



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103974972 B

(45)授权公告日 2018.05.22

(21)申请号 201280046415.1

(22)申请日 2012.07.27

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 103974972 A

(43)申请公布日 2014.08.06

(30)优先权数据  
61/512,536 2011.07.28 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2014.03.24

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2012/048510 2012.07.27

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02013/016622 EN 2013.01.31

(73)专利权人 阿森尼克斯公司  
地址 美国北卡罗来纳州

(72)发明人 金伯利·S·桑普森  
杜安·A·莱赫蒂宁

(74)专利代理机构 上海大邦律师事务所 31252  
代理人 胡红芳

(51)Int.Cl.  
C07K 14/325(2006.01)  
C12N 15/82(2006.01)  
A01H 5/00(2018.01)

(56)对比文件  
WO 2010099365 A2,2010.09.02,  
WO 2010141141 A2,2010.12.09,  
US 5686069 A,1997.11.11,  
WO 2009052242 A2,2009.04.23,  
审查员 徐俊

权利要求书2页 说明书29页  
序列表12页

(54)发明名称

AXMI270毒素基因及其使用方法

(57)摘要

在此提供了用于赋予针对细菌、植物、植物细胞、组织以及种子的杀虫活性的组合物和方法。提供了包含针对毒素多肽的编码序列的组合物。这些编码序列可以用在DNA构建体或表达盒中,以便用于在植物和细菌中转化和表达。组合物还包含转化的细菌、植物、植物细胞、组织、以及种子。具体地说,提供了分离的毒素核酸分子。另外,涵盖了与这些多核苷酸相应的氨基酸序列、以及与这些氨基酸序列特异性结合的抗体。具体地说,本发明提供了分离的核酸分子,这些核酸分子包含编码SEQ ID NO:3至5中所示的氨基酸序列的核苷酸序列、或在SEQ ID NO:2中列出的核苷酸序列、以及它们的变体和片段。

1. 一种重组核酸分子,该重组核酸分子由核苷酸序列构成,该核苷酸序列编码具有杀虫活性的氨基酸序列,其中所述核苷酸序列选自下组,该组由以下各项组成:

编码由SEQ ID NO:3至5中任何一项的氨基酸序列构成的多肽的核苷酸序列。

2. 如权利要求1所述的重组核酸分子,其中所述核苷酸序列是已经被设计为用于在植物中表达的合成序列。

3. 如权利要求1所述的重组核酸分子,其中所述核苷酸序列被可操作地连接至能够指导所述核苷酸序列在植物细胞中表达的启动子。

4. 一种包含如权利要求1所述的重组核酸分子的载体。

5. 如权利要求4所述的载体,该载体进一步包含编码异源多肽的核酸分子。

6. 一种包含如权利要求1所述的重组核酸分子的细菌宿主细胞。

7. 一种具有杀虫活性的重组多肽,该多肽为由SEQ ID NO:3至5中任何一项的氨基酸序列构成的多肽。

8. 如权利要求7所述的多肽,该多肽与多个异源氨基酸序列连接。

9. 一种包含如权利要求7所述的多肽的组合物。

10. 如权利要求9所述的组合物,其中所述组合物选自下组,该组由以下各项组成:粉末、颗粒、喷雾剂、乳液、胶体、以及溶液。

11. 如权利要求9所述的组合物,其中所述组合物是通过将细菌细胞的培养物干燥、均质化、提取、过滤、离心、沉降、或浓缩而制备的。

12. 如权利要求9所述的组合物,该组合物包含按重量计从1%至99%的所述多肽。

13. 一种非治疗目的的用于控制甜菜夜蛾、小菜蛾、大豆夜蛾、玉米螟种群的方法,该方法包括使所述种群与杀虫有效量的如权利要求7所述的多肽接触。

14. 一种非治疗目的的用于杀死甜菜夜蛾、小菜蛾、大豆夜蛾、玉米螟的方法,该方法包括使这些害虫接触或向这些害虫喂食杀虫有效量的如权利要求7所述的多肽。

15. 一种用于生产具有杀虫活性的多肽的方法,该方法包括在编码该多肽的核酸分子被表达的条件下培养如权利要求6所述的细菌宿主细胞。

16. 一种用于保护植物免受害虫侵害的方法,该方法包括在植物或其细胞中表达编码杀虫多肽的核苷酸序列,其中所述核苷酸序列选自下组,该组由以下各项组成:

编码由SEQ ID NO:3至5中任何一项的氨基酸序列构成的多肽的核苷酸序列;

其中,所述害虫为甜菜夜蛾、小菜蛾、大豆夜蛾、玉米螟。

17. 如权利要求16所述的方法,其中所述植物产生杀虫多肽,该杀虫多肽具有针对甜菜夜蛾、小菜蛾、大豆夜蛾、玉米螟的杀虫活性。

18. 一种用于增加植物的产量的方法,该方法包括在田地中使基因组中稳定结合有DNA构建体的植物或其种子生长,该DNA构建体包含编码具有杀虫活性的多肽的核苷酸序列,其中所述核苷酸序列选自下组,该组由以下各项组成:

编码由SEQ ID NO:3至5中任何一项的氨基酸序列构成的多肽的核苷酸序列;

其中所述田地被害虫侵染,所述多肽具有针对该害虫的杀虫活性,所述害虫为甜菜夜蛾、小菜蛾、大豆夜蛾、玉米螟。

19. 一种重组核酸分子,该重组核酸分子由核苷酸序列构成,该核苷酸序列编码具有杀虫活性的氨基酸序列,其中所述核苷酸序列选自:在SEQ ID NO:2中列出的核苷酸序列。

20. 一种用于保护植物免受害虫侵害的方法,该方法包括在植物或其细胞中表达编码杀虫多肽的核苷酸序列,其中所述核苷酸序列选自:在SEQ ID NO:2中列出的核苷酸序列;其中,所述害虫为甜菜夜蛾、小菜蛾、大豆夜蛾、玉米螟。

21. 一种用于增加植物的产量的方法,该方法包括在田地中使基因组中稳定结合有DNA构建体的植物或其种子生长,该DNA构建体包含编码具有杀虫活性的多肽的核苷酸序列,其中所述核苷酸序列选自:在SEQ ID NO:2中列出的核苷酸序列;

其中所述田地被害虫侵染,所述多肽具有针对该害虫的杀虫活性,所述害虫为甜菜夜蛾、小菜蛾、大豆夜蛾、玉米螟。

## AXMI270毒素基因及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2011年7月28日提交的美国临时申请序列号61/512,536的权益,该申请的内容通过引用以其全部内容结合在此。

[0003] 电子提交的序列表的引用

[0004] 所述序列表的官方副本经由EFS-Web作为ASCII格式序列列表以电子方式提交,文件名为“APA116030SEQLIST.TXT”,创建于2012年7月19日、并且具有24.9千字节大小,并且与本说明书同时提交。包含在这一ASCII格式文件中的序列列表是本说明书的一部分并且通过引用以其全部内容结合在此。

### 发明领域

[0005] 本发明涉及分子生物学领域。提供了编码杀虫蛋白的新颖的基因。这些蛋白质和编码它们的这些核酸序列在制备杀虫制剂中以及在生产转基因抗害虫植物中是有用的。

[0006] 发明背景

[0007] 苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)是革兰氏阳性产芽孢土壤细菌,其特征在于其产生晶状内含体的能力,所述晶状内含体特异性地对于昆虫的某些目和种具有毒性,但对于植物和其他非靶生物是无害的。因此,包含苏云金芽孢杆菌菌株或它们的杀昆虫蛋白质的组合物可用作环境上可接受的杀昆虫剂以用于防治农业昆虫害虫或者各种人或动物疾病的昆虫媒介。

[0008] 来自苏云金芽孢杆菌的晶体(Cry)蛋白( $\delta$ -内毒素)具有主要针对鳞翅目、半翅目、双翅目、以及鞘翅目幼虫的有效的杀昆虫活性。这些蛋白还已经显示针对膜翅目、同翅目、虱目、食毛目、以及蜱螨亚纲害虫目(Acari pest order)、连同其他无脊椎动物目(如线虫动物门、扁形动物门、以及原生动物门肉鞭毛虫亚门)的活性(费特逊(Feitelson)(1993)在先进的经基因改造的杀虫剂中的苏云金芽孢杆菌家族树(The *Bacillus Thuringiensis* family tree In Advanced Engineered Pesticides),马塞尔·德克尔格式(Marcel Dekker, Inc.),纽约,纽约州(N.Y.))。这些蛋白质最初主要基于它们的杀昆虫活性而分类为CryI至CryV。主要类别是鳞翅目特异性的(I)、鳞翅目和双翅目特异性的(II)、鞘翅目特异性的(III)、双翅目特异性的(IV)以及线虫特异性的(V)和(VI)。这些蛋白质进一步分类成亚家族;在每个家族内更高度相关的蛋白质被指定了分组字母例如Cry1A、Cry1B、Cry1C等等。在每个分组内更加密切相关的蛋白质被给予诸如Cry1C1、Cry1C2等的名称。

[0009] 最近基于氨基酸序列同源性而不是昆虫靶特异性描述了Cry基因的新命名法(克里克莫尔(Crickmore)等人(1998)微生物学与分子生物学评论(Microbiol.Mol.Biol.Rev.)62:807-813)。在该新的分类中,每种毒素被指定了独特的名称,其中包括第一级(primary rank)(阿拉伯数字)、第二级(secondary rank)(大写字母)、第三级(tertiary rank)(小写字母)、以及第四级(quaternary rank)(另一个阿拉伯数字)。在该新的分类中,在第一级中,罗马数字已被换成阿拉伯数字。具有低于45%的序列同一性的蛋白质具有不同的第一级,第二和第三级的标准分别为78%和95%。

[0010] 晶体蛋白不展示杀昆虫活性,直至其被摄取并溶解在昆虫中肠之中。被摄取的原毒素在昆虫消化道中被蛋白酶水解成活性毒性分子。(Höfte 和怀特利(Whiteley) (1989) 生物学评论(Microbiol.Rev.) 53:242-255)。这种毒素与靶幼虫的中肠中的顶端刷状缘受体结合并插入顶端膜中,产生离子通道或孔,从而导致幼虫死亡。

[0011]  $\delta$ -内毒素通常具有五个保守的序列结构域和三个保守的结构域(参见,例如 de Maagd 等人(2001) 遗传学趋势(Trends Genetics) 17:193-199)。第一个保守的结构域由 7 个  $\alpha$  螺旋组成并且参与膜插入和孔形成。结构域 II 由排列成希腊钥匙(Greek key) 构型的三个  $\beta$  片层组成,并且结构域 III 由“果酱卷(jelly-roll)”形式的两个反向平行的  $\beta$  片层组成(de Maagd 等人,2001,上文)。结构域 II 和 III 参与受体识别和结合,并且因此被认为是毒素特异性的决定簇。

[0012] 由于昆虫可能带来破坏、以及通过控制昆虫害虫在产量方面的改进,对于发现一种新形式的杀虫毒素存在着不断的需要。

[0013] 发明概述

[0014] 提供了用于赋予针对细菌、植物、植物细胞、组织以及种子的杀虫活性的组合物和方法。组合物包含针对杀虫的(pesticidal) 和杀昆虫的(insectidal) 多肽的核酸分子编码序列、包含那些核酸分子的载体、以及包含这些载体的宿主细胞。组合物还包含这些杀虫多肽序列以及针对那些多肽的抗体。这些核苷酸序列可以用在 DNA 构建体或表达盒中,以用于在多种生物(包括微生物和植物) 中进行转化和表达。这些核苷酸或氨基酸序列可以是合成序列,这些合成序列已经被设计为用于在一种生物中表达,该生物包括但不限于:一种微生物或一种植物。组合物还包含含有本发明的核苷酸序列的细菌、植物、植物细胞、组织、以及种子。

[0015] 具体地说,提供了编码一种杀虫蛋白的分离的核酸分子。另外,涵盖了与这些杀虫蛋白相应的氨基酸序列。具体地,本发明提供了一种分离或重组的核酸分子,该核酸分子包括编码 SEQ ID NO:3 至 5 中所示的氨基酸序列的核苷酸序列、或在 SEQ ID NO:2 中列出的核苷酸序列、以及它们的生物活性变体和片段。还涵盖了与本发明的一个核苷酸序列互补的核苷酸序列、或与本发明的一个序列或其互补物杂交的核苷酸序列。另外还提供了包含本发明的这些核苷酸序列或者编码本发明的这些氨基酸序列的核苷酸序列以及它们的生物活性变体和片段的载体、宿主细胞、植物以及种子。

[0016] 提供了用于产生本发明的多肽的方法、以及用于使用这些多肽来控制或杀死鳞翅目、半翅目、鞘翅目、线虫、或双翅目害虫的方法。还包括用于检测在样品中的本发明的这些核酸和多肽的方法和试剂盒。

[0017] 本发明的这些组合物和方法用于产生具有增强的害虫抗性或耐受性的生物。这些生物以及包括这些生物的组合物对于农业目的是所希望的。本发明的这些组合物还用于产生具有杀虫活性的改变的或改进的蛋白质、或检测在产物或生物中的杀虫蛋白或核酸的存在。

[0018] 详细说明

[0019] 本发明描绘了用于调节生物(特别是植物或植物细胞) 中的害虫抗性或耐受性的组合物和方法。“抗性”是指该害虫(例如,昆虫) 在摄取或以其他方式接触本发明的多肽类之后被杀死。“耐受性”是指该害虫的运动、摄食、繁殖、或其他功能的损害或降低。这些方法

涉及用编码本发明的一种杀虫蛋白的核苷酸序列来转化生物。具体地说,本发明的核苷酸序列用于制备具有杀虫活性的植物和微生物。因此,提供了转化的细菌、植物、植物细胞、植物组织以及种子。组合物是杆菌或其他物种的杀虫核酸和蛋白质。这些序列用于随后转化到感兴趣的生物中的表达载体的构建,作为用于其他同源(或部分同源的)基因的分离的探针,以及用于通过本领域中已知的方法(如,结构域交换或DNA改组)来产生改变的杀虫蛋白,例如内毒素的Cry1、Cry2以及Cry9家族成员。这些蛋白用于控制或杀死鳞翅目、半翅目、鞘翅目、双翅目、以及线虫害虫种群、以及用于生产具有杀虫活性的组合物。

[0020] 关于“杀虫毒素”或“杀虫蛋白”是指一种毒素,该毒素具有针对一种或多种害虫的毒性,包括但不限于:鳞翅目、双翅目、以及鞘翅目、或线虫动物门成员、或者与这种蛋白质具有同源性的一种蛋白质。已经从生物中分离出杀虫蛋白,这些生物包括例如,芽孢杆菌(*Bacillus* sp)、双酶梭菌(*Clostridium bifermentans*)、以及日本甲虫类芽孢杆菌(*Paenibacillus popilliae*)。杀虫蛋白包括从在此披露的全长核苷酸序列中推导出的氨基酸序列、以及比这些全长序列更短的氨基酸序列(或者由于使用了一个可替代的下游起始位点、或者由于产生一个较短的具有杀虫活性的蛋白质的加工过程)。加工可以在表达该蛋白质的生物内发生,或在该害虫摄取该蛋白质之后发生。

[0021] 杀虫蛋白类涵盖了 $\delta$ -内毒素。 $\delta$ -内毒素包括被标识为cry1至cry43、cyt1和cyt2、以及Cyt样毒素的蛋白质。目前存在着超过250种已知的 $\delta$ -内毒素种类,它们具有宽范围的特异性和毒性。关于扩展性列表,参见克里克莫尔等人(1998),*微生物学与分子生物学评论* 62:807-813,并且对于定期更新,参见克里克莫尔等人(2003)“苏云金芽孢杆菌毒素命名法(*Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature)”,在[www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/index](http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index)处。

[0022] 因此,在此提供了新颖的分离或重组的核苷酸序列,这些序列赋予了杀虫活性。这些核苷酸序列编码与已知的 $\delta$ -内毒素或二元毒素具有同源性的多肽。还提供了这些杀虫蛋白的氨基酸序列。由这种基因的翻译而产生的蛋白质允许细胞控制或杀死摄取了该蛋白质的害虫。

[0023] 分离的核酸分子、以及它们的变体和片段

[0024] 本发明的一个方面涉及分离的或重组的核酸分子,这些核酸分子包含编码杀虫蛋白和多肽或它们的生物活性部分的核苷酸序列;以及足以用作杂交探针来鉴定编码具有序列同源性的区域的蛋白质的核酸分子的核酸分子。在此还涵盖了能够在如在此的其他部分所定义的严格条件下与本发明的核苷酸序列杂交的核苷酸序列。如在此所使用的,术语“核酸分子”旨在包括DNA分子(例如,重组DNA、cDNA或基因组DNA)和RNA分子(例如,mRNA)以及使用核苷酸类似物产生的DNA或RNA的类似物。这种核酸分子可以是单链或双链的,但优选是双链DNA。

[0025] “分离的”或“重组的”核酸序列(或DNA)被用在此处是指一种核酸序列(或DNA),该核酸序列(或DNA)不再存在于它的自然环境中(例如,在体外或在重组细菌或植物宿主细胞中)。在一些实施例中,一种分离的或重组的核酸是不含有在衍生出该核酸的生物的基因组DNA中天然地位于该核酸侧翼的序列(即,位于该核酸的5'和3'末端的序列)(优选编码蛋白质的序列)。出于本发明的目的,“分离的”当用于指核酸分子时不包括分离的染色体。例如,在不同的实施例中,编码分离的 $\delta$ -内毒素的核酸分子可包含小于约5kb、4kb、3kb、2kb、1kb、

0.5kb、或0.1kb的核苷酸序列,这些核苷酸序列在衍生出该核酸的细胞的基因组DNA中天然地位于该核酸分子侧翼。在不同的实施例中,基本上不含有细胞物质的一种 $\delta$ 内毒素蛋白包括具有少于约30%、20%、10%或5%(按干重计)的非 $\delta$ 内毒素蛋白(在此也被称为“污染蛋白质”)的蛋白质制剂。

[0026] 编码本发明的这些蛋白质的核苷酸序列包括SEQ ID NO:2中列出的序列以及它们的变体、片段以及互补物。关于“互补物”是指与给定的核苷酸序列足够地互补使得它可以与该给定的核苷酸序列杂交由此形成一个稳定的双链体的核苷酸序列。对于由这些核苷酸序列所编码的杀虫蛋白的相应氨基酸序列在SEQ ID NO:3至5中列出。

