



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101501066 B

(45) 授权公告日 2012. 05. 30

(21) 申请号 200780029753. 3

代理人 罗菊华

(22) 申请日 2007. 06. 14

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

C07K 14/325 (2006. 01)

60/813, 774 2006. 06. 14 US

C12N 15/82 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2009. 02. 10

US 5589382 A, 1996. 12. 31, 第 5 栏 35 至 40 行, 第 8 栏第 1 至 13 行, 第 9 栏第 20 至 21 行, 第 14 栏第 19 至第 15 栏第 38 行, 第 17 至 26 栏, .

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2007/071173 2007. 06. 14

罗兰, 等. 苏云金芽孢杆菌杀线虫晶体蛋白的相关基因. 《中国生物防治》. 2005, 第 21 卷 (第 1 期), 全文.

(87) PCT申请的公布数据

W02007/147029 EN 2007. 12. 21

李海燕, 等. 植物抗虫基因工程的研究进展. 《东北农业大学学报》. 2000, 第 31 卷 (第 4 期), 全文.

(73) 专利权人 阿则耐克斯公司

地址 美国北卡罗来纳州

审查员 高宇

(72) 发明人 N·卡洛兹 N·达克 T·卡恩

N·迪塞 S·简 D·J·汤姆索

R·郭 J·蒂森

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

权利要求书 2 页 说明书 29 页

(54) 发明名称

δ -内毒素基因家庭, AXMI-031、AXMI-039、AXMI-040 和 AXMI-049, 及其使用方法

(57) 摘要

提供了用于将杀有害生物活性赋予细菌、植物、植物细胞、组织和种子的组合物和方法。提供了组合物, 其包含 δ -内毒素多肽的编码序列。所述编码序列可以在 DNA 构建体或表达盒中使用以用于转化植物和细菌并在其中表达。所述组合物还包含转化的细菌、植物、植物细胞、组织和种子。特别地, 提供了分离的 δ -内毒素核酸分子。另外, 包括了相应于所述多核苷酸的氨基酸序列, 和特异性地结合这些氨基酸序列的抗体。特别地, 本发明提供了分离的核酸分子, 其包含编码 SEQ ID NO : 2、4、6、8、10、12、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35 或 38 中所示的氨基酸序列的核苷酸序列, 或者 SEQ ID NO : 1、3、5、7、9、11、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34 或 37 中所示的核苷酸序列, 以及其变体和片段。

1. 分离的或重组的核酸分子,其包含选自下列的核苷酸序列:
 - a) SEQ ID NO :1、7、9、11、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32 或 37 的核苷酸序列,或其互补物;
 - b) 与 SEQ ID NO :1、7、9、11、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32 或 37 的核苷酸序列具有至少 95%序列同一性的核苷酸序列,或其互补物,其中所述核苷酸序列编码具有抗植物寄生性线虫的杀有害生物活性的多肽;
 - c) 编码包含 SEQ ID NO :2、8、10、12、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33 或 38 的氨基酸序列的多肽的核苷酸序列;
 - d) 编码包含与 SEQ ID NO :2、8、10、12、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33 或 38 的氨基酸序列具有至少 95%序列同一性的氨基酸序列的多肽的核苷酸序列,其中所述核苷酸序列编码具有抗植物寄生性线虫的杀有害生物活性的多肽;和
 - e) 以登记号 B-30935 进行保藏的质粒的 DNA 插入片段的 δ -内毒素核苷酸序列,或其互补物。
2. 权利要求 1 的分离的或重组的核酸分子,其中所述核苷酸序列与能够在植物细胞中指导核苷酸序列表达的启动子可操作地连接。
3. 权利要求 1 或 2 的分离的或重组的核酸分子,其中所述核苷酸序列是被设计用于在植物中表达的合成序列。
4. 载体,其包含权利要求 1,2 或 3 的核酸分子。
5. 权利要求 4 的载体,其进一步包含编码异源多肽的核酸分子。
6. 宿主细胞,其包含权利要求 1 的分离的或重组的核酸分子,并且其不是植物细胞。
7. 权利要求 6 的宿主细胞,其中所述宿主细胞是细菌宿主细胞。
8. 具有杀有害生物活性的分离的或重组的多肽,其选自:
 - a) 包含 SEQ ID NO :2、8、10、12、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33 或 38 的氨基酸序列的多肽;
 - b) 包含与 SEQ ID NO :2、8、10、12、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33 或 38 的氨基酸序列具有至少 95%序列同一性的氨基酸序列的多肽,其中所述多肽具有抗植物寄生性线虫的杀有害生物活性;
 - c) 由 SEQ ID NO :1、7、9、11、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32 或 37 的核苷酸序列编码的多肽;
 - d) 由与 SEQ ID NO :1、7、9、11、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32 或 37 的核苷酸序列至少 95%同一的核苷酸序列编码的多肽,其中所述多肽具有抗植物寄生性线虫的杀有害生物活性;和
 - e) 由以登记号 B-30935 进行保藏的质粒的 DNA 插入片段的 δ -内毒素核苷酸序列编码的多肽。
9. 权利要求 8 的多肽,其进一步包含异源氨基酸序列。
10. 抗体,其选择性地结合权利要求 8 的多肽。
11. 组合物,其包含权利要求 8 的多肽。
12. 权利要求 11 的组合物,其中所述组合物选自粉剂、粉尘剂、丸剂、颗粒剂、喷雾剂、乳液、胶体和溶液。

13. 权利要求 11 的组合物,其中通过苏云金芽孢杆菌细胞的培养物的脱水、冻干、匀浆、提取、过滤、离心、沉淀或浓缩来制备所述组合物。

14. 权利要求 11 的组合物,其包含大约 1 重量%至大约 99 重量%的所述多肽。

15. 用于防治线虫有害生物群体的方法,所述方法包括使所述群体与杀有害生物有效量的权利要求 8 的多肽接触。

16. 用于杀死线虫有害生物的方法,所述方法包括使所述有害生物与杀有害生物有效量的权利要求 8 的多肽接触,或者用杀有害生物有效量的权利要求 8 的多肽饲喂所述有害生物。

17. 用于产生具有杀有害生物活性的多肽的方法,其包括在其中表达编码所述多肽的核酸分子条件下培养权利要求 6 的宿主细胞。

18. 用于保护植物免受有害生物侵害的方法,其包括将至少一个包含编码杀有害生物多肽的核苷酸序列的表达载体引入所述植物或其细胞中,其中所述核苷酸序列选自:

a) SEQ ID NO :1、7、9、11、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32 或 37 的核苷酸序列;

b) 与 SEQ ID NO :1、7、9、11、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32 或 37 的核苷酸序列具有至少 95%序列同一性的核苷酸序列,其中所述核苷酸序列编码具有抗植物寄生性线虫的杀有害生物活性的多肽;

c) 编码包含 SEQ ID NO :2、8、10、12、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33 或 38 的氨基酸序列的多肽的核苷酸序列;

d) 编码与 SEQ ID NO :2、8、10、12、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33 或 38 的氨基酸序列具有至少 95%序列同一性的多肽的核苷酸序列,其中所述核苷酸序列编码具有抗植物寄生性线虫的杀有害生物活性的多肽;和

e) 以登记号 B-30935 进行保藏的质粒的 DNA 插入片段的 δ -内毒素核苷酸序列,或其互补物。

19. 权利要求 18 的方法,其中所述植物产生杀有害生物多肽,所述杀有害生物多肽具有针对线虫有害生物的杀有害生物活性。

δ -内毒素基因家族, AXMI-031、AXMI-039、AXMI-040 和 AXMI-049, 及其使用方法

发明领域

[0001] 本发明涉及分子生物学领域。提供了编码杀有害生物蛋白质的新型基因。这些蛋白质和编码它们的核酸序列可用于制备杀有害生物制剂和生产转基因的抗有害生物的植物。

[0002] 发明背景

[0003] 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体是无害的。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有害生物或者各种人或动物疾病的昆虫媒介物。

[0004] 来自苏云金芽孢杆菌的晶体 (Cry) 蛋白 (δ -内毒素) 具有有效的主要针对鳞翅类昆虫、双翅类昆虫和鞘翅类昆虫幼虫的杀有害生物活性。这些蛋白质也显示出针对膜翅目 (Hymenoptera)、同翅目 (Homoptera)、虱目 (Phthiraptera)、食毛目 (Mallophaga) 和蜱螨亚纲 (Acari) 有害生物, 以及其他无脊椎动物例如线形动物门 (Nemathelminthes)、扁形动物门 (Platyhelminthes) 和肉鞭毛虫门 (Sarcomastigophora) (Feitelson (1993) *The Bacillus Thuringiensis family tree*. Advanced Engineered Pesticides, Marcel Dekker, Inc., New York, 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。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。

[0005] 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 (Crickmore 等人 (1998) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62 :807-813)。在所述新的分类中, 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) 和第四级 (quaternary rank) (另一个阿拉伯数字)。在所述新的分类中, 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%。

[0006] 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 Whiteley (1989) *Microbiol. Rev.* 53 :242-255)。该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, 因而产生离子通道或孔, 从而导致幼虫死亡。

[0007] δ -内毒素通常具有 5 个保守的序列结构域和 3 个保守的结构域 (参见, 例如, de Maagd 等人 (2001) *Trends Genetics* 17 :193-199)。第一个保守结构域由 7 个 α 螺旋组成, 并且参与膜插入和孔形成。结构域 II 由以希腊钥匙构型进行排列的三个 β

折叠片组成,和结构域 III 由以“果冻卷饼 (jelly-roll)”样式的两个反向平行 β 折叠片组成 (de Maagd 等人,2001,同上)。结构域 II 和 III 参与受体识别和结合,因而被认为是毒素特异性的决定子。

[0008] 因为昆虫可带来的破坏,所以存在对于发现新形式的苏云金芽孢杆菌 δ -内毒素的持续需要。

[0009] 发明概述

[0010] 提供了用于将有害生物抗性赋予细菌、植物、植物细胞、组织和种子的组合物和方法。组合物包括:编码 δ -内毒素多肽的序列的核酸分子、含有这些核酸分子的载体和含有所述载体的宿主细胞。组合物还包括内毒素的多肽序列和针对这些多肽的抗体。所述核苷酸序列可以在 DNA 构建体或表达盒中使用以用于转化生物体(包括微生物和植物)并在其中表达。所述核苷酸或氨基酸序列可以是设计用于在生物体(包括但不限于微生物或植物)中表达的合成序列。组合物还包含转化的细菌、植物、植物细胞、组织和种子。

[0011] 特别地,提供了相应于 δ -内毒素核酸序列的分离的核酸分子。另外,还包括相应于所述多核苷酸的氨基酸序列。特别地,本发明提供了分离的核酸分子,其包含编码 SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35 或 38 中所示的氨基酸序列的核苷酸序列,SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34 或 37 中所示的核苷酸序列,或以登记号 B-30935、B-30936、B-30937 和 B-50046 保藏在细菌宿主中的 δ -内毒素核苷酸序列,以及其变体和片段。还包括与本发明的核苷酸序列互补的核苷酸序列或与本发明的序列杂交的核苷酸序列。

[0012] 提供了用于产生本发明的多肽的方法,和用于使用这些多肽来防治或杀死鳞翅类或鞘翅类有害生物的方法。还包括用于在样品中检测本发明的核酸和多肽的方法和试剂盒。

[0013] 进一步提供了用于防治或杀射线虫有害生物群体的方法。所述方法包括向植物中引入编码具有大于 22kDa 的分子大小的线虫活性多肽的多核苷酸。这些线虫活性多肽可用于防治或杀死植物寄生性线虫,特别是胞囊线虫 (cyst nematodes)。

[0014] 本发明的组合物和方法可用于产生具有有害生物抗性的生物体,特别是细菌和植物。这些生物体和从其衍生的组合物对于农业目的来说是所希望的。本发明的组合物还可用于产生改变的或改进的具有杀有害生物活性 (pesticidal activity) 的 δ -内毒素蛋白,或用于检测产品或生物体中 δ -内毒素蛋白或核酸的存在。

[0015] 发明详述

[0016] 本发明涉及用于调节生物体特别是植物或植物细胞中的有害生物抗性的组合物和方法。所述方法包括用编码本发明的 δ -内毒素蛋白的核苷酸序列来转化生物体。特别地,本发明核苷酸序列可用于制备具有杀有害生物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、植物组织和种子。组合物是苏云金芽孢杆菌的 δ -内毒素核酸和蛋白质。所述序列可用于构建用于随后转化入目的生物体中的表达载体,用作用于分离其他 δ -内毒素基因的探针,和用于通过本领域中已知的方法(例如,结构域交换或 DNA 改组)来产生改变的杀有害生物蛋白质 (pesticidal protein)。所述蛋白质可用于防治或杀死鳞翅类昆虫、鞘翅类昆虫和线虫有害生物群体,和用于生产具有杀有害生物活性的组合物。

[0017] 包含本发明的核苷酸序列的质粒于 2006 年 6 月 9 日保藏于农业研究机构保藏中心 (Agricultural Research Service CultureCollection, Northern Regional Research Laboratory (NRRL), 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604, United States of America) 的永久收藏中, 登记号为 NRRL B-30935(axmi-031)、NRRL B-30936(axmi-039)、NRRL B-30937(axmi-040); 和于 2007 年 5 月 29 日保藏于农业研究机构保藏中心的永久收藏中, 登记号为 NRRL B-50046(axmi-049)。这些保藏将根据国际承认用于专利程序的微生物保存布达佩斯条约的条款进行维持。这些保藏仅仅为了本领域技术人员方便而进行, 并非承认保藏是根据 35 U. S. C. § 112 所要求的。

