



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104798802 B

(45)授权公告日 2017.03.22

(21)申请号 201510097004.0

(22)申请日 2015.03.04

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104798802 A

(43)申请公布日 2015.07.29

(73)专利权人 北京大北农科技集团股份有限公司

地址 100080 北京市海淀区中关村大街27号14层

专利权人 北京大北农生物技术有限公司

(72)发明人 韩超 王利君 于彩虹 岳健婷

(51)Int.Cl.

A01N 47/44(2006.01)

A01P 7/04(2006.01)

C12N 15/84(2006.01)

C12N 15/32(2006.01)

A01H 5/00(2006.01)

A01H 1/02(2006.01)

A01H 4/00(2006.01)

A01G 13/00(2006.01)

A01G 1/00(2006.01)

(56)对比文件

CN 1818067 A,2006.08.16,说明书第2-3页.

CN 1256712 A,2000.06.14,说明书第3、5、7页.

CN 1256712 A,2000.06.14,说明书第3、5、7页.

CN 103039494 A,2013.04.17,权利要求3-17、序列表第1-10页.

US 20120324606 A1,2012.12.20,第1-5页.

审查员 董玉轩

权利要求书4页 说明书17页

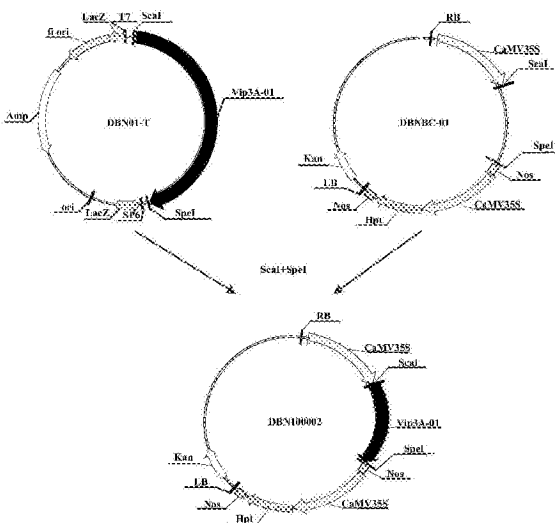
序列表16页 附图2页

(54)发明名称

杀虫蛋白的用途

(57)摘要

本发明涉及一种杀虫蛋白的用途,所述控制二化螟害虫的方法包括:将二化螟害虫至少与Vip3A蛋白接触。本发明通过植物体内产生能够杀死二化螟的Vip3A蛋白来控制二化螟害虫;与现有技术使用的农业防治方法、化学防治方法和物理防治方法相比,本发明对植物进行全生育期、全植株的保护以防治二化螟害虫的侵害,且无污染、无残留,效果稳定、彻底,简单、方便、经济。



1. 一种控制二化螟害虫的方法,其特征在于,包括将二化螟害虫至少与Vip3A蛋白接触,所述Vip3A蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列。

2. 根据权利要求1所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述Vip3A蛋白存在于至少产生所述Vip3A蛋白的宿主细胞中,所述二化螟害虫通过摄食所述宿主细胞至少与所述Vip3A蛋白接触。

3. 根据权利要求2所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述Vip3A蛋白存在于至少产生所述Vip3A蛋白的细菌或转基因植物中,所述二化螟害虫通过摄食所述细菌或所述转基因植物的组织至少与所述Vip3A蛋白接触,接触后所述二化螟害虫生长受到抑制和/或导致死亡,以实现二化螟危害植物的控制。

4. 根据权利要求3所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述转基因植物可以处于任意生育期。

5. 根据权利要求3所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述转基因植物的组织为根、叶片、茎秆、果实、雄穗、雌穗、花药或花丝。

6. 根据权利要求3所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述对二化螟危害植物的控制不因种植地点和/或种植时间的改变而改变。

7. 根据权利要求3至6任一项所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述植物来自水稻、甘蔗、茭白、玉米、高粱、大豆、油菜、麦类、粟或稗。

8. 根据权利要求7所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述接触步骤之前的步骤为种植含有编码所述Vip3A蛋白的多核苷酸的植物。

9. 根据权利要求8所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述Vip3A蛋白的核苷酸序列如SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4所示的核苷酸序列。

10. 根据权利要求9所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述植物还包括至少一种不同于编码所述Vip3A蛋白的核苷酸的第二种核苷酸。

11. 根据权利要求10所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述第二种核苷酸编码Cry类杀虫蛋白质、Vip类杀虫蛋白质、蛋白酶抑制剂、凝集素、 α -淀粉酶或过氧化物酶。

12. 根据权利要求11所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述第二种核苷酸编码Cry1Ab蛋白。

13. 根据权利要求12所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述Cry1Ab蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列。

14. 根据权利要求13所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述第二种核苷酸如SEQ ID NO:6所示的核苷酸序列。

15. 根据权利要求10所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述第二种核苷酸为抑制目标昆虫害虫中重要基因的dsRNA。

16. 根据权利要求8所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述植物还包括至少一种不同于编码所述Vip3A蛋白的核苷酸的第二种核苷酸。

17. 根据权利要求16所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述第二种核苷酸编码Cry类杀虫蛋白质、Vip类杀虫蛋白质、蛋白酶抑制剂、凝集素、 α -淀粉酶或过氧化物酶。

18. 根据权利要求17所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述第二种核苷酸编码Cry1Ab蛋白。

19. 根据权利要求18所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述Cry1Ab蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列。

20. 根据权利要求19所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述第二种核苷酸如SEQ ID NO:6所示的核苷酸序列。

21. 根据权利要求16所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述第二种核苷酸为抑制目标昆虫害虫中重要基因的dsRNA。

22. 根据权利要求7所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述植物还包括至少一种不同于编码所述Vip3A蛋白的核苷酸的第二种核苷酸。

23. 根据权利要求22所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述第二种核苷酸编码Cry类杀虫蛋白质、Vip类杀虫蛋白质、蛋白酶抑制剂、凝集素、 α -淀粉酶或过氧化物酶。

24. 根据权利要求23所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述第二种核苷酸编码Cry1Ab蛋白。

25. 根据权利要求24所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述Cry1Ab蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列。

26. 根据权利要求25所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述第二种核苷酸如SEQ ID NO:6所示的核苷酸序列。

27. 根据权利要求22所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述第二种核苷酸为抑制目标昆虫害虫中重要基因的dsRNA。

28. 根据权利要求3至6任一项所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述植物还包括至少一种不同于编码所述Vip3A蛋白的核苷酸的第二种核苷酸。

29. 根据权利要求28所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述第二种核苷酸编码Cry类杀虫蛋白质、Vip类杀虫蛋白质、蛋白酶抑制剂、凝集素、 α -淀粉酶或过氧化物酶。

30. 根据权利要求29所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述第二种核苷酸编码Cry1Ab蛋白。

31. 根据权利要求30所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述Cry1Ab蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列。

32. 根据权利要求31所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述第二种核苷酸如SEQ ID NO:6所示的核苷酸序列。

33. 根据权利要求28所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述第二种核苷酸为抑制目标昆虫害虫中重要基因的dsRNA。

34. 根据权利要求7所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述Vip3A蛋白的核苷酸序列如SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4所示的核苷酸序列。

35. 根据权利要求34所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述植物还包括至少一种不同于编码所述Vip3A蛋白的核苷酸的第二种核苷酸。

36. 根据权利要求35所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述第二种核苷酸编码Cry类杀虫蛋白质、Vip类杀虫蛋白质、蛋白酶抑制剂、凝集素、 α -淀粉酶或过氧化物酶。

37. 根据权利要求36所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述第二种核苷酸编码Cry1Ab蛋白。

38. 根据权利要求37所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述Cry1Ab蛋白的氨

基酸序列如SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列。

39. 根据权利要求38所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述第二种核苷酸如SEQ ID NO:6所示的核苷酸序列。

40. 根据权利要求35所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述第二种核苷酸为抑制目标昆虫害虫中重要基因的dsRNA。

41. 根据权利要求3至6任一项所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述Vip3A蛋白的核苷酸序列如SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4所示的核苷酸序列。

42. 根据权利要求41所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述植物还包括至少一种不同于编码所述Vip3A蛋白的核苷酸的第二种核苷酸。

43. 根据权利要求42所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述第二种核苷酸编码Cry类杀虫蛋白质、Vip类杀虫蛋白质、蛋白酶抑制剂、凝集素、 α -淀粉酶或过氧化物酶。

44. 根据权利要求43所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述第二种核苷酸编码Cry1Ab蛋白。

45. 根据权利要求44所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述Cry1Ab蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列。

46. 根据权利要求45所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述第二种核苷酸如SEQ ID NO:6所示的核苷酸序列。

47. 根据权利要求42所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述第二种核苷酸为抑制目标昆虫害虫中重要基因的dsRNA。

48. 根据权利要求3至6任一项所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述接触步骤之前的步骤为种植含有编码所述Vip3A蛋白的多核苷酸的植物。

49. 根据权利要求48所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述Vip3A蛋白的核苷酸序列如SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4所示的核苷酸序列。

50. 根据权利要求49所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述植物还包括至少一种不同于编码所述Vip3A蛋白的核苷酸的第二种核苷酸。

51. 根据权利要求50所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述第二种核苷酸编码Cry类杀虫蛋白质、Vip类杀虫蛋白质、蛋白酶抑制剂、凝集素、 α -淀粉酶或过氧化物酶。

52. 根据权利要求51所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述第二种核苷酸编码Cry1Ab蛋白。

53. 根据权利要求52所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述Cry1Ab蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列。

54. 根据权利要求53所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述第二种核苷酸如SEQ ID NO:6所示的核苷酸序列。

55. 根据权利要求50所述的控制二化螟害虫的方法,其特征在于,所述第二种核苷酸为抑制目标昆虫害虫中重要基因的dsRNA。

56. 一种Vip3A蛋白质控制二化螟害虫的用途,其中,所述Vip3A蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列。

57. 一种产生控制二化螟害虫的植物的方法,其特征在于,包括向所述植物的基因组中引入编码Vip3A蛋白的多核苷酸序列,所述Vip3A蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:1或SEQ

ID NO:3所示的氨基酸序列。

58. 一种产生控制二化螟害虫的植物繁殖体的方法,其特征在于,包括将由权利要求57所述方法获得的第一植株与第二植株杂交,和/或取下由权利要求57所述方法获得的植株上具有繁殖能力的组织进行培养,从而产生含有编码Vip3A蛋白的多核苷酸序列的植物繁殖体。

59. 一种培养控制二化螟害虫的植物的方法,其特征在于,包括:

种植至少一个植物繁殖体,所述植物繁殖体的基因组中包括编码Vip3A蛋白的多核苷酸序列,所述Vip3A蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列;

使所述植物繁殖体长成植株;

使所述植株在人工接种二化螟害虫和/或二化螟害虫自然发生危害的条件下生长,收获与其他不具有编码Vip3A蛋白的多核苷酸序列的植株相比具有减弱的植物损伤和/或具有增加的植物产量的植株。

杀虫蛋白的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种杀虫蛋白的用途,特别是涉及一种Vip3A蛋白质通过在植物中表达来控制二化螟为害植物的用途。

背景技术

[0002] 二化螟*Chilo suppressalis*属鳞翅目,螟蛾科,在我国南北稻区广泛分布的常发性害虫之一。在分蘖期受害造成枯鞘、枯心苗,在穗期受害造成虫伤株和白穗,一般年份减产3%-5%,严重时减产在3成以上,给当前的水稻生产造成严重威胁。

[0003] 水稻是中国重要的粮食作物,随着全球温室效应的加强,近两年温度不断上升,虫害发生种类及数量都有所提高。每年因二化螟造成的粮食损失巨大,更甚者影响到当地人口的生存状况。为了防治二化螟,人们通常采用的主要防治方法有:农业防治、化学防治和物理防治。

[0004] 农业防治是把整个农田生态系统多因素的综合协调管理,调控作物、害虫、环境因素、创造一个有利于作物生长而不利于二化螟发生的农田生态环境。可以采取调整水稻播种期、处理稻茬、灌水灭虫、拔出白穗等措施,以达到消灭一定数量害虫的目的。因农业防治必须服从作物布局和增产的要求,应用有一定的局限性,不能作为应急措施,在二化螟爆发时就显得无能为力。

[0005] 化学防治即农药防治,是利用化学杀虫剂来杀灭害虫,是二化螟综合治理的重要组成部分,它具有快速、方便、简便和高经济效益的特点,特别是二化螟大发生的情况下,是必不可少的应急措施。二化螟作为蛀茎害虫,对其的防治时期把握非常重要,用药最佳时期是卵孵盛期至幼虫蛀茎之前,否则高龄幼虫蛀入茎秆之后,将很难达到防治的目的。目前化学防治方法主要是药液喷雾。但化学防治也有其局限性,如使用不当往往会导致农作物发生药害、害虫产生抗药性,以及减少天敌、污染环境,使农田生态系统遭到破坏和农药残留对人、畜的安全构成威胁等不良后果。

[0006] 物理防治主要根据害虫对环境条件中各种物理因素的反应,利用各种物理因素如光、电、色、温湿度等以及机械设备进行诱杀、辐射不育等方法来防治害虫。目前应用最广泛的是频振式杀虫灯诱杀,它利用害虫成虫的趋光性,近距离用光,远距离用波,引诱害虫靠近,对二化螟成虫的防治具有一定的效果;但是频振式杀虫灯需要每天及时清理高压电网上的污垢,否则会影响杀虫效果;并且在雷雨天不能开灯,在操作上还有电击伤人的危险;此外安装灯的一次性投入较大。

[0007] 为了解决农业防治、化学防治和物理防治在实际应用中的局限性,科学家们经过研究发现将来自于苏云金芽孢杆菌的编码杀虫蛋白的抗虫基因转入植物中,可获得一些抗虫转基因植物以防治植物虫害。Vip3A杀虫蛋白是众多杀虫蛋白中的一种,是由蜡状芽孢杆菌产生的特异性蛋白质。

