(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 117947081 A
(43)申请公布日 2024.04.30

(21)申请号 202410080110.7
(22)申请日 2018.01.11
(30)优先权数据
62/445,313 2017.01.12 US
(62)分案原申请数据
201880010953.2 2018.01.11
(71)申请人 孟山都技术公司
地址 美国密苏里州
(72)发明人 J·A·鲍姆 D·J·伯温 C·A·蔡 D·J·池 W·P·克林顿 C·L·达特 L·英格里什 S·弗拉辛斯基 V·M·古佐夫 K·A·贾雷尔 U·R·凯森帕利 T·M·马尔瓦尔 R·M·麦卡罗尔 J·S·米利甘 J·P·摩根斯特恩 D·G·洛克 S·A·萨尔瓦多 T·F·史密斯 C·E·索托 C·M·斯塔尔茨 B·M·塔奇克 T·T·沃恩 M·W·F·F·雷兴贝格
(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所 11256
专利代理师 孟凡宏 谢燕军
(51)Int.Cl.
C12N 15/82(2006.01)
C07K 14/325(2006.01)
A01H 5/00(2018.01)
A01H 5/10(2018.01)
A01H 6/46(2018.01)
A01H 6/54(2018.01)
A01H 6/60(2018.01)
A01N 37/46(2006.01)
A01N 63/50(2020.01)
A01N 63/23(2020.01)
A01P 7/04(2006.01)

权利要求书3页 说明书18页
序列表（电子公布） 附图3页

(54)发明名称

对鳞翅目昆虫具有活性的杀害虫毒素蛋白质

(57)摘要

本文公开了编码展现鳞翅目昆虫抑制活性的杀昆虫蛋白质的核苷酸序列,含有黑切根虫(BCW)毒性蛋白质的嵌合体和BCW毒素杀昆虫剂,表达所述嵌合体或所述杀昆虫剂的转基因植物,以及在本文中称为BCW 001、BCW 002、BCW 003的新型杀昆虫蛋白质,和用于检测所述核苷酸序列或所述杀昆虫剂在生物样品中的存在性的方法。

CN 117947081 A

1.一种包含核苷酸序列的多核苷酸构建体,所述核苷酸序列编码:

(a)具有包含选自由SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:8组成的组的序列的氨基酸1至607的氨基酸序列的杀昆虫蛋白质,或其杀昆虫片段;

(b)展现与(a)的所述氨基酸序列的至少95%同一性的多肽片段;或

(c)具有如以SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:8中的任一者所示的从位置7至607的氨基酸序列的杀昆虫蛋白质,

其中所述核苷酸序列可操作地连接到异源性启动子序列。

2.一种对黑切根虫鳞翅目种具有毒性的蛋白质,其包含:如以SEQ ID NO:2所示的从位置256至606的氨基酸序列。

3.根据权利要求1所述的多核苷酸构建体,其中所述杀昆虫蛋白质展现针对选自由以下组成的组的鳞翅目种的活性:草地夜蛾、甜菜夜蛾、斜纹夜蛾、蓓带夜蛾、豆白缘切根虫、粉纹夜蛾、大豆夜蛾、黎豆夜蛾、苜蓿绿夜蛾、烟芽夜蛾、粒肤地老虎、一星粘虫、小地老虎、西方灰地老虎、玉米螟、脐橙螟、玉米根草螟、稻切叶野螟、向日葵螟、南美玉米苗斑螟、苹果蠹蛾、葡萄小食心虫、梨小食心虫、向日葵芽卷叶蛾、小菜蛾、棉红铃虫、舞毒蛾、棉叶波纹夜蛾、果树黄卷蛾、玫瑰黄卷蛾、二化螟、稻纵卷叶螟、玉米根草螟、早熟禾草螟、西南玉米杆草螟、小蔗杆草螟、埃及钻夜蛾、翠纹钻夜蛾、棉铃虫、玉米穗虫、烟芽夜蛾、稻切叶野螟、葡萄花翅小卷蛾、棉红铃虫、柑桔潜叶蛾、欧洲粉蝶、菜粉蝶、小菜蛾和番茄斑潜蝇。

4.根据权利要求2所述的蛋白质,其进一步包含针对选自由以下组成的组的鳞翅目种的生物活性:草地夜蛾、甜菜夜蛾、斜纹夜蛾、蓓带夜蛾、豆白缘切根虫、粉纹夜蛾、大豆夜蛾、黎豆夜蛾、苜蓿绿夜蛾、烟芽夜蛾、粒肤地老虎、一星粘虫、小地老虎、西方灰地老虎、玉米螟、脐橙螟、玉米根草螟、稻切叶野螟、向日葵螟、南美玉米苗斑螟、苹果蠹蛾、葡萄小食心虫、梨小食心虫、向日葵芽卷叶蛾、小菜蛾、棉红铃虫、舞毒蛾、棉叶波纹夜蛾、果树黄卷蛾、玫瑰黄卷蛾、二化螟、稻纵卷叶螟、玉米根草螟、早熟禾草螟、西南玉米杆草螟、小蔗杆草螟、埃及钻夜蛾、翠纹钻夜蛾、棉铃虫、玉米穗虫、烟芽夜蛾、稻切叶野螟、葡萄花翅小卷蛾、棉红铃虫、柑桔潜叶蛾、欧洲粉蝶、菜粉蝶、小菜蛾和番茄斑潜蝇。

5.一种载体,其包含如权利要求1所述的多核苷酸构建体。

6.一种宿主细胞,其包含如权利要求1所述的多核苷酸构建体,其中所述宿主细胞选自由细菌细胞、酵母细胞和植物细胞组成的组。

7.如权利要求6所述的宿主细胞,其中所述植物细胞选自由以下组成的组:苜蓿、香蕉、大麦、菜豆、西兰花、卷心菜、芸苔、胡萝卜、木薯、蓖麻、花椰菜、芹菜、鹰嘴豆、大白菜、柑桔、椰子、咖啡、玉米、三叶草、棉花、葫芦、黄瓜、花旗松、茄子、桉树、亚麻、大蒜、葡萄、蛇麻子、韭菜、莴苣、火炬松、粟、甜瓜、坚果、燕麦、橄榄、洋葱、观赏植物、棕榈、牧场草、豌豆、花生、胡椒、木豆、松树、马铃薯、白杨、南瓜、辐射松、萝卜、油菜籽、稻米、砧木、黑麦、红花、灌木、高粱、南方松、大豆、菠菜、南瓜小果、草莓、糖用甜菜、甘蔗、向日葵、甜玉米、枫香、甜薯、柳枝黍、茶、烟草、番茄、黑小麦、草皮草、西瓜,以及小麦植物细胞。

8.一种植物,其包含如权利要求1所述的多核苷酸构建体。

9.一种从如权利要求8所述的植物产生的种子,其中所述种子包含可检测量的所述多核苷酸构建体。

10.如权利要求8所述的植物,其中从所述植物产生的种子、花粉、子代、植物细胞、植物

组织和商品产品包含可检测量的所述多核苷酸构建体。

11.一种生物样品,其包含可检测量的如权利要求1所述的多核苷酸构建体。

12.一种组合物,其提供杀昆虫有效量的如权利要求2所述的蛋白质以防治鳞翅目害虫物种,以及:

(a)不同于所述蛋白质并且也对相同鳞翅目种具有毒性的剂,其中所述剂选自由以下组成的组:具有不同于所述蛋白质的氨基酸序列的多肽、RNA分子,和化学化合物;或

(b)选自由以下组成的组的剂:Cry1A、Cry1Ab、Cry1Ac、Cry1A.105、Cry1Ae、Cry1B、Cry1C、Cry1D、Cry1E、Cry1F、Cry1G、Cry1H、Cry1I、Cry1J、Cry1K、Cry1L、Cry2A、Cry2Ab、Cry2Ae、Cry4B、Cry6、Cry7、Cry8、Cry9、Cry15、Cry43A、Cry43B、ET35、ET66、TIC400、TIC800、TIC807、TIC834、TIC853、TIC1415、VIP3A、VIP3Ab、AXMI杀昆虫蛋白、DIG杀昆虫蛋白、eHIP和VIP蛋白。

13.如权利要求12所述的组合物,其进一步包含额外杀害虫剂,其中所述额外剂选自由以下组成的组:Cry1C、Cry3A、Cry3B、Cry34、Cry35、Cry51Aa1、ET29、ET33、ET34、ET70、TIC407、TIC417、TIC431、TIC901、TIC1201、TIC3131、5307、DIG-10、Axmi184、Axmi205和AxmiR1。

14.一种产生包含如权利要求1所述的多核苷酸序列的种子的方法,所述方法包括:

(a)种植一个或多个包含所述多核苷酸的种子;

(b)从所述种子生长出植物;以及

(c)从所述植物收集许多种子,其中所述种子包含所述多核苷酸构建体。

15.如权利要求8所述的植物,其进一步包含:

(a)选自由以下组成的组的玉米植物转基因事件:DKB89614-9、MON801、MON802、MON809、MON810、MON863、MON88017、MON89034、事件4114-3、事件5307、DAS59122-7、Bt10、Bt11、Bt176、CBH-351、DKB-83614-9、MIR162、MIR604、TC1507、TC6275、事件676、事件678、事件680、事件98140、DAS40278-9、DKB89790-5、MON21-9、HCEM485、MON832、MON87427、NK603、T14、T25和VCO01981-5;

(b)选自由以下组成的组的大豆植物转基因事件:MON87751、DAS81419-2、MON87701、A2704-12、A2704-21、A5547-127、A5547-35、CV127、DAS44406-6、DAS68416-4、DP356043、FG72、MON4032、ACS-GM003-1、MON87705、MON87708、MON89788、W62、W98和GFM Cry1A;

(c)选自由以下组成的组的棉花植物转基因事件:DAS24236-5、DAS21023-5、事件31707、事件31803、事件31807、事件31808、事件42317、BNLA-601、COT102、COT67B、事件1、GHB119、GK12、MON15985、MLS9124、MON1076、MON531、MON757、T303-3、T304-40、SGK321、事件19-51a、GHB614、LLCotton25、MON88701、MON88702、MON1445、MON1698和MON88913;

(d)甘蔗植物转基因事件NXI-1T;和

(e)选自由以下组成的组的稻米植物转基因事件:LLRICE06、LLRICE601、LLRIC2E62、GM-A17054和GM-A17054。

16.一种鳞翅目昆虫毒性蛋白质,其以可操作键联方式包含:

(a)包含Cry1A结构域I氨基酸序列的第一肽区段;

(b)包含BCW 001结构域II-结构域III氨基酸序列的第二肽区段;

其中所述鳞翅目昆虫毒性蛋白质在针对选自由以下组成的组的鳞翅目害虫测试时展

现毒性生物活性:黑切根虫(小地老虎)、玉米耳虫(玉米穗虫)、西方豆切根虫(豆白缘切根虫)、欧洲玉米螟(玉米螟)、西南玉米螟(西南玉米杆草螟)、卷心菜尺蠖(粉纹夜蛾)、大豆尺蠖(大豆夜蛾)、秋行军虫(草地夜蛾)和蔗螟(小蔗杆草螟)。

对鳞翅目昆虫具有活性的杀害虫毒素蛋白质

[0001] 本申请是申请日为2018年1月11日、申请号为201880010953.2、发明名称为“对鳞翅目昆虫具有活性的杀害虫毒素蛋白质”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的引用

[0003] 本申请要求2017年1月12日提交的美国临时申请号62/445,313的权益,所述美国临时申请以引用的方式整体并入本文。

[0004] 序列表的并入

[0005] 本文提供计算机可读形式的序列表,其含有于2018年1月11日创建的名为“MONS434WO-sequence listing.txt”的文件。如在MS-Windows®中所测量,该文件为166,134字节,并且以引用的方式整体并入本文。这个序列表由SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:12组成。

