



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103748228 B

(45)授权公告日 2017.02.15

(21)申请号 201280026634.3  
(22)申请日 2012.03.30  
(65)同一申请的已公布的文献号  
    申请公布号 CN 103748228 A  
(43)申请公布日 2014.04.23  
(30)优先权数据  
    61/469380 2011.03.30 US  
(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
    2013.11.29  
(86)PCT国际申请的申请数据  
    PCT/IB2012/000827 2012.03.30  
(87)PCT国际申请的公布数据  
    W02012/131495 EN 2012.10.04  
(73)专利权人 墨西哥国立大学  
    地址 墨西哥墨西哥城  
(72)发明人 M.索贝伦-查贝斯  
    A.布拉沃-德拉帕拉  
    I.戈麦斯-戈麦斯  
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
    72001  
    代理人 孔青 权陆军

(51)Int.Cl.  
    C12N 15/82(2006.01)  
    C07K 14/325(2006.01)  
(56)对比文件  
    WO 99/24581 A2,1999.05.20,  
    CN 101492490 A,2009.07.29,  
    EP 2087120 A2,2009.08.12,  
    DE MAAGD RUUD A ET AL.Domain III  
    substitution in Bacillus thuringiensis  
    delta-endotoxin CryIA(b) results in  
    superior toxicity for Spodoptera exigua  
    and altered membrane protein recognition.  
    《APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY,  
    AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY》.1996,  
    第62卷(第5期),1537-1543.

审查员 李宁

权利要求书1页 说明书31页  
序列表20页

(54)发明名称  
    突变型苏云金芽孢杆菌CRY基因及其使用方法

(57)摘要  
    本发明提供从苏云金芽孢杆菌(Bacillus thuringiensis)菌株获得的编码对昆虫害虫(包括鳞翅目)具有杀虫活性的 $\delta$ -内毒素的核酸。本发明的具体实施例提供编码突变型杀虫多肽的分离核酸分子、包含本发明核酸分子的杀虫组合物、表达盒以及转化的微生物和植物。这类组合物用于控制昆虫害虫的方法。

1. 一种突变型Cry1Ab多肽,其与天然存在的SEQ ID NO: 2所示的Cry1Ab多肽相比较具有选自以下的一个氨基酸替换:在位置509处用丙氨酸替换丝氨酸,在位置513处用丙氨酸替换缬氨酸,在位置514处用丙氨酸替换天冬酰胺,在位置585处用丙氨酸替换苏氨酸,在位置587处用丙氨酸替换丝氨酸,在位置589处用丙氨酸替换组氨酸,和在位置590处用丙氨酸替换缬氨酸,其中所述突变型Cry1Ab多肽相对于天然存在的SEQ ID NO: 2的Cry1Ab多肽具有针对草地贪夜蛾改善的杀虫活性。
2. 一种多核苷酸,其编码根据权利要求1所述的突变型Cry1Ab多肽。
3. 一种表达盒,其包括根据权利要求2所述的多核苷酸。
4. 根据权利要求3所述的表达盒,其中所述多核苷酸有效连接至在植物中驱动表达的启动子。
5. 根据权利要求3所述的表达盒,其中所述多核苷酸有效连接至在微生物中驱动表达的启动子。
6. 一种产生包含根据权利要求2所述的多核苷酸的植物的方法,其中所述多核苷酸有效连接至在所述植物中具有活性的启动子。
7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述植物为单子叶植物。
8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述单子叶植物选自玉蜀黍、甘蔗、小麦、大米、大麦、高粱和黑麦。
9. 根据权利要求8所述的方法,其中所述单子叶植物为玉蜀黍。
10. 根据权利要求6所述的方法,其中所述植物为双子叶植物。
11. 一种保护植物免受草地贪夜蛾害虫侵害的方法,所述方法包括将根据权利要求2所述的多核苷酸引入所述植物中,其中所述多核苷酸有效连接至在所述植物中驱动表达的启动子。
12. 一种杀虫组合物,其包含根据权利要求1所述的至少一种突变型Cry1Ab多肽。
13. 一种根据权利要求12所述的杀虫组合物,还包含载体。
14. 一种包含根据权利要求2所述的多核苷酸的微生物,其中所述多核苷酸有效连接至在所述微生物中具有活性的启动子。
15. 一种杀虫组合物,包含根据权利要求14所述的微生物。
16. 根据权利要求15所述的杀虫组合物,还包含载体。
17. 一种保护植物免受草地贪夜蛾害虫侵害的方法,包括将有效量的根据权利要求12、13、15和16中任一项所述的杀虫组合物施加至草地贪夜蛾害虫的环境。
18. 根据权利要求17所述的方法,其中通过撒播或种子包衣施加所述组合物。
19. 根据权利要求18所述的方法,其中通过喷雾或撒粉施加所述组合物。
20. 一种用于控制耕作区中草地贪夜蛾害虫的方法,包括使用根据权利要求4所述的表达盒转染的转基因种子播种所述区域。

## 突变型苏云金芽孢杆菌CRY基因及其使用方法

[0001] 对通过EFS-WEB作为文本文件提交的序列表的引用

[0002] 序列表的正式副本通过EFS-Web以文本文件的形式与本说明书同时提交,其符合美国信息交换标准码(ASCII),文件名为416951SEQLIST.txt,创建日期为2012年3月28日,大小为29千字节。通过EFS-Web提交的序列表是本说明书的一部分,并且以引用的方式并如本文,如同以全文示出。

### 技术领域

[0003] 本发明涉及植物分子生物学和植物害虫控制领域。更具体地讲,本发明涉及苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)Cry基因,所述Cry基因编码由针对昆虫害虫的杀虫活性表征的 $\delta$ -内毒素。本发明的组合物和方法利用所公开的核酸及其编码的突变型杀虫多肽来控制害虫。

### 背景技术

[0004] 昆虫害虫是造成世界农作物损失的主要因素。例如,秋夜蛾或烟草天蛾采食损害可能对农业生产者而言是经济上毁灭性的。单是来自玉米根虫的昆虫害虫相关作物损失就已经达到一年十亿美元的损害和控制费用。

[0005] 传统上,影响昆虫害虫群体(例如玉米根虫群体)的主要方法为作物轮作和施加广谱合成化学杀虫剂。然而,消费者和政府监管机构同样日益忧虑与生产和使用合成化学杀虫剂相关的环境危害。由于这些忧虑,监管机构已经禁止或者限制使用一些危害较大的杀虫剂。因此,在开发替代性杀虫剂方面存在巨大兴趣。

[0006] 使用微生物剂如真菌、细菌或者另一种昆虫对具有农业意义的昆虫害虫进行生物控制,提供了具有环境友好性和商业吸引力的替代方案。一般而言,使用生物杀虫剂具有更低的污染和环境危害风险,并且还提供比作为传统广谱化学杀昆虫剂之特征更高的靶特异性。此外,生物杀虫剂的生产成本往往较低,并且因此改善众多作物的经济产量。

[0007] 已知芽孢杆菌属(*Bacillus*)微生物的某些菌种对多种昆虫害虫具有杀虫活性,所述昆虫害虫包括鳞翅目(Lepidoptera)、双翅目(Diptera)、鞘翅目(Coleoptera)、半翅目(Hemiptera)害虫以及其他害虫。苏云金芽孢杆菌和日本金龟芽孢杆菌(*Bacillus papilliae*)属于迄今所发现的最成功生物控制剂。昆虫病原性已经归因于:幼虫芽孢杆菌(*B. larvae*)、缓病芽孢杆菌(*B. lentimorbus*)、日本金龟芽孢杆菌(*B. papilliae*)、球形芽孢杆菌(*B. sphaericus*)、苏云金芽孢杆菌(*B. thuringiensis*)的菌株(Harwood, ed. (1989) *Bacillus* (Plenum Press), p. 306 (Harwood编辑, 1989年,《芽孢杆菌属》, 普莱南出版社, 第306页)和蜡状芽孢杆菌(*B. cereus*)的菌株(WO 96/10083)。杀虫活性似乎集中在类芽孢结晶蛋白包涵体中,不过也已经从芽孢杆菌的营养生长期分离出杀虫蛋白。已经分离和表征几种编码这些杀虫蛋白的基因(参见例如美国专利No. 5,366,892和5,840,868)。

[0008] 微生物杀虫剂,特别从芽孢杆菌菌株获得的那些,已经在农业中作为化学控制害虫的替代方案发挥重要作用。从苏云金芽孢杆菌菌株分离的杀虫蛋白,称为 $\delta$ 内毒素或Cry

毒素,最初以无活性原毒素形式产生。这些原毒素通过昆虫肠道中蛋白酶的作用按蛋白水解方式转化为活性毒素。参见Rukmini et al.(2000)Biochimie 82:109-116(Rukmini等人,2000年,《生物化学》,第82卷,第109-116页);Oppert(1999)Arch.Insect Biochem.Phys.42:1-12(Oppert,1999年,《昆虫生物化学与生理学档案》,第42卷,第1-12页);和Carroll et al.(1997)J.Invertebrate Pathology 70:41-49(Carroll等人,1997年,《无脊椎动物病理学杂志》,第70卷,第41-49页)。毒素的蛋白分解活化可以包括从蛋白移除N末端肽和C末端肽,以及蛋白质的内部切割。一旦活化,Cry毒素以高亲和力与昆虫肠道中上皮细胞上的受体结合,从而在细胞膜中形成渗漏通道、昆虫肠道裂解以及因饥饿和败血症造成的后续昆虫死亡。参见(例如)Li et al.(1991)Nature 353:815-821(Li等人,1991年,《自然》,第353卷,第815-821页)。

[0009] 最近,农业科学家已经通过用杀虫基因对作物进行基因工程改造以产生来自芽孢杆菌的杀虫蛋白,开发出了昆虫抗性增强的作物。例如,经基因工程化以产生Cry毒素的玉米和棉化植株(参见,如Aronson(2002)Cell Mol.Life Sci.59(3):417-425(Aronson,2002年,《细胞分子生命科学》,第59卷,第3期,第417-425页);Schnepf et al.(1998)Microbiol.Mol.Biol.Rev.62(3):775-806(Schnepf等人,1998年,《微生物分子生物学评论》,第62卷,第3期,第775-806页)目前广泛在美国农业中应用,并且已经给农场主提供替代传统昆虫控制方法的环境友好的方案。此外,已经开发了经基因工程化以含有杀虫Cry毒素的马铃薯。虽然这些经基因工程化的抗昆虫作物已经证明在商业上十分成功,但它们仅对少数经济上重要的昆虫害虫提供抗性。

[0010] 因此,仍然需要具有更广范围针对昆虫害虫的杀昆虫活性的新型Bt毒素,例如,对来自鳞翅目的更多种类昆虫有活性的毒素。此外,仍然需要针对多种昆虫害虫具有活性的生物杀虫剂和需要具有改善的杀昆虫活性的生物杀虫剂。

## 发明内容

[0011] 提供用于保护植物免受植物害虫(特别是昆虫害虫)侵害的组合物和方法。更具体地讲,本文献提供了在农业中用于控制多种作物的在农业上有意义的害虫(例如秋夜蛾,如草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*))的组合物和方法。组合物包含改变的Cry核苷酸序列和由此类序列编码的多肽。所述多肽在结构域III(结合结构域)中经诱变或改变。组合物包含核酸分子,其编码对昆虫害虫具有杀昆虫活性的 $\delta$ 内毒素的Cry家族新型突变型成员。例如,提供了在结构域III中具有特定氨基酸置换的Cry1Ab和Cry1C改变的多肽。改变的多肽显示针对额外害虫的毒素活性以及增加的杀昆虫活性。对于Cry1Ab而言,氨基酸在选自SEQ ID NO:2的氨基酸残基509、513、514、585、587、589和590的至少一个位置中替换为其他氨基酸。对于Cry1C而言,氨基酸在选自SEQ ID NO:4的氨基酸残基508、509、510和590的至少一个位置中替换为其他氨基酸。

[0012] 本发明的核酸分子和突变型杀虫多肽用于涉及保护植物免受昆虫害虫侵害和用于影响昆虫害虫的方法中。所述方法包括将多核苷酸构建体引入植物中,所述多核苷酸构建体包含与植物中驱动表达的启动子有效连接的本发明核酸分子。核酸分子在植物(如,单子叶植物或双子叶植物)内的表达将导致产生突变型杀虫多肽并且向植物赋予提高的昆虫抗性。因此,还提供了包含核酸分子并且表达本发明新型突变型杀虫多肽的转基因(如,转

化)植物细胞、植物组织、植物及其种子。

[0013] 本发明还提供了杀虫组合物和制剂及它们用于控制昆虫害虫的方法。杀虫组合物包含本发明的突变型杀虫多肽或转化的微生物,所述微生物包括编码本发明的突变型杀虫多肽的核苷酸序列。使用这些组合物来影响昆虫害虫的方法可以包括将杀虫组合物施加至昆虫害虫的环境。

[0014] 本发明涵盖以下实施例。

[0015] 1.一种突变型Cry多肽,其与天然存在的Cry多肽相比较在选自对应于SEQ ID NO:2的氨基酸残基509、513、514、585、587、589和590以及SEQ ID NO:4的氨基酸残基508、509、510和590的至少一个位置处具有至少一个氨基酸替换,其中所述突变型Cry多肽具有杀虫活性。

[0016] 2.实施例1的突变型Cry多肽,其中所述多肽包括选自下列各项的氨基酸序列:

[0017] a)SEQ ID NO:2中示出的氨基酸序列,其具有其中氨基酸残基在选自残基509、513、514、585、587、589和590的至少一个位置中替换为不同氨基酸的至少一个氨基酸替换;

[0018] b)与(a)的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列,其中所述氨基酸序列保留所述替换;

[0019] c)与(a)的氨基酸序列具有至少98%序列同一性的氨基酸序列,其中所述氨基酸序列保留所述替换。

[0020] 3.实施例2的突变型Cry多肽,其中所述氨基酸替换包括在位置509处用丙氨酸替换丝氨酸。

[0021] 4.实施例2的突变型Cry多肽,其中所述氨基酸替换包括在位置513处用丙氨酸替换缬氨酸。

[0022] 5.实施例2的突变型Cry多肽,其中所述氨基酸替换包括在位置514处用丙氨酸、组氨酸或苯基丙氨酸替换天冬酰胺。

[0023] 6.实施例2的突变型Cry多肽,其中所述氨基酸替换包括在位置585处用丙氨酸替换苏氨酸。

[0024] 7.实施例2的突变型Cry多肽,其中所述氨基酸替换包括在位置587处用丙氨酸替换丝氨酸。

[0025] 8.实施例2的突变型Cry多肽,其中所述氨基酸替换包括在位置589处用丙氨酸替换苏氨酸。

[0026] 9.实施例2的突变型Cry多肽,其中所述氨基酸替换包括在位置590处用丙氨酸替换缬氨酸。

[0027] 10.实施例1的突变型Cry多肽,其中所述多肽包括选自下列各项的氨基酸序列:

[0028] a)SEQ ID NO:4中示出的氨基酸序列,其具有其中氨基酸残基在选自残基508、509、510和590的至少一个位置中替换为不同氨基酸的至少一个氨基酸替换;

[0029] b)与(a)的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列,其中所述氨基酸序列保留所述替换;

[0030] c)与(a)的氨基酸序列具有至少98%序列同一性的氨基酸序列,其中所述氨基酸序列保留所述替换。

[0031] 11.实施例10的突变型Cry多肽,其中所述氨基酸替换包括在位置508处用丙氨酸

替换谷氨酰胺。

[0032] 12. 实施例10的突变型Cry多肽,其中所述氨基酸替换包括在位置509处用丙氨酸替换缬氨酸。

[0033] 13. 实施例10的突变型Cry多肽,其中所述氨基酸替换包括在位置510处用丙氨酸、组氨酸或苯基丙氨酸替换天冬酰胺。

[0034] 14. 实施例10的突变型Cry多肽,其中所述氨基酸替换包括在位置590处用丙氨酸替换丝氨酸。

[0035] 15. 一种具有核苷酸序列的多核苷酸,该序列编码实施例1-14中任一项的突变型Cry多肽。

[0036] 16. 一种表达盒,其包含实施例15的多核苷酸。

[0037] 17. 实施例16的表达盒,其中所述多核苷酸有效连接至在植物中驱动表达的启动子。

[0038] 18. 实施例16的表达盒,其中所述多核苷酸有效连接至在微生物中驱动表达的启动子。

[0039] 19. 一种宿主细胞,其包含实施例15的多核苷酸的或实施例16-18中的任一项的表达盒。

[0040] 20. 一种包含实施例15的多核苷酸的植物,其中所述多核苷酸有效连接至在所述植物中具有活性的启动子。

[0041] 21. 实施例20的植物,其中所述植物为单子叶植物。

[0042] 22. 实施例21的植物,其中所述单子叶植物选自玉蜀黍、甘蔗、小麦、大米、大麦、高粱和黑麦。

[0043] 23. 实施例22的植物,其中所述单子叶植物为玉蜀黍。

[0044] 24. 实施例20的植物,其中所述植物为双子叶植物。

[0045] 25. 一种由权利要求20-24中任一项的植物所产生的转基因种子。

[0046] 26. 一种保护植物免受昆虫害虫侵害的方法,所述方法包括将实施例15的多核苷酸引入所述植物中,其中所述多核苷酸有效连接至在所述植物中驱动表达的启动子。

[0047] 27. 实施例26的方法,其中所述害虫为鳞翅目害虫。

[0048] 28. 一种杀虫组合物,其包含实施例1-14中任一项的至少一种突变型Cry多肽。

[0049] 29. 一种实施例28的杀虫组合物,还包含载体。

[0050] 30. 一种包含实施例15的多肽的微生物,其中所述多肽有效连接至在所述微生物中具有活性的启动子。

[0051] 31. 一种包含实施例30的微生物的杀虫组合物。

[0052] 32. 实施例31的杀虫组合物,还包含载体。

[0053] 33. 一种保护植物免受昆虫害虫侵害的方法,包括将有效量的实施例28、29、31和32中任一项的杀虫组合物施加至昆虫害虫的环境。

[0054] 34. 实施例33的方法,其中通过喷雾、撒粉、撒播或种子包衣来施加所述组合物。

[0055] 35. 一种用于控制耕作区的昆虫害虫的方法,其包括用实施例25的转基因种子播种所述区域。

## 具体实施方式

[0056] 提供了用于保护植物免受害虫(尤其是昆虫害虫)侵害的组合物和方法。所述组合物包含改变的Cry多肽。通过替换或置换结构域III(受体结合结构域)中的至少一个氨基酸使所述多肽突变。改变的多肽显示提高的毒素活性以及针对更广范围昆虫的毒性。还提供了编码改变的多肽的核苷酸序列。

[0057] 通过提供改变的Cry1Ab和Cry1C多肽举例说明本发明。然而,由于Cry毒素之间的保守结构,因此可以在其他Cry毒素多肽中作出相似的改变并且对此类改变的多肽测试活性。可以在Cry多肽的结构域III,特别是结构域III、beta 16( $\beta$ 16)和beta 22( $\beta$ 22)中作出突变或改变。其他Cry多肽可以与本发明的多肽比对,并且可以在氨基酸序列中作出突变。可以在相关Cry多肽的对应位置处作出至少一种变化。即,可以将氨基酸508至590的至少一个氨基酸突变并且替换为另一种氨基酸。可以作出或引入氨基酸变化并且对改变的多肽测试活性。

[0058] 突变可以增加多肽的毒性和/或使多肽对额外的昆虫具有毒性。即,在天然多肽不对昆虫显示毒性的情况下,改变的多肽可以对该昆虫显示毒性。从而增加能够被所述多肽控制的昆虫谱。

[0059] 本发明所公开的多肽和多核苷酸是从天然存在的(即,自然界中存在的)Cry序列修饰而来,因为它们具有至少一个氨基酸置换,并且在本文称为“突变型Cry多肽”或“突变型Cry多核苷酸”。与天然存在的Cry多肽在选自对应于SEQ ID NO:2的氨基酸残基509、513、514、585、587、589和590和SEQ ID NO:4的氨基酸残基508、509、510和590的位置的至少一个位置处相比较,具有至少一个氨基酸替换,置换。