[0008] Vip3A蛋白通过激发凋亡类型的细胞程序性死亡对敏感性昆虫具有毒杀效应。Vip3A蛋白在昆虫肠道内被水解为4种主要蛋白产物,其中只有一种蛋白水解产物(33KD)为

Vip3A蛋白的毒性核心结构。Vip3A蛋白结合敏感昆虫的中肠上皮细胞,启动细胞程序性死亡,造成中肠上皮细胞的溶解导致昆虫死亡。对非敏感昆虫不产生任何病症,不会导致中肠上皮细胞的凋亡和溶解。

[0009] 已证明转Vip3A基因的植株可以抵抗小地老虎、草地贪夜蛾、大螟、水稻夜蛾等鳞翅目Lepidoptera害虫的侵害,然而,至今尚无关于通过产生表达Vip3A蛋白的转基因植株来控制二化螟对植物危害的报道。

发明内容

[0010] 本发明的目的是提供一种杀虫蛋白的用途,首次提供了通过产生表达Vip3A蛋白的转基因植株来控制二化螟对植物危害的方法,且有效克服现有技术农业防治、化学防治和物理防治等技术缺陷。

[0011] 为实现上述目的,本发明提供了一种控制二化螟害虫的方法,包括将二化螟害虫至少与Vip3A蛋白接触。

[0012] 进一步地,所述Vip3A蛋白存在于至少产生所述Vip3A蛋白的宿主细胞中,所述二化螟害虫通过摄食所述宿主细胞至少与所述Vip3A蛋白接触。

[0013] 更进一步地,所述Vip3A蛋白存在于至少产生所述Vip3A蛋白的细菌或转基因植物中,所述二化螟害虫通过摄食所述细菌或所述转基因植物的组织至少与所述Vip3A蛋白接触,接触后所述二化螟害虫生长受到抑制和/或导致死亡,以实现二化螟危害植物的控制。

[0014] 所述转基因植物可以处于任意生育期。

[0015] 所述转基因植物的组织为根、叶片、茎秆、果实、雄穗、雌穗、花药或花丝。

[0016] 所述对二化螟危害植物的控制不因种植地点和/或种植时间的改变而改变。

[0017] 所述植物来自水稻、甘蔗、茭白、玉米、高粱、大豆、油菜、麦类、粟或稗。

[0018] 所述接触步骤之前的步骤为种植含有编码所述Vip3A蛋白的多核苷酸的植物。

[0019] 优选地,所述Vip3A蛋白的氨基酸序列具有SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列。所述Vip3A蛋白的核苷酸序列具有SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4所示的核苷酸序列。

[0020] 在上述技术方案的基础上,所述植物还可以包括至少一种不同于编码所述Vip3A蛋白的核苷酸的第二种核苷酸。

[0021] 进一步地,所述第二种核苷酸编码Cry类杀虫蛋白质、Vip类杀虫蛋白质、蛋白酶抑制剂、凝集素、 α -淀粉酶或过氧化物酶。

[0022] 优选地,所述第二种核苷酸编码Cry1Ab蛋白。

[0023] 更进一步地,所述Cry1Ab蛋白的氨基酸序列具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列,所述第二种核苷酸具有SEQ ID NO:6所示的核苷酸序列。

[0024] 可选择地,所述第二种核苷酸为抑制目标昆虫害虫中重要基因的dsRNA。

[0025] 为实现上述目的,本发明还提供了一种Vip3A蛋白质控制二化螟害虫的用途。

[0026] 为实现上述目的,本发明还提供了一种产生控制二化螟害虫的植物的方法,包括向所述植物的基因组中引入编码Vip3A蛋白的多核苷酸序列。

[0027] 为实现上述目的,本发明还提供了一种产生控制二化螟害虫的植物繁殖体的方

法,包括将由所述方法获得的第一植株与第二植株杂交,和/或取下由权利要求18所述方法获得的植株上具有繁殖能力的组织进行培养,从而产生含有编码Vip3A蛋白的多核苷酸序列的植物繁殖体。

[0028] 为实现上述目的,本发明还提供了一种培养控制二化螟害虫的植物的方法,包括:

[0029] 种植至少一个植物繁殖体,所述植物繁殖体的基因组中包括编码Vip3A蛋白的多核苷酸序列;

[0030] 使所述植物繁殖体长成植株;

[0031] 使所述植株在人工接种二化螟害虫和/或二化螟害虫自然发生危害的条件下生长,收获与其他不具有编码Vip3A蛋白的多核苷酸序列的植株相比具有减弱的植物损伤和/或具有增加的植物产量的植株。

[0032] 本发明中所述的“植物繁殖体”包括但不限于植物有性繁殖体和植物无性繁殖体。所述植物有性繁殖体包括但不限于植物种子;所述植物无性繁殖体是指植物体的营养器官或某种特殊组织,其可以在离体条件下产生新植株;所述营养器官或某种特殊组织包括但不限于根、茎和叶,例如:以根为无性繁殖体的植物包括草莓和甘薯等;以茎为无性繁殖体的植物包括甘蔗和马铃薯(块茎)等;以叶为无性繁殖体的植物包括芦荟和秋海棠等。

[0033] 本发明中所述的“接触”,是指昆虫和/或害虫触碰、停留和/或摄食植物、植物器官、植物组织或植物细胞,所述植物、植物器官、植物组织或植物细胞既可以是其体内表达杀虫蛋白,还可以是所述植物、植物器官、植物组织或植物细胞的表面具有杀虫蛋白和/或具有产生杀虫蛋白的微生物。

[0034] 本发明术语“控制”和/或“防治”是指二化螟害虫至少与Vip3A蛋白接触,接触后二化螟害虫生长受到抑制和/或导致死亡。进一步地,二化螟害虫通过摄食植物组织至少与Vip3A蛋白接触,接触后全部或部分二化螟害虫生长受到抑制和/或导致死亡。抑制是指亚致死,即尚未致死但能引起生长发育、行为、生理、生化和组织等方面的某种效应,如生长发育缓慢和/或停止。同时,植物在形态上应是正常的,且可在常规方法下培养以用于产物的消耗和/或生成。此外,含有编码Vip3A蛋白的多核苷酸序列的控制二化螟害虫的植物和/或植物繁殖体,在人工接种二化螟害虫和/或二化螟害虫自然发生危害的条件下,与非转基因的野生型植株相比具有减弱的植物损伤,具体表现包括但不限于改善的茎秆抗性、和/或提高的籽粒重量、和/或增产等。Vip3A蛋白对二化螟的“控制”和/或“防治”作用是可以独立存在的,不因其它可“控制”和/或“防治”二化螟害虫的物质的存在而减弱和/或消失。具体地,转基因植物(含有编码Vip3A蛋白的多核苷酸序列)的任何组织同时和/或不同步地,存在和/或产生,Vip3A蛋白和/或可控制二化螟害虫的另一种物质,则所述另一种物质的存在既不影响Vip3A蛋白对二化螟的“控制”和/或“防治”作用,也不能导致所述“控制”和/或“防治”作用完全和/或部分由所述另一种物质实现,而与Vip3A蛋白无关。通常情况下,在大田,二化螟害虫摄食植物组织的过程短暂且很难用肉眼观察到,因此,在人工接种二化螟害虫和/或二化螟害虫自然发生危害的条件下,如转基因植物(含有编码Vip3A蛋白的多核苷酸序列)的任何组织存在死亡的二化螟害虫、和/或在其上停留生长受到抑制的二化螟害虫、和/或与非转基因的野生型植株相比具有减弱的植物损伤,即为实现了本发明的方法和/或用途,即通过二化螟害虫至少与Vip3A蛋白接触以实现控制二化螟害虫的方法和/或用途。

[0035] 在本发明中,Vip3A蛋白在一种转基因植物中的表达可以伴随着一个或多个Cry类

杀虫蛋白质和/或Vip类杀虫蛋白质的表达。这种超过一种的杀虫毒素在同一株转基因植物中共同表达可以通过遗传工程使植物包含并表达所需的基因来实现。另外,一种植物(第1亲本)可以通过遗传工程操作表达Vip3A蛋白质,第二种植物(第2亲本)可以通过遗传工程操作表达Cry类杀虫蛋白质和/或Vip类杀虫蛋白质。通过第1亲本和第2亲本杂交获得表达引入第1亲本和第2亲本的所有基因的后代植物。

[0036] RNA干扰(RNA interference, RNAi)是指在进化过程中高度保守的、由双链RNA(double-stranded RNA, dsRNA)诱发的、同源mRNA高效特异性降解的现象。因此在本发明中可以使用RNAi技术特异性剔除或关闭目标昆虫害虫中特定基因的表达。

[0037] 在分类系统上,一般主要根据成虫翅的脉序、连锁方式和触角的类型等形态特征,将鳞翅目分为亚目、总科、科等,而螟蛾科是鳞翅目中种类最多的科之一,全世界已发现1万种以上,仅中国记录就有几千条。大部分螟蛾科昆虫是农作物的害虫,多数以蛀茎形式为害,如水稻螟和高粱条螟。尽管二化螟与水稻螟、高粱条螟等同属于鳞翅目螟蛾科,除了在分类标准上存在相似性,在其它形态结构上则存在极大差异;就好比植物中的草莓与苹果一样(同属于蔷薇目蔷薇科),它们都有花两性,辐射对称,花瓣5片等特征,但是其果实以及植株形态却是千差万别。而二化螟不管是从幼虫形态还是成虫形态上来看,都具有其独特的特征。

[0038] 同属螟蛾科的昆虫不仅在形态特征上存在较大差异,同时在取食习性上,也存在差异。例如同为螟蛾科的三化螟仅为害水稻,是一种单食性害虫。而二化螟除了为害水稻外,还为害茭白、甘蔗等作物。取食习性的不同,也暗示着体内消化系统所产生的酶和受体蛋白不同。而消化道中产生的酶是Bt基因起作用的关键点,只有能够与特异性Bt基因相结合的酶或受体蛋白,才有可能使得某个Bt基因对该害虫具有抗虫效果。越来越多的研究表明,同目不同科、甚至同科不同种的昆虫对同种Bt蛋白的敏感性表现不同。例如Vip3A基因对螟蛾科的亚洲玉米螟*Ostrinia furnacalis*表现出了抗虫活性,但是对于同属螟蛾科的印度谷螟*Plodia interpunctella*以及欧洲玉米螟*Ostrinia nubilalis*却没有抗虫效果。上述三种害虫均属于鳞翅目螟蛾科,但同种Bt蛋白对三种螟蛾科害虫表现出不同的抗性效果。尤其是欧洲玉米螟和亚洲玉米螟在分类上甚至同属于螟蛾科*Ostrinia*属(同目同科同属),但是其对同种Bt蛋白的反应却是截然不同的,更加充分说明了Bt蛋白与昆虫体内酶和受体的相互作用方式是复杂且难以预料的。

[0039] 本发明中所述的植物、植物组织或植物细胞的基因组,是指植物、植物组织或植物细胞内的任何遗传物质,且包括细胞核和质体和线粒体基因组。

[0040] 本发明中所述的多核苷酸和/或核苷酸形成完整“基因”,在所需宿主细胞中编码蛋白质或多肽。本领域技术人员很容易认识到,可以将本发明的多核苷酸和/或核苷酸置于目的宿主中的调控序列控制下。

[0041] 本领域技术人员所熟知的,DNA典型的以双链形式存在。在这种排列中,一条链与另一条链互补,反之亦然。由于DNA在植物中复制产生了DNA的其它互补链。这样,本发明包括对序列表中示例的多核苷酸及其互补链的使用。本领域常使用的“编码链”指与反义链结合的链。为了在体内表达蛋白质,典型将DNA的一条链转录为一条mRNA的互补链,它作为模板翻译出蛋白质。mRNA实际上是从DNA的“反义”链转录的。“有义”或“编码”链有一系列密码子(密码子是三个核苷酸,一次读三个可以产生特定氨基酸),其可作为开放阅读框(ORF)阅

读来形成目的蛋白质或肽。本发明还包括与示例的DNA有相当功能的RNA。

[0042] 本发明中核酸分子或其片段在严格条件下与本发明Vip3A基因杂交。任何常规的核酸杂交或扩增方法都可以用于鉴定本发明Vip3A基因的存在。核酸分子或其片段在一定情况下能够与其他核酸分子进行特异性杂交。本发明中,如果两个核酸分子能形成反平行的双链核酸结构,就可以说这两个核酸分子彼此间能够进行特异性杂交。如果两个核酸分子显示出完全的互补性,则称其中一个核酸分子是另一个核酸分子的“互补物”。本发明中,当一个核酸分子的每一个核苷酸都与另一个核酸分子的对应核苷酸互补时,则称这两个核酸分子显示出“完全互补性”。如果两个核酸分子能够以足够的稳定性相互杂交从而使它们在至少常规的“低度严格”条件下退火且彼此结合,则称这两个核酸分子为“最低程度互补”。类似地,如果两个核酸分子能够以足够的稳定性相互杂交从而使它们在常规的“高度严格”条件下退火且彼此结合,则称这两个核酸分子具有“互补性”。从完全互补性中偏离是可以允许的,只要这种偏离不完全阻止两个分子形成双链结构。为了使一个核酸分子能够作为引物或探针,仅需保证其在序列上具有充分的互补性,以使得在所采用的特定溶剂和盐浓度下能形成稳定的双链结构。

[0043] 本发明中,基本同源的序列是一段核酸分子,该核酸分子在高度严格条件下能够和相匹配的另一段核酸分子的互补链发生特异性杂交。促进DNA杂交的适合的严格条件,例如,大约在45°C条件下用 $6.0 \times$ 氯化钠/柠檬酸钠(SSC)处理,然后在50°C条件下用 $2.0 \times$ SSC洗涤,这些条件对本领域技术人员是公知的。例如,在洗涤步骤中的盐浓度可以选自低度严格条件的约 $2.0 \times$ SSC、50°C到高度严格条件的约 $0.2 \times$ SSC、50°C。此外,洗涤步骤中的温度条件可以从低度严格条件的室温约22°C,升高到高度严格条件的约65°C。温度条件和盐浓度可以都发生改变,也可以其中一个保持不变而另一个变量发生改变。优选地,本发明所述严格条件可为在 $6 \times$ SSC、0.5%SDS溶液中,在65°C下与SEQ ID NO:2发生特异性杂交,然后用 $2 \times$ SSC、0.1%SDS和 $1 \times$ SSC、0.1%SDS各洗膜1次。

