



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112016016014-2 B1



(22) Data do Depósito: 09/01/2015

(45) Data de Concessão: 07/06/2022

(54) Título: GENE RESISTENTE A INSETO DERIVADO DE SER HUMANO E ANTICORPO DE CADEIA ÚNICA DE IDIÓTIPO DE ANTI-TOXINA CRY1B CODIFICADO PELO MESMO E SUA APLICAÇÃO

(51) Int.Cl.: C12N 15/13; C12N 15/70; C07K 16/12; A01N 47/44; A01P 7/04.

(52) CPC: A01N 47/44; C12N 15/70; C07K 16/12.

(30) Prioridade Unionista: 26/01/2014 CN 201410037175.X.

(73) Titular(es): JIANGSU ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES.

(72) Inventor(es): XIANJIN LIU; CHONGXIN XU; XIAO ZHANG; YUAN LIU; YAJING XIE; CUNZHENG ZHANG; XIANGYANG YU; DONGLAN WANG.

(86) Pedido PCT: PCT CN2015070421 de 09/01/2015

(87) Publicação PCT: WO 2015/109952 de 30/07/2015

(85) Data do Início da Fase Nacional: 08/07/2016

(57) Resumo: GENE RESISTENTE A INSETO DERIVADO DE SER HUMANO E ANTICORPO DE CADEIA ÚNICA DE IDIÓTIPO DE TOXINA ANTI-CRY1B CODIFICADO PELO MESMO E APLICAÇÃO DO MESMO. São fornecidos um gene resistente a inseto derivado de ser humano que tem uma sequência nucleotídica representada por SEQ ID NO.1, e um anticorpo de cadeia única de idiótipo de toxina anti-Cry1B codificado pelo dito gene resistente a inseto derivado de ser humano e que tem uma sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO.2. O anticorpo de cadeia única de idiótipo é do tipo (beta) e tem atividade inseticida, e após a expressão pelo sistema procariótico, a cultura primária do mesmo tem atividade de ligação ao BBMV de receptor específico de membrana peritrófica de intestino médio de *Cnaphalocrocis medinalis*.

**"GENE RESISTENTE A INSETO DERIVADO DE SER HUMANO E
ANTICORPO DE CADEIA ÚNICA DE IDIÓTIPO DE ANTI-TOXINA CRY1B
CODIFICADO PELO MESMO E SUA APLICAÇÃO"**

CAMPO DA INVENÇÃO

[0001] A presente invenção refere-se ao campo de controle biológico e modificação genética, particularmente a um gene resistente a inseto derivado de ser humano e anticorpo de cadeia única de idiótipo de anti-toxina Cry1B através do mesmo e aplicação do mesmo.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0002] Atualmente, o gene inseticida amplamente usado no mundo para controle biológico de pragas é o gene de toxina Bt de *Bacillus thuringiensis* (Bt) (como: Cry1B, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1C e Cry1F et al.). *Bacillus thuringiensis* é a bactéria patogênica de inseto. A toxina Bt gerada pelo mesmo tem um efeito de eliminação específica em muitas espécies de pragas agrícolas e florestais. Desde que Belgian Plant Genetic Systems relatou primeiramente o sucesso de tabaco resistente a inseto de Bt transgênico em 1987 até os dias atuais, o gene Bt foi transferido para as principais safras no mundo, como: milho-maís, arroz em casca, algodão, tomate, batata e tabaco. De acordo com as estatísticas do Serviço Internacional para a Aquisição de Aplicações de Agrobiotecnologia (ISAAA) em 2012, a área de algodão com Bt transgênico cultivada na China excedeu 3,9 milhões de

hectares, considerando 71,5% da área total do algodão cultivado na China. Entretanto, após a aplicação e generalização de safras com Bt transgênico, é possível que potenciais perigos na fuga de gene, mudança de estrutura ecológica microbiana do solo, resistência a fármaco de espécies e perigo ao sistema imunológico normal tenham despertado gradualmente a atenção da sociedade. "Diversity of Rhizospheric Microorganisms and Bacterial Physiological Groups of Transgenic Bt Maize" (Wang Min *et al.*, Chinese Journal of Ecology, publicação em março de 2010) e "Influence of Transgenic Bt Maize on Bacterial Quantity and Diversity of Soil" (Liu Ling *et al.*, Journal of Ecology and Rural Environment, publicação em março de 2011) analisaram a quantidade e diversidade bacteriana do solo em que o milho-maís com Bt transgênico é cultivado em interior e em exterior. Os resultados mostram uma diferença significativa entre o grupo de cultivo de milho-maís com Bt transgênico e o grupo de controle em branco.

