

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

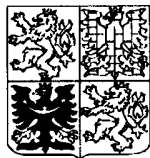
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2326-98

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **26. 01. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **26.01.96**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **96US/9601247**

(33) Země priority: **WO**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16. 12. 97**
(Věstník č. 12/97)

(86) PCT číslo: **PCT/US96/01247**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 97/27305**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 N 15/75
C 12 N 15/32
C 07 K 14/325
A 01 N 63/00
C 12 N 1/21

// (C 12 N 1/21, C 12 R 1:07)

(71) Přihlášovatel:

ABBOTT LABORATORIES, Abbott Park, IL,
US;

(72) Původce:

Adams Lee F., Davis, CA, US;
Widner William R., Davis, CA, US;
Diderichsen Borge K., Birkerød, DK;
Thomas Michael D., Davis, CA, US;
Jorgensen Steen T., Allerød, DK;
Sloma Alan P., Davis, CA, US;
Jorgensen Per L., Copenhagen, DK;

(74) Zástupce:

Jirotková Ivana Ing., Nad Štolou 12, Praha
7, 17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob získávání integrantů kmene
Bacillus thuringiensis**

(57) Anotace:

Způsob získávání integrantu/ů/ kmene
Bacillus thuringiensis. Vynález se dále týká
takových integrantů, kompozic obsahujících
takové integranty, stejně jako způsobů potírá-
ní škůdce/ů/ za použití těchto kompozic.

CZ 2326-98 A3

Způsob získávání integrantů kmene *Bacillus thuringiensis*

Tato patentová přihláška je částečnou pokračovací přihláškou přihlášky pořadového čísla 08/274,608, podané 13. července 1994, která je částečnou pokračovací přihláškou přihlášky pořadového čísla 08/092,338 podané 15. července 1993, nyní vzaté zpět. Tato přihláška je rovněž částečnou pokračovací přihláškou přihlášky 07/835,701, podané 26. května 1992.

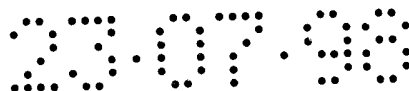
Oblast techniky

Vynález se týká způsobu získávání integrantu(ů) kmene *Bacillus thuringiensis*. Vynález se dále týká takového(ých) integrantu(ů) nebo jeho spor, kompozic obsahujících takový integrant(y), stejně jako způsobů pro potírání škůdce(ů), které těchto kompozic používají.

Dosavadní stav techniky

Škůdci mohou být potírání buď chemickými pesticidy nebo biopesticidy. Avšak vzhledem k širokému spektru účinku mohou chemické pesticidy ničit organismy, které cílem nejsou, jako je užitečný hmyz a paraziti i dravci proti ničivým škůdcům. Mimo to jsou chemické pesticidy obvykle toxické pro zvířata i lidi. Dále pak, jsou-li vybraní škůdci opakovaně vystavováni takovým látkám, může se u nich vyvinout resistance.

Biopesticidy využívají ke zvládnutí zamoření plodin hmyzem, fungálními škůdci a plevelem, přirozeně se vyskytující patogeny. Jako příklad biopesticidu je bakterie, která produkuje substanci, toxickou pro zamořujícího škůdce. Obecně je biopesticid méně škodlivý pro organismy, na které není zaměřen, a pro životní prostředí v celku, než chemické

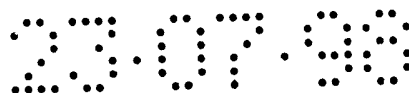


pesticidy.

Nejvíce rozšířeným biopesticidem je *Bacillus thuringiensis*. *Bacillus thuringiensis* je pohyblivá, tyčinkovitá, gram-positivní bakterie, v přírodě široce rozšířená, zejména v půdě a prostředích bohatých na škůdce. Během sporulace produkuje *Bacillus thuringiensis* parasporální krystalickou inklusi(e), která(é) je (jsou) po požití toxická(é) pro citlivé larvy. Inkluse se může (mohou) lišit co do tvaru, počtu a složení. Jsou tvořeny z jednoho nebo více proteinů, nazývaných delta-endotoxiny, které z hlediska velikosti mohou být v rozmezí 27-140 kDa. Delta-endotoxiny jsou ve vnitřnostech larev proteázami obvykle konvertovány na menší (zkrácené) toxické polypeptidy působící destrukci zažívacího traktu a na konec uhynutí škůdce (Höfte a Whiteley, 1989, *Microbiol. Rev.* 53:242-255).

Delta-endotoxiny jsou kódovány *cry* (krystalický protein) geny. *Cry* geny se rozdělují na šest tříd a několik podtříd založených na homologii aminokyselin a pesticidní specificitě. Šest hlavních tříd představují Lepidoptera-specifické (*cryI*), Lepidoptera- a Diptera-specifické (*cryII*), Coleoptera-specifické (*cryIII*), Diptera-specifické (*cryIV*) (Höfte a Whiteley, 1989, *Microbiol. Rev.* 53:242-255), Coleoptera- a Lepidoptera-specifické (označované Tailorem a spol., 1992, *Mol. Microbiol.* 6:1211-1217, jako *cryV* geny); a Nematoda-specifické (označované Feitelsonem a spol., 1992, *Bio/Technology* 10:271-275, jako *cryV* a *cryVI* geny). Některé krystalické delta-endotoxiny *Bacillu thuringiens* jsou také podle publikací pesticidní pro Acari, Hymenoptera, Phthiraptera, Platyhelminthes, Homoptera, Blattodea a Protozoa.

Delta-endotoxiny byly připraveny pomocí metod rekombinantní DNA. Delta-endotoxiny připravené metodami rekombinantní DNA mohou anebo nemusí být v krystalické formě.



Různé *cry* geny byly klonovány, sekvencovány a exprimovány v různých hostitelích, jako je např. *E. coli*. (Schnepf *a spol.*, 1987, *J. Bacteriol.* 169:4110-4118) a *Bacillus subtilis* (Shivakumar *a spol.*, 1986, *J. Bacteriol.* 166:194-204).

Amplifikace *cry* genů bylo dosaženo pomocí *Bacillus subtilis*. Gen delta-endotoxinu *Bacillu thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD73 byl klonován do *Bacillus subtilis* za použití integrativního plasmidu a zmnožen (Calogero *a spol.*, 1989, *Appl. Environ. Microbiol.*, 55:446-453). Avšak, jak bylo bylo zjištěno srovnáním s *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD73, nebyl pozorován vzrůst velikosti krystalů. Kromě toho nebyl popsán rozdíl v pesticidní aktivitě.

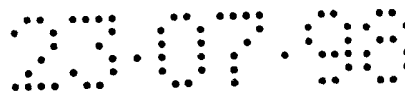
Úroveň exprese genů delta-endotoxinů se zdá být závislá na použitých hostitelských buňkách (Skivakumar *a spol.*, 1989, *Gene* 79:21-23). Skivakumar *a spol.* našli na příklad výrazné difference při expresi *cryIA* a *cryIIA* genů delta-endotoxinů *Bacillu thuringiensis* subsp. *kurstaki* v *Bacillus subtilis* a *Bacillus megaterium*. *CryIA* gen byl exprimován, když byl vícekopiový vektor přítomen v *Bacillus megaterium*, v *Bacillus subtilis* však nikoliv. *CryIIA* byl exprimován v obou hostitelích, ale v *Bacillus megaterium* ve větší míře. Elektronovou mikroskopií byly zkoumány sekce buněk *Bacillus megaterium*, které tyto geny delta-endotoxinů exprimují a v těchto buňkách byla zjištěna přítomnost velkých bipyramidálních krystalů. Není však žádná indikace, že tyto krystaly jsou nějak větší než krystaly nalézané v *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, které normálně tyto geny obsahují. Výsledky bioessayů buněk *Bacillus megaterium*, exprimující tyto geny delta-endotoxinů, naznačují, že zde nebyl žádný vzrůst pesticidální aktivity ve srovnání s *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. A vskutku, pro dosažení stejného efektu v zahubení hmyzu bylo zapotřebí



pětinásobné koncentrace *Bacillu megaterium* než *Bacillu thuringiensis* subsp. *kurstaki*.

Při dřívějších způsobech se hostující buňka transformovala pomocí vektoru rekombinantní DNA, nesoucí sekvenci DNA, která kóduje delta-endotoxin a replikační sekvence DNA. Exprese delta-endotoxinu je závislá na replikaci vektoru rekombinantní DNA v hostiteli. Jestliže se, za účelem produkování žádaného polypeptidu procedurami rekombinantní DNA, bakteriální buňky transformují vektorem rekombinantního plasmidu, který nese vloženou genetickou informaci s kódem pro delta-endotoxin, často se pozorovalo, že se takové plasmidy stávají nestálé, i když samy o sobě mohou být stabilní součástí buňky. Tato nestabilita může nabýt buď formy nestálého trvání plasmidu v buňkách tak, že se plasmid případně vytratí z buněčné populace, anebo tak, že DNA kódující příslušný protein může být plasmidem vymazána. Tradiční způsob řešení předešlého problému bylo pěstování transformovaných buněk za zvoleného omezení, což znamená, typicky v přítomnosti antibiotika, vůči kterému příslušné buňky se staly resistantní díky přítomnosti genu kódujícího produkt zprostředkující resistenci vůči onomu antibiotiku, na plasmidu transformovaném do buněk. Avšak tento přístup není ani ekonomicky vhodný pro produkci ve velkém měřítku vzhledem k vysokým nákladům antibiotik přicházejících v úvahu, ani žádoucí z důvodů ochrany životního prostředí. Použití antibiotik v kultivačních prostředích také více znesnadňuje získání produktu, který by schválily zdravotní a jim podobné úřady.

