



- (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 A01N 63/02; C12N 15/82; C12N 15/32; (13) B
A61K 35/742; C07K 14/325



1-0045055

-
- (21) 1-2018-01116 (22) 25/08/2016
(86) PCT/US2016/048714 25/08/2016 (87) WO2017/035364 02/03/2017
(30) 62/210,737 27/08/2015 US
(45) 25/04/2025 445 (43) 25/07/2018 364A
(71) MONSANTO TECHNOLOGY LLC (US)
800 North Lindbergh Boulevard, Mail Zone E1NA, St. Louis, Missouri 63167,
United States of America
(72) BOWEN, David J. (US); CHAY, Catherine A. (US); CLICHE, Todd A. (US);
KESANAPALLI, Uma R. (US); LUTKE, Jennifer L. (US).
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)
-

- (54) PHÂN TỬ AXIT NUCLEIC TÁI TỔ HỢP MÃ HÓA PROTEIN TRỪ SÂU, TẾ BÀO THỰC VẬT VÀ TẾ BÀO CHỦ BIỂU HIỆN PHÂN TỬ AXIT NUCLEIC TÁI TỔ HỢP NÀY, THỰC VẬT VÀ BỘ PHẬN CỦA THỰC VẬT CHỨA PHÂN TỬ AXIT NUCLEIC TÁI TỔ HỢP NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP KIỂM SOÁT SÂU BỌ CÁNH VÂY HOẶC SỰ PHÁ HOẠI CỦA SÂU BỌ

(21) 1-2018-01116

(57) Sáng chế đề cập đến phân tử axit nucleic tái tổ hợp chứa trình tự khởi đầu khác loại được liên kết theo cách hoạt động được với đoạn polynucleotit mã hóa protein trừ sâu hoặc đoạn có tác dụng trừ sâu của nó. Các protein trừ sâu có tác dụng gây độc chống lại loài gây hại cánh vảy được mô tả, và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, và TIC7473PL. Sáng chế cũng đề cập đến thực vật chuyển gen, tế bào thực vật, hạt và các bộ phận của thực vật kháng lại sự gây hại của loài cánh vảy, chế phẩm ức chế côn trùng và sản phẩm hàng hóa chứa trình tự axit nucleic tái tổ hợp mã hóa protein trừ sâu theo sáng chế. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp 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 phương pháp kiểm soát các sâu bọ cánh vảy bằng cách sử dụng bất kỳ trong số các protein trừ sâu TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, và TIC7473PL và phương pháp sản xuất hạt.

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 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 trừ sâu chống lại các loài gây hại cho cây trồng và hạt giống trong nông nghiệp, cụ thể là các loài cánh vảy của sâu bọ. Các thực vật, các bộ phận của thực vật và hạt 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 mì, 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 ngoài mục đích 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 loài 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 cánh vảy và cánh cứng, 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 gây hại cánh vảy tác động tiêu cực đến nông nghiệp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, sâu khoang đen (*Spodoptera exempta*), sâu ngài đêm đen (*Agrotis ipsilon*), sâu đục bắp trên cây ngô (*Helicoverpa zea*), sâu lá bông (*Alabama argillacea*), sâu tơ cải bắp (*Plutella xylostella*), sâu đục thân cây ngô Châu Âu (*Ostrinia nubilalis*),

sâu xanh mùa thu (*Spodoptera frugiperda*), sâu xanh mùa thu kháng Cry1Fa1 (*Spodoptera frugiperda*), sâu đục thời xa xưa (OWB, *Helicoverpa armigera*), sâu khoang phương Nam (*Spodoptera eridania*), sâu đo đậu tương (*Chrysodeixis includens*), sâu có đốm (*Earias vittella*), sâu đục thân cây ngô Tây Nam (*Diatraea grandiosella*), sâu chồi thuốc lá (*Heliothis virescens*), sâu ngài đêm thuốc lá (*Spodoptera litura*, còn được biết là sâu bướm cụm), sâu ngài đêm đậu Tây (*Striacosta albicosta*), và sâu bướm đậu mèo (*Anticarsia gemmatilis*).

Về mặt lịch sử, việc sử dụng mạnh mẽ thuốc trừ sâu hóa học tổng hợp được tin tưởng là chất kiểm soát sâu bệnh trong nông nghiệp. Mối 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 giống *Bacillus*, đã được phát hiện ra và phát triển làm chất kiểm soát sâu bệnh sinh học. Các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* (Bt) đã được sử dụng làm nguồn protein trừ sâu 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 tinh thể bào tử vỏ ở giai đoạn tấn công 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 trừ sâu tiết. 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 trừ sâu 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 sâu bệnh phá hoại cây trồng trong nông nghiệp bằng các phương pháp 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 thích nghi trên toàn cầu. Ví dụ, vào năm 2012, 26,1 triệu hecta được trồng 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 trừ sâu đang được sử dụng hiện nay.

Sự phát triển tính kháng ở sâu bệnh 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 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 các loài côn trùng nhạy cảm trên một phổ rộng hơn 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 gây độc cho cùng một loài sâu bọ và có các cơ chế tác dụng khác nhau làm giảm khả năng kháng ở các loài côn trùng đích đơn lẻ bất kỳ.

Do đó, các tác giả sáng chế mô tả ở đây họ độc tố protein mới từ *Paenibacillus popilliae*, cùng với các protein độc tố tương tự, các protein biến thể, và các protein tái tổ hợp điển hình thể hiện hoạt tính trừ sâu chống lại loài cánh vảy đích, cụ thể là chống lại sâu khoang đen (*Spodoptera exempta*), sâu xám (*Agrotis ipsilon*), sâu đục bắp trên cây ngô (*Helicoverpa zea*), sâu lá bông (*Alabama argillacea*), sâu tơ cải bắp (*Plutella xylostella*), sâu đục thân cây ngô Châu Âu (*Ostrinia nubilalis*), sâu xanh mùa thu (*Spodoptera frugiperda*), sâu xanh mùa thu kháng Cry1Fa1 (*Spodoptera frugiperda*), sâu đục thời xa xưa (OWB, *Helicoverpa armigera*), sâu khoang phương Nam (*Spodoptera eridania*), sâu đo đậu tương (*Chrysodeixis includens*), sâu có đốm (*Earias vittella*), sâu đục thân cây ngô Tây Nam (*Diatraea grandiosella*), sâu chồi thuốc lá

(*Heliothis virescens*), sâu ngài đêm thuốc lá (*Spodoptera litura*, còn được biết là sâu bướm cụm), sâu ngài đêm đậu Tây (*Striacosta albicosta*), và sâu bướm đậu mèo (*Anticarsia gemmatilis*).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Được mô tả ở đây là nhóm các protein trừ sâu có tác dụng ức chế côn trùng (protein độc tố), được gọi ở đây là TIC6757, TIC7472, và TIC7473 thuộc lớp độc tố protein TIC6757, được chỉ ra là có tác dụng ức chế chống lại một hoặc nhiều sâu bệnh hại cây trồng. Protein TIC6757 và các protein trong lớp độc tố protein TIC6757 có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp với các protein trừ sâu khác và các chất độc khác trong các chế phẩm và *in planta*, do đó cung cấp giải pháp thay thế cho các protein trừ sâu và các hóa chất trừ sâu đang được sử dụng hiện nay trong hệ thống nông nghiệp.

Trong một phương án, được mô tả trong đơn này là phân tử axit nucleic tái tổ hợp chứa đoạn trình tự khởi đầu khác loại được liên kết theo cách hoạt động được với đoạn polynucleotit mã hóa protein trừ sâu hoặc một đoạn của nó, trong đó (a) protein trừ sâu này chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, hoặc SEQ ID NO:18; hoặc (b) protein trừ sâu này chứa trình tự axit amin có độ đồng nhất về trình tự axit amin ít nhất là 85%, hoặc 90%, hoặc 95%, hoặc 98%, hoặc 99%, hoặc khoảng 100% với SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, hoặc SEQ ID NO:18; 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, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, và SEQ ID NO:17; hoặc (d) đoạn polynucleotit này mã hóa protein trừ sâu hoặc một đoạn của nó chứa trình tự polynucleotit có độ đồng nhất về trình tự axit amin 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, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, hoặc SEQ ID NO:17; hoặc (e) phân tử axit nucleic tái tổ hợp này được liên kết theo cách hoạt động được 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. Phân tử axit nucleic tái tổ hợp này có thể chứa trình tự có chức năng biểu hiện

protein trừ sâu ở thực vật; hoặc được biểu hiện trong tế bào thực vật để sinh ra lượng có tác dụng trừ sâu của protein trừ sâu.

Trong một phương án khác của sáng chế là các tế bào chủ chứa phân tử axit nucleic tái tổ hợp theo sáng chế, trong đó 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*, *Pantoea*, và *Erwinia*. Trong một số phương án, loài *Bacillus* này là *Bacillus cereus* hoặc *Bacillus thuringiensis*, *Brevibacillus* này là *Brevibacillus laterosporus*, hoặc *Escherichia* là *Escherichia coli*. Các tế bào chủ thực vật được đề xuất bao gồm tế bào cây hai lá mầm và tế bào cây 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, dưa, cà phê, ngô, cỏ ba lá, bông (*Gossypium* sp.), bầu bí, dưa chuột, linh sam Douglas, cà tím, bạch đàn, cây lanh, tỏi, nho, cây huỳnh quang, tỏi tây, rau diếp, thông trầm hương, kê, dưa, quả hạch, yến mạch, oliu, hành tây, cây cảnh, cỏ, cỏ, đậu, lạc, ớt, đậu triều, thông, khoai tây, bạch dương, bí đỏ, thông Radiata, cải ngựa, 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, khoa lang, cỏ kê Mỹ, chè, thuốc lá, cà chua, tiểu hắc mạch, cỏ, dưa hấu, và lúa mì.

Trong một phương án khác, protein trừ sâu này thể hiện tác dụng chống lại côn trùng cánh vảy, bao gồm sâu bướm đậu mè, sâu đục mía, sâu đục thân ngô Lesser, sâu đục bắp trên cây ngô, sâu chồi thuốc lá, sâu đo đậu tương, sâu khoang đen, sâu khoang phương Nam, sâu xanh mùa thu, sâu xanh da láng, sâu đục thời xa xưa, sâu lá phương Đông, sâu hồng hại bông, sâu xám, sâu đục thân cây ngô Tây Nam, sâu lá bông, sâu tơ cải bắp, sâu bắt có đốm, sâu ngài đêm thuốc lá, sâu ngài đêm đậu Tây, và sâu đục thân cây ngô Châu Âu.

Cũng được đề xuất trong sáng chế là các thực vật chứa phân tử axit nucleic tái tổ hợp chứa đoạn trình tự khởi đầu khác loại liên kết theo cách hoạt động được với đoạn polynucleotit mã hóa protein trừ sâu hoặc một đoạn của nó, trong đó: (a) protein trừ sâu này chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:16, hoặc SEQ ID NO:18; hoặc (b) protein trừ sâu này chứa trình tự axit amin có độ đồng nhất về trình tự axit amin ít nhất là 85%, hoặc 90%, hoặc 95%,

hoặc 98%, hoặc 99%, hoặc khoảng 100% với SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:16, hoặc SEQ ID NO:18; hoặc (c) đoạn polynucleotit này lai trong các điều kiện lai nghiêm ngặt với thể bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:15, hoặc SEQ ID NO:17; hoặc (d) thực vật này biểu hiện lượng phát hiện được của protein trừ sâu này. Trong một số phương án, protein trừ sâu này chứa SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:16, hoặc SEQ ID NO:18. 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, dứa, cà phê, ngô, cỏ ba lá, bông, bầu bí, dưa chuột, linh sam Douglas, cà tím, bạch đàn, cây lanh, tỏi, nho, cây hublông, tỏi tây, rau diếp, thông trầm hương, kê, dưa, quả hạch, yến mạch, oliu, hành tây, cây cảnh, cỏ, cỏ, đậu Hà Lan, lạc, tiêu, đậu triều, thông, khoai tây, bạch dương, bí đỏ, thông Radiata, cải củ, 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 mỳ.

Theo 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 trừ sâu 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 thuộc. Cũng được đề xuất là ít nhất một chất trừ sâu khác trong chế phẩm ức chế côn trùng thể hiện tác dụng chống một hoặc nhiều loài sâu bệnh thuộc bộ cánh vảy, cánh cứng, hoặc cánh nửa. 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 khám 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 sản phẩm hàng hóa 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 sản phẩm hàng hóa này bao gồm ngô sản phẩm hàng hóa 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, gạo, lúa mỳ, cao lương, đậu triều, lạc, trái cây, dưa, và các sản phẩm rau sản phẩm hàng hóa bao gồm, nếu có thể, nước ép, dịch cô đặc, mứt, thạch, mứt cam, và các dạng ăn được khác của các sản phẩm hàng hóa 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 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 phần kết viên thu được từ phế phẩm của sợi bông bện bằng máy, 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 phương pháp sản xuất hạt chứa các phân tử axit nucleic tái tổ hợp được mô tả trong sáng chế. Phương pháp 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 trừ sâu của protein trừ sâu như được chỉ ra trong SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:16, hoặc SEQ ID NO:18; hoặc (b) lượng có tác dụng trừ sâu của protein chứa trình tự axit amin có độ đồng nhất về trình tự axit amin ít nhất là 85%, hoặc 90%, hoặc 95%, hoặc khoảng 100% với SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:16, hoặc SEQ ID NO:18.

Cũng được mô tả trong sáng chế là các phương pháp kiểm soát sự gây hại của sâu bệnh thuộc loài cánh vảy, và kiểm soát sự gây hại của sâu bệnh thuộc loài cánh vảy trên thực vật, cụ thể là cây trồng. Phương pháp này bao gồm, trong một phương án, (a) cho sâu bệnh tiếp xúc với lượng có tác dụng trừ sâu của protein trừ sâu như được chỉ ra trong SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:16, hoặc SEQ ID NO:18; hoặc (b) cho sâu bệnh tiếp xúc với lượng có tác dụng trừ sâu của một hoặc nhiều protein trừ sâu chứa trình tự axit amin có độ đồng nhất về trình tự axit amin ít nhất là 85%, hoặc 90%, hoặc 95%, hoặc khoảng 100% với SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:16, hoặc SEQ ID NO:18.

Được đề xuất thêm ở đây là phương pháp phát hiện sự có mặt của phân tử axit nucleic tái tổ hợp chứa đoạn polynucleotit mã hóa protein trừ sâu hoặc một đoạn của nó, trong đó: (a) protein trừ sâu này chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, hoặc SEQ ID NO:18; hoặc (b) protein trừ sâu này chứa trình tự axit amin có độ đồng nhất về trình tự axit amin ít nhất là 65%, hoặc 70%, hoặc 75%, hoặc 80%, hoặc 85%, hoặc 90%, hoặc 95%, hoặc 98%, hoặc 99%, hoặc khoảng 100% với SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, hoặc SEQ ID NO:18; 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, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, hoặc SEQ ID NO:17. Trong một phương án theo sáng chế, phương pháp này bao gồm cho mẫu chứa các axit nucleic tiếp xúc với đoạn dò axit nucleic mà lai trong các điều kiện lai nghiêm ngặt với ADN bộ gen từ thực vật chứa đoạn polynucleotit mã hóa protein trừ sâu hoặc một đoạn của nó được đề xuất ở đây, và không

lai trong các điều kiện lai như vậy với ADN bộ gen từ cây đồng hợp tử khác mà không chứa đoạn này, trong đó đoạn dò là tương đồng hoặc bổ sung cho SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, hoặc SEQ ID NO:17, hoặc trình tự mã hóa protein trừ sâu chứa trình tự axit amin có độ đồng nhất về trình tự axit amin ít nhất là 65%, hoặc 70%, hoặc 75%, hoặc 80%, hoặc 85%, hoặc 90%, hoặc 95%, hoặc 98%, hoặc 99%, hoặc khoảng 100% với SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, hoặc SEQ ID NO:18. Phương pháp 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 phương pháp phát hiện sự có mặt của protein trừ sâu hoặc một đoạn của nó trong mẫu chứa protein, trong đó protein trừ sâu này chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:2; hoặc protein trừ sâu này chứa trình tự axit amin có độ đồng nhất về trình tự axit amin ít nhất là 65%, hoặc 70%, hoặc 75%, hoặc 80%, hoặc 85%, hoặc 90%, hoặc 95%, hoặc 98%, hoặc 99%, hoặc khoảng 100% với SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, hoặc SEQ ID NO:18. Trong một phương án, phương pháp này bao gồm: (a) cho mẫu này tiếp xúc với kháng thể hoạt động miễn dịch; và (b) phát hiện sự có mặt của protein này. Trong một số phương án bước phát hiện bao gồm ELISA, hoặc phương pháp thẩm tách Tây.

Mô tả vắn tắt các trình tự

SEQ ID NO:1 là trình tự axit nucleic mã hóa protein trừ sâu TIC6757 thu được từ loài *Paenibacillus popilliae* DSC004343.

SEQ ID NO:2 là trình tự axit amin của protein trừ sâu TIC6757.

SEQ ID NO:3 là trình tự mã hóa tổng hợp mã hóa protein trừ sâu TIC6757PL 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 TIC6757PL 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.

SEQ ID NO:5 là trình tự axit nucleic mã hóa protein trừ sâu TIC6757_His, trong đó trình tự axit nucleic mã hóa đuôi Histidin được liên kết theo cách hoạt động được 5' và nằm trong khung với trình tự mã hóa TIC6757.

SEQ ID NO:6 là trình tự axit amin của protein trừ sâu TIC6757_His.

SEQ ID NO:7 là trình tự axit nucleic mã hóa protein trừ sâu TIC7472 thu được từ *Paenibacillus popilliae* loài DSC007648.

SEQ ID NO:8 là trình tự axit amin của protein trừ sâu TIC7242.

SEQ ID NO:9 là trình tự axit nucleic mã hóa protein trừ sâu TIC7472_His, trong đó trình tự axit nucleic mã hóa đuôi Histidin được liên kết theo cách hoạt động được 3' và nằm trong khung với trình tự mã hóa TIC7472.

SEQ ID NO:10 là trình tự axit amin của protein trừ sâu TIC7472_His.

SEQ ID NO:11 là trình tự axit nucleic mã hóa protein trừ sâu TIC7473 từ khung đọc mở ở vị trí nucleotit 1- 2391 và codon kết thúc dịch mã.

SEQ ID NO:12 là sự dịch mã trình tự axit amin của protein trừ sâu TIC7243 thu được từ loài *Paenibacillus popilliae* DSC008493.

SEQ ID NO:13 là trình tự axit nucleic tái tổ hợp mã hóa protein trừ sâu TIC7473_His, trong đó trình tự axit nucleic mã hóa đuôi Histidin được liên kết theo cách hoạt động được 3' và nằm trong khung với trình tự mã hóa TIC7472.

SEQ ID NO:14 là sự dịch mã trình tự axit amin của protein trừ sâu TIC7473_His.

SEQ ID NO:15 là trình tự mã hóa tổng hợp mã hóa protein trừ sâu TIC7472PL 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:16 là trình tự axit amin của TIC7472PL được mã hóa bởi trình tự mã hóa tổng hợp được thiết kế để biểu hiện trong tế bào thực vật (SEQ ID NO:15), và trong đó axit amin alanin bổ sung được gắn xen ngay sau methionin khởi đầu.

SEQ ID NO:17 là trình tự mã hóa tổng hợp mã hóa protein trừ sâu TIC7473PL 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:18 là trình tự axit amin of TIC7473PL được mã hóa bởi trình tự mã hóa tổng hợp được thiết kế để biểu hiện trong tế bào thực vật (SEQ ID NO:17), và trong đó axit amin alanin bổ sung được gắn xen ngay sau methionin khởi đầu.

Mô tả chi tiết sáng chế

Vấn đề trong lĩnh vực kiểm soát sâu bệnh nông nghiệp có thể được mô tả là nhu cầu về các protein độc tố mới mà có tác dụng chống các loài gây hại đích, thể hiện tác dụng gây độc phổ rộng chống các loài 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 trừ sâu mới được minh họa bởi TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, và TIC7473PL được mô tả ở đây, và giải quyết được mỗi nhu cầu trong số các nhu cầu này, cụ thể là chống lại các sâu bọ cánh vảy trên phổ rộng, và cụ thể hơn là chống lại sâu khoang đen (*Spodoptera exempta*), sâu xám (*Agrotis ipsilon*), sâu đục bắp trên cây ngô (*Helicoverpa zea*), sâu lá bông (*Alabama argillacea*), sâu tơ cải bắp (*Plutella xylostella*), sâu đục thân cây ngô Châu Âu (*Ostrinia nubilalis*), sâu xanh mùa thu (*Spodoptera frugiperda*), sâu xanh mùa thu kháng Cry1Fa1 (*Spodoptera frugiperda*), sâu đục thời xa xưa (OWB, *Helicoverpa armigera*), sâu khoang phương Nam (*Spodoptera eridania*), sâu đo đậu tương (*Chrysodeixis includens*), sâu có đốm (*Earias vittella*), sâu đục thân cây ngô Tây Nam (*Diatraea grandiosella*), sâu chồi thuốc lá (*Heliothis virescens*), sâu ngài đêm thuốc lá (*Spodoptera litura*, còn được biết là sâu bướm cụm), sâu ngài đêm đậu Tây (*Striacosta albicosta*), và sâu bướm đậu mèo (*Anticarsia gemmatilis*).

