

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/12

C07K 14/435 C12N 7/01

C07H 21/04 A01H 1/00



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 02135768.4

[45] 授权公告日 2005 年 3 月 23 日

[11] 授权公告号 CN 1194091C

[22] 申请日 2002.11.8 [21] 申请号 02135768.4

[71] 专利权人 山东大学

地址 250100 山东省济南市山大南路 27 号

[72] 发明人 赵小凡 王金星

审查员 王青华

[74] 专利代理机构 济南三达专利事务所

代理人 孙 君

权利要求书 4 页 说明书 11 页

[54] 发明名称 棉铃虫蜕皮调节转录因子 cDNA 及其克隆方法与重组应用

[57] 摘要

棉铃虫蜕皮调节转录因子 cDNA 及其克隆方法与重组应用, 属于生物基因工程技术领域。棉铃虫蜕皮调节转录因子具有 SEQ ID NO 1 和 SEQ ID NO.2 所示的序列。本发明的克隆方法是, 从棉铃虫中提取总 RNA 或 mRNA, 反转录合成 cDNA; 根据蜕皮调节转录因子的保守序列设计引物, 通过链式聚合酶反应扩增到一个 DNA 片段; 将扩增产物纯化, 取纯化产物克隆到 pGEM-T Easy 载体, 转化 DH5 α 细胞, 平板过夜培养。本发明棉铃虫蜕皮调节转录因子, 通过基因重组技术在昆虫核型多角体病毒中进行表达, 获得有杀虫活性的基因重组病毒, 用于害虫防治; 或者通过基因工程方法将棉铃虫蜕皮调节转录因子专入作物, 获得具有抗虫能力的作物。

1. 棉铃虫蜕皮调节转录因子 cDNA, 其特征在于, 具有如下序列:

(1) SEQ ID NO 1 的信息

(a) 序列特征:

- * 长度: 1668 碱基对
- * 类型: 核酸
- * 链型: 双链
- * 拓扑结构: 线性

(b) 分子类型: cDNA

(c) 假设: 否

(d) 反义: 否

(e) 最初来源: 棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*)

(f) 序列描述: SEQ ID NO.1

```

atgaacaaca accagttcca cgattttatit gggtcccagt ggccctccgga ccagcacgga      60
ggtcactcgt cggcatcgac gatgctgcac cagtcccagg gcctgccccca gggatatgcag      120
ctgaagagag aacctcatac ggatgtgcag ccggtgatgc acaaccagat gggcacggac      180
atcacgtcag ggtccgtggc ggacagcaca tccccccgcg ctggcagcag tgacgggatg      240
ttcggctcgt ctatatctgg catgtttatg gataagaaag ccgctaattc tataagagct      300
caaatcgaaa taataccatg caagggtgtgt ggggataaat catctggagt ccactatggc      360
gtcatcacct gcgaggggtg caagggtttc ttacaggogat cacagagtac agtgggtgaac      420
taccagtgtc cacggaataa agcctgcgtg gtogaccggg tcaacagaaa tcgtttgtcag      480
tattgcagat tgcagaaatg cctcaaaactt ggaatgagcc gtgatgcggt gaagtttgga      540
cggatgtcga aaaagcaacg tgagaagggt gaagatgagg tgagattcca tcgcgcacag      600
atgagagctc agactgacac ggccgcccgc tcagtatacg acgctcaaca acaaacgccg      660
agctcaagcg accagttcca tggtcactac aatggctacc cgggctacgg gtccgcttg      720
tcctcatatg ggtacaacaa cgcaggggccg gogctacagt ccaacatggg aggcatacag      780
cctcaagcac ctcaacagca gccctatgac gtgtoggctg attacgtgga ctccaccag      840
gcttacgagc cgaaacagac cgaggggattc ttggatcctg attttattag tcatgcggag      900
ggtgacatca gcaaagtcct ggtgaagagt ttggcagaag cacacgcaaa taccaacccc      960
aaactggagt tcattcatga gatgttcaga aagccacagg atgtctccaa gcttctatac      1020
tatagttcaa tgacgtacga ggaaatgttg ctggattgtg cagacaaatt aactgggatg      1080
attcagaata ttatcgagtt cgctaaactt ataccgggt tcatgaaact gactcaggat      1140
gatcagattt tgctcttgaa atctggctcg ttogagctcg ccatagtccg gctgtcgcga      1200
ctgatagacg tcaaccgtga ccaagtgcta taoggtgatg cgggtgctgtc catcagagaa      1260
tgtgtgcatg cacgtgaccc ccgcgacgtg gcgctgggtg ttggtatctt cgacgcggca      1320
aagacgatcg ctcgactcaa actcactgag actgaactgg cgtatatacca gagccttgtg      1380
ctattgtggc cagagcggca cggcgtccgc ggcaaccctg agatccagtg cctgttcaac      1440
atgtcgatgg cggcgatgcg gcacgagatc gagaccaacc acgccccct caaggagagac      1500

```

gtcactgttc tggacacgct gctcgccaag ataccacact tcagagaact atcactgatg 1560
 cacctggaag ctttgtgocg cttcaaggcc gccaccccc accacgtatt cccggccctc 1620
 tacaaggagc tgttctcact cgacagcgtc ctggactaca cccacggt 1668。

2. 一种权利要求1所述棉铃虫蜕皮调节转录因子cDNA的克隆方法,包括如下步骤:

(1) 从棉铃虫提取总RNA或mRNA, 然后反转录合成cDNA;

(2) 根据蜕皮调节转录因子的保守序列设计引物:

正向引物: 5'-ATGAACAACAACCAGTTCCAC-3'

反向引物: 5'-GTCCTGGACTACACCCACGGT-3'

(3) 通过链式聚合酶反应扩增到一个DNA片段;

