

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patent numeris: **3807**

(51) Int.Cl.⁵: **A01N 63/00,**
C12N 15/33,
C12N 7/01

(21) Paraiškos numeris: **IP1581**

(22) Paraiškos padavimo data: **1993 12 10**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 06 26**

(45) Patent paskelbimo data: **1996 03 25**

(60) SU duomenys: **PCT/US 90/03758, 1990 06 29 SU 4894798, 1991 01 28**

(31,32,33) Prioritetas: **373952, 1989 06 29, US**

(72) Išradėjas:
Lois K. Miller, US
David R. O'Reilly, GB

(73) Patent savininkas:
UNIVERSITY OF GEORGIA RESEARCH FOUNDATION, INC., Boyd Graduate Research Center, Athens, Georgia 30602, US

(74) Patentinis patikėtinis:
Rita Laurinavičiūtė, 5, UAB "Metida", Pilies g. 8/1-2, 2600-MTP Vilnius, LT

(83) Mikroorganizmo deponavimas:
ATCC VR 2244, US

(54) Pavadinimas:
Medžiaga kovai su vabzdžiais, kovos su vabzdžiais būdas, insekticidinė kompozicija, rekombinantinė DNR molekulė, vabzdžio virusas, virusų gavimo būdai, baltymai

(57) Referatas:

Vabzdžių augimo ir vystymosi kontrolės agentas, kuriame yra genai, koduojantys baltymus, kurie įtakoja vabzdžių augimą, vystymąsi ir elgesį. Genas arba aktyvuojamas, norint užkirsti kelią vabzdžių nėrimuisi ir vėrimui lėlyte, arba inaktyvuojamas, norint kad sumažėtų vabzdžių mityba ir augimas, o to pasekoje vabzdys-kenkėjas greičiau žūva. Tokio vabzdžių augimo ir vystymosi regulatoriaus pavyzdys yra bakulevirusas, kuriame inaktyvuotas

Siūlomas išradimas susijęs su vabzdžių-kenkėjų pagerintos biologinės kontrolės būdais ir kompozicijomis. Imant siauriau, šis išradimas susijęs su lazdelės pavidalo geno ir šio geno produkto, kuris yra efektyvus reguliuojant vabzdžių augimą ir vystymąsi, panaudojimu. Šis išradimas taip pat susijęs su genetiškai pakeistu lazdelės pavidalo virusu ir kitais vabzdžių kontrolės agentais, kurie nepalankiai paveikia infekuotų vabzdžių-kenkėjų vystymąsi.

10

Išradimo prielaidos

Susidomėjimą vabzdžių-kenkėjų biologine kontrole apsprendžia tradicinių cheminių pesticidų trūkumai. Paprastai cheminiai pesticidai paveikia ir naudingas ir nenaudingas rūšis. Yra tendencija, kad vabzdžiai-kenkėjai įgyja atsparumą panašioms chemikalams, tuo būdu greitai gali išsivystyti atsparių tokiems pesticidams vabzdžių populiacija. Dar daugiau, cheminių medžiagų liekanos kenkia aplinkai ir potencialiai žmonių sveikatai. Biologinė kontrolė yra alternatyvus vabzdžių kontrolės būdas, leidžiantis sumažinti priklausomybę nuo cheminių pesticidų.

Pagrindinė biologinės kontrolės strategija apima panaudojimą gamtoje sutinkamų organizmų, kurie yra patogeniški vabzdžiams (entomopatogenai), ir auginimą kultūrų, atsparesnių vabzdžiams-kenkėjams. Šio išradimo sprendimo traktavimas apima identifikavimą ir charakterizavimą vabzdžių genų ir genų produktų, kurie gali tarnauti tinkama baze vabzdžių kontrolės agentams, identifikavimą ir eksploatavimą anksčiau nenaudotų mikroorganizmų (prie to taip pat priklauso gamtoje egzistuojančių nepatogeninių mikroorganizmų modifikavimas, norint paversti juos patogeniniais vabzdžių atžvilgiu), šiuo metu naudojamų entomopatogenų modifikavimą ir pagerinimą, o taip pat sukūrimą genų inžinerijos meto-

dais kultūrų, kurios yra atsparesnės vabzdžiams-kenkėjams.

Eutomopatogenams, pasiūlytiems kaip biologiniai pesticidai, priklauso virusai, sukeliantys natūralias epizotijas vabzdžių populiacijose. Lazdelių pavidalo virusai (bakulevirusai) sudaro didelę grupę virusų, infekuojančių tik nariuotakojus vabzdžius (Miller Z.K. /1981/, Genetic Engineering in the Plant Sciences, N. Panopoulous (ed) Praeger Publ., New York, pp. 203-224; Carstens (1980) Trends in Biochemical Science 52: 107-110; Harrapf Payne (1979) Advances in Virus Research. Vol. 25, Zawber et al., (eds) Academic Press N.Y. pp. 273-355). Daugelis bakulevirusų infekuoja vabzdžius, kurie yra pramonei svarbių žemės ūkio ir miškų kultūrų kenkėjai. Tokie bakulevirusai yra potencialiai vertingi biologinės kontrolės agentai (JAV gamtos apsaugos agentūra. U.S. Environment Protection Agency), kaip insektidų panaudojimui, užregistravo keturis lazdelių pavidalo virusus. Vienas iš bakulevirusų, kaip biologinių pesticidų, privalumų yra jų specifiškumas vabzdžio-šeimininko atžvilgiu. Ne tik bakulevirusai, kaip grupė, infekuoja tik nariuotakojus, tačiau taip pat ir individualus lazdelės pavidalo viruso štamas infekuoja tik vieną ar kelias vabzdžių rūšis. Tuo būdu jie nėra pavojingi nei aplinkai, nei žmogui, ir gali būti naudojami, nekenkiant naudingų rūšių vabzdžiams.

Bakulevirusų grupė apima branduolinės poliedrozės virusų (BPV), branduolinės granuliozės virusų (GV) ir lazdelės formų virusų, nesudarančių įsiterpimo kūnų, po grupius. Lazdelės formos virusų okliuduojančiose formose virjonai (apgaubti apvalkalu nukleokapsidai) yra kristalinės baltyminės matricos viduje. Tokia struktūra, taip vadinamas įsiterpimo kūnas arba "įtaškytas" kūnas - tai viruso radimo gamtoje forma, kuri sąlygoja infekcijos perdavimą organizmui nuo organizmo. Išskir-

tinis BPV virusų bruožas yra tai, kad kiekviename įsiterpimo kūne yra daug virjonų. BPV-virusų įsiterpimo kūnai yra santykiniai dideli (iki 5 mikrometrų). GV-virusų įsiterpimo kūnai yra mažesni ir turi po vieną virjoną. Abiejų formų įsiterpimo kūnų kristalinė baltyminė matrica daugiausia yra sudaryta iš vieno polipeptido nuo 25000 iki 33000 daltonų, vadinamo poliedrinu arba granulinu. Neokliuduojančių formų lazdelės pavidalo virusai negamina poliedrino arba granulino baltymus ir nesudaro įsiterpimo kūnų.

Gamtoje infekcija inicijuojama, kai vabzdys ryja lazdelių pavidalo virusais užterštą maistą, dažniausiai įsiterpimo kūnų pavidale. Vabzdžio vidurinio žarnyno šarminėje terpėje įsiterpimo kūnai disocijuoja, išskirdami atskiras virusines daleles, kurios po to patenka į žarnyno sienelės dengiančias epitelines ląsteles. Ląstelės šeimininko viduje lazdelės pavidalo virusas migruoja į branduolį, kur įvyksta replikacija. Pradžioje infekuotoje ląstelėje taip vadinamų "ankstyvųjų genų" sintezuojami kai kurie specifiniai virusiniai baltymai transkripcijos ir transliacijos būdu. Be kitų funkcijų, šie baltymai yra būtini virusinės DNR replikacijai, kuri prasideda po 4-6 valandų po viruso patekimo į ląstelę. Virusinės DNR intensyvi replikacija tęsiasi maždaug 12 valandų po užsikrėtimo (post infektion=pi). Maždaug po 8-10 valandų pi infekuota ląstelė pagamina didelius kiekius taip vadinamų "vėlyvųjų virusinių genų produktų". Jiems priklauso nukleokapsido, supančio virusinę DNR dukterinių virusinių dalelių susidarymo proceso metu, komponentai. Dukterinės virusinės dalelės pradeda susidaryti maždaug po 12 valandų pi. Pradžioje dukteriniai virusai migruoja prie ląstelės membranos, kur, išėję į ląstelės paviršių, įgyja apvalkalą. Tokios rūšies neokliuduotas virusas po to gali infekuoti kitas vabzdžio-šeimininko ląsteles. Poliedrino sintezė prasideda po 12-18 valandų po užsikrėtimo ir po 24 valandų

pi ji pasiekia labai aukštą lygį. Tuo metu stebimas iš
ląstelės išėjusių virusinių dalelių skaičiaus suma-
žėjimas, o po to dukterinis virusas sudaro įsiterpimo
kūnus. Įsiterpimo kūnų susidarymas tęsiasi iki ląstelės
5 mirties arba dalinimosi. Kai kurie lazdelės pavidalo
virusai infekuoja visus vabzdžio-šeimininko audinius,
tuo būdu, pasibaigus infekcijos vystymosi procesui,
visas vabzdys pavirsta skysčiu, išsiskiriant dideliu
įsiterpimo kūnų kiekiui, kurie perneša infekciją ki-
10 tiems individams. (Apžvalga pateikta The Biology of
Baculeviruses, vol. I and II, Granados and Federici
(eds), CRS Press, Boca Raton, Florida, 1986).

Vienas iš esminių lazdelės formos virusų, kaip pesti-
15 cidų, panaudojimo trūkumų yra ilgas laiko tarpas mo-
mento, kai vabzdys įryja virusą, ir kai miršta. Tuo
metu kenkėjas maitinasi ir kankia derliui. Kadangi
mažai įtikėtina, kai šeimininkas bers pesticidus iki to
momento, kad užkrėtimas nepasidarys akivaizdžiai ma-
20 tomu, tai pagrindiniu dalyku turėtų būti vabzdžio mai-
tinimosi laiko sumažinimas iki minimumo.

Jei ko reikia, tai biolaginio pesticido, kuris su-
mažintų vabzdžio maitinimosi apimtį iki jo mirties.
25 Pirmenybę turi biologinis pesticidas, kadangi aplinkai
jis yra mažiau kenksmingas už cheminį. Taip pat pa-
geidautina, kad vabzdys mirtų greičiau. Geno (genų) pa-
naudojimas, kurie koduoja baltymo (baltymų), kontro-
liuojančių vabzdžių vystymąsi, susidarymą, ir jų įvedi-
30 mas į įvairius organizmus leis pagerinti biologinę
vabzdžių-kenkėjų kontrolę.

Išradimo esmė

35 Šis išradimas apibūdina lazdelės pavidalo viruso geną
ir šio geno produktą, įtakojantį vabzdžių augimą,
vystymąsi ir elgesį. Šis išradimas užtikrina šio geno

ir jo produkto panaudojimo būdus, o taip pat šio geno arba jo produkto inaktyvavimo būdus, norint kontroliuoti vabzdžius. Pirmenybę turinčiame realizavimo variante egt genas koduoja viruso AcMNPV ekdistteroid-UDP-gliukozil-transferazę (EGT). Lazdelės pavidalo virusų egt geno ekspresija iššaukia EGT susidarymą, kuri inaktyvuoja hormonus, sąlygojančius vabzdžių nėrimą, tuo būdu užkirsdama kelią nėrimuisi arba lervos vystimui lėlyte. Lazdelės pavidalo virusų egt geno inaktyvavimas leidžia normaliai vykti nėrimuisi ir lervos vystimui lėlyte.

Siūlomas išradimas apima visą eilę vabzdžių kontrolės agentų, panaudojant egt genus ir šių genų funkcionavimo produktus. Šio išradimo vabzdžių kontrolės agentai vabzdžiui kenkėjui iššaukia arba netinkamą EGT baltymo sintezę, arba slopina normalų EGT baltymo funkcionavimą arba pasireiškimą, tuo būdu sutrikdomas normalus vabzdžio vyatymasis.

Tinkamiausia, kad organizmas, turintis egt geną, būtų specifinis tai vabzdžių rūšiai virusas, ir kad viruso egt genas būtų inaktyvuotas, o tai leistų ilgiau vystytis šiuo virusu infekuotam vabzdžiui-šeimininkui. Vabzdžio šeimininko vystymasis susijęs su tokiu jo elgesio pakitimu, kaip mitybos sumažėjimas, ir užsikrėtus virusiniu pesticidu, sulėtėja vabzdžio augimas ir jis greičiau miršta. Šis išradimas taip pat apima pagerinto virusinio pesticido gamybos būdą. Be to, šis išradimas apima vabzdžių kenkėjų kontrolės būdą, kurio esmė yra ta, kad vabzdys-kenkėjas yra paveikiamas pagerintu virusiniu pesticidu.

Šiuo išradimu siūlomi genetiškai pakeisti virusai yra efektyvesni pesticidai, lyginant su iki šiol naudotais virusais. Lazdelės pavidalo virusuose, tokiose kaip, pavyzdžiui, branduolinės poliedrozės virusas Autographa

californica (AcMNPV) arba branduolinės poliedrozės virusas Orgyia pseudotsugata (OpMNPV), natūraliai pasireiškia egt genas. Jo ekspresija prailgina laiko periodą, kurio metu infekuota lerva maitinasi, neka-

5 muojama virusinės infekcijos. Šis išradimas apima egt geno inaktyvavimą viruso genome, ir, pavyzdžiui, ne tik lazdelės pavidalu egt geną galima inaktyvuoti, įvedant į jo vietą arba į jį kitą geną, pavyzdžiui, geną-markerį, koduojantį β -galaktozidazės sintezę. Turėtų

10 būti aišku, kad egt geno pažeidimui gali būti naudojama bet kuri DNR seka, kadangi ji pažeidžia egt koduojančios sekos pasireiškimą. Priešingai, ištrinant atitinkamą koduojantį DNR segmentą, galima pašalinti iš genomo visas egt geno dalis, arba pašalinti ar pakeisti

15 reguliuojančią genomo dalį, kontroliuojančią egt geno ekspresiją. Lazdelės pavidalo virusai su ištrynimais, inaktyvuojančiais egt geną, taip pat gali būti gauti nuosekliai praleidžiant virusą per vabzdžio ląstelių kultūrą. Taip gauti virusai su ištrynimais turi šį

20 privalumą: juose nėra svetimos DNR ir jie skiriasi nuo laikinio tipo virusų tik funkcinio egt geno nebuvimu. Panašūs modifikuoti bakulevirusai, kaip kenkėjų kontrolės agentai, yra efektyvesni už tuos, kurie naudojami šiuo metu. Kaip paprasti mutantai su ištrynimais jie

25 turi būti taip pat priimtini reguliuojančioms žinyboms (pavyzdžiui, U.S. EPA) kaip pesticidai, gauti genų inžinerijos būdu, kadangi juose nėra nehomologinės DNR. Lazdelės pavidalo virusai, kuriuose nepasireiškia funkcinis egt genas, gali būti pakeisti įvedant besiskiriančius nuo egt genus, kurie gali įtakoti vabzdžio vystymąsi, tuo pačiu padidindami tokių virusų, kaip

30 vabzdžių kontrolės agentų, efektyvumą.

Šis išradimas taip pat apima vabzdžių-kenkėjų kontrolės

35 būdą, infekuojant vabzdžių lervas mutantiniu virusu, kuriame nėra intaktnio egt geno, arba jis nesugeba gaminti funkcinį EGT produktą. Lervos, infekuotos mu-

tantiniu virusu, stengiasi nertis ir virsti lėlyte, ir, reiškia, jų mitybos laikas sutrumpėja, lyginant su lervomis, infekuotomis laukinio tipo ar kitais šiuo metu žinomais virusais. Mutantiniu virusu užkrėstos lervos tip pat miršta greičiau, negu lervos, infekuotos laukinio tipo ar kitais šiuo metu naudojamais virusais.

Šio išradimo tikslas yra sukūrimas rekombinantinio viruso, kuris yra efektyvesnis, lyginant su laukinio tipo ar šiuo metu naudojamais virusais. Šio išradimo pavyzdys yra rekombinantinis virusas AcMNPV, žymimas kaip vEGTZ, kuriame dalis egt geno pašalinta ir pakeista bakteriniu genu lacZ, koduojančiu β -galaktozidazės susidarymą. Šios srities specialistams aišku, kad gali būti pakeista bet kuri DNR seka, inaktyvuojanti egt geną. Šio išradimo realizavimo pavyzdys taip pat yra rekombinantinis lazdelės pavidalo virusas, žymimas vEGTDEL, kuriame pašalinta dalis egt geno. Šio išradimo realizavimo pavyzdys yra pesticidas, pagamintas lazdelės pavidalo viruso, su pašalintu egt genu, pagrindu. Jiems taip pat priklauso lazdelės pavidalo virusai, kuriuose natūraliu būdu įvykusios mutacijos, įskaitant ištrynimą, sukėlė egt geno inaktyvavimą.

Šio išradimo tikslas yra, atitinkamai, egt genas ir šio geno pasireiškimo produktas, efektyviai veikiantys kontroliuojant vabzdžius kenkėjus. Šis išradimas taip pat žymiu mastu apima ekdistteroid-UDP-gliukozil-transferazę ir jai specifinius antikūnius. egt genas gali būti identifikuojamas pagal egt geno nukleotidų sekos homologiškumą, pateiktą 1 lentelėje, arba nustatant EGT germento aktyvumą ir po to atliekamą DNR analizę. Pagal čia pateiktas definicijas, egt genas yra bet kuri DNR grandinė, koduojanti ekdistteroid-UDP-gliukozil-transferazės susidarymą. egt geno aktyvumo produktas - baltymas gali būti išvalytas ir išbandytas žinomais būdais, aprašytais 4 pavyzdyje. Turima omenyje, kad egt balty-

- mas yra pakankamai švarus, jei jame yra ne mažiau kaip 70% (svorio) ekdistteroid-UDP-gliukozil-transferazės. Rekombinantinis egt baltymas, tai baltymas, kurį gamina bet koks organizmas, besiskiriantis nuo tokio, kuriame natūraliame pavidale yra šio baltymo sintezę koduojantis genas. Rekombinantinio geno pasireiškimas yra genų inžinerijos arba technikos rezultatas - DNR rekombinacija.
- 10 Dar vienas šio išradimo tikslas yra, panaudojus genų inžineriją, sukūrimas viruso, kuris būtų efektyviu pesticidu ir tuo pat metu būtų nežalingas aplinkai.
- 15 Šio išradimo tikslas taip pat yra rekombinantinis pesticidas, kuriame nebūtų funkcinio egt geno ir pasireikštų antras genas, įtakojantis vabzdžių vystymąsi, be to organizme šio antro geno natūraliu pavidalu nėra. Nurodytas antras genas koduoja metamorfozę įtakojančio produkto sintezę. Tokiu geno produktu gali būti vabzdžių hormonas, įtakojantis vabzdžio vystymąsi, arba fermentas, inaktyvuojantis metamorfozę reguliuojantį hormoną. Ypatingi pavyzdžiai yra protorakotropinis hormonas, išsilukštenimo hormonas ir juvenylinio hormono esterazė. Jei, norint gauti vabzdžių kontrolės agentą, 20 į vabzdžių virusą reikia įvesti baltymus koduojančius genus, tai šiame viruse neturi būti egt geno arba jis turi būti jame inaktyvuotas.
- 25 Dar vienas šio išradimo tikslas yra sukūrimas genetiškai pakeisto organizmo, skirto naudoti vabzdžių vystymosi kontrolės agentu, kuriame pasireiškia genų inžinerijos metodais įvestas egt genas, ir kuriame natūraliomis sąlygomis nebūtų egt geno ekspresijos. Tokie genetiškai pakeisti organizmai, kuriuose pasireiškia EGT, turėtų nepalankiai veikti vabzdžius-kenkėjus, o to pasekoje sumažėtų žemės ūkio kultūrų pa- 35 kenkimas.

