

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>  
C12N 15/75  
A01N 63/00  
C07K 14/325  
C12N 15/32

(11) 공개번호 특1999-0082013  
(43) 공개일자 1999년11월 15일

(21) 출원번호 10-1998-0705733  
(22) 출원일자 1998년07월25일  
    번역문제출일자 1998년07월25일  
(86) 국제출원번호 PCT/US1996/01247 (87) 국제공개번호 WO 1997/27305  
(86) 국제출원출원일자 1996년01월26일 (87) 국제공개일자 1997년07월31일  
(81) 지정국 EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 독일 덴마크 스페인 프랑스  
영국 그리스 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투갈  
국내특허 : 아일랜드 오스트레일리아 브라질 캐나다 체코 일본 대한민국  
    멕시코 우크라이나

(71) 출원인 아보트 러보러터리즈 스티븐 에프. 웨인스톡  
미국, 일리노이 60064-6050, 아보트 파크, 아보트 파크 로드 100  
(72) 발명자 아담스 리 에프.  
미국 캘리포니아 95616 데이비스 1800 코웰 볼러바드 112  
위드너 윌리엄 알.  
미국 캘리포니아 95616 데이비스 이 나인쓰 스트리트 894 아파트먼트301  
디데리히센 보르게 케이.  
덴마크 DK-3460 비르케로드 푸글레상스베지 4  
토마스 마이클 디.  
미국 캘리포니아 95616 데이비스 뉴포트 테라스 3175  
요르겐센 스텐 티.  
덴마크 DK-3450 알레로드 프루누스베지 5  
슬로마 알렌 피.  
미국 캘리포니아 95616 데이비스 도노반 코트 849  
요르겐센 페르 엘.  
덴마크 DK-1302 코펜하겐 케이 드로닝겐스 TV 아에르가데 37 1  
(74) 대리인 이병호

**심사청구 : 없음**

**(54) 바실러스 투린지엔시스 인테그란트의 제조**

**요약**

본 발명은 바실러스 투린지엔시스의 인테그란트를 제조하는 방법에 관한 것이다. 더 나아가서, 본 발명은 이러한 인테그란트, 이러한 인테그란트를 포함하는 조성물 및 이러한 조성물을 이용한 해충의 방제 방법에 관한 것이다.

**대표도**

**도1**

**명세서**

본 출원은 1993년 7월 15일자로 출원되고 현재는 포기된 출원 번호 제 08/092,338호의 계속 출원(continuation-in-part)인 1994년 7월 13일자로 출원된 출원 번호 제 08/274,608호의 계속 출원이다. 또한, 본 출원은 1992년 5월 26일자로 출원된 출원 번호 제 07/853,701호의 계속 출원이다.

**기술분야**

본 발명은 바실러스 투린지엔시스(*Bacillus thuringiensis*)의 인테그란트(integrant)를 수득하는 방법에 관한 것이다. 더 나아가, 본 발명은 이러한 인테그란트 또는 이의 포자, 이러한 인테그란트를 포함하는 조성물 및 이러한 조성물을 이용한 해충의 방제 방법에 관한 것이다.

## 배경기술

해충은 화학적 또는 생물학적 살충제를 이용하여 방제할 수 있다. 그러나, 화학적 살충제는 그 활성이 광범위하기 때문에, 유용한 곤충과 기생충같은 표적으로 삼지 않은 유기체 및 해충을 없애는 포식 동물을 박멸할 수가 있다. 게다가, 화학적 살충제는 종종 동물 및 인간에게 독성을 나타낸다. 더 나아가서는, 이러한 물질에 반복적으로 노출될 경우, 표적으로 삼은 해충이 종종 이에 대한 내성을 갖게 된다.

생물학적 살충제는 자연에서 나타나는 병원균을 이용하여, 작물에 피해를 끼치는 곤충, 곰팡이 및 잡초를 방제한다. 생물학적 살충제의 한 예로는, 해충에 대해 독성을 갖는 물질을 생산해 내는 박테리아가 있다. 화학적 살충제에 비해 전반적으로 생물학적 살충제는 표적으로 삼지 않은 유기체 및 환경에 주는 피해가 일반적으로 적다.

가장 널리 사용되는 생물학적 살충제는 바실러스 투린지엔시스다. 바실러스 투린지엔시스는 자연, 특히 토양 및 해충이 풍부한 환경에 널리 분포되어 있는 운동 능력을 가진 막대 모양의 그람-양성(gram-positive) 박테리아다. 바실러스 투린지엔시스는 포자 형성시에 부포자 결정 봉입체(parasporal crystal inclusion)를 생산하는 데, 이것은 섭취되자마자 감염되기 쉬운 유충에 대해 독성을 나타낸다. 봉입체는 모양, 수 및 구성에 있어서 다양하다. 이 봉입체는 델타-엔도톡신(endotoxin)이라고 불리는 27 내지 140 KDa의 단백질을 하나 이상 포함하고 있다. 일반적으로, 델타-엔도톡신은 유충의 장내에서 단백질 분해 효소에 의해 크기가 더 작은(끝이 잘린) 독성을 갖는 폴리펩티드로 전환되어, 중장(midgut)을 파괴하고, 결국에는 해충을 죽이게 된다(Hofte 및 Whiteley, 1989, Microbiol. Rev. 53:242-255).

델타-엔도톡신은 cry(결정 단백질)유전자에 의해 암호화되어 있다. cry 유전자는 아미노산의 상대적인 상동성 및 살충제 특이성에 기초하여, 6개의 클래스와 몇 개의 서브-클래스로 나뉜다. 6개의 주요 클래스로는 레피토테라-특이성(cry I), 레피토테라- 및 디테라-특이성(cry II), 콜레오테라-특이성(cry III), 디테라-특이성(cry IV)(Hofte 및 Whiteley, 1989, Microbiol. Rev. 53:242-255), 콜레오테라- 및 레피토테라-특이성(1992, Mol. Microbiol. 6:1211-1217에서 Tailor et al.이 cry V 유전자로 칭함) 및 네마토드-특이성(1992, Bio/Technology 10:271-275에서 Feitelson et al.이 cry V 및 cry VI 유전자로 칭함)이 있다. 몇몇 바실러스 투린지엔시스 델타-엔도톡신 결정이 아카리(Acari), 히메노테라(Hymenoptera), 프티라테라(Phthiraptera), 플라티헬민테스(Platyhelminthes), 호뿔테라(Homoptera), 블라토디아(Blattodea) 및 프로토조아(Protozoa)에 대해서도 살충 효과를 갖고 있다고 보고되어 있다.

델타-엔도톡신은 재조합 DNA 방법에 의해 제조되어 왔다. 재조합 DNA 방법에 의해 제조되는 델타-엔도톡신의 형태는 결정형일 수도 있고, 아닐 수도 있다. 다양한 cry 유전자가 클로닝되었고, 그 서열이 밝혀졌으며, 각종의 숙주[예를 들면, 이.콜라이(Schnepf et al., 1987, J. Bacteriol. 169:4110-4118) 및 바실러스 셉틸리스(Shivakumar et al., 1986, J. Bacteriol. 166:194-204)]에서 발현되었다.

cry 유전자는 바실러스 셉틸리스(*Bacillus subtilis*)내에서 증폭시켜 왔다. 바실러스 투린지엔시스 아종(subsp.) 쿠르스타키(kurstaki) HD73의 델타-엔도톡신 유전자는 통합 플라스미드(integrative plasmid)를 이용하여 클로닝 및 증폭시켜 왔다[참조: Calogero et al., 1989, Appl. Environ. Microbiol. 55:446-453]. 반면에, 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 HD73과 비교하여, 결정 크기가 증가하지는 않았다. 게다가, 살충 효과도 차이가 없는 것으로 보고되었다.

델타-엔도톡신 유전자 발현의 정도는 사용되는 숙주 세포에 따라 달라지는 것 같다(Skivakumar et al., 1989, Gene 79:21-31). 예를 들면, Skivakumar 등은 바실러스 셉틸리스 및 바실러스 메가테리움(*Bacillus megaterium*) 내에서 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키의 델타-엔도톡신 유전자 cry IA 및 cry IIA의 발현에 현격한 차이가 있음을 밝혀 냈다. cry IA 유전자는 바실러스 메가테리움내에서 멀티카피(multicopy) 벡터상에 존재하는 경우에 발현이 되었으나, 바실러스 셉틸리스내에서는 그러하지 않았다. cry IIA 유전자는 상기 두 숙주내에서 모두 발현되기는 하였으나, 바실러스 메가테리움내에서의 발현 수준이 더 높았다. 전자 현미경을 통해서 이러한 델타-엔도톡신 유전자를 발현하는 바실러스 메가테리움 세포의 절단면을 조사하였다; 이러한 세포내에 이중 피라미드(bipyramid) 모양의 커다란 결정이 있음을 발견하였다. 그러나, 이러한 결정이 대개 이 유전자를 함유하는 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키에서 발견되는 결정보다 더 크지는 않았다. 이러한 델타-엔도톡신 유전자를 발현하는 바실러스 메가테리움 세포의 생물학적 분석 결과에서 보듯이, 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키와 비교하여, 살충 활성의 증가는 없었다. 동일한 살충 효과를 얻기 위해서는, 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키의 농도보다 5배 농도의 바실러스 메가테리움이 필요한 것이 사실이다.

기존의 방법에 있어서는, 델타-엔도톡신을 암호화하는 DNA 서열 및 DNA 복제 서열을 갖는 재조합 DNA 벡터를 이용하여 숙주 세포를 형질 전환시킨다. 델타-엔도톡신의 발현은 숙주 세포내에서의 재조합 DNA 벡터의 복제 여부에 달려 있다. 재조합 DNA 절차에 의해 목적하는 폴리펩티드를 제조하기 위해, 델타-엔도톡신을 암호화하는 유전 정보를 갖는 재조합 플라스미드 벡터로 박테리아 세포를 형질 전환하는 경우, 이러한 플라스미드가 세포내에서 본래는 안정하게 유지되나 불안정하게 되는 경우도 종종 있다. 이러한 불안정성으로 인해 세포 내에서 플라스미드가 불안정하게 유지되어 결국에는 세포로부터 소실되거나, 문제의 단백질을 암호화하는 DNA가 플라스미드에서 제거될 수가 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 사용되어온 전통적인 방법은 형질 전환된 세포를 선별 압력(selection pressure)하에서, 즉 주로 항생제 존재 하에서 배양하는 것인데, 이러한 항생제에 대한 내성을 가져다 주는 물질을 암호화하는 유전자가 형질 전환된 세포의 플라스미드상에 존재함으로써 당해 세포가 이 항생제에 대해 내성을 갖는다. 그러나, 이러한 방법은 문제가 되는 항생제의 비용이 커서 대량으로 생산하기에는 경제성이 없으며, 환경적인 이유에 의해서도 적합치 않다. 또한, 배양 배지내에 항생제를 사용하게 되면, 제조 산물에 대해 보건 당국 등으로부터 승인을 받기가 더 힘들게 된다.