(4) 将扩增产物纯化, 取纯化产物克隆到pGEM-T Easy载体, 转化DH5 α 细胞, 平板过夜培养。

3. 如权利要求2所述棉铃虫蜕皮调节转录因子cDNA的克隆方法, 其特征在于, 所述步骤

(1) 中反转录合成cDNA是第一链合成cDNA, 取5~10微克总RNA或mRNA, 加反应液20微升, 反应液是50毫摩尔氯化钾和3毫摩尔氯化镁混合液, 10毫摩尔三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲pH 8.3, 1毫摩尔二硫苏糖醇, 5微摩尔寡聚脱氧胸腺核苷酸, 500微摩尔脱氧核糖核苷酸混合物, 25单位RNA酶抑制剂, 8单位AMV逆转录酶, 42°C反应90分钟, 70°C反应10分钟终止反应。

4. 如权利要求2所述棉铃虫蜕皮调节转录因子cDNA的克隆方法, 其特征在于, 链式聚合酶反应试剂与条件如下:

首先将下列试剂混在一起:

10xTaq DNA 聚合酶缓冲液 5 微升

模板 cDNA 1 μ l

正向引物 1.25 μ g/ μ l 1 μ l

反向引物 1.25 μ g/ μ l 1 μ l

脱氧核苷酸混合物 4 μ l

Taq DNA 聚合酶 0.25 μ l

灭菌水 37.75 μ l

总体积 50 μ l

链式聚合酶反应条件为: 首先94°C 变性2分钟, 然后进入下列循环: 94°C 30秒, 53°C 45秒, 72°C 45秒, 共进行30个循环, 最后72°C延伸10分钟。

5. 一种权利要求1所述棉铃虫蜕皮调节转录因子cDNA的重组应用, 通过基因重组技术在昆虫核型多角体病毒中进行表达, 获得有杀虫活性的基因重组病毒, 用于害虫防治; 或者通过基因工程方法将棉铃虫蜕皮调节转录因子专入作物, 获得具有抗虫能力的作物。

6. 棉铃虫蜕皮调节转录因子, 其特征在于, 具有如下序列:

(2) SEQ ID NO. 2 的信息

(a) 序列特征

* 长度: 556 氨基酸

* 类型: 氨基酸

* 链型：单链

* 拓扑结构：线性

(b) 分子类型：蛋白质

(c) 序列描述

Met	Asn	Asn	Asn	Gln	Phe	His	Asp	Leu	Phe	Gly	Ser	Gln	Trp	Pro
1				5					10					15
Pro	Asp	Gln	His	Gly	Gly	His	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Met	Leu	His
16				20					25					30
Gln	Ser	Gln	Gly	Leu	Pro	Gln	Gly	Met	Gln	Leu	Lys	Arg	Glu	Pro
31				35					40					45
His	Thr	Asp	Val	Gln	Pro	Val	Met	His	Asn	Gln	Met	Gly	Thr	Asp
46				50					55					60
Ile	Thr	Ser	Gly	Ser	Val	Ala	Asp	Ser	Thr	Ser	Pro	Pro	Pro	Gly
61				65					70					75
Ser	Ser	Asp	Gly	Met	Phe	Gly	Ser	Ser	Ile	Ser	Gly	Met	Phe	Met
76				80					85					90
Asp	Lys	Lys	Ala	Ala	Asn	Ser	Ile	Arg	Ala	Gln	Ile	Glu	Ile	Ile
91				95					100					105
Pro	Cys	Lys	Val	Cys	Gly	Asp	Lys	Ser	Ser	Gly	Val	His	Tyr	Gly
106				110					115					120
Val	Ile	Thr	Cys	Glu	Gly	Cys	Lys	Gly	Phe	Phe	Arg	Arg	Ser	Gln
121				125					130					135
Ser	Thr	Val	Val	Asn	Tyr	Gln	Cys	Pro	Arg	Asn	Lys	Ala	Cys	Val
136				140					145					150
Val	Asp	Arg	Val	Asn	Arg	Asn	Arg	Cys	Gln	Tyr	Cys	Arg	Leu	Gln
151				155					160					165
Lys	Cys	Leu	Lys	Leu	Gly	Met	Ser	Arg	Asp	Ala	Val	Lys	Phe	Gly
166				170					175					180
Arg	Met	Ser	Lys	Lys	Gln	Arg	Glu	Lys	Val	Glu	Asp	Glu	Val	Arg
181				185					190					195
Phe	His	Arg	Ala	Gln	Met	Arg	Ala	Gln	Thr	Asp	Thr	Ala	Pro	Asp
196				200					205					210
Ser	Val	Tyr	Asp	Ala	Gln	Gln	Gln	Thr	Pro	Ser	Ser	Ser	Asp	Gln
211				215					220					225
Phe	His	Gly	His	Tyr	Asn	Gly	Tyr	Pro	Gly	Tyr	Gly	Ser	Pro	Leu
226				230					235					240
Ser	Ser	Tyr	Gly	Tyr	Asn	Asn	Ala	Gly	Pro	Ala	Leu	Gln	Ser	Asn
241				245					250					255
Met	Gly	Gly	Ile	Gln	Pro	Gln	Ala	Pro	Gln	Gln	Gln	Pro	Tyr	Asp
256				260					265					270