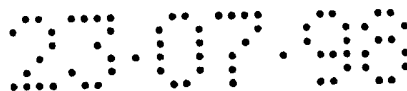
Dříve bylo navrženo, že by plasmidy mohly být stabilizovány tím, že se do nich vloží sekvence DNA kódující partiční funkci, která zajišťuje stejnou distribuci plasmidu do dalších pokolení buněk při buněčném dělení. Alternativní metodou dosažení stabilní dědičnosti klonovaných sekvencí DNA



je provedení opatření pro integraci takových DNA sekvencí do genomu hostující bakterie. Integrace DNA sekvencí přítomných u plasmidových vektorů se může provést tak zvaným "překřížovacím" postupem, jak je popisován např. A. Campbellem, *Advances Genet.* 11, 1962, str. 101-145. Podle tohoto postupu je plasmidový vektor opatřen DNA sekvencí, která je homologická k oblasti bakteriálního genomu, anebo alternativně má dvě homologické sekvence na obou stranách heterologické DNA sekvence, která má být integrována. V následujícím rekombinačním případě jsou homologická sekvence i přilehlé sekvence na vektoru integrovány do hostitelského genomu v oblasti homologie.

V některých případech však bylo zjištěno, že integrované sekvence DNA jsou vymazány z buněk bez voleného omezení, na příklad podobným typem homologického rekombinantního případu jako toho, který je zodpovědný za integraci DNA. Dříve bylo zejména pozorováno, že rekombinace mezi homologickými sekvencemi DNA je stimulována v blízkosti replikační DNA přítomné nebo blízké DNA integrované do genomu hostitelské buňky; viz Ph. Noirot *a spol.*, *J. Mol. Biol.* 196, 1987, str. 39-48 a M. Young a S.D. Ehrlich, *J. Bacteriol.* 171(5), květen 1989, str. 2653-2656.

Předmětem předkládaného vynálezu je proto poskytnout stabilní integraci DNA sekvencí do genomické DNA, např. chromosomu bakteriálních hostitelských buněk, zejména *Bacillus thuringiensis*. Předmětem vynálezu je také vytvořit integranty kmene *Bacillus thuringiensis*, které produkují dostatečná množství delta-endotoxinů. Takové integranty mohou být užitečné pro rozšíření rozsahu hostování *Bacillus thuringiensis* a získání efektivnějších formulací *Bacillus thuringiensis*.



Podstata vynálezu

Vynález se týká způsobů získávání integrantu *Bacillu thuringiensis*, který produkuje nejméně jeden heterologický krystalický endotoxin. Integrant se získává

a) tím, že se do buňky hostitelského kmene *Bacillus thuringiensis* (i) zavede první DNA vektor, obsahující první počátek replikace a nejméně jeden funkční gen kódující nejméně jeden faktor, potřebný pro replikaci plasmidu z řečeného prvního počátku replikace, a s ním (ii) druhý DNA vektor, obsahující druhý počátek replikace, avšak postrádající funkční gen kódující faktor, potřebný pro replikaci plasmidu z druhého počátku replikace, stejně jako sekvenci DNA kódující delta-endotoxin *Bacillu thuringiensis*, sekvenci DNA, která je homologická s oblastí genomu řečeného hostitelského kmene a volitelný signální znak a

(b) kultivací buňky z kroku (a) za selektivních podmínek vedoucích ke ztrátě prvního DNA vektoru a k integraci řečeného druhého DNA vektoru do genomu řečené hostitelské buňky homologickou rekombinací.

V charakteristickém provedení je hostitelským kmenem *Bacillu thuringiensis cry-* kmen.

Předložený vynález se dále týká řečeného integrantu. Sekvence DNA, která kóduje delta-endotoxin *Bacillu thuringiensis*, může být heterologickou DNA sekvencí. V jednom z provedení může integrant kromě obsahu heterologického krystalického delta-endotoxinu obsahovat také homologický krystalický delta-endotoxin, delta-endoxin, který je endogenně produkován hostitelským kmenem *Bacillu thuringiensis*. V jiném provedení může integrant produkovat více než jeden heterologický delta-endotoxin *Bacillu thuringiensis*. V dalším provedení, ve srovnání s odpovídajícím mateřským kmenem, je jako výsledek



amplifikace genu či hyperexprese produkováno veliké množství krystalického delta-endotoxinu s větší pesticidní účinností a případně větší velikostí krystalů. Vynález se také týká pesticidní komposice obsahující takový integrant a pesticidně přijatelný nosič právě tak jako způsobů pro potírání škůdce(ů) při užití takové komposice.

Definice

"Integrant", jak se zde definuje, je kmen *Bacillu thuringiensis*, který obsahuje dodatečný segment DNA (obvykle *cry* gen, gen antibiotické resistance a s plasmidem sdružené DNA) vložený homologickou rekombinací do genomu řečeného kmene.

"Heterologická sekvence DNA", jak se zde definuje, je sekvence DNA, která se v hostitelské buňce *Bacillu thuringiensis* přirozeně nevyskytuje.

"Genom", jak se zde definuje, je veškerá DNA, jak chromosomální tak i plasmid, uvnitř buňky *Bacillu thuringiensis*.

"Mateřský kmen", jak se zde definuje, je kmen, který je zdrojem heterologické sekvence DNA kódující delta-endotoxin *Bacillu thuringiensis*.

"Větší pesticidní účinností", jak se zde definuje, se míní nejméně 1,25-krát větší účinnost proti škůdci, ve smyslu zahubení nebo zakrnění škůdce, než odpovídá mateřskému kmeni. V preferovaném provedení je pesticidní účinnost integrantu mezi kolem 1,5 až kolem 10 násobku pesticidní účinnosti odpovídajícího mateřského kmene *Bacillus thuringiensis*.

"Větším množstvím", jak se zde definuje, je míněno, že integrant produkuje nejméně 1,25-násobné množství krystalického delta-endotoxinu než mateřský kmen.

"Větší velikostí krystalu", jak se zde definuje, se rozumí, že největší plocha krystalu integrantu má nejméně

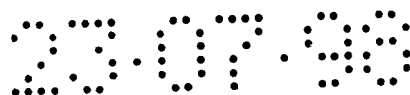


1,2-násobnou plochu povrchu nebo objem krystalu mateřského kmene.

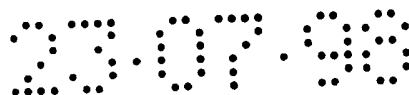
Způsoby získávání integrantů

Integrant podle předloženého vynálezu může být získán systémem "dvouplasmidové" integrace. Tento systém spočívá na prvním čili pomocném plasmidu, který obsahuje původ replikace a nejméně jeden funkční gen kódující nejméně jeden faktor nezbytný pro replikaci plasmidu, např. na teplotu citlivý replikační protein, který působí *in trans*, a druhý vektor čili integrativní plasmid, který v nepřítomnosti pomocného plasmidu nemůže replikovat. Integrativní plasmid podle předloženého vynálezu obsahuje (i) *cry* gen, (ii) oblast homologickou s hostitelským genomem (na příklad 16S rRNA gen nebo gen fosfolipázy C nebo samotný *cry* gen) a (iii) a volitelný signální znak. První plasmid může také obsahovat sekvenci DNA, jež kóduje volitený signální znak, např. znak antibiotické resistance, který se liší od onoho, který je kódován pomocným plasmidem. Pomocný plasmid může být přidáván před anebo současně s integrativním plasmidem.

Při typickém provedení je pomocný plasmid zaveden elektroporací do požadovaného hostitele zahrnujícího, ale neomezujícího se na *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *alesti*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *canadiensis*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *dendrolimus*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *finitimus*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *kenyae*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *subtoxicus*, *Bacillus thuringiensis*



subsp. *toumanoffi*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *toumanoffi*,
Bacillus thuringiensis subsp. *pondicheriensis*, *Bacillus*
thuringiensis subsp. *shandongiensis*, *Bacillus thuringiensis*
 subsp. *sotto*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *nigeriae*,
Bacillus thuringiensis subsp. *yunnanensis*, *Bacillus*
thuringiensis subsp. *dakota*, *Bacillus thuringiensis* subsp.
indiana, *Bacillus thuringiensis* subsp. *tohokuensis*, *Bacillus*
thuringiensis subsp. *kumamotoensis*, *Bacillus thuringiensis*
 subsp. *tochigiensis*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *thompsoni*,
Bacillus thuringiensis subsp. *wuhanensis*, *Bacillus*
thuringiensis subsp. *kyushuensis*, *Bacillus thuringiensis*
 subsp. *ostrinae*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *tolworthi*,
Bacillus thuringiensis subsp. *pakistani*, *Bacillus*
thuringiensis subsp. *japonensis*, *Bacillus thuringiensis*
 subsp. *colmeri*, *Bacillus thuringiensis* subsp.
pondicheriensis, *Bacillus thuringiensis* subsp.
shandongiensis, *Bacillus thuringiensis* subsp. *neoleonensis*,
Bacillus thuringiensis subsp. *coreanensis*, *Bacillus*
thuringiensis subsp. *silo*, *Bacillus thuringiensis* subsp.
mexicanensis a *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*
 a udržován přidáváním zvoleného činidla, na příklad
 antibiotika jako erythromycinu při teplotě, která dovoluje
 vlastní fungování Rep proteinu citlivého na teplotu (např.
 30 °C). Potom se do téhož hostitelského kmene zavede
 integrativní plasmid postrádající funkční replikační protein
 (např. Rep protein) a udržuje se výběrem zvoleného činidla,
 např. chloramfenikolu. Selekcce samotným chloramfenikolem je
 dostatečná, aby byly udržovány oba plasmidy, protože
 integrativní plasmid nemůže existovat bez pomocného plasmidu.
 Růst při vyšší teplotě např. 37 °C nedovoluje replikaci
 pomocného plasmidu. Za nepřítomnosti pomocného plasmidu
 nemůže také replikovat integrativní plasmid kódující
 resistenci chloramfenikolu. Jedinou cestou aby hostitelská



buňka mohla udržet resistenci na chloramfenikol, je tedy integrace integrativního plasmidu Campbellovým způsobem rekombinace v oblasti homologie, kterou sdílí s genomem *Bacillu thuringiensis*. Následkem toho je DNA integrována do genomu hostitelského kmene. V určitém případě je hostitelským kmenem *cry*-kmen. V nejcharakterističtějším případě je hostitelským kmenem kmen *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*.