[0027] 本发明还涵盖了以下核酸分子,这些核酸分子是这些编码杀虫蛋白的核苷酸序列的片段。关于“片段”是指编码一种杀虫蛋白的核苷酸序列的一个部分。核苷酸序列的一个片段可以编码杀虫蛋白的生物活性部分,或者它可以是使用以下披露的方法可以用作一种杂交探针或PCR引物的一个片段。作为编码杀虫蛋白的一个核苷酸序列片段的核酸分子包括至少约50、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1350、1400个邻接核苷酸,或达到在此披露的一种全长的编码杀虫蛋白的核苷酸序列中存在的核苷酸的数目,这取决于所预期的用途。关于“邻接的”核苷酸旨在指彼此邻近的核苷酸残基。本发明的核苷酸序列的片段将编码保留杀虫蛋白的生物活性、并且因此保留杀虫活性的蛋白质片段。因此,还涵盖了在此披露的多肽的生物活性片段。关于“保留活性”是指该片段将具有至少约30%、至少约50%、至少约70%、80%、90%、95%或更高的该杀虫蛋白的杀虫活性。在一个实施例中,该杀虫活性是杀鞘翅目活性。在另一个实施例中,该杀虫活性是杀鳞翅目活性。在另一个实施例中,该杀虫活性是杀线虫活性。在另一个实施例中,该杀虫活性是杀双翅目活性。在另一个实施例中,该杀虫活性是杀半翅目活性。用于测量杀虫活性的多种方法在本领域是已熟知的。参见,例如,查普拉(Czapla)和朗(Lang)(1990)经济昆虫学杂志(J.Econ.Entomol.)83:2480-2485;安德鲁斯(Andrews)等人(1988)生物化学杂志(Biochem.J.)252:199-206;马罗内(Marrone)等人(1985)经济昆虫学杂志78:290-293;以及美国专利号5,743,477,这些文献都通过引用以其全部内容结合在此。

[0028] 编码本发明的蛋白质的生物活性部分的编码杀虫蛋白的核苷酸序列片段将编码至少约15、25、30、50、75、100、125、150、175、200、250、300、350、400、450个邻接氨基酸,或达到在本发明的全长杀虫蛋白中存在的氨基酸的总数目。在一些实施例中,该片段是蛋白酶切片段。例如,蛋白酶切片段可以相对于SEQ ID NO:3至5具有至少约100个氨基酸、约120个、约130个、约140个、约150个、或约160个氨基酸的一个N末端或C末端截短。在一些实施例中,在此所涵盖的这些片段是由例如通过蛋白酶解或通过插入终止密码子来除去C末端结晶结构域而产生。

[0029] 本发明的优选杀虫蛋白是通过与SEQ ID NO:2的核苷酸序列足够地一致的核苷酸序列编码的,或者这些杀虫蛋白是与SEQ ID NO:3至5中所列出的氨基酸序列足够地一致的。关于“足够地一致”是指使用标准参数、使用在此所描述的比对程序之一,一种氨基酸或核苷酸序列与参考序列相比较具有至少约60%或65%序列一致性、约70%或75%序列一致性、约80%或85%序列一致性、约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的序列一致性。本领域的普通技术人员将会认识到,可以对这些数值进行适当地调整以便通过考虑密码子简并性、氨基酸相似性、阅读框定位、等等来确定由两个核苷酸序列编码的蛋白质的

相应一致性。

[0030] 为了确定两个氨基酸序列或两个核酸的一致性百分比,针对最佳比较目的而比对这些序列。这两个序列之间的一致性百分比是由这些序列共有的相同位置的数目的函数(即,一致性百分比=相同位置的数目/位置(例如,重叠位置)的总数目 $\times$ 100)。在一个实施例中,这两个序列是相同长度的。在另一个实施例中,该一致性百分比是贯穿参考序列(即,在此披露的如SEQ ID NO:3至5中任一项的序列)的整体来计算的。在两个序列之间的一致性百分比可以使用与以下说明的那些相似的技术来确定,其中允许或不允许空位。在计算一致性百分比中,对典型地准确的匹配进行计数。一个空位(即,在其中一个残基存在于一个序列中但不存在于另一个序列中的比对中的一个位置)被认为是具有非一致性残基的一个位置。

[0031] 在两个序列之间的一致性百分比的确定可以使用一种数学算法来完成。用于两个序列的比較的数学算法的一个非限制性实例是卡尔林(Karlin)和阿尔丘尔(Altschul)(1990)美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci USA)87:2264的算法,它在卡尔林和阿尔丘尔(1993)美国国家科学院院刊90:5873-5877中进行了修改。这种算法被结合到阿尔丘尔等人(1990)分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)215:403的BLASTN和BLASTX程序中。BLAST核苷酸搜索可以用BLASTN程序(得分=100、字长=12)来进行,以获得与本发明的杀虫样核酸分子同源的核苷酸序列。BLAST蛋白质搜索可以用BLASTX程序(得分=50、字长=3)来进行,以获得与本发明的杀虫蛋白分子同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的空位比对,可以使用如阿尔丘尔等人(1997)核酸研究(Nucleic Acids Res.)25:3389中所说明的空位BLAST(在BLAST2.0中)。可替代地,PSI-Blast可以用于进行一种迭代搜索,该搜索检测了分子间的远离关系。参见阿尔丘尔等人(1997)同上。当利用BLAST、空位BLAST和PSI-Blast程序时,可以使用对应的程序(例如,BLASTX和BLASTN)的默认参数。还可通过目测检查而手工地进行比对。

[0032] 用于序列比較的数学算法的另一个非限制性实例是ClustalW算法(希金斯(Higgins)等人(1994)核酸研究22:4673-4680)。ClustalW比较了序列并且比对了该氨基酸或DNA序列的整体,并且因此可以提供有关整个氨基酸序列的序列保守性的数据。ClustalW算法用于几个可商购的DNA/氨基酸分析软件包,如Vector NTI Program Suite的ALIGNX模块(英杰公司(Invitrogen Corporation),卡尔斯巴德(Carlsbad),加利福尼亚(CA))。在用ClustalW对多个氨基酸序列进行比对之后,可以评估氨基酸一致性百分比。适用于ClustalW比对分析的软件程序的一个非限制性实例是GENEDOC™。GENEDOC™(卡尔·尼古拉斯公司(Karl Nicholas))允许在多个蛋白质之间评估氨基酸(或DNA)相似性和一致性。用于比較序列的数学算法的另一个非限制性实例是迈尔斯(Myers)和米勒(Miller)(1988)生物科学中的计算机应用(CABIOS)4:11-17的算法。这种算法被结合到ALIGN程序(版本2.0)中,该程序是GCG威斯康星遗传学软件包(Wisconsin Genetics Software Package)(版本10)(可商购自阿塞勒德公司(Accelrys, Inc.), 斯克兰顿路9685号(9685Scranton Rd.), 圣地亚哥(San Diego), 加利福尼亚州, 美国)的一部分。当利用ALIGN程序来比較多个氨基酸序列时,可以使用一个PAM120权重残基表、空位长度罚分12、以及空位罚分4。

[0033] 除非另有说明,GAP版本10(它采用了尼德曼(Needleman)和翁施(Wunsch)(1970)分子生物学杂志48(3):443-453的算法)将使用以下参数来用于测定序列一致性或相似性:



对于一个核苷酸序列的一致性百分比和相似性百分比,使用GAP权重50和长度权重3,以及nwsgapdna.cmp评分矩阵;对于一个氨基酸序列的一致性百分比和相似性百分比,使用GAP权重8和长度权重2,以及BLOSUM62评分程序。还可以使用等效程序。关于“等效程序”是指以下任何序列比较程序,该程序针对所研究的任何两个序列、当与由GAP版本10所产生的相应比对相比时产生一个比对,该比对具有相同的核苷酸残基匹配以及一个相同的序列一致性百分比。

[0034] 本发明还涵盖了变体核酸分子。编码杀虫蛋白的核苷酸序列的“变体”包括编码在此披露的杀虫蛋白、但由于遗传密码的简并性而保守性地不同的那些序列以及如以上所讨论的足够一致的那些序列。天然存在的等位基因变体可以使用所熟知的分子生物学技术来鉴定,例如像以下所概括的聚合酶链式反应(PCR)以及杂交技术。变体核苷酸序列还包括合成地衍生的核苷酸序列,这些核苷酸序列已经例如通过使用定点诱变而产生但它们仍编码在本发明中所披露的杀虫蛋白,如以下所讨论的。本发明所涵盖的变体蛋白是有生物活性的,即它们继续具有所希望的天然蛋白的生物活性,即杀虫活性。关于“保留活性”是指该片段将具有至少约30%、至少约50%、至少约70%、或至少约80%的该天然蛋白的杀虫活性。用于测量杀虫活性的多种方法在本领域是已熟知的。参见,例如,查普拉和朗(1990)经济昆虫学杂志83:2480-2485;安德鲁斯(Andrews)等人(1988)生物化学杂志252:199-206;马罗内等人(1985)经济昆虫学杂志78:290-293;以及美国专利号5,743,477,这些文献通过引用以其全部内容结合在此。

[0035] 熟练的技术人员将进一步意识到,可以通过突变本发明的核苷酸序列来引入变化,由此导致在这些编码的杀虫蛋白的氨基酸序列中的变化,而不改变这些蛋白质的生物活性。因此,可以通过将一个或多个核苷酸置换、添加、或缺失引入到在此披露的相应核苷酸序列中而产生分离的核酸分子变体,使得将一个或多个氨基酸置换、添加、或缺失引入到编码的蛋白质中。可以通过标准的技术(如定点诱变和PCR介导的诱变)来引入突变。这样的变体核苷酸序列也由本发明所涵盖。

[0036] 例如,可以在一个或多个、预测的、非必需氨基酸残基处做出保守性氨基酸置换。一个“非必需”氨基酸残基是可以从一种杀虫蛋白的野生型序列改变的而不改变生物活性的残基,而一个“必需”氨基酸残基是生物活性所需要的。“保守性氨基酸置换”是其中氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基替换的置换。在本领域中已经对具有相似侧链的氨基酸残基家族进行定义。这些家族包括具有以下侧链的氨基酸:碱性侧链(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、 $\beta$ 分支的侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)、以及芳香族侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。

[0037]  $\delta$ -内毒素通常具有五个保守的序列结构域和三个保守的结构域(参见,例如de Maagd等人(2001)遗传学趋势17:193-199)。第一个保守的结构域由7个 $\alpha$ 螺旋组成并且参与膜插入和孔形成。结构域II由排列成希腊钥匙构型的三个 $\beta$ 折叠组成并且结构域III由“果酱卷”结构中的两个反向平行的 $\beta$ 折叠组成(de Maagd等人,2001,上文)。结构域II和III参与受体识别和结合,并且因此被认为是毒素特异性的决定簇。

[0038] 氨基酸置换可以在保留功能的非保守性区域中做出。通常,此类置换并非针对保

守的氨基酸残基、或针对在一个保守基序内的氨基酸残基而做出,其中此类残基是蛋白活性所必需的。保守的并且对于蛋白质活性可能是必需的残基的实例包括例如以下残基,这些残基在与本发明的序列相似或相关的毒素的比对中所包含的所有蛋白质之间是相同(例如,在同源蛋白的比对中是相同的残基)。保守的但可能允许保守性氨基酸置换、并且仍保留活性的残基的实例包括例如以下残基,这些残基在与本发明的序列相似或相关的毒素的比对中所包含的所有蛋白质之间仅具有保守性置换(例如,在比对同源蛋白中所包含的所有蛋白质之间仅具有保守性置换的残基)。然而,本领域的普通技术人员应当理解,功能性变体在保守的残基中可以具有少量的保守性或非保守性改变。

[0039] 可替代地,可以通过沿着该编码序列的全部或部分随机地引入突变(如通过饱和和诱变)来制备变体核苷酸序列,并且可以针对赋予杀虫活性的能力来筛选得到的突变体以鉴定保留活性的突变体。在诱变之后,可以重组表达编码的蛋白质,并且可以使用标准的测定技术来测定蛋白质的活性。

[0040] 使用诸如PCR、杂交、以及类似的方法可以鉴定出相应的杀虫序列,这样的序列与本发明的序列具有实质性上的一致性。参见,例如,萨姆布鲁克(Sambrook)和拉塞尔(Russell)(2001)分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)(冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press),冷泉港(Cold Spring Harbor),纽约)以及英尼斯(Innis)等人(1990)PCR方案:方法和应用指导(PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications)(学术出版社(Academic Press),纽约)。

[0041] 在一种杂交方法中,该杀虫核苷酸序列的全部或部分可以用于筛选cDNA或基因组文库。用于构建此类cDNA和基因组文库的方法在本领域内通常是已知的,并且披露于萨姆布鲁克和拉塞尔,2001,同上。所谓的杂交探针可以是基因组DNA片段、cDNA片段、RNA片段、或其他寡核苷酸,并且可以用一个可检测基团(如<sup>32</sup>P、或任何其他可检测的标记物,如其他放射性同位素、一种荧光化合物、一种酶、或一种酶辅因子)进行标记。可以基于在此披露的已知的编码杀虫蛋白的核苷酸序列通过标记合成寡核苷酸来制备用于杂交的探针。可以另外地使用简并引物,这些引物是基于在该核苷酸序列或编码的氨基酸序列中的保守性核苷酸或氨基酸残基而设计的。这种探针典型地包括以下核苷酸序列的一个区域,这些核苷酸序列区域在严格条件下与本发明的编码一种杀虫蛋白的核苷酸序列或它的一个片段或变体的至少约12个、至少约25个、至少约50、75、100、125、150、175、或200个连续核苷酸进行杂交。用于制备用于杂交的探针的方法通常是本领域已知的,并且披露于萨姆布鲁克和拉塞尔,2001(同上)中,该文献通过引用结合在此。

[0042] 例如,在此披露的一个完整的杀虫序列、或它的一个或多个部分可以用作一种探针,该探针能够与相应的杀虫蛋白样序列以及信使RNA特异性地杂交。为了实现在不同的条件下的特异性杂交,这样的探针包括以下序列,这些序列是独特的并且长度优选为至少约10个核苷酸、或长度为至少约20个核苷酸。这样的探针可以用于通过PCR从一种选择的生物中扩增相应的杀虫序列。这种技术可以用于从一种所希望的生物中分离另外的编码序列,或用作一种诊断性测定以便确定在一种生物中的编码序列的存在。杂交技术包括杂交筛选平板接种的DNA文库(噬斑抑或菌落;参见,例如萨姆布鲁克等人(1989)分子克隆:实验室手册(第二版,冷泉港实验室出版社,冷泉港,纽约))。

[0043] 因此,本发明涵盖了用于杂交的探针以及能够与本发明的核苷酸序列的全部或部

分(例如,至少约300个核苷酸、至少约400个、至少约500、1000、1200、1500、2000、2500、3000、3500个核苷酸、或者达到在此披露的一个核苷酸序列的全长)杂交的核苷酸序列。这样的序列的杂交可以在严格条件下进行。“严格条件”或“严格杂交条件”是指以下条件,在这些条件下与其他序列相比一种探针将与它的目标序列杂交达到一个可检测地更大的程度(例如,超过背景至少2倍)。严格条件是序列依赖性的,并且在不同情况下将是不同的。通过控制杂交和/或洗涤条件的严格性,可以鉴定出与该探针100%互补的目标序列(同源探测)。可替代地,可以调整严格条件以便允许序列中的一些错配使得检测出较低程度的相似性(异源探测)。通常,一个探针的长度为小于约1000个核苷酸,优选地长度小于500个核苷酸。

[0044] 典型地,严格条件将是以下条件,在这些条件下该盐浓度在pH7.0至8.3下是小于约1.5M Na离子、典型地约0.01至1.0M Na离子浓度(或其他盐类),并且温度对于短探针(例如,10至50个核苷酸)为至少约30℃,而对于长探针(例如,超过50个核苷酸)为至少约60℃。还可以通过加入去稳定剂(如甲酰胺)实现严格条件。示例性低严格条件包括在37℃下在30%至35%甲酰胺、1M NaCl、1%SDS(十二烷基硫酸钠)的缓冲溶液中进行杂交以及在50℃至55℃下在1X至2X SSC(20X SSC=3.0M NaCl/0.3M柠檬酸三钠)进行洗涤。示例性中等严格条件包括在37℃下在40%至45%甲酰胺、1.0M NaCl、1%SDS中进行杂交以及在55℃至60℃下在0.5X至1X SSC中进行洗涤。示例性高严格条件包括在37℃下在50%甲酰胺、1M NaCl、1%SDS中进行杂交以及在60℃至65℃下在0.1X SSC中进行洗涤。任选地,洗涤缓冲液可包含约0.1%至约1%SDS。杂交的持续时间通常是小于约24小时,通常为约4至约12小时。

[0045] 特异性典型地是杂交后洗涤的函数,关键性因素是最终洗涤溶液的离子强度和温度。对于DNA-DNA杂交物, $T_m$ 可以从梅尼克斯(Meinkoth)和沃尔(Wahl)(1984)分析生物化学(Anal. Biochem.) 138:267-284的等式中进行估计: $T_m=81.5^\circ\text{C}+16.6(\log M)+0.41(\%GC)-0.61(\%form)-500/L$ ;其中M是一价阳离子的摩尔浓度,%GC是在DNA中鸟苷和胞嘧啶核苷酸的百分比,%form是在杂交溶液中甲酰胺的百分比,并且L是以碱基对计的杂交物的长度。 $T_m$ 是以下温度,在该温度下一个互补的目标序列的50%与一个完全匹配的探针进行杂交(在限定的离子强度和pH下)。对于每1%的错配, $T_m$ 减少约1℃;因此,可以调整 $T_m$ 、杂交、和/或洗涤条件,以便与具有所希望的一致性的序列进行杂交。例如,如果找到具有>90%一致性的序列,则 $T_m$ 可以降低10℃。总体上,严格条件被选择为在一种限定的离子强度和pH下比针对该特定序列及其互补物的热解链点( $T_m$ )低约5℃。然而,极端严格条件可以利用在低于该热解链点( $T_m$ )1℃、2℃、3℃或4℃下的杂交和/或洗涤;中等严格条件可以利用在低于该热解链点( $T_m$ )6℃、7℃、8℃、9℃、或10℃下的杂交和/或洗涤;低严格条件可以利用在低于该热解链点( $T_m$ )11℃、12℃、13℃、14℃、15℃或20℃下的杂交和/或洗涤。使用该等式、杂交和洗涤组合物、以及所希望的 $T_m$ ,普通技术人员应当理解,内在地说明了在杂交和/或洗涤溶液的严格性方面的改变。如果所希望的错配程度导致小于45℃(水性溶液)或32℃(甲酰胺溶液)的 $T_m$ ,则优选增加SSC浓度,这样使得可以使用更高的温度。对核酸杂交的广泛指导见于以下文献:泰森(Tijssen)(1993)生物化学和分子生物学中的实验室技术-使用核酸探针杂交(Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes),第1部分,第2章(爱思唯尔(Elsevier),纽约);以及奥苏贝尔(Ausubel)等人编著(1995)现代分子生物学方法(Current Protocols in Molecular