Val	Ser	Ala	Asp	Tyr	Val	Asp	Ser	Thr	Thr	Ala	Tyr	Glu	Pro	Lys
271				275					280					285
Gln	Thr	Glu	Gly	Phe	Leu	Asp	Pro	Asp	Phe	Ile	Ser	His	Ala	Glu
286				290					295					300
Gly	Asp	Ile	Ser	Lys	Val	Leu	Val	Lys	Ser	Leu	Ala	Glu	Ala	His
301				305					310					315
Ala	Asn	Thr	Asn	Pro	Lys	Leu	Glu	Phe	Ile	His	Glu	Met	Phe	Arg
316				320					325					330
Lys	Pro	Gln	Asp	Val	Ser	Lys	Leu	Leu	Tyr	Tyr	Ser	Ser	Met	Thr
331				335					340					345
Tyr	Glu	Glu	Met	Trp	Leu	Asp	Cys	Ala	Asp	Lys	Leu	Thr	Gly	Met
346				350					355					360
Ile	Gln	Asn	Ile	Ile	Glu	Phe	Ala	Lys	Leu	Ile	Pro	Gly	Phe	Met
361				365					370					375
Lys	Leu	Thr	Gln	Asp	Asp	Gln	Ile	Leu	Leu	Leu	Lys	Ser	Gly	Ser
376				380					385					390
Phe	Glu	Leu	Ala	Ile	Val	Arg	Leu	Ser	Arg	Leu	Ile	Asp	Val	Asn
391				395					400					405
Arg	Asp	Gln	Val	Leu	Tyr	Gly	Asp	Ala	Val	Leu	Ser	Ile	Arg	Glu
406				410					415					420
Cys	Val	His	Ala	Arg	Asp	Pro	Arg	Asp	Val	Ala	Leu	Val	Val	Gly
421				425					430					435
Ile	Phe	Asp	Ala	Ala	Lys	Thr	Ile	Ala	Arg	Leu	Lys	Leu	Thr	Glu
436				440					445					450
Thr	Glu	Leu	Ala	Leu	Tyr	Gln	Ser	Leu	Val	Leu	Leu	Trp	Pro	Glu
451				455					460					465
Arg	His	Gly	Val	Arg	Gly	Asn	Pro	Glu	Ile	Gln	Cys	Leu	Phe	Asn
466				470					475					480
Met	Ser	Met	Ala	Ala	Met	Arg	His	Glu	Ile	Glu	Thr	Asn	His	Ala
481				485					490					495
Pro	Leu	Lys	Gly	Asp	Val	Thr	Val	Leu	Asp	Thr	Leu	Leu	Ala	Lys
496				500					505					510
Ile	Pro	Thr	Phe	Arg	Glu	Leu	Ser	Leu	Met	His	Leu	Glu	Ala	Leu
511				515					520					525
Cys	Arg	Phe	Lys	Ala	Ala	His	Pro	His	His	Val	Phe	Pro	Ala	Leu
526				530					535					540
Tyr	Lys	Glu	Leu	Phe	Ser	Leu	Asp	Ser	Val	Leu	Asp	Tyr	Thr	His
541				545					550					555
Gly														
556.														

棉铃虫蜕皮调节转录因子 cDNA 及其克隆方法与重组应用

(一) 技术领域

本发明涉及生物基因工程技术领域中的克隆、表达技术，具体涉及棉铃虫蜕皮调节转录因子 cDNA 及克隆、表达技术。

(二) 背景技术

自有机合成农药在 40 年代问世以来，在保证农业丰收方面起了巨大作用，但它对人类的危害也日趋明显，对环境造成严重污染、危害人类健康已成为不争的事实，因使用农药而中毒的事件时有发生。大量使用广谱性杀虫剂使害虫天敌及有益生物也一同被消灭，打破了自然界的生态平衡，引起新的害虫猖獗。大量使用有机合成农药还使害虫产生抗药性，形成无药可治的害虫，目前合成新药剂的速度往往赶不上害虫产生抗性的速度。化学农药带来的种种问题已引起全世界注意，减少和合理使用化学农药、从耕作制度、作物栽培及生物防治等入手，对害虫实行综合防治势在必行，利用分子生物学和基因工程技术控制害虫是当今生物学领域的研究热点和前沿。本发明旨在克隆棉铃虫蜕皮过程中关键因子-蜕皮调节转录因子基因，将该基因重组到目前已经在田间害虫防治中使用的核型多角体病毒，构建基因重组核型多角体病毒，通过对人及环境安全的昆虫核型多角体病毒载体使棉铃虫蜕皮调节转录因子在害虫体内表达，干扰害虫的正常生长和发育，导致害虫非正常蜕皮而死亡，从而达到控制害虫的目的，减少害虫防治中对化学农药的依赖，保护人类生存环境和人类健康。

昆虫幼虫要经过多次蜕皮才能变为成虫，蜕皮过程是由体内的蜕皮激素引起的，在昆虫生长发育过程中，蜕皮激素 (Ecdysteroid) 的滴度呈现出周期性的变化，在蜕皮激素滴度升高时，昆虫停止取食，行动迟缓，最后蜕皮，在体内则引发一系列级联反应，蜕皮激素与蜕皮激素结合蛋白 (Ecdysteroid receptor, EcR) 及 ultraspiracle (USP) 结合成为三聚体，然后结合在 DNA 上，诱导产生蜕皮调节转录因子 (molt regulating transcription factor, 又称为激素结合子, Hormone Receptor, HR3)。蜕皮调节转录因子 (HR3) 有多种功能，它结合于 DNA，启动蜕皮早期必需的蛋白酶和几丁质酶表达，使旧表皮中的蛋白质和几丁质被分解吸收，同时阻遏幼虫表皮蛋白表达，并结合蜕皮激素使蜕皮激素水平下降，随着蜕皮激素水平下降，不再产生蜕皮调节转录因子，表皮蛋白得以表达，形成新的表皮，同时，在蜕皮激素下降后，蜕壳激素 (Eclosion Hormone) 释放，使旧表皮脱落，多巴脱羧酶也在蜕皮激素下降后出现，合成表皮硬化必需的前体物——多巴胺，使表皮完成鞣化和硬化。如果人为使虫体内持续产生蜕皮调节转录因子，它可结合于 DNA，启动蜕皮早期反应，同时它的持续存在又抑制表皮蛋白表达，使新表皮不能产生，蜕皮晚期基因不能表达，从而导致虫体死亡。

