

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 1/20

A01N 63/00

C12N 15/31

C07K 14/32



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410009808.2

[43] 公开日 2005 年 4 月 27 日

[11] 公开号 CN 1609191A

[22] 申请日 2004.11.16

[21] 申请号 200410009808.2

[71] 申请人 中国农业科学院植物保护研究所

地址 100094 北京市海淀区圆明园西路 2 号

[72] 发明人 宋福平 张杰 冯书亮 黄大昉

王容燕 郎志宏

[74] 专利代理机构 北京海虹嘉诚知识产权代理有限公司

代理人 张涛

权利要求书 1 页 说明书 19 页 附图 5 页

[54] 发明名称 对鞘翅目害虫高效的苏云金芽孢杆菌菌株和基因

[57] 摘要

本发明为“对鞘翅目害虫有效的苏云金芽孢杆菌菌株和基因”，属生物防治技术领域。进一步，本发明涉及对鞘翅目害虫高毒力的苏云金芽孢杆菌菌株，cry8E 和 cry8F 基因的核苷酸序列和其编码的蛋白质的氨基酸序列，涉及使用和协同组合使用苏云金芽孢杆菌菌株、cry8E 和 cry8F 基因表达产物。通过使用上述基因或其组合，可使它们对鞘翅目害虫的毒力高于出发菌株和单基因表达产物，扩大它们对鳞翅目、鞘翅目、双翅目害虫的杀虫谱，并通过应用于转化微生物和植物，使它们表现出对相关害虫的毒性，克服或延缓昆虫对工程菌和转基因植物抗药性的产生。

ISSN 1008-4274

1. 一种苏云金芽孢杆菌菌株 (*Bacillus thuringiensis*), 其在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏编号为 CGMCC NO.1242。
2. 权利要求 1 的菌株在杀灭鞘翅目害虫中的应用。
- 5 3. 一种从权利要求 1 所述的苏云金芽孢杆菌菌株分离克隆的 *cry8E* 基因, 其特征是该基因具有 SEQ ID NO 1 所示的核苷酸序列。
4. 一种 Cry8Ea1 蛋白, 其特征是该蛋白是由权利要求 3 的基因所编码, 且具有 SEQ ID NO 2 所示的氨基酸序列。
5. 一种从权利要求 1 所述的苏云金芽孢杆菌菌株分离克隆的 *cry8F* 基因, 其特征是该基因
- 10 具有 SEQ ID NO 3 所示的核苷酸序列。
6. 一种 Cry8Fa1 蛋白, 其特征是该蛋白是由权利要求 5 的基因所编码, 且具有 SEQ ID NO 4 所示的氨基酸序列。
7. 一种增强对鞘翅目害虫毒性的方法, 其特征是该方法协同组合使用权利要求 3 的 *cry8E* 基因和权利要求 5 的 *cry8F* 基因。

15

15

对鞘翅目害虫高效的苏云金芽孢杆菌菌株和基因

本发明的技术领域

5

本发明属于生物防治技术领域。本发明涉及一种对鞘翅目害虫具有活性的苏云金芽孢杆菌菌株,涉及对鞘翅目害虫高毒力的 *cry8E* 和 *cry8F* 基因的核苷酸序列和分别由其编码的蛋白质的氨基酸序列,涉及协同组合使用 *cry8E* 与 *cry8F* 基因表达产物。

10 本发明的背景技术

金龟子属于鞘翅目金龟总科 (Scarabaeidae),其幼虫(俗称蛴螬,本发明以下也简称为“蛴螬”)是一类重要的世界性分布地下害虫,可危害粮食、棉花、油料作物、蔬菜、糖料作物、烟草、牧草、花卉、草坪草、果树等多种植物。大量调查表明,蛴螬在地下害虫中的危害居首位,其中主要以鳃金龟科和丽金龟科幼虫为主,占总地下害虫量的 70-80%以上。据统计每年全国蛴螬发生面积约 1 亿亩,严重年份曾达 3 亿 2 千万亩,产量损失高达 20% 以上,有些地块甚至绝产。近年发生面积最大、发生量最多的为黄淮海地区,主要危害粮食、油料等作物;其它地区的危害情况也很严重,如危害甘蔗的蛴螬,在广东、广西、云南、四川、福建等地普遍发生;在西藏、青海、甘肃、新疆等西部地区,蛴螬的发生也很严重(魏鸿钧等,《中国地下害虫》,上海:上海科学技术出版社,1989,1-41;王永祥等,“冀中平原区蛴螬种类及综合防治技术”,《河北师范大学学报》(自然科学版),1998,22(2):268-270)。以在我国油料作物中种植面积仅次于油菜居第二位的花生为例。我国的花生产量占世界花生总产量的 35%左右,居世界首位,年出口收入达 207 亿美元,2001 年全国花生面积(500 万公顷)和总产(1450 万吨)均达到历史最高水平。但蛴螬对花生的危害十分严重。为控制蛴螬的危害,一般采用农业、化学、物理等综合防治策略,这虽有一定成效,却难以达到持续控制的效果。因此,寻找新的有效防治方法,已成为当务之急。

在获得对蛴螬高毒力 Bt 基因的基础上,培育杀蛴螬的转基因植物是一条值得探索的新的防治途径。

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt) 是一种分布极其广泛的革兰氏阳性细菌。它在形成芽孢的同时,能产生蛋白性质的伴孢晶体 (parasporal crystal),对鳞翅目 (Lepidoptera)、双翅目 (Diptera)、鞘翅目 (Coleoptera)、膜翅目 (Hymenoptera)、同翅目

(Homoptera)、直翅目(Orthoptera)、食毛目(Mallophaga)等多种昆虫,以及线虫、螨类和原生动物具有特异性的杀虫活性(Schnepf, E.N. et al, *Microbiol. And Molecular Biology Review*, 1998, 62:3 775-806)。这种杀虫晶体蛋白(Insecticidal Crystal Proteins, ICPs)又称 δ -内毒素(delta-endotoxin),对人畜无害,不污染环境,因而 Bt 在害虫的生物防治中得到了最广泛的应用。

目前人们已经克隆了 300 多种编码杀虫晶体蛋白的 Bt 杀虫基因,它们分属 141 种模式基因。近年国际上 *cry8* 类基因的研究动向引人瞩目。研究表明,这类基因对金龟子科、象甲科、叶甲科等多种鞘翅目害虫具有杀虫作用。1992 年,Ohba 等在世界上首次从 Bt 菌株中筛选出对金龟子幼虫具有特异杀虫活性的新菌株(*B.t. subsp. Japonensis* BuiBui)(Ohba, M. et al, A unique isolate of *Bacillus thuringiensis* serovar *japonensis* with a high larvicidal activity specific for scarabaeid beetles, *Letters in Applied Microbiology*, 1992.14:54-57), 1994 年 Sato 等从中克隆出一种新的杀虫基因 *cry8C* (Sato, R. et al, Cloning, heterologous expression, and localization of a novel crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis* serovar *japonensis* strain buibui toxic to scarabaeid insects, *Curr. Microbiol.* 1994. 28:15-19.4)。目前已发现 9 种基因,编码的蛋白由 1160-1210 个氨基酸组成,分子量在 128-137kDa 之间。详细的信息见表 1(Asano, S., Yamanaka, S. and Takeuchi, K., Protein having insecticidal activity, DNA encoding the protein, and controlling agent and controlling method of noxious organisms, 2002, JP 2002045186-A and JP 2002045186-A/2)。其中美国 Mycogen 公司分离的 *Cry8Aa1* 和 *Cry8Ba1* 对金龟科的多种害虫具有明显的杀虫活性(Tracy E. Michaels, et al., *Bacillus thuringiensis* toxins active against scarab pests, 1994, USP5554534)。美国从 Bt 菌株中分离了两种基因 *cry8Bb1* 和 *cry8Bc1* 基因,发现对西方玉米根叶甲(Western corn rootworm)具有显著的杀虫效果并已用于转基因抗虫玉米的开发(Abad, Andre, R., Duck Nicholas, B., Feng, Xiang, Flannagan Ronald, D., Kahn, Theodore, W., Sims, Lynne, E. Genes encoding novel proteins with pesticidal activity against coleopterans, 2002, WO 02/34774 A2)。在我国,河北省农业科学院植物保护研究所和河北农业大学近年来先后筛选获得多株对黄褐丽金龟(*Anomala exoleta*)和铜绿丽金龟(*A. corpulenta*)幼虫具有特异杀虫活性的 Bt 菌株,室内生测死亡率均达 100%(冯书亮等,“一株对金龟子类幼虫具有杀虫活性的苏云金杆菌新分离株”,《中国生物防治》,2000, 16(2): 74-78)。

表1 苏云金芽孢杆菌 Cry8 类杀虫晶体蛋白

名称	编号	分子量	氨基酸数	Bt 菌株	活性	文献出处
Cry8Aa1	U04364	131.00	1157	<i>kumamotoensis</i>	scarabs	Tracy, et al, 1994
Cry8Ba1	U04365	133.54	1169	<i>kumamotoensis</i>	scarab	Tracy, et al, 1994
Cry8Bb1	AX543924	136.53	1206	Bt	<i>Leptinotarsa decemlineata</i> ,	Abad, et al, 2002
Cry8Bc1	AX543926	137.20	1210	Bt	<i>Diabrotica virgifera virgifera</i> , <i>Deiabrotica undecimpunctata howardi</i>	Abad, et al, 2002
Cry8Ca1	U04366	130.42	1160	<i>japonensis</i> Buibui	<i>Anomala cuprea</i>	Sato, et al, 1994
Cry8Da1	AB089299	128.05	1144	<i>Bt galleriae</i>	<i>Anomala cuprea</i>	unpublished
Cry8Da2	BD133574	130.51	1167	Bt	scarabs	Asano, et al, 2002
Cry8Da3	BD133575	130.51	1167	Bt	scarabs	Asano, et al, 2002

