



(19) **HU**

MAGYAR KÖZTÁRSASÁG
Magyar Szabadalmi Hivatal

(11) Lajstromszám: **226 143**

(13) **B1**

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 95 02920**

(22) A bejelentés napja: **1994. 02. 25.**

(40) A közzététel napja: **1996. 10. 28.**

(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlöny és Védjegyértésítőben: **2008. 05. 28.**

(51) Int. Cl.: **A01H 5/00** (2006.01)

A01N 37/46 (2006.01)

A01N 63/00 (2006.01)

A01N 63/02 (2006.01)

C07K 14/325 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 15/32 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:

PCT/EP 94/00553

(87) A nemzetközi közzétételi szám: **WO 9424264**

(30) Elsőbbségi adatok:

93/400949 **1993. 04. 09.** **GB**

93 001820 **1993. 07. 12.** **EP**

(72) Feltalálók:

van Audenhove, Katrien, Gent (BE);

Jansens, Stefan, Gent (BE);

Lambert, Bart, Beernem (BE);

Peferoen, Marnix, Gent (BE);

van Aarssen, Roel, Nazareth (BE);

van Rie, Jeroen, Eeklo (BE)

(73) Jogosult:

Plant Genetic Systems N. V., Gent (BE)

(74) Képviselő:

Somfai & Társai Iparjogi Iroda Kft., Budapest

(54)

Új *Bacillus thuringiensis* törzsek és inszekticid proteinjeik

(57) Kivonat

A találmány tárgya DNS-szekvencia, amely olyan nukleotidszekvenciát tartalmaz, amely az 5. azonosító számú szekvencia 44–658. helyzetű aminosavaiból álló aminosavszekvenciát tartalmazó proteint kódol, és amelyben a 164. helyzetű aminosav lizin vagy alanin, vagy olyan nukleotidszekvenciát tartalmaz, amely a 8. azonosító számú szekvencia 19–1863. helyzetű aminosavaiból álló aminosavszekvenciát tartalmazó proteint kódol. Tárgya továbbá azon kiméra gén, amely tartalmazza ezt a DNS-t és egy promotert, amely alkalmas arra, hogy növényi sejtekben a gént átírja, valamint az olyan növényi sejt, amely ezt a kiméra gént

vagy a CryIAb vagy CryIB toxint és ezt a kiméra gént kódoló DNS-t tartalmazza, továbbá az a növény vagy annak magja, amely több ilyen sejtet tartalmaz. Továbbá tárgya a találmánynak az a protein, amely az 5. azonosító számú szekvencia 44–658. helyzetű aminosavaiból álló aminosavszekvenciát tartalmazza, és amelyben a 164. helyzetű aminosav lizin vagy alanin, vagy a 9. azonosító számú aminosavszekvenciát tartalmazza.

A találmány tárgya továbbá a fentiek előállítására és alkalmazására Lepidoptera rovarok ellen, valamint e célt szolgáló készítmények.

HU 226 143 B1

A találmány tárgya DNS-szekvencia, amely olyan nukleotidszekvenciát tartalmaz, amely az 5. azonosító számú szekvencia 44–658. helyzetű aminosavaiból álló aminosavszekvenciát tartalmazó proteint kódol, és amelyben a 164-helyzetű aminosav lizin vagy alanin, vagy olyan nukleotidszekvenciát tartalmaz, amely a 8. azonosító számú szekvencia 19–1863. helyzetű aminosavaiból álló aminosavszekvenciát tartalmazó proteint kódol. Tárgya továbbá azon kiméra gén, amely tartalmazza ezt a DNS-t és egy promotert, amely alkalmas arra, hogy növényi sejtekben a gént átírja, valamint az olyan növényi sejt, amely ezt a kiméra gént vagy a CryIAb vagy CryIB toxint és ezt a kiméra gént kódoló DNS-t tartalmazza, továbbá az a növény vagy annak magja, amely több ilyen sejtet tartalmaz. Továbbá tárgya a találmánynak az a protein, amely az 5. azonosító számú szekvencia 44–658. helyzetű aminosavaiból álló aminosavszekvenciát tartalmazza, és amelyben a 164-helyzetű aminosav lizin vagy alanin, vagy a 9. azonosító számú aminosavszekvenciát tartalmazza.

További része a találmánynak eljárás olyan növény vagy annak magja előállítására, amely a fenti sejtekből többet tartalmaz, oly módon, hogy az említett növény sejtjeit regeneráljuk és azokból magokat nyerünk. A találmány tárgyát képezi még eljárás Lepidoptera rovarokkal, különösen pedig azon belül Spodoptera littoralisszal, Agrotis ipsilonnal, Ostrinia nubilalisszal és Phthorimaea operculellával szemben rezisztens növény előállítására, oly módon, hogy egy növényi sejtet a találmány szerinti proteint kódoló DNS-sel transzformálunk és az említett sejtől növényt regenerálunk, valamint eljárás Lepidopterák, különösen Agrotis segetum és Phthorimaea operculella rovarok irtására, oly módon, hogy azokat a találmány szerinti proteinnel hozzuk érintkezésbe. Tárgya továbbá növényvédőszer-készítmény Lepidoptera rovarok ellen, amely tartalmazza a találmány szerinti proteint, és az olyan módosított mikroorganizmus, amely a találmány szerinti DNS-t magában foglaló DNS-t tartalmaz.

A találmány a *Bacillus thuringiensis* négy új törzsén alapul (a „BTS02617A törzs”, a „BTS02618A törzs”, a „BTS02654B törzs” és a „BTS02652E törzs”), amelyek mindegyike kristályos proteinek termel (a „BTS02617A kristályos proteinek”, a „BTS02618A kristályos proteinek”, a „BTS02654B kristályos proteinek”, illetve a „BTS02652E kristályos proteinek”), amelyek a spóráképződés időszakában kristályokba (a „BTS02617A kristályok”, a „BTS02618A kristályok”, a „BTS02654B kristályok”, illetve a „BTS02652E kristályok”) csomagolódnak. A BTS02617A, a BTS02618A, a BTS02654B és a BTS02652E törzseket a budapesti szerződés előírásainak megfelelően a Belga Koordinált Mikroorganizmusgyűjteményben [Collection Laboratorium voor Microbiologie Belgium („BCCM-LMG”), R. U. G., K. Ledeganckstraat 35, B–9000 Gent, Belgium] helyeztük letétbe. A találmány tárgya továbbá egy rovarirtó készítmény, amely Lepidopterák ellen hatásos, és amely hatóanyagként magában foglalja a BTS02617A, a BTS02618A, a BTS02654B, illetve a BTS02652E tör-

zsek bármelyikét, vagy előnyösen a BTS02617A, a BTS02618A, a BTS02654B vagy a BTS02652E kristályokat, kristályos proteinek vagy ezek hatásos részét vagy részeit.

5 A találmány tárgya továbbá egy gén (a „BTS02618A gén”), amely jelen van a BTS02617A, a BTS02618A, a BTS02654B és a BTS02652E törzsek genomjában, és amely egy inszekticid proteint („BTS02618A protoxin”) kódol, amely megtalálható a BTS02617A, a
10 BTS02618A, a BTS02654B és a BTS02652E kristályokban. A BTS02618A protoxin az a protein, amelyet a BTS02617A, a BTS02618A, a BTS02654B és a BTS02652E törzsek a megfelelő BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B, illetve BTS02652E kristályokba történő burkolás előtt előállítanak.

A találmány ezen túlmenően egy toxinra is vonatkozik (a „BTS02618A toxin”), melyet a BTS02618A protoxinból nyerhetünk (például tripszines feltárás útján). A BTS02618A toxin egy inszekticid hatású protein,
20 amelyet a BTS02617A kristályokból, a BTS02618A kristályokból, a BTS02654B kristályokból és a BTS02652E kristályokból szabadíthatunk fel, amelyeket viszont a BTS02617A törzs, a BTS02618A törzs, a BTS02654B törzs, illetve a BTS02652E törzs termel.
25 Ezen toxin és a protoxinja a Lepidoptera rovarok széles skálája ellen jelentős aktivitással rendelkezik, különösen pedig a Noctuidae ellen, ezen belül különösen Spodoptera és Agrotis fajok ellen, de más fontos Lepidoptera rovarok ellen is, mint amilyenek a Pyralidae családba tartozók, különösen a kukoricamoly, Ostrinia nubilalis, a Gelechiidae családba tartozók, mint a Phthorimaea operculella és az Yponomeutidae család tagjai, mint amilyen a Plutella xylostella.

Fentieken túlmenően a BTS02618A protein az első
35 olyan Bt protein, amely Agrotis segetum ellen szignifikáns hatást mutat.

A BTS02618A protoxinnak és toxinnak [(pro)toxin] ez az új jellemzője, vagyis az, hogy különféle gazdasági szempontból fontos Lepidoptera rovarcsaládokhoz
40 tartozó rovarok ellen kombinált hatással rendelkezik, így a Noctuidae, Yponomeutidae, Gelechiidae és Pyralidae ellen, ezt a (pro)toxint ideálisan megfelelő anyaggá teszik a káros rovarok igen széles köre elleni fellépésre, oly módon, hogy ezeket a rovarokat a protoxin
45 nal érintkeztetjük. Eljárhatunk akár úgy, hogy a rovarokat vagy növényeket permetezzük, vagy úgy, hogy a BTS02618A gént a növényekkel kapcsolatban álló baktériumokban vagy a növényekben fejezzük ki. Feltehetően a BTS02618A toxin a BTS02618A protoxinak az a legkisebb része, amely a Lepidopterák ellen inszekticid hatást mutat.

A találmány ezen túlmenően transzformált *Bacillus thuringiensis* törzsekre is vonatkozik, amelyek olyan DNS-szekvenciákat tartalmaznak, amelyek a
55 BTS02618A proteint vagy annak olyan variánsait kódolják, amelyeknek lényegében azonos inszekticid aktivitásuk van.

A jelen találmány ezen túlmenően kiméra génre is vonatkozik, amelyet valamely növényi sejt transzformálására alkalmazhatunk, és amely a következő mű-

kódoképesen összekapcsolt DNS-fragmenseket tartalmazza:

1. a bTS02618A gén egy része (az „inszekticid hatású bTS02618A génrész”), amely a BTS02618A protoxin valamely inszekticid hatású részét kódolja, előnyösen a bTS02618A gén csonkolt része (a „csonkolt bTS02618A gén”), amely csak a BTS02618A toxint kódolja;

2. egy promóter, amely alkalmas az inszekticid hatású bTS02618A génrésznek valamely növényi sejtben való transzkripciójára; és

3. a megfelelő 3'-végi transzkriptum kialakításáért és a poliadenilációért felelős jelek, amelyek egy növényi sejtben az inszekticid hatású bTS02618A génrész kifejezésére szolgálnak.

Ezt a kimérágent a továbbiakban „bTS02618A kiméra gén” elnevezéssel említjük.

A jelen találmány tárgya továbbá:

1) valamely növényi sejt (a „transzformált növényi sejt”) például a kukorica- vagy a gyapotsejt, amelynek a genomját az inszekticid hatású bTS02618A génrészrel, előnyösen az bTS02618A kiméra génnel transzformáltuk; és

2) valamely növény (az „transzformált növény”), amelyet a transzformált növényi sejtől regeneráltunk, vagy amelyet az így regenerált növényből vagy szaporítóanyagából vagy magjából termelünk, és amelynek genomja az inszekticid hatású bTS02618A génrészt, előnyösen a bTS02618A kiméra gént tartalmazza, és amely növény a Lepidopterákkal szemben rezisztens.

A találmány tárgya a fentiekén túlmenően:

1) valamely mikrobiális szervezet, amelynek a genomja a teljes bTS02618A génnel, vagy annak egy részével transzformált, mint amilyenek például a *B. thuringiensis* vagy *Pseudomonas* spp.; és

2) valamely mikrobiális spóra, mely a teljes bTS02618A génnel, vagy annak részeivel transzformált genomot tartalmaz.

A jelen találmány ezen túlmenően mesterségesen előállított bTS02618A génekre is vonatkozik, amelyek BTS02618A proteineket és olyan proteineket kódolnak, amelyek erősebben rezisztensek a proteázsal szemben mint a natív Bt proteinek, különösképpen pedig a natív bTS02618A protein. Példaképpen említjük a bTS02618Aa proteint, mint olyan proteint, amely fokozottan proteázrezisztens. Ezen túlmenően a jelen találmány egy olyan DNS-szekvenciára is vonatkozik, amely a bTS02618Aa proteint kódolja.

A jelen találmány tárgya továbbá valamely kiméra gén, melyet egy növényi sejt transzformálására alkalmazhatunk, és amely a következőket tartalmazza:

1. egy DNS-szekvencia, amely kódolja a bTS02618Aa protoxin rovarirtó hatású részét, előnyösen a bTS02618Aa gén valamely csonkolt része (a „csonkolt bTS02618Aa gén”), amely csak a bTS02618Aa toxint kódolja; és

2. egy promóter, amely alkalmas arra, hogy egy növényi sejtben átírja a bTS02618Aa rovarirtó hatású génrészét; és

3. a megfelelő 3'-végi, transzkriptum kialakításért és poliadenilációért felelős jelek, amelyek egy növényi

sejtben az inszekticid hatású bTS02618A génrész kifejezésére szolgálnak.

Ezt a kiméra gént a továbbiakban általában „bTS02618Aa kiméra gén”-nek nevezzük.

A jelen találmány tárgya továbbá:

1) valamely növény sejtje („transzformált növényi sejt”) mint amilyen a kukorica- vagy gyapotsejt, amelynek genomját a rovarirtó hatású bTS02618Aa génrészrel, előnyösen az bTS02618Aa kiméra génnel transzformáltuk; és

2) valamely növény („transzformált növény”), amelyet a transzformált növényi sejtől regeneráltunk, vagy amelyet az így regenerált növényből vagy annak magjaiból állítottunk elő, és amelynek genomja tartalmazza a rovarirtó hatású bTS02618Aa génrészt, előnyösen bTS02618Aa kiméra gént, és amely növény Lepidopterákkal szemben rezisztens.

A találmány tárgya a fentiekén túlmenően:

1) valamely mikrobiális szervezet, mint amilyen például a *B. thuringiensis* vagy *Pseudomonas* spp., amelynek a genomját a teljes bTS02618Aa génnel vagy annak egy részével transzformáltuk, és

2) valamely mikrobiális spóra, amely magában foglal valamely genomot, melyet a teljes bTS02618Aa génnel vagy annak részeivel transzformáltunk.

A jelen találmány tárgyát ezen túlmenően rovarirtó hatású készítmények képezik, amelyek Lepidopterák ellen hatásosak, és amelyek magukban foglalnak egy fokozottan proteázrezisztens Bt proteint, különösképpen pedig a bTS02618Aa proteint, vagy annak valamely lényegében azonos rovarirtó aktivitású variánsát.

A műszaki ismeretekhez tartozik, hogy a *B. thuringiensis* (a továbbiakban „Bt”), egy olyan Gram-pozitív baktérium, amely a sporuláció során endogén kristályokat termel. Ezeket a kristályokat olyan proteinek alkotják, amelyek specifikusan toxikusak a rovarok lárváira. Az ilyen kristályos proteineket és a megfelelő géneket szerkezetük és inszekticid hatásspektrumuk alapján osztályozták (Höfte és Whiteley, 1989). A négy legnagyobb osztályt a Lepidoptera-specifikus (cryI), Lepidoptera- és Diptera-specifikus (cryII), Coleoptera-specifikus (cryIII) és Diptera-specifikus (cryIV) gének alkotják.

Az a tény, hogy üzemi méretben hagyományos szüllyesztett fermentációs módszerek alkalmazhatók a Bt spórák előállítására, kereskedelmi szempontból vonzóvá teszi azt a megoldást, hogy a Bt baktériumok képezzék a növényvédőszer-készítmények forrását.

Korábban már azonosítottak bizonyos Bt-törzsek-ből származó génfragmenseket, amelyek inszekticid proteineket kódolnak, és ezeket növények genomjába integrálták annak érdekében, hogy a növényeket rovarokkal szemben rezisztenssé tegyék. A Bt-génfragmenseknek a növényekben való kifejeződését azonban nem könnyű elérni. Annak érdekében, hogy növényi sejtekben valamely inszekticid protein optimális kifejeződését érjük el, szükségesnek bizonyult minden egyes Bt-génfragsmens speciális módon való manipulálása úgy, hogy az a Bt protoxin egy olyan részét kódolja, amely a célba vett rovarok elleni alapvető toxicitást

megtartja (193.259, 305.275 és 242.246 sz. európai szabadalmi leírások).

A találmány rövid leírását a következőkben foglalkozunk össze.

Négy új törzset állítottunk elő, t.i. a BTS02617A, a BTS02618A, a BTS02654B és a BTS02652E törzseket. A BTS02617A, a BTS02618A, a BTS02654B és a BTS02652E kristályok és kristályos proteinek, a BTS02618A protoxin és toxin, amelyet a fenti törzsek a sporuláció során termelnek és a BTS02618A protoxin inszekticid hatású részei, valamint ezen kristályok, kristályos proteinek, protoxinok, toxinok és rovarirtó hatású protoxinrészek ekvivalensei valamennyien inszekticid hatással rendelkeznek, és ezért inszekticid készítményekké készíthetők ki, általában Lepidopterák ellen, különösen a következők ellen: Noctuidae, úgy mint *Agrotis* spp. (bagolylepkek, mint amilyen az *Agrotis ipsilon* és *Agrotis segetum*), *Mamestra* spp. (például a káposztalepke *Mamestra brassica*) és *Spodoptera* spp., (mint amilyen a *Spodoptera exigua*, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera littoralis* és *Spodoptera litura*), *Pyralidae* ellen (például a kukoricamoly *Ostrinia nubilalis*) továbbá *Gelechiidae* ellen, mint amilyen a *Phthorimaea operculella*, és *Yponomeutidae* ellen (mint amilyen a *Plutella xylostella*). Ezek képezik a különféle gazdasági szempontból fontos szántóföldi növény, mint például a kukorica, gyapot és sok zöldségféle, például káposztafélék jelentősebb kártevőit.

A jelen találmány értelmében egy növényi sejt genomját transzformáljuk valamely inszekticid hatású BTS02618A génrészrel, előnyösen a csonkolt BTS02618A génnel, vagy annak valamely ekvivalensével, mint amilyen a módosított szintetikus BTS02618A gén. Előnyös, ha ezt a transzformálást a kiméra BTS02618A génnel végezzük el. Az így keletkező transzformált növényi sejt módosított növények vagy módosított növények szaporítóanyagai, magjai és olyan növényi sejtenyészetek előállítására alkalmazható, amelyek döntő mértékben a módosított sejtekből állnak. A módosított növények valamennyi, vagy néhány szövetében lévő transzformált sejtek a következő tulajdonságokkal rendelkeznek:

1. genomjukban stabil inszertumként tartalmazzák az inszekticid hatású BTS02618A génrészt, és

2. az inszekticid hatású BTS02618A génrészt kifejezik oly módon, hogy előállítják BTS02618A protoxinjának inszekticid hatású részét, előnyösen a BTS02618A toxinját, és ezáltal a növényt rezisztenssé teszik a Lepidopterákkal szemben. A transzformált növényi sejtek a találmány értelmében arra is alkalmazhatók, hogy ilyen rovarirtó hatású Bt proteineket állítsunk elő kinyerés céljából.

A jelen találmány tárgyát képezi a fentiek túlmenően az az eljárás is, amellyel valamely növényt Lepidopterákkal szemben rezisztenssé teszünk oly módon, hogy valamely növényi sejt genomját az inszekticid hatású BTS02618A génrészrel transzformáljuk, előnyösen a csonka BTS02618A génnel, vagy annak valamely ekvivalensével. Ebből a szempontból előnyös, ha a növényi sejtet a BTS02618A kiméra génnel transzformáljuk.

A jelen találmány a fentiek túlmenően a BTS02618A protoxinokra is vonatkozik, valamint ezen protoxinok inszekticid hatású részeire és a BTS02618A toxinra, valamint a BTS02618A toxin funkcionális részeire, továbbá a BTS02618A génre, a BTS02618A gén rovarirtó hatású részére, a csonkolt BTS02618A génre és a kiméra BTS02618A génre, valamint ezek ekvivalenseire.

A találmány tárgyát képezi a fentiek túlmenően az a természetes vagy mesterséges DNS-szekvencia, amely kódolja a BTS02618A protoxint vagy annak rovarirtó hatású részeit, mint amilyen a toxin.

A jelen találmány tárgyát képezik továbbá Lepidopterák elleni inszekticid készítmények, különösen Noctuidae, *Pyralidae*, *Gelechiidae* és *Yponomeutidae* ellen, valamint eljárás Lepidopterák leküzdésére, különösen Noctuidae, *Pyralidae*, *Gelechiidae* és *Yponomeutidae* leküzdésére, ezen inszekticid készítmény segítségével, ahol a rovarirtó készítmény a BTS02617A, a BTS02618A, a BTS02654B, vagy a BTS02652E törzseket, kristályokat és/vagy kristályos proteineket, vagy a BTS02618A protoxint, toxint és/vagy inszekticid hatású protoxinrészeket vagy ezek ekvivalenseit tartalmazza.

A jelen találmány tárgyát továbbá baktériumok képezik, különösen *E. coli* és *Bacillus thuringiensis* baktériumok, amelyeket oly módon transzformáltunk, hogy kifejezzék azt a DNS-t, amely kódolja a BTS02618A proteinvariánst, mint amilyen a BTS02618Aa protein vagy ahhoz képest még inkább proteázrezisztens Bt proteinek.

Fentiek túlmenően a jelen találmány tárgya valamely mesterséges DNS-szekvencia, amely kódolja a BTS02618A proteint, valamint a Bt proteinek új formái, amelyek kedvezőbb proteázrezisztenciát mutatnak, különösképpen pedig a BTS02618Aa vagy a módosított BTS02618A protein, valamint a DNS-szekvenciák, amelyek ezeket az új proteineket kódolják. Fentiek túlmenően olyan növényi sejteket is találmányunk tárgyának tekintünk, amelyekben kifejeződik egy mesterséges DNS-szekvencia, amely kódolja a BTS02618A toxint vagy a javított proteázrezisztenciával rendelkező Bt toxinokat, különösen előnyösen a BTS02618Aa toxint.

A jelen találmány tárgyát képezik továbbá olyan rovarirtó készítmények, amelyek hatóanyagként tartalmazzák a BTS02618Aa proteint vagy annak valamely lényegében azonos rovarirtó aktivitású variánsát.

A találmány tárgya továbbá eljárás Lepidoptera rovarok leküzdésére, oly módon, hogy ezeket a rovarokat fokozott proteázrezisztenciával rendelkező Bt proteinnel hozzuk érintkezésbe, előnyösen a BTS02618Aa proteinnel vagy annak valamely variánsával.

Különösen előnyösek az új Bt proteinek, előnyösen a Lepidopterák ellen hatásos Bt proteinek, amelyek lényegében azonos inszekticidaktivitással rendelkeznek, mint a natív Bt protein, de amelyekre jellemző, hogy rezisztensek a 60–70 kD közötti toxinformák további proteolitikus hasításával szemben. Ezekben az új Bt proteinekben inaktivált belső proteáz hasítóhelyek vannak

azért, hogy ezek a proteinek fokozott stabilitással rendelkezzenek, miközben megtartják lényegében ugyanazt a rovarirtó aktivitást. Ezért ezek az új Bt proteinek, amikor proteázok jelenlétében hosszabb ideig inkubáljuk, nem hasadnak könnyen gyengébb inszekticid hatású, kisebb proteolitikus fragmensekre.

Az alábbiakban a találmányt részletesen ismertetjük.

A jelen találmány szerinti BTS02618A protoxint hagyományos módon izolálhatjuk a BTS02617A törzsből, amelyet 1992. július 2-án deponáltunk a BCCM-LMG törzsgyűjteményben LMG P-12592 nyilvántartási szám alatt, a BTS02618A törzsből, amelyet 1992. július 2-án deponáltunk a BCCM-LMG törzsgyűjteményben LMG P-12593 nyilvántartási szám alatt, a BTS02654B törzsből, amelyet 1992. július 2-án deponáltunk a BCCM-LMG törzsgyűjteményben LMG P-12594 nyilvántartási szám alatt, vagy a BTS02652E törzsből, amelyet 1993. március 1-én deponáltunk a BCCM-LMG törzsgyűjteményben LMG P-13493 nyilvántartási szám alatt. Így például a BTS02617A, a BTS02618A, a BTS02654B és a BTS02652E kristályokat a megfelelő törzsek spórázótenyésztéseiből izolálhatjuk (Mahillon és Delcour, 1984), és ezt követően a BTS02618A protoxint a kristályokból Höfte és társai módszerével (1986) izolálhatjuk. A protoxinokat arra alkalmazhatjuk, hogy hagyományos módon protoxinra specifikus monoklonális vagy poliklonális antitesteket készítsünk (Höfte és társai 1988). A BTS02618A toxin a BTS02618A protoxinból proteáz (például tripszin) segítségével történő feltárással nyerhető.

A BTS02618A gént hagyományos módszerekkel izolálhatjuk. A bTS02618A gén a BTS02617A, a BTS02618A, a BTS02654B és a BTS02652E törzsekben a 86/300291.1 és 88/401115.5 sz. európai szabadalmi bejelentésekben és a 821 582 sz. amerikai egyesült államokbeli 1986. január 22-én benyújtott szabadalmi bejelentésben ismertetett módszereket alkalmazva izolálhatjuk. A bTS02618A gént a következőképpen azonosítottuk: restrikciós enzimekkel emésztettük a fenti törzsek valamelyikéből származó teljes DNS-t; az így kapott DNS-fragmenseket méretük szerint frakcionáltuk 5 és 10 kb közötti DNS-frakciókra; az így kapott frakciókat klónozóvektorokba ligáltuk, szkríneltük a klónozóvektorokkal transzformált *E. coli* törzseket, egy olyan DNS-próba segítségével, amelyet *cryIIA* gén egyik tartományából állítottunk össze (Smulevitch és társai, 1991; Gleave és társai, 1992).

