

P9503017

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

1004/96

Rovarölő hatású proteint kódoló DNS-fragmens

Képviselet: DANUBIA Lab. Sz., Bp.

KIVONAT

73739

A találmány tárgyát mikrobiális eredetű rovarölő szerek képezik.

A találmány tárgyát közelebbről rovarölő hatású fehérjét kódoló DNS-fragmensek képezik, valamint eljárások hibrid mikroorganizmusok előállítására a találmány szerinti DNS-fragmensek alkalmazásával, mely mikroorganizmusok nagyobb rovarölő hatással rendelkeznek, és rovarölő hatásukat szélesebb gazdaspektrummal fejtik ki. A találmány tárgyát képezik a találmány szerinti DNS-fragmenseket tartalmazó vektorok, a vektorokkal transzformált gazdasejtek, valamint a találmány szerinti gazdasejteket tartalmazó rovarölő hatású készítmények is.

szell. ábrák st.

Alkotó

P9503017

"A"

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

10.03.96

Képviselő:

DANUBIA SZABADALMI ÉS VÉDJEGY IRODA Kft.

Rovarölő hatású proteint kódoló DNS-fragmens

A találmány tárgyát mikrobiális eredetű rovarölő szerek képezik.

A találmány tárgyát közelebbről rovarölő hatású fehérjét kódoló DNS-fragmensek képezik, valamint eljárások hibrid mikroorganizmusok előállítására a találmány szerinti DNS-fragmensek alkalmazásával, mely mikroorganizmusok nagyobb rovarölő hatással rendelkeznek, és rovarölő hatásukat szélesebb gazdaspektrummal fejtik ki.

A találmány tárgyát képezik a találmány szerinti DNS-fragmenseket tartalmazó vektorok, a vektorokkal transzformált gazdasejtek, valamint a találmány szerinti gazdasejteket tartalmazó rovarölő hatású készítmények is.

A találmány szerinti megoldás alkalmas növények megvédésére rovarfertőzésekkel szemben.

Az utóbbi években a kutatók érdeklődése jelentős mértékben fordult a *Bacillus thuringiensis* felé (*B.t.*), valamint a *B.t.* alkalmazása iránt, növények rovarfertőzésének biológiai eljárással történő megakadályozására. Ezek a rovarok számára patogén baktériumok sporuláció alkalmával egy toxikus kristályt termelnek, melyet parasporális kristálynak neveznek.

A különféle gazdaspektrumú *B.t.* törzseket különböző szerotípusokba vagy alfajokba osztályozzák, lagelláris antigénjeik alapján. A legtöbb *B.t.* törzs aktív a pikkelyes szárnyúak rendjének bizonyos tagjaival szemben,

például pillangók és lepkék lárváival szemben, de néhány törzs toxikus a kétszárnyúak és fedelesszárnyúak rendjeinek tagjaival szemben is, például szunyoglárvákkal és bogárlárvákkal szemben. Néhány toxikus kristályt termelő törzs esetén mindaddig semmilyen toxikus aktivitást nem mutattak ki.

A *B.t.* kristályos zárványa a lárva középbelében feloldódik, és felszabadul egy vagy több rovarölő hatású kristályfehérje, más néven δ -endotoxinok, melyek molekulatömege 27 és 140 kD közötti. A legtöbb kristályfehérje protoxin, amely a rovar középbelében proteolitikusan kisebb toxikus polipeptiddé alakul át. Általában a szakirodalomban a kristályfehérjéket Cry-al, és a kristályfehérjéket kódoló géneket cry-al jelzik.

Jelenleg már több mint 40 eredetű cry-gént jellemeztek. A cry-gének egy csoportosítási rendszerét Hofte és Whitely publikálta [Microbiol. Rev., 53, 242 (1989)], amely rendszerben a géneket négy osztályra és néhány alosztályra osztják, a kódolt fehérjék szerkezeti és gazdaspektrumbeli hasonlóságai alapján. A négy fő osztály a pikkelyesszárnyúakra specifikus (I), a pikkelyesszárnyúakra és kétszárnyúakra specifikus (II), a fedelesszárnyúakra specifikus (III), valamint a kétszárnyúakra specifikus (IV) géneket foglalja magába.

A pikkelyesszárnyúakra specifikus gének (cryI) 130-140 kD molekulatömegű fehérjéket kódolnak, melyek a *B.t.* sporulációja folyamán bipiramidális kristályos zárványokban halmozódnak fel. A cryI-géneket az egyéb cry-génektől a szekvenciájukban található homológia alapján (>50% aminosavazonosság) lehet megkülönböztetni. Ezek közül a gének közül három, a cryIA(a), a cryIA(b) és a cryIA(c) között az aminosavazonosság több mint 80 %-os, ezért ezeket egy külön alcsoportnak tekintik. A legújabban felfedezett cryIB-, cryIC- és cryID-gének különböznek egymástól és külön-

bőznek a cryIA-génektől is. A CryIA, CryIB és CryIC-fehérjéket eddig 11 szerotípushoz tartozó 29 törzsből izolált kristálykészítményekben mutatták ki, 35 monoklonális ellenanyag alkalmazásával [Hofte és mtsai.: Microbiol. Rev., 53, 242 (1989)].

A pikkelyesszárnyúakra és kétszárnyúakra specifikus gének osztálya 56 kD molekulatömegű fehérjéket kódoló géneket tartalmaz, mely fehérjék kocka alakú zárványokat képeznek. Az első cryII-gént *B.t. subsp. kurstaki* HD-263-törzsből klónozták meg, és *Bacillus megaterium*ban expresszálták. A CryIIA-fehérjét termelő sejtek toxikusak voltak a *Heliothis virescens* és *Lymantria dispar* pikkelyesszárnyú fajokkal szemben, csakúgy mint a kétszárnyú *Aedes aegypti* faj lárváival szemben.

A fedelesszárnyúakra specifikus osztályhoz tartozó gének olyan géntermékeket kódolnak, melyek a fedelesszárnyúakhoz tartozó fajokkal szemben hatékonyak, és a kódolt fehérjék molekulatömege körülbelül 70 kD. Már legalább három fedelesszárnyúakra specifikus *B.t.*-törzset leírtak: *B.t. tenebrionis*, *B.t. san diego*, valamint *B.t. EG2158*. Ezek a törzsek romboid formájú kristályokat termelnek, mely kristályok egy fő fehérjét tartalmaznak.

A cryIV-gének kétszárnyúakra specifikus osztálya kétszárnyúakra specifikus kristályfehérje gének meglehetősen heterogén csoportjából áll. A cytA-gént és négy másik gént a *B.t. israelensis*ben található 72 Megadaltonos (mD) izolálták. A cryIVA-, cryIVB-, cryIVC- és cryIVD-gének sorrendben 135, 128, 78 és 72 kD molekulatömegű fehérjéket kódolnak. Ezek a fehérjék a cytA-gén 26 kD-os termékével együtt tojásdad kristályos komplexé szerveződnek. A *B.t. morrisoni* PG-14-törzsében szintén találtak azonos vagy hasonló fehérjeösszetételű kristálykomplexet. A *B.t. israelensis*ből vagy rekombináns *E. coli*ből vagy rekombináns *bacillus*-

törzsekből előállított cryIV-osztályhoz tartozó kristályfehérjéket tartalmazó preparátumok különböző mértékben toxikusnak bizonyultak bizonyos moszkítófajok lárváival szemben.

Mióta Hofte és Whitely elkészítették eredeti osztályozási rendszerüket, számos új cry-gént megklónoztak és nukleotidsorrendjüket meghatározták. Yamamoto és Powell egy újabb osztályozási rendszert publikáltak ["*Bacillus thuringiensis* Crystal Proteins", 3-42. old. az "Advanced Engineered Pesticides" című könyvben, szerk. Leo Kim (1993)].

A különböző kereskedelmi forgalomban beszerezhető *B.t.* készítményeket általánosan használják különböző termesztett növények, árnyékoló fák, valamint dísnövények megvédésére különféle rovarfajokkal történő fertőzés ellen, és ezeket a készítményeket a kémiai rovarirtó szerek felhordására alkalmas eszközökkel juttatják a növényekre. A permetlevelek felhordására alkalmas eljárások szakember számára jól ismertek.

A hibrid baktériumokat tartalmazó készítményeket felvihetjük permet, por vagy csalétek formájában egyedül, vagy kombinációban parazitákkal, ragadozókkal vagy egyéb védekező eljárásokkal kombinálva, például alkalmazhatunk kémiai rovarirtószereket, sugárzással indukált sterilizálást, kémiai sterilizálószeret, feromonokat, és hasonlókat. A stresszkeltő anyagok és módszerek alkalmazása fokozhatja a találmány szerinti hibrid baktériumok patogenitását, vagy aktiválhatja az azokkal történő krónikus fertőzést.

A *B.t.* transzformálásra vonatkozásában ismert eljárások többek között a protoplasztfúzió, a protoplaszt transzfekció, a transzdukció, az elektroporáció és a konjugációszerű eljárások.

A *B.t.* transzformálására gyakorta alkalmaznak elektroporációt, az eljárás egyszerűsége, gyorsasága és hatékonysága következtében. 1989-ben kifejlesztettek egy *B.t.* ingázóvektort ("shuttle vektor") is. Ennek az ingázó vektornak az alkalmazhatóságát először úgy demonstrálták, hogy egy *B.t.* kristálytoxin gént egy kristály mínusz (Cry) *B.t.*-törzsbe vitték át, melynek elnevezése cryB volt, és a kapott transzformáns expresszálta a 130 kD molekulatömegű kristályfehérjét.

A natív *B.t.* plazmidokból legújabbban számos klónozó és expressziós vektort fejlesztettek ki, például olyan ingázó vektorokat, melyek tartalmazzák a *B.t. israelensis* 3,65 Md-os plazmidját valamint a pBR322-t; *B.t. kurstaki* HD263-, HD73- és HD1-törzsekből származó plazmidokat; valamint *B.t. israelensis*ből származó plazmidokat és *E. coli* vektorokat. Egy ilyen ingázó vektort használtak fel arra, hogy egy fedelesszárnyúakkal szemben aktív toxin gént egy *B.t. israelensis* törzsbe juttassanak, és így módon kiszélesítsék annak rovarellenes spektrumát, hogy aktív legyen mind kétszárnyúakkal, mind pedig fedelesszárnyúakkal szemben.

Az említett technológiával kapcsolatosan komoly probléma a natív és exogén plazmidok közötti instabilitás vagy inkompatibilitás. Gyakran előfordul, hogy egy vagy több natív *B.t.*-plazmid nem képes együtt fennmaradni egy exogén plazmiddal (plazmidokkal), melyet a baktériumba juttattak, és ezért a natív plazmid szegregáció útján gyorsan elvész. Ez a probléma akkor jelent gondot, ha a natív plazmidok tartalmazzak egy vagy több cry-gént, melyek fontos, hogy a transzgenikus *B.t.*-törzs megőrizzen. Ezt a problémát meg lehet szüntetni oly módon, hogy a *B.t.*-plazmidnak eltávolítjuk azt a részletét, amelyik a rekombináns (vagy exogén) és natív plazmidok közötti inkompatibilitást okozza.

A különböző kutatások számos eljárást föltártak, melyek alkalmasak arra, hogy exogén DNS-t stabilan baktériumsejtekbe juttassunk. Egy *B.t.* eredetű natív-kompatibilis vektort használtak arra, hogy egy fedelesszárnyúakkal szemben aktív cryIIIA-gént egy *B.t. kurstaki*-törzsbe juttassanak, és az így előállított transzgenikus törzs nagy mértékben aktívnak bizonyult fedelesszárnyúakkal szemben, és vad típusú pikkelyesszárnyúakkal szembeni aktivitását is megtartotta. Transzformálhatunk baktériumokat olyan plazmidokkal is, melyek képtelenek autonóm módon replikálódni, és szelektálható markergént hordoznak, amennyiben az alkalmazott plazmid tartalmaz egy olyan DNS-szegmenst, amelyik a gazdasejt kromoszómájának egy részletével homológ. A fenti példa vonatkozásában kimutatták, hogy egy plazmid képes kölcsönhatásba lépni a gazdasejttel egyszeres "crossover" mechanizmus szerint, melyben a bejuttatott plazmid és a homológ gazdaszekvenciák vesznek részt. Eredményül egy kromoszómába integrálódott plazmidot kapunk, melyet a homológ DNS-szegmens direkt ismétlődései szegélyeznek. Az ilyen inszerciók mutagén természetűek, amennyiben a duplikálódott szegmens mindkét vége azonos transzkripció egységen belül található.

Delecluse és mtsai. homológ rekombinációt alkalmaztak a *cytA* rovarellenes hatású fehérjét kódoló gén inaktiválására, *B.t. israelensis*-ben [Delecluse és mtsai.: J. Bacteriol. 173, 3374 (1991)]. Előállítottak egy részleges *cytA*-szekvenciát tartalmazó integrációs vektort, és homológ rekombinációt idéztek elő a *B.t. israelensis* 72 mD-os saját plazmidján található *cytA*-génnel. Az elmondottakon túl Calogero és mtsai. előállítottak egy *B. subtilis* integrációs vektort, amely tartalmazta a *B.t. kurstaki* HD73-törzs teljes cryIA(c) kódoló régióját [Calogero S. és mtsai.: Appl. Env. Microbiol.

55, 446 (1989)]. A plazmidvektorral kimutatták, hogy expresszáltatja a HD73-cryIA(c)-génjét. A PCT/US91/05930 számú szabadalmi bejelentéshez csatolt találmányi leírás (WO/93/03619) olyan rekombináns *B.t. baktériumot* tár fel, amely tartalmaz egy rovarellenes gént hordozó ingázó vektort, és a leírás feltárja a rekombináns baktérium előállítására vonatkozó eljárást is.

Mindazáltal sem az ismertetett általános módszerek, sem a hivatkozott publikációk nem tartalmazzak semmiféle utalást arra, hogy a transzformált *B.t. baktériumok* stabilitásának problémáját meg lehet-e oldani kromoszómális integráció útján.

A találmány szerinti eljárás kidolgozásakor célul tűztük ki, hogy kristálygénnek stabil fennmaradását és expresszálasát oly módon, hogy a géneket *B.t.*-törzsek kromoszómájába integráljuk. A találmány tárgyát képezi továbbá egy eljárás szélesebb gazdaspektrumú és/vagy új specifikus *B.t.*-törzsek kialakítására. Közelebbről a találmány tárgyát képezi egy eljárás olyan *B.t.*-törzsek előállítására, melyek erős spodoptera ellenes aktivitásúak, ugyanakkor megtartják pikkelyes szárnyúakkal szembeni aktivitásukat is.

A találmány tárgyát képezi egy DNS-szegmens, amely tartalmaz egy vagy több rovarölő hatású fehérjét kódoló DNS-szekvenciát, melyek képesek replikálódni és expresszálni *B.t.*-törzsekben, valamint tartalmaz egy olyan DNS-szekvenciát, amely elősegíti a DNS-szegmens *B.t.* kromoszómális DNS-be történő integrálódását, homológ rekombináció útján.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy olyan DNS-szegmens, amely tartalmaz egy vagy több rovarölő hatású fehérjét kódoló DNS-szekvenciát, melyek képesek replikálódni és expresszálni *B.t.*-törzsekben, valamint egy

olyan DNS-szekvenciát, amely képes véletlenszerűen a *B.t.* genomba integrálódni.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy hibrid vektor, amely tartalmaz egy plazmidot vagy ingázó vektort, valamint a találmány szerinti DNS-szegmenst, amely funkcionálisan hozzá van kapcsolva a plazmid vagy vektor szekvenciákhoz.

A találmány tárgyát képezik továbbá hibrid *B.t.* gazdasejtek, melyek kromoszómájába a találmány szerinti DNS-szegmens legalább egy rovarölő hatású fehérjét kódoló DNS-szekvenciája be van integrálódva.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy eljárás a találmány szerinti DNS-szegmens előállítására, mely eljárás szerint: előállítunk egy DNS-szekvenciát, amely homológ egy kromoszómális *B.t.* DNS-szekvenciával; majd ehhez a szekvenciához legalább egy rovarölő hatású fehérjét kódoló DNS-szekvenciát kapcsolunk funkcionálisan, oly módon, hogy amennyiben *B.t.*-sejteket transzformálunk a DNS-szegmessel vagy egy hibrid vektorral, amely funkcionálisan kapcsolva tartalmazza a DNS-szegmenst, a rovarölő hatású fehérjét kódoló DNS-szekvencia expresszálódik.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy eljárás transzformált *B.t.* gazdasejtek előállítására, mely eljárás szerint: i) előállítunk egy DNS-szekvenciát, amely képes véletlenszerűen a *B.t.* kromoszómális DNS-be integrálódni; ii) funkcionálisan hozzákapcsoljuk az előállított DNS-szekvenciát egy vagy több rovarölő hatású fehérjét kódoló DNS-szekvenciához, amelyek képesek replikálódni és expresszálódni *B.t.*-sejtekben; iii) izoláljuk a DNS-szegmenst; iv) *Bacillus thuringiensis* gazdasejteket transzformálunk a DNS-szegmessel, amely DNS-szegmens képes véletlenszerűen a *B.t.* gazdasejtek kromoszómájába integrálódni; és

v) transzformált gazdasejteként azokat a gazdasejteket izoláljuk, melyekben a rovarölő hatású fehérjét kódoló DNS-szekvencia expresszálódik.

Szintén a találmány tárgyát képezi egy eljárás olyan hibrid *B.t.* gazdasejtek előállítására, melyek legalább egy exogén rovarölő hatású peptidet expresszálnak, mely eljárás szerint *B.t.* gazdasejteket a találmány szerinti DNS-szegmenssel vagy a fent leírt hibrid vektorral transzformálunk, engedjük hogy homológ rekombináció történjen, és a rovarölő hatású fehérjét kódoló DNS-szekvencia stabilan beépüljön a *B.t.* sejt kromoszómájába, és izoláljuk a transzformált gazdasejtet.

A találmány tárgyát képezi egy széles gazdaspektrumú rovarölő hatású készítmény, amely tartalmazza a találmány szerinti hibrid gazdasejteket, valamely hordozót, és adott esetben tartalmaz egyéb rovarölő hatású hatóanyagokat is. A találmány szerinti megoldás egy előnyös megvalósítási módja szerint a *B.t.* sejtek rovarölő spektruma szélesíthető oly módon, hogy *B.t.* sejteket a fent leírtak szerint rovarölő hatású fehérjét kódoló DNS-szekvenciával transzformálunk, amely expresszálható marad.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy eljárás növények megvédésére rovarok okozta károsodás ellen, mely eljárás szerint a növényt vagy a talajt a növény közelében a találmány szerinti rovarölő hatású készítmény hatásos mennyiségével érintkeztetjük.

A találmány szerinti megoldást az alábbiakban részletesebben kívánjuk szemléltetni a bemutatott példák, rajzok és szekvenciák segítségével.

Az 1. ábrán a pSB210-plazmid vázlatát láthatjuk, amely gram-negatív replikációs origót tartalmaz.

A 2. ábrán a pSB147-plazmid származtatását valamint családfáját láthatjuk.

A 3. ábrán a pSB210.1-plazmidot láthatjuk, amely tartalmazza a pSB210-szekvenciákat.

A 4. ábrán a pSB210-2-plazmidot láthatjuk, amely tartalmazza a pSB210.1-szekvenciákat.

Az 5. ábrán a pSB210.3-plazmid térképét láthatjuk.

A 6. ábrán a pSB147-plazmid térképét láthatjuk.

A 7. ábrán a pSB136-plazmid előállításának vázlatát láthatjuk.

A találmány szerinti megoldás szempontjából lényeges szekvenciákat a 2. és 5. táblázatban foglaljuk össze, valamint a 3., 5. és 11. példában.

A találmány szerinti megoldás előrelépést jelent a technika állása szerinti *B.t.* törzsekhez képest a rovarölő hatás spektrumának kiszélesítése vonatkozásában. Olyan hibrid *B.t.* törzsek, melyek egynél több rovarölő hatású fehérjét kódoló gént tartalmaznak, és ezáltal szélesebb gazdaspektrummal rendelkeznek, előállíthatók oly módon, hogy idegen eredetű rovarölő hatású fehérjét kódoló gént juttatunk ismert baktériumtörzsek kromoszómájába. Az elmondottak értelmében a találmány tárgyát képezi egy eljárás *B.t.* törzsek gazdaspektrumának szélesítésére, mely eljárás szerint növeljük a törzs által termelt különböző rovarölő hatású kristályfehérjék számát.

A rekombináns *B.t.* törzsekbe bejuttatott plazmidok a sejtek saját plazmidjainak instabilitását okozhatják, és az is lehetséges, hogy a bejuttatott plazmidok maguk is instabilak lesznek. Ez a folyamat gyakran azt eredményezi, hogy megszűnik a sejtekben található kristályfehérje-gének expressziója. A találmány szerinti megoldás ezt a problémát azáltal küszöböli ki, hogy a kristályfehérje-gént a gazdasejt kromoszómájába juttatjuk be,

expresszió céljából, anélkül, hogy a gazdasejt saját plazmidjain található kristályfehérje-gének expresszióját megzavarnánk.

Az elmondottak értelmében a találmány tárgyát képezi egy DNS-szegmens, amely tartalmaz egy vagy több rovarölő hatású fehérjét kódoló DNS-szekvenciát; valamint egy olyan DNS-szekvenciát, amely homológ valamely *B.t.* eredetű kromoszómális DNS-szekvenciával, mely rovarölő hatású fehérjét kódoló DNS-szekvencia beépül az említett *B.t.* sejt kromoszómájába, azzal együtt replikálódik és expresszálódik.

Rovarölő hatású fehérjét kódoló DNS-szekvencia lehet bármely DNS-szekvencia, amely olyan rovarölő hatású fehérjét kódol, amely *B.t.* baktériumsejtekben expresszálható. A találmány szerinti megoldás szempontjából alkalmas rovarölő hatású fehérjét kódoló DNS-szekvenciák többek között - anélkül, hogy igényünket az ismertetettekre korlátoznánk -: a cryIA(a)-, cryIA(b)-, cryIA(c)-, cryIB-, cryIC-, cryD-, cryIE-, cryIF-, cryIIA-, cryIIB-, cryIIIA-, cryIIIB-, cryIIIC-, cryIVA-, cryIVB-, cryIVC-, cryIVD- és cytA-jelű gének, bármely alfajból és/vagy *B.t.* törzsből, valamint bármely *B. larvae* vagy *B. papillae* törzsből származó rovarölő hatású fehérjét kódoló gén, valamint minden egyéb rovarölő hatású fehérjét kódoló gén, melyről ismeretes, hogy *Bacillus* fajokban expresszálható vagy más gram-pozitív baktériumokban. Szintén alkalmas DNS-szekvenciák többek között az olyan rovarölő hatású fehérjéket kódoló szekvenciák, mint például az α -amiláz inhibitor, proteináz inhibitor és bármely más baktériumból származó toxint kódoló szekvencia.

