(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 102993279 A
(43)申请公布日 2013.03.27

(21)申请号 201210469049.2

(22)申请日 2012.11.19

(71)申请人 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
申请人 北京大北农科技集团股份有限公司生物技术中心

(72)发明人 张爱红 贾志伟 李胜兵 杨旭 王利君 王登元 王志新 牛丽红 黄金存 于福宽

(51)Int.Cl.
C07K 14/325(2006.01)
C12N 15/32(2006.01)
C12N 15/63(2006.01)
C12N 5/10(2006.01)
C12N 1/13(2006.01)
C12N 1/19(2006.01)
C12N 1/21(2006.01)
C12N 7/01(2006.01)
C12P 21/02(2006.01)
A01H 5/00(2006.01)
A01N 63/02(2006.01)
A01P 7/04(2006.01)

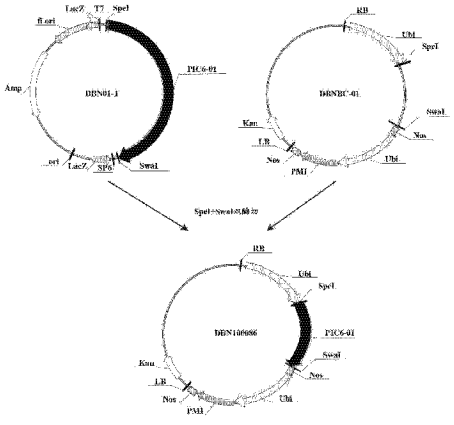
权利要求书 2 页 说明书 19 页
序列表 15 页 附图 5 页

(54)发明名称

杀虫蛋白质、其编码基因及用途

(57)摘要

本发明涉及一种杀虫蛋白质、其编码基因及用途，杀虫蛋白质包括：(a)具有SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列组成的蛋白质；或(b)在(a)中的氨基酸序列经过取代和/或缺失和/或添加一个或几个氨基酸且具有杀虫活性的由(a)衍生的蛋白质；或(c)与SEQ ID NO:2具有至少90%序列同一性的氨基酸序列组成的蛋白质。本发明杀虫蛋白质不仅表达量高且稳定性好，对昆虫害虫的毒力强。



CN 102993279 A

1. 一种杀虫蛋白质，其特征在于，包括：

(a) 具有 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列组成的蛋白质；或

(b) 在(a)中的氨基酸序列经过取代和/或缺失和/或添加一个或几个氨基酸且具有杀虫活性的由(a)衍生的蛋白质；或

(c) 与 SEQ ID NO:2 具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列组成的蛋白质。

2. 根据权利要求 1 所述杀虫蛋白质，其特征在于，所述杀虫蛋白质为与 SEQ ID NO:2 具有至少 95% 序列同一性的氨基酸序列组成的蛋白质。

3. 根据权利要求 1 所述杀虫蛋白质，其特征在于，所述杀虫蛋白质为与 SEQ ID NO:2 具有至少 99% 序列同一性的氨基酸序列组成的蛋白质。

4. 一种杀虫基因，其特征在于，包括：

(a) 编码权利要求 1-3 任一项所述杀虫蛋白质的核苷酸序列；或

(b) 在严格条件下与(a)限定的核苷酸序列杂交且编码具有杀虫活性的蛋白质的核苷酸序列；或

(c) 具有 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列。

5. 一种表达盒，其特征在于，包含在有效连接的调控序列调控下的权利要求 4 所述杀虫基因。

6. 一种包含权利要求 4 所述杀虫基因或权利要求 5 所述表达盒的重组载体。

7. 一种包含权利要求 4 所述杀虫基因或权利要求 5 所述表达盒的转基因宿主生物，其特征在于，包括植物细胞、动物细胞、细菌、酵母、杆状病毒、线虫或藻类。

8. 根据权利要求 7 所述转基因宿主生物，其特征在于，所述植物为玉米、大豆、棉花、水稻、小麦、高粱、牧草或甘蔗。

9. 一种产生杀虫蛋白质的方法，其特征在于，包括：

获得权利要求 7 或 8 所述转基因宿主生物的细胞；

在允许产生杀虫蛋白质的条件下培养所述转基因宿主生物的细胞；

回收所述杀虫蛋白质。

10. 一种用于增加昆虫靶范围的方法，其特征在于，包括：将权利要求 1-3 任一项所述杀虫蛋白质或权利要求 5 所述表达盒编码的杀虫蛋白质在植物中与至少一种不同于权利要求 1-3 任一项所述杀虫蛋白质或权利要求 5 所述表达盒编码的杀虫蛋白质的第二种杀虫核苷酸一起表达。

11. 根据权利要求 10 所述用于增加昆虫靶范围的方法，其特征在于，所述第二种杀虫核苷酸可以编码 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 10 所述用于增加昆虫靶范围的方法，其特征在于，所述第二种杀虫核苷酸为抑制目标昆虫害虫中重要基因的 dsRNA。

13. 一种产生抗虫植物的方法，其特征在于，包括：将权利要求 4 所述杀虫基因或权利要求 5 所述表达盒或权利要求 6 所述重组载体导入植物。

14. 根据权利要求 12 所述产生抗虫植物的方法，其特征在于，所述植物为玉米、大豆、棉花、水稻、小麦、高粱、牧草或甘蔗。

15. 一种用于保护植物免受由昆虫害虫引起的损伤的方法，其特征在于，包括：将权利

要求 4 所述杀虫基因或权利要求 5 所述表达盒或权利要求 6 所述重组载体导入植物，使导入后的植物产生足够保护其免受昆虫害虫侵害量的杀虫蛋白质。

16. 根据权利要求 15 所述用于保护植物免受由昆虫害虫引起的损伤的方法，其特征在于，所述植物为玉米、大豆、棉花、水稻、小麦、高粱、牧草或甘蔗。

17. 一种控制昆虫害虫的方法，其特征在于，包括：使昆虫害虫与抑制量的权利要求 1-3 任一项所述杀虫蛋白质或由权利要求 4 所述杀虫基因编码的昆虫抑制性蛋白质接触。

18. 根据权利要求 17 所述控制昆虫害虫的方法，其特征在于，所述昆虫害虫是鳞翅目昆虫害虫。

杀虫蛋白质、其编码基因及用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种杀虫蛋白质、其编码基因及用途，特别是涉及一种改造的 PIC6-01 杀虫蛋白质、其编码基因及用途。

背景技术

[0002] 植物虫害是导致农作物损失的主要因素，给农民造成重大的经济损失，甚至影响到当地人口的生存状况。为了防治植物虫害，人们通常使用广谱化学杀虫剂和生物杀虫制剂，但二者在实际应用中都具有局限性：化学杀虫剂会带来环境污染的问题，并导致抗药性昆虫的出现；而生物杀虫制剂在环境中容易降解，在生产上需要重复施用，大大增加了生产成本。

[0003] 为了解决化学杀虫剂和生物杀虫制剂在实际应用中的局限性，科学家们经过研究发现将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。PIC6 杀虫蛋白是众多杀虫蛋白中的一种，是由苏云金芽孢杆菌产生的伴胞结晶蛋白。

[0004] PIC6 蛋白被昆虫摄入进入中肠，毒蛋白原毒素被溶解在昆虫中肠的碱性 PH 环境下。蛋白 N- 和 C- 末端被碱性蛋白酶消化，将原毒素转变成活性片段；活性片段和昆虫中肠上皮细胞膜上表面上受体结合，插入肠膜，导致细胞膜出现穿孔病灶，破坏细胞膜内外的渗透压变化及 PH 平衡等，扰乱昆虫的消化过程，最终导致其死亡。

[0005] 每年因植物虫害造成的粮食损失巨大，例如小菜蛾、玉米螟、棉铃虫、东方黏虫或二化螟等。目前未发现 PIC6 杀虫蛋白在植物中的表达水平和毒力的报道。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种杀虫蛋白质、其编码基因及用途，所述 PIC6-01 杀虫蛋白在植物中（尤其为玉米）具有较高的表达量和毒力。

[0007] 为实现上述目的，本发明提供了一种杀虫蛋白质，包括：

[0008] （a）具有 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列组成的蛋白质；或

[0009] （b）在（a）中的氨基酸序列经过取代和 / 或缺失和 / 或添加一个或几个氨基酸且具有杀虫活性的由（a）衍生的蛋白质；或

[0010] （c）与 SEQ ID NO:2 具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列组成的蛋白质。

[0011] 进一步地，所述杀虫蛋白质为与 SEQ ID NO:2 具有至少 95% 序列同一性的氨基酸序列组成的蛋白质。

[0012] 更进一步地，所述杀虫蛋白质为与 SEQ ID NO:2 具有至少 99% 序列同一性的氨基酸序列组成的蛋白质。

[0013] 为实现上述目的，本发明提供了一种杀虫基因，包括：

[0014] （a）编码权利要求 1-3 任一项所述杀虫蛋白质的核苷酸序列；或

[0015] （b）在严格条件下与（a）限定的核苷酸序列杂交且编码具有杀虫活性的蛋白质的核苷酸序列；或

[0016] （c）具有 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列。

[0017] 所述严格条件可为在 6×SSC（柠檬酸钠）、0.5%SDS（十二烷基硫酸钠）溶液中，在 65℃下杂交，然后用 2×SSC、0.1%SDS 和 1×SSC、0.1%SDS 各洗膜 1 次。

[0018] 为实现上述目的，本发明还提供了一种表达盒，包含在有效连接的调控序列调控下的所述杀虫基因。

[0019] 为实现上述目的，本发明还提供了一种包含所述杀虫基因或所述表达盒的重组载体。

[0020] 为实现上述目的，本发明还提供了一种包含所述杀虫基因或所述表达盒的转基因宿主生物，包括植物细胞、动物细胞、细菌、酵母、杆状病毒、线虫或藻类。

[0021] 进一步地，所述植物为玉米、大豆、棉花、水稻、小麦、高粱、牧草或甘蔗。

[0022] 为实现上述目的，本发明还提供了一种产生杀虫蛋白质的方法，包括：

[0023] 获得所述转基因宿主生物的细胞；

[0024] 在允许产生杀虫蛋白质的条件下培养所述转基因宿主生物的细胞；

[0025] 回收所述杀虫蛋白质。

[0026] 为实现上述目的，本发明还提供了一种用于增加昆虫靶范围的方法，包括：将所述杀虫蛋白质或所述表达盒编码的杀虫蛋白质在植物中与至少一种不同于所述杀虫蛋白质或所述表达盒编码的杀虫蛋白质的第二种杀虫核苷酸一起表达。

[0027] 进一步地，所述第二种杀虫核苷酸可以编码 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。

[0028] 可选择地，所述第二种杀虫核苷酸为抑制目标昆虫害虫中重要基因的 dsRNA。

[0029] 在本发明中，PIC6-01 杀虫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 PIC6-01 杀虫蛋白质，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。

[0030] 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。因此可以使用 RNAi 技术特异性剔除或关闭特定基因的表达。

[0031] 为实现上述目的，本发明还提供了一种产生抗虫植物的方法，包括：将所述杀虫基因或所述表达盒或所述重组载体导入植物。

[0032] 优选地，所述植物为玉米、大豆、棉花、水稻、小麦、高粱、牧草或甘蔗。

[0033] 为实现上述目的，本发明还提供了一种用于保护植物免受由昆虫害虫引起的损伤的方法，包括：将所述的杀虫基因或所述的表达盒或所述的重组载体导入植物，使导入后的植物产生足够保护其免受昆虫害虫侵害量的杀虫蛋白质。

[0034] 优选地，所述植物为玉米、大豆、棉花、水稻、小麦、高粱、牧草或甘蔗。

[0035] 将所述的杀虫基因或所述的表达盒或所述的重组载体导入植物，在本发明中为将外源 DNA 导入植物细胞，常规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。

[0036] 为实现上述目的，本发明还提供了一种控制昆虫害虫的方法，包括：使昆虫害虫与抑制量的所述杀虫蛋白质或由所述杀虫基因编码的昆虫抑制性蛋白接触。

[0037] 优选地，所述昆虫害虫是鳞翅目昆虫害虫。

[0038] 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。

[0039] 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。

[0040] 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 和 PNA (肽核酸)。

[0041] 本发明中核酸分子或其片段在严格条件下与本发明杀虫基因杂交。任何常规的核酸杂交或扩增方法都可以用于鉴定本发明杀虫基因的存在。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。

[0042] 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℃条件下用 6.0× 氯化钠／柠檬酸钠(SSC)处理，然后在 50℃条件下用 2.0×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×SSC、50℃到高度严格条件的约 0.2×SSC、50℃。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℃，升高到高度严格条件的约 65 ℃。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×SSC、0.5%SDS 溶液中，在 65℃下与 SEQ ID NO:1 发生特异性杂交，然后用 2×SSC、0.1%SDS 和 1×SSC、0.1%SDS 各洗膜 1 次。

[0043] 因此，具有抗虫活性并在严格条件下与本发明序列 1 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。

