



(19) Országkód

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: P 93 01581
(22) A bejelentés napja: 1993. 05. 28.
(23) Módosítási elsőbbség: 1994. 07. 01.
(30) Elsőbbségi adatok:
07/891,598 1992. 06. 01. US

(40) A közzététel napja: 1994. 12. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 2000. 12. 28.

(11) Lajstromszám:

218 849 B

(51) Int. Cl.⁷

C 12 N 15/33

C 12 N 15/34

C 12 N 15/41

(72) Feltaláló:

Brennan, Lynn Ann, Lawrenceville,
New Jersey (US)

(73) Szabadalmas:

American Cyanamid Co., Wayne,
New Jersey (US)

(74) Képvisező:

DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.,
Budapest

(54)

Gazdaszervezetről gazdaszervezetre a környezetben csökkent terjedési képességgel rendelkező rekombináns bakulovírus és eljárás előállítására

KIVONAT

A találmány tárgyát egy módosított genetikai elemmel rendelkező, nem fertőző bakulovírus képezi, melynek működése genetikai kiegészítéssel helyreállítható, és ezáltal újra a vírus rovarfertőző formája képződik. A találmány kiterjed továbbá egy heterológ gén inszertálására

a vírusgenomba abból a célból, hogy a vírus termeljen egy rovarokat leküzdő vagy módosító anyagot a bioin-szekticid hatás fokozása, valamint e kívánatos tulajdon-ságok genetikai stabilitása érdekében.

A találmány tárgyát egy módosított genetikai elemmel rendelkező, nem fertőző bakulovírus képezi, melynek működése genetikai kiegészítéssel helyreállítható, és ezáltal újra a vírus rovarfertőző formája képződik. A találmány kiterjed továbbá egy heterológ gén inszertálására a vírusgenomba abból a célból, hogy a vírus egy rovarok leküzdését vagy rovarok módosítását biztosító anyagot termeljen a bioinszekticid hatás fokozása, valamint e kívánatos tulajdonságok genetikai stabilitása érdekében.

Leírásunkban a következő rövidítéseket alkalmaztuk:

A. cal. - *Autographa californica*

AcMNPV - *Autographa californica* nukleáris polihedrózis vírus

bp - bázispár

ECV - extracelluláris vírus

GV - granulózis vírus

kD - kilodalton

MOI - a fertőzés multiplicitása

NPV - nukleáris polihedrózis vírus

OB - zárványtest

OV - zárványvírus

PCR - polimeráz láncreakció

PDV - polihedron eredetű vírus

p. i. - fertőzést követően

PIB - polihedron zárványtest (lásd mint az OB)

5' UTR - a géntranszkripció kezdőpontjától a proteinszintézis kezdő kodonját megelőző utolsó bázisig vagy bázispárig terjedő szakasznak megfelelő mRNS- vagy génszekvencia

3' UTR - a proteinszintézis terminációs kodonját követő első bázistól vagy bázispártól az mRNS 3'-végén található, a gén által kódolt utolsó bázisig terjedő szakasznak megfelelő mRNS vagy génszekvencia

(+)-szál - egy gén azon DNS-szála és az azt határoló szekvenciák, amelyek azonos információt hordoznak, mint az adott génből származó RNS

(-)-szál - egy gén azon DNS-szála és az azt határoló szekvenciák, amelyek komplementerek a (+) szállal.

A találmány mindenfajta rovarvírusra vonatkozik, beleértve a DNS- és az RNS-vírusokat. A DNS-vírusokhoz tartoznak az entomopox vírusok (EPV) és a *Baculoviridae* vírusok, mint például a nukleáris polihedrózis vírusok (NPV), granulózis vírusok (GV) stb. Az RNS-vírusokhoz tartoznak a togavírusok, flavivírusok, pikornavírusok, citoplazma polihedrózis vírusok (CPV) stb. Az *Eubaculovirinae* dupla szálú DNS-vírusok alcsaládja két nemzetséget foglal magában, az NPV-eket és GV-eket, melyek különösen alkalmasak rovarok biológiai leküzdésének céljára, mivel életciklusuk során zárványtesteket (OB-eket) képeznek.

Mostanáig több mint 400 bakulovírust azonosítottak gerinctelenekben. Az *Autographa californica* nukleáris polihedrózis vírus (AcMNPV) a *Baculoviridae* család egy jellemző vírusa, amely széles gazdaszervezet-spektrummal rendelkezik. Az AcMNPV-vírust eredetileg *Autographa californica*-ból, (*A. cal.*) a vetésiba-

goly-pilléből izolálták (amely kifejlett alakjában éjszakai molylepke), amely lucerna-araszolóhernyóként ismert. Ez a vírus a pikkelyesszárnú rovarok rendjén belül 12 családot és több mint 30 fajt képes megfertőzni (lásd az irodalmi hivatkozást). Ezen a renden kívül nem ismert más faj, amelyben produktív fertőzést hozna létre.

A bakulovírusok bioinszekticidként való alkalmazása igen ígéretes. A mezőgazdaságban való elterjedt alkalmazásuk egyik fő akadály a rovar megfertőzése és pusztulása közötti hosszú idő. Ez a késedelem néhány naptól néhány hétig terjedhet. Ezen idő alatt a rovar folytatja a táplálkozást, és a növény további károsodását okozza. Számos kutató megkísérelte ennek a hátránynak a kiküszöbölését oly módon, hogy egy heterológ gént inszertáltak a vírusgenomba annak érdekében, hogy egy rovarokat leküzdő vagy módosító anyag, mint például toxin (2., 3., 4. irodalmi hivatkozás), neuropeptid és hormon (5., 6. irodalmi hivatkozás) vagy enzim (7. irodalmi hivatkozás) expresszáldjon.

Bár a géntechnika megfelelő eszközt ad a kezünkbe a technikai akadályok leküzdésére annak érdekében, hogy bioinszekticidként alkalmazható vírusokat kereskedelmi forgalomba hozzunk, felmerült azonban, hogy széles körű alkalmazásuknak van egy második lehetséges akadály is. Nevezetesen vannak olyan feltevések, melyek szerint ezeknek a genetikailag módosított vírusoknak a kibocsátása a környezetbe az ökoszisztémára nézve előre nem látható következményekkel járhat, mivel ezek a vírusok replikálnak és terjednek (8., 9. irodalmi hivatkozás). Jelenleg minden, a rovarok biológiai szabályozása céljára előállított rekombináns rovarvírus kapcsán felvetődik ez a feltevés, mivel mindegyik képes rovarról rovarra terjedni. Szükség van tehát olyan rekombináns rovarspecifikus vírusokra, amelyek a környezetbe való kiszabadulásukat követően rovarról rovarra (gazdaszervezetről gazdaszervezetre) való csökkent átadódási képességgel rendelkeznek.

A bakulovírusok életciklusa, amint az az AcMNPV példáján látható, két szakaszból áll. Az életciklus egy-egy szakaszát a vírus meghatározott formája képviseli, nevezetesen: nem zárványos extracelluláris (sejten kívüli) vírusrészcsekék (ECV) és zárványos vírusrészcsekék (OV) (10., 11. irodalmi hivatkozás). A sejten kívüli és zárványos vírusalakok ugyanazzal a genommal rendelkeznek, de különböző biológiai sajátosságokat mutatnak. A vírus két alakjának érését vírúsgének elkülönült csoportja irányítja, melyek közül néhány a két alaknál egyedi.

A természetben előforduló rovarfertőző formában sok viriont találunk kristályszerű proteinmátrixba ágyazva, amely zárványtestként (OB) ismeretes, és amelyet polihedron zárványtestként is említenek (PIB). A proteinszerű víruszárványokat tehát polihedronoknak nevezzük. A 29 kD molekulatömeggel rendelkező polihedron protein a víruszárványok fő víruskódolta szerkezeti fehérjéje (10., 12. irodalmi hivatkozás). (Hasonlóképpen a GV-k olyan OB-kat képeznek, amelyeket polihedrin helyett elsődlegesen granulin épít fel.)

A víruszárványok a természetes bakulovírus életciklusának fontos részét képezik, mivel a fogékony rovar-

fajok közti horizontális (rovarról rovarra való) átvitel eszközeül szolgálnak. A környezetben egy (rendszerint lárvá állapotú) fogékony rovar a vírus zárványos alakját fogyasztja el valamely fertőzött táplálékforrásból, például egy növényből. A kristályos zárványok a fogékony rovarok belében szétesnek, és fertőző vírusrészecskéket bocsátanak ki. Ezek a polihedron eredetű vírusok (PDV) megtámadják a középbél szöveteinek sejtjeit és ott replikálódnak (10. irodalmi hivatkozás).

Feltételezzük, hogy a vírusrészecskék endocitózis vagy fúzió útján kerülnek a sejtbe, és a vírus-DNS a magpórusában vagy a magban csomagolódik ki. A vírus-DNS replikációja 6 órán belül észlelhető. A fertőzést követő (p. i.) 10–12 óra elteltével az extracelluláris vírusoknak (ECV) a sejt felszínéből való kibújása révén egy másodlagos fertőzés terjed rá az egyéb rovarszövetekre. A vírus ECV alakja felelős a vírus sejtről sejtire való terjedéséért egy adott fertőzött rovaregyeden belül, és ugyancsak felelős a fertőzés átviteléért sejtenyészeten.

A fertőzési ciklus késői szakaszában (12 órával a fertőzést követően) polihedrin protein jelenik meg a fertőzött sejtekben. A polihedrin protein legkorábban a fertőzést követő 18–24 óra múlva áll össze a fertőzött sejt magjában, és a fehérjeszerű zárványokba vírusrészecskék ágyazódnak be. 4–5 nap alatt, a sejtek széteséséig nagy számban halmozódnak fel víruszárványok. Ezek a polihedronok nem játszanak aktív szerepet a fertőzés terjedésében a lárván belül. A vér-nyirok rendszerbe került ECV-k sokszorozódnak és szóródnak, ami a lárvá pusztulásához vezet (10., 11., 12. irodalmi hivatkozás).

Amikor a fertőzött lárvá elpusztul, polihedronok milliói maradnak a széteső szövetben, míg az ECV-k lebomlanak. Amikor más lárvák például a szennyezett növények vagy egyéb táplálék elfogyasztása révén találkoznak a polihedronokkal, a ciklus megismétlődik (10. irodalmi hivatkozás).

Összegezve, a vírus zárványos alakja felelős a rovar kezdeti, a bélen keresztül történő fertőződéséért, és ugyancsak felelős a vírus környezeti stabilitásáért. A PDV-k injektálással adagolva alapvetően nem fertőzők, azonban igen fertőzők szájon át bejutva. A vírus nemzárványos alakja (vagyis az ECV) felelős a másodlagos fertőzésért és a sejtről sejtire terjedő fertőzésért. Az ECV-k injektálással igen fertőzők sejtenyészetekre vagy belső rovarszövetekre, szájon át bejuttatva azonban alapvetően nem fertőzők.

Rovarokra toxikus idegen proteinek expresszálo rekombináns bakulovírusok alkalmazását elősegíti az a tény, hogy gerincesekre vagy növényekre ezek a vírusok nem kórokozók. Ezenkívül a bakulovírusok általában szűk gazdaszervezet-spektrummal rendelkeznek. Sok törzs kórokozó képessége egy vagy néhány rovarfajra korlátozódik.

A legszélesebb körben tanulmányozott bakulovírus az AcMNPV. Az AcMNPV-ről ismeretes, hogy 12 családot és több mint 30 fajt képes megfertőzni a Lepidoptera rovarrenden belül (1. irodalmi hivatkozás). Nem ismert ezen a renden kívül más faj, amelyben produktív fertőzést okozna. Mind a közvélemény, mind különböző

hatóságok számára vita tárgya egy idegen DNS-szekvenciát tartalmazó AcMNPV-törzs kibocsátásának lehetséges következménye (8., 9. irodalmi hivatkozás). Ez arra a lehetőségre vonatkozik, hogy a módosított vírus átterjedhet más, nem célzott lepidopterákra. További mérlegelendő tényező ezeknek a vírusoknak a közismert környezeti stabilitása.

Szükség van tehát rovarról rovarra (gazdaszervezetről gazdaszervezetre) való csökkent terjedési képességgel rendelkező rekombináns rovarspecifikus vírusokra. Ezeknek a vírusoknak képeseknek kell lenniük egy rovar megfertőzésére, de rovarról rovarra való jelentősen csökkent terjedési képességgel kell rendelkezniük, így korlátozva a vírus fennmaradását a környezetben.

A találmány tárgyát tehát rovarról rovarra csökkent terjedési képességgel rendelkező, vagyis a környezetben gazdaszervezetről gazdaszervezetre csökkent átadódási képességgel rendelkező rekombináns rovarvírustörzsek előállítására és tenyésztése képezi. A *Baculoviridae* családba tartozó vírusok különösen alkalmasak ilyen törzsek konstrukciójára életciklusuk fentiekben ismertetett két szakasza következtében.

Ezen vírustörzseket úgy állítjuk elő, hogy először egy genetikai elemet módosítunk, ami a vírust rovarokra nézve fertőzőképtelenné teszi. Az e célra felhasznált genetikai elem nem korlátozódik a *transz*-működésű anyagokat kódoló génekre, mint például RNS-re vagy protein molekulákra, hanem ezek lehetnek *cisz*-működésű elemek vagy szabályozószekvenciák is, mint például a transzkripció erősítőszekvenciák, promoterek, egyéb transzkripció, transláció és genomiális replikáció szabályozóelemek és vírus-DNS (vagy -RNS) becsomagoló szekvenciák.

A módosítás formája lehet delécio, leolvasásikeret-eltolódás, inszertálás, újrendeződés, pontmutáció vagy a génműködés megszakításának egyéb formája. A módosítás további formái olyan eljárások lehetnek, amelyek egy vírusfunkcióba avatkoznak be, mint például a transzkripció vagy a transláció szuppressálása, egy „atiszensz”-RNS alkalmazása, egy további genetikai elem inszertálása és egy további szabályozóelem, mint például az élesztő 5'-irányú aktiválószekvencia (UAS_{GAL}) inszertálása, melynek a működéséhez a GAL 4 protein jelenléte szükséges.

Azt a célt, hogy a gazdaszervezetről gazdaszervezetre való terjedés képességének lényeges csökkentése mellett a rekombináns vírus fertőzőképességét helyreállítsuk, a módosított vírustól hiányzó vagy abban defektív termék vagy funkció kiegészítésével értjük el.

A találmány tárgykörébe tartoznak a rekombináns rovarvírus rovarra fertőző formájának genetikai kiegészítéssel történő előállítására szolgáló eljárások, nevezetesen: (1) a módosított vírustól hiányzó vagy abban defektív terméket vagy működést szolgáltató DNS-fragmenttel transzfectált rovar eredetű szövettenyésztetben való előállítás; (2) a módosított vírustól hiányzó vagy abban defektív terméket vagy működést szolgáltató DNS-fragmenttel stabilan transzformált rovar eredetű sejtvonalakban való előállítás; (3) a módosított vírustól hiányzó vagy abban defektív terméket vagy működést

szolgáltató DNS-fragmenst tartalmazó transzgenikus rovarokban való előállítás.

