểu hiện TIC4472PL hoặc TIC2613PL tạo ra tác dụng chống lại côn trùng Lepidopteran, cụ thể là sâu xanh Miền Nam (*Spodoptera eridania*) và sâu đo đậu tương (*Chrysodeixis includens*) và sâu bướm cây đậu mè rừng (*Anticarsia gemmatilis*).

Ví dụ 6

Thử nghiệm về hoạt tính TIC4472PL và TIC2613PL chống lại vật gây hại Lepidopteran ở các cây ngô đã biến nạp ổn định

Các vector biến nạp thực vật nhị thể chứa casset gen chuyển được thiết kế để biểu hiện cả protein diệt vật gây hại TIC4472PL hoặc TIC2613PL không được gắn đích và được gắn đích lập thể được tách dòng bằng cách sử dụng các quy trình đã biết trong lĩnh vực này. Các vector thu được được sử dụng để biến nạp ổn định cây ngô. Các mô được thu hoạch từ các thể biến nạp và được sử dụng trong thử nghiệm sinh học côn trùng chống lại các sâu bọ Lepidopteran khác nhau.

Trình tự mã hóa tổng hợp mã hóa protein TIC4472PL (SEQ ID NO:3) hoặc TIC2613 (SEQ ID NO:9) được tách dòng vào các vector biến nạp nhị thể. Đối với protein được gắn đích lập thể, trình tự mã hóa protein diệt vật gây hại TIC4472PL hoặc TIC2613PL tổng hợp được liên kết hoạt động trong khung với trình tự mã hóa peptit tín hiệu gắn đích lục lập. Các vector biến nạp thực vật thu được chứa casset gen chuyển thứ nhất để biểu hiện protein diệt vật gây hại TIC4472PL hoặc TIC2613PL chứa trình tự khởi động cơ định, được liên kết hoạt động 5' với trình tự dẫn, được liên kết hoạt động 5' với intron, được

liên kết hoạt động 5' với trình tự mã hóa tổng hợp mã hóa protein TIC4472PL hoặc TIC2613PL gắn đích hoặc không gắn đích lặp thể, mà trình tự này lại được liên kết hoạt động 5' với 3' UTR; và caxet gen chuyển thứ hai để chọn lọc các tế bào thực vật đã biến nạp bằng cách sử dụng kỹ thuật chọn lọc glyphosate.

Các cây ngô được biến nạp bằng các vector biến nạp nhị thể như được mô tả trên đây bằng cách sử dụng quy trình biến nạp qua trung gian *Agrobacterium*. Các tế bào đã biến nạp được cảm ứng để tạo ra thực vật bằng các quy trình đã biết trong lĩnh vực này. Các thử nghiệm sinh học sử dụng các đĩa lá cây được thực hiện tương tự các quy trình được mô tả trong Patent Mỹ số 8,344,207. Cây ngô chưa biến nạp được sử dụng để thu được mô để sử dụng làm đối chứng âm. Nhiều sự kiện biến nạp từ mỗi vector nhị thể được đánh giá chống lại sâu xanh da láng (BAW, *Spodoptera exigua*), sâu xám (BCW, *Agrotis ipsilon*), sâu đục bắp trên cây ngô (CEW, *Helicoverpa zea*), sâu lá bông (CLW, *Alabama argillacea*), sâu đục thân bắp Châu Âu (ECB, *Ostrinia nubilalis*), sâu xanh mùa thu (FAW, *Spodoptera frugiperda*), sâu đục quả Old World (OWB, *Helicoverpa armigera*), sâu lá Oriental (OLW, *Spodoptera litura*), sâu hồng hại bông (PBW, *Pectinophora gossypiella*), sâu đo đậu tương (SBL, *Chrysodeixis includens*), sâu đóm đục quả (SBW, *Earias vittella*), sâu đục thân ngô Tây Nam (SWCB, *Diatraea grandiosella*), sâu đục thân mía (SCB, *Diatraea saccharalis*), sâu đục chồi cây Thuốc lá (TBW, *Heliothis virescens*), và sâu bướm cây đậu mè rừng (VBW, *Anticarsia gemmatilis*), cũng như côn trùng gây hại Lepidopteran khác.

Các sâu bọ được quan sát về tỉ lệ tử vong và choáng do tiêu hóa các đĩa lá đã trình bày biểu hiện TIC4472PL hoặc TIC2613PL và được so sánh với các đĩa lá thu được từ cây ngô không biến nạp.

Tất cả các chế phẩm được mô tả và được yêu cầu bảo hộ ở đây có thể được tạo ra và được thực hiện mà không cần thử nghiệm quá mức theo phân mô tả này. Mặc dù các chế phẩm theo sáng chế đã được mô tả theo các phương án minh họa trên đây, sẽ là rõ ràng với người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực này là các biến đổi, thay đổi, cải biến, và các thay thế có thể được áp dụng cho chế phẩm được mô tả ở đây, mà không vượt ra ngoài tinh thần và phạm vi của sáng chế. Cụ thể hơn, rõ ràng là một số hợp chất có liên quan cả về hóa học và vật lý có thể được thay thế cho các hợp chất được mô tả ở đây trong khi các kết quả giống hoặc tương tự vẫn đạt được. Tất cả các thay thế và cải biến tương tự này rõ ràng đối với người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực này được xem là nằm trong tinh thần và phạm vi của sáng chế như được xác định bởi yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Tất cả các công bố và tài liệu patent đã công bố được trích dẫn trong phần mô tả này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn đến mức độ giống như từng công bố hoặc đơn yêu cầu cấp patent này được chỉ ra cụ thể và riêng biệt là được đưa vào bằng cách viện dẫn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phân tử axit nucleic tái tổ hợp chứa trình tự khởi động khác loại được liên kết hoạt động với đoạn polynucleotit mã hóa protein diệt vật gây hại hoặc đoạn có tác dụng diệt vật gây hại của nó, trong đó:

a. protein diệt vật gây hại này bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, hoặc SEQ ID NO:6 và thể hiện hoạt tính diệt vật gây hại; hoặc

b. protein diệt vật gây hại này bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự axit amin ít nhất là 93%, hoặc 95%, hoặc 98% hoặc 99%, hoặc khoảng 100% với SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, hoặc SEQ ID NO:6 và thể hiện hoạt tính diệt vật gây hại; hoặc

c. đoạn polynucleotit này lai hóa trong các điều kiện lai hóa nghiêm ngặt với polynucleotit có trình tự nucleotit của SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:1, hoặc SEQ ID NO:5 và protein diệt vật gây hại được mã hóa này thể hiện hoạt tính diệt vật gây hại.

2. Phân tử axit nucleic tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó:

a. phân tử axit nucleic tái tổ hợp bao gồm trình tự có chức năng biểu hiện protein diệt vật gây hại ở thực vật; hoặc

b. phân tử axit nucleic tái tổ hợp được biểu hiện ở tế bào thực vật để tạo ra lượng có tác dụng diệt vật gây hại của protein diệt vật gây hại; hoặc

c. phân tử axit nucleic tái tổ hợp này trong sự liên kết hoạt động với vector, và vector này được chọn từ nhóm bao gồm plasmid, phagemid, bacmid, cosmid, và nhiễm sắc thể nhân tạo của vi khuẩn hoặc nấm men.

3. Tế bào chủ bao gồm phân tử axit nucleic tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó tế bào chủ này được chọn từ nhóm bao gồm tế bào vi khuẩn và tế bào thực vật.

4. Tế bào chủ theo điểm 3, trong đó tế bào chủ vi khuẩn là từ chi vi khuẩn được chọn từ nhóm bao gồm: *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Pantoea*, và *Erwinia*.

5. Tế bào chủ theo điểm 4, trong đó loài *Bacillus* là *Bacillus cereus* hoặc *Bacillus thuringiensis*, *Brevibacillus* này là *Brevibacillus laterosporus*, và *Escherichia* này là *Escherichia coli*.

6. Tế bào chủ theo điểm 3, trong đó tế bào thực vật là tế bào thực vật hai lá mầm hoặc một lá mầm.

7. Tế bào chủ theo điểm 6, trong đó tế bào thực vật được chọn từ nhóm bao gồm tế bào cây cỏ linh lăng, chuối, lúa mạch, đậu, bông cải xanh, bắp cải, cải, cà rốt, sắn, thầu dầu, bông cải trắng, cần tây, đậu gà, cải thảo, cam, dứa, cà phê, ngô, cỏ ba lá, bông, bầu bí, dưa chuột, gỗ linh sam, cà tím, bạch đàn, chanh, tỏi, nho, cây hublông, tỏi tây, rau diếp, thông trầm hương, kê, dưa, quả hạch, yến mạch, ôliu, hành tây, cây cảnh, cỏ, cỏ, đậu Hà Lan, lạc, ớt, đậu triều, thông, khoai tây, bạch dương, bí đỏ, thông Radiata, củ cải, cải dầu, lúa, cây thân rễ, lúa mạch đen, hồng hoa, cây bụi, cây cao lương, thông phương Nam, đậu nành, rau chân vịt, bí, dâu tây, củ cải đường, mía, hướng dương, ngô ngọt, gỗ gôm, khoai lang, cỏ kê Mỹ, trà, thuốc lá, cà chua, tiểu hắc mạch, cỏ, dưa hấu, và lúa mì.

8. Phân tử axit nucleic tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó protein này thể hiện hoạt tính chống lại côn trùng Lepidopteran.

9. Phân tử axit nucleic tái tổ hợp theo điểm 8, trong đó côn trùng này được chọn từ nhóm bao gồm: sâu xanh da láng (*Spodoptera exigua*), sâu đục bắp trên cây ngô (*Helicoverpa zea*), sâu lá bông (*Alabama argillacea*), sâu đục thân bắp châu Âu (*Ostrinia nubilalis*), sâu xanh mùa thu (*Spodoptera frugiperda*), sâu đục quả Old World (*Helicoverpa armigera*), sâu lá Oriental (*Spodoptera litura*), sâu hồng hại bông (*Pectinophora gossypiella*), sâu hồng hại bông kháng Cry1Ac (*Pectinophora gossypiella*), sâu đo đậu tương (*Chrysodeixis includens*), sâu xanh miền Nam (*Spodoptera eridania*), sâu đục thân ngô Tây Nam (*Diatraea grandiosella*), sâu đốm đục quả (*Earias vittella*), sâu đục thân mía (*Diatraea saccharalis*), sâu đục chồi cây Thuốc lá (*Heliothis virescens*), và sâu bướm cây đậu mèo rừng (*Anticarsia gemmatilis*).

10. Cây hoặc bộ phận của nó chứa phân tử axit nucleic tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó cây này kháng lại sự phá hoại của côn trùng.

11. Cây hoặc bộ phận của nó theo điểm 10, trong đó cây này là cây một lá mầm hoặc cây hai lá mầm.

12. Cây theo điểm 10, trong đó cây này được chọn từ nhóm bao gồm cỏ linh lăng, chuối, lúa mạch, đậu, bông cải xanh, bắp cải, cải, cà rốt, sắn, thầu dầu, bông cải trắng, cần tây, đậu gà, cải thảo, cam, dứa, cà phê, ngô, cỏ ba lá, bông, bầu bí, dưa chuột, gỗ linh sam, cà tím, bạch đàn, cây chanh, tỏi, nho, cây hublông, tỏi tây, rau diếp, thông trầm hương, kê, quả

dưa, quả hạch, yến mạch, oliu, hành tây, cây cảnh, cò, củ, đậu Hà Lan, củ lạc, cây ớt, đậu triều, thông, khoai tây, bạch dương, bí đỏ, thông Radiata, củ cải, hạt cải dầu, lúa, cây thân rễ, lúa mạch đen, hồng hoa, cây bụi, cây cao lương, thông phương Nam, đậu tương, rau chân vịt, quả bí, dâu tây, củ cải đường, mía, hoa hướng dương, ngô ngọt, gỗ gôm, khoai lang, củ kê Mỹ, chè, thuốc lá, cà chua, tiểu hắc mạch, củ, dưa hấu, và lúa mì.

13. Hạt của cây theo điểm 10, trong đó hạt này bao gồm phân tử axit nucleic tái tổ hợp.

14. Chế phẩm ức chế côn trùng chứa phân tử axit nucleic tái tổ hợp theo điểm 1.

15. Chế phẩm ức chế côn trùng theo điểm 14, còn bao gồm trình tự nucleotit mã hóa ít nhất một chất diệt vật gây hại khác mà khác với protein diệt vật gây hại này.

16. Chế phẩm ức chế côn trùng theo điểm 15, trong đó ít nhất một chất diệt vật gây hại khác này được chọn từ nhóm bao gồm protein ức chế côn trùng, phân tử dsARN ức chế côn trùng, protein phụ trợ.

17. Chế phẩm ức chế côn trùng theo điểm 16, trong đó ít nhất một chất diệt vật gây hại khác thể hiện hoạt tính chống lại một hoặc nhiều vật gây hại thuộc các bộ Lepidoptera, Coleoptera, hoặc Hemiptera.

