SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**

ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

280 300

(21) Číslo prihlášky: **3044-89**

(22) Dátum podania: **19.05.89**

(31) Číslo prioritnej prihlášky: **1946/88-5, 3279/88-2, 180/89-8**

(32) Dátum priority: **20.05.88, 02.09.88, 20.01.89**

(33) Krajina priority: **CH, CH, CH**

(40) Dátum zverejnenia: **08.11.99**

(45) Dátum zverejnenia udelenia vo Vestníku: **08.11.99**

(86) Číslo PCT:

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl [6]

C 12N 15/00
A 01N 63/00

(73) Majiteľ patentu: NOVARTIS AG, Basel, CH;

(72) Pôvodca vynálezu: Schurter Walter, Dr., Allschwil, CH;
Geiser Martin, Dr., Ettingen, CH;
Mathé Danièle, Bartenheim la Chaussée, FR;

(54) Názov vynálezu: **Spôsob priamej, cielenej a reprodukovateľnej genetickej manipulácie, bifunkčné vektory, produkčné mikroorganizmy rodu *Bacillus* transformované použitím bifunkčného vektora, insekticídny prostriedok a použitie bifunkčných vektorov**

(57) Anotácia:
Genetická manipulácia *Bacillus thuringiensis* a/alebo *Bacillus cereus* pomocou rekombinantnej DNA spočíva v izolácii vhodnej DNA a v jej transformácii do buniek *Bacillus thuringiensis* a/alebo *Bacillus cereus* pomocou transformačného postupu zahŕňajúceho krátkodobé pôsobenie elektrického prúdu. Opisuje sa aj insekticídny prostriedok obsahujúci ako účinnú zložku transformované bunky *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus,* alebo bezbunkové preparáty, ktoré obsahujú protoxín produkovaný transformovanými bunkami *Bacillus*.

Oblasť techniky

Vynález sa týka priamej, cielenej, reprodukovateľnej genetickej manipulácie *Bacillus thuringiensis*, ako aj blízko príbuzného *Bacillus cereus* technológiou s použitím rekombinantnej DNA, postup je založený na účinnom spôsobe transformácie pre uvedený typ *Bacillus*.

Ďalej sa uvedený vynález týka konštrukcie plazmidov a zvláštnych typov vektorov najmä "shuttle"-vektorov, ako aj kmeňov *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus*, ktoré boli transformované s použitím uvedených plazmidov.

Vynález sa takisto týka spôsobu včlenenia a prípadne expresie génov alebo iných využiteľných reťazcov do *Bacillus thuringiensis* a/alebo *Bacillus cereus*, najmä sa však vynález týka spôsobu včlenenia a expresie génov pre protoxín.

Vynález sa týka aj spôsobu priameho klonovania a prípadne expresie a identifikácie nových génov alebo iných využiteľných reťazcov DNA v *Bacillus thuringiensis* a/alebo *Bacillus cereus*, čím sa po prvýkrát vytvára možnosť založiť génovú banku priamo v *Bacillus thuringiensis* a/alebo *Bacillus cereus* a dosiahnuť tam jej expresiu.

Doterajší stav techniky

Bacillus thuringiensis patrí do veľkej skupiny gram-pozitívnych aeróbnych baktérií, ktoré vytvárajú endospóry. Na rozdiel od blízko príbuzných druhov *B. cereus* a *B. anthracis* produkuje väčšina doteraz známych druhov *B. thuringiensis* v priebehu svojej sporulácie parasporálne inkluzívne telieska, ktoré sú na základe svojej kryštalickej štruktúry označované tiež ako kryštalické telieska. Tieto kryštalické telieska pozostávajú z isekticídne účinných kryštalických bielkovín protoxínu, ktoré vytvárajú takzvaný δ-endotoxín.

Tieto bielkovinové kryštály sú príčinou toxicity *B. thuringiensis* pre hmyz. Uvedený endotoxín však vyvíja svoju isekticídnu účinnosť až po perorálnom podaní týchto kryštalických teliesok a ich rozpustení v alkalickej črevnej šťave cieľových druhov hmyzu, pričom sa uvoľnia vlastné toxické zložky protoxínu obmedzenou proteolýzou na základe pôsobenia proteáz z tráviacej sústavy hmyzu.

Uvedené endotoxíny z rôznych kmeňov *B. thuringiensis* sa vyznačujú vysokou špecifickosťou proti cieľovým druhom hmyzu, najmä proti rôznym jedincom a larvám z čeľadí *Lepidoptera*, *Coleoptera* a *Diptera*, súčasne sa tieto toxíny vyznačujú vysokou účinnosťou. Ďalšou výhodou, ktorá hrá úlohu pri použití δ-endotoxínu z *B. thuringiensis*, je zjavná nemožnosť cieľových druhov hmyzu vyvinúť odolnosť proti uvedenej kryštalickej bielkovine a okrem toho tiež neškodnosť uvedených toxínov pri ich požití človekom, inými druhmi cicavcov, vtákmi, rybami alebo inými druhmi hmyzu s výnimkou cieľových druhov.

Insekticídna účinnosť protoxínov *B. thuringiensis* je už dávno známa. Už na konci dvadsiatych rokov sa používali prostriedky s obsahom *B. thuringiensis* ako biologické insekticídy na potlačenie rôznych ochorení kultúrnych rastlín, spôsobených hmyzom. Pri objavení *B. thuringiensis* var. *israelensis*, ktorý bol opísaný v publikácii Goldberg L. a Margalit J., Mosquito News, 37, 355-358, 1977, a po objave *B. thuringiensis var. tenebrionis*, ktorý bol opísaný v publikácii Krieg A. a ďalší, Z. Ang. Ent., 96, 500-508, 1983, bolo možné rozšíriť spektrum použitia aj na larvy komárov a chrobákov.

Pri zavedení genetickej technológie je možné zabezpečiť toxínom *B. thuringiensis* ešte ďalšie rozsiahle možnosti použitia.

Napríklad klonovanie uvedeného endotoxínu v cudzorodých produkčných organizmoch, napríklad v *E. coli*, patrí už k bežným postupom. Táto skutočnosť viedla k tomu, že sú už známe reťazce DNA celého radu δ-endotoxínov a boli opísané napríklad v publikáciách Schnepf H. E. a Whiteley H. R., Proc. Natl. Acad. Sci USA 78, 2893-2897, 1981, Klier A. a ďalší, The EMBO J. 1, 791-799, 1982, Geiser M. a ďalší, Gene 48, 109-118, 1986 a Hauder M. Z. a ďalší, Gene 52, 285-290, 1987.

Väčšina druhov *B. thuringiensis* obsahuje väčší počet génov, ktoré sú kódom pre insekticídne účinnú bielkovinu. Tieto gény, k expresii ktorých dochádza iba v sporulačnej fáze, sú vo väčšom počte prípadov lokalizované vo veľkých prenosných plazmidoch s 30 až 150 megajednotkami, a preto sa dajú veľmi jednoduchým spôsobom prenášať medzi rôznymi kmeňmi *B. thuringiensis* a tiež medzi kmeňmi *B. thuringiensis* a *B. cereus*, ak sú kompatibilné, ako bolo opísané v publikácii Gonzales J. M. a ďalší, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 6951-6955, 1982.

Gény pre protoxín *B. thuringiensis var. kurstaki* patria do skupiny príbuzných génov, z ktorých celý rad bol už klonovaný a sú tiež známe ich reťazce. Všetky tieto práce sa uskutočňovali prevažne v systéme na klonovanie z *E. coli*.

Klonovanie génov *B. thuringiensis* bolo až doteraz v podstate obmedzené na niekoľko výlučne heterológnych produkčných systémov, z ktorých sa systém z *E. coli* ukázal ako najvýhodnejší.

V poslednom čase boli podávané také správy, týkajúce sa klonovania a expresie génov pre protoxíny v iných systémoch, napríklad v *B. subtilis* podľa publikácie Klier A. a ďalší, The EMBO J., 1, 791-799, 1982, ďalej v *Pseudomonas fluorenzens*, ako bolo opísané v publikácii Obukowicz M. G. a ďalší, J. Bacteriol., 168, 982-989, 1986 a v *Saccharomyces cerevisidae*, tak ako bolo opísané v európskom patentovom spise č. O 292 435.

Pri klonovaní *E. coli* sa využíva skutočnosť, že mnohé gény pre protoxín obsahujú okrem bežných gram-pozitívnych promótorov aj promótor, ktorý sa podobá promótoru z *E. coli*. Tieto príbuzné reťazce DNA promótora umožňujú to, že gén pre protoxín *B. thuringiensis* môže dosiahnuť expresiu aj v heterológnych systémoch, ak je schopný zvrchu rozoznávať spomenutý riadiaci reťazec.

Bielkoviny protoxínu, k expresii ktorých došlo, sa potom môžu izolovať rozrušením produkčných buniek podľa známych postupov a identifikovať.

V priebehu výskumu sa však ukázalo, že vo všetkých prípadoch nie sú v géne pre protoxín k dispozícii promótory podobné promótorom z *E. coli*, takže až doteraz je možné dosiahnuť expresiu v heterológnych produkčných systémoch a tým aj identifikovať iba v prípade určitých génov pre protoxíny, a to tých, ktoré spĺňajú uvedenú podmienku promótora, ako bolo opísané v publikácii Donovan L. P. a ďalší, Mol. Gen. Genet., 214, 365-372, 1988.

Klonovanie génov mimo prirodzeného produkčného organizmu a použitie týchto kmeňov v praxi ako biologických insekticídov je spojené s celým radom nevýhod:

a) expresiu génov pre protoxín z *B. thuringiensis* je možné dosiahnuť iba v určitých prípadoch

b) všeobecne dochádza len k veľmi malej sekrécii cudzorodej bielkoviny, ktorej expresia sa dosiahla, alebo k sekrécii vôbec nedochádza

c) nie je vždy možné zaistiť správne zaradenie génu pre uvedený endotoxín v heterológnych produkčných bunkách,

čo môže viesť k nežiaducim zmenám pri špecifickej účinnosti alebo v celej oblasti účinnosti toxínu
d) v prípade, že vôbec dôjde k expresii, je miera dosiahnutej expresie klonovaného cudzorodého génu oproti natívnym reťazcom len nízka.

V publikáciách Schnepf H. E. a Whiteley H. R., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 78, 2893-2897, 1981 a J. Biol. Chem., 260, 6273, 1985, sa uvádza, že toxín *B. thuringiensis*, klonovaný v *E. coli*, tvorí iba 0,5 až 1 % celkovej bielkoviny v bunke *E. coli*, oproti tomu tvorí kryštalická bielkovina v *B. thuringiensis* 30 až 40 % sušiny sporulujúcej kultúry. Tieto veľké rozdiely v miere dosiahnutej expresie sú pravdepodobne spôsobené neprítomnosťou riadiacich signálov, špecifických pre sporuláciu v heterológnom produkčnom systéme, ďalšou príčinou by mohli byť aj ťažkosti pri rozoznávaní promótora *B. thuringiensis* a/alebo problémy spôsobené posttranslačnou modifikáciou molekuly toxínu v cudzorodej bunke.
e) celý rad produkčných kmeňov, všeobecne používaných na expresiu, nie je toxikologicky taký indiferentný ako *B. thuringiensis* alebo *B. cereus*
f) *B. thuringiensis* a *B. cereus* tvoria prirodzený podiel mikrobiálnej flóry v pôde, obvykle hlavný podiel, čo nie je možné zaistiť pri produkčných kmeňoch, používaných na expresiu.

Všetky uvedené problémy a ťažkosti by bolo možné prekonať v prípade, že by sa podarilo klonovať uvedené gény *B. thuringiensis* priamo v homológnom produkčnom systéme, v ktorom by bolo možné využiť gram-pozitívne promótory pre gény pre protoxín a tak dosiahnuť expresiu.

Až doteraz však neexistuje žiadny postup, ktorý by umožňoval modifikovať *B. thuringiensis*, z komerčného hľadiska taký dôležitý mikroorganizmus, priamo genetickým spôsobom a tak umožniť napríklad účinné opätovné včlenenie klonovaného génu pre protoxín do kmeňa *B. thuringiensis*.

Podstatou tohto problému je zrejme skutočnosť, že až doteraz nebol vyvinutý účinný transformačný systém pre *B. thuringiensis* ani pre blízko príbuzný *B. cereus*, ktorý by umožnil dosiahnuť vysokú mieru transformácie a tak umožňoval použitie už známej metódy rekombinantnej DNA tiež pre *B. thuringiensis*.

Až doteraz sa použité postupy na získanie nových kmeňov *B. thuringiensis* s novými insekticídnymi vlastnosťami zakladali na prenose plazmidu s génom, ktorý je kódom pre protoxín, konjugáciou.

Úspešné opätovné včlenenie klonovaného génu pre kryštalickú bielkovinu v *B. thuringiensis* bolo doteraz opísané len v jedinom prípade v publikácii Klier A. a ďalší, Mol. Gen. Genet., 191, 257-262, 1983, pričom však aj v tomto prípade, vzhľadom na to, že nebol k dispozícii vhodný transformačný systém pre *B. thuringiensis*, sa opäť použila konjugácia medzi *B. subtilis* a *B. thuringiensis* a tým sa dosiahol prenos. Aj v tomto prípade sa ako pomocný organizmus použila *E. coli*.

Pri prenose pomocou konjugácie však dochádza k celému radu závažných nevýhod, takže tieto postupy nie sú vhodné na bežnú genetickú modifikáciu *B. thuringiensis* a *B. cereus*.
a) Prenos plazmidov s obsahom génu, ktorý je kódom pre protoxín, konjugáciou je možné uskutočniť len reakciou medzi kmeňmi *B. thuringiensis* alebo medzi kmeňmi *B. cereus* a *B. thuringiensis*, ktoré sú navzájom kompatibilné.
b) Pri prenose plazmidu konjugáciou medzi nepríbuznými kmeňmi sa často môže dosiahnuť iba nízka frekvencia cieľového prenosu.
c) Vzniká možnosť, že sa nebude dať dosiahnuť riadenie expresie génu pre protoxín alebo jej modifikácie.
d) Nie je k dispozícii žiadna možnosť modifikovať samotný použitý gén.
e) Za súčasnej prítomnosti väčšieho počtu génov pre protoxíny v jedinom kmeni môže dôjsť k silnému zníženiu expresie jednotlivých génov na základe známych účinkov.
f) Môže dôjsť k prejavom nestálosti na základe možnej homológnej rekombinácie použitých génov pre protoxín.

Ďalšie transformačné postupy, ktoré sa už celkom bežne dajú použiť pri celom rade gram-pozitívnych organizmov, sa v prípade *B. thuringiensis* aj v prípade *B. cereus* ukázali ako nepoužiteľné.

K uvedeným postupom patrí napríklad priama transformácia bakteriálnych protoplastov použitím polyetylénglykolu, ktorá sa dá použiť v celom rade kmeňov *Streptomyces* podľa publikácie Bibb J. J. a ďalší, Nature 247, 398-400, 1978, pri *B. subtilis*, ako bolo opísané v publikácii Chang S. a Cohen S. N., Molec. Gen. Genet. 168, 111-115, 1979, pri *B. megaterium* podľa publikácie Brown B. J. a Carlton B. C., J. Bacteriol. 142, 508-512, 1980, pri *Streptococcus lactis* podľa publikácie Kondo J. K. a McKay L. L., Appl. Environ. Microbiol. 48, 252-259, 1984, pri *S. faecalis* podľa publikácie Wirth R. a ďalší, J. Bacteriol. 165, 831-836, 1986, pri *Corynebacterium glutamicum* podľa publikácie Yoshihama M. a ďalší, J. Bacteriol. 162, 591-597, 1985, a pri mnohých ďalších gram-pozitívnych baktérií s dobrým výsledkom.

Na použitie týchto postupov je nevyhnutné najprv zmeniť bakteriálne bunky na protoplasty, to znamená, že je potrebné porušiť bunkovú stenu pôsobením príslušných enzýmov.

Pri týchto priamych transformačných postupoch by bolo potrebné dosiahnuť expresiu novozavedenej genetickej informácie a regeneráciu transformovaných protoplastov na komplexných pevných živných prostriedkoch pred tým, ako by bolo možné preukázať dostatočnú transformáciu napríklad použitím označenia selekcie.

Tieto transformačné postupy sa potom ukázali pri *B. thuringiensis* a pri príbuznom *B. cereus* ako nevhodné. Vzhľadom na vysokú odolnosť buniek *B. thuringiensis* proti lyzozýmu a len malú regenerovateľnosť protoplastov na intaktné bunky s bunkovou stenou zostáva dosiahnuteľná miera transformácie veľmi nízka a zle reprodukovateľná, ako bolo opísané v publikáciách Alikhanian S. J. a ďalší, J. Bacteriol. 146, 7-9, 1981, Martin P. A. a ďalší, J. Bacteriol. 145, 980-983, 1981, a Fisher H. M., Arch. Microbiol. 139, 231-217, 1984.

Použitím týchto postupov je teda možné nanajvýš včleňovať veľmi jednoduché plazmidy, ktoré sa nehodia na prácu s rekombinantnou DNA, do buniek *B. thuringiensis* alebo *B. cereus* s nízkou frekvenciou.

Správy o jednotlivých výsledkoch transformácie, dosiahnutých použitím uvedených postupov, spočívajú vo vypracovaní veľmi náročných optimalizačných programov, ktoré sú navyše použiteľné iba pri jedinom určitom kmeni *B. thuringiensis* a sú spojené s vysokými nákladmi za súčasne veľkej náročnosti na čas, ako bolo opísané v publikácii Schall D., Genübertragung zwischen Isolaten von Bacillus thuringiensis durch Protoplastentransformation und Fusion. Dissertation, Universität Tübingen, 1986. Tieto postupy nie sú z uvedených dôvodov vhodné na bežné používanie v priemyselnom meradle.

Ako sa dá usúdiť z veľkého množstva prác a z intenzívneho výskumu genetiky *B. thuringiensis*, je veľký záujem o vývoj nových postupov, ktorými by bolo možné podrobiť *B. thuringiensis* alebo blízko príbuzný *B. cereus*

priamej genetickej modifikácii a tým napríklad dosiahnuť klonovanie génu pre protoxín v prírodnom systéme. Napriek tomu neboli doteraz uspokojivo vyriešené uvedené problémy a ťažkosti. Až doposiaľ teda nie sú k dispozícii vhodné transformačné postupy, ktoré by umožňovali rýchlu, účinnú a reprodukovateľnú transformáciu *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus* s dostatočne vysokou frekvenciou transformácie, ani vhodné vektory na klonovanie, ktoré by umožňovali použitie metódy rekombinantnej DNA tak, ako je bežne používaná pri iných bakteriálnych systémoch, tiež pri *B. thuringiensis*. To isté platí aj pre *B. cereus*.

Podstata vynálezu

V súčasnosti sa nečakane zistilo, že všetky uvedené problémy a ťažkosti sa dajú odstrániť pomerne jednoduchým spôsobom.

Vynález si kladie za úlohu navrhnúť nový postup, ktorým by bolo možné použitím rekombinantnej DNA po prvýkrát uskutočniť priamu, cielenú a reprodukovateľnú genetickú manipuláciu *B. thuringiensis* i *B. cereus*, postup by mal spočívať v tom, že by bol *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus* transformovaný s použitím jednoduchého transformačného postupu s vysokou účinnosťou použitím rekombinantnej DNA, ktorá by bola vhodná na predpokladanú genetickú manipuláciu *Bacillus thuringiensis* a/alebo *Bacillus cereus*.

Predmetom predloženého vynálezu je teda spôsob priamej, cielenej a reprodukovateľnej genetickej manipulácie *Bacillus thuringiensis* a/alebo *Bacilluscereus* použitím technológie rekombinantnej DNA, ktorý spočíva v tom, že sa izoluje vhodná DNA a pomocou jednoduchého transformačného postupu s vysokou účinnosťou sa transformuje do *Bacillus thuringiensis* a/alebo *Bacillus cereus*, pričom sa transformácia *Bacillus thuringiensis* a/alebo *Bacillus cereus* uskutočňuje tak, že sa

a) pripraví bunková suspenzia s vhodnou hustotou buniek v živnom prostredí, vhodnom na pestovanie buniek *Bacillus thuringiensis* prípadne *Bacillus cereus*, pri prevzdušňovaní dostačujúcom pre ich rast,

b) bunky sa oddelia od prostredia a znova sa suspendujú v inokulačnom pufri, ktorý je vhodný na nasledujúce otvorenie pórov elektrickým prúdom,

c) pridá sa vzorka DNA v koncentrácii, ktorá je vhodná na otvorenie pórov elektrickým prúdom, výhodne v koncentrácii medzi 1 μg a 20 μg,

d) zmes pripravená v krokoch b) a c) sa prenesie do zariadenia na otvorenie pórov elektrickým prúdom,

e) zmesou sa nechá raz alebo viackrát vybiť kondenzátor v priebehu krátkeho časového úseku, pričom sa krátkodobo vytvorí silné elektrické pole v čase, ktorý je dostatočný na transformáciu buniek *Bacillus thuringiensis* a/alebo *Bacillus cereus* rekombinantnou DNA,

f) bunky sa po otvorení pórov elektrickým prúdom prípadne ďalej inkubujú

g) takto spracované bunky sa nanesú na platne s vhodným selekčným prostredím, a potom sa

h) transformované bunky oddelia.

Vynález takisto zahŕňa priamy spôsob klonovania, expresiu a identifikáciu génov alebo iných využiteľných sekvencií DNA, predovšetkým však génov pre protoxín v *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus*, a to tak, že sa

a) celková DNA z *B. thuringiensis* rozštiepi pôsobením príslušných restrikčných enzýmov,

b) z výsledných sa po pôsobení reštrikčných enzýmov izolujú fragmenty vhodnej veľkosti,

c) tieto fragmenty sa uložia do vhodného vektora,

d) použitím uvedeného vektora sa transformujú bunky *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus* a

e)z transformovaných buniek sa pomocou vhodného selekčného postupu oddelia bunky s obsahom nových reťazcov DNA a tieto reťazce sa prípadne izolujú.

Okrem štrukturálnych génov sa pri uskutočňovaní spôsobu podľa vynálezu môžu samozrejme použiť aj ľubovoľné iné využiteľné reťazce DNA, napríklad nekódové reťazce DNA, ktoré majú riadiacu funkciu, napríklad "protizmyslovej" DNA.

Spôsob podľa vynálezu otvára veľké množstvo nových možností, ktoré by sa mohli použiť tak z vedeckého, ako aj z komerčného hľadiska.

Týmto spôsobom je napríklad po prvýkrát možné riadiť syntézu δ-endotoxínu na genetickej úrovni, najmä z hľadiska sporulácie.

Teraz bude pravdepodobne možné objasniť aj otázku, na ktorom mieste molekuly toxínu sa nachádzajú úseky, ktoré sú príčinou toxicity proti niektorým druhom hmyzu, a do akej miery sú tieto miesta spojené so špecifickosťou tohto účinku.

Znalosť molekulárnej organizácie rôznych molekúl toxínu a gény, ktoré sú kódom pre túto molekulu z rôznych druhov *B. thuringiensis*, majú výnimočne veľký praktický význam pre cielenú genetickú manipuláciu týchto génov, ktorá je teraz po prvýkrát umožnená použitím spôsobu podľa vynálezu.

Nový spôsob podľa vynálezu umožňuje okrem cielenej modifikácie vlastného génu pre uvedený endotoxín aj manipuláciu riadiacich reťazcov DNA na expresiu týchto génov, čím sa dajú zvýšiť niektoré špecifické vlastnosti uvedených endotoxínov, napríklad ich špecifickosť, ich vstrebávanie a podobne, a okrem toho aj rýchlosť a mieru ich produkcie, napríklad zabudovanie účinnejších alebo silnejších reťazcov promótorov.

Cielenou mutáciou vybraných génov alebo úsekov génov *in vitro* sa týmto spôsobom dajú získať nové varianty *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus*.

Ďalšia možnosť konštrukcie nových variantov *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus* spočíva v tom, že sa naviažu gény alebo úseky génov, ktoré pochádzajú z rôznych kmeňov *B. thuringiensis*, čím sa dajú získať kmene *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus* s rozšíreným spektrom použitia. Na tento účel, t. j. na získanie nových variantov *B. thuringiensis* alebo *B. cereus* sa môžu použiť aj syntetické alebo polosyntetické gény, alebo úseky génov.

Spôsob podľa vynálezu vzhľadom na veľké zvýšenie frekvencie transformácií a vzhľadom na zjednodušenie celého postupu po prvýkrát umožňuje vytvorenie génovej banky a rýchlu selekciu modifikovaných a nových génov *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus*.

Spôsob podľa vynálezu po prvýkrát podmieňuje priamu expresiu génovej banky v *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus* a umožňuje tiež identifikáciu nových génov pre protoxín v *B. thuringiensis* použitím známych, výhodne imunologických alebo biologických postupov.

Vynález sa takisto týka aj postupu, ktorý na základe silného zvýšenia účinnosti transformácie *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus* umožňuje v porovnaní s predtým známymi postupmi po prvýkrát priamu genetickú modifikáciu genómu *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus*.

Vynález sa týka najmä spôsobu transformácie *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus* včlenením rekombinantnej DNA, najmä DNA plazmidu a/alebo vektora do buniek *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus* použitím elektrického otvárania pórov.

Vhodný je spôsob transformácie *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus* pomocou reťazcov DNA, ktoré sú kódom pre δ-endotoxín, a reťazcov DNA, ktoré sú kódom pre bielkovinu, ktorá má v podstate vlastnosti zodpovedajúce uvedeným insekticídnym vlastnostiam toxínov *B. thuringiensis*.

Vynález sa týka aj expresie reťazcov DNA, ktoré sú kódom pre uvedený endotoxín alebo pre bielkovinu, ktorá má aspoň v podstate insekticídne vlastnosti toxínov *B. thuringiensis*, pričom expresia sa dosahuje v transformovaných bunkách *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus*.

Vynález sa týka tiež spôsobu výroby bifunkčných vektorov ("shuttle"-vektory), a to na použitie v *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus*, a tiež použitie týchto vektorov na transformáciu *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus*.

Výhodná je konštrukcia bifunkčných vektorov, ktoré sú okrem buniek *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus* schopné replikácie v rade ďalších heterológnych systémov, predovšetkým v bunkách *E. coli*.

Vynález sa týka najmä spôsobu výroby týchto bifunkčných vektorov pre *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus*, obsahujúcich reťazec DNA, ktorý je kódom pre polypeptidový δ-endotoxín, prirodzene sa vyskytujúci v *B. thuringiensis*, alebo aspoň jeden polypeptid, ktorý je tomuto toxínu homológny, to znamená, že má aspoň v podstate insekticídne vlastnosti toxínov *B. thuringiensis*. Vynález sa týka aj použitia týchto vektorov na transformáciu buniek *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus* a tiež expresie reťazcov DNA v týchto vektoroch, predovšetkým tých reťazcov DNA, ktoré sú kódom pre uvedený endotoxín *B. thuringiensis* alebo aspoň pre jednu bielkovinu, ktorá má podstatné insekticídne vlastnosti toxínu *B. thuringiensis*.

Vynález sa týka tiež použitia *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus* ako všeobecného organizmu na klonovanie a expresiu homológnej, ale najmä tiež heterológnej, DNA alebo kombinácie homológnej a heterológnej DNA.

Vynález sa týka aj samotných plazmidov a bifunkčných vektorov, ich použitia na transformáciu *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus* a tiež transformovaných buniek *B. thuringiensis* a *B. cereus*.

Obzvlášť výhodné na použitie pri uskutočňovaní spôsobu podľa vynálezu sú bifunkčné vektory pXI61 (=pK61) a pXI93 (pK93), ktoré boli po transformácii *B. thuringiensis var. kurstaki* HD1 cryB a *B. cereus* 569 K uložené vo verejnej zbierke kultúr Deutschen Sammlung von Mikroorganizmen (Braunschweig, SRN) podľa Budapeštianskej zmluvy č. DSM 4573 (pXI61, transformovaný v *B. thuringiensis var. kurstaki* HD1 cryB) a č. DSM 4571 (pXI93, transformácia v *B. thuringiensis var. kurstaki* HD1 cryB) a č. DSM 4573 (pXI93, transformácia v *B. cereus* 569 K).

Vynález sa tiež týka nových variet *B. thuringiensis* a *B. cereus*, ktoré sa transformovali použitím reťazca DNA, ktorý je kódom pre δ-endotoxín z *B. thuringiensis* a pri expresii ktorého sa dá získať aspoň jedna bielkovina, ktorá má v podstate isekticídne vlastnosti toxínu *B. thuringiensis*.

Transformované bunky *B. thuringiensis* a *B. cereus* a toxíny, ktoré sú produkované týmito bunkami, sa dajú použiť na výrobu insekticídnych prostriedkov. Tieto insekticídne prostriedky takisto tvoria predmet vynálezu.

