



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108064233 B

(45) 授权公告日 2022.07.15

(21) 申请号 201680028762.X

(22) 申请日 2016.05.13

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108064233 A

(43) 申请公布日 2018.05.22

(30) 优先权数据
62/163837 2015.05.19 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2017.11.17

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2016/032273 2016.05.13

(87) PCT国际申请的公布数据
W02016/186986 EN 2016.11.24

(73) 专利权人 先锋国际良种公司
地址 美国依阿华州

(72) 发明人 H.科兹伊 J.奥拉 U.舍伦伯格
卫俊智 谢卫平 钟晓红 朱根海

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001
专利代理师 翟建伟 黄希贵

(51) Int.Cl.
C07K 14/21 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/31 (2006.01)
C12N 15/84 (2006.01)
A01H 5/00 (2018.01)
A01N 47/44 (2006.01)
A01P 7/04 (2006.01)

审查员 关维

权利要求书1页 说明书94页 附图3页

(54) 发明名称

杀昆虫蛋白及其使用方法

(57) 摘要

提供了用于控制有害生物的组合物和方法。这些方法涉及用编码杀昆虫蛋白的核酸序列转化生物体。具体地,这些核酸序列可用于制备具有杀昆虫活性的植物和微生物。因此,提供了经转化的细菌、植物、植物细胞、植物组织以及种子。组合物是细菌物种的杀昆虫核酸和蛋白。这些序列在用于随后转化到包括植物在内的目的生物体中的表达载体的构建中具有用途,充当用于分离其他同源(或部分同源的)基因的探针。这些杀有害生物蛋白可用于控制鳞翅目(Lepidopteran)、鞘翅目(Coleopteran)、双翅目(Dipteran)、真菌、半翅目(Hemipteran)和线虫有害生物群体、抑制其生长或将其杀灭,并且可用于生产具有杀昆虫活性的组合物。

1. 一种分离的IPD073多肽,其由SEQ ID NO: 2、4或8的氨基酸序列组成,其中所述IPD073多肽具有针对根萤叶甲属(*Diabrotica*)物种的杀昆虫活性。

2. 权利要求1的分离的IPD073多肽,其中所述根萤叶甲属物种选自玉米根萤叶甲(*Diabrotica virgifera*)、斑点黄瓜甲虫(*Diabrotica undecimpunctata howardi*)、北方玉米根虫(*Diabrotica barberi*)和南美叶甲(*Diabrotica speciosa*)。

3. 一种编码IPD073多肽的重组多核苷酸,其中所述IPD073多肽由SEQ ID NO: 2、4、6或8的氨基酸序列组成。

4. 权利要求3的重组多核苷酸,其中所述多核苷酸是非基因组多核苷酸,其中所述非基因组多核苷酸是cDNA。

5. 权利要求4的重组多核苷酸,其中所述多核苷酸具有针对在农业上重要作物中表达而优化的密码子。

6. 一种宿主细胞,其包含权利要求3、4或5的多核苷酸。

7. 一种DNA构建体,其包含与异源调节元件可操作地连接的权利要求3、4或5的多核苷酸。

8. 一种用于产生转基因植物或植物细胞的方法,所述转基因植物或植物细胞包含权利要求7的DNA构建体。

9. 一种包含IPD073多肽的组合物,其中所述IPD073多肽由SEQ ID NO: 2、4、6或8的氨基酸序列组成。

10. 一种融合蛋白,其由IPD073多肽和信号序列或转运肽组成,其中所述IPD073多肽由SEQ ID NO: 2、4、6或8的氨基酸序列组成。

11. 一种用于控制鞘翅目昆虫有害生物群体的方法,所述方法包括将所述昆虫有害生物群体与IPD073多肽接触,其中所述IPD073多肽由SEQ ID NO: 2、4、6或8的氨基酸序列组成。

12. 一种抑制鞘翅目昆虫有害生物生长或将其杀灭的方法,所述方法包括将所述昆虫有害生物与包含IPD073多肽的组合物接触,其中所述IPD073多肽由SEQ ID NO: 2、4、6或8的氨基酸序列组成。

13. 一种在转基因植物中控制鞘翅目昆虫侵染的方法,所述方法包括在所述植物中使编码IPD073多肽的多核苷酸表达,其中所述IPD073多肽由SEQ ID NO: 2、4、6或8的氨基酸序列组成。

14. 一种用于控制鞘翅目昆虫有害生物群体的方法,所述方法包括将所述昆虫有害生物群体与包含权利要求7的DNA构建体的转基因植物或植物细胞接触。

15. 一种抑制鞘翅目昆虫有害生物生长或将其杀灭的方法,所述方法包括将所述昆虫有害生物与包含权利要求7的DNA构建体的转基因植物或植物细胞接触。

16. 权利要求11-15中任一项的方法,其中所述昆虫或昆虫群体对至少一种Bt毒素有抗性。

17. IPD073多肽用于抑制鞘翅目昆虫或昆虫群体生长或将其杀灭的用途,其中所述IPD073多肽由SEQ ID NO: 2、4、6或8的氨基酸序列组成。

杀昆虫蛋白及其使用方法

[0001] 以电子方式提交的序列表的引用

[0002] 该序列表的官方副本经由EFS-Web作为ASCII格式的序列表以电子方式提交,文件名为“5354-W0-PCT_SequenceListing”,创建于2016年4月12日,且具有1381千字节大小,并与本说明书同时提交。包含在该ASCII格式的文件中的序列表是说明书的一部分并通过引用以其全文结合在此。

[0003] 政府支持

[0004] 根据协议号LB09005376,政府享有本发明的一定的权利。

发明领域

[0005] 本披露涉及分子生物学领域。提供了编码杀有害生物蛋白的新颖基因。这些杀有害生物蛋白和编码它们的核酸序列可用于制备杀有害生物配制品和生产转基因有害生物抗性植物。

背景技术

[0006] 使用微生物剂(如真菌、细菌或其他昆虫物种)对具有农业意义的昆虫有害生物进行生物防治,为合成型化学杀有害生物剂提供了环境友好且有商业吸引力的替代方案。一般来说,使用生物杀有害生物剂造成污染和环境危害的风险较低,并且生物杀有害生物剂提供比传统广谱化学杀昆虫剂所特有的靶特异性更强。此外,生物杀有害生物剂往往生产成本较低,并且因此能提高各种作物的经济产量。

[0007] 已知芽孢杆菌属微生物的某些物种对于一系列昆虫有害生物具有杀有害生物活性,这些昆虫有害生物包括鳞翅目(Lepidoptera)、双翅目(Diptera)、鞘翅目(Coleoptera)、半翅目(Hemiptera)等。苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)和日本金龟子芽孢杆菌(*Bacillus popilliae*)是迄今为止发现的最成功的生物防治剂。昆虫致病性还归因于幼虫芽孢杆菌(*B. larvae*)、缓病芽孢杆菌(*B. lentimorbus*)、球形芽孢杆菌(*B. sphaericus*)和蜡状芽孢杆菌(*B. cereus*)的菌株。微生物杀昆虫剂,特别是从芽孢杆菌属菌株获得的那些微生物杀昆虫剂,在农业上作为有害生物化学防治的替代方案起着重要作用。

[0008] 通过将作物植物进行遗传工程改造以生产来自芽孢杆菌属(*Bacillus*)的杀有害生物蛋白,已经开发出昆虫抗性增强的作物植物。例如,已经对玉米和棉花植物进行遗传工程改造以产生从Bt株分离的杀有害生物蛋白。现在,这些遗传工程化作物广泛应用于农业中,并且为农民提供了取代传统昆虫防治方法的环境友好型替代方案。虽然它们已被证明在商业上非常成功,但是这些遗传工程化抗昆虫作物植物仅针对窄范围的经济上重要的昆虫有害生物提供抗性。在某些情况下,昆虫可以对不同杀昆虫化合物产生抗性,这就导致需要鉴别用于有害生物防治的替代性生物防治剂。

[0009] 因此,仍然需要对昆虫有害生物具有不同作用方式和/或范围的杀昆虫活性的新颖杀有害生物蛋白,例如针对鳞翅目和鞘翅目中的各种昆虫具有活性的杀昆虫蛋白,这些

昆虫包括但不限于已对现存生物杀昆虫剂产生抗性的昆虫有害生物。

发明内容

[0010] 提供了用于对细菌、植物、植物细胞、组织以及种子赋予杀有害生物活性的组合物和方法。组合物包含杀有害生物和杀昆虫多肽的核酸分子编码序列、包含那些核酸分子的载体、以及包含这些载体的宿主细胞。组合物还包括杀有害生物多肽序列以及针对那些多肽的抗体。这些核酸序列可以在DNA构建体或表达盒中使用,以用于在多种生物体(包括微生物和植物)中进行转化和表达。这些核苷酸或氨基酸序列可以是合成序列,这些合成序列已经被设计用于在生物体中表达,该生物体包括但不限于:微生物或植物。组合物还包含经转化的细菌、植物、植物细胞、组织、以及种子。

[0011] 特别地,提供了编码IPD073多肽的分离的或重组的核酸分子,这些多肽包括氨基酸取代、缺失、插入、其片段。此外,涵盖了对应于IPD073多肽的氨基酸序列。提供了分离的或重组的能够编码SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:292-568中的任一个、和SEQ ID NO:571的IPD073多肽的核酸分子,以及氨基酸取代、缺失、插入、其片段,及其组合。还涵盖了与实施例的核酸序列互补或与实施例的序列杂交的核酸序列。还提供了分离的或重组的SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:292-568中的任一个、和SEQ ID NO:571的IPD073多肽,以及氨基酸取代、缺失、插入、其片段及其组合。

[0012] 提供了用于产生本披露的多肽和使用那些多肽用来控制或杀灭鳞翅目、鞘翅目、线虫、真菌、和/或双翅目有害生物的方法。实施例的转基因植物表达本文披露的杀有害生物序列中的一种或多种。在不同的实施例中,该转基因植物进一步包含一种或多种另外的昆虫抗性基因,例如,用于控制鞘翅目、鳞翅目、半翅目或线虫有害生物的一种或多种另外的基因。本领域技术人员将理解,转基因植物可以包含给予目的农艺性状的任何基因。

[0013] 还包括用于在样品中检测实施例的核酸和多肽的方法。提供了用于在样品中检测IPD073多肽的存在或检测编码IPD073多肽的多核苷酸序列的存在的试剂盒。该试剂盒可以与实施用于检测预期试剂的方法所需的所有试剂和对照样品,以及使用说明书一起提供。