Việc đề cập trong sáng chế đến TIC6757, “protein TIC6757”, “độc tố protein TIC6757”, “protein độc tố TIC6757”, “protein trừ sâu TIC6757”, “độc tố liên quan đến TIC6757”, “protein độc tố liên quan đến TIC6757”, TIC6757PL, “protein TIC6757PL”, “độc tố protein TIC6757PL”, “protein độc tố TIC6757PL”, “protein trừ sâu TIC6757PL”, “độc tố liên quan đến TIC6757PL”, “protein độc tố liên quan đến TIC6757PL”, TIC7472, “protein TIC7472”, “độc tố protein TIC7472”, “protein độc tố TIC7472”, “protein trừ sâu TIC7472”, “độc tố liên quan đến TIC7472”, “protein độc tố

liên quan đến TIC7472”, TIC7472PL, “protein TIC7472PL”, “độc tố protein TIC7472PL”, “protein độc tố TIC7472PL”, “protein trừ sâu TIC7472PL”, “độc tố liên quan đến TIC7472PL”, “protein độc tố liên quan đến TIC7472PL”, TIC7473, “protein TIC7473”, “độc tố protein TIC7473”, “protein độc tố TIC7473”, “protein trừ sâu TIC7473”, “độc tố liên quan đến TIC7473”, “protein độc tố liên quan đến TIC7473”, TIC7473PL, “protein TIC7473PL”, “độc tố protein TIC7473PL”, “protein độc tố TIC7473PL”, “protein trừ sâu TIC7473PL”, “độc tố liên quan đến TIC7473PL”, “protein độc tố liên quan đến TIC7473PL”, và tương tự, dùng để chỉ protein trừ sâu hoặc protein ức chế côn trùng mới bắt kỳ, mà chứa, mà bao gồm, mà là gần như tương đồng với, mà tương tự với, hoặc thu được từ trình tự protein trừ sâu hoặc trình tự protein ức chế côn trùng bất kỳ của TIC6757 (SEQ ID NO:2), TIC6757PL (SEQ ID NO:4), TIC7472 (SEQ ID NO:8), TIC7472PL (SEQ ID NO:16), TIC7473 (SEQ ID NO:12), hoặc TIC7473PL (SEQ ID NO:18) và các đoạn có tác dụng trừ sâu hoặc ức chế côn trùng của chúng, hoặc tổ hợp của chúng, mà gây ra hoạt tính chống sâu bệnh cánh vảy, bao gồm protein bất kỳ thể hiện tác dụng trừ sâu hoặc ức chế côn trùng nếu sự sắp xếp thẳng hàng protein này với TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, hoặc TIC7473PL tạo ra sự đồng nhất trình tự axit amin với tỉ lệ phần trăm bất kỳ từ khoảng 85% đến khoảng 100%. Các protein TIC6757 và TIC6757PL bao gồm cả dạng được gắn đích lục lạp và dạng không được gắn đích lục lạp 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 TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, hoặc TIC7473PL. Mảnh hoặc đoạn thể hiện hoạt tính ức chế côn trùng cũng được mô tả trong sáng chế nếu sự sắp xếp thẳng hàng mảnh hoặc đoạn này, với phần tương ứng của protein TIC6757 được chỉ ra trong SEQ ID NO:2, protein TIC6757PL được chỉ ra trong SEQ ID NO:4, protein TIC7472 được chỉ ra trong SEQ ID NO:8, protein TIC7472PL được chỉ ra trong SEQ ID NO:16, protein TIC7473 được chỉ ra trong SEQ ID NO:12, hoặc protein TIC7473PL được chỉ ra trong SEQ ID NO:18, tạo ra sự đồng nhất trình tự axit amin theo tỉ lệ phần trăm bất kỳ từ khoảng 85 đến khoảng 100 phần trăm giữa mảnh hoặc đoạn này và phần tương ứng của protein TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, hoặc TIC7473PL.

Việc đề cập trong sáng chế đến các thuật ngữ “hoạt động” hoặc “hoạt tính”, “tác dụng trừ sâu” 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 sâu bệnh, kiểm soát các hoạt động ăn của sâu bệnh trên cây trồng cụ thể chứa lượng hữu hiệu của protein TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, hoặc TIC7473PL) hoặc tiêu diệt (gây bệnh, gây chết, hoặc làm giảm khả năng sinh sản) sâu bệnh. Các thuật ngữ này được dự định bao gồm kết quả là cung cấp lượng có tác dụng trừ sâu của protein độc tố cho sâu bệnh, trong đó sự tiếp xúc của sâu bệnh 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 đuổi sâu bệnh khỏi thực vật, mô của thực vật, bộ phận của thực vật, hạt, tế bào thực vật, hoặc ra 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 trừ sâu của protein độc tố trong hoặc trên thực vật này. Nói chung, tác dụng trừ sâu 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 sâu bệnh đích cụ thể, bao gồm, nhưng không giới hạn ở các côn trùng thuộc bộ cánh vảy. 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 bộ đích.

Lượng có tác dụng trừ sâu của chất độc, khi được cung cấp trong khẩu phần ăn của sâu bệnh đích, thể hiện tác dụng trừ sâu khi chất độc tiếp xúc với sâu bệnh. Chất độc có thể là protein trừ sâu hoặc một hoặc nhiều chất hóa học đã biết trong lĩnh vực này. Chất hóa học trừ dịch hoặc trừ sâu và chất protein trừ dịch hoặc trừ sâu 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 sâu bệnh đích, organoclorua, organophosphat, carbamat, pyrethroid, neonicotinoid, và ryanoid. Các chất protein trừ dịch hoặc trừ sâu 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 loài cánh vảy, cũng như các độc tố protein được sử dụng để kiểm soát các sâu bệnh thực vật khác như các protein Cry và Cyt sẵn có trong lĩnh vực này để sử dụng trong việc kiểm soát loài cánh cứng, cánh nửa và cánh giống.

Được dự định là việc đề cập đến loài gây hại, cụ thể là loài gây hại trên cây trồng, có nghĩa là sâu bọ trên cây trồng, cụ thể là các sâu bọ cánh vảy mà được kiểm soát bởi lớp độc tố protein TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, hoặc TIC7473PL. Tuy nhiên, việc đề cập đến loài gây hại cũng có thể bao gồm các sâu bọ cánh cứng, cánh nửa và cánh giống trên thực vật, cũng như giun tròn và nấm khi các chất độc gắn đích các loài gây hại này được đưa vào cùng hoặc có mặt cùng với protein TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, hoặc TIC7473PL hoặc protein đồng nhất từ 85 đến khoảng 100 phần trăm với TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, hoặc TIC7473PL.

Các protein TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, và TIC7473PL có quan hệ bởi chức năng chung và thể hiện hoạt tính trừ sâu đối với các sâu bọ thuộc loài côn trùng cánh vảy, bao gồm giai đoạn trưởng thành, nhộng, ấu trùng, và sơ sinh.

Các côn trùng thuộc bộ cánh vảy 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 mè (*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 rễ 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 vichèna*), sâu ngài đục

trái phượng Đông (*Grapholita molesta*), sâu chồi hoa hướng dương (*Suleima helianthana*); và nhiều loài cánh vảy 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 sâu bọ khác thuộc bộ cánh vảy bao gồm, ví dụ, sâu lá bông (*Alabama argillacea*), sâu cuốn lá cây ăn quả (*Archips argyrospila*), bướm cuốn lá Châu Âu (*Archips rosana*) và các 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 cây ngô Tây Nam (*Diatraea grandiosella*), sâu đục thân cây mía (*Diatraea saccharalis*), ấu trùng của sâu bướm có gai (*Earias insulana*), sâu có đốm (*Earias vittella*), sâu bướm Mỹ (*Helicoverpa armigera*), sâu đục bắp trên cây ngô (*Helicoverpa zea*, còn được biết là sâu đục vỏ đậu tương và sâu bướm hại bông), sâu chồi thuốc lá (*Heliothis virescens*), sâu kéo màng cỏ (*Herpetogramma licarsisalis*), sâu ngài đêm đậu 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 biết là sâu bướm cùm), 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 thành phần axit nucleic như trình tự mã hóa, trình tự intron, trình tự dẫn không được dịch mã, trình tự khởi đầu, trình tự kết thúc dịch mã, và tương tự, mà được tìm thấy một cách tự nhiên trong ADN của bộ gen của sinh vật không được coi là “được phân lập” với điều kiện là thành phần này nằm trong bộ gen của sinh vật này và ở vị trí trong bộ gen mà nó được tìm thấy một cách tự nhiên trong đó. Tuy nhiên, mỗi thành phần trong các thành phần này, và các bộ phận của các thành phần này, sẽ là “được phân lập” trong phạm vi sáng chế với điều kiện là thành phần 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. Tương tự, trình tự nucleotit mã hóa protein trừ sâu và 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 trừ sâu 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 plasmid 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 sản phẩm hàng hóa thu được từ thực vật hoặc vi khuẩn.

Như được mô tả thêm trong sáng chế, khung đọc mở (ORF) mã hóa TIC6757 (SEQ ID NO:19) được phát hiện ra trong ADN thu được từ *Paenibacillus popilliae* chủng DSC004343. 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. Các kỹ thuật tin sinh học và sàng lọc thông lượng cao được sử dụng để sàng lọc các trình tự vi khuẩn cho các gen mã hóa protein thể hiện sự tương đồng với TIC6757. Khung đọc mở (ORF) mã hóa TIC7472 (SEQ ID NO:7) được phát hiện ra trong ADN thu được từ *Paenibacillus popilliae* chủng DSC007648. Khung đọc mở (ORF) mã hóa TIC7473 (SEQ ID NO:11) được phát hiện ra trong ADN thu được từ *Paenibacillus popilliae* chủng DSC008493. Thử nghiệm sinh học sử dụng các protein thu được từ tế bào chủ vi khuẩn của TIC6757 chứng minh tác dụng kháng lại bộ cánh vảy loài sâu xanh da láng (*Spodoptera exigua*), sâu xám (*Agrotis ipsilon*), sâu đục bắp trên cây ngô (*Helicoverpa zea*), sâu lá bông (*Alabama argillacea*), sâu tơ cải bắp (*Plutella xylostella*), sâu đục thân cây ngô Châu Âu (*Ostrinia nubilalis*), sâu xanh mùa thu (*Spodoptera frugiperda*), sâu xanh mùa thu kháng Cry1Fa1 (*Spodoptera frugiperda*), sâu đục thời xa xưa (OWB, *Helicoverpa armigera*), sâu khoang phương Nam (*Spodoptera eridania*), sâu đo đậu tương (*Chrysodeixis includens*), sâu có đốm (*Earias vittella*), sâu đục thân cây ngô Tây Nam (*Diatraea grandiosella*), sâu chồi thuốc lá (*Heliothis virescens*), sâu ngài đêm thuốc lá (*Spodoptera litura*, còn được biết là sâu bướm cụm), và sâu bướm đậu mè (*Anticarsia gemmatilis*). Thử nghiệm sinh học sử dụng các protein thu được từ tế bào chủ vi khuẩn của TIC7472 và TIC7473 chứng minh tác dụng kháng lại bộ cánh vảy loài sâu đục bắp trên cây ngô (*Helicoverpa zea*), sâu xanh mùa thu (*Spodoptera frugiperda*),

sâu khoang phương Nam (*Spodoptera eridania*), sâu đo đậu tương (*Chrysodeixis includens*), và sâu đục thân cây ngô Tây Nam (*Diatraea grandiosella*).

Để biểu hiện trong tế bào thực vật, các protein TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, và TIC7473PL có thể được biểu hiện để nằm trong bào tương hoặc gắn đích 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 sâu bệnh 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,-biphosphat 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 loại 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 loại 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 theo cách hoạt động được 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 TIC6757, TIC7472, và TIC7473 có thể được tạo ra bằng cách sử dụng trình tự axit amin của TIC6757, TIC7472, hoặc TIC7473 để tạo ra các protein mới với các đặc điểm mới. Các protein độc tố TIC6757, TIC7472, và TIC7473 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 TIC6757 có thể được thao tác di truyền *in planta* bằng cách sử dụng nhiều phương pháp 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 với CRISPR). Các phương pháp 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 phương pháp này, một hoặc nhiều codon trong trình tự mã hóa độc tố được thay đổi để thao tác di truyền trình tự axit amin protein mới. Ngoài ra, một đoạn 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 thao tác di truyền 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 tạo ra tác dụng 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 phương pháp đã biết trong lĩnh vực này để tạo ra các thực vật hoàn chỉnh biểu hiện protein độc tố mới.

Cũng được đề xuất là các đoạn của TIC6757, TIC7472, và TIC7473 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 TIC6757, TIC7472, và TIC7473 hoặc các biến thể protein thu được, nhưng nên giữ được hoạt tính ức chế côn trùng của ít nhất là TIC6757, TIC7472, hoặc TIC7473.

Các protein mà tương tự với các protein TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, và TIC7473PL có thể được nhận dạng 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 tương đồng 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: có, các gốc ưa nước: GPSNDQERK, các điểm phạt khoảng trống đặc hiệu gốc: có (Thompson, *et al* (1994) *Nucleic Acids Research*, 22:4673-4680). Tỉ lệ phần trăm tương đồng trình tự axit amin còn được tính toán bằng cách lấy 100% nhân với (số axit amin tương đồng/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 hoạt tính ức chế côn trùng kháng lại các loài côn trùng cánh vảy có quan hệ với TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, hoặc TIC7473PL 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, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:12, hoặc SEQ ID NO:18 được nhận diện là các so khớp trong sắp xếp thẳng hàng này trong đó protein truy vấn thể hiện sự tương đồng axit amin ít nhất là 85% đến khoảng 100% dọc theo độ dài của protein truy vấn, nghĩa là khoảng 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, hoặc tỉ lệ phần trăm bất kỳ trong khoảng này.

Các protein điển hình TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, và TIC7473PL được sắp xếp thẳng hàng với nhau bằng cách sử dụng thuật toán Clustal W. Ma trận theo cặp của các tỉ 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. Ma trận theo cặp thể hiện các protein điển hình TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, và TIC7473PL.

Độc tố	TIC6757 (SEQ ID NO:2)	TIC6757 PL (SEQ ID NO:4)	TIC7472 (SEQ ID NO:8)	TIC7472PL (SEQ ID NO:16)	TIC7473 (SEQ ID NO:12)	TIC7473PL (SEQ ID NO:18)
TIC6757 (SEQ ID NO:2)	-	99,9 (796)	99,7 (795)	99,6 (794)	99,9 (796)	99,7 (795)
TIC6757 PL (SEQ ID NO:4)	99,7 (796)	-	99,5 (794)	99,7 (796)	99,6 (795)	99,9 (797)
TIC7472 (SEQ ID NO:8)	99,7 (795)	99,6 (794)	-	99,9 (796)	99,9 (796)	99,7 (795)
TIC7472 PL (SEQ ID NO:16)	99,5 (794)	99,7 (796)	99,7 (796)	-	99,6 (795)	99,9 (797)
TIC7473 (SEQ ID NO:12)	99,9 (796)	99,7 (795)	99,9 (796)	99,7 (795)	-	99,9 (796)
TIC7473 PL (SEQ ID NO:18)	99,6 (795)	99,9 (797)	99,6 (795)	99,9 (797)	99,7 (796)	-

Mô tả bảng: Sự sắp xếp thẳng hàng Clustal W giữa (X) và (Y) được báo cáo trong ma trận theo 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, TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, TIC7473PL và các protein liên quan cũng có thể có quan hệ với nhau bởi cấu trúc bậc một (các motif axit amin được bảo tồn), bởi độ dài (khoảng 797 axit amin), và bởi các đặc điểm khác. Các đặc điểm của các độc tố protein TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, và TIC7473PL được báo cáo trong Bảng 2.

Bảng 2. Các đặc điểm chọn lọc của các protein TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, và TIC7473PL

Protein	Khối lượng phân tử (theo Daltons)	Độ dài axit amin	Điểm đẳng điện	Điện tích ở độ PH=7,0	Số lượng các axit amin bazơ mạnh (-)	Số lượng các axit amin axit mạnh	Số lượng các axit amin kỵ nước	Số lượng các axit amin có cực
TIC6757	90011,21	797	4,4289	-34,5	81	112	391	406
TIC6757PL	90082,29	798	4,4289	-34,5	81	112	392	406
TIC7472	90096,28	797	4,4141	-35,5	81	113	390	407
TIC7472PL	90167,36	798	4,4141	-35,5	81	113	391	407
TIC7473	90069,25	797	4,4141	-35,5	81	113	390	407
TIC7473PL	90140,33	798	4,4141	-35,5	81	113	391	407

Như được mô tả thêm trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế, trình tự phân tử axit nucleic tổng hợp mã hóa biến thể của TIC6757, TIC6757PL 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 TIC6757PL được thể hiện bằng SEQ ID NO:3. Protein TIC6757PL có axit amin alanin bổ sung ngay sau methionin khởi đầu so với protein TIC6757. Gốc alanin bổ sung được gắn xen vào trình tự axit amin TIC6757 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 TIC7472 và TIC7473 được gọi ở đây là TIC7472PL và TIC7473PL, tương ứng, và được thiết kế để sử dụng ở thực vật. Các trình tự phân tử axit nucleic tổng hợp điển hình mà được thiết kế để sử dụng ở thực vật mã hóa TIC7472PL và TIC7473PL được thể hiện lần lượt bằng SEQ ID NO:15 và SEQ ID NO:17. Cả protein TIC7472PL và TIC7473PL đều có axit amin alanin bổ sung ngay sau methionin khởi đầu so với các protein TIC7472 và TIC7473.

Các caxet và vectơ biểu hiện chứa trình tự phân tử axit nucleic tái tổ hợp có thể được tạo ra và được đưa vào tế bào cây ngô, đậu tương hoặc bông theo các phương pháp biến nạp và các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, sự 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 (hạt cải dầu), 7,026,528 (lúa mỳ), và 6,365,807 (gạo), 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 thành các thực vật biến nạp mà biểu hiện các protein TIC6757PL, TIC7472 và TIC7473 và chứng minh tác dụng trừ sâu bằng thử nghiệm sinh học được thực hiện khi có mặt ấu trùng sâu bệnh cánh vảy bằng cách sử dụng các đĩa lá cây thu được từ thực vật được biến nạp này. Các thực vật 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 phương pháp để biến nạp thực vật là đã biết trong lĩnh vực này.

Ngoài các phương pháp 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 locut 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 phương pháp 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 phương pháp 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.

Chế phẩm phân tử axit nucleic tái tổ hợp mã hóa TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, và TIC7473PL được đề xuất. Ví dụ, các protein TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, và TIC7473PL 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 theo cách hoạt động được với các yếu tố biểu hiện di truyền như trình tự khởi đầu 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 đầu hoạt động ở thực vật liên kết theo cách hoạt động được với trình tự mã hóa protein TIC6757PL, TIC7472PL, hoặc TIC7473PL để biểu hiện protein này ở thực vật hoặc trình tự khởi đầu hoạt động *Bt* liên kết theo cách hoạt động được với trình tự mã hóa protein TIC6757, TIC7472, hoặc TIC7473 để biểu hiện protein này ở vi khuẩn *Bt* hoặc loài *Bacillus* khác. Các yếu tố khác có thể được liên kết theo cách hoạt động được với trình tự mã hóa protein TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, hoặc TIC7473PL 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 plastid, 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 đầu khác loại liên kết theo cách hoạt động được với polynucleotit như SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:1, SIQ ID NO:7, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:15, và SEQ ID NO:17 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:8, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:16, và SEQ ID NO:18. Trình tự khởi đầu khác loại cũng có thể được liên kết theo cách hoạt động được với các trình tự mã hóa ADN tổng hợp mã hóa TIC6757PL, TIC7472PL, hoặc TIC7473PL được gắn đích plastid; hoặc TIC6757PL, TIC7472PL, hoặc TIC7473PL không được gắn đích. Các codon của phân

từ 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 thế câm).

Cấu trúc ADN tái tổ hợp chứa trình tự mã hóa protein TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, hoặc TIC7473PL 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 TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, hoặc TIC7473PL, protein khác với protein TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, hoặc TIC7473PL, phân tử dsARN ức chế côn trùng, hoặc protein phụ thuộc. Các protein phụ thuộc bao gồm, nhưng không giới hạn ở, đồng nhân tố, 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 thuộc 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 đầu hoặc mỗi protein hoặc các phân tử dsARN là dưới sự kiểm soát của các trình tự khởi đầu 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 TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, hoặc TIC7473PL được biểu hiện từ một đoạn nucleotit chung mà cũng chứa các khung đọc mở và các trình tự khởi đầu 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 đầu 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 TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, hoặc TIC7473PL 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

vectơ này có thể được sử dụng để đạt được sự biểu hiện ổn định hoặc tạm thời trình tự mã hóa protein TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, hoặc TIC7473PL 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 TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, hoặc TIC7473PL 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 TIC6757 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, linh sam Douglas, cà tím, bạch đàn, cây lanh, tỏi, nho, cây hublông, tỏi tây, rau diếp, thông trầm hương, kê, dưa, quả hạch, yến mạch, oliu, hành tây, cây cảnh, cò, cỏ, đậu Hà Lan, lạc, tiêu, đậu triều, thông, khoai tây, bạch dương, bí đỏ, thông *Radiata*, cải củ, 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, gổ gôm, khoai lang, cỏ kê Mỹ, chè, thuốc lá, cà chua, tiểu 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.