세포 분열시 자세포(progeny cell)로 플라스미드가 고루 분배되도록 하는 분배 작용을 암호화하는 DNA 서

열을 플라스미드에 삽입함으로써 플라스미드가 안정화될 수 있다는 것은 예전부터 제안되어온 사실이다. 삽입된 DNA 서열이 안정되게 계속 유전될 수 있도록 하는 다른 방법으로는, 이 DNA 서열을 숙주 박테리아의 계놈내에 통합시키는 것이다. 문헌에 기재되어 있는 바와 같이, 플라스미드 벡터상에 존재하는 DNA 서열의 통합은 소위 '교차(crossing-over)'에 의해 이루어진다[참조: A.Campbell, Advances Genet. 11, 1962, pp.101-145]. 이러한 절차에 따르면, 플라스미드 벡터가 박테리아 계놈상의 한 부위와 상동(homologous)인 DNA 서열을 제공하거나, 통합될 이종(heterologous)의 DNA 서열의 양쪽 부위에 각각 하나씩 상동인 DNA 서열을 제공한다. 재조합에 의해, 벡터상의 상동 서열 및 인접한 서열들이 숙주 계놈의 상동 부위에 통합된다.

반면에, 일정한 경우에는 선별 압력이 없는 경우, 예를 들면 DNA 통합에서의 상동 재조합과 유사한 방식에 의해, 통합된 DNA 서열이 세포로부터 소실된다는 사실이 밝혀져있다. 특히, 숙주 세포 계놈내로 통합된 DNA 상 또는 부근에 존재하는 복제 DNA의 근접 부위에서 상동 DNA 서열간의 재조합이 촉진된다는 것은 예전에 관측된 사실이다[참조: Ph.Noiro et al., J.Mol.Biol.196,1987,pp.39-48; M.Young 및 S.D.Ehrlich, J.Bacteriol.171(5), May 1989, pp.2653-2656].

따라서, 본 발명의 목적은 박테리아 숙주 세포, 특히 바실러스 투린지엔시스 of the 계놈 DNA(예를 들면, 염색체)로 DNA 서열을 안정되게 통합시키는 것이다. 또한, 본 발명은 바실러스 투린지엔시스 균주의 인테그란트를 만들어, 충분한 양의 델타-엔도톡신을 제조하는 것도 목적으로 하고 있다. 이러한 인테그란트는 바실러스 투린지엔시스 of the 숙주 범위를 넓히고, 보다 효과적인 형태의 바실러스 투린지엔시스를 수득하는 데에 있어서 유용할 수 있다.

#### 발명의 요약

본 발명은 하나 이상의 이종의 델타-엔도톡신 결정을 생산해 내는 바실러스 투린지엔시스 of the 인테그란트를 수득하는 방법에 관한 것이다.

(a) 숙주인 바실러스 투린지엔시스 균주 세포내로 하기 (i) 및 (ii)를 도입하는 단계:

(i) 제 1 복제 시발점 및 이 복제 시발점으로부터의 플라스미드 복제에 필요한 하나 이상의 인자를 암호화하는 기능성 유전자를 하나 이상 포함하는 제 1 DNA 벡터

(ii) 제 2 복제 시발점은 포함하나 이 복제 시발점으로부터의 플라스미드 복제에 필요한 인자를 암호화하는 기능성 유전자는 포함하지 않고, 바실러스 투린지엔시스 of the 델타-엔도톡신을 암호화하는 DNA 서열, 상기 숙주 균주 계놈의 한 부위와 상동인 DNA 서열 및 선별 마커(marker)를 포함하는 제 2 DNA 벡터; 및

(b) 선별 조건하에서 단계 (a)의 세포를 배양하여, 제 1 DNA 벡터의 소실 및 상동 재조합에 의한 제 2 DNA 벡터의 상기 숙주 세포 계놈내로의 통합 단계에 의해 인테그란트를 수득한다.

특정 양태에서는, 숙주인 바실러스 투린지엔시스 균주가 cry- 균주이다.

더 나아가서, 본 발명은 상기 인테그란트에 관한 것이다. 바실러스 투린지엔시스 of the 델타-엔도톡신을 암호화하는 DNA 서열은 이종의 DNA 서열일 수가 있다. 한 양태에서는, 인테그란트가 이종의 델타-엔도톡신 결정뿐만 아니라 숙주 바실러스 투린지엔시스 균주에 의해 생산되는 내인성의 상동 델타-엔도톡신 결정을 포함할 수도 있다. 다른 양태에서는, 인테그란트가 이종의 바실러스 투린지엔시스 of the 델타-엔도톡신을 하나 이상 생산해 낼 수 있다. 또 다른 양태에서는, 유전자 증폭 또는 초발현의 결과 모균주(parental strain)에 비하여, 더 강력한 살충 효과를 갖는 델타-엔도톡신 결정이 더 많은 양이 생산되며, 생산되는 결정의 크기는 더 클 수도 있고 아닐 수도 있다.

또한, 본 발명은 이러한 인테그란트 및 살충제에 허용 가능한 담체를 포함하는 살충제 조성물과 이러한 조성물을 이용하여 해충을 방제하는 방법에 관한 것이다.

#### 용어의 정의

여기에서 정의된 '인테그란트(integrant)'는 바실러스 투린지엔시스 균주로서, 이 균주의 계놈내로 상동 재조합에 의해 삽입된 부수적인 DNA 단편(일반적으로, cry 유전자, 항생제 내성 유전자 및 플라스미드-관련 DNA)을 함유하는 바실러스 투린지엔시스 균주이다.

여기에서 정의된 '이종(heterologous)의 DNA 서열'은 바실러스 투린지엔시스 세포내에서 자연적으로는 나타나지 않는 DNA 서열이다.

여기에서 정의된 '계놈'은 바실러스 투린지엔시스 세포내에 있는 염색체 DNA 및 플라스미드 DNA 모두를 의미한다.

여기에서 정의된 '모균주(parental strain)'는 바실러스 투린지엔시스 of the 델타-엔도톡신을 암호화하는 이종의 DNA 서열의 출처가 되는 균주이다.

여기에서 정의된 '더욱 강력한 살충 활성'이란 해충을 죽이거나 그 성장을 저해함으로써, 모균주에 비해 해충에 대한 살충 활성이 1.25배 이상이 되는 것을 의미한다. 바람직한 양태에서는, 인테그란트의 살충 활성이 바실러스 투린지엔시스 of the 모균주에 비해 약 1.5배 내지 10배가 된다.

여기에서 정의된 '더 많은 양'이란 인테그란트가 모균주에 비해 1.25배 이상의 델타-엔도톡신 결정을 생산해 내는 것을 의미한다.

여기에서 정의된 '더 큰 결정의 크기'란 인테그란트의 결정의 가장 큰 면이 모균주의 결정의 표면적 또는 용적에 비해 1.2배 이상이 되는 것을 의미한다.

#### 도면의 간단한 설명

도 1에서는 플라스미드 pDN3000의 지도를 보여준다.

도 2에서는 플라스미드 pE194<sup>ts</sup>의 지도를 보여준다.

도 3에서는 플라스미드 pPL1975의 지도를 보여준다.

도 4에서는 플라스미드 pET235의 지도를 보여준다.

도 5에서는 플라스미드 pCP115의 지도를 보여준다.

### 발명의 상세한 설명

인테그란트의 수득 방법

'두 개의 플라스미드' 통합 시스템에 의해 본 발명의 인테그란트를 수득할 수 있다. 이 시스템은 복제 시발점 및 플라스미드 복제를 위해 필요로 하는 인자(예를 들면, 트랜스로 작용하는 온도-민감성 복제 단백질)를 하나 이상 암호화하는 기능성 유전자를 하나 이상 포함하는 제 1 플라스미드 또는 보조 플라스미드와 보조 플라스미드 없이는 복제가 불가능한 제 2 벡터 또는 통합 플라스미드에 의존한다. 본 발명의 통합 플라스미드는 (i) cry 유전자, (ii) 숙주 계능(예를 들면, 16S rRNA 유전자, 포스포리파아제 C 유전자 또는 cry 유전자 자체)과의 상동 부위 및 (iii) 선별 마커를 포함한다. 제 1 플라스미드가 선별 마커(예를 들면, 보조 플라스미드에 의해 암호화되는 것과는 상이한 항생제 내성 마커)를 암호화하는 DNA 서열을 포함할 수도 있다. 보조 플라스미드는 통합 플라스미드보다 먼저, 또는 이와 동시에 첨가할 수 있다.

구체적인 양태에서는, 보조 플라스미드를 전기 천공(electroporation)에 의해 목적하는 숙주내로 도입한다. 이러한 숙주로는 바실러스 투린지엔시스 아종(subsp.) 쿠르스타키(kurstaki), 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이(aizawai), 바실러스 투린지엔시스 아종 갈레리아에(galleriae), 바실러스 투린지엔시스 아종 엔토모시더스(entomocidus), 바실러스 투린지엔시스 아종 테네브리오니스(tenebrionis), 바실러스 투린지엔시스 아종 투린지엔시스(thuringiensis), 바실러스 투린지엔시스 아종 알레스티(alesti), 바실러스 투린지엔시스 아종 캐나다엔시스(canadiensis), 바실러스 투린지엔시스 아종 담스타디엔시스(darmstadiensis), 바실러스 투린지엔시스 아종 덴드롤리머스(dendrolimus), 바실러스 투린지엔시스 아종 피니티머스(fininitus), 바실러스 투린지엔시스 아종 케니아에(kenyae), 바실러스 투린지엔시스 아종 모리소니(morrisoni), 바실러스 투린지엔시스 아종 서브톡시커스(subtoxicus), 바실러스 투린지엔시스 아종 투마노피(toumanoffi), 바실러스 투린지엔시스 아종 투마노피(toumanoffi), 바실러스 투린지엔시스 아종 폰디케리엔시스(pondicheriensis), 바실러스 투린지엔시스 아종 쉐도지엔시스(shandongiensis), 바실러스 투린지엔시스 아종 소토(sotto), 바실러스 투린지엔시스 아종 나이지리아에(nigeriae), 바실러스 투린지엔시스 아종 윤나벤시스(yunnanensis), 바실러스 투린지엔시스 아종 다코타(dakota), 바실러스 투린지엔시스 아종 인디아나(indiana), 바실러스 투린지엔시스 아종 토호쿠엔시스(tohokuensis), 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠마모토엔시스(kumamotoensis), 바실러스 투린지엔시스 아종 토키지엔시스(tochigiensis), 바실러스 투린지엔시스 아종 톰소니(thompsoni), 바실러스 투린지엔시스 아종 우하벤시스(wuhanensis), 바실러스 투린지엔시스 아종 큐슈엔시스(kyushuensis), 바실러스 투린지엔시스 아종 오스트리아에(ostrinae), 바실러스 투린지엔시스 아종 톨워티(tolworthi), 바실러스 투린지엔시스 아종 파키스탄(pakistani), 바실러스 투린지엔시스 아종 자포넨시스(japonensis), 바실러스 투린지엔시스 아종 콜메리(colmeri), 바실러스 투린지엔시스 아종 폰디케리엔시스(pondicheriensis), 바실러스 투린지엔시스 아종 쉐동지엔시스(shandongiensis), 바실러스 투린지엔시스 아종 네올레오넨시스(neoleonensis), 바실러스 투린지엔시스 아종 코레아넨시스(coreanensis), 바실러스 투린지엔시스 아종 실로(silo), 바실러스 투린지엔시스 아종 멕사카넨시스(mexicanensis) 및 바실러스 투린지엔시스 아종 이스라엘렌시스(israelensis)가 포함되나, 이에 한정되는 것은 아니다. 그리고 나서, 선별제(예를 들면, 에리트로마이신 같은 항생제)를 첨가하여 온도-민감성 Rep 단백질이 적절히 기능을 발휘할 수 있는 온도(예를 들면, 30°C)에서 유지시킨다. 이 때, 기능성 복제 단백질(예를 들면, Rep 단백질)이 없는 통합 플라스미드를 동일한 숙주 균주에 도입시킨 후, 선별제(예를 들면, 클로르암페니콜)를 이용한 선별에 의해 유지시킨다. 통합 플라스미드는 보조 플라스미드 없이는 존재할 수가 없기 때문에, 클로르암페니콜만을 사용한 선별로도 두 플라스미드를 유지시키기에 충분하다. 고온(예를 들면, 37°C)에서 성장시키는 경우, 보조 플라스미드는 복제가 불가능하다. 보조 플라스미드가 존재하는 않는 경우, 클로르암페니콜 내성 유전자를 암호화하는 통합 플라스미드 또한 복제가 불가능하다. 따라서, 숙주 세포가 클로르암페니콜에 대한 내성을 유지할 수 있는 유일한 방법은 캠퐵 재조합 이벤트(Campbell recombination event)에 의해 통합 플라스미드를 바실러스 투린지엔시스 계능과의 상동 부위에 통합시키는 것이다. 그 결과, 이 DNA가 숙주 균주의 계능내로 통합된다. 구체적 양태에서는, 숙주 균주가 cry-균주이다. 가장 구체적 양태에서는, 숙주 균주가 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 균주이다.