18. Chế phẩm ức chế côn trùng theo điểm 17, trong đó ít nhất một protein diệt vật gây hại khác được chọn từ nhóm bao gồm các biến thể Cry1A, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1A.105, Cry1Ae, Cry1B, Cry1C, Cry1C, Cry1D, Cry1E, Cry1F, thể khảm Cry1A/F, các biến thể Cry1G, Cry1H, Cry1I, Cry1J, Cry1K, Cry1L, Cry2A, Cry2Ab, Cry2Ae, Cry3, Cry3A, Cry3B, Cry4B, Cry6, Cry7, Cry8, Cry9, Cry15, Cry34, Cry35, Cry43A, Cry43B, Cry51Aa1, ET29, ET33, ET34, ET35, ET66, ET70, TIC400, TIC407, TIC417, TIC431, TIC800, TIC807, TIC834, TIC853, TIC900, TIC901, TIC1201, TIC1415, TIC2160, TIC3131, TIC836, TIC860, TIC867, TIC869, TIC1100, VIP3A, VIP3B, VIP3Ab, AXMI-AXMI-, AXMI-88, AXMI-97, AXMI-102, AXMI-112, AXMI-117, AXMI-100, AXMI-115, AXMI-113, và AXMI-005, AXMI134, AXMI-150, AXMI-171, AXMI-184, AXMI-196, AXMI-204, AXMI-207, AXMI-209, AXMI-205, AXMI-218, AXMI-220, AXMI-221z, AXMI-222z, AXMI-223z, AXMI-224z và AXMI-225z, AXMI-238, AXMI-270, AXMI-279, AXMI-345, AXMI-335, AXMI-R1 và các biến thể của chúng, IP3 và các biến thể của chúng, DIG-3, DIG-5, DIG-10, DIG-657 và protein DIG-11.

19. Chế phẩm ức chế côn trùng theo điểm 14, được xác định là chứa tế bào thực vật biểu hiện phân tử axit nucleic tái tổ hợp này.

20. Thương phẩm được sản xuất từ cây hoặc bộ phận của nó theo điểm 10, trong đó thương phẩm này bao gồm lượng phát hiện được của phân tử axit nucleic tái tổ hợp hoặc protein diệt vật gây hại này.

21. Thương phẩm theo điểm 20, được chọn từ nhóm bao gồm ngô thương phẩm được đóng gói bằng máy xử lý hạt, bông ngô, bánh ngô, bột ngô, bột ngô xay thô, xirô ngô, dầu ngô, thức ăn sẵn cho gia súc chứa ngô, tinh bột ngô, ngũ cốc chứa ngô, và các sản phẩm tương tự, và các thương phẩm tương ứng từ đậu tương, lúa, lúa mì, cây cao lương, đậu triều, lạc, trái cây, dưa, và rau các bao gồm, nếu có thể, nước ép, dịch cô đặc, mứt, thạch, mứt đặc, và các dạng ăn được khác của các thương phẩm này chứa lượng phát hiện được của các polynucleotit và hoặc polypeptit theo sáng chế này, hạt bông nguyên chất hoặc đã xử lý, dầu bông, xơ vải, hạt và các bộ phận của cây được xử lý để làm thực phẩm hoặc thức ăn cho gia súc, sợi, giấy, sinh khối, và các sản phẩm nhiên liệu như nhiên liệu thu được từ dầu bông hoặc viên thu được từ phế phẩm của máy tách sợi bông, hạt đậu tương nguyên chất hoặc được xử lý, dầu đậu tương, protein đậu tương, bột thô đậu tương, bột đậu tương, vảy đậu tương, cám đậu tương, sữa đậu tương, pho mát đậu tương, rượu đậu tương, thức ăn gia súc chứa đậu tương, giấy chứa đậu tương, kem chứa đậu tương, sinh khối đậu tương, và các sản phẩm nhiên liệu được sản xuất bằng cách sử dụng cây đậu tương và các bộ phận của cây đậu tương.

22. Phương pháp sản xuất hạt bao gồm các bước:

- a. gieo hạt thứ nhất theo điểm 13;
- b. trồng cây từ hạt; và
- c. thu hoạch hạt từ cây này, trong đó hạt được thu hoạch này bao gồm phân tử axit nucleic tái tổ hợp.

23. Phương pháp phòng trừ sự phá hoại của vật gây hại hoặc loài gây hại Lepidopteran, phương pháp này bao gồm các bước:

- a. cho vật gây hại tiếp xúc với lượng có tác dụng diệt côn trùng của protein diệt vật gây hại như được chỉ ra trong SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, hoặc SEQ ID NO:6; hoặc

b. cho vật gây hại tiếp xúc với lượng có tác dụng diệt côn trùng của một hoặc nhiều protein diệt vật gây hại bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự axit amin ít nhất là 93%, hoặc 95%, hoặc 98%, hoặc 99%, hoặc khoảng 100% với SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, hoặc SEQ ID NO:6.

24. Phương pháp phát hiện sự có mặt của phân tử axit nucleic tái tổ hợp theo điểm 1 trong mẫu chứa ADN bộ gen thực vật, bao gồm:

a. cho mẫu này tiếp xúc với mẫu dò axit nucleic mà lai hóa trong các điều kiện lai hóa nghiêm ngặt với ADN bộ gen từ thực vật chứa phân tử ADN theo điểm 1, và không lai hóa trong điều kiện lai hóa như vậy với ADN bộ gen từ thực vật đồng hợp tử khác mà không chứa phân tử axit nucleic tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó mẫu dò này là tương đồng hoặc bổ sung với SEQ ID NO:3, hoặc trình tự mã hóa protein diệt vật gây hại chứa trình tự axit amin có

độ đồng nhất trình tự axit amin ít nhất là 93%, hoặc 95%, hoặc 98%, hoặc 99%, hoặc khoảng 100% với SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, hoặc SEQ ID NO:6;

b. đưa mẫu và mẫu dò này vào các điều kiện lai hóa nghiêm ngặt; và

c. phát hiện sự lai hóa của mẫu dò với ADN của mẫu.

25. Phương pháp phát hiện sự có mặt của protein diệt vật gây hại trong mẫu chứa protein, trong đó protein diệt vật gây hại này bao gồm:

a. trình tự axit amin của SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, hoặc SEQ ID NO:6;

b. độ đồng nhất trình tự axit amin ít nhất là 93%, hoặc 95%, hoặc 98%, hoặc 99% hoặc khoảng 100% với SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, hoặc SEQ ID NO:6,

c. mảnh chứa ít nhất 800 axit amin liên tục của SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, hoặc SEQ ID NO: 6;

phương pháp này bao gồm các bước:

- i. cho mẫu tiếp xúc với kháng thể có phản ứng miễn dịch; và
- ii. phát hiện sự có mặt của protein.

26. Phương pháp theo điểm 25, trong đó bước phát hiện bao gồm ELISA, hoặc thẩm tách Western.

27. Phân tử axit nucleic tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó đoạn polynucleotit này mã hóa protein diệt vật gây hại bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, hoặc SEQ ID NO:6 và thể hiện hoạt tính diệt vật gây hại.

28. Phân tử axit nucleic tái tổ hợp theo điểm 27, trong đó đoạn polynucleotit này mã hóa protein diệt vật gây hại bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:4.

29. Phân tử axit nucleic tái tổ hợp theo điểm 27, trong đó đoạn polynucleotit này mã hóa protein diệt vật gây hại bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:2 và thể hiện hoạt tính diệt vật gây hại.

30. Phân tử axit nucleic tái tổ hợp theo điểm 27, trong đó đoạn polynucleotit này mã hóa protein diệt vật gây hại bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:6 và thể hiện hoạt tính diệt vật gây hại.

31. Phân tử axit nucleic tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó đoạn polynucleotit này mã hóa protein diệt vật gây hại bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự axit amin ít nhất là 93% với SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, hoặc SEQ ID NO:6 và thể hiện hoạt tính diệt vật gây hại.

32. Phân tử axit nucleic tái tổ hợp theo điểm 31, trong đó đoạn polynucleotit này mã hóa protein diệt vật gây hại bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự axit amin ít nhất là 95% với SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, hoặc SEQ ID NO:6 và thể hiện hoạt tính diệt vật gây hại.

33. Phân tử axit nucleic tái tổ hợp theo điểm 32, trong đó đoạn polynucleotit này mã hóa protein diệt vật gây hại bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự axit amin ít nhất là 98% với SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, hoặc SEQ ID NO:6 và thể hiện hoạt tính diệt vật gây hại.

34. Phân tử axit nucleic tái tổ hợp theo điểm 33, trong đó đoạn polynucleotit này mã hóa protein diệt vật gây hại bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự axit amin ít nhất là 99% với SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, hoặc SEQ ID NO:6 và thể hiện hoạt tính diệt vật gây hại.

35. Phân tử axit nucleic tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó đoạn polynucleotit này lai hóa trong các điều kiện lai hóa nghiêm ngặt với polynucleotit có trình tự nucleotit của SEQ ID

NO:3, SEQ ID NO:1, hoặc SEQ ID NO:5 và protein diệt vật gây hại được mã hóa này thể hiện hoạt tính diệt vật gây hại.

36. Phân tử axit nucleic tái tổ hợp theo điểm 35, trong đó đoạn polynucleotit này lai hóa trong các điều kiện lai hóa nghiêm ngặt với polynucleotit có trình tự nucleotit của SEQ ID NO:3 và protein diệt vật gây hại được mã hóa này thể hiện hoạt tính diệt vật gây hại.

37. Phân tử axit nucleic tái tổ hợp theo điểm 35, trong đó đoạn polynucleotit này lai hóa trong các điều kiện lai hóa nghiêm ngặt với polynucleotit có trình tự nucleotit của SEQ ID NO:1 và protein diệt vật gây hại được mã hóa này thể hiện hoạt tính diệt vật gây hại.

38. Phân tử axit nucleic tái tổ hợp theo điểm 35, trong đó đoạn polynucleotit này lai hóa trong các điều kiện lai hóa nghiêm ngặt với polynucleotit có trình tự nucleotit của SEQ ID NO:5 và protein diệt vật gây hại được mã hóa này thể hiện hoạt tính diệt vật gây hại.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Monsanto Technology LLC
 Bowen, David J
 Chay, Catherine A
 Howe, Arlene R
 Kesanapalli, Uma

<120> Phân tử axit nucleic tái tổ hợp mã hóa protein diệt vật gây hại, chế phẩm ức chế côn trùng và phương pháp phòng trừ sự phá hoại của vật gây hại hoặc loài gây hại Lepidopteran

<130> MONS:426WO

<150> US 62/406082

<151> 10-10-2016

<160> 10

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 3564

<212> ADN

<213> Bacillus thuringiensis

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(3564)

<223> Trình tự axit nucleic mã hóa protein trừ sâu TIC4472
 thu được từ loài Bacillus thuringiensis EG10742.

<400> 1

```
atgaataata atattgaaaa ccaatgcgta ccttacaatt gtttaagtaa tcctgaagaa
60
gtaatttttg atggagaacg gatatcaact ggtaattcat caattgatat ttctctgtca
120
cttggttcaac ttctggtatc taactttgta ccaggcggag gatttttagt agggttaata
180
gattttgtat ggggaatagt aggccttct ccatgggatg catttctagt gcaaattgaa
240
caattaattc agcaaagaat agaagcatat gctagggctg cagcaatttc taatttagaa
300
ggaataggaa acaatttcaa tatatatgtg gaagcatttc aagaatggga agaagatcct
360
aataatccag caaccaggaa tagagtagtt gatcgcttcc gtatacttga tgggctactt
420
gaaagggaca ttccttcggt tcgaatttct ggatttgaag tccccctttt atccgtttat
480
gctcaagcgg ccaatctgca tctagctata ttaagagatt ctgtaatttt tggagaaaga
540
tggggattga caacaacaaa tgtcaatgaa aactataata gacaaatcag gcatattgat
600
gaatatgctg atcactgtgc aaatacgtat aatcggggat taaataattt accgaaatct
660
acgtatcaag attggataac atataatcga ttacggagag aattaacatt gactgtatta
720
gatatcgctg ctttctttcc aaactatgac aataggcggg atccaattca gccagttggg
780
caactaacia gggaagttaa tacggacca ttaattactt ttaatcccca gttacagtct
840
gtagctcaat tacctacttt taacgttatg gaaagcaacg caattagaaa tcctcatttg
900
```


tttgatatat tgaataatct tacaatTTTT acggattggt ttagtggttg acgcaacttt
 960
 tattggggag gacatcgagt aacttctaac tatataggag gaggcaacat aacatctcct
 1020
 atatatggaa gagaggcgaa ccaggagcct ccaagatctt ttacttttaa tggacctgtt
 1080
 tttaggactt tatcaaatcc tactttacga ttattacagc aaccttggcc agcaccacca
 1140
 ttttaatttac gtggtgttga aggagtagaa ttttctacac ctacaaatag ctttacgtat
 1200
 cgaggaagag gtacagttga ttctttaacc gaattaccgc ctgaggataa tagtggtgcta
 1260
 cctcgcgagg gatatagtca tcgtttatgt catgcaactt ttgttcaaag atctggaaca
 1320
 ccatttttaa caacgggtgt agtattttct tggacgcac gcagtgcaac tcttacaat
 1380
 acaattgac cagacaaaat tactcagata ctttagtga aaggatttag agtttgagat
 1440
 ggcgcctctg tcgttacagg accaggtttt acaggagggg atatccttcg aagaactaac
 1500
 tttggggatt ttgtatctat gcaagttaat attaattcac caataacaca aagataccgt
 1560
 ttaagatttc gttatgcttc cagtagagat gcacgactta cagtagcgac aggagcagca
 1620
 aacacaggag ttggagggca aattagtgtg gacatggctc ttcagaaaac tatggaaatt
 1680
 ggagagagct taacatctag aacatttaga tataccgatt ttagtaatcc tttttcattt
 1740
 agagctaata cagatataat tcgtataaat gaacaaccac tattcggtgc aggctctatt
 1800
 agtagtggtg aactttatat agataaaatt gaaattattc tagcagatgc aacatttgaa
 1860
 gcagaatatg atttggaag agcacagaag gcggtgaatg cgctgtttac ttctacaaac
 1920
 caaagaggat taaaaacaga tgtgacggat tatcatattg atcaagtatc caatttagtt
 1980
 gagtgtttat cggatgaatt ttgtctggat gaaaaacgag aattgtccga gaaagtcaaa
 2040
 catgcgaagc gactcagtga tgagcgaaat ttactccagg atcgaaattt cacatccatt
 2100
 aatgggcaac tagaccgtgg ctggagagga agtacggata ttaccatcca aggaggagat
 2160
 gacgtattca aagagaatta cgtcacacta ctgggtacct ttgatgagtg ctatccaacg
 2220
 tatttatatc aaaaaataga tgagtcgaaa ttaaaagcct ataccgcta tgaattaaga
 2280
 gggatatatc aggatagtca agacttagaa atctatttaa ttcgctacaa tgcaaaacac
 2340
 gaaacagtaa atgtgccagg tacaggttcc ttatggccgc tttcagtcga aagtccaatc
 2400
 ggaaagtgtg gagaaccgaa tcgatgcaca ccacacctg aatggaatcc taatctagat
 2460
 tgttcctgca gagacgggaa aacatgtgca catcattctc atcatttctc cttggacatt
 2520
 gatgttggtg gtacagactt aaatgaagat ctaggtgtat gggatgatatt caagattaag
 2580