Kitas šio išradimo tikslas yra sukūrimas insekticidinių kompozicijų, tinkamų naudoti žemės ūkyje. Kaip žinoma, į tokių kompozicijų sudėtį įeina ūkio prasme tinkamas nešėjas ir vabzdžių virusas, pavyzdžiui lazdelės pavidalo virusas, prieš tai genetiškai modifikuotas taip, kad nurodyto viruso egt genas yra inaktyvuotas. Po to tokiems egt bakulevirusams gali būti įvykdyti genetiniai pakitimai, iššaukiantys heteroroginio geno, kuris koduoja vabzdžių hormono, įtakojančio metamorfozei, arba fermento, inaktyvuojančio tokį įtakojančią metamorfozę vabzdžių hormoną, ekspresiją. Heterologiniams genams, kurių produktai įtakoja metamorfozę, priklauso, tačiau tuo neapsiribojama, protorakotropinis hormonas, išsilukštenimo hormonas ir juvenylinio hormono esterazė. Pirmenybę turinčioje realizavimo formoje insektidinės kompozicijos, turinčios genetiškai pakeistus lazdelės pavidalo virusus, yra skirtos išpurškimui.

Kaip insektidinės kompozicijos nagrinėjamos taip pat ir tokios, į kurių sudėtį įeina žemės ūkiui tinkamas nešėjas ir genetiškai pakeistas vabzdžių parazitas. Vabzdžių parazitas - tai organizmas, kuris gyvena ir dauginasi tarpriame tarpusavio ryšyje su vabzdžio lerva, o tai neigiamai atsiliepia lervai. Vabzdžių parazitų gali būti bakterija, grybelis, virusas arba kitas vabzdys. Tokio genetiškai pakeisto vabzdžių parazito, turinčio egt geną, veikimas vabzdžių kontrolės agentu stiprės dėl šio geno inaktyvacijos.

Bet kuri iš aukščiau minėtų insekticidinių kompozicijų taip pat gali turėti savo sudėtyje ingredientus, stimuliuojančius vabzdžių mitybą. Vabzdys-kenkėjas gali ryti šio išradimo insekticidines kompozicijas, užneštas ant augalų, ir vabzdžiai-kenkėjai, kurie yra jautrūs šios kompozicijos vabzdžių kontrolės agentui, pradės mažiau maitintis ir mirs.

Taip pat šio išradimo tikslas yra užtikrinti modifikuotą biologinį pesticidą, kuris inhibuoja egt geno arba šio geno funkcionavimo produkto pasireiškimą.

5 **Trumpas figūrų aprašymas**

1 figūra schematiškai vaizduoja genomą AcMNPV, parodanti egt geno lokalizaciją. AcMNPV genomą pateiktas sąlyginiais vienetais, o taip pat Eco RI ir Hind III restrikcijos kortos pavidalu.

2 figūroje schematiškai pateikti egt geno sekos tyrimų ir šios sekos analizės rezultatai. 2A figūroje pa-
vaizduota šios geno srities endonukleazinės restrikcijos korta. 2B fig. pateikti sekos kompiuterinės analizės rezultatai, ieškant atvirų nuskaitymo rėmelių. Vertikaliomis linijomis parodyti terminuojantys kodonai, kurie yra polipeptidinės grandinės sintezės sustabdymo signalai. Seka "transliuojama" vesose trijose potencialiai atidarytuose nuskaitymo rėmeliuose, kiekvienoje DNR gijoje (1, 2, 3, 1', 2', 3'). egt atitinkantis atviras nuskaitymo rėmelis (2) pažymėtas kaip EGT.

3 figūra schematiškai vaizduoja egt geno sričių struktūras viruse AcMNPV(A) ir rekombinantiniuose virusuose (B) ir vEGTDEL(C). Užštrichuotas stačiakampis yra lacZ genas.

4 figūroje schematiškai pateikti elektroforezė agarozės gelio ir dėmių analizė pagal Southern'y, kurios atliekamos lazdelės pavidalo OpMNPV egt geno identifikacijai.

6 figūra vaizduoja kontrolinių neinfekuotų lervų arba ketvirto amžiaus lervų, užkrėstų laukinio tipo virusais AcMNPV arba vEGTZ, svorio padidėjimo grafiką.

7 fig. pateiktas lervų, užkrėtus 4 amžiaus lervas laukinio tipo virusais AcMNPV arba vEGTZ, mirtingumo grafikas.

5 8 fig. yra svorio padidėjimo grafikas, infekavus 5 amžiaus lervas laukinio tipo AcMNPV virusais arba vEGTZ.

9 fig. pateiktas lervų, infekavus 5 amžiaus lervas laukinio tipo virusais AcMNPV arba vEGTZ, mirtingumo grafikas.

10 fig. pateiktas lervų, infekavus pirmo amžiaus lervas laukinio tipo virusais AcMNPV arba vEGTZ, kuriuose poliedrinių išsiterpimo kūnų (PIK) koncentracija yra 4,8 x 10 PIK/ml, mirtingumo grafikas.

11 fig. pateiktas lervų, infekavus pirmo amžiaus lervas laukinio tipo virusais AcMNPV arba vEGTZ, kuriuose PIK koncentracija yra 2,4 x 10 PIK/ml, mirtingumo grafikas.

Detalus išradimo realizavimo variantų aprašymas

Žvynasparniai vabzdžiai vystymosi nuo kiaušinėlio iki suaugusio individo procese keičiasi pagal gerai charakterizuotą virsmų seką (detalesnį aprašymą žr. Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Vols. 7 and 8, Kerkut and Gilbert (eds)., Pergamon Press, Oxford, 1984).

Po išėjimo iš kiaušinėlio pas vabzdžio lervą prasideda intensyvios mitybos periodas, kurio metu ji kelis kartus išsiners, o tai užtikrina jos nepertraukiamą augimą. Laiko tarpai tarp nuosekliai einančių nėrimų yra vadinami amžiaus (lervingumo) stadijomis. Pasibaigus augimo periodui, lerva virsta lėlyte ir galų gale pavirsta suaugusiu vabzdžiu. Nėrimosi ir vartimo lėlyte procesus (apibendrinančiai vadinamus metamorfoze) regu-

liuoja bendras kelių įvairių hormonų grupių veikimas. Pradinis stimulus yra tam tikrų smegenų ląstelių išskiriamas proktorakotropinis hormonas (PTTH). Tai stimuliuoja ekdistteroidų, kurie dažnai vadinami vabzdžių

5 nėrimosi hormonais, sekreciją grotorakalinėmis liaukomis. Esant juvenyliniam hormonui, yra garantuotas lervos nėrimasis, o jam nesant virs lėlyte. Išsilukštenimo hormonas taip pat yra svarbus kai kurių su metamorfoze susijusių elgsenos pakitimų realizavimui.

10

Lazdelės pavidalo virusas AcMNPV, naudojamas kaip modelinė sistema daugelyje lazdelių pavidalo virusų tyrimų, visai nelauktai išsikiša į aukščiau aprašytą vabzdžio vystymosi procesą. Infekuotos AcMNPV vabzdžių

15 lervos nebesugeba daugiau nerti ir virsti lėlyte, o tai susiję su tuo, kad AcMNPV valdo sintezę fermento, kuris žinomas kaip ekdistteroid-UDP-gliukozil-transferazė (EGT), ir kuris selektyviai inaktyvuoja vabzdžių ekdistteroidus.

20

Šio išradimo autoriai identifikavo EGT koduojantį geną AcMNPV genome jis tęsiasi nuo 8,4 iki 9,6 sąlyginių vienetų (1 ir 2 fig.). Kaip parodyta 1C fig., virusinės DNR fragmentai, supantys egt geną, buvo klonuoti į pUC 19,

25 Bluescript M13⁺ ir Bluescript M13⁻ plazmidus. 2 fig. parodyta egt genomo srities restrikcijos korta ir kompiuterinė analizė, norint nustatyti šioje srityje atvirų nuskaitymui rėmelių buvimą. Tik 2 rėmeles turi sąlyginai ilgą, atvirą nuskaitymui seką, kuri buvo identifiukuota kaip egt geno kodavimo sritis. 1 lentelėje

30 pateikta egt geno nukleotidų seka ir iš jos išvesta 506 aminorūgščių seka. egt geno koduojamoji seka tęsiasi maždaug nuo 149 iki 1670 nukleotido.

35

Nukleotidų seka ir AcMNPV viruso egt geno aminorūgščių pranašauta seka

1 lentelė

1	GTCGACGCGC	TTCTGCGTAT	AATTGCACAC	TAACATGTTG	CCCTTTGAAC
51	TTGACCTCGA	TTGTGTTAAT	TTTGCTAT	AAAAAGGTCA	CCCTTTAAAA
101	TTTGTTACAT	AATCAAATTA	CCAGTACAGT	TATTCGGTTT	GAAGCAAAAT
					egt: M
151	GACTATTCTC	TGCTGGCTTG	CACTGCTGTC	TACGCTTACT	GCTGTAAATG
	T I L	C W L A	L L S	T L T	A V N A
201	CGGCCAATAT	ATTGGCCGTG	TTTCCTACGC	CAGCTTACAG	CCACCATATA
	A N I	L A V	F P T P	A Y S	H H I
251	GTGTACAAAG	TGTATATTGA	AGCCCTTGCC	GAAAAATGTC	ACAACGTTAC
	V Y K V	Y I E	A L A	E K C H	N V T
301	GGTCGTCAAG	CCCAAACGTG	TTGCGTATTC	AACTAAAACT	TATTGCGGTA
	V V K	P K L F	A Y S	T K T	Y C G N
351	ATATCACGGA	AATTAATGCC	GACATGTCTG	TTGAGCAATA	CAAAAACTA
	I T E	I N A	D M S V	E Q Y	K K L
401	GTGGCGAATT	CGGCAATGTT	TAGAAAGCGC	GGAGTGGTGT	CCGATACAGA
	V A N S	A M F	R K R	G V V S	D T D
451	CACGGTAACC	GCCGCTAACT	ACCTAGGCTT	GATTGAAATG	TTCAAAGACC
	T V T	A A N Y	L G L	I E M	F K D Q
501	AGTTTGACAA	TATCAACGTG	CGCAATCTCA	TTGCCAACAA	CCAGACGTTT
	F D N	I N V	R N L I	A N N	Q T F
551	GATTTAGTCG	TCGTGGAAGC	GTTTGCCGAT	TATGCGTTGG	TGTTTGGTCA
	D L V V	V E A	F A D	Y A L V	F G H
601	CTTGTACGAT	CCGGCGCCCG	TAATTCAAAT	CGCGCCTGGC	TACGGTTTGG
	L Y D	P A P V	I Q I	A P G	Y G L A
651	CGGAAAACCTT	TGACACGGTC	GGCGCCGTGG	CGCGGCACCC	CGTCCACCAT
	E N F	D T V	G A V A	R H P	V H H

1 lentelė (tęsinys)

701	CCTAACATTT	GGCGCAGCAA	TTTCGACGAC	ACGGAGGCAA	ACGTGATGAC
	P N I W	R S N	F D D	T E A N	V M T
751	GGAAATGCGT	TTGTATAAAG	AATTTAAAAAT	TTTGGCCAAC	ATGTCCAACG
	E M R	L Y K E	F K I	L A N	M S N A
801	CGTTGCTCAA	ACAACAGTTT	GGACCCAACA	CACCGACAAT	TGAAAACTA
	L L K	Q Q F	G P N T	P T I	E K L
851	CGCAACAAGG	TGCAATTGCT	TTTGCTAAAC	CTGCATCCCA	TATTTGACAA
	R N K V	Q L L	L L N	L H P I	F D N
901	CAACCGACCC	GTGCCGCCCA	GCGTGCAGTA	TCTTGGCGGA	GGAATCCATC
	N R P	V P P S	V Q Y	L G G	G I H L
951	TTGTAAAGAG	CGCGCCGTTG	ACCAAATTAA	GTCCGGTCAT	CAACGCGCAA
	V K S	A P L	T K L S	P V I	N A Q
1001	ATGAACAAGT	CAAAAAGCGG	AACGATTTAC	GTAAGTTTTG	GGTCGAGCAT
	M N K S	K S G	T I Y	V S F G	S S I
1051	TGACACCAAA	TCGTTTGCAA	ACGAGTTTCT	TTACATGTTA	ATCAATACGT
	D T K	S F A N	E F L	Y M L	I N T F
1101	TCAAAACGTT	GGATAATTAC	ACCATATTAT	GGAAAATTGA	CGACGAAGTA
	K T L	D N Y	T I L W	K I D	D E V
1151	GTAAAAAACA	TAACGTTGCC	CGCCAACGTA	ATCACGCAAA	ATTGGTTTAA
	V K N I	T L P	A N V	I T Q N	W F N
1201	TCAACGCGCC	GTGCTGCGTC	ATAAAAAAAT	GGCGGCGTTT	ATTACGCAAG
	Q R A	V L R H	K K M	A A F	I T Q G
1251	GCGGACTACA	ATCGAGCGAC	GAGGCCTTGG	AAGCCGGGAT	ACCCATGGTG
	G L Q	S S D	E A L E	A G I	P M V
1301	TGTCTGCCCA	TGATGGGCGA	CCAGTTTTAC	CATGCGCACA	AATTACGCA
	C L P M	M G D	Q F Y	H A H K	L Q Q

1 lentelė (tęsinys)

1351	ACTCGGCGTA	GCCCGCGCCT	TGGACACTGT	TACCGTTTCC	AGCGATCAAC
	L G V	A R A L	D T V	T V S	S D Q L
1401	TACTAGTGGC	GATAAACGAC	GTGTTGTTTA	ACGCGCCTAC	CTACAAAAA
	L V A	I N D	V L F N	A P T	Y K K
1451	CACATGGCCG	AGTTATATGC	GCTCATCAAT	CATGATAAAG	CAACGTTTCC
	H M A E	L Y A	L I N	H D K A	T F P
1501	GCCTCTAGAT	AAAGCCATCA	AATTCACAGA	ACGCGTAATT	CGATATAGAC
	P L D	K A I K	F T E	R V I	R Y R H
1551	ATGACATCAG	TCGTCAATTG	TATTCATTAA	AAACAACAGC	TGCCAATGTA
	D I S	R Q L	Y S L K	T T A	A N V
1601	CCGTATTCAA	ATTACTACAT	GTATAAATCT	GTGTTTTCTA	TTGTAATGAA
	P Y S N	Y Y M	Y K S	V F S I	V M N
1651	TCACTTAACA	CACTTTTAAT	TACGTCAATA	AATGTTATTC	ACCATTATTT
	H L T	H F *			
1701	ACCTGGTTTT	TTTGAGAGGG	GCTTTGTGCG	ACTGCGCACT	TCCAGCCTTT
1751	ATAAACGCTC	ACCAACCAAA	GCAGGTCATT	ATTGTGCCAG	GACGTTCAAA

Pirmenybę turinčiame šio išradimo realizavime AcMNPV
5 bakuleviruso egt genas inaktyvuojamas, pakeičiant jo
dali bakterine seka, koduojančia β -galaktozidazes. Toks
rekombinantinis bakulevirusas žymimas vEGTZ. Antrame
pirmenybę turinčiame realizavimo variante, kaip parody-
ta 3 fig., viruso AcMNPV egt geno dalis pašalinama be
10 pakeitimo. Baltymų, sintezuojamų infekuojant laukinio
tipo AcMNPV ir vEGTZ, palyginimas parodė, kad EGT bal-
tymas yra peptidinė grandinė su 60 kDa molekuline mase,
išskiriama infekuotomis ląstelėmis. Vabzdžių viruso egt
geno inaktyvavimo alternatyvinis mechanizmas yra įter-
15 pimas geno, kuris koduoja hormono, įtakojančio metamor-
fozę, arba inaktyvuojančio toki hormoną fermento sin-

tezę, ir kuris pasireiškia nurodytu virusu infekuotoje vabzdžių ląstelėje.

5 Genų banko duomenų Bazės tyrimai parodė, kad nuo 21 iki 22% egt aminorūgščių sekos yra homologiška žinduolių UPD-gliukozil-transferazėms. egt aminorūgščių linijinės sekos ir kai kurių šių fermentų sugretinimas parodytas 2 lentelėje.

10 2 lentelė iliustruoja egt aminorūgščių linijinės sekos ir kitų biologinių rūšių UDP-gliukozil-transferazių sugretinimą. Pranašauta egt aminorūgščių seka lyginama su žmogaus (HUMVDPGAT) (Jackson et al. (1987) Biochem. J. 242:531), pelių (MVSVDPGAT) (Kimura and Owens (1987) Eur. J. Biochem. 163:515) ir žiurkių (RATVDPGAT) (Mackenzie (1987) J. Biol. Chem. 262:9744) UDP-gliukoronozil-transferazėmis ir su kukurūzų (ZMAYVDPGT) (Ralston et al. (1988) Genetics 119:185) UDP-gliukozil-transferaze, panaudojant FASTER algoritmą (Zipman and Pearson (1985), siūlomo International Biotechnologies.). Viršutinio registro raidės rodo tikslų sutapimą; apatinio registro raidės apibrėžia pakeitimus, kurie dažnai sutinkami tarp giminingų baltymų (Dayhoff, (1978)

25 2 lentelė

EGT	MTILCWLALLS-----TLTAVNAANILAVFPTPAYSHHIVYKVYIEALAEKCHNVTV
HUMUDPGAT	Msm....ALL.....fss.s,gkvL-V.PT-.fSH.m..K..ld.L.qr.HeVTV
MUSUDPGAT	M.....ALL.....f.sVk.gkvL-V.P-.fSH.m..Ki.ld.L.qr.HeVTV
RATUDPGAT	M.....ALf.....f.s.h.gkvL-V.P-.fSH.m..Ki.ld.L.qr.HeVTV
	↓
EGT	VKP-KLFAYSTKTYCGNITEI-NADMSVE-----QYKKLVANSAMFRKRGVVSDDTD
HUMUDPGAT	l.s...inf..ns.....Ev....lt.....-...KqLV...A-...kd.....s
MUSUDPGAT	lrP...y....K...G...E...t.vS.d.....K.v...t.-...Rd.....
RATUDPGAT	lKP...F....K...d...EI.st.iS.d.....K.L...t.-...Rd.....

