(19)

SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 892359 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE PUBLIC

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 892359

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C12N 15/75
A01N 25/00

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **17.05.1989**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **17.05.1989**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **21.11.1989**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

20.05.1988 CH 1946/88
02.09.1988 CH 3279/88
20.01.1989 CH 180/89

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Novartis AG, Schwarzwaldallee 215, 4058 BASEL, SVEITSI, (CH)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Schurter, Walter, Switzerland, SVEITSI, (CH)
2 • Geiser, Martin, Switzerland, SVEITSI, (CH)
3 • Mathé, Daniéle, France, RANSKA, (FR)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Oy Jalo Ant-Wuorinen Ab, Iso Roobertinkatu 4 - 6 A, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention
Bacillus thuringiensis-bakteerin transfomointi
Transformering av Bacillus thuringiensis

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism - Deposit of microorganism

3668 DSM
4571 DSM
4572 DSM
4573 DSM
4574 DSM
4575 DSM

Menetelmä Bacillus thuringiensiksen tai B. cereuksen geneettiseksi muuntamiseksi

Keksintö koskee menetelmää, jolla voidaan suorittaa Bacillus thuringiensiksen ja sille läheistä sukua olevan B. cereuksen suora ja kohdennettu geneettinen manipulaatio käyttämällä apuna yhdistelmä-DNA-tekniikkaa, ja kyseinen menetelmä perustuu mainitun Bacillus-lajin tehokkaaseen transformointiin sopivilla plasmideilla ja "sukkulavektoreilla".

Bacillus thuringiensis kuuluu suureen gram-positiivisten, aerobisten, sisäitiöitä muodostavien bakteerien ryhmään. Erona läheistä sukua oleville Bacillus-lajeille B. cereus ja B. anthracis tuottavat tähän mennessä tunnetut B. thuringiensis-lajit itiönmuodostuksen aikana parasporaalisen sulkeumakappaleen, jota sen kiteisen rakenteen perusteella nimitetään yleisesti myös kidekappaleeksi. Tämä kidekappale koostuu insektisidisesti vaikuttavista kiteisistä protoksiiniproteii-

neista, niinsanotuista δ-endotoksiineista.

Nämä proteiinikiteet vastaavat B. thuringiensiksen hyönteisiin kohdistamasta myrkkyvaikutuksesta. δ-endotoksiini paljastaa insektisidisen aktiivisuutensa vasta sen jälkeen, kun hyönteinen on ottanut kidekappaleen sisäänsä suun kautta ja kappale on liuennut kohdehyönteisen emäksiseen suolinesteeseen ja protoksiinin varsinaiset toksiset komponentit ovat vapautuneet rajoitetun proteolyysin tuloksena, jonka hyönteisten ruuansulatuskanavan proteaasien vaikutus saa aikaan.

Erilaisten B. thuringiensis-kantojen δ-endotoksiinit ovat erityisluonteeltaan sellaisia, että niillä on korkea spesifisyys tiettyjen kohdehyönteisten suhteen, erityisesti erilaisten perhosten, kovakuoriaisten ja kaksisiipiäisten toukkien suhteen, joihin niillä on myös suuri vaikutus. Muita etuja, joilla on merkitystä B. thuringiensiksen δ-endotoksiinien käytössä, ovat kohdehyönteisten ilmeinen vaikeus kehittää vastustuskyky kiteistä proteiinia vastaan sekä se, että toksiinit eivät vahingoita ihmisiä eivätkä muita nisäkkäitä, lintuja, kaloja eivätkä muita hyönteisiä kuin mainitut kohdehyönteiset.

B. thuringiensiksen protoksiinien insektisidinen potentiaali tunnetaan jo vanhastaan. Jo 20-luvulta lähtien on B. thuringiensis-valmisteita käytetty bioinsektisideinä erilaisten, hyönteisten aiheuttamien viljelykasvien sairauksien torjunnassa. Kun [1]Goldberg ja Margalit (1977) löysivät B. thuringiensis var. israelensiksen ja [2]Krieg et al. (1983) löysivät B. thuringiensis var. tenebrioniksen, voitiin B. thuringiensiksen käyttöspektriä laajentaa jopa hyttysten ja kovakuoriaisten toukkiin.

Geeniteknologian ja sen mukanaan tuomien uusien mahdollisuuksien myötä on B. thuringiensiksen toksiinien ala kokenut uuden nousun.

Niinpä δ-endotoksiinigeenien kloonaus vieraisiin

isäntäorganismeihin, kuten esimerkiksi E. coliin, on jo rutiinia. Tästä johtuu, että nykyisin tunnetaan melkoisen δ-endotoksiinijoukon DNA-sekvenssit (esim. [3]Schnepf HE ja Whiteley HR, 1981; [4]Klier A et al., 1982; [5]Geiser M et al., 1986; [6]Haider MZ et al., 1987).

Useimmat B. thuringiensis-lajit sisältävät useampia geenejä, jotka koodittavat insektisidisesti vaikuttavaa proteiinia. Nämä geenit, jotka ilmentyvät vain itiönmuodostusvaiheen aikana, sijaitsevat useimmissa tapauksissa suurissa, siirtymiskykyisissä plasmideissa (30 - 150 Md), josta syystä niitä voidaan hyvin helposti vaihtaa eri B. thuringiensis-kantojen välillä sekä B. thuringiensiksen ja B. cereuksen välillä, mikäli nämä ovat yhteensopivia ([7]Gonzalez JM et al., 1982).

B. thuringiensis var. kustakin protoksiinigeenit kuuluvat geeniperheeseen, jonka edustajista erinäisiä on jo kloonattu ja sekvensoitu. Nämä työt on tehty ensi sijassa E. coli-kloonaussysteemissä.

Näin ollen on B. thuringiensis-geenin kloonaus tähän mennessä rajoittunut oleellisesti vain harvoihin ja pekästään heterologisiin isäntäsysteemeihin, joista E. coli-systeemi on parhaiten tutkittu ja ymmärretty.

Tunnetaan kyllä myös selostuksia protoksiinigeenien onnistuneesta kloonauksesta ja ilmentämisestä muissa isäntäsysteemeissä, kuten esimerkiksi B. subtiliksessa ([4]Klier A et al., 1982), Pseudomonas fluoreszenksessa ([8]Obukowicz MG et al, 1986) ja Saccharomyces cerevisiaessa (EP 0 238 441). Myös δ-endotoksiinigeenin sijoittaminen isäntänä toimiviin kasvisoluihin ja ilmentäminen niissä on tähän mennessä onnistunut (EP 0 292 435).

E. coliin tapahtuvassa kloonauksessa käytetään hyväksi sitä tosiseikkaa, että monilla protoksiinigeeneillä on gram-positiivisten promoottorien lisäksi mahdollisesti myös E. coliin soveltuva promoottori. Nämä promoottorinkaltaiset DNA-sekvenssit tekevät mahdolliseksi sen, että B. thuringiensis-protoksiinigeenejä voidaan

ilmentää myös heterologisissa isäntäsysteemeissä, mikäli nämä kykenevät tunnistamaan edellämainitut säätelysekvenssit. Ilmentyneet protoksiiniproteiinit voidaan sitten isäntäsolujen rikkomisen jälkeen eristää ja tunnistaa ennestään tunnettujen menetelmien avulla.

Tähän mennessä on kuitenkin osoittautunut, ettei kaikissa tapauksissa ole käytettävissä E. colinkaltaisia promoottoreita protoksiinigeeneissä ([9]Donovan et al, 1988), mistä syystä tähän mennessä vain tietyt protoksiinigeenit, jotka täyttävät edellämainitut edellytykset, ovat ilmennettävissä ja siten tunnistettavissa heterologisissa isäntäsysteemeissä.

Näin ollen näiden geenien kloonaukseen luontaisen isäntäorganismin ulkopuolelle sekä näiden kantojen käytännön käyttöön bioinsektisideinä liittyy joukko osaksi vakavia haittoja:

a) B. thuringiensis-protoksiinien ilmentyminen on mahdollista vain tietyissä tapauksissa.

b) Yleensä ei saada aikaan lainkaan ilmentyneiden vieraiden proteiinien erittymistä tai erittymistä tapahtuu vain vähäisessä määrin.

c) δ-endotoksiinien oikea laskostuminen ei aina pääse tapahtumaan heterologisten isäntäsolujen pelkistävässä ympäristössä, mikä saattaa aiheuttaa ei-toivotun muutoksen ominaisaktiivisuuteen tai toksiinin isäntäalueeseen.

d) Jos ilmentyminen yleensä tapahtuu, ovat kloonattujen vieraiden geenien ilmentymismäärät synnynnäisten ilmentämissekvenssien alaisuudessa enimmäkseen pieniä.

[3);10]Schnepf ja Whitley (1981; 1985) arvioivat, että E. coliin kloonattua B. thuringiensis-toksiinia on vain noin 0,5 - 1 % E. colin koko soluproteiinimäärästä, kun taas kideproteiinia on B. thuringiensiksessä 30 - 40 % kuivapainosta, kun viljelmä on itiönmuodostusvaiheessa. Nämä vakavat erot ilmentymismäärissä johtuvat mahdollisesti itiönmuodostukselle spesifisten säätely-

signaalien puuttumisesta heterologisissa isäntäsysteemeissä sekä vaikeuksista B. thuringiensis-promoottorien tunnistamisessa ja/tai ongelmista vieraan isännän aikaansaamassa toksiinimolekyylin luennanjälkeisessä muokkauksessa.

d) Monet yleisesti ilmentämiseen käytetyistä isäntäkannoista eivät ole toksikologisesti niin vaarattomia kuin B. thuringiensis ja B. cereus.

e) B. thuringiensis ja B. cereus muodostavat maaperän mikrobikasvuston pääosan, mikä yleensä ei ole laita ilmentämiseen käytettyjen isäntäkantojen kohdalla.

Nämä edellämainitut ongelmat ja vaikeudet voitaisiin voittaa, jos mainitut B. thuringiensis-geenit onnistuttaisiin suoraan kloonaamaan homologiseen isäntäsysteemiin, jossa ilmentymisessä voidaan käyttää hyväksi protoksiinigeenien luontaisia gram-positiivisia promoottoreita.

Mutta tähän mennessä ei ole olemassa mitään menetelmää, jolla voidaan suorittaa B. thuringiensikselle, tälle kaupalliselta kannalta niin tärkeälle bakteerille, suora geneettinen modifiointi ja näin esimerkiksi kloonatun protoksiinigeenin tehokas jälleensiirto B. thuringiensis-kantaan.

Syyksi tähän on ensi sijassa katsottava se, ettei tähän mennessä ole onnistuttu kehittämään tehokasta transformointisysteemiä B. thuringiensikselle eikä sille läheistä sukua olevalle B. cereukselle, joka systeemi takaisi riittävän korkeat transformoitumistaajuudet ja siten vakiintuneiden geeniteknologisten menetelmien käytön B. thuringiensiksen käsittelyssä.

Tähän mennessä käytetyt menetelmät uusien B. thuringiensis-kantojen aikaansaamiseksi, joilla kannoilla on uusia insektisidiä ominaisuuksia, perustuvat pääasiallisesti plasmidin koodittamien protoksiinigeenien konjugaaliseen siirtoon.

Onnistunut kloonatun B. thuringiensis-kideproteiinigeenin siirto takaisin B. thuringiensikseen on tähän

mennessä selostettu vain yhdessä ainoassa tapauksessa ([11]Klier A et al, 1983), jolloin myös tässä B. thuringiensikselle sopivan transformointimenetelmän puuttuessa piti turvautua konjugaaliseen siirtoon B. subtiliksen ja B. thuringiensiksen välillä. Myös tässä Klier et al.:n kuvaamassa menetelmässä käytetään E. colia väliisäntänä.

Konjugaalisissa siirtomenetelmissä on kuitenkin koko joukko vakavia haittoja,jotka tekevät niistä sopimattomia käytettäviksi B. thuringiensiksen ja/tai B. cereuksen rutiininomaiseen geneettiseen muuntamiseen.

a) Protoksiineja koodittavan plasmidin konjugaalinen siirto on mahdollista vain B. thuringiensis-kantojen välillä tai B. cereus- ja B. thuringiensis-kantojen välillä, jotka ovat keskenään yhteensopivia.

b) Konjugaalisessa plasmidinsiirrossa, joka tapahtuu etäistä sukua olevien kantojen välillä, saavutetaan usein vain pieni siirtotaajuus.

c) Ei ole mitään mahdollisuutta säädellä tai muuntaa protoksiinigeenien ilmentymistä.

d) Ei ole mitään mahdollisuutta muokata itse geeniä.

e) Jos yhdessä kannassa on läsnä useita protoksiinigeenejä, voi yksittäisten geenien ilmentyminen vähentyä voimakkaasti ns. geeniannosvaikutuksen vuoksi.

f) Saattaa syntyä epästabiilisuuksia, jotka johtuvat toisilleen sukua olevien protoksiinigeenien mahdollisesta homologisesta rekombinaatiosta.

Vaihtoehtoiset transformointimenetelmät, jotka ovat nykyään rutiinikäytössä useilla gram-positiivisilla organismeilla, ovat osoittautuneet sopimattomiksi sekä B. thuringiensikselle että B. cereukselle.

Edellämainittuihin menetelmiin kuuluu esim. bakteeriprotoplastien suora transformointi käyttämällä apuna polyetyleeniglykolikäsittelyä ja tällöin on onnistuttu useilla Streptomyces-kannoilla ([12]Bibb JJ et al., 1978), B. subtiliksella ([13]Chang S ja Cohen SN, 1979),

B. megateriumilla ([14]Brown BJ ja Carlton BC, 1980), Streptococcus lactiksella ([15]Kondo JK ja McKay LL, 1984), S. faecaliksella ([16]Wirth R et al.), Corynebacterium glutamicumilla ([17]Yoshihama M et al, 1985) sekä lukuisilla muilla gram-positiivisilla bakteereilla.

Tämän menetelmän käyttöä varten pitää bakteerisolut ensin protoplastisoida eli niiden solunseinät pitää poistaa lyyttisten entsyymien avulla.

Vielä eräs edellytys tämän suoran transformointimenetelmän onnistuneelle käytölle on tuodun uuden geneettisen informaation ilmentyminen sekä transformoitujen protoplastien regenerointi kompleksisilla kiinteillä alustoilla, ennenkuin onnistunut transformoituminen voidaan osoittaa esim. valintamerkin avulla.

Tämä transformointimenetelmä osoittautui sopimattomaksi B. thuringiensikselle ja sille läheistä sukua olevalle B. cereukselle. Koska B. thuringiensis-soluilla on suuri vastustuskyky lysotsyymin suhteen ja vain puutteellinen regeneroitumiskyky protoplasteista ehjän solunseinän omaaviksi soluiksi, jäivät saavutetut transformoitumismäärät vähäisiksi ja vaikeiksi toistaa ([18]Alikhanian SJ et al, 1981; [19]Martin PA et al., 1981; [20]Fisher H-M et al, 1984).

Tällä menetelmällä voidaan näin ollen siirtää B. thuringiensikseen tai B. cereukseen pienellä taajuudella korkeintaan hyvin yksinkertaisia plasmideja, jotka eivät sovellu geeniteknologiseen työskentelyyn.

Yksittäiset kertomukset tyydyttävistä transformoitumistaajuuksista, jotka on saavutettu edellä selostetun menetelmän avulla, perustuvat hyvin monimutkaisten optimointiohjelmien käyttöön, joita kuitenkin voidaan konkreettisesti käyttää vain tiettyyn B. thuringiensis-kantaan, ja joihin liittyy paljon aikaa ja kustannuksia. ([21]Schall D, 1986). Näin ollen nämä menetelmät eivät sovellu rutiinikäyttöön teollisessa mittakaavassa.

Kuten B. thuringiensis-genetiikan alueella tehdys-

tä tutkimustyöstä voidaan päätellä, on olemassa suuri mielenkiinto uusien menetelmien kehittämiseen, jotka tekevät mahdolliseksi B. thuringiensiksen ja sille läheistä sukua olevan B. cereuksen suoran geneettisen muuntamisen ja näin esimerkiksi protoksiinigeenien kloonauksen luonnolliseen isäntäsysteemiin. Esiintyviä vaikeuksia ja ongelmia ei kuitenkaan tähän mennessä ole kyetty ratkaisemaan tyydyttävällä tavalla.

Tällä hetkellä ei ole käytettävissä sopivia transformointimenetelmiä, jotka mahdollistavat B. thuringiensiksen ja/tai B. cereuksen nopean, tehokkaan ja toistettavan transformoinnin suurella transformoitumistaajuudella, eikä myöskään ole käytettävissä sopivia kloonausvektoreita, jotka sallivat jo muille isäntäbakteerisysteemeille vakiintuneiden geeniteknologisten menetelmien käytön myös B. thuringiensikselle. Tämä koskee myös B. cereusta samalla tavalla.

Tämä tehtävä on voitu nyt yllättäen ratkaista esillä olevan keksinnön puitteissa käyttämällä yksinkertaisia, osaksi ennestään tunnettuja menetelmävaiheita.

Näin ollen esillä oleva keksintö koskee uudenlaista menetelmää, joka geeniteknologiaan perustuen ensi kertaa mahdollistaa B. thuringiensiksen ja B. cereuksen suoran, kohdennetun ja toistettavissa olevan geneettisen muuntamisen siten, että Bacillus thuringiensis ja/tai Bacillus cereus transformoidaan yksinkertaisen transformointimenetelmän avulla suurella teholla käyttämällä yhdistelmä-DNA:ta, joka soveltuu Bacillus thuringiensiksen ja/tai Bacillus cereuksen tarkoitetuun geneettiseen muuntamiseen.

Tässä menetelmässä
(a) eristetään siirrettävä DNA,
(b) kloonataan eristetty DNA vektorissa, joka kykenee replikoitumaan bakteeri-isäntäsolussa, joka on *B. thuringiensis* tai *B. cereus*, heterologisessa kloonausjärjestelmässä,
(c) eristetään kloonattu DNA ja siirretään se elektroporaatiolla suoraan mainittuun bakteerisoluun siten, että impulssi(e)n eksponentiaalinen vaimenemisaika on alueella noin 2 - noin 50 ms, ja
(d) viljellään transformoituja bakteerisoluja ja mahdollisesti eristetään kloonattu vektori-DNA.

Rakennegeenien ohella voidaan tietysti keksinnönmukaisessa menetelmässä käyttää mitä tahansa muita hyödyllisiä DNA-sekvenssejä, kuten esimerkiksi koodittamattomia DNA-sekvenssejä, joilla on säätelyfunktio, kuten esim. "antisense-DNA":ta.

Keksinnönmukainen menetelmä avaa näin ollen lukuisia uusia mahdollisuuksia, jotka ovat erittäin mielenkiintoisia tieteelliseltä ja myös kaupalliselta kannalta katsottuina.

Niinpä nyt on esimerkiksi ensi kertaa mahdollista saada tietoja δ-endotoksiinisynteesin säätelystä, erityisesti mitä tulee itiönmuodostukseen, geneettisellä tasolla.

Myös kysymyksen, missä toksiinimolekyylin kohdassa on(ovat) hyönteismyrkkyvaikutuksesta vastaava(t) alue(et), ja missä määrin tämä(nämä) on(ovat) yhteydessä isäntäspesifisyyteen, pitäisi nyt selvitä.

Eri toksiinimolekyylien molekyylirakenne sekä näitä molekyylejä koodittavat eri B. thuringiensis-lajien toksiinigeenit ovat erittäin mielenkiintoisia käytännön kannalta, kun näitä geenejä halutaan muuntaa kohdennetusti, mikä siis nyt on esimmäistä kertaa mahdollista keksinnönmukaisen menetelmän avulla.

Uusi keksinnönmukainen menetelmä sallii δ-endotoksiinigeenien itsensä kohdennetun muuntamisen ohella myös näiden geenien ilmentymistä ohjaavien säätely-DNA-sekvenssien muuntamisen, jolloin sekä δ-endotoksiinien spesifisiä ominaisuuksia, kuten esimerkiksi niiden isäntäspesifisyyttä, niiden resorptiokäyttäytymistä jne. voidaan muuttaa tarkoitushakuisesti ja niiden tuotantomääriä voidaan nostaa, esim. sijoittamalla mukaan voimakkaita ja tehokkaita promoottorisekvenssejä.

Valittujen geenien tai alageenien kohdennetulla in vitro-mutatoinnilla saadaan siis aikaan uusia B. thuringiensis- ja/tai B. cereus-muunnoksia.

Vielä eräs mahdollisuus uusien B. thuringiensis- ja/tai B. cereus-muunnosten rakentamiseen on geenien tai geeninosien yhteenliittäminen, jotka ovat peräisin eri B. thuringiensis-lähteistä, jolloin saadaan aikaan B.thuringiensis- ja/tai B. cereus-kantoja, joilla on laajempi käyttöalue. Myös synteettisesti tai puolisynteettisesti valmistettuja toksiinigeenejä voidaan tällä tavalla käyttää uusien B. thuringiensis- ja/tai B. cereus-muunnosten rakentamiseen.

Lisäksi mahdollistaa keksinnönmukainen menetelmä transformoitumisfrekvenssin voimakkaan kasvun sekä menetelmän yksinkertaistumisen perusteella ensi kertaa geenipankkien perustamisen sekä muunnettujen ja uusien geenien nopean skriinauksen B. thuringiensiksessa ja/tai

B. cereuksessa.

Erityisesti mahdollistaa keksinnönmukainen menetelmä nyt ensi kertaa geenipankkien suoran ilmentämisen B. thuringiensiksessa ja/tai B. cereuksessa sekä uusien protoksiinigeenien tunnistamisen B. thuringiensiksessa käyttämällä apuna ennestään tunnettuja, mielellään immunologisia tai biologisia menetelmiä.

Esillä oleva keksintö koskee näin ollen menetelmää, joka B. thuringiensiksen/B. cereuksen transformoitumistehokkuuden suuren kohoamisen seurauksena verrattuna ennestään tunnettuihin menetelmiin tekee ensimmäistä kertaa mahdolliseksi B. thuringiensis- ja/tai B. cereus-perimän suoran geneettisen muuntamisen.

Tarkemmin sanottuna koskee esillä oleva keksintö menetelmää B. thuringiensiksen ja/tai B. cereuksen transformoimiseksi siirtämällä yhdistelmä-DNA, erityisesti plasmidi- ja/tai vektori-DNA, B. thuringiensis- ja/tai B. cereus-soluihin käyttämällä apuna elektroporaatiota.

Tällöin asetetaan etusijalle menetelmä B. thuringiensiksen ja/tai B. cereuksen transformoimiseksi δ-endotoksiinia koodittavilla DNA-sekvensseillä sekä DNA-sekvensseillä, jotka koodittavat sellaista proteiinia, jolla on oleellisesti mainittujen B. thuringiensis-toksiinien hyönteismyrkkyominaisuudet.

Menetelmän avulla saadaan aikaan sellaisten DNA-sekvenssien ilmentyminen transformoituneissa B. thuringiensis- ja/tai B. cereus-soluissa, jotka koodittavat δ-endotoksiinia tai proteiinia, jolla on ainakin oleellisesti B. thuringiensis-toksiinin hyönteismyrkkyominaisuudet.

Keksinnössä käytetään kaksitoimisia, ns. "sukkulavektoreita" B. thuringiensis- ja/tai B. cereus-solujen transformoimiseksi.

Etusijalle asetetaan sellaisten kaksitoimisten

vektorien käyttö, jotka replikoituvat paitsi B. thuringiensiksessa ja/tai B. cereuksessa myös yhdessä tai useammassa muussa, heterologisessa isäntäsysteemissä, erityisesti E. coli-soluissa.

Erityisesti käytetään sellaisia "sukkulavektoreita" B. thuringiensista ja/tai B. cereusta varten, jotka vektorit sisältävät DNA-sekvenssin, joka koodittaa δ-endotoksiinipolypeptidiä, joka esiintyy luonnostaan B. thuringiensiksessa, tai vähintään polypeptidiä, joka on tämän kanssa oleellisesti homologinen eli sillä on vähintään oleellisesti B. thuringiensis-toksiinin hyönteismyrkkyominaisuudet.

B. thuringiensista ja/tai B. cereusta voidaan käyttää yleisinä isäntäorganismeina homologisen ja erityisesti myös heterologisen DNA:n tai homologisen ja heterologisen DNA:n yhdistelmän kloonaamiseen ja ilmentämiseen.

Edelleen esillä oleva keksintö koskee edellä tarkemmin karakterisoitujen plasmidien ja "sukkulavektoreiden" käyttöä B. thuringiensiksen ja/tai B. cereuksen transformointiin.

Erityisen edullisia ovat keksinnön kohteena kaksitoimiset ("sukkula") vektorit pXI61 (= pK61) ja pXI93 (=pK93), joilla on transformoitu B. thuringiensis var. kurstaki HD1 cryB tai B. cereus 569 K, ja jotka on talletettu kansainvälisenä talletuspaikkana toimivaan Deutsche Sammlung von Mikroorganismen-talletuslaitokseen

(Braunschweig, Länsi-Saksa) Budapestin sopimuksen määräyksiä noudattaen numerolla DSM 4572 (pXI61, transformoitu B. thuringiensis var. kurstaki HD1 cryB:hen) ja numerolla DSM 4571 (pXI93, transformoitu B. thuringiensis var. kurstaki HD1 cryB:hen) ja numerolla DSM 4573(pXI93, transformoitu B. cereus 569 K:hon).

Transformoituneita B. thuringiensis- ja B. cereus-soluja sekä näiden tuottamia toksiineja voidaan käyttää insektisidisten aineiden tuottamiseen.

Hyönteisiä voidaan torjua käyttämällä edellä tarkemmin karakterisoituja transformoituneita B. thuringiensis- ja/tai B. cereus-soluja tai soluvapaita kidekappale-(δ-endotoksiini)valmisteita, jotka sisältävät mainittujen transformoituneiden Bacillus-solujen tuottamia protoksiineja.

Seuraavassa selostetaan kuvia lyhyesti.

Kuva 1: E. coli HB101:n transformointi pBR322:lla (o) ja *B. thuringiensis HD1 cryB:n transformointi pBC16:lla (•) (Δ eloonjääneiden *HD1 cryB-solujen lukumäärä).

Kuva 2: *B. thuringiensis HD1 cryB-viljelmän iän vaikutus transformoitumisfrekvenssiin.

Kuva 3: PBS-puskuriliuoksen pH-arvon vaikutus transformoitumisfrekvenssiin.

Kuva 4: PBS-puskuriliuoksen sakkaroosipitoisuuden vaikutus transformoitumisfrekvenssiin.

Kuva 5: Transformanttien lukumäärän ja transformoinnissa käytetyn DNA-määrän välinen riippuvuus.

Kuva 6: "Sukkulavektorin" *pXI61 yksinkertaistettu

restriktiokartta. Ruudutettu alue tarkoittaa gram-positiivisesta pBC16:sta peräisin olevia sekvenssejä ja loput ovat peräisin gram-negatiivisesta plasmidista pUC8.

Kuva 7: *pXI93:n yksinkertaistettu restriktiokartta. Ruudutettu alue tarkoittaa protoksiinirakennegeeniä (nuoli, kurhd1) ja koodittamattomia 5'- ja 3'-sekvenssejä. Loppuosa, jota ei ole ruudutettu, on peräisin "sukkulavektorista" *pXI61.

Kuva 8: SDS (natriumdodekyylisulfaatti)/polyakryyliamidigeelielektroforeesit uutteille, jotka on saatu itiöitä muodostavista *B. thuringiensis HD1 cryB-, B. cereus 569K- ja näiden johdannaisten viljelmistä. (1: *HD1 cryB (pXI93), 2: *HD1 cryB (pXI61), 3: *HD1 cryB, 4: HD1, LBG B-4449, 5: *B. cereus 569K (pXI93), 6: 569K).

a) Coomassie -värjätty, M: molekyylimassastandardi, MG: molekyylimassa (daltonia), nuoli: 130 000 daltonin protoksiinin paikka.

b) Saman geelin Western-blot, kun on lisätty polyklonaalisia vasta-aineita, jotka kohdistuvat B. thuringiensis HD1:n K-1-kideproteiiniin.

Positiiviset vyöhykkeet löydettiin käyttämällä apuna leimattuja, vuohessa tuotettuja vasta-aineita. Nuoli: 130 000 daltonin protoksiinin paikka. Muut vyöhykkeet: Protoksiinin hajoamistuotteita.

Kuva 9: B. subtilis LBG B-4468:n transformointi pBC16-plasmidi-DNA:lla käyttämällä B. thuringiensikselle optimoitua elektroporaatiomenetelmää. (o: transformantteja/ug plasmidi-DNA:ta; • : elävien alkioiden luku/ml)

* Prioriteettiasiakirjassa käytetty, plasmidien nimittämiseen sisäisesti valittu merkintä pK on ulkomaisissa selostuksissa korvattu virallisesti hyväksytyllä merkinnällä pXI.

Myös toteutustapaesimerkeissä käytetyn asporogeenisen B. thuringiensis HD1-mutantin merkintä on muutettu

cryβ:sta cryB:ksi.

Esillä olevan keksinnön oleellinen osa koskee uudenlaista B. thuringiensiksen ja B. cereuksen transformointimenetelmää, joka perustuu plasmidi-DNA:n siirtämiseen B. thuringiensiksen ja/tai B. cereuksen soluihin käyttämällä sinänsä tunnettua elektroporaatiotekniikkaa.

Esillä olevan keksinnön tekemiseen asti ovat kaikki kokeet kariutuneet yritettäessä soveltaa muiden bakteeri- isäntäsysteemien kohdalla jo vakiintuneita transformointimenetelmiä B. thuringiensikseen ja sille läheistä sukua olevaan B. cereukseen, mutta nyt on esillä olevassa keksinnössä tässä yllättäen onnistuttu käyttämällä elektroporaatiotekniikkaa sekä lisätoimenpiteitä.

Tätä onnistumista pitää myös siksi pitää yllättävänä ja odottamattomana, että eräs neuvostoliittolainen ryhmä ([22]Shivarova N et al, 1983) on jo aiemmin tehnyt elektroporaatiokokeita B. thuringiensis-protoplasteilla, mutta saavutetut transformoitumisfrekvenssit olivat niin pieniä, että tämä menetelmä katsottiin käyttökelvottomaksi B. thuringiensiksen transformoinnissa eikä siihen ole sittemmin kiinnitetty huomiota.

B. thuringiensis- ja/tai B. cereus-solujen elektroporaation kriittisten menetelmäparametrien tutkimuksen perusteella on nyt yllättäen voitu kehittää transformointimenetelmä, joka ihanteellisella tavalla soveltuu B. thuringiensiksen ja B. cereuksen tarpeisiin ja johtaa transformoitumistiheyksiin, jotka ovat välillä 10^6 - 10^8 solua/µg plasmidi-DNA:ta, erityisesti välillä 10^6 - 10^7 solua/µg plasmidi-DNA:ta.