国外已对烟草天蛾、柞蚕卷蛾、蜡螟、果蝇的蜕皮调节转录因子进行了分子克隆和作用机理研究，基因库 (GenBank) 检索结果证明目前尚无棉铃虫蜕皮调节转录因子的研

究报道。昆虫核多角体病毒具有种属特异性，不感染人及其它脊椎动物，国内外均已经用做生物杀虫剂并在大田应用，但野生型核型多角体病毒杀虫速度较慢，在自然界使用达不到理想的防虫效果。通过基因工程方法，将棉铃虫蜕皮调节转录因子基因转入核型多角体病毒，可以使害虫提前进入蜕皮，从而增加核型多角体病毒的杀虫速度。通过基因工程方法，将棉铃虫蜕皮调节转录因子基因转入作物体内，可以引起取食的害虫进入非正常的提前蜕皮导致死亡，达到控制害虫的目的。由于棉铃虫属于鳞翅目夜蛾科，因此该项发明对其它鳞翅目害虫、特别是夜蛾科害虫的防治具有参考意义。

(三) 发明内容

本发明针对现有技术的不足，提供一种从棉铃虫提取的棉铃虫蜕皮调节转录因子 cDNA，并提供棉铃虫蜕皮调节转录因子 cDNA 的克隆方法以及重组技术。

本发明从棉铃虫中克隆到棉铃虫蜕皮调节转录因子 cDNA，它具有 SEQ ID NO 1 和 SEQ ID NO.2 所示的序列：

(1) SEQ ID NO 1 的信息

(a) 序列特征：

- * 长度：1668 碱基对
- * 类型：核酸
- * 链型：双链
- * 拓扑结构：线性

(b) 分子类型：cDNA

(c) 假设：否

(d) 反义：否

(e) 最初来源：棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*)

(f) 序列描述：SEQ ID NO.1

```

atgaacaaca accagttcca cgattttattt ggggtcccagt ggcctccgga ccagcacgga      60
ggtcactcgt cggcatcgac gatgctgcac cagtcccagg gcctgccccca gggatatgcag      120
ctgaagagag aacctatac ggatgtgcag cgggtgatgc acaaccagat gggcacggac      180
atcacgtcag ggtccgtggc ggacagcaca tccccccgc ctggcagcag tgacgggatg      240
ttcggtcgt ctatatctgg catgtttatg gataagaaag ccgctaattc tataagagct      300
caaatcgaaa taataccatg caaggtgtgt ggggataaat catctggagt ccactatggc      360
gtcatcacct gcgaggggtg caagggtttc ttcaggcgat cacagagtac agtgggtgaac      420
taccagtgtc cacggaataa agcctgcgtg gtcgaccggg tcaacagaaa tcgttgtcag      480
tattgcagat tgcagaaatg cctcaaactt ggaatgagcc gtgatgcggt gaagtttgga      540
cggatgtcga aaaagcaacg tgagaagggt gaagatgagg tgagattcca tgcgcacag      600
atgagagctc agactgacac ggcgcccgac tcagtatacg acgctcaaca acaaacgccg      660
agctcaagcg accagttcca tggtcactac aatggctacc cgggctacgg gtcgccgttg      720
tcctcatatg ggtacaacaa cgcagggccg gcgctacagt ccaacatggg aggcatcacg      780
cctcaagcac ctcaacagca gccctatgac gtgtcggctg attacgtgga ctccaccacg      840
gottacgagc cgaaacagac cgagggattc ttggatcctg attttattag tcatgcggag      900

```

```

ggtgacatca gcaaagtcct ggtgaagagt ttggcagaag cacacgcaaa taccaacccc      960
aaactggagt tcattcatga gatgttcaga aagccacagg atgtctccaa gcttctatac      1020
tatagttcaa tgacgtacga ggaaatgtgg ctggattgtg cagacaaatt aactgggatg      1080
attcagaata ttatcgagtt cgctaaactt ataccgggt tcatgaaact gactcaggat      1140
gatcagatgt tgctcttgaa atctggctcg ttcgagctcg ccatagtccg gctgtcgcga      1200
ctgatagacg tcaaccgtga ccaagtgcta tacggtgatg cgggtgctgtc catcagagaa      1260
tgtgtgcatg cacgtgaccc ccgcgacgtg gcgctggtgg ttggtatctt cgacgcggca      1320
aagacgatcg ctcgactcaa actcactgag actgaactgg cgctatacca gagccttgtg      1380
ctattgtggc cagagcggca cggcgtccgc ggcaaccctg agatccagtg cctgttcaac      1440
atgtcgatgg cggcgatgcg gcacgagatc gagaccaacc acgccccct caaggagac      1500
gtcactgttc tggacacgct gctcgccaag ataccacct tcagagaact atcactgatg      1560
cacctggaag ctttgtgccg cttcaaggcc gccaccccc accacgtatt cccggccctc      1620
tacaaggagc tgttctcact cgacagcgtc ctggactaca cccacggt      1668