本发明的内容

5 本发明的目的:

本发明的目的是提供对暗黑鳃金龟、椰心叶甲等鞘翅目重要害虫具有高毒力的一种苏云金芽孢杆菌菌株和两种新的 *cry8E* 和 *cry8F* 模式基因序列, 以及一种对暗黑鳃金龟具有明显增效作用的 *cry8E* 和 *cry8F* 基因组合, 以应用于转化微生物和植物, 使之表现出对相关害虫的毒性, 并克服、延缓害虫对工程菌和转基因植物的抗药性产生。

10

本发明的技术方案:

1. 对鳃金龟地下害虫有效的 Bt 菌株 185 的筛选与鉴定

本发明自行分离了 Bt 菌株 185。土壤采自河北省保定市顺平县苹果园。取 0.1—0.2g 土样放入装有 10ml 灭菌水和玻璃珠的试管中, 在漩涡振荡器上振荡 3 分钟, 将土粒打碎, 然后放于 200rpm 摇床上振荡 10 分钟, 75℃ 水浴锅中水浴 17 分钟, 充分将非芽孢菌杀死, 待稍静置后, 选取 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 三个稀释度, 分别吸取 100ul 菌悬液于 BP 平板上, 涂布均匀, 于 37℃ 培养三天, 挑取似 Bt 菌落涂片镜检。发现一株含有球形晶体的 Bt 菌株 (见

附图 1)。

该菌株的培养条件为 30℃，普通 LB 培养基，pH7.0。该菌株为芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、苏云金芽孢杆菌种，并已在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏，保藏日期为 2004 年 11 月 5 日，保藏编号为 CGMCC NO.1242。经鉴定，关于该菌株的信息包括：

5 能形成芽孢，同时能形成球形伴孢晶体，SDS-PAGE 电泳表明其杀虫晶体蛋白约为 130kDa（见附图 2）；其晶体蛋白在 14 小时开始表达，而生长曲线表明其 14 小时已进入停滞期（见附图 3），表明该晶体蛋白启动子可能为依赖芽孢形成的；生物学测定表明，该菌株对金龟科地下害虫暗黑鳃金龟具有明显杀虫作用，7 天校正死亡率达 90%，对椰心叶甲也具有一定的杀虫活性（见表 2）。

10

表 2 Bt 菌株 185 的杀虫活性

	7 天校正死亡率%	14 天校正死亡率%
暗黑鳃金龟	90	100
椰心叶甲	22	35

2. 菌株 185 中 *cry* 基因鉴定

根据 *cry8* 类基因保守区设计了一对通用引物：

S5un8: 5-’ CGGCAAACCTTAGTAGAATGC-3’

15

S3un8: 5-’ CTGACTGATTTCCACCATCACG-3。

表 3 是这些基因与引物的同源序列，表 4 是用这对引物预测的 *cry8* 基因扩增产物，以及酶切片段大小，通过这种 PCR—RFLP 方法可以分别鉴定出将这些基因。

表 3 引物与 *cry8* 各基因的保守区配对情况及配对区在基因上的位置

基因型	引物 S5un8/S3un8 与基因的保守区配对情况			
	引物 S5un8:		引物 S3un8:	
	5’-cggcaaacttagtagaatgc-3’	位置	5’-gcactaccacc ttagtcagt c-3	位置
<i>cry8Aa</i>	cggcaaacttagtGgaatgc	2101~2120	cgtgatggtggaaatcaAtcag	3273~3294
<i>cry8Ba</i>	cggcCaacttagtGgaatgc	2089~2108	cgtgatggtggaaatcaAtcag	3261~3282
<i>cry8Bb</i>	cggcaaacttagtGgaatgc	2104~2123	cgtgatggtggaaacaAAcag	3276~3297
<i>cry8Bc</i>	cggcaaacttagtGgaatgc	2116~2135	cgtgatggtggaaatcaAAcag	3288~3309
<i>cry8Ca</i>	cggcaaacttaAtagaatgc	2092~2111	cgtgatggtgcaaatcagAcag	3282~3303
<i>cry8Da</i>	TAAaaaacttagtagaatgc	2044~2063	cgtgatggtgCGaatcagTcag	3234~3255

20

注：“N”为不配对碱基。

表 4 *cry8* 的 PCR 扩增产物和限制性酶切长度多态性

基因型	PCR (S5un8/S3un8)	
	产物大小 Size (bp)	<i>Eco</i> 0109I 和 <i>Dra</i> I 酶切结果 Digested with <i>Eco</i> 0109I and <i>Dra</i> I (bp)
<i>cry8Aa</i>	1194	197, 442, 555
<i>cry8Ba</i>	1194	639, 555,
<i>cry8Bb</i>	1194	639, 555
<i>cry8Bc</i>	1194	639, 555
<i>cry8Ca</i>	1212	197, 92, 310, 613
<i>cry8Da</i>	1212	197, 92, 310, 613

用下列PCR反应体系（50μL）鉴定了Bt菌株 185:

10×PCR buffer	5μL
MgCl ₂ (20mM)	6μL
dNTP(10mM)	1μL
引物对(10mM)	1μL/个
模板	1uL
Taq聚合酶(5U/μL)	0.5μL

超纯水补至 50μL，混匀离心，加石蜡油 30μL。

扩增循环：94℃变性 1 分钟，54℃退火 1 分钟，72℃延伸 4 分钟，25 个循环，最后

5 72℃延伸 10 分钟。

结果（见附图 4）显示与已知 *cry8* 类基因的图谱不同，表明菌株 185 中可能含有新的 *cry8* 杀虫基因。

3. 菌株 185 中 *cry8E* 基因的克隆

用 *Pst*I 和 *Kpn*I 酶切 Bt 菌株总 DNA，用载体 pBluescript SK(+)分别建立了两个 DNA
10 片段库，然后用引物 S5un8/S3un8(见表 3)和 PCR 方法检测两个 DNA 库，得到两个阳性克隆 pSS3612 和 pSS162，分别插入 11kb 的 *pst*I 片段和 2.0kb 的 *Kpn*I 片段（见附图 5）。酶切分析 pSS3612,7kb 的 *Pst*I 和 *Kpn*I 双酶切片段含有 *cry8Ea1* 的全长基因，用 pBluescript SK(+)亚克隆该片段，得到 pSS3612-7，同时亚克隆了 4kb 的 *Kpn*I 片段中，得到 pSS3612-4（见附图 6）。将 pSS162 和 pSS3612-7 的插入序列测序。得到序列 SEQ ID NO 1。

15 4. *cry8Ea1* 基因的序列分析

序列 SEQ ID NO 1 为 pSS3612 中 *Pst*I 和 *Kpn*I 双酶切片段,序列全长 7276bps，分析表明其含有两个较大的开放阅读框，ORF1 的位置是 3658-7152，ORF2 的位置是 2799-3377。

ORF1 的位置是 3658-7152，GC 含量为 38.03%，编码 1164 个氨基酸组成的蛋白。经测定，其氨基酸序列为 SEQ ID NO 2 所示。同源分析表明该蛋白与 Cry8 类蛋白具有较高同源
20 性，表 5 为其同源性数据。由于与已知的 Cry8 类蛋白氨基酸同源性均低于 78%，最高只有 58.2%(Cry8Bb1)，被 Bt 杀虫晶体蛋白命名委员会命名为 Cry8Ea1。

表 5 Cry8 蛋白同源比较数据

	Cry8a1	Cry8Ba1	Cry8Bb1	Cry8Bc1	Cry8Da1	Cry8Ca1	Cry8Ea1	Cry8Fa1
Cry8Aa1	100%							
Cry8Ba1	46.10%	100%						
Cry8Bb1	47.20%	82.10%	100%					
Cry8Bc1	46.10%	83.50%	90.50%	100%				
Cry8Da1	51.30%	26.20%	25.60%	25.50%	100%			
Cry8Ca1	36.70%	21.20%	21.30%	21.00%	63.10%	100%		
Cry8Ea1	26.60%	55.60%	57.00%	58.20%	26.10%	21.00%	100%	
Cry8Fa1	24.40%	42.50%	42.40%	42.10%	24.60%	20.60%	64.80%	100%

本发明进一步分析了 Cry8Ea1 蛋白的氨基酸组成（见表 6，附图 7），得知其分子量为 131.56kDa，等电点为 pH4.735（见附图 8）。

5

表 6 Cry8Ea1 蛋白的氨基酸组成

氨基酸	数目	百分比%	氨基酸	数目	百分比%
Ala(A):	63	5.41	Asn(N):	80	6.87
Asx(B):	0	0	Pro(P):	52	4.46
Cys(C):	4	.34	Gln(Q):	61	5.24
Asp(D):	63	5.41	Arg(R):	62	5.32
Glu(E):	80	6.87	Ser(S):	93	7.98
Phe(F):	43	3.69	Thr(T):	87	7.47
Gly(G):	80	6.87	Val(V):	81	6.95
His(H):	9	.77	Trp(W):	17	1.46
Ile(I):	62	5.32	Unk(X):	0	0
Lys(K):	46	3.95	Tyr(Y):	69	5.92
Leu(L):	93	7.98	Glx(Z):	0	0
Met(M):	19	1.63	Total	:	1164