[0044] 因此,具有抗虫活性并在严格条件下与本发明SEQ ID NO:2杂交的序列包括在本发明中。这些序列与本发明序列至少大约40%-50%同源,大约60%、65%或70%同源,甚至至少大约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同源性。

[0045] 本发明中所述的基因和蛋白质不但包括特定的示例序列,还包括保存了所述特定示例的蛋白质的杀虫活性特征的部分和/片段(包括与全长蛋白质相比在内和/或末端缺失)、变体、突变体、取代物(有替代氨基酸的蛋白质)、嵌合体和融合蛋白。所述“变体”或“变异”是指编码同一蛋白或编码有杀虫活性的等价蛋白的核苷酸序列。所述“等价蛋白”是指与权利要求的蛋白具有相同或基本相同的抗二化螟害虫的生物活性的蛋白。

[0046] 本发明中所述的DNA分子或蛋白序列的“片段”或“截短”是指涉及的原始DNA或蛋白序列(核苷酸或氨基酸)的一部分或其人工改造形式(例如适合植物表达的序列),前述序列的长度可存在变化,但长度足以确保(编码)蛋白质为昆虫毒素。

[0047] 使用标准技术可以修饰基因和容易的构建基因变异体。例如,本领域熟知制造点突变的技术。又例如美国专利号5605793描述了在随机断裂后使用DNA重装配产生其它分子多样性的方法。可以使用商业化核酸内切酶制造全长基因的片段,并且可以按照标准程序使用核酸外切酶。例如,可以使用酶诸如Ba131或定点诱变从这些基因的末端系统地切除核

苷酸。还可以使用多种限制性内切酶获取编码活性片段的基因。可以使用蛋白酶直接获得这些毒素的活性片段。

[0048] 本发明可以从B.t.分离物和/或DNA文库衍生出等价蛋白和/或编码这些等价蛋白的基因。有多种方法获取本发明的杀虫蛋白。例如,可以使用本发明公开和要求保护的杀虫蛋白的抗体从蛋白质混合物鉴定和分离其它蛋白。特别地,抗体可能是由蛋白最恒定和与其它B.t.蛋白最不同的蛋白部分引起的。然后可以通过免疫沉淀、酶联免疫吸附测定(ELISA)或western印迹方法使用这些抗体专一地鉴定有特征活性的等价蛋白。可使用本领域标准程序容易的制备本发明中公开的蛋白或等价蛋白或这类蛋白的片段的抗体。然后可以从微生物中获得编码这些蛋白的基因。

[0049] 由于遗传密码子的冗余性,多种不同的DNA序列可以编码相同的氨基酸序列。产生这些编码相同或基本相同的蛋白的可替代DNA序列正在本领域技术人员的技术水平内。这些不同的DNA序列包括在本发明的范围内。所述“基本上相同的”序列是指有氨基酸取代、缺失、添加或插入但实质上不影响杀虫活性的序列,亦包括保留杀虫活性的片段。

[0050] 本发明中氨基酸序列的取代、缺失或添加是本领域的常规技术,优选这种氨基酸变化为:小的特性改变,即不显著影响蛋白的折叠和/或活性的保守氨基酸取代;小的缺失,通常约1-30个氨基酸的缺失;小的氨基或羧基端延伸,例如氨基端延伸一个甲硫氨酸残基;小的连接肽,例如约20-25个残基长。

[0051] 保守取代的实例是在下列氨基酸组内发生的取代:碱性氨基酸(如精氨酸、赖氨酸和组氨酸)、酸性氨基酸(如谷氨酸和天冬氨酸)、极性氨基酸(如谷氨酰胺、天冬酰胺)、疏水性氨基酸(如亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸)、芳香氨基酸(如苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸),以及小分子氨基酸(如甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸和甲硫氨酸)。通常不改变特定活性的那些氨基酸取代在本领域内是众所周知的,并且已由,例如,N.Neurath和R.L.Hill在1979年纽约学术出版社(Academic Press)出版的《Protein》中进行了描述。最常见的互换有Ala/Ser,Val/Ile,Asp/Glu,Thu/Ser,Ala/Thr,Ser/Asn,Ala/Val,Ser/Gly,Tyr/Phe,Ala/Pro,Lys/Arg,Asp/Asn,Leu/Ile,Leu/Val,Ala/Glu和Asp/Gly,以及它们相反的互换。

[0052] 对于本领域的技术人员而言显而易见地,这种取代可以在对分子功能起重要作用的区域之外发生,而且仍产生活性多肽。对于由本发明的多肽,其活性必需的并因此选择不被取代的氨基酸残基,可以根据本领域已知的方法,如定点诱变或丙氨酸扫描诱变进行鉴定(如参见,Cunningham和Wells,1989,Science 244:1081-1085)。后一技术是在分子中每一个带正电荷的残基处引入突变,检测所得突变分子的抗虫活性,从而确定对该分子活性而言重要的氨基酸残基。底物-酶相互作用位点也可以通过其三维结构的分析来测定,这种三维结构可由核磁共振分析、结晶学或光亲和标记等技术测定(参见,如de Vos等,1992,Science 255:306-312;Smith等,1992,J.Mol.Biol 224:899-904;Wlodaver等,1992,FEBS Letters 309:59-64)。

[0053] 在本发明中,Vip3A蛋白包括但不限于序列1,与序列1所示的氨基酸序列具有一定同源性的氨基酸序列也包括在本发明中。这些序列与本发明序列类似性/相同性典型的大于78%,优选的大于85%,更优选的大于90%,甚至更优选的大于95%,并且可以大于99%。也可以根据更特定的相同性和/或类似性范围定义本发明的优选的多核苷酸和蛋白质。例如与本发明示例的序列有78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、

89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的相同性和/或类似性。

[0054] 在本发明中,产生所述Vip3A蛋白的转基因植物包括但不限于COT102转基因棉花事件和/或包含COT102转基因棉花事件的植物材料(如在CN1004395507C所描述的)、COT202转基因棉花事件和/或包含COT202转基因棉花事件的植物材料(如在CN1886513A所描述的)、或者MIR162转基因玉米事件和/或包含MIR162转基因棉花事件的植物材料(如在CN101548011A所描述的),其均可以实现本发明的方法和/或用途,即通过二化螟害虫至少与Vip3A蛋白接触以实现控制二化螟害虫的方法和/或用途,更具体地,所述Vip3A蛋白存在于至少产生所述Vip3A蛋白的转基因植物中,所述二化螟害虫通过摄食所述转基因植物的组织至少与所述Vip3A蛋白接触,接触后所述二化螟害虫生长受到抑制和/或导致死亡,以实现二化螟危害植物的控制。

[0055] 本发明中所述调控序列包括但不限于启动子、转运肽、终止子、增强子、前导序列、内含子以及其它可操作地连接到所述Vip3A蛋白的调节序列。

[0056] 所述启动子为植物中可表达的启动子,所述的“植物中可表达的启动子”是指确保与其连接的编码序列在植物细胞内进行表达的启动子。植物中可表达的启动子可为组成型启动子。指导植物内组成型表达的启动子的示例包括但不限于,来源于花椰菜花叶病毒的35S启动子、玉米Ubi启动子、水稻GOS2基因的启动子等。备选地,植物中可表达的启动子可为组织特异的启动子,即该启动子在植物的一些组织内如在绿色组织中指导编码序列的表达水平高于植物的其他组织(可通过常规RNA试验进行测定),如PEP羧化酶启动子。备选地,植物中可表达的启动子可为创伤诱导启动子。创伤诱导启动子或指导创伤诱导的表达模式的启动子是指当植物经受机械或由昆虫啃食引起的创伤时,启动子调控下的编码序列的表达较正常生长条件下有显著提高。创伤诱导启动子的示例包括但不限于,马铃薯和西红栊的蛋白酶抑制基因(pinI和pinII)和玉米蛋白酶抑制基因(MPI)的启动子。

[0057] 所述转运肽(又称分泌信号序列或导向序列)是指导转基因产物到特定的细胞器或细胞区室,对受体蛋白质来说,所述转运肽可以是异源的,例如,利用编码叶绿体转运肽序列靶向叶绿体,或者利用‘KDEL’保留序列靶向内质网,或者利用大麦植物凝集素基因的CTPP靶向液泡。

[0058] 所述前导序列包括但不限于,小RNA病毒前导序列,如EMCV前导序列(脑心肌炎病毒5'非编码区);马铃薯Y病毒组前导序列,如MDMV(玉米矮缩花叶病毒)前导序列;人类免疫球蛋白重链结合蛋白质(BiP);苜蓿花叶病毒的外壳蛋白质mRNA的不翻译前导序列(AMV RNA4);烟草花叶病毒(TMV)前导序列。

[0059] 所述增强子包括但不限于,花椰菜花叶病毒(CaMV)增强子、玄参花叶病毒(FMV)增强子、康乃馨风花环病毒(CERV)增强子、木薯脉花叶病毒(CsVMV)增强子、紫茉莉花叶病毒(MMV)增强子、夜香树黄化曲叶病毒(CmYLCV)增强子、木尔坦棉花曲叶病毒(CLCuMV)、鸭跖草黄斑驳病毒(CoYMV)和花生褪绿线条花叶病毒(PCLSV)增强子。

[0060] 对于单子叶植物应用而言,所述内含子包括但不限于,玉米hsp70内含子、玉米泛素内含子、Adh内含子1、蔗糖合酶内含子或水稻Act1内含子。对于双子叶植物应用而言,所述内含子包括但不限于,CAT-1内含子、pKANNIBAL内含子、PIV2内含子和“超级泛素”内含子。

[0061] 所述终止子可以为在植物中起作用的适合多聚腺苷酸化信号序列,包括但不限

于,来源于农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 胭脂碱合成酶 (NOS) 基因的多聚腺苷酸化信号序列、来源于蛋白酶抑制剂 II (pin II) 基因的多聚腺苷酸化信号序列、来源于豌豆 ssRUBISCO E9基因的多聚腺苷酸化信号序列和来源于 α -微管蛋白 (α -tubulin) 基因的多聚腺苷酸化信号序列。

[0062] 本发明中所述“有效连接”表示核酸序列的联结,所述联结使得一条序列可提供对相连序列来说需要的功能。在本发明中所述“有效连接”可以为将启动子与感兴趣的序列相连,使得该感兴趣的序列的转录受到该启动子控制和调控。当感兴趣的序列编码蛋白并且想要获得该蛋白的表达时“有效连接”表示:启动子与所述序列相连,相连的方式使得得到的转录物高效翻译。如果启动子与编码序列的连接是转录物融合并且想要实现编码的蛋白的表达时,制造这样的连接,使得得到的转录物中第一翻译起始密码子是编码序列的起始密码子。备选地,如果启动子与编码序列的连接是翻译融合并且想要实现编码的蛋白的表达时,制造这样的连接,使得5'非翻译序列中含有的第一翻译起始密码子与启动子相联结,并且连接方式使得得到的翻译产物与编码想要的蛋白的翻译开放读码框的关系是符合读码框的。可以“有效连接”的核酸序列包括但不限于:提供基因表达功能的序列(即基因表达元件,例如启动子、5'非翻译区域、内含子、蛋白编码区域、3'非翻译区域、聚腺苷化位点和/或转录终止子)、提供DNA转移和/或整合功能的序列(即T-DNA边界序列、位点特异性重组酶识别位点、整合酶识别位点)、提供选择性功能的序列(即抗生素抗性标记物、生物合成基因)、提供可计分标记物功能的序列、体外或体内协助序列操作的序列(即多接头序列、位点特异性重组序列)和提供复制功能的序列(即细菌的复制起点、自主复制序列、着丝粒序列)。

[0063] 本发明中所述的“杀虫”或“抗虫”是指对农作物害虫是有毒的,从而实现“控制”和/或“防治”农作物害虫。优选地,所述“杀虫”或“抗虫”是指杀死农作物害虫。更具体地,目标昆虫是二化螟害虫。

[0064] 本发明中Vip3A蛋白对二化螟害虫具有毒性。本发明中的植物,特别是水稻、甘蔗和玉米,在其基因组中含有外源DNA,所述外源DNA包含编码Vip3A蛋白的核苷酸序列,二化螟害虫通过摄食植物组织与该蛋白接触,接触后二化螟害虫生长受到抑制和/或导致死亡。抑制是指致死或亚致死。同时,植物在形态上应是正常的,且可在常规方法下培养以用于产物的消耗和/或生成。此外,该植物可基本消除对化学或生物杀虫剂的需要(所述化学或生物杀虫剂为针对Vip3A蛋白所靶向的二化螟害虫的杀虫剂)。

[0065] 植物材料中杀虫晶体蛋白(ICP)的表达水平可通过本领域内所描述的多种方法进行检测,例如通过应用特异引物对组织内产生的编码杀虫蛋白质的mRNA进行定量,或直接特异性检测产生的杀虫蛋白质的量。

[0066] 可以应用不同的试验测定植物中ICP的杀虫效果。本发明中目标昆虫主要为二化螟。

[0067] 本发明中,所述Vip3A蛋白可以具有序列表中SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列。除了包含Vip3A蛋白的编码区外,也可包含其他元件,例如编码选择性标记的蛋白质。

[0068] 此外,包含编码本发明Vip3A蛋白的核苷酸序列的表达盒在植物中还可以与至少一种编码除草剂抗性基因的蛋白质一起表达,所述除草剂抗性基因包括但不限于,草胺磷抗性基因(如bar基因、pat基因)、苯敌草抗性基因(如pmpH基因)、草甘膦抗性基因(如EPSPS