A szolgáltatót terméktől vagy működéstől függően szükséges vagy kívánatos lehet heterológ vírus- vagy sejt-promoter alkalmazása a DNS-fragmens expresszá-lásának szabályozására. Ezt adagolási vagy időzí-tési megfontolások tehetik szükségessé.

Az (1) és (2) eljárásban alkalmazott rovarsejtek és a (3) eljárásban alkalmazott transzgenikus rovarok tehát „segítőként” („helper”-ként) működnek a vírus fertő-ző-képességének helyreállításában oly módon, hogy az így előállított vírusrészecskék (virionok) fertőzést okoznak, amikor a természetben a rovarok elfogyasztják azokat. A fertőzött lárvákban termelődött virionok, mivel azok nincsenek kiegészítve, defektívek és így a fertőzés nem terjed könnyen más rovarokra. Ezért ha vad típusú vírus-sal történő társfertőzés nem következik be, a rekombináns vírus életciklusa egyetlen fertőzéssel véget ér.

A találmány előnyös megvalósításában egy rovarokat leküzdő vagy módosító anyagot kódoló gént inszertáltunk a vírusgenomba. A gént a módosított vírusban a vírusgenom bármely megfelelő helyére inszertálhatjuk. Ilyen anyagok lehetnek toxinok, neuropeptidok és hormonok, valamint enzimek. Az így expresszált anyag fokozza a bioinszekticid hatást.

Pontosabban a gént a gazdaszervezetről gazdaszervezetre való csökkent átadódásért felelős módosított genetikai elem szomszédságába vagy közvetlenül abba inszertáljuk. A heterológ génnek a módosított genetikai elem helyének szomszédságába vagy közvetlenül a módosítás helyére történő inszertálása megelőzi vagy nagymértékben minimalizálja az olyan genetikai rekombináció lehetőségét, amely a vírus olyan alakját eredményezné, amely mind vad típusú fenotípussal, mind egy gazdaszervezetről gazdaszervezetre való átadódásra ható rovarokat leküzdő vagy módosító génnel rendelkezik.

A mellékelt 1. ábra az AcMNPV genomja ismert bakulovírus génjeinek lineáris térképét ábrázolja (13. irodalmi hivatkozás).

A 2. ábra a delta-p74-1 plazmid konstrukciójának részletét mutatja, amely egy deléciót hordoz az AcMNPV-p74 génjében.

A 3. ábra az A4000 AcMNPV-törzs p74 génjében (delta-p74) létrehozott deléció részletét mutatja.

A 4. ábra a pMEV sorozatba tartozó expressziós vektor részletének restrikciós térképét ábrázolja, ahol jelöltük a promotert, a polilinkerszakaszt és a 3'-UTR-egységet.

Rovarról rovarra történő csökkent terjedési képességgel rendelkező módosított rovarvírus előállítása oly mértékben meggyorsítja a fertőző vírus környezetből való eltűnésének sebességét, ami meghaladja a természetes abiotikus és biotikus lebomlási folyamatok által elérhető. A módosított vírus tehát nem marad fenn a környezetben.

A találmány szerinti megoldás mindenfajta rovarvírusról vonatkozik, beleértve DNS- és RNS-vírusokat. A DNS-vírusok lehetnek kettős szálú, burokkal rendelkező DNS-vírusok, mint például (család, azután faj) Entomopoxvirinae (fedelelesszárművek poxvírusa), Eubaculo-

virinae (Autographa californica MNPV; Helicoverpa zea SNPV), Nudibaculovirinae (Helicoverpa zea NOB), Ichnovírus (Campoletis sonorensis vírus) és Bracovírus (Cotesia melanoscela vírus) és kettős szálú, burokok nélküli DNS-vírusok, mint például Iridovirinae (Chilo iridescent vírus) és egyszálú, burokok nélküli DNS-vírusok, mint például Parvoviridae (Galleria densovirus).

Az RNS-vírusok lehetnek kettős szálú, burokkal rendelkező RNS-vírusok, mint például Togaviridae (Sindbis vírus), Bunyaviridae (répa levélfodrosodást okozó vírus) és Flaviviridae (Wesselborn vírus), ugyancsak ide tartoznak a kettős szálú, burokkal nem rendelkező RNS-vírusok, mint például a Reoviridae (Corripa vírus) és Birnaviridae (Drosophila X vírus), és az egyszálú, burokkal nem rendelkező RNS-vírusok, mint például Picornaviridae (tücsökparalízis-vírus), Tetraviridae (Nudaria beta vírus), és Nodaviridae (gyászbagárvírus).

Az Eubaculovirinae dupla szálú DNS-vírusok alcsládja két nemzetséget foglal magában, az NPV-ket és GV-ket, melyek különösen alkalmasak biológiai kontroll céljára, mivel életciklusuk során zárványtesteket képeznek. Az NPV-k közé tartozik például a *Lymantria dispar* NPV (cigány éjjeli lepke NPV), az *Autographa californica* MNPV, az *Anagrapha falcifera* NPV (zelleraraszó NPV), a *Spodoptera littoralis* NPV, a *Spodoptera frugiperda* NPV, a *Heliothis armigera* NPV, a *Mamestra brassicae* NPV, a *Choristoneura fumiferana* NPV, a *Trichoplusia ni* NPV, a *Helicoverpa zea* NPV, a *Rachiplusia ou* NPV stb. A GV-k közé tartoznak például a *Cydia pomonella* GV (almamoly GV), a *Pieris brassicae* GV, a *Trichoplusia ni* GV, az *Artogeia rapae* GV, az *Plodia interpunctella* GV (indiai lisztmoly) stb. Az entomopox vírusok közé tartoznak például a *Melolontha melonotha* EPV, az *Amsacta moorei* EPV, a *Locusta migratoria* EPV, a *Melanoplus sanguinipes* EPV, a *Schistocerca gregaria* EPV, az *Aedes aegypti* EPV, a *Chironomus luridus* EPV stb.

A találmány tárgyát rovarok leküzdésére, különösen a Lepidoptera, Orthoptera, Diptera, Isoptera, Hymenoptera, Homoptera, Hemiptera és Coleoptera rendek leküzdése és mezőgazdasági termények, fák, cserjék, gyümölcsösök és dísznövények ezen rovarok támadásától való védelme képezi.

Bár a találmány szerinti megoldást az *Autographa californica* NPV (AcMNPV) példáján szemléltetjük, érthető, hogy a találmányban ismertetett elvek a fent felsorolt rovarvírusok mindegyike esetében alkalmazhatók. Megfontolandó továbbá, hogy a találmány szerinti megoldás jól alkalmazható új, a szakirodalomban még nem azonosított és nem osztályozott rovarvírusok kifejlesztésében.

Az AcMNPV-vel való fertőzéskor kezdetben a vírus ECV-ként is ismeretes sarjadzó (budded) alakja termelődik. Az ECV felelős a vírus sejtről sejtre való átviteléért egy adott fertőzött rovaron belül és sejtenyészetben való szaporodás közben. Az NPV-k esetében a fertőzési ciklus késői szakaszában a sejt megkezd a PDV alak termelését, amely polihedron zárványtestnek (PIB) is nevezett kristályos zárványtestbe (OB) csomagolódik. (Hasonlóképpen a GV-k polihedrin helyett el-

sősorban granulinból álló OB-ket képeznek.) A vírusnak ez a PDV alakja felelős a rovar kezdeti fertőzéséért a bélen keresztül, és ugyancsak felelős a vírus környezeti stabilitásáért.

A találmány szerint különösen előnyös egy olyan működés megváltoztatása, amely az intakt fertőző OB termelődésében játszik szerepet, és amely nincs hatással a vírus sarjadzó (budded) (ECV) alakjára.

Ilyen mutációkat kimutattak az AcMNPV-ben (14. idom. hiv.). Számos mutagenézises kísérletben azonosítottak olyan genetikai lokuszokat, melyek mutációja esetében sarjadzó vírusok termelődnek, azonban intakt fertőző polihedronok nem. Az egyik legérdekesebb és legtöbb alkalmazási lehetőséget ígérő lokusz az AcMNPV genomjának „P” Hind III fragmensén található p74 gén (15. irodalmi hivatkozás). A p74 egy, a bakulovírus-fertőzés késői szakaszában és viszonylag kis mennyiségben termelődő protein (15. irodalmi hivatkozás).

A p74 gén megfelelőit azonosították más NPV-kben is, beleértve a *Choristoneura fumeiferana* NPV-t (16. irodalmi hivatkozás), és az *Orgyia pseudotsugata* NPV-t (17. irodalmi hivatkozás). A p74 megfelelőjének a Nukleáris Polihedrózis Vírus nemzetség mindegyik tagjában jelen kell lennie. A NPV-k és a velük rokonságot mutató Granulózis Vírusok nemzetségének életciklusában található hasonlóságok alátámasztják annak a valószínűségét, hogy ezek a GV-k kódolnak egy, a p74-hez hasonló sajátosságokat mutató gént.

A p74 gént és a szomszédos p10 gént eltávolító nagyméretű deléciók olyan vírust eredményeznek, amelyek által termelt polihedront lárvákkal megetetve azokban nem okoz fertőzést. Mivel a csupán a p10 génben létrehozott deléción olyan polihedron termelődéséhez vezet, amely szájon át bejuttatva fertőzést hoz létre, a fenti fenotípusért a p74 génben létrejött deléción tehető felelőssé (15. irodalmi hivatkozás).

Amint azt az 1. példában alább ismertetjük, a találmány tárgyát képezi egy (delta-p74-1-nek nevezett) transzfervektor előállítás, amely a vad típusú genommal rekombinálódva egyedül a p74 génben (delta-p74) hoz létre deléciót (3. ábra). Ezt a delta-p74-1 transzfervektort hordozó *E. coli* HB101 törzset 1992. május 21-én letétbe helyeztük az American Type Culture Collection intézetnél (12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA, ahol az ATCC 68988 nyilvántartási számot kapta. 1992. május 21-én ugyancsak letétbe helyeztük az American Type Culture Collection gyűjteményében egy A4000-nek nevezett AcMNPV törzs mintáit (amelyben a p74 gént delációval megszakítottuk), és amelyet VR2373 nyilvántartási számmal láttak el.

Amint azt a 2. példában alább ismertetjük, igazoltuk, hogy a p74 gént kódoló DNS-szakasz delációja okozza a lárvákkal megetetve nem fertőzőképes PIB-ek termelődését. Sarjadzó vírusok termelődnek, és ezek a rovarhemocoelbe injektálva fertőzők.

Egy DNS-szakasz egyszerű delációja nem az egyetlen módosítási lehetőség, amelyet a vírus egy adott genetikai eleme működésének megszüntetésére felhasználhatunk. Ebben a megvalósítási módban alkalmazha-

tó genetikai elem nem korlátozódik *transz*-működésű anyagokat kódoló génekre, mint például RNS-re vagy proteinmolekulákra, hanem magában foglal *cisz*-működésű elemeket vagy szabályozószekvenciákat is, mint például transzkripció erősítésszekvenciákat, promotereket, egyéb transzkripció transzlációs és genomális replikáció-ellenőrző elemeket és vírus DNS (vagy RNS) becsomagoló szekvenciákat.

A módosítás formája ugyancsak lehet leolvasásikeret-eltolódás, inszertálás, újrendeződés, pontmutáció vagy a génműködés megszakításának egyéb formája. A módosítás magában foglalhat leolvasásikeret-eltolódást, amely vagy túl korai proteinterminációt okoz, vagy megváltozott, nem működőképes protein keletkezéséhez vezet. Ugyancsak a találmány tárgykörébe tartozik egy terminációs kodon inszertálása a gén proteint kódoló szakaszába és a megfelelő szuppresszor tRNS-t kódoló gén beépítése a „helper” sejtvonalba.

A módosítás további formái olyan eljárásokat foglalnak magukban, amelyek egy vírusfunkcióba avatkoznak be, mint például a transzkripció vagy a transzláció szuppresszálása, egy „atiszensz” RNS alkalmazása, egy további genetikai elem inszertálása a vírusgenomba, és a kívánt szabályozóelem „in transz” szolgáltatása. Ennek az eljárásnak egy példája az élesztő GAL 4 proteinfüggő, 5'-irányú aktiválószekvenciájának (UAS_{GAL}) alkalmazása.

Az adott vírúsgéntől 5'-irányban a GAL 4 által szabályozható élesztő 5'-irányú aktiválószekvenciának a beiktatása a vírúsgén transzkripcióját a GAL 4 protein jelenlététől teszi függővé. A „helper” sejtvonalt tartalmazza az alább ismertetett heterológ promoterek egyikeként ellenőrzése alatt működő, GAL 4-et kódoló szakaszt. A találmány tárgykörébe tartoznak egyéb lehetséges UAS elemek, így például az élesztő ivaros szaporodástípus-rendszerében található. Ugyancsak a találmány tárgykörébe tartoznak aktiválásukhoz egy protein kötődését igénylő szabályozószekvencia-elemek, mint például a szteroidreceptorok és ezek DNS-kötő helyei.

A találmány ugyancsak kiterjed a csupán meghatározott proteinek jelenlétében működő promoterek alkalmazására. Ennek egy példája a T7 bakteriofág T7 promotere, amely T7 specifikus RNS-polimerázt igényel a transzkripció megindításához. A T7 promoternak a p74 géntől 5'-irányban annak természetes promotere helyére történő beiktatása a vírúsgén transzkripcióját a T7 RNS-polimeráz jelenlététől teszi függővé. Ennek a vírúsnak a „helper” sejtvonala tartalmazza a T7 RNS-polimerázt egy heterológ promotert, mint például az IE-1 vírúspromotert szabályozása alatt.

A p74 génen és annak funkcionális megfelelőin kívül vannak további génműködések, melyeknek a módosítása a rekombinációs vírus korlátozásához vezet (lásd a 14. irodalmi hivatkozást). Különösen előnyösek az intakt, fertőzőképes OB-k termelődéséhez alapvetően szükséges működésekben szerepet játszó gének. Ezek példái közé sorolható egy, az ECV-k termelődéséről OB-k termelődésére való átkapcsolást szabályozó genetikai elem, a vírusrészecske közvetlen összeépüléséhez vagy -éréséhez szükséges funkciót kódoló genetikai

elem és egy, a vírusrészcseke strukturális fehérjéjét kódoló gén.

A találmány szerinti további módosított gének például FP (néhány polihedron) mutánsokat termelő gének, mint például a 25K gén (18. irodalmi hivatkozás), továbbá olyan gének, melyek működésének megszakítása a kívánt fenotípushoz vezet, mint például a késői és nagyon késői génműködésekre fajlagos vírustranszkripciósfaktorok, a polihedronburok-proteinek (32–36,5 kD) génjei, a PDV protein génje, mely a középbélreceptorral lép kölcsönhatásba, és felelős a középbélsejtek kezdeti fertőzéséért, a PDV nukleokapszid összeépüléséért felelős gén vagy genetikai elem, a polihedron szerveződéséért felelős gén és egy GV-ben található „Viral Enhancing Factor” (19. irodalmi hivatkozás) (víruserősítő faktor) NPV-ben található funkcionális megfelelőjét kódoló gén.