5. *cry8Fa1* 基因的克隆

对 pSS162 质粒中插入序列进行了分析，片段长 2.3kb，具有完整的 3' 端序列，与 *cry8Ea1* 序列完全同源，但 5' 端差异较大，并且缺少完整的读码框，根据该序列的特异区段设计了 1 对引物（5-185-KpnI:TTGGTATGGCGTTTCGTTG；和 3-185-KpnI:TATTGCAGGTCCAGGATTCAC），用于克隆该全长基因，将菌株 185 的质粒 DNA 用 XbaI 酶切，与载体 pBluescript SK(+) 连接，筛选得到插入约 9Kb 外源片段的阳性克隆 pSS266（见附图 9），进一步酶切分析表明 ClaI 酶切产生的 3.0kb 片段含有 5' 端读码框（见附图 10），用 pBluescript SK(+) 亚克隆得到该片段，阳性克隆命名为 pSS266-3，对该片段进行了测序，把得到的序列与 pSS162 中的插入序列进行拼接得到 3.9kb 片段。

6. *cry8F* 基因的序列分析

对上述 3.9kb 的核酸片段进行测序,得到的核苷酸序列如 SEQ ID NO 3 所示。对该序列进行分析表明:该序列含有 1 个较大的开放阅读框 357-3878;GC 含量为 36.88%;编码 1174 个氨基酸组成的蛋白(其编码的蛋白质的氨基酸序列如 SEQ ID NO 4 所示)。进一步的同源分析表明,该蛋白质与 Cry8 类蛋白有较高的同源性(同源性数据见以上表 5)。由于与已知的 Cry8 类蛋白氨基酸同源性均低于 78%,最高只有 64.8%(Cry8Ea1),该蛋白被 Bt 杀虫晶体蛋白命名委员会命名为 Cry8Fa1。

本发明用生物分析软件 Bioedit 进一步分析了 Cry8Fa1 蛋白的氨基酸组成,结果见表 7 和附图 11。结果表明,该蛋白的分子量为 133.08kDa,等电点为 pH4.565(见附图 12)。

表 7 Cry8Ea1 蛋白的氨基酸组成

氨基酸	数目	百分比%	氨基酸	数目	百分比%
Ala(A):	68	5.79	Asn(N):	91	7.75
Asx(B):	0	0	Pro(P):	54	4.59
Cys(C):	3	.25	Gln(Q):	60	5.11
Asp(D):	62	5.28	Arg(R):	60	5.11
Glu(E):	87	7.41	Ser(S):	82	6.98
Phe(F):	47	4	Thr(T):	91	7.75
Gly(G):	68	5.79	Val(V):	79	6.72
His(H):	12	1.02	Trp(W):	15	1.27
Ile(I):	72	6.13	Unk(X):	0	0
Lys(K):	40	3.4	Tyr(Y):	63	5.36
Leu(L):	102	8.68	Glx(Z):	0	0
Met(M):	18	1.53	Total	1174	100

10

7. *cry8E* 和 *cry8F* 基因的表达

本发明根据克隆的 *cry8Ea1* 和 *cry8Fa1* 基因的全长序列,设计了用于表达两种基因的引物,序列如下:

8E1: CGCGGATCC (*Bam* HI) GATGAGTCCAAATAATCAAAATG
 15 8E2: ACGCGTTCGAC (*Sal* I) CTCTACGTCAACAATCAATCAATTC
 8F1: CGCGGATCC (*Bam* HI) GATGAGTCCAAATAATCAAAATG
 8F2: CATTAACTCTGCCCACGGATCT (C) TCTGGTGCAAAGAAGTCCAG
 8F3: CTTGACTTCTTTGCACCAGAA (G) GATCCGTGGGCAGTTAATG
 8F4: CCGCTCTGAG (*Xho* I) CTCTACGTCAACAATCAATCAATTC

20

引物 8E1 和 8E2 分别引入 *Bam*HI 和 *Sal*I 位点,以含全长 *cry8Ea1* 的 pSS3612 质粒 DNA 为模板,扩增得到全长基因,插入 Bt 表达载体 pSXY422b 中,转化大肠杆菌 SCS110,提取质粒,电击转化 Bt 无晶体突变株 HD-73 中(该突变株来源于中国农业科学院植物保护研究所生物技术实验室,可以向公众提供),得到工程菌 BioT8E。

由于 *cry8Fa1* 全长基因内存在 1 个 *Bam*HI 切点, 用重叠引物 PCR 的方法对这一位点进行了突变, 重叠引物 8F2 和 8F3 中引入了点突变 (划线部分)、引物 8F1 和 8F4 分别引入 *Bam*HI 和 *Xho*I。以含全长 *cry8Fa1* 基因的 pSS266 质粒 DNA 为模板, 分别用 8F1 和 8F2、8F3 和 8F4 扩增得到 0.3kb 和 3.1kb 产物, 再分别以它们为模板, 分别利用引物 8F1 和 8F4 5 扩增得到 3.4kb 的全长基因, 插入 Bt 表达载体 pSXY422b 中, 转化大肠杆菌 SCS110, 提取质粒, 电击转化 Bt 无晶体突变株 HD-73⁻中, 得到工程菌 Biot8F。

分别将上述两株工程菌 30℃ 于牛肉膏培养基 (蛋白胨 5 克, 牛肉膏 3 克, 葡萄糖 10 克, 水 1000mL, 121℃, 20 分钟高压蒸汽灭菌) 中培养 30 小时, 取 500μL 菌液至 Eppendorf 管中, 超声波破碎 30 秒钟 (B. Braun U Labsonic, 230V, T_{间隔}=0.5 秒); 取 100μL 加入 25μL 新配 0.5N NaOH, 25 10 ℃ 作用 5 分钟; 加入 65μL 3× 样品缓冲液 (925μL 上样缓冲液 + 75μL β-巯基乙醇), 100℃ 煮沸 5 分钟。离心除去沉淀。上样 10uL 进行 SDS-PAGE 电泳分析结果 (方法参见 Sambrook, J. et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1989)。结果 (见附图 13) 表明, 工程菌 Biot8E 和 Biot8F 中的 *cry8Ea1* 和 *cry8Fa1* 基因均获得了表达, 表达物的分子量为 130kDa 左右。

15 8. Cry8E 和 Cry8F 蛋白的活性测定

将 Bt 工程菌株接种在普通细菌琼脂克氏瓶培养基上培养 3 天。将受体菌株 HD-73⁻接种在普通细菌琼脂克氏瓶培养基上培养 4 天。将培养物洗下, 2 倍梯度浓度稀释, 将 40ml 菌悬液加入到 200g 有均匀粗细土豆丝的细土 (紫外线灭菌) 中, 混匀, 使土壤含水量保持在 18%-20%。接入暗黑鳃金龟 15 天龄幼虫 20 头, 以加入清水的处理为空白对照, 28℃ 感染饲养, 14 天检查死虫数, 计算 LC₅₀。结果见表 8, 表明工程菌株对暗黑鳃金龟具有极高的毒杀 20 活性。其表达的 Cry8E 和 Cry8F 蛋白均具有杀暗黑鳃金龟幼虫的活性。

表 8 Bt 工程菌和 185 菌株对暗黑鳃金龟幼虫的毒力测定

菌株	LC ₅₀ (10 ⁸ cfu/ml)	回归方程	R 值
Biot8E	0.5250	Y=5.3841+1.3724X	0.9671
Biot8F	0.9464	Y=5.0276+1.1515X	0.9918

25

菌种保藏信息:

菌种名称: 芽孢杆菌属、苏云金芽孢杆菌, *Bacillus thuringiensis*

保藏机构：中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心

保藏日期：2004 年 11 月 5 日

保藏编号：CGMCC NO.1242

5 附图说明：

图 1：185 菌株芽孢和晶体形态。

图 2：185 菌株晶体蛋白 SDS-PAGE 分析。

图 3：185 菌株生长曲线。

10 图 4：菌株 185 的 PCR-RFLP 图谱。其中：

M. DNA 分子量标准

1. PCR 产物

2. PCR 产物酶切

图 5：重组质粒 pSS162 和 pSS3162 的 PCR 扩增产物和酶切分析。其中：

15 M. λ DNA/Eco 130I

1. pSS162 PCR 产物

2. pSS3162 PCR 产物

3. pBlueScript SK(+)/KpnI

4. pSS162/ KpnI

20 5. pSS3162/PstI

图 6：pSS3612 插入片段的亚克隆酶切分析。其中：

M. λ DNA/Eco 130I

1. pBlueScript SK(+)/KpnI

2. pSS3162/ PstI+ KpnI

25 3. pSS3612/ KpnI

4. pSS3162/PstI+KpnI

图 7：Cry8Ea1 蛋白的氨基酸组成图。

图 8：Cry8Ea1 蛋白的滴定曲线。

图 9：重组质粒 pSS266 的 PCR 扩增产物和酶切分析。其中：

30 M. λ DNA/Eco 130I

1. pSS266 PCR 产物

2. pSS162/ XbaI

3. pBlueScript SK(+)/XbaI

图 10：重组质粒 pSS266 的酶切分析。其中：

35 1. XbaI

2. NotI

3. PstI

4. NdeI

5. ClaI

40 6. SacI

7. KpnI

M. λ DNA/Eco130I

图 11：Cry8Fa1 蛋白的氨基酸组成图。

图 12: Cry8Fa1 蛋白的滴定曲线。

图 13: *cry8Ea1* 和 *cry8Fa1* 基因在 Bt 无晶体突变株中的表达。其中:

M. 蛋白质分子量标准

1. Biot8E
2. Biot8F
3. Bt 185
4. HD-73

具体实施方案

以下叙述根据本发明实施方案的实施例。应该说明的是, 本发明的实施例对于本发明只有说明作用, 而没有限制作用。

实施例 1、对鳃金龟地下害虫有效的 Bt 菌株 185 的筛选与鉴定

土壤采自河北省保定市顺平县苹果园。取 0.1—0.2g 土样放入装有 10ml 灭菌水和玻璃珠的试管中, 在旋涡振荡器上振荡 3 分钟, 将土粒打碎, 然后放于 200rpm 摇床上振荡 10 分钟, 75℃水浴锅中水浴 17 分钟, 充分将非芽孢菌杀死, 待稍静置后, 选取 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 三个稀释度, 分别吸取 100ul 菌悬液于 BP 平板上, 涂布均匀, 于 37℃培养三天, 挑取似 Bt 菌落涂片镜检。发现一株含有球形晶体的 Bt 菌株 (见附图 1)。

该菌株为芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、苏云金芽孢杆菌种。将该菌株在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心提交保藏, 保藏日期为 2004 年 11 月 5 日, 保藏编号为 CGMCC NO.1242。经鉴定, 关于该菌株的信息包括: 能形成芽孢, 同时能形成球形伴孢晶体, SDS-PAGE 电泳表明其杀虫晶体蛋白约为 130kDa (见附图 2), 其晶体蛋白在 14 小时开始表达, 而生长曲线表明其 14 小时已进入停滞期 (见附图 3), 表明该晶体蛋白启动子可能为依赖芽孢形成的; 生物学测定表明, 该菌株对金龟科地下害虫暗黑鳃金龟具有明显杀虫作用, 7 天校正死亡率达 90%, 对椰心叶甲也具有一定的杀虫活性。

实施例 2、菌株 185 中 *cry* 基因鉴定

根据 *cry8* 类基因保守区设计了一对通用引物

S5un8: 5-' CGGCAAACTTAGTAGAATGC-3'

S3un8: 5-' CTGACTGATTCCACCATCACG-3。

用下列 PCR 反应体系 (50μL) 鉴定了 Bt 菌株 185:

10×PCR buffer	5μL
MgCl ₂ (20mM)	6μL
dNTP(10mM)	1μL
引物对(10mM)	1μL/个
模板	1uL
Taq聚合酶(5U/μL)	0.5μL

超纯水补至 50 μ L, 混匀离心, 加石蜡油 30 μ L。

扩增循环: 94 $^{\circ}$ C变性 1 分钟, 54 $^{\circ}$ C退火 1 分钟, 72 $^{\circ}$ C延伸 4 分钟, 25 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C延伸 10 分钟。

结果(见附图 4)显示与已知 *cry8* 类基因的图谱不同, 表明菌株 185 中可能含有新的
5 *cry8* 杀虫基因。

实施例 3、菌株 185 中 *cry8E* 基因的克隆

用 *Pst*I 和 *Kpn*I 酶切 Bt 菌株总 DNA, 用载体 pBluescript SK(+)分别建立了两个 DNA 片段库, 然后用引物 S5un8/S3un8 和 PCR 方法检测两个 DNA 库, 得到两个阳性克隆 pSS3612 和 pSS162, 分别插入 11kb 的 *pst*I 片段和 2.0kb 的 *Kpn*I 片段(见附图 5)。酶切分析 pSS3612,
10 7kb 的 *Pst*I 和 *Kpn*I 双酶切片段含有 *cry8Ea1* 的全长基因, 用 pBluescript SK(+)亚克隆该片段, 得到 pSS3612-7, 同时亚克隆了 4kb 的 *Kpn*I 片段中, 得到 pSS3612-4 (如附图 6)。将 pSS162 和 pSS3612-7 的插入序列测序, 得到序列 SEQ ID NO 1。该序列为 pSS3612 中 *Pst*I 和 *Kpn*I 双酶切片段, 序列全长 7276bps, 分析表明其含有两个较大的开放阅读框, ORF1 的位置是 3658-7152, ORF2 的位置是 2799-3377。

15 ORF1 的位置是 3658-7152, GC 含量为 38.03%, 编码 1164 个氨基酸组成的蛋白, 经测定, 其氨基酸序列为 SEQ ID NO 2 所示。同源分析表明该蛋白与 Cry8 类蛋白具有较高同源性(见表 5)。由于与已知的 Cry8 类蛋白氨基酸同源性均低于 78%, 最高只有 58.2%(Cry8Bb1), 被 Bt 杀虫晶体蛋白命名委员会命名为 Cry8Ea1。

本发明进一步分析了 Cry8Ea1 蛋白的氨基酸组成(见表 6 和附图 7), 得知其分子量为
20 131.56kDa, 等电点为 pH4.735 (见附图 8)。

实施例 4、*cry8Fa1* 基因的克隆

对 pSS162 质粒中插入序列进行了分析, 片段长 2.3kb, 具有完整的 3' 端序列, 与 *cry8Ea1* 序列完全同源, 但 5' 端差异较大, 并且缺少完整的读码框, 根据该序列的特异区段设计了 1 对引物 (5-185-KpnI:TTGGTATGGCGTTTCGTTG; 和 3-185-KpnI:
25 TATTGCAGGTCCAGGATTCAC), 用于克隆该全长基因, 将 185 质粒 DNA 用 *Xba*I 酶切, 与载体 pBluescript SK(+)连接, 筛选得到插入约 9Kb 外源片段的阳性克隆 pSS266 (见附图 9), 进一步酶切分析表明 *Cla*I 酶切产生的 3.0kb 片段含有 5' 端读码框(见附图 10), 用 pBluescript SK(+)亚克隆得到该片段, 阳性克隆命名为 pSS266-3, 对该片段进行了测序, 把得到的序列与 pSS162 中的插入序列进行拼接得到 3.9kb 片段。对核酸片段进行测序, 得
30 到如 SEQ ID NO 3 所示的核苷酸序列。对该序列进行分析表明: 该序列含有 1 个较大的开

放阅读框 357-3878; GC 含量为 36.88%; 编码 1174 个氨基酸组成的蛋白(该蛋白质的氨基酸序列如 SEQ ID NO 4 所示)。进一步的同源分析表明, 该蛋白质与 Cry8 类蛋白有较高的同源性(见表 5)。由于与已知的 Cry8 类蛋白氨基酸同源性均低于 78%, 最高只有 64.8%(Cry8Ea1), 该蛋白被 Bt 杀虫晶体蛋白命名委员会命名为 Cry8Fa1。

- 5 本发明用生物分析软件 Bioedit 进一步分析了 Cry8Fa1 蛋白的氨基酸组成(见表 7 和附图 11)。结果表明, 该蛋白质的分子量为 133.08kDa, 等电点为 pH4.565(见附图 12)。

实施例 5、*cry8E* 和 *cry8F* 基因的表达

根据克隆的 *cry8Ea1* 和 *cry8Fa1* 基因的全长序列, 设计了用于表达两种基因的引物, 序列如下:

- 10 8E1: CGCGGATCC (*Bam* HI) GATGAGTCCAAATAATCAAAATG
 8E2: ACGCGTCGAC (*Sal* I) CTCTACGTCAACAATCAATCAATTC
 8F1: CGCGGATCC (*Bam* HI) GATGAGTCCAAATAATCAAAATG
 8F2: CATTAACCTCTGCCCACGGATCT (C) TCTGGTGCAAAGAAGTCCAG
 8F3: CTTGACTTCTTTGCACCAGAA (G) GATCCGTGGGCAGTTAATG
 15 8F4: CCGCTCGAG (*Xho* I) CTCTACGTCAACAATCAATCAATTC

引物 8E1 和 8E2 分别引入 *Bam*HI 和 *Sal*I 位点, 以含全长 *cry8Ea1* 的 pSS3612 质粒 DNA 为模板, 扩增得到全长基因, 插入 Bt 表达载体 pSXY422b 中, 转化大肠杆菌 SCS110, 提取质粒, 电击转化 Bt 无晶体突变株 HD-73⁻中, 得到工程菌 BioT8E。

- 20 由于 *cry8Fa1* 全长基因内存在 1 个 *Bam*HI 切点, 用重叠引物 PCR 的方法对这一位点进行了突变, 重叠引物 8F2 和 8F3 中引入了点突变(划线部分)、引物 8F1 和 8F4 分别引入 *Bam*HI 和 *Xho*I。以含全长 *cry8Fa1* 基因的 pSS266 质粒 DNA 为模板, 分别用 8F1 和 8F2、8F3 和 8F4 扩增得到 0.3kb 和 3.1kb 产物, 再分别以它们为模板, 分别利用引物 8F1 和 8F4 扩增得到 3.4kb 的全长基因, 插入 Bt 表达载体 pSXY422b 中, 转化大肠杆菌 SCS110, 提取质粒, 电击转化 Bt 无晶体突变株 HD-73⁻中, 得到工程菌 BioT8F。

- 25 分别将上述两株工程菌 30℃ 于牛肉膏培养基中培养 30 小时, 取 500μL 菌液至 Eppendorf 管中, 超声波破碎 30 秒钟(B. Braun U Labsonic, 230V, $T_{\text{间隔}}=0.5$ 秒); 取 100μL 加入 25μL 新配 0.5N NaOH, 25℃ 作用 5 分钟; 加入 65μL 3× 样品缓冲液(925μL 上样缓冲液+75μL β-巯基乙醇), 100℃ 煮沸 5 分钟。离心除去沉淀。上样 10μL 进行 SDS-PAGE 电泳分析结果。结果(见附图 13)表明, 工程菌 Biot8E 和 Biot8F 中的 *cry8Ea1* 和 *cry8Fa1* 基因均获得了表达, 表达物的分子量为
 30 130kDa 左右。