```

(2) SEQ ID NO. 2 的信息

(a) 序列特征

- * 长度: 556 氨基酸
- * 类型: 氨基酸
- * 链型: 单链
- * 拓扑结构: 线性

(b) 分子类型: 蛋白质

(c) 序列描述

```

Met Asn Asn Asn Gln Phe His Asp Leu Phe Gly Ser Gln Trp Pro
1           5           10           15
Pro Asp Gln His Gly Gly His Ser Ser Ala Ser Thr Met Leu His
16          20          25          30
Gln Ser Gln Gly Leu Pro Gln Gly Met Gln Leu Lys Arg Glu Pro
31          35          40          45
His Thr Asp Val Gln Pro Val Met His Asn Gln Met Gly Thr Asp
46          50          55          60
Ile Thr Ser Gly Ser Val Ala Asp Ser Thr Ser Pro Pro Pro Gly
61          65          70          75
Ser Ser Asp Gly Met Phe Gly Ser Ser Ile Ser Gly Met Phe Met
76          80          85          90
Asp Lys Lys Ala Ala Asn Ser Ile Arg Ala Gln Ile Glu Ile Ile
91          95          100         105
Pro Cys Lys Val Cys Gly Asp Lys Ser Ser Gly Val His Tyr Gly
106         110         115         120

```

Val	Ile	Thr	Cys	Glu	Gly	Cys	Lys	Gly	Phe	Phe	Arg	Arg	Ser	Gln
121				125					130					135
Ser	Thr	Val	Val	Asn	Tyr	Gln	Cys	Pro	Arg	Asn	Lys	Ala	Cys	Val
136				140					145					150
Val	Asp	Arg	Val	Asn	Arg	Asn	Arg	Cys	Gln	Tyr	Cys	Arg	Leu	Gln
151				155					160					165
Lys	Cys	Leu	Lys	Leu	Gly	Met	Ser	Arg	Asp	Ala	Val	Lys	Phe	Gly
166				170					175					180
Arg	Met	Ser	Lys	Lys	Gln	Arg	Glu	Lys	Val	Glu	Asp	Glu	Val	Arg
181				185					190					195
Phe	His	Arg	Ala	Gln	Met	Arg	Ala	Gln	Thr	Asp	Thr	Ala	Pro	Asp
196				200					205					210
Ser	Val	Tyr	Asp	Ala	Gln	Gln	Gln	Thr	Pro	Ser	Ser	Ser	Asp	Gln
211				215					220					225
Phe	His	Gly	His	Tyr	Asn	Gly	Tyr	Pro	Gly	Tyr	Gly	Ser	Pro	Leu
226				230					235					240
Ser	Ser	Tyr	Gly	Tyr	Asn	Asn	Ala	Gly	Pro	Ala	Leu	Gln	Ser	Asn
241				245					250					255
Met	Gly	Gly	Ile	Gln	Pro	Gln	Ala	Pro	Gln	Gln	Gln	Pro	Tyr	Asp
256				260					265					270
Val	Ser	Ala	Asp	Tyr	Val	Asp	Ser	Thr	Thr	Ala	Tyr	Glu	Pro	Lys
271				275					280					285
Gln	Thr	Glu	Gly	Phe	Leu	Asp	Pro	Asp	Phe	Ile	Ser	His	Ala	Glu
286				290					295					300
Gly	Asp	Ile	Ser	Lys	Val	Leu	Val	Lys	Ser	Leu	Ala	Glu	Ala	His
301				305					310					315
Ala	Asn	Thr	Asn	Pro	Lys	Leu	Glu	Phe	Ile	His	Glu	Met	Phe	Arg
316				320					325					330
Lys	Pro	Gln	Asp	Val	Ser	Lys	Leu	Leu	Tyr	Tyr	Ser	Ser	Met	Thr
331				335					340					345
Tyr	Glu	Glu	Met	Trp	Leu	Asp	Cys	Ala	Asp	Lys	Leu	Thr	Gly	Met
346				350					355					360
Ile	Gln	Asn	Ile	Ile	Glu	Phe	Ala	Lys	Leu	Ile	Pro	Gly	Phe	Met
361				365					370					375
Lys	Leu	Thr	Gln	Asp	Asp	Gln	Ile	Leu	Leu	Leu	Lys	Ser	Gly	Ser
376				380					385					390
Phe	Glu	Leu	Ala	Ile	Val	Arg	Leu	Ser	Arg	Leu	Ile	Asp	Val	Asn
391				395					400					405

```

Arg Asp Gln Val Leu Tyr Gly Asp Ala Val Leu Ser Ile Arg Glu
406                410                415                420
Cys Val His Ala Arg Asp Pro Arg Asp Val Ala Leu Val Val Gly
421                425                430                435
Ile Phe Asp Ala Ala Lys Thr Ile Ala Arg Leu Lys Leu Thr Glu
436                440                445                450
Thr Glu Leu Ala Leu Tyr Gln Ser Leu Val Leu Leu Trp Pro Glu
451                455                460                465
Arg His Gly Val Arg Gly Asn Pro Glu Ile Gln Cys Leu Phe Asn
466                470                475                480
Met Ser Met Ala Ala Met Arg His Glu Ile Glu Thr Asn His Ala
481                485                490                495
Pro Leu Lys Gly Asp Val Thr Val Leu Asp Thr Leu Leu Ala Lys
496                500                505                510
Ile Pro Thr Phe Arg Glu Leu Ser Leu Met His Leu Glu Ala Leu
511                515                520                525
Cys Arg Phe Lys Ala Ala His Pro His His Val Phe Pro Ala Leu
526                530                535                540
Tyr Lys Glu Leu Phe Ser Leu Asp Ser Val Leu Asp Tyr Thr His
541                545                550                555
Gly
556

```

本发明的棉铃虫蜕皮调节转录因子 cDNA 的克隆方法如下：

- (1) 从棉铃虫提取总RNA或mRNA，然后反转录合成cDNA；
- (2) 根据蜕皮调节转录因子的保守序列设计引物：
正向引物：5'-ATGAACAACAACCAGTTCCAC-3'
反向引物：5'-GTCCTGGACTACACCCACGGT-3'
- (3) 通过链式聚合酶反应扩增到一个 DNA 片段；
- (4) 将扩增产物纯化，取纯化产物克隆到 pGEM-T Easy 载体，转化 DH5α 细胞，平板过夜培养。

