



(19) Országkód

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

221 339 B1

(21) A bejelentés ügyszáma: P 95 00573
(22) A bejelentés napja: 1993. 07. 12.
(30) Elsőbbségi adatok:
93400949.9 1993. 04. 09. EP
92402358.3 1992. 08. 27. EP
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/EP 93/01820
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 94/05771

(51) Int. Cl.⁷

C 12 N 1/20

C 12 N 5/04

C 12 N 5/10

A 01 H 5/00

C 12 N 15/32

A 01 N 63/02

(40) A közzététel napja: 1995. 09. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 2002. 09. 30.

(72) Feltalálók:

van Audenhove, Katrien, Gent (BE)
Jansens, Stefan, Gent (BE)
Lambert, Bart, Beernem (BE)
Peferoen, Marnix, Gent (BE)

(73) Szabadalmaz:

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

(74) Képviseelő:

Somfai & Társai Iparjogi Kft., Budapest

(54) **Új Bacillus thuringiensis törzsek és inszekticid proteinjeik**

KIVONAT

A találmány tárgyát új *Bacillus thuringiensis* baktériumok képezik, mégpedig a következők: a BTS02617A törzs, amelynek letéti száma BCCM-LMG P-12592, a BTS02618A törzs, amelynek letéti száma BCCM-LMG P-12593, a BTS02654B törzs, amelynek letéti száma BCCM-LMG P-12594, a BTS02652E törzs, amelynek letéti száma BCCM-LMG P-13493.

A találmány tárgya továbbá rovarirtó hatású protein, amely a 4. azonosító számú szekvencia szerinti aminosavszekvencia 1-658. helyzetű aminosavaiból álló aminosavszekvenciát, a 4. azonosító számú szekvencia szerinti aminosavszekvencia 44-658. helyzetű aminosavaiból álló aminosavszekvenciát, a 4. azonosító

tó számú szekvencia szerinti aminosavszekvencia 165-658. helyzetű aminosavaiból álló aminosavszekvenciát tartalmazza. A találmány egyik alelete az olyan rovarirtó hatású protein, amely a 4. azonosító számú szekvencia 1-1157. helyzetű aminosavaiból álló aminosavszekvenciát tartalmazza.

A találmány tárgya továbbá a DNS, amely olyan nukleotidszekvenciát tartalmaz, amely ezt a proteint kódolja; továbbá rovarirtó készítmény Lepidoptera ellen, amely hatóanyagként az új baktériumot vagy proteint tartalmazza, valamint eljárás rovarok elleni védekezésre; és az a transzformált növény vagy mag, amelynek egy vagy több sejtje a fenti DNS-t tartalmazza.

HU 221 339 B1

A találmány tárgya új *Bacillus thuringiensis* baktériumok, amelyeket a Budapesti Szerződés értelmében BCCM-LMG-nél (Belgian Coordinated Collections of Microorganisms, K. Ledeganckstraat 35, B-9000 Gent, Belgium) helyeztünk letétbe, mégpedig a következők: a BTS02617A törzs, amelynek letéti száma BCCM-LMG P-12592, a BTS02618A törzs, amelynek letéti száma BCCM-LMG P-12593, a BTS02654B törzs, amelynek letéti száma BCCM-LMG P-12594, a BTS02652E törzs, amelynek letéti száma BCCM-LMG P-13493.

A találmány tárgya továbbá rovarirtó hatású protein, amely a 4. azonosító számú szekvencia szerinti aminosavszekvencia 1-658. helyzetű aminosavaiból álló aminosavszekvenciát, a 4. azonosító számú szekvencia szerinti aminosavszekvencia 44-658. helyzetű aminosavaiból álló aminosavszekvenciát vagy a 4. azonosító számú szekvencia szerinti aminosavszekvencia 165-658. helyzetű aminosavaiból álló aminosavszekvenciát tartalmazza. A találmány egyik alelete az olyan rovarirtó hatású protein, amely a 4. azonosító számú szekvencia 1-1157. helyzetű aminosavaiból álló aminosavszekvenciát tartalmazza. A találmány tárgya továbbá egy DNS, amely olyan nukleotidszekvenciát tartalmaz, amely a fentiek szerinti proteint kódolja, például a 4. azonosító számú szekvencia 797-2641. helyzetű nukleotidjaiból álló nukleotidszekvenciát tartalmazza. A találmány tárgyát képezi egy olyan DNS is, amely kiméra génben van jelen, amely kiméra gén tartalmaz egy olyan promotert szakaszt, amely képes a nevezett DNS-nek egy növényi sejtbe való átírására. Ez a DNS előnyösen módosított kodonhasználattal rendelkező DNS-t tartalmaz. A találmány tárgya továbbá rovarirtó készítmény Lepidoptera ellen, amely hatóanyagként tartalmazza a következőket: legalább egy találmány szerinti baktérium és/vagy protein.

A találmány tárgya továbbá eljárás kártékony rovarok elleni védekezésre, amelynél a rovar a találmány szerinti baktériummal, proteinnel és/vagy készítménnyel érintkeztetjük. Fentiekben túlmenően a találmány tárgya a genomjában a fenti DNS-t tartalmazó transzformált növényi sejt, és ilyen sejtet vagy sejteket tartalmazó transzformált növény vagy növénymag. Ilyen növények különösen a következők: gyapot, kukorica, paradicsom, dohány, repce, lucerna, napraforgó, saláta, burgonya, rizs, szója, Brassica fajok és cukorrépa. A kártékony rovarok különösen a következők: *Agrotis ipsilon*, *Spodoptera exigua*, *Spodoptera littoralis*, *Spodoptera frugiperda*, *Mamestra brassica*, *Heliothis virescens*, *Ostrinia nubilalis* és *Plutella xylostella*.

Az EP 358557 számú európai közzétételi irat bt4 és bt18 géneket és egy eljárást ismert, amellyel egy növény Lepidoptera ellen rezisztenssé tehető. A találmány szerinti törzseket azonban nem találta meg. Így nem ismerhette fel, hogy az igényelt fehérje N-terminális részének (amely más proteinek vonatkozásában Cry9Ca1-ként ismert és a toxicitásért felelős rész), maximális aminosavhomológia-szintje csak 51%.

A találmány tárgya egy gén (a bTS02618 gén), amely jelen van a BTS02617A, a BTS02618A, a BTS02654B és a BTS02652E törzsek genomjában, és

amely egy inszekticid proteint (a „BTS02618A protoxin”) kódol, amely megtalálható a BTS02617A, a 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 burkolásuk előtt előállítanak.

A találmány ezen túlmenően egy toxinra is vonatkozik (a „BTS02618A toxin”), amelyet a BTS02618A protoxinból nyerhetünk (például tripszines feltárás útján). A BTS02618A toxin egy inszekticid hatású protein, amelyet a BTS02617A kristályokból, a BTS02618A kristályokból, a BTS02654B kristályokból és a BTS02652E kristályokból szabadíthatunk fel, amelyek viszont a BTS02617A törzs által, a BTS02618A törzs által, a BTS02654B törzs által, illetve a BTS02652E törzs által termelődnek. Ezen toxin és a protoxinja a Lepidoptera rovarok széles skálája ellen jelentős aktivitással rendelkeznek, különösen pedig a Noctuidae, 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* és az Yponomeutidae család tagjai, mint amilyen a *Plutella xylostella*.

A BTS02618A protoxinnak és toxinnak („(pro)toxin”) ez az új jellemzője, vagyis az, hogy különféle gazdasági szempontból fontos Lepidoptera rovarcsaládokhoz, így a Noctuidae, Yponomeutidae és Pyralidae családba tartozó rovarok ellen kombinált hatással rendelkeznek, ezt a (pro)toxint ideálisan megfelelő anyaggá teszik a kártékony rovarok igen széles rétege elleni fellépésre oly módon, hogy ezeket a rovarokat a protoxinval érintkeztetjük akár úgy, hogy a rovarokat vagy növényeket permetezzük, akár úgy, hogy a bTS02618A gént a növényekkel kapcsolatban álló baktériumokban vagy a növényekben fejezzük ki. A BTS02618A toxin feltehetően a legkisebb egysége a BTS02618A protoxinnak, amely a Lepidoptera ellen inszekticid hatású.

A jelen találmány ezen túlmenően egy kiméra génre is vonatkozik, amely alkalmas arra, hogy valamely növényi sejtet transzformáljon, és amely a következő működőképesen összekapcsolt DNS-fragmenseket tartalmazza:

1. a bTS02618A gén egy részét (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 toxin kódolja,

2. egy promotert, amely alkalmas arra, hogy az inszekticid hatású bTS02618A génrészt valamely növényi sejtben átírja, és

3. az inszekticid hatású bTS02618A génrésznek valamely növényi sejtben való kifejeződésére szolgáló, megfelelő 3' végi transzkriptum kialakításáért és poliadenilációért felelős jelek.