[0018] “ δ -内毒素”意指来自苏云金芽孢杆菌的毒素, 其具有针对一种或多种有害生物的毒性活性, 所述有害生物包括但不限于鳞翅目 (Lepidoptera)、双翅目 (Diptera) 和鞘翅目 (Coleoptera) 的成员或线虫动物门 (Nematoda) 的成员; 或者与此类蛋白质具有同源性的蛋白质。在一些情况下, 已从其他生物体 (包括双酶梭菌 (*Clostridium bifermentans*) 和日本甲虫类芽孢杆菌 (*Paenibacillus popilliae*)) 中分离出了 δ -内毒素蛋白。 δ -内毒素蛋白包括从本文公开的全长核苷酸序列中推导出的氨基酸序列, 和比全长序列短的氨基酸序列 (由于使用了备选的下游起始位点, 或由于产生更短的具有杀有害生物活性的蛋白质的加工过程)。所述加工可以在其中表达所述蛋白质的生物体中进行, 或者在摄取所述蛋白质后在昆虫中进行。 δ -内毒素包括被鉴定为 cry1 至 cry43、cyt1 和 cyt2 的蛋白质以及 Cyt-样毒素。目前存在超过 250 种已知的 δ -内毒素, 它们具有广泛的特异性和毒性。关于庞大的列表, 可参见 Crickmore 等人 (1998), *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:807-813; 和关于定期的更新, 可参见 Crickmore 等人 (2003) “*Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature”, 在 www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index 处。

[0019] 本文提供了赋予杀有害生物活性的新型分离的核苷酸序列。还提供了 δ -内毒素蛋白的氨基酸序列。由该基因的翻译而产生的蛋白质允许细胞防治或杀死摄取了所述细胞的有害生物。

[0020] 分离的核酸分子, 及其变体和片段

[0021] 本发明的一个方面涉及分离的或重组的核酸分子, 其包含编码 δ -内毒素蛋白和多肽或其生物学活性部分的核苷酸序列; 以及足以用作杂交探针以鉴定编码 δ -内毒素的核酸的核酸分子。如本文所使用的, 术语“核酸分子”意欲包括 DNA 分子 (例如, 重组 DNA、cDNA 或基因组 DNA) 和 RNA 分子 (例如, mRNA) 以及通过使用核苷酸类似物而产生的 DNA 或 RNA 的类似物。核酸分子可以是单链或双链的, 但优选是双链 DNA。

[0022] “分离的”或“纯化的”核酸分子或者蛋白质或其生物学活性部分, 基本上不含其他细胞材料或培养基 (当通过重组技术生产时), 或者基本上不含化学前体或其他化学制品 (当以化学方法合成时)。优选地, “分离的”核酸不含在该核酸所源自的生物体的基因组 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' 末端处的序列) (优选蛋白质编码序列)。对本发明而言, 当用于指核酸分子时, “分离的”不包括分离的染色体。例如, 在各种实施方案中, 分离的编码 δ -内毒素的核酸分子可以包含少于约 5kb、4kb、3kb、2kb、1kb、0.5kb 或 0.1kb 的在该核酸所源自的细胞的基因组 DNA 中天然地位于该核酸分子侧翼的核苷酸序列。基本上不含细胞材料的 δ -内毒素蛋白包括具有少于约 30%、20%、10% 或 5% (干重) 的非 δ -内毒素蛋白 (在本文中也称为“污染蛋白质”) 的蛋白质制

剂。

[0023] 编码本发明的蛋白质的核苷酸序列包括 SEQ ID NO :1、3、5、34 和 37 中所示的序列,以登记号 NRRL B-30935、B-30936、B-30937 和 B-50046 保藏在细菌宿主中的 δ -内毒素核苷酸序列,及其变体、片段和互补物(例如,SEQ ID NO :7、9、11、14、16、18、20、22、24、26、28、30 和 32)。“互补物”意指这样的核苷酸序列,即其与给定的核苷酸序列充分互补,如此使得它可以与给定的核苷酸序列杂交从而形成稳定的双链体。由该核苷酸序列编码的 δ -内毒素蛋白的相应氨基酸序列显示于 SEQ ID NO :2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34 和 37 中。

[0024] 本发明还包括这样的核酸分子,其为编码这些 δ -内毒素的核苷酸序列的片段(例如,SEQ ID NO :9、11、14、18、20、22 和 24)。“片段”意指编码 δ -内毒素蛋白的核苷酸序列的部分。核苷酸序列的片段可以编码 δ -内毒素蛋白的生物学活性部分,或者它可以是使用下文公开的方法而可以用作杂交探针或 PCR 引物的片段。作为 δ -内毒素核苷酸序列的片段的核酸分子包含至少约 50、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1050、1100、1150、1200、1250、1300、1350、1400、1450、1500、1550、1600、1650、1700、1750、1800、1850、1900、1950、2000、2050、2100、2150、2200、2250、2300、2350、2400、2450、2500、2550、2600、2650、2700、2750、2800、2850、2900、2950、3000、3050、3100、3150、3200、3250、3300、3350 个邻接核苷酸,或高至在本文公开的全长的编码 δ -内毒素的核苷酸序列中存在的核苷酸的数目(例如,对于 SEQ ID NO :1 为 3558 个核苷酸,对于 SEQ ID NO :3 为 3984 个核苷酸,对于 SEQ ID NO :5 为 3720 个核苷酸,和对于 SEQ ID NO :34 为 3669 个核苷酸),这取决于所期望的用途。“邻接”核苷酸意指彼此紧邻的核苷酸残基。本发明的核苷酸序列的片段将编码保留 δ -内毒素蛋白的生物学活性并因而保留杀有害生物活性的蛋白质片段。“保留活性”意指该片段将具有 δ -内毒素蛋白的至少约 30%、至少约 50%、至少约 70%、80%、90%、95% 或更高的杀有害生物活性。用于测量杀有害生物活性的方法是本领域众所周知的。参见,例如, Czapla 和 Lang (1990) J. Econ. Entomol. 83 :2480-2485 ;Andrews 等人 (1988) Biochem. J. 252 :199-206 ;Marrone 等人 (1985) J. of Economic Entomology 78 :290-293 ;和美国专利号 5,743,477,所有这些文献均通过提及而整体合并入本文。

[0025] 编码 δ -内毒素的核苷酸序列的片段(其编码本发明蛋白质的生物学活性部分)将编码至少约 15、25、30、50、75、100、125、150、175、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100 个邻接氨基酸,或高至在本发明的全长 δ -内毒素蛋白中存在的氨基酸的总数目(例如,对于 SEQ ID NO :2 为 1185 个氨基酸,对于 SEQ ID NO :4 为 1327 个氨基酸,对于 SEQ ID NO :6 为 1239 个氨基酸,和对于 SEQ ID NO :35 为 1223 个氨基酸)。

[0026] 优选的本发明的 δ -内毒素蛋白由与 SEQ ID NO :1、3、5、7、9、11、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34 或 37 的核苷酸序列具有足够同一性的核苷酸序列编码。“具有足够同一性”意指这样的氨基酸或核苷酸序列,即通过使用本文描述的比对程序之一并采用标准参数,其与参照序列相比较具有至少约 60%或 65%序列同一性,约 70%或 75%序列同一性,约 80%或 85%序列同一性,约 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%或者更高的序列同一性。本领域技术人员将会认识到,这些值可以适当地进行调整以通过考虑密码子简并性、氨基酸相似性、读码框定位等来确定由 2 个核苷酸序列所编码的

蛋白质的相应同一性。

[0027] 为了确定 2 个氨基酸序列或 2 个核酸的同一性百分比,就最佳比较目的来对序列进行比对。2 个序列之间的同一性百分比是由所述序列共有的相同位置的数目的函数(即,同一性百分比=相同位置的数目/位置(例如,重叠位置)的总数目 $\times 100$)。在一个实施方案中,2 个序列具有相同的长度。2 个序列之间的同一性百分比可以使用与下文描述的那些类似的技术来进行确定,其中允许或不允许缺口。在计算同一性百分比中,通常计数准确的匹配。

[0028] 2 个序列之间的同一性百分比的确定可以使用数学算法来完成。用于 2 个序列比较的数学算法的非限制性例子是 Karlin 和 Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 : 2264 的算法,其在 Karlin 和 Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 :5873-5877 中进行了修改。将此类算法整合入 Altschul 等人 (1990) *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 δ -内毒素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 δ -内毒素蛋白分子同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的有缺口的比对,可以使用如 Altschul 等人 (1997) *Nucleic Acids Res.* 25 :3389 中所描述的 Gapped BLAST(在 BLAST 2.0 中)。备选地,PSI-Blast 可以用于执行检测分子间的远距离关系的迭代搜索。参见 Altschul 等人 (1997)(同上)。当利用 BLAST、Gapped BLAST 和 PSI-Blast 程序时,可以使用各个程序(例如,BLASTX 和 BLASTN)的缺省参数。还可通过目测检查而手工地进行比对。

[0029] 用于序列比较的数学算法的另一个非限制性例子是 ClustalW 算法(Higgins 等人 (1994) *Nucleic Acids Res.* 22 :4673-4680)。ClustalW 比较序列并比对氨基酸或 DNA 序列的整体,因此可以提供关于整个氨基酸序列的序列保守性的数据。ClustalW 算法在几个商购可得的 DNA/氨基酸分析软件包中使用,例如 Vector NTI Program Suite(Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) 的 ALIGNX 模块。在用 ClustalW 比对氨基酸序列后,可以评估氨基酸同一性百分比。可用于 ClustalW 比对分析的软件程序的非限制性例子是 GeneDoc™。GeneDoc™(Karl Nicholas) 允许评估多个蛋白质之间的氨基酸(或 DNA)相似性和同一性。用于序列比较的数学算法的另一个非限制性例子是 Myers 和 Miller (1988) *CABIOS* 4 :11-17 的算法。此类算法被整合入 ALIGN 程序(版本 2.0)中,所述 ALIGN 程序是 GCG Wisconsin Genetics Software Package, Version 10(可从 Accelrys, Inc., 9685 Scranton Rd., San Diego, CA, USA 获得)的一部分。当利用 ALIGN 程序来比较氨基酸序列时,可以使用 PAM120 权重残基表、12 的缺口长度罚分和 4 的缺口罚分。

[0030] 除非另有说明,采用 Needleman 和 Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48(3) :443-453 的算法的 GAP Version 10 将被用于测定序列同一性或相似性,其中使用下述参数:关于核苷酸序列的同一性%和相似性%,使用 50 的 GAP 权重和 3 的长度权重,以及 nwsgapdna.cmp 评分矩阵;关于氨基酸序列的同一性%或相似性%,使用 8 的 GAP 权重和 2 的长度权重,以及 BLOSUM62 评分矩阵。还可以使用等价的程序。“等价的程序”意指任何这样的序列比较程序,即对于所研究的任何 2 个序列,当与由 GAP Version 10 产生的相应比对相比较时,产生具有相同的核苷酸残基匹配和相同的序列同一性百分比的比对。本发明还包括变体核酸分子(例如,SEQ ID NO :7、9、11、16、18、22、24、26、28、30 和 32)。编码 δ -内毒素的核苷酸

序列的“变体”包括编码本文公开的 δ -内毒素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,以及如上所述具有足够同一性的那些序列。天然存在的等位基因 变体可以使用众所周知的分子生物学技术来鉴定,例如如下所述的聚合酶链式反应 (PCR) 和杂交技术。变体核苷酸序列还包括合成衍生的核苷酸序列,其例如通过使用定点诱变产生但仍编码本发明中公开的 δ -内毒素蛋白,如下所述。本发明所包括的变体蛋白质是在生物学上有活性的,即它们继续具有所需的天然蛋白质的生物学活性,即保留了杀有害生物活性。“保留活性”意指该变体将具有至少约 30%、至少约 50%、至少约 70%或至少约 80%的天然蛋白质的杀有害生物活性。用于测量杀有害生物活性的方法是本领域众所周知的。参见,例如, Czapla 和 Lang (1990) J. Econ. Entomol. 83 :2480-2485 ;Andrews 等人 (1988) Biochem. J. 252 :199-206 ;Marrone 等人 (1985) J. of Economic Entomology 78 :290-293 ;和美国专利号 5,743,477,所有这些文献均通过提及而整体合并入本文。

[0031] 技术人员将会进一步意识到,可以通过突变本发明的核苷酸序列而引入改变,从而导致编码的 δ -内毒素蛋白的氨基酸序列中的改变,而不改变该蛋白质的生物活性。因此,分离的核酸分子变体可以通过下述方式来制备:将一个或多个核苷酸置换、添加或删除引入本文公开的相应的核苷酸序列中,从而使得将一个或多个氨基酸置换、添加或删除引入所编码的蛋白质中。可以通过标准技术来引入突变,例如通过定点诱变和 PCR 介导的诱变。此类变体核苷酸序列也包括在本发明内。

[0032] 例如,保守氨基酸置换可以在一个或多个预测的非必需氨基酸残基处进行。“非必需”氨基酸残基是可以从 δ -内毒素蛋白的野生型序列中进行改变而不改变生物活性的残基,而“必需”氨基酸残基是生物活性所需的。“保守氨基酸置换”是其中氨基酸残基被具有类似侧链的氨基酸残基替代的置换。在本领域中已定义了具有相似侧链的氨基酸残基家族。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸),具有酸性侧链的氨基酸(例如,天冬氨酸、谷氨酸),具有不带电荷的极性侧链的氨基酸(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),具有非极性侧链的氨基酸(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),具有 β -分枝的侧链的氨基酸(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和具有芳香族侧链的氨基酸(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。

[0033] δ -内毒素通常具有 5 个保守的序列结构域和 3 个保守的结构域(参见,例如, de Maagd 等人 (2001) Trends Genetics 17 :193-199)。第一个保守结构域由 7 个 α 螺旋组成,并且参与膜插入和孔形成。结构域 II 由以希腊钥匙构型进行排列的三个 β 折叠片组成,和结构域 III 由以“果冻卷饼 (jelly-roll)”样式的两个反向平行 β 折叠片组成 (de Maagd 等人, 2001, 同上)。结构域 II 和 III 参与受体识别和结合,因而被认为是毒素特异性的决定子。

[0034] 氨基酸置换可以在保留功能的非保守区域中进行。一般而言,此类置换不对保守的氨基酸残基,或者不对位于保守基序内的氨基酸残基进行,其中此类残基是蛋白质活性所需的。保守并且可能对于蛋白质活性而言必需的残基的例子包括,例如在本发明的氨基酸序列与已知的 δ -内毒素序列的比对中所包含的所有蛋白质之间相同的残基。保守但可能允许保守氨基酸置换并仍保留活性的残基的例子包括,例如仅在本发明的氨基酸序列与已知的 δ -内毒素序列的比对中所包含的所有蛋白质之间具有保守置换的残基。然而,本