Bár a polihedringén is módosítható, ennek az alkalmazási módnak jelentős gyakorlati korlátai lehetnek. A polihedringénnek a vírusreplikáció során elért magas transzkripció/transzláció rátája a vírusgenom magas szintű amplifikációjához kapcsolódva a fertőzött sejtben az összes megfesthető protein 50–75%-át kitevő polihedrinprotein-mennyiséget eredményez. Ez a nagy mennyiségű protein valószínűtlenné teszi, hogy a polihedringén korlátozott számú, víruson kívüli eredetű kópiája ellensúlyozni tudná a vírusban deletált polihedringént. Egy polihedrin-mínusz vírus kiegészítése elérhető lehet azonban olyan szabályozóelemek vagy -faktorok alkalmazásával, amelyeket elegendő kisebb mennyiségben szolgáltatni. Ilyen típusú módosítás lehet a vírus polihedringén olyan genetikai módosítása, hogy az egy szuppresszor tRNS-t tartalmazzon, vagy a polihedringén szabályozóelemeinek módosítása és a vírus szaporítása egy megfelelő „helper” sejtvonalonban vagy rovartörzsben, amint azt fent ismertettük.

A polihedringénnel ellentétben úgy tűnik, hogy a p74 protein sokkal kisebb mennyiségben szükséges. Bár a gén a vírusfertőzés késői szakaszában íródik át, amikor a vírusgenom nagymértékben amplifikálódott, a p74-fajlagos mRNS szintje viszonylag alacsony. Lehetséges egy olyan p74 konstrukció előállítása, amely esetében korlátozott számú víruson kívüli eredetű kópia a vírus szájon át való fertőzőképességének helyreállításához elegendő p74 funkciót eredményez.

A találmány szerinti megoldást az AcMNPV példáján szemléltetjük. A p74 génnel azonos funkciót ellátó gének mindegyike, a bakulovírusok NPV és GV csoportjához tartozó vírusban jelen kell lennie. Az AcMNPV-vel közeli rokonságban álló bakulovírus-fajokban is lehetséges p74 génhomológok izolálása AcMNPV fragmensekkel csökkentett szigorúságú feltételek mellett végzett hibridizációval. Ez a megközelítés azért különösen előnyös, mivel a rendelkezésünkre álló adatok arra utalnak, hogy a p74 gén a legkonzervatívabb bakulovírusgénnek egyike (16. irodalmi hivatkozás). Távolsági rokonságot mutató vírusok, például a GV-k esetén ez a megközelítés esetleg nem használható. A 14. példa egy azonosított AcMNPV génnel homológ funkciót kódoló gének azonosítására szolgáló másik megközelítési módot ismertet. Ebben a kísérletsorozat-

ban egy ismert genetikai hibával rendelkező AcMNPV törzset kotranszfektáltunk az adott vírusgenom fragmen-
seivel. Az adott gént a hiba kiegészítése alapján azonosítottuk. Ezt a megközelítést sikeresen alkalmaztuk a
5 *Cydia pomonella* granulosis vírusban az AcMNPV p35 apoptózis gátló génjével homológ működésű gén azonosítására (20. irodalmi hivatkozás).

Egyéb eljárások is alkalmazhatók további alapvető fontosságú késői génműködések azonosítására. Pas-
sarelli és Miller (21. irodalmi hivatkozás) a közelmúlt-
ban közöltek egy késői/nagyon késői gének transzkripciósfaktorainak azonosítására szolgáló eljárást. Ebben az eljárásban, az AcMNPV vírusgenom fragmenseit olyan konstrukciókkal kotranszfektálták, amelyekben a
10 CAT gén expresszálsát késői vagy nagyon késői víruspromoterek irányítják. Az AcMNPV genom azon fragmenseit, amelyek a vírus késői/nagyon késői génjeinek normális transzkripciójában játszanak szerepet, a CAT-aktivitás háttér-szint fölé emelkedése alapján azonosították.

A genetikai kiegészítés technikájával, a módosított génműködés kiegészítésével a vírus rovarra fertőző formáját állítjuk elő. A módosított vírusnak ez a rovarra fertőző formája nem vihető át könnyen gazdaszervezetről gazdaszervezetre. A genetikai kiegészítés egy gé-
25 nek arra a képességére vonatkozik, hogy amennyiben „in tranz” jelen van, a mutáns fenotípust vad típusú fenotípussá változtatja.

A találmány tárgykörébe különböző, a rekombináns rovarvírus rovarra fertőző alakjának előállítására szolgáló eljárások tartoznak, nevezetesen: (1) a módosított ví-
30 rusból hiányzó vagy abban defektív terméket vagy funkciót szolgáltató DNS-fragmensekkel transzfektált rovar eredetű szövettenszövet sejtjeiben való előállítás; (2) a módosított víruból hiányzó vagy abban defektív terméket vagy funkciót szolgáltató DNS-fragmensekkel stabilan transzformált rovar eredetű sejtvonalakban való előállítás; (3) a módosított víruból hiányzó vagy abban defektív terméket vagy funkciót szolgáltató, DNS-fragmenst tartalmazó transzgenikus rovarokban való előállítás. Az
40 (1) vagy (2) eljárásban alkalmazott sejtvonalak pótolják a hiányzó funkciót és „helper” sejtvonallakként szolgálnak.

Például az AcMNPV-ben a p74 gént deletáltuk, amint azt a fentiekben ismertettük. A vad típusú p74
45 gén kiegészíti a módosított vírus hiányosságát az eljárásnak alábbiakban ismertetett három megvalósítási módja szerint: (1) a vírust a működőképes p74 extrakromoszomális kópiáit tartalmazó rovar eredetű sejtekben tenyésztjük. Ezek az extrakromoszomális kópiák le-
50 hetnek DPTS-fragmensek, a p74 gént tartalmazó plazmidok vagy olyan plazmidok, amelyek a sejtosztódás folyamán vagy vírussfertőzésre válaszképpen képesek replikálódni. (2) A vírust olyan rovar eredetű sejtvonalonban tenyésztjük, amely a sejt genomjába stabilan beépülve tartalmazza a p74 gén egy vagy több működőképes kópiáját. (3) A vírust olyan transzgenikus rovarban tenyésztjük, amely a rovargenomban tartalmazza a p74 gén egy vagy több működőképes kópiáját.

Mindhárom eljárás esetében a működőképes p74
60 gén származhat AcMNPV-ből vagy származhat az

Eubaculoviridae család bármely más tagjából, amennyiben az visszaállítja a fertőzőképességet. A koncepció lényege, hogy a működőképes p74 gén „in transz” jelen van, és egy, a vad típusú fenotípust helyreállító diffúzibilis anyagot szolgáltat.

A vírus kiegészített formájának előállítására szolgáló egyik eljárás szerint a vírust a hiányzó funkciót pótló sejtvonalban tenyésztjük. A delta-p74 vírust például olyan sejtvonalban tenyésztjük, amely a p74 génterméket expresszálja. Az AcMNPV „P” Hind III fragmensét – elsődlegesen a delta-p74 gént, valamint az AcMNPV genom kis mennyiségű természetes határolószekvenciáit – tartalmazó plazmidot a delta-p74 vírussal kotranszfektálva átmenetileg elérhető a vírus fertőző formájának helyreállítása. Ennek az AC0028.3 nevezetű plazmidot tartalmazó *E. coli* HB101 törzsnek a mintáit, amely a p74 gént és az ismertett határolószekvenciákat tartalmazza, 1992. május 21-én letétbe helyezzük az American Type Culture Collection intézetnél, ahol az ATCC 68987 nyilvántartási számot kapta. Mivel ennél a kotranszfektálási eljárásnál csupán a sejtek 0,1–5,0%-a tartalmazza mind a működőképes p74 gént, mind a delta-p74 vírusgenomot, ez a módszer eredendően nem hatékony.

„Helper” sejtvonal előállítására sokkal hatásosabb módszer a p74 gén egy kópiájának inszertálása a sejtbe oly módon, hogy a gén stabilan beépüljön a sejt genomjába (lásd a 6. példát). Ezt az eljárást alkalmazták nem bakulovírus eredetű gének Sf9 rovarsejtvonalba történő inszertálására (22. irodalmi hivatkozás). Az Sf9 rovar-sejtvonal (ATCC nyilvántartási szám CRL 1711) egy *Spodoptera frugiperda* 21 (Sf21) származék. Az adott gén kópiáját tartalmazó plazmidot egy szelektálható markert tartalmazó plazmiddal kotranszfektáljuk.

A szelektálható marker egy olyan gén, melynek expresszálása lehetővé teszi a markergént, valamint a kívánt gént tartalmazó vektorral transzformált sejtek azonosítását. Szokásosan alkalmazott szelektálható markerek közé tartoznak például a timidinkináz (TK) és a hipoxantin-guanin-foszforibozil-transzferáz (HGPRT) gének és az antibiotikum rezisztenciát, például neomicin- és higromicinrezisztenciát átvivő gének.

A kiegészítő DNS-t a szelektálható markert tartalmazó DNS-hez képest 2–20-szoros moláris feleslegben alkalmaztuk. Ez a lehető legnagyobb mértékben megnöveli annak a valószínűségét, hogy a szelektálható markert expresszáló sejt tartalmazza a kérdéses gént is. A választott sejtvonalnak fogékonynak kell lennie az alkalmazott vírusra. Az AcMNPV előnyös alkalmazási módja esetén Sf9 vagy Sf21 sejteket használtunk. A transzfekciót követően a sejteket szelekciós körülmények mellett tenyésztettük, és a szelektálható markert expresszáló sejteket felszaporítottuk. Ezeket a sejteket arra nézve vizsgáltuk, hogy képesek-e kiegészíteni a delta-p74 vírusban található p74 deléciót.

Ezt az eljárást alkalmaztuk a fent ismertetett, a p74-et hordozó, AC0028.3 plazmid kópiáit tartalmazó Sf9 sejtvonalak izolálására. Az Sf9(28.3)CL–2 elnevezésű sejtvonal mintáit, amely a sejt genomjába stabilan beépülve tartalmazza az AC0028.3 plazmid kópiáit, 1993.

április 7-én letétbe helyeztük az American Type Culture Collection intézetnél, ahol az ATCC CRL 11322 nyilvántartási számon szerepel. Amint azt a 7. példában ismertetjük, igazoltuk, hogy a defektív, szájon át nem fertőzőképes delta-p74 vírus tenyésztése a fenti sejtvonalban szájon át fertőzőképes delta-p74 vírusokat eredményez.

A kiegészítés nem korlátozódik a vírus sejttenyésztésben való szaporítására. A „helper” sejtvonalhoz hasonló módon előállíthatunk „helper” rovartörzset is. A *Drosophila* P elem transzformációja szokásos eljárás manapság, és hasonló rendszer bármely rovar esetében tervezhető. Ezenkívül rovarok vektor nélküli transzformációja végezhető emlősökben alkalmazott eljárásokhoz hasonló módon. A szükséges gént hordozó rovarok előállítására alkalmazható eljárások a preblasztoderma peték közvetlen injektálása (23. irodalmi hivatkozás) vagy ballisztikus transzformációja (24. irodalmi hivatkozás) fémshálakkal.

A viszonylag gyenge endogén p74 promoter elegendő a p74 géntermék termeléséhez. Előnyösebb lehet azonban a p74 gén működésének irányítására egy erősebb vagy egy korábbi promoter alkalmazása. Egy heterológ promoter használata fokozhatja a delta-p74 vírus kiegészítésének hatékonyságát. Bármely víruspromoter alkalmazható. Alkalmazható például a 6,9 K (bázikus protein) promoter, a DA26 promoter, a polihedrin promoter, a 35 K promoter, a p10 promoter és az IE–1 promoter.

A 4. és 5. példában ismertetett heterológ promoter-konstrukciók alkalmazása egy további előnnyel rendelkezik. Ezekben a konstrukciókban eltávolítottuk csaknem az egész, az 1. példában ismertetett A4000-delta-p74 vírus p74 génjében található, delécióig terjedő homológ 5'-irányú szekvenciákat. Ez nagymértékben csökkenti a delta-p74 vírus és a sejt genomjába beépült p74 szekvenciák közti rekombináció esélyét. Ez a homológ rekombináció másképp a p74 gén működésének és a vírus vad fenotípusának helyreállításához vezethet (lásd a 7. példát). További lépés a homológ rekombináció lehetőségének csökkentésére a delta-p74 vírus p74 génjében található deléció méretének növelése oly módon, hogy ne maradjon kódolószekvencia. Ez könnyen elvégezhető az 1. példában ismertetett eljárás módosításával.

A heterológ promoter nem korlátozódik víruspromoterekre. Sejtpromoterek ugyancsak megfelelnek. Sejt promoterek korlátlanul rendelkezésre állnak. Ilyen sejtpromoterek például a *Bombyx mori* aktinpromoter és a *Drosophila melanogaster* hsp 70 promoter. Az alkalmas promoterek a vírusherzélés során középestől nagy mennyiségig expresszálódnak a megfelelő rovarsejtekben. Ez a sajátosság nem korlátozza a promotereket rovarpromoterekre. Különböző gerinces, élesztő- vagy egyéb vírusosztályból származó promoterek is megfelelhetnek ezeknek az ismérveknek. A fent említett promoterek bármelyike szintén képes irányítani a szelektálható marker expresszióját.

A találmány további megvalósítási módja szerint a vírusgenomba egy rovarszabályozó vagy -módosító anyagot kódoló heterológ gént inszertálunk. Ez az anyag lehet például egy toxin, egy neuropeptid vagy egy hor-

mon, vagy enzim. Előnyösen a heterológ gént közvetlenül a vírus módosított genetikai elemének helyére inszertáljuk, ami azt jelenti, hogy a genetikailag módosított vírus és egy felül fertőző, vad típusú vírus közti rekombináció a legtöbb esetben nem eredményezi vad típusú funkcióval és az inszertált heterológ génnel rendelkező vírus keletkezését. A találmány tárgykörébe tartozik a heterológ génnek a vírus módosított genetikai elemének szomszédságába történő inszertálása úgy, hogy a heterológ gén és a módosított genetikai elem szegregációja az utódvírusok kevesebb mint 10%-ában jön létre. Mindkét esetben megvalósul tehát a genetikailag módosított vírus korlátozása.

Az alkalmazható toxinok közé tartoznak az *Androctonus australis* skorpióból származó rovarspecifikus AaIT toxin (25. irodalmi hivatkozás), a *Pyemotes tritici* atkafaj egy toxinja (2. irodalmi hivatkozás), a *Bacillus thuringiensis aizawai* alfajából (BTK) származó toxin (4. irodalmi hivatkozás), pókméregből izolált toxin (26. irodalmi hivatkozás) és a *Bacillus thuringiensis* CylrIVD (BTI) toxin (3. irodalmi hivatkozás). Az eljárásban alkalmazható neuropeptidok vagy hormonok közé tartoznak például az eclosion hormon (6. irodalmi hivatkozás), a prothoracicotrop hormon (PTTH), az adipokinikus hormon, diuretikus hormon és a proktolin (5. irodalmi hivatkozás). Az alkalmazható enzimek egy példája a „juvenile hormon”-észteráz (JHE) (7. irodalmi hivatkozás).