acgcaagatg gtcattgcaag actaggaaat ctagagtttc tcgaagagaa accattagta
 2640
 ggagaagcgt tagctcgtgt gaaaagagcg gagaaaaaat ggagagacaa acgcgaaaaa
 2700
 ttgcaattag aaacaaatat cgtttacaaa gaggcaaaag aagctgtgga tgctttat
 2760
 gtaaactctc aatatgatag attacaagtg gatacgaaca ttgccatgat tcatgcggca
 2820
 gataaacgcg ttcatagaat ccgagaagcg tatcttccag agttatctgt gattccgggt
 2880
 gtcaatgcgg ctattttcga agaattagaa ggggtgtgtt tcactgcatt ctccctatat
 2940
 gatgcgagaa atgtcattaa aaatggcgat ttaataatg gcttatcatg ctggaacgtg
 3000
 aaagggcatg tagaagaaca aaacgaccat cgttcgggtcc ttgttgtccc ggaatgggaa
 3060
 gcagaagtgt cacaagaggt tcgtgtctgt ccaggtcgtg gctatatacct tcgtgttaca
 3120
 gcatacaaag agggatatgg agaaggctgt gtaaccattc atgggatcga gaacaataca
 3180
 gacgaactga agttagcaa ctgcgtagaa gaggaagtct atccaaacaa cacggtaacg
 3240
 tgtaatgatt atcctgcaaa tcaagaagaa tacgggggtg cgtacacttc tcgtaatcgt
 3300
 ggatatgacg aaacttatgg aagcaattct tccgtatcag ctgattatgc gtcagtttat
 3360
 gaagaaaaag cgtatacaga tggacgaaga gacaatccat gtgaatttaa cagaggggat
 3420
 ggggattata cgccactacc agctggctat gtaacaaaag aattagaata cttcccagaa
 3480
 accgataagg tatggattga gattggagaa acggaaggaa cattcatcgt ggacagtgtg
 3540
 gaattactcc ttatggagga atag
 3564

<210> 2
 <211> 1187
 <212> PRT
 <213> *Bacillus thuringiensis*

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1187)
 <223> Trình tự axit amin của protein trừ sâu TIC4472.
 <400> 2

Met Asn Asn Asn Ile Glu Asn Gln Cys Val Pro Tyr Asn Cys Leu Ser
 1 5 10 15

Asn Pro Glu Glu Val Ile Leu Asp Gly Glu Arg Ile Ser Thr Gly Asn
 20 25 30

Ser Ser Ile Asp Ile Ser Leu Ser Leu Val Gln Leu Leu Val Ser Asn
 35 40 45

Phe Val Pro Gly Gly Gly Phe Leu Val Gly Leu Ile Asp Phe Val Trp
 50 55 60

Gly Ile Val Gly Pro Ser Pro Trp Asp Ala Phe Leu Val Gln Ile Glu
 65 70 75 80
 Gln Leu Ile Gln Gln Arg Ile Glu Ala Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Ile
 85 90 95
 Ser Asn Leu Glu Gly Ile Gly Asn Asn Phe Asn Ile Tyr Val Glu Ala
 100 105 110
 Phe Gln Glu Trp Glu Glu Asp Pro Asn Asn Pro Ala Thr Arg Asn Arg
 115 120 125
 Val Val Asp Arg Phe Arg Ile Leu Asp Gly Leu Leu Glu Arg Asp Ile
 130 135 140
 Pro Ser Phe Arg Ile Ser Gly Phe Glu Val Pro Leu Leu Ser Val Tyr
 145 150 155 160
 Ala Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ala Ile Leu Arg Asp Ser Val Ile
 165 170 175
 Phe Gly Glu Arg Trp Gly Leu Thr Thr Thr Asn Val Asn Glu Asn Tyr
 180 185 190
 Asn Arg Gln Ile Arg His Ile Asp Glu Tyr Ala Asp His Cys Ala Asn
 195 200 205
 Thr Tyr Asn Arg Gly Leu Asn Asn Leu Pro Lys Ser Thr Tyr Gln Asp
 210 215 220
 Trp Ile Thr Tyr Asn Arg Leu Arg Arg Glu Leu Thr Leu Thr Val Leu
 225 230 235 240
 Asp Ile Ala Ala Phe Phe Pro Asn Tyr Asp Asn Arg Arg Tyr Pro Ile
 245 250 255
 Gln Pro Val Gly Gln Leu Thr Arg Glu Val Tyr Thr Asp Pro Leu Ile
 260 265 270
 Thr Phe Asn Pro Gln Leu Gln Ser Val Ala Gln Leu Pro Thr Phe Asn
 275 280 285
 Val Met Glu Ser Asn Ala Ile Arg Asn Pro His Leu Phe Asp Ile Leu
 290 295 300
 Asn Asn Leu Thr Ile Phe Thr Asp Trp Phe Ser Val Gly Arg Asn Phe
 305 310 315 320
 Tyr Trp Gly Gly His Arg Val Thr Ser Asn Tyr Ile Gly Gly Gly Asn
 325 330 335
 Ile Thr Ser Pro Ile Tyr Gly Arg Glu Ala Asn Gln Glu Pro Pro Arg
 340 345 350
 Ser Phe Thr Phe Asn Gly Pro Val Phe Arg Thr Leu Ser Asn Pro Thr

355					360					365					
Leu	Arg	Leu	Leu	Gln	Gln	Pro	Trp	Pro	Ala	Pro	Pro	Phe	Asn	Leu	Arg
	370					375					380				
Gly	Val	Glu	Gly	Val	Glu	Phe	Ser	Thr	Pro	Thr	Asn	Ser	Phe	Thr	Tyr
385					390					395					400
Arg	Gly	Arg	Gly	Thr	Val	Asp	Ser	Leu	Thr	Glu	Leu	Pro	Pro	Glu	Asp
				405					410					415	
Asn	Ser	Val	Leu	Pro	Arg	Glu	Gly	Tyr	Ser	His	Arg	Leu	Cys	His	Ala
			420					425					430		
Thr	Phe	Val	Gln	Arg	Ser	Gly	Thr	Pro	Phe	Leu	Thr	Thr	Gly	Val	Val
		435					440					445			
Phe	Ser	Trp	Thr	His	Arg	Ser	Ala	Thr	Leu	Thr	Asn	Thr	Ile	Asp	Pro
	450					455					460				
Asp	Lys	Ile	Thr	Gln	Ile	Pro	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Arg	Val	Trp	Ser
465					470					475					480
Gly	Ala	Ser	Val	Val	Thr	Gly	Pro	Gly	Phe	Thr	Gly	Gly	Asp	Ile	Leu
				485					490					495	
Arg	Arg	Thr	Asn	Phe	Gly	Asp	Phe	Val	Ser	Met	Gln	Val	Asn	Ile	Asn
			500					505					510		
Ser	Pro	Ile	Thr	Gln	Arg	Tyr	Arg	Leu	Arg	Phe	Arg	Tyr	Ala	Ser	Ser
		515					520					525			
Arg	Asp	Ala	Arg	Leu	Thr	Val	Ala	Thr	Gly	Ala	Ala	Asn	Thr	Gly	Val
	530					535					540				
Gly	Gly	Gln	Ile	Ser	Val	Asp	Met	Ala	Leu	Gln	Lys	Thr	Met	Glu	Ile
545					550					555					560
Gly	Glu	Ser	Leu	Thr	Ser	Arg	Thr	Phe	Arg	Tyr	Thr	Asp	Phe	Ser	Asn
				565					570					575	
Pro	Phe	Ser	Phe	Arg	Ala	Asn	Pro	Asp	Ile	Ile	Arg	Ile	Asn	Glu	Gln
			580					585					590		
Pro	Leu	Phe	Gly	Ala	Gly	Ser	Ile	Ser	Ser	Gly	Glu	Leu	Tyr	Ile	Asp
		595					600					605			
Lys	Ile	Glu	Ile	Ile	Leu	Ala	Asp	Ala	Thr	Phe	Glu	Ala	Glu	Tyr	Asp
	610					615					620				
Leu	Glu	Arg	Ala	Gln	Lys	Ala	Val	Asn	Ala	Leu	Phe	Thr	Ser	Thr	Asn
625					630					635					640
Gln	Arg	Gly	Leu	Lys	Thr	Asp	Val	Thr	Asp	Tyr	His	Ile	Asp	Gln	Val
				645					650					655	

Ser Asn Leu Val Glu Cys Leu Ser Asp Glu Phe Cys Leu Asp Glu Lys
 660 665 670
 Arg Glu Leu Ser Glu Lys Val Lys His Ala Lys Arg Leu Ser Asp Glu
 675 680 685
 Arg Asn Leu Leu Gln Asp Arg Asn Phe Thr Ser Ile Asn Gly Gln Leu
 690 695 700
 Asp Arg Gly Trp Arg Gly Ser Thr Asp Ile Thr Ile Gln Gly Gly Asp
 705 710 715 720
 Asp Val Phe Lys Glu Asn Tyr Val Thr Leu Leu Gly Thr Phe Asp Glu
 725 730 735
 Cys Tyr Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln Lys Ile Asp Glu Ser Lys Leu Lys
 740 745 750
 Ala Tyr Thr Arg Tyr Glu Leu Arg Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln Asp
 755 760 765
 Leu Glu Ile Tyr Leu Ile Arg Tyr Asn Ala Lys His Glu Thr Val Asn
 770 775 780
 Val Pro Gly Thr Gly Ser Leu Trp Pro Leu Ser Val Glu Ser Pro Ile
 785 790 795 800
 Gly Lys Cys Gly Glu Pro Asn Arg Cys Thr Pro His Leu Glu Trp Asn
 805 810 815
 Pro Asn Leu Asp Cys Ser Cys Arg Asp Gly Lys Thr Cys Ala His His
 820 825 830
 Ser His His Phe Ser Leu Asp Ile Asp Val Gly Cys Thr Asp Leu Asn
 835 840 845
 Glu Asp Leu Gly Val Trp Val Ile Phe Lys Ile Lys Thr Gln Asp Gly
 850 855 860
 His Ala Arg Leu Gly Asn Leu Glu Phe Leu Glu Glu Lys Pro Leu Val
 865 870 875 880
 Gly Glu Ala Leu Ala Arg Val Lys Arg Ala Glu Lys Lys Trp Arg Asp
 885 890 895
 Lys Arg Glu Lys Leu Gln Leu Glu Thr Asn Ile Val Tyr Lys Glu Ala
 900 905 910
 Lys Glu Ala Val Asp Ala Leu Phe Val Asn Ser Gln Tyr Asp Arg Leu
 915 920 925
 Gln Val Asp Thr Asn Ile Ala Met Ile His Ala Ala Asp Lys Arg Val
 930 935 940
 His Arg Ile Arg Glu Ala Tyr Leu Pro Glu Leu Ser Val Ile Pro Gly
 945 950 955 960

```

Val Asn Ala Ala Ile Phe Glu Glu Leu Glu Gly Cys Val Phe Thr Ala
          965                      970                      975

Phe Ser Leu Tyr Asp Ala Arg Asn Val Ile Lys Asn Gly Asp Phe Asn
          980                      985                      990

Asn Gly Leu Ser Cys Trp Asn Val Lys Gly His Val Glu Glu Gln Asn
          995                      1000                      1005

Asp His Arg Ser Val Leu Val Val Pro Glu Trp Glu Ala Glu Val
    1010                      1015                      1020

Ser Gln Glu Val Arg Val Cys Pro Gly Arg Gly Tyr Ile Leu Arg
    1025                      1030                      1035

Val Thr Ala Tyr Lys Glu Gly Tyr Gly Glu Gly Cys Val Thr Ile
    1040                      1045                      1050

His Gly Ile Glu Asn Asn Thr Asp Glu Leu Lys Phe Ser Asn Cys
    1055                      1060                      1065

Val Glu Glu Glu Val Tyr Pro Asn Asn Thr Val Thr Cys Asn Asp
    1070                      1075                      1080

Tyr Pro Ala Asn Gln Glu Glu Tyr Gly Gly Ala Tyr Thr Ser Arg
    1085                      1090                      1095

Asn Arg Gly Tyr Asp Glu Thr Tyr Gly Ser Asn Ser Ser Val Ser
    1100                      1105                      1110

Ala Asp Tyr Ala Ser Val Tyr Glu Glu Lys Ala Tyr Thr Asp Gly
    1115                      1120                      1125

Arg Arg Asp Asn Pro Cys Glu Phe Asn Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr
    1130                      1135                      1140

Thr Pro Leu Pro Ala Gly Tyr Val Thr Lys Glu Leu Glu Tyr Phe
    1145                      1150                      1155

Pro Glu Thr Asp Lys Val Trp Ile Glu Ile Gly Glu Thr Glu Gly
    1160                      1165                      1170

Thr Phe Ile Val Asp Ser Val Glu Leu Leu Leu Met Glu Glu
    1175                      1180                      1185

```

<210> 3

<211> 3567

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự mã hóa tổng hợp mã hóa protein trừ sâu TIC4472PL được thiết kế để biểu hiện trong tế bào thực vật trong đó codon alanin bổ sung được gắn xen ngay sau codon methionin khởi đầu.