A „bTS02618A gén” kifejezés a jelen leírásban magában foglalja a BTS02618A protoxint vagy toxint vagy ennek funkcionálisan egyenértékű variánsait kódoló DNS-szekvenciákat. Tekintettel a genetikai kód degeneráltságára, néhány aminosavkodont más kodonnal helyettesíthetünk anélkül, hogy a protein aminosav-szekvenciáját megváltoztatnánk. Ezen túlmenően néhány aminosavat más ekvivalens aminosavval helyettesíthetünk anélkül, hogy szignifikánsan megváltoztatnánk a protein rovarirtó hatását. Hasonlóképpen az aminosavak összetételének a megváltoztatása molekulán belül olyan területeken, amelyek nem felelősek a

kötődésért és a toxicitásért, valószínűleg nem okoz különbséget a protein rovarirtó hatásában. A gén ilyen ekvivalensei olyan DNS-szekvenciák lehetnek, amelyek a 4. azonosító számú szekvencia szerinti BTS02618A toxin vagy protoxin DNS-szekvenciájához hibridizálódnak, és amelyek olyan proteint kódolnak, amelynek azonos rovarirtó jellemzői vannak, mint a találmány szerinti BTS02618A (pro)toxinnak. Ilyen értelemben a „hibridizáció” kifejezés hagyományos hibridizációs körülményeket foglal magában, előnyösen szigorú hibridizációs körülményeket.

A „BTS02618A protein” általános kifejezés a BTS02618A protoxinra és lényegében azonos inszekticid aktivitású variánsaira és mutánsaira vonatkozik, például ide tartoznak BTS02618A és BTS02618Aa toxinok.

A „javított vagy fokozott proteázrezisztens protein” kifejezés azt jelenti, hogy a natív protoxin proteázos hasításából származó Bt proteinfragmens nem eredményezi az inszekticid aktivitás lényeges elvesztését (amelyet a protein inszekticid aktivitással rendelkező toxinrészének további hasítása eredményezne). Előnyös, ha a protein inszekticid hatású toxinrésze mintegy 60 és mintegy 70 kD közé esik, és különösképpen ha a további hasítás a toxin N-terminális részén következik be. Az is előnyös, ha a protein Lepidoptera elleni inszekticid hatással rendelkezik.

A bTS02618A gén „alternatív formájának” egyik előnyös példája a 6. azonosító számú szekvencia szerinti bTS02618A mesterséges gén, amely a BTS02618A toxint kódolja. A mesterséges bTS02618A gén egy további előnyös példáját a 8. azonosító számú DNS-szekvenciájával mutatjuk be, amelyet az egyértelműség kedvéért „bTS02618Aa gén” elnevezéssel illetünk, és amely a BTS02618A proteinhez lényegében hasonló rovarirtó aktivitással rendelkező (hasonló de különböző) proteint kódolja.

Természetes, hogy a jelen találmány nem korlátozódik azokra a speciálisan előnyös megvalósításokra, amelyek ebben a leírásban mint „alternatív variánsok vagy formák” szerepelnek. A területen járatos szakember számára kézenfekvő további olyan DNS-szekvenciák megszerkesztése, amelyeknek kodonhasználat eltérő, azonban ugyanazt a proteint kódolják, vagy egy hasonló proteint, amelynek lényegében azonos rovarirtó aktivitása van. Némelyik prokarióta és eukarióta kifejezőrendszerben például a génexpressziót fokozza, ha a kodonhasználatot a gazdasejt kodonhasználatára változtatjuk (Bennetzen és Hall, 1982; Itakura 1977). Ezen túlmenően, tekintettel arra, hogy számos Bt génről ismert, hogy nem rendelkeznek eukarióta kodonokkal, és hogy génjeik igen gazdagok AT-ben, néha célszerű a kodonhasználat megváltoztatása (Adang és társa 1985, Schnett és társa, 1985).

Fentiek megvalósítására kodonhasználati táblázatok állnak a szakemberek rendelkezésére, amelyek a szakirodalomból megismerhetők (Wadak és társa, 1990; Murray és társa 1989), éppúgy, mint a nagyobb DNS-szekvencia adatbankokban (például EMBL Heidelberg, Németország). Ennek megfelelően szintetikus DNS-szekvenciák szerkeszthetők úgy, hogy azonos

vagy lényegében azonos proteinek termelődjenek (lásd például Cohen és társa 1973).

Proteinek vonatkozásában a „lényegében azonos” kifejezés azt jelenti, hogy olyan proteincről van szó, amely néhány aminosavban tér el, vagy amelyhez hozzáadtak néhány aminosavat (például egy fúziós protein, lásd Vaeck 1987) vagy amelyből elhagytak néhány aminosavat (például N- vagy C-terminális csonkolás), míg a proteinek rovarirtó aktivitása megmarad. Egy szakember számára általában ismert tény, hogy szokásos aminosavcserék lehetségesek a polipeptidlánc számos helyén anélkül, hogy komolyabban módosulna a polipeptid aktivitása [lásd Watson és társai, *Molecular Biology of the Gene* 226–227 (1987)].

Az a kifejezés, hogy „BTS02618A toxin funkcionális részei” a jelen leírásban a toxin bármely olyan specifikus szerkezetű részét (részeit) vagy területét (területeit) jelenti, amelyet egy másik (Bt) proteinhez kapcsolhatunk egy új hibrid protein előállítás céljából, amely a BTS02618A toxin legalább egy funkcionális jellemzőjével (például a kötődési és/vagy toxicitási jellemzőkkel) rendelkezik (Ge és társai, 1991). Az ilyen részek a BTS02618A protein kötődési és/vagy toxicitási jellemzőivel rendelkező hibrid Bt proteinnek az alapvető tulajdonságát képezhetik. Az ilyen protein megnövekedett gazdakörrel és javított toxicitással rendelkezhet, és/vagy a rovarrezisztencia kifejlődésének megelőzésére irányuló stratégiában használható fel (408 403 sz. európai közzétételi irat; Visser és társai, 1993).

A jelen leírásban alkalmazott „BTS02618Aa toxin” kifejezés a BTS02618A toxin új formájára vonatkozik, amely a természetes BTS02618A toxintól bizonyos aminosavakban tér el. Megállapítást nyert, hogy a BTS02618A protoxint a proteázok egy mintegy 69 kD-os proteinné és egy mintegy 55 kD-os proteinné emésztik, és az utóbbinak lényegesen gyengébb a rovarirtó hatása. A proteáz emésztés növekvő időtartamával egyre fokozódó mennyiségben keletkezik a mintegy 55 kD-os protein. Megállapítottuk, hogy ezt az 55 kD-os proteint az emésztés a 4. azonosító számú szekvenciában bemutatott 164. pozícióban lévő arginnál hasítja. Ezért a BTS02618Aa toxinban az argint ezen a helyen lizinrel helyettesítettük, 43 N-terminális aminosavat Met-Ala-val helyettesítettünk, és a C-terminális végződés egészen a 666. aminosavig (a 4. azonosító számú szekvencia) csonkoltuk. Hasonlóan más Bt toxinokhoz a BTS02618Aa toxin C-terminális vége tovább csonkolható a minimálisan toxikus fragmens eléréséig (4. azonosító számú szekvenciában a 658. aminosavig).

A BTS02618A protein másik formájában, a „BTS02618Ab protein”-ben ezt az argintet egy alaninnal helyettesítettük. Mindkét BTS02618Aa/b protein kevésbé fogékony a proteázokra és mégis lényegében azonos rovarirtó aktivitással rendelkezik. A BTS02618Aa és a BTS02618Ab protoxin toxikus fragmenséből származó C-terminális rész 100%-ig ugyanolyan, mint a BTS02618A protoxin C-terminális része.

A „bTS02618Aa gén” és a „bTS02618Ab gén” a bejelentésben olyan DNS-szekvenciákat jelent, amelyek a

BTS02618Aa, illetve BTS02618Ab proteineket kódolják. Nyilvánvaló, hogy amint a BTS02618Aa és BTS02618Ab protein aminosavszekvenciáját megismertük, többféle DNS-szekvencia alakítható ki. Az ilyen további DNS-szekvenciák szintetikus vagy félszintetikus DNS-szekvenciák lehetnek, amelyeket megváltoztattunk annak érdekében, hogy a génben bizonyos helyeket inaktíváljunk. Így például szelektíven inaktíválhatók bizonyos rejtett szabályozó- vagy feldolgozóelemek, amelyek jelen vannak a természetes szekvenciában (WO 91/16432, illetve WO 93/09218 sz. PCT közlési iratok). Eljárhatunk úgy is, hogy a teljes kodonhasználatot valamely közelebbi rokon gazdaszervezetnek, előnyösen annak a gazdaszervezetnek a kodonhasználatához igazítjuk, amelyben expresszálni kívánunk.

A BTS02618A protein ilyen módosítása úgy is elérhető, hogy a 123. helyzetben lévő aminosavból kihagyjuk az argintet, vagy úgy, hogy ezt az aminosavat valamely más aminosavval helyettesítjük, feltéve, hogy az új BTS02618A protein inszekticid aktivitása nem csökken lényegesen. A proteáz hasítási helyét körülvevő egyéb aminosavak is megváltoztathatók, de úgy, hogy az inszekticid hatás lényegében ne változzon.

Az új proteinek rutinszerűen tesztelhetők biológiai vizsgálóeljárások segítségével annak érdekében, hogy toxicitásukat a természetes BTS02618A protein toxicitásával összehasonlítsuk. Az ilyen proteinek összes toxicitási paraméterétől elvárjuk, hogy azok a természetes proteinek toxicitáshoz hasonlóak legyenek.

Inszekticid hatásuk tartós voltánál fogva az ilyen új proteinek igen hasznosak a jelentős kártevő rovarok elleni küzdelemben. A proteáz aktivitással szembeni fokozott rezisztenciájuk a rovarok elleni küzdelemben kiugróan hasznos toxinokká avatja e proteineket, például az ilyen proteineket kódoló DNS-szekvenciát valamely idegen gazdaszervezetben, például baktériumban vagy növényben kifejezve. Egy DNS-szekvencia fentiekben leírt kisebb módosításait rutinszerűen végezzük el PCR-közvetített mutagenézissel (Ho és társai, 1989; White és társai, 1989).

A fenti variánsok azt mutatják, hogy valóban a BTS02618A proteinen anélkül hajthatók végre módosítások, hogy a rovarirtó hatásban lényeges változás következne be. Amellett, hogy az N-terminális végen 43 aminosav elhagyható, és a C-terminális aminosavak nagy része elhagyható, még néhány belső elhelyezkedésű aminosav is más aminosavval helyettesíthető úgy, hogy eközben a BTS02618A toxin lényegében azonos rovarirtó hatása megmarad.

Hasonlóképpen a CryIB protoxinról (Brizzard és Whiteley, 1988) és a természetben előforduló variánsáról (408 403 sz. európai közzétételi irat) megállapították, hogy egy körülbelül 69 kD-os toxinná és egy kisebb, körülbelül 55 kD-os toxinná hasadnak proteázaktivitás hatására. Erre a toxinra is igaz, hogy (a startkodonhoz képest) a Brizzard és Whiteley (1988) szekvenciában vagy a 408 403 számú európai közzétételi iratban szereplő szekvenciában a 144. és 146. aminosav-helyzetekben lévő arginin módosítása képes megnö-

velni a rovarbélben a protein stabilitását. Valóban, a 4412 Bt-törzsből nyert vagy az *E. coli*-ban kifejezett CryIB protoxin hosszabb proteázos kezelése egy mintegy 55 kD-os proteint eredményezett, amelynek N-terminális vége a 145. helyzetben lévő aminosavval kezdődött (Thr-Arg-Ser-Val-Leu-) és egy további, a 147. helyzetnél kezdődő (Ser-Val-Leu-Tyr-Thr-) 55 kD-os proteint eredményezett. A 144. és 146. helyzetben lévő arginin aminosavak módosítása stabilabb toxinformához vezet, amely még mindig toxikus. Ez a módosítás a CryIB proteint vagy annak variánsait kódoló természetes vagy mesterséges DNS-szekvenciába, mint például a 358 557 számú európai közzétételi iratban szereplő Bt 14 toxinba a szakember számára jól ismert módszerekkel beépíthető abból a célból, hogy egy stabilabb CryIB protein termelődjék. Az ilyen CryIB protein a BTS02618A vagy BTS02618Aa proteinnal és a CryIAb proteinnal együtt a Lepidoptera rovarok ellen, különösképpen az *Ostrinia nubilalis* ellen használható úgy, hogy a fenti proteineket kódoló DNS-szekvenciákat egy gazdasejtben, különösképpen egy növényi sejtnél kifejezzük. Így tehát egy vagy több aminosav módosítása más Bt proteinekben is hasznos lehet, különösképpen olyan Lepidoptera-ellenes Bt proteinekben, amelyeket a proteázok szintén tovább hasítanak.

A fentiekén túlmenően, a BTS02617A vagy BTS02618A vagy BTS02654B vagy BTS02652E törzsek teljes DNS-éből készült 5–10 kb-os fragmensek megfelelő kifejezővektorokba ligálhatók, *E. coli*-ba transzformálhatók, és ezt követően a klónok szkrínélhetők hagyományos telep-immunpróba módszerekkel, a toxin kifejezésére szkrínélhetők (French és társai 1986) a BTS02618A toxin ellen létrehozott monoklonális vagy poliklonális antitestekkel.

A BTS02617A vagy BTS02618A vagy BTS02654B vagy BTS02652E törzsekhez tartozó teljes DNS-ből készült 5–10 kb közötti fragmenseket megfelelő ingázóvektorokhoz ligálhatjuk (Lereclus és társai, 1992) és kristály nélküli Bt-mutánsba transzformálhatjuk. A klónokat ezek után szkrínéljük annak felderítésére, hogy termelődtek-e kristályok (ez mikroszkóposan állapítható meg), vagy pedig kristályos proteinek (ez utóbbi SDS-PAGE módszerrel detektálható).

Az így azonosított BTS02618A gént hagyományos módszerrel (Maxam és Gilbert 1980) szekventáltuk a DNS-szekvencia felderítése érdekében. A Southern-blot-hibridizáció és a szekvenciák összehasonlítása azt mutatta, hogy ez a gén különbözik a korábban ismertetett, Lepidoptera elleni hatással rendelkező protoxinokat és toxinokat kódoló génektől (Höfte és Whiteley, 1989).

A BTS02618A gén rovarirtó hatású része, amely a protoxinjának egy rovarirtó hatású szakaszát kódolja, valamint a gén egy csonkolt része, amely csak a toxinját kódolja, hagyományos módon állítható elő a gén szekvenciaanalízise után. Az BTS02618A protoxinjának és toxinjának aminosavszekvenciáját a BTS02618A gén és a csonka BTS02618A gén DNS-szekvenciája alapján határoztuk meg. Az a kifejezés, hogy a BTS02618A gén „inszekticid hatású része” vagy „valamely része”, egy

olyan DNS-szekvenciát jelent, amely egy olyan polipeptidet kódol, amelyben kevesebb aminosav van jelen, mint a BTS02618A protoxinban, de amely még mindig toxikus a Lepidoptera-ra.

Annak érdekében, hogy a BTS02618A gént vagy valamely azzal ekvivalens gént teljes egészében vagy valamely inszekticid hatású részét expresszáljuk *E. coli*-ban, más Bt-törzsekben és növényekben, megfelelő restriktációs helyeket építhetünk be minden gén vagy génrész mellé. Ez helyre irányuló mutagenézissel valósítható meg, jól ismert eljárások alkalmazásával (Stanssens és társai, 1989; White és társai, 1989).

A növényekben való kifejeződés javítására előnyös lehet a BTS02618A génnek vagy a BTS02618A gén inszekticid hatású részének kodonhasználatát módosítani a WO 91/16432 és WO 93/09218 sz. PCT közzétételi iratoknak, illetve a 0 358 962 és 0 359 472 sz. európai közzétételi iratoknak megfelelően, hogy valamely ekvivalens, módosított vagy mesterséges gén vagy génrész keletkezzen. Annak érdekében, hogy egyszerű növényekben – mint amilyen a kukorica – fokozott expressziót érjünk el, egyszerű intront illeszthetünk a BTS02618A kiméra génhez, és a BTS02618A génrész DNS-szekvenciáját tovább is változtathatjuk a transzlációra semleges módon úgy, hogy módosítjuk a génrészben jelen lévő esetlegesen gátló DNS-szekvenciákat helyre irányított intron beiktatásokkal és/vagy a kodonhasználatban cseréket hajtunk végre, például a kodonhasználatot a szóban forgó növény által leginkább kedvelt kodonhasználatához igazítjuk (Murray és társai, 1989) anélkül, hogy a kódolt aminosavszekvenciát lényegesen megváltoztatnánk.

A módosított BTS02618A géneket a 6. és 8. azonosító számú szekvenciákban mutatjuk be, amelyek a BTS02618A toxint és egy variánsát kódoló DNS-szekvenciát mutatják be. Ezen DNS-szekvenciák általánosan módosított kodonhasználattal rendelkeznek, amelyet a növények, különösen az egyszerűek, mint például a kukorica kodonhasználatához igazítottunk. A 6. azonosító számú szekvencia szerinti DNS pontosan ugyanazt a toxint kódolja, mint a természetes BTS02618A gén, de növényekben magasabb kifejeződési szinteket ér el, különösen egyszerűknél, mint amilyen a kukorica, mely a gazdasejthez igazított kodonhasználatnak köszönhető.

A fentiekén túlmenően azt találtuk, hogy a BTS02618Aa toxin egy olyan receptorhoz kötődik, amely eltér az *Ostrinia nubilalis* bélsejthártyájában lévő CryIAb toxinreceptor csoporttól. Ez azt mutatja, hogy a BTS02618A toxin egyedi receptorral rendelkezik a vele szemben érzékeny rovarokban. A széles gazdaspektrum, az eltérő receptorhoz való kötődés és a csekély homológia más Bt toxinokkal arra utal, hogy a BTS02618A toxin a Bt toxinok új osztályát képviseli. Mivel úgy tűnik, hogy a BTS02618A toxin egy eltérő célhelyet ismer fel, ez különösen hasznos lehet abból a célból, hogy meggátolja a rovarok rezisztenciájának kifejlődését, vagy hogy olyan rovarokat küzdjünk le a segítségével, amelyek más Bt toxinokkal szemben rezisztensek. Különösképpen jelentős a rezisztenciaki-

alakulás megelőzésében az bTS02618A génnek más, nem kompetitívan kötődő toxinokat kódoló Bt génekkel (ilyeneket ismertet a 408 403 sz. európai közzétételi irat) való együttes kifejezése egyetlen gazdán belül. Előnyös a CryIAb és bTS02618A proteinek együttes expressziója.

Az érzékeny rovar kártevők széles spektrumára tekintettel a bTS02618A toxin és variánsai különösen hasznosak növények transzformálására, például egyszikűek (mint amilyen a kukorica) és zöldségfélék (mint amilyenek a káposztafélék) esetén annak érdekében, hogy ezeket a növényeket a rovarkártól megvédjük.

Az inszekticid hatású bTS02618A génrész vagy annak ekvivalense, előnyösen a bTS02618A kiméra gén, amely a bTS02618A protoxin inszekticid hatású részét kódolja, hagyományos módon stabilan beiktatható egy különálló növényi sejt sejtmag genomjába, és az ily módon transzformált növényi sejt hagyományos módon használható egy rovarok ellen rezisztens módosított növény előállítására. Ilyen vonatkozásban egy *Agrobacterium tumefaciens*ben lévő, inszekticid hatású bTS02618A génrészt hordozó ártalmatlanított Ti-plazmid használható fel a növényi sejt transzformálására. Ezt követően egy transzformált növény regenerálható a transzformált növényi sejtől ismert módszerek felhasználásával, mint amilyenek például a 0 116 718 és 0 270 822 sz. európai közzétételi iratokban, a WO 84/02913 számú PCT közzétételi iratban és a 87/400544.0 sz. európai szabadalmi bejelentésben, valamint Gould és társai (1991) publikációjában leírt módszerek.

Az előnyösnek talált Ti-plazmid vektorok mindegyike tartalmazza az inszekticid hatású bTS02618A génrészt a Ti-plazmidban lévő T-DNS határszekvenciái között, vagy legalább annak jobb oldali határszekvenciájának bal oldalán elhelyezve.

Természetes, hogy a növényi sejt transzformálására más típusú vektorok is alkalmazhatók, olyan eljárásokkal, mint amilyen a közvetlen géntranszfer (amelyet például a 0 233 247 sz. európai közzétételi iratban ismertettek), a pollen-közvetített transzformáció, (amelyet például a 0 270 356 számú európai közzétételi iratban, a WO 85/01856 sz. PCT közzétételi iratban és a 4 684 611 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban ismertettek), növényi RNS-vírus által közvetített transzformáció (amelyet például a 0 067 553 sz. európai közzétételi iratban és a 4 407 956 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban ismertettek), liposzóma által közvetített transzformáció (amelyet például a 4 536 475 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban ismertettek) és más módszerek, mint amilyenek például a nemrég leírt, kukorica (Fromm és társai, 1990; Gordon-Kamm és társai, 1990) és rizs (Shimamoto és társai, 1989; Datta és társai, 1990) bizonyos vonalainak transzformálására szolgáló módszerek, illetve a szintén nemrégiben publikált módszer, amely általában egyszikűek transzformálására szolgál (WO 92/09696 sz. PCT közzétételi irat).

A keletkezett transzformált növény a hagyományos növénytermesztési séma szerint további módosított,

vagyis azonos jellemzőkkel bíró növények előállítására, vagy pedig a rovarirtó hatású bTS02618A génrésznek azonos vagy rokon növény fajok más fajtáiba való bevitelére használható fel. A transzformált növényekből származó magok stabil genomi inszertumként tartalmazzák az inszekticid hatású bTS02618A génrészt. A transzformált növény sejtjeiből hagyományos módszerekkel lehet előállítani a bTS02618A protoxin inszekticid hatású részét, előnyösen a bTS02618A toxint, amelyet kinyerhetünk abból a célból, hogy hagyományos inszekticid készítményeket állítsunk elő Lepidoptera ellen (821 582 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés, 86/300 291.1 sz. európai szabadalmi bejelentés).

Az inszekticid hatású bTS02618A génrészt, előnyösen a csonkolt bTS02618A gént növényi sejt genomjába visszük be úgy, hogy a génrész kifejeződését a növényi sejtben szabályozni képes promotertől lefelé (azaz 3'-irányba) illesztjük be. Ez előnyösen úgy valószínűsíthető meg, hogy a bTS02618A kiméra gént iktatjuk be a növényi sejt genomjába. Előnyös promoterek például a következők: a karfiol-mozaikvírus CM1841 (Gardner és társai 1981), CabbB-S (Franck és társai, 1980) CabbB-JI izolátumainak (Hull és Howell 1987) erősen konstitutív 35S promoterei (a „35S promoterek”); valamint a TR1' promoter és a TR2' promoter (a továbbiakban „TR1' promoter”, illetve „TR2' promoter”), amelyek a T-DNS az 1', illetve 2' génjeinek a kifejeződését irányítják (Velten és társai 1984).

Hasonlóképpen olyan promoter is alkalmazható, amely nem konstitutív, hanem amely a növény egy vagy több szövetére vagy szervére nézve specifikus (például a levelekre és/vagy gyökerekre nézve), így a beiktatott bTS02618A génrész csak a specifikus szerv(ek) vagy szövet(ek) sejtjeiben fejeződik ki. Például a rovarirtó hatású bTS02618A génrész szelektíven volt kifejezhető valamely növény leveleiben (például kukoricában, gyapotban) oly módon, hogy az inszekticid hatású génrészt egy fény által indukálható promoter szabályozása alá helyeztük. Ilyen a ribulóz-1,5-bifoszfát-karboxiláz kis alegység génjének promotere, amely ugyanabból a növényből, vagy valamely más növényből (például borsóból) származhat (ezt írják le a 821 582 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésben és a 86/300 291.1 sz. európai szabadalmi bejelentésben). Egy további lehetőség szerint úgy is eljárhatunk, hogy egy olyan promotert alkalmazunk, amelynek a kifejeződése indukálható (például hőmérséklet, vagy kémiai faktorok hatására).

Az inszekticid hatású bTS02618A génrészt a növényi genomba illesztjük úgy, hogy a beiktatott gén felfelé (vagyis 5'-irányba) helyezkedjen el a megfelelő 3'-terminális transzkripció szabályozójelekhez képest (vagyis a transzkriptum kialakulásáért és a poliadenilációért felelős jelekhez képest). Ez előnyösen úgy valószínűsíthető meg, hogy a bTS02618A kiméra gént illesztjük be a növényi sejt genomjába. Előnyös poliadenilációs és transzkriptum kialakulásáért felelős jelek közé tartoznak az oktopin szintáz gén (Gielen és társai 1984) és a T-DNS-gén 7 (Velten és Schell 1985) jelei, amelyek a

transzformált növényi sejtekben 3'-nem átíró DNS-szekvenciákként működnek.

