



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102796187 B

(45) 授权公告日 2014. 07. 16

(21) 申请号 201210167972. 0

(22) 申请日 2012. 05. 25

(66) 本国优先权数据

201110142100. 4 2011. 05. 27 CN

(73) 专利权人 中国科学院上海生命科学研究院

地址 200031 上海市徐汇区岳阳路 319 号

(72) 发明人 苗雪霞 张浩 李海超 王玉冰

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司
31100

代理人 陈静

(51) Int. Cl.

C07K 14/435 (2006. 01)

C12N 15/12 (2006. 01)

C12N 15/63 (2006. 01)

C12N 1/21 (2006. 01)

C12N 1/15 (2006. 01)

C12N 1/19 (2006. 01)

C12N 5/10 (2006. 01)

C12N 15/113 (2010. 01)

A01N 61/00 (2006. 01)

A01P 1/00 (2006. 01)

A01P 3/00 (2006. 01)

A01P 5/00 (2006. 01)

A01P 7/02 (2006. 01)

A01P 7/04 (2006. 01)

A01P 13/00 (2006. 01)

A01P 7/00 (2006. 01)

A01H 5/00 (2006. 01)

A01H 5/10 (2006. 01)

(56) 对比文件

Yubing Wang 等. Second-Generation Sequencing Supply an Effective Way to Screen RNAi Targets in Large Scale for Potential Application in Pest Insect Control. 《PLOS ONE》. 2011, 第 6 卷 (第 4 期),

王高峰 等. RNA 干扰技术在植物线虫基因功能研究及虫害防治方面的应用. 《生物技术通报》. 2008, (第 5 期),

Y. Y. Zhao 等. PsOr1, a potential target for RNA interference-based pest management. 《Insect Molecular Biology》. 2010, 第 20 卷 (第 1 期),

审查员 白鸽

权利要求书 2 页 说明书 30 页

序列表 13 页 附图 7 页

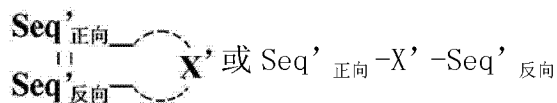
(54) 发明名称

基于 RNAi 技术防治害虫的新方法

(57) 摘要

本发明涉及基于 RNAi 技术防治害虫的新方法。揭示了一个对于防治鳞翅目昆虫有用的靶标基因及其编码的蛋白, 基于该靶标基因的核酸序列制备核酸抑制物或表达核酸抑制物的宿主, 可有效地杀灭鳞翅目昆虫。本发明还提供了利用同一基因的不同片段, 获得昆虫种类特异型和种间广谱型的杀虫制剂和方法。

1. 一种分离的多肽,其特征在于,该多肽选自下组:
 - (a) SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的多肽;
 - (b) SEQ ID NO:3 编码的多肽、SEQ ID NO:4 编码的多肽或 SEQ ID NO:5 编码的多肽。
2. 一种分离的多核苷酸,其特征在于,其核苷酸序列选自下组:
 - (a) 编码如权利要求 1 所述多肽的多核苷酸;
 - (b) 与多核苷酸 (a) 互补的多核苷酸。
3. 一种分离的多核苷酸,其特征在于,该多核苷酸是:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3-5 任一所示序列的多核苷酸。
4. 一种载体,其特征在于,它含有权利要求 2 或 3 所述的多核苷酸中的一种、二种或多种。
5. 一种遗传工程化的宿主细胞,其特征在于,它含有权利要求 4 所述的载体,或其基因组中整合有权利要求 2 或 3 所述的多核苷酸中的一种、二种或多种;所述的宿主细胞是原核细胞。
6. 权利要求 2 或 3 任一所述的多核苷酸的用途,用于作为制备特异性干扰有害昆虫基因表达或抑制有害昆虫生长的干扰分子的抑制或沉默靶标,所述的有害昆虫基因选自贮藏蛋白 2 基因;所述的有害昆虫是鳞翅目昆虫。
7. 一种核酸抑制物,其是以权利要求 2 或 3 任一所述的多核苷酸作为抑制或沉默靶标的 dsRNA,具有如下结构:



其中,

Seq'正向是与 SEQ ID NO:3-5 任一所示序列的多核苷酸所对应的 RNA 序列;

Seq'反向为与 Seq'正向互补的序列;

X' 为无;或为位于 Seq'正向和 Seq'反向之间的间隔序列,所述间隔序列与 Seq'正向和 Seq'反向不互补;

|| 表示在 Seq'正向和 Seq'反向之间形成的氢键。

8. 一种核酸抑制物,其特征在于,所述的核酸抑制物是构建物,所述构建物含有以下结构:

Seq正向-X-Seq反向;

其中,

Seq正向是 SEQ ID NO:3-5 任一所示序列的多核苷酸;

Seq反向为与 Seq正向互补的序列;

X 为位于 Seq正向和 Seq反向之间的间隔序列,并且所述间隔序列与 Seq正向和 Seq反向不互补。

9. 一种宿主细胞,其包含权利要求 7-8 任一所述的核酸抑制物;所述的宿主细胞是原核细胞。

10. 权利要求 7-8 任一所述的核酸抑制物或权利要求 5 或 9 所述的宿主细胞的用途,用于制备防治有害昆虫的制剂;所述的有害昆虫是鳞翅目昆虫。

11. 一种防治有害昆虫的制剂,所述的有害昆虫是鳞翅目昆虫,其包含:

安全有效量选自以下的物质:权利要求 7-8 任一所述的核酸抑制物或权利要求 5 或 9 所述的宿主细胞;以及;

农药学上可接受的载体。

12. 权利要求 11 所述的制剂,其还包含至少一种选自以下的杀虫剂:化学杀虫剂、马铃薯糖蛋白、苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白、致病杆菌杀虫蛋白、光杆状菌杀虫蛋白、侧孢芽孢杆菌杀虫蛋白和球形芽孢杆菌杀虫蛋白。

13. 一种防治有害昆虫的方法,其特征在于,所述方法包括:将权利要求 7-8 任一所述的核酸抑制物喷洒有害昆虫;所述的有害昆虫是鳞翅目昆虫。

14. 一种防治有害昆虫的方法,其特征在于,所述方法包括:将权利要求 7-8 任一所述的核酸抑制物导入到植物中,喂食有害昆虫;所述的有害昆虫是鳞翅目昆虫。

15. 如权利要求 6 或 10 所述的用途,或权利要求 11 所述的制剂,或权利要求 13-14 所述的方法,其特征在于,所述的昆虫为玉米螟或棉铃虫或小菜蛾。

基于 RNAi 技术防治害虫的新方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术和农药学领域;更具体地,本发明涉及基于 RNAi 技术防治害虫的新方法。

背景技术

[0002] 亚洲玉米螟 (*Ostrinia furnacalis* Guenée) 和棉铃虫 (*Helicoverpa armigera* Hubner) 是重要世界性农业害虫,亚洲玉米螟主要危害玉米、高粱、向日葵等重要的粮食经济作物,棉铃虫主要危害棉花和蔬菜等 20 多科 200 余种重要农作物。小菜蛾常年危害面积占蔬菜种植总面积的 10% 左右(2010 蔬菜种植面积 3333 万 hm^2 ,小菜蛾发生面积达 253 万 hm^2 ;2009 菜种植面积 3000 万 hm^2 ,小菜蛾发生面积达 270 万 hm^2),造成的损失在 20~30% 左右,如果防治不及时或者措施不合理可能造成绝收。目前对亚洲玉米螟、棉铃虫和小菜蛾的防治,仍然是以化学防治为主,但是其对生态环境及粮食安全生产造成了巨大的损害。化学防治诸多危害已经使得人们不得不寻求更好的害虫治理办法,生物防治虽然可以起到防治作用,但是由于其见效期慢,效果不明显,受环境影响较大而得不到大众认可。

[0003] RNAi 现象自从 1991 年发现以来迅速发展,研究表明,通过特异基因的 RNAi,可以达到定向干涉物种的靶基因,出现某些生理现象,达到研究基因功能的目的,同时,这种现象有着极高的特异性,即同源基因对不同物种起的干涉效果并不明显,因此是一种理想的害虫防治体系。

[0004] 目前,利用 RNAi 技术进行害虫防治已有报道,Baum 等(2007)证明 v-ATPase 对玉米根萤叶甲 (Western corn rootworm WCR *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) 有致死效果,可以用于田间防治;同年,mao 等通过将 P450 的 dsRNA 导入棉花中,可以导致棉铃虫 (cotton bollworm *Helicoverpa armigera*) 死亡;Tian(2009)证实通过饲喂的方法可以导致甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua* (Hübner)) 的死亡,一系列的现有技术都表明, RNAi 技术作为一种新型的害虫防治方法是可行的,但是,之前的研究也表明,基于 RNAi 技术的害虫防治还有很多问题需要解决,如:1) 如何快速高通量的发掘靶标基因;2) 如何简便的应用于田间生产;3) 抗性问题的;4) 安全性问题等等。因此,将 RNAi 技术应用于害虫防治领域,还需要解决上述问题。首先需要获得足够多的、有效的靶标基因,这样,大量的靶标基因通过不同的组合方式,不同的时期使用不同的基因进行防治,可有效地避免害虫抗性的出现。

[0005] 因此,利用 RNAi 技术的害虫防治集中在靶标基因的获得以及如何方便、有效地应用于田间这两个急需解决的问题,本发明旨在为解决这些问题提供途径。此外,本发明还提供了利用同一基因的不同片段,可以获得昆虫种类特异型和种间广谱型的杀虫制剂和方法。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种基于 RNAi 技术防治害虫的新方法。

[0007] 在本发明的第一方面,提供一种分离的多肽,该多肽选自下组:

[0008] (a) SEQ ID NO:2 氨基酸序列的多肽;

[0009] (b) 将 SEQ ID NO:2 氨基酸序列经过一个或多个氨基酸残基的取代、缺失或添加而形成的,且具有 (a) 多肽功能的由 (a) 衍生的多肽。

[0010] 在另一优选例中,该多肽是 SEQ ID NO:2 氨基酸序列的多肽。

[0011] 在本发明的另一方面,提供一种分离的多核苷酸,它包含一核苷酸序列,该核苷酸序列选自下组:

[0012] (a) 编码所述多肽的多核苷酸;

[0013] (b) 与多核苷酸 (a) 互补的多核苷酸。

[0014] 在另一优选例中,该多核苷酸选自下组的一种:

[0015] (1) SEQ ID NO:1 所示序列的多核苷酸;

[0016] (2) SEQ ID NO:1 中第 41-2308 位的序列的多核苷酸;

[0017] (3) 与 (1) 或 (2) 限定的序列在严格条件下杂交的且编码的蛋白与 (1) 或 (2) 的多核苷酸编码的蛋白功能相同的多核苷酸;

[0018] (4) 与 (1) 或 (2) 限定的序列在具有 80% 以上 (较佳地 90% 以上;更佳地 95%;更佳地 98%;更佳地 99%) 的序列相同性且编码的蛋白与 (1) 或 (2) 的多核苷酸编码的蛋白功能相同的多核苷酸。

[0019] 在本发明的另一方面,提供一种载体,它含有所述的多核苷酸。

[0020] 在本发明的另一方面,提供一种遗传工程化的宿主细胞 (较佳地,为非生殖性或繁殖性的细胞),含有所述的载体,或其基因组中整合有所述的多核苷酸。

[0021] 在本发明的另一方面,提供一种多核苷酸片段,所述多核苷酸片段的序列与前面所述的多核苷酸序列具有 10% 以上 (较佳地 15% 以上;更佳地 20%;更佳地 25%;更佳地 30%) 的序列相同性。

[0022] 在另一优选例中,该多核苷酸片段选自下组的一种:

[0023] (i) SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3-5、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:20-21 任一所示序列的多核苷酸;

[0024] (ii) 与 (i) 限定的序列在严格条件下杂交的任一多核苷酸或互补序列,其中包含所述的任一条核苷酸的 dsRNA 被有害生物摄取后,会抑制所述有害生物的生长;

[0025] (iii) 与 (i) 限定的序列具有至少 70% (优选至少 75%、80%、85%、90%,更优选至少 95%、96%、97%、98%、99%) 以上的序列一致性的任一多核苷酸或互补序列,其中包含所述的任一条核苷酸的 dsRNA 被有害生物摄取后,会抑制所述有害生物的生长;

[0026] (iv) 包含 (i) 限定的任一所示序列之至少 17-21 个连续核苷酸的序列或互补序列,其中包含所述的任一条核苷酸的 dsRNA 被有害生物摄取后,会抑制所述有害生物的生长;

[0027] (v) 与 (i) 或 (ii) 或 (iii) 或 (iv) 限定的序列在严格条件下杂交的且编码的蛋白结构域与 (i) 或 (ii) 或 (iii) 的多核苷酸片段编码的蛋白结构域功能相同的多核苷酸片段;

[0028] (vi) 与 (i) 或 (ii) 或 (iii) 或 (iv) 限定的序列在具有 80% 以上 (较佳地 90% 以上;更佳地 95%;更佳地 98%;更佳地 99%) 的序列相同性且编码的蛋白结构域与 (i) 或 (ii)

或 (iii) 的多核苷酸片段编码的蛋白结构域功能相同的多核苷酸片段。

[0029] 在本发明的另一方面,提供一种载体,它含有所述的多核苷酸片段中的一种、二种或多种。

[0030] 在本发明的另一方面,提供一种遗传工程化的宿主细胞,它含有所述的载体,或其基因组中整合有所述的多核苷酸片段中的一种、二种或多种。

[0031] 在本发明的另一方面,提供所述的多核苷酸或多核苷酸片段的用途,用于作为制备特异性干扰有害生物基因表达或抑制有害生物生长的干扰分子的抑制或沉默靶标,所述的有害生物基因选自贮藏蛋白基因;或用于作为制备杀昆虫(如鳞翅目昆虫)的制剂的靶标。

[0032] 在另一优选例中,所述的贮藏蛋白基因选自亚洲玉米螟贮藏蛋白基因或棉铃虫贮藏蛋白基因或小菜蛾贮藏蛋白基因;

[0033] 所述的鳞翅目昆虫选自亚洲玉米螟或棉铃虫或小菜蛾;

[0034] 在本发明的另一方面,提供所述的多肽的用途,用于作为筛选或制备杀昆虫的制剂的靶标。

[0035] 在另一优选例中,所述的制剂选自(但不限于):核酸抑制物,蛋白抑制剂,抗体,配体,蛋白水解酶,蛋白结合分子。

[0036] 在另一优选例中,所述的核酸抑制物选自:

[0037] dsRNA、反义核酸、小干扰 RNA、微小 RNA ;或

[0038] 能表达或形成所述 dsRNA、反义核酸、小干扰 RNA、微小 RNA 的构建物。

[0039] 在本发明的另一方面,提供一种核酸抑制物,选自:

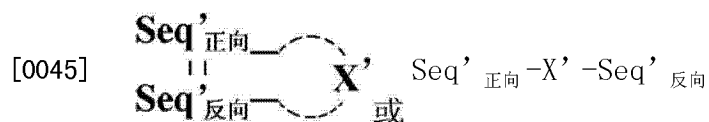
[0040] (1) 以所述的多核苷酸或多核苷酸片段,或它们的转录本为抑制或沉默靶标的 dsRNA、反义核酸、小干扰 RNA、微小 RNA ;其中所述的任一 dsRNA、反义核酸、小干扰 RNA、微小 RNA 被有害生物摄取后,会抑制所述有害生物的生长 ;或

[0041] (2) 以有害生物基因作为抑制或沉默靶标的 dsRNA、反义核酸、小干扰 RNA、微小 RNA,其中所述的任一 dsRNA、反义核酸、小干扰 RNA、微小 RNA 被有害生物摄取后,会抑制所述有害生物的生长,所述的有害生物基因选自贮藏蛋白基因 ;或

[0042] (3) 能表达或形成 (1)、(2) 所述 dsRNA、反义核酸、小干扰 RNA、微小 RNA 的构建物。

[0043] 在另一优选例中,所述的核酸抑制物是所述的多核苷酸表达产生的 dsRNA,其中所述 dsRNA 被有害生物摄取后,会抑制所述有害生物的生长。

[0044] 在另一优选例中,所述的核酸抑制物是 dsRNA,其具有如下结构:



[0046] 其中,

[0047] Seq'正向是与权利要求 2 或 3 任一所述的多核苷酸所对应的 RNA 序列或它们的序列片段,或包含与选自权利要求 2 或 3 中所限定序列的核苷酸序列之至少一部分互补的核苷酸序列所对应的 RNA 序列;

[0048] Seq'反向为与 Seq'正向基本上互补的序列;

[0049] X' 为无 ;或为位于 Seq'正向和 Seq'反向之间的间隔序列,所述间隔序列与 Seq'正向

和 Seq'_{反向} 不互补；

[0050] || 表示在 Seq'_{正向} 和 Seq'_{反向} 之间形成的氢键。

[0051] 在另一优选例中,所述的核酸抑制物是构建物,所述构建物含有以下结构：

[0052] Seq_{正向}-X-Seq_{反向}；

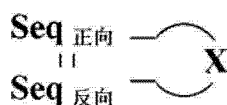
[0053] 其中,Seq_{正向} 是权利要求 2 或 3 任一所述的多核苷酸或它们的序列片段,或包含与选自权利要求 2 或 3 中所限定序列的核苷酸序列之至少一部分互补的核苷酸序列；

[0054] Seq_{反向} 为与 Seq_{正向} 基本上互补的序列；

[0055] X 为位于 Seq_{正向} 和 Seq_{反向} 之间的间隔序列,并且所述间隔序列与 Seq_{正向} 和 Seq_{反向} 不互补。

[0056] 在另一优选例中,所述的构建物可形成以下结构：

[0057]



[0058] 其中,

[0059] Seq_{正向}、Seq_{反向} 和 X 的定义如上述,

[0060] || 表示在 Seq_{正向} 和 Seq_{反向} 之间形成的氢键。

[0061] 在另一优选例中,所述的构建物是表达载体(质粒)。

[0062] 在另一优选例中,所述的多核苷酸或多核苷酸片段可作为抑制该多核苷酸的 mRNA 转录或抑制该多核苷酸编码的多肽的表达的靶标。

[0063] 在另一优选例中,所述的多核苷酸或多核苷酸片段可作为制备杀昆虫的制剂的靶标。

[0064] 在本发明的另一方面,提供一种宿主细胞(如细菌、真菌、酵母、植物细胞),其包含所述的核酸抑制物(如所述的构建物)。

[0065] 在本发明的另一方面,提供所述的核酸抑制物或所述的宿主细胞的用途,用于制备防治昆虫的制剂。

[0066] 在本发明的另一方面,提供一种防治昆虫的制剂(如农药制剂或农药组合物),其包含:安全有效量选自以下的物质:所述的核酸抑制物(如 10-500 μg/mL)或所述的宿主细胞;以及;农药学上可接受的载体。

[0067] 在另一优选例中,其还包含至少一种选自以下的杀虫剂:化学杀虫剂、马铃薯糖蛋白、苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白、致病杆菌杀虫蛋白、光杆状菌杀虫蛋白、侧孢芽孢杆菌杀虫蛋白和球形芽孢杆菌杀虫蛋白。

[0068] 在本发明的另一方面,提供一种防治有害生物的方法,干扰有害生物基因表达,所述的有害生物基因选自贮藏蛋白基因。

[0069] 在另一优选例中,所述方法包括:将权利要求 7-10 任一所述的核酸抑制物或权利要求 5 或 11 所述的宿主细胞喂食和/或喷洒有害生物。

[0070] 在本发明的另一方面,提供一种杀灭昆虫的方法,所述方法包括:降低所述昆虫中所述的多肽的表达;或降低所述昆虫中所述的多核苷酸或多核苷酸片段相应的 mRNA 的转录。

[0071] 在另一优选例中,提供所述方法包括:将所述的核酸抑制物或所述的宿主细胞施

用于（如喷洒）需要防治的对象（如植物，特别是被昆虫侵害的植物；或昆虫）。

[0072] 在本发明的另一方面，提供将所述的核酸抑制物或所述的宿主细胞喂食昆虫或喷洒昆虫。

[0073] 在另一优选例中，所述方法包括：在植物体内表达特异性干扰有害生物基因表达的干扰分子；所述的昆虫基因选自贮藏蛋白基因。

[0074] 在本发明的另一方面，提供一种制备抗昆虫的植物的方法，所述方法包括：将所述的核酸抑制物导入到植物中。

[0075] 在本发明的另一方面，提供一种植物或其种子，所述植物由所述的多核苷酸转化获得。

[0076] 在另一优选例中，所述多核苷酸在植物细胞中表达为 dsRNA。

[0077] 在另一优选例中，所述有害生物是选自：昆虫、螨、真菌、酵母、霉菌、细菌、线虫、杂草和寄生虫以及腐生植物。

[0078] 在另一优选例中，所述的有害生物是昆虫，包括但不限于：鳞翅目昆虫、鞘翅目昆虫、半翅目昆虫、以及双翅目昆虫。

[0079] 在另一优选例中，所述的昆虫有害生物选自鳞翅目昆虫，优选为玉米螟或棉铃虫或小菜蛾。

[0080] 在本发明的另一方面，提供一种制备抗昆虫的植物的方法，所述方法包括：将所述的核酸抑制物导入到植物中。

[0081] 在另一优选例中，所述制备抗昆虫的植物的方法是：

[0082] (1) 提供携带表达载体的农杆菌，所述的表达载体含有所述的核酸抑制物；

[0083] (2) 将植物细胞或组织或器官与步骤 (1) 中的农杆菌接触，从而使所述的核酸抑制物转入植物细胞或组织或器官。

[0084] 在另一优选例中，所述制备抗昆虫的植物的方法还包括：

[0085] (3) 选择出转入了所述的核酸抑制物的植物细胞或组织或器官；和

[0086] (4) 将步骤 (3) 中的植物细胞或组织或器官再生成植物。

[0087] 在另一优选例中，昆虫食用所述的抗昆虫的植物后，存活率显著下降或死亡。

[0088] 本发明的其它方面由于本文的公开内容，对本领域的技术人员而言是显而易见的。

附图说明

[0089] 图 1、不同结构域 dsRNA 处理亚洲玉米螟后不同时间的致死效率。其中，EYFP 为增强型黄色荧光蛋白基因，作为外源基因对照。CK 为空白对照，为正常人工饲养的亚洲玉米螟。