Vynález sa týka aj prostriedkov na boj s hmyzom pomocou bližšie charakterizovaných transformovaných buniek *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus*, ako aj prostriedkov, ktoré obsahujú bezbunkový kryštalický endotoxín vo forme kryštalických teliesok tak, ako je vo forme protoxínu produkovaný transformovanými bunkami *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus*. Vynález sa týka tiež spôsobu ničenia hmyzu uvedenými prostriedkami.

Vynález sa týka najmä nového transformačného postupu pri *B. thuringiensis* a *B. cereus*. Tento postup spočíva vo včlenení DNA plazmidu do buniek *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus* a okrem iného sa pri ňom používa známy postup otvárania pórov pôsobením elektrického prúdu.

Až doteraz sa všetky experimenty uskutočňovali tak, že sa na *B. thuringiensis* a blízko príbuzný *B. cereus* aplikovali transformačné postupy, ktoré sa vypracovali a s úspechom sa používali v iných bakteriálnych systémoch, v súčasnosti sa však pri uskutočňovaní spôsobu podľa vynálezu s použitím otvárania pórov pôsobením elektrického prúdu a ďalších opatrení dajú dosiahnuť prekvapivo dobré výsledky.

Tieto výsledky sú nečakané a prekvapujúce aj preto, lebo už aj predtým sa uskutočňovali experimenty s otváraním pórov protoplastov *B. thuringiensis*, no dosiahnutá frekvencia transformácií bola taká nízka, že sa tento postup na základe týchto výsledkov považoval za nepoužiteľný na transformáciu *B. thuringiensis* a z uvedeného dôvodu sa mu už nevenovala žiadna pozornosť. Uvedené výsledky boli opísané v publikácii Shivarova N., Zeitschr. Allgem. Mikrobiol. 23, 595 - 599, 1983.

Podľa známych experimentov, týkajúcich sa otvárania pórov buniek *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus*, sa teraz nečakane umožnilo vyvinutie transformačného postupu, ktorý je ideálne prispôsobený fyziológii *B. thuringiensis* a *B. cereus* a ktorým sa dá dosiahnuť transformácia v oblasti 10^6 až 10^8 buniek/μg DNA plazmidu, zvyčajne sa dosahujú výsledky 10^6 až 10^7 buniek/μg DNA plazmidu.

Podobné vysoké hodnoty transformácie v rozmedzí 10^2 až 10^6 transformovaných buniek/μg DNA plazmidu sa doteraz dali dosiahnuť iba pri použití transformácie pomocou polyetylénglykolu podľa publikácie Schall D., Genübertragung zwischen Isolaten von Bacillus thuringiensis durch Protoplastentransformation und Fusion. Dissertation, Universität Tübingen, 1986. Vysoké hodnoty tejto transformácie však boli obmedzené na tie kmene *B. thuringiensis*, ktoré boli špecificky vhodné na uvedený postup, čo bolo nevyhnutné dokázať predbežnými experimentmi náročnými na čas, takže tento postup bol z praktického hľadiska nehospodárny a nevhodný.

Všetky uvedené postupy boli v mnohých prípadoch pri opakovanom uskutočnení nereprodukovateľné alebo zle reprodukovateľné.

Na druhej strane ide pri uskutočňovaní spôsobu podľa vynálezu o spôsob transformácie, ktorý sa môže použiť zásadne pre všetky kmene *B. thuringiensis* a *B. cereus*, tento spôsob je oveľa menej náročný na čas, je hospodárnejší a účinnejší ako transformácia s použitím polyetylénglykolu.

Pri uskutočňovaní spôsobu podľa vynálezu sa môžu použiť celé, neporušené bunky, takže odpadá premena na protoplasty, ktorá je náročná na čas a pre bunky *B. thuringiensis* a *B. cereus* kritická, odpadá tiež nasledujúca regenerácia na komplexnom živnom prostredí.

Pri použití postupu s polyetyléglykolom trvá uskutočnenie celého postupu jednotlivých stupňov až jeden týždeň, kým pri uskutočňovaní transformácie spôsobom podľa vynálezu sa transformované bunky dajú získať v priebehu niekoľkých hodín, spravidla cez noc.

Ďalšou výhodou spôsobu podľa vynálezu je skutočnosť, že sa zvyšuje počet buniek *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus*, ktoré sa dajú podrobiť úspešnej transformácii za jednotku času.

Pri uskutočňovaní tradičného postupu s použitím polyetylénglykolu sa môžu na platne súčasne nanášať iba malé množstvá, aby sa zabránilo zabrzdeniu regenerácie príliš rýchlym rastom buniek a ich nasledujúcim prehustením,

kým pri použití otvárania pórov pôsobením elektrického prúdu sa môžu na platne súčasne nanášať veľké množstvá *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus*.

Tým sa umožní selekcia transformantov aj pri veľmi malej frekvencii transformácie, čo by použitím opísaných postupov nebolo možné alebo bolo možné len s veľkými časovými nákladmi.

Z toho vyplýva, že novým spôsobom sa z jedinej transformácie dá získať množstvo DNA v oblasti nanogramov.

Všetky tieto skutočnosti majú svoj význam predovšetkým v prípade, že je potrebné použiť veľmi účinný transformačný systém tak, ako je to napríklad použitím DNA z *E. coli*, čo môže, vzhľadom na veľmi vyjadrený systém reštrikčných endonukleáz v *B. thuringiensis* oproti *E. coli*, viesť k redukcii transformačného výsledku až o faktor 10^3.

Spôsob transformácie podľa vynálezu, ktorý je v podstate založený na známej technológii s použitím otvárania pórov pôsobením elektrického prúdu, je charakterizovaný nasledujúcimi špecifickými stupňami:

a) vytvorí sa suspenzia buniek s vhodnou hustotou buniek v živnom prostredí, ktoré je vhodné na pestovanie buniek *B. thuringiensis* za súčasného prevzdušňovania, dostatočného pre rast buniek,

b) zo suspenzie buniek sa bunky oddelia a uvedú sa do suspenzie v inokulačnom pufri, vhodnom na nasledujúce otvorenie pórov pôsobením elektrického prúdu,

c) pridá sa sonda DNA v koncentrácii, vhodnej na otvorenie pórov pôsobením elektrického prúdu,

d) takto získaný materiál sa prenesie do zariadení na otváranie pórov pôsobením elektrického prúdu,

e) suspenziou sa jeden alebo viackrát nechá krátkodobo vybiť kondenzátor, aby sa krátkodobo vytvorilo silné elektrické pole v čase, ktorý je dostatočný na transformáciu buniek *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus* pôsobením rekombinantnej DNA,

f) takto spracované bunky sa podrobia prípadne ešte nasledujúcej inkubácii,

g) získané bunky sa nanesú na platne s vhodným selekčným živným prostredím a

h) transformované bunky sa oddelia.

V špecifickom výhodnom uskutočnení spôsobu podľa vynálezu sa bunky *B. thuringiensis* najprv inkubujú vo vhodnom živnom prostredí za dostatočného prevzdušňovania a pri vhodnej teplote, výhodne 20 až 35 °C, až do optickej hustoty OD_{550} s hodnotou 0,1 až 1,0. Vek kultúr, určených na otváranie pórov pôsobením elektrického prúdu, má podstatný význam na frekvenciu transformácie. Obzvlášť výhodná je optická hustota kultúr 0,1 až 0,3 a najmä 0,2. Je však potrebné uviesť, že dobrá frekvencia transformácie sa dá dosiahnuť aj použitím kultúr *Bacillus* z inej rastovej fázy, ide najmä o kultúry pestované cez noc, ako je znázornené na obrázku 2.

Ako východiskový materiál sa spravidla používajú čerstvé bunky alebo spóry, rovnako možné je vychádzať aj z hlboko zmrazeného bunkového materiálu. Výhodne ide o bunkové suspenzie *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus* vo vhodnom kvapalnom prostredí, ktoré výhodne obsahuje určitý podiel látky zabraňujúcej zamrznutiu.

Vhodnou látkou tohto typu bude predovšetkým zmes osmoticky účinných zložiek a dimetylsulfoxidu vo vode alebo vo vhodnom pufri. Ďalšími vhodnými zložkami, ktoré prichádzajú do úvahy na toto použitie, sú napríklad cukry, viacnasýtené alkoholy ako glycerol, alkoholy odvodené od cukrov, aminokyseliny a polyméry, napríklad polyetylénglykol.

V prípade, že sa vychádza zo spór *B. thuringiensis*, sa tieto spóry naočkujú najprv do vhodného živného prostredia a inkubujú sa cez noc pri vhodnej teplote, výhodne v rozmedzí 25 až 28 °C za dostatočného prevzdušňovania. Suspenzia sa potom zriedi a ďalej sa spracováva uvedeným spôsobom.

Na indukciu sporulácie *B. thuringiensis* sa môže použiť akékoľvek prostredie, ktoré sporuláciu vyvoláva. Pri uskutočňovaní spôsobu podľa vynálezu je vhodné najmä prostredie GYS, ktoré bolo opísané v publikácii Youston A. A. a Rogoff M. H., J. Bacteriol. 100, 1229-1236, 1969.

Prívod kyslíka do živného prostredia sa zvyčajne zaisťuje miešaním kultúry, napríklad na trepačke, pričom sa používajú výkyvy v rozmedzí 50 až 300 výkyvov za minútu.

Pestovanie spór *B. thuringiensis* a tiež vegetatívnych buniek tohto mikroorganizmu sa pri uskutočňovaní spôsobu podľa vynálezu uskutočňuje akýmikoľvek známymi postupmi, pričom sa z hľadiska uľahčenia praktického uskutočnenia postupu výhodne používajú kvapalné živné prostredia.

Zloženie týchto živných prostredí sa môže meniť podľa použitých kmeňov *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus*. Vo všeobecnosti sa používa komplexné prostredie s málo definovanými, ľahko využiteľnými zdrojmi uhlíka a dusíka tak, ako sa bežne používajú na kultiváciu aeróbnych kmeňov *Bacillus*.

Okrem toho je nevyhnutné, aby živné prostredie obsahovalo vitamíny a potrebné kovové ióny, ktoré sa však spravidla nachádzajú v použitých komplexných živných prostrediach v dostatočnej koncentrácii ako zložky alebo nečistoty.

V prípade potreby je možné použiť uvedené zložky, napríklad základné vitamíny alebo ióny sodné, draselné, meďnaté, vápenaté, horečnaté, železité, amóniové, fosforečné, síranové, chloridové alebo uhličitanové a stopové prvky kobalt, mangán, zinok a ďalšie vo forme solí.

Ako vhodné zdroje dusíka sa okrem extraktov z kvasníc môžu uviesť aj hydrolyzáty z kvasníc, autolyzáty kvasníc, samotné kvasinky a predovšetkým sójová múka, kukuričná múka, ovsené múka, Edamin (enzymaticky natrávený mliečny albumín), peptón, hydrolyzát kazeínu, kukuričný výluh a tiež extrakty z mäsa, môže sa však použiť aj rad iných látok, takže uvedené vymenovanie má slúžiť iba ako príklad a nemá v žiadnom smere obmedzovať spôsob podľa vynálezu.

Výhodná koncentrácia uvedených zdrojov dusíka sa pohybuje v rozmedzí 1,0 až 20 g/l.

Zo zdrojov uhlíka pripadajú do úvahy najmä glukóza, laktóza, sacharóza, dextróza, maltóza, škroby, cerelóza, celulóza alebo sladový extrakt. Výhodná koncentrácia týchto zdrojov sa pohybuje v rozmedzí 1,0 až 20 g/l.

Okrem komplexných živných prostredí sa dajú samozrejme použiť aj polosyntetické alebo syntetické živné prostredia, ak tieto prostredia obsahujú všetky uvedené živné látky vo vhodnej a dostatočnej koncentrácii.

Okrem výhodného prostredia LB tak, ako sa používa pri uskutočňovaní spôsobu podľa vynálezu, sa môžu použiť aj iné, na pestovanie buniek *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus* vhodné prostredia, napríklad prostredie 3 s obsahom antibiotík, prostredie SCGY a podobne. Pestovanie sporulovaných kultúr *B. thuringiensis* sa výhodne uskutočňuje v prostredí GYS (šikmý agar), kultúry sa udržujú pri teplote 4 °C.

Sotva bunková kultúra dosiahne požadovanú hustotu buniek, bunky sa oddelia odstredením a uvedú sa do suspenzie vo vhodnom pufri, výhodne vopred vychladenom ľadom.

Teplota v priebehu uvedených pozorovaní nie je kritická a je možné ju meniť v pomerne širokom rozmedzí. Výhodne sa teplota pohybuje v rozmedzí 0 až 35 °C, ešte výhodnejšie v rozmedzí 2 až 15 °C, obzvlášť výhodná je teplota 4 °C. Čas inkubácie buniek *B. cereus* pred otvorením pórov pôsobením elektrického prúdu a po ňom má len malý vplyv na dosiahnuteľnú frekvenciu transform, ako je uvedené v tabuľke 1. Až príliš dlhá inkubácia vedie k poklesu frekvencie transformácie. Výhodný je čas inkubácie 0,1 až 30 minút, najmä čas 10 minút. V priebehu týchto postupov sa ukázalo, že teplota nie je kritická a môže sa voľne voliť v širokom rozmedzí. Výhodne sa teplota pohybuje v rozmedzí od 0 až 35 °C, ešte výhodnejšie v rozmedzí 2 až 15 °C, obzvlášť výhodná je teplota 4 °C. Postup sa dá viackrát opakovať. Zvlášť vhodným roztokom pufra je pri uskutočňovaní spôsobu podľa vynálezu osmoticky stabilizovaný fosfátový pufor, ktorý ako stabilizačné činidlo obsahuje cukor, napríklad glukózu alebo sacharózu, alkoholy odvodené od cukrov, napríklad manitol, pričom je prostredie upravené na pH 5,0 až 8,0. Výhodný je najmä fosfátový pufor typu PBS s rozmedzím pH 5,0 až 8,0, výhodne 5,5 až 6,5, ktorý obsahuje sacharózu ako stabilizačné činidlo v koncentrácii 0,1 až 1, 0 M, výhodne 0,3 až 0,5 M, ako je znázornené na obrázku 3 a 4.

Podiel suspenzie buniek *Bacillus* sa potom inkubuje v kyvetách alebo iných ľubovoľných vhodných nádobách so sondou DNA vo vhodnom čase, výhodne 0,1 až 30 minút, najmä 5 až 15 minút a pri vhodnej teplote, výhodne pri teplote 0 až 35 °C, ešte výhodnejšie pri teplote 2 až 15 °C, obzvlášť výhodná je teplota 4 °C.

Pri uskutočňovaní týchto experimentov pri nižších teplotách je vhodné používať vopred vychladené kyvety alebo iné vhodné, takisto vopred vychladené, nádoby.

Medzi frekvenciou transformácie a použitou transformáciou DNA pri otvorení pórov pôsobením elektrického prúdu sa tiež nachádza lineárna súvislosť, pričom frekvencia transformácií stúpa so stúpajúcou koncentráciou DNA, ako je znázornené na obrázku 5. Výhodná koncentrácia DNA pri uskutočňovaní spôsobu podľa vynálezu sa pohybuje v rozmedzí 1 ng až 20 µg. Výhodná je najmä koncentrácia DNA v rozmedzí 10 ng až 10 µg.

Potom sa takto spracovaný materiál, t. j. *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus* spolu s DNA plazmidmi alebo inou vhodnou sondou DNA, prenesie do príslušného zariadenia na otváranie pórov pôsobením elektrického prúdu a tam sa podrobí tomuto otváraniu pórov vo forme krátkodobého elektrického impulzu.

Ak ide o zariadenie na otváranie pórov pôsobením elektrického prúdu vhodné na použitie pri uskutočňovaní spôsobu podľa vynálezu, sú k dispozícii rôzne zariadenia ponúkané rôznymi výrobcami, napríklad Bio Rad (Richmond, CA, USA, "Gene Pulser Apparatus"), Biotechnologies and Experimental Research, Ivc., (San Diego, CA, USA, "BTX Transfector 100"), Promiga (Madison, WI, USA, "X-Cell 2000 Electroporation System") a podobne.

Je samozrejmé, že pri uskutočňovaní spôsobu podľa vynálezu sa na otvorenie pórov môže použiť aj akékoľvek iné zariadenie.

Okrem toho sa môžu použiť rôzne formy impulzov, napríklad takzvané pravouhlé impulzy alebo impulzy tvaru exponenciály.

Druhý uvedený typ impulzov je pri uskutočňovaní spôsobu podľa vynálezu výhodnejší. K vzniku týchto impulzov dochádza pri vybití kondenzátora a tieto impulzy sú charakteristické rýchlym vzostupom napätia a potom priebehom, tvar ktorého sa podobá exponenciálnej krivke na základe vzťahu medzi odporom a kapacitou. Časová konštanta RC je mierou dĺžky celého úseku exponenciály. Zodpovedá času, ktorý je potrebný na pokles napätia o 37 % od počiatočného napätia V_0.

Ďalším významným parametrom, ktorý ovplyvňuje bakteriálnu bunku, je sila elektrického poľa medzi bunkami a pomer medzi použitým napätím a vzdialenosťou medzi elektródami.

Ďalší veľký význam má v tejto súvislosti čas poklesu napätia v tvare exponenciály, ktorý závisí od konštrukcie použitého zariadenia, napríklad od kapacity použitého kondenzátu, no aj od iných parametrov, napríklad od zložení roztoku pufra alebo od použitého objemu bunkovej suspenzie, v ktorej má dôjsť k otvoreniu pórov pôsobením elektrického prúdu.

V priebehu uskutočňovania štúdií sa ukázalo napríklad to, že pri znížení objemu bunkovej suspenzie, v ktorej má byť uskutočnená uvedená reakcia, na polovicu, dôjde k zvýšeniu frekvencie transformácií približne o faktor 10.

Predĺženie poklesu exponenciály pri optimálnom zložení pufra tiež priaznivo ovplyvňuje frekvenciu transformácií.

Všetky pracovné opatrenia, ktoré môžu viesť k predĺženiu času poklesu napätia v tvare exponenciály a tým k zvýšeniu frekvencie transformácií, sú teda pri uskutočňovaní spôsobu podľa vynálezu výhodné.

Pri uskutočňovaní spôsobu podľa vynálezu sa výhodný čas poklesu napätia v tvare exponenciály pohybuje v rozmedzí 8 až 20 ms, najmä v rozmedzí 8 až 20 ms. Obzvlášť výhodný je čas poklesu napätia 10 až 12 ms.

Pri uskutočňovaní spôsobu podľa vynálezu sa bakteriálne bunky podrobujú krátkodobému vybitiu kondenzátora cez bunkovú suspenziu s obsahom DNA s použitím veľmi silného elektrického poľa, čím dochádza ku krátkodobému a reverzibilnému zvýšeniu priepustnosti buniek *B. thuringiensis*. Parametre sa pri uskutočňovaní otvárania pórov pôsobením elektrického prúdu navzájom upravujú podľa vynálezu takým spôsobom, že sa dosahuje optimálny príjem DNA, ktorá sa nachádza v pufri, v ktorom sa uskutočňuje otváranie pórov do buniek *Bacillus*.

Nastavenie kapacity na kondenzátore je pri uskutočňovaní spôsobu podľa vynálezu zvyčajne v rozmedzí 1 až 250 µF, výhodne 1 až 50 µF a najmä 25 µF. Voľba východiskového napätia je v širokom rozmedzí voľne voliteľná a nie je príliš kritická. Obvykle sa používa východiskové napätie V_0 v rozmedzí 0,2 až 50 kV, najmä v rozmedzí 0,2 až 2,5 kV, výhodné predovšetkým v rozmedzí 1,2 kV až 1,8 kV. Odstup elektród závisí, okrem iného, od celkových rozmerov zariadenia na otváranie pórov s použitím elektrického prúdu. Táto vzdialenosť sa zvyčajne pohybuje v rozmedzí 0,1 až 1,0 cm, výhodne v rozmedzí 0,2 až 1,0 cm, obzvlášť výhodná vzdialenosť oboch elektród je 0, 4 cm. Zo vzdialenosti oboch elektród a napätia na kondenzátore sa dá odvodiť sila elektrického poľa, ktoré pôsobí na bunkovú suspenziu. Tieto hodnoty sa obvykle pohybujú v rozmedzí 100 až 50 000 V/cm. Obzvlášť výhodná hodnota sily elektrického poľa je 10 až 10 000 V/cm, najmä 3000 až 4500 V/cm.

Jemné nastavenie voliteľných parametrov, napríklad kapacity, východiskového napätia, vzdialenosti medzi elektródami a podobne, do určitej miery závisí od konštrukcie použitých zariadení a môže sa pre každý prípad v určitých hraniciach meniť. Uvedené hraničné hodnoty sa teda môžu v určitých prípadoch znížiť alebo prekročiť, ak by to malo byť nevyhnutné na dosiahnutie optimálnej sily elektrického poľa pri uskutočňovaní uvedeného postupu.

Vlastné otvorenie pórov pôsobením elektrického prúdu sa môže jeden alebo viackrát opakovať tak dlho, kým sa

dosiahne optimálna frekvencia transformácií v použitom systéme.

Po uskutočnenom otvorení pórov pôsobením elektrického prúdu sa takto spracované bunky *Bacillus* výhodne dajú podrobiť ešte následnej inkubácii, výhodne v čase od 0,1 až 30 minút pri teplote v rozmedzí 0 až 35 °C, výhodne v rozmedzí 2 až 15 °C. Nakoniec sa takto spracované bunky zriedia vhodným živným prostredím a potom sa ďalej inkubujú vo vhodnom časovom úseku, výhodne 2 až 3 hodiny pri dostatočnom prevzdušňovaní a pri vhodnej teplote, výhodne pri teplote 20 až 35 °C.

Nakoniec sa bunky *B. thuringiensis* nanesú na platne s obsahom pevného živného prostredia, ktoré obsahuje ako prísadu vhodné činidlo na selekciu reťazcov DNA, novozavedených do bakteriálnych buniek. Podľa typu použitej DNA môže ísť napríklad o látky s antibiotickým účinkom, o farbivá a podobne. Obzvlášť výhodnou látkou pri uskutočňovaní spôsobu podľa vynálezu sú pri selekcii buniek *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus* antibiotiká, ktoré sa volia zo skupiny tetracyklín, kanamycín, chloramfenikol a erytromycín.

Rovnako výhodné môže byť aj použitie chromogénnych substrátov, ako napríklad X-gal, t. j. 5-bróm-4-chlór-3-indolyl-ß-D-galaktozid, ktoré sa môžu ľahko stanoviť na základe svojich špecifických farebných reakcií.

Pri uskutočňovaní spôsobu podľa vynálezu sa zásadne môžu použiť aj akékoľvek iné fenotypické označovacie prostriedky tak, ako sú v odbore známe a bežne sa používajú.

Súčasne sa môže použiť ľubovoľné, na pestovanie buniek *B. thuringiensis* vhodné živné prostredie, ktoré sa dá bežným spôsobom spevniť, napríklad pridaním agaru, agarózy, želatíny a podobne.

Pri uskutočňovaní spôsobu podľa vynálezu sa môžu parametre, ktoré boli jednotlivo podrobne uvedené pre *bunky B. thuringiensis*, použiť rovnako aj pre bunky *B. cereus*.

Opísaný postup, ktorý sa pri uskutočňovaní spôsobu podľa vynálezu používa na transformáciu *B. thuringiensis* alebo *B. cereus*, nezostáva obmedzený, ako to až doteraz bolo v prípade známych postupov, iba na použitie určitých plazmidov prirodzene sa vyskytujúcich v *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus*, ale je použiteľný pri všetkých typoch DNA.

Spôsob podľa vynálezu teda po prvýkrát umožňuje cielenú transformáciu *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus*, pri uskutočňovaní ktorej sa dá okrem homológnej, t. j. prirodzene sa vyskytujúcej plazmidovej DNA v *B. thuringiensis* alebo blízko príbuznom *B. cereus*, použiť aj plazmidová DNA heterológneho pôvodu.

Pri uskutočňovaní tohto postupu môže ísť aj o DNA plazmidu, ktorá sa prirodzene vyskytuje v inom organizme než v *B. thuringiensis* alebo blízko príbuznom *B. cereus*, ako napríklad plazmidy pUB110 a pC194 zo *Staphylococcus aureus*, opísané v publikáciách Horinouchi S. a Weisblum B., J. Bacteriol. 150, 815 - 825, 1982, a Polak J. a Novick R. P., Plasmid 7, 152 - 162, 1982, a plazmid pIM13 z *B. subtilis*, ktorý bol opísaný v publikácii, a Halvorson H.O., J. Gen. Microbiol. 120, 259 - 263, 1980, ktoré sú schopné replikácie v *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus*, no tiež DNA hybridné plazmidy, ktoré boli skonštruované technológiou s použitím rekombinantnej DNA, z DNA homológneho alebo heterológneho plazmidu, alebo kombinácie homológneho a heterológneho plazmidu. Uvedená hybridná DNA plazmidu je vhodnejšia na prácu s rekombinantnou DNA ako izoláty prírodného pôvodu.

Ako príklad je možné uviesť plazmid pBD67, opísaný v publikácii Gryczan T. a ďalší, J. Bacteriol. 141, 246 - 253, 1980, a plazmidy pBD347, pBD348 a pUB1664 bez toho, že by bol tento výpočet úplný, takže spôsob podľa vynálezu nemá byť použitím uvedených plazmidom nijako obmedzený.

Zvláštny význam na uskutočňovanie experimentov s klonovaním v rôznych kmeňov *B. thuringiensis* alebo *B. cereus* má použitie vektorov na klonovanie, ktoré sa už použili pri *B. subtilis*, napríklad pBD64.

Okrem plazmidovej DNA sa na transformáciu pri uskutočňovaní spôsobu podľa vynálezu v *B. thuringiensis* alebo *B. cereus* môže použiť aj akákoľvek iná DNA. Transformovaná DNA môže byť replikovaná buď autonómne, alebo integrovane v chromozóme. Môže teda ísť napríklad o DNA vektora, ktorá nie je odvodená od plazmidu, ale od fága.

Vynález sa týka aj spôsobu konštrukcie bifunkčných vektorov ("shuttle"-vektory).

Obzvlášť vhodné sú podľa vynálezu konštrukcia a použitie bifunkčných hybridných vektorov typu plazmidu, ktoré sú okrem *B. thuringiensis* alebo blízko príbuzného *B. cereus* schopné aj replikácie v jednom alebo vo viacerých heterológnych organizmoch a ktoré sú identifikovateľné nielen v homológnych, ale aj v heterológnych systémoch.

Pod pojmom "heterológne produkčné organizmy" sa v rámci vynálezu rozumejú všetky tie organizmy, ktoré nepatria do skupiny *B. thuringiensis* a *B. cereus* a ktoré sú schopné stabilne udržať DNA, schopnú replikácie.

Z heterológnych funkčných organizmov platia uvedené definície tak pre prokaryotické, ako aj pre eukaryotické organizmy. Ako príklady týchto organizmov z prokaryotickej skupiny sa môžu uviesť niektorí predstavitelia z čeľade *Bacillus*, napríklad *B. subtilis* alebo *B. megaterium*, ďalej z čeľade *Staphylococcus*, napríklad *S. aureus*, ďalej *Streptococcus*, napríklad *S. faecalis*, *Streptomyces*, napríklad *Streptomyces spp.*, *Pseudomonas*, napríklad *Pseudomonas spp.*, *Escherichia*, napríklad *E. coli*, *Agrobacterium*, napríklad *Agrobacterium tumefaciens* alebo *A. rhizogenes*, *Salmonella*, *Erwinia* a podobne. Zo skupiny eukaryotických organizmov sa predovšetkým môžu uviesť v prvom rade kvasinky a živočíšne, a rastlinné bunky. Tento výpočet opäť nie je úplný a vynález nemá byť týmto výpočtom žiadnym spôsobom obmedzený. Každému odborníkovi sú známe ďalšie vhodné príklady zo skupiny prokaryotických i eukaryotických produkčných organizmov.

Vhodné na použitie v rámci vynálezu sú najmä *B. subtilis* alebo *B. megaterium*, *Pseudomonas spp.* a hlavne *E. coli* zo skupiny prokaryotických produkčných organizmov a kvasinky alebo živočíšne, alebo rastlinné bunky zo skupiny eukaryotických produkčných organizmov.

Výhodné sú predovšetkým bifunkčné vektory, ktoré sú schopné replikácie tak v *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus*, ako aj v *E. coli*.

Vynález zahŕňa aj použitie uvedených bifunkčných vektorov na transformáciu *B. thuringiensis* a *B. cereus*.

Konštrukcia uvedených bifunkčných vektorov sa uskutočňuje s použitím rekombinantnej technológie DNA tak, že sa najprv rozštiepia plazmidy a/alebo vektory homológneho pôvodu z *B. thuringiensis* a *B. cereus* i heterológneho pôvodu pôsobením vhodných restrikčných enzýmov, a potom sa spoja tie fragmenty DNA, ktoré obsahujú funkcie, nevyhnutne potrebné na replikáciu vo zvolenom produkčnom systéme v prítomnosti príslušných enzýmov.