[0044] 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鳞翅目昆虫害虫的生物活性的蛋白。

[0045] 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），包括临近片段和与全长分子相比内部和 / 或末端的缺失，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。在一些情况下（特别是植物中的表达），使用编码截短蛋白质的截短基因可能是有利的。优选的截短基因一般编码全长蛋白质的 40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98 或 99%。

[0046] 由于遗传密码子的丰余性，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。

[0047] 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。

[0048] 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。

[0049] 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)。

[0050] 因此,与序列 2 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 60%,优选的大于 75%,更优选的大于 80%,甚至更优选的大于 90%,并且可以大于 95%。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 49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、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。

[0051] 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杀虫基因的调节序列。

[0052] 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、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,马铃薯和西红柿的蛋白酶抑制基因(pin Ⅰ和 pin Ⅱ)和玉米蛋白酶抑制基因(MPI)的启动子。

[0053] 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。

[0054] 所述前导序列包含但不限于,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;人类免疫球蛋白质重链结合蛋白质(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。

[0055] 所述增强子包含但不限于,花椰菜花叶病毒(CaMV)增强子、玄参花叶病毒(FMV)增强子、康乃馨风化环病毒(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。

[0056] 对于单子叶植物应用而言,所述内含子包含但不限于,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,所述内含子包含但不限于, CAT-1 内含子、pKANNIBAL 内含子、PIV2 内含子和“超级泛素”内含子。

[0057] 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。

[0058] 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连结，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）。

[0059] 本发明中所述的“杀虫”是指对农作物害虫是有毒的。更具体地，目标昆虫是害虫，例如，但不限于，大部分鳞翅目害虫，如玉米螟、二化螟、棉铃虫、小菜蛾或东方黏虫等。

[0060] 本发明中，所述杀虫蛋白质为 PIC6-01 氨基酸序列，如序列表中 SEQ ID NO:2 所示。所述杀虫基因为 PIC6-01 核苷酸序列，如序列表中 SEQ ID NO:1 所示。所述杀虫基因为用于植物，特别是玉米转化的 DNA 序列，除了包含由 PIC6-01 核苷酸序列编码的蛋白质的编码区外，也可包含其他元件，例如编码转运肽的编码区、编码选择性标记的蛋白质或赋予除草剂抗性的蛋白质的编码区。

[0061] 本发明中 PIC6-01 杀虫蛋白质对大多数鳞翅目害虫具有毒性。本发明中的植物，特别是玉米，在其基因组中含有外源 DNA，所述外源 DNA 包含 PIC6-01 核苷酸序列，通过表达抑制量的该蛋白而保护其免受害虫的威胁。抑制量是指致死的或亚致死的剂量。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由 PIC6-01 核苷酸序列编码的蛋白质所靶向的昆虫的杀虫剂）。

[0062] 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。

[0063] 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鳞翅目害虫，更具体地为亚洲玉米螟、东方黏虫或二化螟等。

[0064] 此外，包含本发明杀虫蛋白质（PIC6-01 氨基酸序列）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，草胺膦抗性基因（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、对氨腈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。

[0065] 本发明提供了一种杀虫蛋白质、其编码基因及用途,具有以下优点:

[0066] 1、毒力强。本发明杀虫蛋白质 PIC6-01 的杀虫毒力强,尤其是针对危害玉米的鳞翅目害虫。

[0067] 2、表达量高。本发明杀虫基因 PIC6-01 采用玉米的偏好密码子,完全符合玉米基因的特性,使得本发明杀虫基因特别适合在单子叶植物中表达,尤其是玉米,其表达量高且稳定性好。

[0068] 3、杀虫谱广。本发明杀虫蛋白质 PIC6-01 蛋白不仅对亚洲玉米螟表现出较高的抗性,而且首次报道了本发明杀虫蛋白质 PIC6-01 蛋白对东方黏虫和二化螟也具有较高的活性,因此在植物上应用前景广阔。

[0069] 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

[0070] 图 1 为本发明杀虫蛋白质、其编码基因及用途的含有 PIC6-01 核苷酸序列的重组克隆载体 DBN01-T 构建流程图;

[0071] 图 2 为本发明杀虫蛋白质、其编码基因及用途的含有 PIC6-01 核苷酸序列的重组表达载体 DBN100086 构建流程图;

[0072] 图 3 为本发明杀虫蛋白质、其编码基因及用途的含有天然序列的重组表达载体 DBN100086N 构建流程图;

[0073] 图 4 为本发明杀虫蛋白质、其编码基因及用途的转基因玉米植株的 PIC6 杀虫蛋白质的 mRNA 相对含量图;

[0074] 图 5 为本发明杀虫蛋白质、其编码基因及用途的转基因玉米植株接种亚洲玉米螟的抗虫效果图;

[0075] 图 6 为本发明杀虫蛋白质、其编码基因及用途的转基因玉米植株接种二化螟的抗虫效果图;

[0076] 图 7 为本发明杀虫蛋白质、其编码基因及用途的转基因玉米植株接种东方黏虫的抗虫效果图。

具体实施方式

[0077] 下面通过具体实施例进一步说明本发明杀虫蛋白质、其编码基因及用途的技术方案。

[0078] 第一实施例、PIC6-01 基因序列的获得和合成

[0079] 1、获得 PIC6-01 基因序列

[0080] PIC6-01 杀虫蛋白质的氨基酸序列(699 个氨基酸),如序列表中 SEQ ID NO:2 所示;依据玉米偏好性密码子获得编码相应于所述 PIC6-01 杀虫蛋白质的氨基酸序列(699 个氨基酸)的核苷酸序列(2100 个核苷酸),如序列表中 SEQ ID NO:1 所示。玉米的密码子使用偏好性可参考 http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.

cgi?species=381124。

[0081] 2、合成上述 PIC6-01 核苷酸序列

[0082] 所述 PIC6-01 核苷酸序列(如序列表中 SEQ ID NO:1 所示)由南京金斯瑞生物科技公司合成;合成的所述 PIC6-01 核苷酸序列(SEQ ID NO:1)的 5'端还连接有 SpeI 酶切位点,所述 PIC6-01 核苷酸序列(SEQ ID NO:1)的 3'端还连接有 SwaI 酶切位点。

[0083] 同时,合成 PIC6-01 取代核苷酸序列(如序列表中 SEQ ID NO:3 所示),其为所述 PIC6-01 氨基酸序列(如序列表中 SEQ ID NO:2 所示)中第 693 位 Met 替换为 Asp;合成的所述 PIC6-01 取代核苷酸序列(SEQ ID NO:3)的 5'端还连接有 SpeI 酶切位点,所述 PIC6-01 取代核苷酸序列(SEQ ID NO:3)的 3'端还连接有 SwaI 酶切位点。

[0084] 同时,合成 PIC6-01 截短核苷酸序列(如序列表中 SEQ ID NO:4 所示),其为所述 PIC6-01 氨基酸序列(如序列表中 SEQ ID NO:2 所示)的第 1 至 660 位氨基酸;合成的所述 PIC6-01 截短核苷酸序列(SEQ ID NO:4)的 5'端还连接有 SpeI 酶切位点,所述 PIC6-01 截短核苷酸序列(SEQ ID NO:4)的 3'端还连接有 SwaI 酶切位点。

[0085] 同时,合成 PIC6-01 添加核苷酸序列(如序列表中 SEQ ID NO:5 所示),其为所述 PIC6-01 氨基酸序列(如序列表中 SEQ ID NO:2 所示)中在第 699 位后添加 3 个氨基酸 Arg、Glu、Asn;合成的所述 PIC6-01 添加核苷酸序列(SEQ ID NO:5)的 5'端还连接有 SpeI 酶切位点,所述 PIC6-01 添加核苷酸序列(SEQ ID NO:5)的 3'端还连接有 SwaI 酶切位点。

[0086] 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

[0087] 1、构建含有 PIC6-01 核苷酸序列的重组克隆载体 DBN01-T

[0088] 将合成的 PIC6-01 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 T7 RNA 聚合酶启动子;PIC6-01 为 PIC6-01 核苷酸序列(SEQ ID NO:1);MCS 为多克隆位点)。

[0089] 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. No:CD501),其热激条件为:50μl 大肠杆菌 T1 感受态细胞、10μl 质粒 DNA (重组克隆载体 DBN01-T),42℃水浴 30 秒;37℃水浴 1 小时(100rpm 转速下摇床摇动),在表面涂有 X-gal (5-溴-4-氯-3-吲哚-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℃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 100μl 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 150μl 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 150μl 冰冷的溶液 III(4M 醋酸钾,2M 醋酸),立即充分混匀,冰上放置 5-10min;于温度 4℃、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℃、转速 12000rpm 条件下离心 5min,弃上清液,沉淀用质量浓度为 70% 的乙醇洗涤后晾干;加入 30μl 含 Rnase(20μg/ml)的 TE(10mM Tris-HCl,1mM EDTA, PH8.0)溶解沉淀;于温度 37℃下水浴 30min,消化 RNA;于温度 -20℃

保存备用。

[0090] 提取的质粒经 SpeI 和 SwaI 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 PIC6-01 核苷酸序列为序列表中 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列，即 PIC6-01 核苷酸序列正确插入。

[0091] 按照上述构建重组克隆载体 DBN01-T 的方法，将合成的所述 PIC6-01 取代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，miPIC6-01 为 PIC6-01 取代核苷酸序列（SEQ ID NO:3）。酶切和测序验证重组克隆载体 DBN02-T 中所述 PIC6-01 取代核苷酸序列正确插入。

[0092] 按照上述构建重组克隆载体 DBN01-T 的方法，将合成的所述 PIC6-01 截短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，mtPIC6-01 为 PIC6-01 截短核苷酸序列（SEQ ID NO:4）。酶切和测序验证重组克隆载体 DBN03-T 中所述 PIC6-01 截短核苷酸序列正确插入。

[0093] 按照上述构建重组克隆载体 DBN01-T 的方法，将合成的所述 PIC6-01 添加核苷酸序列连入克隆载体 pGEM-T 上，得到重组克隆载体 DBN04-T，其中，maPIC6-01 为 PIC6-01 添加核苷酸序列（SEQ ID NO:5）。酶切和测序验证重组克隆载体 DBN04-T 中所述 PIC6-01 添加核苷酸序列正确插入。

[0094] 2、构建含有 PIC6-01 核苷酸序列的重组表达载体 DBN100086

[0095] 用限制性内切酶 SpeI 和 SwaI 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 PIC6-01 核苷酸序列片段插到表达载体 DBNBC-01 的 SpeI 和 SwaI 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，表达载体 DBNBC-01 中的 SpeI 和 SwaI 酶切位点也是利用常规的酶切方法引入的，构建成重组表达载体 DBN100086，其构建流程如图 2 所示（Kan：卡那霉素基因；RB：右边界；Ubi：玉米 Ubiquitin（泛素）基因启动子（SEQ ID NO:6）；PIC6-01：PIC6-01 核苷酸序列（SEQ ID NO:1）；Nos：胭脂碱合成酶的终止子（SEQ ID NO:7）；PMI：磷酸甘露糖异构酶基因（SEQ ID NO:8）；LB：左边界）。

[0096] 将重组表达载体 DBN100086 用热激方法转化大肠杆菌 T1 感受态细胞，其热激条件为：50μl 大肠杆菌 T1 感受态细胞、10μl 质粒 DNA（重组表达载体 DBN100086），42℃水浴 30 秒；37℃水浴 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℃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℃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 SpeI 和 SwaI 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 DBN100086 在 SpeI 和 SwaI 位点间的核苷酸序列为序列表中 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列，即 PIC6-01 核苷酸序列。

[0097] 按照上述构建重组表达载体 DBN100086 的方法，将 SpeI 和 SwaI 酶切重组克隆载体 DBN02-T 切下的所述 PIC6-01 取代核苷酸序列插入表达载体 DBNBC-01，得到重组表达载体 DBN100086-i。酶切和测序验证重组表达载体 DBN100086-i 在 SpeI 和 SwaI 位点间即为所述 PIC6-01 取代核苷酸序列。

[0098] 按照上述构建重组表达载体 DBN100086 的方法，将 SpeI 和 SwaI 酶切重组克隆载

体 DBN03-T 切下的所述 PIC6-01 截短核苷酸序列插入表达载体 DBNBC-01，得到重组表达载体 DBN100086-t。酶切和测序验证重组表达载体 DBN100086-t 在 SpeI 和 SwaI 位点间即为所述 PIC6-01 截短核苷酸序列。

[0099] 按照上述构建重组表达载体 DBN100086 的方法，将 SpeI 和 SwaI 酶切重组克隆载体 DBN04-T 切下的所述 PIC6-01 添加核苷酸序列插入表达载体 DBNBC-01，得到重组表达载体 DBN100086-a。酶切和测序验证重组表达载体 DBN100086-a 在 SpeI 和 SwaI 位点间即为所述 PIC6-01 添加核苷酸序列。

[0100] 3、构建含有天然序列的重组表达载体 DBN100086N（正对照）

[0101] 按照本发明第二实施例中 1 所述的构建含有 PIC6-01 核苷酸序列的重组克隆载体 DBN01-T 的方法，利用天然序列（SEQ ID NO:9）构建含有天然序列的重组克隆载体 DBN01R-T。对阳性克隆进行测序验证，结果表明重组克隆载体 DBN01R-T 中插入的天然序列为序列表中 SEQ ID NO:9 所示的核苷酸序列，即天然序列正确插入。

