(19) **RU** (11) **2 106 409** (13) **C1**

(51) МПК[6] **C 12 N 15/32, A 01 N 63/00, C 12 N 15/20**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 5053184/13, 18.09.1992

(30) Приоритет: 20.03.1990 US 496,568

(46) Дата публикации: 10.03.1998

(56) Ссылки: EP, заявка, 0318143, кл. C 12 N 15/20, 1989.

(86) Заявка PCT:
US 91/01786 (18.03.91)

(71) Заявитель:
Экоджен Инк. (US)

(72) Изобретатель: **Вилльям П.Донован[US], Марк Дж.Рупар[US], Аннет С.Слейни[US], Тимоти Б.Джонсон[US]**

(73) Патентообладатель:
Экоджен Инк. (US)

(54) ВЫДЕЛЕННЫЙ И ОЧИЩЕННЫЙ ФРАГМЕНТ ДНК CRY IIIC, ТОКСИЧНЫЙ ДЛЯ ЖЕСТКОКРЫЛЫХ БЕЛОК CRY IIIC, ИНСЕКТИЦИДНАЯ КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ БОРЬБЫ С ЖЕСТКОКРЫЛЫМИ НАСЕКОМЫМИ (ВАРИАНТЫ), ШТАММ БАКТЕРИЙ BACILLUS THURINGIENSIS - ПРОДУЦЕНТ ТОКСИЧНОГО ДЛЯ ЖЕСТКОКРЫЛЫХ БЕЛКА CRY IIIC (ВАРИАНТЫ), ТОКСИЧНЫЙ ДЛЯ ЖЕСТКОКРЫЛЫХ БЕЛОК, СПОСОБ БОРЬБЫ С ЖЕСТКОКРЫЛЫМИ НАСЕКОМЫМИ

(57) Реферат:

Использование: сельскохозяйственная биотехнология, в частности биологическая защита растений от насекомых-вредителей. Сущность: из нового штамма Bacillus thuringiensis получен очищенный и выделенный фрагмент ДНК CryIIIC, который содержит нуклеотидную последовательность оснований, кодирующую аминокислотную последовательность белка CryIIIC, токсичного для жесткокрылых. Токсичный белок CryIIIC эффективен при использовании его в инсектицидных композициях в способе борьбы с жесткокрылыми насекомыми. 8 с. и 3 з.п. ф-лы, 7 табл., 12 ил.

RU 2106409 C1

RU 2106409 C1

(19) **RU** (11) **2 106 409** (13) **C1**

(51) Int. Cl.[6] **C 12 N 15/32, A 01 N 63/00, C 12 N 15/20**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: 5053184/13, 18.09.1992

(30) Priority: 20.03.1990 US 496,568

(46) Date of publication: 10.03.1998

(86) PCT application:
US 91/01786 (18.03.91)

(71) Applicant:
Ehkodzhen Ink. (US)

(72) Inventor: Vill'jam P.Donovan[US], Mark Dzh.Rupar[US], Annet S.Slejni[US], Timoti B.Dzhonson[US]

(73) Proprietor:
Ehkodzhen Ink. (US)

(54) ISOLATED AND PURIFIED DNA FRAGMENT CRY IIIC; PROTEIN CRY IIIC TOXIC FOR COLEOPTERA; INSECTICIDE COMPOSITION TO FIGHT AGAINST COLEOPTEROUS INSECTS (VARIANTS); STRAIN OF BACILLUS THURINGIENSIS BACTERIA - A PRODUCENT OF PROTEIN CRY IIIC TOXIC FOR COLEOPTERA (VARIANTS); PROTEIN TOXIC FOR COLEOPTERA; METHOD TO FIGHT AGAINST COLEOPTEROUS INSECTS

(57) Abstract:

FIELD: agricultural biotechnology, biological plant protection against injurious insects. SUBSTANCE: purified and isolated DNA fragment Cry IIIC that contains nucleotide sequence of bases coding amino acid sequence of protein Cry IIIC is obtained from new strain of Bacillus thuringiensis. Toxic protein Cry IIIC is efficient at its application in insecticide compositions while fighting against coleopterous insects. EFFECT: higher efficiency of plant protection. 8 cl, 4 cl, 7 tbl, 12 dwg

RU 2106409 C1

RU 2106409 C1

Из нового штамма B.t. получен очищенный и выделенный ген типа cry III. Ген содержит нуклеотидную последовательность оснований, кодирующую аминокислотную последовательность, приведенную на фиг. 1-3. Белок 74,4 кДа, продуцируемый этим геном, представляет собой кристалл неправильной формы, токсичный для жесткокрылых насекомых, включая картофельного колорадского жука и насекомых рода Diabrotica.

Ген cry III бациллы THURINGIENSIS и белок, токсичный для жесткокрылых насекомых.

Данное изобретение относится к гену, выделенному из Bacillus thuringiensis (далее называется B.t), кодирующему инсектицидный кристаллический белок, обозначаемый Cry III, а также к инсектицидным композициям, содержащим этот белок, и к растениям, модифицированным с помощью этого гена. Инсектицидные композиции и трансформированные растения токсичны по отношению к отряду жесткокрылых и, в частности, токсичны для насекомых рода Diabrotica.

B. t. представляет собой грам-положительную почвенную бактерию, которая продуцирует кристаллические белки в процессе споруляции, особенно токсичные для насекомых определенных отрядов и видов. Было показано, что многие различные штаммы B.t. продуцируют инсектицидные кристаллические белки. Композиции, содержащие штаммы B.t., продуцирующие инсектицидные белки, производятся промышленностью и используются как приемлемые для окружающей среды инсектициды, поскольку они крайне токсичны для конкретного целевого насекомого, но безвредны для растений и нецелевых организмов.

Ряд генов, кодирующих кристаллические белки, были клонированы из нескольких штаммов B. t. Хороший обзор представлен в H. Hofte et al, Microbiol. Rev. , 53, pp. 242-255 (1989). Хотя этот источник не является известным прототипом по отношению к данному изобретению, он дает хороший обзор генов и белков, получаемых из B.t., и их применению, дает номенклатуру и схему классификации генов и белков B.t., а также содержит обширную библиографию.

Кристаллический B.t. белок активен только после того, как насекомое его съест. После съедания щелочная среда и протеолитические ферменты в среднем кишечнике насекомого растворяют кристалл, что позволяет выделить токсические компоненты. Эти токсичные компоненты разрушают клетки среднего кишечника, что заставляет насекомое прекратить питаться и, возможно, приводит к его смерти. Действительно доказано, что B.t. является эффективным и безопасным для окружающей среды инсектицидом при работе с различными насекомыми-вредителями.

Как отмечено Hofte et al, большинство инсектицидных штаммов B.t. активны против насекомых отряда чешуекрылых, т.е. гусеничных насекомых. Другие штаммы B. t. проявляют инсектицидную активность против насекомых отряда двукрылых, т.е. мух и комаров, или против и чешуекрылых, и двукрылых насекомых. В последние годы сообщалось о нескольких штаммах B.t., продуцирующих кристаллический белок, который проявляет инсектицидную активность по отношению к насекомым отряда жесткокрылых, т.е. жуков.

О первом выделении штамма B.t., обладающего токсичным для жесткокрылых действием, сообщалось A. Krieg et al. в Zangew. Ent., 96, pp. 500-508 (1983); см. также Krieg et al., Anz. Schaedlingskde, Pflanzenschutz, Umweltschutz, 57, pp. 145-150 (1984) и патент США N 4766203, выданный 23 августа 1988, A. Krieg et al. Сообщается, что штамм, обозначенный B.t. var. tenebrionis, является токсичным для личинок жесткокрылых насекомых Agelastica alni (жук-листоед голубой ольхи) и Leptinotarsa decemlineata (колорадский картофельный жук). B.t. tenebrionis дает инсектицидный кристаллический белок размером около 65-70 килоДальтон (кДа) (патент США N 4766203; см. также K. Bernhard, FEMS Microbiol Lett, 33, pp. 261-265 (1986).

V. Sekar et al. , Proc. Nate. Acad. Sci. USA, 84, pp. 7036-7040 (1987) сообщает о клонировании и охарактеризовании гена токсичного для жесткокрылых кристаллического белка, продуцируемого B.t. tenebrionis. Размер белка, как выводится из последовательности гена, составлял 73 кДа, однако выделенный белок содержал главным образом компонент 65 кДа. Hofte et al, Nucleic Acid Research, 15, p.7183 (1987) также сообщает о последовательности ДНК для клонированного гена из B.t. tenebrionis, причем последовательность гена идентична сообщаемой у Stkar et al (1987).

Mc Pherson et al., Bio/Technology, 6. pp. 61-66 (1988) раскрывает последовательность ДНК клонированного гена контроля насекомых из B.t. tenebrionis, и эта последовательность идентична сообщаемой у Sekar et al (1987). Обнаружено, что клетки E.coli и Pseudomonas fluorescens, содержащие клонированный ген, токсичны для личинок картофельного калорадского жука.

Токсичный для жесткокрылых штамм, обозначенный B.t. var. San diego, продуцирует, как сообщает C. Herrnstadt et al., Bio/Technology, 4, pp.305-308 (1986), кристаллический белок размером 64 кДа, токсичный для разнообразных жесткокрылых насекомых: сильная токсичность по отношению к Purrhalta luteola (жук-листоед ильма); умеренная токсичность по отношению к Anthonomus grandis (долгоносик хлопковый), Leptinotarsa decemlineata (картофельный колорадский жук), Otiorhinchus sulcatus (долгоносик бахчевый), Tenemrio molitor (хрущак большой мучной) и Haltica tombacina; слабая токсичность по отношению к Diabrotica undecimpunctata undecimpunctata (жук-блошка II-точечная).

Последовательность ДНК клонированного гена токсина жесткокрылых B.t. san diego сообщалась у C. Herrnstadt et al., Gene, 57, pp. 37-46 (1987); см. также патент США N 4771131, выданный 13 сентября 1988 г. Herrnstadt et al. Последовательность гена токсина B.t. san diego идентична сообщаемой у Sekar et al. (1987) для клонированного гена токсина жесткокрылых B.t. tenebrionis.

A. Krieg et al., J. Appl. Ent., 104, pp. 417-424 (1987) сообщает, что штамм B. t. san

RU 2106409 C1

RU 2106409 C1

diego идентичен штамму B.t. tenebrionis, что доказывается разнообразными диагностическими тестами.

Еще один штамм B.t., обозначенный EG 2158, продуцирует, как сообщает W. P. Donovan et al., Mol. Gen. Genet. 215, pp.365-372 (1988), кристаллический белок весом 73 кДа, который является инсектицидом по отношению к жесткокрылым насекомым. Ген, кодирующий токсин, из EG 2158-штамма B.t. клонировали, инсеквенировали, и его последовательность оказалась идентичной последовательности, сообщаемой у Sekar et al. (1987) для клонированного гена B.t. tenebrionis токсина жесткокрылых. Этот ген токсина жесткокрылых назван cry IIIA у Hofte et al, Microbiol Rev., 53, pp. 242-255 (1989).

В патенте США N 4797279, выданном 10 января 1989 г., авторы Karamata et al, раскрывается гибридный микроорганизм, содержащий плазмиду из B.t. Kurstaki с геном токсина чешуекрылых и плазмиду из B.t. tenebrionis с геном токсина жесткокрылых. Гибридный B. t. продуцируют кристаллические белки, характерные для продуцируемых B.t. Krrstaki, а также для B.t.tenebrionis.

Опубликованная заявка на Европатент N 0303379, опубл. 15 февраля 1989 г. Mycogen Corporation, раскрывает новый изолят B.t., идентифицированный как B. t. MT104, который обладает инсектицидной активностью против и жесткокрылых, и чешуекрылых насекомых.

Опубликованная заявка на Европатент N 0318143, опубл. 31 мая 1989 г, Lubrizol Genetics, Jnc, раскрывает клонирование, охарактеризование и избирательную экспрессию интактного, частично модифицированного гена из B.t. tenebrionis, а также перенос клонированного гена в микроорганизм-хозяин, что дает микроорганизм, способный продуцировать белок, обладающий токсичностью по отношению к жесткокрылым насекомым. Суммируются данные бисанализа на насекомых для B.t. San diego, воспроизведенные по Herrnstadt et al, Bio/Technology, 4, pp. 305-308 (1986). Включены также данные по B.t.tenebrionis из другого источника; сообщают, что B.t. tenebrionis проявляет сильную токсичность по отношению к колорадскому картофельному жуку, умеренную токсичность к western corn rootworm (Diabrotica virgifera virgifera) и слабую к блошке II-точечной Говарда (Diabrotica undecimpuncata).

Опубликованная заявка на Европатент N 0324254, опубл. 19 июля 1989 г., Jmperial Chemical Jndustries PLC, раскрывает новый штамм B.t., идентифицированный как A30, обладающий инсектицидной активностью против жесткокрылых насекомых.

Опубликованная заявка на Европатент N 0328383, опубл. 16 августа 1989 г. , Mycogen Corporation, раскрывает новый микроорганизм B.t. PS40D1, который обладает инсектицидной активностью против жесткокрылых насекомых.

Опубликованная заявка на Европатент N 0330342, опубл. 30 августа 1989 г. , Mycogen Corporation, раскрывает новый микроорганизм B.t., идентифицированный как B. t. PS86B1, который обладает инсектицидной активностью против жесткокрылых насекомых.

Эти последние четыре публикации не являются прототипами по отношению к данному изобретению.

B. t. tenebrionis, о котором впервые сообщил A. Krieg et al, был открыт вблизи Дармштадта, Германия, и полагают, что B.t.San diego, о котором сообщал Herrnstadt et al, был получен вблизи Сан Диего, Калифорния. B.t. штамм EG2158, о котором сообщал Donovan et al., был выделен из образца зерновой пыли из Канзаса. Таким образом, разнообразные штаммы B.t., выделенные из нескольких удаленных друг от друга местностей, содержали очевидно идентичный ген токсина жесткокрылых, ген cry IIIA.

В литературе нет, по-видимому, сообщений о каком-либо другом гене токсина жесткокрылых, помимо уникального гена B.t., впервые обнаруженного в B.t. tenebrionis более чем семь лет назад.