Phương pháp tạo ra cây chuyển gen chứa lượng protein TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, hoặc TIC7473PL ức chế côn trùng cánh vảy 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 cánh vảy. Các thực vật 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 phương pháp 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 TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, hoặc TIC7473PL, 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 sản phẩm hàng hóa hoặc các sản phẩm thương mại khác thu được từ thực vật chuyển gen hoặc bộ phận của thực vật chuyển gen, trong đó sản phẩm hàng hóa 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 TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, hoặc TIC7473PL.

Các thực vật biểu hiện các protein TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, hoặc TIC7473PL 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 đặc điểm chuyển gen khác như gen dung nạp thuốc diệt cỏ, gen gây ra các đặc điểm về sản lượng hoặc dung nạp stress và tương tự hoặc các đặc điểm này có thể được kết hợp vào một vector duy nhất nhờ đó các đặc điểm này được liên kết toàn bộ.

Như được mô tả thêm trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế, các trình tự mã hóa protein TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, hoặc TIC7473PL và

các trình tự có tỉ lệ phần trăm đồng nhất đáng kể với TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, hoặc TIC7473PL có thể được nhận dạng bằng cách sử dụng các phương pháp 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 TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, hoặc TIC7473PL 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 liên hệ gần.

Ngoài ra, các trình tự nucleotit mã hóa protein độc tố TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, và TIC7473PL 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 phương pháp khuếch đại chu trình nhiệt hoặc khuếch đại đẳng nhiệt và phương pháp lai. Ví dụ, các oligonucleotit thu được từ trình tự như được chỉ ra trong SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:15, hoặc SEQ ID NO:17 có thể được sử dụng để xác định sự có mặt hoặc vắng mặt của các gen chuyển TIC6757PL, TIC7472PL, hoặc TIC7473PL trong mẫu axit deoxyribonucleic thu được từ sản phẩm hàng hóa. Với độ nhạy của một số phương pháp 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, SEQ ID NO:15, và SEQ ID NO:17 có thể được sử dụng để phát hiện gen chuyển TIC6757PL, TIC7472PL, và TIC7473PL trong sản phẩm hàng hóa thu được từ các nguồn gộp, tại đó chỉ một phần của sản phẩm hàng hóa 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, SEQ ID NO:15, và SEQ ID NO:17. Các oligonucleotit “đột biến” là hữu ích để nhận diện các biến thể trình tự axit amin TIC6757PL, TIC7472PL, và TIC7473PL 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 trừ sâu 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 phương pháp 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 trừ sâu hoặc đoạn có tác dụng trừ sâu 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 thể hiện là SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:1, SIQ ID NO:7, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:15, hoặc SEQ ID NO:17 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 hiểu biết 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 biểu hiện các protein trừ sâu ở chủng *Bacillus* hoặc trong tế bào thực vật, là các phương án của sáng chế, công nhận là nhiều trình tự mã hóa dư thừa này sẽ không lai trong các điều kiện này với các trình tự *Bacillus* hoặc *Paenibacillus* tự nhiên mã hóa TIC6757, TIC7472, và TIC7473. Sáng chế đề xuất việc sử dụng các phương pháp nhận diện này và các phương pháp khác đã biết đối với người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực này, để nhận diện trình tự mã hóa protein TIC6757, TIC7472, và TIC7473 và các trình tự có tỉ lệ phần trăm tương đồng trình tự đáng kể với các trình tự mã hóa protein TIC6757, TIC7472, và TIC7473.

Sáng chế cũng đề xuất việc sử dụng các phương pháp phân tử đã biết trong lĩnh vực này để thao tác di truyền hoặc tách dòng các protein hữu ích về thương mại chứa các thể khảm protein từ protein trừ sâu; ví dụ, các thể khảm này có thể được lắp ráp từ các đoạn của protein TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, hoặc TIC7473PL để thu được các phương án hữu ích bổ sung bao gồm tổ hợp của các đoạn của protein TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, hoặc TIC7473PL với các đoạn của các protein đa dạng khác với TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, hoặc TIC7473PL và các protein liên quan. Các protein TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, hoặc TIC7473PL có thể được sắp xếp thẳng hàng với nhau và với *Bacillus*, *Paenibacillus* hoặc các protein trừ sâu khác (dù các trình tự này có quan hệ gần hoặc xa về mặt 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

thăng hàng, dẫn đến việc tạo thành các protein khảm. Các protein khảm này có thể được đưa vào phân tích thử nghiệm sinh học sâu bệnh và được mô tả về sự có mặt hoặc vắng mặt của hoạt tính sinh học tăng cường hoặc phổ sâu bệnh 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 sâu bệnh cụ thể hoặc về phổ sâu bệnh rộng hơn bằng cách hoán đổi các vùng chức năng hoặc các đoạn với các protein khác hoặc bằng cách sử dụng các phương pháp tiến hóa có định hướng đã biết trong lĩnh vực này.

Các phương pháp kiểm soát côn trùng, cụ thể là sự gây hại của loài cánh vảy trên cây trồng, bằng các protein TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, hoặc TIC7473PL cũng được mô tả trong sáng chế. Các phương pháp này có thể bao gồm nuôi thực vật chứa lượng ức chế côn trùng hoặc loài cánh vảy của protein độc tố TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, hoặc TIC7473PL. Trong một số phương án, các phương pháp này có thể bao gồm thêm bất kỳ một hoặc nhiều bước trong số: (i) phủ chế phẩm bất kỳ chứa hoặc mã hóa protein độc tố TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, hoặc TIC7473PL lên thực vật hoặc hạt mà sẽ lớn thành cây; và (ii) biến nạp thực vật hoặc tế bào thực vật lớn thành cây với polynucleotit mã hóa protein độc tố TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, hoặc TIC7473PL. Nói chung, được đề xuất là protein độc tố TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, hoặc TIC7473PL 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 kháng lại các côn trùng cánh vảy.

Trong một số phương án, phân tử axit nucleic tái tổ hợp của các protein độc tố TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, hoặc TIC7473PL là thành phần có tác dụng trừ sâu của chế phẩm ức chế côn trùng được bào chế 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 TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, hoặc TIC7473PL trong các điều kiện thích hợp cho sự biểu hiện protein độc tố TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, hoặc TIC7473PL. Chế phẩm này có thể được bào chế bằng cách hút ẩm, làm đông khô, đồng 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 phần tế bào kết viên. 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 tính kháng, chế phẩm ức chế côn trùng chứa TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, hoặc TIC7473PL 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 cánh vảy, nhưng khác với protein độc tố TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, hoặc TIC7473PL. 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 sâu bệnh cánh vảy 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, AXMI-209 (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 của bộ cánh vảy 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.

Theo 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 sâu bệnh cánh nửa, hỗn hợp protein ức chế côn trùng theo sáng chế có thể được sử dụng với các protein có tác dụng trên loài cánh nửa 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 sâu bệnh cánh cứng 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), AXMI-207 (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 π -Hexatoxin-Hv1a (công bố đơn Patent Mỹ US2014-0366227 A1).

Các polypeptit bổ sung để kiểm soát sâu bọ cánh cứng, cánh vảy, và cánh nửa có thể được tìm thấy trên trang web danh pháp độc tố *Bacillus thuringiensis* được duy trì bởi Neil Crickmore (trên trang 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 với các loài sâu bệnh cánh vảy được gắn 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 loài sâu bệnh mà cũng được kiểm soát bởi các protein được mô tả ở đây là sử dụng được 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 phương pháp 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 khác để kiểm soát cùng một loại sâu bệnh hoặc các sâu bệnh 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 sâu bệnh trong phạm vi vật chủ rộng hơn hoặc kiểm soát được các loài sâu bệnh trên thực vật mà chưa được kiểm soát hiệu quả bởi các protein trừ sâu TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, hoặc TIC7473PL.

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, viên, 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 chứa 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 TIC6757

Các trình tự mã hóa ba protein trừ sâu *Paenibacillus popilliae* mới được nhận diện, tách dòng, xác nhận trình tự, và được thử nghiệm trong thử nghiệm sinh học côn trùng. Các protein trừ sâu, TIC6757, TIC7472, và TIC7473, được phân lập lần lượt từ *Paenibacillus popilliae* chủng DSC004343, DSC007648, và DSC008493, trình diện các protein tương tự Vip3C mới. Các trình tự có quan hệ xa với TIC6757, TIC7472, và TIC7473 là Vip3Ca2 (đồng nhất 83,7%, có quan hệ gần nhất đã biết), Vip3Aa1 (đồng nhất 66,75%), và protein tương tự Vip3B (đồng nhất 60,93%). Chất lượng đặc biệt và độc nhất của TIC6757, TIC7472, và TIC7473 chỉ ra là các protein trừ sâu này có thể có cơ chế tác dụng mới (MOA).

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 TIC6757, TIC7472, và TIC7473 từ ADN bộ gen toàn phần được phân lập lần lượt từ *Paenibacillus popilliae* chủng DSC004343, DSC007648, và DSC008493. 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 các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này vào hai vectơ biểu hiện *Bt* khác nhau trong mỗi liên kết theo cách hoạt động được với trình tự khởi đầu biểu hiện được *Bt*. Một vectơ biểu hiện *Bt* chứa trình tự khởi đầu mà hoạt động trong quá trình hình thành bào tử của trực khuẩn. Vectơ biểu hiện khác chứa trình tự khởi đầu không hoạt động trong quá trình hình thành bào tử. Ngoài ra, mỗi đơn vị siêu sao chép được tách dòng vào vectơ được sử dụng cho sự biểu hiện protein trong *Escherichia coli* (*E. coli*). Để phân lập các protein được biểu hiện bởi *E. coli*, đuôi Histidin được liên kết theo cách hoạt động được với các trình tự mã hóa được biểu hiện để tạo thuận lợi cho việc tinh chế cột của protein này. Các trình tự mã hóa và các trình tự protein tương ứng của chúng được sử dụng để biểu hiện vi khuẩn được trình bày trong Bảng 3 dưới đây.

Bảng 3. Các trình tự mã hóa độc tố và các trình tự protein tương ứng được sử dụng để biểu hiện trong *Bt* và *E. coli*.

Độc tố	Trình tự mã hóa ADN SEQ ID NO:	Protein SEQ ID NO:	Vật chủ biểu hiện vi khuẩn
TIC6757	1	2	<i>Bt</i>
TIC7472	7	8	<i>Bt</i>
TIC7473	11	12	<i>Bt</i>
TIC6757_His	5	6	<i>E. coli</i>
TIC7472_His	9	10	<i>E. coli</i>
TIC7473_His	13	14	<i>E. coli</i>

Ví dụ 2

TIC6757, TIC7472, và TIC7473 thể hiện tác dụng đối với loài cánh vẩy trong thử nghiệm sinh học côn trùng

Các protein trừ sâu TIC6757, TIC7472, và TIC7473 được biểu hiện trong *Bt* và *E. coli* được thử nghiệm về độc tính đối với các loài khác nhau của bộ cánh vẩy, cánh cứng, và cánh nửa. Các chế phẩm chứa mỗi độc tố từ *Bt* được thử nghiệm kháng lại các loài cánh vẩy 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 tơ cải bắp (DBM, *Plutella xylostella*), sâu đục thân cây ngô Châu Âu (ECB, *Ostrinia nubilalis*), sâu xanh mùa thu (FAW, *Spodoptera frugiperda*), sâu xanh mùa thu kháng Cry1Fa1 (FAWR1, *Spodoptera frugiperda*), sâu bướm Mỹ (AWB, *Helicoverpa armigera*), sâu hồng hại bông (PBW, *Pectinophora gossypiella*), sâu khoang phương Nam (SAW, *Spodoptera eridania*), sâu đo đậu tương (SBL, *Chrysodeixis includens*), sâu có đốm (SBW, *Earias vittella*), sâu đục thân cây ngô Tây Nam (SWCB, *Diatraea grandiosella*), sâu chồi thuốc lá (TBW, *Heliothis virescens*), sâu ngài đêm thuốc lá (TCW, *Spodoptera litura*, còn được biết là sâu bướm cụm), và sâu bướm đậu mè (VBW, *Anticarsia gemmatilis*); sâu bọ hại khoai tây Colorado thuộc loài bộ cánh cứng (CPB, *Leptinotarsa decemlineata*), sâu đục rễ ngô phương Tây (WCB, *Diabrotica virgifera virgifera*); và sâu bọ hại cây và quả thuộc loài cánh nửa (TPB, *Lygus lineolaris*), sâu bọ hại cây và quả phương Tây (WTP, *Lygus hesperus*), bọ xít nâu Nam và Trung Mỹ (NBSB, *Euschistus heros*), và bọ xít xanh (GSB, *Nezara viridula*).

Hoạt tính sinh học của các protein trừ sâu TIC6757, TIC7472, và TIC7473 được đánh giá bằng cách sản sinh protein này trong vật chủ biểu hiện *E. coli* hoặc *Bt*. Trong trường hợp vật chủ biến thể, chủng *Bt* biểu hiện TIC6757, TIC7472, hoặc TIC7473 được nuôi trong hai mươi tư (24) giờ và sau đó môi trường nuôi cấy được bổ sung vào chế độ ăn của 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 TIC6757, TIC7472, hoặc TIC7473 với côn trùng trên chế độ ăn với môi trường nuôi cấy đối chứng không được xử lý. Các chủng *E. coli* biểu hiện TIC6757, TIC7472, hoặc TIC7473 được xử lý theo cách tương tự và cũng được cung cấp trong chế độ ăn côn trùng. Hoạt tính thử nghiệm sinh học được quan sát cho mỗi protein từ chế phẩm *Bt* hoặc *E. coli* hoặc cả hai chế phẩm được thể hiện trong Bảng 4 và 5 dưới đây, trong đó “+” thể hiện hoạt tính và “NT” thể hiện độc tố này chưa được thử nghiệm chống lại sâu bọ cụ thể.

Bảng 4. Hoạt tính thử nghiệm sinh học của TIC6757, TIC7472, và TIC7473 chống lại sâu bọ.

Độc tố	BAW	BCW	CEW	CLW	DBM	ECB	FAW	FAWR1	AWB	PBW	SAW	SBL
TIC6757	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+
TIC7472	NT	NT	+	NT	NT	NT	+	NT	NT	NT	+	+
TIC7473	NT	NT	+	NT	NT	NT	+	NT	NT	NT	+	+

Bảng 5. Hoạt tính thử nghiệm sinh học của TIC6757, TIC7472, và TIC7473 chống lại sâu bọ.

Độc tố	SBW	SWCB	TBW	TCW	VBC	CPB	WCR	TPB	WTP	NBSB	SGB
TIC6757	+	+	+	+	+						
TIC7472	NT	+		NT	NT		NT			NT	NT
TIC7473	NT	+		NT	NT		NT			NT	NT

Như có thể thấy trong Bảng 4 và 5 trên đây, độc tố côn trùng TIC6757 thể hiện hoạt tính chống lại nhiều sâu bọ cánh vảy (BAW, BCW, CEW, CLW, DBM, ECB,

FAW, FAWR1, AWB, SAW, SBL, SBW, SWCB, TBW, TCW, và VBC). Hoạt tính được quan sát thấy đối với hầu hết sâu bệnh được thử nghiệm kháng TIC7472 và TIC7473 (CEW, FAW, SAW, SBL, SWCB).

Ví dụ 3

Thử nghiệm về hoạt tính của TIC6757PL chống lại sâu bệnh cánh vảy ở cây ngô đã được biến nạp ổn định

Các vector biến nạp thực vật nhị thể chứa casset gen chuyển được thiết kế để biểu hiện protein trừ sâu TIC6757PL được gắn đích plastid và không được gắn đích được tách dòng bằng cách sử dụng các phương pháp 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 cánh vảy 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 ngô. Các trình tự tổng hợp được tổng hợp, theo các phương pháp thường được mô tả trong Patent Mỹ 5,500,365, để tránh một số trình tự có vấn đề về độc hại như các trình tự polyadenyl hóa thực vật giàu ATTTA và A/T trong khi vẫn bảo tồn trình tự axit amin của protein *Paenibacillus* tự nhiên. Các trình tự mã hóa tổng hợp mã hóa protein TIC6757PL chứa gốc alanin bổ sung ngay sau methionin khởi đầu so với protein TIC6757. Đối với protein gắn đích plastid, trình tự mã hóa protein trừ sâu TIC6757PL tổng hợp được liên kết theo cách hoạt động được trong khung với trình tự mã hóa peptid tín hiệu gắn đích lục lạp. Các vector biến nạp thực vật thu được chứa casset gen chuyển thứ nhất để biểu hiện protein trừ sâu TIC6757PL chứa trình tự khởi đầu cơ định, được liên kết theo cách hoạt động được 5' với trình tự dẫn, được liên kết theo cách hoạt động được 5' với intron, được liên kết theo cách hoạt động được 5' với trình tự mã hóa tổng hợp mã hóa protein TIC6757PL gắn đích hoặc không gắn đích plastid, mà trình tự này lại được liên kết theo cách hoạt động được 5' với 3' UTR; và casset gen chuyển thứ hai để chọn lọc các tế bào thực vật đã biến nạp bằng cách sử dụng kỹ thuật chọn lọc glyphosate. Trình tự mã hóa tổng hợp cho protein trừ sâu TIC6757PL được thể hiện bằng SEQ ID NO:3 và mã hóa protein được thể hiện bằng SEQ ID NO:4.

Các cây ngô được biến nạp bằng bốn vector biến nạp nhị thể khác nhau như được mô tả trên đây bằng cách sử dụng phương pháp biến nạp qua trung gian *Agrobacterium*. Các cấu trúc vector biến nạp thực vật nhị thể 1 và 3 chứa trình tự mã hóa mã hóa protein TIC6757PL gắn đích plastid, trong khi các cấu trúc 2 và 4 chứa trình tự mã hóa mã hóa protein TIC6757PL không gắn đích. Các tế bào đã biến nạp được cảm ứng để tạo ra thực vật bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Các thử nghiệm sinh học sử dụng các đĩa lá cây được thực hiện tương tự các phương pháp 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 ngô chưa biến nạp được sử dụng để thu được mô để sử dụng làm đối chứng âm. Các sự kiện gắn xen một bản sao R₀ biến nạp nhiều lần từ mỗi vector nhị thể được đánh giá về tác dụng chống sâu xám (BCW, *Agrotis ipsilon*), sâu đục bắp trên cây ngô (CEW, *Helicoverpa zea*), sâu xanh mùa thu (FAW, *Spodoptera frugiperda*), và sâu đục thân cây ngô Tây Nam (SWCB, *Diatraea grandiosella*).

Các cây R₀ đã biến nạp biểu hiện TIC6757PL có hiệu quả cao (được xác định là có ít hơn hoặc bằng mười bảy phần trăm hư hại lá với tỉ lệ chết một trăm phần trăm) trong việc chống lại tất cả bốn loại sâu bọ được thử nghiệm như được thể hiện trong Bảng 6. Độ thâm nhập cao (được thể hiện là “(H)”) được xác định là lớn hơn năm mươi phần trăm các sự kiện thử nghiệm cho mỗi cấu trúc có ít hơn hoặc bằng mười bảy phần trăm hư hại lá với tỉ lệ tử vong một trăm phần trăm. Độ thâm nhập thấp (được thể hiện là “(L)”) được xác định là ít hơn hoặc bằng năm mươi phần trăm các sự kiện thử nghiệm cho mỗi cấu trúc có ít hơn hoặc bằng mười bảy phần trăm hư hại lá với tỉ lệ tử vong một trăm phần trăm.

Bảng 6. Số lượng các sự kiện biểu hiện TIC6757 với $\leq 17,5\%$ hư hại lá với tỉ lệ tử vong một trăm phần trăm và độ thâm nhập.

		Số lượng các sự kiện với $\leq 17,5\%$ hư hại lá và tỉ lệ tử vong 100% (độ thâm nhập)			
Cấu trúc	Tổng số sự kiện	BCW	CEW	FAW	SWC
Cấu trúc 1	22	17 (H)	18 (H)	18 (H)	11 (L)
Cấu trúc 2	20	14 (H)	14 (H)	14 (H)	4 (L)
Cấu trúc 3	19	17 (H)	17 (H)	17 (H)	17 (H)
Cấu trúc 4	20	16 (H)	16 (H)	15 (H)	7 (L)

Các sự kiện R₀ đã chọn thu được từ R₀ cấu trúc 1 (được gắn đích plastid) và cấu trúc 2 (không gắn đích plastid) được để tự thụ phấn, tạo ra dòng con F₁. Một số cây con F₁ dị hợp tử từ mỗi sự kiện R₀ được lựa chọn cho thử nghiệm sinh học đĩa lá và được đánh giá về tác dụng chống lại sâu xám (BCW, *Agrotis ipsilon*), sâu đục bắp trên cây ngô (CEW, *Helicoverpa zea*), sâu xanh mùa thu (FAW, *Spodoptera frugiperda*), và sâu đục thân cây ngô Tây Nam (SWCB, *Diatraea grandiosella*). Bảng 7 dưới đây thể hiện tỉ lệ phần trăm hư hại lá trung bình và tỉ lệ tử vong trung bình cho mỗi cây thu được từ mỗi cấu trúc/sự kiện. Các cây con F₁ được tham chiếu đối với sự kiện R₀. Ví dụ, “Sự kiện-1_1” là cây con F₁ dị hợp tử thứ nhất thu được từ Sự kiện-1 và “Sự kiện-1_2” là cây con F₁ dị hợp tử thứ nhất thu được từ Sự kiện-1. “N” là số lượng mẫu từ mỗi cây được sử dụng trong thử nghiệm. Như có thể thấy trong Bảng 7 và 8, hầu hết các cây thu được từ mỗi sự kiện R₀ thể hiện không nhiều hơn năm phần trăm hư hại lá và một trăm phần trăm tử vong kháng BCW, CEW, và FAW. Đối với SWCB, nhiều cây thu được từ mỗi sự kiện R₀ thể hiện ít hơn mười phần trăm hư hại lá và lớn hơn năm mươi phần trăm tử vong trong thử nghiệm.