基因)、溴苯腈 (bromoxynil) 抗性基因、磺酰脲抗性基因、对除草剂茅草枯的抗性基因、对氨基脲的抗性基因或谷氨酰胺合成酶抑制剂 (如PPT) 的抗性基因,从而获得既具有高杀虫活性、又具有除草剂抗性的转基因植物。

[0069] 本发明中,将外源DNA导入植物,如将编码所述Vip3A蛋白的基因或表达盒或重组载体导入植物细胞,常规的转化方法包括但不限于,农杆菌介导的转化、微量发射轰击、直接将DNA摄入原生质体、电穿孔或晶须硅介导的DNA导入。

[0070] 本发明提供了一种杀虫蛋白的用途,具有以下优点:

[0071] 1、内因防治。现有技术主要是通过外部作用即外因来控制二化螟害虫的危害,如农业防治、化学防治和物理防治;而本发明是通过植物体内产生能够杀死二化螟的Vip3A蛋白来控制二化螟害虫的,即通过内因来防治。

[0072] 2、无污染、无残留。现有技术使用的化学防治方法虽然对控制二化螟害虫的危害起到了一定作用,但同时也对人、畜和农田生态系统带来了污染、破坏和残留;使用本发明控制二化螟害虫的方法,可以消除上述不良后果。

[0073] 3、全生育期防治。现有技术使用的控制二化螟害虫的方法都是阶段性的,而本发明是对植物进行全生育期的保护,转基因植物 (Vip3A蛋白) 从发芽、生长,一直到开花、结果,都可以避免遭受二化螟的侵害。

[0074] 4、全植株防治。现有技术使用的控制二化螟害虫的方法大多是局部性的,如叶面喷施;而本发明是对整个植株进行保护,如转基因植物 (Vip3A蛋白) 的根、叶片、茎秆、果实、雄穗、雌穗、花药或花丝等都是可以抵抗二化螟侵害的。

[0075] 5、效果稳定。现有技术使用的频振式杀虫灯不仅需要每天及时清理高压电网的污垢,而且在雷雨天不能使用;本发明是使所述Vip3A蛋白在植物体内进行表达,有效地克服了频振式杀虫灯的效果受外界因素影响的缺陷,且本发明转基因植物 (Vip3A蛋白) 的防治效果在不同地点、不同时间、不同遗传背景也都是稳定一致的。

[0076] 6、简单、方便、经济。现有技术使用的频振式杀虫灯的一次性投入较大,且操作不当还有电击伤人的危险;本发明只需种植能够表达Vip3A蛋白的转基因植物即可,而不需要采用其它措施,从而节省了大量人力、物力和财力。

[0077] 7、效果彻底。现有技术使用的控制二化螟害虫的方法,其效果是不彻底的,只起到减轻作用;而本发明转基因植物 (Vip3A蛋白) 对二化螟初孵幼虫的防治效果几乎为百分之百,极个别存活幼虫也基本上停止发育,3天后幼虫基本仍处于初孵状态,都是明显的发育不良,且已停止发育,在田间自然环境中无法存活,而转基因植物大体上只受到轻微损伤。

[0078] 下面通过附图和实施例,对本发明的技术方案做进一步的详细描述。

附图说明

[0079] 图1为本发明杀虫蛋白的用途的含有Vip3A核苷酸序列的重组克隆载体DBN01-T构建流程图;

[0080] 图2为本发明杀虫蛋白的用途的含有Vip3A核苷酸序列的重组表达载体DBN10002构建流程图;

[0081] 图3为本发明杀虫蛋白的用途的转基因水稻植株接种二化螟的叶片损伤图。

具体实施方式

[0082] 下面通过具体实施例进一步说明本发明杀虫蛋白的用途的技术方案。

[0083] 第一实施例、基因的获得和合成

[0084] 1、获得核苷酸序列

[0085] Vip3A-01杀虫蛋白质的氨基酸序列(789个氨基酸),如序列表中SEQ ID NO:1所示;编码相应于所述Vip3A-01杀虫蛋白质的氨基酸序列的Vip3A-01核苷酸序列(2370个核苷酸),如序列表中SEQ ID NO:2所示。Vip3A-02杀虫蛋白质的氨基酸序列(789个氨基酸),如序列表中SEQ ID NO:3所示;编码相应于所述Vip3A-02杀虫蛋白质的氨基酸序列的Vip3A-02核苷酸序列(2370个核苷酸),如序列表中SEQ ID NO:4所示。

[0086] Cry1Ab杀虫蛋白质的氨基酸序列(615个氨基酸),如序列表中SEQ ID NO:5所示;编码相应于所述Cry1Ab杀虫蛋白质的氨基酸序列的Cry1Ab核苷酸序列(1848个核苷酸),如序列表中SEQ ID NO:6所示。

[0087] 2、合成上述核苷酸序列

[0088] 所述Vip3A-01核苷酸序列(如序列表中SEQ ID NO:2所示)、所述Vip3A-02核苷酸序列(如序列表中SEQ ID NO:4所示)、所述Cry1Ab核苷酸序列(如序列表中SEQ ID NO:6所示)由南京金斯瑞生物科技有限公司合成;合成的所述Vip3A-01核苷酸序列(SEQ ID NO:2)的5'端还连接有ScaI酶切位点,所述Vip3A-01核苷酸序列(SEQ ID NO:2)的3'端还连接有SpeI酶切位点;合成的所述Vip3A-02核苷酸序列(SEQ ID NO:4)的5'端还连接有ScaI酶切位点,所述Vip3A-02核苷酸序列(SEQ ID NO:4)的3'端还连接有SpeI酶切位点;合成的所述Cry1Ab核苷酸序列(SEQ ID NO:6)的5'端还连接有NcoI酶切位点,所述Cry1Ab核苷酸序列(SEQ ID NO:6)的3'端还连接有BamHI酶切位点。

[0089] 第二实施例、重组表达载体的构建及重组表达载体转化农杆菌

[0090] 1、构建含有Vip3A基因的重组克隆载体

[0091] 将合成的Vip3A-01核苷酸序列连入克隆载体pGEM-T(Promega, Madison, USA, CAT: A3600)上,操作步骤按Promega公司产品pGEM-T载体说明书进行,得到重组克隆载体DBN01-T,其构建流程如图1所示(其中,Amp表示氨苄青霉素抗性基因;f1表示噬菌体f1的复制起点;LacZ为LacZ起始密码子;SP6为SP6 RNA聚合酶启动子;T7为T7RNA聚合酶启动子;Vip3A-01为Vip3A-01核苷酸序列(SEQ ID NO:2);MCS为多克隆位点)。

[0092] 然后将重组克隆载体DBN01-T用热激方法转化大肠杆菌T1感受态细胞(Transgen, Beijing, China, CAT: CD501),其热激条件为:50 μ l大肠杆菌T1感受态细胞、10 μ l质粒DNA(重组克隆载体DBN01-T),42 $^{\circ}$ C水浴30秒;37 $^{\circ}$ C振荡培养1小时(100rpm转速下摇床摇动),在表面涂有IPTG(异丙基硫代- β -D-半乳糖苷)和X-gal(5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷)的氨苄青霉素(100毫克/升)的LB平板(胰蛋白胨10g/L,酵母提取物5g/L,NaCl 10g/L,琼脂15g/L,用NaOH调pH至7.5)上生长过夜。挑取白色菌落,在LB液体培养基(胰蛋白胨10g/L,酵母提取物5g/L,NaCl 10g/L,氨苄青霉素100mg/L,用NaOH调pH至7.5)中于温度37 $^{\circ}$ C条件下培养过夜。碱法提取其质粒:将菌液在12000rpm转速下离心1min,去上清液,沉淀菌体用100 μ l冰预冷的溶液I(25mM Tris-HCl,10mM EDTA(乙二胺四乙酸),50mM葡萄糖,pH8.0)悬浮;加入200 μ l新配制的溶液II(0.2M NaOH,1% SDS(十二烷基硫酸钠)),将管子颠倒4次,混合,置

冰上3-5min;加入150 μ l冰冷的溶液III(3M醋酸钾,5M醋酸),立即充分混匀,冰上放置5-10min;于温度4 $^{\circ}$ C、转速12000rpm条件下离心5min,在上清液中加入2倍体积无水乙醇,混匀后室温放置5min;于温度4 $^{\circ}$ C、转速12000rpm条件下离心5min,弃上清液,沉淀用浓度(V/V)为70%的乙醇洗涤后晾干;加入30 μ l含RNase(20 μ g/ml)的TE(10mM Tris-HCl,1mM EDTA,PH8.0)溶解沉淀;于温度37 $^{\circ}$ C下水浴30min,消化RNA;于温度-20 $^{\circ}$ C保存备用。

[0093] 提取的质粒经AhdI和XhoI酶切鉴定后,对阳性克隆进行测序验证,结果表明重组克隆载体DBN01-T中插入的所述Vip3A-01核苷酸序列为序列表中SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列,即Vip3A-01核苷酸序列正确插入。

[0094] 按照上述构建重组克隆载体DBN01-T的方法,将合成的所述Vip3A-02核苷酸序列连入克隆载体pGEM-T上,得到重组克隆载体DBN02-T,其中,Vip3A-02为Vip3A-02核苷酸序列(SEQ ID NO:4)。酶切和测序验证重组克隆载体DBN02-T中所述Vip3A-02核苷酸序列正确插入。

[0095] 按照上述构建重组克隆载体DBN01-T的方法,将合成的所述Cry1Ab核苷酸序列连入克隆载体pGEM-T上,得到重组克隆载体DBN03-T,其中,Cry1Ab为Cry1Ab核苷酸序列(SEQ ID NO:4)。酶切和测序验证重组克隆载体DBN03-T中所述Cry1Ab核苷酸序列正确插入。

[0096] 2、构建含有Vip3A基因的重组表达载体

[0097] 用限制性内切酶ScaI和SpeI分别酶切重组克隆载体DBN01-T和表达载体DBNBC-01(载体骨架:pCAMBIA2301(CAMBIA机构可以提供)),将切下的Vip3A-01核苷酸序列片段插到表达载体DBNBC-01的ScaI和SpeI位点之间,利用常规的酶切方法构建载体是本领域技术人员所熟知的,构建成重组表达载体DBN100002,其构建流程如图2所示(Kan:卡那霉素基因;RB:右边界;CaMV35S:花椰菜花叶病毒35S启动子(SEQ ID NO:7);Vip3A-01:Vip3A-01核苷酸序列(SEQ ID NO:2);Nos:胭脂碱合成酶基因的终止子(SEQ ID NO:8);Hpt:潮霉素磷酸转移酶基因(SEQ ID NO:9);LB:左边界)。

[0098] 将重组表达载体DBN100002用热激方法转化大肠杆菌T1感受态细胞,其热激条件为:50 μ l大肠杆菌T1感受态细胞、10 μ l质粒DNA(重组表达载体DBN100002),42 $^{\circ}$ C水浴30秒;37 $^{\circ}$ C振荡培养1小时(100rpm转速下摇床摇动);然后在含50mg/L卡那霉素(Kanamycin)的LB固体平板(胰蛋白胨10g/L,酵母提取物5g/L,NaCl 10g/L,琼脂15g/L,用NaOH调pH至7.5)上于温度37 $^{\circ}$ C条件下培养12小时,挑取白色菌落,在LB液体培养基(胰蛋白胨10g/L,酵母提取物5g/L,NaCl 10g/L,卡那霉素50mg/L,用NaOH调pH至7.5)中于温度37 $^{\circ}$ C条件下培养过夜。碱法提取其质粒。将提取的质粒用限制性内切酶ScaI和SpeI酶切后鉴定,并将阳性克隆进行测序鉴定,结果表明重组表达载体DBN100002在ScaI和SpeI位点间的核苷酸序列为序列表中SEQ ID NO:2所示核苷酸序列,即Vip3A-01核苷酸序列。

[0099] 按照上述构建重组表达载体DBN100002的方法,将ScaI和SpeI、NcoI和BamHI酶切重组克隆载体DBN02-T和DBN03-T切下的所述Vip3A-02核苷酸序列和Cry1Ab核苷酸序列插入表达载体DBNBC-01,得到重组表达载体DBN100003。酶切和测序验证重组表达载体DBN100003中的核苷酸序列含有为序列表中SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:6所示核苷酸序列,即Vip3A-02核苷酸序列和Cry1Ab核苷酸序列,所述Vip3A-02核苷酸序列和所述Cry1Ab核苷酸序列可以连接所述CaMV35S启动子和Nos终止子。

[0100] 3、重组表达载体转化农杆菌

[0101] 对已经构建正确的重组表达载体DBN100002和DBN100003用液氮法转化到农杆菌LBA4404 (Invitrogen, Chicago, USA, CAT:18313-015) 中,其转化条件为:100 μ L农杆菌LBA4404、3 μ L质粒DNA(重组表达载体);置于液氮中10分钟,37 $^{\circ}$ C温水浴10分钟;将转化后的农杆菌LBA4404接种于LB试管中于温度28 $^{\circ}$ C、转速为200rpm条件下培养2小时,涂于含50mg/L的利福平(Rifampicin)和100mg/L的卡那霉素(Kanamycin)的LB平板上直至长出阳性单克隆,挑取单克隆培养并提取其质粒,用限制性内切酶StyI和AatII对重组表达载体DBN100002和DBN100003酶切后进行酶切验证,结果表明重组表达载体DBN100002和DBN100003结构完全正确。

[0102] 第三实施例、转基因植株的获得

[0103] 1、获得转基因水稻植株

[0104] 按照常规采用的农杆菌侵染法,将无菌培养的水稻品种日本晴的愈伤组织与第二实施例中3所述的农杆菌共培养,以将第二实施例中2构建的重组表达载体DBN100002和DBN100003中的T-DNA(包括花椰菜花叶病毒35S启动子序列、Vip3A-01核苷酸序列、Vip3A-02核苷酸序列、Cry1Ab核苷酸序列、Hpt基因和Nos终止子序列)转入到水稻染色体组中,获得了转入Vip3A-01核苷酸序列的水稻植株和转入Vip3A-02-Cry1Ab核苷酸序列的水稻植株;同时以野生型水稻植株作为对照。