[0102] 按照本发明第二实施例中 2 所述的构建含有 PIC6-01 核苷酸序列的重组表达载体 DBN100086 的方法，利用天然序列构建含有天然序列的重组表达载体 DBN100086N，其构建流程如图 3 所示（载体骨架：pCAMBIA2301（CAMBIA 机构可以提供）；Kan：卡那霉素基因；RB：右边界；Ubi：玉米 Ubiquitin（泛素）基因启动子（SEQ ID NO:6）；mN：天然序列（SEQ ID NO:9）；Nos：胭脂碱合成酶的终止子（SEQ ID NO:7）；PMI：磷酸甘露糖异构酶基因（SEQ ID NO:8）；LB：左边界）。对阳性克隆进行测序验证，结果表明重组表达载体 DBN100086N 中插入的天然序列为序列表中 SEQ ID NO:9 所示的核苷酸序列，即天然序列正确插入。

[0103] 4、重组表达载体转化农杆菌

[0104] 对已经构建正确的重组表达载体 DBN100086、DBN100086-i、DBN100086-t、DBN100086-a 和 DBN100086N（天然序列）用液氮法转化到农杆菌 LBA4404（Invitrgen，Chicago，USA；Cat.No：18313-015）中，其转化条件为：100μL 农杆菌 LBA4404、3μL 质粒 DNA（重组表达载体）；置于液氮中 10 分钟，37℃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℃、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 BglII 酶切 DBN100086、DBN100086-i、DBN100086-t、DBN100086-a 后进行酶切验证，用限制性内切酶 StyI 和 BglI 酶切 DBN100086N（天然序列）后进行酶切验证，结果表明重组表达载体 DBN100086、DBN100086-i、DBN100086-t、DBN100086-a 和 DBN100086N（天然序列）结构完全正确。

[0105] 第三实施例、转入 PIC6-01 核苷酸序列的玉米植株的获得及验证

[0106] 1、获得转入 PIC6-01 核苷酸序列的玉米植株

[0107] 按照常规采用的农杆菌侵染法，将无菌培养的玉米品种综 31（Z31）的幼胚与第二实施例中 4 所述的农杆菌共培养，以将第二实施例中 2 和 3 构建的重组表达载体 DBN100086、DBN100086-i、DBN100086-t、DBN100086-a 和 DBN100086N（天然序列）中的 T-DNA（包括玉米 Ubiquitin 基因的启动子序列、PIC6-01 核苷酸序列、PIC6-01 取代核苷酸序列、PIC6-01 截短核苷酸序列、PIC6-01 添加核苷酸序列、天然序列、PMI 基因和 Nos 终止子序列）转入到玉米染色体组中，获得了转入 PIC6-01 核苷酸序列的玉米植株、转入 PIC6-01 取代核苷酸序列的玉米植株、转入 PIC6-01 截短核苷酸序列的玉米植株、转入 PIC6-01 添加核

苷酸序列的玉米植株和转入天然序列的玉米植株(正对照);同时以野生型玉米植株作为负对照。

[0108] 对于农杆菌介导的玉米转化,简要地,从玉米中分离未成熟的幼胚,用农杆菌悬浮液接触幼胚,其中农杆菌能够将PIC6-01核苷酸序列传递至幼胚之一的至少一个细胞(步骤1:侵染步骤)。在此步骤中,幼胚优选地浸入农杆菌悬浮液(OD_{660}=0.4-0.6,侵染培养基(MS盐4.3g/L、MS维他命、干酪素300mg/L、蔗糖68.5g/L、葡萄糖36g/L、乙酰丁香酮(AS)40mg/L、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)1mg/L,pH5.3))中以启动接种。幼胚与农杆菌共培养一段时期(3天)(步骤2:共培养步骤)。优选地,幼胚在侵染步骤后在固体培养基(MS盐4.3g/L、MS维他命、干酪素300mg/L、蔗糖20g/L、葡萄糖10g/L、乙酰丁香酮(AS)100mg/L、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)1mg/L、琼脂8g/L,pH5.8)上培养。在此共培养阶段后,可以有一个选择性的"恢复"步骤。在"恢复"步骤中,恢复培养基(MS盐4.3g/L、MS维他命、干酪素300mg/L、蔗糖30g/L、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)1mg/L、琼脂8g/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3:恢复步骤)。优选地,幼胚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,接种的幼胚在含选择剂(甘露糖)的培养基上培养并选择生长着的转化愈伤组织(步骤4:选择步骤)。优选地,幼胚在有选择剂的筛选固体培养基(MS盐4.3g/L、MS维他命、干酪素300mg/L、蔗糖5g/L、甘露糖12.5g/L、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)1mg/L、琼脂8g/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5: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(MS分化培养基和MS生根培养基)上培养以再生植物。

[0109] 筛选得到的抗性愈伤组织转移到所述MS分化培养基(MS盐4.3g/L、MS维他命、干酪素300mg/L、蔗糖30g/L、6-苄基腺嘌呤2mg/L、甘露糖5g/L、琼脂8g/L,pH5.8)上,25℃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2.15g/L、MS维他命、干酪素300mg/L、蔗糖30g/L、吲哚-3-乙酸1mg/L、琼脂8g/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28℃下培养16小时,再于20℃下培养8小时。

[0110] 2、用TaqMan验证转入PIC6-01核苷酸序列的玉米植株

[0111] 分别取转入PIC6-01核苷酸序列的玉米植株、转入PIC6-01取代核苷酸序列的玉米植株、转入PIC6-01截短核苷酸序列的玉米植株、转入PIC6-01添加核苷酸序列的玉米植株和转入天然序列的玉米植株的叶片约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PIC6基因的拷贝数。同时以野生型玉米植株作为负对照,按照上述方法进行检测分析。实验设3次重复,取平均值。

[0112] 检测PIC6基因拷贝数的具体方法如下:

[0113] 步骤11、分别取转入PIC6-01核苷酸序列的玉米植株、转入PIC6-01取代核苷酸序列的玉米植株、转入PIC6-01截短核苷酸序列的玉米植株、转入PIC6-01添加核苷酸序列的玉米植株、转入天然序列的玉米植株和野生型玉米植株的叶片各100mg,分别在研钵中用液氮研成匀浆,每个样品取3个重复;

[0114] 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;

[0115] 步骤13、用NanoDrop 2000(Thermo Scientific)测定上述样品的基因组DNA浓

度；

[0116] 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；

[0117] 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，以野生型玉米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：

[0118] 以下引物和探针用来检测 PIC6-01 核苷酸序列、PIC6-01 取代核苷酸序列、PIC6-01 截短核苷酸序列和 PIC6-01 添加核苷酸序列：

[0119] 引物 1（CF1）：ACCAGGACAAGCACCAGAGC 如序列表中 SEQ ID NO:10 所示；

[0120] 引物 2（CR1）：CTTCAGGCTGTCGGTGCTG 如序列表中 SEQ ID NO:11 所示；

[0121] 探针 1（CP1）：AGCAGCAACGCCAAGGTGGACAAG 如序列表中 SEQ ID NO:12 所示；

[0122] 以下引物和探针用来检测天然序列：

[0123] 引物 3（CF2）：CAAACAGGTATTGGTATTGCGG 如序列表中 SEQ ID NO:13 所示；

[0124] 引物 4（CR2）：CCCTTAGGCCATAGCTCACCT 如序列表中 SEQ ID NO:14 所示；

[0125] 探针 2（CP2）：CTTGGTACCCTAGGCGTTCCTTTTGCAG 如序列表中 SEQ ID NO:15 所示；

[0126] PCR 反应体系为：

[0127]

JumpStart™ Taq ReadyMix™ （Sigma）	10μl
50×引物/探针混合物	1μl
基因组 DNA	3μl
水（ddH_2O）	6μl

[0128] 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。

[0129] PCR 反应条件为：

[0130]

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

[0131] 利用 SDS2. 3 软件（Applied Biosystems）分析数据。

[0132] 实验结果表明，PIC6-01 核苷酸序列、PIC6-01 取代核苷酸序列、PIC6-01 截短核苷酸序列、PIC6-01 添加核苷酸序列和天然序列均已整合到所检测的玉米植株的染色体组中，而且转入 PIC6-01 核苷酸序列的玉米植株、转入 PIC6-01 取代核苷酸序列的玉米植株、转入 PIC6-01 截短核苷酸序列的玉米植株、转入 PIC6-01 添加核苷酸序列的玉米植株和转入天然序列的玉米植株均获得了含有单拷贝 PIC6 基因的转基因玉米植株。

[0133] 第四实施例、转基因玉米植株的 RT-PCR 检测

[0134] 1、转基因玉米植株的杀虫蛋白质（PIC6 蛋白）的 mRNA 含量检测

[0135] 分别取 0.2g 转入 PIC6-01 核苷酸序列的玉米植株、转入 PIC6-01 取代核苷酸序列的玉米植株、转入 PIC6-01 截短核苷酸序列的玉米植株、转入 PIC6-01 添加核苷酸序列的玉米植株和转入天然序列的玉米植株的新鲜叶片(心叶)作为样品,液氮研磨收集 100-200mg 组织,后加入 1ml 所述 TRIZOL 提取液,涡旋使样品充分裂解,室温放置 5min ;加入 0.2ml 氯仿(chloroform)剧烈振荡混匀 15s,室温放置 10min ;4℃下,12000rpm 的转速下离心 10min,取上清液加入 0.5ml (或 0.5X 开始体积)的 RNase-Free 水,再加入 1ml 的异丙醇(1:1 体积),充分混匀,室温放置 10min,沉淀 ;4℃下,12000rpm 的转速下离心 10min,取沉淀加入 1ml 质量分数为 75% 的乙醇洗涤 RNA 沉淀 ;4℃下,8000rpm 的转速下离心 10min,去上清,RNA 稍晾干约 10-15min,加入 100μl 体积的 RNase-Free 水充分溶解 ;RNA 样品 DAaseI 酶切,

[0136] 如 :20 μl RNA 样品(≤ 5μg,溶于水或者 TE Buffer)

[0137]

10x DNase I Buffer	5 μl
RNase-Free DNase I	2 μl
RNase-Free Water	23 μl
Final Reaction Volume	50 μl

[0138] 混匀,37℃温浴 30min,DNaseI 灭活(DNaseI 说明书)

[0139] 加入 1/10 体积的 3M NaOAc (RNase free, pH5.2)及 3V 的乙醇沉淀 RNA ;-80℃下,放置 2 h,2-8℃下,12000rpm 的转速下离心 10min ;加入 500μl 质量分数为 75% 的乙醇洗涤,2-8℃下,10000 rpm 的转速下离心 5min ;加入质量分数为 75% 的乙醇再洗一次,离心后,再空甩一次,吸干离心管壁上的乙醇。室温干燥 10-15 min ;加入 100μl RNase free 水充分溶解,离心去杂质,上清即为制备的总 RNA ;光密度法测定总 RNA 的浓度及纯度(OD_{260}/OD_{280})(Gene Quant);总 RNA 电泳,检测总 RNA 是否降解(可放于 -80℃保存)。加入 2μg 总 RNA,1μl 引物,1μl 10mM dNTPs,补水(RNase-free 水)至 13μl ;65℃变性 10min 后立即冰浴 2min,退火 ;加入 4μl 5×M-MLV buffer,1μl 20mM DTT,1μl RNase Inhibitor 和 1μl M-MLV (Invitrigen);42℃温浴 1-2h 后,取出于 -20℃保存备用。每份样品取 0.1μg 用于 Real-time PCR (RT-PCR)检测,引物如下 :

[0140]

PMI	引物 5 (SEQ ID NO:16)	CATTAACTCAGTGCAAAACTATGCC	退火温度 54 摄氏度;采用 ABI 7900HT 仪器进行反应
	引物 6 (SEQ ID NO:17)	AGTAGGGAGACAATCTCGGAAAATT	
天然序列	引物 3 (SEQ ID NO:13)	CAAACAGGTATTGGTATTGCGG	
	引物 4 (SEQ ID NO:14)	CCCTTAGGCCATAGCTCACCT	
PIC6-01	引物 1 (SEQ ID NO:10)	ACCAGGACAAGCACCAGAGC	
	引物 2 (SEQ ID NO:11)	CTTCAGGCTGTCGGTGCTG	

[0141] 计算方法参照 Livak et al. “Analysis of Relative Gene Expression Data

Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$Method", Method (2001)25 (4): 402-408。

[0142] 同时以野生型玉米植株和经荧光定量 PCR 鉴定为非转基因的玉米植株作为对照，按照上述方法进行检测分析。转入 PIC6-01 核苷酸序列的共 3 个株系(S1、S2 和 S3)，转入 PIC6-01 取代核苷酸序列的共 2 个株系(S4 和 S5)，转入 PIC6-01 截短核苷酸序列的共 2 个株系(S6 和 S7)，转入 PIC6-01 添加核苷酸序列的共 2 个株系(S8 和 S9)，转入天然序列的共 2 个株系(S10 和 S11)，经荧光定量 PCR 鉴定为非转基因的(NGM)共 1 个株系，野生型的(CK)共 1 个株系；从每个株系选 5 株进行测试，每株重复 6 次。