Egy defektív vagy deletált p74 génnel, valamint egy, a p74 génmódosítás helyére inszertált toxint kódoló heterológ génnel rendelkező rekombináns bakulovírus például olyan vírust eredményez, amely fokozottan hatásos a célrovar ellen, de a környezetben nem képes könnyen terjedni egyik rovarról a másikra.

A 11–12. példában alább ismertetettek szerint egy AcMNPV vírust izoláltunk, amelyben a DA26 víruspromoter ellenőrzése alatt álló AaIT rovarspecifikus skorpiótoxint az A4000 delta-p74 vírus deléciójának helyére inszertáltuk. Ennek a vírusnak a mintáit 1993. április 7-én letétbe helyeztük az American Type Culture Collection intézetnél, ahol az ATCC VR 2405 nyilvántartási számon szerepel. Ennek a vírusnak a vad típusú Sf9 sejtekben való szaporítása (amint azt vártuk) szájon át bejuttatva nem fertőző PIB-ek termelődéséhez vezet. Abban az esetben, ha a vírust a fent ismertetett Sf9(28.3)CL-2 helper sejtvonalon szaporítjuk, szájon át fertőzőképes PIB-eket kapunk, és a fertőzött rovarok az AaIT toxinra jellemző kontraktilis bénulás tüneteit mutatják (lásd alább a 12. példát).

Ennek a vírusnak a szaporítása működőképes p74 génterméket szolgáltató sejtvonalon vagy transzgenikus rovarban képessé teszi a vírust arra, hogy rovarokat bélien át fertőzzön meg. Mivel azonban a további kiegészítés hiányzik, a természetes rovarpopulációban csak szájon át történő fertőzésben defektív vírusok termelődnek. Egy társfertőzést létrehozó vad típusú vírus hiányában tehát a rekombináns vírus életciklusa ezzel az egyetlen fertőzéssel véget ér. Ez ellentétben áll a bakulovírusok alkalmazásának eddig közölt megközelítési módjaival (2), melyek szerint a fertőzött rovar puszt-

ulását követően OB-k kerülnek a környezetbe, ahol azokat más rovarok megeszik, a vírus életciklusa ismétlődik, és létrejön a gazdaszervezetről gazdaszervezetre való terjedés.

5 A találmány szerinti legfontosabb megállapítás talán az, hogy a vírus módosított genetikai elemének szomszédságába vagy közvetlenül annak helyére a toxint, neuropeptidet, hormont vagy enzimet kódoló heterológ gén beiktatásával a genetikailag módosított vírus és egy vad típusú vírus közti homológ rekombináció csak az eredeti szülői genotípusokat állítja vissza.

Egy toxingén inszertálása a p74 deletált szakaszába például egy olyan vírushoz vezet, amely toxin+/fertőző OB-. Egy vad típusú (toxin-/fertőző OB+) vírussal történő rekombináció csak toxin+/fertőző OB-, valamint toxin-/fertőző OB+ utódokat eredményez. A homológ rekombináció toxin+/fertőző OB+ utódokat eredményező folyamata akadályozott, mivel a géndeletálást és -inszertálást ugyanazon a helyen végeztük el, ahelyett, hogy ezeket egymástól távol, a vírusgenom különböző lokuszaiban hoztuk volna létre. A toxingén ezért csupán a fertőző OB-k termelésére nézve defektív vírusokban található. A toxinért felelős heterológ gén továbbra is visszaszorul, és csökkent utódvírus-képzési képessége miatt a fertőző vírus sokkal gyorsabban eltűnik az ökoszisztémából, mint a vad típusú vírus.

A találmány szerinti megoldást a következő példakkal szemléltetjük. Ezek a példák csupán a találmány szemléltetésére szolgálnak, és semmilyen formában nem korlátozzák annak tárgykörét.

A példákban ismertetett eljárásokban a gyakorlatban szokásos molekuláris biológiai eljárásokat alkalmaztuk Sambrook és munkatársai szerint (27. irodalmi hivatkozás). Bakulovírusok tenyésztését és előállítását Summers és Smith által ismertetett szokásos eljárások szerint végeztük (28. irodalmi hivatkozás). A „megnevezett” AcMNPV fragmensekre vonatkozó minden utalás az E2 AcMNPV törzs Summers és Smith által közölt fizikai térképén alapszik (28. irodalmi hivatkozás).

1. példa

A delta-p74-1 transzfervektor és az A4000 rekombináns vírus előállítása

A delta-p74-1 transzfervektort az *Autographa californica* NPV E2 törzsből állítottuk elő a p74 génnek a bakulovírusgenom körülbelül 90. térképegységénél való deletálásával (lásd az 1. ábrát). A p74-et kódoló DNS-t tartalmazó BstEII „E” fragmenst az E2 törzsből származó vírus-DNS-ből tisztítottuk. Ezt a fragmenst a pSE280 plazmidvektor (Invitrogen, San Diego, CA) BstEII hasítási helyére szubklónoztuk. Ezt a klónt LB10.2-nek neveztük. Az LB10.2-ből a p74 gén 5'-szakaszát, valamint 5' határolószekvenciáit kódoló fragmenst a következő lépésekkel izoláltuk: NcoI enzimmel hasítottuk, ezt az NcoI hasítási helyet T4 DNS-polimerázzal tompa végűvé alakítottuk, XhoI-gyel hasítottuk, és a kapott fragmenst gélen tisztítottuk. Ezt a tompa végűvé alakított NcoI-XhoI fragmenst az LB9.6 plazmid tompa végűvé alakított KpnI, valamint az XhoI hasítási helyei közé szubklónoztuk. Az LB9.6

plazmid a Bluescript SK plazmid (Stratagene, La Jolla, CA) származéka, amelybe a HincII hasítási helyen egy polilinkert inszertáltak. A linker további egyedi restriktációs enzim hasítási helyeket tartalmaz, amelyek felhasználhatók heterológ gén inszertálására a p74 deletált szakasza (lásd lent). A fent ismertetett 5' határoló-, valamint 5' p74 szekvenciákat tartalmazó plazmidot LB 11.12-nek neveztük. A p74 gén 3' harmadát, valamint 3' határolószekvenciáit tartalmazó HpaI/BamHI fragmensét izoláltuk, és az LB11.12 plazmid EcoRV és BamHI hasítási helyei közé klónoztuk. A kapott klón a delta-p74-1 transzfervektor (lásd a 2. ábrát). Ez a transzfervektor kódolja a 4750 bázispár (bp) 5' határolószekvenciát, az 1–69. bázispárok közé eső p74 szekvenciát, a fent ismertetett plazmid polilinkerének 64 bázispárját, az 1287-től az 1937. bázispárnál található terminációs kodonig terjedő p74 szekvenciákat, valamint 1796 bázispár 3' határolószekvenciát (15. irodalmi hivatkozás). A 3. ábra részletesebben mutatja a p74 gén kódolószakaszában létrehozott deléciót. Ezt a transzfervektort használtuk ezután a szokásos kotranszfekciós eljárásokkal az A4000 vírustörzs előállítására (29. irodalmi hivatkozás). 2×10^6 Sf9 sejtet oltottunk egy 60 mm-es szövetyenyésztő edénybe. Miután a sejtek letapadtak, a tápfolyadékot eltávolítottuk a sejtekről, és azt 10% borjúembrió-szérumot (FCS), valamint antibiotikumokat tartalmazó 0,75 ml Grace-féle tápfolyadékra cseréltük. 1 μ g AcMNPV DNS-t és 2 μ g delta-p74-1 DNS-t adtunk 0,75 ml transzfekciós pufferhez (25 mmol/l HEPES, pH 7,1; 140 mmol/l NaCl; 125 mmol/l CaCl_2). A DNS-t ezután cseppenként a sejtekhez adtuk, és a sejteket 4 órán át 27 °C-on inkubáltuk. 4 óra elteltével a tápfolyadékot eltávolítottuk, és a sejteket óvatosan 10% FCS-t és antibiotikumokat tartalmazó friss TNMFH-val mostuk. Ezt követően a sejtek tápfolyadékát újra FCS-t és antibiotikumokat tartalmazó friss TNMFH-ra cseréltük. Az ECV-eket 4–5 nap múlva összegyűjtöttük, és különálló plakkokat izoláltunk a Summers és Smith által ismertetett plakkvizsgálati módszer szerint (28. irodalmi hivatkozás).

A különálló plakkokkal ezután olyan 48 rekeszes szövetyenyésztő lemez egyes rekeszeit fertőztük, amelyet előzőleg $7,5 \times 10^4$ Sf9 sejtet oltottunk be 0,5 ml friss TNMFH tápfolyadékban. 5 nap elteltével soronként, illetve oszloponként a rekeszekből 10–10 μ l sárga virust tartalmazó felülúszót gyűjtöttünk. PCR reakciót állítottunk be 4 μ l összegyűjtött felülúszó és a 3. ábrán látható A és C oligomerek felhasználásával. Mivel a C oligomer a deletált p74-re specifikus, ebben a reakcióban csak a rekombináns vírust tartalmazó fragmenst sokszoroztunk. A PCR reakciót a következőképp állítottuk össze: először 4 μ l összegyűjtött felülúszót 1 órán át 55 °C-on 200 μ g/ml *Streptomyces griseus*-ból származó nem specifikus proteázzal (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) emésztettünk 1 $\times$ A puffert [10 mmol/l Tris (pH 8,3); 50 mmol/l KCL-t; 0,1 μ g/ml zselatint; 0,45% Nonidet™ P40-et (Shell Oil Co.); és 0,45% Tween™ 20-at (ICI Americas, Inc.)] tartalmazó 25 μ l reakciós térfogatban. A nem specifikus proteázt ezt követően 12 percig tartó 95 °C-ra való hevítéssel inaktiváltuk: A PCR amplifikáció tartalmazza a proteázzal kezelt vírus összekeverését mindegyik ismertetett oligonukleotid primer 50 pmol mennyiségével a négy dNTP (dATP, dGTP, dCTP és dTTP) 200 μ mol/l mennyiségét, 1,5 mmol/l MgCl_2 -t, 1 $\times$ A puffert és 1,25 egység AmpliTaq™ DNS-polimerázt (Perkin-Elmer/Cetus, Norwalk, CT) tartalmazó 50 μ l reakciós térfogatban. A mintát a következő lépéseket tartalmazó 30 ciklusban sokszoroztunk: 1 perc 94 °C (denaturálás), 1,5 perc 55 °C (a hőmérséklet csökkentésekor a primerek hozzákapcsolódása a komplementer DNS-szakaszhoz: „annealing”), és 2,5 perc 72 °C (extenzió). A 25. ciklust 72 °C-on 7 perces extenziós lépéssel rendelkező ciklus követte. A reakciós elegy 20 μ l-jét 1,2% agarózgélén elektroforetizáltuk a rekombináns vírus jelenlétének igazolására. Mivel a mintákat soronként, illetve oszloponként gyűjtöttük össze, a rekombináns vírust egy pozitív sor és egy pozitív oszlop kereszteződésénél található rekesz alapján azonosítottuk.

2. példa
Az A4000 fenotípusának kimutatása *Heliothis virescens* lárvákon végzett levéllemezzpróbbával
Az A4000 vírustörzs fertőzőképességének vizsgálatára a szokásos levéllemezzpróbat végeztük harmadik lárvállapotban levő *Heliothis virescens* lárvákon, 1 μ l (meghatározott mennyiségű PIB-et tartalmazó) cseppertfogatnyi vírust TET pufferben [50 mmol/l Tris-HCl; pH 7,5; 10 mmol/l EDTA; 0,1% Triton™ X-100 (Rohm és Haas, Philadelphia, PA)] egy 5 mm átmérőjű gyapotlemez-lemezhez adtunk megnedvesített szűrő-papír korongot (körülbelül 4 mm átmérő – 300 μ l víz) tartalmazó különálló rekeszben. A csepp száradását követően egyetlen lárvát helyeztünk a rekeszbe, és a rekeszt lezártuk. A lárvákat egy éjszakán át hagytuk táplálkozni. A következő reggelen azokat a lárvákat, amelyek az egész levéllemezt megették, rovarfedelt tartalmazó különálló rekeszekbe helyeztük át. Addig követtük a lárvák mortalitását, míg a túlélők bebábozódtak. Ezt az eljárást megisméltük az A1000 elnevezésű, vad típusú E2 AcMNPV vírustörzsszel, amelyet kontrollként alkalmaztunk. Két független kísérlet eredménye a következő volt:

Vírus	Mennyiség (PIB-ek)	Pusztulás/össz- lárvaszám
1. vizsgálat		
A4000 (delta-p74)	$2,5 \times 10^5$	1/31
	5×10^4	0/32
	5×10^3	0/31
	5×10^2	0/32
A1000 (vad típusú)	5×10^2	16/18
	5×10^1	14/31
2. vizsgálat		
A4000 (delta-p74)	5×10^6	0/20
	5×10^5	0/21
	5×10^4	0/24
	5×10^3	0/20
A1000 (vad típusú)	5×10^2	22/32
	5×10^1	5/32

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a p74 gén-deléció tartalmazó vírusok az intakt p74 gént tartalmazó fertőző vírusnál még 10,000-szer nagyobb adagban sem fertőzők. Az A4000 esetében tapasztalt egyetlen lárvá pusztulása nem tudható be a normális fertőzési folyamat következményének.