Biology), 第2章(格林出版社和威力出版社(Greene Publishing and Wiley-Interscience), 纽约)。参见, 萨姆布鲁克等人(1989)分子克隆: 实验室手册(第二版, 冷泉港实验室出版社, 冷泉港, 纽约)。

[0046] 分离的蛋白质及其变体和片段

[0047] 杀虫蛋白也涵盖于本发明之内。关于“杀虫蛋白”是指具有SEQ ID NO:3至5所列出的氨基酸序列的一种蛋白质。还提供了它的片段、生物活性部分以及变体, 并且它们可以用于实践本发明的方法。“分离的蛋白”或“重组的蛋白”被用于指代一种蛋白质, 该蛋白质不再存在于它的自然环境中(例如, 在体外或在重组体细菌或植物宿主细胞中)。

[0048] “片段”或“生物活性部分”包括以下多肽片段, 这些多肽片段包含与SEQ ID NO:3中列出的氨基酸序列足够地一致的氨基酸序列, 并且展示出杀虫活性。杀虫蛋白的生物活性部分可以是以下多肽, 该多肽的长度例如为10、25、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150、1200、1250、1300、1350个、或更多个氨基酸。这样的生物活性部分可以通过重组技术进行制备, 并且对杀虫活性进行评估。用于测量杀虫活性的多种方法在本领域是已熟知的。参见, 例如, 查普拉和朗(1990)经济昆虫学杂志83:2480-2485; 安德鲁斯(Andrews)等人(1988)生物化学杂志252:199-206; 马罗内等人(1985)经济昆虫学杂志78:290-293; 以及美国专利号5,743,477, 这些文献通过引用以其全部内容结合在此。如在此所使用的, 一个片段包含SEQ ID NO:3至5的至少8个邻接氨基酸。然而, 本发明涵盖了其他片段, 如在长度大于约10、20、30、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150、1200、1250、1300、1350个、或更多个氨基酸的蛋白质中的任何片段。

[0049] 关于“变体”是指具有与SEQ ID NO:3至5中任一项的氨基酸序列至少约60%、65%、约70%、75%、约80%、85%、约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%一致的氨基酸序列的蛋白质或多肽。变体还包括由与SEQ ID NO:2的核酸分子或其互补物在严格条件下杂交的核酸分子编码的多肽。变体包括由于诱变而在氨基酸序列方面不同的多肽。由本发明所涵盖的变体蛋白是生物活性的, 即它们继续具有所希望的天然蛋白的生物活性, 即保留了杀虫活性。在一些实施例中, 这些变体相对于天然蛋白具有改进的活性。用于测量杀虫活性的多种方法在本领域是已熟知的。参见, 例如, 查普拉和朗(1990)经济昆虫学杂志83:2480-2485; 安德鲁斯(Andrews)等人(1988)生物化学杂志252:199-206; 马罗内等人(1985)经济昆虫学杂志78:290-293; 以及美国专利号5,743,477, 这些文献通过引用以其全部内容结合在此。

[0050] 细菌基因(如本发明的axmi基因)在开放阅读框的起始附近常常具有多个甲硫氨酸起始密码子。经常, 在这些起始密码子中的一个或多个上的翻译起始将导致一种功能蛋白的产生。这些起始密码子可以包括ATG密码子。然而, 细菌(如, 芽孢杆菌)还将该密码子GTG识别为一个起始密码子, 并且在GTG密码子上起始翻译的蛋白质在第一个氨基酸上包含一个甲硫氨酸。在少数情况下, 细菌系统中的翻译可以在TTG密码子处启动, 尽管在这种情况下TTG编码一个甲硫氨酸。此外, 常常不首先确定这些密码子中的哪一些在细菌中自然地使用。因此, 应当理解, 使用这些可替代的甲硫氨酸密码子之一也可能导致杀虫蛋白的产生。这些杀虫蛋白涵盖于本发明之中, 并且可以在本发明的这些方法中使用。应当理解的是当在植物中表达时将有必要将替代起始密码子改变为ATG以用于正确的翻译。

[0051] 在本发明的不同实施例中,杀虫蛋白包含从在此披露的全长核苷酸序列中推导出的氨基酸序列、以及由于使用替代的下游起始位点而比这些全长序列更短的氨基酸序列。因此,本发明的核苷酸序列和/或包含本发明的核苷酸序列的载体、宿主细胞以及植物(以及制备和使用本发明的核苷酸序列的方法)可以包含编码与SEQ ID NO:3的残基20至687(在SEQ ID NO:4中列出)或SEQ ID NO:3的残基22至687(在SEQ ID NO:5中列出)相应的氨基酸序列的核苷酸序列。

[0052] 还涵盖了针对本发明的多肽、或它们的变体或片段的抗体。用于产生抗体的多种方法在本领域是已熟知的(参见,例如哈洛(Harlow)和拉内(Lane)(1988)抗体:实验室手册(Antibodies:A Laboratory Manual),冷泉港实验室,冷泉港,纽约;美国专利号4,196,265)。

[0053] 因此,本发明一方面涉及与本发明的蛋白质或肽分子中的一种或多种以及它们的同源物、融合物或片段特异性结合的抗体、单链抗原结合分子、或其他蛋白质。在一个具体的优选实施例中,该抗体与具有SEQ ID NO:3、4、或5中所列出的氨基酸序列的一种蛋白质或其片段特异性结合。在另一个实施例中,该抗体与包含选自SEQ ID NO:3、4、或5中所列出的氨基酸序列的一个氨基酸序列的一种融合蛋白或其片段特异性结合。

[0054] 本发明的抗体可以用于定量地或定性地检测本发明的蛋白质或肽分子、或者检测这些蛋白质的翻译后修饰。如在此所使用的,如果一种抗体或肽与本发明的一种蛋白质或肽分子的结合不被非相关分子的存在竞争性抑制,则将这种结合称为“特异性结合”。

#### [0055] 改变或改进的变体

[0056] 应当认识到,可以通过不同的方法来改变一种杀虫蛋白的DNA序列,并且这些改变可以导致编码以下蛋白质的DNA序列,这些蛋白质具有不同于由本发明的一种杀虫蛋白编码的氨基酸序列的那些。这种蛋白可以按照不同的方式进行改变,包括SEQ ID NO:3至5的一个或多个氨基酸的氨基酸置换、缺失、截短、以及插入,包括达到约2、约3、约4、约5、约6、约7、约8、约9、约10、约15、约20、约25、约30、约35、约40、约45、约50、约55、约60、约65、约70、约75、约80、约85、约90、约100、约105、约110、约115、约120、约125、约130、约135、约140、约145、约150、约155个、或更多个氨基酸置换、缺失或插入。用于此类操作的方法在本领域内通常是已知的。例如,通过在DNA中的突变可以制备一种杀虫蛋白的氨基酸序列变体。这还可以通过几种诱变形式之一和/或在定向进化中来完成。在某些方面,在该氨基酸序列中所编码的改变将基本上不影响该蛋白质的功能。这样的变体将具有所希望的杀虫活性。然而,应当理解,可以通过使用这样的技术改进杀虫蛋白对本发明的这些组合物赋予杀虫活性的能力。例如,可以在以下宿主细胞中表达一种杀虫蛋白,这些宿主细胞在DNA复制过程中显示出高比率的碱基错参,如XL-1Red(Stratagene,拉荷亚(La Jolla),加利福尼亚州)。在这样的菌株中繁殖之后,可以分离出该DNA(例如通过制备质粒DNA,或通过由PCR进行扩增并且将得到的PCR片段克隆到一个载体中),在一种非诱变菌株中培养这些杀虫蛋白突变体,并且鉴定具有杀虫活性的经突变的基因,例如通过进行一项对杀虫活性进行测试的测定。通常,在摄食测定中混合并使用了这种蛋白。参见,例如马罗内等人(1985)经济昆虫学杂志78:290-293。这样的测定可包括使植物与一种或多种害虫接触,并且确定该植物的存活和/或引起害虫死亡的能力。导致毒性增加的突变的实例见于史涅夫(Schnepf)等人(1998)微生物学与分子生物学评论(Microbiol.Mol.Biol.Rev.)62:775-806。

[0057] 可替代地,可以在氨基或羧基的末端上对多种蛋白质的蛋白序列进行改变,而基本上不影响活性。这可以包括通过现代分子方法所引入的插入、缺失、或改变,这些方法如PCR,包括PCR扩增,这些PCR扩增借助于将编码氨基酸的序列包含到在PCR扩增中所使用的寡核苷酸之中而改变或延长了该编码蛋白的序列。可替代地,所加入的蛋白序列可以包括完整的编码蛋白质的序列,如在本领域内通常用于产生蛋白融合物的那些序列。这样的融合蛋白常常用于(1)增加一种感兴趣的蛋白质的表达;(2)引入一个结合结构域、酶活性、或表位以促进蛋白纯化、蛋白检测、或本领域已知的其他实验用途;或(3)将一种蛋白质的分泌或翻译靶向一个亚细胞器,如革兰氏阴性菌的壁膜间隙,或真核细胞的内质网,后者常常导致蛋白质的糖基化。

[0058] 本发明的变体核苷酸和氨基酸序列还涵盖了由诱变和致重组操作程序(如DNA改组)所衍生的序列。使用这样的操作,可以将一个或多个不同的杀虫蛋白编码区用于创造出一种具有所希望的性质的新杀虫蛋白。按照这种方式,从包含以下序列区域的相关序列多核苷酸的种群中产生重组多核苷酸的文库,这些序列区域具有基本的序列一致性并且可以在体外或体内进行同源重组。例如,使用这种方法,可以将编码一个感兴趣的结构域的序列基序在本发明的一个杀虫基因与其他已知的杀虫基因之间进行改组,以获得编码一种蛋白质的新基因,该蛋白质具有一种改进的感兴趣的性质,例如一种增加的杀昆虫活性。用于这样的DNA改组的策略在本领域内是已知的。参见,例如,施特默尔(Stemmer)(1994)美国国家科学院院刊91:10747-10751;施特默尔(1994)自然(Nature)370:389-391;卡莫瑞(Cramer)等人(1997)自然生物技术(Nature Biotech.)15:436-438;摩尔(Moore)等人(1997)分子生物学杂志272:336-347;张(Zhang)等人(1997)美国国家科学院院刊94:4504-4509;卡莫瑞等人(1998)自然391:288-291;以及美国专利号5,605,793和5,837,458。

[0059] 结构域交换或改组是针对产生改变的杀虫蛋白的另一种机制。可在杀虫蛋白之间交换结构域,从而导致具有改进的杀虫活性或目标谱的杂合或嵌合毒素。用于产生重组蛋白和测试它们的杀虫活性的方法在本领域是已熟知的(参见,例如,纳莫夫(Naimov)等人(2001)应用与环境微生物学(Appl. Environ. Microbiol.)67:5328-5330;de Maagd等人(1996)应用与环境微生物学62:1537-1543;格(Ge)等人(1991)生物化学杂志(J. Biol. Chem.)266:17954-17958;史涅夫等人(1990)生物化学杂志265:20923-20930;兰格(Rang)等人(1999)应用与环境微生物学65:2918-2925)。

#### [0060] 载体

[0061] 本发明的杀虫序列可以被提供在用于在一种感兴趣的植物中表达的表达盒中。关于“植物表达盒”是指DNA构建体,该构建体能够导致一种蛋白质在一种植物细胞中从一个开放阅读框中的表达。典型地,这些构建体包含启动子和编码序列。经常,这样的构建体还将包含3'非翻译区。这样的构建体可以包含“信号序列”或“前导序列”,以促进该肽的共翻译或翻译后运输至某些细胞内结构,如叶绿体(或其他质体)、内质网、或高尔基体。

[0062] 关于“信号序列”是指是已知或怀疑导致跨过该细胞膜的共翻译或翻译后肽运输的序列。在真核生物中,这典型地涉及分泌到高尔基体内,其中具有某些产生的糖基化。细菌的杀昆虫毒素经常被合成为毒素原,它们是在该目标害虫的肠中被蛋白水解激活(常(Chang)(1987)酶学方法(Methods Enzymol.)153:507-516)。在本发明的一些实施例中,该信号序列位于该天然序列中,或可以衍生自本发明的一个序列。关于“前导序列”是指当被

翻译时导致足以触发该肽链的共翻译运输至一个亚细胞器的氨基酸序列的任何序列。因此,这包括通过进入内质网内、进入液泡、质体(包括叶绿体、线粒体)等中来对运输和/或糖基化进行靶向的前导序列。

[0063] 关于“植物转化载体”是指一种DNA分子,该分子对于有效转化一个植物细胞而言是必需的。这种分子可以由一个或多个植物表达盒组成,或可以被组织到超过一个的“载体”DNA分子中。例如,二元载体是植物转化载体,它们利用两个非邻接DNA载体来编码用于植物细胞转化的所有需求的顺式和反式作用功能(海伦斯(Hellens)和姆林内克斯(Mullineaux) (2000)植物科学趋势(Trends in Plant Science)5:446-451)。“载体”是指用于在不同的宿主细胞之间进行转移的核酸构建体。“表达载体”是指一种载体,该载体具有将异源的DNA序列或片段结合、整合到一种外源细胞中并在其中表达该异源DNA序列或片段的能力。该盒将包括与本发明的一个序列可操作地连接的5'和3'调节序列。关于“可操作地连接”是指在一个启动子与一个第二序列之间的功能性连接,其中该启动子序列引发并介导了相应于该第二序列的DNA序列的转录。通常,可操作地连接意味着被连接的核酸序列是邻接的并且(在有必要时连结两个蛋白编码区)是在相同的阅读框中邻接的。该盒可以另外地包含至少一种有待共转化到生物中的另外的基因。可替代地,可以在多个表达盒上提供这种或这些另外的基因。

[0064] 在不同实施例中,本发明的核苷酸序列被可操作地连接至启动子,例如植物启动子。“启动子”是指一个核酸序列,该核酸序列发挥作用以指导下游编码序列的转录。该启动子连同其他转录和翻译的调节性核酸序列(也被称为“控制序列”)是感兴趣的DNA序列的表达所必需的。

[0065] 这种表达盒配备有多个限制位点,这些限制位点用于插入该杀虫序列以便处于这些调节区的转录调节之下。

[0066] 该表达盒将以5'至3'的转录方向包括一个转录和翻译的起始区(即,一个启动子)、一种本发明的DNA序列、以及在植物中发挥作用的一个翻译和转录的终止区(即,终止区)。该启动子对于该植物宿主和/或本发明的DNA序列而言可以是天然的或类似的、或外源的或异源的。另外地,该启动子可以是天然序列或可替代地是一个合成序列。在该启动子对于该植物宿主而言是“天然的”或“同源的”的情况下,它是指该启动子是在该启动子所引入的天然植物中被发现的。在启动子对于本发明的DNA序列而言是“外源的”或“异源的”的情况下,它是指该启动子对于可操作地连接的本发明的DNA序列而言不是天然的或天然存在的启动子。

[0067] 该终止区对于转录起始区而言可以是天然的,对于可操作地连接的感兴趣的DNA序列而言可以是天然的,对于该植物宿主而言可以是天然的,或可以衍生自另一种来源(即,对于该启动子、该感兴趣的DNA序列、该植物宿主、或它们的任何组合而言是外源的或异源的)。方便的终止区可以获自根瘤土壤杆菌(*A. tumefaciens*)的Ti质粒,如章鱼碱合成酶和胭脂碱合成酶的终止区。还参见,乔瑞诺(Guerineau)等人(1991)分子遗传学与普通遗传学(Mol.Gen.Genet.)262:141-144;普劳德富特(Proudfoot) (1991)细胞(Cell)64:671-674;桑斯法冈(Sanfacon)等人(1991)基因与发育(Genes Dev.)5:141-149;摩根(Mogen)等人(1990)植物细胞(Plant Cell)2:1261-1272;芒罗(Munroe)等人(1990)基因(Gene)91:151-158;巴拉斯(Ballas)等人(1989)核酸研究(Nucleic Acids Res.)17:7891-7903;以及

乔希(Joshi)等人(1987)核酸研究15:9627-9639)。

[0068] 在适当情况下,可以针对在转化的宿主细胞中的增加的表达来优化这种或这些基因。即,可以使用宿主细胞偏爱的密码子来合成这些基因以用于改进的表达,或者可以一个宿主偏爱的密码子使用频率使用密码子来合成这些基因。通常,该基因的GC含量会增加。参见,例如,坎贝尔(Campbell)和哥瑞(Gowri)(1990)植物生理学(Plant Physiol.)92:1-11,它讨论了宿主偏爱的密码子使用。用于合成植物偏爱的基因的方法在本领域内是可供使用的。参见,例如,美国专利号5,380,831和5,436,391、美国专利公开号20090137409、以及莫里(Murray)等人(1989)核酸研究17:477-498,它们通过引用结合在此。

[0069] 在一个实施例中,将该杀虫蛋白靶向叶绿体而用于表达。按照这种方式,在该杀虫蛋白未直接被插到该叶绿体中时,该表达盒将另外地包含编码转运肽的核酸以便将该杀虫蛋白导向该叶绿体。这些转运肽在本领域是已知的。参见,例如,冯·海耶(Von Heijne)等人(1991)植物分子生物学导报(Plant Mol.Biol.Rep.)9:104-126;克里克(Clark)等人(1989)生物化学杂志264:17544-17550;岱拉-乔帕(Della-Cioppa)等人(1987)植物生理学84:965-968;罗默(Romer)等人(1993)生物化学和生物物理研究通讯(Biochem.Biophys.Res.Commun.)196:1414-1421;以及沙阿(Shah)等人(1986)科学(Science)233:478-481。

[0070] 可以针对在叶绿体中的表达来优化被靶向该叶绿体的杀虫基因,以便考虑在该植物细胞核与这种细胞器之间在密码子使用方面的差异。按照这种方式,可以使用叶绿体偏爱的密码子来合成感兴趣的核酸。参见,例如,美国专利号5,380,831,该专利通过引用结合在此。