Более того, даже среди различных штаммов B.t., относительно которых сообщалось, что они имеют кристаллические белки, обладающие инсектицидной активностью против жесткокрылых насекомых, не было ни одного, который обнаружил бы значительную токсичность по отношению к личинкам и взрослым особям рода Diabrotica (жук-блошка длинноусая), который включает Western Corn rootworm (Diabrotica virgifera virgifera) блошку II-точечную Говарда (Diabrotica undecimpunctata howardi) и northern corn rootworm (Diabrotica barberi). Ген cryIIIC по данному изобретению экспрессирует белок-токсин, обладающий количественно оцениваемой инсектицидной активностью против насекомых Diabrotica и среди них - жесткокрылых насекомых.

Один из аспектов данного изобретения относится к очищенному и выделенному гену токсина жесткокрылых, имеющему нуклеотидную основную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность, приведенную на фиг. 1-3, и далее обозначаемому как ген CRYIIIC. Ген cryIIIC содержит кодирующую область, простирающуюся от оснований нуклеотида 14 до 1972, показанных на фиг. 1-3.

Другой аспект данного изобретения относится к инсектицидному белку, продуцируемому геном cryIIIC. Белок cryIIIC содержит аминокислотную последовательность, выведенную из нуклеотидной последовательности гена cryIIIC с основания 14 по 1972, что показано на фиг. 1-3. Белок проявляет инсектицидную активность против насекомых отряда жесткокрылых, в частности колорадского картофельного жука, и против насекомых рода Diabrotica.

Еще один аспект изобретения относится к биологически чистой культуре бактерии B.t., хранящейся в NRRL под номером поступления NRRLB-18533 и обозначаемой штамм B.t.EG4961. Штамм B.t.EG4961 несет ген cryIIIC и продуцирует инсектицидный белок cryIIIC. Биологически чистые культуры других B.t.-бактерий, несущих ген cryIIIC, также входят в объем данного изобретения.

Еще один аспект данного изобретения относится к инсектицидным композициям, содержащим в сочетании с приемлемым в сельскохозяйственном отношении носителем

RU 2106409 C1

RU 2106409 C1

либо белок CryIIIC, либо ферментативную культуру штамма B.t., который продуцировал белок CryIIIC.

Изобретение также относится к методу контроля жесткокрылых насекомых путем нанесения на растение-хозяин таких насекомых инсектицидно эффективного количества белка CryIIIC либо ферментативной культуры B.t., в которой содержится белок CryIIIC. Метод применим к разнообразным жесткокрылым насекомым, включая колорадского картофельного жука, жука-листоеда ильма, завезенного ивового жука-листоеда и жука-блошку длинноусую.

Еще один аспект данного изобретения относится к рекомбинантной плазмиде, содержащей ген cryIIIC, биологически чистой культуре бактерии, трансформированной такой рекомбинантной плазмидой, причем бактерия это предпочтительно B.t., а также к растению, трансформированному геном cryIIIC.

Дальнейший аспект данного изобретения относится к методу повышения инсектицидной активности против жесткокрылых насекомых у инсектицидной композиции, содержащей белок-токсин жесткокрылых, который включает добавление или введение в композицию, содержащую белок CryIII, белка CryI в количестве, обеспечивающем эффект повышения инсектицидной активности композиции. Инсектицидные композиции, содержащие белок CryIIIC, и проявляемая белком CryI повышенная инсектицидная активность направлены против насекомых отряда жуков, в частности против колорадского картофельного жука и жука-блошки длинноусой.

Фиг. 1-3 показывают нуклеотидную основную последовательность гена cryIIIC и выведенную аминокислотную последовательность белка CryIIIC. Указан сайт связывания рибосомы (RBS). Указаны также сайты рестрикции HindIII и BamH1.

Фиг. 4 представляет собой фотографию окрашенного этидия бромидом геля агарозы, содержащего фракционированные по размеру нативные плазмиды штаммов B. t. EG2158, EG2838 и EG4961. Числа справа на фиг. 4 указывают приблизительные размеры в мегадальтонах (МДа) плазмид штамма B.t. EG4961.

Фиг. 5 представляет собой фотографию автора диаграммы, полученной переносом плазмиды, показанной на фиг. 4, на нитроцеллюлозный фильтр, гибридизацией фильтра с cryIIIB зондом, 2,4 kilobase (kb), меченным радиоактивными изотопами, воздействие фильтра на рентгеновскую пленку. Число справа на фиг. 5 указывает размер в МДа плазмиды B.t. штамма EG4961, которая гибридизуется с зондом cryIIIB. Буква f справа на фиг. 5 указывает фрагменты, образующиеся при распаде плазмиды, гибридизующей cryIIIB.

Фиг. 6 представляет собой фотографию окрашенного этидия бромидом геля агарозы, содержащего ДНК из B.t. штаммов EG2158, EG2838 и EG4961, выделенных с помощью HindIII плюс EcoRI и разделенных на фракции по размерам электрофорезом. Панель, обозначенная stnd, представляет стандартный размер.

Фиг. 7 представляет собой фотографию авторадиограммы, снятой путем переноса фрагментов ДНК фиг. 6 на нитроцеллюлозный фильтр, гибридизацией фильтра с меченным радиоактивными изотопами зондом cryIIIB, 2,4 kb, и воздействия фильтра на чувствительную к рентгеновским лучам пленку. Числа справа на фиг. 7 указывают размеры в kb рестрикционных фрагментов штамма B.t. EG4961, гибридизованных с зондом cryIIIB. Панель, помеченная stnd, представляет собой стандарт размера.

Фиг. 8 представляет собой фотографию окрашенного Coomassie додецилсульфат натрия - полиакриламидного геля, на котором показаны кристаллические белки, растворенные из B.t.-штаммов EG2158, EG2838 и EG4961. Числа справа на фиг. 8 указывают приблизительные размеры в кДа кристаллических белков, продуцируемых штаммов B.t. EG4961.

Фиг. 9 показывает карту рестрикции плазмиды pEG258. Расположение и ориентация гена cryIIIC показаны стрелкой. Ген, обозначенный "ген cryX", расположен в пределах области, указанной пунктирной линией. Asp заменяет Asp718, Bam заменяет BamH1, H3 заменяет Hind III и P заменяет Pst1 (расщепляющие ферменты). Показан также маркер масштабом 1 kb.

Фиг. 10, в основе которой лежит тот же масштаб, что и для фиг. 9, показывает карту рестрикции плазмиды pEG260, содержащей фрагмент размером 8,3 kb ДНК из штамма B.t. EG4961, где ген cryIIIC показан стрелкой, а ген cryX расположен в пределах области, указанной пунктирной линией. Кроме сокращений, принятых для расщепляющих ферментов на фиг.9, (RV/Asp) обозначает слияние EcoRV и Asp718 сайтов рестрикции, а (RV/Pst)обозначает слияние сайтов рестрикции EcoRV и Pst1.

Фиг.11, в основе которой лежит тот же масштаб, что и для фиг.9, показывает карту рестрикции плазмиды pEG269, содержащей ген cryIIIC, как показано стрелкой, как часть фрагмента ДНК из рекомбинантного штамма E.coli EG7233. Сокращения, использованные для pEC258 на фиг. 9, применимы и к этой фигуре. Кроме того, Sph обозначает сайт рестрикции Sph1, а S3A/Bam обозначает слияние сайтов рестрикции SauIIIA и BamH1.

Фиг. 12 представляет собой фотографию окрашенного Coomassie SDS - полиакриламидного геля. Гель показывает полосы белка, синтезированного следующими бактериальными штаммами: E.coli штамм EG7221 (puC18/Cry$^-$); E.coli штамм EG7218 (pEG258/CryIIIC$^+$ cryX$^+$); B.t. штамм EG7211 (pEG220/Cry$^-$); B.t. штамм EG4961 (cryIIIC $^+$cryX$^+$); B.t. штамм EG7220 (pEG260/cryIIIC$^+$cryX$^+$); B.t. штамм EG7231 (pEG269/cryIII$^+$cryX$^-$). Числа справа от геля указывают приблизительные размеры в кДа кристаллических белков, продуцируемых этими штаммами.

Подробное описание предпочтительных примеров исполнения.

Выделение и очистка гена cryIIIC и кристаллического белка CryIIIC, токсичного для жесткокрылых, и характеристики нового штамма B.t. EG4961, который продуцирует белок CryIIIC, описаны в последующих примерах. Использование штамма B. t.

RU 2106409 C1

RU 2106409 C1

EG4961 и кристаллического белка CryIIIC в инсектицидных композициях и методы также иллюстрируются примерами.

Примеры иллюстрируют также синергетические увеличения инсектицидной активности белка CryIII при введении белка CryI. Таким образом, инсектицидные композиции, отличающиеся сочетанием обоих белков CryIII и CryI, обеспечивают повышенную инсектицидную активность, в частности, по отношению к колорадскому картофельному жуку и блошке-жуку длинноусому, а также к другим насекомым.

Ген типа cryIII по данному изобретению, т.е. ген cryIIIC, обладает нуклеотидной последовательностью оснований, приведенной на фиг. 1-3. Кодирующая область гена cryIIIC простирается от нуклеотидного основания в положении 14 до положения 1972, показанного на фиг. 1-3.

Сравнение нуклеотидных пар оснований кодирующей области гена cryIIIC с соответствующей кодирующей областью cryIIIA гена по известному уровню техники указывает на значительные различия между двумя генами. Ген cryIIIC только на 75% гомологичен (позиционно идентичен) с геном cryIIIA.

Сравнение нуклеотидных пар оснований кодирующей области гена cryIIIC с соответствующей кодирующей областью гена cryIIIB, полученного из недавно открытого штамма B. t. EG2838 (NRRL поступление N B-18603), указывает, что ген cryIIIC на 96% гомологичен (позиционно идентичен) с геном cryIIIB.

Белок типа CryIII по данному изобретению, т.е. белок CryIIIC, который кодирует ген cryIIIC, обладает аминокислотной последовательностью, показанной на фиг. 1-3. В данном описании ссылки на "белок" CryIIIC являются синонимом описанию его как "кристаллического белка", "белкового токсина", "инсектицидного белка" и т.п., если из контекста не следует по-иному. Размер белка CryIIIC, как можно сделать вывод из последовательности ДНК гена CryIIIC, составляет 74,4 кДа.

Размер белка CryIIIB, как выводится из последовательности гена CryIIIB, составляет 74,2 кДа. Для известного белка CryIIIA, который кодируется геном cryIIIA, выведен размер 73,1 кДа.

Несмотря на очевидную аналогичность размера, сравнение аминокислотной последовательности белка CryIIIC с последовательностью известного белка CryIIIA показывает, что между ними существуют значительные различия. Белок CryIIIC только на 69% гомологичен (позиционно-идентичные аминокислоты) белку CryIIIA. Белок CryIIIC на 94% гомологичен белку CryIIIB. Тем не менее, несмотря на явную гомологичность белков CryIIIC и CryIIIB, показано, что белок CryIIIC - это совершенно отличный от CryIIIB белок вследствие значительно более высокой инсектицидной активности по сравнению с CryIIIB по отношению к отряду жесткокрылых и, в частности, к насекомым рода Diabrotica. Белок CryIIIC - это первый B.t. - белок, проявляющий заметную инсектицидную активность против жука-блошки длинноусого.

Данное изобретение охватывает мутантов и рекомбинантных или полученных методами генной инженерии производных гена cryIIIC, которые продуцируют белок, токсичный по отношению к жесткокрылым, с практически такими же свойствами, как и белок CryIIIC.

Ген cryIIIC также можно использовать как зонд гибридизации ДНК для определения аналогичных или близкородственных генов cryIII-типа в других штаммах B. t. Ген cryIIIC или его части, или его производные можно пометить для использования в качестве зонда гибридизации, например, радиоактивной меткой с помощью традиционных способов. Меченный зон гибридизации ДНК можно затем использовать способом, описанным в примерах.

Ген cryIIIC и соответствующий инсектицидный белок CryIIIC были вначале идентифицированы в штамме B.t. EG4961, в новом штамме B.t. Характеристики штамма B.t. EG4961 более полно описаны а примерах. Сравнение плазмидного ряда и других характеристик штамма B.t. EG4961 с характеристиками недавно открытого штамма B.t. EG2838 и известного штамма B.t. EG2158 показывает, что эти три токсичных по отношению к жесткокрылым штамма B.t. совершенно различны.

Ген cryIIIC можно ввести в различные микроорганизмы-хозяева с помощью хорошо известных методов трансформирования подходящего хозяина в условиях, позволяющих стабильное существование и экспрессию клонированного гена cryIIIC. Подходящие хозяева, позволяющие экспрессию гена cryIIIC и продуцирование белка CryIIIC, включают Bacillus thuringiensis и другие виды бацилл, такие как B. subtilis или B.megaterium. Должно быть ясно, что подвергнутые генетическим изменениям или полученные методами генной инженерии организмы, содержащие ген cryIIIC, могут также содержать другие гены токсинов, присутствующие в том же микроорганизме, и что эти гены могут одновременно продуцировать инсектицидные кристаллические белки, отличающиеся от белка CryIIIC.

Штаммы Bacillus, описанные в данном изобретении, можно культивировать на традиционной ростовой среде и стандартными ферментативными методами. Штаммы B. t. , содержащие ген cryIIIC, можно сбраживать, как описано в примерах, до тех пор, пока клетки B.t. в культуре не достигнут стадии цикла роста, когда образуется кристаллический белок CryIIIC. Для спорогенных штаммов B.t. сбраживание обычно продолжают и на стадии споруляции, когда вместе со спорами образуется кристаллический белок CryIIIC. Культуру B.t. затем собирают центрифугированием, фильтрацией и т.п. методами, чтобы отделить твердые, в которых содержится кристаллический белок CryIIIC, от водного бульона культуры.

Штаммы B. t. , примеры которых даются в данном описании, представляют собой спорообразующие разновидности (или спорогенные штаммы), но ген cryIIIC также используют в непосредственных штаммах Bacillus,т.е. в штаммах, продуцирующих кристаллический белок без продуцирования спор. Должно быть понятно, что ссылки на "бродящие культуры" штаммов B.t. (в которых содержится ген cryIIIC) в данном описании

RU 2106409 C1

RU 2106409 C1

охватывают спорулированные культуры B.t., содержащие кристаллический белок CryIIIC и споры, и спорогенные штаммы Bacillus, которые продуцировали кристаллический белок на вегетативной стадии, а также неспорогенные штаммы Bacillus, содержащие ген cryIIIC, в которых культура достигла стадии роста, когда действительно происходит продуцирование кристаллического белка.

