



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201730340 A

(43)公開日：中華民國 106 (2017) 年 09 月 01 日

(21)申請案號：106103545

(22)申請日：中華民國 106 (2017) 年 02 月 02 日

(51)Int. Cl.：

C12N15/113 (2010.01)

C12N15/82 (2006.01)

A01N63/00 (2006.01)

A01P7/04 (2006.01)

A01H5/00 (2006.01)

(30)優先權：2016/02/03

美國

62/290,847

(71)申請人：陶氏農業科學公司(美國) DOW AGROSCIENCES LLC (US)

美國

弗勞恩霍夫爾協會(德國) FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FOERDERUNG
DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V. (DE)

德國

(72)發明人：納爾瓦 肯尼士 E. NARVA, KENNETH E. (US)；沃登 莎拉 E. WORDEN, SARAH E. (US)；弗瑞 梅根 L. FREY, MEGHAN L. (US)；倫格沙米 木魯蓋森 RANGASAMY, MURUGESAN (IN)；甘德拉 普雷姆昌德 GANDRA, PREMCHAND (IN)；洛 溫蒂 LO, WENDY (US)；費希萊維奇 伊蓮 FISHILEVICH, ELANE (US)；費雪 雷納 FISHER, RAINER (DE)；維爾辛斯卡斯 安卓斯 VILCINSKAS, ANDREAS (DE)；科諾爾 艾里恩 KNORR, EILEEN (DE)

(74)代理人：惲軼群；劉法正

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：60 項 圖式數：2 共 210 頁

(54)名稱

控制昆蟲害蟲的 RPB7 核酸分子

RPB7 NUCLEIC ACID MOLECULES TO CONTROL INSECT PESTS

(57)摘要

本揭示內容關於核酸分子及使用該核酸分子經由昆蟲害蟲內的標靶編碼與所轉錄非編碼序列之 RNA 干擾-介導抑制來控制昆蟲害蟲—包括鞘翅目及/或半翅目害蟲—的方法。本揭示內容亦關於製作表現可用於控制昆蟲害蟲之核酸分子的基因轉殖植物的方法，以及藉由該方法獲得的植物細胞與植物。

This disclosure concerns nucleic acid molecules and methods of use thereof for control of insect pests through RNA interference-mediated inhibition of target coding and transcribed non-coding sequences in insect pests, including coleopteran and/or hemipteran pests. The disclosure also concerns methods for making transgenic plants that express nucleic acid molecules useful for the control of insect pests, and the plant cells and plants obtained thereby.

【發明摘要】

【中文發明名稱】

控制昆蟲害蟲的RPB7核酸分子

【英文發明名稱】

RPB7 NUCLEIC ACID MOLECULES TO CONTROL INSECT PESTS

【中文】

本揭示內容關於核酸分子及使用該核酸分子經由昆蟲害蟲內的標靶編碼與所轉錄非編碼序列之RNA干擾-介導抑制來控制昆蟲害蟲—包括鞘翅目及/或半翅目害蟲—的方法。本揭示內容亦關於製作表現可用於控制昆蟲害蟲之核酸分子的基因轉殖植物的方法，以及藉由該方法獲得的植物細胞與植物。

【英文】

This disclosure concerns nucleic acid molecules and methods of use thereof for control of insect pests through RNA interference-mediated inhibition of target coding and transcribed non-coding sequences in insect pests, including coleopteran and/or hemipteran pests. The disclosure also concerns methods for making transgenic plants that express nucleic acid molecules useful for the control of insect pests, and the plant cells and plants obtained thereby.

【指定代表圖】 (無)

【代表圖之符號簡單說明】
(無)

【特徵化學式】
(無)

【發明說明書】

【中文發明名稱】

控制昆蟲害蟲的RPB7核酸分子

【英文發明名稱】

RPB7 NUCLEIC ACID MOLECULES TO
CONTROL INSECT PESTS

【技術領域】

【0001】優先權主張

本申請案主張2016年2月3日為“RPB7 NUCLIEC ACID MOLECULES TO CONTROL INSECT PESTS”所提申之美國臨時專利申請號62/290,847提申日期之利益。

【0002】技術領域

本發明大致上關於昆蟲害蟲(譬如鞘翅目害蟲及半翅目害蟲)所造成之植物損傷的基因控制。在特定具體例中，本發明關於標靶編碼與非編碼聚核苷酸的識別，以及重組DNA技術用於轉錄後抑止或抑制昆蟲害蟲細胞內之標靶編碼與非編碼聚核苷酸的表現以提供植物保護效應的用途。

【先前技術】

【0003】背景

西方玉米根蟲(WCR) (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte)是北美最具破壞性的玉米根蟲物種之一且在美國中西部的玉米種植區域受到特別關注。北方玉米根蟲(NCR) (*Diabrotica barberi* Smith and Lawrence)

是和WCR共同棲息在許多相同範圍的密切相關物種。有數個其他相關的條葉甲屬(*Diabrotica*)亞種是美洲的重要害蟲：墨西哥玉米根蟲(MCR) (*D. virgifera zeae* Krysan and Smith)；南方玉米根蟲(SCR) (*D. undecimpunctata howardi* Barber)；黃瓜條葉甲(*D. balteata* LeConte)；特氏斑點黃瓜條葉甲(*D. undecimpunctata tenella*)；南美條葉甲(*D. speciosa* Germar)；及曼氏斑點黃瓜條葉甲(*D. u. undecimpunctata* Mannerheim)。美國農業部已估計玉米根蟲造成每年十億美金的財政損失，包括八億美金的產量損失與兩億美金的處理費用。

【0004】WCR與NCR卵皆於夏季期間產在土壤中。該昆蟲在整個冬天停留於卵階段。卵是長橢圓形、白色，且長度小於0.004吋。幼蟲在五月底或六月初孵化，卵孵化的確切時間由於溫度差異和位置所致，每年不盡相同。剛孵出的幼蟲是長度小於0.125吋的白色蟲子。一旦孵化，幼蟲開始食用玉米根部。玉米根蟲要經歷三齡幼蟲。在食用數週後，幼蟲蛻皮成蛹。它們化蛹在土壤中，隨後在七月和八月以成蟲從土壤中冒出。成年根蟲的長度約0.25吋。

【0005】玉米根蟲幼蟲在玉米與數種其他草類物種上完成發育。比起在玉米上取食的幼蟲，在金色狗尾草上取食的幼蟲稍晚冒出並具有較小的成蟲頭囊尺寸。Ellsbury *et al.* (2005) Environ. Entomol. 34:627-34。WCR成蟲食用外露穗頂上的玉米鬚、花粉、與穀粒。假使

WCR成蟲在玉米繁殖組織出現之前冒出，它們可能食用葉部組織，因此減緩植物生長且偶爾殺死宿主植物。然而，當玉米鬚與花粉存在時，成蟲會迅速轉移到偏好的玉米鬚與花粉。NCR成蟲亦食用玉米植物的繁殖組織，但反而極少食用玉米葉。

【0006】在玉米的大部分根蟲損傷是由幼蟲取食造成。剛孵出的根蟲最初食用微細玉米根毛並鑽入根尖。隨著幼蟲越長越大，它們食用並鑽入主根。當玉米根蟲富集時，幼蟲的食用時常導致根部縮減，一路直到玉米秸稈的基部。嚴重的根部損傷會干擾根部輸送水和養分至該植物的能力、減緩植物生長，並導致糧食生產減少，因此時常大幅降低整體產量。嚴重的根部損傷亦時常導致玉米植物倒伏，這使得收割更加困難，並進一步降低產量。而且，成蟲食用玉米繁殖組織可能導致穗頂上的玉米鬚縮減。假使此「玉米鬚剪切(silk clipping)」在花粉脫落期間極為嚴重，可能打亂授粉。

【0007】玉米根蟲的控制可嘗試藉由，舉例來說，輪作、化學殺蟲劑、生物農藥(譬如生成孢子的革蘭氏陽性菌，蘇力菌(*Bacillus thuringiensis*))；表現**Bt**毒素的基因轉殖植物、PIP多肽(參閱，譬如PCT國際專利公開號WO 2015/038734)、及/或AflP多肽(參閱，譬如美國專利公開號US 2104/0033361 A1)、或彼等的組合。輪作有加諸耕地使用不必要限制的缺點。再者，一些根蟲物種可能產卵在大豆田，藉此減低玉米和大豆實行輪作的有效性。

【0008】在實現玉米根蟲控制的策略上，最重度倚賴的是化學殺蟲劑。雖然使用化學殺蟲劑是不夠完善的玉米根蟲控制策略；當化學殺蟲劑的成本加至儘管使用殺蟲劑仍可能發生的根蟲損害的成本時，每年在美國因玉米根蟲可能損失超過十億美金。幼蟲群體過多、暴雨、以及不正確施用(多個)殺蟲劑可能都會導致不適當的玉米根蟲控制。而且，持續使用殺蟲劑可能選出殺蟲劑-抗藥性根蟲株，還有由於對非標靶物種的毒性所出現的重大環境議題。

【0009】椿象及其他半翅目昆蟲(異翅目(heteroptera))為另一重要的農業害蟲難題。已知全世界有超過50種密切相關的椿象物種造成作物損傷。McPherson & McPherson (2000) Stink bugs of economic importance in America north of Mexico, CRC Press。該等昆蟲出現在眾多重要作物，包括玉蜀黍、大豆、果實、蔬菜、與穀物。

【0010】椿象在到達成蟲階段之前要經歷多個若蟲階段。該等昆蟲在約30-40天後從卵發育為成蟲。若蟲和成蟲皆取食軟組織的汁液，其中它們也注入消化酶，造成口外組織消化和壞死。所消化的植物材料和養分隨後被攝入。從植物維管系統消耗的水和養分導致植物組織損傷。發育中穀粒與種子的損傷是最重大的，因為產量與發芽會顯著減少。在溫暖氣候發生的多個世代導致顯著的昆蟲壓力。椿象的現今管理仰賴以個別田地為基礎的殺蟲劑處理。因此，迫切需要替代性管理策略，以使作物損失減至

最少。

【0011】RNA干擾(RNAi)是利用內源性細胞途徑的方法，藉由該方法，對於標靶基因序列的全部、或適當大小的任何部分為特異性的干擾RNA (iRNA)分子(譬如dsRNA分子)導致其所編碼的mRNA降解。RNAi已用於在眾多物種與實驗系統進行基因「減弱(knockdown)」；舉例來說，秀麗隱桿線蟲(*Caenorhabditis elegans*)、植物、昆蟲胚胎、以及組織培養的細胞。參閱，譬如Fire *et al.* (1998) *Nature* 391:806-11；Martinez *et al.* (2002) *Cell* 110:563-74；McManus and Sharp (2002) *Nature Rev. Genetics* 3:737-47。

【0012】RNAi係經由內源性途徑，包括DICER蛋白複合體達到mRNA之降解。DICER將長的dsRNA分子切成大約20個核苷酸的短片段，稱作小型干擾RNA (siRNA)。該siRNA開展成兩個單股RNAs：隨從股(passenger strand)與引導股(guide strand)。隨從股被降解，引導股被併入RNA-誘發的靜默複合體(RISC)。微型核糖核酸(miRNA)是結構上非常相似的分子，該等從含有連接雜交的隨從與引導股的多核苷酸「環」的前體分子裂解，彼等可同樣地併入RISC中。轉錄後基因靜默在該引導股特異性地結合至一互補mRNA分子，並誘發阿若戈蛋白(Argonaute)—RISC複合體的催化組分一切割時發生。儘管在諸如植物、線蟲與一些昆蟲的一些真核生物中的最初siRNA及/或miRNA的濃度有限，但已知此過程係在該生

物全身性地傳播。

【0013】美國專利 7,612,194 與美國專利公開號 2007/0050860、2010/0192265、與 2011/0154545 揭示了單離自西方玉米根蟲蛹的 9112 個表現序列標籤(EST)序列庫。美國專利 7,612,194 與美國專利公開號 2007/0050860 當中提議將一啟動子以操作方式聯接至互補至其中所揭示之西方玉米根蟲液泡型 H^+ -ATPase (V-ATPase) 的數個特定部分序列之一的一核酸分子，以表現植物細胞中的反股 RNA。美國專利公開號 2010/0192265 提議將一啟動子以操作方式聯接至互補至未知與未揭露功能的西方玉米根蟲基因之特定部分序列(部分序列係陳述為 58% 一致於秀麗隱桿線蟲的 C56C10.3 基因產物)的一核酸分子，以表現植物細胞中的反股 RNA。美國專利公開號 2011/0154545 提議將一啟動子以操作方式聯接至互補至西方玉米根蟲衣被蛋白乙型次單元基因的兩個特定部分序列的一核酸分子，以表現植物細胞中的反股 RNA。又，美國專利 7,943,819 揭露單離自西方玉米根蟲幼蟲、蛹、與剖分中腸的 906 個表現序列標籤(EST)序列庫，並提議將一啟動子以操作方式聯接至互補至西方玉米根蟲帶電多泡體蛋白 4b 基因的特定部分序列的一核酸分子，以表現植物細胞中的雙股 RNA。

【0014】除了 V-ATPase 的數個特定部分序列與未知功能基因的特定部分序列以外，美國專利 7,612,194 及美國專利公開號 2007/0050860、2010/0192265、與

2011/0154545在使用其中所列示用於RNA干擾的超過九千個序列的任何特定序列上並無提供進一步提議。而且，美國專利7,612,194、及美國專利公開號2007/0050860、2010/0192265、與2011/0154545對於所提供之超過九千個序列當中的其他何者在用作dsRNA或siRNA時對玉米根蟲物種致死、或者甚至可用於玉米根蟲物種，皆無提供任何指示。除了帶電多泡體蛋白4b基因的特定部分序列以外，美國專利7,943,819在使用其中所列示用於RNA干擾的超過九千個序列上並無提供提議。而且，美國專利7,943,819對於所提供之超過九千個序列當中的其他何者在用作dsRNA或siRNA時對玉米根蟲物種致死、或者甚至可用於玉米根蟲物種，並無提供指示。美國專利申請案公開號 U.S. 2013/040173 與 PCT 申請案公開號 WO 2013/169923說明了衍生自西方玉米根蟲Snf7基因的序列，以在玉蜀黍進行RNA干擾。

【0015】互補至玉米根蟲DNAs的絕大多數序列(例如前述)在用作dsRNA或siRNA時並不提供植物免於玉米根蟲物種的防範效應。舉例來說，Baum *et al.* (2007) Nature Biotechnology 25:1322-1326說明藉由RNAi抑制數個WCR基因標靶的效應。該等作者報導他們所測試的26個標靶基因的當中8個在超過520 ng/cm²之極高iRNA(譬如dsRNA)濃度沒能提供實驗上顯著的鞘翅目害蟲死亡率。

【0016】美國專利7,612,194與美國專利公開號

2007/0050860的作者首次報導靶向西方玉米根蟲的玉米植物之植物RNAi。Baum *et al.* (2007) Nat. Biotechnol. 25(11):1322-6。該等作者說明一高通量活體內膳食RNAi系統，以篩揀發展基因轉殖RNAi玉蜀黍的潛力標靶基因。在具290個標靶的初始基因池中，僅14個展現幼蟲控制潛力。最有效的雙股RNAs (dsRNA)之一係靶向編碼液泡ATPase次單元A (V-ATPase)的一基因，結果以低濃度dsRNA快速壓抑對應內源性mRNA並觸發特異性RNAi回應。於是，該等作者首次記載植物RNAi作為可能的害蟲管理工具，並同時證實無法以事前演繹(*a priori*)準確識別有效標靶，即便從相對小的候選基因組。

【發明內容】

【0017】 揭示內容

本案揭露的是核酸分子(譬如標靶基因、DNAs、dsRNAs、siRNAs、miRNAs、shRNAs、與hpRNAs)、及其用於控制昆蟲害蟲的方法，包括，舉例來說，鞘翅目害蟲，例如西方玉米根蟲(*D. v. virgifera* LeConte (西方玉米根蟲，“WCR”));北方玉米根蟲(*D. barberi* Smith and Lawrence (北方玉米根蟲，“NCR”));南方玉米根蟲(*D. u. howardi* Barber (南方玉米根蟲，“SCR”));墨西哥玉米根蟲(*D. v. zea* Krysan and Smith (墨西哥玉米根蟲，“MCR”));黃瓜條葉甲；特氏斑點黃瓜條葉甲(*D. u. tenella*)；曼氏斑點黃瓜條葉甲(*D. u. undecimpunctata* Mannerheim)；與南美條葉甲，以及半翅目害蟲，例如英

雄美洲蟪(*Euschistus heros* (Fabr.)) (新熱帶褐椿，
“BSB”)；褐臭椿(*E. servus* (Say) (褐椿象)；稻綠椿
(*Nezara viridula* (L.)) (南方綠椿象)；紅肩綠蟪
(*Piezodorus guildinii* (Westwood)) (紅帶蟪象)；褐翅椿
(*Halyomorpha halys* (Stål)) (褐翅椿象)；綠椿(*Chinavia
hilare* (Say)) (綠椿象)；馬格那椿(*C. marginatum*
(Palisot de Beauvois))；馬勒卡椿(*Dichelops
melacanthus* (Dallas))；弗卡待克蟪(*D. furcatus* (F.))；
地中海椿(*Edessa meditabunda* (F.))；新熱帶紅肩綠蟪
(*Thyanta perditor* (F.)) (新熱帶紅肩綠蟪象)；諾比蟲
(*Horcias nobilellus* (Berg)) (棉花蟲)；斑蟪(*Taedia
stigmosa* (Berg))；秘魯紅蟪(*Dysdercus peruvianus*
(Guérin-Méneville))；擬新扭白蟻(*Neomegalotomus
parvus* (Westwood))；葉足蟲(*Leptoglossus zonatus*
(Dallas))；尼氏蟲(*Niesthrea sidae* (F.))；草盲蟪(*Lygus
hesperus* (Knight)) (西部牧草盲蟪)；和美國牧草盲蟪(*L.
lineolaris* (Palisot de Beauvois))。在特定例子中，揭露
了可和昆蟲害蟲的一或多個原生核酸之至少一部分同源的
例示性核酸分子。

【0018】在該等與進一步例子中，原生核酸序列可為
標靶基因，其產物可以，舉例來說且不設限：涉及代謝過
程或涉及幼蟲/若蟲發育。在一些例子中，標靶基因的表現
藉由包含其同源聚核苷酸之一核酸分子的轉錄後抑制可對
昆蟲害蟲致死、或導致昆蟲害蟲的生長及/或生存力減少。

在特別的例子中，RNA聚合酶複合體II RPB7次單元基因(本案稱作 *rpb7*) 或 *rpb7* 同源物(homolog) 或同系物(ortholog)可選作轉錄後靜默的標靶基因。在特定例子中，可用於轉錄後抑制的標靶基因為選自於由下列所構成之群組的*rpb7*基因：SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、與SEQ ID NO:78。包含下列聚核苷酸的一單離核酸分子係因此揭示於本案：SEQ ID NO:1；SEQ ID NO:1的互補體及/或反向互補體；SEQ ID NO:3；SEQ ID NO:3的互補體及/或反向互補體；SEQ ID NO:5；SEQ ID NO:5的互補體及/或反向互補體；SEQ ID NO:78；SEQ ID NO:78的互補體及/或反向互補體；及/或包含前述任一者至少15個鄰接核苷酸的片段(譬如SEQ ID NOs:7-10與SEQ ID NO:80)。

【0019】亦揭露的是一種核酸分子，其包含編碼和標靶基因產物(舉例來說，*rpb7*基因的產物)內部之胺基酸序列至少約85%一致的多肽的一聚核苷酸。舉例來說，一核酸分子可包含編碼和SEQ ID NO:2 (西方玉米根蟲RPB7-1)、SEQ ID NO:4 (西方玉米根蟲RPB7-2)、SEQ ID NO:6 (西方玉米根蟲RPB7-3)、SEQ ID NO:79 (英雄美洲蟥RPB7-1)至少85%一致之多肽；及/或*rpb7*基因的產物內部之一胺基酸序列的一聚核苷酸。更揭露了一種包含一聚核苷酸的核酸分子，該聚核苷酸為編碼和標靶基因產物內部之一胺基酸序列至少85%一致之多肽的一聚核苷酸的互補體或反向互補體。

【0020】亦揭露的是一種cDNA聚核苷酸，其可用於製造互補至全部或部分之昆蟲害蟲標靶基因，舉例來說，*rpb7*基因的iRNA（譬如dsRNA、siRNA、shRNA、miRNA、shRNA、與hpRNA）分子。在特定具體例中，dsRNAs、siRNAs、shRNA、miRNAs、shRNAs、及/或hpRNAs可在體外、或藉由基因改造生物，例如植物或細菌在體內製造。在特定例子中，所揭露的是一種cDNA分子，其可用於製造互補至全部或部分之*rpb7*基因（譬如SEQ ID NO:1；SEQ ID NO:3；SEQ ID NO:5；與SEQ ID NO:78）。

【0021】另揭露的是抑制鞘翅目害蟲關鍵基因之表現的*rpb7*措施(means)，以及對一植物提供鞘翅目害蟲防範的*rpb7*措施。抑制鞘翅目害蟲關鍵基因之表現的*rpb7*措施包括選自於由SEQ ID NOs:89-92；及其互補體與反向互補體所構成之群組的一聚核苷酸所構成的單股RNA分子。抑制鞘翅目害蟲關鍵基因之表現的*rpb7*措施的功能性等效物包括實質上同源於從包含SEQ ID NOs:7-10任一者之鞘翅目*rpb7*基因轉錄的全部或部分RNA的單-或雙-股RNA分子。對植物提供鞘翅目害蟲防範的*rpb7*措施包括一DNA分子，其包含操作性地聯結至一啟動子之編碼抑制鞘翅目害蟲關鍵基因之表現的*rpb7*措施的一聚核苷酸，其中該DNA分子能夠被整合至植物的基因組中。

【0022】另揭露的是抑制半翅目害蟲關鍵基因之表現的*rpb7*措施，以及對一植物提供半翅目害蟲防範的*rpb7*

措施。抑制半翅目害蟲關鍵基因之表現的*rpb7*措施包括選自於由SEQ ID NO:80及其互補體與反向互補體所構成之群組的一聚核苷酸所構成的單股RNA分子。抑制半翅目害蟲關鍵基因之表現的*rpb7*措施的功能性等效物包括實質上同源於從包含SEQ ID NO:78之半翅目*rpb7*基因轉錄的全部或部分RNA的單-或雙-股RNA分子。對植物提供半翅目害蟲防範的*rpb7*措施包括一DNA分子，其包含操作性地聯結至一啟動子之編碼抑制半翅目害蟲關鍵基因之表現的*rpb7*措施的一聚核苷酸，其中該DNA分子能夠被整合至植物的基因組中。

【0023】此外揭露的是用於控制昆蟲害蟲(譬如鞘翅目或半翅目害蟲)群體的方法，該方法包含將一iRNA (譬如dsRNA、siRNA、shRNA、miRNA、與hpRNA)分子提供給一昆蟲害蟲(譬如鞘翅目或半翅目害蟲)，該分子在被該害蟲攝食後發揮功能，以抑制該害蟲內的生物功能。

【0024】在一些具體例中，用於控制鞘翅目害蟲群體的方法包含將一iRNA分子提供給該鞘翅目害蟲，該iRNA分子包含選自於由下列所構成之群組的一聚核苷酸的全部或包含至少15個鄰接核苷酸的一片段：SEQ ID NO:86；SEQ ID NO:86的互補體或反向互補體；SEQ ID NO:87；SEQ ID NO:87的互補體或反向互補體；SEQ ID NO:88；SEQ ID NO:88的互補體或反向互補體；SEQ ID NO:89；SEQ ID NO:89的互補體或反向互補體；SEQ ID NO:90；SEQ ID NO:90的互補體或反向互補體；SEQ ID NO:91；

SEQ ID NO:91的互補體或反向互補體；SEQ ID NO:92；SEQ ID NO:92的互補體或反向互補體；雜交至包含SEQ ID NOs:1、3、5、與7-10之任一者的鞘翅目害蟲原生*rpb7*聚核苷酸(譬如WCR)的一聚核苷酸；雜交至包含SEQ ID NOs:1、3、5、與7-10之任一者的鞘翅目害蟲原生*rpb7*聚核苷酸的一聚核苷酸的互補體或反向互補體；雜交至包含了包含SEQ ID NOs:1、3、5、與7-10之任一者的條葉甲屬生物(譬如WCR)原生編碼聚核苷酸的至少15個鄰接核苷酸的片段的一聚核苷酸；以及雜交至包含了包含SEQ ID NOs:1、3、5、與7-10之任一者的條葉甲屬生物原生編碼聚核苷酸的至少15個鄰接核苷酸的片段的一聚核苷酸的互補體或反向互補體。

【0025】在一些具體例中，用於控制鞘翅目害蟲群體的方法包含將一iRNA分子提供給該鞘翅目害蟲，該iRNA分子包含選自於由下列所構成之群組的一聚核苷酸的全部或包含至少15個鄰接核苷酸的一片段：SEQ ID NO:93；SEQ ID NO:93的互補體或反向互補體；SEQ ID NO:94；SEQ ID NO:94的互補體或反向互補體；雜交至包含SEQ ID NO:78及/或SEQ ID NO:80的半翅目害蟲原生*rpb7*聚核苷酸(譬如BSB)的一聚核苷酸；雜交至包含SEQ ID NO:78及/或SEQ ID NO:80的半翅目害蟲原生*rpb7*聚核苷酸的一聚核苷酸的互補體或反向互補體；雜交至包含了包含SEQ ID NO:78及/或SEQ ID NO:80的半翅目生物(譬如BSB)原生編碼聚核苷酸的至少15個鄰接核苷酸的片段的

一聚核苷酸；以及雜交至包含了包含SEQ ID NO:78及/或SEQ ID NO:80的半翅目生物原生編碼聚核苷酸的至少15個鄰接核苷酸的片段的一聚核苷酸的互補體或反向互補體。

【0026】在特定具體例中，在被昆蟲害蟲攝食後發揮功能，以抑制該害蟲內的生物功能的iRNA係由包含選自於由下列所構成之群組的全部或一部分聚核苷酸的DNA所轉錄：SEQ ID NO:1；SEQ ID NO:1的互補體或反向互補體；SEQ ID NO:3SEQ ID NO:3的互補體或反向互補體；SEQ ID NO:5；SEQ ID NO:5的互補體或反向互補體；SEQ ID NO:7；SEQ ID NO:7的互補體或反向互補體；SEQ ID NO:8；SEQ ID NO:8的互補體或反向互補體；SEQ ID NO:9；SEQ ID NO:9的互補體或反向互補體；SEQ ID NO:10；SEQ ID NO:10的互補體或反向互補體；SEQ ID NO:78；SEQ ID NO:78的互補體或反向互補體；SEQ ID NO:80；SEQ ID NO:80的互補體或反向互補體；包含SEQ ID NOs:1、3、5、與7-10之任一者的條葉甲屬生物(譬如WCR)原生編碼聚核苷酸；包含SEQ ID NOs:1、3、5、與7-10之任一者的條葉甲屬生物原生編碼聚核苷酸的互補體或反向互補體；包含了包含SEQ ID NOs:1、3、5、與7-10之任一者的條葉甲屬生物原生編碼聚核苷酸的至少15個鄰接核苷酸的一片段；包含了包含SEQ ID NOs:1、3、5、與7-10之任一者的條葉甲屬生物原生編碼聚核苷酸的至少15個鄰接核苷酸的一片段的互

補體或反向互補體；包含SEQ ID NO:78及/或SEQ ID NO:80的半翅目生物(譬如BSB)原生編碼聚核苷酸；包含SEQ ID NO:78及/或SEQ ID NO:80的半翅目生物原生編碼聚核苷酸的互補體或反向互補體；包含了包含SEQ ID NO:78及/或SEQ ID NO:80的半翅目生物(譬如BSB)原生編碼聚核苷酸的至少15個鄰接核苷酸的一片段；以及包含了包含SEQ ID NO:78及/或SEQ ID NO:80的半翅目生物原生編碼聚核苷酸的至少15個鄰接核苷酸的一片段的互補體或反向互補體。

【0027】本案亦揭露一種方法，其中將dsRNAs、siRNAs、shRNAs、miRNAs、及/或hpRNAs可於以膳食為主的試驗、或於表現dsRNAs、siRNAs、shRNAs、miRNAs、及/或hpRNAs之基因改造植物細胞提供給一昆蟲害蟲。在該等與進一步例子中，dsRNAs、siRNAs、shRNAs、miRNAs、及/或hpRNAs可被害蟲攝入。本發明之dsRNAs、siRNA、shRNAs、miRNAs、及/或hpRNAs的攝入可隨後在害蟲內產生RNAi，繼而可導致就害蟲生存力極為關鍵的基因靜默並最終導致死亡。於是，揭示了一種方法，其中將包含可用於控制昆蟲害蟲的(多個)例示聚核苷酸的核苷酸分子提供給一昆蟲害蟲。在特定例子中，使用本發明核酸分子受到控制的鞘翅目及/或半翅目害蟲可為WCR、NCR、SCR、MCR、BSB、黃瓜條葉甲、特氏斑點黃瓜條葉甲、南美條葉甲、曼氏斑點黃瓜條葉甲、褐臭椿、紅肩綠椿、褐翅椿、稻綠椿、綠椿、馬格那椿、

馬勒卡椿、弗卡待克椿、地中海椿、地中海椿、新熱帶紅肩綠椿、諾比蟲、斑椿、秘魯紅椿、擬新扭白蟻、葉足蟲、尼氏蟲、草盲椿及/或美國牧草盲椿。

【0028】前述及其他特徵將由參照圖1-2的下列數個具體例的詳細說明而變得更加顯明。

【圖式簡單說明】

【0029】圖1包括用於以單對引子從單一轉錄模板生成dsRNA的策略圖示。

【0030】圖2包括用於從兩個轉錄模板生成dsRNA的策略圖示。

【實施方式】

【0031】序列表

隨附序列表所列的核酸序列係使用37 C.F.R. § 1.822所定義的核苷酸鹼基標準字母縮寫顯示。所列的核酸與胺基酸序列係定義具有以所述方式排列之核苷酸與胺基酸單體的分子(即，分別為聚核苷酸與多肽)。所列的核酸與胺基酸序列亦各別定義包含以所述方式排列之核苷酸與胺基酸單體的一類聚核苷酸或多肽。鑑於基因密碼子的冗餘性，將理解到的是包括一編碼序列的一核苷酸序列亦說明編碼相同多肽的該類聚核苷酸作為包括該參考序列一聚核苷酸。另將理解到的是一胺基酸序列說明編碼該多肽的該類聚核苷酸ORFs。

【0032】僅顯示各別核酸序列當中的一股，但互補股係理解為任何提及展示股時被包括在內。因為主要核酸序

列的互補體與反向互補體是主要序列所必要揭露的，所以該核酸序列的互補性序列與反向互補性序列在任何提及核酸序列時被包括在內，除非有明確指示不然(或從序列出現的上下文可清楚為其他方式)。而且，本領域可理解到RNA股的核苷酸序列是由其所轉錄的DNA序列決定(但以尿嘧啶(U)核鹼基取代胸腺嘧啶(T))，RNA序列在任何提及編碼其之DNA序列時被包括在內。在隨附序列表：

SEQ ID NO:1顯示含有一例示性WCR *rpb7* DNA，本案在一些地方稱作WCR *rpb7*或WCR *rpb7-1*的重疊群：

```
CTCGACCTGTAGATTCTTGTCTATTTTGCCAC
CGATTTTGCTGTGGTGACGATGGCAATATGTCAAA
CACTAGCAAATACAAAAAAGAAGACGAAATATAA
TCCTAACCTTAACACCGGAAAATAACGTTTGTTTA
TAATTTATCAATAGACAAATTAAAATAATGTTTTA
CCACATATCTCTAGAACACGAAATCCTACTACATC
CACAATATTTTCGGACCACAACCTGTTAGAAAAAGT
CAAAACTAAACTGTATACCGAAGTTGAAGGAACT
TGCACAGGAAAGTATGGATTTGTGATTGCAGTAA
CCACTATAGATAGCATAGGTGCCGGTTTGATACTA
CCCGGACAAGGCTTTGTAGTCTACCCGGTGAAAT
ATAAAGCCATTGTGTTCCGTCCATTCAAAGGTGAA
GTCCTGGATGCGGTGGTTCGACAAGTCAACAAAG
TTGGCATGTTTCGCCGAAATAGGTCCTTTATCTTGT
TTCATTTCTCATCATTCCATACCCGCAGAAATGGA
```

GTTTTGTCCTAACGTTAATCCCCAATGCTATAAGA
CTAAAGACGAAGATGTTGTGATACGAGCAGAAGG
AGAAATCAGATTGAAAATAGTGGGTACGAGAGTA
GACGCCTCAGGGATATTTGCCATTGGAACCTTAAT
GGATGATTATCTGGGATTAATAAGTAATTAAGTTG
AATATTTTTTAAAATGTATTTATAAGTCTATAATTT
TTAATATACAAAAATCAAACATTAACAAAAAAA
A

SEQ ID NO:2顯示一例示性WCR *rpb7* DNA，本案
在一些地方稱作WCR RPB7或WCR RPB7-1所編碼之
RPB7多肽的胺基酸序列：

MFYHISLEHEILLHPQYFGPQLLEKVKTKLYTE
VEGTCTGKYGFVIAVTTIDSIGAGLILPGQGFVVYPV
KYKAIVFRPFKGEVLDAVVRQVNKVGMF AEIGPLS
CFISHHSIPAEMEFCPNVNPQCYKTKDEDVVIRAEG
EIRLKIVGTRVDASGIFAIGTLMDDYLGLISN

SEQ ID NO:3 顯示包含另一例示性WCR *rpb7*
DNA，本案在一些地方稱作WCR *rpb7-2*的重疊群：

AAACATAAATCCCTTAACCTATTTGTTTCGCG
AAGACAATAACTCCTCTAAATTTCCAATCACAAA
ATGTTCTACCACATTTCCCTCGAACATGAAATATT
GCTGCATCCCAAGTATTTCTGGGCCCAACTGATGG
AAACAGTGAAACAGAACTGTACACAGAAGTTGA
AGGCACATGCACCGGAAAGTATGGATTCGTCATA

GCAGTAACAACAATCGATCAGATCGGCTCTGGTA
TAATACAGCCGGGACAAGGATTCGTTGTGTATCC
CGTCAAATATAAGGCAATCGTTTTCCGACCATTCA
AGGGCGAAGTGTTGGACGCTGTCGTGACACAAGT
GAATAAAGTGGGAATGTTTCGCAGAAATCGGTCCA
TTGTCGTGCTTCATATCGCATCATTCCATACCAGC
TGACATGCAGTTCTGTCCGAATGGAAATCCGCCCT
GTTACAAATCGAAAGAAGAGGAAGTGGTCATCGC
CCCAGAAGATAAAATCCGCCTGAAGATTGTGGGT
ACAAGAGTTGATGCCACTGGAATCTTCGCTATCG
GGACTCTTATGGACGATTATTTGGGCTTAG

SEQ ID NO:4 顯示一例示性 WCR *rpb7* DNA (即 *rpb7-2*) 所編碼之另一 WCR RPB7 多肽的胺基酸序列：

MFYHISLEHEILLHPKYFGPQLMETVKQKLYTE
VEGTCTGKYGFVIAVTTIDQIGSGIIQPGQGFFVYPV
KYKAIVFRPFKGEVLDAVVTQVNKVGMF AEIGPLS
CFISHHSIPADMQFCPNGNPPCYKSKEEEVVIAPEDK
IRLKIVGTRVDATGIFAIGTLMDDYLGL

SEQ ID NO:5 顯示包含另一例示性 WCR *rpb7* DNA，本案在一些地方稱作 WCR *rpb7-3* 的重疊群：

GCTCGAGCGATCGTCGTCGCTGTAGCTACTGC
TGTCGTCGCCATGTTCTTCCTCAAGCAGCTCTCGC
GCGACCTGCTGCTCCATCCGATGCACTTTGGCCCG
AAGCTCCACGACATCATCCGCTTGCGTTTGATCGA

AGAGGTCGAGGGCACGTCCATGGGCAAGTACGGG
TATGTTATCACCGTCACGGAAGTGCGCGACGAAG
ACATTGGCAAGGGGCGTGATCCAGGACAACCTCGGG
CTTTGTGTGTTTCAACATCCGGTACCGCGCGATCC
TCTTCCGTCCGTTCAAGAACCAGGTGCTCGACGCA
GTCGTGACAGTCGTGAACCAGCTCGGGTTCTTCGC
CGACGTCGGACCGCTCCAGGTCTTTGTCTCGCGCC
ACGCGATGCCGACGGACCTGAACAACGGGCTACGA
CCACGAGAACAAACGCGTGGATCTCTGATGACCGC
GAAGTCGAGATCCGCAAAGGCTGCGGGCGTGCGGC
TCAAGATCATGGGGCGTGAGCGTCGACGTCACGGA
GATTAATGCGATTGGGACGATCAAGGACGACTAC
TTGGGGCTCATCTCGTCCGAGAACTTCTAGTGCAC
GCGGCAAACAACAGCAGCGCCACTGGCAGCAAGA
GCGACCGACATACGTTGCCCGAGTTGCGACTGTG
CACTGACGCGCAACGTT

SEQ ID NO:6 顯示一例示性 WCR *rpb7* DNA (即 *rpb7-3*) 所編碼之另一 WCR RPB7 多肽的胺基酸序列：

MFFLKQLSRDLLHPMHFGPKLHDIIRLRLIEEV
EGTSMGKYGYVITVTEVRDEDIGKGVIQDNSGFVCF
NIRYRAILFRPFKNQVLDAVVTVVNQLGFFADVGPL
QVFVSRHAMPTDLNNGYDHENNAWISDDREVEIRK
GCGVRLKIMGVSDVTEINAIGTIKDDYLGLISSENF

SEQ ID NO:7 顯示一例示性 WCR *rpb7* DNA，本案

在一些地方稱作WCR *rpb7-1* reg1 (第1區)，其在一些實施例係用於製造dsRNA：

CCACAACCTGTTAGAAAAAGTCAAAACTAAAC
TGTATACCGAAGTTGAAGGAACTTGCACAGGAAA
GTATGGATTTGTGATTGCAGTAACCACTATAGATA
GCATAGGTGCCGGTTTGATACTACCCGGACAAGG
CTTTGTAGTCTACCCGGTGAAATATAAAGCCATTG
TGTTCCGTCCATTCAAAGGTGAAGTCCTGGATGCG
GTGGTTCGACAAGTCAACAAAGTTGGCATGTTCG
CCGAAATAGGTCCTTTATCTTGTTTCATTTCTCAT
CATTCCATACCCGCAGAAATGGAGTTTTGTCCTAA
CGTTAATCCCCAATGCTATAAGACTAAAGACGAA
GATGTTGTGATACGAGCAGAAGGAGAAATCAGAT
TGAAAATAGTGGGT

SEQ ID NO:8顯示另一例示性WCR *rpb7* DNA，本案在一些地方稱作WCR *rpb7-2* reg1 (第1區)，其在一些實施例係用於製造dsRNA：

CCCTCGAACATGAAATATTGCTGCATCCCAAG
TATTTCTGGGCCCCAACTGATGGAAACAGTGAAAC
AGAAACTGTACACAGAAGTTGAAGGCACATGCAC
CGGAAAGTATGGATTCGTCATAGCAGTAACAACA
ATCGATCAGATCGGCTCTGGTATAATACAGCCGG
GACAAGGATTCGTTGTGTATCCCGTCAAATATAA
GGCAATCGTTTTCCGACCATTCAAGGGCGAAGTG

TTGGACGCTGTCGTGACACAAGTGAATAAAGTGG
GAATGTTTCGCAGAAATCGGTCCATTGTCGTGCTTC
ATATCGCATCATTCCATACCAGCTGACATGCAGTT
CTGTCCGAATGGAAATCCGCCCTGTTACAAATCG
AAAGAAGAGGAAGTGGTCATCGCC

SEQ ID NO:9顯示另一例示性WCR *rpb7* DNA，本案在一些地方稱作WCR *rpb7-3* reg1 (第1區)，其在一些實施例係用於製造dsRNA：

ACGTCGACGCTCACGCCCATGATCTTGAGCCG
CACGCCGCAGCCTTTGCGGATCTCGACTTCGCGGT
CATCAGAGATCCACGCGTTGTTCTCGTGGTCGTAG
CCGTTGTTTCAGGTCCGTCGGCATCGCGTGGCGCGA
GACAAAGACCTGGAGCGGTCCGACGTCGGCGAAG
AACCCGAGCTGGTTCACGACTGTCACGACTGCGT
CGAGCACCTGGTTCTTGAACGGACGGAAGAGGAT
CGCGCGGTACCGGATGTTGAAACACACAAAGCCC
GAGTTGTCCTGGATCACGCCCTTGCCAATGTCTTC
GTCGCGCACTTCCGTGACGGTGATAACATACCCGT
ACTTGCCCATGGACGTGCCCTCGACCTCTTCGATC
AAACGCAAGCGGATGAT

SEQ ID NO:10顯示另一例示性WCR *rpb7* DNA，本案在一些地方稱作WCR *rpb7-1* v1 (第1版本)，其在一些實施例係用於製造dsRNA：

AAAGCCATTGTGTTCCGTCCATTCAAAGGTGA

AGTCCTGGATGCGGTGGTTCGACAAGTCAACAAA
GTTGGCATGTTTCGCCGAAATAGGTCCTTTATCTTG
TTTCATTTCTCATCATTCCATACCCGCAGAAATGG
AGTTTTGTCCTAACGTTAATCCCCAATGCTATAAG
ACTAAAGACGAAGATGTTGTGATACGAGCAGAAG
GAGAAATCAGATTGA

SEQ ID NO:11顯示T7噬菌體啟動子的核苷酸序列。

SEQ ID NO:12顯示一例示性***YFP***編碼區的片段。

SEQ ID NOs:13-20 顯示用於擴增例示性 WCR *rpb 7*，包含*rpb 7-1* reg1、*rpb 7-2* reg1、*rpb 7-3* reg1、與 *rpb 7-1 v1*的一部分的引子，其在一些實施例係用於製造 dsRNA。