DNA sekvence kódující delta-endotoxin může být volena ze skupiny obsahující *cryI*, *cryII*, *cryIII*, *cryIV*, *cryV*, nebo *cryVI* geny, avšak neomezuje se to jen na ně. Při jednom z provedení obsahuje delta-endotoxin kódující sekvence DNA gen *cryIC*. *CryIC* gen kóduje delta-endotoxin specifický pro lepidopterové škůdce. Sekvence DNA obsahující *cryIC* gen se dá získat z kmene *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. V nejtypičtějším případě se *cryIC* DNA sekvence získává z *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* kmene EMCC0087.

Plasmidy mohou být vneseny do hostitelského kmene *Bacillu thuringiensis* postupy, které jsou v oboru běžně známy, např. elektroporací, protoplastisací buněk, transdukcí, chemickou transformací a regenerací (Macaluso a Mettus, 1991, *J. Bacteriol.* 173:1353-1356; Crawford a spol., 1987, *J. Bacteriol.* 169:5423-5428; a Battisti a spol., 1985, *J. Bacteriol.* 162:543-550). Simultánní růst při vhodné teplotě, např. při 37 °C nebo vyšší, a vliv antibiotika dává výběr pro integraci plasmidu do genomu hostitelské buňky rekombinací s homologickou oblastí genomu hostitelské buňky. Buňka, která ve svém genomu nese útvar integrované DNA, se pěstuje v prostředí se vzrůstajícími množstvými činidla, které udává výběr volitelného signálního znaku, např. prostředí obsahující antibiotikum, čímž znásobuje volitelný signální znak a nutně také *cry* gen (Albertini a Galizzi, 1985, *J. Bacteriol.* 162:1203-1211).



V preferovaném provedení je DNA kódující delta-endotoxin amplifikována v integrantu. V typickém případě probíhá takové zmnožování přenosem integrantu do media obsahujícího větší množství činidla udávajícího výběr volitelného signálního znaku. Tento krok může být opakován několikrát se vzrůstajícím množstvím činidla udávajícího výběr volitelného signálního znaku.

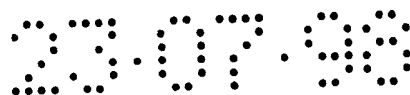
Integrant podle předkládaného vynálezu může být kultivován za použití medií a fermentačních technik v oboru běžných (viz na příklad Rogoff *a spol.*, 1969, *J. Invertebrate Path.* 14:122-129; Dulmage *a spol.*, 1971, *J. Invertebrate Path.* 18:353-358; Dulmage *a spol.* v *Microbial Control of Pests and Plant Diseases*, H.D. Burges (vydavatel), Academic Press, New York, 1980). Po skončení fermentačního cyklu se krystaly delta-endotoxinu(ů) *Bacillu thuringiensis* a spory z fermentační směsi shromáždí způsoby v oboru běžně známými, např. centrifugací.

Čistění spor nebo delta-endotoxinů produkovaných kmenem integrantu podle předkládaného vynálezu může být provedeno různými, v oboru známými způsoby, které zahrnují, aniž by se jen na ně omezovaly, ultrafiltraci, diferenční extrakci, centrifugaci podle gradientu hustoty, chromatografii nebo jiné techniky pro čistění proteinů a/nebo částic.

Účinnost krystalického delta-endotoxinu nebo spor kmene integrantu podle předkládaného vynálezu proti různým škůdcům může být stanovena pomocí biotestů s použitím v oboru známých postupů jako je přidávání umělé diety, potahování umělou dietou, natírání listů, namáčení listů, sprejování olistění a vodního testu.

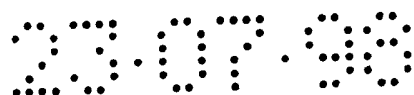
Komposice

Kmeny integrantu *Bacillu thuringiensis*, krystalické endo-toxiny a/nebo spory podle vynálezu mohou být formulovány



do pesticidní(ch) komposice(ic), to je na příklad suspense, disperse, vodná emulze, zásypový pudr, práškový moučka, emulsifikovatelný koncentrát, aerosol nebo opouzdřené mikro či makro granule anebo jakékoliv jiné formulace, které kontrolovaně uvolňují *Bacillus thuringiensis*. Takové komposice lze připravovat přidáním povrchově aktivního činidla, např. dispergačního činidla, emulsifikačního činidla nebo zvlhčovacího činidla nebo inertního nosiče či dalších komponent, které usnadňují manipulaci a aplikaci proti jednotlivým škůdcům, na které jsou zacíleny.

Vhodná povrchově aktivní činidla zahrnují aniontové sloučeniny jako karboxylát, na příklad karboxylát kovu od mastné kyseliny s dlouhým řetězcem; N-acylsarkosinát; mono- nebo diestery fosforečné kyseliny s ethoxyláty mastných alkoholů nebo soli takových esterů; sulfáty mastných alkoholů jako dodecylsulfát sodný, oktadecylsulfát sodný nebo cetylsulfát sodný; sulfáty ethoxylovaných mastných alkoholů; sulfáty ethoxylovaných alkylnolů; ligninsulfonáty; ropné sulfonáty; alkylarensulfonáty jako alkylbenzensulfonáty nebo nižší alkylnaftalensulfonáty, např. butylnaftalensulfonát; soli sulfonovaných kondenzátů naftalenu a formaldehydu nebo soli polyakrylové kyseliny; soli sulfonovaných kondenzátů fenolu a formaldehydu; nebo složitější sulfonáty jako amidsulfonáty, např. sulfonované kondenzační produkty kyseliny olejové a N-methyltaurinu nebo dialkyl sulfojantarany např. dioktyl sulfojantaran sodný. Neionogenní činidla zahrnují kondenzační produkty esterů mastných kyselin, mastných alkoholů, amidů mastných kyselin nebo fenolů substituovaných alkyly masných alkoholů nebo alkenyly s ethylenoxidem a/nebo propylenoxidem, esterů mastných kyselin s ethery polyhydroxyalkoholů, např. estery mastných kyselin a sorbitolu, kondenzační produkty takových esterů s ethylenoxidem, např. esterů mastných kyselin

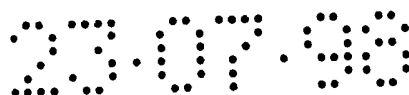


s polyoxyethylensorbitolem, blokových kopolymerů ethylenoxidu a propylenoxidu, acetylenických glykolů jako 2,4,7,9-tetraethyl-5-decin-4,7-diolu nebo ethoxylovaných acetylenických glykolů. Příklady kationaktivních povrchově aktivních činidel představují například acetát, naftenát nebo oleát alifatického mono-, di- nebo polyaminu; kyslík obsahující amin jako aminoxid polyethylenalkylaminu; aminy spojené amidovými skupinami získávané kondenzací karboxylových kyselin s di- nebo polyaminy anebo kvarterní amoniové soli.

Příklady inertních materiálů zahrnují anorganické minerály jako fylosilikáty, uhličitany, sírany, fosfáty; organické materiály jako cukry, škroby nebo cyklodextriny; nebo rostlinné materiály jako většina kukuřičných palic, slupky rýže, skořápky ořechů, kukuřičná mouka, peletisované zrní a celulozová vlákna.

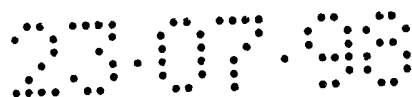
Komposice podle předkládaného vynálezu mohou být ve vhodné formě k přímé aplikaci nebo jako koncentrát či primární komposice, která před aplikací vyžaduje zředění vhodným množstvím vody nebo jiného rozpouštědla. Pesticidní koncentrace se bude měnit podle povahy jednotlivé formulace, zvláště jde-li o koncentrát nebo o přímé užití. Komposice obsahuje 0,1 % až 99 %, přednostně 0,1 % až 95 % integrantu, mutantu nebo variantu podle předkládaného vynálezu, 1 % až 98 % pevného nebo kapalného inertního nosiče a 0 % až 50 %, přednostně pak 0,1 % až 50 % povrchově aktivního činidla. Tyto komposice se používají v množství kolem 0,01 libry až 5 liber na akr (= 0,0121 kg/ha až 5,605 kg/ha) jsou-li v suché formě a kolem 0,01 pinty až 10 pint na akr (= 0,017 l/ha až 11 l/ha) jsou-li v kapalně formě.

Podle dalšího způsobu provedení mohou být intergranty podle předkládaného vynálezu před formulací ošetřeny tak, aby se prodloužila pesticidní účinnost při jeho aplikaci



v prostředí ničeného škůdce. Takové ošetření může být uskutečněno chemickými a/nebo fyzikálními prostředky, pokud toto ošetření zhoubně neovlivní vlastnosti směsi/í. Mezi příklady chemických činidel patří, ale neomezují se jen na halogenační činidla, aldehydy jako formaldehyd a glutaraldehyd, činidla proti infekci jako zephiran chlorid, alkoholy jako isopropanol a ethanol a histologické fixativy jako Bouin-ův fixativ a Helly-ho fixativ (viz na příklad Humason, *Animal Tissue Techniques*, W.H. Freeman and Co., 1967), konzervační prostředky, ochranné UV filtry, sprejové adjuvanty (zvlhčovač), prostředky proti pění a adhesiva.