Ako zdroj pre DNA plazmidu a/alebo vektora heterológneho pôvodu sa môže použiť niektorý z uvedených heterológnych produkčných organizmov.

Spojenie rôznych fragmentov DNA musí postupovať takým spôsobom, aby boli zachované podstatné funkcie,

ktoré sú potrebné na replikáciu v rôznych produkčných systémoch.

Okrem toho sa na konštrukciu uvedených bifunkčných vektorov môže samozrejme použiť aj plazmidová DNA alebo DNA z vektora čisto homológneho pôvodu, pričom však aspoň jeden z fragmentov DNA, ktoré sa použili z heterológneho zdroja, musí umožňovať replikáciu v homológnom produkčnom systéme *B. thuringiensis* a *B. cereus*.

Ako zdroj DNA z plazmidu a/alebo vektora heterológneho pôvodu, ktorá je však schopná replikácie v produkčnom systéme *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus*, sa na tomto mieste môžu uviesť niektorí predstavitelia zo skupiny gram-pozitívnych baktérií, ktoré sa volia najmä z čeľade *Staphylococcus*, napríklad *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*, napríklad *Streptococcus faecalis*, *Bacillus*, napríklad *Bacillus megaterium* alebo *Bacillus subtilis*, *Streptomyces*, napríklad *Streptomyces spp.* a podobne. Okrem týchto predstaviteľov zo skupiny gram-pozitívnych baktérií tak, ako boli vymenované, sa pri uskutočňovaní spôsobu podľa vynálezu môže ešte použiť celý rad ďalších organizmov, ktoré môže ľahko určiť ktorýkoľvek odborník.

Vynález sa týka aj spôsobu výroby bifunkčných vektorov, vhodných na transformáciu *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus*, spôsob sa uskutočňuje tak, že sa DNA plazmidu homológncho a heterológneho pôvodu najprv

a) rozštiepi na fragmenty pôsobením vhodných reštrikčných enzýmov, a potom

b) sa tieto fragmenty, ktoré obsahujú podstatné funkcie, nevyhnutné na replikáciu a na selekciu v požadovanom produkčnom systéme, v prítomnosti vhodných enzýmov opäť spojených takým spôsobom, aby zostali zachované podstatné funkcie, ktoré sú potrebné na replikáciu a selekciu v rôznych produkčných systémoch.

Týmto spôsobom vznikajú bifunkčné plazmidy, ktoré okrem funkcií, nevyhnutných na replikáciu v *B. thuringiensis* alebo v *B. cereus*, obsahujú ešte ďalšie reťazce DNA, ktoré zaisťujú replikáciu aspoň v jednom ďalšom heterológnom produkčnom systéme.

Aby sa mohla zaistiť rýchla a účinná selekcia bifunkčných vektorov tak v homológnych, ako aj v heterológnych cieľových produkčných systémoch, je výhodné skonštruovať vektory so špecifickými selekčnými označovacími prostriedkami, ktoré by boli použiteľné tak v *B. thuringiensis* a/alebo v *B. cereus*, ako aj v heterológnych produkčných systémoch, to znamená, že by v oboch týchto systémoch zaisťovali rýchlu a nekomplikovanú selekciu. Pri uskutočňovaní spôsobu podľa vynálezu je výhodné predovšetkým použitie reťazcov DNA, ktoré sú kódom odolnosti proti antibiotikám, najmä reťazcov DNA, ktoré sú kódom odolnosti proti antibiotikám zo skupiny kanamycín, tetracyklín, chloramfenikol, erytromycín a podobne.

Rovnako výhodné sú aj gény, ktoré sú kódom pre enzýmy s chromogénnym substrátom, napríklad X-gal (5--bróm-4-chlór-3-indolyl-ß-D-galaktozid). Kolónie, ktoré sa transformovali, sa potom dajú veľmi jednoducho oddeliť od netransformovaných kolónií na základe špecifickej farebnej reakcie.

Ďalšie špecifické fenotypické gény, ktoré sa môžu použiť na označenie, sú odborníkom známe a môžu sa použiť aj pri uskutočňovaní spôsobu podľa vynálezu.

Obzvlášť výhodná je v rámci vynálezu konštrukcia bifunkčných vektorov, obsahujúcich okrem reťazcov DNA, ktoré umožňujú replikáciu v *B. thuringiensis* alebo v *B. cereus*, alebo v oboch produkčných systémoch, obsahujú aj také fragmenty DNA, ktoré sú potrebné na dosiahnutie replikácie v ďalších bakteriálnych produkčných systémoch, ako napríklad v *B. subtilis*, *B. megaterium*, *Pseudomonas spp.*, *E. coli* a podobne.

Výhodné sú najmä bifunkčné vektory, ktoré na jednej strane sú schopné replikácie v *B. thuringiensis* alebo v *B. cereus*, alebo v oboch týchto organizmoch, a na strane druhej sú schopné replikácie aj v eukaryotických produkčných systémoch zo skupiny kvasiniek, živočíšnych a rastlinných buniek a podobne.

Výhodná je predovšetkým aj konštrukcia bifunkčných vektorov, ktoré okrem reťazcov DNA, ktoré sú potrebné na replikáciu týchto vektorov v *B. thuringiensis* alebo v *B. cereus*, alebo v oboch týchto systémoch, obsahujú aj také reťazce DNA, ktoré umožňujú replikáciu týchto vektorov v *E. coli*.

Je napríklad možné pri konštrukcii uvedených bifunkčných vektorov ako východiskové plazmidy pre systém *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus*, a a/alebo *E. coli*, ktoré sa však môžu použiť iba obmedzene, použiť aj plazmid *B. cereus* pBC16, ako aj od *E. coli* odvodené plazmidy pBR322 a plazmid pUC8, ktorý bol opísaný v publikácii Vieira J. a Messing J., Gene 19, 259 - 268, 1982.

Vynález sa takisto týka bifunkčných vektorov ("shuttle"), ktoré okrem funkcií nevyhnutných na replikáciu a selekciu v homológnych a heterológnych produkčných systémoch, obsahujú navyše ešte jeden alebo viac génov vo forme, ktorá je schopná expresie, alebo zvláštne využiteľné reťazce DNA. Vynález sa týka aj spôsobu výroby týchto vektorov tak, že sa uvedené gény alebo zvláštne využiteľné reťazce DNA včlenia do uvedených bifunkčných vektorov použitím vhodných enzýmov.

Použitím bifunkčných vektorov, získaných spôsobom podľa vynálezu, ako aj pri použití opísaných transformačných postupov je teraz po prvýkrát možné použitie reťazcov DNA, klonovanej mimo bunky *B. thuringiensis* v cudzorodom produkčnom systéme, na transformáciu buniek *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus* s vysokou účinnosťou.

V súčasnosti je teda po prvýkrát možné včleniť gény alebo zvláštne využiteľné reťazce DNA, najmä aj tie, ktoré majú riadiacu funkciu, stabilne do buniek *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus* a tam prípadne dosiahnuť ich expresiu, čím vznikajú bunky *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus* s novými žiaducimi vlastnosťami.

Ako gény, ktoré sa môžu použiť pri uskutočňovaní spôsobu podľa vynálezu, prichádzajú do úvahy tak homológne a heterológne gény alebo reťazce DNA a tiež syntetické gény alebo reťazce DNA, ako aj kombinácie uvedených látok.

Kódové reťazce DNA sa môžu konštruovať výlučne z DNA genómu, z cDNA alebo zo syntetickej DNA. Ďalšia možnosť spočíva v konštrukcii hybridného reťazca DNA, hybridného reťazca cDNA, DNA genómu, syntetickej DNA alebo môže ísť aj o kombinácie všetkých uvedených typov rôznych DNA.

V tomto prípade môže cDNA pochádzať z toho istého génu ako DNA genómu alebo môžu cDNA a DNA genómu pochádzať z rôznych génov. V každom prípade je však možné získať DNA genómu a/alebo cDNA každú zvlášť z rovnakých alebo z rôznych génov.

V prípade, že reťazec DNA obsahuje časti, ktoré pochádzajú z viac ako jedného génu, môžu tieto gény zodpovedať tomu istému organizmu, väčšiemu počtu organizmov, ktoré patria k rôznym kmeňom, k varietam toho istého kmeňa alebo rôznym kmeňom tej istej čeľade, alebo môže ísť o organizmy, patriace do viac ako jednej čeľade alebo do odlišnej taxonomickej jednotky.

Aby sa mohla dosiahnuť expresia uvedených štruktúrnych génov v bakteriálnej bunke, je potrebné najprv spojiť

kódové reťazce génov správnym spôsobom tak, aby obsahovali aj funkčné reťazce na expresiu výsledného štruktúrneho génu v bunkách *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus*.

Hybridné konštrukcie génov obsahujú v rámci vynálezu okrem štruktúrneho génu aj signály na expresiu, ktoré v sebe zahŕňajú tak reťazec promótora a terminátora, ako aj ďalšie riadiace reťazce v 3' alebo 5' neprenášanej oblasti.

Obzvlášť výhodné pri uskutočňovaní spôsobu podľa vynálezu je použitie prírodných signálov pre expresiu z *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus* alebo z mutantov a variantov týchto mikroorganizmov, ktoré sú v podstate homológne s prírodným reťazcom. Pri uskutočňovaní spôsobu podľa vynálezu je určitý reťazec DNA v podstate homológny druhému reťazcu DNA v tom prípade, že je homológny aspoň v 70 %, výhodne aspoň v 80 % a najmä v 90 % aktívnych úsekov celého reťazca DNA. Pri uskutočňovaní spôsobu podľa vynálezu znamená termín "v podstate homológny" v prípade dvoch rôznych nukleotidov v kódovej oblasti toho istého reťazca DNA aj tú situáciu, pri ktorej pri výmene jedného z týchto nukleotidov za iný nukleotid dôjde iba k takzvanej mutácii.

Výhodné je najmä použitie promótorov z *B. thuringiensis*, závislých od sporulácie, v prítomnosti ktorých dochádza k expresii v závislosti od dosiahnutia sporulácie.

Obzvlášť výhodné pri transformácii *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus* je použitie takých reťazcov DNA, ktoré sú kódom pre niektorý z δ-endotoxínov.

Kódová oblasť chimérneho génu, získaného spôsobom podľa vynálezu, výhodne obsahuje reťazec nukleotidov, ktorý je kódom pre polypeptid, prirodzene sa vyskytujúci v *B. thuringiensis*, alebo aj pre polypeptid, ktorý je s už uvedeným polypeptidom homológny v tom zmysle, že má aspoň v podstate isekticídne vlastnosti uvedeného kryštalického bielkovinového δ-endotoxínu z *B. thuringiensis*. V rámci vynálezu má určitý polypeptid v podstate vlastnosti, ktoré sú homológne s isekticídnymi vlastnosťami kryštalického bielkovinového δ-endotoxínu *B. thuringiensis* v tom prípade, že má podobné spektrum insekticídnej účinnosti proti larvám hmyzu ako kryštalická bielkovina, prirodzene sa vyskytujúca v *B. thuringiensis*. Môže ísť o rôzne podskupiny tohto mikroorganizmu, napríklad *kurstaki*, *berliner*, *alesti*, *tolworthi*, *sotto*, *dendrolimus*, *tenebrionis* a *israelensis*. Výhodným podtypom, účinným najmä proti larvám *Lepidoptera* je typ *kurstaki* a najmä *kurstaki* HD1.

V prípade kódovej oblasti môže ísť o oblasť, ktorá sa prirodzene vyskytuje v *B. thuringiensis*. Alternatívne môže kódová oblasť obsahovať prípadne aj reťazec, ktorý je síce odlišný od reťazca *B. thuringiensis*, no je mu ekvivalentný na základe degenerácie genetického kódu.

Kódová oblasť chimérneho génu môže byť aj kódom pre polypeptid, ktorý sa síce líši od prirodzene sa vyskytujúceho kryštalického bielkovinového endotoxínu, ale ktorý si stále ešte v podstate udržuje insekticídne vlastnosti kryštalickej bielkoviny. Takýto kódový sled je vlastne variantom prirodzene sa vyskytujúcej kódovej oblasti. Pod pojmom "variant" prírodného reťazca DNA sa v rámci vynálezu rozumie modifikovaná forma prírodného reťazca, ktorá však ešte spĺňa pôvodnú funkciu uvedeného reťazca. Týmto variantom môže byť mutant alebo syntetický reťazec DNA, ktorý je v podstate homológny prírodnému reťazcu. V rámci vynálezu je určitý reťazec v podstate homológny druhému reťazcu DNA v prípade, že aspoň 70 %, výhodne aspoň 80 % a najmä aspoň 90 % aktívnych úsekov je homológnych druhému reťazcu DNA. V prípade dvoch rôznych nukleotidov platí pojem "v podstate homológny" aj v situácii, keď v kódovom slede dôjde po výmene jedného z týchto nukleotidov za iný nukleotid iba k takzvanej tichej mutácii.

Pri uskutočňovaní spôsobu podľa vynálezu sa teda môže použiť každý gén, ktorý je kódom pre reťazec aminokyselín, má insekticídnu účinnosť endotoxínu *B. thuringiensis* a spĺňa všetky uvedené požiadavky. Výhodné v tomto smere je predovšetkým použitie reťazca nukleotidov, ktorý je v podstate homológny aspoň časti alebo častiam prírodného reťazca, ktoré sú príčinou insekticídnej účinnosti a/alebo špecifickosti kryštalického bielkovinového toxínu z *B. thuringiensis*.

Polypeptid, ktorý sa produkuje pri expresii chimérneho génu, má s kryštalickou bielkovinou spravidla spoločné aspoň niektoré imunologické vlastnosti, pretože aspoň z časti obsahuje tie isté antigénne determinanty.

Z tohto dôvodu je polypeptid, pre ktorý je kódom uvedený chimérny gén, výhodne príbuzný s endotoxínom, ktorý je ako kryštalická bielkovina produkovaný *B. thuringiensis*, ktorý produkuje kryštalickú bielkovinu s podjednotkou, zodpovedajúcou protoxínu s molekulovou hmotnosťou 130 000 až 140 000. Táto podjednotka môže byť rozštiepená proteázami alebo zásadami za vzniku insekticídneho fragmentu s molekulovou hmotnosťou 70 000.

Pri konštrukcii chimérnych génov, v ktorých kódová oblasť obsahuje kód pre fragmenty protoxínov alebo ešte menšie časti protoxínov, napriek tomu môže byť v týchto fragmentoch zachovaná požadovaná insekticídna účinnosť. Protoxín, jeho insekticídne fragmenty a časti týchto fragmentov sa môžu spojiť s inými molekulami, napríklad s polypeptidmi a bielkovinami.

Kódové oblasti, vhodné na použitie pri uskutočňovaní spôsobu podľa vynálezu, sa môžu získať z génov *B. thuringiensis* pre kryštalický toxín tak, ako to bolo opísané v PCT prihláške WO86/01536 (Whitley a ďalší) a v US patentových spisoch č. 4 448 885 a 4 467 036. Výhodný reťazec nukleotidov, ktorý je kódom pre kryštalickú bielkovinu, sa nachádza medzi nukleotidmi 156 a 3623 vo vzorci I, ktorý je na obrázku 10, alebo ide o kratší reťazec, ktorý je kódom pre insekticídny fragment tejto kryštalickej bielkoviny, ako to bolo uvedené v publikácii Geiser M. a ďalší, Gene 48, 109 - 118, 1986 a v európskom patentovom spise č. 238 441.

Kódový reťazec nukleotidov 156 až 3623 vo vzorci I je kódom pre polypeptid nasledujúceho vzorca II.

Vzorec II

Met Asp Asn Asn Pro Asn Ile Asn Glu Cys	10
Ile Pro Tyr Asn Cys Leu Ser Asn Pro Glu	20
Val Glu Val Leu Gly Gly Glu Arg Ile Glu	30
Thr Gly Tyr Thr Pro Ile Asp Ile Ser Leu	40
Ser Leu Thr Gln Phe Leu Leu Ser Glu Phe	50
Val Pro Gly Ala Gly Phe Val Leu Gly Leu	60
Val Asp Ile Ile Trp Gly Ile Phe Gly Pro	70
Ser Gln Trp Asp Ala Phe Leu Val Gln Ile	80
Glu Gln Leu Ile Asn Gln Arg Ile Glu Glu	90
Phe Ala Arg Asn Gln Ala Ile Ser Arg Leu	100
Glu Gly Leu Ser Asn Leu Tyr Gln Ile Tyr	110
Ala Glu Ser Phe Arg Glu Trp Glu Ala Asp	120
Pro Thr Asn Pro Ala Leu Arg Glu Glu Met	130
Arg Ile Gln Phe Asn Asp Met Asn Ser Ala	140
Leu Thr Thr Ala Ile Pro Leu Phe Ala Val	150
Gln Asn Tyr Gln Val Pro Leu Leu Ser Val	160

Tyr Val Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser 170
Val Leu Arg Asp Val Ser Val Phe Gly Gln 180
Arg Trp Gly Phe Asp Ala Ala Thr Ile Asn 190
Ser Arg Tyr Asn Asp Leu Thr Arg Leu Ile 200
Gly Asn Tyr Thr Asp His Ala Val Arg Trp 210
Tyr Asn Thr Gly Leu Glu Arg Val Trp Gly 220
Pro Asp Ser Arg Asp Trp Ile Arg Tyr Asn 230
Gln Phe Arg Arg Glu Leu Thr Leu Thr Val 240
Leu Asp Ile Val Ser Leu Phe Pro Asn Tyr 250
Asp Ser Arg Thr Tyr Pro Ile Arg Thr Val 260
Ser Gln Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Asn 270
Pro Val Leu Glu Asn Phe Asp Gly Ser Phe 280
Arg Gly Ser Ala Gln Gly Ile Glu Gly Ser 290
Ile Arg Ser Pro His Leu Met Asp Ile Leu 300
Asn Ser Ile Thr Ile Tyr Thr Asp Ala His 310
Arg Gly Glu Tyr Tyr Trp Ser Gly His Gln 320
Ile Met Ala Ser Pro Val Gly Phe Ser Gly 330
Pro Glu Phe Thr Phe Pro Leu Tyr Gly Thr 340
Met Gly Asn Ala Ala Pro Gln Gln Arg Ile 350
Val Ala Gln Leu Gly Gln Gly Val Tyr Arg 360
Thr Leu Ser Ser Thr Leu Tyr Arg Arg Pro 370
Phe Asn Ile Gly Ile Asn Asn Gln Gln Leu 380
Ser Val Leu Asp Gly Thr Glu Phe Ala Tyr 390
Gly Thr Ser Ser Asn Leu Pro Ser Ala Val 400
Tyr Arg Lys Ser Gly Thr Val Asp Ser Leu 410
Asp Glu Ile Pro Pro Gln Asn Asn Asn Val 420
Pro Pro Arg Gln Gly Phe Ser His Arg Leu 430
Ser His Val Ser Met Phe Arg Ser Gly Phe 440
Ser Asn Ser Ser Val Ser Ile Ile Arg Ala 450
Pro Met Phe Ser Trp Ile His Arg Ser Ala 460
Glu Phe Asn Asn Ile Ile Pro Ser Ser Gln 470
Ile Thr Gln Ile Pro Leu Thr Lys Ser Thr 480
Asn Leu Gly Ser Gly Thr Ser Val Val Lys 490
Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu 500
Arg Arg Thr Ser Pro Gly Gln Ile Ser Thr 510
Leu Arg Val Asn Ile Thr Ala Pro Leu Ser 520
Gln Arg Tyr Arg Val Arg Ile Arg Tyr Ala 530
Ser Thr Thr Asn Leu Gln Phe His Thr Ser 540
Ile Asp Gly Arg Pro Ile Asn Gln Gly Asn 550
Phe Ser Ala Thr Met Ser Ser Gly Ser Asn 560
Leu Gln Ser Gly Ser Phe Arg Thr Val Gly 570
Phe Thr Thr Pro Phe Asn Phe Ser Asn Gly 580
Ser Ser Val Phe Thr Leu Ser Ala His Val 590
Phe Asn Ser Gly Asn Glu Val Tyr Ile Asp 600
Arg Ile Glu Phe Val Pro Ala Glu Val Thr 610
Phe Glu Ala Glu Tyr Asp Leu Glu Arg Ala 620
Gln Lys Ala Val Asn Glu Leu Phe Thr Ser 630
Ser Asn Gln Ile Gly Leu Lys Thr Asp Val 640
Thr Asp Tyr His Ile Asp Gln Val Ser Asn 650
Leu Val Glu Cys Leu Ser Asp Glu Phe Cys 660
Leu Asp Glu Lys Lys Glu Leu Ser Glu Lys 670

Val Lys His Ala Lys Arg Leu Ser Asp Glu 680
Arg Asn Leu Leu Gln Asp Pro Asn Phe Arg 690
Gly Ile Asn Arg Gln Leu Asp Arg Gly Trp 700
Arg Gly Ser Thr Asp Ile Thr Ile Gln Gly 710
Gly Asp Asp Val Phe Lys Glu Asn Tyr Val 720
Thr Leu Leu Gly Thr Phe Asp Glu Cys Tyr 730
Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln Lys Ile Asp Glu 740
Ser Lys Leu Lys Ala Tyr Thr Arg Tyr Gln 750
Leu Arg Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln Asp 760
Leu Glu Ile Tyr Leu Ile Arg Tyr Asn Ala 770
Lys His Glu Thr Val Asn Val Pro Gly Thr 780
Gly Ser Leu Trp Pro Leu Ser Ala Pro Ser 790
Pro Ile Gly Lys Cys Ala His His Ser His 800
His Phe Ser Leu Asp Ile Asp Val Gly Cys 810
Thr Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly Val Trp 820
Val Ile Phe Lys Ile Lys Thr Gln Asp Gly 830
His Ala Arg Leu Gly Asn Leu Glu Phe Leu 840
Glu Glu Lys Pro Leu Val Gly Glu Ala Leu 850
Ala Arg Val Lys Arg Ala Glu Lys Lys Trp 860
Arg Asp Lys Arg Glu Lys Leu Glu Trp Glu 870
Thr Asn Ile Val Tyr Lys Glu Ala Lys Glu 880
Ser Val Asp Ala Leu Phe Val Asn Ser Gln 890
Tyr Asp Arg Leu Gln Ala Asp Thr Asn Ile 900
Ala Met Ile His Ala Ala Asp Lys Arg Val 910
His Ser Ile Arg Glu Ala Tyr Leu Pro Glu 920
Leu Ser Val Ile Pro Gly Val Asn Ala Ala 930
Ile Phe Glu Glu Leu Glu Gly Arg Ile Phe 940
Thr Ala Phe Ser Leu Tyr Asp Ala Arg Asn 950
Val Ile Lys Asn Gly Asp Phe Asn Asn Gly 960
Leu Ser Cys Trp Asn Val Lys Gly His Val 970
Asp Val Glu Glu Gln Asn Asn His Arg Ser 980
Val Leu Val Val Pro Glu Trp Glu Ala Glu 990
Val Ser Gln Glu Val Arg Val Cys Pro Gly 1000
Arg Gly Tyr Ile Leu Arg Val Thr Ala Tyr 1010
Lys Glu Gly Tyr Gly Glu Gly Cys Val Thr 1020
Ile His Glu Ile Glu Asn Asn Thr Asp Glu 1030
Leu Lys Phe Ser Asn Cys Val Glu Glu Glu 1040

Val Tyr Pro Asn Asn Thr Val Thr Cys Asn 1050
Asp Tyr Thr Ala Thr Gln Glu Glu Tyr Glu 1060
Gly Thr Tyr Thr Ser Arg Asn Arg Gly Tyr 1070
Asp Gly Ala Tyr Glu Ser Asn Ser Ser Val 1080
Pro Ala Asp Tyr Ala Ser Ala Tyr Glu Glu 1090
Lys Ala Tyr Thr Asp Gly Arg Arg Asp Asn 1100
Pro Cys Glu Ser Asn Arg Gly Tyr Gly Asp 1110
Tyr Thr Pro Leu Pro Ala Gly Tyr Val Thr 1120
Lys Glu Leu Glu Tyr Phe Pro Glu Thr Asp 1130
Lys Val Trp Ile Glu Ile Gly Glu Thr Glu 1140
Gly Thr Phe Ile Val Asp Ser Val Glu Leu 1150
Leu Leu Met Glu Glu konec 1156

Pri transformácii s použitím chiméreho génu spôsobom podľa vynálezu v bunkách *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus* sa gén výhodne najprv zabuduje do niektorého vektora. Výhodné je najmä včlenenie génov do bifunkčných vektorov podľa vynálezu.

V prípade, že uvedený gén nie je k dispozícii v množstve, ktoré je dostatočné na včlenenie do buniek *Bacillus*, môže sa vektor najprv podrobiť amplifikácii replikáciou v heterológnej produkčnej bunke. Na amplifikáciu génov sú najvhodnejšie bunky baktérií alebo kvasiniek. Sotva je k dispozícii dostatočné množstvo génu, je možné včleniť tento gén do buniek *Bacillus*. Včlenenie génu do buniek *B. thuringiensis* alebo *B. cereus* sa môže uskutočniť v rovnakom vektore, ako sa použil na replikáciu, alebo sa môže použiť iný vektor podľa vynálezu.

Príkladom bakteriálnych produkčných buniek, ktoré sú vhodné na replikáciu chimérneho génu sú napríklad baktérie z čeľadí *Escherichia*, ako je *E. coli*, *Agrobacterium*, ako je *A. tumefaciens* alebo *A. rhizogenes*, ďalej *Pseudomonas*, ako *Pseudomonas spp.*, *Bacillus*, ako je *Bacillus megaterium* alebo *Bacillus subtilis* a podobne. Pri uskutočňovaní spôsobu podľa vynálezu sa v súčasnosti po prvý raz môžu využiť aj *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus* ako produkčné bunky. Spôsob klonovania heterológnych génov v baktériách je známy a bol opísaný v US patentových spisoch č. 4 237 224 a 4 468 464.

Replikácia génov, ktoré obsahujú kód pre kryštalickú bielkovinu *B. thuringiensis*, v *E. coli* bola opísaná v publikácii Wong a ďalší, J. Biol. Chem. 258, 1960 - 1967, 1983.

Príklady produkčných buniek z kvasiniek, ktoré sú vhodné na elektrifikáciu génov spôsobom podľa vynálezu, zahŕňajú najmä kvasinky z čeľade *Saccharomyces*, ako bolo uvedené v európskom patentovom spise č. 238 441.

Na amplifikáciu génu podľa vynálezu sa môže použiť ľubovoľný vektor, ktorý môže byť zabudovaný do chimérneho génu a ktorý je schopný replikácie vo vhodnej produkčnej bunke, napríklad v baktériách alebo v kvasinkách. Tento vektor môže byť odvodený napríklad od fága alebo od plazmidu. Príkladom vektorov, ktoré sú odvodené od fágov a môžu sa použiť pri uskutočňovaní spôsobu podľa vynálezu, môžu byť vektory, odvodené od fágov M13- a lambda. Vhodné vektory, odvodené od fága M13, zahŕňajú vektory M13mp18 a M13mp19. Vektory, odvodené od fága lambda, zahŕňajú vektory lambdagt11, lambdagt7 a lambda- Charon4.

Z vektorov, odvodených od plazmidov a výhodných najmä na replikáciu v baktériách, sa môže uviesť napríklad pBR322, opísaný v publikácii Norrander a ďalší, Gene 26, 101 - 104, 1983, a Ti plazmidy, ktoré boli opísané v publikácii Bevan a ďalší, Nature 304, 184 - 187, 1983, bez toho, aby sa týmto výpočtom, ktorý nie je úplný, mohlo obmedzovať uskutočnenie spôsobu podľa vynálezu. Najvýhodnejšími vektormi na amplifikáciu génov baktérií sú v súčasnosti vektory pBR322, pUC18 a pUC19.

Na priame klonovanie v *Bacillus thuringiensis* a/alebo *B. cereus* je potrebné uviesť v prvom rade vektory na priame klonovanie, napríklad pBD347, pBD348, pBD64 a pUB64, a najmä bifunkčné vektory, ktoré už boli podrobne opísané, bez toho, aby bolo možné obmedziť vynález na tieto uvedené vektory.

Obzvlášť výhodné sú v rámci vynálezu bifunkčné vektory pXI61 (=pK61) a pXI93 (=pK93), ktoré sa po transformácii v *B. thuringiensis var. kurstaki* HD1 cryB a/alebo *B. cereus* 569 K uložili do verejnej zbierky kultúr "Deutschen Sammlung von Mikroorganizmen" (Braunschweig, SRN) podľa Budapeštianskej zmluvy pod číslom DSM 4573 (pXI61, transformácia v *B. thuringiensis var. kurstaki* HD1 cryB), DSM 4571 (pXI93, transformácia v *B. thuringiensis var. kurstaki* HD1 cryB) a DSM 4573 (pXI93, *transformácia v B. cereus* 569 K).