[0003] "Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* sp. *kurstaki* HD73 binds to surface proteins in the mouse small intestine" (Vázquez-Padrón *et al.*, Biochem Biophys Res Commun, publicação em janeiro de 2000) constatou que quando a proteína tóxica intrínseca de Bt e proteína tóxica extrínseca de Bt tomada por um camundongo atingiu 10 mg/kg e 100 mg/kg, taxa positiva de ANAE de célula T, índice

de esplenomegalia e fagocitose de macrófago do camundongo foram todos inibidos obviamente durante o experimento em animais. Quanto maior é a admissão, mais óbvio o efeito inibidor será. Esse experimento também constatou que quando o coeficiente acumulativo da proteína de toxina Bt no corpo de animal era maior do que 6,24, pode resultar em uma lesão do fígado, rim e trato gastrointestinal e em anomalias de fígado e rim, anomalias de inchaço celular e degeneração vacuolar poderia ser observada e lesão epitelial vascular glomerular poderia ser vista. Obviamente, não se pode excluir que as mesmas foram causadas por reações imunológicas. Enquanto isso, o uso a longo prazo de proteína de toxina Bt em uma dose grande também pode resultar na redução significativa de total células brancas do sangue (WBC) e hemoglobina (HGB) dos animais. Isso também indica que a proteína de toxina Bt tem uma toxicidade de óbvia de imunossupressão. Portanto, o desenvolvimento de efetores substitutos com a bioatividade de toxina Bt (como: anticorpo anti-idiotípico) é um ponto ativo de pesquisa no campo de desenvolvimento de praga biológica.

[0004] Como o gene de anticorpo humanizado é derivado do ser humano, o mesmo tem a vantagem da homologia genética com o sistema imunológico humano. O mesmo pode evitar os danos de seu resíduo no alimento ao sistema imunológico humano após a aspersão de sua preparação ou

expressão transgênica.

[0005] Em 1974, o imunologista dinamarquês Jerne introduziu o conceito de anticorpo anti-idiotípico em sua "Teoria de Rede Imunológica". O anticorpo anti-idiotípico (doravante denominado como "Anti-Id") se refere ao anticorpo específico gerado para abordar o idiótipo (doravante no presente documento denominado como "Id") nas regiões variáveis de moléculas de anticorpo. Bona, *et al.* classificou o Anti-Id em quatro tipos (α , β , γ e ϵ) com base na reação serológica entre Id e Anti-Id bem como a função de Anti-Id do tipo β de AId tem o efeito de "imagem interna", isto é: tem um determinante antigênico igual ao antígeno (haptina), para que possa ter as funções e bioatividade de antígeno.

[0006] Atualmente, é de conhecimento universal que o Anti-Id com um efeito semelhante ao antígeno alvo pode ser obtido por tecnologia de exibição de fagos através do estabelecimento de uma biblioteca de anticorpos em fago, e triagem específica. O processo de triagem de anticorpo específico por tecnologia de exibição de fagos é chamado de "panning" e inclui, principalmente, quatro etapas: ligação, lavagem, eluição e amplificação. Raats *et al.* adotou o revestimento de anticorpo monoclonal anticortisol como antígeno de fase sólida para triagem direta triagem direta. Antes da triagem, uma mesma espécie de anticorpo monoclonal negativo é testada negativamente para evitar testar

fragmentos de anticorpo recombinante ligados à região constante de anticorpo e testar com sucesso o Anti-Id contra cortisol. Goletz *et al.* também aplicou o sistema de exibição de anticorpos em fago e pesquisou e comparou a influência de métodos de eluição diferentes em resultados de triagem de fragmento de Anti-Id. De entre os 96 clones eventualmente testados, 28 foram clones positivos com características Anti-Id. Até o momento, nenhum material ou produto específico ao efetor ativo de Bt substituível, particularmente anticorpo de cadeia única Anti-Id do tipo toxina Anti-Bt (doravante no presente documento denominado como "Anti-Id ScFvs") foi relatado.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0007] Para abordar o potencial risco de segurança da aplicação extensiva de safras de toxina Bt e preparações de toxina da mesma, hipersensibilidade e outros problemas no presente, a presente invenção é concretizada através do desenvolvimento de um efetor biológico substituível com bioatividade de toxina Bt, e sua aplicação no controle biológico de pragas:

[0008] Um gene resistente a inseto derivado de ser humano, sendo que tem uma sequência nucleotídica representada por SEQ ID NO.1.

[0009] Na presente invenção, um anticorpo de cadeia única de idiótipo de anti-toxina Cry1B codificado por SEQ ID

NO.1, que tem uma sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO.2;

[0010] Na presente invenção, um vetor de expressão procariótico que contém o gene resistente a inseto derivado de ser humano SEQ ID NO.1;

[0011] Na presente invenção, uma aplicação de gene resistente a inseto derivado de ser humano SEQ ID NO.1 no controle de pragas agrícolas;

[0012] Na presente invenção, um inseticida que contém o anticorpo de cadeia única de idiótipo de anti-toxina Cry1B com uma sequência de aminoácidos como representado por SEQ ID NO.2.