A rovarirtó hatású BTS02618A génrész a növény genomjába adott esetben hibrid gén formájában építhető be (86/300 291.1 sz. európai szabadalmi bejelentés; Vaecq és társai, 1987) ugyanannak a promoternak a szabályozása mellett, mint egy szelekciós marker-gén, például a kanamicinrezisztenciát kódoló neogén (0 242 236 sz. európai közzétételi irat), így a növény egy fúziós proteint fejez ki.

A Lepidoptera-ellenes proteint kódoló teljes BTS02618A gén vagy része más baktériumok transzformálására is felhasználható. Ilyen például a B. thuringiensis, amely Lepidoptera vagy Coleoptera ellen inszekticid hatással rendelkezik. Ezáltal olyan transzformált Bt-törzset állíthatunk elő, amely Lepidoptera és Coleoptera kártevő rovarok széles köre ellen, vagy további Lepidoptera rovarkártevők irtására használható fel. Megfelelő klónozóeszközbe beépített BTS02618A génnel vagy génrésszel hagyományos módszerekkel valósítható meg a baktériumok transzformálása előnyösen úgy, hogy hagyományos elektroporációs módszereket alkalmazunk, mint amilyeneket például Mahillon és társai (1989) és a WO 90/06999 sz. PCT közzétételi iratban ismertettek.

BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B és BTS02652E törzsek mutánsait előállíthatjuk úgy is, hogy ezeket a törzseket valamely mutagén ágenssel kezeljük, például nitrozo-guanidinnel vagy ultraibolya sugárzással. Ezeket a módszereket a szakterületen jártasak jól ismerik. Etil-metánszulfonátos kezeléssel asporogén mutánsok is előállíthatók. A kapott mutánsokat a lényegében azonos rovarirtó aktivitás megtartása mellett javított tulajdonságokra (mint amilyen például a nagyüzemi fermentáció lehetősége és hasonló) szkrinálhatjuk.

A BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B, vagy BTS02652E törzsek egy vagy több idegen teljes Bt génnel vagy annak egy inszekticid hatású részével transzformálhatók, ilyenek: a bt18 gén (0 358 557 sz. európai közzétételi irat), vagy valamely más Lepidoptera-ellenes proteint kódoló Bt gén; és a bt109P gén (WO91/16433 sz. PCT közzétételi irat), amely egy Coleoptera elleni proteint kódol. Ezáltal egy olyan transzformált Bt-törzs állítható elő, amely a rovarkártevők még nagyobb csoportjának leküzdését teszi lehetővé (például Coleopterák és/vagy további Lepidopterák).

Egy hagyományos klónozóvektorba beépített idegen Bt-gén egészével vagy annak egy részével jól ismert módszerrel megvalósítható a BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B vagy BTS02652E törzsek transzformációja, előnyösen hagyományos elektroporációs módszert alkalmazva (Chassy és társai 1988) vagy más eljárással, például Lereclus és társai (1992) által leírt módszerrel.

A sejtek jó kitermeléssel történő előállítására a BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B, vagy BTS02652E törzsek mindegyike hagyományos módszerekkel fermentálható (Dulmage, 1981; Bernhard és Utz, 1993). Megfelelő, jól ismert körülmények között

(Dulmage, 1981) a BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B vagy BTS02652E törzsek spórákat fejlesztenek, nagy mennyiségben BTS02618A protoxint tartalmazó kristályos proteineket termelve.

5 Egy találmány szerinti rovarirtó készítményt, különösen pedig valamely Lepidoptera elleni készítményt hagyományos módon formázhatunk úgy, hogy a BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B vagy BTS02652E törzsek valamelyikét vagy előnyösen a megfelelő kristályokat, kristályos proteineket, vagy a BTS02618A protoxint, toxint vagy inszekticid hatású protoxinrészt alkalmazzuk hatóanyagként megfelelő hordozókkal, hígítókkal, emulgeáló- és/vagy diszpergálószerekkel együtt (például a Bernhard és Utz által ismertett módszerrel, 1993.).

10 Az ilyen inszekticid készítményt nedvesíthető por-ként, pasztillaként, granulátumként vagy porkészítményként, vagy vizes vagy nem vizes oldószerekkel képzett folyékony készítményként hab, gél, szuszpenzió, koncentrátum stb. formájában, készíthetjük el. A BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B, vagy BTS02652E törzsek, kristályok, kristályos proteinek, vagy a BTS02618A protoxin, toxin vagy rovarirtó hatású protoxinrész koncentrációját az ilyen készítményben attól függően állítjuk be, hogy a készítmény milyen természetű és milyen felhasználásra szánjuk. Általában a találmány szerinti kártevőellenes készítmények 2–4 héten át megvédik a szabadföldi területeket a Lepidopteráktól a készítménnyel való egy-egy kezelést követően. Ha ennél hosszabb ideig tartó védelemre törekszünk (például egy teljes vegetációs periódus tartamára), akkor a készítményből rendszeres időközönként újabb mennyiségeket kell alkalmazni.

30 A jelen találmány értelmében rovarok, különösképpen pedig Lepidopterák ellen előnyösen úgy alkalmazható a készítmény, hogy valamely megtámadott és védeni kívánt helyre (területre) felvisszük (például rápermetezzük) a BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B vagy BTS02652E törzsek, spórák, kristályok, kristályos proteinek vagy a BTS02618A protoxinja, toxinja vagy rovarirtó hatású protoxinrésze, előnyösen a BTS02618A toxin rovarirtó hatású mennyiségét. A kezelni és védeni kívánt hely fogalmi körébe tartozónak tekintjük a rovarkártevők élőhelyét vagy a növekedésben lévő vegetációt, vagy azt a földterületet, amelyen a vegetációt termelni kívánjuk.

40 A BTS02618A protoxin vagy toxin előállítására a BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B vagy BTS02652E törzset hagyományos módon megfelelő táptalajon tenyésztjük, és azután feltárjuk hagyományos módszerekkel, például enzimatis lebonnással vagy detergenssekkal vagy más ismert módszerrel. Ezután a protoxin standardmódszerekkel elválasztható és tisztítható, például kromatográfiával, extrakcióval, elektroforézissel és hasonlóakkal. A toxint ezután a protoxin tripszinnel történő emésztésével kaphatjuk meg.

55 A BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B vagy BTS02652E sejteket összegyűjtésük után változatlan állapotban is felhasználhatjuk akár élő, akár elölt sej-

tekként, előnyösen szárítva, azon a területen, amelyet a rovarok ellen védeni kívánunk. Ilyen szempontból előnyös, ha egy tisztított BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B vagy BTS02652E törzset használunk (akár élő, akár előlt állapotban), különösképpen valamely olyan sejtömeget, amely 90,0–99,9 t%-ban BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B, vagy BTS02652E törzsekből áll.

A BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B, vagy BTS02652E sejtek, kristályok vagy kristályos proteinek, vagy a BTS02618A protoxin, toxin vagy inszekticid hatású protoxinrész igen sokféle módon készíthető ki valamely rovarirtó készítménnyé, tetszés szerinti mennyiségű és számú nedves vagy száraz hagyományos adalék anyag hozzáadásával, a konkrét felhasználástól függően. Az adalék anyagok lehetnek nedvesítőanyagok, detergenssek, stabilizálók, tapadást fokozó anyagok, szétterjedést fokozó anyagok és töltőanyagok. Ilyen készítmények közé tartoznak a paszták, porozószeretek, nedvesíthető porok, granulátumok, csalik és aeroszolos permetek.

Más Bt sejtek, kristályok, kristályos proteinek, protoxinok, toxinok és inszekticid hatású protoxinrészek és más inszekticidek, valamint fungicidek, biocidek, herbicidek és műtrágyák is alkalmazhatók a BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B, vagy BTS02652E sejtek, kristályok, vagy kristályos proteinek, vagy a BTS02618A protoxin, toxin, vagy rovarirtó hatású protoxinrész mellett további előnyök és kedvező hatások elérése céljából.

Az ilyen rovarirtó készítményt hagyományos módszerekkel állíthatjuk elő, és az alkalmazott BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B vagy BTS02652E sejtek, kristályok, vagy kristályos proteinek, vagy a BTS02618A protoxin, toxin, vagy rovarirtó hatású protoxinrész mennyisége egy sor különféle tényezőtől függ, ilyen az irtani kívánt kártékony rovar, az alkalmazott készítmény, a kezelendő terület típusa, amelyen a készítményt alkalmazni kívánjuk, valamint az uralkodó időjárási feltételek. Általában a BTS02618A protoxin, rovarirtó hatású protoxinrész, vagy toxin koncentrációja a készítményre számított minimális, mintegy 0,1 t%-tól a készítményre számított mintegy 100 t%-ig terjed, előnyösen mintegy 0,15 t% és mintegy 0,8 t% közötti érték a készítményre számítva.

A gyakorlatban bizonyos rovarokkal megetethető a BTS02618A protoxin, toxin, rovarirtó hatású protoxinrész vagy ezek keveréke a védett területen, vagyis azon a területen, ahol az ilyen protoxint, toxint, és/vagy rovarirtó hatású protoxinrészt alkalmazzuk. Eljárhatunk úgy is, hogy bizonyos rovarokkal a BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B, vagy BTS02652E törzs vagy transzformánsai ép és élő sejtjeit etetjük meg úgy, hogy a rovarok valamennyit elfogyasztanak a törzsek protoxinjaiból, és elpusztulnak vagy károsodást szenvednek.

Abból a célból, hogy a rovarokat akár transzformált növények, akár rovarirtó készítmények vagy hasonló formájában BTS02618A proteinnel érintkeztetve elpusztítsuk, a BTS02618A protein bármely fent ismer-

tetett, lényegében azonos a rovarirtó aktivitású variánsát, előnyösen pedig a BTS02618Aa és BTS02618Ab proteineket használhatjuk fel. Ezen túlmenően bármely fent ismertetett, növények és baktériumok transzformálására szolgáló módszer alkalmazható arra, hogy BTS02618Aa vagy BTS02618Ab proteinnel lépünk fel a rovarok ellen. A természetes BTS02618A protein helyett a BTS02618A protein valamely más, fokozottan proteázrezisztens proteinvariánsa is alkalmazható.

Példák

A következő példák részletesen szemléltetik a találmányt.

A példákban hivatkozott ábrákban és szekvencialistában a következők szerepelnek:

1. ábra

Az Alul-gyel emésztett Bt-törzsek Southern-blot-analízise: HD127 Bt-törzs (1. oszlop), a BTS02618A törzs (2. oszlop), a BTS02459 Bt-törzs [*cryIA(c)*-t, 81K-t, *cryIC*-t és *cryIE*-t tartalmazza, 3. oszlop], és a BTS02480E Bt-törzs (amely azonos géneket tartalmaz, mint a HD-127, 4. oszlop), a *cryI* kristályos protein gén DNS-próbáinak keverékét alkalmazva, amely a *cryIG* próbát (1. azonosító számú szekvencia) is tartalmazza. Mindegyik sáv egy speciális kristályos proteingénnek felel meg. A próbák segítségével megállapítottuk, hogy a BTS02618A törzs a *cryIA(b)* gént és egy új gént tartalmaz, mégpedig a bTS02618A gént, amelyet egy körülbelül 530 bp-os Alul-fragmensként azonosítottunk, mely hibridizál az 1. azonosító számú szekvencia szerinti *cryIG* próbával. A felismert *cryI* gének neveit megadtuk és néhány fragmens méretét is. A bTS02618A gént 3 csillaggal jelöltük; „?” jellel az ismeretlen génfragmenseket szerepeltettük.

Szekvencialista

1. azonosító számú szekvencia – A bTS02618A gén izolálására alkalmazott DNS-próba nukleotidszekvenciája. Ez a próba a *cryIG* DNS-szekvencia részéből származik, és komplementer a Smulevitch és társai által (1991) ismertetett DNS-szekvencia 2732–2750. nukleotidjaival.

2. azonosító számú szekvencia – A bTS02618A gén részleges 5'-nukleotidszekvenciája, amely magában foglalja a feltételezett transzlációs iniciációs kodont a 195–197. nukleotidpozíciókban.

3. azonosító számú szekvencia – A bTS02618A gén részleges 3'-nukleotidszekvenciája, (N: ismeretlen nukleotid), amely magában foglalja a feltételezett transzlációs iniciációs kodont a 1146–1148. nukleotidpozíciókban.

4. azonosító számú szekvencia – A bTS02618A gén nukleotidszekvenciája és a BTS02618A protoxin transzlált aminosavszekvenciája. A protoxin nyitott leolvasási kerete a 668. nukleotidtól a 4141. nukleotidig terjed. A transzlációs iniciációs kodon 668–670. nukleotidhelyzetben van, a transzlációs stopkodon a 4139–4141. nukleotidhelyzetben.

5. azonosító számú szekvencia – A BTS02618A protein aminosavszekvenciája. A mintegy 69 kD-os BTS02618A toxin szekvenciája a 44. aminosavtól a 658. aminosavig terjed.

6. azonosító számú szekvencia – Egy módosított csonkolt bTS02618A gén nukleotidszekvenciája és a BTS02618A toxin transzlatált aminosavszekvenciája.

7. azonosító számú szekvencia – A módosított bTS02618A toxingén transzlatált aminosavszekvenciája. Bár ezen a helyen csak a toxinrészt ábrázoljuk, a protein teljes hossza 100%-ban azonos aminosavszekvenciával rendelkezik, mint a BTS02618A protein. (5. azonosító számú szekvencia).

8. azonosító számú szekvencia – A módosított bTS02618Aa toxingén nukleotidszekvenciája és a BTS02618A toxin transzlatált aminosavszekvenciája. A N- és C-terminális aminosavak delécióján és az N-terminális metioninkodon után egy alaninkodon beiktatásán túlmenően a BTS02618Aa toxin csak a 123. számú aminosavban tér el a BTS02618A toxintól (az Arg kodon Lys kodonra cserélődött).

9. azonosító számú szekvencia – A BTS02618Aa toxin aminosavszekvenciája. A BTS02618Aa protoxin a toxinflagmentből származó C-terminális részében 100%-ban azonos a BTS02618A protoxinnal.

Amennyiben egyébként nem említjük a példákban, a rekombináns DNS előállítására és manipulálására vonatkozó valamennyi eljáráshoz Sambrook és társai által ismertetett standardeljárásokat alkalmazzuk [Molecular Cloning – A Laboratory Manual, Second Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, (1989)].

1. példa

A BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B és BTS02652E törzsek jellemzése

A BTS02617A, a BTS02618A és a BTS02654B törzseket gabonaporból izoláltuk, amelyet Cadlanban, Bicol tartományban a Fülöp-szigeteken gyűjtöttünk össze, és a BCCM-LMG-gyűjteményben 1992. július 2-án LMGP-12592, LMGP-12593, illetve LMGP-12594 nyilvántartási számon deponáltunk. A BTS02652E törzset is Fülöp-szigeteki gabonaporból izoláltuk, majd 1993. március 1-én a BCCM-LMG-ben LMG P-13493 nyilvántartási számon deponáltuk.

Valamennyi törzs hagyományos standard táptalajon tenyésztendő, előnyösen T₃ közegen (3 g/l tripton, 2 g/l triptóz, 1,5 g/l élesztőextraktum, 5 mg mangán-klorid, 0,05 M nátrium-foszfát, pH=6,8 és 1,5% agar) előnyösen 28 °C-on. Hosszú ideig tartó tárolás céljára előnyös, ha azonos térfogatú spóra-kristály szuszpenziót azonos térfogatú 50%-os glicerinnel keverünk össze, és -70 °C-on raktározzuk, vagy a spóra-kristály szuszpenziót liofilezzük. Spóráképzés céljából előnyös, ha a törzset T₃ táptalajon tenyésztjük 48 órán át 28 °C-on, majd 4 °C-on tartjuk. A vegetatív fázis alatt a törzsek mindegyike fakultatív anaerob körülmények között is képes növekedni, azonban spóráképződés csak aerob körülmények között fordul elő.

A törzsek mindegyikét autoklávban sterilizzuk 120 °C-on, (1 bár nyomás mellett) 20 percen át. Az

ilyen kezelés teljesen inaktíválja mind a spórákat, mind a BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B és BTS02652E protoxinokat. A spórák ibolyán túli besugárzással (254 nm) is inaktíválhatók.

5 Miután Nutrient Agar („NA”, Difco Laboratories, Detroit, MI, Amerikai Egyesült Államok) táptalajon egy napon át tenyésztettük a törzseket, a BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B és BTS02652E törzsek mindegyikének telepei opálos fehér, szabálytalan szélű telepeket képeznek. Minden törzs sejtjeiben (Gram-pozitív pálcák 1,7–2,4×5,6–7,7 µm) 28 °C-on T₃ agaron való 48 órás tenyésztés után megjelennek a spórák. A spóráfejlődés során termelt kristályos proteineket a BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B vagy 10 BTS02652E törzsek kristályai burkolják be. Különösen figyelemre méltó, hogy a kristály a spórához tapadt állapotban marad spórázás után is.

15 A BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B és BTS02652E törzsek Bt szerotípusát meghatároztuk, és azt találtuk, hogy ez valamennyi fenti törzs esetén tolvorthi H9 szerotípus. Ezt hagyományos szerotipizáló módszerekkel határoztuk meg, mint amilyen a WHO Collaborating Center alkalmaz az entomopatogén Bacillus esetén.

25

2. példa

A BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B és BTS02652E törzsek, a BTS02618A protoxin és BTS02618Aa, valamint BTS02618Ab toxinok vagy protoxinok inszekticid hatása Noctuidae, Gelechiidae, Yponomeutidae és Pyralidae családokba tartozó fajokkal szemben

A toxicitási vizsgálatokat frissen kikelt lárvákon vizsgáltuk (Plutella xylostella esetén harmadik lárváalakotú lárvákat alkalmazzunk), amelyeket mesterséges tápon tartottunk, amely a BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B és BTS02652E törzsek egyikének spóra-kristály keverékeivel vagy a BTS02618Aa vagy 40 BTS02618Ab toxinokkal vagy protoxinokkal volt összeállítva. A mesterségesen összeállított tápot Costar 24 mérőhelyes lapok mérőhelyeire adagoltuk. A táp formaldehidet nem tartalmazott. 50 µl hígított mintát vittünk fel a táp felszínére, és lamináris légáramban megszárítottuk. Az LC₅₀ mérőeljárásokhoz a hígításokat 45 PBS-BSA pufferben készítettük el, és öt hígított mintát alkalmazzunk. Minden mérőhelyre két lárvát helyeztünk, és 24 lárvát használtunk minta-hígításokként. Az élő és elpusztult M. brassica, S. frugiperda, H. virescens, O. nubilalis, Plutella xylostella és S. exigua lárvákat az ötödik napon számoltuk meg, majd a hatodik napon az élő és elpusztult A. ipsilon, A. segetum és S. litoralis lárvákat számoltuk meg. Az LC₅₀- és LC₉₅-értékeket [vagyis azokat a koncentrációkat, amelyek ahhoz szükségesek, hogy a vizsgált rovarok 50%-át, illetve 50 95%-át elpusztítsa) a spóra-kristályok száma/cm²-ben kifejezve vagy ng (pro)toxin/cm²-ben kifejezve] Probit-analízis (Finney, 1971) segítségével értékeltük, az eredményeket az alábbiakban közöljük.

60 A burgonyamolyt (Phthorimaea operculella) a következő vizsgálatnak vetettük alá: burgonyagumókból

vágott korongokat különféle koncentrációjú BTS02618Aa proteinoldatokba mártottuk. 3 ilyen korongot, amelyet előzőleg megszáritottunk egy tálcára

helyeztünk, amelyen 20 Phthorimaea lárvát helyeztünk el. A letalitást 4–5 nap múlva határoztuk meg minden egyes koncentrációra nézve.

I. táblázat
Spodoptera littoralis

Kísérlet/törzs	LC ₅₀ ^a	LC ₉₅ ^a	FL _{min-max} ^b	Merekség
1. kísérlet				
BTS02618A	2,4	7,7	1,5–3,4	3,2
HD127 ^c	2,5	168	1,2–7,4	1,0
2. kísérlet				
BTS02618A	1,1	4	0,8–1,6	3,0
HD127	21,2	133,7	14,4–31,9	2,0

^a jelentése: 10⁵ spóra-kristály/cm²;

^b jelentése: az LC₅₀-értékek 95%-os konfidenciahatára;

^c a Howard Dulmage gyűjteményből (Northern Region Research Center, 1815 North University, Peoria, Ill. Amerikai Egyesült Államok). A kurátor dr. L. Nakamura.

20 Tisztított BTS02618A protoxinnal végzett kísérletek ugyancsak azt mutatják, hogy ez a protoxin szignifikánsan toxikus az S. littoralis lárvákra.

II.1. táblázat
Spodoptera exigua
1. Kristály/spóra keverékek

Kísérlet/törzs	LC ₅₀ ^a	LC ₉₅ ^a	FL _{min-max} ^b	Merekség
1. kísérlet				
BTS02618A	1,4	7,9	0,48–3,9	2,2
HD127	8,2	163,5	5,1–15,7	1,3
2. kísérlet				
BTS02618A	1,2	3,56	0,91–1,57	3,5
BTS02617A	0,79	2,12	0,61–1,03	3,81
HD127	3,5	44,2	1,36–11,5*	1,5
Florbac	4,1	53,9	1,5–17,0*	1,47
BTSO0170U ^c	5,1	46,5	1,83–24,4*	1,71
3. kísérlet				
Javelin ^d	23,12	195,7	14,6–56,7	1,77
4. kísérlet				
BTS02618A	1,07	2,91	0,83–1,39	3,8
BTS02617A	0,87	4,7	0,59–1,21	2,22
HD127	4,7	56,9	1,85–18,7*	1,52
Florbac ^e	2,53	48,1	0,79–6,71*	1,29
BTSO0170U	1,94	56,3	0,55–5,4*	1,12

^a jelentése: 10⁵ spóra-kristály/cm²;

^b jelentése: az LC₅₀-értékek 95%-os konfidenciahatára,

^a *-gal jelölt értékek az LC₅₀-értékek 90%-os konfidenciahatárát jelentik;

^c jelentése: WO 90/06999 sz. PCT közzétételi irat;

^d jelentése: Javelin^R-ből (Sandoz, Lichtstrasse, Basel, Svájc) izolált törzs;

^e jelentése: Florbac^R-ből (Novo Nordisk, Novo Alle, Bagsvaerd, Dánia) izolált törzs.

II.2. táblázat
2. Toxin/protoxin vizsgálatok

ICP		LC ₅₀ ^a	LC ₉₅ ^a	FT _{min-max} ^b	Meredekség
BTS02618A	Protoxin	26,6	100,6	20,9–33,9	2,8
CryIC	Toxin	68,9	313,2	50,5–94,1	2,5
CryID	Toxin	118,6	870,6	82,7–170,0	1,9

^a jelentése: ng/cm²;

^b jelentése: az LC₅₀-értékek 95%-os konfidenciahatárai.

III.1. táblázat
Mamestra brassica
1. kristály/spóra keverékek

Kísérlet/törzs	LC ₅₀ ^a	LC ₉₅ ^a	FL _{min-max} ^b	Meredekség
HD127	37,8	297,6	17,8–91,1	1,8
BTS02618A	8,6	59,6	6,0–12,2	1,9
BTS02617A	5,2	25,8	3,7–7,1	2,4
BTS02652	12,92	44,2	9,7–17,1	3,0
BTS02654	14,2	60,5	10,8–19,9	2,6
BTS02617A	0,87	4,7	0,59–1,21	2,22
HD127	4,7	56,9	1,85–18,7*	1,52
Florbac ^e	2,53	48,1	0,79–6,71*	1,29
BTSO0170U	1,94	56,3	0,55–5,4*	1,12

^a jelentése: 10⁵ spóra-kristály/cm²;

^b jelentése: az LC₅₀-értékek 95%-os konfidenciahatára.

III.2. táblázat
Protoxinkísérletek

ICP		LC ₅₀ ^a	LC ₉₅ ^a	FL _{min-max} ^b	Meredekség
BTS02618A	Protoxin	25,3	125,1	19,3–33,2	2,4
CryIC	Protoxin	22,0	62,9	16,3–29,6	3,6
CryIA(b)	Protoxin	162,4	7169	93,2–283,1	1,0

^a jelentése: ng/cm²;

^b jelentése: az LC₅₀-értékek 95%-os konfidenciahatára.

IV.1a. táblázat
Agrotis ipsilon
1. Kristály/spóra keverékek

Törzs	Halálozás ^a	Gén ^b
Btgall. ^c	1/20	cryIF, cryIG, cryII, 81k
HD127 ^d	2/20	cryIAa, cryIAb, cryIC, cryID, cryII, 81k
BTS02618A	16/20 ^e	cryIAb, cryII, bTS02618A
puffer	1/20	nincs

^a jelentése: 6 nap múlva elpusztult 1. lárvállapotú lárvák száma (10⁷ spóra-kristály/cm²);

^b jelentése: az ezekben a törzsekben ismert módon jelen lévő gének;

^c jelentése: Bt gall. Smulevics és társai (1991) szerint;

^d jelentése: HD127 a Howard Dulmage gyűjteményből (NRRC, lásd fent) szerezhető be.

^e jelentése: a túlélő lárvákban súlyos növekedésgátlás mutatkozik.

IV.1b. táblázat

Törzs	LC ₅₀ ^a	LC ₉₅ ^a	FL _{min-max} ^b	Merekség
BTS02618A	84,4	207,9	65,9–109,6	4,2
HD127	>250			
BTS02617A	53,4	261,0	27,7–112,3	2,4

^a jelentése 10⁶ spóra/cm²;^b az LC₅₀-értékek 95%-os konfidenciahatára.