2 lentelė (tęsinys)

EGT VTAANYLGLIEMFKDQF-DNINVRNLIANNQ--TFDLVVVEAFADYALVFGHLYDPA
HUMUDPGATf.dilr....D.vs.kkIm.k.Q...FDvVl.dAl..fg.llaeL...P
MUSUDPGAT l.....f.d.F.....D.vs.keLmtk.Q...FDvll.dpiA..g.liaeL.q.p
RATUDPGAT i.....f...y.....D.vs.kqLmtk.Q...FDvl..dpiA..g.liaeL.h.p

EGT PVI--QIAPGYGLAENFDTVGAVAR-HPVHHPNIW-RSNFDDTEANVMTEMRLYKEF
HUMUDPGAT .V...rfsPGYai..h.g.l...p...PV..sel..q..F.e...Nmi-.v-LY.EF
MUSUDPGAT .l...rfsPGY.i..s.g....p...PV..s.l..q..F.e...Nmi-.M-LY.dF
RATUDPGAT .l....fsPG..L..sig.....p...PV..s.l..k..F.D...Nmi-.M-LY.dF

EGT --KIL-ANMSNALLKQQFGPNTPTIEKLRNKVQLLLLNLHPIFDNNRPVPPSVQYL
HUMUDPGAT GGlH...a.PL.K....f-.Q.s..ng..vf-SlGS.v--n.seE...vi.sal..
MUSUDPGAT GGlH...a.PL.K....f-.Q.s...g..vf-SlGS.v--n.teE....i..al..
RATUDPGAT GGlH...a.PL.K....f-.Q.s...g..vf-SlGS.v--n.teE....L..al..
ZMAYUDPGT 285 qp..G..YVSFGT....rp...El...L.ds...

EGT LDNYTILWKIDDEVVKNITLPANVITQNWFNQRAVLRHKKMAAFITQGGQLQSSDEAL
HUMUDPGAT i.-..vLWrfDgn....l.L.t,l--.kWl.Q..lL.H.K..AFIThGG.ng...Ai
MUSUDPGAT i.-..vLWKfDg.....l...t.V--.kWl.Q..lL.H.K..AFhThGG.ng..Eai
RATUDPGAT i.-..vLWKfDg.....l...t.V--.kWl.Q..lL.H.K..AFvThGG.ng..Eai
ZMAYUDPGT L.....W.l....l...a..g..l...W..Q.AVLRH..vgAFvThaG..S..EgL

EGT EAGIPMVCLPMMGDQFYHAHKLQQLGVARALDTVTVSSDQLLVAINDVLFNAPTYKK
HUMUDPGAT .p.IPMV.vPl.aDQ..n...mk..G.A.sLD..TmSS.dLL.Alk.Vi-N.P.YK.
MUSUDPGAT ..GIPMi.iPl.GeQ..n...m...G.A.ALn..TmS..dvL.AleeVi-..P.YKK
RATUDPGAT ..GIPMi.iPl.GDQ..n...m...G.A.sLn..TmS..dfL.AleeVi-d.P.YKK
ZMAYUDPGT .sGvPM.C.P..GDQ..nAr.v.hvG.G.Afe.-amtS..v..AveelL.....rr



EGT HMAELYALINHDKATFPPLDKAIKFTERVIRYRHDISRQLYSLKTTAANVPYSNYM
HUMUDPGAT n...L-s.IhHDqp-..PLDrA-.F....v-.RH..akhL....-A.dl.---f.
MUSUDPGAT n...L-s.IhHDqp-..PLDrA-.F....v-.RH..akhL.pL---g.Nl.---f.
RATUDPGAT nv..L-s.IhHDqp-..PLDrA-.F....I-.RH..akhL.pL---g.NlP---Y.
ZMAYUDPGT ..AEL.ALv.e..g.....K.frF.E.V.R.

2 lentelė (tęsinys)

EGT YKSVFSIVMNLTHF*
HUMUDPGAT Y.S-l.v....La.....-.....*
MUSUDPGAT Y.S-l.vi...Ls.....*
RATUDPGAT Y.S-l.vi...LT.F.....*

Atlas of Protein Sequence and Structure, National
5 Biomedical Research Foundation, Vol. 5 Supplement 3,
Silver Spring, MD); taškai žymi retai sutinkamus pakei-
timus; brūkšnelis rodo praleidimą sekoje; tarpas
duodamas aminorūgščių pašalinimo iš sekos vietose.
vEGTZ ir vEGTDEL egt geno aminorūgštys tarpuose tarp
10 strėlyčių yra pašalintos. AcMNPV geno homologiškumas
žinomoms UDP-gliukozil-transferazei ir UDP-gliukorono-
zil-transferazei patvirtina identifikavimą šios AcMNPV
sekos, kaip koduojančios egt geno sekas.

15 Pas žinduolius UDP-gliukuronazil-transferazės katali-
zuoja gliukurono rūgšties pernešimą į visą eilę kaip
egzogeninių, taip ir endogeninių lipofilinių substratų
(žiūrėk apžvalgą Glucuronidation of Drugs and Other
Compounds, Dutton (ed), CRC Press, Boca Raton Florida,
20 1988). Ši prisijungimo reakcija atlieka esminį vaidmenį
detoksikacijoje ir saugiam tam tikrų vaistinių prepa-
ratų ir kancerogenų pašalinime. Be to per junginius su
gliukurono rūgštimi vyksta normalaus metabolizmo ir
įvairių endogeninių junginių, kaip bilirubinas ir ste-
25 roidiniai hormonai, paskirstymo procesai. Turimi duome-
nys apie vabzdžių sistemas rodo, kad panašios cukrų
prisijungimo reakcijos apima gliukozės, o ne gliukurono
rūgšties pernešimą (žiūrėk apžvalgą Smith (1977) Drug
Metabolism From Microbs to Man, Parke and Smith (eds),
30 Taylor and Francis LTD London, pp. 19-232). Kaip ir pas
žinduolius, taip ir pas vabzdžius panašiose prisi-
jungimo reakcijose dalyvauja įvairūs egzogeniniai ir
endogeniniai junginiai.

Šio išradimo autoriai parodė, kad AcMNPV viruso EGT baltymas yra UDP-gliukozil-transferazė, kuri selektyviai sujungia gliukozę su tokiais ekdistteroidais, kaip ekdizonas, 20-hidroksiekdizonas ir makisteronas A (žiūrėk 3 lentelę). Nei lizatai, nei neląstelinė neinfekuotų ląstelių arba infekuotų vEGTZ ląstelių terpe nemodifikuoja ekdizono. Didžioji dalis aktyvios ekdistteroid-gliukozil transferazės, gaminamos AcMNPV infekuotomis ląstelėmis, išsiskiria į tarpląstelinę terpę; santykinai žemas jos aktyvumo lygis yra stebimas AcMNPV infekuotų ląstelių lizatuose.

Panaudojant AcMNPV viruso egt geną kaip žymę, egt genas, kaip parodyta 4 fig., buvo identifiikuotas kitame lazdelės pavidalo viruse, ir būtent branduolinės poliedrozės viruse Orgyia pseudotsugata (OpMNPV). Specialistui turi būti suprantami pranašumai, kuriuos teikia šis atradimas, tai yra bet kurio lazdelės pavidalo viruso, vabzdžio ar vabzdžių viruso, egt genas gali būti lokalizuotas, charakterizuotas ir analogišku būdu išskirtas. egt genai, kurių nukleotidinė seka ne mažiau kaip 70% homologiška sekai, pateiktai 1 lentelėje, laikomi ekvivalentiški šiai sekai, su sąlyga, kad homologiški genai koduoja fermentą, kuris yra ekdistteroid-UDP-gliukozil-transferazė.

egt geno funkciniais ekvivalentais yra tokie ekvivalentai, kaip ekdizonas, kurie taip pat katalizuoja ekdistteroidų inaktyvaciją, pernešdami pusę gliukozės nuo UDP-gliukozės į ekdistteroidą (ekdistteroidus). Tokie funkciniai egt-ekvivalentai gali būti identifiukuoti čia aprašytais metodais.

Lokalizuoiant, identifiukuojant ir išskiriant egt geną, patyręs specialistas, pasinaudodamas šiuo išradimu ir žinomomis metodikomis, gali inaktyvuoti šį geną ir gau-

ti agentą, užtikrinantį vabzdžio vystymosi ir augimo efektyvesnę kontrolę.

5 Lygindami vEGTZ savybes su laukinio tipo (wt) AcMNPV, šio išradimo autoriai parodė, kad egt geno ekspresija užkerta kelią vabzdžio nėrimuisi ir virstimui lėlyte. Vabzdžiai, infekuoti wtAcMNPV, nesineria ir nevirsta lėlytėmis, tuo tarpu infekuotieji vEGTZ-neriasi ir stengiasi virsti lėlyte (žr. II pavyzdžio 4 lentelę).

10

Dėl nėrimosi ir virstimo lėlyte slopinimo, infekavimas laukinio tipo virusu AcMNPV iš tikro gali prailginti lervos mitybos periodą. Lervos, užkrėstos laukinio tipo virusu penktos amžiaus stadijos pradžioje (paskutinė
15 amžiaus stadija), maitinasi iki pat mirties, kuri įvyksta 5 arba 6 dieną po užkrėtimo. Tačiau neinfekuotos lervos, besiruošdamos virsti lėlyte, nustoja maitintis po 2-3 dienų, sulaukus penktos amžiaus stadijos (žiūrėk 8 fig.). Analogiškai efektai stebimi ir tiriant ankstesnių amžiaus stadijų lervas. Nėrimosi metu neinfekuotos
20 lervos nustoja maitintis maždaug 24 valandas, tuo tarpu wtAcMNPV užkrėstos lervos nesineria ir, atitinkamai, toliau maitinasi (žiūr. 6 fig.).

25 Rekombinantiniai lazdelės pavidalo virusai, neturintys funkcinio egt geno, neprailgina lervos mitybos periodo trukmę. Tuo būdu infekuotos lervos penktos amžiaus pradiniam periode, praėjus dviems dienoms po užkrėtimo, nustoja maitintis ir ruošiasi virstimui lėlyte
30 (žiūr. 8 fig.). Tačiau, kaip parodyta 9 fig., jos nevirsta lėlytėmis ir vietoje to miršta nuo virusinės infekcijos net greičiau, negu laukinio tipo virusu infekuotos lervos. Analogiškai lervos, infekuotos virusu ankstyvojoje ketvirtoje amžiaus stadijoje, nustoja maitintis praėjus dviem dienoms po užkrėtimo ir po to
35 miršta greičiau, negu infekuotosios laukinio tipo virusu (žiūrėk 6 ir 7 fig.). Tai, kad lazdelės pavidalo

virusas, neturintis funkcinio geno, užmuša vabzdžius greičiau, o tai aiškiai matyti, tada, kaip parodyta 10 ir 11 fig., kai AcMNPV ir vEGTZ virusais infekuojamos tik ką iš kiaušinėlių išsiritusios pirmos amžiaus sta-
5 dijos lervos. vEGTZ užkrėstos lervos nuo virusinės infekcijos miršta 3-4 dienomis anksčiau, lyginant su tomis, kurios buvo užkrėstos wtAcMNPV. Reiškia, rekombinantiniai lazdelės pavidalo virusai, neturintys funkcinio egt geno, yra žymiai efektyvesni kaip vabzdžių
10 kontrolės agentai, negu laukinio tipo lazdelės pavidalo virusai. Šios srities specialistams turėtų būti aki-vaizdūs privalumai šio išradimo, kurio esmė yra tame, kad egt genas bet kuriuo žinomu būdu gali būti pada-rytas nefunkciniu bet kuriame lazdelės pavidalo viruse
15 arba vabzdžių viruse.

Aukščiau ir žemiau esančiuose pavyzdžiuose aprašytas efektas laukuose bus dar stipresnis. vEGTZ infekuotos lervos turi sunkumų su nėrimusi, tačiau tai sėkmingai
20 realizuojasi tik kruopščiai kontroliuojamose laboratorinėse sąlygose. Nesant griežtai temperatūros ir apšvietimo kontrolei, daugelis lervų negali baigti nėrimosi. Tokie vabzdžiai napraveda vėl maitintis ir po to greitai miršta.

25 Nežiūrint į tai, kad kiek sutrumpėja laikas, per kurį viruso palikuonys gali kauptis lervyje, užkrėstoje lazdelės pavidalo virusu, neturinčiu funkcinio egt geno, ir sumažėja infekuoto vabzdžio mityba, yra pastebimas žymus dukterinio viruso gaminimasis. Virus
30 kiekis, skaičiuojant vienai lervai, gautas po vėlesnių amžiaus stadijų lervų užkrėtimo vEGTZ, sudaro maždaug pusę to, kas gaunama užkrėtus laukinio tipo virusu. To užtenka, kad būtų užtikrintas viruso pernešimas į lauką
35 ir efektyviai, kainos prasme, būtų gauti dideli virusinių dalelių kiekiai.

Kitame šio išradimo realizavimo variante vabzdžių virusą, kuriame nėra funkcinio egt geno, genų inžinerijos pagalba modifikuoja taip, kad jo, kaip biologinės kontrolės agento, efektyvumas išauga geno, kurio produktas
5 įtakoja vabzdžio vystymąsi, įvedimo sąskaita.

Genas, koduojantis PTH (peptidinis hormonas) gali būti įvestas į viruso, neturinčio egt geną, genomą, ir PTH ekspresija bus pakankamai aukšta, kad įtakotų nerimosi
10 procesus. Pas tokio tipo virusu infekuotas lervas yra aukščiausiu laipsniu pažeista vystymosi hormoninė kontrolė. Tokie vabzdžiai greitai suserga, o tai kenkia vystymuisi ir augimui, ir yra mitybos sumažėjimo ir mirties priežastimi.

15 Išsilukštenimo hormonas taip pat yra smulkus peptidinis hormonas, kurio genas, panaudojant žinomus metodus, gali būti įvestas į virusinį genomą su nefunkciniu egt genu. Ryšium su tuo, kad išsilukštenimo hormonas apsprendžia daugelį su metamorfoze susijusių elgsenos
20 pakitimų, vabzdys, užkrėstas Egt- virusu, gaminančiu šį hormoną užtektinai dideliais kiekiais, nenormaliai elgsis ir/arba vystysis, pavyzdžiui, mažiau maitinsis.

25 Vabzdyje pirminiu juvenylinio hormono aktyvumo reguliatoriumi yra fermentas esterazė, inaktyvuojantis juvenylinį hormoną. Rekombinantinis virusas, neturintis funkcinio egt geno ir gaminantis pakankamai aukštą juvenylinio hormono esterazės lygį, gali neigiamai įtakoti vabzdžio elgesį ir/arba vystymąsi.
30

Svarbu pažymėti, kad nors visi aukščiau paminėti genai gali būti įvesti į laukinio tipo virusų genomą, negalima laukti, kad šiuo atveju jie žymiu mastu įtakotų vabzdžio elgesį, kadangi egt geno ekspresija laukinio
35 tipo virusais inaktyvuoja ekdistteroidinius nerimosi hormonus ir tai kliudo, nežiūrint į kitų hormonų ga-

mybą, normaliai metamorfozės eigai. Tuo būdu sėkminga strategija turi apimti, kaip aprašyta šiame išradime, generavimą virusų metamorfozės eigos pakeitimui, priklausomai nuo prieš tai atlikto egt geno inaktyvavimo.

5

Specialistams aišku, kad šio išradimo vabzdžių kontrolės agentams priklauso mutantiniai organizmai, kuriuose nėra intaktnio egt geno, arba jis nesugeba gaminti funkcinį egt produktą, o taip pat taip genetiškai pakeisti organizmai, kad jie išskiria kitą fermentą arba peptidinį hormoną, kurie modifikuoja hormoną.

10

Kaip parodyta, egt geno produktas galingai ir specifiskai įtakoja vabzdžių vystymąsi. Ekdisteroidai vaidina lemiamą vaidmenį pagrindinai visų vabzdžių rūšių vystymesi (žr. apžvalgą Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Kerkut and Gilbert (eds) Pergamon Press, Oxford (1984). Tuo būdu egt genas siūlo plačias potencialias galimybes plataus masto vabzdžių kontrolės strategijai. Pavyzdžiui, ketvirtame pirmenybės turinčiame šio išradimo realizavimo variante, žemės ūkio kultūra, panaudojant žinomus metodus, yra taip genetiškai pakeičiama, kad ji žymiu mastu pradeda gaminti EGT baltymą. Ant tokios kultūros besimaitinantys vabzdžiai nesugebės baigti vystymąsi ir virsti suaugusiu individu, tuo būdu užtikrinama ilgalaikė žemės ūkio kultūros apsauga. Bakterijos, paprastai esančios ant augalo arba jo viduje, taip pat gali būti analogišku būdu pakeistos, panaudojant žinomus genų inžinerijos metodus, ir to pasekoje gaminti EGT fermentą. Tokios bakterijos taip pat gali aktyviai funkcionuoti kaip vabzdžių kontrolės biologiniai agentai.

15

20

25

30

35

Norint iššaukti egt geno ekspresiją, genetiškai gali būti pakeistos nefitopatogeninės besikolonizuojančios ant augalų bakterijos. Augalai su tokių genetiškai modifikuotų bakterijų kolonijomis bus apsaugoti nuo

vabzdžių-kenkėjų, jautrių išryškinamų baltymų (baltymo) poveikiui. Nefitopatogeninės bakterijos, sudarančios kolonijas ant augalų, yra aprašytos, pavyzdžiui, U.S. Patent Nr 4.798.723, o kai kurių ant augalų besikolonizuojančių bakterijų genetinis modifikavimas aprašytas U.S. Patent Nr 4. 771.131 ir EPO Publication Nr 0185005. Taip pat yra žinomos kitos ant augalų besikolonizuojančios bakterijos. Ekspresyvių genų įvedimui, tam kad būtų užtikrintas vabzdžių kontrolės sukūrimas, gali būti panaudoti visi metodai, panašūs aukščiau aprašytiems.

Vabzdžiams įrijus tokią genetiškai modifikuotą medžiagą arba augalinę medžiagą, kurioje yra tokių genetiškai modifikuotų bakterijų kolonijos, atsirastų normalaus vystymosi sutrikimai. Yra žinoma, kad kai kurie vabzdžiai, pavyzdžiui amarai, turi ypatingai pralaidų žarnyną. Prityrę specialistai supranta, kokios molekulinės-biologinės stadijos yra būtinos tokio augaluose pasireiškiančio geno sukonstravimui ir ką būtina atlikti, kad šį geną įvesti į augalo genomą.

Atrodo, jog yra įmanoma, kad tam tikrose gyvenimo ciklo stadijose pačiuose vabzdžiuose pasireiškia egt genas, ir kad jis yra svarbus vystymosi reguliavimo mechanizmo komponentas. Tuo būdu, matyt, vabzdžių egt genas pasirodys besąs tinkama naujos vabzdžių kontrolės strategijos priemone. Šis išradimas užtikrina būdą, leidžiantį tokios strategijos planavimą.