Lähes samoja transformoitumisfrekvenssejä, jotka olivat välillä 10^2 ja korkeintaan 10^6 transformanttia/µg plasmidia, on tähän mennessä voitu saavuttaa vain [21]Schall'in (1986) kuvaamilla PEG-transformointimenetelmillä (PEG = polyetyleeniglykoli). Korkeat transformoitumisfrekvenssit rajoittuivat vain niihin B. thuringiensis-kantoihin, joihin voitiin soveltaa PEG-menetelmää spesi-

fisten, hyvin aikaavievien optimointitutkimusten avulla, mistä syystä näyttää siltä, ettei tämä menetelmä sovellu käytännön tarkoituksiin.

Lisäksi osoittautuivat nämä menetelmät käytännössä useissa tapauksissa toistamiskelvottomiksi tai vain huonosti toistettaviksi.

Sitä vastoin on esillä olevan keksinnön mukaisessa menetelmässä periaatteessa kyse kaikkiin B. thuringiensis- ja B. cereus-kantoihin käytettäväksi soveltuvasta transformointimenetelmästä, joka on vähemmän aikaavievä, rationaalisempi ja näin ollen tehokkaampi kuin perinteiset PEG-transformointimenetelmät.

Niinpä voidaan keksinnönmukaisessa menetelmässä käyttää esimerkiksi kokonaisia, ehjiä soluja, joten pois jäävät aikaavievä ja B. thuringiensikselle ja B. cereukselle kriittinen protoplastisointi sekä siihen liittyvä kompleksiravintoalustoissa tapahtuva regeneroinnti.

Lisäksi vaatii PEG-menetelmissä tarvittavien menetelmävaiheiden läpivienti aikaa jopa viikon, kun taas keksinnönmukaisilla transformointimenetelmillä ovat transformoituneet solut käytössä muutamassa tunnissa (yleensä yön jälkeen).

Vielä eräs keksinnönmukaisen menetelmän etu koskee sitä B. thuringiensis- ja/tai B. cereus-solujen lukumäärää, joka voidaan transformoida aikayksikköä kohti.

Kun perinteisissä PEG-menetelmissä voidaan samanaikaisesti maljata vain pieniä eriä, jotta voidaan välttää solujen liian tiheästä kasvusta johtuva regeneroitumisen estyminen, voidaan elektroporaatiotekniikkaa käyttämällä maljata samanaikaisesti suuria määriä B. thuringiensis- ja/tai B. cereus-soluja.

Tämä mahdollistaa myös transformanttien osoittamisen hyvin pienillä transformoitumisfrekvensseillä, mikä edelläkuvatuilla menetelmillä ei ole ollut mahdollista tai on ollut mahdollista vain kovalla vaivalla.

Sitä paitsi nyt riittävät nanogramma-alueella olevat DNA-määrät, jotta saadaan vähintään muutamia transformantteja.

Tällä on merkitystä erityisesti silloin, kun tarvitaan tehokasta transformointimenetelmää, kuten esimerkiksi käytettäessä E. colin DNA-materiaalia, sillä B. thuringiensis-soluissa voimakkaasti E. coli-DNA:han kohdistuva restriktiosysteemi saattaa johtaa 10^3-kertaisesti pienetyneeseen transformoitumisfrekvenssiin.

Keksinnönmukaiselle transformointimenetelmälle, joka oleellisesti perustuu sinänsä tunnettuun elektroporaatiotekniikkaan, on tunnusomaista seuraavat menetelmävaiheet:

a) B. thuringiensis-solujen kasvatukseen sopivaan ravintoalustaan valmistetaan sopivan solutiheyden omaava solususpensio ja säädetään solujen kasvulle riittävä ilmastus;

b) erotetaan solut solususpensiosta ja uudelleensuspendoidaan ne seuraavaan elektroporaation sopivaan inokulaatiopuskuriin;

c) lisätään DNA-näyte elektroporaatioon sopivaan pitoisuuteen;

d) sijoitetaan kohdissa b) ja c) selostettu erä elektroporaatiolaitteeseen;

e) suoritetaan yksi tai useampia lyhytaikaisia kondensaattorin purkamisia solususpensioon, jotta saadaan aikaan lyhytaikaisia korkeita sähkökentänvoimakkuuksia ajaksi, joka riittää B. thuringiensis- ja/tai B. cereus-solujen transformoitumiseen yhdistelmä-DNA:lla;

f) elektroporoituja soluja jälki-inkuboidaan haluttaessa;

g) elektroporoidut solut maljataan sopivassa valintaalustassa; ja

h) transformoituneet solut poimitaan.

Esillä olevan keksinnön mukaisen menetelmän erityisessä ja etusijalle asetettavassa toteutusmuodossa inkuboi-

daan B. thuringiensis-soluja ensin sopivassa ravintoalustassa riittävää ilmastusta käyttäen sopivassa lämpötilassa, mielellään välillä 20 - 35°C:ssa olevassa lämpötilassa, kunnes on saavutettu optinen tiheys (OD_{550}) 0,1 - 1,0. Elektroporaatioon tarkoitettujen Bacillus-viljelmien iällä on selvä vaikutus transformoitumisfrekvenssiin. Näin ollen on erityisen edullista, jos Bacillus-viljelmän tiheys on välillä 0,1 - 0,3, erityisesti 0,2. Huomattakoon myös, että myös muissa kasvuvaiheissa olevilla Bacillus-viljelmillä, erityisesti yön yli kasvaneilla viljelmillä, on voitu saavuttaa hyviä transformoitumisfrekvenssejä (ks. kuva 2).

Lähtömateriaalina käytetään yleensä tuoreita soluja tai itiöitä, mutta yhtä hyvin voidaan käyttää syväjäädytettyä solumateriaalia. Tällöin käytetään mielellään sopivassa nestemäisessä ravintoalustassa olevien B. thuringiensis- ja/tai B. cereus-solujen solususpensioita, jotka mielellään sisältävät tietyn määrän "jäänestoainetta".

Sopivia jäänestoaineita ovat ensi sijassa osmoottisesti aktiivisten komponenttien ja DMSO:n seokset vedessä tai sopivassa puskuriliuoksessa. Muita sopivia komponentteja, joiden käyttö jäänestoaineliuoksissa tulee kysymykseen, ovat sokeri, useammanarvoiset alkoholit, kuten esimerkiksi glyseriini, sokerialkoholit, aminohapot ja polymeerit, kuten esimerkiksi polyetyleeniglykoli.

Jos lähdetään B. thuringiensis-itiöistä, niillä ympätään ensin sopiva ravintoalusta ja inkuboidaan yön yli sopivassa lämpötilassa, mielellään välillä 25 - 28°C, käyttämällä riittävää ilmastusta. Sitten tämä erä laimennetaan ja jatkokäsitellään edelläkuvatulla tavalla.

Jotta saataisiin aikaan B. thuringiensiksen itiönmuodostus, voidaan käyttää kaikkia ravintoalustoita, jotka aiheuttavat tällaisen itiönmuodostuksen. Esillä olevassa keksinnössä asetetaan etusijalle GYS-ravinto-

alusta ([23]Yousten AA ja Rogoff MH, (1969)).

Hapen tuonti kasvatusalustaan tapahtuu yleensä viljelmiä liikuttelemalla, esimerkiksi ravistelulaitteessa niin, että kierrosnopeudet ovat mielellään välillä 50 - 300 min^{-1}.

B. thuringiensis-itiöiden sekä vegetatiivisten mikro-organismisolujen kasvatus esillä olevan keksinnön puitteissa tapahtuu ennestään tunnetuilla, yleisesti käyttökelpoisilla menetelmillä, joissa käytännön syistä mielellään käytetään nestemäisiä ravintoalustoita.

Ravintoalustaan koostumus saattaa jonkin verran vaihdella käytetystä B. thuringiensis- tai B. cereus-kannasta riippuen. Yleensä asetetaan etusijalle kompleksialustat, jotka sisältävät vähänmääriteltyjä, helposti-assimiloituvia hiili- ja typpilähteitä, jollaisia yleisesti käytetään aerobisten Bacillus-lajien kasvatuksessa.

Lisäksi tarvitaan vitamiineja ja välttämättömiä metalli-ioneja, joita kuitenkin yleensä on käytetyissä kompleksiravintoalustoissa läsnä riittävinä pitoisuuksina aineosina tai epäpuhtauksina.

Haluttaessa voidaan mainittuja aineosia, kuten esimerkiksi välttämättömiä vitamiineja sekä Na^{+}-, K^{+}-, Cu^{2+}-, Ca^{2+}-, Mg^{2+}- Fe^{3+}-, NH_4^{+}-, PO_4^{3-}-, SO_4^{2-}-, Cl^{-}-, CO_3^{2-}-ioneja ja hivenaineita kobolttia, mangaani ja sinkki jne.,lisätä suolamuodossaan.

Erityisen edullisina typpilähteinä mainittakoon hiivauutteiden, hiivahydrolysaattien, hiiva-autolysaattien ja hiivasolujen ohella ennen kaikkea soijajauho, maissijauho, kaurajauho, Edamin (entsymaattisesti hajotettu laktalbumiini), peptoni, kaseiinihydrolysaatti, maissinliuotusvedet ja lihauutteet, mutta keksintöä ei tällä esimerkkiluettelolla haluta kuitenkaan rajoittaa millään tavoin.

Mainittujen N-lähteiden edullinen pitoisuus on välillä 1,0 g/l - 20 g/l.

Hiililähteenä tulevat ensi sijassa kysymykseen

glukoosi, laktoosi, sakkaroosi, dekstroosi, maltoosi, tärkkelys, sereloosi, selluloosa ja mallasuute. Edullinen pitoisuus on välillä 1,0 g/l - 20 g/l.

Kompleksisten ravintoalustoiden ohella voidaan tietysti myös käyttää puoli- tai täyssynteettisiä ravintoalustoita, jotka sisältävät edellä tarkemminselostetut ravintoaineet sopivina pitoisuuksina.

Esillä olevassa keksinnössä edullisen LB-ravintoalustan lisäksi voidaan käyttää myös kaikkia muita B. thuringiensiksen ja/tai B. cereuksen kasvatukseen sopivia ravintoalustoita, kuten esimerkiksi antibioottista ravintoalustaa 3, SCGY-ravintoalustaa jne. Sporuloitujen B. thuringiensis-viljelmien säilytys on edullista suorittaa GYS-ravintoalustoissa (agarvinopinta) 4°C:ssa.

Kun soluviljelmä on saavuttanut halutun solutiheyden, otetaan solut talteen sentrifugoimalla ja suspendoidaan sopivaan puskuriliuokseen, joka sitä ennen on jäähdytetty jäällä.

Tutkimuksissa osoittautui, ettei lämpötila ollut kriittinen tekijä, ja näin ollen se on valittavissa laajoissa rajoissa. Edullinen lämpötila-alue on 0 - 35°C, mielellään 2 - 15°C ja aivan erityisesti 4°C. Bacillus-solujen inkubointiajalla ennen elektroporaatiota ja sen jälkeen on vain pieni vaikutus saavutettavaan transformoitumisfrekvenssiin (ks. taulukko 1). Liian pitkä inkubointi johtaa vain transformoitumisfrekvenssin alenemiseen. Edullinen inkubointiaika on 0,1 - 30 minuuttia, erityisesti 10 minuuttia. Tutkimuksissa osoittautui, ettei lämpötila ollut kriittinen tekijä, ja näin ollen se on vapaasti valittavissa laajoissa rajoissa. Edullinen lämpötila-alue on 0 - 35°C, mielellään 2 - 15°C ja aivan erityisesti 4°C. Tämä käsittely voidaan toistaa kerran tai useammin. Erityisen edullisia puskuriliuoksia esillä olevassa keksinnössä ovat osmoottisesti stabiloidut fosfaattipuskurit, jotka sisältävät stabiloivana aineena sokeria, kuten esimerkiksi glukoosia

tai sakkaroosia tai sokerialkoholia, kuten esimerkiksi mannitolia, ja joiden pH-arvo on säädetty välille 5,0 - 8,0. Erityisen edullisia ovat PBS-tyyppiset fosfaattipuskurit, joiden pH on välillä 5,0 - 8,0, mielellään välillä 5,5 - 6,5, ja jotka sisältävät sakkaroosia stabiloivana aineena pitoisuudessa 0,1 - 1,0 M, mielellään pitoisuudessa 0,3 - 0,5 M (ks. kuvat 3 ja 4).

Tämän jälkeen suspendoitujen Bacillus-solujen erät siirretään kyvetteihin tai mihin tahansa muihin sopiviin astioihin ja inkuboidaan DNA-näytteen kanssa sopiva aika, mielellään 0,1 - 30 minuuttia, erityisesti 5 - 15 minuuttia, sopivassa lämpötilassa, mielellään 0 - 35°C:ssa, mutta erityisesti välillä 2 - 15°C olevassa lämpötilassa ja aivan erityisesti 4°C:ssa.

Matalissa lämpötiloissa työskenneltäessä on edullista käyttää esijäähdytettyjä kyvettejä tai mitä tahansa muita sopivia, esijäähdytettyjä astioita.

Transformoitumisfrekvenssin ja elektroporaatiossa käytetyn DNA-pitoisuuden välillä on laajalla alueella lineaarinen yhteys niin, että transformoitumisfrekvenssi kasvaa DNA-pitoisuduen kasvaessa (ks. kuva 5). Tässä keksinnössä etusijalle asetettava DNA-pitoisuus on välillä 1 ng - 20 µg. Erityisen edullinen DNA-pitoisuus on 10 ng - 2 µg.

Sitten koko erä, joka sisältää B. thuringiensis- ja/tai B. cereus-solut ja plasmidi-DNA:n tai muun sopivan DNA-näytteen, sijoitetaan elektroporaatiolaitteeseen, jossa siihen kohdistetaan lyhytaikainen sähköimpulssi.

Elektroporaatiolaitteita, jotka sopivat käytettäviksi keksinnönmukaisessa menetelmässä, on saatavissa useilta valmistajilta, joista mainittakoon esim. Bio Rad (Richmond, CA, USA; "Gene Pulser Apparatus"), Biotechnologies and Experimental Research, Inc. (San Diego, CA, USA; "BTX Transfector 100"), Promega (Madison, WI, USA; "X-Cell 2000 Electroporation System") jne.

On selvää, että keksinnönmukaisessa menetelmässä

voidaan käyttää mitä tahansa muuta sopivaa laitetta.

Tällöin voidaan käyttää erilaisia impulssimuotoja, kuten esimerkiksi suorakulmaista impulssia tai eksponentiaalisesti laskevaa impulssia.

Viimeksimainitut asetetaan esillä olevassa keksinnössä etusijalle. Ne syntyvät kondensaattorin purkautuessa ja niille on ominaista hyvin nopea jännitteen kohoaminen alussa ja sitä seuraava eksponentiaalinen laskuvaihe vastuksen ja kapasitanssin funktiona. Aikavakio RC antaa mitan eksponentiaaliselle vaimenemisajalle. Se vastaa aikaa, joka tarvitaan jännitteen laskemiseen 37 %:iin lähtöjännitteestä (V_o).

Eräs bakteerisoluihin kohdistuvan vaikutuksen ratkaisevista parametreistä liittyy sähkökentän voimakkuuteen, joka soluihin kohdistetaan, ja joka lasketaan käytetyn jännitteen ja elektrodilevyjen välisen etäisyyden perusteella.

Yhtä lailla tärkeä merkitykseltään tässä yhteydessä on eksponentiaalinen vaimenemisaika, joka riippuu sekä käytetyn laitteen rakenteesta (esim. kondensaattorin kapasitanssista) että muista parametreistä, kuten esimerkiksi puskuriliuoksen koostumuksesta tai elektroporaatioon käytetyn solusupension tilavuudesta.

Niinpä on tutkimusten kuluessa esimerkiksi ilmennyt, että elektroporaatioon käytetyn solusupension tilavuuden pienentäminen puoleen johtaa transformoitumisfrekvenssin kohoamiseen 10-kertaiseksi.

Eksponentiaalisen vaimenemisajan piteneminen, kun käytetty puskuriliuos optimoidaan, saa samoin aikaan selvän kohoamisen transformoitumisfrekvenssissä.

Kaikki toimenpiteet, jotka johtavat eksponentiaalisen vaimenemisajan pitenemiseen ja näin ollen transformoitumisfrekvenssin kohoamiseen, ovat näin ollen edullisia esillä olevan keksinnön puitteissa.

Esillä olevan keksinnön mukaisesti edullinen vaimenemisaika on noin 2 - noin 50 ms, erityisesti noin 8 -

noin 20 ms. Erityisen edullinen vaimenemisaika on noin 10 - 12 ms.

Esillä olevan keksinnön mukaisesti kohdistetaan bakteerisoluihin hyvin korkeat sähkökentänvoimakkuudet purkamalla kondensaattori lyhyen ajan kuluessa kerran tai useammin lyhyesti DNA-pitoisen solususpension kautta, jolloin B. thuringiensis-solujen läpäisevyys kohoaa lyhytaikaisesti ja reversiibelisti. Elektroporaatioparametrit säädetään keksinnönmukaisen menetelmän kuluessa sellaisiksi, että voidaan taata elektroporaatiopuskurissa olevan DNA:n optimaalinen siirtyminen Bacillus-soluihin.

Kondensaattorin kapasitanssiasetus on esillä olevassa keksinnössä mielellään 1 - 250 µF, erityisesti 1 - 50 µF ja aivan erityisesti 25 µF. Lähtöjännite voidaan valita laajalta alueelta, koska se ei ole kriittinen tekijä. Edullinen lähtöjännite V_o on 0,2 - 50 kV, erityisesti 0,2 - 2,5 kV ja aivan erityisesti 1,2 - 1,8 kV. Elektrodilevyjen etäisyys riippuu mm. elektroporaatiolaitteen mitoituksesta. Se on mielellään 0,1 - 1,0 cm, erityisesti 0,2 - 1,0 cm. Erityisen edullinen levyjen etäisyys on 0,4 cm. Elektrodilevyjen etäisyydestä ja kondensaattoriin säädetystä lähtöjännitteestä määräytyvät solususpensioon vaikuttavat kentänvoimakkuusarvot. Nämä ovat mielellään alueella 100 - 50 000 V/cm. Erityisen edullisia ovat kentänvoimakkuudet 100 - 10 000 V/cm ja aivan erityisesti 3 000 - 4500 V/cm.

Vapaasti valittavien parametrien, kuten esimerkiksi kapasitanssin, lähtöjännitteen, levyjen etäisyyden jne. hienosäätö riippuu tietyssä määrin käytetyn laitteen rakenteesta, ja säätöjä voidaan tapauksittain muutella määrätyissä rajoissa. Mainitut raja-arvot voidaan näin ollen tietyissä tapauksissa ylittää tai alittaa, mikäli tämä on tarpeen optimaalisten kentänvoimakkuuksien saavuttamiseksi.

Varsinainen elektroporaatiokäsittely voidaan tois-

taa kerran tai useammin siihen asti, kunnes kulloiselle-kin systeemille optimaalinen transformoitumisfrekvenssi on saavutettu.

Elektroporaation jälkeen on edullista suorittaa käsiteltyjen Bacillus-solujen jälki-inkubointi, joka mielellään kestää 0,1 - 30 minuuttia välillä 0 - 35°C, erityisesti välillä 2 - 15°C olevassa lämpötilassa. Sitten elektroporoidut solut laimennetaan sopivalla ravintoalustalla ja inkuboidaan vielä sopiva aika, mielellään 2 - 3 tuntia riittävästi ilmastettuina sopivassa lämpötilassa, mielellään välillä 20 - 35°C.

Sitten B. thuringiensis-solut maljataan kiinteille ravintoalustoille, jotka sisältävät bakteerisoluihin siirrettyjen uusien DNA-sekvenssien valintaan sopivaa reagenssia lisäaineena. Käytetyn DNA:n laadusta riippuen voi mainittu regenssi olla esimerkiksi antibioottisesti vaikuttava yhdiste, väriaine jne. Erityisen edullisia ovat esillä olevassa keksinnössä Bacillus thuringiensiksen ja/tai B. cereuksen solujen valinnassa antibiootit, kun ne valitaan seuraavien joukosta: tetrasykliini, kanamysiini, kloramfenikoli ja erytromysiini.

Samoin ovat edullisia kromogeeniset substraatit, kuten esimerkiksi X-gal (5-bromi-4-kloori-3-indolyyli-β-D-galaktosidi), jotka voidaan osoittaa spesifisen värireaktiona avulla.

Alan ammatti-ihmiset tuntevat myös muita fenotyyppisiä merkkejä ja niitä voidaan käyttää tässä keksinnössä yhtä hyvin.

Voidaan käyttää mitä tahansa B. thuringiensis-solujen kasvatukseen sopivia ravintoalustoita, joihin on lisätty jotakin tavallisesti käytettyä kiinteytysainetta, kuten esimerkiksi agaria, agaroosia, liivatetta jne.

Edellä B. thuringiensikselle yksityiskohtaisesti sovellettuja menetelmäparametrejä voidaan soveltaa yhtä lailla B. cereukseen.

Edellä B. thuringiensiksen tai B. cereuksen trans-

formoimiseksi kuvattu keksinnönmukainen menetelmä ei rajoitu, kuten tekniikan tason mukaisesti käytössä olevat menetelmät, tiettyjen luonnostaan B. thuringiensiksessa ja/tai B. cereuksessa esiintyvien plasmidien käyttöön, vaan se on käyttökelpoinen kaikilla DNA-laaduilla.

Näin ollen on nyt ensi kertaa mahdollista transformoida B. thuringiensis ja/tai B. cereus kohdennetusti niin, että voidaan käyttää paitsi homologista eli luonnollisesti B. thuringiensiksessa tai sille läheistä sukua olevassa B. cereuksessa esiintyvää plasmidi-DNA:ta myös heterologista alkuperää olevaa plasmidi-DNA:ta.

Tällöin voi olla kyseessä plasmidi-DNA, joka luonnostaan esiintyy muussa organismissa kuin B. thuringiensiksessä tai sille läheistä sukua olevassa B. cereuksessa, kuten plasmidit pUB110 ja pC194 Staphylococcus aureuksesta ([24]Horinouchi S ja Weisblum B, 1982; [25]Polak J ja Novick RP, 1982) sekä plasmidi pIM13 B. subtiliksesta ([26]Mahler J ja Halvorson HO, 1980), jotka kykenevät replikoitumaan B. thuringiensiksessa ja/tai B. cereuksessa, tai yhdistelmäplasmidi-DNA, joka on geeniteknologisesti rakennettu homologisesta plasmidi-DNA:sta tai heterologisesta plasmidi-DNA:sta tai homologisen ja heterologisen plasmidi-DNA:n yhdistelmästä. Viimeksimainittu yhdistelmäplasmidi-DNA sopii paremmin yhdistelmä-DNA-työskentelyyn kuin luonnosta eristetty.

Esimerkinomaisesti mainitaan tässä plasmidit pBD64 ([27]Gryczan T et al, 1980), pBD347, pBD348 sekä pUB1664, mutta näillä ei haluta millään tavoin rajoittaa tätä patenttihakemusta.

Erityistä merkitystä kloonauskokeiden suorittamiselle eri B. thuringiensis- tai B. cereus-kannoissa näyttäisi olevan erityistä merkitystä B. subtiliksessa jo vakiintuneilla kloonausvektoreilla, kuten esimerkiksi pBD64:llä.

Paitsi plasmidi-DNA:lla voidaan B. thuringiensis

tai B. cereus transformoida myös millä tahansa muulla DNA:lla. Transformoimalla siirretty DNA voi tällöin replikoitua joko autonomisesti tai kromosomiin integroituneena. Tällöin voi olla kyseessä esimerkiksi vektori-DNA, joka on johdettu fagista eikä plasmidista.

Lisäksi koskee esillä oleva keksintö kaksitoimisten vektorien ("sukkulavektorien") käyttöä.

Erityisen edullista on esillä olevassa keksinnössä sellaisten kaksitoimisten(yhdistelmä) plasmidivektorien, ns. "sukkulavektorien" käyttö, jotka kykenevät replikoitumaan paitsi B. thuringiensiksessa tai sille läheistä sukua olevassa B. cereuksessa myös yhdessä tai useammassa heterologisessa isäntäorgansimissa, ja jotka ovat tunnistettavissa sekä homologisissa että heterologisissa isäntäsysteemeissä.

Heterologisilla isäntäorganismeilla ymmärretään tässä keksinnössä kaikkia sellaisia organismeja, jotka eivät kuulu B. thuringiensis/B. cereus-joukkoon, ja jotka kykenevät säilyttämään itsereplikoituvan DNA:n stabiilisti.

Heterologisina organismeina voivat näin ollen yllä olevan määritelmän mukaan toimia sekä prokaryoottiset että eukaryoottiset organismit. Tässä yhteydessä mainittakoon prokaryoottisten isäntäorganismien edustajina yksittäiset edustajat suvuista Bacillus, kuten esimerkiksi B. subtilis tai B. megaterium, Staphylococcus, kuten esimerkiksi S. aureus, Streptococcus, kuten esimerkiksi Streptococcus faecalis, Streptomyces, kuten esimerkiksi Streptococcus spp., Pseudomonas, kuten esimerkiksi Pseudomonas spp., Escherichia, kuten esimerkiksi E. coli, Agrobacterium, kuten esimerkiksi A. tumefaciens tai A. rhizogenes, Salmonella, Erwinia jne. Eukaryoottisista isännistä voidaan ensi sijassa mainita hiivat sekä kasvi- ja eläinsolut. Tämä esimerkinomainen luettelo ei ole poissulkeva eikä sillä millään tavoin rajoiteta esillä olevaa keksintöä. Ammatti-ihmisten

tiedossa on muita sopivia prokaryoottisten ja eukaryoottisten isäntäorganismien edustajia.

Erityisen edullisia tässä keksinnössä ovat B. subtilis tai B. megaterium, Pseudomonas spp. ja erityisesti E. coli prokaryoottisista isännistä sekä hiivat ja eläin- ja kasvisolut eukaryoottisista isännistä.

Aivan erityisen edullisia ovat sellaiset kaksitoimiset vektorit, jotka kykenevät replikoitumaan B. thuringiensis- ja/tai B. cereus-soluissa sekä E. colissa.

Erityisesti esillä oleva keksintö kattaa mainittujen kaksitoimisten vektorien käytön B. thuringiensiksen ja B. cereuksen transformointiin.

"Sukkulavektorien" rakentaminen tapahtuu yhdistelmä-DNA-tekniikan avulla siten, että homologista (B. thuringiensis, B. cereus) sekä heterologista alkuperää oleva plasmidi ja/tai vektori-DNA katkaistaan ensin sopivilla restriktioentsyymeillä ja sen jälkeen liitetään sopivien entsyymien läsnäollessa yhteen ne DNA-fragmentit, jotka sisältävät kulloisessakin halutussa isäntäsysteemissä tapahtuvalle replikaatiolle oleelliset toiminnot.

Heterologista alkuperää olevan plasmidi- ja/tai vektori-DNA:n lähteeksi sopivat edellämainitut heterologiset isäntäorganismit.

Eri DNA-fragmenttien yhteenliittämisen pitää tapahtua siten, että eri isäntäsysteemeissä tapahtuvalle replikaatiolle oleelliset toiminnot säilyvät.

Tietysti voidaan käyttää myös puhtaasti heterologista alkuperää olevaa plasmidi- ja/tai vektori-DNA:ta "sukkulavektorien" rakentamisessa, mutta tällöin pitää vähintään yhden heterologisen fuusiopartnerin sisältää sellaisia DNA-jaksoja, jotka mahdollistavat replikaation homologisessa B. thuringiensis/B. cereus-isäntäsysteemissä.

Heterologista alkuperää olevan plasmidi- ja/tai vektori-DNA:n lähteenä, joka DNA siitä huolimatta kykenee replikoitumaan B. thuringiensis/B. cereus-isäntäsysteemis-

sä, mainittakoon tässä yhteydessä esimerkkeinä gram-positiiviset bakteerit, jotka edustavat sukuja Staphylococcus, kuten esimerkiksi Staphylococcus aureus, Streptococcus, kuten esimerkiksi Streptococcus faecalis, Bacillus, kuten esimerkiksi Bacillus megaterium tai B. subtilis, Streptomyces, kuten esimerkiksi Streptomyces spp. jne. Tässä esimerkinomaisesti lueteltujen gram-positiivisten bakteerien edustajien ohella on koko joukko muita organismeja, joita voidaan käyttää keksinnönmukaisessa menetelmässä, ja jotka ovat ammatti-ihmisten tiedossa.

Esillä oleva keksintö koskee näin ollen lisäksi menetelmää kaksitoimisten vektorien valmistamiseksi, jotka sopivat B. thuringiensiksen ja/tai B. cereuksen transformointiin, ja menetelmälle on tunnusomaista se, että homologista sekä heterologista alkuperää oleva plasmidi-DNA

a) ensin pilkotaan sopivien restriktioenstyymien avulla ja

b) sen jälkeen ne fragmentit, jotka sisältävät kulloinkin halutussa isäntäsysteemissä tapahtuvaan replikaatioon ja valintaan tarvittavat toiminnot, liitetään yhteen sopivien entsyymien läsnäollessa siten, että eri isäntäsysteemeissä tapahtuvaan replikaatioon ja valintaan tarvittavat oleelliset toiminnot säilyvät.

Tällä tavalla syntyy kaksitoimisia plasmideja, jotka sisältävät paitsi B. thuringiensksessa tai B. cereuksessa tapahtuvalle replikaatiolla tarpeelliset toiminnot myös muita DNA-sekvenssejä, jotka varmistavat replikaation vähintään yhdessä muussa heterologisessa isäntäsysteemissä.

Jotta voidaan suorittaa nopea ja tehokas kaksitoimisten vektorien valinta sekä homologisessa(sissa) että heterologisessa(sissa) isäntäsysteemissä(eissä), on edullista varustaa mainitut vektorit spesifisillä valintamerkeillä, joita voidaan käyttää sekä B. thuringiensiksessa ja/tai B. cereuksessa että heterologisissa(essa)

isäntäsysteemissä(eissä), eli jotka mahdollistavat nopean ja yksinkertaisen valinnan. Tässä keksinnössä on erittäin edullista käyttää antibioottiresistenssiä koodittavia DNA-sekvenssejä, erityisesti sellaisia DNA-sekvenssejä, jotka koodittavat johonkin seuraavista antibiooteista kohdistuvaa resistenssiä: mm. kanamysiini, tetrasykliini, kloramfenikoli, erytromysiini.