[0143] 转基因玉米植株的 PIC6 杀虫蛋白质的 mRNA 含量的平均实验结果如图 4 所示。结果表明，转入 PIC6-01 核苷酸序列的玉米植株中的 PIC6 杀虫蛋白质的 mRNA 相对含量为转入天然序列的玉米植株的 20 倍左右。本领域技术人员熟知的，RT-PCR 技术灵敏而且用途广泛，可直接用于检测细胞中基因的转录水平，进而间接地说明该基因的表达水平和蛋白表达量和稳定性。因此，这一结果表明依据玉米的偏好密码子优化的 PIC6-01 核苷酸序列显著地增加了 PIC6-01 蛋白在玉米中表达的稳定性和表达量。与转入 PIC6-01 核苷酸序列的玉米植株的相比，转入 PIC6-01 取代核苷酸序列的玉米植株、转入 PIC6-01 截短核苷酸序列的玉米植株和转入 PIC6-01 添加核苷酸序列的玉米植株中 PIC6 杀虫蛋白质的 mRNA 含量无显著差异。

[0144] 2、转基因玉米植株的抗虫效果检测

[0145] 将转入 PIC6-01 核苷酸序列的玉米植株、转入 PIC6-01 取代核苷酸序列的玉米植株、转入 PIC6-01 截短核苷酸序列的玉米植株、转入 PIC6-01 添加核苷酸序列的玉米植株、转入天然序列的玉米植株、野生型玉米植株和经荧光定量 PCR 鉴定为非转基因的玉米植株(V3-V4 时期)分别对亚洲玉米螟、东方黏虫和二化螟进行抗虫效果检测。

[0146] (1)亚洲玉米螟：分别取转入 PIC6-01 核苷酸序列的玉米植株、转入 PIC6-01 取代核苷酸序列的玉米植株、转入 PIC6-01 截短核苷酸序列的玉米植株、转入 PIC6-01 添加核苷酸序列的玉米植株、转入天然序列的玉米植株、野生型玉米植株和经荧光定量 PCR 鉴定为非转基因的玉米植株的新鲜叶片，用无菌水冲洗干净并用纱布将叶片上的水吸干，然后将玉米叶片去除叶脉，同时剪成约 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滤纸上，所述滤纸用蒸馏水润湿，每个培养皿中放 10 头人工饲养的亚洲玉米螟(初孵幼虫)，虫试培养皿加盖后，在温度 26-28℃、相对湿度 70%-80%、光周期(光 / 暗) 16 :8 的条件下放置 3 天后统计幼虫死亡情况，计算各样品中亚洲玉米螟的平均死亡率。转入 PIC6-01 核苷酸序列的共 3 个株系(S1、S2 和 S3)，转入 PIC6-01 取代核苷酸序列的共 2 个株系(S4 和 S5)，转入 PIC6-01 截短核苷酸序列的共 2 个株系(S6 和 S7)，转入 PIC6-01 添加核苷酸序列的共 2 个株系(S8 和 S9)，转入天然序列的共 2 个株系(S10 和 S11)，经荧光定量 PCR 鉴定为非转基因的(NGM)共 1 个株系，野生型的(CK)共 1 个株系；从每个株系选 5 株进行测试，每株重复 6 次。结果如表 1 和图 5 所示。

[0147] 表 1、转基因玉米植株接种亚洲玉米螟的抗虫实验结果

[0148]

单株的亚洲玉米螟致死率（%）（每株重复6次）						亚洲玉米螟致死情况	
植株	1	2	3	4	5	单株系平均致死率（%）	平均致死率（%）
S1	70	57	68	78	76	69.8	
S2	63	68	71	65	69	67.2	68.4
S3	74	61	70	74	62	68.2	
S4	70	71	66	62	66	67	65.3
S5	69	65	65	61	58	63.6	
S6	61	63	55	57	62	59.6	59.6
S7	58	68	52	55	65	59.6	
S8	70	65	70	65	68	67.6	66.9
S9	67	63	65	66	70	66.2	
S10	15	10	13	9	14	12.2	12.8
S11	12	14	14	11	16	13.4	
NGM	0	0	0	0	0	0	0
CK	0	0	0	0	0	0	0

[0149] 表1的结果表明：转入PIC6-01核苷酸序列的玉米植株和转入天然序列的玉米植株中都可以选到对亚洲玉米螟具有一定抗性的植株，但转入PIC6-01核苷酸序列的玉米植株的试虫死亡率显著高于转入天然序列的玉米植株。转入PIC6-01核苷酸序列的玉米植株的试虫死亡率在65%左右或以上，而转入天然序列的玉米植株的试虫死亡率在13%左右。图5的结果表明：转入PIC6-01核苷酸序列的玉米植株虽然不会造成初孵幼虫的大量死亡，但是却对幼虫发育进度造成极大的抑制，3天后幼虫基本仍处于初孵状态或介于初孵－阴性对照状态之间，且其叶片损伤率也较小。

[0150] （2）二化螟：分别取转入PIC6-01核苷酸序列的玉米植株、转入PIC6-01取代核苷

酸序列的玉米植株、转入PIC6-01截短核苷酸序列的玉米植株、转入PIC6-01添加核苷酸序列的玉米植株、转入天然序列的玉米植株、野生型玉米植株和经荧光定量PCR鉴定为非转基因的玉米植株的新鲜叶片，用无菌水冲洗干净并用纱布将叶片上的水吸干，然后将玉米叶片去除叶脉，同时剪成约1cm×2cm的长条状，取3片剪后的长条状叶片放入圆形塑料培养皿底部的滤纸上，所述滤纸用蒸馏水润湿，每个培养皿中放10头人工饲养的二化螟（初孵幼虫），虫试培养皿加盖后，在温度26-28℃、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：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PIC6-01核苷酸序列的共3个株系（S1、S2和S3），转入PIC6-01取代核苷酸序列的共2个株系（S4和S5），转入PIC6-01截短核苷酸序列的共2个株系（S6和S7），转入PIC6-01添加核苷酸序列的共2个株系（S8和S9），转入天然序列的共2个株系（S10和S11），经荧光定量PCR鉴定为非转基因的（NGM）共1个株系，野生型的（CK）共1个株系；从每个株系选5株进行测试，每株重复6次。结果如表2和图6所示。

[0151] 表2的结果表明：转入PIC6-01核苷酸序列的玉米植株和转入天然序列的玉米植株中都可以选到对二化螟具有一定抗性的植株，但转入PIC6-01核苷酸序列的玉米植株的生测总分显著高于转入天然序列的玉米植株。转入PIC6-01核苷酸序列的玉米植株的生测总分均在160分以上，而转入天然序列的玉米植株的生测总分在80分左右。图6的结果表明：转入PIC6-01核苷酸序列的玉米植株虽然不会造成初孵幼虫的大量死亡，但是却对幼虫发育进度造成极大的抑制，3天后幼虫基本仍处于初孵状态或介于初孵－阴性对照状态之间，且其叶片损伤率在30%以下。

[0152] 表2、转基因玉米植株接种二化螟的抗虫实验结果

[0153]

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（%）		
S1	25	1	5	1	10	30	175	
S2	20	0	7	1	10	20	163	169
S3	15	2	4	2	10	20	169	
S4	20	4	4	1	10	10	161	161
S5	35	4	3	1	10	20	160	
S6	20	6	2	0	10	20	186	155
S7	40	3	6	1	10	0	124	
S8	34	2	6	1	10	10	141	163
S9	35	1	5	0	10	40	184	
S10	40	0	2	8	10	0	80	87
S11	40	0	1	8	10	10	94	
NGM	96	0	0	10	10	0	14	14
CK	97	0	0	10	10	0	13	13

[0154] （3）东方黏虫：分别取转入PIC6-01核苷酸序列的玉米植株、转入PIC6-01取代核苷酸序列的玉米植株、转入PIC6-01截短核苷酸序列的玉米植株、转入PIC6-01添加核苷酸序列的玉米植株、转入天然序列的玉米植株、野生型玉米植株和经荧光定量PCR鉴定为非转基因的玉米植株的新鲜叶片，用无菌水冲洗干净并用纱布将叶片上的水吸干，然后将玉米叶片去除叶脉，同时剪成约1cm×2cm的长条状，取3片剪后的长条状叶片放入圆形塑料培养皿底部的滤纸上，所述滤纸用蒸馏水润湿，每个培养皿中放10头人工饲养的东方黏虫（初孵幼虫），虫试培养皿加盖后，在温度26-28℃、相对湿度70%-80%、光周期（光／暗）16：8的条件下放置3天后，根据东方黏虫幼虫发育进度、死亡率和叶片损伤率三项指标，获得抗性总分：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 PIC6-01 核苷酸序列的共 3 个株系(S1、S2 和 S3),转入 PIC6-01 取代核苷酸序列的共 2 个株系(S4 和 S5),转入 PIC6-01 截短核苷酸序列的共 2 个株系(S6 和 S7),转入 PIC6-01 添加核苷酸序列的共 2 个株系(S8 和 S9),转入天然序列的共 2 个株系(S10 和 S11),经荧光定量 PCR 鉴定为非转基因的(NGM)共 1 个株系,野生型的(CK)共 1 个株系 ;从每个株系选 5 株进行测试,每株重复 6 次。结果如表 3 和图 7 所示。

[0155] 表 3 的结果表明 :转入 PIC6-01 核苷酸序列的玉米植株和转入天然序列的玉米植株中都可以选到对东方黏虫具有一定抗性的植株,但转入 PIC6-01 核苷酸序列的玉米植株的生测总分显著高于转入天然序列的玉米植株。转入 PIC6-01 核苷酸序列的玉米植株的生测总分均在 120 分以上,而转入天然序列的玉米植株的生测总分在 35 分左右。图 7 的结果表明 :转入 PIC6-01 核苷酸序列的玉米植株虽然不会造成初孵幼虫的大量死亡,但是却对幼虫发育进度造成极大的抑制,3 天后幼虫基本仍处于初孵状态或介于初孵 - 阴性对照状态之间,且其叶片损伤率在 50% 左右或以下。

[0156] 由此证明转入 PIC6-01 核苷酸序列的玉米植株具有较高抗虫能力,即表达 PIC6-01 蛋白水平高的转入 PIC6-01 核苷酸序列的玉米植株也具有较高的毒力,因此依据玉米的偏好密码子优化的 PIC6-01 核苷酸序列显著地增加了 PIC6-01 蛋白在玉米中表达的毒力。此外,与转入 PIC6-01 核苷酸序列的玉米植株的相比,转入 PIC6-01 取代核苷酸序列的玉米植株、转入 PIC6-01 截短核苷酸序列的玉米植株和转入 PIC6-01 添加核苷酸序列的玉米植株中 PIC6-01 蛋白的毒力无显著差异。

[0157] 综上所述,本发明 PIC6-01 杀虫基因采用玉米的偏好密码子,完全符合玉米基因的特性,使得本发明杀虫基因特别适合在单子叶植物中表达,尤其是玉米,本发明 PIC6-01 杀虫蛋白质不仅表达量高且稳定性好,对昆虫害虫的毒力强,尤其是鳞翅目昆虫害虫。

[0158] 表 3、转基因玉米植株接种东方黏虫的抗虫实验结果

[0159]

植株	叶片损伤率（%）	东方黏虫发育进度（单株系）			东方黏虫致死情况（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（%）		
S1	40	1	6	2	10	10	127	124
S2	45	2	4	3	10	10	120	
S3	55	1	5	2	10	20	126	
S4	45	1	6	2	10	10	122	118
S5	40	1	7	2	10	0	113	
S6	35	1	7	2	10	0	118	111
S7	45	1	6	3	10	0	103	
S8	50	1	7	1	10	10	122	120
S9	60	1	8	0	10	10	117	
S10	90	0	3	7	10	0	35	37
S11	95	1	3	6	10	0	38	
NGM	99	0	0	10	10	0	11	11
CK	99	0	0	10	10	0	11	11

[0160] 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。

[0001]

序列表

<110> 北京大北农科技集团股份有限公司
北京大北农科技集团股份有限公司生物技术中心
<120> 杀虫蛋白质、其编码基因及用途
<130> DBNBC9
<160> 17
<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 2100
<212> DNA
<213> PIC6-01 核苷酸序列