#### [0071] 植物转化

[0072] 本发明的方法涉及将一个核苷酸构建体引入到植物中。关于“引入”是指按照以下方式将该核苷酸构建体给予该植物,该方式使得该构建体获得接近该植物的一个细胞的内部的途径。本发明的方法不需要使用将一个核苷酸构建体引入植物中的一种具体方法,只需要该核苷酸构建体获得接近该植物的至少一个细胞的内部的途径。用于将核苷酸构建体引入到植物中的方法是本领域已知的,这些方法包括但不限于:稳定转化法、瞬时转化法、以及病毒介导法。

[0073] 关于“植物”是指整个植物、植物器官(例如,叶子、茎、根等)、种子、植物细胞、繁殖体、胚以及它们的子代。植物细胞可以是分化的或未分化的(例如,愈伤组织、悬浮培养细胞、原生质体、叶细胞、根细胞、韧皮部细胞、花粉)。

[0074] “转基因植物”或“转化的植物”或“稳定转化的”植物或细胞或组织是指已经将外源的核酸序列或DNA片段结合或整合到该植物细胞中的植物。这些核酸序列包括外源的、或不存在于该未转化的植物细胞中的那些序列、以及可以是内源的、或存在于该未转化的植物细胞中的那些序列。“异源的”通常是指以下核酸序列,这些核酸序列对于它们所在的细胞或天然基因组的一部分而言不是内源的,并且已经通过感染、转染、显微注射、电穿孔、微粒轰击、或类似方法添加到该细胞中。

[0075] 本发明的转基因植物表达了在此披露的新颖的毒素序列中的一种或多种。在不同实施例中,该转基因植物进一步包含一种或多种另外的昆虫抗性基因(例如,Cry1,如Cry1A、Cry1B、Cry1C、Cry1D、Cry1E、以及Cry1F家族的成员;Cry2,如Cry2A家族的成员;



Cry9,如Cry9A、Cry9B、Cry9C、Cry9D、Cry9E、以及Cry9F家族的成员;等)。本领域技术人员将理解,转基因植物可以包含赋予一种感兴趣的农艺性状的任何基因。

[0076] 通过在本领域内已知的几种技术之一可以实现植物细胞的转化。可以对本发明的杀虫基因进行修饰以便在植物细胞中获得或增强表达。典型地,表达这种蛋白质的一个构建体将包含一个驱动该基因的转录的启动子、以及一个允许转录终止和多腺苷酸化的3'非翻译区。这样的构建体的组织在本领域内是已熟知的。在一些情况下,可能有用的是将该基因工程化使得所得到的肽被分泌、或者以其他方式靶向在植物细胞中。例如,该基因可以被工程化以包含一个信号肽来促进该肽转移到内质网。还可以优选使该植物表达盒工程化以包含内含子,使得该内含子的mRNA加工是表达所需要的。

[0077] 典型地,这种“植物表达盒”将被插入一种“植物转化载体”中。这种植物转化载体可以包含对于实现植物转化所需要的一个或多个DNA载体。例如,利用包含超过一个邻接DNA区段的植物转化载体在本领域内是一种常见的实践。在本领域内,这些载体经常被称为“二元载体”。二元载体连同具有辅助质粒的载体最常用于土壤杆菌介导的转化,其中在实现有效转化所需要的DNA区段的大小和复杂性是相当大的情况下,将功能分散到分开的DNA分子上是有利的。二元载体典型地包含质粒载体,该质粒载体包含对于T-DNA转移所需要的顺式作用序列(如左边界和右边界)、被工程化以便能够在植物细胞中表达的一个选择标记、以及一个“感兴趣的基因”(一个被工程化以便能够在植物细胞中表达的基因,对于它而言转基因植物的产生是所希望的)。在这种质粒载体上还存在着细菌复制所需要的序列。这些顺式作用序列以一种方式进行排列以便允许有效转移到植物细胞中并在其中进行表达。例如,该选择标记基因以及该杀虫基因位于该左边界与右边界之间。经常,一个第二质粒载体包含介导T-DNA从土壤杆菌转移到植物细胞中的反式作用因子。这种质粒经常包含这些毒性功能(Vir基因),这些毒性功能允许由土壤杆菌感染植物细胞,并且通过在边界序列上的切割以及vir介导的DNA转移来转移DNA,如在本领域中所理解(海伦斯和姆林内克斯(2000)植物科学趋势5:446-451)。几种类型的土壤杆菌属菌株(例如,LBA4404、GV3101、EHA101、EHA105、等)可以用于植物转化。该第二质粒载体是通过其他方法(如微粒轰击、显微注射、电穿孔、聚乙二醇、等)转化这些植物所不需要的。

[0078] 通常,植物转化法类涉及将异源DNA转移到目标植物细胞(例如,未成熟或成熟的胚、悬浮培养物、未分化的愈伤组织、原生质体,等等)中,之后跟随应用一个最大阈值水平的合适选择(取决于这种选择标记基因),以便从一群未转化的细胞团中回收这些转化的植物细胞。典型地将外植体转移到一种新鲜供应的相同培养基中并将其常规培养。随后,在被置于补充有一种最大阈值水平的选择试剂的再生培养基上之后,这种转化的细胞被分化成芽。然后,将这些芽转移到一种选择性生根培养基中用于回收已生根的芽或小植株。随后,转基因小植物生长成成熟植物并产生能育种子(例如,日江井(Hiei)等人(1994)植物杂志(The Plant Journal)6:271-282;石田(Ishida)等人(1996)自然生物技术(Nature Biotechnology)14:745-750)。典型地将外植体转移到一种新鲜供应的相同培养基中并将其常规培养。用于产生转基因植物的技术和方法的一般说明可见于艾尔丝(Ayres)和帕克(Park)(1994)植物科学的关键性评论(Critical Reviews in Plant Science)13:219-239以及柏木妮(Bommineni)和裘哈尔(Jauhar)(1997)Maydica42:107-120。因为这种转化的材料包含多个细胞;转化的和未转化的细胞二者都存在于受试的目标愈伤组织或细胞组织或

组群的任何部分中。杀死未转化的细胞并允许转化的细胞进行增殖的能力导致了转化的植物培养物。经常,去除未转化的细胞的能力是快速回收转化的植物细胞以及成功产生转基因植物的一个限制。

[0079] 转化方案以及用于将核苷酸序列引入到植物中的方案可依据靶向用于转化的植物或植物细胞的类型(即,单子叶或双子叶)而变化。转基因植物的产生可以通过几种方法之一来进行,包括但不限于:显微注射、电穿孔、直接基因转移、通过土壤杆菌将异源DNA引入植物细胞中(土壤杆菌-介导的转化)、用粘附于粒子上的异源外源DNA来轰击植物细胞、射弹粒子加速(ballistic particle acceleration)、气溶胶束转化(aerosol beam transformation)(美国公开申请号20010026941;美国专利号4,945,050;国际公开号W091/00915;美国公开申请号2002015066)、Lec1转化、以及用于转移DNA的不同的其他非粒子直接介导法。

[0080] 用于叶绿体转化的方法在本领域内是已知的。参见,例如,什瓦布(Svab)等人(1990)美国国家科学院院刊87:8526-8530;什瓦布和马利加(Maliga)(1993)美国国家科学院院刊90:913-917;什瓦布和马利加(1993)欧洲分子生物学杂志(EMBO J.)12:601-606。该方法依靠将含有一种选择标记的DNA的粒子枪递送到质体基因组中并且通过同源重组将该DNA靶向该质体基因组中。另外,质体转化可以通过一个核编码的以及质体指导的RNA聚合酶的组织偏爱的表达、通过一个沉默的携带质体的转基因的反式激活来完成。这种系统已经报道于麦克布赖德(McBride)等人(1994)美国国家科学院院刊91:7301-7305。

[0081] 在将异源外源DNA整合到植物细胞中之后,然后在该培养基中应用一种最大阈值水平的合适选择以杀死这些未转化的细胞,并且通过定期转移到一种新鲜培养基中来分离和增殖这些从这种选择处理中存活的假定转化的细胞。通过连续传代和使用合适的选择进行攻击,鉴定并增殖了这些用该质粒载体转化的细胞。然后,可以使用分子和生物化学的方法来证实整合到该转基因植物的基因组中的感兴趣的异源基因的存在。

[0082] 已转化的细胞可以根据常规方法长成植物。参见,例如,麦考密克(McCormick)等人(1986)植物细胞报告(Plant Cell Reports)5:81-84。然后,可以使这些植物生长,并且用相同的转化的品系或不同的品系进行授粉,并且鉴定出这种得到的具有所希望的表型特征的组成型表达的杂合体。可以使两代或更多代生长以确保所希望的表型特征的表达被稳定地维持并遗传,然后收获种子以确保已经获得了所希望的表型特征的表达。按照这种方式,本发明提供了转化的种子(也被称为“转基因种子”),该种子具有本发明的核苷酸构建体,例如被稳定地结合到它们的基因组中的本发明的表达盒。

[0083] 植物转化的评估

[0084] 在将异源外源DNA引入到植物细胞中之后,通过不同的方法来证实异源基因在植物类基因组中的转化或整合,这些方法例如对与该整合的基因相关联的核酸、蛋白质以及代谢产物的分析。

[0085] PCR分析是在移植到土壤中之前的早期阶段筛选转化的细胞、组织或芽中所结合基因的存在的一种快速方法(萨姆布鲁克和拉塞尔(2001)分子克隆:实验室手册,冷泉港实验室出版社,冷泉港,纽约)。PCR是使用对感兴趣的基因或土壤杆菌载体背景等特异的寡核苷酸引物类来进行。

[0086] 可以通过基因组DNA的DNA印迹分析来证实植物类转化(萨姆布鲁克和拉塞尔,

2001, 上文)。一般而言,从该转化体中提取了总DNA,用合适的限制酶进行消化,在琼脂糖凝胶中进行分级,并且转移至硝酸纤维素或尼龙膜上。然后,根据标准的技术,用例如放射性标记<sup>32</sup>P的目标DNA片段来探测该膜或“印迹”以证实引入的基因整合到该植物基因组中(萨姆布鲁克和拉塞尔,2001,上文)。

[0087] 在RNA印迹分析中,从该转化体的特定组织中分离RNA,在甲醛琼脂糖凝胶中进行分级,并且根据在本领域内是常规的标准操作来印迹到尼龙滤膜上(萨姆布鲁克和拉塞尔,2001,上文)。然后,通过在本领域内已知的方法、通过将该滤膜与衍生自一种杀虫基因的放射性探针进行杂交来测试由该杀虫基因所编码的RNA的表达(萨姆布鲁克和拉塞尔,2001,同上)。

[0088] 使用与存在于杀虫蛋白上的一种或多种表位结合的抗体,可以对转基因植物进行蛋白质印迹、生物化学测定、以及类似测定,以便通过标准操作来证实由该杀虫基因所编码的蛋白质的存在(萨姆布鲁克和拉塞尔,2001,上文)。

#### [0089] 植物中的杀虫活性

[0090] 在本发明的另一方面,可以产生表达一种具有杀虫活性的杀虫蛋白的转基因植物。以上通过实例来说明的方法可用于产生转基因植物,但产生这些转基因植物细胞的方式对于本发明而言不是至关重要的。可以依据实验者的判断来使用在本领域内已知或说明的方法,如土壤杆菌介导的转化、生物射弹转化、以及非粒子介导法。可以通过在本领域内所说明的普通方法来分离表达一种杀虫蛋白的植物,这些方法例如通过愈伤组织的转化、转化的愈伤组织的选择、以及从此类转基因愈伤组织中再生出能育的植物类。在此类方法中,可以使用任何基因作为一个选择标记,只要它在植物细胞中的表达赋予了鉴定或选择转化的细胞的能力。

[0091] 已经开发了多种与植物细胞一起使用的标记物,如对于氯霉素、氨基糖甙G418、潮霉素、以及类似物的抗性。编码参与叶绿体代谢的产物的其他基因也可以用作选择标记。例如,提供对于植物除草剂(如草甘磷、溴苯腈、或咪唑啉酮)的抗性的基因可以具有特别的用途。这样的基因已经被报道(斯托克(Stalker)等人(1985)生物化学杂志263:6310-6314(溴苯腈抗性腈水解酶基因);以及萨塔西瓦姆(Sathasivan)等人(1990)核酸研究18:2188(AHAS咪唑啉酮抗性基因)。另外,在此披露的这些基因作为评估细菌细胞或植物细胞的转化的标记是有用的。用于检测在一种植物、植物器官(例如,叶子、茎、根、等)、种子、植物细胞、繁殖体、胚或它们的子代中转基因的存在的方法是本领域内所熟知的。在一个实施例中,通过测试杀虫活性来检测转基因的存在。

[0092] 可以针对杀虫活性来测试表达一种杀虫蛋白的能育植物,并且选择显示出最佳活性的植物以用于进一步的育种。在本领域内对害虫活性进行测定的方法是可供使用的。通常,在摄食测定中混合并使用了这种蛋白质。参见,例如马罗内等人(1985)经济昆虫学杂志78:290-293。

[0093] 本发明可以用于转化任何植物种类,包括但不限于单子叶植物和双子叶植物。感兴趣的植物的实例包括但不限于:玉米(corn)(玉米(maize))、高粱、小麦、向日葵、番茄、十字花科植物、胡椒、马铃薯、棉花、水稻、大豆、甜菜、甘蔗、烟草、大麦、以及油菜、芸苔属植物、苜蓿、黑麦、粟、红花、花生、甘薯、木薯、咖啡、椰子、菠萝、柑桔属的树、可可、茶、香蕉、鳄梨、无花果、番石榴、芒果、橄榄、番木瓜、腰果、澳洲坚果、杏仁、燕麦、蔬菜、观赏性植物、以

及针叶树。

[0094] 蔬菜包括但不限于：番茄、莴苣、青豆、利马豆、豌豆，以及甜瓜属 (genus *Curcumis*) 的成员，如黄瓜、网纹甜瓜、以及甜瓜。观赏性植物包括但不限于：杜鹃花属、绣球属、木槿属、蔷薇属、郁金香、水仙属、碧冬茄属、康乃馨、一品红、以及菊花。优选地，本发明的植物是农作物植物 (例如，玉米、高粱、小麦、向日葵、番茄、十字花科植物、胡椒、马铃薯、棉花、水稻、大豆、甜菜、甘蔗、烟草、大麦、油菜、等)。

[0095] 在虫害控制方面的用途

[0096] 在害虫控制或工程化处理其他生物中用于采用多种菌株作为杀虫剂的总体方法在本领域内是已知的，这些菌株包含本发明的一种核苷酸序列或它的一种变体。参见，例如，美国专利号 5,039,523 和 EP0480762A2。

[0097] 包含本发明的核苷酸序列或它的变体的芽孢杆菌菌株、或已经被遗传改变而包含本发明的杀虫基因和蛋白质的微生物可以用于保护农业作物以及产品免受害虫的侵害。在本发明的一个方面，用以下试剂来处理一种产生毒素 (杀虫剂) 的生物的完整的 (即，未裂解的) 细胞，当这些细胞被施用到一种或多种目标害虫的环境中时这些试剂延长了在该细胞中产生的毒素的活性。

[0098] 可替代地，通过将杀虫基因引入到细胞宿主中来产生该杀虫剂。该杀虫基因的表达直接或间接地导致了该杀虫剂的细胞内产生和维持。在本发明的一个方面，然后在以下条件下对这些细胞进行处理，当该细胞被施用到一种或多种目标害虫的环境时这些条件延长了在该细胞中产生的毒素的活性。得到的产物保留该毒素的毒性。然后，可以按照常规技术来配制这些天然胶囊化的杀虫剂，以用于施用到寄宿着一种目标害虫的环境 (例如，土壤、水、以及植物的叶)。参见，例如 EPA0192319 以及其中所引用的文献。可替代地，可配制表达本发明的一种基因的这些细胞，例如以便允许得到的材料作为一种杀虫剂的施用。

[0099] 本发明的活性成分通常以组合物的形式进行施用，并且可以同时或相继地与其他化合物一起施用到有待处理的作物区域或植物中。这些化合物可以是肥料、除草剂、冷冻保护剂 (cryoprotectants)、表面活性剂、洗涤剂、杀虫肥皂 (pesticidal soaps)、休眠喷洒油 (dormant oils)、聚合物、和/或定时释放或生物可降解载体制剂，这些制剂允许在单次施用该制剂之后对目标区域进行长期给药。它们还可以是选择性除草剂、化学杀昆虫剂、杀病毒剂、杀微生物剂、杀变形虫剂、杀害虫剂、杀真菌剂、杀细菌剂、杀线虫剂、杀软体动物剂、或这些制剂中的几种的混合物，如果希望的话，与其他农业上可接受的载体、表面活性剂或在制剂领域内通常采用的促进施用的佐剂一起。合适的载体和佐剂可以是固体或液体，并且相应于在配制技术中常常采用的物质，例如天然的或再生的矿物质、溶剂、分散剂、湿润剂、增粘剂、粘合剂或肥料。同样地，可将这些制剂制备成可食用的“诱饵”或塑造成害虫“陷阱”以允许由一种目标害虫来摄食或摄取该杀虫制剂。

[0100] 施用本发明的一种活性成分或本发明的一种农业化学组合物 (该组合物包含由本发明的细菌菌株所产生的这些杀虫蛋白中的至少一种) 的方法包括叶施用、种子涂覆和土壤施用。施用次数以及施用率取决于由相应的害虫所侵染的强度。

[0101] 可以将该组合物配制成一种粉末、粉剂、小丸、颗粒、喷雾剂、乳液、胶体、溶液、或类似剂型，并且可以通过以下常规方法来制备该组合物，这些方法例如将包含该多肽的细菌细胞的培养物干燥、冷冻干燥、均质化、提取、过滤、离心、沉降、或浓缩。在包含至少一种

这种杀虫多肽的所有此类组合物中,该多肽可以按照按重量计从约1%至约99%的浓度而存在。

[0102] 可以在一个给定的区域内通过本发明的这些方法来杀死鳞翅目、半翅目、双翅目、或鞘翅目害虫或减少其数目,或者可以将它们预防性地施用到一个环境区域内以防止被一种易受影响的害虫的侵染。优选地,这种害虫摄取、或接触一个杀虫有效量的该多肽。关于“杀虫有效量”是指该杀虫剂能够引起至少一种害虫的死亡、或明显减少害虫的生长、摄食、或正常生理发育的量。这个量将取决于以下因素而变化:例如,有待控制的特定的目标害虫;有待处理的特定的环境、地点、植物、作物、或农业场所;环境条件;以及施用的杀虫有效的多肽组合物的方法、速率、浓度、稳定性、以及数量。这些制剂还可以根据气候条件、环境因素、和/或施用频率和/或害虫侵染的严重度而变化。