Edullisia ovat myös geenit, jotka koodittavat kromogeenisen substraatin, kuten esimerkiksi X-gal (5-bromi-4-kloori-3-indolyyli-β-D-galaktosidi), omaavaa entsyymiä. Tällöin voidaan transformoituneet pesäkkeet osoittaa hyvin yksinkertaisesti spesifisen värireaktion avulla.

Ammatti-ihmiset tuntevat muita fenotyyppisiä merkki-geenejä, joita voidaan yhtä hyvin käyttää esillä olevassa keksinnössä.

Erityisen edullista on esillä olevan keksinnön puitteissa sellaisten "sukkulavektorien" rakentaminen, jotka sisältävät paitsi DNA-sekvenssejä, jotka sallivat replikoitumisen B. thuringiensiksessa tai B. cereuksessa tai näissä kummassakin isäntäsysteemissä, myös sellaisia DNA-jaksoja, jotka ovat tarpeen replikoitumiselle muissa bakteeri-isäntäsysteemeissä, kuten esimerkiksi B. subtiliksessa, B. megateriumissa, Pseudomonas spp:ssä, E. colissa jne.

Samoin ovat edullisia sellaiset "sukkulavektorit", jotka replikoituvat ensinnäkin B. thuringiensiksessa tai B. cereuksessa tai näissä molemmissa ja toiseksi myös jossakin eukaryoottisessa isäntäsysteemissä, joka edustaa hiivoja, eläin- tai kasvisoluja jne.

Aivan erityisen edullista on rakentaa sellaisia "sukkulavektoreita", jotka sisältävät DNA-sekvenssejä, jotka ovat tarpeen mainittujen vektorien replikaatiolle B. thuringiensiksessa tai B. cereuksessa tai näissä kummassakin systeemissä, ja myös sellaisia DNA-sekvenssejä, jotka mahdollistavat mainittujen "sukkulavektorien"

replikaation E. colissa.

Esimerkkejä tällaisista lähtöplasmideista "sukkulavektorien" rakentamiseksi B. thuringiensis-B. cereus/E. coli-systeemiä varten, millään tavoin kuitenkaan rajoittamatta, ovat B. cereus-plasmidi pBC16 sekä E. coli-plasmidista pBR322 johdettu plasmidi pUC8 ([28] Vieira J ja Messing J, 1982).

Lisäksi käytetään esillä olevassa keksinnössä kaksitoimisia ("sukkula") vektoreita, jotka sisältävät paitsi homologisissa ja heterologisissa isäntäsysteemeissä tapahtuvaa replikaatiota ja valintaa varten tarvittavat toiminnot myös lisäksi yhden tai useampia geenejä ilmentymiskelpoisessa muodossa tai muita hyödyllisiä DNA-sekvenssejä. Esillä oleva keksintö koskee samoin menetelmää näiden vektorien valmistamiseksi siten, että mainitut geenit tai muut hyödylliset DNA-sekvenssit liitetään sopivien entsyymien avulla näihin kaksitoimisiin vektoreihin.

Keksinnönmukaisten "sukkulavektorien" sekä edelläkuvatun transformointimenetelmän avulla on näin ollen ensi kertaa mahdollista transformoida B. thuringiensis-solujen ulkopuolella, vieraassa isäntäsysteemissä kloonattuja DNA-sekvenssejä suurella tehokkuudella B. thuringiensis- ja/tai B. cereus-soluihin.

Näin ollen voidaan nyt ensi kertaa sijoittaa stabiilisti geenejä tai muita hyödyllisiä DNA-sekvenssejä, erityisesti myös sellaisia, joilla on säätelyfunktio, B. thuringiensis- tai B. cereus-soluihin ja haluttaessa ilmentää niitä siellä, jolloin saadaan aikaan B. thuringiensis- tai B. cereus-soluja, joilla on uusia ja toivottavia ominaisuuksia.

Geeneinä, joita voidaan käyttää esillä olevassa keksinnössä, tulevat kysymykseen homologiset ja heterologiset geenit tai DNA sekä synteettiset geenit tai DNA, jotka ovat keksinnön määritelmän mukaisia, sekä mainittujen DNA-sekvenssien yhdistelmät.

Näin ollen voi koodittava DNA-sekvenssi olla raken-

nettu pelkästään perimä-DNA:sta, cDNA:sta tai synteettisestä DNA:sta. Toinen mahdollisuus on rakentaa yhdistelmä-DNA-sekvenssejä, jotka koostuvat sekä cDNA:sta että myös perimä-DNA:sta ja synteettisestä DNA:sta tai näiden DNA-laatujen yhdistelmästä.

Tässä tapauksessa voi cDNA olla peräisin samasta geenistä kuin perimä-DNA tai cDNA ja perimä-DNA voivat olla peräisin eri geeneistä. Siis kaikissa tapauksissa voivat perimä-DNA ja/tai cDNA kukin kohdallaan olla peräisin samasta tai eri geeneistä.

Kun DNA-sekvenssi sisältää osia useammasta kuin yhdestä geenistä, voivat nämä geenit olla peräisin joko yhdestä ja samasta organismista, useammista organismeista, jotka kuuluvat saman lajin eri kantoihin tai muunnoksiin tai saman suvun eri lajeihin tai organismeille, jotka ovat peräisin useammasta kuin yhdestä suvusta edustaen samaa tai eri taksonomisia yksiköitä.

Jotta mainitut rakennegeenit saataisiin ilmentymään bakteerisolussa, pitää koodittavat geenisekvenssit ensin liittää toimivalla tavalla B. thuringiensis- ja/tai B. cereus-soluissa toimiviin ilmentämissekvensseihin.

Keksinnönmukaiset yhdistelmägeenirakenteet sisältävät näin ollen rakennegeenin(ien) lisäksi ilmentymissignaaleja, joissa on mukana sekä promoottori- että terminaattorisekvenssejä että myös muita säätelysekvenssejä luetuksi tulemattomilta 3'- ja 5'-alueilta.

Erityisen edullisia ovat esillä olevassa keksinnössä itsensä B. thuringiensiksen ja/tai B. cereuksen ja näiden mutanttien ja muunnosten ilmentymissignaalit, jotka ovat oleellisesti ottaen homologisia luonnonsekvenssien kanssa. Esillä olevassa keksinnössä on DNA-sekvenssi oleellisesti ottaen homologinen toisen DNA-sekvenssin kanssa, kun vähintään 70 %, mielellään vähintään 80 % tai erityisesti vähintään 90 % DNA-sekvenssin aktiivisista jaksoista ovat homologisia. Tässä oleellisesti ottaen homologisen määritelmässä katsotaan DNA-sekvens-

sin kaksi erilaista nukleotidia homologisiksi koodittaval-la alueella, kun yhden nukleotidin vaihto toiseen saa aikaan hiljaisen mutaation.

Erityisen edullista on käyttää B. thuringiensiksen sporulaatiosta riippuvaisia promoottoreita, jotka takaa-vat ilmentymisen itiönmuodostuksesta riippuvaisena.

Erityisen edullista B. thuringiensiksen tai B. cereuksen transformointiin esillä olevassa keksinnössä on käyttää δ-endotoksiinia koodittavia DNA-sekvenssejä.

Keksinnönmukaisen kimeerisen geenin koodittava alue sisältää mielellään nukleotidisekvenssin, joka koodittaa sellaista polypeptidiä, joka esiintyy luonnos-taan B. thuringiensiksessa, tai polypeptidiä, joka on tämän kanssa oleellisesti ottaen homologinen eli sillä on kiteisen δ-endotoksiiniproteiinin oleelliset myrkky-ominaisuudet vähintään. Esillä olevan keksinnön mukaises-ti on polypeptidillä määritelmän mukaisesti oleellisesti ottaen B. thuringiensiksen kiteisen δ-endotoksiinin myrkyllisyysominaisuudet, kun se tehoaa insektisidisesti samaan hyönteistoukkaspektriin kuin B. thuringiensis-alalajin kiteinen proteiini. Muutamia sopivia alalajeja ovat esimerkiksi seuraavat: kurstaki, berliner, alesti, tolworthi, sotto, dendrolimus, tenebrionis ja israelen-sis. Lepidoptera-toukille edullinen alalaji on kurs-taki ja erityisesti kurstaki HD1.

Koodittava alue voi olla alue, joka esiintyy luon-nostaan B. thuringiensiksessa. Vaihtoehtoisesti voi koodittava alue sisältää myös sekvenssin, joka poikkeaa B. thuringiensiksen sekvenssistä, mutta on sen kanssa ekvivalenttinen geneettisen koodin degeneroitumisen perusteella.

Kimeerisen geenin koodittava alue voi myös koodit-taa sellaista polypeptidiä, joka poikkeaa luonnostaan esiintyvästä kiteisestä δ-endotoksiiniproteiinista, mutta sisältää kuitenkin edelleen kiteisen proteiinin hyönteis-myrkkyominaisuudet. Tällainen koodittava sekvenssi

on tavallisesti luonnon koodittavan sekvenssin muunnos. Luonnon DNA-sekvenssin "muunnoksella" ymmärretään esillä olevassa keksinnössä määritelmän mukaisesti luonnon sekvenssin muunnettua muotoa, jolla kuitenkin on edelleen sama toimintakyky. Muunnos voi olla mutantti tai synteettinen DNA-sekvenssi, ja se on oleellisesti homologinen vastaavan luonnonsekvenssin kanssa. Esillä olevan keksinnön puitteissa on DNA-sekvenssi toisen DNA-sekvenssin kanssa oleellisesti ottaen homologinen, kun vähintään 70 %, mielellään vähintään 80 % ja erityisesti vähintään 90 % DNA-sekvenssin aktiivisesta alueesta on homologista. Esillä olevan keksinnön käsitteen "oleellisesti ottaen homologinen" mukaisesti katsotaan koodittavan alueen DNA-sekvenssin sisältämät kaksi toisistaan poikkeavaa nukleotidia homologisiksi, kun näiden nukleotidien vaihtaminen toisekseen edustaa hiljaista mutaatiota.

Esillä olevassa keksinnössä voidaan näin ollen käyttää mitä tahansa aminohappojärjestystä koodittavaa kimeeristä geeniä, jolla on B. thuringiensis-δ-endotoksiinin insektisidiset ominaisuudet, ja joka täyttää tunnetut ja vaaditut vaatimukset. Erityisen edullista on käyttää nukleotidisekvenssiä, joka on oleellisesti ottaen homologinen ainakin luonnonsekvenssin osan tai osien kanssa, joka(jotka) vastaa(vastaavat) B. thuringiensis-toksiinin insektisidisestä aktiivisuudesta ja/tai isäntäspesifisyydestä.

Kimeerisen geenin kautta ilmentyneellä polypeptidillä on yleensä ainakin muutamia yhteisiä immunologisia ominaisuuksia luonnon kiteisen proteiinin kanssa, koska siinä on ainakin osittain samat antigeeniset determinantit.

Näin ollen on mainitun kimeerisen geenin koodittama polypeptidi mielellään rakenteellisesti sukua B. thuringiensiksen tuottaman kiteisen proteiinin δ-endotoksiinin kanssa. B. thuringiensis tuottaa kiteistä proteiinia, jonka alayksikkö vastaa protoksiinia, jonka molekyylimassa on noin 130 000 - 140 000. Proteaasit

tai alkalit kykenevät pilkkomaan tämän alayksikön insektisidisiksi fragmenteiksi, joiden molekyylimassa on 70 000 ja mahdollisesti pienempi.

Kimeeristen geenien rakentamisessa, joiden koodittava alue kattaa protoksiinin osia tai niiden vielä pienempiä jaksoja, voi koodittavan alueen fragmentointi jatkua niin pitkään, kun fragmentit tai näiden fragmentitien osat vielä osoittavat tarvittavaa insektisidistä aktiivisuutta. Protoksiini, protoksiinin insektisidiset fragmentit ja näiden fragmenttien insektisidiset osat voidaan liittää muihin molekyyleihin, kuten polypeptideihin ja proteiineihin.

Koodittavia alueita, jotka sopivat käytettäviksi esillä olevan keksinnön mukaisessa menetelmässä, voidaan saada B. thuringiensiksen geeneistä, jotka koodittavat kiteisiä toksiineja (Whiteley et al., PCT-patenttihakemus WO86/01536 ja USA:n patenttijulkaisut no. 4 448 885 ja 4 467 036). Edullinen nukleotidisekvenssi, joka koodittaa kiteistä proteiinia, sijaitsee kaavan I nukleotidien 156 ja 3623 välissä tai on lyhempi sekvenssi, joka koodittaa kiteisen proteiinin insektisidistä fragmenttia ([5]Geiser et al., 1986 ja EP-patenttijulkaisu 238 441).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