3. példa

Az A4000 kiegészítése a vírus nem fertőzőképes formájának előállítása céljából egy, az AcMNPV „P” HindIII fragmensének nem stabilan beépült kópiáját tartalmazó sejtvonalban való szaporítással

Sf9 sejteket kotranszfektáltunk az 1. példában ismertetett szokásos eljárással. A transzfektációban 1 µg genomális A4000 vírus DNS-t használtunk 10-szeres moláris feleslegben levő AC0028.3 plazmid-DNS-sel vagy anélkül. Az AC0028.3 plazmid tartalmazza az AcMNPV „P” HindIII fragmensét Bluescript KS II (Stratagene, LaJolla, CA) HindIII hasítási helyére inserálva. A „P” HindIII fragmenst a 2. ábra tetején az AcMNPV BstEII „E” fragmens részeként jelöltük. Ez a fragmens tartalmazza a teljes p74 kódolószekvenciát 221 bázis-pár 5' és 56 bázispár 3' határolószekvenciával együtt. A fertőző sejtekből 48 óra elteltével alacsony fordulatszámú centrifugálással polihedront gyűjtöttünk, majd azokat TET-pufferben szuszpendáltuk. A szuszpendált vírushoz 1% végkoncentrációban SDS-t adtunk. A sejt-DNS-t a minta gyors keverésével és pipettázásával összetördeltük. A sejt-DNS-t a PIB-ek SDS-t nem tartalmazó TET-pufferben végzett sorozatos mosásával, és ezt követően alacsony fordulatszámú centrifugálással távolítottuk el. Végezetül a PIB-eket TET-pufferben szuszpendáltuk, és a vizsgálat céljára hemocitóméterben számoltuk. A biopróbát a 2. példában ismertetettek szerint végeztük. A csupán A4000 DNS-sel transzformált Sf9 sejtekből nyert polihedronok 1×10^5 PIB mennyiség mellett nem okozták a lárvák pusztulását. Az A4000 és AC0028.3 DNS-sel kotranszfektált Sf9 sejtekből származó PIB-ek fertőzőképes vírus jelenlétének köszönhetően a lárvák pusztulását okozták. Tehát az A4000 vírus szaporítása (az AC0028.3 plazmid jelenlétének köszönhetően) működőképes p74 proteint termelő sejtekben rovarra fertőző A4000 vírus termelődéséhez vezet. Ez a vírus képes produktív fertőzést létrehozni lárvákban. Ezt az eredményt az elpusztult lárvákból összegyűjtött PIB-ek segítségével igazoltuk. A PIB-eket a következő eljárással gyűjtöttük: az elpusztult lárvákat egy olyan csészébe helyeztük, amelynek az alját eltávolítottuk és NytexTM-mel helyettesítettük (Tetko, Briarcliff Manor, N. Y.). Az elpusztult lárvákat TET-pufferrel mostuk (1 ml/lárva) és a PIB-eket tartalmazó átfolyó puffert összegyűjtöttük. Ezeket a PIB-eket 1% SDS-t tartalmazó TET-pufferben szuszpendáltuk, felkevertük, és alacsony fordulatszámon ülepítettük. A PIB-eket ezután néhányszor SDS-t nem tartalmazó TET-pufferrel mostuk. A PIB-ekből DNS-t állítottunk elő Summers és Smith eljárása szerint (28. irodalmi hivatkozás, a 35. oldalon ismertetett módon). A delta-p74 vírus jelenlétét ezekben az elpusztult lárvákban az 1. példában ismertetett oligomerek felhasználásával végzett PCR-amplifikációval igazoltuk.

4. példa

Heterológ promotert tartalmazó expressziós vektor előállítása

Heterológ promoterek alkalmazása a p74 gén expressziójának irányítására fokozhatja a delta-p74 vírus kiegészítésének hatékonyságát. Erre a célra alkalmazható alkalmas vektorok a következő elemeket tartalmazzák: (1) egy heterológ promotert a transzkripció szabályozására; (2) polilinkert, amely megkönnyíti az expresszálni kívánt DNS-szekvencia inserálását; (3) egy 3' UTR-t, amely az elsődlegesen átírt termék (mRNS) éréséhez és poliadenilációjához szükséges helyet biztosítja (lásd a 4. ábrát). Egy ilyen expressziós vektort, amely tartalmazta az AcMNPV DA26 gén promotert, egy polilinkert és az AcMNPV 6,9 K bázikus protein 3' UTR-szekvenciáját, pMEV1-nek neveztünk. Egy AC0064.1-nek nevezett, meghatározott pMEV1 izolátumot hordozó *E. coli* DH5-alfa törzs mintáját 1993. április 7-én letétbe helyeztük az American Type Culture Collection intézetnél, ahol az az ATCC 69275 nyilvántartási számon szerepel. További vektorok könnyen előállíthatók oly módon, hogy a pMEV1 plazmidpromotert tartalmazó PstI/XbaI fragmensét az AcMNPV 6.9 K (pMEV2), a polihedrin (pMEV3), valamint a 35 K (pMEV4) vírusgének promotereit tartalmazó PstI/XbaI enzimekkel hasított fragmensekkel helyettesítjük. Az ezeknek a vektoroknak az előállításánál felhasznált promoterfragmenseket klónozott vírus DNS PCR amplifikációjával állítottuk elő promoterspecifikus oligonukleotid primer párok segítségével. A primereket úgy terveztük meg, hogy az amplifikált promoterszakasz a következő általános szerkezettel rendelkezzen: (1) egy 22 bázispárból álló 5'-végi heteropolimer szintetikus szekvencia, amely a következő restrikciós endonukleázfelismerő helyeket tartalmazta: (a) a következő sorrendben) SstI, Sse8387I és StuI; (2) egy vírus-DNS-szakasz, amely a gén domináló transzkripciós kezdőpontjától 5'-irányban a 100–350. bázispártól az 5' UTR 3'-végéig (azaz a translációs kezdő kodon vonatkozásában a –1. pozícióig) terjedt; és (3) egy 23 bázispárból álló 3'-végi heteropolimerszakasz, amely a következő restrikciós endonukleázfelismerő helyeket tartalmazta: (a) a következő sorrendben) Esp3I és XbaI. Az Esp3I restrikciós felismerőhely helyzete és irányultsága olyan volt, hogy a hasítási helyek a (+) szálon a –5. és –4. pozíciók közé, a (–) szálon pedig a –1 és +1 pozíciók közé estek.

A 35 K promoterek előállításánál alkalmazott templát az AcMNPV „K” HindIII fragmense volt. A primer (+) szálának szekvenciája tartalmazta a következő restrikciós enzim hasítási helyekkel rendelkező, 22 bázispárból álló heteropolimerszekvenciát: SstI, Sse8387I és StuI; valamint tartalmazta a –399-től a –382. bázisig terjedő 35 K 5' szekvenciát. A primer (–) szála tartalmazta a –21-től a –1. bázisig terjedő 35 K 5' szekvenciát, ezt követte a 23 bázispárból álló heteropolimerszakasz, amely a következő restrikciós enzim hasítási helyekkel rendelkezett: Esp3I és XbaI. Mindegyik amplifikációs reakcióhoz a megfelelő primerpár 50 pmol mennyiségét 250 pg templát-DNS-sel

kevertük össze 50 µl reakciós keverékben [10 mmol/l Tris-HCl (pH 8,3); 50 mmol/l KCl; 1,5 mmol/l MgCl₂; 200 µmol/l dNTP-k; 100 µg/ml zselatin; és 2,5 egység AmpliTaq™ DNS-polimeráz (Perkin-Elmer/Cetus, Norwalk, CT)]. A mintát 25 cikluson át amplifikáltuk [1,0 perc 94 °C (denaturáció); 1,5 perc 55 °C („annealing”); és 3,0 perc 72 °C (extenzió)]. Ugyanúgy, mint a többi reakció esetében az utolsó extenziós lépés 7 percig tartott.

Mindegyik reakciót EDTA (10 mmol/l végkoncentrációig) és Sarkosyl (nátrium N-lauroil-szarkozin) (0,2% tömeg/térfogat végkoncentrációig) hozzáadásával állítottuk le. A terméket ezután egyszer kloroformmal, egyszer fenol: kloroform keverékével extraháltuk, és etanollal kicsaptuk. A DNS-mintákat a megfelelő pufferben oldottuk, és PstI (amely az Sse837I hasítási hely közepső hat bázisát [CTGCA*G] ismeri fel) és XbaI enzimekkel emésztettük. Ezt követően mindegyik feltételezett promoterfragmenst 1,2%-os alacsony olvadáspontú agarózgélén gélelektroforézissel tisztítottuk, és egy pMEV1-ből származó 3,2 kb PstI/XbaI vektorfragmenssel ligáltuk. Ez a fragmens tartalmazta a polilinkert, a pMEV1-ből származó 3' UTR-t és Bluescript SK+ leolvasási kereket. A kívánt rekombinánsokat restriktions enzimvizsgálattal és DNS-szekvencia-meghatározással azonosítottuk. A gyakorlatban járatos személy ezt az eljárást bármely ismert szekvenciájú promotorszakasz, például az AcMNPV 6,9 K promoter, a polihedrinpromoter vagy sejtpromoterek, például a *Drosophila melanogaster* hsp 70 promoter esetében alkalmazhatja.

5. példa

Heterológ promotor-p74 kódolószakasz-konstrukciók előállítása

A p74 proteint kódoló szakaszát a megfelelő AC0028.3 szakasz PCR-amplifikációjával izoláltuk heterológ promotereket tartalmazó expressziós vektorba való inszertálás céljára (amint azt a 4. példában ismertettük). Az ennél a reakciónál alkalmazott 24 bázisból álló (+)-szál primer 5'-vége a p74 gén ATG translációs kezdőpontjánál van. A (-)-szál primer 29 bázisból áll, és tartalmazza a p74 szekvencia 3'-végi 20 bázisát a transláció végét jelző TAA kodonnal bezárólag, és ezt egy további 9 bázisból álló, egy BamHI hasítási helyet tartalmazó szekvencia követi. A PCR reakciónál alkalmazott feltételek a következők voltak: összekevertünk 250 pmol AC0028.3-at a meghatározott oligonukleotid primerek mindegyikének 50 pmol mennyiségével a következő összetételű reakcióelegy 50 µl térfogatban: mindegyik dNTP (dATP, dGTP, dCTP és dTTP) 200 µmol/l mennyiségben; 1,5 mmol/l MgCl₂; 1×A puffer; és 1,25 egység AmpliTaq™ DNS-polimeráz (Perkin-Elmer/Cetus, Norwalk, CT). A mintát 5 amplifikációs ciklusnak vetettük alá [mindegyik 1 perc 94 °C (denaturáció); 1,5 perc 45 °C („annealing”); és 3 perc 72 °C (extenzió)], amelyet 25 amplifikációs ciklus követett [mindegyik 1 perc 94 °C (denaturáció); 1,5 perc 55 °C („annealing”), és 2,5 perc 72 °C (extenzió)]. A ciklusokat egy 7 perces 72 °C-on végzett extenzió követte.

Tisztítást követően a reakciótermékeket DNS-polimeráz I Klenow fragmensével (27. irodalmi hivatkozás) kezeltük a négy dNTP jelenlétében, hogy a PCR-termékeket tompa végűvé tegyük. A p74 kódolószakaszának 3'-végét ezután BamHI enzimmel emésztettük, és a kapott fragmenst 1%-os alacsony olvadáspontú agarózgélén elektroforézissel tisztítottuk. Ez a fragmens ezután klónoozható volt a 4. példában ismertett expressziós vektorok bármelyikébe. A p74 gén inszertálására szolgáló expressziós vektor előállítása céljából mindegyik vektort Esp3I-gyel emésztettük, és az így kapott kinyúló 5'-végeket *E. coli* DNS-polimeráz I (Klenow-fragmens) segítségével a négy dNTP jelenlétében feltöltöttük. Ezután mindegyik terméket BamHI-gyel emésztettük. A vektort a szabadabbá váló polilinkerfragmenstől 1%-os alacsony olvadáspontú agarózgélén végzett elektroforézissel elválasztottuk, és független reakciókban a p74-kódoló génszakaszhoz ligáltuk.

6. példa

A p74 gén működőképes kópiáját a sejtgenomba beépülve tartalmazó stabil Sf9 sejtvonalak izolálása

Ebben a példában olyan Sf9 sejtek izolálását ismertettjük, melyek p74 géntartalmú konstrukciókat tartalmaznak a sejtgenomba stabilan beépülve [lásd Jarvis és munkatársai (22)]. Pontosabban egy AC0028.3 (ATCC 68987) elnevezésű plazmidot alkalmaztunk. Ez a plazmid tartalmazza az AcMNPV „P” HindIII fragmensét, amely a p74 gént, valamint kis mennyiségű természetes határolószekvenciát foglal magába. Először Sf9 sejteket kotranszfektáltunk 2 µg AC0028.3 plazmid-DNS és 1 µg IE-1 Neo plazmid DNS-keverékével (22). A transzfektációt követően a sejteket 2 órán át 28 °C-on inkubáltuk. Miután a sejteket teljes TNMFH tápfolyadékkal mostuk (27), ismét tápfolyadékot cseréltünk rajtuk, és 22 órán át 28 °C-on inkubáltuk őket. A sejteket ezután alacsony sűrűségben kioltottuk, hogy gyéren letapadt tenyészetet kapjunk, és a neomicin analóg G418-at (GIBCO-BRL, Grand Island, N. Y.) 0,5 mg/ml mennyiségben (aktív összetevőkre számítva) tartalmazó teljes TNMFH tápfolyadékot cseréltünk rajtuk. A sejteket ezt követően 28 °C-on inkubáltuk egy hétig. Egy hét elteltével a tápfolyadékot G418-at nem tartalmazó teljes TNMFH-ra cseréltük. Három különálló lemez mindegyikénél a következő eljárást alkalmaztuk. A túlélő sejteket összegyűjtöttük és felszaporítottuk. A három felszaporított sejtsoport stabil sejtvonalakot alkotott, ezeket Sf9(28.3)CL-1-nek, Sf9(28.3)CL-2-nek (ATCC CRL 11,322), és Sf9(28.3)CL-3-nak neveztük. Ezeket a keverék sejtsoportokat tovább szaporítottuk, és PCR segítségével az 1. példában ismertettek szerint vizsgáltuk a p74 gén jelenlétére a p74 (+) szálára specifikus oligomer (oligomer A) és az A4000 vírusban a p74 génből hiányzó szakaszra specifikus oligomer (oligomer B) (lásd 3. ábra) felhasználásával.

7. példa

Rovarra fertőző A4000 vírus előállítása a fenti sejtvonalakban való szaporítással, és fenotípusuk jellemzése

A 6. példa szerint izolált mindhárom sejtvonalat A4000 vírus 1-nél nagyobb MOI (multiplicity of infection) értékkel fertőztük. Virustermelés elérhető 0,01–20 közötti MOI mennyiséggel. A fertőzött sejtekből a 3. példában ismertetett eljárással PIB-eket gyűjtöttünk. Szokásos levéllemezipróbát végeztünk (lásd a 2. példát). Az alábbiakban három független kísérlet eredményeit ismertetjük, ahol az A1000 vírus az AcMPNV vad típusú E2 törzse.

Vírus/sejtvonal		Elpusztult	
(Passzálás#)	Adag (PIB-ek)	Vizsgált szám	Mortalitás (%)
<i>1. vizsgálat</i>			
A4000/Sf9	1×10^5	0/16	0
A4000/CL-1(P3)	1×10^5	7/16	44
A4000/CL-2(P2)	1×10^5	9/15	60
A4000/CL-3(P2)	1×10^5	6/16	38
A1000/Sf9	1×10^3	30/32	94
Kezeletlen	0	0/30	0
<i>2. vizsgálat</i>			
A4000/Sf9	1×10^5	0/15	0
A4000/CL-1(P3)	1×10^5	1/15	6
A4000/CL-2(P2)	1×10^5	4/16	25
A4000/CL-3(P2)	1×10^5	6/16	38
A1000/Sf9	1×10^3	21/28	75
Kezeletlen	0	0/32	0
<i>3. vizsgálat</i>			
A4000/Sf9	1×10^5	0/16	0
A4000/CL-1(P7)	1×10^5	5/16	31
A4000/CL-2(P6)	1×10^5	5/16	31
A4000/CL-3(P6)	1×10^5	0/16	0
A4000/CL-3(P2)	1×10^5	3/15	20
A1000/Sf9	1×10^3	17/31	55
Kezeletlen	0	0/15	0

Amint a fenti adatokból látható, ha az AC0028.3 plazmida stabilan transzformált Sf9 sejteket A4000 vírussal fertőzzük, a kapott PIB-ek szájon át fertőzőképesek lesznek. Ezzel ellentétben az A4000 vírussal fertőzött szülői, nem transzformált Sf9 sejtekből származó PIB-ek nem okozzák a lárvák pusztulását. Ez azt jelenti, hogy az A4000 vírus szaporítása működőképes p74 proteint tartalmazó sejtekben (egy működőképes p74 génonstrukció stabil beépülésének köszönhetően, lásd a 6. példát) rovarra fertőző A4000 vírusok termelődéséhez vezet. A komplementációs képesség elvesztésének oka a 6. passzálás után az Sf9(28.3)CL-3 sejtvonal esetében nem ismert.