SEQ ID NO:21顯示一例示性***YFP***基因。

SEQ ID NO:22顯示膜聯蛋白(*annexin*)第1區的DNA序列。

SEQ ID NO:23顯示膜聯蛋白第2區的DNA序列。

SEQ ID NO:24顯示乙型血影蛋白2 (*beta spectrin 2*) 第1區的DNA序列。

SEQ ID NO:25顯示乙型血影蛋白2第2區的DNA序列。

SEQ ID NO:26顯示***mtRP-L4***第1區的DNA序列。

SEQ ID NO:27顯示***mtRP-L4***第2區的DNA序列。

SEQ ID NOs:28-55顯示用於擴增膜聯蛋白、乙型血影蛋白2、***mtRP-L4***、與***YFP***的基因區以供dsRNA合成的

引子。

SEQ ID NO:56顯示編碼TIP41-樣蛋白的玉蜀黍DNA序列。

SEQ ID NO:57顯示T20VN引子寡聚核苷酸的核苷酸序列。

SEQ ID NOs:58-62顯示用於玉蜀黍dsRNA轉錄體表現分析的引子與探針。

SEQ ID NO:63顯示用於二元載體骨架偵測的*SpecR*編碼區之一部分的核苷酸序列。

SEQ ID NO:64顯示用於基因組拷貝數分析的*AAD1*編碼區的核苷酸序列。

SEQ ID NO:65顯示玉蜀黍轉化酶基因。

SEQ ID NOs:66-74顯示用於基因拷貝數測定與二元載體骨架偵測的DNA寡聚核苷酸的核苷酸序列。

SEQ ID NOs:75-77顯示用於玉蜀黍轉錄表現分析的引子與探針。

SEQ ID NO:78顯示一例示性顯示一例示性新熱帶褐椿(英雄美洲蟪) *rpb7* DNA，本案在一些地方稱作BSB *rpb7-1*：

ACAAGATTTGAAAATGTTTTACCATATTTCTC
TTGAACATGATATATTACTACATCCGAGATATTTT
GGACCTCAATTACATGAAACAGTTAAACAAAAAT
TGTACACTGAAGTTGAAGGGACCTGTACTGGCAA
GTATGGATTTGTTATTGCAGTCACTAATATTGATA

ACATTGGAGCTGGTGTTATACAGCCAGGACAAGG
 ATTTGTGGTTTATCCAGTGAAATATAAAGCCATTG
 TTTT TAGACCTTTTAAGGGAGAAGTTGTTGATGCT
 ATTGTTACTCAAGTTAATAAGGTTGGAATGTTTGC
 AGAAATTGGACCATTTGTCTTGTTTTATATCCCATC
 ACTCGATACCTGCTGATATGGAATTCTGCCCCAAT
 GAAACTCCACCTTGTTACCGTTCTAAAGATGAGG
 ATGTTGTAATAACAGCAGAAGATGTAATAAGGTG
 TAAAATAGTTGGGACTAGAGTTGATGCATCCGGT
 ATTTT TGCTATTGGTACTCTTATGGATGATTATTT
 AGGTTTGATTGGAAGTTAAAATTTTTTACTTGAAG
 ACAGTCTACATGCAGGAGGAATTAGAAGAAAATA
 ATAAACATTCTGTTTAGACTGTATGATTTAGAAAA
 TGTGAAAAATATGCTGGACTATTTATTATTACACT
 GTTGTAATTTTTTGGAACCAATAAAAGTATTTTACA
 AAAAAAA

SEQ ID NO:79顯示一例示性BSB *rpb 7* DNA (即BSB *rpb 7-1*)所編碼之BSB RPB7多肽的胺基酸序列：

MFYHISLEHDILLHPRYFGPQLHETVKQKLYTE
 VEGTCTGKYGFVIAVTNIDNIGAGVIQPGQGFFVYP
 VKYKAIVFRPFKGEVVDIAIVTQVNKVGMFAEIGPLS
 CFISHHSIPADMEFCPNETPPCYRSKDEDVVITAEDV
 IRCKIVGTRVDASGIFAIGTLMDDYLGLIGS

SEQ ID NO:80顯示一例示性BSB *rpb 7* DNA，本案

在一些地方稱作BSB_*rpb7-1* reg1 (第1區)，其在一些實施例係用於製造dsRNA：

GTAAACAAAAATTGTACACTGAAGTTGAAG
GGACCTGTACTGGCAAGTATGGATTTGTTATTGCA
GTCACTAATATTGATAACATTGGAGCTGGTGTTAT
ACAGCCAGGACAAGGATTTGTGGTTTATCCAGTG
AAATATAAAGCCATTGTTTTTAGACCTTTTAAGGG
AGAAGTTGTTGATGCTATTGTTACTCAAGTTAATA
AGGTTGGAATGTTTGCAGAAATTGGACCATTGTCT
TGTTTTATATCCCATCACTCGATACCTGCTGATAT
GGAATTCTGCCCCAATGAACTCCACCTTGTTACC
GTTCTAAAGATGAGG

SEQ ID NOs:81-82顯示用於擴增例示性BSB *rpb7*序列，包含BSB_*rpb7-1* reg1之一部分的引子，其用於在一些實施例中製造dsRNA。

SEQ ID NO:83顯示一例示性*YFP* v2 DNA，其在一些實施例係用於製造dsRNA的正股。

SEQ ID NOs:84-85顯示用於*YFP*序列*YFP* v2的PCR擴增的引子，其用於在一些實施例中製造dsRNA。

SEQ ID NOs:86-94顯示包含例示性*rpb7*聚核苷酸及其片段的核苷酸所轉錄的例示性RNAs。

SEQ ID NO:95顯示IDT訂製寡聚探針*rpb7* PRB Set1，其標記有FAM並以Zen與Iowa Black淬熄劑二次淬熄。

SEQ ID NO:96顯示一例示性聯結子聚核苷酸，其在RNA轉錄體轉錄時形成「環圈(loop)」，以形成髮夾結構。

詳細說明

I. 數個具體例的概觀

【0033】吾人開發RNA干擾(RNAi)作為昆蟲害蟲管理的工具，使用供表現dsRNA之基因轉殖植物的最有可能標靶害蟲物種之一；西方玉米根蟲。到目前為止，推論作為根蟲幼蟲RNAi標靶的大部分基因並無確實達成其目的。在此，吾人說明在例示性昆蟲害蟲—西方玉米根蟲與新熱帶褐椿—RNAi-介導的*rpb7*減弱(knockdown)，在，舉例來說，iRNA分子透過攝入或注射的*rpb7*傳遞時，其顯示具有致死表型。在本案具體例中，藉由餵食昆蟲傳遞*rpb7* dsRNA的能力賦予對於昆蟲(譬如鞘翅目及半翅目)害蟲管理極為有益的RNAi效應。藉由結合*rpb7*-介導的RNAi和其他有益的RNAi標靶(舉例來說，但不限於**ROP** RNAi標靶，如美國專利申請號14/577,811所述，**RNA聚合酶II** RNAi標靶，如美國專利申請號62/133,214所述，**RNA聚合酶III40** RNAi標靶，如美國專利申請號14/577,854所述，**RNA聚合酶II215** RNAi標靶，如美國專利申請號62/133,202所述，**RNA聚合酶II33** RNAi標靶，如美國專利申請號62/133,210)所述，**ncm** RNAi標靶(美國專利申請號62/095487)，**snap25** RNAi標靶(美國專利申請號62/193502)所述，**COPI alpha** (美國專利申請號62/063199)，**COPI gamma** (美國專利申請號

62/063192), *COPI delta* (美國專利申請號62/063216), *COPI beta* (美國專利申請號62/063203), *dre4* (美國專利申請號61/989843), 轉錄延伸因子*spt5* RNAi標靶, 如美國專利申請號62/168613所述), 以及轉錄延伸因子*spt6* RNAi標靶, 如美國專利申請號62/168606所述), 舉例來說, 以多重作用模式影響多重標靶序列的潛力可增加發展涉及RNAi技術之昆蟲害蟲管理的永續方式的機會。

【0034】本案揭露的是以基因控制昆蟲(譬如鞘翅目及/或半翅目)害蟲侵擾的方法與組成物。亦提供了識別對昆蟲害蟲生命週期不可或缺而用作RNAi-介導之控制昆蟲害蟲群體的標靶基因的一或多個(多個)基因的方法。可設計編碼RNA分子的DNA質體載體, 以壓抑就生長、生存、及/或發育而言不可或缺的一或多個(多個)標靶基因。在一些具體例中, 該RNA分子可能能夠形成dsRNA分子。在一些具體例中, 提供了透過互補至昆蟲害蟲之標靶基因的編碼或非編碼序列的核酸分子在轉錄後抑止表現或抑制標靶基因的方法。在該等與進一步的具體例中, 害蟲可攝入互補至一標靶基因的編碼或非編碼序列的核酸分子的全部或一部分所轉錄的一或多個dsRNA、siRNA、shRNA、miRNA、及/或hpRNA分子, 藉此提供植物保護效應。

【0035】於是, 一些具體例涉及使用互補至(多個)標靶基因的編碼及/或非-編碼序列之dsRNA、siRNA、shRNA、miRNA及/或hpRNA)標靶基因產物表現的序列-特異性抑制, 以達到昆蟲(譬如鞘翅目及/或半翅目)害

蟲的至少部分控制。所揭露的是一組單離與純化的核酸分子，包含，舉例來說，SEQ ID NOs:1；3；5；與78之任一者；以及彼等的至少15個鄰接核苷酸片段所列示之聚核苷酸。在一些具體例中，穩定的dsRNA分子可從該等聚核苷酸、其片段、或包含該等聚核苷酸之一者的基因表現，以供轉錄後靜默或抑制標靶基因。在某些具體例中，單離與純化的核酸分子包含SEQ ID NOs:1、3、5、與78之任一者的全部或至少15個鄰接核苷酸(譬如SEQ ID NOs:7-10與80)，及/或彼等的互補體或反向互補體。

【0036】一些具體例涉及在其基因組具有編碼至少一個(多個) iRNA(譬如dsRNA)分子之至少一個重組DNA的重組宿主細胞(譬如植物細胞)。在特定具體例中，一dsRNA分子可在被昆蟲(譬如鞘翅目及/或半翅目)害蟲攝入時提供，以轉錄後靜默或抑制害蟲標靶基因的表現。該重組DNA可包含，舉例來說，SEQ ID NOs:1、3、5、7-10、78與80之任一者；SEQ ID NOs:1、3、5、7-10、78與80之任一者的至少15個鄰接核苷酸片段；以及由包含SEQ ID NOs:1、3、5、7-10、78與80之一的基因部分序列構成的聚核苷酸；及/或彼等的互補體或反向互補體。

【0037】一些具體例涉及在其基因組具有編碼至少一個(多個) iRNA(譬如dsRNA)分子之重組DNA的重組宿主細胞，該iRNA包含SEQ ID NOs:86-88與93之任一者所編碼的全部或至少15個鄰接核苷酸(譬如選自包含SEQ ID NOs:89-92與94群組的至少一聚核苷酸)，或彼等的互補體

或反向互補體。在被昆蟲(譬如鞘翅目及/或半翅目)害蟲攝入時，該(多個) iRNA分子可靜默或抑制害蟲之標靶*rpb7* DNA (譬如包含選自於由SEQ ID NOs:1、3、5、7-10、78、與80所構成群組之聚核苷酸的全部或至少15個鄰接核苷酸的DNA)的表現，藉此導致害蟲停止生長、發育、生存、及/或進食。

【0038】 在一些具體例中，在其基因組具有編碼能夠形成dsRNA分子之至少一個RNA分子的至少一個重組DNA的重組宿主細胞可為經轉形之植物細胞。一些具體例涉及包含此類經轉形植物細胞的基因轉殖植物。除了此類基因轉殖植物之外，任何基因轉殖植物世代的植物子代、基因轉殖種子、與基因轉殖植物產物皆有提供，其各別包含(多個)重組DNA。在特定具體例中，能夠形成dsRNA分子之RNA分子可在基因轉殖植物細胞中表現。因此，在該等與其他具體例中，dsRNA分子可從基因轉殖植物細胞單離。在特定具體例中，該基因轉殖植物為選自包含下列之群組的植物：玉米(*Zea mays*)、大豆(*Glycine max*)、棉花、與禾本科(*Poaceae*)植物。

【0039】 一些具體例涉及用於調節在昆蟲(譬如鞘翅/或半翅目)害蟲細胞內之標靶基因的表現的方法。在該等與其他具體例中，可提供核酸分子，其中該核酸分子包含編碼能夠形成dsRNA分子之RNA分子的一聚核苷酸。在特定具體例中，編碼能夠形成dsRNA分子之RNA分子的一聚核苷酸可操作性地聯結至一啟動子，亦可操作性地聯結至一

轉錄終止序列。在特定具體例中，用於調節在昆蟲害蟲細胞內之標靶基因的表現的方法：(a)以包含編碼能夠形成dsRNA分子之RNA分子的一聚核苷酸的載體轉形一植物細胞；(b)在足以容許包含複數個經轉形之植物細胞的植物細胞培養物發育的條件下培養該經轉形之植物細胞；(c)選擇已將該至少一聚核苷酸整合至其基因組中的經轉形植物細胞；及(d)測定該經選擇之經轉形植物細胞包含該載體之聚核苷酸所編碼之能夠形成dsRNA分子的RNA分子。一植物可從一植物細胞再生，該植物細胞具有被整合至其基因組中之該載體且包含該載體之聚核苷酸所編碼之dsRNA分子。

【0040】於是，亦揭露的是包含一載體的基因轉殖植物，其載體具有一整合至其基因組中的聚核苷酸，該聚核苷酸編碼能夠形成dsRNA分子之RNA分子，其中該基因轉殖植物包含載體聚核苷酸所編碼的dsRNA分子。在特定具體例中，能夠在植物形成dsRNA分子之RNA分子的表現係足以調節接觸該經轉形植物或植物細胞(舉例來說，在經轉形植物、一部分的植物(譬如根部)或植物細胞上進食)的昆蟲(譬如鞘翅目或半翅目)害蟲細胞標靶基因的表現，俾使害蟲的生長及/或存活受到抑制。本案揭露的基因轉殖植物可展現對昆蟲害蟲侵擾的防範及/或增強之防範。特定的基因轉殖植物可展現免於選自於由下列所構成群組之一或多個鞘翅目及/或(多個)半翅目害蟲的防範及/或增強之防範：WCR；BSB；NCR；SCR；MCR；黃瓜條葉甲；特

氏斑點黃瓜條葉甲；曼氏斑點黃瓜條葉甲；南美條葉甲；褐臭椿(Say)；稻綠椿(L.)；紅肩綠椿(Westwood)；褐翅椿(Stål)；綠椿(Say)；馬格那椿(Palisot de Beauvois)；馬勒卡椿(Dallas)；弗卡待克椿(F.)；地中海椿(F.)；新熱帶紅肩綠椿(F.)；諾比蟲(Berg)；斑椿(Berg)；秘魯紅椿(Guérin-Ménéville)；擬新扭白蟻(Westwood)；葉足蟲(Dallas)；尼氏蟲(F.)；草盲椿(Knight)；和美國牧草盲椿(Palisot de Beauvois)。

【0041】本案亦揭露的是對昆蟲(譬如鞘翅目或半翅目)害蟲投遞控制劑，例如一iRNA分子的方法。此類控制劑可直接或間接地造成昆蟲害蟲群體進食、生長、或以其他方式造成宿主損傷的能力受到損害。在一些具體例中，提供了包含投遞穩定的dsRNA分子至昆蟲害蟲以壓抑害蟲之至少一個標靶基因的方法，藉此得到RNAi並減少或消除害蟲宿主的植物損傷。在一些具體例中，抑制昆蟲害蟲之標靶基因的表現的方法可造成害蟲停止生長、存活、及/或發育。

【0042】在一些具體例中，提供了包含一iRNA(譬如dsRNA)分子的組成物(譬如局部組成物)，其在植物、動物內、及/或植物或動物的環境內使用，以達到消除或減少昆蟲(譬如鞘翅目或半翅目)害蟲侵擾。在特定具體例中，該組成物可為欲餵食昆蟲害蟲的營養組成物或食物來源。欲餵食昆蟲害蟲的營養組成物或食物來源可以是，舉例來說，但不限於，RNAi誘餌或包含iRNA分子的植物細胞或

組織。一些具體例包含製作害蟲可取得的營養組成物或食物來源。攝入包含iRNA分子的組成物可造成害蟲的一或多個細胞攝取該分子，其可繼而造成抑制害蟲的(多個)細胞之至少一個標靶基因表現。藉由在害蟲宿主內提供包含一iRNA分子的一或多個組成物，在存在有害蟲的任何宿主組織或環境內或上之昆蟲害蟲侵擾所致的植物或植物細胞的攝入或損傷可能受限或消除。

【0043】當dsRNA和食物或引誘劑或兩者混合時，形成了RNAi誘餌。當害蟲吃誘餌時，它們亦食用dsRNA。誘餌可以採取顆粒、凝膠、可流動粉末、液體、或固體的形式。在另一具體例中，*rpb7*可以併入誘餌調配物中，例如在美國專利號8,530,440中所述，茲此以參照方式併入本文。一般而言，藉由誘餌，將誘餌放置在昆蟲害蟲的環境中或周圍，舉例來說，WCR可和誘餌接觸及/或被吸引。

【0044】本案所述的組成物與方法可連同其他方法與組成物一起使用，以控制昆蟲(譬如鞘翅目或半翅目)害蟲所致的損傷。舉例來說，本案所述用於保護植物免於昆蟲害蟲的一iRNA分子可用於包含額外使用下列的方法：有效抵抗昆蟲害蟲的一或多個化學劑、有效抵抗此類害蟲的生物農藥、輪作、其他iRNA分子的重組表現、及/或展現不同於RNAi-介導方法之特徵的特徵的重組基因技術與RNAi組成物(譬如在植物中重組製造對昆蟲害蟲有害的蛋白質(譬如*Bt*毒素、PIP-1多肽(參閱，譬如美國專利公開號US 2014/0007292 A1)、及/或AflP多肽(參閱，譬如美國

專利公開號US 2104/0033361 A1))。

II. 縮寫

BSB	英雄美洲蟥(<i>Euschistus heros</i>)
dsRNA	雙股核糖核酸
GI	生長抑制
NCBI	國家生技資訊中心
gDNA	基因組去氧核糖核酸
iRNA	抑制性核糖核酸
ORF	開放讀取框
RNAi	核糖核酸干擾
miRNA	微型核糖核酸
shRNA	短髮夾核糖核酸
siRNA	小型抑制性核糖核酸
hpRNA	髮夾核糖核酸
UTR	未轉譯區
WCR	西方玉米根蟲
NCR	北方玉米根蟲
MCR	墨西哥玉米根蟲
PCR	聚合酶鏈反應
qPCR	定量聚合酶鏈反應
RISC	RNA-誘發的靜默複合體
SCR	南方玉米根蟲
SEM	平均值的標準誤差
YFP	黃色螢光蛋白

III. 術語

【0045】在以下說明與表格中，使用眾多術語。為了提供對說明書與專利申請範圍，包括此類術語給定的範疇的清楚與一致性理解，提供了下列定義：

【0046】鞘翅目害蟲：用於本案時，術語「鞘翅目害蟲」指的是鞘翅目的害蟲昆蟲，包括條葉甲屬的害蟲昆蟲，其食用農業作物與作物產物，包括玉米與其他真草。在特定例子中，一鞘翅目害蟲係選自包含下列的清單：西方玉米根蟲(WCR)；北方玉米根蟲(NCR)；南方玉米根蟲(SCR)；墨西哥玉米根蟲(MCR)；黃瓜條葉甲；特氏斑點黃瓜條葉甲；曼氏斑點黃瓜條葉甲；和南美條葉甲。

【0047】接觸(到一生物)：用於本案時，提到核酸分子，術語「接觸到」或「被攝入」一生物(譬如鞘翅目或半翅目害蟲)包括核酸分子內化進入生物，舉例來說且不設限：該分子被該生物攝入(譬如藉由食用)；以包含該核酸分子的組成物接觸該生物；以包含該核酸分子的溶液浸泡生物。

【0048】重疊群(Contig)：用於本案時，術語「重疊群」指的是從衍生自單一基因來源的一組重疊DNA區段重新建構的DNA序列。

【0049】玉米植物：用於本案時，術語「玉米植物」指的是物種玉米(玉蜀黍)的植物。

【0050】表現：用於本案時，編碼聚核苷酸(舉例來說，基因或轉殖基因)的「表現」指的是一過程，藉由該過

程，核酸轉錄單元(包括，譬如gDNA或cDNA)的編碼訊息轉換成細胞的操作性、非操作性、或結構部分，時常包括蛋白質的合成。基因表現可藉由外部信號影響；舉例來說，使細胞、組織、或生物暴露至增加或減少基因表現之藥劑。基因的表現亦可在從DNA至RNA至蛋白質的途徑的當中任何地方受到調控。基因表現的調控發生在，舉例來說，經由作用在轉錄、轉譯、運送與加工、中介分子，例如mRNA的降解上來控制、或經由活化、去活化、隔室化、或已製作特定蛋白質分子後的降解、或藉由彼等的任何組合。基因表現可藉由本領域習知的任何方法於RNA位準或蛋白質位準測量，包括但不限於北方墨點法、RT-PCR、西方墨點法、或(多個)體外、原位、或體內蛋白質活性試驗。

【0051】基因材料：用於本案時，術語「基因材料」包括所有基因、與核酸分子，例如DNA與RNA。

【0052】半翅目害蟲：用於本案時，術語「半翅目害蟲」指的是半翅目的害蟲昆蟲，包括，舉例來說但不限於，蟪科(Pentatomidae)、盲蟪科(Miridae)、紅蟪科(Pyrrhocoridae)、緣蟪科(Coreidae)、蛛緣蟪科(Alydidae)、與姬緣蟪科(Rhopalidae)的昆蟲，其食用廣泛範圍的宿主植物並具有刺吸式口器。在特定例子中，半翅目害蟲選自包含下列清單：英雄美洲蟪(新熱帶褐椿)、稻綠椿象(南方綠椿)、紅肩綠蟪(紅帶蟪象)、褐翅椿(褐翅椿象)、綠椿(綠椿象)、褐臭椿(褐椿象)、馬勒卡椿、弗卡

待克蟪、地中海椿、新熱帶紅肩綠蟪(新熱帶紅肩綠蟪象)、馬格那椿、諾比蟲(棉花蟲)、斑蟪、秘魯紅蟪、擬新扭白蟻、葉足蟲、尼氏蟲、草盲蟪(西部牧草盲蟪)、和美國牧草盲蟪。

【0053】抑制：用於本案時，術語「抑制」—在用於說明針對編碼聚核苷酸(舉例來說，基因)效應時—指的是編碼聚核苷酸所轉錄的mRNA細胞位準及/或該編碼聚核苷酸的肽、多肽、或蛋白質產物之可測得減量。在一些例子中，編碼聚核苷酸的表現可受到抑制，俾使表現大致上被消除。「特異性抑制」指的是抑制標靶編碼聚核苷酸而不因而影響細胞內的其他編碼聚核苷酸(譬如基因)的表現，其中該特異性抑制係於該細胞內達成。

【0054】昆蟲：在本案論及害蟲使用時，術語「昆蟲害蟲」明確地包括鞘翅目昆蟲害蟲。在一些實施例中，術語「昆蟲害蟲」明確地指稱選自包含下列名單的條葉甲屬(*Diabrotica*)鞘翅目害蟲：西方玉米根蟲(WCR)；北方玉米根蟲(NCR)；南方玉米根蟲(SCR)；墨西哥玉米根蟲(MCR)；黃瓜條葉甲；特氏斑點黃瓜條葉甲；曼氏斑點黃瓜條葉甲；和南美條葉甲。在一些具體例中，該術語亦包括一些其他昆蟲害蟲；譬如半翅目昆蟲害蟲。

【0055】單離：—「單離」生物組分(例如核酸或蛋白質)已從該組分天然存在之生物細胞內的其他生物組分實質上分離、製造、或純化(即，其他染色體與染色體外DNA與RNA、和蛋白質)，同時在該組分產生化學或功能變化

(譬如一核酸可藉由打斷連結該核酸至染色體其餘DNA的化學鍵而從染色體單離)。已被「單離」的核酸分子與蛋白質包括藉由標準純化方法純化的核酸分子與蛋白質。該術語亦涵括藉由在宿主細胞重組表現製備的核酸與蛋白質，以及化學合成的核酸分子、蛋白質、與肽。

【0056】 核酸分子：用於本案時，術語「核酸分子」可指稱核苷酸的聚合形式，其可包括RNA、cDNA、gDNA的正股與反股，以及合成形式與上述的混合聚合物。一核苷酸或核鹼基可指稱核糖核苷酸、去氧核糖核苷酸、或兩類核苷酸的修飾形式。「核酸分子」在用於本案時係同義於「核酸」與「聚核苷酸」。核酸分子通常為至少10個鹼基長度，除非另有指明。慣例上，核酸分子的核苷酸序列係自分子5'端讀至3'端。核酸分子的「互補體」指的是具有可和該核酸分子的核鹼基形成鹼基對(即，A-T/U、與G-C)的核鹼基的一聚核苷酸。

【0057】 一些具體例包括包含一模板DNA的核酸，其係轉錄成一RNA分子，其為一mRNA分子的互補體。在該等具體例中，該轉錄成mRNA分子的核酸的互補體係以5'至3'方向出現，俾使RNA聚合酶(其以5'至3'方向轉錄DNA)將從該互補體轉錄一核酸，其可雜交至mRNA分子的互補體。除另有明確陳述之外，或從上下文清楚看出其他方式，術語「互補體」因此指的是具有可和參考核酸之核鹼基自5'至3'形成鹼基對的核鹼基的聚核苷酸。同樣地，除另有明確陳述之外(或從上下文清楚看出其他方

式)，核酸的「反向互補體」指的是呈相反方向的互補體。
前述係以下列例子展示：

ATGATGATG 聚核苷酸

TACTACTAC 該聚核苷酸的「互補體」

CATCATCAT 該聚核苷酸的「反向互補體」

【0058】本發明一些具體例可包括髮夾RNA-生成RNAi分子。在該等RNAi分子中，RNA干擾所靶向的核酸的互補體與反向互補體可在相同分子找到，俾使單股RNA分子可「折起」且以包含該互補與反向互補聚核苷酸之該區自體雜交。

【0059】「核酸分子」包括所有聚核苷酸，舉例來說：DNA的單-與雙股形式；RNA的單股；及RNA (dsRNA) 的雙股形式。術語「核苷酸序列」或「核酸序列」指的是核酸的正股與反股作為個別單股或位於雙螺旋。術語「核糖核酸(RNA)」包括了iRNA (抑制性RNA)、dsRNA (雙股RNA)、siRNA (小型干擾RNA)、shRNA (小型髮夾RNA)、mRNA (信使RNA)、miRNA (微型-RNA)、hpRNA (髮夾RNA)、tRNA (運送RNAs，無論連同對應醯化胺基酸呈帶電或未帶電)、與cRNA (互補RNA)。術語「去氧核糖核酸」(DNA)包括了cDNA、gDNA、及DNA-RNA雜交物。術語「聚核苷酸」與「核酸」、及彼等的「片段(fragments)」被熟習此藝者理解為包括兩個gDNAs、核糖體RNAs、運送RNAs、信使RNAs、操縱組、以及編碼或可適於編碼肽、多肽、或蛋白質的較小型改造聚核苷酸。

【0060】寡聚核苷酸：寡聚核苷酸為短的核酸聚合物。寡聚核苷酸可藉由切割長的核酸區段、或藉由聚合個別核苷酸前驅物來形成。自動化合成儀允許合成高達數百個鹼基對長度的寡核苷酸。因為寡聚核苷酸可結合至一互補核酸，彼等可用作偵測DNA或RNA的探針。由DNA (寡聚去氧核糖核苷酸)構成的寡聚核苷酸可用於PCR，一種用於擴增DNAs的技術。在PCR中，寡聚核苷酸通常被稱作「引子」，其容許DNA聚合酶延長寡核苷酸並複製互補股。

【0061】一核酸分子可包括藉由天然存在及/或非天然存在的核苷酸聯結方式聯結在一起的天然存在與修飾核苷酸之一或兩者。熟習此藝者將輕易理解到的是，核酸分子可以化學方式或生物方式修飾，或可含有非天然或衍化核苷酸鹼基。此類修飾包括，舉例來說，標記、甲基化、以類似物取代一或多個天然存在核苷酸、核苷酸內修飾(譬如未帶電聯結：舉例來說，甲基磷酸酯、磷酸三酯、胺基磷酸酯、胺基甲酸酯等等；帶電聯結：舉例來說，硫代磷酸酯，二硫代磷酸酯等等；側基部分：舉例來說，肽；內嵌劑：舉例來說，吡啶、補骨脂等等；螯合劑；烷化劑；和修飾性聯接：舉例來說，甲型端基異構核酸等等)。術語「核酸分子」亦包括任何拓撲構形，包括單-股、雙-股、部分地雙螺旋、三螺旋、髮夾型、環型、以及鎖型構形。

【0062】在本案使用時，關於DNA，術語「編碼聚核苷酸」、「結構性聚核苷酸」、或「結構性核酸分子」指的是透過轉錄與mRNA—在置於適當調控元件控制時—最

終轉譯成一多肽的一聚核苷酸。關於RNA，術語「編碼聚核苷酸」指的是轉譯成肽、多肽、或蛋白質的一聚核苷酸。一編碼聚核苷酸的邊界是由5'-端的轉譯起始密碼子與3'-端的轉譯停止密碼子決定。編碼聚核苷酸包括，但不限於：gDNA；cDNA；EST；和重組聚核苷酸。

【0063】用於本案時，「所轉錄的非編碼聚核苷酸」指的是不轉譯成肽、多肽、或蛋白質的mRNA分子區段，例如5'UTR、3'UTR與內含子區段。再者，「所轉錄的非編碼聚核苷酸」指稱轉錄成在細胞發揮功能的RNA的核酸，舉例來說，結構性RNAs (譬如核糖體RNA (rRNA)，例子有5S rRNA、5.8S rRNA、16S rRNA、18S rRNA、23S rRNA、與28S rRNA、及等等)；運送RNA (tRNA)；與snRNAs，例如 U4、U5、U6、及等等。所轉錄的非編碼聚核苷酸亦包括，舉例來說，而不限於，小型RNAs (sRNA)，該術語經常用於說明小型細菌非編碼RNAs；小核仁RNAs (snoRNA)；微型RNAs；小型干擾RNAs (siRNA)；Piwi-交互作用RNAs (piRNA)；與長的非編碼RNAs。又再者，「所轉錄的非編碼聚核苷酸」指稱可原生存在於核酸的基因內「間隔子」且轉錄成RNA分子的聚核苷酸。

【0064】致死RNA干擾：用於本案時，術語「致死RNA干擾」指稱導致，舉例來說，經傳遞dsRNA、miRNA、siRNA、shRNA、及/或hpRNA之個體死亡或降低生存力的RNA干擾。

【0065】基因組：用於本案時，術語「基因組」指稱在細胞細胞核發現的染色體DNA，亦指稱在細胞的亞細胞組分發現的胞器DNA。在本發明一些具體例中，可將DNA分子引進植物細胞，俾使該DNA分子整合至植物細胞的基因組中。在該等與進一步具體例中，該DNA分子可整合至植物細胞的細胞核DNA中、或整合至植物細胞的葉體綠或粒線體DNA中。術語「基因組」在應用至細菌時是指稱細菌細胞的染色體與質體兩者。在本發明一些具體例中，可將DNA分子引進細菌，俾使該DNA分子整合至細菌的基因組。在該等與進一步具體例中，該DNA分子可整合至染色體或定位為或定位於穩定的質體。

【0066】序列一致性：本案針對兩個聚核苷酸或多肽使用的術語「序列一致性」或「一致性」指稱—當在特定比對窗口以最大對應性對齊時—兩分子序列內的相同殘基。

【0067】用於本案時，術語「序列一致性百分比」可指稱在比對窗口比對一分子的兩個最佳化對齊序列(譬如核酸序列或多肽序列)所決定的值，其中在相比於參考序列(其不包含添加或刪除)以供兩個序列的最佳化對齊時，在比對窗口的序列部分可包含添加或刪除(即空隙)。百分比係藉由下列計算：決定兩序列中存在一致性核苷酸或胺基酸殘基的位置數目以生成配對位置數目、將配對位置數目除以比對窗口中的全部位置數目、並將結果乘以100以生成序列一致性百分比。比對參考序列在每個位置皆一致的

序列被稱作和參考序列100%一致，反之亦然。

【0068】對齊序列以供比對的方法在本領域係眾所周知。各式程式與對齊演算法係說明於，舉例來說：Smith and Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482; Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443 ; Pearson and Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444; Higgins and Sharp (1988) *Gene* 73:237-44; Higgins and Sharp (1989) *CABIOS* 5:151-3; Corpet *et al.* (1988) *Nucleic Acids Res.* 16:10881-90; Huang *et al.* (1992) *Comp. Appl. Biosci.* 8:155-65; Pearson *et al.* (1994) *Methods Mol. Biol.* 24:307-31; Tatiana *et al.* (1999) *FEMS Microbiol. Lett.* 174:247-50。序列對齊方法與同源性計算的詳細考量可在譬如Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10找到。

【0069】國家生技資訊中心(NCBI)鹼基局部對齊搜尋工具(Basic Local Alignment Search Tool) (BLAST™; Altschul *et al.* (1990))可得自數個來源，包括國家生技資訊中心(Bethesda, MD)、與網路上，以連同數個序列分析程式使用。如何使用此程式決定序列一致性的說明可在網路上於BLAST™的「幫助(help)」章節取得。就核酸序列比對而言，可使用預設BLOSUM62矩陣設置為預設參數運用BLAST™ (Blastn)程式的「比對兩個序列(Blast 2 sequences)」功能。和參考聚核苷酸序列具甚至更大序列

相似度的核酸在藉此方法評估時將顯示增多之一致性百分比。

【0070】特異性地雜交(Specifically hybridizable)/特異性地互補(Specifically complementary)：用於本案時，術語「特異性地雜交」與「特異性地互補」為指出足夠互補程度，俾使核酸分子與標靶核酸分子之間發生穩定的特異性結合的術語。兩核酸分子之間的雜交涉及在兩核酸分子的核鹼基之間形成反向平行對齊。該兩分子隨後能夠和相對股上的對應鹼基形成氫鍵，而形成使用本領域眾所周知的方法可偵測到的雙螺旋分子，假使該分子足夠穩定。一聚核苷酸不必100%互補於欲特異性地雜交之標靶核酸。然而，必須存在以使雜交具特異性的互補性份量係為所使用雜交條件的函數。

【0071】產生特定嚴苛度的雜交條件將取決於挑選的雜交方法本質和雜交核酸序列的組成物與長度而有所不同。一般而言，雜交溫度與雜交緩衝液的離子強度(尤其是 Na^+ 及/或 Mg^{++} 濃度)將決定雜交嚴苛性，儘管洗滌時間亦影響嚴苛性。關於實現特定嚴苛度所必需的雜交條件的計算係熟習此藝者所習知的，並在舉例來說，Sambrook *et al.* (ed.) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, chapters 9 and 11；與 Hames and Higgins (eds.) *Nucleic Acid Hybridization*, IRL Press, Oxford, 1985中有討論。關於核酸雜交的進一

步詳細指示與指導可在，舉例來說，Tijssen, “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays,” in Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology- Hybridization with Nucleic Acid Probes, Part I, Chapter 2, Elsevier, NY, 1993；與Ausubel *et al.*, Eds., Current Protocols in Molecular Biology, Chapter 2, Greene Publishing and Wiley-Interscience, NY, 1995中找到。

【0072】用於本案時，「嚴苛條件」係涵蓋雜交僅會一在假使雜交分子與標靶核酸分子內的同源性序列之間有少於20%未配對一發生的條件。「嚴苛條件」包括另外的特定嚴苛性位準。於是，用於本案時，「中度嚴苛性」條件為該等具多於20%序列未配對之分子將不會雜交的條件；「高度嚴苛性」條件為該等具多於10%未配對之序列將不會雜交的條件；以及「極高度嚴苛性」條件為該等具多於5%未配對之序列將不會雜交的條件。

【0073】下列為代表性、非設限雜交條件。

【0074】高度嚴苛條件(偵測共享至少90%序列一致性的聚核苷酸)：在5x SSC緩衝液於65 °C雜交16小時；在2x SSC緩衝液於室溫洗滌兩次，各為15分鐘；以及在0.5x SSC緩衝液於65 °C洗滌兩次，各為20分鐘。

【0075】中度嚴苛條件(偵測共享至少80%序列一致性的聚核苷酸)：在5x-6x SSC緩衝液於65-70 °C雜交16-20小時；在2x SSC緩衝液於室溫洗滌兩次，各為5-20

分鐘；以及在1x SSC 緩衝液於55-70 °C洗滌兩次，各為30分鐘。

【0076】非嚴苛控制條件(共享至少50%序列一致性的聚核苷酸將會雜交)：在6x SSC緩衝液於室溫至55 °C雜交16-20小時；在2x-3x SSC緩衝液於室溫至55 °C洗滌至少兩次，各為20-30分鐘。

【0077】用於本案時，關於核酸的術語「實質上同源」或「實質同源性」指稱具有在嚴苛條件下雜交至參考核酸之鄰接核鹼基的聚核苷酸。舉例來說，實質上同源於SEQ ID NOs:1、3、5、7-10、78、與80之任一者的參考核酸的核酸為該等在嚴苛條件下(譬如列舉的中度嚴苛條件，見上文)雜交至參考核酸。實質上同源的聚核苷酸可具有至少80%序列一致性。舉例來說，實質上同源的聚核苷酸可具有約80%至100%序列一致性，例如79%；80%；約81%；約82%；約83%；約84%；約85%；約86%；約87%；約88%；約89%；約90%；約91%；約92%；約93%；約94%；約95%；約96%；約97%；約98%；約98.5%；約99%；約99.5%；及約100%。實質同源性的特性與特異性雜交密切相關。舉例來說，一核酸分子在有足夠互補程度時可特異性地雜交，以避免在特異性結合係為所欲的條件下，舉例來說，在嚴苛雜交條件下，核酸非特異性結合至非標靶聚核苷酸(舉例來說，標靶及/或宿主生物的其他基因組聚核苷酸)。

【0078】用於本案時，術語「同系物(ortholog)」指

稱在二或多個物種內從共同祖先核酸演化並在該二或多個物種內可保留相同功能的基因。

【0079】用於本案時，當聚核苷酸的每一個核苷酸以5'至3'方向讀取時係互補於另一聚核苷酸的每一個核苷酸以3'至5'方向讀取時，兩個核酸分子被稱為展現「完全互補性」。互補於參考聚核苷酸的聚核苷酸將展現和參考聚核苷酸的反向互補體的序列一致性。該等術語與說明在本領域中係明確定義且為具本領域通常知識者所容易理解的。

【0080】操作性地聯結(Operably linked)：當一第一聚核苷酸與一第二聚核苷酸呈功能性關聯時，該第一聚核苷酸係和該第二聚核苷酸操作性地聯結。當重組地製造時，以及，在有必要接合在相同讀取框(譬如在轉譯融合的ORF)的兩蛋白質-編碼區域時，操作性地聯結的核酸序列一般為鄰接。然而，核酸不需鄰接以操作性地聯結。

【0081】在提及調控基因元件與編碼聚核苷酸所使用的術語「操作性地聯結」意指調控元件影響所聯結編碼聚核苷酸的表現。「調控元件」或「控制元件」指稱影響轉錄時點與位準/份量、RNA加工或穩定性、或相連編碼聚核苷酸轉譯的聚核苷酸。調控元件可包括啟動子；轉譯前導子；內含子；增強子；主幹-環圈結構；抑制子結合聚核苷酸；帶有終止序列的聚核苷酸；帶有聚腺苷酸化識別序列的聚核苷酸；等等。特定調控元件可位於操作性地聯結至彼等的編碼聚核苷酸上游及/或下游。又，操作性地聯

結至一編碼聚核苷酸的特定調控元件可位於雙股核酸分子的相連互補股上。

【0082】啟動子：用於本案時，術語「啟動子」指稱可在轉錄起點上游且可涉及啟始轉錄的RNA聚合酶與其他蛋白之識別與結合的DNA區域。一啟動子可操作性地聯結至一編碼聚核苷酸以供在細胞中表現、或一啟動子可操作性地聯結至一編碼信號肽的聚核苷酸，該信號肽可操作性地聯結至一編碼聚核苷酸以供在細胞中表現。「植物啟動子」可為能夠在植物細胞內啟始轉錄的啟動子。在發育控制之下的啟動子例子包括偏好在某些組織啟始轉錄的啟動子，例如葉、根、種子、纖維、木質部導管、管胞、或厚壁組織。此類啟動子被稱作「組織-偏好性(tissue-preferred)」。僅在某些組織啟始轉錄的啟動子被稱作「組織-特異性(tissue-specific)」。「細胞類型-特異性」啟動子主要驅動在一或多個器官中的某些細胞類型的表現，舉例來說，根或葉中的維管束細胞。「可誘發」啟動子可為可受到環境控制的啟動子。藉由可誘發啟動子可啟始轉錄的環境條件例子包括厭氧條件與光照。組織-特異性、組織-偏好性、細胞類型-特異性、及可誘發啟動子構成「非-組成性」啟動子類別。「組成性」啟動子是在大多數的環境條件下或在大多數組織或細胞類型中可具有活性的啟動子。

【0083】任何可誘發啟動子可用於本發明的一些具體例。見 Ward *et al.* (1993) Plant Mol. Biol.