技术领域

[0006] 本发明总体涉及昆虫抑制性蛋白质的领域,特别是涉及展现针对植物和种子的农业相关鳞翅目(Lepidopteran)害虫的昆虫抑制活性的蛋白质,所述植物和种子的农业相关鳞翅目害虫特别是诸如黑切根虫(“BCW”,小地老虎(Agrotis ipsilon))的鳞翅目害虫。

[0007] 发明背景

[0008] 由苏云金芽孢杆菌(Bacillus thuringiensis,Bt)细菌物种产生的昆虫抑制性蛋白质是在本领域中已知的。某些Bt蛋白质可用于通过将农业上可接受的含有一种或多种此类蛋白质的制剂喷雾于植物上,用被配制为含有杀昆虫有效量的此类蛋白质的组合物对种子进行包衣,或通过在植物/种子中表达结果有效的一种或多种所述蛋白质来防治作物植物的农业害虫。

[0009] 仅少许Bt蛋白质已被开发来用作转基因性状以实现由农民进行商业使用以防治昆虫害虫。农民依赖于这些蛋白质来提供指定害虫防治谱,并且可继续在叶和土壤施用中依赖于广谱化学物质来防治害虫。某些鳞翅目昆虫,诸如地老虎属(Agrotis)种和Striacosta种,已被证明特别难以使用当前在用的转基因杀昆虫性状进行防治,所述性状包括Cry1Ab、Cry1Ac、Cry1Fa、Cry2Ab、Cry2Ae、VIP3Aa和已较不频繁使用的各种其他Bt毒素。因此,需要这样的昆虫抑制性蛋白质,所述昆虫抑制性蛋白质展现针对更广泛谱系的昆虫害虫物种的活性,并且用于在毒素中使用以用于克服害虫对包括当前用于害虫管理系统中的毒素的现有杀害虫剂的抗性发展。

[0010] 本申请描述新型蛋白质家族、变体和嵌合毒素蛋白质构建体,所述新型蛋白质家族、变体和嵌合毒素蛋白质构建体各自展现惊人有效的针对鳞翅目,特别是针对诸如黑切根虫之类的地老虎属种害虫的杀昆虫活性。

发明内容

[0011] 显示一组新型昆虫抑制性多肽(毒素蛋白质BCW 001、BCW 002和BCW 003,以及它们的杀害虫片段)会展现针对作物植物的若干鳞翅目害虫,特别是针对黑切根虫物种(地老

虎属种)的抑制活性。各蛋白质可单独或彼此组合以及与其他Bt蛋白质和昆虫抑制剂组合用于制剂中以及植物中,由此提供当前用于农业系统中的Bt蛋白质和杀昆虫剂化学物质的替代物。

[0012] 本发明提供多核苷酸构建体,其以可操作键联方式含有异源性启动子区段,所述异源性启动子区段连接到编码具有Cry1A特征的杀昆虫蛋白质或其杀昆虫活性片段的核苷酸序列,所述杀昆虫蛋白质相对于Cry1A类毒素蛋白质小于全长,并且具有如以SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO 6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:12阐述的从约位置1至位置607的氨基酸序列。展现此类杀昆虫活性的小于全长多肽应展现与如以SEQ ID NO:2阐述的BCW 001氨基酸序列从约位置1至约位置606或从约位置5至约位置600具有至少约100%、99%、98%、97%、96%、95%、94%、94%、92%、91%或90%同一性。如果将使用全长或显著较大毒素片段,那么同一性百分比应具有较小严格性,并且扩展至与如以SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:6阐述的全长毒素蛋白质序列具有从约100%至约95%、至约90%、至约85%或甚至80%同一性的同一性百分比,因为当在膳食生物测定中针对黑切根虫幼虫测试时,以及当在植物中在玉米、棉花中以及在表达此类蛋白质的大豆转基因事件中测试时,这些毒素蛋白质展现商业适用水平的生物活性。

[0013] 本发明还提供对黑切根虫鳞翅目种具有毒性的蛋白质,包括具有如以SEQ ID NO:2阐述的从位置256至606的氨基酸序列的蛋白质(BCW 001蛋白),以及具有如以SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:6中的任一者阐述的从氨基酸位置257至607的氨基酸序列的蛋白质(在本文中分别称为BCW 002毒素蛋白和BCW 003毒素蛋白)。

[0014] 还观察到所述杀昆虫蛋白质展现针对选自由以下组成的组的鳞翅目种的活性:草地夜蛾(Spodoptera frugiperda)、甜菜夜蛾(Spodoptera exigua)、斜纹夜蛾(Spodoptera litura)、蓓带夜蛾(Mamestra configurata)、豆白缘切根虫(Striacosta albicosta)、粉纹夜蛾(Trichoplusia ni)、大豆夜蛾(Pseudoplusia includens)、黎豆夜蛾(Anticarsia gemmatalis)、苜蓿绿夜蛾(Hypena scabra)、烟芽夜蛾(Heliothis virescens)、粒肤地老虎(Agrotis subterranea)、一星粘虫(Pseudaletia unipuncta)、小地老虎、西方灰地老虎(Agrotis orthogonia)、玉米螟(Ostrinia nubilalis)、脐橙螟(Amyelois transitella)、玉米根草螟(Crambus caliginosellus)、稻切叶野螟(Herpetogramma licarsisalis)、向日葵螟(Homoeosoma electellum)、南美玉米苗斑螟(Elasmopalpus lignosellus)、苹果蠹蛾(Cydia pomonella)、葡萄小食心虫(Endopiza viteana)、梨小食心虫(Grapholita molesta)、向日葵芽卷叶蛾(Suleima helianthana)、小菜蛾(Plutella xylostella)、棉红铃虫(Pectinophora gossypiella)、舞毒蛾(Lymantria dispar)、棉叶波纹夜蛾(Alabama argillacea)、果树黄卷蛾(Archips argyrospila)、玫瑰黄卷蛾(Archips rosana)、二化螟(Chilo suppressalis)、稻纵卷叶螟(Cnaphalocrocis medinalis)、玉米根草螟(Crambus caliginosellus)、早熟禾草螟(Crambus teterrellus)、西南玉米杆草螟(Diatraea grandiosella)、小蔗杆草螟(Diatraea saccharalis)、埃及钻夜蛾(Earias insulana)、翠纹钻夜蛾(Egrias vittella)、棉铃虫(Helicoverpa armigera)、玉米穗虫(Helicoverpa zea)、烟芽夜蛾(Heliothis virescens)、稻切叶野螟(Herpetogramma licarsisalis)、葡萄花翅小卷蛾(Lobesia botrana)、棉红铃虫(Pectinophora gossypiella)、柑桔潜叶蛾(Phyllocnistis citrella)、欧洲粉蝶(Pieris brassicae)、菜粉蝶(Pieris rapae)、小菜

蛾(Plutella xylostella)和番茄斑潜蝇(Tuta absoluta)。

[0015] 本发明的蛋白质也可展现针对选自由以下组成的组的鳞翅目种的生物活性:草地夜蛾、甜菜夜蛾、斜纹夜蛾、蓓带夜蛾、豆白缘切根虫、粉纹夜蛾、大豆夜蛾、黎豆夜蛾、苜蓿绿夜蛾、烟芽夜蛾、粒肤地老虎、一星粘虫、小地老虎、西方灰地老虎、玉米螟、脐橙螟、玉米根草螟、稻切叶野螟、向日葵螟、南美玉米苗斑螟、苹果蠹蛾、葡萄小食心虫、梨小食心虫、向日葵芽卷叶蛾、小菜蛾、棉红铃虫、舞毒蛾、棉叶波纹夜蛾、果树黄卷蛾、玫瑰黄卷蛾、二化螟、稻纵卷叶螟、玉米根草螟、早熟禾草螟、西南玉米杆草螟、小蔗杆草螟、埃及钻夜蛾、翠纹钻夜蛾、棉铃虫、玉米穗虫、烟芽夜蛾、稻切叶野螟、葡萄花翅小卷蛾、棉红铃虫、柑桔潜叶蛾、欧洲粉蝶、菜粉蝶、小菜蛾和番茄斑潜蝇。

[0016] 本发明的蛋白质和本文涵盖的构建体可包括在任何载体中,所述载体包括质粒、粘粒、杆粒、噬菌体介导的载体等。

[0017] 此类载体可用于将本发明的构建体引入许多宿主细胞中,包括引入细菌细胞、酵母细胞和植物细胞中。

[0018] 为酵母细胞的宿主细胞可为酿酒酵母(Saccharomyces cereviseae)或裂殖酵母(Saccharomyces pombe)等。细菌宿主细胞可为许多已知的此类宿主细胞,包括但不限于大肠杆菌(E.coli)、苏云金芽孢杆菌和其他相关芽孢杆菌。植物宿主细胞可从许多植物物种获得,包括但不限于来自以下植物的植物细胞:苜蓿、香蕉、大麦、菜豆、西兰花、卷心菜、芸苔、胡萝卜、木薯、蓖麻、花椰菜、芹菜、鹰嘴豆、大白菜、柑桔、椰子、咖啡、玉米、三叶草、棉花、葫芦、黄瓜、花旗松、茄子、桉树、亚麻、大蒜、葡萄、蛇麻子、韭菜、莴苣、火炬松、粟、甜瓜、坚果、燕麦、橄榄、洋葱、观赏植物、棕榈、牧场草、豌豆、花生、胡椒、木豆、松树、马铃薯、白杨、南瓜、辐射松、萝卜、油菜籽、稻米、砧木、黑麦、红花、灌木、高粱、南方松、大豆、菠菜、南瓜小果、草莓、糖用甜菜、甘蔗、向日葵、甜玉米、枫香、甜薯、柳枝黍、茶、烟草、番茄、黑小麦、草皮草、西瓜和小麦植物。

[0019] 可通过以下方式来产生转基因植物事件,特别是玉米、棉花和大豆转基因植物品种:将本发明的含有例如以SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:11阐述的经适当修饰的多核苷酸序列的构建体引入此类植物细胞的基因组中,以及回收在基因组中包含用于表达至少本发明的蛋白质毒素(即,BCW 001、BCW 002或BCW 003蛋白质毒素)的遗传构建体的可繁殖转基因玉米、大豆或棉花植物。此类转基因植物将已向它们的植物基因组中引入了这样的多核苷酸构建体,所述多核苷酸构建体包含至少异源性启动子区段,所述异源性启动子区段可操作地连接到编码具有选自由SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:12组成的组的氨基酸序列的BCW 001、BCW 002或BCW 003杀昆虫蛋白或其杀昆虫蛋白质片段的核苷酸序列。

[0020] 种子也被构想为本发明的特征,其中种子从所述转基因植物产生,并且此类种子含有可检测量的引入到植物基因组中的多核苷酸构建体。从各个此类转基因植物产生的花粉、种子、子代植物细胞、植物组织和商品产品将含有可检测量的多核苷酸构建体。

[0021] 含有至少可检测量的编码此类BCW 001、BCW 002或BCW 003蛋白的多核苷酸构建体的任何生物样品都将在本发明的范围内。

[0022] 提供杀昆虫有效量的本发明的BCW 001、002或003蛋白的组合物被构想并且提供来防治鳞翅目害虫物种。此类组合物也可含有不同于BCW毒素蛋白的补充剂。此类药剂将如