实施例 6、Cry8E 和 Cry8F 蛋白的活性测定

将 Bt 工程菌株接种在普通细菌琼脂克氏瓶培养基上培养 3 天。将受体菌株 HD-73⁻接种

在普通细菌琼脂克氏瓶培养基上培养 4 天。将培养物洗下，2 倍梯度浓度稀释，将 40ml 菌悬液加入到 200g 有均匀粗细土豆丝的细土（紫外线灭菌）中，混匀，使土壤含水量保持在 18%-20%。接入暗黑鳃金龟 15 天龄幼虫 20 头，以加入清水的处理为空白对照，28℃感染饲养，14 天检查死虫数，计算 LC_{50} 。结果（见表 8）表明工程菌株对暗黑鳃金龟具有极高的毒杀活性。其表达的 Cry8E 和 Cry8F 蛋白均具有杀暗黑鳃金龟幼虫的活性。

附：本发明所涉及的 DNA 序列和蛋白质序列

SEQ ID NO 1 (*cry8Ea1* 基因的核苷酸序列)：

5
ctgcagaata gacacggata cgatcgccctt cacataaatg ctgaaatctt cttctagaca 60
PstI
ttcttgtgtc acctcatttt ttgtttttta actacagtat gttatatgca aaagaagggg 120
tagaggattg ggcctttttac tacaaaaata caaaaacata cttatgattg catatggaga 180
10 tgtcaaagt catgcattaa aaatggatta gaaatgattt caaataggca aaagcctatt 240
ccaatgaaga aagattgaca taggctattg tatatagaag aaggtaacga ggaacatact 300
gttagggtag acctaacata gaagtatgct tgtttgaagc atgtacatct tgaaatacca 360
gtagaaatat gggggaacat gttattttta taattggtaa aatcttttgt tagaagggtga 420
aggcgtatga gacaacaaag agtatgtgag tgtaacaatt gtaggaaaaa gggtgagaag 480
15 aatcatcttt gtcaatatat aaaacgtggg gattgtatat gggtcagttc ctttggaagc 540
aagttacaaa agagtgggtat ttctctgtta ataaaagatt cttttttatt atgggttgat 600
gaaaaacatc aattaaatca aaccagtcta caggggatcc atattgaaaa aagacaataa 660
atgaagaagg agtctcattg ttaacgaagt gtgtacatct atcatgtaca catcgtaagt 720
cgtatgttct acctgtatct ggtaggaaag aattgtcgca tgtgcaaggc gtatatacac 780
20 aaacatgttt tgttatattt ttgaataatt tgaaaataaa tatgttataa ttaataact 840
ttcgtgtgtt ttttttgcga aatccctaga aagtatcgta aaaagtcctt aacaattttg 900
tgaaactgaac ccaaaaaatt agacaaatat attaagcagc tactaaggat tgaactctgt 960
attgcacggg ggacaatcct tttagttttg ttttaattct tttgtgattg tagtaatgaa 1020
tataagtttc tagttcttgc ttaaattggt ccatactttc aaactcttta agataaagta 1080
25 attcagactt taataagcca aagaaatttt ccatgactgc attatctaag caattttccct 1140
tacgggacat actttggata acgttatggt ttttaagcga ctgatgatat tgtcgcatth 1200
gataatgcc aacctgatcc gagtgtaaaa taggagtttc cttatcattc aaacattgaa 1260
acgccttatt taacatttta gaaacaaggg aataggcagg tctatgttct atattgtaag 1320
ctataatttc tccgttatat aagtcttaaa tgggtgatag atatagtttt ttaccatgta 1380
30 agtggaaact cgtcacatct gttacccatt tctcgtttgg ttttgatgcg tgaaaattac 1440
gttttaaaat attaggagcg aatttccga cagtcccttt atatgaacga tattttttta 1500
atcgaacaag acattttaat cccaggatat tcattaaacg tcgaacgggt ttatgattta 1560
atgcatggcc tcgattacgt aattccaatg taatacgacg ataaccatac ctcccaaaat 1620
tctcactaaa aatctcttta attaatctt taactttctt atatttatct ggacgtttcg 1680
35 cttgtttcat ccagtaataa tacgtactac gagcgatatt agcgactttc acaagggtcaa 1740
cgaccttata tttatgcctt aattcataaa tcaattgcgc tttgtcttgg tctgtgatgt 1800
tttcttcttt tgaactaagg cattcaactt ttttaaatag tcattttcca tacgcagacg 1860
ttcattctct gcttgtagcg cttctataga acctcaaga aatacttcgt tttgttttaa 1920
atgttgttagc ttagcttttt ctttggccat ggtagacgc cctttttctt ttgatttttag 1980
40 ggcattctaat ccttctgttt cataagctac tttccatttt cggagtgttt cgcaagaagg 2040
aatattaaaa aaagcagctg tttctctcag agatgtocca ttttcattca tataatgaat 2100
tacatctagt ttatactcga gagggtaagt tgtatagcgt ttttcaaacg ctttttcccc 2160
tgaaaattca aaccgtttta tccattgata aagttctcta ggatgaaccc ctatagaatt 2220
agcaatgggt tttccgcctt ccgtaccttc tagatatcgt tttactgctt gtattttatc 2280

	ttttgaagaa aatttagcca taaaaaatgc acctccaatt gttaattatg tgtctaacaa	2340
	ttggggtgca cttcattgtt ggggactttt gtatgttcct ttttagacat tcttttaagt	2400
	tctttatata gaaagactga agaaagcaga ataagaagtc catccoctga ttcattgagaa	2460
	ccgaaaaatt catgatgcac tggatgcca atatttagat acatttccta ttgatattct	2520
5	acgagattga attgatgtaa tgttgttccc ttttgggtcaa actgaccaat ggcgatagct	2580
	ctccttgcac gagtacttct caaacttcca ttacacattg tattccccat cttttttatg	2640
	tatatctttt ggggaaaatc gtaatttctg cttatgatga caagatttta ctaaaataag	2700
	aagagtggaa tattttactc tatgtcaaac aaaaaagcaa tatatgttta aacgcgaaaa	2760
	taatcatcat atcaacaatg cccggtacat aaagatagat ggggggattt ttcgaaatga	2820
10	ORF2 →	
	ttcgaaaagg ctccattgat tccgataggag gtgcacagaa aaaaatggaa gaacaatatg	2880
	catcgcaaga tcagtcagat gtagaagggt tcaagcggaa gaaaaaacat accattccct	2940
	ttcaatgtat gggttctatt ccaacagggt ttcaaattca aaaaccgaat acaccaaaac	3000
	ttgtttatga tgtaagccat ttatctatgg taaaagagat gtgtaaacga gtgattgacg	3060
15	tagaggattg tgggcaagtc gaaatcgatt tacatgtctt aaaaatcaaa ggtgtcttac	3120
	cctttattgt gaacgtttcc attgagccgc ttagtatgga acatgtgtat accacaagtg	3180
	gtagagacac atccctattt ttaagttgtc aagaaaccgt atatgtggat catattttta	3240
	aatatagtgt cgatcatgtc ccgtattatg tgattgatgg tcatcatatt ctagtacgtg	3300
	atgtcgtgat aaagttgtg gaagaaaacc cgcaaacggc tcaaatatca ggtgtttttt	3360
20	attttgatta tgcatattt caatgaaac aaaaacgttc tcttatacgg cattcccaa	3420
	End codon	
	agcatcgcca ccttttttat catacaatag ttcgttctaa gaagagccgt aatatttttc	3480
	tatctaacag gaattttatc atctacagaa gaatattctt atcatggtaa tgaggagagg	3540
	gattgaaagt caaaagatta cctgatttgt catgtaagaa aaaggaatcg atcgtacagg	3600
25	aaagtcaaaa gaaagtgtaa aaattttata tcttgtgtat gtataggagg aaaatagatg	3660
	RBS ORF1 →	
	agtcctaaata atcaaaatga atatgaaatt atagatatgg caccttctac atctgtatcc	3720
	aatgattcta acagataccc ttttgcgagt gatccaacaa atgcattaca aaatatgaat	3780
	tataaagagt atttaagaat gtctgaggga tatgatagtg aatattctgg ctccacctgaa	3840
30	gtgcttatta gtgagcgaga tgcggttaag acagcaatca gtttggtagg tactatatta	3900
	ggaaaattag gagttccatt ggtaggaccg attgtgagcc tatatagtac acttattgat	3960
	gttttgtggc caggtggaaa gagtcaatgg gaaattttta tggaaacaagt agaagcactt	4020
	attaatcaaa aaatagcaga atacgcaagg gctaaggcac ttgcagaatt agaagggtta	4080
	ggaaataact atcaattata ttttaacagca cttgaagaat ggaggaaaa tccaagcagt	4140
35	acaagagtct tacgtgatgt tccgaatcga tttgaaatcc ttgatagctt atttacacaa	4200
	tatatgcctt cttttcgggt aacagggttat gaagtacat tactttcagt atatgcgcaa	4260
	gcagctaacc ttcatattat gttatttaag gacgcttcta tttttggaga agaattggggg	4320
	ttctctacaa ccgctattaa taactattat aatcgtaaaa tgagtcttat cgcgcaatat	4380
	tctgatcatt gtgtacaatg gtatagaact ggggttagatc gattaaaagg atcgaatgct	4440
40	aaacaatggg ttgaatataa ccgcttccga agagaaatga cattatcggg gtttagatatt	4500
	atgacattat ttccaatgta tgacatgcgc acgtacccaa tggaaacaaa agcacaacta	4560
	acaagggaag tatatacaga tccaattggg gccataggag cgcaagggtc ttgggtatgac	4620
	tcagcacctt ctttcaatac tctggaaagt acttttataa gaggaaagca tctatttgat	4680
	tttataacta gactctctat atatacaggg cgaagctcat tcagtgttag taattactta	4740
45	aaaaaatgga tagggcatca aatatcctct caacctatag gcggcagtat acaaactcaa	4800
	acctatggca ctacgagtgg cagttctgtt attgtacgc agcaaatgg ctttacagg	4860