上述棉铃虫蜕皮调节转录因子 cDNA 的克隆方法具体操作如下：

从田间采集或人工饲养的棉铃虫中，采用一步法或 RNA kit 提取总 RNA，或者用 mRNA kit 分离提取 mRNA。

然后利用 5~10 微克总 RNA 或 mRNA 反转录合成 cDNA。cDNA 第一链合成：5~10 微克总 RNA 或 mRNA，加反应液 20 微升，反应液是 50 毫摩尔氯化钾和 3 毫摩尔氯化镁混合液，10 毫摩尔三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液 (Tris-HCl) pH 8.3，1 毫摩尔二硫苏糖醇 (DTT)，5 微摩尔寡聚脱氧胸腺核苷酸 (Oligod (T)₁₇)，500 微摩尔脱氧核糖核苷酸混合物 (dNTP)，25 单位 RNA 酶抑制剂，8 单位 AMV 逆转录酶) 42°C 反应 90 分钟。

70°C 10 分钟终止反应。

链式聚合酶反应 (PCR) 试剂与条件如下:

首先将下列试剂混在一起:

10xTaq DNA 聚合酶缓冲液 5 微升 (μl)

模板 cDNA 1 μl

正向引物 (1.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 1 μl

反向引物 (1.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 1 μl

脱氧核苷酸混合物(dNTP) 4 μl

Taq DNA 聚合酶 0.25 μl

灭菌水 37.75 μl

总体积 50 μl

链式聚合酶 (PCR) 反应条件为: 首先 94°C 变性 2 分钟, 然后进入下列循环: 94°C 30 秒, 53°C 45 秒, 72°C 45 秒, 共进行 30 个循环, 最后 72°C 延伸 10 分钟。

结果扩增到一个 DNA 片段。将扩增产物纯化, 取 3 μl 纯化产物克隆到 pGEM-T Easy 载体 (Promega 公司产品), 转化 DH5 α 细胞 (常用载体宿主细胞), 平板过夜培养。挑取 3 个白斑, 提取质粒, 用于序列测定。

测序得到一个开放阅读框部分, 1668bp, 由此推得具 556 个氨基酸的一段序列, 将此序列放入国际基因库中检索, 与已发表的埃及伊蚊、家蚕、果蝇等动物的蜕皮调节转录因子的序列比较, 结果显示一致性为 70% 左右, 因此可以确定该基因为一种新的蜕皮调节转录因子。

上述棉铃虫蜕皮调节转录因子 cDNA 的重组应用, 通过基因重组技术在昆虫核型多角体病毒中进行表达, 获得有杀虫活性的基因重组病毒, 用于害虫防治; 或者通过基因工程方法将棉铃虫蜕皮调节转录因子转入作物, 获得具有抗虫能力的作物。

根据棉铃虫蜕皮调节转录因子 cDNA 序列, 设计表达引物, 通过基因重组技术将该蜕皮调节转录因子重组到昆虫核型多角体病毒, 产生有杀虫活性的蜕皮调节转录因子基因重组核型多角体病毒, 获得具有生产价值的基因重组病毒杀虫剂; 或者通过基因工程方法将棉铃虫蜕皮调节转录因子重组到作物, 增加作物抗虫性, 获得具有抗虫能力的作物, 利于害虫的防治。

本发明克隆到棉铃虫蜕皮调节转录因子 cDNA, 通过在昆虫核型多角体病毒中进行表达, 可获得有杀虫活性的基因重组病毒, 用于害虫防治; 通过基因工程方法将棉铃虫蜕皮调节转录因子转入作物, 可获得具有抗虫能力的作物。

(四) 具体实施方式

实施例 1: 棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*), 田间采集。

1. 总 RNA 的提取: 采用现有技术一步法提取总 RNA。

2. cDNA 第一链合成: 6 微克总 RNA, 加反应液 20 微升, 反应液是 50 毫摩尔氯化钾和 3 毫摩尔氯化镁混合液, 10 毫摩尔三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液 (Tris-HCl) pH 8.3, 1 毫摩尔二硫苏糖醇 (DTT), 5 微摩尔寡聚脱氧胸腺核苷酸 (Oligod (T)₁₇), 500 微摩尔脱氧核糖核苷酸混合物 (dNTP), 25 单位 RNA 酶抑制剂, 8 单位 AMV 逆转录酶) 42°C

反应 90 分钟。70°C 10 分钟终止反应。

3. PCR 反应：链式聚合酶反应（PCR）试剂与条件：

首先将下列试剂混在一起：

•10xTaq DNA 聚合酶缓冲液	5 微升 (μl)
•模板 cDNA	1μl
•正向引物 (1.25μg/μl)	1μl
•反向引物 (1.25μg/μl)	1μl
•脱氧核苷酸混合物(dNTP)	4μl
•Taq DNA 聚合酶	0.25μl
•灭菌水	37.75μl
•总体积	50μl

正向引物：5'-ATGAACAACAACCAGTTCCAC-3'

反向引物：5'-GTCCTGGACTACACCCACGGT-3'

PCR 反应条件为：首先 94°C 变性 2 分钟，然后进入下列循环：94°C 30 秒，53°C 45 秒，72°C 45 秒，共进行 30 个循环，最后 72°C 延伸 10 分钟。

4. 反应产物纯化：利用德国奎因 (QIAGEN) 公司产品 QIAquick Gel Extraction Kit，操作步骤按产品说明书进行。

5. 棉铃虫蜕皮调节转录因子 cDNA 克隆：取纯化产物 3 微升，连接于 pGEM-T Easy 载体 (Promega 公司产品)。转化到大肠杆菌 DH5α 菌株，在含有氨苄青霉素 (100 微克/毫升)、5-溴-4-氯-3-吡啶-β-D-半乳糖苷 (X-gal 0.2 微克/毫升) 和异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG 0.1 摩尔/毫升) 的平板生长过夜，挑取 3 个白斑，在 LB 液体培养基 (5 毫升，含 100 微克/毫升氨苄青霉素) 中培养过夜。