[0014] 实施例的这些组合物和方法可用于产生具有增强的有害生物抗性或耐受性的生物体。这些生物体以及包含这些生物体的组合物对于农业目的是所希望的。实施例的组合物还可用于产生具有杀有害生物活性的经改变或改进的蛋白质,或用于检测IPD073多肽的存在。

附图说明

[0015] 图1A-1B显示IPD073Aa (SEQ ID NO:4)、IPD073Ab (SEQ ID NO:6)、IPD073Ca (SEQ ID NO:6)、IPD073Cb (SEQ ID NO:8)、IPD073Cc (SEQ ID NO:10)、IPD073Cd (SEQ ID NO:12)、和IPD073Ea (SEQ ID NO:14)的氨基酸序列的AlignX比对。突出了序列多样性。保守氨基酸用浅色阴影表示,而非保守氨基酸用暗阴影指示。

[0016] 图2显示了对于用IPD073Aa多核苷酸 (SEQ ID NO:569) 转化的单个PHP61755事件和对于没有IPD073Aa基因的阴性对照载体,遭受玉米根虫损伤的根节数 (CRWNIS = 玉米根虫节点损伤评分)。每个星都代表单个的事件。

具体实施方式

[0017] 本披露涉及用于控制有害生物的组合和方法。这些方法涉及用编码IPD073多肽的核酸序列转化生物体。具体地,实施例的核酸序列可用于制备具有杀有害生物活性的植物和微生物。因此,提供了经转化的细菌、植物、植物细胞、植物组织以及种子。组合是细菌物种的杀有害生物核酸和蛋白。这些核酸序列可用于表达载体的构建,用于随后转化到目的生物体中,作为用于分离其他同源(或部分同源)基因的探针,并且通过本领域已知的方法(如定点诱变、结构域交换或DNA改组)用于生产经改变的IPD073多肽。IPD073多肽可用于控制或杀灭鳞翅目、鞘翅目、双翅目、真菌、半翅目和线虫有害生物群体,并可用于生产具有杀有害生物活性的组合。目的昆虫有害生物包括但不限于鳞翅目物种(包括但不限于:例如棉铃虫(CEW) (*Helicoverpa zea*)、欧洲玉米螟(ECB) (*Ostrinia nubilalis*)、小菜蛾,例如棉铃虫(*Helicoverpa zea* Boddie);大豆尺蠖,例如大豆尺夜蛾(*Pseudoplusia includens* Walker);和绒毛豆毛虫,例如大豆夜蛾(*Anticarsia gemmatalis* Hübner))和鞘翅目物种(包括但不限于西方玉米根虫(玉米根萤叶甲)-WCRW、南方玉米根虫(斑点黄瓜甲虫(*Diabrotica undecimpunctata howardi*))-SCRW、和北方玉米根虫(Northern corn rootworm,*Diabrotica barberi*)-NCRW)。

[0018] “杀有害生物毒素”或“杀有害生物蛋白”在此用是指毒素或与这种蛋白质具有同源性的蛋白质,该毒素具有针对以下一种或多种有害生物的毒性活性,这些有害生物包括但不限于:鳞翅目、双翅目、半翅目以及鞘翅目或线虫门的成员。已经从生物体中分离出杀有害生物蛋白,这些生物体包括例如,芽孢杆菌属物种(*Bacillus* sp.)、假单胞菌属物种(*Pseudomonas* sp.)、发光杆菌属物种(*Photobacterium* sp.)、致病杆菌属物种(*Xenorhabdus* sp.)、双酶梭菌(*Clostridium bifermentans*)以及鲍比氏类芽孢杆菌(*Paenibacillus popilliae*)。杀有害生物蛋白包括但不限于:来自假单胞菌属物种(*Pseudomonas* sp.),如PSEEN3174(Monalysin;(2011) PLoS Pathogens[公共科学图书馆] 7:1-13)的杀昆虫蛋白;来自假单胞菌(*Pseudomonas protegens*)菌株CHA0和Pf-5(以前称为荧光菌(*fluorescens*))(Pechy-Tarr,(2008) Environmental Microbiology[环境微生物学] 10:2368-2386;GenBank登录号EU400157)的杀昆虫蛋白;来自台湾假单胞菌(*Pseudomonas Taiwanensis*)(Liu等人,(2010) J.Agric.Food Chem.[农业与食品化学杂志],58:12343-12349)和来自假产碱假单胞菌(*Pseudomonas pseudoalcaligenes*)(Zhang等人,(2009) Annals of Microbiology[微生物学杂志] 59:45-50和Li等人,(2007) Plant Cell Tiss.Organ Cult.[植物细胞,组织和器官培养杂志] 89:159-168)的杀昆虫蛋白;来自发光杆菌属物种和致病杆菌属物种(Hinchliffe等人,(2010) The Open Toxicology Journal[开放毒理学杂志],3:101-118和Morgan等人,(2001) Applied and Envir.Micro.[应用与环境微生物学] 67:2062-2069)的杀昆虫蛋白;来自美国专利号6,048,838和美国专利号6,379,946的杀昆虫蛋白;美国专利公开号US 20140007292的PIP-1多肽;美国专利公开号US 20140033361的AfIP-1A和/或AfIP-1B多肽;美国专利公开号US 20140274885和US 20160040184的PHI-4多肽;PCT公开号WO 2015/023846的PIP-47多肽、PCT公开号WO 2015/038734的PIP-72多肽;PCT公开号WO 2015/120270的PtIP-50多肽和PtIP-65多肽;PCT公开号WO 2015/120276的PtIP-83多肽;PCT序列号PCT/US 15/55502的PtIP-96多肽;US序列号62/201977的IPD079多肽;US序列号62/269482的IPD082多肽;以及 δ -内毒素包括但不限于

Cry1、Cry2、Cry3、Cry4、Cry5、Cry6、Cry7、Cry8、Cry9、Cry10、Cry11、Cry12、Cry13、Cry14、Cry15、Cry16、Cry17、Cry18、Cry19、Cry20、Cry21、Cry22、Cry23、Cry24、Cry25、Cry26、Cry27、Cry28、Cry29、Cry30、Cry31、Cry32、Cry33、Cry34、Cry35、Cry36、Cry37、Cry38、Cry39、Cry40、Cry41、Cry42、Cry43、Cry44、Cry45、Cry46、Cry47、Cry49、Cry50、Cry51、Cry52、Cry53、Cry54、Cry55、Cry56、Cry57、Cry58、Cry59、Cry60、Cry61、Cry62、Cry63、Cry64、Cry65、Cry66、Cry67、Cry68、Cry69、Cry70、Cry71、和Cry72类的 δ -内毒素基因和苏云金芽孢杆菌溶细胞cyt1和cyt2基因。这些类别的苏云金芽孢杆菌杀昆虫蛋白的成员是本领域技术人员熟知的(参见,Crickmore等人,“*Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature[苏云金芽孢杆菌毒素命名法]”(2011),在lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/,可以使用“www”前缀在万维网上访问该网址)。

[0019] δ -内毒素的实例还包括但不限于:美国专利号5,880,275和7,858,849的Cry1A蛋白;美国专利号8,304,604、8,304,605和8,476,226的DIG-3或DIG-11毒素(cry蛋白(如Cry1A、Cry3A)的 α 螺旋1和/或 α 螺旋2变体的N末端缺失);美国专利申请序列号10/525,318的Cry1B;美国专利号6,033,874的Cry1C;美国专利号5,188,960和6,218,188的Cry1F;美国专利号7,070,982、6,962,705和6,713,063的Cry1A/F嵌合体;美国专利号7,064,249的Cry2蛋白如Cry2Ab蛋白;Cry3A蛋白,包括但不限于:通过融合至少两种不同Cry蛋白的可变区和保守区的独特组合产生的工程化杂合杀昆虫蛋白(eHIP)(美国专利申请公开号2010/0017914);Cry4蛋白;Cry5蛋白;Cry6蛋白;美国专利号7,329,736、7,449,552、7,803,943、7,476,781、7,105,332、7,378,499和7,462,760的Cry8蛋白;Cry9蛋白如Cry9A、Cry9B、Cry9C、Cry9D、Cry9E和Cry9F家族的成员;Cry15蛋白,描述于以下文献中:Naimov等人(2008) *Applied and Environmental Microbiology*[应用与环境微生物学]74:7145-7151;美国专利号6,127,180、6,624,145和6,340,593的Cry22、Cry34Ab1蛋白;美国专利号6,248,535、6,326,351、6,399,330、6,949,626、7,385,107和7,504,229的CryET33和cryET34蛋白;美国专利公开号2006/0191034、2012/0278954,和PCT公开号WO 2012/139004的CryET33和CryET34同源物;美国专利号6,083,499、6,548,291和6,340,593的Cry35Ab1蛋白;Cry46蛋白、Cry51蛋白、Cry二元毒素;TIC901或相关毒素;美国专利申请公开号2008/0295207的TIC807;PCT US2006/033867的ET29、ET37、TIC809、TIC810、TIC812、TIC127、TIC128;美国专利号8,236,757的AXMI-027、AXMI-036和AXMI-038;美国专利号7,923,602的AXMI-031、AXMI-039、AXMI-040、AXMI-049;WO 2006/083891的AXMI-018、AXMI-020和AXMI-021;WO 2005/038032的AXMI-010;WO 2005/021585的AXMI-003;美国专利申请公开号2004/0250311的AXMI-008;美国专利申请公开号2004/0216186的AXMI-006;美国专利申请公开号2004/0210965的AXMI-007;美国专利申请号2004/0210964的AXMI-009;美国专利申请公开号2004/0197917的AXMI-014;美国专利申请公开号2004/0197916的AXMI-004;WO 2006/119457的AXMI-028和AXMI-029;WO 2004/074462的AXMI-007、AXMI-008、AXMI-0080rf2、AXMI-009、AXMI-014和AXMI-004;美国专利号8,084,416的AXMI-150;美国专利申请公开号2011/0023184的AXMI-205;美国专利申请公开号2011/0263488的AXMI-011、AXMI-012、AXMI-013、AXMI-015、AXMI-019、AXMI-044、AXMI-037、AXMI-043、AXMI-033、AXMI-034、AXMI-022、AXMI-023、AXMI-041、AXMI-063和AXMI-064;美国专利申请公开号2010/0197592的AXMI-R1和相关蛋白;WO 2011/103248的AXMI221Z、AXMI222z、AXMI223z、AXMI224z和