Pri konštrukcii chimérneho génu, vhodného na replikáciu v baktériách, sa do vektora zabuduje reťazec promótora, 5'-neprenášaný reťazec, kódový reťazec a 3'-neprenášaný reťazec, alebo sa tieto časti môžu zabudovať do uvedených vektorov vcelku. Vhodné vektory na použitie pri uskutočňovaní spôsobu podľa vynálezu sú tie, ktoré sú schopné replikácie v produkčných bunkách. Promótor, 5'-neprenášaná oblasť, kódová oblasť a 3'-neprenášaná oblasť môžu byť teda spojené mimo vektora a až potom zabudované do vektora. Dá sa postupovať aj tak, že sa do vektora zabudujú časti chimérneho génu. V prípade vektora na klonovanie v *B. thuringiensis* alebo *B. cereus* sa môže tento pracovný stupeň vynechať, pretože celá jednotka, ktorá je izolovaná z *B. thuringiensis* a ktorá sa skladá z 5'-neprenášanej oblasti, kódovej oblasti a 3'-neprenášanej oblasti, môže byť vcelku zabudovaná do vektora.

Vektor, okrem toho, výhodne obsahuje označovací gén, ktorý v produkčnej bunke vyvíja vlastnosť, v dôsledku ktorej je možné rozoznať bunky, transformované uvedeným vektorom. Výhodné sú také označovacie gény, ktoré sú kódom pre odolnosť proti antibiotikám. Príkladom antibiotík, vhodných na toto použitie, môžu byť ampicilín, chloramfenikol, erytromycín, tetracyklín, hygromycín, G418 a kanamycín.

Výhodné sú aj také označovacie gény, ktoré sú kódom pre enzým s chromogénnym substrátom, napríklad X-gal (5-bróm-4-chlór-3-indolyl-ß-D-galaktozid). Transformované kolónie sa potom dajú odlíšiť veľmi jednoduchým spôsobom podľa špecifickej farebnej reakcie.

Včlenenie alebo zabudovanie génov do vektora sa dá uskutočniť pomocou štandardných postupov, napríklad s použitím rekombinantnej DNA spôsobom podľa publikácie Maniatis a ďalší, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, USA, 1982, a s použitím homológnej rekombinácie spôsobom podľa publikácie Hinnen a ďalší, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1929 - 1933, 1978.

Spôsob s použitím rekombinantnej DNA spočíva v tom, že sa vektor najprv rozštiepi a požadovaný reťazec DNA sa uloží medzi rozštiepené fragmenty vektora a potom sa zakončenie požadovaného reťazce DNA spojí so zodpovedajúcim zakončením vektora.

Použitý vektor sa výhodne rozštiepi vhodnými reštrikčnými endonuklcázami. Vhodné enzýmy na toto použitie sú napríklad tie, ktoré vytvárajú hladké zakončenia, ako sú SmaI, HpaI a EcoRV, a také enzýmy, ktoré vytvárajú kohézne zakončenia, napríklad EcoRI, SacI a BamHI.

Požadovaný reťazec DNA existuje za normálnych okolností ako časť väčšej molekuly DNA, napríklad chromozómu, plazmidu, transpozómu alebo fága. Požadovaný reťazec DNA je teda v týchto prípadoch potrebné vybrať z pôvodného zdroja a prípadne modifikovať takým spôsobom, aby sa vzniknuté zakončenia dali spojiť so zakončeniami rozštiepeného vektora. V prípade, že sú zakončenia požadovaného reťazca DNA a rozštiepeného vektora hladké, dajú sa navzájom spojiť napríklad pomocou špecifických ligáz, ako je T4 DNA-ligáza.

Zakončenie požadovaných reťazcov DNA sa môže spojiť aj s kohéznym zakončením rozštiepeného vektora, v tomto prípade sa môžu použiť ligázy špecifické pre kohézne zakončenia, môže sa však použiť aj T4 DNA-ligázy. Ligáza, špecifická pre kohézne zakončenia, je napríklad DNA ligáza z *E. coli*.

Kohézne zakončenia sa výhodne vytvoria tak, že sa požadovaný reťazec DNA a vektor rozštiepia pôsobením rovnakej reštrikčnej endonukleázy. V tomto prípade majú požadovaný reťazec DNA a rozštiepený vektor kohézne zakončenia, ktoré sú navzájom komplementárne.

Kohézne zakončenia sa dajú vytvoriť aj tak, že sa pomocou terminálnej dezoxynukleotidyltransferázy na konce požadovaného reťazca DNA naviažu homopolymérne zakončenia a rovnaké zakončenia sa pripoja k rozštiepenému vektoru. Potom sa kohézne zakončenie môže vytvoriť tak, že sa na konce týchto útvarov naviaže reťazec syntetického oligonukleotidu, v ktorom sa nachádza miesto na určitú endonukleázu (Linker), takže sa potom tento reťazec môže rozštiepiť touto určitou endonukleázou, ako bolo opísané napríklad v publikácii Maniatis a ďalší, Molecular Cloning.

A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, USA, 1982.

Spôsobom podľa vynálezu sa teda po prvýkrát môžu geneticky modifikovať gény *B. thuringiensis*, najmä reťazce, ktoré sú kódom pre endotoxín, a to mimo *B. thuringiensis*, ďalej sa tieto gény mimo tohto mikroorganizmu môžu klonovať a potom sa včleniť späť do *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus*, kde je možné dosiahnuť expresiu týchto génov pre endotoxíny v homológnom bakteriálnom produkčnom systéme.

To znamená, že v súčasnosti je možné uskutočňovať cielenú manipuláciu genómu *B. thuringiensis* tak, že sa najprv získa veľké množstvo plazmidového materiálu v cudzorodom systéme na klonovanie a s použitím tohto materiálu sa potom transformuje *B. thuringiensis*.

Zvláštny význam má v tomto zmysle tak možnosť modifikácie génu pre δ-endotoxín, ako aj expresia kontrolných reťazcov na riadenie tohto génu.

Okrem chimérnych génov sa samozrejme môže včleniť akákoľvek iná genetická konštrukcia pomocou spôsobu podľa vynálezu do buniek *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus*.

Je napríklad možné použitím spôsobu podľa vynálezu včleňovať do genómu bunky *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus* nekódovú DNA, napríklad "protizmyslovú" DNA, takže v tomto prípade dôjde pri expresii k transkripcii mRNA, ktorá brzdí expresiu zodpovedajúcej DNA, ktorá má kodóny v správnom zmysle. Týmto spôsobom sa môže cielene potlačiť expresia určitých nežiaducich génov v *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus*.

Okrem toho vzniká v súčasnosti možnosť okrem dobre definovaných kmeňov *B. thuringiensis* použiť na výrobu zlepšených insekticídnych prostriedkov aj *B. thuringiensis* po klonovaní a prípadne po expresii heterológnych a/alebo homológnych génov.

V špecifickom a výhodnom uskutočnení spôsobu podľa vynálezu je, okrem iného, po prvýkrát možné klonovať nové gény, najmä však nové gény pre protoxín priamo v prirodzenom produkčnom organizme, to znamená v bunkách *B. thuringiensis* alebo *B. cereus*.

V prípade potreby sa týmto spôsobom dajú vybudovať aj nové gény pre protoxín a génovú zbierku pre *B. thuringiensis*.

V prvom stupni tohto postupu sa známym spôsobom izoluje celková DNA kmeňa *B. thuringiensis*, ktorý produkuje protoxín a táto DNA sa rozloží na jednotlivé fragmenty. DNA *B. thuringiensis* sa dá fragmentovať buď mechanicky, výhodne však pôsobením vhodných reštrikčných enzýmov. Podľa voľby týchto enzýmov sa potom dá získať čiastočne alebo úplne rozštiepená vzorka DNA. Výhodné pri uskutočňovaní spôsobu podľa vynálezu je predovšetkým použitie restrikčných enzýmov, ktoré štiepia v niekoľkých miestach a/alebo vedú iba k čiastočnému rozštiepeniu DNA *B. thuringiensis*, ide napríklad o reštrikčný enzým SauIIIA, no bez toho, aby bol spôsob podľa vynálezu obmedzený na použitie tohto enzýmu. Je samozrejmé, že pri uskutočňovaní spôsobu podľa vynálezu sa môžu použiť aj iné vhodné reštrikčné enzýmy.

Restrikčné fragmenty, získané uvedeným spôsobom sa potom môžu rozdeliť známym spôsobom podľa ich veľkosti. Na toto delenie sa spravidla použije odstreďovanie, napríklad s použitím gradientu sacharózy alebo elektroforézy, napríklad na agarózovom géli, alebo kombináciou týchto postupov.

Tie frakcie, ktoré obsahujú fragmenty správnej veľkosti, t. j. fragmenty, ktoré vzhľadom na svoju veľkosť môžu byť kódom pre protoxín, sa spoja a použijú na ďalšie stupne podľa vynálezu.

Potom sa takto izolované fragmenty bežným spôsobom uložia do vhodného vektora na klonovanie a potom sa včlenia transformáciou spôsobom podľa vynálezu priamo do *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus*, výhodne však do tých kmeňov *B. thuringiensis*, ktoré sú bez protoxínu.

Ako vektory sa môžu použiť tak gram-pozitívne plazmidy, napríklad pBC16, pUB110, pC194, ako aj už podrobne opísané bifunkčné vektory. Výhodný na použitie pri uskutočňovaní spôsobu podľa vynálezu je predovšetkým bifunkčný vektor pXI200, ktorý bude ďalej podrobnejšie opísaný v príklade 9.1. Vhodné vektory obsahujú výhodne také reťazce DNA, ktoré umožňujú jednoduchú identifikovateľnosť transformovaných klonov s obsahom týchto vektorov v skupine netransformovaných klonov. Výhodné sú najmä tie reťazce DNA, ktoré sú kódom pre špecifický označovací prostriedok, ktorý pri expresii vedie k vzniku vlastností, umožňujúcich jednoduchú selekciu, ako je napríklad odolnosť proti antibiotikám. Môže ísť napríklad o odolnosť proti ampicilínu, chloramfenikolu, erytromycínu, tetracyklínu, hygromycínu, G418 alebo kanamycínu.

Výhodné sú predovšetkým také označovacie gény, ktoré sú kódom pre enzým s chromogénnym substrátom, napríklad X-gal (5-bróm-4-chlór-3-indolyl-ß-D-galaktozid). Transformované kolónie sa potom môžu ľahko odlíšiť na základe špecifickej farebnej reakcie.

Po otvorení pórov pôsobením elektrického prúdu sa bunky *B. thuringiensis* alebo *B. cereus* prenesú na selektívne sporulačné živné prostredie a v ňom sa inkubujú až do dosiahnutia úplnej sporulácie pri teplote 10 až 40 °C, výhodne pri teplote 20 až 35 °C a najmä pri teplote 29 až 31 °C. Sporulačné živné prostredie obsahuje ako látku, ktorá umožňuje selekciu, výhodne niektoré z uvedených antibiotík, v závislosti od použitého vektora, a okrem toho spevňujúce prostriedky, napríklad agar, agarózu, želatínu a podobne.

V priebehu sporulácie dochádza k autolýze sporulujúcich buniek, čo je veľmi výhodné pre následnú selekciu, pretože nie je potrebné umelo rozrušiť bunky. V prípade klonov, ktoré obsahujú požadovaný gén pre protoxín, k expresii ktorého dochádza pri riadení prírodného promótora, ležia kryštalické bielkoviny voľne v prostredí. Tieto kryštalické bielkoviny uložené voľne v živnom prostredí, sa potom môžu fixovať pomocou membránových filtrov alebo iným vhodným spôsobom. Vhodnými membránovými filtrami sú napríklad membrány z nylonu alebo nitrocelulózy, membrány tohto typu sú bežne dostupné.

Takto fixované kryštalické bielkoviny sa môžu v priebehu selekcie ľahko identifikovať.

Pri uskutočňovaní spôsobu podľa vynálezu sa výhodne môže uskutočniť imunologická selekcia s použitím protilátok, ktoré sú špecifické pre protoxín. Tieto postupy sú známe a boli opísané napríklad v publikácii Young R. A. a ďalší, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1194 - 1198, 1983. Pri uskutočňovaní spôsobu podľa vynálezu je výhodné najmä použitie monoklonálnych protilátok, ktoré sú schopné špecificky rozoznať určitú časť bielkovinovej molekuly. Tieto protilátky sa môžu použiť jednotlivo alebo vo forme zmesí. Okrem toho je samozrejme možné použiť na imunologickú selekciu aj polyklonálne antiséra. Rovnako dobre sa dajú použiť aj zmesi monoklonálnych a polyklonálnych protilátok.

Spôsob výroby monoklonálnych protilátok proti protoxínu *B. thuringiensis* je známy a bol opísaný podrobnejšie napríklad v publikáciách Huber-Lukač M., Zur Interaktion des delta-Endotoxins von Bacillus thuringiensis mit mono-

klonalen Antikörpen und Lipiden, Dissertation č. 7547, ETH Zürich, 1984 a Huber-Lukač M. a ďalší, Infect. Immunol. 54, 228 - 232, 1986. Tieto postupy sa dajú použiť aj pri uskutočňovaní spôsobu podľa vynálezu.

Tento imunologický postup, založený na protilátkach, takisto tvorí súčasť spôsobu podľa vynálezu.

Okrem toho patrí do rámca vynálezu samozrejme aj každý ďalší spôsob selekcie, zameraný na dôkaz nových reťazcov v *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus*.

Bunky *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus*, ktoré sa transformovali pomocou uvedeného postupu, ako aj toxíny, produkované týmito transformovanými bunkami, sú zvlášť vhodné na boj proti hmyzu, najmä však na boj proti hmyzu radu *Lepidoptera*, *Diptera* a *Coleoptera*.

Vynález sa týka aj spôsobu ničenia hmyzu tak, že sa hmyz alebo priestor, v ktorom sa hmyz vyskytuje, uvedie do styku s

a) bunkami *B. thuringiensis* alebo *B. cereus*, alebo so zmesou týchto buniek, transformovaných molekulou DNA s obsahom štruktúrneho génu, ktorý je kódom pre polypeptid typu δ-endotoxínu, prirodzene sa vyskytujúccho v *B. thuringiensis*, alebo tiež pre polypeptid, ktorý je s ním v podstate homológny, alebo s

b) bezbunkovými prostriedkami s obsahom kryštálov, tvorených protoxínom, ktorý je produkovaný transformovanými bunkami *Bacillus*.

Vynález sa takisto týka insekticídnych prostriedkov, ktoré okrem bežne používaných nosičov, pomocných látok alebo zmesí týchto materiálov obsahujú

a) bunky *B. thuringiensis* alebo B. cereus alebo zmes týchto buniek, transformovaných pomocou rekombinantnej molekuly DNA s obsahom štruktúrneho génu, ktorý je kódom pre polypeptid typu δ-endotoxínu, prirodzene sa vyskytujúceho v *B. thuringiensis*, alebo tiež pre polypeptid, ktorý je s ním v podstate homológny, alebo

b) bezbunkové prostriedky s obsahom kryštálov, tvorených protoxínom, ktorý je produkovaný transformovanými bunkami *Bacillus*.

Na použitie ako insekticídy sa používajú transformované mikroorganizmy, ktoré obsahujú rekombinantný gén pre toxín *B. thuringiensis*, výhodne transformované živé alebo usmrtené bunky *B. thuringiensis* alebo *B. cereus*, ako aj toxické bielkoviny, produkované týmito transformovanými bunkami v zmenenej forme alebo výhodne v zmesi s bežne používanými pomocnými látkami na toto použitie. Výsledné prostriedky môžu mať akúkoľvek bežne používanú formu, môže ísť napríklad o koncentrované suspenzie, rozotierateľné pasty, roztoky na priame použitie alebo koncentrované roztoky, namáčané prášky, rozpustné prášky, poprašky, granuláty alebo aj kapsuly, napríklad použitím polymérnych látok.

Uvedené prostriedky sa dajú tiež nanášať bežnými spôsobmi, ako sú rozprašovanie, postrek, poprašovanie, nalievanie alebo náter podľa účelu použitia a podľa povahy použitého prostriedku.

Je samozrejmé, že použiť sa môžu aj insekticídne zmesi, ktoré pozostávajú z transformovaných živých alebo mŕtvych buniek *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus* a tiež z bezbunkových kryštálov, ktoré obsahujú protoxín, ktorý je produkovaný uvedenými transformovanými bunkami *Bacillus*.

Tieto prostriedky, to znamená transformované živé alebo usmrtené bunky *Bacillus* alebo zmesi týchto buniek s toxínmi, produkovanými týmito transformovanými bunkami, a prípadne aj pevné alebo kvapalné pomocné prostriedky, sa môžu získať známym spôsobom napríklad dôkladným premiešaním transformovaných buniek a/alebo toxických bielkovín s pevnými nosičmi a prípadne so zlúčeninami, ktoré ovplyvňujú povrchové napätie (namáčadlá).

Z pevných nosičov sa napríklad na poprašky alebo dispergované prášky používajú spravidla hlinky, ako sú kalcit, mastenec, kaolín, montmorilonit alebo atapulgit. Na zlepšenie fyzikálnych vlastností sa môže použiť napríklad vysoko dispergovaná kyselina kremičitá alebo vysoko dispergované polymérne materiály. Ako nosič sa na granuláty môžu použiť pórovité materiály, ako je pemza, tehlová drvina, sépionit alebo bentonit, ale aj materiály, ktoré nenasávajú vodu, napríklad kalcit alebo piesok. Okrem toho sa dá použiť celý rad vopred granulovaných materiálov anorganickej alebo organickej povahy, najmä dolomit alebo aj rastlinné zvyšky, usušené a spracované na častice s požadovaným rozmerom.

Z namáčadiel prichádzajú do úvahy neiónové, katiónové a/alebo aniónové namáčadlá s dobrými dispergačnými a zosieťujúcimi vlastnosťami. Môžu sa samozrejme použiť aj zmesi namáčadiel.

Vhodné aniónové namáčadlá sú napríklad vo vode rozpustné syntetické povrchovo aktívne zlúčeniny alebo aj vo vode rozpustné mydlá.

Z mydiel sa môžu použiť amónne soli s obsahom alkalických kovov alebo kovov alkalických zemín alebo amóniové soli nesubstituovaných alebo substituovaných vyšších alifatických kyselín s 10 až 22 atómami uhlíka, napríklad sodná alebo draselná soľ kyseliny olejovej alebo steárovej, alebo zmes alifatických kyselín, napríklad kokosového oleja alebo hydrogenovaného loja. Ďalej sa môžu použiť aj soli metylaurínu s alifatickými kyselinami, napríklad sodná soľ kyseliny *cis*-2-(metyl-9-oktadecenylamino)etánsulfónovej, obsah týchto látok vo výslednom prostriedku je približne 3 %.

Často sa však používajú aj takzvané syntetické namáčadlá, predovšetkým sulfonáty alebo sulfáty alifatických kyselín, sulfonovaných derivátov benzimidazolov, alkylarylsulfonátov alebo alifatických alkoholov, napríklad 2,4,7,9-tetrametyl-5-decin-4,7-diolu, obsah týchto látok je zvyčajne približne 2 %.

Sulfonáty alebo sulfáty alifatických kyselín sa spravidla používajú vo forme solí s alkalickými kovmi alebo kovmi alkalických zemín alebo vo forme amónnych solí, prípadne substituovaných, alkylový zvyšok obsahuje 8 až 22 atómov uhlíka, pričom sa za alkylový zvyšok považuje aj alkylová časť acylového zvyšku, ide napríklad o sodnú alebo vápenatú soľ lignínsulfónovej, dodecylsíranu alebo zmesi alifatických kyselín a alifatických alkoholov vo forme sulfátov zvyčajne prírodného pôvodu. Do tejto skupiny patria aj soli esterov kyseliny sírovej a sulfónovej a adičnými produktmi alifatických alkoholov s etylénoxidom. Sulfónované deriváty benzimidazolu výhodne obsahujú dva zvyšky kyseliny sulfónovej a jeden zvyšok alifatickej kyseliny s 8 až 22 atómami uhlíka. Alkylarylsulfonáty sú napríklad sodné, vápenaté alebo trietanolamínové soli kyseliny dodecylbenzénsulfónovej, dibutylnaftalénsulfónovej, alebo tie isté soli kondenzačného produktu formaldehydu s kyselinou naftalénsulfónovou.

Ďalej prichádzajú do úvahy aj zodpovedajúce fosfáty, napríklad soli esterov kyseliny fosforečnej s adičným produktom etylénoxidov a p-nonylfenolu s celkovým počtom 4 až 14 atómov uhlíka.

Z neiónových namáčadiel prichádzajú do úvahy predovšetkým deriváty polyglykoléteru a alifatických alebo cykloalifatických alkoholov, nasýtených alebo nenasýtených alifatických kyselín a alkylfenolov a 3 až 30 glykoléterovými skupinami, 8 až 20 atómami uhlíka v alifatickom uh-

ľovodíkovom zvyšku a 6 až 18 atómami uhlíka v alkylovom zvyšku alkylfenolu.

Ďalšími vhodnými namáčadlami neiónovej povahy sú adičné produkty polyetylénoxidu a polypropylénglykolu s 20 až 250 etylénglykoléterovými skupinami, ďalej adičné produkty etyléndiaminopolypropylénglykolu a alkylpolypropylénglykolu s 1 až 10 atómami uhlíka v alkylovom reťazci. Tieto látky zvyčajne obsahujú na jednu propylénglykolovú jednotku jednu až päť etylénglykolových jednotiek.

Ako príklad neiónových namáčadiel sa môžu uviesť nonylfenolpolyetoxyetanoly, polyglykoléter ricínového oleja, adičné produkty polypropylénu a polyetylénoxidu, tributylfenoxypolyetoxyetanol, polyetylénglykol a oktylfenoxypolyetoxyetanol. Ďalej prichádzajú do úvahy aj estery alifatických kyselín s polyoxyetylsorbitánom, napríklad polyoxyetylénsorbiténtrioleát.

V prípade katiónových namáčadiel môže ísť predovšetkým o kvartérne amóniové soli, ktoré nesú ako substituenty na atóme dusíka aspoň jeden alkylový zvyšok s 8 až 22 atómami uhlíka a ako ďalšie substituenty nesubstituovaných alebo halogénovaných nižší alkyl, benzyl alebo nižší hydroxyalkyl. Soli sú zvyčajne halogenidy, metylsulfáty alebo etylsulfáty, ide napríklad ostearyltrimetylamóniumchlorid alebo obenzyldi(2-chlóretyl)-etylamóniumbromid.

Namáčadlá, ktoré sa môžu použiť na tieto účely, boli opísané napríklad v publikáciách McCutcheon's, 1986 International McCutcheon's Emulsifiers and Detergens, The Manufacturig Confections Publishing C., Glen Rock, NI, USA a Helmut Stache "Tensid-Taschenbuch" Carl Hanser-Verlag, Mníchov/Viedeň 1981.

Agrochemické prostriedky obsahujú spravidla 0,1 až 99 %, výhodne 0,1 až 95 % transformovaných živých alebo mŕtvych buniek *Bacillus* alebo zmesi týchto buniek, alebo toxíny bielkovinovej povahy, produkované týmito transformovanými bunkami *Bacillus*, 99,9 až 1 %, výhodne 99,8 až 5 % pevnej alebo kvapalnej pomocnej látky a 0 až 25 %, výhodne 0,1 až 25 % namáčadla.

Obvykle sa dodávajú koncentrované prostriedky, no užívateľ používa na priame použitie zriedené prostriedky.

Uvedené prostriedky môžu obsahovať ešte ďalšie prísady, napríklad stabilizátory, protipenivé látky, regulátory viskozity, spojivá, látky, ktoré uľahčujú prilipnutie, a tiež hnojivá alebo ďalšie účinné látky na dosiahnutie zvláštnych účinkov.

Transformované živé alebo mŕtve bunky *Bacillus* alebo zmesi týchto buniek, obsahujúce gény, ktoré sú kódom pre rekombinantné toxíny *B. thuringiensis*, ako aj vlastné bielkovinové toxíny, ktoré sú produkované uvedenými transformovanými bunkami *Bacillus*, sa veľmi dobre hodia na ničenie škodlivého hmyzu. Výhodne ide o rastlinných škodcov z radu *Lepidoptera*, predovšetkým z čeľadí *Pieris*, *Heliothis*, *Spodoptera* a *Plutella*, napríklad *Pieris brassicae*, *Heliothis virescens*, *Heliothis zea*, *Spodoptera littoralis* a *Plutella xylostella*.

Ďalší škodlivý hmyz, ktorý je možné ničiť uvedenými prostriedkami, je napríklad hmyz radu *Coleoptera*, z čeľadí *Chrysomelidae*, napríklad *Diabrotica undecimpunctata*, *D. longicornis*, *D. virgitera*, *D. undecimpunctata howardi*, *Agelastica alni*, *Leptinotarsa decemlineata*, a tiež hmyz radu *Diptera*, napríklad *Anopheles sergentii*, *Uranatenia unguiculata*, *Culex univitanus*, *Aedes aegypti*, *Culex pipiens* a podobne.

Množstvo, v ktorom sú bunky *Bacillus* prípadne toxín, produkovaný týmito bunkami, použité, závisí od podmienok, napríklad od počasia, typu pôdy, štádií rastu rastlín a od času aplikácie.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Vynález bude ďalej podrobnejšie opísaný v súvislosti s priloženými výkresmi.

Na obrázku 1 je znázornená transformácia kmeňa *E. coli* HB 101 použitím plazmidu pBR322 (o) a ^{x}*B. thuringiensis* HD cryB s obsahom plazmidu pBC16 (o). (Δ znamená počet prežívajúcich buniek ^{x}HD1 cryB).

Na obrázku 2 je znázornený vplyv veku kultúry ^{x}*B. thuringiensis* HD1 cryB na frekvenciu uskutočňovanej transformácie.

Na obrázku 3 je znázornený vplyv pH v PBS-pufri na frekvenciu transformácie.

Na obrázku 4 je znázornený vplyv koncentrácie sacharózy v PBS-pufri na frekvenciu uskutočňovanej transformácie.

Na obrázku 5 je znázornená závislosť medzi počtom transformovaných buniek a množstvom DNA, ktoré sa použilo na transformáciu.

Na obrázku 6 je zjednodušene znázornená mapa miest pôsobenia restrikčných enzýmov v bifunkčnom vektore ^{x}pXI61. Vyšrafovaný úsek označuje reťazec z gram-pozitívneho plazmidu pBC16, zvyšok pochádza z gram-pozitívneho plazmidu pUC8.

Na obrázku 7 je zjednodušene znázornená mapa miest pôsobenia reštrikčných enzýmov v plazmide ^{x}pXI93. Vyšrafované úseky označujú štruktúrny gém pre protoxín (Pfeil, Kurhdl) a nekódové reťazce na 5'-zakončení a na 3'-zakončení. Zostávajúca nevyšrafovaná časť pochádza z vektora ^{x}pXI61.

Na obrázku 8 je znázornená elektroforéza extraktov sporulujúcich kultúr ^{x}*B. thuringiensis* HD1 cryB, *B. cereus* 569 K a ich derivátov na SDS polyakrylamidovom géli (s dodecylsíranom sodným). (1: ^{x}HD1 cryB (pXI93), 2: ^{x}HD1 cryB (pXI61), 3: ^{x}HD1 cryB, 4: HD1, LBG B-4449, 5: ^{x}*B. cereus* 569 K (pXI93), 6: 596 K.

a) sfarbené farbivom Coomasie, M: molekulová hmotnosť štandardu, MG: molekulová hmotnosť v jednotkách, šípka: poloha protoxínu s molekulovou hmotnosťou 130 000 jednotiek.

b) Western blot použitím toho istého gélu a polyklonálnej protilátky proti kryštalickej bielkovine K-1 z *B. thuringiensis* HD1.

Znázornený je aj výskyt pozitívnych pásov použitím značenej protilátky proti kozím bielkovinám. Šípkou je znázornená poloha protoxínu s molekulovou hmotnosťou 130 000 jednotiek, ďalšie pásy znázorňujú produkty odbúravania protoxínov.

Na obrázku 9 je znázornená transformácia *B. subtilis* LBG B-4468 použitím DNA plazmidu pBC16 a pomocou elektrického otvárania pórov tak, ako je to optimálne pre *B. thuringiensis*. (o: počet transformantov/μg plazmidovej DNA, o znamená počet živých baktérií/ml).

Na obrázku 10 je znázornená nukleotidová sekvencia, ktorej úsek ohraničený nukleotidmi 156 až 3623 je kódom pre polypeptid vzorca II.

Poznámka:

^{x} V prioritnom doklade sa na označenie plazmidu použilo označenie pK, pri podávaní ďalších prihlášok do zahraničia sa už používalo označenie pXI.

Tiež označenie asporogénnych mutantov *B. thuringiensis* HD1 sa v príkladoch uskutočnenia zmenilo z pôvodného označenia cryß na cryB.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklady prostriedkov s obsahom materiálu z *B. thuringiensis*

V nasledujúcich príkladoch sa pod pojmom "bunky *Bacillus*" rozumejú také bunky *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus*, ktoré obsahujú rekombinantný gén *B. thuringiensis* podľa vynálezu. Uvedené údaje v percentách znamenajú vždy hmotnostné percentá.