A találmány szerinti DNS-szegmens alkalmas homológ DNS-szekvenciaként tartalmazhat bármely olyan DNS-szekvenciát, amely lényegében homológ bármely *B.t.* fajból vagy törzsből - mint például a fenti 1.

táblázatban felsorolt törzsekből - származó bármely kromoszómális DNS-fragmenssel. A homológ DNS-szekvencia lehetővé teszi és irányítja a találmány szerinti DNS-szegmens gazdasejt DNS-be történő integrálódását, homológ rekombináció útján. Amennyiben a találmány szerinti DNS-szegmenst cirkuláris kovalensen zárt DNS-szegmensként juttatjuk be a gazdasejtbe, a homológ rekombináció egyszeres "cross-over" eseményként történhet meg a gazdasejt DNS-e és a homológ DNS-szekvencia között. Amennyiben a találmány szerinti DNS-szegmenst lineáris DNS-szegmens formájában juttatjuk be, a homológ rekombináció kétszeres "cross-over" eseményként történhet meg, a gazdasejt DNS-e és a kívánt rovarölő hatású fehérjét kódoló DNS-t szegélyező homológ DNS-szekvenciák között. Az elmondottak értelmében a homológ DNS-szekvenciák alkalmazhatók egy vagy kettő szegélyező DNS-szekvencia formájában. A találmány szerinti DNS-szegmens előállítható továbbá kettősszálús és egyszálús formában is. Az egyszálús formát előállíthatjuk a kettősszálús forma hővel vagy vegyszerekkel történő denaturálása útján, a szakirodalomból ismert eljárások alkalmazásával. A kettősszálús formát előállíthatjuk a kívánt szekvencia restriktív enzimekkel történő emésztése útján, majd azt követő ligálással, szakirodalomból ismert eljárások alkalmazásával.

A fenti homológ DNS-szekvencia a bakteriális kromoszóma egy olyan fragmensével homológ, melynek mérete körülbelül 5 bázistól körülbelül 20 kb-ig terjedhet. Előnyösen a szekvencia körülbelül 500 bázis és körülbelül 10 kb közötti méretű fragmenssel homológ. A homológ szekvencia előnyösen homológ lehet a *B.t.* foszfolipáz-C-enzimet kódoló körülbelül 2250 bázis hosszúságú fragmensével. Különösen előnyösek azok a homológ DNS-szekvenciák, melyek a *B.t.* gazdasejtek kromoszómájának rovarölő fe-

hérjét kódoló endogén génjeitől eltérő szekvenciákkal homológok. Amennyiben a DNS-szegmens olyan DNS-szekvenciát tartalmaz, amely a rovarölő hatású fehérjét kódoló bakteriális szekvenciának mind az 5'- mind pedig a 3'-végi szegélyező szekvenciájával homológ, a fent elmondottak értelmében szakember képes lesz meghatározni a rovarölő hatású fehérjét kódoló régió mindkét végén található homológ régió méretét. Ennek a megközelítésmódnak az alkalmazásával egyetlen új gén hozzáadása is szélesítheti a gazdasejt rovarölő spektrumát.

A találmány szerinti DNS-szegmens tartalmazhat továbbá egy gram-negatív baktériumból származó replikációs origót is. Replikációs origóként többek között alkalmazhatunk bármely olyan replikációs origót, amely a következő gram-negatív nemzetségekhez tartozó baktériumfajok vagy törzsek közül egyben vagy többben működőképes: *Neisseria*, *Veillonella*, *Brucella*, *Pasteurella*, *Hemophilus*, *Bordetella*, *Escherichia*, *Erwinia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*, *Thiobacillus*, *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Photobacterium*, *Zymomonas*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Desulfovibrio* és *Spirillum*. Amennyiben a találmány szerinti DNS-szegmenst gram-negatív baktériumban - például *E. coli*-ban - klónozzuk meg, majd a klónozott szegmenssel *Bacillus thuringiensis*t transzformálunk, csak azok a rovarölő hatású fehérjét kódoló DNS-szekvenciák fognak fennmaradni, melyek integrálódtak a gazdasejt kromoszómájába. Mivel a gram-negatív eredetű replikációs origó nem működőképes *B.t.* gazdasejtekben, a *B.t.* gazdasejt az előbbieket szerint bejuttatott találmány szerinti DNS-szegmenst nem fogja replikálni, és a rovarölő hatású fehérjét kódoló szekvenciát nem fogja

expresszálni, csak akkor, ha a DNS-szegmens a gazdasejt kromoszómájába integrálódik.

A találmány szerinti DNS-szegmens tartalmazhat továbbá egy szelektálható markergént, amely gram-pozitív baktériumoktól eltérő egysejtű élőlényekben expresszálni, olyan szelektálható markergént, amelyik expresszálni gram-pozitív baktériumban, és/vagy olyan szelektálható markergént, amely expresszálni gram-negatív és gram-pozitív baktériumban is. A gram-pozitív baktériumtól eltérő egysejtű gazdaszervezetben expresszálni szelektálható markergént úgy definiáljuk, hogy az lehet bármely DNS-szekvencia, amely képes egy gram-pozitív gazdaszervezettől eltérő egysejtű gazdaszervezetben bármilyen fenotípust létrehozni, amely alkalmas az adott DNS-szekvenciát hordozó gazdaszervezet kimutatására vagy kiválasztására. A gram-pozitív baktériumban expresszálni szelektálható markergént úgy definiáljuk, hogy az lehet bármely olyan DNS-szekvencia, amely képes egy gram-pozitív bakteriális gazdaszervezetben olyan fenotípust létrehozni, amely alkalmas az adott DNS-szekvenciát hordozó gram-pozitív gazdaszervezet kimutatására, vagy kiválasztására. A gram-negatív és a gram-pozitív baktériumban egyaránt expresszálni szelektálható markergént úgy definiáljuk, hogy az lehet bármely olyan DNS-szekvencia, amely képes gram-pozitív és gram-negatív bakteriális gazdaszervezetben olyan fenotípust létrehozni, amely alkalmas az adott DNS-t hordozó gazdasejtek kimutatására, vagy kiválasztására. Alkalmas markergének példaként megemlíthetjük azokat a markergéneket, melyek expressziója gyógyszerrezisztenciát, vegyszerekkel szembeni rezisztenciát, aminosav auxotrófiát vagy prototrófiát, vagy egyéb fenotípusos variációt idéz elő, amely alkalmas arra, hogy általa a mutáns vagy rekombináns élő-

lényt kiválasszuk vagy kimutassuk. A szelektálható markergén jelenléte megkönnyíti a klónozást és/vagy a találmány szerinti DNS-szegmens fenn tartását gram-negatív baktériumokban, és elősegíti a találmány szerinti DNS-szegmenst hordozó rekombináns *B.t.* baktériumok szelektálását és/vagy kimutatását.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy olyan DNS-szegmens, amely tartalmaz legalább egy rovarölő hatású fehérjét kódoló DNS-szekvenciát, amely képes *B.t.* bakteriális gazdasejtekben replikálódni és expresszálni, valamint egy olyan DNS-szekvenciát, amely képes véletlenszerűen a *B.t.* gazdaszervezet genomi DNS-ébe integrálódni. A találmány szerinti megoldásban alkalmazható véletlenszerűen integrálódni képes DNS-szekvenciák lehetnek többek között inszerciós szekvenciák, vagy transzpozon szekvenciák, melyek képesek önmagukat és a funkcionálisan hozzájuk kapcsolt DNS-szekvenciákat beinszertálni vagy bemásolni a *B.t.* gazdasejt kromoszómális vagy plazmid DNS-ének véletlenszerűen elhelyezkedő pozícióiba. Ilyen szekvenciák például megemlíthetjük a transzpozonokat, mint például az alábbiakban bemutatott Tn917-transzpozont, a Tn1545- és a Tn916-transzpozonokat, melyek mindegyikének leírása megtalálható Camilli és mtsai. közleményében, [Camilli és mtsai.: *J. Bacterial* 172, 3738 (1990)], és megemlíthetünk a technika állása szerint ismert más gram-pozitív transzpozonokat is. Bár a technika állása szerint véletlenszerűen integrálódó DNS-szekvenciák vagy DNS-egységek ismeretesek, a találmány szerinti megoldásban elsőként alkalmazunk ilyen szekvenciákat rovarölő hatású gének gram-pozitív baktériumokba történő inszertálására.

A találmány szerinti transzpozon szekvenciát tartalmazó DNS-szegmenst előnyösen plazmid vektor hordozhatja. Alkalmas plazmidok pél-

dául a pTV51Ts- és a pLTV1-jelű plazmidok, melyeket az alábbiakban ismertetünk más plazmidokkal együtt. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint hőmérsékletérzékeny plazmidokat használunk a transzpozonokat beépülve tartalmazó gazdasejtek szelektálása céljából. Az olyan plazmidok, mint például a pTV51Ts és a pLTV1, nem képesek egy bizonyos hőmérséklet fölött replikálódni. Az elmondottak értelmében egy hőmérsékletérzékeny plazmidon található DNS-szegmens nem permisszív hőmérsékleten csak abban az esetben fog a gazdasejtben fennmaradni, ha az adott DNS-szegmens a gazdasejt genomjába integrálódott. A transzpozíciós hatékonyságot fokozhatjuk, amennyiben a transzpozonban található markergénre szelektálunk, például egy gyógyszerrezisztenciát, aminosav-auxtrofótiát vagy prototrófiát, vagy hasonlókat kódoló génre.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint a találmány szerinti DNS-szegmenst többszörös transzpozíciós események előidézésére használjuk, egyetlen B.t. gazdasejten belül. Amennyiben hőmérsékletérzékeny plazmidvektorokat alkalmazunk, oly módon érhetjük el, hogy a DNS-szegmens a gazdasejt genomi DNS-ébe többszörösen beinszertálódjék, hogy gyors hőmérsékletemelést alkalmazunk. Amennyiben olyan transzpozon-elemeket alkalmazunk, melyek valamely hatóanyaggal szembeni rezisztenciát kódoló markergéneket hordoznak, akkor ha az adott hatóanyag nagyobb mennyiségével érintkeztetjük a gazdasejteket, a többszörös transzpozíciós események valószínűsége megnő. Amennyiben a gazdasejteket mitomicin C-vel érintkeztetjük, a transzpozíciós gyakoriság szintén fokozódik. Eljárhatunk úgy is, hogy a gram-pozitív gazdasejtet egy egész sor különböző transzpozon elemmel transzformáljuk, mely transzpozon elemek mindegyike egyedi szelekciós markergént hordoz.

A találmány egy megvalósítási módja szerint a találmány szerinti transzpozon-elem tartalmaz minden olyan szabályozó szekvenciát, amely szükséges ahhoz, hogy a rovarölő hatású fehérjét kódoló beinszertálódott DNS-szekvencia expresszáldjék a gazdasejtben. A találmány más megvalósítási módjai szerint eljárhatunk úgy is, hogy a transzpozon-elemet úgy tervezzük meg, hogy egy operont vagy génfüziót hozzon létre, amelyben a rovarölő hatású fehérjét kódoló szekvencia a gazdasejt DNS-ének transzkripció és/vagy transláció szabályozása alá helyeződik. Operonokat és génfüziókat előállíthatunk a Youngman-féle TN917-közvetítette operon és génfüziós eljárások alkalmazásával [79-103. old. (1973)], valamint egyéb szakirodalomból ismert eljárások alkalmazásával.

A találmány szerinti transzpozon-elemet felhasználhatjuk olyan transzformált B.t. gazdasejtek előállítására, melyek legalább egy exogén rovarölő hatású fehérjét expresszálnak, oly módon, hogy a találmány szerinti transzpozon-elemhez funkcionálisan hozzákapszolunk legalább egy rovarölő hatású fehérjét kódoló DNS-szekvenciát, amely képes B.t.-sejtekben replikálódni és expresszáldni, ily módon egy DNS-szegmenst állítunk elő, és amennyiben B.t.-sejteket transzformálunk az előállított DNS-szegmennel, a rovarölő hatású fehérjét kódoló DNS-szekvencia beintegrálódik a B.t.-sejt kromoszómájába, ahol expresszáldhat, *Bacillus thuringiensis* gazdasejteket transzformálunk a kialakított DNS-szegmennel, és hagyjuk, hogy a DNS-szegmens véletlenszerűen beintegrálódjék a B.t. sejt kromoszómájába, majd a transzformált gazdasejteket izoláljuk. A B.t. genomba véletlenszerűen integrálódni képes transzpozon-elemet vagy DNS-szekvenciát előállíthatjuk a technika állása szerint ismert eljárások alkalmazásával, ilyen eljárások például a restrikciós enzimes emésztés, a ligálás, a

klónozás, és/vagy a kémiai szintézis. A rovarölő hatású fehérjét kódoló gént vagy DNS-szekvenciát hasonló, a technika állása szerint ismert eljárások alkalmazásával állíthatjuk elő, és ugyanezen eljárások alkalmazásával funkcionálisan hozzákapcsolhatjuk valamely véletlenszerűen integrálódni képes DNS-szekvenciához.

A transzformálást végrehajthatjuk például transzfekció, elektroporáció, transzdukció vagy konjugáció alkalmazásával. A transzformált gazdasejteket a bennük található szelektálható markergénre történő szelektálással izolálhatjuk. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint a véletlenszerűen integrálódni képes DNS-szekvencia tartalmazza a tM917-transzpozont.

A B.t.-sejtek rovarölő spektrumát kiszélesíthetjük oly módon, hogy fenntartjuk a sejtek endogén rovarölő hatású fehérjét kódoló DNS-szekvenciáinak expresszióját, és egy vagy több exogén rovarölő hatású kódoló gént funkcionálisan hozzákapcsolunk egy olyan transzpozon elemhez, amely képes a B.t.-sejtek kromoszómáiba integrálódni.

A találmány szerinti DNS-szegmenst előállíthatjuk hibridplazmid formájában is. Szakember számára kézenfekvő, hogy a hibridplazmid előállítására felhasználható bármely olyan plazmidszekvencia, amely alkalmas arra, hogy a találmány szerinti DNS-szegmenst hordozza. Különösen alkalmasak a találmány szerinti megoldásban történő felhasználásra a következő plazmidok: pSB210.1, pSB210.2, pSB210.3, pSB136 és pSB147, mely plazmidokat az alábbiakban az 1., 6. és 11. példákban részletezünk, de alkalmazhatuk egyéb plazmidokat is.

A találmány szerinti DNS-szegmenst előállíthatjuk gram-pozitív baktériumokban működőképes hibrid ingázóvektor formájában is. Erre a célra

alkalmas minden olyan vektor, amely képes önállóan replikálódni gram-negatív baktériumokban, élesztőkben vagy bármely egyéb egysejtű gazdaszervezetben, amellett, hogy gram-pozitív baktériumokban is képes replikálódni.

Az ilyen ingázóvektorok a technika állása szerint jól ismertek. Az ingázóvektorok alkalmasságát először úgy demonstrálták, hogy egy *B.t.* kristálytoxin-gént egy kristály-minusz-*B.t.* törzsbe vittek át, melynek elnevezése cryB volt. A kapott transzformáns sejtek expresszálták a 130 kD kristályfehérjét. Az elmondottakon túl Lereclus és mtsai. előállítottak egy másik ingázóvektort, amely magában foglalta a pHT1030-jelű *B.t.* eredetű plazmidot, valamint a pUC18-plazmidot, és az előállított ingázóvektor alkalmazásával egy *B.t.* 407-jelű törzsből izolált cryIA(a)-gént átvittek a cryB-törzsbe [Lereclus, D. és mtsai.: FEMS Microbiol. Lett. 49, (1988)]. Amennyiben a vektort a 407-törzs cry-származékába juttatták be, a toxin-gén expressziójának mértéke jelentősen fokozódott a vad-típusú törzsben tapasztalható expresszióhoz képest, ami lehetséges, hogy a gén megnövekedett kópiaszámának következménye volt. Miteva és mtsai. előállítottak egy olyan ingázóvektort, amely magában foglalta a 3,65 Mdaltonos *B.t. israelensis* plazmidot, és a pBR322-plazmidot [Miteva, V.I. és mtsai.: Arch. Microbiol. 150, 496 (1988)]. Leírtak olyan ingázóvektorokat is, melyek egyrészt a *B.t.* kurstaki eredetű HD263, HD73, HD1 és *B.t. israelensis* eredetű *B.t.* plazmidokat, másrészt pedig *E. coli* vektorokat tartalmaztak. Egy ilyen ingázóvektort felhasználtak arra, hogy egy fedelesszárnnyúakkal szemben aktív toxingént egy *B.t. israelensis* törzsbe juttassanak, és így módon a baktérium rovarölő spektrumát kiszélesítették, és az aktív lett mind kétszárnnyú-

akkal, mind pedig fedelesszárnyúakkal szemben [Crickmore, N. és mtsai.: Biochem. J. 270, (1990)].

A találmány tárgyát képezik továbbá *B.t.* gazdasejtek, melyek tartalmaznak legalább egy találmány szerinti rovarölő hatású fehérjét kódoló DNS szekvenciát, stabilan beépülve kromoszómájukba. Alkalmas *B.t.* gazdasejtek többek között az 1. táblázatban bemutatott *B.t.* alfajok és azok különböző törzsei, valamint az alább bemutatott *B.t.* törzsek, csakúgy mint bármely más *B.t.* alfaj vagy törzs, mely a technika állása szerint ismeretes. A leírásban használt értelemben a "gazdasejt" kifejezés vonatkozik a *B.t.* baktérium vegetatív és spóra formájára is. A találmány szerinti DNS-szegmens gazdasejt kromoszómájába történő stabil beépülését úgy értelmezzük, hogy a DNS-szegmens sok nemzedéken keresztül fennmarad a gazdasejt kromoszómájában, a *B.t.* gazdasejtek sporulációs és csírázási fázisaiban is.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint a transzformált *B.t.* gazdasejtek egynél több expresszálnak exogén rovarölő hatású fehérjét kódoló DNS-szekvenciát tartalmaznak, stabilan kromoszómájukba integrálódva. A többszörösen előforduló kódoló szekvenciák a fent leírt rovarölő hatású fehérjéket kódoló szekvenciák bármely kombinációját tartalmazhatják, és tartalmazhatják egyazon rovarölő hatású fehérjét kódoló szekvencia egynél több kópiáját is. A találmány egy különösen előnyös megvalósítási módja szerint a találmány szerinti gazdasejt képes kettő vagy több különböző rovarölő hatású fehérjét expresszálni.

Szakember számára nyilvánvaló, hogy a találmány szerinti DNS-szegmens felhasználható bármely exogén DNS-szekvencia *B.t.* gazdasejtek kromoszómájába történő stabil beépítésére. A leírásban használt értelemben az exogén DNS-kifejezés jelent bármely olyan DNS-t, amely egy *B.t.* gazda-

sejt kromoszómális DNS-ét megváltoztatja, amennyiben a gazdasejt kromoszómájába integrálódik. A kívánt DNS-szekvenciát bejuttathatjuk *B.t.* sejtekbe a találmány szerinti rovarölő hatású fehérjét kódoló DNS-szekvenciák esetén leírtakhoz hasonlóan. Az elmondottak értelmében a találmány tárgyát képezik olyan *B.t.* gazdasejtek, melyek kromoszómájába a gazdasejt által replikálható és expresszálnak exogén DNS-szekvencia van beépülve.

A találmány szerinti DNS-szegmenst előállíthatjuk oly módon, hogy előállítunk egy *B.t.* baktériumból származó kromoszómális DNS-szekvenciával homológ DNS-szekvenciát, és ehhez funkcionálisan hozzákapcsolunk legalább egy rovarölő hatású fehérjét kódoló DNS-szekvenciát, oly módon, hogy amennyiben egy *Bacillus thuringiensis* baktériumot a DNS-szegmenssel transzfektálunk, a rovarölő hatású fehérjét kódoló DNS-szekvencia expresszáldjék.

A homológ DNS-szekvenciát előállíthatjuk oly módon, hogy *B.t.* baktériumokból készített ismert genomi könyvtárakat szűrővizsgálatnak vesszük alá. Amennyiben a kívánt *B.t.* baktériumból előállított genomi könyvtár nem hozzáférhető, a technika állása szerint ismert eljárások alkalmazásával előállíthatunk ilyet. Genomi könyvtárak szűrővizsgálatára alkalmas eljárások szintén ismeretesek a technika állása szerint. Amennyiben a kívánt szekvenciát azonosítottuk, azt a genomból restrikciós enzimes emésztéssel kihasíthatjuk. Amennyiben a DNS- vagy peptidszekvencia ismeretes, a technika állása szerint ismert eljárások alkalmazásával a kívánt DNS-fragmenseket megszentetizálhatjuk. Eljárhatunk úgy is, hogy amennyiben nem áll rendelkezésünkre ismert DNS- vagy peptidszekvencia, genomi eredetű restrikciós fragmenseket használunk homológ fragmensek véletlenszerű klónozásához.

A rovarölő hatású fehérjét kódoló DNS-szekvenciát funkcionálisan hozzákapcsolhatjuk a homológ DNS-szekvenciához oly módon, hogy amennyiben homológ rekombináció útján a rovarölő hatású fehérjét kódoló DNS beintegrálódik a gazdasejt kromoszómájába, a rovarölő hatású fehérjét kódoló DNS képes legyen *Bacillus thuringiensis* sejtekben expresszálni. A találmány egy megvalósítási módja szerint a DNS-szegmens tartalmaz olyan szabályozószekvenciákat, melyek képesek a rovarölő hatású fehérjét kódoló DNS transzkripcióját és transzlációját *B.t.* gazdasejtekben előidézni. Az ilyen szabályozószekvenciák tartalmazhatnak többek között promótert, operátort, represszort és/vagy enhanszer szekvenciákat, transzkripciós iniciációs és terminációs helyeket, riboszómakötő helyeket, transzlációs start- és stopkódonokat, és/vagy egyéb technika állása szerint ismert szabályozószekvenciákat. A rovarölő hatású fehérjét kódoló DNS-szekvencia például funkcionálisan hozzá lehet kapcsolva olyan szabályozószekvenciához, melyek abban a bakteriális gazdasejtben szabályozzák a rovarölő hatású fehérjét kódoló DNS expresszióját, amelyből az származik.

A találmány tárgyát képezik olyan DNS-szegmensek is, melyek úgy vannak tervezve, hogy operon vagy génfüziókat hozzanak létre a gazdasejt DNS-én belül. Operonfüzió esetén a DNS-szegmens tartalmazhat olyan szabályozóelemeket, melyek képesek a rovarölő hatású fehérjét kódoló mRNS transzlációját vezérelni. A homológ DNS-szekvenciát tervezhetjük úgy, hogy az a rovarölő hatású fehérjét kódoló DNS-szekvenciát a gazdasejt DNS-én belül oly módon integrálja be egy operonba, hogy a gazdasejt kromoszómájába történő beintegrálódást követően, hogy a gazdasejt szabályozó szekvenciái irányítsák a rovarölő hatású fehérjét kódoló DNS-szekvencia transzkripcióját és transzlációját. Operon- és génfüziók előállítására alkal-

mas eljárások leírását megtalálhatjuk többek között Sambrook és mtsai. kézikönyvében [Sambrook és mtsai.: "Molecular Cloning A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY (1989)].

Megalkotása után a találmány szerinti DNS-szegmenst a technika állása szerint ismert eljárások alkalmazásával izolálhatjuk, ilyen eljárások például a centrifugálás vagy az agaróz gélelektroforézis.

A találmány szerinti DNS-szegmens előállítása során beépíthetünk továbbá egy szelektálható markergént is, amely lehet olyan gén, amely gram-pozitív gazdasejtektől eltérő egysejtű gazdasejtekben képes expresszálni, lehet olyan gén, amely gram-pozitív gazdasejtekben képes expresszálni és lehet olyan gén is, amelyik képes expresszálni mind gram-pozitív mind pedig gram-negatív gazdasejtekben. Valamely egysejtű élőlényben működőképes szelektálható markergént abból a célból használunk, hogy a DNS-szegmenst abban az élőlényben klónozzuk és tisztítsuk.