AXMI225z; W02011/103247的AXMI218、AXMI219、AXMI220、AXMI226、AXMI227、AXMI228、AXMI229、AXMI230和AXMI231; 美国专利号8,334,431的AXMI-115、AXMI-113、AXMI-005、AXMI-163和AXMI-184; 美国专利申请公开号2010/0298211的AXMI-001、AXMI-002、AXMI-030、AXMI-035和AXMI-045; 美国专利申请公开号2009/0144852的AXMI-066和AXMI-076; 美国专利号8,318,900的AXMI128、AXMI130、AXMI131、AXMI133、AXMI140、AXMI141、AXMI142、AXMI143、AXMI144、AXMI146、AXMI148、AXMI149、AXMI152、AXMI153、AXMI154、AXMI155、AXMI156、AXMI157、AXMI158、AXMI162、AXMI165、AXMI166、AXMI167、AXMI168、AXMI169、AXMI170、AXMI171、AXMI172、AXMI173、AXMI174、AXMI175、AXMI176、AXMI177、AXMI178、AXMI179、AXMI180、AXMI181、AXMI182、AXMI185、AXMI186、AXMI187、AXMI188、AXMI189; 美国专利申请公开号2010/0005543的AXMI079、AXMI080、AXMI081、AXMI082、AXMI091、AXMI092、AXMI096、AXMI097、AXMI098、AXMI099、AXMI100、AXMI101、AXMI102、AXMI103、AXMI104、AXMI107、AXMI108、AXMI109、AXMI110、AXMI111、AXMI112、AXMI114、AXMI116、AXMI117、AXMI118、AXMI119、AXMI120、AXMI121、AXMI122、AXMI123、AXMI124、AXMI1257、AXMI1268、AXMI127、AXMI129、AXMI164、AXMI151、AXMI161、AXMI183、AXMI132、AXMI138、AXMI137, 具有美国专利号8,319,019的修饰的蛋白水解位点的Cry蛋白如Cry1A和Cry3A; 美国专利申请公开号2011/0064710的来自苏芸金芽孢杆菌菌株VBTS 2528的Cry1Ac、Cry2Aa和Cry1Ca毒素蛋白。Cry蛋白的杀昆虫活性是本领域技术人员所熟知的(回顾参见van Frankenhuyzen, (2009) J. Invert. Path. [无脊椎动物病理学杂志]101:1-16)。使用Cry蛋白作为转基因植物性状是本领域技术人员熟知的, 并且Cry转基因植物(包括但不限于表达以下各项的植物: Cry1Ac、Cry1Ac+Cry2Ab、Cry1Ab、Cry1A.105、Cry1F、Cry1Fa2、Cry1F+Cry1Ac、Cry2Ab、Cry3A、mCry3A、Cry3Bb1、Cry34Ab1、Cry35Ab1、Vip3A、mCry3A、Cry9c和CBI-Bt) 已获得法规性审批(参见, Sanahuja, (2011) Plant Biotech dournal [植物生物技术杂志]9:283-300和CERA (2010) 环境风险评估的转基因作物数据库中心(CERA) (GM Crop Database Center for Environmental Risk Assessment (CERA)), ILSI研究基金会(ILSI Research Foundation), 华盛顿特区, 网址为cera-gme.org/index.php?action=gm_crop_database, 可以使用“www”前缀在万维网上访问该网址)。本领域技术人员熟知的多于一种杀有害生物蛋白也可以在植物如Vip3Ab和Cry1Fa (US 2012/0317682); Cry1BE和Cry1F (US 2012/0311746); Cry1CA和Cry1AB (US 2012/0311745); Cry1F和CryCa (US 2012/0317681); Cry1DA和Cry1BE (US 2012/0331590); Cry1DA和Cry1Fa (US 2012/0331589); Cry1AB和Cry1BE (US 2012/0324606); Cry1Fa和Cry2Aa以及Cry1I和Cry1E (US 2012/0324605); Cry34Ab/35Ab和Cry6Aa (US 20130167269); Cry34Ab/VCry35Ab和Cry3Aa (US20130167268); 以及Cry3A和Cry1Ab或Vip3Aa (US 20130116170) 中表达。杀有害生物蛋白还包括杀昆虫脂肪酶, 这些杀昆虫脂肪酶包括美国专利号7,491,869的脂质酰基水解酶, 以及胆固醇氧化酶, 例如来自链霉菌(*Streptomyces*) (Purcell等人, (1993) Biochem Biophys Res Commun [生物化学与生物物理研究通讯]15:1406-1413)。杀有害生物蛋白还包括美国专利号5,877,012、6,107,2796,137,033、7,244,820、7,615,686、和8,237,020等的VIP(营养期杀昆虫蛋白)毒素。其他VIP蛋白质是本领域技术人员熟知的(参见, lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/vip.html, 其可以使用“www”前缀在万维网上访问)。杀有害生物蛋白还包括毒素复合物(TC)蛋白, 该毒素复合物(TC)蛋白可从生物体如致病杆菌属、发光杆菌属和类

芽孢杆菌属获得(参见,美国专利号7,491,698和8,084,418)。一些TC蛋白具有“独立”杀昆虫活性并且其他TC蛋白增强由相同给定生物体产生的独立毒素的活性。可以通过源自不同属的来源生物体的一种或多种TC蛋白“增效剂”来增强“独立”TC蛋白(例如来自发光杆菌属、致病杆菌属或类芽孢杆菌属)的毒性。有三种主要类型的TC蛋白。如在此所述,A类蛋白(“蛋白A”)是独立的毒素。B类蛋白(“蛋白B”)和C类蛋白(“蛋白C”)提高了A类蛋白的毒性。A类蛋白的实例是TcbA、TcdA、XptA1和XptA2。B类蛋白的实例是TcaC、TcdB、XptB1Xb和XptC1Wi。C类蛋白的实例是TccC、XptC1Xb和XptB1Wi。杀有害生物蛋白还包括蜘蛛、蛇和蝎毒蛋白。蜘蛛肽的实例包括但不限于莱科毒素-1肽及其突变体(美国专利号8,334,366)。

[0020] 在一些实施例中,IPD073多肽包含从本文公开的全长核酸序列推导出的氨基酸序列,以及由于使用替代性下游起始位点、或由于加工产生具有杀昆虫活性的较短蛋白而比全长序列短的氨基酸序列。加工可以在表达该蛋白的生物体内或在摄取蛋白后的有害生物中发生。

[0021] 因此,本文提供了赋予杀有害生物活性的新颖的分离的或重组的核酸序列。还提供了IPD073多肽的氨基酸序列。由这些IPD073多肽基因翻译产生的蛋白质允许细胞控制或杀灭摄取该蛋白质的有害生物。

[0022] 核酸分子及其变体和片段

[0023] 一个方面涉及包含编码IPD073多肽或其生物活性部分的核酸序列的分离或重组的核酸分子,以及足以用作杂交探针以识别编码具有序列同源性区域的蛋白质的核酸分子的多种核酸分子。如在此使用的,术语“核酸分子”是指DNA分子(例如,重组DNA、cDNA、基因组DNA、质粒DNA、线粒体DNA)和RNA分子(例如,mRNA)以及使用核苷酸类似物而产生的DNA或RNA的类似物。该核酸分子可以是单链的或双链的,但优选地是双链的DNA。

[0024] 在此使用的“分离的”核酸分子(或DNA)是指不再处于其天然环境中,例如处于体外的核酸序列(或DNA)。在此使用的“重组”核酸分子(或DNA)是指在重组细菌或植物宿主细胞中的核酸序列(或DNA)。在一些实施例中,“分离的”或“重组的”核酸不含有天然地位于在衍生出该核酸的生物体的基因组DNA中的该核酸侧翼的序列(即,位于该核酸的5'和3'末端的序列)(优选蛋白质编码序列)。出于本披露的目的,“分离的”或“重组的”当用于指核酸分子时不包括分离的染色体。例如,在不同的实施例中,编码IPD073多肽的重组核酸分子可以包含小于约5kb、4kb、3kb、2kb、1kb、0.5kb或0.1kb的核酸序列,该核酸序列在衍生出该核酸的细胞的基因组DNA中天然地位于该核酸分子的侧翼。

[0025] 在一些实施例中,与天然或基因组核酸序列相比,编码IPD073多肽的分离的核酸分子在核酸序列中具有一个或多个变化。在一些实施例中,天然或基因组核酸序列的变化包括但不限于:由于遗传密码的简并性造成的核酸序列的变化;与天然或基因组序列相比,由于氨基酸取代、插入、缺失和/或添加造成的核酸序列的变化;一个或多个内含子的去除;一个或多个上游或下游调节区域的缺失;和与基因组核酸序列相关的5'和/或3'非翻译区域的缺失。在一些实施例中,编码IPD073多肽的核酸分子是非基因组序列。

[0026] 考虑了编码IPD073多肽或相关蛋白质的多种多核苷酸。当有效地连接到合适的启动子、转录终止和/或聚腺苷酸化序列上时,这类多核苷酸可用于在宿主细胞中生产IPD073多肽。这类多核苷酸还可用于分离编码IPD073多肽或相关蛋白的同源或基本上同源的多核苷酸的探针。

[0027] 编码IPD073多肽的多核苷酸

[0028] 编码IPD073多肽或相关的蛋白质的多核苷酸一个来源是含有编码IPD073多肽的多核苷酸的假单胞菌属、肠杆菌属 (*Enterobacter*)、西地西菌属 (*Cedecea*) 或标桩菌属 (*Stigmatella*) 物种。SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:15-291的任一个、SEQ ID NO:569或SEQ ID NO:570的多核苷酸在细菌宿主细胞中可以用于表达IPD073多肽,这些细胞宿主细胞包括但不限于土壤农杆菌属 (*Agrobacterium*)、芽胞杆菌属、埃希氏菌属 (*Escherichia*)、沙门氏菌属 (*Salmonella*)、假单胞菌属和根瘤菌属 (*Rhizobium*) 细菌宿主细胞。这些多核苷酸还可用于分离编码IPD073多肽或相关蛋白的同源或基本上同源的多核苷酸的探针。这样的探针可用于鉴定源自细菌物种的同源或基本上同源的多核苷酸。