[0090] 图 2、不同结构域 dsRNA 处理棉铃虫后不同时间的致死效率。

[0091] 图 3、亚洲玉米螟 OfSP 基因与其它鳞翅昆虫基因的同源比对结果。其中，*Trichoplusia ni*：粉纹夜蛾；*Hyalophora cecropia*：刻克罗普斯蚕蛾；*Choristoneura fumiferana*：云杉卷叶蛾；*Helicoverpa zea*：谷实夜蛾；*Helicoverpa armigera*：棉铃虫；*Sesamia nonagrioides*：粉茎螟；*Omphisa fuscidentalis*：竹蠹螟；*Hyphantria cunea*：美国白蛾；*Plodia interpunctella*：印度谷螟；*Plutella xylostella*：小菜蛾；*Spodoptera*

litura:斜纹夜蛾;Ostrinia furnacalis:亚洲玉米螟。

[0092] 图 4、dsSP-N、dsSP-M、dsSP-C 的电泳鉴定结果。其中 M 为分子量标记。

[0093] 图 5、dsSP-C 施用于亚洲玉米螟 1 龄幼虫后第 0、1、3、5 天 (d) 的基因表达情况。其中, CK 为空白对照。

[0094] 图 6、不同结构域 dsRNA 处理亚洲玉米螟后不同时间的致死效率。其中, EYFP 为增强型黄色荧光蛋白基因, 作为外源基因对照。CK 为空白对照, 为正常人工饲养的亚洲玉米螟。

[0095] 图 7、经 dsSP 喷洒处理后的玉米螟幼虫不能正常化蛹。

[0096] 图 8、经 dsSP 喷洒处理后的玉米螟成虫不能正常产卵。

[0097] 图 9、经 dsSP 喷洒处理后的棉铃虫幼虫不能正常化蛹。

[0098] 图 10、经 dsSP 喷洒处理后的棉铃虫成虫不能正常产卵。

[0099] 图 11、棉铃虫自己 SP 基因的 dsRNA 对棉铃虫的致死率。

[0100] 图 12、玉米螟及小菜蛾自己的 SP 基因的 dsRNA 对小菜蛾的致死率。

[0101] 图 13、pART27-dsRNA 载体的示意图。

具体实施方式

[0102] 本发明人经过广泛的研究, 找到了一个对于防治鳞翅目昆虫有用的靶标基因, 基于该靶标基因的核酸序列制备核酸抑制物或表达核酸抑制物的宿主, 可有效地杀灭鳞翅目昆虫。

[0103] 术语

[0104] 如本文所用, “分离的”是指物质从其原始环境中分离出来 (如果是天然物质, 原始环境即是天然环境)。如活体细胞内的天然状态下的多聚核苷酸和多肽是没有分离纯化的, 但同样的多聚核苷酸或多肽如从天然状态中同存在的其他物质中分开, 则为分离纯化的。本领域的技术人员能用标准的蛋白质纯化技术纯化蛋白。基本上纯的多肽在非还原聚丙烯酰胺凝胶上能产生单一的主带。

[0105] 如本文所用, 所述的“植物”没有特别的限制, 只要所述“植物”是易于被昆虫 (如鳞翅目昆虫) 侵害的, 如各种农作物、花卉植物、或林业植物等。所述的植物比如可以是 (不限于): 双子叶植物、单子叶植物、或裸子植物。更具体地, 所述的植物包括 (但不限于): 棉花、小麦、大麦、黑麦、水稻、玉米、高粱、甜菜、苹果、梨、李、桃、杏、樱桃、草莓、木莓、黑莓、豆、扁豆、豌豆、大豆、油菜、芥、罂粟、齐墩果、向日葵、椰子、蓖麻油植物、可可豆、花生、葫芦、黄瓜、西瓜、亚麻、大麻、黄麻、柑桔、柠檬、葡萄柚、菠菜、苘苳、芦笋、洋白菜、大白菜、小白菜、胡萝卜、洋葱、土豆、西红柿、青椒、鳄梨、桂皮、樟脑、烟叶、坚果、咖啡、茄子、甘蔗、茶叶、胡椒、葡萄树、蚝麻草、香蕉、天然橡胶树和观赏植物等。

[0106] 如本文所用, 所述的“昆虫”是指任何基因组中包括有贮藏蛋白基因的昆虫。较佳地, 所述昆虫可以是一种能以植物为食的植食性昆虫, 比如其可以是弹尾目、等翅目、鞘翅目、双翅目、膜翅目、鳞翅目、直翅目、半翅目、缨翅目的昆虫或农业害虫, 具体例如是长翅卷蛾属种、褐带卷蛾属、透翅蛾属、地老虎属、棉叶波纹夜蛾、黎豆夜蛾、黄卷蛾属、带卷蛾属、夜蛾属、玉米楷夜蛾、粉斑螟、桃蛀果蛾、螟属、色卷蛾属、葡萄果蠹蛾、卷叶螟属、云卷蛾属、鞘蛾属、苹果异型小卷蛾、卷叶蛾属、玉米螟属、展叶松夜蛾、金刚钻属、粉螟属、花小

卷蛾属、黄毒蛾属、切根虫属、食心虫属、广翅小卷蛾、夜蛾属、菜蛾、美国白蛾、番茄蠹蛾、旋纹潜叶蛾、细蛾属、毒蛾属、潜叶蛾属、天幕毛虫属、甘蓝夜蛾、烟草天蛾、尺蠖属、欧洲玉米螟、超小卷蛾属、小眼夜蛾、红铃虫、棉铃虫、马铃薯块茎蛾菜粉蝶、粉蝶属、小菜蛾、巢蛾属、白野螟属、大螟属、卷叶蛾属、粘虫属、透翅蛾属、带蛾属、卷蛾属、粉纹夜蛾、树巢蛾属、叩甲属、象甲属、甜菜隐食甲、甜菜茎跳甲、谷象属、实象属、皮蠹属、叶甲属、瓢虫属、马铃薯甲虫、稻象甲属、金龟属、谷盗属、耳喙象属、丽金龟属、跳甲属、蠹属、金龟子、米象属、麦蛾属、粉甲属、拟谷盗属、斑皮蠹属、非蠨属、蠨属、蝼蛄属、马得拉非蠨、飞蝗属、大蠨属、蚱蜢属、白蚁属、蓟马属、条蓟马属、单蓟马属、棕黄蓟马、棉蓟马、非洲桔硬蓟马。更佳地,所述的“昆虫”是对植物有害的昆虫,中国专利申请号为 200680042821.5 的专利申请文本及 US 2009/0306189 A1, WO 2007/080127 A2, AU 2006/335978 A1, US 2009/0285784 A1 的申请文本作为发明的参考文献, CN101365795 中 41-47 页对于昆虫的描述可以纳入本发明的说明书内容。

[0107] 如本文所用,所述的“鳞翅目昆虫”是指任何基因组中包括有 SEQ ID NO:3-5、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:20-21 任一所示的基因(片段)序列或其同源基因或与其杂交的基因的鳞翅目昆虫,且这些基因在所述的昆虫中作为该昆虫生长或生存所必需的基因。所述的鳞翅目包括蛾(moths),实例包括:谷蛾科(Tineidae)和织蛾科(Oecophoridae)比如衣蛾(*Tineola bisselliella*)(普通衣蛾(Common Clothes Moth)),和螟蛾科(Pyralidae)比如紫斑谷螟(*Pyralis farinalis*)(膳食飞蛾(Meal Moth)),亚洲玉米螟,和夜蛾科比如棉铃虫,和菜蛾科比如小菜蛾等。

[0108] 如本文所用,术语“RNA 干扰(RNA interference, RNAi)”是指一些 RNA 可以高效、特异地阻断体内特定基因的表达,促使 mRNA 降解,诱使细胞表现出特定基因缺失的表型,其也称为 RNA 干预或者干涉。RNA 干扰是高度特异的在 mRNA 水平上的基因沉默机制。

[0109] 如本文所用,术语“干扰 RNA”或“dsRNA”是指一种 RNA 分子,能够以同源互补序列的 mRNA 为靶目标降解特定的 mRNA,这个过程就是 RNA 干扰途径(RNA interference pathway)。

[0110] 如本文所用,“基本上互补”是指核苷酸的序列是足够互补的,可以以一种可预见的方式发生相互作用,如形成二级结构(如茎环结构)。通常,两条“基本上互补”的核苷酸序列互相之间至少有 70% 的核苷酸是互补的;优选的,至少有 80% 的核苷酸是互补的;更优选的,至少有 90% 的核苷酸是互补的;进一步优选的,至少有 95% 的核苷酸是互补的;如 98%、99% 或 100%。一般地,两条足够互补的分子之间可以具有最多 7 个不匹配的核苷酸;优选的,具有最多 6 个不匹配的核苷酸;更优选的,具有最多 5 个不匹配的核苷酸;进一步优选的,具有最多 4 个不匹配的核苷酸,如具有 0、1、2、3、4 个不匹配的核苷酸。

[0111] 如本文所用,“互补”的序列通常是指将 5'-3' 方向的序列转换为其 3'-5' 方向的序列(如 5' ATCG 3' → GCTA),然后再取其互补序列(如 GCTA → 5' CGAT 3')。

[0112] 如本文所用,“茎环”结构也被称作“发夹”结构,是指一种核酸分子,其可形成一种包括双链区域(茎部)的二级结构,所述的双链区域由该核酸分子的两个区域(位于同一分子上)形成,两个区域分列双链部分的两侧;其还包括至少一个“环”结构,包括非互补的核酸分子,即单链区域。即使该核酸分子的两个区域不是完全互补的,核酸的双链部分也可保持双链状态。例如,插入、缺失、取代等可导致一个小区域的不互补或该小区域自身形成

茎环结构或其它形式的二级结构,然而,该两个区域仍可基本上互补,并在可预见的方式中发生相互作用,形成茎环结构的双链区域。茎环结构是本领域技术人员所熟知的,通常在获得了一条具有一级结构的核苷酸序列的核酸后,本领域技术人员能够确定该核酸是否能形成茎环结构。

[0113] 如本文所用,所述的“核酸抑制物”是指基于本发明的对于防治鳞翅目昆虫有用的靶标基因或其片段或截短形式制备获得的、具有防治鳞翅目昆虫活性的一类物质的总称。所述的“核酸抑制物”例如是一些干扰分子,包括 dsRNA(又称为,双链 RNA、双链核糖核酸或双链核糖核苷酸序列)、反义核酸、小干扰 RNA、微小 RNA 等,或是可以表达或形成所述 dsRNA、反义核酸、小干扰 RNA 或微小 RNA 的构建物。

[0114] 如本文所用,所述的“可操作(性)地连接”或“操作性连接”是指两个或多个核酸区域或核酸序列的功能性的空间排列。例如:启动子区被置于相对于目的基因核酸序列的特定位置,使得核酸序列的转录受到该启动子区域的引导,从而,启动子区域被“可操作地连接”到该核酸序列上。

[0115] 如本文所用,“与多核苷酸(或 DNA)序列对应的 RNA 序列”是指一种 RNA 序列,若 DNA 序列是“AT”则 RNA 序列是“AU”。

[0116] 如本文所用,所述的“含有”,“具有”或“包括”包括了“包含”、“主要由……构成”、“基本上由……构成”、和“由……构成”;“主要由……构成”、“基本上由……构成”和“由……构成”属于“含有”、“具有”或“包括”的下位概念。

[0117] 贮藏蛋白及其编码基因

[0118] 为了寻找对于防治有害生物有用的靶标基因,本发明人经过了广泛而深入的研究,最终找到了本发明的靶标基因,所述的靶标基因为贮藏蛋白基因。

[0119] 贮藏蛋白(SP)是属于六聚体蛋白家族的其中一种,昆虫中的 sp 相关基因一般具有 cylindrical structures,由 7-8 个约 50KD 的 polypeptide chains 组成的结构;有 1 个铜结合位点,根据氨基酸结构又可分为富含蛋氨酸(>4% methionine)的贮藏蛋白和富含芳香基的氨基酸(>15% aromatic amino)的贮藏蛋白,与富含芳香基氨基酸的 sp 相比,富含蛋氨酸的 sp 不含有糖基化位点,不同物种序列一致性在 40%-90% 之间(40% 序列一致性被认为是同源较高)。

[0120] 本发明人深入研究后发现,来自昆虫的贮藏蛋白基因(例如玉米螟 OfSP 基因、棉铃虫 H. arm SP,小菜蛾 PxSP1、PxSP2)是昆虫发育或生长相关的关键基因,这些基因的表达下调或抑制可以导致昆虫生长发生问题(例如化蛹异常或产的卵不能孵化)或死亡。

[0121] 以上述基因作为抑制或沉默靶标,可制备特异性干扰分子,抑制玉米螟或棉铃虫或小菜蛾生长发育。上述基因还可以是来自其它生物,所述基因的功能已被建立于文献中,其核苷酸序列与玉米螟基因具有高度同源性或其基因功能与玉米螟基因功能相似,可预见这些高度同源基因或功能相似基因可作为靶标,制备特异性干扰分子,抑制其他生物的生长。

[0122] 本文中使用的术语“高度同源”或者“高度同源性”,在提到核酸序列时,表示在严谨条件下与 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18-19 任何序列或其互补序列能杂交的核苷酸序列。在严谨条件下与 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18-19 或其互补序列能杂交的序列,是允许两条序列间发生反平行比对的序列,然后两条序列能在严谨条件下

以相反链上的对应碱基形成氢键,以形成二体分子,其在严谨条件下是足够稳定的,使用本领域公知方法能探测到。优选地,此类高度同源的序列与 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18-19 任何序列所示的对照核苷酸序列或其互补序列具有大约 40% 至大约 50% 的序列一致性,或者优选地,大约 65% 至大约 70% 的序列一致性,或者更优选地,大约 80% 至大约 85% 的序列一致性,或者最优选地,大约 90% 至大约 95% 的序列一致性,至大约 99% 的序列一致性。

[0123] 用于确定序列一致性的方法是本领域常规的,其包括使用 Blast 软件和 EMBOSS 软件(The European Molecular Biology Open Software Suite(2000), Rice, P. Longden, I. and Bleasby, A. Trends in Genetics 16, (6) pp276-277)。本文使用的术语“一致性”是指序列之间在核苷酸水平上的关系。通过在比较窗中对最优比对的序列(例如,两条或更多)进行比较来确定“一致性百分比”,其中所述比较窗中的序列部分与最优序列比对的参考序列相比可包含插入或缺失。所述参考序列不包含插入或缺失。所述参考窗选自至少 10 个连续核苷酸至约 50、约 100 或者至约 150 个核苷酸,优选约 50 ~ 150 个核苷酸。然后,通过测定所述窗中的序列之间一致的核苷酸数目并将该数目除以所述窗中的核苷酸数并乘以 100 来计算“一致性百分比”。

[0124] 针对上述靶基因,本发明人进一步研究了可有效下调这些靶基因的靶标基因片段,最终找到了 6 个靶标基因片段,它们的核苷酸序列选自 SEQ ID NO:3-5、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:20-21 任一所示的序列。

[0125] 所述的靶标基因(片段)的片段或截短形式也包括在本发明中,只要这些片段或截短形式在被用于制备所述的核酸抑制物后,该核酸抑制物也具有杀灭鳞翅目昆虫的活性。

[0126] 本发明人意外地发现,这些靶标基因片段或它们的截短体在昆虫体内发挥着重要的作用,它们被抑制、干扰或沉默将导致昆虫存活率的显著下降或直接死亡。因此,可基于这些靶标基因片段来设计各种核酸抑制物,从而用于害虫的防治。

[0127] 本发明还提供了一个多核苷酸集(集合),所述多核苷酸集包括 SEQ ID NO:3-5、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:20-21 所示的序列。当需要制备防治鳞翅目昆虫的核酸抑制物(如构建物或 dsRNA)或其制剂时,可从所述的多核苷酸集中获取 1-6 条多核苷酸。可基于多个多核苷酸的序列(较佳地,例如是 6)来分别制备核酸抑制物或表达核酸抑制物的宿主,当同时(或混合)应用时,可达到更为广谱、更为有效的杀灭鳞翅目昆虫的效果。

[0128] 核酸抑制物

[0129] 任何基于本发明提供的靶标基因(片段)或其片段或截短形式制备获得的、具有防治鳞翅目昆虫活性的物质都可作为核酸抑制物,用于防治鳞翅目昆虫。所述等核酸抑制物较佳的是一些干扰分子,例如,dsRNA、反义核酸、小干扰 RNA 或微小 RNA 的构建物,或可以表达或形成所述 dsRNA、反义核酸、小干扰 RNA 或微小 RNA 的构建物。更佳地是 dsRNA 或可以表达所述 dsRNA 的构建物。

[0130] 根据本发明所提供的基因及其序列,可设计出用于表达 dsRNA、反义核酸、小干扰 RNA 或微小 RNA 的构建物。因此,本发明提供了一种人工构建的构建物。根据本发明提供的基因及其序列来设计所述的构建物是本领域技术人员可了解的,通常可使该构建物包含一个内含子序列(与两侧序列不互补),两端连接上互补的基因序列,导入细胞后,能产生“茎

环”结构,并且“茎”状部分能够形成 dsRNA、反义核酸、小干扰 RNA 或微小 RNA,这种 dsRNA、反义核酸、小干扰 RNA 或微小 RNA 能特别有效的抑制目的基因的表达。

[0131] 作为本发明的一种优选方式,所述的构建物含有至少一个如下所示的结构:

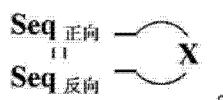
[0132] $\text{Seq}_{\text{正向}} - \text{X} - \text{Seq}_{\text{反向}}$

[0133] 其中, $\text{Seq}_{\text{正向}}$ 的核苷酸序列选自权利要求 2 或 3 任一所示的序列或序列片段, $\text{Seq}_{\text{正向}}$ 与 $\text{Seq}_{\text{反向}}$ 为基本上互补的核苷酸序列;

[0134] X 为位于 $\text{Seq}_{\text{正向}}$ 和 $\text{Seq}_{\text{反向}}$ 之间的间隔序列,并且所述间隔序列与 $\text{Seq}_{\text{正向}}$ 和 $\text{Seq}_{\text{反向}}$ 不互补;

[0135] 式 I 所示的结构在可形成如下所示的二级结构:

[0136]



[0137] 该结构可进一步被剪切、加工形成双链形式的干扰分子,从而发挥基因沉默的作用。

[0138] 所述的构建物可以制备成可形成多于 1 个茎环结构的形式,例如,可以包含 2 个或 2 个以上的茎环结构。

[0139] 通常,所述的构建物位于表达载体上。因此,本发明还包括一种载体,它含有所述的构建物。所述的表达载体通常还含有与所述的构建物操作性相连的启动子、复制起点和/或标记基因等。本领域的技术人员熟知的方法能用于构建本发明所需的表达载体。这些方法包括体外重组 DNA 技术、DNA 合成技术、体内重组技术等。所述的表达载体优选地包含一个或多个选择性标记基因,以提供用于选择转化的宿主细胞的表型性状,如卡那霉素、庆大霉素、潮霉素、氨苄青霉素抗性。

[0140] 包含上述的适当基因序列以及适当启动子或者控制序列的载体,可以用于转化适当的宿主。在本发明的方法中,所述的宿主可以是任何适合于携带所述表达载体并能够表达出核酸抑制物的宿主。例如,所述的宿主为大肠杆菌,真菌,酵母,植物细胞,动物细胞等。

[0141] 用重组 DNA 转化宿主可用本领域技术人员熟知的常规技术进行,具体视植物种类的不同而定。当宿主为原核生物如大肠杆菌时,能吸收 DNA 的感受态细胞可在指数生长期后收获,用 CaCl_2 法处理,所用的步骤在本领域众所周知。另一种方法是使用 MgCl_2 。如果需要,转化也可用电穿孔的方法进行。真菌和酵母细胞、植物细胞、动物细胞的转化也是本领域技术人员熟知的。

[0142] 携带所述构建物或表达载体并能够表达出核酸抑制物的宿主能够直接施用于需要防治的对象(如植物),以达到防治鳞翅目昆虫的目的。

[0143] 以上所述的茎环结构的“茎”状部分即由 $\text{Seq}_{\text{正向}}$ 和 $\text{Seq}_{\text{反向}}$ 相互作用形成,可被加工形成核酸抑制物。所形成的核酸抑制物具有如下结构:

[0144]



[0145] 其中, $\text{Seq}'_{\text{正向}}$ 选自权利要求 2 或 3 任一所示序列对应的 RNA 序列或序列片段; $\text{Seq}'_{\text{反向}}$ 为与 $\text{Seq}'_{\text{正向}}$ 基本上互补的序列。X' 为位于 $\text{Seq}'_{\text{正向}}$ 和 $\text{Seq}'_{\text{反向}}$ 之间的间隔序列,所述间

隔序列与 Seq'_{正向}和 Seq'_{反向}不互补。X'序列可在体外进行切除,也可不进行切除,待 dsRNA 进入昆虫体内后由昆虫体内的酶(如核酸酶 Dicer)加工切除。

[0146] 所述的核酸抑制物可直接施用于需要防治的对象(如植物),以达到防治鳞翅目昆虫的目的。

[0147] 本发明的多肽(蛋白)可以是重组多肽、天然多肽、合成多肽,优选的是重组多肽。本发明的多肽可以是天然纯化的产物,或是化学合成的产物,或使用重组技术从原核或真核宿主(例如,植物、细菌、酵母、昆虫细胞)中产生。根据重组生产方案所用的宿主,本发明的多肽可以是糖基化的,或可以是非糖基化的。本发明的多肽还可包括或不包括起始的甲硫氨酸残基。

[0148] 本发明还包括贮藏蛋白 2 的片段、衍生物和类似物。如本文所用,术语“片段”、“衍生物”和“类似物”是指基本上保持本发明的贮藏蛋白 2 相同的生物学功能或活性的多肽。本发明的多肽片段、衍生物或类似物可以是(i)有一个或多个保守或非保守性氨基酸残基(优选保守性氨基酸残基)被取代的多肽,而这样的取代的氨基酸残基可以是也可以不是由遗传密码编码的,或(ii)在一个或多个氨基酸残基中具有取代基团的多肽,或(iii)成熟多肽与另一个化合物(比如延长多肽半衰期的化合物,例如聚乙二醇)融合所形成的多肽,或(iv)附加的氨基酸序列融合到此多肽序列而形成的多肽(如前导序列或分泌序列或用来纯化此多肽的序列或蛋白原序列,或融合蛋白)。根据本文的定义这些片段、衍生物和类似物属于本领域熟练技术人员公知的范围。