IV.2. táblázat

2. Toxin/protoxin kísérlet

ICP		LC ₅₀ ^a	LC ₉₅ ^a	FL _{min-max} ^b	Merekség
CryIA	Toxin	>1350			
BTS02618A	Protoxin	212,2	1973	168,1–267,9	1,7

^a ng/cm²;^b az LC₅₀-értékek 95%-os konfidenciahatára.

Tekintettel arra, hogy Macintosh és társai (1990) le-
írták, hogy a CryIAC toxinnak bizonyos hatása van az
A. ipsilon ellen, összehasonlításképpen megvizsgáltuk

20 a tisztított CryIAC toxin hatását ezekre a rovarokra,
azonban az A. ipsilonra nézve szignifikáns mortalitást
nem idézett elő.

V.1. táblázat

Heliothis virescens

1. Kristály/spóra keverék

Kísérlet/törzs	LC ₅₀ ^a	LC ₉₅ ^a	FL _{min-max} ^b	Merekség
BTS02617A	1,69	14,99	0,67–2,89	1,73
BTS02618A	2,71	25,4	0,88–6,99	1,69
BTS00170U ^c	15,1	398,7	8,3–41,2	1,15
Dipel ^d	2,99	14,11	1,25–7,76	2,45

^a 10³ spóra-kristály/cm²;^b az LC₅₀-értékek 95%-os konfidenciahatára;^c WO 90/06999 sz. PCT szabadalmi közzétételi irat;^d Dipel^R-ből (Abbott Lab., North Chicago, Ill., Amerikai Egyesült Államok) izolált törzs.

V.2. táblázat

2. Toxin/protoxin kísérlet

ICP		LC ₅₀ ^a	LC ₉₅ ^a	FL _{min-max} ^b	Merekség
BTS02618A	Protoxin	31,6	182,7	20–50	2,1
CryIA	Toxin	7,2	169,1	4,9–10,5	1,2

^a ng/cm²;^b az LC₅₀-értékek 95%-os konfidenciahatára.

VI.1. táblázat

Ostrinia nubilalis

1. Kristály/spóra keverék

Kísérlet/törzs	LC ₅₀ ^a	LC ₉₅ ^a	FL _{min-max} ^b	Merekség
BTS02617A	4,92	12,49	2,45–6,81	4,0
BTS02618A	6,17	39,7	2,93–9,74	2,0
Dipel ^d	>30			

^a 10⁵ spóra-kristály/cm²;^b az LC₅₀-értékek 95%-os konfidenciahatára;^c Dipel^R (Abbott Lab.)-ből izolált törzs.

VI.2. táblázat
2. Tisztított protoxin kísérlet

ICP		100% halálozás ^a
CryIAb	Toxin	1350
CryIB	Toxin	1350
BTS02618A	Protoxin	100

^a az a koncentráció, amely mellett 100%-os mortalitás volt megállapítható (ng/cm²-ben megadva).

A tisztított BTS02618A protoxin hatására szignifikáns toxicitás mutatkozott az *Ostrinia nubilalis* lárvákban is, az *Ostrinia*-törzsek ellen legaktívabb CryI toxinokkal összehasonlítva.

Plutella xylostella

Plutella xylostella lárvák esetében több kísérletben szignifikáns mortalitás volt észlelhető akkor is, ha a mesterséges táphoz tisztított BTS02618A toxint adagoltunk.

Spodoptera frugiperda

A bTS02618A génnel transzformált kristályhiányos Bt-törzseiből származó kristály/spóra keverékekről (Mahillon és társai, 1989) is megállapítottuk, hogy szignifikánsan akadályozzák a *S. frugiperda* lárvák növekedését a rovarok etetésével járó kísérletek során.

Agrotis segetum

Megállapítottuk, hogy a BTS02618Aa toxin a bagolylepke hernyója (*Agrotis segetum*) ellen is hatásos. A BTS02618A protein ezen variánsa *Agrotis* lárvák 50%-át pusztította el 980 ng/cm² (=LC₅₀) BTS02618Aa toxinkoncentráció esetén. Összehasonlító kísérletek azt mutatják, hogy minden további vizsgálat alá vetett CryI toxin [(CryIAb, CryIAc, CryIAa, CryIC, CryID, CryIE, Hofte&Whiteley 1989; 358.557 sz. európai közéleti irat)] LC₅₀-értéke ezen rovar esetében több mint 15 000 ng/cm². Az *Agrotis segetum* különféle haszonnövények jelentős rovarkártevőjeként ismert.

Phthorinmeae operculella

A burgonyamoly, a *Phthorinmeae operculella* is érzékenynek mutatkozott a BTS02618Aa toxin ellen. Azok a lárvák, amelyek BTS02618A toxint ettek, szignifikánsan magasabb mortalitási hányadot mutattak, mint a kontroll-lárvák.

A fentiekben túlmenően a BTS02618Aa toxint különféle rovarokon megvizsgálva azt találtuk, hogy lényegében azonos rovarirtó hatással rendelkezik, mint a BTS02618A protein. Biológiai mérőeljárásokat végeztünk *Heliothis virescens*, *Mamestra brassicae*, *Ostrinia nubilalis*, *Spodoptera exigua*, és *Spodoptera littoralis* rovarokkal, és ezek csupán csekély eltérést mutattak az LC₅₀-értékekben a BTS02618A proteinnel összehasonlítva. Ez azt mutatja, hogy az új BTS02618Aa toxin és a természetes forma rovarirtó hatása nem tér el lényegesen.

A BTS02618A toxin és protoxin egyik alaninmutánsa, vagyis a BTS02618Ab toxin és BTS02618Ab protoxin *Ostrinia nubilalis*-on vizsgálva azt mutatta, hogy ezen anyagok lényegében ugyanolyan toxikusak, mint a BTS02618Aa toxin vagy protoxin.

Ugyanakkor azt találtuk, hogy a BTS02618Aa toxin nem toxikus a vizsgált Coleoptera rovarokra nézve: *Leptinotarsa decemlineata* és *Diabrotica undecimpunctata howardi* nem reagáltak a BTS02618Aa toxinnal. Ezeket a rovarokat a szakirodalomból jól ismert táplálékfelvételi vizsgálóeljárásokkal vizsgáltuk meg (ilyet ismertet például Rupar és társai, 1991).

Arra a következtetésre jutottunk, hogy a jelen találmány szerinti törzsek, valamint a jelen találmány szerinti BTS02618A protein jelentős inszekticid hatással rendelkeznek olyan rovarok széles köre ellen, amelyek nem érzékenyek a jelenleg hozzáférhető Bt proteinnek közül egyikre sem, és hatásosak legalább három *Spodoptera* faj ellen, és további Noctuidae családba tartozó rovarok ellen, mint például *A. ipsilon*, *A. segetum*, *M. brassica*, és *H. virescens* ellen, valamint a *Pyrallidae*, mint például *O. nubilalis* ellen, *Gelechiidae*, mint például *P. operculella* ellen, továbbá az *Yponomeutidae*, mint például *Pulella xylostella* ellen. Ezeket az eredményeket összegeztük, és a más CryI gének esetén kapott adatokkal (Van Frankenhuyzen, 1993) hasonlítottuk össze a VII. táblázatban. Az eredmények azt mutatják, hogy a rovarok milyen egyedülállóan széles köre érzékeny a BTS02618A proteinre.

Ugyanilyen a gazdaspektruma a BTS02618Aa és BTS02618Ab toxinoknak is. Így ezeket a toxinokat szintén alkalmazhatjuk rovarok ellen, és azzal a további előnnyel rendelkeznek, hogy – a proteázaktivitásra való csekély érzékenyséjük következtében – stabilabban, mivel, mintegy 55 kD-os protein szinte egyáltalán nem képződik.

3. példa

A bTS02618A gén azonosítása

A BTS02618A törzsben az Alul által emésztett teljes DNS Southern blot-analízisével határoztuk meg (1. sz. ábra), DNS-próbaként az 1. azonosító számú szekvencia szerinti cryIG gén DNS-szekvenciáját alkalmazva (Gleave és társai, 1992), standard hibridizációs feltételek alkalmazása mellett. A bTS02618A gén részleges DNS-szekvenciáit – amelyek az 5'- és a 3'-végi szakaszokat tartalmazzák – a 2., illetve 3. azonosító számú szekvenciában mutatjuk be, és a bTS02618A gén teljes DNS-szekvenciája, valamint a BTS02618A protein teljes aminosavszekvenciája a 4. azonosító számú szekvenciában kerül bemutatásra.

A 2. és 3. azonosító számú részleges szekvenciák lehetővé teszik, hogy a bTS02618A gént felismerjük a BTS02617A, BTS02654B és BTS02652E törzsekben, és lehetővé teszik olyan próbák összeállítását, amelyekkel ezekben és más Bt-törzsekben a teljes gén-szekvencia is meghatározható és izolálható. A bTS02618A gén transzlációs iniciációs kodonját meghatároztuk, és az a 2. azonosító számú szekven-

ciában a 195–197. nukleotidhelyzetben található, amely megfelel a 4. azonosító számú szekvencia 668–670. nukleotidhelyzetének. Meghatároztuk, hogy a translációs stopkodon a 3. azonosító számú szekvenciában a 1146–1148. nukleotidhelyzetben található, amely megfelel a 4. azonosító számú szekvencia 4139–4141. nukleotidhelyzeteinek.

A BTS02618A gént a BTS02617A, BTS02654B és BTS02652E törzsekben is azonosítottuk, próbaként az 1. azonosító számú szekvencia DNS-szekvenciáját használva, valamint cryI génekben lévő konzervatív DNS-fragmensekből származó más DNS-próbákat.

Azt találtuk, hogy a teljes hosszúságú BTS02618A gén egy 129,9 kD-os protoxint kódol. Az aminosav-szekvenciát más ismert CryI proteinekkel összehasonlítva azt találtuk, hogy a C-terminális rész (az 5. konzervatív szekvenciaszakasz C-terminális része) homológ a CryIG-vel (88%). Megállapítottuk, hogy az N-terminális résszel (toxin) a legjobban a CryIB toxin homológ, ez azonban kevesebb volt mint 50% (a homológiát úgy fejezzük ki, hogy az a helyes bázispárosodások számát osztjuk az aminosavak számával a leg-hosszabb fragmensben).

Úgy véljük, hogy a legkisebb inszekticid hatású protein egy 69 kD-os (615 aminosavas) protein, amely a 4. azonosító számú szekvenciában a 44. aminosavtól a 658. aminosavig terjed. Egy kisebb, 55 kD-os (494 aminosav) triptikus fragmens a 4. azonosító számú szekvenciában a 165. aminosavtól a 658. aminosavig terjed, amelynek még inszekticid hatása van az *S. exigua* ellen, azonban ez a hatás már szignifikánsan csökkent. Ezért a csonkolt BTS02618A gén vagy egy ekvivalens csonkolt gén előnyösen a fent leírt 4. azonosító számú szekvencia szerinti BTS02618A protoxin 69 kD-os proteinjét kódolja.

4. példa

A BTS02618A gén klónozása és kifejezése

A BTS02618A gén izolálása céljából a BTS02618A törzs teljes DNS-ét előállítottuk és Sau3A segítségével részlegesen emésztettük. Az emésztett DNS-t méret alapján frakcionáltuk szacharóz gradiensen, és a 7 kb és 10 kb közé eső fragmenseket egy BamHI-vel emésztett és BAP-vel kezelt pUC19 klónozóvektorhoz (Yannisch-Perron és társai 1985) ligáltuk. Ezután a rekombináns *E. coli* klónokat, amelyek a vektorokat tartalmazzák, a 3. példában leírt és az 1. azonosító számú szekvencia szerinti cryIG DNS próbával szkríneltük, hogy azonosítsuk azokat a klónokat, amelyek a BTS02618A gént tartalmazzák.

Az így azonosított DNS-fragmenseket ezután Maxam és Gilbert (1980) módszere szerint szekventáltuk. A BTS02618A gén részleges szekvenciáit a 2., illetve 3. azonosító számú szekvenciában mutatjuk be, míg a 4. azonosító számú szekvenciában a teljes BTS02618A gén szekvenciáját és a BTS02618A protein szekvenciáját láthatjuk. A DNS-szekvencia-analízis alapján a gént megfelelő restrikciós enzimekkel hasítjuk, és így módon a csonkolt BTS02618A gént kapjuk, amely a BTS02618A toxint kódolja. A gén *E. coli*ban

való kifejeződését standardmódszerek segítségével váltottuk ki (Sambrook és társai 1989, lásd fent).

A BTS02618A gént szokásos módszerekkel egy kristályhiányos berlini Bt 1715 törzsbe és egy kurstati Bt HD–1 törzsbe [Dipel™- termelőtörzs (Abbott Laboratories)] is beépítettük, saját bakteriális protometereinek szabályozása mellett, egy megfelelő ingázóvektor felhasználásával (Mahillon és társai, 1988).

A kurstati HD–1 Bt-törzs 2 transzformánsának spóra-kristály keverékét (amely a BTS02618A gént tartalmazza) az eredeti kurstati HD–1 Bt-törzset, a vad típusú BTS02618A törzset, a berlini Vt 1715 kristályhiányos törzset és a berlini Bt 1715 kristályhiányos törzs egyik transzformánsát (amelyek a BTS02618A gént tartalmazzák) biológiai mérőeljárásnak vetettük alá *Spodoptera exigua* ellen. A mérőeljárásokat ugyanúgy végeztük el, mint ahogy azt a 2. példában ismertettük. A kristályhiányos transzformált berlini Bt 1715 (amely BTS02618A tartalmú) erősen toxikus volt *S. exigua* ellen (100% mortalitás 4×10^4 spóra-kristály per cm^2 tápagar esetén), míg kristályhiányos berlini Bt 1715 nem volt toxikus. A kurstati HD–1 Bt-törzs (BTS02618A) transzformánsok átlagosan 22 (LC_{50} -szint) – 76-szor (LC_{95} -szint) toxikusabbak voltak, mint az eredeti HD–1 (2. táblázat).

Hasonlóképpen a BTS02618A protein vagy a BTS02618A protein más variánsai bármilyen Bt-törzsbe átvihetők és kifejezhetők a szakterületen ismert bármely módszer segítségével (Baum és társai, 1991; Gamel&Piot, 1992; Lecadet és társai, 1992) feltéve, hogy az alkalmazott vektor a Bt-gazdatörzsszel kompatibilis, és stabilan megmarad a gazdabaktériumban. Ismert, hogy az olyan plazmidvektorok, amelyek a gazdatörzshöz képest replikonhomológiával rendelkeznek, nem alkalmasak (Gamel és Piot 1992).

5. példa

A BTS02618A gén és a csonkolt BTS02618A gén *E. coli*ba való beépítése és a csonkolt BTS02618A gén bevittele növényekbe

Annak érdekében, hogy az BTS02618A gént és a 4. példa szerinti csonkolt BTS02618A gént *E. coli*ban, illetve növényekben fejezzük ki, különféle génkazettákat készítettünk *E. coli*ban a 86/300291.1 és 88/402115.5 sz. európai szabadalmi bejelentésben ismertetett eljárások alkalmazásával.

A következőket hajtjuk végre: a növényekben történő szignifikáns kifejeződés céljából olyan kazettákat, amelyek a) a csonka gént vagy b) egy hibrid gént, vagyis i) a csonka gén és ii) a neo-gén fúzióját tartalmazzák,

köztes növényi expressziós vektorok T-DNS határszekvenciái közé visszük be (a 86/300291.1 sz. európai szabadalmi bejelentésben ismertetett módon); növényi expressziós vektorokban lévő transzkriptum-kialakításért és poliadenilációért felelős jelekhez fuzionáljuk;

a karfiol-mozzaikvírusból származó, 35S3 transzkriptumot irányító konstitutív promoter (Hull és Howell, 1987) vagy az oktopin Ti-plazmid TR-DNS-éből szár-

mazó 2'-promoter (Velten és társai 1984) szabályozása alá helyezzük;

és az oktopin-szintáz gén 3'-végi transzkriptum kialakításért és poliadenilációért felelős jeleihez (Gielen és társai 1984) fuzionáljuk.

Standard eljárások alkalmazásával (Deplaere és társai, 1985) a köztes növényi vektorokat, amelyek a csonkolt bTS02618A gént tartalmazzák, beviszük a C58C1Rif^R Agrobacterium-törzsbe (821 582 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés; 86/300291.1 sz. európai szabadalmi bejelentés), amely az ártalmatlanított pGV2260 Ti-plazmidot (Vaecck és társai 1987) hordozza. A spektinomycinrezisztencia alapján elvégzett szelekció eredményeképpen kointegrálódott plazmidokat kapunk, amelyek pGV2260-ból és a megfelelő köztes növényi expressziós vektorokból állnak. Ezen rekombináns Agrobacterium-törzsek mindegyikét ezután arra használjuk, hogy különféle gyapotrónvényeket transzformáljunk velük azért, hogy a csonkolt bTS02618A gént a különféle növényi sejtek tartalmazzák, és az a sejtekben kifejeződjék.

6. példa

A csonkolt bTS02618A gén kifejeződése növényekben

A csonkolt bTS02618A gén expressziós termékeinek a transzformált növények leveleiben (amely növényeket az 5. példa szerinti transzformált növényi sejtekből generáltuk) megjelenő Lepidoptera elleni rovarirtó hatását úgy határozzuk meg, hogy megállapítjuk az ilyen leveleken élő Agrotis és Spodoptera spp. lárvák növekedési sebességét és mortalitását. A kapott eredményeket összehasonlítjuk a nem transzformált növények levelein élő lárvák növekedési sebességével. Az Agrotis és Spodoptera spp. elleni toxicitást ismert módon határozzuk meg (358 557 sz. európai közzétételi irat, 821 582 sz. amerikai egyesült államokbeli és 86/300 291.1 sz. európai szabadalmi bejelentés).

Lényegesen magasabb halálozási arányt tapasztalunk azon lárvák esetében, amelyek a csonkolt bTS02618A gént és a csonkolt bTS02618A-neo hibrid gént tartalmazó transzformált növények leveleivel táplálkoznak, mint azon lárváknál, amelyek nem transzformált növények levelein élnek. Azt találtuk, hogy a transzformált növények a BTS02618A expressziójuk következtében az Ostrinia nubilalis, Mamestra brassica, Heliothis virescens és Plutella xylostella támadásai-val szemben is ellenállóak.

Magától értetődik, hogy a jelen találmány nem korlátozódik a BTS02617A (BCCM-LNG P-12592) törzsre, a BTS02618A (BCCM-LMG P-12593) törzsre, a BTS02654B (BCCM-LMG P-12594) törzsre és a BTS02652E (BCCM-LMG P-13493) törzsre. A találmány magában foglalja a BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B és BTS02652E törzsek bármely mutánsát vagy variánsát is, amely lényegében azonos tulajdonságú kristályokat, kristályos proteineket, protoxinokat vagy toxinokat termel, különösképpen azokat, amelyek Lepidoptera-ellenes tulajdonságúak, azon belül Noctui-

dae-ellenes, Yponomeutidae-ellenes, Gelechiidae-ellenes és Pyralidae-ellenes tulajdonságúak. Legfontosabbak azok, amelyek Spodoptera-, Plutella-, Ostrinia-, Mamestra-, Heliothis-, Phthorimaea- és Agrotis-ellenes tulajdonságúak, mint a megfelelő BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B vagy BTS02652E kristályok, vagy kristályos proteinek vagy a BTS02618A protoxin vagy toxin.

Ez a találmány felöleli a bTS02618A gént és annak bármely rovarirtó hatású részét, mint amilyen a csonkolt bTS02618A gén. Ebből a szempontból a „bTS02618A gén” kifejezés, amint azt itt használjuk, az olyan BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B vagy BTS02652E törzsből izolált gént jelenti, amely az 1. azonosító számú nukleotidszekvenciához hibridizál, és jelenti továbbá bármely ekvivalens gént, amely azt a protoxint kódolja, amelynek lényegében azonos az aminosavszekvenciája és rovarölő aktivitása, mint a BTS02618A protoxin, és amely előnyösen tartalmazza a 2. vagy 3. azonosító számú szekvenciában bemutatott részleges nukleotidszekvenciákat vagy pedig a 4. azonosító számú szekvenciában bemutatott teljes szekvenciát.

A találmány szintén nem korlátozódik a csonkolt bTS02618A génnel transzformált gyapotrónvényekre. A találmány bármely, a bTS02618A génnel vagy valamely azzal ekvivalens gén rovarirtó hatású részével transzformált növényre vonatkozik. Ilyenek a paradicsom, dohány, repce, lucerna, napraforgó, saláta, burgonya, kukorica, rizs, szója, káposztafélék, cukorrépa és más hüvelyesek és zöldségfélék.

Ismeretesek a kukoricasejtek transzformálására és transzgenikus növények regenerálására szolgáló eljárások (D'Halluin és társai, 1992; Fromm és társai 1990; Gould és társai, 1991; Koziel és társai, 1993; Omirulleh és társai, 1993; Spencer és társai, 1992; Klein és társai, 1992; Walters és társai, 1992). A kukoricasejtek transzformálására szolgáló vektor olyan kiméra géneket tartalmaz, amelyek egy bTS02618A proteint kódolnak, vagy annak valamely variánsát (például BTS02618Aa), és amely protein vagy variáns megfelelő promotereket tartalmaz, mint amilyenek a 35S promotor származékai vagy a kukoricagénből, előnyösen egy konstitutívan kifejezett kukoricagénből származó promotor;

tartalmaz továbbá megfelelő 3'-vég kialakítására szolgáló szekvenciákat, mint például a természetes kukoricagénekből vagy a 35S, gén 7 vagy oktopin-szintáz-génekből származó gének ilyen szekvenciáit (lásd a részletes leírást, valamint Mogen és társai, 1990; Wu és társai, 1993).

Fokozott kifejeződést lehet elérni akkor, ha a kiméra gén szerkezetbe egy intront viszünk be feltéve, hogy az intron a gabonasejtekben helyes „splicing”-on megy át. Erre a célra használható egy természetes kukoricagén intron például az Adhl intron (Callis és társai, 1989; Maas és társai, 1991). A promoterszekvenciába enhancerelemeket is bevihetünk (például Omirulleh és társai, 1993).

A transzgenikus kukoricánövények szelektív táplálajon nevelhetők jól ismert szelekciós markergének,

például herbicidrezisztencia-gének vagy antibiotikum-reszisztencia-gének beépítésével kiméra génként a transzformáló DNS-be. A transzgénikus kukoricánövényeket a transzformált fenotípusra szelektáljuk Ostrinia nubilalis lárvákon végzett biológiai vizsgálattal. Ezek a

lárva gyorsan felfüggesztik a táplálkozást az bTS02618A-val transzformált kukoricán, és a kukoricánövényekben nem okoznak jelentősebb kárt.

Ez a találmány nem korlátozódik arra sem, hogy csupán az Agrobacterium tumefaciens Ti-plazmidjait használjuk a növényi sejteknek valamely rovarirtó hatású bTS02618A génrésszel történő transzformációjához. Más ismert megoldásokat is alkalmazhatunk, amelyek a növényi sejt transzformációjához használatosak, így például az egyszerűk és kétszikűek transzformálására használhatunk liposzomákat, elektroporációt, vagy növényi vírusokon vagy polleneken alapuló vektorrendszereket.

A fentiekben túlmenően a növények és baktériumok átalakítására más, a bTS02618A protoxint és toxint kódoló DNS-szekvenciákat is használhatunk, nem csupán azokat, amelyek természetes módon vannak jelen a bTS02617A, bTS02618A, bTS02654B és bTS02652E törzsekben. Ilyen szempontból ezen gének természetes DNS-szekvenciáját módosíthatjuk úgy, hogy

1. néhány kodont másokkal helyettesítünk, amelyek azonos vagy más, de előnyösen azonos aminosavakat kódolnak;

2. bizonyos kodonokat kihagyunk, vagy hozzáadunk; és/vagy

3. reciprok rekombinációt végzünk a Ge és társai által leírt módon (1991). A feltétel az, hogy a módosítások ne változtassák meg lényegesen a kódolt bTS02618A protoxin (például toxin) rovarirtó hatású részeinek tulajdonságait, különösképpen pedig a rovarirtó tulajdonságukat, főleg pedig Lepidoptera-ellenes tulajdonságukat.

Így például bizonyos körülmények között a növények transzformálására a fentiekben leírt találmány szerinti módosított kodonhasználattal rendelkező mesterséges bTS02618A gén vagy génrész alkalmazható a természetes, rovarirtó hatású bTS02618A génrész helyett valamely találmány szerinti bTS02618A kiméra génben.

Ezen túlmenően a jelen találmány körébe tartozónak tekintünk más olyan rekombináns DNS-eket is, amelyek a teljes bTS02618A gént vagy részét más idegen DNS-sel összekapcsolva tartalmazzák, különösképpen olyan vektorok DNS-ével, amely vektorok alkalmasak növények és E. colitól eltérő mikroorganizmusok transzformálására. Ilyen szempontból a jelen találmány nem korlátozódik a korábban leírt és a bTS02618A gént vagy annak részeit tartalmazó specifikus plazmidokra, hanem ezeken túlmenően a találmány bármely olyan rekombináns DNS-t is magában foglal, amely ezekkel ekvivalens DNS-szekvenciákat tartalmaz.

A találmány továbbá mindazon rekombináns DNS-re kiterjed, amely a bTS02618A gént egészben

vagy részben tartalmazza, és amely alkalmas arra, hogy mikroorganizmusokat transzformáljunk velük olyan körülmények között, amelyek lehetővé teszik, hogy a gén részben vagy teljesen kifejeződjön, és a nevezett mikroorganizmusból ki lehessen nyerni, vagy egy növényi sejtbe lehessen beépíteni. Ilyen mikroorganizmusok a növényekkel kapcsolatban álló baktériumok, mint például más Bacillus thuringiensis törzsek, Bacillus subtilis, Pseudomonas- és Xanthomonas-törzsek, vagy élesztők, mint amilyen a Streptomyces cerevisiae.