[0103] 可通过将该细菌细胞、晶体、和/或孢子悬浮物、或分离的蛋白组分与所希望的农业上可接受的载体配制在一起来制备所说明的杀虫剂组合物。在施用之前,可以用一种合适的手段(如冻干、冷冻干燥、干燥的,或在一种水性载体、介质或合适的稀释剂,如盐水或其他缓冲液中)配制这些组合物。这些经配制的组合物可以处于以下形式:一种粉剂或颗粒材料、或一种在油(植物性或矿物性)中的悬浮体、或水或油/水乳液、或作为一种可湿性粉末、或与适合于农业施用的任何其他载体材料相组合。适合的农业载体可以是固体或液体并且在本领域是已熟知的。术语农业上“可接受的载体”涵盖了所有佐剂、惰性组分、分散剂、表面活性剂、增粘剂、粘合剂、等等,它们在杀虫剂配制技术中是常用的;这些对于杀虫剂配制领域的普通技术人员而言是已熟知的。这些制剂可以与一种或多种固体或液体佐剂相混合,并且通过不同的手段进行制备,例如通过使用常规的配制技术将这种杀虫组合物与合适的佐剂进行均匀地混合、掺合和/或研磨。合适的制剂和施用方法说明于美国专利号 6,468,523中,该文献通过引用结合在此。

[0104] “害虫”包括但不限于:昆虫、真菌、细菌、线虫、螨、蜱、以及类似物。昆虫害虫包括选自以下目的昆虫:鞘翅目、双翅目、膜翅目、鳞翅目、食毛目、同翅目、半翅目、直翅目(Orthoptera)、缨翅目(Thysanoptera)、革翅目(Dermaptera)、等翅目、虱目(Anoplura)、蚤目(Siphonaptera)、毛翅目(Trichoptera)、等等,特别是鞘翅目、鳞翅目、以及双翅目。

[0105] 鞘翅目包括肉食亚目(suborder Adephaga)和多食亚目(suborder Polyphaga)。肉食亚目包括步甲总科(superfamily Caraboidea)和豉甲总科(superfamily Gyrinoidea),而多食亚目包括牙甲总科(superfamily Hydrophiloidea)、隐翅甲总科(superfamily Staphylinoidea)、花萤总科(superfamily Cantharoidea)、郭公虫总科(superfamily Cleroidea)、叩头虫总科(superfamily Elateroidea)、花甲总科(superfamily Dascilloidea)、泥甲总科(superfamily Dryopoidea)、九甲总科(superfamily Byrrhoidea)、扁甲总科(superfamily Cucujoidea)、芜菁总科(superfamily Meloidea)、花蚤总科(superfamily Mordelloidea)、拟步甲总科(superfamily Tenebrionoidea)、长蠕总科(superfamily Bostrichoidea)、金龟总科(superfamily Scarabaeoidea)、天牛总科(superfamily Cerambycoidea)、叶甲总科(superfamily Chrysomeloidea)以及象甲总科(superfamily Curculionoidea)。步甲总科包括虎甲科(Cicindelidae)、步甲科(Carabidae)、以及龙虱科(Dytiscidae)。豉甲总科包括豉甲科(family Gyrinidae)。牙甲总科包括牙甲科(family Hydrophilidae)。隐翅甲总

科包括葬甲科(family Silphidae)和隐翅甲科(family Staphylinidae)。花萤总科包括花萤科(family Cantharidae)和萤科(family Lampyridae)。郭公虫总科包括郭公虫科(Cleridae)和皮蝽科(Dermestidae)。叩头虫总科包括叩头虫科(Elateridae)和吉丁虫科(Buprestidae)。扁甲总科包括瓢虫科(Coccinellidae)。芫菁总科包括芫菁科(Meloidae)。拟步甲总科包括拟步甲科(Tenebrionidae)。金龟总科包括黑蛭科(Passalidae)和金龟科(Scarabaeidae)。天牛总科包括天牛科(Cerambycidae)。叶甲总科包括叶甲科(Chrysomelidae)。象甲总科包括象甲科(Curculionidae)和小蝽科(Scolytidae)。

[0106] 双翅目包括长角亚目(Nematocera)、短角亚目(Brachycera)、以及环裂亚目(Cyclorrhapha)。长角亚目包括大蚊科(Tipulidae)、毛蠓科(Psychodidae)、蚊科(Culicidae)、蠓科(Ceratopogonidae)、摇蚊科(Chironomidae)、蚋科(Simuliidae)、毛蚊科(Bibionidae)、以及瘿蚊科(Cecidomyiidae)。短角亚目包括水虻科(Stratiomyidae)、虻科(Tabanidae)、剑虻科(Therevidae)、食虫虻科(Asilidae)、拟食虫虻科(Mydidae)、蜂虻科(Bombyliidae)、以及长足虻科(Dolichopodidae)。环裂亚目包括无缝组(Division Aschiza)和有缝组(Division Schizophora)。无缝组包括蚤蝇科(Phoridae)、蚜蝇科(Syrphidae)和眼蝇科(Conopidae)。有缝组包括无瓣类(Acalyptratae)和有瓣类(Calyptratae)。无瓣类包括斑蝇科(Otitidae)、实蝇科(Tephritidae)、潜蝇科(Agromyzidae)、以及果蝇科(Drosophilidae)。有瓣类包括虱蝇科(Hippoboscidae)、狂蝇科(Oestridae)、寄蝇科(Tachinidae)、花蝇科(Anthomyiidae)、蝇科(Muscidae)、丽蝇科(Calliphoridae)、以及麻蝇科(Sarcophagidae)。

[0107] 鳞翅目包括凤蝶科(Papilionidae)、粉蝶科(Pieridae)、灰蝶科(Lycaenidae)、蛱蝶科(Nymphalidae)、斑蝶科(Danaidae)、眼蝶科(Satyridae)、弄蝶科(Hesperiidae)、天蛾科(Sphingidae)、天蚕蛾科(Saturniidae)、尺蛾科(Ceometridae)、灯蛾科(Arctiidae)、夜蛾科(Noctuidae)、毒蛾科(Lymantriidae)、透翅蛾科(Sesiidae)、以及谷蛾科(Tineidae)。

[0108] 对于主要农作物的本发明的昆虫害虫包括:玉米:玉米螟(*Ostrinia nubilalis*)、欧洲玉米螟(European corn borer);小地老虎(*Agrotis ipsilon*)、黑地老虎(black cutworm);谷实夜蛾(*Helicoverpa zea*)、棉铃虫(corn earworm);草地夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)、秋夜蛾(fall armyworm);西南玉米秆草螟(*Diatraea grandiosella*)、西南玉米螟(southwestern corn borer);南美玉米苗斑螟(*Elasmopalpus lignosellus*)、小玉米秆螟(lesser cornstalk borer);小蔗秆草螟(*Diatraea saccharalis*)、小蔗秆草螟(surgarcane borer);玉米根叶甲(*Diabrotica virgifera*)、西方玉米根螟(western corn rootworm);长角叶甲巴氏亚种(*Diabrotica longicornis barberi*)、北方玉米根螟(northern corn rootworm);黄瓜十一星叶甲食根亚种(*Diabrotica undecimpunctata howardi*)、南方玉米根螟(southern corn rootworm);梳爪叩头虫属(*Melanotus* spp.)、金针虫(wireworms);北方圆头犀金龟(*Cyclocephala borealis*)、北方圆头犀金龟(蛴螬);南方圆头犀金龟(*Cyclocephala immaculata*)、南方圆头犀金龟(蛴螬);日本弧丽金龟(*Popillia japonica*)、日本金龟子;玉米铜色跳甲(*Chaetocnema pulicaria*)、玉米跳甲;玉米隐啄象(*Sphenophorus maidis*)、玉米谷象;玉米缢管蚜(*Rhopalosiphum maidis*)、玉米叶蚜虫;玉米根蚜(*Anuraphis maidiradicis*)、玉米根蚜虫;美洲谷长蝽(*Blissus leucopterus leucopterus*)、高粱长蝽;赤胫黑蝗(*Melanoplus femurrubrum*)、红胫蝗虫

(redlegged grasshopper);血黑蝗(*Melanoplus sanguinipes*)、迁徙蝗虫;玉米种蝇(*Hylemya platura*)、种蝇;玉米斑潜蝇(*Agromyza parvicornis*)、玉米斑潜蝇;玉米黄蓟马(*Anaphothrips obscurus*)、草蓟马;窃蚁(*Solenopsis milesta*)、窃蚁;二斑叶螨(*Tetranychus urticae*)、二斑叶螨;高粱:斑禾草螟(*Chilo partellus*)、高粱螟;草地夜蛾、秋夜蛾;谷实夜蛾、棉铃虫;南美玉米苗斑螟、小玉米秆螟;粒肽脏切夜蛾(*Feltia subterranea*)、颗粒地老虎(*granulate cutworm*);长毛食叶然金龟(*Phyllophaga crinita*)、蛴螬;伪金针虫属(*Eleodes spp.*)、叩头虫属(*Conoderus spp.*)、以及Aeolus属、蛴螬;黑角负泥虫(*Oulema melanopus*)、谷类叶甲;玉米铜色跳甲、玉米跳甲;玉米隐啄象、玉米谷象;玉米缢管蚜、玉米叶蚜;美甘蔗伪毛蚜(*Sipha flava*)、黄甘蔗蚜;美洲谷长蝽、高粱长蝽;高粱瘿蚊(*Contarinia sorghicola*)、梁瘿蚊(*sorghum midge*);朱砂叶螨(*Tetranychus cinnabarinus*)、朱砂叶螨;二斑叶螨(*Tetranychus urticae*)、二斑叶螨;小麦:一点黏虫(*Pseudaletia unipunctata*)、黏虫;草地夜蛾、秋夜蛾;南美玉米苗斑螟、小玉米秆螟;西方灰地老虎(*Agrotis orthogonia*)、西方地老虎;南美玉米苗斑螟、小玉米秆螟;黑角负泥虫、谷类叶甲;三叶草叶象(*Hypera punctata*)、三叶草叶象;黄瓜十一星叶甲食根亚种、南方玉米根螟;俄罗斯小麦蚜虫;麦二叉蚜(*Schizaphis graminum*)、麦二叉蚜;麦长管蚜(*Macrosiphum avenae*)、麦长管蚜;赤胫黑蝗、赤胫黑蝗;异黑蝗(*Melanoplus differentialis*)、异黑蝗;血黑蝗、迁徙蝗虫;小麦瘿蚊(*Mayetiola destructor*)、小麦瘿蚊(*Hessian fly*);麦红吸浆虫(*Sitodiplosis mosellana*)、麦蛆(*wheat midge*);美洲秆蝇(*Meromyza americana*)、美洲麦秆黄潜蝇(*wheat stem maggot*);麦疫种蝇(*Hylemya coarctata*)、麦种蝇(*wheat bulb fly*);烟褐花蓟马(*Frankliniella fusca*)、烟草蓟马;麦茎蜂(*Cephus ductus*)、麦茎蜂;曲叶螨(*Aceria tulipae*)、小麦曲叶螨(*wheat curl mite*);向日葵:向日葵芽卷叶蛾(*Suleima helianthana*)、向日葵芽蛾;向日葵同斑螟(*Homoeosoma electellum*)、向日葵蛾;向日葵叶甲(*zygogramma exclamationis*)、向日葵甲虫;胡萝卜利犀金龟(*Bothyrus gibbosus*)、胡萝卜甲虫;向日葵籽瘿蚊(*Neolasioptera murtfeldtiana*)、向日葵籽蠓;棉花:烟芽夜蛾(*Heliothis virescens*)、棉花蚜虫;谷实夜蛾、棉铃虫;甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)、甜菜夜蛾;红铃麦蛾(*Pectinophora gossypiella*)、粉色棉铃虫;棉铃象(*Anthonomus grandis*)、棉子象鼻虫;棉蚜(*Aphis gossypii*)、棉花蚜虫;棉序盲蝽(*Pseudatomoscelis seriatus*)、棉花跳盲蝽;温室粉虱(*Trialeurodes abutilonea*)、带状翅白粉虱(*bandedwinged whitefly*);美国牧草盲蝽(*Lygus lineolaris*)、牧草盲蝽;赤胫黑蝗、红胫蝗虫;异黑蝗、异黑蝗;烟蓟马(*Thrips tabaci*)、洋葱蓟马;烟褐花蓟马、烟蓟马;朱砂叶螨、朱砂叶螨;二斑叶螨、二斑叶螨;水稻:小蔗秆草螟、甘蔗螟;草地夜蛾、秋夜蛾;谷实夜蛾、棉铃虫;葡萄鞘叶甲(*Colaspis brunnea*)、葡萄鞘叶甲;稻水象(*Lissorhoptrus oryzophilus*)、稻水象;米象(*Sitophilus oryzae*)、米象;二条黑尾叶蝉(*Nephotettix nigropictus*)、米叶蝉;美洲谷长蝽、高粱长蝽;拟缘蝽(*Acrosternum hilare*)、绿蝽;大豆:大豆夜蛾(*Pseudoplusia includens*)、大豆尺夜蛾(*soybean looper*);梨豆夜蛾、夜蛾科;苜蓿绿夜蛾(*Plathypena scabra*)、苜蓿绿夜蛾;玉米螟、欧洲玉米螟;小地老虎、黑地老虎;甜菜夜蛾、甜菜夜蛾;烟芽夜蛾、棉花蚜虫;谷实夜蛾、棉铃虫;墨西哥大豆瓢虫(*Epilachna varivestis*)、墨西哥大豆瓢虫;桃蚜(*Myzus persicae*)、桃蚜;蚕豆微叶蝉(*Empoasca fabae*)、马铃薯叶蝉;拟缘蝽、绿蝽;赤胫黑蝗、赤

胫黑蝗;异黑蝗、异黑蝗;玉米种蝇、玉米种蝇;大豆蓟马(*Sericothrips variabilis*)、大豆蓟马;烟蓟马、洋葱蓟马;草莓叶螨(*Tetranychus turkestanii*)、草莓叶螨;二斑叶螨、二斑叶螨;大麦:玉米螟、欧洲玉米螟;小地老虎、黑地老虎;麦二叉蚜、麦二叉蚜(*greenbug*);美洲谷长蝽、高粱长蝽;拟缘蝽、绿蝽;烟草蝽(*Euschistus servus*)、茶色蝽;灰地种蝇(*Delia platura*)、种蝇;小麦瘿蚊、小麦瘿蚊;潜岩螨(*Petrobia latens*)、麦长腿蜘蛛;油料种子油菜:甘蓝蚜(*Brevicoryne brassicae*)、卷心菜蚜;蔬菜黄条跳甲(*Phyllotreta cruciferae*)、跳甲;蓓带夜蛾(*Mamestra configurata*)、贝莎夜蛾(*Bertha armyworm*);菜蛾(*Plutella xylostella*)、小菜蛾;地种蝇属(*Delia* ssp.)、根蛆。

[0109] 线虫包括寄生线虫,例如根结线虫、胞囊线虫、以及根腐线虫,包括异皮线虫属、根结线虫属、以及球异皮线虫属;特别是胞囊线虫的成员,包括但不限于:大豆异皮线虫(*Heterodera glycines*) (大豆胞囊线虫);甜菜异皮线虫(甜菜胞囊线虫);燕麦异皮线虫(*Heterodera avenae*) (燕麦胞囊线虫);以及马铃薯金线虫(*Globodera rostochiensis*)以及马铃薯白线虫(*Globodera pailida*) (马铃薯胞囊线虫)。根腐线虫包括短体线虫属。

#### [0110] 用于增加植物产量的方法

[0111] 提供了用于增加植物产量的方法。这些方法包括提供表达一种编码在此披露的杀虫多肽序列的多核苷酸的一种植物或植物细胞并且在被一种害虫侵染(或者易受到该害虫侵染)的田地中使该植物或其种子生长,所述多肽具有针对该害虫的杀虫活性。在一些实施例中,该多肽具有针对一种鳞翅目、鞘翅目、双翅目、半翅目、或者线虫害虫的杀虫活性,并且所述田地被一种鳞翅目、半翅目、鞘翅目、双翅目、或线虫害虫侵染。如在此所定义的,该植物的“产量”是指由该植物所产生的生物质的品质和/或数量。关于“生物质”是指任何经测量的植物产物。生物质产生的增加是在所测量的植物产物的产量方面的任何改进。增加植物产量具有几种商业应用。例如,增加植物叶生物质可以增加用于人或动物消费的叶菜的产量。另外,增加叶生物质可以用于增加植物衍生的药学或工业产物的生产。产量的增加可以包括与一种不表达该杀虫序列的植物相比任何统计显著性增加,包括但不限于:产量的至少1%的增加、至少3%的增加、至少5%的增加、至少10%的增加、至少20%的增加、至少30%、至少50%、至少70%、至少100%或更大的增加。在多种特定方法中,植物产量由于植物表达在此披露的一种杀虫蛋白而获得改进的害虫抗性而增加。该杀虫蛋白的表达导致害虫侵染或摄食的能力减小。

[0112] 还可以用一种或多种化学成分来处理植物,这些化学成分包括一种或多种除草剂、杀虫剂、或杀真菌剂。示例性的化学成分包括:水果/蔬菜类除草剂:莠去津、除草定、敌草隆、草甘膦、利谷隆、噻草酮、西玛津、氟乐灵、吡氟禾草灵、草丁膦、氯吡嘧磺隆(*Gowan*)、百草枯、戊炔草胺、烯禾啶、氟丙嘧草酯、氯吡嘧磺隆、三嗪茚草胺(*Indaziflam*);水果/蔬菜杀虫剂:涕灭威、转苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuriangiensis*)、甲萘威(*Carbaryl*)、克百威(*Carbofuran*)、毒死蜱(*Chlorpyrifos*)、氯氰菊酯(*Cypermethrin*)、溴氰菊酯(*Deltamethrin*)、阿维菌素(*Abamectin*)、氟氯氰菊酯/ $\beta$ -氟氯氰菊酯、高氰戊菊酯、 $\lambda$ -氟氯氰菊酯、灭螨醌、联苯肼酯、甲氧虫酰胺、双苯氟脲、环虫酰胺、噻虫啉、呋虫胺、噻虫酯、螺螨酯、 $\gamma$ -氟氯氰菊酯、螺甲螨酯、多杀菌素、氯虫酰胺、氰虫酰胺、杀铃脲、螺虫乙酯、吡虫啉、氟虫酰胺、硫双威(*Thiodicarb*)、氰氟虫腙、砒虫啉、丁氟螨酯、腈吡嘧酯(*Cyanopyrafen*)、噻虫胺、噻虫嗪、乙基多杀菌素(*Spinetoram*)、硫双威(*Thiodicarb*)、氟啉虫酰胺、甲硫威、