<400> 3

atggctaata acaacatcga gaaccagtgc gtgccctaca actgcctttc gaacccggag
 60
 gaagtgatcc tggacggcga aaggatctcg accgggaata gcagcatcga catctcgctt
 120
 tcgctcgtgc agcttctagt cagtaacttc gttccgggcg gagggtttct cgtgggcctt
 180
 attgacttcg tttggggcat cgtggggcca tctccttggg acgcattcct cgtgcagatc
 240
 gagcaactga tccagcagcg tatcgaggcg tacgctaggg ctgccgctat ctccaacctg
 300
 gagggcatcg gcaacaactt caacatctac gttgaagcct tccaagaatg ggaggaagat
 360
 cctaataacc cagctacgcg gaacagagtg gtggatcgct ttagaatcct cgacggcctc
 420
 ctggaaaggg acatcccagag cttccgtatt tccggcttcg aggtgccgct gctgagcgtg
 480
 tacgcgcaag cggccaatct gcacctggcg attctccggg actctgtgat cttcggcgag
 540
 cgggtggggcc tcaccaccac taacgtgaac gagaactaca accgccagat ccgccacatc
 600
 gacgagtacg cggaccactg cgccaacaca tacaatcgcg ggctgaacaa cctccctaag
 660
 agcacttacc aagattggat cacctacaac aggetccgcc gggaactcac tctcacagtc
 720
 ctcgacatcg ctgccttctt cccgaactac gacaaccgcc gctacccgat tcagccagtc
 780
 ggccagctca cccgtgaggt gtacaccgat ccactgataa ctttcaatcc gcagctccag
 840
 tctgtcgcac agttgcccac cttcaacgtc atggaaagca acgcatcag gaacccacac
 900
 ttgttcgaca tccttaacaa cctgactatc ttcaccgact gggtcagcgt cggacggaac
 960
 ttctactggg gcggacaccg cgtcacctca aactacatcg gcggcggaac cattacttcg
 1020
 cccatctacg gccgggagggc gaatcaggag ccgccacgca gctttacatt caacggtcct
 1080
 gtgtttcgca cgttatcgaa cccgacactc aggetgctcc agcagccctg gcctgcgccg
 1140
 ccgtttaatt tgcgcggcgt cgaaggcgtc gagttcagta cgccgaccaa cagcttcacc
 1200
 tatcgcggaac gcgggactgt tgactccctg acagagctgc cgccggagga caactcgggt
 1260
 ctgccgcgtg agggctacag ccataggctt tgtcacgcga cctttgtgca gcgatccggg
 1320
 acacggttcc ttacaaccgg cgtggtgttc tcctggacac accgcagtgc aactctgacg
 1380
 aacacgattg acccagacaa gatcacgcag atcccgttag tgaagggtt ccgggtttgg
 1440
 tctggtgcct ctgtagtcac tgggcctggc ttacgggtg gcgacatcct ccgtcgcacg
 1500
 aactttggcg acttcgtgtc catgcaagtg aacattaaca gccctattac gcaacgctac
 1560
 cggctgaggt tcagatacgc ttcctcgcgg gacgcccgtc ttacgggtggc gacgggcgca
 1620
 gcgaacactg gagttggcgg ccaaactctc gtggacatgg ctttgcagaa gactatggag
 1680

atcgggtgagt ctctcacatc tcgcacgttc cgctacacgg atttctccaa ccctttctcc
 1740
 ttccgcgcca atccggacat cattcggatc aacgaacagc cgctcttcgg cgcgggctcc
 1800
 atctcatccg gtgagcttta cattgataag attgagataa ttctggccga cgcgaccttt
 1860
 gaggcagagt atgatctgga gcgcgcacag aaggccgtga acgcgctgtt tacgtccacg
 1920
 aaccagcgcg ggctcaagac agacgtcaca gactaccaca tcgaccaagt ctccaacctt
 1980
 gtcgagtgtc tctccgacga gttctgcctg gacgagaagc gggagcttag tgagaagggtg
 2040
 aagcacgcaa agcgctgtc tgacgagcgg aaccttctac aagaccgtaa cttcacctcc
 2100
 attaacgggc agctagaccg tggctggcgc gggtcaccg acatcactat ccaagggtggc
 2160
 gacgacgtct tcaaggagaa ctacgtgacg ctgctcggca cttttgacga gtgctaccg
 2220
 acatacctct atcagaagat tgacgagtct aagctcaagg cttacacccg ttacgagctg
 2280
 cgtggctaca tcgaggactc ccaggatctg gaaatctatc tcatcagata caacgcgaag
 2340
 cacgagacag tcaacgtacc tgggacaggc tctctctggc ctctgtctgt ggagagtccc
 2400
 atcggcaa at gtggcgagcc gaacagatgt actccgcacc tggagtggaa tcccaacttg
 2460
 gactgtagtt gccgcgacgg caagacctgc gcgcaccact cccaccactt ctccctggac
 2520
 attgacgtcg gctgcacgga tctcaacgag gatctgggcg tttgggtcat cttcaagata
 2580
 aagaccaggg acggacacgc cagactggga aacctagagt tccttgagga gaagccgctg
 2640
 gtcggcgaag cactggcgcg ggtcaagagg gccgagaaga agtggcgagg caaacgggag
 2700
 aaacttcaac tcgaaacgaa catcgtttac aaggaggcaa aggaggccgt ggacgcactg
 2760
 ttctgtaact cgcagtacga ccgcctccaa gtggacacca acatcgccat gatccatgca
 2820
 gcggacaagc gcgtgcaccg aatcaggga gcgtacttgc ccgagttgtc cgttatccct
 2880
 ggctgtaacg ctgccatctt cgaggaactg gagggctgcg tgttcaccgc attctccctg
 2940
 tacgacgcac gaaacgtcat caagaatggc gacttcaaca acggcctgag ctgctggaac
 3000
 gtgaagggcc acgtggagga gcagaacgac caccgctccg tgttagtggt cccggaatgg
 3060
 gaagccgaag tgagccagga ggtcagggtg tgtcccggtc gcggttacat cctccgctg
 3120
 accgcctaca aggagggcta tggcgagggc tgctgacga tacacggtat cgagaacaac
 3180
 accgatgagc ttaagttctc gaactgcgtg gaggaggagg tgtaccgaa taacacagtg
 3240
 acgtgcaatg actaccggc caaccaggag gactacggcg gtgcctacac gagccgaaac
 3300
 cgtggctatg acgaaactta cggctcgaac agcagcgtgt ctgcggatta tgccagtgtg
 3360

tacgaggaga aggcgtacac ggacgggcg cgcgacaacc cttgagagtt caatagaggc
 3420
 tatggcgact acacgccgct gcccgccggt tatgtgacga aggagttgga atacttccca
 3480
 gagacggaca aggtgtggat cgagattggc gagaccgagg gcacgttcat tgtggacagc
 3540
 gttgagctgc tactgatgga ggagtga
 3567

<210> 4

<211> 1188

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của TIC4472PL được mã hóa bởi trình tự mã hóa tổng hợp được thiết kế để biểu hiện trong tế bào thực vật (SEQ ID NO:3), và trong đó axit amin alanin bổ sung được gắn xen ngay sau methionin khởi đầu.

<400> 4

Met Ala Asn Asn Asn Ile Glu Asn Gln Cys Val Pro Tyr Asn Cys Leu
 1 5 10 15

Ser Asn Pro Glu Glu Val Ile Leu Asp Gly Glu Arg Ile Ser Thr Gly
 20 25 30

Asn Ser Ser Ile Asp Ile Ser Leu Ser Leu Val Gln Leu Leu Val Ser
 35 40 45

Asn Phe Val Pro Gly Gly Gly Phe Leu Val Gly Leu Ile Asp Phe Val
 50 55 60

Trp Gly Ile Val Gly Pro Ser Pro Trp Asp Ala Phe Leu Val Gln Ile
 65 70 75 80

Glu Gln Leu Ile Gln Gln Arg Ile Glu Ala Tyr Ala Arg Ala Ala Ala
 85 90 95

Ile Ser Asn Leu Glu Gly Ile Gly Asn Asn Phe Asn Ile Tyr Val Glu
 100 105 110

Ala Phe Gln Glu Trp Glu Glu Asp Pro Asn Asn Pro Ala Thr Arg Asn
 115 120 125

Arg Val Val Asp Arg Phe Arg Ile Leu Asp Gly Leu Leu Glu Arg Asp
 130 135 140

Ile Pro Ser Phe Arg Ile Ser Gly Phe Glu Val Pro Leu Leu Ser Val
 145 150 155 160

Tyr Ala Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ala Ile Leu Arg Asp Ser Val
 165 170 175

Ile Phe Gly Glu Arg Trp Gly Leu Thr Thr Thr Asn Val Asn Glu Asn
 180 185 190

Tyr Asn Arg Gln Ile Arg His Ile Asp Glu Tyr Ala Asp His Cys Ala

195					200					205					
Asn	Thr	Tyr	Asn	Arg	Gly	Leu	Asn	Asn	Leu	Pro	Lys	Ser	Thr	Tyr	Gln
	210					215					220				
Asp	Trp	Ile	Thr	Tyr	Asn	Arg	Leu	Arg	Arg	Glu	Leu	Thr	Leu	Thr	Val
225					230					235					240
Leu	Asp	Ile	Ala	Ala	Phe	Phe	Pro	Asn	Tyr	Asp	Asn	Arg	Arg	Tyr	Pro
			245						250					255	
Ile	Gln	Pro	Val	Gly	Gln	Leu	Thr	Arg	Glu	Val	Tyr	Thr	Asp	Pro	Leu
			260					265					270		
Ile	Thr	Phe	Asn	Pro	Gln	Leu	Gln	Ser	Val	Ala	Gln	Leu	Pro	Thr	Phe
		275					280					285			
Asn	Val	Met	Glu	Ser	Asn	Ala	Ile	Arg	Asn	Pro	His	Leu	Phe	Asp	Ile
	290					295					300				
Leu	Asn	Asn	Leu	Thr	Ile	Phe	Thr	Asp	Trp	Phe	Ser	Val	Gly	Arg	Asn
305					310					315					320
Phe	Tyr	Trp	Gly	Gly	His	Arg	Val	Thr	Ser	Asn	Tyr	Ile	Gly	Gly	Gly
			325						330					335	
Asn	Ile	Thr	Ser	Pro	Ile	Tyr	Gly	Arg	Glu	Ala	Asn	Gln	Glu	Pro	Pro
			340					345					350		
Arg	Ser	Phe	Thr	Phe	Asn	Gly	Pro	Val	Phe	Arg	Thr	Leu	Ser	Asn	Pro
		355					360					365			
Thr	Leu	Arg	Leu	Leu	Gln	Gln	Pro	Trp	Pro	Ala	Pro	Pro	Phe	Asn	Leu
	370					375					380				
Arg	Gly	Val	Glu	Gly	Val	Glu	Phe	Ser	Thr	Pro	Thr	Asn	Ser	Phe	Thr
385					390					395					400
Tyr	Arg	Gly	Arg	Gly	Thr	Val	Asp	Ser	Leu	Thr	Glu	Leu	Pro	Pro	Glu
				405					410					415	
Asp	Asn	Ser	Val	Leu	Pro	Arg	Glu	Gly	Tyr	Ser	His	Arg	Leu	Cys	His
			420					425					430		
Ala	Thr	Phe	Val	Gln	Arg	Ser	Gly	Thr	Pro	Phe	Leu	Thr	Thr	Gly	Val
		435					440					445			
Val	Phe	Ser	Trp	Thr	His	Arg	Ser	Ala	Thr	Leu	Thr	Asn	Thr	Ile	Asp
	450					455					460				
Pro	Asp	Lys	Ile	Thr	Gln	Ile	Pro	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Arg	Val	Trp
465					470					475					480
Ser	Gly	Ala	Ser	Val	Val	Thr	Gly	Pro	Gly	Phe	Thr	Gly	Gly	Asp	Ile
				485					490					495	