[0060] 在一些实施例中,与Cry1多肽家族内天然存在的Cry多肽相比较,突变型Cry多肽为突变型Cry1多肽并且因此在选自对应于SEQ ID NO:2的氨基酸残基509、513、514、585、587、589和590和SEQ ID NO:4的氨基酸残基508、509、510和590的位置中的至少一个位置处包括至少一个氨基酸置换。

[0061] 改变的Cry1Ab多肽包括结构域III $\beta$ 16和 $\beta$ 22内部的置换。具体地讲,“突变型或改变的Cry1Ab多肽”意指在下列一个或多个位置处使至少一个氨基酸替换为不同氨基酸的Cry1Ab多肽:SEQ ID NO:2的氨基酸509、513、514、585、587、589和590(天然的Cry1Ab序列,由SEQ ID NO:1编码;参见GenBank登录号M13898)。在位置509、513、514、585、587、589和590中的一个位置处具有置换的Cry1Ab多肽对草地贪夜蛾显示毒素活性。“突变型或改变的Cry1C多肽”意指在SEQ ID NO:4(天然的Cry1C序列,由SEQ ID NO:3编码;参见GenBank登录号AY955268)的氨基酸位置508、509、510和590中的一个位置处具有至少一个氨基酸置换的Cry1C多肽。

[0062] 所列位置的天然氨基酸可以用任何其他氨基酸置换并且对所得多肽测试针对目的昆虫的活性。在一个实施例中,天然氨基酸用丙氨酸替换。在一些位置中,天然氨基酸用苯基丙氨酸或组氨酸替换。

[0063] Bt Cry蛋白具有五个保守序列区域和三个保守结构域(参见例如de Maagd et al.(2001)*Trends Genetics* 17:193-199(de Maagd等人,2001年,《遗传学趋势》,第17卷,第193-199页)。大多数氨基端保守结构域(结构域I)由七个 $\alpha$ 螺旋组成,其中中央疏水螺旋-

$\alpha 5$ 由六个其他两亲螺旋包围,并且参与膜插入和孔形成。第二保守结构域(结构域II)由涉及细胞结合的三个反平行的 $\beta$ -折叠组成,并且大多数羧基端保守结构域(结构域III)由 $\beta$ -夹层组成。结构域II和III中的暴露区域参与受体识别和结合,因此被认为是毒素特异性的决定因素。这些结构域的位置和性质是本领域技术人员已知的。参见(例如)Grochulski et al.(1995)*J Mol Biol* 254:447-464(Grochulski等人,1995年,《分子生物学杂志》,第254卷,第447-464页);Morse,Yamamoto,and Stroud(2001)*Structure* 9:409-417(Morse、Yamamoto和Stroud,2001年,《结构》,第9卷,第409-417页);Li et al.(1991)*Nature* 353:815-821(Li等人,1991年,《自然》,第353卷,第815-821页);Galitsky et al.(2001)*Acta Cryst D*57:1101-1109(Galitsky等人,2001年,《晶体学报》,第D57卷,第1101-1109页);Boonserm et al.(2006)*J Bacteriol* 188:3391-3401(Boonserm等人,2006年,《细菌学杂志》,第188卷,第3391-3401页);Boonserm et al.(2005)*J Mol Biol* 348:363-382(Boonserm等人,2005年,《分子生物学杂志》,第348卷,第363-382页);和Guo et al.(2009)*J Struct Biol* 168:259-266(Guo等人,2009年,《结构生物学杂志》,第168卷,第259-266页)。本文所公开的突变型Cry多肽在结构域III内具有至少一个突变。

[0064] 本文还公开了包含本发明核苷酸序列的植物、植物细胞、种子、微生物和表达盒,所述核苷酸序列编码本发明的突变型或改变的Cry多肽。还提供了与载体组合的包含本发明的分离突变型杀虫多肽的杀虫组合物,或表达本发明核酸的微生物。本发明的组合物用于保护植物免受昆虫害虫侵害的方法中或用于影响昆虫害虫。

[0065] 本发明涉及由本发明的多核苷酸编码的突变型Cry杀虫多肽以及使用此类突变型多肽的方法。包含突变型杀虫多肽或其变体或片段的组合物和制剂可用于影响昆虫害虫的方法中。“影响昆虫害虫”意指(例如)制止昆虫害虫进一步采食植物、伤害昆虫害虫或杀死昆虫害虫。本发明的杀虫多肽可以在目的植物或植物部分中表达。同样,包含突变型杀虫多肽的组合物或制剂可以施加至昆虫害虫的环境。在一个实施例中,突变型杀虫多肽与载体组合以便随后施加至昆虫害虫的环境。

[0066] 本领域的技术人员将认识到,本发明的组合物和方法可以单独使用或与用于控制影响植物的昆虫害虫的其他组合物和方法组合使用。例如,本发明可以结合其他杀虫蛋白或传统化学杀虫剂使用。

[0067] “杀虫基因”或“杀虫多核苷酸”指编码显示杀虫活性的多肽的核苷酸序列。如本文所用,术语“杀虫活性”指物质(例如多肽)抑制昆虫害虫的生长、采食或繁殖和/或杀死昆虫害虫的能力。“杀虫多肽”、“杀虫蛋白”或“昆虫毒素”意在表示具有杀虫活性的蛋白。

[0068] 如本文所用,术语“杀虫活性”和“杀昆虫活性”同义地用来指某生物或物质(例如蛋白)的活性,所述活性可以由采食和暴露适宜长度的时间后害虫死亡率、害虫体重减轻、害虫排斥性和害虫的其他行为及身体变化(但不限于此)度量。这样,杀虫活性影响害虫健康状况的至少一个可测量参数。如本文所用,“害虫”是指干扰或有害于植物发育和/或生长的生物。

[0069] 用于评估杀虫活性的测定法是本领域公知的。参见(例如)美国专利No.6,570,005和6,339,144。参见(例如)美国专利No.6,570,005和6,339,144。还参见Brooke et al.(2001)*Bull.Entomol.Res.*91:265-272(Brooke等人,2001年,《昆虫学研究通报》,第91卷,第265-272页);Chen et al.(2007)*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 104:13901-13906(Chen等

人,2007年,《美国国家科学院院刊》,第104卷,第13901-13906页);Crespo et al.(2008) Appl. Environ. Microb. 74:130-135(Crespo等人,2008年,《应用与环境微生物学》,第74卷,第130-135页);Khambay et al.(2003) Pest Manag. Sci. 59:174-182(Khambay等人,2003年,《害虫治理科学》,第59卷,第174-182页);Liu & Dean(2006) Protein Eng. Des. Sel. 19:107-111(Liu和Dean,2006年,《蛋白质工程、设计与选择》,第19卷,第107-111页);Marrone et al.(1985) J. Econ. Entomol. 78:290-293(Marrone等人,1985年,《经济昆虫学杂志》,第78卷,第290-293页);Robertson et al., Pesticide Bioassays with Arthropods (2<sup>nd</sup> ed., CRC Press 2007)(Robertson等人,《节肢动物的杀虫剂生物测定》,第二版,CRC出版社,2007年);Scott & McKibben(1976) J. Econ. Entomol. 71:343-344(Scott和McKibben,1976年,《经济昆虫学杂志》,第71卷,第343-344页);Strickman(1985) Bull. Environ. Contam. Toxicol. 35:133-142(Strickman,1985年,《环境污染与毒物学通报》,第35卷,第133-142页);和Verma et al.(1982) Water Res. 16 525-529(Verma等人,1982年,《水研究》,第16卷,第525-529页);以及美国专利No. 6,268,181。昆虫生物测定的例子包括但不限于在采食和暴露于杀虫剂或杀虫多肽持续适宜长度的时间后害虫死亡率、害虫体重减轻、害虫排斥性、害虫吸引性和害虫的其他行为及身体变化。一般方法包括将杀虫剂、杀虫多肽或具有杀虫多肽的生物添加到封闭容器中的食源。参见(例如)美国专利No. 6,339,144和6,570,005。然后可以在采食和暴露适宜长度的时间后,通过(但不限于)死亡率、体重、吸引、排斥的变化和其他行为和身体变化来测量杀虫活性。

[0070] 用于测试杀虫活性的优选发育阶段是这些上述昆虫害虫的幼虫或不成熟形式。可以将昆虫在完全黑暗中在约20℃至约30℃和约30%至约70%相对湿度饲养。可以如以下文献中所述进行生物测定:Czapla and Lang(1990) J. Econ. Entomol. 83(6):2480-2485(Czapla和Lang,1990年,《经济昆虫学杂志》,第83卷,第6期,第2480-2485页)。饲养昆虫幼虫和进行生物测定的方法是本领域普通技术人员公知的。

[0071] 多种评估杀虫活性的生物测定技术是本领域技术人员已知的。一般方法包括将实验化合物或者生物体添加到封闭容器中的食源。然后可以在采食和暴露适宜长度的时间后,通过(但不限于)死亡率、体重、吸引、排斥的变化和其他行为和身体变化来测量杀虫活性。

[0072] 具有“改善的杀虫活性”的多肽可以指与参考多肽(如,天然存在的Cry多肽)相比,表现出针对单一植物害虫的活性或针对广谱植物害虫的活性增加的多肽。在一些实施例中,与天然存在的Cry多肽(如,SEQ ID NO:2或4)相比时,本发明所公开的突变型Cry杀虫多肽或其变体或片段表现出改善的杀虫活性。在某些实施例中,本发明所公开的突变型Cry杀虫多肽比天然存在的Cry多肽(如,SEQ ID NO:2或4)表现出针对至少一种易感昆虫害虫的2倍至100倍更大的活性,包括但不限于约2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍、16倍、17倍、18倍、19倍、20倍、25倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、和100倍活性。改善的或增强的杀虫活性的发现,要求如针对靶害虫测定时,相对于天然存在的多肽展示出针对相同害虫的杀虫活性增加至少10%,或者杀虫活性增加至少20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、100%、150%、200%或300%或者更高。

[0073] 在某些实施例中,与天然存在的Cry(如,SEQ ID NO:2或4)相比时,本发明所公开

的突变型Cry杀虫多肽或其变体或片段针对鳞翅目害虫表现出更高2或4)相比时表现出改善的杀虫活性。在这些实施例的一些中,与天然存在的Cry3多肽(如,SEQ ID NO:2或4)相比时,突变型Cry多肽针对烟草天蛾(*Manduca sexta*)和秋夜蛾(草地贪夜蛾)中的至少一者具有更高2或4)相比时,本发明所公开的突变型Cry杀虫多肽或其变体或片段表现出改善的杀虫活性。

[0074] 本发明涵盖分离的或实质上纯化的多核苷酸或多肽组合物。“分离的”或“纯化的”多核苷酸或多肽或其生物活性部分,实质上或基本上不含通常如所述多核苷酸或多肽的天然环境中存在那样与其伴随或相互作用的组分。因此,分离的或纯化的多核苷酸或多肽,当通过重组技术生产时基本上不含其他细胞物质或培养基,或者当通过化学法合成时基本上不含化学前体或其他化学品。优选地,“分离的”多核苷酸不含在衍生该多核苷酸的生物体的基因组DNA中天然处于该多核苷酸旁侧的序列(即位于该多核苷酸的5'端和3'端的序列)(优选蛋白编码序列)。例如,在各个实施例中,分离的多核苷酸可以含有少于约5kb、4kb、3kb、2kb、1kb、0.5kb或0.1kb的在衍生该多核苷酸的细胞的基因组DNA中天然处于该多核苷酸旁侧的核苷酸序列。基本上不含细胞物质的蛋白包括具有小于约30%、20%、10%、5%或1%(以干重计)杂质蛋白的蛋白制剂。当本发明的蛋白或其生物活性部分以重组方式产生时,最佳的是,培养基占据少于约30%、20%、10%、5%或1%(以干重计)的化学前体或非目的蛋白的化学品。

[0075] 本发明的蛋白可以具有额外的改变,包括氨基酸置换、缺失、截短和插入。用于这类操纵的方法通常是本领域已知的。例如,可以通过DNA中的突变来制备杀虫蛋白的氨基酸序列变体和片段。用于诱变和多核苷酸改变的方法是本领域公知的。参见(例如)Kunkel (1985)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:488-492(Kunkel,1985年,《美国国家科学院院刊》,第82卷,第488-492页);Kunkel et al.(1987)Methods in Enzymol.154:367-382(Kunkel等人,1987年,《酶学方法》,第154卷,第367-382页);美国专利No.4,873,192;Walker and Gaastra,eds.(1983)Techniques in Molecular Biology(MacMillan Publishing Company,New York)(Walker和Gaastra编辑,1983年,《分子生物学技术》,纽约麦克米兰出版公司)以及其中引用的参考文献。有关不影响目的蛋白的生物活性的适当氨基酸置换的指导可以在以下文献所述的模型中找到:Dayhoff et al.(1978)Atlas of Protein Sequence and Structure(Natl.Biomed.Res.Found.,Washington,D.C.)(Dayhoff等人,1978年,《蛋白质序列和结构图册》(美国国家生物医学研究基金会,华盛顿特区),该文献以引用的方式并入本文。保守性置换,如将一个氨基酸交换为另一具有相似性质的氨基酸,可以是最佳的。

[0076] 突变型Cry蛋白的变体将继续具有所需杀虫活性。显然,要在编码该变体的DNA中作出的突变不得将该序列置于可读框外,并且最佳地将不形成可能产生二级mRNA结构的互补区。参见欧洲专利申请公开No.75,444。在替换、缺失或插入之前难以预测这种操作的确切作用时,本领域技术人员将知道会通过常规筛选测定法评价这种作用。即,可以通过(例如)昆虫采食测定法评价杀虫多肽的活性。参见(例如)Marrone et al.(1985)J.Econ.Entomol.78:290-293(Marrone等人,1985年,《经济昆虫学杂志》,第78卷,第290-293页)以及Czapla and Lang(1990)supra(Czapla和Lang,1990年,同上),所述文献以引用的方式并入本文。

[0077] 本发明涵盖突变型Cry序列的变体和片段。“变体”意在表示基本上相似的序列。对于多核苷酸,变体包含这样的多核苷酸,其具有在5'和/或3'端处的缺失(即,截短);在突变型Cry多核苷酸中的一个或多个内部位点处的一个或多个核苷酸的缺失和/或添加。对于多核苷酸,保守变体将编码突变型Cry蛋白的氨基酸序列。一般来讲,本发明的特定突变型多核苷酸的变体将与参考多核苷酸具有至少约80%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%的序列同一性,如通过本文所述的序列比对程序和参数所确定。

[0078] “变体”多肽意指因以下方式而衍生自突变型Cry蛋白或其片段的蛋白质:在天然蛋白的N末端和/或C末端缺失(所谓的截短)一个或多个氨基酸、在天然蛋白的一个或多个内部位点处缺失或添加一个或多个氨基酸和/或在天然蛋白中的一个或多个位点处置换一个或多个氨基酸。本发明所涵盖的变体多肽是具有生物活性的,即它们继续具有突变型Cry蛋白的所需生物活性。

[0079] 通常,本发明的多肽的生物活性变体将与该天然蛋白的氨基酸序列具有至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、约96%、约97%、约98%、约99%或更多的序列同一性,如本文别处描述的序列比对程序和参数所确定。本发明的蛋白的生物活性变体可以与该蛋白相差少至1-15个氨基酸残基、少至1-10个、少至6-10个、少至5个、少至4、3、2个或者甚至1个氨基酸残基。

[0080] 如本文所用,术语“片段”指本发明多核苷酸的核苷酸序列的一部分或本发明多肽的氨基酸序列的一部分。核苷酸序列的片段可以编码保留天然蛋白或相应全长蛋白的生物活性并因此具有相关生物活性(例如杀虫活性)的蛋白质片段。

[0081] 作为突变型Cry核苷酸序列的片段的核酸包含至少16、20、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、1000、1200、1400、1600、1800或1900个核苷酸,或至多到本文所公开的突变型Cry核苷酸序列中存在的核苷酸总数。在特定实施例中,本发明的核酸公开了衍生自(如产生于)本发明核酸的片段,其中所述片段编码由杀虫活性表征的截短突变型Cry内毒素。由本发明的多核苷酸片段编码的截短多肽由这样的杀虫活性表征,所述杀虫活性相对于衍生该片段的核酸所编码的相应全长多肽的活性而言等同或改进。在一些实施例中,本发明的核酸片段在天然或相应的全长编码序列的3'末端截短。核酸片段也可以同时在天然或相应的全长编码序列的5'和3'末端截短。

[0082] 此外,应当理解本发明还涵盖这样的多肽,其是本发明示例性杀虫蛋白的且具有本发明杀虫多肽的至少约100、约200、约300、约400、约500、约600、约700、约800、约900、约1000、约1044、约1100或约1155个连续氨基酸长度的片段并且保留杀虫活性。

[0083] 突变型Cry多核苷酸和多肽的变体和片段将保留上文所讨论的置换氨基酸。即,对于Cry1Ab,多肽变体将在SEQ ID NO:2的位置509、512、513、514、585、587、589和590处包含至少一个氨基酸置换。Cry1C变体将在SEQ ID NO:4的位置508、509、510和590处包含至少一个氨基酸置换。

[0084] 以下术语用于描述两个或更多个多核苷酸或多肽之间的序列关系:(a)“参考序列”、(b)“比较窗口”、(c)“序列同一性”和(d)“序列同一性百分数”。

[0085] (a)如本文所用,“参考序列”是用作序列比较基准的确定序列。参考序列可以是指定序列的子集或全部;例如,是全长cDNA或基因序列的区段或者完整cDNA或基因序列。

[0086] (b)如本文所用,“比较窗口”是指多核苷酸序列的连续和指定的区段,其中该比较

窗口中的该多核苷酸序列与参考序列(不包含添加或缺失)相比可以包含添加或缺失(即空位),以实现两个多核苷酸的最佳比对。通常,比较窗口是至少20个连续的核苷酸长度,任选可以是30、40、50、100个或更长。本领域的技术人员认识到,为避免与参考序列因多核苷酸序列中包含空位所致的高度相似性,通常引入空位罚分并从匹配数扣除空位罚分。

[0087] 用于对齐序列以便比较的方法是本领域公知的。因此,可使用数学算法完成任何两个序列之间的序列同一性百分数的确定。此类数学算法的非限制性例子是Myers and Miller(1988)CABIOS 4:11-17(Myers和Miller,1988年,《生物信息学》,第4卷,第11-17页)的算法;Smith et al.(1981)Adv.Appl.Math.2:482(Smith等人,1981年,《应用数学进展》,第2卷,第482页)的局部比对算法;Needleman and Wunsch(1970)J.Mol.Biol.48:443-453(Needleman和Wunsch,1970年,《分子生物学杂志》,第48卷,第443-453页)的全局比对算法;Pearson and Lipman(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.85:2444-2448(Pearson和Lipman,1988年,《美国国家科学院院刊》,第85卷,第2444-2448页)的搜索局部比对方法;Karlin and Altschul(1990)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:2264(Karlin和Altschul,1990年,《美国国家科学院院刊》,第87卷,第2264页)的算法,其如在Karlin and Altschul(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:5873-5877(Karlin和Altschul,1993年,《美国国家科学院院刊》,第90卷,第5873-5877页)中作了修改。