同BCW毒素蛋白一样也将对相同鳞翅目种具有毒性。补充剂将选自由具有不同于BCW蛋白的氨基酸序列的蛋白质或多肽组成的药剂组,并且也可为赋予对靶标昆虫害虫的毒性效应的RNA分子(诸如dsRNA、miRNA或siRNA)的药剂,并且也可为杀昆虫化合物(诸如除虫菊酯、有机磷酸酯杀害虫剂),等等。或者,补充剂可为任何可相容的Cry或相关毒素蛋白质,诸如另一Cry1A、Cry1Ab、Cry1Ac、Cry1A.105、Cry1Ae(但这些不是优选的,因为这些可能不赋予适当抗性管理性质)、或Cry1B、Cry1C、Cry1D、Cry1E、Cry1F、Cry1G、Cry1H、Cry1I、Cry1J、Cry1K、Cry1L、Cry2A、Cry2Ab、Cry2Ae、Cry4B、Cry6、Cry7、Cry8、Cry9、Cry15、Cry43A、Cry43B、ET35、ET66、TIC400、TIC800、TIC807、TIC834、TIC853、TIC1415、VIP3A、VIP3Ab、Axmi杀昆虫蛋白、DIG杀昆虫蛋白、eHIP和VIP蛋白,以及本领域中已知会赋予对黑切根虫物种幼虫或可适用的其他鳞翅目靶标害虫物种的毒性性质的任何毒素蛋白质。

[0023] 此类组合物也可包括未必对相同靶标害虫具有毒性的额外杀害虫剂,诸如选自由以下组成的组的额外药剂:Cry1C、Cry3A、Cry3B、Cry34、Cry35、Cry51Aa1、ET29、ET33、ET34、ET70、TIC407、TIC417、TIC431、TIC901、TIC1201、TIC3131、5307、DIG-10、Axmi184、Axmi205和AxmiR1。

[0024] 利用本发明的蛋白质的杀害虫性质的用于产生种子的方法也被构思。所述方法包括被设计来表达BCW 001、BCW 002或BCW 003蛋白或展现与所述蛋白的至少约90％同一性的蛋白质的多核苷酸构建体,所述方法包括种植一个或多个含有表达一种或多种本发明的BCW蛋白毒素的多核苷酸的种子,从所述种子生长出植物,以及接着从所述植物收集许多此类种子。所收集种子将含有所述多核苷酸构建体,并且将产生也将对黑切根虫害虫侵扰具有抗性的植物。

[0025] 此类植物可为玉米、棉花、大豆或易感于被证明受本发明的蛋白质防治的鳞翅目害虫物种的任何其他植物。此类植物被构思为先前产生的将受益于本发明的蛋白质的毒性性质的效应的转基因植物。属于该种类的玉米植物包括但不限于选自由以下组成的组的转基因事件:DKB89614-9、MON801、MON802、MON809、MON810、MON863、MON88017、MON89034、事件4114-3、事件5307、DAS59122-7、Bt10、Bt11、Bt176、CBH-351、DKB-83614-9、MIR162、MIR604、TC1507、TC6275、事件676、事件678、事件680、事件98140、DAS40278-9、DKB89790-5、MON21-9、HCEM485、MON832、MON87427、NK603、T14、T25和VCO01981-5。属于该种类的转基因植物的大豆植物选自由以下组成的组:MON87751、DAS81419-2、MON87701、A2704-12、A2704-21、A5547-127、A5547-35、CV127、DAS44406-6、DAS68416-4、DP356043、FG72、MON4032、ACS-GM003-1、MON87705、MON87708、MON89788、W62、W98和GFM Cry1A。属于该种类的棉花转基因植物选自由以下组成的组:DAS24236-5、DAS21023-5、事件31707、事件31803、事件31807、事件31808、事件42317、BNLA-601、COT102、COT67B、事件1、GHB119、GK12、MON15985、MLS9124、MON1076、MON531、MON757、T303-3、T304-40、SGK321、事件19-51a、GHB614、LLCotton25、MON88701、MON88702、MON1445、MON1698和MON88913。属于该种类的甘蔗转基因植物包括甘蔗植物转基因事件NXI-1T。将受益于具有编码此类BCW蛋白毒素的构建体的稻米植物在本领域中是已知的,包括选自由以下组成的组的稻米植物转基因事件:LLRICE06、LLRICE601、LLRICE62、GM-A17054和GM-A17054。

[0026] 此外,提供包含可检测量的所公开重组多核苷酸的经加工植物产品。所述经加工产品包括但不限于:植物生物质、油、粗粉、动物饲料、面粉、薄片、糠、棉绒、壳,和经加工种

子。

[0027] 还提供制备转基因植物的方法。此类方法包括将重组多核苷酸引入植物细胞中，以及选择表达昆虫抑制量的由所述重组多核苷酸编码的重组多肽的转基因植物。

[0028] 本发明的其他实施方案、特征和优势将根据以下具体实施方式、实施例和权利要求而显而易知。

附图说明

[0029] 图1示出在生物测定中用BCW 001、BCW 002和BCW 003毒素蛋白测试的鳞翅目昆虫害虫物种的清单。“+”指示相对于缓冲剂对照具有致死性；“-”指示未观察到超过缓冲剂对照的水平的显著致死性；“ND”指示未使用可适用的毒素蛋白加以测试。BCW 001展现针对小地老虎(黑切根虫)、豆白缘切根虫(西方豆切根虫)、玉米穗虫(玉米耳虫)、玉米螟(欧洲玉米螟)、西南玉米杆草螟(西南玉米螟)、粉纹夜蛾(卷心菜尺蠖)、大豆夜蛾(大豆尺蠖)的致死性，并且在针对草地夜蛾(秋行军虫)测试时不展现致死性或生长阻碍。未用BCW 001测试小蔗杆草螟(蔗螟)。BCW 002展现针对小地老虎(黑切根虫)、豆白缘切根虫(西方豆切根虫)、玉米穗虫(玉米耳虫)和玉米螟(欧洲玉米螟)的致死性，并且在针对草地夜蛾(秋行军虫)测试时不展现致死性或生长阻碍。未用BCW 002测试小蔗杆草螟(蔗螟)、西南玉米杆草螟(西南玉米螟)、粉纹夜蛾(卷心菜尺蠖)和大豆夜蛾(大豆尺蠖)。BCW 003展现针对小地老虎(黑切根虫)、豆白缘切根虫(西方豆切根虫)、玉米穗虫(玉米耳虫)、玉米螟(欧洲玉米螟)、小蔗杆草螟(蔗螟)、西南玉米杆草螟(西南玉米螟)、粉纹夜蛾(卷心菜尺蠖)和大豆夜蛾(大豆尺蠖)的致死性，并且在针对草地夜蛾(秋行军虫)测试时不展现致死性或生长阻碍。

[0030] 图2示出BCW 001(SEQ ID NO:2，顶行)相对于BCW 002(SEQ ID NO:4，中行)相对于BCW 003(SEQ ID NO:6，底行)的氨基酸序列比对；在各三联行以下的星号代表在三个不同序列中的至少一者中在可适用的氨基酸位置处的差异。

[0031] 序列简述

[0032] SEQ ID NO:1是编码BCW 001鳞翅目昆虫毒性蛋白的天然苏云金芽孢杆菌菌株EG4384核苷酸序列。

[0033] SEQ ID NO:2是从如以SEQ ID NO:1阐述的开放阅读框推导的BCW 001氨基酸序列。

[0034] SEQ ID NO:3是编码嵌合BCW 002鳞翅目昆虫毒性蛋白的人工序列。

[0035] SEQ ID NO:4是从如以SEQ ID NO:3阐述的开放阅读框推导的BCW 002氨基酸序列，其中此类BCW 002蛋白由Cry1Ac的结构域I可操作地连接到BCW 001的结构域II和III(如以SEQ ID NO:2阐述的氨基酸位置258至氨基酸位置606)，并且可操作地连接到如以SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:6阐述的从氨基酸位置608至1177的Cry1Ac原毒素结构域所组成。SEQ ID NO:4(BCW 002)仅在位置259处不同于SEQ ID NO:6(BCW 003)，BCW 002在该位置处含有异亮氨酸，BCW 003如同BCW 001中一样含有苏氨酸。

[0036] SEQ ID NO:5是编码嵌合BCW 003鳞翅目昆虫毒性蛋白的人工序列。

[0037] SEQ ID NO:6是从如以SEQ ID NO:3阐述的开放阅读框推导的BCW 003氨基酸序列，其中所述BCW 003蛋白由Cry1Ac的结构域I可操作地连接到BCW 001的结构域II和III

(如以SEQ ID NO:2阐述的氨基酸位置258至氨基酸位置606),并且可操作地连接到如以SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:6阐述的从氨基酸位置608至1177的Cry1Ac原毒素结构域所组成。SEQ ID NO:6(BCW 003)仅在位置259处不同于SEQ ID NO:4(BCW 002),BCW 002在该位置处含有异亮氨酸,BCW 003如同BCW 001中一样含有苏氨酸。

[0038] SEQ ID NO:7是用于在植物中表达的编码BCW 001蛋白的人工序列。

[0039] SEQ ID NO:8是由SEQ ID NO:7获得的BCW 001推导氨基酸序列。

[0040] SEQ ID NO:9是用于在植物中表达的编码BCW 002蛋白的人工序列。

[0041] SEQ ID NO:10是由SEQ ID NO:9获得的BCW 002推导氨基酸序列。

[0042] SEQ ID NO:11是用于在植物中表达的编码BCW 003蛋白的人工序列。

[0043] SEQ ID NO:12是由SEQ ID NO:11获得的BCW 003推导氨基酸序列。

具体实施方式

[0044] 通过将含有杀昆虫蛋白质的制剂喷雾于植物/种子上来防治作物植物的农业害虫的一替代方案是将编码这些蛋白质的多核苷酸插入植物基因组中以达成在植物或植物部分中表达。用这些多核苷酸转化的植物携带昆虫抗性,所述昆虫抗性为这些表达的蛋白质作为转基因性状提供的。

[0045] 为避免发展出针对当前所用蛋白质的昆虫抗性或规避所述昆虫抗性,需要具有不同作用模式(MOA)以及广泛谱系和功效的新型蛋白质来进行鳞翅目昆虫防治。一种用以解决该需要的方式是对Bt基因组测序以希望发现新型杀昆虫蛋白质。另一方法是将来自各种Bt蛋白质的区段互换以创建具有昆虫抑制性质的新型嵌合Bt蛋白质。由重新拣选本领域中已知的众多天然杀昆虫晶体蛋白质的结构域结构来任意创建的嵌合蛋白具有增强性质的可能性是微小的(参见例如AStrategy for Shuffling Numerous Bacillus thuringiensis Crystal Protein Domains;J.Economic Entomology,97(6):1805-1813.2004)。

[0046] 本文公开编码在本文中标识为BCW蛋白的杀昆虫蛋白质的核苷酸序列,所述杀昆虫蛋白质解决对替代性MOA的需要,提供针对更广泛谱系的昆虫害虫的活性,并且起用于延迟或避免抗性发展,特别是用于防治黑切根虫(BCW)害虫的作用。

[0047] 在对苏云金芽孢杆菌菌株EG4384的基因组测序之后,BCW 001作为预测氨基酸序列具有Cry1A型蛋白的特征的开放阅读框而被发现。BCW 001开放阅读框(ORF)编码具有1180个氨基酸的蛋白质,并且所述蛋白质被预测具有Cry1蛋白毒素的许多特征,包括可鉴定结构域I、II和III结构以及在所预测蛋白质的羧基末端半部处的特征性Cry1A型原毒素结构域。所预测结构域I氨基酸序列(SEQ ID NO:2的残基1至约258)展现与Cry1Ac蛋白毒素结构域I的约67%同一性。所预测结构域II氨基酸序列(如以SEQ ID NO:2阐述的从约259至约残基459的残基)展现与Cry1Ai2结构域II的完全(100%)同一性。所预测结构域III氨基酸序列(如以SEQ ID NO:2阐述的从约260至约606的残基)展现与Cry1Ah2中的相应结构域III残基的约63%同一性。BCW 001所预测蛋白的原毒素结构域结构(如以SEQ ID NO:2阐述的约残基607至1180)展现与Cry1Aa9中的相应残基的约96%同一性。总的说来,该所预测全长蛋白质展现与Cry1Ai的约83%氨基酸序列同一性,并且如以SEQ ID NO:2阐述的从氨基酸位置1至约残基607的所预测毒素区域展现与Cry1Ai1的76%同一性。难以将该新型毒素