Bảng 7. Tỉ lệ phần trăm hư hại lá và tỉ lệ tử vong trung bình ở dòng con F₁ thu được từ các sự kiện R₀ đã chọn biểu hiện TIC6757PL.

Cấu trúc	Sự kiện_cây	N	BCW		CEW	
			% Hư hại lá trung bình	Tỉ lệ tử vong trung bình	% Hư hại lá trung bình	Tỉ lệ tử vong trung bình
Cấu trúc 1	Sự kiện-1_1	3	5,00	100,00	5,00	100,00
Cấu trúc 1	Sự kiện-1_2	3	5,00	100,00	5,00	100,00
Cấu trúc 1	Sự kiện-1_3	3	5,00	100,00	5,00	100,00
Cấu trúc 1	Sự kiện-1_4	3	5,00	100,00	6,65	100,00
Cấu trúc 1	Sự kiện-2_1	3	5,00	100,00	5,00	100,00
Cấu trúc 1	Sự kiện-2_2	3	NT	NT	7,50	100,00
Cấu trúc 1	Sự kiện-2_3	3	NT	NT	8,35	100,00
Cấu trúc 2	Sự kiện-3_1	3	5,00	100,00	5,00	100,00
Cấu trúc 2	Sự kiện-3_2	3	5,00	100,00	5,00	100,00
Cấu trúc 2	Sự kiện-4_1	3	5,00	100,00	5,00	100,00

Cấu trúc 2	Sự kiện-4_2	3	5,00	100,00	5,00	100,00
Cấu trúc 2	Sự kiện-4_3	3	6,65	66,67	5,00	100,00
Cấu trúc 2	Sự kiện-4_4	3	6,65	66,67	5,00	100,00
Cấu trúc 2	Sự kiện-4_5	3	20,00	33,33	10,00	100,00
Cấu trúc 2	Sự kiện-5_1	3	5,00	100,00	5,00	100,00
Cấu trúc 2	Sự kiện-5_2	3	5,00	100,00	5,00	100,00
Cấu trúc 2	Sự kiện-5_3	3	5,00	100,00	5,00	100,00
Không	Đối chứng âm	3	55,00	0,00	55,00	0,00

Bảng 8. Tỷ lệ phần trăm hư hại lá và tỷ lệ tử vong trung bình ở dòng con F₁ thu được từ các sự kiện R₀ đã chọn biểu hiện TIC6757PL.

Cấu trúc	Sự kiện_cây	N	FAW		SWCB	
			% Hư hại lá trung bình	Tỷ lệ tử vong trung bình	% Hư hại lá trung bình	Tỷ lệ tử vong trung bình
Cấu trúc 1	Sự kiện-1_1	3	5,00	100,00	6,65	66,67
Cấu trúc 1	Sự kiện-1_2	3	5,00	100,00	6,65	66,67
Cấu trúc 1	Sự kiện-1_3	3	5,00	100,00	7,50	50,00
Cấu trúc 1	Sự kiện-1_4	3	5,00	100,00	8,35	66,67
Cấu trúc 1	Sự kiện-2_1	3	5,00	100,00	5,00	50,00
Cấu trúc 1	Sự kiện-2_2	3	5,00	100,00	5,00	50,00
Cấu trúc 1	Sự kiện-2_3	3	5,00	100,00	6,65	66,67
Cấu trúc 2	Sự kiện-3_1	3	5,00	100,00	5,00	100,00
Cấu trúc 2	Sự kiện-3_2	3	5,00	100,00	15,00	50,00
Cấu trúc 2	Sự kiện-4_1	3	5,00	100,00	12,50	0,00
Cấu trúc 2	Sự kiện-4_2	3	5,00	100,00	40,00	100,00
Cấu trúc 2	Sự kiện-4_3	3	5,00	100,00	48,35	0,00
Cấu trúc 2	Sự kiện-4_4	3	5,00	100,00	55,00	0,00
Cấu trúc 2	Sự kiện-4_5	3	5,00	100,00	55,00	0,00

Cấu trúc 2	Sự kiện-5_1	3	5,00	100,00	5,00	100,00
Cấu trúc 2	Sự kiện-5_2	3	5,00	100,00	6,65	66,67
Cấu trúc 2	Sự kiện-5_3	3	5,00	100,00	8,35	0,00
Không	Đối chứng âm	3	55,00	0,00	51,65	0,00

Các sự kiện R₀ đã chọn thu được từ cấu trúc 3 (được gắn đích plastid) và cấu trúc 4 (không gắn đích) được cho tự thụ phấn để tạo ra dòng con F₁. Cây con F₁ dị hợp tử từ mỗi sự kiện R₀ được chọn cho thử nghiệm sinh học đĩa lá và được thử nghiệm chống lại sâu ngài đêm đậu Tây (WBC, *Striacosta albicosta*). Bảng 9 thể hiện tỉ lệ phần trăm hư hại lá trung bình và tỉ lệ tử vong trung bình của cây con F₁ từ mỗi sự kiện R₀ và đối chứng âm. “N” là số lượng mẫu từ mỗi cây được sử dụng trong thử nghiệm.

Bảng 9. Tỉ lệ phần trăm hư hại lá trung bình và tỉ lệ tử vong trung bình ở dòng con F₁ thu được từ các sự kiện R₀ đã chọn biểu hiện TIC6757PL.

Cấu trúc	Sự kiện	N	% Hư hại lá trung bình	Tỉ lệ tử vong trung bình
Cấu trúc 3	Sự kiện-6_1	4	5,00	100,00
Cấu trúc 3	Sự kiện-7_1	4	5,00	100,00
Cấu trúc 3	Sự kiện-8_1	4	5,00	100,00
Cấu trúc 3	Sự kiện-9_1	4	5,00	100,00
Cấu trúc 3	Sự kiện-10_1	4	5,00	100,00
Cấu trúc 3	Sự kiện-11_1	4	5,00	100,00
Cấu trúc 3	Sự kiện-12_1	4	5,00	100,00
Cấu trúc 3	Sự kiện-13_1	4	5,00	100,00
Cấu trúc 3	Sự kiện-14_1	4	5,00	100,00
Cấu trúc 3	Sự kiện-15_1	4	27,50	50,00
Cấu trúc 4	Sự kiện-16_1	4	5,00	100,00
Cấu trúc 4	Sự kiện-17_1	4	5,00	100,00
Cấu trúc 4	Sự kiện-18_1	4	5,00	100,00
Đối chứng âm		4	45,00	0,00

Như có thể thấy trong Bảng 9 trên đây, toàn bộ trừ một cây con F₁ từ mỗi sự kiện R₀ được thử nghiệm chống lại WBC thể hiện không quá năm phần trăm hư hại lá và tỉ lệ tử vong một trăm phần trăm.

Cây giống con thu được từ cây con F₁ dị hợp tử đã chọn được biến nạp với cấu trúc 3 (gắn đích plastid) và cấu trúc 4 (không gắn đích) được thử nghiệm về tác dụng chống sâu xám (BCW, *Agrotis ipsilon*). Hạt giống con F₁, cũng như hạt không được biến nạp (đối chứng âm), được trồng trong chậu. Sau tám ngày khi các cây giống con mọc lên từ đất, mỗi cây được gây hại bằng ba BCW tuổi thứ ba. Mười bốn ngày sau khi gây hại các cây được kiểm tra bằng cách đếm số lượng cây bị gãy do BCW. Sáu mươi tám cây con F₁ thu được từ mười sự kiện R₀ khác nhau được biến nạp với cấu trúc 3 và mười cây con F₁ thu được từ bốn sự kiện R₀ khác nhau được biến nạp bằng cấu trúc 4 được sử dụng trong thử nghiệm. Mười lăm cây đối chứng âm cũng được sử dụng trong thử nghiệm này. Sau khi kiểm tra các cây, được quan sát thấy là tám mươi phần trăm đối chứng âm bị gãy bởi BCW trong khi không phần trăm cây con F₁ được biến nạp bằng cấu trúc 3 và cấu trúc 4 thể hiện sự gãy.

Ví dụ trên đây chứng minh là các cây ngô đã biến nạp biểu hiện TIC6757PL có tác dụng tốt hơn trong việc chống lại sâu bọ cánh vảy, cụ thể là sâu xám (*Agrotis ipsilon*), sâu đục bắp trên cây ngô (*Helicoverpa zea*), sâu xanh mùa thu (*Spodoptera frugiperda*), sâu đục thân cây ngô Tây Nam (*Diatraea grandiosella*), và sâu ngài đêm đậu Tây (*Striacosta albicosta*).

Ví dụ 4

Thử nghiệm về hoạt tính của TIC6757PL chống lại sâu bệnh cánh vảy ở cây đậu tương được biến nạp ổn định

Các vector biến nạp thực vật nhị thể chứa casset gen chuyển được thiết kế để biểu hiện protein trừ sâu TIC6757PL được gắn đích và không được gắn đích plastid được tách dòng bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Các vector tạo thành được sử dụng để biến nạp ổn định 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 bọ cánh vảy khác nhau.

Trình tự mã hóa tổng hợp được thiết kế để biểu hiện ở thực vật như được mô tả trong ví dụ 3 trên đây được tách dòng vào vector biến nạp thực vật nhị thể, và được sử

dụng để biến nạp tế bào cây đậu tương. Các vector nhị thể chứa các trình tự mã hóa TIC6757PL gắn đích và không gắn đích plastid được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Các vector biến nạp thực vật thu được chứa casset gen chuyển thứ nhất để biểu hiện protein trừ sâu TIC6757PL chứa trình tự khởi đầu cơ định, được liên kết theo cách hoạt động được 5' với trình tự dẫn, được liên kết theo cách hoạt động được 5' với trình tự mã hóa tổng hợp mã hóa protein TIC6757PL gắn đích hoặc không gắn đích plastid, mà trình tự này lại được liên kết theo cách hoạt động được 5' với 3' UTR và; casset gen chuyển thứ hai để chọn lọc các tế bào thực vật biến nạp bằng cách sử dụng kỹ thuật chọn lọc spectinomycin. Các cấu trúc 1, 3 và 5 chứa trình tự mã hóa mã hóa protein trừ sâu TIC6757PL không gắn đích. Các cấu trúc 2, 4 và 6 chứa trình tự mã hóa mã hóa protein TIC6757PL gắn đích plastid.

Các tế bào đậu tương đã biến nạp được cảm ứng để tạo ra cây bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Các thử nghiệm sinh học sử dụng các đĩa lá cây được thực hiện tương tự các phương pháp 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. Các sự kiện biến nạp nhiều lần từ mỗi vector nhị thể được đánh giá về tác dụng chống lại sâu khoang phương Nam (SAW, *Spodoptera eridania*), sâu đo đậu tương (SBL, *Chrysodeixis includens*), và sâu đục vỏ đậu tương (SPW, *Helicoverpa zea*).

Cây đậu tương R₀ đã biến nạp biểu hiện TIC6757PL có hiệu quả cao (được xác định là có ít hơn hoặc bằng hai mươi phần trăm hư hại lá) trong việc chống lại SAW, SBL, và SPW như được thể hiện trong Bảng 10. Độ thâm nhập cao (được thể hiện bằng "(H)") được xác định là lớn hơn năm mươi phần trăm các sự kiện thử nghiệm cho mỗi cấu trúc có ít hơn hoặc bằng hai mươi phần trăm hư hại lá. Độ thâm nhập thấp (được thể hiện bằng "(L)") được xác định là nhỏ hơn hoặc bằng năm mươi phần trăm các sự kiện thử nghiệm cho mỗi cấu trúc có ít hơn hoặc bằng hai mươi phần trăm hư hại lá.

Bảng 10. Số lượng các sự kiện biểu hiện TIC6757PL với $\leq 20\%$ hư hại lá và độ thâm nhập

Cấu trúc	Tổng số sự kiện	Số lượng các sự kiện với $\leq 20\%$ hư hại lá (độ thâm nhập)		
		SAW	SBL	SPW
Cấu trúc 1	15	14 (H)	14 (H)	12 (H)
Cấu trúc 2	15	5 (L)	3 (L)	8 (H)

Cấu trúc 3	15	12 (H)	13 (H)	13 (H)
Cấu trúc 4	15	15 (H)	15 (H)	15 (H)
Cấu trúc 5	15	14 (H)	13 (H)	14 (H)
Cấu trúc 6	15	15 (H)	15 (H)	15 (H)

Cây đậu tương chuyển gen R_0 đã chọn biểu hiện độc tố protein TIC6757PL thu được từ sự biến nạp các cấu trúc 3, 4, 5, và 6 được để cho tự thụ phấn và tạo ra hạt R_1 . Hạt R_1 được để cho nảy mầm tạo ra cây R_1 . Các cây R_1 đồng hợp tử đối với casset biểu hiện TIC6757PL được chọn cho thử nghiệm sinh học đĩa lá kháng sâu khoang phương Nam (SAW, *Spodoptera eridania*), sâu đo đậu tương (SBL, *Chrysodeixis includens*), sâu đục vỏ đậu tương (SPW, *Helicoverpa zea*), và sâu bướm đậu đậu mèo (VBW, *Anticarsia gemmatilis*). Bảng 11 và 12 thể hiện tỉ lệ phần trăm hư hại lá trung bình được thể hiện bởi mỗi côn trùng cho mỗi cây con R_1 và đối chứng âm, giống A3555. Bảng 11 và 12 cũng thể hiện tỉ lệ phần trăm trung bình sai số chuẩn (SEM) của sự hư hại lá được thể hiện bởi mỗi côn trùng cho mỗi sự kiện được thử nghiệm so với đối chứng âm. “N” là số lượng mẫu từ mỗi cây được sử dụng trong thử nghiệm. “SEM” thể hiện sai số chuẩn của tỉ lệ phần trăm hư hại trung bình.

Bảng 11. Tỉ lệ phần trăm hư hại lá trung bình đối với cây đậu tương R_1 biểu hiện TIC6757PL.

Cấu trúc	Số lượng sự kiện	Số lượng cây/sự kiện	SAW			SBL		
			N	% hư hại trung bình	SEM	N	% hư hại trung bình	SEM
Cấu trúc 3	5	6	4	0,37	0,30	4	1,91	0,72
Cấu trúc 4	8	6	4	0,31	0,25	4	1,25	0,34
Cấu trúc 5	8	6	4	0,02	0,02	4	0,75	0,35
Cấu trúc 6	8	6	4	0,76	0,34	4	0,97	0,35
Đối chứng âm	Giống A3555	8	4	87,93	9,74	4	79,44	12,44

Bảng 12. Tỷ lệ phần trăm hư hại lá trung bình đối với cây đậu tương R₁ biểu hiện TIC6757PL.

Cấu trúc	Số lượng sự kiện	Số lượng cây/sự kiện	SPW			VBC		
			N	% hư hại trung bình	SEM	N	% hư hại trung bình	SEM
Cấu trúc 3	5	6	4	16,32	3,83	4	1,89	0,60
Cấu trúc 4	8	6	4	2,25	0,30	4	0,96	0,31
Cấu trúc 5	8	6	4	2,40	0,50	4	0,51	0,25
Cấu trúc 6	8	6	4	3,65	0,53	4	0,71	0,32
Đối chứng âm	Giống A3555	8	4	97,25	1,09	4	88,88	10,30

Như có thể thấy trong các Bảng 11 và 12, cây đậu tương R₁ biểu hiện protein độc tố TIC6757PL có tác dụng tốt hơn trong việc chống SAW, SBL, SPW, và VBC. Đối với SAW, tất cả bốn sự kiện đều thể hiện ít hơn một (1) phần trăm hư hại lá trong khi đối chứng âm có xấp xỉ tám mươi tám (88) phần trăm hư hại lá. Đối với SBL, tất cả bốn (4) sự kiện đều thể hiện ít hơn hai (2) phần trăm hư hại lá trong khi đối chứng có xấp xỉ tám mươi (80) phần trăm hư hại lá. Đối với SPW, ba trong số bốn sự kiện thể hiện ít hơn bốn (4) phần trăm hư hại lá trong khi đối chứng có xấp xỉ chín mươi bảy (97) phần trăm hư hại lá. Đối với VBC, ba trong số các sự kiện thể hiện ít hơn một (1) phần trăm hư hại lá và một sự kiện thể hiện ít hơn hai (2) phần trăm hư hại lá, trong khi đối chứng âm có gần tám mươi chín (89) phần trăm hư hại lá.

Ví dụ trên đây chứng minh là cây đậu tương đã biến nạp biểu hiện TIC6757PL có tác dụng tốt hơn trong việc chống lại côn trùng cánh vảy, cụ thể là sâu khoang phương Nam (*Spodoptera eridania*), sâu đo đậu tương (*Chrysodeixis includens*), sâu đục vỏ đậu tương (*Helicoverpa zea*), và sâu bướm đậu mèo (*Anticarsia gemmatilis*).

Ví dụ 5

Thử nghiệm về hoạt tính TIC6757PL chống lại sâu bệnh cánh vảy ở cây bông được biến nạp ổn định

Các vector biến nạp thực vật nhị thể chứa casset gen chuyển được thiết kế để biểu hiện protein trừ sâu TIC6757PL được gắn đích và không được gắn đích plastid được tách dòng bằng cách sử dụng các phương pháp 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 cánh vảy khác nhau.

Trình tự mã hóa tổng hợp được thiết kế để biểu hiện ở thực vật như được mô tả trong ví dụ 3 trên đây được tách dòng vào vector biến nạp thực vật nhị thể, và được sử dụng để biến nạp tế bào cây bông. Các vector nhị thể chứa các trình tự mã hóa TIC6757PL gắn đích và không gắn đích plastid được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Các vector biến nạp thực vật thu được chứa casset gen chuyển thứ nhất để biểu hiện protein trừ sâu TIC6757PL chứa trình tự khởi đầu cơ định, được liên kết 5' với trình tự dẫn, được liên kết theo cách hoạt động được 5' với trình tự mã hóa tổng hợp mã hóa protein TIC6757PL gắn đích hoặc không gắn đích plastid, mà trình tự này lại được liên kết theo cách hoạt động được 5' với 3' UTR và; casset gen chuyển thứ hai để chọn lọc các tế bào thực vật biến nạp bằng cách sử dụng kỹ thuật chọn lọc spectinomycin.

Các tế bào cây bông đã biến nạp được cảm ứng để tạo ra cây bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Các thử nghiệm sinh học sử dụng các đĩa lá cây được thực hiện tương tự các phương pháp được mô tả trong Patent Mỹ số 8,344,207. Cây bông chưa biến nạp được sử dụng để thu được mô để sử dụng làm đối chứng âm. Các sự kiện biến nạp nhiều lần từ mỗi vector nhị thể được đánh giá về tác dụng kháng lại sâu khoang phương Nam sâu bướm hại bông (CBW, *Helicoverpa zea*), sâu xanh mùa thu (FAW, *Spodoptera frugiperda*), sâu đo đậu tương (SBL, *Chrysodeixis includens*), và sâu chồi thuốc lá (TBW, *Heliothis virescens*).

Các cây bông R₀ đã biến nạp biểu hiện TIC6757PL có hiệu quả cao (được xác định là có ít hơn hoặc bằng mười phần trăm hư hại lá) chống lại CBW, FAW, SBL và TBW như được thể hiện trong Bảng 13. Độ thâm nhập cao (được thể hiện bằng "(H)") được xác định là lớn hơn năm mươi phần trăm các sự kiện thử nghiệm cho mỗi cấu trúc có ít hơn hoặc bằng mười phần trăm hư hại lá. Độ thâm nhập thấp (được thể hiện bằng "(L)") được xác định là nhỏ hơn hoặc bằng năm mươi phần trăm các sự kiện thử nghiệm cho mỗi cấu trúc có ít hơn hoặc bằng mười phần trăm hư hại lá.

Bảng 13. Số lượng các sự kiện biểu hiện TIC6757PL với $\leq 10\%$ hư hại lá và độ thâm nhập.