Отделенные твердые представляют собой главным образом кристаллический белок CryIIIC и споры B.t., а также некоторое количество дебриса, некоторое количество интактных клеток и остатки твердых продуктов среды брожения. При необходимости кристаллический белок можно отделить от других выделенных твердых, что осуществляют традиционными методами, например фракционированием с градиентом плотности сахарозы. Белок CryIIIC высокой чистоты можно получить растворением выделенного кристаллического белка и осаждением потом из раствора.

Белок CryIIIC, как отмечалось ранее, является мощным инсектицидным соединением против жесткокрылых насекомых, таких как колорадский картофельный жук, завезенный жук-листоед ивовый и т.п. Белок CryIIIC в противоположность белкам CryIIIA и CryIIIB проявляет измеримую инсектицидную активность против насекомых Diabrotica, например жука-блошки длинноусого, на которые относительно слабо действуют другие кристаллические белки B.t., токсичные для жесткокрылых. Белок CryIIIC можно использовать как активный ингредиент инсектицидных композиций, используемых для контроля жесткокрылых насекомых, таких как были упомянуты выше. Такие инсектицидные композиции или формулы содержат, как правило, приемлемые в сельскохозяйственном отношении носители или аджуванты в дополнение к активному ингредиенту.

Белок CryIIIC можно использовать в инсектицидных формулах в выделенной или очищенной форме, например в виде собственно кристаллического белка. Напротив, белок CryIIIC может присутствовать в выделенных твердых продуктах брожения, полученных из культуры штамма Bacillus, например Bacillus thuringiensis, или другого микроорганизма-хозяина, несущего ген cryIIIC и способного продуцировать белок CryIIIC. Предпочтительные микроорганизмы-хозяева Bacillus включают штамм B.t. EG4961 и генетически усовершенствованные штаммы B. t. , производные от штамма B.t. EG4961. Последние штаммы B. t. можно получить через плазмидную обработку и/или методом сопряжения, и они содержат плазмиду, содержащую нативный ген cryIIIC из штамма B.t. EG4961. Полученный генной инженерией или трансформированный штамм B.t. или другой микроорганизм-хозяин, содержащий рекомбинантную плазмиду, которая экспрессирует клонированный ген cryIIIC, полученный методами технологии рекомбинантной ДНК, также можно использовать.

Примеры таких трансформантов включают штаммы B.t. EG7231 и EG7220, которые содержат клонированный ген cryIIIC на рекомбинантной плазмиде.

Выделенные твердые продукты ферментации содержат главным образом кристаллический белок и (если используют спорообразующий штамм B.t.) споры, могут также присутствовать клеточный дебрис и остатки твердых продуктов среды брожения. Выделенные твердые брожения, содержащие белок CryIIIC, можно высушить при необходимости перед введением в инсектицидную композицию.

Формулы или композиции по данному изобретению, содержащие в качестве активного компонента инсектицидный белок CryIIIC, используют в количествах, обеспечивающих инсектицидный эффект, которые могут меняться в зависимости от таких факторов, как конкретные контролируемые жесткокрылые насекомые, конкретное обрабатываемое растение или культура и способ нанесения инсектицидной композиции. Количество инсектицидной композиции по данному изобретению, обеспечивающее инсектицидный эффект, применяют по способу контроля насекомых по данному изобретению.

Инсектицидные композиции готовят, соединяя компонент, обладающий инсектицидной активностью, с желаемым, приемлемым в сельскохозяйственном отношении носителем. Композиции могут представлять собой дусты или гранулированный материал, или суспензию в масле (растительном или минеральном), или водные либо масляно-водные эмульсии, или смачиваемые порошки, или в сочетании с любым другим материалом носителя, пригодным для использования в сельском хозяйстве. Подходящие сельскохозяйственные носители могут быть твердыми или жидкими, и они хорошо известны. Термин "приемлемый в сельскохозяйственном отношении носитель" охватывает все аджуванты, например инертные компоненты, дисперсанты, поверхностно-активные вещества, связующие, добавки, придающие липкость, и т.д., которые обычно используют в инсектицидных композициях, они хорошо известны специалистам по инсектицидным композициям.

Формулы, содержащие белок CryIIIC и один или более твердых или жидких аджувантов, готовят известными способами, например смешением, гомогенизацией и/или измельчением компонента, обладающего инсектицидной активностью, - CryIIIC с подходящими аджувантами.

Белок CryIIIC и другие белки-токсины жесткокрылых, такие как CryIIIB и CryIIIA, можно также использовать в сочетании с белком CryI, что обеспечивает неожиданно повышенную инсектицидную активность против целевых жесткокрылых насекомых. Специфическая активность белков CryIIIC, CryIIIB и CryIIIA по отношению к жесткокрылым насекомым сильно возрастает при введении или добавлении белка CryI в инсектицидную композицию, содержащую белок CryIII. Этот метод можно использовать для получения синергетической инсектицидной композиции CryIII-CryI путем физического объединения соответствующих белков CryIII и CryI или через объединение штаммов B.t., продуцирующих

RU 2106409 C1

RU 2106409 C1

соответствующие белки. Предпочтительным белком CryI для использования в инсектицидной синергической CryIII-композиции является CryIA и, в частности, CryIA(c), хотя и полагают, что в синергетических композициях можно использовать другие белки CryI. Удивительно, но не наблюдается увеличения инсектицидной активности белка CryI по отношению к чешуекрылым насекомым, т.е. по-видимому отсутствует "обратный синергизм" для белков CryI в присутствии кристаллических белков CryIII.

При необходимости комбинации белков CryIIIC (или CryIIIB) и CryI по данному изобретению можно получить in sity из культур штаммов B.t. или другого микроорганизма-хозяина, несущего такие гены cryIII и гены cryI, способные продуцировать соответствующие белки CryIII и CryI. Такие штаммы или хозяева можно получить методом обработки плазмид и/или сопряжения с участием B.t. или других штаммов или микроорганизма-хозяина, содержащих рекомбинантную плазмиду, которая экспрессирует клонированные гены cryIII и cryI.

Присутствие в композиции белка CryI в количестве, приблизительно эквивалентном количеству белка CryIII, обеспечивает хорошее повышение специфической инсектицидной активности по отношению к жесткокрылым. Меньшее чем это, равное 1: 1, соотношение CryI:CryIII, вероятно, все еще будет обеспечивать удовлетворительный уровень повышения активности белка CryIII.

Инсектицидные композиции по данному изобретению наносят на среду, окружающую жесткокрылое насекомое, как правило, на листву растения или культуры, которые требуется защищать традиционными методами, предпочтительно распылением. Допустимы также другие методы нанесения, например опыление, опрыскивание, пропитывание, инъекции в почву, покрытие семян, покрытие или обрызгивание саженцев и т.п., и они могут потребоваться для насекомых, вызывающих заражение корней или стеблей. Такие методики нанесения хорошо известны.

Ген cryIIIC или его функциональный эквивалент, далее иногда называемый "геном токсина", можно ввести в разнообразные микроорганизмы. Экспрессия гена cryIIIC приводит к продуцированию инсектицидного токсина - кристаллического белка CryIIIC. Подходящие микроорганизмы включают B.t. и другие виды Bacillus, такие как B. subtilis или B. megaterium. Например, в качестве хозяина для гена cryIIIC можно использовать микроорганизмы, колонизирующие на корнях или на растениях. Существуют различные методики, хорошо известные специалистам, для введения гена cryIIIC в микроорганизм-хозяин в условиях, позволяющих стабильное существование и экспрессию гена в полученном трансформанте.

Трансформанты, т.е. микроорганизм-хозяин, содержащие клонированный ген в рекомбинантной плазмиде, можно выделить в соответствии с традиционными методами, обеспечивающими рост только тех микроорганизмов, в которых содержится рекомбинантная плазмида. Затем трансформанты можно проверить на инсектицидную активность. Эти методы также представляют собой известные стандартные процедуры.

Характеристики, особенно важные при выборе клетки-хозяина для целей продуцирования, включают легкость введения гена в клетку-хозяин, доступность систем экспрессии, эффективность экспрессии, стабильность инсектицидного белка CryIIIC с хозяине и присутствие дополнительных генетических возможностей. Клетка-хозяин, содержащий инсектицидный ген cryIIIC, может расти на любой традиционной питательной среде, где получают экспрессию гена cryIIIC и продуцирование белка CryIIIC, как правило, до спорообразования. Споры с клетками, содержащими кристаллический белок, можно собрать в соответствии с традиционными методами, например центрифугированием или фильтрацией.

Ген cryIIIC можно также внедрить в растение, которое способно к экспрессии гена и продуцированию белка CryIIIC, что делает растение более устойчивым к атакам насекомых. Генную инженерию растений с геном cryIIIC можно осуществлять введением желаемой ДНК, содержащей ген, в ткани или клетки растения, использовав молекулы ДНК различных видов и происхождения, которые хорошо известны по генной инженерии растений. Пример методики введения ДНК в ткань растения описан в заявке на Европатент N 0289479, опубликованный 2 ноября 1988 Monsanto Company.

ДНК, содержащую ген cryIIIC или модифицированный ген cryIIIC, способный продуцировать белок CryIIIC, можно ввести в ткани или клетки растения непосредственно с зараженными плазмидами, такими как Ti, плазмида из Agrobacterium tumefaciens, вирусами или микроорганизмами, такими как A. tumefaciens, с помощью лизосом или липосом, путем микроинъекций механическими методами и другими способами, знакомыми по инженерии растений.

В нуклеотидной последовательности оснований гена cryIIIC можно делать вариации, поскольку различные аминокислоты, формирующие кодируемый геном белок, могут определяться более чем одним кодоном, и это также хорошо известно в данной области. Кроме того, могут быть вариации или усечения в кодирующей области нуклеотидной последовательности оснований cryIIIC, позволяющие экспрессию гена и продуцирование функционально эквивалентных форм инсектицидного белка CryIIIC. Эти вариации, которые средние специалисты могут определить без излишних экспериментов по данному описанию, следует рассматривать как входящие в объем данного изобретения, поскольку они полностью эквивалентны заявляемому объекту.

Далее данное изобретение будет рассмотрено более детально со ссылкой на конкретные нелимитирующие примеры. Эти примеры относятся к работе, которая была действительно сделана с помощью известных методов и на производимом в промышленности оборудовании.

Новый штамм B.t. EG4961 выделили по методике, описанной в примере 1.

Пример 1. Выделение штамма B.t.EG4961.

RU 2106409 C1

RU 2106409 C1

Пробы зерновой пыли получили из различных источников в США и зарубежом, как правило, из зернохранилищ. Пробы зерновой пыли обработали путем приготовления суспензии пыли в водном буфере и нагревания суспензии при 60 °С в течение 30 мин для обогащения теплостойкими спорообразующими бактериями типа Bacillus, такими как B.t. Обработанные суспензии пыли разбавили водным буфером и распределили разбавления на агаровых пластинах, так чтобы на поверхности агаровой пластины каждая индивидуальная бактерия из зерновой пыли выросла в колонию. Затем часть каждой колонии перенесли с агаровой пластины на нитроцеллюлозный фильтр. Фильтр обработали NaOH, чтобы вызвать лизис колоний и фиксировать ДНК из каждой колонии на фильтре.

Несколько измененную методику обработки разработали для колоний B.t., используемых в процессе гибридизации колоний, т.к. было обнаружено, что стандартные методики, применяемые для E. coli, не годятся для B.t. При проведении вышеописанной обработки требуются особые условия, чтобы колонии B.t. находились в стадии вегетативного роста, что делает их восприимчивыми к лизису под действием NaOH. Соответственно после того, как часть каждой колонии перенесли на нитроцеллюлозный фильтр, фильтр поместили вверх той стороной, на которой имеется колония, на агаровую среду, содержащую 0,5% (вес./об.) глюкозы. Перенесенные колонии затем выращивали на агар-глюкозной среде в течение 5 ч при 30 °С. Введение 5% глюкозы в агаровую среду и цикл выращивания 5 ч, 30 °С оказались критичными для обеспечения вегетативного состояния колоний B.t. и тем самым их восприимчивости к лизису.

Несмотря на мнение, выражаемое одним по крайней мере исследователем, что попытки использования существующего гена токсина жесткокрылых в качестве зонда для выявления нового гена, токсичного по отношению к southern corn rootworm, будут безуспешными, клонированный ген токсина жесткокрылых использовали в качестве специфичного зонда для обнаружения в пробах зерновой пыли других новых и редких штаммов B.t.

Фрагмент рестрикции ДНК по HindIII размером 2,9 kb, содержащий ген cryIIIA, ранее известный как ген cryC штамма B.t. EG2158 и описанный у Donovan et al. , Mol.Gen. Genet. 214, pp. 365 - 372 (1988), использовали как зонд в процессе гибридизации колоний.

Фрагмент ДНК HindIII cryIIIA размером 2,9 kb, содержащий полный ген cryIIIA, пометили альфа-P^{32}dATP и ферментом Кленова по стандартной методике. Нитроцеллюлозные фильтры, содержащие ДНК из каждой изолированной колонии, термостатировали при 65°С в течение 16 ч в забуференном растворе, содержащем радиоактивно меченный зонд 2,9 kb HindIII cryIIIA, для гибридизации ДНК из колоний, содержащих ДНК из меченного зонда cryIIIA. Гибридизацию проводили при температуре 65°С, чтобы быть уверенными, что ДНК-зонд cryIIIA будет гибридизован только с ДНК из колоний, содержащих ген, аналогичный ДНК-зонду cryIIIA.

Зонд ctyIIIA 2,9 kb гибридизовался со многими колониями B.t. из различных проб зерновой пыли. Исследование этих колоний выявило, что они не содержали никаких генов типа cryIII. В этих колониях содержались гены типа cryI. Гены типа cryI кодируют кристаллические белки, токсичные для жесткокрылых или чешуекрылых, молекулярная масса которых составляет около 130 кДа. Компьютерное сравнение последовательности гена cryIIIA с последовательностью нескольких генов типа cryI выявило, что 3'-конец гена cryIIIA был частично гомологичен частям генов типа cryI. Это открытие подтверждало мнение относительно того, что 3'-конец гена cryIIIA вызывал гибридизацию зонда cryIIIA, 2,9 kb, с колониями B.t., содержащими гены типа cryI.

Чтобы решить эту проблему, зонд HindIII cryIIIA, 2,9 kb, гидролизовали действием фермента XbaI и очистили фрагмент HindIII-XbaI размером 2 kb, в котором содержится ген cryIIIA, минус 3'-конец. Фрагмент HindIII-XbaI, 2 kb, содержит усеченный с 3'-конца ген cryIIIA. Когда фрагмент 2 kb используют в повторных экспериментах по гибридизации колоний, он не гибридизуется с колониями B.t., содержащими ген cryI.