[0088] 这些数学算法的计算机执行可以用于行序列的比较以确定序列同一性。此类执行包括但不限于:PC/Gene程序(可得自Intelligenetics公司,加利福尼亚州山景城(Mountain View,California))中的CLUSTAL;GCGWisconsin Genetics Software Package版本10(可得自美国加利福尼亚州圣地亚哥的9685斯克伦顿路的Accelrys公司(Accelrys Inc.,9685 Scranton Road,San Diego,California,USA)中的ALIGN程序(版本2.0)和GAP、BESTFIT、BLAST、FASTA和TFASTA。使用这些程序的比对可以利用默认参数进行。CLUSTAL程序由以下文献详细描述:Higgins et al.(1988)Gene 73:237-244(1988)(Higgins等人,1988年,《基因》,第73卷,第237-244页);Higgins et al.(1989)CABIOS 5:151-153(Higgins等人,1989年,《计算机在生物科学中的应用》,第5卷,第151-153页);Corpet et al.(1988)Nucleic Acids Res.16:10881-90(Corpet等人,1988年,《核酸研究》,第16卷,第10881-10890页);Huang et al.(1992)CABIOS 8:155-65(Huang等人,1992年,《计算机在生物科学中的应用》,第8卷,第155-165页);和Pearson et al.(1994)Meth.Mol.Biol.24:307-331(Pearson等人,1994年,《分子生物学方法》,第24卷,第307-331页)。ALIGN程序是基于Myers和Miller(1988)(出处同上)的算法。当比较氨基酸序列时,ALIGN程序可使用PAM120加权残基表、空位长度罚分12和空位罚分4。Altschul et al.(1990)J.Mol.Biol.215:403(Altschul等人,1990年,《分子生物学杂志》,第215卷,第403页)的BLAST程序是基于Karlin和Altschul(1990)(出处同上)的算法。BLAST核苷酸搜索可以用BLASTN程序、score(得分)=100、wordlength(字长)=12进行,以获得与编码本发明蛋白质的核苷酸序列同源的核苷酸序列。BLAST蛋白质搜索可以用BLASTN程序、score(得分)=50、wordlength(字长)=3进行,以获得与本发明蛋白质或多肽同源的氨基酸序列。为出于比较目的获得带空位的比对,可以如Altschul et al.(1997)Nucleic Acids Res.25:3389(Altschul等人,1997年,《核酸研究》,第25卷,第3389页)中所述利用Gapped BLAST(BLAST2.0版)。或者,PSI-BLAST(BLAST 2.0版)可以用来进行检测分子之间远源关系的迭

代搜索。参见Altschul等人(1997),出处同上。当利用BLAST、Gapped BLAST、PSI-BLAST时,可以使用各个程序的默认参数(例如BLASTN用于核苷酸序列,BLASTX用于蛋白)。参见万维网上的ncbi.nlm.nih.gov。还可以通过视检手动进行比对。

[0089] 除非另外指明,否则本文提供的序列同一性/目似性值指用GAP版本10使用如下参数获得的值:核苷酸序列的同一性%和相似性%,其使用GAP权重50和长度权重3以及nwsgapdna.cmp打分矩阵;氨基酸序列的同一性%和相似性%,其使用GAP权重8和长度权重2以及使用BLOSUM62打分矩阵;或其任何等同程序。“等同程序”指这样的任何序列比较程序,所述程序对于任何两个所考虑的序列,与GAP版本10所产生的相应比对结果比较时,产生具有相同核苷酸或氨基酸残基匹配和相同序列同一性百分数的比对结果。

[0090] GAP使用Needleman和Wunsch(1970)J.Mol.Biol.48:443-453(Needleman和Wunsch,1970年,《分子生物学杂志》,第48卷,第443-453页)算法来找到两个完整序列的能使匹配数最大而使空位数最小的比对结果。GAP会考虑所有可能的比对和空位位置,并产生具有最大数目的匹配碱基和最少的空位的比对结果。它允许以匹配碱基数为单位提供空位产生罚分和空位延伸罚分。GAP必须对其插入的每个空位利用匹配的空位产生罚分数。如果选择大于零的空位延伸罚分,则GAP必须对每个插入的空位另外利用空位长度乘以空位延伸罚分。对于蛋白序列,GCG Wisconsin Genetics Software Package的版本10中的默认空位产生罚分值和空位延伸罚分值分别为8和2。对于核苷酸序列,默认空位产生罚分为50,而默认空位延伸罚分为3。空位产生罚分和空位延伸罚分可以表述为选自0-200的整数。因此,例如,空位产生罚分和空位延伸罚分可以是0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65或更大。

[0091] GAP给出具有最好比对的家族中的一个成员。可以存这个家族的许多成员,但其他成员没有更好的品质。GAP显示用于比对的四个优值因子:品质、比率、同一性和相似性。品质是为了比对序列而最大化的指标。比率是品质除以较短区段中的碱基数。同一性百分数是实际匹配的符号的百分数。相似性百分数是相似的符号的百分数。将对应于空位的符号忽略。当一对符号的打分矩阵值大于或等于0.50(相似性阈值)时,对相似性打分。GCG Wisconsin Genetics Software Package的版本10中所用的打分矩阵为BLOSUM62(参见Henikoff and Henikoff(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:10915(Henikoff和Henikoff,1989年,《美国国家科学院院刊》,第89页,第10915页))。

[0092] (c)如本文所用,“序列同一性”或“同一性”在两个多核苷酸或多肽序列的情形下指在指定的比较窗口上比对以获得最大对应时,两个序列中相同的残基。当序列同一性百分数针对蛋白使用时,应认识到,不相同的残基位置往往差别在于保守氨基酸置换,其中氨基酸残基置换为其他具有相似化学性质(例如电荷或疏水性)的氨基酸残基,因此不改变分子的功能性质。如果序列差别在于保守性置换,则可以上调序列同一性百分数以校正置换的保守性质。此类因保守置换而不同的序列称作具有“序列相似性”或“相似性”。用于作出这种调整的手段是本领域技术人员公知的。通常,这涉及将保守性置换评定为部分错配而不是完全错配,从而增加序列同一性百分数。因而,例如,如果给予相同的氨基酸1分,给予非保守性置换0分,则给予保守性置换0和1之间的分数。保守性置换的打分是(例如)如在程序PC/GENE(加利福尼亚州山景城的Intelligenetics公司(Intelligenetics,Mountain View,California)中所执行那样进行计算。

[0093] (d)如本文所用,“序列同一性百分数”意指通过比较窗口范围内比较两个最佳比对的序列所确定的值,其中多核苷酸序列在比较窗口中的部分与参考序列(不包含添加或缺失)相比可以包含添加或缺失(即空位),以实现两个序列的最佳比对。该百分比是这样计算的:确定在两个序列中出现的相同核酸碱基或氨基酸残基的位置数以得到匹配的位置数,将匹配的位置数除以比较窗口中的位置总数,然后将结果乘以100以得到序列同一性百分数。

[0094] 如本文所用,在对应于天然存在Cry(如,SEQ ID NO:2或4)的特定氨基酸残基的位置处的突变型Cry多肽的氨基酸残基是指突变型Cry多肽内部的氨基酸残基,当使用比对程序(例如本领域已知的程序或本文所述的程序)将突变型Cry序列与天然存在的Cry序列(如,SEQ ID NO:2或4)为了最大同源性比对时,所述氨基酸残基看起来与天然存在的Cry序列中的特定位置处的氨基酸残基相对。

[0095] 本发明的多核苷酸可以在宿主细胞,例如细菌、真菌、酵母、昆虫、哺乳动物或优选地植物细胞中表达。如本文所用的术语“宿主细胞”指含有载体并支持该表达载体复制和/或表达的细胞。宿主细胞可以是原核细胞,例如芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)或是真核细胞,例如酵母、昆虫或植物细胞。在一些实施例中,宿主细胞为单子叶或双子叶植物细胞。

[0096] 本发明的突变型杀虫多核苷酸可以在表达盒中提供,以便用于目的宿主细胞中的表达。该表达盒将包括与本发明的杀虫多核苷酸有效连接的5'和3'调节序列。“有效连接”意指两个或更多个元件之间的功能性连接。例如,目的多核苷酸和调节序列(即,启动子)之间的有效连接是允许该目的多核苷酸表达的功能性连接。有效连接的元件可以是连续的或非连续的。当用来指两个蛋白编码区域的连接时,有效连接意指所述编码区域处于相同的可读框中。该表达盒可以额外含有至少一个待共转化到该生物中的额外基因。或者,可以在多个表达盒上提供额外的基因。这种表达盒设有多个限制位点和/或重组位点,以插入本发明的多核苷酸处于调节区的转录调节之下。表达盒可以额外含有选择标记基因。

[0097] 该表达盒将在5'至3'转录方向包括:在宿主细胞中具有功能的转录和翻译起始区(即启动子)、本发明的杀虫多核苷酸、在宿主细胞中具有功能的转录和翻译终止区(即终止区)。本发明的调节区(即,启动子、转录调节区和翻译终止区)和/或本发明的多核苷酸可以相对于宿主细胞或彼此是天然的/类似的。或者,本发明的调节区和/或杀虫多核苷酸可以相对于宿主细胞或彼此是异源的。如本文所用,针对序列的“异源”是源于外来物种的序列,或者,如果来自相同物种,则在组成和/或基因座方面因有意的人为干预而背离其天然形式受到实质性修饰。例如,与异源多核苷酸有效连接的启动子来自于与衍生该多核苷酸的物种不同的物种,或者如果来自相同/相似的物种,则一者或者两者背离它们的原始形式和/或基因座收到实质修饰,或者该启动子相对于有效连接的多核苷酸不是天然启动子。如本文所用,嵌合基因包含与转录起始区有效连接的编码序列,所述转录起始区相对于该编码序列是异源的。虽然使用异源启动子表达序列可能是最佳的,但可以使用天然启动子序列。

[0098] 终止区可以相对于转录起始区是天然的,可以相对于有效连接的目的杀虫多核苷酸是天然的,可以相对于植物宿主是天然的,或者可以衍生自另一来源(即相对于该启动子、目的多核苷酸、宿主细胞或其任何组合是外来或异源的)。便利的终止区可以得自根瘤农杆菌(*A. tumefaciens*)的Ti质粒,例如章鱼氨酸合酶和胭脂氨酸合酶终止区。还可参见Guerineau et al.(1991)*Mol.Gen.Genet.*262:141-144(Guerineau等人,1991年,《分子遗

传学与普通遗传学》,第262卷,第141-144页);Proudfoot(1991)Cell 64:671-674 (Proudfoot,1991年,《细胞》,第64卷,第671-674页);Sanfacon et al.(1991)Genes Dev.5:141-149(Sanfacon等人,1991年,《基因和发育》,第5卷,第141-149页);Mogen et al.(1990)Plant Cell 2:1261-1272(Mogen等人,1990年,《植物细胞》,第2卷,第1261-1272页);Munroe et al.(1990)Gene 91:151-158(Munroe等人,1990年,《基因》,第91卷,第151-158页);Ballas et al.(1989)Nucleic Acids Res.17:7891-7903(Ballas等人,1989年,《核酸研究》,第17卷,第7891-7903页);和Joshi et al.(1987)Nucleic Acids Res.15:9627-9639(Joshi等人,1987年,《核酸研究》,第15卷,第9627-9639页)。

[0099] 在适当情况下,多核苷酸可以行优化以增加在转化植物中的表达。即,可以使用植物偏好的密码子合成多核苷酸以改进表达。关于宿主偏好密码子使用的讨论,参见(例如)Campbell and Gowri(1990)Plant Physiol.92:1-11(Campbell和Gowri,1990年,《植物生理学》,第92卷,第1-11页)。本领域可获得用于合成植物偏好基因的方法。参见(例如)美国专利No.5,380,831和5,436,391,以及Murray et al.(1989)Nucleic Acids Res.17:477-498(Murray等人,1989年,《核酸研究》,第17卷,第477-498页),所述文献以引用的方式并入本文。

[0100] 已知额外的序列修饰增强在细胞宿主中的基因表达。这些包括消除以下序列:编码假多腺苷酸化信号、外显子-内含子剪接位点信号的序列、转座子样重复序列以及其他此类充分表征的可能危害基因表达的序列。可以将该序列的G-C含量调整至给定细胞宿主的平均水平,所述平均水平通过参考该宿主细胞中表达的已知基因来计算出来。当可能时,将序列修饰以避免预测的发夹二级mRNA结构。

[0101] 表达盒可以额外含有5'前导序列。此类前导序列可以起到增强翻译的作用。翻译前导序列是本领域已知的并且包括:小核糖核酸病毒前导序列,例如,EMCV前导序列(脑心肌炎5'非编码区)(Elroy-Stein et al.(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:6126-6130 (Elroy-Stein等人,1989年,《美国国家科学院院刊》,第86卷,第6126-6130页));马铃薯Y病毒前导序列,例如TEV前导序列(烟草蚀纹病毒)(Gallie et al.(1995)Gene 165(2):233-238(Gallie等人,1995年,《基因》,第165卷,第2期,第233-238页)),MDMV前导序列(玉米矮花叶病毒),以及人免疫球蛋白重链结合蛋白(BiP)(Macejak et al.(1991)Nature 353:90-94(Macejak等人,1991年,《自然》,第353卷,第90-94页);来自苜蓿花叶病毒的外壳蛋白mRNA(AMV RNA 4)的非翻译前导序列(Jobling et al.(1987)Nature 325:622-625 (Jobling等人,1987年,《自然》,第325卷,第622-625页));烟草花叶病毒前导序列(TMV)(Gallie et al.(1989)in Molecular Biology of RNA,ed.Cech(Liss,New York),pp.237-256(Gallie等人,1989年,《RNA的分子生物学》,Cech编辑,纽约Liss出版社,第237-256页));以及玉米枯黄斑点病毒前导序列(MCMV)(Lommel et al.(1991)Virology 81:382-385(Lommel等人,1991年,《病毒学》,第81卷,第382-385页))。还可参见Della-Cioppa et al.(1987)Plant Physiol.84:965-968(Della-Cioppa等人,1987年,《植物生理学》,第84卷,第965-968页)。

[0102] 在制备表达盒时,可以操纵多个DNA片段,以提供处于正确取向和如适当处于正确可读框的DNA序列。为此目的,衔接子或接头可以用来将DNA片段连接在一起,或可以涉及其他操纵以提供便利的限制位点、去除多余的DNA、去除限制位点等。出于这个目的,可以涉及

体外诱变、引物修复、限制性酶切、复性、再置换(例如转换和易位)。

[0103] 表达盒还可以包含用于选择转化细胞的选择标记基因。选择标记基因用于选择转化的细胞或组织。标记基因包括编码抗生素抗性的基因,如编码新霉素磷酸转移酶II(NEO)和潮霉素磷酸转移酶(HPT)的那些基因,以及赋予针对除草剂化合物的抗性的基因,所述除草剂化合物例如草铵膦、溴苯腈、咪唑啉酮和2,4-二氯苯氧基乙酸(2,4-D)。额外的选择标记包括表型标记,如 $\beta$ -半乳糖苷酶和荧光蛋白如绿荧光蛋白(GFP)(Su et al.(2004) *Biotechnol. Bioeng.* 85:610-9(Su等人,2004年,《生物技术和生物工程》,第85卷,第610-619页)和Fetter et al.(2004) *Plant Cell* 16:215-28(Fetter等人,2004年,《植物细胞》,第16卷,第215-228页))、青色荧光蛋白(CYP)(Bolte et al.(2004) *J. Cell Science* 117:943-54(Bolte等人,2004年,《细胞科学杂志》,第117卷,第943-954页)和Kato et al.(2002) *Plant Physiol.* 129:913-42(Kato等人,2002年,《植物生理学》,第129卷,第913-942页))和黄色荧光蛋白(Evrogen的PhiYFP™,参见Bolte et al.(2004) *J. Cell Science* 117:943-54(Bolte等人,2004年,《细胞科学杂志》,第117卷,第943-954页))。对于额外的选择标记,通常参见Yarranton(1992) *Curr. Opin. Biotech.* 3:506-511(Yarranton,1992年,《生物技术新观点》,第3卷,第506-511页); Christopherson et al.(1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6314-6318(Christopherson等人,1992年,《美国国家科学院院刊》,第89卷,第6314-6318页); Yao et al.(1992) *Cell* 71:63-72(Yao等人,1992年,《细胞》,第71卷,第63-72页); Reznikoff(1992) *Mol. Microbiol.* 6:2419-2422(Reznikoff,1992年,《分子微生物学》,第6卷,第2419-2422页); Barkley et al.(1980) in *The Operon*, pp.177-220(Barkley等人,1980年,《操纵子》,第177-220页); Hu et al.(1987) *Cell* 48:555-566(Hu等人,1987年,《细胞》,第48卷,第555-566页); Brown et al.(1987) *Cell* 49:603-612(Brown等人,1987年,《细胞》,第49卷,第603-612页); Figge et al.(1988) *Cell* 52:713-722(Figge等人,1988年,《细胞》,第52卷,第713-722页); Deuschle et al.(1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5400-5404(Deuschle等人,1989年,《美国国家科学院院刊》,第86卷,第5400-5404页); Fuerst et al.(1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2549-2553(Fuerst等人,1989年,《美国国家科学院院刊》,第86卷,第2549-2553页); Deuschle et al.(1990) *Science* 248:480-483(Deuschle等人,1990年,《科学》,第248卷,第480-483页); Gossen(1993) Ph.D. Thesis, University of Heidelberg(Gossen,1993年,海德堡大学博士学位论文); Reines et al.(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:1917-1921(Reines等人,1993年,《美国国家科学院院刊》,第90卷,第1917-1921页); Labow et al.(1990) *Mol. Cell. Biol.* 10:3343-3356(Labow等人,1990年,《分子细胞生物学》,第10卷,第3343-3356页); Zambretti et al.(1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3952-3956(Zambretti等人,1992年,《美国国家科学院院刊》,第89卷,第3952-3956页); Baim et al.(1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:5072-5076(Baim等人,1991年,《美国国家科学院院刊》,第88卷,第5072-5076页); Wyborski et al.(1991) *Nucleic Acids Res.* 19:4647-4653(Wyborski等人,1991年,《核酸研究》,第19卷,第4647-4653页); Hillenand-Wissman(1989) *Topics Mol. Struc. Biol.* 10:143-162(Hillenand-Wissman,1989年,《分子与结构生物学论题》,第10卷,第143-162页); Degenkolb et al.(1991) *Antimicrob. Agents Chemother.* 35:1591-1595(Degenkolb等人,1991年,《抗微生物制剂和化学治疗》,第35卷,第1591-1595

页);Kleinschmidt et al.(1988)Biochemistry 27:1094-1104(Kleinschmidt等人,1988年,《生物化学》,第27卷,第1094-1104页);Bonin(1993)Ph.D.Thesis,University of Heidelberg(Bonin,1993年,海德堡大学博士论文);Gossen et al.(1992)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:5547-5551(Gossen等人,1992年,《美国国家科学院院刊》,第89卷,第5547-5551页);Oliva et al.(1992)Antimicrob.Agents Chemother.36:913-919(Oliva等人,1992年,《抗微生物制剂和化学治疗》,第36卷,第913-919页);Hlavka et al.(1985)Handbook of Experimental Pharmacology,Vol.78(Springer-Verlag,Berlin)(Hlavka等人,1985年,《实验药理学手册》,第78卷(斯普林格出版社,柏林));Gill et al.(1988)Nature 334:721-724(Gill等人,1988年,《自然》,第334卷,第721-724页)。这些公开内容以引用的方式并入本文。

[0104] 上面关于选择标记基因的列表并非意在是限制性的。任何选择标记基因均可以用于本发明中。

[0105] 许多启动子可以用于本发明的实施中,包括目的多核苷酸序列的天然启动子。可以基于所需的结果选择启动子。核酸可以与组成型启动子、组织偏好启动子或其他启动子组合,以在植物中表达。

[0106] 此类组成型启动子包括(例如)Rsyn7启动子的核心启动子以及WO 99/43838和美国专利No.6,072,050中公开的其他组成型启动子;核心CaMV 35S启动子(Odell et al.(1985)Nature 313:810-812(Odell等人,1985年,《自然》,第313卷,第810-812页));水稻肌动蛋白(McElroy et al.(1990)Plant Cell 2:163-171(McElroy等人,1990年,《植物细胞》,第2卷,第163-171页));遍在蛋白(Christensen et al.(1989)Plant Mol.Biol.12:619-632(Christensen等人,1989年,《植物分子生物学》,第12卷,第619-632页)和Christensen et al.(1992)Plant Mol.Biol.18:675-689(Christensen等人,1992年,《植物分子生物学》,第18卷,第675-689页));pEMU(Last et al.(1991)Theor.Appl.Genet.81:581-588(Last等人,1991年,《理论和应用遗传学》,第81卷,第581-588页));MAS(Velten et al.(1984)EMBO J.3:2723-2730(Velten等人,1984年,《欧洲分子生物学组织杂志》,第3卷,第2723-2730页));ALS启动子(美国专利No.5,659,026)等等。其他的组成型启动子包括(例如)美国专利No.5,608,149、5,608,144、5,604,121、5,569,597、5,466,785、5,399,680、5,268,463、5,608,142和6,177,611。