A találmány szerinti szelektálható markergéneket funkcionálisan hozzákapszolhatjuk a DNS-szegmenshez oly módon, hogy a markergént a DNS-szegmens mellé illesztjük vagy pedig a gram-pozitív szelekciós marker-gént beinszertáljuk a DNS-szegmensbe oly módon, hogy amennyiben a DNS-szegmens a *B.t.* gazdasejt kromoszómájába integrálódik, a szelektálható markergén ne befolyásolja károsan a rovarölő hatású fehérjét kódoló DNS-szekvencia *B.t.* gazdasejtben történő expresszióját. Az elmondottakon túl fontos még, hogy a gram-pozitív szelekciós markergén kapcsolása ne befolyásolja károsan a klónozásra használt gazdasejtben történő szelekció célját szolgáló markergén működését (nem gram-pozitív gazdasejt alkalmazása esetén), és a markergénnek a *B.t.* gazdasejtben expresszálnak kell lennie. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint a gram-

pozitív szelekciós markergén hordozza az expressziójához szükséges valamennyi szabályozóelemet is. A gram-pozitív szelektálható markergént úgy is megválaszthatjuk, hogy az a korábbiakban leírtakhoz hasonlóan a gazdasejt DNS-ében található operonban vagy valamely génnel fúzionálva működjék.

A találmány szerinti eljárás tartalmazhat egy további lépést is, amely szerint a fent leírt DNS-szegmenshez funkcionálisan egy replikációs origót kapcsolunk, amely működőképes a klónozáshoz használt egysejtű organizmusban. Ez az organizmus lehet rovarsejt, CHO-sejt, gram-negatív baktérium, élesztő és hasonló. A fent leírt replikációs origót funkcionálisan hozzákapcsolhatjuk a találmány szerinti DNS-szegmenshez oly módon, hogy a replikációs origót a DNS-szegmensben belül úgy helyezzük el, hogy az ne gátolja a DNS-szegmens egyetlen további elemének működését sem, például a rovarölő hatású fehérjét kódoló DNS-en és az azzal homológ DNS-szekvenciákon kívül.

Olyan *B.t.* gazdasejtet, amely kromoszómájában stabilan beépülve tartalmaz egy olyan DNS-szegmenst, amely legalább egy rovarölő hatású fehérjét kódol, az alábbiak szerint állíthatunk elő:

- i) előállítunk egy találmány szerinti DNS-szegmenst;
- ii) egy *B.t.* gazdasejtet a DNS-szegmessel transzformálunk;
- iii) lehetővé tesszük, hogy homológ rekombináció játszódjék le, és a rovarölő hatású fehérjét kódoló DNS-szekvencia stabilan beépüljön a gazdasejt kromoszómájába; és
- iv) izoláljuk a transzformált gazdasejtet.

B.t. gazdasejteket a DNS-szegmessel transzformálhatunk szakember által jól ismert, a technika állásához tartozó eljárások alkalmazásával, pél-

dául elektroporációval, transzfekcióval, transzdukcióval és konjugációval, vagy a felsorolt eljárások kombinációjával.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy széles spektrumú rovarölő hatású készítmény, amely rovarölésben hatásos mennyiségben találmány szerinti hibrid gazdasejteket, valamint hordozót tartalmaz.

A találmány szerinti készítmény 1 gramm hordozóra vonatkoztatva körülbelül 10^6 és 10^{13} közötti számú hibrid mikroorganizmust, előnyösebben pedig körülbelül 10^{10} és 10^{11} közötti számú mikroorganizmust tartalmaz. Mindazáltal más mikroorganizmus mennyiségek is alkalmazhatók. A találmány szerinti készítményben a *B.t.* gazdasejtek jelen lehetnek akár vegetatív, akár spóra formában. Alkalmas hordozók a technika állása szerint jól ismertek, és szakember képes kiválasztani a találmány szerinti megoldásban alkalmazható hordozókat. A hordozók tipikusan inert vegyületek vagy készítmények, melyek nem lépnek kölcsönhatásba sem a rovarölő hatású készítményben található gazdasejtekkel, sem a kezelni kívánt növényekkel. Mindazáltal alkalmazhatók olyan hordozók is, melyek a növények által vagy a talajlakó élőlények által metabolizálhatók, és ezért biodegradábilisak. A rovarölő hatású készítmény hatékonysága és hatásának hosszantartósága fokozható olyan hordozók hozzáadásával, mint például szétszóródást elősegítő hatóanyagok, ragasztóanyagok, nedvesítő hatóanyagok, és hordozóként alkalmazhatunk például kukoricalisztból készített adalékanyagot, Loco® (amin-sztrearát) permetlé adalékanyagokat, Plyac®-t, Triton B-1956-ot, L-100- és H-35-jelű polibuténeket, kukoricaolajat, Triton B-1946-ot, valamint Cellosize QP 4400-et, borsavat, felületaktív olajokat, Pinolén®-t, valamint egyéb technika állása szerint ismert adjuvánsokat. A hatóanyagokat a technika állása szerint ismert eljárással keverjük és formulázzuk, és a talál-

mány szerinti készítmény por, folyadék vagy aeroszol formájában szereljük ki. A hibrid gazdasejtet legelőnyösebben alacsony hőmérsékleten adjuk a készítményhez, és a sejteket csak felhasználás előtt olvasztjuk fel.

A találmány szerinti rovarölő hatású készítmények tartalmazhatnak továbbá egyéb rovarölő hatású vegyületeket is. Ismeretes, hogy a *B.t.* tartalmú készítmények számos vegyi rovarölő szerrel kompatibilisek, ilyen szerrek összefoglalását megtalálhatjuk például Herfs és Pflanzenkrankh közleményében [Herfs, W., és Pflanzenkrankh, Z.: Pflanzenschutz 72, 584 (1965)]. Az elmondottak értelmében a találmány szerinti rovarölő hatású készítmények tartalmazhatnak egy vagy több rovarölő hatású hatóanyagot, a Herfs-féle közleményben felsoroltak közül, vagy tartalmazhatnak a technika állása szerint ismert *B.t.* gazdasejteket, vagy ezek hibridjeit, melyeket a találmány szerinti megoldással összhangban állítottunk elő.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy eljárás növények rovarkártól történő megvédésére, mely eljárás szerint a találmány szerinti rovarölő hatású készítmény hatékony mennyiségét a növényre vagy a növény körüli talajba juttatjuk.

A kereskedelmi forgalomban beszerezhető mikroorganizmus-tartalmú rovarölő készítmények alkalmazási eljárásai, melyek a technika állása szerint jól ismertek, alkalmasak a találmány szerinti rovarölő hatású készítmények alkalmazására is. Tipikusan a találmány szerinti készítményeket úgy alkalmazzuk, hogy holdanként körülbelül 10^8 - 10^{16} hibrid mikroorganizmust juttatunk ki, előnyösebben pedig holdanként körülbelül 10^{13} - 10^{14} hibrid mikroorganizmust juttatunk ki. A találmány szerinti készítményeket legelőnyösebben a növények permetezése útján alkalmazzuk, és alkalmazható ismételt kijuttatás is.

Az alábbi példákkal a találmány szerinti megoldást kívánjuk részletesebben szemléltetni anélkül azonban, hogy igényünket az ismertetettékre korlátoznánk, hacsak másképpen nem jelezzük.

1. példa

Plazmidok előállítása

A kompetens *E. coli* DH5a (Gibco BRL) és GM2163 (New England Biolabs) sejteket Alexander eljárása alapján állítottunk elő [Alexander, D.C.: Meth. Enzymol 154, 41-63. (1987)]. A plazmidokat az *E. coli* sejtekből Birnboim és Doly eljárása szerint izoláltuk [Birnboim és Doly: Nucl. Acids. Res. 7, 1513 (1979)].

A pSB210.2-plazmidot - amely tartalmazza a cryIC-gént, a *B. subtilis* ermC-génjét, amely eritromicin rezisztenciát kódol, valamint a foszfolitáz C régiót, melyet Lechner írt le, és amely integrációs célpontként szerepel [Lechner és mtsai.: Mol. Microbiol. 3, 621 (1989)] - egy háromlépéses eljárással állítottuk elő. Először az 1. ábrán látható pSB210-plazmidot állítottuk elő, a 2. ábrán látható pSB140-plazmidból, melyet a 2. példában ismertetünk részletesebben, oly módon, hogy a plazmid EcoRI és HindIII hasítóhelyei közé egy többszörös klónozóhelyet (MCS) építettünk be. Az MCS-t úgy állítottuk elő, hogy összeillesztettük a KK14- és KK14B-jelű oligonukleotidokat, melyek szekvenciáját az alábbi 2. táblázatban adjuk meg, amely oligonukleotidokat az Applied Biosystems-től beszerzett oligonukleotid tisztító kromatográfiás eszközökkel tisztítottunk meg, a gyártó utasításai szerint.

2. táblázat

Az oligonukleotidok szekvenciái

Megjelölés	Szekvencia (5' → 3')	Hibridizálódó gén	Szekv.az.sz.
Phos1	GGAACGCTACATACTAGTGATAGAGTAG	phospholipase C	1
Phos4	GCTTGTACACCGCAACTGTTTCGCATG	phospholipase C	2
KK14B	AGCTTGC GGCCGCGTCGACCCCGGGCCATGGGGGCGG	(MCS)	3
KK14	AATTCGGGCCCCCATGGCCCGGGTTCGACGCGGCCGCA	(MCS)	4
GalP1	CCACAGTTACAGTCTGTAGCTCAATTACC	cryIC	5
GalP2	CCGCTACTAATAGAACCCTGCACCA	cryIC	6
NHS20	CAATACATTATCCATGGAAAATTCCTCCTTAAATATCATG	cryIIA	7
NHS39	GAGCAATGAAAGAGTTAGGGCCCTGTTTAAGGTGTCATG	cryIIA	8
NHS42	GAGTGAATTATGGGGG	cryIIA	9
NHS43	ATTTTGTATTAAACGG	cryIIB	10
cryIIA1	ACTATTTGTGATGCGTATAATGTA	cryIIA	11
cryIIA2	AATTCCCCATTCATCTGC	cryIIA	12
PG2	GAAATCGGCTCAGGAAAAGG	ermC	13
PG4	CCTTAAACATGCAGGAATTGACG	ermC	14
PG5	CTATTGGTTGGAATGGCGTG	ermC	15
TYIAA	GAGCCAAGCAGCTGGAGGAGTTTACACC	cryIA(a)	16
TYIAC	TCACTTCCCATCGACATCTACC	cryIA(c)	17
TYIUN12	ATCACTGAGTCGCTTCGCATGTTTGACTTTCTC	cryI-type5	18
TY6	GGTCGTGGCTATATCCTTCGTGTACAGC	cryI-type	19
TY13	ACAGAAGAATTGCTTTTCATAGGCTC	cryI-type	20
TY14	GAATTGCTTTTCATAGGCTCCGTC	cryI-type	21
Tet3	CAACAAACGGGCCATAAGCTTGTATAAG	tet	22
Tet4	GCCGTCTGTAACGGTACCTAAGG	tet	23
CPO1.Rev	CACCCAGTTTGTACTCGCAGG	tet	24

A 2. lépésben a fos-C-gént építettük be a pSB210-plazmidba. A fos-C-régiót PCR-eljárással amplifikáltuk HD73-össz-DNS-ről, a fenti 2. táblázatban ismertetett Phos1- és Phos4-jelű láncindító oligonukleotidok alkalmazásával. A PCR-terméket a pUC18-plazmid Sma1-helyére klónoztuk, és így állítottuk elő a pSB139-plazmidot. A fos-C célpont régiót a pSB139-plazmidból izoláltuk egy 2,2 kb hosszúságú tompavégűvé alakított Kpn1/BamH1-fragmensként, mely fragmenst gélből tisztítottuk és a pSB210-plazmidba ligáltuk, mely plazmidot előzőleg Msc1- és BamH1-enzimekkel emésztettük, majd "GeneClean" reagenskészlet (Bio101) alkalmazásával tisztítottunk, a gyártó utasításai szerint. A kapott plazmidot, melynek szerkezetét a 3. ábrán láthatjuk, pSB210.1-plazmidnak neveztük el.

A utolsó lépésben a kialakított plazmidba beépítettünk egy kristálygént. A pSB210.2-plazmid tartalmazza a cryI-C-gént egy 4,2 kb-os ApaI/NotI-fragmenszen, amely a pSB619-plazmidból származik, mely plazmidot részletesen az alábbi 3. példában ismertetjük. A pSB619-plazmidot ApaI- és NotI-enzimekkel emésztettük, majd izoláltuk az 4,2 kb-os ApaI/NotI-fragmenst. A 4,2 kb-os ApaI/NotI-fragmenst az előzőleg ApaI- és NotI-enzimekkel elhasított pSB210.1-plazmidba ligáltuk, és így módon kialakítottuk a pSB210.2-jelű plazmidot, melynek szerkezetét a 4. ábra szemlélteti. A pSB210.3-plazmid tartalmazza a pSB013-plazmidból egy 6 kb-os fragmensként izolált cryIC-gént (a plazmidot részletesebben a 4. példában ismertetjük), a fragmenst ApaI- és NotI-enzimekkel végrehajtott emésztés után izoláltuk. A 6 kb-os ApaI/NotI-fragmenst elektroelúcióval tisztítottuk, és a pSB210.1-plazmidba ligáltuk, melyet előzőleg ApaI- és NotI-enzimekkel hasítottunk, így módon előállítva a pSB210.3-plazmidot, melynek szerkezetét az 5. ábrán mutatjuk be. A pSB3210.3-plazmid abban különbözik a pSB3210.2-plazmidtól, hogy ebben a cryIC-gént a cryIIA-promóter mögé helyeztük, a pSB3210.2-plazmidban pedig a cryIC-gén a natív cryIC-promóter szabályozása alatt áll. Mindkét plazmidban a cryIC-gént a cryIAC-terminátor követi. A pSB147-plazmidot az alábbi 5. példában leírtak szerint állítottuk elő. Ez a plazmid integrációs célpontként tartalmazza a foszfolipáz-C régiót, tartalmazza továbbá a cryIIA-operont, valamint az ermC-gént, amely eritromicin rezisztenciát kódol. Az elektroporációs kísérletekben olyan plazmid-DNS-t használtunk, melyet GM2163-jelű dam⁻, dcm⁻, *E. coli* törzsből izoláltunk [Woodcock, D.M.: Nucleic Acids Res. 17, 3469 (1989)].

2. példa

A pSB140-plazmid előállítása

A pSB901-plazmidot az *ermC*-gén izolálása céljából állítottuk elő, mely gén eritromicin rezisztenciát kódol. A pSB901-plazmidot úgy állítottuk elő, hogy a Monod és mtsai. által leírt [Monod és mtsai.: J. Bacteriol. **167**, 138 (1981)] pLM13-jelű *Bacillus subtilis* plazmidból az *ermC*-gént egy HindIII/ClaI-fragmensként izoláltuk. Az *ermC*-gént tartalmazó HindIII/ClaI fragmenst HindIII és AccI enzimekkel hasított pUC18-plazmidba ligáltuk. Abból a célból, hogy a pBR322-plazmidban található tetr-gént a pSB901-plazmidból származó *ermC*-génre cseréljük, a pBR322-plazmidot megemésztettük Aval-enzimmal, és a linearizált vektort az *E. coli* DNS-polimeráz-I-enzim Klenow-fragmensével kezeltük és így tompavégűvé tettük azt. A Klenow-fragmenssel végzett kezelést követően a pBR322-plazmidot HindIII-enzimmal emésztettük, és az emésztés eredményeként kapott nagy fragmenst elválasztottuk a tetr-gént tartalmazó fragmenstől. A pSB901-plazmidot először SmaI- majd HindIII-enzimekkel emésztettük, és izoláltuk az *ermC*-gént tartalmazó SmaI/HindIII-fragmenst. Az *ermC*-gént tartalmazó fragmenst ezután összeligáltuk a pBR322 nagyobbik HindIII-fragmensével, így módon előállítva a pSB140-plazmidot. A pSB140-plazmid előállításának vázlatát a 2. ábrán láthatjuk.

3. példa

A pSB619-plazmid előállítása

A 8 kb-os EcoRI-DNS-fragmensként izolált *crylC*-gént a Lambda ZAP-II-vektor EcoRI helyére klónoztuk, mely vektort a Stratagene cégtől szereztük be. Az említett gént oly módon izoláltuk, hogy az USDA intézettől

beszerzett *Bacillus thuringiensis aizawai* HD229 törzsből készített plazmid preparátumot EcoRI-enzimmal emésztettük, majd a kapott fragmenseket gélelektroforézissel elválasztottuk egymástól, és a körülbelül 8 kb hosszúságú fragmenseket izoláltuk a gélből. A cryIC-gént előállíthatjuk a Honee és mtsai. által leírt klónozási eljárás alkalmazásával is [Honee, G., van der Salm, T., és Visser, B.: Nucl. Acids. Res. 16, 6240 (1988)]. A cryIC-klónt két egymástól elkülönített lépésben emésztettük, az első lépésben HindIII- és KpnI-enzimmal emésztettünk, a 2. lépésben pedig KpnI- és EcoRI-enzimekkel. Az emésztés eredményeként kaptunk egy 2,6 kb-os HindIII/KpnI-fragmenst, amely tartalmazta a cryIC-szekvencia N-terminális részét a promóterrel együtt, valamint kaptunk egy 2,3 kb-os KpnI/EcoRI-fragmenst, amely tartalmazta a C-terminális szekvenciát és a terminátort. A cryIC-gént úgy rekonstruáltuk, hogy a 2,6 kb-os HindIII/KpnI-fragmenst a 2,3 kb-os KpnI/EcoRI-fragmenshez ligáltuk a Pharmacia cégtől beszerzett pTZ19R-vektorban. A cryIC-gén transzlációs starthelyére genetikai manipuláció útján bejuttattunk egy egyedi NcoI-hasítóhelyet, a stop kódot követően pedig egy további EcoRI-helyet juttattunk be. Ezek a restrikciós hasítóhelyek lehetővé tették, hogy a cryIC-gén teljes kódoló régióját egyetlen folytonos fragmenszen izolálni tudjuk. A cryIC-promótert és a teljes kódoló régiót tartalmazó 3,8 kb-os HindIII/EcoRI-fragmenst ezután a pBluescript-vektorba klónoztuk, a PCR-eljárással előállított 350 bp cryIA(C)-terminátorral együtt.

A cryIA(C)-terminátort oly módon állítottuk elő PCR-eljárás alkalmazásával, hogy a cryIA(C) publikált szekvenciája alapján szintetizált két alábbi láncindító oligonukleotidot alkalmaztuk:

első láncindító: GTCTCATGCAAACCTCAGG, szekvenciaazonosító szám: 25,
 második láncindító: CTCTGGCGCTCCATCTAC, szekvenciaazonosító szám: 26.

A PCR-reakcióban templátként egy *B.t. kurstaki* HD73-törzsből klónozott cryIA(C)-gént használtunk. A PCR-eljárással előállított terminátort a pBluescript KS+ (Stratagene) vektor Xba1-helyére klónoztuk, miután a vektort Klenow-fragmenssel tompavégűvé alakítottuk, a terminátort a T3-promóterrel azonos orientációban klónoztuk. A cryI(C)-promótert és kódoló régiót tartalmazó HindIII/EcoRI-fragmenst ezután a pBluescript KS+-vektor HindIII- és EcoRI-helyeire klónoztuk. A cryIA(C)-gén klónozását és szekvenálását Adang és mtsai. írták le [Adang, M.J., Staver, M.J., Rouchelleau, T.A., Leighton, J., Barker, R.F. és Thompson, D.V.: Gene 36, 289 (1985)]. A kapott plazmid konstrukciót pSB619-nek neveztük el.

4. példa

A pSB013-plazmid előállítása

A *B.t. kurstaki* HD-1-törzsét az USDA intézettől szereztük be. A HD-1-törzsből az "ASAP" reagenskészlet alkalmazásával izoláltunk össz-DNS-t, a Boehringer Mannheim cég használati utasítása szerint. A *B.t. kurstaki* HD-1-össz-DNS-ből kiindulva PCR-reakcióval előállítottuk a teljes cryIIA-operont tartalmazó 1800 bp DNS-fragmenst, a PCR-reakcióban láncindítóként az NHS39- és NHS20-jelű kinázozott oligonukleotidokat alkalmaztuk, mely oligonukleotidok szekvenciáját a fenti 4. táblázatban mutatuk be. A PCR-reakcióban Vent-polimerázt alkalmaztunk, a gyártó utasításai szerint (New England Biolabs, Beverly, MA). A PCR-reakció termékeit gélből izoláltuk, és HindIII-enzimmal emésztett pTZ19R-vektorba ligáltuk. A

ligálási reakció termékét kompetens *E. coli* DH5 α -sejtek transzformálására használtuk. A transzformánsokat 75 μ g/ml ampicillint (amp) és 40 mmól/l Xgal-t tartalmazó LB-lemezekken szelektáltuk. A transzformánsokat található plazmidokat ApaI- és NcoI-enzimes emésztéssel vizsgáltuk, és a pTZ19R-plazmid többszörös klónozó helyén az 1800 bp-os PCR-fragmens orientációját AflII-enzimmal végzett emésztés útján határoztuk meg. Egy plazmidnak, amely az 1800 bp-os fragmenst a kívánt orientációban tartalmazta, a pSBOO9 nevet adtuk.

a pSB070 egy pSB619-hez hasonló plazmid, amely a cryIC kódoló régió helyett a cryIIIA kódoló régiót tartalmazza. A pSB070-plazmid előállítása során úgy járhatunk el, hogy a *B.t. tenebrionis*ból vagy *B.t. sandiegoból* származó cryIIIA-gént a Herrnstadt, C. és mtsai. által leírtak szerint megklónozzuk [Herrnstadt, C., Gilroy, T.E., Sobieski, D.A., Bennett, B.D. és Gaertner, F.H.: *Gene* 57, 37 (1987)].

A cryIIIA-gént tartalmazó 3 kb-os HindIII-fragmenst a pTZ18R-plazmidba (Pharmacia) klónoztuk. Izoláltunk egy olyan plazmidot, amelyben a cryIIIA-gén kódoló régiójának C-terminális vége az EcoRI-helyet tartalmazó többszörös klónozó helyhez volt ligálva. Abból a célból, hogy a cryIIIA-gént a pSB070-plazmidba klónozzuk, az ATG-kódon felhasználásával genetikai manipuláció útján egy egyedi Nco-helyet alakítottunk ki, a transzlációs start helynél. Miután az NcoI-helyet kialakítottuk, a cryIIIA-kódoló régiót a pTZ18R-plazmidból NcoI- és EcoRI-enzimekkel végrehajtott emésztéssel kihalásítottuk, majd a pSB619-plazmidba klónoztuk, amelyből előzőleg a cryIC-kódoló régiót eltávolítottuk.

Mind a pSB009-plazmidot - amely pTZ19R-plazmidba klónozva tartalmazta a cryIIA-operon fragmenst -, mind pedig a pSB070-plazmidot -

amely tartalmazta a cryIIIA-kódoló régiót a cryIC-promóterrel és a cryIAC-terminátorral együtt - megemésztettük mind ApaI- mind pedig NcoI-enzimekkel. Izoláltuk a pSB070-plazmid 5667 bázispáros fragmensét, valamint a pSB009-plazmid 1800 bázispáros fragmensét, amely tartalmazta a cryIIA operont. Ezeket a fragmenseket összeligáltuk. A ligátummal kompetens *E. coli* DH5 α -sejteket transzformáltunk, majd a klónokat 75 μ g/ml ampicillint tartalmazó LB-lemezeken szelektáltuk, 37 °C-on, egy éjszakán keresztül. 12 klónból plazmidot izoláltunk, és azokat a kívánt operont egységet tartalmazó izolátum azonosítása céljából AflII- és NotI-enzimekkel emésztettük. A megfelelő plazmidot pSB010-nek neveztük el.