[0149] 在本发明中,术语“贮藏蛋白 2”指 SEQ ID NO:2 序列的多肽或其变异形式。这些变异形式包括(但并不限于):若干个(通常为 1-50 个,较佳地 1-30 个,更佳地 1-20 个,最佳地 1-10 个,还更佳如 1-8 个或 1-5 个)氨基酸的缺失、插入和/或取代,以及在 C 末端和/或 N 末端添加或缺失一个或数个(通常为 20 个以内,较佳地为 10 个以内,更佳地为 5 个以内)氨基酸。例如,在本领域中,用性能相近或相似的氨基酸进行取代时,通常不会改变蛋白质的功能。又比如,在 C 末端和/或 N 末端添加或减少一个或数个氨基酸通常也不会改变蛋白质的功能。该术语还包括贮藏蛋白 2 的活性片段和活性衍生物。

[0150] 多肽的变异形式包括:同源序列、保守性变异体、等位变异体、天然突变体、诱导突变体、在高或低的严紧度条件下能与贮藏蛋白 2DNA 杂交的 DNA 所编码的蛋白等。本发明还提供了其他多肽,如包含贮藏蛋白 2 或其片段的融合蛋白。除了几乎全长的多肽外,本发明还包括了贮藏蛋白 2 的可溶性片段。通常,该片段具有贮藏蛋白 2 序列的至少约 20 个连续氨基酸,通常至少约 30 个连续氨基酸,较佳地至少约 50 个连续氨基酸,更佳地至少约 80 个连续氨基酸,最佳地至少约 100 个连续氨基酸。

[0151] 本发明还提供贮藏蛋白 2 或多肽的类似物。这些类似物与天然贮藏蛋白 2 的差别可以是氨基酸序列上的差异,也可以是不影响序列的修饰形式上的差异,或者兼而有之。这些多肽包括天然或诱导的遗传变异体。诱导变异体可以通过各种技术得到,如通过辐射或暴露于诱变剂而产生随机诱变,还可通过定点诱变法或其他已知分子生物学的技术。类似物还包括具有不同于天然 L-氨基酸的残基(如 D-氨基酸)的类似物,以及具有非天然存在的或合成的氨基酸(如 β 、 γ -氨基酸)的类似物。应理解,本发明的多肽并不限于上述例举的代表性的多肽。

[0152] 修饰(通常不改变一级结构)形式包括:体内或体外的多肽的化学衍生形式如乙

酰化或羧基化。修饰还包括糖基化。修饰形式还包括具有磷酸化氨基酸残基（如磷酸酪氨酸，磷酸丝氨酸，磷酸苏氨酸）的序列。还包括被修饰从而提高了其抗蛋白水解性能或优化了溶解性能的多肽。

[0153] 在本发明中，“贮藏蛋白 2 保守性变异多肽”指与 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列相比，有至多 20 个，较佳地至多 10 个，更佳地至多 5 个，最佳地至多 3 个氨基酸被性质相似或相近的氨基酸所替换而形成多肽。这些保守性变异多肽最好根据表 1 进行氨基酸替换而产生。

[0154] 本发明所述的贮藏蛋白 2 在昆虫体内的表达被降低后，昆虫的存活率可显著降低，可以用于筛选或制备杀昆虫的制剂的靶标，因此，基于该靶标蛋白，可设计出多种的杀虫制剂，例如蛋白抑制剂，其可在被施用于防治对象后，起到杀灭昆虫的作用。

[0155] 所述的靶标蛋白或其片段或其变异体也包括在本发明中，只要这些片段或变异体在被用于制备所述的蛋白抑制物后，该蛋白抑制物也具有杀灭鳞翅目昆虫的活性。

[0156] 表 1

[0157]

氨基酸残基	代表性的取代	优选的取代
Ala(A)	Val ;Leu ;Ile	Val
Arg(R)	Lys ;Gln ;Asn	Lys
Asn(N)	Gln ;His ;Lys ;Arg	Gln
Asp(D)	Glu	Glu
Cys(C)	Ser	Ser
Gln(Q)	Asn	Asn
Glu(E)	AsD	AsD
Gly(G)	Pro ;Ala	Ala
His(H)	Asn ;Gln ;Lys ;Arg	Arg
Ile(I)	Leu ;Val ;Met ;Ala ;Phe	Leu
Leu(L)	Ile ;Val ;Met ;Ala ;Phe	Ile
Lys(K)	Arg ;Gln ;Asn	Arg
Met(M)	Leu ;Phe ;Ile	Leu
Phe(F)	Leu ;Val ;Ile ;Ala ;Tyr	Leu
Pro(P)	Ala	Ala

Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr ;Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp ;Phe ;Thr ;Ser	Phe
Val (V)	Ile ;Leu ;Met ;Phe ;Ala	Leu

[0158] 本发明还提供了编码本发明贮藏蛋白 2 或其保守性变异多肽的多核苷酸。

[0159] 本发明的多核苷酸可以是 DNA 形式或 RNA 形式。DNA 形式包括 cDNA、基因组 DNA 或人工合成的 DNA。DNA 可以是单链的或是双链的。DNA 可以是编码链或非编码链。编码成熟多肽的编码区序列可以与 SEQ ID NO :1 所示的编码区序列相同或者是简并的变异体。如本文所用,“简并的变异体”在本发明中是指编码具有 SEQ ID NO :2 序列的蛋白,但与 SEQ ID NO :1 所示的编码区序列有差别的核酸序列。

[0160] 编码 SEQ ID NO :2 的成熟多肽的多核苷酸包括:只编码成熟多肽的编码序列;成熟多肽的编码序列和各种附加编码序列;成熟多肽的编码序列(和任选的附加编码序列)以及非编码序列。

[0161] 术语“编码多肽的多核苷酸”可以是包括编码此多肽的多核苷酸,也可以是还包括附加编码和/或非编码序列的多核苷酸。

[0162] 本发明还涉及上述多核苷酸的变异体,其编码与本发明有相同的氨基酸序列的多肽或多肽的片段、类似物和衍生物。此多核苷酸的变异体可以是天然发生的等位变异体或非天然发生的变异体。这些核苷酸变异体包括取代变异体、缺失变异体和插入变异体。如本领域所知的,等位变异体是一个多核苷酸的替换形式,它可能是一个或多个核苷酸的取代、缺失或插入,但不会从实质上改变其编码的多肽的功能。

[0163] 来源于本发明的靶标基因的较短的片段也被包含在本发明中,作为设计核酸抑制物的基础。本领域人员均了解,一些较短的序列也可用于作为核酸抑制物,例如一些 siRNA 序列往往仅有 18bp。本发明还涉及与上述的序列杂交且两个序列之间具有至少 15%;较佳地至少 18%,更佳地至少 25%,更佳地至少 50%,更佳地至少 70%,更佳地至少 80%,更佳地至少 90%,更佳地至少 95%,更佳地至少 98%,更佳地至少 99%相同性的多核苷酸。本发明特别涉及在严格(严紧)条件下与本发明所述多核苷酸可杂交的多核苷酸。在本发明中,“严格(严紧)条件”是指:(1) 在较低离子强度和较高温度下的杂交和洗脱,如 0.2×SSC, 0.1% SDS, 60℃;或(2) 杂交时加有变性剂,如 50% (v/v) 甲酰胺,0.1% 小牛血清 /0.1% Ficoll, 42℃等;或(3) 仅在两条序列之间的相同性至少在 80%以上,较好至少 90%以上,更好是 95%以上时才发生杂交。并且,可杂交的多核苷酸编码的多肽与 SEQ ID NO :2 所示的成熟多肽有相同的生物学功能和活性。

[0164] 本发明还涉及与上述的序列杂交的核酸片段。如本文所用,“核酸片段”的长度至少含 15 个核苷酸,较好是至少 30 个核苷酸,更好是至少 50 个核苷酸,最好是至少 100 个核苷酸以上。核酸片段可用于核酸的扩增技术(如 PCR)以确定和/或分离编码贮藏蛋白 2 的多核苷酸。

[0165] 本发明的编码贮藏蛋白 2 的核苷酸全长序列或其片段通常可以用 PCR 扩增法、重组法或人工合成的方法获得。对于 PCR 扩增法,可根据本发明所公开的有关核苷酸序列,尤其是开放阅读框序列来设计引物,并用市售的 cDNA 库或按本领域技术人员已知的常规方法所制备的 cDNA 库作为模板,扩增而得有关序列。当序列较长时,常常需要进行两次或多次 PCR 扩增,然后再将各次扩增出的片段按正确次序拼接在一起。

[0166] 一旦获得了有关的序列,就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体,再转入细胞,然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。

[0167] 此外,还可用人工合成的方法来合成有关序列,尤其是片段长度较短时。通常,通过先合成多个小片段,然后再进行连接可获得序列很长的片段。

[0168] 目前,已经可以完全通过化学合成来得到编码本发明蛋白(或其片段,或其衍生物)的 DNA 序列。然后可将该 DNA 序列引入本领域中已知的各种现有的 DNA 分子(或如载体)和细胞中。此外,还可通过化学合成将突变引入本发明蛋白序列中。

[0169] 本发明上述的编码贮藏蛋白 2 的多核苷酸可用于作为制备杀虫制剂的靶标基因。本发明人发现,本发明的靶标基因或其片段在昆虫体内发挥着重要的作用,它们被抑制、干扰或沉默将导致昆虫存活率的显著下降或直接死亡。因此,基于该靶标基因,可设计出多种的杀虫制剂,例如设计核酸抑制物,其可在被施用于防治对象后,起到杀灭昆虫的作用。

[0170] 所述的靶标基因或其片段或截短形式或基因变异体或片段变异体也包括在本发明中,只要这些片段或截短形式或变异体在被用于制备所述的核酸抑制物后,该核酸抑制物也具有杀灭鳞翅目昆虫的活性。

[0171] 本发明也涉及包含本发明的多核苷酸或其片段或变异体的载体,以及用本发明的载体或贮藏蛋白 2 编码序列经基因工程产生的宿主细胞,以及经重组技术产生本发明所述多肽的方法。

[0172] 通过常规的重组 DNA 技术,可利用本发明的多聚核苷酸序列来表达或生产重组的贮藏蛋白 2。一般来说有以下步骤:

[0173] (1). 用本发明的编码贮藏蛋白 2 的多核苷酸(或变异体),或用含有该多核苷酸的重组表达载体转化或转导合适的宿主细胞;

[0174] (2). 在合适的培养基中培养宿主细胞;

[0175] (3). 从培养基或细胞中分离、纯化蛋白质。

[0176] 本发明中,贮藏蛋白 2 多核苷酸序列可插入到重组表达载体中。术语“重组表达载体”指本领域熟知的细菌质粒、噬菌体、酵母质粒、植物细胞病毒、哺乳动物细胞病毒或其他载体。总之,只要能在宿主体内复制和稳定,任何质粒和载体都可以用。表达载体的一个重要特征是通常含有复制起点、启动子、标记基因和翻译控制元件。

[0177] 本领域的技术人员熟知的方法能用于构建含贮藏蛋白 2 编码 DNA 序列和合适的转录/翻译控制信号的表达载体。这些方法包括体外重组 DNA 技术、DNA 合成技术、体内重组技术等。所述的 DNA 序列可有效连接到表达载体中的适当启动子上,以指导 mRNA 合成。表达载体还包括翻译起始用的核糖体结合位点和转录终止子。

[0178] 此外,表达载体优选地包含一个或多个选择性标记基因,以提供用于选择转化的宿主细胞的表型性状,如真核细胞培养用的二氢叶酸还原酶、新霉素抗性以及绿色荧光蛋白(GFP),或用于大肠杆菌的卡那霉素或氨苄青霉素抗性。

[0179] 包含上述的适当 DNA 序列以及适当启动子或者控制序列的载体,可以用于转化适当的宿主细胞,以使其能够表达蛋白质。

[0180] 宿主细胞可以是原核细胞,如细菌细胞;或是低等真核细胞,如酵母细胞;或是高等真核细胞,如植物细胞。代表性例子有:大肠杆菌,链霉菌属、农杆菌;真菌细胞如酵母;植物细胞等。

[0181] 本发明的多核苷酸在高等真核细胞中表达时,如果在载体中插入增强子序列时将会使转录得到增强。增强子是 DNA 的顺式作用因子,通常大约有 10 到 300 个碱基对,作用于启动子以增强基因的转录。

[0182] 本领域一般技术人员都清楚如何选择适当的载体、启动子、增强子和宿主细胞。

[0183] 用重组 DNA 转化宿主细胞可用本领域技术人员熟知的常规技术进行。当宿主为原核生物如大肠杆菌时,能吸收 DNA 的感受态细胞可在指数生长期后收获,用 CaCl_2 法处理,所用的步骤在本领域众所周知。另一种方法是使用 MgCl_2 。如果需要,转化也可用电穿孔的方法进行。当宿主是真核生物,可选用如下的 DNA 转染方法:磷酸钙共沉淀法,常规机械方法如显微注射、电穿孔、脂质体包装等。转化植物也可使用农杆菌转化或基因枪转化等方法,例如叶盘法、水稻幼胚转化法等。对于转化的植物细胞、组织或器官可以用常规方法再生成植株。

[0184] 杀虫制剂

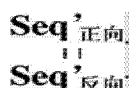
[0185] 任何基于本发明提供的靶标蛋白或其片段或截短形式制备获得的、具有防治鳞翅目昆虫活性的物质都可作为杀昆虫的制剂,用于防治鳞翅目昆虫。所述的制剂例如蛋白抑制剂,蛋白水解酶,蛋白结合分子,抗体,配体。任何可以抑制该靶标蛋白的活性或表达的物质,都被包含在本发明中。

[0186] 任何基于本发明提供的靶标基因或其片段或截短形式制备获得的、具有防治鳞翅目昆虫活性的物质都可作为核酸抑制物,用于防治鳞翅目昆虫。所述的核酸抑制物较佳的是些干扰分子,例如,dsRNA、反义核酸、小干扰 RNA 或微小 RNA 的构建物,或可以表达或形成所述 dsRNA、反义核酸、小干扰 RNA 或微小 RNA 的构建物。更佳地是 dsRNA 或可以表达所述 dsRNA 的构建物。

[0187] 根据本发明所提供的基因及其序列,可设计出用于表达 dsRNA、反义核酸、小干扰 RNA 或微小 RNA 的构建物。因此,本发明提供了一种人工构建的构建物。根据本发明提供的基因及其序列来设计所述的构建物是本领域技术人员可了解的,通常可使该构建物包含一个内含子序列(与两侧序列不互补),两端连接上互补的基因序列,导入细胞后,能产生“茎环”结构,并且“茎”状部分能够形成 dsRNA、反义核酸、小干扰 RNA 或微小 RNA,这种 dsRNA、反义核酸、小干扰 RNA 或微小 RNA 能特别有效的抑制目的基因的表达。

[0188] 根据本发明的一种优选方式,所述的核酸抑制物具有如下结构:

[0189]



[0190] 其中,Seq'正向是与编码所述的贮藏蛋白 2 的多核苷酸序列或其片段所对应的 RNA 序列;Seq'反向为与 Seq'正向基本上互补的序列。

[0191] 所述的核酸抑制物可直接施用于需要防治的对象(如植物),以达到防治鳞翅目

昆虫的目的。

[0192] 作为本发明的优选实施方式,所述的 Seq' 正向是选自 SEQ ID NO:3-5、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:20-21 任一所示的 DNA 所对应的 RNA。更优选地,是选自 SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:5 或 SEQ ID NO:17,或 SEQ ID NO:20-21 任一所示的 DNA 所对应的 RNA,前者 (SEQ ID NO:3) 可用于开发防治亚洲玉米螟的特异型制剂;而后者 (SEQ ID NO:5) 更适用于开发防治鳞翅目害虫的广谱型制剂。

[0193] 作为本发明的另一种可选择的方式,所述的构建物含有至少一个如下所示的结构:

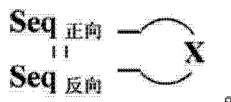
[0194] Seq_{正向}-X-Seq_{反向}

[0195] 其中,Seq_{正向}是编码所述的贮藏蛋白 2 的多核苷酸或其片段,Seq_{正向}与 Seq_{反向}为基本上互补的核苷酸序列;

[0196] X 为位于 Seq_{正向}和 Seq_{反向}之间的间隔序列,并且所述间隔序列与 Seq_{正向}和 Seq_{反向}不互补;

[0197] 式 I 所示的结构在可形成如下所示的二级结构:

[0198]



[0199] 该结构可进一步被剪切、加工形成双链形式的干扰分子 (RNA 分子),从而发挥基因沉默的作用。

[0200] 所述的构建物可以制备成可形成多于 1 个茎环结构的形式,例如,可以包含 2 个或 2 个以上的茎环结构。

[0201] 通常,所述的构建物位于表达载体上。因此,本发明还包括一种载体,它含有所述的构建物。所述的表达载体通常还含有与所述的构建物操作性相连的启动子、复制起点和/或标记基因等。本领域的技术人员熟知的方法能用于构建本发明所需的表达载体。这些方法包括体外重组 DNA 技术、DNA 合成技术、体内重组技术等。所述的表达载体优选地包含一个或多个选择性标记基因,以提供用于选择转化的宿主细胞的表型性状,如卡那霉素、庆大霉素、潮霉素、氨苄青霉素抗性。

[0202] 包含上述的适当基因序列以及适当启动子或者控制序列的载体,可以用于转化适当的宿主。在本发明的方法中,所述的宿主可以是任何适合于携带所述表达载体并能够表达出核酸抑制物的宿主。例如,所述的宿主为大肠杆菌,真菌,酵母,植物细胞,动物细胞等。

[0203] 携带所述构建物或表达载体并能够表达出核酸抑制物的宿主能够直接施用于需要防治的对象 (如植物),以达到防治鳞翅目昆虫的目的。

[0204] 本发明所述的核酸抑制物除了利用构建物进行细胞表达外,还可以利用体外化学合成的方法获得。应理解,任何可形成本发明所述的核酸抑制物的方法均可被应用于本发明中。

[0205] 转基因植物

[0206] 本发明还涉及一种以植物为媒介防治有害生物的方法或改良植物的抗虫性的方法,该方法包括将所述的核酸抑制物导入到植物中。植物的转基因是本领域技术人员熟知的技术,例如可使用农杆菌转化或基因枪转化等方法,例如叶盘法、幼胚转化法等。对于转

化的植物细胞、组织或器官可以用常规方法再生成植株,从而获得具有抗虫性的植物。

[0207] 在本发明中,所述的以植物为媒介防治有害生物的方法或改良植物的抗虫性的基本原理是:以植物作为媒介,使昆虫服食可干扰昆虫贮藏蛋白基因表达的干扰 RNA,从而抑制昆虫

[0208] 虫的生长或杀灭昆虫。所述的“干扰 RNA”是指基于本发明提供的作为靶标的昆虫贮藏蛋白基因或其片段(截短形式)制备或加工(如被体内加工)获得的、具有防治昆虫活性的一类物质的总称。所述的“干扰 RNA”例如包括 dsRNA、反义核(苷)酸、小干扰 RNA、微小 RNA 等。更具体地,所述的原理为:通过转基因的方法让植物体内表达昆虫基因(全长或部分)的双链 RNA(dsRNA),在植物体内形成高丰度的干扰 RNA,当昆虫取食这种转基因植物的同时也摄入了大量的干扰 RNA,所述的干扰 RNA 在进入昆虫体内后能够抑制所述昆虫基因在表达,干扰昆虫正常的生长发育甚至引起其死亡。利用所述原理,可以有效地改良植物对于昆虫的抵抗能力。将 RNA 干扰技术应用到转基因植物上,开发新型的转基因抗性植物,对农业的发展具有重大的意义。

[0209] 优选的,一种改良植物的抗虫性的方法包括:

[0210] (1) 提供携带表达载体的农杆菌,所述的表达载体含有所述的核酸抑制物;

[0211] (2) 将植物细胞或组织或器官与步骤(1)中的农杆菌接触,从而使所述的核酸抑制物转入植物细胞或组织或器官;

[0212] (3) 选择出转入了所述的核酸抑制物的植物细胞或组织或器官;和

[0213] (4) 将步骤(3)中的植物细胞或组织或器官再生成植物。

[0214] 可采用任何适当的常规手段,包括试剂、温度、压力条件等来实施所述的方法。

[0215] 目前,利用植物作为媒介,通过使昆虫服食可干扰昆虫基因表达的核酸抑制物(干扰分子),从而抑制昆虫的生长或杀灭昆虫已经是本领域人员熟知的技术了,例如 Ying-Bo Mao 等, Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol (NATURE BIOTECHNOLOGY VOLUME 25NUMBER 11 NOVEMBER 2007) 中证明了该种方法的有效性。

[0216] 组合物和防治鳞翅目昆虫的方法

[0217] 本发明还提供了一种制剂(如农药组合物),其含有安全有效量的携带所述构建物或表达载体并能够表达出核酸抑制物的宿主(细胞)或所述的核酸抑制物(如:10-500 μ g/ml;较佳地 20-200 μ g/ml;更佳地 30-100 μ g/ml);以及农药学上可接受的载体。

[0218] 本发明中,术语“含有”表示各种成分可一起应用于本发明的混合物或组合物中。因此,术语“主要由...组成”和“由...组成”包含在术语“含有”中。

[0219] 本发明中,“农药学上可接受的”的成分是适用于农业用途而对人或动物(除鳞翅目昆虫以外)、植物没有过度不良副反应(如毒性、刺激和变态反应)的,即有合理的效益/风险比的物质。

[0220] 本发明中,“农药学上可接受的载体”是用于将本发明的携带所述构建物或表达载体并能够表达出核酸抑制物的宿主或本发明的核酸抑制物传送给鳞翅目昆虫的可接受的溶剂、悬浮剂或赋形剂。农药学上可接受的载体可以是液体或固体,较佳的是能够较高程度保持宿主或核酸抑制物活性的载体。

[0221] 所述制剂（或农药组合物）的剂型可以是多种多样的，包括但不限于：水溶液，悬浮剂，可湿粉剂，可乳化浓缩物，乳液，可喷洒溶液，水性分散系，粉剂，颗粒剂，或微胶囊。应理解，只要能够将本发明的携带所述构建物或表达载体并能够表达出核酸抑制物的宿主或本发明的核酸抑制物在保持全部或部分活性的前提下递送到鳞翅目昆虫的剂型都是可取的。优选那些易于递送的剂型，例如，所述农药组合物是液体喷洒剂、或喷雾剂。

[0222] 在本发明中，所述的辅剂是一种辅助成分，在组合物中起辅助调节功能，比如其可以是一种表面活性剂、附着助剂或其它类型助剂。

[0223] 浓缩型的农药组合物中活性成分（即：携带所述构建物或表达载体并能够表达出核酸抑制物的宿主或本发明的核酸抑制物）的含量较高，如含有核酸抑制物 200–500 $\mu\text{g/ml}$ ，而稀释型农药和实际使用的组合物中活性成分含量较低，如含有核酸抑制物 20–100 $\mu\text{g/ml}$ ，施用量为 50–1000 $\mu\text{l}/300\text{--}500$ 头，或根据携带所述构建物或表达载体并能够表达出核酸抑制物的宿主（细胞）表达的核酸抑制物含量，参照核酸抑制物施用量，施用一定量的宿主（细胞）。此外，还可以包含其他合适的化学剂、增效剂、微量元素、稳定剂、粘合剂、润湿剂、分散剂、乳化剂、渗透剂、鞣化剂、溶剂、充填剂等常用组分。本发明农药组合物中还可以含有其它活性杀虫剂或杀微生物剂。

[0224] 在制备农药组合物时，合适的固体稀释剂包括但不限于：硅藻土，玉米壳，磷酸三钙，软木粉，高岭土、膨润土或硅镁土等粘土，和水溶性聚合物。

[0225] 此外，固体组合物还可以含有一种或多种相容性润湿剂，分散剂，乳化剂或色素，这些成分在固态时也可起稀释剂的作用。

[0226] 这样的固体组合物可以是粉剂，颗粒剂或可湿粉剂的形式。通常通过研磨获得粉剂，通过造粒或压片获得颗粒剂、片剂或砖型剂。

[0227] 液体组合物的形式可以是溶液，悬浮液和乳液，也可以将其包在天然或合成聚合物中，并可以包含润湿剂、分散剂或乳化剂。这样的乳液、悬浮液或溶液可用水性、有机或水–有机稀释剂来制备水溶性聚合物（以及上述稀释剂的混合物）。此外，所述稀释剂中可含有例如以上所述离子型或非离子型的润湿剂、分散剂或乳化剂或它们的混合物。

[0228] 各种制剂的原理都是已知的，并在例如以下文献中有所描述：Winnacker-Kuchler, “Chemische Technologie” 化学技术, Vol. 7, C. Hauser Verlag Munich, 第4版, 1986; van Valkenburg, “农药剂型”, Marcel Dekker N. Y., 第2版, 1972–73; K. Martens, “喷雾干燥手册”, 第3版, G. Goodwin Ltd. London.