蛋白质指定为特定Cry1A类别,因此将向苏云金芽孢杆菌命名委员会提供该序列,并且所述委员会将确定该蛋白质是否应得到它自身的单独和新型类别。

[0048] BCW 001蛋白在苏云金芽孢杆菌的无晶体菌株中从质粒载体产生,并且针对多种鳞翅目害虫来测试芽孢晶体制备物。对于数据,参见图1第2列。证据指示该蛋白质不具有它从其得出它的起源的任何蛋白质即本领域中已知的Cry1Aa、Cry1Ah或Cry1Ai毒素蛋白的特征。当针对黑切根虫加以测试时,先前技术蛋白质都不展现任何可观活性,然而,当针对黑切根虫加以测试时,该新型蛋白质BCW 001在生物测定中具有毒性,并且当针对一连串其他鳞翅目害虫加以测试时以及在图1中所阐述,惊人地展现毒性性质。

[0049] 具体地,在生物测定中,相较于未处理昆虫膳食对照,BCW 001蛋白展现针对西方豆切根虫(“WBC”,豆白缘切根虫)、玉米耳虫(“CEW”,玉米穗虫)、欧洲玉米螟(“ECB”,玉米螟)、西南玉米螟(“SWC”,西南玉米杆草螟)、大豆尺蠖(“SL”,大豆夜蛾)、卷心菜尺蠖(“CLW”,粉纹夜蛾)以及第1龄期和第3龄期黑切根虫(“BCW”,小地老虎)的活性。

[0050] 如以下进一步所述,使用Cry1Ac的结构域I和BCW 001的结构域II和III产生嵌合毒素蛋白质(即分别如以SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:6阐述的BCW 002和BCW 003),并且将这些嵌合毒素蛋白质引入玉米和甘蔗植物中。两种嵌合蛋白均在玉米中展现针对BCW、WBC、CEW和SWC的活性。BCW 003在甘蔗中展现针对SCB的活性。

[0051] 如本文所用的短语“BCW蛋白”是指赋予针对特别是但不限于BCW、WBC和/或SCB的鳞翅目昆虫的活性的包含BCW 001(SEQ ID NO:2)、BCW 002(SEQ ID NO:4)和BCW 003(SEQ ID NO:6),由BCW 001(SEQ ID NO:2)、BCW 002(SEQ ID NO:4)和BCW 003(SEQ ID NO:6)组成,与BCW 001(SEQ ID NO:2)、BCW 002(SEQ ID NO:4)和BCW 003(SEQ ID NO:6)大致上同源,或源于BCW 001(SEQ ID NO:2)、BCW 002(SEQ ID NO:4)和BCW 003(SEQ ID NO:6)的任何昆虫抑制性多肽序列的任何新型昆虫抑制性蛋白质,及其昆虫抑制性区段或其组合。编码BCW 001的多核苷酸源于菌株EG4384。BCW 001的核心毒性氨基酸序列对应于如以SEQ ID NO:2阐述的从约位置28至约位置606以及直至位置618的氨基酸,并且BCW 002和003的核心毒性氨基酸序列分别对应于如以SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:6阐述的从约位置29至约位置607以及直至约位置619的氨基酸。

[0052] 在一个实施方案中,本文公开的蛋白质由于主要δ-内毒素结构、长度(约1176-1180个氨基酸)、蛋白质的不具有原毒素的长度(从约600至约619个氨基酸)、毒性核心的长度(约591个氨基酸)、或存在至少一个BCW特异性区段而相关。

[0053] 利用以下这些缺省参数,使用Clustal W算法将示例性蛋白质加以彼此比对,从而产生各对的成对氨基酸数目同一性和成对氨基酸同一性百分比:权重矩阵:blosum;空位开放罚分:10.0;空位延伸罚分:0.05;亲水性空位:开启;亲水性残基:GPSNDQERK;残基特异性空位罚分:开启。Clustal W算法描述于Thompson,J.D.,Higgins,D.G.和Gibson,T.J.(1994)"CLUSTAL W:improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting,positions-specific gap penalties and weight matrix choice."Nucleic Acids Research,22:4673-4680中。

[0054] 其他比对算法在本领域中也是可用的,并且提供与使用Clustal W比对获得的结果类似的结果。

[0055] 术语“约”在本文中用于描述这些区段边界可变化1、2、3、4、5、10、20、25、30或35个

残基,此取决于亲本蛋白质的序列和它们的彼此比对。为进一步描述各种区段的可变性和构型,表2和表3对BCW 002和003以及其他对黑切根虫具有活性的嵌合体的区段边界进行列表。

[0056] 术语“片段”在本文中用于描述相比于描述BCW毒性蛋白的完整氨基酸或核酸序列,较短的连续氨基酸或核酸序列。

[0057] 短语“昆虫抑制性”和“杀昆虫性”在本文中可互换使用,并且是指蛋白质、蛋白质片段、蛋白质区段或多核苷酸产生对昆虫活力、生长、昆虫发育、昆虫繁殖、昆虫摄食行为、昆虫交配行为的任何可测量抑制作用和/或导致由摄食该蛋白质、蛋白质片段、蛋白质区段或多核苷酸的昆虫引起的不利作用的任何可测量降低。

[0058] 术语“生物活性”、“活性的”、“活性”、“有效的”、“有效力的”或其变化形式在本文中可互换用于描述本发明的蛋白质对靶标昆虫害虫的作用。

[0059] 作物是在它的生长阶段的某一点收集其产物的自生植物或栽培植物。所述产物的非限制性实例是种子、圆荚、叶、花、茎、根或其任何部分。

[0060] 从包含如本文例示的多核苷酸或表达如本文例示的蛋白质的任何植物组织、细菌、病毒或载体获得生物样品,诸如但不限于种子、圆荚、叶、花、茎、根或其任何部分,并且含有可检测量的所述多核苷酸、蛋白质或两者。

[0061] 短语“可检测量”在本文中用于描述本文公开的蛋白质或多核苷酸的可通过标准分析方法来检测的最小量,所述分析方法诸如但不限于聚合酶链式反应(PCR)和酶联免疫吸附测定(ELISA)技术等。

[0062] 在一个实施方案中,本文所述的毒素蛋白质由于共同功能而相关,并且展现对于鳞翅目昆虫物种的杀昆虫活性。

[0063] BCW 001区段对含有所述区段的Cry1嵌合体给予黑切根虫活性。给予黑切根虫活性的BCW 001区段的实例以SEQ ID NO:2阐述,从约氨基酸位置250至约606,并且更特别是从约氨基酸位置255至约606。含有对应于BCW 001毒素蛋白的结构域II和III的该氨基酸区段的Cry1嵌合体将经常也对嵌合蛋白赋予与防治黑切根虫相关的毒性性质,并且这已在Cry1A、Cry1B、Cry1C、Cry1D、Cry1E和Cry1F骨架内加以测试,其中可适用的毒素构建体已使它的结构域II和III组分被来自BCW 001的该氨基酸范围取代,并且在许多情况下,黑切根虫活性在嵌合构建体中得以惊人地维持(数据未显示)。

[0064] 在本发明的一方面,具体来说,由可适用的BCW毒素蛋白防治的害虫是来自鳞翅目的昆虫害虫,包括成虫、蛹、幼虫和新生体。

[0065] 鳞翅目的昆虫包括但不限于夜蛾科(Noctuidae)中的行军虫、切根虫、尺蠖和棉铃虫(例如秋行军虫(草地夜蛾)、甜菜行军虫(甜菜夜蛾)、披肩行军虫(蓓带夜蛾(Mamestra configurata))、黑切根虫(小地老虎)、卷心菜尺蠖(粉纹夜蛾)、大豆尺蠖(大豆夜蛾(Pseudoplusia includens))、黎豆毛虫(黎豆夜蛾)、绿三叶草虫(苜蓿绿夜蛾(Hypena scabra))、烟草蚜虫(烟芽夜蛾)、颗粒切根虫(粒肤地老虎(Agrotis subterranea))、西方切根虫(西方灰地老虎(Agrotis orthogonia))、行军虫(一星粘虫(Pseudaletia unipuncta)));来自螟蛾科(Pyralidae)的螟虫、鞘蛾幼虫、结网虫、锥虫、卷心菜虫和雕叶虫(例如欧洲玉米螟(玉米螟)、脐橙虫(脐橙螟(Amyelois transitella))、玉米根结网虫(玉米根草螟(Crambus caliginosellus))、草地结网虫(稻切叶野螟(Herpetogramma

licarsisalis))、向日葵蛾(向日葵螟(Homoeosoma electellum))、小玉米杆螟(南美玉米苗斑螟(Elasmopalpus lignosellus)));卷蛾科(Tortricidae)中的卷叶虫、蛀虫、种子蠕虫和果实蠕虫(例如苹果蠹蛾(苹果蠹蛾(Cydia pomonella))、葡萄浆果蛾(葡萄小食心虫(Endopiza viteana))、东方果蛾(梨小食心虫(Grapholita molesta))、向日葵芽蛾(向日葵芽卷叶蛾(Suleima helianthana)));以及许多其他在经济上重要的鳞翅目昆虫(例如菱纹背蛾(小菜蛾)、粉螟蛉虫(棉红铃虫)、吉卜赛蛾(舞毒蛾(Lymantria dispar)))。鳞翅目的其他昆虫害虫包括例如棉叶波纹夜蛾(Alabama argillacea)(棉叶蠕虫)、果树黄卷蛾(Archips argyrospila)(果树卷叶虫)、玫瑰黄卷蛾(A.rosana)(欧洲卷叶虫)和其他黄卷蛾属种、二化螟(Chilo suppressalis)(亚洲稻螟或稻茎螟)、稻纵卷叶螟(Cnaphalocrocis medinalis)(稻卷叶虫)、玉米根草螟(玉米根结网虫)、早熟禾草螟(C.teterrellus)(早熟禾结网虫)、西南玉米杆草螟(西南玉米螟)、小蔗杆草螟(D.saccharalis)(甘蔗螟)、埃及钻夜蛾(Earias insulana)(多刺螟蛉虫)、翠纹钻夜蛾(E.vittella)(斑点螟蛉虫)、棉铃虫(美洲螟蛉虫)、玉米穗虫(H.zea)(玉米耳虫或棉花螟蛉虫)、烟芽夜蛾(烟草蚜虫)、稻切叶野螟(草地结网虫)、葡萄花翅小卷蛾(Lobesia botrana)(欧洲葡萄藤蛾)、棉红铃虫(粉螟蛉虫)、柑桔潜叶蛾(Phyllocnistis citrella)(柑桔潜叶虫)、欧洲粉蝶(Pieris brassicae)(大白蝴蝶)、菜粉蝶(P.rapae)(外来卷心菜虫或小白蝴蝶)、小菜蛾(菱纹背蛾)、甜菜夜蛾(甜菜行军虫)、斜纹夜蛾(S.litura)(烟草切根虫、群集毛虫)、草地夜蛾(S.frugiperda)(秋行军虫)和番茄斑潜蝇(Tuta absoluta)(番茄潜叶虫)。

[0066] 本文公开的蛋白质也可用于产生特异性结合BCW特异性毒素蛋白的抗体,并且可用于筛选和发现BCW毒素种类的其他成员。

[0067] 在一个实施方案中,编码昆虫抑制性BCW 001相关蛋白的示例性多核苷酸以SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:11阐述。编码这些蛋白质的核苷酸序列可作为筛选探针和引物用于使用热扩增或等温扩增和/或杂交方法以及为本领域普通技术人员所知的其他鉴定方法来鉴定所述种类的其他成员。