[0013] A presente invenção testou e obteve a partir do banco genético humano um anticorpo de cadeia única de idiótipo de anti-toxina Cry1B do tipo "β" - com atividade inseticida. Após ser expressa pelo sistema procariótico, a cultura primária desse anticorpo de cadeia única tem atividade de ligação a BBM de receptor específico de membrana peritrófica de intestino médio de *Cnaphalocrocis medinalis*. A presente invenção obtém anticorpo de cadeia única de idiótipo de anti-toxina Cry1B do tipo "β" sem imunização animal. O ciclo de preparação é curto. A sequência de aminoácidos é pequena. É adequado para produção em massa in vitro. Enquanto isso, a presente invenção como um novo recurso de gene resistente a inseto tem significância prática

e científica importante para explorar e desenvolver novos tipos de recursos de gene resistente a inseto que simulam a bioatividade de toxina Bt para reduzir os riscos de segurança do amplo uso de toxinas Bt existentes e até mesmo substituir Bt no futuro no controle biológico de pragas agrícolas e reduzir o uso de pesticidas.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0014] A Figura 1 é um esquema do resultado de detecção de C7 por ELISA.

[0015] A Figura 2 é um esquema do resultado de determinação biológica de C7.

[0016] A Figura 3 é um esquema que mostra a condição de morte de larvas de terceiro instar de *Cnaphalocrocis medinalis* após as mesmas serem alimentadas com folhas de arroz com casca embebidas com C7, CK+ e CK- respectivamente.

[0017] A Figura 4 é um esquema que mostra a condição de morte de larvas de terceiro instar de *Plutella xylostella* após as mesmas serem alimentadas com folhas repolho embebidas com C7, CK+ e CK-, respectivamente.

DESCRIÇÃO DETALHADA DAS CONCRETIZAÇÕES

[0018] Concretização 1. Teste de gene resistente a inseto derivado de ser humano

[0019] Fórmulas de meio e reagentes envolvidas na concretização:

[0020] (1) meio fluido de 2×TY:

[0021] Adicionar 16 g de triptona, 10 g de extrato de levedura e 5 g de NaCl em 900 mL de água bidestilada, misturar os mesmos bem, ajustar o volume para 1 L com água bidestilada, colocar o líquido em um autoclave, esterilizar a 121 °C por 20 minutos, resfriar o mesmo e armazenar o mesmo a 4 °C para uso futuro.

[0022] (2) meio fluido de 2×TY-AG:

[0023] Adicionar ampicilina com concentração final de 100 µg/mL e glicose com uma razão de massa de 1% para meio de cultura de 2×TY.

[0024] (3) meio fluido de 2×TY-AK:

[0025] Adicionar ampicilina com concentração final de 100 µg/mL e canamicina com uma concentração final de 50 µg/mL para meio de cultura de 2×TY.

[0026] (4) meio fluido de 2×TY-AGK:

[0027] Adicionar ampicilina com concentração final de 100 µg/mL, canamicina com concentração final de 50 µg/mL e glicose com uma razão de massa de 1% para meio de cultura de 2×TY.

[0028] (5) meio sólido de TYE:

[0029] Adicionar 15,0 g de agarose, 8 g NaCl, 10 g de triptona e 5 g de extrato de levedura a 900 mL de água bidestilada, ajustar o volume para 1 L com água bidestilada, colocar o líquido em um autoclave, esterilizar a 121 °C por

20 minutos, resfriar o mesmo e armazenar o mesmo a 4 °C para uso futuro.

[0030] (6) meio sólido de TYE-AG:

[0031] Adicionar ampicilina com concentração final de 100 µg/mL e glicose com uma razão de massa de 1% para meio sólido de TYE.

[0032] (7) solução de PBS

[0033] Pesar 8,0 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 2,9 g de Na₂HPO₄·12H₂O e 0,2 g de KH₂PO₄, adicionar os mesmos em água destilada respectivamente, dissolver os mesmos completamente e ajustar o volume para 1 l.

[0034] (8) solução de PBST

[0035] Adicionar Tween-20 com uma razão de volume de 0,05% para solução de PBS.

[0036] (9) solução de PEG/NaCl:

[0037] Pesar 20 g de PEG 8000 e 14,61g de NaCl, adicionar 80 mL de água desionizada, ajustar o volume para 100 mL, colocar a solução em uma autoclave, esterilizar a mesma a 121 °C por 20 minutos, resfriar a mesma e armazenar a mesma a 4 °C para uso futuro.

[0038] (10) solução tampão de citrato (CPBS, pH=5,5):

[0039] Pesar 21 g de C₆H₇O₈ (ácido cítrico) e 71,6 g de Na₂HPO₄·12H₂O, adicionar os mesmos a água destilada respectivamente, dissolver os mesmos completamente e ajustar

o volume para 1 l.

[0040] (11) solução de tetrametil benaidina (TMB) :

[0041] Pesar 10 mg de TMB, dissolver o mesmo em 1 mL de sulfóxido de dimetil, manter a solução em um lugar escuro e armazenar o mesmo a 4 °C para uso futuro.

[0042] (12) solução cromogênica de substrato:

[0043] Composição de fórmula de 10 mL: 9,875 mL de CPBS, 100 µL de solução de TMB e 25 µL de H₂O₂ em uma razão de volume de 20%.