7. példa

A bTS02618A toxint kódoló mesterséges

bTS02618A gén felépítése

Az bTS02618A aminosavszekvenciája alapján egy mesterséges DNS-szekvenciát szerkesztettünk, amely gyakorlatilag ugyanezt a proteint kódolja. Először megterveztük a mesterséges bTS02618A toxin gén DNS-szekvenciát a kukorica által előnyben részesített kodonokat alkalmazva (Murray és társai 1989). A mesterséges gén tervezése közben elkerültük a TA és CG kettősök alkalmazását a 2. és 3. kodonhelyzetekben. A mesterséges gént a lokális magas GC-tartalomra nézve is korrigáltuk (a több mint 5-ös bp méretű GC-szakaszokat elkerültük). Megfelelő restriktációs helyeket is beépítettünk a gén teljes hosszában. Így a végső gén nem mindig a leginkább előnybe részesített kukoricakodonokat használta. A mesterséges géneket egy Applied Biosystems 380B DNS szintetizálón állítottuk elő standard ciano-etil-foszforamidit-kémia felhasználásával. Az oligonukleotidokat gélen tisztítottuk, és ismert módszerekkel teljes hosszúságú fragmensekké egyesítettük (lásd Dabies és társai módszerét, 1991).

A mesterséges toxin génből hiányzott a bTS02618A kódolószekvencia 2. kodonjától a 43. kodonig terjedő része, és a 44. kodon előtt egy ATG (start) és egy GCT (Ala) kodon helyezkedik el, annak érdekében, hogy megfelelő transzlációs iniciációs hely alakuljon ki (Joshi, 1984, javaslatára alapján). A mesterséges bTS02618A toxin gén a C-terminális végén a meghatározott minimális toxikus gént fragmensen túlmenően néhány további kodont is tartalmazott, mivel ebben a további C-terminális részben volt a megfelelő kukorica-transzlációs stop jel. A mesterséges bTS02618A gént tartalmazó kiméra gén szerkezetet a fent leírt módon visszük be a kukoricasejtekbe. A legtöbb kukoricánövény, amely ezekből a sejtekből regenerálható, és amelyeket a transzformálnak találunk, az bTS02618A gén kifejeződése következtében rovarirtó hatású. Némely kiválasztott transzgénikus kukoricánövény Northern- és Southern-analízise azt mutatja, hogy a transzgén stabilan integrálódott, és a bTS02618A mRNS expresszió könnyen kimutatható mennyiségben volt jelen. Ezek a növények igen jól védekeztek a rovarok ellen. ELISA-meghatározás alapján megállapítható, hogy az inszekticidaktivitás foka a szövetekben jelen lévő Bt protein mennyiségétől függ.

Úgy véljük, hogy bármilyen módszer, ami ismert kukorica transzformálására, és amely azzal az ered-

ménnyel jár, hogy a BTS02618A protein megfelelő mennyiségben kifejeződik, alkalmas arra, hogy rovarokkal szemben rezisztens kukoricát fejlesszünk ki. Ebből a szempontból előnyös lehet legalább 2 nem kompetitíven kötő Bt protein (mint amilyen a CryIAb és BTS02618A) kifejezése egy növényben, annak érdekében, hogy a rovarrezisztencia kifejlődését elkerüljük.

8. példa

A BTS02618A protein új variánsának kialakítása

A mintegy 69 kD-os BTS02618A toxin további proteolitikus hasadásának elkerülésére a BTS02618A protein új variánsát állítottuk elő. Ezen protein egyik új variánsában a 6. azonosító számú szekvenciában a 123. aminosavhelyzetben jelen lévő Arg-t Lys-re cseréltük (BTS02618Aa protein). Egy további variánsban a 6. azonosító számú a 123. aminosavhelyzetben jelen lévő Arg-t Ala-val helyettesítettük (BTS02618Ab protein). Azt találtuk, hogy ezek a proteinek rezisztensebbek a proteázkezeléssel szemben (vagyis a proteinekből nem keletkezett a mintegy 55 kD-os protein). A rovarokon végzett vizsgálatok megerősítették, hogy toxicitásukat megtartották. Az BTS02618Aa toxin aminosavszekvenciáját a 9. azonosító számú szekvenciában mutatjuk be.

További változatokat is létrehoztunk, amelyekben a proteázhasítási helyen az aminosavszekvenciát megváltoztattuk, és azt tapasztaltuk, hogy ezek a proteázaktivitással szemben rezisztensebbek, míg inszekticid hatásukat megtartották.

Megterveztünk továbbá egy mesterséges gént, amely a BTS02618Aa toxin fragmenst kódolja. N- és C-terminális deléciók, valamint egy Met és egy Ala kodonnak az 1. és 2. helyzetbe való addíciója mellett (a 6. azonosító számú szekvenciával rendelkező DNS esetén) ez a gén egy kodonban tér el a 6. azonosító számú szekvencia szerinti szintetikus géntől: az Arg kodont (CGC) Lys (AAG) kodon helyettesíti. A többi nukleotid ugyanolyan, mint a 6. azonosító számú szekvenciával rendelkező mesterséges bTS02618A génnél. Az ilyen módosítást PCR által közvetített mutagenézissel végeztük el bTS02618A mesterséges génből kiindulva a megfelelő primerek alkalmazásával. Lényegében az történt, hogy a 123. helyzetben mutált kodont tartalmazó, PCR-ral létrehozott és restriktions enzimmel emésztett fragmenst (a mutált kodont a 123-helyzetben tartalmazó) fragmenst beillesztettük az emésztett 6. azonosító számú szekvencia szerinti bTS02618A gén megfelelő helyére, miáltal a 8. azonosító számú szekvencia szerinti DNS keletkezett.

A fentiekben ismertetett eljárásokat alkalmazva a bTS02618Aa génnel kukoricánövények transzformálhatók. A szelektált, a bTS02618Aa gént kifejező transzformált kukoricánövények *Ostrinia nubilalis* lárvákra nézve inszekticid hatásúak.

Úgy véljük, hogy a találmány részletes ismertetése részben ismertetett bármely módszer alkalmazható a fenti Bt-gének kifejezésére transzformált kukoricánövényekben, akár önmagukban, akár más Bt-génnel kombinálva. Különösen előnyös erre a célra valamely,

a CryIAb proteint kódoló DNS-szekvencia. Rutinszerű eljárásokat alkalmazva a kapott regeneránsokból megfelelő vonalak szelektálhatók, amelyek a kívánt tulajdonságokkal rendelkeznek.

9. példa

BTS02618A toxin megkötése rovarok bélsejthártyájában

Az találtuk, hogy a BTS02618Aa toxin nem gátolja a CryIAb toxin kötődését az *Ostrinia nubilalis* középbéli sejthártya-vezikulumaihoz.

Ebben a kísérleti felállásban a következő proteineket használtuk: BTS02618A nem biotinilezett lizin mutánsa (BTS02618Aa); nem biotinilezett CryIAb; valamint biotinilezett (és biológiailag aktív) CryIAb. Valamennyi alkalmazásra kerülő ICP tripszinrezisztens toxin volt. A következő kombinációkat vizsgáltuk meg:

- biotinilezett CryIAb×kompetitor nélkül;
- biotinilezett CryIAb×1000-szeres CryIAb toxinfelesleg;
- biotinilezett CryIAb×1000-szeres BTS02618Aa toxinfelesleg.

A fenti kísérletekhez összekeverünk 10 ng biotinilezett CryIAb-t (jelöletlen kristályos proteinfeleslegének jelenlétében vagy a nélkül) és 10 mg *Ostrinia nubilalis* lárvá középbélből származó kefeszegélyes sejthártya-vezikulumot. Ezeket a vezikulumokat Wolfeisberger és társai (1987) módszerével preparáltuk. Az elegyet PBS-ben (8 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 150 mM NaCl, pH=7,4) készítettük el, amely 0,1% BSA-t tartalmazott. Az elegyet 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk, azután 10 percen át centrifugáltuk. A pelletet 500 mikroliter PBS – 0,1% BSA-ban mostuk, majd ismét centrifugáltunk, és a pelletet egy SDS-PAGE mintapufferban feloldottuk. A mintákat 10%-os poliakrilamidgélben futtattuk. A gélt szobahőmérsékleten 2 órán át félszáraz blottolókészüléken blottoltuk (LKB Novablott készülék). Az alkalmazott blottolópuffer a következő: 39 mM glicin, 48 mM Tris, 0,0375% (tömeg/térfogat), nátrium-dodecil-szulfát, 20% metanol. A membránt legalább 2 órán át TBS-ben (10 mM Tris, 150 mM nátrium-klorid, pH=7,6) blokkoltuk 0,1% BSA segítségével, majd sztreptavidin-peroxidáz konjugátummal inkubáltuk, majd 45 percen át 1/1000-szeresre hígítottuk TBS-0,1% BSA segítségével. A membránt 4×5 percen át és 1×15 percen át mostuk TBS-0,2% Tween 20 segítségével. A mosási lépések között a foltot alaposan kimostuk csap alatt. A membránt ECL-reagensben (Amersham) 1 percig inkubáltuk, és azután röntgenfilmre exponáltuk.

A biotinilezett CryIAb esetében röntgenfilm segítségével egy sáv volt megfigyelhető, amely a kötött toxin sávjának felel meg. Ha CryIAb toxin feleslegének jelenlétében inkubáltunk biotinilezett CryIAb toxint, akkor a filmen a sáv nem volt megfigyelhető, mert – mint az várható volt – a feleslegben alkalmazott jelöletlen toxin kiszorította a jelölt toxint. A BTS02618Aa toxin feleslegének jelenlétében vizsgált biotinilezett CryIAb toxin esetében megfigyelhető egy sáv, amely a kötött biotinilezett CryIAb-nek felel meg. Megállapítható tehát, hogy

a jelöletlen BTS02618Aa toxin képtelen volt arra, hogy kompetícióba lépjen a CryIAb-vel a vezikulumokhoz való kötődés szempontjából. Ez arra mutat, hogy az *Ostrinia nubilalis* esetében a BTS02618Aa nem ugyanazon receptorhoz kötődik, mint a CryIAb.

Hasonló kísérleti felállásban a jelöletlen CryIAb toxin nem lépett kompetícióba a biotinnal jelölt és biológiailag aktív BTS02618Aa toxin receptoraiért, míg a feleslegben alkalmazott jelöletlen BTS02618Aa toxin esetében ilyen kompetíciót figyeltünk meg.

Megállapítható tehát, hogy a BTS02618A protein az *Ostrinia* középbélí sejthártyákon más receptorkötési helyeket ismer fel, és alkalmas egy olyan stratégia kialakításra, amelynek célja a rovarokban a rezisztencia kialakulásának lelassítása vagy megelőzése. Ezt például a CryIAb és a BTS02618A toxinnak valamely növényben való kifejezésével érhetjük el. Mivel mindkét toxin igen hatásos a fő rovar kártevők csoportja ellen, és nyilvánvaló, hogy eltérő receptormolekulákat ismer-

nek fel, további előnyökkel is jár alkalmazásuk transzgenikus növényekben, mint például a kukoricában és zöldségfélékben. A kukoricánövények a CryIAb és BTS02618Aa génnel a szakterületen ismert bármely módszer alkalmazásával transzformálhatók. Ilyen módszerekhez tartozik a toxint tartalmazó növények keresztezése, vagy a 408 403 sz. európai közzétételi iratban ismertetett bármelyik megoldás alkalmazása.

10 A VII. táblázat ismertetése

A VII. táblázatban mutatjuk be a CryI proteinek hatását különféle Lepidoptera rovarkártévők esetében:

- + jelöli azt, ha van inszekticid hatás,
 - jelöli azt, ha nincs inszekticid hatás,
 - +/- jelöli azt, ha van hatás, de csekély,
 - NA jelöli, hogy nincs hozzáférhető adat,
- 2618A a BTS02618A protein rövidítése [Van Frankenhuyzen (1993) adatai és A. ipsilon és 2618A esetén a jelen találmány szerinti adatok].

VII. táblázat

	2618A	IAb	IAC	IB	IC	IF
<i>S. exigua</i>	+	+ / –	–	–	+	+
<i>S. littoralis</i>	+	–	–	–	+	NA
<i>H. virescens</i>	+	+	+	–	+ / –	+
<i>A. ipsilon</i>	+	NA	–	NA	NA	NA
<i>O. nubilalis</i>	+	+	+	NA	NA	+
<i>P. xylostella</i>	+	+	+	+	+	NA
<i>M. brassica</i>	+	+	–	–	+	NA

A VIII. táblázat ismertetése

LC₅₀–LC₉₅ tesztek rekombináns Bt-k spóra-kristály keverékeivel.

- 35 A vizsgálatokat úgy hajtottuk végre, ahogy a leírásban ismertettük. A számok a spóra-kristályok száma $\times 10^6$ per cm² tápagar értékeket mutatják.

VIII. táblázat

Törzs	LC ₅₀	LC ₉₅	F195 _{min-max}	Meredekség
Bt kurstaki HD–HD–1/1	18,9	91,2	3,9–15,4	1,6 $\pm$ 0,4
(bTS02618A)	0,4	1,7	0,1–0,6	2,5 $\pm$ 0,7
HD–1/2 bTS02618A	0,4	0,93	0,2–0,5	4,3 $\pm$ 1,2
BTS02618A	1,5	4,3	0,9–2,1	3,6 $\pm$ 0,9

Idézett irodalom

- Adang et al. (1985). *Gene* 36, 289.
- Bennetzen & Hall. (1982). *J. Biol. Chem.* 257 3026–3031.
- Berhard, K. and Utz, R., „Production of *Bacillus thuringiensis* insecticides for experimental and commercial uses”, In *Bacillus thuringiensis*, An Environmental Biopesticide: Theory and Practice, pp. 255–267, eds. Entwistle, P. F., Cory, J. S., Bailey, M. J. and Higgs, S., John Wiley and Sons, New York (1993).

- 50 – Brizzard & Whiteley (1988). *Nucl. Acids Res.* 16, 2723–2724.
- Callis et al. (1987). *Genes and Development* 1, 1183–1200.
- Chassy, B. M., Mercenier, A. and Flickinger, J., *Trends Biotechnol.* 6, 303–309 (1988).
- 55 – Cohen et al., *PNAS* 70, 3240–3244 (1973).
- D'Halluin et al. (1992). *The Plant Cell* 4, 1495–1505.
- 60 – Datta S., Peterhans A., Datta K. and Potrykus I., *Bio/Technology* 8, 736–740 (1990).

- Davies, L. et al. (1991). Society for Applied Bacteriology, Technical Series n. 28, pp. 351–359
- Deblaere, R., Blijtebier, B. De Greve, H., Deboeck, F., Schell, J., Van Montagu, M. and Leemans, J., *Nucleic Acids Research* 13, 4777–4788 (1985). 5
- Dulmage, H. T., „Production of Bacteria for Biological Control of Insects” in *Biological Control in Crop Production*, Ed. Paparizas, D. C., Osmun Publishers, Totowa, N. J., USA, pp. 129–141 (1981).
- Finney, Probit Analysis, 3rd Edition, Cambridge University Press (1971). 10
- Franck, Guilley, Jonard, Richards and Hirth, *Cell*. 21, 285–294 (1980).
- French, B. T., Maul, H. N. and Maul, G. G., *Anal. Biochem.* 156, 417–423 (1986). 15
- Fromm M., Morrish F., Armstrong C., Williams R., Thomas J. and Klein T., *Bio/Technology* 8, 833–839 (1990).
- Gardner, Howarth, Hahn, Brown-Luedi, Shepard and Messing, *Nucleic Acids Research* 2, 2871–2887 (1981). 20
- Ge A., Rivers D., Milne R. and Dean D., *J. Biol. Chem.* 266, 17954–17958 (1991).
- Gielen, J., De Beukeleer, M., Seurinck, J., Deboeck, F., De Greve, H., Lemmers, M., Van Montagu, H. and Schell, J., *EMBO J* 3, 835–845 (1984). 25
- Gleave, A. P., Hegdes, R. J. and Broadwell, A. H., *J. Gen. Microbiol.* 138, 55–62 (1992).
- Gordon-Kamm W., Spencer M., Mangano M., Adams T., Daines R., Start W., O'Brien J., Chambers S., Adams W., Willets N., Rice T., Mackey C., Krueger R., Kausch A. and Lemaux P., *The Plant Cell*. 2, 603–618 (1990). 30
- Gould, J., Devey, M., Hasegawa, O., Ulian, E. C., Peterson, G. and Smith, R. H., *Plant Physiol.* 95, 426–434 (1991). 35
- Ho et al. (1989). *Gene* 77, 51–59.
- Höfte, H., De Greve, H., Seurinck, J., Jansens, S., Mahillon, J., Ampe, Vandekerckhove, J., Vanderbruggen, H., Van Montagu, M., Zabeau, M. and Vaeck, M., *Eur. J. Biochem.* 161, 273–280 (1986) 40
- Höfte, H., Van Rie, J., Jansens, S., Van Houtven, A., Verbruggen, H. and Vaeck, M., *Applied and Environmental Microbiology* 54, 2010–2017 (1988)
- Höfte H. and Whiteley H. R., *Microbiological Review* 53, 242–255 (1989). 45
- Hull and Howell, *Virology* 86, 482–493 (1987)
- Itakura et al. (1977). *Science* 198, 1056–1063.
- Joshi, C. P. (1987). *Nucl. Acids Res.* 16, 6643–6653. 50
- Klein et al. (1992). *Bio/Technology* 10, 286–291.
- Koziel et al. (1993). *Bio/Technology* 11, 194–200.
- Lereclus, D.; Vallade, M.; Chaufaux, J.; Arantes, O. & Rambaud, S., *Bio/Technology* 10, 418 (1992).
- Macintosh, S. C. et al., *J. Invertebrate Patholog.* 55, 258–266 (1990). 55
- Mahillon, J. and Delcour, J., *J. Microbiol. Methods* 3, 69–73 (1984).
- Mahillon, J. and Seurinck, J., *Nucl. Acids Res.* 16, 11 827–11 828 (1988). 60
- Mahillon et al, *Plasmid* 19, 169–173 (1988).
- Mahillon et al, *FEMS Microbiol. Letters* 60, 205–210 (1989).
- Maas et al. (1991). *Plant Mol. Biol.* 16, 199–207.
- Maxam, A. M. and Gilbert, W., *Methods in Enzymol.* 65, 499–560 (1980).
- Mogen et al., *The Plant Cell.*, 2, 1261–1272 (1990).
- Murray, E., Lotzer, J. and Eberle, M., *Nucleic Acids Research* 17(2), 477–498 (1989).
- Omirulleh et al. (1993). *Plant Mol. Biol.* 21, 415–428.
- Rupa et al., *Applied & Environ. Micro.*, 57 3337–3344 (1991).
- Schnepf et al. (1985). *Journal of Biological Chemistry* 260, 6264.
- Shimamoto K., Terada R., Izawa T. and Fujimoto H., *Nature* 338, 274–276 (1989).
- Smulevitch, S. V., Osterman, A. L., Shevelev, A. B., Kaluger, S. V., Karasin, A. I., Kadyrov, R. M., Zagnitko, O. P., Chestukhina, G. G. and Stepanov, V. M., *FEBS Lett.* 293, 1(2), 25–28 (1991).
- Spencer et al. (1992). *Plant Mol. Biol.* 18, 201–210.
- Stanssens P., Opsomer C., McKeown Y., Kramer W., Zabeau M. and Fritz H. J., *Nucleic Acids Research* 12, 4441–4454 (1989).
- Vaeck, M., Reynaerts, A., Höfte, H., Jansens, S., De Beukeleer, M., Dean, C., Zabeau, M., Van Montagu, M. and Leemans, J., *Nature* 327, 33–37 (1987).
- Van Frankenhuyzen, „The Challenge of *Bacillus thuringiensis*”, in „*Bacillus thuringiensis*, An Environmental Biopesticide: Theory and Practice”, pp. 1–35, eds. Entwistle, P. F., Cory, J. S., Bailey, M. J. and Higgs, S., John Wiley and Sons, New York (1993).
- Velten, J., Velten, L., Hain, R. and Schell, J., *EMBO J* 3, 2723–2730 (1984).
- Velten, J. and Schell, J. *Nucleic Acids Research* 13, 6981–6998 (1985).
- Visser, B., Bosch, D. and Honée, G., „Domain-Structure Studies of *Bacillus thuringiensis* Crystal Proteins: A Genetic Approach”, In *Bacillus thuringiensis*, An Environmental Biopesticide: Theory and Practice, pp. 71–88, eds. Entwistle, P. F., Cory, J. S., Bailey, M. J. and Higgs, S., John Wiley and Sons, New York (1993).
- Wada et al. (1990). *Nucl., Acids Res.* 18, 2367–1411.
- Walters et al. (1992). *Plant Mol. Biol.* 18, 189–200.
- White et al. (1989). *Trends in Genet.* 5, 185–189.
- Wolfersberger, M., Luthy, P., Maurer, A., Parenti, P., Sacchi, V. F., Giordana, B. and Hanozet, G. M. (1987) *Comp. Biochem. Physiol.* 86A, 301–308.
- Wu et al. (1991). *The Plant Journal*, 4, 535–544 (1993).
- Yannisch-Perron, C., Vierra, J. and Messing, J., *Gene* 33, 103–119 (1985).

SZEKVENCIALISTA

(1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT:

- (A) NAME: Plant Genetic Systems N. V.
- (B) STREET: Plateaustraat 22
- (C) CITY: Gent
- (E) COUNTRY: Belgium
- (D) POSTAL CODE (ZIP): B-9000
- (G) TELEPHONE: 32-9-2358454
- (H) TELEFAX: 32-9-2240694
- (I) TELEX: 11.361 Pgsgen

(ii) TITLE OF INVENTION: New *Bacillus thuringiensis* strains and their insecticidal proteins.