A cryIC-gént a pSB010-plazmid cryIIA operon egységébe klónoztuk. A pSB619-plazmidot úgy állítottuk elő, ahogy azt a fenti 3. példában leírtuk. A teljes hosszúságú cryIC kódoló régiót úgy állítottuk elő, hogy a pSB619-plazmidot NcoI-, EcoRI- és BglII-enzimekkel emésztettük, és izoláltuk a 3900 bázispáros NcoI/EcoRI-fragmenst. Az operon egységet tartalmazó vektort a pSB010-et megemésztettük NcoI- és EcoRI-enzimekkel, majd izoláltuk. A 3900 bázispáros cryIC-fragmenst összeligáltuk a pSB010-vektor megfelelő NcoI/EcoRI-fragmensével. A ligátummal DH5 α -sejteket transzformáltunk, és a klónokat 75 μ g/ml ampicillint tartalmazó LB-lemezeken szelektáltuk. 12 klónból származó plazmid DNS-t analizáltunk restrikciós emésztésekkel (AflII + EcoRI és AflII + BglII). A plazmidot, amely tartalmazta a teljes hosszúságú cryIC-gént, a cryIIA operontól 3'-irányban, pSB013-nak neveztük el.

5. példa

A pSB304-plazmid előállítása

A pSB304-plazmidot úgy állítottuk elő, hogy a *B.t. galleriae* HD232-törzsből származó cryIIA-operont megklónoztuk. A *B.t. galleriae* HD232-törzset az USDA intézettől szereztük be. Az operon megklónozása során úgy jártunk el, hogy a *B.t. galleriae* HD232-sejtekből izolált DNS-t HindIII-enzimmal emésztettük, és a körülbelül 5 kb méretű fragmenseket gélelektroforézissel tisztítottuk. A gélből tisztított fragmenseket HindIII-al emésztett pTZ18R-plazmidba (Pharmacia) ligáltuk, majd a ligátumot *E. coli* DH5 α -sejtekbe transzfektáltuk. A cryIIA-operont tartalmazó klónokat cryIIA-specifikus oligonukleotiddal (CCCATGGATAATGTATTGAATAG TGGAAG, szekvenciaazonosító szám: 27) végrehajtott hibridizációval azonosítottuk. Egy olyan plazmidot választottunk ki, amely a cryIIA- és a lacZ-géneket azonos orientációban tartalmazta. A kiválasztott klónból plazmid-DNS-t izoláltunk, és a cryIIA-operon nem kívánatos 5'-végi szekvenciáit tartalmazó BamHI-fragmenst a plazmidból eltávolítottuk, és így állítottuk elő a pSB304-jelű plazmidot. A cryIIA-operon és 5'-végi régiója szekvenciájáról további információkat találhatunk Widner és mtsai. közleményében [Widner, W.R. és Whiteley, H.R.: J. Bacteriol. 171, 965 (1989)].

6. példa

A pSB147-plazmid előállítása

A pSB140-plazmidot a 2. példában leírtak szerint állítottuk elő. A következő lépésben a pSB140-plazmidba beépítettük a cryIIA-operont. A cryIIA-operont a fenti 5. példában leírtak szerint előállított pSB304-plazmidból izoláltuk. A pSB304-plazmid a *B.t. galleriae* HD232-törzsből

származó cryIIA-operont tartalmazza, egy pTZ18R-plazmidba épített BamHI/HindIII-fragmensen megklónozva. A pSB30- és pSB140-plazmidokat EcoRI- és HindIII-enzimekkel megemésztettük. Izoláltuk a nagyméretű pSB140-fragmenst, majd a cryIIA-operont tartalmazó EcoRI/HindIII-fragmenst összeligáltuk a nagyméretű pSB140-fragmenssel, így módon előállítva a pSB141-plazmidot.

A következő lépésben beépítettünk a vektorba egy integrálódási célszekvenciát. A célszekvencia egy olyan DNS-fragmens volt, amely tartalmazta az USDA intézettől beszerzett *B.t. kurstaki* HD73-törzsből származó foszfatidil-inozitol-specifikus foszfolipáz-C-gént (plc). Ezt a DNS-fragmenst a HD73-törzsből izolált össz-DNS-t templátként használva, polimeráz láncreakció segítségével állítottuk elő. A *B.t. kurstaki* HD73-törzsből az "ASAP" reagenskészlet alkalmazásával izoláltunk össz-DNS-t a Boehringer Mannheim cég előírásai szerint.

Az ATCC 10792 nyilvántartású számú *B.t.* törzs plc-régiójának DNS-szekvenciáját a "GenBank" adatbázisból kerestük ki (nyilvántartási szám: X14178), mely szekvenciát Lechner és mtsai. írtak le [Lechner, M. és mtsai.: Mol. Microbiol. 3, 621 (1989)]. A szóbanforgó 2254 bázispárhosszúságú szekvenciárészlet a plc-génen kívül tartalmazott a géntől 5'-irányban egy 454 bázispár hosszúságú szekvenciárészletet, valamint egy 810 bázispár hosszúságú szekvenciárészletet a géntől 3'-irányban. A két PCR-láncindító oligonukleotidot, a 2. táblázatban ismertetett Phos1 és Phos4 láncindító oligonukleotidokat úgy terveztük, hogy azok képesek legyenek a plc-gént szegélyező régiókkal hibridizálódni. Ezen láncindító oligonukleotidok alkalmazásával a HD73-össz-DNS-templáton polimeráz láncreakciót hajtottunk végre, és így módon egy 2,2 kb-os DNS-fragmenst

állítottunk elő, amely tartalmazta a HD73-törzs plc-régióját. Az előállított PCR-terméket az *E. coli* DNS-polimeráz-I Klenow-fragmensével kezeltük, majd egy SmaI-enzimmal hasított pUC18-vektorba klónoztuk, így módon előállítva a pSB139-plazmidot.

A pSB139-plazmidot megemésztettük KpnI- és BamHI-enzimokkal, majd a plc-régiót elválasztottuk a vektorszekvenciáktól. A pSB141-plazmidot szintén hasítottuk KpnI- és BamHI-enzimokkal, és a kapott fragmenseket összeligáltuk az izolált plc-régiót tartalmazó fragmenssel. A kapott konstrukció, a pSB141.5-plazmid tartalmazta a pSB141-plazmid pBR322-eredetű részét, valamint a pSB139-plazmidból származó plc-régiót.

A következő lépésben a pSB141- és pSB141.5-plazmidot használtuk fel egy olyan plazmid előállítására, amelyik tartalmazta az ermC-gént, a plc-régiót, valamint a cryIIA-operont. A pSB141.5-plazmidot megemésztettük BamHI-enzimmal. A pSB141-plazmidot megemésztettük BamHI-enzimmal és a cryIIA-operont és az ermC-gént tartalmazó fragmenst izoláltuk. A cryIIA/ermC-BamHI-fragmenst összeligáltuk a linearizált pSB141.5-plazmiddal, előállítva így módon a pSB147-plazmidot. A pSB147-plazmid térképe a 6. ábrán látható, és a pSB147-plazmid előállításának vázlatát a 2. ábra mutatja be.

7. példa

Hibrid plazmid bejuttatása *B.t.*-sejtekbe elektroporáció útján

A kristálygéneket úgy építettük be a *B.t.*-sejtekbe, hogy a megfelelő plazmidokat elektroporáció útján juttattuk a sejtekbe (elektrotranszformáció). A plazmidok nem tartalmaztak gram-pozitív replikációs origót, amely szükséges lett volna a sejtekben történő replikációjukhoz.

Ehelyett a plazmidok tartalmaztak egy olyan DNS-régiót, amely a kromoszómába történő integrálódás során célszekvenciaként funkcionált, a Phos-C-régiót; tartalmaztak továbbá egy szelektálható markergént, amely a sejteknek erythromycin-rezisztenciát biztosított. A nagy koncentrációban sejtekbe elektroporált plazmidot egyszeri "cross-over" eseménnyel kényszerítettük a kromoszómába, mely esemény a célszekvencia megkettőződését eredményezi.

A HD73-törzsből a fent leírt eljárás alkalmazásával, a pSB147- és pSB210.2-plazmidok felhasználásával kromoszómális integránsokat állítottunk elő. A többi vizsgált törzs azonban az elektroporációval szemben ellenállónak bizonyult, és ezért nem lehetett olyan nagy hatékonysággal transzformálni őket, hogy a kromoszómális integrációt elő tudjuk idézni. Kompetens sejteket úgy állítottunk elő, hogy 100 ml 0,5 mól/l szacharózt tartalmazó agy-szív infúziós táptalajt (BHIS, Difco) eldobható fehér kaccsal beoltottunk a megfelelő sejtekkel, a leoltást friss, egy éjszakán át inkubált LB-lemezekről végeztük. A sejteket terelőidomot is tartalmazó 1 l-es tenyésztőlombikokban tenyésztettük 37 °C-on, 300 ford/perc-cel rázatva őket, 600 nm-en mérve OD=0,2 értékig, amely pont elérése után a sejteket jégen tartottuk. Valamennyi mosóoldatot lehűtve alkalmaztuk. A sejteket ezután 250 ml-es steril lombikokba vittük át, majd 7 percen keresztül 6000 ford/perc-cel kiülepítettük őket. a sejteket tartalmazó üledéket ezután 1x1 térfogat, majd 2x0,1 térfogat következő összetételű oldattal mostuk: 0,5 mól/l szacharóz, 5 mmól/l HEPES, pH=7. Az üledéket ezután 10 ml végtérfogatban HEPES-szacharóz oldatban felfuszpendáltuk. Az integrálódó plazmidok elektroporálása céljából frissen előállított kompetens sejteket használtunk.

200 μ l kompetens sejthez plazmid-DNS-t kevertünk. A HD73-sejtek esetén a következő pulzusparamétereket alkalmaztuk: $kV=1,25$, $\mu F=3$ és $\Omega=\infty$. A pulzusvégrehajtása után a sejteket 125 ml-es lombikban lévő 5 ml BHIS-táptalajba vittük át, és 30 °C-on 3 órán keresztül 250 ford/perccel rázattuk őket regenerálás céljából. Azon minták esetében, melyeknél a vektorok integrálódását kívántuk elérni, a sejteket 7000 ford/perccel 5 percen át végzett centrifugálással kiülepítettük, majd a kiülepített sejteket 10 μ g/ml eritromicint tartalmazó LB-táptalajra szélesztettük.

Az eletroporációs eljárás hatékonyságát kontrollplazmidként a pSB098-plazmid-DNS-sel ellenőriztük. A pSB098 egy olyan ingázó vektor, amely egyrészt a pTZ19R-plazmidot (Pharmacia), másrészt pedig a pBC16.1-plazmidot tartalmazza. A pBC16.1 egy *B. cereus* eredetű vektor, melyet Kreft készített [Kreft, J.: Mol. Gen. Genet. 162, 59 (1978)]. A pTZ19R- és pBC16.1-plazmidokat megemésztettük EcoRI-enzimmal. A linearizált plazmidokat egy plazmiddá ligáltuk, és így állítottuk elő a pSB098-jelű plazmidot, mely plazmidban az ampicillin és tetraciklin rezisztenciákat kiváltó gének ellentétes polaritásúak.

A HD73-törzsből előállított kompetens sejteket dam-, dcm-GM2163-törzsből izolált plazmid-DNS alkalmazásával elektrotranszformáltuk. A transzformációs kísérletek eredményeit az alábbi 3. táblázat foglalja össze. A bemutatott adatokon túl a HD1-51-törzset transzformáltuk még a 210.1-plazmiddal (kísérleti adatokat nem közlünk).

3. táblázatA *B. thuringiensis* kurstaki HD73-törzs transzformációs hatékonysága

Plazmid	Mennyiség (μg)	Mennyiség (μl)	Transzfektánsok száma	Hatékonyság (transzformáns/ μg pSB098 DNS)
HD73-törzs				
pSB210.2	9	10	3	3.5×10^5
pSB147	15	10	8	2×10^6

A táblázat utolsó oszlopában megadott hatékonyság értéket minden kísérletben úgy állapítottuk meg, hogy elektroporáció útján $0,51 \mu\text{g}$ pSB098 DNS-t juttatunk be, és kiszámítottuk, hogy μg -DNS-enként hány kolóniaformáló egységet kaptunk. A kapott érték alapján becsülhető volt, hogy a sejtek hogyan reagáltak az adott elektroporációs körülményekre. A pSB210.3-plazmiddal nem sikerült transzformánst előállítanunk.

A *B.t. kurstaki* HD73-törzset az USDA intézettől szereztük be (a bacillus thuringiensis tenyészetek beszerezhetők a "U.S.Department of Agriculture" intézettől, "USDA/ARS Agricultural Reviews and Manuals: ARM-S-30", 1982. október).

Az előállított transzformánsokat, melyeket a leírásban rekombinánsoknak vagy transzfektánsoknak is nevezünk, PCR-eljárással ellenőriztük, hogy tartalmazzák-e a bejuttatni kívánt géneket. A pSB210.2 szekvenciákat tartalmazó HD73-rekombinánsokat (HD73::pSB210.2) a cryIC-gén jelenléte vonatkozásában a galp1- és galp2-jelű láncindító oligonukleotidok alkalmazásával ellenőriztük, az ermC-gén jelenléte vonatkozásában pedig a PG2- és PG4-jelű láncindító oligonukleotidok alkalmazá-

sával. A 8 vizsgált HD73::pSB147-klón közül a cryIIA-I és cryIIA-II láncindító oligonukleotidok alkalmazásával kettőről kimutattuk, hogy megtalálható benne a cryIIA-gén, és a PG2- és PG4 láncindítók alkalmazásával kimutattuk az ermC-gén jelenlétét is. A láncindító oligonukleotidok szekvenciáit a fenti 2. táblázatban adjuk meg. Plazmidprofil vonatkozásában a HD73::pSB210.2 rekombináns azonosnak bizonyult a szülői HD73-törzzsel.

8. példa

Fágok előállítása hibrid-plazmid fágfejbe történő csomagolására

CP51-fágot *B. cereus* 569-törzs fertőzött spóráival átitatott szűrőpapírkorongon, Thorne eljárása szerint kaptunk, (1978) lásd fent. A törzset oly módon élesztettük fel, hogy 25 ml, 0,4 % glicerint tartalmazó NBY-tápfolyadékot [literenként 8 g “Difco Nutrient broth”, 3 g “Difco yeast extract” (élesztőkivonat)] (NBYG) a korongok egyikével beoltottunk, és 37 °C-on, 16 óráig tenyésztettünk. A tenyészetet összegyűjtöttük, a sejtörmeleket 10 000 ford/perc-cel üleptettük, a fágizátumot 0,45 µm áteresztőképességű szűrőn átnyomva sterilizáltuk, és 16 °C-on tároltuk.

A lizátum titerét az 569-törzs fág-mentes izolátumával szemben végzett vizsgálattal meghatároztuk. A lizátumot 1 % peptonban 10-szer és 100-szor hígítottuk. Körülbelül 10^6 , 569-törzsből származó sejtet elegyítettünk 100 µl fághigítással, és azt 2 ml TBAB (“Difco Tryptose blood agar Base”) lágyagarhoz adtuk. Ezt olyan “Phage Assay Plate” (PA) lemezekre (literenként: 8 g “Difco Nutrient broth”, 59 g NaCl; 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,05 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,15 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; pH 5,9-6,0) rétegeztük felül, melyeket egy éjszakán át, szobahőmérsékleten szárítottunk. A lemezeket egy éjszakán át, 30 °C-on inkubáltuk, és a plakkokat megszámláltuk.

A fágfertőzésre való fogékonyság tesztelésére az egyes vizsgált törzsekből (SA11, SA12, S287 és HD73) körülbelül 10^6 sejtet oltottunk felső

réteggént PA-lemezekre. Az agar felszínét egy fág-törzstenyészetbe mártott oltokacccsal óvatosan megérintettük, és a lemezeket 30 °C-on inkubáltuk. A következő napon mind a négy törzs esetében feltisztulás volt megfigyelhető a sejtrétegen.

9. példa

Fágok szaporítása

Friss, egy éjszakán át tenyésztett lemezről származó HD73::pSB210.2-sejtekkel egy 20 mm-es csőben, 6 ml LB-táptalajt oltottunk be. A tenyészetet 37 °C-on, 4-6 óráig tenyésztettük, optikai denzitását meghatároztuk, és a sejteket LB-vel 3×10^6 sejt/ml koncentrációig hígítottuk. NBYG-lemezeket 4 ml térfogatú NBY-lágyagarral felülrétegeztünk, melyhez előzőleg 0,5 ml, 4×10^6 plakképző egységet (PFU) tartalmazó CP51-fágtörzstenyészetet, valamint vagy 1×10^6 vagy 3×10^6 sejtet adtunk. A lemezeket egy éjszakán át, 30 °C-on inkubáltuk, és a fágokat 5 ml PA-tápfolyadékba összegyűjtöttük. A felső agarréteget a PA-tápfolyadékba kapartuk és 18 mm-es műanyagcsövekbe tettük. A sejttörmelékét kiülepítettük. A lizátumot, melyet CP210.2-ként jelöltünk, 0,45 µm áteresztőképességű szűrőn átnyomva sterilizáltuk, és 15 °C-on tároltuk.

A titer meghatározása céljából a HD73-törzsből 5×10^6 CFU-t (telepképző egységet) elegyítettünk a CP210.2-lizátum 10^{-2} és 10^{-4} hígításainak 100 µl-ével, és 2 ml NBY-lágyagarral, felső réteggént PA-lemezekre öntöttük. Egy éjszakán át tartó, 30 °C-on végzett inkubálást követően a 10^{-4} hígítást tartalmazó lemezen 1200 plakk volt megfigyelhető, az ennek alapján kiszámított titer $1,2 \times 10^8$ PFU/ml volt.

10. példa

A transzdukciónál alkalmazott feltételek meghatározása

A fágok kezelésénél alkalmazott eljárások Thorne által leírt módszeren alapultak (1978), lásd fent. Az egyes *B.t.*-törzsek esetében a mililiterenkénti telepképző egységek (CFU) számát és a fágtörzstenyészetek mililiterenkénti plakk-képző egységben kifejezett titerét sorozathígítások alkalmazásával határoztuk meg.

A CP51-fágtörzstenyészet titerét az alábbiak szerint határoztuk meg. 0,1 ml térfogatú, 1 % Peptonban hígított fágot és körülbelül 2×10^7 *B. cereus* 569-törzsből származó spórát adtunk 2 ml PA-lágyagarhoz, és a beoltott lágyagart PA-agarlemzekre felülrétegeztük. A felülrétegezett lemezeket 30 °C-on, 16-20 órán át inkubáltuk. A plakkokat megszámloltuk, és a fágtörzsenyészetek PFU/ml-ben kifejezett titerét az alkalmazott hígítások alapján kiszámítottuk. A *B.t.*-tenyészetek sejtkoncentrációját a technika állása szerinti standard módszerekkel határoztuk meg. Az eredményeket az alábbi, 4. táblázatban foglaltuk össze.

4. táblázat

A *B.t.*-sejtek telepképző egységei számának (CFU) és a fágtörzstenyészet titerének (PFU) meghatározása

CFU	CFU/ml
<i>B. cereus</i> 569-törzs	5×10^7
<i>B. thuringiensis</i> -törzs	
HD73	$8,6 \times 10^8$
SA11 és SA12	$2,6 \times 10^8$
S287	$1,1 \times 10^7$
PFU	PFU/ml
CP51:	8×10^6
CP210.2:	$1,2 \times 10^8$

*11. példa*A pSB136-plazmid előállítása

A pSB136-plazmid (lásd, a 7. ábrán) egy integrációs vektor, amely megkönnyíti a cryIC-génnek a *B.t.* kromoszómájába történő inszertálását. A pSB136-vektor tartalmazza a cryIC-gént, egy integrációs célszekvenciát, egy tetraciklin-rezisztenciagént és a pBR322-vektor egy részét. A *B.t. aizawai* HD229 cryIC-gént és a pBC16-1 *B. cereus* plazmid tetraciklin-rezisztenciagént (tet^r) klónoztuk. Az integrációs célszekvencia egy, a *B.t. kurstaki* HD1 cryB kromoszómájából származó, ismeretlen funkcióval rendelkező DNS-fragmens volt.

A pSB136-plazmid alkalmazható a cryIC-génnek bármely olyan *B.t.*-törzs kromoszómájába történő beépítésére, amely már eleve nem tetraciklin-rezisztens. Az integráció végbemenéséhez azonban, a recipiens-törzsnek rendelkeznie kell az integrációs célszekvenciával homológ szekvenciákkal, és a törzset hatékonyan kell transzformálni (1 µg transzformációhoz használt DNS-re $\geq 10^4$ transzformánsnak kell jutnia).

Kompetens *E. coli*-DH5a-sejteket Alexander eljárása szerint állítottunk elő [Alexander (1978), lásd fent]. A transzformációt a technika állása szerint jólismert módszerekkel, "Library Efficiency DH5a Competent Cells" sejtek (Gibco, BRL, Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) alkalmazásával végeztük.

A transzformánsokat 75 µg/ml ampicillint tartalmazó LB-táptalajon szelektáltuk. A restrikciós enzimekkel végzett emésztéseket, ligálásokat, etanol-precipitációt, fenol-extrakciókat, kináz-reakciókat és a DNS T4 DNS-polimerázzal, borjú intesztinális foszfáttal és az *E. coli* DNS-polimeráz-I Klenow-fragmensével történő kezelését Maniatis és munkatársai által leírt eljárások szerint végeztük [Maniatis T. és mtsai.: "Molecular

Cloning: A Laboratory Manual”, “Cold Spring Harbor Laboratory”, Cold Spring Harbor, NY (1982)].

A Stahly és munkatársai által leírt *B.t. kurstaki* HD1-cryIB egy olyan HD1-törzs, amelyikből a plazmidot eltávolították (“plazmid cured”) [Stahly D.P. és mtsai.: Biochem. Biophys. Res. Comm. 84, 581 (1978)]. A *B.t. kurstaki* HD1-cryIB-törzsből össz-DNS-t izoláltunk az alábbi módszer szerint. 200 ml 2xTY-tápfolyadékot *B.t.*-törzsszel oltottunk be és 30 °C-on, egy éjszakán át inkubáltuk 200 ford/perc-cel, terelőidommal történő keverés mellett. 200 ml 2xTY-tápfolyadékot a fenti tenyészet 2 ml-ével oltottunk be, és 300 ford/perc-cel, terelőidommal történő keverés mellett, 30 °C-on inkubáltuk. Amikor a tenyészet optikai denzitása 600 nm-en mérve az OD=0,8-1 értéket elérte, a sejteket 10 000 ford/perc-cel, 5 percig, 4 °C-on végzett centrifugálással összegyűjtöttük. A sejteket TES-pufferrel mostuk (TE+100 mmól/l NaCl) és 18 ml, 25 %-os szacharózt, 25 mmól/l Tris-HCl-t (pH 8), valamint 25 mmól/l EDTA-t tartalmazó pufferben szuszpendáltuk. A szacharóz-oldathoz 2 ml térfogatú, 10 mg/ml lizozimet adtunk és óvatosan elkevertük. Az elegyet 37 °C-on, 30-60 percig inkubáltuk és protoplasztok jelenlétére vizsgáltuk. Az elegyhez 2,2 ml 20 %-os SDS-t adtunk, óvatosan elkevertük, és 15 percig, 50 °C-on inkubáltuk. Ehhez 5,5 ml 5 mól/l NaCl-t adtunk, óvatosan elkevertük, és 5 percig 50 °C-on, majd egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk. Az elegyet 4 °C-on, 10 000 ford/perc-cel, 10 percig centrifugáltuk, és a felülúszót 2 csőbe öntöttük. A csövekhez 28 ml (összesen 56 ml) hideg EtOH-t adtunk, óvatosan elkevertük, egy éjszakán át -20 °C-on inkubáltuk, majd 13 000 ford/perc mellett, 30 percig centrifugáltuk. A precipitátumot kinyertük és 70 %-os EtOH-ban mostuk. A precipitátumot ezután 10 ml (összesen 20 ml) 1 mól/l NaCl-t tartalmazó TE-pufferben oldottuk, és egy éjszakán át, 4 °C-on inkubáltuk. Ezt követően, a két cső tartalmát egy csőbe tettük. A csőhöz 200 µl, 1 mg/ml koncentrációjú RN-áz és

1200 µl, 10 mg/ml koncentrációjú proteináz-K-t adtunk, és az elegyet centrifugáltuk. A vizes réteget összegyűjtöttük, és 20 ml fenol/kloroform eleggyel még kétszer mostuk. A vizes réteghez 20 ml kloroformot adtunk és centrifugáltuk. A vizes réteget összegyűjtöttük és egy éjszakán át, 2000 ml TE-pufferrel szemben dializáltuk.