[0029] 编码IPD073多肽的多核苷酸也可以从IPD073多肽序列从头合成。该多核苷酸基因的序列可以通过使用遗传密码从IPD073多肽序列中推导出来。计算机程序如“BackTranslate”(GCG™包,阿克莱瑞公司 (Acclerys, Inc.), 加利福尼亚州圣地亚哥市) 可用于将肽序列转换成编码该肽的相应核苷酸序列。用于获得相应的核苷酸序列的IPD073多肽序列的实例包括但不限于IPD073多肽SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:292-568的任一个、和SEQ ID NO:571。此外,可以对本披露的合成的IPD073多核苷酸序列进行设计,使其在植物中表达。美国专利号5,500,365描述了用于合成植物基因以改进由所合成的基因编码的蛋白质的表达水平的方法。该方法涉及对外源转基因的结构基因序列的改性,使该外源转基因更有效地被植物转录、加工、翻译和表达。在植物中表达良好的基因的特征包括消除可能在基因转录物的编码区域中引起不希望的内含子剪接或聚腺苷酸化的序列,同时基本上保留有害生物蛋白的有毒部分的氨基酸序列。美国专利号5,689,052中披露了用于在单子叶植物中获得转基因的增强表达的类似方法。

[0030] 在一些实施例中,编码IPD073多肽的多核苷酸是具有列于SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:15-291中的任一个、SEQ ID NO:569或SEQ ID NO:570的序列的多核苷酸、及其变体、片段和互补序列。在本文中使用“互补序列”来指与给定核酸序列充分互补的核酸序列,使得其可以与该给定核酸序列杂交从而形成稳定的双链体。在本文中使用“多核苷酸序列变体”来指除遗传密码的简并性之外编码相同多肽的核酸序列。

[0031] 在一些实施例中,编码IPD073多肽的多核苷酸是非基因组核酸序列。如在此使用的,“非基因组核酸序列”或“非基因组核酸分子”或“非基因组多核苷酸”是指与天然或基因组核酸序列相比,具有核酸序列的一个或多个变化的核酸分子。在一些实施例中,天然或基因组核酸分子的变化包括但不限于:由于遗传密码的简并性造成的核酸序列的变化;用于在植物中表达的核酸序列的密码子优化;与天然或基因组序列相比,将至少一个氨基酸取代、插入、缺失和/或添加引入的核酸序列的变化;去除与该基因组核酸序列相关的一个或多个内含子;插入一个或多个异源内含子;缺失与该基因组核酸序列相关的一个或多个上游或下游调节区;插入一个或多个异源上游或下游调节区;缺失与该基因组核酸序列相关的5'和/或3'非翻译区;插入异源5'和/或3'非翻译区;和聚腺苷酸化位点的修饰。在一些实施例中,非基因组核酸分子是cDNA。在一些实施例中,非基因组核酸分子是合成的核酸序列。

[0032] 在一些实施例中,编码IPD073多肽的核酸分子是具有如下核苷酸序列的非基因组

多核苷酸,所述核苷酸序列与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:15-291中的任一个、SEQ ID NO:569或SEQ ID NO:570的核酸序列具有至少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%同一性,其中IPD073多肽具有杀昆虫活性。

[0033] 在一些实施例中,所述核酸分子编码包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:292-568中的任一个或SEQ ID NO:571的氨基酸序列的IPD073多肽,相比于在SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:292-568中的任一个、或SEQ ID NO:571的相应位置的天然氨基酸,所述氨基酸序列具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、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或更多个氨基酸取代、缺失和/或增加。

[0034] 还提供了编码如下转录和/或翻译产物的核酸分子,这些转录和/或翻译产物随后被剪接以最终产生功能性IPD073多肽。剪接可以在体外或体内完成,并且可以涉及顺式或反式剪接。用于剪接的底物可以是多核苷酸(例如,RNA转录物)或多肽。多核苷酸的顺式剪接的实例是去除插入到编码序列中的内含子并剪接两个侧翼外显子区域以产生IPD073多肽编码序列。反式剪接的实例是通过将该编码序列分离成两个或更多个片段来对多核苷酸进行加密,这些片段可以单独转录并且然后被剪接以形成全长杀有害生物编码序列。使用可以引入到构建体中的剪接增强子序列可以促进多肽的顺式或反式剪接(美国专利号6,365,377和6,531,316)。因此,在一些实施例中,这些多核苷酸并不直接编码全长IPD073多肽,而是编码IPD073多肽的一个或多个片段。这些多核苷酸可用于通过涉及剪接的机制来表达功能性IPD073多肽,其中剪接可以在多核苷酸(例如内含子/外显子)和/或多肽(例如内含肽/外显肽)的水平上发生。这可以用于,例如,控制杀有害生物活性的表达,因为如果在允许剪接过程以产生功能性产物的环境中表达所有必需的片段,则仅表达功能性杀有害生物多肽。在另一个实例中,将一个或多个插入序列引入多核苷酸中可促进与低同源性多核苷酸的重组;使用针对该插入序列的内含子或内含肽便于去除该间插序列,从而恢复经编码的变体的功能。

[0035] 作为编码IPD073多肽的这些核酸序列的片段的核酸分子也涵盖在实施例中。在本文中“片段”来指编码IPD073多肽的核酸序列的一部分。核酸序列的片段可以编码IPD073多肽的生物活性部分,或者它可以是可以使用下文披露的方法用作杂交探针或PCR引物的片段。作为编码IPD073多肽的核酸序列的片段的核酸分子包含至少约150、180、210、240、270、300、330或360个连续核苷酸或至多存在于编码本文披露的IPD073多肽的全长核酸序列中的核苷酸数目,这取决于预期用途。“连续核苷酸”在此用于指彼此紧邻的核苷酸残基。实施例的核酸序列的片段将编码保留IPD073多肽的生物学活性并因此保留杀昆虫活性的蛋白质片段。“保留杀昆虫活性”在本文中用于指具有全长IPD073Aa多肽(SEQ ID NO:2)的至少约10%、至少约30%、至少约50%、至少约70%、80%、90%、95%或更高的杀昆虫活性的多肽。在一些实施例中,该杀昆虫活性是鳞翅目活性。在一个实施例中,该杀昆虫活性针对鞘翅目物种。在一个实施例中,该杀昆虫活性针对根萤叶甲属物种。

[0036] 在一些实施例中,该杀昆虫活性针对玉米根虫复合物的一种或多种昆虫有害生物:西方玉米根虫,玉米根萤叶甲(*Diabrotica virgifera*);北方玉米根虫(*D.barberi*);南方玉米根虫或斑点黄瓜甲虫(spoued cucumber beetle,*Diabrotica undecimpunctata howardi*);和墨西哥玉米根虫(Mexican corn rootworm,*D.virgifera zea*)。

[0037] 在一些实施例中,编码IPD073多肽、编码蛋白质的生物活性部分的核酸序列的片段将编码至少约15、20、30、50、75、100、125个连续氨基酸或高达这些实施例的全长IPD073多肽中存在的总数量的氨基酸。在一些实施例中,该片段是通过以下各项来自相对于SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:292-568中的任一个、SEQ ID NO:571或其变体的N-末端和/或C-末端的至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34或更多个氨基酸的N-末端和/或C-末端截短:例如通过蛋白水解、起始密码子的插入、编码缺失的氨基酸的密码子的缺失并伴随终止密码子插入,或在编码序列中插入终止密码子。

[0038] 在一些实施例中,IPD073多肽由与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:15-291中的任一个、SEQ ID NO:569或SEQ ID NO:570的核酸序列充分同源的核酸序列编码。在本文中使用“充分同源的”来指使用在此所述的这些比对程序中的一个,使用标准参数,与参比序列相比,具有至少约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同源性的氨基酸或核酸序列。本领域技术人员将认识到,可以通过考虑密码子简并性、氨基酸相似性、阅读框定位等来适当地调整这些值以确定由两个核酸序列编码的蛋白质的相应同源性。在一些实施例中,该序列同源性是针对编码IPD073多肽的多核苷酸的全长序列或针对IPD073多肽的全长序列。

[0039] 在一些实施例中,编码IPD073多肽的核酸选自:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:15-291中的任一个、SEQ ID NO:569或SEQ ID NO:570。

[0040] 在一些实施例中,编码IPD073多肽的核酸与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:292-568中的任一个、或SEQ ID NO:571相比具有至少约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的序列同一性。在一些实施例中,使用ClustalW算法在Vector NTI®程序包(英杰公司(Invitrogen Corporation),卡尔斯巴德,加利福尼亚州)的ALIGNX®模块中在所有默认参数下计算该序列同一性。在一些实施例中,使用ClustalW算法在Vector NTI程序包(英杰公司,卡尔斯巴德,加利福尼亚州)的ALIGNX模块中在所有默认参数下计算该整个全长多肽的序列同一性。

[0041] 为了确定两种氨基酸序列或两种核酸序列的同一性百分比,出于最佳比较目的,将序列进行比对。两个序列之间的百分比同一性是由序列共享的相同位置的数量的函数(即,同一性百分比=相同位置数/位置总数(例如重叠位置)×100)。在一些实施例中,两个序列是相同长度的。在另一个实施例中,比较实在整个参考序列中进行(例如,在整个SEQ ID NO:1中)。可使用类似于上述那些技术的技术,在容许或不容许缺口的情况下确定两个序列之间的百分比同一性。在计算百分比同一性中,典型地计数确切的匹配。

[0042] 用于比较序列的数学算法的另一个非限制性实例是如下文献中所述算法:Needleman和Wunsch,(1970) *J.Mol.Biol.* [分子生物学杂志] 48 (3):443-453,使用GAP版本

10软件来确定序列同一性或相似性,使用以下默认参数:对于核酸序列的同一性%和相似性%,使用GAP权重为50和长度权重为3,以及nwsgapdna.cmpii评分矩阵;对于氨基酸序列的同一性%或相似性%,使用GAP权重为8和长度权重为2,以及BLOSUM62评分程序。也可以使用等效的程序。在此使用的“等效的程序”是指任何序列比较程序,该程序对于任何两个所讨论的序列产生一个比对,当与GAP版本10所产生的对应的比对相比较时,该比对具有相同的核苷酸残基配对以及相同的序列同一性百分比。

[0043] 这些实施例还涵盖编码IPD073多肽变体的核酸分子。编码核酸序列的IPD073多肽的“变体”包括编码本文披露的IPD073多肽但是由于遗传密码的简并性以及如上所述的充分同一的那些序列而存在保守差异的那些序列。可以使用熟知的分子生物学技术(如下文概述的聚合酶链反应(PCR)和杂交技术)来识别天然存在的等位基因变体。变体核酸序列还包括经合成衍生的核酸序列,该核酸序列已经例如通过使用定点诱变而产生,但是仍然编码如下所讨论的所披露的IPD073多肽。

[0044] 本披露提供编码本披露的IPD073多肽中的任何一个的经分离或重组的多核苷酸。本领域普通技术人员将容易理解,由于遗传密码的简并性,存在许多编码本披露的IPD073多肽的核苷酸序列。