Cấu trúc	Số lượng các sự kiện với $\leq 10\%$ hư hại lá/số lượng các sự kiện được thử nghiệm (độ thâm nhập)			
	CBW	FAW	SBL	TBW
Cấu trúc 1	22/25 (H)	21/24 (H)	21/25 (H)	21/25 (H)
Cấu trúc 2	12/15 (H)	6/15 (L)	13/15 (H)	13/15 (H)
Cấu trúc 3	7/13 (H)	8/14 (H)	4/13 (L)	6/14 (L)
Cấu trúc 4	11/14 (H)	8/14 (H)	9/14 (H)	10/14 (H)
Cấu trúc 5	20/25 (H)	19/23 (H)	20/24 (H)	19/23 (H)
Cấu trúc 6	6/7 (H)	7/7 (H)	7/7 (H)	6/7 (H)
Cấu trúc 7	22/25 (H)	22/25 (H)	22/25 (H)	22/25 (H)

Ví dụ 6

Thử nghiệm về hoạt tính TIC7472PL và TIC7473PL chống lại sâu bệnh cánh vảy 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 protein trừ sâu TIC7472PL hoặc TIC7473PL được gắn đích và không được gắn đích plastid được tách dòng bằng cách sử dụng các phương pháp 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 cánh vảy 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 ngô. Các trình tự tổng hợp được tổng hợp, theo các phương pháp được mô tả chung trong Patent Mỹ 5,500,365, để tránh một số trình tự có vấn đề về độc hại như các trình tự polyadenyl hóa thực vật giàu ATTTA và A/T trong khi vẫn bảo tồn trình tự axit amin của protein *Paenibacillus* tự nhiên. Các trình tự mã hóa tổng hợp mã hóa protein TIC7472PL và TIC7473PL chứa gốc alanin bổ sung ngay sau methionin khởi đầu so với protein TIC7472 và TIC7473. Đối với protein gắn đích plastid, trình tự mã hóa protein trừ sâu TIC7472PL hoặc TIC7473PL tổng hợp được liên kết theo cách hoạt động được trong khung với trình tự mã hóa peptit tín hiệu gắn đích

lục lập. Các vector biến nạp thực vật thu được chứa caxet gen chuyển thứ nhất để biểu hiện protein trừ sâu TIC7472PL hoặc TIC7473PL chứa trình tự khởi đầu cơ định, được liên kết theo cách hoạt động được 5' với trình tự dẫn, được liên kết theo cách hoạt động được 5' với intron, được liên kết theo cách hoạt động được 5' với trình tự mã hóa tổng hợp mã hóa protein TIC7472PL hoặc TIC7473PL gắn đích hoặc không gắn đích plastid, mà trình tự này lại được liên kết theo cách hoạt động được 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 glyphosat. Trình tự mã hóa tổng hợp cho protein trừ sâu TIC7472PL được thể hiện bằng SEQ ID NO:15 và mã hóa protein được thể hiện bằng SEQ ID NO:16. Trình tự mã hóa tổng hợp cho protein trừ sâu TIC7473PL được thể hiện bằng SEQ ID NO:17 và mã hóa protein được thể hiện bằng SEQ ID NO:18.

Các cây ngô được biến nạp bằng các vector biến nạp nhị thể như được mô tả trên đây bằng cách sử dụng phương pháp biến nạp qua trung gian *Agrobacterium*. Các tế bào đã biến nạp được cảm ứng để tạo ra thực vật bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Các thử nghiệm sinh học sử dụng các đĩa lá cây được thực hiện tương tự các phương pháp 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. Sự kiện biến nạp nhiều lần từ mỗi vector nhị thể được đánh giá về tác dụng chống lại sâu xám (BCW, *Agrotis ipsilon*), sâu đục bắp trên cây ngô (CEW, *Helicoverpa zea*), sâu xanh mùa thu (FAW, *Spodoptera frugiperda*), và sâu đục thân cây ngô Tây Nam (SWCB, *Diatraea grandiosella*), cũng như các sâu bọ cánh vảy 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 TIC7472PL hoặc TIC7473PL và được so sánh với các đĩa lá thu được từ cây ngô không biến nạp.

Ví dụ 7

Thử nghiệm về hoạt tính TIC6757PL chống lại sâu bệnh cánh vảy ở cây bông và đậu tương được biến nạp ổn định

Các vector biến nạp thực vật nhị thể chứa caxet gen chuyển được thiết kế để biểu hiện protein trừ sâu TIC7472PL hoặc TIC7473PL được gắn đích và không được gắn đích plastid được tách dòng bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Các vector thu được được sử dụng để biến nạp ổn định cây bông và 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 bọ cánh vảy khác nhau.

Trình tự mã hóa tổng hợp được thiết kế để biểu hiện ở thực vật như được mô tả trong ví dụ 6 trên đây được tách dòng vào vector biến nạp thực vật nhị thể, và được sử dụng để biến nạp tế bào cây bông hoặc đậu tương. Các vector nhị thể chứa các trình tự mã hóa TIC7472PL hoặc TIC7473PL gắn đích và không gắn đích plastid được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Các vector biến nạp thực vật thu được chứa caxet gen chuyển thứ nhất để biểu hiện protein trừ sâu TIC7472PL hoặc TIC7473PL chứa trình tự khởi đầu cơ định, được liên kết theo cách hoạt động được 5' với trình tự dẫn, được liên kết theo cách hoạt động được 5' với trình tự mã hóa tổng hợp mã hóa protein TIC7472PL hoặc TIC7473PL gắn đích hoặc không gắn đích plastid, mà trình tự này lại được liên kết theo cách hoạt động được 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 spectinomycin. Các cấu trúc 1, 2 và 7 chứa trình tự mã hóa tách dòng protein trừ sâu TIC6757PL không gắn đích. Các cấu trúc 3, 4, 5 và 6 chứa trình tự mã hóa mã hóa protein trừ sâu TIC6757PL gắn đích.

Các tế bào bông hoặc đậu tương đã biến nạp được cảm ứng để tạo ra thực vật bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Các thử nghiệm sinh học sử dụng các đĩa lá cây được thực hiện tương tự các phương pháp được mô tả trong Patent Mỹ số 8,344,207. Cây bông hoặc đậu tương chưa biến nạp được sử dụng để thu được mô để sử dụng làm đối chứng âm. Các sự kiện biến nạp nhiều lần từ mỗi vector nhị thể được đánh giá về tác dụng chống sâu khoang phương Nam (SAW, *Spodoptera eridania*), sâu đo đậu tương (SBL, *Chrysodeixis includens*), sâu đục vỏ đậu tương (SPW, *Helicoverpa zea*), sâu xanh mùa thu (FAW, *Spodoptera frugiperda*), sâu đo đậu tương (SBL, *Chrysodeixis includens*), sâu chồi thuốc lá (*Heliothis virescens*), sâu bướm hại bông (CBW, *Helicoverpa zea*), và sâu bướm đậu mè (VBW, *Anticarsia gemmatilis*) cũng như các sâu bọ cánh vảy 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 TIC7472PL hoặc TIC7473PL và được so sánh với các đĩa lá thu được từ cây bông hoặc đậu tương 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 phần 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 các 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 đầu khác loại được liên kết theo cách hoạt động được với đoạn polynucleotit mã hóa protein trừ sâu, trong đó protein trừ sâu này chứa trình tự axit amin có độ đồng nhất về trình tự axit amin ít nhất 99% với trình tự có độ dài đầy đủ được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16 và SEQ ID NO:18; và trong đó protein trừ sâu này hoạt động chống lại sâu bọ cánh vảy.
2. Tế bào thực vật biểu hiện phân tử axit nucleic tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó tế bào thực vật này tạo ra lượng có tác dụng trừ sâu của protein trừ sâu hoặc đoạn có tác dụng trừ sâu được mã hóa bởi phân tử axit nucleic tái tổ hợp này.
3. Tế bào chủ biểu hiện phân tử axit nucleic tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó tế bào chủ này được chọn từ nhóm gồm tế bào vi khuẩn và tế bào thực vật.
4. Tế bào chủ theo điểm 3, trong đó tế bào chủ này là từ chi vi khuẩn được chọn từ nhóm 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*, loài *Brevibacillus* là *Brevibacillus laterosperous*, và loài *Escherichia* là *Escherichia coli*.
6. Tế bào thực vật theo điểm 2, trong đó tế bào thực vật này là tế bào thực vật hai lá mầm hoặc một lá mầm.
7. Tế bào thực vật theo điểm 6, trong đó tế bào thực vật này được chọn từ nhóm gồm tế bào cây cỏ linh lăng, chuối, lúa mạch, đậu, bông cải xanh, bắp cải, cà rốt, sắn, thầu dầu, bông cải trắng, cần tây, đậu gà, cải thảo, dưa, cà phê, ngô, cỏ ba lá, bông, dưa chuột, linh sam Douglas, cà tím, bạch đàn, cây lanh, tỏi, nho, cây hublông, tỏi tây, rau diếp, thông trầm hương, kê, dưa, quả hạch, yến mạch, oliu, hành tây, cò, cỏ, đậu Hà Lan, lạc, tiêu, đậu triều, khoai tây, bạch dương, bí đỏ, thông Radiata, cải củ, hạt cải dầu, lúa, lúa mạch đen, hồng hoa, cao lương, thông phương Nam, đậu tương, rau chân vịt, bí, dâu tây, củ cải đường, mía, hướng dương, ngô ngọt, gỗ gôm, khoai lang, cỏ kê Mỹ, chè, thuốc lá, cà chua, tiểu hắc mạch, cỏ, dưa hấu và lúa mỳ.

8. Phân tử axit nucleic tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó protein thể hiện hoạt tính chống lại sâu bọ cánh vảy.
9. Phân tử axit nucleic tái tổ hợp theo điểm 8, trong đó sâu bọ cánh vảy được chọn từ nhóm gồm: sâu bướm đậu mèo, sâu đục mía, sâu đục thân ngô Lesser, sâu đục bắp trên cây ngô, sâu chồi thuốc lá, sâu đo đậu tương, sâu khoang đen, sâu khoang phương Nam, sâu xanh mùa thu, sâu xanh da láng, sâu bướm Mỹ, sâu lá phương Đông, sâu hồng hại bông, sâu xám, sâu đục thân cây ngô Tây Nam, sâu lá bông, sâu tơ cải bắp, sâu có đốm, sâu ngài đêm thuốc lá, sâu ngài đêm đậu tây và sâu đục thân cây ngô châu Âu.
10. Thực vật, hoặc bộ phận của thực vật chứa phân tử axit nucleic tái tổ hợp theo điểm 1.
11. Thực vật, hoặc bộ phận của thực vật theo điểm 10, trong đó thực vật này là thực vật một lá mầm hoặc thực vật hai lá mầm.
12. Thực vật theo điểm 10, trong đó thực vật này được chọn từ nhóm gồm cỏ linh lăng, chuối, lúa mạch, đậu, bông cải xanh, bắp cải, cà rốt, sắn, thầu dầu, bông cải trắng, cần tây, đậu gà, cải thảo, dưa, cà phê, ngô, cỏ ba lá, bông, dưa chuột, linh sam Douglas, cà tím, bạch đàn, cây lanh, tỏi, nho, cây hublông, tỏi tây, rau diếp, thông trầm hương, kê, dưa, quả hạch, yến mạch, oliu, hành tây, cò, cỏ, đậu Hà Lan, lạc, tiêu, đậu triều, khoai tây, bạch dương, bí đỏ, thông Radiata, cải củ, hạt cải dầu, lúa, lúa mạch đen, hồng hoa, cao lương, thông phương Nam, đậu tương, rau chân vịt, bí, dâu tây, củ cải đường, mía, hướng dương, ngô ngọt, gỗ gôm, khoai lang, cỏ kê Mỹ, chè, thuốc lá, cà chua, tiểu hắc mạch, cỏ, dưa hấu, và lúa mỳ.
13. Hạt của thực vật theo điểm 10, trong đó hạt này chứa phân tử axit nucleic tái tổ hợp.
14. Sản phẩm hàng hóa được sản xuất từ thực vật hoặc bộ phận của thực vật theo điểm 10, trong đó sản phẩm hàng hóa này chứa lượng phát hiện được của phân tử axit nucleic tái tổ hợp hoặc protein trừ sâu đã nêu.
15. Sản phẩm hàng hóa theo điểm 14, trong đó sản phẩm hàng hóa này được chọn từ nhóm gồm bông, bánh, bột, bột xay thô, xirô, dầu, thức ăn ủ chua, tinh bột, ngũ cốc, nước ép, dịch cô đặc, mứt, thạch, mứt cam, hạt nguyên hoặc đã xử lý, xơ, sợi, giấy, sinh khối, các sản phẩm nhiên liệu, protein, cám, sữa, pho mát, rượu, thức ăn động vật, giấy, và kem; trong đó sản phẩm hàng hóa này được sản xuất từ tế bào chủ thu được từ thực

vật được chọn từ nhóm gồm đậu tương, lúa, lúa mỳ, cao lương, đậu triều, lạc, trái cây, dưa, và rau.

16. Phương pháp sản xuất hạt, trong đó phương pháp này bao gồm bước:

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

17. Thực vật kháng lại sự phá hoại của sâu bọ, trong đó các tế bào của thực vật này chứa phân tử axit nucleic tái tổ hợp theo điểm 1.

18. Phương pháp kiểm soát sâu bọ cánh vảy hoặc sự phá hoại của sâu bọ, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho sâu bọ tiếp xúc với lượng có tác dụng trừ sâu của một hoặc nhiều protein trừ sâu chứa trình tự axit amin có độ đồng nhất về trình tự axit amin ít nhất 99% với trình tự được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:16, và SEQ ID NO:18.

19. Phân tử axit nucleic tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó protein trừ sâu chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16 và SEQ ID NO:18.

20. Phân tử axit nucleic tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó protein trừ sâu chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:2.

21. Phân tử axit nucleic tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó protein trừ sâu chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:8.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Monsanto Technology LLC
Bowen, David J
Catherine, Chay A
Todd, Ciche A
Uma, Kesanapalli R
Jennifer, Lutke L

<120> PHÂN TỬ AXIT NUCLEIC TÁI TỔ HỢP MÃ HÓA PROTEIN TRỪ SÂU, TẾ BÀO THỰC VẬT VÀ TẾ BÀO CHỦ BIỂU HIỆN PHÂN TỬ AXIT NUCLEIC TÁI TỔ HỢP NÀY, THỰC VẬT VÀ BỘ PHẬN CỦA THỰC VẬT CHỨA PHÂN TỬ AXIT NUCLEIC TÁI TỔ HỢP NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP KIỂM SOÁT SÂU BỌ CÁNH VÂY HOẶC SỰ PHÁ HOẠI CỦA SÂU BỌ

<130> 38-21(61627)-0001

<150> US 62/210,737

<151> 27-08-2015

<160> 18

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 2394

<212> ADN

<213> Paenibacillus popilliae

<220>

<221> đặc điểm mới

<222> (1)..(2394)

<223> Trình tự ADN thu được từ chủng Paenibacillus popilliae DSC004343 mã hóa TIC6757.

<400> 1

atgaagcaga ataataatTT tagtgtaagg gccttaccaa gttttattga tgtttttaat
60

ggaatttatg gttttgccac tggcattcaa gatattttta acatgatttt tggaacagat
120

acaggtgatc taacactaga agaagtttta aaaaatcaag agttacttta tgatatttct
180

ggtaaacttg aggggattag tggagaccta agtgagatta ttgcgcaggg aaatttgaat
240

acagaattag ctaaggaatt gctaaaaatc gctaatgagc agaacaacgt attaactgat
300

gttaataaca aactcaatgc gataaattcg atgctccaca tctatcttcc taaaattaca
360

aatatgttaa gcgatgttat gaaacagaat tatgctctga gtcttcaaat agaatatctc
420

agtaaacaac tacaggagat atcagataaa cttgatgtta ttaacttaaa tgtactcatt
480

aactctacac tcacagaaat cactcctgct tatcaacgta ttaaataatgt aaatgaaaaa
540

ttt gatgaat taactcttgc tacagaaaaa actctaagag caaaacaagg tagcgaagac
600

attattgcta atgatactct tgaaaattta actgagctaa cagaactagc gaaaagtgt
660

acaaaaaatg acatggatag ttctgagttt tatctccata cattccatga tgtattgatt
720

ggcaataatt tatttggtcg ttctggcttta aaaacagctg cagaattgat tactaaagac
780

gagataaaga cgagtggaag tgagatagga aaagtttata gtttcttaat tgtactaact
840

tgtctacaag caaaagcctt tctcacttta acggcatgcc gaaaattatt gggcttatca
900

gatattgatt atactaatat tctaaatcag catctaaatg atgaaaagaa tgtatttcgt
960

gataacatac ttcctacact gtccaataaa ttttctaacc ctaattatgt aaaaactata
1020

gtagtgata attatgcaaa agttatttta gaagctgaac caggatatgc tttagttgga
1080

tttgaaatta tcaatgatcg aatcccggtta ttaaaagcgt ataaagctaa gctaaaacaa
1140

aattatcaag ttgatcatca gtcgttatca gagattgttt atttagatat cgataaacta
1200

ttttgtccaa aaaattctga acaaaaatat tatactaaaa gtctgacatt tctgatggc
1260

tatgttatta ctaagattac ctttgaaaaa aagctgaaca acctaagata tgaggcaaca
1320

gcaaattttt atgacccatc tacaggagat attgatttaa atgagaagca agtggaatct
1380

acttttcttc aagcagatta tatttctata aatgttagtg atgatgatgg tgtttacatg
1440

ccgttaggcg ttatcagcga aacatttttg tctccaatta atagttttga attagaagtt
1500

gacgagaaat cgaaaatctt aactttaaca tgtaaacttt atttacgaga atatttatta
1560

gaatctgatt taataaataa agagacaagc ctcattgctc cgcctaatgt ttttatcagt
1620

aatatcgtag aaaattggaa catagaagcg gataatctag aaccatgggt agcaaataac
1680

aagaatgcat atgtcgatag tacaggcggc atagagggat ctaaagctct atttactcaa
1740

ggtgatgggg aattttcaca atttattgga gataaattaa aaccaaatac agattatatt
1800

attcaatata ctgtaaaagg aaaacctgct atttatttaa aaaacaaaaa tactggatat
1860

actatgtacg aagatacaaa cggtagttct gaagaatttc aaactatagc tgtaaattat
1920

acttcagaaa ctgataccttc acaaacacat ttagttttta aaagtcaaag tggctatgag
1980

gcttgggggg acaactttat tattctagaa tgtaaggcat ttgaaactcc agaaggcca
2040

gaattgataa aatttgatga ttggattagt tttggtacta cttacattag agatgatga
2100

cttactatcg atccaagtcg tggaggttat tttagacaat ctcttaaatt agacagctat
2160

tcaacttata atttgagctt ttctttttct ggattatggg ctaagggtat tataaaaaat
2220

tcccacggag tagtattggt tgaaaaagta agtcagcagt cttcatagc agatattagt
2280

gaaagtttta ctaccacatc aaataaagaa ggatttttta tagaactaac gggcgatagt
2340

cgtggtgggt ttgggtcggt ccgtagtttt tctatgaagg aaaagtttga ataa
2394

<210> 2

<211> 797

<212> PRT

<213> Paenibacillus popilliae

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM MỚI

<222> (1)..(797)

<223> Trình tự axit amin của TIC6757 thu được từ trình tự mã hóa mã hóa TIC6757 của chủng Paenibacillus popilliae DSC004343.

<400> 2

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

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

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

Tyr Ser Phe Leu Ile Val Leu Thr Cys Leu Gln Ala Lys Ala Phe Leu
 275 280 285

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

Thr Asn Ile Leu Asn Gln His Leu Asn Asp Glu Lys Asn Val Phe Arg
 305 310 315 320

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

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

Glu Pro Gly Tyr Ala Leu Val Gly Phe Glu Ile Ile Asn Asp Arg Ile
 355 360 365

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

Asp His Gln Ser Leu Ser Glu Ile Val Tyr Leu Asp Ile Asp Lys Leu
 385 390 395 400

Phe Cys Pro Lys Asn Ser Glu Gln Lys Tyr Tyr Thr Lys Ser Leu Thr
 405 410 415

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

Asn Asn Leu Arg Tyr Glu Ala Thr Ala Asn Phe Tyr Asp Pro Ser Thr
 435 440 445

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

Ala Asp Tyr Ile Ser Ile Asn Val Ser Asp Asp Asp Gly Val Tyr Met
 465 470 475 480

Pro Leu Gly Val Ile Ser Glu Thr Phe Leu Ser Pro Ile Asn Ser Phe
 485 490 495

Glu Leu Glu Val Asp Glu Lys Ser Lys Ile Leu Thr Leu Thr Cys Lys
 500 505 510

Ser Tyr Leu Arg Glu Tyr Leu Leu Glu Ser Asp Leu Ile Asn Lys Glu

```

515                               520                               525

Thr Ser Leu Ile Ala Pro Pro Asn Val Phe Ile Ser Asn Ile Val Glu
530                               535                               540

Asn Trp Asn Ile Glu Ala Asp Asn Leu Glu Pro Trp Val Ala Asn Asn
545                               550                               555                               560

Lys Asn Ala Tyr Val Asp Ser Thr Gly Gly Ile Glu Gly Ser Lys Ala
565                               570                               575

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

Leu Lys Pro Asn Thr Asp Tyr Ile Ile Gln Tyr Thr Val Lys Gly Lys
595                               600                               605

Pro Ala Ile Tyr Leu Lys Asn Lys Asn Thr Gly Tyr Thr Met Tyr Glu
610                               615                               620

Asp Thr Asn Gly Ser Ser Glu Glu Phe Gln Thr Ile Ala Val Asn Tyr
625                               630                               635                               640

Thr Ser Glu Thr Asp Pro Ser Gln Thr His Leu Val Phe Lys Ser Gln
645                               650                               655

Ser Gly Tyr Glu Ala Trp Gly Asp Asn Phe Ile Ile Leu Glu Cys Lys
660                               665                               670

Ala Phe Glu Thr Pro Glu Gly Pro Glu Leu Ile Lys Phe Asp Asp Trp
675                               680                               685

Ile Ser Phe Gly Thr Thr Tyr Ile Arg Asp Asp Val Leu Thr Ile Asp
690                               695                               700

Pro Ser Arg Gly Gly Tyr Phe Arg Gln Ser Leu Lys Leu Asp Ser Tyr
705                               710                               715                               720

Ser Thr Tyr Asn Leu Ser Phe Ser Phe Ser Gly Leu Trp Ala Lys Val
725                               730                               735

Ile Ile Lys Asn Ser His Gly Val Val Leu Phe Glu Lys Val Ser Gln
740                               745                               750

Gln Ser Ser Tyr Val Asp Ile Ser Glu Ser Phe Thr Thr Thr Ser Asn
755                               760                               765

```

Lys Glu Gly Phe Phe Ile Glu Leu Thr Gly Asp Ser Arg Gly Gly Phe
 770 775 780

Gly Ser Phe Arg Asp Phe Ser Met Lys Glu Lys Phe Glu
 785 790 795

<210> 3

<211> 2397

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự ADN tổng hợp được thiết kế để biểu hiện ở thực vật mã hóa TIC6757PL với gốc Alanin bổ sung được gắn xen ở vị trí 2 so với trình tự axit amin TIC6757 vi khuẩn thu được từ chủng *Paenibacillus popilliae* DSC004343 mã hóa TIC6757.