领域技术人员应当理解,功能性变体可以具有较少的在保守残基中的保守或非保守改变。

[0035] 备选地,可以通过沿着全部或部分编码序列随机引入突变,例如通过饱和诱变,来制备变体核苷酸序列,并且可以就赋予 δ -内毒素活性的能力来筛选所得到的突变体,以鉴定保留活性的突变体。在诱变后,编码的蛋白质可以重组地表达,并且蛋白质的活性可以通过使用标准测定法技术来测定。

[0036] 使用诸如 PCR、杂交等的方法可以鉴定出相应的 δ -内毒素序列,此类序列与本发明的序列具有实质的同一性。参见,例如,Sambrook 和 Russell(2001)Molecular Cloning: A Laboratory Manual(ColdSpring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY)和 Innis 等人(1990)PCR Protocols:A Guide to Methods and Applications(Academic Press,NY)。

[0037] 在杂交方法中,全部或部分 δ -内毒素核苷酸序列可以用于筛选 cDNA 或基因组文库。用于构建此类 cDNA 和基因组文库的方法是本领域通常已知的,并且在 Sambrook 和 Russell,2001(同上)中公开。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,并且可以用可检测基团例如 ^{32}P 或任何其他可检测标记例如其他放射性同位素、荧光化合物、酶或酶辅因子进行标记。可以基于本文公开的已知的编码 δ -内毒素的核苷酸序列,通过对合成的寡核苷酸进行标记来制备用于杂交的探针。可以另外使用基于在所述核苷酸序列或编码的氨基酸序列中的保守核苷酸或氨基酸残基而设计的简并引物。探针通常包含这样的核苷酸序列区域,所述核苷酸序列区域在严格条件下与本发明的编码 δ -内毒素的核苷酸序列或其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、200、250、300、350 或 400 个连续核苷酸杂交。用于制备用于杂交的探针的方法是本领域通常已知的,并且公开于 Sambrook 和 Russell,2001(同上)中,该文献通过提及而合并入本文。

[0038] 例如,本文公开的完整 δ -内毒素序列,或者其一个或多个部分,可以用作能够与相应的 δ -内毒素样序列和信使 RNAs 特异性地杂交的探针。为了达到在各种条件下的特异性杂交,此类探针包括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 个核苷酸的序列。此类探针可以用于通过 PCR 从所选择的生物体中扩增出相应的 δ -内毒素序列。这种技术可以用于从所需生物体中分离另外的编码序列,或用作诊断测定法以测定生物体中编码序列的存在。杂交技术包括铺板的 DNA 文库的杂交筛选(噬斑或菌落;参见,例如,Sambrook 等人(1989)Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第二版,ColdSpring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York)。

[0039] 此类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”意指这样的条件,即在所述条件下探针将与其靶序列杂交,达到相比与其他序列来说可检测地更大的程度(例如,为背景的至少 2 倍)。严格条件是序列依赖性的并且在不同情况下是不同的。通过控制杂交和/或洗涤条件的严格性,可以鉴定出与探针 100% 互补的靶序列(同源探测)。备选地,可以调整严格条件以允许序列中的一些错配,从而使得检测出较低程度的相似性(异源探测)。一般地,探针长度为小于约 1000 个核苷酸,优选地长度小于 500 个核苷酸。

[0040] 通常,严格条件是这样的条件,其中在 pH 7.0-8.3 下盐浓度小于约 1.5M Na 离子,通常约 0.01-1.0M Na 离子浓度(或其他盐),以及温度对于短探针(例如,10-50 个核苷酸)

为至少约 30℃, 和对于长探针 (例如, 超过 50 个核苷酸) 为至少约 60℃。严格条件还可以用添加去稳定剂如甲酰胺来达到。示例性的低严格性条件包括于 37℃ 用 30-35% 甲酰胺、1M NaCl、1% SDS (十二烷基硫酸钠) 的缓冲溶液进行杂交, 和于 50-55℃ 在 1X-2X SSC (20X SSC = 3.0M NaCl/0.3M 柠檬酸三钠) 中进行洗涤。示例性的中等严格性条件包括于 37℃ 在 40-45% 甲酰胺、1.0M NaCl、1% SDS 中进行杂交, 和于 55-60℃ 在 0.5X-1X SSC 中进行洗涤。示例性的高严格性条件包括于 37℃ 在 50% 甲酰胺、1M NaCl、1% SDS 中进行杂交, 和于 60-65℃ 在 0.1X SSC 中进行洗涤。任选地, 洗涤缓冲液可以包含约 0.1% - 约 1% SDS。杂交的持续时间一般少于约 24 小时, 通常为约 4- 约 12 小时。

[0041] 特异性通常是杂交后洗涤的函数, 关键因素是离子强度和最终洗涤溶液的温度。对于 DNA-DNA 杂交物, T_m 可以从 Meinkoth 和 Wahl (1984) Anal. Biochem. 138 :267-284 的等式中进行估计: $T_m = 81.5^\circ\text{C} + 16.6(\log M) + 0.41(\% \text{ GC}) - 0.61(\% \text{ form}) - 500/L$; 其中 M 是一价阳离子的摩尔浓度, % GC 是 DNA 中鸟苷和胞嘧啶核苷酸的百分比, % form 是杂交溶液中甲酰胺的百分比, 和 L 是以碱基对计的杂交物的长度。 T_m 是这样的温度, 在该温度下 50% 的互补靶序列与完全匹配的探针杂交 (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, 以与所需同一性的序列杂交。例如, 如果寻求具有 $\geq 90\%$ 同一性的序列, 那么 T_m 可以减少 10℃。一般地, 严格条件被选择为在限定的离子强度和 pH 下比关于特定序列和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比热解链点 (T_m) 低 1、2、3 或 4℃ 下的杂交和 / 或洗涤; 中等严格条件可以利用在比热解链点 (T_m) 低 6、7、8、9 或 10℃ 下的杂交和 / 或洗涤; 低严格条件可以利用在比热解链点 (T_m) 低 11、12、13、14、15 或 20℃ 下的杂交和 / 或洗涤。使用该等式、杂交和洗涤组成以及所需 T_m , 普通技术人员应当理解, 内在地描述了杂交和 / 或洗涤溶液的严格性中的改变。如果所希望的错配程度导致低于 45℃ (水性溶液) 或 32℃ (甲酰胺溶液) 的 T_m , 那么优选增加 SSC 浓度, 从而使得可以使用更高的温度。关于核酸杂交的详细指导可见下述参考文献: Tijssen (1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes, 第 I 部分, 第 2 章 (Elsevier, New York); 和 Ausubel 等人, 编辑, (1995) Current Protocols in Molecular Biology, 第 2 章 (Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York)。参见 Sambrook 等人 (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York)。

[0042] 分离的蛋白质及其变体和片段

[0043] δ -内毒素蛋白也包括在本发明中。“ δ -内毒素蛋白”意指具有 SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35 或 38 中所示的氨基酸序列的蛋白质。还提供了其片段、生物学活性部分和变体, 并且它们可以用于实践本发明的方法。

[0044] “片段”或“生物学活性部分”包括这样的多肽片段, 所述多肽片段包含与 SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12、16、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35 或 38 中所示的氨基酸序列具有足够同一性的氨基酸序列并且展示出杀有害生物活性 (例如, SEQ ID NO: 15、19、21、23 或 25)。 δ -内毒素蛋白的生物学活性部分可以是例如长度为 10、25、50、100 或更多个氨基酸的多肽。此类生物学活性部分可以通过重组技术来制备, 并且就杀有害生物活性来进行评估。用于测量杀有害生物活性的方法是本领域众所周知的。参见, 例如, Czapla

和 Lang(1990) J. Econ. Entomol. 83 :2480-2485 ;Andrews 等 人 (1988) Biochem. J. 252 :199-206 ;Marrone 等 人 (1985) J. of Economic Entomology 78 :290-293 ;和美国专利号 5,743,477,所有这些文献均通过提及而整体合并入本文。如本文所使用的,片段包含 SEQ ID NO :2、4、6、8、10、12、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35 或 38 的至少 8 个邻接氨基酸。然而,本发明包括其他片段,例如该蛋白质中超过约 10、20、30、50、100、150、200、250、300、350、400、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150、1200、1250 或 1300 个氨基酸的任何片段。

[0045] “变体”意指这样的蛋白质或多肽,其具有与 SEQ ID NO :2、4、6、8、10、12、16、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35 或 38 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% 同一的氨基酸序列(例如,SEQ ID NO :10、12、17、19、23、25、27、29、31 或 33)。变体还包括由这样的核酸分子编码的多肽,所述核酸分子在严格条件下与 SEQ ID NO :1、3、5、7、9、11、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34 或 37 的核酸分子或其互补物杂交。变体包括由于诱变而在氨基酸序列方面不同的多肽。本发明所包括的变体蛋白质是生物学上有活性的,即它们继续拥有所希望的该天然蛋白质的生物学活性,即保留了杀有害生物活性。用于测量杀有害生物活性的方法是本领域众所周知的。参见,例如, Czapla 和 Lang(1990) J. Econ. Entomol. 83 :2480-2485 ;Andrews 等 人 (1988) Biochem. J. 252 :199-206 ;Marrone 等 人 (1985) J. of Economic Entomology 78 :290-293 ;和美国专利号 5,743,477,所有这些文献均 通过提及而整体合并入本文。

[0046] 细菌基因,例如本发明的 axmi-031、axmi-039、axmi-040 和 axmi-049 基因,在开放读码框的起始附近十分经常具有多个甲硫氨酸起始密码子。通常,在这些起始密码子中的一个或多个处的翻译起始将导致功能蛋白质的产生。这些起始密码子可以包括 ATG 密码子。然而,诸如芽孢杆菌属物种 (*Bacillus* sp.) 的细菌还将密码子 GTG 识别为起始密码子,并且在 GTG 密码子处起始翻译的蛋白质在第一个氨基酸处包含甲硫氨酸。此外,常常事先不确定这些密码子中的哪一些天然地在细菌中使用。因此,应当理解,备选的甲硫氨酸密码子之一的使用也可能导致产生编码杀有害生物活性的 δ -内毒素蛋白。这些 δ -内毒素蛋白包括在本发明中,并且可以在本发明的方法中使用。

[0047] 还包括了针对本发明的多肽或者其变体或片段的抗体。用于产生抗体的方法是本领域众所周知的(参见,例如 Harlow 和 Lane(1988) *Antibodies :A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. ;美国专利号 4,196,265)。

[0048] 改变或改善的变体

[0049] 应认识到,可以通过各种方法来改变改变 δ -内毒素的 DNA 序列,并且这些改变可以导致编码这样的蛋白质的 DNA 序列,所述蛋白质具有与由本发明的 δ -内毒素所编码的氨基酸序列不同的氨基酸序列。这种蛋白质可以以各种方式进行改变,包括 SEQ ID NO :2、4、6、8、10、12、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35 或 38 的一个或多个氨基酸的氨基酸置换、删除、截短和插入,包括高至约 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 个或更多氨基酸置换、删除或插入。

[0050] 用于此类操作的方法是本领域通常已知的。例如,可以通过 DNA 中的突变来制备

δ -内毒素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,氨基酸序列中所编码的改变将基本上不影响蛋白质的功能。此类变体将具有所希望的杀有害生物活性。然而,应当理解, δ -内毒素赋予杀有害生物活性的能力可以通过对于本发明的组合物使用此类技术来进行改善。例如,可以在这样的宿主细胞中表达 δ -内毒素,所述宿主细胞显示出高比率的在DNA复制期间的碱基错掺入,例如XL-1Red(Stratagene)。在此类菌株中进行繁殖后,可以分离出 δ -内毒素DNA(例如通过制备质粒DNA,或者通过经由PCR进行扩增并将所得到的PCR片段克隆到载体中),在非诱变菌株中培养 δ -内毒素突变,并鉴定具有杀有害生物活性的经突变的 δ -内毒素基因,例如通过进行用于测试杀有害生物活性的测定法。通常,在饲喂测定法中混入和使用所述蛋白质。参见,例如,Marrone等人(1985)*J. of Economic Entomology* 78:290-293。此类测定法可包括使植物与一种或多种有害生物接触,并测定植物存活和/或引起有害生物死亡的能力。导致毒性增加的突变的实例可在Schnepf等人(1998)*Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:775-806中找到。

[0051] 备选地,可以在氨基或羧基末端处对许多蛋白质的蛋白质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例如PCR而引入的插入、删除或改变,所述方法包括借助于在PCR扩增中使用的寡核苷酸之中包含氨基酸编码序列而改变或延长蛋白质编码序列的PCR扩增。备选地,所添加的蛋白质序列可以包括完整的蛋白质编码序列,例如本领域通常用于产生蛋白质融合物的那些序列。此类融合蛋白常常用于(1)增加目的蛋白质的表达;(2)引入结合结构域、酶活性或表位以有助于蛋白质纯化、蛋白质检测或本领域已知的其他实验用途;或(3)将蛋白质的分泌或翻译靶向至亚细胞器,例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。

[0052] 本发明的变体核苷酸和氨基酸序列还包括衍生自诱变和重组操作程序例如DNA改组的序列。使用此类操作程序,可以将一个或多个不同的 δ -内毒素蛋白编码区用于制备具有所需性质的新的 δ -内毒素蛋白。以这种方式,从包含这样的序列区域的相关序列多核苷酸群体中产生重组多核苷酸的文库,所述序列区域具有充分的序列同一性并可以在体外或体内进行同源重组。例如,使用这种方法,可以在本发明的 δ -内毒素基因和其他已知的 δ -内毒素基因之间改组编码目的结构域的序列基序,以获得编码具有改善的目的性质例如增加的杀昆虫活性的蛋白质的新基因。用于此类DNA改组的策略是本领域已知的。参见,例如,Stemmer(1994)*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-10751; Stemmer(1994)*Nature* 370:389-391;Cramer等人(1997)*Nature Biotech.* 15:436-438; Moore等人(1997)*J. Mol. Biol.* 272:336-347;Zhang等人(1997)*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4504-4509;Cramer等人(1998)*Nature* 391:288-291;以及美国专利号5,605,793和5,837,458。