F1. Granuláty

	a)	b)
Bunky *Bacillus* a/alebo nimi produkovaný bielkovinový toxín	5 %	10 %
kaolín	94 %	-
vysoko dispergovaná kyselina kremičitá	1 %	-
atapulgit	-	90 %

Bunky *Bacillus* a/alebo bielkovinový toxín, produkovaný týmito bunkami, sa najprv uvedie do suspenzie v metylénchloride, suspenzia sa potom postrekom nanesie na nosič, a potom sa rozpúšťadlo odparí vo vákuu.

F2. Poprašok

	a)	b)
Bunky *Bacillus* a/alebo nimi produkovaný bielkovinový toxín	2 %	5 %
vysoko dispergovaná kyselina kremičitá	1 %	5 %
mastenec	97 %	-
kaolín	-	90 %

Prostriedok, ktorý sa môže použiť ako poprašok, sa získa dôkladným premiešaním nosného materiálu s bunkami *Bacillus* a/alebo toxínom.

F3. Prášok, určený na postrek

	a)	b)	c)
bunky *Bacillus* a/alebo nimi produkovaný bielkovinový toxín	25 %	50 %	75 %
lignínsulfonát sodný	5 %	5 %	-
laurylsíran sodný	3 %	-	5 %
diizopropylnaftalénsulfonát sodný	-	6 %	10 %
oktylfenolpolyetylénglykoléter (7 - 8 mólov etylénoxidu)	-	2 %	-
vysoko dispergovaná kyselina kremičitá	5 %	10 %	10 %
kaolín	62 %	27 %	-

Bunky *Bacillus* a/alebo nimi produkovaný bielkovinový toxín sa opatrne a dôkladne premieša s ostatnými zložkami a získaná zmes sa potom zomelie vo vhodnom mlyne.

Týmto spôsobom sa získa prášok, ktorý je možné riediť vodou na suspenziu akejkoľvek požadovanej koncentrácie.

F4. Vylisovaný granulát

Bunky *Bacillus* a/alebo nimi produkovaný bielkovinový toxín	10 %
lignínsulfát sodný	2 %
karboxymetylcelulóza	1 %
kaolín	87 %

Bunky *Bacillus* a/alebo nimi produkovaný bielkovinový toxín sa premiešajú s pomocnými látkami, zmes sa dôkladne zomelie a potom sa navlhčí vodou. Získaná zmes sa potom lisuje a vzniknutý granulát sa vysuší v prúde vzduchu.

F5. Opuzdrené granuláty

Bunky *Bacillus* a/alebo nimi produkovaný bielkovinový toxín	3 %
polyetylénglykol	3 %
kaolín	94 %

Bunky *Bacillus* a/alebo nimi produkovaný bielkovinový toxín sa homogénne premiešajú v miešacom zariadení a zmes sa rovnomerne nanesie na kaolín, navlhčený polyetylénglykolom. Týmto spôsobom sa získa bezprašný granulát.

F6. Koncentrovaná suspenzia

Bunky *Bacillus* a/alebo nimi produkovaný bielkovinový toxín	40 %
etylénglykol	10 %
nonylfenolpolyetylénglykol (15 mólov etylénoxidu)	6 %
soľ kyseliny alkylbenzénsulfónovej s trietanolamínom[X]	3 %
karboxymetylcelulóza	1 %
silikónový olej vo forme 75 % emulzie	0,1 %
voda	39 %

[X] Alkyl je výhodne lineárny a obsahuje 10 až 14, najmä 12 až 14 atómov uhlíka, ide napríklad o soľ kyseliny n-dodecylbenzénsulfónovej s trietylamínom.

Bunky *Bacillus* a/alebo nimi produkovaný bielkovinový toxín sa dôkladne premiešajú s ostatnými prísadami. Týmto spôsobom sa získa koncentrovaná suspenzia, z ktorej sa zriedením vodou dá získať suspenzia akejkoľvek požadovanej koncentrácie.

Praktické uskutočnenie vynálezu bude objasnené nasledujúcimi príkladmi. Najprv budú uvedené všeobecné postupy, použité v časti s príkladmi.

Všeobecné postupy s využitím rekombinantnej DNA

Vzhľadom na to, že rad postupov, ktoré sa používajú pri uskutočňovaní spôsobu podľa vynálezu, je bežne známy, budú ďalej stručne vysvetlené všeobecne použiteľné postupy tak, aby nebolo nevyhnutné ich vždy znova vysvetľovať v konkrétnych príkladoch uskutočnenia. Ak nie je vyslovene uvedené inak, sú všetky tieto postupu uvedené v základnej publikácii Maniatis a ďalší, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, USA, 1982.

A. Štiepenie reštrikčnými endonukleázami

Zvyčajne je obsah DNA v reakčnej zmesi v roztoku pufra, ktorý je dodávaný z New England Biolabs, Beverly, MA, 50 až 500 µg/ml. Na každý mikrogram DNA sa pridá 2 až 5 jednotiek reštrikčnej endonukleázy a reakčná zmes sa inkubuje pri teplote odporúčanej výrobcom 1 až 3 hodiny. Reakcia sa zastaví tak, že sa zmes zahrieva 10 minút pri teplote 65 °C alebo sa extrahuje fenolom, a potom sa DNA vyzráža etanolom. Tento postup je opísaný na stranách 104 - 106 uvedenej Maniatisovej publikácie.

B. Spracovanie DNA polymerázou na dosiahnutie hladkých zakončení

50 až 500 µg/ml DNA vo forme fragmentov sa pridá do pufra (New England Biolabs). Tento pufer obsahuje všetky štyri deoxynukleotidtrifosfáty v koncentrácii 0,2 mM. Reakcia prebieha 30 minút pri teplote 15 °C a potom sa ukončí zohriatím na 65 °C na 10 minút. V prípade fragmentov, ktoré po rozštiepení reštrikčnou endonukleázou vzniknú v reakčnej zmesi a obsahujú 5'-zakončenie po štiepení napríklad enzýmami EcoRI a BamHI, to znamená kohézne zakončenie, sa použije napríklad Klenowov fragment DNA polymerázy alebo veľký fragment tohto enzýmu. V prípade fragmentov, ktoré sa získali enzýmami, pri použití ktorých sa získa 3'-kohézne zakončenie, ako je to v prípade enzýmov PstI a SacI, sa použije T4-DNA polymeráza. Použitie oboch týchto enzýmov je opísané na strane 113 až 121 uvedenej Maniatisovej publikácie.

C. Elektroforéza na agarózovom géli a čistenie fragmentov DNA z tohto gélu

Elektroforéza na agarózovom géli sa uskutočňuje v horizontálnom zariadení, ktoré je opísané na strane 150 až 163 uvedenej Maniatisovej publikácie. Použitý pufer zodpovedá tris-boritanovému pufru, ktorý je použitý v publikácii. Fragmenty DNA sa zafarbia etídiumbromidom v množstve 0,5 µg/ml, toto farbivo môže byť k dispozícii v géli alebo v pufri počas elektroforézy alebo sa môže pridať až po elektroforéze. DNA sa potom môže zviditeľniť použitím ultrafialového svetla s väčšou vlnovou dĺžkou. V prípade, že fragmenty nemajú byť oddelené od gélu, sa použije agaróza, ktorá tuhne pri nižšej teplote (Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri). Po elektroforéze sa môže požadovaný fragment vyrezať, uložiť do skúmavky z plastickej hmoty, zahriať na teplotu 65 °C počas 15 minút, a potom sa zmes trikrát extrahuje fenolom a dvakrát zráža etanolom. Tento postup je trochu zmenený v porovnaní s postupom, ktorý je uvedený na strane 170 uvedenej Maniatisovej publikácie.

Dá sa postupovať aj tak, že sa DNA izoluje z agarózoveho gélu pomocou "Geneclean Kits" (Bio 101 Inc., La Jolla, CA, US).

D. Odstránenie 5'-terminálnych fosfátov z fragmentov DNA

V priebehu klonovania plazmidu spracovanie vektora fosfatázou znižuje recirkularizáciu vektora tak, ako je uvedené na strane 13 uvedenej Maniatisovej publikácie. Po rozštiepení DNA príslušnou reštrikčnou endonukleázou sa pridá jedna jednotka alkalickej fosfatázy z teľacieho čreva (Boehringer-Mannheim, Mannheim). DNA sa jednu hodinu inkubuje pri 37 °C, potom sa dvakrát extrahuje fenolom a vyzráža etanolom.

E. Spojenie fragmentov DNA

V prípade, že majú byť spojené fragmenty s komplementárnym kohéznym zakončením, inkubuje sa približne 100 ng každého z týchto fragmentov z reakčnej zmesi s objemom 20 až 40 µl s približne 0,2 jednotky T4 DNA-ligázy (New England Biolabs) v pufri odporúčanom výrobcom. Inkubácia trvá 1 až 20 hodín pri teplote 15 °C. V prípade, že majú byť spojené fragmenty s nekohéznym zakončením, inkubujú sa rovnakým spôsobom, ako bolo uvedené, v tomto prípade je však potrebné zvýšiť množstvo T4 DNA-ligázy v zmesi na 2 až 4 jednotky.

F. Transformácia DNA v *E. coli*

Na väčšinu pokusov sa použil kmeň *E. coli* HB101. DNA sa do buniek *E. coli* včlenila s použitím postupu, v ktorom sa ako pomocná látka používa chlorid vápenatý a ktorý je opísaný na strane 250 až 251 uvedenej Maniatisovej publikácie.

G. Selekcia *E. coli* na prítomnosť plazmidov

Po uskutočnení transformácie sa získané kolónie *E. coli* pozorujú kvôli prítomnosti požadovaných plazmidov získaných rýchlou izoláciou plazmidov. Dva použiteľné postupy sú uvedené na strane 366 až 369 uvedenej Maniatisovej publikácie.

H. Izolácia DNA plazmidu vo veľkom meradle

Postup na izoláciu plazmidu z *E. coli* vo veľkom meradle je uvedený na strane 88 až 94 uvedenej Maniatisovej publikácie.

Prostredia a roztoky pufrov

Prostredie LB

	g/l
Tryptón	10
extrakt z kvasníc	5
chlorid sodný	5

Prostredie č. 3 s obsahom antibiotík (Difco Laboratories)

	g/l
extrakt z hovädzieho mäsa	1,5
extrakt z kvasníc	1,5
peptón	5
glukóza	1
chlorid sodný	3,5
hydrogénfosforečnan draselný	3,68
dihydrogénfosforečnan draselný	1,32

Prostredie SCGY

	g/l
aminokyseliny kazeínu	1
extrakt z kvasníc	0,1
glukóza	5
hydrogénfosforečnan draselný	14
dihydrogénfosforečnan draselný	6
citrónan sodný	1
síran amónny	2
síran horečnatý . 7 H_2O	0,2

Prostredie GYS
(Youston A. A. a Rogoff M. H.
J. Bacteriol. 100, 1229 - 1236, 1969)

	g/l
glukóza	1
extrakt z kvasníc	2
síran amónny	2
hydrogénfosforečnan draselný	0,5
síran horečnatý . 7 H_2O	0,2
chlorid vápenatý . 2 H_2O	0,08
síran mangánatý . H_2O	0,05

Pred sterilizáciou v autokláve sa pH tohto prostredia upraví na 7,3.

PBS-pufer

	mM
sacharóza	400
chlorid horečnatý	1
fosfátový pufer s pH 6,0	7

TBST-pufer

	mM
Tween 20[x]	0,05g/100ml
Tris/HCl[x] (pH 8,0)	10
NaCl (v bidestilovanej vode)	150

[x]Tween 20 polyetoxysorbitanlaurát
[x]Tris/HCl α,α,α-tris(hydroxymetyl)metylamino-hydrochlorid

Vnútorné označenie pK, tak ako je uvedené pri plazmidoch v prioritnom doklade, bolo v prihláške nahradené oficiálne uznávaným označením pXI.

Takisto označenie pre mutanty asporogénneho *B. thuringiensis* HD1 sa zmenilo z cryß podľa prioritného dokladu na bežné cryB.

Príklad 1

Transformácia *B. thuringiensis* pomocou otvárania pórov pôsobením elektrického prúdu

Príklad 1.1

10 ml prostredia LB s obsahom 10 g/l Tryptónu, 5 g/l extraktu z kvasníc a 5 g/l chloridu sodného sa naočkuje spórami *B. thuringiensis var. kurstaki* HD1cryB, ide o variant bez plazmidu, ktorý bol opísaný v publikácii Stahly D. P. a ďalší, Biochem. Biophys. Res. Comm. 84, 591 - 588, 1978.

Zmes sa potom inkubuje cez noc pri teplote 27 °C v trepacom zariadení pri 50 výkyvoch za minútu. Potom sa kultúra *B. thuringiensis* zriedi na 100 až 400 ml prostredia LB a ďalej sa pestuje pri teplote 30 °C na trepacom zariadení pri 250 výkyvoch za minútu až do dosiahnutie optickej hustoty OD_{550} 0,2.

Potom sa bunky oddelia odstredením a uvedú sa do suspenzie v 1/40 objemu chladeného pufra PBS a obsahom 400 mM sacharózy, 1 mM chloridu horečnatého a 7 mM fosfátového pufra s pH 6,0. Odstredenie a uvedenie buniek *B. thuringiensis* do suspenzie v pufri PBS sa ešte raz opakuje.

Takto spracované bunky je potom možné priamo podrobiť otvoreniu pórov pôsobením elektrického prúdu alebo sa po pridaní glycerolu v množstve 20 g/100 ml môžu skladovať pri teplote v rozmedzí -20 až -70 °C do ďalšieho použitia.

Potom sa prenesie 800 µl schladených buniek do vopred vychladenej kyvety, a potom sa pridá 0,2 µg DNA plazmidu pBC16, opísanej v publikácii Bernhard K. a ďalší, J. Bacteriol. 133, 897 - 903, 1978, obsah DNA vo vzorke je teda 20 µg/ml, výsledná zmes sa inkubuje ešte 10 minút pri teplote 4 °C.

Použitím hlboko zmrazeného bunkového materiálu sa bunky nechajú najprv rozmraziť na ľade alebo pri teplote miestnosti. Ďalšie spracovanie prebieha tak, ako s použitím čerstvého bunkového materiálu.

Kyveta sa potom uloží do zariadenia na otváranie pórov pôsobením elektrického prúdu a suspenziou sa nechá vybiť kondenzátor s napätím 0,1 až 2,5 kV.

Použitý kondenzátor mal kapacitu 25 µF, vzdialenosť medzi kyvetami a elektródou bola 0,4 cm, elektrické pole malo vysoké východiskové hodnoty 0,25 až 6,25 kV/cm. Čas poklesu exponenciálnej krivky bol v rozmedzí 10 až 12 ms.

Na uvedené pokusy s otváraním pórov pôsobením elektrického prúdu sa môže použiť napríklad zariadenie "Gene Pulser Apparatus", 165 - 2075 (Bio Rad, 1414 Harbour Way South, Richmond, CA, 94804, USA).

Je samozrejmé, že pri uskutočňovaní spôsobu podľa vynálezu sa môže použiť aj akékoľvek iné vhodné zariadenie.

Po ďalšej 10-minútovej inkubácii pri teplote 4 °C sa suspenzia buniek zriedi pridaním 1,2 ml prostredia LB a potom sa inkubuje 2 hodiny pri teplote 30 °C na trepačke pri 250 výkyvoch za minútu.

Nakoniec sa na platne nanesú vhodné zriedenia, použije sa agar LB, to znamená prostredie LB, spevnené pridaním 15 g/l agaru. Toto prostredie obsahuje ako prísadu na selekciu novozískaného plazmidu aj príslušné antibiotikum. V prípade plazmidu pBC16 ide o tetracyklín, ktorý sa do živného prostredia zvyčaje pridáva v koncentrácii 20 mg/l.

Na obrázku 1 je uvedená závislosť východiskového napätia pri danej vzdialenosti dosiek kondenzátora a dosiahnutej frekvencie transformácie pre plazmid pBC16 a kmeň *B. thuringiensis* HD1cryB.

Expresia zabudovanej DNA sa môže dokázať podľa získanej odolnosti proti tetracyklínu. Už dve hodiny po transformácii *B. thuringiensis* včlenením plazmidu pBC16 možno pozorovať úplnú fenotypickú expresiu novozavedenej odolnosti proti tetracyklínu, ako je zrejmé z tabuľky 2.

Príklad 1.2

Transformácia buniek *B. thuringiensis* sa uskutočňuje rovnakým spôsobom ako v príklade 1.1 s tým rozdielom, že objem bunkovej suspenzie pri uskutočňovaní elektrického otvárania pórov je v tomto prípade 400 µl.

Týmto opatrením sa frekvencia transformácie môže zvýšiť desaťnásobne.

Príklad 2

Transformácia *B. thuringiensis* HD1cryB celým radom rôznych plazmidov

Väčšina pokusov sa uskutočňovala s plazmidom pBC16, čo je prirodzene sa vyskytujúci plazmid z *B. cereus*. Okrem toho sa s úspechom môžu v bunkách *B. thuringiensis* použiť aj ďalšie prirodzene sa vyskytujúce plazmidy, napríklad plazmid pUB110, uvedený v publikácii Polak J. a Novick R. P., Plazmid 7, 152 - 162, plazmid pC194, opísaný v publikácii Horinouchi S. a Weisblum B., J. Bacteriol. 150, 815 - 825, 1982, alebo plazmid pIM13, ktorý bol opísaný v publikácii Mahler J. a Halvorson H. O., J. Gen. Microbiol. 120, 259 - 263, 1980, ako je zhrnuté aj v tabuľke 3.

Aj varianty týchto plazmidov, ktoré sú vhodnejšie na prácu s rekombinantnou DNA ako s prírodnými izolátmi, sa môžu použiť spôsobom podľa vynálezu na transformáciu *B. thuringiensis*, kmeňa HD1cryB, ide napríklad o *B. subtilis* vektor na klonovanie pBD64, ktorý bol opísaný v publikácii Gryczan T. a ďalší, J. Bacteriol. 164, 246 - 253, 1980, a tiež plazmidy pBD347, pBD348 a pUB1664, ktoré sú uvedené v tabuľke 3. Tieto plazmidy sú bežne dostupné (Dr. W. Schurter, CIBA-GEIGY AG., Bazilej).

Výsledky transformácie, uvedené v tabuľke 3, jasne dokazujú, že nezávisle od použitej DNA plazmidu sa spôsobom podľa vynálezu môže dosiahnuť frekvencia transformácie, ktorá je s jedinou výnimkou vždy v oblasti 10^5 až 10^7.

Príklad 3

Konštrukcia bifunkčného vektora pre *B. thuringiensis*

Doteraz známe bifunkčné vektory pre *E. coli* a *B. subtilis*, napríklad pHV33, opísaný v publikácii Primrose S. B., Ehrlich S. D., Plasmid 6, 193 - 201, 1981, sa pre kmeň *B. thuringiensis* HD1cryB nehodí, ako je zrejmé z tabuľky 3.

Na konštrukciu účinného bifunkčného vektora sa veľký fragment po štiepení plazmidu pBC16 enzýmom EcoRI pôsobením T4 DNA-ligázy uloží na miesto štiepenia tým istým enzýmom v plazmide pUC8, ktorý bol opísaný v publikácii Vieira J. a Messing J., Gene 19, 259 - 268, 1982. Potom sa táto konštrukcia použije na transformáciu buniek *E. coli*. Správna konštrukcia, overená analýzou pomocou reštrikčných enzýmov, bola označená pXI 62.

Potom sa odstráni distálna viacväzbová oblasť v plazmide pUC8 v mieste pôsobenia enzýmu EcoRI. Čiastočným štiepením týmto enzýmom sa plazmid pXI 62 linearizuje. Kohézne zakončenie po štiepení uvedeným enzýmom sa vyplní Klenowovým fragmentom polymerázy a reťazce sa znova spoja pôsobením T4 DNA-ligázy. Po transformácii *E. coli* sa analýzou s použitím reštrikčných enzýmov oddelí správna konštrukcia a označí sa pXI 61. Na obrázku 6 je znázornená mapa pôsobenia reštrikčných enzýmov, ktoré sú schopné rozštiepiť uvedený plazmid iba v jednom mieste.

Táto konštrukcia sa podľa príkladu 1 môže priamo použiť na transformáciu *B. thuringiensis* HD1cryB.

Vzhľadom na existenciu silných reštrikčných bariér v kmeňoch *B. thuringiensis* je účinnosť transformácie v tomto prípade s použitím pXI61 z *E. coli* nižšia ako s použitím plazmidovej DNA, pochádzajúcej z kmeňa *B. thuringiensis* HD1cryB, ako je zrejmé z tabuľky 3. Napriek tomu sa plazmid pXI61 môže považovať za veľmi vhodný na pokusy s klonovaním v *B. thuringiensis*.

Príklad 4

Uloženie génu pre kuhrdl δ-endotoxín do kmeňov *B. thuringiensis* a *B. cereus*.

Reťazec DNA, ktorý sa pri uskutočňovaní spôsobu podľa vynálezu použil na včlenenie a expresiu v *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus* a ktorý je kódom pre bielkovinový kuhrdl δ-endotoxín, pochádzajúci z plazmidu pK36, ktorý bol 4. marca 1986 uložený do medzinárodnej zbierky kultúr "Deutschen Sammlung von Mikroorganismen", SRN, podľa budapeštianskej zmluvy o medzinárodnom uznávaní uložených mikroorganizmov na účely patentovania pod číslom v zbierke DSM 3668.

Podrobný opis spôsobu na identifikáciu a izoláciu génov pre δ-endotoxín a tiež konštrukcia plazmidu pK36 sú známe a boli podrobnejšie opísané v európskom patentovom spise č. 238 441.

DNA plazmidu pK36 sa úplne rozštiepi použitím enzýmu PstI a BamHI a fragment s veľkosťou 4,3 kb, ktorý obsahuje gén pre uvedený δ-endotoxín, so vzorcom I sa izoluje na agarózovom géli. Tento fragment sa potom uloží do plazmidu pXI61, ktorý sa najprv rozštiepi tými istými endonukleázami a potom sa spracováva pôsobením alkalickej fosfatázy z teľacieho žalúdka. Po transformácii *E. coli* HB 101 sa po overení analýzou pomocou reštrikčných enzýmov izoluje správna konštrukcia, ktorá bola označená pXI93. Na obrázku 7 je znázornená mapa pôsobenia reštrikčných enzýmov v tomto plazmide.

Plazmid pXI93 sa dá včleniť do kmeňa *B. thuringiensis* HD1cryB dvoma rôznymi spôsobmi.

a) Bunky *B. thuringiensis* sa môžu priamo transformovať izolovaným plazmidom pXI93 z *E. coli* spôsobom, ktorý bol opísaný v príklade 1.

b) Plazmid pXI93 sa najprv podrobí transformácii v bunkách *B. subtilis* spôsobom podľa Changa a Cohena, Molec. Gen. Genet. 168, 111 - 115, 1979. Z transformantov sa izolujú tie, ktoré obsahujú úplnú a neporušenú DNA plazmidu pXI93 a použijú sa podľa príkladu 1 na transformáciu *B. thuringiensis* HD1cryB.

S použitím oboch uvedených postupov sa získajú transformanty, ktoré obsahujú neporušený plazmid pXI93, ako je možné dokázať analýzou pôsobením reštrikčných enzýmov.

Príklad 5

Dôkaz expresie génu pre δ-endotoxín v *B. thuringiensis*

Sporulujúce kultúry *B. thuringiensis* HD1cryB (pXI61) a HD1cryB (pXI93) sa porovnávali v mikroskope vo fázovom kontraste pri 400-násobnom zväčšení. Len pri kmeni s obsahom plazmidu pXI93 bolo možné dokázať typické bipyramidálne bielkovinové kryštály. Extrakty z týchto kultúr sa delili elektroforeticky na SDS-polyakrylamidovom géli. Iba v prípade kmeňa s obsahom plazmidu pXI93 sa v dala v géli dokázať bielkovina s molekulárnou hmotnosťou 130 000, ktorá zodpovedá uvedenému δ-endotoxínu, ako je zrejmé z obrázku 8a.

Pri analýze metódou western blot, ktorá je znázornená na obrázku 8b, táto bielkovina s molekulovou hmotnosťou 130 000 a tiež niektoré produkty jej odbúravania špecificky reagujú s polyklonálnymi protilátkami, ktoré boli vopred pripravené proti kryštalickej bielkovine z *B. thuringiensis var. kurstaki* HD1 spôsobom podľa publikácie Huber-Lukač H., Dissertation, Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich, Švajčiarsko, č. 7050, 1982. Podrobný opis tohto postupu sa dá nájsť aj v európskom patentovovom spise č. 238 441. V plazmide pXI93 sa pred kódovou oblasťou pre toxín nachádza úsek so 156 pármi báz, ktorý obsahuje uvedený promótor, závislý od sporulácie, ako bolo opísané v publikácii Wong H. C. a ďalší, J. Biol. Chem. 258, 1960 - 1967, 1983. Tento reťazec je dostačujúci na vysokú expresiu génu pre δ-endotoxín v *B. thuringiensis* HD1cryB a *B. cereus* 569 K.

Príklad 6

Stanovenie toxicity rekombinantného kmeňa *B. thuringiensis* HD1cryB (pXI93)

Kmene *B. thuringiensis* HD1cryB a HD1cryB (pXI93) sa pestovali pri teplote 25 °C v sporulačnom živnom prostredí GYS. Po úplnej sporulácii, kontrolovanej v mikroskope vo fázovom kontraste, boli spóry a, ak boli prítomné, aj kryštály protoxínu, izolované odstredením a usušené rozprašovaním. Získaný prášok sa pridával v rôznej koncentrácii do krmiva lariev v štádiu L-1 *Heliothis virescens*. Úmrtnosť lariev sa stanovila po šiestich dňoch.

Ako sa dalo očakávať, kmeň HD1cryB, ktorý nemá gén pre protoxín, nie je toxický pre *Heliothis virescens*, no kmeň, ktorý obsahuje plazmid pXI93 spôsobuje uhynutie *H. virescens*, závislé od dávky, ako je zrejmé z tabuľky 4. Je teda zrejmé, že rekombinantné kmene, ktoré sa získali pomocou otvorenia pórov pôsobením elektrického prúdu, sa môžu použiť ako biologické insekticídne prostriedky.

Príklad 7

Otvorenie pórov v rôznych kmeňoch *B. thuringiensis* a v iných kmeňoch *Bacillus*.

Transformácia, ktorá sa použila pri *B. thuringiensis* HD1cryB, sa môže použiť aj pri celom rade iných kmeňov.

Všetky skúmané kmene *B. thuringiensis var. kurstaki* sa týmto spôsobom môžu transformovať jednoducho a s vysokou účinnosťou, ako je zrejmé z tabuľky 5.

Použitím laboratórneho kmeňa *B. cereus* sa takisto dá dosiahnuť veľmi účinná transformácia. To isté platí aj pre ďalšie testované variety *B. thuringiensis*, a to *var. israelensis* a *var. thuringiensis*. Na druhej strane je účinnosť transformácie v prípade *B. subtilis* použitím otvorenia pórov pôsobením elektrického prúdu je pomerne dosť nízka.

Pomocou metódy s polyetylénglykolom v protoplastoch *B. subtilis* sa však môže dosiahnuť účinnosť transformácie až 4 x 10^6/µg plazmidovej DNA.

Nízka účinnosť transformácie v *B. subtilis* použitím otvorenia pórov pôsobením elektrického prúdu nesúvisí s tým, že by sa použili nesprávne parametre, napríklad nevhodné napätie alebo príliš vysoké elektrické impulzy, ako je zrejmé z obrázku 9.

Príklad 8

Transformácia *B. thuringiensis* HD1cryB použitím génu pre ß-galaktozidázu.

8.1. Zabudovanie miesta pôsobenia reštrikčného enzýmu BamHI bezprostredne pred prvý kodón AUG génu pre protoxín *B. thuringiensis*

Skôr ako je možné spojiť gén pre ß-galaktozidázu z plazmidu piWiTh5 (Dr. M. Geiser, CIBA-GEIGY AG., Bazilej, Švajčiarsko) s promótorom génu pre kuhrdl δ-endotoxín z *B. thuringiensis*, je potrebné modifikovať reťazec DNA, ktorý sa nachádza v bezprostrednej blízkosti začiatočného kodónu AUG génu pre protoxín.

Táto modifikácia sa môže uskutočniť mutagenézou sprostredkovanou oligonukleotidom použitím fága M13mp8 s jednoduchým reťazcom, ktorý obsahuje fragment s veľkosťou 1,8 kB po štiepení pôsobením enzýmu HincII a HindIII génu pre δ-endotoxín, v ktorom sa nachádza aj 5'-oblasť génu pre toxín.

Najprv sa 3 µg plazmidu pK36 (príklad 4) rozštiepia pôsobením reštrikčných enzýmov HindIII a HincII. Výsledný fragment sa čistí elektroforézou na agarózovom géli a potom sa z gélu izoluje.