<400> 1

atgaagctga agaaccagga caagcaccag agcttcagca gcaacgccaa ggtggacaag 60
atcagcaccg acagcctgaa gaacgagacc gacatcgagc tgcagaacat caaccacgag 120
gactgcctga agatgagcga gtacgagaac gtggagccgt tcgtgagcgc cagcaccatc 180
cagaccggca tcggcatcgc cggcaagatc ctgggcaccc tgggcgtgcc gttcgccggc 240
caggtggcca gcctgtacag cttcatcctg ggcgagctgt ggccgaaggg caagaaccag 300
tgggagatct tcatggagca cgtggaggag atcatcaacc agaagatcag cacctacgcc 360
aggaacaagg ccctgaccga cctgaagggc ctgggcgacg ccctggccgt gtaccacgac 420
agcctggaga gctgggtggg caacaggaac aacaccaggg ccaggagcgt ggtgaagagc 480
cagtacatcg ccctggagct gatgttcgtg cagaagctgc cgagcttcgc cgtgagcggc 540
gaggaggtgc cgctgctgcc gatctacgcc caggccgcca acctgcacct gctgctgctg 600
agggacgcca gcatcttcgg caaggagtgg ggcctgagca gcagcgagat cagcaccttc 660
tacaacaggc aggtggagag ggccggcgac tacagcgacc actgcgtgaa gtggtacagc 720
accggcctga acaacctgag gggcaccaac gccgagagct gggtgaggta caaccagttc 780
aggagggaca tgaccctgat ggtgctggac ctggtggccc tgttcccgag ctacgacacc 840
cagatgtacc cgatcaagac caccgcccag ctgaccaggg aggtgtacac cgacgccatc 900
ggcaccgtgc acccgcaccc gagcttcacc agcaccacct ggtacaacaa caacgccccg 960
agcttcagcg ccatcgaggc cgccgtggtg aggaacccgc acctgctgga cttcctggag 1020
caggtgacca tctacagcct gctgagcagg tggagcaaca cccagtacat gaacatgtgg 1080
ggcggccaca agctggagtt caggaccatc ggcggcaccc tgaacatcag cacccagggc 1140

[0002]

agcaccaaca ccagcatcaa cccggtgacc ctgccgttca ccagcaggga cgtgtacagg 1200
accgagagcc tggccggcct gaacctgttc ctgacccagc cggtgaacgg cgtgccgagg 1260
gtggacttcc actggaagtt cgtgacccac ccgatcgcca gcgacaactt ctactacccg 1320
ggctacgccg gcatcggcac ccagctgcag gacagcgaga acgagctgcc gccggaggcc 1380
accggccagc cgaactacga gagctacagc cacaggctga gccacatcgg cctgatcagc 1440
gccagccacg tgaaggccct ggtgtacagc tggacccaca ggagcgccga caggaccaac 1500
accatcgagc cgaacagcat cacccagatc ccgctggtga aggccttcaa cctgagcagc 1560
ggcgccgccg tggtgagggg cccgggcttc accggcggcg acatcctgag gaggaccaac 1620
accggcacct tcggcgacat cagggtgaac atcaacccgc cgttcgccca gaggtacagg 1680
gtgaggatca ggtacgccag caccaccgac ctgcagttcc acaccagcat caacggcaag 1740
gccatcaacc agggcaactt cagcgccacc atgaacaggg gcgaggacct ggactacaag 1800
accttcagga ccgtgggctt caccaccccg ttcagcttcc tggacgtgca gagcaccttc 1860
accatcggcg cctggaactt cagcagcggc aacgaggtgt acatcgacag gatcgagttc 1920
gtgccggtgg aggtgaccta cgaggccgag tacgacttcg agaaggccca ggagaaggtg 1980
accgccctgt tcaccagcac caacccgggc ggcctgaaga ccaacgtgac cgagtaccac 2040
atcgaccagg tgagcaacct ggtggagagc ctgagcatga acagcatcag catgaagtga 2100

<210> 2
<211> 699
<212> PRT
<213> PIC6-01 氨基酸序列

<400> 2

Met Lys Leu Lys Asn Gln Asp Lys His Gln Ser Phe Ser Ser Asn Ala
1 5 10 15
Lys Val Asp Lys Ile Ser Thr Asp Ser Leu Lys Asn Glu Thr Asp Ile
20 25 30
Glu Leu Gln Asn Ile Asn His Glu Asp Cys Leu Lys Met Ser Glu Tyr
35 40 45
Glu Asn Val Glu Pro Phe Val Ser Ala Ser Thr Ile Gln Thr Gly Ile
50 55 60
Gly Ile Ala Gly Lys Ile Leu Gly Thr Leu Gly Val Pro Phe Ala Gly

[0003]

65 70 75 80

Gln Val Ala Ser Leu Tyr Ser Phe Ile Leu Gly Glu Leu Trp Pro Lys
85 90 95

Gly Lys Asn Gln Trp Glu Ile Phe Met Glu His Val Glu Glu Ile Ile
100 105 110

Asn Gln Lys Ile Ser Thr Tyr Ala Arg Asn Lys Ala Leu Thr Asp Leu
115 120 125

Lys Gly Leu Gly Asp Ala Leu Ala Val Tyr His Asp Ser Leu Glu Ser
130 135 140

Trp Val Gly Asn Arg Asn Asn Thr Arg Ala Arg Ser Val Val Lys Ser
145 150 155 160

Gln Tyr Ile Ala Leu Glu Leu Met Phe Val Gln Lys Leu Pro Ser Phe
165 170 175

Ala Val Ser Gly Glu Glu Val Pro Leu Leu Pro Ile Tyr Ala Gln Ala
180 185 190

Ala Asn Leu His Leu Leu Leu Leu Arg Asp Ala Ser Ile Phe Gly Lys
195 200 205

Glu Trp Gly Leu Ser Ser Ser Glu Ile Ser Thr Phe Tyr Asn Arg Gln
210 215 220

Val Glu Arg Ala Gly Asp Tyr Ser Asp His Cys Val Lys Trp Tyr Ser
225 230 235 240

Thr Gly Leu Asn Asn Leu Arg Gly Thr Asn Ala Glu Ser Trp Val Arg
245 250 255

Tyr Asn Gln Phe Arg Arg Asp Met Thr Leu Met Val Leu Asp Leu Val
260 265 270

Ala Leu Phe Pro Ser Tyr Asp Thr Gln Met Tyr Pro Ile Lys Thr Thr
275 280 285

Ala Gln Leu Thr Arg Glu Val Tyr Thr Asp Ala Ile Gly Thr Val His
290 295 300

Pro His Pro Ser Phe Thr Ser Thr Thr Trp Tyr Asn Asn Asn Ala Pro
305 310 315 320

Ser Phe Ser Ala Ile Glu Ala Ala Val Val Arg Asn Pro His Leu Leu
325 330 335

Asp Phe Leu Glu Gln Val Thr Ile Tyr Ser Leu Leu Ser Arg Trp Ser

[0004]

340 345 350

Asn Thr Gln Tyr Met Asn Met Trp Gly Gly His Lys Leu Glu Phe Arg
355 360 365

Thr Ile Gly Gly Thr Leu Asn Ile Ser Thr Gln Gly Ser Thr Asn Thr
370 375 380

Ser Ile Asn Pro Val Thr Leu Pro Phe Thr Ser Arg Asp Val Tyr Arg
385 390 395 400

Thr Glu Ser Leu Ala Gly Leu Asn Leu Phe Leu Thr Gln Pro Val Asn
405 410 415

Gly Val Pro Arg Val Asp Phe His Trp Lys Phe Val Thr His Pro Ile
420 425 430

Ala Ser Asp Asn Phe Tyr Tyr Pro Gly Tyr Ala Gly Ile Gly Thr Gln
435 440 445

Leu Gln Asp Ser Glu Asn Glu Leu Pro Pro Glu Ala Thr Gly Gln Pro
450 455 460

Asn Tyr Glu Ser Tyr Ser His Arg Leu Ser His Ile Gly Leu Ile Ser
465 470 475 480

Ala Ser His Val Lys Ala Leu Val Tyr Ser Trp Thr His Arg Ser Ala
485 490 495

Asp Arg Thr Asn Thr Ile Glu Pro Asn Ser Ile Thr Gln Ile Pro Leu
500 505 510

Val Lys Ala Phe Asn Leu Ser Ser Gly Ala Ala Val Val Arg Gly Pro
515 520 525

Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr Asn Thr Gly Thr Phe
530 535 540

Gly Asp Ile Arg Val Asn Ile Asn Pro Pro Phe Ala Gln Arg Tyr Arg
545 550 555 560

Val Arg Ile Arg Tyr Ala Ser Thr Thr Asp Leu Gln Phe His Thr Ser
565 570 575

Ile Asn Gly Lys Ala Ile Asn Gln Gly Asn Phe Ser Ala Thr Met Asn
580 585 590

Arg Gly Glu Asp Leu Asp Tyr Lys Thr Phe Arg Thr Val Gly Phe Thr
595 600 605

Thr Pro Phe Ser Phe Leu Asp Val Gln Ser Thr Phe Thr Ile Gly Ala

[0005]

610 615 620

Trp Asn Phe Ser Ser Gly Asn Glu Val Tyr Ile Asp Arg Ile Glu Phe

625 630 635 640

Val Pro Val Glu Val Thr Tyr Glu Ala Glu Tyr Asp Phe Glu Lys Ala

645 650 655

Gln Glu Lys Val Thr Ala Leu Phe Thr Ser Thr Asn Pro Gly Gly Leu

660 665 670

Lys Thr Asn Val Thr Glu Tyr His Ile Asp Gln Val Ser Asn Leu Val

675 680 685

Glu Ser Leu Ser Met Asn Ser Ile Ser Met Lys

690 695

<210> 3

<211> 2100

<212> DNA

<213> PIC6-01 取代核苷酸序列

<400> 3

atgaagctga agaaccagga caagcaccag agcttcagca gcaacgccaa ggtggacaag 60

atcagcaccg acagcctgaa gaacgagacc gacatcgagc tgcagaacat caaccacgag 120

gactgcctga agatgagcga gtacgagaac gtggagccgt tcgtgagcgc cagcaccatc 180

cagaccggca tcggcatcgc cggcaagatc ctgggcaccc tgggcgtgcc gttcgccggc 240

caggtggcca gcctgtacag cttcatcctg ggcgagctgt ggccgaaggg caagaaccag 300

tgggagatct tcatggagca cgtggaggag atcatcaacc agaagatcag cacctacgcc 360

aggaacaagg ccctgaccga cctgaagggc ctgggcgacg ccctggccgt gtaccacgac 420

agcctggaga gctgggtggg caacaggaac aacaccaggg ccaggagcgt ggtgaagagc 480

cagtacatcg ccctggagct gatgttcgtg cagaagctgc cgagcttcgc cgtgagcggc 540

gaggaggtgc cgctgctgcc gatctacgcc caggccgcca acctgcacct gctgctgctg 600

agggacgcca gcatcttcgg caaggagtgg ggcctgagca gcagcgagat cagcaccttc 660

tacaacaggc aggtggagag ggccggcgac tacagcgacc actgcgtgaa gtggtacagc 720

accggcctga acaacctgag gggcaccaac gccgagagct gggtgaggta caaccagttc 780

aggagggaca tgaccctgat ggtgctggac ctggtggccc tgttcccgag ctacgacacc 840

cagatgtacc cgatcaagac caccgcccag ctgaccaggg aggtgtacac cgacgccatc 900

[0006]

ggcaccgtgc acccgcaccc gagcttcacc agcaccacct ggtacaacaa caacgccccg 960
agcttcagcg ccatcgaggc cgccgtggtg aggaacccgc acctgctgga cttcctggag 1020
caggtgacca tctacagcct gctgagcagg tggagcaaca cccagtacat gaacatgtgg 1080
ggcggccaca agctggagtt caggaccatc ggcggcaccc tgaacatcag cacccagggc 1140
agcaccaaca ccagcatcaa cccggtgacc ctgccgttca ccagcaggga cgtgtacagg 1200
accgagagcc tggccggcct gaacctgttc ctgacccagc cggtgaacgg cgtgccgagg 1260
gtggacttcc actggaagtt cgtgacccac ccgatcgcca gcgacaactt ctactacccg 1320
ggctacgccg gcatcggcac ccagctgcag gacagcgaga acgagctgcc gccggaggcc 1380
accggccagc cgaactacga gagctacagc cacaggctga gccacatcgg cctgatcagc 1440
gccagccacg tgaaggccct ggtgtacagc tggacccaca ggagcgccga caggaccaac 1500
accatcgagc cgaacagcat cacccagatc ccgctggtga aggccttcaa cctgagcagc 1560
ggcgccgccg tggtgagggg cccgggcttc accggcggcg acatcctgag gaggaccaac 1620
accggcacct tcggcgacat cagggtgaac atcaacccgc cgttcgccca gaggtacagg 1680
gtgaggatca ggtacgccag caccaccgac ctgcagttcc acaccagcat caacggcaag 1740
gccatcaacc agggcaactt cagcgccacc atgaacaggg gcgaggacct ggactacaag 1800
accttcagga ccgtgggctt caccaccccg ttcagcttcc tggacgtgca gagcaccttc 1860
accatcggcg cctggaactt cagcagcggc aacgaggtgt acatcgacag gatcgagttc 1920
gtgccggtgg aggtgaccta cgaggccgag tacgacttcg agaaggccca ggagaaggtg 1980
accgccctgt tcaccagcac caacccgggc ggcctgaaga ccaacgtgac cgagtaccac 2040
atcgaccagg tgagcaacct ggtggagagc ctgagcgata acagcatcag catgaagtga 2100