      4330        4340        4350        4360
CATGTATATC CTGGGTCAGG TGGTTGTGCA CAAACTGCAG
```

Kaavan I nukleotidien 156 - 3623 määrittelemä koodittava alue koodittaa kaavan II mukaista polypeptidiä.

Kaava II

Met Asp Asn Asn Pro Asn Ile Asn Glu Cys	10
Ile Pro Tyr Asn Cys Leu Ser Asn Pro Glu	20
Val Glu Val Leu Gly Gly Glu Arg Ile Glu	30
Thr Gly Tyr Thr Pro Ile Asp Ile Ser Leu	40
Ser Leu Thr Gln Phe Leu Leu Ser Glu Phe	50
Val Pro Gly Ala Gly Phe Val Leu Gly Leu	60
Val Asp Ile Ile Trp Gly Ile Phe Gly Pro	70
Ser Gln Trp Asp Ala Phe Leu Val Gln Ile	80
Glu Gln Leu Ile Asn Gln Arg Ile Glu Glu	90
Phe Ala Arg Asn Gln Ala Ile Ser Arg Leu	100
Glu Gly Leu Ser Asn Leu Tyr Gln Ile Tyr	110
Ala Glu Ser Phe Arg Glu Trp Glu Ala Asp	120
Pro Thr Asn Pro Ala Leu Arg Glu Glu Met	130
Arg Ile Gln Phe Asn Asp Met Asn Ser Ala	140
Leu Thr Thr Ala Ile Pro Leu Phe Ala Val	150
Gln Asn Tyr Gln Val Pro Leu Leu Ser Val	160
Tyr Val Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser	170
Val Leu Arg Asp Val Ser Val Phe Gly Gln	180
Arg Trp Gly Phe Asp Ala Ala Thr Ile Asn	190
Ser Arg Tyr Asn Asp Leu Thr Arg Leu Ile	200
Gly Asn Tyr Thr Asp His Ala Val Arg Trp	210
Tyr Asn Thr Gly Leu Glu Arg Val Trp Gly	220
Pro Asp Ser Arg Asp Trp Ile Arg Tyr Asn	230
Gln Phe Arg Arg Glu Leu Thr Leu Thr Val	240
Leu Asp Ile Val Ser Leu Phe Pro Asn Tyr	250
Asp Ser Arg Thr Tyr Pro Ile Arg Thr Val	260
Ser Gln Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Asn	270
Pro Val Leu Glu Asn Phe Asp Gly Ser Phe	280
Arg Gly Ser Ala Gln Gly Ile Glu Gly Ser	290
Ile Arg Ser Pro His Leu Met Asp Ile Leu	300

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

Val Lys His Ala Lys Arg Leu Ser Asp Glu 680

Arg Asn Leu Leu Gln Asp Pro Asn Phe Arg 690

Gly Ile Asn Arg Gln Leu Asp Arg Gly Trp 700

Arg Gly Ser Thr Asp Ile Thr Ile Gln Gly 710

Gly Asp Asp Val Phe Lys Glu Asn Tyr Val 720

Thr Leu Leu Gly Thr Phe Asp Glu Cys Tyr 730

Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln Lys Ile Asp Glu 740

Ser Lys Leu Lys Ala Tyr Thr Arg Tyr Gln 750

Leu Arg Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln Asp 760

Leu Glu Ile Tyr Leu Ile Arg Tyr Asn Ala 770

Lys His Glu Thr Val Asn Val Pro Gly Thr 780

Gly Ser Leu Trp Pro Leu Ser Ala Pro Ser 790

Pro Ile Gly Lys Cys Ala His His Ser His 800

His Phe Ser Leu Asp Ile Asp Val Gly Cys 810

Thr Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly Val Trp 820

Val Ile Phe Lys Ile Lys Thr Gln Asp Gly 830

His Ala Arg Leu Gly Asn Leu Glu Phe Leu 840

Glu Glu Lys Pro Leu Val Gly Glu Ala Leu 850

Ala Arg Val Lys Arg Ala Glu Lys Lys Trp 860

Arg Asp Lys Arg Glu Lys Leu Glu Trp Glu 870

Thr Asn Ile Val Tyr Lys Glu Ala Lys Glu 880

Ser Val Asp Ala Leu Phe Val Asn Ser Gln 890

Tyr Asp Arg Leu Gln Ala Asp Thr Asn Ile 900

Ala Met Ile His Ala Ala Asp Lys Arg Val 910

His Ser Ile Arg Glu Ala Tyr Leu Pro Glu 920

Leu Ser Val Ile Pro Gly Val Asn Ala Ala 930

Ile Phe Glu Glu Leu Glu Gly Arg Ile Phe 940

Thr Ala Phe Ser Leu Tyr Asp Ala Arg Asn 950

Val Ile Lys Asn Gly Asp Phe Asn Asn Gly 960

Leu Ser Cys Trp Asn Val Lys Gly His Val 970

Asp Val Glu Glu Gln Asn Asn His Arg Ser 980

Val Leu Val Val Pro Glu Trp Glu Ala Glu 990

Val Ser Gln Glu Val Arg Val Cys Pro Gly 1000

Arg Gly Tyr Ile Leu Arg Val Thr Ala Tyr 1010

Lys Glu Gly Tyr Gly Glu Gly Cys Val Thr 1020

Ile His Glu Ile Glu Asn Asn Thr Asp Glu 1030

Leu Lys Phe Ser Asn Cys Val Glu Glu Glu 1040

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

Jotta B. thuringiensis- tai B. cereus-solut saadaan keksinnönmukaisella menetelmällä transformoiduiksi kimeerisellä geenillä, sijoitetaan geeni mielellään ensin vektoriin. Erityisen edullista on sijoittaminen keksinnönmukaisiin kaksitoimisiin vektoreihin.

Kun vastaavaa geeniä on käytettävissä liian pieni määrä, jotta se riittäisi Bacillus-soluihin siirtämiseen, voidaan vektori ensin monistaa replikoimalla heterologisissa isäntäsoluissa. Parhaiten sopivia geenien monistamiseen ovat bakteeri- tai hiivasolut. Kun riittävä määrä geeniä on käytettävissä, se siirretään Bacillus-soluihin. Geenin siirto B. thuringiensis- tai B. cereus-soluihin voidaan suorittaa samalla vektorilla, jota käytettiin replikaatioon, tai muulla vektorilla. Erityisen edullisia ovat keksinnönmukaiset kaksitoimiset vektorit.

Muutamia esimerkkejä bakteeri-isäntäsoluista, jotka soveltuvat kimeerisen geenin replikaatioon, ovat seuraaviin sukuihin kuuluvat bakteerit: Escherichia, kuten E. coli, Agrobacterium, kuten A. tumefaciens tai A. rhizogenes, Pseudomonas, kuten Pseudomonas spp., Bacillus, kuten B. megaterium tai B. subtilis jne. Keksinnönmukaisella transformointimenetelmällä on nyt

esillä olevan keksinnön puitteissa ensi kertaa mahdollista käyttää B. thuringiensista tai B. cereusta itseään isäntäsoluina. Menetelmiä heterologisten geenien kloonaamiseksi bakteereissa on selostettu USA:n patenttijulkaisuissa 4 237 224 ja 4 468 464.

B. thuringiensiksen kiteistä proteiinia koodittavien geenien replikaatiota E. colissa on selostettu julkaisussa [29] Wong et al. (1983).

Esimerkkejä hiivasoluista, jotka sopivat keksinnönmukaisten geenien replikaatioon, ovat mm. Saccharomyces-sukuun kuuluvat (eurooppalainen patenttihakemusjulkaisu EP 0 238 441).

Keksinnönmukaisten geenien monistamiseen voidaan käyttää mitä tahansa sellaista vektoria, johon voidaan sijoittaa kyseinen kimeerinen geeni, ja joka replikoituu sopivassa isäntäsolussa, kuten bakteereissa tai hiivoissa. Vektori voi olla johdettu esimerkiksi fagista tai plasmidista. Esimerkkejä vektoreista, jotka on johdettu fageista, ja joita voidaan käyttää esillä olevassa keksinnössä, ovat M13- ja λ-fageista johdetut vektorit. M13-fageista johdettuja vektoreita, joita voidaan käyttää, ovat M13mp18 ja M13mp19. λ-fageista johdettuja sopivia vektoreita ovat mm. λgt11, λgt7 ja λCharon4.

Plasmideista johdetuista vektoreista, jotka sopivat erityisesti replikaatioon bakteereissa, mainittakoon tässä esimerkkeinä erityisesti pBR322 ([30] Bolivar et al., 1977), pUC18 ja pUC19 ([31] Norrander et al., 1983), sekä Ti-plasmidit ([32] Bevan et al., 1983), mutta esillä olevaa keksintöä ei rajoiteta näihin millään tavoin. Etusijalle asetettavat vektorit geenien monistamiseen bakreereissa ovat pBR322, pUC18 ja pUC19.

B. thuringiensiksen ja/tai B. cereuksen suoraan kloonaukseen sopivat ennen kaikkea suorakloonausvektorit, kuten esimerkiksi pBD347, pBD348, pBD64 ja pUB1664, sekä erityisesti "sukkulavektorit", joita edellä on selostetu yksityiskohtaisesti, mitenkään näihin kuitenkaan

rajoittumatta.

Erityisen edullisia esillä olevassa keksinnössä ovat kaksitoimiset ("sukkula") vektorit pXI61 (=pK61) ja pXI93 (=pK93), jotka B. thuringiensis var. kurstaki HD1 cryB:hen tai B. cereus 569 K:hon transformoituina on talletettu kansainväliseksi talletuspaikaksi hyväksyttyyn "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen"-talletuslaitokseen (Braunschweig, Länsi-Saksa) Budapestin sopimuksen mukaisesti talletusnumeroilla DSM 4572 (pXI61, transformoitu B. thuringiensis var. kurstaki HD1, cryB:hen) ja DSM 4571 (pXI93, transformoitu B. thuringiensis var, kurstaki HD1 cryB:hen) ja DSM 4573 (pXI93, transformoitu B. cereus 569 K:hon).

Jotta saadaan rakennetuksi bakteereissa replikaatioon sopiva kimeerinen geeni, liitetään promoottorisekvenssi, luetuksi tulematon 5'-sekvenssi, koodittava sekvenssi ja luetuksi tulematon 3'-sekvenssi vektoriin tai oikeassa järjestyksessä yhdistetään johonkin edellämainituista vektoreista. Sopivia vektoreita ovat keksinnönmukaisesti sellaiset, jotka kykenevät replikoitumaan isäntäsolussa.

Promoottori, luetuksi tulematon 5'-alue, koodittava alue ja luetuksi tulematon 3'-alue voidaan haluttaessa ensin liittää vektorin ulkopuolella yhdeksi kokonaisuudeksi ja sen jälkeen yhdistää vektoriin. Vaihtoehtoisesti voidaan kimeerisen geenin osia liittää yksitellen vektoriin.

Kun kyseessä ovat B. thuringiensis- tai B. cereus-kloonausvektorit, voi tämä menetelmävaihe jäädä pois, koska vektoriin voidaan liittää B. thuringiensiksesta eristetty koko yksikkö, joka koostuu luetuksi tulemattomasta 5'-alueesta, koodittavasta alueesta ja luetuksi tulemattomasta 3'-alueesta.

Vektori sisältää lisäksi mielellään myös merkkigeenin, joka antaa isäntäsolulle ominaisuuden, jonka avulla vektorilla transformoituneet solut voidaan tunnistaa.

Etusijalle asetetaan antibioottiresistenssin antavat merkkigeenit. Muutamia esimerkkejä sopivista antibiooteista ovat ampisilliini, kloramfenikoli, erytromysiini, tetrasykliini, hygromysiini, G418 ja kanamysiini.

Samoin ovat edullisia sellaiset merkkigeenit, jotka koodittavat kromogeenisen substraatin , kuten esim. X-gal (5-bromi-4-kloori-3-indolyyli-β-D-galaktosidi) omaavaa enstyymiä.Transformoituneet pesäkkeet voidaan tämän jälkeen osoittaa värireaktion avulla hyvin yksinkertaisesti.

Geenin sijoittaminen tai rakentaminen vektorissa suoritetaan tavanomaisilla menetelmillä, esimerkiksi käyttämällä yhdistelmä-DNA:ta ([33]Maniatis et al., 1982) ja käyttämällä homologista rekombinaatiota ([34]Hinnen et al., 1978).

Yhdistelmä-DNA-menetelmät perustuvat siihen, että ensin vektori katkaistaan ja haluttu DNA-sekvenssi sijoitetaan katkaistujen vektorinosien väliin; halutun DNA-sekvenssin päät liitetään tämän jälkeen vektorin vastaaviin päihin.

Vektori on edullista katkaista sopivilla restriktioendonukleaaseilla. Sopivia restriktioendonukleaaseja ovat esimerkiksi sellaiset, jotka muodostavat tasaisia päitä, kuten SmaI, HpaI ja EcoRV, sekä sellaiset, jotka muodostavat porrastettuja päitä, kuten EcoRI, SacI ja BamHI,

Haluttu DNA-sekvenssi esiintyy tavallisesti suuremman DNA-molekyylin, kuten kromosomin, plasmidin, transposonin tai fagin osana. Näissä tapauksissa leikataan haluttu DNA-sekvenssi irti alkuperäisestä lähteestä ja mahdollisesti muokataan niin, että sen päät voidaan liittää katkaistun vektorin päihin. Kun halutun DNA-sekvenssin ja katkaistun vektorin päät ovat tasaiset, ne voidaan liittää yhteen käyttämällä esimerkiksi tasaisille päille spesifisiä ligaaseja, kuten T4 DNA-ligaasia.

Halutun DNA-sekvenssin päät voidaan myös porras-

tetussa muodossa liittää katkaistun vektorin päihin, missä tapauksessa käytetään kohesiivisille päille spesifistä ligaasia, joka voi olla myös T4 DNA-ligaasi. Toinen porrastetuille päille spesifinen ligaasi on esimerkiksi E. colin DNA-ligaasi.

Porrastetut päät on tarkoituksenmukaista rakentaa siten, että haluttu DNA-sekvenssi ja vektori katkaistaan samalla restriktioendonukleaasilla. Tällöin on halutulla DNA-sekvenssillä ja katkaistulla vektorilla porrastetut päät, jotka ovat toistensa kanssa komplementaariset.

Kohesiiviset päät voidaan rakentaa myös niin, että terminaalisen deoksinukleotidyylitransferaasin avulla liitetään komplementaariset, homolopymeeriset päät haluttuun DNA-sekvenssiin ja katkaistuun vektoriin. Vaihtoehtoisesti voidaan kohesiiviset päät rakentaa myös niin, että liitetään synteettinen oligonukleotidisekvenssi, jonka tietty restriktioendonukleaasi tunnistaa, ja joka tunnetaan nimellä kytkijä, ja sekvenssi katkaistaan kyseisellä endonukleaasilla (ks. esimerkiksi [33] Maniatis et al., 1982).

Näin ollen on esillä olevan keksinnön mukaisesti nyt ensi kertaa mahdollista muokata ja kloonata B. thuringiensis-geenejä, erityisesti δ-endotoksiinia koodittavia DNA-sekvenssejä, geneettisesti B. thuringiensiksen ulkopuolella ja sen jälkeen siirtää takaisin B.thuringiensis- ja/tai B. cereus-soluihin, joissa mainitut δ-endotoksiinigeenit voidaan ilmentää (homologisessa bakteeri-isäntäsysteemissä).

Tämä tarkoittaa, että nyt voidaan myös B. thuringiensiksen perimää muokata kohdennetusti siten, että ensin valmistetaan suuria määriä plasmidimateriaalia vieraassa kloonaussysteemissä ja sen jälkeen tällä materiaalilla transformoidaan B. thuringiensis.

Tällöin on erityisen mielenkiinnon kohteena mahdollisuus muokata δ-endotoksiinigeenejä sekä näiden geenien ilmentymistä sääteleviä ohjaussekvenssejä.

Paitsi kimeerisiä geenejä voidaan keksinnönmukaisen menetelmän avulla siirtää Bacillus thuringiensis- ja/tai Bacillus cereus-soluihin myös mikä tahansa muu kimeerinen geneettinen rakenne.

Näin on esillä olevan keksinnön menetelmää käyttämällä ajateltavissa, että koodittamaton, "antisense"-DNA siirretään Bacillus thuringiensis- ja/tai Bacillus cereus-soluihin niin, että mainitun "antisense"-DNA:n ilmentymisessä tulee mRNA transkriboiduksi ja se estää vastaavan "sense"-DNA:n ilmentymisen. Tällä tavoin on mahdollista tukahduttaa tiettyjen, ei-toivottujen geenien ilmentyminen Bacillus thuringiensiksessa ja/tai Bacillus cereuksessa tarkoituksellisesti.

Lisäksi on nyt olemassa mahdollisuus paitsi valmistaa parempia, hyvin määriteltyjä B. thuringiensis-kantoja parempien bioinsektisidien tuottamiseen myös käyttää B. thuringiensistä yleisisäntänä heterologisten ja/tai homologisten geenien kloonaukseen ja ilmentämiseen.

Esillä olevan keksinnön erityisen ja edullisen toteutustavan mukaisesti on nyt lisäksi ensi kertaa mahdollista kloonata uusia geenejä ja erityisesti uusia protoksiinigeenejä suoraan luonnollisessa isännässä eli B. thuringiensiksessa tai B. cereuksessa.

Uusia protoksiinigeenejä etsittäessä valmistetaan ensin B. thuringiensiksen geenikirjasto.

Tällöin ensimmäisenä menetelmävaiheena eristetään protoksiinia tuottavan B. thuringiensis-kannan koko DNA sinänsä tunnetuilla menetelmillä ja saatu DNA pilkotaan yksittäisiksi fragmenteiksi. B. thuringiensis-DNA voidaan tällöin fragmentoida joko mekaanisesti, esimerkiksi leikkausvoimien avulla, tai mielellään hajottamalla sopivilla restriktioentsyymeillä. Entsyymin valinnasta riippuen saadaan DNA-näyte hajoamaan osittain tai täydellisesti. Erityisen edullista on esillä olevassa keksinnössä käyttää sellaisia restriktioentsyymejä, joilla on neljän nukleotidin mittainen tunnistuskohta,

ja/tai jotka johtavat B. thuringiensis-DNA:n osittaiseen pilkkoutumiseen, kuten esimerkiksi restriktioensyymiä SauIIIA, tähän kuitenkaan rajoittumatta. On selvää, että keksinnönmukaisessa menetelmässä voidaan käyttää myös kaikkia muita sopivia restriktioensyymejä.

Edellä selostetulla tavalla saadut restriktiofragmentit erotetaan tämän jälkeen kokonsa perusteella sinänsä tunnettujen menetelmien avulla. DNA-fragmenttien koosta riippuvaiseen erottamiseen käytetään tavallisesti sentrifugointimenetelmiä, kuten sakkaroosigradienttisentrifugointia, tai elektroforeettisia menetelmiä, kuten agaroosigeelielektroforeesia, tai jotakin näiden menetelmien yhdistelmää.

Fraktiot, jotka sisältävät oikeankokoisia fragmentteja eli fragmentteja, jotka kokonsa perusteella kykenevät koodittamaan protoksiinia, yhdistetään ja käytetään seuraavassa menetelmävaiheessa.

Edellä eristetyt fragmentit sijoitetaan ensin standardimenetelmiä käyttäen sopiviin kloonausvektoreihin ja sen jälkeen siirretään keksinnönmukaisen transformointimenetelmän avulla suoraan Bacillus thuringiensikseen tai B. cereukseen, mielellään kuitenkin protoksiinivapaaseen Bacillus thuringiensis-kantaan.

Vektoreina voidaan käyttää sekä gram-positiivisia plasmideja, joista mainittakoon esim. pBC16, pUB110, pC194, että aiemmin yksityiskohtaisesti selostettuja "sukkulavektoreita". Erityisen edullinen esillä olevassa keksinnössä käytettäväksi on sukkulavektori pXI200, jota selostetaan jäljempänä yksityiskohtaisesti (ks. esimerkki 9.1.). On edullista, jos vektorit sisältävät DNA-sekvenssejä, jotka mahdollistavat transformoituneiden, vektoripitoisten kloonien helpon tunnistettavuuden valtavasta määrästä transformoitumattomia klooneja. Erityisen edullisia ovat DNA-sekvenssit, jotka koodittavat spesifistä merkkiä, joka johtaa helpon valinnan mahdollistavan merkin, kuten antibioottiresistenssin, ilmentymiseen.Tässä

yhteydessä mainittakoon resistenssit seuraavien antibioottien suhteen: ampisilliini, kloramfenikoli, erytromysiini, tetrasykliini, hygromysiini, G418 tai kanamysiini.

Samoin ovat edullisia merkkigeenit, jotka koodittavat kromogeenisen substraatin, kuten esim. X-gal (5-bromi-4-kloori-3-indolyyli-β-D-galaktosidi) omaavaa entsyymiä. Transformoituneet pesäkkeet voidaan tämän jälkeen hyvin yksinkertaisesti osoittaa spesifisellä värireaktiolla.

Elektroporaation jälkeen siirretään käsitellyt B. thuringiensis- tai B. cereus-solut selektiiviseen sporulaatioravintoalustaan ja inkuboidaan siellä täydelliseen itiönmuodostukseen asti välillä 10 - 40°C, mielellään välillä 20 - 35°C ja aivan erityisesti välillä 29 - 31°C olevassa lämpötilassa. Sporulaatioravintoalusta sisältää valinta-aineena mielellään yhtä edellämainituista antibiooteista riippuen käytetystä vektorista sekä sopivaa kiinteytysainetta, kuten esimerkiksi agaria, agaroosia, liivatetta jne.

Itiönmuodostuksen kuluessa tapahtuu sporuloivien solujen autolyysi, mikä on suuri menetelmätekninen etu myöhempää seulontaa ajatellen, koska solujen rikkomista keinotekoisesti ei tarvita. Klooneilla, jotka sisältävät halutun protoksiinigeenin, joka ilmentyy luontaisen promoottorinsa säätelyssä, ovat muodostuneet kideproteiinit vapaasti ravintoalustassa. Nämä vapaasti ravintoalustassa esiintyvät kideproteiinit voidaan sitten esimerkiksi kalvosuodattimien tai muiden sopivien välineiden avulla kiinnittää. Sopivia kalvosuodattimia ovat esimerkiksi nailon- tai nitroselluloosakalvot. Tällaisia kalvoja on vapaasti kaupallisesti saatavissa.

Näin kiinnitetyt kideproteiinit voidaan tämän jälkeen havaita ja tunnistaa hyvin yksinkertaisesti sopivilla seulonnoilla.

Esillä olevassa keksinnössä asetetaan etusijalle immunologinen seulonta käyttämällä protoksiinispesifisiä

vasta-aineita. Immunoseulontamenetelmät ovat ennestään tunnettuja ja niitä on selostettu esimerkiksi julkaisussa [35] Young et al., 1983, yksityiskohtaisesti. Erityisen edullista on esillä olevassa keksinnössä käyttää monoklonaalisia vasta-aineita, jotka tunnistavat aivan spesifisesti tietyn osan proteiinimolekyylistä. Näitä vasta-aineita voidaan käyttää joko yksittäin tai seosmuodossa. On selvää, että immunoseulonnassa voidaan myös käyttää polyklonaalisia vastaseerumeita. Ajateltavissa ovat myös seokset, jotka perustuvat monoklonaalisiin ja polyklonaalisiin vasta-aineisiin.

Menetelmiä monoklonaalisten vasta-aineiden valmistamiseksi Bacillus thuringiensis-protoksiiniproteiineja vastaan tunnetaan ennestään ja niitä on yksityiskohtaisesti selostettu esimerkiksi julkaisuissa [36] Huber-Lukač (1984) ja [37] Huber-Lukač et al. (1986). Näitä menetelmiä voidaan käyttää myös tässä yhteydessä.

Esillä olevassa keksinnössä käytetään vasta-aineisiin perustuvaa immunologista seulontamenetelmää.

On selvää, että esillä olevassa keksinnössä voidaan myös käyttää muita sopivia seulontamenetelmiä uusien DNA-sekvenssien toteamiseen B. thuringiensiksessa ja/tai B. cereuksessa.

Bacillus thuringiensis- ja B. cereus-solut, jotka on transformoitu edelläselostetun menetelmän avulla, sekä näistä transformoituneista Bacillus-soluista tuotetut toksiinit sopivat erinomaisella tavalla hyönteisten torjuntaan, ja aivan erityisesti Lepidoptera-, Diptera- ja Coleoptera-lahkojen hyönteisten torjuntaan.

Hyönteisiä torjuttaessa hyönteiset ja niiden elintila käsitellään

a) B. thuringiensis- tai B. cereus-soluilla tai näiden seoksella, jotka solut ovat transformoituneet yhdistelmä-DNA-molekyylillä, joka sisältää rakennegeenin, joka koodittaa δ-endotoksiinipolypeptidiä, joka esiintyy

luonnostaan B. thuringiensiksessa, tai polypeptidiä, joka on tämän kanssa oleellisesti ottaen homologinen; tai

b) soluvapailla kidekappalepreparaateilla, jotka sisältävät mainittujen transformoituneiden Bacillus-solujen tuottamaa protoksiinia.

Käytettävät hyönteistentorjunta-aineet sisältävät tavallisesti käytettyjen kantaja-aineiden, dispergointiaineiden tai kantaja- ja dispergointiaineiden lisäksi

a) B. thuringiensis- tai B. cereus-soluja tai näiden seosta, jotka solut ovat transformoituneet yhdistelmä-DNA-molekyylillä, joka sisältää rakennegeenin, joka koodittaa δ-endotoksiinipolypeptidiä, joka esiintyy luonnostaan B. thuringiensiksessa, tai polypeptidiä, joka on tämän kanssa olellisesti ottaen homologinen; tai

b) soluvapaita kidekappalepreparaatteja, jotka sisältävät mainittujen transformoituneiden Bacillus-solujen tuottamaa protoksiinia.

Hyönteisten torjunnassa käytetään transformoituneita mikro-organismeja, jotka sisältävät B. thuringiensis-toksiinin yhdistelmägeenin, mielellään transformoituneita eläviä tai kuolleita B. thuringiensis- tai B. cereus-soluja, elävien ja kuolleiden B. thuringiensis- ja B. cereus-solujen seokset mukaanlukien, sekä mainittujen transformoituneiden solujen tuottamia toksiiniproteiineja sellaisinaan tai mielellään formulointitekniikassa yleisesti käytettyjen apuaineiden kanssa ja ne formuloidaan sinänsä tunnetulla tavalla esimerkiksi suspensiokonsentraateiksi, levitettäviksi tahnoiksi, suoraan ruiskutettaviksi tai laimennettaviksi liuoksiksi, kostutettaviksi jauheiksi, liukeneviksi jauheiksi, pölytteiksi, sirotteiksi tai kapseloiduiksi valmisteiksi esim. polymeerikapseleihin.

Käyttömenetelmät, kuten ruiskutus, sumutus, pöly-

tys, sirotus, sively tai kastelu valitaan aineen, tarkoituksen ja olosuhteiden mukaan.

On selvää, että voidaan käyttää myös insektisidisiä seoksia, jotka koostuvat transformoituneista, elävistä tai kuolleista B. thuringiensis- ja/tai B. cereus-soluista sekä soluvapaista kidekappalevalmisteista, jotka sisältävät protoksiinia, jota mainitut transformoituneet Bacillus-solut tuottavat.

Formulaatiot eli aineet tai valmisteet, jotka sisältävät transformoituneita, eläviä tai kuolleita Bacillus-soluja tai näiden seosta sekä mainittujen transformoituneiden Bacillus-solujen tuottamia toksiiniproteiineja ja mahdollisesti kiinteitä tai nestemäisiä apuaineita, valmistetaan tunnetulla tavalla, esim. sekoittamalla perusteellisesti keskenään solut ja/tai toksiiniproteiinit ja kiinteät kantaja-aineet sekä haluttaessa pinta-aktiiviset yhdisteet (tensidit).

Kiinteinä kantaja-aineina esimerkiksi pölytteissä ja dispergoituvissa jauheissa, käytetään yleensä luonnonkivijauheita, kuten kalsiittia, talkkia, kaoliinia, montmorilloniittia tai attapulgiittia. Fysikaalisten ominaisuuksien parantamiseksi voidaan lisätä myös voimakkaasti disperssiä piihappoa tai voimakkaasti disperssejä, imukykyisiä polymeerejä. Rakeisina, adsorptiivisina sirotteiden kantaja-aineina tulevat kysymykseen huokoiset tyypit, kuten esimerkiksi hohkakivi, tiilimurska, merenvaha tai bentoniitti, ja ei-adsorptiivisina kantaja-aineina tulevat kysymykseen esimerkiksi kalsiitti tai hiekka. Lisäksi voidaan käyttää mitä erilaisimpia esirakeistettuja materiaaleja, jotka voivat olla epäorgaanisia tai orgaanisia, kuten erityisesti dolomiittia tai hienonnettua kasvijätettä.

Pinta-aktiivisina aineina tulevat kysymykseen ei-ioniset, kationi- ja/tai anioniaktiiviset tensidit, joilla on hyvät dispergointi- ja kostutusominaisuudet. Tensideillä ymmärretään myös tensidiseoksia.

Käytetyt anioniset tensidit voivat olla ns. vesiliukoisia saippuoita tai vesiliukoisia, synteettisiä, pinta-aktiivisia yhdisteitä.

Saippuoista mainittakoon korkeampien rasvahappojen (C_{10}-C_{22}) alkali-, maa-alkali- tai substituoimattomat tai substituoidut ammoniumsuolat, kuten esimerkiksi öljy- tai steariinihapon natrium- tai kaliumsuola, tai esimerkiksi kookospähkinä- tai talirasvasta saatujen luonnon-rasvahapposeosten vastaavat suolat. Lisäksi mainittakoon rasvahappo- metyyli-tauriinisuolat, kuten esimerkiksi cis-2-(metyyli-9-oktadekenyyliamino)etaanisulfonihapon natriumsuola (pitoisuus formulaatioissa mielellään noin 3 %).

Useammin käytetään kuitenkin ns. synteettisiä tensidejä, erityisesti rasvasulfonaatteja, rasvasulfaatteja, sulfonoituja bentsimidatsolijohdannaisia tai alkyyliaryylisulfonaatteja tai rasva-alkoholeja, kuten esimerkiksi 2,4,7,9-tetrametyyli-5-dekiini-4,7-diolia (pitoisuus formulaatioissa mielellään noin 2 %).

Rasvasulfonaatit tai -sulfaatit ovat yleensä alkali-, maa-alkali- tai mahdollisesti substituoimattomina tai substituoituina ammoniumsuoloina ja niiden alkyylitähteessä on 8 - 22 hiiliatomia, joilloin alkyyli sisältää myös asyylitähteiden alkyyliosan, ja esimerkkeinä mainittakoon ligniinisulfonihapon , dodekyylisulfaatin tai luonnon rasvahapoista valmistetun rasva-alkoholiseoksen natrium- tai kalsiumsuola. Näihin kuuluvat myös rasva-alkoholi-etyleenioksidiadduktien ja rikkihappoesterien ja sulfonihappojen suolat. Sulfonoidut bentsimidatsolijohdannaiset sisältävät mielellään 2 sulfonihapporyhmää ja yhden rasvahapporyhmän, jossa on 8 - 22 hiiliatomia. Alkyyliaryylisulfonaatit ovat esimerkiksi dodekyylibentseenisulfonihapon, dibutyylinaftaleenisulfonihapon tai naftaleenisulfonihappo-formaldehydikondensaatiotuotteen natrium-, kalsium- tai trietanoliamiinisuoloja.

Edelleen tulevat kysymykseen vastaavat fosfaatit, kuten esimerkiksi p-nonyylifenoli-(4-14)-etyleenioksidiadduktin fosforihappoesterin suolat.

Ei-ionisina tensideinä tulevat ensi sijassa kysymykseen alifaattisten tai sykloalifaattisten alkoholien, tyydyttyneiden tai tyydyttymättömien rasvahappojen tai alkyylifenolien polyglykolieetterijohdannaiset, jotka sisältävät 3 - 30 glykolieetteriryhmää ja 8 - 20 hiiliatomia (alifaattisessa) hiilivetytähteessä tai 6 - 18 hiiliatomia alkyylifenolin alkyyliryhmässä.

Muita sopivia ei-ionisia tensidejä ovat vesiliukoiset, 20 - 250 etyleeniglykolieetteriryhmää ja 10 - 100 propyleeniglykolieetteriryhmää sisältävät polyetyleenioksidiadduktit polypropyleeniglykolissa, etyleenidiaminopolypropyleeniglykolissa tai alkyylipolypropyleeniglykolissa, jonka alkyyliketjussa on 1 - 10 hiiliatomia. Mainitut yhdisteet sisältävät tavallisesti propyleeniglykoliyksikköä kohti 1 - 5 etyleeniglykoliyksikköä.

Esimerkkeinä ei-ionisista tensideistä mainittakoon nonyylifenolipolyetoksietanoli, risiiniöljypolyglykolieetteri, polypropyleeni/polyetyleenioksidiadduktit, tributyylifenoksipolyetoksietanoli, polyetyleeniglykoli ja oktyylifenoksipolyetoksietanoli. Lisäksi tulevat kysymykseen polyoksietyleenisorbitaanin rasvahappoesterit, kuten polyoksietyleenisorbitaanitrioleaatti.

Kyseeseen tulevat kationiset tensidit ovat ennen kaikkea kvaternäärisiä ammoniumsuoloja, joissa on N-substituenttina vähintään yksi 8 - 22 hiiliatomia sisältävä alkyyliryhmä ja muina N-substituentteina substituoimattomia tai halogenoituja alempialkyyli-, alempialkyylibentsyyli- tai hydroksialempialkyyliryhmiä. Suolat ovat mielellään halogenidi-, metyylisulfaatti- tai etyylisulfaattimuodossa, joista mainittakoon esimerkiksi stearyylitrimetyyliammoniumkloridi tai bentsyylidi(2-kloorietyyli)etyyliammoniumbromidi.

Formulointitekniikassa käytettäviksi sopivia ten-