[0229] 用于本发明组合物的所需的配制辅剂，（例如惰性物质，表面活性剂，溶剂和其他添加剂），也是已知的，其描述例如：Watkins“杀虫粉剂稀释剂和载体手册”第2版，Darland Books, Caldwell N. J. ;H. v. Olphen, “粘土胶体化学导引”第2版，J. Wiley&Sons, N. Y. , Marsden, “溶剂指南”第2版，Interscience, N. Y. 1950; McCutcheon’s, “除垢剂和乳化剂年刊”，MC Publ. Corp., Ridgewood N. J. ;Sisley 和 Wood, “表面活性剂百科全书”，Chem. Publ. Co. Inc., N. Y. 1964; Schonfelt, “Grenzflächenaktive Äthylenoxidaddukte” 表面活性环氧乙烷加成产物, Wiss. Verlagsgesell., Stuttgart 1976; Winnacker-Kuchler, “Chemische Technologie” 化学技术, Vol. 7, C. Hauser Verlag Munich, 第4版, 1986.

[0230] 可湿粉剂可均匀分散于水。除活性物质之外，可湿粉剂还可包含润湿剂，分散剂，稀释剂等无环境公害的物质。粉剂的制备可以是：将活性物质与精细粉碎后的滑石、高岭

土、膨润土之类天然粘土或硅藻土等固体物质一同研磨。颗粒剂的制备可以用活性物质喷涂吸附于惰性物质颗粒,或将活性物质溶液通过粘合剂(例如聚乙烯醇、聚丙烯酸钠,或矿物油)施加于载体(例如砂、高岭土或惰性物质颗粒)表面。如果欲与化肥混合施用,则可将合适的活性物质象制备化肥颗粒那样制备成颗粒。

[0231] 就控制植物中昆虫侵袭的目的而言,通过喷雾应用将昆虫控制用的 dsRNA 运送到植物表面提供了另一种保护植物的手段。在这种情况下,被工程改造以产生和积累 dsRNA 的细菌可被发酵,发酵产品被配方为可与常见农业应用兼容的喷雾产品。所述配方可以包括:高效叶片覆盖所需的合适的胶粘物和润湿剂,以及用于保护 dsRNA 免受 UV 损害的 UV 保护剂。此类添加剂是生物杀昆虫剂工业中常用的,也是本领域技术人员公知的。同样地,用于土壤应用的配方可以包括下述颗粒配方,其用作为土壤有害昆虫(例如,玉米根虫)幼虫的饵。

[0232] 其中所述细菌或酵母细胞被灭活或被杀死,例如通过热处理或机械处理。

[0233] 本发明人意外地发现,所述的核酸抑制物可通过渗透的方式由昆虫体表进入到昆虫体内。因此可通过将各种核酸抑制物或含有各种核酸抑制物的组合物施用于昆虫体表来达到防治昆虫的目的。所述的施用方式包括但不限于喷洒、涂覆、滴加于昆虫的体表。所述的核酸抑制物选自:dsRNA、反义核酸、小干扰 RNA、微小 RNA;或能表达或形成所述 dsRNA、反义核酸、小干扰 RNA、微小 RNA 的构建物。

[0234] 本发明还提供了一种防治鳞翅目昆虫的方法,所述方法包括:将所述的携带所述构建物或表达载体并能够表达出核酸抑制物的宿主(细胞)或所述的核酸抑制物施用于需要防治的对象(如植物,特别是被鳞翅目昆虫侵害的植物;或昆虫本身)。

[0235] 也可直接用所述的核酸抑制物或含有该核酸抑制剂的农药组合物或表达所述核酸抑制物的宿主细胞喂食昆虫或喷洒昆虫。所述的农药组合物可被制成喷洒剂,从而可直接喷洒用于害虫防治。

[0236] 具体地,可合成 dsRNA 直接喷洒,用于害虫防治,合成 dsRNA 纯化物加入渗透剂或鞣化剂喷洒田间用于害虫防治。

[0237] 本发明针对鳞翅目害虫防治难题,基于 RNAi 技术开发了可用于田间防治昆虫的靶标基因及其有效片段(结构域),并证明了通过喷雾这种简便的方法可以使核酸抑制物起到抑制基因表达的效果,最终导致鳞翅目害虫的死亡,从而达到防治的目的,所述方法方便、快捷、准确且无公害。

[0238] 本发明的主要优点在于:

[0239] (1) 本发明首次揭示以及确认了全新的,可用于作为防治昆虫的靶点的靶标基因。

[0240] (2) 本发明首次揭示了利用基因的不同结构域可以分别合成特异型和广谱型的用于防治鳞翅目害虫的靶标基因,同时证明了基于这些基因结构域获得的 dsRNA 可直接应用于害虫防治。所述害虫防治方法方便、快捷、准确,并能很好地解决目前害虫防治中所面临的害虫抗性和环境污染问题。

[0241] (3) 本发明基于 RNAi 技术来实现杀虫的目的,这是一种新型高效、定点控制、无公害的技术;获得的 dsRNA 可直接应用于田间,进行害虫防治。

[0242] (4) 筛选出物种特异的靶标基因片段,将对非靶标的影响程度降到最低。

[0243] (5) 筛选出同类物种广谱型的靶标基因片段,将防治成本降到最低。

[0244] (6) 开发成本低,可快速用于生产。

[0245] (7) 使用方便、环境兼容性好。

[0246] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件如 J. 萨姆布鲁克等编著,分子克隆实验指南,科学出版社,2002 中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和份数按重量计算。

[0247] 除非另行定义,文中所使用的所有专业与科学用语与本领域熟练人员所熟悉的意义相同。此外,任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可应用于本发明中。文中所述的较佳实施方法与材料仅作示范之用。

[0248] 实施例 1、获得靶标基因信息

[0249] 以亚洲玉米螟的分析为例,方法步骤如下:

[0250] 1. 亚洲玉米螟总 RNA 的提取

[0251] 采用常规 Trizol 法提取,常规方法纯化,DNA 酶处理,获得浓度 $\geq 300\text{ng}/\mu\text{l}$ 、总量 $\geq 6\mu\text{g}$ 、OD260/280 为 1.8 ~ 2.2 的 Total RNA 样品。

[0252] 2. mRNA 的分离及 cDNA 的合成

[0253] 用带有 oligo-dT 的磁珠分离出带有 polyA 的 mRNA,然后用随机 6 聚物和 Invitrogen 的 Superscript II reverse transcriptase 试剂盒合成 cDNA 第一链。

[0254] 3. 基因的扩增及测序

[0255] 利用靶标基因特异的引物 (OfSPF:CATGGGGACACAGTTGAGCTTC (SEQ ID NO:14); OfSPR: TGCTGTAAATCTAGCCTCAGTCA (SEQ ID NO:15)) 进行扩增,将获得的基因片段纯化,连接到 (Takara 公司生产)PMD-18 载体中,转化入 Top10 菌株,蓝白斑筛选,阳性菌株测序,亚洲玉米螟贮藏蛋白 2 全长序列的测序结果如下 (SEQ ID NO:1;其中,下划线部分为编码序列):

[0256] acatggggacacagttgagcttcaacgagtcggctgcagtatgagggctgtagtactattggttttggc
cattgcggttttggccgctggccggcaagtcgacgataccatgcttggtaaagacatcgctcacgatggacatcaagg
agaggcaaatgttcatcttgaaattacttaaccacgttctggagcccgatgtacaaggaaatcgaagatatggc
aagaacttcaacattgaagagaacattcagctgtttaccaggactgaagtagtgaagaagtttatctactactacaa
gcttggtatgcttctctgctggtagatcttcacatccacgtggaccgccagctgaaggaagtcgtctccatgttcc
acatgctctactacgccaaagacttcgtcaccttcatcaagaccgcatgctggatgcgcctttaccttaacgaaggc
atgttcgtctatgctctcactgtagccgtcagacaccgtgaagactgcaagggtatcattcttctctccccatacga
aatctaccatactacttcttgcgcgccgatgttatccagaaggttacttactcaagatgagacgaggactccttg
accacaagctgtgcgacttctacggaatcaagaagactgacaaggatgtctacatcatcgatgagaacacatacgac
agaagaacaactctcaattacgatgacaagcttcgctacttcaccgaggacattgaccttaacacctactactacta
cttccacgtcgactatccgttctggatgagagacgaatgcttcgacaagatcaggatcaggcgtttcgaacttactc
tgtacatgtaccagcaaattcttggcagatactacctggagcgtctgtctaatggcttttggtgagattaaaactctt
acatacaacaaaccgatcaagaacggatactggccctggatgatgttgacaaacgggtgttcaattccctaagaggca
gaacaactatgttgtcatccgtgatgacgttattgagaatctccgtcttgcagacgcatacgaaatgatcatcaagg
aagctattgtcaagggattcgttgaagtcaatggcttaagactggaactgaccaagactgatgatatcgagactctt
ggaagactcatctacggaaagattgacaaggtggacgtggacaaataccacattgatgcttacagatacctgctcat

catcatgaaatcgattcttggactgaacacggtgaaatctgacaaatacttcgctcggttccttctgtcttggacagct
accagaccgctctccgtgacccagctcttctacaaactccagaaacgtctcattgacttggcttctcctcttcaaattg
cgtctgccatgctacaacaaggacgacctctacttccctggcgtgaagatcgacaacgctcggtggttgacaagctcgt
cacttacttcgatgactacctgatggacatgaccaacgccgttatgctcactgaagatgaactcaagaagaccactt
ccgacatgaaattcttcgctccgcaaacgccgtctgaatcaccagcccttcaaagtgaccgctcgatgttctctcagac
aaaaccgctgactgcgtcatcaggatcttctctgggaccgaaagaggaccaccacggcgtctcattgacatcaacaa
gaaccgcatgaacttcgctgaactcgacagcttctctacaaactgggtcaatggcaagaacactattgtcaggaact
ccttcgacatgcacaacctgggtccgacccgcatcatgacccgcgacctctggaagaaggttgacaccatcactgac
ttcagagatctccttgtcaaggacctcagaaacttccacactgggttccccaccagggttgcttctgcccagaagtaa
ggttggaggtatgaagatgatgctgtacgtcatcgctgactcctctgaagttgggtcgacaacggttgacctcaacattc
tggacaccaaccgcaaagacttcatgatggacttcaggctgactgttcttttggacaagaggcctcttggtttccca
ttcgaccgtcgattgatgtagtgaagttcttctcactcctaacaatgaagtttgcgatgttatgatcttccacaagaa
gcaggtttgcgacatgaagactcgctggaacaaatacgtgttgaagaactacgacatgtatgacaggaccatgatca
ccgatgacacctccttcgctcgacatcgacatccacacgaagtcaatggtagaccatgacgtcaacgtgttcgacaat
tactaaatggtaataatattcctagattatagttcaaagaatgatgactgaggctagatttacagcaagtttaaaaa
tgtaaaaaataaaaaataaataatttaataaacaataaaaaa

[0257] 编码的蛋白序列 (SEQ ID NO :2 ;755aa) :

[0258] MRVVLLVLAIAALAAGRQVDDTMLGKDIVTMDIKERQMFILKLLNHVLEPVMYKEIEDIGKNFNIEEN
IQLFTRTEVVKKFIYYYKLGLMPRGEIFTIHVDRQLKEVVSFMHMLYYAKDFVTFIKTACWMRLYLNEGFMVYALT
AVRHREDCKGIILPPPYEIPYFYFLRADVIQKAYLLKMRRGLLDHKLCDYFIKKTDKDVYIIDENTYDRRTTLNYD
DKLRYFTEDIDLNTYYYYFHVDPFWMRDECFDKIRIRRFELTLYMYQQILARYYLERLSNGLGEIKTLTYNPKIKN
GYWPWMLHNGVQFPKRQNNYVVRDDVIENLRLADAYEMI KEAIVKGFVEVNGLRLELTKTDDIETLGRLIYGKI
DKVDVDKYHIDAYRYLLIIMKSILGLNTLKSDKYFVVPVSLDSYQTALRDPVFYKLQKRLIDLVLFLKRLPCYNKD
DLYFPGVKIDNVVVDKLVTYFDDYLMDMTNAVMLTEDELKKTSDMKFFVRKRRLNHQPFKVTVDVLSDKTADCVIR
IFLGPKEDHHGRLIDINKNRMNFVELDSFLYKLVNGKNTIVRNSFDMHNLVRDRIMTRDLWKKVDITDFRDLLVKD
LRNFHTGFPTRLLLPRSKVGGMKMMLYVIVTPLKLVDNVDLNIIDTNRKDFMMDFRSTVLLDKRPLGFPFDRRIDVV
KFFTPNMKFVDVMIFHKKQVCDMKTRWNKYVLKNYDMDRTMITDDTSFVDIDITHKSMVDHVDNVFDNY

[0259] 实施例 2、dsRNA 的合成

[0260] 利用本发明所述的方法,运用于玉米螟的研究当中,本发明人选取贮藏蛋白 2 基
因的三个结构域 (SP-N, SP-M, SP-C, 序列见表 2), 扩增该三个结构域所需引物见表 3。

[0261] 表 2、贮藏蛋白 2 基因的三个结构域序列

[0262]

SP-N	CtattggTTTTGGCCATTGCGGCTTTGGCCGCTGGCCGGCAAGTCGACGATACCATGCTTGGTAA AGACATCGTCACGATGGACATCAAGGAGAGGCAATGTTTATCTTTGAAATTACTTAACCAAGTTC TGGAGCCCGTCATGTACAAGGAAATCGAAGATATTGGCAAGAAGTTCAACATTGAAGAGAACATT CAGCTGTTTACCAGGACTGAAGTAGTGAAGAAGTTTATCTACTACTACAAGCTTGGTATGETTCC TCGTGGTGAGATCTTCACCATCCAGCTGGACCGCCAGCTGAAGGAAGTCGTCTCCATGTTCCACA TGCTCTACTACGCCAAGACTTCGTCACTTCATCAAGACCGCATGCTGGATGCGCCTTTACCTT AACGAAGGCATGTTCTGTCTATGCTCTCACTGTAGCCGTCA(SEQ ID NO: 3)
SP-M	Tgacaagcttcgctacttcaccgaggacattgaccttaacacctactactactacttccacgtcg actatccgttctggatgagagacgaatgcttcgacaagatcaggatcaggcgcttcgaacttact ctgtacatgtaccagcaaattcttggcagatactacctggagcgtctgtctaatggctcttgggtga gattaaaactcttacatacaacaaccgatcaagaacggatactggccctggatgatgttgacaca acgggtgttcaattccctaagaggcagaacaactatgttgtcatccgtgatgacgttattgagaat ctccgtcttgcagacgcatacgaaatgacatcaaggaagctattgtcaagggaattcggttgaagt caatggcttaagactggaactgaccaagactgatgatatcgagactcttggaaagactcatctacg gaaagattgacaaggtggacgtggacaaataccacattgatgcttacagataacctgctcateate atgaaatcgattcttggactgaacacgttgaaatctgacaaatacttctgtcttcttctgtctt ggacagctaccagaccgctctccgtgaccagctcttctac(SEQ ID NO: 4)
SP-C	Gactgcgtcatcaggatcttccctgggaccgaaagaggaccaccacggccgtctcattgacatcaa caagaaccgcatgaacttcgtcgaactcgacagcttccctctacaaactgggtcaatggcaagaaca ctattgtcaggaactccttcgacatgcacaacctgggtccgcgaccgcatcatgacccgcgacctc tggaagaaggttgacaccatcaactgacttcagagatctccttgtcaaggacctcagaaacttcca caactggtttccccaccaggttgettctgcccagaagtaaggttggaggtatgaagatgatgctgt acgtcatcgtgactcctctgaagttgggtcgacaacgttgacctcaacattctggacaccaacegc aaagacttcatgatggacttcaggtcgactgttcttttggacaagaggectcttgggtttccatt cgaccgtcgattgatgtagtgaagttcttactcctaacaatgaagtttgtcgatgttatgatct tccacaagaagcaggttgcgacatgaagactcgttggaacaaatacgtgttgaagaactacgac atgtatgacaggaccatgatcaccgatg(SEQ ID NO: 5)

[0263] 表 3、合成 dsRNA 所用引物

[0264]

名称	SEQ ID NO:	引物序列
dsOfSP_N	正向 6	TAATACGACTCACTATAGGGAGACTATTGGTTTTGGCCATTGCGG
	反向 7	TAATACGACTCACTATAGGGAGATGACGGCTACAGTGAGAGCATA
dsOfSP_M	正向 8	TAATACGACTCACTATAGGGAGATGACAAGCTTCGCTACTTCACC
	反向 9	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGTAGAAGACTGGGTACAGGAGA
dsOfSP_C	正向 10	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGACTGCGTCATCAGGATCTTCC
	反向 11	TAATACGACTCACTATAGGGAGACATCGGTGATCATGGTCCTGTC
EYFP	正向 12	TAATACGACTCACTATAGGGAGGACGACGGCAACTACAAG
	反向 13	TAATACGACTCACTATAGGGGAAGTCCAGCAGGACCATGT

[0265] 其中, EYFP 为增强型黄色荧光蛋白基因, 作为外源基因对照。

[0266] 以表 3 所述的引物分别扩增贮藏蛋白 2 基因的三个结构域 SP-N, SP-M, SP-C 的 DNA 序列, 作为合成 dsRNA 的模板。

[0267] 利用 MEGAscript[®] T7Kit (购自 AMBION 公司, 产品货号 AM1334) 进行靶标基因 dsRNA 的合成, 获得可用于生物测定的 dsRNA。其简要原理及步骤是: 首先用亚洲玉米螟幼虫组织的总 RNA 为模板, 反转录获得 cDNA, 然后以表 3 所列的 dsRNA 合成引物扩增不同 OfSP 基因的结构域, 对其产物进行纯化, 再以纯化产物为模板, 利用 Kit 试剂盒进行体外转录, 获得 dsRNA 后, 再去除产物中的 DNA, 并进行纯化处理, 就可以获得所需的 dsRNA。具体操作步骤如下:

[0268] 以前述获得的三个结构域的 DNA 序列为模板, 按照 AM1334 Kit 中的说明书进行操作:

[0269] 1) 体外转录获得 dsRNA

[0270]

ATP	2 μ L
GTP	2 μ L
CTP	2 μ L

[0271]

UTP	2 μ L
T7 Enzyme Mix	2 μ L
模板 DNA	0.1 μ L
10X 反应缓冲液	2 μ L
Nuclease-free Water	加至 20 μ L

[0272] 混合均匀, 短暂离心, 37℃ 孵育 4h。

[0273] 2) 消除 DNA

[0274] 体外转录反应结束, 酶化反应体系中含有少量模板 DNA, 需要在 DNaseI 作用下消化掉, 在上述反应液中加入 1 μ L 的 DnaseI, 混合均匀, 37℃ 孵育 30min。

[0275] 3) dsRNA 的纯化

[0276] 上述反应体系中:

[0277] 加入 100 μ L 和 15 μ L 醋酸铵终止反应;

[0278] 加入等体积酚/氯仿/异戊醇混和液 (25 : 24 : 1);

[0279] 4℃ 15000r/min, 离心 15min, 取上层水相转移至新的 1.5mL 离心管中;

[0280] 加入 140 μ L (等体积) 氯仿/异戊醇混和液 (24 : 1);

[0281] 加入 12 μ L (1/10 体积) 3M 醋酸钠溶液 (pH5.5);

[0282] 加入 2 倍体积无水乙醇, -20℃ 过夜沉淀 RNA;

[0283] 12000r/min 离心 15-30min;

[0284] 弃上清, 加入 70% 乙醇 250 μ L, 室温轻轻吹打洗涤;

[0285] 12000r/min 离心 10min, 弃上清, 室温干燥沉淀; 用适量 TE 溶解沉淀。

[0286] 最终获得的 dsRNA 分别命名为: dsSP-N、dsSP-M、dsSP-C, 电泳鉴定结果见图 4, 可

见成功获得了所需的 dsRNA。

[0287] 实施例 3、dsRNA 对亚洲玉米螟的基因的沉默作用

[0288] 本发明人将获得的 dsSP-C(溶于 ddH₂O)直接喷雾于亚洲玉米螟 1 龄幼虫,观察其基因表达情况的变化。喷雾后贮藏蛋白 2 基因(ds 0fSP)第 0、1、3、5 天的基因表达情况见图 5。