델타-엔도톡신을 암호화하는 DNA 서열은 cryI, cryII, cryIII, cryIV, cryV 또는 cryVI 유전자를 포함하는 그룹중에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 한 양태에서는, 델타-엔도톡신을 암호화하는 DNA 서열이 cryIC 유전자를 포함한다. cryIC 유전자는 레피토텀라 해충에 대해 특이적인 델타-엔도톡신을 암호화한다. cryIC 유전자를 포함하는 DNA 서열은 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이의 한 균주로부터 수득할 수 있다. 가장 구체적 양태에서는, cryIC DNA 서열이 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 균주 EMCC0087로부터 수득된다.

플라스미드는 관련 기술 분야에서 공지된 공정(예를 들면, 전기 천공, 세포벽 제거, 형질 도입, 화학적 형질 전환 및 재생산)에 의해 숙주인 바실러스 투린지엔시스 균주내로 도입될 수 있다[Macaluso 및 Mettus, 1991, J.Bacteriol. 173:1353-1356; Crawford et al., 1987, J.Bacteriol. 169:5423-5428; 및 Battisti et al., 1985, J.Bacteriol. 162:543-550]. 적당한 온도(예를 들면, 37°C 또는 그 이상) 및 항생제 압력하에서의 동시 성장을 통해, 숙주 세포 계능의 상동 부위와의 재조합에 의해 플라스미드가 숙주 세포 계능내로 통합된 것을 선별할 수 있다. 계능내에 통합된 DNA 작제물(construct)을 보유하는 세포를 선별 마커에 대한 선별제의 양을 증가시키면서 배지(예를 들면, 항생제를 포함하는 배지)에서 배양함으로써, 선별 마커 및 cry 유전자를 증폭시킬 수 있다(Albertini 및 Galizzi, 1985, J.Bacteriol. 162:1203-1211).

바람직한 양태에서는, 델타-엔도톡신을 양호화하는 DNA가 인테그란트내에서 증폭되는 것이다. 구체적으로는, 선별 마커에 대한 선별제를 많은 양 포함하는 배지로 인테그란트를 옮김으로써 이러한 증폭이 이루어진다. 이러한 단계는 선별 마커에 대한 선별제의 양을 증가시키면서, 수 회 반복될 수 있다.

본 발명의 인테그란트는 관련 기술 분야에서 공지되어 있는 배지 및 발효 기술을 이용하여 배양할 수 있다[참조: Rogoff et al., 1969, J. Invertebrate Path. 14:122-129; Dulmage et al., 1971, J. Invertebrate Path. 18:353-358; Dulmage et al., in Microbial Control of Pests and Plant Diseases, H.D. Burges(ed.), Academic Press, New York, 1980]. 발효 사이클이 완료되자마자, 관련 기술 분야에서 잘 알려져 있는 방법(예를 들면, 원심 분리)에 의해 발효액으로부터 바실러스 투린지엔시스 델타-엔도톡신 결정 및 포자를 수득할 수 있다.

본 발명의 인테그란트 균주에 의해 생성되는 포자 또는 델타-엔도톡신의 정제는 초여과, 분별 추출, 밀도 구배 원심 분리, 크로마토그래피 이거나 단백질 및/또는 입자의 정제에 사용되는 다른 기술들을 포함하는 관련 기술 분야에 공지되어 있는 다양한 공정에 의해 이루어질 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

각종의 해충에 대한 본 발명의 인테그란트 균주의 델타-엔도톡신 결정 또는 포자의 활성에 대해서는 관련 기술 분야에 공지되어 있는 공정(예를 들면, 인공 식품 결합, 인공 식품 증복, 잎 착색, 잎 침수, 잎 분무 및 수성 분석)을 이용하여 생물학적으로 분석이 가능하다.

#### 조성물

본 발명의 인테그란트 바실러스 투린지엔시스 균주, 델타-엔도톡신 결정 및/또는 포자를 살충제 조성물로 제형화할 수 있다. 즉, 살충제 조성물은, 예를 들면 현탁액, 분산액, 수성 유탁액, 살포 분말, 분산 분말, 유탁 농축제, 에어로졸 또는 마이크로- 내지 매크로-캡슐 과립이거나 바실러스 투린지엔시스의 방출을 제어할 수 있다면 어느 형태로나 제형화 할 수 있다. 이러한 조성물은 계면 활성제(예를 들면, 분산제, 유탁제 또는 습윤제), 불활성 담체 또는 표적으로하는 특정 해충을 처리하고 이에 투여하기 용이하게 하기 위한 다른 요소들을 첨가함으로써 수득할 수 있다.

적합한 계면 활성제로는 긴 지방산 사슬의 금속 카복실레이트 같은 카복실레이트; N-아실사르코시네이트; 지방 알콜 에톡실레이트를 갖는 인산의 모노- 또는 디-에스테르이거나 이러한 에스테르의 염; 도데실 설페이트 나트륨, 옥타데실 설페이트 나트륨 또는 세틸 설페이트 나트륨 같은 지방 알콜 설페이트; 에톡시화된 지방 알콜 설페이트; 에톡시화된 알킬페놀 설페이트; 리그닌 설포네이트; 페트롤륨 설포네이트; 알킬-벤젠 설포네이트 또는 저급 알킬나프탈렌 설포네이트(예를 들면, 부틸-나프탈렌 설포네이트) 같은 알킬 아릴 설포네이트; 염 또는 설포나된 나프탈렌-포름알데히드 축합물 또는 폴리아크릴산의 염; 설포나된 페놀-포름알데히드 축합물의 염; 또는 아마이드 설포네이트 같은 더 복잡한 설포네이트(예를 들면, 올레산 및 N-메틸 타우린의 설포나된 축합 생성물 또는 설포네이트 나트륨이거나 디옥틸 석시네이트 같은 디알킬 설포석시네이트) 같은 음이온성 화합물이 포함된다. 비이온성 화합물로는 지방산 에스테르, 지방 알콜, 지방산 아마이드 또는 지방-알킬- 이거나 알케닐-치환된 페놀과 에틸렌 산화물 및/또는 프로필렌 산화물의 축합물, 소르비탄 지방산 에스테르 같은 폴리하이드릭 알콜 에테르의 지방 에스테르, 이러한 에스테르와 에틸렌 산화물의 축합물(예를 들면, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르), 에틸렌 산화물 및 프로필렌 산화물의 블록 코폴리머(block copolymer), 2,4,7,9-테트라에틸-5-데신-4,7-디올 같은 아세틸렌 글리콜 또는 에톡시화된 아세틸렌 글리콜이 포함된다. 양이온 계면 활성제로는 아세테이트, 나프테네이트 또는 올레에이트로서 알리파틱 모노아민, 디아민 또는 폴리아민; 폴리옥시에틸렌 알킬아민의 아민 산화물 같은 산소-함유 아민; 카르복시산과 디아민 또는 폴리아민의 축합 반응에 의해 제조되는 아마이드-결합된 아민; 또는 4차 암모늄 염이 포함된다.

불활성 물질의 예로는 피롤리리케이트, 카보네이트, 설페이트, 포스페이트 같은 무기 광물; 당, 전분 또는 사이클로덱스트린 같은 유기물; 또는 분말 옥수수 슛대, 쌀겨, 호두 껍질, 콘밀(cornmeal), 펠렛화된 곡물 및 셀룰로오스 섬유질 같은 식물성 물질이 포함된다.

본 발명의 조성물은 직접 투여하기에 적합한 형태이거나 투여하기 이전에 적당량의 물이나 기타 희석제로 희석해야만 하는 농축제 또는 1차 조성물일 수가 있다. 살충제의 농도는 특정 제형이 갖는 성질, 특히 농축제인지 직접 사용되는 것인지에 따라 달라진다. 조성물은 0.1% 내지 99%, 바람직하게는 0.1% 내지 95%의 본 발명의 인테그란트, 돌연변이체 또는 변이체, 1% 내지 98%의 고체 또는 액체 불활성 담체 및 0% 내지 50%, 바람직하게는 0.1% 내지 50%의 계면 활성제를 함유한다. 이 조성물의 투여량은 건조 형태의 경우에는 1 에이커당 약 0.01 lb 내지 5.0 lb, 액체 형태의 경우에는 1 에이커당 약 0.01 pt 내지 10 pts 이다.

다른 양태에서는, 표적으로하는 해충이 있는 환경에 세포를 투여하는 경우, 제형화하기 이전에 본 발명의 인테그란트를 처리하여 살충 활성을 지속시킬 수 있다. 이러한 처리로 인해 조성물의 성질에 악영향을 끼치지만 않는다면, 화학적 및/또는 물리적인 방법으로 처리할 수 있다. 화학적 시약으로는 할로겐화제; 포름알데히드 및 글루타르알데히드 같은 알데히드; 제피란 클로라이드 같은 항-감염제; 이소프로프라놀 또는 에탄올 같은 알콜; Bouin의 고정제 및 Heilly의 고정제 같은 조직 고정제(참조: 예를 들면, Humason, Animal Tissue Techniques, W.H. Freeman and Co., 1967); 방부제; UV 햇빛 차단제; 분무 보조제(휴벡탄트); 항-거품제; 및 스티커가 포함되나, 이에 한정되는 것은 아니다.

본 발명의 조성물은 식물에 해충이 나타나기 시작하는 시점 또는 해충이 나타나기 이전에 예방 조치로서 예를 들면, 분무 내지 살포함으로써 직접 식물에 투여할 수 있다. 본 발명의 범위내에서 보호되는 식물로는 하기의 것들이 포함되나, 이에 한정되는 것은 아니다: 곡물(밀, 보리, 호밀, 귀리, 쌀, 수수 및 이와 관련된 작물), 무(사탕무 및 사료 무), 핵과, 이과 및 연과(사과, 배, 플럼, 복숭아, 아몬드, 체리, 딸기, 나무딸기 및 검은 딸기, 토마토), 콩과 식물(장두, 편두, 완두, 콩), 오일 식물(레일, 겨자, 양귀비, 올리브, 해바라기, 코코넛, 피마자, 코코아 장두, 땅콩), 오이과 식물(오이, 호박, 멜론), 섬유성 식물(목화, 아마, 대마, 황마), 감귤류 열매(오렌지, 레몬, 그레이프 후르트, 맨드린), 야채(시금치, 양상추, 아스파라거스, 배추 및 기타 브라스카, 당근, 양파, 감자, 파프리카), 녹나무(아보카도, 계피, 장뇌), 낙엽성 나무 및 침엽수(보리수나무, 주목나무, 참나무, 오리나무, 포플라, 자작나무, 전나무, 낙엽

송, 소나무) 또는 옥수수, 담배, 너트, 커피, 사탕수수, 차, 포도 흙, 바나나, 천연 고무나무 및 관상용 식물. 바람직한 투여 방법은 앞 분무에 의한 것이다. 일반적으로, 식물의 초기 성장기 때에 해충을 방제하는 것이 중요한 데, 이것은 이 시기에 식물이 입게 되는 피해가 가장 크기 때문이다. 분무 또는 살포하는 경우, 필요하다면 다른 살충제(예를 들면, 살균제, 풀 제초제 또는 비료)도 함께 분무 또는 살포하는 것이 간편하다. 바람직한 양태에서는, 본 발명의 조성물을 식물에 직접 투여한다.