[0068] 本发明的一方面提供用于发现相关蛋白质的方法,并且所述方法包括对Bt基因组测序,汇编序列数据,鉴定和克隆编码所述杀害虫蛋白质的Bt基因,以及表达和测试新型Bt蛋白质以测定杀害虫活性。本发明的另一方面采用分子方法来工程改造和克隆商业适用蛋白质,其包括来自杀害虫蛋白质种类的蛋白质的嵌合体,例如嵌合体可由BCW毒性蛋白的区段装配以获得额外实施方案。可使所公开蛋白质经受彼此比对以及与其他Bt杀害虫蛋白质的比对,并且可鉴定各所述蛋白质的适用于在所比对蛋白质之间进行取代,从而导致构建嵌合蛋白的区段。可使所述嵌合蛋白经受害虫生物测定分析,并且对相较于嵌合体中各所述区段所源于的亲本蛋白质,生物活性增加和/或靶标害虫谱扩大的存在性进行表征。可通过与其他蛋白质调换结构域或区段来进一步工程改造多肽的杀害虫活性以获得对特定害虫或对更广泛谱系的害虫的活性。

[0069] 在一个实施方案中,本文公开的蛋白质包括本文公开的蛋白质的功能等效片段(N末端或C末端缺失)。

[0070] 本文提供BCW毒性蛋白。在某些实施方案中,BCW 001相关毒素蛋白可被分离,可被提供在组合物、转基因微生物或转基因植物中。在该实施方案中,BCW 002蛋白以及特别是BCW 003蛋白赋予鳞翅目昆虫抑制活性,特别是针对黑切根虫和/或蔗螟的抑制活性。在本

申请中提及“经分离蛋白质”或等效术语或短语意指所述蛋白质是单独或与其他组成成分组合存在,但不在它的天然环境内的蛋白质。举例来说,只要本发明的毒素蛋白质在这些毒素蛋白质所天然见于其中的生物体内,那么天然见于所述生物体内的本发明的毒素蛋白质等不被视为是“经分离的”。然而,只要蛋白质不在它所天然见于其中的生物体内,那么在本公开的范围内,这些毒素蛋白质各自将是“经分离的”。

[0071] 如本文所用的“可操作地连接”是指使核酸序列或氨基酸序列接合以使一个序列可对连接的序列提供所需功能或可相容或适用特征。

[0072] 与BCW 001、BCW 002和BCW 003具有生物功能等效性的肽、多肽和蛋白质包括但不限于含有这些BCW毒素蛋白序列中的保守性氨基酸取代的氨基酸序列。在所述氨基酸序列中,序列中的一个或多个氨基酸被另外氨基酸取代,从而导致沉默或保守性氨基酸序列变化。

[0073] 尽管所公开的昆虫抑制性多肽优选包含BCW 001、BCW 002或BCW 003蛋白质序列,但本文也公开该序列的具有与该昆虫抑制性蛋白质的昆虫抑制活性相同或类似的昆虫抑制活性的片段和变体。举例来说,具有至少30、35、38、40、45、50、55、60、65、70、75、100、150、200、500、550个或更多个处于BCW相关毒素蛋白中的氨基酸的连续序列具有昆虫抑制活性。在另一实施方案中,BCW相关毒素蛋白的具有昆虫抑制活性的片段可包含BCW毒素蛋白序列中的氨基酸取代、缺失、插入或添加。

[0074] 在一个实施方案中,昆虫抑制性多肽包含如以SEQ ID NO:2阐述的BCW 001蛋白质序列的从约残基28至约残基618的昆虫抑制性区段。非限制性实例包括以下中的任一者:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6或独自或可操作连接于嵌合蛋白中的具有与该特定BCW 001蛋白的昆虫抑制活性相同或类似的昆虫抑制活性的较短片段或变体。在另一实施方案中,具有含至少约38个或更多个处于SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6中的任一者中的氨基酸的连续氨基酸序列的区段也提供功能性杀昆虫蛋白质。昆虫抑制性BCW 001毒性片段也可包含具有含591个氨基酸的区域的至少30、35、38、40、45、50、100、150、200、500、550、555、560、565、570、572、574、580或585个氨基酸残基的区段,所述区域对应于具有SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6中的任一者的序列的约残基28至约618。

[0075] 在一些实施方案中,成熟BCW 001蛋白(成熟意指是1180个氨基酸的原毒素形式的蛋白质在昆虫害虫消化道中通过蛋白水解而被裂解以释放就在残基607至约残基618的N末端的核心毒素,从而释放或多或少地包含如以SEQ ID NO:2阐述的残基1至残基606或从约5至约618的任何数目的残基的活性毒素区段,只要所释放区段展现对黑切根虫幼虫的毒性性质即可)的片段可为具有昆虫抑制活性的截短形式,其中一个或多个氨基酸从蛋白质的N末端、C末端、中间或其组合缺失。这些片段可为BCW 001的天然存在或合成变体,并且保留BCW毒素蛋白的昆虫抑制活性。在某些实施方案中,成熟BCW 001、BCW 002或BCW 003蛋白的片段展现由它们所源于的起始蛋白质分子具有的杀害虫活性。本文所述的片段或变体可进一步包含本文鉴定的导致蛋白质的杀害虫活性的结构域。具有昆虫抑制活性的截短衍生物是对应于如以SEQ ID NO:2阐述的BCW 001毒素蛋白质序列的从约28至约606或至约618的残基,或对应于如以SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6阐述的BCW毒素蛋白的从约29至约607以及至残基619的残基的BCW毒素蛋白。

[0076] 在另一实施方案中,截短N末端缺失突变形式包括但不限于缺乏来自BCW毒素蛋白的不具有原毒素的毒素部分或毒性核心的N末端和/或C末端的氨基酸残基的BCW 001毒性蛋白。举例来说,可使BCW 001蛋白的对应于SEQ ID NO:2的残基28至618或对应于SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6的残基29至619的毒性核心的1至6个N末端氨基酸残基缺失。对应于SEQ ID NO:2的残基28至618或SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6的残基29至619的BCW毒素蛋白的截短C末端缺失突变形式包括但不限于缺乏1至6个C末端氨基酸残基的BCW毒素蛋白。在其他实施方案中,具有SEQ ID NO:2的相应残基28至618或SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6的相应残基29至619的BCW毒素蛋白可具有N末端1至6个氨基末端残基截短与C末端1至6个羧基末端残基截短两者。

[0077] 在一些实施方案中,CPR24719蛋白的对不同于CPR24719-1的蛋白质给予黑切根虫活性的个别区段1至6或区段1至6的组合也可展现相同或类似功能。

[0078] 相对于成熟BCW毒素蛋白的具有以SEQ ID NO:2的残基28至618显示或对应于SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6的残基29至619的相应氨基酸序列的相应区段,本文公开的BCW毒素蛋白的片段和变体可具有约62%或更大序列同一性、约65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%或更大序列同一性、以及约99%、99.5%、100%氨基酸序列同一性。

[0079] 本发明的一实施方案包括编码BCW毒素蛋白的重组多核苷酸组合物。举例来说,BCW毒素蛋白可用重组DNA构建体表达,其中具有编码蛋白质的开放阅读框的经分离多核苷酸分子可操作地连接到各种元件,诸如启动子和对于在构建体所意图用于的系统中的表达具有功能性的任何其他调控元件。在本申请中提及“经分离DNA分子”或等效术语或短语意指所述DNA分子是单独或与其他组成成分组合存在,但不在它的天然环境内的DNA分子。举例来说,只要元件在生物体的基因组内以及在它所天然见于其中的基因组内的位置处,那么天然见于所述生物体的基因组的DNA内的核酸元件诸如编码序列、内含子序列、未翻译前导序列、启动子序列、转录终止序列等不被视为是“经分离的”。然而,只要元件不在生物体的基因组内以及不在它所天然见于其中的基因组内的位置处,那么在本公开的范围内,这些元件各自以及这些元件的子部分将是“经分离的”。类似地,编码杀昆虫蛋白质或那个蛋白质的任何天然存在的杀昆虫变体的核苷酸序列将是经分离核苷酸序列,只要所述核苷酸序列不在编码所述蛋白质的所述序列所天然见于的细菌的DNA内即可。出于本公开的目的,编码天然存在的杀昆虫蛋白质的氨基酸序列的合成核苷酸序列将被视为是经分离的。出于本公开的目的,任何转基因核苷酸序列,即插入植物或细菌的细胞的基因组中或存在于染色体外载体中的DNA的核苷酸序列,将被视为是经分离核苷酸序列,无论它存在于用于转化细胞的质粒或类似结构内,植物或细菌的基因组内,抑或以可检测量存在于源于植物或细菌的组织、子代、生物样品或商品产品中。非限制性实例包括植物功能性启动子可操作地连接到BCW毒素蛋白编码序列以在植物中表达蛋白质,或Bt功能性启动子可操作地连接到BCW毒素蛋白编码序列以在Bt中表达蛋白质。可被可操作地连接到BCW毒素蛋白编码序列的其他元件包括但不限于增强子、内含子、前导物、所编码蛋白质固定标签(HIS标签)、所编码亚细胞易位肽(例如质体转运肽、信号肽)、翻译后修饰酶的所编码多肽位点、核糖体结合位点和RNAi靶标位点。

[0080] 如本文所用,“重组DNA分子”是包含在无人为干预下将不一起天然存在的DNA分子

的组合的DNA分子。举例来说,重组DNA分子可为包含至少两个相对于彼此是异源性的DNA分子的DNA分子、包含与在自然界中存在的DNA序列不同的DNA序列的DNA分子、或已通过遗传转化或基因编辑来并入宿主细胞的DNA中的DNA分子。类似地,“重组蛋白质分子”是包含在无人为干预下将不一起天然存在的氨基酸的组合的蛋白质分子。举例来说,重组蛋白质分子可为包含至少两个相对于彼此是异源性的氨基酸分子的蛋白质分子、包含与在自然界中存在的氨基酸序列不同的氨基酸序列的蛋白质分子、或由于对宿主细胞进行遗传转化或通过对宿主细胞基因组进行基因编辑而在宿主细胞中表达的蛋白质分子。

[0081] 与此一起提供的示例性重组多核苷酸分子包括但不限于SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:11,以及以SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:5阐述的核苷酸区段,和编码具有如以SEQ ID NO:2(BCW 001)、SEQ ID NO:4(BCW 002)、SEQ ID NO:6(BCW 003)以及SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:12阐述的氨基酸序列的相应多肽或蛋白质的核苷酸区段中的各者。编码本文公开的蛋白质的重组多核苷酸分子的密码子可被同义密码子取代(也被称为沉默取代)。也提供编码任何本文公开的BCW毒素变异蛋白的重组多核苷酸。

[0082] 包含BCW毒素蛋白编码序列的重组DNA构建体也可进一步包含编码一种或多种昆虫抑制剂的DNA区域,其可被配置来与编码BCW毒素蛋白、不同于BCW毒素蛋白的蛋白质、昆虫抑制性dsRNA分子或杀昆虫化合物的DNA序列并行表达或共表达。杀昆虫化合物的非限制性实例是有机氯化物、有机磷酸酯和氨基甲酸酯、拟除虫菊酯(pyrethroid)、新烟碱类(neonicotinoid)和莱恩碱类(ryanoid)。

[0083] 可装配重组DNA构建体以使所有蛋白质或dsRNA分子都由一个启动子表达,或各蛋白质或dsRNA分子处于单独启动子控制下,或处于其某一组合的情况下。本文公开的蛋白质可由多基因表达系统表达,其中一种或多种本文公开的蛋白质由共同核苷酸区段表达,在所述区段上视所选表达系统的类型而定也含有其他开放阅读框和/或启动子。举例来说,细菌多基因表达系统可利用单一启动子来驱动来自单一操纵元内的多重连接/串联开放阅读框的表达。在另一实例中,植物多基因表达系统可利用多重连接表达盒,各自表达不同蛋白质或其他药剂诸如一种或多种dsRNA分子。在另一实例中,植物多基因表达系统可利用未多重连接表达盒,各自表达不同蛋白质或其他药剂诸如一种或多种dsRNA分子。用于本文所述的重组核酸中的启动子可包含完整启动子序列或其具有启动子活性或基因调控活性的任何变体或片段。