Súčasne sa rozštiepi 100ng DNA M13mp8 RF (Biolab, Tozer Road, Beverly MA, 01915, USA) pôsobením reštrikčných enzýmov SmaI a HindIII, po pôsobení fenolu sa potom materiál vyzráža pridaním etanolu. Takto spracovaná DNA fágu sa potom zmieša s 200 ng vopred izolovaného protoxínového fragmentu a spojí sa s týmto fragmentom pôsobením T4 DNA-ligázy.

Po transfekcii *E. coli* JM103 sa získa šesť bielych plakov, ktoré sa analyzujú pôsobením reštrikčných enzýmov.

Izolát, ktorý v správnom poradí obsahuje gén pre ß-galaktozidázu a promótor uvedeného génu pre δ-endotoxín z *B. thuringiensis*, sa označil M13mp8/Hinc-Hind.

Pomocou zariadenia na syntézu DNA (APPLIED BIOSYSTEM DNA SYNTHESIZER) sa syntetizuje oligonukleotid s nasledujúcim reťazcom

(5') GTTCGGATTGGGATCCATAAG (3')

Tento syntetický oligonukleotid je komplementárny s oblasťou M13mp8/Hinc-Hind od polohy 153 do polohy 173 génu pre δ-endotoxín so vzorcom I. Uvedený reťazec oligonukleotidu je však odlišný v polohách 162 a 163 od vzorca I, čím dochádza k tvorbe miesta pôsobenia reštrikčného enzýmu BamHI. Všeobecne je táto mutagenéza opísaná v publikácii Zoller J. M. a Smith N., Nucl. Acids. Res. 10, 6587, 1982. Približne 5 µg DNA fága M13mp8/Hinc-Hind sa zmieša s 0,3 µg fosforylovaných oligonukleotidov s celkovým objemom 40 µl. Výsledná zmes sa 15 minút zohrieva na teplotu 65 °C, potom sa schladí najprv na 50 °C a potom úplne na 4 °C. Potom sa pridá pufer, nukleotidtrifosfáty, ATP, T4 DNA-ligáza a veľký fragment DNA-polymerázy a zmes sa inkubuje cez noc pri teplote 15 °C podľa uvedenej publikácie Zollera a Smitha. Po elektroforéze na agarózovom géli sa cirkulárna DNA s dvojitým reťazcom čistí a zabuduje pomocou transfekcie do *E. coli* JM103. Môže sa použiť aj kmeň *E. coli* JM107.

Výsledný reťazec sa testuje na prítomnosť reťazca, ktorý je schopný hybridizácie s oligonukleotidom značeným ^{32}P. Izolované fágy sa potom analyzujú pôsobením reštrikčných endonukleáz.

Fág, ktorý obsahuje správnu konštrukciu a teda miesto pôsobenia enzýmu BamHI bezprostredne pred prvým kodónom AUG génu pre protoxín, sa označil M13mp8//Hinc-Hind/Bam.

8.2 Spojenie génu pre ß-galaktozidázu s promótorom pre δ-endotoxín

8.2.1

Promótor génu pre δ-endotoxín je uložený na fragmente M13mp8//Hinc-Hind/Bam po štiepení enzýmami EcoRI/BamHI, fragment obsahuje 162 párov báz. DNA fága RF sa rozštiepi reštrikčnými enzýmom BamHI. Zakončenie na reťazci v polohe 5' sa odstráni pôsobením nukleázy z fazule (Biolabs) podľa údajov výrobcu. Potom sa táto DNA rozštiepi enzýmom EcoRI a po elektroforéze na agarózovom géli sa z toho izoluje fragment s veľkosťou 162 párov báz.

Gén pre ß-galaktozidázu sa izoluje z plazmidu piWiTh5. DNA tohto plazmidu sa najprv rozštiepi v jedinom mieste pôsobením enzýmu HindIII. 3'-zakončenie sa vyplní Klenowovým fragmentom DNA polymerázy, ako je opísané na strane 113 až 114 uvedenej Maniatisovej publikácie, a modifikovaná DNA sa rozštiepi pôsobením reštrikčného enzýmu SalI. Fragment DNA, ktorý obsahuje gén pre ß-galaktozidázu sa izoluje pomocou elektroforézy na agarózovom géli.

Vektor pXI61, opísaný v príklade 3, sa rozštiepi pôsobením reštrikčných enzýmov EcoRI a SalI a obidva predtým izolované fragmenty sa zabudujú do vektora pXI61.

Po transformácii pórov kmeňov *E. coli* HB101 alebo JM107 uvedenou zmesou sa požadované bunkové klony stanovia analýzou pôsobením reštrikčných enzýmov a podrobia sa selekcii vzhľadom na svoju účinnosť typu ß-galaktozidázy použitím chromogénneho substrátu X-gal (5-bróm-4-chlór-3-indolyl-ß-D-galaktozid). Klon, obsahujúci správnu genetickú konštrukciu, sa označil pXI80.

8.2.2

Alternatívne sa môže postupovať aj tak, že sa fragment EcoRI/BamHI so 162 pármi báz s obsahom promótora pre δ-endotoxín izoluje tak, že sa rozštiepi M13mp8//Hinc-Hind/ Bam enzýmami EcoRI a BamHI, a potom sa jednotlivé fragmenty od seba delia elektroforézou na géli.

Gén pre ß-galaktozidázu sa v tomto prípade tiež izoluje z plazmidu piWiTh5, ako bolo opísané v príklade 8.1. DNA plazmidu sa rozštiepi pôsobením restrikčných enzýmov BamHI a BglII a veľký fragment sa po elektroforéze na agarózovom géli izoluje.

Vektor pHY300 PLK (PHY-001, Toyobo Co., Ltd., 2 - - 8 Dojima Hama 2-Chome, Kita-ku, Osaka, 530, Japonsko), ktorý je bežne dostupný, ako bolo uvedené v príklad 9.1, sa rozštiepi pôsobením reštrikčných enzýmov EcoRI a BglII. Obidva vopred izolované fragmenty sa potom uložia do vektora pHY300 PLK.

Výsledná zmes sa potom použije na transformáciu *E. coli* JM107 (Bethesda Research Laboratories (BRL), 411 N, Stonestreet Avenue, Rockville, MD 20850, USA). Klon, ktorý má účinnosť ß-galaktozidázy sa ďalej analyzoval štiepením pôsobením reštrikčných enzýmov. Klon, ktorý obsahoval správnu genetickú konštrukciu, sa označil pXI101.

8.3 Transformácia *B. subtilis* a *B. thuringiensis* pomocou plazmidov pXI80 a pXI101

DNA plazmidov pXI80 a pXI101 sa najprv použila na transformáciu v protoplastoch *B. subtilis* spôsobom podľa publikácie Chang S. a Cohen S. N., Molec. Gen. Genet. 168, 111 - 115, 1979.

Zvolí sa správny klon, ktorý sa izoluje štandardným postupom a potom sa použije na transformáciu buniek *B. thuringiensis* HD1 cryB pôsobením elektrického prúdu, ako bolo opísané v postupe otvárania pórov v príklade 1.

Transformované bunky *B. thuringiensis* sa nanesú na platne agaru GYS (sporulačné prostredie), ktoré ako prísadu obsahujú X-gal.

Správne transformované klony sa v priebehu sporulácie farbia na modro.

Na druhej strane zostáva kmeň *B. thuringiensis* HD1 cryB transformovaný vektorom pXI61 za týchto podmienok biely.

Pri analýze pomocou reštrikčných enzýmov sa môže dokázať, že v správne transformovaných klonoch buniek *B. thuringiensis* sa nachádza neporušený plazmid pXI80 alebo pXI101.

8.4 Gén pre ß-galaktozidázu pod riadením promótora, ktorý je závislý od sporulácie

Bunky *B. thuringiensis* HD1 cryB, ktoré obsahujú plazmid pXI101, sa pestujú na uvedenom prostredí GYS. V rôznych obdobiach v priebehu rastovej fázy (a to tak v priebehu vegetatívneho rastu, ako aj v priebehu sporulácie) sa uskutočňuje skúška na ß-galaktozidázu spôsobom podľa publikácie Miller J. H., "Experiments in Molecular Genetics", Cold Spring Harbor Laboratory, 1972, experimenty 48 a 49.

Jediný rozdiel oproti predchádzajúcemu stupňu spočíva v použití X-gal ako chromogénneho substrátu pri súčasnom meraní farebného produktu hydrolýzy, ktorý sa v bunkách tvorí približne po jednej hodine.

Bunky sa potom oddelia odstredením a meria sa optická hustota supernatantu pri vlnovej dĺžke 650nm (OD_{650}).

Ukázalo sa, že optická hustota sa zvyšuje v závislosti od sporulácie. Na druhej strane bunky netransformovaných kmeňov B. thuringiensis nie sú schopné hydrolyzovať chromogénny substrát X-gal.

Príklad 9

Vytvorenie génovej banky *B. thuringiensis*

9.1 Konštrukcia pXI200

Plazmid pXI200 je derivát plazmidu pXI300 PLK, ktorý je bežne dostupný (PHY-001, Toyobo Co., Ltd., 2 - 8 Dojima Hama 2-Chome, Kita-ku, Osaka, 530 Japonsko). Plazmid pHY300 PLK, konštrukcia ktorého bola opísaná v európskom patentovom spise č. 162 725, obsahuje tak gén na odolnosť proti ampicilínu (amp^R), ako aj gén na odolnosť proti tetracyklínu.

Plazmid pHY300 PLK sa úplne rozštiepi enzýmami BglI a PvuI. Výsledné reštrikčné fragmenty sa potom delia elektroforézou na agarózovom géli. Fragment s veľkosťou 4,4 kb sa z agarózového gélu izoluje, čistí a nakoniec znova viaže pôsobením T4 DNA-ligázy.

Výsledná zmes sa použije na transformáciu v *E. coli* HB101. Po inkubácii transformovaných buniek *E. coli* HB101 pri teplote 37 °C na selektívnom L-agare, ktorý obsahuje 20 µg/ml tetracyklínu, sa izolujú transformanty, odolné proti tetracyklínu (Tc^r). Z klonu citlivého na ampicilín v množstve 100 µg/ml (Ap^S) sa podarilo izolovať plazmid, ktorému chýbalo miesto pôsobenia enzýmu PstI v géne na odolnosť proti ampicilínu a súčasne tiež fragment s veľkosťou 0,3 kb. Tento plazmid sa označil pXI200.

9.2 Klonovanie protoxínového génu z *Bacillus thuringiensis var. kurstaki* HD1 v *B. thuringiensis* HD1 cryB.

50 µg celkovej DNA z *B. thuringiensis var. kurstaki* HD1 sa úplne rozštiepi inkubáciou s reštrikčnými enzýmami PstI a HpaI. Takto získané reštrikčné fragmenty sa prenesú do kontinuálneho sacharózového gradientu (5 až 23 g/100 ml) a podrobia sa odstredeniu a tým aj deleniu podľa svojej veľkosti, odoberú sa frakcie po 500 µl. Odstredenie sa uskutočňuje v rotore TST 41 (Kotron) pri maximálne 2,4 x 10^5 g celkom 16 hodín pri teplote 15 °C. Potom sa odoberajú diely po 50 µl na stanovenie veľkosti fragmentov na agarózovom géli, ktorý obsahuje 0,8 g/100 ml agarózy v Tris-acetátovom pufri alebo Tris--boritanovom pufri vždy s obsahom EDTA, ako bolo opísané v uvedenej Maniatisovej publikácii. Tie frakcie, ktoré obsahujú fragmenty s veľkosťou 3 až 6 kb, sa spoja a za súčasného zrážania etanolom sa koncentrujú na objem 10 µl.

5 µg bifunkčného vektora pXI200, ktorý bol opísaný v príklade 9.1, sa úplne rozštiepi pôsobením reštrikčných enzýmov PstI a SmaI. 5'-Fosfátové skupiny výsledných reštrikčných fragmentov sa potom odstránia pôsobením alkalickej fosfatázy z teľacieho čreva.

0,2 až 0,3 µg vopred izolovanej DNA z kmeňa HD1 sa potom zmieša s 0,5 µg DNA vektora pXI200 a potom sa inkubuje za súčasného pridania 0,1 jednotky T4 DNA-ligázy cez noc pri teplote 14 °C. Jedna takzvaná "biela jednotka" T4 DNA-ligázy zodpovedá enzymatickej účinnosti, ktorá je dostatočná na premenu 1 nM [^{32}P] z pyrofosfátu pri teplote 37 °C v priebehu 20 minút na materiál absorbovateľný Noritom. Výsledná zmes sa potom priamo použije na elektrické otvorenie pórov za súčasnej transformácie buniek *B. thuringiensis* HD1 cryB spôsobom, ktorý bol opísaný v príklade 1. Po transformácii buniek *B. thuringiensis* otvorením pórov pôsobením elektrického prúdu sa potom bunky prenesú na selektívny sporulačný agar, ktorý ako selekčný prostriedok obsahuje 20 µg/ml tetracyklínu, a potom sa materiál inkubuje pri teplote 30 °C až do úplnej sporulácie.

9.3 Výroba monoklonálnych protilátok proti protoxínovému typu bielkoviny z *B. thuringiensis*

Výroba monoklonálnych protilátok proti δ-endotoxínu z *B. thuringiensis var. kurstaki* HD1 sa uskutoční spôsobom podľa publikácie Huber-Lukač M., "Zur Interaktion des delta-Endotoxins von Bacillus thuringiensis mit monoklonalen Antikörpen und Lipiden", Dissertation č. 7547, ETH Zürich, 1984 a Huber-Lukač M. a ďalší, Infect. Immunol. 54, 228 - 232, 1986.

V prípade buniek hybridómu, ktoré sa použili na tvorbu protilátok, ide o produkty fúzie myelómových buniek Sp2/0-Ag, ktoré boli opísané v publikácii Shulman a ďalší, Nature 276, 269, 1978, a uložené v American Type Culture Collection, in Rockville, Maryland, USA, a slezinných lymfocytov myší BALB/c, ktoré sa vopred imunizovali δ-endo-toxínom z kmeňa *B. thuringiensis var. kurstaki* HD1.

Týmto spôsobom sa dajú získať monoklonálne protilátky, ktoré sú špecifické proti δ-endotoxínu *B. thuringiensis*. Výhodné sú predovšetkým také monoklonálne protilátky, ktoré sa špecificky viažu na epitop N-terminálnej polovice bielkovinového protoxínu (napríklad protilátka 54.1 z uvedenej publikácie Huber-Lukača a ďalších, 1986) alebo na epitop stálej časti bielkoviny, účinnej proti *Lepidoptera* v C-terminálnej polovici (napríklad protilátka 83.16 z tej istej publikácie).

Na imunologické pozorovanie, ktoré bude opísané v príklade 9.4, sa však môžu použiť aj iné monoklonálne alebo aj polyklonálne protilátky.

9.4 Imunologické skúšky

Na imunologické pozorovanie podľa tohto príkladu sa môžu použiť monoklonálne protilátky, ktoré sa získali podľa príkladu 9.3, alebo akékoľvek iné vhodné monoklonálne protilátky.

Najprv sa kryštalické bielkoviny, ktoré sa nachádzajú voľne v prostredí, viažu po sporulácii buniek *B. thuringiensis* na prenosovú membránu (napríklad Pall Biodyne Transfer-Membran alebo Pall Ultrafine Filtration Corporation, Glen Cove, N.Y.), táto membrána sa potom približne na 5 minút uloží na platňu. Filter sa potom 5 minút premýva pufrom TBST, ktorý obsahuje 0,05 g/10 ml Tween 20, 10 mM tris/HCl s pH 8,0 a 150 mM chloridu sodného v bidestilovanej vode, a potom sa inkubuje 15 až 30 minút na blokovanie nešpecifických väzieb v zmesi pufra TBST s prídavkom 1 g/100 ml odtučneného mlieka.

Takto pripravený filter sa potom inkubuje cez noc s protilátkami, špecifickými proti protoxínu (zmes protilátok 54.1 a 83.16 z uvedenej publikácie Huber-Lukača a ďalších, 1986). Nenaviazané protilátky sa odstránia trojnásobným premytím tohto filtra pufrom TBST, premytie trvá 5 až 10 minút. Na dôkaz protoxínu, viazaného na protilátku, sa filter inkubuje s ďalšou protilátkou. Touto sekundárnou protilátkou je napríklad protilátka proti myším bielkovinám, značená alkalickou fosfatázou, ide napríklad o konjugát kozích protilátok proti myšiemu IgG(H+L) s alkalickou fosfatázou (Bio-Rad, č. katalógu 170-6520). Po 30 minútach inkubácie sa nenaviazaná protilátka odstráni z filtra rovnako ako prvá protilátka trojnásobným premytím filtra vždy 5 až 10 minút pufrom TBST. Nakoniec sa inkubuje filter so zmesou substrátu, ktorý je zložený z NBT (tetrazóliumchlorid p-nitromodrej) a BCIP (soľ 5-bróm-4-chlór-3--indolylfosfát-p-toluidínu). Enzymatická reakcia sa uskutočňuje podľa odporúčania výrobcu (Bio-Rad, 1414 Karbour Way South, Richmond CA, 94804, USA).

Pozitívne, t. j. protoxín obsahujúce klony sa dajú veľmi jednoducho rozoznať vzhľadom na ich fialové sfarbenie. K tomuto sfarbeniu dochádza na základe enzymatickej reakcie alkalickej fosfatázy s uvedenou zmesou substrátu. Pri transformácii, uvedenej v príklade 9.2, vzniká 800 až 1000 transformantov. Z tohto množstva obsahujú dve kolónie jednoznačne pozitívny signál pri uvedenej enzymatickej reakcii.

Z pozitívnych klonov, v ktorých bolo možné na základe opísanej enzymatickej reakcie dokázať expresiu protoxínového génu, sa izolovala DNA plazmidu. Pomocou analýzy pôsobením reštrikčných enzýmov a porovnaním so známymi mapami miest pôsobenia týchto enzýmov sa dali klonované protoxínové gény ďalej charakterizovať a nakoniec identifikovať.

Obidva klony obsahovali rekombinantný plazmid s včleneným fragmentom s veľkosťou 43 kb. Nasledujúce štepenie pôsobením reštrikčných enzýmov HindIII, PvuII, EcoRI a XbaI dovoľujú identifikáciu génov porovnaním s mapami miest pôsobenia reštrikčných enzýmov v géne pre endotoxín *B. thuringiensis var. kurstaki* HD1. V obidvoch prípadoch ide o gén kuhrdl, ktorý je známy aj ako gén pre protoxín s veľkosťou 5,3 kb a ktorý bol opísaný v publikácii Geiser M. a ďalší, Gene 48, 109 - 118, 1986.

Tento gén, klonovaný priamo v *B. thuringiensis* a identifikovaný imunologickým spôsobom, hybridizuje s fragmentom BamHI/HindIII s veľkosťou 1847 párov báz z génu 5,3 kb plazmidu pK36 podľa uvedenej publikácie Geisera a ďalších, 1986. Pri uskutočňovaní SDS/PAGE majú obidva klony typické pásy, bežné pri protoxine s molekulovou hmotnosťou 130 000 jednotiek, tieto látky takisto reagujú špecificky s uvedenými monoklonálnymi protilátkami z príkladu 9.4 pri použití metódy western blot podľa publikácie Towbin H. a ďalší, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350 - 4354, 1979.

Tabuľka 1

Vplyv času inkubácie pri teplote 4 °C pred otvorením a po ňom pórov pôsobením elektrického prúdu v kmeni *B. thuringiensis* HD1 cryB použitím 0,2 µg pBC16

vzorka	1	2	3	4	5	6	7	8
predbežná inkubácia[x] (min.)	0	5	10	20	20	20	20	20
Následná inkubácia[xx] (min.)	20	20	20	20	0	5	10	20
Frekvencia transformácií (transformanty/mikrogram DNA plazmidu)	2,6 x10^6	2,1 x10^6	2,2 x10^6	2,3 x10^6	2,5 x10^6	1,9 x10^6	3,3 x10^6	1,7 x10^6

x inkubácia pri 4 °C medzi pridaním DNA a otvorením pórov

xx inkubácia pri 4 °C medzi otvorením pórov a počiatkom expresie

Tabuľka 2

Expresia odolnosti proti tetracyklínu plazmidu pBC16 po transformácii *B. thuringiensis* HD1 cryB. Tento kmeň bol transformovaný z DNA plazmidu pBC16 pri otvorení pórov spôsobom podľa vynálezu. Po rôznom čase inkubácie v prostredí LB pri teplote 30 °C sa transformované bunky podrobili selekcii na agare LB s obsahom 20 µg/ml tetracyklínu.

Čas expresie odolnosti proti tetracyklínu (hod.)	frekvencia transformácie, transformanty/ /μg DNA	počet živých buniek
0,5	0	4×10^8
1	$1,6 \times 10^6$	10^9
2	$8,8 \times 10^6$	$1,4 \times 10^9$
3	8×10^6	$1,6 \times 10^9$

Tabuľka 3

Transformácia *B. thuringiensis* HD1 cryB rôznymi plazmidmi

plazmid	pôvod	značenie odolnosti[1] gram-negatívne	gram-pozitívne	frekvencia transformácií[2]
		prírodne sa vyskytujúce plazmidy		
pBC16	*B. cereus*	-	Tc	$1,9 \times 10^6$
pUB110	*Staphylococcus aureus*	-	Km, Ble	$3,3 \times 10^{6x}$
pC194	*S. aureus*	-	Cm	6×10^{6x}
pIM13	*B. subtilis*	-	Km	$1,8 \times 10^5$
		modifikované plazmidy/vektory na klonovanie		
pBD64	pUB110 replikón	-	Km, Cm	5×10^6
pBD347	pIM13 replikón	-	Cm	$2,9 \times 10^5$
pBD348	pIM13 replikón	-	Em, Cm	$1,1 \times 10^5$
pUB1664	pUB110 replikón	-	Cm, Em	$3,5 \times 10^4$
		bifunkčné ("shuttle") vektory		
pHV33	pBR322/pC194	Amp, Tc	Cm	$< 50^x$
pK61	pUC8/pBC16	Amp	Tc	$2,8 \times 10^4$

1 Tc: tetracyklín, Km: kanamycín, Ble: Bleomycín, Cm: chloramfenikol, Em: erytromycín
2 DNA plazmidu je z *B. thuringiensis* HD1 cryB s výnimkou prípadov označených x, kde je z *B. subtilis* LBG4468

Tabuľka 4

Biologický test *B. thuringiensis* HD1 cryB a HD1 cryB (pXI 93) proti *Heliothis virescens*. Sporulované kultúry, t. j.spóry a prípadne kryštály protoxínu, sušené rozprašovaním, sa pridávali do potravy larvám L-1 *Heliothis virescens*.

kmeň	frekvencia transformácií[1]
B. thuringiensis var. *kurstaki*	
HD1 cryB	1
HD1 dipel	0,25
HD1-9	0,9
HD73	0,1
HD191	0,5
B. thuringiensis var. *thuringiensis*	
HD 2-D6-4	13,8
B. thuringiensis var. *israelensis*	
LBG B-4444	2,6
B. cereus	
569 K	7,5
B. subtilis	
LBG B-4468	0,0002

Tabuľka 5

Transformovateľnosť kmeňov *B. thuringiensis*, *B. cereus* a *B. subtilis*. Všetky kmene sa transformovali plazmidom pBC16 postupom s otvorením pórov pôsobením elektrického prúdu

kmeň	frekvencia transformácií[1]
B. thuringiensis var. *kurstaki*	
HD1 cryB	1
HD1 dipel	0,25
HD1-9	0,9
HD73	0,1
HD191	0,5
B. thuringiensis var. *thuringiensis*	
HD 2-D6-4	13,8
B. thuringiensis var. *israelensis*	
LBG B-4444	2,6
B. cereus	
569 K	7,5
B. subtilis	
LBG B-4468	0,0002

1 Relatívne hodnoty vztiahnuté na frekvenciu transformácie *var. kurstaki* HD1 cryB, ktorá sa rovná 1.

Uloženie mikroorganizmov

Z každého z uvedených mikroorganizmov, ktoré sa použili pri uskutočňovaní spôsobu podľa vynálezu, bola uložená kultúra do medzinárodne uznávanej zbierky kultúr Deutschen Sammlug von Mikroorganizmen, Braunschweig, SRN, podľa požiadaviek budapeštianskej zmluvy na ukladanie mikroorganizmov na patentové účely. Potvrdenie životnosti uložených vzoriek vydáva tá istá zbierka.

Označenie plazmidov pK v prioritnom doklade sa v prihláškach, ktoré boli prihlasované neskôr v zahraničí, zmenilo na uznávané označenie pXI.

Takisto aj označenie asporogénneho mutanta *B. thuringiensis* HD1, použité v príkladoch uskutočnenia, sa z pô-

vodného označenia cryß zmenilo na uznávané označenie cryB.

Uloženie mikroorganizmov

mikroorganizmus	uloženie	číslo	dátum vydania osvedčenia o životnosti
HB 101 (pK36) (*E. coli* HB101 transf. DNA plazmidu pK36)	4.3.1986	DSM 3667	7.3.1986
^{x}HD1 cryß (*B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1 cryß)	4.5.1988	DSM 4574	4.5.1988
^{x}HD1 cryß (^{x}pK 61) *B. thuringiensis* HD1 cryß transf. DNA ^{x}pK93	4.5.1988	DSM 4572	4.5.1988
^{x}HD1 cryß (^{x}pK 93) *B. thuringiensis* HD1 cryß transf. DNA ^{x}pK93	4.5.1988	DSM 4571	4.5.1988
569 K (*Bacillus cereus* 569 K)	4.5.1988	DSM 4575	4.5.1988
569 K (^{x}pK 93) (*B. cereus* 569 K, transf. DNA ^{x}pK93)	4.5.1988	DSM 4573	4.5.1988

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Spôsob priamej, cielenej a reprodukovateľnej genetickej manipulácie *Bacillus thuringiensis* a/alebo *Bacillus cereus* použitím technológie rekombinantnej DNA, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa izoluje vhodná DNA a pomocou jednoduchého transformačného postupu s vysokou účinnosťou sa transformuje do *Bacillus thuringiensis* a/alebo *Bacillus cereus*, pričom sa transformácia *Bacillus thuringiensis*, prípadne *Bacillus cereus*, uskutočňuje tak, že sa
a) pripraví bunková suspenzia s vhodnou hustotou buniek v živnom prostredí, vhodnom na pestovanie buniek *Bacillus thuringiensis*, prípadne *Bacillus cereus*, za dostatočného prevzdušňovania pre ich rast,
b) bunky sa oddelia z prostredia a znovu sa suspendujú v inokulačnom pufri, ktorý je vhodný na nasledujúce otvorenie pórov elektrickým prúdom
c) pridá sa vzorka DNA v koncentrácii, ktorá je vhodná na otvorenie pórov elektrickým prúdom, výhodne v koncentrácii v rozsahu od 1 µg do 20 µg,
d) zmes pripravená v stupňoch b) a c) sa prenesie do zariadenia na otvorenie pórov elektrickým prúdom,
e) zmesou sa nechá na krátky čas raz alebo viackrát vybiť kondenzátor, pričom sa krátkodobo vytvorí silné elektrické pole na čas, ktorý je dostačujúci na transformáciu buniek *Bacillus thuringiensis* a/alebo *Bacillus cereus* rekombinantnou DNA,
f) bunky sa po otvorení pórov elektrickým prúdom prípadne ďalej inkubujú,
g) takto spracované bunky sa nanesú na platne s vhodným selekčným prostredím a potom sa
h) transformované bunky oddelia.

2. Spôsob podľa nároku 1, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa na prípravu suspenzie buniek podľa nároku 1, odsek a) použijú spóry *Bacillus thuringiensis*.

3. Spôsob podľa nároku 1, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa na prípravu buniek podľa nároku 1, odsek a) použijú hlboko zmrazené bunky *Bacillus thuringiensis* a/alebo *Bacillus cereus*.

4. Spôsob podľa nároku 1, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa na kultiváciu buniek *Bacillus thuringiensis*, prípadne *Bacillus cereus*, použije
a) komplexné živné prostredie s obsahom ľahko využiteľného zdroja uhlíka a dusíka, tak ako sa zvyčajne používa na kultiváciu aeróbnych kmeňov *Bacillus*,
a1) prípadne sa k tomuto prostrediu uvedenému v odseku a) navyše pridajú vitamíny a nevyhnutné ióny kovov, alebo
b) plne syntetické alebo polosyntetické živné prostredie, ktoré obsahuje
b1) komplexný alebo definovaný zdroj uhlíka a dusíka, ktorý je možné ľahko využiť, alebo kombináciu oboch týchto zdrojov, ako aj
b2) nevyhnutné vitamíny a ióny kovov.

5. Spôsob podľa nároku 1, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa pripraví suspenzia buniek Bacillus s optickou hustotou v rozsahu od 0,1 do 1,0.

6. Spôsob podľa nároku 1, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa ako pufor na otvorenie pórov elektrickým prúdom použije osmoticky stabilizovaný fosfátový pufor.