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 9

(iv) COMPUTER READABLE FORM:

- (A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPO)

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 19 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1..19
- (D) OTHER INFORMATION: /function- „for isolating bTSO2618A gene from its containing strain” /note- „the probe is a part of the coding DNA strand of the cryIG gene (Smulevitch et al. (1991))”

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 1:

TTCTGTACTA TTGATTGTA

19

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 1561 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: double
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(vi) ORIGINAL SOURCE:

- (A) ORGANISM: *Bacillus thuringiensis*
- (B) STRAIN: BTO2618A

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: misc_feature

(B) LOCATION: 1..1561

(D) OTHER INFORMATION: /note- „contains the translation initiation codon of the bTSO2618A gene"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 2:

```

AAAAAGAAAT AGGAATAAAT ACTATCCATT TTTTCAAGAA ATATTTTTTTT ATTAGAAAGG      60
AATCTTTCTT ACACGGGAAA ATCCTAAGAT TGAGAGTAAA GATATATATA TATAAATACA      120
ATAAAGAGTT TGTCAGGATT TTTGAAAGAT ATGATATGAA CATGCACTAG ATTTATAGTA      180
TAGGAGGAAA AAGTATGAAT CGAAATAATC AAAATGAATA TGAAATTATT GATGCCCCC      240
ATTGTGGGTG TCCATCAGAT GACGATCTGA GGTATCCTTT GGCAAGTGAC CCAAATGCAG      300
CGTTACAAAA TATGAACTAT AAAGATTACT TACAAATGAC AGATGAGGAC TACACTGATT      360
CTTATATAAA TCCTAGTTTA TCTATTAGTG GTAGAGATGC AGTTCAGACT GCGCTTACTG      420
TTGTTGGGAG AATACTCGGG GCTTTAGGTG TTCCGTTTTT TGGACAAATA GTGAGTTTTT      480
ATCAATTCTT TTTAAATACA CTGTGGCCAG TTAATGATAC AGCTATATGG GAAGCTTTCA      540
TGCGACAGGT GGAGGAACTT GTCAATCAAC AAATAACAGA ATTTGCAAGA AATCAGGCAC      600
TTGCAAGATT GCAAGGATTA GGAGACTCTT TTAATGTATA TCAACGTTCC CTTCAAAATT      660
GGTTGGCTGA TCGAAATGAT ACACGAAATT TAAGTGTTGT TCGTGCTCAA TTTATAGCTT      720
TAGACCTTGA TTTTGTTAAT GCTATTCCAT TGTTTGCAGT AAATGGACAG CAGGTCCAT      780
TACTGTCAGT ATATGCACAA GCTGTGAATT TACATTGTGT ATTATTAAAA GATGCATCTC      840
TTTTTCGAGA AGGATCGGGA TTCACACAGG GGGAAATTTT CACATATTAT GACCGTCAAT      900
TGGAACAAAC CGCTAAGTAC ACTAATTACT GTGAACTTG GTATAATACA GGTTTAGATC      960
GTTTAAGAGG AACAAATACT GAAAGTTGGT TAAGATATCA TCAATTCCGT AGAGAAATGA     1020
CTTTAGTGGT ATTAGATGTT GTGCCGCTAT TTCCATATTA TGATGTACGA CTTTATCCAA     1080
CGGGATCAAA CCCACAGCTT ACACGTGAGG TATATACAGA TCCGATTGTA TTTAATCCAC     1140
CAGCTAATGT TGGACTTTGC CGACGTTGGG GTACTAATCC CTATAATACT TTTTCTGAGC     1200
TCGAAAATGC CTTCAATTCG CCACCACATC TTTTGTATAG GCTGAATAGC TTAACAATCA     1260
GCAGTAATCG ATTTCCAGTT TCATCTAATT TTATGGATTA TTGGTCAGGA CATACGTTAC     1320
GCCGTAGTTA TCTGAACGAT TCAGCAGTAC AAGAAGATAG TTATGGCCTA ATTACAACCA     1380
CAAGAGCAAC AATTAATCCC GGAGTTGATG GAACAAACCG CATAGAGTCA ACGGCAGTAG     1440
ATTTTCGTTT TGCATTGATA GGTATATATG GCGTGAATAG AGCTTCTTTT GTCCCAGGAG     1500
GCTTGTTTAA TGGTACGACT TCTCCTGCTA ATGGAGGATG TAGAGATCTC TATGATACAA     1561
A

```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 1554 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: double

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: *Bacillus thuringiensis*

(B) STRAIN: BTS02618A

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: misc_feature

(B) LOCATION: 1146..11A8

(D) OTHER INFORMATION: /function- „Presumed translational stop codon of bTS02618A gene"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 3:

```

AAAATTATCC AACATACATT TATCAAAAAG TAGATGCATC GGTGTTAAAG CCTTATACAC      60
GCTATAGACT AGATGGATTT GTGAAGNGTA GTCAAGATTT AGAAATTGAT CTCATCCACC      120
ATCATAAAGT CCATCTTGTA AAAAATGTAC CAGATAATTT AGTATCTGAT ACTTACTCAG      180
ATGTTTCTTG CAGCGGAATC AACCGTTGTG ATGAACAGCA TCAGGTAGAT ATGCAGCTAG      240

```

ATGCGGAGCA	TCATCCAATG	GATTGCTGTG	AAGCGGCTCA	AACACATGAG	TTTTCTTCCT	300
ATATTAATAC	AGGGGATCTA	AATGCAAGTG	TAGATCAGGG	CATTTGGGTT	GTATTAATAAG	360
TTCAACAAC	AGATGGGTAT	GCGACGTTAG	GAAATCTTGA	ATTGGTAGAG	GTTGGGCCAT	420
TATCGGGTGA	ATCTCTAGAA	CGGGAACAAA	GAGATAATGC	GAAATGGAAT	GCAGAGCTAG	480
GAAGAAAACG	TGCAGAAATA	GATCGTGTGT	ATTTAGCTGC	GAAACAAGCA	ATTAATCATC	540
TGTTTGTAGA	CTATCAAGAT	CAACAATTAA	ATCCAGAAAT	TGGGCTAGCA	GAAATTAATG	600
AAGCTTCAAA	TCTTGTAGAG	TCAATTTTCG	GTGTATATAG	TGATACACTA	TTACAGATTC	660
CTGGGATTAA	CTACGAAATT	TACACAGAGT	TATCCGATCG	CTTACAACAA	GCATCGTATC	720
TGTATACGTC	TAGAAATGCG	GTGCAAAATG	GAGACTTTAA	CAGTGGTCTA	GATAGTTGGA	780
ATACAACAT	GGATGCATCG	GTTTCAGCAAG	ATGGCAATAT	GCATTTCTTA	GTTCTTTTCG	840
ATTGGGATGC	ACAAGTTTCC	CAACAATTGA	GAGTAAATCC	GAATTGTAAG	TATGTCTTAC	900
GTGTGACAGC	AAGAAAAGTA	GGAGGCGGAG	ATGGATACGT	CACAATCCGA	GATGGCGCTC	960
ATCACCAAGA	AACTCTTACA	TTTAATGCAT	GTGACTACGA	TGTAAATGGT	ACGTATGTCA	1020
ATGACAATTC	GTATATAACA	GAAGAAGTGG	TATTCTACCC	AGAGACAAAA	CATATGTGGG	1080
TAGAGGTGAC	TGAATCCGAA	GGTTCATTCT	ATATAGACAG	TATTGAGTTT	ATTGAAACAC	1140
AAGAGTAGAA	GAGGGGGATC	CTAACGTATA	GCAACTATGA	GAGGATACTC	CGTACAAACA	1200
AAGATTAAAA	AAAGGTAAAA	TGAATAGAAC	CCCCTACTGG	TAGAAGGACC	GATAGGGGGT	1260
TCTTACATGA	AAAAATGTAG	CTGTTTACTA	AGGTGTATAA	AAAACAGCAT	ATCTGATAGA	1320
AAAAAGTGAG	TACCTTATAA	AGAAAGAATT	CCATTCACAG	TTTCGGTATC	ATATAAATAA	1380
TGATAGGGGT	ATCCTTCTTA	TTTACATTAT	TTTTTCGCAAT	TATCTCGACC	TTCTTCTTTC	1440
CGCTCACAAT	GATGATGATC	ATGACAACAA	TCGCGTCCAT	AGCGAACTCT	TTCGATATTA	1500
ATAATATCTA	AACTCCTGTA	GCAGTCATTT	CCATTTTTTTT	TGATCCAGTA	AATA	1554

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 4344 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: double
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: CDS
- (B) LOCATION: 668..4141

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1..4344
- (D) OTHER INFORMATION: /note- „encompasses entire sequence of SEQ ID NO (SID) 2: from nt position 474 to 2034 in SID 4"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1..4344
- (D) OTHER INFORMATION: /note- „also encompasses part of the sequence of SID 3: from nt position 2994 to 4344 in SID 4"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1..4344
- (D) OTHER INFORMATION: /note- „SID 3 shows additional nucleotides, located 3' from the sequence shown in SID 4 (1352-1554 in SID 4)"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 4:

GAATTCAGC	TCGGTACCTT	TTCAGTGTAT	CGTTTCCCTT	CCATCAGGTT	TTCAAATTGA	60
AAAGCCGAAT	GATTTGAAAC	TTGTTTACGA	TGTAAGTCAT	TTGTCTATGA	CGAAAGATAC	120
GTGTAAAAAA	CGTATTGAGA	TTGATGAATG	TGGACAAGTA	GAAATTGACT	TACAAGTATT	180

HU 226 143 B1

AAAGATTAAG GGTGTCCTTT CTTTTATCGG AAATTTCTCT ATTGAACCTA TTCTGTGTGA															240
AAACATGTAT ACAACGGTTG ATAGAGATCC GTCTATTTCC TTAAGTTTCC AAGATACGGT															300
ATATGTGGAC CATATTTTAA AATATAGCGT CCAACAACCTA CCATATTATG TAATTGATGG															360
TGATCATATT CAAGTACGTG ATTTACAAAT CAAACTGATG AAAGAGAATC CGCAATCTGC															420
TCAAGTATCA GGTTTGTTTT GTTTTGTATA TGAGTAAGAA CCGAAGGTTT GTAAAAAAGA															480
AATAGGAATA AATACTATCC ATTTTTTCAA GAAATATTTT TTTATTAGAA AGGAATCTTT															540
CTTACACGGG AAAATCCTAA GATTGAGAGT AAAGATATAT ATATATAAAT ACAATAAAGA															600
GTTTGTCTAGG ATTTTTTGAAA GATATGATAT GAACATGCAC TAGATTTATA GTATAGGAGG															660
AAAAAGT ATG AAT CGA AAT AAT CAA AAT GAA TAT GAA ATT ATT GAT GCC															709
Met Asn Arg Asn Asn Gln Asn Glu Tyr Glu Ile Ile Asp Ala															
1 5 10															
CCC CAT TGT GGG TGT CCA TCA GAT GAC GAT GTG AGG TAT CCT TTG GCA															757
Pro His Cys Gly Cys Pro Ser Asp Asp Asp Val Arg Tyr Pro Leu Ala															
15 20 25 30															
AGT GAC CCA AAT GCA GCG TTA CAA AAT ATG AAC TAT AAA GAT TAC TTA															805
Ser Asp Pro Asn Ala Ala Leu Gln Asn Met Asn Tyr Lys Asp Tyr Leu															
35 40 45															
CAA ATG ACA GAT GAG GAC TAC ACT GAT TCT TAT ATA AAT CCT AGT TTA															853
Gln Met Thr Asp Glu Asp Tyr Thr Asp Ser Tyr Ile Asn Pro Ser Leu															
50 55 60															
TCT ATT AGT GGT AGA GAT GCA GTT CAG ACT GCG CTT ACT GTT GTT GGG															901
Ser Ile Ser Gly Arg Asp Ala Val Gln Thr Ala Leu Thr Val Val Gly															
65 70 75															
AGA ATA CTC GGG GCT TTA GGT GTT CCG TTT TCT GGA CAA ATA GTG AGT															949
Arg Ile Leu Gly Ala Leu Gly Val Pro Phe Ser Gly Gln Ile Val Ser															
80 85 90															
TTT TAT CAA TTC CTT TTA AAT ACA CTG TGG CCA GTT AAT GAT ACA GCT															997
Phe Tyr Gln Phe Leu Leu Asn Thr Leu Trp Pro Val Asn Asp Thr Ala															
95 100 105 110															
ATA TGG GAA GCT TTC ATG CGA CAG GTG GAG GAA CTT GTC AAT CAA CAA															1045
Ile Trp Glu Ala Phe Met Arg Gln Val Glu Glu Leu Val Asn Gln Gln															
115 120 125															
ATA ACA GAA TTT GCA AGA AAT CAG GCA CTT GCA ACA TTG CAA GGA TTA															1093
Ile Thr Glu Phe Ala Arg Asn Gln Ala Leu Ala Arg Leu Gln Gly Leu															
130 135 140															
GGA GAC TCT TTT AAT GTA TAT CAA CGT TCC CTT CAA AAT TGG TTG GCT															1141
Gly Asp Ser Phe Asn Val Tyr Gln Arg Ser Leu Gln Asn Trp Leu Ala															
145 150 155															
GAT CGA AAT GAT ACA CGA AAT TTA AGT GTT GTT CGT CCT CAA TTT ATA															1189
Asp Arg Asn Asp Thr Arg Asn Leu Ser Val Val Arg Ala Gln Phe Ile															
160 165 170															
GCT TTA GAC CTT GAT TTT GTT AAT GCT ATT CCA TTG TTT GCA GTA AAT															1237
Ala Leu Asp Leu Asp Phe Val Asn Ala Ile Pro Leu Phe Als Val Asn															
175 180 185 190															
GGA CAG CAG GTT CCA TTA CTG TCA GTA TAT GCA CAA GCT GTG AAT TTA															1285
Gly Gln Gln Val Pro Leu Leu Ser Val Tyr Ala Gln Ala Val Asn Leu															
195 200 205															

HU 226 143 B1

CAT	TTG	TTA	TTA	TTA	AAA	GAT	GCA	TCT	CTT	TTT	GGA	GAA	GGA	TGG	GGA	1333
His	Leu	Leu	Leu	Leu	Lys	Asp	Ala	Ser	Leu	Phe	Gly	Glu	Gly	Trp	Gly	
			210					215					220			
TTC	ACA	CAG	GCG	GAA	ATT	TCC	ACA	TAT	TAT	GAC	CGT	CAA	TTG	GAA	CTA	1381
Phe	Thr	Gln	Gly	Glu	Ile	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Asp	Arg	Gln	Leu	Glu	Leu	
		225					230					235				
ACC	GCT	AAG	TAC	ACT	AAT	TAC	TGT	GAA	ACT	TGG	TAT	AAT	ACA	GGT	TTA	1429
Thr	Ala	Lys	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Cys	Glu	Thr	Trp	Tyr	Asn	Thr	Gly	Leu	
	240					245					250					
GAT	CGT	TTA	AGA	GGA	ACA	AAT	ACT	GAA	AGT	TGG	TTA	AGA	TAT	CAT	CAA	1477
Asp	Arg	Leu	Arg	Gly	Thr	Asn	Thr	Glu	Ser	Trp	Leu	Arg	Tyr	His	Gln	
255					260					265					270	
TTC	CGT	AGA	GAA	ATG	ACT	TTA	GTG	GTA	TTA	GAT	GTT	GTG	GCG	CTA	TTT	1525
Phe	Arg	Arg	Glu	Met	Thr	Leu	Val	Val	Leu	Asp	Val	Val	Ala	Leu	Phe	
			275					280						285		
CCA	TAT	TAT	GAT	GTA	CGA	CTT	TAT	CCA	ACG	GGA	TCA	AAC	CCA	CAG	CTT	1573
Pro	Tyr	Tyr	Asp	Val	Arg	Leu	Tyr	Pro	Thr	Gly	Ser	Asn	Pro	Gln	Leu	
			290					295					300			
ACA	CGT	GAG	GTA	TAT	ACA	GAT	CCG	ATT	GTA	TTT	AAT	CCA	CCA	GCT	AAT	1621
Thr	Arg	Glu	Val	Tyr	Thr	Asp	Pro	Ile	Val	Phe	Asn	Pro	Pro	Ala	Asn	
		305					310					315				
GTT	GGA	CTT	TGC	CGA	CGT	TGG	GGT	ACT	AAT	CCC	TAT	AAT	ACT	TTT	TCT	1669
Val	Gly	Leu	Cys	Arg	Arg	Trp	Gly	Thr	Asn	Pro	Tyr	Asn	Thr	Phe	Ser	
	320					325				330						
GAG	CTC	GAA	AAT	GCC	TTC	ATT	CGC	CCA	CCA	CAT	CTT	TTT	GAT	AGG	CTG	1717
Glu	Leu	Glu	Asn	Ala	Phe	Ile	Arg	Pro	Pro	His	Leu	Phe	Asp	Arg	Leu	
335				340						345					350	
AAT	AGC	TTA	ACA	ATC	AGC	AGT	AAT	CGA	TTT	CCA	GTT	TCA	TCT	AAT	TTT	1765
Asn	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Asn	Arg	Phe	Pro	Val	Ser	Ser	Asn	Phe	
			355					360						365		
ATG	GAT	TAT	TGG	TCA	GGA	CAT	ACG	TTA	CGC	CGT	AGT	TAT	CTG	AAC	GAT	1813
Met	Asp	Tyr	Trp	Ser	Gly	His	Thr	Leu	Arg	Arg	Ser	Tyr	Leu	Asn	Asp	
		370						375					380			
TCA	GCA	GTA	CAA	GAA	GAT	AGT	TAT	GGC	CTA	ATT	ACA	ACC	ACA	AGA	GCA	1861
Ser	Ala	Val	Gln	Glu	Asp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Ile	Thr	Thr	Thr	Arg	Ala	
		385					390					395				
ACA	ATT	AAT	CCC	GGA	GTT	GAT	GGA	ACA	AAC	CGC	ATA	GAG	TCA	ACG	GCA	1909
Thr	Ile	Asn	Pro	Gly	Val	Asp	Gly	Thr	Asn	Arg	Ile	Glu	Ser	Thr	Ala	
	400					405					410					
GTA	GAT	TTT	CGT	TCT	GCA	TTG	ATA	GGT	ATA	TAT	GGC	GTG	AAT	AGA	GCT	1957
Val	Asp	Phe	Arg	Ser	Ala	Leu	Ile	Gly	Ile	Tyr	Gly	Val	Asn	Arg	Ala	
415					420					425					430	
TCT	TTT	GTC	CCA	GGA	GGC	TTG	TTT	AAT	GCT	ACG	ACT	TCT	CCT	GCT	AAT	2005
Ser	Phe	Val	Pro	Gly	Gly	Leu	Phe	Asn	Gly	Thr	Thr	Ser	Pro	Ala	Asn	
			435					440						445		

HU 226 143 B1

GGA GGA TGT AGA GAT CTC TAT GAT ACA AAT GAT GAA TTA CCA CCA GAT Gly Gly Cys Arg Asp Leu Tyr Asp Thr Asn Asp Glu Leu Pro Pro Asp 450 455 460	2053
GAA AGT ACC GGA AGT TCA ACC CAT AGA CTA TCT CAT GTT ACC TTT TTT Glu Ser Thr Gly Ser Ser Thr His Arg Leu Ser His Val Thr Phe Phe 465 470 475	2101
AGC TTT CAA ACT AAT CAG GCT GGA TCT ATA GCT AAT GCA GGA AGT GTA Ser Phe Gln Thr Asn Gln Ala Gly Ser Ile Ala Asn Ala Gly Ser Val 480 485 490	2149
CCT ACT TAT GTT TGG ACC CGT CGT GAT GTG GAC CTT AAT AAT ACG ATT Pro Thr Tyr Val Trp Thr Arg Arg Asp Val Asp Leu Asn Asn Thr Ile 495 500 505 510	2197
ACC CCA AAT AGA ATT ACA CAA TTA CCA TTG CTA AAG GCA TCT GCA CCT Thr Pro Asn Arg Ile Thr Gln Leu Pro Leu Val Lys Ala Ser Ala Pro 515 520 525	2245
GTT TCG GGT ACT ACG GTC TTA AAA GGT CCA GGA TTT ACA GGA GGG GGT Val Ser Gly Thr Thr Val Leu Lys Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Gly 530 535 540	2293
ATA CTC CGA AGA ACA ACT AAT GGC ACA TTT GGA ACG TTA AGA GTA ACG Ile Leu Arg Arg Thr Thr Asn Gly Thr Phe Gly Thr Leu Arg Val Thr 545 550 555	2341
GTT AAT TCA CCA TTA ACA CAA CAA TAT CGC CTA AGA CTT CGT TTT GCC Val Asn Ser Pro Leu Thr Gln Gln Tyr Arg Leu Arg Val Arg Phe Ala 560 565 570	2389
TCA ACA GGA AAT TTC AGT ATA AGG GTA CTC CGT GGA GGG GTT TCT ATC Ser Thr Gly Asn Phe Ser Ile Arg Val Leu Arg Gly Gly Val Ser Ile 575 580 585 590	2437
GGT GAT GTT AGA TTA GGG AGC ACA ATG AAC AGA GGG CAG GAA CTA ACT Gly Asp Val Arg Leu Gly Ser Thr Met Asn Arg Gly Gln Glu Leu Thr 595 600 605	2485
TAC GAA TCC TTT TTC ACA AGA GAG TTT ACT ACT ACT GGT CCG TTC AAT Tyr Glu Ser Phe Phe Thr Arg Glu Phe Thr Thr Thr Gly Pro Phe Asn 610 615 620	2533
CCG CCT TTT ACA TTT ACA CAA GCT CAA GAG ATT CTA ACA GTG AAT GCA Pro Pro Phe Thr Phe Thr Gln Ala Gln Glu Ile Leu Thr Val Asn Ala 625 630 635	2581
CAA GGT GTT AGC ACC GCT GGT GAA TAT TAT ATA GAT AGA ATT GAA ATT Glu Gly Val Ser Thr Gly Gly Glu Tyr Tyr Ile Asp Arg Ile Glu Ile 640 645 650	2629
GTC CCT GTG AAT CCG GCA CGA GAA GCG GAA GAG CAT TTA GAA GCG GCG Val Pro Val Asn Pro Ala Arg Glu Ala Glu Glu Asp Leu Glu Ala Ala 655 660 665 670	2677
AAG AAA GCG GTG GCG AGC TTG TTT ACA CGT ACA AGG GAC GGA TTA CAG Lys Lys Ala Val Ala Ser Leu Phe Thr Arg Thr Arg Asp Gly Leu Gln 675 680 685	2725

HU 226 143 B1

GTA AAT GTG ACA GAT TAT CAA GTG GAC CAA GCG GCA AAT TTA GTG TCA	2773
Val Asn Val Thr Asp Tyr Gln Val Asp Gln Ala Ala Asn Leu Val Ser	
690 695 700	
TGC TTA TCC CAT GAA CAA TAT GGG CAT GAC AAA AAG ATG TTA TTG GAA	2821
Cys Leu Ser Asp Glu Gln Tyr Gly His Asp Lys Lys Met Leu Leu Glu	
705 710 715	
GCG GTA AGA GCG GCA AAA CGC CTC AGC CGC GAA CGC AAC TTA CTT CAA	2869
Ala Val Arg Ala Ala Lys Arg Leu Ser Arg Glu Arg Asn Leu Leu Gln	
720 725 730	
GAT CCA GAT TTT AAT ACA ATC AAT AGT ACA GAA GAG AAT GGC TGG AAG	2917
Asp Pro Asp Phe Asn Thr Ile Asn Ser Thr Glu Glu Asn Gly Trp Lys	
735 740 745 750	
GCA AGT AAC GGT GTT ACT ATT AGC GAG GGC GGT CCA TTC TTT AAA GGT	2965
Ala Ser Asn Gly Val Thr Ile Ser Glu Gly Gly Pro Phe Phe Lys Gly	
755 760 765	
CGT GCA CTT CAG TTA GCA AGC GCA AGA GAA AAT TAT CCA ACA TAC ATT	3013
Arg Ala Leu Gln Leu Ala Ser Ala Arg Glu Asn Tyr Pro Thr Tyr Ile	
770 775 780	
TAT CAA AAA GTA GAT GCA TCG GTG TTA AAG CCT TAT ACA CGC TAT AGA	3061
Tyr Gln Lys Val Asp Ala Ser Val Leu Lys Pro Tyr Thr Arg Tyr Arg	
785 790 795	
CTA GAT GGA TTT GTG AAG AGT AGT CAA GAT TTA GAA ATT GAT CTC ATC	3109
Leu Asp Gly Phe Val Lys Ser Ser Gln Asp Leu Glu Ile Asp Leu Ile	
800 805 810	
CAC CAT CAT AAA GTC CAT CTT GTA AAA AAT GTA CCA GAT AAT TTA GTA	3157
His His His Lys Val His Leu Val Lys Asn Val Pro Asp Asn Leu Val	
815 820 825 830	
TCT GAT ACT TAC TCA GAT GGT TCT TGC AGC GGA ATC AAC CGT TGT GAT	3205
Ser Asp Thr Tyr Ser Asp Gly Ser Cys Ser Gly Ile Asn Arg Cys Asp	
835 840 845	
GAA CAG CAT CAG GTA GAT ATG CAG CTA GAT GCG GAG CAT CAT CCA ATG	3253
Glu Gln His Gln Val Asp Met Gln Leu Asp Ala Glu His His Pro Met	
850 855 860	
GAT TGC TGT GAA GCG GCT CAA ACA CAT GAG TTT TCT TCC TAT ATT AAT	3301
Asp Cys Cys Glu Ala Ala Gln Thr His Glu Phe Ser Ser Tyr Ile Asn	
865 870 875	
ACA GGG GAT CTA AAT GCA AGT GTA GAT CAG GGC ATT TGG GTT GTA TTA	3349
Thr Gly Asp Leu Asn Ala Ser Val Asp Gln Gly Ile Trp Val Val Leu	
880 885 890	
AAA GTT CGA ACA ACA GAT GGG TAT GCG ACG TTA GGA AAT CTT GAA TTG	3397
Lys Val Arg Thr Thr Asp Gly Tyr Ala Thr Leu Gly Asn Leu Glu Leu	
895 900 905 910	
GTA GAG CTT GGG CCA TTA TCG GGT GAA TCT CTA GAA CGG GAA CAA AGA	3445
Val Glu Val Gly Pro Leu Ser Gly Glu Ser Leu Glu Arg Glu Gln Arg	
915 920 925	

HU 226 143 B1

GAT AAT GCG AAA TGG AAT GCA GAG CTA GGA AGA AAA CGT GCA GAA ATA Asp Asn Ala Lys Trp Asn Ala Glu Leu Gly Arg Lys Arg Ala Glu Ile 930 935 940	3493
GAT CGT GTG TAT TTA GCT GCG AAA CAA GCA ATT AAT CAT CTG TTT GTA Asp Arg Val Tyr Leu Ala Ala Lys Gln Ala Ile Asn His Leu Phe Val 945 950 955	3541
GAC TAT CAA GAT CAA CAA TTA AAT CCA GAA ATT GGG CTA GCA GAA ATT Asp Tyr Gln Asp Gln Gln Leu Asn Pro Glu Ile Gly Leu Ala Glu Ile 960 965 970	3589
AAT GAA GCT TCA AAT CTT GTA GAG TCA ATT TCG GGT CTA TAT AGT GAT Asn Glu Ala Ser Asn Leu Val Glu Ser Ile Ser Gly Val Tyr Ser Asp 975 980 985 990	3637
ACA CTA TTA CAG ATT CCT GGG ATT AAC TAC GAA ATT TAC ACA GAG TTA Thr Leu Leu Gln Ile Pro Gly Ile Asn Tyr Glu Ile Tyr Thr Glu Leu 995 1000 1005	3685
TCC GAT CGC TTA CAA CAA GCA TCG TAT CTG TAT ACG TCT AGA AAT GCG Ser Asp Arg Leu Gln Gln Ala Ser Tyr Leu Tyr Thr Ser Arg Asn Ala 1010 1015 1020	3733
GTG CAA AAT GGA GAC TTT AAC AGT GGT CTA GAT AGT TGG AAT ACA ACT Val Gln Asn Gly Asp Phe Asn Ser Gly Leu Asp Ser Trp Asn Thr Thr 1025 1030 1035	3781
ATG GAT GCA TCG GTT CAG CAA GAT GGC AAT ATG CAT TTC TTA GTT CTT Met Asp Ala Ser Val Gln Gln Asp Gly Asn Met His Phe Leu Val Leu 1040 1045 1050	3829
TCG CAT TGG GAT GCA CAA GTT TCC CAA CAA TTG AGA GTA AAT CCG AAT Ser His Trp Asp Ala Gln Val Ser Gln Gln Leu Arg Val Asn Pro Asn 1055 1060 1065 1070	3877
TGT AAG TAT GTC TTA CGT GTG ACA GCA AGA AAA GTA GGA GGC GGA GAT Cys Lys Tyr Val Leu Arg Val Thr Ala Arg Lys Val Gly Gly Gly Asp 1075 1080 1085	3925
GGA TAC GTC ACA ATC CGA GAT GGC GCT CAT CAC CAA GAA ACT CTT ACA Gly Tyr Val Thr Ile Arg Asp Gly Ala His His Gln Glu Thr Leu Thr 1090 1095 1100	3973
TTT AAT GCA TGT GAC TAC GAT GTA AAT GGT ACG TAT GTC AAT GAC AAT Phe Asn Ala Cys Asp Tyr Asp Val Asn Gly Thr Tyr Val Asn Asp Asn 1105 1110 1115	4021
TCG TAT ATA ACA GAA GAA GTG GTA TTC TAC CCA GAG ACA AAA CAT ATG Ser Tyr Ile Thr Glu Glu Val Val Phe Tyr Pro Glu Thr Lys His Met 1120 1125 1130	4069
TGG GTA GAG CTG AGT GAA TCC GAA CGT TCA TTC TAT ATA GAC AGT ATT Trp Val Glu Val Ser Glu Ser Glu Gly Ser Phe Tyr Ile Asp Ser Ile 1135 1140 1145 1150	4117
GAG TTT ATT GAA ACA CAA GAG TAGAAGAGGG GGATCCTAAC GTATAGCAAC Glu Phe Ile Glu Thr Gln Glu 1155	4168