sidejä on selostettu mm. seuraavissa julkaisuissa: [38] 1986 International McCutcheon's Emulsifiers & Detergents, The Manufacturing Confectioner Publishing Co., Glen Rock, NJ, USA; Helmut Stache "Tensid-Taschenbuch", Carl Hanser-Verlag München/Wien 1981.

Maatalouskemialliset aineet sisältävät yleensä 0,1 - 99 %, erityisesti 0,1 - 95 % transformoituneita, eläviä tai kuolleita Bacillus-soluja tai näiden seosta tai mainittujen transformoituneiden Bacillus-solujen tuottamia toksiiniproteiineja, 99,9 - 1 %, erityisesti 99,8 - 5 % kiinteätä tai nestemäistä lisäainetta ja 0 - 25 %, erityisesti 0,1 - 25 % tensidiä.

Vaikka konsentraatit asetetaan etusijalle kauppatavaroina, käyttää loppukäyttäjä yleensä laimennettuja formulaatioita.

Tällaiset aineet voivat sisältää myös muita lisäaineita, kuten stabilointiaineita, vaahdonestoaineita, viskositeetinsäätöaineita, sideaineita, kiinnitysaineita ja lannoitusaineita tai muita vaikuttavia aineita, jotta saadaan aikaan erityisvaikutuksia.

Transformoituneet elävät tai kuolleet Bacillus-solut tai näiden seokset, jotka solut sisältävät B. thuringiensis-toksiinin yhdistelmägeenin, sekä mainittujen transformoituneiden Bacillus-solujen tuottamat toksiiniproteiinit itse soveltuvat erinomaisesti tuhohyönteisten torjuntaan. Ennen kaikkea on tässä syytä mainita Lepidoptera-lahkon kasvintuhoajahyönteiset ja niistä erityisesti sukujen Pieris, Heliothis, Spodoptera ja Plutella edustajat, kuten esimerkiksi Pieris brassicae, Heliothis virescens, Heliothis zea, Spodoptera littoralis ja Plutella xylostella.

Muita tuhohyönteisiä, joita voidaan torjua edellä kuvatuilla insektisidisillä valmisteilla ovat esimerkiksi Coleoptera-lahkon kovakuoriaiset, joista erityisesti Chrysomelidae-suvun edustajat, kuten esim. Diabrotica undecimpunctata, D. longicornis, D. virgitera, D. unde-

cimpunctata howardi, Agelastica alni, Leptinotarsa decemlineata jne. sekä Diptera-lahkon hyönteiset, kuten esimerkiksi Anopheles sergentii, Uranatenia unguiculata, Culex univittatus, Aedes aegypti, Culex pipiens jne.

Määrät, joina Bacillus-soluja tai niiden tuottamia toksiiniproteiineja käytetään, riippuvat kulloisistakin olosuhteista, kuten esimerkiksi sääolosuhteista, maaperän rakenteesta, kasvien kasvusta ja levitysajankohdasta.

B. thuringiensis-toksiinia sisältävän materiaalin formulointiesimerkkejä

Seuraavissa formulointiesimerkeissä ymmärretään käsitteellä "Bacillus-solut" sellaisia B. thuringiensis ja/tai B. cereus-soluja, jotka sisältävät keksinnönmukaisen B. thuringiensis-yhdistelmägeenin. (Prosentit takoittavat kauttaaltaan massaprosentteja.)

F1. Sirote	a)	b)
Bacillus-soluja ja/tai niiden tuottamaa toksiiniproteiinia	5 %	10 %
kaoliinia	94 %	-
voimakkaasti disperssiä piihappoa	1 %	-
attapulgiittia	-	90 %

Bacillus-solut ja/tai niiden tuottama toksiiniproteiini suspendoidaan ensin metyleenikloridiin, sitten suspensio suihkutetaan kantaja-aineelle ja lopuksi suspendointiaine haihdutetaan vakuumissa.

F2. Pölyte	a)	b)
Bacillus-soluja ja/tai niiden tuottamaa toksiiniproteiinia	2 %	5 %
voimakkaasti disperssiä piihappoa	1 %	5 %
talkkia	97 %	-
kaoliinia	-	90 %

Käyttövalmis pölyte saadaan sekoittamalla perusteellisesti keskenään kantaja-aineet ja Bacillus-solut ja/tai näiden tuottama toksiiniproteiini.

F3. Ruiskutejauhe	a)	b)	c)
Bacillus-soluja ja/tai niiden tuottamaa toksiiniproteiinia	25 %	50 %	75 %
natriumligniinisulfonaattia	5 %	5 %	-
natriumlauryylisulfaattia	3 %	-	5 %
natriumdi-isopropyyli-naftaleenisulfonaattia	-	6 %	10 %
oktyylifenolipolyetyleeni-glykolieetteriä (7 - 8 moolia etyleenioksidia)	-	2 %	-
voimakkaasti disperssiä piihappoa	5 %	10 %	10 %
kaoliinia	62 %	27 %	-

Bacillus-solut ja/tai niiden tuottama toksiiniproteiini sekoitetaan perusteellisesti lisäaineisiin ja näin saatu seos jauhetaan sopivassa myllyssä hyvin. Näin sadaan ruiskutejauhe, josta veden avulla voidaan laimentaa pitoisuudeltaan haluttuja suspensioita.

F4. Ekstruuderisirote	
Bacillus-soluja ja/tai niiden tuottamaa toksiiniproteiinia	10 %
natriumligniinisulfonaattia	2 %
karboksimetyyliselluloosaa	1 %
kaoliinia	87 %

Bacillus-solut ja/tai niiden tuottama toksiiniproteiini sekoitetaan apuaineisiin, jauhetaan huolellisesti ja kostutetaan vedellä. Tämä seos ekstrudoidaan ja kuivataan sen jälkeen ilmavirrassa.

F5. Suojattu sirote

Bacillus-soluja ja/tai niiden tuottamaa toksiiniproteiinia	3 %
polyetyleeniglykoli 200	3 %
kaoliinia	94 %

Homogeenisesti sekoitetut Bacillus-solut ja/tai niiden tuottama toksiiniproteiini sekoitetaan tasaisesti sekoittimessa polyetyleeniglykolilla kostutettuun kaoliiniin. Näin saadaan pölyämätöntä suojattua sirotetta.

F6. Suspensiokonsentraatti

Bacillus-soluja ja/tai niiden tuottamaa toksiiniproteiinia	40 %
etyleeniglykolia	10 %
nonyylifenolipolyetyleeniglykolia (15 moolia etyleenioksidia)	6 %
alkyylibentseenisulfonihapon trietanoliamiinisuolaa*	3 %
karboksimetyyliselluloosaa	1 %
silikoniöljyä 75 %:sen vesiemulsion muodossa	0,1 %
vettä	39 %

*Alkyyli on mielellään lineaarinen sisältäen 10 - 14, erityisesti 12 - 14 hiiliatomia, kuten esimerkiksi n-dodekyylibentseenisulfonihapon trietanoliamiinisuola.

Homogeenisesti sekoitetut Bacillus-solut ja/tai näiden tuottama toksiiniproteiini sekoitetaan lisäaineisiin perusteellisesti. Näin saadaan suspensiokonsentraatti, josta vedellä laimentamalla saadaan pitoisuudeltaan haluttuja suspensioita.

Esimerkit

Yleiset yhdistelmä-DNA-tekniset menetelmät

Koska monet esillä olevassa keksinnössä käytetyistä

geeniteknologisista menetelmistä ovat rutiinia alan ammatti-ihmiselle, selostetaan yleisesti käyttökelpoisia menetelmiä seuraavassa lyhyesti, jotta näiden yleisten tietojen esittämisestä voidaan luopua konkreettisissa toteutustapaesimerkeissä. Ellei erityisesti toisin mainita, on kaikki nämä menetelmät selostettu viitteessä [33] Maniatis et al., 1982.

A. Katkaisu restriktioendonukleaaseilla

Tyypillisesti sisältää reaktioerä DNA:ta 50 - 500 µg/ml valmistajan (New England Biolabs, Beverly, MA) suosittelemassa puskuriliuoksessa. Jokaista DNA-µg:aa kohti lisätään 2 - 5 yksikköä restriktioendonukleaasia ja reaktioerää inkuboidaan 1 - 3 tuntia valmistajan suosittelemassa lämpötilassa. Reaktio lopetetaan kuumentamalla 10 minuuttia 65°C:ssa tai uuttamalla fenolilla, mitä seuraa DNA:n saostus etanolilla. Tätä tekniikkaa on selostettu sivuilla 104 - 106 julkaisussa [33] Maniatis et al.

B. DNA:n käsittely polymeraasilla, jotta saadaan tasaiset päät

Yhdessä reaktioerässä lisätään DNA-fragmentteja 50 - 500 µg/ml valmistajan (New England Biolabs) suosittelemaan puskuriin. Reaktioerä sisältää kaikkia neljää deoksinukleotiditrifosfaattia, kutakin pitoisuutena 0,2 mM. Reaktio kestää 30 minuuttia 15°C:ssa, minkä jälkeen se lopetetaan kuumentamalla 10 minuuttia 65 °C:ssa. Fragmenteille, jotka on käsitelty sellaisilla restriktioendonukleaaseilla, kuten EcoRI:llä tai BamHI:llä, jotka tuottavat ulostyöntyviä 5'-päitä, käytetään DNA-polymeraasin suurta fragmenttia eli Klenow-fragmenttia. Fragmenteille, jotka saadaan sellaisilla endonukleaaseilla, kuten PstI:llä tai SacI:llä, jotka tuottavat ulostyöntyviä 3'-päitä, käytetään T4-DNA-polymeraasia. Näiden

kummankin entsyymin käyttöä on selostettu sivuilla 113 - 121 julkaisussa [33] Maniatis et al.

C. Agaroosigeelielektroforeesi ja DNA-fragmenttien puhdistus geeleistä

Agaroosigeelielektroforeesi suoritetaan horisontaalisessa laitteessa, kuten sivuilla 150 - 163 julkaisussa [33] Maniatis et al. on selostettu. Käytetty puskuri vastaa siinä kuvattua Tris-boraattipuskuria. DNA-fragmentit värjätään etidiumbromidilla (0,5 µg/ml), jota on joko geeli- tai säiliöpuskurissa elektroforeesin aikana, tai joka haluttaessa lisätään vasta elektroforeesin jälkeen. DNA tehdään näkyväksi valaisemalla pitkäaaltoisella ultraviolettivalolla. Jos fragmentteja ei haluta erottaa geelistä, käytetään agaroosia, joka geeliytyy matalammassa lämpötilassa, ja jota on saatavissa Sigma Chemical-firmasta (St. Louis, Missouri). Elektroforeesin jälkeen leikataan haluttu fragmentti irti, sijoitetaan muoviputkeen, kuumennetaan noin 15 minuuttia 65°C:ssa, uutetaan kolmeen kertaan fenolilla ja saostetaan kahdesti etanolilla. Tämä menetelmä on hieman muunnettu julkaisussa [33] Maniatis et al. sivulla 170 kuvatusta menetelmästä.

Vaihtoehtoisesti voidaan DNA eristää agaroosigeelistä myös käyttämällä "Geneclean Kit"-pakkausta (Bio 101 Inc., La Jolla, CA, USA).

D. 5'-terminaalisten fosfaattien poisto DNA-fragmenteista

Plasmidinkloonausvaiheiden aikana vähentää vektoriplasmidin fosfataasikäsittely vektorin renkaaksipalautumista (selostettu sivulla 13 julkaisussa [33] Maniatis et al.). Kun DNA on leikattu oikealla restriktioendonukleaasilla, lisätään yksi yksikkö emäsfosfataasia, joka on peräisin vasikan suolesta, ja jota on saatavissa Boehringer-Mannheim-firmasta (Mannheim). DNA:ta inkuboi-

daan 1 tunti 37°C:ssa ja sen jälkeen uutetaan kaksi kertaa fenolilla ja saostetaan etanolilla.

E. DNA-fragmenttien yhteenliittäminen

Kun halutaan liittää yhteen fragmentit, joilla on komplementaariset porrastetut päät, inkuboidaan noin 100 ng kutakin fragmenttia 20 - 40 µl:ssa reaktioseosta noin 0,2 yksikön kanssa T4 DNA-ligaasia (New England Biolabs) valmistajan suosittelemassa puskurissa. Inkubointi suoritetaan 1 - 20 tunnissa 15°C:ssa. Kun halutaan liittää yhteen DNA-fragmentit, joissa on tasaiset päät, inkuboidaan edellä kuvatulla tavalla, mutta nyt käytetään T4 DNA-ligaasia 2 - 4 yksikköä.

F. E. colin transformointi DNA:lla

Useimmissa esimerkeissä käytetään E. coli-kantaa HB101. DNA siirretään E. colin kalsiumkloridimenetelmällä, joka on selostettu sivuilla 250 - 251 julkaisussa [33] Maniatis et al.

G. Plasmidien seulonta E. colista

Transformoinnin jälkeen tutkitaan saaduista E. coli-pesäkkeistä halutun plasmidin läsnäolo nopealla plasmidineristämismenetelmällä. Kaksi käyttökelpoista menetelmää on selostettu sivuilla 366 - 369 julkaisussa [33] Maniatis et al.

H. Plasmidi-DNA:n eristäminen suuressa mittakaavassa

Menetelmä plasmidien eristämiseksi E. colista suuressa mittakaavassa on selostettu sivuilla 88 - 94 julkaisussa [33] Maniatis et al.

Ravintoalustat ja puskuriliuokset

LB-ravintoalusta	(g/l)
tryptonia	10
hiivauutetta	5
NaCl	5

Antibioottinen ravintoalusta no. 3 (Difco Laboratories)

	(g/l)
naudanlihauutetta	1,5
hiivauutetta	1,5
peptonia	5
glukoosia	1
NaCl	3,5
K_2HPO_4	3,68
KH_2PO_4	1,32

SCGY-ravintoalusta	(g/l)
kasaminohappoja	1
hiivauutetta	0,1
glukoosia	5
K_2HPO_4	14
KH_2PO_4	6
Na_3-sitraattia	1
$(NH_4)_2SO_4$	2
$MgSO_4.7H_2O$	0,2

GYS-ravintoalusta ([22]Yousten & Rogoff, 1969)	(g/l)
glukoosia	1
hiivauutettta	2
$(NH_4)_2SO_4$	2
K_2HPO_4	0,5
$MgSO_4.7H_2O$	0,2
$CaCl_2.2H_2O$	0,08
$MnSO_4.H_2O$	0,05

pH säädetään ennen autoklavointia arvoon 7,3

PBS-puskuri	(mM)
sakkaroosia	400
$MgCl_2$	1
fosfaattipuskuria, pH 6,0	7

TBST-puskuri	(mM)
Tween 20*	0,05 til.-%
Tris/HCl* (pH 8,0)	10
NaCl (kahdesti tislatussa vedessä)	150)16a

*Tween 20 polyetoksisorbitaanilauraatti
*Tris/HCl α,α,α-tris(hydroksimetyyli)metyyliaminohydrokloridi

Prioriteettidokumentissa plasmidien nimeämiseen valittu sisäinen merkintä pK on ulkomaanhakemuksessa korvattu virallisesti hyväksytyllä merkinnällä pXI.

Toteutustapaesimerkeissä asporogeeniselle B. thuringiensis HD1-mutantille käytetty merkintä cryβ on muutettu merkinnäksi cryB.

Esimerkki 1: B. thuringiensiksen transformointi elektroporaation avulla

Esimerkki 1.1: 10 ml LB-ravintoalustaa (tryptonia 10 g/l, hiivauutetta 5 g/l, NaCl 5 g/l) ympätään B. thuringiensis var. kurstaki HD1cryB-itiöillä ([39]Stahly DP et al, 1978), joka on B. thuringiensis var. kurstaki HD1:n plasmidivapaa muunnos.

Tätä erää inkuboidaan yön yli 27°C:ssa pyöritysravistelulaitteessa nopeudella 50 min^{-1}. Tämän jälkeen B. thuringiensis-viljelmä laimennetaan 100-kertaisesti 100 - 400 ml:aan LB-ravintoalustaa ja kasvatetaan edelleen 30°C:ssa pyöritysravistelulaitteessa nopeudella 250 min^{-1}, kunnes optinen tiheys (OD_{550}) saavuttaa arvon 0,2.

Solut erotetaan sentrifugoimalla ja suspendoidaan 1/40 tilavuuteen jäällä jäähdytettyä PBS-puskuria (400

mM sakkaroosia, 1 mM $MgCl_2$, 7 mM fosfaattipuskuria, pH 6,0). Sentrifugointi ja näin saatujen B. thuringiensis-solujen suspendointi PBS-puskuriin toistetaan vielä kerran.

Näin esikäsitellyt solut voidaan joko elektroporoida suoraan tai myöhempää käyttöä varten säilyttää -20 - -70°C:ssa, kun puskuriliuokseen on lisätty glyseriiniä (20 % (massa/tilavuus)).

800 µl erät jäällä jäähdytettyjä soluja siirretään tämän jälkeen esijäähdytettyihin kyvetteihin, sitten lisätään 0,2 µg pBC16-plasmidi-DNA:ta ([40]Bernhard K., et al, 1978) (20 µg/ml) ja koko erää inkuboidaan 10 minuuttia 4°C:ssa.

Kun käytetään syväjäädytettyä solumateriaalia, sulatetaan ensin sopiva erä jäädytettyjä soluja jäässä tai huoneenlämpötilassa. Jatkokäsittely tapahtuu samoin kuin tuoretta solumateriaalia käytettäessä.

Sitten kyvetti sijoitetaan elektroporaatiolaitteeseen ja suspensiossa olevat B. thuringiensis-solut elektroporoidaan siten, että niihin kohdistetaan kerran kondensaattoripurkaus välillä 0,1 - 2,5 kV olevalla jännitteellä.

Tässä käytetyn kondensaattorin kapasiteetti on 25 µF, kyvettien elektrodien etäisyys on 0,4 cm, mikä johtaa purkauksessa säädöstä riippuen eksponentiaalisesti laskevaan kentänvoimakkuuteen, jonka huippuarvot ovat alussa 0,25 - 6,25 kV/cm. Eksponentiaalinen vaimenemisaika on välillä 10 - 12 ms.

Selostetuissa elektroporaatiokokeissa voidaan käyttää esimerkiksi Bio Rad-firman elektroporaatiolaitetta ("Gene Pulser Apparatus", no. 165-2075, Bio Rad, 1414 Harbour Way South, Richmond, CA 94804, USA).

On selvää, että keksinnönmukaisessa menetelmässä voidaan myös käyttää mitä tahansa sopivaa laitetta.

Tämän jälkeen inkuboidaan vielä 10 minuuttia 4°C:ssa ja sitten solususpensio laimennetaan 1,2 ml:lla LB-

ravintoalustaa ja inkuboidaan 2 tuntia 30°C:ssa pyöritysravistelulaitteessa nopeudella 250 min^{-1}.

Tämän jälkeen maljataan sopivat laimennokset LB-agarille (LB-ravintoalusta, joka on kiinteytetty agarilla, 15 g/l), johon on lisätty vastasaadun plasmidin valintaan sopivaa antibioottia. Plasmidin pBC16 tapauksessa on kyseessä tetrasykliini, jota lisätään ravintoalustaan pitoisuuteen 20 mg/l.

B. thuringiensis HD1cryB:lle ja pBC16:lle käytetystä lähtöjännitteestä riippuen mainitulla levyjenetäisyydellä saadut transformoitumisfrekvenssit on esitetty kuvassa 1.

Siirretyn DNA:n ilmentyminen voidaan osoittaa esiintyvän tetrasykliiniresistenssin avulla. Jo 2 tunnin kuluttua siitä, kun B. thuringiensis on transformoitunut plasmidilla pBC16, tapahtuu vastatuodun tetrasykliiniresistenssin täydellinen fenotyyppinen ilmentyminen (ks. taulukko 2).

Esimerkki 1.2: B. thuringiensis-solujen transformointi suoritetaan tarkalleen samoin kuin esimerkissä 1.1, mutta nyt on elektroporaatioon käytetyn solususpension tilavuus 400 µl.

Tällä menettelyllä voidaan transformoitumisfrekvenssi nostaa 10-kertaiseksi.

Esimerkki 2: B. thuringiensis HD1cryB:n transformointi erilaisilla plasmideilla

Suurin osa kokeista suoritetaan plasmidilla pBC16, joka on B. cereuksesta saatu luonnostaan esiintyvä plasmidi. B. thuringiensis-soluihin voidaan kuitenkin siirtää myös muita luonnostaan esiintyviä plasmideja, kuten esimerkiksi pUB110 ([25]Polack J. ja Novik RP, 1982), pC194 ([24]Horinouchi S ja Weisblum B, 1982) ja pIMI13 ([26]Mahler I ja Halvorson HO, 1980) (ks. taulukko 3).

Myös näiden plasmidien muunnoksilla, jotka soveltuvat paremmin geeniteknologiseen työskentelyyn kuin luonnosta saadut, voidaan keksinnönmukaisella menetelmällä transformoida B. thuringiensis-kanta HD1cryβ, joista plasmideista mainittakoon B. subtiliksen kloonausvektori pBD64 ([27]Gryczan T et al, 1980) sekä plasmidit pBD347, pBD348 ja pUB1664 (ks. taulukko 3; plasmidit pBD347, pBD348 ja pUB1664 voidaan saada tri W. Schurterilta, CIBA-GEIGY AG, Basel).

Taulukossa 3 esitetyistä transformointituloksista ilmenee selvästi, että käytetystä plasmidi-DNA:sta riippumatta saavutetaan keksinnönmukaista transformointimenetelmää käyttäen välillä 10^5 - 10^7 olevat transformoitumisfrekvenssit - yhtä lukuunottamatta.

Esimerkki 3: "Sukkulavektorin" rakentaminen Bacillus thuringiensistä varten

Olemassa olevat E. colin ja B. subtiliksen kaksitoimiset vektorit, kuten esimerkiksi pHV33 ([41]Primrose SB ja Ehrlich SD, Plasmid, 6, 193 - 210, 1981) eivät sovellu B. thuringiensis HD1cryB:lle (ks. taulukko 3).

Voimakkaan kaksitoimisen vektorin rakentamista varten liitetään ensin plasmidin pBC16 suuri EcoRI-fragmentti T4 DNA-ligaasin avulla plasmidin pUC8 EcoRI-kohtaan ([28]Vieira J ja Messing J, 1982). Sitten E. coli-solut transformoidaan tällä rakenteella. Restriktioanalyysillä oikeaksi todetulle rakenteelle annetaan nimeksi pXI62.

Seuraavaksi poistetaan etäällä pUC8-monikytkijäalueesta sijaitseva EcoRI-katkaisukohta. Plasmidi pXI62 linearisoidaan osittaisella EcoRI-katkaisulla. Porrastetut päät täytetään Klenow-polymeraasilla ja liitetään uudestaan yhteen T4 DNA-ligaasin avulla. Transformoidaan E. coli ja restriktioanalyysillä oikeaksi tunnistetulle rakenteelle annetaan nimeksi pXI61. Kuvassa 6 on esitetty plasmidin pXI61 kartta, josta näkyvät

restriktioentsyymien ainoat katkaisukohdat.

Tällä rakenteella voidaan esimerkissä 1 kuvatulla transformointimenetelmällä transformoida B. thuringiensis HD1cryB suoraan.

Koska B. thuringiensis-kannoissa on voimakkaammat rajoitusesteet, ovat transformoitumisfrekvenssit tässä tapauksessa, kun käytetään E. colista peräisin olevaa pXI16-DNA:ta, pienemmät kuin käytettäessä B. thuringiensisis HD1cryB:stä peräisin olevaa plasmidi-DNA:ta (ks. taulukko 3). Tästä huolimatta sopii pXI61 erittäin hyvin kloonauskokeiden suorittamiseen B. thuringiensiksessa.

Esimerkki 4: Kurhd1 delta-endotoksiinigeenin siirtäminen B. thuringiensis- ja B. cereus-kantoihin

Esillä olevassa keksinnössä käytetty DNA-sekvenssi, joka siirretään B. thuringiensikseen tai B. cereukseen ilmentämistä varten, ja joka koodittaa kurhdl delta-endotoksiiniproteiinia, on peräisin plasmidista pK36, joka on talletettu 4. maaliskuuta 1986 talletusnumerolla DSM 3668 kansainväliseksi talletuspaikaksi hyväksyttyyn Deutsche Sammlung von Mikroorganismen-kokoelmaan (Länsi-Saksa) Budapestin sopimuksen mukaisesti, joka koskee mikro-organismien tallettamista patentointitarkoituksia varten.

Yksityiskohtainen selostus δ-endotoksiinigeenin tunnistamisesta ja eristämisestä sekä plasmidin pK36 rakentamisesta sisältyy eurooppalaiseen patenttihakemukseen 0238 441, joka sisällytetään tähän viitteeksi.

pK36-plasmidi-DNA katkaistaan täysin restriktioentsyymeillä PstI ja BamHI ja 4,3 ke:n fragmentti, joka sisältää Kurhd1 delta-endotoksiinigeenin (vrt. kaava I) eristetään agaroosigeelistä. Sitten tämä fragmentti liitetään plasmidiin pXI61, joka sitä ennen on katkaistu PstI:llä ja BamHI:llä ja käsitelty vasikan suolen emäsfosfataasilla. Sitten suoritetaan E. coli HB101:n

transformointi ja restriktioanalyysillä oikeaksi tunnistetulle rakenteelle annetaan nimeksi pXI93. Plasmidin pXI93 restriktiokartta on esitetty kuvassa 7.

Plasmidi pXI93 voidaan siirtää kahdella eri tavalla B. thuringiensis HD1cryB-kantaan.

a) B. thuringiensis-solut transformoidaan E. colista saadulla pXI93-eristeellä suoraan käyttämällä esimerkissä 1 kuvattua keksinnönmukaista transformointimenetelmää.

b) B. subtilis-solut transformoidaan ensin plasmidilla pXI93 kuten Chang ja Cohen, 1979, ovat selostaneet. Transformanteista, jotka sisältävät täydellisen ja ehjän pXI93-plasmidi-DNA:n, eristetään tämä ja sillä transformoidaan B. thuringiensis HD1cryB esimerkissä 1 kuvatun elektroporaatiomenetelmän avulla.

Kumpikin menetelmä johtaa transformantteihin, jotka sisältävät ehjän pXI93-plasmidin, mikä on osoitettavissa restriktioanalyysillä.

Esimerkki 5: B. thuringiensiksessa tapahtuvan delta-endotoksiinigeenin ilmentymisen osoittaminen

B. thuringiensis HD1 cryB:n, HD1cryB (pXI61):n ja HD1cryB (pXI93):n sporuloivia viljelmiä verrataan toisiinsa faasikontrastimikroskoopissa 400-kertaisella suurennuksella. Vain plasmidin pXI93 sisältävistä soluista voidaan osoittaa tyypilliset kaksoispyramidiset proteiinikiteet. Itse viljelmistä otetut uutteet erotetaan elektroforeettisesti SDS-polyakryyliamidigeelissä. Vain plasmidin pXI93 sisältävästä kannasta voitiin osoittaa geelistä 130 000 daltonin proteiinivyöhyke, joka vastaa Kurhd1-geenituotetta (kuva 8a).

"Western blot"-analyysissä (kuva 8b) reagoivat tämä 130 000 daltonin proteiini ja sen hajoamistuotteet spesifisesti polyklonaalisten vasta-aineiden kanssa, jotka on valmistettu B. thurigniensis var. kurstaki HD1:n kideproteiinia vastaan julkaisussa [42] Huber-Lukac H,

1982, kuvatulla menetelmällä. Yksityiskohtainen selostus tästä menetelmästä löytyy eurooppalaisesta patenttihakemuksesta EP 238 441, joka sisällytetään tähän viitteeksi. Plasmidissa pXI93 on toksiinia koodittavan alueen ylävirrassa 156 ep:n DNA-alue, joka sisältää edellä selostetun sporulaatiosta riippuvaisen tandempromoottorin ([29]Wong HC et al, 1983). Tämä sekvenssi riittää delta-endotoskiinigeenin suureen ilmentymiseen B. thuringiensis HD1 cryB:ssä ja B. cereus 569K:ssa.

Esimerkki 6: B. thuringiensis HD1 cryB (pXI93)-rekombinanttien toksisuuden osoittaminen

B. thuringiensis HD1 cryB:tä ja HD1 cryB (pXI93):a kasvatetaan 25°C:ssa sporulaatioravinto-alustassa (GYS-ravintoalusta). Kun itiönmuodostus on tapahtunut täydellisesti, kun tarkistetaan faasikontrastimikroskoopilla, otetaan itiöt ja protoksiinikiteet (mikäli niitä on läsnä) talteen sentrifugoimalla ja sumukuivataan. Näin saatua jauhetta sekoitetaan eri pitoisuuksina Heliothis virescensin (tobacco budworm) L-1-toukkien ravintoon. Toukkien kuolleisuus määritetään 6 vuorokauden kuluttua.

Kuten on odotettavissa, ei protoksiinigeenistä vapaa kanta HD1 cryB ole myrkyllinen Heliothis virescensin suhteen, kun taas plasmidilla pXI93 transformoitunut kanta aiheuttaa annoksesta riippuvaisen kuolleisuuden H. virescensille (taulukko 4). Tämä osoittaa, että elektroporaatiomenetelmällä aikaansaatuja yhdistelmäkantoja todella voidaan käyttää bioinsektisideinä.

Esimerkki 7: Eri B. thuringiensis-ja B. spec. kantojen elektroporaatio

Kohdassa 1 selostettua B. thuringiensis HD1 cryB:n transformointimenetelmää voidaan käyttää myös muihin kantoihin.

Kaikki testatut B. thuringiensis var. kurstaki-

kannat voidaan transformoida tällä menetelmällä hyvin yksinkertaisesti ja tehokkaasti (taulukko 5).

B. cereus-laboratoriokannalla voidaan myös saavuttaa erinomaisia transformoitumisfrekvenssejä. Sama pätee myös muille testatuille B. thuringiensis-muunnoksille (var. israelensis, var. thuringiensis). Sen sijaan B. subtilis transformoituu elektroporaatiomenetelmällä vain hyvin puutteellisesti.

Protoplasteista riippuvaista PEG-menetelmää käyttämällä voitiin sen sijaan B. subtiliksella saavuttaa transformoitumistiheydet 4 x 10^6/µg plasmidi-DNA:ta.

B. subtiliksella saavutetut matalat transformoitumistiheydet käytettäessä elektroporaatiotekniikkaa eivät ole yhteydessä väärin valittuihin parametreihin, kuten esimerkiksi sopimattomaan jännitteeseen tai korkeaan kuolleisuuteen, jonka sähköimpulssi saa aikaan, kuten kuvasta 9 on havaittavissa.

Esimerkki 8: B. thuringiensis HD1 cryβ:n transformointi β-galaktosidaasigeenillä

8.1. BamHI-restriktiokatkaisukohdan rakentaminen välittömästi B. thuringiensis-protoksiinigeenin ensimmäisen AUG-kodonin eteen

Ennenkuin plasmidi piWiTh5 (saatavissa tri M. Geiserilta, CIBA-GEIGY, Basel, Sveitsi) voidaan liittää B. thuringiensiksen Kurhd1 δ-endotoksiinigeenin promoottoriin, pitää protoksiinigeenin AUG-aloituskodonin ympäristössä oleva DNA-sekvenssi ensin muokata.

Tämä muokkaus suoritetaan käyttämällä apuna oligonukleotidivälitteistä mutageneesiä yksisäikeisellä M13mp8-fagilla, joka sisältää δ-endotoksiinigeenin 1,8 ke:n HincII-HindIII-fragmentin, joka kattaa toksiinigeenin 5'-alueen.

Ensin katkaistaan 3 µg plasmidia pK36 (vrt. esimerkki 4) restriktioentsyymeillä HindIII ja HincII. Saatu fragmentti puhdistetaan agaroosigeelielektroforeesilla

ja eristetään sen jälkeen geelistä.

Samanaikaisesti katkaistaan 100 ng M13mp8-RF-fagi-DNA:ta (Biolab, Tozer Road, Beverly MA, 01915, USA, tai mikä tahansa muu valmistaja) restriktioentsyymeillä SmaI ja HindIII, fenoloidaan ja saostetaan lisäämällä etanolia. Näin käsitelty fagi-DNA sekoitetaan sitten 200 ng:n kanssa aiemmin eristettyä protoksiinifragmenttia ja liitetään tähän lisäämällä T4 DNA-ligaasia.

E. coli JM103:n transfektoinnnin jälkeen valitaan 6 valkoista plakkia ja ne analysoidaan restriktiokartoituksen avulla.

Yksi eriste, jossa β-galaktosidaasigeenin ja B. thuringiensiksen Kurhd1 δ-endotoksiinigeenin promoottorin välinen liitos on onnistunut, valitaan ja sille annetaan nimeksi M13mp8/Hinc-Hind.

DNA-synteesilaitteen ("Applied Biosystem DNA Synthesizer") avulla syntetisoidaan oligonukleotidi, jolla on seuraava sekvenssi

(5') GTTCGGATTGGGATCCATAAG (3')

Tämä synteettinen oligonukleotidi on komplementaarinen M13mp8/Hinc-Hind-DNA:n sen alueen kanssa, joka ulottuu Kurdh1 δ-endotoksiinigeenin asemasta 153 asemaan 173 (vrt. kaava I). Edellä esitetyssä oligonukleotidisekvenssissä on kuitenkin asemissa 162 ja 163 epäpari verrattuna kaavan I mukaiseen sekvenssiin, mistä aiheutuu BamHI- restriktiokohdan muodostuminen. Yleinen mutagenointimenetelmä on selostettu julkaisussa JM Zoller ja M Smith ([43]JM Zoller ja M Smith; 19). Noin 5 µg yksisäikeistä M13mp18/Hinc-Hind-fagi-DNA:ta sekoitetaan 0,3 µg:an kanssa fosforyloitua oligonukleotidia 40 µl:n kokonaistilavuudessa. Tätä seosta kuumennetaan 5 minuuttia 65°C:ssa, sitten jäähdytetään ensin 50°C:seen ja seuraavaksi hitaasti 4°C:seen. Tämän jälkeen lisätään puskuria, nukleotiditrifosfaatteja, ATP:tä, T4 DNA-ligaasia ja DNA-polymeraasin suurta fragmenttia ja inkuboidaan yön yli 15°C:ssa julkaisussa [43]JM Zoller

ja M Smith kuvatulla tavalla. Agaroosigeelielektroforeesin jälkeen puhdistetaan kaksisäikeinen DNA ja se siirretään transfektoinnilla E. coli-kantaan JM103. Vaihtoehtoisesti voidaan myös käyttää E. coli-kantaa JM107.

Saaduista plakeista tutkitaan sekvenssit, jotka hybridisoituvat ^{32}P:llä leimatun oligonukleotidin kanssa; fagit tutkitaan DNA:n restriktioanalyysin avulla.

Fagille, jolla on oikea rakenne sikäli, että siinä on BamHI-katkaisukohta välittömästi ennen protoksiinigeenin ensimmäistä AUG-kodonia, annetaan nimeksi M13mp8/Hinc-Hind/Bam.

8.2. β-galaktosidaasigeenin liittäminen δ-endotoksiinipromoottoriin

8.2.1: δ-endotoksiinin promoottori on M13mp8/Hinc-Hind/Bam-fagi-DNA:n 162 ep:n pituisessa EcoRI/BamHI-fragmentissa. RF-fagin DNA katkaistaan restriktioentsyymillä BamHI. Näin syntyneet yli ulottuvat 5'-päät poistetaan käsittelemällä "Mung Bean"-nukleaasilla (Biolabs) valmistajan ohjeiden mukaan. Tämän jälkeen DNA katkaistaan restriktioendonukleaaasilla EcoRI ja 162 ep:n fragmentti eristetään agaroosielektroforeesin jälkeen agaroosigeelistä.