[0107] 根据所需的结果,可能有利的是从诱导型启动子表达基因。对于调节本发明核苷酸序列在植物中的表达特别有意义的是伤口诱导型启动子。这种伤口诱导型启动子可以响应于昆虫采食所引起的损害,并且包括马铃薯蛋白酶抑制剂(pin II)基因(Ryan(1990)Ann.Rev.Phytopath.28:425-449(Ryan,1990年,《植物病理学年鉴》,第28卷,第425-449页);Duan et al.(1996)Nature Biotechnology 14:494-498(Duan等人,1996年,《自然-生物技术》,第14卷,第494-498页));wun1和wun2,美国专利No.5,428,148;win1和win2(Stanford et al.(1989)Mol.Gen.Genet.215:200-208(Stanford等人,1989年,《分子遗传学与普通遗传学》,第215卷,第200-208页));系统素(McGurl et al.(1992)Science 225:1570-1573(McGurl等人,1992年,《科学》,第225卷,第1570-1573页));WIP1(Rohmeier et al.(1993)Plant Mol.Biol.22:783-792(Rohmeier等人,1993年,《植物分子生物学》,第22卷,第783-792页);Eckelkamp et al.(1993)FEBS Letters 323:73-76(Eckelkamp等人,

1993年,《欧洲生物化学学会联盟通讯》,第323卷,第73-76页);MPI基因(Corderok et al.(1994)Plant J.6(2):141-150(Corderok等人,1994年,《植物杂志》,第6卷,第2期,第141-150页));等等,这些文献以引用的方式并入本文。

[0108] 组织偏好的启动子可以用来使增强的杀虫蛋白表达靶向于特定的植物组织内部,特别靶向于可能成为害虫攻击目标的组织内部。在特定实施例中,在可能出现昆虫相关损害的组织中选择性表达杀虫多肽。组织偏好的启动子包括Yamamoto et al.(1997)Plant J.12(2):255-265(Yamamoto等人,1997年,《植物杂志》,第12卷,第2期,第255-265页);Kawamata et al.(1997)Plant Cell Physiol.38(7):792-803(Kawamata等人,1997年,《植物细胞生理学》,第38卷,第7期,第792-803页);Hansen et al.(1997)Mol.Gen Genet.254(3):337-343(Hansen等人,1997年,《分子遗传学与普通遗传学》,第254卷,第3期,第337-343页);Russell et al.(1997)Transgenic Res.6(2):157-168(Russell等人,1997年,《转基因研究》,第6卷,第2期,第157-168页);Rinehart et al.(1996)Plant Physiol.112(3):1331-1341(Rinehart等人,1996年,《植物生理学》,第112卷,第3期,第1331-1341页);Van Camp et al.(1996)Plant Physiol.112(2):525-535(Van Camp等人,1996年,《植物生理学》,第112卷,第2期,第525-535页);Canevascini et al.(1996)Plant Physiol.112(2):513-524(Canevascini等人,1996年,《植物生理学》,第112卷,第2期,第513-524页);Yamamoto et al.(1994)Plant Cell Physiol.35(5):773-778(Yamamoto等人,1994年,《植物细胞生理学》,第35卷,第5期,第773-778页);Lam(1994)Results Probl.Cell Differ.20:181-196(Lam,1994年,《细胞分化的结果与问题》,第20卷,第181-196页);Orozco et al.(1993)Plant Mol Biol.23(6):1129-1138(Orozco等人,1993年,《植物分子生物学》,第23卷,第6期,第1129-1138页);Matsuoka et al.(1993)Proc Natl.Acad.Sci.USA 90(20):9586-9590(Matsuoka等人,1993年,《美国国家科学院院刊》,第90卷,第20期,第9586-9590页);和Guevara-Garcia et al.(1993)Plant J.4(3):495-505(Guevara-Garcia等人,1993年,《植物杂志》,第4卷,第3期,第495-505页)。

[0109] 叶偏好的启动子是本领域已知的。参见(例如)Yamamoto et al.(1997)Plant J.12(2):255-265(Yamamoto等人,1997年,《植物杂志》,第12卷,第2期,第255-265页);Kwon et al.(1994)Plant Physiol.105:357-67(Kwon等人,1994年,《植物生理学》,第105卷,第357-367页);Yamamoto et al.(1994)Plant Cell Physiol.35(5):773-778(Yamamoto等人,1994年,《植物细胞生理学》,第35卷,第5期,第773-778页);Gotor et al.(1993)Plant J.3:509-18(Gotor等人,1993年,《植物杂志》,第3卷,第509-518页);Orozco et al.(1993)Plant Mol.Biol.23(6):1129-1138(Orozco等人,1993年,《植物分子生物学》,第23卷,第6期,第1129-1138页);和Matsuoka et al.(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90(20):9586-9590(Matsuoka等人,1993年,《美国国家科学院院刊》,第90卷,第20期,第9586-9590页)。

[0110] 根偏好启动子是已知的并且可以选自许多可得自文献的启动子,或从各种相容性物种从头分离。参见(例如)Hire et al.(1992)Plant Mol.Biol.20(2):207-218(Hire等人,1992年,《植物分子生物学》,第20卷,第2期,第207-218页)(大豆根特异性谷氨酰胺合成酶基因);Keller and Baumgartner(1991)Plant Cell 3(10):1051-1061(Keller和Baumgartner,1991年,《植物细胞》,第3卷,第10期,第1051-1061页)(法国菜豆的GRP 1.8基因中的根特异性控制元件);Sanger et al.(1990)Plant Mol.Biol.14(3):433-443

(Sanger等人,1990年,《植物分子生物学》,第14卷,第3期,第433-443页)((根瘤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)的甘露氨酸合酶(MAS)基因的根特异性启动子);和Miao et al.(1991)*Plant Cell* 3(1):11-22(Miao等人,1991年,《植物细胞》,第3卷,第1期,第11-22页)(编码细胞溶胶谷氨酰胺合成酶(GS)的全长cDNA克隆,其在大豆的根和根瘤中表达)。还可参见Bogusz et al.(1990)*Plant Cell* 2(7):633-641(Bogusz等人,1990年,《植物细胞》,第2卷,第7期,第633-641页),其中描述了从来自固氮非豆科植物榆科山黄麻(*Parasponia andersonii*)和相关的非固氮非豆科植物鸡屎藤山麻黄(*Trema tomentosa*)的血红蛋白基因分离的两个根特异性启动子。这些基因的启动子连接至 $\beta$ -葡糖醛酸酶报告基因并引入非豆科植物烟草(*Nicotiana tabacum*)和豆科植物百脉根(*Lotus corniculatus*)二者中,并且在这两种情况下,根特异性启动子活性均保留。Leach和Aoyagi(1991)描述了他们对毛根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)的高度表达的rolC和rolD根诱导基因的分析(参见*Plant Science(Limerick)*79(1):69-76(《植物科学》,Limerick,第79卷,第1期,第69-76页)。他们得出结论,增强子和组织偏好的DNA决定子是在那些启动子中分离的。Teeri等人(1989)使用与lacZ的基因融合显示编码章鱼氨酸合酶的农杆菌(*Agrobacterium T-DNA*基因在根尖的表皮中特别活跃,并且TR2'基因在完整植物中是根特异性的并且受叶组织中的创伤刺激,这对于与杀昆虫或杀幼虫基因一起使用是特别理想的特征组合(参见EMBO J.8(2):343-350(《欧洲分子生物学组织杂志》,第8卷,第2期,第343-350页))。与nptII(新霉素磷酸转移酶II)融合的TR1'基因显示了相似特性。另外的根偏好启动子包括VfENOD-GRP3基因启动子(Kuster et al.(1995)*Plant Mol.Biol.*29(4):759-772(Kuster等人,1995年,《植物分子生物学》,第29卷,第4期,第759-772页));和rolB启动子(Capana et al.(1994)*Plant Mol.Biol.*25(4):681-691(Capana等人,1994年,《植物分子生物学》,第25卷,第4期,第681-691页))。还可参见美国专利NO.5,837,876、5,750,386、5,633,363、5,459,252、5,401,836、5,110,732、和5,023,179。其他目的根偏好启动子在2004年12月22日提交的名为“Maize Metallothionein Promoter”(玉蜀黍金属硫蛋白启动子)的美国专利申请No.11/022,111以及2004年12月22日提交的名为“Maize Metallothionein 2 Promoter and Methods of Use”(玉蜀黍金属硫蛋白2启动子及其使用方法)的美国专利申请No.11/022,449中公开,所述两项专利申请均以引用的方式全文并入本文。

[0111] “种子偏好的”启动子包括“种子特异性”启动子(在种子发育期间活跃的那些启动子,例如种子贮藏蛋白的启动子)以及“种子萌发”启动子(在种子萌发期间活跃的那些启动子)。参见Thompson et al.(1989)*BioEssays* 10:108(Thompson等人,1989年,《生物学论文集》,第10卷,第108页),所述文献以引用的方式并入本文。这类种子偏好的启动子包括但不限于Cim1(细胞分裂素诱导信息);cZ19B1(玉蜀黍19kDa玉米醇溶蛋白);milps(肌醇-1-磷酸合酶)(参见W0 00/11177和美国专利No.6,225,529;该专利以引用的方式并入本文)。 $\gamma$ -玉米醇溶蛋白是胚乳特异性启动子。球蛋白1(G1b-1)是代表性的胚特异性启动子。对于双子叶植物而言,种子特异性启动子包括但不限于菜豆 $\beta$ -菜豆素、油菜籽蛋白、 $\beta$ -伴球蛋白、大豆凝集素、十字花科蛋白等等。对于单子叶植物而言,种子特异性启动子包括但不限于玉蜀黍15kDa玉米醇溶蛋白、22kDa玉米醇溶蛋白、27kDa玉米醇溶蛋白、 $\gamma$ -玉米醇溶蛋白、蜡质、shrunken 1、shrunken 2、球蛋白1等。还可参见W0 00/12733,其中公开了来自end1和

end2基因的种子偏好启动子;所述文献以引用的方式并入本文。

[0112] 在特定方面,用于保护植物免受昆虫害虫侵害的方法包括将至少一种多核苷酸引入植物中,其中所述多核苷酸包括编码本发明突变型杀虫多肽的核苷酸序列。多核苷酸与植物中驱动表达的启动子有效连接。植物表达突变型杀虫多肽,从而在昆虫攻击部位使昆虫害虫暴露于该多肽。本发明的突变型杀虫多肽的表达可以靶定至其中杀虫活性尤其重要的特定植物组织,例如,叶、根、茎秆或维管组织。这样的组织偏好性表达可以由根偏好、叶偏好、维管组织偏好、茎秆偏好的或种子偏好的启动子实现。

[0113] 正如本发明的突变型杀虫多肽的表达可以使用适当的启动子靶向至特定植物组织或细胞类型一样,通过使用靶向肽,该表达也可以靶向至细胞内部的不同位置。取决于组织或细胞类型的新陈代谢功能,该蛋白质在细胞不同区室内的位置可以使其更有效对抗给定的害虫或使其更少地干扰细胞功能。例如,通过在构建体(即,表达盒)中包括编码信号肽的序列(这种序列也可以称为“信号序列”),可以产生前置有信号肽的蛋白质,所述信号肽指导翻译产物进入内质网中。所用的信号序列可以是(例如)与编码多肽的基因相关的信号序列,或者它可以取自另一个基因。

[0114] 在文献中描述了多个信号肽,并且它们在很大程度上可互换(Raikhel and Chrispeels,“Protein sorting and vesicle traffic”in Buchanan et al.,eds,(2000) Biochemistry and Molecular Biology of Plants(American Society of Plant Physiologists,Rockville,MD(Raikhel和Chrispeels,“蛋白分选和囊泡运输”,Buchanan等人编辑,2000年,《植物生物化学与分子生物学》(马里兰州罗克维尔的美国植物生物学家学会),所述文献以引用的方式并入本文。信号肽的添加将导致翻译产物进入内质网(在该过程中信号肽本身从多肽中移除),但蛋白质的最终胞内位置取决于其他因素,其中可以操纵所述因子以产生对害虫和细胞类型而言最合适的定位。默认通路,即,如果不包含任何其他靶向性标记物的情况下多肽所采用的通路,导致多肽跨细胞膜分泌入质外体(Raikhel和Chrispeels,出处同上)。质外体是质膜系统外的区域并且包括细胞壁、细胞间隙和木质部导管,它们形成水和溶质可以移动穿过其中的连续可渗透系统。这通常将为合适的位置。

[0115] 可以通过使肽定位在细胞内而非细胞膜外,更有效地对抗其他害虫。这可以通过(例如)将内质网停留信号编码序列添加到基因的序列实现。用于完成该操作的方法和序列在Raikhel和Chrispeels(出处同上)中描述;例如,将编码氨基酸K、D、E和L的序列或文献中所述的其变体按这种页序添加到多肽的蛋白质编码部分的末端将实现这一点。ER停留序列是本领域公知的,包括(例如)KDEL(SEQ ID NO:5)、SEKDEL(SEQ ID NO:6)、HDEL(SEQ ID NO:7)和HDEF(SEQ ID NO:8)。参见(例如)Denecke et al.(1992).EMBO J.11:2345-2355(Denecke等人,1992年,《欧洲分子生物学组织杂志》,第11卷,第2345-2355页);Wandelt et al.(1992)Plant J.2:181-192(Wandelt等人,1992年,《植物杂志》,第2卷,第181-192页);Denecke et al.(1993)J.Exp.Bot.44:213-221(Denecke等人,1993年,《实验植物学杂志》,第44卷,第213-221页);Vitale et al.(1993)J.Exp.Bot.44:1417-1444(Vitale等人,1993年,《实验植物学杂志》,第44卷,第1417-1444页);Gomord et al.(1996)Plant Physiol.Biochem.34:165-181(Gomord等人,1996年,《植物生理学与生物化学》,第34卷,第165-181页);Lehmann et al.(2001)Plant Physiol.127(2):436-449(Lehmann等人,2001年,《植物生理学》,第127卷,第2期,第436-449页)。

[0116] 或者,除了信号肽之外,使用例如Raikhel和Chrispeels(出处同上)所述的那些液泡靶向标记,将导致该肽定位于液泡结构中。如Raikhel和Chrispeels(出处同上)中所述,液泡靶向标记可以置于构建体中的不同位置。使用质体转运肽编码序列替代信号肽编码序列将导致肽定位于所选择的细胞类型的质体中(Raikhel和Chrispeels,出处同上)。此类转运肽是本领域已知的。参见(例如)Von Heijne et al.(1991)Plant Mol.Biol.Rep.9:104-126(Von Heijne等人,1991年,《植物分子生物学导报》,第9卷,第104-126页);Clark et al.(1989)J.Biol.Chem.264:17544-17550(Clark等人,1989年,《生物化学杂志》,第264卷,第17544-17550页);Della-Cioppa et al.(1987)Plant Physiol.84:965-968(Della-Cioppa等人,1987年,《植物生理学》,第84卷,第965-968页);Romer et al.(1993)Biochem.Biophys.Res.Commun.196:1414-1421(Romer等人,1993年,《生物化学与生物物理研究通讯》,第196卷,第1414-1421页);和Shah et al.(1986)Science 233:478-481(Shah等人,1986年,《科学》,第233卷,第478-481页)。编码此类转运肽的叶绿体靶向序列也是本领域已知的,包括核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶(Rubisco)的叶绿体小亚基(de Castro Silva Filho et al.(1996)Plant Mol.Biol.30:769-780(de Castro Silva Filho等人,1996年,《植物分子生物学》,第30卷,第769-780页);Schnell et al.(1991)J.Biol.Chem.266(5):3335-3342(Schnell等人,1991年,《生物化学杂志》,第266卷,第5期,第3335-3342页));5-烯醇式丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶(EPSPS)(Archer et al.(1990)J.Bioenerg.Biomemb.22(6):789-810(Archer等人,1990年,《生物能与生物膜杂志》,第22卷,第6期,第789-810页);色氨酸合成酶(Zhao et al.(1995)J.Biol.Chem.270(11):6081-6087(Zhao等人,1995年,《生物化学杂志》,第270卷,第11期,第6081-6087页));质体蓝素(Lawrence et al.(1997)J.Biol.Chem.272(33):20357-20363(Lawrence等人,1997年,《生物化学杂志》,第272卷,第33期,第20357-20363页));分支酸合酶(Schmidt et al.(1993)J.Biol.Chem.268(36):27447-27457(Schmidt等人,1993年,《生物化学杂志》,第268卷,第36期,第27447-27457页));和捕光叶绿素a/b结合蛋白(LHBP)(Lamppa et al.(1988)J.Biol.Chem.263:14996-14999(Lamppa等人,1988年,《生物化学杂志》,第263卷,第14996-14999页))。本领域的技术人员也可以预想生成转基因植物,其中叶绿体已转化为过量表达杀虫肽的基因。参见(例如)Daniell(1999)Nature Biotech 17:855-856(Daniell,1999年,《自然-生物技术》,第17卷,第855-856页);和美国专利No.6,338,168。

[0117] 技术人员也可以预想通过添加合适的靶向信息,将杀虫多肽定位于其他细胞区室中。(Raikhel和Chrispeels,出处同上)。可以在以下网址找到万维网上可获的可用站点,所述站点提供有关各种靶向序列识别的信息和参考文献:psort.nibb.ac.jp/mit。与蛋白质靶向现有技术相关的其他参考文献包括Silva-Filho(2003)Curr.Opin.Plant Biol.6:589-595(Silva-Filho,2003年,《植物生物学新见》,第6卷,第589-595页);Nicchitta(2002)Curr.Opin.Cell Biol.14:412-416(Nicchitta,2002年,《细胞生物学新见》,第14卷,第412-416页);Bruce(2001)Biochim Biophys Acta 1541:2-21(Bruce,2001年,《生物化学与生物物理学报》,第1541卷,第2-21页);Hadlington & Denecke(2000)Curr.Opin.Plant Biol.3:461-468(Hadlington和Denecke,2000年,《植物生物学新见》,第3卷,第461-468页);Emanuelsson et al.(2000)J Mol.Biol.300:1005-1016(Emanuelsson等人,2000年,《分子生物学杂志》,第300卷,第1005-1016页);Emanuelsson & von Heijne

(2001) *Biochim Biophys Acta* 1541:114-119 (Emanuelsson和von Heijne, 2001年,《生物化学与生物物理学报》,第1541卷,第114-119页,所述参考文献以引用的方式并入本文。

[0118] 本发明的方法涉及将多肽或多核苷酸引入植物中。“引入”意指向植物以如此方式提供多核苷酸或者多肽,从而所述序列进入植物细胞内部。本发明的方法不取决于将序列引入植物中的特定方法,只要多核苷酸或多肽可进入植物的至少一个细胞的内部即可。将多核苷酸或多肽引入植物中的方法是本领域已知的,包括但不限于稳定转化方法、瞬时转化方法和病毒介导的方法。

[0119] “稳定转化”意指被引入植物中的核苷酸构建体整合至植物的基因组中并能够由其子代遗传。“瞬时转化”意指多核苷酸被引入植物中但未整合至植物的基因组中,或多肽被引入植物中。