	tttgacgttt ataagacttt atcaacagcg ggggttctgt ttgcttatac ttcgaaatat	4920
	tatggcggtat ctaaagttgt ttttgatgcg atatatcctg acaacaagta taaaacaaca	4980
	tttacctata atcctggatc tgaaggattt ggagcgcaag aaaaggattc agaagttgaa	5040
	ttgccaccag aaacattaga tcaacccaat tatgaggcgt atagccatag attgaattat	5100
5	gttacattta ttagaaatcc agatgtacca gtattttctt ggacacatcg gagtgcggat	5160
	cgtacgaata cagttttattc agataaaatc actcaaatac cagttgtaaa ggccagtgc	5220
	ggccctaaac cttccgctaa cgaagttgga cactatcttg gtggagatcc aatatcattt	5280
	aactcttctg gtagcactgg agtgataagg ttaaataata attcaccatt atcccaaaaa	5340
	taccgtgtga gaattcgcta ttgctcttca gttgattttg acttagatgt agttcgtgga	5400
10	ggcactactg taaataatgg tagattttaac aaaagcgcg ctaacgtcgg atggcaaagt	5460
	ttgaagtatg aaaattttta atttgcaagc ttttctacac cttttacatt taatcaagct	5520
	caagatacat taaaaataag tgtaaggaat tttagttcaa tcgtaggagg cagcgtagtt	5580
	tatatagacc gaatcgagct catcccagta aatgcaacat atgaggcaga acaagattta	5640
	gattcggcaa agaaagcagt gaataccttg tttacgaata caaaagatgg tttacgacca	5700
15	ggggtaacgg attatgaagt gaatcaagcg gcaaacttag tggaatgcct atcggatgat	5760
	ttgtatccaa atgaaaaacg cttgttattt gatgcagtga aagaggcaaa acgactcagc	5820
	gaggcacgta acttactaca agatccagat ttccaagaga taaatggaga aaatggatgg	5880
	accgcaagta caggaattga ggttgtagaa ggagatgctc tatttaaagg gcgttatcta	5940
	cgcctaccag gtgcgagaga aatggataca gaaacgtatc caacgtatct gtatcaaaaa	6000
20	gtagaggaag gtgtattaaa accatacaca agatatagat tgagagggtt tgtcggaaagc	6060
	agtcaaggct tggaaatttc cacaattcgt catcagacga accgaattgt aaaaaatgtt	6120
	ccagatgatt tattaccaga tgtacctcct gtaaactctg atggtagaat caatcgatgc	6180
	agcgaacaaa agtatgtgaa tagccgttta gaaggagaaa gaggattacc aaatgggaat	6240
	cgttctgctg aagcgcatga attctctctc cctattgata taggagagct ggattacaat	6300
25	gaaaatgcag gaatatgggt tggattttaag attacggacc cagagggata tgcaacactc	6360
	ggtaaccttg aattggtaga agagggacca ttgtcaggag acgcactaga acgcctgcaa	6420
	agagaagaac aacagtggaa gcttcaaatg acaaaaagac gtgaagagac ggatagaaaa	6480
	tatacggcag caaaacaagc ggtagatcgt ttatatgcag attaccaaga tcaacaattg	6540
	aatccaaacg tagaaattac ggatattact gcggcccaaa acctgatata gtccattcct	6600
30	tatgtatata atgaaatgtt cccagaaata caagggatga actatacgaa gtacacagag	6660
	ttaacaaatc gactccaaca agcgtggggt ttgtatgac aacgaaacgc cataccaaat	6720
	ggtgatttcc gaaatgaatt aagtaattgg aatacaacat ctggtgtaaa tgtacaacaa	6780
	atcaacaata cgtctgtctt agtcatgcca aactgggatg ggcaagtttc gcaacagttt	6840
	acagttcaac cgaatcaaag atatgtatta cgagttactg caagaaaaga aggggtaggg	6900
35	aatgggtatg tgagtatccg tgatggtgga aatcaaacag aaacgcttac gtttagtgca	6960
	agcgattata acacagatag tgtgtataat acgcaagtgt cgaatacaaa tgggttgtag	7020
	aatgagcaaa caggatatac cacaaaaaca gtgacattca tcccatatac agatcaagtg	7080
	tggattgaga tgagcgagac cgaaggtatg ttctatatag aaagtgtcga attgattgtt	7140
	gacgtagagt <u>aa</u> tggttagta cccctccaga tacagggtttc atctggaggg gtttttttct	7200
40	End codon	
	gaaaaagggc cttttttag agagaatcc gattatttta ttacgattat atattttgtg	7260
	gatagatcat <u>ggtacc</u>	7276
	KpnI	

45 SEQ ID NO 2 (Cry8Ea1 蛋白的氨基酸序列):

	MSPNNQNEYE IIDMAPSTSV SNDSNRYPFA SDPTNALQNM NYKEYLRMSE GYDSEYSGSP	60
	EVLISERDAV KTAISLVGTI LGKLGVPVVG PIVSLYSTLI DVLWPGGKSQ WEIFMEQVEA	120
	LINQKIAEYA RAKALAELEG LGNNYQLYLT ALEEWQENPS STRVLRDVRN RFEILDSLFT	180
5	QYMPSFRVTG YEVPLLSVYA QAANLHLLLL KDASIFGEW GFSTTAINNY YNRQMSLIAQ	240
	YSDHCVQWYR TGLDRLKGSN AKQWVEYNRF RREMTLSVLD IMTLFPMYDM RTYPMETKAQ	300
	LTREVYTDPI GAIGAQGSWY DSAPSFNTLE STFIRGKHLF DFITRLSIYT GRSSFSASNY	360
	LKKWIGHQIS SQPIGGSIQT QTYGTTSGSS VIATQQIGFT GFDVYKTLST AGVLFAYTSK	420
	YYGVSKVVF D AIYPDNKYKT TFTYNPGSEG IGAQEKDSEV ELPPETLDQP NYEAYSHRLN	480
10	YVTFIRNP DV PVFSWTHRSA DRTNTVYSDK ITQIPVVKAS DGPKPSANEV GHYLG G DPIS	540
	FNSSGSTGVI R LNINSPLSQ KYRVIRIRYCS SVDFDL DVVR GGTTVNNGRF NKSAPNVGWQ	600
	SLKYENFKFA SFSTPFTFNQ AQDTLKISVR NFSSIVGGSV VYIDRIELIP VNATYEAQD	660
	LDSAKKAVNT LFTNTKDGLR PGVTDYEVNQ AANLVECLSD DLYPNEKRL L F DAVKEAKRL	720
	SEARNLLQDP DFQEINGENG WTA STGIEVV EGDALFKGRY LRLPGAREMD TETYPTYLYQ	780
15	KVEEGVLKPY TRYRLRGFVG SSQGLEISTI RHQTNRIVKN VPDDL L PDVP PVNSDGRINR	840
	CSEQKYVNSR LEGERGLPNG NRSAAEHEFS LPIDIGELDY NENAGIWVGF KITDPEGYAT	900
	LGNLELVEEG PLSGDALERL QREEQWKLQ MTKRREETDR KYTAAQAVD RLYADYQDQQ	960
	LNP NVEITDI TAAQNLIQSI PYVYNEMFPE IQGMNYTKYT ELTNRLQQAW GLYDQRNAIP	1020
	NGDFRNELSN WNTTSGVNVQ QINNTSVLVM PNWDGQVSQQ FTVQP NQRYV LRV TARKEGV	1080
20	GNGYVSIRDG GNQ TETLTF S ASDYNTDSVY NTQVSNTNGL YNEQTGYTTK TVTFIPYTDQ	1140
	VWIEMSETEG MFYIESVELI VDVE	1164

SEQ ID NO 3 (*cry8Fa1* 基因的核苷酸序列) :

25	atcgataaag ggaatggaag acaactcgca aatggctcaa atatcggggtg ttttttattt	60
	tgattatgca taattacaat gaaaacaaaa agaattcatt tgtatagtat tcccagaaat	120
	atcgtgacat cgtttatcat acaataattc gttctaagaa gagccggatt atttttcaat	180
	ctaacaggaa ttttattgtc tacagaagaa tattcttatac acggtaatga ggagagggag	240
	tgaaaatcaa aagagtacct gatttgtcat gtaagaacaa aagaaatcga tcgtacagga	300
30	aagtcaaaag aaagtgtaaa aaattttata tcttttgtat gtata ggagg aaaatag atg	360
		RBS ORF→
	agtccaaata atcaaaatga atatgaaatt atagatatgg caccttctac atctgtaacc	420
	aatgattcta acagataccc ttttgcaat gagcccacaa atgcattaca aaatatgaat	480
	tataaggatt atttaagaat gtctgaggga tattctcctg aatatttaac aagcctaagt	540
35	ccttacagcc agtttggcac agttgataag atcatcagta ttattagtct attgaatagt	600
	gctgcaggta ttcttggtct tgattttttt actggattgc tgcaatttat tcttgacttc	660
	tttgcaaccag aggatccgtg ggcagagtta atggaaactag tggacaact catagatcaa	720
	aaaataacag ttgctacaag agaaaaggcg ctcgcagaat taagaggact gataaatgga	780
	taccttgtat atcagcaatc attagaaagt tggctggaaa atccaaatgc tacaagagct	840
40	agtatagttc gagaacaata tgtcgcttta gaacttgatt ttgttacttc gatttcatct	900
	tttgcgatag ctggacagga agtaccgtta ttagccgtgt acgcacaagc tgctaattta	960
	catttgttat tattgagaga tgtgtcaata tttggagaag aatggggatt aacagtaaat	1020
	gagggttaata ccttctatat tctgcaaatg acttatataa ctgagtatag tgattattgt	1080
	gtaagaattt ataatactgg cttaaataaa taaaaggat ctagtgcatac tagttggggt	1140
45	gattataatc gctttcgtag agaaatgaac ttactagtag tagatattat tgcgttattt	1200
	ccaaactatg atgttcgtag gtatccaatg gaaacaacaa cggaattaac aagagtagtt	1260