β-galaktosidaasigeeni eristetään plasmidista piWiTh5. Plasmidi piWiTh5-DNA katkaistaan ensin ainoasta HindIII-kohdastaan. Ulostyöntyvät 3'-päät täytetään DNA-polymeraasin Klenow-fragmentin avulla (vrt. [33] Maniatis et al., 1983, ss. 113 - 114) ja muokattu DNA katkaistaan tämän jälkeen restriktioentsyymillä SalI. β-galaktosidaasigeenin sisältävä DNA-fragmentti eristetään agaroosigeelielektroforeesin avulla.

Vektori pXI61 (vrt. esimerkki 3) katkaistaan restriktioentsyymeillä EcoRI ja SalI ja molemmat aiemmin eristetyt fragmentit liitetään vektoriin pXI61.

Tällä yhteenliittämisseoksella transformoidaan E. coli-kanta HB101 tai JM107 ja sen jälkeen valitaan

oikein yhteenliittyneet solukloonit restriktioanalyysin avulla ja sen perusteella, että β-galaktosidaasiaktiivisuus kohdistuu kromogeeniseen X-gal-substraattiin (5-bromi-4-kloori-3-indolyyli-β-D-galaktosidi). Yhdelle kloonille, joka sisältää oikean rakenteen, annetaan nimeksi pXI80.

8.2.2: Vaihtoehtoisessa toteutusmuodossa leikataan irti 162 ep:n pituinen EcoRI/BamHI-fragmentti, joka sisältää δ-endotoksiinin promoottorin, katkaisemalla M13mp8/Hinc-Hind/Bam EcoRI:llä ja BamHI:llä ja sen jälkeen tämä fragmentti eristetään elektroforeettisesti.

β-galaktosidaasigeeni eristetään myös tässä tapauksessa plasmidista piWiTh5 (vrt. esimerkki 8.1). Tällöin plasmidi-DNA katkaistaan restriktioentsyymeillä BamHI ja BglII ja suuri fragmentti eluoidaan geelielektroforeesin jälkeen agaroosigeelistä.

Vektori pHY300 PLK (no. PHY-001; Toyobo Co., Ltd., 2 - 8 Dojima Hama 2-Chome, Kitka-ku, Osaka, 530 Japani), joka on kaupallisesti saatavissa (vrt. esimerkki 9.1), katkaistaan restriktioentsyymeillä EcoRI ja BglII. Tämän jälkeen molemmat aiemmin eristetyt fragmentit liitetään vektoriin pHY300 PLK.

Sitten koko yhteenliittämisseoksella transformoidaan E. coli-kanta JM107 (Bethesda Research Laboratories (BRL), 411 N, Stonestreet Avenue, Rockville, MD 20850, USA). Klooni, joka osoittaa β-galaktosidaasiaktiivisuutta, analysoidaan vielä restriktiokatkaisuilla. Kloonille, jolla on oikea geneettinen rakenne, annetaan nimeksi pXI101.

8.3. B. subtiliksen ja B. thuringiensiksen transformointi plasmideilla pXI80 tai pXI101

pXI80- tai pXI101-plasmidi-DNA:lla transformoidaan ensin ennestään tunnetulla, julkaisussa [13] Chang ja Cohen, 1979, kuvatulla menetelmällä B. subtilis-proto-

plastit.

Valitaan oikea klooni ja transformoiva DNA eristetään standardimenetelmillä ja sillä transformoidaan B. thuringiensis HD1 cryB-solut elektroporaatiota käyttämällä (vrt. esimerkki 1).

Transfromoidut B. thuringiensis-solut maljataan GYS-agarille (sporulaatioravintoalusta), joka sisältää lisäksi X-galia.

Oikein transformoituneet kloonit värjäytyvät sporulaation alkaessa sinisiksi.

B. thuringiensis HD1 cryB-kanta, joka on transformoitu pXI61-vektorilla, pysyy sen sijaan samoissa olosuhteissa valkoisena.

Restriktioanalyysi osoittaa, että oikein transformoituneissa klooneissa on B. thuringiensis-soluissa ehjä pXI80- tai pXI101-plasmidi.

8.4. Sporulaatiosta riippuvaisen promoottorin säätelyssä oleva β-galaktosidaasigeeni

B. thuringiensis HD1 cryB-soluja, jotka sisältävät pXI80- tai pXI101-plasmidin, kasvatetaan edellä kuvatulla tavalla GYS-ravintoalustassa. Eri ajankohtina kasvuvaiheen aikana (sekä vegetatiivisen kasvuvaiheen että itiönmuodostusvaiheen) aikana suoritetaan β-galaktosidaasimääritys julkaisussa [44] JH Miller kuvatulla menetelmällä ("Experiments in Molecular Genetics", Cold Spring Harbor Laboratory, 1971, kokeet 48 ja 49).

Ainoat erot edellä kuvattuun menetelmään verrattuina ovat X-galn käyttö kromogeenisenä substraattina ja värillisen hydrolyysituotteen mittaus, jota solut muodostavat noin 1 tunnin kuluttua.

Sitten solut poistetaan sentrifugoimalla ja jäännöksen optinen tiheys mitataan 650 nm:n aallonpituudella (OD_{650}).

Ilmenee, että optisen tiheyden kasvu riipuu itiönmuodostuksesta. Transformoitumattomat B. thuringiensis-

solut sen sijaan eivät kykene hydrolysoimaan kromogeenisenä substraattina toimivaa X-galia.

Esimerkki 9: Geenipankkien perustaminen Bacillus thuringiensikseen

9.1. pXI200:n rakentaminen

Plasmidi pXI200 on plasmidin pHY300 PLK johdannainen, joka viimeksimainittu plasmidi voidaan ostaa Toyobo Co., Ltd.-firmasta (no. PHY-001; Toyobo Co., Ltd., 2 - 8 Dojima Hama 2-Chome, Kita-ku, Osaka, 530 Japani). Plasmidi pHY300 PLK, jonka rakentaminen on selostettu eurooppalaisessa patenttihakemuksessa EP 162 725, sisältää sekä ampisilliiniresistenssi- (amp^R) että tetrasykliiniresistenssigeenin ($tetr^R$).

Plasmidi pHY300 PLK katkaistaan täysin BglI:llä ja PvuI:llä. Syntyneet restriktiofragmentit erotetaan tämän jälkeen agaroosielektroforeesin avulla. 4,4 ke:n fragmentti eristetään agaroosigeelistä, puhdistetaan ja liitetään sen jälkeen uudestaan yhteen T4 DNA-ligaasilla.

E. coli HB101 transformoidaan koko yhteenliittämiserällä. Kun ~~transformoituneita~~ E. coli HB101-soluja on inkuboitu 37°C:ssa selektiivisessä L-agarissa, joka sisälsi 20 µg/ml tetrasykliiniä, valitaan tetrasykliiniresistentit (Tc^r) transformantit. Ampisilliinille sensitiivisestä (Ap^S) kloonista (100 µg/ml ampisilliiniä) voidaan eristää plasmidi, joka on menettänyt Ap^r-geenissä olevan PstI-kohdan yhdessä 0,3 ke:n pituisen PvuI/BglII-fragmentin kanssa. Tälle plasmidille annetaan nimeksi pXI200.

9.2. Bacillus thuringiensis var. kurstaki HD1:n protoksiinigeenien kloonaus Bacillus thuringiensis HD1 cryA:aan

Bacillus thuringiensis var. kurstaki HD1:n koko

DNA (50 µg) katkaistaan täysin restriktioentsyymeillä PstI ja HpaI. Näin saadut restriktiofragmentit sijoitetaan jatkuvaan sakkaroosigradienttiin (5 - 23 % (massa/tilavuus)), jossa ne erotetaan tiheysgradienttisentrifugoinnin avulla koon mukaan ja kerätään 500 µl:n fraktioiksi. Sentrifugointi suoritetaan TST 41-roottorissa (Kontron -viskuriroottori) korkeintaan 2,4 x 10^5 g:n kiihtyvyydellä 16 tunnissa 15°C:n lämpötilassa. Sitten sijoitetaan 50 µl:n näyte-erät fragmenttikoon määrittämistä varten agaroosigeeliin (0,8 % (massa/tilavuus) agaroosia Tris-asetaatti-EDTA:ssa tai Tris-boraatti-EDTA:ssa; ks. [33] Maniatis et al., 1982). Fraktiot, jotka sisältävät pituudeltaan 3 - 6 ke:n välillä olevia fragmentteja, yhdistetään ja konsentroidaan etanolisaostuksella 10 µl:n pitoisuuteen.

5 µg esimerkissä 9.1 selostettua "sukkulavektoria" pXI200 katkaistaan täysin restriktioentsyymeillä PstI ja SmaI. Saatujen restriktiofragmenttien 5'-fosfaattiryhmät poistetaan tämän jälkeen käsittelemällä vasikan suolen emäsfosfataasilla.

0,2 - 0,3 µg edellä eristettyä HD1-DNA:ta sekoitetään tämän jälkeen 0,5 µg:n kanssa pXI200-vektori-DNA:tta, lisätään 0,1 yksikköä (ns. "Weiss-yksikkö"; yksi yksikkö T4 DNA-ligaasia vastaa entsyymiaktiivisuutta, joka riittää muuttamaan 1 nM (^{32}P):a pyrofosfaatista 37°C:ssa 20 minuutissa Noritiin absorboituvaksi materiaaliksi) T4 DNA-ligaasia ja inkuboidaan yön yli 14°C.ssa. Koko yhteenliittämisseoksella transformoidaan tämän jälkeen Bacillus thuringiensis HD1 cryB-solut käyttämällä elektroporaatiota (vrt. esimerkki 1). Elektroporoidut B. thuringiensis-solut maljataan tämän jälkeen selektiiviselle sporulaatioagarille, joka sisältää 20 µg/ml tetrasykliiniä valintaravintoalustana, ja inkuboidaan 30°C:ssa täydelliseen itiönmuodostukseen asti.

9.3. B. thuringiensis-protoksiiniproteiiniin kohdistuvien monoklonaalisten vasta-aineiden valmistus

Monoklonaalisten vasta-aineiden tuottaminen Bacillus thuringiensis var. kurstaki HD1:n δ-endotoksiinia vastaan suoritetaan julkaisussa [36] Huber-Lukač, (1984) tai julkaisussa [37] Huber-Lukač et al., (1986) selostetulla tavalla.

Vasta-aineiden valmistuksessa käytetyt hybridoomasolut ovat fuusiotuotteita, jotka ovat syntyneet Sp2/0-Ag-myeloomasoluista (selostettu julkaisussa [45] Shulman et al., 1978; saatavissa "American Type Culture Collection"-kokoelmista, Rockville, Maryland, USA) ja pernan lymfosyyteistä, jotka on saatu BALB/c-hiiristä, jotka on sitä ennen immunisoitu B. thuringiensis var. kurstaki HD1:n δ-endotoksiinilla.

Tällä tavalla voidaan saada monoklonaalisia vasta-aineita, jotka kohdistuvat spesifisesti B. thuringiensis-δ-endotoksiiniin. Erityisen edullisia ovat monoklonaaliset vasta-aineet, jotka sitoutuvat spesifisesti protoksiiniproteiinin N-terminaalisessa puolikkaassa olevaan epitooppiin (esim. viitteen Huber-Lukač et al.,1986 vasta-aine 54.1), tai jotka tunnistavat epitoopin protoksiiniproteiinin C-terminaalisessa vakiopäässä, kun proteiini on aktiivinen perhosten suhteen (esim. viitteen Huber-Lukač et al., 1986 vasta-aine 83.16).

Immunoseulontaan voidaan kyllä käyttää myös muita monoklonaalisia tai polyklonaalisia vasta-aineita (vrt. esimerkki 9.4).

9.4. Immunologinen seulonta

Immunologiseen seulontaan käytetään esimerkin 9.3 mukaisesti valmistettuja tai muita sopivia monoklonaalisia vasta-aineita.

Ensin kiinnitetään B. thuringiensis-soluista sporu-

laatiossa vapautuneet kideproteiinit siirtokalvojen avulla (esim. Pall Biodyne Transfer-Membran; Pall Ultrafine Filtration Corporation, Glen Cove, N.Y.) siten, että nämä sijoitetaan maljojen päälle noin 5 minuutiksi. Sitten kalvoja pestään 5 minuuttia TBST-puskurissa (0,05 % (massa/tilavuus) Tween 20, 10 mM Tris/HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl kahdesti tislatussa vedessä) ja sen jälkeen inkuboidaan 15-30 min. epäspesifisten sidosten tukkimiseksi seoksessa, jossa on TBST-puskuria ja 1 % (massa/tilavuus) kevytmaitoa.

Näin esivalmistettuja kalvoja inkuboidaan sitten yön yli protoksiinispesifisten vasta-aineiden (vasta-aineiden 54.1 ja 83.16 seos, [37] Huber-Lukač et al., (1986)) kanssa. Sitoutumattomat vasta-aineet poistetaan pesemällä kolme kertaa, 5 - 10 minuuttia kullakin kerralla, kalvot TBST-puskurilla. Jotta saadaan osoitetuksi vasta-aineisiin sitoutunut protoksiini, inkuboidaan kalvoja toisen vasta-aineen kanssa. Toisena vasta-aineena toimii emsäfosfataasilla leimattu anti-hiiri-vasta-aine, jota voidaan ostaa esimerkiksi Bio-Rad-firmasta (luettelon no. 170-6520, vuohessa tuotettu anti-hiiri-IgG(H+L)-emäsfosfataasikonjugaatti). Kun on inkuboitu 30 minuuttia, pestään sitoutumattomat sekundääriset vasta-aineet edellä kuvatulla tavalla pesemällä kalvot kolme kertaa (kulloinkin 5 - 10 minuuttia) TBST-puskurilla. Sen jälkeen inkuboidaan kalvoja substraattiseoksella, jossa on NBT:tä (p-nitrosinitetratsoliumkloridia; nitrosininen tetratsoliumkloridi) ja BCIP:tä (5-bromi-4-kloori-3-indolyylifosfaatti-p-toluidiinisuola). Entsymaattinen reaktio suoritetaan valmistajan (Bio-Rad; 1414 Harbour Way South, Richmond CA, 94804, USA) ohjeiden mukaan.

Positiiviset eli protoksiinia sisältävät kloonit voidaan tunnistaa hyvin yksinkertaisesti violetin värin avulla. Väri johtuu entsymaattisesta reaktiosta, joka tapahtuu emäsfosfataasin ja edellä mainitun substraattiseoksen välillä. Esimerkissä 9.2 selostetussa trans-

formoinnissa, kun käytettiin mainittua yhteenliittämisseosta, saatiin 800 - 1000 transformanttia. Näistä antoi 2 pesäkettä yksiselitteisesti positiivisen signaalin edellä selostetussa entsyymireaktiossa.

Positiivisista klooneista, joiden voitiin kuvatun entsyymireaktion perusteella osoittaa ilmentävän protoksiinigeeniä, eristettiin plasmidi-DNA. Restriktioanalyysillä ja vertaamalla ennestään tunnettuihin restriktiokarttoihin voitiin kloonatut protoksiinigeenit karakterisoida tarkemmin ja lopuksi identifioida.

Molemmat kloonit sisältävät yhdistelmäplasmidin, jossa on 4,3 ke:n insertti. Kun suoritettiin restriktiokatkaisut HindIII:lla, PvuII:lla, EcoRI:llä ja XbaI:llä, voitiin insertissä oleva geeni tunnistaa vertaamalla B. thuringiensis var. kurstaki HD1:n endotoksiinigeenin ennestään tunnettuihin restriktiokarttoihin. Kummassakin tapauksessa on kyseessä kurhd1-geeni, joka tunnetaan myös 5,3 ke:n protoksiinigeeninä, ja joka on selostettu julkaisussa [5] Geiser et al., 1986.

Tämä suoraan B. thuringiensikseen kloonattu ja immunologisella seulonnalla tunnistettu geeni hybridisoituu lisäksi plasmidissa pK36 ([5] Geiser et al., 1986) olevan 5,3 ke:n geenin 1847 ep:n pituisen BamHI/HindIII-fragmentin kanssa. SDS/PAGE-analyysissä osoittavt molemmat kloonit protoksiinille tyypillistä 130 000 daltonin vyöhykettä, joka Western blot-analyysissä ([46] Towbin et al., 1979) reagoi spesifisesti edellä selostettujen (ks. esimerkki 9.4) monoklonaalisten vasta-aineiden kanssa.

Taulukot

Taulukko 1: Ennen ja jälkeen elektroporaatiota 4°C:ssa tapahtuvan inkuboinnin kestoajan vaikutus transformoitumistiheyteen. B. thuringiensis HD1 cryB transformoitiin elektroporaatiomenetelmää käyttäen 0,2 µg:lla plasmidia pBC16 erää kohti.

Näyte	1	2	3	4	5	6	7	8
Esi-inkubointi* (minuuttia)	0	5	10	20	20	20	20	20
Jälki-inkubointi* (minuuttia)	20	20	20	20	0	5	10	20
Transformoitumisfrekvenssi (transformanttia/ µg plasmidi-DNA:ta)	2.6×10^6	2.1×10^6	2.2×10^6	2.3×10^6	2.5×10^6	1.9×10^6	3.3×10^6	1.7×10^6

* Inkubointi 4°C:ssa DNA:n lisäämisen ja elektroporaation välillä.

** Inkubointi 4°C:ssa elektroporaation ja ilmentämisjakson välillä.

Taulukko 2: Plasmidin pBC16 tetrasykliiniresistenssin ilmentyminen B. thuringiensis HD1cryB:n transformoinnin jälkeen. B. thuringiensis HD1 cryB transformoitiin pBC16-plasmidi-DNA:lla käyttämällä keksinnönmukaista elektroporaatiomenetelmää. Kun on inkuboitu eri pituisia aikoja LB-ravintoalustassa 30°C:ssa, valitaan transformoituneet solut maljaamalla LB-agarissa, joka sisältää tetrasykliiniä 20 µg/ml.

Tetrasykliini-resistenssin ilmentymisaika (tuntia)	Transformoitumisfrekvenssi (transformantteja/µg DNA:ta)	Elävien solujen lukumäärä
0.5	0	4×10^8
1	1.6×10^6	10^9
2	8.8×10^6	1.4×10^9
3	8×10^6	1.6×10^9

Taulukko 3: B. thuringiensis-kannan HD1 cryB transformointi eri plasmideilla

Plasmidi	Alkuperä	Resistenssimerkki[1] gram-negatiivinen	gram-positiivinen	Transformoitumisfrekvenssi[2]
luonnossa esiintyvät plasmidit				
pBC16	B. cereus	-	Tc	1.9×10^6
pUB110	Staphylococcus aureus	-	Km, Ble	3.3×10^6*
pC194	S. aureus	-	Cm	6×10^6*
pIM13	B. subtilis	-	Em	1.8×10^5
muokatut plasmidit/kloonausvektorit				
pBD64	pUB110	-	Km, Cm	5×10^6
pBD347	pIM13	-	Cm	2.9×10^5
pBD348	pIM13	-	Em, Cm	1.1×10^5
pUB1664	pUB110	-	Cm, Em	3.5×10^4
"sukkulavektorit"				
pHV33	pBR322/pC194,	Amp, Tc	Cm	< 50*
pK61	pUC8/ pBC16,	Amp	Tc	2.8×10^4

1: Tc: tetrasykliini; Km: kanamysiini; Ble: bleomysiini; Cm: kloramfenikoli; Em; erytromysiini.

2: Kaikki plasmidi-DNA:t ovat peräisin B. thuringiensis HD1 cryB:sta lukuunottamatta *-merkittyjä, jotka on eristetty B. subtilis LBG4468:sta.

Taulukko 4: B. thuringiensis-kantojen HD1 cryB ja HD1 cryB (pXI 93) biologinen testaus Heliothis virescensiä vastaan.
Sumukuivattuja, sporuloineita viljelmiä (itiöt ja (jos läsnä) protoksiinikiteet) sekoitettiin mainitut määrät Heliothis virescensin L-1 toukkien ravintoon.

Itiöiden ja protoksiinikiteiden pitoisuus (µg/g ravintoa)	H. virescensin kuolleisuus (%) 1 jonka aiheutti:	
	HD1 cryB	HD1 cryB (pXI93)
200	0	57
100	0	43
50	3	27
25	0	10
12.5	0	0

Taulukko 5: *B. thuringiensis*-, *B. cereus*- ja *B. subtilis*-solujen transformoituvuus. Kaikki kannat transformoitiin plasmidilla pBC16 käyttämällä kohdassa 1 selostettua elektroporaatiomenetelmää.

Kanta	Transformoitumis-frekvenssi[1]
B. thuringiensis var. kurstaki	
HD1cryB	1
HD1 dipel	0.25
HD1-9	0.9
HD 73	0.1
HD 191	0.5
B. thuringiensis var. thuringiensis	
HD 2-D6-4	13.8
B. thuringiensis var. israelensis	
LBG B-4444	2.6
B. cereus	
569 K	7.5
B. subtilis	
LBG B-4468	0.0002

[1] suhteelliset arvot vertaamalla *B. thuringiensis* var. kurstaki HD1 cryB:llä saavutettuun transformoitumisfrekvenssiin, joka määriteltiin 1:ksi.

Mikro-organismien talletus

Jokaisesta seuraavassa luetelluista mikro-organismeista, joita esillä olevassa keksinnössä käytetään, talletettiin viljelmä kansainväliseksi talletuspaikaksi hyväksyttyyn "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen"-kokoelmaan (Braunschweig, Länsi-Saksa) noudattamalla Budapestin sopimusta, joka koskee mikro-organismien tallettamista patentointitarkoituksia varten.Mainittu kansainvälinen talletuspaikka on antanut selvityksen talletettujen näytteiden elinkykyisyydestä.

Talletetut mikro-organismit

Mikro-organismit	Talletus-päivämäärä	Talletus-numero	Elinkykyisyys-todistuksen päivämäärä
HB 101 (pK36) (E. coli HB101 transformoitu plasmidilla DNA)	4. maalisk. 1986	DSM 3668	7. maalisk. 1986
*HD1 cryβ (Bacillus thuringiensis var. kurstaki HD1 cryβ	4. toukok.1988	DSM 4574	4. toukok. 1988
*HD1 cryβ (*pK 61) (B. thuringiensis transformoitu *pK61-plasmidi-DNA:lla	4. toukok.1988	DSM 4572	4. toukok. 1988
*HD1 cryβ (*pK 93) (B. thuringiensis HD1 cryβ transformoitu *pK93-plasmidi-DNA:lla)	4. toukok. 1988	DSM 4571	4. toukok. 1988
569 K (Bacillus cereus 569 K)	4. toukok. 1988	DSM 4575	4. toukok. 1988
569 K (*pK 93) (B. cereus 569 K transformoitu *pK93-plasmidi-DNA:lla)	4. toukok. 1988	DSM 4573	4. toukok. 1988

Prioriteettidokumentissa plasmidien nimeämisessä käytetty sisäinen merkintä pK on ulkomaanhakemuksessa muutettu virallisesti hyväksytyksi merkinnäksi pXI.

Asporogeenisten B. thuringiensis HD1-mutanttien merkintä cryβ on myös muutettu merkinnäksi cryB.

Kirjallisuusluettelo

1. Goldberg L ja Margalit J, Mosquito News, 37: 355-358, 1977
2. Krieg A et al, Z. Ang. Ent., 96: 500-508, 1983
3. Schnepf, HE ja Whiteley HR, Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 78: 2893-2897, 1981
4. Klier A et al, The EMBO J, 1: 791-799, 1982
5. Geiser M et al. Gene, 48: 109-118, 1986
6. Haider MZ et al., Gene, 52: 285-290, 1987
7. Gonzalez JM et al.. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 6951-6955, 1982
8. Obukowicz MG et al., J. Bacteriol., 168: 982-989, 1986
9. Donovan LP et al., Mol. Gen. Genet., 214: 365-372, 1988
10. Schnepf HE ja Whitely HR, J. Biol.Chem., 260: 6273, 1985
11. Klier A et al, Mol. Gen. Genet., 191: 257-262, 1983
12. Bibb JJ et al, Nature, 274: 398-400, 1978
13. Chang S ja Cohen SN, Molec. Gen. Genet., 168: 111-115, 1979
14. Brown BJ ja Carlton BC, J. Bacteriol., 142: 508-512, 1980
15. Kondo JK ja McKay LL, Appl. Environ. Microbiol., 48: 252-259, 1984
16. Wirth R. et al, J. bacteriol., 165: 831-836, 1986
17. Yoshihama M et al,, J.Bacteriol., 162: 591-597, 1985
18. Alikhanian SJ et al, J. Bacteriol., 146, 7-9, 1981
19. Martin PA et al, J. Bacteriol., 145: 980-983, 1981
20. Fischer HM, Arch. Microbiol., 139: 213-217, 1984
21. Schall D, Genübertragung zwischen Isolaten von Bacillus thuringiensis durch Protoplastentransformation und -fusion. Dissertation, Universität Tübingen, 1986
22. Shivarova N, Zeitschr. Allgem. Mikrobiol., 23: 595-599, 1983
23. Youston AA ja Rogoff MH, J. Bacteriol., 100: 1229-1236, 1969
24. Horinouchi S, ja Weisblum B, J. Bacteriol., 150: 815-825, 1982
25. Polak J ja Novick RP Plasmid, 7: 152-162, 1982
26. Mahler J ja Halvorson HO, J. Gen. Microbiol., 120: 259-263, 1980
27. Gryczan T et al, J. Bacteriol., 141: 246-253, 1980
28. Vieira J ja Messing J, Gene, 19: 259-268, 1982
29. Wong et al, J. Biol. Chem., 258: 1960 - 1967, 1983
30. Bolivar et al, Gene 2: 95 - 113, 1977
31. Norrander et al, Gene, 26: 101 - 104, 1983

32. Bevan et al, Nature, 304: 184 - 187, 1983
33. Maniatis et al, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, USA, 1982
34. Hinnen et al, Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 75: 1929-1933, 1978
35. Young RA et al, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 80: 1194-1198, 1983
36. Huber-Lucač M, 'Zur Interaktion des delta-Endotoxins von Bacillus thuringiensis mit monoklonalen Antikörpern und Lipiden', Dissertation Nr. 7547, ETH Zürich, 1984
37. Huber-Lucač M et al, Infect. Immunol., 54: 228-232, 1986
38. McCutcheon's, 1986 International McCutcheon's Emulsifiers & Detergents, The Manufacturing Confections Publishing Co., Glen Rock, NJ, USA
39. Stahly DP et al, Biochem. Biophys. Res. Comm, 84: 581-588, 1978
40. Bernhard K et al, J. Bacteriol., 133: 897-903, 1978
41. Primrose SB, Ehrlich SD, Plasmid 6: 193-201, 1981
42. Huber-Lukac H, Dissertation, Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich, Schweiz, No. 7050, 1982
43. Zoller JM ja Smith M, Nucl. Acids Res., 10: 6487, 1982
44. Miller JH, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, 1972
45. Shulman et al, Nature, 276: 269, 1978
46. Towbin H et al, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 76: 4350-4354, 1979

Patenttikirjallisuus

EP 162,725
EP 238,441
WO 86/01536
US-P 4,448,885
US-P 4,447,036
US-P 4,237,224
US-P 4,468,464

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä gram-positiivisten bakteerien, *B. thuringiensiksen* tai *B. cereuksen* suoraksi, kohdennetuksi ja toistettavaksi geneettiseksi muuntamiseksi, **tunnettu** siitä, että

(a) eristetään siirrettävä DNA,
(b) kloonataan eristetty DNA vektorissa, joka kykenee replikoitumaan bakteeri-isäntäsolussa, joka on *B. thuringiensis* tai *B. cereus*, heterologisessa kloonausjärjestelmässä,
(c) eristetään kloonattu DNA ja siirretään se elektroporaatiolla suoraan mainittuun bakteerisoluun siten, että impulssi(e)n eksponentiaalinen vaimenemisaika on alueella noin 2 - noin 50 ms, ja
(d) viljellään transformoituja bakteerisoluja ja mahdollisesti eristetään kloonattu vektori-DNA.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että siirrettävä DNA liitetään ensin ilmentämissekvensseihin, jotka ovat toiminnallisia bakteerisolussa, joka on *B. thuringiensis* -solu tai *B. cereus* -solu, ja mahdollisesti eristetään ilmentymistuote.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että elektroporaatiolla suoritettava siirtäminen sisältää seuraavat menetelmävaiheet:
a) *B. thuringiensis* tai *B. cereus* -solujen kasvatukseen sopivaan ravintoalustaan valmistetaan sopivan solutiheyden omaava solususpensio ja säädetään kasvulle riittävä ilmastus,
b) erotetaan solut solususpensiosta ja uudelleensuspendoidaan ne seuraavaksi suoritettavaan elektroporaatioon sopivaan inokulaatiopuskuriin,
c) lisätään DNA-näyte elektroporaatioon sopivassa pitoisuudessa,

d) sijoitetaan kohdissa b) ja c) selostettu erä elektroporaatiolaitteeseen,
e) suoritetaan yksi tai useampia lyhytaikaisia kondensaattorin purkamisia solususpensioon, jotta saadaan aikaan lyhytaikaisia korkeita sähkökentänvoimakkuuksia, jolloin solususpensioon kohdistetun impulssin eksponentiaalinen vaimenemisaika on alueella noin 2 - noin 50 ms,
f) haluttaessa elektroporoituja soluja jälki-inkuboidaan,
g) elektroporoidut solut maljataan sopivalle valinta-alustalle ja
h) transformoituneet solut valikoidaan.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että kohdassa a) mainitun solususpension valmistukseen käytetään *B. thuringiensis* -itiöitä.

5. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mainitun *Bacillus*-solususpension optinen tiheys (OD_{550}) on 0,1 - 1,0.

6. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että kohdassa b) mainittu inokulointipuskuri on osmoottisesti stabiloitu fosfaattipuskuri, jossa on stabiloivana aineena sokeria tai sokerialkoholia.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mainitun fosfaattipuskurin pH-arvo on 5,0 - 8,0.

8. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että *Bacillus*-solujen inkubointi ennen elektroporaatiota, sen aikana ja sen jälkeen tapahtuu lämpötilassa välillä 0 °C - 35 °C.

9. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että lisätyn DNA-näytteen pitoisuus on 1 ng - 20 µg.

10. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että kentänvoimakkuus on 3000 V/cm - 4500 V/cm.

11. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mainittu valintaravintoalusta sisältää *B. thuringiensiksen* tai *B. cereuksen* valintaan sopivaa
a) antibioottia, joka on tetrasykliini, kanamysiini, kloramfenikoli tai erytromysiini, tai
b) kromogeenista substraattia.

12. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mainittuihin bakteerisoluihin, *B. thuringiensikseen* tai *B. cereukseen* siirrettävä yhdistelmä-DNA on alkuperältään homologista tai heterologista tai kyseessä on homologisen ja heterologisen DNA:n yhdistelmä.

13. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mainittu yhdistelmä-DNA sisältää yhden tai useampia rakennegeenejä sekä *Bacillus thuringiensiksessa* tai *Bacillus cereuksessa* tai näissä kummassakin toimivia, sääteleviä 3'- ja 5'-reunasekvenssejä, jotka on liitetty toimivalla tavalla rakennegeeniin (-geeneihin) niin, että mainitun (mainittujen) rakennegeenin (-geenien) ilmentyminen tapahtuu *Bacillus thuringiensiksessa* tai *Bacillus cereuksessa* tai näissä kummassakin.

14. Patenttivaatimuksen 13 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että 3'- ja 5'-DNA-reunasekvensseihin sisältyy itiönmuodostuksesta riippuvainen *Bacillus thuringiensiksen* promoottori.

15. Patenttivaatimuksen 13 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mainittu rakennegeeni koodittaa δ-endotoksiinipolypeptidiä, joka esiintyy luonnostaan *B. thuringiensiksessa* tai polypeptidiä, joka on tämän kanssa olennaisesti homologinen eli sillä on ainakin olennaisesti *B. thurin-*

giensiksen kiteisen δ-endotoksiinipolypeptidin toksisuusominaisuudet.

16. Patenttivaatimuksen 15 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mainittu δ-endotoksiinia koodittava DNA-sekvenssi on olennaisesti homologinen vähintään luonnollista δ-toksiinia koodittavan sekvenssin osan tai osien kanssa, jo(t)ka vastaa(vat) insektisidisestä aktiivisuudesta.

17. Patenttivaatimuksen 15 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mainittu polypeptidi on olennaisesti homologinen sopivien *B. thuringiensis* -alalajien *kurstaki, berliner, alesti, sotto, tolworthi, dendrolimus, tenebrionis* tai *israelensis* δ-endotoksiinipolypeptidin kanssa.

18. Patenttivaatimuksen 15 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mainittu δ-endotoksiinia koodittava DNA-sekvenssi on *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1:n DNA-fragmentti, joka on kaavassa I nukleotidien 156 ja 3623 välissä, tai mikä tahansa lyhyempi DNA-fragmentti, joka vielä koodittaa polypeptidiä, jolla on hyönteismyrkkyominaisuuksia:

Kaava I

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

        60         70         80         90        100
GTGCATTTTT TCATAAGATG AGTCATATGT TTTAAATTGT AGTAATGAAA

       110        120        130        140        150
AACAGTATTA TATCATAATG AATTGGTATC TTAATAAAAG AGATGGAGGT

       160        170        180        190        200
AACTTATGGA TAACAATCCG AACATCAATG AATGCATTCC TTATAATTGT

       210        220        230        240        250
```