[0289] 从图 5 的结果可以看出,用双链 RNA 处理后第 5 天,该基因的表达被显著抑制。同样地,蛋白电泳鉴定发现,贮藏蛋白 2 的表达也被显著抑制。

[0290] 实施例 4、dsRNA 对亚洲玉米螟的致死效率

[0291] 利用本发明所述的方法,运用于亚洲玉米螟的研究当中,本发明人将获得的 dsRNA(dsSP-N、dsSP-M、dsSP-C 分别溶于 ddH₂O)直接喷雾于亚洲玉米螟初孵幼虫上(以 dsSP-N 第 7 天的致死中浓度 LC₅₀ 为标准浓度,浓度为 41.55 μg/mL),观察在喷药后第 1、3、5、7、9 天(d)幼虫的致死情况。

[0292] 结果如图 1,以本发明的靶标基因的三个结构域(SP-N, SP-M, SP-C)为模板合成的 dsSP-N、dsSP-M、dsSP-C 分别地喷雾于亚洲玉米螟后,它们在第 7 天的致死率分别为 51.36%、32.14%、51.43%,而空白对照(CK)和外源基因对照(EYFP)没有显著致死效果。

[0293] 分析结果显示,三种 dsRNA 的致死效率差异均显著,其中针对 SP-N, SP-C 两个结构域的 dsRNA 效果更优。由此表明,dsRNA 可以通过昆虫体表进入昆虫体内,抑制靶标基因,起到杀虫作用,所以基于本发明靶标基因的其它形式的核酸抑制物也可以通过喷洒昆虫起到杀虫作用。

[0294] 实施例 5、亚洲玉米螟的 dsRNA 对棉铃虫的致死效率

[0295] 利用本发明所述的方法,应用于棉铃虫的研究当中,本发明人将获得的 dsRNA(dsSP-N、dsSP-M、dsSP-C 分别溶于 ddH₂O)直接喷雾于棉铃虫的初孵幼虫上(以 dsSP-N 第 7 天的致死中浓度 LC₅₀ 为标准浓度,浓度为 41.55 μg/mL),观察在喷药后第 1、3、5、7、9 天(d)幼虫的致死情况。

[0296] 结果如图 2,以本发明的靶标基因的三个结构域(SP-N, SP-M, SP-C)为模板合成的 dsSP-N、dsSP-M、dsSP-C 分别地喷雾于棉铃虫的初孵幼虫上后,它们在第 7 天的致死率分别为 13.33%、19.85%、45.24%。

[0297] 分析结果显示,三种 dsRNA 均有一定的致死作用,其中针对 SP-C 结构域的 dsRNA 效果最优。可见,SP-C 可作为棉铃虫防治的较好的靶标结构域。

[0298] 可能由于喷洒不均匀,尽管 dsSP-C 处理的死亡率仅有 45.24%。但进一步的观察发现,即使在幼虫期没有立即死亡,有一部分会出现化蛹异常而死亡,结果见图 9。

[0299] 再进一步观察,还有个别能比较正常化蛹的虫子,尽管也能羽化为成虫,但是其所产的卵却不能孵化出下一代的幼虫。如图 10 所示,3-5 天后,未处理的对照已经转色,将要孵化,但处理过成虫所产的卵还未转色,最终也没能孵化出幼虫。

[0300] 实施例 6、dsRNA 对亚洲玉米螟的致死效率

[0301] 利用本发明所述的方法,运用于亚洲玉米螟的研究当中,本发明人将获得的 dsRNA(dsSP-N、dsSP-M、dsSP-C 分别溶于 ddH₂O)直接喷雾于亚洲玉米螟初孵幼虫上(以 dsSP-N 第 7 天的致死中浓度 LC₅₀ 为标准浓度,浓度为 41.55 μg/mL),观察在喷药后第 1、3、5、7 天(d)幼虫的致死情况。

[0302] 结果如图 6,以本发明的靶标基因的三个结构域 (SP-N, SP-M, SP-C) 为模板合成的 dsSP-N、dsSP-M、dsSP-C 分别喷雾于亚洲玉米螟后,它们在第 7 天的致死率分别为 74.82%、73.13%、76.69%,而空白对照 (CK) 和外源基因对照 (EYFP) 没有显著致死效果。

[0303] 分析结果显示,三种 dsRNA 与对照相比的致死效率差异均达到显著水平,其中针对 SP-N, SP-C 两个结构域的 dsRNA 效果更优。由此表明,dsRNA 可以通过昆虫体表进入昆虫体内,抑制靶标基因,起到杀虫作用,所以基于本发明靶标基因的其它形式的核酸抑制物也可以通过喷洒昆虫起到杀虫作用。

[0304] 由于喷洒更均匀,死亡率比前次实验 (见实施例 4,最高仅为 51%) 有所提高,死亡率已经超过 70%,进一步的观察发现,即使在幼虫期没有立即死亡,有一部分会出现化蛹异常而最终死亡,结果见图 7。

[0305] 再进一步观察,还有个能比较正常化蛹的虫子,尽管也能羽化为成虫,但是其所产的卵却不能孵化出下一代的幼虫。如图 8 所示,处理过的成虫所产的卵发育异常,不能孵化。

[0306] 实施例 7、棉铃虫自身 SP 基因的 dsRNA 对棉铃虫的致死率

[0307] 利用本发明所述的方法,应用于棉铃虫的研究当中。棉铃虫中与玉米螟 sp 基因同源的基因 PxSP1 的核苷酸序列见 SEQ ID NO:16。

[0308] (1) 棉铃虫中与玉米螟 sp 基因同源的基因 (H. arm-SP) 的 dsRNA 的制备

[0309] 本发明人制备了棉铃虫中与玉米螟 sp 基因同源的基因 (H. arm-SP) 的 dsRNA,所针对的玉米螟 sp 基因同源的基因片段如下 (SEQ ID NO:17):

[0310] CGGTGAAATTATGACAACCGCTCAGAGGATTAACACCCATGGCCAAAACATGGTTGAGCACTACCCTTC AACCTACAAATGGGACAACAATGTGGTGATCAGGTGGAATGCTACGATCTGGCCTTACTTAAGAAGCGAAACCATGC CTCTTGCTTACTTCACTCATGACTTCAGCCTAAACACCTTCTACTACAACCTCCATCTTGCCCAACCCAGCTGGCTG CACAGTGAAGTTCTTCCAGTGAACAAACACAGGCGTGGAAGTGGTTCTGGTTCTTGACACAAGCAGATCCTCACTCG TTACTACATGGAGAGACTGTCTAACGACTCGGTGAAATCCCCGAGCTTGGCCACGAGATTGTTTCAGTACGGTTACG CTTTCGGGTCTTTTGTACCACAATGGCGTGCCCTTCCCTGCAAGGCCCACTACTTTAACTTGGATCAGCCCCAGCTC GTTAATGAAATCCAAGAAATCCTCGACTACGAGCGCCGTATTCGTGACGCCATCGACCAGGGTTACGTTGTAAACCA CCTTGGTGAACACATTGACATCTGCGCTCCTGAGGCCATCGAAATCTTGGGTAGCATTATTGAGGCTAACGTTGACT CTCCTAATGCCAAATACTACAAGGACTTCATCAGCATCTGGAAGAAGGTTTTGGGCGACTCTATTGTTCAAGACAAC CAGTACCACAACAACCTACGTCC

[0311] 参照实施例 2 中提供的方法,利用 MEGAscript® T7 Kit (购自 AMBION 公司,产品货号 AM1334) 进行靶标基因 dsRNA 的合成。引物序列如下:

[0312]

H.arm SP DSF TAATACGACTCACTATAGGGAGACGGTGAAATTATGACAACCGCTC(SEQ ID NO: 30)

H.arm SP DSR TAATACGACTCACTATAGGGAGAGACGTAGTTGTTGTGGTACTGG(SEQ ID NO: 31)

[0313] (2) 效果验证

[0314] 本发明人将获得的棉铃虫中与玉米螟 sp 基因同源的基因 (H. arm-SP) 的 dsRNA (dsH. arm-SP,溶于 ddH₂O) 直接喷雾于棉铃虫的初孵幼虫上 (以亚洲玉米螟 (Of) dsSP-N 第 7 天的致死中浓度 LC₅₀ 为标准浓度,浓度为 41.55 μg/mL),观察在喷药后第 1、3、5、7 天 (d)

幼虫的致死情况。

[0315] 结果如图 11, 以本发明的靶标基因的为模板合成的 dsH. arm-SP 喷雾于棉铃虫的初孵幼虫上后, 在第 7 天的致死率为 73. 33%。

[0316] 实施例 8、小菜蛾自身的 SP 基因的 dsRNA 对小菜蛾的致死率

[0317] 利用本发明所述的方法, 应用于小菜蛾的研究当中。小菜蛾中与玉米螟 sp 基因同源的基因 PxSP1 的核苷酸序列见 SEQ ID NO:18 ;小菜蛾中与玉米螟 sp 基因同源的基因 PxSP2 的核苷酸序列见 19。

[0318] (1) 小菜蛾中与玉米螟 sp 基因同源的基因 (PxSP1、PxSP2) 的 dsRNA 的制备

[0319] 本发明人制备了小菜蛾中与玉米螟 sp 基因同源的基因 (PxSP1、PxSP2) 的 dsRNA, 所针对的小菜蛾 sp 基因同源的基因片段如下:

[0320] dsPxsp1 (SEQ ID NO:20):

[0321] ACGTCGACCGCCAGATGAAGGAGGTTGTCAAAGCTTCCATCTCCTTTATTTGCGAAAGGACTTCACCACTTTCTCAAGACTGCCTGCTGGATGCGTCTCTACCTGAACGAGGGCATGTTGCTCTACGCGCTCACTGTGGCCTGCGCCACCGCGAGGACTGCCGCGGCATCATCTGCCTCCTCCCTACGAAATCTACCCGTACTACTTCGTCCGTGCTGATGTCATCCAGAAGGCCTACAAGCTCAAGATGAAGAGGGGACTTCTCGACGCCAAGCTCTGCGAGTTCTACGGTATCAAGAAGACTGACAAAGATGTCTATGTGATCGATGAGAATATTTATGACAAACGAGTTTACCTGAACTACGACGACAAGCTCCGCTACTTCACGGAAGACATCGACCTAAACACCTACTACTACTTCCATGCTGACTATCCGTTCTGGATGAGGATGACATCTTCAGGAACGATTTACCAAAAATAAGGCGTGGCGAAATCTGTTTATACATGATGCAACAACCTGCTTGCAGGCATTACCTGAACGTCTTTCCAACGGTTTGGGCGAGATTACTACCCTGTCCTGGAACAAACCCATCAAGAAGGGATTCGTGCCCTGGATGACCCTGCACAA

[0322] DsPxsp2 (SEQ ID NO:21):

[0323] ACGTCGACCGCCAGATGAAGGAGGTCATCAGCGCCTTCCACCTGCTCTACTACGCCAAGGACTTCACCACTTTCTCAAGACTGCCTGCTGGATGCGTCTCTACCTGAACGAGGGCATGTTGCTCTACGCGCTCACTGTGGCCTGCGCCACCGCGAGGACTGCCGCGGCATCATCTGCCTCCTCCCTACGAAATCTACCCGTACTACTTCGTTCTGCTGATGTCATCCAGAACGCCTACAAGCTGAAGATGAAGAGAGGACTCCTTGACCCCAAGCTCTGCGAGTTCTACGGCATCAAGAAGACCGACAAGGACGTCTATGTGATCGATGAGAACGTTTATGACAAGCGCGTGACCTCAACCGCGACGACAACTCAGGTACTTCACTGAAGACATCGACCTGAACACCTACTACTACTTCCACGTTGACTATCCGTTCTGGATGAGGATGACATCTTCAGGAACGATTTCACTAAGACCAGGCGTGGAGAAAATCTGCCTATACATGATGCAGCAACTGCTTGCAGACACTACTTAGAGCGCCTTTCAAACGGCTCGGCGAGATCACGACTCTGTCCTGGAACAAACCCATCAAGAAGGGATTCGTGCCCTGGATGGCGCTGCACAACGGTGT

[0324] 参照实施例 2 中提供的方法, 利用 MEGAscript® T7 Kit (购自 AMBION 公司, 产品货号 AM1334) 进行靶标基因 dsRNA 的合成。引物序列如下:

[0325]

Px SP1 DSF	TAATACGACTCACTATAGGGAGAACGTCGACCGCCAGATGAAGGA(SEQ ID NO: 32)
Px SP1 DSR	TAATACGACTCACTATAGGGAGATTGTGCAGGGTCATCCAGGGCA(SEQ ID NO: 33)
Px SP2 DSF	TAATACGACTCACTATAGGGAGAACGTCGACCGCCAGATGAAGGA(SEQ ID NO: 34)
Px SP2 DSR	TAATACGACTCACTATAGGGAGAACACCGTTGTGCAGCGCCAT(SEQ ID NO: 35)

[0326] (2) 效果验证

[0327] 本发明人将获得的小菜蛾 SP1 和 SP2 的 dsRNA(dsPxSP1 和 dsPxSP2 分别溶于 ddH₂O) 直接喷雾于小菜蛾的初孵幼虫上(以亚洲玉米螟 dsSP-N 第 7 天的致死中浓度 LC50 为标准浓度,浓度为 41.55 μg/mL),观察在喷药后第 1、3、5 天(d) 幼虫的致死情况。

[0328] 结果如图 12,以本发明的小菜蛾的 2 个靶标基因的双链 RNA(PxSP1 和 PxSP2) 为模板合成的 dsRNA 分别地喷雾于小菜蛾的初孵幼虫上后,它们在第 5 天的致死率分别为 58.00% 和 54.67%,并以玉米螟的 dsSP 测试了对小菜蛾的致死率,5 天死亡率为 14.67%,与对照无显著差异。

[0329] 实施例 9、dsRNA 的应用

[0330] 通过将玉米螟贮藏蛋白基因 OfSP 与其它昆虫的基因进行比对,从图 3 的结果可以看出,亚洲玉米螟 OfSP 基因与棉铃虫的同源关系相对最远,但利用亚洲玉米螟 SP-C 的 dsRNA 可以在棉铃虫中得到同样的杀虫效果,可以预期,它对鳞翅目其它害虫也会产生相似的作用效果。

[0331] 实施例 10、SP-N、SP-M、SP-C 截短形式及其效果

[0332] 本发明人基于 SP-N(SEQ ID NO:3)、SP-M(SEQ ID NO:4) 和 SP-C(SEQ ID NO:5) 设计了截短形式的 dsRNA 片段。如下:

[0333] SP-N-M1dsRNA:合成和纯化方法如实施例 2,不同点在于靶标基因片段为 SEQ ID NO:3 中第 1-420 位。

[0334] SP-N-M2dsRNA:合成和纯化方法如实施例 2,不同点在于靶标基因片段为 SEQ ID NO:3 中第 10-420 位。

[0335] SP-M-M1dsRNA:合成和纯化方法如实施例 2,不同点在于靶标基因片段为 SEQ ID NO:4 中第 1-615 位。

[0336] SP-M-M2dsRNA:合成和纯化方法如实施例 2,不同点在于靶标基因片段为 SEQ ID NO:4 中第 10-615 位。

[0337] SP-C-M1dsRNA:合成和纯化方法如实施例 2,不同点在于靶标基因片段为 SEQ ID NO:5 中第 1-603 位。

[0338] SP-C-M2dsRNA:合成和纯化方法如实施例 2,不同点在于靶标基因片段为 SEQ ID NO:5 中第 10-603 位。

[0339] 如实施例 4 的方法,将以上获得的 6 种 dsRNA 分别喷洒于亚洲玉米螟和棉铃虫初孵幼虫上(浓度为 41.55 μg/mL)。在施用后第 7 天,这些 dsRNA 对于幼虫的致死率均达到 10% 以上。

[0340] 实施例 11、转基因载体的构建和转化

[0341] 1、35S::dsGFP 和 35S::dsOfSP_C 表达载体的构建

[0342] 所需构建的 dsRNA 载体如图 13 中 pART27-dsRNA 所示,包括一个 35S 启动子,一个反向的基因片段(即 Anti-sense),一个 PDK(丙酮酸磷酸激酶)基因的内含子(即 Intron,约 742bp),一个正向的基因片段(即 Sense C1)和 OCS 终止子,以及 NOS 启动子, NPT II(新霉素磷酸转移酶基因)和 NOS 终止子。该表达载体是通过包含 Sense-Intron-Antisense 序列的双元载体 pKANNIBAL 载体(购自中国质粒载体菌株细胞株基因保藏中心)通过 Not I 酶切后连入同样经过 Not I 酶切的 pART27 载体(购自中国质粒载体菌株细胞株基因保藏

中心)而构建获得。

[0343] 用含有 Hind III 和 Xba I 酶切位点的基因特异引物 dsGFP_1F_Hind III 和 dsGFP_1R_Xba I ;dsOfSP_C1F_Hind III 和 dsOfSP_C1R_Xba I 用高保真酶 KOD, 分别以 GFP(来源于质粒 Pcambia1302, 参加 <http://www.cambia.org/daisy/bios/585.html>, 该基因不存在于亚洲玉米螟中), 以及亚洲玉米螟的 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 克隆相应的 dsGFP_1 和 dsOfSP_C1 片段。再将克隆到的片段用 Hind III 和 Xba I 进行双酶切, 分别插入到 pKANNIBAL 载体上的克隆位点(Hind III /Xba I)之间, 此即为正向片段(Sense)。

[0344] 用相同的方法将含有 Kpn I 和 Xho I 酶切位点的基因特异引物 dsGFP_2F_Kpn I 和 dsGFP_2R_Xho I ;dsOfSP_C2F_Kpn I 和 dsOfSP_C2R_Xho I 用高保真酶 KOD, 分别以 GFP 以及亚洲玉米螟的 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 克隆相应的 dsGFP_2 和 dsOfSP_C2 片段。再将克隆到的片段用 Kpn I 和 Xho I 进行双酶切, 进而插入到相应的已经含有正向 dsGFP_1 和 dsOfSP_C1 片段的 pKANNIBAL 载体上的克隆位点(Kpn I /Xho I)之间。

[0345] 将构建好的 pKANNIBAL/dsGFP 和 pKANNIBAL/dsOfSP_C 载体分别用 Not I 进行酶切, 同时将 pART27 用 Not I 进行酶切, 分别将酶切下来的 dsGFP 和 dsOfSP_C 片段插入到 pART27 载体上, 从而获得分别携带相应目的片段的重组表达载体, 分别称为 35S::dsGFP 和 35S::dsOfSP_C 表达载体。

[0346] 前述制备过程中采用的引物如表 4。

[0347] 表 4

[0348]

代号	序列	SEQ ID NO:
dsGFP_1F_HindIII	CCCAAGCTTAGGACGACGGCAACTACAAG	22
dsGFP_1R_Xba I	GCTCTAGAGAACTCCAGCAGGACCATGT	23
dsOfSP_C1F_HindIII	CCCAAGCTTGACTGCGTCATCAGGATCTTCC	24
dsOfSP_C1R_Xba I	GCTCTAGACATCGGTGATCATGGTCCTGTC	25
dsGFP_2F_Kpn I	CGGGGTACCAGGACGACGGCAACTACAAG	26
dsGFP_2R_Xho I	CCGCTCGAGGAACTCCAGCAGGACCATGT	27
dsOfSP_C2F_Kpn I	CGGGGTACCGACTGCGTCATCAGGATCTTCC	28
dsOfSP_C2R_Xho I	CCGCTCGAGCATCGGTGATCATGGTCCTGTC	29

[0349] 2、根癌农杆菌的转化

[0350] 根癌农杆菌的转化采用冻融法。一个单菌落 GV3101、LBA4404 或 EHA105 (均购自 Invitrogen 公司), 3ml LB 培养基(含 50 μ g/ml 卡那霉素 Kan 和 25 μ g/ml 利福霉素 Rif), 28° C, 220rpm, 培养到 OD600=0.5(约 6 小时)。在冰上放置 30 分钟, 4° C, 5000g 离心 5 分钟。重悬于 10mL 0.15M NaCl。4° C, 5000g 离心 5 分钟。重悬于 1mL 20mM CaCl₂, 50 μ L/管分装, 液氮速冻, -80° C 保存感受态细胞。混合含目的基因的双元载体和 50 μ L/管感受态细胞, 在冰上放置 30 分钟, 液氮速冻 1 分钟。在 37° C 水浴中 5 分钟使菌液融化, 加 1mL LB 培养基, 28° C, 220rpm, 培养 2~4 小时。取 50~100 μ L 涂 LB 培养基平板(含 50 μ g/ml 卡

那霉素 Kan 和 25 μ g/ml 利福霉素 Rif)

[0351] 实施例 12、植物的转化以及转基因后代的筛选

[0352] 在本实施例中,以拟南芥、烟草以及玉米的转基因为例,其它植物的转化也可以此为参照。

[0353] 1. 拟南芥的转基因

[0354] 拟南芥植物的转化采用花芽浸泡法(floral dip)。一个含双元载体的单菌落 GV3101, 3mL LB 培养基(50 μ g/ml 卡那霉素 Kan、50 μ g/ml 庆大霉素 Gen 和 25 μ g/ml 利福霉素 Rif), 28° C, 220rpm, 12 小时。2mL 菌液, 50mL 培养基(50 μ g/ml 卡那霉素 Kan、50 μ g/ml 庆大霉素 Gen 和 25 μ g/ml 利福霉素 Rif), 28° C, 220rpm, 12 小时。4200rpm, 15 分钟。菌体重悬于 500mL 含 0.02%Silwet L-77 的 5% 蔗糖溶液中。植株花芽部分在菌液中浸泡 5 秒钟, 平放于塑料盆内, 保湿, 避光, 16~24 小时, 然后温室生长至开花结籽。T0 代种子在 4° C 春花 2~4 天, 用 20% 漂白水处理 15 分钟, 无菌水清洗 3~4 遍。悬于 0.5% 的琼脂糖(55° C), 铺在 0.6% 琼脂的 LB 培养基(含 50 μ g/ml 卡那霉素 Kan), 22° C, 连续光照, 约 1 周后, 绿色抗性苗移栽到营养土(泥炭:蛭石:珍珠岩=1:1:1)中生长。