[0105] 对于农杆菌介导的水稻转化,简要地,把水稻种子接种在诱导培养基(N6盐、N6维他命、干酪素300mg/L、蔗糖30g/L、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D) 2mg/L、植物凝胶3g/L, pH5.8)上,从水稻成熟胚诱导出愈伤组织(步骤1:愈伤诱导步骤),之后,优选愈伤组织,用农杆菌悬浮液接触愈伤组织,其中农杆菌能够将Vip3A-01核苷酸序列、Vip3A-02核苷酸序列和/或Cry1Ab核苷酸序列传递至愈伤组织上的至少一个细胞(步骤2:侵染步骤)。在此步骤中,愈伤组织优选地浸入农杆菌悬浮液(OD₆₆₀=0.3,侵染培养基(N6盐、N6维他命、干酪素300mg/L、蔗糖30g/L、葡萄糖10g/L、乙酰丁香酮(AS) 40mg/L、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D) 2mg/L、pH5.4))中以启动侵染。愈伤组织与农杆菌共培养一段时期(3天)(步骤3:共培养步骤)。优选地,愈伤组织在侵染步骤后在固体培养基(N6盐、N6维他命、干酪素300mg/L、蔗糖30g/L、葡萄糖10g/L、乙酰丁香酮(AS) 40mg/L、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D) 2mg/L、植物凝胶3g/L, pH5.8)上培养。在此共培养阶段后,有一个“恢复”步骤。在“恢复”步骤中,恢复培养基(N6盐、N6维他命、干酪素300mg/L、蔗糖30g/L、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D) 2mg/L、植物凝胶3g/L, pH5.8)中至少存在一种已知抑制农杆菌生长的抗生素(头孢霉素),不添加植物转化体的选择剂(步骤4:恢复步骤)。优选地,愈伤组织在有抗生素但没有选择剂的固体培养基上培养,以消除农杆菌并为侵染细胞提供恢复期。接着,接种的愈伤组织在含选择剂(潮霉素)的培养基上培养并选择生长着的转化愈伤组织(步骤5:选择步骤)。优选地,愈伤组织在有选择剂的筛选固体培养基(N6盐、N6维他命、干酪素300mg/L、蔗糖10g/L、潮霉素50mg/L、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D) 2mg/L、植物凝胶3g/L, pH5.8)上培养,导致转化的细胞选择性生长。然后,愈伤组织再生成植物(步骤6:再生步骤),优选地,在含选择剂的培养基上生长的愈伤组织在固体培养基(N6分化培养基和MS生根培养基)上培养以再生植物。

[0106] 筛选得到的抗性愈伤组织转移到所述N6分化培养基(N6盐、N6维他命、干酪素300mg/L、蔗糖20g/L、6-苄氨基腺嘌呤2mg/L、奈乙酸1mg/L、植物凝胶3g/L, pH5.8)上,25 $^{\circ}$ C下培养分化。分化出来的小苗转移到所述MS生根培养基(MS盐、MS维他命、干酪素300mg/L、

蔗糖15g/L、植物凝胶3g/L, pH5.8) 上, 25℃下培养至约10cm高, 移至温室培养至结实。在温室中, 每天于30℃下培养。

[0107] 2、获得转基因甘蔗植株

[0108] 转化方法主要参考广西大学2012级硕士李燦学位论文第22页至24页。取甘蔗顶端新生茎节, 去掉蔗梢和叶鞘, 留下茎尖生长锥及心叶茎段。在超净工作台上, 用75% (v/v) 酒精棉球对表面进行擦拭消毒, 用已灭菌的镊子小心剥去心叶外层, 取中间5—7cm长的心叶段, 横切成厚度约3mm的薄片接种于诱导培养基上, 温度26℃条件下, 黑暗培养20天。挑选生长情况良好的愈伤组织转移到新的MS培养基中预培养4天, 再用于转化试验; 转化时, 在超净工作台中将待侵染的愈伤组织用已灭菌的镊子夹出, 放在干净的滤纸上面静置2小时, 至表面完全干燥, 稍有收缩; 将干燥的甘蔗愈伤组织放入侵染液中浸泡30分钟, 同时放在摇床上缓慢摇动; 将愈伤组织捞出并转移到干净的滤纸上, 在超净工作台中完全吹干, 直至愈伤组织表面干燥、无水膜。把愈伤组织块切成0.6*0.6cm的小块, 之后转移到含有100μmol/L乙酰丁香酮(AS)的MR固体培养基中, 温度23℃暗培养3天; 把侵染后的愈伤组织夹出, 置于滤纸上在超净工作台上吹干, 直到材料表面干爽后, 将材料转移到含有500mg/L头孢霉素和潮霉素筛选的分化培养基中; 每隔2周更换一次培养基, 期间把被污染的愈伤组织剔除, 当幼苗长约3cm高的时候, 转移到含有潮霉素筛选剂的生根培养基中诱导生根。由此获得了转入Vip3A-01核苷酸序列的甘蔗植株和转入Vip3A-02-Cry1Ab核苷酸序列的甘蔗植株; 同时以野生型甘蔗植株作为对照。

[0109] 第四实施例、用TaqMan验证转基因植株

[0110] 分别取转入Vip3A-01核苷酸序列的水稻植株和转入Vip3A-02-Cry1Ab核苷酸序列的水稻植株的叶片约100mg作为样品, 用Qiagen的DNeasy Plant Maxi Kit提取其基因组DNA, 通过Taqman探针荧光定量PCR方法检测Vip3A基因和Cry1Ab基因的拷贝数。同时以野生型水稻植株作为对照, 按照上述方法进行检测分析。实验设3次重复, 取平均值。

[0111] 检测Vip3A基因和Cry1Ab基因拷贝数的具体方法如下:

[0112] 步骤11、分别取转入Vip3A-01核苷酸序列的水稻植株、转入Vip3A-02-Cry1Ab核苷酸序列的水稻植株和野生型水稻植株的叶片各100mg, 分别在研钵中用液氮研成匀浆, 每个样品取3个重复;

[0113] 步骤12、使用Qiagen的DNeasy Plant Mini Kit提取上述样品的基因组DNA, 具体方法参考其产品说明书;

[0114] 步骤13、用NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) 测定上述样品的基因组DNA浓度;

[0115] 步骤14、调整上述样品的基因组DNA浓度至同一浓度值, 所述浓度值的范围为80-100ng/μl;

[0116] 步骤15、采用Taqman探针荧光定量PCR方法鉴定样品的拷贝数, 以经过鉴定已知拷贝数的样品作为标准品, 以野生型水稻植株的样品作为对照, 每个样品3个重复, 取其平均值; 荧光定量PCR引物和探针序列分别是:

[0117] 以下引物和探针用来检测Vip3A-01和Vip3A-02核苷酸序列:

[0118] 引物1: ATTCTCGAAATCTCCCCTAGCG如序列表中SEQ ID NO:10所示;

[0119] 引物2: GCTGCCAGTGGATGTCCAG如序列表中SEQ ID NO:11所示;

[0120] 探针1: CTCCTGAGCCCCGAGCTGATTAACACC如序列表中SEQ ID NO:12所示;

[0121] 以下引物和探针用来检测Cry1Ab核苷酸序列：

[0122] 引物3: TGCGTATTCAATTCAACGACATG如序列表中SEQ ID NO:13所示；

[0123] 引物4: CTTGGTAGTTCTGGACTGCGAAC如序列表中SEQ ID NO:14所示；

[0124] 探针2: CAGCGCCTTGACCACAGCTATCCC如序列表中SEQ ID NO:15所示；

[0125] PCR反应体系为：

	JumpStart™ Taq ReadyMix™ (Sigma)	10μl
[0126]	50×引物/探针混合物	1μl
	基因组 DNA	3μl
	水 (ddH ₂ O)	6μl

[0127] 所述50×引物/探针混合物包含1mM浓度的每种引物各45μl, 100μM浓度的探针50μl和860μl 1×TE缓冲液, 并且在4℃, 贮藏在琥珀试管中。

[0128] PCR反应条件为：

	步骤	温度	时间
	21	95℃	5 分钟
[0129]	22	95℃	30 秒
	23	60℃	1 分钟
	24	回到步骤 22, 重复 40 次	

[0130] 利用SDS2.3软件(Applied Biosystems)分析数据。

[0131] 实验结果表明, Vip3A-01核苷酸序列和Vip3A-02-Cry1Ab核苷酸序列均已整合到所检测的水稻植株的染色体组中, 而且转入Vip3A-01核苷酸序列的水稻植株和转入Vip3A-02-Cry1Ab核苷酸序列的水稻植株均获得了单拷贝的转基因水稻植株。

[0132] 按照上述用TaqMan验证转基因水稻植株的方法, 对转基因甘蔗植株进行检测分析。实验结果表明, Vip3A-01核苷酸序列和Vip3A-02-Cry1Ab核苷酸序列均已分别整合到所检测的甘蔗植株的染色体组中, 而且转入Vip3A-01核苷酸序列的甘蔗植株和转入Vip3A-02-Cry1Ab核苷酸序列的甘蔗植株均获得了单拷贝的转基因植株。

[0133] 第五实施例、转基因植株的抗虫效果检测

[0134] 将转入Vip3A-01核苷酸序列的水稻植株和转入Vip3A-02-Cry1Ab核苷酸序列的水稻植株; 转入Vip3A-01核苷酸序列的甘蔗植株和转入Vip3A-02-Cry1Ab核苷酸序列的甘蔗植株; 相应的野生型水稻植株和甘蔗植株, 以及经Taqman鉴定为非转基因的水稻植株和甘蔗植株对二化螟进行抗虫效果检测。

[0135] 1、转基因水稻植株的抗虫效果检测

[0136] 分别取转入Vip3A-01核苷酸序列的水稻植株和转入Vip3A-02-Cry1Ab核苷酸序列的水稻植株、野生型水稻植株和经Taqman鉴定为非转基因的水稻植株(分蘖期)的新鲜叶片, 用无菌水冲洗干净并用纱布将叶片上的水吸干, 然后将水稻叶片剪成约1cm×4cm的长条状, 取1片剪后的长条状叶片放入圆形塑料培养皿底部的保湿滤纸上, 每个培养皿中放10头二化螟(初孵幼虫), 虫试培养皿加盖后, 在温度28℃、相对湿度70%-80%、光周期(光/暗)16:8的条件下放置3天后, 根据二化螟幼虫发育进度、死亡率和叶片损伤率三项指标, 获

得抗性总分(满分300分):抗性总分=100×死亡率+[100×死亡率+90×(初孵虫数/接虫总数)+60×(初孵-阴性对照虫数/接虫总数)+10×(阴性对照虫数/接虫总数)]+100×(1-叶片损伤率)。转入Vip3A-01核苷酸序列的共3个转化事件株系(S1、S2和S3),转入Vip3A-02-Cry1Ab核苷酸序列的共3个转化事件株系(S4、S5和S6),经Taqman鉴定为非转基因的(NGM1)共1个株系,野生型的(CK1)共1个株系;从每个株系选3株进行测试,每株重复6次。结果如表1和图3所示。

[0137] 表1、转基因水稻植株接种二化螟的抗虫实验结果

[0138]

植株	叶片 损伤 率 (%)	二化螟发育进度 (单株系)		二化螟致死情况 (单株系)		总分 (单株 系)	平均 总分	
		初孵-阴 性对照	≥阴性 对照	接虫 总数	死亡率 (%)			
		初孵						
S1	1	1.5	0	0	10	85	283	
S2	5	3.5	0	0	10	65	257	278
S3	1	0.5	0	0	10	95	294	
S4	1	0	0	0	10	100	299	
S5	1	0	0	0	10	100	299	295
S6	1	1	0	0	10	90	288	
NGM1	55	0	0	10	10	0	55	55
CK1	55	0	0	9.5	10	5	65	65

[0139] 表1的结果表明:转入Vip3A-01核苷酸序列的水稻植株和转入Vip3A-02-Cry1Ab核苷酸序列的水稻植株对二化螟均具有较好的杀虫效果,二化螟的平均死亡率均在80%以上,部分甚至达到100%,其抗性总分也均在280分左右;而经Taqman鉴定为非转基因的水稻植株和野生型水稻植株的抗性总分一般在60分左右。

[0140] 图3的结果表明:与野生型水稻植株相比,转入Vip3A-01核苷酸序列的水稻植株和转入Vip3A-02-Cry1Ab核苷酸序列的水稻植株对二化螟初孵幼虫的防治效果几乎为百分之百,极个别存活幼虫也基本上停止发育,3天后幼虫基本仍处于初孵状态,同时表现出极弱的生命力,且转入Vip3A-01核苷酸序列的水稻植株和转入Vip3A-02-Cry1Ab核苷酸序列的水稻植株大体上只受到极轻微损伤,肉眼几乎无法辨别出二化螟的取食痕迹,其叶片损伤率均在5%以下。

[0141] 由此证明转入Vip3A-01核苷酸序列的水稻植株和转入Vip3A-02-Cry1Ab核苷酸序

列的水稻植株都显示出高抗二化螟的活性,这种活性足以对二化螟的生长产生不良效应从而使其在田间得以控制。同时通过控制二化螟的钻蛀为害,也有可能降低水稻上病害的发生,极大的提高水稻的产量及品质。