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

A jelen találmány tárgya továbbá:

1. valamely növényi sejt („transzformált növényi sejt”) például a kukorica- vagy a gyapotsejt, amelynek a genomja az inszekticid hatású BTS02618A génrésszel, előnyösen a BTS02618A kiméra génnel transzformált, és

2. valamely növény („transzformált növény”), amelyet a transzformált növényi sejtől regeneráltunk, vagy amelyet az ily módon regenerált növényből vagy szaporító anyagából, vagy magjából állítottunk elő, és amelynek genomja az inszekticid hatású BTS02618A génrészt, előnyösen a BTS02618A kiméra gént tartalmazza, és amely növény Lepidopterákkal szemben rezisztens.

A találmány tárgya a fentiekén túlmenően:

1. olyan mikrobiális szervezet, mint például a *B. thuringiensis* vagy *Pseudomonas* spp., amelynek a genomját a teljes BTS02618A génnel vagy annak egy részével transzformáltuk, és

2. egy mikrobiális spóra, amely a teljes BTS02618A génnel vagy annak részeivel transzformált genomot tartalmaz.

A műszaki ismeretekhez tartozik, hogy a *B. thuringiensis* (a továbbiakban „Bt”) 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 süllyesztett fermentációs módszerek alkalmazhatók a Bt spórák előállítására, üzleti szempontból vonzóvá teszi azt a megoldást, hogy Bt baktériumokat alkalmazzának a növényvédőszer-készítmények forrásaként.

Korábban már azonosítottak bizonyos Bt törzsekből származó génfragmenseket, amelyek inszekticid proteinek 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 génfragmens speciális módon való manipulálása úgy, hogy az a Bt protoxinnak egy olyan részét kódolja, amely megtartja az alapvető toxicitását azokkal a rovarokkal szemben, melyek ellen védekezni kívánunk (86/300 291.1 és 88/402 115.5 számú európai szabadalmi bejelentések és 821 582 számú amerikai egyesült államokbeli, 1986. január 22-én benyújtott szabadalmi bejelentés).

A találmány rövid leírását a következőkben foglaljuk össze:

A találmány értelmében 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 Lepidoptera ellen, különösen a következők ellen: Noctuidae, úgymint *Agrotis* spp. (bagoly-lepkék mint amilyen az *Agrotis ipsilon*), *Mamestra* spp. (például a káposztalepke, vagyis *Mamestra brassica*) és *Spodoptera* spp. (mint amilyen a *Spodoptera exigua*, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera littoralis* és *Spodoptera litura*), Pyralidae ellen (például kukoricamoly, *Ostrinia nubilalis*) 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 génrésszel, 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 alkalmazható módosított növények vagy módosított növények szaporítóanyagai, magjai és olyan növényi sejt kultúrák előállítására, 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 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 tárgyat képezi a fentiekén túlmenően az az eljárás is, amellyel valamely növényt Lepidopterákkal szemben rezisztenssé teszünk oly módon, hogy valamely növényi sejt genomját az inszekticid hatású BTS02618A génrésszel 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 fentiekén 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 tárgyat képezi a fentiekén túlmenően az a természetes vagy mesterséges DNS-szekvencia,

amely a BTS02618A protoxint vagy annak rovarirtó hatású részeit, mint például a toxint kódolja.

A jelen találmány tárgyát képezik továbbá Lepidopterák elleni inszekticid készítmények, különösen Noctuidae, Pyralidae, Yponomeutidae ellen, valamint eljárás Lepidopterák leküzdésére, különösen Noctuidae, Pyralidae és Yponomeutidae leküzdésére, ezen inszekticid készítmény segítségével, ahol a rovarirtó készítmény a BTS02617A, 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.

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 spórázó tenyészetéből izolálhatjuk (Mahillon és Delcour, 1984) és ezt követően a BTS02618A protoxint izolálhatjuk a kristályokból Höfte és társai módszerével (1986). A protoxinokat alkalmazhatjuk arra, 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 azonosítható oly módon, hogy az EP 193 259 és EP 0 305 275 számú európai közzétételi iratokban ismertetett módszereket alkalmazzuk (amelynek tárgyát hivatkozásképpen itt idéztnék tekintjük).

A BTS02618A gént a következőképpen azonosítotuk: restriktációs 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 klónozó vektorokba ligáltuk, szkríneltük a klónozó vektorokkal transzformált E. coli törzseket egy olyan DNS próba segítségével, amelyet cryIG gének 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-szekvenciát. Tekintettel a genetikai kód degeneráltságára, néhány aminosavkodont más kodonnal

helyettesíthetünk anélkül, hogy a protein aminosavszekvenciáját megváltoztatnánk. Ezen túlmenően néhány aminosavat más ekvivalens aminosavval helyettesíthetünk anélkül, hogy szignifikánsan megváltoztatnánk a rovarirtó hatását. Hasonlóképpen az aminosavok összetételének megváltoztatása a molekula olyan területein, amelyek nem felelősek a kötődésért és a toxicitásért, valószínűleg nem okoz különbséget a rovarirtó hatásában. A gén ilyen ekvivalensei olyan DNS-szekvenciák tartoznak, mint amilyenek a 4. azonosító számú szekvencia szerinti BTS02618A toxin vagy protoxin DNS-szekvenciájával 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 körülményekre vonatkozik, legelőnyösebben szigorú hibridizációs körülményekre.

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, valamely új hibridprotein előállítás céljából, amely a BTS02618A toxin (Ge és társai, 1991) legalább egy funkcionális jellemzőjével (például a kötődési és/vagy toxicitási jellemzőkkel) rendelkezik. Az ilyen BTS02618A protein kötődési és/vagy toxicitási jellemzőivel rendelkező részek a hibrid Bt protein egyik alapvető tulajdonságát alakíthatják ki. Egy ilyen protein nagyobb gazdakörrel és javított toxicitással rendelkezhet, és/vagy a rovarok rezisztenciájának a kialakulásának megelőzésére irányuló stratégiában használható fel (408 403 számú európai közzétételi irat; Visser és társai, 1993).

További lehetőséget jelent, hogy a BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B vagy BTS02652E törzsek teljes DNS-éből készült 5 és 10 kb közötti fragmensek megfelelő expressziós vektorokba ligálhatók, és E. coli-ba transzformálhatók, és a klónokat ezután hagyományos telepimmunpróba-módszerekkel (French és munkatársai, 1986) a BT02618A toxin ellen termelt monoklonális és poliklonális antitestekkel a toxin expressziójára szkrínélhetők.

Úgyszintén, a BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B vagy BTS02652E törzsek teljes DNS-éből készült 5 és 10 kb közötti fragmensek megfelelő Bt ingázó vektorokba ligálhatjuk (Lerecrus és társai, 1992) és egy kristályhiányos Bt-mutánsba transzformálhatjuk. A klónokat ezután kristálytermelésre (detektálás mikroszkópiás úton) vagy kristályos proteinekre (detektálás SDS-PAGE útján) szkrínéljük.

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

A BTS02618A gén rovarirtó hatású része, amely a protoxinjának egy rovarirtó hatású részét kódolja, vala-

mint a gén egy csonkolt része, amely pontosan a toxinját kódolja, hagyományos módon állítható elő a gén-szekvencia analízise után. A 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 (vagy rovarirtó) 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 *E. coli*-ban, más *Bt* törzsekben és növényekben expresszáljuk, megfelelő restriktációs helyek építhetők 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 úgy módosítani a WO 91/16432 és WO 93/09218 számú PCT közvételi iratoknak, illetve a 0 358 962 és 0 359 472 számú európai közvételi iratoknak megfelelően, hogy valamely ekvivalens, módosított vagy mesterséges gén vagy génrész keletkezzen. Annak érdekében, hogy egyszikű növényekben – mint amilyen a kukorica – fokozott expressziót érjünk el, egy egyszikű intront illeszthetünk a bTS02618A kiméra génhez, és a bTS02618A génrész DNS-szekvenciáját translációra semleges módon tovább változtathatjuk úgy, hogy a génben részben jelenlévő esetlegesen gátló DNS-szekvenciákat módosítjuk helyre irányuló intronbeiktatások segítségével és/vagy úgy, hogy a kodonhasználatot változtatjuk meg. Például a kodonhasználatot a szóban forgó növény által leginkább kedvelt kodonhasználatnak megfelelően alakítjuk át (Murai és társai, 1989) anélkül, hogy a kódolt aminosavszekvenciát lényegesen megváltoztatnánk.