[0355] 2. 烟草的转基因

[0356] 将含有目的基因的农杆菌 LBA4404 过夜培养(28° C 培养过夜, 至 OD600 $\approx$ 2.0)。将无菌烟草叶片切割成约 1.0cm² 大小, 浸泡在农杆菌培养液中 5~10 分钟。用无菌滤纸吸去多余的农杆菌培养液, 将浸泡过的烟草叶片铺在 1/2MS 固体培养基上, 暗培养两天。然后, 将叶片移至 MS (含 1mg/L 6-BA) 固体筛选培养基(Kan^r, Cefr), 隔 10~15 天更换新鲜 MS 培养基, 直至叶片伤口处长出小芽, 将新长出的小芽移至不含 6-BA 的 MS 培养基, 隔 10~15 天更换新鲜 MS, 直至其长根后, 移至土壤中种植。

[0357] MS 培养基: 4.4g/L Murashige and Skoog basal medium (Sigma, Cat. M5519), 蔗糖 15g/L, 0.8% 琼脂粉, MES 0.5g/L, pH 5.7。

[0358] 3. 玉米的转基因

[0359] 将含有目的基因的农杆菌 EHA105 在含 50 μ g/ml 卡那霉素 Kan 和 50 μ g/ml 利福霉素 Rif 的 YEP 液体培养基中 28° C 震荡培养至 OD600 $\approx$ 0.6, 8000rpm 离心 5 分钟收集农杆菌。菌体重悬于侵染培养基中, 在农杆菌转化前向重悬液中乙酰丁香酮(AS) 100 μ mol/L 和 0.05% 的表面活性剂 Silwet L-77。挑选整齐饱满的玉米种子, 用 70% 的乙醇浸泡 2~5 分钟, 然后用 0.1%HgCl₂ 浸泡 10~15 分钟, 再用无菌水冲洗 3~5 次。将灭菌种子放在无菌的三角瓶中, 加适量无菌水在培养箱中 25° C 暗培养待萌发, 种子发芽后转入萌发培养基上继续生长, 待苗长至 4cm 时剥离胚芽鞘和幼叶, 暴露出茎尖生长点, 用手术刀轻微挫伤用于转化。将茎尖浸泡在重悬液中并置于真空干燥器中, 在 50kPa 压力侵染 7min。侵染结束后用无菌滤纸吸净种子上多余菌液, 然后放在萌发培养基上, 25° C 黑暗条件下继续培养, 直至重新长出新叶片。将长出新叶片的转化苗用清水洗掉菌体后移栽到花盆中, 下部为土壤, 上部为 6~8cm 的蛭石。2~3 周后转化苗长至三叶期, 用 300ppm 的除草剂(农达) 喷洒在玉米叶片上进行转化植株的筛选, 经过筛选后将存活的植株移栽到温室中。

[0360] 实施例 13、转基因植物的分子生物学鉴定

[0361] 在本实施例中, 选取实施例 12 获得的 T3 代纯合株系转基因植物, 采用抗生素筛选、Northern 杂交对转基因植株进行验证。

[0362] 用于 Northern 检测的转膜：

[0363] 转膜：采用常规方法提取转基因植物的总 RNA 样品，在 RNA 样品中加入 10× 电泳加样液，混匀，65° C 放置 10 分钟，冰上冷却。电泳使用 15%TBE-urea PAGE 胶，1×TBE 电泳缓冲液。上样前预电泳 5~10 分钟并用电泳缓冲液冲洗泳道，除去上样孔中析出的尿素。每泳道加样量为 10~20 μg 总 RNA，电场强度 20V/cm，至溴酚蓝染料迁移至凝胶的底部时结束。凝胶在 1×TBE 中平衡 10 分钟。采用半干电转移系统(Hofer Semi-DryTransfer Units, Amersham, Cat. 80-6211-86) 转移 RNA。转移条件：40mA (约 7~8V)，2~4 小时，Hybond-N+ (Amersham, Cat. RPN303B) 尼龙膜。尼龙膜经 6×SSC 溶液短暂漂洗，紫外交联(120mJ)，夹在两层滤纸之间，80° C 烘烤 1 小时，备用。

[0364] 10×TBE：0.9M Tris, 0.9M 硼酸, 20mM EDTA (pH 8.0) (Sigma, Cat. T4415)；

[0365] 10× 电泳加样液：Ambion, Cat. 8546G；

[0366] 电泳胶储存液：15% 聚丙烯酰胺 (30%Acyl/bis, 19 : 1, 华舜, Cat. W443), 8M 尿素, 1×TBE；

[0367] 15%TBE-urea PAGE 胶(10mL)：10mL 电泳胶储存液, 80 μL 10% 过硫酸铵, 5 μL TEMED, 混匀；

[0368] 探针标记：取 25ng 纯化 PCR 产物作为模板标记探针。探针的标记使用 Prime-a-Gene Labeling System (Promega, Cat. U1100)。37° C 水浴 1 小时。标记探针在沸水中放置 5 分钟，立即置于冰上，备用。

[0369] 预杂交和杂交采用 (Clontech 的 ExpressHyb 体系)：将尼龙膜放入杂交管中，以 6×SSC 润湿，保证膜和管壁间没有气泡。倒掉 6×SSC，加入 5mL 杂交液，37° C 预杂交 60 分钟。预杂交结束后，更换 5mL 新鲜杂交液，加入探针，混匀，杂交过夜。

[0370] 洗膜与压片：杂交结束后，倒出杂交液。在室温下，用 2×SSC, 0.05%SDS，洗膜两次，每次 5 分钟，然后用 0.2×SSC, 0.1%SDS，在洗涤两次，每次 20 分钟。用保鲜膜包裹，胶带固定，压增感屏和 X-ray 胶片，-70° C, 2 天。胶片用 D-72 液显影。

[0371] Northern 检测表达含 GFP 和 OfSP_C 基因序列 dsRNA 的转基因拟南芥、烟草和玉米。

[0372] 实施例 14、检测表达 OfSP_C 基因序列 dsRNA 的转基因植物对玉米螟的影响

[0373] 取生长一致的三日龄玉米螟，分别喂以 dsGFP (对照)，dsOfSP_C 转基因拟南芥、烟草或玉米，每天观察玉米螟幼虫的表型。结果证明，取食 dsOfSP_C 转基因玉米的幼虫死亡率显著高于取食 dsGFP 的转基因玉米。

[0374] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0001]

序列表

<110> 中国科学院上海生命科学研究院

<120> 基于 RNAi 技术防治害虫的新方法

<130> 113046Z1

<160> 35

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 2426

<212> DNA

<213> 亚洲玉米螟 (*Ostrinia furnacalis* Guenée)

<400> 1

```

acatggggac acagttgagc ttcaacgagt cggtgcagt atgagggtg tagtactatt    60
ggtttttgcc attgcggett tggccgtgg ccggcaagtc gacgatacca tgcttggtaa    120
agacatcgtc acgatggaca tcaaggagag gcaaatgttc atcttgaaat tacttaacca    180
cgttctggag cccgtcatgt acaaggaaat cgaagatatt ggcaagaact tcaacattga    240
agagaacatt cagctgttta ccaggactga agtagtgaag aagtttatct actactacaa    300
gcttggtatg cttectegtg gtgagatctt caccatecac gtggaccgcc agctgaagga    360
agtcgtctcc atgttccaca tgcctacta cgcacaagac ttctgcacct tcatcaagac    420
cgcattcggt atgcgccttt accttaacga aggcattgtt gtctatgetc tcaactgtagc    480
cgtcagacac cgtgaagact gcaagggtat cattcttctt ccccatcacg aatatctacc    540
atactacitc ttgcgcgccg atgttatcca gaaggcttac ttactcaaga tgagacgagg    600
actccttgac cacaagctgt gcgacttcta cggaaatcaag aagactgaca aggatgtcta    660
catcatgatg gagaacacat acgacagaag aacaactctc aattacgatg acaagcttcg    720
ctacttcacc gaggacattg accttaacac ctactactac tacttccacg tcgactatcc    780
gttctggatg agagacgaat gcttcgacaa gatcaggatc aggcgtttcg aacttactct    840
gtacatgtac cagcaaatc ttgccagata ctacctggag cgtctgtcta atggtcttgg    900
tgagattaaa actcttcat acaacaacc gatcaagaac ggatactggc cctggatgat    960
gttcacaaac ggtgttcaat tccctaagag gcagaacaac tatgttgtca tccgtgatga    1020
cgttattgag aatctcgtc ttgcagacgc atacgaaatg atcatcaagg aagctattgt    1080
caagggtatc gttgaagtca atggettaag actggaactg accaagactg atgatatcga    1140
gactcttggc agactcatct acggaagat tgacaagggt gacgtggaca aataccacat    1200
tgatgettac agataacctg tcatcatcat gaaatcgatt cttggactga acacgttgaa    1260
atctgacaaa tacttctcg ttcttctgt cttggacagc taccagaccg ctctcctgta    1320
cccagtcitc tacaacitcc agaaacgtct cattgaattg gtcttctct tcaaatgtcg    1380
tetgcatgac tacaacaagg acgacctcta ctccctggc gtgaagatcg acaacgtcgt    1440
ggttgacaag ctcttcactt acttcgatga ctacctgat gacatgacca acgccgttat    1500
gtcactgaa gatgaactca agaagaccac ttccgatcgt aaattcttcg tccgcaaacg    1560
ccgtctgaat caccagecct tcaaagtgac cgtcgatgtt ctctcagaca aaaccgtga    1620
ctcgctcate aggatcttcc tgggaccgaa agaggaccac caccgctgc tcattgacat    1680
caacaagaac cgcattgaact tcgtcgaact cgacagcttc ctctacaaac tgggtcaatgg    1740
caagaacact attgtcagga actccttcga catgcacaac ctggtccgeg accgcatcat    1800
gaccgcgcac ctctggaaga aggttgacac catcactgac ttcagagatc tccctgtcaa    1860
ggacctcaga aacttccaca ctggtttccc caccaggttg cttctgccc gaagtaaggt    1920
tggagggtat aagatgatgc tgtacgtcat cgtgactcct ctgaagttgg tcgacaacgt    1980

```

[0002]

```

tgacctcaac attctggaca ccaacegcaa agaattcatg atggaattca ggtcgactgt 2040
tcttttggac aagaggcctc ttggtttccc attcgaccgt cgcattgatg tagtgaagtt 2100
cttcactect aacatgaagt ttgtcgatgt tatgatcttc cacaagaagc aggtttgcga 2160
catgaagact cgctggaaca aatacgtgtt gaagaactac gacatgtatg acaggaccat 2220
gatcaccgat gacacctect tegtgcacat cgacatccac acgaagtcaa tggtagacca 2280
tgacgtcaac gtgttcgaca attactaaat ggtaataata ttctagatt atagtccaaa 2340
gaatgatgac tgagctaga ttacagcaa gttaaaaaat gtaaaaaaat aaaaataaat 2400
aatttaataa acaaaaaaaaa aaaaaa 2426

```

<210> 2

<211> 755

<212> PRT

<213> 亚洲玉米螟 (*Ostrinia furnacalis* Guenée)

<400> 2

```

Met Arg Ala Val Val Leu Leu Val Leu Ala Ile Ala Ala Leu Ala Ala
1           5           10          15
Gly Arg Gln Val Asp Asp Thr Met Leu Gly Lys Asp Ile Val Thr Met
          20          25          30
Asp Ile Lys Glu Arg Gln Met Phe Ile Leu Lys Leu Leu Asn His Val
          35          40          45
Leu Glu Pro Val Met Tyr Lys Glu Ile Glu Asp Ile Gly Lys Asn Phe
          50          55          60
Asn Ile Glu Glu Asn Ile Gln Leu Phe Thr Arg Thr Glu Val Val Lys
          65          70          75          80
Lys Phe Ile Tyr Tyr Tyr Lys Leu Gly Met Leu Pro Arg Gly Glu Ile
          85          90          95
Phe Thr Ile His Val Asp Arg Gln Leu Lys Glu Val Val Ser Met Phe
          100         105         110
His Met Leu Tyr Tyr Ala Lys Asp Phe Val Thr Phe Ile Lys Thr Ala
          115         120         125
Cys Trp Met Arg Leu Tyr Leu Asn Glu Gly Met Phe Val Tyr Ala Leu
          130         135         140
Thr Val Ala Val Arg His Arg Glu Asp Cys Lys Gly Ile Ile Leu Pro
          145         150         155         160
Pro Pro Tyr Glu Ile Tyr Pro Tyr Tyr Phe Leu Arg Ala Asp Val Ile
          165         170         175
Gln Lys Ala Tyr Leu Leu Lys Met Arg Arg Gly Leu Leu Asp His Lys
          180         185         190
Leu Cys Asp Phe Tyr Gly Ile Lys Lys Thr Asp Lys Asp Val Tyr Ile
          195         200         205
Ile Asp Glu Asn Thr Tyr Asp Arg Arg Thr Thr Leu Asn Tyr Asp Asp
          210         215         220
Lys Leu Arg Tyr Phe Thr Glu Asp Ile Asp Leu Asn Thr Tyr Tyr Tyr
          225         230         235         240
Tyr Phe His Val Asp Tyr Pro Phe Trp Met Arg Asp Glu Cys Phe Asp
          245         250         255
Lys Ile Arg Ile Arg Arg Phe Glu Leu Thr Leu Tyr Met Tyr Gln Gln
          260         265         270
Ile Leu Ala Arg Tyr Tyr Leu Glu Arg Leu Ser Asn Gly Leu Gly Glu
          275         280         285
Ile Lys Thr Leu Thr Tyr Asn Lys Pro Ile Lys Asn Gly Tyr Trp Pro

```

[0003]

290	295	300
Trp Met Met Leu His Asn Gly Val Gln Phe Pro Lys Arg Gln Asn Asn		
305	310	315
Tyr Val Val Ile Arg Asp Asp Val Ile Glu Asn Leu Arg Leu Ala Asp		
325	330	335
Ala Tyr Glu Met Ile Ile Lys Glu Ala Ile Val Lys Gly Phe Val Glu		
340	345	350
Val Asn Gly Leu Arg Leu Glu Leu Thr Lys Thr Asp Asp Ile Glu Thr		
355	360	365
Leu Gly Arg Leu Ile Tyr Gly Lys Ile Asp Lys Val Asp Val Asp Lys		
370	375	380
Tyr His Ile Asp Ala Tyr Arg Tyr Leu Leu Ile Ile Met Lys Ser Ile		
385	390	395
Leu Gly Leu Asn Thr Leu Lys Ser Asp Lys Tyr Phe Val Val Pro Ser		
405	410	415
Val Leu Asp Ser Tyr Gln Thr Ala Leu Arg Asp Pro Val Phe Tyr Lys		
420	425	430
Leu Gln Lys Arg Leu Ile Asp Leu Val Phe Leu Phe Lys Leu Arg Leu		
435	440	445
Pro Cys Tyr Asn Lys Asp Asp Leu Tyr Phe Pro Gly Val Lys Ile Asp		
450	455	460
Asn Val Val Val Asp Lys Leu Val Thr Tyr Phe Asp Asp Tyr Leu Met		
465	470	475
Asp Met Thr Asn Ala Val Met Leu Thr Glu Asp Glu Leu Lys Lys Thr		
485	490	495
Thr Ser Asp Met Lys Phe Phe Val Arg Lys Arg Arg Leu Asn His Gln		
500	505	510
Pro Phe Lys Val Thr Val Asp Val Leu Ser Asp Lys Thr Ala Asp Cys		
515	520	525
Val Ile Arg Ile Phe Leu Gly Pro Lys Glu Asp His His Gly Arg Leu		
530	535	540
Ile Asp Ile Asn Lys Asn Arg Met Asn Phe Val Glu Leu Asp Ser Phe		
545	550	555
Leu Tyr Lys Leu Val Asn Gly Lys Asn Thr Ile Val Arg Asn Ser Phe		
565	570	575
Asp Met His Asn Leu Val Arg Asp Arg Ile Met Thr Arg Asp Leu Trp		
580	585	590
Lys Lys Val Asp Thr Ile Thr Asp Phe Arg Asp Leu Leu Val Lys Asp		
595	600	605
Leu Arg Asn Phe His Thr Gly Phe Pro Thr Arg Leu Leu Leu Pro Arg		
610	615	620
Ser Lys Val Gly Gly Met Lys Met Met Leu Tyr Val Ile Val Thr Pro		
625	630	635
Leu Lys Leu Val Asp Asn Val Asp Leu Asn Ile Leu Asp Thr Asn Arg		
645	650	655
Lys Asp Phe Met Met Asp Phe Arg Ser Thr Val Leu Leu Asp Lys Arg		
660	665	670
Pro Leu Gly Phe Pro Phe Asp Arg Arg Ile Asp Val Val Lys Phe Phe		
675	680	685
Thr Pro Asn Met Lys Phe Val Asp Val Met Ile Phe His Lys Lys Gln		
690	695	700

[0004]

Val Cys Asp Met Lys Thr Arg Trp Asn Lys Tyr Val Leu Lys Asn Tyr
 705 710 715 720
 Asp Met Tyr Asp Arg Thr Met Ile Thr Asp Asp Thr Ser Phe Val Asp
 725 730 735
 Ile Asp Ile His Thr Lys Ser Met Val Asp His Asp Val Asn Val Phe
 740 745 750

Asp Asn Tyr
 755

<210> 3
 <211> 430
 <212> DNA
 <213> 亚洲玉米螟 (*Ostrinia furnacalis* Guenée)

<400> 3
 ctattggttt tggccattgc ggctttggcc gctggccggc aagtcgacga taccatgett 60
 ggtaaagaca tegtacgat ggacatcaag gagaggcaaa tttcatett gaaattactt 120
 aaccacgttc tggagccgt catgtacaag gaaatcgaag atatggcaa gaactcaac 180
 attgaagaga acattcagct gtttaccagg acigaagtag tgaagaagtt tatctactac 240
 tacaagettg gtatgettcc tegtggtag atcttcacca tccacgtgga cggccagctg 300
 aaggaagtcg tctccatgt ccacatgctc tactacgcca aagacttctg cacttcate 360
 aagaccgat gctggatgcg cctttacctt aacgaaggca tgttcgteta tgcctcact 420
 gtagccgtca 430

<210> 4
 <211> 625
 <212> DNA
 <213> 亚洲玉米螟 (*Ostrinia furnacalis* Guenée)

<400> 4
 tgacaagett cgtacttca ccgaggacat tgaccttaac acctactact actacttcca 60
 cgtcgactat ccgttctgga tgagagacga atgcttcgac aagatcagga tcaggcgttt 120
 cgaacttact ctgtacatgt accagcaaat tcttgccaga tactacctgg agcgtctgtc 180
 taatggctct ggtgagatta aaactcttac atacaacaaa ccgatcaaga acggatactg 240
 gccctggatg atgttgcaaa acggtgttca attccctaag aggcaagaaca actatgttgt 300
 catccgtgat gacgttattg agaattctcg tcttgccagc gcatacgaaa tgatcatcaa 360
 ggaagctatt gtcaagggat tcttgaagt caatggctta agactggaac tgaccaagac 420
 tgatgatata gagactcttg gaagactcat ctacggaaag attgacaagg tggacgtgga 480
 caaataccac atgatgett acagatacct gctcatcacc atgaaatcga ttcctggact 540
 gaacacgttg aaatctgaca aatacttctg cgttccctct gtcttggaac gctaccagac 600
 cgtctccctg gaccagctct tctac 625

<210> 5
 <211> 613
 <212> DNA
 <213> 亚洲玉米螟 (*Ostrinia furnacalis* Guenée)

<400> 5
 gactgcgtca tcaggatett cctgggaccg aaagaggacc accacggccg tctcattgac 60
 atcaacaaga accgatgaa cttcgtcgaa ctgcacagct tctctacaa actgtgcaat 120
 ggcaagaaca ctattgtcag gaactcttc gacatgcaca acctggctcg cgaccgcatc 180
 atgaccgcg acctcggaa gaaggttgac accatcactg acttcagaga tctcctgtc 240

[0005]

```

aaggacctca gaaacttcca cactggtttc cccaccaggt tgcttctgcc cagaagtaag 300
gttggaggta tgaagatgat gctgtacgtc atcgtgactc ctctgaagtt ggtcgacaac 360
gttgacctca acattctgga caccacccgc aaagacttca tgaaggactt caggtegact 420
gttcttttgg acaagaggcc tcttggtttc ccattcgacc gtcgcattga tgtagtgaag 480
ttcttcactc ctaacatgaa gtttgcgat gttatgatct tccacaagaa gcaggtttgc 540
gacatgaaga ctgcctggaa caatacgtg ttgaagaact acgacatgta tgacaggacc 600
atgatcaccg atg 613

```

<210> 6
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> misc_feature
 <223> 引物
 <400> 6

```

taatacgact cactataggg agactattgg ttttggccat tgcgg 45

```

<210> 7
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> misc_feature
 <223> 引物
 <400> 7

```

taatacgact cactataggg agatgacggc tacagtgaga gcata 45

```

<210> 8
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> misc_feature
 <223> 引物
 <400> 8

```

taatacgact cactataggg agatgacaag cttegtact tcacc 45

```

<210> 9
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> misc_feature
 <223> 引物
 <400> 9

```

taatacgact cactataggg agagtagaag actgggtcac ggaga 45

```

<210> 10
 <211> 45
 <212> DNA

[0006]

<213>	人工序列	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	引物	
<400>	10	
	taatacgact cactataggg agagactgcg tcatcaggat cticc	45
<210>	11	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	引物	
<400>	11	
	taatacgact cactataggg agacateggt gatcatgggc ctgtc	45
<210>	12	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	引物	
<400>	12	
	taatacgact cactataggg aggacgacgg caactacaag	40
<210>	13	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	引物	
<400>	13	
	taatacgact cactataggg gaactccagc aggaccatgt	40
<210>	14	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	引物	
<400>	14	
	catggggaca cagttgagct tc	22
<210>	15	
<211>	23	
<212>	DNA	

[0007]

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<223> 引物

<400> 15

tgctgtaaat ctagecctcag tca

23

<210> 16

<211> 2442

<212> DNA

<213> 棉铃虫(Helicoverpa armigera Hubner)