22:361-366。藉由可誘發啟動子，回應誘發劑的轉錄率增加了。例示性可誘發啟動子包括，但不限於：回應銅的來自ACEI系統的啟動子；回應苯磺醯胺除草劑安全劑的來自玉米的***In2***基因；來自Tn10的Tet抑制子；與來自類固醇激素基因的可誘發啟動子，其轉錄活性可被糖皮質類固醇激素誘發(Schena *et al.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:0421)。

【0084】例示性組成啟動子包括，但不限於：來自植物病毒的啟動子，例如來自花椰菜鑲嵌病毒(CaMV)的35S啟動子；來自水稻肌動蛋白基因的啟動子；泛素啟動子；pEMU；MAS；玉蜀黍H3組蛋白啟動子；與ALS啟動子，***Xba1/NcoI***片段5'至油菜***ALS3***結構基因(或類似於該***Xba1/NcoI***片段的聚核苷酸)(國際PCT公開號WO96/30530)。

【0085】此外，任何組織-特異性或組織-偏好性啟動子可利用在本發明的一些具體例。以包含操作性地聯結至一組織特異性啟動子之一編碼聚核苷酸的核酸分子轉形的植物可在特定組織中專一地、或偏好地製造所編碼聚核苷酸的產物。例示性組織-特異性或組織-偏好性啟動子包括，但不限於：種子-偏好性啟動子，例如來自菜豆基因者；葉-特異性與光-誘發啟動子，例如來自***cab***或植物加氧酶(***rubisco***)的啟動子；花粉囊-特異性啟動子，例如來自***LAT52***者；花粉-特異性啟動子，例如來自***Zm13***者；以及小孢子-偏好性啟動子，例如來自***apg***者。

【0086】大豆植物：用於本案時，術語「大豆植物」指稱大豆屬 (*Glycine*) 物種的植物，舉例來說，大豆 (*Glycine max*)。

【0087】轉形(Transformation)：用於本案時，術語「轉形」或「轉導」指稱轉移一或多個(複數個)核酸分子進入細胞。當一核酸分子變成穩定被一細胞複製時，無論藉由核酸分子併入細胞基因組、或藉由游離基因複製，則該細胞被轉導進入細胞的該核酸分子「轉形」。用於本案時，術語「轉形」涵蓋可藉以將一核酸分子引進此類細胞的所有技術。例子包括，但不限於：以病毒載體轉染；以質體載體轉形；電穿孔(Fromm *et al.* (1986) *Nature* 319:791-3)；脂質轉染(Felgner *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7)；顯微注射(Mueller *et al.* (1978) *Cell* 15:579 85)；農桿菌-介導的轉移(Fraley *et al.* (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4803-7)；直接DNA攝取；以及微彈轟擊(Klein *et al.* (1987) *Nature* 327:70)。

【0088】轉殖基因(Transgene)：一外源性核酸。在一些例子中，一轉殖基因可為編碼能夠形成dsRNA分子之RNA的一或兩(多)股的DNA，其包含互補於在鞘翅目及/或半翅目害蟲中所找到的核酸分子的聚核苷酸。在一些例子中，轉殖基因可為反股聚核苷酸，其中該反股聚核苷酸的表現抑制標靶核酸的表現，藉此產生RNAi表型。在一些例子中，轉殖基因可為結構基因(譬如除草劑-耐受基

因、編碼工業上或藥學上有用化合物的基因、或編碼所欲農業性狀的基因)。在該等與其他例子中，轉殖基因可含有操作性地聯結至該轉殖基因的編碼聚核苷酸的調控元件(譬如啟動子)。

【0089】載體(Vector)：一種引進細胞—舉例來說—以製造轉形細胞的核酸分子。一載體可包括容許其在宿主細胞內複製的基因元件，例如複製起點。載體的例子包括，但不限於：攜帶外源性DNA進入細胞的質體；黏接質體；噬菌體；或病毒。一載體亦可包括一或多個基因，包括本領域習知製造反股分子、及/或可擇標記基因及其他基因元件。一載體可轉導、轉形、或轉染細胞，藉此致使該細胞表現該載體所編碼的核酸分子及/或蛋白質。一載體任擇地包括有助於實現核酸分子進入細胞的材料(譬如脂質體、蛋白質外衣等等)。

【0090】產量(Yield)：在相同生長位置於相同時間與相同條件下生長，相較於檢查品種產量之約100%或更大穩定產量。在特定具體例中，「改良之產量(improved yield)」或「改良產量(improving yield)」意指—在含有有損於在相同時間與相同條件下生長的作物的鞘翅目及/或半翅目害蟲顯著密度的相同生長位置—具有相較於檢查品種產量之105%或更大穩定產量的栽培種，其為本案組成物與方法所靶向。

【0091】除明確指示或暗示以外，術語「一(a)」、「一(an)」、與「該(the)」用於本案時象徵「至少一個」。

【0092】除非另有明確解釋，否則本案使用的所有技術性與科學性術語係具有本揭示內容所屬領域中具有通常技藝者所一般理解的相同意義。分子生物學中的常用術語定義可在，舉例來說，Lewin's Genes X, Jones & Bartlett Publishers, 2009 (ISBN 10 0763766321)；Krebs *et al.* (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9)；與 Meyers R.A. (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference, VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8)找到。所有百分比係以重量計且所有溶劑混合物比例係以體積計，除非另有註記。所有溫度為攝氏度。

IV. 包含昆蟲害蟲序列的核酸分子

A. 概觀

【0093】本案所揭露的是可用於控制昆蟲害蟲的核酸分子。在一些例子中，該昆蟲害蟲為鞘翅目(譬如條葉甲屬的物種)或半翅目(譬如美洲蟥屬的物種)昆蟲害蟲。所述核酸分子包括標靶聚核苷酸(譬如原生基因、與非編碼聚核苷酸)、dsRNAs、siRNAs、shRNAs、hpRNAs、與miRNAs。舉例來說，dsRNA、siRNA、miRNA、shRNA、及/或hpRNA分子係在一些具體例中說明，該等可特異性地互補至鞘翅目及/或半翅目害蟲內一或多個原生核酸的全部或部分。在該等與進一步具體例中，(多個)原生核酸可為一或多個(多個)標靶基因，其產物可為，舉例來說而

不限於：涉及代謝過程或涉及幼蟲/若蟲發育。本案所述核酸分子—當被引進包含該核酸分子所特異性地互補之至少一個(多個)原生核酸的細胞時—可啟始細胞的RNAi，結果減少或消除該(多個)原生核酸的表現。在一些例子中，特異性地互補至標靶基因之核酸分子所致的減少或消除該標靶基因表現可造成減少或停止害蟲生長、發育、及/或進食。

【0094】 在一些具體例中，在昆蟲害蟲的至少一個標靶基因可被選定，其中該標靶基因包含*rpb7*聚核苷酸。在特定例子中，在鞘翅目害蟲的一標靶基因被選定，其中該標靶基因包含選自SEQ ID NOs:1、3、5、與7-10的一聚核苷酸。在特定例子中，在半翅目害蟲的一標靶基因被選定，其中該標靶基因包含選自SEQ ID NOs:78的聚核苷酸及/或SEQ ID NO:80的聚核苷酸。

【0095】 在一些具體例中，一標靶基因可為包含可以電腦模擬(*in silico*)反向轉譯成包含和*rpb7*聚核苷酸的蛋白產物胺基酸序列至少約85%一致(譬如至少84%、85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約100%、或100%一致)的鄰接胺基酸序列之多肽的聚核苷酸的核酸分子。一標靶基因可為昆蟲害蟲的任何*rpb7*核酸，彼等的轉錄後抑制對害蟲的生長、存活、及/或生存具有不利效應，舉例來說，提供植物抵抗害蟲的保護益處。在特定例子中，一標靶基因是包含可以電腦模擬反向轉譯成包含和SEQ ID NO:2；SEQ ID NO:4；SEQ ID NO:6；或SEQ ID NO:79之胺基酸序列至少約85%一致、約90%一

致、約95%一致、約96%一致、約97%一致、約98%一致、約99%一致、約100%一致、或100%一致的鄰接胺基酸序列之多肽的聚核苷酸的核酸分子。

【0096】根據本發明所提供的是DNAs，其表現產生RNA分子，該RNA分子包含特異性地互補至昆蟲(譬如鞘翅目及/或半翅目)害蟲之一編碼聚核苷酸所編碼的一原生RNA分子的全部或一部分的聚核苷酸。在一些具體例中，在表現的RNA分子被昆蟲害蟲攝入後，可獲得害蟲細胞的編碼聚核苷酸被向下調控。在特定具體例中，昆蟲害蟲細胞的編碼聚核苷酸被向下調控可造成對害蟲生長及/或發育的不利效應。

【0097】在一些具體例中，標靶聚核苷酸包括所轉錄的非編碼RNAs，例如5'UTRs；3'UTRs；剪接前導子；內含子；外含子(outron) (譬如之後在反向剪接修飾的5'UTR RNA)；予體子(donatrons) (譬如提供用於反向剪接的予體序列所需的非編碼RNA)；以及標靶昆蟲害蟲基因的其他非編碼的經轉錄RNA。此類聚核苷酸可衍生自單順反子和多順反子基因。

【0098】於是，本案亦連同一些具體例說明的是iRNA分子(譬如dsRNAs、siRNAs、miRNAs、shRNAs、與hpRNAs)，其包含特異性地互補至昆蟲(譬如鞘翅目及/或半翅目)害蟲內一標靶核酸之全部或一部分的至少一聚核苷酸。在一些具體例中，一iRNA分子可包含互補至複數個標靶核酸之全部或一部分的(多個)聚核苷酸；舉例來

說，2、3、4、5、6、7、8、9、10、或更多個標靶核酸。在特定具體例中，一iRNA分子可在體外、或在例如植物或細菌之基因改造生物體內製造。亦揭露了可用於製造特異性地互補至昆蟲害蟲內一標靶核酸之全部或一部分的dsRNA分子、siRNA分子、miRNA分子、shRNA分子、及/或hpRNA分子的cDNAs。另外說明了用於達到特定宿主標靶穩定轉形的重組DNA構築體。經轉形宿主標靶可表現來自該重組DNA構築體的dsRNA、siRNA、miRNA、shRNA、及/或hpRNA分子的有效位準。因此，也說明了一植物轉形載體，其包含操作性地聯結至在植物細胞內發揮功能的一異源性啟動子的至少一聚核苷酸，其中(多個)聚核苷酸的表現產生包含特異性地互補至昆蟲害蟲內一標靶核酸之全部或一部分的一串鄰接核鹼基RNA分子。

【0099】在特定例子中，可用來控制昆蟲(譬如鞘翅目及/或半翅目)害蟲的核酸分子可包括：單離自條葉甲屬包含*rpb7*聚核苷酸的一原生核酸之全部或至少15個鄰接核苷酸(譬如SEQ ID NOs:1、3、與5之任一者)；在表現時產生包含特異性地互補至條葉甲屬*rpb7*所轉錄的一原生RNA分子之全部或至少15個鄰接核苷酸的一聚核苷酸的RNA分子的DNAs；包含特異性地互補至條葉甲屬*rpb7*之全部或至少15個鄰接核苷酸的至少一聚核苷酸的iRNA分子(譬如dsRNAs、siRNAs、miRNAs、shRNAs、與hpRNAs)；可用於製造特異性地互補至條葉甲屬*rpb7*之全部或至少15個鄰接核苷酸的dsRNA分子、siRNA分子、

miRNA分子、shRNA分子、及/或hpRNA分子的cDNAs；單離自英雄美洲蟥包含*rpb7*聚核苷酸的一原生核酸之全部或至少15個鄰接核苷酸(譬如SEQ ID NO:78)；在表現時產生特異性地互補至英雄美洲蟥*rpb7*所轉錄的一原生RNA分子之全部或至少15個鄰接核苷酸的一聚核苷酸的RNA分子的DNAs；包含特異性地互補至英雄美洲蟥*rpb7*之全部或至少15個鄰接核苷酸的至少一聚核苷酸的iRNA分子；可用於製造特異性地互補至英雄美洲蟥*rpb7*之全部或一部分的dsRNA分子、siRNA分子、miRNA分子、shRNA分子、及/或hpRNA分子的cDNAs；和用於達到特定宿主標靶穩定轉形的重組DNA構築體，其中一經轉形宿主標靶包含前述核酸分子之一或多者。

B. 核酸分子

【0100】具體例尤其包括抑制昆蟲(譬如鞘翅目及/或半翅目)害蟲的細胞、組織、或器官之標靶基因表現的iRNA分子(譬如dsRNA、siRNA、miRNA、shRNA、與hpRNA)；和能夠在細胞或微生物表現成iRNA分子的DNA分子，以抑制昆蟲害蟲的細胞、組織、或器官之標靶基因表現。

【0101】本發明一些具體例提供一種單離核酸分子，其包含選自於由下列所構成之群組的至少一個(譬如一、二、三、或更多個)(多個)聚核苷酸：SEQ ID NOs:1、3、與5；SEQ ID NOs:1、3、與5之任一者的互補體或反向互補體；SEQ ID NOs:1、3、與5之任一者的至少15個鄰接核苷酸片段(譬如SEQ ID NOs:7-10之任一者)；SEQ

ID NOs:1、3、與5之任一者的至少15個鄰接核苷酸片段的互補體或反向互補體；包含SEQ ID NOs:7-10之任一者的條葉甲屬生物(譬如WCR)原生編碼聚核苷酸；包含SEQ ID NOs:7-10之任一者的條葉甲屬生物原生編碼聚核苷酸的互補體或反向互補體；包含SEQ ID NOs:7-10之任一者的條葉甲屬生物原生編碼聚核苷酸的至少15個鄰接核苷酸片段；以及包含SEQ ID NOs:7-10之任一者的條葉甲屬生物原生編碼聚核苷酸的至少15個鄰接核苷酸片段的互補體或反向互補體。

【0102】本發明一些具體例提供一種單離核酸分子，其包含選自於由下列所構成之群組的至少一個(譬如一、二、三、或更多個)(多個)聚核苷酸：SEQ ID NO:78；SEQ ID NO:78的互補體或反向互補體；SEQ ID NO:78的至少15個鄰接核苷酸片段(譬如SEQ ID NO:80)；SEQ ID NO:78的至少15個鄰接核苷酸片段的互補體或反向互補體；包含SEQ ID NO:80的半翅目生物(譬如BSB)原生編碼聚核苷酸；包含SEQ ID NO:80的半翅目生物原生編碼聚核苷酸的互補體或反向互補體；包含SEQ ID NO:80的半翅目生物原生編碼聚核苷酸的至少15個鄰接核苷酸片段；以及包含SEQ ID NO:80的半翅目生物原生編碼聚核苷酸的至少15個鄰接核苷酸片段的互補體或反向互補體。

【0103】在特定具體例中，昆蟲(譬如鞘翅目及/或半翅目)害蟲接觸或攝入該單離聚核苷酸所轉錄的iRNA抑制

該害蟲的生長、發育、及/或進食。在一些具體例中，該昆蟲的接觸或攝入係透過進食包含該iRNA的植物材料或誘餌(「RNAi誘餌」)來發生。在一些具體例中，該昆蟲的接觸或攝入係透過以包含該iRNA的組成物噴灑包含該昆蟲的植物來發生。

【0104】 在一些具體例中，本發明的一單離核酸分子可包含選自於由下列所構成之群組的至少一個(譬如一、二、三、或更多個)(多個)聚核苷酸：SEQ ID NO:86；SEQ ID NO:86的互補體或反向互補體；SEQ ID NO:87；SEQ ID NO:87的互補體或反向互補體；SEQ ID NO:88；SEQ ID NO:88的互補體或反向互補體；SEQ ID NO:89；SEQ ID NO:89的互補體或反向互補體；SEQ ID NO:90；SEQ ID NO:90的互補體或反向互補體；SEQ ID NO:91；SEQ ID NO:91的互補體或反向互補體；SEQ ID NO:92；SEQ ID NO:92的互補體或反向互補體；SEQ ID NO:93；SEQ ID NO:93的互補體或反向互補體；SEQ ID NO:94；SEQ ID NO:94的互補體或反向互補體；SEQ ID NOs:86-94之任一者的至少15個鄰接核苷酸片段；SEQ ID NOs:86-94之任一者的至少15個鄰接核苷酸片段的互補體或反向互補體；包含SEQ ID NOs:89-92之任一者的條葉甲屬生物原生編碼聚核苷酸；包含SEQ ID NOs:89-92之任一者的條葉甲屬生物原生編碼聚核苷酸的互補體或反向互補體；包含SEQ ID NOs:89-92之任一者的條葉甲屬生物原生編碼聚核苷酸的至少15個鄰接核苷酸片段；包含SEQ ID

NOs:89-92之任一者的條葉甲屬生物原生編碼聚核苷酸的至少15個鄰接核苷酸片段的互補體或反向互補體；包含SEQ ID NO:94的美洲蟥屬生物原生編碼聚核苷酸；包含SEQ ID NO:94的美洲蟥屬生物原生編碼聚核苷酸的互補體或反向互補體；包含SEQ ID NO:94的美洲蟥屬生物原生編碼聚核苷酸的至少15個鄰接核苷酸片段；以及包含SEQ ID NO:94的美洲蟥屬生物原生編碼聚核苷酸的至少15個鄰接核苷酸片段的互補體或反向互補體。

【0105】在某些具體例中，本發明所提供的dsRNA分子包含互補至來自包含SEQ ID NOs:1、3、5、與78之任一者的標靶基因、與彼等的至少15個鄰接核苷酸片段的聚核苷酸的一轉錄體，抑制昆蟲害蟲內的該標靶基因造成減少或去除就害蟲的生長、發育、或其他生物功能而言不可或缺的多肽或聚核苷酸物質。一選定聚核苷酸可展現和SEQ ID NOs:1、3、5、與78之任一者；SEQ ID NOs:1、3、5、與78之任一者的至少15個鄰接核苷酸片段；及前述任一者的互補體或反向互補體之約80%至約100%的序列一致性。舉例來說，一選定聚核苷酸可展現和SEQ ID NOs:1、3、5、與78之任一者；SEQ ID NOs:1、3、5、與78之任一者的至少15個鄰接核苷酸片段(譬如SEQ ID NOs:7-10、與80)；以及前述任一者的互補體或反向互補體之79%；80%；約81%；約82%；約83%；約84%；約85%；約86%；約87%；約88%；約89%；約90%；約91%；約92%；約93%；約94% 約95%；約96%；約97%；約98%；

約98.5%；約99%；約99.5%；或約100%的序列一致性。

【0106】 在一些具體例中，能夠在細胞或微生物表現成iRNA分子以抑制標靶基因表現的一DNA分子可包含特異性地互補至在一或多個標靶昆蟲害蟲物種(譬如鞘翅目或半翅目害蟲物種)發現的一原生聚核苷酸之全部或一部分的一單一聚核苷酸，或該DNA分子可從複數個此類特異性地互補之聚核苷酸建構成嵌合體。

【0107】 在其他具體例中，核酸分子可包含被「間隔子」隔開的一第一與一第二聚核苷酸。一間隔子可為包含任何核苷酸序列的一區，當有需要時，該間隔子有助於該第一與第二聚核苷酸之間形成二級結構。在一個具體例中，該間隔子是供mRNA用的正股或反股編碼聚核苷酸的一部分。該間隔子可另擇地包含能夠共價性地聯結至核酸分子的核苷酸或其同源物的任何組合。在一些例子中，該間隔子可為內含子(譬如ST-LS1內含子)。

【0108】 舉例來說，在一些具體例中，該DNA分子可包含編碼一或多個不同iRNA分子的聚核苷酸，其中不同iRNA分子各別包含一第一聚核苷酸與一第二聚核苷酸，其中該第一與第二聚核苷酸彼此互補。該第一與第二聚核苷酸可藉由間隔子在一RNA分子內相連。該間隔子可構成該第一聚核苷酸或該第二聚核苷酸的一部分。包含該第一與第二核苷酸聚核苷酸之RNA分子的表現可藉由該第一與第二核苷酸聚核苷酸之特異性分子內鹼基配對進而形成dsRNA分子。該第一聚核苷酸或該第二聚核苷酸可和昆蟲

害蟲(譬如鞘翅目或半翅目害蟲)的原生聚核苷酸(譬如標靶基因、或轉錄的非編碼聚核苷酸)、其衍生物、或其互補聚核苷酸實質上一致。

【0109】 dsRNA核酸分子包含聚合的核糖核苷酸雙股，並可包括對於磷酸酯-糖骨架或核苷的修飾。RNA結構的修飾可量身訂做，以允許特異性抑制。在一個具體例中，dsRNA分子可經由泛素酶促過程修飾，俾使可生成siRNA分子。此酶促方法可利用RNase III酶，例如真核生物的DICER，在體外或體內。見Elbashir *et al.* (2001) *Nature* 411:494-8；與Hamilton and Baulcombe (1999) *Science* 286(5441):950-2。DICER或功能上等效的RNase III酶將較大的dsRNA股及/或hpRNA分子切成較小的寡聚核苷酸(譬如siRNAs)，各別約為長度19-25個核苷酸。該等酶製造的siRNA分子具有 2至3個核苷酸的3'外掛物、和5'的磷酸酯與3'的羥基端。RNase III酶所生成的siRNA分子在細胞內係開展並分成單股RNA。該siRNA分子隨後和標靶基因所轉錄的RNAs特異性地雜交，兩RNA分子之後被細胞固有的RNA-降解機制降解。此過程可在標靶生物內造成有效降解或去除標靶基因所編碼的RNA。此結果是所標靶之基因的轉錄後靜默。在一些具體例中，內源性RNase III酶從異源性核酸分子製造的siRNA分子可有效率地介導昆蟲害蟲之標靶基因向下調控。

【0110】 在一些具體例中，核酸分子可包括至少一個非天然存在的聚核苷酸，其可轉錄成能夠經由分子間雜交

形成dsRNA分子的單股RNA分子。此類dsRNAs通常自體組合，並可提供於昆蟲(譬如鞘翅目或半翅目)害蟲的營養來源，以達到標靶基因的轉錄後抑制。在該等與進一步具體例中，一核酸分子可包含兩個不同非天然存在的聚核苷酸，各別特異性地互補至昆蟲害蟲的不同標靶基因。當此類核酸分子作為dsRNA分子提供給，舉例來說，鞘翅目及/或半翅目害蟲時，dsRNA分子抑制害蟲內至少兩個不同標靶基因的表現。

C. 獲得核酸分子

【0111】昆蟲(譬如鞘翅目及半翅目)害蟲的眾多聚核苷酸可用作設計核酸分子的標靶，例如編碼有iRNAs的iRNAs與DNA分子。然而，選擇原生聚核苷酸不是簡單的過程。舉例來說，僅有少數的鞘翅目或半翅目害蟲原生聚核苷酸將是有效標靶。無法確定地預測特定原生聚核苷酸是否可有效地被本發明核酸分子下調，或特定原生聚核苷酸的下調是否將對昆蟲害蟲的生長、生存、進食、及/或存活具有不利效應。絕大多數的原生鞘翅目及半翅目害蟲聚核苷酸，例如自其單離的ESTs (舉例來說，美國專利7,612,194所列的鞘翅目害蟲聚核苷酸)對害蟲的生長及/或生存並不具有不利效應。也無法預測哪個對昆蟲害蟲可具有不利效應的原生聚核苷酸能夠用於重組技術，以表現互補於宿主植物的此類原生聚核苷酸的核酸分子，並且在投予時對害蟲提供不利效應，而不造成宿主植物的損害。

【0112】在一些具體例中，核酸分子(譬如在昆蟲(譬

如鞘翅目或半翅目)害蟲宿主植物內提供的dsRNA分子)係經選擇，以靶向編碼對害蟲發育而言不可或缺的蛋白質或蛋白質的一部分，例如涉及代謝或酵解生化途徑、細胞分裂、能量代謝、消化、宿主植物辨識、及等等的多肽的cDNAs。如本案所述，含有一或多個dsRNAs的組成物被一標靶害蟲生物攝入—該一或多個dsRNAs的至少一個區段係特異性地互補至該標靶害蟲生物細胞製造的RNA的至少實質上一致區段—可造成該標靶死亡或其他抑制。衍生自昆蟲害蟲的聚核苷酸—DNA或RNA—可用於建構防範害蟲侵擾的植物細胞。鞘翅目及/或半翅目害蟲的宿主植物(譬如玉米或大豆)，舉例來說，可經轉形，以含有本案提供之衍生自鞘翅目及/或半翅目害蟲的一或多個聚核苷酸。經轉形進入宿主的聚核苷酸可編碼在經轉形宿主內之細胞或生物體液形成dsRNA結構的一或多個RNAs，於是使得假若/當該害蟲和該基因轉殖宿主形成營養關聯時，可得到該dsRNA。此可造成害蟲細胞之一或多個基因表現受到壓抑，最終死亡或抑制其生長或發育。

【0113】在特定具體例中，基本上涉及昆蟲(譬如鞘翅目或半翅目)害蟲的生長與發育的一基因係被靶向。用於本發明的其他標靶基因可包括，舉例來說，在害蟲生存、移動、遷徙、生長、發育、侵染性、與覓食點建立扮演重要角色的基因。標靶基因因此可為管家基因或轉錄因子。此外，用於本發明的原生昆蟲害蟲聚核苷酸亦可衍生自植物、病毒、細菌或昆蟲基因的同源物(譬如同系物)，其功

能是熟習此藝者所習知的，且該聚核苷酸可和標靶害蟲基因組內的標靶基因特異性地雜交。以已知核苷酸序列藉由雜交識別基因同源物的方法是熟習此藝者所習知的。

【0114】 在一些具體例中，本發明提供獲得一核酸分子的方法，該核酸分子包含用於製造iRNA (譬如dsRNA、siRNA、miRNA、shRNA、與hpRNA)分子的聚核苷酸。一個此類具體例包含：(a)在昆蟲(譬如鞘翅目或半翅目)害蟲內在dsRNA-介導的基因壓抑後以表現、功能、與表型分析一或多個(多個)標靶基因；(b)以包含在dsRNA-介導的壓抑分析中展現改變的(譬如減少的)生長或發育表型的經靶向害蟲的聚核苷酸或其同源物之全部或一部分的探針探測一cDNA或gDNA庫；(c)識別和該探針特異性地雜交的DNA選殖體；(d)單離步驟(b)所識別的該DNA選殖體；(e)將包含步驟(d)所單離的選殖體的cDNA或gDNA片段定序，其中該經定序核酸分子包含該RNA或其同源物之全部或一實質部分；和(f)以化學方式合成一基因、或siRNA、miRNA、hpRNA、mRNA、shRNA、或dsRNA之全部或一實質部分。

【0115】 在另外具體例中，獲得包含用於製造一iRNA(譬如dsRNA、siRNA、miRNA、shRNA、與hpRNA)分子之實質部分的一聚核苷酸的一核酸片段的方法包括：(a)合成特異性地互補至來自經靶向昆蟲(譬如鞘翅目或半翅目)害蟲之原生聚核苷酸一部分的第一與第二寡聚核苷酸引子；和(b)使用步驟(a)的該第一與第二寡聚核苷酸引

子擴增存在於選殖載體的一cDNA或gDNA插入序列，其中該擴增的核酸分子包含siRNA、miRNA、hpRNA、mRNA、shRNA、或dsRNA分子之實質部分。

【0116】核酸可藉由許多方式單離、擴增、或製造。舉例來說，iRNA (譬如dsRNA、siRNA、miRNA、shRNA、與hpRNA)分子可藉由衍生自gDNA或cDNA庫的標靶聚核苷酸(譬如標靶基因或標靶所轉錄的非編碼聚核苷酸)、或其部分的PCR擴增獲得。DNA或RNA可從標靶生物抽取，核酸庫可使用熟習此藝者熟知的方法從彼等製備。從標靶生物生成的gDNA或cDNA庫可用於標靶基因的PCR擴增與定序。經確認的PCR產物可用於在體外轉錄以最少啟動子生成正股與反股RNA的模板。或者，核酸分子可藉由許多技術的任一者合成(參閱，譬如Ozaki *et al.* (1992) *Nucleic Acids Research*, 20: 5205-5214；與Agrawal *et al.* (1990) *Nucleic Acids Research*, 18: 5419-5423)，包括使用自動化DNA合成儀(舉例來說，P.E. Biosystems, Inc. (Foster City, Calif.)型號392或394 DNA/RNA合成儀)、使用標準化學方法，例如磷醯胺化學方法。參閱，譬如Beaucage *et al.* (1992) *Tetrahedron*, 48: 2223-2311；美國專利4,980,460、4,725,677、4,415,732、4,458,066、與4,973,679。亦可運用產生非天然骨架基團的另擇化學方法，例如硫代磷酸酯、亞磷醯胺等等。

【0117】本發明的RNA、dsRNA、siRNA、miRNA、shRNA、或hpRNA分子可藉由熟習此藝者經由手動或自

動化反應、或在包含著包含編碼該RNA、dsRNA、siRNA、miRNA、shRNA、或hpRNA分子之聚核苷酸的核酸分子的細胞體內以化學方式或酶促方式製造。RNA亦可藉由部分或全有機合成—可藉由體外酶促或有機合成引進任何經修飾核糖核苷酸。RNA分子可藉由細胞RNA聚合酶或噬菌體RNA聚合酶(譬如T3 RNA聚合酶、T7 RNA聚合酶、與SP6 RNA聚合酶)合成。可用於選殖與聚核苷酸表現的表現構築體是本領域所習知的。參閱，譬如國際PCT公開號WO97/32016；以及美國專利5,593,874、5,698,425、5,712,135、5,789,214、與5,804,693。化學合成或藉由體外酶促合成的RNA分子可在引進細胞之前純化。舉例來說，RNA分子可藉由溶劑或樹脂提取、沉澱、電解、層析、或彼等之組合從混合物中純化。或者，化學合成或藉由體外酶促合成的RNA分子可以無純化或最少地純化來使用，舉例來說，以避免樣本加工所導致的損失。該RNA分子可乾燥儲存或溶於水溶液。溶液可含有緩衝液或鹽，以促進dsRNA分子雙股的黏合、及/或穩定。

【0118】在具體例中，dsRNA分子可藉由單一自身互補的RNA股或兩條互補的RNA股形成。dsRNA分子可在體內或體外合成。細胞的內源性RNA聚合酶可在體內介導該一或兩股RNA的轉錄，或選殖的RNA聚合酶可用於在體內或體外介導轉錄。昆蟲害蟲之標靶基因的轉錄後抑制可為宿主-靶向型，其藉由宿主之器官、組織、或細胞類型的特異性轉錄(譬如使用組織特異性啟動子)；宿主的環境條

件刺激(譬如使用回應至感染、脅迫、溫度、及/或化學誘導劑的可誘導啟動子)；及/或在宿主發育階段或育齡的改造轉錄(譬如使用發育階段-特異性啟動子)。形成dsRNA分子的RNA股—無論在體外或體內轉錄—可或可不為聚核苷酸化，且可或不能夠被細胞的轉譯裝置轉譯成多肽。

D. 重組載體與宿主細胞轉形

【0119】在一些具體例中，本發明亦提供用於引進細胞(譬如細菌細胞、酵母細胞、或植物細胞)的DNA分子，其中該DNA分子包含—在表現成RNA並被昆蟲(譬如鞘翅目及/或半翅目)害蟲攝食後—實現壓抑害蟲細胞、組織、或器官之標靶基因的聚核苷酸。於是，一些具體例提供一種重組核酸分子，其包含能夠在植物細胞表現成iRNA(譬如dsRNA、siRNA、miRNA、shRNA、與hpRNA)分子的聚核苷酸，以抑制昆蟲害蟲的標靶基因表現。為了啟始或增進表現，此類重組核酸分子可包含一或多個調控元件，該調控元件可操作性地聯結至能夠表現成iRNA的聚核苷酸。在植物中表現基因壓抑分子的方法是習知的，並可用來表現本發明的聚核苷酸。參閱，譬如國際PCT公開號WO06/073727；以及美國專利公開號2006/0200878 A1)。

【0120】在明確具體例中，本發明的重組DNA分子可包含編碼有可形成dsRNA分子之RNA的聚核苷酸。此類重組DNA分子可編碼有在攝食後可形成能夠抑制昆蟲(譬如鞘翅目及/或半翅目)害蟲細胞的(多個)內源性標靶基因表現的dsRNA分子的RNAs。在許多具體例中，所轉錄的

RNA可形成可以穩定形式提供的dsRNA分子；譬如像是髮夾型與莖環型結構。

【0121】 在一些具體例中，一股dsRNA分子可藉由從實質上同源於選自於由下列所構成之群組的聚核苷酸轉錄形成：SEQ ID NOs:1、3、5、與78；SEQ ID NOs:1、3、5、與78之任一者的互補體或反向互補體；SEQ ID NOs:1、3、5、與78之任一者的至少15個鄰接核苷酸片段(譬如SEQ ID NOs:7-10與80)；SEQ ID NOs:1、3、5、與78之任一者的至少15個鄰接核苷酸片段的互補體或反向互補體；包含SEQ ID NOs:7-10之任一者的條葉甲屬生物(譬如WCR)原生編碼聚核苷酸；包含SEQ ID NOs:7-10之任一者的條葉甲屬生物原生編碼聚核苷酸的互補體或反向互補體；包含SEQ ID NOs:7-10之任一者的條葉甲屬生物原生編碼聚核苷酸的至少15個鄰接核苷酸片段；包含SEQ ID NOs:7-10之任一者的條葉甲屬生物原生編碼聚核苷酸的至少15個鄰接核苷酸片段的互補體或反向互補體；包含SEQ ID NO:80的半翅目生物(譬如BSB)原生編碼聚核苷酸；包含SEQ ID NO:80的半翅目生物原生編碼聚核苷酸的互補體或反向互補體；包含SEQ ID NO:80的半翅目生物原生編碼聚核苷酸的至少15個鄰接核苷酸片段；和包含SEQ ID NO:80的半翅目生物原生編碼聚核苷酸的至少15個鄰接核苷酸片段的互補體或反向互補體。

【0122】 在一些具體例中，一股dsRNA分子可藉由從實質上同源於選自於由下列所構成之群組的聚核苷酸轉錄

形成：SEQ ID NOs:7-10與80；SEQ ID NOs:7-10與81之任一者的互補體或反向互補體；SEQ ID NOs:1、3、5、與78之任一者的至少15個鄰接核苷酸片段；和SEQ ID NOs:1、3、5、與78之任一者的至少15個鄰接核苷酸片段的互補體或反向互補體。

【0123】在特定具體例中，編碼有可形成dsRNA分子之RNA的一重組DNA分子可包含一編碼區，其中至少兩個聚核苷酸係經排列，俾使相對於至少一個啟動子，一聚核苷酸係於正股方向，另一聚核苷酸係於反股方向，其中該正股聚核苷酸與反股聚核苷酸是藉由帶有，舉例來說，約五(~5)至約一千個(~1000)核苷酸的間隔子聯結或連結。該間隔子可在正股與反股聚核苷酸之間形成環圈。正股聚核苷酸或反股聚核苷酸可實質上同源於標靶基因(譬如包含SEQ ID NOs:1、3、5、與78之任一者的*rpb7*基因)或包含彼等至少15個鄰接核苷酸的片段。在一些具體例中，然而，重組DNA分子可編碼可形成無間隔子之dsRNA分子的RNA。在具體例中，正股編碼聚核苷酸與反股編碼聚核苷酸可為不同長度。

【0124】經由在本發明的重組核酸分子創建適當的表現匣，被識別具有針對昆蟲害蟲之不利效應或關於害蟲之植物保護效應的聚核苷酸可輕易地併入表現的dsRNA分子。舉例來說，此類聚核苷酸可藉下列表現成帶有莖幹與環圈結構的髮夾：取對應於標靶基因聚核苷酸(譬如包含SEQ ID NOs:1、3、5、與78之任一者的*rpb7*基因，以及

包含前述任一者至少15個鄰接核苷酸的片段)的一第一區段；將此聚核苷酸聯結至不同源或互補至該第一區段的一第二區段間隔子區域；並將此聯結至一第三區段，其中該第三區段的至少一部分係實質上互補至該第一區段。此類構築體藉由第一區段和第三區段的分子內鹼基配對形成莖幹與環圈結構，其中該環圈結構形成為包含該第二區段。參閱，譬如美國專利公開號 2002/0048814 與 2003/0018993；與國際 PCT 公開號 WO94/01550 與 WO98/05770。一 dsRNA 分子可以，舉例來說，雙股結構的形式，例如莖幹-環圈結構(譬如髮夾)生成，從而藉由，舉例而言，在額外的植物可表現匣上的所靶向基因片段的共同表現，所靶向原生昆蟲(譬如鞘翅目及/或半翅目)害蟲聚核苷酸的 siRNA 製造增強了，其產生增強之 siRNA 製造，或減少甲基化以避免 dsRNA 髮夾啟動子的轉錄基因靜默。

【0125】本發明的一些具體例包括將本發明的重組核酸分子引進植物(即，轉形)，以達到一或多個 iRNA 分子表現的昆蟲(譬如鞘翅目及/或半翅目)害蟲-抑制位準。重組 DNA 分子可為，舉例來說，載體，例如線性或密閉環狀質體。載體系統可為單一載體或質體、或共同含有欲引進宿主基因組的總 DNA 的兩或多個載體或質體。除此之外，載體可為表現載體。本發明的核酸可以，舉例來說，適用於嵌入在一或多個宿主中發揮功能的適宜啟動子控制之下的載體，以驅動所聯結之編碼聚核苷酸或其他 DNA 元件的

表現。有許多載體可用於此目的，適當載體的選擇將主要取決於欲嵌入載體的核酸尺寸及欲以該載體轉形的特定宿主細胞。各別載體含有取決於其功能(譬如DNA擴增或DNA表現)的各式各樣組分及其所相容的特定宿主細胞。

【0126】為賦予基因轉殖植物免於一昆蟲(譬如鞘翅目及/或半翅目)害蟲的保護作用，重組DNA可以，舉例來說，轉錄成重組植物組織或體液之內的iRNA分子(譬如形成dsRNA分子的RNA分子)。一iRNA分子可包含實質上同源於且可特異性地雜交至可導致宿主植物物種損傷的昆蟲害蟲內的對應轉錄聚核苷酸的聚核苷酸。害蟲可接觸在基因轉殖宿主植物細胞內轉錄的iRNA分子，舉例來說，藉由攝食包含該iRNA分子的基因轉殖宿主植物的細胞或體液。於是，在特定例子中，侵染該基因轉殖宿主植物的鞘翅目及/或半翅目害蟲內的標靶基因表現會被該iRNA分子壓抑。在一些具體例中，標靶鞘翅目及/或半翅目害蟲內的標靶基因表現之壓抑可致使防範該植物免於該害蟲的侵襲。

【0127】為了能夠將iRNA分子傳遞至和經本發明重組核酸分子轉形之一植物細胞呈營養關聯的昆蟲害蟲，iRNA分子在該植物細胞表現(即，轉錄)是必要的。於是，一重組核酸分子可包含操作性地聯結至在一宿主細胞，例如欲擴增該核酸分子的細菌細胞、與欲表現該核酸分子的植物細胞中發揮功能的一或多個調控元件，例如異源性啟動子元件的本發明聚核苷酸。

【0128】適用於本發明核酸分子的啟動子包括可誘導性、病毒性、合成性、或組成性啟動子，以上皆為本領域眾所習知的。說明此類啟動子的非設限例子包括美國專利6,437,217 (玉蜀黍RS81啟動子)；5,641,876 (水稻肌動蛋白啟動子)；6,426,446 (玉蜀黍RS324啟動子)；6,429,362 (玉蜀黍PR-1啟動子)；6,232,526 (玉蜀黍A3啟動子)；6,177,611 (組成性玉蜀黍啟動子)；5,322,938、5,352,605、5,359,142、與5,530,196 (CaMV 35S啟動子)；6,433,252 (玉蜀黍L3油質蛋白啟動子)；6,429,357 (第2型水稻肌動蛋白啟動子與第2型水稻肌動蛋白內含子)；6,294,714 (光誘導性啟動子)；6,140,078 (鹽誘導性啟動子)；6,252,138 (病原體誘導性啟動子)；6,175,060 (缺磷誘導性啟動子)；6,388,170 (雙向啟動子)；6,635,806 (珈瑪-薏苡醇溶蛋白啟動子)；與美國專利公開號2009/757,089 (玉蜀黍葉綠體醛縮酶啟動子)。額外的啟動子包括胭脂鹼合成酶(NOS)啟動子(Ebert *et al.* (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84(16):5745-9)與章魚鹼合成酶(OCS)啟動子(農桿菌(*Agrobacterium tumefaciens*)的腫瘤誘導質體上所攜帶)；花椰菜花葉病毒啟動子，例如花椰菜鑲嵌病毒(CaMV) 19S啟動子(Lawton *et al.* (1987) Plant Mol. Biol. 9:315-24)；CaMV 35S啟動子(Odell *et al.* (1985) Nature 313:810-2；玄參鑲嵌病毒35S-啟動子(Walker *et al.* (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84(19):6624-8)；蔗糖合成酶啟動子(Yang and

Russell (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:4144-8) ; R基因複合體啟動子(Chandler *et al.* (1989) Plant Cell 1:1175-83) ; 葉綠素a / b結合蛋白基因啟動子 ; CaMV 35S (美國專利 5,322,938 、 5,352,605 、 5,359,142 、 與 5,530,196) ; FMV 35S (美國專利 6,051,753 、 與 5,378,619) ; PC1SV 啟動子(美國專利 5,850,019) ; SCP1 啟動子(美國專利 6,677,503) ; 與 AGRtu.nos啟動子(GenBank™ 寄存號 V00087; Depicker *et al.* (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1:561-73; Bevan *et al.* (1983) Nature 304:184-7) 。

【0129】在特定具體例中，本發明的核酸分子包含組織-特異性啟動子，例如根部-特異性啟動子。根部-特異性啟動子係驅動以可操作方式聯結的專一或偏好在根部組織的編碼聚核苷酸的表現。本領域習知根部-特異性啟動子的例子。參閱，譬如美國專利 5,110,732 ; 5,459,252 與 5,837,848 ; 及 Opperman *et al.* (1994) Science 263:221-3 ; 與 Hirel *et al.* (1992) Plant Mol. Biol. 20:207-18。在一些具體例中，根據本發明用於鞘翅目害蟲控制的聚核苷酸或片段可選殖在以相對於該聚核苷酸或片段之相反轉錄方向定位的兩個根部-特異性啟動子之間，且該等啟動子係可在基因轉殖植物細胞操作並在該細胞內表現，以在基因轉殖植物細胞內製造後續可形成 dsRNA 分子的 RNA 分子，如上文所述。在植物組織表現的 iRNA 分子可被昆蟲害蟲攝食，俾使達到標靶基因表現之