<400> 3

atggctaagc agaacaacaa cttctccgtg cgcgcgctcc cgtcgttcat cgacgtcttc
 60

aacggcatct acgggttcgc caccggcatc caggacatct tcaacatgat cttcggcacc
 120

gacacgggcg acctcacgct ggaggaggtg ctcaagaacc aggaactgct ctacgacatc
 180

tcgggcaagc tggaggcat ctccggcgac ctacgcgaaa ttatcgcgca agggaacctc
 240

aacacggagc tggcgaaaga gctgctcaag atcgccaacg agcagaacaa cgtgctgacg
 300

gacgtgaaca acaagctcaa cgcgatcaac tcgatgctcc acatctacct cccaagatt
 360

acgaacatgc tgtccgacgt catgaagcag aactatgcc tcagcctcca gatcgagtag
 420

ctctcgaagc agctccagga gatttcggat aagctggacg tcatcaacct gaacgtgctg
 480

ataaactcca cgctcacgga gatcactccg gcctaccagc gcatcaagta cgtgaacgag
 540

aagttcgacg agctgacact ggcgactgag aagaccctcc gcgccaagca agggtcogag
 600

gacatcattg cgaacgacac gctggagaac ttgacggagt tgaccgagct ggccaagagc
 660

gtgacgaaga acgacatgga cagcttcgag ttctacctcc acactttcca cgacgtgctg
 720

atcggaaca acctcttcgg ccggagcgcg ctcaagaccg cagccgagct gattacgaag
 780

gacgagatca agacctccg gtccgagatc ggaaaggtgt acagcttcct gatcgtcctc
840

acgtgcttac aagctaaggc gttcctcacc ctgaccgcct gccgtaagct gttgggcctg
900

tccgacatcg actacaccaa catcctcaac cagcacctca acgacgagaa gaacgtcttt
960

cgggacaaca tcctcccgac actgagcaac aagttcagta acccgaacta cgtcaagacg
1020

attggcagcg acaactacgc caagggttatc ctagaggccg agcccggtta cgccttggtc
1080

gggttcgaga tcatcaacga ccgcatcccg gtcctcaagg cgtacaaggc caagctcaag
1140

cagaactacc aagtggacca ccagagcctc agcgagatcg tgtacctgga catcgacaag
1200

ttgtttctgcc cgaagaactc ggagcagaag tattacacca agagcctgac cttcccgga
1260

ggctacgtta ttacaaagat cacgttcgag aagaagctca acaacctccg ttacgaggca
1320

actgccaaact tctacgaccc gtccacggc gacattgact tgaacgagaa gcaagtcgag
1380

tccacgttcc tccaggccga ctacatcagc atcaacgtca gcgacgacga cggcgtgtac
1440

atgccgctcg gagtcatcag cgagaccttc ctccagccga tcaactcggt cgagctggag
1500

gtggacgaga agtccaagat tctcacctg acctgcaaga gctacctccg ggaatacctc
1560

ctggagagcg acctcatcaa taaggagact tcgctcatag ctccgcccga cgtcttcac
1620

tccaacatcg tcgagaactg gaacatcgag gccgacaacc tggagccgtg ggtggcaaac
1680

aacaagaacg cctacgtgga ctccaccggc gggatcgagg gaagcaaggc cctgttcacc
1740

cagggcgacg gtgagttctc gcagttcatc ggcgacaagc tcaagcccaa cacggactac
1800

atcatccagt acaccgtcaa gggcaagcca gcgatctacc tcaagaacaa gaacaccggg
1860

tacaccatgt acgaggacac gaacggcagc agcgaggagt tccagaccat cgcggtcaac
1920

tacacctccg agaccgatcc ctcccagacc caccttgtct tcaagtccca gagcggctac
1980

gaggcgtggg gcgacaactt catcatcctg gagtgcgaagg ctttcgagac tcccgaagggc
2040

ccggagctta tcaagttcga tgactggatt tcgtttggca ccacctacat ccgggacgac
2100

gtgctaacca tcgacccgtc gcgcggcggc tacttccgcc aaagcctcaa gctggactcg
2160

tactccacgt acaacctatc tttcagcttc tcgggcctgt gggcgaaggt gattatcaag
2220

aactcgcaag gcgtggtcct gttcgagaag gtctcccagc agtcgtcata cgtggacatc
2280

agcgagtcc taccaccac cagcaacaag gagggcttct tcatcgagct gaccggcgac
2340

tcgcgcggcg ggttcggctc cttccgcgac ttctccatga aggagaaatt cgagtga
2397

<210> 4

<211> 798

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của TIC6757PL được mã hóa bởi trình tự ADN tổng hợp trong đó gốc Alanin bổ sung được gắn xen ở vị trí 2 so với trình tự axit amin TIC6757 vi khuẩn.

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Tyr Ser Phe Leu Ile Val Leu Thr Cys Leu Gln Ala Lys Ala Phe
 275 280 285

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

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

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

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

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

595 600 605
 Lys Pro Ala Ile Tyr Leu Lys Asn Lys Asn Thr Gly Tyr Thr Met Tyr
 610 615 620
 Glu Asp Thr Asn Gly Ser Ser Glu Glu Phe Gln Thr Ile Ala Val Asn
 625 630 635 640
 Tyr Thr Ser Glu Thr Asp Pro Ser Gln Thr His Leu Val Phe Lys Ser
 645 650 655
 Gln Ser Gly Tyr Glu Ala Trp Gly Asp Asn Phe Ile Ile Leu Glu Cys
 660 665 670
 Lys Ala Phe Glu Thr Pro Glu Gly Pro Glu Leu Ile Lys Phe Asp Asp
 675 680 685
 Trp Ile Ser Phe Gly Thr Thr Tyr Ile Arg Asp Asp Val Leu Thr Ile
 690 695 700
 Asp Pro Ser Arg Gly Gly Tyr Phe Arg Gln Ser Leu Lys Leu Asp Ser
 705 710 715 720
 Tyr Ser Thr Tyr Asn Leu Ser Phe Ser Phe Ser Gly Leu Trp Ala Lys
 725 730 735
 Val Ile Ile Lys Asn Ser His Gly Val Val Leu Phe Glu Lys Val Ser
 740 745 750
 Gln Gln Ser Ser Tyr Val Asp Ile Ser Glu Ser Phe Thr Thr Thr Ser
 755 760 765
 Asn Lys Glu Gly Phe Phe Ile Glu Leu Thr Gly Asp Ser Arg Gly Gly
 770 775 780
 Phe Gly Ser Phe Arg Asp Phe Ser Met Lys Glu Lys Phe Glu
 785 790 795

<210> 5

<211> 2454

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit nucleic tái tổ hợp mã hóa protein TIC6757 có đuôi Histidin

<400> 5

atgcatcacc atcaccatca ccatcaccat cacggtaccg agaccgtccg cttccaatcc
60

atgaagcaga ataataattt tagtgtaagg gccttaccaa gttttattga tgtttttaat
120

ggaatttatg gttttgccac tggcattcaa gatattttta acatgatttt tggaacagat
180

acagggtgatc taacactaga agaagtttta aaaaatcaag agttacttta tgatatttct
240

ggtaaacttg aggggattag tggagaccta agtgagatta ttgcgcaggg aaatttgaat
300

acagaattag ctaaggaatt gctaaaaatc gctaattgagc agaacaacgt attaactgat
360

gttaataaca aactcaatgc gataaattcg atgctccaca tctatcttcc taaaattaca
420

aatatgttaa gcgatgttat gaaacagaat tatgctctga gtcttcaa atagaatctc
480

agtaaacaac tacaggagat atcagataaa cttgatgtta ttaacttaaa tgtactcatt
540

aactctacac tcacagaaat cactcctgct tatcaacgta ttaaatatgt aaatgaaaaa
600

tttgatgaat taactcttgc tacagaaaaa actctaagag caaaacaagg tagcgaagac
660

attattgcta atgatactct tgaaaattta actgagctaa cagaactagc gaaaagtgt
720

acaaaaaatg acatggatag tttcgagttt tatctccata cattccatga tgtattgatt
780

ggcaataatt tatttggtcg ttcggcttta aaaacagctg cagaattgat tactaaagac
840

gagataaaga cgagtggaag tgagatagga aaagtttata gtttctta atgtactaact
900

tgtctacaag caaaagcctt tctcacttta acggcatgcc gaaaattatt gggcttatca
960

gatattgatt atactaatat tctaaatcag catctaaatg atgaaaagaa tgtatttcgt
1020

gataacatac ttctacact gtccaataaa ttttctaacc ctaattatgt aaaaactata
1080

ggtagtgata attatgcaaa agttatttta gaagctgaac caggatatgc tttagttgga
1140

tttgaaatta tcaatgatcg aatcccggta ttaaaagcgt ataaagctaa gctaaaacaa
1200

aattatcaag ttgatcatca gtcgttatca gagattgttt atttagatat cgataaacta
1260

ttttgtccaa aaaattctga acaaaaatat tataactaaaa gtctgacatt tcttgatggc
1320

tatgttatta ctaagattac ctttgaaaaa aagctgaaca acctaagata tgaggcaaca
1380

gcaaattttt atgaccatc tacaggagat attgatttaa atgagaagca agtggaatct
1440

acttttcttc aagcagatta tatttctata aatgttagtg atgatgatgg tgtttacatg
1500

ccgttagggc ttatcagcga aacatttttg tctccaatta atagttttga attagaagtt
1560

gacgagaaat cgaaaatctt aactttaaca tgtaaactctt atttacgaga atatttatta
1620

gaatctgatt taataaataa agagacaagc ctcattgctc cgctaattgt ttttatcagt
1680

aatatcgtag aaaattggaa catagaagcg gataatctag aaccatgggt agcaaataac
1740

aagaatgcat atgtcgatag tacaggcggc atagagggat ctaaagctct atttactcaa
1800

ggtgatgggg aattttcaca atttattgga gataaattaa aaccaaatac agattatatt
1860

attcaatata ctgtaaaagg aaaacctgct atttatttaa aaaacaaaaa tactggatat
1920

actatgtacg aagatacaaa cggtagttct gaagaatttc aaactatagc tgtaaattat
1980

acttcagaaa ctgaccttc acaaacacat ttagttttta aaagtcaaag tggctatgag
2040

gcttgggggg acaactttat tattctagaa tgtaaggcat ttgaaactcc agaaggcca
2100

gaattgataa aatttgatga ttggattagt tttggtacta cttacattag agatgatga
2160

cttactatcg atccaagtcg tggaggttat ttagacaat ctcttaaatt agacagctat
2220

tcaacttata atttgagctt ttctttttct ggattatggg ctaaggttat tataaaaaat
2280

tcccacggag tagtattggt tgaaaaagta agtcagcagt cttcatcagt agatattagt
2340

gaaagtttta ctaccacatc aaataaagaa ggatttttta tagaactaac gggcgatagt
2400

cgtgggtggtt ttgggtcggt ccgtgatttt tctatgaagg aaaagtttga ataa
2454

<210> 6

<211> 817

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của protein TIC6757 có đuôi Histidin.

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

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

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

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

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

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

Ala Ala Glu Leu Ile Thr Lys Asp Glu Ile Lys Thr Ser Gly Ser Glu
    275                      280                      285

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

Lys Ala Phe Leu Thr Leu Thr Ala Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ser
    305                      310                      315                      320

Asp Ile Asp Tyr Thr Asn Ile Leu Asn Gln His Leu Asn Asp Glu Lys
    325                      330                      335

Asn Val Phe Arg Asp Asn Ile Leu Pro Thr Leu Ser Asn Lys Phe Ser
    340                      345                      350

Asn Pro Asn Tyr Val Lys Thr Ile Gly Ser Asp Asn Tyr Ala Lys Val
    355                      360                      365

Ile Leu Glu Ala Glu Pro Gly Tyr Ala Leu Val Gly Phe Glu Ile Ile
    370                      375                      380

Asn Asp Arg Ile Pro Val Leu Lys Ala Tyr Lys Ala Lys Leu Lys Gln
    385                      390                      395                      400

Asn Tyr Gln Val Asp His Gln Ser Leu Ser Glu Ile Val Tyr Leu Asp
    405                      410                      415