[0120] 转化方案以及将多肽或多核苷酸序列引入到植物中的方案,可以根据待转化的植物或植物细胞的类型(即单子叶植物或双子叶植物)而变化。将多肽和多核苷酸引入植物细胞中的合适方法包括微量注射(Crossway et al.(1986) *Biotechniques* 4:320-334 (Crossway等人,1986年,《生物技术》,第4卷,第320-334页))、电穿孔(Riggs et al.(1986) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 83:5602-5606 (Riggs等人,1986年,《美国国家科学院院刊》,第83卷,第5602-5606页))、农杆菌介导的转化(美国专利No.5,563,055和美国专利No.5,981,840)、直接基因转移(Paszkowski et al.(1984) *EMBO J.*3:2717-2722 (Paszkowski等人,1984年,《欧洲分子生物学组织杂志》,第3卷,第2717-2722页)) and 弹道粒子加速(参见(例如)美国专利No.4,945,050、美国专利No.5,879,918、美国专利No.5,886,244、和5,932,782;Tomes et al.(1995) in *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture: Fundamental Methods*, ed. Gamborg and Phillips (Springer-Verlag, Berlin) (Tomes等人,1995年,《植物细胞、组织和器官培养:基本方法》,Gamborg和Phillips编辑,斯普林格出版社,柏林); McCabe et al.(1988) *Biotechnology* 6:923-926 (McCabe等人,1988年,《生物技术》,第6卷,第923-926页)); 和Lec1转化(WO 00/28058)。还可参见Weissinger et al.(1988) *Ann.Rev.Genet.*22:421-477 (Weissinger等人,1988年,《遗传学年鉴》,第22卷,第421-477页); Sanford et al.(1987) *Particulate Science and Technology* 5:27-37 (Sanford等人,1987年,《粒子科学与技术》,第5卷,第27-37页)(洋葱); Christou et al.(1988) *Plant Physiol.*87:671-674 (Christou等人,1988年,《植物生理学》,第87卷,第671-674页)(大豆); McCabe et al.(1988) *Bio/Technology* 6:923-926 (McCabe等人,1988年,《生物技术》,第6卷,第923-926页)(大豆); Finer and McMullen (1991) *In Vitro Cell Dev.Biol.*27P:175-182 (Finer和McMullen,1991年,《体外细胞发育生物学》,第27P卷,第175-182页)(大豆); Singh et al.(1998) *Theor.Appl.Genet.*96:319-324 (Singh等人,1998年,《理论和应用遗传学》,第96卷,第319-324页)(大豆); Datta et al.(1990) *Biotechnology* 8:736-740 (Datta等人,1990年,《生物技术》,第8卷,第736-740页)(水稻); Klein et al.(1988) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 85:4305-4309 (maize) (Klein等人,1988年,《美国国家科学院院刊》,第85卷,第4305-4309页)(玉蜀黍); Klein et al.(1988) *Biotechnology* 6:559-563 (maize) (Klein等人,1988年,《生物技术》,第6卷,第559-563页)(玉蜀黍); 美国专利No.5,240,855、5,322,783、和5,324,646; Klein et al.(1988) *Plant Physiol.*91:440-444 (maize) (Klein等人,1988年,《植物生理学》,第91卷,第440-444页)(玉蜀黍); Fromm et

al.(1990)Biotechnology 8:833-839(maize)(Fromm等人,1990年,《生物技术》,第8卷,第833-839页)(玉蜀黍);Hooykaas-Van Slogteren et al.(1984)Nature(London)311:763-764(Hooykaas-Van Slogteren等人,1984年,《自然(伦敦)》,第311卷,第763-764页);美国专利No.5,736,369(谷类食物);Bytebier et al.(1987)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:5345-5349(Bytebier等人,1987年,《美国国家科学院院刊》,第84卷,第5345-5349页)(百合科);De Wet et al.《1985)in The Experimental Manipulation of Ovule Tissues, ed.Chapman et al.(Longman,New York),pp.197-209(De Wet等人,1985年,《胚珠组织的实验操纵》,Chapman等人编辑,朗文出版社,纽约,第197-209页)(花粉);Kaeppler et al.(1990)Plant Cell Reports 9:415-418(Kaeppler等人,1990年,《植物细胞报道》,第9卷,第415-418页)和Kaeppler et al.(1992)Theor.Appl.Genet.84:560-566(Kaeppler等人,1992年,《理论与应用遗传学》,第84卷,第560-566页)(晶须介导的转化);D'Halluin et al.(1992)Plant Cell 4:1495-1505(electroporation)(D'Halluin等人,1992年,《植物细胞》,第4卷,第1495-1505页)(电穿孔);Li et al.(1993)Plant Cell Reports 12:250-255(Li等人,1993年,《植物细胞报道》,第12卷,第250-255页)和Christou and Ford(1995)Annals of Botany 75:407-413(Christou和Ford,1995年,《植物学年鉴》,第75卷,第407-413页)(水稻);Osjoda et al.(1996)Nature Biotechnology 14:745-750(Osjoda等人,1996年,《自然生物技术》,第14卷,第745-750页)(通过根瘤农杆菌转化玉蜀黍);所述全部文献均以引用的方式并入本文。

[0121] 在具体的实施例中,可以使用多种瞬时转化方法向植物提供本发明的核苷酸序列。这类瞬时转化方法包括但不限于直接向植物引入杀虫蛋白或其变体和片段,或者向植物引入杀虫多肽转录物。这类方法包括(例如)微量注射或粒子轰击。参见(例如)Crossway et al.(1986)Mol.Gen.Genet.202:179-185(Crossway等人,1986年,《分子和普通遗传学》,第202卷,第179-185页);Nomura et al.(1986)Plant Sci.44:53-58;(Nomura等人,1986年,《植物科学》,第44卷,第53-58页);Hepler et al.(1994)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:2176-2180(Hepler等人,1994年,《美国国家科学院院刊》,第91卷,第2176-2180页)和Hush et al.(1994)J.Cell Science 107:775-784(Hush等人,1994年,《细胞科学杂志》,第107卷,第775-784页),其全部以引用的方式并入本文。或者,可以使用本领域已知的技术,将杀虫多核苷酸瞬时转化至植物中。这类技术包括病毒载体系统以及多核苷酸以如此方式沉淀,从而排除DNA随后释放。因此,来自粒子结合的DNA的转录可能出现,但DNA被释放而整合至基因组中的频率大大降低。这类方法包括使用以聚乙基亚胺(PEI;Sigma#P3143)涂布的粒子。

[0122] 在其他实施例中,可以通过使植物与病毒或病毒核酸接触而将本发明的多核苷酸引入植物中。通常,这类方法涉及将本发明的核苷酸构建体掺入病毒DNA或者RNA分子内。已经认识到,本发明的杀虫多肽可以最初作为病毒聚蛋白的一部分合成,所述病毒聚蛋白稍后可以通过体内或体外蛋白水解加工以产生所需的重组蛋白。另外认识到,本发明的启动子还涵盖由病毒RNA聚合酶用于转录的启动子。涉及病毒DNA或RNA分子的将多核苷酸引入植物中并表达其中所编码的蛋白质的方法是本领域已知的。参见(例如)美国专利No.5,889,191、5,889,190、5,866,785、5,589,367、5,316,931;和Porta et al.(1996)Molecular Biotechnology 5:209-221(Porta等人,1996年,《分子生物技术》,第5卷,第209-221页);所

述文献以引用的方式并入本文。

[0123] 用于将多核苷酸定向插入植物基因组中特定位置处的方法是本领域已知的。在一个实施例中,使用位点特异性重组系统实现在所需的基因组位置处插入多核苷酸。参见(例如)WO 99/25821、WO 99/25854、WO 99/25840、WO 99/25855和WO 99/25853,所述全部文献以引用的方式并入本文。简而言之,可以在转移盒中包含本发明的多核苷酸,所述转移盒旁侧分布有两个非重组产生的重组位点。将转移盒引入在其基因组中稳定掺入靶位点的植物中,其中所述靶位点旁侧分布有两个与该转移盒的所述位点对应的非重组产生的重组位点。提供适当的重组酶,并且将该转移盒整合在该靶标位点处。目的多核苷酸因此整合在植物基因组中的特定染色体位置处。

[0124] 转化的细胞可以根据常规方式培育成植株。参见(例如)McCormick et al.(1986) Plant Cell Reports 5:81-84(McCormick等人,1986年,《植物细胞报道》,第5卷,第81-84页)。然后将这些植株培育,并且用相同的转化株或不同的株授粉,并且鉴定出具有所需表型特征的组成型表达的所得子代。可以培养两代或更多代以确保所需表型特性的表达得到稳定保持和遗传,然后可以收获种子以确保已经实现所需表型特征的表达。以此方式,本发明提供在其基因组中稳定掺入本发明多核苷酸(例如本发明的表达盒)的转化种子(也称为“转基因种子”)。

[0125] 在某些实施例中,本发明的多核苷酸可以与目的多核苷酸序列的任何组合叠加,以产生具有所需性状的植物。如本文所用,“性状”指源自特定序列或序列群组的表型。例如,本发明的多核苷酸可以与编码具有杀虫和/或杀昆虫活性的多肽的任何其他多核苷酸叠加,所述多肽例如是其他苏云金芽孢杆菌毒性蛋白(描述于美国专利No.5,366,892、5,747,450、5,737,514、5,723,756、5,593,881和Geiser et al.(1986)Gene 48:109(Geiser等人,1986年,《基因》,第48卷,第109页))、凝集素(Van Damme et al.(1994)Plant Mol.Biol.24:825(Van Damme等人,1994年,《植物分子生物学》,第24卷,第825页))、五邻体(美国专利No.5,981,722中有所描述)等等。所生成的组合还可以包括目的多核苷酸中的任何一者的多个拷贝。本发明的多核苷酸也可与任何其他基因或基因的组合叠加,以产生具有多种所需性状组合的植物,所述性状包括但不限于动物饲料所需的性状,如高油基因(如美国专利No.6,232,529);平衡的氨基酸(如hordothionins(美国专利No.5,990,389、5,885,801、5,885,802、和5,703,409);高赖氨酸大麦(Williamson et al.(1987)Eur.J.Biochem.165:99-106(Williamson等人,1987年,《欧洲生物化学杂志》,第165卷,第99-106页)和WO 98/20122))以及高甲硫氨酸蛋白(Pedersen et al.(1986)J.Biol.Chem.261:6279(Pedersen等人,1986年,《生物化学杂志》,第261卷,第6279页);Kirihara et al.(1988)Gene 71:359(Kirihara等人,1988年,《基因》,第71卷,第359页);和Musumura et al.(1989)Plant Mol.Biol.12:123(Musumura等人,1989年,《植物分子生物学》,第12卷,第123页));增加的消化率(如修饰的贮藏蛋白(2001年11月7日提交的美国专利申请No.10/053,410)和硫氧还蛋白(2001年12月3日提交的美国专利申请No.10/005,429)),上述文献的公开内容以引用的方式并入本文。

[0126] 本发明的多核苷酸也可以与疾病或者除草剂抗性所需的性状叠加(例如伏马毒素脱毒基因(美国专利No.5,792,931);无毒和疾病抗性基因(Jones et al.(1994)Science 266:789(Jones等人,1994年,《科学》,第266卷,第789页);Martin et al.(1993)Science

262:1432(Martin等人,1993年,《科学》,第262卷,第1432页);Mindrinos et al.(1994) Cell 78:1089(Mindrinos等人,1994年,《细胞》,第78卷,第1089页));导致除草剂抗性的乙酰乳酸合酶(ALS)突变体,例如S4和/或Hra突变体;谷氨酰胺合成酶抑制剂例如草丁膦或basta(如bar基因);和草甘膦抗性(EPSPS基因));以及加工过程或加工产品所需的性状例如高油(如美国专利No.6,232,529);改性油(如脂肪酸去饱和酶基因(美国专利No.5,952,544;WO 94/11516));改性淀粉(如ADPG焦磷酸化酶(AGPase)、淀粉合成酶(SS)、淀粉分支酶(SBE)和淀粉去分支酶(SDBE));和聚合物或生物塑料(如美国专利No.5,602,321; $\beta$ -酮硫解酶、聚羟基丁酸酯合成酶和乙酰乙酰辅酶A还原酶(Schubert et al.(1988) J.Bacteriol.170:5837-5847(Schubert等人,1988年,《细菌学杂志》,第170卷,第5837-5847页))有利于聚羟基链烷酸酯(PHA)的表达;上述文献的公开内容以引用的方式并入本文。还可以将本发明的多核苷酸与提供例如雄性不育(如参见美国专利No.5,583,210)、茎秆强度、开花时间之类的农学性状或例如细胞周期调节或基因靶向(如WO 99/61619、WO 00/17364和WO 99/25821)之类的转化技术性状的多核苷酸组合,上述文献的公开内容以引用的方式并入本文。

[0127] 这些叠加的组合可以通过任何方法而产生,所述方法包括但不限于通过任何常规方法或顶交方法使植物杂交,或遗传转化。如果通过遗传转化植株来叠加序列,则目的多核苷酸序列可以在任何时间并且以任何页序组合。例如,包括一种或多种所需性状的转基因植物可以用作靶标,以通过后续转化引入其他性状。性状可以按共转化方案随目的多核苷酸同时引入,其中所述多核苷酸由转化盒的任何组合提供。例如,如果将要引入两个序列,则可以在独立的转化盒中(反式)或在同一转化盒中(页式)包含这两个序列。序列的表达可以由相同启动子或由不同启动子驱动。在某些情况中,可能期望引入将抑制目的多核苷酸表达的转化盒。这可以与其他抑制盒或过量表达盒的任何组合进行组合以便在植株中生成所需的性状组合。进一步认识到,可以使用位点特异性重组系统在所需的基因组位置处叠加多核苷酸序列。参见(例如)WO 99/25821、WO 99/25854、WO 99/25840、WO 99/25855和WO 99/25853,所述全部文献以引用的方式并入本文。

[0128] 如本文所用,术语植物还包括植物细胞、植物原生质体、从中可再生出玉蜀黍植物的植物细胞组织培养物、植物愈伤组织、植物团块、在植物或植物部分中完好的植物细胞,例如胚、花粉、胚珠、种子、叶、花、枝、果实、仁、穗、穗轴、壳皮、茎秆、根、根尖、花粉囊等等。谷粒意指由商业种植者出于栽培或繁植物种之外的目的所生产的成熟种子。再生植物的子代、变体和突变体也包括在本发明的范围内,条件是这些部分包含所引入的多核苷酸。

[0129] 本发明可以用于转化和保护任何植物物种,包括但不限于单子叶植物和双子叶植物。目的植物物种的例子包括但不限于玉米(*Zea mays*)、芸苔属(*Brassica*)(如,甘蓝型油菜(*B.napus*)、芜菁(*B.rapa*)、芥菜(*B.juncea*)),特别是可用作种子油来源的那些芸苔属物种;苜蓿(*Medicago sativa*)、水稻(*Oryza sativa*)、黑麦(*Secale cereale*)、高粱(*Sorghum bicolor*,*Sorghum vulgare*)、粟(如,珍珠粟(*Pennisetum glaucum*)、黄米(*Panicum miliaceum*)、谷子(*Setaria italica*)、龙爪稷(*Eleusine coracana*)、向日葵(*Helianthus annuus*)、红花(*Carthamus tinctorius*)、小麦(*Triticum aestivum*)、大豆(*Glycine max*)、烟草(*Nicotiana tabacum*)、马铃薯(*Solanum tuberosum*)、落花生(*Arachis hypogaea*)、棉花(海岛棉(*Gossypium barbadense*)、陆地棉(*Gossypium hirsutum*))、甘薯(*Ipomoea*

batatus)、木薯(*Manihot esculenta*)、咖啡(*Coffea* spp.)、椰子(*Cocos nucifera*)、菠萝(*Ananas comosus*)、柑橘(*Citrus* spp.)、可可(*Theobroma cacao*)、茶(*Camellia sinensis*)、香蕉(*Musa* spp.)、鳄梨(*Persea americana*)、无花果(*Ficus casica*)、番石榴(*Psidium guajava*)、芒果(*Mangifera indica*)、橄榄(*Olea europaea*)、番木瓜(*Carica papaya*)、腰果(*Anacardium occidentale*)、澳洲坚果(*Macadamia integrifolia*)、杏树(*Prunus amygdalus*)、糖用甜菜(*Beta vulgaris*)、甘蔗(*Saccharum* spp.)、燕麦、大麦、蔬菜、观赏植物和针叶树。

[0130] 蔬菜包括番茄(*Lycopersicon esculentum*)、莴苣(如,*Lactuca sativa*)、青豆(*Phaseolus vulgaris*)、利马豆(*Phaseolus limensis*)、豌豆(*Lathyrus* spp.)和黄瓜属(*Cucumis*)的成员,例如黄瓜(*C. sativus*)、香瓜(*C. cantalupensis*)和甜瓜(*C. melo*)。观赏植物包括杜鹃花(*Rhododendron* spp.)、八仙花(*Macrophylla hydrangea*)、木槿(*Hibiscus rosasanensis*)、玫瑰(*Rosa* spp.)、郁金香(*Tulipa* spp.)、水仙花(*Narcissus* spp.)、矮牵牛花(*Petunia hybrida*)、康乃馨(*Dianthus caryophyllus*)、一品红(*Euphorbia pulcherrima*)和菊花。

[0131] 可用于实施本发明的针叶树包括(例如)松树,例如火炬松(*Pinus taeda*)、湿地松(*Pinus elliotii*)、西黄松(*Pinus ponderosa*)、黑松(*Pinus contorta*)和辐射松(*Pinus radiata*);花旗松(*Pseudotsuga menziesii*);西铁杉(*Tsuga canadensis*);北美云杉(*Picea glauca*);红杉(*Sequoia sempervirens*);枞树,例如银枞(*Abies amabilis*)和胶枞(*Abies balsamea*);以及雪松如西方红雪松(*Thuja plicata*)和阿拉斯加黄雪松(*Chamaecyparis nootkatensis*)。在具体实施例中,本发明的植物是作物植物(例如,玉米、苜蓿、向日葵、芸苔、大豆、棉花、红花、花生、高粱、小麦、稷、烟草等等)。在其他实施例中,玉米、大豆和甘蔗植物是最佳的,在另外其他实施例中,玉米植物是最佳的。

[0132] 其他目的植物包括提供目的种子的禾谷植物、油料种子植物和豆科植物。目的种子包括禾谷种子,例如玉米、小麦、大麦、水稻、高粱、黑麦等。油料种子植物包括棉花、大豆、红花、向日葵、芸苔、玉蜀黍、苜蓿、棕榈、椰子等。豆科植物包括豆类和豌豆。豆类包括瓜尔豆、槐豆、胡芦巴、大豆、四季豆、豇豆、绿豆、利马豆、蚕豆、小扁豆、鹰嘴豆等。

[0133] 编码本发明突变型杀虫多肽的基因可以根据本领域中的标准方法引入任何合适的微生物宿主中。例如,可以选择已知占领一种或者多种目的作物的“植物圈”(叶面、叶圈、根际和/或根面)的微生物宿主。如此选择这些微生物,从而能够在特定环境中成功地与野生型微生物竞争,以及提供表达突变型杀虫蛋白的基因的的稳定保持和表达。

[0134] 这类微生物包括细菌、藻类和真菌。特别要关注的是诸如以下的微生物:细菌,如假单胞菌属(*Pseudomonas*)、欧文氏菌属(*Erwinia*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、黄单胞菌属(*Xanthomonas*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、根瘤菌属(*Rhizobium*)、红假单胞菌属(*Rhodopseudomonas*)、甲基菌属(*Methylius*)、土壤杆菌属(*Agrobacterium*)、醋杆菌属(*Acetobacter*)、乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、固氮菌属(*Azotobacter*)、明串珠菌属(*Leuconostoc*)和产碱菌属(*Alcaligenes*),真菌,特别是酵母,如酵母菌属(*Saccharomyces*)、隐球菌属(*Cryptococcus*)、克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)、掷孢酵母属(*Sporobolomyces*)、红酵母属(*Rhodotorula*)和短梗霉属(*Aureobasidium*)。特别值得关注的是诸如以下的此类植物圈

细菌物种,例如丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)、木醋杆菌(*Acetobacter xylinum*)、农杆菌(*Agrobacterium*)、球形红假单胞菌(*Rhodopseudomonas spheroides*)、野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris*)、苜蓿根瘤菌(*Rhizobium meliloti*)、富营养产碱菌(*Alcaligenes entrophus*)、木质棍状杆菌(*Clavibacter xyli*)和维涅兰德固氮菌(*Azotobacter vinlandii*),以及诸如以下的植物圈酵母物种,例如深红酵母(*Rhodotorula rubra*)、粘红酵母(*R.glutinis*)、海滨红酵母(*R.marina*)、橙黄红酵母(*R.aurantiaca*)、浅白色隐球酵母(*Cryptococcus albidus*)、流散隐球酵母(*C.diffluens*)、罗伦隐球酵母(*C.laurentii*)、罗斯酵母(*Saccharomyces rosei*)、普地酵母(*S.pretoriensis*)、酿酒酵母(*S.cerevisiae*)、粉红掷孢酵母(*Sporobolomyces rosae*)、香气掷孢酵母(*S.odorus*)、佛地克鲁维酵母(*Kluyveromyces veronae*)和出芽短梗霉(*Aureobasidium pollulans*)。特别值得关注的是有色素的微生物。