Leu Arg Arg Thr Asn Phe Gly Asp Phe Val Ser Met Gln Val Asn Ile
 500 505 510
 Asn Ser Pro Ile Thr Gln Arg Tyr Arg Leu Arg Phe Arg Tyr Ala Ser
 515 520 525
 Ser Arg Asp Ala Arg Leu Thr Val Ala Thr Gly Ala Ala Asn Thr Gly
 530 535 540
 Val Gly Gly Gln Ile Ser Val Asp Met Ala Leu Gln Lys Thr Met Glu
 545 550 555 560
 Ile Gly Glu Ser Leu Thr Ser Arg Thr Phe Arg Tyr Thr Asp Phe Ser
 565 570 575
 Asn Pro Phe Ser Phe Arg Ala Asn Pro Asp Ile Ile Arg Ile Asn Glu
 580 585 590
 Gln Pro Leu Phe Gly Ala Gly Ser Ile Ser Ser Gly Glu Leu Tyr Ile
 595 600 605
 Asp Lys Ile Glu Ile Ile Leu Ala Asp Ala Thr Phe Glu Ala Glu Tyr
 610 615 620
 Asp Leu Glu Arg Ala Gln Lys Ala Val Asn Ala Leu Phe Thr Ser Thr
 625 630 635 640
 Asn Gln Arg Gly Leu Lys Thr Asp Val Thr Asp Tyr His Ile Asp Gln
 645 650 655
 Val Ser Asn Leu Val Glu Cys Leu Ser Asp Glu Phe Cys Leu Asp Glu
 660 665 670
 Lys Arg Glu Leu Ser Glu Lys Val Lys His Ala Lys Arg Leu Ser Asp
 675 680 685
 Glu Arg Asn Leu Leu Gln Asp Arg Asn Phe Thr Ser Ile Asn Gly Gln
 690 695 700
 Leu Asp Arg Gly Trp Arg Gly Ser Thr Asp Ile Thr Ile Gln Gly Gly
 705 710 715 720
 Asp Asp Val Phe Lys Glu Asn Tyr Val Thr Leu Leu Gly Thr Phe Asp
 725 730 735
 Glu Cys Tyr Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln Lys Ile Asp Glu Ser Lys Leu
 740 745 750
 Lys Ala Tyr Thr Arg Tyr Glu Leu Arg Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln
 755 760 765
 Asp Leu Glu Ile Tyr Leu Ile Arg Tyr Asn Ala Lys His Glu Thr Val
 770 775 780
 Asn Val Pro Gly Thr Gly Ser Leu Trp Pro Leu Ser Val Glu Ser Pro
 785 790 795 800

Ile Gly Lys Cys Gly Glu Pro Asn Arg Cys Thr Pro His Leu Glu Trp
 805 810 815
 Asn Pro Asn Leu Asp Cys Ser Cys Arg Asp Gly Lys Thr Cys Ala His
 820 825 830
 His Ser His His Phe Ser Leu Asp Ile Asp Val Gly Cys Thr Asp Leu
 835 840 845
 Asn Glu Asp Leu Gly Val Trp Val Ile Phe Lys Ile Lys Thr Gln Asp
 850 855 860
 Gly His Ala Arg Leu Gly Asn Leu Glu Phe Leu Glu Glu Lys Pro Leu
 865 870 875 880
 Val Gly Glu Ala Leu Ala Arg Val Lys Arg Ala Glu Lys Lys Trp Arg
 885 890 895
 Asp Lys Arg Glu Lys Leu Gln Leu Glu Thr Asn Ile Val Tyr Lys Glu
 900 905 910
 Ala Lys Glu Ala Val Asp Ala Leu Phe Val Asn Ser Gln Tyr Asp Arg
 915 920 925
 Leu Gln Val Asp Thr Asn Ile Ala Met Ile His Ala Ala Asp Lys Arg
 930 935 940
 Val His Arg Ile Arg Glu Ala Tyr Leu Pro Glu Leu Ser Val Ile Pro
 945 950 955 960
 Gly Val Asn Ala Ala Ile Phe Glu Glu Leu Glu Gly Cys Val Phe Thr
 965 970 975
 Ala Phe Ser Leu Tyr Asp Ala Arg Asn Val Ile Lys Asn Gly Asp Phe
 980 985 990
 Asn Asn Gly Leu Ser Cys Trp Asn Val Lys Gly His Val Glu Glu Gln
 995 1000 1005
 Asn Asp His Arg Ser Val Leu Val Val Pro Glu Trp Glu Ala Glu
 1010 1015 1020
 Val Ser Gln Glu Val Arg Val Cys Pro Gly Arg Gly Tyr Ile Leu
 1025 1030 1035
 Arg Val Thr Ala Tyr Lys Glu Gly Tyr Gly Glu Gly Cys Val Thr
 1040 1045 1050
 Ile His Gly Ile Glu Asn Asn Thr Asp Glu Leu Lys Phe Ser Asn
 1055 1060 1065
 Cys Val Glu Glu Glu Val Tyr Pro Asn Asn Thr Val Thr Cys Asn
 1070 1075 1080
 Asp Tyr Pro Ala Asn Gln Glu Glu Tyr Gly Gly Ala Tyr Thr Ser

1085		1090		1095
Arg Asn	Arg Gly Tyr Asp	Glu Thr Tyr Gly Ser	Asn Ser Ser Val	
1100		1105	1110	
Ser Ala	Asp Tyr Ala Ser	Val Tyr Glu Glu Lys	Ala Tyr Thr Asp	
1115		1120	1125	
Gly Arg	Arg Asp Asn Pro	Cys Glu Phe Asn Arg	Gly Tyr Gly Asp	
1130		1135	1140	
Tyr Thr	Pro Leu Pro Ala	Gly Tyr Val Thr Lys	Glu Leu Glu Tyr	
1145		1150	1155	
Phe Pro	Glu Thr Asp Lys	Val Trp Ile Glu Ile	Gly Glu Thr Glu	
1160		1165	1170	
Gly Thr	Phe Ile Val Asp	Ser Val Glu Leu Leu	Leu Met Glu Glu	
1175		1180	1185	

<210> 5

<211> 3564

<212> ADN

<213> Bacillus thuringiensis

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(3564)

<223> Trình tự axit nucleic mã hóa protein trừ sâu TIC1425 thu được từ loài Bacillus thuringiensis EG10731.

<400> 5

atgaataata atattgaaaa ccaatgcgta ccttacaatt gtttaagtaa tcctgaagaa
60gtaatttttg atggagaacg gatatcaact ggtaattcat caattgatat ttctctgtca
120cttggttcaac ttctggtatc taactttgta ccaggcggag gatttttagt agggttaata
180gattttgtat ggggaatagt aggcccttct ccatgggatg catttctagt gcaaattgaa
240caattaattc agcaaagaat agaagcatat gctagggctg cagcaatttc taatttagaa
300ggaataggaa acaatttcaa tatatatgtg gaagcatttc aagaatggga agaagatcct
360aataatccag caaccaggaa tagagtagtt gatcgcttgc gtatacttga tgggctactt
420gaaagggaca ttccttcggt tcgaatttct ggatttgaag tccccctttt atccgtttat
480gctcaagcgg ccaatctgca tctagctata ttaagagatt ctgtaatttt tggagaaaga
540tggggattga caacaacaaa tgtcaatgaa aactataata gacaaatcag gcatattgat
600gaatatgctg atcactgtgc aaatacgtat aatcggggat taaataattt accgaaatct
660acgtatcaag attggataac atataatcga ttacggagag aattaacatt gactgtatta
720

gatatcgctg ctttctttcc aaactatgac aataggcggg atccaattca gccagttggg
 780
 caactaaciaa gggaagttta tacggacca ttaattactt ttaatcccca gttacagtct
 840
 gtagctcaat tacctacttt taacgttatg gaaagcaacg caattagaaa tcctcatttg
 900
 tttgatatat tgaataatct tacaattttt acggattggg ttagtggttg acgcaacttt
 960
 tattggggag gacatcgagt aacttctaac tatataggag gaggcaacat aacatctcct
 1020
 atatatggaa gagaggcgaa ccaggagcct ccaagatctt ttacttttaa tggacctgtt
 1080
 tttaggactt tatcaaatcc tactttacga ttattacagc aaccttggcc agcaccacca
 1140
 ttttaatttac gtggtgttga aggagtagaa ttttctacac ctacaaatag ctttacgtat
 1200
 cgaggaagag gtacagttga ttctttaacc gaattaccgc ctgaggataa tagtgtgcta
 1260
 cctcgcgagg gatatagtca tcgtttatgt catgcaactt ttgttcaaag atctggaaca
 1320
 ccatttttaa caacgggtgt agtattttct tggacgcac gcagtgcac tcttaciaat
 1380
 acaattgatc cagacaaaat tactcagata cctttagtga aaggatttag agtttgaggt
 1440
 ggcgcctctg tcgttacagg accaggtttt acaggagggg atatccttcg aagaactaac
 1500
 tttggggatt ttgtatctat gcaagttaat attaattcac caataacaca aagataccgt
 1560
 ttaagatttc gttatgcttc cagtagagat gcacgactta cagtagcgac aggagcagca
 1620
 aacacaggag ttggagggca aattagtgtg gacatggctc ttcagaaaac tatggaaatt
 1680
 ggagagagct taacatctag aacattttaga tataccgatt ttagtaatcc tttttcattt
 1740
 agagctaata cagatataat tcgtataaat gaacaaccac tattcggtgc aggctctatt
 1800
 agtagtggtg aactttatat agataaaatt gaaattattc tagcagatgc aacatttgaa
 1860
 gcagaatatg atttgaaaag agcacagaag gcggtgaatg cgctgtttac ttctaciaac
 1920
 caaagaggat taaaaacaga tgtgacggat tatcatattg atcaagtatc caatttagtt
 1980
 gagtgtttat cggatgaatt ttgtctggat gaaaaacgag aattgtccga gaaagtcaaa
 2040
 catgcgaagc gactcagtga tgagcgaaat ttactccagg atcgaaattt cacatccatt
 2100
 aatgggcaac tagaccgtgg ctggagagga agtacggata ttaccatcca aggaggagat
 2160
 gacgtattca aagagaatta cgtcacacta ctgggtacct ttgatgagtg ctatccaacg
 2220
 tttttatatc aaaaaataga tgagtcgaaa ttaaaagcct ataccgcta tgaattaaga
 2280
 gggtatatcg aggatagtca agacttagaa atctatttaa ttcgctacia tgcaaaacac
 2340
 gaaacagtaa atgtgccagg tacaggttcc ttatggccgc tttcagtcga aagtccaatc
 2400

ggaaagtgtg gagaaccgaa tcgatgcaca ccacaccttg aatggaatcc taatctagat
 2460
 tgttcctgca gagacgggaa aacatgtgca catcattctc atcatttctc cttggacatt
 2520
 gatgttggat gtacagactt aaatgaagat ctaggtgtat gggatgatatt caagattaag
 2580
 acgcaagatg gtcatgcaag actaggaaat ctagagtttc tcgaagagaa accattagta
 2640
 ggagaagcgt tagctcgtgt gaaaagagcg gagaaaaaat ggagagacaa acgcgaaaaa
 2700
 ttgcaattag aaacaaatat cgtttacaaa gaggcaaaag aagctgtgga tgctttat
 2760
 gtaaactctc aatatgatag attacaagtg gatacgaaca ttgccatgat tcatgcggca
 2820
 gataaacgcg ttcatagaat ccgagaagcg tatcttccag agttatctgt gattccgggt
 2880
 gtcaatgcgg ctattttcga agaattagaa ggggtgtattt tcaactgcatt ctccctatat
 2940
 gatgcgagaa atgtcattaa aaatggcgat ttaataatg gcttatcatg ctggaacgtg
 3000
 aaagggcgtg tagaagaaca aaacgaccat cgttcgggtcc ttgttgtccc ggaatgggaa
 3060
 gcagaagtgt cacaagaggt tcgtgtctgt ccaggtcgtg gctatatcct tcgtgttaca
 3120
 gcatacaaag agggatatgg agaaggctgt gtaaccattc atgggatcga gaacaatata
 3180
 gacgaactga agtttagcaa ctgcgtagaa gaggaagtct atccaaacaa cacggtaacg
 3240
 tgtaatgatt atcctgcaaa tcaagaagaa tacgggggtg cgtacacttc tcgtaatcgt
 3300
 ggatatgacg aaacttatgg aagcaattct tccgtatcag ctgattatgc gtcagtttat
 3360
 gaagaaaaag cgtatacaga tggacgaaga gacaatccat gtgaatttaa cagagggtat
 3420
 ggggattata cgccactacc agctggctat gtaacaaaag aattagaata cttcccagaa
 3480
 accgataagg tatggattga gattggagaa acggaaggaa cattcatcgt ggacagtgtg
 3540
 gaattactcc ttatggagga ataa
 3564

<210> 6
 <211> 1187
 <212> PRT
 <213> Bacillus thuringiensis

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1187)
 <223> Trình tự axit amin của protein trừ sâu TIC1425.
 <400> 6

Met	Asn	Asn	Asn	Ile	Glu	Asn	Gln	Cys	Val	Pro	Tyr	Asn	Cys	Leu	Ser
1				5					10					15	

Asn	Pro	Glu	Glu	Val	Ile	Leu	Asp	Gly	Glu	Arg	Ile	Ser	Thr	Gly	Asn
				20				25					30		