Papildomą šio išradimo realizavimo formą sudaro ekdiosteroidų analogai, kurie susijungia su EGT fermentu, tačiau jų atskilimas nuo fermento nėra įmanomas. Tokie "savižudybės substratai" sudarys konkurenciją prisijungimui prie EGT fermento ir slopins arba blokuos jo veikimą, tuo pačiu išsikišdami į vabzdžio vystymąsi. Priešingai, rekombinantiniai organizmai gali būti pa-

keisti genų inžinerijos metodais, pasinaudojant teiginiiais, aprašytais šiame išradime, tuo būdu vabzdžio egt geno ekspresija bus nuslopinta gaminantis, pavyzdžiui, anti-RNR.

5

Šiame išradime vabzdžių kontrolės agentas yra kompozicija arba aktyvus ingredientas kompozicijos, kuri nepalankiai veikia vabzdį kenkėją. Reakcija į vabzdžių kontrolės agentą yra mitybos sumažėjimas, pažeidžiama normali metamorfozė, ko pasekoje vabzdžio mirtis yra neišvengiama. Pagal šį išradimą vabzdžių kontrolės agentu gali būti vabzdžių virusas, genetiškai pakeistas norint inaktyvuoti geną, koduojantį fermento, apsprendžiančio ekdisteroido modifikaciją, sintezę, arba vabzdžių virusas su tolimesniais genetinėmis pakitimais, kurių rezultatas yra heterologinio geno, įtakojančio metamorfozę, ekspresija, arba tai gali būti augalas, vabzdžių parazitas arba nefitopatogeninė bakterija, be to bet kuriame iš šių organizmų, genų inžinerijos pasekoje, pasireiškia heterolitinis genas, koduojantis metamorfozę įtakojančio baltymo sintezę.

Insekticidinės kompozicijos, tinkamos užnešti ant augalų, norint kontroliuoti vabzdžius-kenkėjus, turi žemės ūkio atžvilgiu priimtina nešėją ir vabzdžių vystymąsi kontroliuojantį agentą. Šio išradimo insekticidinės kompozicijos užnešimas gali apsaugoti augalus nuo vabzdžių-kenkėjų, jų mitybos sumažėjimo ir jautrių vabzdžių nužudymo pasekoje.

30

Specialistai žino, koku būdu parinkti vabzdžių kontrolės agentą, pavyzdžiui, virusą, tinkamą atitinkamam vabzdžiui kenkėjui.

35

Specialistams aišku, kad vabzdžiai-kenkėjai gali būti paveikti šio išradimo kontroliuojančiu agentu, bet ku-

riuo tradiciniu būdu, įskaitant ryjimą, įkvėpimą ir tiesioginį kontaktą.

5 Kaip kontroliuojantys agentai gali būti naudojami taip pat augalai arba entomopatogeniniai mikroorganizmai su atitinkamais genetiniais pakitimais ir todėl gaminantys bent vieną baltymą, įtakojančią vabzdžių vystymąsi. Tokių baltymų pavyzdžiai apima, tačiau neapsiriboja, protorakotropinį hormoną, nėrimosi hormoną, juvenylinio
10 hormono esterazę ir ekdipon-gliukozil-transferazę.

Norint iššaukti egt geno ekspresiją, taip pat gali būti genetiškai pakeisti vabzdžių parazitai, įskaitant virusus, bakterijas, grybelius ir kitus vabzdžius. Tokių
15 parazitų parazitavimas ant atitinkamų vabzdžių iššauks, be simptomų, susijusių paprasčiausiai su nemodifikuotu buvimu, vabzdžio normalaus vystymosi pažeidimas. Infekuoto vabzdžio vystymosi pažeidimai sustiprins ligotumo būvį. Vabzdžio-kenkėjo infekavimo pasekoje sumažėja mityba ir greičiau įvyksta mirtis.
20

Genetiniam modifikavimui organizmo, kurio tikslas yra vabzdžių kontrolės agento gaminimas, gali būti panaudotos DNR sekos, koduojančios sintezę šiame išradime
25 aprašyto EGT-baltymo, kuris įtakoja vabzdžio vystymąsi ir kurio ekspresiją kontroliuoja tą organizmą atitinkantis promotoris. Tokie genetiniai pakitimai gali būti atlikti vabzdžių parazitams, augalams ir ant augalų besikolonizuojančioms nefitopatogeninėms bakterijoms.

30 Į šio išradimo sferą patenka egt genas, šio geno produktas, nukreipti prieš paskutiniąją antikūnų visi kiti reagentai, aukščiau išvardintų komponuotų dariniai arba su jais susiję. EGT baltymas gali būti žymiu mastu
35 išvalytas panaudojant čia aprašytus, o taip pat žinomus metodus.

Šiame išradime aprašyti lazdelės pavidalo virusai su genetiniais pakitimais pagrindinai naudojami kaip komponentai žemės ūkio kompozicijų, skirtų užnešimui ant augalų, tam kad būtų galima biologiškai kontroliuoti vabzdžius, kurie yra augalų kenkėjai. Yra žinomi įvairūs tokių vabzdžių kontrolės kompozicijų, priimtinių žemės ūkiui, gamybos būdai.

Kontroliuojančio agento koncentracija, reikalinga gavi-
mui efektyvių insekticidinių kompozicijų, naudojamų žemės ūkyje augalų apsaugai, priklauso nuo organizmo tipo, naudojamos mutacijos ir kompozicijos receptūros. Specialistui suprantama, kad efektyvias kontroliuojančio agento koncentracijų reikšmes kompozicijoje galima lengvai nustatyti eksperimentiškai. Pavyzdžiui, viruso koncentraciją, kuri jau pasižymi insekticidiniu efektu, lengvai galima nustatyti bet kuriuo iš būdų, pateiktų VI-XI pavyzdžiuose.

Žemės ūkio kompozicijos turi būti tinkamos naudoti žemės ūkyje ir gerai disperguotis lauke. Bendru atveju kompozicijos komponentai neturi būti fitotoksiški ir kenkti visai okliuduojančių virusų bendrijai. Užnešimas ant palų neturi kenkti lapams ir žaloti juos. Be atitinkamų kietų arba, o tai turi pirmenybę, skystų nešėjų, žemės ūkio kompozicijos gali turėti komponentus, kurie padidina lipnumą ir adheziją, emulgatorius ir drėkintojus, tačiau ne komponentus, kurie mažina vabzdžių mitybą arba viruso funkcionavimą. Gali būti pageidautina įvesti komponentus, apsaugančius kontroliuojantį agentą nuo inaktyvacijos ultravioletiniu spinduliavimu. Vabzdžių-kenkėjų kontrolės žemės ūkio kompozicijos taip pat gali turėti agentus, stimuliuojančius vabzdžių mitybą.

Yra apžvalgų, kuriuose aprašomi vabzdžių biologinės kontrolės agentų užnešimo ir jų naudojimo žemės ūkyje

būdai. Žiūrėk, pavyzdžiui, Couch and Ignoffo (1981) Microbial Control of Pests and Plant Disease, 1970-1980, Burges (ed) chapter 34, pp. 621-634; Carke and Rishbeth, ibid, chapter 39, pp. 717-732, Brockwell (1980) Methods for Evaluating Nitrogen Fixation, Bergsen (ed), pp. 417-488; Burton (1982) Biological Nitrogen Fixation Technology for Tropical Agriculture, Graham and Harris (eds) pp. 105-114; ir Roughley (1982) ibid, pp. 115-127, The Biology of Baculeviruses, vol. II supra.

10

Šis išradimas iliustruojamas žemiau pateiktais pavyzdžiais, į kuriuos jokių būdu negalima žiūrėti kaip į šio išradimo srities apribojimą. Aišku, kad specialistams gali atsirasti įvairūs konkretaus realizavimo variantai, išradimo modifikacijos ir ekvivalentai, neišeinantys iš šio išradimo idėjos ir/arba pridedamos išradimo apibrėžties ribų.

15

I pavyzdys

20

1 fig. parodyta egt geno padėtis AcMNPV genome, virš AcMNPV geno kortelės parodytas mastelis sąlyginiais vienetais. Norint nustatyti šio geno ir jam gretimų sričių nukleotidinę seką, o tai leistų po to atlikti genetines manipuliacijas, iš pradžių reikia klonuoti kai kuriuos DNR fragmentus, flankuojančius šią sritį, į plazmidžių vektorius (standartinės klonavimo metodikas žiūrėk: T. Maniatis et al. (1982) Molekular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N 4). 1 fig. A panelėje parodyta AcMNPV geno linijinė kortelė, po jo suskaidymo Eco RI ir Hind III restrikcinėmis endonukleazėmis. B panelėje padidintu masteliu parodyta geno sritis nuo 7,6 iki 11,1 sąlyginio vieneto, parodanti egt padėtį. Kaip pradinis AcMNPV buvo naudojamas štamai L1 (Lee and Miller (1978) J. Virol. 27:754). Klonuojami DNR fragmentai ir gautų plazmidžių pavadinimai parodyti 1 fig., C panelė.

30

35

1 fragmentas, užimantis stitį nuo PstI saito, esančio
7,6 s.v. taške, iki DamHI saito (11,1 s.v.), klonuo-
jamas į plazmidinį vektorių pUC19; abu fragmentai 2 ir
3 (atitinkamai nuo PstI (7,6 s.v.) iki EcoRI (8,65 s.v.)
5 ir nuo EcoRI (8,65 s.v.) iki SalI (10,5 s.v.) klo-
nuojami į vektorius Bluescript M13⁺ ir Bluescript M13⁻
(Stratagene, San Diego, Californija). 5 fragmentas
(esantis nuo BstEII (8,35 s.v.) iki BstEI (8,7 s.v.)
klonuojamas į Bluescript M13⁺.

10

Po to generuojasi daug BCPSE ir BGES plazmidų paklonių
(Henikoff (1984) Gene 28:251). Šie pakloniai besiskiria
nuosekliai didėjančiais virusinių intarpų ištrynimais,
tuo būdu jie turi skirtingus virusinės DNR kiekius, ku-
15 riems iki pilno virusinio fragmento trūksta iki 50 ba-
zinių elementų porų. Po to daugeliui tokių paklonių ir
BCB plazmidei yra atliekamas priauginimas (Sander et
al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463), tuo bū-
du abiejose kryptyse atstatoma pilno egt geno seka. Po
20 to gauta nukleotidinė seka yra analizuojama, nirint nu-
statyti nuskaitymui atvirus rėmelius, kurie gali koduo-
ti baltymus. Tam naudojamos kompiuterinės programos
Pustell and Kefatas (1984) Nucl. Acids Res. 12:643-655
ir Devereaux et al. (1984) Nucl. Acids Res. 12:387-396.
25 Tokia analizė rodo, kad egt genas koduoja baltymą, su-
sidedantį iš 506 aminorūgščių. egt geno nukleotidų seka
ir šio geno produkto pranašauta aminorūgščių seka pa-
teikta 1 lentelėje.

30

2 pavyzdys

35

Tam, kad sukonstruoti rekombinantinius virusus, nesu-
gebančius atlikti egt geno ekspresijos, reikia atlikti
tolimesnes manipuliacijas su 1 pavyzdyje aprašytais
plazmidžių klonais. pUCBCPsB plazmidą suskaido pasi-
naudojant EcoRI ir XbaI restriktuojančiomis endonukle-
azėmis (restrikcijos egt geno viduje saitus žr. 3 fig.)

ir atmeta mažą fragmentą. *lacZ* Escherichia coli genas, atskeltas nuo pSKS 104 (Casadabom et al. (1983) Methods Enzimol. 100:293-303), panaudojant EcoRI ir Aha III endonukleazes, po to, kai laisvi XbaI galai užpildomi T4 fago DNR-polimeraze, įsiterpia tarp saitų EcoRI ir XbaI. gauta plazmidė žymima PEGTZ.

Į šią plazmidę įterptas *lacZ* genas yra rėmelio ribose kartu su prieš tai buvusia koduojančia egt seka. Priešingai, pEGTDEL plazmidę konstruoja paprasčiausiai sujungiant EcoRI ir XbaI saitus (po to kai abu abiejų saitų galai užpildomi), neįstatant tarp jų jokios nukleotidinės sekos. Visi virusai yra štamo L-1 AcMNPV (Lee and Miller (1978) supra išvestinės, gryna linija gauta per ženklelius ir padauginta nusistovėjusioje ląstelių linijos kultūroje Spoclopetra frugiperda IPLB-SF2L (SF-ląstelės) (Vaughn et al. (1977) In vitro 13:213-217), naudojant aukščiau aprašytus metodus (Lee and Miller (1978); Miller et al., (1986) Genetic Engineering Principles and Methods, vol. 8 (eds. J.Setlow and A.Hollaender), Plenum Press, N.Y., 277-298, 1986).

Po to, pasinaudojant laukinio tipo AcMNPV DNR, pEGTZ plazmidė buvo perkelta į SF-ląsteles. Ši procedūra leidžia atlikti homologišką rekombinaciją tarp virusinės ir plazmidinės DNR sekų, to pasekoje viruso egt genas pakeičiamas plazmidės egt-*lacZ* genų jungtimi. Kadangi pasiliekanči egt koduojanti seka lieka rėmelyje kartu su *lacZ* sekomis, tai toks rekombinantinis virusas gamins jungtinį baltymą, kuris bus sudarytas iš 84 egt aminorūgščių, sujungtų su β -galaktozidaze. Rekombinantinį virusą žymimą cEGTZ, galima identifikuoti, kadangi β -galaktozidazės ekspresijos pasekoje susidaro žydros virusinės žymės, esant tokiam chromogeniniam indikatoriu, kaip 5-brom-4-chlor-3-indolin- β -D-galaktopiranozidas (X-gal). vEGTZ viruso egt geno diagrama pateikta 3 fig. B panelėje.

Rekombinantinis virusas vEGTDEL gaunamas pernešant pEGTDEL plazmidę ir DNR iš vEGTZ viruso į SF-ląsteles. Homologinės rekombinacijos pasekoje vEGTZ geninė jungtis egt-lacZ pakeičiama egt genu su pEGTDEL ištrynimu.

5 Rekombinantinis vEGTDEL virusas identifikuojamas pagal jo nesugebėjimą sudaryti žydras žymes, esant X-gal. vEGTDEL viruso egt geno struktūra parodyta 3 fig., C.

III pavyzdys

10

egt geno produktą identifikuoja lyginant baltymus, sintezuotus laukinio tipo AcMNPV virusu (kuris gamina EGT) ir sintezuojamus cEGTZ arba vEGTDEL virusais (kurie nesugeba gaminti EGT). SF-ląstelės infekuojamos arba

15 laukinio tipo AcMNPV, arba vEGTZ su gaugybe užkrėtimu (MO1)20, kaip tai aprašyta O'Reilli and Miller (1990) J. Virol. 64:1321-1328. Infekuotas ląsteles taip pat analizuoja. Praėjus 6 valandoms po užkrėtimo, ląsteles 1 valandą infekuoja, esant radioaktyviais ^{35}S izotopais žymėtam metioninui, tam, kad radioaktyvios žymės būtų įvestos į visus baltymus. Po to ląstelės lizuojamos ir baltymai atskiriami elektroforizuojant SDS-poliakrilamido gelyje (SDS-PAGE) (Laemmli et al. (1970) Nature 227:68-685). Visi ląstelių pagaminti baltymai

20 taip pat surenkami ir analizuojami. Po SDS-PAGE radioizotopais žymėti baltymai nustatomi, panaudojant autoradiografiją. Iš infekuotų wtAcMNPV ląstelių buvo išskirtas 60 kDa molekulinės masės baltymas, kas nebuvo gauta vEGTZ infekuotų arba neinfekuotų ląstelių atveju.

25 Šis baltymas nėra nustatomas lizatinėse ląstelėse, infekuotose laukinio tipo AcMNPV, o tai įrodo jo sekreciją ląstelėmis. Šie duomenys rodo, kad egt geno produktu yra sintezuojamas 60 kDa baltymas, o tai gerai derinasi su duomenimis apie nukleotidų ir aminorūgščių

30 seką.

35

IV pavyzdys

EGT baltymo fermentinį aktyvumą nustatinėjome lyginant SF-ląsteles, infekuotas wtAcMNPV arba vEGTZ. SF-ląstelės, infekuotos wtAcMNPV arba vEGTZ, aprašytos III pavyzdyje. Po 12 valandų "pi" ląstelės ir tarpląstelinė terpė buvo surenkami ir apdorojami atskirai. Lygia-grečiai buvo apdorojamos neinfekuotos ląstelės. Ląstelinių lizatų ir tarpląstelinę terpę inkubavome esant 1 mM UDP-gliukozės ir 0,25 $\mu\text{Ci}/^3\text{H}$ / ekdizono, kaip tai aprašyta pas O'Reilly and Miller (1989) Science 245:1110-1112.

Ekdisteroid-UDP-gliukozil-transferazės aktyvumas ląsteliniuose lizatuose ir tarpląsteliniame skystyje katalizuos gliukozės pernešimą nuo UDP-gliukozės į ekdizoną, susidarant ekdizono-gliukozės junginiui (konjugatui). Ekdizonas ir ekdizono-gliukozės junginys atskiriami plonasluoksnės chromatografijos ant silikagelio pagalba (Bausal and Gessner (1988) Anal. Biochem. 109-321) ir vizualizuojami autoradiografijos būdu. Ekdizono-gliukozės junginiai (b) susidaro tik testuojant AcMNPV infekuotus ląstelinius lizatus arba tarpląstelinį skystį. Junginiai nestebimi, jeigu naudojamos neinfekuotos arba vEGTZ infekuotos ląstelės arba tarpląstelinis skystis, o tai įrodo, kad aktyvumą apsprendžia egt ekspresija. Didžioji aktyvumo dalis yra susikaupusi tarpląstelinėje terpėje, o tai atitinka III pavyzdyje aptariamus duomenis. Gliukozės prisijungimo prie ekdizono įrodymą gauna testuojant wt-infekuotus lizatus aukščiau aprašytu būdu, išskyrus tai, kad UDP-gliukozę pakeičia radioaktyviais izotopais žymėta UDP/U- ^{14}C /gliukoze. Reakcijos, vykstančios dalyvaujant nežymėtai UDP-gliukozei arba žymėtai UDP/U- ^{14}C /gliukozei, abiejose reakcijose dalyvaujant ^3H /ekdizonui, ir susidarančių junginių scintiliacijų paskaičiavimas rodo, kad gali būti nustatytas ^3H iš ekdizono ir ^{14}C iš

gliukozės. Šie duomenys rodo, kad egt geno produktu yra UDP-gliukozil-transferazė, kuri yra gliukozės pernešimo nuo UDP-gliukozės į ekdizoną katalizatoriumi.