[0045] 本领域技术人员将进一步了解,可以通过核酸序列的突变来引入变化,从而导致已编码的IPD073多肽的氨基酸序列的改变,并且保持这些蛋白质的生物活性。因此,变体核酸分子可以通过以下方式产生:将一个或多个核苷酸取代、添加和/或缺失引入到在此所披露的相应的核酸序列中,这样使得将一个或多个氨基酸取代、添加或缺失引入到所编码的蛋白质中。可以通过标准技术(如定点诱变和PCR介导的诱变)引入突变。本披露也涵盖此类变体核酸序列。

[0046] 可替代地,可以通过沿编码序列的全部或部分随机引入突变(例如通过饱和诱变)来制备变体核酸序列,并且可以筛选所得突变体赋予杀有害生物活性以识别保留活性的突变体的能力。在诱变之后,这种经编码的蛋白质可以进行重组地表达,并且这种蛋白质的活性可以使用标准的测定技术来确定。

[0047] 本披露的多核苷酸及其片段任选用作各种重组和递归重组反应的底物,除了例如Ausubel、Berger和Sambrook所述的标准克隆方法之外,即以产生具有所需性质的另外的杀有害生物多肽同源物及其片段。各种这样的反应是已知的,包括由诸位发明人及其同事开发的那些反应。用于生产在此列出的任何核酸的变体的方法(这些方法包括将此多核苷酸与第二(或更多)多核苷酸递归重组,从而形成变体多核苷酸文库)也是本披露的实施例,所产生的文库、包括这些文库的细胞和通过这些方法产生的任何重组多核苷酸也是如此。另外,这样的方法任选地包括基于杀有害生物活性从这些文库中选择变体多核苷酸,正如其中这样的递归重组在体外或体内进行。

[0048] 各种多样性产生方案,包括核酸递归重组方案是可获得的并且在本领域中被充分描述。该程序可以单独和/或组合使用以产生核酸或核酸组的一种或多种变体,以及所编码蛋白质的变体。单独地或整体地,这些程序提供了产生多样化核酸和核酸集合(包括例如核酸文库)的稳健且广泛适用的方式,这些方式可用于,例如,具有新的和/或改进的特征的核酸、蛋白质、途径、细胞和/或生物体的工程化或快速进化。

[0049] 虽然在随后的讨论过程中作出明确的区分和分类,但是应当理解,这些技术通常

不是相互排斥的。实际上,各种方法可以单独使用或组合、平行或串联使用,以便取得不同的序列变体。

[0050] 在此描述的任何多样性产生程序的结果可以是一种或多种核酸的产生,其可以选择或筛选具有或赋予所需性质的核酸或编码具有或者赋予所需性质的蛋白的核酸。通过本领域技术人员可以在此或以其他方式获得的一种或多种方法进行多样化之后,可以针对所需活性或性质,例如,杀有害生物活性或,在所需pH下的这种活性等选择所产生的任何核酸。这可以包括通过本领域任何测定来识别可以例如以自动化或可自动化形式检测的任何活性,参见例如以下的杀昆虫活性筛选的讨论。各种相关(或甚至不相关)的性质可以由执业者酌情串联或平行评估。

[0051] 用于产生改性的核酸序列的各种多样性产生程序的描述,例如编码具有杀有害生物活性的多肽或其片段的那些可以在以下出版物和其中引用的参考文献中找到:Soong, et al., (2000) *Nat Genet* 25 (4):436-439 [Soong等人, (2000), 自然遗传学, 25 (4):436-439]; Stemmer, et al., (1999) *Tumor Targeting* 4:1-4 [Stemmer等人, (1999), 肿瘤靶向, 4:1-4]; Ness, et al., (1999) *Nat Biotechnol* 17:893-896 [Ness等人, (1999), 自然生物技术, 17:893-896]; Chang, et al., (1999) *Nat Biotechnol* 17:793-797 [Chang等人, (1999), 自然生物技术, 17:793-797]; Minshull and Stemmer, (1999) *Curr Opin Chem Biol* 3:284-290 [Minshull和Stemmer, (1999), 生物化学当代观点, 3:284-290]; Christians, et al., (1999) *Nat Biotechnol* 17:259-264 [Christians等人, (1999), 自然生物技术, 17:259-264]; Crameri, et al., (1998) *Nature* 391:288-291 [Crameri等人, (1998), 自然, 391:288-291]; Crameri, et al., (1997) *Nat Biotechnol* 15:436-438 [Crameri等人, (1997), 自然生物技术, 15:436-438]; Zhang, et al., (1997) *PNAS USA* 94:4504-4509 [Zhang等人, (1997), 美国国家科学院院刊, 94:4504-4509]; Patten, et al., (1997) *Curr Opin Biotechnol* 8:724-733 [Patten等人, (1997), 当前生物技术的观点, 8:724-733]; Crameri, et al., (1996) *Nat Med* 2:100-103 [Crameri等人, (1996), 自然医学, 2:100-103]; Crameri, et al., (1996) *Nat Biotechnol* 14:315-319 [Crameri等人, (1996), 自然生物技术, 14:315-319]; Gates, et al., (1996) *J Mol Biol* 255:373-386 [Gates等人, (1996), 分子生物学杂志, 255:373-386]; Stemmer, (1996) "Sexual PCR and Assembly PCR" In: *The Encyclopedia of Molecular Biology*. VCH Publishers, New York. pp.447-457 [Stemmer, (1996), "有性PCR和装配PCR", 在:分子生物学百科全书, VCH出版商, 纽约, 第447-457页中]; Crameri and Stemmer, (1995) *BioTechniques* 18:194-195 [Crameri和Stemmer, (1995), 生物技术, 18:194-195]; Stemmer, et al., (1995) *Gene*, 164:49-53 [Stemmer等人, (1995), 基因, 164:49-53]; Stemmer, (1995) *Science* 270:1510 [Stemmer, (1995), 科学, 270:1510]; Stemmer, (1995) *Bio/Technology* 13:549-553 [Stemmer, (1995), 生物/技术, 13:549-553]; Stemmer, (1994) *Nature* 370:389-391 and Stemmer, (1994) *PNAS USA* 91:10747-10751 [Stemmer, (1994), 自然, 370:389-391和Stemmer, (1994), 美国国家科学院院刊, 91:10747-10751]。

[0052] 产生多样性的突变方法包括例如定点诱变 (Ling等人, (1997) *Anal Biochem* [分析生物化学] 254 (2):157-178; Dale, et al., (1996) *Methods Mol Biol* 57:369-374 [Dale等人, (1996), 分子生物学方法, 57:369-374]; Smith, (1985) *Ann Rev Genet* 19:423-462 [Smith, (1985), 遗传学年评, 19:423-462]; Botstein and Shortle, (1985) *Science* 229:

1193-1201 [Botstein和Shortle, (1985), 科学, 229:1193-1201]; Carter, (1986) Biochem J 237:1-7 and Kunkel, (1987) "The efficiency of oligonucleotide directed mutagenesis" in Nucleic Acids & Molecular Biology (Eckstein and Lilley, eds., Springer Verlag, Berlin) [Carter, (1986), 生物化学杂志, 237:1-7 和 Kunkel, (1987), "寡核苷酸定向诱变的效率", 在: 核酸与分子生物学 (Eckstein 和 Lilley 主编, 施普林格出版公司, 柏林)]; 使用含尿嘧啶的模板的诱变 (Kunkel, (1985) PNAS USA 82:488-492; Kunkel 等人, (1987) Methods Enzymol [酶学方法] 154:367-382 以及 Bass 等人, (1988) Science [科学] 242:240-245); 寡核苷酸定向诱变 (Zoller 和 Smith, (1983) Methods Enzymol [酶学方法] 100:468-500; Zoller 和 Smith, (1987) Methods Enzymol [酶学方法] 154:329-350 (1987); Zoller 和 Smith, (1982) Nucleic Acids Res [核酸研究] 10:6487-6500); 经硫代磷酸改性的 DNA 诱变 (Taylor 等人, (1985) Nucl Acids Res [核酸研究] 13:8749-8764; Taylor 等人, (1985) Nucl Acids Res [核酸研究] 13:8765-8787 (1985); Nakamaye 和 Eckstein, (1986) Nucl Acids Res [核酸研究] 14:9679-9698; Sayers 等人, (1988) Nucl Acids Res [核酸研究] 16:791-802 以及 Sayers 等人, (1988) Nucl Acids Res [核酸研究] 16:803-814); 使用有缺口的双链体 DNA 的诱变 (Kramer 等人, (1984) Nucl Acids Res [核酸研究] 12:9441-9456; Kramer 和 Fritz, (1987) Methods Enzymol [酶学方法] 154:350-367; Kramer 等人, (1988) Nucl Acids Res [核酸研究] 16:7207 以及 Fritz 等人, (1988) Nucl Acids Res [核酸研究] 16:6987-6999)。

[0053] 其他合适的方法包括点错配修复 (Kramer 等人, (1984) Cell [细胞] 38:879-887)、使用有修复缺陷的宿主菌株的诱变 (Carter 等人, (1985) Nucl Acids Res [核酸研究] 13:4431-4443 以及 Carter, (1987) Methods in Enzymol [酶学方法] 154:382-403)、缺失诱变 (Eghtedarzadeh 和 Henikoff, (1986) Nucl Acids Res [核酸研究] 14:5115)、限制性-选择和限制性-纯化 (Wells 等人, (1986) Phil Trans R Soc Lond A [伦敦皇家学会哲学会刊系列 A] 317:415-423)、通过全基因合成的诱变 (Nambiar 等人, (1984) Science [科学] 223:1299-1301; Sakamar 和 Khorana, (1988) Nucl Acids Res [核酸研究] 14:6361-6372; Wells 等人, (1985) Gene [基因] 34:315-323 以及 Grundström 等人, (1985) Nucl Acids Res [核酸研究] 13:3305-3316)、双链断裂修复 (Mandecki, (1986) PNAS USA, 83:7177-7181 以及 Arnold, (1993) Curr Opin Biotech [生物技术当代观点] 4:450-455)。许多上述方法的另外的细节可以在酶学方法第 154 卷中找到, 其还描述了用各种诱变方法故障查找问题的有用对照。