본 발명의 조성물은 레피토펜테라(Lepidoptera) 목에 속하는 해충에 효과적으로 작용할 수 있는 데, 예를 들면 아크로이아 그리셀라(*Achroia grisella*), 아클레리스 글로베라나(*Acleris gloverana*), 아클레리스 바리아나(*Acleris variana*), 아독소파이에스 오라나(*Adoxophyes orana*), 아그로티스 입실론(*Agrotis ipsilon*), 알라바마 아르길라세아(*Alabama argillacea*), 알소필라 포메타리아(*Alsophila pomataria*), 아미엘로이스 트랜시텔라(*Amyelois transitella*), 아나가스타 쿠에니엘라(*Anagasta kuehniella*), 아나르시아 리네아텔라(*Anarsia lineatella*), 아니소타 세나토리아(*Anisota senatoria*), 안테라에아 페르나이(*Antheraea pernyi*), 안티카르시아 겐마탈리스(*Anticarsia gemmatalis*), 아르킵스 종(*Archips* sp.), 아르기로타에니아 종(*Argyrotaenia* sp.), 아테티스 민다라(*Athetis mindara*), bombyx 모리(*Bombyx mori*), 버컬라트릭스 투르베리엘라(*Bucculatrix thurberii*), 카드라 카우텔라(*Cadra cautella*), 코리스토뉴라 종(*Choristoneura* sp.), 코킬리스 호스페스(*Cochylis hospes*), 콜리아스 유리듬(*Colias eurytheme*), 코르키라 세팔로니카(*Coryra cephalonica*), 시디아 라티페레아누스(*Cydia latiferreanus*), 시디아 포모넬라(*Cydia pomonella*), 다타나 인테게리마(*Datana integerrima*), 덴드롤리머스 시베리커스(*Dendrolimus sibericus*), 데스미아 푸네랄리스(*Desmia funeralis*), 디아파니아 하이알리나타(*Diaphania hyalinata*), 디아파니아 니티달리스(*Diaphania nitidalis*), 디아트래에아 그란디오셀라(*Diatraea grandiosella*), 디아트래에아 사카랄리스(*Diatraea saccharalis*), 엔노모스 서브시그나리아(*Ennomos subsignaria*), 에오유마 로프티니(*Eoreuma loftini*), 에페스티아 엘루텔라(*Epeestia elutella*), 에란니스 텔리아리아(*Erannis tiliaria*), 에스티그메네 아크레아(*Estigmene acrea*), 율리아 살루브리콜라(*Eulia salubricola*), 유포코엘리아 엠비그엘라(*Eupoecilia ambiguella*), 유포에실리아 엠비그엘라(*Eupoecilia ambiguella*), 유프록티스 크리소로에아(*Euproctis chrysorrhoea*), 육소아 메소리아(*Euxoa messoria*), 갈레리아 멜로넬라(*Galleria mellonella*), 그라폴리타 몰레스타(*Grapholita molesta*), 해리시나 아메리카나(*Harrisina americana*), 헬리코베르파 서브플렉사(*Helicoverpa subflexa*), 헬리코베르파 제아(*Helicoverpa zea*), 헬리오티스 비레센스(*Heliothis virescens*), 헤밀류카 올리비아에(*Hemileuca oliviae*), 호모에오소마 엘렉텔럼(*Homoeosoma electellum*), 하이팬트리아 큐네아(*Hyphantria cunea*), 케이페리아 리코페르시셀라(*Keiferia lycopersicella*), 램디나 피셀라리아 피셀라리아(*Lambdina fiscellaria fiscellaria*), 램디나 피셀라리아 루구브로사(*Lambdina fiscellaria lugubrosa*), 류코마 살리시스(*Leucoma salicis*), 로베시아 보트라나(*Lobesia botrana*), 록소스테게 스틱티칼리스(*Loxostege sticticalis*), 라이만트리아 디스파르(*Lymantria dispar*), 마칼라 티르시살리스(*Macalla thyrsisalis*), 말라코소마 종(*Malacosoma* sp.), 마메스트라 브라시카에(*Mamestra brassicae*), 마메스트라 컨피구라타(*Mamestra configurata*), 만두카 퀸퀘마콜라타(*Manduca quinquemaculata*), 만두카 섹스타(*Manduca sexta*), 마루카 테스툴라리스(*Maruca testulalis*), 멜란크라 픽타(*Melanchra picta*), 오페로프테라 브루마타(*Operophtera brumata*), 오르기아 종(*Orygia* sp.), 오스트리니아 누빌라리스(*Ostrinia nubilalis*), 팔레아크리타 베르나타(*Palaearctia vernata*), 파필리오 크레스폰테스(*Papilio cresphontes*), 펙티노포라 고시피엘라(*Pectinophora gossypiella*), 프리가니디아 캘리포르니카(*Phryganidia californica*), 필로노릭테르 블란카르델라(*Phyllonorycter blancardella*), 피에리스 나피(*Pieris napi*), 피에리스 라파에(*Pieris rapae*), 플라티페나 스카브라(*Plathypena scabra*), 플라티노타 플로우엔다나(*Platynota flouendana*), 플라티노타 설타나(*Platynota sulfana*), 플라티틸리아 카르두이닥틸라(*Platyptilia carduidactyla*), 플로디아 인터퓌크텔라(*Plodia interpunctella*), 플루텔라 크실로스텔라(*Plutella xylostella*), 폰티아 프로토디스(*Pontia protodice*), 슈달레티아 유니퓌크타(*Pseudaletia unipuncta*), 슈도플러시아 인클루덴스(*Pseudoplua includens*), 사볼로데스 아에그로타타(*Sabulodes aegrotata*), 슈주라 콘신나(*Schizura concinna*), 시모트로가 세레알렐라(*Sitotroga cerealella*), 스피로노타 오셀라나(*Spilota ocellana*), 스포토펜테라 종(*Spodoptera* sp.), 신그라파 팔시페라(*Syngrapha falcifera*), 타우른스토포에아 피티오캄파(*Thaurnstopoea pityocampa*), 티네올라 비셀리엘라(*Tineola bisselliella*), 트리코플러시아 니(*Trichoplusia ni*), 우데아 루비갈리스(*Udea rubigalis*), 크실로미게스 큐리알리스(*Xylomyges curialis*), 이포노뮤타 파델라(*Yponomeuta padella*); 본 발명의 조성물은 콜레옵테라(Coleoptera) 목에 속하는 해충에 대해서도 효과적일 수 있다. 그 예로는, 렙티노타르사 종(*Leptinotarsa* sp.), 아칸토셀리데스 옴벡터스(*Acanthoscelides obtectus*), 칼로스브러커스 키넨시스(*Callosobruchus chinensis*), 에펠라크나 바티베스티스(*Epilachna varivestis*), 피랄타 루테올라(*Pyrrhalla luteola*), 실라스 포르미카리우스 엘레간툴러스(*Cylas formicarius elegantulus*), 리스트로노투스 오레고넨시스(*Listronotus oregonensis*), 시토틸러스 종(*Sitophilus* sp.), 사이클로세팔라 보레알리스(*Cyclocephala borealis*), 사이클로세팔라 임마쿨라타(*Cyclocephala immaculata*), 매크로닥틸러스 서브스피노서스(*Macrodactylus subspinosus*), 포필리아 자포니카(*Popillia japonica*), 리조트로거스 마잘리스(*Rhizotrogus majalis*), 알피토비우스 디아페리너스(*Alphitobius diaperinus*), 팔로러스 랫체부르기(*Palorus ratzeburgi*), 테네브리오 몰리토르(*Tenebrio molitor*), 테네브리오 옴스커러스(*Tenebrio obscurus*), 트리볼리움 카스타눔(*Tribolium castaneum*), 트리볼리움 콘퓨섬(*Tribolium confusum*), 트리볼리움 디스트럭터(*Tribolium destructor*); 디프테라(Diptera), 예를 들면 아에데스 종(*Aedes* sp.), 안데스 비타터스(*Andes vittatus*), 아나스트레파 루덴스(*Anastrepha ludens*), 아나스트레파 서스펜사(*Anastrepha suspensa*), 아노펠레스 바르베리(*Anopheles barberi*), 아노펠레스 콰드림아쿨라투스(*Anopheles quadrimaculatus*), 아르미게레스 서브알바터스(*Armigeres subalbatus*), 캘리포라 스티기안(*Calliphora stygian*), 캘리포라 비시나(*Calliphora vicina*), 세라티티스 캐피타타(*Ceratitis capitata*), 키로노머스 텐탄스(*Chironomus tentans*), 크리소미아 루피파시에스(*Chrysomya rufifacies*), 코클리오마이아 마셀라리아(*Cochliomyia macellaria*), 쿨렉스 종(*Culex* sp.), 쿨리세타 이노르나타(*Culiseta inornata*), 다크스 올레아에(*Dacus oleae*), 델리아 안티쿠아(*Delia antiqua*), 델리아 플라투라(*Delia platura*), 델리아 라디쿰(*Delia radicum*), 드로스필라 멜라노가스테르(*Drosophila melanogaster*), 유페오데스 코롤라에(*Eupeodes corollae*), 글로시나 오스테니(*Glossina austeni*), 글로시나 브레비팔피스(*Glossina brevipalpis*), 글로시나 퍼시페스(*Glossina fuscipes*), 글로시나 모르시탄스 센트랄리스(*Glossina morsitans centralis*), 글로시나 모르시탄스 모르시탄스(*Glossina morsitans morsitans*), 글로시나 모르시탄스 서브모르시탄스(*Glossina morsitans submorsitans*), 글로시