Kompozice podle vynálezu lze aplikovat přímo na rostlinu na příklad postřikem nebo poprášením v době, kdy se na rostlině začal objevovat škůdce nebo jako ochranné opatření před jeho výskytem. Mezi rostliny, které lze chránit v rozsahu tohoto vynálezu patří, ale nejsou omezeny jen na ně: obiloviny (pšenice, ječmen, žito, oves, rýže, čirok a příbuzné plodiny), řepy (cukrová řepa, krmná řepa), peckoviny, jádroviny a měkké ovoce (jablka, hrušky, švestky, broskve, mandle, třešně, jahody, maliny, borůvky), luskoviny (fazole, čočka, hrách, soja), olejníky (řepka, hořčice, mák, olivy, slunečnice, kokos, skočce poskytující ricinový olej, kakaové boby, podzemnice olejná), okurkovité rostliny (okurky, dýně, melouny), vláknité rostliny (bavlna, len, konopí, juta), citrusové ovoce (pomeranče, citrony, grapefruity, mandarinky), zelenina (špenát, salát, chřest, zelí a jiné košťáloviny, mrkve, cibule, rajčata, brambory, paprika), vavřínovité rostliny (avokado, skořice, kafr), opadavé listnaté stromy i jehličnany (lípy, tisy, duby, olše, topoly, břízy, jedle, modřiny, borovice), nebo rostliny jako jsou kukuřice, tabák, ořechy, káva, třtina cukrová, vinná réva, chmel, banánovníky, kaučukovníky stejně tak jako rostliny okrasné. Preferovaným způsobem aplikace je

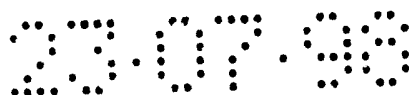


sprejování listí. Zpravidla je důležité získat kontrolu nad škůdcem v ranných stadiích vývoje rostliny, protože to je doba, kdy může být poškozena nejvážněji. Pokud se má za to, že je to nutné, může postřik nebo poprašek obsahovat výhodně i jiný insekticid nebo pesticid, jako např. fungicid, herbicid nebo hnojivo k ošetření trávníku. V preferovaném provedení se kompozice podle vynálezu aplikuje přímo na rostlinu.

Kompozice podle předkládaného vynálezu může být účinná proti škůdcům řádu Lepidoptera na příklad *Achroia grisella*, *Acleris gloverana*, *Acleris variana*, *Adoxophyes orana*, *Agrotis ipsilon*, *Alabama argillacea*, *Alsophila pometaria*, *Amyelois transitella*, *Anagasta kuehniella*, *Anarsia lineatella*, *Anisota senatoria*, *Antheraea pernyi*, *Anticarsia gemmatalis*, *Archips* sp., *Argyrotaenia* sp., *Athetis mindara*, *Bombyx mori*, *Bucculatrix thurberiella*, *Cadra cautella*, *Choristoneura* sp., *Cochylis hospes*, *Colias eurytheme*, *Corcyra cephalonica*, *Cydia latiferreanus*, *Cydia pomonella*, *Datana integerrima*, *Dendrolimus sibericus*, *Desmia funeralis*, *Diaphania hyalinata*, *Diaphania nitidalis*, *Diatraea grandiosella*, *Diatraea saccharalis*, *Ennomos subsignaria*, *Eoreuma loftini*, *Ephestia elutella*, *Erannis tiliaria*, *Estigmene acrea*, *Eulia salubricola*, *Eupoecilia ambiguella*, *Eupoecilia ambiguella*, *Euproctis chrysorrhoea*, *Euxoa messoria*, *Galleria mellonella*, *Grapholita molesta*, *Harrisina americana*, *Helicoverpa subflexa*, *Helicoverpa zea*, *Heliothis virescens*, *Hemileuca oliviae*, *Homoeosoma electellum*, *Hyphantria cunea*, *Keiferia lycopersicella*, *Lambdina fiscellaria fiscelaria*, *Lambdina fiscellaria lugubrosa*, *Leucoma salicis*, *Lobesia botrana*, *Loxostege sticticalis*, *Lymantria dispar*, *Macalla thyrsisalis*, *Malacosoma* sp., *Mamestra brassicae*, *Mamestra configurata*, *Manduca quinquemaculata*, *Manduca sexta*, *Maruca testulalis*, *Melanchra picta*, *Operoptera brumata*, *Orgyia* sp., *Ostrinia*



nubilalis, *Paleacrita vernata*, *Papilio cressphontes*,
Pectinophora gossypiella, *Phryganidia californica*,
Phyllonorycter blancardella, *Pieris napi*, *Pieris rapae*,
Plathypena scabra, *Platynota flouendana*, *Platynota sultana*,
Platyptilia carduidactyla, *Plodia interpunctella*, *Plutella*
xylostella, *Pontia protodice*, *Pseudaletia unipuncta*,
Pseudoplusia includens, *Sabulodes aegrotata*, *Schizura*
concinna, *Sitotroga cerealella*, *Spilonota ocellana*,
Spodoptera sp., *Thaurnstopoea pityocampa*, *Tineola*
bisselliella, *Trichoplusia ni*, *Udea rubigalis*, *Xylomyges*
curialis, *Yponomeuta padella*. Kompozice podle vynálezu mohou
být také účinné proti hmyzům škůdcům řádu Coleoptera, na
příklad *Leptinotarsa* sp., *Acanthoscelides obtectus*,
Callosobruchus chinensis, *Epilachna varivestis*, *Pyrrhalta*
luteola, *Cylas formicarius elegantulus*, *Listronotus*
oregonensis, *Sitophilus* sp., *Cyclocephala borealis*,
Cyclocephala immaculata, *Makrodactylus subspinosus*, *Popillia*
japonica, *Rhizotrogus majalis*, *Alphitobius diaperinus*,
Palorus ratzeburgi, *Tenebrio molitor*, *Tenebrio obscurus*,
Tribolium castaneum, *Tribolium confusum*, *Tribolium*
destructor; Dále řádu Diptera na příklad *Aedes* sp., *Andes*
vittatus, *Anastrepha ludens*, *Anastrepha suspensa*, *Anopheles*
quadrifasciatus, *Armigeres subalbatus*, *Calliphora stygian*,
Calliphora vicina, *Ceratitis capitata*, *Chironomus tentans*,
Chrysomya rufifacies, *Cochliomyia macellaria*, *Culex* sp.,
Culiseta inornata, *Dacus oleae*, *Delia antiqua*, *Delia platura*,
Delia radicum, *Drosophila melanogaster*, *Eupeodes corollae*,
Glossina austeni, *Glossina brevipalpis*, *Glossina fuscipes*,
Glossina morsitans centralis, *Glossina morsitans morsitans*,
Glossina morsitans submorsitans, *Glossina pallidipes*,
Glossina palpalis gambiensis, *Glossina palpalis palpalis*,
Glossina tachinoides, *Haemagogus equinus*, *Haematobia*
irritans, *Hypoderma bovis*, *Hypoderma lineatum*, *Leucopis*



ninae, Lucilia cuprina, Lucilia sericata, Lutzomyia longipalpis, Lutzomyia shannoni, Lycoriella mali, Mayetiola destructor, Musca autumnalis, Musca domestica, Neobellieria sp., Nephrotoma suturalis, Ophyra aenescens, Phaenicia sericata, Phlebotomus sp., Phormia regina, Sabethes cyaneus, Sarcophaga bullata, Scatophaga stercoraria, Stomoxys calcitrans, Toxorhynchites amboinensis, Tripteroides bambusa. Dále řádu Acari na příklad *Oligonychus pratensis, Panonychus ulmi, Tetranychus urticae*; nebo řádu Hymenoptera na příklad *Iridomyrmex humilis, Solenopsis invicta*; či řádu Isoptera na příklad *Reticulitermes hesperus, Reticulitermes flavipes, Coptotermes formosanus, Zootermopsis angusticollis, Neotermes connexus, Incisitermes minor, Incisitermes immigrans*; nebo řádu Siphonaptera na příklad *Ceratophyllus gallinae, Ceratophyllus niger, Nosopsyllus fasciatus, Leptopsylla segnis, Ctenocephalides canis, Ctenocephalides felis, Echicnophaga gallinacea, Pulex irritans, Xenopsylla cheopis, Xenopsylla vexabilis, Tunga penetrans*; a řádu Tylenchida na příklad *Meloidogyne incognita, Pratylenchus penetrans*.

Přehled obrázků na výkresech

Obrázek 1 ukazuje mapu plasmidu pDN3000.

Obrázek 2 ukazuje mapu plasmidu pE194^{ts}.

Obrázek 3 ukazuje mapu plasmidu pPL1975.

Obrázek 4 ukazuje mapu plasmidu pET235.

Obrázek 5 ukazuje mapu plasmidu pCP115.

Příklady provedení vynálezu

Následující příklady jsou uváděny pro ilustraci, nikoliv však aby omezovaly.



Příklad 1

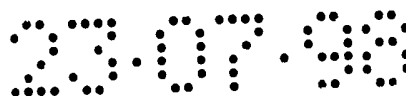
Bakteriální kmeny a plasmidy

Bacillus thuringiensis subsp. *aizawai* EMCC0087 byl uložen v NRRL pod přírůstkovým číslem NRRL B-21147. *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* 4D7 a 4D9 (cry- HD-1) byl získán z Bacillus Genetic Stock Center na Ohio State University. *Escherichia coli* GM48 dam- dcm- byl popsán Yanish-Perronem a spol., 1985, *Gene* 33:103-119 a *E. coli* GM272 (Raleigh a spol., 1988, *Nucl. Acids Res.* 16:1563-1575; dam- dcm- hsd-) byl získán od New England Biolabs. Plasmid pBR322 může být získán z komerčních zdrojů. Plasmid pMI1101D byl popsán Youngmannem a spol., 1984, v *Plasmid* 12:1-9. Plasmid pE194^{ts} je ukázán na obrázku 2 a byl rovněž popsán Villafanem a spol., 1987, v *J. Bact.* 169:4822-4829. Plasmid pCP115 popsali Price a Doi, 1985, *Mol. Gen. Genet.* 201:88-95 a je uveden na obrázku 5.