因灭汀-苯甲酸盐(Emamectin-benzoate)、茚虫威、苯线磷、吡丙醚、苯丁锡氧化物; 水果/蔬菜杀真菌剂: 唑啉菌胺、唑菌酯、苯噻菌胺酯、啉酰菌胺、克菌丹、多菌灵、百菌清、铜、氰霜唑、环氟菌胺、霜脲氰、环丙唑醇、环丙嘧啶、苯醚甲环唑、烯酰吗啉、二噻农、咪唑菌酮、环酰菌胺、氟啉胺、咯菌腈、氟吡菌胺、氟吡菌酰胺、氟唑菌酯、氟唑菌酰胺(Fluxapyroxad)、灭菌丹、乙磷酸、异菌脲、异丙菌胺、先正达(Isopyrazam)、醚菌酯(Kresoxim-methyl)、代森锰锌、双炔酰菌胺、甲霜灵(Metalaxy1)/精甲霜灵(mefenoxam)、代森联、苯菌酮、腈菌唑、戊菌唑、吡噻菌胺、啉氧菌酯、霜霉威(Propamocarb)、丙环唑、丙森锌、丙氧喹啉、丙硫菌唑、唑菌胺酯、啉霉胺、啉氧灵、螺环菌胺(Spiroxamine)、硫、戊唑醇、甲基硫菌灵(Thiophanate-methyl)、肟菌酯(Trifloxystrobin); 谷类除草剂: 2,4-D、啉嘧磺隆、溴草腈、唑草酮-E、绿麦隆、氯磺隆、炔草酸-P、二氯吡啶酸、麦草畏、禾草灵-M、吡氟酰草胺、精恶唑禾草灵、双氟磺草胺、氟酮磺隆-NA、氟噻草胺、氟啉嘧磺隆-M、氟草烟(Fluroxypyr)、呋草酮、草甘膦、碘甲磺隆、碘苯腈、异丙隆、MCPA、甲基二磺隆、甲磺隆、二甲戊乐灵、唑啉草酯、丙苯磺隆、苄草丹、啉磺草胺、磺酰磺隆、噻吩磺隆、三甲苯草酮、醚苯磺隆、苯磺隆、氟乐灵、三氟甲磺隆; 谷类杀真菌剂: 唑菌酯、联苯吡菌胺(Bixafen)、啉酰菌胺、多菌灵、百菌清、环氟菌胺、环丙唑醇、环丙嘧啶、醚菌胺、氟环唑、苯锈啉、丁苯吗啉、氟吡菌酰胺、氟唑菌酯、唑啉菌酮、氟唑菌酰胺(Fluxapyroxad)、先正达、醚菌酯、叶菌唑、苯菌酮、吡噻菌胺、啉氧菌酯、咪鲜胺、丙环唑、丙氧喹啉、丙硫菌唑、唑菌胺酯、啉氧灵、螺环菌胺、戊唑醇、甲基硫菌灵、肟菌酯; 谷类杀昆虫剂: 乐果、 $\lambda$ -氟氯氰菊酯、溴氰菊酯、 $\alpha$ -氯氰菊酯、 $\beta$ -氟氯氰菊酯、联苯菊酯、吡虫啉、噻虫胺、噻虫嗪、噻虫啉、啉虫脒、呋虫胺、毒死蜱、抗蚜威、甲硫威、砒虫啉; 玉米除草剂: 莠去津、甲草胺、溴苯腈、乙草胺、麦草畏、二氯吡啶酸、(S-)二甲酚噻草胺、草铵膦、草甘膦、异恶唑草酮、(S-)异丙甲草胺、甲基磺草酮、啉嘧磺隆、氟唑磺隆、砒嘧磺隆、磺草酮、甲酰胺磺隆、苯吡唑草酮、环磺酮(Tembotrione)、啉啉肟草醚、酮脲磺草胺酯、氟噻草胺、吡咯磺隆(Pyroxasulfon); 玉米杀昆虫剂: 克百威、毒死蜱、联苯菊酯、氟虫腈、吡虫啉、 $\lambda$ -氯氟氰菊酯、七氟菊酯、特丁磷、噻虫嗪、噻虫胺、螺甲螨酯、氟虫酰胺、杀铃脲、氯虫酰胺、溴氰菊酯、硫双威、 $\beta$ -氟氯氰菊酯、氯氰菊酯、联苯菊酯、氯芬奴隆(Lufenuron)、丁基嘧啶磷、乙虫腈、氟虫酰胺、噻虫啉、啉虫脒、呋虫胺、阿维菌素; 玉米杀真菌剂: 唑菌酯、联苯吡菌胺、啉酰菌胺、环丙唑醇、醚菌胺、氟环唑、种衣酯、氟吡菌酰胺、氟唑菌酯、氟唑菌酰胺、先正达、叶菌唑、吡噻菌胺、啉氧菌酯、丙环唑、丙硫菌唑、唑菌胺酯、戊唑醇、肟菌酯; 水稻除草剂: 丁草胺、敌稗、四唑嘧磺隆、苄嘧磺隆、氰氟草酯、杀草隆、四唑酰草胺、咪唑磺隆、苯噻草胺、去稗安、吡嘧磺隆、稗草畏、二氯喹啉酸、禾草丹、茚草酮、氟噻草胺、四唑酰草胺、氯吡嘧磺隆、去稗安、苯并双环酮、环酯草醚、五氟磺草胺、双草醚、稻思达、乙氧嘧磺隆、丙草胺、硝草酮、特糠酯酮(Tefuryltrione)、恶草酮、精恶唑禾草灵、吡丙醚(Pyrimisulfan); 水稻杀昆虫剂: 二噻农、仲丁威、丙硫克百威、噻嗪酮、呋虫胺、氟虫腈、吡虫啉、异丙威、噻虫啉、环虫酰肼、噻虫胺、乙虫腈、氟虫酰胺、氯虫酰胺、溴氰菊酯、啉虫脒、噻虫嗪、氟虫酰胺、多杀菌素、乙基多杀菌素、因灭汀-苯甲酸盐、氯氰菊酯、毒死蜱、醚菊酯、克百威、丙硫克百威、砒虫啉; 水稻杀真菌剂: 唑菌酯、多菌灵、环丙酰菌胺、双氯氰菌胺、苯醚甲环唑、敌瘟磷、唑菌腈、庆大霉素、己唑醇、恶霉灵、异稻瘟净(IBP)、稻瘟灵、异噻菌胺、春日霉素(Kasugamycin)、代森锰锌、苯氧菌胺、肟醚菌胺、戊菌隆、噻菌灵、丙环唑、丙森锌、咯嗪酮、戊唑醇、甲基硫菌灵、噻酰菌胺、三环唑、肟菌酯、有效霉素(Validamycin); 棉花除草剂: 敌草隆、伏草隆、MSMA、乙氧

氟草醚、扑草净、氟乐灵、唑草酮、烯草酮、丁基吡氟禾草灵、草甘膦、吡草伏、二甲戊乐灵、噻硫苯甲酸钠、三氟啶磺隆、得杀草、草铵膦、丙炔氟草胺、塞苯隆；棉花杀昆虫剂：乙酰甲胺磷、涕灭威、毒死蜱、氯氰菊酯、溴氰菊酯、阿维菌素、啉虫脒、因灭汀-苯甲酸盐、吡虫啉、茚虫威、 $\lambda$ -氯氟氰菊酯、多杀菌素、硫双威、 $\gamma$ -氯氟氰菊酯、螺甲螨酯、啉虫丙醚、氟啉虫酰胺、氟虫双酰胺、杀铃脲、氯虫酰胺、 $\beta$ -氟氯氰菊酯、螺虫乙酯、噻虫胺、噻虫嗪、噻虫啉、呋虫胺、氟虫双酰胺、氟虫酰胺、多杀菌素、乙基多杀菌素、 $\gamma$ 氯氟氰菊酯、4-[[ (6-氯吡啶-3-基) 甲基] (2,2-二氟乙基) 氨基] 呋喃-2 (5H) -酮、硫双威、阿维菌素、氟啉虫酰胺、啉虫丙醚、螺甲螨酯、砒虫啉；棉花杀真菌剂：啞菌酯、联苯吡菌胺、啉酰菌胺、多菌灵、百菌清、酮、环丙唑醇、苯醚甲环唑、醚菌胺、氟环唑、咪唑菌酮、氟啉胺、氟吡菌酰胺、氟啞菌酯、氟唑菌酰胺、异菌脲、先正达、异噻菌胺、代森锰锌、代森锰、苯氧菌胺、吡噻菌胺、啉氧菌酯、甲基代森锌、丙硫菌唑、唑菌胺酯、五氯硝基苯、戊唑醇、氟醚唑、甲基硫菌灵、肟菌酯；大豆除草剂：甲草胺、灭草松、氟乐灵、氯啞磺隆、氯酯磺草胺、精恶唑禾草灵、氟磺胺草醚、丁基吡氟禾草灵、草甘膦、甲氧咪草烟、灭草啞、咪草烟、(S-) 异丙甲草胺、噻草酮、二甲戊乐灵、得杀草、草铵膦；大豆杀昆虫剂： $\lambda$ -氟氯氰菊酯、灭多虫、吡虫啉、噻虫胺、噻虫嗪、噻虫啉、啉虫脒、呋虫胺、氟虫酰胺、氯虫酰胺、氟虫酰胺、多杀菌素、乙基多杀菌素、因灭汀-苯甲酸盐、氟虫脞、乙虫脞、溴氰菊酯、 $\beta$ -氟氯氰菊酯、 $\gamma$ 和 $\lambda$ 氯氟氰菊酯、4-[[ (6-氯吡啶-3-基) 甲基] (2,2-二氟乙基) 氨基] 呋喃-2 (5H) -酮、螺虫乙酯、螺甲螨酯、杀铃脲、氟啉虫酰胺、硫双威、 $\beta$ -氟氯氰菊酯；大豆杀真菌剂：啞菌酯、联苯吡菌胺、啉酰菌胺、多菌灵、百菌清、酮、环丙唑醇、苯醚甲环唑、醚菌胺、氟环唑、氟啉胺、氟啉胺、氟吡菌酰胺、氟啞菌酯、粉唑醇、氟唑菌酰胺、先正达、异菌脲、异噻菌胺、代森锰锌、代森锰、叶菌唑、苯氧菌胺、腈菌唑、吡噻菌胺、啉氧菌酯、丙环唑、甲基代森锌、丙硫菌唑、唑菌胺酯、五氯硝基苯、戊唑醇、氟醚唑、甲基硫菌灵、肟菌酯；甜菜除草剂：杀草敏、甜安宁、乙氧氟草黄、甜菜宁、野麦畏、二氯吡啶酸、丁基吡氟禾草灵、环草定、苯噻草酮、啞草酸、噻草酮、三氟啶磺隆、得杀草、精啞禾灵；甜菜杀昆虫剂：吡虫啉、噻虫胺、噻虫嗪、噻虫啉、啉虫脒、呋虫胺、溴氰菊酯、 $\beta$ -氟氯氰菊酯、 $\gamma$ / $\lambda$ 氯氟氰菊酯、4-[[ (6-氯吡啶-3-基) 甲基] (2,2-二氟乙基) 氨基] 呋喃-2 (5H) -酮、七氟菊酯、氯虫酰胺、氟虫脞、克百威；卡诺拉 (Canola) 除草剂：二氯吡啶酸、禾草灵、丁基吡氟禾草灵、草铵膦、草甘膦、吡草胺、氟乐灵、胺苯磺隆、啞草酸、精啞禾灵、烯草酮、得杀草；卡诺拉杀真菌剂：啞菌酯、联苯吡菌胺、啉酰菌胺、多菌灵、环丙唑醇、苯醚甲环唑、醚菌胺、氟环唑、氟啉胺、氟啉胺、氟吡菌酰胺、氟啞菌酯、氟硅唑、氟唑菌酰胺、异菌脲、先正达、甲哌鎊氯、叶菌唑、苯氧菌胺、多效唑 (Paclobutrazole)、吡噻菌胺、啉氧菌酯、咪鲜胺、丙硫菌唑、唑菌胺酯、戊唑醇、甲基硫菌灵、肟菌酯、烯菌酮；卡诺拉杀昆虫剂：克百威、噻虫啉、溴氰菊酯、吡虫啉、噻虫胺、噻虫嗪、啉虫脒、呋虫胺、 $\beta$ -氟氯氰菊酯、 $\gamma$ 和 $\lambda$ 氯氟氰菊酯、氟胺氰菊酯 (tau-Fluvaleriate)、乙虫脞、多杀菌素、乙基多杀菌素、氟虫双酰胺、氯虫酰胺、氟虫酰胺、4-[[ (6-氯吡啶-3-基) 甲基] (2,2-二氟乙基) 氨基] 呋喃-2 (5H) -酮。

[0113] 通过说明而不是通过限制来提供以下实例。

[0114] 实验性实例

[0115] 实例1. 从苏云金芽孢杆菌中发现新颖杀虫基因

[0116] 使用以下步骤从细菌菌株ATX47350中鉴定一种新颖的杀虫基因：

[0117] • 从该菌株中制备总的DNA。总的DNA含有基因组DNA和染色体外DNA。染色体外DNA

含有以下各项中的一些或全部的一种混合物:不同大小的质粒;噬菌体染色体;其他未表征的染色体外分子。

[0118] • 对该DNA进行测序。通过新一代测序方法对总的DNA进行测序。

[0119] • 通过同源性和/或其他计算分析来鉴定推定的毒素基因。

[0120] • 当需要时,通过几种PCR或克隆策略中的一种(例如TAIL-PCR)来对感兴趣的基因进行序列最终处理。

[0121] 表1.从菌株ATX14785中鉴定的新颖基因

[0122]

基因名称	分子量 (kD)	最近的同源性	核苷酸 SEQ ID NO	氨基酸 SEQ ID NO
Axmi270			1	
Axmi270 (截短的)	78.3	57.5% Cry1Ae (截短的)	2	3
Axmi270 (trun_altstart1)				4
Axmi270 (trun_altstart2)				5
Axmi270 (trun_altstart3)				6

[0123] 通过PCR从pAX980中扩增AXMI270,并且通过本领域已熟知的多种方法将PCR产物克隆到芽孢杆菌表达载体pAX916中或者另一种适合的载体中。将所得的包含具有axmi基因的该载体的芽孢杆菌菌株培养在一种常规的生长培养基中,如CYS培养基(10g/1 Bacto酪蛋白胨;3g/1酵母提取物;6g/1 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;14g/1K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>;0.5mM MgSO<sub>4</sub>;0.05mM MnCl<sub>2</sub>;0.05mM FeSO<sub>4</sub>),直到通过显微镜检查看出孢子形成。制备多个样品并在生物测定中测试它们的活性。

[0124] 实例2.Axmi270的杀虫活性

[0125] 表达Axm270(SEQ ID NO:2)并测定生物活性。使用herculase聚合酶和结合5'端的NotI接头和3'端的AscI接头的引物将该基因从Athenix菌株ATX47350中进行PCR扩增。用AscI消化扩增的PCR产物并将其连接到pMalC4X载体中以形成质粒pAX7177。通过测序证实该克隆并且将pAX7177转化到B121感受态细胞中。将一个单一菌落接种到LB培养基中并在

37℃下生长直到到达对数生长期,并且在20℃下使用0.5mM IPTG持续诱导16小时。在室温下以1:50比率用Xa因子(Factor Xa)将纯化的Axmi270消化过夜。

[0126] 对表达的一种或多种Axmi基因的生物测定导致观察到对昆虫害虫的以下活性:

[0127] 表3.在生物测定中表达的蛋白质的活性

[0128]

害虫名称	矮化评分	死亡率评分
西南玉米秆草螟	重度矮化	0%
梨豆夜蛾	重度矮化	0%
甜菜夜蛾	重度矮化	100%
小菜蛾	重度矮化	100%
大豆夜蛾	重度矮化	100%
小蔗秆草螟	强矮化	0%
玉米螟	中度矮化	25%
烟芽夜蛾	中度矮化	0%
草地夜蛾	中度矮化	0%
球菜夜蛾	轻度矮化	0%

[0129] 实例3.杀虫活性的其他测定

[0130] 本发明的核苷酸序列可以针对它们产生杀虫蛋白的能力来进行测试。经常通过多种方式来评定一种杀虫蛋白充当针对一种害虫的杀虫剂的能力。在本领域内熟知的一种方法是进行一项摄食测定。在这项摄食测定中,将这种害虫暴露于一种包含有待测试的化合物的样品或对照样品。经常,这是通过将有待测试的材料、或此类材料的一种合适的稀释物置于该害虫将摄取的材料(如,人工饵料)上来进行。有待测试的该材料可以由一种液体、固体、或浆料组成。可将有待测试的材料置于表面上,并接着允许其干燥。可替代地,可将有待测试的材料与一种溶化的人工饵料进行混合,并且随后将它们分配到该测定小室中。该测定小室可以是例如一个杯子、一个皿、或一个微量滴定板的一个孔。

[0131] 用于吸吮性害虫(sucking pest)(例如,蚜虫)的测定可以涉及通过一个分隔物将这种测试材料与这种昆虫分开,这种分隔物理想地是可以被这种吸吮性昆虫的吸吮式口器刺穿以便允许摄取这种测试材料的部分。经常将这种测试材料与一种摄食刺激物(如蔗糖)相混合,以便促进该测试化合物的摄取。

[0132] 其他类型的测定可以包括将这种测试材料显微注射到这种害虫的口或肠内,以及形成转基因的植物,之后测试这种害虫摄食该转基因植物的能力。植物测试可涉及分离被正常地消耗的植物部分,例如放在叶上的小笼,或分离在包含昆虫的笼中的整个植物。

[0133] 测试害虫的其他方法和手段在本领域是已知的,并且可见于例如罗伯森(Robertson)和普雷斯勒(Preisler)编著(1992)使用节肢动物的杀虫剂生物测定(Pesticide bioassays with arthropods),CRC,波卡拉顿(Boca Raton),佛罗里达州(FL)。可替代地,在期刊“Arthropod Management Tests”以及“Journal of Economic Entomology”中、或通过与美国昆虫学学会(Entomological Society of America,ESA)的会员的讨论而经常地说明了这些测定。