<210> 4
<211> 1983
<212> DNA
<213> PIC6-01 截短核苷酸序列

<400> 4
atgaagctga agaaccagga caagcaccag agcttcagca gcaacgccaa ggtggacaag 60
atcagcaccg acagcctgaa gaacgagacc gacatcgagc tgcagaacat caaccacgag 120
gactgcctga agatgagcga gtacgagaac gtggagccgt tcgtgagcgc cagcaccatc 180
cagaccggca tcggcatcgc cggcaagatc ctgggcaccc tgggcgtgcc gttcgccggc 240
caggtggcca gcctgtacag cttcatcctg ggcgagctgt ggccgaaggg caagaaccag 300
tgggagatct tcatggagca cgtggaggag atcatcaacc agaagatcag cacctacgcc 360

[0007]

aggaacaagg ccctgaccga cctgaagggc ctgggcgacg ccctggccgt gtaccacgac 420
agcctggaga gctgggtggg caacaggaac aacaccaggg ccaggagcgt ggtgaagagc 480
cagtacatcg ccctggagct gatgttcgtg cagaagctgc cgagcttcgc cgtgagcggc 540
gaggaggtgc cgctgctgcc gatctacgcc caggccgcca acctgcacct gctgctgctg 600
agggacgcca gcatcttcgg caaggagtgg ggcctgagca gcagcgagat cagcaccttc 660
tacaacaggc aggtggagag ggccggcgac tacagcgacc actgcgtgaa gtggtacagc 720
accggcctga acaacctgag gggcaccaac gccgagagct gggtgaggta caaccagttc 780
aggagggaca tgaccctgat ggtgctggac ctggtggccc tgttcccgag ctacgacacc 840
cagatgtacc cgatcaagac caccgcccag ctgaccaggg aggtgtacac cgacgccatc 900
ggcaccgtgc acccgcaccc gagcttcacc agcaccacct ggtacaacaa caacgccccg 960
agcttcagcg ccatcgaggc cgccgtggtg aggaacccgc acctgctgga cttcctggag 1020
caggtgacca tctacagcct gctgagcagg tggagcaaca cccagtacat gaacatgtgg 1080
ggcggccaca agctggagtt caggaccatc ggcggcaccc tgaacatcag cacccagggc 1140
agcaccaaca ccagcatcaa cccggtgacc ctgccgttca ccagcaggga cgtgtacagg 1200
accgagagcc tggccggcct gaacctgttc ctgacccagc cggtgaacgg cgtgccgagg 1260
gtggacttcc actggaagtt cgtgacccac ccgatcgcca gcgacaactt ctactacccg 1320
ggctacgccg gcatcggcac ccagctgcag gacagcgaga acgagctgcc gccggaggcc 1380
accggccagc cgaactacga gagctacagc cacaggctga gccacatcgg cctgatcagc 1440
gccagccacg tgaaggccct ggtgtacagc tggacccaca ggagcgccga caggaccaac 1500
accatcgagc cgaacagcat cacccagatc ccgctggtga aggccttcaa cctgagcagc 1560
ggcgccgccg tggtgagggg cccgggcttc accggcggcg acatcctgag gaggaccaac 1620
accggcacct tcggcgacat cagggtgaac atcaacccgc cgttcgccca gaggtacagg 1680
gtgaggatca ggtacgccag caccaccgac ctgcagttcc acaccagcat caacggcaag 1740
gccatcaacc agggcaactt cagcgccacc atgaacaggg gcgaggacct ggactacaag 1800
accttcagga ccgtgggctt caccaccccg ttcagcttcc tggacgtgca gagcaccttc 1860
accatcggcg cctggaactt cagcagcggc aacgaggtgt acatcgacag gatcgagttc 1920
gtgccggtgg aggtgaccta cgaggccgag tacgacttcg agaaggccca ggagaaggtg 1980
tga 1983

<210> 5
<211> 2109
<212> DNA
<213> PIC6-01 添加核苷酸序列

[0008]

<400> 5

atgaagctga agaaccagga caagcaccag agcttcagca gcaacgccaa ggtggacaag 60
atcagcaccg acagcctgaa gaacgagacc gacatcgagc tgcagaacat caaccacgag 120
gactgcctga agatgagcga gtacgagaac gtggagccgt tcgtgagcgc cagcaccatc 180
cagaccggca tcggcatcgc cggcaagatc ctgggcaccc tgggcgtgcc gttcgccggc 240
caggtggcca gcctgtacag cttcatcctg ggcgagctgt ggccgaaggg caagaaccag 300
tgggagatct tcatggagca cgtggaggag atcatcaacc agaagatcag cacctacgcc 360
aggaacaagg ccctgaccga cctgaagggc ctgggcgacg ccctggccgt gtaccacgac 420
agcctggaga gctgggtggg caacaggaac aacaccaggg ccaggagcgt ggtgaagagc 480
cagtacatcg ccctggagct gatgttcgtg cagaagctgc cgagcttcgc cgtgagcggc 540
gaggaggtgc cgctgctgcc gatctacgcc caggccgcca acctgcacct gctgctgctg 600
agggacgcca gcatcttcgg caaggagtgg ggcctgagca gcagcgagat cagcaccttc 660
tacaacaggc aggtggagag ggccggcgac tacagcgacc actgcgtgaa gtggtacagc 720
accggcctga acaacctgag gggcaccaac gccgagagct gggtgaggta caaccagttc 780
aggagggaca tgaccctgat ggtgctggac ctggtggccc tgttcccgag ctacgacacc 840
cagatgtacc cgatcaagac caccgcccag ctgaccaggg aggtgtacac cgacgccatc 900
ggcaccgtgc acccgcaccc gagcttcacc agcaccacct ggtacaacaa caacgccccg 960
agcttcagcg ccatcgaggc cgccgtggtg aggaacccgc acctgctgga cttcctggag 1020
caggtgacca tctacagcct gctgagcagg tggagcaaca cccagtacat gaacatgtgg 1080
ggcggccaca agctggagtt caggaccatc ggcggcaccc tgaacatcag cacccagggc 1140
agcaccaaca ccagcatcaa cccggtgacc ctgccgttca ccagcaggga cgtgtacagg 1200
accgagagcc tggccggcct gaacctgttc ctgacccagc cggtgaacgg cgtgccgagg 1260
gtggacttcc actggaagtt cgtgacccac ccgatcgcca gcgacaactt ctactacccg 1320
ggctacgccg gcatcggcac ccagctgcag gacagcgaga acgagctgcc gccggaggcc 1380
accggccagc cgaactacga gagctacagc cacaggctga gccacatcgg cctgatcagc 1440
gccagccacg tgaaggccct ggtgtacagc tggacccaca ggagcgccga caggaccaac 1500
accatcgagc cgaacagcat cacccagatc ccgctggtga aggccttcaa cctgagcagc 1560
ggcgccgccg tggtgagggg cccgggcttc accggcggcg acatcctgag gaggaccaac 1620
accggcacct tcggcgacat cagggtgaac atcaacccgc cgttcgccca gaggtacagg 1680
gtgaggatca ggtacgccag caccaccgac ctgcagttcc acaccagcat caacggcaag 1740
gccatcaacc agggcaactt cagcgccacc atgaacaggg gcgaggacct ggactacaag 1800
accttcagga ccgtgggctt caccaccccg ttcagcttcc tggacgtgca gagcaccttc 1860
accatcggcg cctggaactt cagcagcggc aacgaggtgt acatcgacag gatcgagttc 1920

[0009]

gtgccggtgg aggtgaccta cgaggccgag tacgacttcg agaaggccca ggagaaggtg 1980
accgccctgt tcaccagcac caacccgggc ggcctgaaga ccaacgtgac cgagtaccac 2040
atcgaccagg tgagcaacct ggtggagagc ctgagcatga acagcatcag catgaagagg 2100
gagaactga 2109

<210> 6
<211> 1992
<212> DNA
<213> 玉米 Ubiquitin（泛素）基因启动子

<400> 6
ctgcagtgca gcgtgacccg gtcgtgcccc tctctagaga taatgagcat tgcatgtcta 60
agttataaaa aattaccaca tattttttt gtcacacttg tttgaagtgc agtttatcta 120
tctttataca tatatttaaa ctttactcta cgaataatat aatctatagt actacaataa 180
tatcagtgtt ttagagaatc atataaatga acagttagac atggtctaaa ggacaattga 240
gtattttgac aacaggactc tacagtttta tctttttagt gtgcatgtgt tctccttttt 300
ttttgcaaat agcttcacct atataatact tcatccattt tattagtaca tccatttagg 360
gtttagggtt aatggttttt atagactaat ttttttagta catctatttt attctatttt 420
agcctctaaa ttaagaaaac taaaactcta ttttagtttt tttatttaat aatttagata 480
taaaatagaa taaaataaag tgactaaaaa ttaaacaaat accctttaag aaattaaaaa 540
aactaaggaa acatttttct tgtttcgagt agataatgcc agcctgttaa acgccgtcga 600
cgagtctaac ggacaccaac cagcgaacca gcagcgtcgc gtcgggccaa gcgaagcaga 660
cggcacggca tctctgtcgc tgcctctgga cccctctcga gagttccgct ccaccgttgg 720
acttgctccg ctgtcggcat ccagaaattg cgtggcggag cggcagacgt gagccggcac 780
ggcaggcggc ctcctcctcc tctcacggca cggcagctac gggggattcc tttcccaccg 840
ctccttcgct ttcccttcct cgcccgccgt aataaataga cacccccctcc acaccctctt 900
tccccaacct cgtgttgttc ggagcgcaca cacacacaac cagatctccc ccaaatccac 960
ccgtcggcac ctccgcttca aggtacgccg ctcgtcctcc cccccccccc ctctctacct 1020
tctctagatc ggcgttccgg tccatggtta gggcccggta gttctacttc tgttcatgtt 1080
tgtgttagat ccgtgtttgt gttagatccg tgctgctagc gttcgtacac ggatgcgacc 1140
tgtacgtcag acacgttctg attgctaact tgccagtgtt tctctttggg gaatcctggg 1200
atggctctag ccgttccgca gacgggatcg atttcatgat tttttttgtt tcgttgcata 1260
gggtttggtt tgccctttc ctttatttca atatatgccg tgcacttgtt tgtcgggtca 1320

[0010]

tcttttcatg ctttttttg tcttggttgt gatgatgtgg tctggttggg cggtcgttct 1380
agatcggagt agaattctgt ttcaaactac ctggtggatt tattaatttt ggatctgtat 1440
gtgtgtgcca tacatattca tagttacgaa ttgaagatga tggatggaaa tatcgatcta 1500
ggataggtat acatgttgat gcgggtttta ctgatgcata tacagagatg ctttttgttc 1560
gcttggttgt gatgatgtgg tgtggttggg cggtcgttca ttcgttctag atcggagtag 1620
aatactgttt caaactacct ggtgtattta ttaattttgg aactgtatgt gtgtgtcata 1680
catcttcata gttacgagtt taagatggat ggaaatatcg atctaggata ggtatacatg 1740
ttgatgtggg ttttactgat gcatatacat gatggcatat gcagcatcta ttcatatgct 1800
ctaaccttga gtacctatct attataataa acaagtatgt tttataatta ttttgatctt 1860
gatatacttg gatgatggca tatgcagcag ctatatgtgg atttttttag ccctgccttc 1920
atacgctatt tatttgcttg gtactgtttc ttttgtcgat gctcaccctg ttgtttggtg 1980
ttacttctgc ag 1992

<210> 7
<211> 253
<212> DNA
<213> 胭脂碱合成酶的终止子

<400> 7
gatcgttcaa acatttggca ataaagtttc ttaagattga atcctgttgc cggtcttgcg 60
atgattatca tataatttct gttgaattac gttaagcatg taataattaa catgtaatgc 120
atgacgttat ttatgagatg ggtttttatg attagagtcc cgcaattata catttaatac 180
gcgatagaaa acaaaatata gcgcgcaaac taggataaat tatcgcgcgc ggtgtcatct 240
atgttactag atc 253

<210> 8
<211> 1176
<212> DNA
<213> 磷酸甘露糖异构酶基因

<400> 8
atgcaaaaac tcattaactc agtgcaaaac tatgcctggg gcagcaaaac ggcgttgact 60

[0011]

gaactttatg gtatggaaaa tccgtccagc cagccgatgg ccgagctgtg gatgggcgca 120
catccgaaaa gcagttcacg agtgcagaat gccgccggag atatcgtttc actgcgtgat 180
gtgattgaga gtgataaatc gactctgctc ggagaggccg ttgccaaacg ctttggcgaa 240
ctgcctttcc tgttcaaagt attatgcgca gcacagccac tctccattca ggttcatcca 300
aacaaacaca attctgaaat cggttttgcc aaagaaaatg ccgcaggtat cccgatggat 360
gccgccgagc gtaactataa agatcctaac cacaagccgg agctggtttt tgcgctgacg 420
cctttccttg cgatgaacgc gtttcgtgaa ttttccgaga ttgtctccct actccagccg 480
gtcgcaggtg cacatccggc gattgctcac tttttacaac agcctgatgc cgaacgttta 540
agcgaactgt tcgccagcct gttgaatatg cagggtgaag aaaaatcccg cgcgctggcg 600
attttaaaat cggccctcga tagccagcag ggtgaaccgt ggcaaacgat tcgtttaatt 660
tctgaatttt acccggaaga cagcggtctg ttctccccgc tattgctgaa tgtggtgaaa 720
ttgaaccctg gcgaagcgat gttcctgttc gctgaaacac cgcacgctta cctgcaaggc 780
gtggcgctgg aagtgatggc aaactccgat aacgtgctgc gtgcgggtct gacgcctaaa 840
tacattgata ttccggaact ggttgccaat gtgaaattcg aagccaaacc ggctaaccag 900
ttgttgaccc agccggtgaa acaaggtgca gaactggact tcccgattcc agtggatgat 960
tttgccttct cgctgcatga ccttagtgat aaagaaacca ccattagcca gcagagtgcc 1020
gccattttgt tctgcgtcga aggcgatgca acgttgtgga aaggttctca gcagttacag 1080
cttaaaccgg gtgaatcagc gtttattgcc gccaacgaat caccggtgac tgtcaaaggc 1140
cacggccgtt tagcgcgtgt ttacaacaag ctgtaa 1176