Ezt követően DNS-t állítottunk elő [a 3. példában, valamint Summers és Smith (28) által a 35. oldalon ismertetettek szerint] a fenti 1. kísérlet során a kiegészítő

tővírus által elpusztított hús lárvából külön-külön összegyűjtött PIB-ekből. PCR-amplifikációt végeztünk az A, valamint C primerek felhasználásával a delta-p74 vírus jelenlétének vizsgálatára, és az A, valamint B primerek felhasználásával a vad típusú vírus jelenlétének vizsgálatára (a primereket a 3. ábra mutatja). Az eredmények azt mutatták, hogy mind a hús lárvá fertőződött a delta-p74 vírussal. A delta-p74 vírusra jellemző pozitív jelen felül a hús lárvából ötnél egy intakt p74 génre fajlagos erős PCR sávot is megfigyeltünk. Az 1. kísérletből származó 20 lárvából 18 esetben izolált PIB-ek felhasználásával levéllemezipróbát végeztünk (lásd a 2. példát). Mindegyik mintánál lárvánként 1×10^5 PIB-et és 32 lárvát használtunk. Csak az intakt p74 gén jelenlétére nézve pozitív jelet adó négy lárvában kaptunk háttér-szint feletti mortalitást. A csupán a deletált p74 gén jelenlétére nézve pozitív 14 vizsgált lárvá egyikénél sem figyeltünk meg háttér-szint feletti lárvá mortalitást.

Anélkül, hogy a magyarázatot az alábbi okokra korlátoznánk, ezeket az eredményeket két ok egyikére vezethetjük vissza. A közvetlenebb ok az lehetett, hogy a kiegészített vírus mintái vad típusú vírussal kontaminálódtak, vagy a kiindulóvizsgálatból (1. vizsgálatból) származó lárvák némelyike vad típusú vírust hordozott, és a delta-p74 vírussal való felül fertőzést követően az ezekből a lárvákból előállított PIB-készítményekben mind a vad típusú, mind a delta-p74 vírus jelen lehetett. Egy másik lehetséges magyarázat szerint a delta-p74 vírusnak a komplementáló sejtvonalban való tenyésztése során homológ rekombináció jött létre a vírus és a sejtenomba beépült p74 szekvenciák között. Ha ez néhány esetben megtörtént, akkor a komplementált vírustól elpusztult lárvák közül néhány vad típusú vírust is tartalmazott. Ez a vad típusú vírus a második vizsgálati körben szájon át adagolva fertőző lehetett. A jelen konstrukciókban a deléciótól 5'-irányban 284 bázispár-, 3'-irányban 713 bázispár-azonosság található a delta-p74 vírus és a sejtenomba beépült p74 szekvenciák között. Ha a második magyarázat helyes, akkor ez az eredmény a vírusban és a sejtvonalban található homológ szekvenciák mennyiségének csökkentésével, vagy ha szükséges, megszüntetésével elkerülhető.

8. példa

A p74 gén működőképes kópiáját stabilan a rovargenomba beépülve tartalmazó transzgenikus rovarok előállítása

Ebben a példában volfrámrészecskék segítségével ballisztikus DNS-beviteli technikát alkalmaztunk transzgenikus rovartörzsek előállítására (24). Az 5. példában ismertetett egy-egy p74 konstrukcióhoz embrió-oltópufferben (0,1 mmol/l nátrium-foszfát, pH 6,8; 5 mmol/l KCl) oldott 20–100 µg DNS-t csaptunk ki 1,2 mm átmérőjű mosott volfrámrészecskékre (Bio-Rad, Richmond, CA). A kicsapási reakció összterfogat 65 µl volt. A kicsapás után 50 µl felülúszót távolítottunk el. Az üledéket és 12–15 µl felülúszót erőteljesen elkevertük, mielőtt abból 8 µl-t makroprojektorra vittünk volna. Biolistics biorészecske-hordozó rendszert

(DuPont, Wilmington, DE) alkalmaztunk choriontól megfosztott *Trichoplusia ni* embriók bombázására, mielőtt azok blasztodermává alakultak volna. Ez alatt az eljárás alatt az embriókat filterpapíron tartottuk. Az embriókat ezután kikelésig Series 700 halocarbonolaj (Halocarbon Products Corp., Hackensack, N. J.) alá helyeztük. Amikor a túlélő rovarok kikeltek, 25 rovarból álló csoportokat raktunk össze egy-egy ketrecbe. Ezekből a ketrecekben összegyűjtöttük a petéket, és az embriókból Roberts szerint (30) DNS-t állítottunk elő. PCR reakciót végeztünk (lásd az 1. példát) a 3. ábrán bemutatott A és B oligomerek felhasználásával, annak meghatározására, hogy melyik ketrecben keletkeztek a p74 gént tartalmazó peték. Miután a pozitív csoportokat azonosítottuk, az azokból származó petéket tápláltuk, és hagytuk kifejlett példányokká fejlődni. Kifejlett példányokat párosítottunk, és az általuk lerakott petékből izolált DNS-t újból PCR segítségével vizsgáltuk a p74 gén jelenlétére. Ezt az eljárást addig folytattuk, amíg a p74 génre nézve homozigóta molyvonalat sikerült előállítanunk.

9. példa

Rovarra fertőző A4000 vírus előállítás a fenti transzgenikus rovartörzsekben való szaporítással és a fenotípus jellemzése

Először 5 µl szövettenyésztő folyadékban 1×10^5 A4000 sarjadzó vírust oltottunk vércsírokba kisszámú (10–20 db), negyedik lárvállapotban levő transzgenikus *Trichoplusia ni* lárvának. Miután az A4000 vírus következtében a legtöbb lárv elpusztult (4–5 nap), a 3. példában ismertetettek szerint PIB-eket gyűjtöttünk. Ezeket a PIB-eket használtuk további amplifikációra. Az 5. példában ismertetett p74 génkonstrukciók egyikét tartalmazó harmadik lárvállapotban levő transzgenikus *Trichoplusia ni* lárvákat $1 \times 1,5$ hüvelyk méretű négyszögből álló táplálékra helyeztük, melynek felületét 0,4 µl milliliterenként 1×10^6 PIB-t tartalmazó A4000 vírussal fertőztük. Miután az A4000 vírus következtében a legtöbb lárv elpusztult (5–6 nap), a fentiekben ismertetettek szerint PIB-eket gyűjtöttünk. Ezeknek a PIB-eknek a mintáit törzsként TET-pufferben tároltuk, és a vírust a szokásos levéllemez biopróbával vizsgáltuk vad típusú második lárvállapotban levő *Trichoplusia ni* lárvákon. Az eredmények azt mutatták, hogy az A4000 vírusnak egy működőképes p74 gént tartalmazó transzgenikus rovarban való tenyésztése annak fertőzőképességét körülbelül a normális szintre állítja vissza. A kiegészített vírus által elpusztított lárvákból gyűjtött vírusok azonban szájon át való adagoláskor csökkent fertőzőképességgel rendelkeztek.

10. példa

Toxin kódoló gén inszertálása a delta-p74-1 transzfervektorba, és az A4TxP-I rekombináns vírus izolálása

A *Pyemotes tritici* eredetű rovarspecifikus atkatoxint (TxP-I) kódoló DNS-fragmenst a Tox34 cDNS-klónból izoláltuk (2). A teljes proteint kódoló gént, valamint némi 5' és 3' nem transzlálódó szakaszt tartalma-

zó EcoRI fragmenst klónoztunk az AcMNPV pVL1393 vektorba (Invitrogen, San Diego, CA). Egy ebből a konstrukcióból származó EcoRV-HindIII (tompá végűvé alakított) fragmenst inszertáltunk a delta-p74-1 transzfervektorba a deléción belül található AflII hasítási helyre (lásd a 2. ábrát). Ennek az LB15.9 nevezetű plazmidnak az 1. példában ismertetettek szerint A4000 vírusgenom DNS-sel Sf9 sejtekbe végzett kotranszfektálása olyan rekombináns vírust eredményez, amely kódolja a TxP-I gént, azonban nem képes szájon át lárvákat fertőzni. Ezen vírus sarjadzó formájának injektálása negyedik lárvállapotban levő *Heliothis virescens* lárvák vér-nyirok rendszerébe azonban a TxP-I expressziója következtében kialakuló jellegzetes bénuláshoz vezet. Ezenkívül ennek a vírusnak a 3., 7. és 9. példában ismertetett eljárások szerinti tenyésztése rovarra fertőző A4TxP-I vírusok termelődéséhez vezet. Ez a fertőző A4TxP-I vírus képes szájon át fertőzni lárvákat és bénulást kiváltani. A fertőzött lárvák által termelt vírusok azonban nem tartják meg rovarfertőző képességüket.

11. példa

Kodonoptimalizált AaIT gént tartalmazó expressziós vektor előállítása

Az észak-afrikai *Androctonus australis* Hector skorpiómérgében található egy AaIT nevezetű rovarfajlagos toxin. Transzfervektort állítottunk elő az AaIT génnek az AcMNPV polihedrinszakaszába való inszertálására. Ez az AC0055.1 nevezetű vektor tartalmazza a pVL985 plazmid (30) BamHI hasítási helyére inszertált AaIT gént, és egy *Drosophila melanogaster* kutikula génjelző peptidjéhez kötött, az érett AaIT toxin számára kodonoptimalizált nukleotidszekvenciából áll. Ezt a transzfervektort tartalmazó HB101 *E. coli* törzs mintáit 1992. december 17-én letétbe helyeztük az American Type Culture Collection intézetnél, ahol az a 69166 nyilvántartási számot kapta.

Ennek a transzfervektornak a toxint kódoló szakaszát a 4. példában ismertetett expressziós vektorokba való további inszertálás céljából PCR segítségével visszanyertük. A reakciónál felhasznált (+)-szál primer egy 27 bázisból álló oligonukleotid volt, melynek 5'-vége egybeesett az amplifikálandó kodonoptimalizált (AC0055.1-ben található) AaIT gén ATG translációs kezdő kodonjával.

A (-)-szál primer az AC0055.1-ben az AaIT gén 3'-végétől 5'-irányban körülbelül 35–40 bázisra található szakasszal hibridizált. A PCR reakciónál alkalmazott feltételek alapvetően azonosak voltak az 1. példában ismertetettekkel. Tisztítást követően a reakcióból származó termékeket az 5. példában leírtak szerint kezeltük, azaz a kivétellel, hogy a fragmenst 1,8%-os alacsony olvadáspontú agarózon tisztítottuk gélelektroforézissel.

A toxin inszertálására szolgáló expressziós vektor előállítás céljából mindegyik vektort Esp3I-vel emésztettük, és a kapott 5'-túlérő végeket mind a négy dNTP jelenlétében *E. coli* DNS-polimeráz I-gyel (Klenow-fragmenssel) feltöltöttük. Ezután mindegyik készítményt BamHI enzimmal emésztettük. A vektort a sza-

baddá tett polilinkerfragmenstől 1%-os alacsony olvadáspontú agarózgélén gélelektroforézissel elválasztottuk, majd egy független reakcióban az AaIT-kódoló génfragmenshez ligáltuk.

12. példa

Az AaIT toxinkódoló rekombináns A4001 vírus izolálása

Az inszertálás céljára használt A4000 vírus DNS előállítására a DNS-t egymást követően Sse8387I és Bsu36I emésztéssel linearizáltuk. Egy tipikus eljárás szerint 40 µg A4000 vírus DNS-t emésztettünk 2 órán keresztül 37 °C-on 100 egység Sse8387I enzimmel (Takara Biochemical, Inc., Berkeley, CA) 250 µl térfogatban (10 mmol/l Tris-HCl, pH 7,5; 10 mmol/l MgCl₂; 1 mmol/l dithiothreitol (DTT); 50 mmol/l NaCl; és 0,01% BSA). A reakcióelegyet ezután 100 mmol/l NaCl és 50 mmol/l Tris-HCl koncentrációkra állítottuk be (pH 7,9), és a DNS-t 2 óráig 37 °C-on 100 egység Bsu36I enzimmel (New England Biolabs, Beverly, MA) emésztettük. A reakciót ezután SDS 1%-os (tömeg/térfogat), NaCl 0,3 mol/l és EDTA 10 mmol/l végkoncentrációig való hozzáadásával állítottuk le. Ezt követően a DNS-t egy 2 ml térfogatú Sephacryl-300-at (Pharmacia, Piscataway, N. J.) tartalmazó „poly-prep” oszlopon (BioRad Laboratories, Richmond, CA) kromatografáltuk, amelyet 10 mmol/l Tris-HCl (pH 8,0), 1 mmol/l EDTA, 0,1% SDS, és 0,3 mol/l NaCl összetételű pufferrel ekvibráltunk. Húszt, egyenként 150 µl térfogatú frakciót gyűjtöttünk. Mindegyik frakcióból 10 µl-t gélelektroforézissel vizsgáltunk a vírus-DNS-t tartalmazó frakciók azonosítására. Ezeket a frakciókat összegyűjtöttük, egy ízben fenol:kloroform eleggyel extraháltuk, majd a vírus-DNS-t etanollal kicsaptuk. A DNS-t TE-pufferben [10 mmol/l Tris-HCl (pH 8,0); 1 mmol/l EDTA] 0,2–1 mg/ml koncentrációban szuszpendáltuk, és 4 °C-on tároltuk. Annak ellenőrzésére, hogy a vírus-DNS-t teljesen linearizáltuk, egy mintát EcoRI enzimmel emésztettünk, és gélelektroforézissel vizsgáltunk. Az a vírus-DNS, amely egy 7 kb nagyságú EcoRI fragmenst tartalmazott, nem emésztődött teljesen Bsu36I és Sse8387I enzimekkel, és ezeket nem használtuk fel.

A 11. példában ismertetett AaIT-tartalmú expreziós vektort Bsu36I és Sse8387I enzimekkel emésztettük. Húszt ng toxinkódoló fragmenst ligáltunk 0,5 µg Bsu36I/Sse8387I enzimekkel linearizált és tisztított AcMNPV A4000 DNS-sel 5 µl reakcióelegyben [25 mmol/l Tris-HCl (pH 7,6); 5 mmol/l MgCl₂; 1 mmol/l ATP; 1 mmol/l DTT; 5% (tömeg/térfogat) polietilénlikol-8000; és 0,5 egység T4 DNS-ligáz (GIBCOBRL, Gaithersburg, MD)]. Egy éjszakán át 16 °C-on végzett inkubációt követően a teljes ligálási reakcióval Sf9 sejteket transzfektáltunk az 1. példában ismertetettek szerint.