Az inszekticid hatású bTS02618A génrész vagy annak ekvivalense, előnyösen a bTS02618A kiméra gén, amely a BTS02618A protoxin inszekticid hatású részét kódolja, hagyományos módon stabilan bevezethető egy különálló növényi sejt sejtmaggenomjába, és az ily módon transzformált növényi sejt hagyományos módon használható fel egy rovarok ellen rezisztens módosított növény előállítására. Ilyen vonatkozásban egy *Agrobacterium tumefaciens*-ben lévő és az inszekticid hatású bTS02618A génrészt hordozó, ártalmatlanított Ti-plazmid használható a növényi sejt transzformálására, és ezt követően egy transzformált növény regenerálható a transzformált növényi sejtől ismert módszerek felhasználásával, mint amilyenek például a 0 116 718 és 0 270 822 számú európai közvételi iratokban, a WO 87/02913 PCT közvételi iratban és a 87/400544.0 számú európai szabadalmi bejelentésben, valamint Gould és társai (1991) publikációjában leírtak.

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

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

A keletkezett transzformált növény a hagyományos növénytermesztési séma szerint további, azonos jellemzőkkel bíró transzformált növények előállítására, vagy pedig a rovarirtó hatású bTS02618A génrésznek azonos vagy rokon növényfajok más fajtáiba való bevitelére használható fel. A transzformált növényekből származó magok stabil genomi inszertumként tartalmazhatják az inszekticid hatású bTS02618A génrészt. A transzformált növény sejtjeiből hagyományos módszerekkel lehet előállítani a BTS02618A protoxin, előnyösen a BTS02618A toxin inszekticid hatású részét, amelyet kinyerhetünk abból a célból, hogy hagyományos inszekticid készítményeket állítsunk elő Lepidoptera ellen (821 852 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés, 86/300291.1 számú európai szabadalmi bejelentés).

Az inszekticid hatású bTS02618A génrész, előnyösen a csonkolt bTS02618A gén bevezethető a növényi sejt genomba úgy, hogy a beillesztett gén a génrész kifejeződését a növényi sejtben irányítani képes promotertől lefelé (azaz 3' irányba) legyen, annak szabályozása alatt. Ez előnyösen úgy valósítható meg, hogy a bTS02618A kiméra gént iktatjuk be a növényi sejt genomjába. Előnyös promoterek például a következők: a karfiol mozaik vírus CM1841 (Gardner és társai, 1981), CAbbB–S (Franck és társai, 1980) és CabbB–JI (Hull és Howell, 1987) izolátumainak erősen konstitutív 35S promoterei (a „35S promoterek”); valamint a TR1' promotor és a TR2' promotor (a továbbiakban „TR1' promotor”, illetve „TR2” promotor”), amelyek a T–DNS 1', illetve 2' géneinek kifejeződését irányítják (Velten és társai, 1984).

Hasonlóképpen olyan promotor is alkalmazható, amely nem konstitutív, hanem amely a növény egy

vagy több szövetre 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 promóter szabályozása alá helyeztük. Ilyen a ribulóz-1,5-bisfoszfát-karboxiláz kis alegység génjének promotere, amely ugyanabból a növényből vagy valamely más növényből (például babból származhat (ezt írják le a 821 582 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésben és a 86/300 291.1 számú 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 génrész felfelé (vagyis 5' irányba) helyezkedjen el a megfelelő 3' terminális transzkripció szabályozó jelekhez képest (vagyis a transzkriptum kialakításáért felelős és poliadenilációs jelekhez képest). Ez előnyösen úgy valósítható meg, hogy a BTS02618A kiméra gént illesztjük be a növényi sejt genomjába. Előnyös poliadenilációs és transzkriptum kialakítási 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 átíródó DNS-szekvenciákként működnek.

A rovarirtó hatású BTS02618A génrész a növény genomjába adott esetben hibrid gén formájában (86/300 291.1 számú európai szabadalmi bejelentés; Waeck és társai, 1987) is beépíthető ugyanakkor a promoterek a szabályozása mellett, mint egy szelekciós marker, például a kanamicinrezisztenciát kódoló neogén (0 242 236 számú európai közzétételi irat), hogy a növény egy fúziós proteint fejezzen ki.

A Lepidoptera elleni proteint kódoló teljes BTS02618A gén vagy része felhasználható arra is, hogy más baktériumokat transzformáljunk vele. Ilyen például a *B. thuringiensis*, amely Lepidoptera vagy Coleoptera ellen inszekticid hatással rendelkezik. Ezáltal olyan transzformált Bt törzset állíthatunk elő, amely a Lepidoptera és Coleoptera rovarkátevők széles köre elleni küzdelemben, vagy a további Lepidoptera rovarkátevők irtására használható fel. A baktériumok transzformálása megfelelő klónozóeszközbe beépített BTS02618A génnel vagy génrészszel hagyományos módszerekkel valósítható meg, előnyösen hagyományos elektroporációs módszereket alkalmazva, mint amilyenek például Mahillon és társai (1989) és a WO 90/06999 számú PCT közzétételi irat ismertettek.

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 számú európai közzétételi irat), vagy valamely más Bt gén, amely Lepidoptera ellenes proteint kódol; és a bt109P gén (WO

91/16433 számú PCT közzétételi irat), amely egy Coleoptera ellenes proteint kódol. Ezáltal egy olyan transzformált Bt törzs állítható elő, amely a rovarkátevők még nagyobb csoportjának leküzdését teszi lehetővé (például Coleopterák és/vagy további Lepidopterák).

A BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B vagy BTS02652E törzsek transzformációját egy hagyományos klónozóvektorba beépített idegen Bt-gén egészével vagy annak egy részével jól ismert módszerrel valósíthatjuk meg, előnyösen hagyományos elektroporációs eljárással (Chassy és társai, 1988) vagy más módszerrel, például Lereclus és társai (1992) által leírt módon.

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, a BTS02618A kristályos proteineket tartalmazó protoxint nagy mennyiségben kitermelve.

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 dispergálószerrel együtt [például a Bernhard és Utz által ismertett módszerrel (1993)].

Az ilyen inszekticid készítményt nedvesíthető porként, pasztillaként, granulátumként vagy porkészítményként, vagy vizes vagy nem vizes oldószerrel képzett folyékony készítményben 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 készítményekben attól függően állítjuk be, hogy a készítmény milyen típusú és milyen felhasználásra szánjuk. Általában a jelen találmány szerinti kártevő-ellenes készítmények 2-4 héten át megvédik a szabadföldi területeket a Lepidoptera-tól a készítménnyel való egy-egy kezelést követően. Ha ennél hosszabb ideig tartó védelemre törekszünk (például egy teljes vegetációs időszak tartamára), akkor a készítményből rendszeres időközönként újabb mennyiségeket kell alkalmazni.

A jelen találmány értelmében rovarok, különösképpen pedig Lepidoptera 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 protoxinrész, előnyösen a BTS02618A toxin rovarirtó hatású mennyiségét. A kezelni és védeni kívánt hely fogalmi körébe tartozónak tekintjük a rovarkátevők élőhelyét vagy a növekedés-

ben lévő vegetációt, vagy azt a földterületet, amelyen a vegetációt termelni kívánjuk.

A BTS02618A protoxin vagy toxin előállítására a BTS02617A, BTS02618A, a BTS02654B vagy BTS02652E törzset hagyományos módon megfelelő táptalajon tenyésztjük, és aztán feltárjuk hagyományos módszerekkel, például enzimatis lebonatással vagy detergensekkel vagy más ismert módszerrel. Ezután a protoxin standard módszerekkel elválasztható és tisztítható, például kromatográfiával, extrakcióval, elektroforézissel vagy más ismert módszerrel. A toxint ezután a protoxin tripszines emésztésével kaphatjuk meg.

A BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B vagy BTS02652E sejteket összegyűjtésük után változatlan állapotban is felhasználhatjuk akár élő, akár elölt sejt-ként, előnyösen szárítva, azon a területeken, amelyeket a rovarok ellen védeni kívánunk. Ilyen szempontból előnyös, ha egy tisztított BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B vagy BTS02652E törzset használunk (akár élő, akár elölt állapotban), különösképpen valamely olyan sejtömeget, amely 90,0–99,9 tömeg%-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 adalékanyag hozzáadásával, a konkrét felhasználástól függően. Az adalékanyagok lehetnek nedvesítő anyagok, detergensek, stabilizálók, tapadást fokozó anyagok, szétterjedést fokozó anyagok és töltőanyagok. Az ilyen készítmények közé tartoznak a paszták, porozószeretek, nedvesíthető porok, granulátumok, csalik és aeroszoloz 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 sejtekkel, kristályokkal vagy kristályos proteinekkal vagy a BTS02618A protoxinnal, toxinnal vagy rovarirtó hatású protoxinrészsel együtt 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 tömeg%-ig terjed, előnyösen mintegy 0,15 tömeg% és mintegy 0,8 tömeg% 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 törzsek vagy transzformánsai ép és élő sejtjeit etetjük meg úgy, hogy a rovarok elfogyasztanak valamennyit a törzsek protoxinjaiból, és elpusztulnak vagy károsodást szenvednek.