[0053] 结构域交换或改组是用于产生改变的 δ -内毒素蛋白的另一种机制。可在 δ -内毒素蛋白之间交换结构域II和III,从而导致具有改进的杀有害生物活性或靶标谱(target spectrum)的杂合或嵌合毒素。用于产生重组蛋白质和就杀有害生物活性来对它们进行测试的方法是本领域众所周知的(参见,例如,Naimov等人(2001)*Appl. Environ. Microbiol.* 67:5328-5330;de Maagd等人(1996)*Appl. Environ. Microbiol.* 62:1537-1543;Ge等人(1991)*J. Biol. Chem.* 266:17954-17958;Schnepf等人(1990)*J. Biol.*

Chem. 265 :20923-20930 ;Rang 等人 (1999) Appl. Environ. Microbiol. 65 :2918-2925)。

[0054] 载体

[0055] 本发明的 δ -内毒素序列可以在用于在目的植物中表达的表达盒中提供。“植物表达盒”意指能够导致在植物细胞中从开放读码框表达蛋白质的 DNA 构建体。通常,这些构建体包含启动子和编码序列。通常,此类构建体还将包含 3' 非翻译区。此类构建体可以包含“信号序列”或“前导序列”(即,SEQ ID NO :9、11、28、30 和 32),以有助于所述肽的共翻译或翻译后运输至某些细胞内结构,例如叶绿体(或其他质体)、内质网或高尔基体。

[0056] “信号序列”意指已知或怀疑导致穿过细胞膜的共翻译或翻译后肽运输的序列。在真核生物中,这通常涉及分泌到高尔基体内,其中具有某些发生的糖基化。“前导序列”意指当被翻译时导致足以引发肽链共翻译运输至亚细胞器的氨基酸序列(即,SEQ ID NO :10、12、29、31 和 33)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/或糖基化实施靶向的前导序列。

[0057] “植物转化载体”意指对于植物细胞的有效转化来说所必需的 DNA 分子。此类分子可以由一个或多个植物表达盒组成,或可以组织入超过一个的“载体”DNA 分子中。例如,二元载体是植物转化载体,其利用 2 个非邻接 DNA 载体来编码用于植物细胞转化的所有必需的顺式和反式作用功能(Hellens 和 Mullineaux(2000) Trends in Plant Science 5 : 446-451)。“载体”指设计用于在不同宿主细胞之间进行转移的核酸构建体。“表达载体”指具有将异源 DNA 序列或片段引入、整合入外源细胞中并在其中表达该异源 DNA 序列或片段的能力的载体。所述表达盒将包含与本发明的序列可操作地连接的 5' 和 3' 调节序列。“可操作地连接”意指启动子和第二序列之间的功能连接,其中启动子序列起始并介导相应于第二序列的 DNA 序列的转录。一般地,可操作地连接意指,被连接的核酸序列是邻接的,并且在必需使 2 个蛋白质编码区联合在一起时是邻接的并在同一读码框中。所述盒可以另外还包含至少一种待共转化到生物体中的另外的基因。备选地,所述另外的基因可以在多个表达盒上提供。

[0058] “启动子”是指发挥功能以指导下游编码序列转录的核酸序列。启动子连同其他转录和翻译调节核酸序列(也称为“控制序列”)一起是目的 DNA 序列表达所必需的。

[0059] 给此类表达盒提供多个限制位点,所述限制位点用于插入 δ -内毒素序列以处于调节区的转录调节之下。

[0060] 所述表达盒以 5' -3' 的转录方向包含转录和翻译起始区(即,启动子),本发明的 DNA 序列,和在植物中具有功能的翻译和转录终止区(即,终止区)。启动子对于植物宿主和/或本发明的 DNA 序列来说可以是天然的或类似的,或者外源的或异源的。此外,启动子可以是天然序列或者备选地是合成序列。当启动子对于植物宿主是“天然的”或“同源的”时,意指所述启动子在该启动子所引入的天然植物内存在。当启动子对于本发明的 DNA 序列是“外源的”或“异源的”时,意指所述启动子对于可操作地连接的本发明 DNA 序列来说不是天然的或天然存在的启动子。

[0061] 终止区可以对于转录起始区来说是天然的,可以对于可操作地连接的目的 DNA 序列来说是天然的,可以对于植物宿主来说是天然的,或可以衍生自另一种来源(即,对于启动子、目的 DNA 序列、植物宿主或其任何组合来说是外源的或异源的)。方便的终止区可从根瘤土壤杆菌的 Ti 质粒中获得,例如章鱼碱合酶和胭脂碱合酶的终止区。还可参见

Guerineau 等人 (1991) Mol. Gen. Genet. 262 :141-144 ;Proudfoot (1991) Cell 64 :671-674 ; Sanfacon 等人 (1991) Genes Dev. 5 :141-149 ;Mogen 等人 (1990) Plant Cell 2 :1261-1272 ; Munroe 等 人 (1990) Gene 91 :151-158 ;Ballas 等 人 (1989) Nucleic Acids Res. 17 : 7891-7903 ;和 Joshi 等人 (1987) Nucleic Acid Res. 15 :9627-9639。

[0062] 在适当时,可以就在转化的宿主细胞中的表达增加来优化所述基因。即,可以使用宿主细胞偏爱的密码子来合成所述序列以获得改善的表达,或者可以通过以宿主偏爱的密码子使用频率使用密码子来合成所述基因。一般地,将增加所述基因的 GC 含量。关于宿主偏爱的密码子使用的讨论,可参见例如 Campbell 和 Gowri (1990) Plant Physiol. 92 :1-11。用于合成植物偏爱的基因的方法是本领域中可得的。参见,例如,美国专利号 5,380,831 和 5,436,391,以及 Murray 等人 (1989) Nucleic Acids Res. 17 :477-498,通过提及而合并入本文。

[0063] 在一个实施方案中, δ -内毒素被靶向叶绿体以进行表达。以这种方式,当 δ -内毒素不直接插入叶绿体内时,表达盒将另外包含编码转运肽的核酸以将 δ -内毒素导向叶绿体。此类转运肽是本领域已知的。参见,例如 Von Heijne 等人 (1991) Plant Mol. Biol. Rep. 9 :104-126 ;Clark 等 人 (1989) J. Biol. Chem. 264 :17544-17550 ;Della-Cioppa 等 人 (1987) Plant Physiol. 84 :965-968 ;Romer 等 人 (1993) Biochem. Biophys. Res. Commun. 196 :1414-1421 ;和 Shah 等人 (1986) Science 233 :478-481。

[0064] 可以就在叶绿体中的表达来优化被靶向叶绿体的 δ -内毒素基因,以解决植物细胞核和这种细胞器之间的在密码子使用方面的差异。以这种方式,可以使用叶绿体偏爱的密码子来合成目的核酸。参见,例如,美国专利号 5,380,831,通过提及而合并入本文。

[0065] 植物转化

[0066] 本发明的方法涉及将核苷酸构建体引入植物内。“引入”意指以使得该构建体进入植物细胞内部的方式将核苷酸构建体呈递给植物。本发明的方法不要求使用用于将核苷酸构建体引入植物的具体方法,只要求使该核苷酸构建体进入植物的至少一个细胞的内部。用于将核苷酸构建体引入植物内的方法是本领域已知的,包括但不限于,稳定转化法、瞬时转化法和病毒介导的方法。

[0067] “植物”意指整个植株、植物器官(例如,叶、茎、根等)、种子、植物细胞、繁殖体、胚胎及其后代。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)。

[0068] “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将外源核酸序列或 DNA 片段引入或整合到植物细胞内的植物。这些核酸序列包括外源的或不存在于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未转化的植物细胞中的那些序列。“异源的”一般指这样的核酸序列,所述核酸序列对于它们所存在于其中的细胞来说不是内源的或者不是天然基因组的一部分,并且已通过感染、转染、显微注射、电穿孔、微粒轰击等加入细胞中。

[0069] 可通过本领域已知的几种技术中的一种来转化植物细胞。可以修饰本发明的 δ -内毒素基因以获得或增强在植物细胞中的表达。通常,表达此类蛋白质的构建体将包含启动子以驱动所述基因的转录,以及包含 3' 非翻译区以允许转录终止和多腺苷酸化。此类构建体的组织在本领域中是众所周知的。在一些情况下,其可用于对所述基因进行改造,

从而所得的肽被分泌或者在植物细胞内被靶向。例如,基因可以经改造以包含信号肽从而有助于将肽转移至内质网。还可以优选改造植物表达盒以包含内含子,从而使得内含子的 mRNA 加工是表达所需的。

[0070] 通常,这种“植物表达盒”将被插入“植物转化载体”中。这种植物转化载体可以由对于实现植物转化所需的一个或多个 DNA 载体构成。例如,利用由超过一种邻接 DNA 区段构成的植物转化载体是本领域中常见的实践。这些载体在本领域中通常称为“二元载体”。二元载体以及具有辅助质粒的载体最常用于土壤杆菌介导的转化,其中对于实现有效转化所需的 DNA 区段的大小和复杂性相当大,并且将功能分散到分开的 DNA 分子上是有利的。二元载体通常包括质粒载体,所述质粒载体包含对于 T-DNA 转移所需的顺式作用序列(例如左边界和右边界)、经改造从而能够在植物细胞中表达的选择标记、和“目的基因”(经改造从而能够在对于其希望产生转基因植物的植物细胞中表达的基因)。在这种质粒载体上还存在有细菌复制所需的序列。顺式作用序列以允许有效转移到植物细胞内并在其中表达的方式排列。例如,选择标记基因和 δ -内毒素位于左和右边界之间。通常,第二质粒载体包含介导 T-DNA 从土壤杆菌转移到植物细胞的反式作用因子。这种质粒通常包含毒力功能(Vir 基因),其允许用土壤杆菌感染植物细胞,并通过在边界序列处进行切割和 vir 介导的 DNA 转移来转移 DNA,如本领域中所了解的(Hellens 和 Mullineaux (2000) Trends in Plant Science, 5:446-451)。几类土壤杆菌属菌株(例如, LBA4404、GV3101、EHA101、EHA105 等)可以用于植物转化。第二质粒载体不是通过其他方法例如微粒轰击、显微注射、电穿孔、聚乙二醇等转化植物所必需的。

[0071] 一般而言,植物转化法涉及将异源 DNA 转移到靶植物细胞(例如,未成熟或成熟的胚胎、悬浮培养物、未分化的愈伤组织、原生质体等)中,随后应用最大阈值水平的合适选择(取决于选择标记基因),以从未转化的细胞群体中回收经转化的植物细胞。通常将外植体转移到新鲜供应的相同培养基中并进行常规培养。随后,在置于补充有最大阈值水平的选择试剂的再生培养基上后,使经转化的细胞分化成幼芽。然后将幼芽转移至选择性生根培养基中以用于回收生根的幼芽或小植物。然后,转基因小植物生长为成熟植物并产生能育的种子(例如,Hiei 等人 (1994) The Plant Journal 6:271-282; Ishida 等人 (1996) Nature Biotechnology 14:745-750)。通常将外植体转移到新鲜供应的相同培养基中并进行常规培养。用于产生转基因植物的技术和方法的概括性描述可以在 Ayres 和 Park (1994) Critical Reviews in Plant Science 13:219-239 以及 Bommineni 和 Jauhar (1997) Maydica 42:107-120 中找到。因为经转化的材料包含许多细胞;所以经转化的和未转化的细胞存在于受试靶愈伤组织或组织或细胞群的任何部分中。杀死未转化的细胞并允许经转化的细胞增殖的能力导致产生经转化的植物培养物。通常,去除未转化的细胞的能力是快速回收经转化的植物细胞和成功产生转基因植物的限制条件。

[0072] 转化方案以及用于将核苷酸序列引入植物的方案可依据作为转化的靶标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,直接的 DNA 转移,通过土壤杆菌将异源 DNA 引入植物细胞内(土壤杆菌介导的转化),用与粒子附着的异源外源 DNA 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 WO

91/00915 ;美国公开申请号 2002015066), Lec1 转化,和用于转移 DNA 的各种其他非粒子直接介导的方法。

[0073] 用于转化叶绿体的方法是本领域已知的。参见,例如, Svab 等人 (1990)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 :8526-8530 ;Svab 和 Maliga (1993)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 :913-917 ;Svab 和 Maliga (1993)EMBO J. 12 :601-606。该方法依赖于包含选择标记的 DNA 的基因枪递送并通过同源重组将该 DNA 靶向质体基因组。此外,质体转化可以通过核编码且质体指导的 RNA 聚合酶的组织偏爱的表达,经由沉默的质体携带的转基因的反式激活来完成。此类系统已在 McBride 等人 (1994)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 :7301-7305 中得到报道。

[0074] 在将异源外源 DNA 整合入植物细胞中后,然后在培养基中应用最大阈值水平的合适选择以杀死未转化的细胞,并通过定期转移至新鲜培养基来分离和增殖从该选择处理中存活的假定经转化的细胞。通过连续传代和使用合适的选择进行攻击,可鉴定和增殖用所述质粒载体转化的细胞。然后,分子和生物化学法可以用于证实转基因植物的基因组中存在整合的异源目的基因。

[0075] 已转化的细胞可以依照常规方法生长为植物。参见,例如,McCormick 等人 (1986) Plant Cell Reports 5 :81-84。然后,可以让这些植物进行生长,并用相同的转化株或不同株进行授粉,并且鉴定出具有所需表型特征的组成型表达的所得到的杂种。可以生长两代或更多代以确保所需表型特征的表达被稳定地维持和遗传,并随后收获种子以确保已获得了所需表型特征的表达。以这种方式,本发明提供了经转化的种子(也称为“转基因种子”),其具有本发明的核苷酸构建体,例如稳定地整合入其基因组内的本发明的表达盒。

[0076] 植物转化的评估

[0077] 在将异源外源 DNA 引入植物细胞内后,通过各种方法来证实异源 基因已转化或整合入植物基因组中,所述方法例如为分析与整合的基因相关的核酸、蛋白质和代谢产物。

[0078] PCR 分析是在移植到土壤中之前的较早阶段时就整合的基因的存在来筛选转化的细胞、组织或幼芽的快速方法 (Sambrook 和 Russell (2001)Molecular Cloning :A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)。PCR 使用对目的基因或土壤杆菌载体背景等特异的寡核苷酸引物来进行。