A klónozásra felhasznált plazmid-DNS-t *E. coli* sejtekből izoláltuk alkalikus lizálással [Birnboim H.C. és Doly J.: "A Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA", Nucl. Acids Res. 7, 1513-1523 (1979)] vagy a Quiagen Inc. cégtől beszerzett Quiagen-oszlopok alkalmazásával.

A pSB136-plazmid előállítása négy részből állt (utalunk a 7. ábrára). Az első lépésben, a pBR322-plazmidból a tetraciklin-rezisztenciagént, (amely *E. coli*-ban működőképes), *Bacillus*-ban működőképes tet^r-génnel helyettesítettük. Ezután, a plazmidhoz egy integrációs célszekvenciát adtunk, amely a HD1-cryB-genomból izolált, ismeretlen funkcióval rendelkező DNS-fragmens volt. A harmadik lépésben a plazmidhoz egy NotI-linkert adtunk a cryIC-gén klónozásának megkönnyítésére. Az utolsó klónozási lépésben, a cryIC-gént hozzáadtuk az integrációs vektorhoz. Valamennyi fenti lépést az alábbiakban részletesen ismertetünk.

A pSB206-plazmidot oly módon állítottuk elő, hogy a pBC16-plazmidból származó tet^r-gént [Bernhard K. és mtsai.: J. Bacteriol. 133, 897 (1978)] pUC18-plazmidba klónoztuk. A pBC16-1-plazmidot Kreft és mtsai. eljárása szerint [Kreft J. és mtsai.: Mol. Gen. Genet. 162, 59 (1978)], a pBC16-plazmidból állítottuk elő egy EcoRI-fragmens eltávolításával. A tet^r-gént a pBC16-1-plazmidból polimeráz-láncreakciós eljárás alkalmazásával, a fenti, 4. táblázatban ismertetett Tet3 és Tet4 láncindító oligonukleotidok felhasználásával izoláltuk. A Tet3 láncindító oligonukleotid a tet^r-géntől 5'-irányban egy HindIII hasítási helyet iktatott be, a Tet4 láncindító

oligonukleotid pedig a tet^r -géntől 3'-irányban egy KpnI hasítási helyet iktatott be. A PCR-terméket pUC18-plazmidba inszertáltuk a többszörös klónozási helyen található HindIII hasítási helyre.

A pSB206-plazmidot a tet^r -gén eltávolítása céljából SmaI- és HindIII-enzimekkel emésztettük. Hogy a tet^r -gént a pBR322-plazmidból eltávolítsuk, ezt a plazmidot AvaI-enzimmal emésztettük, tompa végek kialakítása céljából *E. coli* DNS-polimeráz I. Klenow-fragmensével kezeltük, majd HindIII-enzimmal emésztettük. A kívánt fragmenseket tisztítottuk, és a pBR322-vektort a pSB206-plazmidból származó tet^r -génnel ligáltuk, hogy megkapjuk a pSB131-plazmidot.

Ezt követően, a pSB131-plazmidhoz egy integrációs célszekvenciát adtunk. Az integrációs célszekvencia forrása a HD1-cryB-genomból izolált, 1,1 kb nagyságú DNS-fragmens volt. Ezt a fragmenst pUC18-plazmidba klónoztuk, és a konstrukciót pSB132-plazmidnak neveztük. A HD1-cryB-genomból az 1,1 kb nagyságú DNS-fragmenst az alábbiak szerint izoláltuk. HD1-cryB-törzsből származó össz-DNS-t HaeIII vagy EcoRV restriktációs enzimekkel emésztettünk, a két emésztett elegyet összekevertük és 0,8 %-os agarózgélben elektroforézisnek vetettük alá. Három méretnek megfelelő frakciókat vágunk ki a gélből: (1) 0,5-0,9 kb; (2) 0,9-1,8 kb; és (3) 1,8-2,7 kb méreteknél megfelelő frakciókat.

Az (1.) és (2.) DNS-frakciókat tisztítottuk. A (2.)-frakcióból származó DNS-t SmaI-enzimmal emésztett pUC18-plazmidba ligáltuk, és a kapott klónokat EcoRI/HindIII emésztéssel karakterizáltuk. A pSB132-plazmid egy 1,1 kb nagyságú inszertet tartalmazott.

Ezután, az 1,1 kb cryB-fragmenst pSB132-plazmidból pSB131-plazmidba vittük át. A pSB132-plazmidot EcoRI-enzimmal emésztettük, *E. coli* DNS polimeráz I. Klenow-fragmensével végzett kezeléssel feltöltöttük és HindIII-enzimmal emésztettük. A pSB131-plazmidot SspI- és

HindIII-enzimekkel hasítottuk, és a pSB132-plazmidból származó tisztított, 1,1 kb nagyságú fragmenssel ligáltuk, így alakítottuk ki a pSB134-plazmidot.

A pSB134-plazmidhoz egy NotI-linkert adtunk, hogy a cryIC-gén hozzáadását megkönnyítsük. A NotI-linker a következő szekvenciával rendelkezett: pAGCGGCCGCT (New England Biolabs #1125, 28. azonosító számú szekvencia). A pSB134-plazmidot BamHI-enzimmal emésztettük és *E. coli* DNS-polimeráz I. Klenow-fragmensével végzett kezeléssel tompa végeket alakítottunk ki. Ezt követően 200:1 mól-arány mellett a NotI-linkereket a linearizált pSB143-plazmidba ligáltuk, és a kapott konstrukciót pSB134.5-plazmidnak neveztük.

Az utolsó lépésben a cryIC-gént hozzáadtuk a pSB134.5-plazmidhoz. A cryIC-gén a pSB619-plazmidból származott, melyet a 3. példában, a fentiekben írtunk le. A pSB619-plazmid hordozza a *B.t. aizawai* HD229-törzsből származó cryIC-gént, melyet annak natív promótere előz meg és a *B.t. kurstaki* HD73 cryIA(c)-terminátor-szekvenciája követ. A cryIC-gént a promóterrel és terminátorral együtt egy, Bluescript KS(+)-plazmidban található ApaI/NotI-egységként klónoztuk. A cryIC-gén izolálása céljából, a pSB619-plazmidot ApaI-enzimmal emésztettük, T4 DNS-polimerázzal feltöltöttük, és NotI-enzimmal emésztettük. A pSB134.5-plazmidot EcoRI-enzimmal emésztettük, *E. coli* DNS-polimeráz I. Klenow-fragmensével végzett kezeléssel feltöltöttük, majd NotI-enzimmal emésztettük. a cryIC-egységet a pSB619 vektor-résztől megtisztítottuk, és pSB134.5-plazmidba ligáltuk, így alakítottuk ki a pSB136-plazmidot.

12. példa

A cryIC-gén bejuttatása *B.t. kurstaki* HD1-cryB- és HD73-törzsekbe

A pSB136-plazmidot a 11. példában fent leírtak szerint állítottuk elő. Ez a plazmid tartalmazza a pBC16.1-plazmidból származó tet^r-gént, valamint integrációs célszekvenciaként a HD1-cryB-kromoszóma ismeretlen funkcióval rendelkező DNS-fragmensét. Ezeket a fragmenseket a pBR322-plazmidba ligáltuk.

Kompetens *B.t. kurstaki* HD1-cryB- és HD73-sejteket a 6. példában fent leírt BHIS-eljárás szerint állítottunk elő. Az elektromos pulzus közlését követően regenerálás céljából a sejteket 3 órára, 37 °C-ra, 5 ml BHIS-tápfolyadékba vittük át. A HD1-cryB-sejtek esetében a következő pulzusparamétereket alkalmaztuk: kV=1,05, μ F=25 és $\Omega=\infty$. A HD73-sejtek esetében a következő pulzusparamétereket alkalmaztuk kV=1,25, μ F=3 és $\Omega=\infty$. Az elektroporációt követően a teljes tenyészetet kiülepítettük, kis tréfogatú tápfolyadékban felfuszpendáltuk és szelektív táptalajra szélesztettük. A transzformáció hatékonyságának meghatározására standardként pSB098-plazmid-DNS-t alkalmaztunk, a hatékonyságot valamennyi kísérletben 1 μ g pSB098-plazmidra jutó telepképző egységek (CFU) számával adtuk meg.

A HD1-cryB-sejtek esetében, amikor a sejteket 7,5 μ g pSB136-plazmiddal elektroporáltuk, egy tetraciklin-rezisztens telepet kaptunk. A sejtek általános transzformációs hatékonysága 6×10^5 CFU/ μ g volt (pSB098-plazmid alkalmazása mellett). Erről az új, rekombináns CryB::pSB136-törzsről a 13. példában az alábbiakban leírtak szerint, PCR-analízissel kimutattuk, hogy tartalmazza a tetraciklin-rezisztenciagént, valamint a cryIC-gént.

A CryB::pSB136-törzset CYS-tápfolyadékban tenyésztettük a sporulációig. Ez a tenyészet mililiterenként 4×10^8 spórát tartalmazott, összehasonlításképp, ugyanabban a kísérletben a HD1-CryB-törzs mililiterenként

5×10^8 spórát tartalmazott. A tetraciklin-rezisztenciagén a sporuláció és a vegetatív alakká történő alakulás során 98 %-ban stabilnak bizonyult.

A HD73-sejtek esetében, amikor a sejteket $15 \mu\text{g}$ pSB136-plazmiddal elektroporáltuk, két telepet kaptunk, egy olyan kísérlet során, melyben a sejtek általános transzformációs hatékonysága 2×10^6 CFU/ μg DNS volt. Mindkét telep, melyeket HD73::pSB136-nak neveztünk, az alábbi 13. példában leírt PCR-analízis alapján pozitívnak bizonyult a cryIC-génre és a tetraciklin-rezisztenciagénre.

13. példa

A CryB::pSB136 és a HD73::pSB136 rekombináns törzsek PCR-vizsgálata

A CryB::pSB136 és a HD73::pSB136 rekombináns törzsekben a bejuttatott cryIC-gén, valamint tetraciklin-rezisztenciamarker jelenlétét PCR-eljárással igazoltuk. Friss, egy éjszakán át tenyésztett lemezeiről vett sejteket 10 percig, $8 \mu\text{l}$ térfogatú, $1 \times$ Taq polimeráz pufferben a szükséges láncindító oligonukleotidokat ($0,5 \mu\text{l}$, $20 \mu\text{mol/l}$ koncentrációjú törzsoldatból) és dNTP-elegyet ($1,6 \mu\text{l}$, $1,25 \text{ mmol/l}$ koncentrációjú törzsoldatból) tartalmazó oldatban forraltunk. A sejtörmelékot kiülepítettük, és a csőhöz $2 \mu\text{l}$, $1 \times$ Taq polimeráz pufferben $0,05$ egység Taq polimerázt adtunk. A tetraciklin-rezisztenciagén jelenlétének kimutatására két láncindító oligonukleotid kombinációt alkalmaztunk. A Tet3 és Tet4 kombinációjával egy körülbelül $1,4 \text{ kb}$ fragmenst kaptunk, a Tet3, valamint CP01.Rev kombinációja pedig egy körülbelül $0,35 \text{ kb}$ nagyságú fragmenst eredményezett. A cryIC-gén kimutatására a galP1 és galP2 láncindító oligonukleotidokat alkalmaztuk, és azokkal egy $0,8 \text{ kb}$ nagyságú fragmenst kaptunk. A láncindító oligonukleotidok szekvenciáit a fenti 2. táblázatban ismertetjük.

14. példa

A cryIC- és cryIIA-gének bejuttatása *B.t. kurstaki* HD73-törzsbe

A pSB304-plazmidot az 5. példában fent leírtak szerint állítottuk elő. A cryIIA-gént a pSB304-plazmidból egy NotI-EcoRI-fragmensként izoláltuk. A pSB134.5-plazmidot a 10. példában fent leírtak szerint állítottuk elő. A cryIIA NotI-EcoRI-fragmenst a pSB134.5.2-plazmidból NotI és EcoRI-enzimmal emésztett pSB134.5-plazmidba ligáltuk.

Kompetens HD73-sejteket a 6. példában fent leírt BHIS-eljárás szerint állítottunk elő. Az elektromos pulzus közlését követően a sejteket 3 órán át, 37 °C-on, 5 ml BHIS-tápfolyadékban regeneráltuk. A HD73-sejtek esetében a következő pulzusparamétereket alkalmaztuk $kV=1,25$, $\mu F=3$ és $\Omega=\infty$. Az elektroporációt követően a teljes tenyészetet kiülepítettük, kis térfogatú tápfolyadékban felfuszpendáltuk és szelektív táptalajra szélesztettük. A transzformáció hatékonyságának meghatározására a 12. példában leírtakhoz hasonlóan, standardként pSB098-plazmid-DNS-t alkalmaztunk, és a transzformációs hatékonyságot 1 μg pSB098-plazmid-DNS-re jutó telepképző egységek (CFU) számával adtuk meg.

A HD73-sejtek 20 μg pSB134.5.2-plazmiddal végzett elektroporációjával tíz telepet kaptunk. A transzformáció hatékonysága 1×10^6 CFU/ μg DNS volt. A transzformánsok közül a 15. példában alább leírt PCR-analízissel kettő bizonyult pozitívnak a tetraciklin-rezisztenciára és cryIIA-génekre. A két transzformánst HD73::pSB134.5.2-törzsnek neveztük.

*15. példa*A HD73::pSB134.5.2 rekombináns törzs PCR-vizsgálata

A HD73::pSB134.5.2-rekombinánsokban a bejuttatott cryIIA-gén, valamint tetraciklin-rezisztenciamarker jelenlétét a 13. példában leírtak szerint, PCR-eljárással igazoltuk. A cryIIA-génre történő vizsgálathoz a cryIIA1 és

cryIIA2 láncindító oligonukleotidokat alkalmaztuk, ezekkel egy 0,57 kb nagyságú fragmenst kaptunk. A láncindító oligonukleotidok szekvenciáit a fenti 4. táblázatban adtuk meg.

16. példa

B.t.-törzsek transzdukciója

Abból a célból, hogy egy törzs kromoszómájába integrálódott kristálygént olyan törzs kromoszómájába vigyünk át, amelyik elektroporációval nem könnyen transzformálható, generalizált transzdukciót végeztünk. Ezekben az esetekben DNS-donorként egy integrálódott kristálygént tartalmazó törzset, a HD73::pSB210.2-törzset használtunk több *B.t.*-törzs, többek között SA11-, SA12- és S287-törzsek transzdukálására.

A generalizált transzdukciós eljárást széles körben alkalmazzák genetikai információ cseréjére, az eljárást Margolin *E. coli* és *S. typhimurium* esetében alaposan jellemezte, és az Thorne szerint, esetenként *Bacillus thuringiensis*-nél is alkalmazható [Margolin: “*Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*”, Cell. and Mol. Biol., (1987); Thorne: “Transduction in *Bacillus thuringiensis*”, Applied and Environmental Microbiology, 35, 1109 (1978)].

A generalizált transzdukciós eljárásnál alkalmazott CP51-fágot, melyet talajból izoláltak és *Bacillus cereus* kromoszómális térképének meghatározására szolgáló kísérletekben használtak, C.B Thorne-től kaptuk [Thorne C.B.: “Transducing Bacteriophage for *Bacillus cereus*”, J. of Virol., 2, 657 (1968); és “Transduction of *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis*”, Bacteriological Reviews 32, 358 (1968)]. Thorne és munkatársai a fágot egyéb *Bacillus*-törzsekkel szemben is tesztelték, többek között *B. thuringiensis* törzsekkel szemben [lásd fent, Thorne (1978)].

A SA11-, SA12-, S287 és HD73-törzsekből származó sejteket a 8. példában leírt eljárás szerint tenyésztettünk, és körülbelül 10^7 CFU/ml-re hígítottunk.

A HD73::pSB210.2 rekombináns törzs 2. számú izolátumát alkalmaztuk CP51-fágok szaporítására. Az így kapott, CP210.2-nek nevezett lizátum titerét meghatároztuk, és azt mililiterenként $1,2 \times 10^8$ plakk-képző egységben (PFU/ml) állapítottuk meg. Egy LB-lemez felszínére steril HA-filtert helyeztünk (Millipore), majd a filterre 100 μ l térfogatban az egyes CP210.2-fáglizátumokat és sejteket pipettáztunk, majd a folyadékot steril drótszélesztőkaccsal óvatosan szétoszlattuk. A lemezeket 3 órán át, 37 °C-on inkubáltuk. A filtereket erythromycint (10 μ g/ml) tartalmazó LB-lemezekre vittük át, 37 °C-ra visszatettük, és 36 óráig szaporodni hagytuk. A lemeztranszdukciós kísérletek eredményeit az alábbi, 5. táblázatban foglaltuk össze.

5. táblázat

Transzdukciós kísérletek eredményei

Törzs	Kioltott CFU	Fertőzés multiplicitása	Ery ^r -telepek	Hatékonyság
HD73	1×10^6	10	2	$1,6 \times 10^{-7}$
SA11	4×10^6	3	4	3×10^{-7}
SA12	4×10^6	3	2	$1,6 \times 10^{-7}$
S287	1×10^6	40	3	2×10^{-8}

A hatékonyságot egy plakk-képző egységre jutó erythromycin-rezisztens telepek számával fejeztük ki. A HD73-, SA11- és SA12-törzsek esetében $1,2 \times 10^7$ plakk-képző egységet oltottunk ki. Az S287-törzs esetében 4×10^7 PFU-t oltottunk ki.

*17. példa*Rekombináns törzsek vizsgálata polimeráz-lánreakcióval

Valamennyi rekombináns törzs PCR-vizsgálatát a 13. példában leírtak szerint, teljes sejtek felhasználásával végeztük. Az erythromycin-rezisztens telepeket, melyeket a "CP"-rövidítéssel jelöltünk, PCR-eljárással analizáltuk a géntartalomra nézve, és összehasonlítottuk a vad-típusú törzsszel. Az eredményeket az alábbi 6. táblázatban összegeztük.

6. táblázatTranszdukált törzsek géntartalma PCR-analízis alapján

Törzs	IA(a)	IA(b)	IA(c)	IIA	IC	ermC
SA11WT	+	+	+	+	-	-
SA11CP1	+	+	+	+	+	+
SA11CP2	+	+	+	+	+	+
SA11CP3	+	+	+	+	+	+
SA11CP4	+	+	+	+	+	+
SA12WT	+	+	+	+	-	-
SA12CP1	+	+	+	+	+	+
SA12CP2	+	+	+	+	+	+
S287WT	+	+	+	+	-	-
S287CP1	+	+	+	+	+	+
S287CP2	+	+	+	+	+	+

WT=vad-típusú

A rekombinánsok megtartották a szülői törzsekben található kristálygén-készletet. Csak a rekombináns törzsek bizonyultak pozitívnak a bejutta-

tott cryIC- és ermC-génekre specifikus láncindító oligonukleotidokkal vizsgálva. A cryIA(b)-génekre történő vizsgálat alkalmával, először a TY6 és TY14 próbákat alkalmaztuk (lásd fent, a 2. táblázatban), de ez a pár bizonyos mértékű keresztreakciót adott a pSB210.2 kontroll plazmiddal, amelyik csak a cryIC-gént tartalmazza. A későbbi kísérletek során, a TY14 láncindító oligonukleotidot a 2. táblázatban fent leírt TY13-mal helyettesítettük.

18. példa

Vad-típusú és rekombináns *B.t.*-törzsekből származó plazmidok összehasonlítása

A rekombináns *B.t.*-törzsekből származó plazmidokat Birnboim és Doly alkalikus lizálósos eljárásával [lásd fent, (1979)] izoláltuk, melyet az alábbiak szerint módosítottunk. A törzseket tetraciklin-tartalmú LB-lemezekre szélesztettük, és egy éjszakán át, 30 °C-on tenyésztettük, majd friss SA-lemezekre [1xSpizizen-só, 1 % kazamínosavak, 5 % glükóz, 0,0005 mmól/l MnSO₄ H₂O) oltottuk át, és 4-4 óráig, 37 °C-on tenyésztettük. Az egyes törzsek esetében 2-3 kacsnyi sejtet szuszpendáltunk jégén, 100 µl TESL-pufferben [100 mmól/l Tris (pH=8), 10 mmól/l EDTA, 20 % szacharóz, 2 mg/ml lizozim], és 15 percig, 37 °C-on inkubáltuk. Az elegyhez 200 µl lízis-oldatot (0,2 normál/l NaOH, 1 % SDS) adtunk, azt a csövek óvatos döntögetésével összekevertük, és 5 percig, szobahőmérsékleten inkubáltuk. A csövekhez 150 µl jéghideg kálium-acetát oldatot adtunk, és az elegyet a csövek döntögetésével összekevertük. Ezután az oldatot 20 percig, 15 000 ford/perc-cel, 4 °C-on centrifugáltuk. A felülúszót széles lumenű, eldobható transzfer-pipettával kinyertük, majd 1 ml, 100 %-os etanolhoz adtuk és a cső döntögetésével összekevertük. Ezt követően az elegyet 20 percig, 15 000 ford/perc-cel, 4 °C-on centrifugáltuk. A felülúszót leszívással eltávolítottuk, majd az üledéket 1 ml, 70 %-os etanolban szuszpendáltuk, a

cső döntögetésével összekevertük, majd 5 percig, szobahőmérsékleten centrifugáltuk. A felülúszót leszívással eltávolítottuk, majd az üledéket 2 percig, "Speedvac"-készülékben vákum alatt szárítottuk. A szárított üledéket 20 µl TE-pufferben szuszpendáltuk, körülbelül 15 percig jégen inkubáltuk, majd a cső oldalának ütögetésével óvatosan összekevertük.

A DNS-t 1xTAE-pufferben, 0,8 %-os agarózon, U=70V és A=32 mA mellett, 3 óráig elektroforetizáltuk. A rekombinánsok plazmid-profiljáról megállapítottuk, hogy az megegyezik a megfelelő vad-típusú szülői törzsekben találhatóival, ezúton igazoltuk, hogy a rekombinánsok nem hordoznak nem kívánt plazmidokat.

19. példa

Vad-típusú és hibrid *B.t.*-törzsek kromoszómális DNS-ének összehasonlítása

A HD73-törzsben létrehozott integránsokban, az SA11- és SA12-törzsekben létrehozott transzdukált törzsekben, valamint a HD73-törzsben található kromoszómális DNS-t DNS-DNS hibridizációs kísérletekben analizáltuk. A pSB139-plazmidból három hibridizációs-próbaként alkalmazott fragmenst izoláltunk:

(a) egy általános foszfolipáz C (fos-C) hibridizációs-próbát, amely az ismert fos-C-szekvenciát a BamHI hasítási helytől a ClaI hasítási helyig, 1800 bázispár hosszúságban fedi át;

(b) egy bal Eco (E_L) hibridizációs-próbát, amely 850 bázispár hosszúságú szekvenciát fed át a BamHI hasítási helytől az EcoRI hasítási helyig;

(c) egy jobb Eco (E_R) hibridizációs-próbát, amely egy 1427 bázispárból álló EcoRI-fragmens.