5 Toliau atliekami eksperimentai, norint detaliau išsi-
aiškinti EGT specifiškumą substratui. Šiuose eksperi-
mentuose buvo inkubuojami įvairūs substratai (1 mM),
esant tarpląstelinei terpei, gauti iš wtAcMNPV infe-
kuotų ląstelių, kuriuose buvo stebimas gana aukštas egt
10 aktyvumas. Norint įsitikinti, kad visus stebimus jun-
ginių susidarymo atvejus sąlygoja EGT, kiekvienas subs-
tratas taip pat buvo inkubuojamas su terpe, gauta iš
neinfekuotų arba infekuotų vEGTZ ląstelių, kurios
nesugeba gaminti EGT. Kiekvienu atveju reakcijoje daly-
15 vaudavo 0,05 μCi UDP/ U^{14}C -gliukozės. Visi junginiai,
kurie EGT atžvilgiu elgiasi kaip substratai, turi pri-
sijungti gliukozei; juos galima nustatyti, kadangi gliu-
kožė žymėta radioaktyviais izotopais.

20 3 lentelė

EGT specifiškumas substratui

Substratas	Perneštos gliukozės kontrolė	Perneštos gliukozės laukinis tipas
p-aminobenzoinė rūgštis	-	-
bilirubinas	-	-
chloramfenikopas	-	-
dietilstilbestrolas	-	-
ekdizonas	-	155,7
estradiolas	-	-
2o-hidroksiekdizonas	-	87,8
hidroksichinolinas	-	-

3 lentelė (tęsinys)

Substratas	Perneštos gliukozės kontrolė	Perneštos gliukozės laukinis tipas
makisteronas A	-	89,6
(-)-mentolas	-	-
metilumbeliferonas	-	-
α -naftolas	-	-
p-nitrofenolis	-	-
fenolftaleinas	-	-
testosteronas	-	-
α -tetralolas	-	-

5 Substratus inkubuoja esant terpei, gautai iš atitinkamu būdu infekuotų ląstelių ir 0,05 μCi UDP/U¹⁴C/-gliukozės. Perneštos gliukozės kiekis apskaičiuojamas iš scinciliacijų skaičiaus nuo atitinkamų chromatografinės plokštelės vietų.

10 Norint pademonstruoti, kad šiose reakcijose gliukurono rūgštis nėra pernešama, tolimesnei kontrolei UDP/U¹⁴C/-gliukurono rūgštis buvo įvedinėjama į reakcijų sistemas su terpėmis, gautomis ląstelių, infekuotų laukinio tipo virusu. Gauti rezultatai pateikti 3 lentelėje. Kaip
15 substratai buvo identifikuoti tik ekdizonas, 20-hidrok-siekdizonas ir makisteronas A, visi - ekdistteroidai. Terpėse, gautose iš neinfekuotų arba vEGTZ infekuotų ląstelių, konjugatai neaptikti, o tai patvirtina, kad stebimą aktyvumą apsprendžia egt ekspresija. Naudojant
20 UDP/U¹⁴C/-gliukurono rūgštį, konjugatai nestebimi, o tai rodo, kad gliukurono rūgštis nėra pernešama su EGT pagalba.

V pavyzdys

Tam, kad gauti taip pat ir kitų bakulevirusų genų, žymiu mastu homologiškų AcMNPV egt genui, buvimo įrodymą, buvo atskirta OpMNPV DNR ir atskirai paveikta restrikcinėmis endonukleazėmis EcoRI, BamHI ir hind III. Šie fermentai suskaldo virusinę DNR į kelis įvairaus dydžio segmentus, kurių padėtis OpMNPV genome jau yra žinoma (Leisy et al. (1984) J. Virol. 52:699).

Po to buvo atlikta hibridizacija pagal Southern'y, pagal būdą, aprašytą T. Maniatis et al. (1982) supra. Pasinaudojant fermentais EcoRI ir XbaI, iš plazmidės BGES buvo išpjautas AcMNPV egt geno vidinis segmentas (žr. 1 fig.). Šį fermentą pažymėjome radioaktyviu izotopu ^{32}P ir naudojome kaip bet kurių giminingų sekų OpMNPV genome nustatymo būdą. Aišku, kad atitinkamomis sąlygomis DNR fragmentas prisijungs kitą fragmentą, kurio sudėtyje yra analogiška arba identiška seka. Tuo būdu, ant neiloninės membranos vyksta AcMNPV egt geno-žymės prisijungimas prie bet kokio DNR OpMNPV fragmento, kuriame yra giminingos DNR sekos. Vietoje prijungimo, žymės galima vizualizuoti, panaudojant membranos ekspoziciją rentgeno spinduliais. Pradžioje vyksta egt-žymės hibridizacija su neilonine membrana švelniomis sąlygomis/1M natrio chloridas, 0,3M natrio citratas, 5% dekstrino sulfato, 5x Denhardt'o tirpalo, 0,25% SDS, esant 37°C/. Tai leidžia žymės hibridizaciją su sąlyginai tolimomis giminingomis sekomis. Po to palaipsniui griežtina hibridizacijos sąlygas, keliant hibridizacijos temperatūrą, arba į hibridizacijos tirpalą įvedant formamidą tol, kol neatsiras specifiniai hibridizaciniai ryšiai. Hibridizacija, parodyta 4 fig., vyksta šiomis sąlygomis: 1M natrio chloridas, 0,3M natrio citranas, 5% dekstrino sulfatas, 5x Denhardt'o tirpalo 0,25% SDS, temperatūra 68°C, trukmė 15val. Po to membraną du kartus praplauna, kiekvieną kartą po 15 minučių, 0,3M natrio chlorido, 0,1M natrio citrato ir

0,1% SDS tirpale, esant 68°C temperatūrai. 4 fig. parodoma, kad AcMNPV egt-žymė jungiasi prie tam tikrų OpMNPV DNR, ir būtent, prie EcoRI B fragmento, BamHI A fragmento ir prie Hind III ir S fragmentų. Pažymėtina, kad egt genas OpMNPV genome užima tą pačią sąlyginę vietą, kaip ir AcMNPV genas (5 fig.). Analogiškas raštas yra naudojamas egt-homologiškų genų identifikacijai kituose entomopatogenuose. Aišku, kad EGT aktyvumo patvirtinimui, esant stipriai besiskiriančioms sekoms, prireiks testavimo metodo, aprašyto IV pavyzdyje. Tada geno, koduojančio EGT fermentą, išskyrimui reikės molekulinės-genetinės analizės, kurios metodologija yra žinoma.

EGT geno radimui kituose organizmuose naudojamas, skirtingai nuo aukščiau aprašytojo, specifinis aktyvumo UDP-gliukozil-transferazei testavimo būdas, aprašytas IV pavyzdyje. Šis testas naudojamas enzimo nustatymui valymo standartiniais biocheminiais metodais procese. Po valymo standartiniais biocheminiais metodais, nustatoma EGT baltymo dalinė aminorūgščių seka. Gautą informaciją naudoja oligonukleotidinės žymės sukūrimui, su kurios pagalba po to nustato EGT geno padėtį genome.

VI pavyzdys

Ekdisteroido titras hemolimfoje keičiasi cikliška, reguliuodamas pasikeitimus ir lerva-lerva ir lervalelytė, ir kadangi daroma prielaida, kad gliukozės prisijungimas inaktyvuoja ekdist roidus (Warren et al. (1986) J.Liq. Chromatogr. 9:1759; Thompson et al. (1987) Arch. Insect Biochem. Physiol. 4:1; Thompson et al. (1988) Arch. Insect Biochem. Physiol. 7:157), tai yra įmanomas tarpusavio ryšys tarp vabzdžio normalaus vystymosi proceso pažeidimo ir infekavimo AcMNPV virusu su egt ekspresija. Vystymosi pažeidimą demonstruoja šiuo būdu: tik ką nusinėrusias ketvirto amžiaus

S. frugiperda lervas įpurškimo būdu infekavo wtAcMNPV ir vEGTZ virusais ir kasdien stebėjo jų įmanomus vystymosi pakitimus. Neigiamai kontrolei vienai grupei lervų įvedė audinių kultūros skystį. Eksperimento rezultatai pateikti 4 lentelėje, žiūrėk žemiau. Visos lervos, kurioms buvo įvesta audinių kultūra (netikras infekavimas), nusinebė, ir kaip buvo laukta, virto penkto amžiaus lervomis. Iš 16 lervų, infekuotų laukinio tipo virusu, panaši transformacija buvo pastebėta tik pas vieną lervą. Priešingai, visos lervos, infekuotos mutantiniu virusu vEGTZ, nusinebė iš ketvirtos į penktą amžiaus stadiją. Tuo būdu, wtAcMNPV viruso egt geno ekspresija aiškiai ir specifiškai slopina vabzdžio-šeimininko nėrimąsi. Po to abi infekuotos lervų grupės žuvo nuo virusinės infekcijos, kas įrodo, kad VEGTZ viruso egt funkcijos pažeidimas nekludo jam nužudyti šeimininką.

4 lentelė

20

Nėrimosi slopinimas, infekuojant wtAcMNPV virusu

Virusas	Nėrimasis	Mirtingumas
Netikras infekavimas	16	0
Laukinis tipas	1	16
vEGTZ	16	16

Ketvirto amžiaus S. frugiperda lervoms įvedė 1×10^5 pfu wtAcMNPV arba vEGTZ 5-se μ l. Netikrai infekuotoms lervoms įvedė 5 μ l skystos audinio kultūros. Kiekvienoje grupėje buvo po 16 lervų, kurios buvo laikomos šiomis sąlygomis: dirbtinė dieta (R.L. Burton (1969) ARS publication pp. 33-134), 28°C temperatūra, ciklas šviesa:tamsa=14:10 valandų. Lervos kiekvieną dieną buvo apžiūrimos ar nusinebė, ir 7-ą dieną buvo registruojamas mirtingumas.

Atlikus viruso injekciją penktos ankstyvosios stadijos lervoms, gauti analogiški rezultatai. Nė viena iš kokių tik nuginėrusių penkto amžiaus lervų, infekuotų laukinio tipo virusu, nerodė lėlytės susidarymo požymių, tuo tarpu kai dauguma vEGTZ infekuotų lervų rodė kai kuriuos elgesio nukrypimus (nustojo maitintis, neramumas kokono pynimas), o tai yra artėjančio lervos virtimo lėlyte požymiai. Tačiau visos lervos, kurioms buvo įvesta virusinė infekcija, žuvo iki lėlytės susidarymo. Šie duomenys rodo, kad infekavimas AcMNPV kliudo lervų nėrimuisi ir lėlytės susidarymui. Jie taip pat rodo, kad tokios rūšies vabzdžių vystymosi pažeidimą sąlygoja egt geno ekspresija.

VII pavyzdys

Laukinio tipo AcMNPV/wt/ ir vEGTZ bisanalizė in vivo išryškino, kad egt geno ekspresija prailgina laiką, kurio metu lerva maitinasi, ir kad egt funkcijos pažeidimas gerina viruso, kaip pesticido, charakteristiką. Atliekant šiuos tyrimus, S. frugiperda lervoms buvo daromos arba wtAcMNPV, arba vEGTZ injekcijos ankstyvoje 4-je stadijoje. Palyginimui kontrolinėms lervoms buvo įvedama audinio kultūra, kuri neturėjo viruso. Kiekvieną dieną buvo tikrinamas lervų priesvoris, nėrimosi požymiai ir mirtingumas. 6 ir 7 fig., atitinkamai, pateiktas įvairių grupių lervų dienos priesvoris, o taip pat mirtingumo procentas. Kontrolinės grupės lervos per pirmas dvi dienas nuosaikiai augo, o po to nustojo maitintis ir pasiruošė virsti lėlyte. Tik viena iš 16 lervų, infekuotų wtAcMNPV, nuginėrė, vietoje to tris dienas po užkrėtimo lervos nepertraukiamai augo. Šioje stadijoje jos suserga, tačiau iki 5 dienos nė viena lerva nežuvo. 6-ai dienai visos wtAcMNPV infekuotos lervos žuvo. Priešingai, visos vEGTZ infekuotos lervos nuginėrė iš ketvirtos į penktą amžiaus stadiją ir per tą laiką nesimaitino. Tuo

paaiškinamas priesvorio nebuvimas nuo 1-os iki 2-os dienos. Po nėrimosi jos vėl pradeda maitintis, tačiau 3-ai dienai joms pradeda reikštis ligos požymiai. Praėjus 4 dienoms po užkrėtimo, jos pradeda mirti ir 5-ai dienai visos žūva. Lervos, infekuotos išvestiniu iš AcMNPV virusu, kuriame nėra funkcinio egt geno, mažiau maitinasi ir žūsta nuo užkrėtimo greičiau, lyginant su lervomis, infekuotomis laukinio tipo AcMNPV.

10 Infekavus 5-os amžiaus stadijos lervas, šie reiškiniai stebimi dar aiškiau (8 ir 9 fig.). Kaip ir tikėtasi, kontrolinės lervos per dvi dienas žymiai išaugo, o po to nustojo maitintis, ruošdamosis lėlytės susidarymui. Nustojimą maitintis lydi staigus svorio sumažėjimas.

15 Lervoms, infekuotoms wtAcMNPV, nepasireiškė maitinimosi nustojimo požymiai; jos toliau maitinosi ir jų svoris didėjo dar dvi dienas, o po to pradėjo reikštis susirgimo požymiai. Iki 7-sios dienos po užkrėtimo mirtingumas nebuvo visiškas.

20 Galima padaryti šią išvadą. Lervos, infekuotos vEGTZ, kaip ir kontrolinės, maitinasi tik pirmas dvi dienas po užkrėtimo. Po to stebimas ryškus svorio sumažėjimas, kadangi lervos ruošiasi lėlytės susidarymui. Tačiau nė

25 viena lerva nevirsta lėlyte, trečiai dienai stebimi ligos požymiai, o per šešias dienas po užkrėtimo visos jos žūsta.

VIII pavyzdys

30 Palyginama užkrėtimo vEGTZ ir wtAcMNPV įtaka ką tik išsiritusioms pirmo amžiaus S. frugiperdi lervoms. Ką tik gimusioms S. frugiperdi lervoms duoda maistą, kuriame yra įvairūs kiekiai vEGTZ ir wtAcMNPV poliedrinių

35 įsiterpimo kūnų, ir kiekvieną dieną stebimas jų mirtingumas. 10 ir 11 fig. pateikti rezultatai, gauti naudojant dvi skirtingas dozes. Galima matyti, kad

abiem atvejais vEGTZ infekuotoms lervoms mirtis, žymiu mastu, įvyksta daug anksčiau, palyginus su lervomis, infekuotomis laukinio tipo virusu. Bendrai paėmus, lervos, užkrėstos rekombinantiniu virusu, žūsta 3-4 dienomis anksčiau, negu užkrėstos wt-virusu. Šis rezultatas yra papildomas įrodymas to, kad bakulevirusai, turintys inaktyvuotus egt genus, kaip biologiniai pesticidai geriau veikia, negu laukinio tipo bakulevirusai su intaktiniais genais.

10

IX pavyzdys

Rekombinantinių virusų su protorakotropinio hormono (PTTH) ekspresija konstravimui, PTTH geną klonuoja į perdislokavimo plazmidą pEV mod XIV, kuris aprašytas U.S. Patent application Serial No 07/353.847, 1989 gegužės 17d: čia paraiška įtraukta kaip nuoroda. Ši plazmidė turi poliedrino AcMNPV geno, kuris yra ekspresyvinio PTTH geno rekombinacijos į EGT virusą mediatorius, kylančią ir nusileidžiančią sekas. Daugybinio klonavimo saitas prie įprastinio poliedrino transliacijos indukavimo saito, žemyn nuo LS XIV-modifikuoto poliedrino promotorio (Rankin et al. bene 70:39 (1988)). PTTH Bombix more genas išskiriamas iš pBc22k-C19 plazmidės (Kowakami et al., Science 247:1333, (1990), panaudojant restrikcinių fermentą Hind III. Hind III rišamieji galai yra užpildomi su fago T4 DNR-polimeraze, o po to plazmidę suskaido panaudojant EcoRI. Plazmidę pEV mod XIV suskaldo panaudojant KpnI, nukarusi KpnI galą pašalina su fago T4 DNR-polimeraze ir plazmidą suskaido panaudojant EcoRI. Fragmentą, kuriame yra PTTH genas, klonuoja per šiuos saitus į perdislokavimo plazmidą. Gautoje plazmidėje žymimoje pEVPTTH, PTTH genas yra betarpiškai žemiau LSXIV-modifikuoto poliedrino promotorio.

35

Rekombinantinius virusus su PTH ekspresija gauna pernešant pEVPTH į SF-ląsteles per virusų wtAcMNPV ir EGT E. Rekombinacijos tarp sekų, flankuojančių poliedriną virusinėje DNR, ir sekų, flankuojančių PTH geną pEVPTH plazmide, pasekoje poliedrino genas pakeičiamas PTH genu. Virusai, kurių genome yra tokia rekombinacija pagal neigiamą okliuzijos fenotipą (Miller et al., Genetic Engineering, Principles and Methods, vol. 8, J.Setlav and A.Hollaender, eds., Plenum Press N.Y., 1986, pp. 277-298). Atitinkami rekombinantiniai virusai žymimi vEGTPTH ir vwPTH.

Analogišku būdu gaunami rekombinantiniai virusai su juvenylinio hormono esterazės ekspresija. Pradžioje išpjauna juvenylinio hormono esterazės geną Helithis virescens Hanzlik et al., (1989) J. Biol. Chem. 264:12119) iš plazmidės pCHEL6B (Hammock et al. (1990) Nature 334:458), panaudojant skaidymą EcoRI ir KpnI. Perdislokavimo plazmidą pEV mod XIV taip pat atskelia panaudojant EcoRI ir KpnI ir fragmentą, turintį juvenylinio hormono esterazės geną, įterpia tarp šių saitų. Tuo būdu pEVIHE savo sudėtyje turi poliedrino geno sekas, flankuojančias juvenylinio hormono esterazės geną. EGTIHE ir vwTIHE rekombinantiniai virusai gaunami pEVIHE transfekuojuant, atitinkamai, su vEGTZ arba wtAcMNPV, ir atrenkant ženklelius be įsiterpimo kūnų.

Rekombinantinių virusų su išsilukštenimo hormono ekspresija konstravimui iš plazmidės pF5-3 išpjauna išsilukštenimo hormono Manduca sexta geną (Horodyski et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8123), suskaidant EcoRI ir HpaI pagalba. pEV mod XIV suskaido panaudojant KpnI, laisvą KpnI galą pašalina panaudojant fago T4 DNR polimerazę, o po to suskaido su EcoRI. Fragmento, turinčio išlukštenimo hormono geną, įterpimas į perdislokavimo plazmidę duoda pVEEH rekombinantą, kuriame

išsilukštenimo hormono genas eina žemyn nuo poliedrino LSXIV-modifikavimo promotorio. Šio plazmido kontra-
sfekcija su vEGTZ arba vDA26I DNR leidžia išskirti
rekombinantinius virusus, atitinkamai, vEGT⁻EH ir
5 vDA26ZEH. vDA26Z yra rekombinantinis virusas su lacZ E.
coli geno intarpu DA26 geno viduje (O' Reilly et al.,
J. Gen. Virol., in Press). DA26 geno funkcija nėra
žinoma, tačiau metamorfozės atžvilgiu pagal fenotipą
vDA26Z yra laukinio tipo. Dėl lacZ geno buvimo, vDA26Z
10 išvestinės, esant X-gal, duoda žydrus ženklelius.