[0079] 可以通过基因组 DNA 的 Southern 印迹分析来证实植物转化 (Sambrook 和 Russell, 2001, 同上)。一般而言,从转化体中提取总 DNA,用合适的限制酶消化,在琼脂糖凝胶中进行分级,并转移至硝酸纤维素或尼龙膜上。随后,用例如放射标记的 ³²P 靶 DNA 片段来探测膜或“印迹”,以根据标准技术 (Sambrook 和 Russell, 2001, 同上) 来证实引入的基因整合到植物基因组中。

[0080] 在 Northern 印迹分析中,从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,并根据本领域常规使用的标准操作程序印迹到尼龙滤纸上 (Sambrook 和 Russell, 2001, 同上)。随后,通过采用本领域已知的方法将滤纸与衍生自 δ -内毒素的放射性探针杂交来测试由 δ -内毒素编码的 RNA 的表达 (Sambrook 和 Russell, 2001, 同上)。

[0081] 可以对转基因植物进行 Western 印迹法、生物化学测定法等,以通过标准操作程序来确证由 δ -内毒素基因编码的蛋白质的存在 (Sambrook 和 Russell, 2001, 同上),其中使用与 δ -内毒素蛋白上存在的一种或多种表位结合的抗体。

[0082] 植物中的杀有害生物活性

[0083] 在本发明的另一个方面,可产生表达具有杀有害生物活性的 δ -内毒素的转基因植物。如上作为实例而描述的方法可用于产生转基因植物,但产生转基因植物的方式对于本发明而言不是至关重要的。可依据实验者的判断,使用在本领域中已知或描述的方法,例如土壤杆菌介导的转化、生物射弹转化和非粒子介导的方法。可通过在本领域中描述的普遍方法来分离表达 δ -内毒素的植物,例如通过愈伤组织的转化,选择经转化的愈伤组织,并从此类转基因愈伤组织中再生出能育的植物。在这样的方法中,可使用任何基因作为选择标记,只要其在植物细胞中的表达赋予鉴定或选择经转化的细胞的能力。

[0084] 已开发了许多用于植物细胞的标记,例如对于氯霉素、氨基糖苷 G418、潮霉素等的抗性。编码参与叶绿体代谢的产物的其他基因也可用作选择标记。例如,提供对于植物除草剂例如草甘膦、溴苯腈或咪唑啉酮的抗性的基因可以是特别有用的。已报导了此类基因 (Stalker 等人 (1985) J. Biol. Chem. 263 :6310-6314 (溴苯腈抗性腈水解酶基因); 和 Sathasivan 等人 (1990) Nucl. Acids Res. 18 :2188 (AHAS 咪唑啉酮抗性基因))。另外,本文公开的基因可用作标记来评估细菌或植物细胞的转化。用于检测植物、植物器官 (例如,叶、茎、根等)、种子、植物细胞、繁殖体、胚胎或其后代中转基因的存在的方法是本领域众所周知的。在一个实施方案中,可通过就杀有害生物活性进行测试来检测转基因的存在。

[0085] 可就杀有害生物活性来对表达 δ -内毒素的能育的植物进行测试,并选择显示出最佳活性的植物以用于进一步的育种。在本领域中可获得用于检验有害生物活性的方法。通常,在饲喂测定法中混入和使用所述蛋白质。参见,例如, Marrone 等人 (1985) J. of Economic Entomology 78 :290-293。

[0086] 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。目的植物的例子包括但不限于,玉米 (玉蜀黍)、高粱、小麦、向日葵、番茄、十字花科植物、胡椒属植物、马铃薯、棉花、稻、大豆、甜菜、甘蔗、烟草、大麦和油籽油菜、芸苔属物种 (Brassicasp.)、苜蓿、黑麦、粟、红花、花生、甘薯、木薯、咖啡、椰子、菠萝、柑橘类树、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、杏树、燕麦、蔬菜、观赏植物和针叶树。

[0087] 蔬菜包括但不限于,番茄、莴苣、青豆、利马豆、豌豆,以及甜瓜属 (Cucumis) 的成员,例如黄瓜、罗马甜瓜和香瓜。观赏植物包括但不限于,杜鹃花、绣球、木槿、玫瑰花、郁金香、水仙花、矮牵牛、康乃馨、一品红和菊花。优选地,本发明的植物是农作物植物 (例如,玉蜀黍、高粱、小麦、向日葵、番茄、十字花科植物、胡椒属植物、马铃薯、棉花、稻、大豆、甜菜、甘蔗、烟草、大麦、油籽油菜等)。

[0088] 在有害生物防治中的用途

[0089] 用于在有害生物防治中或在改造其他生物体中使用包含本发明的核苷酸序列或其变体的株系作为杀有害生物剂的一般方法在本领域中是已知的。参见,例如,美国专利号 5,039,523 和 EP 0480762A2。

[0090] 包含本发明的核苷酸序列或其变体的芽孢杆菌菌株或者已被遗传改变而包含杀有害生物基因和蛋白质的微生物可用于保护农作物和产品免受有害生物侵害。在本发明的一个方面,用这样的试剂来处理产生毒素 (杀有害生物剂) 的生物体的完整的 (即未裂解的) 细胞,所述试剂在将所述细胞施用于靶有害生物的环境时延长在所述细胞中产生的毒

素的活性。

[0091] 备选地,通过向细胞宿主中引入 δ -内毒素基因来产生杀有害生物剂。 δ -内毒素基因的表达式直接或间接地导致杀有害生物剂的细胞内产生和维持。在本发明的一个方面,然后在当将所述细胞施用于靶有害生物的环境时延长在所述细胞中产生的毒素的活性的条件下处理这些细胞。所得的产物保持所述毒素的毒性。然后可按照常规技术来配制这些天然胶囊化的杀有害生物剂,以施用于栖宿有靶有害生物的环境例如土壤、水和植物的叶。参见,例如 EPA 0192319,以及其中所引用的文献。备选地,可配制表达本发明的基因的细胞,以例如允许作为杀有害生物剂来施用所得的材料。

[0092] 线虫防治

[0093] 植物寄生性线虫,包括胞囊线虫(cyst nematodes)、根结线虫(root knot nematodes)和其他线虫,每年对农作物造成数十亿美元的损害。植物寄生性线虫用它们的口针(stylet)(由嘴和食道部分中的一些部分形成)刺穿植物细胞壁,并将植物细胞汁液抽吸入它们的消化系统中。本领域中的许多出版物得出结论:定居型(sedentary)植物寄生性线虫在体内不摄取大于约 23-28kDa 的分子。这已导致普遍的信念:由这些线虫产生的摄食管用作分子筛,从而限制了可被摄取的分子的大小。Böckenhoff 和 Grundler((1994)Parasitology 109:249-254)将经荧光标记的葡聚糖注射入被甜菜异皮线虫(Heterodera schachtii)摄食的合胞体。他们发现,线虫摄取 22kDa 的葡聚糖,但不摄取 40kDa 的葡聚糖。Urwin 等人((1998)Planta 204:472-479)发现,在转基因拟南芥中表达的 23kDa 融合蛋白不能被甜菜异皮线虫摄取,尽管约 11kDa 的蛋白质可被摄取。类似地,Unwin 等人((1997)Molecular Plant-Microbe Interactions 10:394-400)发现,在转基因拟南芥中表达的 28kDa 绿色荧光蛋白(GFP)不能被甜菜异皮线虫摄取。因此,先前没有认识到或没有证明,可通过在植物中表达大于 22kDa 的蛋白质来防治线虫,因为据了解线虫不摄取这样的蛋白。

[0094] 本文提供了用于在植物中赋予对于线虫的抗性的方法和组合物。所述方法包括将至少一个编码线虫活性多肽的核苷酸序列引入植物中,和在包含线虫的田地中使所述植物生长。“线虫活性多肽(nematode-active polypeptide)”意指,当被线虫摄取时导致至少一个线虫死亡或者生长或增殖受到阻碍的多肽。在一个实施方案中,线虫活性多肽具有大于约 22kDa,约 23kDa,约 24、约 25、约 26、约 27、约 28、约 29、约 30、约 31、约 32、约 33、约 34、约 35、约 36、约 37、约 38、约 39、约 40、约 41、约 42、约 43、约 44、约 45、约 46、约 47、约 48、约 49、约 50、约 51、约 52、约 53、约 54、约 55、约 56、约 57、约 58、约 59、约 60、约 61、约 62、约 63、约 64、约 65、约 66、约 67、约 68、约 69、约 70、约 71、约 72、约 73、约 74、约 75、约 76、约 77、约 78、约 79、约 80kDa 或更大的分子量。

[0095] 在另一个实施方案中,线虫活性多肽具有针对植物寄生性线虫的活性。线虫活性多肽在植物中的表达降低了线虫侵染植物的根或摄食植物的根的能力。对本发明的组合物敏感的植物寄生性线虫的实例包括根结线虫(根结线虫属物种(Meloidogyne sp.))、矮化线虫(矮化线虫属物种(Tylenchorhynchus sp.))、矛形线虫(纽带线虫属物种(Hoplolaimus sp.))、螺旋线虫(螺旋线虫属物种(Helicotylenchus sp.))、根腐线虫(lesion nematode)(短体线虫属物种(Pratylenchus sp.))、胞囊线虫(异皮线虫属物种(Heterodera sp.))和球异皮线虫属物种(Globodera sp.))和环线虫(环线虫属物种

(*Criconema* sp.))。

[0096] 杀有害生物组合物

[0097] 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于待处理的作物区域或植物。这些化合物可以是肥料、除草剂、冷冻保护剂(cryoprotectants)、表面活性剂、去污剂、杀有害生物肥皂(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(其允许在单次施用所述制剂后对靶区域进行长期给药)。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、杀软体动物剂或几种这些制剂的混合物,如果想要,与其他农业上可接受的载体、表面活性剂或促进施用的助剂(在制剂领域中通常使用的)一起。合适的载体和助剂可以是固体或液体,并且相应于配制技术中常常使用的物质,例如天然或再生的矿物质、溶剂、分散剂、湿润剂、增粘剂、粘合剂或肥料。同样地,可将所述制剂制备成可食用的“诱饵”或塑造成有害生物“陷阱”以允许靶有害生物摄食或摄取所述杀有害生物制剂。

[0098] 用于施用本发明活性成分或包含至少一种由本发明的细菌菌株产生的杀有害生物蛋白质的本发明农业化学组合物的方法包括叶面施用、种子包衣和土壤施用。施用次数和施用率(rate of application)取决于受相应有害生物侵染的强度。

[0099] 可以将组合物配制成粉剂、粉尘剂(dust)、丸剂、颗粒剂、喷雾剂、乳液、胶体、溶液等,并且可以通过常规方法,例如包含所述多肽的细胞培养物的脱水(desiccation)、冻干、匀浆、提取、过滤、离心、沉淀或浓缩来制备所述组合物。在包含至少一种此类杀有害生物多肽的所有此类组合物中,所述多肽可以以约1重量%至约99重量%的浓度存在。

[0100] 可通过本发明的方法在给定区域内杀死鳞翅类、鞘翅类或线虫有害生物或减少其数目,或者可将本发明的方法预防性地应用于环境区域以防止被可能的有害生物侵染。优选地,有害生物摄取杀有害生物有效量的多肽或与杀有害生物有效量的多肽接触。“杀有害生物有效量(pesticidally-effective amount)”意指这样的杀有害生物剂的量,所述量能够引起至少一个有害生物死亡,或者明显减少有害生物生长、取食或正常的生理发育。该量将随下列因素而变化:例如,待防治的特定的靶有害生物,待处理的特定的环境、地点、植物、作物或农业场所,环境条件,以及施用在杀有害生物上有效的多肽组合物的方法、比率(rate)、浓度、稳定性和数量。所述制剂还可以随气候条件、环境考虑和/或施用频率和/或有害生物侵染的严重度而变化。

[0101] 可通过将细菌细胞、晶体和/或芽孢悬浮液或者分离的蛋白质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描述的杀有害生物剂组合物。在施用前,可以以合适的方法例如冻干、冷冻干燥、脱水,或者在水性载体、介质或合适稀释剂例如盐水或其他缓冲液中配制所述组合物。经配制的组合物可以为粉尘剂或颗粒材料的形式,或者在油(植物油或矿物油)中的悬浮液的形式,或者水或油/水乳剂的形式,或者作为可湿性粉剂,或者与适合于农业应用的任何其他载体材料相组合。合适的农业载体可以是固体或液体,并且是本领域众所周知的。术语“农业上可接受的载体”包括通常用于杀有害生物剂配制技术的所有助剂、惰性组分、分散剂、表面活性剂、增粘剂、粘合剂等;这些对于杀有害生物剂配制领域的技术人员来说是熟知的。所述制剂可以与一种或多种固体或液体助剂相混合,并且可以通过各种方法来制备,例如通过使用常规配制技术将杀有害生物组合物与

合适的助剂一起均匀地混合、掺合和 / 或研磨。合适的制剂和施用方法描述于美国专利号 6, 468, 523 中, 该文献通过提及而合并入本文。

[0102] “有害生物 (pest)” 包括但不限于, 昆虫、真菌、细菌、线虫、螨、蜱等。昆虫有害生物包括选自鞘翅目 (Coleoptera)、双翅目 (Diptera)、膜翅目 (Hymenoptera)、鳞翅目 (Lepidoptera)、食毛目 (Mallophaga)、同翅目 (Homoptera)、半翅目 (Hemiptera)、直翅目 (Orthoptera)、缨翅目 (Thysanoptera)、革翅目 (Dermaptera)、等翅目 (Isoptera)、虱目 (Anoplura)、蚤目 (Siphonaptera)、毛翅目 (Trichoptera) 等的昆虫, 特别是选自鞘翅目、鳞翅目和双翅目的昆虫。