<400> 16

gaattcacta	gtgattatgg	gtcgtttggg	gttggtgtgt	ctggcgcctc	tagtgccggg	60
gggccactcg	gaccccgta	ggagcaacct	ctcgcagaaa	gctgcggacc	cagtgttctc	120
gcaacgccaa	tiggatttga	tggctcttga	cttccacctt	cttgaaccga	atcatcttga	180
ctcttgccaa	gtatcgcta	agtcctggag	tctcgagagg	aacatcgaa	attacagcaa	240
tgtgactget	gtaactactt	acatcgagat	gttgagcac	cagtggatac	tcccacgtgc	300
ggtacccttc	tcgcttctgc	aagccgagca	cagattcgga	gcgctcacct	tatacaatgt	360
gcttatctct	gctaaggact	acgacacatt	ctacaagacc	gctgtttacg	ttagggatct	420
cgtaacgag	aacctcttcg	cttacgtgct	cagtatagcc	attctgaacc	gccctgacac	480
ccaaggcatt	tacatccctc	gccttcttga	agtcctcccg	tcatacttct	acaacggtga	540
aattatgaca	accgctcaga	ggattaacac	ccatggccaa	aacatggttg	agcactaccc	600
ttcaacctac	aatgggaca	acaatgtggt	gatcaggtgg	aatgctacga	tctggcctta	660
cttaagaage	gaaaccaatgc	ctcttgctta	cttcaactcat	gacttcagcc	taaacacctt	720
ctactacaac	ctccatcttg	cccaaccag	ctggctgcac	agtgaagtgc	ttccagtga	780
caaacacagg	cgtggagaat	ggttctgggt	cttgcacaag	cagatcttca	ctcgttacta	840
catggagaga	ctgtctaacg	gactcgggtg	aatccccgag	cttggccacg	agattgttca	900
gtacgggttac	gcttcgggtc	tttgttacc	caatggcggtg	cccttccctg	caaggcccaa	960
ctactttaac	ttggatcagc	cccagctcgt	taatgaaatc	caagaaatcc	tcgactacga	1020
gcgcggtatt	cgtgacgcca	tcgaccaggg	ttacgttgtt	aaccaccttg	gtgaacacat	1080
tgacatctgc	gtctctgagg	ccatcgaaat	cttgggttagc	attattgagg	ctaactgtga	1140
ctctctaat	gccaaatact	acaaggacct	catcagcacc	tggagaagg	ttttggcgga	1200
ctctattgtt	caagacaacc	agtaccacaa	caactacgtc	cctctggttg	ttccctcggt	1260
tttggagcac	taccagactg	ctttgcgtga	ccccgcgttc	tacatgatct	ggaagcgtgt	1320
cttgggactg	ttccaaatgt	ggcaggagaa	acttctctctg	tacaagaaag	aagaactggc	1380
ttctccccag	gtggccatcc	agaaggctga	tgtagacaag	ctggtgacat	acttcgaata	1440
cacttacttg	aacgtctctt	ctcacctgca	catgaaccag	gatgaagtta	agggttacta	1500
cgaccaagtc	agcgtgttgg	tacagcaacc	cgtcttgaac	cacaagaggt	tccaagtctg	1560
cgtgaacgtt	aagagcgagg	tcgctaagac	cgttctctgc	aagttcttct	tggcgcccaa	1620
atatgacagc	caaggctatg	agatccctct	tcacatcaac	accagaaact	ttatgcagct	1680
ggatgagttc	acgtatgacc	ttcttgcggg	cgaatgcaca	attactcgtg	attccattga	1740
cacctctggc	aagaagtggg	gttcggttat	cgagatatat	gaggcgggtg	agaaggctgt	1800
gcaaggcaag	ggacagtaca	ccatcgaccc	gaacatggag	aaactcgcg	aacatcttat	1860
gctgcctaag	ggtcgcgtcg	gaggcatgcc	gttcgtctctg	atggtctaca	tctcagagta	1920
ccacgcccgc	aaggttgcct	ccgaacaagt	ctcgtaccca	gctttgtctc	ttggcctgtc	1980
tcccgttatt	cgccaactga	ccgacgagcc	attcggttct	ccagtcacaa	ggcctcttca	2040
cccatggcag	gtggaggggag	tcaagaacct	gtacctccaa	gatgtcttga	tctaccacaa	2100
gcataccccc	gaaatcgagg	ttccccacat	ggaataagcg	attctcggga	tgttatgtac	2160
gccagattta	gaacaatgat	acttctcctg	gaataaacta	ctgagcttct	ggaatgaaga	2220
taagatccat	atgtctctta	tgaagcaagg	gctgatgaac	tagctcaaat	tacttcaage	2280
tcttcaattt	ggcgtcgaca	aacaattaat	gtgcatttat	gttatgttca	tgtattatgt	2340

[0008]

atttattagt atatgtatatt attgttgatg gatatcttct tataatgtgtg tattgcatta 2400
tgtagtgaat tatactatga tgatcaaaaa aaaaaaaaaa aa 2442

<210> 17

<211> 707

<212> DNA

<213> 棉铃虫(Helicoverpa armigera Hubner)

<400> 17

eggtgaaatt atgacaaccg ctgagaggat taacacccat ggccaaaaca tggttgagca 60
ctacccttca acctacaaat gggacaacaa tgtgtgtgat aggtggaatg ctacgatctg 120
gccttactta agaagcgaaa ccatgctctt tgettacttc aetcatgact tcagcetaaa 180
caccttctac tacaacctcc atcttgccca acccagctgg ctgcacagtg aagttcttcc 240
agtgaacaaa cacaggcgtg gagaatgggt ctggttcttg cacaagcaga tctcacteg 300
ttactacatg gagagactgt ctaacggact cggtgaaate cccgagcttg gccacgagat 360
tgttcagtae ggtaacgctt cgggtctttt gtaccacaat ggctgtccct tccctgcaag 420
ggccaaactac tttaacttgg atcagcccca gctcgttaat gaaatccaag aaatcctcga 480
ctacgagcgc cgtattctgt acgccatcga ccagggttac gttgttaacc accttggtga 540
acacattgac atctgcctgc ctgagggcat cgaatctctg ggtagcatta ttgagcetaa 600
cgttgactct cctaatgcca aatactaca ggaattcacc agcatctgga agaaggtttt 660
gggcgactct attgttcaag acaaccagta ccacaacaac tacgtcc 707

<210> 18

<211> 2537

<212> DNA

<213> 小菜蛾(Plutella xylostella)

<400> 18

tcgagcggcc gcccgggcag gtctgcagga tgagagctgc gggtttctt ctgcttggtt 60
tagcggctat ggcccgggcc ggcaccgtca ctgatatcga cagaaatacc gatatgacga 120
cgatggacat caagacgaag caaatgtgga tctgaagtt gctgaaccac atcatgcagc 180
cctgcatgta caaggaaatc gtcgacatcg gcaagaactt caaaatcgag gactgtaccg 240
actgttacgt gaaaaccgag gtcgtgaaga aattcatcga ctgcatgaag gttggcatgt 300
tgccctcgcc tgagatcttc actctccacg tcgaccgcca gatgaaggag gttgtcaaa 360
ctttccatct cctttatttc gcaaaggact tcaccacttt cctcaagact gccgtctgga 420
tgccgtcteta cctgaacgag ggcattgttc ttatccgctt cactgtggcc tgccgccacc 480
gcgaggactg ccgcggcacc atcctgcctc ctccctacga aatctaccgg tactacttcc 540
tcctgtctga tgtcatccag aaggcctaca agctcaagat gaagagggga cttctcgacg 600
ccaagctctg cgagttctac ggtatcaaga agactgacaa agatgtctat gtgatcgatg 660
agaatattta tgacaaacga gtttacctga actacgacga caagctccgc tacttcacgg 720
aagacatcga cctaaacacc tactactact acttccatgc tgactatccg ttctggatga 780
gggatgacat cttcaggaac gatttcacca aaataaggcg tggcgaaate tgtttataca 840
tgtatgaaca actgcttgc aggcattacc ttgaacgtct ttccaacggg ttggcgaga 900
ttactaccct gtcttggaac aaacccatca agaagggtt cgtgccttgg atgaccctgc 960
acaacgggtg tcagatcccc atgaggtgga acaaccacgt aattgttccg gatgacaacg 1020
ttgacattat cactttggtt gaaacctgtg aaaagattat caaggagcc attttcaagg 1080
gtacattga gattaacggc ataagactag agctcaacaa acctgaggat gttgaacatc 1140
ttggcagact tatctttgga aagcttgaga agaccgacct tgacaagaca cgctacgacg 1200
cttaccgcta ctgtctatc atcatgaaat ccgttatgtg acttaacacc ttcaaatctg 1260
acaagtactt cgtcatccg acactgttg acagctacca gactgccctg cgtgaccccg 1320
tattctggcg tcttcagaag aggattgttg acttcttgat ctatttcaag aggcgcctcc 1380
cttctacac cagggaagag ctccacttcc ccggagtcaa gatcgacaac attgtggttg 1440
acaaacttgt cacttacttc gacgactaca tgatggacat gaccaacgct gttatgcttt 1500

[0009]

```

ctgacgagga actgaagaag accaagactg acatgaaatt cctagtaacg aaacgcgcgc 1560
tcaatcacca gcctttcaag gtaacatttg aagttttgtc tgacaagacg acagactgcg 1620
tagtcaggat cttctctggg cctaagaagg atgtctacgg acgtttgatt gacatcaaca 1680
ggaacgcct taactttgtc gagcttgaca cattcgtcta caaactaac acaggcaaga 1740
atgttattgt cagggactcc atggacatgc ataacttggg gcgcgaccgc gtcttcaact 1800
acgactgggt gaagaagctc gataccgttg gagacatcca tcaattgtac atcagagacc 1860
tgaagaacta caacacgcgc tccccacia ggtctctctt acctagggc cagctggcg 1920
gcatggaatt catgctctac tgcattgttt ctccccctgcg tattgtcgag aacgttgacc 1980
agaccctcat cagagacacg accegttaagg acttctctgt tcagtacagg tctactgtgc 2040
ttctggacaa gatgctctc ggctaccctc tggaccgtca cattgacgc gctaggttct 2100
tcaccccaaa catgaagatt gtcgaagtc agatcttcca caagaagatg gtctgtgaca 2160
tgaagactcg ctgggagaag tatgtgttga agaactaca ctacaacttc ttcgacaaga 2220
tgcacatgga cgtggaccac acctactctg acctctctga ggttgacaca gacatcaacc 2280
gcgcgcgcgc catccgcgac gacagcatgg aaagactgta aagcaagcta cacaactaa 2340
agaaattcaa ctcaattact ttaacggctt gaccacetaa cgattctcaa ataccagtaa 2400
agcattaaaa aaatcaaaat atgtcacagt gcatactgtt taaaaacta tttattctag 2460
gaataactgt attataaacc tatttaata caacatcaat gtattgtgat atattttaat 2520
aaaaatatat atgnaag 2537

```

<210> 19

<211> 2450

<212> DNA

<213> 小菜蛾(*Plutella xylostella*)

<400> 19

```

gtcggtgca ggatgagagc tgtttgttc gttctgttcg cctctgcgcg tgcggttcg 60
gccaccccg ccttcgacag caatgactac gagaccaagc tgacaacaac aatggacata 120
aagaccaagc aaatctggct cctgaagctt ctgaaccaca tctacagcc ggtcatgtac 180
aaggaagtag aggaattgg caagaacttc aaaatcgagg accacgttga cttttactcg 240
aaatccgacg ttgtgaagcg ttttgtcaac tgcattgaaga ttggcatgct tctctgtgce 300
gagatcttca ctctccacgt cgaccgcgag atgaaggagg tcatcagcgc ctccacctg 360
ctctactacg ccaaggactt caccaccttc ctcaagactg cctgctggat gcgtctctac 420
ctgaacgagg gcattgttct ctacgcgcgc actgtggcct gccgcacgc cgaggactgc 480
cgcgccatca tctgcctcc tccctacgaa atctaccctg actacttctg tctgtctgat 540
gtcatccaga acgctacaa gctgaagatg aagagaggac tcttgaccg caagctctgc 600
gagttctacg gcatcaagaa gaccgacaag gacgtctatg tgatcgatga gaacgtttat 660
gacaagcgcg tgtacctcaa ccgcgacgac aaactcaggt acttactga agacatcgac 720
ctgaacacct actactacta ctccacgtt gactatccgt tctggatgag ggatgacatc 780
ttcaggaacg atttactaa gaccaggcgt ggagaaatct gctatacat gatgcagcaa 840
ctgcttgcgc gacactactt agagcgccct tcaaacggcc tggcgagat caccactctg 900
tcttgaaca aaccatcaa gaaggatc gtgccctgga tggcgtgca caacggtgtc 960
caactcccca tgagggtgaa caaccacgtc atcgtccgtg aggacaacgt agatgtctc 1020
cgctagtcg aagactacga gatgatcgc aaggaagcta tcatcaagg atacatcgag 1080
atcaacaatg tgaagtttga actcatcaag cctgaggacg tcaatacct gggcagatta 1140
atctacggaa agattgagaa aaccgacctt gacaagactc gcttcgatgc ttaccgtac 1200
cttctcatca tcatgaaatc cgccattggc ctcaacacga tgaagtctga caagtacttc 1260
gtgatgcaa cactcctcga cagctaccag accgctctcc gtgacctgt cttctggcgt 1320
cttcaaaaaga ggatcgtcga cttcttgatt ctgttcaaga ggcgtctgcc ttactacaca 1380
agggaggaac tgcaattcca gggagtgaag attgagaagg ttgtcgttga caaacttate 1440
acatacttcg acgactactt catggacatg actaacgcgc ttatgctaac cgacgaagag 1500
ttgaagaaaa ccacttccga catgacattc ttggttcgca agcgtgcct taatcacgaa 1560
cccttcaaag taaccctcga tgtttactca gacaaggcca ccgactgtgt tgtgagaatt 1620

```

[0010]

```

ttcctgggac cgaaaaagga tgttcacgga cgtctgatcg acttcaacag gaaccgtctc 1680
aacttttggt agctggacac ctctgtgtac aaactggaaa cggcaagaa caccatcgtc 1740
agggaactcta tggacatgca caacttggtg cgtgaccgcg tcatgacaca cgacttctgg 1800
aagaagctcg accacgccag tgacatcaag cagctglaca tcaaggacct caggaactac 1860
aacaccggct tcccgaccag gctgctcctg cccaagggtc gctggggagg tatggagatg 1920
atgctctact gcattgtatc accgctgaag atcgtcgaga acgtggacca gactctgata 1980
agagacacca cccgcaagga ctctctggig aacttcaggt ccacttgtit gctggacaag 2040
atgcctctcg gtttcccgct ggaccggctc gtggacgtgt cccggttctt caccagcaac 2100
atgaagctgg tcgacgtggt ggtgtaccac aagaagaagg tgtcgcacat gaagagccgc 2160
tgggagaagt tcgtctgtag ggactacaac atgggtggac ggacgcccat cgacgccggc 2220
acttatttca ccgacttctg ggaggtggac accgacatcc gccgaagga ccgtttccga 2280
gacgacagcc tcgagcatct gtaaagtatt cactcactg ataaaccgaa cgctaacag 2340
tttacttatg aaatgtcatg attacttacg agctaacagc atatttttta ttacagaaaa 2400
ataatatcaa ttgtgatatg tgacatatta ataaagcaag tatttaata 2450

```

<210> 20

<211> 637

<212> DNA

<213> 小菜蛾(*Plutella xylostella*)

<400> 20

```

acgtcgaccg ccagatgaag gaggttgta aagctttcca tctctttat ttcgcaaagg 60
acttcaccac tttctcaag actgcctgct ggatgcgtct ctacctgaac gagggcatgt 120
tcgtctacgc gctcactgtg gcctgccgcc accgcgagga ctgcccggc atcactctgc 180
ctctctcccta cgaaatctac ccgtactact tcgtccgtgc tgatgtcacc cagaaggcct 240
acaagctcaa gatgaagagg ggacttctcg acgccaaagt ctgcgagttc tacggtatca 300
agaagactga caaagatgct tatgtgatcg atgagaatat ttatgacaaa cgagtttacc 360
tgaactacga cgacaagctc cgtacttca cggaagacat cgacctaac acctactact 420
actacttcca tgctgactat ccgttctgga tgagggatga catcttcagg aacgatttca 480
ccaaaataag gcgtggcgaa atctgtttat acatgatgca acaactgctt gccaggcatt 540
acettgaacg tctttccaac ggtttggcgc agattactac cctgtcctgg aacaaacca 600
tcaagaaggg attcgtgcc tggatgacct tgcacaa 637

```

<210> 21

<211> 643

<212> DNA

<213> 小菜蛾(*Plutella xylostella*)

<400> 21

```

acgtcgaccg ccagatgaag gaggtcatea gcgccttcca cctgctctac tacgccaaagg 60
acttcaccac tttctcaag actgcctgct ggatgcgtct ctacctgaac gagggcatgt 120
tcgtctacgc gctcactgtg gcctgccgcc accgcgagga ctgcccggc atcactctgc 180
ctctctcccta cgaaatctac ccgtactact tcgtccgtgc tgatgtcacc cagaaggcct 240
acaagctgaa gatgaagaga ggactccttg accccaagt ctgcgagttc tacggcatca 300
agaagaccga caaggacgct tatgtgatcg atgagaacgt ttatgacaag cgcgtgtacc 360
tcaaccgcca cgacaaactc aggtacttca ctgaagacat cgacctgaac acctactact 420
actacttcca cgttgactat ccgttctgga tgagggatga catcttcagg aacgatttca 480
ctaagaccag gcgtggagaa atctgcctat acatgatgca gcaactgctt gcccgacact 540
acttagagcg cttttcaaac ggctcggcgc agatcacgac tctgtcctgg aacaaacca 600
tcaagaaggg attcgtgcc tggatggcgc tgcacaacgg tgt 643

```

<210> 22

<211> 29

[0011]

<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	引物	
<400>	22	
	cccaagetta ggacgacggc aactacaag	29
<210>	23	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	引物	
<400>	23	
	getctagaga actccagcag gaccatgt	28
<210>	24	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	引物	
<400>	24	
	cccaagettg actgcgtcat caggatcttc c	31
<210>	25	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	引物	
<400>	25	
	getctagaca tcggtgatca tggctctgtc	30
<210>	26	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	引物	
<400>	26	
	cggggtacca ggacgacggc aactacaag	29
<210>	27	
<211>	29	
<212>	DNA	

[0012]

<213> 人工序列	
<220>	
<221> misc_feature	
<223> 引物	
<400> 27	
ccgctcgagg aactccagca ggaccaatgt	29
<210> 28	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> misc_feature	
<223> 引物	
<400> 28	
cgggggtaccg actgcgtcat caggatcttc c	31
<210> 29	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> misc_feature	
<223> 引物	
<400> 29	
ccgctcgagc atcgggtgac atggtcctgt c	31
<210> 30	
<211> 46	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> misc_feature	
<223> 引物	
<400> 30	
taatacgact cactataggg agacggtgaa attatgacaa ccgctc	46
<210> 31	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> misc_feature	
<223> 引物	
<400> 31	
taatacgact cactataggg agagacgtag ttgttgtggt actgg	45
<210> 32	
<211> 45	

[0013]

<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	引物	
<400>	32	
taatacgact cactataggg agaacgtcga ccgccagatg aagga		45
<210>	33	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	引物	
<400>	33	
taatacgact cactataggg agattgtgca gggtcaccca gggca		45
<210>	34	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	引物	
<400>	34	
taatacgact cactataggg agaacgtcga ccgccagatg aagga		45
<210>	35	
<211>	43	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	引物	
<400>	35	
taatacgact cactataggg agaacaccgt tgtgcagcgc cat		43