<210> 9
<211> 2241
<212> DNA
<213> 天然序列

<400> 9
atgaaactaa agaatcaaga taagcatcaa agtttttcta gcaatgcgaa agtagataaa 60
atctctacgg attcactaaa aaatgaaaca gatatagaat tacaaaacat taatcatgaa 120
gattgtttga aaatgtctga gtatgaaaat gtagagccgt ttgttagtgc atcaacaatt 180
caaacaggta ttggtattgc gggtaaaata cttggtaccc taggcgttcc ttttgcagga 240
caagtagcta gtctttatag ttttatctta ggtgagctat ggcctaaggg gaaaaatcaa 300
tgggaaatct ttatggaaca tgtagaagag attattaatc aaaaaatatc aacttatgca 360
agaaataaag cacttacaga cttgaaagga ttaggagatg ccttagctgt ctaccatgat 420

[0012]

tcgcttgaaa gttgggttgg aaatcgtaat aacacaaggg ctaggagtgt tgtcaagagc 480
caatatatcg cattagaatt gatgttcgtt cagaaactac cttcttttgc agtgtctgga 540
gaggaggtac cattattacc gatatatgcc caagctgcaa atttacattt gttgctatta 600
agagatgcat ctatttttgg aaaagagtgg ggattatcat cttcagaaat ttcaacattt 660
tataaccgtc aagtcgaacg agcaggagat tattccgacc attgtgtgaa atggtatagc 720
acaggtctaa ataacttgag gggtacaaat gccgaaagtt gggtacgata taatcaattc 780
cgtagagaca tgactttaat ggtactagat ttagtggcac tatttccaag ctatgataca 840
caaatgtatc caattaaaac tacagcccaa cttacaagag aagtatatac agacgcaatt 900
gggacagtac atccgcatcc aagttttaca agtacgactt ggtataataa taatgcacct 960
tcgttctctg ccatagaggc tgctgttgtt cgaaacccgc atctactcga ttttctagaa 1020
caagttacaa tttacagctt attaagtcga tggagtaaca ctcagtatat gaatatgtgg 1080
ggaggacata aactagaatt ccgaacaata ggaggaacgt taaatatctc aacacaagga 1140
tctactaata cttctattaa tcctgtaaca ttaccgttca cttctcgaga cgtctatagg 1200
actgaatcat tggcagggct gaatctattt ttaactcaac ctgttaatgg agtacctagg 1260
gttgattttc attggaaatt cgtcacacat ccgatcgcat ctgataattt ctattatcca 1320
gggtatgctg gaattgggac gcaattacag gattcagaaa atgaattacc acctgaagca 1380
acaggacagc caaattatga atcttatagt catagattat ctcatatagg actcatttca 1440
gcatcacatg tgaaagcatt ggtatattct tggacgcatc gtagtgcaga tcgtacaaat 1500
acaattgagc caaatagcat tacacaaata ccattagtaa aagctttcaa tctgtcttca 1560
ggtgccgctg tagtgagagg accaggattt acaggtgggg atatccttcg aagaacgaat 1620
actggtacat ttggggatat acgagtaaat attaatccac cattgcaca aagatatcgc 1680
gtgaggattc gctatgcttc taccacagat ttacaattcc atacgtcaat taacggtaaa 1740
gctattaatc aaggtaattt ttcagcaact atgaatagag gagaggactt agactataaa 1800
acctttagaa ctgtaggctt taccactcca tttagctttt tagatgtaca aagtacattc 1860
acaataggtg cttggaactt ctcttcaggt aacgaagttt atatagatag aattgaattt 1920
gttccggtag aagtaacata tgaggcagaa tatgattttg aaaaagcgca agagaaggtt 1980
actgcactgt ttacatctac gaatccaaga ggattaaaaa cagatgtaaa ggattatcat 2040
attgaccagg tatcaaattt agtagagtct ctatcagatg aattctatct tgatgaaaag 2100
agagaattat tcgagatagt taaatacgcg aagcaactcc atattgagcg taacatgccg 2160
tcgacaagct tgcggccgca ctcgagcacc accaccacca ccactgagat ccggctgcta 2220
acaaagcccg aaaggaagtg a 2241

<210> 10

[0013]

<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 引物 1

<400> 10
accaggacaa gcaccagagc 20

<210> 11
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 引物 2

<400> 11
cttcaggctg tcggtgctg 19

<210> 12
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 探针 1

<400> 12
agcagcaacg ccaaggtgga caag 24

[0014]

<210> 13
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 引物 3

<400> 13
caaacaggta ttggtattgc gg 22

<210> 14
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 引物 4

<400> 14
cccttaggcc atagctcacc t 21

<210> 15
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 探针 2

<400> 15

[0015]

cttggtaccc taggcgttcc ttttgcag 28

<210> 16
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 引物 5

<400> 16
cattaactca gtgcaaaact atgcc 25

<210> 17
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 引物 6

<400> 17
agtagggaga caatctcgga aaatt 25

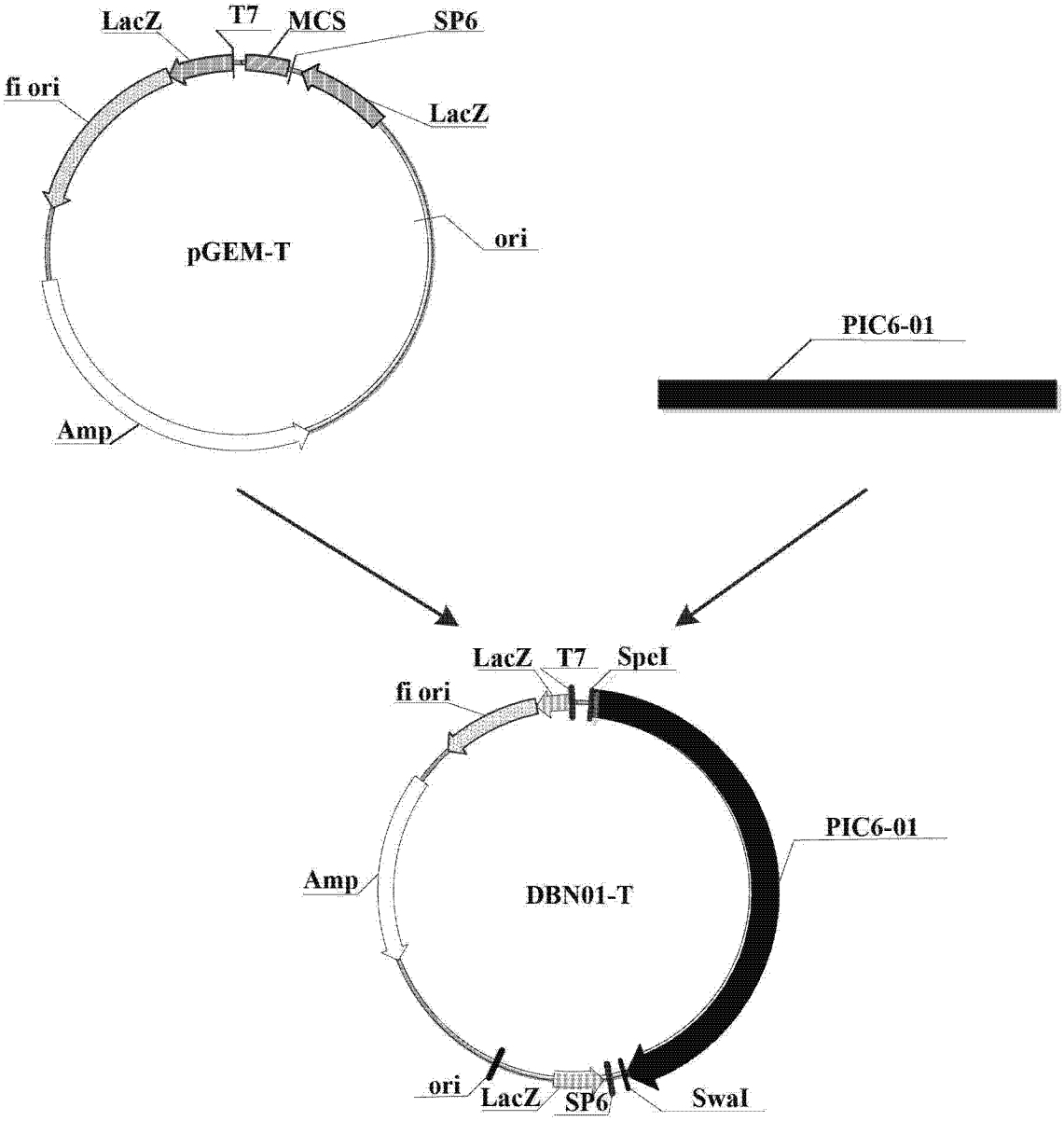

LacZ
T7
MCS
SP6
fi ori
LacZ
ori
pGEM-T
Amp
PIC6-01
LacZ
T7
SpeI
fi ori
PIC6-01
Amp
DBN01-T
ori
LacZ
SP6
SwaI

图 1

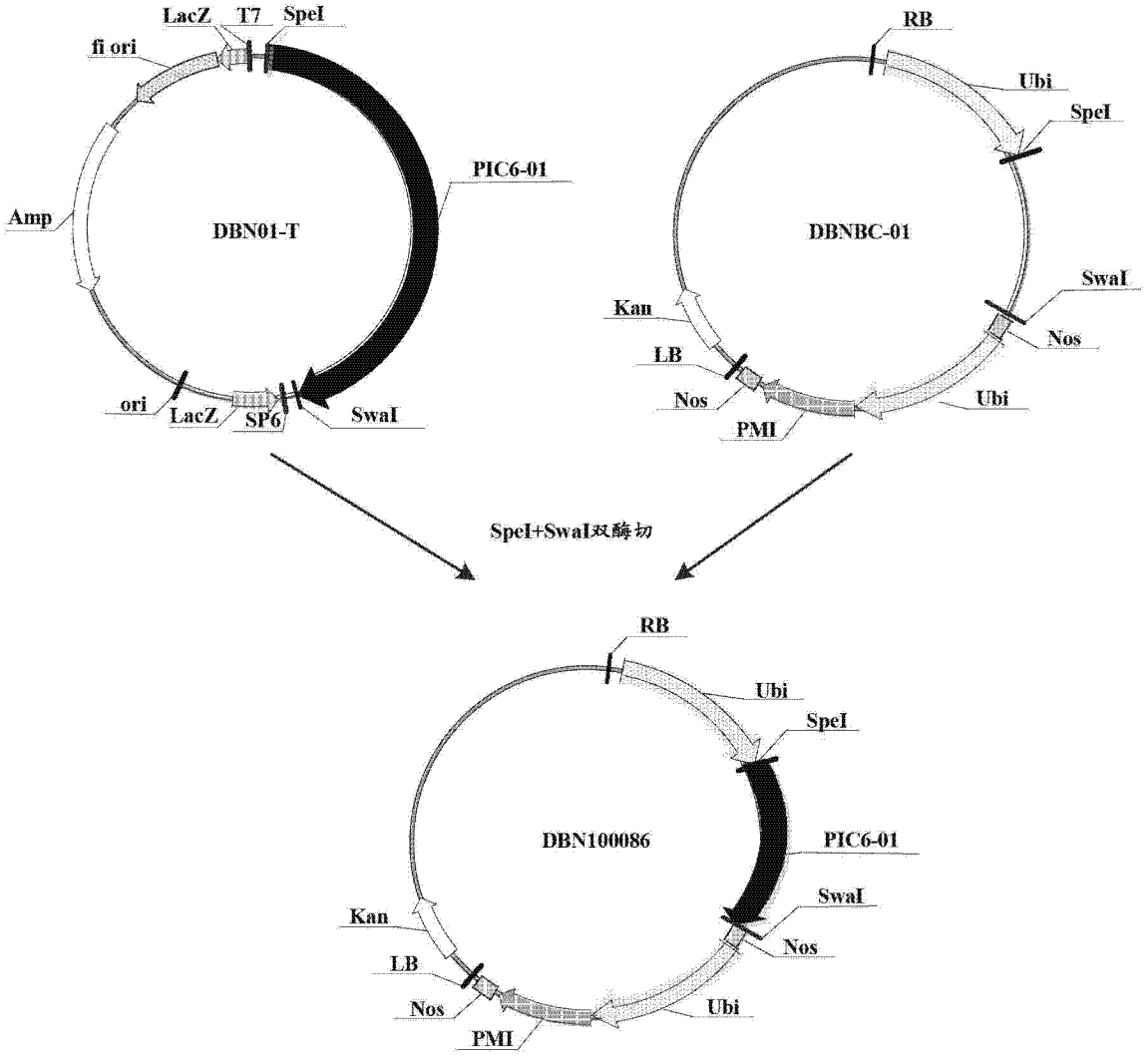

LacZ
T7
SpeI
fi ori
PIC6-01
Amp
DBN01-T
ori
LacZ
SP6
SwaI
RB
Ubi
SpeI
DBNBC-01
SwaI
Kan
Nos
LB
Nos
Ubi
PMI
SpeI+SwaI双酶切
RB
Ubi
SpeI
DBN100086
PIC6-01
SwaI
Kan
Nos
LB
Nos
Ubi
PMI