壓抑。

【0130】可任擇地操作性地聯結至核酸的額外調控元件包括位於啟動子元件與編碼聚核苷酸之間、作用如同轉譯前導元件的5'UTRs。轉譯前導元件係存在於完整加工的mRNA，並可影響初級轉錄物的加工、及/或RNA穩定性。轉譯前導元件的例子包括玉蜀黍與矮牽牛熱休克蛋白前導子(美國專利5,362,865)、植物病毒外殼蛋白前導子、植物加氧酶(rubisco)前導子、及其他。參閱，譬如Turner and Foster (1995) *Molecular Biotech.* 3(3):225-36。5'UTRs的非設限例子包括GmHsp(美國專利5,659,122)；PhDnaK(美國專利5,362,865)；AtAnt1；TEV(Carrington and Freed (1990) *J. Virol.* 64:1590-7)；以及AGRtunos(GenBank™ 寄存號V00087；與Bevan *et al.* (1983) *Nature* 304:184-7)。

【0131】可任擇地操作性地聯結至核酸的額外調控元件亦包括3'非轉譯元件、3'轉錄終止區、或聚腺苷酸化區。該等為位於聚核苷酸下游的基因元件，並包括提供聚腺苷酸化信號的聚核苷酸、及/或能夠影響轉錄或mRNA加工的其他調控信號。該聚腺苷酸化信號係作用在植物中，以致使聚腺苷酸化核苷酸加至mRNA前驅物的3'端。聚腺苷酸化元件可衍生自眾多植物基因、或來自T-DNA基因。3'轉錄終止區的非設限例子是胭脂鹼合成酶3'區(nos 3'; Fraley *et al.* (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4803-7)。使用不同3'非轉譯區的例子係提供於

Ingelbrecht *et al.*, (1989) Plant Cell 1:671-80。聚腺苷酸化信號的非設限例子包括來自豌豆(*Pisum sativum*) RbcS2基因(Ps.RbcS2-E9; Coruzzi *et al.* (1984) EMBO J. 3:1671-9)與AGRtu.nos (GenBankTM 寄存號E01312) 當中一者。

【0132】一些具體例可包括一種包含經單離與純化DNA分子的植物轉形載體，該DNA分子包含操作性地聯結至本發明一或多個聚核苷酸的至少一個上述調控元件。在表現時，該一或多個聚核苷酸產生一或多個(多個)iRNA分子，其包含特異性地互補至一昆蟲(譬如鞘翅目及/或半翅目)害蟲的一原生RNA分子之全部或一部分的聚核苷酸。於是，該(多個)聚核苷酸可包含編碼有存在於所靶向鞘翅目及/或半翅目害蟲RNA轉錄體的聚核糖核苷酸之全部或一部分的一區段，並可包含所靶向害蟲轉錄體之全部或一部分的反向重複。植物轉形載體可含有特異性地互補至不止一個標靶聚核苷酸的聚核苷酸，於是容許製造不止一個dsRNA，以用來抑制標靶昆蟲害蟲的一或多個群體或物種之細胞內的兩或多個基因表現。特異性地互補至存在於不同基因之聚核苷酸的聚核苷酸區段可合併成單一複合核酸分子，以用來在基因轉殖植物表現。此類區段可鄰接或被間隔子隔開。

【0133】在其他具體例中，已含本發明至少一個(多個)聚核苷酸的本發明質體可藉由在相同質體依次插入額外的(多個)聚核苷酸來修飾，其中該額外的(多個)聚核苷

酸係操作性地聯結至如同原始之至少一個(多個)聚核苷酸的相同調控元件。在一些具體例中，核酸分子可被設計成抑制多重標靶基因。在一些具體例中，欲抑制的該多重基因可獲自相同昆蟲(譬如鞘翅目或半翅目)害蟲物種，其可增強核酸分子的有效性。在其他具體例中，該基因可衍生自不同昆蟲害蟲，其可擴展該(多)劑係有效對抗的害蟲範圍。當多重基因被靶向為壓抑或是表現與壓抑之組合時，可加設順反子DNA元件。

【0134】本發明的一重組核酸分子或載體可包含授予經轉形細胞，例如植物細胞可擇表型的可擇標記。可擇標記亦可用於選擇包含本發明重組核酸分子的植物或植物細胞。該標記可編碼殺生物劑抗性、抗生素抗性(譬如卡那黴素(kanamycin)、正大黴素(gentamycin) (G418)、巴龍黴素(bleomycin)、與潮黴素(hygromycin)、等等)、或除草劑耐受性(譬如草甘膦(glyphosate)、等等)。可擇標記的例子包括，但不限於：*neo*基因，其編碼卡那黴素抗性並可使用卡那黴素、G418等等選擇；*bar*基因，其編碼畢拉草(bialaphos)抗性；突變EPSP合成酶基因，其編碼草甘膦耐受性；脲水解酶基因，其授予溴苯脲(bromoxynil)抗性；突變乙醯乳酸合成酶(*ALS*)基因，其授予咪唑啉酮類或磺醯脲類耐受性；與氨甲喋呤(methotrexate)抗性*DHFR*基因。可取得授予下列抗性之多重可擇標記：安比西林(ampicillin)、巴龍黴素、氯黴素(chloramphenicol)、正大黴素、潮黴素、卡那黴素、林可黴素(lincomycin)、

氨甲喋呤、麟絲菌素(phosphinothricin)、嘌呤黴素(puromycin)、大觀黴素(spectinomycin)、利福平(rifampicin)、鏈黴素(streptomycin)和四環素(tetracycline)及等等。此類可擇標記的例子係例示於，譬如美國專利 5,550,318；5,633,435；5,780,708 與 6,118,047。

【0135】本發明的一重組核酸分子或載體亦可包括可篩揀標記。可篩揀標記可用於監控表現。例示性可篩揀標記包括 β -半乳糖苷酶或*uidA*基因(GUS)，其編碼已知各種顯色受質的酶(Jefferson *et al.* (1987) Plant Mol. Biol. Rep. 5:387-405)；R-基因座基因，其編碼調控植物組織製造花青素色素(紅色)的一產物(Dellaporta *et al.* (1988) “Molecular cloning of the maize *R-nj* allele by transposon tagging with *Ac*.” In 18th Stadler Genetics Symposium, P. Gustafson and R. Appels, eds. (New York: Plenum), pp. 263-82)； β -內醯胺酶基因(Sutcliffe *et al.* (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:3737-41)；一基因，其編碼已知各種顯色受質(譬如PADAC，顯色頭孢菌素(cephalosporin))的酶；螢光素酶基因(Ow *et al.* (1986) Science 234:856-9)；*xylE*基因，其編碼可以轉換顯色兒茶酚的兒茶酚雙加氧酶(Zukowski *et al.* (1983) Gene 46(2-3):247-55)；澱粉酶基因(Ikatu *et al.* (1990) Bio/Technol. 8:241-2)；酪胺酸酶基因，其編碼能夠氧化酪胺酸成為DOPA和多巴醌的酶，該等繼而縮合成黑色素

(Katz *et al.* (1983) J. Gen. Microbiol. 129:2703-14) ;
與 α -半乳糖苷酶。

【0136】 在一些具體例中，如上文所述的重組核酸分子可用於創建基因轉殖植物並在植物表現異源性核酸以製備展現對於昆蟲(譬如鞘翅目及/或半翅目)害蟲的敏感性降低的基因轉殖植物的方法。植物轉形載體可藉由，舉例來說，將編碼iRNA分子的核酸分子插入植物轉形載體並將該等引進植物來製備。

【0137】 用於轉形宿主細胞的適宜方法包括可將DNA引進細胞的任何方法，例如藉由原生質體轉形(參閱，譬如美國專利5,508,184)、藉由乾化/抑制-介導的DNA攝取(參閱，譬如Potrykus *et al.* (1985) Mol. Gen. Genet. 199:183-8)、藉由電穿孔(參閱，譬如美國專利5,384,253)、藉由以碳化矽纖維攪動(參閱，譬如美國專利5,302,523與5,464,765)、藉由農桿菌-介導的轉形(參閱，譬如美國專利5,563,055；5,591,616；5,693,512；5,824,877；5,981,840；與6,384,301)與藉由DNA-包覆顆粒的加速(參閱，譬如美國專利5,015,580；5,550,318；5,538,880；6,160,208；6,399,861；與6,403,865)等等。特別可用於轉形玉米的技術係說明於，舉例來說，美國專利7,060,876與5,591,616；與國際PCT公開案WO95/06722。經由應用例如該等技術，幾乎所有物種的細胞可被穩定轉形。在一些具體例中，轉形DNA係整合至宿主細胞基因組中。就多細胞物種而言，基因轉殖細胞可

再生成基因轉殖生物。該等技術任一者可用於製造，舉例來說，包含編碼基因轉殖植物基因組之一或多個iRNA分子的一或多個核酸的基因轉殖植物。

【0138】用於將表現載體引進植物的廣泛利用方法係以農桿菌的天然轉形系統為基礎。根瘤農桿菌(*A. tumefaciens*)與毛根農桿菌(*A. rhizogenes*)為以基因方式轉形植物細胞的植物致病性土壤細菌。根瘤農桿菌與毛根農桿菌的Ti與Ri質體分別攜帶負責植物基因轉形的基因。Ti (腫瘤誘導)-質體含有大型區段，習知為T-DNA，其被轉移至經轉形植物。Ti質體的另一區段，Vir區，是負責T-DNA運送。T-DNA區的邊界是末端重複。在經修飾的二元載體中，腫瘤誘導基因已被刪除，Vir區的功能係用來運送被T-DNA邊界元件包夾的外來DNA。T-區亦可含有有效回收基因轉殖細胞與植物的可擇標記，以及用於插入供運送，例如編碼核酸的dsRNA之聚核苷酸的多重選殖部位。

【0139】在特定具體例中，植物轉形載體係衍生自根瘤農桿菌的Ti質體(參閱，譬如美國專利4,536,475、4,693,977、4,886,937、與5,501,967；與歐洲專利號EP 0 122 791)或毛根農桿菌的Ri質體。額外的植物轉形載體包括，舉例來說而不限於，該等說明於Herrera-Estrella *et al.* (1983) Nature 303:209-13；Bevan *et al.* (1983) Nature 304:184-7；Klee *et al.* (1985) Bio/Technol. 3:637-42；及於歐洲專利號 EP 0 120 516，以及該等衍生自前述之任

一者。天然地和植物交互作用的其他細菌，例如中華根瘤菌屬(*Sinorhizobium*)、根瘤菌屬(*Rhizobium*)、與慢生根瘤菌屬(*Mesorhizobium*)可經修飾，以介導基因運送至眾多不同植物。藉由獲取卸防之Ti質體與適宜二元載體兩者，該等植物相關共生菌可勝任基因運送。

【0140】在提供外源性DNA至接受者細胞後，一般係辨識經轉形細胞，以供進一步培養與植物再生。為了增進辨識經轉形細胞的能力，可能想要運用可擇或可篩標記基因連同如前文所述之用於生成轉形體的轉形載體。在使用可擇標記的情況中，在有可能經轉形的細胞群體內，可藉由使細胞暴露至選擇劑或多個劑來識別經轉形細胞。在使用可篩標記的情況中，細胞可以所欲標記基因性狀篩揀。

【0141】暴露至選擇劑後存活的細胞、或在篩揀試驗中標為陽性的細胞可在支持植物再生的介質中培養。在一些具體例中，任何適宜植物組織培養介質(譬如MS與N6介質)可藉由包括另外物質，例如生長調節劑來修飾。組織可維持在帶有生長調節劑的基礎介質上，直到得到足夠的組織以開始植物再生的努力，或在重複的手動選擇循環後，直到組織的形態適用於再生(譬如至少2週)，隨後移至有助於嫩芽形成的介質。定期地轉移培養物，直到發生足夠的嫩芽形成。一旦形成嫩芽，將彼等移至有助於根形成的培養介質。一旦形成足夠的根，可將植物移至土壤，以供進一步生長和成熟。

【0142】為確認再生植物中感興趣核酸分子(舉例來

說，編碼抑制鞘翅目及/或半翅目害蟲之標靶基因表現的一或多個iRNA分子的DNA)的存在，可進行眾多試驗。例如說，包括，舉例來說：分生試驗，例如南方與北方墨點法、PCR、與核酸定序；生化試驗，例如偵測蛋白產物的存在，譬如藉由免疫方式(ELISA及/或西方墨點法)或藉由酶的功能；植物部分試驗，例如葉部或根部試驗；與分析整株再生植物的表型。

【0143】整合事件可藉由，舉例來說，使用譬如專一對感興趣核酸分子的寡核苷酸引子的PCR擴增來分析。PCR基因分型被理解為包括，但不限於，衍生自被預測含有經整合至基因組中的感興趣核酸分子的單離宿主植物癒傷組織的基因組DNA的聚合酶鏈反應(PCR)擴增，接著PCR擴增產物的標準選殖與序列分析。PCR基因分型方法已有詳細說明(舉例來說，Rios, G. *et al.* (2002) Plant J. 32:243-53)，並可應用至衍生自任何植物物種(譬如玉米)或組織類型，包括細胞培養物的gDNA。

【0144】使用農桿菌-依賴性轉形方法形成的基因轉殖植物通常含有插入一染色體的單一重組DNA。單一重組DNA的聚核苷酸係稱作「基因轉殖事件」或「整合事件」。此類基因轉殖植物為所插入外源性聚核苷酸的雜合子。在一些具體例中，帶有轉殖基因的基因轉殖植物雜合子可藉由含有單一外源性基因的獨立分離子基因轉殖植物，舉例來說，T₀植物的自身有性交配(自交)製造T₁種子來獲得。所製得T₁種子的四分之一會是帶有轉殖基因的純合子。萌

發之 T_1 種子產生可用來測試雜合性的植物，通常使用允許區分雜合子與純合子的SNP試驗或熱擴增試驗(即，合子性試驗)。

【0145】在特定具體例中，至少2、3、4、5、6、7、8、9或10或更多個不同iRNA分子係於具有昆蟲(譬如鞘翅目及/或半翅目)害蟲-抑制效應的植物細胞以內製造。iRNA分子(譬如dsRNA分子)可從在不同轉形事件引進的多重核酸、或從在單一轉形事件引進的單一核酸表現。在一些具體例中，複數個iRNA分子是在單一啟動子控制之下表現。在其他具體例中，複數個iRNA分子是在多重啟動子控制之下表現。可表現單一iRNA分子，其包含各別同源於在相同昆蟲害蟲物種的不同群體、或不同昆蟲害蟲物種的一或多個昆蟲害蟲內的不同基因座(舉例來說，SEQ ID NOs:1、3、5、與78定義的基因座)的多重聚核苷酸。

【0146】除了以重組核酸分子直接轉形植物以外，基因轉殖植物可藉由使具有至少一個基因轉殖事件的第一植物和缺少此類事件的第二植物交配來製備。舉例來說，包含編碼iRNA分子的聚核苷酸的一重組核酸分子可被引進順應轉形的一第一植物系，以製造基因轉殖植物，該基因轉殖植物可和一第二植物系交配，以編碼iRNA分子的聚核苷酸漸滲進入該第二植物系。

【0147】在一些態樣中，衍生自經轉形植物細胞的基因轉殖植物所生產的種子與商品被包括在內，其中該種子或商品包含可偵測量之本發明核酸。在一些具體例中，此

類商品可藉由，舉例來說，獲得基因轉殖植物且從其製備食物或飼料來製造。包含本發明一或多個聚核苷酸的商品包括，舉例來說而不限於：包含本發明一或多個核酸的膳食、油、或植物種子之壓碎或全穀粒，與包含任何膳食、油、或重組植物或種子之壓碎或全穀粒的任何食物產品。在一或多個貨品或商品偵測到本發明一或多個聚核苷酸是實際的證據，該貨品或商品是從為了表現本發明一或多個iRNA分子以控制昆蟲(譬如鞘翅目及/或半翅目)害蟲所設計的基因轉殖植物製造。

【0148】 在一些具體例中，包含本發明核酸分子的基因轉殖植物或種子亦可包含至少一個其他基因轉殖事件在其基因組，包括而不限於：轉錄靶向鞘翅目或半翅目害蟲之SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、與SEQ ID NO:78所定義者以外的基因座的iRNA分子的基因轉殖事件，例如，舉例來說，選自於由下列所構成之群組的一或多個基因座：***Caf1-180*** (美國專利申請案公開號2012/0174258)、***VatpaseC*** (美國專利申請案公開號2012/0174259)、***Rho1*** (美國專利申請案公開號2012/0174260)、***VatpaseH*** (美國專利申請案公開號2012/0198586)、***PPI-87B*** (美國專利申請案公開號2013/0091600)、***RPA70*** (美國專利申請案公開號2013/0091601)、***RPS6*** (美國專利申請案公開號2013/0097730)、***ROP*** RNAi標靶，如美國專利申請號14/577,811所述，***RNA***聚合酶***II*** RNAi標靶，如美國專利

申請號62/133,214所述，**RNA**聚合酶***III140*** RNAi標靶，如美國專利申請號14/577,854所述，**RNA**聚合酶***II215*** RNAi標靶，如美國專利申請號62/133,202所述，**RNA**聚合酶***II33*** RNAi標靶，如美國專利申請號62/133,210)所述，***ncm***RNAi標靶，如美國專利申請號62/095487所述，***Dre4*** RNAi標靶，如美國專利申請號14/705,807所述，***COPI alpha*** RNAi標靶，如美國專利申請號62/063,199所述，***COPI beta*** RNAi標靶，如美國專利申請號62/063,203所述，***COPI gamma*** RNAi標靶，如美國專利申請號62/063,192所述，***COPI delta*** RNAi標靶，如美國專利申請號62/063,216所述，**轉錄延伸因子 *spt5*** RNAi標靶，如美國專利申請號62/168613所述，以及組蛋白伴護蛋白(histone chaperone) ***spt6*** RNAi標靶，如美國專利申請號62/168606所述；轉錄靶向鞘翅目及/或半翅目害蟲以外的生物(譬如植物-寄生性線蟲)之基因的iRNA分子的基因轉殖事件；編碼殺昆蟲蛋白質(譬如蘇力菌殺昆蟲蛋白質、PIP-1多肽、與AflP多肽)的基因；除草劑耐受性基因(譬如提供草甘膦耐受性的基因)；與有助於基因轉殖植物所欲表型的基因，例如增加產量、調整脂肪酸代謝、或恢復細胞質雄性不育)。在特定具體例中，編碼本發明iRNA分子的聚核苷酸可和植物的其他昆蟲控制與疾病性狀合併，以實現加強控制植物疾病與昆蟲損傷的所欲性狀。合併運用不同作用模式的昆蟲控制性狀可提供超越帶有單一控制性狀的植物之優異耐用性的受保護基因轉殖植物，舉例來說，

因為較不可能在田間發展出抵抗該(多個)性狀的抗性。

V. 在昆蟲害蟲之標靶基因壓抑

A. 概觀

【0149】 在本發明一些具體例中，可用於控制昆蟲(譬如鞘翅目及/或半翅目)害蟲的至少一個核酸分子可提供至一昆蟲害蟲，其中該核酸分子造成該害蟲的RNAi-介導的基因靜默。在特定具體例中，一iRNA分子(譬如dsRNA、siRNA、miRNA、shRNA、與hpRNA)可提供至鞘翅目及/或半翅目害蟲。在一些具體例中，可用於控制昆蟲害蟲的一核酸分子可藉由以該害蟲接觸核酸分子來提供至害蟲。在該等與進一步具體例中，可用於控制昆蟲害蟲的一核酸分子可於害蟲食用基質提供，舉例來說，營養組成物。在該等與進一步具體例中，可用於控制昆蟲害蟲的一核酸分子可經由害蟲所攝食的包含該核酸分子的植物材料提供。在某些具體例中，該核酸分子係經由，舉例來說，以包含該重組核酸的載體轉形植物細胞並由該經轉形植物細胞再生植物材料或整株植物引進植物材料的重組核酸的表現而出現在植物材料。

B. RNAi-介導的標靶基因壓抑

【0150】 在一些具體例中，本發明提供可設計成靶向昆蟲害蟲(舉例來說，鞘翅目(譬如WCR、NCR、或SCR)或半翅目(譬如BSB)害蟲)轉錄組內的關鍵原生聚核苷酸(譬如關鍵基因)的iRNA分子(譬如dsRNA、siRNA、miRNA、shRNA、與hpRNA)，舉例來說，藉由設計包含

含有特異性地互補至該標靶聚核苷酸的聚核苷酸之至少一股的iRNA分子。如此設計的iRNA分子的序列可和標靶聚核苷酸的序列一致、或可併入不會阻止iRNA分子及其標靶聚核苷酸之間的特異性雜交的錯配。

【0151】本發明的iRNA分子可用於昆蟲(譬如鞘翅目及/或半翅目)害蟲之基因壓抑的方法，藉此降低害蟲在植物(舉例來說，包含iRNA分子的受保護經轉形植物)上導致損傷的位準或發生率。用於本案時，術語「基因壓抑(gene suppression)」指稱用於降低由基因轉錄成mRNA與後續mRNA轉譯的結果所製得蛋白質的位準的任何方法，包括降低來自基因或編碼聚核苷酸的蛋白質表現，包括轉錄後抑制表現與轉錄壓抑。轉錄後抑制係藉由經靶向壓抑之基因所轉錄的mRNA之全部或一部分與用於壓抑的對應iRNA分子之間的特異同源性介導。此外，轉錄後抑制指稱細胞中供核糖體結合的mRNA份量的實質與可測得減少。

【0152】在具體例中，其中iRNA分子為dsRNA分子，該dsRNA分子可被DICER酶切成短的siRNA分子(長度為大約20個核苷酸)。DICER活性作用在dsRNA分子上所生成的雙股siRNA分子可分成兩個單股siRNAs；「隨從股」與「引導股」。隨從股可被降解，引導股可被併入RISC。轉錄後抑制在該引導股特異性地雜交至一mRNA分子的特異性地互補聚核苷酸時且後續被阿若戈蛋白酶(RISC複合體的催化組分)切割時發生。

【0153】在本發明具體例中，可使用任何形式的iRNA分子。熟習此藝者將理解dsRNA分子在製備期間與提供iRNA分子至細胞的步驟期間通常比單股RNA分子更加穩定，且在細胞中亦通常更加穩定。於是，當siRNA與miRNA分子，舉例來說，在一些具體例中可相等地有效時，由於穩定性，可選擇dsRNA分子。

【0154】在特定具體例中，核酸分子係以包含聚核苷酸被提供，該聚核苷酸可在體外表現，以製造實質上同源於昆蟲(譬如鞘翅目及/或半翅目)害蟲基因組內的聚核苷酸所編碼核酸分子的iRNA分子。在某些具體例中，體外轉錄的iRNA分子可為包含莖幹-環圈結構的穩定dsRNA分子。在昆蟲害蟲接觸該體外轉錄的iRNA分子後，可發生害蟲標靶基因(舉例來說，關鍵基因)的轉錄後抑制。

【0155】在本發明一些具體例中，包含聚核苷酸之至少15個鄰接核苷酸(譬如至少19個鄰接核苷酸)的核酸分子的表現係用於轉錄後抑制昆蟲(譬如鞘翅目及/或半翅目)害蟲標靶基因的方法中，其中該聚核苷酸選自於由下列所構成之群組：SEQ ID NO:86；SEQ ID NO:86的互補體或反向互補體；SEQ ID NO:87；SEQ ID NO:87的互補體或反向互補體；SEQ ID NO:88；SEQ ID NO:88的互補體或反向互補體；SEQ ID NO:93；SEQ ID NO:93的互補體或反向互補體；由包含SEQ ID NO:1之條葉甲屬生物原生編碼聚核苷酸表現的RNA；由包含SEQ ID NO:1之條葉甲屬生物原生編碼聚核苷酸表現的RNA的互補體

或反向互補體；由包含SEQ ID NO:3之條葉甲屬生物原生編碼聚核苷酸表現的RNA；由包含SEQ ID NO:3之條葉甲屬生物原生編碼聚核苷酸表現的RNA的互補體或反向互補體；由包含SEQ ID NO:5之條葉甲屬生物原生編碼聚核苷酸表現的RNA；由包含SEQ ID NO:5之條葉甲屬生物原生編碼聚核苷酸表現的RNA的互補體或反向互補體；由包含SEQ ID NO:78之英雄美洲蟥生物原生編碼聚核苷酸表現的RNA；以及由包含SEQ ID NO:78之英雄美洲蟥生物原生編碼聚核苷酸表現的RNA的互補體或反向互補體。包含前述聚核苷酸至少15個鄰接核苷酸的核酸分子包括，舉例來說而不限於，包含選自於由SEQ ID NOs:89-92與94所構成群組的聚核苷酸的至少15個鄰接核苷酸片段。在某些具體例中，可使用和前述任一者至少約80%一致(譬如79%、約80%、約81%、約82%、約83%、約84%、約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約100%、與100%)的核酸分子的表現。在該等與進一步具體例中，特異性地雜交至存在於昆蟲(譬如鞘翅目及/或半翅目)害蟲之至少一個細胞的一RNA分子的一核酸分子可被表現。

【0156】 在一些具體例中，一iRNA分子係提供在本案稱作「RNAi誘餌」的營養組成物內。在特定具體例中，當一iRNA分子(譬如dsRNA)和標靶昆蟲的食物、昆蟲引誘劑或兩者混合時，可形成RNAi誘餌。當昆蟲吃RNAi誘

餌時，該昆蟲可食用iRNA分子。RNAi誘餌可以，舉例來說，但不限於顆粒、凝膠、可流動粉末、液體、或固體。在特定具體例中，iRNA分子可以併入誘餌調配物中，例如在美國專利號8,530,440中所述，茲此以參照方式併入本文。在一些具體例中，將誘餌放置在昆蟲害蟲的環境中或周圍，俾使，舉例來說，該害蟲可和RNAi誘餌接觸及/或被吸引。

【0157】 本案一些具體例的重要特徵是RNAi轉錄後抑制系統能夠耐受標靶基因由於基因突變、品系多態性或演化分歧可以預期的序列變異。所引進的核酸分子可不必絕對地同源於標靶基因的初級轉錄產物或經完全加工的mRNA，只要該引進的核酸分子可特異性地雜交至標靶基因的初級轉錄產物或已完全加工的mRNA即可。再者，相對於標靶基因的初級轉錄產物或已完全加工的mRNA，所引進的核酸分子可不必為全長。

【0158】 使用本發明iRNA技術的標靶基因抑制是序列-特異性；即，實質上同源於(多個) iRNA分子的聚核苷酸是靶向基因抑制。在一些具體例中，一包含帶有和標靶基因之一部分帶有的核苷酸序列一致之核苷酸序列的聚核苷酸的RNA分子可用來抑制。在該等與進一步具體例中，可使用包含帶有相對於標靶聚核苷酸的一或多個插入、刪除、及/或點突變的聚核苷酸的一RNA分子。在特定具體例中，一iRNA分子 與標靶基因之一部分可共享，舉例來說，至少自約80%、至少自約81%、至少自約82%、至少

自約83%、至少自約84%、至少自約85%、至少自約86%、至少自約87%、至少自約88%、至少自約89%、至少自約90%、至少自約91%、至少自約92%、至少自約93%、至少自約94%、至少自約95%、至少自約96%、至少自約97%、至少自約98%、至少自約99%、至少自約100%、與100%的序列一致性。或者，dsRNA分子的雙螺旋區和標靶基因轉錄體之一部分可特異性地雜交。在可特異性地雜交的分子中，展現較大同源性的少於全長聚核苷酸係彌補較大、較少同源性的聚核苷酸。和標靶基因轉錄體之一部分一致的dsRNA分子雙螺旋區的聚核苷酸長度可為至少約25、50、100、200、300、400、500、或至少約1000個鹼基。在一些具體例中，可使用大於20-100個核苷酸的聚核苷酸。在特定具體例中，可使用大於約200-300個核苷酸的聚核苷酸。在特定具體例中，取決於標靶基因尺寸，可使用大於約500-1000個核苷酸的聚核苷酸。

【0159】在某些具體例中，在害蟲細胞內的害蟲(譬如鞘翅目或半翅目)之標靶基因表現可被抑制至少10%；至少33%；至少50%；或至少80%，俾使發生顯著的抑制。顯著抑制指的是超過可偵測表型臨界值的抑制(譬如停止生長、停止進食、停止發育、誘發死亡等等)、或對應於經抑制之標靶基因的RNA及/或基因產物的可偵測減少。儘管，在本發明某些具體例中，抑制發生在害蟲的實質上所有細胞，在其他具體例中，抑制僅發生在表現該標靶基因的細胞亞群。

【0160】 在一些具體例中，轉錄壓抑係藉由細胞中所存在的展現和啟動子DNA或其互補體之實質序列一致性以作用稱作「啟動子反壓抑(promoter trans suppression)」的dsRNA分子來介導。基因壓抑可有效抵抗可攝食或接觸此類dsRNA分子，舉例來說，藉由攝食或接觸含有該dsRNA分子的植物材料的昆蟲害蟲之標靶基因。用於啟動子反壓抑的dsRNA分子可特異性地設計成抑制或壓抑昆蟲害蟲細胞之一或多個同源或互補聚核苷酸的表現。用以調控植物細胞基因表現之反股或正股方向RNA所致的轉錄後基因壓抑係揭示於美國專利5,107,065；5,759,829；5,283,184；與5,231,020。

C. 提供給昆蟲害蟲的iRNA分子表現

【0161】 用於在昆蟲(譬如鞘翅目及/或半翅目)害蟲之RNAi-介導的基因抑制的iRNA分子表現可以許多體外或體內型式進行。該iRNA分子隨後可提供至昆蟲害蟲，舉例來說，藉由以該害蟲接觸該iRNA分子、或藉由使該害蟲攝入或以其他方式內化該iRNA分子。一些具體例包括鞘翅目及/或半翅目害蟲的經轉形宿主植物、經轉形植物細胞、與經轉形植物的子代。該經轉形植物細胞與經轉形植物可經改造，以在，舉例來說，異源性啟動子控制之下表現該iRNA分子之一或多者，以提供害蟲保護效應。於是，當一基因轉殖植物或植物細胞在進食期間被昆蟲害蟲消耗時，害蟲可攝入在該基因轉殖植物或細胞表現的iRNA分子。本發明的聚核苷酸亦可引進各種各樣的原核

與真核微生物宿主，以製造iRNA分子。術語「微生物」包括原核與真核物種，例如細菌與真菌。

【0162】基因表現的調節可包括此類表現的部分或完全壓抑。在另一具體例中，用於壓抑昆蟲(譬如鞘翅目及/或半翅目)害蟲的基因表現的方法包含在害蟲宿主組織中提供本案所述聚核苷酸在轉錄後所形成的至少一個dsRNA分子的基因壓抑量，該聚核苷酸之至少一個區段係互補至昆蟲害蟲細胞之mRNA。被昆蟲害蟲攝食的dsRNA分子，包括其修飾形式，例如siRNA、miRNA、shRNA、或hpRNA分子可和由*rpb7* DNA分子轉錄的RNA分子，舉例來說，包含選自於由SEQ ID NOs:1、3、5、7-10、78與80所構成群組的聚核苷酸至少約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或約100%一致。因此提供了用於提供 dsRNA分子之包括，但不限於，非天然存在聚核苷酸與重組DNA構築體的單離與實質上純化核酸分子，在將該等引進昆蟲害蟲時，該等壓抑或抑制昆蟲害蟲之內源性編碼聚核苷酸或標靶編碼聚核苷酸的表現。

【0163】特定具體例提供一種用於傳遞iRNA分子的傳遞系統，該iRNA分子係用於轉錄後抑制昆蟲(譬如鞘翅目及/或半翅目)植物害蟲之一或多個(多個)標靶基因並控制該植物害蟲的群體。在一些具體例中，該傳遞系統包含攝入包含在宿主細胞中轉錄之RNA分子的宿主基因轉殖

植物細胞或宿主細胞內含物。在該等與進一步具體例中，創建了含有提供本發明之穩定dsRNA分子的重組DNA構築體的一基因轉殖植物細胞或一基因轉殖植物。包含編碼特定iRNA分子之核酸的基因轉殖植物細胞與基因轉殖植物可藉由下列製造：運用重組DNA技術(該基本技術為本領域眾所周知)建構包含編碼本發明iRNA分子的聚核苷酸的一植物轉形載體(譬如穩定的dsRNA分子)；轉形一植物細胞或植物；以及生成含有該轉錄之iRNA分子的基因轉殖植物細胞或基因轉殖植物。

【0164】為了將昆蟲(譬如鞘翅目及/或半翅目)害蟲防範作用賦予基因轉殖植物，一重組DNA分子可以，舉例來說，轉錄成一iRNA分子，例如一dsRNA分子、一siRNA分子、一miRNA分子、一shRNA分子、或一hpRNA分子。在一些具體例中，由重組DNA分子所轉錄的一RNA分子可形成重組植物組織或體液內的一dsRNA分子。此類dsRNA分子可被包含在和可侵染宿主植物的昆蟲害蟲種類之DNA所轉錄的對應聚核苷酸一致的聚核苷酸之一部分以內。害蟲標靶基因的表現被該dsRNA分子壓抑，且害蟲標靶基因之表現壓抑造成基因轉殖植物可防範該害蟲。已顯示dsRNA分子的調節效應可應用至害蟲所表現的各式基因，包括，舉例來說，負責細胞代謝或細胞轉形的內源性基因，包括持家基因；轉錄因子；蛻皮相關基因；以及編碼涉及細胞代謝或正常生長與發育之多肽的其他基因。

【0165】為了從體內轉殖基因或表現構築體轉錄，在

一些具體例中可使用調控區(譬如啟動子、加強子、靜默子、與聚腺苷酸化信號)，以轉錄該RNA股(或多股)。因此，在一些具體例中，如上文所述，用於製造iRNA分子的聚核苷酸可操作性地聯結至在植物宿主細胞發揮功能的一或多個啟動子元件。該啟動子可為常駐在宿主基因組的內源性啟動子。本發明的聚核苷酸—在操作性地聯結之啟動子元件的控制之下—可進一步側接有利地影響其轉錄及/或所得轉錄體穩定性的額外元件。此類元件可位於該操作性地聯結之啟動子上游、表現構築體的3'端下游，並可同時發生在啟動子上游與表現構築體的3'端下游。

【0166】一些具體例提供用於減少在植物上進食的昆蟲(譬如鞘翅目及/或半翅目)害蟲所導致的宿主植物(譬如玉米植物)損傷的方法，其中該方法包含將表現本發明至少一個核酸分子的經轉形植物細胞提供至宿主植物，其中該(多個)核酸分子在被該(多個)害蟲攝入後發揮功能，以抑制該(多個)害蟲之標靶聚核苷酸的表現，該表現抑制造成該(多個)害蟲死亡及/或減少生長，藉此減少該(多個)害蟲所導致的宿主植物損傷。在一些具體例中，該(多個)核酸分子包含dsRNA分子。在該等與進一步具體例中，該(多個)核酸分子包含了各別包含可特異性地雜交至表現於鞘翅目及/或半翅目害蟲細胞的核酸分子的不止一個聚核苷酸的dsRNA分子。在一些具體例中，該(多個)核酸分子係由可特異性地雜交至表現於昆蟲害蟲細胞的核酸分子的一個聚核苷酸所構成。

【0167】 在一些具體例中，提供了用於增加玉米作物產量的方法，其中該方法包含將本發明至少一個核酸分子引進一玉米植物；培養該玉米植物，以容許包含該核酸的iRNA分子表現，其中包含該核酸的iRNA分子的表現抑制昆蟲(譬如鞘翅目及/或半翅目)害蟲損傷及/或生長，藉此減少或消除由於害蟲侵擾所致的產量損失。在一些具體例中，該iRNA分子為dsRNA分子。在該等與進一步具體例中，包含dsRNA分子的該(多個)核酸分子包含可特異性地雜交至表現於昆蟲害蟲細胞的核酸分子的不止一個聚核苷酸。在一些例子中，該(多個)核酸分子包含可特異性地雜交至表現於鞘翅目及/或半翅目害蟲細胞的核酸分子的聚核苷酸。

【0168】 在一些具體例中，提供了用於調節昆蟲(譬如鞘翅目及/或半翅目)害蟲之標靶基因表現的方法，該方法包含，以包含編碼本發明至少一個iRNA分子的聚核苷酸的一載體轉形植物細胞，其中該聚核苷酸係操作性地聯結至一啟動子與一轉錄終止元件；在足以容許包含複數個經轉形之植物細胞的植物細胞培養物發育的條件下培養該經轉形植物細胞；選擇已將該聚核苷酸整合至其基因組中的經轉形植物細胞；篩揀用於表現該經整合之聚核苷酸所編碼的iRNA分子的該經轉形植物細胞；選擇表現該iRNA分子的基因轉殖植物細胞；以及將該選定基因轉殖植物細胞餵給昆蟲害蟲。植物亦可從表現該經整合核酸分子所編碼之iRNA分子的經轉形植物細胞再生。在一些具體例中，

該iRNA分子為dsRNA分子。在該等與進一步具體例中，該(多個)核酸分子包含dsRNA分子，其各別包含可特異性地雜交至表現於昆蟲害蟲細胞的一核酸分子的不止一個聚核苷酸。在一些例子中，該(多個)核酸分子包含可特異性地雜交至表現於鞘翅目及/或半翅目害蟲細胞的一核酸分子的聚核苷酸。

【0169】作為併入植物細胞基因組之重組基因的表現產物、或併入在種植前施用至種子之塗層或種子處理，本發明的iRNA分子可併入植物物種(譬如玉米)種子。包含重組基因的一植物細胞被視為基因轉殖事件。亦包括在本發明具體例的是用於將iRNA分子傳遞至昆蟲(譬如鞘翅目及/或半翅目)害蟲的傳遞系統。舉例來說，本發明的iRNA分子可直接引進(多個)害蟲的細胞。引進的方法可包括直接混合iRNA和來自(多個)昆蟲害蟲宿主的植物組織，還有將包含本發明iRNA分子的組成物施用至宿主植物組織。舉例來說，iRNA分子可灑在植物表面上。或者，一iRNA分子可藉由微生物表現，且可將該微生物施用至植物表面上、或藉由物理方式引進根或莖，例如注射。如上文所討論，一基因轉殖植物亦可基因改造成表現足以殺死習知侵染該植物之昆蟲害蟲的份量的至少一個iRNA分子。化學或酶促合成所製造的iRNA分子亦可以和普通農業實踐一致的方式調配，並用作控制昆蟲害蟲所致之植物損傷的噴灑或誘餌產品。該調配物可包括有效的葉面覆蓋所需的適當膠黏劑和濕潤劑，還有保護iRNA分子(譬如dsRNA分

子)免於UV損傷的UV保護劑。此類添加劑慣常用於生物殺蟲劑工業，並為熟習此藝者眾所周知。此類施用可和其他噴灑殺蟲劑施用(以生物為基礎或其他方式)組合，以增進免於害蟲的植物保護作用。

【0170】本案列舉的所有參考文獻，包括出版品、專利、與專利申請案係以參照方式併入本案，在某種程度上，彼等和本揭示內容的明確細節不一致，並以彷彿各別參考文獻是個別地且明確地被指出以參照方式併入且以全文列示於本案的相同程度併入。本案所討論的參考文獻僅僅是為了彼等的揭露是早於本申請案的申請日而被提供。本案並無內容被解讀為承認本發明人無權憑藉先前發明而先於此類揭露內容。

【0171】提供下列實施例以例示某些特定特徵及/或態樣。該等實施例不應解讀成本揭示內容限於所說明的特定特徵或態樣。

實施例

實施例1：材料與方法

樣本製備和生物試驗

【0172】眾多dsRNA分子(包括該等對應於 *rpb 7-1* reg1 (SEQ ID NO:7)、*rpb 7-2* reg1 (SEQ ID NO:8)、*rpb 7-3* reg1 (SEQ ID NO:9)、與 *rpb 7-1* v1 (SEQ ID NO:10)者)是使用MEGASCRIPT® T7 RNAi套組(LIFE TECHNOLOGIES, Carlsbad, CA)或T7 Quick高產量RNA合成套組(NEW ENGLAND BIOLABS, Whitby,

Ontario)合成與純化。純化的dsRNA分子是在TE緩衝液製備，所有生物試驗含有由此緩衝液構成的控制處理組，其適宜作為WCR (西方玉米根蟲)死亡或生長抑制的背景檢查。在生物試驗緩衝液中的dsRNA分子濃度是使用NANODROP™ 8000 分光光度計 (THERMO SCIENTIFIC, Wilmington, DE)測量。

【0173】樣本係以新生昆蟲幼蟲在人工昆蟲膳食上進行的生物試驗測試昆蟲活性。WCR卵係獲自CROP CHARACTERISTICS, INC. (Farmington, MN)。

【0174】生物試驗係於為了昆蟲生物試驗特別設計的128-孔塑料盤(C-D INTERNATIONAL, Pitman, NJ)進行。各孔含有為了鞘翅目昆蟲生長所設計的約1.0 mL人工膳食。將一份60 μ L的dsRNA樣本以移液管傳至各孔的膳食表面(40 μ L/cm²)。dsRNA樣本濃度係計算成孔中表面積(1.5 cm²)每平方公分的dsRNA份量(ng/cm²)。將處理盤置於通風櫃，直到膳食表面上的固體蒸發或吸收進入膳食。

【0175】在孵化幾小時內，以濕潤的駱駝毛刷子將個別幼蟲挑起並放在處理膳食上(每孔一或兩隻幼蟲)。隨後以透明塑料膠黏片將128-孔塑料盤的遭侵染孔密封並排氣以允許氣體交換。使生物試驗盤維持在受控制環境條件(28 °C，~40%相對濕度，16:8 (明：暗))，達9天，在該時間後，記錄暴露至各樣本的昆蟲總數、死亡昆蟲數、與存活昆蟲重量。計算各個處理的平均百分比死亡與平均生