A vad-típusú HD73-törzsből kromoszómális DNS-t a 11. példában leírtak szerint izoláltunk, 2xTY-tápfolyadékban (literenként 5 g élesztőkivonat, 5 g tripton, 2,5 g NaCl) előállított tenyészetből vett 100 ml mintákból.

A vad-típusú SA11-, SA12- és HD73-törzsekből, valamint a megfelelő transzdukált törzsekből kromoszómális DNS-t izoláltunk a Boehringer Mannheim cégtől hozzáférhető ASAP-reagenskészlet alkalmazásával, a gyártó utasításai szerint. A kromoszómális DNS-t EcoRI- vagy ApaI-enzimmel teljesen emésztettük, EtBr-ot tartalmazó TBE-pufferben, 0,8 %-os agarózgelen szétválasztottuk, tisztítottuk, denaturáltuk, neutralizáltuk, majd Sambrook és munkatársai eljárása szerint [Sambrook és mtsai.: "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", "Cold Spring Harbor Laboratory Press" (1989)] kapilláris-blot eljárással, 20xSSC-pufferben, egy éjszakán át, "Hy-Bond" nylon-membránokra vittük át. A DNS-t 0,4 mól/l NaOH-dal, 20 percen át végzett kezeléssel a membránokra fixáltuk. Southern-hibridizációt végeztünk az "Amersham ECL"-reagenskészlet alkalmazásával, a gyártó utasításai szerint.

A HD73- és HD73::pSB210.2-törzsekből származó, EcoRI-enzimmel emésztett DNS nagy méretű fos-C-próbával végzett DNS-hibridizációs analízise kimutatta a pSB210.2 integrációs vektorból származó, várakozásnak megfelelő 2,4 és 4,3 kb nagyságú belső fragmensek jelenlétét, de nem mutatta ki határozottan az integrációs hely vagy a szegélyező régiók valamelyik oldalán található kromoszómális régiókat. A belső vektor-csíkok és a későbbiekben szegélyező régióknak bizonyult csíkok intenzitásában megfigyelhető nagy eltérés arra utalt, hogy valószínűleg többszörös integrálódási esemény következett be. Ugyanannak a filternek az E_L -hibridizációs próbával végzett további analízise nem csak a várt, belső EcoRI-fragmensek, hanem az integránsok és a vad-típusú minták kromoszómális DNS-ében egy 1,8 kb nagyságú csík jelenlétét is kimutatta. Ezek az eredmények azt mutat-

ják, hogy a fos-C-génben található EcoRI hasítási helytől 5'-irányban, attól 1,8 kb távolságra egy EcoRI hasítási hely található. Az E_R-próbával történő hibridizáció az integránsokból származó mintákban kimutatta a belső fragmensek jelenlétét, és mind az integránsokból származó, mind a vad-típusú DNS-ben egy körülbelül 9 kb nagyságú csík jelenlétét, azonosítva ezzel a fos-C belső EcoRI hasítási helyétől 3'-irányban található következő EcoRI hasítási helyet.

A fos-C EcoRI hasítási helytől 5'- és 3'-irányban, mind a vad-típusú, mind az integráns törzsekben kimutatott azonos EcoRI csíkok jelenléte bizonyítja, hogy a beépülés a vártank megfelelően, a foszfolipáz C-génnek megfelelő kromoszómális régióban történt.

Az előzővel megegyező, de ApaI-enzimmel emésztett DNS-minták hasonló módon végzett Southern-blot analízise megerősítette, hogy többszörös integráció következett be. Egy olyan izoláltumból származó kromoszómális DNS analízise során, amelyikben csak egyetlen integrációs esemény jött létre, csupán két csíkot látnánk, mindkettő a pSB210.2 integrációs-vektorban található ApaI hasítási helytől a kromoszómában található integrációs helytől 5'- vagy 3'-irányban található vad-típusú ApaI hasítási helyig terjedő szekvenciának felelne meg. Többszörös integrációs esemény ugyanezeket az 5'- vagy 3'-irányban található csíkokat eredményezi, ezenkívül, egy további belső csíkot, amely megfelel két tandem módon integrálódott vektorral bejutatott ApaI hasítási helyek közti DNS-nek.

Southern-blot-analízis egy 10,4 kb nagyságú fragmens jelenlétére mutatott, amely megfelel az integrálódott plazmid teljes hosszának, ami arra utal, hogy a régióban többszörös integrálódási esemény történt. Amennyiben azonban kettőnél több integrációs esemény következett be, a szegélyező ApaI kromoszómális fragmensek nem voltak megfigyelhetők, és nem voltak

meghatározhatók. Az SA11CP1, SA11-CP2, SA12CP1 és SA12CP2 transzdukált törzsekből származó, EcoRI-enzimmel emésztett DNS E_L és E_R hibridizációs próbákkal végzett Southern-blot-analízise ugyancsak 2,4 és 4,3 kb nagyságú belső EcoRI-csíkok jelenlétét mutatta, igazolva, hogy a transzdukáló részecskék által hordozott DNS a kívánt, integrálódott fos-C-helyről származott. Ezek a belső csíkok nem voltak láthatók a vad-típusú SA1- és SA12-DNS-eket tartalmazó sávokban. A próbák ugyancsak ugyanolyan méretű, nevezetesen 1,8 kb és körülbelül 9 kb nagyságú szegélyező csíkokhoz hibridizálódtak, mint a vad-típusú HD73- és HD-51-törzsekben, valamint a megfelelő integránsokban. Az SA11-, SA12-, HD73- és HD-51 törzsek hasonló fos-C-régióval rendelkeznek. A “cross-over”-események pontos száma ezekkel a próbákkal nem határozható meg.

20. példa

A hibrid *B.t.*-törzsek stabilitása és életképessége

Analizáltuk a rekombináns SA11CP1- és SA12CP2-törzsek stabilitását. A bejuttatott gének stabilitását oly módon határoztuk meg, hogy a törzseket antibiotikum-szelekció nélkül tenyésztettük a sporuláción és a vegetatív alakká történő alakuláson keresztül.

A rekombináns SA11CP1- és SA12CP2-, valamint a vad-típusú SA11- és SA12-törzseket LB-lemezekre szélesztetük, és egy éjszakán át, 30 °C-on inkubáltuk. Mindegyik lemezről egyetlen telepet használtunk egy-egy 500 ml térfogatú, terelőidomot is tartalmazó tenyésztőlombikban található, 100 ml CYS tenyésztő tápfolyadék beoltására. A tenyészeteket 30 °C-on, 300 ford/perc-cel keverve tenyésztettük. Amikor a tenyészetek 600 nm-en mérve OD=0,8 értéket értek el, azokat 1:10 arányban hígítottuk. A tenyészetek szaporodását félóránként monitoroztuk, hogy növekedési görbéket vegyünk fel. A log-fázisból a stacioner fázisba történő átlépést követően a te-

nyészeteket további 48 órán át tenyésztettük. Mindegyik sporulálódott tenyészetből 1:10 hígítást készítettünk, és a hígításokat 65 °C-on, 45 percig hőkezeltük.

Feltételeztük, hogy a tenyészetek mililiterenként körülbelül 10^9 spórát tartalmaznak. A mintákat hígítottuk és LB-lemezekre oltottuk. A rekombináns törzsek esetében vegetatív formává alakult spórák számát összehasonlítottuk a vad-típusú törzs esetében kapott számmal. Ötven-száz telepet tartalmazó lemezeről replika-lenyomatot készítettünk erythromycint tartalmazó LB-táptalajra és antibiotikum-mentes LB-táptalajra, majd a lemezeket egy éjszakán át, 30 °C-on inkubáltuk. Meghatároztuk a szelektálható markert tartalmazó telepek számának százalékos arányát az életképes telepek számával szemben.

Az újonnan bejuttatott gének 100 %-ban stabilnak bizonyultak a sporuláció és vegetatív formává történő alakulás során, amint azt az erythromycinnel szemben mutatott folyamatos rezisztencia, valamint a PCR-eljárással kimutatott cryIC- és ermC-gének jelenléte alapján megállapítottuk. Spontán létrejött erythromycin-rezisztens telepet nem találtunk. Az első 8 órában ezeknek a rekombinánsoknak CYS-táptalajban mutatott szaporodási sebessége lényegében megegyezett a megfelelő szülői törzsével. A SA11- (vad-típusú) és a rekombináns SA11CP1-törzs esetében a spórák száma mililiterenként $9,3 \times 10^7$ és $1,5 \times 10^8$, az SA12- (vad-típusú) és a rekombináns SA12CP2-törzs esetében a spórák száma mililiterenként $3,5 \times 10^7$ és $3,4 \times 10^7$ volt. A bejuttatott géneknek nem volt hátrányos hatása a rekombináns törzsek életképességére.

*21. példa*Géntermék expresszáldása hibrid *B.t.*-törzsekben

A gén-expresszáldás tesztelésére a rekombináns és szülői törzsekből 10 ml CYS-táptalajban (literenként 10 g kaziton, 5 g glükóz, 2 g élesztőki-vonat, 1 g KH_2PO_4 , 1 ml 50 mmól/l MgCl_2 , 1 ml 50 mmól/l MnCl_2 , 1 ml 50 mmól/l ZnSO_4 , 1 ml 50 mmól/l FeCl_3 , 1 ml 200 mmól/l CaCl_2) készített tenyészetet 36 órán át, 30 °C-on tenyésztettünk. 50 µl térfogatú mintákat azonos térfogatú 2x mintafelvívő pufferrel elegyítettünk [0,125 mmól/l Tris-HCl (pH=8), 4 % SDS, 0,005 % “Bromophenol Blue”, 20 % (térfogat-%) glicerin, 4 % (térfogat-%) b-merkaptóetanol], és azonnal 5 percig forraltunk. 2,5, 5 és 10 µl térfogatú mintákat 10 %-os akrilamid-gélre (Novex) vittünk fel, és 1,5 órán át, U=125 Volt mellett elektroforetizáltuk.

A bejuttatott kristálygének expresszáldása SDS-poliakrilamid-gélelektroforézissel valamennyi rekombináns törzs esetében egyértelműen kimutatható volt. A HD73::pSB147-törzs esetében a vad-típusú törzsben kimutatható 130 kDa nagyságú csíkon felül, egy körülbelül 65 kDa nagyságú új csíkot láttunk. A 65 kDa megfelel a cryIIA-protein várható méretének. A HD73::pSB210.2-, SA11CP1-, SA11CP2-, SA11CP3-, SA11CP4-, SA12CP1-, SA12CP2-, S287CP1- és S287CP2-törzsek esetében egy további csík volt megfigyelhető 135 kDa-nál, amely a CryIC-protein várható méretének megfelelő méret, ez nem volt látható a vad-típusú HD73-, SA11-, SA12- és S287-törzseknél. A rekombináns törzsek továbbra is expresszálták a vad-típusú szülői törzsek által expresszált egyéb Cry-típusú proteineket, melyet 130 kDaltonnak megfelelően futó csíkként mutattunk ki.

22. példa

Biológiai vizsgálati eljárás hibrid B.t.-törzsek letalitásának vizsgálatára

A legtöbb biológiai vizsgálat céljára a mintákat 500 ml térfogatú, tere-
lőidomot is tartalmazó tenyésztőlombikokban, 100 ml "Fish meal"-
táptalajban (literenként 5,5 % "Fish meal" (halliszt), 4 % keményítő, 0,1 %
NH₄Cl, 0,125 % KH₂PO₄, 0,05 % MgSO₄, 0,001 % FeSO₄, 0,001 % MnCl₂)
tenyésztettük 30 °C-on, 72 órán át, 300 ford/perc mellett. Az 1087. számú
biológiai vizsgálatához a mintákat szintén 500 ml térfogatú, terelőidomot is
tartalmazó tenyésztőlombikokban, 100 ml "Fisch Meal"-táptalajban, 30 °C-
on tenyésztettük, de ebben az esetben friss ferdeagarról származó kacsnyi
spórával beoltott és 6 órán át 30 °C-on tenyésztett 100 ml "Fish meal" kiin-
dulási tenyészetből készített 5 %-os inokulumot használtunk. Az SA11-
mintákat (kontroll) és a megfelelő rekombinánsokat 41 órás tenyésztés eltel-
tével, az SA12-mintákat (kontroll) és a megfelelő rekombinánsokat 47 órás
tenyésztés elteltével kiülepítettük. Valamennyi mintát megvizsgáltunk prote-
in-expresszióra oly módon, hogy azokat 1:10 arányban vízzel hígítottuk,
majd a CYS-tenyészetekhez hasonlóan, a 18. példában fent leírtak szerint
kezeltük. Az összegyűjtést követően a tenyészeteket 4 °C-on tároltuk.

A "Fish meal"-tápfolyadékban tenyésztett rekombináns SA11-, SA12-
és S287-törzseket *Trichopulsia ni* és *Spodoptera exigua* lárvákkal szemben
vizsgáltuk az alábbi eljárás szerint. A rekombináns törzsekből származó
mintákat mesterséges rovar-táplálékkal kevertük, amely 132 g/l búzacsírárt,
28 g/l kazeint, 11 g/l vitamin-keveréket (Moorehead & Co. Van Nuys, CA),
8,8 g/l sókeveréket (BioServ, Frenchtown, NJ), 2,3 g/l szorbinsavat, 1,1 g/l
metil-parabent, 13 g/l agart és 1,5 ml/l formalint tartalmazott. A keveréket
25 °C-on inkubált, harmadik lárvaszakasz késői fázisában levő lárvákkal
etettük. A mortalitást 4 nap elteltével feljegyeztük, és az LC₅₀-et (a lárvák

50 %-ának pusztulását okozó koncentrációt) a technika állása szerint ismert probit-analízissel meghatároztuk.

Valamennyi rekombináns törzs nagyobb aktivitást mutatott a *S. exigua*-val szemben, mint azok a vad-típusú törzsek, melyekből származtak. A *Spodoptera exigua* lárvákkal szemben 1,6-2,2-szeres aktivitás-fokozódás volt kimutatható.

A cryIC-gént több különböző *Bacillus thuringiensis* törzs kromoszómájának ismert helyére juttatuk be, elektrotranszformációs, valamint fáglizátummal végzett transzdukciós technikák alkalmazásával. A transzdukcióval előállított rekombináns törzsek esetében a cryIC-gén expresszáldását SDS-PAGE-eljárással mutattuk ki, és a CryIC-protein hozzájárult a *S. exuiga* lárvákkal szemben mutatott bioaktivitáshoz. A cryIC-gén kromoszómába történő bejuttatása nem váltotta ki az eredetileg meglevő plazmidok instabilitását, és a sporuláció, valamint a vegetatív alakká történő alakulás során önmagát stabilan fenntartotta.

23. példa

B.t.-ben a pLTV1 replikációjának gátlásához szükséges hőmérséklet meghatározása

A *B. subtilis* PY1177(pLTV1)-törzset Dr. Phil Youngman-tól kaptuk, a törzset Camilli és munkatársai írták le [Camilli és mtsai.: J. Bacteriol. 172, 3738 (1990)]. A PY1177-törzsből Birnboim és Doly eljárása szerint [lásd fent, (1979)] pLTV1-DNS-t izoláltunk. A 7. példában fent ismertetettek szerint, elektroporációs technika alkalmazásával a pLTV1-DNS-sel *B.t. kurstaki* HD73-törzset transzformáltunk, és a transzformánst HD73+pLTV1-törzsnek neveztük.

Azt a hőmérsékletet, amely a pLTV1-plazmid *B.t. kurstaki* HD73-törzsben történő replikációjának megakadályozásához szükséges, két egy-

mást követő, különböző hőmérsékleten végzett hőkezeléssel határoztuk meg, melyek közül Bohall eljárása szerint [Bohall N.A.: J. Bacteriology 167, 716 (1986)] az első folyékony táptalajban, a másodikat szilárd táptalajon végeztük. 10 ml LB-tet₁₀-táptalajt tartalmazó tenyésztőlombikot egyetlen HD73+pLTV1-teleppel oltottunk be. Ezt az elsődleges tenyészetet 30 °C-on, terelőidommal keverve, 300 ford/perc mellett, 600 nm-en mérve OD=0,4 érték eléréséig tenyésztettük. A sejteket centrifugálással kinyertük, a tetraciklin eltávolítása céljából (antibiotikum-mentes) LB-táptalajjal mostuk, és 10 ml antibiotikum-mentes LB-ben szuszpendáltuk. A felsuszpendált sejtekkel 10 ml, 30, 37, 40 és 42 °C-ra előmelegített LB-tenyészetet oltottunk be (1 %). A beoltást követően, a tenyészeteket a megfelelő hőmérsékleten tartottuk 600 nm-en mérve OD=0,6-0,8 érték eléréséig. Ezután a tenyészeteket 10⁴-10⁷ faktorral hígítottuk, és a hígításokból 100 µl térfogatú mintákat LB-ery_{0,05}-lemezekre szélesztettünk. Mindegyik lemezt egy éjszakán át, a megfelelő elsődleges tenyészet inkubálási hőmérsékletén inkubáltuk. Egy éjszakán át tartó inkubálást követően, az LB-ery_{0,05}-lemezeken található telepekről négy különböző LB-lemezen, közelebbről, antibiotikum-mentes-, LB-ery₁₀-, LB_{cm12}- és LB_{tet10}-lemezeken replikalenyomatot készítettünk. A lemezeket egy éjszakán át, 30 °C-on inkubáltuk, és a következő napon antibiotikum-érzékenységre osztályoztuk.

Azoknak a kísérleteknek az eredményei, melyekben az elsődleges tenyészetet tetraciklint tartalmazó LB-tápfolyadékban tenyésztettük, a következők voltak. A pLTV1 replikációjára permisszív, 30 °C-os hőmérsékleten, a vizsgált telepek 20 %-a bizonyult erythromycinre, kloramfenikolra és tetraciklinre érzékenynek, ami a replikáció gátlásának következtében a plazmid elvesztésére utalt. 37 °C-on tenyésztve, a telepek 98 %-a volt érzékeny mindhárom antibiotikumra. 40 °C-on a telepek 94 %-a volt érzékeny mindhárom antibiotikumra, és 42 °C-on a telepek 100 %-a bizonyult érzé-

kenynek mindhárom antibiotikumra. Azokban a kísérletekben, melyekben a folyékony elsődleges tenyészetek nem tartalmaztak tetraciklint, ugyanazon hőmérsékletek mellett végbement a hőkezeléssel kiváltott plazmid-vesztés. A permisszív, 30 °C-os hőmérsékleten a tetraciklin-mentes tenyészetek esetében 38 %-os plazmid-vesztés volt megfigyelhető, (ami szignifikánsan magasabb, mint a 30 °C-on inkubált, LB+tet-tenyészeteknél megfigyelt 20 %-os plazmid-vesztés). A 37 °C-on, 40 °C-on és 42 °C-on inkubált tetraciklin-mentes tenyészetekben a plazmid-vesztés 94 %, 90 % és 90 % volt. Arra a következtetésre jutottunk, hogy 37 °C-on és ennél magasabb hőmérsékleten, a kísérletben alkalmazott feltételek mellett a pLTV1-plazmid replikációja gátolt volt. Mivel a plazmid még a replikációra permisszív, 30 °C-os hőmérsékleten is elveszhet, a pLTV1-plazmid bizonyos mértékig instabilnak tűnik.

24. példa

A pLTV1-plazmid által hordozott Tn917-transzpozon transzpozíciója számára megfelelő feltételek meghatározása *B.t.*-ben

Olyan telepek kinyerésére, amelyekben transzpozíció történt, három napot igénybevevő, három lépésből álló eljárást alkalmaztunk. Ezt az eljárást először HD73+pLTV1-törzsszel teszteltük. Először, 10 ml, ery₁-, cm₅- és tet₅-tartalmú folyékony LB-táptalajt egyetlen, pLTV1-plazmidot tartalmazó HD73-teleppel oltottunk be, és 30 °C-on, terelőidommal keverve, 300 ford/perc mellett, 600 nm-en mérve OD=0,7 érték eléréséig tenyésztettünk. Az elsődleges tenyészetet ezután centrifugáltuk, és a kiülepített sejteket az antibiotikum eltávolítása céljából 10 ml LB-táptalajban mostuk. Két másik tenyésztőlombikban, mind ery₁-t, mind cm₆-ot tartalmazó (de tetraciklint nem tartalmazó) 100-100 ml LB-táptalajt 100 µl, mosott elsődleges tenyésztettel oltottunk be. Az egyik tenyésztőlombikot 30 °C-on

(permisszív hőmérsékleten), míg a másikat 37 °C-on (nem-permisszív hőmérsékleten) tenyésztettük 300 ford/perc-cel, egy éjszakán át.

Egy éjszakán át tartó tenyésztést követően a tenyészeteket hígítottuk, és LB-táptalajra, valamint ery₁,cm₅-LB-táptalajra oltottuk. A lemezeket egy éjszakán át ugyanazon a hőmérsékleten inkubáltuk, mint amin a megfelelő, másodlagos tenyészteteket tartalmazó lombikokat inkubáltuk. Ezt a második, egy éjszakán át tartó hőkezelést követően a 37 °C-on tenyésztett ery₁,cm₅-LB-lemezekről különálló telepeket replika-lenyomat technikával LB-lemeztáptalajra, ery₁,cm₅-LB-táptalajra, ery₁₀-LB-lemeztáptalajra, cm₇-LB-lemeztáptalajra és tet₁₀-LB-lemeztáptalajra oltottunk, annak megállapítása céljából, hogy a telepek hány százaléka rezisztens erythromycinre és kloramfenikolra, de érzékeny tetraciklinre, ami transzpozíciós esemény megtörténte utal.

A kapott ery^rcm^rtet^s-telepeket HD73::pLTV1-törzsnek neveztük.

A vártnak megfelelően, a fenti kísérletekből származó pLTV1-plazmidot hordozó HD73-telepek csaknem 100 %-ában megtörtént a pLTV1-plazmidból a lacZ-gén transzpozíciója. Az ery^rcm^rtet^s-HD73-telepek LACNHS1 és LACNHS2 láncindító oligonukleotidokkal végzett PCR-analízise azt mutatta, hogy a pLTV1-plazmidból származó LacZ-gén valamennyi esetben jelen volt. A TY6 és TY7 láncindító oligonukleotidok alkalmazásával végzett további PCR-analízis szerint, 40 transzpozíción átment telep közül 38 megtartotta a natív cryIA(c)-gént. A láncindító oligonukleotidok szekvenciáit az alábbi, 7. táblázatban adjuk meg.