나 팔리디페스(*Glossina pallidipes*), 글로시나 팔팔리스 갠비엔시스(*Glossina palpalis gambiensis*), 글로시나 팔팔리스 팔팔리스(*Glossina palpalis palpalis*), 글로시나 타키노이데스(*Glossina tachinoides*), 헤마고거스 에퀴너스(*Haemagogus equinus*), 헤마토비아 이리탄스(*Haematobia irritans*), 하이포더마 보비스(*Hypoderma bovis*), 하이포더마 리네아툼(*Hypoderma lineatum*), 류코피스 니나에(*Leucopis ninae*), 루실리아 커프리나(*Lucilia cuprina*), 루실리아 세리카타(*Lucilia sericata*), 렛초마이아 롱글파이피스(*Lutzomyia longipalpis*), 렛초마이아 쉐노니(*Lutzomyia shannoni*), 리코리엘라 말리(*Lycoriella mali*), 마이에티올라 디스트럭터(*Mayetiola destructor*), 머스카 오툼날리스(*Musca autumnalis*), 머스카 도메스티카(*Musca domestica*), 네오벨리에리아 종(*Neobellieria* sp.), 네프로토마 서터랄리스(*Nephrotoma suturalis*), 오피라 아에네센스(*Ophyra aenescens*), 파에닉라 세리카타(*Phaenicia sericata*), 플레보토머스 종(*Phlebotomus* sp.), 포르미아 레지나(*Phormia regina*), 사베테스 시아네우스(*Sabethes cyaneus*), 사르코파가 불라타(*Sarcophaga bullata*), 스키타파가 스테르코라리아(*Scatophaga stercoraria*), 스토막시스 칼스트란스(*Stomoxys calcitrans*), 톡소린키테스 앙보이넨시스(*Toxorhynchites amboinensis*), 트립테로이데스 밤버사(*Trypteroides bambusa*); 아카리(*Acar*i), 예를 들면 올리고니커스 프라텐시스(*Oligonychus pratensis*), 파노니커스 얼미(*Panonychus ulmi*), 테트라니커스 우르티카에(*Tetranychus urticae*); 히메노테라(*Hymenoptera*), 예를 들면 이리도미르멕스 휴밀리스(*Iridomyrmex humilis*), 솔레놉시스 인빅타(*Solenopsis invicta*); 이습테라(*Isoptera*), 예를 들면 레티쿨리테르메스 헤스페러스(*Reticulitermes hesperus*), 레티쿨리테르메스 플라비페스(*Reticulitermes flavipes*), 콤토테르메스 포르모사너스(*Coptotermes formosanus*), 주테르몹시스 앤거스티콜리스(*Zootermopsis angusticollis*), 네오테르메스 코넥서스(*Neotermes connexus*), 인시시테르메스 미노르(*Incisitermes minor*), 인시시테르메스 이미그란스(*Incisitermes immigrans*); 시포넵테라(*Siphonaptera*), 예를 들면 세라토틸러스 갈리나에(*Ceratophyllus gallinae*), 세라토틸러스 니게르(*Ceratophyllus niger*), 노습실러스 파시아터스(*Nosopsyllus fasciatus*), 렘톱실라 세그니스(*Leptopsylla segnis*), 크테노세팔리데스 캐니스(*Ctenocephalides canis*), 크테노세팔리데스 펠리스(*Ctenocephalides felis*), 에키크노파가 갈리나세아(*Echinophaga gallinacea*), 풀렉스 이리탄스(*Pulex irritans*), 크세놉실라 케오피스(*Xenopsylla cheopis*), 크세놉실라 벅사빌리스(*Xenopsylla vexabilis*), 퉁가 페네트란스(*Tunga penetrans*); 및 틸렌키다(*Tylenchida*), 예를 들면 멜로디도긴 인코그니타(*Meloidogyne incognita*), 프라틸렌커스 페네트란스(*Pratylenchus penetrans*).

하기 실시예는 본 발명을 설명하기 위해 제시된 것으로서, 이를 제한하기 위한 것은 아니다.

## 실시예

### 실시예 1

#### 박테리아 균주 및 플라스미드

바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 EMCC0087은 NRRL에 기탁되어 있고, 기탁번호는 NRRL B-21147이다. 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 407 및 409(cry-HD-1)은 오하이오 주립 대학교에 있는 바실러스 유전 저장 센터로부터 입수한 것이다. 에셰리키아 콜라이 GM48 dam-dcm-은 문헌에 개시되어 있다(참조: Yanish-Perron et al., 1985, Gene 33:103-119). 이.콜라이 GM272(Raleigh et al., 1988, Nucl. Acids Res. 16:1563-1575; dam-dcm-hsd-)은 뉴잉글랜드 생물 실험실로부터 입수한 것이다. 플라스미드 pBR322는 시판되고 있다. 플라스미드 pM11101D는 문헌에 개시되어 있다(참조: Youngman et al., 1984, Plasmid 12:1-9). 플라스미드 pE194<sup>ts</sup>는 도 2에 나타나 있고, 문헌에도 개시되어 있다(참조: Villafane et al., 1987, J. Bact. 169:4822-4829). 플라스미드 pCP115는 문헌(참조: Price 및 Doi, 1985, Mol. Gen. Genet. 201:88-95)에 개시되어 있고, 도 5에 나타나 있다.

플라스미드 pPL1975는 도 3에 나타나 있다. 하기의 공정을 사용하여 pPL1975를 작제한다. 플라스미드 pDN3000은 pUC19(Yanisch-Perron et al., 1985, Gene 33:103-119)을 EcoRI로 절단한 후, 하기의 서열 1 및 서열 2의 올리고뉴클레오티드 서열(DNA 자동 합성기상에서 Beaucage 및 Caruthers, 1981, Tetrahedron Lett. 22:1859-1869에서 설명하고 있는 포스포아미다이트 방법에 의해 제조됨)을 선형화된 pUC19에 삽입한 후, 결합(ligation)시킴으로써 작제할 수 있다.

### 서열 1

5'-AATTGATCAAGCTTTAAATGCATGCTAGCAACGCGGCCCAACCTCGAGATCTCATG-3'

### 서열 2

3'-CTAGTTCGAAATTTACGTACGATCGTTGCGCCGCGGTTGGAGCTCTAGAGTACTTAA-5'

이러한 결합 혼합물을 사용하여 반응력이 있는(competent) 이.콜라이 SJ6 세포를 형질 전환시킨 후, 이러한 형질 전환체를 암피실린 100 $\mu$ g/ml를 함유한 LB 플레이트 상에서 선별한다. pDN3000내에 삽입된 링커(linker)의 방향은 도 1에서의 제한 부위의 방향과 같다.

플라스미드 pPL1975는 pE195<sup>ts</sup>의 1 부터 1585 위치까지의 DNA를 함유하는 MboI 제한 단편(restriction fragment)을 pDN3000의 BglI 부위에 삽입시킴으로써 작제할 수 있다. 그리고 나서, 이러한 결합 혼합물을 사용하여 반응력이 있는 이.콜라이 SJ6 세포를 형질 전환시킨 후, 이러한 형질 전환체를 암피실린 100 $\mu$ g/ml를 함유한 LB 플레이트 상에서 선별한다. 이 두 단편의 방향은 도 3에 나타난 바와 같다. 따라서, pPL1975는 기능성 이.콜라이 복제 시발점과 원형 플러스 시발점(+ori pE194<sup>ts</sup>) 및 절단된 repF 유전자(repF')를 포함하는 pE194<sup>ts</sup> DNA 단편을 함유한다(Villafane et al., 1987, J. Bact. 169:4822-4829).

### 실시예 2

#### 게놈 DNA의 제조

바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 EMCC0087의 게놈 DNA는 나사 뚜껑을 한 15×1.5cm 시험관내에 있는 LB(Luria-Bertani 발효액) 2ml에 바실러스 투린지엔시스 콜로니를 접종하여 제조한다. 교반없이 37°C에서 밤새 배양한 후, 시험관 내에 있는 내용물을 LB 250ml를 함유한 1L 플라스크로 모두 옮기고, 37°C에서 6시간 동안 300rpm으로 교반하면서 배양시킨다. 플라스크에 있는 내용물을 GSA 회전자내에서 8000rpm으로 회수하고, 이렇게 해서 생성된 펠렛을 25ml 코렉스 원심분리 시험관 중에 있는 TE 완충액(10mM Tris, pH7.9, 1mM EDTA) 20ml 내에서 재현탁시킨다. 고체 라이소자임(lysozyme)을 대략 20mg 첨가한 후, 시험관 내용물을 부드럽게 역위시키면서 혼합한다. 37°C에서 10분간 배양한 후, 0.5M EDTA 1ml, 2M Tris 0.5ml, pH7.9에서 첨가한다. 시험관 내용물을 부드럽게 역위시켜서 한번 더 혼합한 후, 15분간 더 배양한다. 그리고 나서, 200μl의 RNase A(10mg/ml)를 첨가한 후, 37°C에서 15분간 배양하고, 10% SDS 2.3ml를 첨가한다. 프로티네이즈 K(2mg)를 첨가한 후, 시험관 내용물을 50°C에서 2시간 동안 배양하고, 코렉스 시험관 2개에 나누어 넣은 후, 페놀로 2회 이상, 페놀/클로로포름으로 2회 추출한다. 게놈 DNA는 아세트산 나트륨의 1/10 용적 및 95% 에탄올의 2.5 용적으로 침전시킨 후, TE 완충액 약 5ml중에서 재현탁시킨다.

### 실시예 3

#### 플라스미드 pET235의 작제

바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 EMCC0087 DNA 단편의 크기-선별된 라이브러리는 게놈 DNA를 EcoRI으로 절단한 후, 겔 전기영동, 6kb 이상의 단편의 제거 및 전기용출에 의한 아가로스로부터의 방출에 의해 만들어진다. 이러한 단편을 pBR322의 EcoRI 부위에 결합시키고 나서 이.콜라이 균주 XL-1 Blue MRF'(stratagene Cloning Systems; Jerpseth et al.,1992,Strategies 5[3]:81)내로 형질 전환시킨 후, cryIC 유전자를 갖는 8kb의 EcoRI 단편을 예전에 이미 설명되어 있는 콜로니 블랏 혼성화(참조: Sambrook et al.,1989,Molecular Cloning,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor,NY)에 의해 클로닝하고, cryIC 유전자(Honee et al.,1988,Nucleic Acids Research 16:6240)의 뉴클레오티드 869 내지 1175에 상응하는 DNA 단편에 기능성 BamHI 부위를 만들기 위해 5' 말단에 4개의 뉴클레오티드(CGGG)를 첨가한 DNA 단편으로 프로브한다. 이러한 프로브는 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 EMCC0087 게놈 DNA를 PCR 증폭시킴으로써 제조하며, 하기 서열 3에서 보여 주고 있다.

#### 서열 3

```
5'-CGGGATCCACAGTTACAGTCTGTAGCTCAATTACCTACTTTTAAACGTTA
TGGAGAGCAGCCGAATTAGAAATCCTCATTATTTGATATATTGAATAA
TCTTACAATCTTTACGGATTGGTTTAGTGTGGACGCAATTTTTATTGG
GGAGGACATCGAGTAATATCTAGCCTTATAGGAGGTGGTAACATAACA
TCTCCTATATATGGAAGAGAGGCGAACCCAGGAGCCTCCAAGATCCTTTA
CTTTAATGGACCGGTATTTAGGACTTTATCAAATCCTACTTTACGATT
ATTACAGCAACCTTGGCC-3'
```

바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 407의 포스포리파아제 C(plc) 유전자는 BamHI 부위를 함유하는 프라이머를 사용하여 PCR 방법으로 증폭시킨다. 이 프라이머는 하기 서열 4 및 서열 5에서 보여 주고 있다. 증폭된 단편을 BamHI으로 절단한 후, pCP115의 BamHI 부위에 삽입시킨다. plc 유전자의 3'의 절반을 함유하는 EcoRI-BamHI 850bp를 PL1975의 EcoRI과 BamHI 부위 사이에 삽입시킨다. 플라스미드 pET231은 cryIC 유전자를 갖는 EcoRI 단편 8kb를 pNNB11의 EcoRI 부위에 삽입시켜서 작제한다. 플라스미드 pET235(도 1 참조)는 cat를 갖는 pM1101D의 BamHI 단편 1.5kb를 pET231의 BamHI 부위에 삽입시켜서 작제한다.