X pavyzdys

Tam kad in vitro įvertinti tokių rekombinantinių virusų
15 efekta, S. frugiperda lervoms įvedė po 2×10^5 pfu
vEGTDL, vEGT⁻PTTH, vwPTTH virusų, arba tuo pat metu
vEGT⁻PTTH ir vEGT⁻IHE (po 1×10^5 pfu kiekvieno); lervos
buvo vėlyvoje 3-je amžiaus stadijoje, arba ankstyvoje
4-je. Įvedus visus EGT⁻-virusus, infekuoti vabzdžiai
20 išsinėrė ir pergyveno 4-ą stadiją, ir 3-iai dienos buvo
pastebėtas galvos kapsulės nuslydimas, o tai rodo
artėjantį nėrimąsi. Infekavus vien tik vEGT⁻PTTH arba
vEGT⁻PTTH kartu su vEGT⁻IHE, vabzdžiai greitai suserga,
ir 4-ai dienos stebimas žymus mirtingumas. Priešingai,
25 vabzdžiams infekuotiems vEGTDEL, iki 5-os dienos nebuvo
stebimas žymus mirtingumas. Kaip ir buvo tikėtasi,
vabzdžiai, infekuoti vwPTTH virusu, niekada nerodo
nėrimosi į 5-ą stadiją požymių. Galvos kapsulės nusly-
dimas nėra stebimas, ir iki 6-os dienos nebuvo pa-
30 stebėta žymaus mirtingumo. Tuo būdu, PTTH ekspresija,
nesant EGT, priartina vabzdžių žuvimą dėl užkrėtimo 1-a
diena, lyginant su vEGTDEL infekcija. Šie duomenys
ilustruoja bakulevirusų pesticidinių savybių pageri-
nimą dėka ekspresijos genų, įtakojančių vabzdžių me-
35 tamorfoze, ir rodo, kad tokios strategijos efektyvumas
yra įmanomas tik inaktyvuojant egt geną.

5 lentelė

Virusas	Mirtingumo %					
	3	4	5	6	7	8
vEGTDEL	4,5	4,5	68,2	90,9	90,9	95,5
vwTPTTH	0	0	13,0	39,1	78,3	95,7
vEGT ⁻ PTTH	4,2	62,5	87,5	100,0		
vEGT ⁻ PTTH						
ir						
vEGT ⁻ IHE	8,7	60,9	91,3	95,7	100,0	

5

XI pavyzdys

Sudarančių įsiterpimo kūnus virusų su heterologinių
 baltymų, įtakojančių vabzdžių vystymąsi, ekspresija ge-
 neravimas gali būti atliekamas pagal šią schemą. Pra-
 džioje konstruojamas neokliuduojantis virusas su
 β-glaktozidazės ekspresija. lacZ geną, koduojantį fer-
 mentą β-galaktozę, klonuoja į perdislokavimo vektorių
 pSyn VI⁻, aprašytą U.S. Patent Application Serial
 No 07/353.847, 1989m. gegužės 17d. Vektorius pSyn VI⁻
 savyje turi sekas, esančias genome į viršų ir į apačią
 nuo poliedrinio geno, be to daugybinio klonavimo saitas
 yra betarpiškai į apačią nuo sintetinio modifikuoto
 poliedrino promotorio. lacZ genas nupjaunamas nuo plaz-
 mido PSKS105 (Casadaban et al. (1988, supra), suskai-
 dant su PstI. Laisvas PstI galas pašalinamas panau-
 dojant nukleazę numg bean, ir plazmidas suskaidomas su
 SstII. pSyn YI⁻ suskaido pagal saitus EcoTI ir SstII ir
 lacZ geną klonuoja į tuos saitus. Gautas plazmidas
 žymimas pSynYI⁻gal, jame lacZ genas yra betarpiškai į
 apačią nuo sintetinio modifikuoto poliedrino pro-
 motorio. pSynYI⁻gal į SF ląsteles yra pernešami su
 vEGTDEL viruso DNR, ir yra atskiriami neokliuduojantys

10

15

20

25

ženkleliai su β -galaktozidazės ekspresija, kurie yra cEGT⁻ SynYI⁻ virusas.

5 Norint sukurti išiterpimo kūnus sudaranti rekombinantinį virusą su PTH ekspresija, PTT geną klonuoja į perdislokavimo vektorių pSpXIYYI+X3.

10 Konstruojant pSpXIYYI+X3, pradžioje padaromas tarpinis pSpXIYYI+plazmidas. Plazmidė pSpLSXIYYI+CAT (aprašytas JAV patento paraiškoje, Ser. No 07/353.847, 1989m. gegužės 17d.) yra pjaunamas pagal BglIII, ir galai yra užpildomi DNR-polimeraze. Plazmidė pSynYI⁻+wtp (aprašytas JAV patento paraiškoje, Ser. No 07/353.847, 1989m. gegužės 17d.) yra pjaunamas per EcoRI ir SacI, ir mažą
15 fragmentą EcoRI-SacI nuvalo. Dviejų plazmidžių produktus sujungia ir atrenka pSpXIYYI+. Plazmidė pSpXIYYI+ yra identiškas plazmidei pSpLSXIYYI+CAT, išskyrus tai, kad daugybinio klonavimo saitas tarpe tarp BglIII saito ir SacI saito sutampa su pSynYI⁻+wtp.
20 Daugybinio klonavimo saito v3 (aprašyto JAV patento paraiškoje, Ser. No 07/353.847, 1989m. gegužės 17d.) konstravimui tarp pSpXIYYI+plazmidės saitų EcoRI-SacI įvedimas polilinkeris. pSpXIYYI+X3 daugybinio klonavimo saito seka nuo saito BglIII iki saito SacI yra tokia:

25

AGATCATC GAATTCTCGAG CTGCAGATCT GTCGACCCGGG AATAAA
GAGCTC
EcoRv/Bgl EcoRI-XhoI PstI⁻BglI SalI⁻SmaI polyA.

30 Šioje plazmidėje yra intaktinis poliedrino genas, kurį kontroliuoja laukinio tipo poliedrino promotoris. Sintetinis modifikuotas poliedrino promotoris yra aukščiau nuo poliedrino jono ir su priešinga orientacija. Daugybinio klonavimo saito padėtis leidžia įterpti genus, kurių ekspresija turėtų vykti kontroliuojant sin-

tetiniam modifikuotam poliedrino promotoriui. PTH geną nupjauna nuo pBc22k plazmido (Kawasaki et al., (1990) supra), suskaidant pagal Hind III. Laisvą Hind III galą užpildo fago T4 DNR-polimeraze ir plazmidą skaido pagal

5 EcoRI. pSpXIYYI+X3 skaido pagal EcoRI ir SmaI, ir PTH geną klonuoja į tuos saitus, kurie duoda pSpPTH plazmidę. Šioje plazmidėje PTH genas yra žemyn nuo sintetinio modifikuoto poliedrino promotorio einančioje atšakoje, tačiau kaimynystėje, jo orientacija ir koduojančios sekos yra priešingi laukinio tipo poliedrino

10 promotoriui. Abu genai, PTH genas ir poliedrino genas, flankuojamų į AcMNPV genomo poliedrino geno aukštyn ir žemyn einančias sekas.

15 pSpPTH į SF-ląsteles yra pernešamas su cEGT⁻SynYI⁻gal DNR. Rekombinacijos tarp aukštyn ir žemyn einančiomis poliedrino sekomis virusinėje DNR ir sekomis, flankuojančiomis PTH ir poliedrino genus pSpPTH, pasekoje lacZECT⁻SynVI⁻gal genas yra pakeičiamas PTH ir poliedrino genais iš pSpPTH. Rekombinantinis EGT⁻SpPTH

20 virusas yra identifikuojamas pagal fenotipą, kuris yra neigiamas pagal β-galaktozės požymį ir teigiamas pagal okliuzijos požymį.

25 Konstruojant okliuduojantį virusą su juvenylinio hormono esterazės ekspresija, juvenylinio hormono esterazės geną išpjaudavo iš PHEI6B plazmido (Hammock et al., (1990) supra), suskaidant pagal KpnI, pašalinant

30 laisvą galą su fago T4 DNR-polimerazės pagalba ir nupjaunant pagal EcoRI. Po to juvenylinio hormono esterazės geną klonavo į pSpXIYYI+X3 plazmidę, kuria skaidė pagal EcoRI ir SmaI. Gauta plazmidė pSpJHE kontrastuojamas su vEGT⁻SynYI⁻gal DNR, gaunamas rekombinantinis virusas vEGT⁻SpJHE. Tokiame okliuduojančiame viruse

35 juvenylinio hormono esterazės ekspresija vyksta kontroliuojant sintetiniam modifikuoto poliedrino promotoriui.

Analogišku būdu išpjauna išsilukštenimo hormono geną iš pF 5-3 plazmidės (Horodyski et al. (1990) supra), perkertant jį per EcoRI ir HpaI, ir klonuojant į pSpXIYYI+X3, kuris po to suskaidomas pagal EcoRI ir SmaI. Gautos PSpEH plazmidės kontrasfekcijos su vEGT⁻SynYI⁻gal DNR pasekoje gaunamas rekombinantinis virusas vEGT⁻pEH.

Po to sudarantys įsiterpimo kūnus EGT⁻-virusai yra toliau genetiškai keičiami, sukeliant ekspresiją baltymo, kuris įtakoja vabzdžių metamorfozę (vabzdžių peptidinis hormonas arba fermentas, inaktyvuojantis vabzdžių hormonus), to pasekoje jie sumažina mitybą ir pagreitina infekuotų vabzdžių lervų mirtį efektyviau, lyginant su laukinio tipo bakulevirusais, arba bakulevirusais, kuriuose genetiniai pakitimai iššaukė tik egt geno inaktyvavimą.

Kadangi XI pavyzdžio augimo ir vystymosi reguliatoriai sudaro įsiterpimo kūnus, šie virusai gali būti įvedami į efektyvias insektidines, priimtinas žemės ūkiui, kompozicijas, kurias galima užnešti ant infekuotų pasėlių. Vabzdžių maitinimosi tokiais okliuduotomis virusinėmis dalelėmis pasekoje, virusai ir, tuo pačiu, kontroliuojantis agentas pasklis po lauką. Infekcija iššauks vabzdžių žuvimą ir, iš to seka, apsaugos pasėlius nuo vabzdžių-kenkėjų.

Turi būti aišku, kad tai, kas aukščiau parašyta, yra susiję su ypatingais, pirmenybę turinčiais šio išradimo realizavimo pavyzdžiais, ir kad daugybė modifikacijų ir pakeitimų gali atitikti išradimo idėjų ir sritį, kaip tai yra postuluojuama pridedamoje išradimo apibrėžtyje.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Kovos su vabzdžiais agentas, b e s i s k i r i a n -
t i s tuo, kad jis yra vabzdžių parazitas, kuriame yra
5 inaktyvuotas genas, koduojantis modifikuojantį ekdiste-
roidą fermentą.
2. Agentas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
tuo, kad nurodytas genas, koduojantis viruso ekdis-
10 teroid-UDP-gliukoziltransferazę (egt genas).
3. Agentas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
tuo, kad nurodytas vabzdžių parazitas yra vabzdžių
15 virusas.
4. Agentas pagal 3 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
tuo, kad nurodytas vabzdžių virusas yra bakulevirusas.
5. Agentas pagal 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
20 tuo, kad nurodytas bakulevirusas yra branduolinės po-
liedrozės virusas.
6. Agentas pagal 5 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
tuo, kad nurodytą branduolinio poliedrono virusą pasi-
25 renka iš grupės, susidedančios iš branduolinio polied-
rono viruso Autographa californica ir branduolinio
poliedrono viruso Orgyia pseudotsugata.
7. Agentas pagal 6 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
30 tuo, kad nurodytas vabzdžių virusas, turintis inak-
tyvuotą geną, koduojantį ekdistteroid-UDP-gliukoziltran-
sferazę, yra rekombinantinis virusas, kuriame dalis egt
geno pašalinta ir pakeista bakteriniu genu lacZ,
koduojančiu β -galaktozidazės susidarymą (vEGTZ), arba
35 rekombinantinis virusas, kuriame pašalinta dalis egt
geno (vEGTDEL).

8. Agentas pagal 3 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
tuo, kad vabzdžių papildomai modifikuoja, įterpiant
bent vieną heterologinį geną; šis heterologinis genas
ekspresuojasi vabzdžių ląstelėse, infekuotose nurodytu
5 virusu, ir koduoja metamorfozę veikiantį baltymą.

9. Agentas pagal 8 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
tuo, kad nurodytą heterologinį geną pasirenka iš gru-
pės, apimančios baltymus koduojančius genus, kurie yra
10 protoraciklotropinis hormonas, išsilukštenimo hormonas
ir juvenylinio hormono esterazė.

10. Agentas pagal 9 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
tuo, kad nurodytas heterologinis genas yra protora-
15 ciklotropinis hormonas.

11. Agentas pagal 10 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
tuo, kad jis yra rekombinantinis virusas su proto-
ciklotropinio hormono ekspresija (vEGTSpPTTH).
20

12. Agentas pagal 9 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
tuo, kad nurodytas heterologinis genas yra išsilukš-
tenimo hormonas.

13. Agentas pagal 12 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
tuo, kad jis yra rekombinantinis virusas su išsilukš-
tenimo hormono ekspresija (vEGTSpEH).
25

14. Agentas pagal 9 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
30 tuo, kad nurodytas heterologinis genas yra juvenylinio
hormono esterazė.

15. Agentas pagal 14 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
tuo, kad jis yra rekombinantinis virusas su juvenylinio
35 hormono esterazės ekspresija (vEGTSpJHE).

16. Kovos su vabzdžiais pagerinto agento gavimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad atlieka šias stadijas:

5 (a) geno, kuris koduoja metamorfozę veikiantį baltymą, išskyrimą ir

(b) šio geno įvedimą į organizmą, kuriame natūraliomis sąlygomis nėra šio geno ekspresijos.

10

17. Būdas pagal 16 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad nurodytas genas koduoja baltymą iš metamorfozę veikiančių baltymų grupės, apimančios ekdistteroid-UDP-gliukoziltransferazę, protoracikotropinį hormoną, išsilukštenimo hormoną ir juvenylinio hormono esterazę.

15

18. Būdas pagal 17 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad nurodytas organizmas yra vabzdžių virusas, kuriame nėra egt geno ekspresijos.

20

19. Būdas pagal 18 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad nurodytą geną išskiria iš bakuleviruso.

25

20. Būdas pagal 19 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad bakulevirusas yra branduolinės poliedrozės virusas.

30

21. Būdas pagal 20 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad nurodytą branduolinės poliedrozės virusą pasirenka iš branduolinės poliedrozės virusų grupės, susidedančios iš branduolinės poliedrozės viruso Autographa californica ir branduolinės poliedrozės viruso Orgyia pseudotsugata.

35

22. Būdas pagal 16 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad nurodytą organizmą pasirenka iš grupės, apimančios vabzdžių parazitus, nefitogenines ant augalų

besikolonizuojančias bakterijas, entomopatogeninius grybelius ir augalus.

23. Kovos su vabzdžiais pagerinto agento gavimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad organizme atlieka geno, koduojančio ekdistteroid-modifikuojantį fermentą, inaktyvavimo stadiją; šis nurodytas genas yra nurodyto organizmo genomo natūrali dalis.

24. Būdas pagal 23 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad nurodytas genas koduoja ekdistteroid-UDP-gliukoziltransferazę.

25. Būdas pagal 24 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad nurodytas organizmas yra vabzdžių virusas.

26. Būdas pagal 25 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad nurodytas vabzdžių virusas yra bakulevirusas.

27. Būdas pagal 26 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad nurodytas bakulevirusas yra branduolinės poliedrozės virusas.

28. Būdas pagal 23 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad iš nurodyto viruso pasažų serijos vabzdžių ląstelių kultūroje išskiria branduolinės poliedrozės viruso Autographa californica darinį, turintį ištrynimą, kuris inaktyvuoja geną, koduojantį ekdistteroid-UDP-gliukoziltransferazę.

29. Būdas pagal 27 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad branduolinės poliedrozės virusą pasirenka iš grupės, susidedančios iš branduolinės poliedrozės viruso Autographa californica ir branduolinės poliedrozės viruso Orgyia pseudotsugata.

30. Būdas pagal 29 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad nurodytas branduolinės poliedrozės virusas yra vEGTZ arba vEGTDEL.

5 31. Būdas pagal 23 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad papildomai atlieka nurodyto organizmo genetinės modifikacijos stadiją, įvedant heterologinį geną, sugebantį ekspresuoti vabzdžio ląstelėje; šis genas koduoja metamorfozę veikiantį baltymą.

10 32. Būdas pagal 31 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad nurodytą antrąjį geną pasirenka iš grupės, susidedančios iš genų, koduojančių protoracikotropinį hormoną, išsilukštenimo hormoną ir juvenylinio hormono esterazę.

15 33. Kovos su vabzdžiais būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad atlieka stadiją, kurioje nurodytas vabzdys paveikiamas kovos su vabzdžiais agentu, kuris genų inžinierijos būdu yra pakeistas taip, kad ekspresuotųsi genas, koduojantis ekdisteroido modifikavimo fermentą; šis fermentas nepalankiai veikia vabzdį.

20 34. Kovos su vabzdžiais būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad vabzdį paveikia kovos su vabzdžiais agentu, turinčiu geną, koduojantį ekdisteroido modifikavimo fermentą; nurodytas genas yra inaktyvuotas.

25 35. Būdas pagal 34 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad nurodytas genas koduoja ekdisteroid-UDP-gliukoziltransferazę.

30 36. Būdas pagal 35 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad nurodytas kovos su vabzdžiais agentas yra vabzdžių virusas.

35

37. Būdas pagal 36 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
tuo, kad nurodytas vabzdžio virusas yra bakulevirusas.
38. Būdas pagal 37 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
5 tuo, kad nurodytas bakulevirusas yra vienas iš bran-
duolinės poliedrozės virusų Autographa californica arba
Orgyia pseudotsugata.
39. Būdas pagal 38 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
10 tuo, kad nurodytas genas yra inaktyvuotas intarpu he-
terologinio geno, kuris ekspresuojasi nurodytu virusu
infekuotoje vabzdžio ląstelėje, o šis heterologinis
genas koduoja metamorfozę veikiantį baltymą.
40. Būdas pagal 39 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
15 tuo, kad geną pasirenka iš grupės genų, koduojančių
protoracikotropinį hormoną, išsilukštenimo hormoną ir
juvenylinio hormono esterazę.
41. Insekticidinė kompozicija, b e s i s k i r i a n -
20 t i tuo, kad į ją įeina kovos su vabzdžiais agentas ir
tinkamas naudoti žemės ūkyje nešiklis, kurioje nuro-
dytas kovos su vabzdžiais agentas yra genetiškai mo-
difikuotas taip, kad natūralioje būsenoje esantis ge-
25 nas, koduojantis ekdistteroid-UDP-gliukoziltransferazę,
yra inaktyvuotas.
42. Insekticidinė kompozicija pagal 41 punktą, b e s i -
s k i r i a n t i tuo, kad joje yra kovos su vabz-
30 džiais agentas, papildomai modifikuotas taip, kad
ekspresuojasi heterologinis genas, koduojantis metamor-
fozę veikiantį baltymą.
43. Agentas pagal 41 ir 42 punktus, b e s i s k i -
35 r i a n t i s tuo, kad jis yra vabzdžio virusas.