[0103] 鞘翅目包括肉食亚目 (Adephaga) 和多食亚目 (Polyphaga)。肉食亚目包括步甲总科 (Caraboidea) 和豉甲总科 (Gyrinoidea), 而多食亚目包括牙甲总科 (Hydrophiloidea)、隐翅甲总科 (Staphylinoidea)、花萤总科 (Cantharoidea)、郭公虫总科 (Cleroidea)、叩头虫总科 (Elateroidea)、花甲总科 (Dascilloidea)、泥甲总科 (Dryopoidea)、丸甲总科 (Byrrhoidea)、扁甲总科 (Cucujoidea)、芫菁总科 (Meloidea)、花蚤总科 (Mordelloidea)、拟步甲总科 (Tenebrionoidea)、长蠹总科 (Bostrichoidea)、金龟总科 (Scarabaeoidea)、天牛总科 (Cerambycoidea)、叶甲总科 (Chrysomeloidea) 和象甲总科 (Curculionoidea)。步甲总科包括虎甲科 (Cicindelidae)、步甲科 (Carabidae) 和龙虱科 (Dytiscidae)。豉甲总科包括豉甲科 (Gyrinidae)。牙甲总科包括牙甲科 (Hydrophilidae)。隐翅甲总科包括葬甲科 (Silphidae) 和隐翅甲科 (Staphylinidae)。花萤总科包括花萤科 (Cantharidae) 和萤科 (Lampyridae)。郭公虫总科包括郭公虫科 (Cleridae) 和皮蠹科 (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 (Meloidea)。拟步甲总科包括拟步甲科 (Tenebrionidae)。金龟总科包括黑蛱科 (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) 和小蠹科 (Scolytidae)。

[0104] 双翅目包括长角亚目 (Nematocera)、短角亚目 (Brachycera) 和环裂亚目 (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) 和瘿蚊科 (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) 和长足虻科 (Dolichopodidae)。环裂亚目包括无缝组 (Aschiza) 和有缝组 (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 (Calypttratae)。无瓣类包括斑蝇科 (Otitidae)、实蝇科 (Tephritidae)、潜蝇科 (Agromyzidae) 和果蝇科 (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) 和麻蝇科 (Sarcophagidae)。

[0105] 鳞翅目包括凤蝶科 (Papilionidae)、粉蝶科 (Pieridae)、灰蝶科 (Lycaenidae)、蛱蝶科 (Nymphalidae)、斑蝶科 (Danidae)、眼蝶科 (Satyridae)、弄蝶科 (Hesperiidae)、天蛾科 (Sphingidae)、天蚕蛾科 (Saturniidae)、尺蛾科 (Geometridae)、灯蛾科

(Arctiidae)、夜蛾科 (Noctuidae)、毒蛾科 (Lymantriidae)、透翅蛾科 (Sesiidae) 和谷蛾科 (Tineidae)。

[0106] 对于主要农作物的本发明的昆虫有害生物包括：玉米：玉米螟 (*Ostrinia nubilalis*)；小地老虎 (*Agrotis ipsilon*)；谷实夜蛾 (*Helicoverpa zea*)；草地夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*)；西南玉米秆草螟 (*Diatraea grandiosella*)；南美玉米苗斑螟 (*Elasmopalpus lignosellus*)；小蔗秆草螟 (*Diatraea saccharalis*)；玉米根叶甲 (*Diabrotica virgifera*)；长角叶甲巴氏亚种 (*Diabrotica longicornis barberi*)；黄瓜十一星叶甲食根亚种 (*Diabrotica undecimpunctata howardi*)；梳爪叩头虫属物种 (*Melanotus* spp.)；北方圆头犀金龟 (*Cyclocephala borealis*)；南方圆头犀金龟 (*Cyclocephala immaculata*)；日本弧丽金龟 (*Popillia japonica*)；玉米铜色跳甲 (*Chaetocnema pulicaria*)；玉米隐喙象 (*Sphenophorus maidis*)；玉米缢管蚜 (*Rhopalosiphum maidis*)；玉米根蚜 (*Anuraphis maidiradicis*)；美洲谷长蝽 (*Blissus leucopterus leucopterus*)；赤胫黑蝗 (*Melanoplus femurrubrum*)；血黑蝗 (*Melanoplus sanguinipes*)；玉米种蝇 (*Hylemya platura*) 玉米斑潜蝇 (*Agromyza parvicornis*)；玉米黄呆蓟马 (*Anaphothrips obscurus*)；窃蚁 (*Solenopsis molesta*)；二斑叶螨 (*Tetranychus urticae*)；高粱：斑禾草螟 (*Chilo partellus*)；草地夜蛾；谷实夜蛾；南美玉米苗斑螟；粒肤脏切夜蛾 (*Feltia subterranea*)；长毛食叶鳃金龟 (*Phyllophaga crinita*)；*Eleodes* spp.、宽胸叩头虫属物种 (*Conoderus* spp.) 和 *Aeolus* spp.；黑角负泥虫 (*Oulema melanopus*)；玉米铜色跳甲；玉米隐喙象；玉米缢管蚜；美甘蔗伪毛蚜 (*Sipha flava*)；美洲谷长蝽；高粱瘿蚊 (*Contarinia sorghicola*)；朱砂叶螨 (*Tetranychus cinnabarinus*)；二斑叶螨；小麦：一点粘虫 (*Pseudaletia unipunctata*)；草地夜蛾；南美玉米苗斑螟；西方灰地老虎 (*Agrotis orthogonia*)；南美玉米苗斑螟；黑角负泥虫；三叶草叶象 (*Hypera punctata*)；黄瓜十一星叶甲食根亚种；俄罗斯小麦蚜虫；麦二叉蚜 (*Schizaphis graminum*)；麦长管蚜 (*Macrosiphum avenae*)；赤胫黑蝗；异黑蝗 (*Melanoplus differentialis*)；血黑蝗；小麦瘿蚊 (*Mayetiola destructor*)；麦红吸浆虫 (*Sitodiplosis mosellana*)；美洲秆蝇 (*Meromyza americana*)；麦瘦种蝇 (*Hylemya coarctata*)；烟褐花蓟马 (*Frankliniella fusca*)；麦茎蜂 (*Cephus cinctus*)；郁金香瘤瘿螨 (*Aceria tulipae*)；向日葵：向日葵芽卷叶蛾 (*Suleima helianthana*)；向日葵同斑螟 (*Homoeosoma electellum*)；向日葵叶甲 (*Zygogramma exclamationis*)；胡萝卜利犀金龟 (*Bothyrus gibbosus*)；向日葵籽瘿蚊 (*Neolasioptera murtfeldtiana*)；棉花：烟芽夜蛾 (*Heliothis virescens*)；谷实夜蛾；甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*)；红铃麦蛾 (*Pectinophora gossypiella*)；棉铃象 (*Anthonomus grandis*)；棉蚜 (*Aphis gossypii*)；棉序盲蝽 (*Pseudotomoscelis seriatus*)；苘麻粉虱 (*Trialeurodes abutilonea*)；美国牧草盲蝽 (*Lygus lineolaris*)；赤胫黑蝗；异黑蝗；烟蓟马 (*Thrips tabaci*)；烟褐花蓟马；朱砂叶螨；二斑叶螨；水稻：小蔗秆草螟；草地夜蛾；谷实夜蛾；葡萄肖叶甲 (*Colaspis brunnea*)；稻水象 (*Lissorhoptrus oryzophilus*)；米象 (*Sitophilus oryzae*)；二条黑尾叶蝉 (*Nephotettix nigropictus*)；美洲谷长蝽；拟缘蝽 (*Acrosternum hilare*)；大豆：大豆尺夜蛾 (*Pseudoplusia includens*)；大豆夜蛾 (*Anticarsia gemmatilis*)；苜蓿绿夜蛾 (*Plathypena scabra*)；玉米螟；小地老虎；甜菜夜蛾；烟芽夜蛾；谷实夜蛾；墨西哥大豆

瓢虫 (*Epilachnavariyestis*) ; 桃蚜 (*Myzus persicae*) ; 蚕豆微叶蝉 (*Empoasca fabae*) ; 拟缘蝽 ; 赤胫黑蝗 ; 异黑蝗 ; 玉米种蝇 ; 大豆蓟马 (*Sericothripsvariabilis*) ; 烟蓟马 ; 草莓叶螨 (*Tetranychus turkestanii*) ; 二斑叶螨 ; 大麦 : 玉米螟 ; 小地老虎 ; 麦二叉蚜 ; 美洲谷长蝽 ; 拟缘蝽 ; 烟草椿 (*Euschistus servus*) ; 灰地种蝇 (*Delia platura*) ; 小麦瘿蚊 ; 潜岩螨 (*Petrobia latens*) ; 油籽油菜 : 甘蓝蚜 (*Brevicorynebrassicae*) ; 蔬菜黄条跳甲 (*Phyllotreta cruciferae*) ; 蓓带夜蛾 (*Mamestra configurata*) ; 菜蛾 (*Plutella xylostella*) ; 地种蝇属物种 (*Delia* ssp.)。

[0107] 线虫包括寄生性线虫, 例如根结线虫、胞囊线虫和根腐线虫, 包括异皮线虫属物种、根结线虫属物种和球异皮线虫属物种 ; 特别是胞囊线虫的成员, 包括但不限于, 大豆异皮线虫 (*Heterodera glycines*) ; 甜菜异皮线虫 ; 燕麦异皮线虫 (*Heterodera avenae*) ; 以及马铃薯金线虫 (*Globodera rostochiensis*) 和苍白球异皮线虫 (*Globoderapailida*)。根腐线虫包括短体线虫属物种。

[0108] 用于增加植物产量的方法

[0109] 提供了用于增加植物产量的方法。所述方法包括将包含本文公开的杀有害生物序列的多核苷酸引入植物或植物细胞中。如本文所定义的, 植物的“产量”指由植物产生的生物量的品质和 / 或数量。“生物量”意指任何经测量的植物产物。生物量产生方面的增加是在所测量的植物产物的产量方面的任何改善。增加植物产量具有几种商业应用。例如, 增加植物叶生物量可以增加用于人或动物消费的叶菜的产量。此外, 增加叶生物量可以用于增加植物衍生的药物或工业产物的生产。产量的增加可以包括相比于不表达所述杀有害生物序列的植物而言任何统计学上显著的增加, 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。

[0110] 在具体方法中, 由于表达本文公开的杀有害生物蛋白质的植物的有害生物抗性得到提高, 因而增加了植物产量。杀有害生物蛋白质的表达导致有害生物侵染或取食植物的能力降低, 从而提高了植物产量。

[0111] 提供了下述实施例, 这是为了举例说明而不是为了限制。

[0112] 实验

[0113] 实施例 1. ATX9387 的生长以及提取物的制备

[0114] 使菌株 ATX9387 (其通过 MIDI 分析而被鉴定为蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) / 苏云金芽孢杆菌群的成员) 于 30 度在 T3 培养基中生长 16 小时至 5 天。离心培养物, 并将上清液通过 0.2 微米的滤膜, 从而得到无菌的上清液。

[0115] 实施例 2. 秀丽隐杆线虫生物测定法

[0116] 如本领域中已知的来饲养秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditiselegans*) 雌雄同体, 从而产生用于生物测定法的健康动物群体。用于秀丽隐杆线虫的生长、收获和遗传操作的一般程序 (包括生长培养基等) 可在本领域中找到, 例如在 Wood, ed. (1988) *The NematodeCaenorhabditis elegans* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) 中。

[0117] 就对于秀丽隐杆线虫的活性来测试来自菌株 ATX9387 的无菌上清液。在 96 孔平板中进行生物测定法。将 5 至 10 只线虫加至 80 μ l S 培养基中 (Wood, 同上), 并与 20 μ l

无菌上清液、0.5 μ l 浓缩的 HB101 (如 Wood (同上) 中所描述的来制备) 和利福平 (0.1 μ g/ μ l 的终浓度) 相混合。使测定法在室温下进行 3 天, 并对线虫进行定量。阴性对照样品 (T3 培养基或来自失活的菌株的无菌上清液) 包含数百只活跃的线虫, 而受试样品 (含有 ATX9387 上清液) 包含 5 至 10 只行动迟缓的或死亡的线虫。在秀丽隐杆线虫上 ATX9387 提取物的生物测定法的结果显示在表 1 中。

[0118] 表 1. ATX9387 提取物对于秀丽隐杆线虫的活性

[0119]

生长时间	ATX9387	对照
16 小时	-	-
1 天	-	-
2 天	-	-
3 天	++	-
4 天	++	-
5 天	++	-

[0120] [0120] 实施例 3. ATX9387 对于大豆异皮线虫的活性

[0121] 将 ATX9387 的 5 天培养物的无菌上清液浓缩 40 倍, 并饲喂给 SCNJ2 线虫。可重现地观察到取食无菌上清液的线虫是行动迟缓的, 并且展示出比取食浓缩至相同程度的阴性对照提取物的线虫更高的运动性 (motility)。

[0122] 实施例 4. 来自 ATX9387 的抗线虫活性由蛋白质来赋予

[0123] 为了鉴定 ATX9387 中的抗线虫活性, 进行下列测试。首先, 通过下列方式来测试所述活性被加热破坏的能力: 将来自 ATX9387 的无菌上清液的样品加热至 100°C 10 分钟, 然后在线虫生物测定法中测定经加热的材料。来自 ATX9387 的无菌上清液的热处理导致抗线虫活性的丧失。接下来, 用链霉菌蛋白酶处理活性样品以降解蛋白质。该处理导致活性的丧失。将来自 ATX9387 的无菌上清液通过 3kDa 分子量截止值 (“MWC0”) 的浓缩单元。活性成分被 3kDa MWC0 滤器保留, 而流出物显示无活性。这表明, 活性分子的大小大于 3kDa。

[0124] 实施例 5. 来自 ATX9387 的活性的分级

[0125] 在 20mM Tris pH 8 中, 在阴离子交换柱上, 使用从 0M 至 1M NaCl 的梯度, 通过液相色谱法来对 ATX9387 的 4 天培养物的无菌上清液进行分级。几个连续的级分是有活性的。使最具有活性的级分经历 SDS-PAGE, 观察到约 130kd 和约 70kd 的两条显著的条带。