[0142] 2、转基因甘蔗植株的抗虫效果检测

[0143] 分别取转入Vip3A-01核苷酸序列的甘蔗植株、转入Vip3A-02-Cry1Ab核苷酸序列的甘蔗植株、野生型甘蔗植株和经Taqman鉴定为非转基因的甘蔗植株(展开嫩叶)的新鲜叶片,用无菌水冲洗干净并用纱布将叶片上的水吸干,然后将甘蔗叶片剪成约1cm×2cm的长条状,取1片剪后的长条状叶片放入圆形塑料培养皿底部的保湿滤纸上,每个培养皿中放10头二化螟(初孵幼虫),虫试培养皿加盖后,在温度22-26℃、相对湿度70%-80%、光周期(光/暗)16:8的条件下放置3天后,根据二化螟幼虫发育进度、死亡率和叶片损伤率三项指标,获得抗性总分(满分300分):抗性总分=100×死亡率+[100×死亡率+90×(初孵虫数/接虫总数)+60×(初孵-阴性对照虫数/接虫总数)+10×(阴性对照虫数/接虫总数)]+100×(1-叶片损伤率)。转入Vip3A-01核苷酸序列的共3个转化事件株系(S7、S8和S9),转入Vip3A-02-Cry1Ab核苷酸序列的共3个转化事件株系(S10、S11和S12),经Taqman鉴定为非转基因的(NGM2)共1个株系,野生型的(CK2)共1个株系;从每个株系选3株进行测试,每株重复6次。结果如表2所示。

[0144] 表2、转基因甘蔗植株接种二化螟的抗虫实验结果

[0145]

植株	叶片 损伤 率 (%)	二化螟发育进度 (单株系)		二化螟致死情况 (单株系)		总分 (单株 系)	平均 总分	
		初孵	初孵-阴 性对照	≥阴性 对照	接虫 总数			死亡率 (%)
		S7	3	1.5	0			0
S8	3	1.5	0	0	10	85	281	285
S9	1	0.5	0	0	10	95	294	
S10	1	0.5	0	0	10	95	294	
S11	1	0.5	0	0	10	95	294	295
S12	1	0	0	0	10	100	299	
NGM2	75	0	0	10	10	0	35	35
CK2	65	0	0	9.5	10	5	55	55

[0146] 表2的结果表明:转入Vip3A-01核苷酸序列的甘蔗植株和转入Vip3A-02-Cry1Ab核

苷酸序列的甘蔗植株对二化螟均具有较好的杀虫效果,二化螟的平均死亡率均在85%以上,部分甚至达到100%,其抗性总分也均在280分以上;而经Taqman鉴定为非转基因的甘蔗植株和野生型甘蔗植株的抗性总分一般在55分以下。

[0147] 与野生型甘蔗植株相比,转入Vip3A-01核苷酸序列的甘蔗植株和转入Vip3A-02-Cry1Ab核苷酸序列的甘蔗植株对二化螟初孵幼虫的防治效果几乎为百分之百,极个别存活幼虫也基本上停止发育,3天后幼虫基本仍处于初孵状态,同时表现出极弱的生命力,且转入Vip3A-01核苷酸序列的甘蔗植株和转入Vip3A-02-Cry1Ab核苷酸序列的甘蔗植株大体上只受到极轻微损伤,肉眼几乎无法辨别出二化螟的取食痕迹,其叶片损伤率均在3%以下。

[0148] 由此证明转入Vip3A-01核苷酸序列的甘蔗植株和转入Vip3A-02-Cry1Ab核苷酸序列的甘蔗植株都显示出高抗二化螟的活性,这种活性足以对二化螟的生长产生不良效应从而使其在田间得以控制。同时通过控制二化螟的钻蛀为害,也有可能降低甘蔗上病害的发生,极大的提高甘蔗的产量及品质。

[0149] 上述实验结果还表明转入Vip3A-01核苷酸序列的水稻植株、转入Vip3A-02-Cry1Ab核苷酸序列的水稻植株、转入Vip3A-01核苷酸序列的甘蔗植株和转入Vip3A-02-Cry1Ab核苷酸序列的甘蔗植株对二化螟的控制/防治显然是因为植物本身可产生Vip3A蛋白,所以,本领域技术人员熟知的,根据Vip3A蛋白对二化螟的相同毒杀作用,可产生类似的可表达Vip3A蛋白的转基因植株能够用于控制/防治二化螟的危害。本发明中Vip3A蛋白包括但不限于具体实施方式中所给出氨基酸序列的Vip3A蛋白,同时转基因植株还可以产生至少一种不同于Vip3A蛋白的第二种杀虫蛋白质,如Vip类蛋白、Cry类蛋白。

[0150] 综上所述,本发明杀虫蛋白的用途通过植物体内产生能够杀死二化螟的Vip3A蛋白来控制二化螟害虫;与现有技术使用的农业防治方法、化学防治方法和物理防治方法相比,本发明对植物进行全生育期、全植株的保护以防治二化螟害虫的侵害,且无污染、无残留,效果稳定、彻底,简单、方便、经济。

[0151] 最后所应说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的精神和范围。

序列表

- <110> 北京大北农业科技集团股份有限公司
北京大北农业科技集团股份有限公司生物技术中心
- <120> 杀虫蛋白的用途
- <130> DBNBC78
- <160> 15
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 789
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> Vip3A-01 氨基酸序列

<400> 1

[0001]

Met Asn Lys Asn Asn Thr Lys Leu Ser Thr Arg Ala Leu Pro Ser Phe
1 5 10 15
Ile Asp Tyr Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Lys Asp
 20 25 30
Ile Met Asn Met Ile Phe Lys Thr Asp Thr Gly Gly Asp Leu Thr Leu
 35 40 45
Asp Glu Ile Leu Lys Asn Gln Gln Leu Leu Asn Asp Ile Ser Gly Lys
 50 55 60
Leu Asp Gly Val Asn Gly Ser Leu Asn Asp Leu Ile Ala Gln Gly Asn
65 70 75 80
Leu Asn Thr Glu Leu Ser Lys Glu Ile Leu Lys Ile Ala Asn Glu Gln
 85 90 95
Asn Gln Val Leu Asn Asp Val Asn Asn Lys Leu Asp Ala Ile Asn Thr
 100 105 110
Met Leu Arg Val Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Ser Met Leu Ser Asp Val
 115 120 125
Met Lys Gln Asn Tyr Ala Leu Ser Leu Gln Ile Glu Tyr Leu Ser Lys
 130 135 140
Gln Leu Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Ile Ile Asn Val Asn Val

145	150	155	160
Leu Ile Asn Ser Thr	Leu Thr Glu Ile Thr	Pro Ala Tyr Gln Arg Ile	
	165	170	175
Lys Tyr Val Asn Glu Lys Phe Glu Glu	Leu Thr Phe Ala Thr Glu Thr		
	180	185	190
Ser Ser Lys Val Lys Lys Asp Gly Ser	Pro Ala Asp Ile Leu Asp Glu		
	195	200	205
Leu Thr Glu Leu Thr Glu Leu Ala Lys Ser	Val Thr Lys Asn Asp Val		
	210	215	220
Asp Gly Phe Glu Phe Tyr Leu Asn Thr Phe	His Asp Val Met Val Gly		
	225	230	235
235	240		
Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys	Thr Ala Ser Glu Leu Ile		
	245	250	255
Thr Lys Glu Asn Val Lys Thr Ser Gly Ser	Glu Val Gly Asn Val Tyr		
	260	265	270
Asn Phe Leu Ile Val Leu Thr Ala Leu Gln	Ala Gln Ala Phe Leu Thr		
	275	280	285
[0002] Leu Thr Thr Cys Arg Lys Leu Leu Gly	Leu Ala Asp Ile Asp Tyr Thr		
	290	295	300
Ser Ile Met Asn Glu His Leu Asn Lys Glu	Lys Glu Glu Phe Arg Val		
	305	310	315
315	320		
Asn Ile Leu Pro Thr Leu Ser Asn Thr Phe	Ser Asn Pro Asn Tyr Ala		
	325	330	335
Lys Val Lys Gly Ser Asp Glu Asp Ala Lys	Met Ile Val Glu Ala Lys		
	340	345	350
Pro Gly His Ala Leu Ile Gly Phe Glu Ile	Ser Asn Asp Ser Ile Thr		
	355	360	365
Val Leu Lys Val Tyr Glu Ala Lys Leu Lys	Gln Asn Tyr Gln Val Asp		
	370	375	380
Lys Asp Ser Leu Ser Glu Val Ile Tyr Gly	Asp Met Asp Lys Leu Leu		
	385	390	395
395	400		
Cys Pro Asp Gln Ser Glu Gln Ile Tyr Tyr	Thr Asn Asn Ile Val Phe		
	405	410	415
Pro Asn Glu Tyr Val Ile Thr Lys Ile Asp	Phe Thr Lys Lys Met Lys		
	420	425	430
Thr Leu Arg Tyr Glu Val Thr Ala Asn Phe	Tyr Asp Ser Ser Thr Gly		

	435		440		445
	Glu Ile Asp Leu Asn Lys Lys Lys Val Glu Ser Ser Glu Ala Glu Tyr				
	450		455		460
	Arg Thr Leu Ser Ala Asn Asp Asp Gly Val Tyr Met Pro Leu Gly Val				
	465		470		475
	Ile Ser Glu Thr Phe Leu Thr Pro Ile Asn Gly Phe Gly Leu Gln Ala				
		485		490	495
	Asp Glu Asn Ser Arg Leu Ile Thr Leu Thr Cys Lys Ser Tyr Leu Arg				
		500		505	510
	Glu Leu Leu Leu Ala Thr Asp Leu Ser Asn Lys Glu Thr Lys Leu Ile				
		515		520	525
	Val Pro Pro Ser Gly Phe Ile Ser Asn Ile Val Glu Asn Gly Ser Ile				
		530		535	540
	Glu Glu Asp Asn Leu Glu Pro Trp Lys Ala Asn Asn Lys Asn Ala Tyr				
	545		550		555
	Val Asp His Thr Gly Gly Val Asn Gly Thr Lys Ala Leu Tyr Val His				
		565		570	575
[0003]	Lys Asp Gly Gly Ile Ser Gln Phe Ile Gly Asp Lys Leu Lys Pro Lys				
		580		585	590
	Thr Glu Tyr Val Ile Gln Tyr Thr Val Lys Gly Lys Pro Ser Ile His				
		595		600	605
	Leu Lys Asp Glu Asn Thr Gly Tyr Ile His Tyr Glu Asp Thr Asn Asn				
		610		615	620
	Asn Leu Glu Asp Tyr Gln Thr Ile Asn Lys Arg Phe Thr Thr Gly Thr				
	625		630		635
	Asp Leu Lys Gly Val Tyr Leu Ile Leu Lys Ser Gln Asn Gly Asp Glu				
		645		650	655
	Ala Trp Gly Asp Asn Phe Ile Ile Leu Glu Ile Ser Pro Ser Glu Lys				
		660		665	670
	Leu Leu Ser Pro Glu Leu Ile Asn Thr Asn Asn Trp Thr Ser Thr Gly				
		675		680	685
	Ser Thr Asn Ile Ser Gly Asn Thr Leu Thr Leu Tyr Gln Gly Gly Arg				
		690		695	700
	Gly Ile Leu Lys Gln Asn Leu Gln Leu Asp Ser Phe Ser Thr Tyr Arg				
	705		710		715
	Val Tyr Phe Ser Val Ser Gly Asp Ala Asn Val Arg Ile Arg Asn Ser				

	725	730	735
Arg Glu Val Leu Phe Glu Lys Arg Tyr Met Ser Gly Ala Lys Asp Val			
	740	745	750
Ser Glu Met Phe Thr Thr Lys Phe Glu Lys Asp Asn Phe Tyr Ile Glu			
	755	760	765
Leu Ser Gln Gly Asn Asn Leu Tyr Gly Gly Pro Ile Val His Phe Tyr			
	770	775	780
Asp Val Ser Ile Lys			
785			

<210> 2
 <211> 2370
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Vip3A-01 核苷酸序列

[0004]

<400> 2
 atgaacaaga acaacaccaa gctctccaca cgggcacttc cctcctttat tgaactacttt 60
 aatggcatct atgggtttgc tacggggatc aaggacatta tgaacatgat cttcaagaca 120
 gacactggcg gggatcttac gctcgacgag attcttaaga atcagcaact cctgaacgat 180
 atctctggca agctggacgg cgtgaatggg tcacttaacg acctcategc tcaggggaa 240
 ctcaacacag aactgtetaa ggagatcctc aagattgcaa atgagcagaa ccaagttctt 300
 aatgatgtga acaataaget cgacgccatc aacacaatgc ttccggtgta cctcccaaag 360
 attactagea tgetctcgga cgtcatgaag cagaactacg cgctgtcctt tcaaattgag 420
 tatctgagca agcagcttea agaaatctcg gacaagctgg atatcattaa tgtgaacgtc 480
 ctcatcaaca geacctgac ggagattaca ceggegtacc agaggateaa gtatgtgaat 540
 gagaagttcg aggaactcac ttttgctaca gaaactteca gcaaggtcaa gaaggatggc 600
 tcaccagccg acatcctgga tgagcttaca gaactcactg agctggcgaa gtcctgacc 660
 aagaatgacg tegatggett cgagttttac ctgaacaegt tccacgacgt tatggtgggc 720
 aacaatcttt ttgggcggag cgetctcaag actgcatcgg aactgateac caaggagaac 780
 gtttaagacga geggctcgga ggtcgggaat gtttacaact teettatcgt cctcaaccga 840
 ctccaggecc aagcgtttct cacgctgacc acctgccgea agctcctcgg cctcgcagac 900
 atcgattaca cctccatcat gaacgagcac ctgaacaagg agaaggagga gtteccgctg 960
 aatatecttc egacaetctc gaacaacttt tctaatecaa actacgetaa ggteaagggc 1020

	tccgacgaag atgcaaagat gatcggtgag gccaagcctg gecatgcgct catcgggttc	1080
	gagattteta aegactcaat taccgtgctg aaggtctacg aggcgaagct caagcagaat	1140
	tatcaagtgg acaaggatc tctgtcagag gttatctacg ggcacatgga taagctgctt	1200
	tgcctgac agtccgagca aatctactat acgaacaata ttgtcttccc caacgaatac	1260
	gtgatcacca agattgactt tacgaagaag atgaagacac tccggtacga ggtgacggct	1320
	aactttatg attegctac gggcgagatc gacctcaaca agaagaaggt cgaatcatcc	1380
	gaggccgaat acagaacct gtcggcgaac gaegatggcg tgtatatgcc tcttggggtc	1440
	atttttgaga ccttctcac gcccatcaat ggtttgggc tccaggcaga tgagaactcc	1500
	cgctgatca ccttacgtg caagagctac ctccaggagc tgetgcttgc caccgacctc	1560
	tctaacaagg aaacgaaget gatcgttccg ccatcaggct tcattctcaa tattgtggag	1620
	aacgggtcaa ttgaggaaga taatctgga cctgggaagg ctaacaataa gaacgcatac	1680
	gttgaccaca caggcgggggt gaatggcact aaggcgctct atgtgcataa ggatggtgce	1740
	atctcccagt tcattggcga caagctgaag ccgaagacag aatacgtgat tcaatatact	1800
	gtgaagggca agccaagcat ccacctcaag gatgagaaca cagggtacat ccattaagaa	1860
	gatactaaca acaacctgga ggactaccag acaatcaata agaggttcac aactggcaact	1920
	gacctgaagg gggctctct tattctcaag tcccagaatg gcgatgagcc ctggggcgac	1980
	aacttcatca ttctcgaaat ctcccctage gagaagctcc tgagccccga gctgattaac	2040
[0005]	accaataact ggacatccac tggcagcacg aatatctcgg ggaacacct gacgctttac	2100
	cagggcggga gaggcattct gaagcagaac ctccaactgg attcgttctc tacctacaga	2160
	gtctatTTTT cagtttccgg cgacgcgaat gtgcgcatca ggaactcgcg ggaagtcctc	2220
	ttcgagaaga gatacatgtc tggcgctaag gatgtgtcag aaatgttcac cacgaagttt	2280
	gagaaggaca acttttatat cgaactgtcc caaggaata acctctacgg cggccccatt	2340
	gttcattttt acgacgtgag catcaagtga	2370