[0044] Fontes dos materiais envolvidos na concretização:

[0045] Anticorpo policlonal anti-Cry1B, BBMV, anticorpo de cadeia única Anti-Id irrelevante, Anti-Id ScFv de tipo não "β", folhas de repolho e larvas de terceiro instar de *Plutella xylostella* foram fornecidos pelo *Key Laboratory for Agricultural Product Quality and Safety Control Technology and Standard of the Ministry of Agriculture, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences*;

[0046] Biblioteca de anticorpos em fago humanizados, bactérias de TGI e fago auxiliar KM13 foram adquiridos junto à *British Source BioScience*;

[0047] IgG de cabra anti-M13 com HRP foi adquirido pela *Wuhan Boster Biological Technology Co., Ltd.*;

[0048] As toxinas Cry1B e Cry1Ab foram adquiridas

junto à *Shanghai Youlong Biotech Co., Ltd.*;

[0049] As folhas de arroz com casca e larvas de terceiro ínstar de *Cnaphalocrocis medinalis* foram fornecidas pela *Yangzhou Luyuan Bio-Chemical Co., Ltd.*

CONCRETIZAÇÃO 1: Testar anticorpo de cadeia única de idiótipo de anti-toxina Cry1B

[0050] (1) Adicionar 20 µL de líquido de bactéria de uma biblioteca de anticorpos em fago humanizada a 200 mL de meio fluido de 2×TY-AG, cultivar o mesmo em uma temperatura constante de 37 °C até a OD₆₀₀ ser 0,4, medir 50 mL do líquido de bactéria, adicionar 1×10¹² pfu de fago auxiliar KM13 para superinfecção, incubar o líquido a 37 °C por 30 minutos, então centrifugar a mesma a 3.300 g por 10 minutos, descartar o sobrenadante, usar 100 mL de meio fluido de 2×TY-AG para ressuspender o precipitado e cultivar o mesmo a 30 °C de um dia para o outro; centrifugar o mesmo em 3.300 g por 30 minutos até o próximo dia, coletar o sobrenadante, adicionar 20 mL de solução de PEG/NaCl, manter a mesma em banho frio por 1 hora, então, centrifugar a mesma a 3.300 g por 30 minutos e ressuspender o precipitado por 4 mL de PBS; centrifugar a solução de ressuspensão em 11.600 g por 10 minutos; e o sobrenadante é a biblioteca de anticorpos em fago amplificada;

[0051] (2) Usar a biblioteca de anticorpos em fago amplificada obtida na etapa 1 por quatro ciclos de panning:

no primeiro ciclo de panning, revestir 4 mL de 100 µg/mL anticorpo policlonal anti-Cry1B ao fundo de um frasco de cultura celular, manter o mesmo a 4°C de um dia para o outro, lavar o frasco de cultura celular com 1 mL de PBS por 3 vezes no próximo dia, então adicionar 1 mL de biblioteca de anticorpos em fago amplificada misturada completamente e 4 mL de solução de MPBS a 3%, colocar o frasco sobre uma mesa oscilante, sacudir lentamente o mesmo em temperatura ambiente por 1 hora, deixar o mesmo descansar por 1 hora, remover o líquido no frasco de cultura, lavar o frasco com 1 mL de solução de PBST por 20 vezes e adicionar 1 mL de 10 mg/mL de tripsina para eluir o anticorpo em fago ligado especificamente. O eluente é o anticorpo em fago obtido no primeiro ciclo de Panning. As concentrações do anticorpo policlonal anti-Cry1B submetido a panning nos segundo, terceiro e quarto ciclos são 50 µg/mL, 25 µg/mL e 10 µg/mL, respectivamente. O anticorpo em fago usado é o anticorpo em fago obtido a partir do ciclo anterior de panning. O método de panning é o mesmo que o adotado no primeiro ciclo. 10 µL do anticorpo em fago submetido a panning no quarto ciclo é usado para infectar 1 mL de bactérias TG1 em uma fase logarítmica. Após o mesmo ter sido incubado a 37 °C por 1 hora, o mesmo é revestido em um meio sólido de TYE-AG e cultivado a 37 °C de um dia para o outro; no próximo dia, colônias unitárias são captadas aleatoriamente, incubadas em

uma placa de 96 poços que contém 100 µL/poço de meio fluido de 2×TY-AG e cultivada a 37 °C de um dia para o outro; no próximo dia, 2 µL de líquido de bactéria é sugado da placa de poço, transferido para uma nova placa com 96 poços e incubada a 37 °C por 2 horas. 25 µL de fago auxiliar KM13 com titulador de 10^{12} é adicionado a cada poço, incubado a 30 °C por 2 horas, centrifugada em 1.800 g por 10 minutos, o precipitado é ressuspenso com 150 µL de meio fluido de 2×TY-AK e, então, cultivado a 30 °C de um dia para o outro. No próximo dia, o mesmo é centrifugado a 1.800 g por 30 minutos. O sobrenadante é coletado;