[0126] 在另一个实验中, 使菌株 ATX9387 于 30°C 在 T3 培养基中生长 5 天。将培养物以 8,000xg 离心 10 分钟, 并将上清液通过 0.2 μ m 的滤器。使用 Spectra/Por 1 透析管 (6-8,000 MWC0), 将经过滤的上清液逆 20mM Tris pH 8 进行透析, 然后经过 20 倍的柱床体积, 使用从 0 至 1M NaCl 的梯度在阴离子交换柱 (Mono Q) 上进行分级。使用 Slide-A-Lyzer (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) 小型透析单元 (7,000MWC0), 将所述级分逆 20mM Tris pH 8 进行透析, 并以 100 μ l 的生物测定法体积使用 20 μ l 的样品在秀丽隐杆线虫上进行生物测定, 如本文中所描述的。发现级分 12 和 13 具有活性, 将所述级分合并, 然后使用 Amicon Ultra-45,000MWC0 浓缩器浓缩 7 倍。在 50mM 磷酸钠、150mM NaCl (pH7) 中, 在凝胶过滤柱 (Superdex200) 上对该经浓缩的材料进行分级。使用 Centricon YM-3 浓缩器将级分浓缩 10 倍, 然后如上所述在秀丽隐杆线虫上进行生物测定。级分 5 和 6 是最具有活性的, 和级分 7 具有一些活性。所述级分的 SDS-PAGE 显示, 级分 5-7 共享几种蛋白质: 在约 130kDa 处的蛋白质, 在约 75kDa 处的双重带 (doublet), 和在约 53kDa 处的蛋白质。使

最显著的条带经历通过Edman降解来进行的N-末端蛋白质测序。130kDa的蛋白质和70kDa的蛋白质具有非常相似的N-末端序列（通过所使用的方法不能检测到半胱氨酸），因而可能是由相同的初始蛋白质产生的。该蛋白质被命名为AXMI-031 (SEQ ID NO :2)。

[0127] 表 2. 来自 ATX9387 的～ 130kDa 蛋白质的 N- 末端序列

[0128] 1 A, S+S' , M

[0129] 2 D, Q

[0130] 3 ? , P, N

[0131] 4 N

[0132] 5 L

[0133] 6 Q

[0134] 7 S

[0135] 8 Q

[0136] 9 ? , Q

[0137] 10 N

[0138] 11 I

[0139] 12 P

[0140] 13 Y

[0141] 14 N

[0142] 15 V

[0143] 表 3. 来自 ATX9387 的～ 70kDa 蛋白质的 N- 末端序列

[0144] 1 A, G, S+S'

[0145] 2 F

[0146] 3 P

[0147] 4 N

[0148] 5 L

[0149] 6 Q

[0150] 7 V ?

[0151] 8 Q

[0152] 9 ?

[0153] 10 N ? , V ?

[0154] 11 I

[0155] 12 P

[0156] 13 Y, Q

[0157] 14 ? , N

[0158] 15 ? , V

[0159] 使用～ 130kDa 蛋白质和～ 70kDa 蛋白质的 N- 末端序列来进行的蛋白质数据库搜索证明,AXMI-031 蛋白质的 N- 末端氨基酸与内毒素 Cry14Aa (SEQ ID NO :13) 的 N- 末端具有显著的相似性。

[0160] Cry14A 的 N- 末端序列 :MDCNLQSQQNIPYNV (SEQ ID NO :13 的氨基酸残基 1 至 15)。

[0161] 实施例 6. 来自 ATX9387 的 axmi-031 编码区的克隆

[0162] 产生 ATX 9387 的随机片段文库,并鉴定出包含编码 axmi-031 的 N-末端的 DNA 序列的 DNA 克隆 (pAX031)。第二个克隆, pAX032,被鉴定为包含 axmi-031 的 C-末端。克隆 pAX031 和 pAX032 基本上重叠,从而对于本领域技术人员清楚的是,这两个克隆一起包含了完整的 axmi-031 编码区。

[0163] 为了确认 AXMI-031 的性质,使用针对 axmi-031 开放读码框的末端而设计的引物,使用高保真聚合酶 PFU ULTRA™(Stratagene) 从总 DNA 中扩增基因组克隆。将所得的 PCR 产物克隆入 PCR-TOPOII-Blunt 载体 (Invitrogen) 中,从而产生 pAX980。测定 pAX980 的 DNA 序列,并且发现其包含与随机片段文库克隆 pAX031 和 pAX032 中的开放读码框相同的开放读码框。该开放读码框的翻译产生与从纯化的 AXMI-031 蛋白获得的 N-末端序列相一致的蛋白质序列。因此,将该开放读码框命名为 axmi-031 (SEQ ID NO:1)。于 2006 年 6 月 9 日保藏了包含 axmi-031 的质粒克隆 pAX2515,并分配以登记号 NRRL B-30935。

[0164] 实施例 7. AXMI-031 与其他已知的内毒素的比较

[0165] 使用 AXMI-031 蛋白质序列进行的数据库搜索证明, AXMI-031 是 δ -内毒素类的杀昆虫蛋白质的成员。AXMI-031 与 cry14Aa1 内毒素最相似。AXMI-031 的氨基酸序列与 CRY14Aa1 (SEQ ID NO:13) 86.6% 同一。

[0166] 实施例 8. AXMI-031 多肽在大肠杆菌 (E. coli) 中的表达

[0167] 对于在大肠杆菌中的可溶性表达,设计引物以包括来自 axmi-031 ORF 的翻译起始和终止密码子。所述引物加入了最佳的 RBS 和 GatewayattB 重组位点。将 Stratagene Pfu I 聚合酶用于一致地扩增来自 pAX980 的 ORF,并将其与 pDONR221 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 重组,从而产生进入载体 pAX2515 (按照来自 Invitrogen 的方案)。对所述克隆进行测序以进行验证。进行进一步的重组以将 ORF 引入待通过 T7 启动子来表达的 pDEST17 中,从而产生 pAX2530。通过限制酶切消化来核实所插入的 axmi-031 片段的在存在和方向,并将其转化入大肠杆菌 BL21 (DE3) 细胞中。该载体产生在 AXMI-031 的 N-末端上的 26 个氨基酸的翻译融合物 (3.17kDa) (包括 6x His 标签)。

[0168] 如下在 BL21*(DE3) 细胞中从 pAX2530 表达 His-AXMI-031。于 37°C 在具有 50 μ g/ml 羧苄青霉素的 LB 中使 pAX2530 的起始培养物生长过夜。第二天,将饱和的培养物在新鲜培养基中作 1 : 100 稀释,并使该新鲜的培养物于 37°C 生长直至 0.4 的 OD,此时将培养物置于室温下,并摇动过夜。作为对照,关于 axmi-031 构建携带 axmi-004 基因的表达载体 (pAX2530),并在相同的大肠杆菌宿主中从 pAX2504 表达 AXMI-004 蛋白 (美国专利申请号 10/782,020)。通过 SDS-PAGE 来分析整个培养物。包含 pAX2530 的培养物产生显著的在约 135kDa 处的蛋白质条带 (预期的 His-AXMI-031 蛋白的大小),而包含 pAX2504 的培养物不产生该条带。

[0169] 实施例 9. 针对 AXMI-031 的抗体

[0170] 为了产生抗 AXMI-031 抗体,将经亲和纯化的 AXMI-031 (SEQ ID NO:2) 蛋白接种入兔中,并分离和滴定针对 AXMI-031 的抗血清,如本领域中已知的。发现所选择出的抗血清还与 SYNAXMI-031 蛋白 (SEQ ID NO:8) 反应。

[0171] 实施例 10. AXMI-031 对于秀丽隐杆线虫的活性

[0172] 制备包含 pAX2530 的大肠杆菌培养物,发现其产生不存在于对照菌株中的 135kDa

蛋白质,这暗示在包含 pAX2530 的菌株中表达出了 AXMI-031。就对于秀丽隐杆线虫的活性来测试这些培养物,所述培养物是针对秀丽隐杆线虫具有活性的,而对照培养物未显示出针对秀丽隐杆线虫的活性。

[0173] 实施例 11. 在芽孢杆菌 (Bacillus) 中表达 AXMI-031

[0174] 通过 PCR 从 pAX980 中扩增杀昆虫基因 axmi-031,并通过本领域众所周知的方法将 PCR 产物克隆入芽孢杆菌表达载体 pAX916 或另一种合适的载体中。将所得的芽孢杆菌菌株(其包含具有 axmi-031 的载体)培养在常规生长培养基例如 CYS 培养基(10g/l 细菌用酪胺;3g/l 酵母提取物;6g/l KH_2PO_4 ;14g/l K_2HPO_4 ;0.5mM MgSO_4 ;0.05mM MnCl_2 ;0.05mM FeSO_4)上,直至通过显微镜检查观察到明显的芽孢形成。制备样品,并在生物测定法中就针对秀丽隐杆线虫的活性来测试 AXMI-031 蛋白,发现所述蛋白质具有活性。

[0175] 实施例 12. synaxmi-031、synaxmi-031(apo) 和 synaxmi-031(ER)

[0176] 在本发明的一个方面,产生合成的 axmi-031 序列,例如 synaxmi-031 (SEQ ID NO:7)。这些合成的序列具有相对于 axmi-031 序列而言经改变的 DNA 序列,并且编码与原始 AXMI-031 蛋白共线 (collinear) 但缺少存在于 AXMI-031 中的 C-末端“晶体结构域”的蛋白质。synaxmi-031 基因序列编码 SYNAXMI-031 蛋白 (SEQ ID NO:8),其包含 AXMI-031 蛋白的前 685 个氨基酸。

[0177] 在本发明的另一个方面,设计 synaxmi-031 的经修饰的形式,从而使所得的肽被靶向植物细胞器,例如内质网或质外体。已知导致将融合蛋白靶向植物细胞器的肽序列在本领域中是已知的。例如,在本领域中已知来自白羽扇豆 (*Lupinus albus*) 的酸性磷酸酶基因 (Genebank ID GI:14276838;Miller 等人 (2001) Plant Physiology 127:594-606) 的 N-末端区域导致异源蛋白质的内质网靶向。如果所得的融合蛋白还在 C-末端包含含有肽 N-末端-赖氨酸-天冬氨酸-谷氨酸-亮氨酸(即,“KDEL”基序 (SEQ ID NO:36)) 的内质网滞留序列,则融合蛋白将被靶向内质网。如果融合蛋白在 C-末端缺少内质网靶向序列,则融合蛋白将被靶向内质网。如果融合蛋白在 C-末端缺少内质网靶向序列,则该蛋白质将被靶向内质网,但最终将被隔离在质外体中。

[0178] 因此, synaxmi-031ER 基因 (SEQ ID NO:11) 编码融合蛋白,所述融合蛋白包含与 SYNAXMI-031 的 N-末端融合的来自白羽扇豆的酸性磷酸酶基因的 N-末端的 31 个氨基酸,以及在 C-末端的 KDEL 序列。因此,预测所得的蛋白质 AXMI-031ER (SEQ ID NO:12) 在植物细胞中表达后被靶向植物内质网。

[0179] synaxmi-031(apo) 基因 (SEQ ID NO:9) 编码融合蛋白,所述融合蛋白包含与 SYNAXMI-031 的 N-末端融合的来自白羽扇豆的酸性磷酸酶基因的 N-末端的 31 个氨基酸,但缺少在 C-末端的 KDEL (SEQ ID NO:36) 序列。因此,预测所得的蛋白质 AXMI-031 (APO) (SEQ ID NO:10) 在植物细胞中表达后被靶向植物质外体。

[0180] 实施例 13. 截短 synaxmi-031 从而产生备选的 AXMI-031 蛋白

[0181] 除了编码 AXMI-031 及其变体和片段 (SEQ ID NO:15-27) 的合成序列外,还开发和表达了导致 AXMI-031 蛋白的变体的表达的 DNA 构建体。在体外就线虫活性来测试这些基因的亚组。

[0182] 表 4. AXMI-031 变体在体外的杀线虫活性

[0183]

蛋白质	核苷酸 SEQ ID NO:	氨基酸 SEQ ID NO:	对于秀丽隐杆线虫 是否具有活性?
细菌表达			
AXMI-031-截短的	14	15	是
AXMI-031 (m1)	16	17	是
AXMI-031 (m1)-截短的	18	19	是
AXMI-031 (A-D)	20	21	是
SYNAXMI-031 (A-D)	26	27	NT
AXMI-031 (B-C)	22	23	是
AXMI-031 (B-D)	24	25	是

[0184] NT = 未检测的

[0185] 实施例 14. 用于植物表达的细胞靶向结构域的截短和添加

[0186] 在本发明的另一个方面,设计 synaxmi-031 序列的经修饰的形式,从而使所得的肽被靶向植物细胞器,例如内质网或质外体。

[0187] 在本发明的另一个方面,截短所述基因,从而使所得的肽是 AXMI-031 的截短形式,其可以进行或不进行进一步的修饰以靶向植物细胞器,例如质外体或内质网。

[0188] 在本发明的另一个方面,产生经修饰的形式,其导致表达出截短的变体,所述截短的变体包含被设计用于将所得的蛋白质靶向植物细胞器的结构域。

[0189] 设计了下列变体核苷酸序列:

[0190] aposynaxmi-031 (A-D) (SEQ ID NO :28) 编码 APOAXMI-031 (A-D) 蛋白 (SEQ ID NO :29)。apoSyn2axmi-031 (A-D) (SEQ ID NO :30) 编码 APOSYN2AXMI-031 (A-D) 蛋白 (SEQ ID NO :31)。aposynaxmi-031 (f1) (SEQ ID NO :37) 编码 APOSYNAXMI-031 (FL) 蛋白 (SEQ ID NO :38)。Synaxmi031 (f1)-ER (SEQ ID NO :32) 编码 SYNAXMI-031 (FL)-ER 蛋白 (SEQ ID NO :33)。

[0191] 实施例 15. 从菌株 ATX16538、ATX16093 和 ATX21049 中提取质粒 DNA

[0192] 选择菌株 ATX16538、ATX16093 和 ATX21049 用于分析。使每种菌株的纯培养物在大量的丰富培养基中进行生长。离心培养物以收获细胞粒状沉淀。然后,通过本领域已知的方法,通过使用 SDS 进行处理来调制细胞粒状沉淀,从而导致细胞壁的破裂和 DNA 的释放。然后,通过高盐浓度来沉淀蛋白质和大的基因组 DNA。然后,用乙醇来沉淀质粒 DNA。在几种情况下,经过高速离心,通过氯化铯梯度将质粒 DNA 与任何残留的染色体 DNA 分开。备选地,通过与树脂结合来纯化质粒 DNA,如本领域中已知的。对于每种菌株,通过本领域已知的方法,通过在琼脂糖凝胶上显现来检查 DNA 的品质。