TATGAGAGGA	TACTCCGTAC	AAACAAAGAT	TAAAAAAGG	TAAAAATGAAT	AGAACCCCCT	4228
ACTGGTAGAA	GGACCGATAG	GGGGTTCTTA	CATGAAAAAA	TGTAGCTGTT	TACTAAGGTG	4288
TATAAAAAAC	AGCATATCTG	ATAGAAAAAA	GTGAGTACCT	TATAAAGAAA	GAATTC	4344

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 1157 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 5:

Met	Asn	Arg	Asn	Asn	Gln	Asn	Glu	Tyr	Glu	Ile	Ile	Asp	Ala	Pro	His	1	5	10	15
Cys	Gly	Cys	Pro	Ser	Asp	Asp	Asp	Val	Arg	Tyr	Pro	Leu	Ala	Ser	Asp	20	25	30	
Pro	Asn	Ala	Ala	Leu	Gln	Asn	Met	Asn	Tyr	Lys	Asp	Tyr	Leu	Gln	Met	35	40	45	
Thr	Asp	Glu	Asp	Tyr	Thr	Asp	Ser	Tyr	Ile	Asn	Pro	Ser	Leu	Ser	Ile	50	55	60	
Ser	Gly	Arg	Asp	Ala	Val	Gln	Thr	Ala	Leu	Thr	Val	Val	Gly	Arg	Ile	65	70	75	80
Leu	Gly	Ala	Leu	Gly	Val	Pro	Phe	Ser	Gly	Gln	Ile	Val	Ser	Phe	Tyr	85	90	95	
Gln	Phe	Leu	Leu	Asn	Thr	Leu	Trp	Pro	Val	Asn	Asp	Thr	Ala	Ile	Trp	100	105	110	
Glu	Ala	Phe	Met	Arg	Gln	Val	Glu	Glu	Leu	Val	Asn	Gln	Gln	Ile	Thr	115	120	125	
Glu	Phe	Ala	Arg	Asn	Gln	Ala	Leu	Ala	Arg	Leu	Gln	Gly	Leu	Gly	Asp	130	135	140	
Ser	Phe	Asn	Val	Tyr	Gln	Arg	Ser	Leu	Gln	Asn	Trp	Leu	Ala	Asp	Arg	145	150	155	160
Asn	Asp	Thr	Arg	Asn	Leu	Ser	Val	Val	Arg	Ala	Gln	Phe	Ile	Ala	Leu	165	170	175	
Asp	Leu	Asp	Phe	Val	Asn	Ala	Ile	Pro	Leu	Phe	Ala	Val	Asn	Gly	Gln	180	185	190	
Gln	Val	Pro	Leu	Leu	Ser	Val	Tyr	Ala	Gln	Ala	Val	Asn	Leu	His	Leu	195	200	205	
Leu	Leu	Leu	Lys	Asp	Ala	Ser	Leu	Phe	Gly	Glu	Gly	Trp	Gly	Phe	Thr	210	215	220	
Gln	Gly	Glu	Ile	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Asp	Arg	Gln	Leu	Glu	Leu	Thr	Ala	225	230	235	240

HU 226 143 B1

Lys Tyr Thr Asn Tyr Cys Glu Thr Trp Tyr Asn Thr Gly Leu Asp Arg
 245 250 255
 Leu Arg Gly Thr Asn Thr Glu Ser Trp Leu Arg Tyr His Gln Phe Arg
 260 265 270
 Arg Glu Met Thr Leu Val Val Leu Asp Val Val Ala Leu Phe Pro Tyr
 275 280 285
 Tyr Asp Val Arg Leu Tyr Pro Thr Gly Ser Asn Pro Gln Leu Thr Arg
 290 295 300
 Glu Val Tyr Thr Asp Pro Ile Val Phe Asn Pro Pro Ala Asn Val Gly
 305 310 315 320
 Leu Cys Arg Arg Trp Gly Thr Asn Pro Tyr Asn Thr Phe Ser Glu Leu
 325 330 335
 Glu Asn Ala Phe Ile Arg Pro Pro His Leu Phe Asp Arg Leu Asn Ser
 340 345 350
 Leu Thr Ile Ser Ser Asn Arg Phe Pro Val Ser Ser Asn Phe Met Asp
 355 360 365
 Tyr Trp Ser Gly His Thr Leu Arg Arg Ser Tyr Leu Asn Asp Ser Ala
 370 375 380
 Val Gln Glu Asp Ser Tyr Gly Leu Ile Thr Thr Thr Arg Ala Thr Ile
 385 390 395 400
 Asn Pro Gly Val Asp Gly Thr Asn Arg Ile Glu Ser Thr Ala Val Asp
 405 410 415
 Phe Arg Ser Ala Leu Ile Gly Ile Tyr Gly Val Asn Arg Ala Ser Phe
 420 425 430
 Val Pro Gly Gly Leu Phe Asn Gly Thr Thr Ser Pro Ala Asn Gly Gly
 435 440 445
 Cys Arg Asp Leu Tyr Asp Thr Asn Asp Glu Leu Pro Pro Asp Glu Ser
 450 455 460
 Thr Gly Ser Ser Thr His Arg Leu Ser His Val Thr Phe Phe Ser Phe
 465 470 475 480
 Gln Thr Asn Gln Ala Gly Ser Ile Ala Asn Ala Gly Ser Val Pro Thr
 485 490 495
 Tyr Val Trp Thr Arg Arg Asp Val Asp Leu Asn Asn Thr Ile Thr Pro
 500 505 510
 Asn Arg Ile Thr Gln Leu Pro Leu Val Lys Ala Ser Ala Pro Val Ser
 515 520 525
 Gly Thr Thr Val Leu Lys Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Gly Ile Leu
 530 535 540
 Arg Arg Thr Thr Asn Gly Thr Phe Gly Thr Leu Arg Val Thr Val Asn
 545 550 555 560

HU 226 143 B1

Ser	Pro	Leu	Thr	Gln	Gln	Tyr	Arg	Leu	Arg	Val	Arg	Phe	Ala	Ser	Thr		
				565					570					575			
Gly	Asn	Phe	Ser	Ile	Arg	Val	Leu	Arg	Gly	Gly	Val	Ser	Ile	Gly	Asp		
			580					585					590				
Val	Arg	Leu	Gly	Ser	Thr	Met	Asn	Arg	Gly	Gln	Glu	Leu	Thr	Tyr	Glu		
		595					600					605					
Ser	Phe	Phe	Thr	Arg	Glu	Phe	Thr	Thr	Thr	Gly	Pro	Phe	Asn	Pro	Pro		
	610					615					620						
Phe	Thr	Phe	Thr	Gln	Ala	Gln	Glu	Ile	Leu	Thr	Val	Asn	Ala	Glu	Gly		
625					630					635					640		
Val	Ser	Thr	Gly	Gly	Glu	Tyr	Tyr	Ile	Asp	Arg	Ile	Glu	Ile	Val	Pro		
			645						650					655			
Val	Asn	Pro	Ala	Arg	Glu	Ala	Glu	Glu	Asp	Leu	Glu	Ala	Ala	Lys	Lys		
			660					665					670				
Ala	Val	Ala	Ser	Leu	Phe	Thr	Arg	Thr	Arg	Asp	Gly	Leu	Gln	Val	Asn		
		675					680					685					
Val	Thr	Asp	Tyr	Gln	Val	Asp	Gln	Ala	Ala	Asn	Leu	Val	Ser	Cys	Leu		
	690					695					700						
Ser	Asp	Glu	Gln	Tyr	Gly	His	Asp	Lys	Lys	Met	Leu	Leu	Glu	Ala	Val		
705					710					715					720		
Arg	Ala	Ala	Lys	Arg	Leu	Ser	Arg	Glu	Arg	Asn	Leu	Leu	Gln	Asp	Pro		
				725					730					735			
Asp	Phe	Asn	Thr	Ile	Asn	Ser	Thr	Glu	Glu	Asn	Gly	Trp	Lys	Ala	Ser		
			740					745					750				
Asn	Gly	Val	Thr	Ile	Ser	Glu	Gly	Gly	Pro	Phe	Phe	Lys	Gly	Arg	Ala		
	755					760						765					
Leu	Gln	Leu	Ala	Ser	Ala	Arg	Glu	Asn	Tyr	Pro	Thr	Tyr	Ile	Tyr	Gln		
	770					775					780						
Lys	Val	Asp	Ala	Ser	Val	Leu	Lys	Pro	Tyr	Thr	Arg	Tyr	Arg	Leu	Asp		
785					790					795					800		
Gly	Phe	Val	Lys	Ser	Ser	Gln	Asp	Leu	Glu	Ile	Asp	Leu	Ile	His	His		
				805					810					815			
His	Lys	Val	His	Leu	Val	Lys	Asn	Val	Pro	Asp	Asn	Leu	Val	Ser	Asp		
			820					825					830				
Thr	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser	Cys	Ser	Gly	Ile	Asn	Arg	Cys	Asp	Glu	Gln		
		835					840					845					
His	Gln	Val	Asp	Met	Gln	Leu	Asp	Ala	Glu	His	His	Pro	Met	Asp	Cys		
	850					855					860						
Cys	Glu	Ala	Ala	Gln	Thr	His	Glu	Phe	Ser	Ser	Tyr	Ile	Asn	Thr	Gly		
865					870					875					880		

HU 226 143 B1

Asp Leu Asn Ala Ser Val Asp Gln Gly Ile Trp Val Val Leu Lys Val
885 890 895

Arg Thr Thr Asp Gly Tyr Ala Thr Leu Gly Asn Leu Glu Leu Val Glu
900 905 910

Val Gly Pro Leu Ser Gly Glu Ser Leu Glu Arg Glu Gln Arg Asp Asn
915 920 925

Ala Lys Trp Asn Ala Glu Leu Gly Arg Lys Arg Ala Glu Ile Asp Arg
930 935 940

Val Tyr Leu Ala Ala Lys Gln Ala Ile Asn His Leu Phe Val Asp Tyr
945 950 955 960

Gln Asp Gln Gln Leu Asn Pro Glu Ile Gly Leu Ala Glu Ile Asn Glu
965 970 975

Ala Ser Asn Leu Val Glu Ser Ile Ser Gly Val Tyr Ser Asp Thr Leu
980 985 990

Leu Gln Ile Pro Gly Ile Asn Tyr Glu Ile Tyr Thr Glu Leu Ser Asp
995 1000 1005

Arg Leu Gln Gln Ala Ser Tyr Leu Tyr Thr Ser Arg Asn Ala Val Gln
1010 1015 1020

Asn Gly Asp Phe Asn Ser Gly Leu Asp Ser Trp Asn Thr Thr Met Asp
1025 1030 1035 1040

Ala Ser Val Gln Gln Asp Gly Asn Met His Phe Leu Val Leu Ser His
1045 1050 1055

Trp Asp Ala Gln Val Ser Gln Gln Leu Arg Val Asn Pro Asn Cys Lys
1060 1065 1070

Tyr Val Leu Arg Val Thr Ala Arg Lys Val Gly Gly Gly Asp Gly Tyr
1075 1080 1085

Val Thr Ile Arg Asp Gly Ala His His Gln Glu Thr Leu Thr Phe Asn
1090 1095 1100

Ala Cys Asp Tyr Asp Val Asn Gly Thr Tyr Val Asn Asp Asn Ser Tyr
1105 1110 1115 1120

Ile Thr Glu Glu Val Val Phe Tyr Pro Glu Thr Lys His Met Trp Val
1125 1130 1135

Glu Val Ser Glu Ser Glu Gly Ser Phe Tyr Ile Asp Ser Ile Glu Phe
1140 1145 1150

Ile Glu Thr Gln Glu
1155

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 1897 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: double

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: *Bacillus thuringiensis*

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: CDS

(B) LOCATION: 13..1887

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: misc_feature

(B) LOCATION: 13..1887

(D) OTHER INFORMATION: /note- „artificial DNA sequence of the bTS02618A gene, encoding the BTS02618A protein"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 6:

GGTACCAAAA CC ATG GCT GAC TAC CTG CAG ATG ACC GAC GAG GAC TAC	48
Met Ala Asp Tyr Leu Gln Met Thr Asp Glu Asp Tyr	
1 5 10	
ACC GAC AGC TAC ATC AAC CCC AGC CTG AGC ATC AGC GGT CGC GAC GCC	96
Thr Asp Ser Tyr Ile Asn Pro Ser Leu Ser Ile Ser Gly Arg Asp Ala	
15 20 25	
GTG CAG ACC GCT CTG ACC CTG GTG GGT CGC ATC CTG GGT GCC CTG GGC	144
Val Gln Thr Ala Leu Thr Val Val Gly Arg Ile Leu Gly Ala Leu Gly	
30 35 40	
GTG CCC TTC AGC GGT CAG ATC GTG AGC TTC TAC CAG TTC CTG CTG AAC	192
Val Pro Phe Ser Gly Gln Ile Val Ser Phe Tyr Gln Phe Leu Leu Asn	
45 50 55 60	
ACC CTG TGG CCA GTG AAC GAC ACC GCC ATC TGG GAA GCT TTC ATG CGC	240
Thr Leu Trp Pro Val Asn Asp Thr Ala Ile Trp Glu Ala Phe Met Arg	
65 70 75	
CAG GTG GAG GAG CTG GTG AAC CAG CAG ATC ACC GAG TTC GCT CGC AAC	288
Gln Val Glu Glu Leu Val Asn Gln Gln Ile Thr Glu Phe Ala Arg Asn	
80 85 90	
CAG GCC CTG GCT CGC CTG CAG GGC CTG GGC GAC AGC TTC AAC GTG TAC	336
Gln Ala Leu Ala Arg Leu Gln Gly Leu Gly Asp Ser Phe Asn Val Tyr	
95 100 105	
CAG CGC AGC CTG CAG AAC TGG CTG GCC GAC CGC AAC GAC ACC CGC AAC	384
Gln Arg Ser Leu Gln Asn Trp Leu Ala Asp Arg Asn Asp Thr Arg Asn	
110 115 120	
CTG AGC GTG GTG AGG GCC CAG TTC ATC GCC CTG GAC CTG GAC TTC GTG	432
Leu Ser Val Val Arg Ala Gln Phe Ile Ala Leu Asp Leu Asp Phe Val	
125 130 135 140	
AAC GCC ATC CCC CTG TTC GCC GTG AAC GGC CAG CAG GTG CCC CTG CTG	480
Asn Ala Ile Pro Leu Phe Ala Val Asn Gly Gln Gln Val Pro Leu Leu	
145 150 155	

HU 226 143 B1

AGC Ser	GTG Val	TAC Tyr	GCC Ala 160	CAG Gln	GCC Ala	GTG Val	AAC Asn 165	CTG Leu	CAC His	CTG Leu	CTG Leu	CTG Leu	CTG Leu	AAG Lys	GAT Asp	528
GCA Ala	TCC Ser	CTG Leu 175	TTC Phe	GGC Gly	GAG Glu	GGC Gly	TGG Trp 180	GGC Gly	TTC Phe	ACC Thr	CAG Gln	GGC Gly	GAG Glu	ATC Ile	AGC Ser	576
ACC Thr	TAC Tyr 190	TAC Tyr	GAC Asp	CGC Arg	CAG Gln	CTC Leu 195	GAG Glu	CTG Leu	ACC Thr	GCC Ala	AAG Lys 200	TAC Tyr	ACC Thr	AAC Asn	TAC Tyr	624
TCC Cys 205	GAG Glu	ACC Thr	TGG Trp	TAC Tyr	AAC Asn 210	ACC Thr	GGT Gly	CTG Leu	GAC Asp	CGC Arg 215	CTG Leu	AGG Arg	GGC Gly	ACC Thr	AAC Asn 220	672
ACC Thr	GAG Glu	AGC Ser	TGG Trp 225	CTG Leu	CGC Arg	TAC Tyr	CAC His	CAG Gln	TTC Phe 230	CGC Arg	AGG Arg	GAC Glu	ATC Met	ACC Thr 235	CTG Leu	720
GTG Val	GTG Val	CTG Leu 240	GAC Asp	GTG Val	GTG Val	GCC Ala	CTG Leu 245	TTC Phe	CCC Pro	TAC Tyr	TAC Tyr	GAC Asp	GTG Val 250	CGC Arg	CTG Leu	768
TAC Tyr	CCC Pro 255	ACC Thr	GGC Gly	AGC Ser	AAC Asn	CCC Pro	CAG Gln 260	CTG Leu	ACA Thr	CGT Arg	GAG Glu	GTG Val 265	TAC Tyr	ACC Thr	GAC Asp	816
CCC Pro 270	ATC Ile	GTG Val	TTC Phe	AAC Asn	CCA Pro	CCA Pro	GCC Ala 275	AAC Asn	GTG Val	GGC Gly	CTG Leu 280	TGC Cys	CGC Arg	AGG Arg	TGG Trp	864
GGC Gly 285	ACC Thr	AAC Asn	CCC Pro	TAC Tyr	AAC Asn	ACC Thr	TTC Phe	AGC Ser	GAG Glu	CTG Leu	GAG Glu	AAC Asn	GCC Ala	TTC Phe	ATC Ile 300	912
AGG Arg	CCA Pro	CCC Pro	CAC His 305	CTG Leu	TTC Phe	GAC Asp	CGC Arg	CTG Leu	AAC Asn 310	AGC Ser	CTG Leu	ACC Thr	ATC Ile	AGC Ser 315	AGC Ser	960
AAT Asn	CGA Arg	TTC Phe 320	CCC Pro	GTG Val	AGC Ser	AGC Ser	AAC Asn	TTC Phe 325	ATG Met	GAC Asp	TAC Tyr	TGG Trp	AGC Ser 330	GGT Gly	CAC His	1008
ACC Thr	GTG Leu	CGC Arg 335	AGG Arg	AGG Ser	TAG Tyr	CTG Leu	AAC Asn 340	GAC Asp	AGC Ser	GCC Ala	GTG Val	CAG Gln 345	GAG Glu	GAC Asp	AGC Ser	1056
TAC Tyr	GGC Gly 350	CTG Leu	ATC Ile	ACC Thr	ACC Thr	ACC Thr	AGG Arg 355	GCC Ala	ACC Thr	ATC Ile	AAC Asn 360	CCA Pro	GGC Gly	GTG Val	GAC Asp	1104
GGC Gly 365	ACC Thr	AAC Asn	CGC Arg	ATC Ile	GAG Glu	AGC Ser	ACC Thr	GCT Ala	GTG Val	GAC Asp 375	TTC Phe	CGC Arg	AGC Ser	GCT Ala	CTG Leu 380	1152
ATC Ile	GGC Gly	ATC Ile	TAC Tyr 385	GGC Gly	GTG Val	AAC Asn	AGG Arg	GCC Ala	AGC Ser 390	TTC Phe	GTG Val	CCA Pro	GGT Gly	GGC Gly 395	CTG Leu	1200

HU 226 143 B1

TTC AAC GGC ACC ACC AGC CCA GCC AAC GGT GGC TGC CGA GAT CTG TAC	1248
Phe Asn Gly Thr Thr Ser Pro Ala Asn Gly Gly Cys Arg Asp Leu Tyr	
400 405 410	
GAC ACC AAC GAC GAG CTG CCA CCC GAC GAG AGC ACC GGC AGC AGC ACC	1296
Asp Thr Asn Asp Glu Leu Pro Pro Asp Glu Ser Thr Gly Ser Ser Thr	
415 420 425	
CAC CGC CTG AGC CAC GTC ACC TTC TTC AGC TTC CAG ACC AAC CAG GCT	1344
His Arg Leu Ser His Val Thr Phe Phe Ser Phe Gln Thr Asn Gln Ala	
430 435 440	
GGC AGC ATC GCC AAC GCT GGC AGC GTG CCC ACC TAC GTG TGG ACC AGG	1392
Gly Ser Ile Ala Asn Ala Gly Ser Val Pro Thr Tyr Val Trp Thr Arg	
445 450 455 460	
AGG GAC GTG GAC CTG AAC AAC ACC ATC ACC CCC AAC CGC ATC ACC CAG	1440
Arg Asp Val Asp Leu Asn Asn Thr Ile Thr Pro Asn Arg Ile Thr Gln	
465 470 475	
CTG CCC CTG GTG AAG GCC AGC GCT CCC GTG AGC GGC ACC ACC GTG CTG	1488
Leu Pro Leu Val Lys Ala Ser Ala Pro Val Ser Gly Thr Thr Val Leu	
480 485 490	
AAG GGT CCA GGC TTC ACC GGT GGC GGT ATA CTG CGC AGG ACC ACC AAC	1536
Lys Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Gly Ile Leu Arg Arg Thr Thr Asn	
495 500 505	
GGC ACC TTC GGC ACC CTG CGC GTG ACC GTG AAT TCC CCA CTG ACC CAG	1584
Gly Thr Phe Gly Thr Leu Arg Val Thr Val Asn Ser Pro Leu Thr Gln	
510 515 520	
CAG TAC CGC CTG CGC GTG CGC TTC GCC AGC ACC GGC AAC TTC AGC ATC	1632
Gln Tyr Arg Leu Arg Val Arg Phe Ala Ser Thr Gly Asn Phe Ser Ile	
525 530 535 540	
CGC GTG CTG AGG CGT GGC GTG AGC ATC GGC GAC GTG CGC CTG GGC AGC	1680
Arg Val Leu Arg Gly Gly Val Ser Ile Gly Asp Val Arg Leu Gly Ser	
545 550 555	
ACC ATG AAC AGG GGC CAG GAG CTG ACC TAC GAG AGC TTC TTC ACC CGC	1728
Thr Met Asn Arg Gly Gln Glu Leu Thr Tyr Glu Ser Phe Phe Thr Arg	
560 565 570	
GAG TTC ACC ACC ACC GGT CCC TTC AAC CCA CCC TTC ACC TTC ACC CAG	1776
Glu Phe Thr Thr Thr Gly Pro Phe Asn Pro Pro Phe Thr Phe Thr Gln	
575 580 585	
GCC CAG GAG ATC CTG ACC GTG AAC GCC GAG GGC GTG AGC ACC GGT GGC	1824
Ala Gln Glu Ile Leu Thr Val Asn Ala Glu Gly Val Ser Thr Gly Gly	
590 595 600	
GAG TAC TAC ATC GAC CGC ATC GAG ATC GTG CCC GTG AAC CCA GCT CGC	1872
Glu Tyr Tyr Ile Asp Arg Ile Glu Ile Val Pro Val Asn Pro Ala Arg	
605 610 615 620	
GAG CCC GAG GAG GAC TGAGGCTAGC	1897
Glu Ala Glu Glu Asp	
625	

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 625 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 7:

```

Met Ala Asp Tyr Leu Gln Met Thr Asp Glu Asp Tyr Thr Asp Ser Tyr
 1           5           10           15

Ile Asn Pro Ser Leu Ser Ile Ser Gly Arg Asp Ala Val Gln Thr Ala
          20           25           30

Leu Thr Val Val Gly Arg Ile Leu Gly Ala Leu Gly Val Pro Phe Ser
          35           40           45

Gly Gln Ile Val Ser Phe Tyr Gln Phe Leu Leu Asn Thr Leu Trp Pro
          50           55           60

Val Asn Asp Thr Ala Ile Trp Glu Ala Phe Met Arg Gln Val Glu Glu
          65           70           75           80

Leu Val Asn Gln Gln Ile Thr Glu Phe Ala Arg Asn Gln Ala Leu Ala
          85           90           95

Arg Leu Gln Gly Leu Gly Asp Ser Phe Asn Val Tyr Gln Arg Ser Leu
          100          105          110

Gln Asn Trp Leu Ala Asp Arg Asn Asp Thr Arg Asn Leu Ser Val Val
          115          120          125

Arg Ala Gln Phe Ile Ala Leu Asp Leu Asp Phe Val Asn Ala Ile Pro
          130          135          140

Leu Phe Ala Val Asn Gly Gln Gln Val Pro Leu Leu Ser Val Tyr Ala
          145          150          155          160

Gln Ala Val Asn Leu His Leu Leu Leu Leu Lys Asp Ala Ser Leu Phe
          165          170          175

Gly Glu Gly Trp Gly Phe Thr Gln Gly Glu Ile Ser Thr Tyr Tyr Asp
          180          185          190

Arg Gln Leu Glu Leu Thr Ala Lys Tyr Thr Asn Tyr Cys Glu Thr Trp
          195          200          205

Tyr Asn Thr Gly Leu Asp Arg Leu Arg Gly Thr Asn Thr Glu Ser Trp
          210          215          220

Leu Arg Tyr His Gln Phe Arg Arg Glu Met Thr Leu Val Val Leu Asp
          225          230          235          240

Val Val Ala Leu Phe Pro Tyr Tyr Asp Val Arg Leu Tyr Pro Thr Gly
          245          250          255