[0135] 其他示例性的原核生物(革兰氏阴性和革兰氏阳性)包括肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*),如埃希氏菌属(*Escherichia*)、欧文氏菌属、志贺氏菌属(*Shigella*)、沙门氏菌属(*Salmonella*)和变形菌属(*Proteus*);芽孢杆菌科(*Bacillaceae*);根瘤菌科(*Rhizobiceae*),如根瘤菌属;螺菌科(*Spirillaceae*),如发光细菌、发酵单胞菌属(*Zymomonas*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)、气单胞菌属(*Aeromonas*)、弧菌属(*Vibrio*)、脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)和螺菌属(*Spirillum*);乳杆菌科(*Lactobacillaceae*);假单胞菌科(*Pseudomonadaceae*),如假单胞菌属和醋杆菌属(*Acetobacter*);固氮菌科(*Azotobacteraceae*)和硝化杆菌科(*Nitrobacteraceae*)。真核生物有真菌,如藻菌纲(*Phycomycetes*)和子囊菌纲(*Ascomycetes*),其包括酵母,例如酵母菌属和裂殖酵母属(*Schizosaccharomyces*);和担子菌纲(*Basidiomycetes*)酵母,例如红酵母属、短梗霉属、掷孢酵母属等等。

[0136] 具体目的微生物宿主生物体包括酵母,例如红酵母(*Rhodotorula spp.*)、短梗霉(*Aureobasidium spp.*)、酵母菌(*Saccharomyces spp.*)和掷孢酵母(*Sporobolomyces spp.*),叶面生物,例如假单胞菌(*Pseudomonas spp.*)、欧文氏菌(*Erwinia spp.*)和黄杆菌(*Flavobacterium spp.*),以及其他此类生物,包括铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、荧光假单胞菌、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、苏云金芽孢杆菌、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)等等。

[0137] 可以将编码本发明的杀虫多肽的基因引入在植物上繁殖的微生物(体表寄生菌)中,以递送杀虫蛋白至潜在的靶害虫。体表寄生菌(例如)可以是革兰氏阳性或者革兰氏阴性细菌。

[0138] 可以使用电转化法,将编码突变型杀虫蛋白的基因引入(例如)微生物中,例如芽孢杆菌属。具体而言,可以将编码杀虫蛋白的基因克隆到穿梭载体(例如)pHT3101中(Lerecius et al.(1989)*FEMS Microbiol.Letts.*60:211-218(Lerecius等人,1989年,《欧洲微生物学会联合会微生物学快报》,第60卷,第211-218页))。含有特定杀虫基因的编码序列的穿梭载体pHT3101可以(例如)使用电穿孔法转化入芽孢杆菌属中(Lerecius et al.(1989)*FEMS Microbiol.Letts.*60:211-218(Lerecius等人,1989年,《欧洲微生物学会联合会微生物学快报》,第60卷,第211-218页))。

[0139] 本发明还涵盖杀虫组合物。杀虫组合物可以包含本发明的突变型杀虫多肽或者包含或表达编码本发明的突变型杀虫多肽的核苷酸序列的微生物。本发明的杀虫组合物可以施加至植物害虫的环境,如下文所述,从而保护植物免受植物害虫侵害。此外,杀虫组合物可以与可接受的载体一起配制成(例如)悬液、溶液、乳液、撒粉、可分散颗粒、可润湿粉末以及可乳化浓缩物、气溶胶、浸渍颗粒、助剂、可涂覆糊、和还有(例如)在聚合物物质中的包囊物。

[0140] 提供了用于保护植物免受植物害虫侵害的方法,所述方法包括向害虫的环境施加有效量的本发明的杀虫蛋白或组合物。“有效量”是指足以控制植物害虫的蛋白或组合物的量。突变型杀虫蛋白和组合物可以由本领域普通技术人员已知的方法施加至害虫的环境。

[0141] 可以通过添加以下物质获得本发明的杀虫组合物:表面活性剂、惰性载体、防腐剂、保湿剂、采食刺激剂、引诱剂、包囊剂、粘合剂、乳化剂、染料、紫外保护剂、缓冲剂、流平剂或者肥料、微量营养物供体或者影响植物生长的其他制剂。可以将包括但不限于除草剂、杀昆虫剂、杀真菌剂、杀细菌剂、杀线虫剂、杀软体动物剂、杀螨剂、植物生长调节剂、收获助剂和肥料的一种或多种农用化学品与配制领域内常用的载体、表面活性剂或者助剂组合,以促进产品操作和施加至特定的靶病原体。合适的载体和助剂可以是固体或者液体,并对应于通常用于配制技术的物质,如天然或再生的矿物质、溶剂、分散剂、湿润剂、增粘剂、粘合剂或肥料。本发明的活性成分通常以组合物的形式施加,并且可以施加至待处理的作物区、植物或种子。例如,可以在粮仓或筒仓等内贮藏准备时或贮藏期间,将本发明的组合物施加至谷物。本发明的组合物可与其他化合物同时或相继施加。施加包含本发明至少一种杀虫蛋白(更具体地讲,本发明的Cry毒素)的本发明活性成分或本发明农用化学组合物的方法包括但不限于:叶面施加、种子包衣和土壤施加。施加次数和施加速率取决于相应害虫或病原体侵袭的强度。

[0142] 合适的表面活性剂包括但不限于阴离子化合物,例如金属的羧酸盐;长链脂肪酸的羧酸盐;N-酰基肌氨酸盐;磷酸与脂肪醇乙氧基化物的单酯或二酯或者这类酯的盐;脂肪醇硫酸盐,例如十二烷基硫酸钠、十八烷基硫酸钠或者十六烷基硫酸钠;乙氧基化脂肪醇硫酸盐;乙氧基化烷基苯酚硫酸盐;木质素磺酸盐;石油磺酸盐;烷基芳基磺酸盐,例如烷基苯磺酸盐或低级烷基萘磺酸盐,如丁基萘磺酸盐;磺化的萘-甲醛缩合物的盐;磺化的苯酚-甲醛缩合物的盐;更复杂的磺酸盐如酰胺磺酸盐,例如油酸和N-甲基牛磺酸的磺化缩合产物;或二烷基磺基琥珀酸盐,例如琥珀酸二辛酯的磺酸钠。非离子剂包括脂肪酸酯、脂肪醇、脂肪酸酰胺或脂肪烷基或烯基取代的苯酚与环氧乙烷的缩合产物、多元醇醚的脂肪酸酯如脱水山梨糖醇脂肪酸酯,这类酯与环氧乙烷的缩合产物如聚氧乙烯脱水山梨糖醇脂肪酸酯,环氧乙烷和环氧丙烷的嵌段共聚物、炔二醇例如2,4,7,9-四乙基-5-癸炔-4,7-二醇,或乙氧基化的炔二醇。阳离子表面活性剂的例子包括(例如)脂肪族单胺、二胺或聚胺,例如乙酸盐、环烷酸盐或油酸盐;或含氧胺,例如聚氧乙烯烷基胺的氧化胺;通过羧酸与二胺或聚胺缩合所述制备的连接酰胺的胺;或季铵盐。

[0143] 惰性材料的例子包括但不限于无机矿物质,例如高岭土、页硅酸盐、碳酸盐、硫酸盐、磷酸盐;或者植物材料,例如软木、粉碎的玉米穗轴、花生壳、稻壳和胡桃壳。

[0144] 本发明的杀虫组合物可以处于直接施加的合适形式或作为施加前需要用适量水或其他稀释剂稀释的主要组合物的浓缩物。杀虫多肽的浓度将随具体制剂的性质变动,具

体而言,随它是否为浓缩物或待直接使用而变动。组合物含有1-98%的固态或液态惰性载体以及0-50%(优选0.1-50%)的表面活性剂。这些组合物将以商产的标示比率施用,当处于干燥形式时优选地约0.01磅至5.0磅每英亩,当处于液体形式时约0.01品脱至10品脱每英亩。

[0145] 在又一个实施例中,本发明的组合物以及转化的微生物和突变型杀虫蛋白可以在配制前处理,以在施加至靶害虫的环境时延长杀虫活性,只要预处理对杀虫活性无害。这种处理可以通过化学和/或物理手段进行,只要处理不有害地影响组合物的性质。化学试剂的例子包括但不限于卤化剂;醛类,例如甲醛和戊二醛;抗感染剂,例如氯化苯甲羟铵;醇类,例如异丙醇和乙醇;以及组织固定剂,例如Bouin固定剂和Helly固定剂(参见(例如)Humason(1967)Animal Tissue Techniques(W.H.Freeman and Co.)(Humason,1967年,《动物组织技术》,W.H.弗里曼公司))。

[0146] 在本发明的其他实施例中,可能有利的是用蛋白酶(例如胰蛋白酶)处理突变型Cry多肽以活化该蛋白,然后再将本发明的杀虫蛋白组合物施加至靶害虫的环境。通过丝氨酸蛋白酶活化原毒素的方法是本领域公知的。参见(例如)Cooksey(1968)Biochem. J. 6: 445-454(Cooksey,1968年,《生物化学杂志》,第6卷,第445-454页)和Carroll and Ellar(1989)Biochem. J. 261:99-105(Carroll和Ellar,1989年,《生物化学杂志》,第261卷,第99-105页),所述文献的教导内容以引用的方式并入本文。例如,合适的活化方案包括但不限于将待活化的多肽(例如,纯化的突变型Cry多肽)和胰蛋白酶以按1/100的突变型Cry蛋白/胰蛋白酶重量比在20nM NaHCO<sub>3</sub>(pH 8)中混合,并且在36°C消化样品3小时。

[0147] 本发明的杀虫组合物可以通过(例如)以下方式施加至植物害虫、植物、植物种子、植物部分或耕作区的环境:喷雾、雾化、撒粉、分散、涂覆或者倾倒、引入土壤内或引到土壤上、引入灌溉水中、在害虫已开始出现时或者在害虫出现前进行种子处理或一般施加或撒粉作为保护措施。例如,可以将本发明的突变型杀虫蛋白和/或转化的微生物与谷物混合以在贮藏期间保护谷物。通常重要的是在植物生长的早期阶段获得对害虫的良好控制,因为这是植物可能受到最严重损害的时期。在本发明的一个实施例中,将组合物在播种时以颗粒形式直接施加至土壤,所述颗粒形式为载体与芽孢杆菌菌株或者本发明的转化微生物的死细胞的组合物。另一个实施例是颗粒形式的组合物,所述组合物包含农用化学品(例如,除草剂、杀虫剂、肥料、惰性载体)与芽孢杆菌菌株或者本发明的转化微生物的死细胞。

[0148] 本发明的组合物用于以多种方式保护植物、种子和植物产物。例如,该组合物可以用于涉及通过选自喷雾、撒粉、撒播或者种子包衣的方法将有效量的杀虫组合物置于害虫环境中的方法。

[0149] 可以将杀虫组合物在种植前或种植后施加至耕作区。耕作区可以包括昆虫害虫或耕作区的可有利于昆虫害虫的环境条件(如,对于昆虫害虫生长为优选的空气温度、季节、土壤温度)。如本文所用,“耕作区”包括期望在其中种植植物的任何区域。这类耕作区包括但不限于在其中栽培植物的田地(如作物田、草地、树林地、生产林、用于栽培水果和蔬菜的田地等等)、温室、生长室等等。

[0150] 本发明的方法和组合物可对多种害虫有效。害虫包括鳞翅目的昆虫,包括但不限于夜蛾科(Noctuidae)的行军虫、切根虫、尺蠖和烟芽夜蛾(heliiothines);*Agrotis ipsilon* Hufnagel(小地老虎);*A.orthogonia* Morrison(西部切根虫);*A.segetum* Denis

& Schiffermüller(黄地老虎);*A. subterranea* Fabricius(颗粒夜蛾);*Alabama argillacea* Hübner(棉叶虫);*Anticarsia gemmatilis* Hübner(黎豆夜蛾);*Athetis mindara* Barnes and McDunnough(粗皮夜蛾);*Earias insulana* Boisduval(埃及金钢钻);*E. vittella* Fabricius(翠纹金刚钻);*Egira*(*Xylomyges*)*curialis* Grote(柑橘夜蛾);*Euxoa messoria* Harris(暗缘地老虎);*Helicoverpa armigera* Hübner(美洲棉铃虫);*H. zea* Boddie(玉米穗虫或棉铃虫);*Heliothis virescens* Fabricius(烟青虫);*Hypena scabra* Fabricius(苜蓿绿叶蛾);*Hyponeuma taltula* Schaus;(Mamestra *configurata*) Walker(披肩粘虫);*M. brassicae* Linnaeus(甘蓝夜蛾);*Melanchra picta* Harris(斑马纹夜蛾);*Mocis latipes* Guenée(小毛胫夜蛾);*Pseudaletia unipuncta* Haworth(行军虫);*Pseudoplusia includens* Walker(大豆尺蠖);*Richia albicosta* Smith(西部豆夜蛾);*Spodoptera frugiperda* JE Smith(秋夜蛾);*S. exigua* Hübner(甜菜夜蛾);*S. litura* Fabricius(烟草切根虫,斜纹夜蛾);*Trichoplusia ni* Hübner(卷心菜尺蠖);螟蛾科和草螟科的钻心虫、鞘蛾、结网虫、梢斑螟和斑蛾,例如*Achroia grisella* Fabricius(小蜡螟);*Amyelois transitella* Walker(脐橙螟蛾);*Anagasta kuehniella* Zeller(地中海粉斑螟);*Cadra cautella* Walker(杏仁蛾);*Chilo partellus* Swinhoe(斑禾草螟);*C. suppressalis* Walker(高粱条螟/水稻二化螟);*C. terrenellus* Pagenstecher(甘蔗螟虫);*Corcyra cephalonica* Stainton(米蛾);*Crambus caliginosellus* Clemens(玉米根草螟);*C. teterrellus* Zincken(蓝草结网毛虫);*Cnaphalocrocis medinalis* Guenée(稻纵卷叶螟);*Desmia funeralis* Hübner(葡萄卷叶虫);*Diaphania hyalinata* Linnaeus(甜瓜野螟);*D. nitidalis* Stoll(泡菜虫);*Diatraea flavipennella* Box; *D. grandiosella* Dyar(西南玉米钻心虫),*D. saccharalis* Fabricius(甘蔗钻心虫);*Elasmopalpus lignosellus* Zeller(小玉米茎钻心虫);*Eoreumaloftini* Dyar(墨西哥水稻钻心虫);*Ephestia elutella* Hübner(烟草(可可)蛾);*Galleria mellonella* Linnaeus(大蜡螟);*Hedylepta accepta* Butler(甘蔗卷叶蛾);*Herpetogramma licarsisalis* Walker(水稻切叶野螟);*Homoeosoma electellum* Hulst(向日葵螟);*Loxostege sticticalis* Linnaeus(草地螟);*Maruca testulalis* Geyer(豆野螟);*Orthaga thyrisalis* Walker(茶树螟);*Ostrinia nubilalis* Hübner(欧洲玉米螟);*Plodia interpunctella* Hübner(印度谷螟);*Scirpophaga incertulas* Walker(水稻三化螟);*Udea rubigalis* Guenée(芹菜网螟);以及卷蛾科的卷叶虫、蚜虫、种子蠕虫以及果实蠕虫 *Acleris gloverana* Walsingham(西部黑头长翅卷蛾);*A. variana* Fernald(东部漂头长翅卷蛾);*Adoxophyes orana* Fischer von Rösslerstamm(棉褐带卷蛾);黄卷蛾(*Archips* spp.),包括*A. argyrospila* Walker(果树卷叶虫)和*A. rosana* Linnaeus(欧洲卷叶虫);带卷蛾(*Argyrotaenia* spp.);*Bonagota salubricola* Meyrick(巴西苹果卷叶蛾);色卷蛾(*Choristoneura* spp.);*Cochylis hospes* Walsingham(条纹向日葵螟);*Cydia latiferreana* Walsingham(棒小卷蛾);*C. pomonella* Linnaeus(苹果蠹蛾);*Endopiza viteana* Clemens(葡萄卷叶蛾);*Eupoecilia ambiguella* Hübner(女贞细卷蛾);*Grapholita molesta* Busck(梨小食心虫);*Lobesia botrana* Denis & Schiffermüller(欧洲葡萄小卷叶蛾);*Platynota flavedana* Clemens(杂色卷叶蛾);*P. stultana* Walsingham(杂食卷叶蛾);*Spilonota ocellana* Denis & Schiffermüller(苹果芽小卷叶

蛾);和*Suleima helianthana* Riley(向日葵芽蛾)。

[0151] 鳞翅目中选择的其他农艺学害虫包括但不限于*Alsophila pometaria* Harris(秋星尺蠖);*Anarsia lineatella* Zeller(桃条麦蛾);*Anisota senatoria* J.E.Smith(犀客页蛾);*Antheraea pernyi* Guérin-Méneville(姬透目天蚕蛾);*Bombyx mori* Linnaeus(桑蚕);*Bucculatrix thurberiella* Busck(棉叶潜蛾);*Colias eurytheme* Boisduval(苜蓿粉蝶);*Datana integerrima* Grote & Robinson(胡桃毛虫);*Dendrolimus sibiricus* Tschetwerikov(落叶松毛虫),*Ennomos subsignaria* Hübner(白尺蠖);*Erannis tiliaria* Harris(菩提尺蠖);*Erechthias flavistriata* Walsingham(蔗芽潜蛾);*Euproctis chrysorrhoea* Linnaeus(黄毒蛾);*Harrisina americana* Guérin-Méneville(黑拟岭蛾);*Heliothis subflexa* Guenée;*Hemileuca oliviae* Cockrell(牧草天蚕蛾);*Hyphantria cunea* Drury(美国白蛾);*Keiferia lycopersicella* Walsingham(番茄蠹蛾);*Lambdina fiscellaria fiscellaria* Hulst(东部铁杉尺蠖);*L.fiscellaria lugubrosa* Hulst(西部铁杉尺蠖);*Leucoma salicis* Linnaeus(柳毒蛾);*Lymantria dispar* Linnaeus(舞毒蛾);天幕毛虫(*Malacosoma* spp.);*Manduca quinquemaculata* Haworth(五点天蛾,番茄天蛾幼虫);*M.sexata* Haworth(番茄天蛾幼虫,烟草天蛾幼虫);*Ooperophtera brumata* Linnaeus(冬尺蠖);古毒蛾(*Orgyia* spp.);*Paleacrita vernata* Peck(春尺蠖);*Papilio cresphontes* Cramer(大黄带凤蝶,吃芸香科叶子的凤蝶科幼虫);*Phryganidia californica* Packard(加州橡树虫);*Phyllocnistis citrella* Stainton(柑橘潜叶蛾);*Phyllonorycter blancardella* Fabricius(斑幕潜叶蛾);*Pieris brassicae* Linnaeus(大菜粉蝶);*P.rapae* Linnaeus(小菜粉蝶);*P.napi* Linnaeus(暗脉菜粉蝶);*Platyptilia carduidactyla* Riley(洋蓟羽蛾);*Plutella xylostella* Linnaeus(小菜蛾);*Pectinophora gossypiella* Saunders(棉红铃虫);*Pontia protodice* Boisduval & Leconte(南方菜青虫);*Sabulodes aegrotata* Guenée(杂食尺蠖);*Schizura concinna* J.E.Smith(红疣天社蛾);*Sitotroga cerealella* Olivier(麦蛾);*Telchin licus* Drury(白斑拟蝶蛾);*Thaumetopoea pityocampa* Schifferrmüller(松树列队毛虫);*Tineola bisselliella* Hummel(结网衣蛾);*Tuta absoluta* Meyrick(番茄斑潜蝇)和*Yponomeuta padella* Linnaeus(苹果巢蛾)。

[0152] 冠词“一个”和“一种”在本文中用来指一个(种)或不止一个(种)(即,指至少一个(种))该冠词的语法对象。举例来说,“一个要素”是指一个或多个要素。

[0153] 以下实例以举例说明而非限制本发明的方式提供。

[0154] 实验

[0155] 实例1:测定Cry1突变型多肽的杀虫活性

[0156] 结构域II和结构域III已经公认为Cry蛋白的受体结合结构域。就结构域III而言,由与家蚕(*Bombix mori*)氨肽酶N(APN)竞争结合Cry1Aa的单克隆抗体所识别的表位的定位已证实,在结构域III中暴露并且紧邻三维结构的 $\beta 16$ (<sup>508</sup>STLRVN<sup>513</sup>;SEQ ID NO:9)和 $\beta 22$ (<sup>582</sup>VFTLSAHV<sup>589</sup>;SEQ ID NO:10)残基涉及Cry1Aa-APN相互作用。相似的实验表明,Cry1Ab还通过烟草天蛾(*M.sexata*)中的类似氨基酸区域结合APN。为了分析特定Cry1Ab残基的APN结合和毒性效应,对 $\beta 16$ (<sup>506</sup>GQISTLRVNITA<sup>517</sup>;SEQ ID NO:11)和 $\beta 22$ (<sup>583</sup>VFTLSAHVFN<sup>592</sup>;SEQ ID NO:12)残基进行丙氨酸置换。表1和2示出了在苏云金芽孢杆菌中稳定并且产生的突变型多