Ile Asp Lys Leu Phe Cys Pro Lys Asn Ser Glu Gln Lys Tyr Tyr Thr
    420                      425                      430

```

Lys Ser Leu Thr Phe Pro Asp Gly Tyr Val Ile Thr Lys Ile Thr Phe
 435 440 445

Glu Lys Lys Leu Asn Asn Leu Arg Tyr Glu Ala Thr Ala Asn Phe Tyr
 450 455 460

Asp Pro Ser Thr Gly Asp Ile Asp Leu Asn Glu Lys Gln Val Glu Ser
 465 470 475 480

Thr Phe Leu Gln Ala Asp Tyr Ile Ser Ile Asn Val Ser Asp Asp Asp
 485 490 495

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

Ile Asn Ser Phe Glu Leu Glu Val Asp Glu Lys Ser Lys Ile Leu Thr
 515 520 525

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Val Asn Tyr Thr Ser Glu Thr Asp Pro Ser Gln Thr His Leu Val
 660 665 670

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

675 680 685
 Leu Glu Cys Lys Ala Phe Glu Thr Pro Glu Gly Pro Glu Leu Ile Lys
 690 695 700

 Phe Asp Asp Trp Ile Ser Phe Gly Thr Thr Tyr Ile Arg Asp Asp Val
 705 710 715 720

 Leu Thr Ile Asp Pro Ser Arg Gly Gly Tyr Phe Arg Gln Ser Leu Lys
 725 730 735

 Leu Asp Ser Tyr Ser Thr Tyr Asn Leu Ser Phe Ser Phe Ser Gly Leu
 740 745 750

 Trp Ala Lys Val Ile Ile Lys Asn Ser His Gly Val Val Leu Phe Glu
 755 760 765

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

 Thr Thr Ser Asn Lys Glu Gly Phe Phe Ile Glu Leu Thr Gly Asp Ser
 785 790 795 800

 Arg Gly Gly Phe Gly Ser Phe Arg Asp Phe Ser Met Lys Glu Lys Phe
 805 810 815

 Glu

 <210> 7
 <211> 2394
 <212> ADN
 <213> Paenibacillus popilliae

 <220>
 <221> đặc điểm mới
 <222> (1)..(2394)
 <223> Trình tự ADN thu được từ chủng Paenibacillus popilliae
 DSC007648 mã hóa TIC7472.

 <400> 7
 atgaagcaga ataataattt tagtgtaagg gccttaccaa gttttattga tgtttttaat
 60

 ggaatttatg attttgccac tggcattcaa gatattttta acatgatttt tggaacagat
 120

 acaggtgatc taacactaga agaagtttta aaaaatcaag agttacttta tgatatttct
 180

ggtaaacttg aggggattag tggagaccta agtgagatta ttgcgcaggg aaatttgaat
240

acagaattag ctaaggaatt gctaaaaatc gctaattgagc agaacaacgt attaactgat
300

gttaataaca aactcaatgc gataaattcg atgctccaca tctatcttcc taaaattaca
360

aatatgttaa gcgatgttat gaaacagaat tatgctctga gtcttcaaatt agaatatctc
420

agtaaacaac tacaggagat atcagataaa cttgatgtta ttaacttaaa tgtactcatt
480

aactctacac tcacagaaat cactcctgct tatcaacgta ttaaatatgt aaatgaaaaa
540

tttgatgaat taactcttgc tacagaaaaa actctaagag caaaacaagg tagcgaagac
600

attattgcta atgatactct tgaaaattta actgagctaa cagaactagc gaaaagtgt
660

acaaaaaatg acatggatag ttctgagttt tatctccata cattccatga tgtattgatt
720

ggcaataatt tatttggtcg ttccggcttta aaaacagctg cagaattgat tactaaagac
780

gagataaaga cgagtggaag tgagatagga aaagtttata gtttcttaatt tgtactaact
840

tgtctacaag caaaagcctt tctcacttta acggcatgcc gaaaattatt gggcttatca
900

gatattgatt atactaatat tctaaatcag catctaaatg atgaaaagaa tgtatttcgt
960

gataacatac ttcctacact gtccaataaa ttttctaacc ctaattatgt aaaaactata
1020

gtagtgata attatgcaaa agttatttta gaagctgaac caggatatgc tttagttgga
1080

tttgaaatta tcaatgatcg aatcccggta ttaaagcgt ataaagctaa gctaaaacaa
1140

aattatcaag ttgatcatca gtcgttatca gagattgttt atttagatat cgataaacta
1200

ttttgtccaa aaaattctga acaaaaatat tatactaaaa gtctgacatt tctgatggc
1260

tatgttatta ctaagattac ctttgaaaaa aagctgaaca acctaagata tgaggcaaca
1320

gcaaattttt atgaccatc tacaggagat attgatttaa atgagaagca agtggaatct
1380

acttttcttc aagcagatta tatttctata aatgttagtg atgatgatgg tgtttacatg
1440

ccgttaggcg ttatcagcga aacatttttg tctccaatta atagttttga attagaagtt
1500

gacgagaaat cgaaaatctt aactttaaca tgtaaatctt atttacgaga atatttatta
1560

gaatctgatt taataaataa agagacaagc ctcattgctc cgcctaattg ttttatcagt
1620

aatatcgtag aaaattggaa catagaagcg gataatctag aaccatgggt agcaaataac
1680

aagaatgcat atgtcgatag tacaggcggc atagagggat ctaaagctct atttactcaa
1740

ggtgatgggg aattttcaca atttattgga gataaattaa aaccaaatac agattatatt
1800

attcaatata ctgtaaaagg aaaacctgct atttatttaa aaaacaaaaa tactggatat
1860

actatgtacg aagatacaaa cggtagtctt gaagaatttc aaactatagc tgtaaattat
1920

acttcagaaa ctgataccttc acaaacacat ttagttttta aaagtcaaag tggctatgag
1980

gcttgggggg acaactttat tattctagaa tgtaaggcat ttgaaactcc agaaggtcca
2040

gaattgataa aatttgatga ttggattagt tttggtacta cttacattag agatgatgta
2100

cttactatcg atccaagtcg tggagggttat tttagacaat ctcttaaatt agacagctat
2160

tcaacttata atttgagctt ttctttttct ggattatggg ctaagggttat tataaaaaat
2220

tcccacggag tagtattggt tgaaaaagta agtcagcagt cttcatacgt agatattaat
2280

gaaagtttta ctaccacatc aaataaagaa ggatttttta tagaactaac gggcgatagt
2340

cgtgggtggt ttgggtcggt ccgtgatattt tctatgaagg aaaagtttga ataa
2394

<210> 8
<211> 797
<212> PRT
<213> Paenibacillus popilliae

<220>
<221> Đặc điểm mới
<222> (1) .. (797)

<223> Trình tự axit amin của TIC7472 thu được từ trình tự mã hóa mã hóa TIC7472 của chủng *Paenibacillus popilliae* DSC007648.

<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Met Asp Ser Phe Glu Phe Tyr Leu His Thr Phe His Asp Val Leu Ile
 225 230 235 240

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

Ile Thr Lys Asp Glu Ile Lys Thr Ser Gly Ser Glu Ile Gly Lys Val
 260 265 270

Tyr Ser Phe Leu Ile Val Leu Thr Cys Leu Gln Ala Lys Ala Phe Leu
 275 280 285

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

Thr Asn Ile Leu Asn Gln His Leu Asn Asp Glu Lys Asn Val Phe Arg
 305 310 315 320

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

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

Glu Pro Gly Tyr Ala Leu Val Gly Phe Glu Ile Ile Asn Asp Arg Ile
 355 360 365

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

Asp His Gln Ser Leu Ser Glu Ile Val Tyr Leu Asp Ile Asp Lys Leu
 385 390 395 400

Phe Cys Pro Lys Asn Ser Glu Gln Lys Tyr Tyr Thr Lys Ser Leu Thr
 405 410 415

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

Asn Asn Leu Arg Tyr Glu Ala Thr Ala Asn Phe Tyr Asp Pro Ser Thr
 435 440 445

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

Ala Asp Tyr Ile Ser Ile Asn Val Ser Asp Asp Asp Gly Val Tyr Met

23

Ser Thr Tyr Asn Leu Ser Phe Ser Phe Ser Gly Leu Trp Ala Lys Val
725 730 735

Ile Ile Lys Asn Ser His Gly Val Val Leu Phe Glu Lys Val Ser Gln
740 745 750

Gln Ser Ser Tyr Val Asp Ile Asn Glu Ser Phe Thr Thr Thr Ser Asn
755 760 765

Lys Glu Gly Phe Phe Ile Glu Leu Thr Gly Asp Ser Arg Gly Gly Phe
770 775 780

Gly Ser Phe Arg Asp Phe Ser Met Lys Glu Lys Phe Glu
785 790 795

<210> 9
<211> 2418
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit nucleic tái tổ hợp mã hóa protein TIC7472 có đuôi Histidin.

<400> 9
atgaagcaga ataataatTT tagtgtaagg gccttaccaa gttttattga tgtttttaat
60

ggaatttatg attttgccac tggcattcaa gatattttta acatgatttt tggaacagat
120

acaggtgatc taacactaga agaagtttta aaaaatcaag agttacttta tgatatttct
180

ggtaaaccttg aggggattag tggagacctt agtgagatta ttgcgcaggg aaatttgaat
240

acagaattag ctaaggaatt gctaaaaatc gctaatgagc agaacaacgt attaactgat
300

gttaataaca aactcaatgc gataaattcg atgctccaca tctatcttcc taaaattaca
360

aatatgttaa gcgatgttat gaaacagaat tatgctctga gtcttcaa atagaatatctc
420

agtaacaac tacaggagat atcagataaa cttgatgtta ttaacttaaa tgtactcatt
480

aactctacac tcacagaaat cactcctgct tatcaacgta ttaaatatgt aaatgaaaaa
540

tttgatgaat taactcttgc tacagaaaaa actctaagag caaaacaagg tagcgaagac
600

attatttgcta atgatactct tgaaaattta actgagctaa cagaactagc gaaaagtgtgta
660

acaaaaaatg acatggatag ttctgagttt tatctccata cattccatga tgtatttgatt
720

ggcaataatt tatttggtcg ttctggcttta aaaacagctg cagaattgat tactaaagac
780

gagataaaga cgagtggaag tgagatagga aaagtttata gtttcttaat tgtactaact
840

tgtctacaag caaaagcctt tctcacttta acggcatgcc gaaaattatt gggcttatca
900

gatattgatt atactaatat tctaaatcag catctaaatg atgaaaagaa tgtatttcgt
960

gataacatac ttctacact gtccaataaa ttttctaacc ctaattatgt aaaaactata
1020

ggtagtgata attatgcaaa agttatttta gaagctgaac caggatatgc tttagttgga
1080

tttgaaatta tcaatgatcg aatcccggtt ttaaaagcgt ataaagctaa gctaaaacaa
1140

aattatcaag ttgatcatca gtctgttatca gagattgttt atttagatat cgataaacta
1200

ttttgtccaa aaaattctga acaaaaatat tatactaaaa gtctgacatt tcctgatggc
1260

tatgttatta ctaagattac ctttgaaaaa aagctgaaca acctagata tgaggcaaca
1320

gcaaattttt atgacccatc tacaggagat attgatttaa atgagaagca agtggaatct
1380

acttttcttc aagcagatta tattttctata aatgttagtg atgatgatgg tgtttacatg
1440

ccgttaggcg ttatcagcga aacatttttg tctccaatta atagttttga attagaagtt
1500

gacgagaaat cgaaaatctt aactttaaca tgtaaactctt atttacgaga atatttatta
1560

gaatctgatt taataaataa agagacaagc ctcatgtctc cgcctaattgt ttttatcagt
1620

aatatcgtag aaaattggaa catagaagcg gataatctag aaccatgggt agcaaataac
1680

aagaatgcat atgtcgatag tacaggcggc atagagggat ctaaagctct atttactcaa
1740

ggtgatggg aattttcaca atttattgga gataaattaa aaccaaatac agattatatt
1800

attcaatata ctgtaaaagg aaaacctgct atttatttaa aaaacaaaaa tactggatat
1860

actatgtacg aagatacaaa cggtagttct gaagaatttc aaactatagc tgtaaattat
1920

acttcagaaa ctgataccttc acaaacacat ttagttttta aaagtcaaag tggctatgag
1980

gcttggggggg acaactttat tattctagaa tgtaaggcat ttgaaactcc agaaggcca
2040

gaattgataa aatttgatga ttggattagt tttggtacta cttacattag agatgatga
2100

cttactatcg atccaagtcg tggaggttat tttagacaat ctcttaaatt agacagctat
2160

tcaacttata atttgagctt ttctttttct ggattatggg ctaaggttat tataaaaaat
2220

tcccacggag tagtattggt tgaaaaagta agtcagcagt cttcatatcg agatattaat
2280

gaaagtttta ctaccacatc aaataaagaa ggatttttta tagaactaac gggcgatag
2340

cgtggtgggt ttgggtcggt ccgtgatttt tctatgaagg aaaagtttga acaccacat
2400

cacgctcacc atcactga
2418

<210> 10

<211> 805

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của protein TIC7472 có đuôi Histidin.

<400> 10

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

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

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

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

Gly	Ile	Ser	Gly	Asp	Leu	Ser	Glu	Ile	Ile	Ala	Gln	Gly	Asn	Leu	Asn
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

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

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

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

Glu Pro Gly Tyr Ala Leu Val Gly Phe Glu Ile Ile Asn Asp Arg Ile
 355 360 365

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

Asp His Gln Ser Leu Ser Glu Ile Val Tyr Leu Asp Ile Asp Lys Leu
 385 390 395 400

Phe Cys Pro Lys Asn Ser Glu Gln Lys Tyr Tyr Thr Lys Ser Leu Thr
 405 410 415

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

Asn Asn Leu Arg Tyr Glu Ala Thr Ala Asn Phe Tyr Asp Pro Ser Thr
 435 440 445

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

Ala Asp Tyr Ile Ser Ile Asn Val Ser Asp Asp Asp Gly Val Tyr Met
 465 470 475 480

Pro Leu Gly Val Ile Ser Glu Thr Phe Leu Ser Pro Ile Asn Ser Phe
 485 490 495

Glu Leu Glu Val Asp Glu Lys Ser Lys Ile Leu Thr Leu Thr Cys Lys
 500 505 510

Ser Tyr Leu Arg Glu Tyr Leu Leu Glu Ser Asp Leu Ile Asn Lys Glu
 515 520 525

Thr Ser Leu Ile Ala Pro Pro Asn Val Phe Ile Ser Asn Ile Val Glu
 530 535 540

Asn Trp Asn Ile Glu Ala Asp Asn Leu Glu Pro Trp Val Ala Asn Asn
 545 550 555 560

Lys Asn Ala Tyr Val Asp Ser Thr Gly Gly Ile Glu Gly Ser Lys Ala
 565 570 575

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

Leu Lys Pro Asn Thr Asp Tyr Ile Ile Gln Tyr Thr Val Lys Gly Lys
 595 600 605

Pro Ala Ile Tyr Leu Lys Asn Lys Asn Thr Gly Tyr Thr Met Tyr Glu
 610 615 620

Asp Thr Asn Gly Ser Ser Glu Glu Phe Gln Thr Ile Ala Val Asn Tyr
 625 630 635 640

Thr Ser Glu Thr Asp Pro Ser Gln Thr His Leu Val Phe Lys Ser Gln
 645 650 655

Ser Gly Tyr Glu Ala Trp Gly Asp Asn Phe Ile Ile Leu Glu Cys Lys
 660 665 670

Ala Phe Glu Thr Pro Glu Gly Pro Glu Leu Ile Lys Phe Asp Asp Trp
 675 680 685

Ile Ser Phe Gly Thr Thr Tyr Ile Arg Asp Asp Val Leu Thr Ile Asp
 690 695 700

Pro Ser Arg Gly Gly Tyr Phe Arg Gln Ser Leu Lys Leu Asp Ser Tyr
 705 710 715 720

Ser Thr Tyr Asn Leu Ser Phe Ser Phe Ser Gly Leu Trp Ala Lys Val
 725 730 735

Ile Ile Lys Asn Ser His Gly Val Val Leu Phe Glu Lys Val Ser Gln
 740 745 750

Gln Ser Ser Tyr Val Asp Ile Asn Glu Ser Phe Thr Thr Thr Ser Asn
 755 760 765

Lys Glu Gly Phe Phe Ile Glu Leu Thr Gly Asp Ser Arg Gly Gly Phe
 770 775 780

Gly Ser Phe Arg Asp Phe Ser Met Lys Glu Lys Phe Glu His His His
 785 790 795 800

His Ala His His His
805

<210> 11
<211> 2394
<212> ADN
<213> *Paenibacillus popilliae*

<220>
<221> đặc điểm mới
<222> (1)..(2394)
<223> Trình tự ADN thu được từ chủng *Paenibacillus popilliae*
DSC008493 mã hóa TIC7473.

<400> 11
atgaagcaga ataataattt tagtgtaagg gccttaccaa gttttattga tgtttttaat
60

ggaatttatg attttgccac tggcattcaa gatattttta acatgatttt tggaacagat
120

acaggtgatc taacactaga agaagtttta aaaaatcaag agttacttta tgatatttct
180

ggtaaacttg aggggattag tggagacctt agtgagatta ttgcgcaggg aaatttgaat
240

acagaattag ctaaggaatt gctaaaaatc gctaattgagc agaacaacgt attaaactgat
300

gttaataaca aactcaatgc gataaattcg atgctccaca tctatcttcc taaaattaca
360

aatatgttaa gcgatgttat gaaacagaat tatgctctga gtcttcaaat agaatatctc
420

agtaacaac tacaggagat atcagataaa cttgatgtta ttaacttaaa tgtactcatt
480

aactctacac tcacagaaat cactcctgct tatcaacgta ttaaataatgt aaatgaaaaa
540

tttgatgaat taactcttgc tacagaaaaa actctaagag caaaacaagg tagcgaagac
600

attattgcta atgatactct tgaaaattta actgagctaa cagaactagc gaaaagtgt
660

acaaaaaatg acatggatag tttcgagttt tatctccata cattccatga tgtattgatt
720

ggcaataatt tatttggtcg ttcggcttta aaaacagctg cagaattgat tactaaagac
780

gagataaaga cgagtggaag tgagatagga aaagtttata gtttcttaat tgtactaact
840

tgtctacaag caaaagcctt tctcacttta acggcatgcc gaaaattatt gggcttatca
900

gatattgatt atactaatat tctaaatcag catctaaatg atgaaaagaa tgtatttcgt
960

gataacatac ttctacact gtccaataaa ttttctaacc ctaattatgt aaaaactata
1020

ggtagtgata attatgcaaa agttatttta gaagctgaac caggatatgc tttagttgga
1080

tttgaaatta tcaatgatcg aatcccggtta ttaaaagcgt ataaagctaa gctaaaacaa
1140

aattatcaag ttgatcatca gtcgttatca gagattgttt atttagatat cgataaacta
1200

ttttgtccaa aaaattctga acaaaaatat tataactaaa gtctgacatt tcctgatggc
1260

tatgttatta ctaagattac ctttgaaaaa aagctgaaca acctaagata tgaggcaaca
1320

gcaaattttt atgaccatc tacaggagat attgatttaa atgagaagca agtggaatct
1380

acttttcttc aagcagatta tatttctata aatgttagtg atgatgatgg tgtttacatg
1440

ccgttaggcg ttatcagcga aacatttttg tctccaatta atagttttga attagaagtt
1500

gacgagaaat cgaaaatctt aactttaaca tgtaaactct atttacgaga atatttatta
1560

gaatctgatt taataaataa agagacaagc ctcattgctc cgcctaattgt ttttatcagt
1620

aatatcgtag aaaattggaa catagaagcg gataatctag aaccatgggt agcaaataac
1680

aagaatgcat atgtcgatag tacaggcggc atagagggat ctaaagctct atttactcaa
1740

ggtgatgggg aattttcaca atttattgga gataaattaa aaccaaatac agattatatt
1800

attcaatata ctgtaaaagg aaaacctgct atttatttaa aaaacaaaaa tactggatat
1860

actatgtacg aagatacaaa cggtagttct gaagaatttc aaactatagc tgtaaattat
1920

acttcagaaa ctgatccttc acaaacacat ttagttttta aaagtcaaag tggctatgag
1980

gcttgggggg acaactttat tattctagaa tgtaaggcat ttgaaactcc agaaggtcca
2040

gaattgataa aatttgatga ttggattagt tttgtacta cttacattag agatgatgta
2100

cttactatcg atccaagtcg tggaggttat tttagacaat ctcttaaatt agacagctat
2160

tcaacttata atttgagctt ttctttttct ggattatggg ctaaggttat tataaaaaat
2220

tcccacggag tagtattggt tgaaaaagta agtcagcagt cttcatatcg agatattagt
2280

gaaagtttta ctaccacatc aaataaagaa ggatttttta tagaactaac gggcgatagt
2340

cgtggtggtt ttgggtcggt ccgtgatttt tctatgaagg aaaagtttga ataa
2394

<210> 12

<211> 797

<212> PRT

<213> Paenibacillus popilliae

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM MỚI

<222> (1)..(797)

<223> Trình tự axit amin của TIC7473 thu được từ trình tự mã hóa mã hóa TIC7473 của chủng Paenibacillus popilliae DSC008493.

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Met Asp Ser Phe Glu Phe Tyr Leu His Thr Phe His Asp Val Leu Ile
 225 230 235 240

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

Ile Thr Lys Asp Glu Ile Lys Thr Ser Gly Ser Glu Ile Gly Lys Val
 260 265 270

Tyr Ser Phe Leu Ile Val Leu Thr Cys Leu Gln Ala Lys Ala Phe Leu
 275 280 285

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

Thr Asn Ile Leu Asn Gln His Leu Asn Asp Glu Lys Asn Val Phe Arg
 305 310 315 320

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

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

Glu Pro Gly Tyr Ala Leu Val Gly Phe Glu Ile Ile Asn Asp Arg Ile
 355 360 365

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

Asp His Gln Ser Leu Ser Glu Ile Val Tyr Leu Asp Ile Asp Lys Leu
 385 390 395 400

Phe Cys Pro Lys Asn Ser Glu Gln Lys Tyr Tyr Thr Lys Ser Leu Thr
 405 410 415

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

Asn Asn Leu Arg Tyr Glu Ala Thr Ala Asn Phe Tyr Asp Pro Ser Thr
 435 440 445

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

Ala Asp Tyr Ile Ser Ile Asn Val Ser Asp Asp Asp Gly Val Tyr Met
 465 470 475 480

Pro Leu Gly Val Ile Ser Glu Thr Phe Leu Ser Pro Ile Asn Ser Phe
 485 490 495

Glu Leu Glu Val Asp Glu Lys Ser Lys Ile Leu Thr Leu Thr Cys Lys
 500 505 510

Ser Tyr Leu Arg Glu Tyr Leu Leu Glu Ser Asp Leu Ile Asn Lys Glu
 515 520 525

Thr Ser Leu Ile Ala Pro Pro Asn Val Phe Ile Ser Asn Ile Val Glu
 530 535 540

Asn Trp Asn Ile Glu Ala Asp Asn Leu Glu Pro Trp Val Ala Asn Asn
 545 550 555 560

Lys Asn Ala Tyr Val Asp Ser Thr Gly Gly Ile Glu Gly Ser Lys Ala
 565 570 575

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

Leu Lys Pro Asn Thr Asp Tyr Ile Ile Gln Tyr Thr Val Lys Gly Lys
 595 600 605

Pro Ala Ile Tyr Leu Lys Asn Lys Asn Thr Gly Tyr Thr Met Tyr Glu

```

        610                615                620

Asp Thr Asn Gly Ser Ser Glu Glu Phe Gln Thr Ile Ala Val Asn Tyr
625                630                635                640

Thr Ser Glu Thr Asp Pro Ser Gln Thr His Leu Val Phe Lys Ser Gln
        645                650                655

Ser Gly Tyr Glu Ala Trp Gly Asp Asn Phe Ile Ile Leu Glu Cys Lys
        660                665                670

Ala Phe Glu Thr Pro Glu Gly Pro Glu Leu Ile Lys Phe Asp Asp Trp
        675                680                685

Ile Ser Phe Gly Thr Thr Tyr Ile Arg Asp Asp Val Leu Thr Ile Asp
        690                695                700

Pro Ser Arg Gly Gly Tyr Phe Arg Gln Ser Leu Lys Leu Asp Ser Tyr
705                710                715                720

Ser Thr Tyr Asn Leu Ser Phe Ser Phe Ser Gly Leu Trp Ala Lys Val
        725                730                735

Ile Ile Lys Asn Ser His Gly Val Val Leu Phe Glu Lys Val Ser Gln
        740                745                750

Gln Ser Ser Tyr Val Asp Ile Ser Glu Ser Phe Thr Thr Thr Ser Asn
        755                760                765

Lys Glu Gly Phe Phe Ile Glu Leu Thr Gly Asp Ser Arg Gly Gly Phe
        770                775                780

Gly Ser Phe Arg Asp Phe Ser Met Lys Glu Lys Phe Glu
785                790                795

<210> 13
<211> 2418
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit nucleic tái tổ hợp mã hóa protein TIC7473 có đuôi
Histidin.