[0052] (3) 4 µg /mL de anticorpo policlonal anti-Cry1B é medido e adicionado a uma placa com 96 poços, 100 µL/poço, e armazenado a 4 °C de um dia para o outro. No próximo dia, 100 µL do sobrenadante obtido na etapa 2 é adicionado a cada poço. 100 µL de meio fluido de 2×TY-AK é adicionado ao controle negativo. Os mesmos são mantidos em banho de água a 37 °C por 2 horas. Após a placa ser lavada com 250 µL/poço de PBST, 100 µL de IgG de cabra anti-M13 com HRP com diluição de 1: 5.000 é adicionado a cada poço e incubado a 37 °C por 2 horas. 100 µL de solução cromogênica de substrato é adicionada a cada poço e reage em temperatura ambiente por 10 a 20 minutos até que um azul apareça. Finalmente 50 µL de 2 mol/L de H₂SO₄ é adicionado a cada poço para terminar rapidamente a reação. OD₄₅₀ é determinada por

ELISA. Se a OD₄₅₀ da solução/ OD₄₅₀ de controle negativo for maior do que 2,1, a mesma será considerada positiva. O sobrenadante na etapa 2 correspondente a essa solução é o sobrenadante testado que contém o anticorpo de cadeia única de idiótipo de anti-toxina Cry1B.

[0053] A sequência nucleotídica do anticorpo de cadeia única de idiótipo de anti-toxina Cry1B testado determinado pelo método de sequenciamento de Sanger é SEQ ID NO.1, conforme mostrado abaixo:

attgtctgcg gccccgtgat ggtgatgatg atgtgcgggc gcccgtttga tttccacctt	60
ggtcccttgg ccgaacgtag aaggataagc agcagcctgt tgacagtagt aagttgcaaa	120
atcttcaggt tgcagactgc tgatggtgag agtgaaatct gtcccagatc cactgccact	180
gaaccttgat gggacccac tttgcaaaga ggatgcacta tagatcagga gcttaggggc	240
tttccttggg ttctgctgat accaatttaa atagctgcta atgctctgac ttgcccggca	300
agtgatggtg actctgtctc ctacagatgc agacagggag gatggagact gggatcatctg	360
gatgtccgtc gaccgccac cgccgtgcc acctccgctc gaaccgcctc caccgctcga	420
gacggtgacc agggttccct ggccccagta gtcaaaataa gcaccagatt tcgcacagta	480
atatacggcc gtgtcctcgg ctctcaggct gttcatttgc agatacagcg tggtcttgga	540
attgtctctg gagatggtga accggccctt cacggagtct gcgtaacctg tagcaccacc	600
attattagca atagttgaga cccactccag ccccttccct ggagcctggc ggacccagct	660
catggcatag ctgctaaagg tgaatccaga ggctgcacag gagagtctca gggaccccc	720
aggctgtacc aagcctcccc cagactccaa cagctgcacc tcggccatgg ccggtgggc	780
cgcgagtaat aacaatccag cggtgccgt aggcaatagg tatttcatta tgactgtctc	840
ctgaaataga attgt	855

[0054] Após a tradução de nucleotídeo, a sequência de aminoácidos do anticorpo de cadeia única de idiótipo de anti-toxina Cry1B testado determinado pelo método de sequenciamento de Sanger é SEQ ID NO.2, conforme mostrado abaixo:

H-CDR1

MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAEVQLLES GGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWV
R 60

H-CDR2

QAPGKGLEWVSTIANNGGATGYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
K 120

H-CDR1 -----Link-----

SGAYFDYWGGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRA
S 180

L-CDR1

L-CDR2

QSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYSASSLQSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISLQPEDFAT
Y 240

L-CDR3

His-tag

YCQQAAAYPSTFGQGTKVEIKRAAAHHHHHHGAAEQKLISEEDLNGAASP
291

[0055] O **depositante nomeia** esse anticorpo de cadeia única de idiótipo de anti-toxina Cry1B como **C7**.

CONCRETIZAÇÃO 2: Preparar cultura primária de C7

[0056] O sobrenadante obtido através da triagem na Concretização 1 e que contém o anticorpo de cadeia única de idiótipo de anti-toxina Cry1B é transferido para 10 mL de meio fluido de 2×TY-AG em uma razão de volume de 1: 100 e incubado a 37 °C por 2 horas. 100 µL de fago auxiliar KM13 com titulador de 10¹² é adicionado para recuperação, incubado a 30 °C por 2 horas e centrifugado a 1.800 g por 10 minutos. O sobrenadante é removido. O meio fluido de 2×TY-AK é usado

para ressuspender as bactérias precipitadas. O mesmo é cultivado enquanto é agitado a 30 °C e a 250 rpm de um dia para o outro. No próximo dia, o mesmo é centrifugado a 1.800 g por 30 minutos. Seu sobrenadante é o sobrenadante que contém a cultura primária de C7.

CONCRETIZAÇÃO 3: Identificação de subtipo de C7

[0057] (1) Experimento de detecção por ELISA da inibição competitiva

[0058] O experimento adota 6 grupos experimentais e grupos de controle correspondentes. As soluções são preparadas com base na Tabela 1.