<210> 3

<211> 789

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Vip3A-02 氨基酸序列

<400> 3

Met Asn Lys Asn Asn Thr Lys Leu Ser Thr Arg Ala Leu Pro Ser Phe

1 5 10 15

Ile Asp Tyr Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Lys Asp

	20	25	30
	Ile Met Asn Met Ile Phe Lys Thr Asp Thr Gly Gly Asp Leu Thr Leu		
	35	40	45
	Asp Glu Ile Leu Lys Asn Gln Gln Leu Leu Asn Asp Ile Ser Gly Lys		
	50	55	60
	Leu Asp Gly Val Asn Gly Ser Leu Asn Asp Leu Ile Ala Gln Gly Asn		
	65	70	75
	Leu Asn Thr Glu Leu Ser Lys Glu Ile Leu Lys Ile Ala Asn Glu Gln		
	85	90	95
	Asn Gln Val Leu Asn Asp Val Asn Asn Lys Leu Asp Ala Ile Asn Thr		
	100	105	110
	Met Leu Arg Val Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Ser Met Leu Ser Asp Val		
	115	120	125
	Ile Lys Gln Asn Tyr Ala Leu Ser Leu Gln Ile Glu Tyr Leu Ser Lys		
	130	135	140
	Gln Leu Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Ile Ile Asn Val Asn Val		
	145	150	155
[0006]	Leu Ile Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ala Tyr Gln Arg Ile		
	165	170	175
	Lys Tyr Val Asn Glu Lys Phe Glu Glu Leu Thr Phe Ala Thr Glu Thr		
	180	185	190
	Ser Ser Lys Val Lys Lys Asp Gly Ser Pro Ala Asp Ile Leu Asp Glu		
	195	200	205
	Leu Thr Glu Leu Thr Glu Leu Ala Lys Ser Val Thr Lys Asn Asp Val		
	210	215	220
	Asp Gly Phe Glu Phe Tyr Leu Asn Thr Phe His Asp Val Met Val Gly		
	225	230	235
	Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr Ala Ser Glu Leu Ile		
	245	250	255
	Thr Lys Glu Asn Val Lys Thr Ser Gly Ser Glu Val Gly Asn Val Tyr		
	260	265	270
	Asn Phe Leu Ile Val Leu Thr Ala Leu Gln Ala Gln Ala Phe Leu Thr		
	275	280	285
	Leu Thr Thr Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ala Asp Ile Asp Tyr Thr		
	290	295	300
	Ser Ile Met Asn Glu His Leu Asn Lys Glu Lys Glu Glu Phe Arg Val		

305	310	315	320
Asn Ile Leu Pro Thr Leu Ser Asn Thr Phe Ser Asn Pro Asn Tyr Ala			
	325	330	335
Lys Val Lys Gly Ser Asp Glu Asp Ala Lys Met Ile Val Glu Ala Lys			
	340	345	350
Pro Gly His Ala Leu Ile Gly Phe Glu Ile Ser Asn Asp Ser Ile Thr			
	355	360	365
Val Leu Lys Val Tyr Glu Ala Lys Leu Lys Gln Asn Tyr Gln Val Asp			
	370	375	380
Lys Asp Ser Leu Ser Glu Val Ile Tyr Gly Asp Met Asp Lys Leu Leu			
385	390	395	400
Cys Pro Asp Gln Ser Glu Gln Ile Tyr Tyr Thr Asn Asn Ile Val Phe			
	405	410	415
Pro Asn Glu Tyr Val Ile Thr Lys Ile Asp Phe Thr Lys Lys Met Lys			
	420	425	430
Thr Leu Arg Tyr Glu Val Thr Ala Asn Phe Tyr Asp Ser Ser Thr Gly			
	435	440	445
Glu Ile Asp Leu Asn Lys Lys Lys Val Glu Ser Ser Glu Ala Glu Tyr			
[0007]	450	455	460
Arg Thr Leu Ser Ala Asn Asp Asp Gly Val Tyr Met Pro Leu Gly Val			
465	470	475	480
Ile Ser Glu Thr Phe Leu Thr Pro Ile Asn Gly Phe Gly Leu Gln Ala			
	485	490	495
Asp Glu Asn Ser Arg Leu Ile Thr Leu Thr Cys Lys Ser Tyr Leu Arg			
	500	505	510
Glu Leu Leu Leu Ala Thr Asp Leu Ser Asn Lys Glu Thr Lys Leu Ile			
	515	520	525
Val Pro Pro Ser Gly Phe Ile Ser Asn Ile Val Glu Asn Gly Ser Ile			
	530	535	540
Glu Glu Asp Asn Leu Glu Pro Trp Lys Ala Asn Asn Lys Asn Ala Tyr			
545	550	555	560
Val Asp His Thr Gly Gly Val Asn Gly Thr Lys Ala Leu Tyr Val His			
	565	570	575
Lys Asp Gly Gly Ile Ser Gln Phe Ile Gly Asp Lys Leu Lys Pro Lys			
	580	585	590
Thr Glu Tyr Val Ile Gln Tyr Thr Val Lys Gly Lys Pro Ser Ile His			

aacggcatct	acggcttegc	caccggcadc	aaggacatca	tgaacatgat	cttcaagacc	120
gacaceggcg	gegacctgac	cctggacgag	atcctgaaga	accagcagct	getgaaagac	180
atcagcggca	agctggacgg	cgtgaacggc	agcctgaacg	acctgategc	ccagggcaac	240
ctgaacaccg	agctgagcaa	ggagatcctt	aagatcgcca	acgagcagaa	ccaggtgctg	300
aacgacgtga	acaacaaget	ggacgccatc	aacaccatgc	tgcgcgtgta	cctgccgaag	360
atcaccagca	tgctgagcga	cgtgatgaag	cagaactacg	cctgagcctt	gcagatcgag	420
tacctgagca	agcagctgca	ggagatcagc	gacaagetgg	acatcatcaa	cgtgaaagtc	480
ctgateaaca	gcacctgac	cgagatcacc	ccggcctacc	agcgcaccaa	gtactgtaac	540
gagaagtteg	aagagctgac	cttcgccacc	gagaccagca	gcaaggtgaa	gaaggacggc	600
agccccggcg	acatcctgga	cgagctgacc	gagctgaccg	agctggcgaa	gagcgtgacc	660
aagaacgaag	tggacggctt	cgagttctac	ctgaacacct	tcacgcagct	gatggtgggc	720
aacaacctgt	tggcccgeag	cgccctgaag	accgccagcg	agetgatcac	caaggagaac	780
gtgaagacca	gcggcagcga	ggtgggcaac	gtgtacaact	tctgatcgtt	gctgaccgcc	840
ctcgaggccc	aggccttctt	gacctgacc	acctgtcgca	agctgctggg	cctggccgac	900
atcgactaca	ccagcatcat	gaacgagcac	ttgaacaagg	agaaggagga	gttccgcgtg	960
aacatcctgc	cgacctgag	caacaccttc	agcaaccgca	actacgccaa	ggtgaagggc	1020
agcgacgagg	acgccaagat	gatcgtggag	gctaagccgg	gccacgcgct	gatcggcttc	1080
gagatcagca	acgacagcat	caccgtgctg	aagggtgtacg	aggccaagct	gaagcagaac	1140
taccaggtgg	acaaggacag	cttgagcgag	gtgatctacg	gcgacatgga	caagctgctg	1200
tgtccggacc	agagcgagca	aatctactac	accaacaaca	tcgtgttccc	gaacgagtac	1260
gtgatcacca	agatcgactt	caccaagaag	atgaagaccc	tgccttacga	ggtgaccgcc	1320
aacttctacg	acagcagcac	cggcgagatc	gacctgaaca	agaagaaggt	ggagagcagc	1380
gaggccgagt	accgcacct	gagcgcgaac	gacgacggcg	tctacatgcc	actgggcgtg	1440
atcagcggca	ccttctgac	cccgatcaac	ggctttggcc	tgcagccgca	cgagaacagc	1500
cgctgatca	ccctgacctg	taagagctac	ctgcgcgagc	tgctgctagc	caccgacctg	1560
agcaacaagg	agaccaagct	gatcgtgcca	ccgagcggct	tcateagcaa	catcgtggag	1620
aacggcagca	tegaggagga	caacctggag	cgtggaagg	ccaacaaca	gaacgcctac	1680
gtggaccaca	ccggcggcgt	gaacggcacc	aaggccctgt	acgtgcacaa	ggacggcggc	1740
atcagccagt	teatcggega	caagctgaag	ccgaagaccg	agtaogtgat	ccagtaaccc	1800
gtgaagggca	agccatcgat	tcacctgaag	gacgagaaca	ccgctacat	ccactacgag	1860
gacaccaaca	acaacctgga	ggactaccag	accatcaaca	ageccttca	caccggcacc	1920
gacctgaagg	gcgtgtacct	gatcctgaag	agccagaacg	gcgacgaggc	ctggggcgac	1980
aacttctaca	tcttgagat	cagcccagagc	gagaagetgc	tgagcccgga	getgateaac	2040
accaacaact	ggaccagcac	cggcagcacc	aacatcagcg	gcaaacacct	gacctgtac	2100
caggggcgcc	gggcctcct	gaagcagaac	ctgcagctgg	acagcttcag	cacctaccgc	2160
gtgtaactca	gcgtgagcgg	cgacgccaac	gtgcgcatcc	gcaactccc	cgaggtgetg	2220

[0009]

ttcgagaaga ggtacatgag cggegcccaag gacgtgagcg agatgtteac caccaagttc 2280
 gagaaggaca acttctacat cgagctgagc cagggcaaca acctgtacgg cggeccgata 2340
 gtgcaattct acgacgtgag catcaagtag 2370

<210> 5
 <211> 615
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Cry1Ab 氨基酸序列

<400> 5

[0010] 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
 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
	Asp Trp Ile Arg Tyr Asn Gln Phe Arg Arg Glu Leu Thr Leu Thr Val		
	225	230	235
	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
[0011]	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
	Tyr Arg Lys Ser Gly Thr Val Asp Ser Leu Asp Glu Ile Pro Pro Gln		
	405	410	415
	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
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			
	610	615	

[0012]

<210> 6
 <211> 1848
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Cry1Ab 核苷酸序列

<400> 6
 atggacaaca acccaaacat caacgaatgc attecatata actgcttgag taaccagaa 60
 gttgaagtac ttggtggaga acgcattgaa accggttaca ctccatcga catctcttg 120
 tcttgacac agttttctgct cagcgagttc gtgccagggtg ctgggttctg tetcggaata 180
 gttgacatea tetggggtat ctttgggtcca tetcaatggg atgcattcct ggtgcaaatt 240
 gagcagttga tcaaccagag gatogaagag ttgccaggga accagccat ctctaggttg 300
 gaaggattga gcaatcteta ccaaatctat geagagagct teagagagtg ggaagccgat 360
 cctaetaacc cagctctctc egaggaaatg egtattcaat tcaacgacat gaacagcgc 420

	ttgaccacag etatcccatt gttegcagtc cagaactacc aagttcctct cttgtccgtg	480
	tacgttcaag cagetaatct tcaectcage gtgcttcgag acgttagcgt gtttgggcaa	540
	aggtggggat tegatgctgc aaccatcaat agecgttaca acgaccttac taggetgatt	600
	ggaaactaca cegaccacgc tgttcgttgg tacaacactg gettggagcg tgtctggggt	660
	cctgattcta gagattggat tagatacaac cagttcagga gagaattgac cctcacagtt	720
	ttggacattg tgtctctctt cccgaactat gaectecagaa cctaccctat cegtacagt	780
	teccaactta ccagagaaat ctataactaac ccagttcttg agaacttega cggtagcttc	840
	cgtggttctg cccaaggtat cgaaggetc atcaggagcc cacacttgat ggacatctg	900
	aacagcataa ctatctaac cgatgctcac agaggagagt attactggtc tggacaccag	960
	atcatggcct ctccagttgg attcagcggg cccagattta ctttctctct ctatggaact	1020
	atgggaaacg ccgctccaca acaacgtatc gttgetcaac taggtcaggg tgtctacaga	1080
	accttgtctt ccaccttgta cagaagacct ttcaatatcg gtatcaacaa ccagcaactt	1140
	tccgttcttg acggaacaga gttegcctat ggaacctctt ctaacttgc atecgtgtt	1200
	tacagaaaga gcggaaccgt tgattccttg gacgaaatcc caccacagaa caacaatgtg	1260
	ccaccaggc aaggattctc ccacaggttg agccaactgt ccatgttccg ttccggatte	1320
	agcaacagtt ccgtgagcat catcagagct cctatgttct catggattca tegtagtgct	1380
	gagttcaaca atatcattcc ttctctcaa atcaccctaaa tccattgac caagtctact	1440
[0013]	aaccttggat ctggaacttc tglctgaaa ggaccaggct tcacaggagg tgatattctt	1500
	agaagaactt ctectggcca gattagcacc ctcagagtta acatcaactgc accactttct	1560
	caaagatate gtgtcaggat tegttacgca tetaeccacta acttgcatt ccacacctc	1620
	atcgacggaa ggcctataca tcagggtaac ttctccgcaa ccatgtcaag cggeagcaac	1680
	ttgcaatccg gcagcttcag aaccgtcggg tteactactc ctttcaactt ctctaacgga	1740
	teaagegttt tcacccttag cgtctatgtg ttcaattctg gcaatgaagt gtacattgac	1800
	cgtattgagt ttgtgectgc cgaagttacc ttgaggctg agtactga	1848