	tacactgac	caattgtgt	tgacgaaagg	aagggggtgg	cgtcgactca	tagttggacg	1320
	gcgattgcac	catctttctc	aagtatagaa	tctctaactc	gacgaccagg	attatttaca	1380
	tggttagatc	aactaactat	tttttcgaaa	cgcataatcg	aacctagtgt	atttataaat	1440
	agttgggctg	ggcataagat	tagcaccttt	agaacacaaa	aaacagatat	actcataaat	1500
5	accacccatg	gagatactaa	taatcctata	aaagaatttg	tagtagatac	caaaaaagta	1560
	gaagatattt	atcaaacgat	agcataccca	catgcagtag	caaatgaagt	attctattta	1620
	ttcgggtgct	caaaagttga	ttttaatatg	gtacctgcag	gtggctctgc	aaactctgca	1680
	cacaccctca	ttttttctga	tagtacggga	gggagactgg	aaagtattac	gaagaactca	1740
	gaagcagaat	tacctccaac	agagtcatta	tcagatacac	ctcaacccaa	ccaagtaact	1800
10	tattctcaca	gattagatta	tgctacaata	attaaagcaa	ataaaagtta	tggaagtggg	1860
	tatattccat	tattaggttg	gacccatcgg	agtgtagatc	gtaataatac	aatttatccg	1920
	aataaaatca	ctcaaatacc	agcagtaaaa	gctttctcat	atactgaatc	atttaaatgt	1980
	aatgttattg	cagggtccagg	attcacagga	ggagatttaa	taagtttagg	tcatttagag	2040
	aatatttata	tgaaattaaa	cgttccaaat	cctcaaaaat	tccgtgttcg	tattcgttat	2100
15	gctgctagta	caacttcgta	tttgcaaata	actgggctat	ctaatttagc	tcagtctgat	2160
	cgtttcgaac	agacgtattc	taatgaaat	gaaaacaatt	tgatgtttga	aaattttcaa	2220
	tatgtagaac	ttagaaatat	tttttcggta	gatgctccat	tagaaaatca	tcaagtaagt	2280
	atacaaaat	atcaaggtaa	tggttttggt	attatagacc	gaatcgaatt	catccagta	2340
	aatgcaacat	atgaggcaga	acaagattta	gattcggcaa	agaaagcagt	gaataccttg	2400
20	tttacgaata	caaaagatgg	tttacgacca	ggggaacgg	attatgaagt	gaatcaagcg	2460
	gcaaaccttag	tggaatgcct	atcggatgat	ttgtatccaa	atgaaaaacg	cttggtattt	2520
	gatgcagtag	aagaggcaaa	acgactcagc	gaggcacgta	acttactaca	agatccagat	2580
	ttccaagaga	taaatggaga	aaatggatgg	accgcaagta	cagggaattga	ggttgtagaa	2640
	ggagatgctc	tatttaaagg	gcgttatcta	cgcctaccag	gtgcgagaga	aatggatata	2700
25	gaaacgtatc	caacgtatct	gtatcaaaaa	gtagaggaag	gtgtattaaa	accatacaca	2760
	agatatagat	tgagagggtt	tgtcggaagc	agtcaaggct	tggaaatttc	cacaattcgt	2820
	catcagacga	accgaattgt	aaaaaatggt	ccagatgatt	tattaccaga	tgtacctcct	2880
	gtaaaactcg	atggtagaat	caatcgatgc	agcgaacaaa	agtatgtgaa	tagccgttta	2940
	gaaggagaaa	gaggattacc	aatgggaat	cgttctgctg	aagcgcatga	attctctctc	3000
30	cctattgata	taggagagct	ggattacaat	gaaaatgcag	gaatatgggt	tggatttaag	3060
	attacggacc	cagaggggata	tgcaacactc	ggtaaccttg	aattggtaga	agagggacca	3120
	ttgtcaggag	acgcactaga	acgcctgcaa	agagaagaac	aacagtggaa	gcttcaaatg	3180
	acaaaaagac	gtgaagagac	ggatagaaaa	tatacggcag	caaaacaagc	ggtagatcgt	3240
	ttatatgcag	attaccaaga	tcaacaattg	aatccaaacg	tagaaattac	ggatattact	3300
35	gcggcccaaa	acctgatata	gtccattcct	tatgtatata	atgaaatggt	cccagaaata	3360
	caagggatga	actatacgaa	gtacacagag	ttaacaaatc	gactccaaca	agcgtggggt	3420
	ttgtatgatc	aacgaaacgc	cataccaaat	ggtgatttcc	gaaatgaatt	aagtaattgg	3480
	aatacaacat	ctggtgtaaa	tgtacaacaa	atcaacaata	cgtctgtctt	agtcattgcca	3540
	aactgggatg	ggcaagtttc	gcaacagttt	acagttcaac	cgaatcaaag	atatgtatta	3600
40	cgagttactg	caagaaaaga	aggggttaggg	aatgggtatg	tgagtatccg	tgatgggtgga	3660
	aatcaaacag	aaacgcttac	gttttagtgca	agcgattata	acacagatag	tgtgtataat	3720
	acgcaagtgt	cgaatacaaa	tggtttgtac	aatgagcaaa	caggatatac	cacaaaaaca	3780
	gtgacattca	tcccatatac	agatcaagtg	tggattgaga	tgagcgagac	cgaagggtatg	3840
	ttctatatag	aaagtgtcga	attgattgtt	gacgtagagt	aatggtagta	cccctccaga	3900
45			End codon				
	tacaggtttc	atctggaggg	gtttttttct	gaaaaagggc	ctttttttag	agaagaatcc	3960

gattattttta ttacgattat atattttgtg gatagatcat ggtacc

4006

SEQ ID NO 4 (Cry8Fa1 蛋白的氨基酸序列):

5	MSPNNQNEYE IIDMAPSTSV TNSNRYPFA NEPTNALQNM NYKDYLRMSE GYSPEYLTSL	60
	SPYSQFGTVD KIISIISLLN SAAGIPGLDF FTGLLQFILD FFAPEDPWAE LMELVEQLID	120
	QKITVATREK ALAELRGLIN GYLVYQQSLE SWLENPNATR ASIVREQYVA LELDFVTSIS	180
	SFAIAGQEVF LLAVYAQAAN LHLLLLRDVS IFGEWGLTV NEVNTFYIRQ MTYTTEYS DY	240
	CVRIYNTGLN KLGSSASSW VDYNRFRREM NLLVLDIIAL FPNYDVRYP METTTTELTRV	300
10	VYTDPIVFDE RKGVASTHSW TAIAPSFSSI ESLTRRPGLF TWLDQLTIPS KRISQPSVFI	360
	NSWAGHKIST FRTQKTDILI NTTHGDTNNP IKEFVVDTKK VEDIYQTIAY PHAVANEV FY	420
	LPGVPKVD FN MVPAGGSANS AHTLIFSDST GGRLESITKN SEAELPPTES LSDTPQPNQV	480
	TYSHRLDYAT IIKANKSYGS GYIPLLGWTH RSVDRNNTIY PNKITQIPAV KAFSYTESFN	540
	VNVIAGPGFT GGD LISLGH L ENIYMKLNVP NPQKFRVRIR YAASTTSYLQ ITGLSNLAQS	600
15	DRFEQTYSNE NENNLMFENF QYVELRNIFS VDALENHQV SIONYQGN GF VIIDRIEFIP	660
	VNATYEA EQD LDSAKKAVNT LFTNTKDGLR PGVTDYEVNQ AANLVECLSD DLYPNEKRLL	720
	FDAVKEAKRL SEARNLLQDP DFQEINGENG WTA STGIEVV EGDALFKGRY LRLPGAREMD	780
	TETYPTYLYQ KVEEGVLKPY TRYRLRGFVG SSQGLEISTI RHQTNRIVKN VPDDL LPDVP	840
	PVNSDGRINR CSEQKYVNSR LEGERGLPNG NRSAEAHEFS LPIDIGELDY NENAGI WVGF	900
20	KITDPEGYAT LGNLELVEEG PLSGDALERL QREEQWKLQ MTKRREETDR KYTAAKQAVD	960
	RLYADYQDQQ LNP NVEITDI TAAQNLIQSI PYVYNEMFPE IQGMNYTKYT ELTNRLQQAW	1020
	GLYDQRNAIP NGDFRNELSN WNTTSGVNVQ QINNTSVLVM PNWDGQVSQQ FTVQPNQRYV	1080
	LRVTARKEGV GNGYVSIRDG GNQTETLTFS ASDYNTDSVY NTQVSNTNGL YNEQTGYTTK	1140
	TVT FIPYTDQ VWIEMSETEG MFYIESVELI VDVE	1174