TABELA 1 Preparação de soluções para experimento de detecção por ELISA

Grupo	C7	Anticorpo de cadeia única anti-Id irrelevante	meio fluido de 2×TY
Grupo experimental 1	5 µL		45 µL
Grupo de Controle 1		5 µL	45 µL
Grupo experimental 2	10 µL		40 µL
Grupo de Controle 2		10 µL	40 µL
Grupo	20 µL		30 µL

Grupo	C7	Anticorpo de cadeia única anti- Id irrelevante	meio fluido de 2×TY
experimental 3			
Grupo de Controle 3		20 µL	30 µL
Grupo experimental 4	30 µL		20 µL
Grupo de Controle 4		30 µL	20 µL
Grupo experimental 5	40 µL		10 µL
Grupo de Controle 5		40 µL	10 µL
Grupo experimental 6	50 µL		
Grupo de Controle 6		50 µL	

[0059] Na Tabela 1, C7 é o sobrenadante obtido na Concretização 2 e que contém a cultura primária de C7;

[0060] Adicionar 50 µL de 10 µg/mL de anticorpo policlonal anti-Cry1B às soluções preparadas na Tabela 1, respectivamente, incubar as mesmas a 37 °C por 2 horas, adicionar as mesmas a uma placa com 96 poços revestida com 2 µg/mL de toxina Cry1B respectivamente (a placa com 96 poços revestida 2 µg/mL de toxina Cry1B é obtida adicionando-se 2

µg /mL de toxina Cry1B a uma placa com 96 poços no dia anterior, 100 µL/poço e manter a 4 °C de um dia para o outro), reagir por 2 horas; lavar a placa com 250 µL/poço de PBST 3 vezes, adicionar 100 µL/poço de IgG de cabra anti-M13 com HRP com diluição de 1: 5.000, incubar em temperatura ambiente por 1 hora; lavar a placa com 250 µL/poço de PBST 3 vezes, adicionar 100 µL/poço de solução cromogênica de substrato, reagir em temperatura ambiente por 10 a 20 minutos até que um azul apareça e no fim adicionar 50 µL/poço de 2 mol/L de H₂SO₄ para terminar rapidamente a reação; determinar OD₄₅₀ por ELISA.

[0061] Os resultados experimentais são conforme mostrado na Figura 1. A razão de inibição aumenta com o aumento de teor de C7. Os grupos de controle não têm o fenômeno de inibição competitiva, sugerindo que C7 é o anticorpo de cadeia única Anti-Id do tipo β e pode simular a toxina Cry1B para se ligar de forma competitiva ao anticorpo policlonal anti-toxina Cry1B.

[0062] (2) Experimento de determinação biológica

[0063] O experimento tem grupo experimental 1, grupo experimental 2, grupo experimental 3, grupo de controle positivo, grupo de controle negativo 1, grupo de controle negativo 2 e grupo de controle negativo 3; sendo que o procedimento experimental é conforme a seguir:

[0064] (a) Bloqueio: Revestir 100 µL /poço de 5

µg/mL BBMV em uma placa com 96 poços, manter a mesma a 4°C de um dia para o outro, lavar a placa com 250 µL/poço de PBST 3 vezes, no próximo dia, adicionar 200 µL de BAS com uma razão de massa de 3%, respectivamente, incubar em temperatura ambiente por 2 horas, e executar o bloqueio;

[0065] (b) Adição de amostra: Lavar a placa com 96 poços bloqueada na etapa 1 com 250 µL/poço de PBST 3 vezes, e adicionar amostras à placa com 96 poços de acordo com a Tabela 2:

TABELA 2 Preparação de Soluções para experimento de determinação biológica de C7

Grupo	2 µg/mL de toxina Cry1B	C7	Anti-Id ScFv do tipo não "β"	meio fluido de 2×TY-AG	CPBS
Grupo experimental 1	50 µL	10 µL		40 µL	
Grupo experimental 2	50 µL	30 µL		20 µL	
Grupo experimental 3	50 µL	50 µL			
Grupo de controle positivo	50 µL				50 µL
Grupo de controle	50 µL		10 µL	40 µL	

Grupo	2 µg/mL de toxina Cry1B	C7	Anti-Id ScFv do tipo não "β"	meio fluido de 2×TY-AG	CPBS
negativo 1					
Grupo de controle negativo 2	50 µL		30 µL	20 µL	
Grupo de controle negativo 3	50 µL		50 µL		

[0066] Na Tabela 2, C7 é o sobrenadante obtido na Concretização 2 e que contém a cultura primária de C7;

[0067] (c) Incubar a placa com 96 poços adicionada com a amostra na etapa b em temperatura ambiente por 2 horas, lavar a placa com 250 µL/poço de PBST 3 vezes, adicionar 100 µL/poço de 10 µg/mL de anticorpo policlonal anti-Cry1B, então lavar a placa com 250 µL/poço de PBST 3 vezes, adicionar 100 µL/poço de IgG de cabra anti-M13 com HRP com diluição de 1: 5.000 e incubar em temperatura ambiente por 1 hora; lavar a placa com 250 µL/poço de PBST 3 vezes, adicionar 100 µL/poço de solução cromogênica de substrato por poço, reagir em temperatura ambiente por 10 a 20 minutos até que um azul apareça e no fim adicionar 50 µL/poço de 2 mol/L de H₂SO₄ para terminar rapidamente a reação e determinar OD₄₅₀ por ELISA.