[0134] 在一些实施例中,将编码在此披露的这些杀虫蛋白的毒素区域的DNA区域克隆到

大肠杆菌表达载体pMAL-C4x中,位于编码麦芽糖结合蛋白(MBP)的malE基因后面。这些框内融合物导致大肠杆菌内的MBP-Axmi融合蛋白表达。

[0135] 对于大肠杆菌内的表达,用多个单独的质粒转化BL21\*DE3。将多个单一菌落接种到补充有羧苄青霉素和葡萄糖的LB中,并且在37°C下生长过夜。次日,用1%的过夜培养物接种新鲜的培养基并且37°C下生长至对数生长期。随后,在20°C下用0.3mM IPTG诱导培养物。将每个细胞沉淀悬浮于20mM Tris-Cl缓冲液、pH7.4+200mM NaCl+1mM DTT+蛋白酶抑制剂中并且进行超声处理。由SDS-PAGE进行的分析可以用于证实融合蛋白的表达。

[0136] 随后,将总的无细胞提取物上样于连接至快速蛋白液相色谱(FPLC)的直链淀粉柱中,以亲和纯化MBP-axmi融合蛋白。用10mM麦芽糖溶液将结合的融合蛋白从该树脂中洗脱出来。随后用Xa因子抑或胰蛋白酶切割纯化的融合蛋白,以便从Axmi蛋白中除去氨基末端MBP标签。可以通过SDS-PAGE确定这些蛋白质的切割和溶解度

[0137] 实例4.用于植物表达的基因的引导

[0138] 本发明的编码区是与用于在植物中表达的适当的启动子和终止子序列相连的。这样的序列在本领域内是所熟知的,并且可以包括用于在单子叶植物中表达的水稻肌动蛋白启动子或玉米泛素启动子,用于在双子叶植物中表达的拟南芥属UBQ3启动子或CaMV35S启动子、以及nos或PinII终止子。用于生产并证实启动子-基因-终止子构建体的技术在本领域内也是熟知的。

[0139] 在本发明的一个方面,设计并产生了合成的DNA序列。这些合成序列具有相对于亲本序列有所改变的核苷酸序列,但是编码与亲本序列基本一致的蛋白质。

[0140] 在本发明的另一方面,设计这些合成基因的修饰变体以使得将得到的肽靶向一种植物细胞器,如内质网或质外体。已知导致融合蛋白靶向植物细胞器的肽序列在本领域是已知的。例如,来自白羽扇豆的酸性磷酸酶基因的N末端区域(GENBANK® ID GI:14276838,米勒等人(2001)植物生理学(Plant Physiology)127:594-606)在本领域是已知导致异源蛋白的内质网靶向的。如果得到的融合蛋白在C末端还包含一个内质网保留序列,该序列包括肽N末端-赖氨酸-天冬氨酸-谷氨酸-亮氨酸(即,“KDEL”基序,SEQ ID NO:6),则该融合蛋白将被靶向内质网。如果这种融合蛋白在C末端缺少一个靶向内质网的序列,则该蛋白质将被靶向该内质网,但最终将被隔离在质外体中。

[0141] 因此,这个基因编码一种融合蛋白,该融合蛋白包含了来自白羽扇豆的酸性磷酸酶基因的N末端31个氨基酸(GENBANK® ID GI:14276838,米勒等人,2001,同上文),它们在C末端上与本发明的氨基酸序列以及KDEL序列的N末端相融合。因此,预测得到的蛋白质一旦表达于一种植物细胞时就被靶向该植物的内质网。

[0142] 将以上说明的植物表达盒与一种合适的、辅助转化的细胞和组织的选择的植物可选择标记相组合,并且将其连接到植物转化载体中。这些可以包括来自土壤杆菌介导的转化的二元载体、或用于气溶胶或生物射弹转化的简单的质粒载体。

[0143] 实例5.使用在此说明的杀虫蛋白基因的玉米细胞的转化

[0144] 在授粉后8至12天收集玉米穗。将胚与穗进行分离,并且那些大小为0.8-1.5mm的胚是优选用于转化的。将这些胚以盾片侧向上的方式放置在一种合适的孵育培养基上,如DN62A5S培养基(3.98g/L N6盐;1mL/L(的1000x母液)N6维生素;800mg/L L-天冬酰胺;100mg/L肌醇;1.4g/L L-脯氨酸;100mg/L酪蛋白氨基酸;50g/L蔗糖;1mL/L(的1mg/mL母液)

2,4-D)。然而,除DN62A5S以外的培养基和盐类是适合的并且在本领域内是已知的。将这些胚在黑暗中25℃下孵育过夜。然而,本质上不需要将这些胚孵育过夜。

[0145] 将所得到的外植体转移至网眼方阵(30-40个/平板),转移至渗透培养基上并保持约30-45分钟,随后转移至一个聚束平板(beaming plate)上(参见,例如,PCT公开号W0/0138514和美国专利号5,240,842)。

[0146] 在植物细胞中将被设计为本发明基因的DNA构建体加速进入植物组织中,这是使用一种气溶胶束加速器、使用基本上如PCT公开号W0/0138514中所说明的条件进行的。在聚束之后,将胚在渗透培养基上孵育约30分钟,并且将其置于孵育培养基上25℃下黑暗中过夜。为了避免不适当地破坏经聚束的外植体,它们在转移至恢复培养基之前被孵育至少24小时。然后,将胚在25℃下在黑暗中扩散到恢复期培养基上,持续约5天,随后转移至一种选择培养基中。将外植体在选择培养基中孵育达到8周,这取决于所利用的特定选择的性质和特征。在选择期之后,将得到的愈伤组织转移至胚成熟培养基中,直至观察到成熟的体细胞胚的形成。然后,将得到的成熟的体细胞胚置于低光照下,并且通过本领域内所已知的方法来引发再生过程。允许这些得到的芽在生根培养基上生根,并且将得到的植物转移至育苗盆(nursery pot)中并繁殖成转基因植物。

[0147] 材料

[0148] DN62A5S培养基

[0149]

组分	每升	来源
Chu's N6 基础盐混合物 (Prod. No. C 416)	3.98 g/L	植物技术实验室 (Phytotechnology Labs)
Chu's N6 维生素溶液 (Prod. No. C 149)	1 mL/L (的 1000 x 母液)	植物技术实验室
L-天冬酰胺	800 mg/L	植物技术实验室
肌醇	100 mg/L	西格玛公司 (Sigma)
L-脯氨酸	1.4 g/L	植物技术实验室
酪蛋白氨基酸	100 mg/L	飞世尔科技 (Fisher Scientific)
蔗糖	50 g/L	植物技术实验室
2,4-D (Prod. No. D-7299)	1 mL/L (的 1 mg/mL 母液)	西格玛公司

[0150] 用1N KOH/1N KCl将该溶液的pH调整至pH5.8,加入高达3g/L的浓度的水晶洋菜(Gelrite)(西格玛公司),并将该培养基高压灭菌。在冷却至50℃之后,加入2ml/L的5mg/ml硝酸银母液(植物技术实验室)。

[0151] 实例6.通过土壤杆菌介导的转化将本发明的基因转化到植物细胞中

[0152] 穗最好在授粉之后8至12天进行收集。将胚与穗进行分离,并且那些大小为0.8-1.5mm的胚是优选用于转化的。将胚以盾片侧向上的方式置于在一种适当的孵育培养基中,并且在25℃下在黑暗中孵育过夜。然而,本质上不需要将这些胚孵育过夜。将这些胚与一种土壤杆菌属菌株进行接触,该菌株包含了这些适当的载体用于Ti质粒介导的转化,持续约5至10分钟,并接着将其置于共培养基上持续约3天(25℃下、黑暗中)。在共培养之后,将外植体转移到恢复期培养基中,持续约5天(25℃下、黑暗中)。将外植体在选择培养基中孵育达到8周,这取决于所利用的特定选择的性质和特征。在选择期之后,将得到的愈伤组织转移至胚成熟培养基中,直至观察到成熟的体细胞胚的形成。然后,将得到的成熟的体细胞胚置

于低光照下,并且如本领域内所已知地引发再生过程。

[0153] 在本说明书中提到的所有公开文件和专利申请对于本发明所涉及的领域的普通技术人员的技术水平而言是指示性的。所有公开文件和专利申请是通过引用结合在此的,其程度就像每个单独公开文件或专利申请被专门地和单独地表明通过引用结合在此一样。

[0154] 尽管本发明在上文中出于理解清楚的目的、通过展示和实例已经相当详细地进行说明,应当清楚是可以在所附的权利要求书的范围内实行某些改变和改进。



[0001]

PCTUS2012048510 Sequence Listing-CN.txt  
序列表

<110> Sampson, Kimberly (桑普森, 金伯利)  
Lehtinen, Duane (莱特宁, 杜安)

<120> AXMI270毒素基因及其使用方法

<130> APA116030

<150> 61/512,536

<151> 2011-07-28

<160> 6

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 3658

<212> DNA

<213> 苏云金芽孢杆菌

<400> 1

```

aatgttaatt ccccccggt acaaaagtag tgtaactaaa gattattata attagactga      60
ttgagttttt tgttttttag ataaggatat atgctgaaat ataataaaat tagatgagtg      120
ttatcgatat ttttataaga taggcgatag atctagggta gtataaaagc tattataaatt      180
aaatataatg gaggggaact atggatacca aaattcaagg tcaatgtata ccttataaatt      240
gtttgaataa tcctgaaatg gaaatgttaa atagagagag gatagatata gagactggta      300
ataccccaat cgatatttca ctatcgotta cacaatttct ttttaagagaa tttgtcccag      360
gtgtgggatt tgcattaggt ttaattgatt taatatgggg attttttaag ccttctccat      420
gggacgcatt tcttgagcaa attgagcaat taattgatca aaaaatagaa gaattttcta      480
gggccctggc aatttctagg ttggaggggc taggcgaaca atataaaatt tatgcggaaa      540
catttagaag ctgggaagca gatccgacta atccagcatt aagagaagaa atgcgtacac      600
aatttaataa catgaacagt gcgcttataa aagctattcc tcttttgaga gttaaaaatc      660
atgaagtttc tttattatca gtttatactc aggctgcaaa tctacattta tcgattttta      720
gagatgtttc agtttttggg gaaaagtggg gatttaatat agcgacgatt aatagtcggt      780
atactgaatt aactaaattt attcatacct atacagatca ttgtgtaagc tggtaacaata      840
cgggattaaa tcgtttgcca ggttctaatt ttcattgatt ggtaaaatat aattgtttta      900
gaagagattt aacattaact gtattggata ttgtctctct atttccaaat tatgaccota      960
gattatatcc aattcgaaca tcatcccagt taacacgcca agtttatteg gatttacttt      1020
tagcaaacc c atctgggggt ggaaatttca ctaatgtaga tttcgatagt attcttatta      1080
gaaaacctca tttaatggat tttatgagat atattaogat ttataccgat cgacataacg      1140
caagtagaca caatctattt tgggetggac atcaaataat tgcgattgat tctgcaggtc      1200
gtgatattgt ctatcctgta aatggtagtg cagcagaatt tgaaatgcca agacctataa      1260

```

[0002]

PCTUS2012048510 Sequence Listing-CN.txt

```

ggtttagaag tccagttggt gaaattcggg caaatcctgt atgggataga ggatcaactg 1320
caactgctgg cagctatgaa ttttttgag tgacaagtgc ccactttctt acaaatttag 1380
gagtcggttc cgattatcga agcggttota ataaggaagt tactgcttta ccagaccatg 1440
tagtgagtea tattggttat tttagacgaa ataactgcaac gggcagcaac tataggcaaa 1500
caetgacaag tgctccaatt gtctcctgga cgcatagtag cgcagagcca ccaaataaaa 1560
tttattogga tagaattacc caaatgccgt tggtaaaggg acatatectc ggttcaggta 1620
cttctgttgt taggggacca ggatttacag gaggggatac tcttcgaaga acgaatggtg 1680
gtacatttgg agaaatgcaa gtaaatatta atgcaccatt atctcaaaga tatcgcgtga 1740
ggattcgtta tgcttctact acagatttac aatttcatac ttcaattaat gggagagcaa 1800
ttaateagge gaatttttca gcaaccatga aaagaggaga gaatttagaa tctagaactt 1860
ttagaactgt aagttttact actcctttta acttttcaag tgetcaaagt atattcacat 1920
taagtgcctg gaacttttct tcaggtaacg aagtttatat agatcgaata gagtttgctc 1980
cggcagaagt aacatttgaa gcagaatatg atttagaaag agcacagaag gcagtgaatg 2040
ctctgtttat ttctacgaac gaaagagggt taaaaacaga tgtgacagat tatgatattg 2100
atcaagtgtc cagtctagta gaatgtctat cggatgaatt ctgccttgat gaaaaaagag 2160
aattgttcga gaaagttaaa fatgcgaaac gactcagtga tgagcggaat ttactccagg 2220
atecaaatth cacgtccatt aatgggcaac tgaaccgtaa atgaatagga agtacggata 2280
ttacaatcta aggaggagat gacgtattca aagagaatta cgtcacttta tcgggaacct 2340
ttgatgagtg ctatccaatc tatttttatt gaaaaataga tgagtcttaa ttaaaaacct 2400
ataccatta ttaattaaga gggatatatc aagatagtea agatttagaa atctatttga 2460
tttattacaa tcgaaacat aaaacgtaa atgttacagg taccgggtcc ttgtggacac 2520
tttcagttga aagtetaatt ggaaagcggc gcgaaccgaa tcgaatggaa tcttgattta 2580
gattgttcgt gcaggaatag agtgaagtgt acccattatt tctccttga cattgatata 2640
ggatgtacag gcctaaatga gggttgatct ttaggattaa gacgcaagat gccaggcga 2700
gactaggaaa tctagaattt atcgaagaga agctgttatt aggagaaata ttagtgctg 2760
tgaagagagc ggagaaaaaa tggtagagaca aacgtgaaaa actacaatta gaaacacata 2820
tagtgatca agaagcaaaa gcttctattg atgctttatt cgtagattct caatatgata 2880
aattgcaagc tgatacaaac atcgccatga ctcatgtgga agataaacgc gttcatcaaa 2940
tcogagaagc ctatctgcca gaattgtctg tgattccagg tgtaaagcgc acctttttcg 3000
aagaattaga gggacgtatt ttacacgct atttottata tgatacaaga aatgtcataa 3060
aaaatggcga ttttaataat ggattatctt gctggaacgt gaaagggcat gtagatttac 3120
aacagagtca tcatcgctcg gtcttctag tcccagaatg gaaggcagaa gtgtcacagg 3180

```

[0003]

PCTUS2012048510 Sequence Listing-CN.txt

```

agggtgcgtgt ttgttcaggt cgtggctata tccttcgtgt tacagcgtac aaagaaggat 3240
atgggggaagg atgcgtaacg atocatgaga tcgaagataa tacagacgaa ctgaaattca 3300
gcacctgtgt agaagaagca tatccaaaca acaagatagc gtgcaatgaa tatgctgca 3360
atcaagaagt aggagagtgt gcggatgcac gtaatgaccg taoccggtgga tatgaggatg 3420
catatggaag taatccttca gcacctgtgc attacacacc ggcgtacgag gaagaagcgt 3480
atagagatat aatcagtggt aatatgacag aggatatggg aatcatacac tgttacaage 3540
tggttatgta acaaaagaat tagaatactt cccagaaaca gataaagtat ggatagagat 3600
tggagaaaacg gaaggagcat tcatcgtaga cagtgtagaa ttactcctta tagatgaa 3658

```

```

<210> 2
<211> 2061
<212> DNA
<213> 苏云金芽孢杆菌

```

```

<400> 2
atgggatacca aaattcaagg tcaatgtata cettataaatt gtttgaataa tcttgaatg 60
gaaatgttaa atagagagag gatagatata gagactggta ataceccaat cgatatttca 120
ctatcgetta cacaatttct ttttaagagaa tttgtcccag gtgtgggatt tgcattaggt 180
ttaattgatt taatatgggg attttttaag ccttctccat gggacgcatt tcttgagcaa 240
attgagcaat taattgatca aaaaatagaa gaattttcta gggccctggc aatttctagg 300
ttggagggggc taggcgaaca atataaaatt tatgcggaaa cattttagaag ctgggaagca 360
gateccgacta atccagcatt aagagaagaa atgcgtacac aatttaataa catgaacagt 420
gogcttataa aagctattcc tcttttgaga gttaaaaatc atgaagtttc tttattatca 480
gtttatactc aggetgcaa tetacattta tegtattta gagatgtttc agtttttggg 540
gaaaagtggg gatttaatat agcgcagatt aatagtcgtt ataactgaatt aactaaatft 600
attcatacct atacagatca ttgtgtaagc tggtaacaata cgggattaaa tegtttgca 660
ggttctaatt ttcattgatt ggtaaaatat aattgtttta gaagagattt aacattaact 720
gtattggata ttgtctctct atttccaaat tatgaccta gatttatatcc aattogaaca 780
toatcccagt taacaogcga agtttattcg gatttacttt tagcaaacc atctggggtt 840
ggaaatttca ctaatgtaga tttcgatagt attcttatta gaaaacctca tttaatggat 900
tttatgagat atattaogat ttataccgat cgacataaog caagtagaca caatctatft 960
tgggetggac atcaaataat tgogattgat tctgcaggtc gtgatattgt ctatcctgta 1020
aatggtagtg cagcagaatt tgaaatgcca agacctataa ggttttagaag tccagttgtt 1080
gaaattcggg caaatcctgt atgggataga ggatcaactg caactgctgg cagctatgaa 1140
ttttttggag tgacaagtgc ccactttctt acaaatftag gagtcggttc cgattatoga 1200
ageggttcta ataaggaagt tactgcttta ccagacctg tagtgagtca tattggttat 1260

```

[0004]

PCTUS2012048510 Sequence Listing-CN.txt

```

tttagacgaa atactgcaac ggcagcaac tataggcaaa cactgacaag tgctccaatt      1320
gtctcctgga cgcatagtag cgcagagcca ccaaataaaa tttattcgga tagaattacc      1380
caaatgccgt tggtaaaggc acatatectc ggttcaggta cttctgttgt taggggacca      1440
ggatttacag gaggggatac tcttcgaaga acgaatgttg gtacatttgg agaaatgcaa      1500
gtaaatatta atgcaccatt atctcaaaga tatecgtgga ggattcgtta tgcttctact      1560
acagatttac aatttcatac tteaattaat gggagagcaa ttaatcagge gaatttttca      1620
gcaaccatga aaagaggaga gaatttagaa tctagaactt ttagaactgt aagttttact      1680
actcctttta acttttcaag tgetcaaagt atattcacat taagtgettg gaacttttct      1740
tcaggtaacg aagtttatat agategaata gagtttgttc cggcagaagt aacatttgaa      1800
gcagaatatg atttagaaag agcacagaag gcagtgaatg ctctgtttat ttctacgaac      1860
gaaagagggg taaaaacaga tgtgacagat tatgatattg atcaagtgtc cagtctagta      1920
gaatgtctat cggatgaatt ctgccttgat gaaaaaagag aattgttcga gaaagttaaa      1980
tatgcgaaac gactcagtga tgagcggaat ttactccagg atccaaattt cacgtccatt      2040
aatgggcaac tgaaccgtaa a                                          2061
    
```

```

<210> 3
<211> 687
<212> PRT
<213> 苏云金芽孢杆菌
    
```