6. 质粒纯化：收取过夜培养菌液 2 毫升，离心 (10000 转，1 分钟) 收集细胞。用微量 DNA 纯化试剂盒 (Wizard plus SV Minipreps DNA Purification System, 美国普洛麦 Promega 公司) 纯化质粒，纯化步骤按说明书进行。

7. 序列测定与同源检索：取纯化质粒 4 微升，用载体引物 T7 进行全自动测序 (本工作在上海生工公司完成)。将所得序列与基因库序列比较。

所得基因具有 SEQ ID NO 1 和 SEQ ID NO. 2 所示的序列。

实施例 2：

如实施例 1 所述，所不同的是棉铃虫是人工饲养的，采用 RNA kit 提取总 RNA。然后用 8 微克总 RNA 进行 cDNA 第一链合成。

实施例 3：

如实施例 1 所述，所不同的是用 mRNA kit 分离提取 mRNA。然后用 10 微克 mRNA 进行 cDNA 第一链合成。质粒纯化中收取过夜培养菌液 1 毫升进行质粒纯化。

实施例 4：

将实施例 1 获得的棉铃虫蜕皮调节转录因子 cDNA 通过现有技术基因工程方法，转入昆虫核型多角体病毒中，在昆虫细胞或昆虫体内表达，生产具有杀虫功能的基因重组病毒

实施例 5：

将实施例 2 获得的棉铃虫蜕皮调节转录因子 **cDNA** 通过现有技术基因工程方法，转入植物体内，如棉花，增加其抗虫性，在大田中应用。

按照本发明的方法可以通过现有基因工程技术，修饰棉铃虫蜕皮调节转录因子基因并用于所述研究和生产。

HHR3-序列表

序列表

<110>山东大学

<120>棉铃虫蜕皮调节转录因子cDNA及其克隆方法与重组应用

<140>

<141>

<160>2

<170>Patent In3.1

<210> 1

<211>1668

<212>cDNA

<213>棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)

<400>1

```

atgaacaaca accagttcca cgatttattt ggggtccagtg ggcctccgga ccagcacgga      60
ggtcactcgt cggcatcgac gatgctgcac cagtcaccagg gccctgcccc gggtatgcag      120
ctgaagagag aacctcatac ggatgtgcag ccggtgatgc acaaccagat gggcacggac      180
atcacgtcag ggtccgtggc ggacagcaca tccccccgc ctggcagcag tgacgggatg      240
ttcggctcgt ctatatctgg catgtttatg gataagaaag ccgctaattc tataagagct      300
caaatcgaaa taataccatg caagggtgtg ggggataaat catctggagt ccactatggc      360
gtcatcacct gcgaggggtg caagggtttc ttcaggcgat cacagagtac agtgggtgaac      420
taccagtgtc cacggaataa agcctgcgtg gtcgaccggg tcaacagaaa tcgttgtcag      480
tattgcagat tgcagaaatg cctcaaactt ggaatgagcc gtgatgcggt gaagtittga      540
cggatgtcga aaaagcaacg tgagaagggt gaagatgagg tgagattcca tcgcgcacag      600
atgagagctc agactgacac ggcgcccgcac tcagtatacg acgctcaaca acaaaccgcc      660
agctcaagcg accagttcca tggctactac aatggctacc cgggctacgg gtcgccgttg      720
tcctcatatg ggtacaacaa cgcagggccg gcgctacagt ccaacatggg aggcatacag      780
cctcaagcac ctcaacagca gccctatgac gtgtcggctg attacgtgga ciccaccacg      840
gcttacgagc cgaacagac cgagggattc ttggatcctg attttattag tcatgcggag      900
ggtgacatca gcaaagtcct ggtgaagagt ttggcagaag cacacgcaa taccaacccc      960
aaactggagt tcattcatga gatgttcaga aagccacagg atgtctccaa gcttctatac     1020
tatagttcaa tgacgtacga ggaaatgtg ctggattgtg cagacaaatt aactgggatg     1080
attcagaata ttatcgagtt cgctaaactt ataccgggt tcatgaaact gactcaggat     1140
gatcagattt tgctcttgaa atctggctcg ttcgagctcg ccatagtccg gctgtcgcga     1200
ctgatagacg tcaaccgtga ccaagtgtc taacggtgat cgggtgctgt catcagagaa     1260
tgtgtgcatg cacgtgaccc ccgcgacgtg gcgctgggtg ttggtatctt cgacgcggca     1320
aagacgatcg ctgcactcaa actcactgag actgaactgg cgctatacca gagccttgtg     1380
ctatttgtggc cagagcggca cggcgtccgc ggcaaccctg agatccagt cctgttcaac     1440
atgtcgatgg cggcgatgcg gcacgagatc gagaccaacc acgccccct caaggagac     1500
gtcactgttc tggacacgct gctcgccaag ataccacct tcagagaact atcactgatg     1560
cacctggaag ctttgtgccg cttcaaggcc gccaccccc accacgtatt cccggccctc     1620
tacaaggagc tgttctcact cgacagcgtc ctggactaca cccacggt      1668

```

<210> 2

<211>556

<212>PRT

<213>棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)