A következő példák a találmányt szemléltetik.

A példákban hivatkozott ábrákban és szekvenalistában a következők szerepelnek:

15 1. ábra

Az Alul-gyel emésztett Bt törzsek Southern-blot analízise: a 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 proteingén DNS-próbáinak keverékét alkalmazzuk, amely a cryIG próbát (1. azonosító számú szekvencia) 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 AluI fragmensként azonosítottunk, mely hibridizál az 1. azonosító számú szekvencia szerinti cryIG próbával. A felismert cryI gének neveit megadtuk és néhány fragmens méretét is. A bTS02618 gént 3 csillaggal jelöltük; „?” jellel az ismeretlen génfragmenseket szerepeltettük.

35 Szekvenalista

1. azonosító számú szekvencia – a BTS02618A gén izolálására alkalmazott DNS-próba nukleotidszekvenciája. Ez a próba a cryIG DNS-szekvenciájából származik, és komplementer a Smulevitch és társai által (1991) ismertett DNS-szekvencia 2732–2750. nukleotidjaival.

2. azonosító számú szekvencia – a BTS02618A gén részleges 5' nukleotidszekvenciája, amely magában foglalja a feltételezett translációs iniciációs kodont a 195–197. nukleotidpozíciókban.

3. azonosító számú szekvencia – a BTS02618A gén 3' részleges nukleotidszekvenciája (N: ismeretlen nukleotid), amely magában foglalja a feltételezett translációs iniciációs kodont a 1146–1148. nukleotidpozíciókban.

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

Amennyiben egyébként nem említjük a példákban, valamennyi a rekombináns DNS előállítására és manipulálására vonatkozó eljárásról a Sambrook és társai által ismertett standard eljárásokat alkalmazzuk [Mole-

cular 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-szigeti gabonaporból izoláltuk, majd 1993. március 1-én a BCCM-LMG-ben P-13493 nyilvántartási számon deponáltuk.

Valamennyi törzs hagyományos standard táptalajon tenyésztendő, előnyösen T₃ közegen (3 gr/l tripton, 2 g/l triptóz, 1,5 g/l élesztőextraktum, 5 mg mangán-klorid, 0,05 mol nátrium-foszfát, pH=6,8 mellett 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 keverjük össze, és -70 °C-on raktározzuk, vagy a spórakristály-szuszpenziót liofilezzük. Spóraképzés 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 spóraképződés csak aerob körülmények között fordul elő.

A törzsek mindegyikét autoklávban sterilizzük 120 °C-on (1 bar nyomás mellett), 20 percen át. Az ilyen kezelés teljesen inaktíválja mind a spórákat, mind a BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B és BTS02652E protoxinokat. A spórák ibolyántúli besugárzással (254 nm) is inaktíválhatók.

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 spórákat termelő

sejtek. A spórafajlás során termelt kristályos proteinek a BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B vagy BTS02652E törzsek kristályai burkolják be. Különösen figyelemre méltó, hogy a kristály a spórához tapadt állapotban marad spórázás után is.

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

2. példa

A BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B és BTS02652E törzsek és a BTS02618A protoxin inszekticid hatása Noctuidae Yponomeutidae és Pyralidae családokba tartozó fajokkal szemben

A toxicitási vizsgálatokat frissen kikelt lárvákon vizsgáltuk (Plutella xylostella esetén harmadik lárvaalapotú lárvákat alkalmaztunk), amelyeket mesterséges tápon tartottunk, amely a BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B és BTS02652E törzsek egyikének spórakristály-keverékeivel vagy a BTS02618 protoxinnal vagy toxinnal volt összeállítva. A mesterségesen összeállított tápot Costar 24-mérőhelyes lemezek mérőhelyeire adagoltuk. A táp formaldehidet nem tartalmazott. 50 μl hígított mintát vittünk fel a táp felszínére, és lamináris légáramban megszáritottuk. Az LC₅₀ mérőeljárásokhoz a hígításokat PBS-BSA pufferben készítettük el, és 5 hígított mintát alkalmaztunk. Minden mérőhelyre két lárvát helyeztünk és 24 lárvát használtunk mintahígításokként. 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 elhalt A. ipsilon és S. littoralis lárvákat számoltuk. Az LC₅₀ és LC₉₅ értékeket (vagyis azokat a koncentrációkat, amelyek ahhoz szükségesek, hogy a vizsgált rovarok 50%-át, illetve 95%-át elpusztítsa) a spórakristályok száma (cm²-ben kifejezve vagy ng (protoxin)/cm²-ben kifejezve). Probit analízis (Finney, 1971) segítségével értékeltük, az eredményeket az alábbiakban közöljük.

I. táblázat
Spodoptera littoralis

Kísérlet/törzs	LC ₅₀ ^a	LC ₉₅ ^a	FL _{min-max} ^b	Mercedekség
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 spórakristály/cm²

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

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

Tisztított BTS02618A protoxinnal végzett kísérletek azt mutatják, hogy ezen protoxin szignifikánsan toxikus az *S. littoralis* lárvákra.

Spodoptera exigua

II. 1. táblázat

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 spórakristály/cm²

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

^a *-gal jelölt értékek az LC₅₀ értékek 90%-os konfidenciahatára

^c jelentése: WO 90/06999 számú 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	FL _{min-max} ^b	Merekség
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 konfidenciahatára.

Mamestra brassica

III. 1. táblázat

1. kristály/spóra keverékek

Kísérlet/törzs	LC ₅₀ ^a	LC ₉₅ ^a	FL _{min-max} ^b	Merekség
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

III. 1. táblázat (folytatás)

Kísérlet/törzs	LC ₅₀ ^a	LC ₉₅ ^a	FL _{min-max} ^b	Merekség
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 spórákristály/cm²

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

III. 2. táblázat
Protoxin kísérletek

ICP		LC ₅₀ ^a	LC ₉₅ ^a	FL _{min-max} ^b	Merekség
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

Agrotis ipsilon

IV. 1a. táblázat

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 lárvaállapotú lárva száma (10⁷ spórákristály/cm²)

^b jelentése: az czekekben a törzsekben ismert módon jelenlévő gének

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

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

^e jelentése: a túlélő lárva súlyos növekedési gátlást mutatnak.

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			
BTS02618	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) leírták, hogy a CryIAC toxinnak bizonyos hatása van az *A. ipsilon*-ra szemben, megvizsgáltuk a tisztított

CryIAC toxin hatását ezekre a rovarokra, azonban az *A. ipsilon*-ra nézve szignifikáns mortalitást nem idézett elő.

Heliothis virescens

V. 1. táblázat

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 spórakristály/cm²

^b az LC₅₀ értékek 95%-os konfidenciahatára

^c WO 90/06999 számú PCT közzétételi irat

^d Dipel^R-ből (Abbott Lab., North Chicago, Ill., Amerikai Egyesült Államok) izolált törzs

V. 2. táblázat

2. Toxin/prototoxin kísérlet

ICP		LC ₅₀ ^a	LC ₉₅ ^a	FL _{min-max} ^b	Merekség
BTS02618A	Prototoxin	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

Ostrinia nubilalis

VI. 1. táblázat

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 spórakristály/cm²

^b az LC₅₀ értékek 95%-os konfidenciahatára

^c Dipel^R-ből (Abbott Lab.) izolált törzs

VI. 2. táblázat

2. Tisztított prototoxin kísérlet

ICP		100% halálozás ^a
CryIAb	Toxin	1350
CryIB	Toxin	1350
BTS02618A	Prototoxin	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* lárvákon 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 géntranszformált 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.

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 proteinek közül egyikre sem, és hatásosak legalább három *Spodoptera* faj ellen, és más Noctuidae családba tartozó rovarok ellen, mint például *A. ipsilon*, *M. brassica* és *H. virescens* ellen, valamint a *Pyralidae*, mint például *O. nubilalis* ellen, továbbá *Yponomeutidae*, mint például a *Pulella xylostella* ellen. Ezeket az eredményeket összegeztük és a más CryI gének esetén kapott eredményekkel (Van Frankenhuyzen, 1993) hasonlítottuk össze a VII. táblázatban. Az eredmények azt mutatják, hogy a rovarok milyen egyedülállóan széles köre érzékeny a BTS02618A proteinre.