Около 48000 колоний типа Bacillus из проб зерновой пыли испытывали меченным зондом 2 kb HindIII-XbaI cryIIIA. Открыли только один новый штамм B.t. в образце зерновой пыли из Иллинойса, который подвергался специфичной гибридизации с зондом cryIIIA. Этот новый штамм обозначили B.t. EG2838 и поместили в NRRL под номером поступления NRRL B-18603.

Затем еще 50000 колоний типа Bacillus из образцов зерновой пыли также обследовали с помощью меченного зонда 2 kb HindIII-XbaI cryIIIA, но не достигли успеха в идентификации каких-либо штаммов, содержащих новые гены типа cryIII.

Было обнаружено, что штамм B.t. EG2838 обладает инсектицидной активностью по отношению к жесткокрылым насекомым, в частности к колорадскому картофельному жуку. Штамм B.t. EG2838 не обладал заметной инсектицидной активностью по отношению к southern corn rootworm. Ген, обозначенный cryIIIB, выделили из штамма B.t. EG2838 и определили его нуклеотидную последовательность. Ген cryIIIB кодировал кристаллический белок, обозначенный как белок CryIIIB, содержащий 651 аминокислоту, размером 74237 Да. Размер известного белка CryIIIA был ранее вычислен как 73116 Да (644 аминокислоты). Ген cryIIIB на 75% гомологичен гену cryIIIA, а белок CryIIIB на 68% гомологичен белку CryIIIA.

Около 40000 колоний типа Bacillus из тридцати девяти образцов зерновой пыли из различных местностей со всего мира обследовали с помощью зонда cryIIIB, полученного из штамма B.t. EG2838. Зонд cryIIIB пометили по методике, описанной выше для меченного зонда cryIIIA. Меченный зонд cryIIIB состоял из рестрикционного фрагмента SspI, 2,4 kb, из ДНК из штамма B.t. EG2838. Фрагмент содержит полную область кодирования белка для гена cryIIIB

RU 2106409 C1

RU 2106409 C1

токсина жесткокрылых штамма B. t. EG2838. Был открыт новый штамм B.t. из образца зерновой пыли, обладающий способностью специфически гибридизоваться с зондом cryIIIB. Штамм обозначили B.t. EG4961.

Для получения характеристик штамма B.t. EG4961 провели некоторые исследования. Одну серию экспериментов проводили, чтобы получить характеристику флагеллярного серотипа. Дополнительные исследования проводили для определения размеров нативных плазмид в штамме B.t. EG4961 и установления, в которых плазмидах содержатся гены, кодирующие инсектицидный кристаллический белок. Блоттинг-анализ ДНК проводили для определения, может ли любая нативная плазмида штамма B.t. EG4961 гибридизоваться с зондом cryIIIB. Представляло также интерес, несла ли одна встречающаяся в природе плазмида гибридизующий cryIIIB элемент ДНК штамма B.t. EG4961, а не множество плазмид, или хромосомная ДНК. Кроме того, штамм B.t. EG4961 дополнительно оценивали, характеризуя продуцируемые им белки и измеряя инсектицидную активность, связанную со штаммов B.t. EG4961 и его кристаллическими белками. Примеры с 2 по 6 включительно направлены на методику определения характеристик штамма B.t. EG4961, а примеры с 8 по 12 включительно направлены на инсектицидную активность штамма B.t. EG4961.

Пример 2. Характеристика флагеллярного серотипа штамма B.t. EG4961.

Собрали панель флагеллярных антител штамма B.t.-типа для использования в исследованиях серотипа, использовав доступные штаммы B.t.-типа. Штаммы B.t. -типа HD1 (Kurstaki, серотип 3ab), HD5 (Kenyae, серотип 4ac), HD2 (thuringiensis, серотип 1), HD11 (aizawai, серотип 7), HD12 (morrisoni, серотип 8ab) и HD13 (tolworthi, серотип 9) вырастили в жидких культурах (без встряхивания) в условиях, вызывающих продуцирование подвижных вегетативных клеток. Флагеллярные нити отделяли от клеток интенсивным перемешиванием, клетки удаляли центрифугированием, а флагеллярные нити собирали из супернатантов на фильтрах с размером пор 0,2 мкм. Очищенные препараты флагеллярных нитей анализировали электрофорезом на додецилсульфатполиакриламидном геле (SDS-PAGE). Профили SDS-PAGE этих препаратов флагеллярных нитей штаммов B.t. -типа показали основную полосу белка для каждого препарата в диапазоне 20 - 35 кДа.

Очищенные препараты флагеллярных нитей использовали для продуцирования антител у мышей по стандартным методикам. Полученные антисыворотки сортировали на реакцию в стандартных испытаниях на вызываемое антителами склеивание клеток. В этом испытании приготовили последовательные разбавления антисывороток в круглодонном микропланшете с 96 лунками. В лунки добавили фиксированные формалином клеточные суспензии штаммов B.t.-типа (или пробы штаммов для установления серотипа) и не трогали, пока клеточная масса не становилась видна у дна лунки. Испытания оценивали визуально на склеивание клеток со дна планшета с помощью увеличительного зеркала. Антисыворотки, дающие наиболее сильную реакцию с клетками штамма B.t.-типа, из которых они были получены, использовали как реактивы флагеллярных антител.

Клетки от каждого из штаммов B.t. EG2158 и EG4961 отдельно подвергали в виде образцов испытанию на склеивание клеток, используя панель флагеллярных антител от шести штаммов B.t.-типа. В качестве контроля вводили клетки каждого штамма B.t.-типа. Результаты исследования показали, что клетки штаммов B.t.-типа HD1, HD2, HD5, HD11, HD12 и HD13 давали сильную и специфичную реакцию с соответствующими флагеллярными антителами. Клетки штамма B.t. EG2158 давали сильную и специфичную реакцию с флагеллярными антителами morrosoni (штамм B.t.-типа HD12), однако клетки штамма B.t. EG4961 не реагировали ни с одним из антител. Эти результаты подтверждают, что штамм B.t. EG2158 является подвидом morrisoni B.t., и указывают, что штамм B.t. EG4961 не является подвидом morrisoni, Kurstaki, thuringiensis, kenyae, aizawai или tolworthi.

Пример 3. Фракционирование по размерам и зондирование cryIIIB нативных плазмид EG4961.

Штаммы B.t. можно охарактеризовать фракционированием их плазмид по размерам в соответствии с хорошо известной методикой, которую называют электрофорезом в геле агарозы. Метод включает лизис клеток B.t. под действием лизозима и SDS, электрофорез плазмид из лизата через гель агарозы и окрашивание геля этидия бромидом для визуализации плазмид. Более крупные плазмиды, которые медленно движутся через гель, появляются наверху геля, а более мелкие плазмиды появляются ближе к основанию геля.

Гель агарозы на фиг. 4 показывает, что штамм B.t. EG4961 содержит нативные плазмиды весом приблизительно 150, 95, 70, 50, 5 и 1,5 МДа, на что указывают темные горизонтальные полосы. Размеры плазмид вычисляли по сравнению с плазмидами известных размеров (не показаны). Фиг. 4 далее показывает, что токсичный для жесткокрылых штамм B.t. EG2838 содержит нативные плазмиды весом около 100, 90 и 37 МДа. Фиг. 4 также показывает, что токсичный для жесткокрылых штамм B. t. EG2158 содержит нативные плазмиды весом около 150, 105, 88, 72 и 35 МДа. Некоторые из этих плазмид, такие как плазмиды 150 и 1,5 МДа из штамма B. t. EG4961 и плазмида 150 МДа из штамма B.t. EG2158, могут быть не видны на фотографии, хотя их видно в самом геле. Фиг. 4. показывает, что размеры нативных плазмид штамма B.t. EG4961 отличаются от размеров нативных плазмид штаммов B.t. EG2158 и EG2838.

Плазмиды, показанные на фиг. 4, перенесли путем блоттинга из геля агарозы на нитроцеллюлозный фильтр, использовав метод блоттинга по Саузерну, Southern, J. Molec. Biol., 98, pp. 503-517 (1975), и гибридизовали фильтр как описано выше с меченным ДНК-зондом 2,4 kb cryIIIB. После гибридизации фильтр поднесли к рентгеновской пленке. Фотография рентгеновской пленки, приведенная на фиг. 5,

RU 2106409 C1

RU 2106409 C1

показывает (наличием темных полос), что зонд cryIIIB гибридизован с плазмидой 95 МДа штамма B.t. EG4961. Этот результат демонстрирует, что плазмида 95 МДа штамма B.t. EG4961 содержит последовательность ДНК, которая по крайней мере частично гомологична гену cryIIIB. Фиг. 5 показывает также, что зонд cryIIIB гибридизован, как и ожидалось, с плазмидой 88 МДа штамма B.t. EG2158 и с плазмидой 100 МДа штамма B.t. EG2838. Плазмида 88 МДа штамма B. t. EG2158 содержит, как было показано ранее, ген токсина жесткокрылых cryIIIA (смотри Donovan et al., Mol. Gen. Genet., 214, pp. 365-372 (1988). Было показано, что плазмида 100 МДа штамма B.t. EG2838 содержит ген cryIIIB токсина жесткокрылых.

Зонд cryIIIB также гибридизовался с маленькими полосами ДНК в каждом из штаммов B. t. EG4961, EG2158 и EG2838, на что указывает буква f на фиг. 5. Предварительные эксперименты показали, что большие B.t. - плазмиды часто распадаются на фрагменты при электрофорезе. Эти фрагменты нормально мигрируют к положениям линий, указанным буквой f на фиг. 5. Следовательно, наиболее вероятно, что полосы, обозначенные на фиг. 5 буквой f, образуются за счет фрагментации плазмид соответственно 95 МДа, 88 МДа и 100 МДа штаммов B.t. EG4961, EG2158 и EG2838.

Пример 4. Блоттинг-анализ ДНК из штамма B.t. EG4961.

И хромосомную, и плазмидную ДНК из штамма B.t. EG4961 экстрагировали и гидролизовали действием рестриктивных ферментов HindIII плюс EcoRI. Гидролизованную ДНК фракционировали по размерам с помощью электрофореза через гель агарозы и визуализировали фрагменты путем окрашивания этидия бромидом. Фиг. 6 представляет собой фотографию окрашенного геля агарозы, который содержит фракционированные по размеру фрагменты рестрикции штамма B.t. EG4961 по HindIII и EcoRI. Для сравнения идентичным образом обрабатывали ДНК из токсичных по отношению к жесткокрылым штаммов B.t. EG2158 и EG2838. Панель, обозначенная stnd, содержит лямбда-фрагменты ДНК известных размеров, которые служат стандартами размеров. Фиг. 6 показывает, что B.t. - ДНК, расщепленная действием HindIII плюс EcoRI, дает сотни фрагментов ДНК различного размера.

ДНК, показанную на фиг. 6, перенесли из геля агарозы на нитроцеллюлозный фильтр и гибридизовали фильтр при 65°C в забуференном водном растворе, содержащем меченный ДНК-зонд 2,4 kb cryIIIB. После гибридизации рентгеновскую пленку подвергли воздействию фильтра. Фиг. 7 представляет собой фотографию рентгеновской пленки, где числа справа указывают размер в kb гибридизующих cryIIIB-фрагментов штамма B.t. EG4961 по сравнению с лямбда-ДНК, расщепленной действием HindIII, как маркером размера на панели, обозначенной stnd. Фиг. 7 показывает, что ДНК штамма B.t. EG4961, расщепленная под действием HindIII плюс EcoRI, дает гибридизующие cryIIIB-фрагменты размером около 3,8 и 2,4 kb. Фиг. 7 показывает также, что ДНК штамма B.t. EG2838, расщепленная под действием HindIII плюс EcoRI, дает cryIIIB-гибридизующие рестриктивные фрагменты ДНК размером 2,9 и 3,8 kb. Фиг. 7 далее показывает, что приблизительные размеры cryIIIB-гибридизующих рестриктивных фрагментов ДНК штамма B. t. EG2158 составляют 1,6 и 0,7 kb.

Эти результаты предполагают, что штамм B.t. EG4961 содержит ген типа cryIII, который родственен гену зонда cryIIIB, cryIIIB-гибридизующие фрагменты штамма B. t. EG4961 отличаются от фрагментов штаммов B.t. EG2838 и EG2158. Эти результаты, а также результаты дальнейших исследований, описанные в нижеследующих примерах, подтверждают, что ген типа cryIII штамма B.t. EG4961 явно отличается от гена cryIIIB штамма EG2838 и гена cryIIIA штамма EG2158. Ген типа cryIII штамма B.t. EG4961 обозначили cryIIIC.

Пример 5. Характеристики кристаллических белков штамма B.t. EG4961.

Штамм B. t. EG4961 выращивали на вызывающей спорообразование среде DMSG при 30°C до тех пор, пока не происходило спорообразования и лизиса (рост в течение 3-4 дн). Среда DSMG представляет собой 0,4% (вес./об.) питательного бульона Difco, 25 мМ K_2HPO_4, 25 мМ KH_2PO_4, 0,5 мМ $Ca(NO_3)_2$, 0,5 мМ $MgSO_4$, 10 мкМ $FeSO_4$, 10 мкМ $MnCl_2$ и 0,5% (вес./об.) глюкозы. Спорулированную культуру штамма B. t. EG4961 наблюдали под микроскопом и выявили, что она содержала помимо спор B. t. свободно плавающие кристаллы неправильной формы. Как показывает опыт, кристаллы B.t. обычно состоят из белков, которые могут быть токсичными для определенных насекомых. Вид кристаллов штамма B.t. EG4961 отличался от плоских, прямоугольной (или ромбоэдрической) формы кристаллов штамма B. t. EG2158, но отчасти напоминал некоторые кристаллы неправильной формы штамма B.t. EG2838.

Споры, кристаллы и остаточные дебрис лизированных клеток из спорулированной культуры штамма B. t. EG4961 собрали центрифугированием. Кристаллы особым образом солюбилизировали из отделенных центрифугированием твердых продуктов культуры брожения (которые содержат кристаллы, споры и клеточный дебрис), нагревая смесь твердых в солюбилизирующем буфере (0,13 М Трис, pH 8,5, 2% (вес. /об.) SDS, 5% (об./об.) 2 - меркаптоэтпанола, 10% (об./об.) глицерина) при 100°C в течение 5 мин. Солюбилизированные кристаллические белки фракционировали по размеру методом SDS-PAGE. После фракционирования по размеру белки визуализировали путем окрашивания красителем Coomassie. Культуры штаммов B. t. EG2158 и EG2838 обрабатывали идентичным образом в целях сравнения.