#### 서열 4

```
5'-TTGGATCCAGGGAATATTATTTATACGCTCTATAAATAT-3'
```

#### 서열 5

```
5'-TTGGATCCGAATAAAAAATCATGTGGAACCTTCATAG-3'
```

### 실시예 4

#### 플라스미드 pET235의 통합 및 증폭

제조업자들에 의해 기술된 바와 같이, 바이오-래드 유전자 펄서(Bio-Rad Gene Pulser)를 이용하여 이.콜라이 세포를 전기 천공한다. Macaluso 및 Mettus의 방법(1991,J.Bacteriol.173:1353-1356)을 이용하여 전기 천공을 하기 위해 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 409 세포를 준비한다. 반면에 이러한 공정은 달리, 유전자 펄서에 대한 전기적인 변환은 없다. 이 대신에, 세포를 0.2cm 큐벳(cuvette)에 넣은 후, 800Ω, 25μF 및 1600V(1cm 당 8000V)에서 전기 천공을 한다. 전기 천공을 위한 플라스미드 DNA는 GM48(dam-dcm-)로부터 제조되는 플라스미드 DNA에 비해 일반적으로 바실러스 투린지엔시스의 형질 전환 효율이 더 높은 이.콜라이 GM272(dam-dcm-hsd-)에서 제조된다. 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 409은 pE194<sup>ts</sup>로 형질 전환되고, 에리트로마이신 1ml 당 5μg을 함유하는 LB 플레이트 상에서 콜로니를 선별한다. 보조 플라스미드 pE194<sup>ts</sup>를 갖는 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 409은 pET235로 형질 전환시키고, 클로로암페니콜 1ml 당 10μg을 함유하는 LB 플레이트 상에서 콜로니를 선별한다. pE194<sup>ts</sup>를 보존하기 위해, 형질 전환체를 37°C에서 배양함으로써 인테그란트를 형성한다. 에리트로마이신-민감성

콜로니를 클로르암페니콜 1ml 당 30 $\mu$ g 및 60 $\mu$ g를 갖는 플레이트 상에 순차적으로 놓는다. 상기에서 설명한 바와 같이, 인테그란트 EMCC0122는 상-대조(phase-contrast) 광학 현미경으로 측정되는 결정 크기에 따라 선별한다.

#### 실시예 5

바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 4D9 cryIC 인테그란트 EMCC0122의 결정 크기의 측정

포자/결정 제제를 Zeiss Axioscope로 사진을 찍어서 결정에 대한 측정을 하고, 이 때 최종 배율 약 2000X에서 음판(negative)을 인화한다. 자를 사용하여 밀리미터 단위로 결정을 측정하고나서, 각각의 사진에서의 포자의 평균 길이에 표준화시켜서 확대된 사진에 나타나는 차이를 설명할 수 있다. 성숙한 내생 포자가 그 직경이 최대일 때를 대략 1 $\mu$ m라고 가정했을 때, 결정은 하기 표 1의 치수들을 갖는다.

그 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

#### [표 1]

cryIC 인테그란트 EMCC0122의 결정의 치수

표본	결정의 길이( $\mu$ m)	변동 범위( $\mu$ m)	결정의 폭( $\mu$ m)	변동 범위( $\mu$ m)	결정의 용적( $\mu$ m <sup>3</sup> )	측정된 수
EMCC0122	1.0 $\pm$ 0.17	0.74 $\pm$ 1.4	0.60 $\pm$ 0.083	0.45-0.76	0.12 $\pm$ 0.055	20

#### 실시예 6

바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 4D9 cryIC 인테그란트 EMCC0122의 배양

-80 $^{\circ}$ C에서 40% 글리세롤 스탁(stock)으로 유지된 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 4D9 cryIC 인테그란트 EMCC0122의 서브컬처를 사용하여 하기의 조성을 갖는 50ml의 P/Y 배지를 함유하는 250ml의 차단된 진탕 플라스크를 접종한다.

시트르산 1.0g/l

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.3g/l

CaCl<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O 0.33g/l

MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.67g/l

말트린-100 20g/l

효모 추출액 10g/l

펩톤 15.3g/l

추적 금속 0.3ml/l

배지의 pH는 10N NaOH를 사용하여 7.0으로 맞춘다.

접종 후, 250rpm으로 72시간 동안 회전시키는 회전 진탕기상에서 진탕 플라스크를 30 $^{\circ}$ C에서 접종한다.

배양물 1ml 당 소르베이트칼륨 10mg, 벤조에이트나트륨 3mg 및 메틸파라벤 0.5mg을 첨가하여 전체 배양물을 안정화시키고, 30% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>를 사용하여 pH4.5로 조정된 후, 5 $^{\circ}$ C에서 저장한다.

#### 실시예 7

바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 4D9 cryIC 인테그란트 EMCC0122에서 유래한 델타-엔도톡신 결정의 스포도테라 엑시구아(Spodoptera exigua)에 대한 생물학적 분석

바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 cryIC 인테그란트 EMCC0122의 역가(potency)는 3번째 영충(instar)단계에 있는 스포도테라 엑시구아 유충을 이용하여 식이 함유 생물학적 분석을 통해 측정한다.

실시예 6에서의 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 인테그란트 EMCC0122 발효액(broth) 전체를 단계적으로 희석시켜서 효능의 변동 범위를 결정한다. 기준이 되는, 실시예 6에 기술된 바와 같이 배양된 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 EMCC0087도 이와 똑같이 한다.

물, 한천, 당, 카세인, 밀 세균, 메틸 파라벤, 소르브산, 아마인 오일, 셀룰로스, 염 및 비타민을 포함하는 표준 인공 식이를 20 $\ell$  통에 준비한다. 이것으로 7가지의 농도가 다른 시험 물질 10 내지 12 표본을 시험하기에 충분하다. 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 인테그란트 EMCC0122 발효액 제제 전체를 단계적으로 희석하여 정제액(aliquot) 16ml를 수득한다. 각각의 정제액을 용융된 식이 184g에 첨가한다. 그리고 나서, 혼합물을 균질화시킨 후, 40개의 개별적인 웰(well)을 갖는 플라스틱 트레이(tray)에 붓는다. 각각의 식이 배치(batch)를 위해 3개의 대조 트레이를 준비한다. 식이를 식히고 고형화한 후, 3번째 영충 단계에 있는 스포도테라 엑시구아 유충 한 마리씩 각각의 웰에 첨가하고나서, 구멍이 뚫려 있는 투명 마일라(mylar) 박판으로 트레이를 덮는다. 트레이를 랙(rack)상에 올려 놓고, 28 $^{\circ}$ C 습도 65%에서 4일간 배양한다.

4일 후, 곤충의 사망률을 측정한다. 각각의 트레이를 테이블 상단에 강하게 부딪힌 후, 움직이지 않는 유충은 죽은 것으로 계산한다. % 사망률을 계산한 후, 데이터는 평행 프로빗(probbit) 분석을 통해 분석한다. LC50 수치, LC90 수치, 회귀 직선의 기울기, 변동 계수(CV) 및 스포도테라 단위에서의 역가(SU)를

측정한다. 최소한 3회 또는 3개의 역가가 각각의 표본의 평균치의 20%이내가 될 때까지 표본을 측정한다.

결과는 하기 표 2에서 보여주고 있다. EMCC0122의 역가가 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 EMCC0087의 역가의 약 2배 정도이다.

[표 2]

스포도테라 엑시구아에 대한 cryIC 인테그라트 EMCC0122의 역가

표본	LC50	LC90	기율기	CV	SU
EMCC0087EMCC0122	31272074	169228021	2.12.2	10.29.7	7501671

#### 미생물의 기탁

하기의 바실러스 투린지엔시스 균주는 미국 61604 일리노이 페오리아 1815 유니버시티 스트리트 노던 레지널 리서치 래버러토리(NRRL) 애그리컬처럴 리서치 서비스 패턴트 컬처 컬렉션에 기탁되어 있다.

균주	기탁 번호	기탁일
EMCC0087	NRRL B-21147	1993년 10월 6일
EMCC0122	NRRL B-21386	1995년 1월 19일

37 C.F.R. § 1.14 및 35 U.S.C. § 122하에서, 특허상표청장에 의해 재결된 자는 본 특허 출원중에 배양물을 입수할 수 있다는 조건하에서 상기 균주들을 기탁하였다. 기탁물은 각각의 기탁된 균주의 실질적으로 순수한 배양물이다. 외국에서 본 출원의 균주나 이의 자손이 출원된 경우, 그 외국 특허법에 따라 기탁물을 입수할 수 있다. 그러나, 기탁물을 입수할 수 있다고 해서 정부로부터 부여받은 특허권을 훼손하도록 본 발명에 대한 실시 권한을 준다는 것을 의미하는 것은 아니다.

게다가, 본 발명의 배양 기탁물은 미생물 기탁에 관한 부다페스트 조약 규정에 근거하여 보관 및 일반 공중에 제공된다. 즉, 기탁물이 오염되지 않고 생존할 수 있기 위해 필요로 하는 모든 주의를 기울이며, 기탁물 시료 분양에 대한 가장 최근에 있는 요청 후 최소한 5년간은 보관되며, 어떠한 경우라도 기탁일로부터 최소한 30년간 또는 이러한 배양물을 개시하는 특허권이 존속하는 기간동안은 보관된다. 기탁 조건 때문에 기탁 기관이 시료 분양 요청시 시료를 분양할 수 없는 경우, 기탁물을 대체해야 할 의무가 있다는 것을 기탁자는 알고 있다. 본 배양 기탁물을 개시하고 있는 발명에 대해 특허가 부여되자마자, 일반 공중이 기탁물을 입수하는 데에 관한 모든 제한 사항들은 없어지게 된다.

여기에서 상술된 특정 양태들은 본 발명의 몇 가지 면을 예시해주기 위한 것이기 때문에 여기에서 설명 및 청구된 본 발명의 범위는 이러한 특정 양태에 한정되지는 않는다. 모든 균등한 양태들은 본 발명의 범위내에 속하는 것으로 간주된다. 실제로, 관련 기술 분야에서의 통상의 기술자들에게는 여기에서 기술한 내용외에 본 발명의 다양한 변형들도 상기에서 기술한 내용으로부터 명확히 이해할 수 있을 것이다. 이러한 변형들도 하기의 청구 범위내에 속하는 것으로 생각된다. 여기에 다양한 참조 문헌들을 언급하고 있는 데, 이들의 개시 내용들은 모두 참조 문헌에 포함되어 있다.

#### (57) 청구의 범위

##### 청구항 1

(a) 숙주인 바실러스 투린지엔시스 균주 세포내로 하기 (i) 및 (ii)를 도입하는 단계:

(i) 제 1 복제 시발점 및 이 복제 시발점으로부터의 플라스미드 복제에 필요한 하나 이상의 인자를 암호화하는 기능성 유전자를 하나 이상 포함하는 제 1 DNA 벡터

(ii) 제 2 복제 시발점 및 선별 마커는 포함하나 이 복제 시발점으로부터의 플라스미드 복제에 필요한 인자를 암호화하는 기능성 유전자 또는 이의 일부분을 포함하지 않고, 바실러스 투린지엔시스 델타-엔도톡신을 암호화하는 이중의 DNA 서열 및 상기 모균주 계통의 한 부위와 상동인 DNA 서열을 포함하는 제 2 DNA 벡터; 및

(b) 선별 조건하에서 단계 (a)의 세포를 배양하여, 상동 재조합에 의한 제 2 DNA 벡터의 모세포 계통내로의 통합 및 제 1 DNA 벡터의 소실 단계를 포함하는 바실러스 투린지엔시스의 인테그라트를 수득하는 방법.

##### 청구항 2

제1항에 있어서, 숙주인 바실러스 투린지엔시스 균주가 cry- 균주인 방법.