3. példa

A bTS02618A gén azonosítása

A BTS02618A törzsben a bTS02618A gént a törzsben az AluI által emésztett teljes DNS Southern-blot analízisével határoztuk meg (1. számú ábra), hozzá DNS-próbaként az 1. azonosító számú szekvencia szerinti cryIG gén DNS-szekvenciáját alkalmazva (Gleave és társai, 1992), standard hibridizációs feltételek mellett. A bTS02618A gén részleges DNS-szekvenciáit – amelyek az 5' és a 3' végi szakaszokat is 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 génszekvenciája is meghatározható és izolálható. A bTS02618A gén transzlációs iniciációs kodonját meghatároztuk, és az a 2. azonosító számú szekvenciában a 195–197. nukleotidhelyzetben található, amely megfelel a 4. azonosító számú szekvencia 668–670. nukleotidhelyzeteinek. Megállapítottuk, hogy a transzlációs stopkodon a 3. azonosító számú szekvenciában a 1146–1148. nukleotidhelyzetekben található, amely megfelel a 4. azono-

sító 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 aminosavszekvenciát más ismert CryI proteinekkal összehasonlítva azt találtuk, hogy a C-terminális rész (az 5. konzervált szekvenciaszakasz C-terminális része) homológ a CryIG-vel (88%). Megállapítottuk, hogy az N-terminális résszel (a toxin) a legjobban a CryIB toxin homológ, ez azonban kevesebb volt, mint 50% (a homológiát úgy fejezzük ki, hogy a helyes bázispárosodások számát osztjuk az aminosavak számával a leghosszabb 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 (494 aminosav) triptikus fragmens a 4. azonosító számú szekvenciában a 165. aminosavtól a 658. aminosavig terjed, amelynek még inszekticid hatása van az *S. exigua*-val szemben, azonban ez a hatás már szignifikánsan kisebb. 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 szerint frakcionáltuk szacharózgradiensben, 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 tartalmazták, a 3. példában leírt és az 1. azonosító számú szekvencia szerinti cryIG DNS-próbával szkríneltük, hogy azonosítsuk azokat a klónokat, amelyek a bTS02618 gént tartalmazzák.

Az így azonosított DNS-fragmenseket ezután Maxam és Gilbert (1980) módszere szerint szekvenáltuk. A bTS02618A gén részleges szekvenciáit a 2., illetve 3. azonosító számú szekvenciában mutatjuk be, míg a 4. azonosító számú szekvenciában egy teljes bTS02618A gén szekvenciáját és BTS02618A protein szekvenciáját ismertetjük. A DNS-szekvencia analízise alapján a gént megfelelő restriktív enzimekkel hasítottuk, és ily módon a csonkolt bTS02618A gént kaptunk, amely a BTS02618A toxint kódolja. A gén *E. coli*-ban való kifejeződését standard módszerek segítségével váltottuk ki (Sambrook és társai 1989 lásd fent).

A bTS02618A gént szokásos rutinszerű módszerekkel egy kristályhiányos Bt törzsbe is beépítettük PGI2

vagy PGI3 Bt-plazmidok felhasználásával (Mahillon és Seurinck 1988; Mahillon és társai 1988).

5. példa

A bTS02618A gén és a csonkolt bTS02618A gén E. coliba való beépítése és a csonkolt bTS02618A gén bevitele növényekbe

Annak érdekében, hogy a bTS02618A gént és a 4. példa szerinti csonkolt bTS02618A gént *E. coliban*, illetve növényekben fejessük ki, különféle génkassetákat készítettünk *E. coliban* a 86/300291 és 88/402115.5 számú közzétett európai szabadalmi bejelentésekben ismertetett eljárások alkalmazásával.

A növényekben történő szignifikáns kifejeződés céljából olyan kassetákat, amelyek a) a csonka gént vagy b) egy hibrid gént, vagyis a csonka gén és a neogén fúzióját tartalmazzák,

köztes növényi expressziós vektorok T-DNS határszekvenciái közé visszük be (a 86/300291.1 számú európai szabadalmi bejelentésben ismertetett módon);

a növényi expressziós vektorokban lévő transzkriptum kialakításáért és poliadenilációért felelős jelekhez fuzionáljuk;

a karfiol mozaikvírusból származó, 35S3 transzkriptumot irányító konstitutív promoter (Hull és Howell, 1987) vagy az oktopin Ti-plazmid TR-DNS-éből származó 2' promoter (Velten és társai, 1984) szabályozása alá helyezzük;

és az oktopin szintáz gén 3' végi transzkriptum kialakításáért és poliadenilációért felelős szignáljaihoz

(Gielen és társai, 1984) fuzionáljuk. Standard eljárások alkalmazásával (Deplaere és társai, 1985) a köztes növényi vektorokat, amelyek a csonkolt bTS02618A gént tartalmazzák, bevisszük a C58C1Rif^R *Agrobacterium* törzsbe (821 582 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés; 86/300291.1 számú európai szabadalmi bejelentés), amely az ártalmatlanított Ti-plazmidot pGV2260 (Vaeck és társai, 1987) hordozza. A spektinomycin rezisztencia 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 gyapotnövényeket transzformáljunk velük azért, hogy a csonkolt bTS02618A gént a különböző 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 regeneráltuk) megjelenő *Lepidoptera* elleni rovarirtó hatását úgy határozzuk meg, hogy megállapítjuk az ilyen leveleken élő *Agrotis* és *Spodoptera* fajok lárváinak növekedési sebességét. A kapott eredményeket összehasonlítjuk a nem transzformált növények le-

velein élő lárvák növekedési sebességével. Az *Agrotis* és *Spodoptera* spp. elleni toxicitást ismert módon határozzuk meg (358 557 számú európai szabadalmi leírás, 821 582 számú amerikai egyesült államokbeli és 86/300 291.1 számú 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 a nem transzformált növények levelein éltek. Azt találtunk, hogy a transzformált növények a bTS02618A expressziójuk következtében az *Ostrinia nubilalis*, *Mamestra brassica*, *Heliothis virescens* és *Plutella xylostella* támadásával szemben is ellenállóak.

Nem szükséges hangsúlyozni, 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 magába foglalja a bTS02617A, bTS02618A, bTS02654B és bTS02652E törzsek bármely mutánsát vagy variánsát, amely lényegében azonos tulajdonságú kristályokat, kristályos proteineket, protoxinokat vagy toxinokat termel, különösképpen azokat, amelyek *Lepidoptera*-ellenes tulajdonságúak, azon belül *Noctuidae*-ellenes, *Yponomeutidae*- és *Pyralidae*-ellenes tulajdonságúak, különösképpen pedig *Spodoptera*-, *Plutella*-, *Ostrina*-, *Mamestra*-, *Heliothis*- és *Agrotis*-ellenes tulajdonságúak, mint a felelős 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 szekvencia szerinti nukleotidszekvenciához hibridizál, és jelenti továbbá bármely ekvivalens gént, amely azt a protoxint kódolja, amelynek lényegében azonos az aminosavszekvenciája és rovarirtó aktivitása, mint a bTS02618A protoxinnak, és amely előnyösen tartalmazza a 2. vagy 3. azonosító számú szekvenciában bemutatott részleges nukleotidszekvenciát vagy pedig a 4. azonosító számú szekvenciában bemutatott teljes szekvenciát.

A találmány szintén nem korlátozódik a csonkolt bTS02618A génnel transzformált gyapotnövényekre. A találmány bármely, a bTS02618A génnel vagy valamely azzal ekvivalens gén rovarirtó hatású részével transzformált növényre vonatkozik, mint amilyen a paradicsom, dohány, repce, lucerna, napraforgó, saláta, krumpli, kukorica, rizs, szójabab, káposztafélék, kukorépa és más hüvelyesek és zöldségfélék.

Ez a találmány ezen túlmenően 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 egyszikűek és kétszikűek ilyen génrészekkel való transzformálására használhatunk liposzómákat, 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 kitörlünk 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 növények transzformálására egy, a fentiekben leírt, találmány szerinti módosított kodonhasználattal rendelkező mesterséges BTS02618A gén vagy génrész használható 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 alkalmaznak 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 is 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*.

A cryI proteinek aktivitását összefoglalva különféle Lepidoptera típusú rovarkártevők esetében a VII. táblázatban mutatjuk be:

+ és – jelöli az inszekticid hatás jelenlétét vagy távollétét,

+/- jelöli az alacsony aktivitást (Van Frankenhuyzen, 1993 szerint),

NA jelöli, hogy nincs adat,

2618A jelöli a BTS02618A protein rövidítését (Van Frankenhuyzen (1993) adatai, illetve 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

Irodalmi hivatkozások

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).

Chassy, B. M., Mercenier, A. and Flickinger, J., Trends Biotechnol. 6, 303–309 (1988).