Фиг. 8 показывает результаты этих анализов, где числа справа указывают размер в кДа кристаллических белков, синтезируемых штаммом B.t. EG4961. Мажорный белок весом примерно 70 кДа и минорный белок размером около 30 кДа солюбилизировали из центрифугированных твердых, содержащих споры и кристаллы штамма B.t. EG4961. По-видимому, белок весом около 70 кДа

RU 2106409 C1

RU 2106409 C1

штамма B.t. EG4961 по размеру аналогичен токсичному по отношению к жесткокрылым кристаллическому белку размером около 70 кДа штамма B.t. EG2158 и токсичному по отношению к жесткокрылым кристаллическому белку размером около 70 кДа штамма B.t. EG2838. Минорный кристаллический белок размером около 30 кДа штамма B.t. EG4961 в первом приближении аналогичен по размеру кристаллическим белкам приблизительного размера 31 и 29 кДа, продуцируемым штаммом B.t. EG2158, и кристаллическим белкам размером приблизительно 28 кДа и 32 кДа, продуцируемым штаммом B. t. EG2838. Не известно, родственны ли эти небольшие белки друг другу.

В соответствии с методикой примера 4, дальнейший блоттинг-анализ ДНК выявил, что ДНК-зонд cryIIIB, 2,4 kb, специфически гибридизуется с единичным рестрикционным фрагментом Asp718-Pst1, 8,3 kb, ДНК штамма B.t. EG4961. Этот результат подтверждает, что фрагмент 8,3 kb содержал ген cryIIIC.

Фрагмент Asp718-Pst1 размером 8,3 kb штамма B.t. EG4961 выделили, и исследовали рестрикционный фрагмент Asp718-Pst1, 8,3 kb, чтобы подтвердить, что фрагмент содержал ген типа cryIII, и идентифицировать и определить нуклеотидную последовательность оснований гена cryIIIC.

Пример 6. Клонирование и секвенирование гена cryIIIC штамма B.t. EG4961.

Чтобы клонировать фрагмент 8,3 kb, описанный в предыдущем примере, сконструировали библиотеку плазмид штамма B.t. EG4961 путем лигирования отобранных по размеру рестрикционных фрагментов Asp718-Pst1. ДНК штамма B.t. EG4961 в хорошо известный вектор E.coli pUC18. Эта методика подразумевает получение сначала полной ДНК из штамма B.t. EG4961 путем клеточного лизиса с последующим наматыванием, затем двойное расщепление полной ДНК рестриктивными ферментами Asp718 и Pst1, электрофорез расщепленной ДНК через гель агарозы, отрезание слоя геля, содержащего выбранный по фрагменту ДНК размером 7-9 kb, и электроилюирование выбранных по размеру рестрикционных фрагментов Asp718-Pst1 из слоя геля агарозы. Выбранные фрагменты смешали с плазмидным вектором E. coli pUC18, который также был расщеплен действием Asp718 и Pst1. Вектор pUC18 несет ген устойчивости к ампициллину Amp^r и вектор реплицирует в E.coli. К смеси выбранных по размеру рестриктивных ферментов ДНК из штамма B. t. EG4961 и расщепленного вектора pUC18 добавили T4 ДНК-лидазу и ATP, что позволяет лигирование вектора pUC18 с рестрикционными фрагментами штамма B. t. EG4961.

Затем библиотеку плазмид трансформировали следующим образом в клетки E. coli, организм-хозяин, который не содержит представляющего интерес вектора. После лигирования смесь ДНК термостатировали с чувствительным к ампициллину штаммом E. coli, штаммом E.coli HB101, обработанным $CaCl_2$, так чтобы клетки могли принять ДНК. E.coli, в частности штамм HB101, использовали в качестве штамма-хозяина из-за того, что эти клетки можно легко трансформировать рекомбинантными плазмидами, и из-за того, что штамм E.coli HB101 в естественном состоянии не содержит гены, кодирующие кристаллические белки B.t. Поскольку pUC18 привносит резистивность к ампициллину, все клетки штамма-хозяина, приобретшие рекомбинантную плазмиду, должны стать ампициллин-резистентными. После взаимодействия с рекомбинантными плазмидами клетки E.coli распределили на агаровую среду, в которой содержался ампициллин. Из клеток, несущих рекомбинантную плазмиду, на содержащем ампициллин агаре выросло несколько тысяч колоний E. coli.

Затем использовали меченый ген-зонд cry IIIB 2,4 kb в условиях, позволяющих специфическое связывание зонда с трансформированными колониями штамма-хозяина, содержащими фрагмент Asp718 - Pst1 8,3 kb ДНК штамма B.t. EG4961. С зондом 2,4 kb cryIIIB специфически гибридизовалось двенадцать колоний E. coli. Дополнительно исследовали одну cryIIIB - гибридизующую колонию, которую обозначили штамм E.coli EG7218. Штамм E.coli EG7218 содержал рекомбинантную плазмиду, обозначенную pEG258, которая состояла из рестикционных фрагментов ДНК Asp718-Pst1 размером 8,3 kb. Зонд cryIIIB специфически гибридизовался с фрагментом 8,3 kb pEG258. На фиг. 9 приведена рестрикционная карта pEG258.

Фрагмент 8,3 kb pEG258 содержал фрагменты HindIII 2,4 и 3,8 kb и BamH1 - Xba1 4 kb, который специфически гибридизовался с зондом cryIIIB. Фрагмент 2,4 kb Hind III субклонировали в ДНК-секвенирующий вектор M13mp18. Фрагмент 4 kb BamH1 - XbaI субклонировали в ДНК-секвенирующие векторы M13mp18 и M13mp19.

Нуклеотидную последовательность оснований значительной части каждого субклонированного фрагмента ДНК определили по стандартной методике Sanger dideoxy. Для каждого субклонированного фрагмента обе нити ДНК секвенировали с помощью специфичных к последовательности 17-mer олигонуклеотидных праймеров, инициирующих реакции секвенирования ДНК. Секвенирование выявило, что фрагмент 8,3 kb содержал открытую рамку считывания и, в частности, новый ген типа cryIII. Этот новый ген, обозначенный cryIIIC, в значительной степени отличается от гена cryIIIA. Как показано ниже, ген cryIIIC также явно отличается от гена cryIIIB.

Последовательность ДНК гена cryIIIC, кодируемого геном cryIIIC, показана на фиг. 1 - 3. Часть гена cryIIIC, колирующая белок, определяется нуклеотидами, начинающимися с положения 14 и кончающимися положением 1972. Возможный сайт связывания рибосом показан на фиг. 1 как RBC. Размер белка cryIIIC, кодируемого геном cryIIIC, как выведено из открытой рамки считывания гена cryIIIC, составляет 74393 Да (651 аминокислота). Следует отметить, что размер белка cryIIIC по данным SDS-PAGE составляет приблизительно 70 кДа. Следовательно, в данном описании далее будут ссылаться на CryIIIC как на белок с мол. массой около 70 кДа.

RU 2106409 C1

RU 2106409 C1

Ранее было выведено, что размер известного белка CryIIIA составляет 73116 Да (644 аминокислоты). По предварительным данным размер белка CryIIIB составляет 74237 Да (652 аминокислоты).

Секвенирование ДНК выявило присутствие сайтов рестрикции BamH1 и HindIII в гене cryIIIC (смотри фиг.2). Знание положения этих сайтов рестрикции позволяет точно определить положение в ориентацию гена cryIIIC в пределах 8,3 kb фрагмента, что показывает стрелка на фиг. 9.

Для сравнения последовательности гена cryIIIC с последовательностями генов CryIIIB и cryIIIA и для сравнения выведенных аминокислотных последовательностей соответствующих белков CryIIIC, CryIIIB и CryIIIA использовали компьютерную программу Queen and Korn (C. Queen and L.J. Korn, "Analysis of Biological Sequences on Small Computers", DNA, 3, pp. 421 - 436 (1984)).

Нуклеотидная последовательность оснований гена cryIIIC на 96% позиционно идентична нуклеотидной последовательности оснований гена cryIIIB и только на 75% позиционно идентична нуклеотидной последовательности оснований гена cryIIIA. Таким образом, несмотря на то, что ген cryIIIC родственен генам CryIIIB и cryIIIA, ясно, что ген cryIIIC отличается от гена cryIIIB и в значительной степени отличается от гена cryIIIA.

Было найдено, что выведенная аминокислотная последовательность белка CryIIIC на 94% позиционно идентична выведенной аминокислотной последовательности белка CryIIIB, но только на 69% позиционно идентична выведенной аминокислотной последовательности белка CryIIIA. Эти различия вместе с различием в инсектицидной активности, о чем говорилось выше, ясно показывают, что белок CryIIIC, кодируемый геном cryIIIC, представляет собой белок, отличный от белка CryIIIB или белка CryIIIA.

Кроме того, хотя и не желая связываться какой-либо теорией, на основании сравнения аминокислотных последовательностей белка CryIIIC и белка CryIIIB полагают, что следующие аминокислоты могут иметь значение для повышения токсичности по отношению к corn rootworn белка CryIIIC, где числа после принятых сокращений аминокислот указывают положения аминокислоты в последовательности, приведенной на фиг. 1 - 3: His9, Yis231, Gln339, Phe352, Asn446, His449, Val450, Ser451, Lys600 и Lys624. Эти аминокислотные остатки выбрали как имеющие потенциальное значение для токсичности белка CryIIIC по отношению к corn rootworm, так как после исследования аминокислотной последовательности некоторых других белков CryIII аминокислоты в указанных положениях совершенно четко показали другие аминокислоты по сравнению к указанными для белка CryIIIC.

Пример 7. Экспрессия клонированного гена cryIIIC.

Провели исследования для определения продуцирования белка CryIIIC геном cryIIIC.

Таблица 1 суммирует соответствующие характеристики штаммов B.t. и E.coli и плазмид, используемых в процессе этих процедур. Плюс (+) указывает на присутствие обозначенного элемента, активность или функцию, а (-) указывает на их отсутствие. Обозначения s и r указывают соответственно чувствительность и резистентность к антибиотику, с которым каждый из них используется. Используемые в таблице сокращения имеют следующие значения: Amp - ампициллин, Cm - хлорамфеникол, Cry - кристаллический, Tc - тетрациклин.

Клетки E. coli, несущие клонированный 8,3 kb фрагмент, описанный в примере 6, анализировали на продуцирование кристаллического белка CryIIIC размером 70 кДа.

Опыт показал, что клонированные B.t.-гены кристаллических белков дают низкий уровень экспрессии в E.coli и высокий в B.t. Рекомбинантная плазмида pEG258, сконструированная как описано в примере 6, будет реплицировать в E. coli, но не в B.t. Чтобы получить высокий уровень экспрессии клонированного гена cryIIIC, 8,3 kb фрагмент cryIIIC перенесли из pEG258 в плазмидный вектор pNN101 ($Tc^rCm^rCry^-$), который способен к репликации в B.t.

Плазмидную конструкцию pEG258 выделили из штамма E.coli EG7218 путем обработки лизосома/SDS с последующим осаждением ДНК плазмиды под действием этанола, причем всегда использовали стандартные методики. ДНК плазмиды pEG258 затем использовали для трансформации клеток штамма E. Coli GM2163, которым придали компетентность обработкой хлоридом кальция, описанной в примере 6. Штамм E. coli GM2163 является негативным по кристалличности (Cry^-) и ампициллин - чувствительным (Amp^3) штаммом, сконструированным по методикам M. G. Marinus et al. , B Mol. Gen. Genet., 192, pp. 288 - 289 (1983).

Плазмидную конструкцию pEG258 снова выделили, на этот раз из трансформированного штамма E. coli GM2163, использовав только что описанную методику. Выделенную ДНК плазмиды pEG258 рассекали по Asp718 и Pst1. Рассеченную плазмиду подвергли электрофорезу через гель агарозы и электроэлюировали 8,3 kb фрагмент Asp718-Pst1 CryIIIC. Концы фрагмента 8,3 kb "затупили" с помощью T4-полимеразы трифосфатов дезоксинуклеотидов, так чтобы заполнить концы Asp718 и Pst1.

Фрагмент 8,3 kb с "затупленными" концами смешали с вектором pNN101 Bacillus, который был рассечен по EcoRV. К смеси добавили T4 ДНК лидазу и ATP, так чтобы соединить затупленные концы фрагмента 8,3 kb с сайтом EcoRV вектора pNN101. После лигирования смесь ДНК добавили к суспензии клеток штамма B. t. HD73-26. Клетки штамма B.t. HD73-26 являются негативными по кристалличности (Cry^-) и чувствительными к хлорамфениколу (Cm^s). Используя метод электропорации, клетки штамма B.t. HD73-26 в смеси вынудили принять рекомбинантную плазмидную конструкцию, состоящую из pNN101 и лигированного 8,3 kb фрагмента, который также присутствовал в смеси. Таким образом, рекомбинантную плазмиду трансформировали электропорацией в штамм B.t.HD73-26.

После электропорации

RU 2106409 C1

RU 2106409 C1

трансформированные B.t. клетки распределили на агаровую среду, содержащую 5 мкг хлорамфеникола, и выдерживали в течение примерно 16 - 18 ч при 30°C. Клетки, которые приняли плазмиду pNN101, должны вырастать в колонии на хлораминфениколовом агаре, тогда как не поглотившие плазмиду клетки не будут расти. Колонии Cm^r перенесли на нитроцеллюлозу, затем зондировали радиоактивно меченым геном cryIIIB и одну колонию, обозначенную штамм B. t. EG7220, которая специфически гибридизовалась с зондом cryIIIB, исследовали дополнительно.

EG7227 содержал плазмиду, обозначенную pEG260, которая состояла из 8,3 kb фрагмента cryIIIC, внедренного в сайт EcoRV вектора pNN101. Карта рестрикции плазмиды pEG260 показана на фиг. 10.

Клетки штамма B.t. EG7220 росли на спорулирующей среде, содержащей хлорамфеникол (5 мкг/мл), при 23 - 25°C до тех пор, пока не произошли спорообразование и лизис клеток (3 - 4 дн). Микроскопическое исследование выявило, что культура штамма B.t.EG7220 содержала споры и свободно плавающие кристаллы неправильной формы.