<210> 7

<211> 328

<212> DNA

<213> Cauliflower mosaic virus

<400> 7

	ccattgceca getatctgtc actttatigt gaagatagtg gaaaaggaag gtgctccta	60
	caaatgecat cattgcgata aaggaaaggc catcgttgaa gatgcctctg ccgacagtgg	120
	teccaagat ggacccceac ccaegaggag catcgttgaa aaagaagacg ttccaaccac	180
	gtcttcaag caagtggatt gatgtgatat etccactgae gtaagggatg acgeacaate	240

ccactatcct tegcaagacc cttectctat ataaggaagt tcatttcatt tggagaggac 300
acgetgacaa getgacteta gcagatct 328

<210> 8

<211> 253

<212> DNA

<213> *Agrobacterium tumefaciens*

<400> 8

gatcgttcaa acatttggca ataaagtctt ttaagattga atcctgttgc eggteittgc 60
atgattatea tataatttet gttgaattac gttaagcatg taataattaa catgtaatgc 120
atgacgttat ttatgagatg ggTTTTatg attagagtcc cgcaattata catttaatac 180
gcatagaaa aaaaaatata gcgcgcaaac taggataaat tategcgcgc ggtgteatct 240
atgttactag atc 253

[0014]

<210> 9

<211> 1026

<212> DNA

<213> *Salmonella enterica*

<400> 9

atgaaaaagc ctgaactcac cgegacgtct gtcgagaagt ttctgatcga aaagttcgac 60
agcgtctccg acctgatgca gctctcggag ggcaagaat ctctgtcttt cagcttcgat 120
gtaggagggc gtggatatgt cctgcgggta aatagctgcg ccgatggttt ctacaaagat 180
cgttatgttt atcggcaett tgcacggcc gcgctcccga ttcgggaagt gettgacatt 240
ggggaattca gegagagcct gaacctattgc atctcccgc gtgcacaggg tgtaeagt 300
caagacctgc ctgaaacega actgcccgtt gttctgcage eggtoegga ggccatggat 360
gcgatcgtg cggccgatct tagccagacg agcgggttcg gccattcgg accgcaagga 420
atcggteaat aactacatg gcgtgatttc atatgcgcga ttgctgatec ccatgtgtat 480
cactggcaaa ctgtgatgga cgacaccgtc agtgcgtccg tgcgcaggc tctgatgag 540
ctgatgtttt gggccgagga ctgccccgaa gtcggcacc tegtgcacge ggattteggc 600
tccaacaatg tcttgacgga caatggccgc ataacagcgg tcattgactg gagegagggc 660
atgttegggg attcccata cgaggctgcc aacatcttct tctggagcgc gtggttgct 720
tgtatggage agcagacgcg ctacttegag cggaggcate cggagcttgc aggatcgcg 780

[0015]

cggtccggg cgtatatgct cgcattggt cttgaccaac tetatcagag cttggttgac	840
ggcaatttcg atgatgcage ttgggcgcag ggtcgatgcg acgcaatcgt ccgatccgga	900
gccgggactg tegggcgctac acaaatgcc cgcagaagcg cggccgtctg gaccgatgge	960
tgtgtagaag tactcgccga tagtggaaac cgacgcccc a geactcgtec gagggcaaag	1020
gaatag	1026

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 引物 1

<400> 10

attctegaaa tetcccctag cg	22
--------------------------	----

<210> 11

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 引物 2

<400> 11

gctgccagtg gatgtccag	19
----------------------	----

<210> 12

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 探针 1

[0016]

<400> 12

ctcctgagcc cegagctgat taacacc

27

<210> 13

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 引物 3

<400> 13

tgcgtattca attcaacgac atg

23

<210> 14

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 引物 4

<400> 14

cttgtagtt ctggactgcg aac

23

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 探针 2

<400> 15

cagcgcttg accacagcta tccc

24

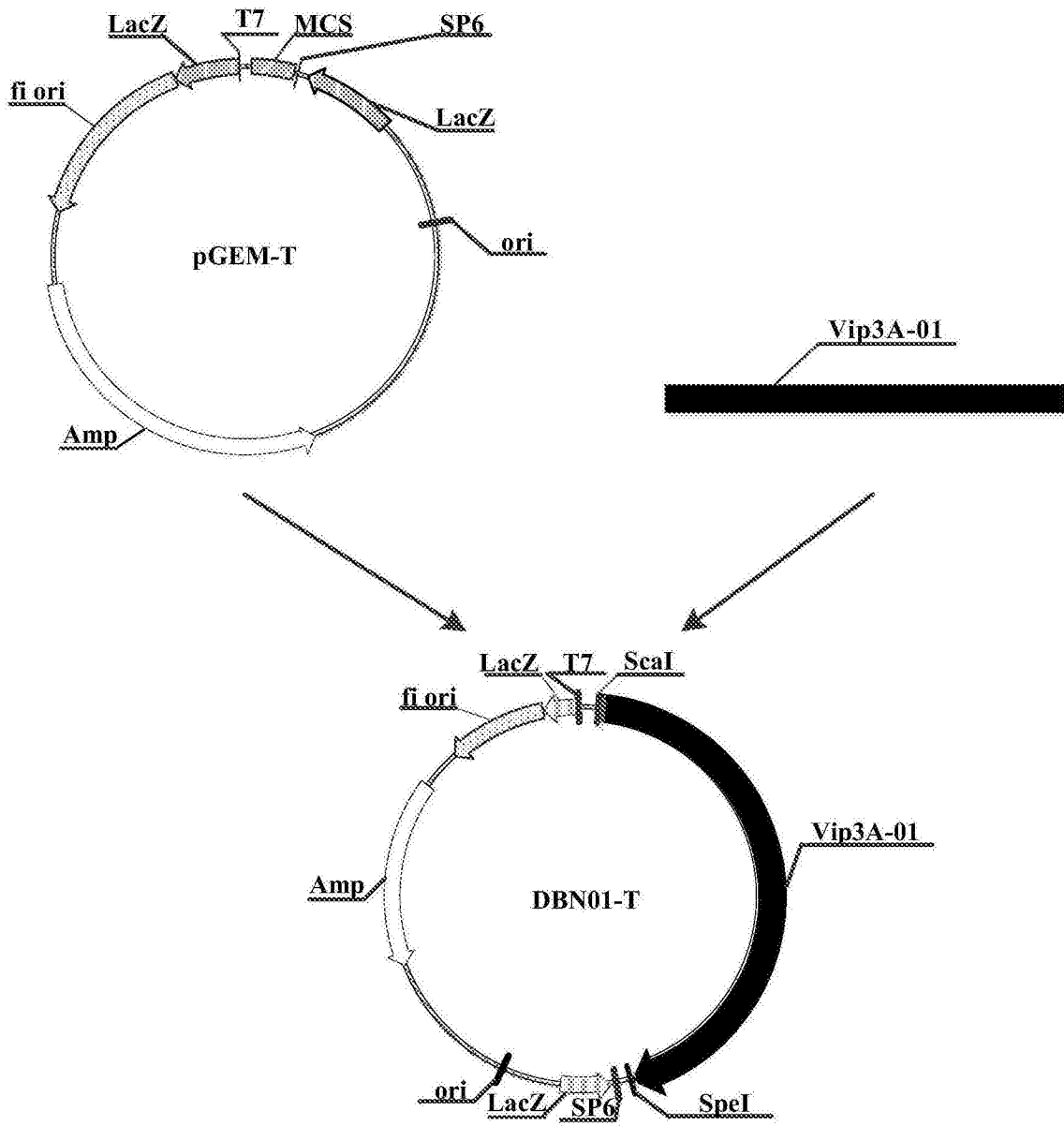


图1

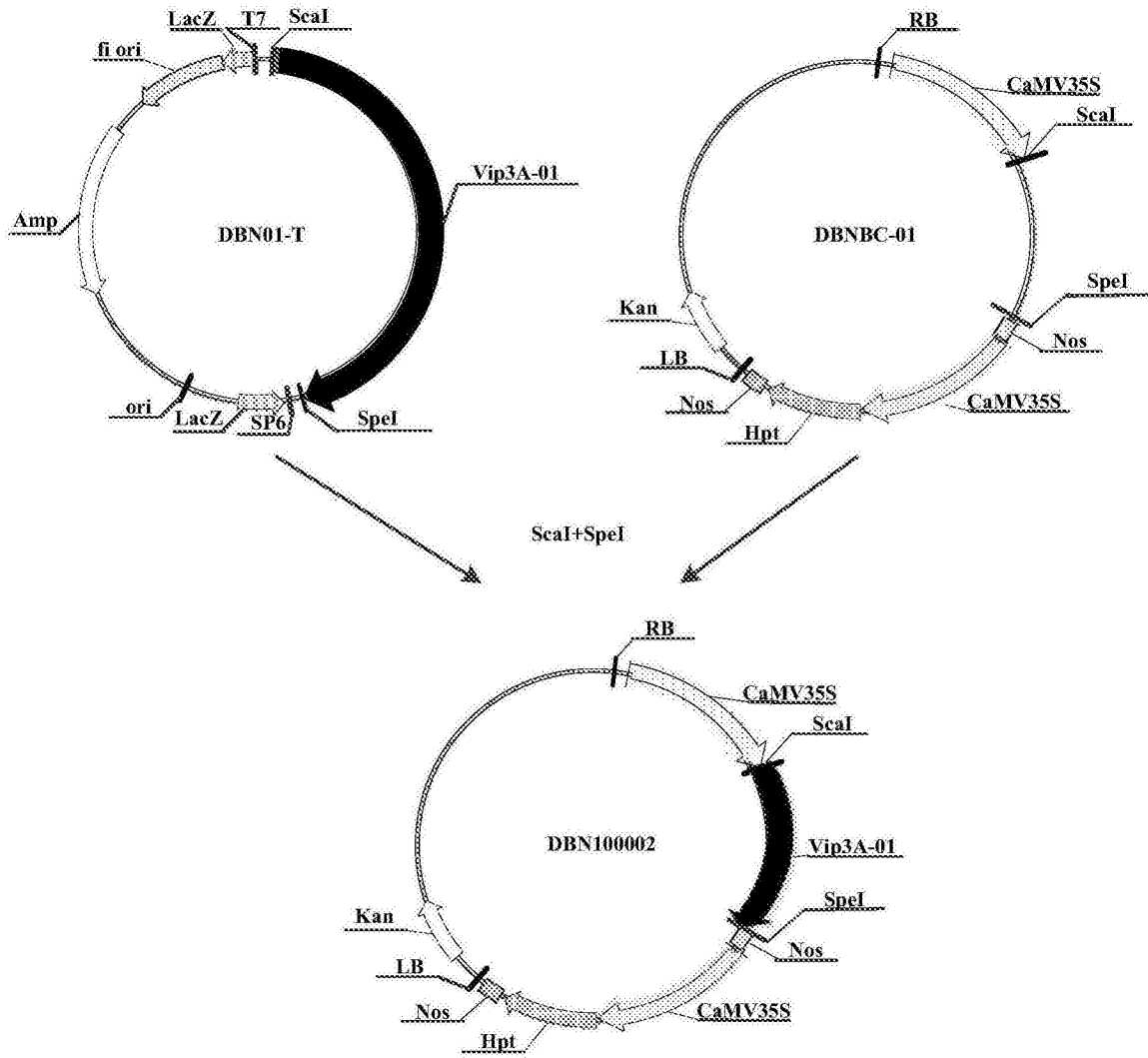


图2

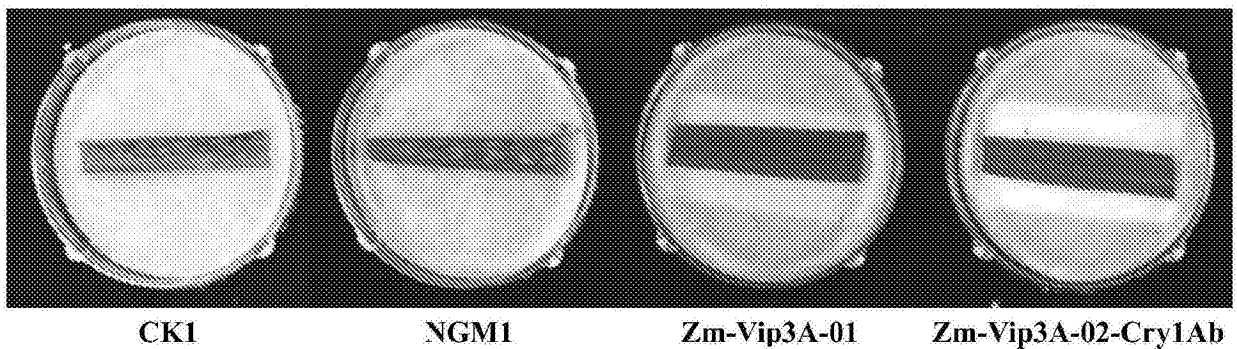


图3