图 2

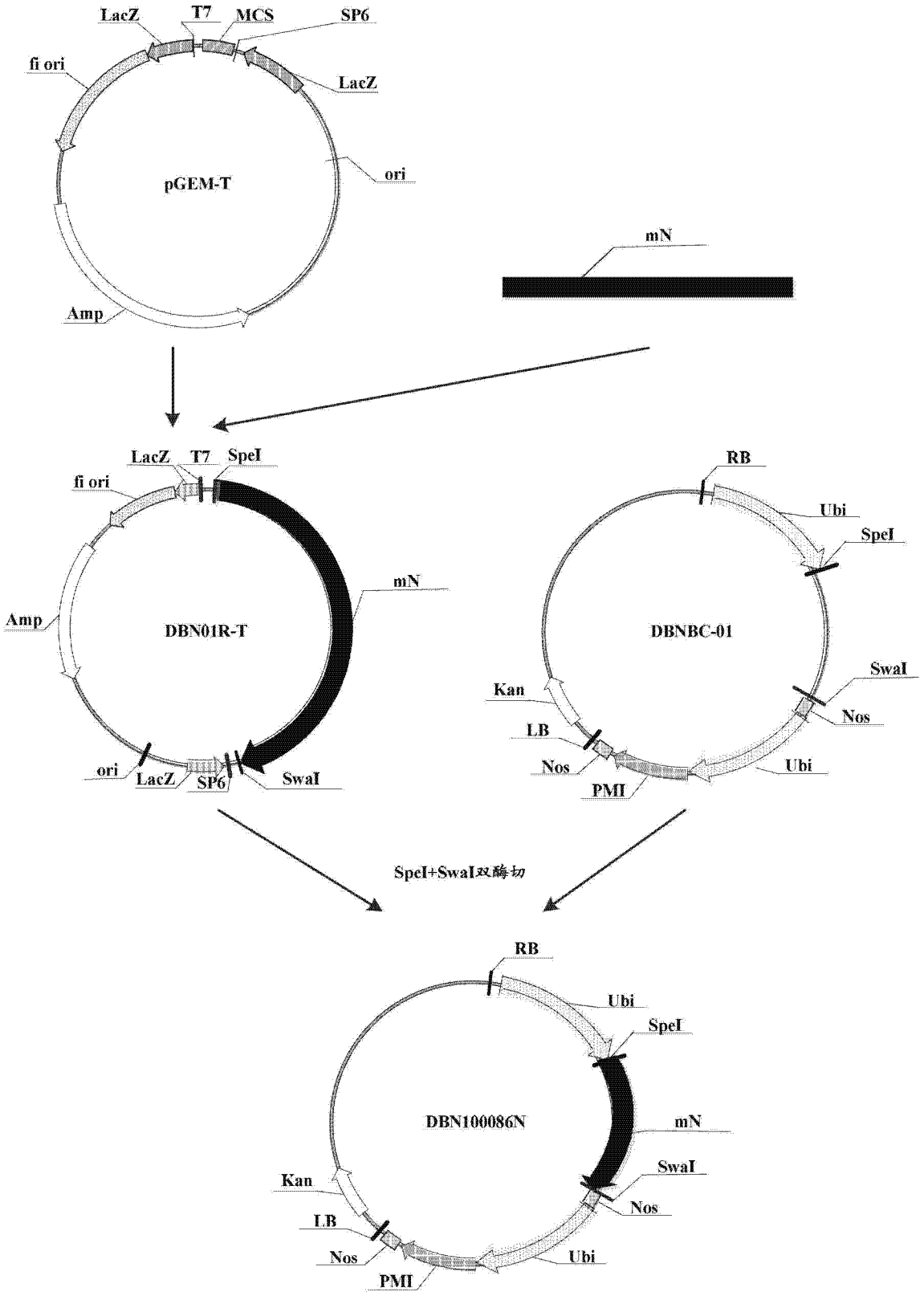

LacZ
T7
MCS
SP6
fi ori
LacZ
ori
pGEM-T
Amp
mN
LacZ
T7
SpeI
fi ori
mN
Amp
DBN01R-T
ori
LacZ
SP6
SwaI
RB
Ubi
SpeI
DBNBC-01
SwaI
Kan
Nos
LB
Nos
Ubi
PMI
SpeI+SwaI双酶切
RB
Ubi
SpeI
DBN100086N
mN
SwaI
Kan
Nos
LB
Nos
Ubi
PMI

图 3

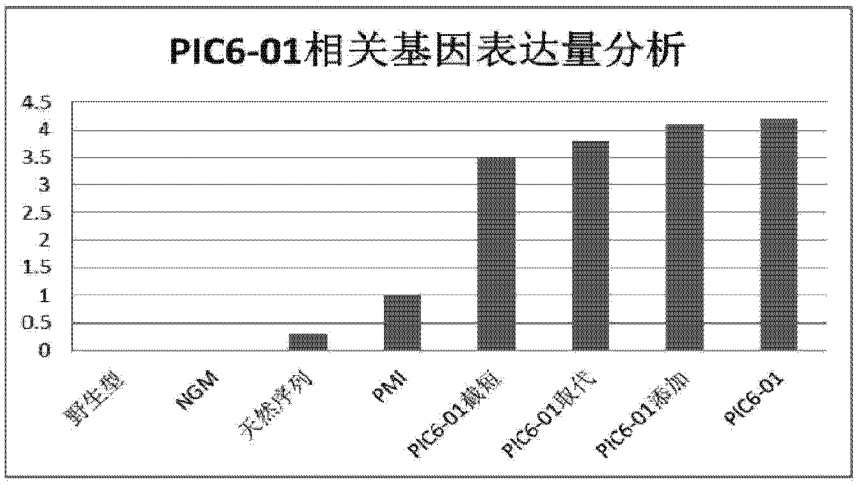

PIC6-01相关基因表达量分析
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
野生型
NGM
天然序列
PMI
PIC6-01截短
PIC6-01取代
PIC6-01添加
PIC6-01

图 4

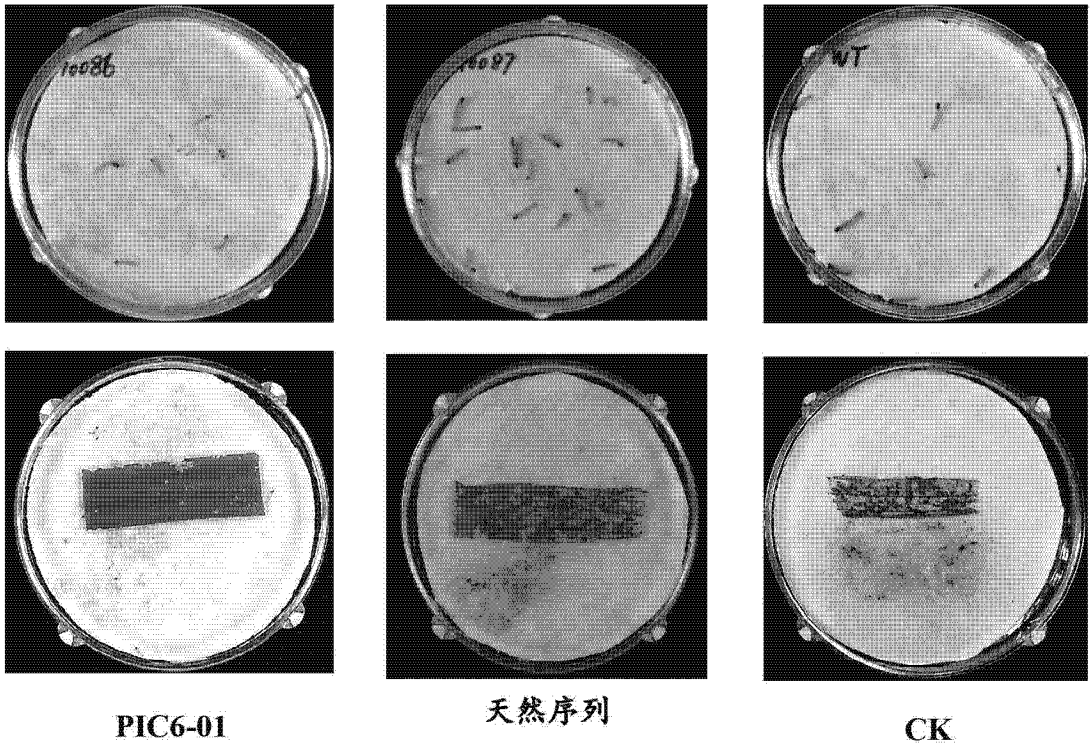
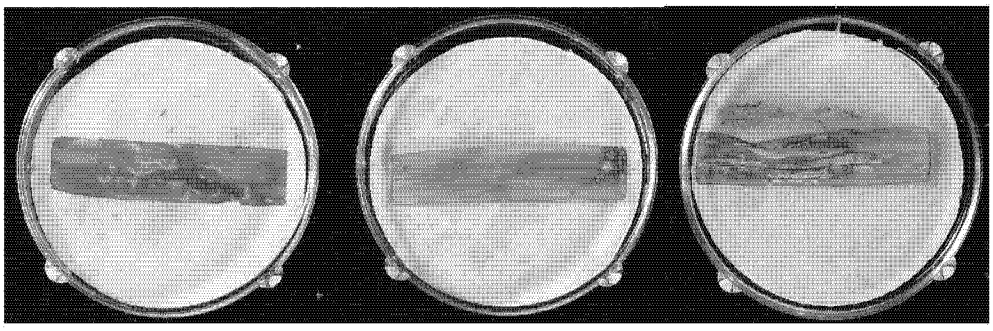
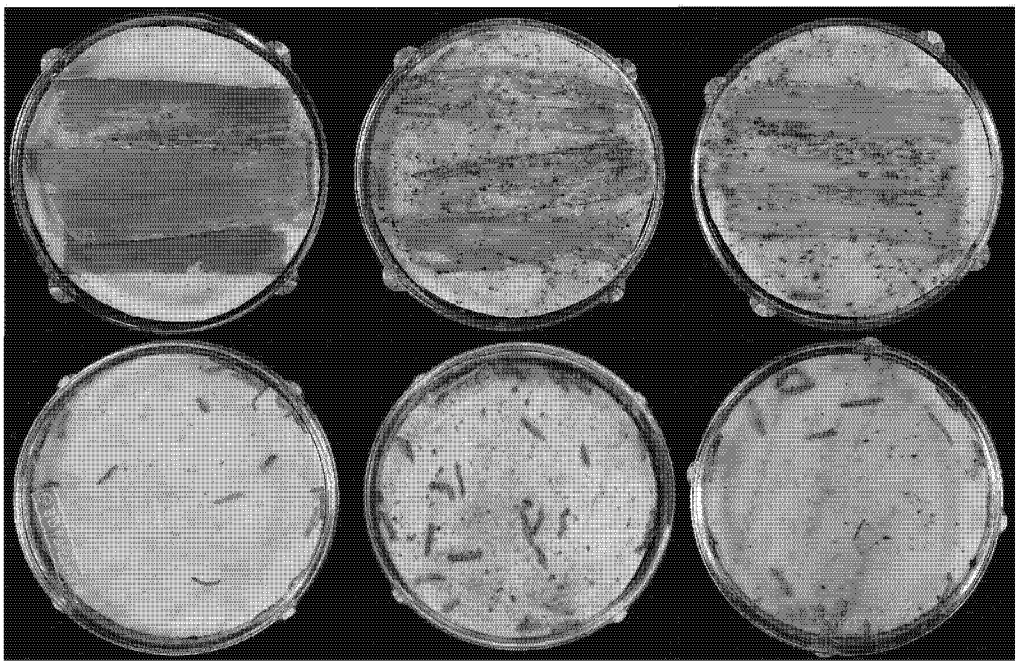

PIC6-01
天然序列
CK

图 5



CK PIC6-01 天然序列

图 6



PIC6-01 CK 天然序列

图 7