A transzfektálás után 5 nappal eltávolítottuk a tápfolyadékot a transzfektált Sf9 sejtekről. A transzfektálásból származó felülúszóból tízszeres hígításokat készítettünk, és a 10⁻³, a 10⁻⁴ és a 10⁻⁵ hígításokból vett kétszer 1 ml térfogatú mennyiséggel 1,5 × 10⁶ sejtet fertőztünk 6 cm átmérőjű tenyésztőedényekben. A vírus hoz-

záadását követően egy órával a vírusinokulumot eltávolítottuk, és a sejteket agaróztartalmú táptalajjal rétegeztük felül, amint azt a megelőző példában ismertettük. Miután a plakkok teljesen kifejlődtek, azokkal 48 rekeszű lemez különálló rekeszeit oltottuk be, és a keletkező utódvírusokat PCR segítségével vizsgáltuk, (+)-szál primerként a 3. ábrán bemutatott A primert, (-)-szál primerként a 11. példában ismertetett kutikula-AaIT primert használtuk.

Egy vagy két további plakktisztítási ciklust követően P1 törzseket készítettünk (28). Az AaIT-tartalmú rekombináns vírust A4001-nek neveztük. Ennek a vírusnak a biológiai aktivitását az ECV-vel végzett injekciós vizsgálattal állapítottuk meg. Az ECV-t a negyedik lárvállapot közepén levő *Heliothis virescens* (dohányrügyhernyó) lárvákba oltottuk. Plakkvizsgálati módszerrel (28) meghatároztuk a vírus titerét, majd 0,5% (térfogat/térfogat) 5-ös számú vörös festékkel kiemésztett TNMFH tápfolyadékban 2 × 10⁷, 2 × 10⁶ és 2 × 10⁵ plakképző egység/ml hígításokat készítettünk. A lárvákat szén-dioxiddal 2–5 percre elaltattuk, majd 26-os méretű tüvel felszerelt Hamilton-fecskendő segítségével 0,5 µl hígított vírussal beoltottuk. A tűt hosszanti irányban illesztettük be az utolsó két álláb között, majd az injekciót megelőzően két-három ízzel előretoltuk. A beoltás után a lárvákat megfigyeltük, hogy szivárog-e belőlük vörösre színeződött vérnyirok, és ha a mintaveszteség nyilvánvaló volt, vagy annak gyanúja felmerült, a kísérletből kihagytuk azokat. A lárvákat ezután 27 °C-on tartottuk lefedett 4 cm² területű etetőkamrákban (kamráként egy lárvát), és a morbiditást vagy mortalitást naponta egyszer szemmel ellenőriztük. Moribundnak (pozitív válasz) tekintettük az egyedet, ha miután a hátára fordítottuk, nem volt képes 0,5–2 percen belül eredeti helyzetbe kerülni.

Amikor *H. virescens* lárvákat a vírus 6 × 10³–1 × 10⁴ plakképző egységével oltottunk, az A4001 vírusfertőzésre reagáló lárvák kontraktilis bénulás tüneteit mutatták, és (talpraállási) válaszidejük az AaIT-termelő rekombináns vírusra jellemző időre csökkent a vad típusú AcMNPV-vel összehasonlítva. Pontosabban a rekombináns vírus válaszidejének átlaga (RT₅₀) az egyik biopróbában a vad típusú vírusra jellemző érték 50%-a (+/- 4%), a második bioesszében 52% (+/- 5%) volt. Ez az eredmény azt mutatja, hogy az AaIT génnek és a kutikula jelzőszekvenciájának inszertálása az AcMNPV-be (A4001) biológiailag aktív toxinexpreszálásán keresztül meggyorsítja a lárvák pusztulását.

A 2. példában ismertetett szokásos levéllemezipróbával csak a kisegítő Sf9(28.3)CL-2 sejtvonalban tenyésztett A4001 vírussal etetett lárvákban fejlődött ki az AaIT toxinra jellemző kontraktilis bénulás. Ezzel szemben vad típusú Sf9 sejtekben tenyésztett, A4001 vírusokkal etetett lárvákban nem fejlődött ki kontraktilis bénulás.

13. példa

Az UAS_{GAL}-p74 transzfervektor és az A4UAS vírus előállítás

Ebben a példában egy fajlagos élesztő 3' aktiváló szekvenciát, UAS_{GAL}-t, és a minimális *Drosophila*

melanogaster hsp 70 promotert (a -43-tól a -1. bázisig terjedően) inszertáltuk a p74 kódolószekvenciájától 3'-irányban a -1. pozícióba a vírusba. A GAL4 struktúránt a pLA plazmidből (32) egy 2,9 kb nagyságú BamHI-HindIII fragmensként izoláltuk. Ezt a GAL4 fragmenst az 5. példában ismertetettek szerint heterológ promotert tartalmazó vektorok egyikébe inszertáltuk. A heterológ promoter-GAL4 konstrukció működőképes kópiáit tartalmazó stabil Sf9 sejteket izoláltunk a 6. példában leírtak szerint. Az UAS_{GAL}-p74 rekombináns vírus előállítására céljából egy UAS_{GAL}-p74 transzfervektort szerkesztettünk. A 17-hsp 70/lacZ konstrukciót (33) használtuk szubsztrátként a PCR-hez egy 175 bázispárból álló fragmens előállítására. Ezt a fragmenst egy, a nagy affinitású 17 bázisból álló GAL4 felismerőhelyet tartalmazó 29 bázispárból álló ismétlődő szekvencia négy példánya alkotja a minimális *Drosophila melanogaster* hsp 70 promoterhez (a -43-tól a -1. bázisig terjedően) kapcsolva. Olyan meghatározott primereket használtunk, amelyek az elkövetkező klónozási lépésekhez kívánt restrikciós hasítási helyeket adtak a fragmens 5' (SmaI) és 3' (Esp 3I és NdeI) végeihez. Ezt a fragmenst inszertáltuk a delta-p74 transzfervektorba (lásd a 4. ábrát) a p74 gén 5'-végéhez legközelebb eső tompa véggé alakított HindIII, valamint a NdeI hasítási helyek közé. Ezt a plazmidklónt LB 17.8-nak neveztük. A p74 kódoló-fragmenst PCR amplifikációval állítottuk elő az 5. példában ismertetett p74-specifikus (+)-szál primer, és (-)-szál primerként a Bluescript-specifikus T3 primer (Stratagene, La Jolla, CA) felhasználásával. Ezt a p74 fragmenst az előzőekben ismertetettek szerint DNS-polimeráz I Klenow-fragmensével kezeltük. A fragmens tisztítását követően azt BclI enzimmel emésztettük, amely a p74 gén 3'-vége közelében hasít. Az LB 17.8 plazmidot hasonló módon kezeltük Esp 3I emésztéssel, majd ennek a végnek Klenow-fragmenssel tompa véggé való alakításával. Miután a vektort tisztítottuk, azt szintén BclI-gyel emésztettük. Az előkészített vektort és a p74 génfragmenst ezután szokásos feltételek mellett ligáltuk. Ez a pUAS_{GAL}-p74-nek nevezett klón tartalmazta a hsp promoter irányítás alatt álló, de a GAL4 protein jelenlététől függő teljes p74 gént. Az A4UAS nevezetű rekombináns AcMNPV vírust az 1. példában ismertetettek szerint állítottuk elő. Kiegészített vírust ennek a rekombináns vírusnak a 6. példában ismertetett sejtvonalakban való tenyésztésével állítottunk elő. Elvégeztük a 2. példában leírt szokásos biopróbát, és az eredmények szerint az UAS_{GAL}-p74 szájon át adagolva nem fertőző rovarokra, amennyiben azonban ezt a vírust a GAL4 kiegészítő sejtvonaltan tenyésztjük, rovarokra szájon át fertőzővé válik.

14. példa

Az AcMNPV p74 gén funkcionális analógjának izolálása granulosos vírus genomjából

Egy granulosos vírus szájon át való fertőzőképességéért felelős gént könnyen izolálhatunk a „marker rescue” technika alkalmazásával (21). Először egymást átfedő kozmid klónokból álló génkönyvtárat készítet-

tünk a *Trichoplusia ni* granulosos vírus (TnGV) DNS-ből úgy, hogy a Sall enzimmel részlegesen emésztett TnGV DNS-t a pVK102 kozmid vektorba (34) ligáltuk. A CpGV kozmid klónok egyikéből 1 µg-t mennyiséget 1 µg AcMNPV A4000 vírus DNS-sel kotranszfectáltunk az 1. példában ismertetettek szerint. 5 nap múlva szokásos plakkvizsgálatot végeztünk (28). Miután a plakkok teljesen kifejlődtek, különálló plakkokkal 48 rekeszű szövettényésztő lemez egyes rekeszeit fertőztük az 1. példában leírtak szerint eljárva. Az ezekből a rekeszekből származó utódvírusokat húszas csoportokba gyűjtöttük, és a 2. példában ismertetettek szerinti levél-lemezpróbában harmadik lárvállapotú *Trichoplusia ni* lárvákkal etettük. Amennyiben egy kozmid klón tartalmazza a p74 funkcionális analógját, az az A4000 vírust szájon át fertőzővé teszi. A fertőzőképesség helyreállításáért felelős meghatározott gént a pozitív kozmid klón plazmid szubklónjaival végzett kotranszfectálás és a fenti próba megismétlésével azonosítottuk.

Irodalomjegyzék

- Granados, R. R., and Federici, B. A., *The Biology of Bakuloviruses*, 1, 99 (1986).
- Tomalski, M. D. and Miller, L. K., *Nature*, 352, 82–85 (1991).
- Federici, B. A., *In Vitro*, 28, 50A (1992).
- Martens, J. W. M., et al., *App. & Envir. Microbiology*, 56, 2764–2770 (1990).
- Menn, J. J. and Borkovec, A. B., *J. Agric. Food Chem.*, 37, 271–278 (1989).
- Eldridge, R., et al., *Insect Biochem.*, 21, 341–351 (1992).
- Hammock, B. D., et al., *Nature*, 344, 458–461 (1990).
- Williamson, M., *Nature*, 353, 394 (1991).
- Hammock, B., *Nature*, 355, 119 (1992).
- Luckow, V. A. and Summers, M. D., *Bio/Technology*, 6, 47–53 (1988).
- Miller, L. K., *Ann. Rev. Microbiol.*, 42, 177–199 (1988).
- Smith, G. E. and Summers, M. D., U.S. Patent Number 4,745,051.
- Blissard, G. W. and Rohrmann, G. F., *Ann. Rev. Entomol.*, 35, 127–155 (1990).
- Partington, S., et al., *Virology*, 175, 91–102 (1990).
- Kuzio, J., et al., *Virology*, 173, 759–763 (1989).
- Hill, J. E., et al., *Biochimica et Biophysica Acta*, 1172, 1–2 (1993).
- Leisy, D. J., et al., *Virology*, 153, 157–167 (1986).
- Beames, B. and Summers, M. D., *Virology*, 168, 344–353 (1989).
- Gallo, L. G., et al., *J. Invertebrate Path.*, 58, 203–210 (1991).
- Crook, N. E., et al., *J. Virology*, 67, 2168–2174 (1993).
- Passarelli, A. L. and Miller, L. K., *J. Virology*, 67, 2149–2158 (1993).
- Jarvis, D. L., et al., *Biotechnology*, 8, 950–955 (1990).

23. Presnail, J. K. and Hoy, M. A., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89, 7732–7736 (1992).

24. Baldarelli, R. M. and Lengyel, J. A., *Nucleic Acids Res.*, 18, 5903–5904 (1991).

25. Zlotkin, E., et al., *Toxicon*, 9, 1–8. (1971).

26. Jackson, J. R. H. and Parks, T. N., United States Patent Number 4,925,664.

27. Sambrook, J., et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989).

28. Summers, M. D. and Smith, G. E., *A Manual Of Methods For baculovirus Vectors And Insect Cell Culture Procedures*, Dept. of Entomology, Texas Agricultural Experiment Station and Texas A & M University, College Station, Texas 77843–2475, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987).

29. Webb, N. R. and Summers, M. D., *J. Methods Cell & Molec. Biol.*, 2, 173–188 (1990).

30. Roberts, D. B., ed., *Drosophila: A Practical Approach*, page 276, IRL Press, Oxford, England (1986).

31. Luckow, V. A. and Summers, M. D., *Virology*, 170, 31–39 (1989).

32. Johnston, S. A., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83, 6553–6557 (1986).

33. Fischer, J. A., et al., *Nature*, 332, 853–856 (1988).

34. Knauf, V. C. and Nester, E. W., *Plasmid*, 8, 45–54 (1982).

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. A környezetben gazdaszervezetről gazdaszervezetre csökkent terjedési képességgel rendelkező bakulovírus, amely a vírus egy genetikai elemének módosításával fertőzőképtelenné van téve, és fertőzőképessége a hiányzó vagy defektív termék vagy működés kiegészítésével helyreállítható, és a fertőzéssel képződő kiegészített vírus nem tartalmazza az említett termék vagy működés kódolására szolgáló genetikai elemet, és képes olyan szekunder fertőzést iniciálni, amely más, a gazdaszervezeten belüli rovarszövetekre áterjed.

2. Az 1. igénypont szerinti vírus, amely DNS-vírus az *Eubaculovirinae* vírusok vagy *Nudibaculovirinae* vírusok csoportjába tartozik.

3. A 2. igénypont szerinti vírus, amely egy *Eubaculovirinae* vírus, amelybe a nukleáris polihedrózis vírusok és a granulózis vírusok tartoznak.

4. Az 1. igénypont szerinti vírus, amelyben a genetikai elem módosítása a génműködés megszakításával vagy a vírusfunkció megzavarásával történt.

5. Az 1. igénypont szerinti vírus, amelynek a fertőzőképessége helyreállítható a vírusnak

(a) a módosított vírusból hiányzó vagy abban defektív terméket vagy funkciót pótló DNS-fragmenssel transzfektált rovarsejtekben;

(b) a módosított vírusból hiányzó vagy abban defektív terméket vagy funkciót pótló DNS-frag-

menssel stabilan transzformált sejtvonalakban; vagy

(c) a módosított vírusból hiányzó vagy abban defektív terméket vagy funkciót pótló DNS-fragmenst tartalmazó transzgenikus rovarokban történő tenyésztésével.

6. Az 5. igénypont szerinti vírus, amely a DNS-fragmens expresszállásának irányítására heterológ promotert tartalmaz.

7. Az 1. igénypont szerinti vírus, amely egy rovarokat leküzdő vagy módosító anyagot kódoló heterológ gént is tartalmaz a vírusgenomba inszertálva.

8. A 7. igénypont szerinti vírus, amely rovarokat leküzdő vagy módosító anyagként toxint, neuropeptideket, hormonokat vagy enzimeket tartalmaz.