7. táblázatOligonukleotid-szekvenciák

		azonosító számú szekvencia
LACNHS1	GGCTTTCGCTACCT GGAGAGACGCGCC CGC	29
LACNHS2	CCAGACCAACTGG TAATGGTAGAGAC CGGC	30
TY6	GGTCGTGGCTATAT CATTCGTGTCACAG C	31
TY7	CCACGCTATCCAC GATGAATG TTCCTT C	32
NHS21	GATATTTTAGCTCA TGATCTTTTCCTCC TATTAAC	33
NHS37	CATTACGCATTTGG AATACC	34

A pSB050-plazmidot abból a célból alakítottuk ki, hogy a cryIIA-operont a *B.t. gallerie* HD232-törzsből a HD73-genomba vigyük át. A *B.t. gallerie* HD232-törzset az USDA intézettől kaptuk. A HD232-törzsből származó teljes cryIIA-operont egy 4 kb nagyságú BamHI-HincII-fragmensként izoláltuk az 5. példában ismertetett pSB304-plazmidból. A pLTV1-plazmidot SmaI és BamHI restrikciós enzimekkel hasítottuk, hogy

egy 20,6 kb fragmenst kapjunk, a fragmenseket ligáltuk egymással, így alakítottuk ki a pSB050-plazmidot. A ligációs termékkel dam-, dcm-GM2163 *E. coli*-törzset transzfektáltunk. A kívánt konstrukciót tartalmazó különálló GM2163-telepeket először LB_{amp75}-lemezeken szelektáltunk, majd a telepeket replika-lenyomat technikával egy sor különböző agarlemezre oltottuk át, melyek vagy nem tartalmaztak antibiotikumot, vagy amp₇₅-, cm₇-, ery₁₀- vagy tet₁₀-tartalmú lemezek voltak. Ötvenöt vizsgált telep közül öt volt rezisztens tetraciklinre, ampicillinre és erythromycinre, ami azt jelentette, hogy a megfelelő fragmens lett ligálva. Az összes többi telep érzékenynek bizonyult tetraciklinre, ami a pLTV1-plazmid hiányára utalt. A rezisztens telepeket a LACNHS1 és LACNHS2 láncindító oligonukleotidok között elhelyezkedő 1400 bp fragmens PCR-amplifikációjával tovább vizsgáltuk. A fenti láncindító oligonukleotidok szekvenciáját a fenti, 7. táblázatban mutattuk be, azok megfelelnek a pLTV1-plazmid által tartalmazott lacZ-génben található szekvenciáknak. A fenti, 7. táblázatban bemutatott szekvenciákkal rendelkező NHS37, valamint NHS21 láncindító oligonukleotidok alkalmazásával végzett PCR-amplifikáció az erythromycin-géntől a cryIIA-operon első nyitott leolvasási keretének végéig tartó régiót eredményezett. A rezisztens telepekből származó DNS-t BglII-enzimmal végzett restrikciós analízissel vizsgáltuk, és azokat a telepeket, amelyek a várt PCR-eredményt adták, valamint 2 kb, 5,3 kb és 16 kb BglII-fragmenseket eredményeztek úgy tekintettük, hogy tartalmazzák a pSB050-elnevezésű plazmidot.

A HD73-törzs pSB050-plazmiddal történő transzformációját a gazdaszettek 5 µg, GM2163-törzsből izolált pSB050-DNS-sel végzett elektroporációjával értük el az alábbi paraméterek alkalmazásával: kV=1,2, µF=3 és Ω=∞. A sejteket permisszív, 30 °C-os hőmérsékleten, BHIS-táptalajban, terelőidommal végzett keveréssel, 300 ford/perc mellett 3 óráig hagytuk regenerálódni. A sejteket ezután koncentráltuk, 10 µg/ml tetraciklint tartalma-

zó LB-lemezekre oltottuk, és egy éjszakán át, 30 °C-on inkubáltuk. A tetraciklin-rezisztens HD73-telepekben a pSB050-plazmid jelenlétét PCR-analízissel, a LACNHS1 és LACNHS2 láncindító oligonukleotidok (melyek 1400 bp terméket eredményeznek), valamint az NHS37 és NHS21 láncindító oligonukleotidok (melyek 600 bp terméket eredményeznek) felhasználásával igazoltuk a Perkin Elmer-Cetus által ajánlott feltételek alkalmazásával. Ezeket az izolátumokat HD73+pSB050-nek neveztük.

26. példa

A CryIIA bejuttatása a *B.t.* HD73-törzs 50 MDalton plazmidjaiba a pSB050-eredetű Tn917-transzpozon transzpozíciójával

A 25. példában leírtak szerint nyert, néhány HD73+pSB050 izolátumot használtunk a pSB050-plazmidból a cryIIA-operon transzpozíciójára a HD73-törzs nagy méretű, rezidens plazmidjába. A HD73+pSB050-izolátumokat nem permisszív hőmérsékleten inkubáltuk, majd kloramfenikol- és erythromycin-rezisztenciára, valamint tetraciklin-érzékenységre szelektáltuk. A kapott ery^rcm^rtet^s-telepeket HD73::050-nek neveztük, arra utalva, hogy a transzpozíciós esemény megtörtént. A transzpozíció megtörténtét az NHS37 és NHS21 láncindító oligonukleotidok közötti, a vártnak megfelelő 600 bp nagyságú fragmens (az ery-géntől a cryIIA-génig terjedő fragmens), valamint LACNHS1 és LACNHS2 láncindító oligonukleotidok közötti 1400 bp nagyságú termék PCR-amplifikációjával igazoltuk. Intakt cryIA(C) kódoló régió jelenlétét is igazoltuk a TY6 és TY7 láncindító oligonukleotidokkal végzett PCR-amplifikációval, mely láncindító oligonukleotidok szekvenciáit a fenti, 7. táblázatban közöljük.

*27. példa*A CryIA(c)- és CryIIA-gének expresszáldása a transzpozíció átsetett HD73::050 *B.t.*-törzsben

A HD73+pBS050- és a HD73::50-törzsek 1000-szeres nagyítás mellett végzett mikroszkópos vizsgálata azt mutatta, hogy mindkét törzs két kristálytípust termel. A HD73+pBS050- és a HD73::50-sejtekben mind a HD73-törzsre jellemző bipiramidális CryIA(c)-kristályok, mind a kuboid CryIIA-kristályok megfigyelhetők voltak. A vad-típusú HD73-sejtekben ilyen kuboid kristályok nem voltak láthatók.

A HD73::050-törzsben a CryIA(c)- és a CryIIA-proteinek expresszáldását SDS-PAGE-analízissel vizsgáltuk. Sporulálódott tenyészetből (40-50 órás tenyészetből) vett 100 µl mintát kiülepítettünk, 10 mmól/l EDTA-ban szuszpendáltunk, jégen, 1:1-arányban, 2x SDS-mintafelvívő pufferrel elegyítettünk, és három percig forraltunk. A mintákat előre kiöntött, 10 %-os Novex-gélen futtattuk, és "Coomassie blue" festékkel megfestettük.

Az SDS-PAGE-analízis kimutatta a 135 kDa CryIA(c)- és a 65 kDa CryIIA-proteinek jelenlétét. Ezt Western-blot-analízissel is megerősítettük, két külön bloton, CryIA(c)- vagy CryIIA-proteinekkel szemben előállított specifikus antiszérumok alkalmazásával.

*28. példa*Spóraszámok és a *B.t.*- HD73::050-törzs stabilitása

A tenyészetek relatív "egészségi állapotának" általános jellemzésére 1 ml tenyészetben található spórák számát összehasonlítottuk a következő *B.t.*-törzsekből származó mintákban: a vad-típusú HD73-törzsből és a HD73+pLTV1-, a HD73+pSB050- és a HD73::050-hibridtörzsekből származó mintákban. A sporulálódott tenyészeteket 45 percig, 65 °C-on kezel-

tük, hogy a megmaradt vegetatív sejteket előljük. Tovafutó hígításokból vett mintákat szélesztettünk LB-agarlemezekre, és a telepeket a következő napon megszámoltuk. A HD73::050-törzsben a transzponálódott DNS stabilitását oly módon határoztuk meg, hogy a fenti spórahígításokat 10 µg/ ml tetraciklint, 1 µg/ml erythromycint és 7 µg/ml kloramfenikolt tartalmazó LB-agarlemezre vagy antibiotikum-mentes LB-agarlemezre szélesztettük. A szelekció mellett kinövő telepek számát összehasonlítottuk a szelekció nélkül kinőtt telepek számával. A HD73::050-törzs esetében a spóraszám kicsit alacsonyabb volt, mint a vad-típusú HD73-törzs esetében. A spóraszám mililiterenként $1-2 \times 10^8$ közé esett. A legtöbb HD73::050 (azaz, 97-100 %) megtartotta a megfelelő ery^rcm^rtet^s antibiotikum-rezisztenciát, ami arra utal, hogy a transzponálódott régió nem vált instabillá és a transzpozíciót követően nem hasítódott ki a DNS-ből.

29. példa

A HD73::050 *B.t.*-törzs plazmidprofilja

Meghatároztuk a HD73::050-törzs plazmidprofilját, annak megállapítása céljából, hogy a transzpozíciós esemény a HD73-törzs kromoszómájában vagy nagy méretű plazmidjában történt. Az alkalmazott plazmid-előállítási eljárás Birnboim és Doly kis mértékben módosított, alkalikus lizálós eljárása volt [Birnboim H.C. és Doly (1979), lásd fent], amelyet a korábbiakban, a 18. példában ismertettünk. A HD73::050- és a vad-típusú HD73-törzsekből származó DNS-készítmények plazmidprofil-analízise azt mutatta, hogy a transzpozon két, az eredeti HD73-törzsben jelenlevő, 50 MDalton nagyságú plazmidba inszertálódott. A géleken a plazmid-csíkok molekula-tömegének megnövekedése volt megfigyelhető, amely növekedés megfelelt a transzponálódott DNS molekulatömegének. Egyes HD73::050-izolátumokban a cryIA(c)-gént hordozó, nagy kópiaszámú, 50 MDalton

nagyságú plazmid volt a transzpozíció célpontja. Más izolátumokban az alacsonyabb kópiaszámú, 50 MDalton nagyságú plazmid volt a transzpozíció célpontja. A HD73-törzsben eredetileg jelenlevő egyéb plazmidok közül egyik esetében sem volt megfigyelhető a molekulatömeg megváltozása.

30. példa

A HD73::050 és a HD73::pLTV *B.t.*-törzsekben végbement transzpozíció Southern-blot-analízise

A vad-típusú HD73-, a HD73::pLTV1-és a HD73::050-törzsekből össz-DNS-t állítottunk elő az ASAP-reagenskészlet alkalmazásával, a “Boehringer Mannheim” utasításai szerint. A DNS-t egy éjszakán át, feleslegben adagolt BamHI- és EcoRI-enzimekkel emésztettük, 18 órán át 20 cm-es, 0,8 %-os TBE-agarózgélben elektroforetizáltuk, majd kapilláris-blot eljárással egy éjszakán át, 20xSSC-pufferben, a Bio-Rad cégtől hozzáférhető “Zeta-Probe”-membránra vittük át. A membránokat az “Amersham ECL”-reagenskészlethez mellékelt utasítások szerint kezeltük és hibridizáltattuk a próbával. A membránra átvitt DNS hibridizáltatására próbaként a 25. példában fent ismertetett, 1400 bp LacZ-gén PCR-terméket alkalmaztuk. A HD73::050-DNS-nek megfelelő csíkokat összehasonlítottuk a vad-típusú HD73-törzsből származó DNS-nek megfelelő csíkokkal.

Southern-blot-analízissel kimutattuk, hogy a transzpozon az 50 MDalton nagyságú plazmidok eltérő helyeire épült be. Előnyben részesített transzpozíciós hely nem volt megfigyelhető. A pLTV1 restrikciós térképe szerint a HD73::pLTV1-törzs 9 kb vagy annál nagyobb, a próbával hibridizálódó BamHI-fragmenseket tartalmazott. Az ilyen méretű csíkok a pLTV1-plazmid egyik 50 MDalton nagyságú plazmidba transzponálódott részének felelnek meg. Hasonlóképp, a HD73::pLTV1-DNS 14 kb vagy nagyobb, a próbával hibridizálódó EcoRI-fragmenseket tartalmazott. A

Southern-analízis során, valamennyi esetben a vártnak megfelelő méretű hibridizálódott csíkok voltak megfigyelhetők. Egyik hibridizálódott csík sem volt azonos méretű, megerősítve, hogy a pLTV1 transzpozíciója véletlenszerű helyeken jött létre a HD73-genomban.

A HD73::050-izolátum Southern-blot-analízise során a vártnak megfelelően, BamHI-emésztést követően, 12 kb vagy annál nagyobb fragmenseknek megfelelő csíkokat láttunk, EcoRI-emésztést követően 17 kb nagyságú vagy annál nagyobb fragmenseknek megfelelő csíkokat figyeltünk meg. A HD73::pLTV1- és HD73::050-törzsek esetében a hibridizálódott csíkok mérete között megfigyelhető eltérés a HD73::050-törzs transzponálódott régiójában található cryIIA-gén jelenlétének tulajdonítható. A fentiek megerősítik, hogy a cryIIA-gén véletlenszerű módon inszertálódott a HD73-törzs genomjába.

31. példa

A B.t. HD73::050-törzs letalitása

HD73::50- és vad-típusú HD73-törzsekből származó friss, egy éjszakan át tenyésztett telepeket külön-külön, 500 ml, Yamamoto által leírt CYS-táptalajba oltottunk, centrifugálással összegyűjtöttünk, és 55 órán át, terelőidommal keverve, 300 ford/perc mellett, 30 °C-on tenyésztettünk [Yamamoto T.: "ACS Symposium Series" 432, 46-60 (1990)]. A sejteket 1/20 térfogat A-pufferben szuszpendáltuk [5 mmól/l Tris (pH=8,0), 0,025 % Triton] és a sejtlizátumot 8 %-os Novex SDS-PAGE-géleken elektroforetizáltuk. A CryIA(c)-protein koncentrációját denzitométeres pásztázással határoztuk meg. A-pufferben tizenkilenc, egyenként kétszeres hígításokat készítettünk, és valamennyi hígításban, ppm-ben kifejezve meghatároztuk a CryIA(c)-protein mennyiségét. A proteinek ismert mennyiségét rovar táplálékhoz kevertük, és azt harmadik lárváállapot késői fázisában levő

Trichoplusia ni és *Spodoptera exigua* lárvákkal megetettük, a lárvákat 4 napig, 25 °C-on inkubáltuk, majd mortalitásukat feljegyeztük.

A biológiai vizsgálat eredményei azt mutatták, hogy a HD73::050-hibridtörzs nagyobb aktivitással rendelkezik, mint a vad-típusú HD73-törzs. A *T. ni* esetében kapott eredmények szerint, a vad-típusú HD73-törzs esetében az LC_{50} (az a koncentráció, ami a lárvák felének pusztulását okozta) 3,5 ppm volt, míg a HD73::050-törzs esetében meghatározott LC_{50} =2 ppm volt. A *S. exigua* vizsgálatával kapott eredmények szerint, a vad-típusú HD73-törzs esetében az LC_{50} =475 ppm volt, míg a HD73::050-törzs esetében meghatározott LC_{50} =225 ppm volt.

A találmány lényege az alábbi, 1. és 2. pontok szerint foglalható össze, és oltalmi igényünket a csatolt igénypontokban definiáljuk.

1. A találmány tárgyát képezi egy DNS-szegmens, amely tartalmaz:

(a) egy vagy több, rovarölő hatású fehérjét kódoló DNS-szekvenciát, amelyik képes *Bacillus thuringiensis* sejtekben replikálódni és expresszálni, valamint *Bacillus thuringiensis* kromoszómális DNS-ben jelenlevő szekvenciával homológ szekvenciát, miáltal a homológ DNS-szekvencia a fenti DNS-szegmensnek a kromoszómába történő inszertálódását irányítja, és miáltal az említett, rovarölő hatású fehérjét kódoló DNS-szekvencia *Bacillus thuringiensis* kromoszómális DNS-ébe inszertálódik; vagy

b) egy vagy több, rovarölő hatású fehérjét kódoló DNS-szekvenciát, amelyik képes *Bacillus thuringiensis* sejtekben replikálódni és expresszálni, valamint *Bacillus thuringiensis* kromoszómális DNS-ébe véletlenszerű módon integrálódni képes DNS-szekvenciát, miáltal az említett DNS-szegmens a rovarölő hatású fehérjét kódoló DNS-szekvenciával együtt stabilan integrálódik a kromoszómális DNS-be.

2. A találmány tárgyát képezi egy eljárás *Bacillus thuringiensis* gazdasejtek előállítására, mely eljárás szerint:

a) *Bacillus thuringiensis* kromoszómális DNS-ével homológ DNS-szekvenciát vagy *Bacillus thuringiensis* kromoszómális DNS-ébe véletlenszerű módon integrálódni képes DNS-t állítunk elő;

b) a fenti DNS-szekvenciához funkcionálisan egy vagy több, rovarölő hatású proteint kódoló DNS-szekvenciát kapcsolunk;

c) A DNS-szegmenseket kinyerjük;

d) *Bacillus thuringiensis* törzset transzformálunk, miáltal a DNS-szegmens beépül a kromoszómális DNS-be; és

e) transzformált gazdasejtet izolálunk, amelyikben a rovarölő hatású proteint kódoló DNS-szekvencia stabilan integrálódott a gazdasejt kromoszómális DNS-ébe és képes a gazdasejtben replikálódni és expresszálni.

SZEKVENCIALISTA

AZ 1. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 28 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: genomi DNS

HIPOTETIKUS: nem

ANTISZENSZ: nem

AZ 1. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GGAACGCTAC ATACTAGTGA TAGAGTAG 28

A 2. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 28 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: genomi DNS

HIPOTETIKUS: nem

ANTISZENSZ: nem

A 2. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GCTTGTACAC CGCAACTGTT TTCGCATG 28

A 3. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 37 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: genomi DNS

HIPOTETIKUS: nem

ANTISZENSZ: nem

A 3. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

AGCTTGCGGC CGCGTCGACC CCGGGCCATG GGGGCCG 37

A 4. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 38 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: genomi DNS

HIPOTETIKUS: nem

ANTISZENSZ: nem

A 4. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

AATTCGGGCC CCCATGGCCC GGGGTCGACG CGGCCGCA 38

- 78 -

AZ 5. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 29 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: genomi DNS

HIPOTETIKUS: nem

ANTISZENZSZ: nem

AZ 5. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CCACAGTTAC AGTCTGTAGC TCAATTACC 29

A 6. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 24 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: genomi DNS

HIPOTETIKUS: nem

ANTISZENZSZ: nem

A 6. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CCGCTACTAA TAGAACCTGC ACCA 24

- 79 -

A 7. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 40 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: genomi DNS

HIPOTETIKUS: nem

ANTISZENSZ: nem

A 7. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CAATACATTA TCCATGGAAA ATTCCTCCTT AAATATCATG 40

A 8. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 39 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: genomi DNS

HIPOTETIKUS: nem

ANTISZENSZ: nem

A 8. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GAGCAATGAA AGAGTTAGGG CCCTGTTTAA GGTGTCATG 39

- 80 -

A 9. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 16 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: genomi DNS

HIPOTETIKUS: nem

ANTISZENSZ: nem

A 9. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GAGTGAATTA TGGGGG 16

A 10. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 16 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: genomi DNS

HIPOTETIKUS: nem

ANTISZENSZ: nem

A 10. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

ATTTTGTATT AAACGG 16

- 81 -

A 11. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 24 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: genomi DNS

HIPOTETIKUS: nem

ANTISZENSZ: nem

A 11. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

ACTATTTGTG ATGCGTATAA TGTA 24

A 12. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 18 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: genomi DNS

HIPOTETIKUS: nem

ANTISZENSZ: nem

A 12. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

AATTCCCCAT TCATCTGC 18

- 82 -

A 13. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: genomi DNS

HIPOTETIKUS: nem

ANTISZENSZ: nem

A 13. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GAAATCGGCT CAGGAAAAGG 20

A 14. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 24 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: genomi DNS

HIPOTETIKUS: nem

ANTISZENSZ: nem

A 14. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CCTTAAAACA TGCAGGAATT GACG 24

- 83 -

A 15. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: genomi DNS

HIPOTETIKUS: nem

ANTISZENSZ: nem

A 15. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CTATTGGTTG GAATGGCGTG 20

A 16. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 28 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: genomi DNS

HIPOTETIKUS: nem

ANTISZENSZ: nem

A 16. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GAGCCAAGCA GCTGGAGGAG TTTACACC 28

- 84 -

A 17. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 22 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: genomi DNS

HIPOTETIKUS: nem

ANTISZENSZ: nem

A 17. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

TCACTTCCCA TCGACATCTA CC 22

A 18. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 33 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: genomi DNS

HIPOTETIKUS: nem

ANTISZENSZ: nem

A 18. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

ATCACTGAGT CGCTTCGCAT GTTTGACTTT CTC 33

- 85 -

A 19. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 29 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: genomi DNS

HIPOTETIKUS: nem

ANTISZENSZ: nem

A 19. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GGTCGTGGCT ATATCCTTCG TGTCACAGC

29

A 20. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 25 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: genomi DNS

HIPOTETIKUS: nem

ANTISZENSZ: nem

A 20. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

ACAGAAGAAT TGCTTTCATA GGCTC

25

A 21. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 23 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: genomi DNS

HIPOTETIKUS: nem

ANTISZENSZ: nem

A 21. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GAATTGCTTT CATAGGCTCC GTC 23

A 22. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 28 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: genomi DNS

HIPOTETIKUS: nem

ANTISZENSZ: nem

A 22. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CAACAAACGG GCCATAAGCT TGTATAAG 28

A 23. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 23 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: genomi DNS

HIPOTETIKUS: nem

ANTISZENSZ: nem

A 23. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GCCGTCTGTA ACGGTACCTA AGG 23

A 24. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 21 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: genomi DNS

HIPOTETIKUS: nem

ANTISZENSZ: nem

A 24. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CACCCAGTTT GTACTCGCAG G 21

A 25. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 18 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: genomi DNS

HIPOTETIKUS: nem

ANTISZENSZ: nem

A 25. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GTCTCATGCA AACTCAGG 18

A 26. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 18 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: genomi DNS

HIPOTETIKUS: nem

ANTISZENSZ: nem

A 26. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CTCTGGCGCT CCATCTAC 18

- 89 -

A 27. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 29 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: genomi DNS

HIPOTETIKUS: nem

ANTISZENSZ: nem

A 27. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CCCATGGATA ATGTATTGAA TAGTGGAAG

29

A 28. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 10 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: genomi DNS

HIPOTETIKUS: nem

ANTISZENSZ: nem

A 28. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

AGCGGCCGCT

10

A 29. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 30 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: genomi DNS

HIPOTETIKUS: nem

ANTISZENSZ: nem

A 29. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GGCTTTCGCT ACCTGGAGAG ACGCGCCCGC 30

A 30. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 30 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: genomi DNS

HIPOTETIKUS: nem

ANTISZENSZ: nem

A 30. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CCAGACCAAC TGGTAATGGT AGAGACCGGC 30

- 91 -

A 31. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 29 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: genomi DNS

HIPOTETIKUS: nem

ANTISZENSZ: nem

A 31. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GGTCGTGGCT ATATCATTCG TGTCACAGC

29

A 32. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 28 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: genomi DNS

HIPOTETIKUS: nem

ANTISZENSZ: nem

A 32. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CCACGCTATC CACGATGAAT GTTCCTTC

28

A 33. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 35 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: genomi DNS

HIPOTETIKUS: nem

ANTISZENZ: nem

A 33. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GATATTTTAG CTCATGATCT TTTCCTCCTA TTAAC

35

A 34. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: genomi DNS

HIPOTETIKUS: nem

ANTISZENZ: nem

A 34. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CATTACGCAT TTGGAATACC

20

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Lineáris vagy cirkuláris DNS-szegmens, amely tartalmaz legalább egy rovarölő hatású fehérjét kódoló DNS-szekvenciát, amely képes *Bacillus thuringiensis* sejtekben replikálódni és expresszálni, *azzal jellemezve*,

hogy a lineáris DNS-szegmensben a rovarölő hatású fehérjét kódoló szekvenciától mind 5'-, mind 3'-irányban elhelyezkedő régiók tartalmaznak olyan nukleotidszekvenciákat, melyet homológok valamely *Bacillus thuringiensis* kromoszómális DNS-ben található szekvenciával, és ezáltal a rovarölő hatású fehérjét kódoló DNS-szekvencia képes a baktérium kromoszómális DNS-ébe integrálódni, vagy

a cirkuláris DNS-szegmensben a rovarölő hatású fehérjét kódoló szekvenciától 5'- vagy 3'-irányban elhelyezkedő régió tartalmaz egy olyan nukleotidszekvenciát, amely a *Bacillus thuringiensis* kromoszómális DNS-ben jelenlevő valamely szekvenciával homológ, és ezáltal a rovarölő hatású fehérjét kódoló DNS-szekvencia képes a baktérium kromoszómális DNS-ébe integrálódni.