Datta S., Peterhans A., Datta K. and Potrykus I., Bio/Technology 8, 736–740 (1990).

50 Deblaere, R., Bijtebier, B. De Greve, H., Debock, F., Schell, J., Van Montagu, M. and Leemans, J., Nucleic Acids Research 13, 4777–4788 (1985).

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).

55 Finney, Probit Analysis, 3rd Edition, Cambridge University Press (1971).

60 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).
- 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* 9, 2871–2887 (1981).
- 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, M. and Schell, J., *EMBO J* 3, 835–845 (1984).
- 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).
- Gould J., Devey, M., Hasegawa, O., Ulian, E. C., Peterson, G. and Smith, R. H., *Plant Physiol.* 95, 426–434 (1991).
- 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).
- 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).
- Hull and Howell, *Virology* 86, 482–493 (1987).
- Lereclus, D., Vallade, M., Chaufaux, J., Arantes, O. & Rambaud, S., *Bio/Technology* 10, 418 (1992).
- MacIntosh, S. C. et al., *J. Invertebrate Patholog.* 56, 258–266 (1990).
- Mahillon, J. and Delcour, J., *J. Microbiol. Methods* 3, 69–73 (1984).
- Mahillon, J. and Seurinck, J., *Nucl. Acids Res.* 16, 11827–11828 (1988).
- Mahillon et al., *Plasmid* 19, 169–173 (1988).
- Mahillon et al., *FEMS Microbiol. Letters* 60, 205–210 (1989).
- Maxam, A. M. and Gilbert, W., *Methods in Enzymol.* 65, 499–560 (1980).
- Murray, E., Lotzer, J. and Eberle, M., *Nucleic Acids Research* 17(2), 477–498 (1989).
- 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).
- Stanssens, P., Opsomer, C., McKeown, Y., Kramer, W., Zabeau, M. and Fritz, H. J., *Nucleic Acids Research* 12, 4441–4454 (1989).
- Vaack, 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 Honee, 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).
- Yannisch–Perron, C., Vierra, J. and Messing, J., *Gene* 33, 103–119 (1985).

Szekvencialista

- (1) Általános tájékoztatás
- (i) Bejelentő
- (A) Név: Plant Genetic Systems N. V.
- (B) Utca: Plateastraat 22
- (C) Város: Gent
- (E) Ország: Belgium
- (F) Irányítószám: 9000
- (G) Telefon: 32 9 2358454
- (H) Telefax: 32 9 224 06 94
- (G) Telex: 11.361 Pgsen
- (ii) Találmány címe: Új *Bacillus thuringiensis* törzsek és inszekticid proteinjeik
- (iii) Szekvenciák száma: 4
- (iv) A számítógépen olvasható forma:
- (A) Hordozó típusa: Floppy lemez
- (B) Komputer: IMB PC kompatibilis
- (C) Működési rendszer: PC–DOS/MS–DOS
- (D) Software: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPO)

(2) Információk az 1. azonosító számú szekvenciához:

(i) Szekvenciajellemzők:

- (A) Szekvencia hossza: 19 nukleotid
 (B) Szekvencia típusa: nukleinsavpróba
 (C) Száltípus: egyszálú
 (D) Topológia: lineáris

(ii) Molekulatípus: szintetikus DNS

(ix) Jellemzők: A próba a Smulevitch és társai (1991) által leírt cryIG gén kódoló DNS szála

(x) Tulajdonságok: Ezt a mintát a bTS02618A gén izolálására használjuk olyan törzsből, amely azt tartalmazza.

(xi) A szekvencia leírása: 1. azonosító számú szekvencia: 5'-TTCTGTACTATTGATTGTA-3'

(3) Információk a 2. azonosító számú szekvenciához

(i) Szekvenciajellemzők:

- (A) Hossza: 1561 bázispár
 (B) Típus: nukleinsav
 (C) Száltípus: kétszálú
 (D) Topológia: lineáris

(ii) Molekulatípus: DNS (genomi)

(iii) Hipotetikus: nem

(iii) Antiszensz: nem

(vi) Eredeti forrás:

- (A) Szervezet: *Bacillus thuringiensis*
 (B) Törzs: BTS02618A

(ix) Jellemzők:

(A) Név/kulcs: Misc- jellemző

(D) Egyéb információ: funkció=„tartalmazza a bTS02618A gén translációs iniciációs kodonját”

(xi) Szekvencia leírása: 2. azonosító számú szekvencia:

AAAATTATCC AACATACATT TATCAAAAAG TAGATGCATC GGTGTTAAAG CCTTATACAC	60
GCTATAGACT AGATGGATTT GTGAAGNGTA GTCAAGATTT AGAAATTGAT CTCATCCACC	120
ATCATAAAGT CCATCTTGTA AAAAAATGTAC CAGATAATTT AGTATCTGAT ACTTACTCAG	180
ATGGTTCTTG CAGCGGAATC AACCGTTGTG ATGAACAGCA TCAGGTAGAT ATGCAGCTAG	240
ATGCGGAGCA TCATCCAATG GATTGCTGTG AAGCGCTCA AACACATGAG TTTTCTTCCT	300
ATATTAATAC AGGGGATCTA AATGCAAGTG TAGATCAGGG CATTGTTGGT GTATTA AAAAG	360
TTCGAACAAC 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
AAGCTTCAA TCTTGTAGAG TCAATTCGG GTGTATATAG TGATACACTA TTACAGATTC	660
CTGGGATTAA CTACGAAATT TACACAGAGT TATCCGATCG CTTACAACAA GCATCGTATC	720
TGTATACGTC TAGAAATGCG GTGCAAAAATG GAGACTTTAA CAGTGGTCTA GATAGTTGGA	780
ATACAACTAT GGATGCATCG GTTCAGCAAG ATGGCAATAT GCATTTCTTA GTTCTTTTCGC	840
ATTGGGATGC ACAAGTTTCC CAACAATTGA GAGTAAATCC GAATTGTAAG TATGTCTTAC	900
GTGTGACAGC AAGAAAAGTA GGAGGCGGAG ATGGATACGT CACAATCCGA GATGGCGCTC	960
ATCACCAGA AACTCTTACA TTTAATGCAT GTGACTACGA TGTAATGGT ACGTATGTCA	1020
ATGACAATTC GTATATAACA GAAGAAGTGG TATTCTACCC AGAGACAAA CATATGTGGG	1080
TAGAGGTGAG TGAATCCGAA GGTTTATTCT ATATAGACAG TATTGAGTTT ATTGAAACAC	1140
AAGAGTAGAA GAGGGGATC CTAACGTATA GCAACTATGA GAGGATACTC CGTACAAACA	1200
AAGATTA AAAAAGGTA AAAAAGGTA TGAATAGAAC CCCCTACTGG TAGAAGGACC GATAGGGGGT	1260
TCTTACATGA AAAAATGTAG CTGTTTACTA AGGTGTATAA AAAACAGCAT ATCTGATAGA	1320
AAAAAGTGAG TACCTTATAA AGAAAGAATT CCATTCACAG TTTCGGTATC ATATAAATAA	1380
TGATAGGGGT ATCCTTCTTA TTTACATTAT TTTTCGCAAT TATCTCGACG TTCTTCTTTC	1440
CGCTCACAAT GATGATGATC ATGACAACAA TCGCGTCCAT AGCGAACTCT TTCGATATTA	1500
ATAATATCTA AACTCGTGTA GCAGTCATT CCATTTTTTT TGATCCAGTA AATA	1554

(4) Információk a 3. azonosító számú szekvenciához:

(i) Szekvenciajellemzők:

- (A) Hossz: 1554 bázispár
 (B) Típus: nukleinsav
 (C) Száltípus: kétszálú
 (D) Topológia: lineáris

(ii) Molekulatípus: DNS (genomi)

(iii) Hipotetikus: nem

(iii) Antiszensz: nem

(vi) Eredeti forrás:

(A) Szervezet: *Barcillus thuringiensis*

(B) Törzs: BTS02618A

(ix) Jellemzők:

(A) Név/kulcs: misc- jellemző

(B) Elhelyezés: 1146...1148

(D) Egyéb információ: funkció=„a bTS02618A gén feltételezett translációs stopkodonja”

(xi) Szekvencia leírása 3. számú SEQ ID:

GAATTCGAGC	TCGGTACCTT	TTCAGTGTAT	CGTTTCCCTT	CCATCAGGTT	TTCAAATTGA		60									
AAAGCCGAAT	GATTTGAAAC	TTGTTTACGA	TGTAAGTCAT	TTGTCTATGA	CGAAAGATAC		120									
GTCTAAAAAA	CGTATTGAGA	TTGATGAATG	TGGACAAGTA	GAAATTGACT	TACAAGTATT		180									
AAAGATTAAG	GGTGTCTTTT	CTTTTATCGG	AAATTTCTCT	ATTGAACCTA	TTCTGTGTGA		240									
AAACATGTAT	ACAACGGTTG	ATAGAGATCC	GTCTATTTCC	TTAAGTTTCC	AAGATACGGT		300									
ATATGTGGAC	CATATTTTAA	AATATAGCGT	CCAACAATA	CCATATTATG	TAATTGATGG		360									
TGATCATATT	CAAGTACGTG	ATTTACAAAT	CAAACGTATG	AAAGAGAATC	CGCAATCTGC		420									
TCAAGTATCA	GGTTTGTTTT	GTTTGTATA	TGAGTAAGAA	CCGAAGGTTT	GTAAAAAAGA		480									
AATAGGAATA	AATACTATCC	ATTTTTCAT	GAAATATTTT	TTTATTAGAA	AGGAATCTTT		540									
CTTACACGGG	AAAATCCTAA	GATTGAGAGT	AAAGATATAT	ATATATAAAT	ACAATAAAGA		600									
GTTTGTGACG	ATTTTGTAAA	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	AGA	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	GCT	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	Ala	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		

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	GGG	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			

(2) Információk a 4. azonosító számú szekvenciához:

(i) Szekvencijellemzők:

(A) Hossz: 4344 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száلتípus: kétszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) Molekulatípus: DNS (genomi)

(iii) Hipotetikus: nem

(iii) Antiszensz: nem

(ix) Jellemzők:

(A) Név/kulcs: CDS

(B) Elhelyezés: 668...4141

(D) Egyéb információ: magába foglalja a teljes 2. azonosító számú szekvenciát: a 4. azonosító számú szekvencia 474–2034. nukleotidjai; magába foglalja továbbá a 3. azonosító számú szekvencia egy részét: a 4. azonosító számú szekvencia a 2994–4344. nukleotidjai; a 3. azonosító számú szekvenciában további nukleotidok is vannak, amelyek lefelé (3' irányba) helyezkednek el a 4. azonosító számú szekvenciában bemutatott szekvenciához képest (3. azonosító számú szekvencia 1352–1554. nukleotidjai)

(xi) Szekvencia leírása: 4. azonosító számú szekvencia:

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	GGT	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		
GGA	GGA	TGT	AGA	GAT	CTC	TAT	GAT	ACA	AAT	GAT	GAA	TTA	CCA	CCA	GAT	2053
Gly	Gly	Cys	Arg	Asp	Leu	Tyr	Asp	Thr	Asn	Asp	Glu	Leu	Pro	Pro	Asp	
			450					455					460			
GAA	AGT	ACC	GGA	AGT	TCA	ACC	CAT	AGA	CTA	TCT	CAT	GTT	ACC	TTT	TTT	2101
Glu	Ser	Thr	Gly	Ser	Ser	Thr	His	Arg	Leu	Ser	His	Val	Thr	Phe	Phe	
		465					470					475				
AGC	TTT	CAA	ACT	AAT	CAG	GCT	GGA	TCT	ATA	GCT	AAT	GCA	GGA	AGT	GTA	2149
Ser	Phe	Gln	Thr	Asn	Gln	Ala	Gly	Ser	Ile	Ala	Asn	Ala	Gly	Ser	Val	
	480				485						490					
CCT	ACT	TAT	GTT	TGG	ACC	CGT	CGT	GAT	GTG	GAC	CTT	AAT	AAT	ACG	ATT	2197
Pro	Thr	Tyr	Val	Trp	Thr	Arg	Arg	Asp	Val	Asp	Leu	Asn	Asn	Thr	Ile	
	495				500					505					510	
ACC	CCA	AAT	AGA	ATT	ACA	CAA	TTA	CCA	TTG	GTA	AAG	GCA	TCT	GCA	CCT	2245
Thr	Pro	Asn	Arg	Ile	Thr	Gln	Leu	Pro	Leu	Val	Lys	Ala	Ser	Ala	Pro	
				515					520					525		
GTT	TCG	GGT	ACT	ACG	GTC	TTA	AAA	GGT	CCA	GGA	TTT	ACA	GGA	GGG	GGT	2293
Val	Ser	Gly	Thr	Thr	Val	Leu	Lys	Gly	Pro	Gly	Phe	Thr	Gly	Gly	Gly	
			530					535					540			
ATA	CTC	CGA	AGA	ACA	ACT	AAT	GGC	ACA	TTT	GGA	ACG	TTA	AGA	GTA	ACG	2341
Ile	Leu	Arg	Arg	Thr	Thr	Asn	Gly	Thr	Phe	Gly	Thr	Leu	Arg	Val	Thr	
		545				550						555				
GTT	AAT	TCA	CCA	TTA	ACA	CAA	CAA	TAT	CGC	CTA	AGA	GTT	CGT	TTT	GCC	2389
Val	Asn	Ser	Pro	Leu	Thr	Gln	Gln	Tyr	Arg	Leu	Arg	Val	Arg	Phe	Ala	
	560					565					570					
TCA	ACA	GGA	AAT	TTC	AGT	ATA	AGG	GTA	CTC	CGT	GGA	GGG	GTT	TCT	ATC	2437
Ser	Thr	Gly	Asn	Phe	Ser	Ile	Arg	Val	Leu	Arg	Gly	Gly	Val	Ser	Ile	
	575				580					585					590	
GGT	GAT	GTT	AGA	TTA	GGG	AGC	ACA	ATG	AAC	AGA	GGG	CAG	GAA	CTA	ACT	2485
Gly	Asp	Val	Arg	Leu	Gly	Ser	Thr	Met	Asn	Arg	Gly	Gln	Glu	Leu	Thr	
				595					600						605	
TAC	GAA	TCC	TTT	TTC	ACA	AGA	GAG	TTT	ACT	ACT	ACT	GGT	CCG	TTC	AAT	2533
Tyr	Glu	Ser	Phe	Phe	Thr	Arg	Glu	Phe	Thr	Thr	Thr	Gly	Pro	Phe	Asn	
			610					615					620			
CCG	CCT	TTT	ACA	TTT	ACA	CAA	GCT	CAA	GAG	ATT	CTA	ACA	GTG	AAT	GCA	2581
Pro	Pro	Phe	Thr	Phe	Thr	Gln	Ala	Gln	Glu	Ile	Leu	Thr	Val	Asn	Ala	
		625					630						635			
GAA	GGT	GTT	AGC	ACC	GGT	GGT	GAA	TAT	TAT	ATA	GAT	AGA	ATT	GAA	ATT	2629
Glu	Gly	Val	Ser	Thr	Gly	Gly	Glu	Tyr	Tyr	Ile	Asp	Arg	Ile	Glu	Ile	
	640					645					650					
GTC	CCT	GTG	AAT	CCG	GCA	CGA	GAA	GCG	GAA	GAG	GAT	TTA	GAA	GCG	GCG	2677
Val	Pro	Val	Asn	Pro	Ala	Arg	Glu	Ala	Glu	Glu	Asp	Leu	Glu	Ala	Ala	
	655				660					665					670	
AAG	AAA	GCG	GTG	GCG	AGC	TTG	TTT	ACA	CGT	ACA	AGG	GAC	GGA	TTA	CAG	2725
Lys	Lys	Ala	Val	Ala	Ser	Leu	Phe	Thr	Arg	Thr	Arg	Asp	Gly	Leu	Gln	
				675					680					685		
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	GAT	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									
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	
					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	GTT	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		
GAT	AAT	GCG	AAA	TGG	AAT	GCA	GAG	CTA	GGA	AGA	AAA	CGT	GCA	GAA	ATA	3493
Asp	Asn	Ala	Lys	Trp	Asn	Ala	Glu	Leu	Gly	Arg	Lys	Arg	Ala	Glu	Ile	
			930						935					940		
GAT	CGT	GTG	TAT	TTA	GCT	GCG	AAA	CAA	GCA	ATT	AAT	CAT	CTG	TTT	GTA	3541
Asp	Arg	Val	Tyr	Leu	Ala	Ala	Lys	Gln	Ala	Ile	Asn	His	Leu	Phe	Val	
		945					950						955			
GAC	TAT	CAA	GAT	CAA	CAA	TTA	AAT	CCA	GAA	ATT	GGG	CTA	GCA	GAA	ATT	3589
Asp	Tyr	Gln	Asp	Gln	Gln	Leu	Asn	Pro	Glu	Ile	Gly	Leu	Ala	Glu	Ile	
	960					965						970				
AAT	GAA	GCT	TCA	AAT	CTT	GTA	GAG	TCA	ATT	TCG	GGT	GTA	TAT	AGT	GAT	3637
Asn	Glu	Ala	Ser	Asn	Leu	Val	Glu	Ser	Ile	Ser	Gly	Val	Tyr	Ser	Asp	
					980					985				990		
ACA	CTA	TTA	CAG	ATT	CCT	GGG	ATT	AAC	TAC	GAA	ATT	TAC	ACA	GAG	TTA	3685
Thr	Leu	Leu	Gln	Ile	Pro	Gly	Ile	Asn	Tyr	Glu	Ile	Tyr	Thr	Glu	Leu	
					1000					1005						
TCC	GAT	CGC	TTA	CAA	CAA	GCA	TCG	TAT	CTG	TAT	ACG	TCT	AGA	AAT	GCG	3733
Ser	Asp	Arg	Leu	Gln	Gln	Ala	Ser	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Ser	Arg	Asn	Ala	
			1010						1015					1020		
GTG	CAA	AAT	GGA	GAC	TTT	AAC	AGT	GGT	CTA	GAT	AGT	TGG	AAT	ACA	ACT	3781
Val	Gln	Asn	Gly	Asp	Phe	Asn	Ser	Gly	Leu	Asp	Ser	Trp	Asn	Thr	Thr	
		1025						1030					1035			
ATG	GAT	GCA	TCG	GTT	CAG	CAA	GAT	GGC	AAT	ATG	CAT	TTC	TTA	GTT	CTT	3829
Met	Asp	Ala	Ser	Val	Gln	Gln	Asp	Gly	Asn	Met	His	Phe	Leu	Val	Leu	
		1040				1045						1050				
TCG	CAT	TGG	GAT	GCA	CAA	GTT	TCC	CAA	CAA	TTG	AGA	GTA	AAT	CCG	AAT	3877
Ser	His	Trp	Asp	Ala	Gln	Val	Ser	Gln	Gln	Leu	Arg	Val	Asn	Pro	Asn	
					1055					1060					1065	
															1070	