44. Agentas pagal 43 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
tuo, kad vabzdžio virusas yra bakulevirusas

45. Agentas pagal 44 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
5 tuo, kad nurodytas bakulevirusas yra branduolinės po-
liedrozės virusas.

46. Agentas pagal 45 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
10 tuo, kad branduolinės poliedrozės virusą pasirenka iš
grupės, sudarytos iš Autographa californica ir Orgyia
pseudotsugata.

47. Rekombinantinė DNR molekulė, b e s i s k i r i a n -
t i tuo, kad ji turi geno, koduojančio ekdisteroid-
15 UDP-gliukoziltransferazę, seką.

48. Rekombinantinė DNR molekulė pagal 47 punktą, b e -
s i s k i r i a n t i tuo, kad jos nukleotidų seka yra
tokia:

20

101		maždaug nuo	AT
151	GACTATTCTC TGCTGGCTTG CACTGCTGTC TACGCTTACT GCTGTAAATG		
201	CGGCCAATAT ATTGGCCGTG TTTCCTACGC CAGCTTACAG CCACCATATA		
251	GTGTACAAAG TGTATATTGA AGCCCTTGCC GAAAAATGTC ACAACGTTAC		
301	GGTCGTCAAG CCCAAACTGT TTGCGTATTC AACTAAAACT TATTGCGGTA		
351	ATATCACGGA AATTAATGCC GACATGTCTG TTGAGCAATA CAAAAAACTA		
401	GTGGCGAATT CGGCAATGTT TAGAAAGCGC GGAGTGGTGT CCGATACAGA		
451	CACGGTAACC GCCGCTAACT ACCTAGGCTT GATTGAAATG TTCAAAGACC		
501	AGTTTGACAA TATCAACGTG CGCAATCTCA TTGCCAACAA CCAGACGTTT		
551	GATTTAGTCG TCGTGGAAGC GTTTGCCGAT TATGCGTTGG TGTTTGGTCA		
601	CTTGTACGAT CCGGCGCCCG TAATTCAAAT CGCGCCTGGC TACGGTTTGG		
651	CGGAAAACTT TGACACGGTC GGCGCCGTGG CGCGGCACCC CGTCCACCAT		
701	CCTAACATTT GGCGCAGCAA TTTCGACGAC ACGGAGGCAA ACGTGATGAC		

751 GGAAATGCGT TTGTATAAAG AATTTAAAAT TTTGGCCAAC ATGTCCAACG
 801 CGTTGCTCAA ACAACAGTTT GGACCCAACA CACCGACAAT TGAAAAACTA
 851 CGCAACAAGG TGCAATTGCT TTTGCTAAAC CTGCATCCCA TATTTGACAA
 901 CAACCGACCC GTGCCGCCCA GCGTGCAGTA TCTTGGCGGA GGAATCCATC
 951 TTGTAAAGAG CGCGCCGTTG ACCAAATTAA GTCCGGTCAT CAACGCGCAA
 1001 ATGAACAAGT CAAAAGCGG AACGATTTAC GTAAGTTTTG GGTGAGCAT
 1051 TGACACCAA TCGTTTGCAA ACGAGTTTCT TTACATGTTA ATCAATACGT
 1101 TCAAACGTT GGATAATTAC ACCATATTAT GGAAAATTGA CGACGAAGTA
 1151 GTAAAAACA TAACGTTGCC CGCCAACGTA ATCACGCAA ATTGGTTTAA
 1201 TCAACGCGCC GTGCTGCGTC ATAAAAAAT GGCGGCGTTT ATTACGCAAG
 1251 GCGGACTACA ATCGAGCGAC GAGGCCTTGG AAGCCGGGAT ACCCATGGTG
 1301 TGTCTGCCCA TGATGGGCGA CCAGTTTTAC CATGCGCACA AATTACAGCA
 1351 ACTCGGCGTA GCCCGCGCCT TGGACACTGT TACCGTTTCC AGCGATCAAC
 1401 TACTAGTGGC GATAAACGAC GTGTTGTTTA ACCCGCCTAC CTACAAAAAA
 1451 CACATGGCCG AGTTATATGC GCTCATCAAT CATGATAAAG CAACGTTTCC
 1501 GCCTCTAGAT AAAGCCATCA AATTCACAGA ACGCGTAATT CGATATAGAC
 1551 ATGACATCAG TCGTCAATTG TATTCATTAA AAACAACAGC TGCCAATGTA
 1601 CCGTATTCAA ATTACTACAT GTATAAATCT GTGTTTTCTA TTGTAATGAA
 1651 TCACTTAACA CACTTTTAAT,

arba jos funkcinis ekvivalentas.

49. Vabzdžių virusas, b e s i s k i r i a n t i s tuo,
 5 kad jis yra gautas būdu pagal 19 punktą.

50. Viruso vEGTZ gavimo būdas, b e s i s k i r i a n -
 t i s tuo, kad atlieka šias stadijas:

10 a) plazmidę pUCBCPSB perpjauna restrikcinėmis endonu-
 kleazėmis EcoI ir XbaI ir valo gautą didelį fragmentą;

b) panaudojant restrikcines endonukleazes EcoRI ir Aha III atskelia lacZ geną nuo pSKS104;

5 c) nurodytą lacZ geną liguoja su nurodytu dideliu (EcoRIXbaI) pUCBCPJB fragmentu po to, kai, panaudojant T4 fago DNR-polimerazę, buvo užpildytas XbaI ir gautas pEGTZ;

10 d) pEGT ir AcMNPV kopernėša į SF-ląsteles;

e) identifikuoja virusinius rekombinantus pagal β -galaktozidazės ekspresiją; ir

15 f) valo rekombinantinį virusą, kuris yra vEGTZ.

51. Viruso vEGTDEL gavimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad atlieka šias stadijas:

20 a) plazmidę pUCBCPS suskaido, panaudojant restrikcines endonukleazes EcoRI ir XbaI, ir valo gautą didelį fragmentą;

25 b) "užbukina" (a) stadijoje nurodyto didelio DNR fragmento abu galus;

c) liguoja (b) stadijoje nurodytą didelį DNR fragmentą;

30 d) pEGTDEL ir vEGTZ kopernėša į SF-ląsteles, kas leidžia atlikti homologinę rekombinaciją;

e) identifikuoja rekombinantinį vEGTDEL pagal tai, kad nevyksta β -galaktozidazės ekspresija;

35 f) valo nurodytą rekombinantinį vEGTDEL.

52. Rekombinantinė ekdistteroid-UDP-gliukoziltransferazė, turinti tokią aminorūgščių seką:

M T I L C W L A L L S T L T A V N A A N I L A V F P T P A Y S
 H H I V Y K V Y I E A L A E K C H N V T V V K P K L F A Y S T
 K T Y C G N I T E I N A D M S V E Q Y K K L V A N S A M F R K
 R G V V S D T D T V T A A N Y L G L I E M F K D Q F D N I N V
 5 R N L I A N N Q T F D L V V V E A F A D Y A L V F G H L Y D P
 A P V I Q I A P G Y G L A E N F D T V G A V A R H P V H H P N
 I W R S N F D D T E A N V M T E M R L Y K E F K I L A N M S N
 A L L K Q Q F G P N T P T I E K L R N K V Q L L L L N L H P I
 F D N N R P V P P S V Q Y L G G G I H L V K S A P L T K L S P
 10 V I N A Q M N K S K S G T I Y V S F G S S I D T K S F A N E F
 L Y M L I N T F K T L D N Y T I L W K I D D E V V K N I T L P
 A N V I T Q N W F N Q R A V L R H K K M A A F I T Q G G L Q S
 S D E A L E A G I P M V C L P M M G D Q F Y H A H K L Q Q L G
 V A R A L D T V T V S S D Q L L V A I N D V L F N A P T Y K K
 15 H M A E L Y A L I N H D K A T F P P L D K A I K F T E R V I R
 Y R H D I S R Q L Y S L K T T A A N V P Y S N Y Y M Y K S V F
 S I V M N H L T H F,

arba ekdistteroid-UDP-gliukoziltransferazė, kurios ami-
 20 norūgščių seka yra bent 70 % homologiška aukščiau
 duotai sekai.

53. Išvalyta ekdistteroid-UDP-transferazė, turinti 52 punk-
 te nurodytą aminorūgščių seką, arba homologišką jai
 25 bent 70 %.