2. Az 1. igénypont szerinti DNS-szegmens, *azzal jellemezve*, hogy gram-negatív baktériumokban működőképes replikációs origót és szelektálható markergént tartalmaz.

3. Hibrid vektor, *azzal jellemezve*, hogy 1. vagy 2. igénypont szerinti DNS-szegmenst tartalmaz.

4. *Bacillus thuringiensis* gazdasejt, *azzal jellemezve*, hogy az előző igénypontok bármelyike szerinti DNS-szegmenst tartalmaz.

5. Rovarölő hatású készítmény, *azzal jellemezve*, hogy a 4. igénypont szerinti gazdasejt rovaröléshez hatékony mennyiségét és hordozót tartalmaz.

6. Eljárás transzformált *Bacillus thuringiensis* gazdasejt előállítására, *azzal jellemezve*, hogy

i) a 3. igénypont szerinti vektort vagy az 1. vagy 2. igénypont szerinti DNS-szegmenst *Bacillus thuringiensis* törzsbe juttatjuk, és

ii) a kapott transzformánsok közül izoláljuk azokat, melyekben a rovarölő hatású fehérjét kódoló DNS-szekvencia stabilan a gazdasejt kromoszómális DNS-ébe integrálódott, és ott képes expresszálni és replikálódni.

7. A 6. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a transzformált gazdasejteket transzdukáljuk és recipiens *Bacillus thuringiensis* sejteket állítunk elő, oly módon, hogy

i) a 6. igénypont szerinti *Bacillus thuringiensis* gazdasejteket transzdukáló fággal érintkeztetjük;

ii) lehetővé tesszük, hogy a fág a gazdasejtben replikálódjék, miáltal a gazdasejt kromoszómális DNS-ébe integrálódott egy vagy több rovarölő hatású fehérjét kódoló DNS-szekvencia beépül a fágba; és

iii) a rovarölő hatású fehérjét kódoló DNS-szekvenciát a fágból recipiens *Bacillus thuringiensis* sejtekbe juttatjuk, oly módon, hogy a rovarölő hatású fehérjét kódoló DNS-szekvencia stabilan beépüljön a recipiens sejtek kromoszómális DNS-ébe, és ott expresszálni, és

8. A 6. vagy 7. igénypontok szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy *Bacillus thuringiensis* gazdasejtként és recipiens sejtként *Bacillus thuringiensis kurstaki* sejteket alkalmazunk.

- 95 -

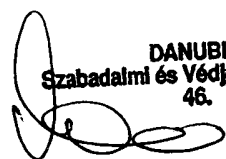
9. A 6., 7. vagy 8. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a rovarölő hatású fehérjét kódoló DNS-szekvencia a cryIC-szekvencia, vagy azzal homológ szekvencia.

95 old.
7 rajz

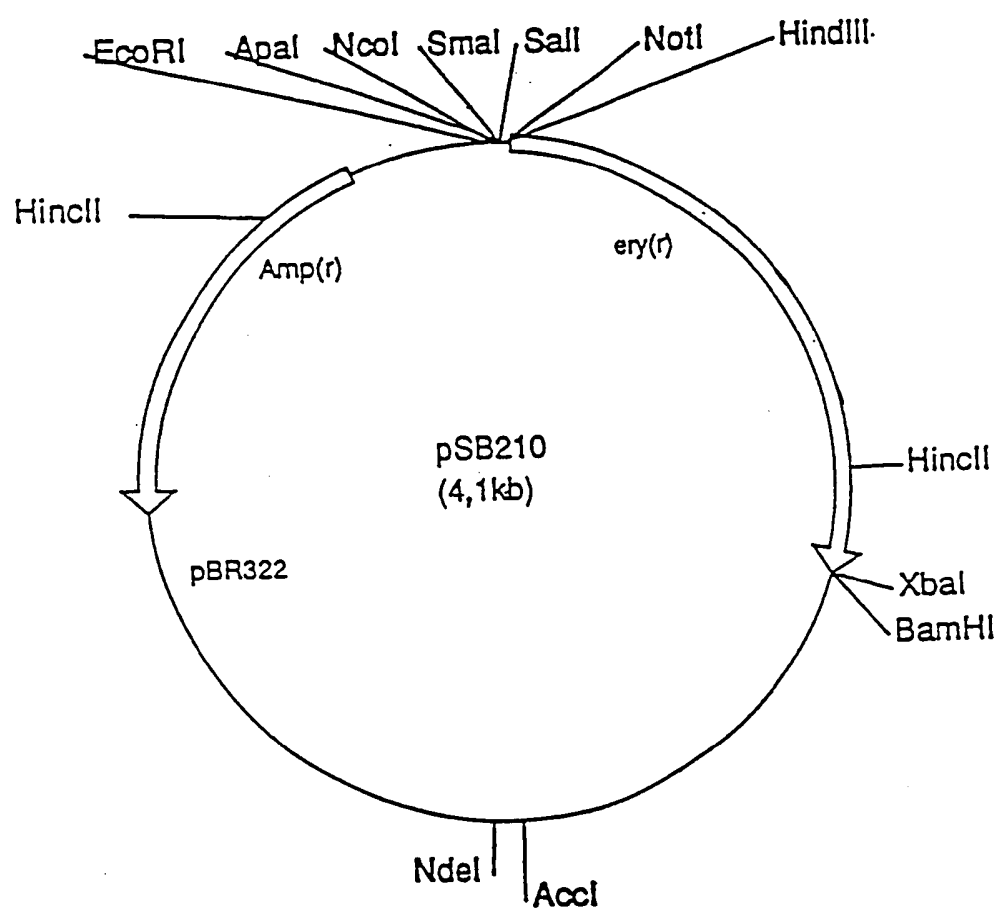
102 old.



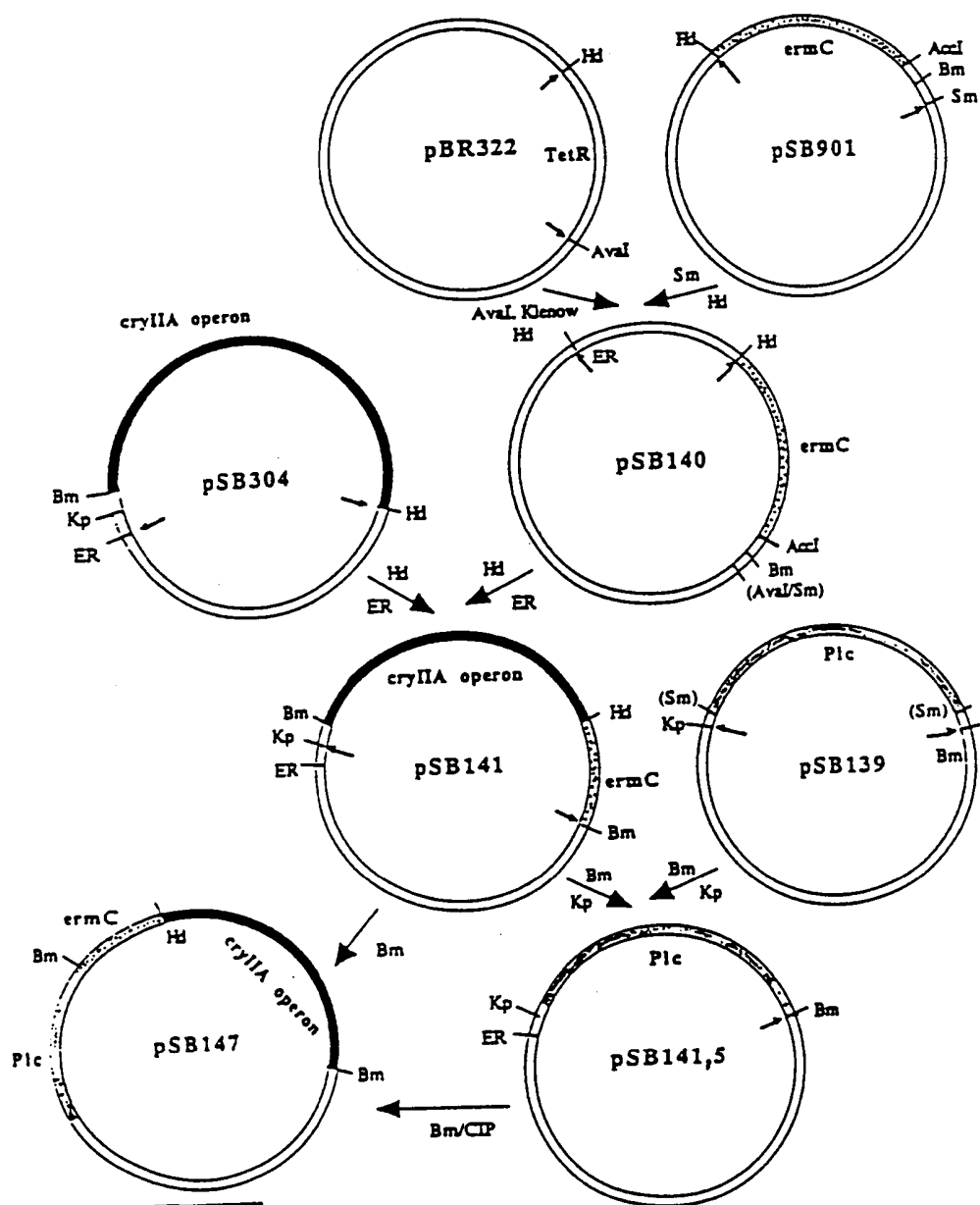
A meghatalmazott:



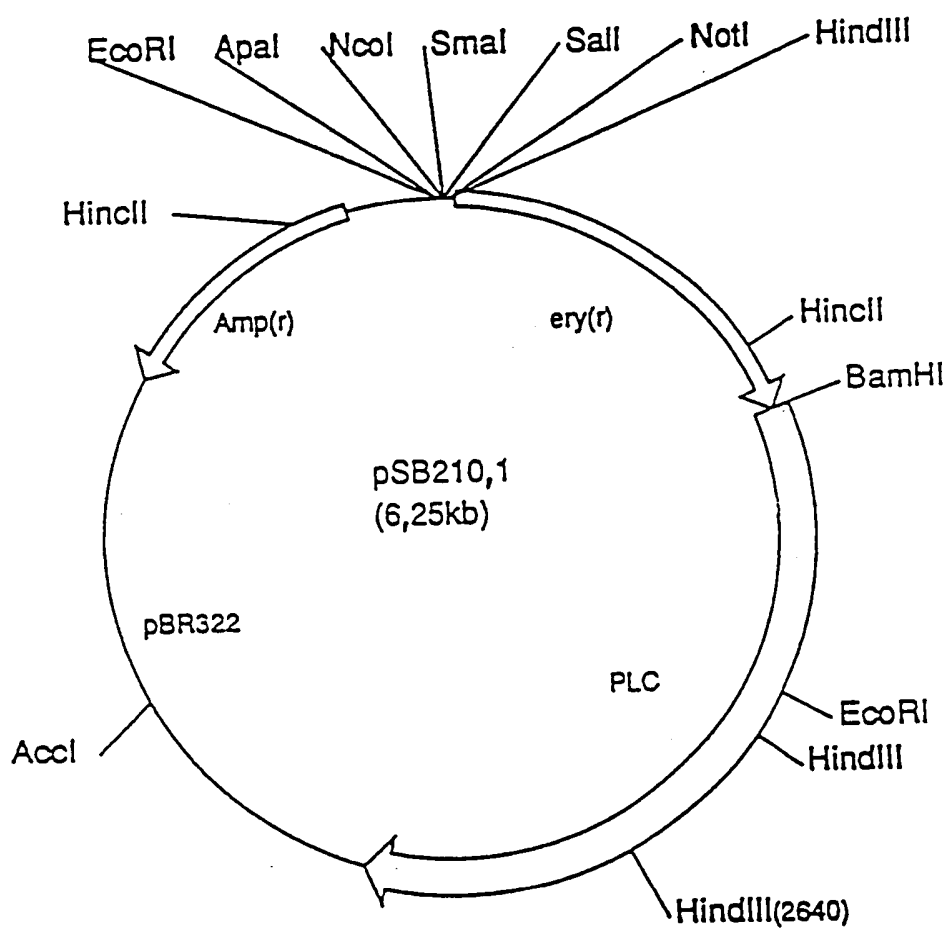
DANUBIA
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.
46.



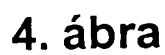
1. ábra



2. ábra

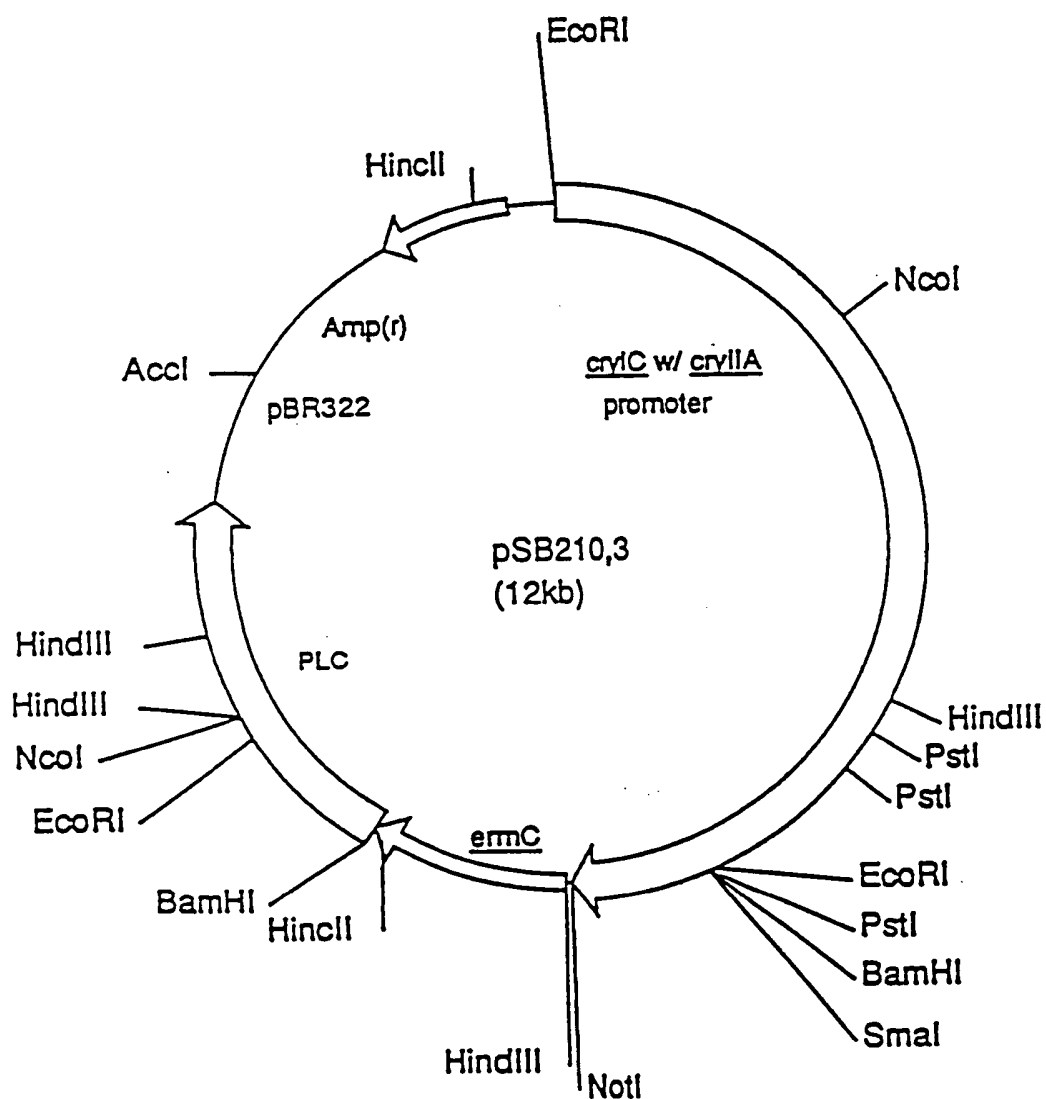


3. ábra

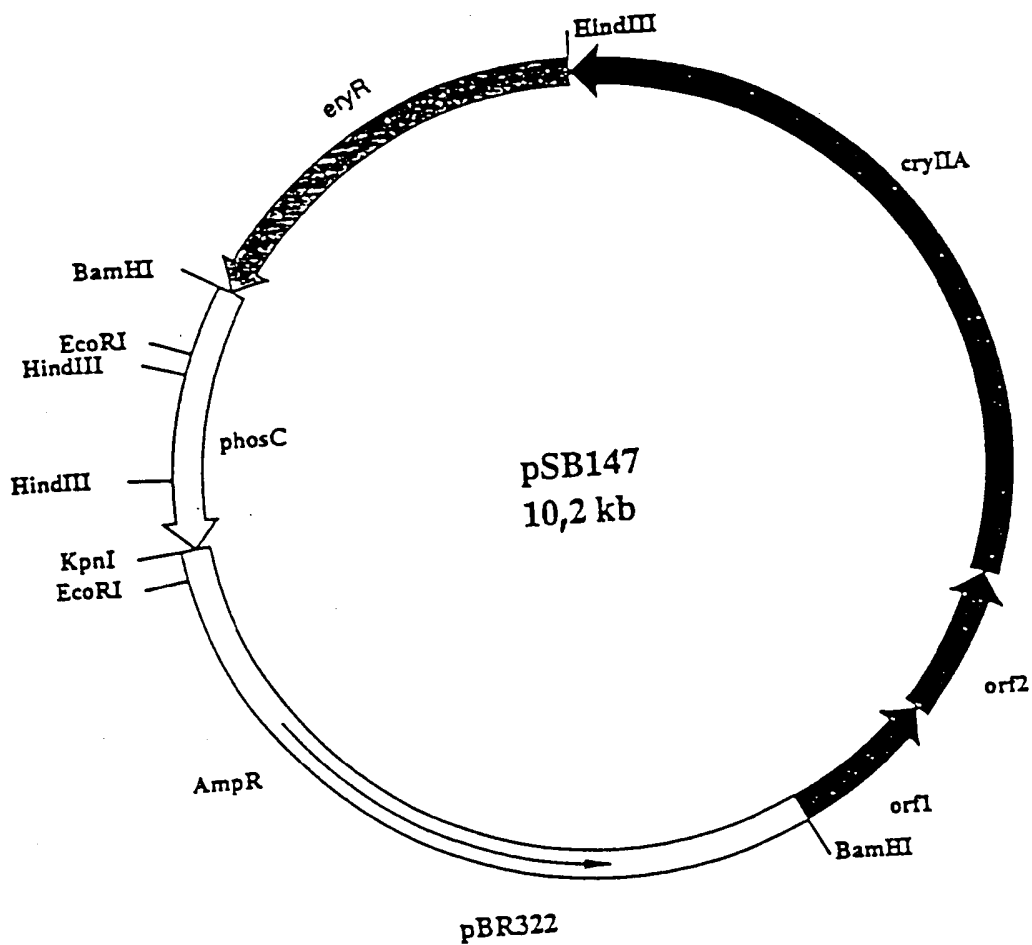


4. ábra

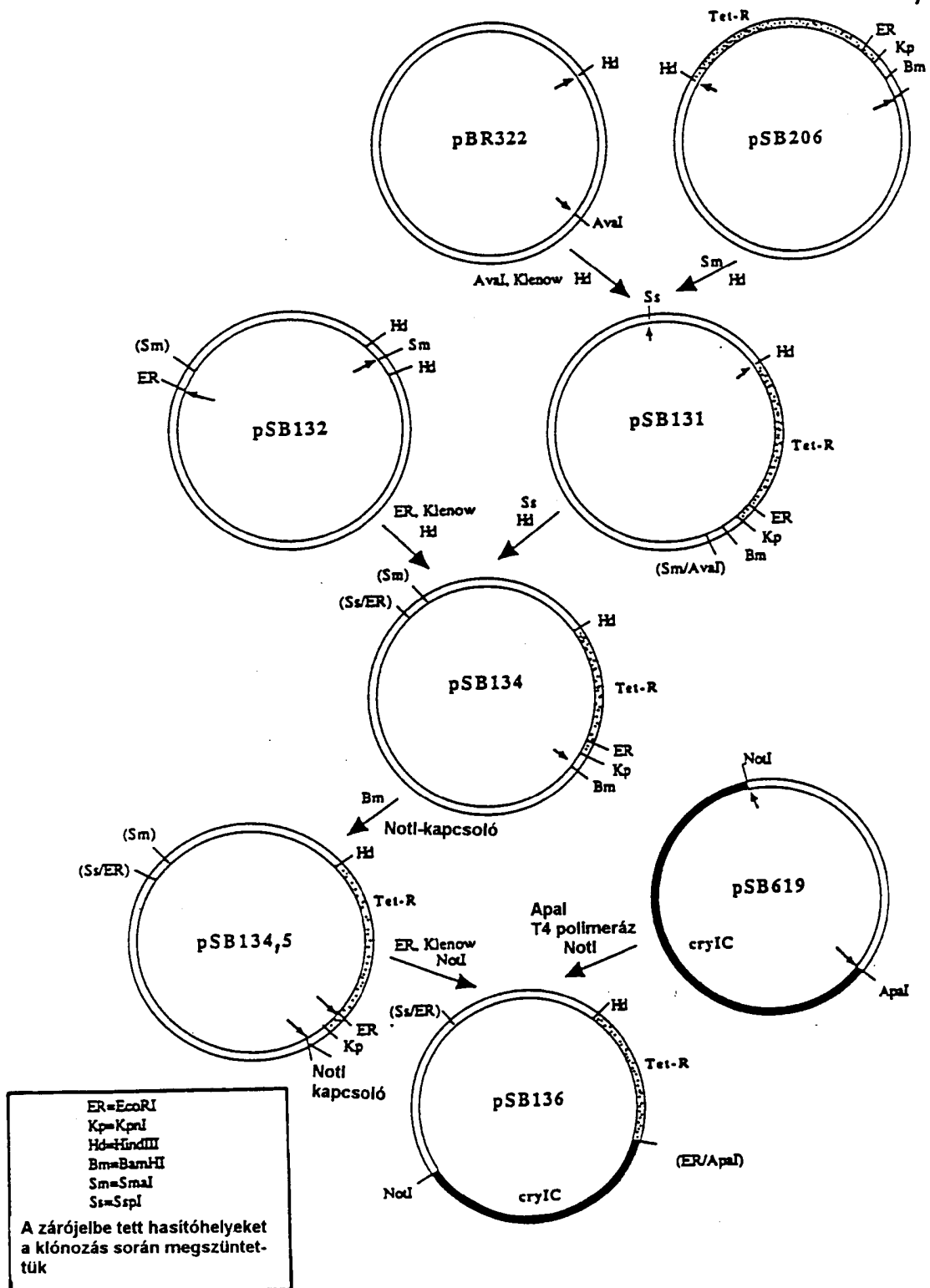
pSB210,3
pSB210,1 w/cryIC
(A pSB013 Apal/NotI-fragmense;
cryIIA-promóter)



5. ábra



6. ábra



7. ábra