<400> 13
atgaagcaga ataataattt tagtgtaagg gccttaccaa gttttattga tgtttttaat
60

```

ggaatttatg attttgccac tggcattcaa gatattttta acatgatttt tggaacagat
120

acaggtgatc taacactaga agaagtttta aaaaatcaag agttacttta tgatattttct
180

ggtaaacttg aggggattag tggagaccta agtgagatta ttgcgcaggg aaatttgaat
240

acagaattag ctaaggaatt gctaaaaatc gctaattgagc agaacaacgt attaactgat
300

gttaataaca aactcaatgc gataaattcg atgctccaca tctatcttcc taaaattaca
360

aatatgttaa gcgatgttat gaaacagaat tatgctctga gtcttcaa atagaatatctc
420

agtaaacaac tacaggagat atcagataaa cttgatgtta ttaacttaaa tgtactcatt
480

aactctacac tcacagaaat cactcctgct tatcaacgta ttaaatatgt aaatgaaaaa
540

tttgatgaat taactcttgc tacagaaaaa actctaagag caaaacaagg tagcgaagac
600

attattgcta atgatactct tgaaaattta actgagctaa cagaactagc gaaaagtgt
660

acaaaaaatg acatggatag tttcgagttt tatctccata cattccatga tgtattgatt
720

ggcaataatt tatttggctg ttcggcttta aaaacagctg cagaattgat tactaaagac
780

gagataaaga cgagtggaag tgagatagga aaagtattata gtttctta atgtactaact
840

tgtctacaag caaaagcctt tctcacttta acggcatgcc gaaaattatt gggcttatca
900

gatattgatt atactaatat tctaaatcag catctaaatg atgaaaagaa tgtatttcgt
960

gataacatac ttctacact gtccaataaa ttttctaacc ctaattatgt aaaaactata
1020

ggtagtgata attatgcaaa agttattttta gaagctgaac caggatatgc tttagttgga
1080

tttgaaatta tcaatgatcg aatcccggta ttaaaagcgt ataaagctaa gctaaaacaa
1140

aattatcaag ttgatcatca gtcgttatca gagattgttt atttagatat cgataaacta
1200

ttttgtccaa aaaattctga acaaaaatat tatactaaaa gtctgacatt tctgatggc
1260

tatgttatta ctaagattac ctttgaaaaa aagctgaaca acctaagata tgaggcaaca
1320

gcaaattttt atgacccatc tacaggagat attgatttaa atgagaagca agtggaatct
1380

acttttcttc aagcagatta tatttctata aatgttagtg atgatgatgg tgtttacatg
1440

ccgttaggcg ttatcagcga aacatttttg tctccaatta atagttttga attagaagtt
1500

gacgagaaat cgaaaatctt aactttaaca tgtaaactctt atttacgaga atatttatta
1560

gaatctgatt taataaataa agagacaagc ctcattgctc cgcctaattgt ttttatcagt
1620

aatatcgtag aaaattggaa catagaagcg gataatctag aaccatgggt agcaaataac
1680

aagaatgcat atgtcgatag tacaggcggc atagagggat ctaaagctct atttactcaa
1740

ggtgatgggg aattttcaca atttattgga gataaattaa aaccaaatac agattatatt
1800

attcaatata ctgtaaaagg aaaacctgct atttatttaa aaaacaaaaa tactggatat
1860

actatgtacg aagatacaaa cggtagtctt gaagaatttc aaactatagc tgtaaattat
1920

acttcagaaa ctgataccttc acaaacacat ttagttttta aaagtcaaag tggctatgag
1980

gcttgggggg acaactttat tattctagaa tgtaaggcat ttgaaactcc agaaggcca
2040

gaattgataa aatttgatga ttggattagt tttggtacta cttacattag agatgatgta
2100

cttactatcg atccaagtcg tggaggttat tttagacaat ctcttaaatt agacagctat
2160

tcaacttata atttgagctt ttctttttct ggattatggg ctaaggttat tataaaaaat
2220

tcccacggag tagtattggt tgaaaaagta agtcagcagt cttcatatcgt agatattagt
2280

gaaagtttta ctaccacatc aaataaagaa ggatttttta tagaactaac gggcgatagt
2340

cgtggtggtt ttgggtcggt ccgtgatttt tctatgaagg aaaagtttga acaccaccat
2400

cacgctcacc atcactga
2418

<210> 14
 <211> 805
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự axit amin của protein TIC7473 có đuôi Histidin.

<400> 14

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Met Asp Ser Phe Glu Phe Tyr Leu His Thr Phe His Asp Val Leu Ile
 225 230 235 240

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

Ile Thr Lys Asp Glu Ile Lys Thr Ser Gly Ser Glu Ile Gly Lys Val
 260 265 270

Tyr Ser Phe Leu Ile Val Leu Thr Cys Leu Gln Ala Lys Ala Phe Leu
 275 280 285

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

Thr Asn Ile Leu Asn Gln His Leu Asn Asp Glu Lys Asn Val Phe Arg
 305 310 315 320

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

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

Glu Pro Gly Tyr Ala Leu Val Gly Phe Glu Ile Ile Asn Asp Arg Ile
 355 360 365

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

Asp His Gln Ser Leu Ser Glu Ile Val Tyr Leu Asp Ile Asp Lys Leu
 385 390 395 400

Phe Cys Pro Lys Asn Ser Glu Gln Lys Tyr Tyr Thr Lys Ser Leu Thr
 405 410 415

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

Asn Asn Leu Arg Tyr Glu Ala Thr Ala Asn Phe Tyr Asp Pro Ser Thr
 435 440 445

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

Ala Asp Tyr Ile Ser Ile Asn Val Ser Asp Asp Asp Gly Val Tyr Met
 465 470 475 480

Pro Leu Gly Val Ile Ser Glu Thr Phe Leu Ser Pro Ile Asn Ser Phe
 485 490 495

Glu Leu Glu Val Asp Glu Lys Ser Lys Ile Leu Thr Leu Thr Cys Lys
 500 505 510

Ser Tyr Leu Arg Glu Tyr Leu Leu Glu Ser Asp Leu Ile Asn Lys Glu
 515 520 525

Thr Ser Leu Ile Ala Pro Pro Asn Val Phe Ile Ser Asn Ile Val Glu
 530 535 540

Asn Trp Asn Ile Glu Ala Asp Asn Leu Glu Pro Trp Val Ala Asn Asn
 545 550 555 560

Lys Asn Ala Tyr Val Asp Ser Thr Gly Gly Ile Glu Gly Ser Lys Ala
 565 570 575

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

Leu Lys Pro Asn Thr Asp Tyr Ile Ile Gln Tyr Thr Val Lys Gly Lys
 595 600 605

Pro Ala Ile Tyr Leu Lys Asn Lys Asn Thr Gly Tyr Thr Met Tyr Glu
 610 615 620

Asp Thr Asn Gly Ser Ser Glu Glu Phe Gln Thr Ile Ala Val Asn Tyr
 625 630 635 640

Thr Ser Glu Thr Asp Pro Ser Gln Thr His Leu Val Phe Lys Ser Gln
 645 650 655

Ser Gly Tyr Glu Ala Trp Gly Asp Asn Phe Ile Ile Leu Glu Cys Lys
 660 665 670

Ala Phe Glu Thr Pro Glu Gly Pro Glu Leu Ile Lys Phe Asp Asp Trp
 675 680 685

Ile Ser Phe Gly Thr Thr Tyr Ile Arg Asp Asp Val Leu Thr Ile Asp

690

695

700

Pro Ser Arg Gly Gly Tyr Phe Arg Gln Ser Leu Lys Leu Asp Ser Tyr
 705 710 715 720

Ser Thr Tyr Asn Leu Ser Phe Ser Phe Ser Gly Leu Trp Ala Lys Val
 725 730 735

Ile Ile Lys Asn Ser His Gly Val Val Leu Phe Glu Lys Val Ser Gln
 740 745 750

Gln Ser Ser Tyr Val Asp Ile Ser Glu Ser Phe Thr Thr Thr Ser Asn
 755 760 765

Lys Glu Gly Phe Phe Ile Glu Leu Thr Gly Asp Ser Arg Gly Gly Phe
 770 775 780

Gly Ser Phe Arg Asp Phe Ser Met Lys Glu Lys Phe Glu His His His
 785 790 795 800

His Ala His His His
 805

<210> 15

<211> 2397

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự ADN tổng hợp được thiết kế để biểu hiện ở thực vật mã hóa TIC7472PL với gốc Alanin bổ sung được gắn xen ở vị trí 2 so với trình tự axit amin TIC7472 vi khuẩn thu được từ chủng *Paenibacillus popilliae* DSC007648 mã hóa TIC7472.

<400> 15

atggctaagc agaacaacaa cttcagcgtg cgggcgctcc cgtccttcat cgacgtcttc
 60

aacggcatct acgacttcgc cacgggcac caggacatct tcaacatgat ctttgggacg
 120

gataccggcg acctcaccct cgaagaagtc cttaagaacc aggaactcct gtacgacatc
 180

agcgggaagc tggagggcat ctcaggcgac ctgtcggaga tcatcgccca gggcaacctc
 240

aacacggagc tcgccaagga actgcttaag atcgccaacg agcagaacaa cgttctgacc
 300

gacgtcaaca acaagctcaa cgcgatcaac tccatgctcc acatctacct gccgaagatc
 360

accaacatgc tgagcgacgt catgaagcag aactacgcgc tgtcgctcca gatcgagtat
420

ttgagcaagc agctccagga aatctcggac aagctcgacg tgataaacct gaacgtcctc
480

atcaactcca cgctgaccga gatcacaccc gcctaccagc gcatcaagta cgtcaacgag
540

aagttcgacg agctgacgct ggcgaccgag aagaccctgc gggcgaagca aggcagcgag
600

gacattattg cgaacgacac gcttgagaat ctacggagc tgactgagct ggcgaagtcc
660

gtgaccaaga acgacatgga ctggttcgag ttctacctac acacctttca tgacgtcctg
720

atcggaaca acctcttcgg gcgcagcgcg ctcaagaccg ctgcggagct tatcacgaag
780

gacgagatca agacctccgg ctcgagatc gggaagggtg acagcttctt gatcgtgttg
840

acgtgcctcc aggccaaggc gttcctcacg ctactgcct gccggaagct cttgggcctc
900

tcagacatcg actacacgaa catcctcaac cagcacctca acgacgagaa gaacgtcttc
960

cgcgacaaca tccttcggac gctttcgaat aagttcagca acccgaacta cgtgaagacc
1020

atcggcagcg ataactacgc gaagggtgata ctggaggcgg agcccggtta cgccctggtc
1080

ggcttcgaga tcattaacga ccgtatcccc gtcctcaagg cgtacaagga caagctcaag
1140

cagaactacc aagtggacca ccagtccctc tccgagatcg tgtacctgga catcgacaag
1200

ctgttctgcc cgaagaacag cgagcagaag tactacacca agtcgctgac cttcccggac
1260

gggtacgtca tcacaaagat cactttcgag aagaagctga acaacctgcg ctacgaggcg
1320

acggcgaact tctacgaccc gagcaccggt gacatcgacc tgaacgagaa gcaagtggag
1380

tccacgttcc tccaggcgga ctacatctct atcaactgta gcgacgacga cggcgtgtac
1440

atgccgctgg gcgtcatctc cgagaccttc ctctctcca tcaactcgtt cgagcttgaa
1500

gtggacgaga aatcgaagat cctgacgctg acctgcaaga gctacctgcg cgagtacctg
1560

ctggagtccg acctcatcaa caaggagacc agcctgacgc cgccgcctaa tgtgttcac
1620

agcaacatcg tggagaactg gaacatcgag gccgacaatt tggaaccctg ggctcgccaac
1680

aacaagaacg cctacgtgga cagcacgggc ggcatcgagg gctccaaggc cctgtttacc
1740

cagggagacg gcgagttcag tcagttcatc gccgacaagc tcaagcccaa cacggactac
1800

atcatccagt acaccgtcaa aggggaagcct gcgatctacc tcaagaacaa gaacaccgga
1860

tacaogatgt acgaggacac caacggctcc tcggaggagt tccagaccat cgcggtgaac
1920

tacacctccg agacggaccc gtcccagacg cacctcgtgt tcaagtccca gtcaggctac
1980

gaagcgtggg gtgacaactt tatcatcctg gactgcaagg cgttcgagac gcccgagggc
2040

ccggaactca tcaagttcga cgactggatc tcattcggca ccacgtacat ccgggacgac
2100

gtcctcacca tcgaccgctc tcggggcggc tacttcgcc agtccctcaa gctcgactcg
2160

tacagcacgt acaacctgtc cttctctttc agcgggctgt gggccaaggt catcatcaag
2220

aactcgcatg gcgtcgctct cttcgagaag gtgtcccagc agagttccta cgtggacatc
2280

aacgagagct tcacgacgac gtccaacaag gagggattct tcacgagct gaccggcgac
2340

agtcgaggag gcttcgggag cttccgggac ttctccatga aggagaagtt cgagtag
2397

<210> 16

<211> 798

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của TIC7472PL được mã hóa bởi trình tự ADN tổng hợp trong đó gốc Alanin bổ sung được gắn xen ở vị trí 2 so với trình tự axit amin TIC7472 vi khuẩn.

<400> 16

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

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

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

Val Tyr Ser Phe Leu Ile Val Leu Thr Cys Leu Gln Ala Lys Ala Phe
 275 280 285

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

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

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

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

Ala Glu Pro Gly Tyr Ala Leu Val Gly Phe Glu Ile Ile Asn Asp Arg
 355 360 365

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

Val Asp His Gln Ser Leu Ser Glu Ile Val Tyr Leu Asp Ile Asp Lys
 385 390 395 400

Leu Phe Cys Pro Lys Asn Ser Glu Gln Lys Tyr Tyr Thr Lys Ser Leu
 405 410 415

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

Leu Asn Asn Leu Arg Tyr Glu Ala Thr Ala Asn Phe Tyr Asp Pro Ser
 435 440 445

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

Gln Ala Asp Tyr Ile Ser Ile Asn Val Ser Asp Asp Asp Gly Val Tyr
 465 470 475 480

Met Pro Leu Gly Val Ile Ser Glu Thr Phe Leu Ser Pro Ile Asn Ser
 485 490 495

Phe Glu Leu Glu Val Asp Glu Lys Ser Lys Ile Leu Thr Leu Thr Cys
 500 505 510

Lys Ser Tyr Leu Arg Glu Tyr Leu Leu Glu Ser Asp Leu Ile Asn Lys
 515 520 525

Glu Thr Ser Leu Ile Ala Pro Pro Asn Val Phe Ile Ser Asn Ile Val
 530 535 540

Glu Asn Trp Asn Ile Glu Ala Asp Asn Leu Glu Pro Trp Val Ala Asn
 545 550 555 560

Asn Lys Asn Ala Tyr Val Asp Ser Thr Gly Gly Ile Glu Gly Ser Lys
 565 570 575

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

Lys Leu Lys Pro Asn Thr Asp Tyr Ile Ile Gln Tyr Thr Val Lys Gly
 595 600 605

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

Glu Asp Thr Asn Gly Ser Ser Glu Glu Phe Gln Thr Ile Ala Val Asn
 625 630 635 640

Tyr Thr Ser Glu Thr Asp Pro Ser Gln Thr His Leu Val Phe Lys Ser
 645 650 655

Gln Ser Gly Tyr Glu Ala Trp Gly Asp Asn Phe Ile Ile Leu Glu Cys
 660 665 670

Lys Ala Phe Glu Thr Pro Glu Gly Pro Glu Leu Ile Lys Phe Asp Asp
 675 680 685

Trp Ile Ser Phe Gly Thr Thr Tyr Ile Arg Asp Asp Val Leu Thr Ile
 690 695 700

Asp Pro Ser Arg Gly Gly Tyr Phe Arg Gln Ser Leu Lys Leu Asp Ser
 705 710 715 720

Tyr Ser Thr Tyr Asn Leu Ser Phe Ser Phe Ser Gly Leu Trp Ala Lys
 725 730 735

Val Ile Ile Lys Asn Ser His Gly Val Val Leu Phe Glu Lys Val Ser
 740 745 750

Gln Gln Ser Ser Tyr Val Asp Ile Asn Glu Ser Phe Thr Thr Thr Ser

755

760

765

Asn Lys Glu Gly Phe Phe Ile Glu Leu Thr Gly Asp Ser Arg Gly Gly
 770 775 780

Phe Gly Ser Phe Arg Asp Phe Ser Met Lys Glu Lys Phe Glu
 785 790 795

<210> 17

<211> 2397

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự ADN tổng hợp được thiết kế để biểu hiện ở thực vật, mã hóa TIC7473PL với gốc Alanin bổ sung được gắn xen ở vị trí 2 so với trình tự axit amin TIC7473 vi khuẩn thu được từ chủng *Paenibacillus popilliae* DSC008493 mã hóa TIC7473.

<400> 17

atggctaagc agaacaacaa cttcagtgtc cgcgccctgc cctccttcat tgacgtcttc
 60

aacggcatct acgacttcgc taccggcatc caggacatct tcaacatgat ctttggaaacg
 120

gataccggcg acctgacgct ggaggaggtg ctcaagaacc aggagctgct ctacgacatc
 180

tccgggaagc tggagggcat ctccggcgac ctgtcggaga tcatcgccca gggcaacctc
 240

aacacggagt tagccaaaga gctgctcaag atcgccaacg agcagaacaa cgtcctgacc
 300

gacgtgaaca acaagctcaa cgccatcaac tccatgctcc acatctacct cccgaagatc
 360

accaacatgc tctccgacgt catgaagcag aactacgccc tcagcctcca gatcgagtag
 420

ctctccaagc agctacagga gatttccgac aagctggacg tcatcaacct gaacgtcctc
 480

atcaattcga cgctcaccga gatcactccg gcgtaccagc gcatcaagta cgtgaacgag
 540

aagttcgacg agctgacgct ggcgactgag aagaccctcc gcgccaacaa gggcagcgag
 600

gacatcatcg ctaacgacac gctggagaac ctgacggaac tcacggagct ggccaagtcc
 660

gtgaccaaga acgacatgga cagcttcgag ttctacctgc atacgttcca cgacgtgctc
 720

atcgggaaca acctgttcgg ccgctccgcc ctcaagacgg ccgccgagct gattacaaag
 780

gacgagatca agacgagcgg ctcgagatc ggcaaggtgt acagtttcct gatcgtcctg
840

acctgtctcc aggctaaggc gttcctgacg ctaaccgcct gccggaagct cctgggcctc
900

agcgacatcg actacaccaa catcctgaac cagcacctga acgacgagaa gaacgtcttc
960

cgcgacaaca tcctgcccac actgtcgaac aagtttctcaa acccgaacta cgtgaagacc
1020

atcgggagcg acaactacgc caaggtgacg ctggaggccg agccgggcta cgcgctgggtg
1080

ggcttcgaga tcatcaacga ccgcatcccg gtcctcaagg cgtacaaggc gaagctcaag
1140

cagaactacc aagtggacca ccagagccta tccgagatcg tgtacctgga catcgacaaa
1200

ctgttctgcc cgaagaactc cgagcagaag tactacacca agtcgctcac cttcccggac
1260

ggctacgtca tcaccaagat cacgttcgag aagaagctca acaacctgcg ttacgaggcg
1320

accgccaaact tctacgaccc gtccaccggc gacatcgacc ttaacgagaa gcaagtcgag
1380

agcaccttcc tccaggccga ctacatctcc atcaacgtct cggacgacga cggcgtgtac
1440

atgccgctgg gcgtcatctc cgagaccttc ctgagcccga tcaacagctt cgagctggag
1500

gtggacgaga agtccaagat cctgacccta acgtgcaaga gctacctcag ggagtacctc
1560

ctggagtccg acctcatcaa caaggagacg agcctgatcg cgctccaaa cgtcttcac
1620

agcaacattg tggagaactg gaacatcgag gcggacaacc tagaaccttg ggtggcgaac
1680

aacaagaacg cctacgtgga cagcaccggc ggcacgagg gcagcaaagc actgttcaact
1740

cagggtgacg gcgagttctc gcagttcatc ggcgacaagc tcaagccaaa caccgactac
1800

atcatccagt acacggtcaa gggcaagcct gctatctacc tcaagaacaa gaacaccggc
1860

tacacgatgt acgaggacac gaacgggtcc agcgaggagt tccagaccat cgccgtgaac
1920

tacaccagcg agaccgaccc gtcccagacc cacctcgtgt tcaagtcgca gagcgggtac
1980

gaggcttggg gagataactt cattatcctg gagtgcaagg cgttcgagac gccggaaggc
2040

ccggagctca tcaagttcga cgactggatc tcgttcggga ccacctacat ccgcgacgac
2100

gtgctcacca tcgacccgag ccgtggcggc tacttccgcc agtccttgaa actcgactcg
2160

tactcgacgt acaacctctc gttcagcttc tcgggcctct gggctaaggt catcatcaag
2220

aactcccacg gcgtcgtcct gttcgagaag gtgtcgcagc agagttcgta cgtggacatc
2280

tcggagtcct tcaccaccac cagcaacaag gagggcttct ttatcgagct cacgggcgac
2340

tcgcgcggcg gcttcggctc gttccgggac tttagtatga aggagaagtt cgagtag
2397

<210> 18

<211> 798

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của TIC7473PL được mã hóa bởi trình tự ADN tổng hợp trong đó gốc Alanin bổ sung được gắn xen vào vị trí 2 so với trình tự axit amin TIC7473 vi khuẩn.

<400> 18

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Tyr Ser Phe Leu Ile Val Leu Thr Cys Leu Gln Ala Lys Ala Phe
 275 280 285

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

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

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

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

Ala Glu Pro Gly Tyr Ala Leu Val Gly Phe Glu Ile Ile Asn Asp Arg
355 360 365

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

Val Asp His Gln Ser Leu Ser Glu Ile Val Tyr Leu Asp Ile Asp Lys
385 390 395 400

Leu Phe Cys Pro Lys Asn Ser Glu Gln Lys Tyr Tyr Thr Lys Ser Leu
405 410 415

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

Leu Asn Asn Leu Arg Tyr Glu Ala Thr Ala Asn Phe Tyr Asp Pro Ser
435 440 445

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

Gln Ala Asp Tyr Ile Ser Ile Asn Val Ser Asp Asp Asp Gly Val Tyr
465 470 475 480

Met Pro Leu Gly Val Ile Ser Glu Thr Phe Leu Ser Pro Ile Asn Ser
485 490 495

Phe Glu Leu Glu Val Asp Glu Lys Ser Lys Ile Leu Thr Leu Thr Cys
500 505 510

Lys Ser Tyr Leu Arg Glu Tyr Leu Leu Glu Ser Asp Leu Ile Asn Lys
515 520 525

Glu Thr Ser Leu Ile Ala Pro Pro Asn Val Phe Ile Ser Asn Ile Val
530 535 540

Glu Asn Trp Asn Ile Glu Ala Asp Asn Leu Glu Pro Trp Val Ala Asn
545 550 555 560

Asn Lys Asn Ala Tyr Val Asp Ser Thr Gly Gly Ile Glu Gly Ser Lys
565 570 575

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

Lys Leu Lys Pro Asn Thr Asp Tyr Ile Ile Gln Tyr Thr Val Lys Gly

595 600 605

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

Glu Asp Thr Asn Gly Ser Ser Glu Glu Phe Gln Thr Ile Ala Val Asn
625 630 635 640

Tyr Thr Ser Glu Thr Asp Pro Ser Gln Thr His Leu Val Phe Lys Ser
645 650 655

Gln Ser Gly Tyr Glu Ala Trp Gly Asp Asn Phe Ile Ile Leu Glu Cys
660 665 670

Lys Ala Phe Glu Thr Pro Glu Gly Pro Glu Leu Ile Lys Phe Asp Asp
675 680 685

Trp Ile Ser Phe Gly Thr Thr Tyr Ile Arg Asp Asp Val Leu Thr Ile
690 695 700

Asp Pro Ser Arg Gly Gly Tyr Phe Arg Gln Ser Leu Lys Leu Asp Ser
705 710 715 720

Tyr Ser Thr Tyr Asn Leu Ser Phe Ser Phe Ser Gly Leu Trp Ala Lys
725 730 735

Val Ile Ile Lys Asn Ser His Gly Val Val Leu Phe Glu Lys Val Ser
740 745 750

Gln Gln Ser Ser Tyr Val Asp Ile Ser Glu Ser Phe Thr Thr Thr Ser
755 760 765

Asn Lys Glu Gly Phe Phe Ile Glu Leu Thr Gly Asp Ser Arg Gly Gly
770 775 780

Phe Gly Ser Phe Arg Asp Phe Ser Met Lys Glu Lys Phe Glu
785 790 795