Ser Ser Ile Asp Ile Ser Leu Ser Leu Val Gln Leu Leu Val Ser Asn
 35 40 45
 Phe Val Pro Gly Gly Gly Phe Leu Val Gly Leu Ile Asp Phe Val Trp
 50 55 60
 Gly Ile Val Gly Pro Ser Pro Trp Asp Ala Phe Leu Val Gln Ile Glu
 65 70 75 80
 Gln Leu Ile Gln Gln Arg Ile Glu Ala Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Ile
 85 90 95
 Ser Asn Leu Glu Gly Ile Gly Asn Asn Phe Asn Ile Tyr Val Glu Ala
 100 105 110
 Phe Gln Glu Trp Glu Glu Asp Pro Asn Asn Pro Ala Thr Arg Asn Arg
 115 120 125
 Val Val Asp Arg Phe Arg Ile Leu Asp Gly Leu Leu Glu Arg Asp Ile
 130 135 140
 Pro Ser Phe Arg Ile Ser Gly Phe Glu Val Pro Leu Leu Ser Val Tyr
 145 150 155 160
 Ala Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ala Ile Leu Arg Asp Ser Val Ile
 165 170 175
 Phe Gly Glu Arg Trp Gly Leu Thr Thr Thr Asn Val Asn Glu Asn Tyr
 180 185 190
 Asn Arg Gln Ile Arg His Ile Asp Glu Tyr Ala Asp His Cys Ala Asn
 195 200 205
 Thr Tyr Asn Arg Gly Leu Asn Asn Leu Pro Lys Ser Thr Tyr Gln Asp
 210 215 220
 Trp Ile Thr Tyr Asn Arg Leu Arg Arg Glu Leu Thr Leu Thr Val Leu
 225 230 235 240
 Asp Ile Ala Ala Phe Phe Pro Asn Tyr Asp Asn Arg Arg Tyr Pro Ile
 245 250 255
 Gln Pro Val Gly Gln Leu Thr Arg Glu Val Tyr Thr Asp Pro Leu Ile
 260 265 270
 Thr Phe Asn Pro Gln Leu Gln Ser Val Ala Gln Leu Pro Thr Phe Asn
 275 280 285
 Val Met Glu Ser Asn Ala Ile Arg Asn Pro His Leu Phe Asp Ile Leu
 290 295 300
 Asn Asn Leu Thr Ile Phe Thr Asp Trp Phe Ser Val Gly Arg Asn Phe
 305 310 315 320
 Tyr Trp Gly Gly His Arg Val Thr Ser Asn Tyr Ile Gly Gly Gly Asn

				325					330					335					
Ile	Thr	Ser	Pro	Ile	Tyr	Gly	Arg	Glu	Ala	Asn	Gln	Glu	Pro	Pro	Arg				
			340					345					350						
Ser	Phe	Thr	Phe	Asn	Gly	Pro	Val	Phe	Arg	Thr	Leu	Ser	Asn	Pro	Thr				
		355					360					365							
Leu	Arg	Leu	Leu	Gln	Gln	Pro	Trp	Pro	Ala	Pro	Pro	Phe	Asn	Leu	Arg				
	370					375					380								
Gly	Val	Glu	Gly	Val	Glu	Phe	Ser	Thr	Pro	Thr	Asn	Ser	Phe	Thr	Tyr				
385					390					395					400				
Arg	Gly	Arg	Gly	Thr	Val	Asp	Ser	Leu	Thr	Glu	Leu	Pro	Pro	Glu	Asp				
				405					410					415					
Asn	Ser	Val	Leu	Pro	Arg	Glu	Gly	Tyr	Ser	His	Arg	Leu	Cys	His	Ala				
			420					425					430						
Thr	Phe	Val	Gln	Arg	Ser	Gly	Thr	Pro	Phe	Leu	Thr	Thr	Gly	Val	Val				
		435					440					445							
Phe	Ser	Trp	Thr	His	Arg	Ser	Ala	Thr	Leu	Thr	Asn	Thr	Ile	Asp	Pro				
	450					455					460								
Asp	Lys	Ile	Thr	Gln	Ile	Pro	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Arg	Val	Trp	Ser				
465					470					475					480				
Gly	Ala	Ser	Val	Val	Thr	Gly	Pro	Gly	Phe	Thr	Gly	Gly	Asp	Ile	Leu				
				485					490					495					
Arg	Arg	Thr	Asn	Phe	Gly	Asp	Phe	Val	Ser	Met	Gln	Val	Asn	Ile	Asn				
			500					505					510						
Ser	Pro	Ile	Thr	Gln	Arg	Tyr	Arg	Leu	Arg	Phe	Arg	Tyr	Ala	Ser	Ser				
		515					520					525							
Arg	Asp	Ala	Arg	Leu	Thr	Val	Ala	Thr	Gly	Ala	Ala	Asn	Thr	Gly	Val				
	530					535					540								
Gly	Gly	Gln	Ile	Ser	Val	Asp	Met	Ala	Leu	Gln	Lys	Thr	Met	Glu	Ile				
545					550					555					560				
Gly	Glu	Ser	Leu	Thr	Ser	Arg	Thr	Phe	Arg	Tyr	Thr	Asp	Phe	Ser	Asn				
				565					570					575					
Pro	Phe	Ser	Phe	Arg	Ala	Asn	Pro	Asp	Ile	Ile	Arg	Ile	Asn	Glu	Gln				
			580					585					590						
Pro	Leu	Phe	Gly	Ala	Gly	Ser	Ile	Ser	Ser	Gly	Glu	Leu	Tyr	Ile	Asp				
		595					600					605							
Lys	Ile	Glu	Ile	Ile	Leu	Ala	Asp	Ala	Thr	Phe	Glu	Ala	Glu	Tyr	Asp				
	610					615					620								

Leu Glu Arg Ala Gln Lys Ala Val Asn Ala Leu Phe Thr Ser Thr Asn
 625 630 635 640
 Gln Arg Gly Leu Lys Thr Asp Val Thr Asp Tyr His Ile Asp Gln Val
 645 650 655
 Ser Asn Leu Val Glu Cys Leu Ser Asp Glu Phe Cys Leu Asp Glu Lys
 660 665 670
 Arg Glu Leu Ser Glu Lys Val Lys His Ala Lys Arg Leu Ser Asp Glu
 675 680 685
 Arg Asn Leu Leu Gln Asp Arg Asn Phe Thr Ser Ile Asn Gly Gln Leu
 690 695 700
 Asp Arg Gly Trp Arg Gly Ser Thr Asp Ile Thr Ile Gln Gly Gly Asp
 705 710 715 720
 Asp Val Phe Lys Glu Asn Tyr Val Thr Leu Leu Gly Thr Phe Asp Glu
 725 730 735
 Cys Tyr Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln Lys Ile Asp Glu Ser Lys Leu Lys
 740 745 750
 Ala Tyr Thr Arg Tyr Glu Leu Arg Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln Asp
 755 760 765
 Leu Glu Ile Tyr Leu Ile Arg Tyr Asn Ala Lys His Glu Thr Val Asn
 770 775 780
 Val Pro Gly Thr Gly Ser Leu Trp Pro Leu Ser Val Glu Ser Pro Ile
 785 790 795 800
 Gly Lys Cys Gly Glu Pro Asn Arg Cys Thr Pro His Leu Glu Trp Asn
 805 810 815
 Pro Asn Leu Asp Cys Ser Cys Arg Asp Gly Lys Thr Cys Ala His His
 820 825 830
 Ser His His Phe Ser Leu Asp Ile Asp Val Gly Cys Thr Asp Leu Asn
 835 840 845
 Glu Asp Leu Gly Val Trp Val Ile Phe Lys Ile Lys Thr Gln Asp Gly
 850 855 860
 His Ala Arg Leu Gly Asn Leu Glu Phe Leu Glu Glu Lys Pro Leu Val
 865 870 875 880
 Gly Glu Ala Leu Ala Arg Val Lys Arg Ala Glu Lys Lys Trp Arg Asp
 885 890 895
 Lys Arg Glu Lys Leu Gln Leu Glu Thr Asn Ile Val Tyr Lys Glu Ala
 900 905 910
 Lys Glu Ala Val Asp Ala Leu Phe Val Asn Ser Gln Tyr Asp Arg Leu
 915 920 925

Gln Val Asp Thr Asn Ile Ala Met Ile His Ala Ala Asp Lys Arg Val
 930 935 940
 His Arg Ile Arg Glu Ala Tyr Leu Pro Glu Leu Ser Val Ile Pro Gly
 945 950 955 960
 Val Asn Ala Ala Ile Phe Glu Glu Leu Glu Gly Cys Ile Phe Thr Ala
 965 970 975
 Phe Ser Leu Tyr Asp Ala Arg Asn Val Ile Lys Asn Gly Asp Phe Asn
 980 985 990
 Asn Gly Leu Ser Cys Trp Asn Val Lys Gly His Val Glu Glu Gln Asn
 995 1000 1005
 Asp His Arg Ser Val Leu Val Val Pro Glu Trp Glu Ala Glu Val
 1010 1015 1020
 Ser Gln Glu Val Arg Val Cys Pro Gly Arg Gly Tyr Ile Leu Arg
 1025 1030 1035
 Val Thr Ala Tyr Lys Glu Gly Tyr Gly Glu Gly Cys Val Thr Ile
 1040 1045 1050
 His Gly Ile Glu Asn Asn Thr Asp Glu Leu Lys Phe Ser Asn Cys
 1055 1060 1065
 Val Glu Glu Glu Val Tyr Pro Asn Asn Thr Val Thr Cys Asn Asp
 1070 1075 1080
 Tyr Pro Ala Asn Gln Glu Glu Tyr Gly Gly Ala Tyr Thr Ser Arg
 1085 1090 1095
 Asn Arg Gly Tyr Asp Glu Thr Tyr Gly Ser Asn Ser Ser Val Ser
 1100 1105 1110
 Ala Asp Tyr Ala Ser Val Tyr Glu Glu Lys Ala Tyr Thr Asp Gly
 1115 1120 1125
 Arg Arg Asp Asn Pro Cys Glu Phe Asn Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr
 1130 1135 1140
 Thr Pro Leu Pro Ala Gly Tyr Val Thr Lys Glu Leu Glu Tyr Phe
 1145 1150 1155
 Pro Glu Thr Asp Lys Val Trp Ile Glu Ile Gly Glu Thr Glu Gly
 1160 1165 1170
 Thr Phe Ile Val Asp Ser Val Glu Leu Leu Leu Met Glu Glu
 1175 1180 1185