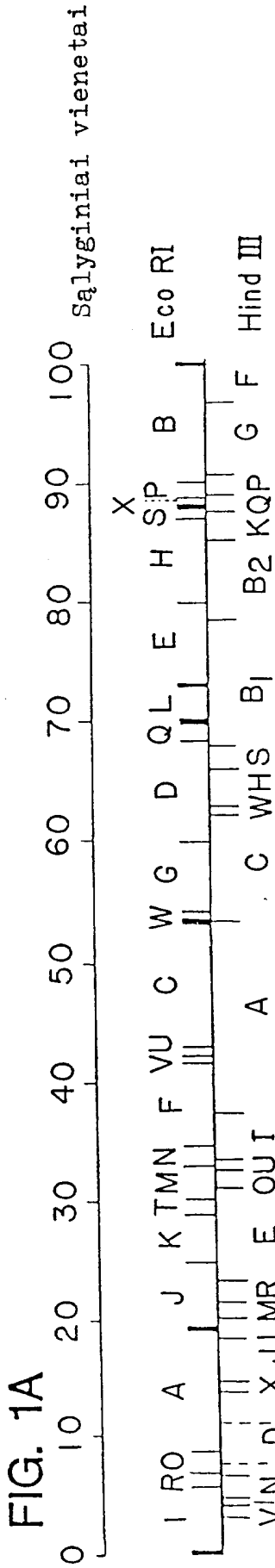


FIG. 1B

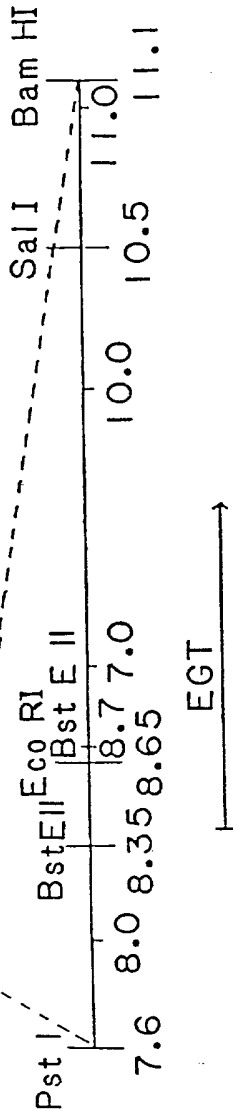


FIG. 1C

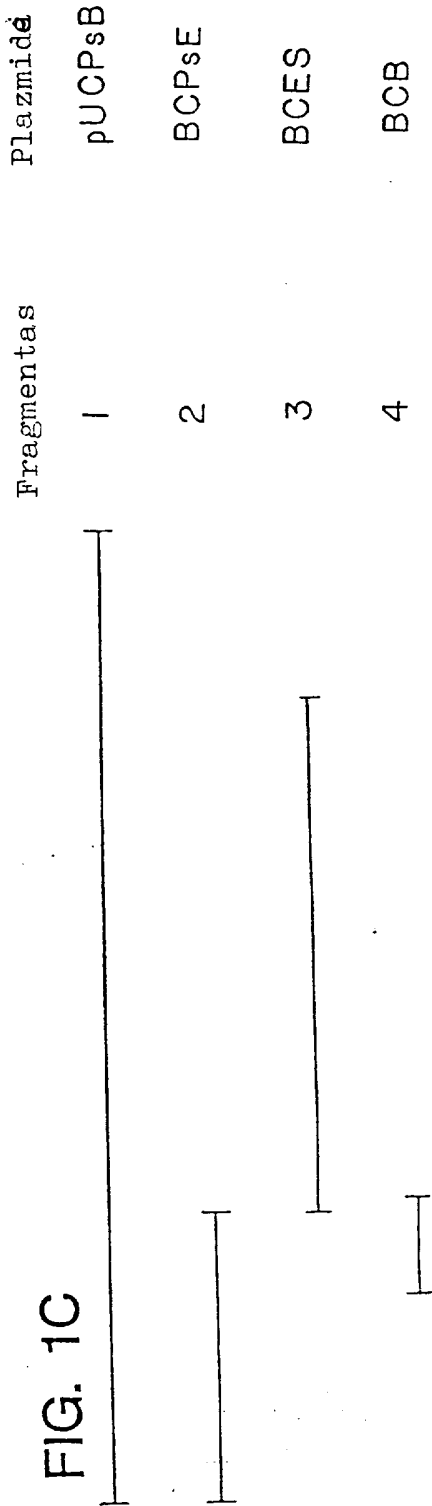


FIG. 2A

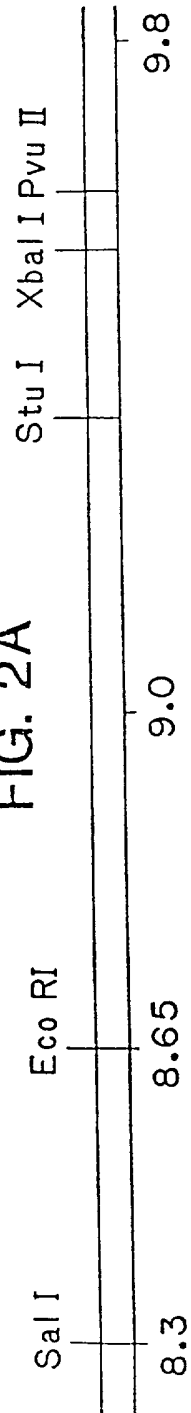


FIG. 2B

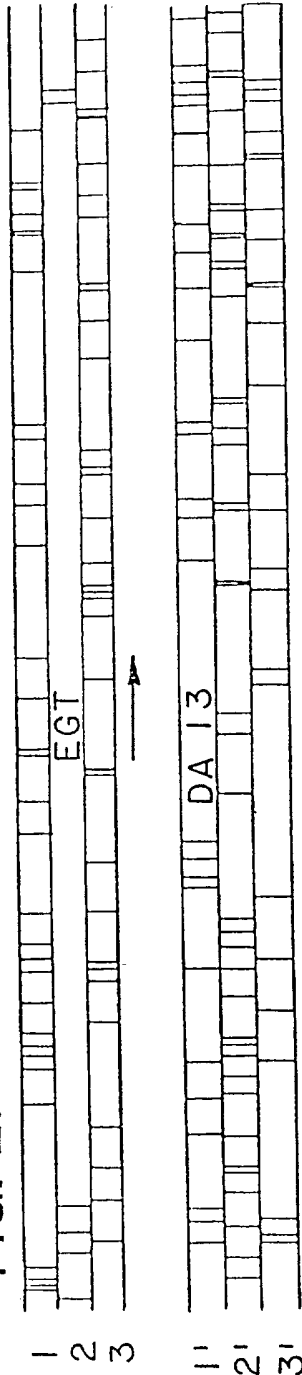


FIG. 3A

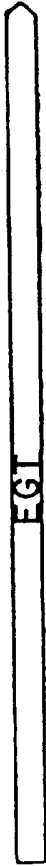


FIG. 3B

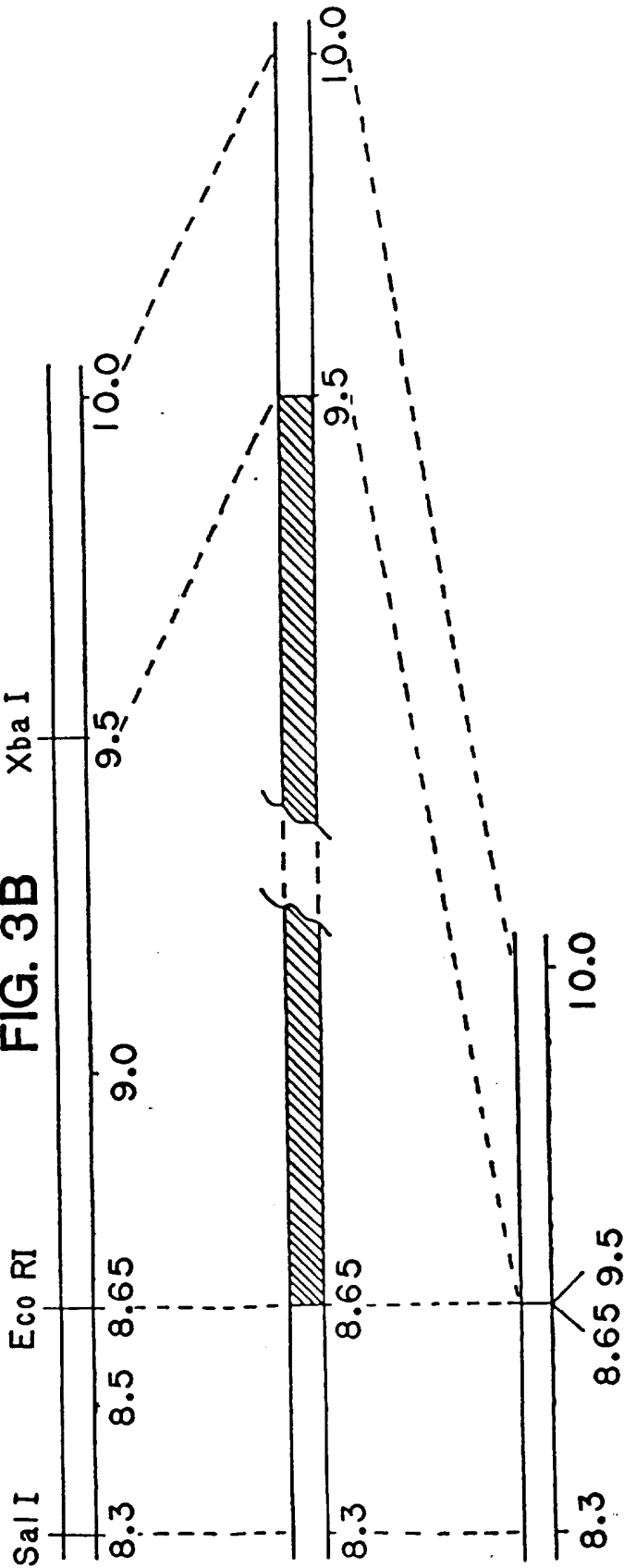


FIG.4

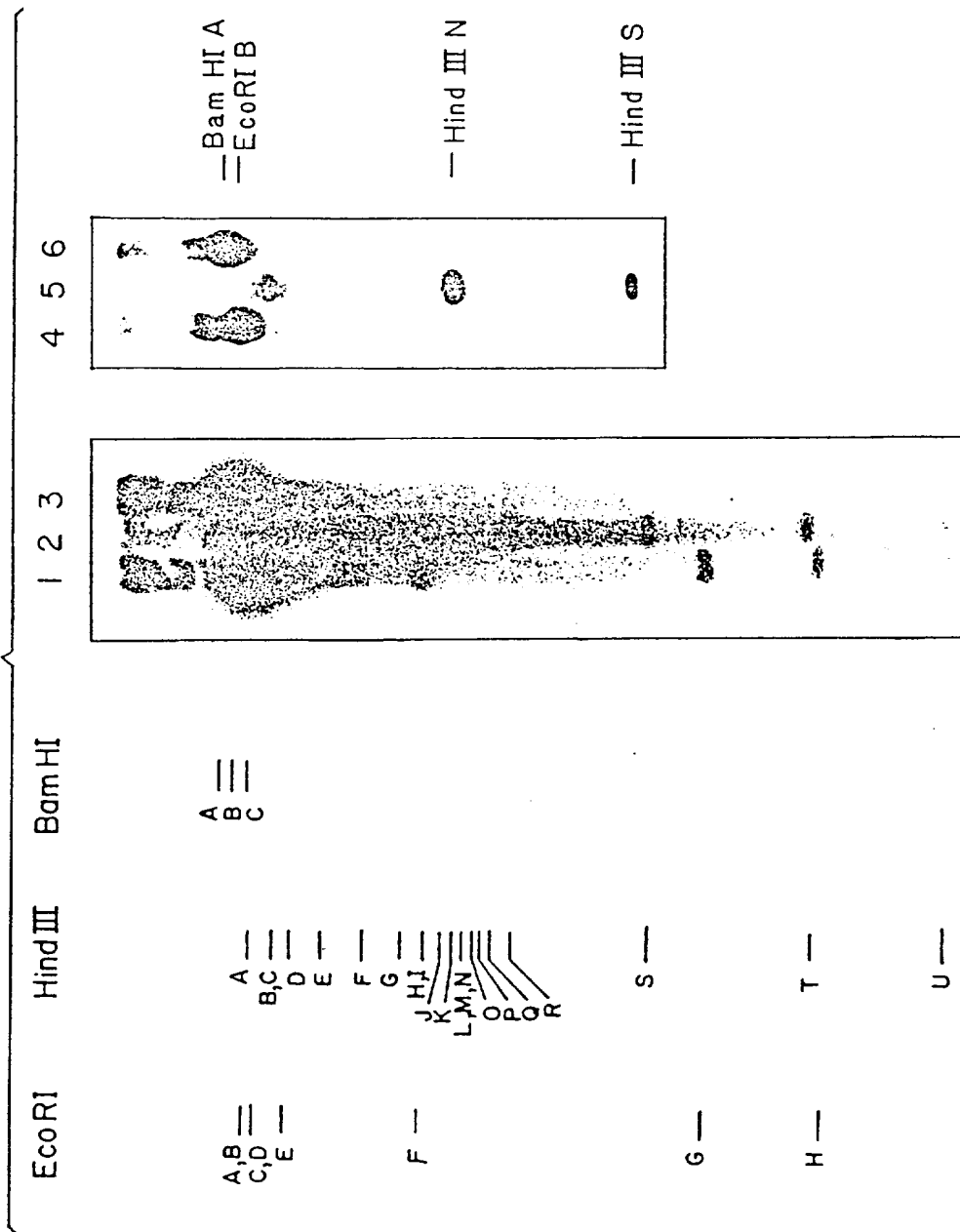
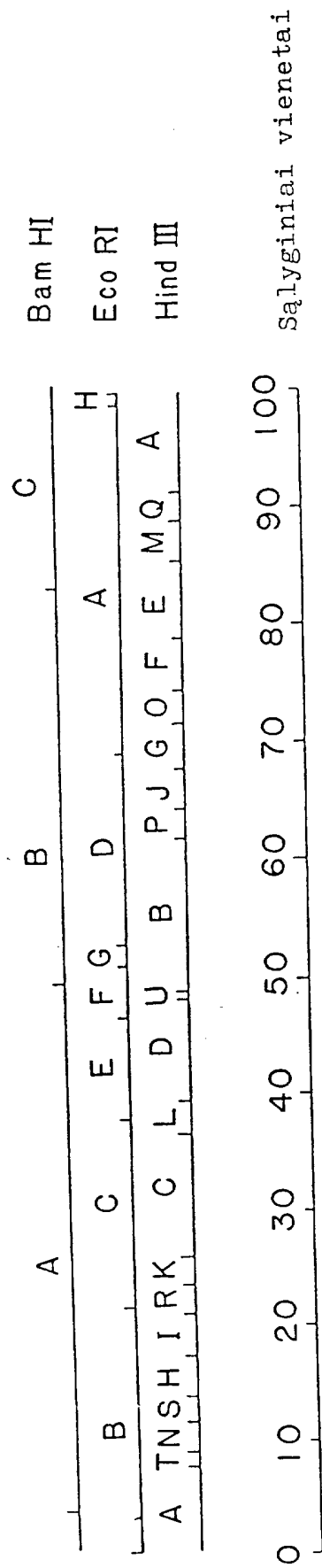


FIG.5



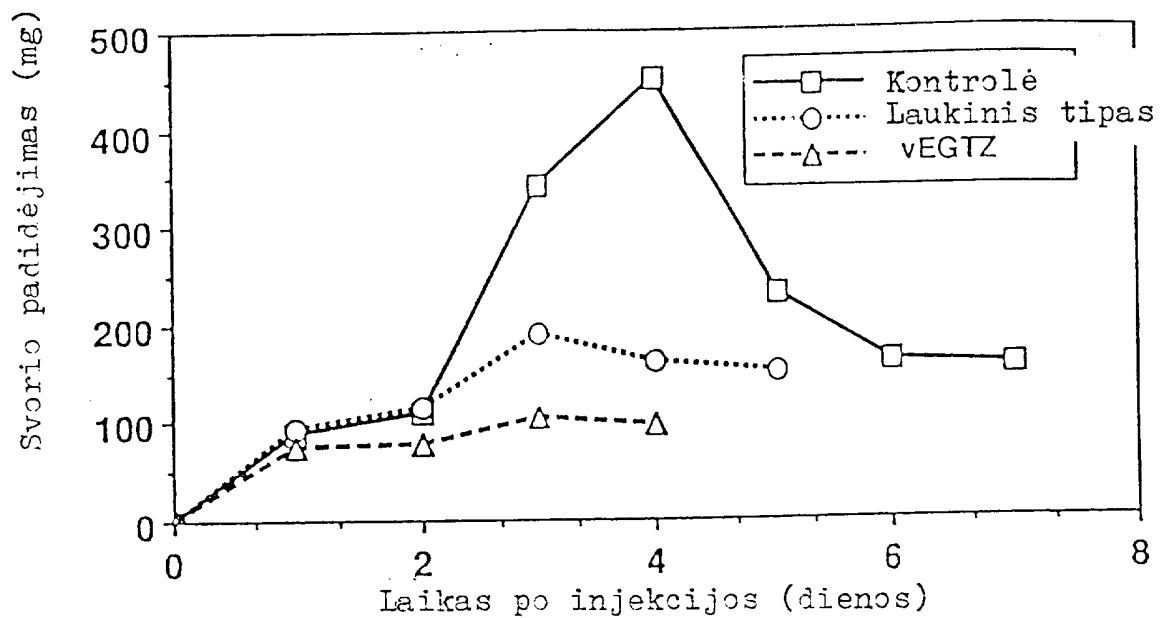


FIG.6

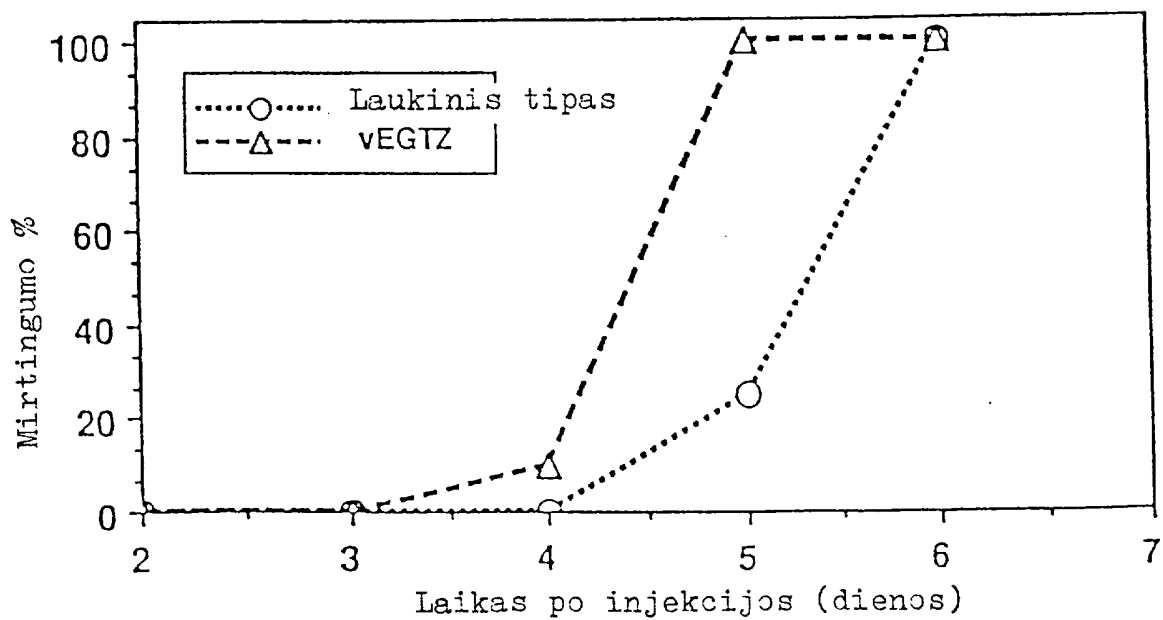


FIG. 7

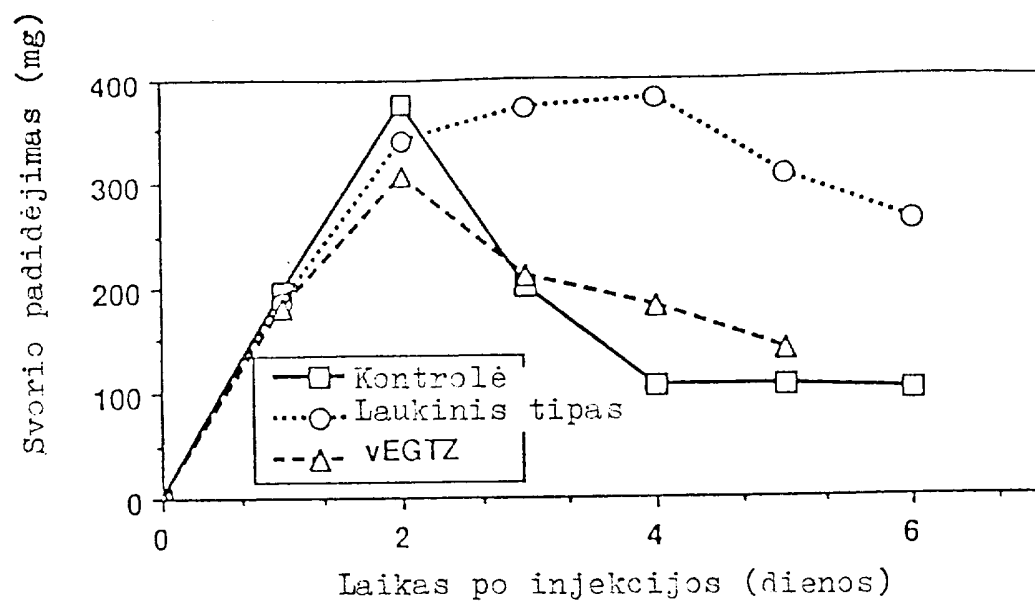


FIG. 8

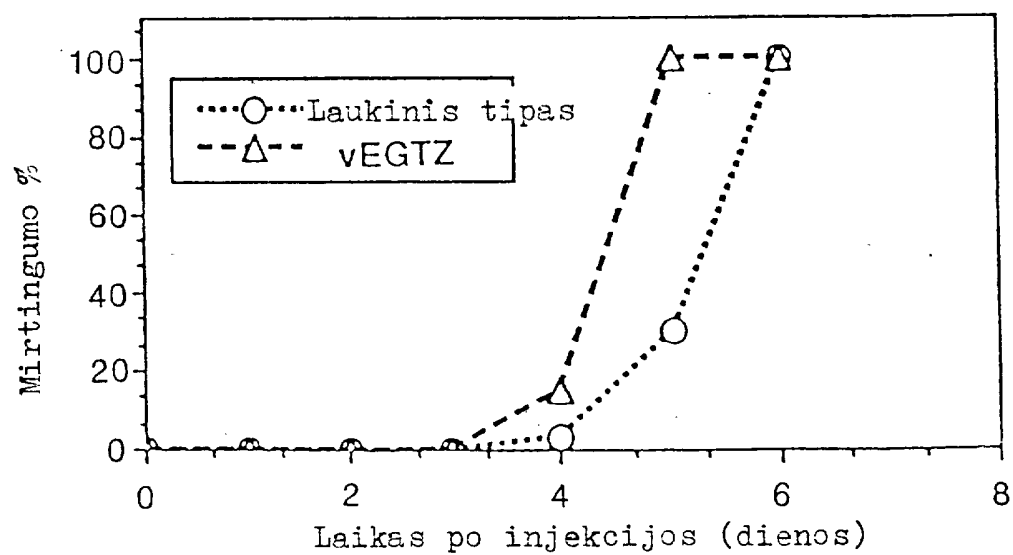


FIG. 9

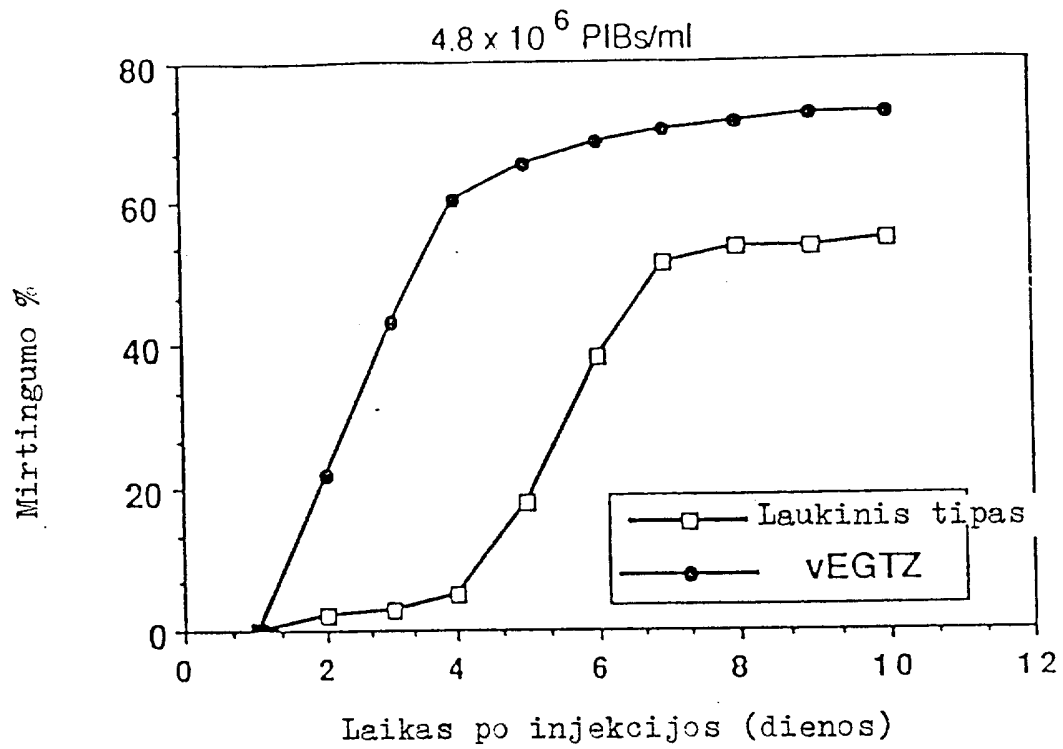


FIG. 10

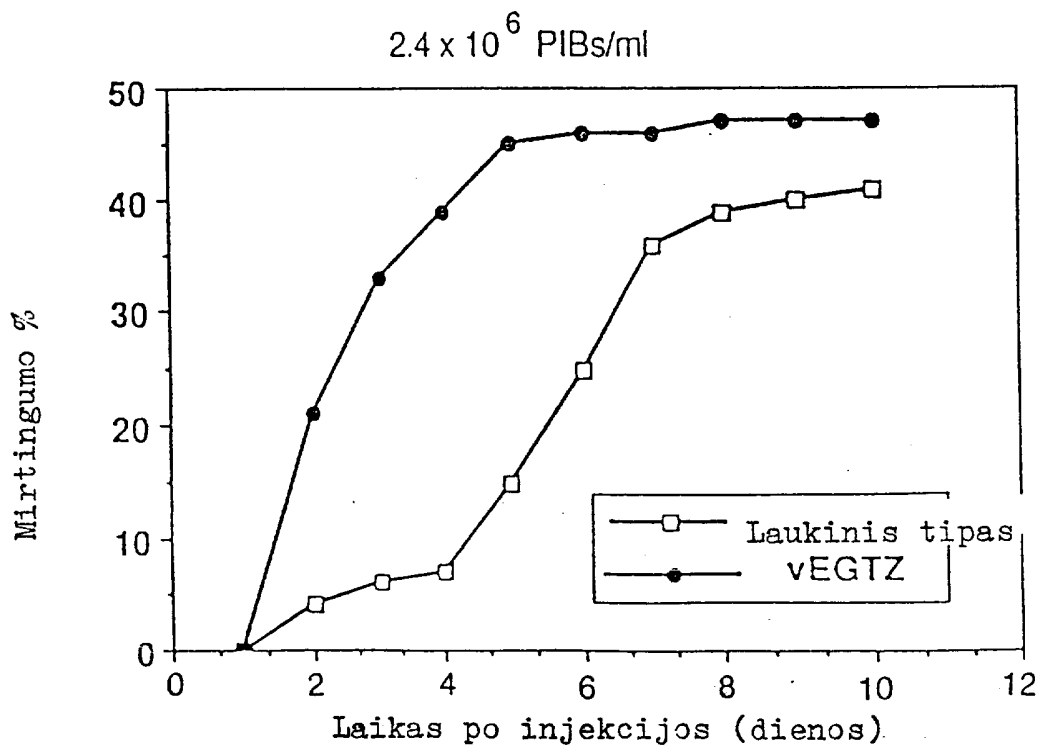


FIG. 11

genas, koduojantis ekdisteroid-gliukoziltransferazę. Be to, tokie bakulevirusai taip pat gali būti modifikuoti taip, kad būtų iššaukta baltymo, įtakojančio metamorfozę, ekspresija. Įtraukti taip pat vabzdžių kontrolės agentų gavimo būdai ir vabzdžių augimo ir vystymosi kontrolės būdai, paveikiant vabzdžius nurodytu kontroliuojančiu agentu.