長抑制。生長抑制(GI)係如下計算：

$$GI = [1 - (TWIT/TNIT)/(TWIBC/TNIBC)] ,$$

其中TWIT為處理組的活昆蟲總重；

TNIT為處理組的昆蟲總數；

TWIBC為背景檢查組(緩衝液控制組)的活昆蟲總重；及

TNIBC為背景檢查組(緩衝液控制組)的昆蟲總數。

【0176】統計分析是使用JMP™軟體(SAS, Cary, NC)執行。

【0177】LC₅₀ (致死濃度)係定義為殺死50%測試昆蟲的劑量。GI₅₀ (生長抑制)係定義為測試昆蟲的平均生長(譬如活重)是背景檢查組樣本所見平均值的50%的劑量。

【0178】重複的生物試驗證實特定樣本的攝入造成玉米根蟲幼蟲出乎意料和出於預期的死亡與生長抑制。

實施例2：識別候選標靶基因

【0179】來自WCR (西方玉米根蟲)多個發育階段的昆蟲被挑選用於匯集轉錄組分析，以提供受到RNAi基因轉殖植物昆蟲保護技術控制的候選標靶基因序列。

【0180】在一個範例中，總RNA係單離自約0.9 gm完全一齡WCR幼蟲；(孵化後4至5日；維持在16 °C)，並使用下列以酚/TRI REAGENT®為主的方法純化(MOLECULAR RESEARCH CENTER, Cincinnati, OH)：

【0181】使幼蟲於室溫以10 mL的TRI REAGENT®

在15 mL均質機中均質化，直到獲得均質的懸浮液。在室溫培育5 min.後，將均質物分配至1.5 mL離心管(每管1 mL)，加入200 μ L氯仿，使混合物劇烈攪拌15秒。使提取靜置於室溫10 min後，藉由於4 °C離心12,000 x g使相分離。小心地將上層相(包含約0.6 mL)移至另一無菌1.5 mL管，並加入同樣體積的室溫異丙醇。於室溫培育5至10 min後，使混合物於12,000 x g離心8 min (4 °C或25 °C)。

【0182】小心地將上清液移除丟棄，以75%乙醇渦旋振盪洗滌RNA丸粒兩次，每次洗滌後以7,500 x g離心5 min (4 °C或25 °C)回收。小心地將乙醇移除，使丸粒風乾3至5 min，隨後溶於不含核酸酶的無菌水。測量260 nm與280 nm吸光度(A)來決定RNA濃度。從約0.9 gm幼蟲的典型提取產生超過1 mg總RNA， A_{260}/A_{280} 比例為1.9。將依此提取的RNA儲存於-80 °C，直到進一步加工。

【0183】RNA品質是藉由1%瓊脂凝膠試跑一份來測定。瓊脂凝膠溶液係在高壓滅菌容器內使用高壓滅菌的10x TAE緩衝液(Tris-乙酸鹽EDTA；1x 濃度為0.04 M Tris-乙酸鹽，1 mM EDTA (乙二胺四乙酸鈉鹽)，pH 8.0)以DEPC (焦碳酸二乙酯)處理過的水稀釋製作。1x TAE係用作運行緩衝液。在使用前，以RNaseAway™ (INVITROGEN INC., Carlsbad, CA)清潔電泳槽與成孔梳。將兩 μ L的RNA樣本和8 μ L的TE緩衝液(10 mM Tris HCl pH 7.0; 1 mM EDTA)與10 μ L的RNA樣本緩衝液 (NOVAGEN® Catalog No 70606; EMD4 Bioscience,

Gibbstown, NJ)混合。使樣本於70 °C加熱3 min，冷卻至室溫，並在每孔載入5 µL (含1 µg至2 µg RNA)。市購RNA分子量標記係於分別的孔同時運行，以比對分子大小。使凝膠於60伏特運行2小時。

【0184】正規化 cDNA 庫係由商業服務提供商 (EUROFINS MWG Operon, Huntsville, AL)使用隨機引子方式從幼蟲總RNA製備。將正規化幼蟲cDNA 庫以1/2 盤規模藉由 GS FLX 454 Titanium™ 系列化學於 EUROFINS MWG Operon定序，其產生600,000個讀取，平均讀取長度為348 bp。350,000個讀取組合成超過50,000個重疊群。未組合讀取與重疊群皆使用公眾可用程式FORMATDB (得自NCBI)轉換成BLASTable資料庫。

【0185】總RNA與正規化cDNA庫係由其他WCR發育階段收集的材料以類似方式製備。用於標靶基因篩揀的匯集轉錄組庫係藉由合併代表各種發育階段的cDNA庫成員來建構。

【0186】RNAi靶向的候選基因被假設對害蟲昆蟲存活與生長不可或缺。選定標靶基因同源物係如下述般於轉錄組序列資料庫識別。以PCR擴增標靶基因的全長或部分序列，以製備雙股RNA (dsRNA)製造模板。

【0187】使用候選蛋白編碼序列的TBLASTN搜尋係針對含未組合條葉甲屬序列讀取或組合重疊群的BLASTable資料庫執行。顯著符合的條葉甲屬序列(定義為就重疊群同源物而言，優於 e^{-20} ，就未組合序列讀取同

源物而言，優於 e^{-10})係使用BLASTX針對NCBI非冗餘資料庫確認。此BLASTX搜尋結果確認了TBLASTN搜尋所識別的條葉甲屬同源候選基因序列確實包含條葉甲屬基因、或為最佳符合的存在於條葉甲屬序列的非-條葉甲屬候選基因序列。在一些情況中，很清楚的是藉由非-條葉甲屬候選基因同源性所選出的若干條葉甲屬重疊群或未組合序列讀取有重疊，且重疊群組合無法加入該等重疊。在那些情況中，Sequencher™ v4.9 (GENE CODES CORPORATION, Ann Arbor, MI)係用來將序列組合成較長的重疊群。

【0188】包括條葉甲屬*rpb7* (SEQ ID NOs:1、3、與5)的數個候選標靶基因被識別為可造成鞘翅目害蟲WCR死亡、生長抑制、發育抑制、及/或進食抑制的基因。

【0189】RNA聚合酶複合體II次單元*rpb7*基因係編碼涉及活化同源異型基因的染色質-結合蛋白。

【0190】SEQ ID NO:1、3、與5的序列是新穎的。該序列未在公共資料庫提供且未揭露於PCT國際專利公開號WO/2011/025860；美國專利申請號20070124836；美國專利申請號20090306189；美國專利申請號US20070050860；美國專利申請號20100192265；美國專利7,612,194；或美國專利申請號2013192256。在GENBANK搜尋沒有找到顯著同源性WCR *rpb7-1* (SEQ ID NO:1)核苷酸序列。WCR *rpb7-2* (SEQ ID NO:3)係略有關於來自冷杉尾蜂(*Orussus abietinus*)的序列片段

(GENBANK 寄存號 XM_012420068.1)。WCR *rpb7-3* (SEQ ID NO:5) 係略有關於來自大豆疫病菌 (*Phytophthora sojae*) 的序列片段 (GENBANK 寄存號 XM_009533254.1)。WCR RPB7-1 胺基酸序列 (SEQ ID NO:2) 的最接近同源物是擬穀盜 (*Tribolium castaneum*) 蛋白，其具有 GENBANK 寄存號 XP_970313.1 (99% 相似；同源區有 98% 一致)。WCR RPB7-2 胺基酸序列 (SEQ ID NO:4) 的最接近同源物是熱帶家蚊 (*Culex quinquefasciatus*) 蛋白，其具有 GENBANK 寄存號 XP_001842888.1 (98% 相似；同源區有 96% 一致)。WCR RPB7-3 胺基酸序列 (SEQ ID NO:6) 的最接近同源物是馬鈴薯疫病菌 (*Phytophthora infestans*) 蛋白，其具有 GENBANK 寄存號 XP_002899067.1 (100% 相似；同源區有 99% 一致)。

【0191】*Rpb7* dsRNA 轉殖基因可和其他 dsRNA 分子合併，例如，以提供冗餘 RNAi 靶向與合併 RNAi 效應。表現標靶 *rpb7* 之 dsRNA 的基因轉殖玉米事件可用於防範玉米根蟲所致的食根損傷。*Rpb7* dsRNA 轉殖基因代表了結合在昆蟲抗性管理基因金字塔中的蘇力菌、PIP、及/或 AflP 殺昆蟲蛋白技術的新穎作用模式，以減緩抗該等根蟲控制技術中任一種的根蟲群體之發展。

實施例3：擴增標靶基因以製造 dsRNA

【0192】條葉甲屬 *rpb7* 候選基因序列的全長或部分選殖體係用來生成供 dsRNA 合成的 PCR 擴增子。引子係設

計成藉由PCR擴增各別標靶基因的一部分編碼區。見表1。若適當的話，將T7噬菌體啟動子序列(TTAATACGACTCACTATAGGGAGA；SEQ ID NO:11)併入經擴增正股或反股的5'端。見表1。總RNA係使用TRIzol[®] (Life Technologies, Grand Island, NY)從WCR提取，隨後用於以SuperScriptIII[®] 首股合成系統製成首股cDNA並製作寡聚dT引子指令(Life Technologies, Grand Island, NY)。首股cDNA係使用位置相對的引子用作PCR反應的模板，以擴增全部或部分的原生標靶基因序列。dsRNA亦從包含黃色螢光蛋白(YFP)編碼區的DNA選殖體擴增(SEQ ID NO:12；Shagin *et al.* (2004) Mol. Biol. Evol. 21(5):841-50)。

表1.用於擴增例示性*rpb7*標靶基因與*YFP*負向控制組基因的一部分編碼區的引子與引子對。

	基因 ID	引子 ID	序列
第 1 對	<i>rpb7-1</i>	Dvv- <i>rpb7-1</i> _For	TTAATACGACTCACTATAGGG AGACCACAAGTGTAGAAAAA GTCAAAC (SEQ ID NO:13)
		Dvv- <i>rpb7-1</i> _Rev	TTAATACGACTCACTATAGGG AGAACCCACTATTTTCAATCT GATTTCTC (SEQ ID NO:14)
第 2 對	<i>rpb7-2</i>	Dvv- <i>rpb7-2</i> _For	TTAATACGACTCACTATAGGG AGACCCTCGAACATGAAATAT TGCTGC (SEQ ID NO:15)
		Dvv- <i>rpb7-2</i> _Rev	TTAATACGACTCACTATAGGG AGAGGCGATGACCACTTCCTC TTC (SEQ ID NO:16)
第 3 對	<i>rpb7-3</i>	Dvv- <i>rpb7-3</i> _For	TTAATACGACTCACTATAGGG AGAACGTCGACGCTCACGCC ATGATCTTG (SEQ ID NO:17)
		Dvv- <i>rpb7-3</i> _Rev	TTAATACGACTCACTATAGGG AGAATCATCCGCTTGCGTTTG ATC (SEQ ID NO:18)
第 4 對	<i>rpb7-2</i> <i>v1</i>	Dvv- <i>rpb7-1_v1</i> _For	TTAATACGACTCACTATAGGG AGAAAAGCCATTGTGTTCCGT

第 5 對	YFP		CC (SEQ ID NO:19)
		Dvv- <i>rpb7</i> -1_v1_Rev	TTAATACGACTCACTATAGGG AGATCAATCTGATTTCTCCTTC TGCTC (SEQ ID NO:20)
		YFP-F_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGA GACACCATGGGCTCCAGCGGC GCCC (SEQ ID NO:28)
		YFP-R_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGA GAAGATCTTGAAGGCGCTCTTC AGG (SEQ ID NO:31)

實施例4：RNAi構築體

藉由PCR與dsRNA合成製備模板

【0193】 用來提供製造*rpb7* dsRNA與YFP dsRNA的特異性模板的策略係顯示於圖1與圖2。意圖用於*rpb7* *dsRNA*合成的模板DNAs係藉由PCR使用表1的引子對與單離自WCR卵、一齡幼蟲、或成蟲的總RNA製備(作為PCR模板)的首股cDNA來製備。就各別選定*rpb7* dsRNA與YFP標靶基因區而言，PCR擴增引進位於所擴增正股與反股5'端的T7啟動子序列(YFP區段係從YFP編碼區的DNA選殖體擴增)。標靶基因各區的該兩個PCR擴增片段隨後以約略相等量混合，且混合物係用作dsRNA製造的轉錄模板。見圖1。以特定引子對擴增的dsRNA模板序列為：SEQ ID NO:7 (*rpb7-1* reg1)、SEQ ID NO:8 (*rpb7-2* reg1)、SEQ ID NO:9 (*rpb7-3* reg1)、SEQ ID NO:10 (*rpb7-1* v1)、與SEQ ID NO:12 (YFP)。昆蟲生物試驗的雙股RNA是依照製造商指示 (INVITROGEN) 使用 AMBION® MEGASCRIP[®] RNAi 套組或依照製造商指示 (New England Biolabs, Ipswich, MA) 使用 HiScribe[®] T7 體外轉錄套組來合成純化。dsRNAs 的濃度是使用NanoDrop

TM 8000 分 光 光 度 計 (THERMO SCIENTIFIC, Wilmington, DE)測量。

建構植物轉形載體

【0194】夾帶用於形成髮夾的包含 *rpb7* (SEQ ID NOs:1、3、與5)區段之標靶基因構築體的進入載體係使用化學合成片段(DNA2.0, Menlo Park, CA)組合與標準分子選殖方法來組裝。RNA初級轉錄體所形成的分子內髮夾係以下列促成，藉由(在單一轉錄單元內)使 *rpb7* 標靶基因區段的兩個拷貝彼此以相反方向排列，該兩個區段被聯結子聚核苷酸(譬如(環圈，例如(SEQ ID NO:96)或ST-LS1 內含子；Vancanneyt *et al.* (1990) Mol. Gen. Genet. 220(2):245-50)分開。於是，初級mRNA轉錄體含有被聯結子序列分開之作為彼此的大型反向重複的兩個 *rpb7* 基因區段序列。一份拷貝的啟動子(譬如玉蜀黍泛素1，美國專利號5,510,474；來自花椰菜鑲嵌病毒(CaMV)的35S；甘蔗桿狀病毒(ScBV)啟動子；來自水稻肌動蛋白基因的啟動子；泛素啟動子；pEMU；MAS；玉蜀黍 H3組蛋白啟動子；ALS啟動子；菜豆基因啟動子；*cab*；*rubisco*；*LAT52*；*Zm13*；及/或*apg*)係用於驅動產生初級mRNA髮夾轉錄體，以及一包含3'未轉譯區的片段(譬如玉蜀黍過氧化物酶5基因(ZmPer5 3'UTR v2；美國專利6,699,984)、AtUbi10、AtEf1、或StPinII)係用於終止髮夾-RNA-表現基因的轉錄。

【0195】二元目的載體包含在植物可操作啟動子(譬

如甘蔗桿狀病毒(ScBV)啟動子(Schenk *et al.* (1999) Plant Mol. Biol. 39:1221-30))或ZmUbi1(美國專利5,510,474))的調控之下的除草劑耐受性基因(芳氧基鏈烷酸雙加氧酶；AAD-1 v3) (美國專利7,838,733(B2)，與Wright *et al.* (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 107:20240-5)。5'UTR與聯結子係座落於啟動子區段3'端與**AAD-1**編碼區起始密碼子之間。包含來自玉蜀黍脂解酶基因的3'未轉譯區片段(ZmLip 3'UTR；美國專利7,179,902)係用於終止AAD-1-mRNA的轉錄。

【0196】一負向控制組二元載體—其包含表現YFP蛋白的基因—係藉由和典型二元目的載體與進入載體的標準GATEWAY®重組反應建構。該二元目的載體包含在玉蜀黍泛素1啟動子(如上文)調控之下的除草劑耐受性基因(芳氧基鏈烷酸雙加氧酶；AAD-1 v3) (如上文)與包含來自玉蜀黍脂解酶基因的3'未轉譯區的片段(ZmLip 3'UTR；如上文)。該進入載體包含在玉蜀黍泛素1啟動子(如上文)之表現控制下的YFP編碼區(SEQ ID NO:21)與包含來自玉蜀黍過氧化物酶5基因(如上文)的3'未轉譯區的片段。

實施例5：篩揀候選標靶基因

【0197】在以膳食為主的試驗中投予WCR時，設計用來抑制實施例2所識別的標靶基因序列的合成dsRNA導致死亡與生長抑制。

【0198】重複的生物試驗證實攝入衍生自**rpb7-1** reg1與**rpb7-1** v1的dsRNA製劑造成了西方玉米根蟲幼蟲

的死亡及生長抑制。表2顯示暴露至*rpb7-1 reg1*與*rpb7-1 v1* dsRNAs的9天後，以膳食為主的WCR 幼蟲進食生物試驗結果，還有以從黃色螢光蛋白(YFP)編碼區(SEQ ID NO:12)製備的dsRNA負向控制組樣本獲得的結果。表3顯示暴露至*rpb7-1 v1* dsRNA的LC₅₀與GI₅₀結果。

表2. 在西方玉米根蟲幼蟲進食9天後獲得的*rpb7* dsRNA 膳食試驗結果。ANOVA分析發現平均%死亡與平均%生長抑制(GI)有顯著差異。平均是使用杜克-克萊默測試(Tukey-Kramer test)分開。

基因名稱	劑量 (NG/CM ²)	N	平均(%死亡) ± SEM*	平均(GI) ± SEM
<i>rpb7-1 v1</i>	500	20	76.72 ± 3.07 (A)	0.91 ± 0.01 (A)
<i>rpb7-1 Reg1</i>	500	2	64.71 ± 17.64 (A)	0.94 ± 0.02 (A)
TE**	0	28	15.47 ± 2.58 (B)	0.07 ± 0.04 (B)
水	0	23	13.39 ± 2.09 (B)	-0.03 ± 0.05 (B)
YFP***	500	24	11.05 ± 1.80 (B)	0.03 ± 0.03 (B)

*SEM = 平均標準差。括號中的字母表示統計位準。未以相同字母連結的位準為顯著不同 (P<0.05)。

**TE = Tris HCl (1 mM)加上EDTA (0.1 mM)緩衝液，pH7.2。

***YFP =黃色螢光蛋白

表 3. *rpb7* dsRNA 在 WCR 幼蟲上的口服效力整理 (ng/cm²)。

基因名稱	LC ₅₀	範圍	GI ₅₀	範圍
<i>rpb7-1 v1</i>	12.50	8.89-17.19	1.58	1.21-2.06

【0199】先前已建議條葉甲屬的某些基因可利用於RNAi-介導的昆蟲控制。見美國專利公開號2007/0124836，其揭露906個序列，和美國專利號7,612,194，其揭露9,112個序列。然而，建議具有RNAi-介導的昆蟲控制利用性的許多基因被測定無效於控制條葉甲屬。亦測到序列*rpb7-1 reg1*與*rpb7-1 v1* dsRNAs提供條葉甲屬出乎意料和出於預期的優越控制，相較於被建議具有RNAi-介導的昆蟲控制利用性的其他基因。

【0200】舉例來說，膜聯蛋白、乙型血影蛋白2、與mtRP-L4各者在美國專利7,612,194被建議有效於RNAi-介導的昆蟲控制。SEQ ID NO:22為膜聯蛋白第1區(Reg 1)的DNA序列，SEQ ID NO:23為膜聯蛋白第2區(Reg 2)的DNA序列。SEQ ID NO:24為乙型血影蛋白2第1區(Reg 1)的DNA序列，SEQ ID NO:25為乙型血影蛋白2第2區(Reg2)的DNA序列。SEQ ID NO:26為mtRP-L4第1區(Reg 1)的DNA序列，SEQ ID NO:27為mtRP-L4第2區(Reg 2)的DNA序列。YFP序列(SEQ ID NO:12)亦用於製造作為負向控制組的dsRNA。

【0201】前述序列係各別用於藉由實施例3的方法製造dsRNA。用來提供製造dsRNA的特異性模板的策略顯示於圖2。意圖用於dsRNA合成的模板係藉由PCR使用表4的引子對與單離自WCR一齡幼蟲的總RNA製備的(作為PCR模板)首股cDNA來製備。(YFP係從DNA選殖體擴增。)就各別選定標靶基因區而言，進行兩個分開的PCR

擴增。首個PCR擴增引進位於所擴增正股5'端的T7啟動子序列。第二個反應將T7啟動子序列併入反股5'端。標靶基因各區的該兩個PCR擴增片段隨後以約略相等量混合，且混合物係用作dsRNA製造的轉錄模板。見圖2。雙股RNA是依照製造商指示 (Invitrogen) 使用 AMBION® MEGAscript® RNAi套組來合成純化。dsRNAs的濃度是使用 NANODROP™ 8000 分光光度計 (THERMO SCIENTIFIC, Wilmington, DE)測量且dsRNAs係各別藉由上述以膳食為主的相同生物試驗方法測試。表4列出用於製造膜聯蛋白Reg1、膜聯蛋白Reg2、乙型血影蛋白2 Reg1、乙型血影蛋白2 Reg2、mtRP-L4 Reg1、mtRP-L4 Reg2、與YFP dsRNA分子的引子序列。表5代表曝露至該等dsRNAs的9天後以膳食為主的WCR幼蟲進食生物試驗結果。重複的生物試驗證實攝入該等dsRNAs並無造成超過TE緩衝液控制組樣本、水、或YFP蛋白質所見的西方玉米根蟲幼蟲的死亡或生長抑制。

表4. 用於擴增基因的一部分編碼區的引子與引子對。

	基因 (區)	引子 ID	序列
第 6 對	YFP	YFP-F_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAC ACCATGGGCTCCAGCGGCGCCC (SEQ ID NO:28)
	YFP	YFP-R	AGATCTTGAAGGCGCTCTTCAGG (SEQ ID NO:29)
第 7 對	YFP	YFP-F	CACCATGGGCTCCAGCGGCGCCC (SEQ ID NO:30)
	YFP	YFP-R_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAA GATCTTGAAGGCGCTCTTCAGG (SEQ ID NO:31)
第 8 對	膜聯蛋白 (Reg 1)	Ann-F1_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAG CTCCAACAGTGGTTCCTTATC (SEQ

			ID NO:32)
	膜聯蛋白 (Reg 1)	Ann-R1	CTAATAATTCTTTTTTAATGTTTCCT GAGG (SEQ ID NO:33)
第 9 對	膜聯蛋白 (Reg 1)	Ann-F1	GCTCCAACAGTGGTTCCTTATC (SEQ ID NO:34)
	膜聯蛋白 (Reg 1)	Ann-R1_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAC TAATAATTCTTTTTTAATGTTTCCTG AGG (SEQ ID NO:35)
第 10 對	膜聯蛋白 (Reg 2)	Ann-F2_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAT TGTTACAAGCTGGAGAACTTCTC (SEQ ID NO:36)
	膜聯蛋白 (Reg 2)	Ann-R2	CTTAACCAACAACGGCTAATAAGG (SEQ ID NO:37)
第 11 對	膜聯蛋白 (Reg 2)	Ann-F2	TTGTTACAAGCTGGAGAACTTCTC (SEQ ID NO:38)
	膜聯蛋白 (Reg 2)	Ann-R2T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAC TTAACCAACAACGGCTAATAAGG (SEQ ID NO:39)
第 12 對	乙型血影 蛋白 2 (Reg 1)	Betasp2-F1_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAA GATGTTGGCTGCATCTAGAGAA (SEQ ID NO:40)
	乙型血影 蛋白 2 (Reg 1)	Betasp2-R1	GTCCATTTCGTCCATCCACTGCA (SEQ ID NO:41)
第 13 對	乙型血影 蛋白 2 (Reg 1)	Betasp2-F1	AGATGTTGGCTGCATCTAGAGAA (SEQ ID NO:42)
	乙型血影 蛋白 2 (Reg 1)	Betasp2-R1_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAG TCCATTTCGTCCATCCACTGCA (SEQ ID NO:43)
第 14 對	乙型血影 蛋白 2 (Reg 2)	Betasp2-F2_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAG CAGATGAACACCAGCGAGAAA (SEQ ID NO:44)
	乙型血影 蛋白 2 (Reg 2)	Betasp2-R2	CTGGGCAGCTTCTTGTTTCCTC (SEQ ID NO:45)
第 15 對	乙型血影 蛋白 2 (Reg 2)	<i>Betasp2</i> -F2	GCAGATGAACACCAGCGAGAAA (SEQ ID NO:46)
	乙型血影 蛋白 2 (Reg 2)	Betasp2-R2_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAC TGGGCAGCTTCTTGTTTCCTC (SEQ ID NO:47)
第 16 對	<i>mtRP-L4</i> (Reg 1)	L4-F1_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAA GTGAAATGTTAGCAAATATAACATC C (SEQ ID NO:48)

	<i>mtRP-L4</i> (Reg 1)	L4-R1	ACCTCTCACTTCAAATCTTGACTTT G (SEQ ID NO:49)
第 17 對	<i>mtRP-L4</i> (Reg 1)	L4-F1	AGTGAAATGTTAGCAAATATAACAT CC (SEQ ID NO:50)
	<i>mtRP-L4</i> (Reg 1)	L4-R1_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAA CCTCTCACTTCAAATCTTGACTTTG (SEQ ID NO:51)
第 18 對	<i>mtRP-L4</i> (Reg 2)	L4-F2_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAC AAAGTCAAGATTTGAAGTGAGAGGT (SEQ ID NO:52)
	<i>mtRP-L4</i> (Reg 2)	L4-R2	CTACAAATAAAACAAGAAGGACCCC (SEQ ID NO:53)
第 19 對	<i>mtRP-L4</i> (Reg 2)	L4-F2	CAAAGTCAAGATTTGAAGTGAGAGG T (SEQ ID NO:54)
	<i>mtRP-L4</i> (Reg 2)	L4-R2_T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAC TACAAATAAAACAAGAAGGACCCC (SEQ ID NO:55)

表5.以西方玉米根蟲幼蟲進食9天後獲得的膳食試驗結果。

基因名稱	劑量 (ng/cm ²)	平均活幼蟲重量 (mg)	平均%死亡	平均生長抑制
膜聯蛋白-Reg 1	1000	0.545	0	-0.262
膜聯蛋白-Reg 2	1000	0.565	0	-0.301
乙型血影蛋白 2 Reg 1	1000	0.340	12	-0.014
乙型血影蛋白 2 Reg 2	1000	0.465	18	-0.367
<i>mtRP-L4</i> Reg 1	1000	0.305	4	-0.168
<i>mtRP-L4</i> Reg 2	1000	0.305	7	-0.180
TE 緩衝液*	0	0.430	13	0.000
水	0	0.535	12	0.000
YFP**	1000	0.480	9	-0.386

*TE = Tris HCl (10 mM)加上EDTA (1 mM)緩衝液，
pH8。

**YFP = 黃色螢光蛋白

實施例6：製造包含殺昆蟲dsRNAs的基因轉殖玉蜀黍組織

【0202】農桿菌-介導的轉形。經由經穩定整合至植物基因組中之嵌合基因的表現製造一或多個殺昆蟲dsRNA分子(舉例來說，至少一個dsRNA分子，包括靶向包含*rpb7* (譬如SEQ ID NOs:1、3、與5)之基因的一dsRNA分子)的基因轉殖玉蜀黍細胞、組織、與植物係按照農桿菌-介導的轉形製造。運用超級二元或二元轉形載體的玉蜀黍轉形方法為本領域所習知，舉例來說，說明於美國專利8,304,604，其以參照方式整體併入本案。經轉形組織係以在含有蓋草(Haloxifop)的介質上生長的能力來選擇且視情況以dsRNA製造來篩揀。將一部分的此類經轉形組織培養物可呈現於新生玉米根蟲幼蟲，以用於基本上如實施例1所說明的生物試驗。

【0203】農桿菌培養啟始。將夾帶上述二元轉形載體(實施例4)的農桿菌菌株DA13192細胞(PCT國際公開號WO 2012/016222A2)的甘油庫存液劃在含適當抗生素的AB最少養份培養介質盤上(Watson *et al.* (1975) J. Bacteriol. 123:255-264)並於20 °C生長3天。隨後將該培養物劃在含相同抗生素的YEP盤上(gm/L：酵母萃取物，10；蛋白胨，10；NaCl，5)並於20 °C培育1天。

【0204】農桿菌培養。在實驗當天，將培育介質與乙醯丁香酮的庫存液製備成適用於實驗構築體數目的體積並移液至無菌、拋棄式250 mL燒瓶。培育介質(Frame *et al.* (2011) *Genetic Transformation Using Maize Immature Zygotic Embryos*. IN Plant Embryo Culture Methods

and Protocols: Methods in Molecular Biology. T. A. Thorpe and E. C. Yeung, (Eds), Springer Science and Business Media, LLC. pp 327-341)含有：2.2 gm/L MS 鹽；1X ISU修飾MS維生素(Frame *et al.*, *ibid.*) 68.4 gm/L 蔗糖；36 gm/L葡萄糖；115 mg/L L-脯胺酸；與100 mg/L 肌醇；pH 5.4)。將乙醯丁香酮從溶於100%二甲亞砜的1 M 庫存液加至含有培育介質的燒瓶，至200 μ M最終濃度，使溶液充分混合。

【0205】就個別構築體而言，將來自YEP盤、充滿農桿菌的1或2個接種圈懸浮於無菌拋棄式50 mL離心管中的15 mL培育介質/乙醯丁香酮庫存液，並以分光光度計測量溶液在550 nm (OD₅₅₀)的光密度。隨後使用額外培育介質/乙醯丁香酮混合物將懸浮液稀釋至OD₅₅₀為0.3至0.4。隨後於室溫將農桿菌懸浮液管水平地置於設為約75 rpm平台振盪器並振盪1至4小時，同時進行胚芽剝離。

【0206】穗消毒和胚芽單離。玉蜀黍未成熟胚芽係獲自長在溫室且自體或同胞授粉的玉米自交系B104植物(Hallauer *et al.* (1997) Crop Science 37:1405-1406)，以產生穗部。穗部是在授粉後的大約10至12天採收。在實驗當天，使去掉外皮的穗部浸在20%市售漂白劑溶液(ULTRA CLOROX® Germicidal Bleach，6.15%次氯酸鈉；兩滴TWEEN 20)並振晃20至30 min，接著在層流通風櫥以無菌去離子水潤洗三次進行表面消毒。未成熟合子胚芽(1.8至2.2 mm長)係以無菌方式從各個穗部剝離並隨

機分配到含有溶於液體培育介質和200 μM 乙醯丁香酮的2.0 mL適當農桿菌細胞懸浮液的微量離心管，對其已加入2 μL 的10% BREAK-THRU[®] S233表面活性劑(EVONIK INDUSTRIES; Essen, Germany)。就既定實驗組別而言，來自匯集穗部的胚芽係用於各別轉形。

【0207】農桿菌共同培養。在單離之後，將胚芽置於搖動平台上5分鐘。隨後將該管內容物倒至共同培養介質盤上，其含有4.33 gm/L MS鹽；1X ISU修飾MS維生素；30 gm/L蔗糖；700 mg/L L-脯胺酸；3.3 mg/L 麥草畏(Dicamba) (3,6-二氯-o-茴香酸或3,6-二氯-2-甲氧基苯甲酸)，溶於KOH；100 mg/L 肌醇；100 mg/L酪蛋白酶解產物；15 mg/L AgNO_3 ；200 μM 乙醯丁香酮，溶於DMSO；與3 gm/L GELZAN[™]，於pH 5.8。以無菌拋棄式移液管將液體農桿菌懸浮液移除。隨後用無菌鑷子在顯微鏡的幫助下將胚芽定位使子葉盤朝上。將該盤封閉，以3M[™] MICROPORE[™]醫用膠帶密封，並置於25 °C培育器和大約60 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 光合活性輻射(PAR)的連續光照。

【0208】癒傷組織(Callus)的選擇與基因轉殖事件的再生。在共同培養期後，將胚芽移至休止介質，其由下列構成：4.33 gm/L MS鹽；1X ISU修飾MS維生素；30 gm/L蔗糖；700 mg/L L-脯胺酸；3.3 mg/L 麥草畏，溶於KOH；100 mg/L 肌醇；100 mg/L酪蛋白酶解產物；15 mg/L AgNO_3 ；0.5 gm/L MES (2-(N-嗎啉代)乙磺酸單水合物；PHYTOTECNOLOGIES LABR.; Lenexa, KS)；250

mg/L 羧苄青黴素；與 2.3 gm/L GELZAN™；於 pH 5.8。不超過 36 個胚芽被移至各盤。將該盤置於透明塑料箱並於 27 °C 培育，以大約 $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR 連續照光 7 至 10 天。隨後將癒癰胚芽移至(<18 個/盤)選擇介質 I 上，其包含休止介質(上文)和 100 nM R-蓋草酸(0.0362 mg/L；選擇夾帶 AAD-1 基因的癒傷組織)。將該盤放回透明箱並於 27 °C 培育，以大約 $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR 連續照光 7 天。隨後將癒癰胚芽移至(<12 個/盤)選擇介質 II 上，其包含休止介質(上文)和 500 nM R-蓋草酸(0.181 mg/L)。將該盤放回透明箱並於 27 °C 培育，以大約 $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR 連續照光 14 天。此選擇步驟容許基因轉殖癒傷組織進一步增生與分化。

【0209】 將增生胚性癒傷組織移至(<9 個/盤)預再生介質上。預再生介質含有 4.33 gm/L MS 鹽；1X ISU 修飾 MS 維生素；45 gm/L 蔗糖；350 mg/L L-脯胺酸；100 mg/L 肌醇；50 mg/L 酪蛋白酶解產物；1.0 mg/L AgNO₃；0.25 gm/L MES；0.5 mg/L 萘乙酸，溶於 NaOH；2.5 mg/L 脫落酸，溶於乙醇；1 mg/L 6-苄胺基嘌呤；250 mg/L 羧苄青黴素；2.5 gm/L GELZAN™；與 0.181 mg/L 蓋草酸；於 pH 5.8。將該盤儲存於透明箱並於 27 °C 培育，以大約 $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR 連續照光 7 天。隨後將再生癒傷組織移至(<6 個/盤)至 PHYTATRAYS™ (SIGMA-ALDRICH) 之再生介質並於 28 °C 培育，每天 16 小時明/8 小時暗(大約 $160 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR) 共 14 天或直到發育出芽和根。再生

介質含有4.33 gm/L MS鹽；1X ISU修飾MS維生素；60 gm/L蔗糖；100 mg/L肌醇；125 mg/L羧苄青黴素；3 gm/L GELLAN™膠；與0.181 mg/L R-蓋草酸；於pH 5.8。隨後將帶有主根的小芽單離並移至延長培養基，並無選擇。延長培養基含有4.33 gm/L MS鹽；1X ISU修飾MS維生素；30 gm/L蔗糖；與3.5 gm/L GELRITE™；於pH 5.8。

【0210】經轉形植物幼芽係以在含有蓋草的介質上生長的能力來選擇，並從PHYTATRAYS™移植至填有生長介質的小盆 (PROMIX BX; PREMIER TECH HORTICULTURE)，以杯子或HUMI-DOMES (ARCO PLASTICS)覆蓋，隨後在CONVIRON生長室(27 °C日/24 °C夜, 16-小時光周期, 50-70% RH, 200 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR)強化。在一些例子中，推定基因轉殖小植株的轉殖基因相對拷貝數係使用設計用來偵測整合至玉蜀黍基因組中的*AADI*除草劑耐受性基因的引子藉由定量即時PCR試驗分析。再者，RNA qPCR試驗係用於偵測推定轉化體是否存在聯結子及/或標靶序列。隨後將選定的經轉形小植株搬進溫室，供進一步生長與測試。

【0211】在溫室轉移並建立供生物試驗與種子製造之T₀植物。當植物達到V3-V4階段，將彼等移植至IE CUSTOM BLEND (PROFILE/METRO MIX 160)土壤混合物並於溫室長至開花(曝光類型：照光或趨同；亮度限制：1200 PAR；16-小時日長；27 °C日/24 °C夜)。

【0212】將用於昆蟲生物試驗的植物從小盆移植至

TINUS™ 350-4 ROOTRAINERS® (SPENCER-Lemaire INDUSTRIES, Acheson, Alberta, Canada) (每個 ROOTRAINER® 每事件一植物)。在移植至 ROOTRAINERS®約四天後，使植物被侵染以用於生物試驗。

【0213】T₁代植物係藉由以非-基因轉殖優秀自交系 B104植物或其他適當花粉予體收集的花粉授粉T₀基因轉殖植物的穗絲，並栽種所得種子。可能的話，進行正反雜交。

實施例7：基因轉殖玉蜀黍組織的分子分析

【0214】玉蜀黍組織的分子分析(譬如RT-qPCR)是在評估食根損傷的同一天從溫室生長植物所收集的葉與根樣本上進行。

【0215】標靶的RT-qPCR試驗結果係用於確效轉殖基因的表現。在經表現RNAs內的聯接子序列(其為形成 dsRNA髮夾分子所不可或缺的)的RT-qPCR試驗結果係用於確效轉錄體的存在。轉殖基因RNA之表現位準係相對於內源性玉蜀黍基因之RNA位準來測量。

【0216】偵測gDNA的一部分 *AAD1* 編碼區的DNA qPCR分析係用於估算轉殖基因插入拷貝數。該等分析的樣本是從生長在環境室的植物收集。該結果係和設計用來偵測一部分的單一拷貝原生基因的試驗的DNA qPCR結果比對，簡單事件(具有 *rpb7*轉殖基因的一或兩個拷貝)係繼續進行以供溫室的進一步研究。

【0217】此外，設計用來偵測一部分的大觀黴素抗性基因(*SpecR*；夾帶在T-DNA以外的二元載體質體上)的qPCR試驗係用於測定基因轉殖植物是否含有外來的經整合質體骨架序列。

【0218】RNA轉錄體表現位準：標靶qPCR。癒傷組織細胞事件或基因轉殖植物係藉由標靶序列的即時定量PCR (qPCR)分析，以測定相較於編碼TIP41樣蛋白質(即，GENBANK寄存號AT4G34270的玉蜀黍同源物；具有74%一致性的tBLASTX得分；SEQ ID NO:56)的內部玉蜀黍基因(舉例來說，GENBANK 寄存號BT069734)的轉錄體位準的全長髮夾轉錄體的相對表現位準。RNA係使用Norgen BioTek總RNA單離套組(Norgen, Thorold, ON)單離。根據套組的建議流程將總RNA投至On Column DNaseI處理。隨後使RNA於NanoDrop 8000分光光度計(THERMO SCIENTIFIC)定量並將濃度正規化至50 ng/ μ L。首股cDNA係使用10 μ L反應體積的高容量cDNA合成套組(High CAPACITY cDNA SYNTHESIS KIT)(INVITROGEN)和5 μ L 變性d RNA實質上根據製造商的建議流程製備。將該流程稍做調整，以包括添加10 μ L的100 μ M T20VN 寡聚核苷酸 (IDT)(TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN，其中V為A、C、或G，且N為A、C、G、或T；SEQ ID NO:57)至1 mL管的隨機引子庫存混合物，以製備合併隨機引子與寡聚dT的工作庫存。

【0219】在cDNA合成後，樣本以不含核酸酶的水以1:3稀釋，並儲存於-20 °C直到試驗。

【0220】標靶基因與TIP41-樣轉錄體的分別即時PCR試驗係於10 μL反應體積的LIGHTCYCLER™ 480 (ROCHE DIAGNOSTICS, Indianapolis, IN)上進行。就標靶基因試驗而言，反應係以引子*rpb7* (F) (SEQ ID NO:58)與 *rpb7* (R) (SEQ ID NO:59)、以及標記有FAM並以Zen與Iowa Black淬熄劑二次淬熄的IDT訂製寡聚探針*rpb7* PRB Set1 (SEQ ID NO:95)運行。就TIP41-樣參考基因試驗而言，使用引子TIPmxF (SEQ ID NO:60)與TIPmXR (SEQ ID NO:61)、與標記有HEX (六氯螢光素)的探針HXTIP (SEQ ID NO:62)。

【0221】所有試驗包括無模板的負向控制組(僅混合物)。就標準曲線而言，空白(來源孔的水)亦包括在來源盤內，以檢查樣本交叉汙染。引子與探針序列係列於表6。供偵測各式轉錄體的反應組分配方係揭露於表7，PCR反應條件匯整於表8。FAM (6-羧基螢光素氨基亞酸酯)螢光部分係於465 nm激發且螢光係於510 nm測量；HEX (六氯螢光素)螢光部分的對應值為533 nm與580 nm。

表6.用於分子分析基因轉殖玉蜀黍的轉錄體位準的寡聚核苷酸序列。

標靶	寡聚核苷酸	序列
<i>rpb7</i>	<i>rpb7</i> (F)	AGCCATTGTGTTCCGTCCAT (SEQ ID NO:58)
<i>rpb7</i>	<i>rpb7</i> (R)	AGGACCTATTTTCGGCGAACA (SEQ ID NO:59)
<i>rpb7</i>	<i>rpb7</i> (FAM- 探)	/56-FAM/CCTGGATGC/ZEN/GGTGGTTCGAC

	針)	A/3IABkFQ/ (SEQ ID NO:95)
TIP41	TIPmx F	TGAGGGTAATGCCAACTGGTT (SEQ ID NO:60)
TIP41	TIPmx R	GCAATGTAACCGAGTGTCTCTCAA (SEQ ID NO:61)
TIP41	HXTIP (HEX-探針)	TTTTTGGCTTAGAGTTGATGGTGTACTGATGA (SEQ ID NO:62)

*TIP41-樣蛋白。

表7. 用於轉錄體偵測的PCR反應配方。

	標靶基因	TIP-樣基因
組分	最終濃度	
Roche緩衝液	1 X	1 X
<i>rpb7</i> (F)	0.4 μM	0
<i>rpb7</i> (R)	0.4 μM	0
<i>rpb7</i> (FAM)	0.2 μM	0
HEXtipZM F	0	0.4 μM
HEXtipZM R	0	0.4 μM
HEXtipZMP (HEX)	0	0.2 μM
cDNA (2.0 μL)	NA	NA
水	至10 μL	至10 μL

表8. RNA qPCR的熱循環儀條件。

標靶基因與TIP41-樣基因偵測			
過程	溫度	時間	循環數
目標活化	95 °C	10 min	1
變性	95 °C	10 sec	40
延長	60 °C	40 sec	
獲取FAM或HEX	72 °C	1 sec	
冷卻	40 °C	10 sec	1