[0068] O resultado experimental é conforme mostrado na Figura 2. Em comparação ao controle positivo, o anticorpo de cadeia única de idiótipo de anti-toxina Cry1B C7 (grupos experimentais 1, 2 e 3) pode inibir a ligação entre a toxina Cry1B e seu receptor BBMV; o controle negativo do tipo não "β" não tem o fenômeno de inibição, o que prova adicionalmente que C7 é do tipo "β".

CONCRETIZAÇÃO 4: Verificar a atividade inseticida do anticorpo de cadeia única de idiótipo de anti-toxina Cry1B

[0069] O experimento tem grupos experimentais e grupos de controle:

[0070] Os grupos experimentais usam o sobrenadante (C7) obtido na Concretização 2 e que contém a cultura primária de C7;

[0071] Os grupos de controle positivo adotam 0,2 g/L de toxina Cry1Ab (CK+);

[0072] Os grupos de controle negativo adotam Anti-Id ScFvs do tipo não "β" (CK-);

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL:

[0073] Medir os grupos experimentais, grupos de controle positivo e grupos de controle negativo, cada um 10 mL, colocá-los em pratos de cultura esterilizados, adicionar 6 folhas de arroz com casca e 6 folhas de repolho respectivamente, embebe-las por 30 minutos, retirar as mesmas e secar as mesmas no ar; alimentar larvas de terceiro

íntar de *Cnaphalocrocis medinalis* e larvas de terceiro íntar de *Plutella xylostella* com folhas secas.

[0074] O resultado experimental é conforme mostrado na Figura 3 e Figura 4. A Figura 3 mostra a condição de morte das larvas de terceiro íntar de *Cnaphalocrocis medinalis* respectivamente alimentadas com folhas de arroz com casca, que foram embebidas com C7, toxina Cry1Ab (CK+) e Anti-Id ScFvs do tipo não "β" (CK-). A Figura 4 mostra a condição de morte das larvas de terceiro íntar de *Plutella xylostella* respectivamente alimentadas com folhas de repolho, que foram embebidas com C7, toxina Cry1Ab (CK+) e Anti-Id ScFvs do tipo não "β" (CK-). Pode ser visto que C7 tem um bom efeito inseticida.

REIVINDICAÇÕES

1. Gene resistente a inseto derivado de ser humano caracterizado por ter uma sequência nucleotídica de SEQ ID NO.1.

2. Anticorpo de cadeia única de idiótipo de anti-toxina Cry1B codificado pelo gene resistente a inseto derivado de ser humano, conforme definido na reivindicação 1, caracterizado por ter uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO.2.

3. Vetor procariótico caracterizado por conter o gene resistente a inseto derivado de ser humano, conforme definido na reivindicação 1.

4. Uso do gene resistente a inseto derivado de ser humano, conforme definido na reivindicação 1, caracterizado por ser no controle de pragas agrícolas.