肽的杀昆虫活性。如表1中所证实，L511A对烟草天蛾没有毒性。相对于野生型Cry1Ab多肽，若干个Cry1Ab结构域III突变体(例如S509A、V513A、N514A、T585A、S587A、H589A和V590A)对草地贪夜蛾(*S. frugiperda*)具有毒性。其中，S509A、V513A和N514A保留针对烟草天蛾的显著活性。在Cry1Ab结构域IIIβ16突变体(表1)中，N514A是针对草地贪夜蛾最有活性的毒素，其活性水平类似于Cry1C(LC<sub>50</sub>为163(92-250)ng/cm<sup>2</sup>)。Cry1Ab结构域IIIβ22突变体中的两个(T585A和S587A突变体)表现出增强的毒性，其毒性甚至高于此前的β16突变体(表2)。

[0157] 表1. Cry1Ab结构域IIIβ16突变体的毒性\*

|                            | LC <sub>50</sub> (ng/cm <sup>2</sup> ) |               |
|----------------------------|--|---------------|
|                            | 烟草天蛾                                   | 草地贪夜蛾         |
| WT Cry1Ab<br>(SEQ ID NO:2) | 3.7 (1.6-6.9)                          | >5000         |
| [0158] S509A               | 5.7 (4.6-7.2)                          | 526 (381-751) |
| T510A                      | 31.9 (14.7-201.7)                      | >5000         |
| L511A                      | >1000                                  | >5000         |
| R512A                      | 6.5 (5-9)                              | >5000         |
| V513A                      | 45 (26-105)                            | 393 (296-523) |
| N514A                      | 15.3 (10.3-25.7)                       | 149 (101-204) |

[0159] \*在每个氨基酸位置的置换相对于SEQ ID NO:2中的残基编号

[0160] 表2. Cry1Ab结构域IIIβ22突变体的毒性\*

|               | LC <sub>50</sub> (ng/cm <sup>2</sup> ) |
|---------------|--|
|               | 草地贪夜蛾                                  |
| [0161] V583A: | 98                                     |
| F584A:        | 350                                    |
| T585A:        | 59                                     |
| L586A:        | >1000                                  |
| [0162] S587A: | 26                                     |
| H589A:        | 202                                    |
| V590A:        | 277                                    |

[0163] \*在每个氨基酸位置的置换相对于SEQ ID NO:2中的残基编号

[0164] 为了分析特定Cry1C残基对APN结合和毒性的影响，β16和β22残基进行丙氨酸置换。表3和4示出了在苏云金芽孢杆菌中稳定并且产生的突变型多肽的杀昆虫活性。如表3中所证实，V505A和S506A对草地贪夜蛾没有毒性。相对于野生型Cry1C多肽，Cry1C结构域IIIβ16突变体V509A和N510A对草地贪夜蛾具有毒性。相对于野生型Cry1C多肽，CryC结构域IIIβ22突变体针对草地贪夜蛾表现出高8倍的活性(表4)。

[0165] 表3. Cry1C结构域IIIβ16突变体的毒性\*

|                           | LC <sub>50</sub> (ng/cm <sup>2</sup> ) |               |
|---------------------------|--|---------------|
|                           | 烟草天蛾                                   | 草地贪夜蛾         |
| WT Cry1C<br>(SEQ ID NO:4) | 25 (18-35)                             | 255 (185-348) |
| [0166] V505A              | 44 (27-100)                            | >2500         |
| S506A                     | 90 (56-222)                            | >2500         |
| L507A                     | 42 (27-83)                             | 335 (250-444) |
| Q508A                     | 43 (30-70)                             | 241 (141-416) |
| V509A                     | 16 (11-22)                             | 118 (36-218)  |
| N510A                     | 33 (25-45)                             | 65 (43-95)    |

[0167] \*在每个氨基酸位置的置换相对于SEQ ID NO:4中的残基编号

[0168] 表4.Cry1C结构域IIIβ22突变体的毒性\*

|                                     | LC <sub>50</sub> (ng/cm <sup>2</sup> ) |
|-------------------------------------|--|
|                                     | 草地贪夜蛾                                  |
| [0169] WT Cry1C<br>(SEQ ID<br>NO:4) | 250 (55-777)                           |
| S590A                               | 32 (16-55)                             |

[0170] \*在每个氨基酸位置的置换相对于SEQ ID NO:4中的残基编号

[0171] 本说明书中提到的所有出版物和专利申请表明了本发明所属领域的技术人员的水平。所有出版物和专利申请均以引用的方式并入本文至相同的程度,就如同每个单独的出版物或专利申请被具体地和独立地指出以引用的方式并入一样。

[0172] 虽然为了清楚地理解起见已经通过举例说明和实例相当详细地描述了本发明,但显然可以在所附权利要求书的范围内实施某些改变和修改。

## 序列表

- <110> Soberon-Chavez, Mario  
Gomez-Gomez, Isabel  
Bravo-De La Parra, Alejandra
- <120> 突变型苏云金芽孢杆菌(Bacillus Thuringiensis) Cry基因及其使用方法
- <130> 035718/416876
- <150> 61/469, 380
- <151> 2011-03-30
- <160> 12
- <170> PatentIn版本3.5
- <210> 1
- <211> 3778
- <212> DNA
- <213> 苏云金芽孢杆菌 (Bacillus thuringiensis)

[0001]

<400> 1

tcaaaaattg atatttagta aaattagttg cactttgtgc atttttcat aagatgagtc 60

atatgtttta aattgtagta atgaaaaaca gtattatate ataatgaatt ggtatcttaa 120

taaaagagat ggagtaact tatggataac aatccgaaca tcaatgaatg cattcettat 180

aattgtttta gtaaccctga agtagaagta ttaggtggag aaagaataga aactggttac 240

acccaatcg atatttcett gtcgtaacg caatttcett tgagtgaatt tgttcccggt 300

gctggatttg tgttaggact agttgatata atatggggaa ttttgggtcc ctctcaatgg 360

gacgcatttc ttgtacaaat tgaacagtta attaaccaaa gaatagaaga attcgcctagg 420

aaccaageca ttctagatt agaaggacta agcaatcttt atcaaattta cgcagaatct 480

tttagagagt gggaagcaga tctactaat ccagcattaa gagaagagat gcgtattcaa 540

ttcaatgaca tgaacagtgc cttacaacc gctattcctc ttttgcagt tcaaaattat 600

caagttcctc ttttatcagt atatgttcaa gctgcaaatt tacatttate agttttgaga 660

gatgttcag tgtttggaca aaggtgggga tttgatgccc cgaetatcaa tagtcttat 720

|        |  |      |
|--------|--|------|
|        | aatgatttaa ctagccttat tggcaactat acagatcatg ctgtacgctg gtacaatagc  | 780  |
|        | ggattagagc gtgtatgggg accggattct agagattgga taagataaa tcaatttaga   | 840  |
|        | agagaattaa cactaactgt attagatatt gtttctctat ttccgaacta tgatagtaga  | 900  |
|        | acgtatecaa ttcgaacagt ttccaatta acaagagaaa ttatatacaa cccagtatta   | 960  |
|        | gaaaattttg atggtagttt tggaggctcg gctcaggcca tagaaggaag tattaggagt  | 1020 |
|        | ccacatttga tggatatact taacagtata accatctata cggatgctca tagaggagaa  | 1080 |
|        | tattattggt cagggcatca aataatggct tctctctag ggttttcggg gccagaattc   | 1140 |
|        | acttttccgc tatatggaac tatgggaaat gcagctccac aacaacgtat tgttgctcaa  | 1200 |
|        | ctaggtcagg gcgtgtatag aacattatcg tccactttat atagaagacc ttttaataa   | 1260 |
|        | gggataaata atcaacaact atctgttctt gacgggacag aatttgctta tggaacctcc  | 1320 |
|        | tcaaatttgc catccgctgt atacagaaaa agcggaacgg tagattcgtt ggatgaata   | 1380 |
|        | ccgcccacaga ataacaact gccacctagg caaggattta gtcacgatt aagccatgtt   | 1440 |
| [0002] | tcaatgttcc gttcaggett tagtaatagt agtghtaagta taataagagc tctatgttc  | 1500 |
|        | tcttgatac atcgtagtgc tgaatttaaat aatataattc ctccatcaca aattacacaa  | 1560 |
|        | atacctttaa caaaatctac taatcttggc tctggaactt ctgtcgttaa aggaccagga  | 1620 |
|        | tttacaggag gagatattct tcgaagaact tcacctggcc agatttcaac cttagagta   | 1680 |
|        | aatattactg caccattatc acaaagatat cgggtaagaa ttctctacgc ttctaccaca  | 1740 |
|        | aatttacaat tccatacatc aattgacgga agacctatta atcaggggaa tttttcagca  | 1800 |
|        | actatgagta gtgggagtaa ttacagctcc ggaagcttta ggaactgtagg ttttactact | 1860 |
|        | ccgtttaact tttcaaatgg atcaagtgtt ttacgttaa gtgctcatgt cttcaattca   | 1920 |
|        | ggcaatgaag tttatataga tcgaattgaa tttgttccgg cagaagtaac ctttgaggca  | 1980 |
|        | gaatatgatt tagaaagagc acaaaaggcg gtgaatgagc tgtttacttc ttccaatcaa  | 2040 |
|        | atcgggttaa naacagatgt gacggattat catattgatc aagtatcaa tttagttgag   | 2100 |
|        | tgtttatctg atgaattttg tctggatgaa aaaaaagaat tgtccgagaa agtcaaacat  | 2160 |

|        |  |      |
|--------|--|------|
|        | gcgaagcgac ttagtgatga gcggaatita cticaagatc caaacitttag agggatcaat | 2220 |
|        | agacaactag accgtggctg gagaggaagt acggatatta ccatccaagg aggcgatgac  | 2280 |
|        | gtattcaaag agaattacgt tacgctattg ggtacctttg atgagtgcta tccaacgtat  | 2340 |
|        | ttatatcaaa aaatagatga gtcgaaatta aaagcctata cccgttacca attaagaggg  | 2400 |
|        | tataicgaag atagtcaaga cttagaaatc tatttaattc gctacaatgc caaacacgaa  | 2460 |
|        | acagtaaagt tgccaggtac gggttccita tggccgcttt cagccccaag tccaatcgga  | 2520 |
|        | aaatgtgecc atcattceca tcatttctcc ttggacattg atgttgatg tacagactta   | 2580 |
|        | aatgaggact taggtgtatg ggtgatattc aagattaaga cgcaagatgg ccatgcaaga  | 2640 |
|        | ctaggaaatc tagaatttct cgaagagaaa ccattagtag gagaagcact agctcgtgig  | 2700 |
|        | aaaagagcgg agaaaaaatg gagagacaaa cgtgaaaaat tggaatggga aacaaatatt  | 2760 |
|        | gtttataaag aggcaaaaga atctgtagat gctttatttg taaactctca atatgataga  | 2820 |
| [0003] | ttacaagcgg ataccaacat cgcgatgatt catgcccag ataaacgegt tcatagcatt   | 2880 |
|        | cgagaagctt atctgctga gctgtctgig atctccgggtg tcaatgccc tatttttgaa   | 2940 |
|        | gaattagaag ggcgtatfff caetgcattc tccctatag atgcgagaaa tgtcattaaa   | 3000 |
|        | aatggtgatt ttaataatgg cttatcctgc tggaactga aaggcatgt agatgtagaa    | 3060 |
|        | gaacaaaaca accaccgtc ggtccttggt gttccggaat gggaaacaga agtgtcacia   | 3120 |
|        | gaagttcgtg tetgtccggg tegtggctat atccttcgtg teacagcgtc caaggagga   | 3180 |
|        | tatggagaag gttgcgtaac cattcatgag atcgagaaca atacagacga actgaagttt  | 3240 |
|        | agcaactgtg tagaagagga agtataacca aacaacacgg taactgttaa tgattatact  | 3300 |
|        | gcgactcaag aagaatatga gggtaactac acttctcgta atcgaggata tgaccgagcc  | 3360 |
|        | tatgaaagca attcttctgt accagctgat tatgcatcag cctatgaaga aaaagcatat  | 3420 |
|        | acagatggac gaagagacaa tctttgtgaa tctaacagag gatatgggga ttacacacca  | 3480 |
|        | ctaccagctg gctatgtgac aaaagaatta gactacttcc cagaaaccga taaggtatgg  | 3540 |

attgagatcg gagaaacgga aggaacattc atcgtggaca gcgtggaatt acttcttatg 3600  
 gaggaataat atatgcttta aaatgtaagg tgtgcaaata aagaatgatt actgacttgt 3660  
 attgaçagat aaataaggaa atttttatat gaataaaaaa cgggcatcac tçttaaaga 3720  
 atgatgtccg tttttigtat gatttaacga gtgatattta aatgtttttt tgçgaagg 3778

<210> 2

<211> 1155

<212> PRT

<213> 苏云金芽孢杆菌

<400> 2

Met Asp Asn Asn Pro Asn Ile Asn Glu Cys Ile Pro Tyr Asn Cys Leu  
 1 5 10 15

Ser Asn Pro Glu Val Glu Val Leu Gly Gly Glu Arg Ile Glu Thr Gly  
 20 25 30

[0004]

Tyr Thr Pro Ile Asp Ile Ser Leu Ser Leu Thr Gln Phe Leu Leu Ser  
 35 40 45

Glu Phe Val Pro Gly Ala Gly Phe Val Leu Gly Leu Val Asp Ile Ile  
 50 55 60

Trp Gly Ile Phe Gly Pro Ser Gln Trp Asp Ala Phe Leu Val Gln Ile  
 65 70 75 80

Glu Gln Leu Ile Asn Gln Arg Ile Glu Glu Phe Ala Arg Asn Gln Ala  
 85 90 95

Ile Ser Arg Leu Glu Gly Leu Ser Asn Leu Tyr Gln Ile Tyr Ala Glu  
 100 105 110

Ser Phe Arg Glu Trp Glu Ala Asp Pro Thr Asn Pro Ala Leu Arg Glu  
 115 120 125

Glu Met Arg Ile Gln Phe Asn Asp Met Asn Ser Ala Leu Thr Thr Ala  
 130 135 140

Ile Pro Leu Phe Ala Val Gln Asn Tyr Gln Val Pro Leu Leu Ser Val  
 145 150 155 160

Tyr Val Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser Val Leu Arg Asp Val Ser  
 165 170 175

Val Phe Gly Gln Arg Trp Gly Phe Asp Ala Ala Thr Ile Asn Ser Arg  
 180 185 190

Tyr Asn Asp Leu Thr Arg Leu Ile Gly Asn Tyr Thr Asp His Ala Val  
 195 200 205

Arg Trp Tyr Asn Thr Gly Leu Glu Arg Val Trp Gly Pro Asp Ser Arg  
 210 215 220

[0005]

Asp Trp Ile Arg Tyr Asn Gln Phe Arg Arg Glu Leu Thr Leu Thr Val  
 225 230 235 240

Leu Asp Ile Val Ser Leu Phe Pro Asn Tyr Asp Ser Arg Thr Tyr Pro  
 245 250 255

Ile Arg Thr Val Ser Gln Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Asn Pro Val  
 260 265 270

Leu Glu Asn Phe Asp Gly Ser Phe Arg Gly Ser Ala Gln Gly Ile Glu  
 275 280 285

Gly Ser Ile Arg Ser Pro His Leu Met Asp Ile Leu Asn Ser Ile Thr  
 290 295 300

Ile Tyr Thr Asp Ala His Arg Gly Glu Tyr Tyr Trp Ser Gly His Gln  
 305 310 315 320

Ile Met Ala Ser Pro Val Gly Phe Ser Gly Pro Glu Phe Thr Phe Pro  
 325 330 335

Leu Tyr Gly Thr Met Gly Asn Ala Ala Pro Gln Gln Arg Ile Val Ala  
 340 345 350

Gln Leu Gly Gln Gly Val Tyr Arg Thr Leu Ser Ser Thr Leu Tyr Arg  
 355 360 365

Arg Pro Phe Asn Ile Gly Ile Asn Asn Gln Gln Leu Ser Val Leu Asp  
 370 375 380

Gly Thr Glu Phe Ala Tyr Gly Thr Ser Ser Asn Leu Pro Ser Ala Val  
 385 390 395 400

Tyr Arg Lys Ser Gly Thr Val Asp Ser Leu Asp Glu Ile Pro Pro Gln  
 405 410 415

[0006]

Asn Asn Asn Val Pro Pro Arg Gln Gly Phe Ser His Arg Leu Ser His  
 420 425 430

Val Ser Met Phe Arg Ser Gly Phe Ser Asn Ser Ser Val Ser Ile Ile  
 435 440 445

Arg Ala Pro Met Phe Ser Trp Ile His Arg Ser Ala Glu Phe Asn Asn  
 450 455 460

Ile Ile Pro Ser Ser Gln Ile Thr Gln Ile Pro Leu Thr Lys Ser Thr  
 465 470 475 480

Asn Leu Gly Ser Gly Thr Ser Val Val Lys Gly Pro Gly Phe Thr Gly  
 485 490 495

Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr Ser Pro Gly Gln Ile Ser Thr Leu Arg

|   |     |     |     |     |     |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|
|   | 500 |     | 505 |     | 510 |
| Val Asn Ile Thr Ala Pro Leu Ser Gln Arg Tyr Arg Val Arg Ile Arg |     |     |     |     |     |
|   | 515 |     | 520 |     | 525 |
| Tyr Ala Ser Thr Thr Asn Leu Gln Phe His Thr Ser Ile Asp Gly Arg |     |     |     |     |     |
|   | 530 |     | 535 |     | 540 |
| Pro Ile Asn Gln Gly Asn Phe Ser Ala Thr Met Ser Ser Gly Ser Asn |     |     |     |     |     |
|   | 545 |     | 550 |     | 555 |
|   |     |     |     |     | 560 |
| Leu Gln Ser Gly Ser Phe Arg Thr Val Gly Phe Thr Thr Pro Phe Asn |     |     |     |     |     |
|   |     | 565 |     | 570 |     |
|   |     |     |     |     | 575 |
| Phe Ser Asn Gly Ser Ser Val Phe Thr Leu Ser Ala His Val Phe Asn |     |     |     |     |     |
|   | 580 |     | 585 |     | 590 |
| [0007]  |     |     |     |     |     |
| Ser Gly Asn Glu Val Tyr Ile Asp Arg Ile Glu Phe Val Pro Ala Glu |     |     |     |     |     |
|   | 595 |     | 600 |     | 605 |
| Val Thr Phe Glu Ala Glu Tyr Asp Leu Glu Arg Ala Gln Lys Ala Val |     |     |     |     |     |
|   | 610 |     | 615 |     | 620 |
| Asn Glu Leu Phe Thr Ser Ser Asn Gln Ile Gly Leu Lys Thr Asp Val |     |     |     |     |     |
|   | 625 |     | 630 |     | 635 |
|   |     |     |     |     | 640 |
| Thr Asp Tyr His Ile Asp Gln Val Ser Asn Leu Val Glu Cys Leu Ser |     |     |     |     |     |
|   |     | 645 |     | 650 |     |
|   |     |     |     |     | 655 |
| Asp Glu Phe Cys Leu Asp Glu Lys Lys Glu Leu Ser Glu Lys Val Lys |     |     |     |     |     |
|   | 660 |     | 665 |     | 670 |
| His Ala Lys Arg Leu Ser Asp Glu Arg Asn Leu Leu Gln Asp Pro Asn |     |     |     |     |     |
|   | 675 |     | 680 |     | 685 |

Phe Arg Gly Ile Asn Arg Gln Leu Asp Arg Gly Trp Arg Gly Ser Thr  
690 695 700

Asp Ile Thr Ile Gln Gly Gly Asp Asp Val Phe Lys Glu Asn Tyr Val  
705 710 715 720

Thr Leu Leu Gly Thr Phe Asp Glu Cys Tyr Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln  
725 730 735