25

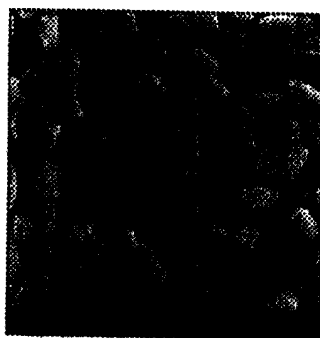


图 1

14 16 18 20 22 M 24 26 28 30 hr

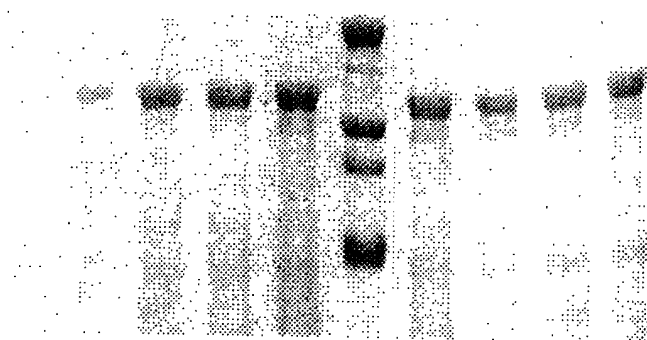


图 2

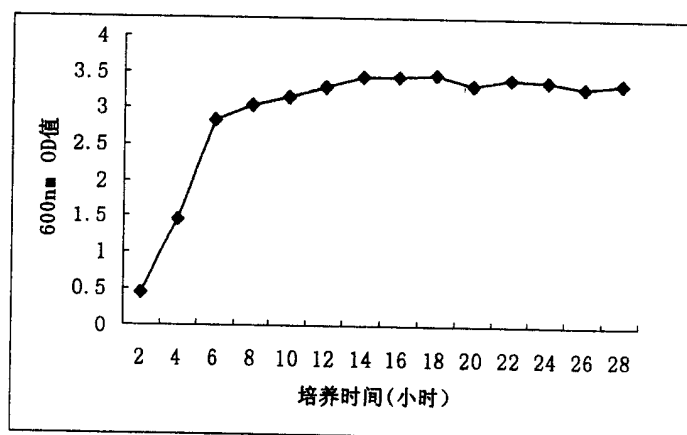


图 3

M 1 2



图 4

M 1 2 3 4 5



图 5

M 1 2 3 4

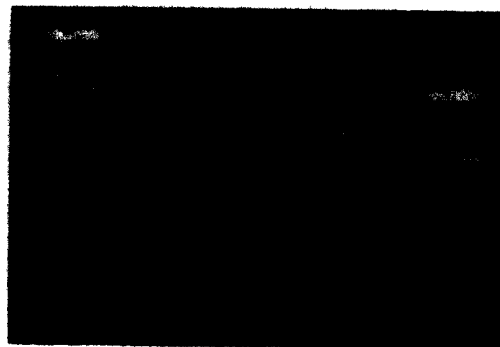


图 6

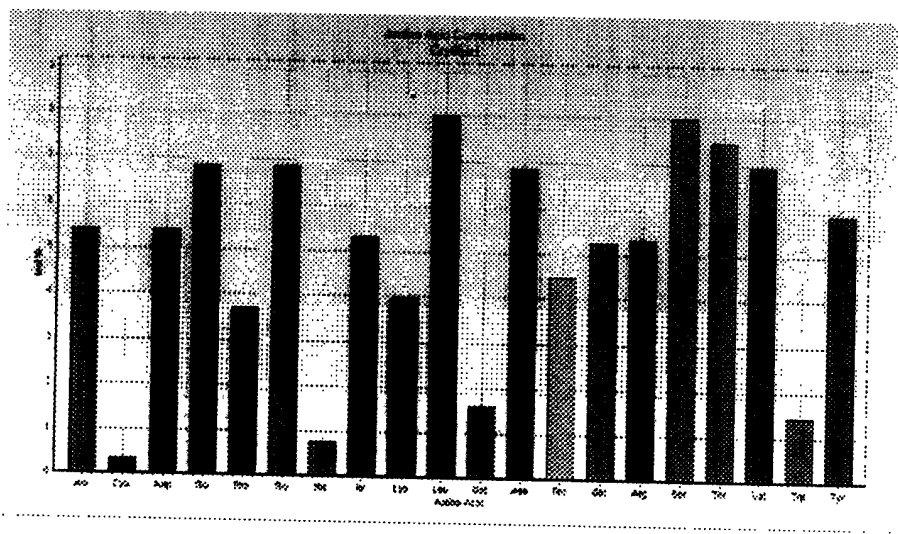


图 7

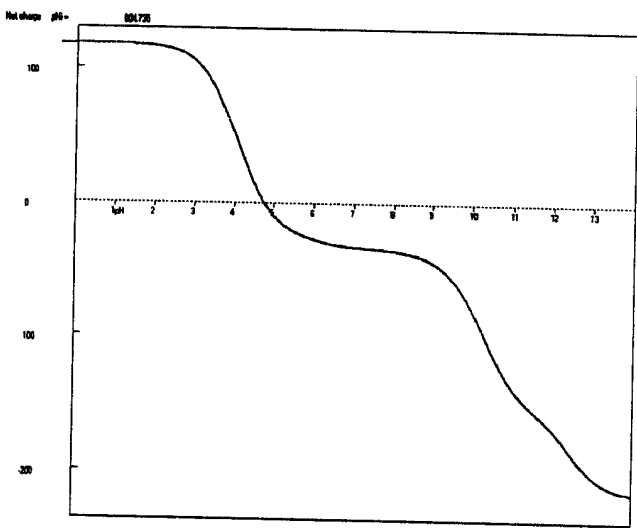


图 8

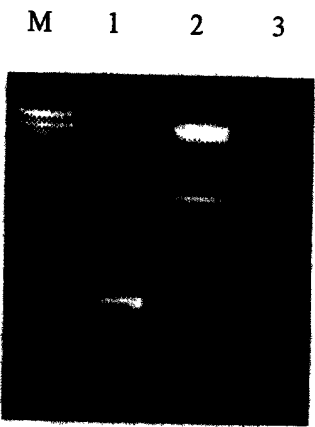


图 9

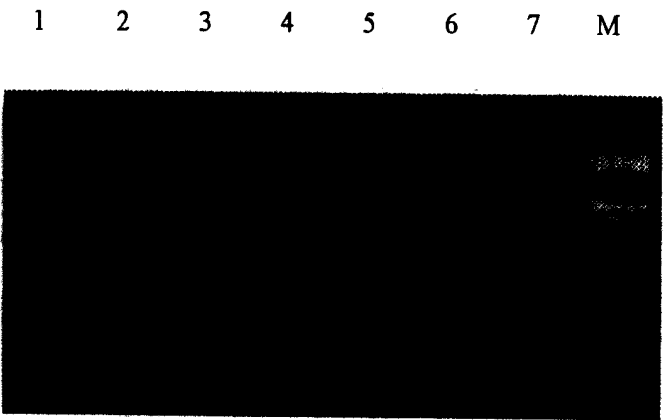


图 10

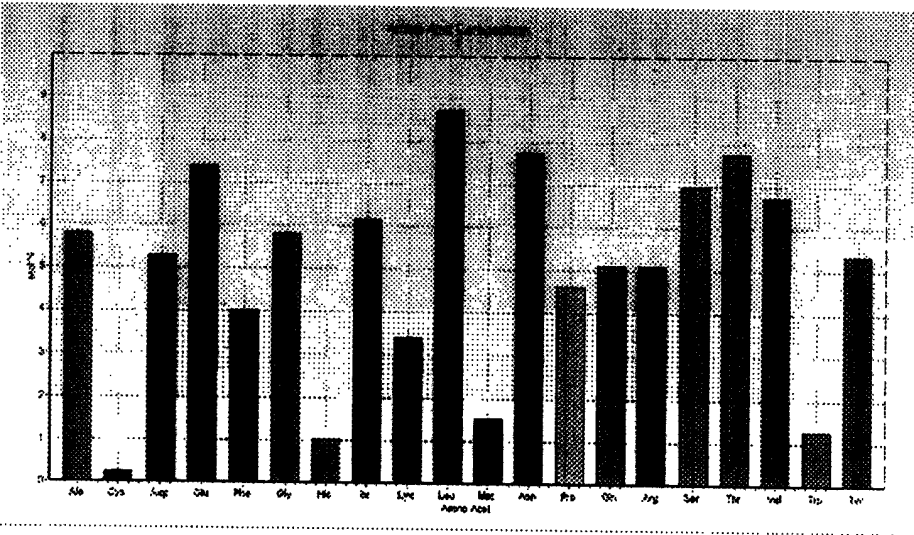


图 11

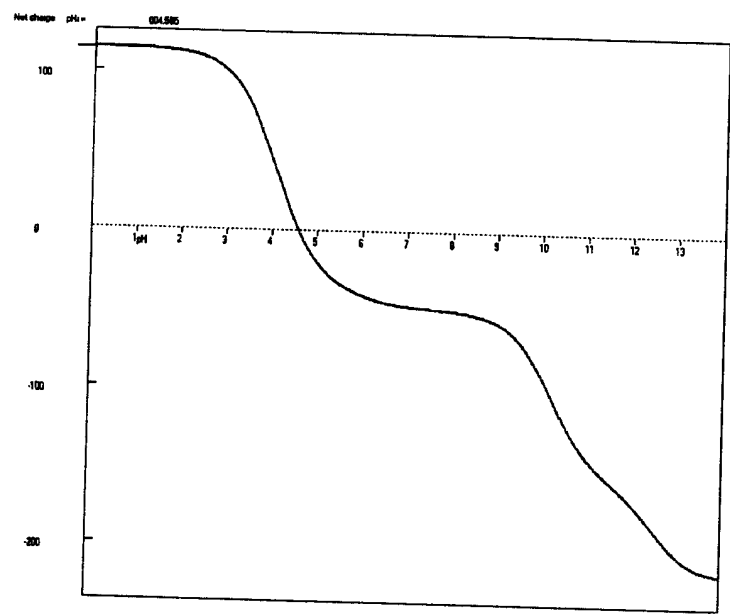


图 12



图 13