【0222】資料係使用LIGHTCYCLER™軟體v1.5分析，根據供應商的建議使用第二導數最大演算法計算Cq值之相對定量。就表現分析而言，表現值係使用 $\Delta\Delta C_t$ 方法(即， $2^{-(Cq_{\text{標靶}} - Cq_{\text{REF}})}$)計算，其倚賴比對兩目標之間的Cq值差異，將基底值選為2是就最佳化PCR反應而言，產物在每個循環變成兩倍的假定之下。

【0223】轉錄體尺寸與整合：北方墨點試驗。在一些例子中，基因轉殖植物的額外分子定性係使用北方墨點法(RNA墨點法)分析獲得，以測定表現*rpb7* dsRNA之基因轉殖植物的*rpb7*髮夾dsRNA的分子尺寸。

【0224】所有材料與設備在使用前係以RNaseZAP (AMBION/INVITROGEN)處理。將組織樣本(100 mg至500 mg)收集在2 mL安全上鎖移液管(SAFELOCK EPPENDORF)中，以三顆鎢珠加1 mL TRIZOL (INVITROGEN)在KLECKO™組織粉碎機(GARCIA MANUFACTURING, Visalia, CA)中破壞5 min，隨後於室溫(RT)培育10 min。任擇地，使樣本於4 °C、11,000 rpm離心10 min，將上清液移至新鮮的2 mL安全上鎖移液管。在將200 µL氯仿加至該均質物後，以倒置2至5 min使該管混合，於RT培育10分鐘，並於4 °C、12,000 x g離心15 min。將上層相移至無菌1.5 mL移液管中，加入600 µL 100%異丙醇，於RT培育10 min至2 hr，隨後於4 °C至25 °C、12,000 x g離心10 min。將上清液丟棄，以1 mL 70%乙醇洗滌RNA丸粒兩次，在洗滌之間，於4 °C至25 °C、7,500 x g離心10 min。將乙醇丟棄，在再懸浮於50 µL不含核酸酶的水之前，使丸粒短暫風乾3至5 min。

【0225】總 RNA 係使用 NANODROP 8000® (THERMO-FISHER)正規化並將樣本正規化至5 µg/10 µL。隨後將10 µL乙二醛(AMBION/INVITROGEN)加至各樣本。將五至14 ng DIG RNA標準標記混合物(ROCHE

APPLIED SCIENCE, Indianapolis, IN)分配並加至等體積的乙二醛中。樣本與標記RNAs係於50 °C變性45 min並儲存在冰上，直到載入溶於NORTHERNMAX 10 X乙二醛運行緩衝液(AMBION/INVITROGEN)的1.25% SEAKEM GOLD瓊脂(LONZA, Allendale, NJ)凝膠。RNAs係藉由於65伏特/30 mA電泳2 hr又15 min分離。

【0226】在電泳後，該凝膠以2X SSC潤洗5 min，並於GEL DOC工作站(BIORAD, Hercules, CA)成像，隨後，使用10X SSC作為轉移緩衝液(20X SSC，包括3 M氯化鈉與300 mM檸檬酸三鈉，pH 7.0)，使RNA於RT被動地移至尼龍膜(MILLIPORE)過夜。在轉移後，該膜以2X SSC潤洗5分鐘，RNA係UV-交聯至該膜(AGILENT/STRATAGENE)，並使該膜於室溫乾燥長達2天。

【0227】使該膜於ULTRAHYB™緩衝液(AMBION/INVITROGEN)預先雜交1至2小時。探針係由藉助ROCHE APPLIED SCIENCE DIG程序以毛地黃毒苷(digoxigenin)標記、含感興趣序列(舉例來說，若適當的話，SEQ ID NOs:7-10之一的反股序列部分)的PCR擴增產物所構成。在建議緩衝液中進行的雜交係在雜交管中、於60 °C溫度過夜。在雜交後，使墨點接受DIG洗滌、包裹、曝光至膜1至30分鐘，隨後使該膜顯影，以上皆依照DIG套組的供應商建議的方法。

【0228】轉殖基因拷貝數測定。將約略等於2個葉片

沖孔的玉蜀黍葉片收集在96-孔收集盤(QIAGEN)。組織破壞係以一個不銹鋼珠在KLECKO™組織粉碎機(GARCIA MANUFACTURING, Visalia, CA) 於 BIOSPRINT96 AP1 裂解緩衝液(BIOSPRINT96 植物套組所供應；QIAGEN)進行。在組織消蝕後，gDNA係以高通量格式使用BIOSPRINT96植物套組與BIOSPRINT96萃取機械手單離。在設立qPCR反應前，gDNA被稀釋成1:3 DNA：水。

【0229】 qPCR分析。藉由水解探針試驗的轉殖基因偵測係使用LIGHTCYCLER®480系統以即時PCR進行。用於水解探針試驗以偵測標靶基因，該聯結子序列(譬如環圈)、或偵測一部分的SpecR基因(即，二元載體質體上攜帶的大觀黴素抗性基因；SEQ ID NO:63；表9的SPC1寡聚核苷酸)的寡聚核苷酸係使用LIGHTCYCLER®探針設計軟體2.0設計。再者，用於水解探針試驗以偵測*AAD-1*除草劑耐受性基因區段(SEQ ID NO:64；表9的GAAD1寡聚核苷酸)的寡聚核苷酸係使用引子表現(PRIMER EXPRESS)軟體(APPLIED BIOSYSTEMS)設計。表9顯示引子與探針的序列。試驗係以適用為內部參考序列的內源性玉蜀黍染色體基因(轉化酶(SEQ ID NO:65；GENBANK寄存號：U16123；本案稱作IVR1)的試劑多工化，以確保gDNA於各試驗中出現。就擴增而言，LIGHTCYCLER®480探針MASTER混合物(ROCHE APPLIED SCIENCE)係以1x最終濃度製備在含0.4 μM各引子與0.2 μM各探針的10 μL體積多工反應(表10)。兩步

驟擴增反應係如表**11**概述般進行。螢光團激活與FAM-與HEX-標記探針的發光係如上述；CY5共軛物的最大激發在650 nm且螢光的最大值在670 nm。

【0230】 Cp得分(螢光信號與背景臨界值交錯的點)係由即時PCR資料使用擬合點演算法(LIGHTCYCLER[®]軟體1.5版)與相對定量模塊(以 $\Delta\Delta C_t$ 方法為基礎)測定。資料係如前述般操作(qPCR)。

表**9**.用於基因拷貝數測定與二元載體質體骨架偵測的引子與探針的序列(帶有螢光共軛物)。

名稱	序列
GAAD1-F	TGTTTCGGTTCCCTCTACCAA (SEQ ID NO:66)
GAAD1-R	CAACATCCATCACCTTGACTGA (SEQ ID NO:67)
GAAD1-P (FAM)	CACAGAACCGTCGCTTCAGCAACA (SEQ ID NO:68)
IVR1-F	TGGCGGACGACGACTTGT (SEQ ID NO:69)
IVR1-R	AAAGTTTGGAGGCTGCCGT (SEQ ID NO:70)
IVR1-P (HEX)	CGAGCAGACCGCCGTGTACTTCTACC (SEQ ID NO:71)
SPC1A	CTTAGCTGGATAACGCCAC (SEQ ID NO:72)
SPC1S	GACCGTAAGGCTTGATGAA (SEQ ID NO:73)
TQSPEC (CY5*)	CGAGATTCTCCGCGCTGTAGA (SEQ ID NO:74)
環圈 F	GGAACGAGCTGCTTGCGTAT (SEQ ID NO:75)
環圈 R	CACGGTGCAGCTGATTGATG (SEQ ID NO:76)
環圈 P (FAM)	TCCCTTCCGTAGTCAGAG (SEQ ID NO:77)

*CY5 = 青色素-5

表**10**.基因拷貝數分析與質體骨架偵測的反應組分。

組分	Amt. (μL)	庫存	最終濃度
2x 緩衝液	5.0	2x	1x
適當前向引子	0.4	10 μM	0.4

適當反向引子	0.4	10 μM	0.4
適當探針	0.4	5 μM	0.2
IVR1-前向引子	0.4	10 μM	0.4
IVR1-反向引子	0.4	10 μM	0.4
IVR1-探針	0.4	5 μM	0.2
H ₂ O	0.6	NA*	NA
gDNA	2.0	ND**	ND
總共	10.0		

*NA = 不適用

**ND = 未測得

表11. DNA qPCR的熱循環儀條件。

基因組拷貝數分析			
過程	過程	過程	過程
目標活化	95 °C	10 min	1
變性	95 °C	10 sec	40
延長 & 獲取 FAM、HEX、 或 CY5	60 °C	40 sec	
冷卻	40 °C	10 sec	1

實施例8：基因轉殖玉蜀黍的生物試驗

【0231】昆蟲生物試驗。植物細胞所製之本發明 dsRNA 的生物活性係藉由生物試驗方法證實。參閱，譬如 Baum *et al.* (2007) *Nat. Biotechnol.* 25(11):1322-1326。吾人能夠藉由在受控的進食環境將，舉例來說，衍生自製造殺昆蟲 dsRNA 之植物的各式植物組織或組織碎片餵給標靶昆蟲來證實效力。或者，萃取物係由衍生自製造殺昆蟲 dsRNA 之植物的各式植物組織製備，所提取的核酸係如本案先前所述分配在人工膳食上方，以供生物試驗。此類進食試驗的結果係和運用來自不製造殺昆蟲 dsRNA 的宿主植物的適當控制組組織以類似

方式執行的生物試驗比對、或和其他控制組樣本比對。在膳食測試上的標靶昆蟲的生長與存活相較於控制組的生長與存活係減少了。

【0232】基因轉殖玉蜀黍事件的昆蟲生物試驗。從洗滌過的卵孵化的兩隻西方玉米根蟲幼蟲(1至3日齡)被選擇並置於生物試驗托盤的各孔上。隨後使該孔覆以“PULL N' PEEL”標籤封面(BIO-CV-16, BIO-SERV)並置於18/6 小時明/暗週期的28 °C培育器。在首次侵擾的九天後，評估幼蟲的死亡，其以各處理昆蟲總數計算為死亡昆蟲百分比。將昆蟲樣本凍在-20 °C兩天，隨後將各處理的昆蟲幼蟲倒出並秤重。生長抑制百分比係以實驗處理組的平均重量除以兩個控制孔處理組的平均重量計算。資料表示為(負向控制組的)生長抑制百分比。超過控制組平均重量的平均重量被正規化至零。

【0233】溫室的昆蟲生物試驗。在土壤中的西方玉米根蟲卵係從CROP CHARACTERISTICS (Farmington, MN)接收。使WCR卵於28 °C培育10至11天。從土壤將卵洗出，置於0.15%瓊脂溶液，將濃度調為每份0.25 mL約75至100個卵。帶有一份卵懸浮液的孵化盤被設置在培養皿中，以監控孵化率。

【0234】生長在ROOTRANERS[®]的玉蜀黍植物的周圍土壤被150至200 WCR個卵侵染。使該昆蟲進食2周，在該時間後，對各植物提供「根分級(Root Rating)」。基本上根據Oleson *et al.* (2005) J. Econ. Entomol. 98:1-8

的節點損傷量表係用於分級。將通過此生物試驗、顯示減少之損傷的植物移植至5加侖盆，以製造種子。移植物以殺蟲劑處理，以避免進一步的根蟲損傷與昆蟲在溫室的釋放。植物係以手授粉，以製造種子。該等植物所製種子被保留用於評估植物的T₁與後續世代。

【0235】基因轉殖負向控制組植物係以夾帶設計為製造黃色螢光蛋白(YFP)的基因的載體轉形所生成。生物試驗係以負向控制組被包括在各組植物材料中來執行。

表12. *rpb7*-表現玉蜀黍植物與YFP控制組植物以溫室生物試驗為主的根損傷分級與相對轉錄體表現位準結果。

樣本 ID	感興趣基因	ssRNA	dsRNA	根分級
Rpb7-1 事件				
130746[1]-005.001	<i>Rpb7-1 v1</i>	0.382	3.364	0.2
130746[1]-006.001	<i>Rpb7-1 v1</i>	0.467	8.282	2
130746[1]-007.001	<i>Rpb7-1 v1</i>	0.476	0.187	2
130746[1]-010.001	<i>Rpb7-1 v1</i>	0.669	4.891	2
130746[1]-011.001	<i>Rpb7-1 v1</i>	1.474	7.621	2
130746[1]-014.001	<i>Rpb7-1 v1</i>	0.337	1.206	1
130746[1]-015.001	<i>Rpb7-1 v1</i>	4.857	7.160	2
130746[1]-018.001	<i>Rpb7-1 v1</i>	0.369	4.959	2
130746[1]-019.001	<i>Rpb7-1 v1</i>	0.432	2.412	1
130746[1]-021.001	<i>Rpb7-1 v1</i>	0.281	3.681	2
130746[1]-022.001	<i>Rpb7-1 v1</i>	0.184	3.340	1
130746[1]-024.001	<i>Rpb7-1 v1</i>	0.785	9.714	1
130746[1]-025.001	<i>Rpb7-1 v1</i>	0.532	5.897	1
130746[1]-026.001	<i>Rpb7-1 v1</i>	1.986	16.336	0.1
130746[1]-027.001	<i>Rpb7-1 v1</i>	0.877	8.456	1
YFP 事件				
126944[16]-186.001	YFP			2
126944[16]-187.001	YFP			2
126944[16]-188.001	YFP			2
126944[16]-190.001	YFP			2
126944[16]-191.001	YFP			1.5
126944[16]-192.001	YFP			2

126944[16]-193.001	YPF			2
126944[16]-196.001	YPF			2
126944[17]-197.001	YPF			2
126944[17]-198.001	YPF			2
126944[17]-200.001	YPF			2
126944[17]-201.001	YPF			2
126944[17]-202.001	YPF			2
126944[17]-203.001	YPF			2
126944[17]-204.001	YPF			2
126944[17]-205.001	YPF			2
126944[17]-206.001	YPF			2
126944[17]-207.001	YPF			2
126944[17]-209.001	YPF			2
126944[17]-211.001	YPF			2

【0236】相對於內部參考基因(TIP-41樣蛋白)的dsRNA測量係介於0.187至16.336的範圍之間。事件130746[1]-005.001與130746[1]-026.001的根分級分別為0.2與0.1。六個額外的*rpb7*事件具有1的根分級。所有YFP控制組具有1.5或更大的根分級。

實施例9：包含鞘翅目害蟲序列的基因轉殖玉米

【0237】10-20株基因轉殖T₀玉米植物係如實施例6說明般生成。獲得以RNAi構築體表現髮夾dsRNA的另外10-20株T₁玉米獨立系，以挑戰玉米根蟲。髮夾dsRNA包含SEQ ID NOs:1、3及/或5的一部分。額外的髮夾dsRNA係衍生自，舉例來說，鞘翅目害蟲序列，例如，舉例來說，Caf1-180（美國專利申請案公開號2012/0174258）、VatpaseC（美國專利申請案公開號2012/0174259）、Rho1（美國專利申請案公開號2012/0174260）、VatpaseH（美國專利申請案公開號2012/0198586）、PPI-87B（美國專利申請案公開號2013/0091600）、RPA70（美國專利申請案公

開號 2013/0091601)、RPS6 (美國專利申請案公開號 2013/0097730)、**ROP** (美國專利申請號 14/577,811)、**RNA**聚合酶**III140** (美國專利申請號 14/577,854)、**RNA**聚合酶**II** (美國專利申請號 62/133,214)、**RNA**聚合酶**II-215** (美國專利申請號 62/133,202)、**RNA**聚合酶**33** (美國專利申請號 62/133,210)、**ncm** (美國專利申請號 62/095487)、**Dre4** (美國專利申請號 14/705,807)、**COPI alpha** (美國專利申請號 62/063,199)、**COPI beta** (美國專利申請號 62/063,203)、**COPI gamma** (美國專利申請號 62/063,192)、或 **COPI delta** (美國專利申請號 62/063,216)、轉錄延伸因子 **spt5** (美國專利申請號 62/168613)、以及 **spt6** (美國專利申請號 62/168606)。該等係經由RT-PCR或其他分子分析方法確認。

【0238】從選定的獨立T₁系製備總RNA係任擇地連同設計為結合在各別RNAi構築體的髮夾表現匣聯結子的引子用於RT-PCR。除此之外，在RNAi構築體的各別標靶基因的特異性引子係任擇地用於擴增與確認在植物製造siRNA所需的加工前mRNA的製造。各別標靶基因所欲帶的擴增確認了各別基因轉殖玉米植物中的髮夾RNA表現。標靶基因的dsRNA髮夾加工成siRNA係於後續任擇地使用RNA墨點雜交在獨立基因轉殖系中確認。

【0239】再者，具有和標靶基因超過80%序列一致性的錯配序列的RNAi分子係以類似於在具有和標靶基因100%序列一致性之RNAi分子所見的方式影響玉米根

蟲。錯配序列和原生序列配對而在相同RNAi構築體形成髮夾dsRNA傳遞了能夠影響進食鞘翅目害蟲的生長、發育與生存力的植物加工siRNAs。

【0240】在植物中傳遞對應於標靶基因的dsRNA、siRNA或miRNA及鞘翅目害蟲經由後續進食攝入造成鞘翅目害蟲之標靶基因經由RNA-介導的基因靜默向下調控。當標靶基因的功能於一或多個發育階段極為重要時，鞘翅目害蟲的生長及/或發育受到影響，就WCR、NCR、SCR、MCR、黃瓜條葉甲、南美條葉甲、特氏斑點黃瓜條葉甲、與曼氏斑點黃瓜條葉甲之至少一者而言，造成鞘翅目害蟲無法成功侵染、進食、及/或發育、或造成死亡。隨後將標靶基因的選擇與RNAi的成功施用用於控制鞘翅目害蟲。

【0241】基因轉殖RNAi系與非經轉形玉米的表型比對。選定用於創建髮夾dsRNA的標靶鞘翅目害蟲基因或序列不具有和任何已知植物基因序列的相似度。因此，並不預期靶向該等鞘翅目害蟲基因或序列的構築體所製造或活化(全身性)的RNAi對於基因轉殖植物有任何不利效應。然而，基因轉殖系的發育與形態特性係和非-經轉形植物，以及經不具有髮夾-表現基因的「空白」載體轉形的基因轉殖系比對。比對植物根、芽、葉與和繁殖特性。記錄下植物芽特性，例如高度、葉數與尺寸、開花時間、花尺寸與外觀。一般而言，在體外與在溫室的土壤培養時，基因轉殖系與不表現標靶iRNA分子者之間並無可觀察到的形態差

異。

實施例10：包含鞘翅目害蟲序列與額外**RNAi**構築體的基因轉殖玉米

【0242】包含轉錄成靶向鞘翅目害蟲以外之生物的iRNA分子的異源性編碼序列在其基因組的基因轉殖玉米植物係透過農桿菌或WHISKERS™方法二次轉形(見Petolino and Arnold (2009) Methods Mol. Biol. 526:59-67)，以製造一或多個殺昆蟲dsRNA分子(舉例來說，至少一個dsRNA分子，其包括靶向包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、或SEQ ID NO:5之基因的dsRNA分子)。基本上如實施例4所述製備的植物轉形質體載體係透過農桿菌或WHISKERS™-介導的轉形方法傳遞至獲自包含轉錄成靶向鞘翅目害蟲以外之生物的iRNA分子的異源性編碼序列在其基因組的基因轉殖Hi II或B104玉米植物的玉蜀黍懸浮液細胞或不成熟玉蜀黍胚芽。獲得製造供控制鞘翅目害蟲的iRNA分子與殺昆蟲蛋白質的雙重轉形植物。

實施例11：包含**RNAi**構築體與額外鞘翅目害蟲控制序列的基因轉殖玉米

【0243】包含轉錄成靶向鞘翅目害蟲生物的iRNA分子(舉例來說，至少一個dsRNA分子，其包括靶向包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、或SEQ ID NO:5之基因的dsRNA分子)的異源性編碼序列在其基因組的基因轉殖玉米植物係透過農桿菌或WHISKERS™方法二次轉形(見Petolino

and Arnold (2009) *Methods Mol. Biol.* 526:59-67)，以製造一或多個殺昆蟲蛋白質分子，舉例來說，Cry3、Cry34與Cry35殺昆蟲蛋白質。基本上如實施例4所述製備的植物轉形質體載體係透過農桿菌或WHISKERS™-介導的轉形方法傳遞至獲自包含轉錄成靶向鞘翅目害蟲生物的iRNA分子的異源性編碼序列在其基因組的基因轉殖B104玉米植物的玉蜀黍懸浮液細胞或不成熟玉蜀黍胚芽。獲得製造供控制鞘翅目害蟲的iRNA分子與殺昆蟲蛋白質的雙重轉形植物。

實施例12：篩揀新熱帶褐椿(英雄美洲蟥)的候選標靶基因

【0244】新熱帶褐椿(BSB;英雄美洲蟥)群體。將BSB養在27 °C、65%相對濕度、16: 8小時明：暗週期的培育器中。將2-3天收集到的一克卵種在底部有濾紙盤的5L容器中，該容器係覆以#18篩目，以供通氣。各飼養容器產生300-400隻成年BSB。在所有階段，每週三次以新鮮青豆飼餵昆蟲，一包含有向日葵種子、大豆、與花生(3:1:1，以重量比例計)的種子混合物係每周更換一次。以棉花外加物作為吸液芯，在瓶中補水。在初始的兩周後，每周一次將昆蟲移至新的容器內。

【0245】BSB人工膳食。BSB人工膳食係如下文般製備。將凍乾青豆於MAGIC BULLET®混拌機中拌成細末，同時生的(有機)花生在另一MAGIC BULLET®混拌機中混拌。將所混拌的乾燥成分於大型MAGIC BULLET®混拌機中合併(重量百分比：青豆，35%；花生，35%；蔗糖，

5%；綜合維生素(譬如昆蟲用的Vanderzant維生素混合物，SIGMA-ALDRICH，型錄號V1007)，0.9%)，將其封蓋且充分振盪，以混合組分。隨後將混合的乾燥成分加至混合碗中。在分開的容器中，讓水與苯菌靈(benomyl)抗真菌劑(50 ppm；25 μ L 20,000 ppm溶液/50 mL 膳食溶液)充分混合，隨後加至乾燥成分混合物。用手混合所有成分，直到溶液完全混和。將膳食塑形成所欲尺寸，以鋁箔鬆散地包裹，於60 °C加熱4小時，隨後冷卻並儲存於4 °C。該人工膳食係於製備的兩週內使用。

【0246】BSB轉錄組組合。BSB發育的六個階段被選定用於製備mRNA庫。總RNA係從凍於-70 °C的昆蟲提取，並在FastPrep[®]-24儀器(MP BIOMEDICALS)上的Lysing MATRIX A 2 mL管(MP BIOMEDICALS, Santa Ana, CA)的10倍體積裂解/結合緩衝液內均質。總mRNA係使用 mirVana[™] miRNA 單離套組 (AMBION; INVITROGEN)根據製造商的流程提取。使用illumina[®] HiSeq[™]系統(San Diego, CA)的RNA定序提供用於RNAi昆蟲控制技術的候選標靶基因序列。HiSeq[™]在六個樣本生成總共約3.78億個讀取。各別樣本的讀取係使用TRINITY[™]組合軟體(Grabherr *et al.* (2011) Nature Biotech. 29:644-652)個別地組合。所組合轉錄體係合併生成匯集轉錄組。此BSB匯集轉錄組含有378,457個序列。

【0247】BSB *rpb7*同系物識別。BSB匯集轉錄組的tBLASTn搜尋係使用果蠅屬 *rpb7* 蛋白同功型 A

(GENBANK 寄存號NP_731983)作為詢問來進行。BSB *rpb7-1* (SEQ ID NO:78)係識別作為英雄美洲蟾候選標靶 *rpb7* 基因，其產物具有預測胺基酸序列SEQ ID NO:79。

【0248】模板製備與 dsRNA 合成。cDNA 係使用 TRIzol® 試劑((LIFE TECHNOLOGIES)由提取自單一年輕的成年昆蟲(約90 mg)的總BSB RNA製備。使昆蟲於室溫、1.5 mL 微量離心管中使用200 µL 的TRIzol® 丸粒研杵 (FISHERBRAND 型錄號12-141-363)與研杵馬達混合物 (COLE-PARMER, Vernon Hills, IL)均質化。在均質化後，加入額外的800 µL TRIzol®，使均質物渦旋，隨後於室溫培育五分鐘。藉由離心將細胞殘渣移除並將上清液移至新的管子。在製造商建議用於1 mL TRIzol® 的 TRIzol® 提取流程後，使RNA丸粒於室溫乾燥並使用第4類沖提緩衝液(即10 mM Tris-HCl pH8.0)再懸浮於來自 GFX PCR DNA 與 GEL EXTRACTION 套組(illustra™; GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES)的200 µL Tris 緩衝液。RNA 濃度係使用 NANODROP™ 8000 分光光度計 (THERMO SCIENTIFIC, Wilmington, DE)測定。

【0249】cDNA 擴增。cDNA 係由5 µg BSB 總RNA 模板與寡聚dT引子，使用供RT-PCR (INVITROGEN)用的 SUPERScript III FIRST-STRAND SYNTHESIS SYSTEM™，依照供應商的建議流程反向轉錄。轉錄反應的最終體積係以不含核酸酶的水加滿至100 µL。

【0250】表 13 顯示的引子係用於擴增 BSB_ *rpb7-1*

reg1。DNA模板係以1 μL cDNA (上文)作為模板，藉由遞減式PCR (黏合溫度從60 °C以每個循環減少1 °C降至50 °C)來擴增。包含BSB_ *rpb7-1 reg1* (SEQ ID NO:80)的325 bp區段的片段係在35個PCR循環期間生成。上述流程亦用於擴增301 bp負向控制組模板 *YFPv2* (SEQ ID NO:83)，使用YFPv2-F (SEQ ID NO:84)與YFPv2-R (SEQ ID NO:85)引子。BSB_ *rpb7-1 reg1*與*YFPv2*引子含有位於其5'端的T7噬菌體啟動子序列(SEQ ID NO:11)，於是能夠使用*YFPv2*與BSB_ *rpb7* DNA片段來轉錄dsRNA。

表13. 用於擴增例示*rpb7*標靶基因與*YFP*負向控制組基因的一部分編碼區的引子與引子對。

	基因 ID	引子 ID	序列
第 20 對	<i>rpb7-1 reg1</i>	BSB_ <i>rpb7</i> -1_For	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGTTAAACA AAAATTGTACACTGAAG (SEQ ID NO:81)
		BSB_ <i>rpb7</i> -1_Rev	TTAATACGACTCACTATAGGGAGACCTCATCT TTAGAACGGTAAC (SEQ ID NO:82)
第 21 對	YFP	YFPv2-F	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGCATCTGG AGCACTTCTCTTTCA (SEQ ID NO:84)
		YFPv2-R	TTAATACGACTCACTATAGGGAGACCATCTCC TTCAAAGGTGATTG (SEQ ID NO:85)

【0251】 dsRNA合成。dsRNA係使用2 μL PCR產物 (上文)作為模板以根據製造商指示使用的MEGAscript™ T7 RNAi 套組 (AMBION) 合成。見圖 1。dsRNA係於NANODROP™ 8000分光光度計定量，並於不含核酸酶的0.1X TE緩衝液(1 mM Tris HCL, 0.1 mM EDTA, pH 7.4)稀釋至500 ng/μL。

【0252】將dsRNA注入BSB血腔。將BSB—如同群體—養在27 °C、65%相對濕度、16: 8小時明：暗週期的培育器中的青豆與種子膳食上。二齡若蟲(各重達1至1.5 mg)用小刷子輕輕處理，以避免損傷，並置於冰上培養皿，以冰凍固定昆蟲。各別昆蟲被注以55.2 nL 500 ng/ μ L dsRNA溶液(即，27.6 ng dsRNA；每克體重的劑量為18.4至27.6 μ g)。注射係使用配備有從Drummond 3.5英吋#3-000-203-G/X玻璃毛細管拔出的注射針頭的NANOJECT™ II注射器(DRUMMOND SCIENTIFIC, Broomhall, PA)來進行。將針尖弄斷，並以輕質礦物油回填毛細管，隨後填入2至3 μ L dsRNA。將dsRNA注入若蟲的腹部(每個dsRNA、每次試驗注射10隻昆蟲)，在不同的三天重複試驗。將被注射的昆蟲(每孔5隻)移至含人工BSB膳食丸的32-孔托盤(Bio-RT-32飼養托盤；BIO-SERV, Frenchtown, NJ)，並覆以Pull-N-Peel™標籤(BIO-CV-4; BIO-SERV)。水分係藉由1.5 mL微量離心管的1.25 mL水以棉花吸液芯補充。托盤係於26.5 °C、60%濕度、與16: 8小時明：暗週期培育。存活力計數與重量是在注射7天後取得。

【0253】BSB *rpb7*為致死dsRNA標靶。如表14所匯整，在各別重複中，至少十隻2nd齡BSB若蟲(各為1 - 1.5 mg)的血腔被注入55.2 nL BSB_*rpb7-1 reg1* dsRNA (500 ng/ μ L)，約略最終濃度為每克昆蟲18.4 - 27.6 μ g dsRNA。以BSB_*rpb7-1 reg1 dsRNA*測到的死亡率係高於

相同份量的注入 **YFPv2** dsRNA (負向控制組)所觀察到的死亡率。

表**14**. 注入七天後，BSB *rpb7* dsRNA注入^{2nd}齡新熱帶褐椿若蟲血腔的結果。

處理組*	N 試驗	平均%死亡 ± SEM**	p 值 <i>t</i> -測試
BSB <i>rpb7-1 reg1</i>	3	62 ± 18.5	0.047†
未注入	1	0	
<i>YFPv2</i>	3	7 ± 6.7	

*對於各別dsRNA，每次試驗注射十隻昆蟲。

**平均標準差

†指出使用斯頓氏*t*-測試(Student's *t*-test) $p < 0.05$ ，顯著異於YFPv2 dsRNA控制組。

實施例**13**：包含半翅目害蟲序列的基因轉殖玉米

【0254】夾帶包含SEQ ID NO:78的任何部分(譬如SEQ ID NO:80)之核酸的表現載體的十至20株基因轉殖T₀玉米植物係如實施例4說明般生成。獲得以RNAi構築體表現髮夾dsRNA的另外的10-20株T₁玉米獨立系，以挑戰BSB。髮夾dsRNA可衍生成包含SEQ ID NO:78的一部分或其區段(譬如SEQ ID NO:80)。該等係經由RT-PCR或其他分子分析方法確認。從選定的獨立T₁系製備總RNA係任擇地連同設計為結合在各別RNAi構築體的髮夾表現匣的聯結子內含子的引子用於RT-PCR。除此之外，在RNAi構築體的各別標靶基因的特異性引子係任擇地用於擴增與確認在植物製造siRNA所需的加工前mRNA的製造。各別標靶基因所欲帶的擴增確認了各別基因轉殖玉米植物中的

髮夾RNA表現。標靶基因的dsRNA髮夾加工成siRNA係於後續任擇地使用RNA墨點雜交在獨立基因轉殖系中確認。

【0255】再者，具有和標靶基因超過80%序列一致性的錯配序列的RNAi分子係以類似於在具有和標靶基因100%序列一致性之RNAi分子所見的方式影響半翅目。錯配序列和原生序列配對而在相同RNAi構築體形成髮夾dsRNA傳遞了能夠影響進食半翅目害蟲的生長、發育與生存力的植物加工siRNAs。

【0256】在植物中傳遞對應於標靶基因的dsRNA、siRNA、shRNA、hpRNA、或miRNA及半翅目害蟲經由後續進食攝入造成半翅目害蟲之標靶基因經由RNA-介導的基因靜默向下調控。當標靶基因的功能於一或多個發育階段極為重要時，半翅目害蟲的生長、發育、及/或存活受到影響，就英雄美洲蟥、褐臭椿、稻綠椿、紅肩綠椿、褐翅椿、綠椿、馬格那椿、馬勒卡椿、弗卡待克椿；地中海椿、新熱帶紅肩綠椿、諾比蟲、斑椿、秘魯紅椿、擬新扭白蟻、葉足蟲、尼氏蟲、草盲椿、和美國牧草盲椿之至少一者而言，造成半翅目害蟲無法成功侵染、進食、發育、及/或造成死亡。隨後將標靶基因的選擇與RNAi的成功施用用於控制半翅目害蟲。

【0257】基因轉殖RNAi系與非-經轉形玉米的表型比對。選定用於創建髮夾dsRNA的標靶半翅目害蟲基因或序列不具有和任何已知植物基因序列的相似度。因此，並不預期靶向該等半翅目害蟲基因或序列的構築體所製造或

活化(全身性)的RNAi對於基因轉殖植物有任何不利效應。然而，基因轉殖系的發育與形態特性係和非-經轉形植物，以及經不具有髮夾-表現基因的「空白」載體轉形的基因轉殖系比對。植物根、芽、葉與和繁殖特性係經比對。基因轉殖與非-經轉形植物的根長與生長模式並無可觀察到的差異。植物芽特性，例如高度、葉數與尺寸、開花時間、花尺寸與外觀是類似的。一般而言，在體外與在溫室的土壤培養時，基因轉殖系與不表現標靶iRNA分子者之間並無可觀察到的形態差異。

實施例14：包含半翅目害蟲序列基因轉殖大豆

【0258】 夾帶包含一部分的SEQ ID NO:78及/或其區段(SEQ ID NO:80)之核酸的表現載體的十至20個基因轉殖T₀大豆植物係如本領域習知般生成，包括，舉例來說，藉由下文農桿菌-介導的轉形。以氯氣消毒成熟大豆種子過夜，達十六小時。在以氯氣消毒後，將種子置於LAMINAR™通風櫥的開放容器中，以驅散氯氣。接著，使用黑盒子在黑暗中、24 °C使消毒過的種子吸飽無菌H₂O，達十六小時。

【0259】 製備裂種大豆。包含一部分胚胎軸的開裂大豆種子需要製備縱向切開的大豆種子材料，其係使用固定至解剖刀的#10刀片沿著種子的種臍分開移除種子外衣，並將種子分成兩個子葉部分。注意小心地部分除去胚胎軸，其中約1/2 – 1/3個胚胎軸仍連在子葉的節點端部。

【0260】 接種。包含一部分胚胎軸的開裂大豆種子浸

在含有包含SEQ ID NO:78及/或其區段(SEQ ID NO:80)之二元質體的農桿菌(譬如EHA 101或EHA 105菌株)溶液約30分鐘。在浸漬包含胚胎軸的子葉之前，將農桿菌溶液稀釋成最終濃度為 $\lambda=0.6 \text{ OD}_{650}$ 。

【0261】共同培養。在接種後，使開裂的大豆種子和農桿菌菌株在覆以一片濾紙之培養皿的共同培養介質(*Agrobacterium* Protocols, vol. 2, 2nd Ed., Wang, K. (Ed.) Humana Press, New Jersey, 2006)上共同培養5天。

【0262】誘芽。在共同培養5天後，開裂的大豆種子係以由B5鹽、B5維生素、28 mg/L亞鐵、38 mg/L Na₂EDTA、30 g/L蔗糖、0.6 g/L MES、1.11 mg/L BAP、100 mg/L TIMENTIN™、200 mg/L頭孢噻肟(cefotaxime)、與50 mg/L萬古黴素(vancomycin) (pH 5.7)構成的液體誘芽(SI)介質洗滌。隨後將開裂的大豆種子培養在由B5鹽、B5維生素、7 g/L諾布爾瓊脂、28 mg/L亞鐵、38 mg/L Na₂EDTA、30 g/L蔗糖、0.6 g/L MES、1.11 mg/L BAP、50 mg/L TIMENTIN™、200 mg/L頭孢噻肟、與50 mg/L萬古黴素(pH 5.7構成的誘芽I (SI I)介質，同時使子葉的平面側朝上，子葉節點埋入介質中。培養2週後，將經轉形的開裂大豆種子的外植體移至含有補充有6 mg/L草銨膦(Liberty®)之SI I介質的誘芽II (SI II)介質。

【0263】芽延長。在SI II介質上培養2週後，將子葉從外植體移開並將含有胚胎軸的萌芽墊在子葉底部切割來

切除。將從子葉單離的芽墊移至芽延長(SE)介質。SE介質係由MS鹽、28 mg/L亞鐵、38 mg/L Na₂EDTA、30 g/L蔗糖與0.6 g/L MES、50 mg/L天門冬醯胺、100 mg/L L-焦穀胺酸、0.1 mg/L IAA、0.5 mg/L GA₃、1 mg/L玉米素核苷、50 mg/L TIMENTIN™、200 mg/L頭孢噻肟、50 mg/L萬古黴素、6 mg/L草銨磷、與7 g/L諾布爾瓊脂、(pH 5.7)。每2週將培養物移至新鮮的SE介質。使培養物在24 °C與80-90 μmol/m²sec光密度之18 h光週期的CONVIRON™生長室中生長。

【0264】生根。從子葉芽墊伸長的芽係藉由子葉芽墊底部切割來單離，並使伸長的芽浸於1 mg/L IBA (吲哚3-丁酸) 1-3分鐘，以促進生根。接著，將伸長的芽移至在非塔(phyta)托盤中的生根介質(MS鹽、B5維生素、28 mg/L亞鐵、38 mg/L Na₂EDTA、20 g/L蔗糖與0.59 g/L MES、50 mg/L天門冬醯胺、100 mg/L L-焦穀胺酸、與7 g/L諾布爾瓊脂，pH 5.6)。

【0265】培養。在24 °C、18 h光週期的CONVIRON™生長室培養1-2週後，將已發展出根部的芽移到加蓋聖代杯子的土壤混拌物中並置於120-150 μmol/m²sec光密度的長日照條件下(16小時明/8小時暗)、於恆常溫度(22 °C)與濕度(40-50%)的CONVIRON™生長室(型號CMP4030與CMP3244，Controlled Environments Limited, Winnipeg, Manitoba, Canada)，以馴化幼小植株。讓生根幼小植株在聖代杯子適應數週，然後移至溫室進一步馴

化並建立健壯的基因轉殖大豆植物。

【0266】獲得以RNAi構築體表現髮夾dsRNA的另外的10-20株T₁大豆獨立系，以挑戰BSB。髮夾dsRNA可衍生成包含SEQ ID NO:78或其區段(譬如SEQ ID NO:80)。該等係經由RT-PCR或本領域習知的其他分子分析方法確認。從選定的獨立T₁系製備總RNA係任擇地連同設計為結合在各別RNAi 構築體的髮夾表現匣的聯結子內含子的引子用於RT-PCR。除此之外，在RNAi構築體的各別標靶基因的特異性引子係任擇地用於擴增與確認在植物製造siRNA所需的加工前mRNA的製造。各別標靶基因所欲帶的擴增確認了各別基因轉殖大豆植物中的髮夾RNA表現。標靶基因的dsRNA髮夾加工成siRNA係於後續任擇地使用RNA墨點雜交在獨立基因轉殖系中確認。

【0267】具有和標靶基因超過80%序列一致性的錯配序列的RNAi分子係以類似於在具有和標靶基因100%序列一致性之RNAi分子所見的方式影響BSB。錯配序列和原生序列配對而在相同RNAi構築體形成髮夾dsRNA傳遞了能夠影響進食半翅目害蟲的生長、發育與生存力的植物加工siRNAs。

【0268】在植物中傳遞對應於標靶基因的dsRNA、siRNA、shRNA、或miRNA及半翅目害蟲經由後續進食攝入造成半翅目害蟲之標靶基因經由RNA-介導的基因靜默向下調控。當標靶基因的功能於一或多個發育階段極為重要時，半翅目害蟲的生長、發育、及進食生存受到影響，

就英雄美洲蟥、紅肩綠蟥、褐翅椿、稻綠椿象、綠椿、褐臭椿、馬勒卡椿、弗卡待克蟥、地中海椿、新熱帶紅肩綠蟥、馬格那椿、諾比蟲、斑蟥、秘魯紅蟥、擬新扭白蟻、葉足蟲、尼氏蟲、與美國牧草盲蟥之至少一者而言，造成半翅目害蟲無法成功侵染、進食、發育、及/或造成死亡。隨後將標靶基因的選擇與RNAi的成功施用用於控制半翅目害蟲。

【0269】 基因轉殖RNAi系與非-經轉形大豆的表型比對。選定用於創建髮夾dsRNA的標靶半翅目害蟲基因或序列不具有和任何已知植物基因序列的相似度。因此，並不預期靶向該等半翅目害蟲基因或序列的構築體所製造或活化(全身性)的RNAi對於基因轉殖植物有任何不利效應。然而，基因轉殖系的發育與形態特性係和非-經轉形植物，以及經不具有髮夾-表現基因的「空白」載體轉形的基因轉殖系比對。針對植物根、芽、葉與和繁殖特性進行比對。基因轉殖與非-經轉形植物的根長與生長模式並無可觀察到的差異。植物芽特性，例如高度、葉數與尺寸、開花時間、花尺寸與外觀是類似的。一般而言，在體外與在溫室的土壤培養時，基因轉殖系與不表現標靶iRNA分子者之間並無可觀察到的形態差異。

實施例15： 人工膳食上的英雄美洲蟥生物試驗。

【0270】 在人工膳食上的dsRNA進食試驗中，將32孔托盤置入~18 mg人工膳食丸粒與水，如同注射實驗(見實施例12)。將200 ng/ μ L濃度的dsRNA加至食物丸粒與水

樣本；100 μ L至兩孔的各者。將五隻2nd齡英雄美洲蟪若蟲引進各孔。水樣本與標靶YFP轉錄體的dsRNA係用作負向控制組。在不同的三天重複試驗。將存活昆蟲秤重，在處理8天後測定死亡率。相較於控制組孔，在提供有 *BSB_rpb7 dsRNA* 的孔觀察到死亡及/或生長抑制。

實施例16：包含半翅目害蟲序列的基因轉殖阿拉伯芥
(*Arabidopsis thaliana*)

【0271】含有用於形成髮夾的包含 *rpb7* 區段((SEQ ID NO:78)之標靶基因構築體的阿拉伯芥(*Arabidopsis*)轉形載體係使用類似於實施例4的標準分子方法生成。阿拉伯芥轉形係使用標準的以農桿菌為主的流程進行。T₁種子係以草銨膦耐受性可擇標記挑選。生成基因轉殖的T₁阿拉伯芥植物且生成純合子的簡單拷貝T₂基因轉殖植物，以供昆蟲研究。生物試驗係以帶有花序的生長中的阿拉伯芥植物進行。將五至十隻昆蟲置於各植物上並在14天內監控存活。