9. A 7. igénypont szerinti vírus, amelyben a heterológ gén

(a) közvetlenül a vírus módosított genetikai elemének helyére; vagy

(b) a vírus módosított genetikai elemének szomszédságába van inszertálva oly módon, hogy a heterológ gén és a módosított genetikai elem szegregációja az utódvírusok legfeljebb 10%-ában jön létre.

10. Eljárás a környezetben gazdaszervezetről gazdaszervezetre csökkent terjedési képességgel rendelkező bakulovírus előállítására, *azzal jellemezve*, hogy

(1) a vírus egy genetikai elemének módosításával a vírust rovarokra fertőzőképtelenné, de olyan szekunder fertőzés iniciálására képessé tesszük, amely más rovarszövetekre áterjed; és

(2) a vírus fertőzőképességét helyreállítjuk a módosított vírusból hiányzó vagy abban defektív termék vagy funkció időleges kiegészítésével, ahol a fertőzéssel létrejövő kiegészített vírus nem tartalmazza az említett termék vagy működés kódolására szolgáló genetikai elemet.

11. A 10. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a genetikai elem módosítását egy génfunkció megszakításával vagy egy vírusfunkció megzavarásával végezzük.

12. A 10. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a vírus fertőzőképességét a vírusnak

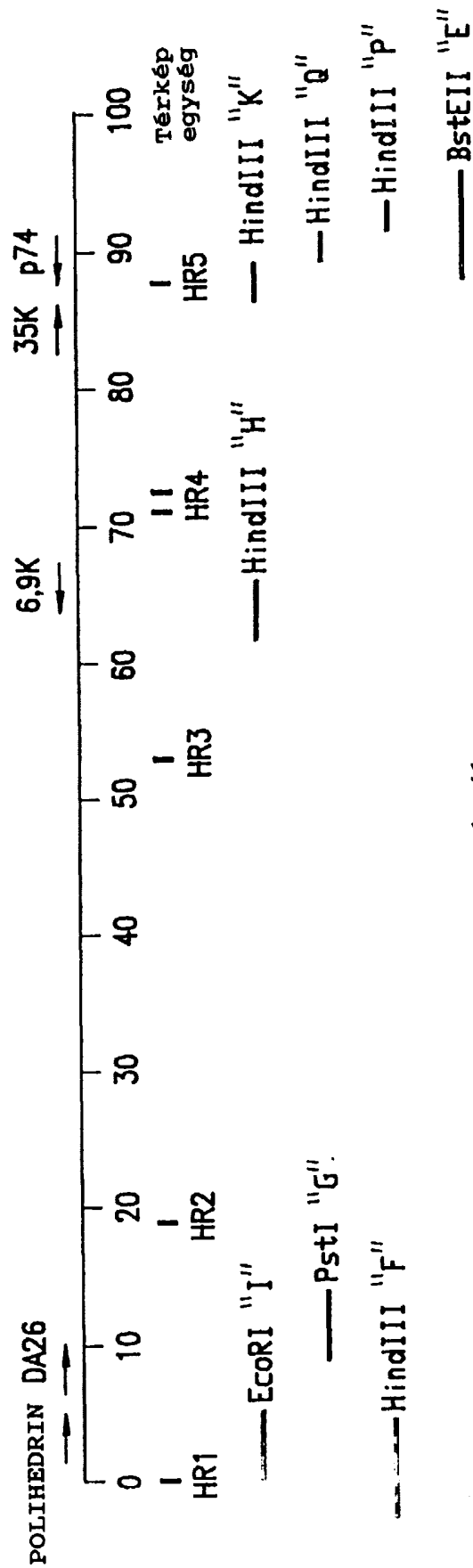
(a) a módosított vírusból hiányzó vagy abban defektív terméket vagy funkciót pótló DNS-fragmenssel transzfektált rovarsejtekben;

(b) a módosított vírusból hiányzó vagy abban defektív terméket vagy funkciót pótló DNS-fragmenssel stabilan transzformált sejtvonalakban; vagy

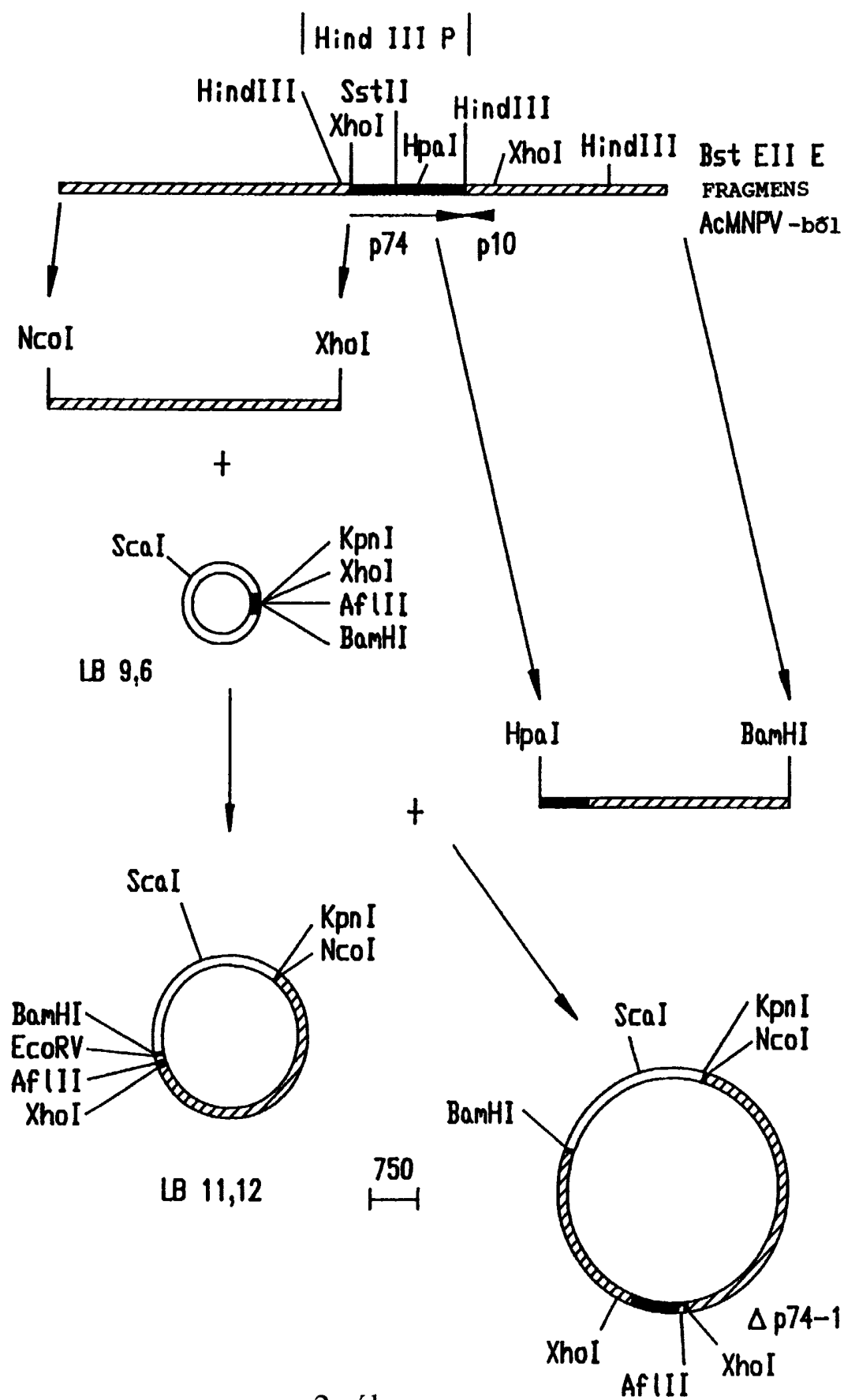
(c) a módosított vírusból hiányzó vagy abban defektív terméket vagy funkciót pótló DNS-fragmenst tartalmazó transzgenikus rovarokban végzett tenyésztésével állítjuk helyre.

13. A 10. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy egy heterológ promotert is alkalmazunk.

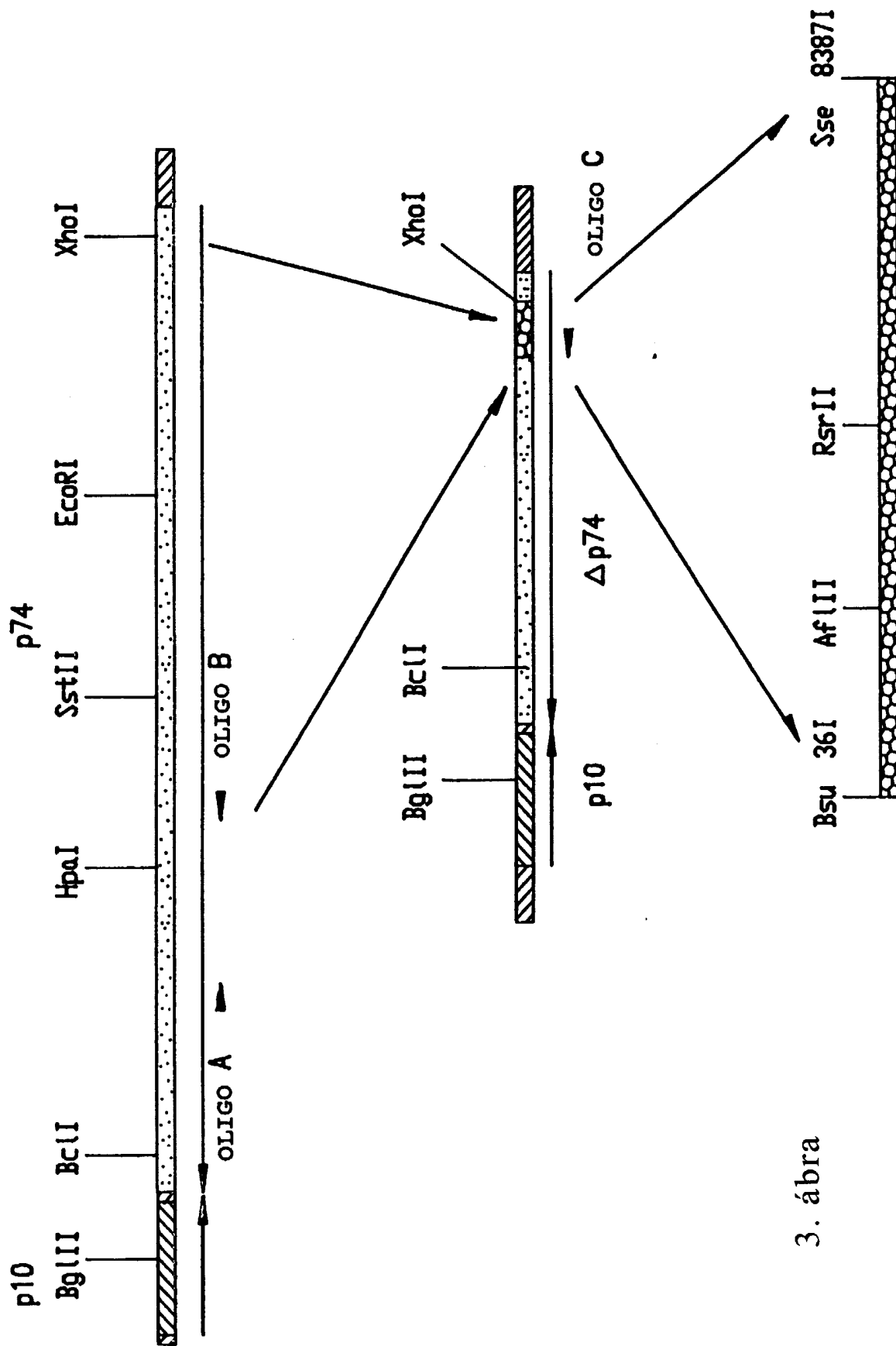
14. A 10. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy egy, a vírusgenomba inszertált rovar szabályozó vagy módosító anyagot kódoló heterológ gént is alkalmazunk.



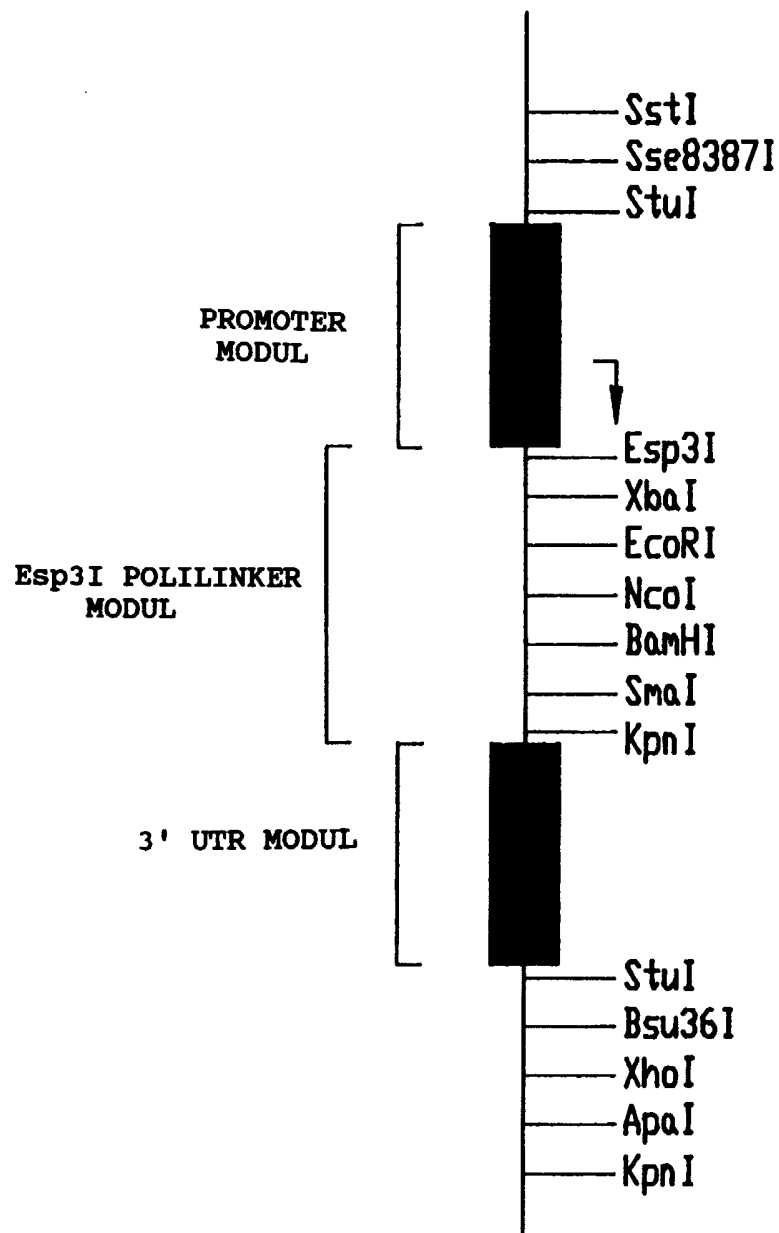
1. ábra



2. ábra



3. ábra



4. ábra