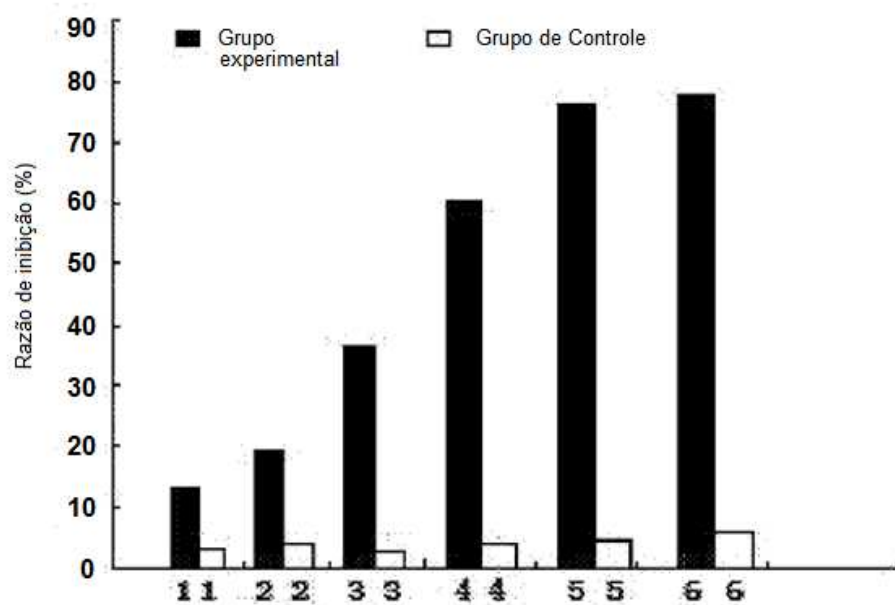


FIG. 1

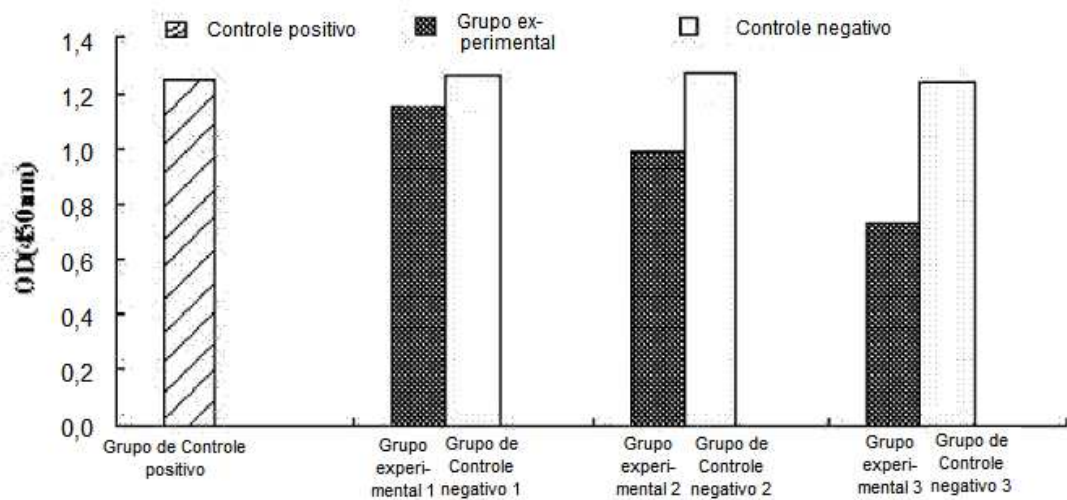


FIG. 2

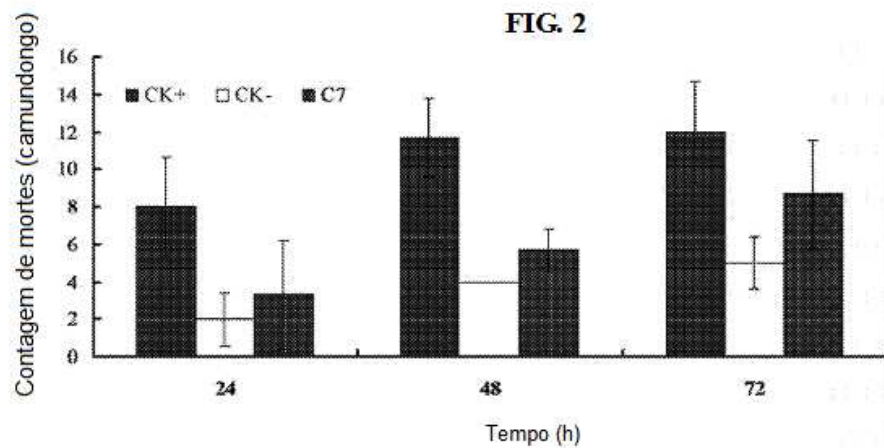
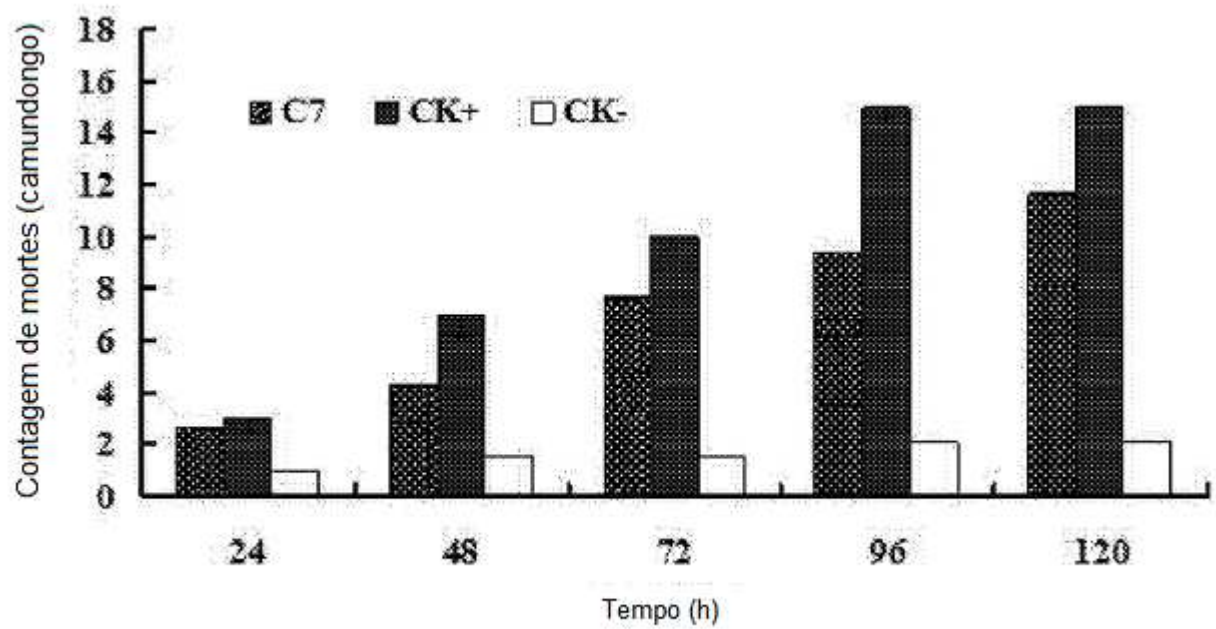


FIG. 3

**FIG. 4**