Споры, кристаллы и клеточный дебрис из спорулированной культуры штамма B.t.EG7220 собрали центрифугированием. Кристаллы перевели в раствор нагреванием центрифугированной смеси твердых в солюбилизирующем буфере (0,13 M Tris, pH 8,5, 2% (вес./об.) SDS, 5% (об./об.) 2-меркаптоэтанола, 10% (об. /об.) глицерина) при 100°C в течение 5 мин. После нагревания смесь нанесли на SDS-полиакриламидный гель, и белки, находившиеся в смеси, фракционировали по размеру путем электрофореза. После фракционирования белки визуализировали окрашиванием с помощью красителя Coomassi. Фотография окрашенного Coomassi приведена на фиг. 12.

Фиг. 12 показывает, что штамм B.t. EG7220 продуцировал мажорный белок размером приблизительно 70 кДа и минорный белок размером около 30 кДа. Эти белки, по видимому, идентичны по размеру мажорному белку размером 70 кДа и минорному белку размером около 30 кДа, продуцируемым штаммом B.t EG4961 (фиг.12). Этот результат показывает, что 8,3 kb фрагмент pEG260 содержит два гена кристаллического белка: один, кодирующий белок размером около 70 кДа, и второй, кодирующий белок около 30 кДа.

Ген, кодирующий белок размером примерно около 70 кДа, представляет собой ген cryIIIC, а кодируемый им белок - это белок CryIIIC. Ген, кодирующий кристаллический белок размером около 30 кДа, обозначили cryX, а кодируемый им белок обозначили CryX.

Как ожидалось и как показано на фиг.12, изогенный контрольный B.t. штамм, обозначенный EG7211, состоящий из штамма B.t.HD73-26 и несущий только плазмидный вектор pEG220, не продуцирует белок размером около 70 кДа или белок размером около 30 кДа. Плазмида pEG220 представляет собой ампициллин-резистентный, тетрациклин-резистентный, хлорамфеникол-резистентный и негативный по кристаллическим белкам шаттл-вектор E.coli-Bacillus, состоящий из pBR322, лигированного в Sph1 сайт pNN101.

Клетки E. coli, несущие клонированный 8,3 kb фрагмент, содержащий ген cryIIIC и ген cryX, анализировали на продуцирование белков размером около 70 и 30 кДа. Клетки E.coli, pEG258 и обозначенные как штамм EG218 вырастили до последней стационарной фазы и собрали клетки центрифугированием. Клетки штамма E. coli EG7218 лизировали, перевели весь клеточный белок в раствор, нагревая клетки в белковом буфере. Комплемент белков, солюбилизированных из клеток E. coli EG7218, оказался идентичен комплементу белков, солюбилизированных из отрицательного контрольного штамма E.Coli, обозначенного EG7221, который нес только плазмидный вектор pUC18, как показано на фиг.12. Этот результат показывает, что клетки E.coli, несущие клонированный 8,3 kb фрагмент cryIIIC, продуцируют очень немного, если вообще продуцируют, кристаллического белка размером 70 кДа или 30 кДа.

Для выделения гена cryIIIC, обеспечивающего продуцирование белка CryIIIC размером около 70 кДа, использовали следующие методики.

Фрагмент Sau3A штамма B.t.EG4961, который содержал ген cryIIIC, но не ген cryX, клонировали с помощью гена cryIIIB как зонда. Это сопровождалось частичным расщеплением ДНК из штамма B. t. EG4961 под действием Sau3A, электрофорезом расщепленной ДНК через гель агарозы и отрезанием слоя геля, содержащего фрагменты Sau3A от 4kb до 9kb. Фрагменты Sau3A электроэлюировали из слоя геля и смешивали с плазмидным вектором pBR322, который был расщеплен по BamH1. Смесь лигирования термостатировали с отработанными $CaCl_2$ клетками штамма E.coli DH5a, что позволило клеткам воспринять плазмидную ДНК.

После термостатирования клетки поместили на агаровые пластины, содержащие ампициллин и среду LB (1% (вес./об.) Difco trypton, 0,5% (вес./об.) экстракта дрожжей Difco, 0,5% (вес. /об.) NaCl, pH 7), чтобы отобрать те клетки, которые абсорбировали плазмидную ДНК. Несколько сотен колоний Amp^r трансформантов подвергли блоттингу на нитроцеллюлозных фильтрах, и фильтры зондировали радиоактивно меченным зондом cryIIIB, как описано в примере 1. Зонд гибридизировали с несколькими колониями, и ниже приведены характеристики одной из этих колоний, обозначенной EG7232. Штамм E.coli EG7232 содержал плазмиду, обозначенную pEG268, которая состояла из pBR322 плюс внедренный ДНК фрагмент Sau3A-BamH1 размером около 5 kb. Внедренный фрагмент ДНК специфически гибридизировался с радиоактивно меченым зондом cryIIIB.

Плазмида pEG268 (Amp^r Tc^s) будет реплицировать в E.coli, но не в B.t. Чтобы получить производное pEG268, репликация которого была бы возможной в B. t. , pEG268 рассекли с помощью Sph1, смешали с плазмидой bacillus PNN101 (Cm^rTc^r), которая также была рассечена под действием

RU 2106409 C1

RU 2106409 C1

Sph1, и смесь лигировали. Смесь лигирования термостатировали с суспензией обработанных $CaCl_2$ клеток E.coli, что позволило клеткам воспринять ДНК из плазмиды pEG269, лигированной с pNN101. После термостатирования клетки поместили на агаровые пластины, содержащие среду LB и тетрациклин, и вырастили несколько сотен тетрациклин-резистентных колоний. Только клетки, абсорбировавшие плазмиду, состоящую из pEG268 и pNN101, будут способны расти и образовывать колонии в присутствии тетрациклина.

Охарактеризование одной из этих Tc ^{r}-колоний, обозначенной EG7233, выбрали предметом дальнейшего исследования. Как и ожидалось, обнаружили, что штамм E.coli EG7233 содержит плазмиду, обозначенную pEG269, которая состояла из pNN101, внедренного в Sph1 сайт pEG268. Карта рестрикции pEG269 показана на фиг.11.

Плазмидную конструкцию pEG269 выделили из штамма E.coli EG7233 обработкой лизозим/SDS с последующим осаждением плазмидной ДНК этанолом, все методики - стандартные. ДНК плазмид pEG269 затем использовали для трансформирования клеток штамма E.coli GM2163, которым придали компетентность с помощью хлорида кальция, как описано выше.

Плазмидную конструкцию pEG269 снова выделили, на этот раз из трансформированного штамма E. coli GM2163. Выделенную ДНК плазмиды pEG269 добавили к суспензии клеток кристалл-отрицательного, хлорамфеникол-чувствительного штамма B. t. HD73-26, и через смесь пропустили электрический ток, так чтобы pEG269 трансформировать электропорацией в штамм B.t.HD73-26. Клетки поместили на пластину с агаром, содержащую среду LB и хлорамфеникол, и вырастили после термостатирования несколько сотен колоний Cm^r. Предметом дальнейших исследований выбрали характеристики одной из колоний Cm ^{r}, обозначенной EG7231. Было обнаружено, как и ожидалось, что штамм B.t.EG7233 содержит pEG269.

Клетки штамма B.t.EG7231 выращивали в среде DSMG, содержащей хлорамфеникол, при 20-23°C в течение 4 дн. Микроскопическое исследование показало, что культура содержала кроме спор частицы, напоминающие кристаллы B.t. Твердые компоненты культуры, включая споры, кристаллы и клеточный дебрис, собрали центрифугированием и приготовили суспензию в водном растворе с концентрацией 100 мг твердых культуры/мл. Часть этой суспензии смешали с солюбилизирующим буфером (0,13 MTris, pH 8,5, 2% (вес./об.) SDS, 5%(об./об.) 2-меркаптоэтанола, 10%(об./об.) глицерина), нагревали при 100°C в течение 5 мин и подвергли смесь электрофорезу через SDS-полиакриламидный гель с целью фракционирования белка по размерам. После фракционирования белки визуализировали окрашиванием геля красителем Coomassi. Фотография окрашенного геля включена в фиг.12.

Штамм B.t.EG7231 продуцировал мажорный белок около 70 кДа, который оказался по размеру идентичен размеру белка CryIIIC размером около 70 кДа, продуцируемого штамм B.t. EG4961, как показано на фиг.12. Штамм B.t. EG7231 не продуцировал регистрируемых количеств кристаллического белка размером около 30 кДа (фиг.12). Этот результат показывает, что ген cryX, кодирующий кристаллический белок размером около 30 кДа, расположен в области, показанной на фиг. 9 и 10 пунктирной линией. Кроме того, это показывает, что штамм B.t. EG7231 содержит ген cryIIIC в изолированном виде.

Следующие примеры 8-12 описывают способ определения инсектицидной активности штамма B.t.EG4961 и белка CryIIIC.

Инсектицидная активность штамма B.t.EG4961 и белка CryIIIC по сравнению со штаммом B.t.EG2158, B.t.tenebrionis и белком CryIIIA.

Пример 8. Общие методики получения и испытания для инсектицидного биоанализа.

Концентраты ферментации. Штаммы B.t.EG4961 и EG2158 и B.t.tenebrionis (B. t. t.) выращивали в жидкой спорулирующей среде при 30°C до тех пор, пока не произошли спорулирование и лизис. Среда содержала источник белка, источник углевода и минеральные соли и представляла собой типичную среду. Добавили NaOH, чтобы довести pH среды до 7,5 перед тем, как поместить в автоклав. Ферментационный бульон сконцентрировали центрифугированием и держали охлажденным до использования.

В том смысле, как используется здесь, кристаллический белок CryIII обозначает кристаллический белок размером около 70 кДа, полученный из культур каждого из испытываемых штаммов B.t.EG4961 и EG2158 и B.t.t. Кристаллические белки CryIII очистили от твердых ферментационной культуры, используя градиенты плотности сахарозы. При использовании градиентов плотности сахарозы для отделения компонентов ферментационной культуры от прорулированных B. t. споры B.t.образуют комок на дне градиента, к а кристаллы B.t. образуют полосу приблизительно посередине градиента. Таким образом, градиенты плотности сахарозы позволяют отделить B.t.-кристаллические белки в относительно чистом виде от B.t. - пор и других твердых ферментационной культуры. Отделенные кристаллические белки CryIII хранили при 4 °C до использования.

Количество кристаллического белка CryIII во всех подвергаемых биоанализу пробах определяли с помощью стандартных процедур SDS-PAGE. Испытывали следующих насекомых: блошку II - точечную Говарда (SCRW) Diabrotica undecimpunctata howardi western corn rootworm (WCRW) Diabrotica vergifera vergifera, колорадского картофельного жука (PBB) Leptinotarsa decemlineata, жука-листоеда ильма Purrhalta luteola, завезенного жука-листоеда ивы Plagiodera versicolora.

Проводили биоанализ двух типов: один с использованием искусственной диета и другой с использованием обмакивания листьев.

Биоанализ с искусственной диетой.

RU 2106409 C1

RU 2106409 C1

Биоанализу подвергали личинки SCRW путем поверхностного загрязнения искусственной диеты по типу Marrone et al., T. Econ. Entomol., 78, pp.290-293 (1985), но без формалина. Каждый биоанализ состоял из восьми последовательных водных разбавлений, причем аликвотные количества наносились на поверхность корма. После высушивания разбавителя (водный раствор 0,005% Triton X-100) личинки первого возраста поместили на корм и термостатировали при 28°C. На каждую дозу испытывали тридцать две личинки. Смертность оценивали через 7 дн. Данные воспроизводящихся биоанализов собирали для анализа (R. T.Daum, Bull.Entomol. Soc. Am., 16 pp.10-15 (1970)), причем корректировали по смерти контроля, где контролем служил только разбавитель (W.S.Abbott, T.Econ. Entomol., 18, pp.265-267 (1925)). Результаты сообщали в виде количества кристаллического белка CryIII на мм^2 площади корма, которое приводило к LC_{50}, т.е. в виде концентрации, убивающей 50% испытываемых насекомых. В скобках приводится 95% доверительный интервал.

Личинки WCRW первой стадии испытывали на той же искусственной диете при одной дозе. Смертность подсчитывали через 48 ч.

Личинки CPB первой стадии испытывали по аналогичной методике, за исключением того, что корм насекомых BioServe's #9380 заменили на картофельные хлопья, добавляемые к искусственной диете. Смертность оценивали через три, а не через семь дней.

Биоанализ с обмакиванием листьев. Для насекомых видов или стадий, для которых нет подходящих искусственных диет, биоанализ проводили, обмакивая подходящий естественный пищевой материал (листья) в суспензии в водном 0,2% растворе Triton X-100 известных концентраций. После того, как стряхнули избыточный материал, листья высушили. Листья, обмокнутые в 0,2% Triton X-100, служит как необработанный контроль.

Пять или десять насекомых окружали в чашке Петри обработанным листом и позволяли кормиться в течение 48 ч. Таким образом испытывали, используя соответствующие источники пищи, взрослые особи SCRW, взрослые особи CPB, личинки и взрослые особи жука-листоеда осины и личинки и взрослые особи завезенного жука-листоеда.

Любые отклонения от вышеописанной методики отмечаются при приведении соответствующих данных.

Пример 9. Инсектицидная активность белков CryIII против личинок CPB, жуков-листоедов ильма и личинок завезенного жука-листоеда ивы.

Штамм B. t. EG4961 аналогичен открытому ранее штамму B.t. EG2158 по активности против личинок CPB при испытаниях на искусственной диете, как показывают данные в таблице 2.

Биоанализ с обмакиванием листьев показал, что штамм B.t. EG4961 аналогичен штамму B. t. EG2158 и B.t.t. по активности против личинок и взрослых особей жука-листоеда ильма и личинок завезенного жука-листоеда ивы.

Пример 10. Инсектицидная активность штаммов B.t. и белков CryIII против личинок SCRW при проведении биоанализа на искусственной диете.

Штамм B.t.EG4961 обладает уникальной активностью против личинок SCRW при проведении биоанализа на искусственной диете по сравнению со штаммов B.t. EG2158 и B.t.t., что показывают данные биоанализа в таблице 3. Сравнительные данные в таблице 3, обозначенные "Ферм. конц. #1" и "Ферм. конц. #2", основаны на различных концентрациях при ферментации штамма B.t. EG4961. Ни штамм B.t.EG2158, ни B.t.t. не вызвали смертности выше 15% при наивысшей испытываемой дозе. Напротив, для штамма B.t. EG4961 были получены величины LC_{50} (т. е. смертность 50% при определенной дозе) (таблица 3).