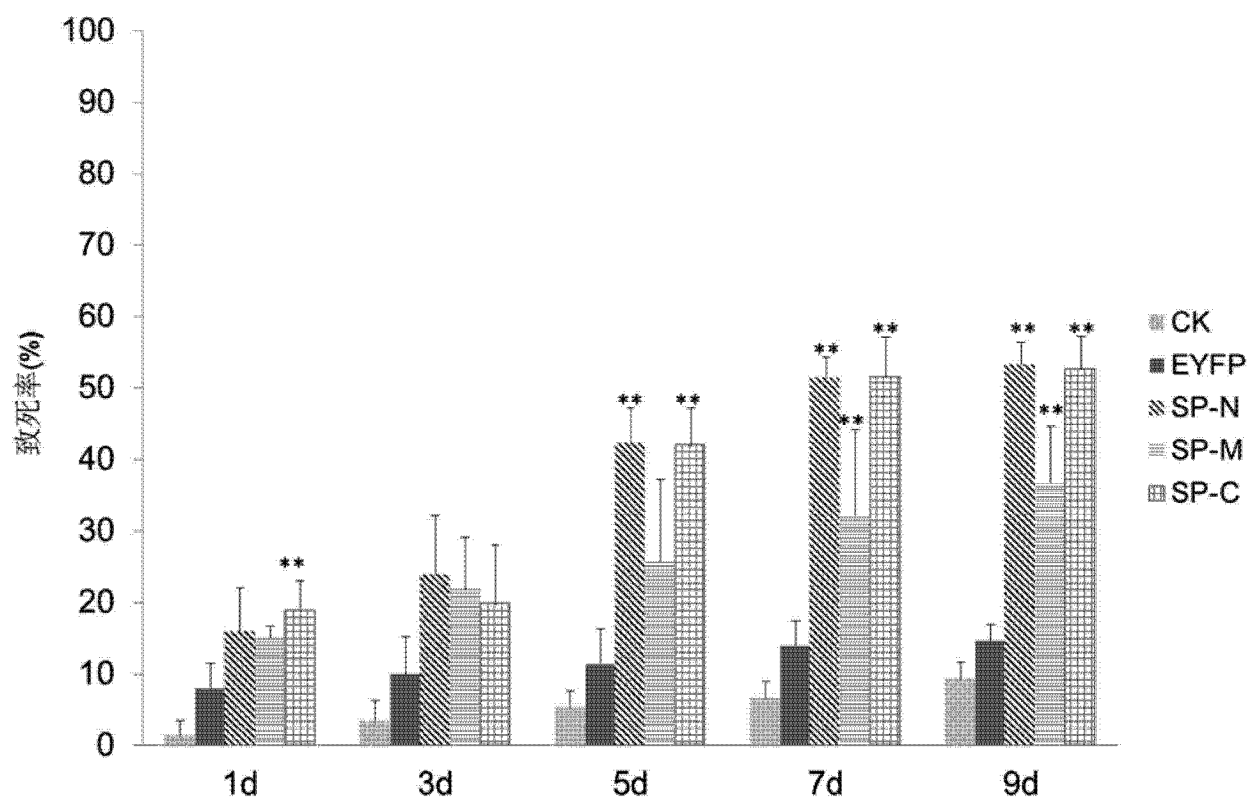


图 1

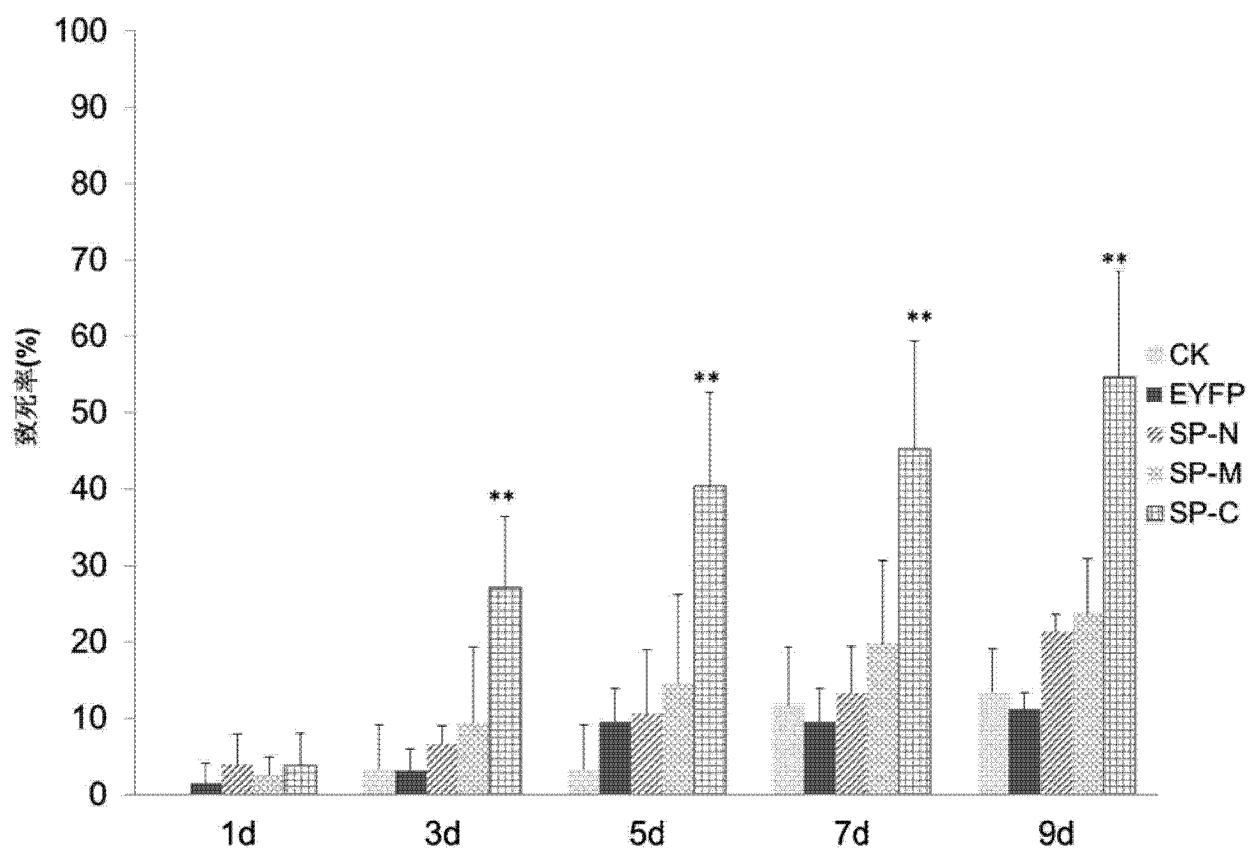


图 2

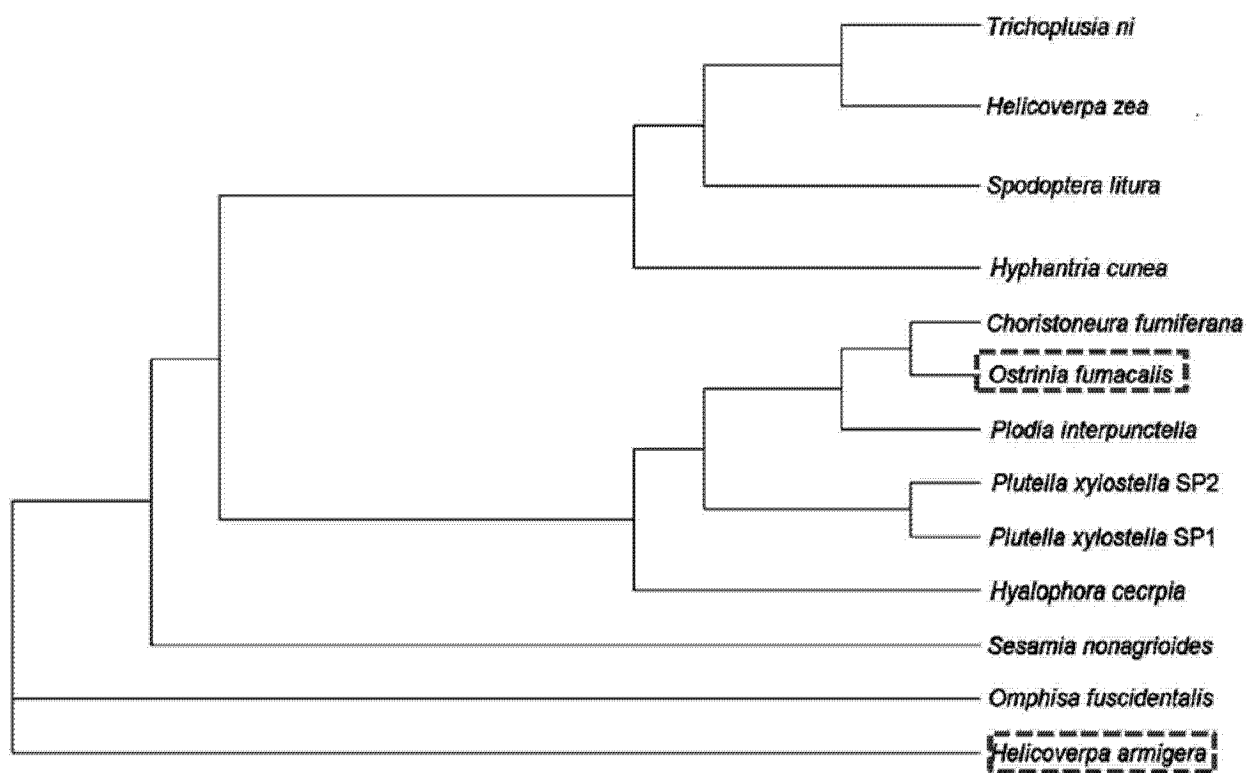


图 3

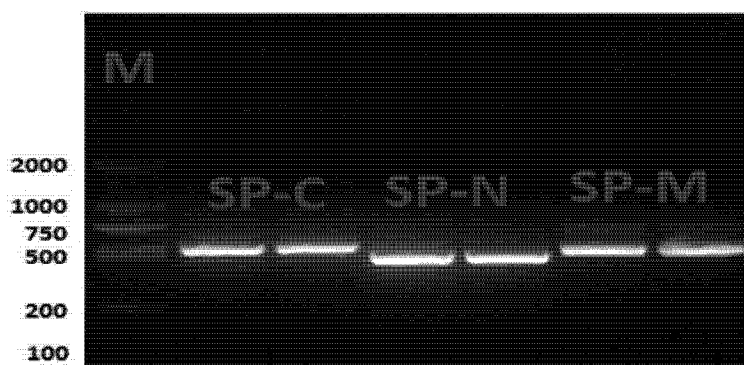


图 4

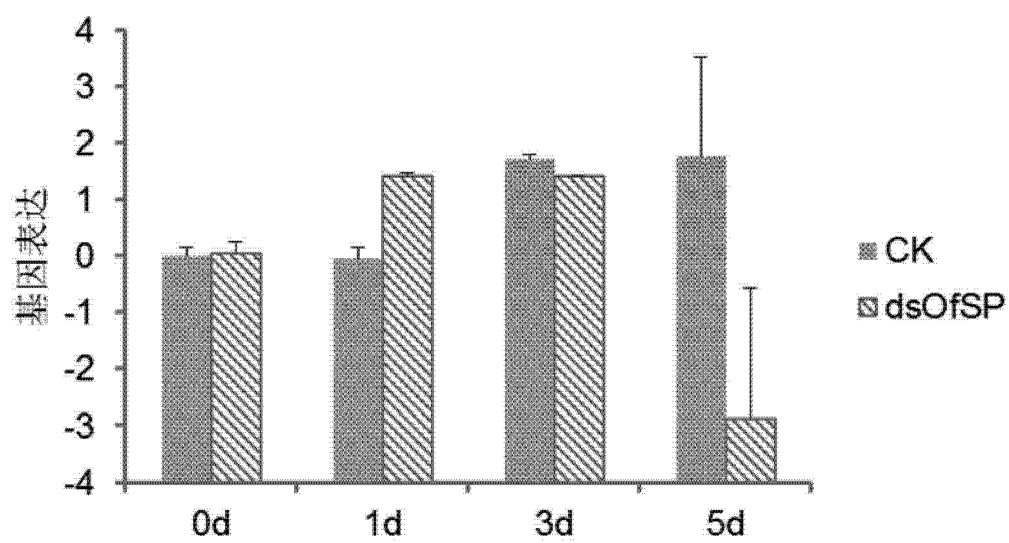


图 5

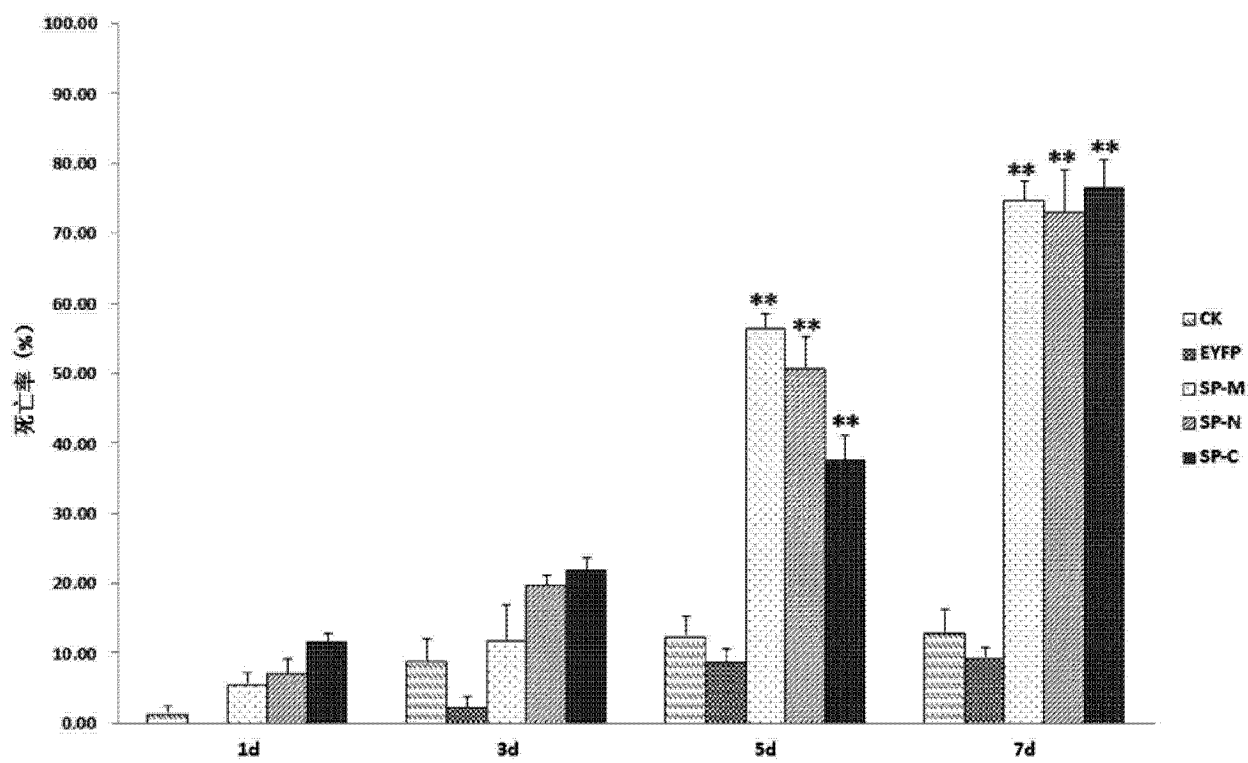


图 6

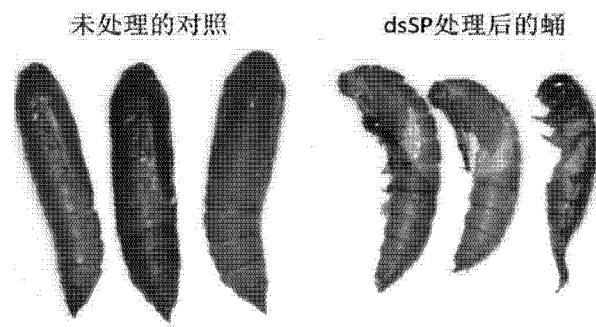


图 7

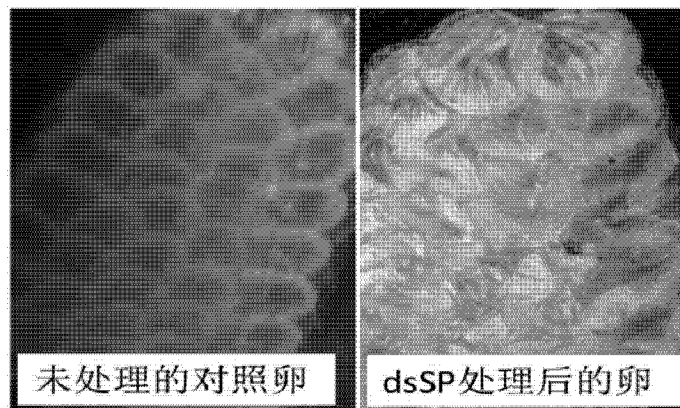


图 8

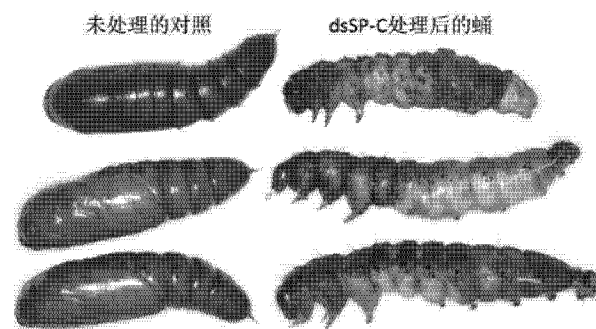


图 9

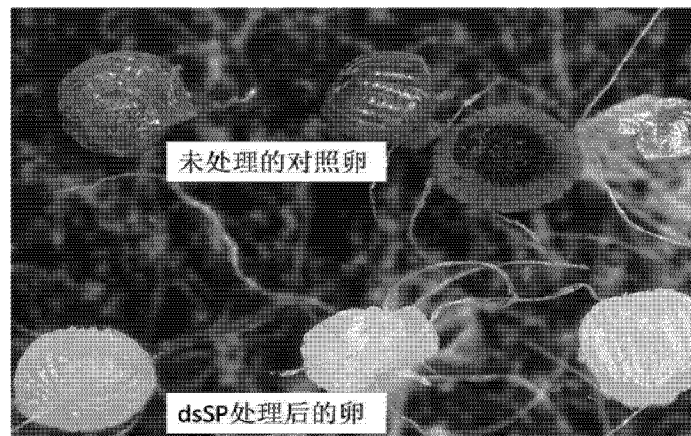


图 10

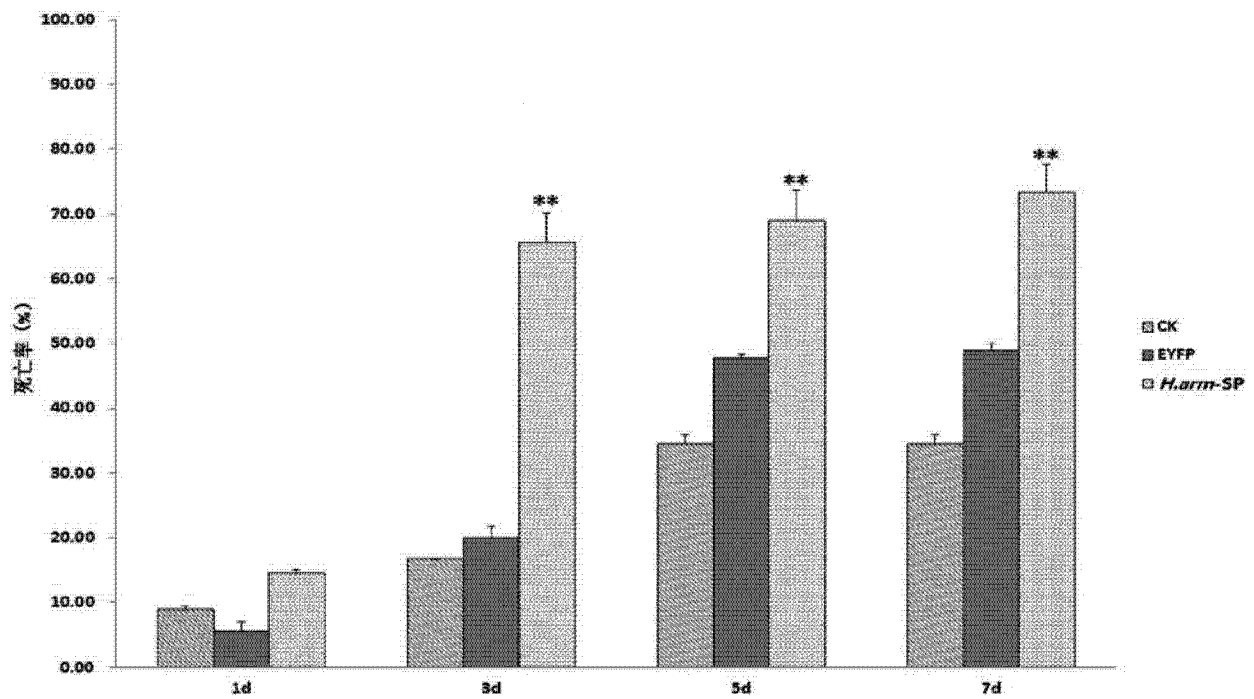


图 11

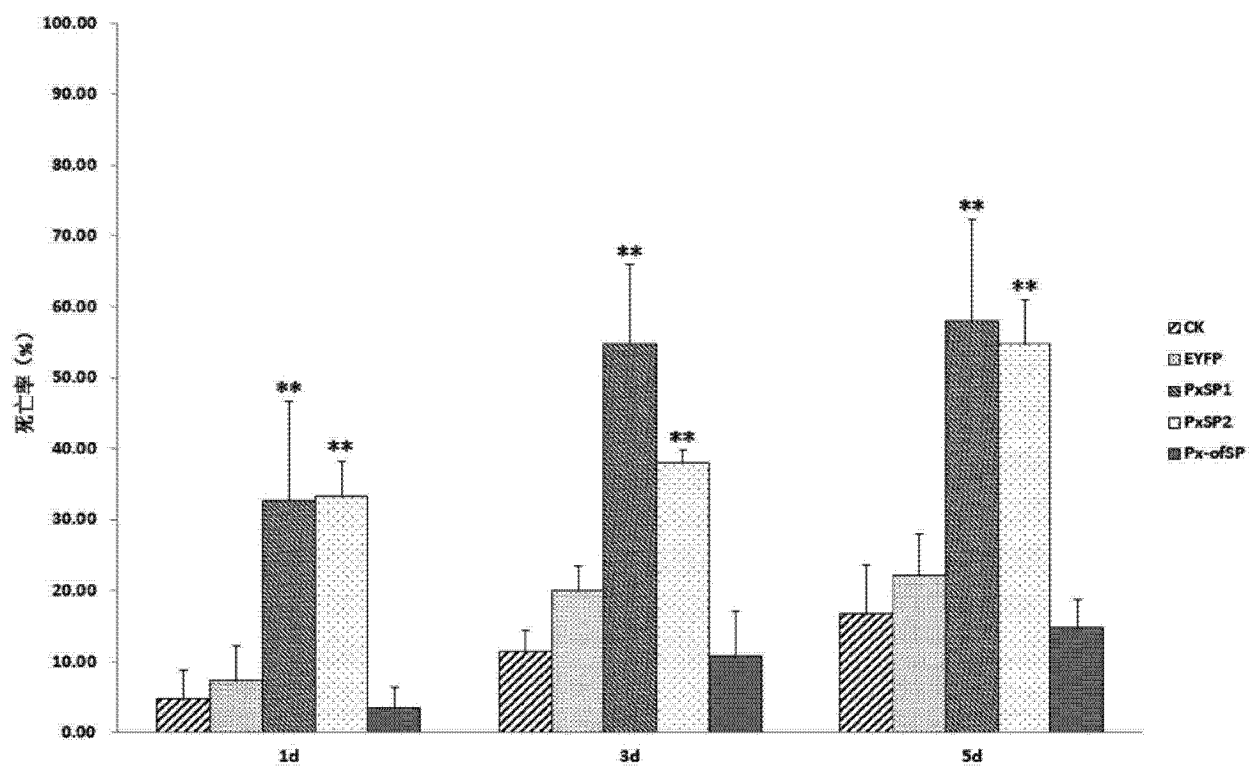


图 12

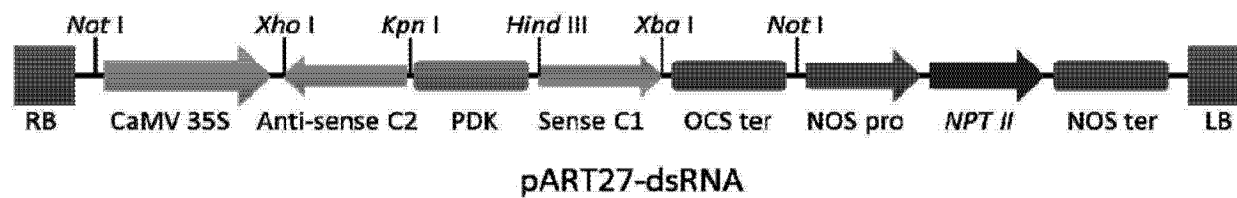


图 13