Lys Ile Asp Glu Ser Lys Leu Lys Ala Tyr Thr Arg Tyr Gln Leu Arg  
740 745 750

Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln Asp Leu Glu Ile Tyr Leu Ile Arg Tyr  
755 760 765

Asn Ala Lys His Glu Thr Val Asn Val Pro Gly Thr Gly Ser Leu Trp  
770 775 780

[0008]

Pro Leu Ser Ala Pro Ser Pro Ile Gly Lys Cys Ala His His Ser His  
785 790 795 800

His Phe Ser Leu Asp Ile Asp Val Gly Cys Thr Asp Leu Asn Glu Asp  
805 810 815

Leu Gly Val Trp Val Ile Phe Lys Ile Lys Thr Gln Asp Gly His Ala  
820 825 830

Arg Leu Gly Asn Leu Glu Phe Leu Glu Glu Lys Pro Leu Val Gly Glu  
835 840 845

Ala Leu Ala Arg Val Lys Arg Ala Glu Lys Lys Trp Arg Asp Lys Arg  
850 855 860

Glu Lys Leu Glu Trp Glu Thr Asn Ile Val Tyr Lys Glu Ala Lys Glu  
865 870 875 880

Ser Val Asp Ala Leu Phe Val Asn Ser Gln Tyr Asp Arg Leu Gln Ala  
 885 890 895

Asp Thr Asn Ile Ala Met Ile His Ala Ala Asp Lys Arg Val His Ser  
 900 905 910

Ile Arg Glu Ala Tyr Leu Pro Glu Leu Ser Val Ile Pro Gly Val Asn  
 915 920 925

Ala Ala Ile Phe Glu Glu Leu Glu Gly Arg Ile Phe Thr Ala Phe Ser  
 930 935 940

Leu Tyr Asp Ala Arg Asn Val Ile Lys Asn Gly Asp Phe Asn Asn Gly  
 945 950 955 960

Leu Ser Cys Trp Asn Val Lys Gly His Val Asp Val Glu Glu Gln Asn  
 965 970 975

[0009]

Asn His Arg Ser Val Leu Val Val Pro Glu Trp Glu Ala Glu Val Ser  
 980 985 990

Gln Glu Val Arg Val Cys Pro Gly Arg Gly Tyr Ile Leu Arg Val Thr  
 995 1000 1005

Ala Tyr Lys Glu Gly Tyr Gly Glu Gly Cys Val Thr Ile His Glu  
 1010 1015 1020

Ile Glu Asn Asn Thr Asp Glu Leu Lys Phe Ser Asn Cys Val Glu  
 1025 1030 1035

Glu Glu Val Tyr Pro Asn Asn Thr Val Thr Cys Asn Asp Tyr Thr  
 1040 1045 1050

Ala Thr Gln Glu Glu Tyr Glu Gly Thr Tyr Thr Ser Arg Asn Arg  
 1055 1060 1065

Gly Tyr Asp Gly Ala Tyr Glu Ser Asn Ser Ser Val Pro Ala Asp  
 1070 1075 1080

Tyr Ala Ser Ala Tyr Glu Glu Lys Ala Tyr Thr Asp Gly Arg Arg  
 1085 1090 1095

Asp Asn Pro Cys Glu Ser Asn Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Thr Pro  
 1100 1105 1110

Leu Pro Ala Gly Tyr Val Thr Lys Glu Leu Glu Tyr Phe Pro Glu  
 1115 1120 1125

Thr Asp Lys Val Trp Ile Glu Ile Gly Glu Thr Glu Gly Thr Phe  
 1130 1135 1140

Ile Val Asp Ser Val Glu Leu Leu Leu Met Glu Glu  
 1145 1150 1155

[0010]

- <210> 3
- <211> 3135
- <212> DNA
- <213> 苏云金芽孢杆菌

<400> 3  
 atggaggaaa ataatacaaaa tcaatgcata cttacaatt gtttaagtaa tcctgaagaa 60  
 gtacttttgg atggagaacg gatatacaact gtaattcat caattgatat ttctctgtca 120  
 ctigttcagt ttcctgtatc taactttgta ccagggggag gatttttagt tggattaata 180  
 gattttgtat ggggaatagt tggccttct caatgggatg catttctagt acaaattgaa 240  
 caattaatta atgaaagaat agctgaattt gctaggaatg ctgetattgc taatttagaa 300  
 ggattaggaa acaatttcaa tatatatgtg gaagcattta aagaatggga agaagatcct 360  
 aataatccag caaccaggac cagagtaatt gatcgcttcc gtatacttga tgggctactt 420  
 gaaaggaca ttccttcggt tcgaatttct ggatttgaag taccctttt atccgtttat 480

|        |  |      |
|--------|--|------|
|        | gctcaagcgg ccaatctgca tctagctata ttaagagatt ctgtaatitt tggagaaaga  | 540  |
|        | tggggattga caacgataaa tgtcaatgaa aactataata gactaattag gcatattgat  | 600  |
|        | gaatatgctg atcactgtgc aaatacgtat aatcggggat taaataatit accgaaatct  | 660  |
|        | acgtatecaag attggataac atataatcga ttacggagag acttaacatt gactgtatta | 720  |
|        | gatatcgccg ctttctttcc aaactatgac aataggagat atccaattca gccagttggt  | 780  |
|        | caactaaca ggaagtta tacggacca ttaattaatt ttaatccaca gttacagtct      | 840  |
|        | gtagetcaat tacctactit taacgttatg gagagcagcg caattagaaa tcttcattta  | 900  |
|        | tttgatata tgaataatct tacaatcttt acggattggt ttagtgttgg acgcaatitt   | 960  |
|        | tattggggag gacatcgagt aatatctagc cttataggag gtgtaacat aacatctcct   | 1020 |
|        | atatatggaa gagagcgaa ccaggagcct ccaagatcct ttacttttaa tggaccgta    | 1080 |
|        | tttaggactt tatcaaatcc tactttacga ttattacagc aaccttgcc agcgcacca    | 1140 |
| [0011] | tttaatttac gtgggttga aggagtagaa tttctacac ctacaaatag ctttaegtat    | 1200 |
|        | cgaggaagag gtacggttga ttcttaact gaattaccgc ctgaggataa tagtgtcca    | 1260 |
|        | cctcggaag gatatagtca tegtattgt catgcaactt ttgtcaaag atctggaaca     | 1320 |
|        | ccttttttaa caactggtgt agtattttct tggacgcatc gtagtgcaac tcttacaat   | 1380 |
|        | acaattgatc cagagagaat taatcaaata ctttagtga aaggatttag agtttgggg    | 1440 |
|        | ggcaectctg tcattacagg accaggattt acaggagggg atatccttcg aagaaatacc  | 1500 |
|        | tttggtgatt ttgtatctct acaagtcaat attaattcac caattacca aagatacgt    | 1560 |
|        | ttaagatttc gttacgttc cagtaggat gcacgagita tagtattaac aggagcggca    | 1620 |
|        | tccacaggag tggaggcca agttagtgt aatatgcctc ttcagaaaac tatggaaata    | 1680 |
|        | ggggagaact taacatctag aacatttaga tataccgatt ttagtaatcc ttttcatit   | 1740 |
|        | agagetaatc cagatataat tggataagt gaacaacetc tatttgggtc aggttetatt   | 1800 |
|        | agtagcggtg aactttatat agataaaatt gaaattatc tagcagatgc aacattgaa    | 1860 |

|        |  |      |
|--------|--|------|
|        | gcagaatctg atttagaaag agcacaaaag geggtgaatg cctgtttac ttcttcaat    | 1920 |
|        | caaatcgggt taaaaaccga tgtgacggat tatcatattg atcaagtatc caatttagtg  | 1980 |
|        | gattgtttat cagatgaatt ttgtctggat gaaaagecag aattgtccga gaaagtcaaa  | 2040 |
|        | catgcgcagc gactcagtga tgagcggaaat ttacttcaag atccaaactt cagagggate | 2100 |
|        | aatagacaac cagaccgtgg ctggagagga agtacagata ttacatcca aggaggagat   | 2160 |
|        | gacgtattca aagagaatta cgtcacacta cgggtaccg ttgatgagtg ctatccaacg   | 2220 |
|        | tatttatatc agaaaataga tgagtcgaaa ttaaaagctt atacccgta tgaattaaga   | 2280 |
|        | gggtatatcg aagatagtea agaactagaa atctatttga tccgttacia tgcaaaacac  | 2340 |
|        | gaaatagtaa atgtgccagg caecgggtcc ttatgcccgc ttcagccca aagtccaate   | 2400 |
|        | ggaaagtgtg gagaaccgaa tcgatgcgcg ccacacctg aatggaatcc tgatctagat   | 2460 |
|        | tgttctgca gagacgggga aaaatgtgca catcattccc atcatttcac cttggatatt   | 2520 |
| [0012] | gatgttgat gtacagactt aatgaggac ttaggtgtat gggatgatatt caagattaag   | 2580 |
|        | acgcaagatg gccatgcaag actagggaaat ctagagttc tcgaagagaa accattatta  | 2640 |
|        | ggggaagcac tagctcgtgt gaaaagagcg gagaagaagt ggagagacia acgagagaaa  | 2700 |
|        | ctgcagttgg aaacaaatat tgtttataaa gaggcaaaag aatctgtaga tgctttattt  | 2760 |
|        | gtaaactctc aatatgatag attacaagtg gatacgaaca tcgcaatgat tcatgcggca  | 2820 |
|        | gataaacgcg ttcatagaat ccgggaagcg talctgccag agttgtctgt gattccaggt  | 2880 |
|        | gtcaatgcgg ccattttcga agaattagag ggacgtattt ttacagcgtc ttccttatat  | 2940 |
|        | gatgcgagaa atgtcattaa aatggcgat ttcaataatg gcttattatg ctggaacgtg   | 3000 |
|        | aaaggatcatg tagatgtaga agagcaaac aaccaccgtt cgtccttgt tatcccagaa   | 3060 |
|        | tgggagcag aagtgtcaca agaggttcgt gtctgtccag gtcgtggcta taccctcgt    | 3120 |
|        | gtcacagcat attaa   | 3135 |

<210> 4

<211> 1044

<212> PRT

<213> 苏云金芽孢杆菌

<400> 4

Met Glu Glu Asn Asn Gln Asn Gln Cys Ile Pro Tyr Asn Cys Leu Ser  
1 5 10 15

Asn Pro Glu Glu Val Leu Leu Asp Gly Glu Arg Ile Ser Thr Gly Asn  
20 25 30

Ser Ser Ile Asp Ile Ser Leu Ser Leu Val Gln Phe Leu Val Ser Asn  
35 40 45

Phe Val Pro Gly Gly Gly Phe Leu Val Gly Leu Ile Asp Phe Val Trp  
50 55 60

Gly Ile Val Gly Pro Ser Gln Trp Asp Ala Phe Leu Val Gln Ile Glu  
65 70 75 80

[0013]

Gln Leu Ile Asn Glu Arg Ile Ala Glu Phe Ala Arg Asn Ala Ala Ile  
85 90 95

Ala Asn Leu Glu Gly Leu Gly Asn Asn Phe Asn Ile Tyr Val Glu Ala  
100 105 110

Phe Lys Glu Trp Glu Glu Asp Pro Asn Asn Pro Ala Thr Arg Thr Arg  
115 120 125

Val Ile Asp Arg Phe Arg Ile Leu Asp Gly Leu Leu Glu Arg Asp Ile  
130 135 140

Pro Ser Phe Arg Ile Ser Gly Phe Glu Val Pro Leu Leu Ser Val Tyr  
145 150 155 160

Ala Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ala Ile Leu Arg Asp Ser Val Ile  
165 170 175

Phe Gly Glu Arg Trp Gly Leu Thr Thr Ile Asn Val Asn Glu Asn Tyr  
 180 185 190

Asn Arg Leu Ile Arg His Ile Asp Glu Tyr Ala Asp His Cys Ala Asn  
 195 200 205

Thr Tyr Asn Arg Gly Leu Asn Asn Leu Pro Lys Ser Thr Tyr Gln Asp  
 210 215 220

Trp Ile Thr Tyr Asn Arg Leu Arg Arg Asp Leu Thr Leu Thr Val Leu  
 225 230 235 240

Asp Ile Ala Ala Phe Phe Pro Asn Tyr Asp Asn Arg Arg Tyr Pro Ile  
 245 250 255

Gln Pro Val Gly Gln Leu Thr Arg Glu Val Tyr Thr Asp Pro Leu Ile  
 260 265 270

[0014]

Asn Phe Asn Pro Gln Leu Gln Ser Val Ala Gln Leu Pro Thr Phe Asn  
 275 280 285

Val Met Glu Ser Ser Ala Ile Arg Asn Pro His Leu Phe Asp Ile Leu  
 290 295 300

Asn Asn Leu Thr Ile Phe Thr Asp Trp Phe Ser Val Gly Arg Asn Phe  
 305 310 315 320

Tyr Trp Gly Gly His Arg Val Ile Ser Ser Leu Ile Gly Gly Gly Asn  
 325 330 335

Ile Thr Ser Pro Ile Tyr Gly Arg Glu Ala Asn Gln Glu Pro Pro Arg  
 340 345 350

Ser Phe Thr Phe Asn Gly Pro Val Phe Arg Thr Leu Ser Asn Pro Thr

|   |     |     |
|---|-----|-----|
| 355   | 360 | 365 |
| Leu Arg Leu Leu Gln Gln Pro Trp Pro Ala Pro Pro Phe Asn Leu Arg |     |     |
| 370   | 375 | 380 |
| Gly Val Glu Gly Val Glu Phe Ser Thr Pro Thr Asn Ser Phe Thr Tyr |     |     |
| 385   | 390 | 395 |
| 400   |     |     |
| Arg Gly Arg Gly Thr Val Asp Ser Leu Thr Glu Leu Pro Pro Glu Asp |     |     |
| 405   | 410 | 415 |
| Asn Ser Val Pro Pro Arg Glu Gly Tyr Ser His Arg Leu Cys His Ala |     |     |
| 420   | 425 | 430 |
| Thr Phe Val Gln Arg Ser Gly Thr Pro Phe Leu Thr Thr Gly Val Val |     |     |
| 435   | 440 | 445 |
| [0015]  |     |     |
| Phe Ser Trp Thr His Arg Ser Ala Thr Leu Thr Asn Thr Ile Asp Pro |     |     |
| 450   | 455 | 460 |
| Glu Arg Ile Asn Gln Ile Pro Leu Val Lys Gly Phe Arg Val Trp Gly |     |     |
| 465   | 470 | 475 |
| 480   |     |     |
| Gly Thr Ser Val Ile Thr Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu |     |     |
| 485   | 490 | 495 |
| Arg Arg Asn Thr Phe Gly Asp Phe Val Ser Leu Gln Val Asn Ile Asn |     |     |
| 500   | 505 | 510 |
| Ser Pro Ile Thr Gln Arg Tyr Arg Leu Arg Phe Arg Tyr Ala Ser Ser |     |     |
| 515   | 520 | 525 |
| Arg Asp Ala Arg Val Ile Val Leu Thr Gly Ala Ala Ser Thr Gly Val |     |     |
| 530   | 535 | 540 |

Gly Gly Gln Val Ser Val Asn Met Pro Leu Gln Lys Thr Met Glu Ile  
545 550 555 560

Gly Glu Asn Leu Thr Ser Arg Thr Phe Arg Tyr Thr Asp Phe Ser Asn  
565 570 575

Pro Phe Ser Phe Arg Ala Asn Pro Asp Ile Ile Gly Ile Ser Glu Gln  
580 585 590

Pro Leu Phe Gly Ala Gly Ser Ile Ser Ser Gly Glu Leu Tyr Ile Asp  
595 600 605

Lys Ile Glu Ile Ile Leu Ala Asp Ala Thr Phe Glu Ala Glu Ser Asp  
610 615 620

Leu Glu Arg Ala Gln Lys Ala Val Asn Ala Leu Phe Thr Ser Ser Asn  
625 630 635 640

[0016]

Gln Ile Gly Leu Lys Thr Asp Val Thr Asp Tyr His Ile Asp Gln Val  
645 650 655

Ser Asn Leu Val Asp Cys Leu Ser Asp Glu Phe Cys Leu Asp Glu Lys  
660 665 670

Arg Glu Leu Ser Glu Lys Val Lys His Ala Gln Arg Leu Ser Asp Glu  
675 680 685

Arg Asn Leu Leu Gln Asp Pro Asn Phe Arg Gly Ile Asn Arg Gln Pro  
690 695 700

Asp Arg Gly Trp Arg Gly Ser Thr Asp Ile Thr Ile Gln Gly Gly Asp  
705 710 715 720

Asp Val Phe Lys Glu Asn Tyr Val Thr Leu Pro Gly Thr Val Asp Glu  
725 730 735

Cys Tyr Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln Lys Ile Asp Glu Ser Lys Leu Lys  
740 745 750

Ala Tyr Thr Arg Tyr Glu Leu Arg Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln Asp  
755 760 765

Leu Glu Ile Tyr Leu Ile Arg Tyr Asn Ala Lys His Glu Ile Val Asn  
770 775 780

Val Pro Gly Thr Gly Ser Leu Trp Pro Leu Ser Ala Gln Ser Pro Ile  
785 790 795 800

Gly Lys Cys Gly Glu Pro Asn Arg Cys Ala Pro His Leu Glu Trp Asn  
805 810 815

Pro Asp Leu Asp Cys Ser Cys Arg Asp Gly Glu Lys Cys Ala His His  
820 825 830

[0017]

Ser His His Phe Thr Leu Asp Ile Asp Val Gly Cys Thr Asp Leu Asn  
835 840 845

Glu Asp Leu Gly Val Trp Val Ile Phe Lys Ile Lys Thr Gln Asp Gly  
850 855 860

His Ala Arg Leu Gly Asn Leu Glu Phe Leu Glu Glu Lys Pro Leu Leu  
865 870 875 880

Gly Glu Ala Leu Ala Arg Val Lys Arg Ala Glu Lys Lys Trp Arg Asp  
885 890 895

Lys Arg Glu Lys Leu Gln Leu Glu Thr Asn Ile Val Tyr Lys Glu Ala  
900 905 910

Lys Glu Ser Val Asp Ala Leu Phe Val Asn Ser Gln Tyr Asp Arg Leu  
915 920 925

Gln Val Asp Thr Asn Ile Ala Met Ile His Ala Ala Asp Lys Arg Val  
 930 935 940

His Arg Ile Arg Glu Ala Tyr Leu Pro Glu Leu Ser Val Ile Pro Gly  
 945 950 955 960

Val Asn Ala Ala Ile Phe Glu Glu Leu Glu Gly Arg Ile Phe Thr Ala  
 965 970 975

Tyr Ser Leu Tyr Asp Ala Arg Asn Val Ile Lys Asn Gly Asp Phe Asn  
 980 985 990

Asn Gly Leu Leu Cys Trp Asn Val Lys Gly His Val Asp Val Glu Glu  
 995 1000 1005

[0018] Gln Asn Asn His Arg Ser Val Leu Val Ile Pro Glu Trp Glu Ala  
 1010 1015 1020

Glu Val Ser Gln Glu Val Arg Val Cys Pro Gly Arg Gly Tyr Ile  
 1025 1030 1035

Leu Arg Val Thr Ala Tyr  
 1040

<210> 5

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> ER停留多肽

<400> 5

Lys Asp Glu Leu  
 1

<210> 6  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> ER停留多肽

<400> 6

Ser Glu Lys Asp Glu Leu  
 1 5

<210> 7  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> ER停留多肽

[0019] <400> 7

His Asp Glu Leu  
 1

<210> 8  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> ER停留多肽

<400> 8

His Asp Glu Phe  
 1

<210> 9  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> 苏云金芽孢杆菌

<400> 9

Ser Thr Leu Arg Val Asn  
1 5

<210> 10

<211> 8

<212> PRT

<213> 苏云金芽孢杆菌

<400> 10

Val Phe Thr Leu Ser Ala His Val  
1 5

[0020]

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

<213> 苏云金芽孢杆菌

<400> 11

Gly Gln Ile Ser Thr Leu Arg Val Asn Ile Thr Ala  
1 5 10

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> 苏云金芽孢杆菌

<400> 12

Val Phe Thr Leu Ser Ala His Val Phe Asn  
1 5 10