[0054] 关于各种多样性产生方法的另外的细节可以在以下美国专利、PCT 公开物和申请和 EP0 公开物中找到: 美国专利号 5,723,323、美国专利号 5,763,192、美国专利号 5,814,476、美国专利号 5,817,483、美国专利号 5,824,514、美国专利号 5,976,862、美国专利号 5,605,793、美国专利号 5,811,238、美国专利号 5,830,721、美国专利号 5,834,252、美国专利号 5,837,458、WO 1995/22625、WO 1996/33207、WO 1997/20078、WO 1997/35966、WO 1999/41402、WO 1999/41383、WO 1999/41369、WO 1999/41368、EP 752008、EP 0932670、WO 1999/23107、WO 1999/21979、WO 1998/31837、WO 1998/27230、WO 1998/27230、WO 2000/00632、WO 2000/09679、WO 1998/42832、WO 1999/29902、WO 1998/41653、WO 1998/41622、WO 1998/42727、WO 2000/18906、WO 2000/04190、WO 2000/42561、WO 2000/42559、WO 2000/42560、WO 2001/23401 和 PCT/US01/06775。

[0055] 实施例的核苷酸序列也可用于从其他生物体分离相应序列,这些生物体包括但不限于包括假单胞菌属、肠杆菌属、西地西菌属或标桩菌属物种的细菌。以这种方式,可以使用如PCR、杂交等方法来识别这样的序列(基于其与本文所述序列的序列同源性)。实施例涵盖基于与在此阐明的全部序列或其片段的序列同一性选择的序列。这些序列包含作为披露序列的直向同源物的序列。术语“直向同源物”是指衍生自共同祖先基因并且由于物种形成而在不同物种中发现的基因。当其核苷酸序列和/或其编码的蛋白质序列共有如本文其他地方所定义的实质同一性时,在不同物种中发现的基因被认为是直向同源物。直向同源物的功能通常在物种间是高度保守的。

[0056] 在PCR方法中,可以设计寡核苷酸引物用于PCR反应,以从由目的任何生物体提取的cDNA或基因组DNA扩增相应的DNA序列。用于设计PCR引物以及PCR克隆的方法是本领域通常已知的并且披露于Sambrook, et al., (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [Sambrook等人, (1989) 分子克隆:实验室手册] (第2版,冷泉港实验室出版社,普莱恩维尤,纽约州)中,以下为“Sambrook”。还参见,Innis等人编辑, (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, New York) [PCR方案:方法与应用指南(学术出版社,纽约)]; Innis和Gelfand编辑, (1995) *PCR Strategies* (Academic Press, New York) [PCR策略(学术出版社,纽约)]; 以及Innis和Gelfand编辑, (1999) *PCR Methods Manual* (Academic Press, New York) [PCR方法手册(学术出版社,纽约)]。已知的PCR方法包括但不限于:使用成对引物、巢式引物、单特异性引物、简并引物、基因特异性引物、载体特异性引物、部分错配引物等的方法。

[0057] 为了从细菌中鉴定潜在的IPD073多肽,可以使用蛋白质印迹和/或ELISA方法用针对IPD073多肽和/或IPD073多肽产生的抗体筛选细菌细胞裂解物。这种类型的测定可以以高通量方式进行。可以通过各种技术(例如基于抗体的蛋白质纯化和识别)进一步分析阳性样品。产生抗体的方法是本领域公知的,如下文所述。

[0058] 可替代地,基于质谱的蛋白质识别方法可以使用文献中的方案用于识别IPD073多肽的同源物(Scott Patterson, (1998), 10.22, 1-24, *Current Protocol in Molecular Biology* published by John Wiley & Son Inc. [Scott Patterson, (1998), 10.22, 1-24, 由约翰&威利父子公司出版的当前分子生物学方案])。具体来说,使用基于LC-MS/MS的蛋白质识别方法将给定细胞裂解物或所需分子量富集样品(从与IPD073多肽的相关分子量带的SDS-PAGE凝胶切除的)的MS数据与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:292-568中的任一个、SEQ ID NO:571的IPD073多肽及其同源物的序列信息结合。肽序列中的任何匹配表明在样品中具有同源蛋白的可能性。可以使用另外技术(蛋白质纯化和分子生物学)来分离蛋白质并识别同源物的序列。

[0059] 在杂交方法中,全部或部分杀有害生物核酸序列可用于筛选cDNA或基因组文库。用于构建此类cDNA和基因组文库的方法是本领域通常已知的,并且披露于Sambrook和Russell, (2001), 同上。所谓的杂交探针可以是基因组DNA片段、cDNA片段、RNA片段或其他寡核苷酸,并且可以用一个可检测基团(如³²P或任何其他可检测的标志物,如其他放射性同位素、荧光化合物、酶或酶辅因子)进行标记。用于杂交的探针可以通过标记基于在此披露的编码已知的IPD073多肽的核酸序列的合成的寡核苷酸来制备。可以另外使用简并引物,这些简并引物是基于在该核酸序列或所编码的氨基酸序列中的保守性核苷酸或氨基酸

残基而设计的。这种探针典型地包含以下核酸序列的区域,该核酸序列区域在严格条件下与编码本披露的IPD073多肽的核酸序列或其片段或变体的至少约12个、至少约25个、至少约50、75、100、125、150、175或200个连续核酸进行杂交。用于制备用于杂交的探针的方法是本领域通常已知的,并且披露于Sambrook和Russell,(2001),同上,其通过引用结合在此。

[0060] 例如,编码本文披露的IPD073多肽的完整核酸序列或者其一个或多个部分可以用作能够与编码IPD073多肽样序列和信使RNA的相应核酸序列特异性杂交的探针。为了实现在不同的条件下的特异性杂交,这样的探针包括以下序列,这些序列是独特的并且长度优选为至少约10个核苷酸、或长度为至少约20个核苷酸。此类探针可以用于通过PCR对来自所选生物体的相应杀有害生物序列进行扩增。可以使用这种技术从所希望的生物体中分离另外的编码序列,或作为用于确定生物体中存在编码序列的诊断试验。杂交技术包括铺板的DNA文库的杂交筛选(斑块或群落;参见,例如,Sambrook,et al.,(1989) *Molecular Cloning:A Laboratory Manual* [Sambrook等人,(1989),分子克隆:实验室手册](第2版,冷泉港实验室出版社,冷泉港,纽约州)。

[0061] 这种序列的杂交可以在严格条件下进行。在此使用的“严格条件”或“严格杂交条件”是指探针与其靶序列杂交的程度将比它与其他序列杂交的程度可检测地更高(例如,比背景高至少2倍)的条件。严格条件是序列依赖性的,并且在不同情况下将有所不同。通过控制杂交和/或洗涤条件的严格性,可以识别与该探针100%互补的靶序列(同源探测)。可替代地,也能够调节严格条件以允许序列中的某些错配,以便检测到更低程度的相似性(异源探测)。通常,探针的长度为小于约1000个核苷酸,优选地长度小于500个核苷酸。

[0062] 蛋白质及其变体和片段

[0063] IPD073多肽也涵盖在本披露中。本文中可互换地使用的“IPD073多肽”或“IPD073蛋白”是指具有杀昆虫活性(包括但不限于对鳞翅目和/或鞘翅目的一种或多种昆虫有害生物的杀昆虫活性)的多肽,并且与SEQ ID NO:2的蛋白质充分同源。多种IPD073多肽是预期的。IPD073多肽的来源或相关的蛋白质是细菌物种,这些细菌物种选自但是不限于:假单胞菌属、肠杆菌属、西地西菌属和标桩菌属物种。

[0064] 本文所使用的“充分同源”是指,使用标准参数、使用本文所述的比对程序之一,与参比序列相比,具有至少约40%、45%、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%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,序列同源性针对IPD073多肽的全长序列。在一些实施例中,相比于SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:292-568中的任一个或SEQ ID NO:571,该IPD073多肽具有至少约40%、45%、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%、99%或更高的序列同一性。本领域技术人员将认识到,考虑到氨基酸相似性等,可以适当地调整这些值以确定蛋白质的相应同源性。在一些实施例中,使用ClustalW算法在VectorNTI®程序包(英杰公司(Invitrogen Corporation),卡尔斯巴德,加利福尼亚州)的ALIGNX®模块中在所有默

认参数下计算该序列同一性。在一些实施例中，序列同一性贯穿于多肽的整个长度，使用具有所有默认参数的Vector NTI®程序组（加利福尼亚州卡尔斯巴德的英杰公司（Invitrogen Corporation））的ALIGNX®模块中的ClustalW算法进行计算。

[0065] 如在此使用的，术语“蛋白质”、“肽分子”、或“多肽”包括包含五个或更多个氨基酸的任何分子。本领域熟知蛋白质、肽或多肽分子可以进行改性，该改性包括翻译后改性，如但不限于二硫键形成、糖基化、磷酸化或寡聚化。因此，如在此使用的，术语“蛋白质”、“肽分子”或“多肽”包括通过任何生物或非生物过程改性的任何蛋白质。术语“氨基酸”是指所有天然存在的L-氨基酸。

[0066] 在此使用的“重组蛋白”是指不再在其自然环境中的蛋白质，例如在体外或重组细菌或植物宿主细胞中。基本上不含细胞材料的IPD073多肽包括具有小于约30%、20%、10%或5%（以干重计）的非杀有害生物蛋白的蛋白质的制剂（在此也称为“污染蛋白”）。

[0067] “片段”或“生物活性部分”包括包含与IPD073多肽充分同一并且显示杀昆虫活性的氨基酸序列的多肽片段。IPD073多肽的“片段”或“生物活性部分”包括如下片段，这些片段包含与列于SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:292-568中的任一个、或SEQ ID NO:571中的氨基酸序列充分同一的氨基酸序列，其中IPD073多肽具有杀昆虫活性。这样的生物活性部分可以通过重组技术制备并评价杀昆虫活性。在一些实施例中，该IPD073多肽片段是通过以下各项来自相对于SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:292-568中的任一个、或SEQ ID NO:571的N-末端和/或C-末端的至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34或更多个氨基酸的N-末端和/或C-末端截短，例如通过蛋白质水解、通过初始密码子的插入、通过编码缺失的氨基酸的密码子的缺失并伴随初始密码子的插入、和/或终止密码子的插入。

[0068] 本文所使用的“变体”是指具有如下氨基酸序列的蛋白质或多肽，该氨基酸序列与亲本氨基酸序列具有至少约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性。

[0069] IPD073多肽

[0070] 在一些实施例中，IPD073多肽包含与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:292-568中的任一个或SEQ ID NO:571的氨基酸序列具有至少40%、45%、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%同一性的氨基酸序列，其中该IPD073多肽具有杀昆虫活性。

[0071] 在一些实施例中，IPD073多肽包含与贯穿SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:292-568中的任一个或SEQ ID NO:571的氨基酸序列的整体长度具有大于80%，至少81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列，其中该IPD073多肽具有杀昆虫活性。

[0072] 在一些实施例中，IPD073多肽包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:292-568中的任一个、和SEQ ID NO:571的氨基酸序列，相比于SEQ ID NO:2、SEQ ID