Plasmid pPL1975 je uveden na obrázku 3. K vytvoření pPL1975 byl použit následující postup. Plasmid pDN3000 byl vytvořen restriktováním pUC19 (Yanish-Perron a spol., 1985, *Gene* 33:103-119) s *EcoRI* a vložení následující sekvence oligonukleotidu (SEQ ID NOS:1 a 2),

5' -AATTGATCAAGCTTTAAATGCATGCTAGCAACGCGGCCGCCAACCTCGAGATCTCATG-3'
3' -CTAGTTCGAAATTTACGTACGATCGTTGCGCCGGCGGTTGGAGCTCTAGAGTACTTAA-5',

připravené na automatickém DNA syntetizéru fosfoamiditovou metodou, kterou popsali Beaucage a Caruthers, 1981, *Tetrahedron Let.* 22:1859-1869, do linearisovaného pUC19 a následovanou ligací. Ligovaná směs se potom použije k transformování kompetentních buněk *E. coli* SJ6 a transformanty se třídí na LB destičkách obsahujících 100 µg/ml ampicilinu. Orientace vloženého článku v pDN3000 je,



jak je na obrázku 1 naznačeno orientací restrikčních míst.

Plasmid pPL1975 se vytvoří vložení DNA obsahujícího *Mbol* fragmentu restriktovaného z pE195^{ts} z posice 1 do 1585 v *Bg*/I místě pDN3000. Ligovaná směs se potom použije k transformování kompetentních buněk *E. coli* SJ6 a transformanty se třídí na LB destičkách obsahujících 100 µg/ml ampicilinu. Orientace těchto dvou fragmentů je ukázána na obrázku 3. Pak tedy pPL1975 obsahuje funkční počátek replikace *E. coli* a pE194^{ts} DNA fragment obsahující intaktní plus počátek (+ *ori* pE194^{ts}) a zkrácený *repF* gen (*repF'*) (Villafane a spol., 1987, *J. Bact.* 169:4822-4829).

Příklad 2

Příprava genomické DNA

Genomická DNA z kmene *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* EMCC0087 byla připravena inokulací 2 ml LB (kultura Luria-Bertani) kolonie *Bacillus thuringiensis* ve zkumavce opatřené šroubovacím uzávěrem. Po inkubaci při 37 °C přes noc bez třepání byl veškerý obsah zkumavky přenesen do 1 l baňky obsahující 250 ml LB a kultivován za třepání 6 hodin při 37 °C a při 300 otáčkách za minutu. Obsah baňky byl shromážděn při 8000 otáčkách za minutu do GSA rotoru a vzniklý sbalek byl znovu suspendován ve 20 ml TE pufru (10 mM Tris, pH 7,9, 1 mM EDTA) v 25 ml centrifugační zkumavce Corex. Přidalo se přibližně 20 mg pevného lysozymu a obsah zkumavky byl promísen mírným obracením. Po 10-ti minutové inkubaci při 37 °C byl přidán 1 ml 0,5 M EDTA a 0,5 ml 2M Tris, pH 7,9. Obsah zkumavky byl znovu promísen mírným obracením a ponechán inkubaci po dalších 15 minut. Potom bylo přidáno 200 µl RNase A (10 mg/ml), pak následovala 15-ti minutová inkubace při 37 °C a přidalo se 2,3 ml 10 %-ního SDS. Byla přidána proteinaza (2 mg), obsah zkumavky byl podroben 2 hodiny inkubaci při 50

°C, rozdělen do dvou Corex zkumavek a nejméně dvakrát extrahován fenolem a dvakrát fenol/chloroformem. Genomická DNA byla vysrážena 1/10 objemu octanu sodného a 2,5 objemy 95% ethanolu a znovu suspendována v přibližně 5 ml TE pufru.

Příklad 3

Vytvoření plasmidu pET235

Serie DNA fragmentů kmene *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* EMCC0087 vybrané velikosti byla vytvořena štěpením genomické DNA *EcoRI*, gelovou elektroforesou, vybráním řezů fragmentů 6 kb a větších a uvolněním z agarosy elektroelucí. Po ligaci fragmentů do *EcoRI* místa pBR322 a transformaci do *E. coli* kmen XL-1 Blue MRF¹ (Stratagene Clonig Systems; Jerpseth a spol., 1992, *Strategies* 5[3]:81), fragment 8-kb *EcoRI* nesoucí *cryC* gen se klonuje, jak bylo dříve popsáno (Sambrook a spol., 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY), skupinovou hybridisací kolonií, prozkoumávající, aby se pomocí fragmentu DNA odpovídajícího nukleotidům 869 až 1175 *cryIC* genu (Honée a spol., 1988, *Nucleic Acids Research* 16:6240) s přidáním čtyř nukleotidů (CGGG) ke 5' konci, vytvořilo funkční *BamHI* místo. Tato sonda vzniká PCR amplifikací genomické DNA kmene *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* EMCC0087 a je níže uvedena jako SEQ ID NO:3:

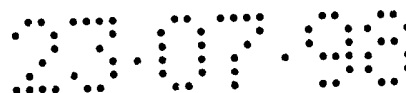
```
5' -CGGGATCCACAGTTACAGTCTGTAGCTCAATTACCTACTTTTAACGTTATGGAGAGCA
GCCGAATTAGAAATCCTCATTGATATATTGAATAATCTTACAATCTTTACGGATTGGTTT
AGTGTGGGACGCAATTTTATTGGGGAGGACATCGAGTAATATCTAGCCTTATAGGAGGTG
GTAACATAACATCTCCTATATATGGAAGAGAGGGCGAACCAGGAGCCTCCAAGATCCTTTAC
TTTTAATGGACCGGTATTTAGGACTTTATCAAATCCTACTTTACGATTATTACAGCAACCT
TGGCC-3' .
```

Gen C(*plc*) fosfolipázy kmene *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* 4D7 byl podroben PCR amplifikaci za použití primerů obsahujících *Bam*HI místa. Primery jsou níže uvedeny: 5' -TTGGATCCAGGGAAATATTATTATACGTCTATAAATAT-3' (SEQ ID NO:4) 5' -TTGGATCCGAATAAAAAATCATGTGGAAACTTCATAG-3' (SEQ ID NO:5). Amplifikovaný fragment byl štěpen *Bam*HI a vložen do *Bam*HI místa u pCP115. 850 bp fragment *Eco*RI-*Bam*HI obsahující 3' polovinu *plc* genu se potom vkládá mezi *Eco*RI a *Bam*HI místa u PL1975. Plasmid pET231 se vytvoří insercí fragmentu 8-kb *Eco*RI nesoucího *cryC* gen do *Eco*RI místa u pNNB 11. Plasmid pET235 (viz obrázek 1) se vytvoří insercí *cat* nesoucího 1,5-kb *Bam*HI fragmentu pMI1101D do *Bam*HI místa u pET231.

Příklad 4

Integrace a amplifikace plasmidu pET235

Buňky *E. coli* byly podrobeny elektroporaci pomocí Bio-Rad Gene Pulseru, jak je výrobcem popsáno. Buňky kmene *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* 4D9 byly pro elektroporaci připraveny metodou, kterou popsal Macaluso a Mettus (1991, *J. Bacteriol.* 173:1353-1356). Avšak na rozdíl od jejich postupu nebyly na Gene Pulseru činěny žádné elektrické modifikace. Namísto toho byly buňky umístěny do 0,2 cm kyvety a podrobeny elektroporaci při 800 ohmech, 25 μ F a 1600 voltech (8000 voltů na cm). Plasmid DNA pro elektroporaci byl připraven v *E. coli* GM272 (dam- dcm- hsd-), která obvykle dává vyšší výtěžky transformace *Bacillu thuringiensis* než dává plasmid DNA připravený z GM48 (dam-dcm-). *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* 4D9 byl transformován s pE194^{ts} a kolonie byly vybírány na LB destičkách obsahujících 5 μ g erythromycinu na ml. *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* 4D9 nesoucí pomocný plasmid pE194ts byl transformován pomocí pET235 a kolonie byly



vybírány na LB destičkách obsahujících 10 μg chloramfenicolu na ml. Integrant EMCC0122 se vybírá na základě velikosti krystalu zjišťované fázovou kontrastní mikroskopií jak je popsáno svrchu.

Příklad 5

Stanovení velikosti krystalu *cryIC* integrantu EMCC0122 kmene *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* 4D9

Měření krystalů byla prováděna fotografováním přípravy spory/krystalu pomocí Zeiss-ova Axioscopu a potom kopírováním negativů do konečného 2000-násobného zvětšení. Měření krystalů v milimetrech bylo provedeno pravítkem a potom normalizováno na průměrnou délku spor na každém snímku, aby se srovnaly jakékoliv rozdíly při zvětšování snímku. Za předpokladu, že dospělá endospora má přibližně 1 μm délky ve svém nejdelším průměru, mají krystaly rozměry uvedené v Tabulce 1.

Výsledky jsou uvedeny níže v Tabulce 1.