TGT AAG TAT GTC TTA CGT GTG ACA GCA AGA AAA GTA GGA GGC GGA GAT	3925
Cys Lys Tyr val Leu Arg Val Thr Ala Arg Lys Val Gly Gly Gly Asp	
1075	1080
1085	
GGA TAC GTC ACA ATC CGA GAT GGC GCT CAT CAC CAA GAA ACT CTT ACA	3973
Gly Tyr Val Thr Ile Arg Asp Gly Ala His His Gln Glu Thr Leu Thr	
1090	1095
1100	
TTT AAT GCA TGT GAC TAC GAT GTA AAT GGT ACG TAT GTC AAT GAC AAT	4021
Phe Asn Ala Cys Asp Tyr Asp Val Asn Gly Thr Tyr Val Asn Asp Asn	
1105	1110
1115	
TCG TAT ATA ACA GAA GAA GTG GTA TTC TAC CCA GAG ACA AAA CAT ATG	4069
Ser Tyr Ile Thr Glu Glu Val Val Phe Tyr Pro Glu Thr Lys His Met	
1120	1125
1130	
TGG GTA GAG GTG AGT GAA TCC GAA GGT TCA TTC TAT ATA GAC AGT ATT	4117
Trp Val Glu Val Ser Glu Ser Glu Gly Ser Phe Tyr Ile Asp Ser Ile	
1135	1140
1145	1150
GAG TTT ATT GAA ACA CAA GAG TAGAAGAGGG GGATCCTAAC GTATAGCAAC	4168
Glu Phe Ile Glu Thr Gln Glu	
1155	
TATGAGAGGA TACTCCGTAC AAACAAAGAT TAAAAAAGG TAAAATGAAT AGAACCCCT	4228
ACTGGTAGAA GGACCGATAG GGGGTTCTTA CATGAAAAA TGTAGCTGTT TACTAAGGTG	4288
TATAAAAAAC AGCATATCTG ATAGAAAAA GTGAGTACCT TATAAAGAAA GAATTC	4344

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. *Bacillus thuringiensis* baktérium, *azzal jellemezve*, hogy a következők valamelyike:

a BTS02617A törzs, amelynek letéti száma BCCM-LMG P-12592, a BTS02618A törzs, amelynek letéti száma BCCM-LMG P-12593, a BTS02654B törzs, amelynek letéti száma BCCM-LMG P-12594, a BTS02652E törzs, amelynek letéti száma BCCM-LMG P-13493.

2. Rovarirtó hatású protein, *azzal jellemezve*, hogy aminosavszekvenciája tartalmazza a 4. azonosító számú szekvencia szerinti aminosavszekvencia 1-658. helyzetű aminosavaiból álló szekvenciát, a 4. azonosító számú szekvencia szerinti aminosavszekvencia 44-658. helyzetű aminosavaiból álló szekvenciát vagy a 4. azonosító számú szekvencia szerinti aminosavszekvencia 165-658. helyzetű aminosavaiból álló szekvenciát.

3. A 2. igénypont szerinti rovarirtó hatású protein, *azzal jellemezve*, hogy aminosavszekvenciája a 4. azonosító számú szekvencia szerinti aminosavszekvencia 1-1157. helyzetű aminosavaiból álló szekvenciát tartalmazza.

4. DNS, *azzal jellemezve*, hogy nukleotidszekvenciája a 2. vagy 3. igénypont bármelyike szerinti proteint kódolja.

5. A 4. igénypont szerinti DNS, *azzal jellemezve*, hogy nukleotidszekvenciája a 4. azonosító számú szekvencia szerinti nukleotidszekvencia 797-2641. helyzetű nukleotidjaiból álló nukleotidszekvenciát tartalmazza.

6. A 4. vagy 5. igénypont szerinti DNS, *azzal jellemezve*, hogy egy kiméra génben van jelen, amely kiméra gén egy olyan promotorszakaszt tartalmaz, amely ké-

25 pes a nevezett DNS-nek egy növényi sejtbe való átírására.

7. A 4-6. igénypontok bármelyike szerinti DNS, *azzal jellemezve*, hogy módosított kodonhasználatú DNS-t tartalmaz.

30 8. Rovarirtó készítmény Lepidoptera ellen, *azzal jellemezve*, hogy a készítmény hatóanyagként az 1. igénypont szerinti baktériumot, a 2. igénypont szerinti proteint és/vagy a 3. igénypont szerinti proteint tartalmazza.

35 9. Eljárás kártékony rovarok elleni védekezésre, *azzal jellemezve*, hogy a rovar az 1. igénypont szerinti baktériummal, a 2. vagy a 3. igénypont szerinti proteinnel és/vagy a 8. igénypont szerinti készítménnyel érintkeztetjük.

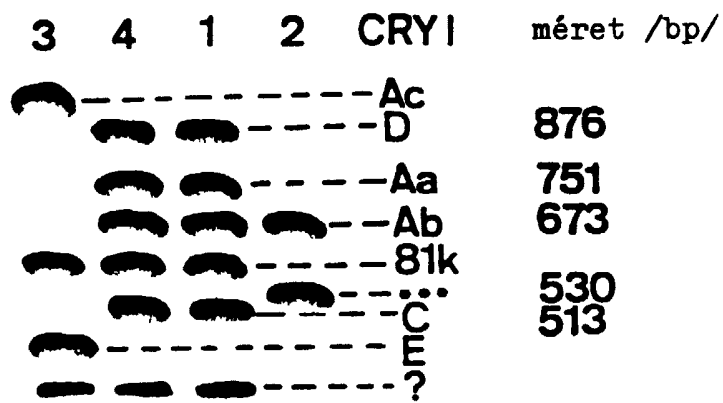
40 10. Transzformált növényi sejt, *azzal jellemezve*, hogy az említett növényi sejt genomja a 6. vagy 7. igénypont szerinti DNS-t tartalmazza.

11. Transzformált növény vagy növénymag, *azzal jellemezve*, hogy egy sejtjében vagy több sejtjében a 6. vagy 7. igénypont szerinti DNS-t tartalmazza.

45 12. A 11. igénypont szerinti növény vagy mag, *azzal jellemezve*, hogy a következők valamelyike: gyapot, kukorica, paradicsom, dohány, repce, lucerna, napraforgó, saláta, burgonya, rizs, szója, Brassica faj és kukorépa.

50 13. Eljárás kártékony rovarok, különösen pedig *Agrotis ipsilon*, *Spodoptera exigua*, *Spodoptera litoralis*, *Spodoptera frugiperda*, *Mamestra brassicae*, *Heliothis virescens*, *Ostrinia nubilalis* és *Plutella xylostella* elleni védekezésre, *azzal jellemezve*, hogy a rovar az 1.

55 igénypont szerinti baktériummal, a 2. vagy 3. igénypont szerinti proteinnel és/vagy a 8. igénypont szerinti készítménnyel érintkeztetjük.



1. ábra