##### 청구항 3

제1항에 있어서, 숙주인 바실러스 투린지엔시스 균주를 바실러스 투린지엔시스 아종(subsp.) 쿠르스타키(kurstaki), 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이(aizawai), 바실러스 투린지엔시스 아종 갈레리아에(galleriae), 바실러스 투린지엔시스 아종 엔토모시더스(entomocidus), 바실러스 투린지엔시스 아종 테네브리오니스(tenebrionis), 바실러스 투린지엔시스 아종 투린지엔시스(thuringiensis), 바실러스 투린지엔시스 아종 알레스티(alesti), 바실러스 투린지엔시스 아종 캐나다엔시스(canadiensis), 바실러스 투린지엔시스 아종 담스타디엔시스(darmstadiensis), 바실러스 투린지엔시스 아종 덴드롤리무스(dendrolimus), 바실러스 투린지엔시스 아종 피니티무스(finitimus), 바실러스 투린지엔시스 아종 케니아에(kenya), 바실러스 투린지엔시스 아종 모리소니(morrisoni), 바실러스 투린지엔시스 아종 서브톡시커스(subtoxicus),

바실러스 투린지엔시스 아종 투마노피(toumanoffi), 바실러스 투린지엔시스 아종 투마노피(toumanoffi), 바실러스 투린지엔시스 아종 폰디케리엔시스(pondicheriensis), 바실러스 투린지엔시스 아종 쉐도지엔시스(shandogiensis), 바실러스 투린지엔시스 아종 소토(sotto), 바실러스 투린지엔시스 아종 나이제리아에(nigeriae), 바실러스 투린지엔시스 아종 윤나넨시스(yunnanensis), 바실러스 투린지엔시스 아종 다코타(dakota), 바실러스 투린지엔시스 아종 인디아나(indiana), 바실러스 투린지엔시스 아종 토호쿠엔시스(tohokuensis), 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠마모토엔시스(kumamotoensis), 바실러스 투린지엔시스 아종 토키지엔시스(tochigiensis), 바실러스 투린지엔시스 아종 톰소니(thompsoni), 바실러스 투린지엔시스 아종 우하넨시스(wuhanensis), 바실러스 투린지엔시스 아종 큐슈엔시스(kyushuensis), 바실러스 투린지엔시스 아종 오스트리니아에(ostrinia), 바실러스 투린지엔시스 아종 톨워티(tolworthi), 바실러스 투린지엔시스 아종 파키스탄니(pakistani), 바실러스 투린지엔시스 아종 자포넨시스(japonensis), 바실러스 투린지엔시스 아종 콜메리(colmeri), 바실러스 투린지엔시스 아종 폰디케리엔시스(pondicheriensis), 바실러스 투린지엔시스 아종 쉐돈지엔시스(shandongiensis), 바실러스 투린지엔시스 아종 네올레오넨시스(neoleonensis), 바실러스 투린지엔시스 아종 코레아넨시스(coreanensis), 바실러스 투린지엔시스 아종 실로(silo), 바실러스 투린지엔시스 아종 멕스카넨시스(mexcanensis) 및 바실러스 투린지엔시스 아종 이스라엘엔시스(israelensis)로 구성되는 그룹 중에서 선택하는 방법.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 숙주인 바실러스 투린지엔시스 균주가 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키인 방법.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 델타-엔도톡신을 암호화하는 DNA 서열이 cryIC 유전자인 방법.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, 델타-엔도톡신을 암호화하는 DNA 서열을 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키(kurstaki), 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이(aizawai), 바실러스 투린지엔시스 아종 갈레리아에(galleriae), 바실러스 투린지엔시스 아종 엔토모시더스(entomocidus), 바실러스 투린지엔시스 아종 테네브리오니스(tenebrionis), 바실러스 투린지엔시스 아종 투린지엔시스(thuringiensis), 바실러스 투린지엔시스 아종 알레스티(alesti), 바실러스 투린지엔시스 아종 캐나다엔시스(canadiensis), 바실러스 투린지엔시스 아종 담스타디엔시스(darmstadiensis), 바실러스 투린지엔시스 아종 덴드롤리머스(dendrolimus), 바실러스 투린지엔시스 아종 피니티머스(finitimus), 바실러스 투린지엔시스 아종 케니아에(kenyae), 바실러스 투린지엔시스 아종 모리소니(morrisoni), 바실러스 투린지엔시스 아종 서브톡시커스(subtoxicus), 바실러스 투린지엔시스 아종 투마노피(toumanoffi), 바실러스 투린지엔시스 아종 투마노피(toumanoffi), 바실러스 투린지엔시스 아종 폰디케리엔시스(pondicheriensis), 바실러스 투린지엔시스 아종 쉐도지엔시스(shandogiensis), 바실러스 투린지엔시스 아종 소토(sotto), 바실러스 투린지엔시스 아종 나이제리아에(nigeriae), 바실러스 투린지엔시스 아종 윤나넨시스(yunnanensis), 바실러스 투린지엔시스 아종 다코타(dakota), 바실러스 투린지엔시스 아종 인디아나(indiana), 바실러스 투린지엔시스 아종 토호쿠엔시스(tohokuensis), 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠마모토엔시스(kumamotoensis), 바실러스 투린지엔시스 아종 토키지엔시스(tochigiensis), 바실러스 투린지엔시스 아종 톰소니(thompsoni), 바실러스 투린지엔시스 아종 우하넨시스(wuhanensis), 바실러스 투린지엔시스 아종 큐슈엔시스(kyushuensis), 바실러스 투린지엔시스 아종 오스트리니아에(ostrinia), 바실러스 투린지엔시스 아종 톨워티(tolworthi), 바실러스 투린지엔시스 아종 파키스탄니(pakistani), 바실러스 투린지엔시스 아종 자포넨시스(japonensis), 바실러스 투린지엔시스 아종 콜메리(colmeri), 바실러스 투린지엔시스 아종 폰디케리엔시스(pondicheriensis), 바실러스 투린지엔시스 아종 쉐돈지엔시스(shandongiensis), 바실러스 투린지엔시스 아종 네올레오넨시스(neoleonensis), 바실러스 투린지엔시스 아종 코레아넨시스(coreanensis), 바실러스 투린지엔시스 아종 실로(silo), 바실러스 투린지엔시스 아종 멕스카넨시스(mexcanensis) 및 바실러스 투린지엔시스 아종 이스라엘엔시스(israelensis)로 구성되는 그룹 중에서 선택되는 바실러스 투린지엔시스 균주로부터 수득하는 방법.

#### 청구항 7

제1항에 있어서, 델타-엔도톡신을 암호화하는 DNA 서열을 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이로부터 수득하는 방법.

#### 청구항 8

제1항에 있어서, 제 2 DNA 벡터에서의 선별 마커가 항생제 내성을 암호화하는 DNA 서열인 방법.

#### 청구항 9

제1항에 있어서, 제 1 DNA 벡터가 제 2 DNA 벡터에서의 선별 마커와는 상이한 선별 마커를 추가로 포함하는 방법.

#### 청구항 10

제1항에 있어서, 제 1 DNA 벡터는 일본쇄의 DNA 플라스미드로부터의 제 1 복제 시발점 및 기능성 rep 유전자를 포함하고; 제 2 DNA 벡터는 일본쇄의 DNA 플라스미드로부터의 제 2 복제 시발점은 포함하나 기능성 rep 유전자는 포함하지 않고, 바실러스 투린지엔시스 델타-엔도톡신을 암호화하는 DNA 서열 및 상기한 숙주 균주 계능의 한 부위와 상동인 DNA 서열을 포함하는 방법.

#### 청구항 11

제1항에 있어서, 단계 (b)에서 세포를 약 37°C에서 배양하는 방법.

**청구항 12**

제1항에 있어서, 단계(b)의 인테그란트를 선별제의 양을 증가시키면서 배양하여, 통합된 DNA 서열을 증폭시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 13**

제1항에 있어서, NRRL에 기탁되어 있고 기탁 번호가 NRRL B-21386인 균주 EMCC0122를 동정할 수 있는 모든 특성을 인테그란트가 갖고 있는 방법.

**청구항 14**

하나 이상의 이종의 델타-엔도톡신 결정을 생산하는 바실러스 투린지엔시스 인테그란트 또는 이의 포자.

**청구항 15**

인테그란트가 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키의 인테그란트인 제1항의 인테그란트.

**청구항 16**

인테그란트가 cry- 균주의 인테그란트인 제1항의 인테그란트.

**청구항 17**

이종의 델타-엔도톡신이 CryIC 단백질인 제1항의 인테그란트.

**청구항 18**

NRRL에 기탁되어 있고 기탁 번호가 NRRL B-21386인 균주 EMCC0122를 동정할 수 있는 모든 특성을 갖고 있는 제1항의 인테그란트.

**청구항 19**

모균주에 의해 생산되는 델타-엔도톡신 결정에 비해 더 큰 활성을 갖는 델타-엔도톡신 결정을 더 많은 양을 생산하는 제1항의 인테그란트.

**청구항 20**

생산되는 델타-엔도톡신이 해충에 대해 활성을 갖는 제1항의 인테그란트.

**청구항 21**

생산되는 델타-엔도톡신이 레피돔테라 목의 해충에 대해 활성을 갖는 제1항의 인테그란트.

**청구항 22**

(a) 제1항의 인테그란트 및 (b) 살충제에 허용가능한 담체를 포함하는 살충제 조성물.

**청구항 23**

(a) 제 2 복제 시발점은 포함하나 이 복제 시발점으로부터의 플라스미드 복제에 필요한 인자를 암호화하는 기능성 유전자 또는 이의 일부는 포함하지 않고; (b) 바실러스 투린지엔시스 델타-엔도톡신을 암호화하는 DNA 서열; (c) 바실러스 투린지엔시스 계놈의 한 부위와 상동인 DNA 서열; 및 (d) 선별 마커를 포함하는 DNA 작제물.

**청구항 24**

제10항의 DNA 작제물을 포함하는 DNA 벡터.

**청구항 25**

(a) 하나 이상의 이종 델타-엔도톡신을 생산하는 바실러스 투린지엔시스의 인테그란트 및 이의 포자; 및 (b) 살충제에 허용가능한 담체를 포함하는 해충 방제에 효과적인 양의 살충제 조성물을 해충에 노출시키는 것을 포함하는 해충 방제 방법.

**청구항 26**

제1항에 있어서, 인테그란트가 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키의 인테그란트인 방법.

**청구항 27**

제1항에 있어서, 인테그란트가 cry- 균주의 인테그란트인 방법.

**청구항 28**

제1항에 있어서, 이종의 델타-엔도톡신이 CryIC 단백질인 방법.

**청구항 29**

제1항에 있어서, NRRL에 기탁되어 있고 기탁 번호가 NRRL B-21386인 균주 EMCC0122를 동정할 수 있는 모

은 특성을 인테그라트가 갖는 방법.

### 청구항 30

제1항에 있어서, 인테그라트가 모균주에 의해 생산되는 델타-엔도톡신 결정에 비해 더 큰 살충 활성을 갖는 델타-엔도톡신을 더 많은 양을 생산하는 방법.