7. Spôsob podľa nároku 6, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že fosfátový pufor obsahuje ako stabilizačný prostriedok cukry alebo cukorné alkoholy.

8. Spôsob podľa nároku 7, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa ako stabilizačný prostriedok použije sacharóza v koncentrácii 0,1 až 1,0 M.

9. Spôsob podľa nároku 6, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa použije fosfátový pufor s hodnotou pH 5,0 až 8,0.

10. Spôsob podľa nároku 1, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa bunky *Bacillus* inkubujú pred otvorením pórov počas neho a po ňom pôsobením elektrického prúdu pri teplote v rozsahu od 0 °C do 35 °C.

11. Spôsob podľa nároku 1, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa bunky *Bacillus* inkubujú pred otvorením pórov počas neho a po ňom pôsobením elektrického prúdu pri teplote v rozsahu od 2 °C do 15 °C.

12. Spôsob podľa nároku 1, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa bunky *Bacillus* inkubujú pred otvorením pórov počas neho a po ňom pôsobením elektrického prúdu pri teplote v rozsahu od 2 °C do 15 °C a ako vzorka DNA sa použije vektor DNA.

13. Spôsob podľa nároku 1, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa v priebehu otvorenia pórov pôsobením elektrického prúdu bakteriálne bunky vystavia v suspenzii buniek s obsahom DNA krátkodobému vybitiu kondenzátora, pričom krátkodobo vzniká veľmi silné elektrické pole, čím sa zvýši permeabilita buniek *Bacillus thuringiensis* prípadne *Bacillus cereus* do tej miery, že sa DNA prítomná v suspenzii začlení do buniek *Bacillus*.

14. Spôsob podľa nároku 13, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa pri otvorení pórov pôsobením elektrického prúdu vytvorí elektrické pole s intenzitou od 100V/cm do 10 000 V/cm.

15. Spôsob podľa nároku 13, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa pracuje s hodnotami intenzity elektrického poľa od 100 V/cm do 50 000 V/cm.

16. Spôsob podľa nároku 1, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že pokles exponenciály, ktorá vyjadruje priebeh impulzu, ktorým sú spracovávané bunky *Bacillus* v suspenzii, prebieha v rozsahu od 2 do 50 ms.

17. Spôsob podľa nároku 1, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa bunky po otvorení pórov pôsobením elektrického prúdu a po vhodnom čase nasledujúcej inkubácie nanesú na platne s obsahom pevného živného prostredia, kto-

ré obsahuje prísadu, vhodnú na umožnenie selekcie transformovaných buniek *Bacillus*.

18. Spôsob podľa nároku 17, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa ako prísada vhodná na umožnenie selekcie *Bacillus thuringiensis* prípadne *Bacillus cereus*, používa antibiotikum vybrané zo skupiny tvorenej tetracyklínom, kanamycínom, chloramfenikolom a erytromycínom.

19. Spôsob podľa nároku 17, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa ako prísada vhodná na umožnenie selekcie *Bacillus thuringiensis* prípadne *Bacillus cereus*, používa chromogénny substrát.

20. Spôsob podľa nároku 1, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že rekombinantná DNA, používaná na transformáciu *Bacillus thuringiensis*, prípadne *Bacillus cereus*, je homológneho alebo heterogénneho pôvodu, alebo ide o kombináciu homológnej a heterológnej DNA.

21. Spôsob podľa nároku 1, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že rekombinantná DNA, použitá na transformáciu, obsahuje jeden alebo niekoľko štruktúrnych génov ako aj riadiace sekvencie v oblasti 3' a 5', ktoré sú funkčné v *Bacillus thuringiensis* alebo v *Bacillus cereus*, alebo v oboch druhoch týchto mikroorganizmov, pričom riadiace sekvencie sú spojené operabilným spôsobom so štruktúrnym génom alebo so štruktúrnymi génmi a tak zaisťujú expresiu štruktúrneho génu alebo štruktúrnych génov v *Bacillus thuringiensis* alebo v *Bacillus cereus* alebo v oboch druhoch týchto mikroorganizmov.

22. Spôsob podľa nároku 21, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že signály pre expresiu sa prirodzene vyskytujú v *Bacillus thuringiensis* alebo v *Bacillus cereus*, alebo v oboch týchto mikroorganizmoch alebo ide o mutanty a varianty týchto prírodných signálov pre expresiu, ktoré sú s prírodnou sekvenciou v podstate homológne.

23. Spôsob podľa nároku 22, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že signály pre expresiu zahŕňajú promótor z *Bacillus thuringiensis*, závislý od sporulácie.

24. Spôsob podľa nároku 1, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že štruktúrny gén je kódom pre polypeptid δ-endotoxínu, ktorý sa prirodzene vyskytuje v *Bacillus thuringiensis* alebo pre polypeptid, ktorý je s ním v podstate homológny, čo znamená, že má prinajmenšom v podstate insekticídne vlastnosti kryštalického polypeptidu δ-endotoxínu z *Bacillus thuringiensis*.

25. Spôsob podľa nároku 24, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sekvencia DNA, ktorá je kódom pre δ-endotoxín, je homológna v podstate aspoň s časťou alebo s časťami prírodnej sekvencie, ktorá je kódom pre δ-endotoxín, ktorá alebo ktoré sú príčinou insekticídneho účinku.

26. Spôsob podľa nároku 25, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že polypeptid je v podstate homológny s polypeptidom δ-endotoxínu z vhodných podskupín *Bacillus thuringiensis*, zvolených zo súboru, ktorý je tvorený *B. kurstaki*, *B. berliner*, *B. alesti*, *B. sotto*, *B. tolworthi*, *B. dendrolimus*, *B. tenebrionis* a *B. israelensis*.

27. Spôsob podľa nároku 25, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sekvenciou DNA, ktorá je kódom pre δ--endotoxín, je fragment DNA z *Bacillus thuringiensis var. kurstaki* HDl, ktorý sa nachádza medzi nukleotidmi 156 a 3623 sekvencie zobrazenej na obrázku 10, alebo ľubovoľný kratší fragment DNA, ktorý je ešte kódom pre polypeptid s insekticídnymi vlastnosťami.

28. Spôsob podľa nároku 20, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že ako DNA sa používa DNA vektor.

29. Spôsob podľa nároku 28, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že ako DNA vektor sa používa DNA plazmidu.

30. Spôsob podľa nároku 28, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa používa DNA vektor, ktorý je odvodený od DNA fága.

31. Spôsob podľa nároku 20, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa ako rekombinantné DNA používajú bifunkčné vektory, ktoré sú okrem v *Bacillus thuringiensis* alebo v blízko príbuznom *Bacillus cereus*, alebo v oboch týchto mikroorganizmoch schopné replikácie v jednom alebo vo väčšom počte iných heterologických produkčných organizmov a ktoré sú identifikovateľné ako v homológnych, tak aj heterológnych produkčných systémoch.

32. Spôsob podľa nároku 31, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa ako heterológne produkčné organizmy používajú

a) prokaryotické organizmy, vybrané zo skupiny čeľadí *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Agrobacterium*, *Salmonella*, *Erwinia* atď. alebo

b) eukaryotických organizmov, vybraných zo skupiny pozostávajúcej z kvasiniek, živočíšnych a rastlinných buniek atď.

33. Spôsob podľa nároku 32, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa ako heterológny produkčný organizmus používa *E. coli*.

34. Spôsob podľa nároku 21, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa

a) izolujú štruktúrne gény,

b) izolované gény sa prípadne operabilne spoja so sekvenciami pre expresiu, ktoré sú funkčné v *Bacillus thuringiensis* prípadne v *Bacillus cereus*

c) genetické konštrukcie z odseku b) sa s použitím vhodných vektorov transformujú do buniek *Bacillus thuringiensis* prípadne v *Bacillus cereus* a

d) prípadne sa dosiahne expresia zodpovedajúceho produktu génu, a prípadne sa produkt izoluje.

35. Spôsob podľa nároku 34, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa používa gén, ktorým je gén protoxínu z *Bacillus thuringiensis*.

36. Spôsob podľa nároku 34, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa používajú sekvencie pre expresiu, ktoré obsahujú promótor z *Bacillus thuringiensis*, závislý od sporulácie.

37. Spôsob podľa nároku 34, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa používa vektor na priame klonovanie.

38. Spôsob podľa nároku 34, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa používajú bifunkčné, tzv. "Shuttle" vektory.

39. Spôsob podľa nároku 34, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa do buniek *Bacillus* miesto génov včleňujú inak využiteľné sekvencie DNA a tam sa klonujú.

40. Spôsob podľa nároku 21, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa

a) celá DNA z *Bacillus thuringiensis* rozštiepi pôsobením vhodných reštrikčných enzýmov,

b) zo vzniknutých restrikčných fragmentov sa izolujú fragmenty vhodnej veľkosti,

c) tieto fragmenty sa uložia do vhodného vektora,

d) vektorom sa transformujú bunky *Bacillus thuringiensis* prípadne *Bacillus cereus*, a

e) z transformantov sa vhodným spôsobom triedenia izolujú nové sekvencie DNA.

41. Spôsob podľa nároku 40, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že v prípade nového génu ide o gén protoxínu.

42. Spôsob podľa nároku 40, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa používajú vektory na priame klonovanie.

43. Spôsob podľa nároku 40, **vyznačujúci sa tým**, že sa používajú bifunkčné, tzv. "Shuttle" vektory.

44. Spôsob podľa nároku 40, **vyznačujúci sa tým**, že sa na selekciu nových sekvencií DNA používa imunologický spôsob triedenia.

45. Spôsob podľa nároku 31, **vyznačujúci sa tým**, že sa *Bacillus thuringiensis var. kurstaki* HD1 cryB transformuje pomocou bifunkčného vektora pXI61 (pK61), uloženého pod číslom DSM 4572.

46. Spôsob podľa nároku 31, **vyznačujúci sa tým**, že sa *Bacillus thuringiensis var. kurstaki* IID1 cryB transformuje pomocou bifunkčného vektora pXI93 (pK93), uloženého pod číslom DSM 4571.

47. Spôsob podľa nároku 31, **vyznačujúci sa tým**, že sa *Bacillus cereus* 569K transformuje pomocou bifunkčného vektora pXI93 (pK93), uloženého pod číslom DSM 4573.

48. Bifunkčné vektory, ktoré sú okrem v *B. thuringiensis* alebo v blízko príbuznom *B. cereus*, alebo v oboch týchto organizmoch schopné replikácie v jednom alebo vo väčšom počte iných heterológnych produkčných organizmoch a ktoré sú identifikovateľné tak v homológnych, ako aj v heterológnych produkčných systémoch.

49. Bifunkčné vektory podľa nároku 49, **vyznačujúce sa tým**, že heterológne produkčné organizmy sú

a) prokaryotické organizmy zvolené zo skupiny zahŕňajúcej čeľade *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Agrobacterium*, *Salmonella*, *Erwinia* a podobne alebo

b) eukaryotické organizmy zvolené zo súboru zahŕňajúceho kvasinky, živočíšne a rastlinné bunky a podobne.

50. Bifunkčné vektory podľa nároku 49, **vyznačujúce sa tým**, že heterológnym produkčným organizmom je *E. coli*.

51. Bifunkčné vektory podľa nároku 48, **vyznačujúce sa tým**, že sa skladajú z DNA plazmidu homológneho alebo heterológneho pôvodu, ktorý je kódom aspoň čiastočne pre funkcie, ktoré sú nutné na replikáciu a selekciu v *B. thuringiensis* alebo v blízko príbuznom *B. cereus*, alebo v oboch týchto organizmoch a tiež v najmenej jednom alebo väčšom počte iných heterológnych produkčných organizmoch.

52. Bifunkčné vektory podľa nároku 48, **vyznačujúce sa tým**, že sa skladajú z DNA plazmidu čisto heterológneho pôvodu.

53. Bifunkčné vektory podľa niektorého z nárokov 51 a 52, **vyznačujúce sa tým**, že

a) DNA homológnym plazmidom je DNA, ktorá sa prirodzene vyskytuje v *B. thuringiensis* alebo v *B. cereus*, alebo v oboch týchto organizmoch, alebo je s touto DNA v podstate homológna, alebo

b) DNA heterológnym plazmidom je DNA, ktorá sa prirodzene vyskytuje v

b1) prokaryotických organizmoch zvolených zo skupiny zahŕňajúcej čeľade *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Agrobacterium*, *Salmonella*, *Erwinia* a podobne alebo

b2) eukaryotických organizmoch zvolených zo súboru zahŕňajúceho kvasinky, živočíšne a rastlinné bunky a podobne,

alebo DNA, ktorá je s uvedenou DNA v podstate homológna.

54. Bifunkčné vektory podľa nároku 53, **vyznačujúce sa tým**, že DNA heterológneho plazmidu je DNA, ktorá sa prirodzene vyskytuje v *E. coli*, alebo DNA, ktorá je s ňou v podstate homológna.

55. Bifunkčné vektory podľa nároku 48, **vyznačujúce sa tým**, že obsahujú jeden alebo väčší počet génov vo forme schopnej expresie alebo inej využiteľnej DNA sekvencii, okrem funkcií podstatných pre replikáciu a selekciu v homológnych a heterológnych produkčných systémoch.

56. Bifunkčné vektory podľa nároku 55, **vyznačujúce sa tým**, že uvedené gény alebo iné využiteľné DNA sekvencie sú homológneho, heterológneho alebo syntetického pôvodu, alebo prípadne sú kombináciou uvedených génov alebo uvedených sekvencií.

57. Bifunkčné vektory podľa nároku 55, **vyznačujúce sa tým**, že uvedené gény pozostávajú z jedného alebo väčšieho počtu štruktúrnych génov a v oblasti 3′ a 5′ tiež z riadiacich reťazcov, funkčných v *B. thuringiensis* alebo v *B. cereus*, alebo v oboch týchto organizmoch, pričom tieto reťazce sú so štruktúrnym génom alebo štruktúrnymi génmi spojené operatívnym spôsobom a zaisťujú tak expresiu štruktúrneho génu alebo štruktúrnych génov v *B. thuringiensis* alebo v *B. cereus*, alebo v oboch týchto organizmoch.

58. Bifunkčné vektory podľa nároku 57, **vyznačujúce sa tým**, že uvedenými riadiacimi reťazcami sú signály pre expresiu, zahŕňajúce reťazec promótora, reťazec terminátora a ďalší riadiaci reťazec v 3′ a 5′ neprenášanej oblasti.

59. Bifunkčné vektory podľa nároku 58, **vyznačujúce sa tým**, že signály pre expresiu sa prirodzene vyskytujú v *B. thuringiensis* alebo v *B. cereus*, alebo v oboch týchto organizmoch, alebo ide o mutanty a varianty týchto prírodných signálov pre expresiu, ktoré sú s prírodnou sekvenciou v podstate homológne.

60. Bifunkčné vektory podľa nároku 59, **vyznačujúce sa tým**, že signály pre expresiu zahŕňajú promótor z *B. thuringiensis*, závislý od sporulácie.

61. Bifunkčné vektory podľa nároku 57, **vyznačujúce sa tým**, že uvedený štruktúrny gén je kódom pre polypeptidový δ-endotoxín, ktorý sa prirodzene vyskytuje v *B. thuringiensis*, alebo pre polypeptid, ktorý je s ním v podstate homológny, čo znamená, že má aspoň v podstate toxické vlastnosti kryštalického polypeptidového δ-endotoxínu z *B. thuringiensis*.

62. Bifunkčné vektory podľa nároku 57, **vyznačujúce sa tým**, že uvedený štruktúrny gén je DNA sekvencia, ktorá je kódom pre prirodzene sa vyskytujúci δ-endotoxín v *B. thuringiensis*, alebo variant prírodnej DNA sekvencie, ktorá je so zodpovedajúcou prírodnou sekvenciou aspoň v podstate homológna.

63. Bifunkčné vektory podľa nároku 61, **vyznačujúce sa tým**, že uvedený polypeptid je v podstate homológny s polypeptidovým δ-endotoxínom vhodnej podskupiny *B. thuringiensis*, vybranej zo súboru zahŕňajúceho *kurstaki*, *berliner*, *alesti*, *sotto*, *tolworthi*, *dendrolimus*, *tenebrionis* a *israelensis*.

64. Bifunkčné vektory podľa nároku 62, **vyznačujúce sa tým**, že kódová sekvencia DNA δ--endotoxínu je homológna v podstate aspoň s časťou alebo časťami prírodnej kódovej sekvencie δ-endotoxínu, ktorý je príčinou insekticídneho účinku.

65. Bifunkčné vektory podľa nároku 61, **vyznačujúce sa tým**, že kódová sekvencia DNA δ-endotoxínu je DNA fragmentom z *B. thuringiensis var. kurstaki* HD1, ktorý sa nachádza medzi nukleotidmi 156 až 3623 v sekvencii zobrazenej na obrázku 10, alebo kratším

fragmentom DNA, ktorá je ešte kódom pre polypeptid s insekticídnymi vlastnosťami.

66. Bifunkčný vektor pXI61 (pK61), transformovaný do *B. thuringiensis var. kurstaki* HD1 cryB (DSM 4572).

67. Bifunkčný vektor pXI93 (pK93), transformovaný do *B. thuringiensis var. kurstaki* HD1 cryB (DSM 4571) a *B. cereus* 569K (DSM 4573).

68. Produkčná bunka, **vyznačujúca sa tým**, že obsahuje bifunkčný vektor podľa niektorého z nárokov 48 až 67.

69. Produkčná bunka podľa nároku 68, **vyznačujúca sa tým**, že ide o mikroorganizmus.

70. Produkčná bunka podľa nároku 69, **vyznačujúca sa tým**, že ide o baktériu.

71. Produkčná bunka podľa nároku 69, **vyznačujúca sa tým**, že ide o *E. coli*.

72. Produkčná bunka podľa nároku 69, **vyznačujúca sa tým**, že ide o *B. thuringiensis* alebo *B. cereus*.

73. Produkčná bunka podľa nároku 68, **vyznačujúca sa tým**, že ide o eukaryotickú bunku zvolenú zo súboru zahŕňajúceho kvasinky a živočíšne a rastlinné bunky.

74. *B. thuringiensis* transformovaný použitím bifunkčného vektora podľa niektorého z nárokov 48 až 67.

75. *B. thuringiensis var. kurstaki* HD1 cryB transformovaný použitím bifunkčného vektora pXI61 (kP61), ktorý bol uložený pod číslo DSM 4572.

76. *B. thuringiensis var. kurstaki* HD1 cryB transformovaný použitím bifunkčného vektora pXI93 (kP93), ktorý bol uložený pod číslo DSM 4572.

77. *B. thuringiensis var. kurstaki* HD1 cryB transformovaný použitím bifunkčného vektora pXI93 (kP93), ktorý bol uložený pod číslo DSM 4571.

78. *B. cereus* transformovaný použitím bifunkčného vektora podľa niektorého z nárokov 48 až 67.

79. *B. cereus* 569K transformovaný použitím bifunkčného vektora pXI93 (pK93), ktorý bol uložený pod číslom DSM 4573.

80. Insekticídny prostriedok, **vyznačujúci sa tým**, že okrem obvykle používaných nosičov, dispergačných prostriedkov alebo nosičov a dispergačných prostriedkov obsahuje

a) bunky *B. thuringiensis* alebo *B. cereus*, alebo zmes týchto buniek *Bacillus*, transformovaných rekombinantnou molekulou DNA, ktorá obsahuje štruktúrny gén, ktorý je kódom pre polypeptid δ-endotoxín, prirodzene sa vyskytujúci v *B. thuringiensis*, alebo pre polypeptid, ktorý je s ním v podstate homológny, alebo

b) bezbunkové kryštalické preparáty, ktoré obsahujú protoxín produkovaný transformovanými bunkami *Baccilus*.

81. Insekticídny prostriedok podľa nároku 80, **vyznačujúci sa tým**, že okrem obvykle používaných nosičov, dispergačných prostriedkov alebo nosičov a dispergačných prostriedkov obsahuje insekticídne zmesi pozostávajúce z transformovaných, živých alebo mŕtvych buniek *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus* podľa odseku a), ako aj z buniek bez kryštalických preparátov, obsahujúce protoxín, ktorý je produkovaný transformovanými bunkami *Bacillus* podľa odscku b).

82. Insekticídny prostriedok, **vyznačujúci sa tým**, že obsahuje

a) bunky *B. thuringiensis* alebo *B. cereus*, alebo zmes týchto buniek transformovaných bifunkčným vektorom podľa nárokov 48 až 67 alebo

b) bezbunkový kryštalický prostriedok s obsahom protoxínu, produkovaného transformovanými bunkami *Bacillus*, spoločne s obvykle používanými nosičmi alebo dispergačnými prostriedkami alebo ich zmesi.

83. Insekticídny prostriedok podľa nároku 82, **vyznačujúci sa tým**, že obsahuje insekticídne zmesi pozostávajúce z transformovaných živých alebo mŕtvych buniek *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus* podľa odseku a) a z bezbunkových kryštalických prostriedkov s obsahom protoxínu, ktorý je produkovaný transformovanými bunkami *Bacillus* podľa odseku b) spoločne s obvykle používanými nosičmi alebo dispergačnými prostriedkami, alebo ich zmesi.

84. Použitie bifunkčných vektorov podľa niektorého z nárokov 48 až 67 na transformáciu *B. thuringiensis* alebo *B. cereus*, alebo oboch týchto organizmov.

85. Použitie podľa nároku 84 na transformáciu *B. thuringiensis var. kurstaki* HD1 cryB.

86. Použitie a) buniek *B. thuringiensis* alebo *B. cereus*, alebo zmesi týchto buniek, transformovaných rekombinantnou molekulou DNA obsahujúcou štruktúrny gén, ktorý kóduje polypeptidový δ-endotoxín, ktorý sa prirodzene vyskytuje v *B. thuringiensis*, alebo polypeptid, ktorý je s ním v podstate homológny, alebo b) bezbunkového kryštalického prostriedku, obsahujúceho protoxín, produkovaný transformovanými bunkami *Baccilus* na ničenie hmyzu.

87. Použitie podľa nároku 86, pričom zmes s insekticídnym účinkom obsahuje transformované živé alebo mŕtve bunky *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus* podľa odseku a) a také bezbunkové kryštalické prostriedky s obsahom protoxínu, produkované podľa odseku b) transformovanými bunkami *Baccilus*.

88. Použitie a) buniek *B. thuringiensis* alebo *B. cereus*, alebo zmesi týchto buniek, transformovaných bifunkčným vektorom podľa niektorého z nárokov 48 až 67, prípadne obsahujúcim štruktúrny gén kódujúci polypeptidový δ-endotoxín, ktorý sa prirodzene vyskytuje v *B. thuringiensis*, alebo polypeptid, ktorý je s ním v podstate homológny, alebo b) bezbunkového kryštalického prostriedku s obsahom protoxínu, produkovaného transformovanými bunkami *Baccilus* na ničenie hmyzu.

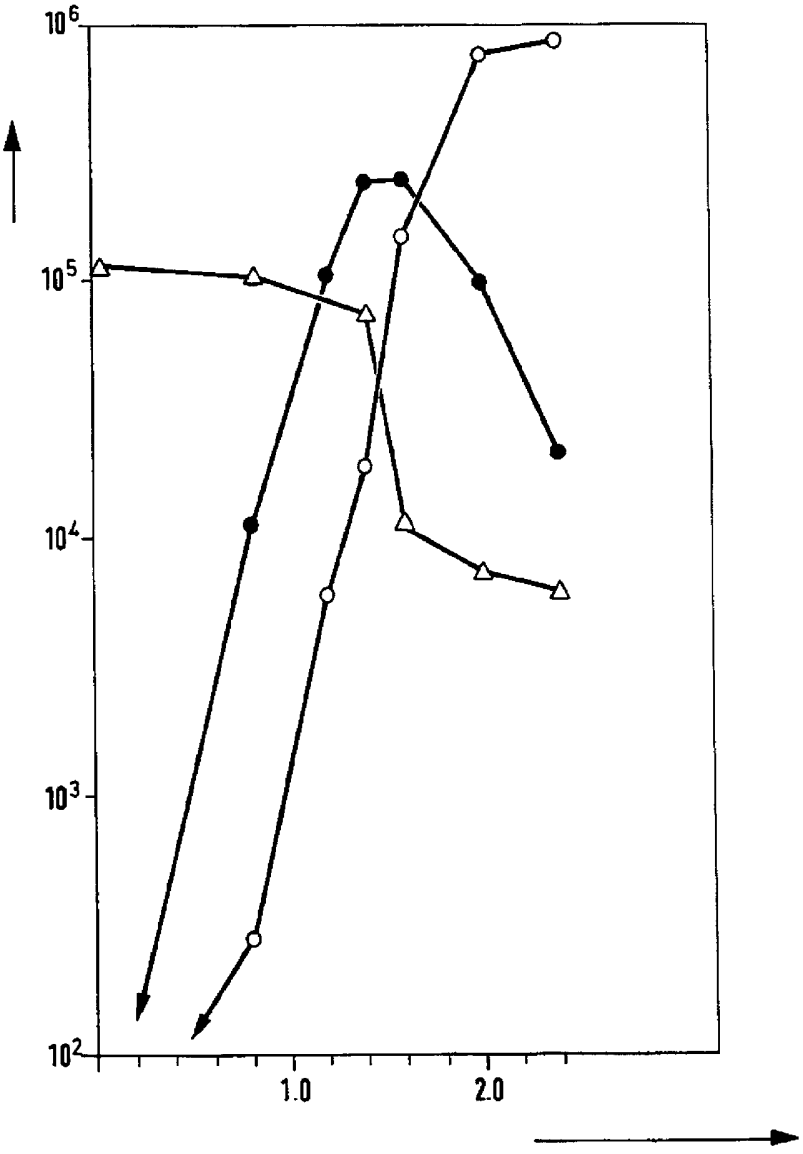
89. Použitie podľa nároku 88, pričom insekticídna zmes obsahuje transformované živé alebo mŕtve bunky *B. thuringiensis* a/alebo *B. cereus* podľa odseku a) alebo bezbunkový kryštalický prostriedok obsahujúci protoxín, produkovaný podľa odseku b) transformovanými bunkami *Baccilus*.

90. Použitie podľa niektorého z nárokov 86 až 89, pričom hmyz je z radu *Lapidoptera*, *Diptera* alebo *Coleoptera*.

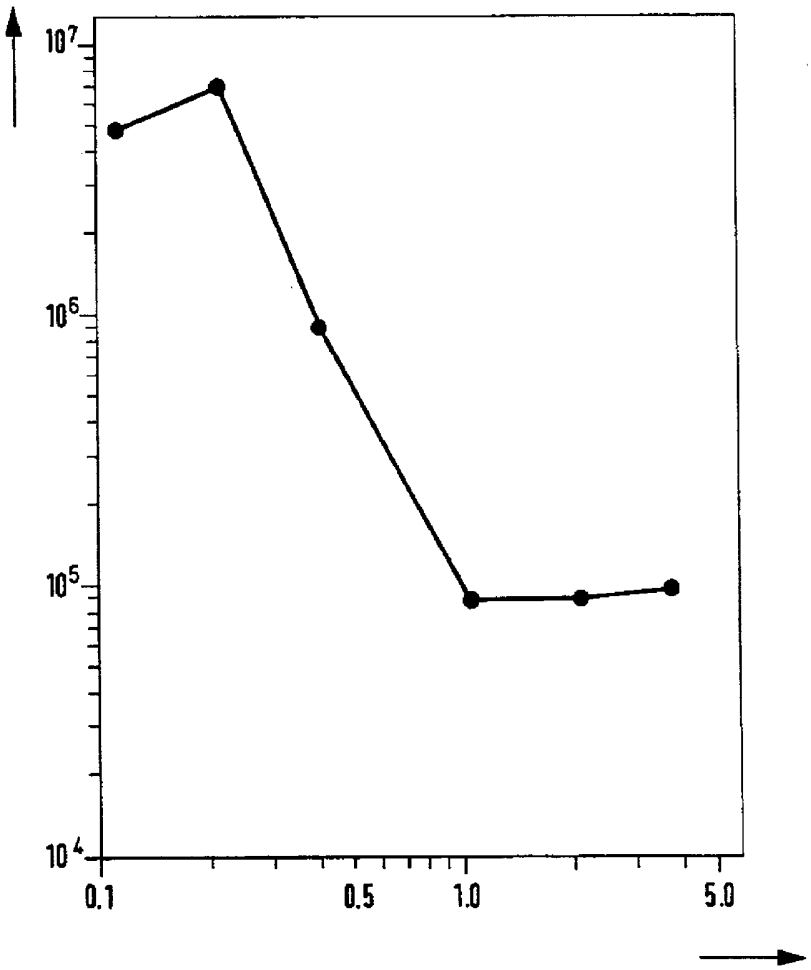
91. Použitie podľa nároku 90, pričom hmyz je z radu *Lepidoptera*.