[0193] 实施例 16. 从菌株 ATX16538、ATX16093 和 ATX21049 中克隆基因

[0194] 从所述质粒 DNA 或每种菌株制备 DNA 文库。这可通过许多本领域已知的方法来进行。例如,可将经纯化的质粒 DNA 剪切成 5-10kb 大小的片段,并在所有 4 种 dNTP 存在下使用 T4DNA 聚合酶和 Klenow 片段来修复 5' 和 3' 单链突出端,如本领域中已知的。然后,可通过使用 T4 多核苷酸激酶进行处理来将磷酸附着至 5' 末端,如本领域中已知的。然后,可将经修复的 DNA 片段过夜连接入标准高拷贝载体 (即 pBLUESCRIPT® SK+) 中,所述载体

适合地进行准备以接受插入片段,如本领域中已知的(例如,通过用产生平端的限制酶进行消化)。

[0195] 通过使用已知具有位于所述克隆位点侧翼的切割位点的限制酶消化所述克隆的亚组,来分析所得的 DNA 文库的品质。确定了高百分比的克隆包含通常具有 5-6kb 的平均插入片段大小的插入片段。

[0196] 实施例 17. 文库平板的高通量测序

[0197] 一旦检查和验证了 DNA 文库品质后,通常以 350rpm 的摇动速度,使菌落于 37°C 在 2ml 96 孔模块(blocks)中的丰富液体培养基之中生长过夜。离心所述模块以将细胞收集在模块的底部。然后,通过以高通量形式预备的标准碱性裂解来准备所述模块。

[0198] 然后,以下列方式,对于大量来自每个模块的克隆,测定来自该文库的克隆的末端序列:使用自动 DNA 测序仪和在位于插入片段侧翼的区域中与质粒载体退火的标准寡核苷酸引物,通过本领域中已知的方法,使用荧光染料终止剂测序技术(fluorescent dye terminator sequencing technique)(Applied Biosystems)来测定被选择用于分析的每个克隆的 DNA 序列。

[0199] 实施例 18. 测序数据的装配(assembly)和筛选

[0200] 将获得的 DNA 序列汇编入装配计划方案(project)中,并排列在一起以形成重叠群。这可以通过使用计算机程序例如 Vector NTi,或者备选地通过使用本文其他地方所描述的 DNA 比对和分析程序的 Pred/Phrap 套件来有效地进行。将这些重叠群,和可能未添加至重叠群的任何独个读取(read)一起,与所有类别的已知的杀有害生物基因的汇编数据库进行比较。进一步分析被鉴定为与已知的内毒素或杀有害生物基因具有同一性的重叠群或独个读取。

[0201] 从菌株 ATX16538 中,发现 pAX2579 包含与“cry”类型的 δ -内毒素具有同源性的开放读码框。该开放读码框被命名为 axmi-039(SEQ ID NO:3),和所编码的蛋白质被命名为 AXMI-039(SEQ ID NO:4)。PCR 扩增 axmi-039ORF 和侧翼序列(起始密码子上游 151bp 和终止密码子下游 29bp),将其克隆入 pRSF1B 中,并进行序列,从而产生 pAX2579。于 2006 年 6 月 9 日将 pAX2579 保藏在 ARS 专利菌株保藏中心(ARS Patent Strain Collection),并分配以登记号 NRRL B-30936。AXMI-039 与 Cry5Ba1(其是经鉴定的最接近的同系物)具有 43.9%的氨基酸序列同一性。

[0202] 从菌株 ATX16093 中,发现 pAX4313 包含与“cry”类型的 δ -内毒素具有同源性的开放读码框。该开放读码框被命名为 axmi-040(SEQ ID NO:5),和所编码的蛋白质被命名为 AXMI-040(SEQ ID NO:6)。于 2006 年 6 月 9 日将 pAX4313 保藏在 ARS 专利菌株保藏中心,并分配以登记号 NRRL B-30937。AXMI-040 与 Cry21Ba1(其是经鉴定的最接近的同系物)具有 42.9%的氨基酸序列同一性。

[0203] 从菌株 ATX21049 中,鉴定了展示出与“cry”类型的 δ -内毒素的同源性的开放读码框。该开放读码框被命名为 axmi-049(SEQ ID NO:34),和所编码的蛋白质被命名为 AXMI-049(SEQ ID NO:35)。通过 PCR 扩增该开放读码框,并将其克隆入载体中,从而产生 pAX5039。于 2007 年 5 月 29 日将 pAX5039 保藏在 ARS 专利菌株保藏中心,并分配以登记号 NRRL B-50046。AXMI-049 与 Cry21Ba1(其是经鉴定的最接近的同系物)具有 46.1%的氨基酸序列同一性。

[0204] 实施例 19. 将本发明的杀有害生物基因装入载体中以用于植物表达

[0205] 独立地将本发明的基因的编码区中的每一个与用于在植物中表达的合适启动子和终止子序列相连接。此类序列在本领域中是众所周知的,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遍在蛋白启动子,用于在双子叶植物中表达的拟南芥 UBQ3 启动子或 CaMV 35S 启动子,以及 nos 或 PinII 终止子。用于产生和验证启动子-基因-终止子构建体的技术在本领域中也是众所周知的。

[0206] 实施例 20. 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

[0207] 在授粉后 8-12 天收集穗。从穗中分离胚胎,并且将大小 0.8-1.5mm 的那些胚胎用于转化。将胚胎以盾盖侧向上的方式放置在合适的温育培养基上,并在黑暗中于 25℃ 温育过夜。然而,本身无需将胚胎温育过夜。使胚胎与包含合适载体(用于 Ti 质粒介导的转移)的土壤杆菌菌株接触 5-10 分钟,并随后铺板在共培养培养基上 3 天(25℃,在黑暗中)。在共培养后,将外植体转移至恢复期培养基 5 天(于 25℃,在黑暗中)。取决于所利用的特定选择的性质和特征,使外植体在选择培养基中温育高达 8 周。在选择期后,将所得到的愈伤组织转移至胚胎成熟培养基,直至观察到成熟的体细胞胚的形成。然后,将所得到的成熟的体细胞胚置于低光照下,并且如本领域已知的来起始再生过程。允许所得到的幼芽在生根培养基上生根,并且将所得到的植物转移至苗盆中并繁殖成转基因植物。

[0208] 实施例 21. 表达 AXMI-031 和变体的转基因植物

[0209] 将本文描述的植物表达盒与合适的用于帮助选择经转化的细胞和组织的植物选择标记相组合,并将其连接入植物转化载体中。这些可包括来自土壤杆菌介导的转化的二元载体或者用于气溶胶(aerosol)或生物射弹转化的简单质粒载体,将 synaxmi-031(apo)克隆入植物表达载体中,并将该载体引入根瘤土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)中,如本领域中已知的。通过本领域已知的花浸渍(floral dip)法将在拟南芥 UBQ3 启动子(Norris 等人(1993) *J. Plant Mol. Biol.* 21:895-906)控制下的 synaxmi-031(apo) 编码区引入拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中,并选择出转基因植物。使用来源于 synaxmi-031 的序列、也与 synaxmi-031(apo) 退火的寡核苷酸引物,通过本领域已知的 PCR 分析来确证转基因 T1 群体中 synaxmi-031(apo) 的存在。

[0210] 从转基因的包含 synaxmi-031(apo) 的植物中制备叶和根组织,并在聚丙烯酰胺凝胶上进行分离,旁边为非转基因对照和 AXMI-031 蛋白的稀释物,然后转移至膜,如本领域中已知的。使用本文描述的抗 AXMI-031 抗体,通过本领域已知的 Western 印迹分析,就 synaxmi-031(apo) 的表达产物的存在来对样品进行测试。在来自转基因的包含 synaxmi-031(apo) 的植物的叶和根组织的样品中均检测到预期大小的 synaxmi-031(apo) 的表达产物,但在非转基因对照中未检测到。

[0211] 表 5. 转基因植物中 SYNAXMI-031 (APO) 的抗体检测

[0212]

组织来源	SYNAXMI-031 (APO) 的检测
未转化的对照	-
包含 synaxmi-031(apo) 的植物 'A'	+++
包含 synaxmi-031(apo) 的植物 'B'	+++

[0213] [0213] 实施例 22. 表达 AXMI-031 的植物的胞囊形成减少

[0214] 与对照植物相比较,就抵抗被甜菜异皮线虫侵染的能力来测试表达

synaxmi-031(apo) 的转基因植物。用约 100 个 J2 孵化物 (hatchling) 来侵染转基因植物以及仅用载体转化的对照植物,并测量进入根的线虫的数目以及所形成的胞囊的数目。发现,与对照相比,表达 SYNAXMI-031(APO) 的转基因植物一致地具有减少的进入根的线虫数目和减少的所形成的胞囊数目。

[0215] 表 6. 在表达 AXMI-031 的植物中减少的胞囊形成

[0216]

	胞囊形成
对照植物	++
表达 AXMI-031(APO) 的植物	+

[0217] 实施例 23. 另外的用于杀有害生物活性的测定法

[0218] 通常用许多方法来评估杀有害生物蛋白用作针对有害生物的杀有害生物剂的能力。本领域众所周知的一个方法是进行饲喂测定法。在此类饲喂测定法中,将有害生物暴露于包含待测试的化合物的样品或对照样品。通常,这可以通过将待测试的材料或此类材料的合适稀释物置于有害生物将摄取的材料(例如,人工饵料)上来进行。待测试的材料可以由液体、固体或浆状物组成。可将待测试的材料置于表面上,然后让其干燥。备选地,可将待测试的材料与溶化的人工饵料相混合,然后分配入测定法小室中。测定法小室可以是例如杯子、皿或微量滴定板的孔。

[0219] 用于吸吮性有害生物(sucking pest)(例如蚜虫)的测定法可包括通过分隔物将受试材料与昆虫分开,所述分隔物理想地是可被吸吮性昆虫的吸吮式口器刺穿从而允许摄取受试材料的部分。通常将受试材料与激食物质例如蔗糖相混合,以促进受试化合物的摄取。

[0220] 其他类型的测定法可以包括将受试材料显微注射入有害生物的口或消化道内,以及形成转基因植物,并随后测试有害生物取食所述转基因植物的能力。植物测试可包括分离通常被消耗的植物部分,例如放在叶上的小笼,或者分离在包含昆虫的笼中的整个植物。

[0221] 用于测定有害生物的其他方法和途径在本领域中是已知的,并且可在例如 Robertson, J. L. & H. K. Preisler. 1992. Pesticide bioassays with arthropods. CRC, Boca Raton, FL 中找到。备选地,在期刊“Arthropod Management Tests”和“Journal of Economic Entomology”中,或者通过与美国昆虫学学会(Entomological Society of America, ESA)的会员的讨论而一般性地描述了测定法。

[0222] 实施例 24. 用本发明的杀有害生物基因来转化玉蜀黍细胞

[0223] 在授粉后 8-12 天收集玉蜀黍穗。从穗中分离胚胎,并且将大小 0.8-1.5mm 的那些胚胎用于转化。将胚胎以盾盖侧向上的方式放置在合适的温育培养基例如 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)上,并在黑暗中于 25°C 温育过夜。

[0224] 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 30-45 分钟,随后转移至束射平板(beaming plate)(参见,例如, PCT 公开号 W0/0138514 和美国专利号 5,240,842)。

[0225] 使用气溶胶束加速器,将被设计为在植物细胞中表达本发明基因的 DNA 构建体加速进入植物组织中,其中使用基本上如 PCT 公开号 W0/0138514 中描述的条件。在束射

(beaming) 后,将胚胎在渗透培养基上温育 30 分钟,然后置于温育培养基上于 25℃在黑暗中过夜。为了避免不适当地破坏经束射的外植体,在转移至恢复培养基前使它们温育至少 24 小时。然后,胚胎在恢复期培养基上于 25℃在黑暗中 扩散 5 天,随后转移至选择培养基。取决于所利用的特定选择的性质和特征,使外植体在选择培养基中温育高达 8 周。在选择期后,将所得到的愈伤组织转移至胚胎成熟培养基,直至观察到成熟的体细胞胚的形成。然后,将所得到的成熟的体细胞胚置于低光照下,并且通过本领域已知的方法起始再生过程。允许所得到的幼芽在生根培养基上生根,并且将所得到的植物转移至苗盆 (nursery pot) 中并繁殖成转基因植物。

[0226] 材料

[0227] DN62A5S 培养基

[0228]

组分	每升	来源
Chu' s N6 基本盐混合物 (Prod. No. C 416)	3.98g/L	Phytotechnology Labs
Chu' s N6 维生素溶液 (Prod. No. C 149)	1mL/L (的 1000x 母液)	Phytotechnology Labs
L- 天冬酰胺	800mg/L	Phytotechnology Labs
肌醇	100mg/L	Sigma
L- 脯氨酸	1.4g/L	Phytotechnology Labs
酪蛋白氨基酸	100mg/L	Fisher Scientific
蔗糖	50g/L	Phytotechnology Labs
2,4-D(Prod. No. D-7299)	1mL/L (的 1mg/mL 母液)	Sigma

[0229] 用 1N KOH/1N KCl 将该溶液的 pH 调整至 pH5.8,添加 Gelrite(Sigma) 至 3g/L, 并进行高压灭菌。在冷却至 50℃后,添加 2ml/L 的 5mg/ml 硝酸银母液 (Phytotechnology Labs)。该配方产生约 20 个平板。

[0230] 说明书中提及的所有出版物和专利申请表明本发明所属领域的技术人员的技术水平。所有出版物和专利申请通过提及而合并入本文, 其程度就好像具体且独个地指出每一独个出版物或专利申请通过提及而合并。

[0231] 尽管为了清楚地理解,已通过举例说明和实施例相当详细地描述了上述发明,但显而易见的是,可以在所附权利要求书的范围内施行某些变化和修饰。