【0272】建構阿拉伯芥轉形載體。以夾帶用於形成髮夾的包含 *BSB_rpb7* 區段(SEQ ID NO:78)之標靶基因構築體的進入載體為主的進入選殖體係使用化學合成片段(DNA2.0, Menlo Park, CA)組合與標準分子選殖方法來組裝。RNA初級轉錄體所形成的分子內髮夾係以下列促成，藉由(在單一轉錄單元內)使標靶基因區段的兩個拷貝彼此以相反方向排列，該兩個區段被聯結子序列分開(譬如環圈(例如 SEQ ID NO:96)或 ST-LS1 內含子)

(Vancanneyt *et al.* (1990) Mol. Gen. Genet. 220(2):245-50)。於是，於是，初級mRNA轉錄體含有被聯結子序列分開之作為彼此的大型反向重複的兩個*rpb7*基因區段序列。一份拷貝的啟動子(譬如阿拉伯芥泛素 10 啟動子 (Callis *et al.* (1990) J. Biological Chem. 265:12486-12493))係用於驅動產生初級 mRNA髮夾轉錄體，包含來自農桿菌開放讀取框23的3'未轉譯區的一片段 (AtuORF23 3' UTR v1；US專利5,428,147) 係用於終止髮夾-RNA-表現基因的轉錄。

【0273】進入載體之內的髮夾選殖體係連同代表性二元目的載體用於標準GATEWAY®重組反應，以製造用於農桿菌-介導之阿拉伯芥轉形的髮夾RNA表現轉形載體。

【0274】二元目的載體包含除草劑耐受性基因 **DSM-2v2** (美國專利公開號2011/0107455)、在木薯葉脈鑲嵌病毒啟動子 (CsVMV 啟動子 v2，美國專利 7,601,885；Verdaguer *et al.* (1996) Plant Mol. Biol. 31:1129-39)調控之下。包含來自農桿菌開放讀取框1的3'未轉譯區的一片段 (AtuORF1 3' UTR v6；Huang *et al.* (1990) J. Bacteriol. 172:1814-22)係用於終止DSM2v2 mRNA的轉錄。

【0275】包含表現**YFP**髮夾RNA之基因的負向控制組二元構築體係藉由標準GATEWAY®重組反應以典型的二元目的載體與進入載體建構。該進入構築體係包含在阿

拉伯芥泛素10啟動子(如上文)表現控制之下的 ***YFP*** 髮夾序列與包含農桿菌ORF23 3'未轉譯區之一片段(如上文)。

【0276】 製造包含殺昆蟲RNAs的基因轉殖阿拉伯芥：農桿菌-介導的轉形。含有髮夾dsRNA序列的二元質體係以電穿孔方式進入農桿菌菌株GV3101 (pMP90RK)。重組農桿菌選殖體係以重組農桿菌菌落的質體製備的限制分析來確認。Qiagen Plasmid Max Kit (Qiagen, Cat# 12162)係用於依照製造商建議的流程從農桿菌培養物提取質體。

【0277】 阿拉伯芥轉形與T₁選擇。使十二至十五株阿拉伯芥植物(哥倫比亞培養品種)生長在溫室的4"盆中，光密度為250 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ 、25 °C、與18:6小時的明：暗條件。轉形前一週修剪初級花莖。農桿菌接種物係藉由將10 μL 重組農桿菌甘油庫存液培育於28 °C、100 mL LB發酵液 (Sigma L3022) +100 mg/L大觀黴素+ 50 mg/L卡那黴素並於225 rpm晃動72小時來製備。在浸漬花之前，農桿菌細胞被採收並懸浮於5%蔗糖 + 0.04% Silwet-L77 (Lehle Seeds Cat # VIS-02) +10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 苄胺基嘌呤(BA)溶液至OD₆₀₀ 0.8~1.0。使植物的地上部分浸在農桿菌溶液5-10分鐘，同時溫和攪動。隨後將植物移至溫室，以定期澆水和施肥正常生長，直到採集種子。

實施例17： 基因轉殖阿拉伯芥的生長與生物試驗

【0278】 選擇經dsRNA構築體轉形的T₁阿拉伯芥。使各別轉形的至多200 mg T₁種子於0.1%瓊脂溶液分層。將

種子種在#5日照介質的發芽托盤(10.5" x 21" x 1"; T.O. Plastics Inc., Clearwater, MN.)。在種植6與9天後，以280 g/ha Ignite[®] (草銨磷)耐受性選擇轉形體。將選定事件移植到4"直徑盆。插入拷貝數分析係使用Roche LightCycler480™透過水解定量即時PCR (qPCR)在移植一週內進行。PCR引子與水解探針係使用LightCycler™探針設計軟體2.0 (Roche)針對DSM2v2可擇標記設計。使該盤維持於24 °C，在100-150 mE/m²s密度之螢光燈和白熾燈下的16:8小時明：暗光週期。

【0279】英雄美洲蟪植物進食生物試驗。為各別構築體選定至少四個低拷貝數(1-2個插入)、四個中等拷貝數(2-3個插入)、與四個高拷貝數(≥4個插入)事件。讓植物生長到繁殖階段(含有花和長莢的植物)。土壤表面係覆有~50 mL體積的白沙，以易於識別昆蟲。將五至十隻2nd齡英雄美洲蟪若蟲引進各別植物上。植物被覆蓋直徑3"、高16"及壁厚0.03"的塑料管(項目編號484485，Visipack Fenton MO)；該管係覆有尼龍篩目以隔離昆蟲。使植物在生長室(conviron)維持正常溫度、光、澆水條件。在14天後，收集昆蟲並秤重；計算死亡百分比以及生長抑制(1-重量處理/重量控制)。YFP髮夾-表現植物係用於控制。相較於控制組植物的若蟲，觀察到在基因轉殖*BSB_rpb7* dsRNA植物上進食的若蟲的顯著死亡及/或生長抑制。

【0280】T₂阿拉伯芥種子生成與T₂生物試驗。對於各別構築體，T₂種子係製自選定低拷貝數(1-2個插入)事件。

將植物(純合子及/或雜合子)投至如上所述的英雄美洲蟪進食生物試驗。採收純合子的T₃種子並儲存以供未來分析。

實施例18：額外作物物種的轉形

【0281】棉花係經*rpb7*轉形，以利用熟習此藝者習知的方法提供半翅目昆蟲的控制，舉例來說，先前說明於美國專利7,838,733的實施例14、或PCT國際專利公開號WO 2007/053482的實施例12的實質上相同技術。

實施例19：用於昆蟲管理的*rpb7* dsRNA

【0282】*Rpb7* dsRNA轉殖基因於基因轉殖植物中係和其他dsRNA分子合併，以提供冗餘的昆蟲控制組與合併的RNAi效應。基因轉殖植物包括，舉例來說而不限於，表現靶向*rpb7*之dsRNA的玉米、大豆、與棉花，以避免鞘翅目及半翅目昆蟲所致的進食損傷。*Rpb7* dsRNA轉殖基因於植物中亦和蘇力菌、PIP-1、及/或AflP殺昆蟲蛋白質技術合併，以代表昆蟲抗性管理基因金字塔的新穎作用模式。當和靶向昆蟲害蟲的其他dsRNA分子及/或和殺昆蟲蛋白質在基因轉殖植物中合併時，觀察到亦減緩抗性昆蟲群體之發育的合併殺昆蟲效應。

【序列表】

<110> 陶氏農業科學公司
弗勞恩霍夫爾協會

<120> 控制昆蟲害蟲的RPB7核酸分子

<130> 2971-P12992US

<160> 96

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 759

<212> DNA

<213> 西方玉米根蟲

<400> 1

ctcgacctgt agattcttgt ctattttgcc accgattttg ctgtggtgac gatggcaata	60
tgtaaacac tagcaaatc aaaaaagaag acgaaatata atcctaacct taacaccgga	120
aaataacgtt tgtttataat ttatcaatag acaaattaaa ataatgtttt accacatata	180
tctagaacac gaaatcctac tacatccaca atatttcgga ccacaactgt tagaaaaagt	240
caaaactaaa ctgtataccg aagttagagg aacttgcaca ggaaagtatg gatttgtgat	300
tgcagtaacc actatagata gcatagggtc cggtttgata ctacccggac aaggctttgt	360
agtctacccg gtgaaatata aagccattgt gttccgtcca ttcaaagtg aagtcctgga	420
tgcggtggtt cgacaagtca acaaagttgg catgttcgcc gaaataggta ctttatcttg	480
tttcatttct catcattcca taccgcaga aatggagttt tgctctaacg ttaatcccca	540
atgctataag actaaagacg aagatgttgt gatacgagca gaaggagaaa tcagattgaa	600
aatagtgggt acgagagtag acgcctcagg gatatttgcc attggaacct taatggatga	660
ttatctggga ttaataagta attaatgga atatttttaa aatgtattta taagtctata	720
atttttaata tacaaaaatc aaacattaac aaaaaaaaaa	759

<210> 2

<211> 173

<212> PRT
<213> 西方玉米根蟲

<400> 2
Met Phe Tyr His Ile Ser Leu Glu His Glu Ile Leu Leu His Pro Gln
1 5 10 15

Tyr Phe Gly Pro Gln Leu Leu Glu Lys Val Lys Thr Lys Leu Tyr Thr
20 25 30

Glu Val Glu Gly Thr Cys Thr Gly Lys Tyr Gly Phe Val Ile Ala Val
35 40 45

Thr Thr Ile Asp Ser Ile Gly Ala Gly Leu Ile Leu Pro Gly Gln Gly
50 55 60

Phe Val Val Tyr Pro Val Lys Tyr Lys Ala Ile Val Phe Arg Pro Phe
65 70 75 80

Lys Gly Glu Val Leu Asp Ala Val Val Arg Gln Val Asn Lys Val Gly
85 90 95

Met Phe Ala Glu Ile Gly Pro Leu Ser Cys Phe Ile Ser His His Ser
100 105 110

Ile Pro Ala Glu Met Glu Phe Cys Pro Asn Val Asn Pro Gln Cys Tyr
115 120 125

Lys Thr Lys Asp Glu Asp Val Val Ile Arg Ala Glu Gly Glu Ile Arg
130 135 140

Leu Lys Ile Val Gly Thr Arg Val Asp Ala Ser Gly Ile Phe Ala Ile
145 150 155 160

Gly Thr Leu Met Asp Asp Tyr Leu Gly Leu Ile Ser Asn
165 170

<210> 3
<211> 577
<212> DNA
<213> 西方玉米根蟲

<400> 3
ctaagcccaa ataatcgtec ataagagtec cgatagcgaa gattccagtg gcatcaactc 60
ttgtaccac aatcttcagg cggattttat cttctggggc gatgaccact tcctcttctt 120
tcgatttgta acagggcgga tttccattcg gacagaactg catgtcagct ggtatggaat 180
gatgcgatat gaagcacgac aatggaccga tttctgcgaa cattcccact ttattcactt 240
gtgtcacgac agcgtccaac acttcgccct tgaatggtcg gaaaacgatt gccttatatt 300
tgacgggata cacaacgaat ccttgtcccg gctgtattat accagagccg atctgatega 360
ttgttgttac tgctatgacg aatccatact ttccggtgca tgtgccttca acttctgtgt 420
acagtttctg tttcactggt tccatcagtt ggggcccga aatacttggga tgcagcaata 480
tttcatgttc gagggaaatg tggtagaaca ttttgtgatt ggaaatttag aggagttatt 540
gtcttcgca acaaataagg taaggattt atgtttt 577

<210> 4
<211> 170
<212> PRT
<213> 西方玉米根蟲

<400> 4
Met Phe Tyr His Ile Ser Leu Glu His Glu Ile Leu Leu His Pro Lys
1 5 10 15

Tyr Phe Gly Pro Gln Leu Met Glu Thr Val Lys Gln Lys Leu Tyr Thr
20 25 30

Glu Val Glu Gly Thr Cys Thr Gly Lys Tyr Gly Phe Val Ile Ala Val
35 40 45

Thr Thr Ile Asp Gln Ile Gly Ser Gly Ile Ile Gln Pro Gly Gln Gly
50 55 60

Phe Val Val Tyr Pro Val Lys Tyr Lys Ala Ile Val Phe Arg Pro Phe
65 70 75 80

Lys Gly Glu Val Leu Asp Ala Val Val Thr Gln Val Asn Lys Val Gly
85 90 95

Met Phe Ala Glu Ile Gly Pro Leu Ser Cys Phe Ile Ser His His Ser
100 105 110

Ile Pro Ala Asp Met Gln Phe Cys Pro Asn Gly Asn Pro Pro Cys Tyr
115 120 125

Lys Ser Lys Glu Glu Glu Val Val Ile Ala Pro Glu Asp Lys Ile Arg
130 135 140

Leu Lys Ile Val Gly Thr Arg Val Asp Ala Thr Gly Ile Phe Ala Ile
145 150 155 160

Gly Thr Leu Met Asp Asp Tyr Leu Gly Leu
165 170

<210> 5
<211> 669
<212> DNA
<213> 西方玉米根蟲

<400> 5
aacgttgcg cgtcagtgcac agtcgcaact cgggcaacgt atgtcggtcg ctctttgctgc 60
cagtggcgct gctgtttgttt gccgcgtgca ctagaagttc tcggacgaga tgagccccaa 120
gtagtcgtcc ttgatcgtcc caatcgcat aatctccgtg acgtcgacgc tcacgcccac 180
gatcttgagc cgcacgccgc agccttttgcg gatctcgact tcgcggtcat cagagatcca 240

cgcgttgttc tcgtggtcgt agccgttggt caggtccgtc ggcatcgcgt ggcgcgagac 300
aaagacctgg agcgggtccga cgtcggcgaa gaacccgagc tggttcacga ctgtcacgac 360
tgcgtcgagc acctggttct tgaacggacg gaagaggatc gcgcggtacc ggatgttgaa 420
acacacaaag cccgagttgt cctggatcac gcccttgcca atgtcttcgt cgcgcacttc 480
cgtgacggtg ataacatacc cgtacttgcc catggacgtg ccctcgacct cttcgatcaa 540
acgcaagcgg atgatgtcgt ggagcttcgg gccaaagtgc atcggatgga gcagcaggtc 600
gcgcgagagc tgcttgagga agaacatggc gacgacagca gtagctacag cgacgacgat 660
cgctcgagc 669

<210> 6
<211> 178
<212> PRT
<213> 西方玉米根蟲

<400> 6
Met Phe Phe Leu Lys Gln Leu Ser Arg Asp Leu Leu Leu His Pro Met
1 5 10 15

His Phe Gly Pro Lys Leu His Asp Ile Ile Arg Leu Arg Leu Ile Glu
20 25 30

Glu Val Glu Gly Thr Ser Met Gly Lys Tyr Gly Tyr Val Ile Thr Val
35 40 45

Thr Glu Val Arg Asp Glu Asp Ile Gly Lys Gly Val Ile Gln Asp Asn
50 55 60

Ser Gly Phe Val Cys Phe Asn Ile Arg Tyr Arg Ala Ile Leu Phe Arg
65 70 75 80

Pro Phe Lys Asn Gln Val Leu Asp Ala Val Val Thr Val Val Asn Gln
85 90 95

Leu Gly Phe Phe Ala Asp Val Gly Pro Leu Gln Val Phe Val Ser Arg
100 105 110

His Ala Met Pro Thr Asp Leu Asn Asn Gly Tyr Asp His Glu Asn Asn
115 120 125

Ala Trp Ile Ser Asp Asp Arg Glu Val Glu Ile Arg Lys Gly Cys Gly
130 135 140

Val Arg Leu Lys Ile Met Gly Val Ser Val Asp Val Thr Glu Ile Asn
145 150 155 160

Ala Ile Gly Thr Ile Lys Asp Asp Tyr Leu Gly Leu Ile Ser Ser Glu
165 170 175

Asn Phe

<210> 7
<211> 390
<212> DNA
<213> 西方玉米根蟲

<400> 7	
ccacaactgt tagaaaaagt caaaactaaa ctgtataccg aagttgaagg aacttgcaca	60
ggaaagtatg gatttgtgat tgcagtaacc actatagata gcataggtgc cggtttgata	120
ctacccggac aaggctttgt agtctacccg gtgaaatata aagccattgt gttccgtcca	180
ttcaaaggtg aagtcctgga tgcggtggtt cgacaagtca acaaagttgg catgttcgcc	240
gaaataggtc ctttatcttg tttcatttct catcattcca taccgcaga aatggagttt	300
tgtcctaacg ttaatcccca atgctataag actaaagacg aagatgttgt gatacgagca	360
gaaggagaaa tcagattgaa aatagtgggt	390

<210> 8
<211> 398
<212> DNA
<213> 西方玉米根蟲

<400> 8
ccctcgaaca tgaaatattg ctgcatccca agtatttcgg gcccctaactg atggaaacag 60

tgaaacagaa actgtacaca gaagttgaag gcacatgcac cggaaagtat ggattcgtca 120

tagcagtaac aacaatcgat cagatcggct ctggtataat acagccggga caaggattcg 180

ttgtgtatcc cgtcaaatat aaggcaatcg ttttccgacc attcaagggc gaagtgttgg 240

acgctgtcgt gacacaagtg aataaagtgg gaatgttcgc agaaatcggc ccattgtcgt 300

gcttcataat gcattattcc ataccagctg acatgcagtt ctgtccgaat ggaaatccgc 360

cctgttacia atcgaaagaa gaggaagtgg tcatcgcc 398

<210> 9
<211> 395
<212> DNA
<213> 西方玉米根蟲

<400> 9
acgtcgacgc tcacgcccac gatcttgagc cgcacgccgc agcctttgcg gatctcgact 60

tcgcgggtcat cagagatcca cgcgttggtc tcgtgggtcgt agccgttggt caggtccgtc 120

ggcatcgctt ggccgcgagc aaagacctgg agcgggtccga cgtcggcgaa gaacccgagc 180

tggttcacga ctgtcacgac tgcgtcgagc acctggttct tgaacggagc gaagaggatc 240

gcgcgggtacc ggatgttgaa acacacaaag cccgagttgt cctggatcac gcccttgcca 300

atgtcttcgt cgcgcacttc cgtgacggtg ataacatacc cgtacttgcc catggacgtg 360

ccctcgacct cttcgatcaa acgcaagcgg atgat 395

<210> 10
<211> 220
<212> DNA

<213> 西方玉米根蟲

<400> 10	
aaagccattg tgttccgtcc attcaaaggt gaagtcctgg atgcggtggt tcgacaagtc	60
aacaaagttg gcatgttcgc cgaaataggt cctttatctt gtttcatttc tcatcattcc	120
ataccgcgag aaatggagtt ttgtcctaac gttaatcccc aatgctataa gactaaagac	180
gaagatgttg tgatacgagc agaaggagaa atcagattga	220

- <210> 11
- <211> 24
- <212> DNA
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> T7 啟動子寡聚核苷酸

<400> 11	
ttaatacgac tcactatagg gaga	24

- <210> 12
- <211> 503
- <212> DNA
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 部分的 YFP 編碼區

<400> 12	
caccatgggc tccagcggcg ccctgctgtt ccacggcaag atcccctacg tggatggagat	60
ggagggcaat gtggatggcc acaccttcag catccgcggc aagggtacg gcgatgccag	120
cgtgggcaag gtggatgccc agttcatctg caccaccggc gatgtgcccg tgccctggag	180
caccctggtg accaccctga cctaeggcgc ccagtgttcc gccaaagtacg gccccgagct	240
gaaggatttc tacaagagct gcatgcccga tggctacgtg caggagcgca ccatcacctt	300
cgagggcgat ggcaatttca agaccgcgc cgaggtgacc ttcgagaatg gcagcgtgta	360

caatcgctg aagctgaatg gccagggctt caagaaggat ggccacgtgc tgggcaagaa 420

tctggagttc aatttcaccc cccactgcct gtacatctgg ggcgatcagg ccaatcacgg 480

cctgaagagc gccttcaaga tct 503

<210> 13

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子 Dvv-rpb7-1_For

<400> 13

ttaatacgac tcactatagg gagaccacaa ctgttagaaa aagtcaaaac 50

<210> 14

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子 Dvv-rpb7-1_Rev

<400> 14

ttaatacgac tcactatagg gagaaccacac tatatttcaat ctgattttctc 50

<210> 15

<211> 48

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子 Dvv-rpb7-2_For

<400> 15

ttaatacgac tcactatagg gagaccctcg aacatgaaat attgctgc 48

<210> 16

<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引子 Dvv-rpb7-2_Rev	
<400>	16	
	ttaatacgac tcactatagg gagaggcgat gaccattcc tcttc	45
<210>	17	
<211>	51	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引子 Dvv-rpb7-3_For	
<400>	17	
	ttaatacgac tcactatagg gagaacgtcg acgctcacgc ccatgatctt g	51
<210>	18	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引子 Dvv-rpb7-3_Rev	
<400>	18	
	ttaatacgac tcactatagg gagaatcatc cgcttgcggtt tgatc	45
<210>	19	
<211>	44	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引子 Dvv-rpb7-1_v2_For	
<400>	19	

ttaatacgac tcactatagg gagaaaagcc attgtgttcc gtcc	44
<210> 20	
<211> 48	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引子 Dvv-rpb7-1_v2_Rev	
<400> 20	
ttaatacgac tcactatagg gagatcaatc tgattttctcc ttctgctc	48
<210> 21	
<211> 705	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> YFP 基因	
<400> 21	
atgtcatctg gaggcattct ctttcatggg aagattcctt acgtttgtgga gatggaaggg	60
aatgttgatg gccacacctt tagcatacgt gggaaaggct acggagatgc ctcagtggga	120
aaggttgatg cacagtteat ctgcacaact ggtgatgttc ctgtgccttg gaggcacatt	180
gtcaccactc tcacctatgg agcacagtgc tttgccaagt atgggtccaga gttgaaggac	240
ttctacaagt cctglatgcc agatggctat gtgcaagagc gcacaatcac ctttgaagga	300
gatggcaact tcaagactag ggctgaagtc acctttgaga atgggtctgt ctacaatagg	360
gtcaaactca atgggtcaagg cttcaagaaa gatgggtcatg tgttgggaaa gaacttggag	420
ttcaacttca ctccccactg cctctacatc tgggggtgacc aagccaacca cggctctcaag	480
tcagccttca agatctgtca tgagattact ggcagcaaag gcgacttcat agtggctgac	540
cacacccaga tgaacactcc cattgggtgga ggtccagttc atgttccaga gtatcatcac	600
atgtcttacc atgtgaaact ttccaaagat gtgacagacc acagagacaa catgtccttg	660

aaagaaactg tcagagctgt tgactgtcgc aagacctacc ttgga 705

<210> 22
<211> 218
<212> DNA
<213> 西方玉米根蟲

<400> 22
tagctctgat gacagagccc atcgagtttc aagccaaaca gttgcataaa gctatcagcg 60
gattgggaac tgatgaaagt acaatmgmtg aaattttaag tgtmcacaac aacgatgaga 120
ttataagaat ttcccaggcc tatgaaggat tgtaccaacg mtcattggaa tctgatatca 180
aaggagatac ctcaggaaca ttaaaaaaga attattag 218

<210> 23
<211> 424
<212> DNA
<213> 西方玉米根蟲

<220>
<221> misc_特徵
<222> (393)..(395)
<223> n 為 a、c、g、或 t

<400> 23
ttgttacaag ctggagaact tctctttgct ggaaccgaag agtcagtatt taatgctgta 60
ttctgtcaaa gaaataaacc acaattgaat ttgatattcg acaaatatga agaaattggt 120
gggcatccca ttgaaaaagc cattgaaaac gagttttcag gaaatgctaa acaagccatg 180
ttacacctta tccagagcgt aagagatcaa gttgcatatt tggttaaccag gctgcatgat 240
tcaatggcag gcgtcggtag tgacgataga actttaatca gaattgttgt ttcgagatct 300
gaaatcgatc tagaggaaat caaacaatgc tatgaagaaa tctacagtaa aaccttggct 360
gataggatag cggatgacac atctggcgac tannnaaaag ccttatttagc cgttgttggt 420

taag 424

<210> 24
<211> 397
<212> DNA
<213> 西方玉米根蟲

<400> 24
agatgttggc tgcattctaga gaattacaca agttcttcca tgattgcaag gatgtactga 60
gcagaatagt ggaaaaacag gtatccatgt ctgatgaatt gggaagggac gcaggagctg 120
tcaatgccct tcaacgcaaa caccagaact tcttccaaga cctacaaaca ctccaatcga 180
acgtccaaca aatccaagaa gaatcagcta aacttcaagc tagctatgcc ggtgatagag 240
ctaaagaaat caccaacagg gagcaggaag tggtagcagc ctgggcagcc ttgcagatcg 300
cttgcgatca gagacacgga aaattgagcg atactggtga tctattcaaa ttctttaact 360
tggtacgaac gttgatgcag tggatggacg aatggac 397

<210> 25
<211> 490
<212> DNA
<213> 西方玉米根蟲

<400> 25
gcagatgaac accagcgaga aaccaagaga tgttagtggg gttgaattgt tgatgaacaa 60
ccatcagaca ctcaaggctg agatcgaagc cagagaagac aactttacgg cttgtatttc 120
tttaggaaag gaattgttga gccgtaatca ctatgctagt gctgatatta aggataaatt 180
ggtcgcgttg acgaatcaaa ggaatgctgt actacagagg tgggaagaaa gatgggagaa 240
cttgcaactc atcctcgagg tataccaatt cgccagagat gcggccgtcg ccgaagcatg 300
gttgatcgca caagaacctt acttgatgag ccaagaacta ggacacacca ttgacgacgt 360
tgaaaacttg ataaagaaac acgaagcggt cgaaaaatcg gcagcggcgc aagaagagag 420
attcagtgct ttggagagac tgacgacgtt cgaattgaga gaaataaaga ggaaacaaga 480

agctgcccag	490
<210> 26	
<211> 330	
<212> DNA	
<213> 西方玉米根蟲	
<400> 26	
agtgaaatgt tagcaaatat aacatccaag tttcgtaatt gtacttgctc agttagaaaa	60
tattctgtag tttcactatc ttcaaccgaa aatagaataa atgtagaacc tcgcgaactt	120
gcctttcctc caaaatatca agaacctcga caagtttggt tggagagttt agatacgata	180
gacgacaaaa aattgggtat tcttgagctg catcctgatg tttttgctac taatccaaga	240
atagatatta tacatcaaaa tgttagatgg caaagtttat atagatatgt aagctatgct	300
catacaaagt caagatttga agtgagaggt	330
<210> 27	
<211> 320	
<212> DNA	
<213> 西方玉米根蟲	
<400> 27	
caaagtcaag atttgaagtg agaggtggag gtcgaaaacc gtggccgcaa aagggattgg	60
gacgtgctcg acatggttca attagaagtc cactttggag aggtggagga gttgttcatg	120
gaccaaaatc tccaaccctt catTTTTTaca tgattccatt ctacaccctg ttgctggggt	180
tgactagcgc actttcagta aaatttgccc aagatgactt gcacgttgtg gatagtctag	240
atctgccaac tgacgaacaa agttatatag aagagctggt caaaagccgc ttttgggggt	300
ccttcttggt ttattttag	320
<210> 28	
<211> 47	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

<220>	
<223> 引子 YFP-F_T7	
<400> 28	
ttaatacgac tcactatagg gagacaccat gggctccagc ggcgccc	47
<210> 29	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引子 YFP-R	
<400> 29	
agatcttgaa ggcgctcttc agg	23
<210> 30	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引子 YFP-F	
<400> 30	
caccatgggc tccagcggcg ccc	23
<210> 31	
<211> 47	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引子 YFP-R_T7	
<400> 31	
ttaatacgac tcactatagg gagaagatct tgaaggcgct cttcagg	47

<210>	32	
<211>	46	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引子 Ann-F1_T7	
<400>	32	
	ttaatacgac tcactatagg gagagctcca acagtggttc cttatc	46
<210>	33	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引子 Ann-R1	
<400>	33	
	ctaataattc ttttttaatg ttcctgagg	29
<210>	34	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引子 Ann-F1	
<400>	34	
	gctccaacag tggttcetta tc	22
<210>	35	
<211>	53	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引子 Ann-R1_T7	
<400>	35	

ttaatacgac tcactatagg gagactaata attctttttt aatgttcctg agg 53

<210> 36
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子 Ann-F2_T7

<400> 36
ttaatacgac tcactatagg gagattgtta caagctggag aacttctc 48

<210> 37
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子 Ann-R2

<400> 37
cttaaccaac aacggctaata aagg 24

<210> 38
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子 Ann-F2

<400> 38
ttgttacaag ctggagaact tctc 24

<210> 39
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>		
<223>	引子 Ann-R2T7	
<400>	39	
ttaatacgac tcactatagg gagacttaac caacaacggc taataagg		48
<210>	40	
<211>	47	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引子 Betasp2-F1_T7	
<400>	40	
ttaatacgac tcactatagg gagaagatgt tggctgcatc tagagaa		47
<210>	41	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引子 Betasp2-R1	
<400>	41	
gtccattcgt ccatccactg ca		22
<210>	42	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引子 Betasp2-F1	
<400>	42	
agatgttggc tgcactaga gaa		23
<210>	43	

<211> 46	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引子 Betasp2-R1_T7	
<400> 43	
ttaatacgac tcactatagg gagagtccat tcgtccatcc actgca	46
<210> 44	
<211> 46	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引子 Betasp2-F2_T7	
<400> 44	
ttaatacgac tcactatagg gagagcagat gaacaccagc gagaaa	46
<210> 45	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引子 Betasp2-R2	
<400> 45	
ctgggcagct tcttgtttcc tc	22
<210> 46	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引子 Betasp2-F2	
<400> 46	

gcagatgaac accagcgaga aa 22

<210> 47
<211> 46
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子 Betasp2-R2_T7

<400> 47
ttaatacgac tcactatagg gagactgggc agcttcttgt ttcttc 46

<210> 48
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子 L4-F1_T7

<400> 48
ttaatacgac tcactatagg gagaagtgaa atgttagcaa atataacatc c 51

<210> 49
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子 L4-R1

<400> 49
acctctcact tcaaattcttg actttg 26

<210> 50
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>	
<223> 引子 L4-F1	
<400> 50	
agtgaaatgt tagcaaatat aacatcc	27
<210> 51	
<211> 50	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引子 L4-R1_T7	
<400> 51	
ttaatacgac tcactatagg gagaacctct cacttcaaat cttgactttg	50
<210> 52	
<211> 50	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引子 L4-F2_T7	
<400> 52	
ttaatacgac tcactatagg gagacaaagt caagatttga agtgagaggt	50
<210> 53	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引子 L4-R2	
<400> 53	
ctacaaataa aacaagaagg accccc	25
<210> 54	

<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引子 L4-F2	
<400> 54	
caaagtcaag atttgaagtg agaggt	26
<210> 55	
<211> 49	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引子 L4-R2_T7	
<400> 55	
ttaatacgac tcactatagg gagactacaa ataaaacaag aaggacccc	49
<210> 56	
<211> 1150	
<212> DNA	
<213> 玉米	
<400> 56	
caacggggca gcactgcact gcactgcaac tgcgaatttc cgtcagcttg gagcgggtcca	60
agcgccctgc gaagcaaact acgccgatgg cttcggcggc ggcggtgggag ggtccgacgg	120
ccgcggagct gaagacagcg ggggcggagg tgattcccgg cggcgtgcga gtgaaggggt	180
gggtcatcca gtcccacaaa ggccctatcc tcaacgccgc ctctctgcaa cgctttgaag	240
atgaacttca aacaacacat ttacctgaga tggtttttgg agagagtttc ttgtcacttc	300
aacatacaca aactggcatc aaatttcatt ttaatgcgt tgatgcactc aaggcatgga	360
agaaagaggc actgccacct gttgaggttc ctgctgcagc aaaatggaag ttcagaagta	420
agccttctga ccaggttata cttgactacg actatacatt tacgacacca tattgtggga	480

gtgatgctgt ggttgtgaac tctggcactc cacaaacaag tttagatgga tgcggcactt 540
tgtgttggga ggataactaat gatcggattg acattgttgc cttttcagca aaagaaccca 600
ttcttttcta cgacgagggtt atcttgtatg aagatgagtt agctgacaat ggtatctcat 660
ttcttactgt gcgagtgagg gtaatgccaa ctggttgggtt tctgcttttg cgtttttggc 720
ttagagttga tgggtgtactg atgaggttga gagacactcg gttacattgc ctgttttgaa 780
acggcgacgg agccaagcca gtggtacttc gtgagtgctg ctggagggaa gcaacatttg 840
ctactttgtc tgcgaaagga tatccttcgg actctgcagc gtacgcggac ccgaacctta 900
ttgccataa gcttcctatt gtgacgcaga agacccaaaa gctgaaaaat cctacctgac 960
tgacacaaag gcgccttacc gcgtgtacat catgactgtc ctgtcctatc gttgcctttt 1020
gtgtttgcca catgttgtgg atgtacgttt ctatgacgaa acaccatagt ccatttcgcc 1080
tgggccgaac agagatagct gattgtcatg tcacgtttga attagaccat tccttagccc 1140
tttttcccc 1150

<210> 57
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 寡聚核苷酸 T20VN

<220>
<221> misc_特徵
<222> (22)..(22)
<223> n 為 a、c、g、或 t

<400> 57
tttttttttt tttttttttt vn 22

<210> 58
<211> 20

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> rpb7 (F)	
<400> 58	
agccattgtg ttccgtccat	20
<210> 59	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> rpb7 (F)	
<400> 59	
aggacctatt tcggcgaaca	20
<210> 60	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引子 TIPmxF	
<400> 60	
tgagggtaat gccaaactggt t	21
<210> 61	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引子 TIPmxR	
<400> 61	

gcaatgtaac cgagtgtctc tcaa	24
<210> 62	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 探針 HXTIP	
<400> 62	
tttttggctt agagttgatg gtgtactgat ga	32
<210> 63	
<211> 151	
<212> DNA	
<213> 大腸桿菌	
<400> 63	
gaccgtaagg cttgatgaaa caacgcggcg agctttgatc aacgaccttt tggaaacttc	60
ggcttcccct ggagagagcg agattctccg cgctgtagaa gtcaccattg ttgtgcacga	120
cgacatcatt cctgggcggtt atccagctaa g	151
<210> 64	
<211> 69	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 部分的 AAD1 編碼區	
<400> 64	
tggtcggttc cctctaccaa gcacagaacc gtcgcttcag caacacctca gtcaaggtga	60
tggatgttg	69
<210> 65	
<211> 4233	
<212> DNA	

<213> 玉米

<400> 65

agcctggtgt ttccggagga gacagacatg atccctgccg ttgctgatcc gacgacgctg	60
gacggcgggg gcgcgcgcag gccgttgctc ccggagacgg accctcgggg gcgtgctgcc	120
gccggcgccg agcagaagcg gccgcccgtt acgccgaccg ttctcaccgc cgtcgtctcc	180
gccgtgctcc tgctcgtcct cgtggcggtc acagtccctg cgtcgcagca cgtcgacggg	240
caggctgggg gcgttccccg gggcgaagat gccgtcgtcg tcgaggtggc cgcctcccgt	300
ggcgtggctg agggcggtgc ggagaagtcc acggccccgc tcctcggtc cggcgcgctc	360
caggacttct cctggaccaa cgcgatgctg gcgtggcagc gcacggcggt ccacttccag	420
cccccaaga actggatgaa cggttagtgg gaccgctgc catcggtgac gacgcgcgga	480
tcgtttttt ctttttctt ctcgttctgg ctctaacttg gttccgcgtt tctgtcacgg	540
acgcctcgtg cacatggcga taccgatcc gccggccgcg tatactatc tacctcgacc	600
ggcttctcca gatccgaac gtaagtgtt ggctccgata cgatcgatca catgtgagct	660
cggcatgctg ctttctgcg cgtgcatgcg gtcctagca ttccacgtcc acgggtcgtg	720
acatcaatgc acgatataat cgtatcggtg cagagatatt gtcccatcag ctgctagctt	780
tcgcgtattg atgtcgtgac attttgacg cagggtccgt gtatcacaag ggctgggtacc	840
acctttcta ccagtggaac ccggactccg cggtatgggg caacatcacc tggggccacg	900
ccgtctcgcg cgacctctc cactggctgc acctaccgt ggccatggtg cccgatcacc	960
cgtacgacgc caacggcgtc tgggtccgggt cggcgacgcg cctgcccgcg ggccggatcg	1020
tcatgtctta cacgggctcc acggcggagt cgtcggcgca ggtgcagaac ctgcgggagc	1080
cggccgacgc gtccgacctg ctgctgcggg agtgggtcaa gtcggacgcc aaccgggtgc	1140
tgggtccgcc gccgggcatc gggccgacgg acttccgcga cccgacgac gcgtgtcgga	1200
cgccggccgg caacgacacg gcgtggcggg tcgccatcgg gtccaaggac cgggaccacg	1260
cggggctggc gctggtgtac cggacggagg acttcgtgcg gtacgacctg gcgccggcgc	1320

tgatgcacgc cgtgccgggc accggcatgt gggagtgcgt ggactttctac cgggtggccg	1380
cgggatcagg cgccgcggcg ggcagcgggg acgggctgga gacgtccgcg gcgccgggac	1440
ccggggtgaa gcacgtgctc aaggctagcc tcgacgacga caagcacgac tactacgcga	1500
tcggcaccta cgacccggcg acggacacct ggacccccga cagcgcggag gacgacgtcg	1560
ggatcggcct ccggtacgac tatggcaagt actacgcgtc gaagaccttc tacgaccccg	1620
tccttcgccg gcgggtgctc tgggggtggg tcggcgagac cgacagcgag cgcgcggaca	1680
tcctcaaggg ctgggcatcc gtgcaggtac gtctcagggt ttgaggctag catggcttca	1740
atcttgctgg catcgaatca ttaatgggca gatattataa cttgataatc tgggttggtt	1800
gtgtgtggtg gggatggtga cacacgcgcg gtaataatgt agctaagctg gttaaggatg	1860
agtaatgggg ttgcgtataa acgacagctc tgctaccatt acttctgaca cccgattgaa	1920
ggagacaaca gtaggggtag ccggtagggt tcgtcgactt gccttttctt ttttcctttg	1980
ttttgttgtg gatcgtccaa cacaaggaaa ataggatcat ccaacaaaca tggaagtaat	2040
cccgtaaaac atttctcaag gaaccatcta gctagacgag cgtggcatga tccatgcatg	2100
cacaaacact agataggtct ctgcagctgt gatgttcctt tacatatacc accgtccaaa	2160
ctgaatccgg tctgaaaatt gttcaagcag agaggccccg atcctcacac ctgtacacgt	2220
ccctgtacgc gccgtcgtgg tctcccgtga tcctgccccg tcccctccac gcggccacgc	2280
ctgctgcagc gctctgtaca agcgtgcacc acgtgagaat ttccgtctac tcgagcctag	2340
tagttagacg ggaaaacgag aggaagcgca cggccaagc acaacacttt gcgcgggccc	2400
gtgacttgtc tccggttggc tgagggcgcg cgacagagat gtatggcgcc gcggcgtgtc	2460
ttgtgtcttg tcttgccat acaccgtagt cagagactgt gtcaaagccg tccaacgaca	2520
atgagctagg aaacgggttg gagagctggg ttcttgcctt gcctcctgtg atgtctttgc	2580
cttgcatagg gggcgcagta tgtagctttg cgttttactt cagcccaaag gatactgctg	2640
atcgtgaatt attattatta tatatatatc gaatatcgat ttcgtcgctc tcgtggggtt	2700

ttattttcca gactcaaact tttcaaaagg cctgtgtttt agttcttttc ttccaattga	2760
gtaggcaagg cgtgtgagtg tgaccaacgc atgcatggat atcgtggttag actggtagag	2820
ctgtcgttac cagcgcgatg cttgtatatg tttgcagtat tttcaaatga atgtctcagc	2880
tagcgtacag ttgaccaagt cgacgtggag ggcgcacaaac agacctctga cattattcac	2940
ttttttttta ccatgccgtg cacgtgcagt caatccccag gacggtcctc ctggacacga	3000
agacgggcag caacctgctc cagtggccgg tggaggaggt ggagaacctc cggatgagcg	3060
gcaagagctt cgacggcgtc gcgctggacc gcggatccgt cgtgcccctc gacgtcggca	3120
aggcgacgca ggtgacgccg cacgcagcct gctgcagcga acgaactcgc gcgttgccgg	3180
cccgcgggcca gctgacttag tttctctggc tgategaccg tgtgcctgcg tgcgtgcagt	3240
tggacatcga ggctgtgttc gaggtggacg cgtcggacgc ggcgggcgtc acggaggccg	3300
acgtgacgtt caactgcagc accagcgcag gcgcggcggg ccggggcctg ctgggccctg	3360
tggcctttct cgtgctggcg gacgacgact tgtccgagca gaccgccgtg tactttctacc	3420
tgtcaaggg cacggacggc agcctccaaa ctttcttctg ccaagacgag ctacaggtatg	3480
tatgttatga cttatgacca tgcattgcag cgcatctctt agctaggctg tgaagcttct	3540
tgttgagttg tttcacagat gcttaccgtc tgctttgttt cgtatttcga ctaggcattc	3600
aaggcgaacg atctggttaa gagagtatac gggagcttgg tccctgtgct agatggggag	3660
aatctctcgg tcagaatact ggtaagtttt tacagcgcca gccatgcatg tgttgccag	3720
ccagctgctg gtactttgga cactcgttct tctcgactg ctcatattg cttctgatct	3780
ggatgcacta caaattgaag gttgaccact ccatcgtgga gagctttgct caaggcggga	3840
ggacgtgcat cacgtcgcga gtgtaccca cagagccat ctacgactcc gcccgctct	3900
tcctcttcaa caacgccaca catgctcag tcaaagcaaa atccgtcaag atctggcagc	3960
tcaactccgc ctacatccgg ccataccgg caacgacgac ttctctatga ctaaattaag	4020
tgacggacag ataggcgata ttgcatactt gcatcatgaa ctcatattgta caacagtgat	4080

tgtttaattt atttgcgtgcc ttcccttatcc ttcttgtgaa actatatggt acacacatgt 4140
atcattaggt ctagtagtgt tgttgcaaag acacttagac accagagggtt ccaggagtat 4200
cagagataag gtataagagg gagcagggag cag 4233