При проведении биоанализа очищенного кристаллического белка CryIIIC штамма B.t. EG4961 наблюдаемая активность оказалась только слегка ниже, чем для концентратов ферментации штамма B.t. EG4961 (содержащего споры и кристаллы). Этот результат позволил идентифицировать кристаллический белок CryIIIC как токсичный агент штамма B.t. EG4961. Личинки, выжившие при проведении биоанализа штамма B.t. EG4961 (и концентратов ферментации, и очищенного кристаллического белка), росли в крайней степени замедленно по сравнению с необработанными контрольными личинками.

Та незначительная активность, которую проявлял концентрат ферментации штамма B.t. EG2158 против личинок SCRW, была утеряна, когда испытывали отдельно его очищенный кристаллический белок. Даже при концентрации очищенного белка CryIIIA, в пять раз превышающей соответствующее количество кристаллического белка CryIIIC, активность против SCRW оказалась несущественной. Минимальная активность штамма B.t. EG2158 в виде концентратора ферментации, может быть, зависела от того, что вместе с кристаллическим белком CryIIIA присутствовали споры.

Испытания штамма концентратора ферментации B.t. EG4961 биоанализом на искусственной диете при одной дозе против личинок WCRW дали смертность, аналогичную наблюдаемой с личинками SCRW. Как и в случае личинок SCRW, B.t. t. дал смертность, не намного превышающую контроль.

Пример 11. Инсектицидная активность штаммов B.t. EG4961, EG2158 и B.t.t. против взрослых особей SCRW и взрослых особей CPB при биоанализе с маканием листьев.

Кроме уникальной активности против личинок SCRW штамм B.t. EG4961 проявляет также уникальную инсектицидную активность против взрослых стадий SCRW и CPB (таблица 4), по отношении к которым относительно неэффективен штамм B. t. EG2158 или B.t.t. Данные биоанализа насекомых, полученные в результате этих исследований, приведены в таблице 4.

Пример 12. Инсектицидная активность клонированного гена cryIIIC.

Штамм B. t. EG4961 и рекомбинантный штамм B.t. EG7231, содержащий клонированный ген cryIIIC из штамма B.t. EG4961 и описанный в примере 7, вырастили

RU 2106409 C1

RU 2106409 C1

на жидкой спорулирующей среде и сконцентрировали центрифугированием, как описано в примерах 5-7. Оба концентрата подвергали биоанализу против личинок SCRW и личинок CPB на искусственной диете, используя вышеописанные методы, но на трех дозах вместо восьми и 16 личинок CPB на дозу вместо 32. Результаты, приведенные в таблице 5, показывают, что штамм B.t. EG7231 продуцирует кристаллический белок CryIIIC, равный по токсичности белку, обнаруженному в штамме B.t. EG4961.

Кристалл-отрицательный спорулирующий штамм EG7211, который использовали для создания штамма B.t. EG7231, испытывали как дополнительный контроль, и он оказался неактивным. Этот биоанализ подтверждает, что ген cryIIIC продуцирует активный по отношению к жесткокрылым кристаллический белок в штамме B.t. EG4961.

Приведенный ниже пример 13 относится к исследованиям, в которых инсектицидная активность белков CryIII против жесткокрылых насекомых наглядно повышена за счет комбинации белка CryI с белком CryIII. Кристаллы белка CryIA(c) нетоксичны по отношению к жесткокрылым насекомым, но, как известно, активны против многочисленных видов чешуекрылых насекомых.

Пример 13. Синергетическое повышение инсектицидной активности белка CryIII при добавлении белка CryI.

Рекомбинантный штамм B.t. EG1269, продуцирующий только кристаллы белка CryIA(c), выращивали на жидкой спорулирующей среде по методикам, в общем виде описанным в примерах 5-7. Рекомбинантный штамм B.t. EG1269 сконструировали введением плазмиды pEG157 в штамм B.t. HD73-26. Плазмиду pEG157 получали субклонированием гена cryIA(c) из pEG87 (штамм B.t. HD263-6) в челночный вектор pEG147. Кристалл белка CryIA(c) очистили градиентом Renografin, количественно оценили с помощью упоминавшегося ранее метода SDS-PAGE. Равные количества этих кристаллов добавили к кристаллам CryIIIC, и смесь кристаллических белков подвергли биоанализу с искусственной диетой против личинок SCRW. Смесь белков CryIIIC-CryI была намного более токсична, чем кристаллы CryIIIC по отдельности, как ясно указывают данные в таблице 6.

Чтобы обеспечить доступность материалов для тех, кто ими заинтересуется после выдачи патента по данной заявке, до подачи данной заявки мы поместили указанные в таблице 7 микроорганизмы в ARS Patent Collections, Agricultural Research Culture Collection, Northern Regional Research Laboratory (NRRL), 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61064.

Эти депозиты микроорганизмов были сделаны в соответствии с "Будапештским договором по международному признанию депозитов микроорганизмов для целей патентования". Все ограничения, касающиеся доступности этих микроорганизмов для ознакомления, будут сняты после выдачи патента США на основании настоящей заявки.

Данное изобретение может быть выполнено в других конкретных формах без отклонения от духа или существенных его признаков, и соответственно при указании объема данного изобретения следует ссылаться на прилагаемую формулу изобретения, а не на приведенное выше описание.

Формула изобретения:

1. Выделенный и очищенный фрагмент ДНК CryIIIC, имеющий нуклеотидную последовательность, включающую кодирующую область от нуклеотида в положении 14 до нуклеотида в положении 1972, представленную на фиг.1, и кодирующую аминокислотную последовательность, приведенную на фиг.1.

2. Фрагмент ДНК CryIIIC по п.1, отличающийся тем, что для использования в качестве гибридизационного зонда он дополнительно содержит радиоактивную метку.

3. Токсичный для жесткокрылых белок CryIIIC, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную на фиг. 1, и рассчитанную молекулярную массу 74393 Да.

4. Инсектицидная композиция для борьбы с жесткокрылыми насекомыми, содержащая действующее вещество и агрономически приемлемый носитель, отличающаяся тем, что в качестве действующего вещества она содержит белок CryIIIC с аминокислотной последовательностью, приведенной на фиг.1, и рассчитанной молекулярной массой 74393 Да в эффективном количестве.

5. Штамм бактерий Bacillus thuringiensis, депонированный под номером NRRL B-18627, - продуцент токсичного для жесткокрылых белка CryIIIC с молекулярной массой 70 кДа.

6. Штамм бактерий Bacillus thuringiensis, депонированный под номеров NRRL B-18533, продуцент токсичного для жесткокрылых белка CryIIIC с мол.м. 70 кДа.

7. Токсичный для жесткокрылых белок, полученный с использованием штамма бактерий Bacillus thuringiensis NRRL B-18533 и имеющий аминокислотную последовательность, представленную на фиг.1.

8. Инсектицидная композиция для борьбы с жесткокрылыми насекомыми, содержащая действующее вещество и агрономически приемлемый носитель, отличающаяся тем, что в качестве действующего вещества она содержит штамм Bacillus thuringiensis NRRL B-18533 или белок, имеющий аминокислотную последовательность, представленную на фиг.1, и продуцируемый этим штаммом в эффективном количестве.

9. Композиция по п. 8, отличающаяся тем, что дополнительно содержит токсичный для чешуекрылых белок CryI причем белок CryI присутствует в количествах, эффективных для повышения инсектицидной активности композиции против жесткокрылых насекомых.

10. Способ борьбы с жесткокрылыми насекомыми, включающий нанесение на растение-хозяйин инсектицидного агента, отличающийся тем, что в качестве инсектицидного агента используют штамм бактерий Bacillus thuringiensis NRRL B-18533 или белок, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную на фиг.1, и продуцируемый этим штаммом.

11. Способ по п.10, отличающийся тем, что инсектицидный агент включает дополнительно токсичный для чешуекрылых

RU 2106409 C1

RU 2106409 C1

белок CryI в количестве, эффективном для повышения инсектицидной активности способа борьбы против жесткокрылых насекомых.

RU 2106409 C1

RU 2106409 C1

Таблица 1

Штамм или плазмида B. thuringiensis	Соответствующие характеристик
HD73-26	Cry^-, Cm^s
EG7211	pEG220 (Cry^-), несущий PB73-26
EG220	pEG260 ($cryIIIC^+$ $cryX^+$), несущий HD73-26
EG7231	pEG269 ($cryIIIC^+$ $cryX^-$), несущий HD73-26
EG4961	$cryIIIC^+$ $cryX^+$
E. coli	
DH5a	Cry^-, Amp^s
GM2163	Cry^-, Amp^s
EG7218	pEG258 ($cryIIIC^+$ $cryX^+$), несущий DH5a
EG7221	pUC18 (Cry^-), несущий DH5a
EG7232	pEG268 ($cryIIIC^+$ $cryX^+$), несущий DH5a
EG7233	pEG269 ($cryIIIC^+$ $cryX^+$), несущий DH5a
Плазмиды	
pEG220	Amp^r, Tc^r, Cm^r, Cry^-, Bacillus - E. coli челночный вектор, состоящий из pBR322, лигированного в Sph1 сайт pNN101
pUC18	Amp^r, Cry^-, E. coli вектор
pNN101	Cm^r, Tc^r, Cry^-, Bacillus вектор
pEG258	Amp^r, $cryIIIC^+$ $cryX^+$ E. coli рекомбинантная плазмида, состоящая из 8,3 kb фрагмента Acp718-Pst1 $cryIIIC^+$ $cryX^+$ штамма B.t. EG4961, лигированного в Asp718-PstI сайты pUC18
pEG260	Tc^r, Cm^r $cryIIIC^+$ $cryX^+$ Bacillus рекомбинантная плазмида, состоящая из 8,3 kb фрагмента Acp718-Pst1 $cryIIIC^+$ $cryX^+$ штамма B.t. EG4961, лигированного в EcoRV сайт pNN101
pEG268	Amp^r, $cryIIIC^+$ $cryX^-$ E. coli рекомбинантная плазмида, состоящая из 5 kb фрагмента Sau3A штамма B.t., EG4961, лигированного в BamH1 сайт pBR322
pEG269	Amp^r (E. coli), Tc^r, Cm^r (B.t.), $cryIIIC^+$ $cryX^-$ рекомбинантная челночная плазмида, состоящая из pNN101, лигированной в Sph1 сайт pEG268.

Таблица 2

Инсектицидная активность штаммов B.t. EG4961 и EG2158 против личинок первого возраста колорадского картофельного жука при проведении биоанализа на искусственной диете LC_{50}(д.и. 95%)* в nr Cry III/мм^2

Тип образца	Испытания	EG4961	EG2158
Ферм. конц.	2	0,47	0,42
Контроль смертности		(0,39-0,57) 3,1	(0,35-0,50)

* В скобках указан 95% доверительный интервал.

RU 2106409 C1

RU 2106409 C1

Таблица 3

Инсектицидная активность штамма B.t. EG4961 против личинок SCRW при проведении биоанализа на искусственной диете LC_{50}(д.и. 95%)* в пг Cry III/мм^2

Тип образца испытания		EG4961	EG2158	B.t.t.
Конц. ферм. #1	4	170 (139-213)	14% умерло С 1000	Не испытывали
Контроль смертности #1		9,4%		
Конц. ферм. #2	4	206 (161-273)	Не испытывали	Умерло 15% С 1000
Контроль смертности #2		8,4		
Очищенные кристаллы белка	4	645 (521-819)	3% умерло С 5000	Не испытывали
Контроль смертности		8,3%		

Таблица 4

Инсектицидная активность штаммов B.t. EG4961, EG2158 и B.t.t. против взрослых особей SCRW и взрослых особей CPB в биоанализе с маканием листьев

Штамм	мкг Cry III/мл	% умерших через 48 ч	
		SCRW	CPB
EG4961	2800	50	100
	1400	37,5	98
	700	25	95
	350	10	70
EG2158	4350	-	-
	2175	-	0
	1088	-	10
	544	-	-
B.t.t.	2250	0	0
	1125	10	5
	563	0	0
Контроль смертности		0	0

(-) прочерки означают "не исследовали".

Таблица 5

Активность штаммов B.t. EG7231 и EG4961 против личинок SCRW и личинок CPB при проведении биоанализа на искусственной диете

Штамм	SCRW	CPB
EG7231	359 (238-593)	0,23 (0,05-0,49)
EG4961	421 (253-1086)	0,32 (0,19-0,50)
EG7211	9,4% погибло	12,5% погибло
Контроль	6,25% погибло	3,125% погибло

RU 2106409 C1

RU 2106409 C1

Таблица 6

Инсектицидная активность смеси кристаллических белков CryIIIC и CryIA (c) против личинок SCRW при проведении биоанализа с искусственной диетой

Обработка	Испытания	LC_{50} пг Cry IIIC/мм^2 (д.и. 95%)
Кристаллы CryIIIC	2	1180 (810-2000)
Кристаллы CryIIIC$^+$		
Кристаллы CryIA(c)	2	309 (220-500)
Кристаллы CryIA(c)	2	погибло 15,6% при 571 пг/мм^2
Контроль смертности		6,25%

Таблица 7

Штамм бактерий	Номер поступлений в	Дата депозита
B. thuringiensis EG2158	B-18213	29.04.1987
B. thuringiensis HD73-26	B-18508	12.06.1989
B. thuringiensis EG4961	B-18533	13.09.1989
B. thuringiensis EG2838	B-18603	08.02.1990
B. thuringiensis EG7231	B-18627	28.02.1990
B. coli EG7218	B-18534	13.09.1989