### 청구항 31

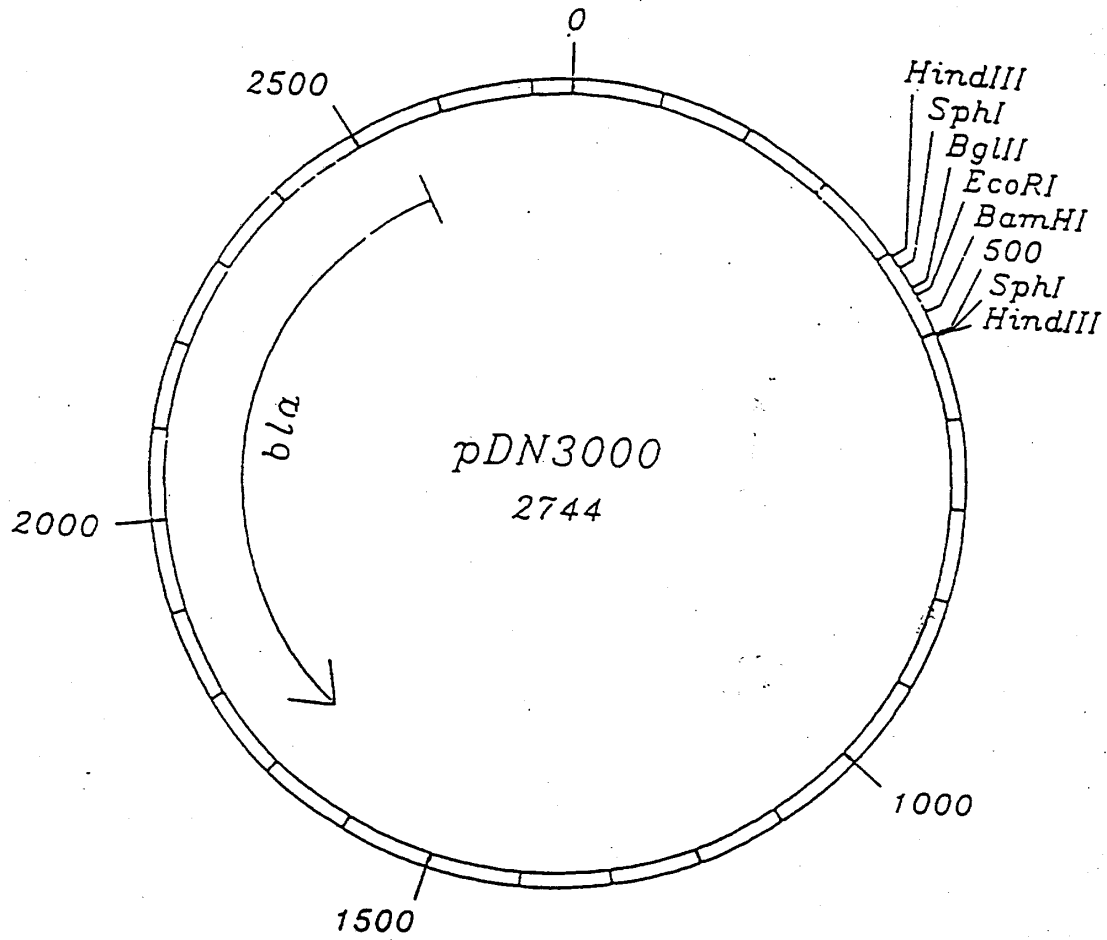
제1항에 있어서, 생산되는 델타-엔도톡신이 해충에 대해 활성을 갖는 방법.

### 청구항 32

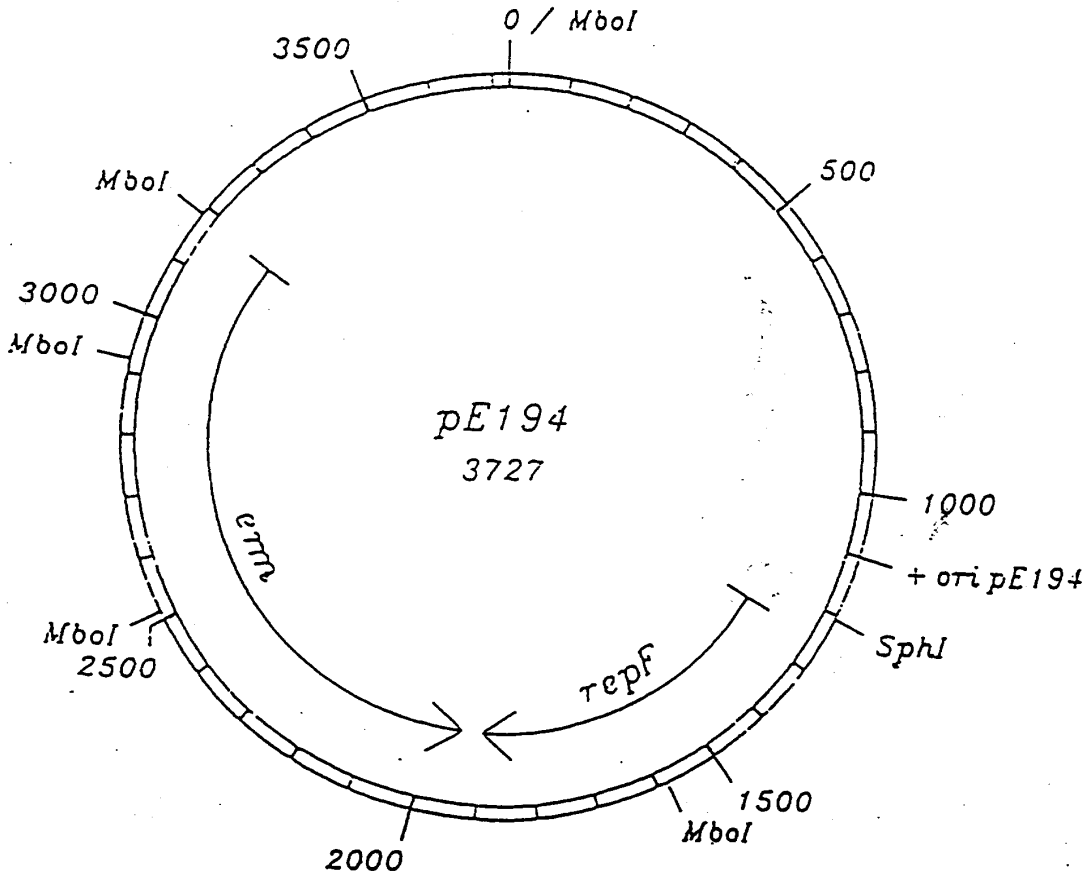
제1항에 있어서, 생산되는 델타-엔도톡신이 레피돛테라 목의 해충에 대해 활성을 갖는 방법.

## 도면

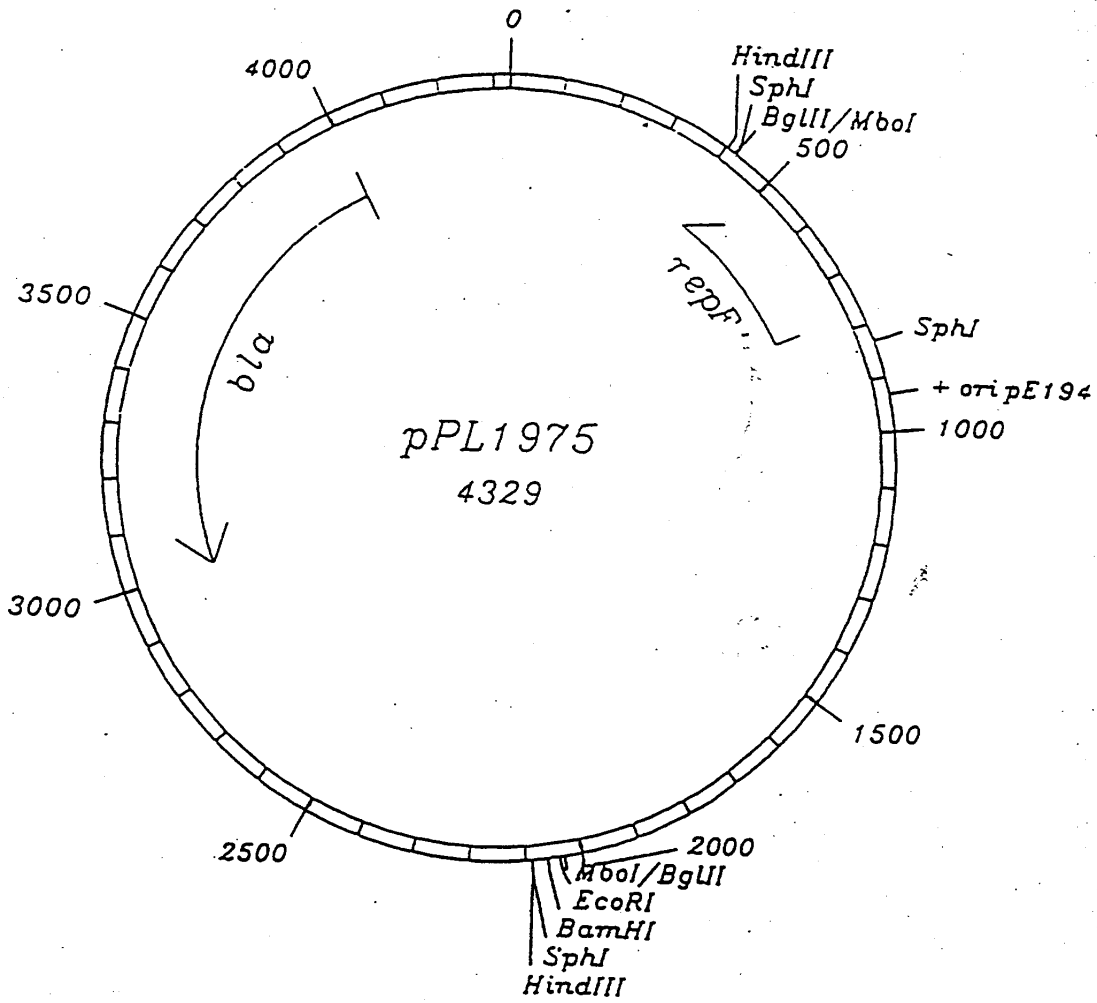
### 도면1



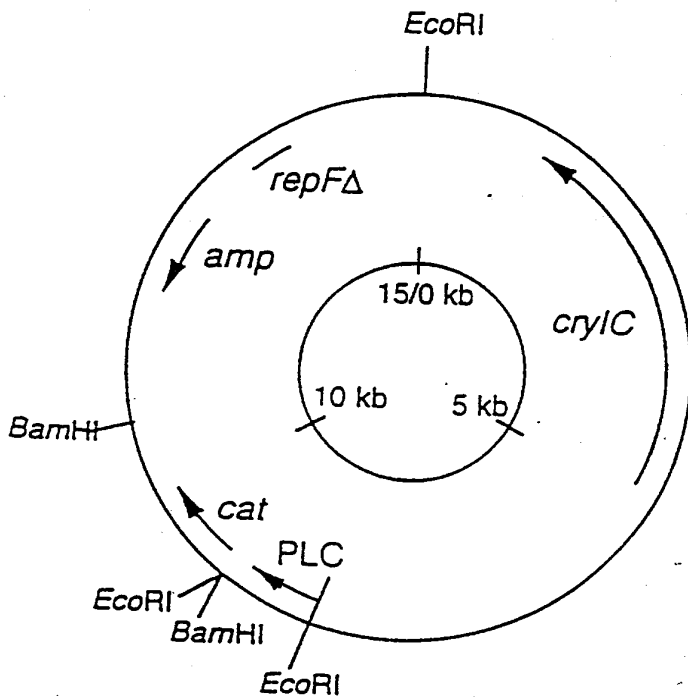
도면2



도면3



도면4



도면5