<210> 7
 <211> 3537
 <212> ADN
 <213> Bacillus thuringiensis

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(3537)
<223> Trình tự axit nucleic mã hóa protein trừ sâu TIC2613 thu được từ
loài Bacillus thuringiensis EG5408.
<400> 7
atggataaca atatcaagaa ccaatgcatt ccttacaatt gtttaaataga tcctgaggta
60
gaaatattag gtgaagaggg gataactact agtaatgaaa atctcgaatt tttcttatcg
120
ctaacgaaat ttgtcttgaa taggtttgtc cctgggtggag catatgtagc tggcctatct
180
gatgtattct ggggatggtt aaaaccttct gattgggtctg caatccttga acaaattgaa
240
gaattaatta accaaaaaat tgagacgttt gctagaaatc aagcaattag tagattggaa
300
gggttaagca acctttatga aatttacgca gatactttta aagaatggga aaaagatccg
360
actaatccag cattaagaga agaaatgcgt acacaattta atgacatgaa cagctctttt
420
gtaacagcta tgcctctttt ttcagttcaa aattttgaag ttcctctttt agcagtatac
480
gctcaagctg caaattttaca tctatcagtt ttaagggatg tctcagtttt tgggtcaaat
540
tggggatttg attcagccac tgtcaatagt cgttataatg atttagtaag aaatattcgt
600
acctatacaa attatgtcgt acgttggtat aacacaggat tagcaagggtt acgaggtact
660
acgtaccaag attggttaaa ttatcatcgc tttagaagag aattaacaat aactgcattg
720
gatatcatta ccatattccc acactacgat aataaaatgt atccaattca accccatttt
780
caattaacaa gagagattta tacggatcca ctaattaatt tcaatccggc gttacagtct
840
gtagcacaat tacctctatt taatgagatg gaaaatagta caattagaag ccctcattta
900
gttgattttt taaataggct tacaatttat acagattggg atagtctcgg aagacactat
960
tattggggag gacatcaa atgtctctaga caaacaggat caacttcac tattacattc
1020
cctatatatg gaagagaggc gaatcaagag gccctagaa catataattt tagtcaacct
1080
gtcttttagaa cactgtcaaa tcctacttta acacgtttta tgcaaccttg gccagcccca
1140
gcatttcagt tgcgtcgtct tgagggagtt gaatttcaaa caactacagg taattttacg
1200
tatcgaggaa gaggtacggt agattccttt gatgaattac caccagatga tacaagcgta
1260
ccagcgcgtg aaggatatag tcatcgttta tgtcatgcaa ctttatcag aaaatctggg
1320
acgccgtatt taacaacggg tgtaacacta tcttggacac acaatagcaa tacacctacg
1380
aatataattt atcctgataa aatcactcaa gtaccattgg tgaaagcatc taaccttcat
1440

```

tctagtgcctt tcgttttaaa aggaccagga tttacaggag gggacatact tggaagaact
1500
agtgtgggca acatagcaga tatccaaatg aatattactg caccgttatc acaaagatat
1560
cgcgtacgaa ttcggtatgc ctctactaca aacttacaat ttcatacgac aattaacggc
1620
agggccgtaa atcaggctaa tttcccagca actatgaata gagtagaaga cttagaatat
1680
aattccttta gaacgataag tttcgggtact ccttttaact ttttagatgc tcaaagtacc
1740
ttcagggttag gtgtatggag cttttcttca ggtaccgttt taatagatag aattgaagtt
1800
gtaccaatgg aagtaacatt tgaagcagaa tctgatttag aaagagcaca aaaggcgggtg
1860
aacgctctgt ttacttctat aaatcaaaaa ggactaaaaa cagatgtaac agattatcac
1920
attgatcaag tatccaattt ggtcgaatgt ctatccgatg aattttgtct agatgaaaag
1980
agagaactat ttgagaaagt caaatatgcg aaacgactca gtgacgaacg gaatttactt
2040
gcgatccaa atttcacatc tattaatggg caactagatc gtggatggag aggaagtacg
2100
gatattacca ttcaaggggg cgatgacgta ttcaaagaaa actacgtcac actatcaggt
2160
acccttgatg agtgttatcc aacctattta tatcaaaaaa tagacgaatc gaaattaaaa
2220
gcgtataccc gttacgagtt acgaggatat atcgaagata gtcaagattt agaagtatac
2280
ttgatcgtt acaataccaa acatgaaaca ttgaatgtac caggtagagg gggcctatgg
2340
ccgcttgacg tagaaagttc aatcggaggg tgtggcgaac caaacgatg cgcaccacaa
2400
atggaatggg atccaaatct agaatgttct tgtagcgacg aggagaaatg tgcgcatcat
2460
tcccatcatt tctctctcga tattgatgtt ggatgtactg atttaaataa aaatctaggt
2520
atatgggtta tattttaaata taaaacgcag aacgggttatg caaaattagg aaatttagag
2580
tttctcgaag agaaaccatt aataggggaa gcgttagctc gtgttaagcg agtggagaaa
2640
aatggaaag acaaacgtga aaaattagaa tttgaaacga atatagtcta caacgaggca
2700
aaagaagctg tggatgcact attcgtaaata tcacaatatg atagattgca agctgatata
2760
aatatcgcaa tgattcatgc ggcggataac aaagttcata aaattcgca ggcgtacctc
2820
ccagagttat ctgtgatacc aggtgtaaat gcgaccgttt ttgaagaatt agaagagcgt
2880
atttttacag cattctccct ttacgatgca agaaatgtga taaaaaatgg ggatttcaat
2940
aatggattat cttgttgga tgtgaagggc caagtagatg tagacaaaaa tgaccatcgt
3000
tctgtccttg ttattccagg atgggaatcg gaagtatcac aagaagttca tgtatgtcca
3060
gatcgtggat acattcttcg tgttacggcg tacaagaag gatatggaga aggctgcgta
3120

acaatccatg agattgataa tcatacagac gaactgaaat ttaaaaactg ctttgaagag
 3180
 gaagtatctc taaataatgc ggtgacatgt gatgagtata ctacaaatca agaagtagga
 3240
 gggtatgcgg atgtacgtca atccaataat cgtggatcta atgaggccta tgtaaactct
 3300
 acttccacat caactgatta tgcatcgctc tacgaggaag agtcgtatac gaatgaacag
 3360
 acatataatt cttgtgaatc taacagaggg tatggtaatc aaatgccatt accgtctggc
 3420
 tatgtgacaa aagaattaga atattttcca gagacagata aagtatggat tgagattgga
 3480
 gaaacagaag gaacattcat cgtagacagt gtggaattac tccttatgga ggaataa
 3537

<210> 8
 <211> 1178
 <212> PRT
 <213> *Bacillus thuringiensis*

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1178)
 <223> Trình tự axit amin của protein trừ sâu TIC2613.
 <400> 8

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

				165					170					175					
Phe	Gly	Gln	Asn	Trp	Gly	Phe	Asp	Ser	Ala	Thr	Val	Asn	Ser	Arg	Tyr				
			180					185					190						
Asn	Asp	Leu	Val	Arg	Asn	Ile	Arg	Thr	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Val	Val	Arg				
		195					200					205							
Trp	Tyr	Asn	Thr	Gly	Leu	Ala	Arg	Leu	Arg	Gly	Thr	Thr	Tyr	Gln	Asp				
	210					215					220								
Trp	Leu	Asn	Tyr	His	Arg	Phe	Arg	Arg	Glu	Leu	Thr	Ile	Thr	Ala	Leu				
225					230					235					240				
Asp	Ile	Ile	Thr	Ile	Phe	Pro	His	Tyr	Asp	Asn	Lys	Met	Tyr	Pro	Ile				
				245					250					255					
Gln	Pro	His	Phe	Gln	Leu	Thr	Arg	Glu	Ile	Tyr	Thr	Asp	Pro	Leu	Ile				
			260					265					270						
Asn	Phe	Asn	Pro	Ala	Leu	Gln	Ser	Val	Ala	Gln	Leu	Pro	Leu	Phe	Asn				
		275					280					285							
Glu	Met	Glu	Asn	Ser	Thr	Ile	Arg	Ser	Pro	His	Leu	Val	Asp	Phe	Leu				
	290					295					300								
Asn	Arg	Leu	Thr	Ile	Tyr	Thr	Asp	Trp	Tyr	Ser	Leu	Gly	Arg	His	Tyr				
305				310						315					320				
Tyr	Trp	Gly	Gly	His	Gln	Ile	Val	Ser	Arg	Gln	Thr	Gly	Ser	Thr	Ser				
				325					330					335					
Thr	Ile	Thr	Phe	Pro	Ile	Tyr	Gly	Arg	Glu	Ala	Asn	Gln	Glu	Ala	Pro				
			340					345					350						
Arg	Thr	Tyr	Asn	Phe	Ser	Gln	Pro	Val	Phe	Arg	Thr	Leu	Ser	Asn	Pro				
		355					360					365							
Thr	Leu	Thr	Arg	Leu	Met	Gln	Pro	Trp	Pro	Ala	Pro	Ala	Phe	Gln	Leu				
	370					375					380								
Arg	Arg	Leu	Glu	Gly	Val	Glu	Phe	Gln	Thr	Thr	Thr	Gly	Asn	Phe	Thr				
385					390					395					400				
Tyr	Arg	Gly	Arg	Gly	Thr	Val	Asp	Ser	Phe	Asp	Glu	Leu	Pro	Pro	Asp				
				405					410					415					
Asp	Thr	Ser	Val	Pro	Ala	Arg	Glu	Gly	Tyr	Ser	His	Arg	Leu	Cys	His				
			420					425					430						
Ala	Thr	Phe	Ile	Arg	Lys	Ser	Gly	Thr	Pro	Tyr	Leu	Thr	Thr	Gly	Val				
		435					440					445							
Thr	Leu	Ser	Trp	Thr	His	Asn	Ser	Asn	Thr	Pro	Thr	Asn	Ile	Ile	Tyr				
	450					455					460								

Pro Asp Lys Ile Thr Gln Val Pro Leu Val Lys Ala Ser Asn Leu His
 465 470 475 480
 Ser Ser Ala Phe Val Leu Lys Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile
 485 490 495
 Leu Gly Arg Thr Ser Val Gly Asn Ile Ala Asp Ile Gln Met Asn Ile
 500 505 510
 Thr Ala Pro Leu Ser Gln Arg Tyr Arg Val Arg Ile Arg Tyr Ala Ser
 515 520 525
 Thr Thr Asn Leu Gln Phe His Thr Thr Ile Asn Gly Arg Ala Val Asn
 530 535 540
 Gln Ala Asn Phe Pro Ala Thr Met Asn Arg Val Glu Asp Leu Glu Tyr
 545 550 555 560
 Asn Ser Phe Arg Thr Ile Ser Phe Gly Thr Pro Phe Asn Phe Leu Asp
 565 570 575
 Ala Gln Ser Thr Phe Arg Leu Gly Val Trp Ser Phe Ser Ser Gly Thr
 580 585 590
 Val Leu Ile Asp Arg Ile Glu Val Val Pro Met Glu Val Thr Phe Glu
 595 600 605
 Ala Glu Ser Asp Leu Glu Arg Ala Gln Lys Ala Val Asn Ala Leu Phe
 610 615 620
 Thr Ser Ile Asn Gln Lys Gly Leu Lys Thr Asp Val Thr Asp Tyr His
 625 630 635 640
 Ile Asp Gln Val Ser Asn Leu Val Glu Cys Leu Ser Asp Glu Phe Cys
 645 650 655
 Leu Asp Glu Lys Arg Glu Leu Phe Glu Lys Val Lys Tyr Ala Lys Arg
 660 665 670
 Leu Ser Asp Glu Arg Asn Leu Leu Ala Asp Pro Asn Phe Thr Ser Ile
 675 680 685
 Asn Gly Gln Leu Asp Arg Gly Trp Arg Gly Ser Thr Asp Ile Thr Ile
 690 695 700
 Gln Gly Gly Asp Asp Val Phe Lys Glu Asn Tyr Val Thr Leu Ser Gly
 705 710 715 720
 Thr Leu Asp Glu Cys Tyr Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln Lys Ile Asp Glu
 725 730 735
 Ser Lys Leu Lys Ala Tyr Thr Arg Tyr Glu Leu Arg Gly Tyr Ile Glu
 740 745 750
 Asp Ser Gln Asp Leu Glu Val Tyr Leu Ile Arg Tyr Asn Thr Lys His
 755 760 765

Glu Thr Leu Asn Val Pro Gly Thr Gly Gly Leu Trp Pro Leu Ala Val
 770 775 780
 Glu Ser Ser Ile Gly Gly Cys Gly Glu Pro Asn Arg Cys Ala Pro Gln
 785 790 795 800
 Met Glu Trp Asp Pro Asn Leu Glu Cys Ser Cys Ser Asp Glu Glu Lys
 805 810 815
 Cys Ala His His Ser His His Phe Ser Leu Asp Ile Asp Val Gly Cys
 820 825 830
 Thr Asp Leu Asn Glu Asn Leu Gly Ile Trp Val Ile Phe Lys Ile Lys
 835 840 845
 Thr Gln Asn Gly Tyr Ala Lys Leu Gly Asn Leu Glu Phe Leu Glu Glu
 850 855 860
 Lys Pro Leu Ile Gly Glu Ala Leu Ala Arg Val Lys Arg Val Glu Lys
 865 870 875 880
 Lys Trp Lys Asp Lys Arg Glu Lys Leu Glu Phe Glu Thr Asn Ile Val
 885 890 895
 Tyr Asn Glu Ala Lys Glu Ala Val Asp Ala Leu Phe Val Asn Ser Gln
 900 905 910
 Tyr Asp Arg Leu Gln Ala Asp Thr Asn Ile Ala Met Ile His Ala Ala
 915 920 925
 Asp Asn Lys Val His Lys Ile Arg Glu Ala Tyr Leu Pro Glu Leu Ser
 930 935 940
 Val Ile Pro Gly Val Asn Ala Thr Val Phe Glu Glu Leu Glu Glu Arg
 945 950 955 960
 Ile Phe Thr Ala Phe Ser Leu Tyr Asp Ala Arg Asn Val Ile Lys Asn
 965 970 975
 Gly Asp Phe Asn Asn Gly Leu Ser Cys Trp Asn Val Lys Gly Gln Val
 980 985 990
 Asp Val Asp Gln Asn Asp His Arg Ser Val Leu Val Ile Pro Gly Trp
 995 1000 1005
 Glu Ser Glu Val Ser Gln Glu Val His Val Cys Pro Asp Arg Gly
 1010 1015 1020
 Tyr Ile Leu Arg Val Thr Ala Tyr Lys Glu Gly Tyr Gly Glu Gly
 1025 1030 1035
 Cys Val Thr Ile His Glu Ile Asp Asn His Thr Asp Glu Leu Lys
 1040 1045 1050
 Phe Lys Asn Cys Phe Glu Glu Glu Val Ser Leu Asn Asn Ala Val

1055		1060		1065
Thr Cys Asp Glu Tyr Thr	Thr Asn Gln Glu Val Gly Gly Tyr Ala			
1070	1075	1080		
Asp Val Arg Gln Ser Asn	Asn Arg Gly Ser Asn Glu Ala Tyr Val			
1085	1090	1095		
Asn Pro Thr Ser Thr Ser	Thr Asp Tyr Ala Ser Leu Tyr Glu Glu			
1100	1105	1110		
Glu Ser Tyr Thr Asn Glu	Gln Thr Tyr Asn Ser Cys Glu Ser Asn			