RU 2106409 C1

RU 2106409 C1

```
        10         20         30         40         50         60
GGGAGGAAGAAAAATGAATCCAAACAATCGAAGTGAACATGATACGATAAAGGTTACACC
  RBS          MetAsnProAsnAsnArgSerGluHisAspThrIleLysValThrPr

        70         80         90        100        110        120
TAACAGTGAATTGCAAACTAACCATAATCAATATCCTTTAGCTGACAATCCAAATTCAAC
oAsnSerGluLeuGlnThrAsnHisAsnGlnTyrProLeuAlaAspAsnProAsnSerTh

       130        140        150        160        170        180
ACTAGAAGAATTAAATTATAAAGAATTTTTAAGAATGACTGAAGACAGTTCTACGGAAGT
rLeuGluGluLeuAsnTyrLysGluPheLeuArgMetThrGluAspSerSerThrGluVa

       190        200        210        220        230        240
GCTAGACAACTCTACAGTAAAAGATGCAGTTGGGACAGGAATTTCTGTTGTAGGGCAGAT
lLeuAspAsnSerThrValLysAspAlaValGlyThrGlyIleSerValValGlyGlnIl

       250        260        270        280        290        300
TTTAGGTGTTGTAGGAGTTCCATTTGCTGGGGCACTCACTTCATTTTATCAATCATTTCT
eLeuGlyValValGlyValProPheAlaGlyAlaLeuThrSerPheTyrGlnSerPheLe

       310        320        330        340        350        360
TAACACTATATGGCCAAGTGATGCTGACCCATGGAAGGCTTTTATGGCACAAGTTGAAGT
uAsnThrIleTrpProSerAspAlaAspProTrpLysAlaPheMetAlaGlnValGluVa

       370        380        390        400        410        420
ACTGATAGATAAGAAAATAGAGGAGTATGCTAAAAGTAAAGCTCTTGCAGAGTTACAGGG
lLeuIleAspLysLysIleGluGluTyrAlaLysSerLysAlaLeuAlaGluLeuGlnGl

       430        440        450        460        470        480
TCTTCAAAATAATTTCGAAGATTATGTTAATGCGTTAAATTCCTGGAAGAAAACACCTTT
yLeuGlnAsnAsnPheGluAspTyrValAsnAlaLeuAsnSerTrpLysLysThrProLe

       490        500        510        520        530        540
AAGTTTGCGAAGTAAAAGAAGCCAAGATCGAATAAGGGAACTTTTTTCTCAAGCAGAAAG
uSerLeuArgSerLysArgSerGlnAspArgIleArgGluLeuPheSerGlnAlaGluSe

       550        560        570        580        590        600
TCATTTTCGTAATTCCATGCCGTCATTTGCAGTTTCCAAATTCGAAGTGCTGTTTCTACC
rHisPheArgAsnSerMetProSerPheAlaValSerLysPheGluValLeuPheLeuPr

       610        620        630        640        650        660
AACATATGCACAAGCTGCAAATACACATTTATTGCTATTAAAAGATGCTCAAGTTTTTGG
oThrTyrAlaGlnAlaAlaAsnThrHisLeuLeuLeuLeuLysAspAlaGlnValPheGl

       670        680        690        700        710        720
AGAAGAATGGGGATATTCTTCAGAAGATGTTGCTGAATTTTATCATAGACAATTAAAACT
yGluGluTrpGlyTyrSerSerGluAspValAlaGluPheTyrHisArgGlnLeuLysLe

       730        740        750        760        770        780
TACACAACAATACACTGACCATTGTGTTAATTGGTATAATGTTGGATTAAATGGTTTAAG
uThrGlnGlnTyrThrAspHisCysValAsnTrpTyrAsnValGlyLeuAsnGlyLeuAr

       790        800        810        820        830        840
AGGTTCAACTTATGATGCATGGGTCAAATTTAACCGTTTTCGCAGAGAAATGACTTTAAC
gGlySerThrTyrAspAlaTrpValLysPheAsnArgPheArgArgGluMetThrLeuTh

       850        860        870        880        890        900
TGTATTAGATCTAATTGTACTTTTCCCATTTTATGATATTCGGTTATACTCAAAAGGGGT
rValLeuAspLeuIleValLeuPheProPheTyrAspIleArgLeuTyrSerLysGlyVa
```

Фиг.1

RU 2106409 C1

RU 2106409 C1

```
      910       920       930       940       950       960
TAAAACAGAACTAACAAGAGACATTTTTACGGATCCAATTTTTTCACTTAATACTCTTCA
lLysThrGluLeuThrArgAspIlePheThrAspProIlePheSerLeuAsnThrLeuGl
                                  BamHI
      970       980       990      1000      1010      1020
GGAGTATGGACCAACTTTTTTGAGTATAGAAAACTCTATTCGAAAACCTCATTTATTTGA
nGluTyrGlyProThrPheLeuSerIleGluAsnSerIleArgLysProHisLeuPheAs

     1030      1040      1050      1060      1070      1080
TTATTTACAGGGGATTGAATTTCATACGCGTCTTCAACCTGGTTACTTTGGGAAAGATTC
pTyrLeuGlnGlyIleGluPheHisThrArgLeuGlnProGlyTyrPheGlyLysAspSe

     1090      1100      1110      1120      1130      1140
TTTCAATTATTGGTCTGGTAATTATGTAGAAACTAGACCTAGTATAGGATCTAGTAAGAC
rPheAsnTyrTrpSerGlyAsnTyrValGluThrArgProSerIleGlySerSerLysTh

     1150      1160      1170      1180      1190      1200
AATTACTTCCCCATTTTATGGAGATAAATCTACTGAACCTGTACAAAAGCTAAGCTTTGA
rIleThrSerProPheTyrGlyAspLysSerThrGluProValGlnLysLeuSerPheAs
                                                  HindIII
     1210      1220      1230      1240      1250      1260
TGGACAAAAAGTTTATCGAACTATAGCTAATACAGACGTAGCGGCTTGGCCGAATGGTAA
pGlyGlnLysValTyrArgThrIleAlaAsnThrAspValAlaAlaTrpProAsnGlyLy

     1270      1280      1290      1300      1310      1320
GGTATATTTAGGTGTTACGAAAGTTGATTTTAGTCAATATGATGATCAAAAAAATGAAAC
sValTyrLeuGlyValThrLysValAspPheSerGlnTyrAspAspGlnLysAsnGluTh

     1330      1340      1350      1360      1370      1380
TAGTACACAAACATATGATTCAAAAAGAAACAATGGCCATGTAAGTGCACAGGATTCTAT
rSerThrGlnThrTyrAspSerLysArgAsnAsnGlyHisValSerAlaGlnAspSerIl

     1390      1400      1410      1420      1430      1440
TGACCAATTACCGCCAGAAACAACAGATGAACCACTTGAAAAAGCATATAGTCATCAGCT
eAspGlnLeuProProGluThrThrAspGluProLeuGluLysAlaTyrSerHisGlnLe

     1450      1460      1470      1480      1490      1500
TAATTACGCGGAATGTTTCTTAATGCAGGACCGTCGTGGAACAATTCCATTTTTTACTTG
uAsnTyrAlaGluCysPheLeuMetGlnAspArgArgGlyThrIleProPhePheThrTr

     1510      1520      1530      1540      1550      1560
GACACATAGAAGTGTAGACTTTTTTAATACAATTGATGCTGAAAAGATTACTCAACTTCC
pThrHisArgSerValAspPhePheAsnThrIleAspAlaGluLysIleThrGlnLeuPr

     1570      1580      1590      1600      1610      1620
AGTAGTGAAAGCATATGCCTTGTCTTCAGGTGCTTCCATTATTGAAGGTCCAGGATTCAC
oValValLysAlaTyrAlaLeuSerSerGlyAlaSerIleIleGluGlyProGlyPheTh

     1630      1640      1650      1660      1670      1680
AGGAGGAAATTTACTATTCCTAAAAGAATCTAGTAATTCAATTGCTAAATTTAAAGTTAC
rGlyGlyAsnLeuLeuPheLeuLysGluSerSerAsnSerIleAlaLysPheLysValTh

     1690      1700      1710      1720      1730      1740
ATTAAATTCAGCAGCCTTGTTACAACGATATCGTGTAAGAATACGCTATGCTTCTACCAC
rLeuAsnSerAlaAlaLeuLeuGlnArgTyrArgValArgIleArgTyrAlaSerThrTh

     1750      1760      1770      1780      1790      1800
TAACTTACGACTTTTTGTGCAAAATTCAAACAATGATTTTCTTGTCATCTACATTAATAA
rAsnLeuArgLeuPheValGlnAsnSerAsnAsnAspPheLeuValIleTyrIleAsnLy
```

Фиг.2

RU 2106409 C1

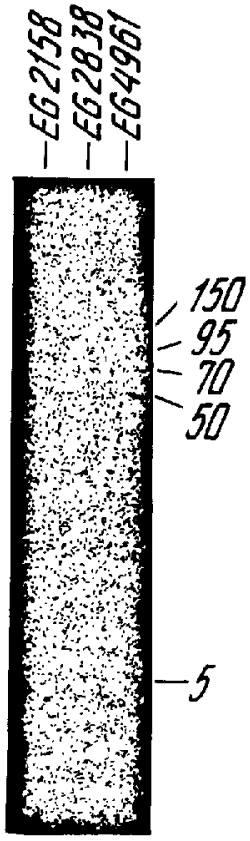
RU 2106409 C1

```
      1810       1820       1830       1840       1850       1860
AACTATGAATAAAGATGATGATTTAACATATCAAACATTTGATCTCGCAACTACTAATTC
sThrMetAsnLysAspAspAspLeuThrTyrGlnThrPheAspLeuAlaThrThrAsnSe

      1870       1880       1890       1900       1910       1920
TAATATGGGGTTCTCGGGTGATAAGAATGAACTTATAATAGGAGCAGAATCTTTCGTTTC
rAsnMetGlyPheSerGlyAspLysAsnGluLeuIleIleGlyAlaGluSerPheValSe

      1930       1940       1950       1960       1970
TAATGAAAAAATCTATATAGATAAGATAGAATTTATCCCAGTACAATTGTAA
rAsnGluLysIleTyrIleAspLysIleGluPheIleProValGlnLeuEnd
```

Фиг.3



Фиг.4

RU 2106409 C1

RU 2106409 C1

Фиг.5

Фиг.6

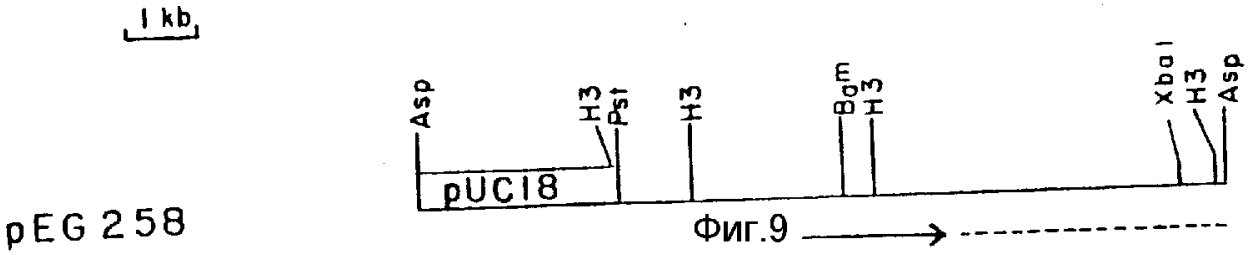
RU 2106409 C1

Фиг.7

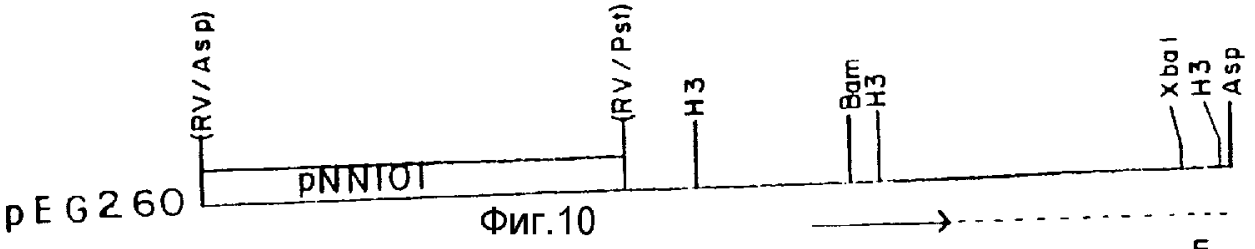
Фиг.8

RU 2106409 C1

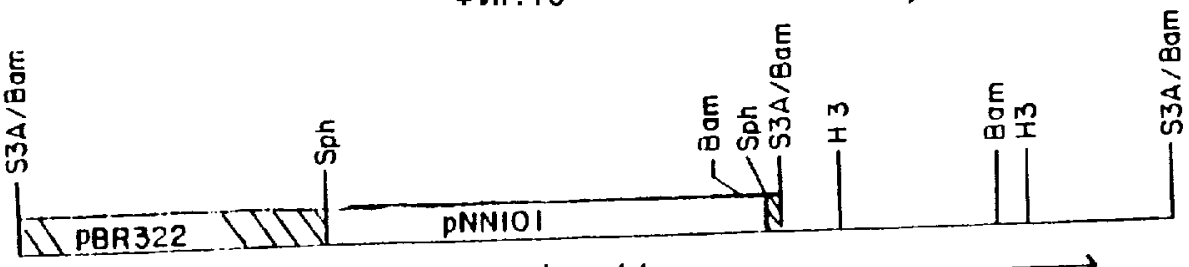
RU 2106409 C1



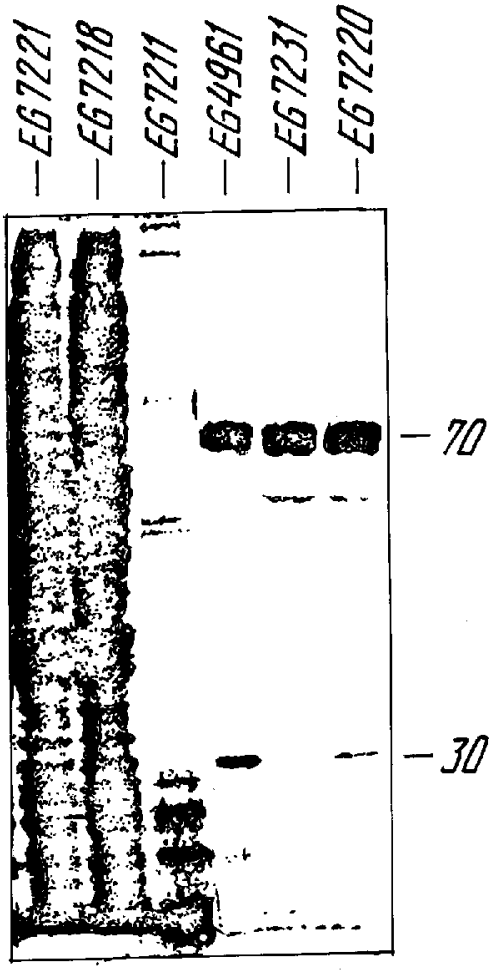
Фиг.9



Фиг.10



Фиг.11



Фиг.12

RU 2106409 C1

RU 2106409 C1