HER3-序列表

<400>2

Met	Asn	Asn	Asn	Gln	Phe	His	Asp	Leu	Phe	Gly	Ser	Gln	Trp	Pro
1				5					10					15
Pro	Asp	Gln	His	Gly	Gly	His	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Met	Leu	His
				20					25					30
Gln	Ser	Gln	Gly	Leu	Pro	Gln	Gly	Met	Gln	Leu	Lys	Arg	Glu	Pro
				35					40					45
His	Thr	Asp	Val	Gln	Pro	Val	Met	His	Asn	Gln	Met	Gly	Thr	Asp
				50					55					60
Ile	Thr	Ser	Gly	Ser	Val	Ala	Asp	Ser	Thr	Ser	Pro	Pro	Pro	Gly
				65					70					75
Ser	Ser	Asp	Gly	Met	Phe	Gly	Ser	Ser	Ile	Ser	Gly	Met	Phe	Met
				80					85					90
Asp	Lys	Lys	Ala	Ala	Asn	Ser	Ile	Arg	Ala	Gln	Ile	Glu	Ile	Ile
				95					100					105
Pro	Cys	Lys	Val	Cys	Gly	Asp	Lys	Ser	Ser	Gly	Val	His	Tyr	Gly
				110					115					120
Val	Ile	Thr	Cys	Glu	Gly	Cys	Lys	Gly	Phe	Phe	Arg	Arg	Ser	Gln
				125					130					135
Ser	Thr	Val	Val	Asn	Tyr	Gln	Cys	Pro	Arg	Asn	Lys	Ala	Cys	Val
				140					145					150
Val	Asp	Arg	Val	Asn	Arg	Asn	Arg	Cys	Gln	Tyr	Cys	Arg	Leu	Gln
				155					160					165
Lys	Cys	Leu	Lys	Leu	Gly	Met	Ser	Arg	Asp	Ala	Val	Lys	Phe	Gly
				170					175					180
Arg	Met	Ser	Lys	Lys	Gln	Arg	Glu	Lys	Val	Glu	Asp	Glu	Val	Arg
				185					190					195
Phe	His	Arg	Ala	Gln	Met	Arg	Ala	Gln	Thr	Asp	Thr	Ala	Pro	Asp
				200					205					210
Ser	Val	Tyr	Asp	Ala	Gln	Gln	Gln	Thr	Pro	Ser	Ser	Ser	Asp	Gln
				215					220					225
Phe	His	Gly	His	Tyr	Asn	Gly	Tyr	Pro	Gly	Tyr	Gly	Ser	Pro	Leu
				230					235					240
Ser	Ser	Tyr	Gly	Tyr	Asn	Asn	Ala	Gly	Pro	Ala	Leu	Gln	Ser	Asn
				245					250					255
Met	Gly	Gly	Ile	Gln	Pro	Gln	Ala	Pro	Gln	Gln	Gln	Pro	Tyr	Asp
				260					265					270
Val	Ser	Ala	Asp	Tyr	Val	Asp	Ser	Thr	Thr	Ala	Tyr	Glu	Pro	Lys
				275					280					285
Gln	Thr	Glu	Gly	Phe	Leu	Asp	Pro	Asp	Phe	Ile	Ser	His	Ala	Glu
				290					295					300
Gly	Asp	Ile	Ser	Lys	Val	Leu	Val	Lys	Ser	Leu	Ala	Glu	Ala	His
				305					310					315
Ala	Asn	Thr	Asn	Pro	Lys	Leu	Glu	Phe	Ile	His	Glu	Met	Phe	Arg
				320					325					330
Lys	Pro	Gln	Asp	Val	Ser	Lys	Leu	Leu	Tyr	Tyr	Ser	Ser	Met	Thr
				335					340					345
Tyr	Glu	Glu	Met	Trp	Leu	Asp	Cys	Ala	Asp	Lys	Leu	Thr	Gly	Met
				350					355					360

HHR3-序列表

Ile	Gln	Asn	Ile	Ile	Glu	Phe	Ala	Lys	Leu	Ile	Pro	Gly	Phe	Met
				365					370					375
Lys	Leu	Thr	Gln	Asp	Asp	Gln	Ile	Leu	Leu	Leu	Lys	Ser	Gly	Ser
				380					385					390
Phe	Glu	Leu	Ala	Ile	Val	Arg	Leu	Ser	Arg	Leu	Ile	Asp	Val	Asn
				395					400					405
Arg	Asp	Gln	Val	Leu	Tyr	Gly	Asp	Ala	Val	Leu	Ser	Ile	Arg	Glu
				410					415					420
Cys	Val	His	Ala	Arg	Asp	Pro	Arg	Asp	Val	Ala	Leu	Val	Val	Gly
				425					430					435
Ile	Phe	Asp	Ala	Ala	Lys	Thr	Ile	Ala	Arg	Leu	Lys	Leu	Thr	Glu
				440					445					450
Thr	Glu	Leu	Ala	Leu	Tyr	Gln	Ser	Leu	Val	Leu	Leu	Trp	Pro	Glu
				455					460					465
Arg	His	Gly	Val	Arg	Gly	Asn	Pro	Glu	Ile	Gln	Cys	Leu	Phe	Asn
				470					475					480
Met	Ser	Met	Ala	Ala	Met	Arg	His	Glu	Ile	Glu	Thr	Asn	His	Ala
				485					490					495
Pro	Leu	Lys	Gly	Asp	Val	Thr	Val	Leu	Asp	Thr	Leu	Leu	Ala	Lys
				500					505					510
Ile	Pro	Thr	Phe	Arg	Glu	Leu	Ser	Leu	Met	His	Leu	Glu	Ala	Leu
				515					520					525
Cys	Arg	Phe	Lys	Ala	Ala	His	Pro	His	His	Val	Phe	Pro	Ala	Leu
				530					535					540
Tyr	Lys	Glu	Leu	Phe	Ser	Leu	Asp	Ser	Val	Leu	Asp	Tyr	Thr	His
				545					550					555
Gly														
556														