```

HU 226 143 B1

Ser Asn Pro Gln Leu Thr Arg Glu Val Tyr Thr Asp Pro Ile Val Phe
260 265 270

Asn Pro Pro Ala Asn Val Gly Leu Cys Arg Arg Trp Gly Thr Asn Pro
275 280 285

Tyr Asn Thr Phe Ser Glu Leu Glu Asn Ala Phe Ile Arg Pro Pro His
290 295 300

Leu Phe Asp Arg Leu Asn Ser Leu Thr Ile Ser Ser Asn Arg Phe Pro
305 310 315 320

Val Ser Ser Asn Phe Met Asp Tyr Trp Ser Gly His Thr Leu Arg Arg
325 330 335

Ser Tyr Leu Asn Asp Ser Ala Val Gln Glu Asp Ser Tyr Gly Leu Ile
340 345 350

Thr Thr Thr Arg Ala Thr Ile Asn Pro Gly Val Asp Gly Thr Asn Arg
355 360 365

Ile Glu Ser Thr Ala Val Asp Phe Arg Ser Ala Leu Ile Gly Ile Tyr
370 375 380

Gly Val Asn Arg Ala Ser Phe Val Pro Gly Gly Leu Phe Asn Gly Thr
385 390 395 400

Thr Ser Pro Ala Asn Gly Gly Cys Arg Asp Leu Tyr Asp Thr Asn Asp
405 410 415

Glu Leu Pro Pro Asp Glu Ser Thr Gly Ser Ser Thr His Arg Leu Ser
420 425 430

His Val Thr Phe Phe Ser Phe Gln Thr Asn Gln Ala Gly Ser Ile Ala
435 440 445

Asn Ala Gly Ser Val Pro Thr Tyr Val Trp Thr Arg Arg Asp Val Asp
450 455 460

Leu Asn Asn Thr Ile Thr Pro Asn Arg Ile Thr Gln Leu Pro Leu Val
465 470 475 480

Lys Ala Ser Ala Pro Val Ser Gly Thr Thr Val Leu Lys Gly Pro Gly
485 490 495

Phe Thr Gly Gly Gly Ile Leu Arg Arg Thr Thr Asn Gly Thr Phe Gly
500 505 510

Thr Leu Arg Val Thr Val Asn Ser Pro Leu Thr Gln Gln Tyr Arg Leu
515 520 525

Arg Val Arg Phe Ala Ser Thr Gly Asn Phe Ser Ile Arg Val Leu Arg
530 535 540

Gly Gly Val Ser Ile Gly Asp Val Arg Leu Gly Ser Thr Met Asn Arg
545 550 555 560

Gly Gln Glu Leu Thr Tyr Glu Ser Phe Phe Thr Arg Glu Phe Thr Thr
565 570 575

HU 226 143 B1

Thr Gly Pro Phe Asn Pro Pro Phe Thr Phe Thr Gln Ala Gln Glu Ile
580 585 590

Leu Thr Val Asn Ala Glu Gly Val Ser Thr Gly Gly Glu Tyr Tyr Ile
595 600 605

Asp Arg Ile Glu Ile Val Pro Val Asn Pro Ala Arg Glu Ala Glu Glu
610 615 620

Asp
625

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 1897 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: double

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: CDS

(B) LOCATION: 13..1887

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: misc_feature

(B) LOCATION: 13..1887

(D) OTHER INFORMATION: /note- „DNA sequence of bTS02618Aa gene encoding the BTS02618Aa protein”

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 8:

GGTACCAAAA CC ATG GCT GAC TAC CTG CAG ATG ACC GAC GAG GAC TAC	48
Met Ala Asp Tyr Leu Gln Met Thr Asp Glu Asp Tyr	
1 5 10	
ACC GAC AGC TAC ATC AAC CCC AGC CTG ACC ATC AGC GGT CGC GAC GCC	96
Thr Asp Ser Tyr Ile Asn Pro Ser Leu Ser Ile Ser Gly Arg Asp Ala	
15 20 25	
GTG CAG ACC GCT CTG ACC GTG CTG GGT CGC ATC CTG GGT GCC CTG GGC	144
Val Gln Thr Ala Leu Thr Val Val Gly Arg Ile Leu Gly Ala Leu Gly	
30 35 40	
GTG CCC TTC AGC GGT CAG ATC GTG AGC TTC TAC CAC TTC CTG CTG AAC	192
Val Pro Phe Ser Gly Gln Ile Val Ser Phe Tyr Gln Phe Leu Leu Asn	
45 50 55 60	
ACC CTG TGG CCA GTG AAC GAC ACC CCC ATC TGG GAA GCT TTC ATG CGC	240
Thr Leu Trp Pro Val Asn Asp Thr Ala Ile Trp Glu Ala Phe Met Arg	
65 70 75	
CAG GTG GAG GAG CTG GTG AAC CAG CAG ATC ACC GAG TTC GCT CGC AAC	288
Gln Val Glu Glu Leu Val Asn Gln Gln Ile Thr Glu Phe Ala Arg Asn	
80 85 90	
CAG GCC CTG GCT CGC CTG CAG GGC CTG GGC GAC AGC TTC AAC GTG TAC	336
Gln Ala Leu Ala Arg Leu Gln Gly Leu Gly Asp Ser Phe Asn Val Tyr	
95 100 105	

HU 226 143 B1

CAG	CGC	AGC	CTG	CAG	AAC	TGG	CTG	GCC	GAC	CGC	AAC	GAC	ACC	AAG	AAC	384
Gln	Arg	Ser	Leu	Gln	Asn	Trp	Leu	Ala	Asp	Arg	Asn	Asp	Thr	Lys	Asn	
	110					115					120					
CTG	AGC	GTG	GTG	AGG	GCC	CAG	TTC	ATC	GCC	CTG	GAC	CTG	GAC	TTC	GTG	432
Leu	Ser	Val	Val	Arg	Ala	Gln	Phe	Ile	Ala	Leu	Asp	Leu	Asp	Phe	Val	
125					130					135					140	
AAC	GCC	ATC	CCC	CTG	TTC	CCC	GTG	AAC	GGC	CAG	CAG	GTG	CCC	CTG	CTG	480
Asn	Ala	Ile	Pro	Leu	Phe	Ala	Val	Asn	Gly	Gln	Gln	Val	Pro	Leu	Leu	
				145					150					155		
AGC	GTG	TAC	GCC	CAG	GCC	GTG	AAC	CTG	CAC	CTG	CTG	CTG	CTG	AAG	GAT	528
Ser	Val	Tyr	Ala	Gln	Ala	Val	Asn	Leu	His	Leu	Leu	Leu	Leu	Lys	Asp	
			160					165						170		
GCA	TCC	CTG	TTC	GGC	GAG	GGC	TGG	GGC	TTC	ACC	CAG	GGC	GAG	ATC	AGC	576
Ala	Ser	Leu	Phe	Gly	Glu	Gly	Trp	Gly	Phe	Thr	Gln	Gly	Glu	Ile	Ser	
	175						180					185				
ACC	TAC	TAC	GAC	CGC	CAG	CTC	GAG	CTG	ACC	GCC	AAG	TAC	ACC	AAC	TAC	624
Thr	Tyr	Tyr	Asp	Arg	Gln	Leu	Glu	Leu	Thr	Ala	Lys	Tyr	Thr	Asn	Tyr	
	190					195					200					
TGC	GAG	ACC	TGG	TAC	AAC	ACC	GGT	CTG	GAC	CGC	CTG	AGG	GGC	ACC	AAC	672
Cys	Glu	Thr	Trp	Tyr	Asn	Thr	Gly	Leu	Asp	Arg	Leu	Arg	Gly	Thr	Asn	
205					210					215					220	
ACC	GAG	AGC	TGG	CTG	CGC	TAC	CAC	CAG	TTC	CGC	AGG	GAG	ATG	ACC	CTG	720
Thr	Glu	Ser	Trp	Leu	Arg	Tyr	His	Gln	Phe	Arg	Arg	Glu	Met	Thr	Leu	
				225					230					235		
GTG	GTG	CTG	GAC	GTG	GTG	GCC	CTG	TTC	CCC	TAC	TAC	GAC	GTG	CGC	CTG	768
Val	Val	Leu	Asp	Val	Val	Ala	Leu	Phe	Pro	Tyr	Tyr	Asp	Val	Arg	Leu	
			240					245					250			
TAC	CCC	ACC	GGC	AGC	AAC	CCC	CAG	CTG	ACA	CGT	GAG	GTG	TAC	ACC	GAC	816
Tyr	Pro	Thr	Gly	Ser	Asn	Pro	Gln	Leu	Thr	Arg	Glu	Val	Tyr	Thr	Asp	
		255					260					265				
CCC	ATC	GTG	TTC	AAC	CCA	CCA	GCC	AAC	GTG	GGC	CTG	TGC	CGC	AGG	TGG	864
Pro	Ile	Val	Phe	Asn	Pro	Pro	Ala	Asn	Val	Gly	Leu	Cys	Arg	Arg	Trp	
	270					275					280					
GGC	ACC	AAC	CCC	TAC	AAC	ACC	TTC	AGC	GAG	CTG	GAG	AAC	GCC	TTC	ATC	912
Gly	Thr	Asn	Pro	Tyr	Asn	Thr	Phe	Ser	Glu	Leu	Glu	Asn	Ala	Phe	Ile	
285					290					295					300	
AGG	CCA	CCC	CAC	CTG	TTC	GAC	CGC	CTG	AAC	AGC	CTG	ACC	ATC	AGC	AGC	960
Arg	Pro	Pro	His	Leu	Phe	Asp	Arg	Leu	Asn	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	
				305					310					315		
AAT	CGA	TTC	CCC	GTG	AGC	AGC	AAC	TTC	ATG	GAC	TAC	TGG	AGC	GGT	CAC	1008
Asn	Arg	Phe	Pro	Val	Ser	Ser	Asn	Phe	Met	Asp	Tyr	Trp	Ser	Gly	His	
			320					325					330			
ACC	CTG	CGC	AGG	AGC	TAC	CTG	AAC	GAC	AGC	GCC	GTG	CAG	GAG	GAC	AGC	1056
Thr	Leu	Arg	Arg	Ser	Tyr	Leu	Asn	Asp	Ser	Ala	Val	Gln	Glu	Asp	Ser	
		335					340					345				

HU 226 143 B1

TAC Tyr	GGC Gly	CTG Leu	ATC Ile	ACC Thr	ACC Thr	ACC Thr	AGG Arg	GCC Ala	ACC Thr	ATC Ile	AAC Asn	CCA Pro	GGC Gly	CTG Val	GAC Asp	1104
350							355				360					
GGC Gly	ACC Thr	AAC Asn	CGC Arg	ATC Ile	GAG Glu	AGC Ser	ACC Thr	GCT Ala	GTG Val	GAC Asp	TTC Phe	CGC Arg	AGC Ser	GCT Ala	CTG Leu	1152
365					370					375					380	
ATC Ile	GGC Gly	ATC Ile	TAC Tyr	GGC Gly	GTG Val	AAC Asn	AGG Arg	GCC Ala	AGC Ser	TTC Phe	GTG Val	CCA Pro	GGT Gly	GGC Gly	CTG Leu	1200
				385					390						395	
TTC Phe	AAC Asn	CGC Gly	ACC Thr	ACC Thr	AGC Ser	CCA Pro	GCC Ala	AAC Asn	GGT Gly	GGC Gly	TGC Cys	CGA Arg	GAT Asp	CTG Leu	TAC Tyr	1248
			400					405					410			
GAC Asp	ACC Thr	AAC Asn	GAC Asp	GAG Glu	CTG Leu	CCA Pro	CCC Pro	GAC Asp	GAG Glu	AGC Ser	ACC Thr	GGC Gly	AGC Ser	AGC Ser	ACC Thr	1296
		415					420					425				
CAC His	CGC Arg	CTG Leu	AGC Ser	CAC His	GTC Val	ACC Thr	TTC Phe	TTC Phe	AGC Ser	TTC Phe	CAG Gln	ACC Thr	AAC Asn	CAG Gln	GCT Ala	1344
	430					435					440					
GGC Gly	AGC Ser	ATC Ile	GCC Ala	AAC Asn	GCT Ala	GGC Gly	AGC Ser	GTG Val	CCC Pro	ACC Thr	TAC Tyr	GTG Val	TGG Trp	ACC Thr	AGG Arg	1392
445					450					455					460	
AGG Arg	GAC Asp	GTG Val	GAC Asp	CTG Leu	AAC Asn	AAC Asn	ACC Thr	ATC Ile	ACC Thr	CCC Pro	AAC Asn	CGC Arg	ATC Ile	ACC Thr	CAG Gln	1440
				465					470					475		
CTG Leu	CCC Pro	CTG Leu	GTG Val	AAG Lys	CCC Ala	AGC Ser	GCT Ala	CCC Pro	GTG Val	AGC Ser	GGC Gly	ACC Thr	ACC Thr	GTG Val	CTG Leu	1488
			480				485							490		
AAG Lys	GGT Gly	CCA Pro	GGC Gly	TTC Phe	ACC Thr	GGT Gly	GGC Gly	GGT Gly	ATA Ile	CTG Leu	CGC Arg	AGG Arg	ACC Thr	ACC Thr	AAC Asn	1536
		495					500					505				
CGC Gly	ACC Thr	TTC Phe	GGC Gly	ACC Thr	CTG Leu	CGC Arg	GTG Val	ACC Thr	CTG Val	AAT Asn	TCC Ser	CCA Pro	CTG Leu	ACC Thr	CAG Gln	1584
	510					515					520					
CAG Gln	TAC Tyr	CGC Arg	CTG Leu	CGC Arg	GTG Val	CGC Arg	TTC Phe	GCC Ala	AGC Ser	ACC Thr	GGC Gly	AAC Asn	TTC Phe	AGC Ser	ATC Ile	1632
525					530					535					540	
CGC Arg	GTG Val	CTG Leu	AGG Arg	GGT Gly	GGC Cly	GTG Val	AGC Ser	ATC Ile	GGC Gly	GAC Asp	GTG Val	CGC Arg	CTG Leu	GGC Gly	AGC Ser	1680
				545					550					555		
ACC Thr	ATG Met	AAC Asn	AGG Arg	GGC Gly	CAG Gln	GAG Glu	CTG Leu	ACC Thr	TAC Tyr	CAG Glu	AGC Ser	TTC Phe	TTC Phe	ACC Thr	CGC Arg	1728
			560					565					570			
GAG Glu	TTC Phe	ACC Thr	ACC Thr	ACC Thr	GGT Gly	CCC Pro	TTC Phe	AAC Asn	CCA Pro	CCC Pro	TTC Phe	ACC Thr	TTC Phe	ACC Thr	CAG Gln	1776
		575					580					585				

GCC CAG GAG ATC CTG ACC GTG AAC GCC GAG GGC GTG AGC ACC GGT GGC	1824
Ala Gln Glu Ile Leu Thr Val Asn Ala Glu Gly Val Ser Thr Gly Gly	
590 595 600	
GAG TAC TAC ATC GAC CGC ATC GAG ATC GTG CCC GTG AAC CCA GCT CGC	1872
Glu Tyr Tyr Ile Asp Arg Ile Glu Ile Val Pro Val Asn Pro Ala Arg	
605 610 615 620	
GAG GCC GAG GAG GAC TGAGGCTAGC	1897
Glu Ala Glu Glu Asp	
625	

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 625 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 9:

Met	Ala	Asp	Tyr	Leu	Gln	Met	Thr	Asp	Glu	Asp	Tyr	Thr	Asp	Ser	Tyr
1				5					10					15	
Ile	Asn	Pro	Ser	Leu	Ser	Ile	Ser	Gly	Arg	Asp	Ala	Val	Gln	Thr	Ala
			20					25					30		
Leu	Thr	Val	Val	Gly	Arg	Ile	Leu	Gly	Ala	Leu	Gly	Val	Pro	Phe	Ser
		35					40					45			
Gly	Gln	Ile	Val	Ser	Phe	Tyr	Gln	Phe	Leu	Leu	Asn	Thr	Leu	Trp	Pro
	50					55					60				
Val	Asn	Asp	Thr	Ala	Ile	Trp	Glu	Ala	Phe	Met	Arg	Gln	Val	Glu	Glu
65					70					75				80	
Leu	Val	Asn	Gln	Gln	Ile	Thr	Glu	Phe	Ala	Arg	Asn	Gln	Ala	Leu	Ala
				85					90					95	
Arg	Leu	Gln	Gly	Leu	Gly	Asp	Ser	Phe	Asn	Val	Tyr	Gln	Arg	Ser	Leu
		100						105					110		
Gln	Asn	Trp	Leu	Ala	Asp	Arg	Asn	Asp	Thr	Lys	Asn	Leu	Ser	Val	Val
		115					120					125			
Arg	Ala	Gln	Phe	Ile	Ala	Leu	Asp	Leu	Asp	Phe	Val	Asn	Ala	Ile	Pro
	130					135					140				
Leu	Phe	Ala	Val	Asn	Gly	Gln	Gln	Val	Pro	Leu	Leu	Ser	Val	Tyr	Ala
145					150					155					160
Gln	Ala	Val	Asn	Leu	His	Leu	Leu	Leu	Leu	Lys	Asp	Ala	Ser	Leu	Phe
				165					170					175	
Gly	Glu	Gly	Trp	Gly	Phe	Thr	Gln	Gly	Glu	Ile	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Asp
			180					185					190		

HU 226 143 B1

Arg	Gln	Leu	Glu	Leu	Thr	Ala	Lys	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Cys	Glu	Thr	Trp	195	200	205
Tyr	Asn	Thr	Gly	Leu	Asp	Arg	Leu	Arg	Gly	Thr	Asn	Thr	Glu	Ser	Trp	210	215	220
Leu	Arg	Tyr	His	Gln	Phe	Arg	Arg	Glu	Met	Thr	Leu	Val	Val	Leu	Asp	225	230	235
Val	Val	Ala	Leu	Phe	Pro	Tyr	Tyr	Asp	Val	Arg	Leu	Tyr	Pro	Thr	Gly	245	250	255
Ser	Asn	Pro	Gln	Leu	Thr	Arg	Glu	Val	Tyr	Thr	Asp	Pro	Ile	Val	Phe	260	265	270
Asn	Pro	Pro	Ala	Asn	Val	Gly	Leu	Cys	Arg	Arg	Trp	Gly	Thr	Asn	Pro	275	280	285
Tyr	Asn	Thr	Phe	Ser	Glu	Leu	Glu	Asn	Ala	Phe	Ile	Arg	Pro	Pro	His	290	295	300
Leu	Phe	Asp	Arg	Leu	Asn	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Asn	Arg	Phe	Pro	305	310	315
Val	Ser	Ser	Asn	Phe	Met	Asp	Tyr	Trp	Ser	Gly	His	Thr	Leu	Arg	Arg	325	330	335
Ser	Tyr	Leu	Asn	Asp	Ser	Ala	Val	Gln	Glu	Asp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Ile	340	345	350
Thr	Thr	Thr	Arg	Ala	Thr	Ile	Asn	Pro	Gly	Val	Asp	Gly	Thr	Asn	Arg	355	360	365
Ile	Glu	Ser	Thr	Ala	Val	Asp	Phe	Arg	Ser	Ala	Leu	Ile	Gly	Ile	Tyr	370	375	380
Gly	Val	Asn	Arg	Ala	Ser	Phe	Val	Pro	Gly	Gly	Leu	Phe	Asn	Gly	Thr	385	390	395
Thr	Ser	Pro	Ala	Asn	Gly	Gly	Cys	Arg	Asp	Leu	Tyr	Asp	Thr	Asn	Asp	405	410	415
Glu	Leu	Pro	Pro	Asp	Glu	Ser	Thr	Gly	Ser	Ser	Thr	His	Arg	Leu	Ser	420	425	430
His	Val	Thr	Phe	Phe	Ser	Phe	Gln	Thr	Asn	Gln	Ala	Gly	Ser	Ile	Ala	435	440	445
Asn	Ala	Gly	Ser	Val	Pro	Thr	Tyr	Val	Trp	Thr	Arg	Arg	Asp	Val	Asp	450	455	460
Leu	Asn	Asn	Thr	Ile	Thr	Pro	Asn	Arg	Ile	Thr	Gln	Leu	Pro	Leu	Val	465	470	475
Lys	Ala	Ser	Ala	Pro	Val	Ser	Gly	Thr	Thr	Val	Leu	Lys	Gly	Pro	Gly	485	490	495
Phe	Thr	Gly	Gly	Gly	Ile	Leu	Arg	Arg	Thr	Thr	Asn	Gly	Thr	Phe	Gly	500	505	510

Thr Leu Arg Val Thr Val Asn Ser Pro Leu Thr Gln Gln Tyr Arg Leu
515 520 525

Arg Val Arg Phe Ala Ser Thr Gly Asn Phe Ser Ile Arg Val Leu Arg
530 535 540

Gly Gly Val Ser Ile Gly Asp Val Arg Leu Gly Ser Thr Met Asn Arg
545 550 555 560

Gly Gln Glu Leu Thr Tyr Glu Ser Phe Phe Thr Arg Glu Phe Thr Thr
565 570 575

Thr Gly Pro Phe Asn Pro Pro Phe Thr Phe Thr Gln Ala Gln Glu Ile
580 585 590

Leu Thr Val Asn Ala Glu Gly Val Ser Thr Gly Gly Glu Tyr Tyr Ile
595 600 605

Asp Arg Ile Glu Ile Val Pro Val Asn Pro Ala Arg Glu Ala Glu Glu
610 615 620

Asp
625

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. DNS-szekvencia, *azzal jellemezve*, hogy olyan nukleotidszekvenciát tartalmaz, amely az 5. azonosító számú szekvencia 44–658. helyzetű aminosavaiból álló aminosavszekvenciát tartalmazó proteint kódol, és amelyben a 164-helyzetű aminosav lizin vagy alanin, vagy olyan nukleotidszekvenciát tartalmaz, amely a 8. azonosító számú szekvencia 19–1863. helyzetű aminosavaiból álló aminosavszekvenciát tartalmazó proteint kódol.

2. Kiméra gén, amely tartalmazza az 1. igénypont szerinti DNS-t, valamint egy promotert, amely alkalmas arra, hogy a gént növényi sejtekben átírja.

3. Protein, *azzal jellemezve*, hogy az 5. azonosító számú szekvencia 44–658. helyzetű aminosavaiból álló aminosavszekvenciát tartalmazza, amelyben a 164. helyzetű aminosav lizin vagy alanin, vagy amely a 9. azonosító számú szekvencia szerinti aminosavszekvenciát tartalmazza.

4. Növényi sejt, *azzal jellemezve*, hogy tartalmazza a 2. igénypont szerinti kiméra gént.

5. Növényi sejt, *azzal jellemezve*, hogy a sejt a CryIAb vagy CryIB toxint és a 2. igénypont szerinti kiméra gént kódoló DNS-t tartalmazza.

6. Növény vagy annak magja, *azzal jellemezve*, hogy az említett növény vagy mag több 4. vagy 5. igénypont szerinti sejtet tartalmaz.

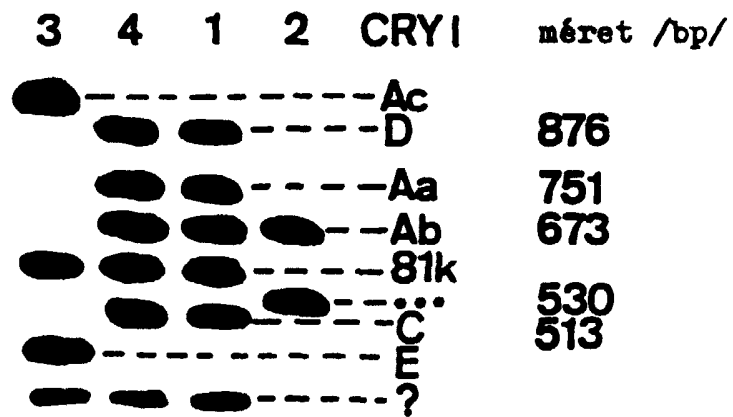
7. Eljárás transzformált növény, vagy annak magja előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a 2. igénypont szerinti kiméra gént tartalmazó transzformált növényi sejtet állítunk elő, majd az említett növény sejtjeit növénné regeneráljuk és abból magokat nyerünk.

8. Eljárás Lepidoptera rovarokkal, különösen pedig Spodoptera littoralisszal, Agrotis ipsilonnal, Ostrinia nubilisszal és Phthorimaea operculellával szemben rezisztens növény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy növényi sejtet a 3. igénypont szerinti proteint kódoló DNS-sel transzformálunk, és az említett sejtől növényt regenerálunk.

9. Eljárás Agrotis segetum és Phthorimaea operculella rovarok irtására, *azzal jellemezve*, hogy az említett rovarokat olyan proteinnel hozzuk érintkezésbe, amely az 5. azonosító számú szekvencia 44–658. helyzetű aminosavaiból álló aminosavszekvenciát tartalmazza, amelyben a 164. helyzetű aminosav lizin vagy alanin, vagy amely a 9. azonosító számú szekvencia szerinti aminosavszekvenciát tartalmazza.

10. Növényvédőszer-készítmény Lepidoptera rovarok ellen, *azzal jellemezve*, hogy a 3. igénypont szerinti proteint tartalmazza.

11. Transzformált mikroorganizmus, *azzal jellemezve*, hogy olyan DNS-t tartalmaz, amely magában foglalja az 1. igénypont szerinti DNS-t.



1. ábra