TTAAGTAACC CTGAAGTAGA AGTATTAGGT GGAGAAAGAA TAGAAACTGG

260 270 280 290 300

TTACACCCCA ATCGATATTT CCTTGTCGCT AACGCAATTT CTTTTGAGTG

310 320 330 340 350

AATTTGTTCC CGGTGCTGGA TTTGTGTTAG GACTAGTTGA TATAATATGG

360 370 380 390 400

GGAATTTTTG GTCCCTCTCA ATGGGACGCA TTTCTTGTAC AAATTGAACA

410 420 430 440 450

GTTAATTAAC CAAAGAATAG AAGAATTCGC TAGGAACCAA GCCATTTCTA

460 470 480 490 500

GATTAGAAGG ACTAAGCAAT CTTTATCAAA TTTACGCAGA ATCTTTTAGA

510 520 530 540 550

GAGTGGGAAG CAGATCCTAC TAATCCAGCA TTAAGAGAAG AGATGCGTAT

560 570 580 590 600

TCAATTCAAT GACATGAACA GTGCCCTTAC AACCGCTATT CCTCTTTTTG

610 620 630 640 650

CAGTTCAAAA TTATCAAGTT CCTCTTTTAT CAGTATATGT TCAAGCTGCA

660 670 680 690 700

AATTTACATT TATCAGTTTT GAGAGATGTT TCAGTGTTTG GACAAAGGTG

710 720 730 740 750

GGGATTTGAT GCCGCGACTA TCAATAGTCG TTATAATGAT TTAACTAGGC

760 770 780 790 800

TTATTGGCAA CTATACAGAT CATGCTGTAC GCTGGTACAA TACGGGATTA

810 820 830 840 850

GAGCGTGTAT GGGGACCGGA TTCTAGAGAT TGGATAAGAT ATAATCAATT

860 870 880 890 900
TAGAAGAGAA TTAACACTAA CTGTATTAGA TATCGTTTCT CTATTTCCGA

910 920 930 940 950
ACTATGATAG TAGAACGTAT CCAATTCGAA CAGTTTCCCA ATTAACAAGA

960 970 980 990 1000
GAAATTTATA CAAACCCAGT ATTAGAAAAT TTTGATGGTA GTTTTCGAGG

1010 1020 1030 1040 1050
CTCGGCTCAG GGCATAGAAG GAAGTATTAG GAGTCCACAT TTGATGGATA

1060 1070 1080 1090 1100
TACTTAACAG TATAACCATC TATACGGATG CTCATAGAGG AGAATATTAT

1110 1120 1130 1140 1150
TGGTCAGGGC ATCAAATAAT GGCTTCTCCT GTAGGGTTTT CGGGGCCAGA

1160 1170 1180 1190 1200
ATTCACTTTT CCGCTATATG GAACTATGGG AAATGCAGCT CCACAACAAC

1210 1220 1230 1240 1250
GTATTGTTGC TCAACTAGGT CAGGGCGTGT ATAGAACATT ATCGTCCACT

1260 1270 1280 1290 1300
TTATATAGAA GACCTTTTAA TATAGGGATA AATAATCAAC AACTATCTGT

1310 1320 1330 1340 1350
TCTTGACGGG ACAGAATTTG CTTATGGAAC CTCCTCAAAT TTGCCATCCG

1360 1370 1380 1390 1400
CTGTATACAG AAAAAGCGGA ACGGTAGATT CGCTGGATGA AATACCGCCA

1410 1420 1430 1440 1450

CAGAATAACA ACGTGCCACC TAGGCAAGGA TTTAGTCATC GATTAAGCCA

1460 1470 1480 1490 1500
TGTTTCAATG TTTCGTTCAG GCTTTAGTAA TAGTAGTGTA AGTATAATAA

1510 1520 1530 1540 1550
GAGCTCCTAT GTTCTCTTGG ATACATCGTA GTGCTGAATT TAATAATATA

1560 1570 1580 1590 1600
ATTCCTTCAT CACAAATTAC ACAAATACCT TTAACAAAAT CTACTAATCT

1610 1620 1630 1640 1650
TGGCTCTGGA ACTTCTGTCG TTAAAGGACC AGGATTTACA GGAGGAGATA

1660 1670 1680 1690 1700
TTCTTCGAAG AACTTCACCT GGCCAGATTT CAACCTTAAG AGTAAATATT

1710 1720 1730 1740 1750
ACTGCACCAT TATCACAAAG ATATCGGGTA AGAATTCGCT ACGCTTCTAC

1760 1770 1780 1790 1800
CACAAATTTA CAATTCCATA CATCAATTGA CGGAAGACCT ATTAATCAGG

1810 1820 1830 1840 1850
GGAATTTTTC AGCAACTATG AGTAGTGGGA GTAATTTACA GTCCGGAAGC

1860 1870 1880 1890 1900
TTTAGGACTG TAGGTTTTAC TACTCCGTTT AACTTTTCAA ATGGATCAAG

1910 1920 1930 1940 1950
TGTATTTACG TTAAGTGCTC ATGTCTTCAA TTCAGGCAAT GAAGTTTATA

1960 1970 1980 1990 2000
TAGATCGAAT TGAATTTGTT CCGGCAGAAG TAACCTTTGA GGCAGAATAT

2010 2020 2030 2040 2050

GATTTAGAAA GAGCACAAAA GGCGGTGAAT GAGCTGTTTA CTTCTTCCAA

2060 2070 2080 2090 2100
TCAAATCGGG TTAAAAACAG ATGTGACGGA TTATCATATT GATCAAGTAT

2110 2120 2130 2140 2150
CCAATTTAGT TGAGTGTTTA TCTGATGAAT TTTGTCTGGA TGAAAAAAAA

2160 2170 2180 2190 2200
GAATTGTCCG AGAAAGTCAA ACATGCGAAG CGACTTAGTG ATGAGCGGAA

2210 2220 2230 2240 2250
TTTACTTCAA GATCCAAACT TTAGAGGGAT CAATAGACAA CTAGACCGTG

2260 2270 2280 2290 2300
GCTGGAGAGG AAGTACGGAT ATTACCATCC AAGGAGGCGA TGACGTATTC

2310 2320 2330 2340 2350
AAAGAGAATT ACGTTACGCT ATTGGGTACC TTTGATGAGT GCTATCCAAC

2360 2370 2380 2390 2400
GTATTTATAT CAAAAAATAG ATGAGTCGAA ATTAAAAGCC TATACCCGTT

2410 2420 2430 2440 2450
ACCAATTAAG AGGGTATATC GAAGATAGTC AAGACTTAGA AATCTATTTA

2460 2470 2480 2490 2500
ATTCGCTACA ATGCCAAACA CGAAACAGTA AATGTGCCAG GTACGGGTTC

2510 2520 2530 2540 2550
CTTATGGCCG CTTTCAGCCC CAAGTCCAAT CGGAAAATGT GCCCATCATT

2560 2570 2580 2590 2600
CCCATCATTT CTCCTTGGAC ATTGATGTTG GATGTACAGA CTTAAATGAG

2610 2620 2630 2640 2650

GACTTAGGTG TATGGGTGAT ATTCAAGATT AAGACGCAAG ATGGCCATGC

2660 2670 2680 2690 2700

AAGACTAGGA AATCTAGAAT TTCTCGAAGA GAAACCATTA GTAGGAGAAG

2710 2720 2730 2740 2750

CACTAGCTCG TGTGAAAAGA GCGGAGAAAA AATGGAGAGA CAAACGTGAA

2760 2770 2780 2790 2800

AAATTGGAAT GGGAAACAAA TATTGTTTAT AAAGAGGCAA AAGAATCTGT

2810 2820 2830 2840 2850

AGATGCTTTA TTTGTAAACT CTCAATATGA TAGATTACAA GCGGATACCA

2860 2870 2880 2890 2900

ACATCGCGAT GATTCATGCG GCAGATAAAC GCGTTCATAG CATTCGAGAA

2910 2920 2930 2940 2950

GCTTATCTGC CTGAGCTGTC TGTGATTCCG GGTGTCAATG CGGCTATTTT

2960 2970 2980 2990 3000

TGAAGAATTA GAAGGGCGTA TTTTCACTGC ATTCTCCCTA TATGATGCGA

3010 3020 3030 3040 3050

GAAATGTCAT TAAAAATGGT GATTTTAATA ATGGCTTATC CTGCTGGAAC

3060 3070 3080 3090 3100

GTGAAAGGGC ATGTAGATGT AGAAGAACAA AACAACCACC GTTCGGTCCT

3110 3120 3130 3140 3150

TGTTGTTCCG GAATGGGAAG CAGAAGTGTC ACAAGAAGTT CGTGTCTGTC

3160 3170 3180 3190 3200

CGGGTCGTGG CTATATCCTT CGTGTCACAG CGTACAAGGA GGGATATGGA

3210 3220 3230 3240 3250

GAAGGTTGCG TAACCATTCA TGAGATCGAG AACAATACAG ACGAACTGAA

3260 3270 3280 3290 3300
GTTTAGCAAC TGTGTAGAAG AGGAAGTATA TCCAAACAAC ACGGTAACGT

3310 3320 3330 3340 3350
GTAATGATTA TACTGCGACT CAAGAAGAAT ATGAGGGTAC GTACACTTCT

3360 3370 3380 3390 3400
CGTAATCGAG GATATGACGG AGCCTATGAA AGCAATTCTT CTGTACCAGC

3410 3420 3430 3440 3450
TGATTATGCA TCAGCCTATG AAGAAAAAGC ATATACAGAT GGACGAAGAG

3460 3470 3480 3490 3500
ACAATCCTTG TGAATCTAAC AGAGGATATG GGGATTACAC ACCACTACCA

3510 3520 3530 3540 3550
GCTGGCTATG TGACAAAAGA ATTAGAGTAC TTCCCAGAAA CCGATAAGGT

3560 3570 3580 3590 3600
ATGGATTGAG ATCGGAGAAA CGGAAGGAAC ATTCATCGTG GACAGCGTGG

3610 3620 3630 3640 3650
AATTACTTCT TATGGAGGAA TAATATATGC TTTATAATGT AAGGTGTGCA

3660 3670 3680 3690 3700
AATAAAGAAT GATTACTGAC TTGTATTGAC AGATAAATAA GGAAATTTTT

3710 3720 3730 3740 3750
ATATGAATAA AAAACGGGCA TCACTCTTAA AAGAATGATG TCCGTTTTTT

3760 3770 3780 3790 3800
GTATGATTTA ACGAGTGATA TTTAAATGTT TTTTTTGCGA AGGCTTTACT

3810 3820 3830 3840 3850

TAACGGGGTA CCGCCACATG CCCATCAACT TAAGAATTTG CACTACCCCC

3860 3870 3880 3890 3900
AAGTGTCAAA AAACGTTATT CTTTCTAAAA AGCTAGCTAG AAAGGATGAC

3910 3920 3930 3940 3950
ATTTTTTATG AATCTTTCAA TTCAAGATGA ATTACAACTA TTTTCTGAAG

3960 3970 3980 3990 4000
AGCTGTATCG TCATTTAACC CCTTCTCTTT TGGAAGAACT CGCTAAAGAA

4010 4020 4030 4040 4050
TTAGGTTTTG TAAAAAGAAA ACGAAAGTTT TCAGGAAATG AATTAGCTAC

4060 4070 4080 4090 4100
CATATGTATC TGGGGCAGTC AACGTACAGC GAGTGATTCT CTCGTTCGAC

4110 4120 4130 4140 4150.
TATGCAGTCA ATTACACGCC GCCACAGCAC TCTTATGAGT CCAGAAGGAC

4160 4170 4180 4190 4200
TCAATAAACG CTTTGATAAA AAAGCGGTTG AATTTTTGAA ATATATTTTT

4210 4220 4230 4240 4250
TCTGCATTAT GGAAAAGTAA ACTTTGTAAA ACATCAGCCA TTTCAAGTGC

4260 4270 4280 4290 4300
AGCACTCACG TATTTTCAAC GAATCCGTAT TTTAGATGCG ACGATTTTCC

4310 4320 4330 4340 4350
AAGTACCGAA ACATTTAGCA CATGTATATC CTGGGTCAGG TGGTTGTGCA

4360
CAAACTGCAG

19. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että kohdassa (b) käytetty vektori on kaksitoiminen vektori, joka kykenee replikoitumaan paitsi *B. thuringiensis* tai *B. cereus* -bakteerisoluissa, myös vähintään yhdessä tai myös useammassa muussa heterologisessa isäntäorganismissa, ja se voidaan tunnistaa sekä homologisessa että heterologisessa isäntäsysteemissä.

20. Patenttivaatimuksen 19 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mainittu kaksitoiminen vektori koostuu sekä homologista että heterologista alkuperää olevasta plasmidi-DNA:sta, joka ainakin osittain koodittaa sellaisia toimintoja, jotka ovat tarpeen replikaatiossa ja valinnassa, jotka tapahtuvat sekä *B. thuringiensiksessa* että sille läheistä sukua olevassa *B. cereuksessa* tai näissä kummassakin että vähintään yhdessä tai myös useammassa heterologisessa isäntäorganismissa.

21. Patenttivaatimuksen 20 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mainittu kaksitoiminen vektori koostuu pelkästään heterologista alkuperää olevasta plasmidi-DNA:sta.

22. Patenttivaatimuksen 19 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mainittu kaksitoiminen vektori on plasmidi pXI61 (pK61), joka on, transformoituna kantaan *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1 cryB, talletettu numerolla DSM 4572.

23. Patenttivaatimuksen 19 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mainittu kaksitoiminen vektori on plasmidi pXI93 (pK93), joka on, transformoituna kantaan *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1 cryB, talletettu numerolla DSM 4571.

Patentkrav

1. Förfarande för direkt, inriktad och reproducerbar genetisk modifiering av gram-positiva bakterier *B. thuringiensis* eller *B. cereus*, **kännetecknat** därav, att

(a) det DNA som skall införas isoleras,
(b) sålunda isolerat DNA klonas i en vektor som kan replikeras i en bakterievärdcell, som är *B. thuringiensis* eller *B. cereus*, i ett heterologt kloningssystem,
(c) sålunda klonat DNA isoleras och införes via elektroporation direkt i nämnda bakteriecell så, att tiden för exponentiellt avklingande av urladdningen(arna) ligger i ett område av ca 2 ms till ca 50 ms, och
(d) sålunda transformerade bakterieceller odlas och klonat vektor-DNA eventuellt isoleras.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, **kännetecknat** därav, att det DNA som skall införas först ligeras med expressionssekvenser som är funktionsdugliga i en bakteriecell, som är en *B. thuringiensis*-cell eller en *B. cereus*-cell, och att expressionsprodukten eventuellt isoleras.

3. Förfarande enligt patentkravet 2, **kännetecknat** därav, att införandet via elektroporation omfattar följande förfaringssteg:
a) framställning av en cellsuspension med lämplig celldensitet i ett för uppodling av *B. thuringiensis*- eller *B. cereus*-celler lämpligt näringsmedium och inställning av en för tillväxten av cellerna tillräcklig luftning,
b) avskiljande av cellerna från cellsuspensionen och återuppslamning i en för efterföljande elektroporation lämplig ympningsbuffert,
c) tillsats av ett DNA-prov i en för elektroporationen lämplig koncentration,
d) införande av den under punkt b) och c) beskrivna satsen i en elektroporationsapparat,

e) utförande av en eller flera kortvariga kondensatorurladdningar över cellsuspensionen för åstadkommande av kortvariga höga elektriska fältstyrkor, varvid tiden för exponentiellt avklingande av urladdningen(arna) ligger i ett område av ca 2 ms till ca 50 ms,
f) eventuell efterinkubation av de för elektroporation utsatta cellerna,
g) utbredning av de för elektroporation utsatta cellerna på ett lämpligt selektionsmedium, och
h) utsållning av de transformerade cellerna.

4. Förfarande enligt patentkravet 3, **kännetecknat** därav, att för framställning av den under punkt a) nämnda cellsuspensionen användes sporer från *B. thuringiensis*.

5. Förfarande enligt patentkravet 3, **kännetecknat** därav, att nämnda *Bacillus*-cellsuspension uppvisar en optisk densitet (OD_{550}) av 0,1-1,0.

6. Förfarande enligt patentkravet 3, **kännetecknat** därav, att den under punkt b) nämnda ympningsbufferten utgöres av en osmotiskt stabiliserad fosfatbuffert, som innehåller socker eller sockeralkohol som stabiliserande medel.

7. Förfarande enligt patentkravet 6, **kännetecknat** därav, att nämnda fosfatbuffert uppvisar ett pH-värde av 5,0-8,0.

8. Förfarande enligt patentkravet 3, **kännetecknat** därav, att inkubationen av *Bacillus*-cellerna genomföres före, under och efter elektroporationen vid en temperatur av mellan 0 och 35°C.

9. Förfarande enligt patentkravet 3, **kännetecknat** därav, att koncentrationen av det tillsatta DNA-provet ger en mängd av från 1 ng till 20 µg.

10. Förfarande enligt patentkravet 3, **kännetecknat** därav, att värdet på fältstyrkan uppgår till 3000 - 4500 V/cm.

11. Förfarande enligt patentkravet 3, **kännetecknat** därav, att nämnda selektionsmedium innefattar ett för selektion av *B. thuringiensis* respektive *B. cereus* lämpligt
a) antibiotikum, som är tetracyklin, kanamycin, kloramfenikol eller erytromycin, eller
b) kromogent substrat.

12. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 2, **kännetecknat** därav, att för införande i nämnda bakterieceller av *B. thuringiensis* eller *B. cereus* använt rekombinant DNA uppvisar homologt eller heterologt ursprung eller utgöres av en kombination av homologt eller heterologt DNA.

13. Förfarande enligt patentkravet 2, **kännetecknat** därav, att nämnda rekombinanta DNA innehåller en eller flera strukturgener samt 3'- och 5'-flankerande, i *Bacillus thuringiensis* eller *Bacillus cereus* eller i bägge dessa funktionsdugliga reglersekvenser som är sammanlänkade på ett opererbart sätt med strukturgenen(erna) så, att det sker expression av nämnda strukturgen(er) i *Bacillus thuringiensis* eller *Bacillus cereus* eller i bägge dessa.

14. Förfarande enligt patentkravet 13, **kännetecknat** därav, att de 3'- och 5'-flankerande DNA-sekvenserna innefattar en sporuleringsberoende promotor från *Bacillus thuringiensis*.

15. Förfarande enligt patentkravet 13, **kännetecknat** därav, att nämnda strukturgen kodar en δ-endotoxin-polypeptid, som förekommer naturligt i *B. thuringiensis*, eller en polypeptid som är väsentligen homolog därmed, dvs som uppvisar åtminstone väsentligen samma toxicitetsegenskaper som en kristallin δ-endotoxinpolypeptid från *B. thuringiensis*.

16. Förfarande enligt patentkravet 15, **kännetecknat** därav, att nämnda δ-endotoxin-kodande DNA-sekvens är väsentligen homolog med åtminstone det parti eller de partier av sekvensen som kodar naturligt δ-endotoxin, som är ansvarig(a) för den insekticida aktiviteten.

17. Förfarande enligt patentkravet 15, **kännetecknat** därav, att nämnda polypeptid är väsentligen homolog med en δ-endotoxinpolypeptid från lämpliga underarter av *B. thuringiensis*, dvs *kurstaki*, *berliner*, *alesti*, *sotto*, *tolworthi*, *dendrolimus*, *tenebrionis* eller *israelensis*.

18. Förfarande enligt patentkravet 15, **kännetecknat** därav, att nämnda δ-endotoxin-kodande DNA-sekvens utgöres av ett DNA-fragment från *B. thuringiensis* var *kurstaki* HD1, som är anordnad mellan nukleotiderna 156 och 3623 i formel I eller utgöres av varje godtyckligt, kortare DNA-fragment, som fortfarande kodar en polypeptid med insekttoxiska egenskaper:

Formel I

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

        60          70          80          90         100
GTGCATTTTT TCATAAGATG AGTCATATGT TTTAAATTGT AGTAATGAAA

       110         120         130         140         150
AACAGTATTA TATCATAATG AATTGGTATC TTAATAAAAG AGATGGAGGT

       160         170         180         190         200
AACTTATGGA TAACAATCCG AACATCAATG AATGCATTCC TTATAATTGT

       210         220         230         240         250
```

TTAAGTAACC CTGAAGTAGA AGTATTAGGT GGAGAAAGAA TAGAAACTGG

260 270 280 290 300

TTACACCCCA ATCGATATTT CCTTGTCGCT AACGCAATTT CTTTTGAGTG

310 320 330 340 350

AATTTGTTCC CGGTGCTGGA TTTGTGTTAG GACTAGTTGA TATAATATGG

360 370 380 390 400

GGAATTTTTG GTCCCTCTCA ATGGGACGCA TTTCTTGTAC AAATTGAACA

410 420 430 440 450

GTTAATTAAC CAAAGAATAG AAGAATTCGC TAGGAACCAA GCCATTTCTA

460 470 480 490 500

GATTAGAAGG ACTAAGCAAT CTTTATCAAA TTTACGCAGA ATCTTTTAGA

510 520 530 540 550

GAGTGGGAAG CAGATCCTAC TAATCCAGCA TTAAGAGAAG AGATGCGTAT

560 570 580 590 600

TCAATTCAAT GACATGAACA GTGCCCTTAC AACCGCTATT CCTCTTTTTG

610 620 630 640 650

CAGTTCAAAA TTATCAAGTT CCTCTTTTAT CAGTATATGT TCAAGCTGCA

660 670 680 690 700

AATTTACATT TATCAGTTTT GAGAGATGTT TCAGTGTTTG GACAAAGGTG

710 720 730 740 750

GGGATTTGAT GCCGCGACTA TCAATAGTCG TTATAATGAT TTAACTAGGC

760 770 780 790 800

TTATTGGCAA CTATACAGAT CATGCTGTAC GCTGGTACAA TACGGGATTA

810 820 830 840 850

GAGCGTGTAT GGGGACCGGA TTCTAGAGAT TGGATAAGAT ATAATCAATT

860 870 880 890 900

TAGAAGAGAA TTAACACTAA CTGTATTAGA TATCGTTTCT CTATTTCCGA

910 920 930 940 950

ACTATGATAG TAGAACGTAT CCAATTCGAA CAGTTTCCCA ATTAACAAGA

960 970 980 990 1000

GAAATTTATA CAAACCCAGT ATTAGAAAAT TTTGATGGTA GTTTTCGAGG

1010 1020 1030 1040 1050

CTCGGCTCAG GGCATAGAAG GAAGTATTAG GAGTCCACAT TTGATGGATA

1060 1070 1080 1090 1100

TACTTAACAG TATAACCATC TATACGGATG CTCATAGAGG AGAATATTAT

1110 1120 1130 1140 1150

TGGTCAGGGC ATCAAATAAT GGCTTCTCCT GTAGGGTTTT CGGGGCCAGA

1160 1170 1180 1190 1200

ATTCACTTTT CCGCTATATG GAACTATGGG AAATGCAGCT CCACAACAAC

1210 1220 1230 1240 1250

GTATTGTTGC TCAACTAGGT CAGGGCGTGT ATAGAACATT ATCGTCCACT

1260 1270 1280 1290 1300

TTATATAGAA GACCTTTTAA TATAGGGATA AATAATCAAC AACTATCTGT

1310 1320 1330 1340 1350

TCTTGACGGG ACAGAATTTG CTTATGGAAC CTCCTCAAAT TTGCCATCCG

1360 1370 1380 1390 1400

CTGTATACAG AAAAAGCGGA ACGGTAGATT CGCTGGATGA AATACCGCCA

1410 1420 1430 1440 1450

CAGAATAACA ACGTGCCACC TAGGCAAGGA TTTAGTCATC GATTAAGCCA

1460 1470 1480 1490 1500
TGTTTCAATG TTTCGTTCAG GCTTTAGTAA TAGTAGTGTA AGTATAATAA

1510 1520 1530 1540 1550
GAGCTCCTAT GTTCTCTTGG ATACATCGTA GTGCTGAATT TAATAATATA

1560 1570 1580 1590 1600
ATTCCTTCAT CACAAATTAC ACAAATACCT TTAACAAAAT CTACTAATCT

1610 1620 1630 1640 1650
TGGCTCTGGA ACTTCTGTCG TTAAAGGACC AGGATTTACA GGAGGAGATA

1660 1670 1680 1690 1700
TTCTTCGAAG AACTTCACCT GGCCAGATTT CAACCTTAAG AGTAAATATT

1710 1720 1730 1740 1750
ACTGCACCAT TATCACAAAG ATATCGGGTA AGAATTCGCT ACGCTTCTAC

1760 1770 1780 1790 1800
CACAAATTTA CAATTCCATA CATCAATTGA CGGAAGACCT ATTAATCAGG

1810 1820 1830 1840 1850
GGAATTTTTC AGCAACTATG AGTAGTGGGA GTAATTTACA GTCCGGAAGC

1860 1870 1880 1890 1900
TTTAGGACTG TAGGTTTTAC TACTCCGTTT AACTTTTCAA ATGGATCAAG

1910 1920 1930 1940 1950
TGTATTTACG TTAAGTGCTC ATGTCTTCAA TTCAGGCAAT GAAGTTTATA

1960 1970 1980 1990 2000
TAGATCGAAT TGAATTTGTT CCGGCAGAAG TAACCTTTGA GGCAGAATAT

2010 2020 2030 2040 2050

GATTTAGAAA GAGCACAAAA GGCGGTGAAT GAGCTGTTTA CTTCTTCCAA

2060 2070 2080 2090 2100
TCAAATCGGG TTAAAAACAG ATGTGACGGA TTATCATATT GATCAAGTAT

2110 2120 2130 2140 2150
CCAATTTAGT TGAGTGTTTA TCTGATGAAT TTTGTCTGGA TGAAAAAAAA

2160 2170 2180 2190 2200
GAATTGTCCG AGAAAGTCAA ACATGCGAAG CGACTTAGTG ATGAGCGGAA

2210 2220 2230 2240 2250
TTTACTTCAA GATCCAAACT TTAGAGGGAT CAATAGACAA CTAGACCGTG

2260 2270 2280 2290 2300
GCTGGAGAGG AAGTACGGAT ATTACCATCC AAGGAGGCGA TGACGTATTC

2310 2320 2330 2340 2350
AAAGAGAATT ACGTTACGCT ATTGGGTACC TTTGATGAGT GCTATCCAAC

2360 2370 2380 2390 2400
GTATTTATAT CAAAAAATAG ATGAGTCGAA ATTAAAAGCC TATACCCGTT

2410 2420 2430 2440 2450
ACCAATTAAG AGGGTATATC GAAGATAGTC AAGACTTAGA AATCTATTTA

2460 2470 2480 2490 2500
ATTCGCTACA ATGCCAAACA CGAAACAGTA AATGTGCCAG GTACGGGTTC

2510 2520 2530 2540 2550
CTTATGGCCG CTTTCAGCCC CAAGTCCAAT CGGAAAATGT GCCCATCATT

2560 2570 2580 2590 2600
CCCATCATTT CTCCTTGGAC ATTGATGTTG GATGTACAGA CTTAAATGAG

2610 2620 2630 2640 2650

GACTTAGGTC TATGGGTGAT ATTCAAGATT AAGACGCAAG ATGGCCATGC

2660 2670 2680 2690 2700

AAGACTAGGA AATCTAGAAT TTCTCGAAGA GAAACCATTA GTAGGAGAAG

2710 2720 2730 2740 2750

CACTAGCTCG TGTGAAAAGA GCGGAGAAAA AATGGAGAGA CAAACGTGAA

2760 2770 2780 2790 2800

AAATTGGAAT GGGAAACAAA TATTGTTTAT AAAGAGGCAA AAGAATCTGT

2810 2820 2830 2840 2850

AGATGCTTTA TTTGTAAACT CTCAATATGA TAGATTACAA GCGGATACCA

2860 2870 2880 2890 2900

ACATCGCGAT GATTCATGCG GCAGATAAAC GCGTTCATAG CATTCGAGAA

2910 2920 2930 2940 2950

GCTTATCTGC CTGAGCTGTC TGTGATTCCG GGTGTCAATG CGGCTATTTT

2960 2970 2980 2990 3000

TGAAGAATTA GAAGGGCGTA TTTTCACTGC ATTCTCCCTA TATGATGCGA

3010 3020 3030 3040 3050

GAAATGTCAT TAAAAATGGT GATTTTAATA ATGGCTTATC CTGCTGGAAC

3060 3070 3080 3090 3100

GTGAAAGGGC ATGTAGATGT AGAAGAACAA AACAACCACC GTTCGGTCCT

3110 3120 3130 3140 3150

TGTTGTTCCG GAATGGGAAG CAGAAGTGTC ACAAGAAGTT CGTGTCTGTC

3160 3170 3180 3190 3200

CGGGTCGTGG CTATATCCTT CGTGTCACAG CGTACAAGGA GGGATATGGA

3210 3220 3230 3240 3250

GAAGGTTGCG TAACCATTCA TGAGATCGAG AACAATACAG ACGAACTGAA

3260 3270 3280 3290 3300

GTTTAGCAAC TGTGTAGAAG AGGAAGTATA TCCAAACAAC ACGGTAACGT

3310 3320 3330 3340 3350

GTAATGATTA TACTGCGACT CAAGAAGAAT ATGAGGGTAC GTACACTTCT

3360 3370 3380 3390 3400

CGTAATCGAG GATATGACGG AGCCTATGAA AGCAATTCTT CTGTACCAGC

3410 3420 3430 3440 3450

TGATTATGCA TCAGCCTATG AAGAAAAAGC ATATACAGAT GGACGAAGAG

3460 3470 3480 3490 3500

ACAATCCTTG TGAATCTAAC AGAGGATATG GGGATTACAC ACCACTACCA

3510 3520 3530 3540 3550

GCTGGCTATG TGACAAAAGA ATTAGAGTAC TTCCCAGAAA CCGATAAGGT

3560 3570 3580 3590 3600

ATGGATTGAG ATCGGAGAAA CGGAAGGAAC ATTCATCGTG GACAGCGTGG

3610 3620 3630 3640 3650

AATTACTTCT TATGGAGGAA TAATATATGC TTTATAATGT AAGGTGTGCA

3660 3670 3680 3690 3700

AATAAAGAAT GATTACTGAC TTGTATTGAC AGATAAATAA GGAAATTTTT

3710 3720 3730 3740 3750

ATATGAATAA AAAACGGGCA TCACTCTTAA AAGAATGATG TCCGTTTTTT

3760 3770 3780 3790 3800

GTATGATTTA ACGAGTGATA TTTAAATGTT TTTTTTGCGA AGGCTTTACT

3810 3820 3830 3840 3850

TAACGGGGTA CCGCCACATG CCCATCAACT TAAGAATTTG CACTACCCCC

3860 3870 3880 3890 3900
AAGTGTCAAA AAACGTTATT CTTTCTAAAA AGCTAGCTAG AAAGGATGAC

3910 3920 3930 3940 3950
ATTTTTTATG AATCTTTCAA TTCAAGATGA ATTACAACTA TTTTCTGAAG

3960 3970 3980 3990 4000
AGCTGTATCG TCATTTAACC CCTTCTCTTT TGGAAGAACT CGCTAAAGAA

4010 4020 4030 4040 4050
TTAGGTTTTG TAAAAAGAAA ACGAAAGTTT TCAGGAAATG AATTAGCTAC

4060 4070 4080 4090 4100
CATATGTATC TGGGGCAGTC AACGTACAGC GAGTGATTCT CTCGTTCGAC

4110 4120 4130 4140 4150
TATGCAGTCA ATTACACGCC GCCACAGCAC TCTTATGAGT CCAGAAGGAC

4160 4170 4180 4190 4200
TCAATAAACG CTTTGATAAA AAAGCGGTTG AATTTTTGAA ATATATTTTT

4210 4220 4230 4240 4250
TCTGCATTAT GGAAAAGTAA ACTTTGTAAA ACATCAGCCA TTTCAAGTGC

4260 4270 4280 4290 4300
AGCACTCACG TATTTTCAAC GAATCCGTAT TTTAGATGCG ACGATTTTCC

4310 4320 4330 4340 4350
AAGTACCGAA ACATTTAGCA CATGTATATC CTGGGTCAGG TGGTTGTGCA

4360
CAAACTGCAG

19. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 2, **kännetecknat** därav, att den i steg (b) använda vektorn utgöres av en bifunktionell vektor som kan replikeras förutom i bakteriella *B. thuringiensis*- eller *B. cereus*-celler även i åtminstone en eller flera andra heterologa värdorganismer och som är identifierbar såväl i ett homologt som i ett heterologt värdsystem.

20. Förfarande enligt patentkravet 19, **kännetecknat** därav, att nämnda bifunktionella vektor består av ett plasmid-DNA av både homologt och heterologt ursprung, som åtminstone delvis kodar sådana funktioner som behövs vid replikation och selektion, som sker både i *B. thuringiensis* och i till denna närsläktad *B. cereus* eller i bägge dessa och åtminstone i en eller också flera heterologa värdorganismer.

21. Förfarande enligt patentkravet 20, **kännetecknat** därav, att nämnda bifunktionella vektor består enbart av plasmid-DNA av heterologt ursprung.

22. Förfarande enligt patentkravet 19, **kännetecknat** därav, att nämnda bifunktionella vektor är plasmid pXI61 (pK61), som, transformerad i stammen *B. thuringiensis* var *kurstaki* HD1 cryB, deponerats under nummer DSM 4572.

23. Förfarande enligt patentkravet 19, **kännetecknat** därav, att nämnda bifunktionella vektor är plasmid pXI93 (pK93), som, transformerad i stammen *B. thuringiensis* var *kurstaki* HD1 cryB, deponerats under nummer DSM 4571.

Fig. 1

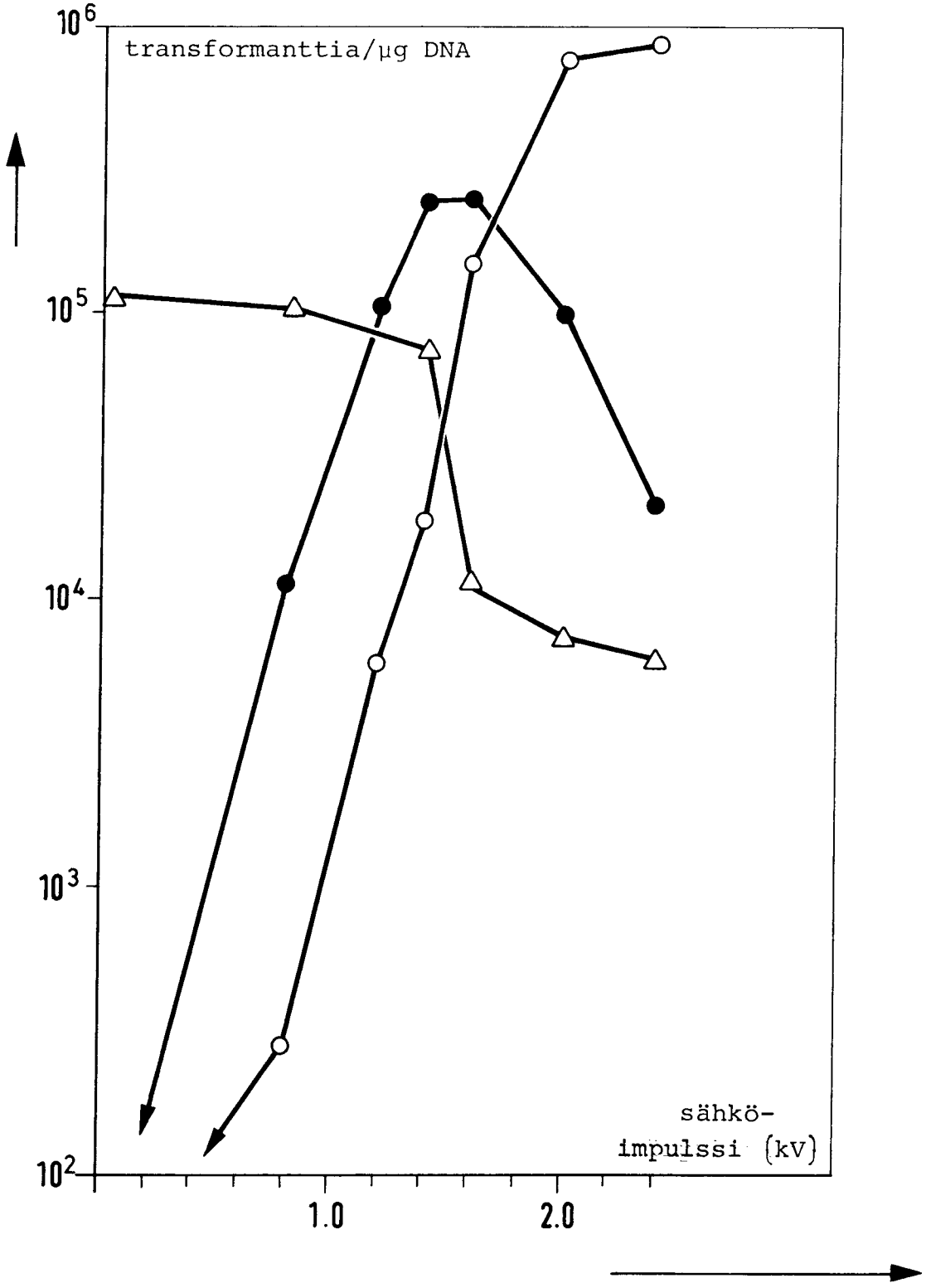

10^6
transformanttia/µg DNA
10^5
10^4
10^3
10^2
1.0
2.0
sähkö-
impulssi (kV)

Fig. 2

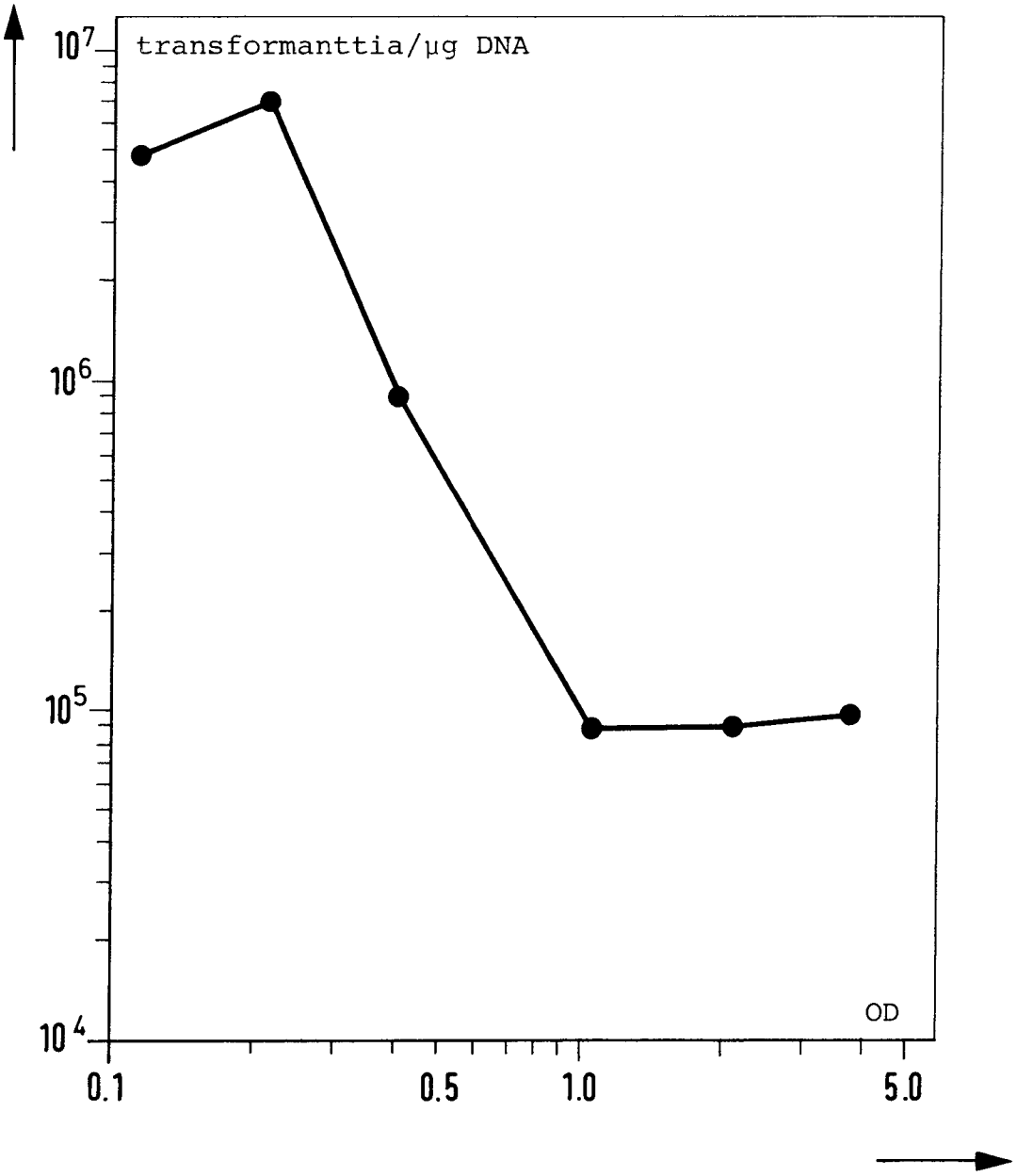


Fig. 3

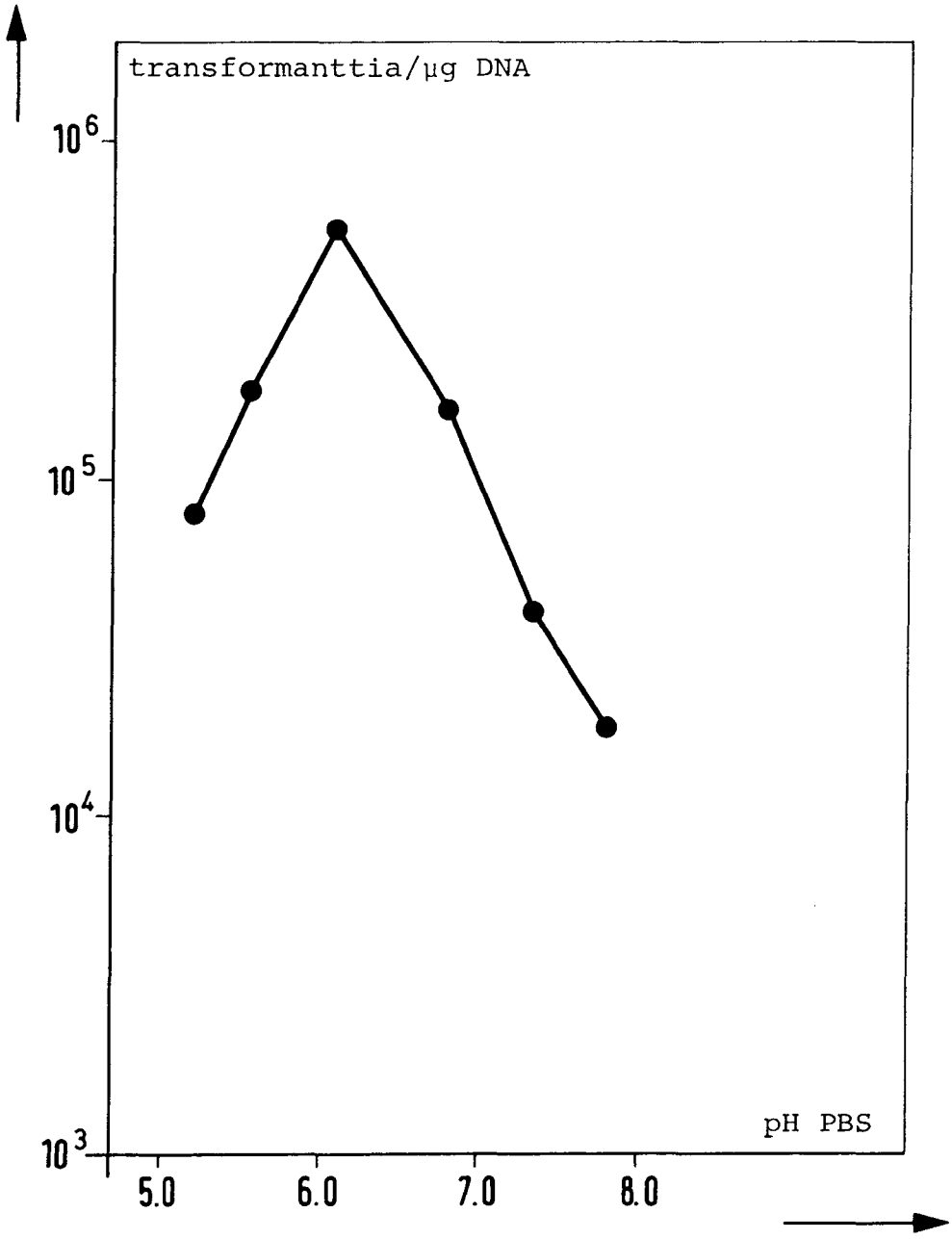
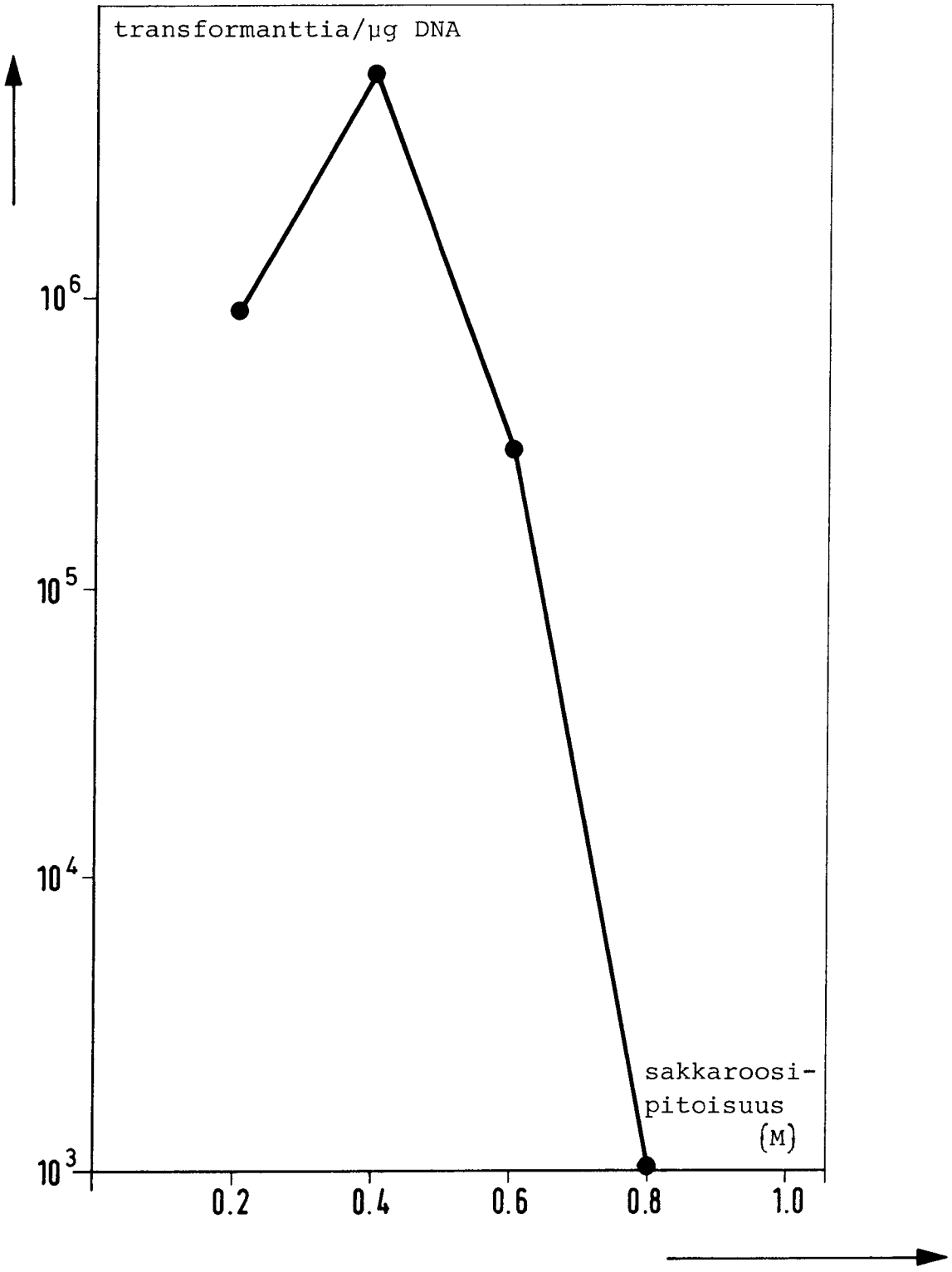


Fig. 4


transformanttia/µg DNA
10^6
10^5
10^4
10^3
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
sakkaroosi-
pitoisuus
(M)

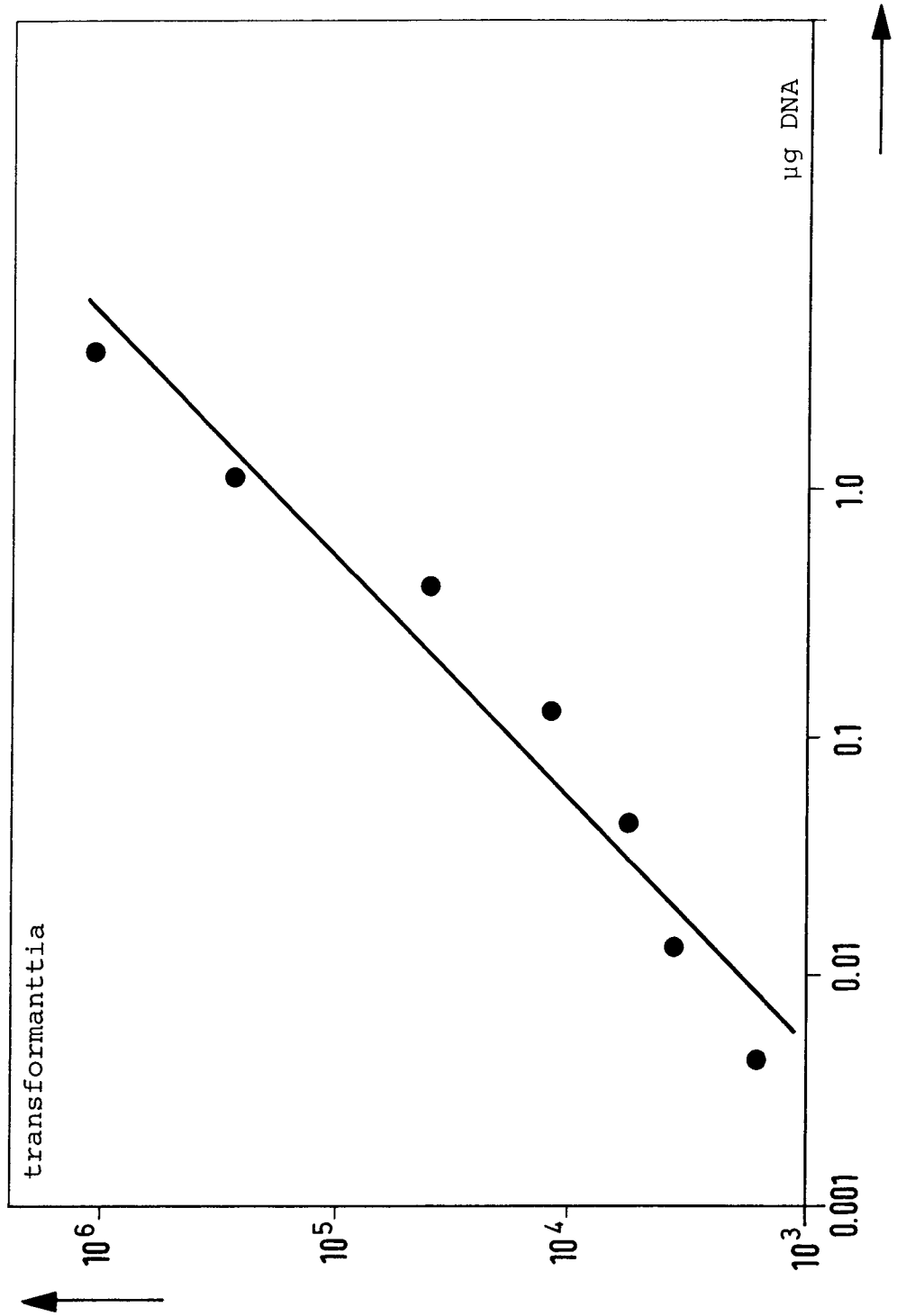


Fig. 5

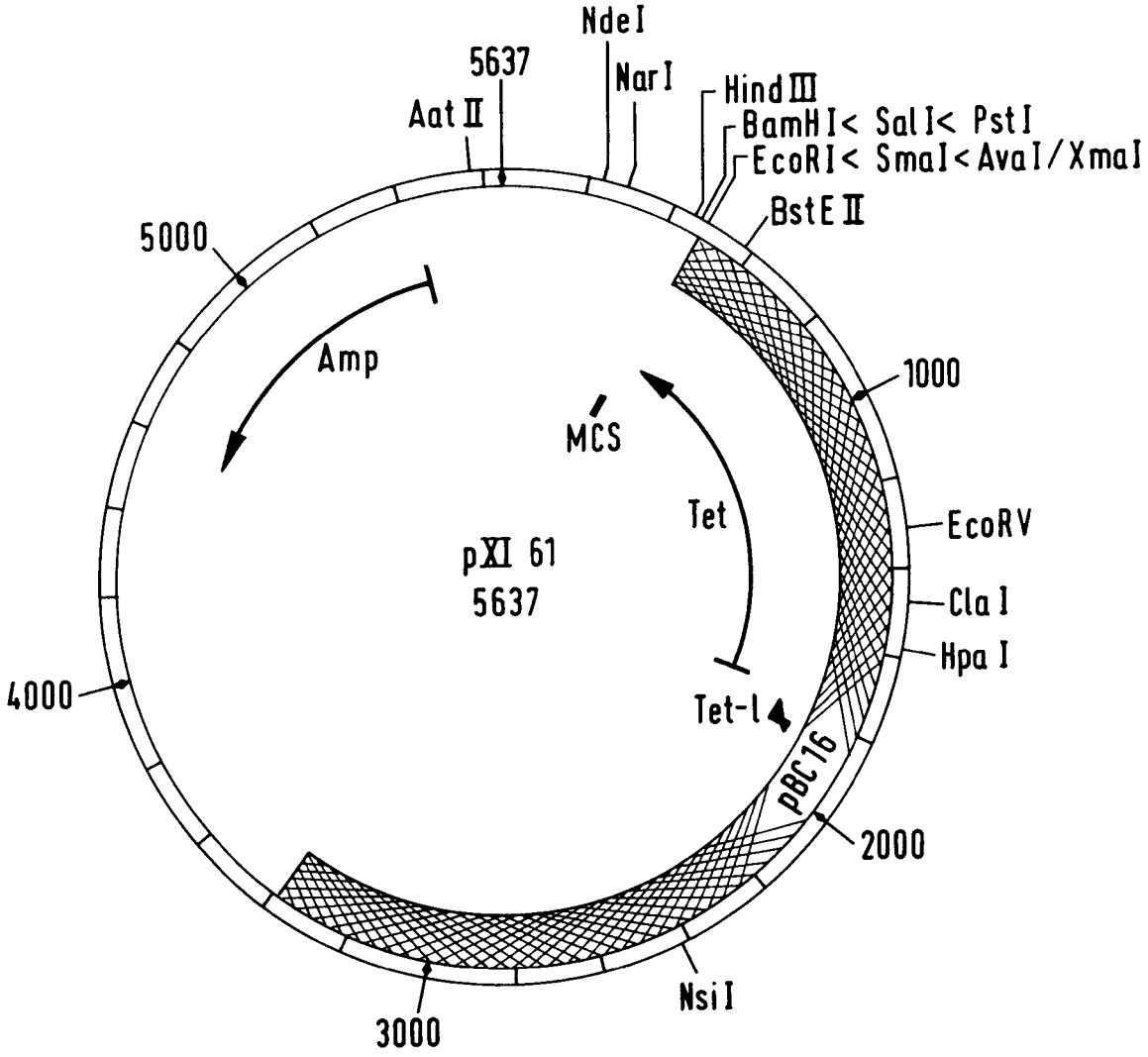

NdeI
5637
NarI
HindIII
AatII
BamHI< SalI< PstI
EcoRI< SmaI<AvaI/XmaI
BstEII
5000
1000
Amp
MCS
Tet
pXI 61
5637
EcoRV
ClaI
HpaI
4000
Tet-l
pBC16
2000
NsiI
3000

Fig. 6

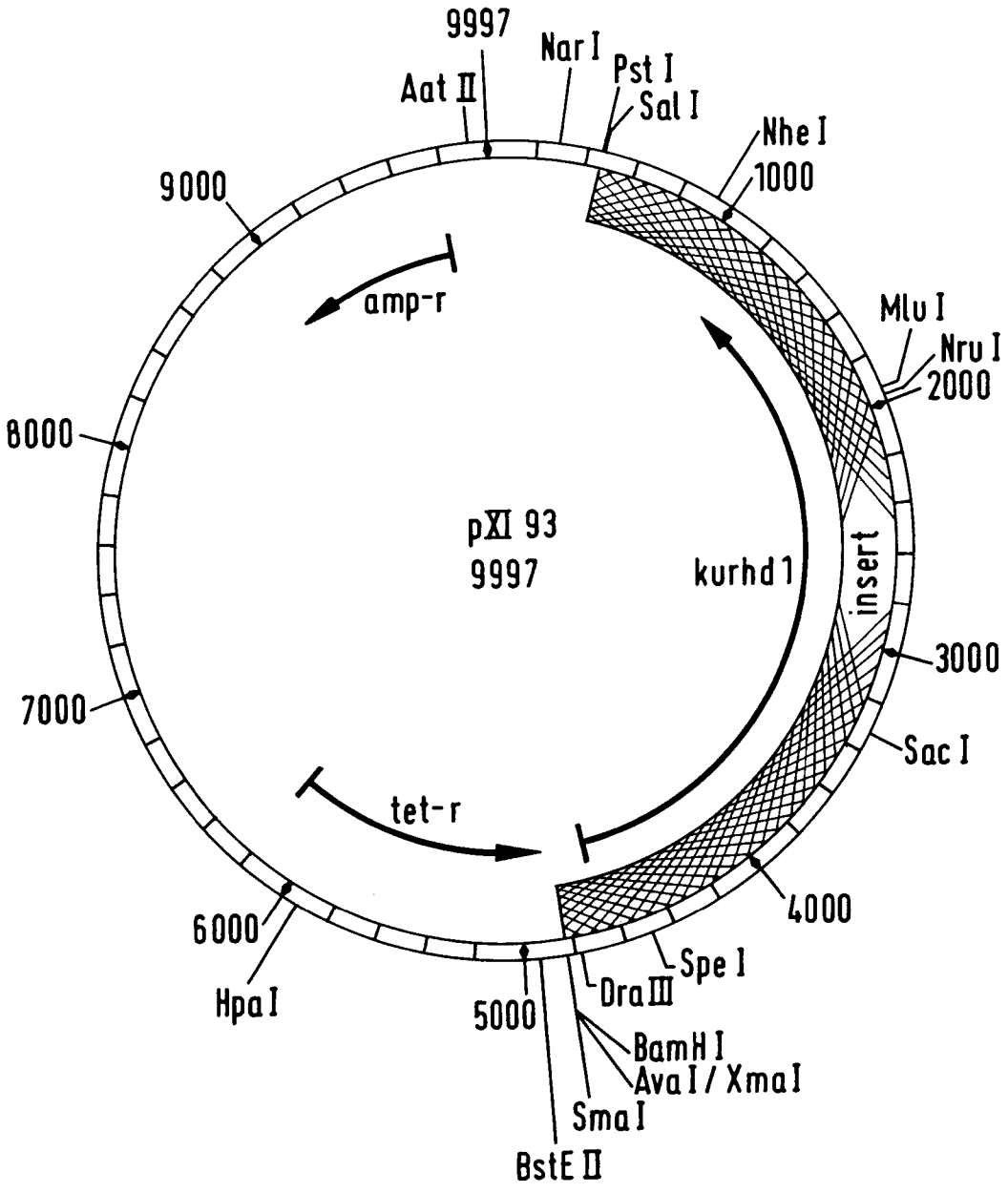

9997
Nar I
Pst I
Sal I
Aat II
Nhe I
1000
9000
amp-r
Mlu I
Nru I
2000
8000
pXI 93
9997
kurhd 1
insert
3000
7000
Sac I
tet-r
4000
6000
Spe I
Dra III
Hpa I
5000
BamH I
Ava I / Xma I
Sma I
BstE II

Fig. 1

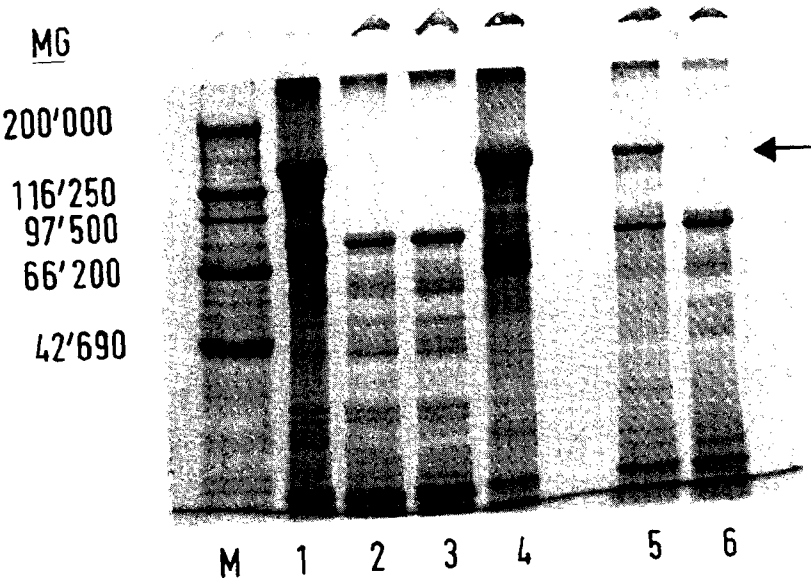


Fig. 8a

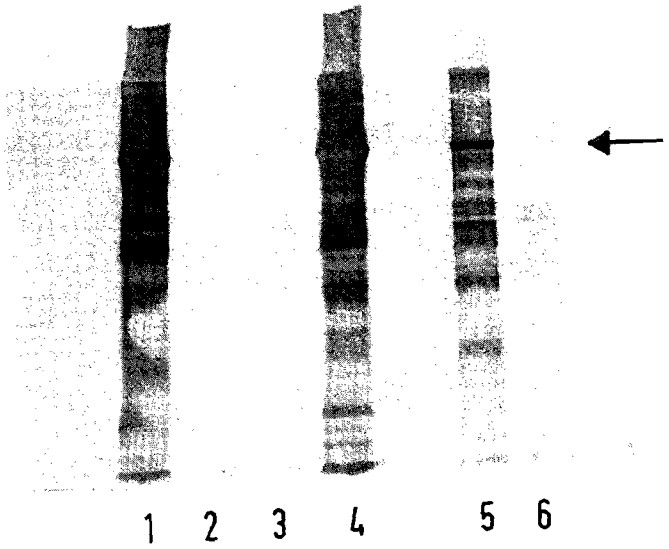
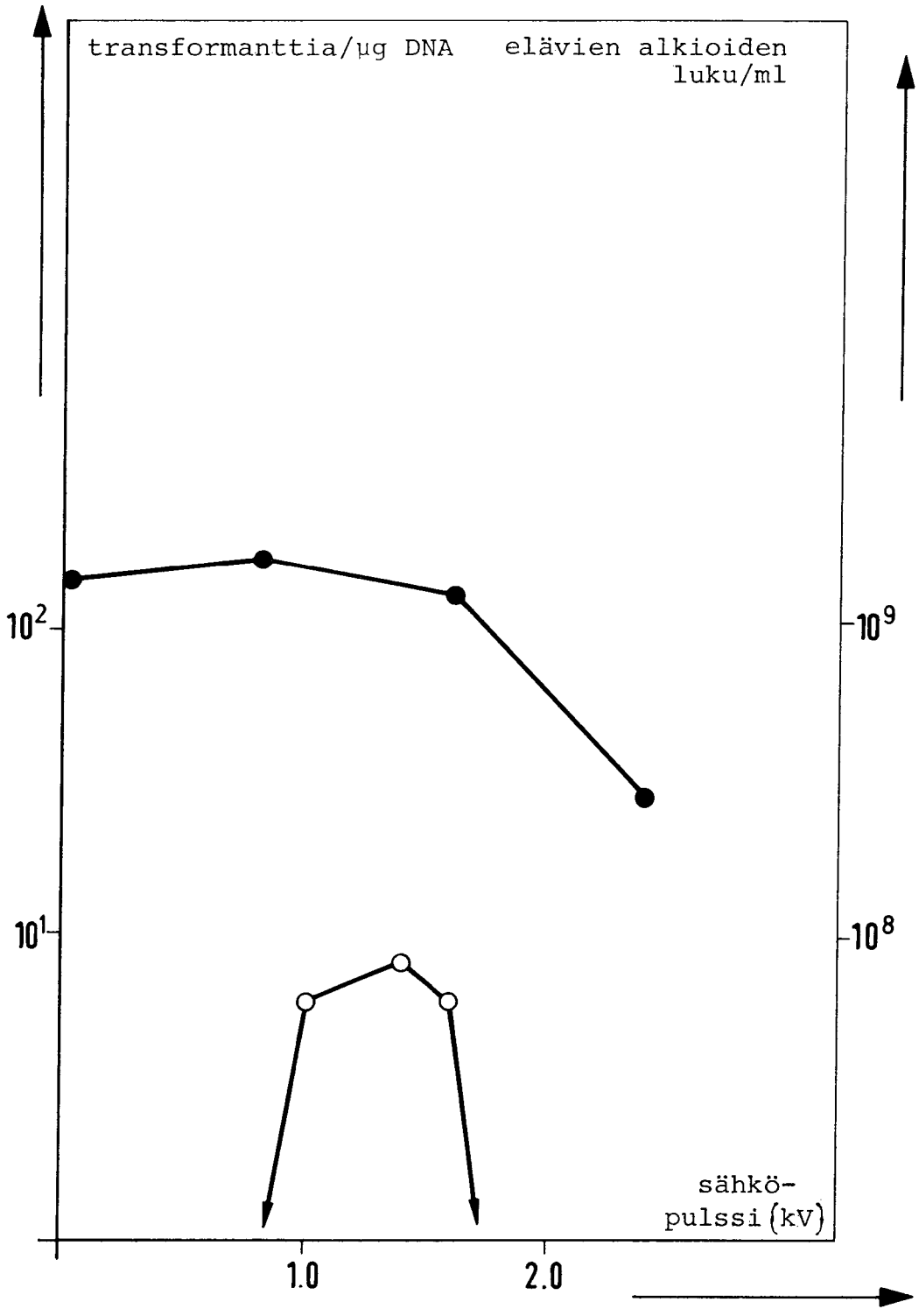


Fig. 8b

Fig. 9


transformanttia/µg DNA
elävien alkioiden luku/ml
10^2
10^1
10^9
10^8
sähkö-pulssi (kV)
1.0
2.0

Hak.n:o 892359

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer, utläggnings- och patentskrifter:

FI

CH

DE

DK

FR

GB

NO

SE

US

Merkitse hakemusjulkaisun (esim. saksal. Offenlegungsschrift) numeron eteen H ja vastaavasti kuulutus- ja patenttijulkaisun numeron eteen K ja P.

Käännä Vänd

EP - B-175151, C12N15/32

WO

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

- PROC. NATL. ACAD. SCI USA 79 (1982) 6451-55
- ZEITSCHRIFT FÜR ALLGEMEINE MIKROBIOLOGIE 23 (1983) 595-599
- MOLECULAR AND GENERAL GENETICS 191 (1983) 257-262
- J. BACTERIOL. 157 (1984) 705-711

2.12.96

Allekirjoitus