[0084] 包含BCW毒素蛋白编码序列的重组多核苷酸或重组DNA构建体可通过载体例如质粒、杆状病毒、人工染色体、病毒粒子、粘粒、噬菌粒、噬菌体或病毒载体来递送至宿主细胞中。所述载体可用于实现在宿主细胞中稳定或短暂表达BCW毒素蛋白编码序列,或随后表达成多肽。包含BCW毒素蛋白编码序列,并且引入宿主细胞中的外源性重组多核苷酸或重组DNA构建体在本文中被称为“转基因”。

[0085] 本文也提供含有表达任何一种或多种本文提供的BCW毒素蛋白编码序列的任何重组多核苷酸的转基因细菌、转基因植物细胞、转基因植物、真菌和酵母以及转基因植物部分。术语“细菌细胞”或“细菌”可包括但不限于土壤杆菌属(Agrobacterium)、芽孢杆菌属(Bacillus)、埃希氏菌属(Escherichia)、沙门氏菌属(Salmonella)、假单胞菌属(Pseudomonas)或根瘤菌属(Rhizobium)细胞。术语“植物细胞”或“植物”可包括但不限于苜蓿、香蕉、大麦、菜豆、西兰花、卷心菜、芸苔、胡萝卜、木薯、蓖麻、花椰菜、芹菜、鹰嘴豆、大白

菜、柑桔、椰子、咖啡、玉米、三叶草、棉花、葫芦、黄瓜、花旗松、茄子、桉树、亚麻、大蒜、葡萄、蛇麻子、韭菜、莴苣、火炬松、粟、甜瓜、坚果、燕麦、橄榄、洋葱、观赏植物、棕榈、牧场草、豌豆、花生、胡椒、木豆、松树、马铃薯、白杨、南瓜、辐射松、萝卜、油菜籽、稻米、砧木、黑麦、红花、灌木、高粱、南方松、大豆、菠菜、南瓜小果、草莓、糖用甜菜、甘蔗、向日葵、甜玉米、枫香、甜薯、柳枝黍、茶、烟草、番茄、黑小麦、草皮草、西瓜和小麦植物细胞或植物。在某些实施方案中,提供由转基因植物细胞再生的转基因植物和转基因植物部分。在某些实施方案中,转基因植物可通过繁殖、切割、折断、研磨或另外解离来自植物的部分来从转基因种子获得。在某些实施方案中,植物部分可为种子、圆荚、叶、花、茎、根或其任何部分或转基因植物部分的非可再生部分。如在该情形下所用,转基因植物部分的“非可再生”部分是不能被诱导以形成完整植物,或不能被诱导以形成能够有性和/或无性繁殖的完整植物的部分。在某些实施方案中,植物部分的非可再生部分是转基因种子、圆荚、叶、花、茎或根的部分。

[0086] 本文还提供制备包含昆虫或鳞翅目昆虫抑制量的BCW毒素蛋白的转基因植物的方法。所述植物可通过以下方式来制备:将编码任何本文提供的BCW毒素蛋白的重组多核苷酸引入植物细胞中,以及选择源于所述植物细胞的表达昆虫或鳞翅目昆虫抑制量的BCW毒素蛋白的植物。植物可通过再生、播种、授粉或分生组织转化技术来由植物细胞获得。

[0087] 用于对植物进行转化的方法在本领域中是已知的。举例来说,土壤杆菌介导的转化描述于美国专利申请公布2009/0138985A1(大豆)、2008/0280361A1(大豆)、2009/0142837A1(玉米)、2008/0282432(棉花)、2008/0256667(棉花)、2003/0110531(小麦)、2001/0042257A1(糖用甜菜)、美国专利5,750,871(加拿大油菜)、7,026,528(小麦)和6,365,807(稻米)中以及Arencibia等(1998)Transgenic Res.7:213-222(甘蔗)中。

[0088] 本文还提供表达昆虫或鳞翅目昆虫抑制量的BCW毒素蛋白的转基因植物用以防治昆虫或鳞翅目昆虫侵扰的用途。任何以上提及的转基因植物都可用于本文提供的用于保护植物免遭昆虫或鳞翅目昆虫侵扰的方法中。获得表达对鳞翅目昆虫具有活性的蛋白质诸如Cry1A蛋白(美国专利号5,880,275)、Cry1B(美国专利申请号10/525318)、Cry1C(美国专利号6,033,874)、Cry1F、Cry1A/F嵌合体(美国专利号7,070,982;6,962,705和6,713,063)和Cry2Ab蛋白(美国专利号7,064,249)的转基因植物的方法是充分表征的。

[0089] 本文还提供任何以上提及的转基因宿主细胞用以产生BCW毒素蛋白的用途。

[0090] 本发明的额外方面包括用于检测编码BCW毒素蛋白或其特性片段和区段的多核苷酸的抗体和方法、用于鉴定所述蛋白质种类的额外昆虫抑制性成员的方法、用于防治昆虫生长和/或侵扰的制剂和方法、以及用于对植物和其他接受宿主提供所述防治的方法。

[0091] 在某些实施方案中,植物产品可包括源于转基因植物或转基因植物部分的商品或其他贸易产品,其中商品或其他产品可通过检测编码或包含BCW毒素蛋白的特性部分的核苷酸区段或所表达RNA或蛋白质来在贸易全程加以追踪。所述商品或其他贸易产品包括但不限于植物部分、生物质、油、粗粉、糖、动物饲料、面粉、薄片、糠、棉绒、经加工种子和种子。

[0092] 还与此一起提供的是经加工植物产品,其中所述经加工产品包含可检测量的编码BCW毒素蛋白、其区段、其昆虫抑制性片段或其任何特性部分的重组多核苷酸。在某些实施方案中,经加工产品选自由以下组成的组:植物生物质、油、粗粉、动物饲料、面粉、薄片、糠、棉绒、壳和经加工种子。在某些实施方案中,经加工产品是非可再生的。

[0093] 本文还提供防治昆虫的方法。在某些实施方案中,防治作物植物的鳞翅目昆虫侵

扰。所述方法可包括使包含昆虫或鳞翅目昆虫抑制量的BCW毒素蛋白的植物生长。在某些实施方案中,所述方法可进一步包括以下中的任何一者或多者:(i)将包含或编码BCW毒素蛋白的任何组合物施加于植物或产生植物的种子;和/或(ii)用编码BCW毒素蛋白的多核苷酸转化植物或产生植物的植物细胞。在某些实施方案中,植物是经短暂或稳定转化的转基因植物,其包含表达昆虫或鳞翅目昆虫抑制量的BCW毒素蛋白的转基因。在某些实施方案中,植物是已向其施加包含BCW毒素蛋白的组合物的非转基因植物。在所述方法的某些实施方案中,植物是玉米或甘蔗植物。在某些实施方案中,鳞翅目种是小地老虎。在某些实施方案中,鳞翅目种是小蔗杆草螟。在某些实施方案中,鳞翅目种在作物田地中。

[0094] 在植物中或通过某一方法使本文公开的蛋白质富集可包括在表达/产生重组多肽/蛋白质的条件下培养重组Bt细胞。这种方法可包括通过干燥、冻干、均质化、提取、过滤、离心、沉降或浓缩表达/产生所述重组多肽的重组Bt细胞的培养物进行制备。这种方法可产生Bt细胞提取物、细胞混悬液、细胞匀浆、细胞溶解产物、细胞上清液、细胞滤液或细胞集结块。通过获得如此产生的重组多肽/蛋白质,包括重组多肽/蛋白质的组合物可包括细菌细胞、细菌芽孢和伴胞包涵体,并且可被配制以用于各种用途,包括作为农业昆虫抑制性喷雾产品或作为膳食生物测定中的昆虫抑制性制剂。

[0095] 在一个实施方案中,包含所公开重组多肽/蛋白质的昆虫抑制性组合物/制剂可进一步包含至少一种展现针对相同鳞翅目昆虫物种的昆虫抑制活性,但不同于重组多肽的额外多肽,以提供鳞翅目昆虫对BCW毒素蛋白或其他鳞翅目昆虫抑制性组合物的抗性的发生降低。所述多肽选自由以下组成的组:昆虫抑制性蛋白质、昆虫抑制性dsRNA分子和化合物。使用所述核糖核苷酸序列来防治昆虫害虫的一个实例描述于美国专利申请公布号2006/0021087中。其他所述组合物的实例包括但不限于Cry1A(美国专利号5,880,275)、Cry1Ab、Cry1Ac、Cry1Ae、Cry1B(美国专利申请号10/525,318)、Cry1C(美国专利号6,033,874)、Cry1E、Cry1F以及Cry1A/F嵌合体(美国专利号7,070,982;6,962,705;和6,713,063)、Cry1G、Cry1H、Cry1I、Cry1J、Cry1K、Cry1L、Cry2A、Cry2Ab(美国专利号7,064,249)、Cry2Ae、Cry4B、Cry6、Cry7、Cry8、Cry9、Cry15、Cry43A、Cry43B、ET35、ET66、TIC400、TIC800、TIC807、TIC834、TIC853和TIC1415。其他非限制性实例是可与本文公开的蛋白质组合的对鳞翅目昆虫具有活性的蛋白质VIP、Axmi和DIG,诸如但不限于Vip3A,VIP3Ab,AXMI-184,AXMI-196,DIG-3,DIG-4,DIG-5和DIG-11。

[0096] 在其他实施方案中,所述组合物可进一步包含至少一种展现对不由另外昆虫抑制性BCW毒素蛋白抑制的昆虫的昆虫抑制活性的额外多肽以使所得昆虫抑制谱扩大。举例来说,对于防治鞘翅目(Coleopteran)害虫,昆虫抑制性BCW毒素蛋白的组合可与诸如但不限于以下的对鞘翅目昆虫具有活性的蛋白质一起使用:Cry1C变体、Cry3A变体、Cry3Bb(美国专利号6,501,009)、Cry34/35、5307、Axmi184、Axmi205、AxmiR1、TIC407、TIC417、TIC431、TIC901、TIC1201、TIC3131、DIG-10和eHIP(美国专利申请公布号2010/0017914)。

[0097] 在本领域中已用文件记载昆虫发展出对某些杀昆虫剂的抗性的可能性。一种昆虫抗性管理策略在于采用表达两种通过不同作用模式来起作用的不同昆虫抑制剂的转基因作物。因此,对任一昆虫抑制剂具有抗性的任何昆虫都可由另一昆虫抑制剂防治。另一昆虫抗性管理策略采用对未针对鳞翅目害虫物种加以保护的植物的使用以产生庇护。一个特定实例描述于美国专利号6,551,962中。

[0098] 本文公开的其他实施方案包括被设计用于防治也由本文公开的蛋白质防治的害虫的待与蛋白质一起用于种子处理的经表面施加的杀害虫化合物,喷洒制剂、滴注制剂或擦拭制剂可直接施加于土壤(土壤浸润),施加于表达本文公开的蛋白质的生长植物,或被配制以施加于含有一种或多种编码一种或多种所公开蛋白质的转基因的种子。用于种子处理的所述制剂可与本领域中已知的各种粘着剂和增粘剂一起施加。所述制剂可含有在MOA方面与所公开蛋白质协同的杀害虫剂,以使配制杀害虫剂通过不同MOA来起防治可由所公开蛋白质防治的相同或类似害虫的作用,或所述杀害虫剂起防治在更广泛宿主范围内的害虫诸如鳞翅目种或半翅目(Hemipteran)种或不被有效防治的其他植物害虫物种诸如鞘翅目种的作用。

[0099] 以上提及的组合物/制剂可进一步包含农业上可接受的载体,所述组合物/制剂诸如诱饵、粉剂、粉尘剂、丸粒、颗粒剂、喷雾剂、乳液、胶体混悬液、水溶液、芽孢杆菌芽孢/晶体制剂、种子处理剂、被转化以表达一种或多种蛋白质的重组植物细胞/植物组织/种子/植物、或被转化以表达一种或多种蛋白质的细菌。视重组多肽固有的昆虫抑制或杀昆虫抑制水平和待施加于植物或应用于膳食测定的制剂的水平的而定,以重量计,组合物/制剂可包括各种量的重组多肽,例如以重量计,0.0001%至0.001%至0.01%至1%至99%的重组多肽。