16 výkresov

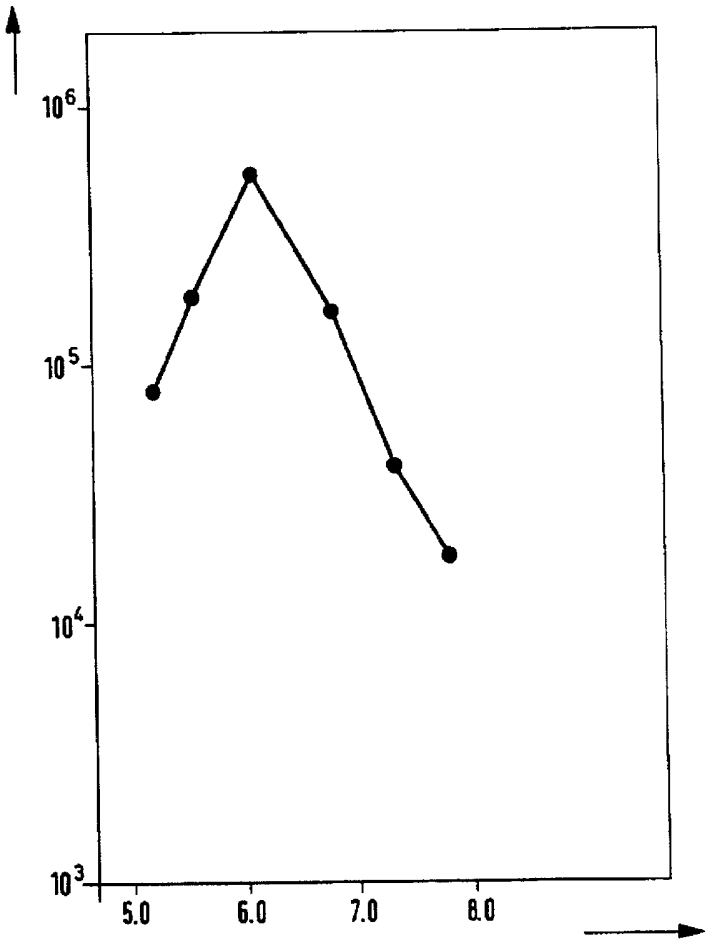
Obr. 1



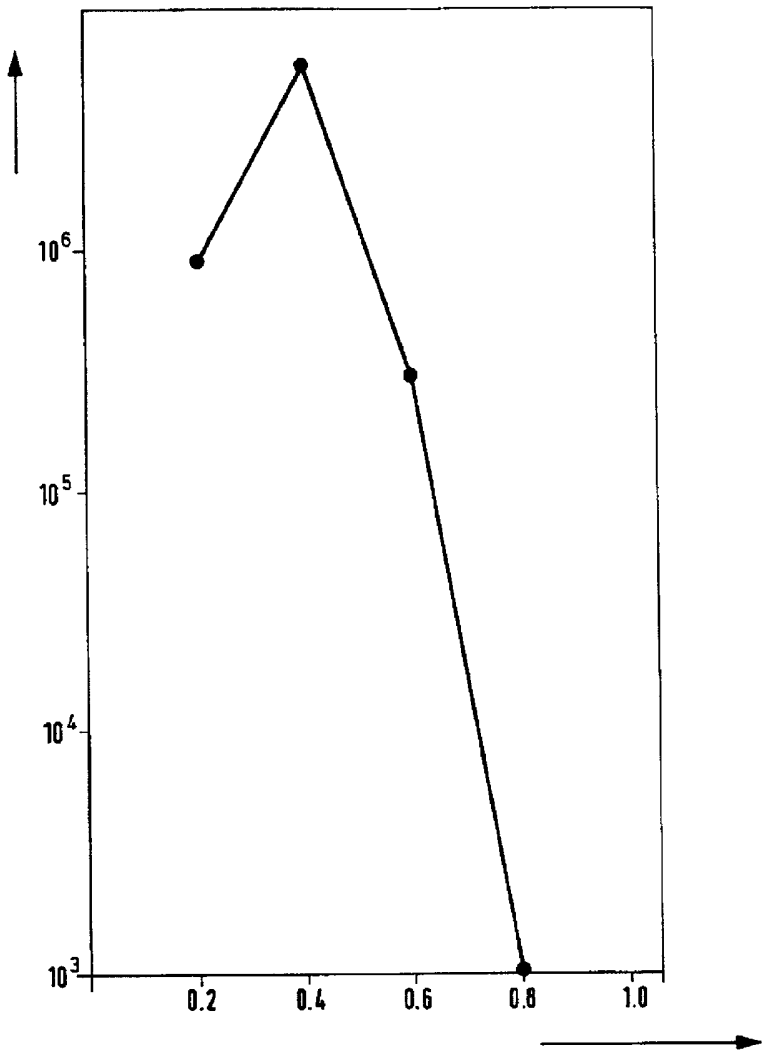
Obr. 2

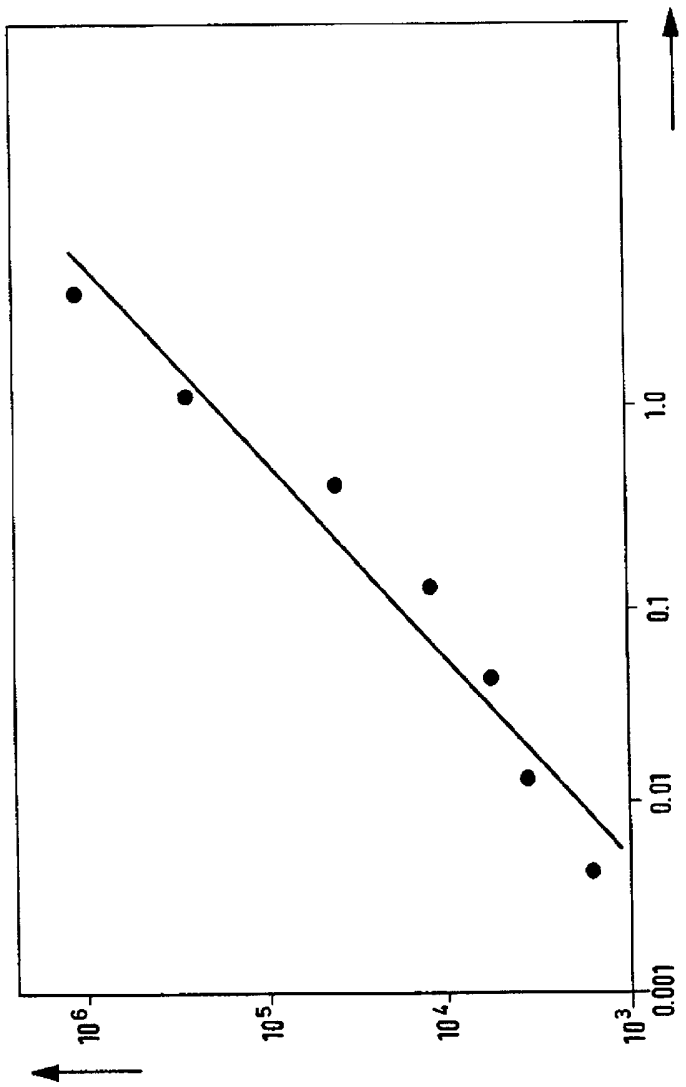


Obr. 3

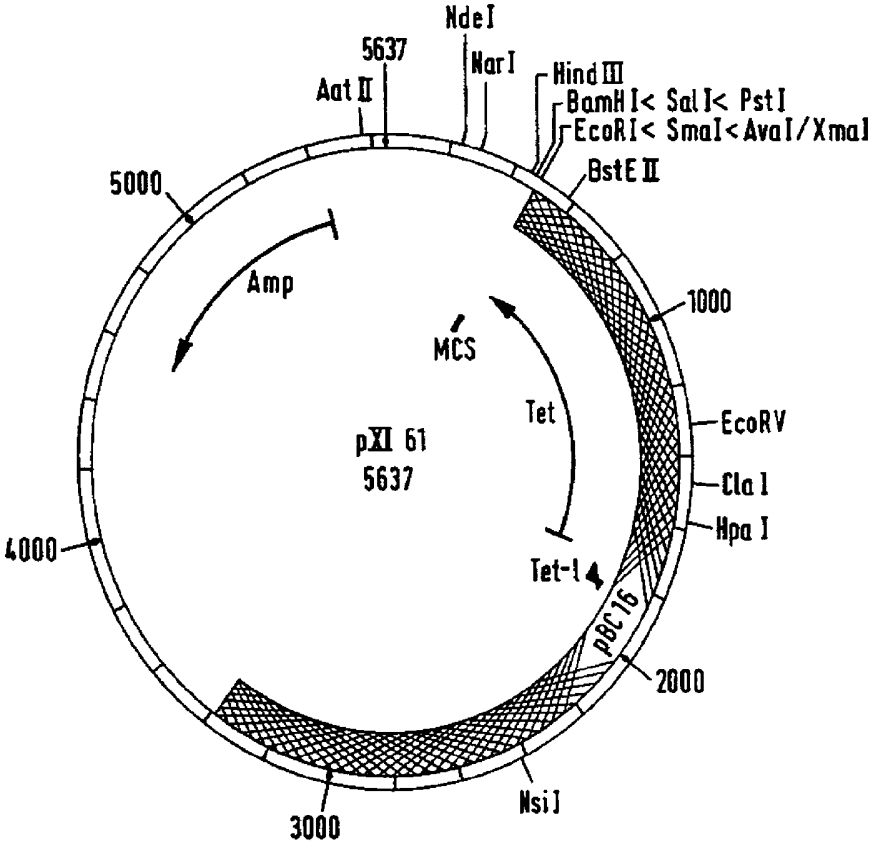


Obr. 4

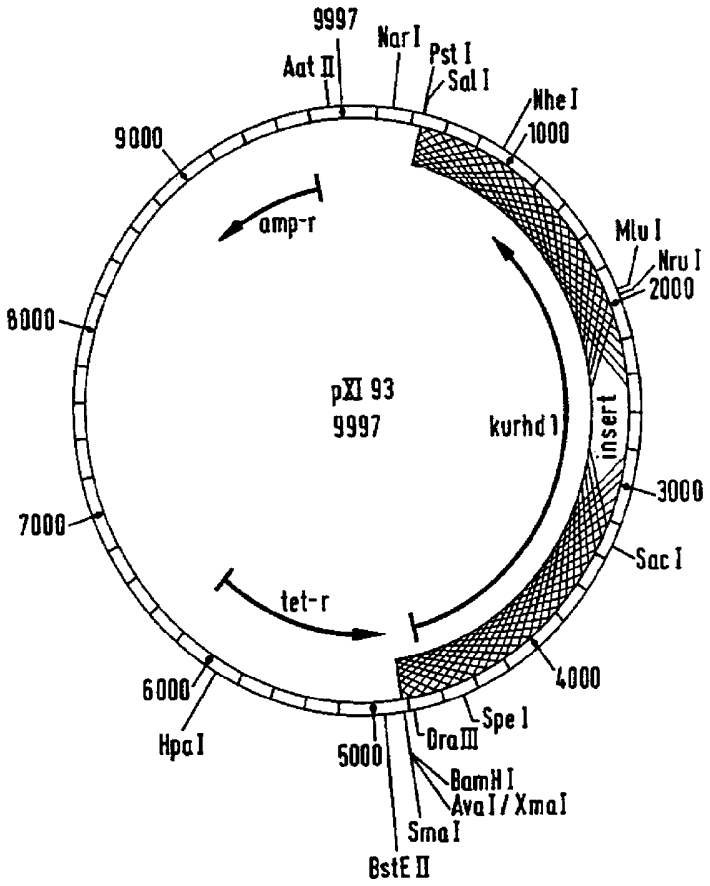




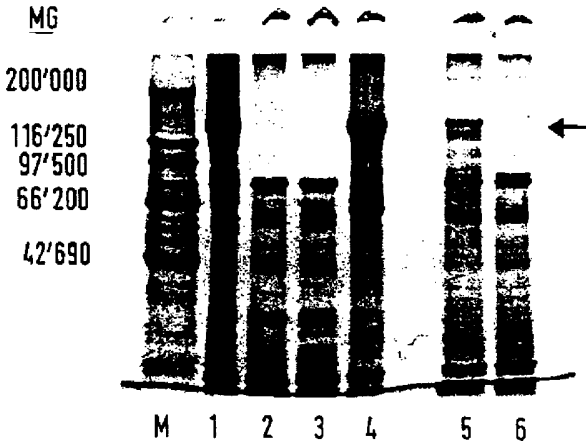
Obr. 5


NdeI
5637
NarI
HindIII
BamHI< SalI< PstI
EcoRI< SmaI<AvaI/XmaI
AatII
BstEII
5000
1000
Amp
MCS
Tet
pXI 61
5637
EcoRV
ClaI
HpaI
4000
Tet-1
pBC16
2000
NsiI
3000

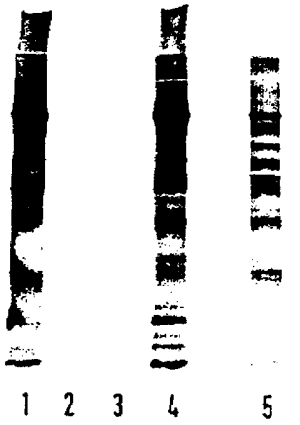
Obr. 6


9997
Nar I
Pst I
Sal I
Aat II
Nhe I
1000
9000
amp-r
Mlu I
Nru I
2000
8000
pXI 93
9997
kurhd 1
insert
3000
7000
Sac I
tet-r
4000
6000
Spe I
Dra III
Hpa I
5000
BamH I
Ava I / Xma I
Sma I
BstE II

Obr. 7

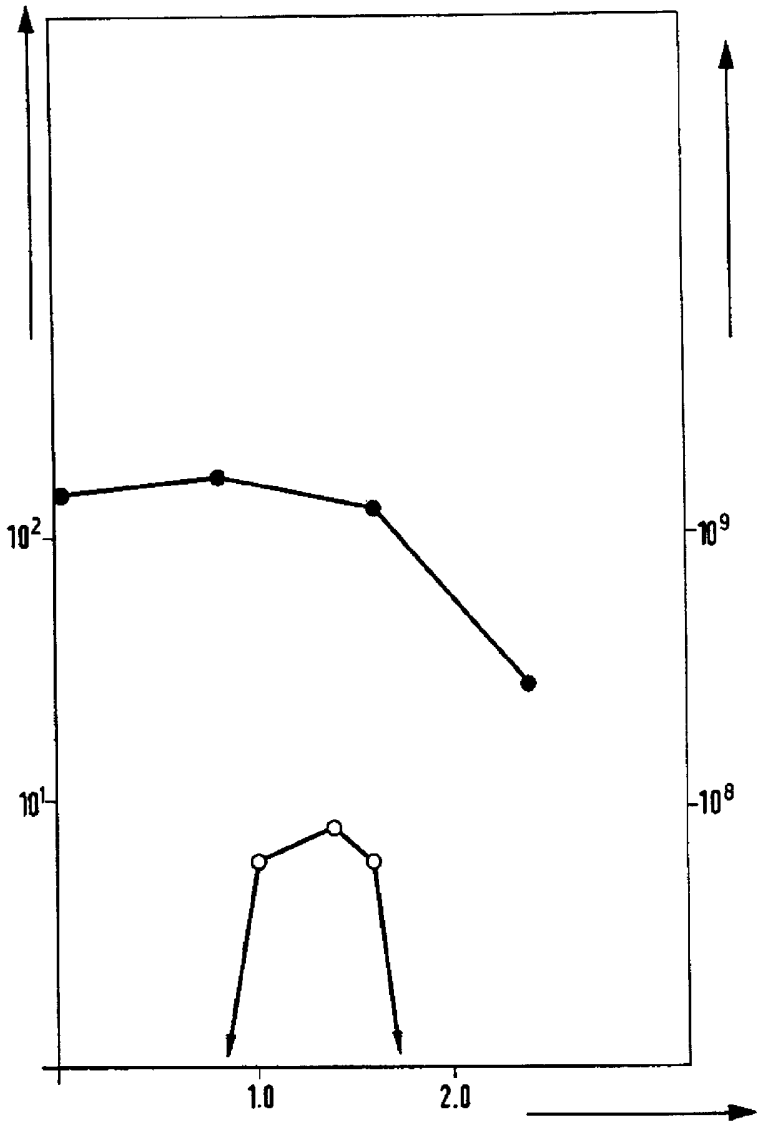


Obr. 8a



Obr. 8b

Obr. 9



Obr. 10a

```
        10          20          30          40          50          60
GTTAACACCC TGGGTCAAAA ATTGATATTT AGTAAAATTA GTTGCACTTT GTGCATTTTT

        70          80          90         100         110         120
TCATAAGATG AGTCATATGT TTTAAATTGT AGTAATGAAA AACAGTATTA TATCATAATG

       130         140         150         160         170         180
AATTGGTATC TTAATAAAAG AGATGGAGGT AACTTATGGA TAACAATCCG AACATCAATG

       190         200         210         220         230         240
AATGCATTCC TTATAATTGT TTAAGTAACC CTGAAGTAGA AGTATTAGGT GGAGAAAGAA

       250         260         270         280         290         300
TAGAAACTGG TTACACCCCA ATCGATATTT CCTTGTCGCT AACGCAATTT CTTTTGAGTG

       310         320         330         340         350         360
AATTTGTTCC CGGTGCTGGA TTTGTGTTAG GACTAGTTGA TATAATATGG GGAATTTTTG

       370         380         390         400         410         420
GTCCGTCTCA ATGGGACGCA TTTCTTGTAC AAATTGAACA GTTAATTAAC CAAAGAATAG

       430         440         450         460         470         480
AAGAATTCGC TAGGAACCAA GCCATTTCTA GATTAGAAGG ACTAAGCAAT CTTTATCAAA

       490         500         510         520         530         540
TTTACGCAGA ATCTTTTAGA GAGTGGGAAG CAGATCCTAC TAATCCAGCA TTAAGAGAAG

       550         560         570         580         590         600
AGATGCGTAT TCAATTCAAT GACATGAACA GTGCCCTTAC AACCGCTATT CCTCTTTTTG
```

Obr. 10b

610 620 630 640 650 660
CAGTTCAAAA TTATCAAGTT CCTCTTTTAT CAGTATATGT TCAAGCTGCA AATTTACATT

670 680 690 700 710 720
TATCAGTTTT GAGAGATGTT TCAGTGTTTG GACAAAGGTG GGGATTTGAT GCCGCGACTA

730 740 750 760 770 780
TCAATAGTCG TTATAATGAT TTAACTAGGC TTATTGGCAA CTATACAGAT CATGCTGTAC

790 800 810 820 830 840
GCTGGTACAA TACGGGATTA GAGCGTGTAT GGGGACCGGA TTCTAGAGAT TGGATAAGAT

850 860 870 880 890 900
ATAATCAATT TAGAAGAGAA TTAACACTAA CTGTATTAGA TATCGTTTCT CTATTTCCGA

910 920 930 940 950 960
ACTATGATAG TAGAACGTAT CCAATTCGAA CAGTTTCCCA ATTAACAAGA GAAATTTATA

970 980 990 1000 1010 1020
CAAACCCAGT ATTAGAAAAT TTTGATGGTA GTTTTCGAGG CTCGGCTCAG GGCATAGAAG

1030 1040 1050 1060 1070 1080
GAAGTATTAG GAGTCCACAT TTGATGGATA TACTTAACAG TATAACCATC TATACGGATG

1090 1100 1110 1120 1130 1140
CTCATAGAGG AGAATATTAT TGGTCAGGGC ATCAAATAAT GGCTTCTCCT GTAGGGTTTT

1150 1160 1170 1180 1190 1200
CGGGGCCAGA ATTCACTTTT CCGCTATATG GAACTATGGG AAATGCAGCT CCACAACAAC

1210 1220 1230 1240 1250 1260
GTATTGTTGC TCAACTAGGT CAGGGCGTGT ATAGAACATT ATCGTCCACT TTATATAGAA

1270 1280 1290 1300 1310 1320
GACCTTTTAA TATAGGGATA AATAATCAAC AACTATCTGT TCTTGACGGG ACAGAATTTG

Obr. 10c

1330 1340 1350 1360 1370 1380
CTTATGGAAC CTCCTCAAAT TTGCCATCCG CTGTATACAG AAAAAGCGGA ACGGTAGATT

1390 1400 1410 1420 1430 1440
CGCTGGATGA AATACCGCCA CAGAATAACA ACGTGCCACC TAGGCAAGGA TTTAGTCATC

1450 1460 1470 1480 1490 1500
GATTAAGCCA TGTTTCAATG TTTCGTTCAG GCTTTAGTAA TAGTAGTGTA AGTATAATAA

1510 1520 1530 1540 1550 1560
GAGCTCCTAT GTTCTCTTGG ATACATCGTA GTGCTGAATT TAATAATATA ATTCCTTCAT

1570 1580 1590 1600 1610 1620
CACAAATTAC ACAAATACCT TTAACAAAAT CTACTAATCT TGGCTCTGGA ACTTCTGTCG

1630 1640 1650 1660 1670 1680
TTAAAGGACC AGGATTTACA GGAGGAGATA TTCTTCGAAG AACTTCACCT GGCCAGATTT

1690 1700 1710 1720 1730 1740
CAACCTTAAG AGTAAATATT ACTGCACCAT TATCACAAAG ATATCGGGTA AGAATTCGCT

1750 1760 1770 1780 1790 1800
ACGCTTCTAC CACAAATTTA CAATTCCATA CATCAATTGA CGGAAGACCT ATTAATCAGG

1810 1820 1830 1840 1850 1860
GGAATTTTTC AGCAACTATG AGTAGTGGGA GTAATTTACA GTCCGGAAGC TTTAGGACTG

1870 1880 1890 1900 1910 1920
TAGGTTTTAC TACTCCGTTT AACTTTTCAA ATGGATCAAG TGTATTTACG TTAAGTGCTC

1930 1940 1950 1960 1970 1980
ATGTCTTCAA TTCAGGCAAT GAAGTTTATA TAGATCGAAT TGAATTTGTT CCGGCAGAAG

1990 2000 2010 2020 2030 2040
TAACCTTTGA GGCAGAATAT GATTTAGAAA GAGCACAAAA GGCGGTGAAT GAGCTGTTTA

Obr. 10d

2050 2060 2070 2080 2090 2100
CTTCTTCCAA TCAAATCGGG TTAAAAACAG ATGTGACGGA TTATCATATT GATCAAGTAT

2110 2120 2130 2140 2150 2160
CCAATTTAGT TGAGTGTTTA TCTGATGAAT TTTGTCTGGA TGAAAAAAAA GAATTGTCCG

2170 2180 2190 2200 2210 2220
AGAAAGTCAA ACATGCGAAG CGACTTAGTG ATGAGCGGAA TTTACTTCAA GATCCAAACT

2230 2240 2250 2260 2270 2280
TTAGAGGGAT CAATAGACAA CTAGACCGTG GCTGGAGAGG AAGTACGGAT ATTACCATCC

2290 2300 2310 2320 2330 2340
AAGGAGGCGA TGACGTATTC AAAGAGAATT ACGTTACGCT ATTGGGTACC TTTGATGAGT

2350 2360 2370 2380 2390 2400
GCTATCCAAC GTATTTATAT CAAAAAATAG ATGAGTCGAA ATTAAAAGCC TATACCCGTT

2410 2420 2430 2440 2450 2460
ACCAATTAAG AGGGTATATC GAAGATAGTC AAGACTTAGA AATCTATTTA ATTCGCTACA

2470 2480 2490 2500 2510 2520
ATGCCAAACA CGAAACAGTA AATGTGCCAG GTACGGGTTC CTTATGGCCG CTTTCAGCCC

2530 2540 2550 2560 2570 2580
CAAGTCCAAT CGGAAAATGT GCCCATCATT CCCATCATTT CTCCTTGGAC ATTGATGTTG

2590 2600 2610 2620 2630 2640
GATGTACAGA CTTAAATGAG GACTTAGGTG TATGGGTGAT ATTCAAGATT AAGACGCAAG

2650 2660 2670 2680 2690 2700
ATGGCCATGC AAGACTAGGA AATCTAGAAT TTCTCGAAGA GAAACCATTA GTAGGAGAAG

2710 2720 2730 2740 2750 2760
CACTAGCTCG TGTGAAAAGA GCGGAGAAAA AATGGAGAGA CAAACGTGAA AAATTGGAAT

Obr. 10e

```
2770        2780        2790        2800        2810        2820
GGGAAACAAA TATTGTTTAT AAAGAGGCAA AAGAATCTGT AGATGCTTTA TTTGTAAACT

2830        2840        2850        2860        2870        2880
CTGAATATGA TAGATTACAA GCGGATACCA ACATCGCGAT GATTCATGCG GCAGATAAAC

2890        2900        2910        2920        2930        2940
GCGTTCATAG CATTCGAGAA GCTTATCTGC CTGAGCTGTC TGTGATTCCG GGTGTCAATG

2950        2960        2970        2980        2990        3000
CGGCTATTTT TGAAGAATTA GAAGGGCGTA TTTTCACTGC ATTCTCCCTA TATGATGCGA

3010        3020        3030        3040        3050        3060
GAAATGTCAT TAAAAATGGT GATTTTAATA ATGGCTTATC CTGCTGGAAC GTGAAAGGGC

3070        3080        3090        3100        3110        3120
ATGTAGATGT AGAAGAACAA AACAACCACC GTTCGGTCCT TGTTGTTCCG GAATGGGAAG

3130        3140        3150        3160        3170        3180
CAGAAGTGTC ACAAGAAGTT CGTGTCTGTC CGGGTCGTGG CTATATCCTT CGTGTCACAG

3190        3200        3210        3220        3230        3240
CGTACAAGGA GGGATATGGA GAAGGTTGCG TAACCATTCA TGAGATCGAG AACAATACAG

3250        3260        3270        3280        3290        3300
ACGAACTGAA GTTTAGCAAC TGTGTAGAAG AGGAAGTATA TCCAAACAAC ACGGTAACGT

3310        3320        3330        3340        3350        3360
GTAATGATTA TACTGCGACT CAAGAAGAAT ATGAGGGTAC GTACACTTCT CGTAATCGAG

3370        3380        3390        3400        3410        3420
GATATGACGG AGCCTATGAA AGCAATTCTT CTGTACCAGC TGATTATGCA TCAGCCTATG

3430        3440        3450        3460        3470        3480
AAGAAAAAGC ATATACAGAT GGACGAAGAG ACAATCCTTG TGAATCTAAC AGAGGATATG
```

Obr. 10f

```
3490        3500        3510        3520        3530        3540
GGGATTACAC ACCACTACCA GCTGGCTATG TGACAAAAGA ATTAGAGTAC TTCCCAGAAA

3550        3560        3570        3580        3590        3600
CCGATAAGGT ATGGATTGAG ATCGGAGAAA CGGAAGGAAC ATTCATCGTG GACAGCGTGG

3610        3620        3630        3640        3650        3660
AATTACTTCT TATGGAGGAA TAATATATGC TTTATAATGT AAGGTGTGCA AATAAAGAAT

3670        3680        3690        3700        3710        3720
GATTACTGAC TTGTATTGAC AGATAAATAA GGAAATTTTT ATATGAATAA AAAACGGGCA

3730        3740        3750        3760        3770        3780
TCACTCTTAA AAGAATGATG TCCGTTTTTT GTATGATTTA ACGAGTGATA TTTAAATGTT

3790        3800        3810        3820        3830        3840
TTTTTTGCGA AGGCTTTACT TAACGGGGTA CCGCCACATG CCCATCAACT TAAGAATTTG

3850        3860        3870        3880        3890        3900
CACTACCCCC AAGTGTCAAA AAACGTTATT CTTTCTAAAA AGCTAGCTAG AAAGGATGAC

3910        3920        3930        3940        3950        3960
ATTTTTTATG AATCTTTCAA TTCAAGATGA ATTACAACTA TTTTCTGAAG AGCTGTATCG

3970        3980        3990        4000        4010        4020
TCATTTAACC CCTTCTCTTT TGGAAGAACT CGCTAAAGAA TTAGGTTTTG TAAAAAGAAA

4030        4040        4050        4060        4070        4080
ACGAAAGTTT TCAGGAAATG AATTAGCTAC CATATGTATC TGGGGCAGTC AACGTACAGC

4090        4100        4110        4120        4130        4140
GAGTGATTCT CTCGTTCGAC TATGCAGTCA ATTACACGCC GCCACAGCAC TCTTATGAGT

4150        4160        4170        4180        4190        4200
CCAGAAGGAC TCAATAAACG CTTTGATAAA AAAGCGGTTG AATTTTTGAA ATATATTTTT
```

Obr. 10g

```
      4210        4220        4230        4240        4250        4260
TCTGCATTAT GGAAAAGTAA ACTTTGTAAA ACATCAGCCA TTTCAAGTGC AGCACTCACG

      4270        4280        4290        4300        4310        4320
TATTTTCAAC GAATCCGTAT TTTAGATGCG ACGATTTTCC AAGTACCGAA ACATTTAGCA

      4330        4340        4350        4360
CATGTATATC CTGGGTCAGG TGGTTGTGCA CAAACTGCAG
```

Koniec dokumentu