TABULKA 1
Rozměry krystalu *cryC* integrantu EMCC0122

Vzorek	Délka kryst. (μm)	Rozsah (μm)	Šířka kryst. (μm)	Rozsah (μm)	Objem kryst. (μm^3)	Počet
EMCC0122	1,0 \pm \pm 0,17	0,74 \pm \pm 1,4	0,60 \pm \pm 0,083	0,45 \pm \pm 0,76	0,12 \pm \pm 0,055	20

Příklad 6

Kultivace *cryIC* integrantu EMCC0122 kmene *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* 4D9

Subkultura *cryIC* integrantu EMCC0122 kmene *Bacillus*

thuringiensis subsp. *kurstaki* 4D9, udržovaná při -80 °C jako 40%-ní zásobní roztok v glycerolu byla ve 250 ml uzavřených třepacích baňkách použita k naočkování 50 ml P/Y media, které mělo následující složení:

Kyselina citronová	1,0 g/l
KH ₂ PO ₄	1,3 g/l
CaCl ₂ .H ₂ O	0,33 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,67 g/l
Maltrin-100	20 g/l
Extrakt kvasnic	10 g/l
Pepton	15,3 g/l
Stopové kovy	0,3 ml/l

pH media bylo za použití 10 N NaOH adjustováno na 7,0.

Po naočkování byly třepací baňky inkubovány při 30 °C 72 hodin na rotační třepačce o 250 ot/min. Všechny kultury byly stabilizovány přidávkem 10 mg sorbátu draselného, 3 mg benzoanu sodného a 0,5 mg parabenu na ml kultury, 30%-ní H₃PO₄ adjustovány na pH 4,5 a uchovávány při 5 °C.

Příklad 7

Bioessay krystalického delta-endotoxinu z *cryIC* integrantu EMCC0122 kmene *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* 4D9 proti *Spodoptera exigua*

Účinnost *cryIC* integrantu EMCC0122 kmene *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* 4D9 byla stanovena bioessayem s přidáváním výživy pro larvy třetího mezistadia vývoje *Spodoptera exigua*.

Veškerá kultura *cryIC* integrantu EMCC0122 kmene *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* 4D9 z příkladu 6 se naředila po seriích, aby se zjistil rozsah účinnosti. Jako referenční standard se rovněž analyzoval *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* EMCC0087 kultivovaný jak popsáno v příkladu 6.

Standardní umělá potrava složená z vody, agaru, cukru, kaseinu, pšeničných klíčků, methylparabenu (= methyl 4-hydroxybenzoát), sorbové kyseliny, oleje z lněných semen, celulosy, solí a vitaminů byly připravena ve 20 l kotli. To poskytuje dostatek potravy pro testování 10 až 12 vzorků se sedmi různými koncentracemi testované substance. Veškerá kultura z přípravy integrantu EMCC0122 kmene *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* se naředila po seriích na 16 alikvotních podílů. Každý alikvot se přidal ke 184 g roztavené potravy. Potom se směs homogenisovala a poté nalila na plastový táč, který měl 40 jednotlivých jímek. Pro každou dávku potravy byly připraveny tři kontrolní táčy. Jakmile byla potrava ochlazená a ztuhla, byla do každé jímký přidána jedna larva *Spodoptera exigua* třetího stadia vývoje a táčy byly pokryty perforovanou folií průhledného plastu. Táčy byly umístěny do polic a po čtyři dny byly podrobeny inkubaci při 28 °C a 65%-ní vlhkosti.

Po čtyřech dnech byla spočítána mortalita hmyzu. Na vršek každého tácu bylo zaměřeno prudké fouknutí a larvy, které se nehýbaly byly počítány jako mrtvé. Byla vypočtena procenta mortality a data byla analyzována pomocí paralelních kontrolních analýz. Byly stanoveny LC50, LC90, směrnice regresních přímek, koeficient odchylek (CV) a potence ve *Spodoptera* jednotkách (SU). Stanovení se provádělo nejméně třikrát nebo pokud tři účinnosti nebyly do 20 % průměru vypočteného pro každý vzorek.

Výsledky jsou udány níže v Tabulce 2. Účinnost EMCC0122 je přibližně dvakrát taková jako u *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* EMCC0087.

Tabulka 2

Účinnost *cryIC* integrantu EMCC0122 na *Spodoptera exigua*

Vzorek	LC50	LC90	Směrnice	CV	SU
EMCC0087	3127	16922	2,1	10,2	750
EMCC0122	2074	8021	2,2	9,7	1671

Uložení mikroorganismů

Následující kmeny *Bacillus thuringiensis* byly uloženy v Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Laboratory (NRRL), 1815 University Street, Peoria, Illinois, 61604, USA.

<u>Kmen</u>	<u>Přírůstkové číslo</u>	<u>Datum uložení</u>
EMCC0087	NRRL B-21147	6. října 1993
EMCC0122	NRRL B-21386	19. ledna 1995

Kmeny byly deponovány za podmínek, které zaručují, že přístup ke kultuře bude dosažitelný během řízení o této patentové přihlášce tomu, koho určí Commissioner of Patents and Trademarks (předseda úřadu pro patenty a ochranné známky), který je pro to zmocněn podle 37 C.F.R. 1,14 a 35 U.S.C. 122. Uložený vzorek představuje v podstatě čistou kulturu každého deponovaného kmene. Uložený vzorek je dostupný, jak vyžadují cizí patentová práva v zemích, v nichž jsou zaregistrovány protějšky nebo příbuzné přihlášky subjektu. Je však třeba pochopit, že dostupnost uloženého vzorku nezakládá volnost provozovat předložený vynález za narušení patentových práv udělovaných státním aktem.

Přemětný deposit kultury bude dále uchováván a pro veřejnost přístupný v soulase s ustanoveními Budapeštské dohody o depositu mikroorganismů, tj. bude uchováván se vši

péčí nezbytnou pro udržení jejich životnosti a zabránění kontaminace v období nejméně pěti let po nejposlednější žádosti o poskytnutí vzorku depositu a v každém případě po dobu nejméně 30 (třiceti) let po datu uložení nebo vymahatelné platnosti každého patentu, který může být vydán o objevu kultury. Ukladatel uznává povinnost vyměnit deposit pokud by depositní místo nemohlo poskytnout žádaný vzorek vzhledem k podmínkám depositu. Všechna omezení veřejné přístupnosti předmětného depositu kultury budou neodvolatelně odstraněna po udělení patentu, který jej popisuje.

Zde popsany a nárokovany vynález není omezen v rozsahu zde popisovanými typickými příklady, protože tyto příklady jsou zamýšleny jako ilustrace různých aspektů vynálezu. Každé ekvivalentní případy jsou považovány, že spadají do rozsahu tohoto vynálezu. Různé modifikace vynálezu kromě těch, které jsou zde ukázány a popsány, se ovšem z předcházejícího popisu stanou zřejmými pro zkušené odborníky. Takové modifikace je třeba rovněž považovat, že spadají do rozsahu připojených patentových nároků.

Citují se různé odkazy a na jejich obsah se v jejich celistvosti odkazuje.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob získávání integrantu kmene *Bacillus thuringiensis* v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e s e

a) do buňky hostitelského kmene *Bacillus thuringiensis* (i) zavede první DNA vektor, obsahující první počátek replikace a nejméně jeden funkční gen kódující nejméně jeden faktor, potřebný pro replikaci plasmidu z řečeného prvního počátku replikace, a s ním (ii) druhý DNA vektor, obsahující druhý počátek replikace, avšak postrádající funkční gen nebo jeho část kódující faktor, potřebný pro replikaci plasmidu z druhého počátku replikace, stejně jako heterologickou sekvenci DNA kódující delta-endotoxin *Bacillu thuringiensis* a sekvenci DNA, která je homologická s oblastí genomu řečeného mateřského kmene a

(b) buňka z kroku (a) kultivuje za vybraných podmínek vedoucích k integraci řečeného druhého DNA vektoru do genomu řečené mateřské buňky homologickou rekombinací a ztratě prvního DNA vektoru.

2. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e hostitelským kmenem *Bacillu thuringiensis* je *cry* kmen.

3. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e s e hostitelský kmen *Bacillu thuringiensis* volí ze skupiny kmenů *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *alesti*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *canadiensis*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis*, *Bacillus*



thuringiensis subsp. *dendrolimus*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *finitimus*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *kenyae*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *subtoxicus*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *toumanoffi*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *toumanoffi*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *pondicheriensis*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *shandogiensis*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *sotto*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *nigeriae*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *yunnanensis*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *dakota*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *indiana*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *tohokuensis*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *kumamotoensis*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *tochigiensis*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *thompsoni*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *wuhanensis*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *kyushuensis*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *ostrinae*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *tolworthi*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *pakistani*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *japonensis*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *colmeri*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *pondicheriensis*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *shandongiensis*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *neoleonensis*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *coreanensis*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *silo*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *mexicanensis* a *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*.

4. Způsob podle nároku 1 v y z n a ě u j í c í s e t í m, ž e hostitelským kmenem je *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*.

5. Způsob podle nároku 1 v y z n a ě u j í c í s e t í m, ž e sekvence DNA kódující delta-endotoxin je *cryIC* gen.

6. Způsob podle nároku 1 v y z n a ě u j í c í s e t í m, ž e se sekvence DNA kódující delta-endotoxin získá z kmene *Bacillus thuringiensis* vybraného ze skupiny zahrnující *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *alesti*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *canadiensis*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *dendrolimus*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *finitimus*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *kenyae*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *subtoxicus*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *toumanoffi*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *toumanoffi*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *pondicheriensis*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *shandogensis*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *sotto*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *nigeriae*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *yunnanensis*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *dakota*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *indiana*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *tohokuensis*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *kumamotoensis*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *tochigiensis*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *thompsoni*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *wuhanensis*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *kyushuensis*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *ostrinae*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *tolworthi*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *pakistani*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *japonensis*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *colmeri*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *pondicheriensis*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *shandongensis*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *neoleonensis*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *coreanensis*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *siloi*, *Bacillus thuringiensis* subsp.



mexicanensis a *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*.

7. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e se sekvence DNA kódující delta-endotoxin získává z kmene *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*.

8. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e volitelný signální znak z druhého DNA vektoru je sekvence DNA kódující antibiotickou resistenci.

9. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e první DNA vektor obsahuje dále volitelný signální znak, přičemž se tento signální znak liší od volitelného signálního znaku ve druhém DNA vektoru.

10. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e první DNA vektor obsahuje první počátek replikace z jednovláknového DNA plasmidu a funkční *rep* gen a druhý DNA vektor obsahuje druhý počátek replikace z jednovláknového DNA plasmidu, avšak postrádá funkční *rep* gen, DNA sekvenci kódující delta-endotoxin kmene *Bacillus thuringiensis* a DNA sekvenci, která je homologická s oblastí genomu řečeného hostitelského kmene.

11. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e se buňka v kroku (b) podrobí inkubaci při kolem 37 °C.

12. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e řečený způsob dále zahrnuje amplifikaci integrované DNA sekvence kultivací integrantu z kroku (b) za přítomnosti vzrůstajících množství selektujícího činidla.

13. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e integrant má všechny identifikační charakteristiky kmene EMCC0122, uloženého v NRRL a majícího přírůstkové číslo NRRL B-21386.

14. Integrant *Bacillu thuringiensis* nebo jeho spora, který produkuje nejméně jeden heterologický krystalický delta-endotoxin.

15. Integrant podle nároku 1, kde integrantem je integrant *Bacillu thuringiensis* subsp. *kurstaki*.

16. Integrant podle nároku 1, kde integrantem je integrant *cry*- kmene.

17. Integrant podle nároku 1, kde heterologickým delta-endotoxinem je CryIC protein.

18. Integrant podle nároku 1, kde integrant má všechny identifikační charakteristiky kmene EMCC0122, uloženého v NRRL a majícího přírůstkové číslo NRRL B-21386.

19. Integrant podle nároku 1, kde integrant produkuje větší množství krystalického delta-endotoxinu s větší pesticidní účinností ve srovnání s krystalickým delta-endotoxinem produkovaným mateřským kmenem.

20. Integrant podle nároku 1, kde produkovaný delta-endotoxin je účinný proti hmyzímu škůdci.

21. Integrant podle nároku 1, kde produkovaný delta-endotoxin je účinný proti hmyzímu škůdci řádu Lepidoptera.

22. Pesticidní kompozice v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje (a) integrant podle nároku 1 a (b) pesticidně přijatelný nosič.

23. Konstrukt DNA, obsahující (a) druhý počátek replikace, avšak postrádající funkční gen nebo jeho část kódující faktor nutný pro replikaci plasmidu z druhého počátku replikace; (b) DNA sekvenci kódující delta-endotoxin *Bacillu thuringiensis*; (c) sekvenci DNA, která je homologická s oblastí genomu *Bacillu thuringiensis*; a (d) volitelný signální znak.

24. DNA vektor, obsahující konstrukt DNA podle nároku 10.

25. Způsob potírání škůdce v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e se škůdce vystaví efektivnímu množství škůdce potírající pesticidní kompozice, obsahující (a) integrant kmene *Bacillus thuringiensis* nebo jeho spory, produkující nejméně jeden heterologický krystalický delta-endotoxin, a (b) pesticidně přijatelný nosič.

26. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e integrantem je integrant kmene *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*.

27. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e integrantem je integrant kmene *cry*-.

28. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e heterologickým delta-endotoxinem je CryIC protein.

29. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e integrant má všechny identifikační charakteristiky kmene EMCC0122, uloženého v NRRL a majícího přírůstkové číslo NRRL B-21386.

30. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e integrant produkuje větší množství krystalického delta-endotoxinu s větší pesticidní účinností ve srovnání s krystalickým delta-endotoxinem produkovaným odpovídajícím mateřským kmenem.

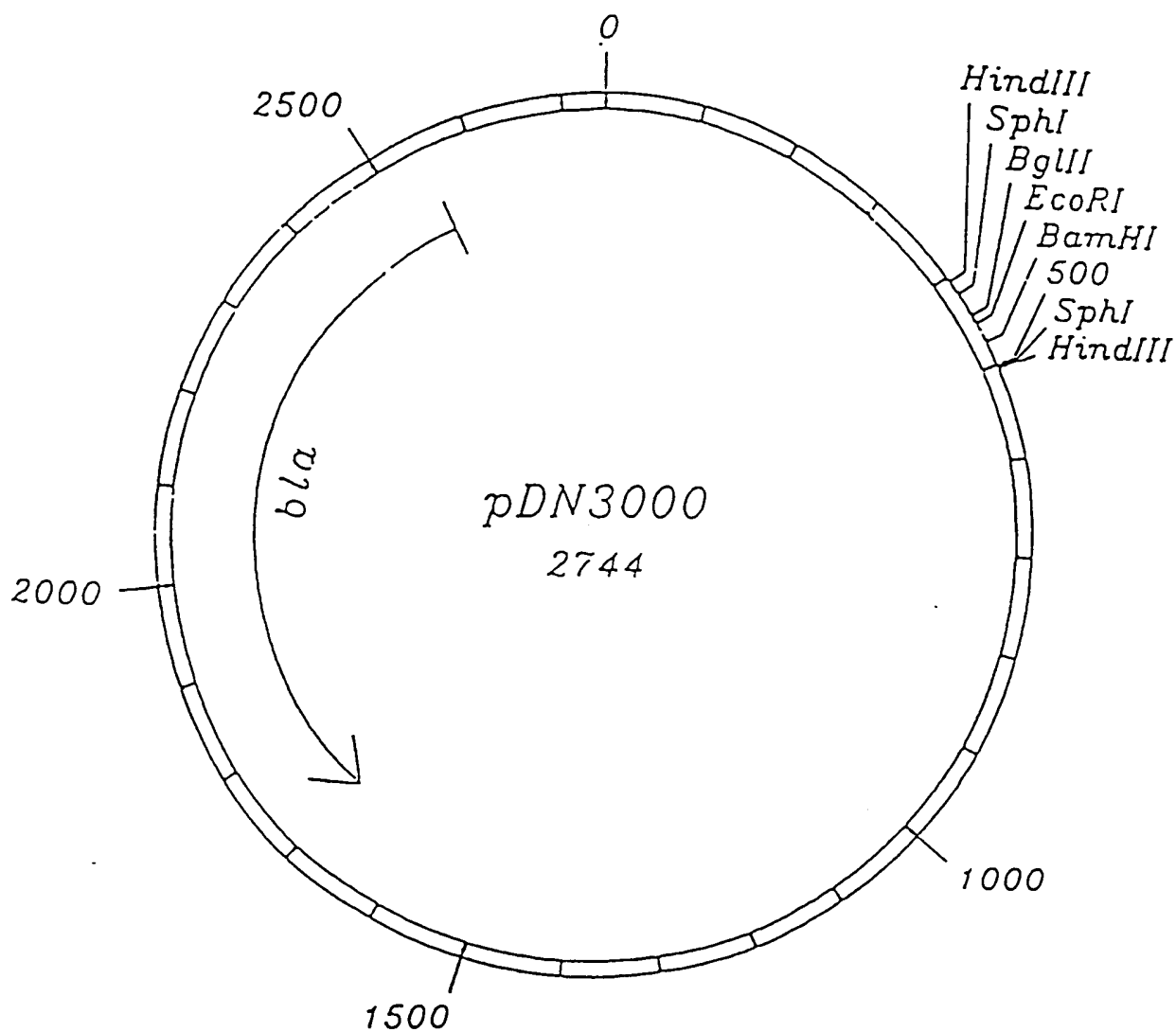
31. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e produkovaný delta-endotoxin je účinný proti hmyzímu škůdci.

32. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e produkovaný delta-endotoxin je účinný proti hmyzímu škůdci řádu Lepidoptera.