[0100] 本文公开的蛋白质可组合在用于向植物表面、向土壤进行表面施加的制剂、用于种子处理的制剂、以及具有对鳞翅目种的靶标害虫具有毒性的其他药剂的制剂中。所述药剂包括但不限于:Cry1A蛋白、Cry1B、Cry1C、Cry1F、Cry1A/F嵌合体和Cry2Ab蛋白。

[0101] 实施例

[0102] 以下所公开实施方案仅代表可以各种形式体现的本发明。因此,本文公开的特定结构和功能细节不应解释为具有限制性。应了解本文引用的各参考文献的整个公开内容以引用的方式并入本文。

[0103] 实施例1

[0104] 该实施例教导对毒素蛋白质BCW 001的探索和分析以及对嵌合毒素BCW 002和BCW 003的构建。

[0105] 通过使用芽孢晶体制备物,在膳食生物测定中,Bt菌株EG4384被鉴定为赋予鳞翅目昆虫活性。产生该菌株的基因组的序列,加工原始序列读段,由经加工的读段装配重叠群,鉴定显示与Cry1蛋白的同源性的开放阅读框,并且分析推导的氨基酸序列。鉴定出了如以SEQ ID NO:1阐述的特定开放阅读框,其编码相较于本领域中已知的大多数Cry1蛋白,展现新型氨基酸序列的蛋白质的推导氨基酸序列(BCW 001,SEQ ID NO:2)。从开放阅读框推导的蛋白质因为其长度为1180个氨基酸而具有的新型Cry1型蛋白的全部特征,并且与已知Cry1蛋白的比对指示该蛋白质具有在约600-630个氨基末端氨基酸内的特征性三结构域结构,以及Cry1A型特征性原毒素氨基酸序列结构。编码该预测氨基酸序列的多核苷酸序列含有也具有Cry1特征性的开放阅读框,即在编码毒素的预测结构域I的C末端区域的DNA区段内具有NheI限制位点,并且在编码预测原毒素结构域的N末端部分的DNA区段内具有KpnI限制位点。

[0106] BCW 001毒素与Cry1Ac进行氨基酸序列比较揭示对应于结构域I的氨基酸区段(从约位置1直至约位置258的氨基酸)展现与Cry1Ac内的那个相同区段的仅约67%同一性,对

应于结构域II的氨基酸区段(从约位置58直至约位置460的氨基酸)展现与Cry1Ac内的那个相同区段的极低同一性百分比,并且对应于结构域III的氨基酸区段(从约位置460直至约位置607的氨基酸)展现与来自Cry1Ah2的结构域III区段的约63%同一性。

[0107] 将从NheI限制位点直至KpnI限制位点的编码大致上预测结构域II和III的DNA区段切除,并且取代含有编码Cry1Ac的DNA区段的表达载体中Cry1Ac编码序列的相应区段,从而导致开放阅读框由编码Cry1Ac的结构域I的第一区段、编码BCW 001的结构域II和III的第二区段和编码Cry1Ac毒素蛋白的原毒素结构域的第三区段组成,并且以连续顺序从5'至3'使所述第一区段、所述第二区段和所述第三区段同框连接。该嵌合构建体(SEQ ID NO:3)编码在本文中称为BCW 002的嵌合毒素蛋白质(SEQ ID NO:4)。略微改变结构域I与结构域II之间的分界点产生了开放阅读框(SEQ ID NO:5),所述开放阅读框编码在本文中称为BCW 003的嵌合毒素蛋白质(SEQ ID NO:6),所述嵌合毒素蛋白质具有仅在氨基酸位置259处不同于BCW 002的氨基酸序列。BCW 003,如同BCW 001一样,在位置259处含有苏氨酸(T),而BCW 002在那个位置处含有异亮氨酸(I)。BCW 001主要在毒素的结构域I(即氨基酸1-202)内不同于BCW 002和BCW 003,并且如上所陈述,BCW 002和BCW 002实际上是同一的,不同之处是在位置259处的I/T差异。

[0108] 实施例2

[0109] 该实施例教导BCW 001、BCW 002和BCW 003蛋白的有效鳞翅目害虫防治生物活性。

[0110] 将表达BCW 001、BCW 002和BCW 003毒素蛋白的构建体转化至大肠杆菌或可适用的苏云金芽孢杆菌或其他芽孢杆菌中允许在生物测定中测试所表达蛋白质,并且与本领域中已知的对黑切根虫具有毒性的蛋白质诸如Cry1Fa和Cry1Ac进行比较。观察到所得重组菌株表达具有针对鳞翅目害虫的活性的重组蛋白。当针对黑切根虫和玉米耳虫幼虫测试时,生物测定活性是特别强烈的。如以上在本发明的具体实施方式、发明背景和发明内容中所指定,存在极少数已被发现展现任何可观水平的针对黑切根虫的生物活性的毒素蛋白质,因此,本领域中需要鉴定此类蛋白质以在植物中用于保护此类植物免遭黑切根虫侵扰,以及确保存在对黑切根虫具有活性的补充性蛋白质的足够供给,所述补充性蛋白质可用于克服对当前在用的任何所述对黑切根虫具有活性的蛋白质诸如Cry1Fa毒素蛋白的抗性的任何发展。

[0111] 实施例3

[0112] 该实施例教导当BCW 001的结构域II和III取代其他Cry1毒素中的相应结构域时,此类结构域足以将黑切根虫生物活性传递至此类其他Cry1毒素蛋白。

[0113] 鉴定了具有针对鳞翅目昆虫的活性的许多BCW毒素嵌合体,两种嵌合体特别展现针对BCW、WBC和SCB的强烈活性。

[0114] 具有编码Cry1Ab、Cry1Ac和Cry1Ca的核苷酸序列的构建体用于构建含有取代Cry1Ab、Cry1Ac和Cry1Ca的可适用结构域的结构域II和结构域III BCW 001区段的嵌合体,并且在芽孢晶体生物测定中测试所得天然和嵌合蛋白。对在所述膳食生物测定中针对BCW、FAW和CEW的活性进行列表。在测试的实验条件下,Cry1Ac展现针对FAW、BCW和CEW的活性,Cry1Ab展现针对FAW和CEW但不针对BCW的活性,并且Cry1Ca不展现针对FAW、BCW以及CEW的活性。BCW 001展现针对BCW和CEW而非FAW的活性。相较于BCW 003,对于Cry1Ac,Cry1Ac针对BCW的活性是约1/10。当在生物测定中针对FAW、BCW和CEW测试时,Cry1Ab和Cry1Ac、含有BCW

001的结构域II和III的嵌合体展现毒性性质。Cry1Ac针对CEW不具有毒性,并且Cry1Ab针对BCW不具有毒性。构建了Cry1Ca/BCW 001嵌合体,其中Cry1Ca结构域III取代BCW 001的相应结构域,并且所得嵌合毒素对FAW、BCW和CEW展现毒性性质,而Cry1Ca毒素在针对这些害虫中的任一者测试时都是无效的。

[0115] 实施例4

[0116] 该实施例说明BCW 001、BCW 002和BCW 003在生物测定中针对多种鳞翅目害虫测试时的毒性性质。

[0117] 用于生物测定以及对昆虫的致死性和生长阻碍进行评分的方案在本领域中是已知的,所述方案的实例描述于PCT专利申请公布号WO 2012/139004和美国专利号7,927,598中。

[0118] 图1使各种BCW 001、BCW 002和BCW 003毒素蛋白与在膳食生物测定中根据昆虫物种获得的杀害虫活性相关联。这些毒素蛋白质各自显示针对鳞翅目昆虫的活性。

[0119] 实施例5

[0120] 该实施例教导用于植物中的编码本发明的蛋白质的人工序列的构建、用于植物中的植物载体和构建体的制备、以及表达本发明的蛋白质的植物的产生。

[0121] 根据美国专利5,500,365中所述的方法,设计和合成编码BCW 001蛋白(SEQ ID NO:1)、BCW 002蛋白(SEQ ID NO:3)和BCW 003蛋白(SEQ ID NO:5)的核苷酸序列。设计用于植物表达的这些经工程改造编码区在本文中提供为编码BCW 001的SEQ ID NO:7、编码BCW 002的SEQ ID NO:9和编码BCW 003的SEQ ID NO:11。

[0122] 构建具有如以SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:11阐述的序列的多种植物表达盒。所述表达盒适用于在植物原生质体中短暂表达或转化植物细胞。关于蛋白质在细胞内的最终放置来设计典型表达盒。以使蛋白质被翻译以及保持在胞质液中的方式设计一组表达盒。设计另一组表达盒以具有与毒素蛋白质邻接的转运肽,以允许靶向细胞的细胞器诸如叶绿体或质体。所有表达盒都被设计在5'末端以启动子起始,所述启动子可包含多个连续连接的启动子元件和增强子元件以加强转基因的表达。启动子序列通常连续继之以一个或多个在启动子的3'的前导序列。在前导序列的3'提供内含子序列以改进转基因的表达。毒素或转运肽的编码序列以及毒素的编码序列位于启动子、前导物和内含子构型的3'。在编码序列的3'提供序列以有助于转录终止,并且提供对所得转录物的多腺苷酸化重要的序列。所有上述元件都经常与被提供用于构建表达盒的额外序列诸如限制核酸内切酶位点或连接非依赖性克隆位点连续排列。

[0123] 对于玉米植物,设计一组用于胞质表达BCW 001,包含墨西哥玉米(Mexicana)泛素1启动子;用于胞质表达BCW 002,包含水稻(Orysza sativa)肌动蛋白(actin)15启动子或35S启动子;以及用于胞质表达BCW 003,包含35S启动子的表达盒。

[0124] 设计另一组用于在玉米植物中靶向表达BCW 002和BCW 003昆虫毒素蛋白的表达盒,其中叶绿体肽编码序列(例如CTP2)同框融合在编码BCW毒素蛋白的DNA区段的5'末端,所述表达盒包含水稻肌动蛋白15启动子或35S启动子以及包含35S启动子的序列。

[0125] 在植物转化载体中构建包含CaMV 35S启动子或可操作地连接到35S启动子的PClSV.FLt启动子的甘蔗植物表达盒。在一些情况下,包括表达靶向叶绿体的Cry2Ab的盒。

[0126] 针对第三龄期BCW、WBC、CEW、SWC和SCB幼虫测试表达本发明的蛋白质的植物。将

BCW 001的胞质表达盒以及BCW 002和BCW 003的胞质和质体靶向表达盒克隆,并且用于产生表达这些蛋白质的转基因玉米事件。通过本领域中已知的方法来诱导经转化细胞以形成植物。如美国专利8,344,207中所述,以类似方式进行使用植物叶盘的生物测定。基于由昆虫吞食的叶盘的百分比,在0(0%被食用)至11(大于50%被食用)的标度上对叶损害等级(LDR)指定等级评分。等级评分步幅以5%以递增方式增加。同基因玉米株系用于获得组织作为阴性对照,并且对结果进行评估。相对于未转化对照,质体靶向表达BCW 002和BCW 003昆虫毒素蛋白与胞质表达BCW 002和BCW 003昆虫毒素蛋白两者均使摄食损害降低。针对这些昆虫的叶盘测定的结果与来自以上呈现的实施例的生物测定数据一致。一种包含用于胞质表达的BCW 003盒的构建体导致34个转化事件,这些事件中的25个事件展现完全防治BCW新生体。也针对CEW、SWC和FAW测试将BCW 001和BCW 003表达至胞质液中的玉米植物。表达BCW 003的植物展现100%防治CEW和SWC,并且LDR值在1与2之间的范围内。三个表达BCW 001的转化事件导致植物展现针对CEW和SWC的功效,并且LDR值在1与3之间的范围内。这与先前实施例中呈现的膳食生物测定数据一致。