<400> 3

```

Met Asp Thr Lys Ile Gln Gly Gln Cys Ile Pro Tyr Asn Cys Leu Asn
1          5          10          15

Asn Pro Glu Met Glu Met Leu Asn Arg Glu Arg Ile Asp Ile Glu Thr
          20          25          30

Gly Asn Thr Pro Ile Asp Ile Ser Leu Ser Leu Thr Gln Phe Leu Leu
          35          40          45

Arg Glu Phe Val Pro Gly Val Gly Phe Ala Leu Gly Leu Ile Asp Leu
          50          55          60

Ile Trp Gly Phe Phe Lys Pro Ser Pro Trp Asp Ala Phe Leu Glu Gln
65          70          75          80

Ile Glu Gln Leu Ile Asp Gln Lys Ile Glu Glu Phe Ser Arg Ala Leu
          85          90          95

Ala Ile Ser Arg Leu Glu Gly Leu Gly Glu Gln Tyr Lys Ile Tyr Ala
          100          105          110
    
```

## PCTUS2012048510 Sequence Listing-CN.txt

Glu Thr Phe Arg Ser Trp Glu Ala Asp Pro Thr Asn Pro Ala Leu Arg  
 115 120 125  
 Glu Glu Met Arg Thr Gln Phe Asn Asn Met Asn Ser Ala Leu Ile Lys  
 130 135 140  
 Ala Ile Pro Leu Leu Arg Val Lys Asn His Glu Val Ser Leu Leu Ser  
 145 150 155 160  
 Val Tyr Thr Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser Ile Leu Arg Asp Val  
 165 170 175  
 Ser Val Phe Gly Glu Lys Trp Gly Phe Asn Ile Ala Thr Ile Asn Ser  
 180 185 190  
 Arg Tyr Thr Glu Leu Thr Lys Phe Ile His Thr Tyr Thr Asp His Cys  
 195 200 205  
 Val Ser Trp Tyr Asn Thr Gly Leu Asn Arg Leu Arg Gly Ser Asn Phe  
 210 215 220  
 His Asp Trp Val Lys Tyr Asn Cys Phe Arg Arg Asp Leu Thr Leu Thr  
 225 230 235 240  
 Val Leu Asp Ile Val Ser Leu Phe Pro Asn Tyr Asp Pro Arg Leu Tyr  
 245 250 255  
 Pro Ile Arg Thr Ser Ser Gln Leu Thr Arg Glu Val Tyr Ser Asp Leu  
 260 265 270  
 Leu Leu Ala Asn Pro Ser Gly Val Gly Asn Phe Thr Asn Val Asp Phe  
 275 280 285  
 Asp Ser Ile Leu Ile Arg Lys Pro His Leu Met Asp Phe Met Arg Tyr  
 290 295 300  
 Ile Thr Ile Tyr Thr Asp Arg His Asn Ala Ser Arg His Asn Leu Phe  
 305 310 315 320  
 Trp Ala Gly His Gln Ile Ile Ala Ile Asp Ser Ala Gly Arg Asp Ile  
 325 330 335  
 Val Tyr Pro Val Asn Gly Ser Ala Ala Glu Phe Glu Met Pro Arg Pro  
 340 345 350  
 Ile Arg Phe Arg Ser Pro Val Val Glu Ile Arg Ser Asn Pro Val Trp  
 355 360 365

[0005]

## PCTUS2012048510 Sequence Listing-CN.txt

Asp Arg Gly Ser Thr Ala Thr Ala Gly Ser Tyr Glu Phe Phe Gly Val  
 370 375 380  
 Thr Ser Ala His Phe Leu Thr Asn Leu Gly Val Gly Ser Asp Tyr Arg  
 385 390 395 400  
 Ser Gly Ser Asn Lys Glu Val Thr Ala Leu Pro Asp His Val Val Ser  
 405 410 415  
 His Ile Gly Tyr Phe Arg Arg Asn Thr Ala Thr Gly Ser Asn Tyr Arg  
 420 425 430  
 Gln Thr Leu Thr Ser Ala Pro Ile Val Ser Trp Thr His Ser Ser Ala  
 435 440 445  
 Glu Pro Pro Asn Lys Ile Tyr Ser Asp Arg Ile Thr Gln Met Pro Leu  
 450 455 460  
 Val Lys Ala His Ile Leu Gly Ser Gly Thr Ser Val Val Arg Gly Pro  
 465 470 475 480  
 Gly Phe Thr Gly Gly Asp Thr Leu Arg Arg Thr Asn Val Gly Thr Phe  
 485 490 495  
 Gly Glu Met Gln Val Asn Ile Asn Ala Pro Leu Ser Gln Arg Tyr Arg  
 500 505 510  
 Val Arg Ile Arg Tyr Ala Ser Thr Thr Asp Leu Gln Phe His Thr Ser  
 515 520 525  
 Ile Asn Gly Arg Ala Ile Asn Gln Ala Asn Phe Ser Ala Thr Met Lys  
 530 535 540  
 Arg Gly Glu Asn Leu Glu Ser Arg Thr Phe Arg Thr Val Ser Phe Thr  
 545 550 555 560  
 Thr Pro Phe Asn Phe Ser Ser Ala Gln Ser Ile Phe Thr Leu Ser Ala  
 565 570 575  
 Trp Asn Phe Ser Ser Gly Asn Glu Val Tyr Ile Asp Arg Ile Glu Phe  
 580 585 590  
 Val Pro Ala Glu Val Thr Phe Glu Ala Glu Tyr Asp Leu Glu Arg Ala  
 595 600 605  
 Gln Lys Ala Val Asn Ala Leu Phe Ile Ser Thr Asn Glu Arg Gly Leu  
 610 615 620

[0006]

## PCTUS2012048510 Sequence Listing-CN.txt

Lys Thr Asp Val Thr Asp Tyr Asp Ile Asp Gln Val Ser Ser Leu Val  
625 630 635 640

Glu Cys Leu Ser Asp Glu Phe Cys Leu Asp Glu Lys Arg Glu Leu Phe  
645 650 655

Glu Lys Val Lys Tyr Ala Lys Arg Leu Ser Asp Glu Arg Asn Leu Leu  
660 665 670

Gln Asp Pro Asn Phe Thr Ser Ile Asn Gly Gln Leu Asn Arg Lys  
675 680 685

<210> 4  
<211> 668  
<212> PRT  
<213> 苏云金芽孢杆菌  
<400> 4

Met Glu Met Leu Asn Arg Glu Arg Ile Asp Ile Glu Thr Gly Asn Thr  
1 5 10 15

Pro Ile Asp Ile Ser Leu Ser Leu Thr Gln Phe Leu Leu Arg Glu Phe  
20 25 30

[0007] Val Pro Gly Val Gly Phe Ala Leu Gly Leu Ile Asp Leu Ile Trp Gly  
35 40 45

Phe Phe Lys Pro Ser Pro Trp Asp Ala Phe Leu Glu Gln Ile Glu Gln  
50 55 60

Leu Ile Asp Gln Lys Ile Glu Glu Phe Ser Arg Ala Leu Ala Ile Ser  
65 70 75 80

Arg Leu Glu Gly Leu Gly Glu Gln Tyr Lys Ile Tyr Ala Glu Thr Phe  
85 90 95

Arg Ser Trp Glu Ala Asp Pro Thr Asn Pro Ala Leu Arg Glu Glu Met  
100 105 110

Arg Thr Gln Phe Asn Asn Met Asn Ser Ala Leu Ile Lys Ala Ile Pro  
115 120 125

Leu Leu Arg Val Lys Asn His Glu Val Ser Leu Leu Ser Val Tyr Thr  
130 135 140

Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser Ile Leu Arg Asp Val Ser Val Phe  
145 150 155 160

Gly Glu Lys Trp Gly Phe Asn Ile Ala Thr Ile Asn Ser Arg Tyr Thr

PCTUS2012048510 Sequence Listing-CN.txt

```

165                               170                               175
Glu Leu Thr Lys Phe Ile His Thr Tyr Thr Asp His Cys Val Ser Trp
180                               185                               190
Tyr Asn Thr Gly Leu Asn Arg Leu Arg Gly Ser Asn Phe His Asp Trp
195                               200                               205
Val Lys Tyr Asn Cys Phe Arg Arg Asp Leu Thr Leu Thr Val Leu Asp
210                               215
Ile Val Ser Leu Phe Pro Asn Tyr Asp Pro Arg Leu Tyr Pro Ile Arg
225                               230                               235                               240
Thr Ser Ser Gln Leu Thr Arg Glu Val Tyr Ser Asp Leu Leu Leu Ala
245                               250                               255
Asn Pro Ser Gly Val Gly Asn Phe Thr Asn Val Asp Phe Asp Ser Ile
260                               265                               270
Leu Ile Arg Lys Pro His Leu Met Asp Phe Met Arg Tyr Ile Thr Ile
275                               280                               285
[0008] Tyr Thr Asp Arg His Asn Ala Ser Arg His Asn Leu Phe Trp Ala Gly
290                               295                               300
His Gln Ile Ile Ala Ile Asp Ser Ala Gly Arg Asp Ile Val Tyr Pro
305                               310                               315
Val Asn Gly Ser Ala Ala Glu Phe Glu Met Pro Arg Pro Ile Arg Phe
325                               330                               335
Arg Ser Pro Val Val Glu Ile Arg Ser Asn Pro Val Trp Asp Arg Gly
340                               345                               350
Ser Thr Ala Thr Ala Gly Ser Tyr Glu Phe Phe Gly Val Thr Ser Ala
355                               360                               365
His Phe Leu Thr Asn Leu Gly Val Gly Ser Asp Tyr Arg Ser Gly Ser
370                               375                               380
Asn Lys Glu Val Thr Ala Leu Pro Asp His Val Val Ser His Ile Gly
385                               390                               395                               400
Tyr Phe Arg Arg Asn Thr Ala Thr Gly Ser Asn Tyr Arg Gln Thr Leu
405                               410                               415
Thr Ser Ala Pro Ile Val Ser Trp Thr His Ser Ser Ala Glu Pro Pro

```



## PCTUS2012048510 Sequence Listing-CN.txt

420 425 430

Asn Lys Ile Tyr Ser Asp Arg Ile Thr Gln Met Pro Leu Val Lys Ala  
435 440 445

His Ile Leu Gly Ser Gly Thr Ser Val Val Arg Gly Pro Gly Phe Thr  
450 455 460

Gly Gly Asp Thr Leu Arg Arg Thr Asn Val Gly Thr Phe Gly Glu Met  
465 470 475 480

Gln Val Asn Ile Asn Ala Pro Leu Ser Gln Arg Tyr Arg Val Arg Ile  
485 490 495

Arg Tyr Ala Ser Thr Thr Asp Leu Gln Phe His Thr Ser Ile Asn Gly  
500 505 510

Arg Ala Ile Asn Gln Ala Asn Phe Ser Ala Thr Met Lys Arg Gly Glu  
515 520 525

Asn Leu Glu Ser Arg Thr Phe Arg Thr Val Ser Phe Thr Thr Pro Phe  
530 535 540

[0009] Asn Phe Ser Ser Ala Gln Ser Ile Phe Thr Leu Ser Ala Trp Asn Phe  
545 550 555 560

Ser Ser Gly Asn Glu Val Tyr Ile Asp Arg Ile Glu Phe Val Pro Ala  
565 570 575

Glu Val Thr Phe Glu Ala Glu Tyr Asp Leu Glu Arg Ala Gln Lys Ala  
580 585 590

Val Asn Ala Leu Phe Ile Ser Thr Asn Glu Arg Gly Leu Lys Thr Asp  
595 600 605

Val Thr Asp Tyr Asp Ile Asp Gln Val Ser Ser Leu Val Glu Cys Leu  
610 615 620

Ser Asp Glu Phe Cys Leu Asp Glu Lys Arg Glu Leu Phe Glu Lys Val  
625 630 635 640

Lys Tyr Ala Lys Arg Leu Ser Asp Glu Arg Asn Leu Leu Gln Asp Pro  
645 650 655

Asn Phe Thr Ser Ile Asn Gly Gln Leu Asn Arg Lys  
660 665

<210> 5

PCTUS2012048510 Sequence Listing-CN.txt

&lt;211&gt; 666

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 苏云金芽孢杆菌

&lt;400&gt; 5

Met Leu Asn Arg Glu Arg Ile Asp Ile Glu Thr Gly Asn Thr Pro Ile  
1 5 10 15

Asp Ile Ser Leu Ser Leu Thr Gln Phe Leu Leu Arg Glu Phe Val Pro  
20 25 30

Gly Val Gly Phe Ala Leu Gly Leu Ile Asp Leu Ile Trp Gly Phe Phe  
35 40 45

Lys Pro Ser Pro Trp Asp Ala Phe Leu Glu Gln Ile Glu Gln Leu Ile  
50 55 60

Asp Gln Lys Ile Glu Glu Phe Ser Arg Ala Leu Ala Ile Ser Arg Leu  
65 70 75 80

Glu Gly Leu Gly Glu Gln Tyr Lys Ile Tyr Ala Glu Thr Phe Arg Ser  
85 90 95

[0010]

Trp Glu Ala Asp Pro Thr Asn Pro Ala Leu Arg Glu Glu Met Arg Thr  
100 105 110

Gln Phe Asn Asn Met Asn Ser Ala Leu Ile Lys Ala Ile Pro Leu Leu  
115 120 125

Arg Val Lys Asn His Glu Val Ser Leu Leu Ser Val Tyr Thr Gln Ala  
130 135 140

Ala Asn Leu His Leu Ser Ile Leu Arg Asp Val Ser Val Phe Gly Glu  
145 150 155 160

Lys Trp Gly Phe Asn Ile Ala Thr Ile Asn Ser Arg Tyr Thr Glu Leu  
165 170 175

Thr Lys Phe Ile His Thr Tyr Thr Asp His Cys Val Ser Trp Tyr Asn  
180 185 190

Thr Gly Leu Asn Arg Leu Arg Gly Ser Asn Phe His Asp Trp Val Lys  
195 200 205

Tyr Asn Cys Phe Arg Arg Asp Leu Thr Leu Thr Val Leu Asp Ile Val  
210 215 220

Ser Leu Phe Pro Asn Tyr Asp Pro Arg Leu Tyr Pro Ile Arg Thr Ser  
225 230 235 240

## PCTUS2012048510 Sequence Listing-CN.txt

Ser Gln Leu Thr Arg Glu Val Tyr Ser Asp Leu Leu Leu Ala Asn Pro  
 245 250 255  
 Ser Gly Val Gly Asn Phe Thr Asn Val Asp Phe Asp Ser Ile Leu Ile  
 260 265 270  
 Arg Lys Pro His Leu Met Asp Phe Met Arg Tyr Ile Thr Ile Tyr Thr  
 275 280 285  
 Asp Arg His Asn Ala Ser Arg His Asn Leu Phe Trp Ala Gly His Gln  
 290 295 300  
 Ile Ile Ala Ile Asp Ser Ala Gly Arg Asp Ile Val Tyr Pro Val Asn  
 305 310 315  
 Gly Ser Ala Ala Glu Phe Glu Met Pro Arg Pro Ile Arg Phe Arg Ser  
 325 330 335  
 Pro Val Val Glu Ile Arg Ser Asn Pro Val Trp Asp Arg Gly Ser Thr  
 340 345 350  
 Ala Thr Ala Gly Ser Tyr Glu Phe Phe Gly Val Thr Ser Ala His Phe  
 [0011] 355 360 365  
 Leu Thr Asn Leu Gly Val Gly Ser Asp Tyr Arg Ser Gly Ser Asn Lys  
 370 375 380  
 Glu Val Thr Ala Leu Pro Asp His Val Val Ser His Ile Gly Tyr Phe  
 385 390 395 400  
 Arg Arg Asn Thr Ala Thr Gly Ser Asn Tyr Arg Gln Thr Leu Thr Ser  
 405 410 415  
 Ala Pro Ile Val Ser Trp Thr His Ser Ser Ala Glu Pro Pro Asn Lys  
 420 425 430  
 Ile Tyr Ser Asp Arg Ile Thr Gln Met Pro Leu Val Lys Ala His Ile  
 435 440 445  
 Leu Gly Ser Gly Thr Ser Val Val Arg Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly  
 450 455 460  
 Asp Thr Leu Arg Arg Thr Asn Val Gly Thr Phe Gly Glu Met Gln Val  
 465 470 475 480  
 Asn Ile Asn Ala Pro Leu Ser Gln Arg Tyr Arg Val Arg Ile Arg Tyr  
 485 490 495

## PCTUS2012048510 Sequence Listing-CN.txt

Ala Ser Thr Thr Asp Leu Gln Phe His Thr Ser Ile Asn Gly Arg Ala  
500 505 510

Ile Asn Gln Ala Asn Phe Ser Ala Thr Met Lys Arg Gly Glu Asn Leu  
515 520 525

Glu Ser Arg Thr Phe Arg Thr Val Ser Phe Thr Thr Pro Phe Asn Phe  
530 535 540

Ser Ser Ala Gln Ser Ile Phe Thr Leu Ser Ala Trp Asn Phe Ser Ser  
545 550 555 560

Gly Asn Glu Val Tyr Ile Asp Arg Ile Glu Phe Val Pro Ala Glu Val  
565 570 575

Thr Phe Glu Ala Glu Tyr Asp Leu Glu Arg Ala Gln Lys Ala Val Asn  
580 585 590

Ala Leu Phe Ile Ser Thr Asn Glu Arg Gly Leu Lys Thr Asp Val Thr  
595 600 605

[0012]

Asp Tyr Asp Ile Asp Gln Val Ser Ser Leu Val Glu Cys Leu Ser Asp  
610 615 620

Glu Phe Cys Leu Asp Glu Lys Arg Glu Leu Phe Glu Lys Val Lys Tyr  
625 630 635 640

Ala Lys Arg Leu Ser Asp Glu Arg Asn Leu Leu Gln Asp Pro Asn Phe  
645 650 655

Thr Ser Ile Asn Gly Gln Leu Asn Arg Lys  
660 665

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 4

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 内质网靶向肽

&lt;400&gt; 6

Lys Asp Glu Leu

1