1115	1120	1125		
Arg Gly Tyr Gly Asn Gln	Met Pro Leu Pro Ser Gly Tyr Val Thr			
1130	1135	1140		
Lys Glu Leu Glu Tyr Phe	Pro Glu Thr Asp Lys Val Trp Ile Glu			
1145	1150	1155		
Ile Gly Glu Thr Glu Gly	Thr Phe Ile Val Asp Ser Val Glu Leu			
1160	1165	1170		
Leu Leu Met Glu Glu				
1175				

<210> 9

<211> 3540

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự mã hóa tổng hợp mã hóa protein trừ sâu TIC2613PL được thiết kế để biểu hiện trong tế bào thực vật trong đó codon alanin bổ sung được gắn xen ngay sau codon methionin khởi đầu.

<400> 9

atggctgaca acaacatcaa gaaccagtgc atcccggtaca actgcctcaa cgacccggag
60

gtcgagatcc tcggcgagga gggcataacg acgagcaacg agaaccttga gttcttcttc
120

agcctcacga agttcgtcct gaaccgcttc gtgccgggag gagcctacgt ggctggcctg
180

ttcgtatgtgt tctgggggatg gctcaagcca agcgactggt ccgcgattct ggagcagatc
240

gaggaactca tcaaccagaa gatcgagaca ttcgcccgca accaggccat cagccgcctg
300

gagggcctct cgaacctcta cgaaatctac gccgatacgt tcaaggagtg ggagaaggat
360

ccgacgaacc cggccttgcg cgaggagatg aggacgcaat tcaacgacat gaactccagc
420

ttcgtcaccg ccatgccgct gttctccgtc cagaacttcg aggtgccctt gctcgccgtg
480

tacgcgcaag ctgcgaactt acatcttagc gtcctccgag acgtcagcgt cttcggccag
540

aactggggat tcgattccgc gacggtgaac tcacggtaca atgatctcgt gcggaacatc
600

cggacctaca ccaattacgt cgtgcgctgg tacaacacgg gattggcgcg tctgcgcggc
 660
 actacctacc aggactggct caactaccac cggttccgcc gcgaactcac aatcacagcg
 720
 ctggacatca ttaccatctt cccgcactac gacaacaaga tgtaccaat ccagcctcac
 780
 ttccagctta cccgtgagat ctacacggac ccgctcatca acttcaatcc cgcactgcaa
 840
 tcagtagccc aattgccact cttcaacgag atggagaact cgacaatccg aagccctcac
 900
 ctcgtggact tcctcaaccg cctgaccatc tacacggatt ggtactctct tggtcggcac
 960
 tactattggg gcgggcacca aatcgtgtcc aggcagaccg gctctacctc taccataacc
 1020
 ttcccgatct atggccggga ggccaaccag gaggtccga ggacttacia cttcagtcag
 1080
 ccagtgttcc gcacactctc caacccgact ctactcgtt tgatgcagcc ctggcccgt
 1140
 cccgcgtttc agctcagaag attggagggc gtggagttcc aaacaacgac gggcaacttc
 1200
 acctaccgtg gccgtgggac ggtggacagt ttcgacgagt tgctccgga cgacaccagc
 1260
 gtgcctgcaa gggaaggcta ctgcacagg ctgtgccacg cgacgttcat ccgcaagtct
 1320
 gggacaccct acctgacaac cggcgtcact ctctcctgga cccacaacag caacacaccc
 1380
 accaacataa tctaccctga caagataaca caagtgccgc tgggtgaaggc ttcgaacctc
 1440
 cattcctccg ccttcgtcct caaggggtccg ggcttcaccg gcggcgacat cctgggtcgc
 1500
 acgtcgggtc gcaacatcgc ggacattcag atgaacatta ccgcacctct gtcccagcgc
 1560
 tacagagtgc gtatccgcta cgcgagtacg accaacctcc aattccacac tacgatcaat
 1620
 gggagggcgg ttaatcaggc caacttcccg gccacgatga accgggtcga agacctggag
 1680
 tacaactcgt ttcggaccat ctctttcggc acgccgttca acttctaga cgcccagtca
 1740
 acctttcggc tgggagtttg gagcttcagc agcggcacag tcctcatcga ccgaatagag
 1800
 gtggttccga tggaggtcac gttcgaggcg gagtcggacc tggagcgagc gcagaaggct
 1860
 gtaaatgcgt tgttcacgag cattaaccag aagggcctca agaccgatgt cacagactac
 1920
 cacatcgacc aagtgtcgaa cctggtggag tgtctgtcgg atgagttctg tcttgacgag
 1980
 aagcgggagc tgttcgagaa ggtgaagtat gctaagcggc tgagcgacga gcggaacttg
 2040
 ttggctgacc cgaacttcac cagcatcaac ggacagctcg accgtgggtg gcgaggttcc
 2100
 accgacatca cgatacaggg cggagacgat gtgttcaagg agaactatgt gaccctctca
 2160
 ggaacactgg atgagtgcga cccgacctat ctctaccaga agatcgacga gagcaagctc
 2220
 aaggcttaca cgcgctacga actccgtggc tacatcgaag actcccagga tcttgaggtg
 2280

tacctcatat gctacaacac aaagcacgag acgctcaacg ttcctggcac cgggtggtctt
 2340
 tggcccttgg ccgtggagag tagcatcggc ggggtgcggtg agccaaaccg atgcgcgccca
 2400
 cagatggaat gggatccgaa cctagagtgc tcctgctcag acgaggagaa gtgcgcccac
 2460
 cactcccacc acttctcgct cgacattgac gttggctgca cggatctcaa cgagaaccta
 2520
 ggaatctggg tgatcttcaa gattaagacc cagaacggct acgccaagct cgggaatctg
 2580
 gagtttcttg aggagaagcc gctgatcggc gaggccctcg cgcgcgtgaa gcgagtcgag
 2640
 aagaagtgga aagacaagcg ggagaagcta gagtttgaaa cgaacattgt ttacaacgag
 2700
 gcaaaggaag ccgtggacgc tctgttcgta aacagtcagt acgaccgtct ccaggccgac
 2760
 acgaacatcg caatgataca cgcggcggat aacaagggtgc acaagattcg ggaggcttac
 2820
 ctgcccagac tgtcggatcat cccaggcgta aacgctaccg tgttcgagga gctggaggaa
 2880
 cggatcttca ccgcgtttct cctctatgac gcaaggaacg tcatcaagaa cggcgacttc
 2940
 aacaacggcc tgagctgctg gaacgtgaag ggccaagtgg acgtcgatca gaacgatcac
 3000
 cgctccgttc tggtcattcc aggggtgggag tccgaggtga gccaaagaggt ccatgtgtgc
 3060
 ccggaccgtg gctacatcct tcgggtgacc gcgtacaagg agggctacgg cgaaggctgc
 3120
 gtgaccatac acgagatcga caaccacacc gacgagctta agttcaagaa ctgcttcgag
 3180
 gaggaggtgt cactgaacaa cgccgtgacc tgcgacgagt acacgaccaa tcaggaggtc
 3240
 ggcggtctacg ccgacgtccg ccagtcgaac aatcgaggca gcaacgaggc gtacgtgaac
 3300
 ccaacctcca cctcgacgga ctacgccagc ctctacgagg aggagtccta cacaacgag
 3360
 cagacctaca actcgtgcga gagcaaccga ggttacggga accagatgcc gctaccgtcc
 3420
 gggtagctga cgaaggagct ggagtatttc ccagagaccg acaagggtgtg gatcgagatc
 3480
 ggcgagacag agggcacgtt catcgtggac agcgtcgagc tgctgttgat ggaggagtga
 3540

<210> 10

<211> 1179

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của TIC2613PL được mã hóa bởi trình tự mã hóa tổng hợp được thiết kế để biểu hiện trong tế bào thực vật (SEQ ID NO:9), và trong đó axit amin alanin bổ sung được gắn xen ngay sau methionin khởi đầu.

<400> 10

Met Ala Asp Asn Asn Ile Lys Asn Gln Cys Ile Pro Tyr Asn Cys Leu
 1 5 10 15

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

Tyr Tyr Trp Gly Gly His Gln Ile Val Ser Arg Gln Thr Gly Ser Thr
 325 330 335
 Ser Thr Ile Thr Phe Pro Ile Tyr Gly Arg Glu Ala Asn Gln Glu Ala
 340 345 350
 Pro Arg Thr Tyr Asn Phe Ser Gln Pro Val Phe Arg Thr Leu Ser Asn
 355 360 365
 Pro Thr Leu Thr Arg Leu Met Gln Pro Trp Pro Ala Pro Ala Phe Gln
 370 375 380
 Leu Arg Arg Leu Glu Gly Val Glu Phe Gln Thr Thr Thr Gly Asn Phe
 385 390 395 400
 Thr Tyr Arg Gly Arg Gly Thr Val Asp Ser Phe Asp Glu Leu Pro Pro
 405 410 415
 Asp Asp Thr Ser Val Pro Ala Arg Glu Gly Tyr Ser His Arg Leu Cys
 420 425 430
 His Ala Thr Phe Ile Arg Lys Ser Gly Thr Pro Tyr Leu Thr Thr Gly
 435 440 445
 Val Thr Leu Ser Trp Thr His Asn Ser Asn Thr Pro Thr Asn Ile Ile
 450 455 460
 Tyr Pro Asp Lys Ile Thr Gln Val Pro Leu Val Lys Ala Ser Asn Leu
 465 470 475 480
 His Ser Ser Ala Phe Val Leu Lys Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp
 485 490 495
 Ile Leu Gly Arg Thr Ser Val Gly Asn Ile Ala Asp Ile Gln Met Asn
 500 505 510
 Ile Thr Ala Pro Leu Ser Gln Arg Tyr Arg Val Arg Ile Arg Tyr Ala
 515 520 525
 Ser Thr Thr Asn Leu Gln Phe His Thr Thr Ile Asn Gly Arg Ala Val
 530 535 540
 Asn Gln Ala Asn Phe Pro Ala Thr Met Asn Arg Val Glu Asp Leu Glu
 545 550 555 560
 Tyr Asn Ser Phe Arg Thr Ile Ser Phe Gly Thr Pro Phe Asn Phe Leu
 565 570 575
 Asp Ala Gln Ser Thr Phe Arg Leu Gly Val Trp Ser Phe Ser Ser Gly
 580 585 590
 Thr Val Leu Ile Asp Arg Ile Glu Val Val Pro Met Glu Val Thr Phe
 595 600 605
 Glu Ala Glu Ser Asp Leu Glu Arg Ala Gln Lys Ala Val Asn Ala Leu

610					615					620					
Phe	Thr	Ser	Ile	Asn	Gln	Lys	Gly	Leu	Lys	Thr	Asp	Val	Thr	Asp	Tyr
625					630					635					640
His	Ile	Asp	Gln	Val	Ser	Asn	Leu	Val	Glu	Cys	Leu	Ser	Asp	Glu	Phe
				645					650					655	
Cys	Leu	Asp	Glu	Lys	Arg	Glu	Leu	Phe	Glu	Lys	Val	Lys	Tyr	Ala	Lys
			660					665					670		
Arg	Leu	Ser	Asp	Glu	Arg	Asn	Leu	Leu	Ala	Asp	Pro	Asn	Phe	Thr	Ser
		675					680					685			
Ile	Asn	Gly	Gln	Leu	Asp	Arg	Gly	Trp	Arg	Gly	Ser	Thr	Asp	Ile	Thr
	690					695					700				
Ile	Gln	Gly	Gly	Asp	Asp	Val	Phe	Lys	Glu	Asn	Tyr	Val	Thr	Leu	Ser
705					710					715					720
Gly	Thr	Leu	Asp	Glu	Cys	Tyr	Pro	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Gln	Lys	Ile	Asp
				725					730					735	
Glu	Ser	Lys	Leu	Lys	Ala	Tyr	Thr	Arg	Tyr	Glu	Leu	Arg	Gly	Tyr	Ile
			740					745					750		
Glu	Asp	Ser	Gln	Asp	Leu	Glu	Val	Tyr	Leu	Ile	Arg	Tyr	Asn	Thr	Lys
		755					760					765			
His	Glu	Thr	Leu	Asn	Val	Pro	Gly	Thr	Gly	Gly	Leu	Trp	Pro	Leu	Ala
	770					775					780				
Val	Glu	Ser	Ser	Ile	Gly	Gly	Cys	Gly	Glu	Pro	Asn	Arg	Cys	Ala	Pro
785					790					795					800
Gln	Met	Glu	Trp	Asp	Pro	Asn	Leu	Glu	Cys	Ser	Cys	Ser	Asp	Glu	Glu
				805					810					815	
Lys	Cys	Ala	His	His	Ser	His	His	Phe	Ser	Leu	Asp	Ile	Asp	Val	Gly
			820					825					830		
Cys	Thr	Asp	Leu	Asn	Glu	Asn	Leu	Gly	Ile	Trp	Val	Ile	Phe	Lys	Ile
		835					840					845			
Lys	Thr	Gln	Asn	Gly	Tyr	Ala	Lys	Leu	Gly	Asn	Leu	Glu	Phe	Leu	Glu
	850					855					860				
Glu	Lys	Pro	Leu	Ile	Gly	Glu	Ala	Leu	Ala	Arg	Val	Lys	Arg	Val	Glu
865					870					875					880
Lys	Lys	Trp	Lys	Asp	Lys	Arg	Glu	Lys	Leu	Glu	Phe	Glu	Thr	Asn	Ile
				885					890					895	
Val	Tyr	Asn	Glu	Ala	Lys	Glu	Ala	Val	Asp	Ala	Leu	Phe	Val	Asn	Ser
			900					905					910		

Gln Tyr Asp Arg Leu Gln Ala Asp Thr Asn Ile Ala Met Ile His Ala
 915 920 925
 Ala Asp Asn Lys Val His Lys Ile Arg Glu Ala Tyr Leu Pro Glu Leu
 930 935 940
 Ser Val Ile Pro Gly Val Asn Ala Thr Val Phe Glu Glu Leu Glu Glu
 945 950 955 960
 Arg Ile Phe Thr Ala Phe Ser Leu Tyr Asp Ala Arg Asn Val Ile Lys
 965 970 975
 Asn Gly Asp Phe Asn Asn Gly Leu Ser Cys Trp Asn Val Lys Gly Gln
 980 985 990
 Val Asp Val Asp Gln Asn Asp His Arg Ser Val Leu Val Ile Pro Gly
 995 1000 1005
 Trp Glu Ser Glu Val Ser Gln Glu Val His Val Cys Pro Asp Arg
 1010 1015 1020
 Gly Tyr Ile Leu Arg Val Thr Ala Tyr Lys Glu Gly Tyr Gly Glu
 1025 1030 1035
 Gly Cys Val Thr Ile His Glu Ile Asp Asn His Thr Asp Glu Leu
 1040 1045 1050
 Lys Phe Lys Asn Cys Phe Glu Glu Glu Val Ser Leu Asn Asn Ala
 1055 1060 1065
 Val Thr Cys Asp Glu Tyr Thr Thr Asn Gln Glu Val Gly Gly Tyr
 1070 1075 1080
 Ala Asp Val Arg Gln Ser Asn Asn Arg Gly Ser Asn Glu Ala Tyr
 1085 1090 1095
 Val Asn Pro Thr Ser Thr Ser Thr Asp Tyr Ala Ser Leu Tyr Glu
 1100 1105 1110
 Glu Glu Ser Tyr Thr Asn Glu Gln Thr Tyr Asn Ser Cys Glu Ser
 1115 1120 1125
 Asn Arg Gly Tyr Gly Asn Gln Met Pro Leu Pro Ser Gly Tyr Val
 1130 1135 1140
 Thr Lys Glu Leu Glu Tyr Phe Pro Glu Thr Asp Lys Val Trp Ile
 1145 1150 1155
 Glu Ile Gly Glu Thr Glu Gly Thr Phe Ile Val Asp Ser Val Glu
 1160 1165 1170
 Leu Leu Leu Met Glu Glu
 1175