23.07.98

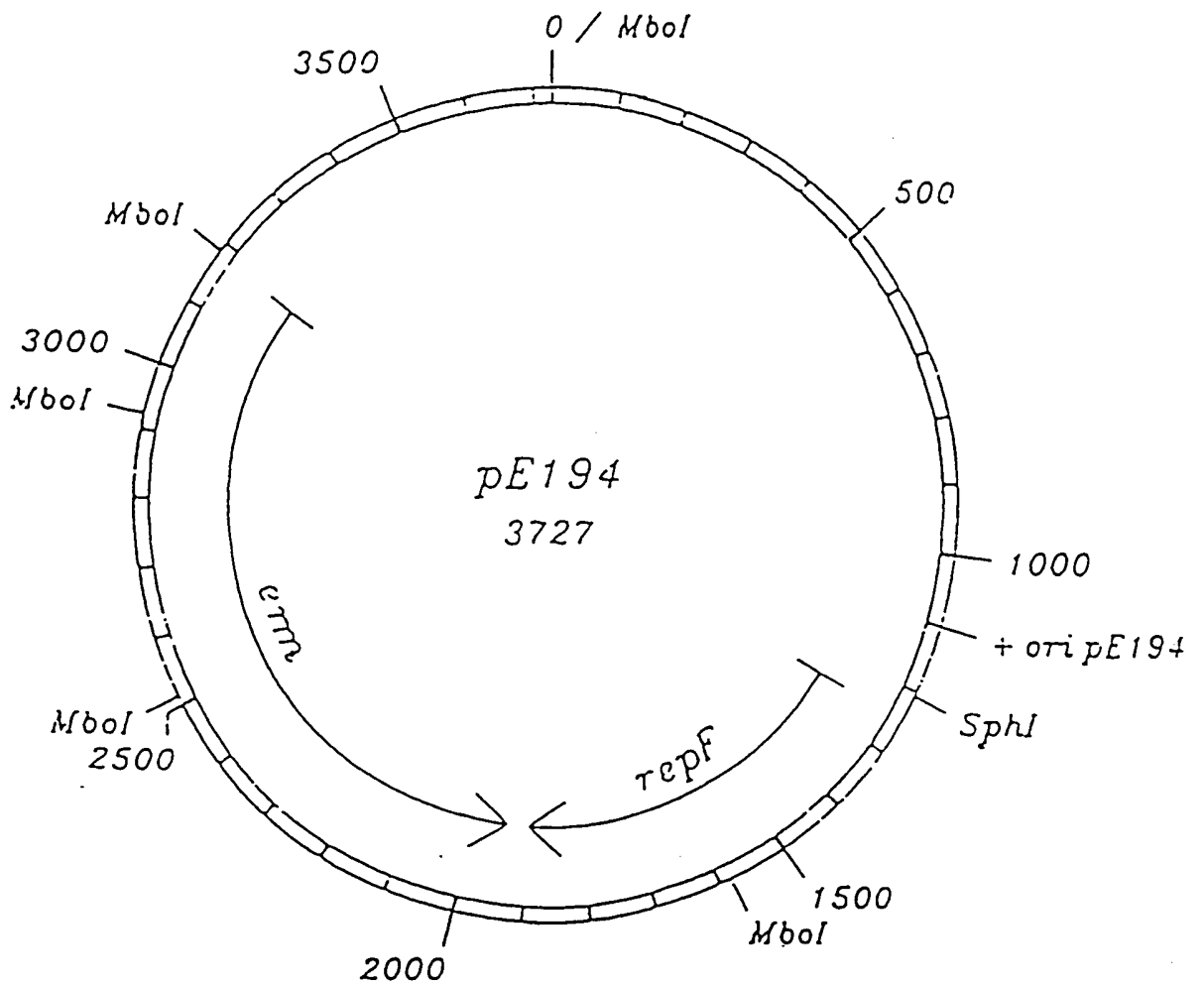
PV2326-98

~~45137~~



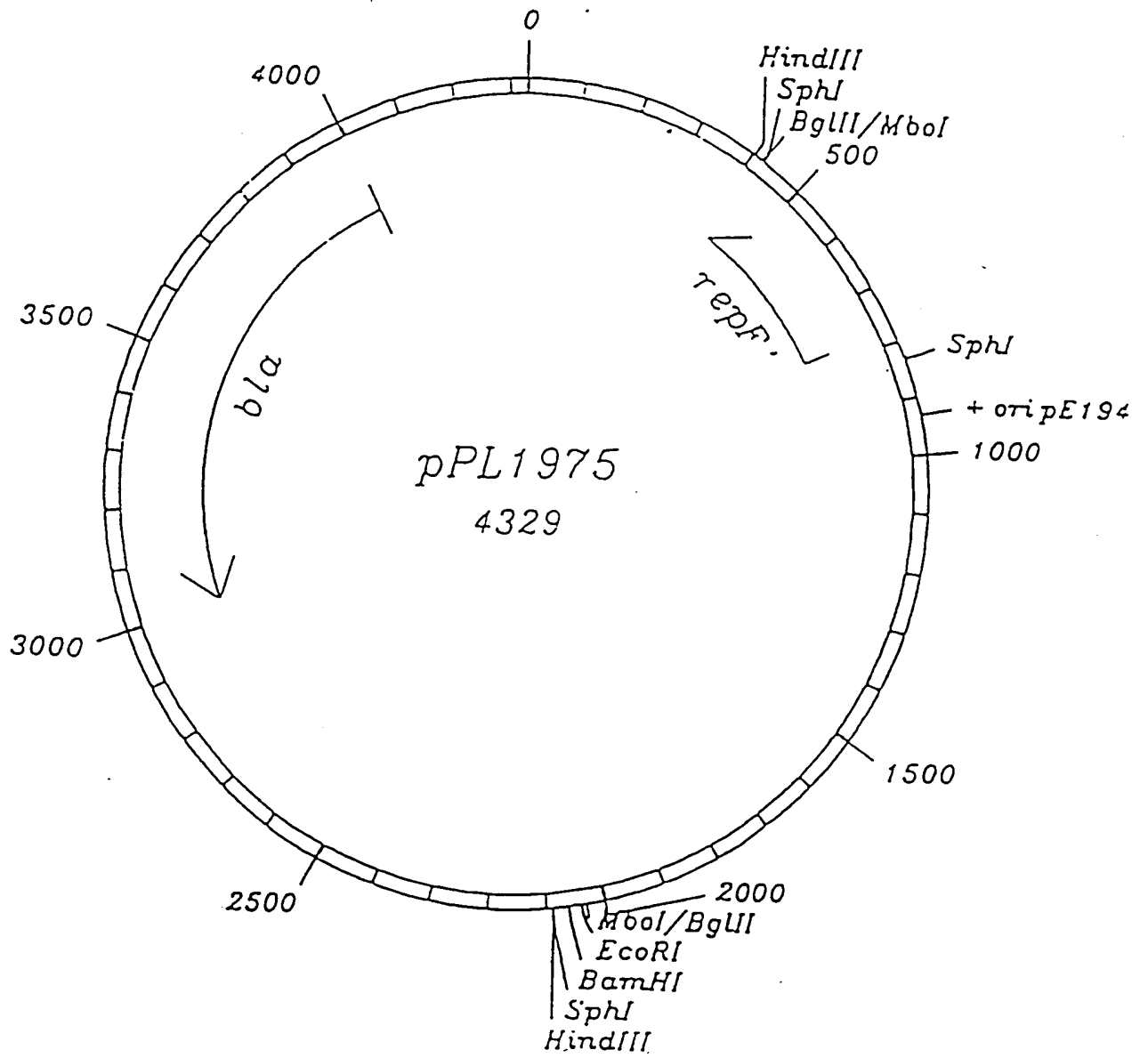
Obr. 1.

23.07.98



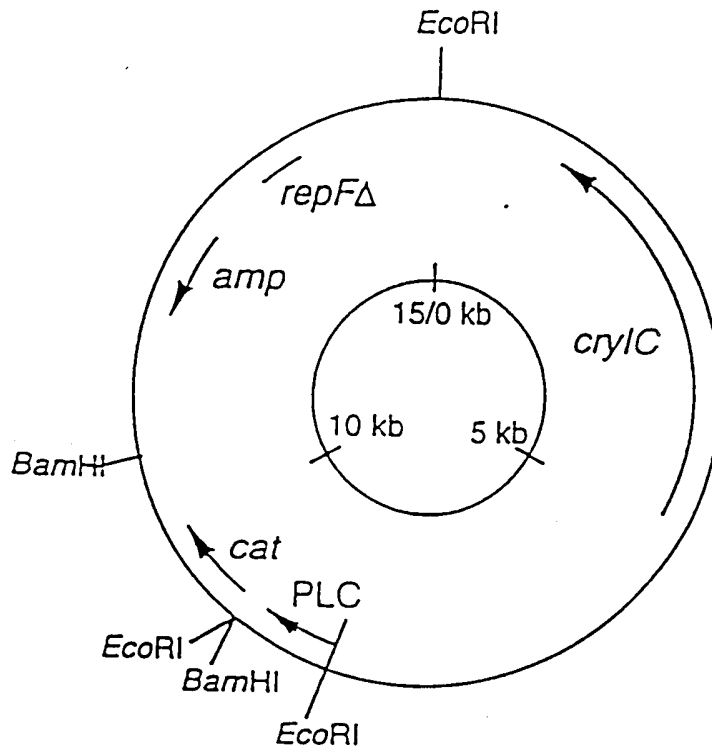
Obr. 2

23.07.98



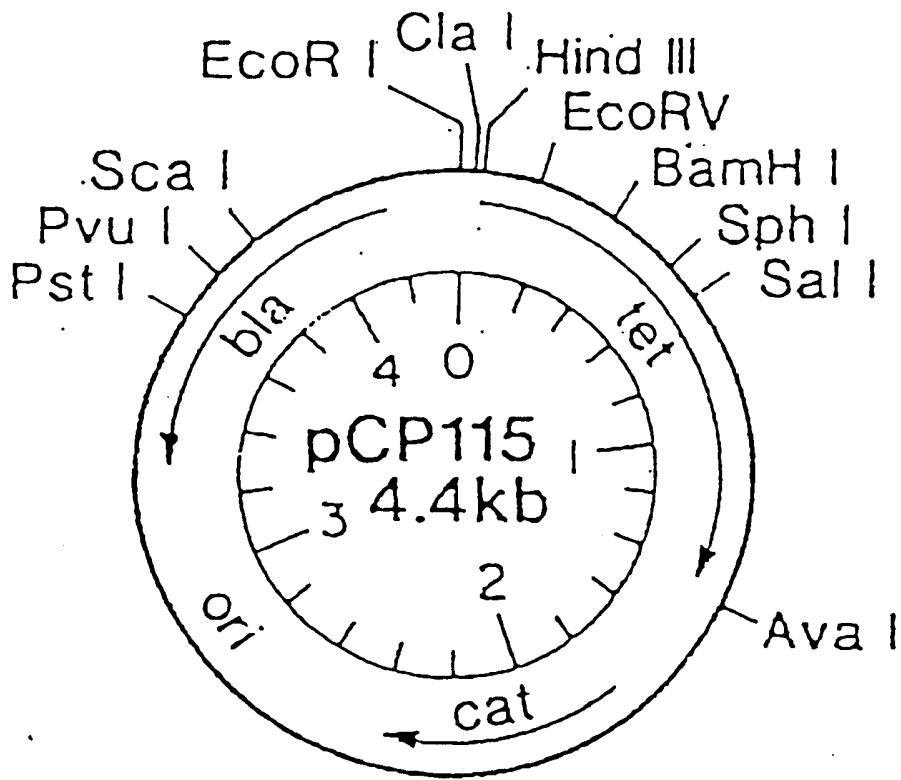
Obr. 3

23.07.98



Obr. 4

23.07.98



Obr. 5