<210> 66
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子 GAAD1-F

<400> 66
tgttcggttc cctctaccaa 20

<210> 67
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子 GAAD1-R

<400> 67
caacatccat caccttgact ga 22

<210> 68
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 探針 GAAD1-P (FAM)

<400> 68
cacagaaccg tcgcttcagc aaca 24

<210> 69
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子 IVR1-F

<400> 69
tggcggacga cgacttgt 18

<210> 70
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子 IVR1-R

<400> 70
aaagtttgga ggctgccgt 19

<210> 71
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 探針 IVR1-P (HEX)

<400> 71
cgagcagacc gccgtgtact tctacc 26

<210> 72
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子 SPC1A

<400> 72
cttagctgga taacgccac 19

<210> 73
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子 SPC1S

<400> 73
gaccgtaagg cttgatgaa 19

<210> 74
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 探針 TQSPEC (CY5*)

<400> 74
cgagattctc cgcgctgtag a 21

<210> 75
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 環圈 F

<400> 75
ggaacgagct gcttgcgatat 20

<210> 76
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>	
<223> 環圈 R	
<400> 76	
cacggtgcag ctgattgatg	20
<210> 77	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 環圈 P (FAM)	
<400> 77	
tcccttccgt agtcagag	18
<210> 78	
<211> 697	
<212> DNA	
<213> 英雄美洲蟾	
<400> 78	
acaagatttg aaaatgtttt accatatttc tcttgaacat gatataattac tacatccgag	60
atatttttggga cctcaattac atgaaacagt taaacaaaaa ttgtacactg aagttgaagg	120
gacctgtact ggcaagtatg gatttgttat tgcagtcact aatattgata acattggagc	180
tggtgttata cagccaggac aaggatttgt ggtttatcca gtgaaatata aagccattgt	240
ttttagacct tttaaggagg aagttgttga tgctattgtt actcaagtta ataaggttgg	300
aatgtttgca gaaattggac cattgtcttg ttttatatcc catcactega tacctgctga	360
tatggaattc tgccccaatg aaactccacc ttgtttaccgt tctaaagatg aggatgttgt	420
aataacagca gaagatgtaa taaggtgtaa aatagttggg actagagttg atgcatccgg	480
tatttttgct attggtactc ttatggatga ttatttaggt ttgattggaa gttaaaattt	540
tttacttgaa gacagtctac atgcaggagg aattagaaga aaataataaa cattctgttt	600

agactgtatg atttagaaaa tgtgaaaaat atgctggact atttattatt acactgttgt 660

aattttttgga accaataaaaa gtattttaca aaaaaaa 697

<210> 79
<211> 173
<212> PRT
<213> 英雄美洲蟾

<400> 79
Met Phe Tyr His Ile Ser Leu Glu His Asp Ile Leu Leu His Pro Arg
1 5 10 15

Tyr Phe Gly Pro Gln Leu His Glu Thr Val Lys Gln Lys Leu Tyr Thr
20 25 30

Glu Val Glu Gly Thr Cys Thr Gly Lys Tyr Gly Phe Val Ile Ala Val
35 40 45

Thr Asn Ile Asp Asn Ile Gly Ala Gly Val Ile Gln Pro Gly Gln Gly
50 55 60

Phe Val Val Tyr Pro Val Lys Tyr Lys Ala Ile Val Phe Arg Pro Phe
65 70 75 80

Lys Gly Glu Val Val Asp Ala Ile Val Thr Gln Val Asn Lys Val Gly
85 90 95

Met Phe Ala Glu Ile Gly Pro Leu Ser Cys Phe Ile Ser His His Ser
100 105 110

Ile Pro Ala Asp Met Glu Phe Cys Pro Asn Glu Thr Pro Pro Cys Tyr
115 120 125

Arg Ser Lys Asp Glu Asp Val Val Ile Thr Ala Glu Asp Val Ile Arg
130 135 140

Cys Lys Ile Val Gly Thr Arg Val Asp Ala Ser Gly Ile Phe Ala Ile
145 150 155 160

Gly Thr Leu Met Asp Asp Tyr Leu Gly Leu Ile Gly Ser
165 170

<210> 80
<211> 325
<212> DNA
<213> 英雄美洲蟾

<400> 80
gttaaacaaa aattgtacac tgaagttgaa gggacctgta ctggcaagta tggatttggt 60
attgcagtca ctaatattga taacattgga gctgggtgtta tacagccagg acaaggattt 120
gtggtttatc cagtgaaata taaagccatt gtttttagac cttttaaggg agaagttggt 180
gatgctattg ttactcaagt taataagggt ggaatgtttg cagaaattgg accattgtct 240
tgttttatat cccatcactc gatacctgct gatatggaat tctgccccaa tgaaactcca 300
ccttgttacc gttctaaaga tgagg 325

<210> 81
<211> 49
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子 BSB_rpb7-1_For

<400> 81
ttaatacgac tcactatagg gagagttaaa caaaaattgt aactgaag 49

<210> 82
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>	
<223> 引子 BSB_rpb7-1_Rev	
<400> 82	
ttaatacgac tcactatagg gagacctcat ctttagaacg gtaac	45
<210> 83	
<211> 301	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> YPFv2 dsRNA 的正股	
<400> 83	
catctggagc acttctcttt catgggaaga ttccttacgt tgtggagatg gaagggaatg	60
ttgatggcca cacccttagc atacgtggga aaggctacgg agatgcctca gtgggaaagg	120
ttgatgcaca gttcactctgc acaactgggtg atgttctctgt gccttggagc acacttgtca	180
ccactctcac ctatggagca cagtgccttg ccaagtatgg tccagagttg aaggacttct	240
acaagtcctg tatgccagat ggctatgtgc aagagcgcac aatcaccttt gaaggagatg	300
g	301
<210> 84	
<211> 47	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引子 YFPv2-F	
<400> 84	
ttaatacgac tcactatagg gagagcatct ggagcacttc tctttca	47
<210> 85	
<211> 46	
<212> DNA	

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子 YFPv2-R

<400> 85

ttaatacgac tcactatagg gagaccatct ccttcaaagg tgattg 46

<210> 86

<211> 759

<212> RNA

<213> 西方玉米根蟲

<400> 86

cucgaccugu agauucuugu cuuuuuugcc accgauuuug cuguggugac gauggcaaua 60

ugucaaacac uagcaauuac aaaaaagaag acgaaauaua auccuaaccu uaacaccgga 120

aaauaacguu uguuuuauau uuaucaauag acaauuuaaa auuauuuuuu accacauauc 180

ucuagaacac gaaauccuac uacauccaca auuuuucgga ccacaacugu uagaaaaagu 240

caaaacuaaa cuguauaccg aaguugaagg aacuugcaca ggaaaguaug gauuugugau 300

ugcaguaacc acuauagaua gcuuaggugc cgguuugaua cuaccgggac aaggcuuugu 360

agucuaccg gugaaauaua aagccauugu guuccgucca uucaaaggug aaguccugga 420

ugcggugguu cgacaaguca acaaaguugg cauguucgcc gaaauagguc cuuuaucuug 480

uuucauuucu cauauucca uaccgcgaga aauggaguuu uguccuaacg uuaaucccca 540

augcuauaag acuaaagacg aagauguugu gauacgagca gaaggagaaa ucagauugaa 600

aaugugggu acgagaguag acgccucagg gauuuugcc auuggaaccu uaauggauga 660

uuauucugga uuaauaagua auuaaguuga auuuuuuuua aauguauuaa uaagucuaua 720

uuuuuuuaua uacaaaaauc aaacauaac aaaaaaaaaa 759

<210> 87

<211> 577

<212> RNA

<213> 西方玉米根蟲

<400> 87	
cuaagcccaa auaaucgucc auaagagucc cgauagcgaa gauuccagug gcaucaacuc	60
uuguacccac aaucucagg cggauuuuau cuucuggggc gaugaccacu uccucuucuu	120
ucgaauugua acagggcgga uuuccauucg gacagaacug caugucagcu gguauggaau	180
gaugcgauau gaagcacgac aauggaccga uuucugcgaa cauuccacu uuauucacuu	240
gugucacgac agcguccaac acuucgccc ugaauaggucg gaaaacgauu gccuuauauu	300
ugacgggga cacaacgaau ccuugucccg gcuguauuau accagagccg aucugaucga	360
uuguuguuac ugcuaugacg aauccauacu uuccggugca ugugccuucacuucugugu	420
acaguucug uuucacuguu uccaucagu ggggcccga auacuuggga ugcagcaaua	480
uuucauguuc gagggaaug ugguagaaca uuuugugauu ggaaauuag aggaguauu	540
gucuucgca acaauaggu uaagggaauu auguuu	577

- <210> 88
- <211> 669
- <212> RNA
- <213> 西方玉米根蟲

<400> 88	
aacguugcg gucagugcac agucgcaacu cgggcaacgu augucggucg cucuugcugc	60
caguggcgcu gcuguuguuu gccgugca cuagaaguuc ucggacgaga ugagcccaa	120
guagucgucc ugaucgucc caaucgcau aaucuccgug acgucgacgc ucacgccau	180
gaucuugagc cgcacgccg agccuuugcg gaucucgacu ucgcggucau cagagaacca	240
cgcguguuuc ucguggucgu agccguuguu cagguccguc ggcaucgcu ggcgcgagac	300
aaagaccugg agcgguccga cgucggcgaa gaaccgagc ugguucacga cugucacgac	360
ugcgucgagc accugguucu ugaacggacg gaagaggau gcgcgguaacc ggauguugaa	420
acacacaaag cccgaguugu ccuggaucac gcccuugcca augucuucgu cgcgcacuuc	480

cgugacggug auaacauacc cguacuugcc cauggacgug cccucgaccu cuucgaucaa 540
acgcaagcgg augaugucgu ggagcuucgg gccaaagugc aucggaugga gcagcagguc 600
gcgcgagagc ugcuuagga agaacauggc gacgacagca guagcuacag cgacgacgau 660
cgucgagc 669

<210> 89
<211> 390
<212> RNA
<213> 西方玉米根蟲

<400> 89
ccacaacugu uagaaaaagu caaaacuaaa cuguauaccg aaguugaagg aacuugcaca 60
ggaaaguaug gauuugugau ugcaguaacc acuauagaua gcuaaggugc cgguuugaua 120
cuacccggac aaggcuuugu agucuaccg gugaaauaua aagccauugu guuccgucca 180
uucaaaggug aaguccugga ugcggugguu cgacaaguca acaaaguugg cauguucgcc 240
gaaauagguc cuuuaucuug uuucuuucu caucauucca uacccgcaga aauggaguuu 300
uguccuaacg uuaaucccca augcuauaag acuaaagacg aagauguugu gauacgagca 360
gaaggagaaa ucagauugaa aauguggggu 390

<210> 90
<211> 398
<212> RNA
<213> 西方玉米根蟲

<400> 90
cccucgaaca ugaaauauug cugcauccca aguauuucgg gcccacacug auggaaacag 60
ugaaacagaa acuguacaca gaaguugaag gcacaugcac cggaaguau ggauucguca 120
uagcaguaac aacaucgau cagaucggcu cugguauau acagccggga caaggauucg 180
uuguguauc cgucaauau aaggcaucg uuuccgacc auucaagggc gaaguguugg 240
acgcugucgu gacacaagug aaauaagugg gaaguucgc agaaucggu ccuugucgu 300

gcuucauauc gcaucauucc auaccagcug acaugcaguu cuguccgaau ggaaaucgcg 360

ccuguuacaa aucgaaagaa gaggaagugg ucaucgcc 398

<210> 91
<211> 395
<212> RNA
<213> 西方玉米根蟲

<400> 91

acgucgacgc ucacgccc au gaucuugagc cgcacgccgc agccuuugcg gaucucgacu 60

ucgcgguc au cagagaacca cgcguuguuc ucguggucgu agccguuguu cagguccguc 120

ggcaucgcgu ggcgcgagac aaagaccugg agcgguccga cgucggcgaa gaacccgagc 180

ugguucacga cugucacgac ugcgucgagc accugguucu ugaacggacg gaagaggau 240

gcgcgguaacc ggauguugaa acacacaaag cccgaguugu ccuggaucac gcccuugcca 300

augucuucgu cgcgcacuuc cgugacggug auaacauacc cguacuugcc cauggacgug 360

cccucgaccu cuucgaucaa acgcaagcgg augau 395

<210> 92
<211> 220
<212> RNA
<213> 西方玉米根蟲

<400> 92

aaagccauug uguuccgucc auucaaaaggu gaaguccugg augcgguggu ucgacaaguc 60

aacaaaguug gcauguucgc cgaaauaggu ccuuuauuu guuucuuuc ucaucauucc 120

auacccgcag aaauggaguu uuguccuaac guuaaucccc aaugcuauaa gacuaaagac 180

gaagauguug ugauacgagc agaaggagaa aucagauuga 220

<210> 93
<211> 697
<212> RNA
<213> 英雄美洲蟥

<400> 93						
acaagauuug	aaaauuuuu	accuuuuuc	ucuugaacau	gauuuuuuac	uacauccgag	60
auuuuuugga	ccucauuuac	augaaacagu	uaaacaacaaa	uuguacacug	aaguugaagg	120
gaccuguacu	ggcaaguau	gauuuuuuu	ugcagucacu	aaauuugaua	acauuggagc	180
ugguguuuua	cagccaggac	aaggauuugu	gguuuuaucca	gugaaauua	aagccauugu	240
uuuuagaccu	uuuaagggag	aaguuguuga	ugcuauuguu	acucaaguua	auaagguugg	300
aauguuuugca	gaaauuggac	cauugucuug	uuuuuuaucc	caucacucga	uaccugcuga	360
uauggaaauuc	ugccccaau	aaacuccacc	uuguuaccgu	ucuaaagau	aggauguugu	420
aaauaacagca	gaagauguua	uaagguguua	aaauaguuggg	acuagaguug	augcauccgg	480
uuuuuuugcu	auugguacuc	uuauuggau	uuuuuuaggu	uugauuggaa	guuuuuuuuu	540
uuuacuugaa	gacagucuac	augcaggagg	aaauagaaga	aaauuuuuuu	cauucuguuu	600
agacuguaug	uuuuagaaaa	ugugaaaaau	augcuggacu	uuuuuuuuuu	acacuguugu	660
aauuuuuugga	accauuuuuu	guuuuuuaca	aaaaaaa			697

- <210> 94
<211> 325
<212> RNA
<213> 英雄美洲蟾

<400> 94						
guuuuacaaa	aauguuacac	ugaaguugaa	gggaccugua	cuggcaagua	uggauuuguu	60
auugcaguca	cuaauuuuga	uaacauugga	gcugguguua	uacagccagg	acaaggauuu	120
gugguuuuau	cagugaaaua	uaaagccauu	guuuuuagac	cuuuuaaggg	agaaguuguu	180
gaugcuauug	uuacucaagu	uaauaagguu	ggauguuug	cagaaauugg	accuugucu	240
uguuuuuuuu	cccaucacuc	gauaccugcu	gauauggaau	ucugcccaa	ugaaacucca	300
ccuuguuacc	guucuaaaga	ugagg				325

<210> 95
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 訂製寡聚探針 rpb7

<400> 95
cctggatgcg gtggttcgac a 21

<210> 96
<211> 153
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>環圈

<400> 96
agtcatcacg ctggagcgca catataggcc ctccatcaga aagtcattgt gtatatctct 60
catagggaac gagctgcttg cgtatttccc ttccgtagtc agagtcatca atcagctgca 120
ccgtgtcgta aagcgggacg ttcgcaagct cgt 153

【發明申請專利範圍】

【第1項】 一種單離核酸，該核酸包含操作性地聯結至一異源性啟動子的至少一聚核苷酸，其中該聚核苷酸選自於由下列所構成之群組：

SEQ ID NO:1；SEQ ID NO:1的互補體或反向互補體；SEQ ID NO:1的至少15個鄰接核苷酸片段；SEQ ID NO:1的至少15個鄰接核苷酸片段的互補體或反向互補體；包含SEQ ID NOs:7與10的條葉甲屬(*Diabrotica*)生物原生編碼序列；包含SEQ ID NOs:7與10的條葉甲屬生物原生編碼序列的互補體或反向互補體；包含SEQ ID NOs:7與10的條葉甲屬生物原生編碼序列的至少15個鄰接核苷酸片段；包含SEQ ID NOs:7與10的條葉甲屬生物原生編碼序列的至少15個鄰接核苷酸片段的互補體或反向互補體；

SEQ ID NO:3；SEQ ID NO:3的互補體或反向互補體；SEQ ID NO:3的至少15個鄰接核苷酸片段；SEQ ID NO:3的至少15個鄰接核苷酸片段的互補體或反向互補體；包含SEQ ID NO:8的條葉甲屬生物原生編碼序列；包含SEQ ID NO:8的條葉甲屬生物原生編碼序列的互補體或反向互補體；包含SEQ ID NO:8的條葉甲屬生物原生編碼序列的至少15個鄰接核苷酸片段；包含SEQ ID NO:8的條葉甲屬生物原生編碼序列的至少15個鄰接核苷酸片段的互補體或反向互補體；

SEQ ID NO:5；SEQ ID NO:5的互補體或反向互補

體；SEQ ID NO:5的至少15個鄰接核苷酸片段；SEQ ID NO:5的至少15個鄰接核苷酸片段的互補體或反向互補體；包含SEQ ID NO:9的條葉甲屬生物原生編碼序列；包含SEQ ID NO:9的條葉甲屬生物原生編碼序列的互補體或反向互補體；包含SEQ ID NO:9的條葉甲屬生物原生編碼序列的至少15個鄰接核苷酸片段；包含SEQ ID NO:9的條葉甲屬生物原生編碼序列的至少15個鄰接核苷酸片段的互補體或反向互補體；

SEQ ID NO:78；SEQ ID NO:78的互補體或反向互補體；SEQ ID NO:78的至少15個鄰接核苷酸片段；SEQ ID NO:78的至少15個鄰接核苷酸片段的互補體或反向互補體；包含SEQ ID NO:80的美洲蟠屬(*Euschistus*)生物原生編碼序列；包含SEQ ID NO:80的美洲蟠屬生物原生編碼序列的互補體或反向互補體；包含SEQ ID NO:80的美洲蟠屬生物原生編碼序列的至少15個鄰接核苷酸片段；包含SEQ ID NO:80的美洲蟠屬生物原生編碼序列的至少15個鄰接核苷酸片段的互補體或反向互補體。

【第2項】 如請求項1之聚核苷酸，其中該聚核苷酸選自於由下列所構成之群組：SEQ ID NO:1；SEQ ID NO:1的互補體或反向互補體；SEQ ID NO:3；SEQ ID NO:3的互補體或反向互補體；SEQ ID NO:5；SEQ ID NO:5的互補體或反向互補體；SEQ ID NO:1的至少15個鄰接核苷酸片段；SEQ ID NO:1的至少15個鄰接核苷酸片段的互補體或反向互補體；SEQ ID NO:3的至少15個鄰接核苷酸

片段；SEQ ID NO:3的至少15個鄰接核苷酸片段的互補體或反向互補體；SEQ ID NO:5的至少15個鄰接核苷酸片段；SEQ ID NO:5的至少15個鄰接核苷酸片段的互補體或反向互補體；包含SEQ ID NOs:7-10之任一者的條葉甲屬生物原生編碼序列；包含SEQ ID NOs:7-10之任一者的條葉甲屬生物原生編碼序列的互補體或反向互補體；包含SEQ ID NOs:7-10之任一者的條葉甲屬生物原生編碼序列的至少15個鄰接核苷酸片段；包含SEQ ID NOs:7-10之任一者的條葉甲屬生物原生編碼序列的至少15個鄰接核苷酸片段的互補體或反向互補體。

【第3項】 如請求項1之聚核苷酸，其中該聚核苷酸選自於由下列所構成之群組：SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:80、以及前述任一者的互補體或反向互補體。

【第4項】 如請求項3之聚核苷酸，其中該生物選自於由下列所構成之群組：西方玉米根蟲(*D. v. virgifera* LeConte)；北方玉米根蟲(*D. barberi* Smith and Lawrence)；南方玉米根蟲(*D. u. howardi*)；墨西哥玉米根蟲(*D. v. zea*)；黃瓜條葉甲(*D. balteata* LeConte)；特氏斑點黃瓜條葉甲(*D. u. tenella*)；南美條葉甲(*D. speciosa*)；曼氏斑點黃瓜條葉甲(*D. u. undecimpunctata* Mannerheim)；英雄美洲蟥(*Euschistus heros* (Fabr.)) (新熱帶褐椿)、稻綠椿(*Nezara viridula* (L.)) (南方綠椿象)、

紅肩綠蝽(*Piezodorus guildinii* (Westwood)) (紅帶蝽象)、褐翅椿(*Halyomorpha halys* (Stål)) (褐翅椿象)、綠椿(*Chinavia hilare* (Say)) (綠椿象)、褐臭椿(*E. servus* (Say)) (褐椿象)、馬勒卡椿(*Dichelops melacanthus* (Dallas))、弗卡特克蝽(*Dichelops furcatus* (F.))、地中海椿(*Edessa meditabunda* (F.))、新熱帶紅肩綠蝽(*Thyanta perditor* (F.)) (新熱帶紅肩綠蝽象)、馬格那椿(*Chinavia marginatum* (Palisot de Beauvois))、諾比蟲(*Horcias nobilellus* (Berg)) (棉花蟲)、斑蝽(*Taedia stigmosa* (Berg))、秘魯紅蝽(*Dysdercus peruvianus* (Guérin-Méneville))、擬新扭白蟻(*Neomegalotomus parvus* (Westwood))、葉足蟲(*Leptoglossus zonatus* (Dallas))、尼氏蟲(*Niesthrea sidae* (F.))、草盲蝽(*Lygus hesperus* (Knight)) (西部牧草盲蝽)、和美國牧草盲蝽(*Lygus lineolaris* (Palisot de Beauvois))。

【第5項】 一種植物轉形載體，其包含如請求項1之聚核苷酸。

【第6項】 一種核糖核酸(RNA)分子，其係由如請求項1之聚核苷酸所轉錄。

【第7項】 一種雙股核糖核酸分子，其係由如請求項1之聚核苷酸之表現所製造。

【第8項】 如請求項7之雙股核糖核酸分子，其中以一鞘翅目或半翅目昆蟲接觸該聚核苷酸序列係抑制特異性地互補至該聚核苷酸之內源性核苷酸序列的表現。

【第9項】 如請求項8之雙股核糖核酸分子，其中以一鞘翅目或半翅目昆蟲接觸該核糖核苷酸分子係殺死或抑制昆蟲的生長、生存或進食。

【第10項】 如請求項7之雙股RNA，其包含一第一、一第二與一第三RNA區段，其中該第一RNA區段包含該聚核苷酸，其中該第三RNA區段係藉由該第二聚核苷酸序列聯結至該第一RNA區段，且其中該第三RNA區段實質上為該第一RNA區段的反向互補體，俾使該第一與該第三RNA區段在轉錄成一核糖核酸時雜交，以形成該雙股RNA。

【第11項】 如請求項6之RNA，其選自於由下列所構成之群組：長度介於約15個與約30個核苷酸之間的一雙股核糖核酸分子與一單股核糖核酸分子。

【第12項】 一種植物轉形載體，其包含如請求項1之聚核苷酸，其中該異源性啟動子係於一植物細胞內發揮功能。

【第13項】 一種細胞，其係經如請求項1之聚核苷酸轉形。

【第14項】 如請求項13之細胞，其中該細胞為一原核細胞。

【第15項】 如請求項13之細胞，其中該細胞為一真核細胞。

【第16項】 如請求項15之細胞，其中該細胞為一植物細胞。

【第17項】 一種植物，其係經如請求項1之聚核苷酸

轉形。

【第18項】一種如請求項17之植物的種子，其中該種子包含該聚核苷酸。

【第19項】一種由如請求項17之植物所製成的商品，其中該商品包含一可偵測量之該聚核苷酸，該商品較佳為食物或油。

【第20項】如請求項17之植物，其中該至少一聚核苷酸係以一雙股核糖核酸分子在植物內表現。

【第21項】如請求項16之細胞，其中該細胞為玉米、大豆、或棉花細胞。

【第22項】如請求項17之植物，其中該植物為玉米、大豆、或棉花。

【第23項】如請求項17之植物，其中該至少一聚核苷酸係以核糖核酸分子在植物內表現，當鞘翅目或半翅目昆蟲攝食該植物的一部分時，該核糖核酸分子係抑制特異性地互補至該至少一聚核苷酸之內源性聚核苷酸的表現。

【第24項】如請求項1之聚核苷酸，其更包含編碼一RNA分子的至少一個額外聚核苷酸，該RNA分子抑制一內源性昆蟲基因表現。

【第25項】一種植物轉形載體，其包含如請求項24之聚核苷酸，其中該(等)額外聚核苷酸係各別操作性地聯結至在植物細胞內發揮功能的異源性啟動子。

【第26項】一種用於控制鞘翅目或半翅目害蟲群體的方法，該方法包含提供包含核糖核酸(RNA)分子之一劑，

該劑在接觸到該害蟲後即發揮功能，以抑制該害蟲內的生物功能，其中該RNA可和選自於由下列所構成之群組的一聚核苷酸特異性地雜交：SEQ ID NOs:86-88與93之任一者；SEQ ID NOs:86-88與93之任一者的互補體或反向互補體；SEQ ID NOs:86-88與93之任一者的至少15個鄰接核苷酸片段；SEQ ID NOs:86-88與93之任一者的至少15個鄰接核苷酸片段的互補體或反向互補體；SEQ ID NOs:1、3、5、與78之任一者的轉錄體；SEQ ID NOs:1、3、5、與78之任一者的轉錄體的互補體或反向互補體；SEQ ID NOs:1、3、5、與78之任一者的轉錄體的至少15個鄰接核苷酸片段；以及SEQ ID NOs:1、3、5、與78之任一者的轉錄體的至少15個鄰接核苷酸片段的互補體或反向互補體。

【第27項】如請求項26之方法，其中該劑的該RNA係和選自於由下列所構成之群組的一聚核苷酸特異性地雜交：SEQ ID NOs:89-92與94之任一者；SEQ ID NOs:89-92與94之任一者的互補體或反向互補體；SEQ ID NOs:89-92與94之任一者的至少15個鄰接核苷酸片段；SEQ ID NOs:89-92與94之任一者的至少15個鄰接核苷酸片段的互補體或反向互補體；SEQ ID NOs:7-10、與80之任一者的轉錄體；SEQ ID NOs:7-10、與80之任一者的轉錄體的互補體或反向互補體；SEQ ID NOs:7-10、與80之任一者的轉錄體的至少15個鄰接核苷酸片段；以及SEQ ID NOs:7-10、與80之任一者的轉錄體的至少15個鄰接核

苷酸片段的互補體或反向互補體。

【第28項】如請求項26之方法，其中該劑為一雙股RNA分子。

【第29項】一種用於控制鞘翅目害蟲群體的方法，該方法包含：

提供包含一第一與一第二聚核苷酸序列之一劑，該劑在接觸到該鞘翅目害蟲後即發揮功能，以抑制鞘翅目害蟲內的生物功能，其中該第一聚核苷酸序列包含一區，該區和SEQ ID NOs:86-92之任一者之約15至約30個鄰接核苷酸展現出從約90%至約100%的序列一致性，且其中該第一聚核苷酸序列特異性地雜交至該第二聚核苷酸序列。

【第30項】一種用於控制半翅目害蟲群體的方法，該方法包含：

提供包含一第一與一第二聚核苷酸序列之一劑，該劑在接觸到該半翅目害蟲後即發揮功能，以抑制該半翅目害蟲內的生物功能，其中該第一聚核苷酸序列包含一區，該區和SEQ ID NO:93與SEQ ID NO:94之一者之從約15至約30個鄰接核苷酸展現出從約90%至約100%的序列一致性，且其中該第一聚核苷酸序列特異性地雜交至該第二聚核苷酸序列。

【第31項】一種用於控制鞘翅目或半翅目昆蟲害蟲群體的方法，該方法包含：

在一鞘翅目或半翅目昆蟲害蟲之宿主植物內提供一經轉形植物細胞，該細胞包含如請求項1之聚核苷酸，其

中該聚核苷酸係經表現，以製造一核糖核酸分子，該分子在接觸到屬於該群體之鞘翅目害蟲後即發揮功能，以抑制該鞘翅目害蟲內的標靶序列的表現並導致該鞘翅目害蟲或害蟲群體生長及/或存活減少，其係相較於在不包含該聚核苷酸的相同宿主植物物種之植物上的相同害蟲物種。

【第32項】如請求項31之方法，其中該核糖核酸分子為一雙股核糖核酸分子。

【第33項】如請求項31之方法，其中，相較於侵擾缺少該經轉形植物細胞之相同宿主植物物種的一宿主植物的相同害蟲物種群體，該鞘翅目或半翅目害蟲群體係減少的。

【第34項】如請求項32之方法，其中，相較於侵擾缺少該經轉形植物細胞之相同物種的一宿主植物的鞘翅目害蟲群體，該鞘翅目害蟲群體係減少的。

【第35項】一種用於在植物控制昆蟲害蟲侵擾的方法，該方法包含在該昆蟲害蟲的膳食中提供一核糖核酸(RNA)，該核糖核酸和選自於由下列所構成之群組的一聚核苷酸可特異性地雜交：

SEQ ID NOs:86-88與93；

SEQ ID NOs:86-88與93之任一者的互補體或反向互補體；

SEQ ID NOs:86-88與93之任一者的至少15個鄰接核苷酸片段；

SEQ ID NOs:86-88與93之任一者的至少15個鄰接核苷酸片段的互補體或反向互補體；

SEQ ID NOs:1、3、5、與78之任一者的轉錄體；

SEQ ID NOs:1、3、5、與78之任一者的轉錄體的互補體或反向互補體；

SEQ ID NOs:1、3、5、與78之任一者的轉錄體的至少15個鄰接核苷酸片段；以及

SEQ ID NOs:1、3、5、與78之任一者的轉錄體的至少15個鄰接核苷酸片段的互補體或反向互補體。

【第36項】如請求項35之方法，其中該膳食包含經轉形以表現該聚核苷酸的一植物細胞或包含該RNA的一RNAi誘餌。

【第37項】如請求項35之方法，其中該可特異性地雜交的RNA被包含在一雙股RNA分子之內。

【第38項】一種用於在植物中控制昆蟲害蟲侵擾的方法，該方法包含以一和選自於由下列所構成之群組的一聚核苷酸可特異性地雜交的核糖核酸(RNA)接觸一昆蟲害蟲：

SEQ ID NOs:86-88與93；

SEQ ID NOs:86-88與93之任一者的互補體或反向互補體；

SEQ ID NOs:86-88與93之任一者的至少15個鄰接核苷酸片段；

SEQ ID NOs:86-88與93之任一者的至少15個鄰接核苷酸片段的互補體或反向互補體；

SEQ ID NOs:1、3、5、與78之任一者的轉錄體；

SEQ ID NOs:1、3、5、與78之任一者的轉錄體的互補體或反向互補體；

SEQ ID NOs:1、3、5、與78之任一者的轉錄體的至少15個鄰接核苷酸片段；以及

SEQ ID NOs:1、3、5、與78之任一者的轉錄體的至少15個鄰接核苷酸片段的互補體或反向互補體。

【第39項】如請求項38之方法，其中以該RNA接觸該昆蟲害蟲包含以包含該RNA的組成物噴灑該植物。

【第40項】如請求項38之方法，其中該可特異性地雜交的RNA被包含在一雙股RNA分子之內。

【第41項】一種用於改善植物作物產量的方法，該方法包含：

將如請求項1之核酸引進一植物中，以製造一基因轉殖植物；以及

培養該植物，以容許該至少一聚核苷酸表現；其中該至少一聚核苷酸的表現係抑制昆蟲害蟲的發育或生長以及由於昆蟲害蟲侵染所致的產量損失。

【第42項】如請求項41之方法，其中該至少一聚核苷酸的表現製造一RNA分子，該RNA分子係壓抑已接觸一部分玉米植物的昆蟲害蟲內的至少一第一標靶基因。

【第43項】如請求項41之方法，其中該聚核苷酸選自於由下列所構成之群組：SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:80、

以及前述任一者的互補體或反向互補體。

【第44項】如請求項41之方法，其中該植物為玉米、大豆、或棉花植物。

【第45項】一種用於製造一基因轉殖植物細胞的方法，該方法包含：

以包含如請求項1之核酸的載體轉形一植物細胞；

在足以容許包含複數個經轉形之植物細胞的植物細胞培養物發育的條件下培養該經轉形之植物細胞；

選擇已將該至少一聚核苷酸整合至其基因組中的經轉形植物細胞；

篩揀用於表現該至少一聚核苷酸所編碼之核糖核酸(RNA)分子的該經轉形植物細胞；以及

選擇表現該RNA的植物細胞。

【第46項】如請求項45之方法，其中該載體包含選自於由下列所構成之群組的一聚核苷酸：SEQ ID NO:1；SEQ ID NO:1的互補體或反向互補體；SEQ ID NO:3；SEQ ID NO:3的互補體或反向互補體；SEQ ID NO:5；SEQ ID NO:5的互補體或反向互補體；SEQ ID NOs:1、3、與5之任一者的至少15個鄰接核苷酸片段；SEQ ID NOs:1、3、與5之任一者的至少15個鄰接核苷酸片段的互補體或反向互補體；包含SEQ ID NOs:7-10之任一者的條葉甲屬生物原生編碼序列；包含SEQ ID NOs:7-10之任一者的條葉甲屬生物原生編碼序列的互補體或反向互補體；包含SEQ ID NOs:7-10之任一者的條葉甲屬生物原生編碼序列的至少

15個鄰接核苷酸片段；包含SEQ ID NOs:7-10之任一者的條葉甲屬生物原生編碼序列的至少15個鄰接核苷酸片段的互補體或反向互補體。

【第47項】如請求項45之方法，其中該RNA分子為雙股RNA分子。

【第48項】一種用於製造一防範鞘翅目害蟲之基因轉殖植物的方法，該方法包含：

提供如請求項46之方法所製造的基因轉殖植物細胞；以及

從該基因轉殖植物細胞再生一基因轉殖植物，其中該至少一聚核苷酸所編碼之核糖核酸分子的表現係足以調節接觸該經轉形植物之一鞘翅目害蟲內的標靶基因的表現。

【第49項】一種用於製造一基因轉殖植物細胞的方法，該方法包含：

以一載體轉形一植物細胞，該載體包含用於對一植物提供鞘翅目害蟲防範之*rpb7*措施(means)；

在足以容許包含複數個經轉形之植物細胞的植物細胞培養物發育的條件下培養該經轉形植物細胞；

選擇已將該用於對一植物提供鞘翅目害蟲防範之*rpb7*措施整合至其基因組中的經轉形植物細胞；

篩揀用於表現該用於抑制鞘翅目害蟲內之關鍵基因表現之*rpb7*措施的該經轉形植物細胞；以及

選擇表現該用於抑制鞘翅目害蟲內之關鍵基因表現之*rpb7*措施的一植物細胞。

【第50項】一種用於製造一防範鞘翅目害蟲之基因轉殖植物的方法，該方法包含：

提供如請求項49之方法所製造的基因轉殖植物細胞；以及

從該基因轉殖植物細胞再生一基因轉殖植物，其中該用於抑制一鞘翅目害蟲內之關鍵基因表現之*rpb7*措施的表現係足以調節接觸該經轉形植物之一鞘翅目害蟲內的標靶基因的表現。

【第51項】一種用於製造一基因轉殖植物細胞的方法，該方法包含：

以包含用於對一植物提供半翅目害蟲防範之*rpb7*措施的一載體轉形一植物細胞；

在足以容許包含複數個經轉形之植物細胞的植物細胞培養物發育的條件下培養該經轉形植物細胞；

選擇已將該對一植物提供半翅目害蟲防範之*rpb7*措施整合至其基因組中的經轉形植物細胞；

篩揀表現該用於抑制半翅目害蟲內之關鍵基因表現之*rpb7*措施的該經轉形植物細胞；以及

選擇表現該用於抑制半翅目害蟲內之關鍵基因表現之*rpb7*措施的一植物細胞。

【第52項】一種用於製造一防範半翅目害蟲之基因轉殖植物的方法，該方法包含：

提供如請求項51之方法所製造的基因轉殖植物細胞；以及

從該基因轉殖植物細胞再生一基因轉殖植物，其中該用於抑制一半翅目害蟲內之關鍵基因表現之 *rpb7* 措施的表現係足以調節接觸該經轉形植物之一半翅目害蟲內的標靶基因的表現。

【第53項】如請求項1之核酸，其更包含編碼來自蘇力菌 (*Bacillus thuringiensis*) 之多肽、PIP-1 多肽、或 AflP-1A 多肽的一聚核苷酸。

【第54項】如請求項53之核酸，其中該聚核苷酸係編碼選自包含下列之群組的來自蘇力菌之多肽：Cry1B、Cry1I、Cry2A、Cry3、Cry7A、Cry8、Cry9D、Cry14、Cry18、Cry22、Cry23、Cry34、Cry35、Cry36、Cry37、Cry43、Cry55、Cyt1A、與Cyt2C。

【第55項】如請求項16之細胞，其中該細胞包含編碼來自蘇力菌之多肽、PIP-1 多肽、或 AflP-1A 多肽的一聚核苷酸。

【第56項】如請求項55之細胞，其中該聚核苷酸係編碼選自包含下列之群組的來自蘇力菌之多肽：Cry1B、Cry1I、Cry2A、Cry3、Cry7A、Cry8、Cry9D、Cry14、Cry18、Cry22、Cry23、Cry34、Cry35、Cry36、Cry37、Cry43、Cry55、Cyt1A、與Cyt2C。

【第57項】如請求項17之植物，其中該植物包含編碼來自蘇力菌之多肽、PIP-1 多肽、或 AflP-1A 多肽的一聚核苷酸。

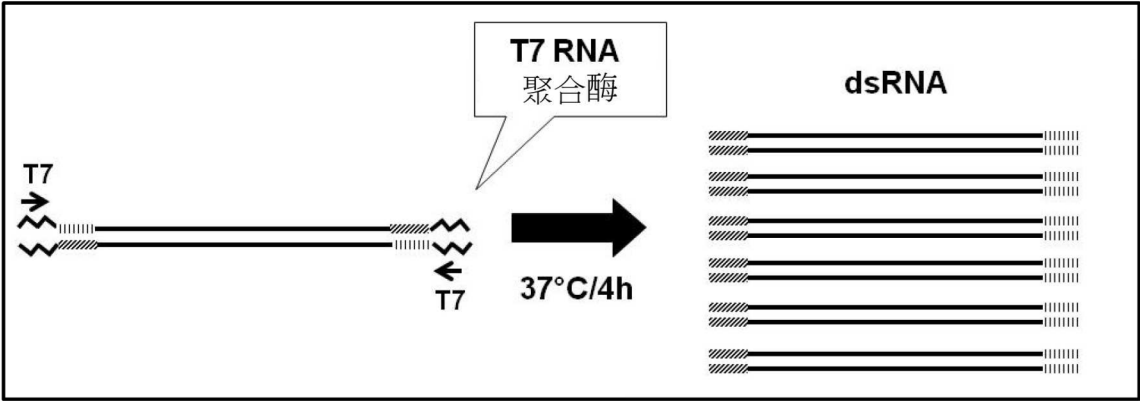
【第58項】如請求項57之植物，其中該聚核苷酸係編

碼選自包含下列之群組的來自蘇力菌之多肽：Cry1B、Cry1I、Cry2A、Cry3、Cry7A、Cry8、Cry9D、Cry14、Cry18、Cry22、Cry23、Cry34、Cry35、Cry36、Cry37、Cry43、Cry55、Cyt1A、與Cyt2C。

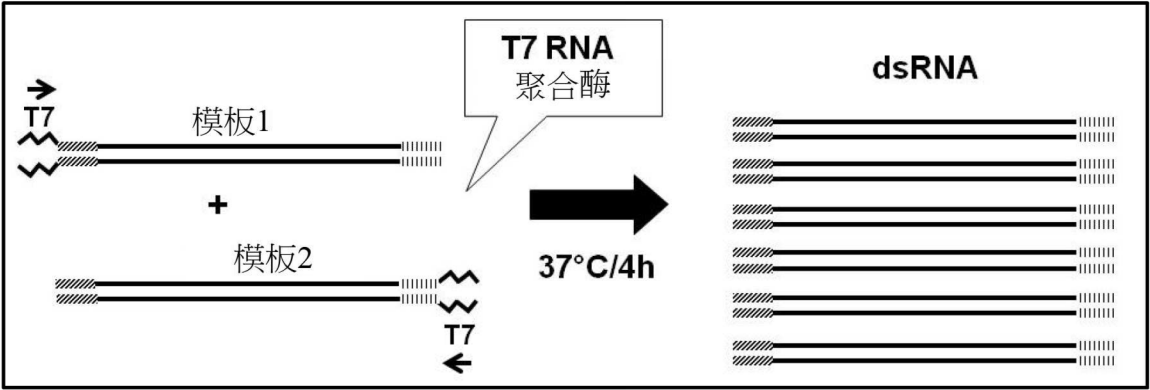
【第59項】如請求項45之方法，其中該經轉形植物細胞包含編碼來自蘇力菌之多肽、PIP-1多肽、或AflP-1A多肽的一聚核苷酸。

【第60項】如請求項59之方法，其中該聚核苷酸係編碼選自包含下列之群組的來自蘇力菌之多肽：Cry1B、Cry1I、Cry2A、Cry3、Cry7A、Cry8、Cry9D、Cry14、Cry18、Cry22、Cry23、Cry34、Cry35、Cry36、Cry37、Cry43、Cry55、Cyt1A、與Cyt2C。

【發明圖式】



【圖1】



【圖2】