[0127] 产生表达BCW 003的转基因甘蔗植物,并且在生物测定中针对SCB加以测试。各生物测定包括作为阴性对照的来自野生型甘蔗的叶盘和表达高水平的Cry2Ab的阳性对照。在侵扰之后四(4)天测量昆虫致死性和叶损害。发现来自表达BCW 003的若干转基因甘蔗事件的叶盘以植物中方式防治蔗螟,并且展现类似于阳性对照的低于2的损害等级,以及90%-100%的平均昆虫致死率。

[0128] 相较于仅表达BCW 003的事件,表达BCW 003和Cry2Ab的转基因事件展现更好SCB防治。

昆虫物种	BCW 001	BCW 002	BCW 003
小地老虎	+	+	+
豆白缘切根虫	+	+	+
玉米穗虫	+	+	+
玉米螟	+	+	+
小蔗杆草螟	ND	ND	+
西南玉米杆草螟	+	ND	+
粉纹夜蛾	+	ND	+
大豆夜蛾	+	ND	+
草地夜蛾	-	-	-

图1

```
SEQ ID NO:2   MEEN-NQNQCVPYNCLNNPAIEILEGDRISVGNTPIDISLSLVELLISEFVPGGGIITGL    59
SEQ ID NO:4   MDNNPNINECIPYNCLSNPEVEVLGGERIETGYTPIDISLSLTQFLLSEFVPGAGFVLGL    60
SEQ ID NO:6   MDNNPNINECIPYNCLSNPEVEVLGGERIETGYTPIDISLSLTQFLLSEFVPGAGFVLGL    60
               ** * * * *     *  ** * * *  ** *         *** *      * ***

SEQ ID NO:2   LNIVWGFVGPSQWDAFLAQVEQLINQRISEAVRNTAIQELEGMARVYRTYATAFAEWERD    119
SEQ ID NO:4   VDIIWGIFGPSQWDAFLVQIEQLINQRIEEFARNQAISRLEGLSNLYQIYAESFREWEAD    120
SEQ ID NO:6   VDIIWGIFGPSQWDAFLVQIEQLINQRIEEFARNQAISRLEGLSNLYQIYAESFREWEAD    120
               ** *  **        * *        * **  *  **   **** **  ** *   *

SEQ ID NO:2   PNNTDLREAVRTQFTATETYISGRISVLKIQNFEVQLLSVFAQAANLHLSLLRDVVFFGQ    179
SEQ ID NO:4   PTNPALREEMRIQFNDMNSALTTAIPLLAVQNYQVPLLSVYVQAANLHLSVLRDVSVFGQ    180
SEQ ID NO:6   PTNPALREEMRIQFNDMNSALTTAIPLLAVQNYQVPLLSVYVQAANLHLSVLRDVSVFGQ    180
               * **   ** *  ********** ** **  ** *    **        *    **

SEQ ID NO:2   RWGFSTTTVNNYYNDLTEEISTYTDYAVRWYNTGLERVWGPDSRDWVRYNQFRRELTLTV    239
SEQ ID NO:4   RWGFDAATINSRYNDLTRLIGNYTDYAVRWYNTGLERVWGPDSRDWVRYNQFRRELTLTV    240
SEQ ID NO:6   RWGFDAATINSRYNDLTRLIGNYTDYAVRWYNTGLERVWGPDSRDWVRYNQFRRELTLTV    240
                   *** * **     ** **

SEQ ID NO:2   LDIVALFPNYDSRRYPIRTVSQLTREIYTNPVLENFDGSFRGMAQRIEQNIRQPHLMDIL    299
SEQ ID NO:4   LDIVALFPNYDSRRYPIRIVSQLTREIYTNPVLENFDGSFRGMAQRIEQNIRQPHLMDIL    300
SEQ ID NO:6   LDIVALFPNYDSRRYPIRTVSQLTREIYTNPVLENFDGSFRGMAQRIEQNIRQPHLMDIL    300
                             *

SEQ ID NO:2   NSITIYTDVHRGFNYWSGHQITASPVGFSGPEFAFPLFGNAGNAAPPVLVSLTGLGIFRT    359
SEQ ID NO:4   NSITIYTDVHRGFNYWSGHQITASPVGFSGPEFAFPLFGNAGNAAPPVLVSLTGLGIFRT    360
SEQ ID NO:6   NSITIYTDVHRGFNYWSGHQITASPVGFSGPEFAFPLFGNAGNAAPPVLVSLTGLGIFRT    360

SEQ ID NO:2   LSSPLYRRIILGSGPNNQELFVLDGTEFSFASLTTNLPSTIYRQRGTVDSLDVIPPQDNS    419
SEQ ID NO:4   LSSPLYRRIILGSGPNNQELFVLDGTEFSFASLTTNLPSTIYRQRGTVDSLDVIPPQDNS    420
SEQ ID NO:6   LSSPLYRRIILGSGPNNQELFVLDGTEFSFASLTTNLPSTIYRQRGTVDSLDVIPPQDNS    420

SEQ ID NO:2   VPPRAGFSHRLSHVTMLSQAAGAVYTLRAPTFSWQHRSATTTNIIAADSITQIPAVKGRS    479
SEQ ID NO:4   VPPRAGFSHRLSHVTMLSQAAGAVYTLRAPTFSWQHRSATTTNIIAADSITQIPAVKGRS    480
SEQ ID NO:6   VPPRAGFSHRLSHVTMLSQAAGAVYTLRAPTFSWQHRSATTTNIIAADSITQIPAVKGRS    480

SEQ ID NO:2   IINNGTVISGPGFTGGDLVRLYNADFNINNRAYLEVPIFFQSPSTNYRVRVRYASTSSLP    539
SEQ ID NO:4   IINNGTVISGPGFTGGDLVRLYNADFNINNRAYLEVPIFFQSPSTNYRVRVRYASTSSLP    540
SEQ ID NO:6   IINNGTVISGPGFTGGDLVRLYNADFNINNRAYLEVPIFFQSPSTNYRVRVRYASTSSLP    540

SEQ ID NO:2   VDVVFGNISHPTTFPATARSLDNLQSNDFGYIDIAGTFLPSLGPSIGIRPMLSTINLIVD    599
SEQ ID NO:4   VDVVFGNISHPTTFPATARSLDNLQSNDFGYIDIAGTFLPSLGPSIGIRPMLSTINLIVD    600
SEQ ID NO:6   VDVVFGNISHPTTFPATARSLDNLQSNDFGYIDIAGTFLPSLGPSIGIRPMLSTINLIVD    600

SEQ ID NO:2   RFEFIPVTATFEAESDLERAQKAVNALFTSTNQLGIKTDVTDYHIDQVSNLVECLSDEFY    659
SEQ ID NO:4   RFEFIPVTATFEAESDLERAQKAVNALFTSTNQLGIKTDVTDYHIDQVSNLVECLSDEFY    660
SEQ ID NO:6   RFEFIPVTATFEAESDLERAQKAVNALFTSTNQLGIKTDVTDYHIDQVSNLVECLSDEFY    660
```

图2

```
SEQ ID NO:2   LDEKRELSEKVKHAKRLSDERNLLQDPNFRGINRQPDRGWRGSTDITIQGGDDVFKENYV   719
SEQ ID NO:4   LDEKRELSEKVKHAKRLSDERNLLQDPNFRGINRQPDRGWRGSTDITIQGGDDVFKENYV   720
SEQ ID NO:6   LDEKRELSEKVKHAKRLSDERNLLQDPNFRGINRQPDRGWRGSTDITIQGGDDVFKENYV   720

SEQ ID NO:2   TLPGTFDECYPTYLYQKIDESKLKAYTRYQLRGYIEDSQDLEIYLIRYNAKHETVNVPGT   779
SEQ ID NO:4   TLPGTFDECYPTYLYQKIDESKLKAFTRYQLRGYIEDSQDLEIYLIRYNAKHETVNVPGT   780
SEQ ID NO:6   TLPGTFDECYPTYLYQKIDESKLKAFTRYQLRGYIEDSQDLEIYLIRYNAKHETVNVPGT   780
                                        *

SEQ ID NO:2   GSLWPLSAQSPIGKCGEPNRCAPHLEWNPDLHCSCRDGEKCAHHSHHFSLDIDVGCTDLN   839
SEQ ID NO:4   GSLWPLSAQSPIGKCGEPNRCAPHLEWNPDLDCSCRDGEKCAHHSHHFSLDIDVGCTDLN   840
SEQ ID NO:6   GSLWPLSAQSPIGKCGEPNRCAPHLEWNPDLDCSCRDGEKCAHHSHHFSLDIDVGCTDLN   840
                                        *

SEQ ID NO:2   EDLGVWVIFKIKTQDGHARLGNLEFLEEKPLVGEALARVKRAEKKWRDKREKLQLETNIV   899
SEQ ID NO:4   EDLGVWVIFKIKTQDGHARLGNLEFLEEKPLVGEALARVKRAEKKWRDKREKLEWETNIV   900
SEQ ID NO:6   EDLGVWVIFKIKTQDGHARLGNLEFLEEKPLVGEALARVKRAEKKWRDKREKLEWETNIV   900
                                                          **

SEQ ID NO:2   YKEAKESVDALFVNSQYDQLQADTNIAMIHAADKRVHRIREAYLPELSVIPGVNADISEE   959
SEQ ID NO:4   YKEAKESVDALFVNSQYDQLQADTNIAMIHAADKRVHSIREAYLPELSVIPGVNAAIFEE   960
SEQ ID NO:6   YKEAKESVDALFVNSQYDQLQADTNIAMIHAADKRVHSIREAYLPELSVIPGVNAAIFEE   960
                                              *               * *

SEQ ID NO:2   LEGRIFTAFSLYDARNVIKNGDFNNGLLCWNVKGHVDVEEQNNHRSVLVVPEWEAEVSQE  1019
SEQ ID NO:4   LEGRIFTAFSLYDARNVIKNGDFNNGLSCWNVKGHVDVEEQNNQRSVLVVPEWEAEVSQE  1020
SEQ ID NO:6   LEGRIFTAFSLYDARNVIKNGDFNNGLSCWNVKGHVDVEEQNNQRSVLVVPEWEAEVSQE  1020
                                        *               *

SEQ ID NO:2   VRVCPGRGYILRVTAYKEGYGEGCVTIHEIENNTDELKFSNCVEEEVYPNNTVTCNDYTA  1079
SEQ ID NO:4   VRVCPGRGYILRVTAYKEGYGEGCVTIHEIENNTDELKFSNCVEEEIYPNNTVTCNDYTV  1080
SEQ ID NO:6   VRVCPGRGYILRVTAYKEGYGEGCVTIHEIENNTDELKFSNCVEEEIYPNNTVTCNDYTV  1080
                                                    *           *

SEQ ID NO:2   NQEEYEGTYTSRNRGYDEAYESNSSVPAEYASVYEEKVYTDGRRGNPCESNRGYGDYTPL  1139
SEQ ID NO:4   NQEEYGGAYTSRNRGYNEAP----SVPADYASVYEEKSYTDGRRENPCEFNRGYRDYTPL  1136
SEQ ID NO:6   NQEEYGGAYTSRNRGYNEAP----SVPADYASVYEEKSYTDGRRENPCEFNRGYRDYTPL  1136
                   * *        *  *****    *        *      *    *    *

SEQ ID NO:2   PAGYVTKELEYFPETDKVWIEIGETEGTFIVDSVELLLMEE                      1180
SEQ ID NO:4   PVGYVTKELEYFPETDKVWIEIGETEGTFIVDSVELLLMEE                      1177
SEQ ID NO:6   PVGYVTKELEYFPETDKVWIEIGETEGTFIVDSVELLLMEE                      1177
               *
```

图2(接续)