NO:4、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:292-568中的任一个或SEQ ID NO:571的相应位置的天然氨基酸,该氨基酸序列具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、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或更多个氨基酸取代、缺失和/或增加,其中该IPD073多肽具有杀昆虫活性。

[0073] 在一些实施例中,序列同一性贯穿于多肽的整个长度,使用具有所有默认参数的Vector NTI®程序组(加利福尼亚州卡尔斯巴德的英杰公司(Invitrogen Corporation))的ALIGNX®模块中的ClustalW算法进行计算。

[0074] 在一些实施例中,序列同一性贯穿于多肽的整个长度,使用具有所有默认参数的BLAST(基本局部比对20搜索工具(Basic Local Alignment 20Search Tool);Altschul等人,(1993)J.Mol.Biol.[分子细胞生物学]215:403-410)进行计算。

[0075] 在一些实施例中,IPD073多肽包含如下氨基酸序列,相比于SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:292-568中的任一个或SEQ ID NO:571的相应位置的天然氨基酸,该氨基酸序列具有任意组合的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37或38个氨基酸取代、缺失和/或增加,其中该IPD073多肽具有杀昆虫活性。

[0076] 在一些实施例中,IPD073多肽包含如下氨基酸序列,相比于SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:292-568中的任一个或SEQ ID NO:571的相应位置的天然氨基酸,该氨基酸序列具有任意组合的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18或19个氨基酸取代、增加和/或增加,其中该IPD073多肽具有杀昆虫活性。

[0077] 在一些实施例中,该IPD073多肽包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:292-568中的任一个或SEQ ID NO:571的氨基酸序列,其中该IPD073多肽具有杀昆虫活性。

[0078] 对于杀昆虫蛋白家族的系统发育的、序列基序、和结构分析

[0079] 可以使用序列和结构分析方法,该方法由四个部分组成:系统发育树构建、蛋白质序列基序发现、二级结构预测、和蛋白质序列与二级结构的比对。关于每个部分的详细描述如下:

[0080] 1) 系统发育树构建

[0081] 可以使用软件MEGA5进行系统发育分析。将蛋白质序列经受ClustalW版本2分析(Larkin M.A等人(2007)Bioinformatics[生物信息学]23(21):2947-2948),用于多重序列比对。然后通过基于JTT矩阵的模型的最大似然量法推断进化历史。获得具有最高对数似然值的树,以Newick格式导出,并进一步处理,以与出现在树中的相同顺序提取序列ID。可以为每个杀昆虫蛋白家族手工识别代表亚科的几个进化枝。

[0082] 2) 蛋白质序列基序发现

[0083] 根据先前构建的系统发育树对蛋白质序列进行重新排序,并送入MOTIF分析工具MEME(多重EM用于MOTIF启发)(Bailey T.L.和Elkan C.,Proceedings of the Second International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology[第二届国际分子生物学智能系统会议论文集],第28-36页,AAAI出版社,门洛帕克,加利福尼亚,1994)用于鉴定关键序列基序。MEME设置如下:最小位点数2,最小基序宽度5,和最大基序数

30.通过视觉观察确定了每个亚家族独有的序列基序。贯穿整个基因家族的MOTIF分布在HTML网页中可以是可视化的。相对于每个MOTIF的E-值的排名对MOTIF进行编号。

[0084] 3) 二级结构预测

[0085] 可以将PSIPRED (顶级二级结构预测方法) (Jones DT. (1999) J.Mol.Biol.[分子细胞生物学]292:195-202) 安装在本地的Linux服务器中,并用于蛋白质二级结构预测。该工具使用基于PSI-BLAST输出的两个前馈神经网络提供准确的结构预测。通过去除Uniref100中的低复杂度、跨膜和卷曲的螺旋区域来创建PSI-BLAST数据库。PSIPRED结果包含二级结构(α 螺旋:H, β 链:E,以及线圈:C)和给定蛋白质序列中每个氨基酸的相应置信度得分。

[0086] 4) 蛋白质序列与二级结构的比对

[0087] 可以开发定制的脚本,以根据来自步骤1的所有蛋白质的多重蛋白质序列比对来产生间隙二级结构比对。所有经比对的蛋白质序列和结构都被连接成单个FASTA文件,并然后导入到MEGA中用于可视化和鉴定保守结构。

[0088] 在一些实施例中,IPD073多肽具有在约35kD与约50kD之间的、以及在约40kD与约45kD之间的、以及在约42kD与约44kD之间的计算的分子量。

[0089] 在一些实施例中,IPD073多肽具有改性的物理性质。如在此使用的,术语“物理性质”是指适于描述蛋白质的物理化学特征的任何参数。如在此使用的,“目的物理性质”和“目的性质”可互换使用,以指正在研究和/或改性的蛋白质的物理性质。物理性质的实例包括但不限于:蛋白质表面上的净表面电荷和电荷分布、蛋白质表面上的净疏水性和疏水残基分布、表面电荷密度、表面疏水密度、表面电离基团的总计数、表面张力、蛋白质大小及其在溶液中的分布、熔融温度、热容量、和第二位力系数。物理性质的实例还包括但不限于:溶解度、折叠、稳定性、和消化性。在一些实施例中,IPD073多肽增加了昆虫肠中的蛋白水解片段的消化性。模拟胃液消化的模型是本领域技术人员已知的(Fuchs,R.L.和J.D.Astwood.Food Technology[食品技术]50:83-88,1996;Astwood,J.D.等人,Nature Biotechnology[生物技术]14:1269-1273,1996;Fu TJ等人,J.Agric Food Chem.[农业与食品化学杂志]50:7154-7160,2002)。

[0090] 在一些实施例中,变体包括由于诱变而在氨基酸序列方面不同的多肽。本披露所涵盖的变体蛋白质具有生物学活性,即它们仍然具有天然蛋白质所需的生物学活性(即杀有害生物活性)。在一些实施例中,该变体将具有至少约10%、至少约30%、至少约50%、至少约70%、至少约80%或更高的天然蛋白质的杀昆虫活性。在一些实施例中,变体可以具有比天然蛋白质改进的活性。

[0091] 细菌基因通常在可读框的起始附近具有多个甲硫氨酸起始密码子。经常,在这些起始密码子中的一个或多个处的翻译起始将导致一种功能蛋白质的产生。这些起始密码子可以包括ATG密码子。然而,细菌(如,芽孢杆菌属物种)还将该密码子GTG识别为起始密码子,并且在GTG密码子处起始翻译的蛋白质在第一个氨基酸处包含甲硫氨酸。在少数情况下,细菌系统中的翻译可以在TTG密码子处启动,尽管在此事件中TTG编码甲硫氨酸。此外,常常不首先确定这些密码子中的哪一些在细菌中自然地使用。因此,应当理解,使用这些可替代的甲硫氨酸密码子之一也可能导致杀有害生物蛋白的产生。这些杀有害生物蛋白涵盖于本披露之中,并且可以在本披露的这些方法中使用。应当理解的是当在植物中表达时将有必要将替代起始密码子改变为ATG以用于正确的翻译。

[0092] 在另一方面,IPD073多肽可以表达为具有催化多步翻译后蛋白质剪接的间插序列的前体蛋白。蛋白质剪接涉及从多肽切除间插序列,并伴随连接侧翼序列以产生新的多肽(Chong,et al.,(1996)J.Biol.Chem.,271:22159-22168[Chong等人,(1996),生物化学杂志,271:22159-22168])。这种被称为内含肽的间插序列或蛋白质剪接元件,通过在N末端和C末端剪接点处的以下三个协调反应催化其自身的切除:N末端半胱氨酸或丝氨酸的酰基重排;两个末端之间形成支链酯或硫酯中间体的酯交换反应,和与内含肽C末端天冬酰胺的环化相偶联释放内含肽的肽键切割(Evans,et al.,(2000)J.Biol.Chem.,275:9091-9094[Evans等人,(2000),生物化学杂志,275:9091-9094])。阐明蛋白质剪接的机制导致了許多基于内含肽的应用(Comb,et al.,US Patent Number 5,496,714;Comb,et al.,US Patent Number 5,834,247;Camarero and Muir,(1999)J.Amer.Chem.Soc.121:5597-5598;Chong,et al.,(1997)Gene 192:271-281,Chong,et al.,(1998)Nucleic Acids Res.26:5109-5115;Chong,et al.,(1998)J.Biol.Chem.273:10567-10577;Cotton,et al.,(1999)J.Am.Chem.Soc.121:1100-1101;Evans,et al.,(1999)J.Biol.Chem.274:18359-18363;Evans,et al.,(1999)J.Biol.Chem.274:3923-3926;Evans,et al.,(1998)Protein Sci.7:2256-2264;Evans,etal.,(2000)J.Biol.Chem.275:9091-9094;Iwai and Pluckthun,(1999)FEBS Lett.459:166-172;Mathys,et al.,(1999)Gene 231:1-13;Mills,et al.,(1998)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95:3543-3548;Muir,et al.,(1998)Proc.Natl.Acad.Sci.USA95:6705-6710;Otomo,et al.,(1999)Biochemistry 38:16040-16044;Otomo,et al.,(1999)J.Biolmol.NMR 14:105-114;Scott,et al.,(1999)Proc.Natl.Acad.Sci.USA96:13638-13643;Severinov and Muir,(1998)J.Biol.Chem.273:16205-16209;Shingledecker,et al.,(1998)Gene 207:187-195;Southworth,et al.,(1998)EMBO J.17:918-926;Southworth,et al.,(1999)Biotechniques 27:110-120;Wood,et al.,(1999)Nat.Biotechnol.17:889-892;Wu,et al.,(1998a)Proc.Natl.Acad.Sci.USA95:9226-9231;Wu,et al.,(1998b)Biochim Biophys Acta 1387:422-432;Xu,et al.,(1999)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 96:388-393;Yamazaki,et al.,(1998)J.Am.Chem.Soc.,120:5591-5592[Comb等人,美国专利号5,496,714;Comb等人,美国专利号5,834,247;Camarero和Muir,(1999),美国化学学会学报,121:5597-5598;Chong等人,(1997),基因,192:271-281,Chong等人,(1998),核酸研究,26:5109-5115;Chong等人,(1998),生物化学杂志,273:10567-10577;Cotton等人,(1999),美国化学会志,121:1100-1101;Evans等人,(1999),生物化学杂志,274:18359-18363;Evans等人,(1999),生物化学杂志,274:3923-3926;Evans等人,(1998),蛋白质科学,7:2256-2264;Evans等人,(2000),生物化学杂志,275:9091-9094;Iwai和Pluckthun,(1999),欧洲生化学会联盟通讯,459:166-172;Mathys等人,(1999),基因,231:1-13;Mills等人,(1998),美国国家科学院院刊,95:3543-3548;Muir等人,(1998),美国国家科学院院刊,95:6705-6710;Otomo等人,(1999),生物化学,38:16040-16044;Otomo等人,(1999),生物分子核磁共振杂志,14:105-114;Scott等人,(1999),美国国家科学院院刊,96:13638-13643;Severinov和Muir,(1998),生物化学杂志,273:16205-16209;Shingledecker等人,(1998),基因,207:187-195;Southworth等人,(1998),欧洲分子生物学杂志,17:918-926;Southworth等人,(1999),生物技术,27:110-120;Wood等人,(1999),自然生物技术,17:

889-892;Wu等人,(1998a),美国国家科学院院刊,95:9226-9231;Wu等人,(1998b),生物化学与生物物理学报,1387:422-432;Xu等人,(1999),美国国家科学院院刊,96:388-393;Yamazaki等人,(1998),美国化学会志,120:5591-5592)。针对在植物转基因中应用内含肽,参见,Yang,et al.,(Transgene Res 15:583-593(2006)) and Evans,et al.,(Annu.Rev.Plant Biol.56:375-392(2005)) [Yang等人,(转基因研究,15:583-593(2006)) 和Evans等人,(植物生物学年评,56:375-392(2005))]。

[0093] 在另一方面,IPD073多肽可以由两个单独的基因编码,其中前体蛋白的内含肽来自两个称为分裂内含肽的基因,并且前体的两部分通过肽键形成而连接起来。该肽键的形成通过内含肽介导的反式剪接实现。为此目的,包含两个单独基因的第一和第二表达盒进一步编码能够介导蛋白质反式剪接的内含肽。通过反式剪接,由第一和第二片段编码的蛋白质和多肽可以通过肽键形成连接。反式剪接内含肽可以选自包括真核生物、古细菌和真细菌在内的不同生物体的核仁和细胞器基因组。可以使用的内含肽列在neb.com/neb/inteins.html上,其可以使用“www”前缀在万维网上访问。编码内含肽的核苷酸序列可以分裂成5'和3'部分,该5'和3'部分分别编码内含肽的5'和3'部分。可能使内含肽剪接不需要的序列部分(例如归巢内切核酸酶结构域)缺失。将内蛋白编码序列分裂,使得5'和3'部分能够进行反式剪接。为了选择内含肽编码序列的合适的分裂位点,可以遵循由Southworth, et al.,(1998)EMBO J.17:918-926 [Southworth等人,(1998),欧洲分子生物学杂志,17:918-926]公开的注意事项。在构建第一和第二表达盒中,5'内含肽编码序列连接到编码IPD073多肽的N末端部分的第一片段的3'末端,并且3'内含肽编码序列连接到编码IPD073多肽的C末端部分的第二片段的5'末端。

[0094] 通常,可以使用任何分裂内含肽来设计反式剪接配偶体,包括任何天然存在或人工分裂的分裂内含肽。已知若干种天然存在的分裂内含肽,例如:集胞藻属物种PCC6803的DnaE基因的分裂内含肽(参见,Wu,et al.,(1998)Proc Natl Acad Sci USA.95(16):9226-31 and Evans,et al.,(2000)J Biol Chem.275(13):9091-4 [Wu等人,(1998),美国国家科学院院刊,95(16):9226-31和Evans等人,(2000),生物化学杂志,275(13):9091-4]) 和来自点状念珠藻的DnaE基因的分裂内含肽(参见,Iwai,et al.,(2006)FEBS Lett.580(7):1853-8 [Iwai等人,(2006),欧洲生化学会联盟通讯,580(7):1853-8])。非分裂内含肽在实验室中人为分裂以产生新的分裂内含肽,例如:人工分裂Ssp DnaB内含肽(参见,Wu,et al.,(1998)Biochim Biophys Acta.1387:422-32 [Wu等人,(1998),生物化学与生物物理学报,1387:422-32]) 和分裂Sce VMA内含肽(参见,Brenzel,et al.,(2006)Biochemistry.45(6):1571-8 [Brenzel等人,(2006),生物化学,45(6):1571-8]) 和人工分裂的真菌微型内含肽(参见,Elleuche,et al.,(2007)Biochem Biophys Res Commun.355(3):830-4 [Elleuche等人,(2007),生物化学与生物物理学研究通讯,355(3):830-4])。还有把已知的内含肽编入目录的内含肽数据库(参见,例如,可以在bioinformatics.weizmann.ac.il/~pietro/inteins/Inteinstable.html处获得的在线数据库,其可以使用“www”前缀在万维网上访问)。

[0095] 天然存在的非分裂内含肽可能具有内切核酸酶活性或其他酶活性,这些活性通常可以在设计人工分裂的分裂内含肽时被去除。这样的迷你内含肽或最小化的分裂内含肽是本领域熟知的,并且通常小于200个氨基酸残基长(参见,Wu,et al.,(1998)Biochim

Biophys Acta.1387:422-32[Wu等人,(1998),生物化学与生物物理学报,1387:422-32])。合适的分裂内含肽可以向其结构添加使其他纯化可行的多肽元件,条件是这些元件不会抑制分裂内含肽的剪接,或以允许它们在拼接之前被去除的方式添加。已经报道了使用包含以下各项的蛋白质的蛋白质剪接:细菌内含肽样(BIL)结构域(参见,Amitai,et al.,(2003)Mol Microbiol.47:61-73[Amitai,等人,(2003),分子微生物学,47:61-73])和刺猬(Hog)自动加工结构域(当称为Hog/内含肽超家族或HINT家族时,后者与内含肽组合;参见,Dassa,et al.,(2004)J Biol Chem.279:32001-7[Dassa等人,(2004),生物化学杂志,279:32001-7]))以及结构域如还可用于制备人工分裂的内含肽的这些。特别地,可以通过分子生物学方法来改性这些家族的非剪接成员,以引入或恢复在这些相关物种中的剪接活性。最近的研究表明,当允许N末端分裂内含肽组分与自然界中未发现的C末端裂解内含肽组分反应作为其“配偶体”时,可以观察到剪接;例如,已经观察到使用与“自然”剪接配偶体具有少至30%至50%同源性的配偶体进行剪接(参见,Dassa,et al.,(2007)Biochemistry.46(1):322-30[Dassa等人,(2007),生物化学,46(1):322-30])。不同分裂内含肽的其他这种混合物已被证明是与另一个不反应的混合物(参见,Brenzel,et al.,(2006)Biochemistry.45(6):1571-8[Brenzel等人,(2006),生物化学,45(6):1571-8])。然而,使用常规方法并且酶有运用创造性技能是情况下确定特定的一对多肽是否能够彼此结合以提供功能性内含肽,在相关领域的技术人员的能力范围内。

[0096] 另一方面,IPD073多肽是环状排列的变体。在某些实施例中,IPD073多肽是SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:292-568中的任一个或SEQ ID NO:571的多肽的环状排列的变体。

[0097] 重组DNA方法的发展使得有可能研究序列转座对蛋白质折叠、结构和功能的影响。创建新序列中使用的方法类似于通过其氨基酸序列的线性改组对天然存在的蛋白质对进行关联的方法(Cunningham等人,(1979)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.[美国国家科学院院刊]76:3218-3222;Teather和Erflle,(1990)J.Bacteriol.[细菌学杂志]172:3837-3841;Schimming等人,(1992)Eur.J.Biochem.[欧洲生物化学杂志]204:13-19;Yamiuchi和Minamikawa,(1991)FEBS Lett.[欧洲生化学会联合会快报]260:127-130;MacGregor等人,(1996)FEBS Lett.[欧洲生化学会联合会快报]378:263-266)。Goldenberg和Creighton描述了这种类型的重排对蛋白质的第一次体外应用(J.Mol.Biol.165:407-413,1983[分子生物学杂志,165:407-413,1983])。在创建环形排列的变体中,在原始序列的内部位点(断点)处选择新的N末端,该新序列从断点与原始序列具有氨基酸相同的次序,直到其达到原始C末端或其附近的氨基酸。在这一点上,新序列直接或通过序列(接头)的另外部分连接到原始N末端或其附近的氨基酸,并且新序列以原始序列相同的序列继续,直到其达到原始序列的断点位点的N末端的氨基酸处于或附近的点,该残基形成链的新C末端。接头的氨基酸序列的长度可以凭经验或以结构信息的指导或通过使用两种方法的组合来选择。当没有结构信息可用时,可以使用设计和采取必要的确认,而不会破坏杀有害生物多肽的构型的能力(构象灵活;Karplus and Schulz,(1985)Naturwissenschaften 72:212-213[Karplus和Schulz,(1985),自然科学,72:212-213])制备小系列接头用于测试,该设计的长度为了跨越从0至50 Å的范围而变化并且选择该设计的序列以与表面暴露一致(亲水性,Hopp and Woods,(1983)Mol.Immunol.20:483-489;Kyte and Doolittle,(1982)J.Mol.Biol.157:

105-132; solvent exposed surface area, Lee and Richards, (1971) *J. Mol. Biol.* 55: 379-400 [Hopp和Woods, (1983), 分子免疫学, 20:483-489; Kyte和Doolittle, (1982), 分子生物学杂志, 157:105-132; 溶剂暴露表面积, Lee和Richards, (1971), 分子生物学杂志, 55: 379-400])。假设每个残基平均翻译为2.0至3.8 Å, 这意味着要测试的长度在0至30个残基之间, 其中0至15个残基为优选范围。这种经验性系列的实例将是使用重复n次的盒序列如Gly-Gly-Gly-Ser构建接头, 其中n为1、2、3或4。本领域技术人员将认识到, 存在许多长度或组成不同的这样的序列, 其可以用作接头, 其中主要注意事项是它们是既不过长也过短的(cf., Sandhu, (1992) *Critical Rev. Biotech.* 12:437-462 [参见Sandhu, (1992), 生物技术评论, 12:437-462]); 如果它们太长, 熵效应可能会使三维折叠不稳定, 并且也可能使得折叠在动力学上是不切实际的, 并且如果它们太短, 则它们可能由于扭转或空间应变使分子不稳定。蛋白质结构信息分析的技术人员将认识到, 使用定义为c-α碳之间距离的链末端之间的距离可用于定义待使用的序列的长度, 或至少限制在接头的经验选择中必须测试的可能性的数量。他们还将认识到, 在有时多肽链末端的位置在源自X射线衍射或核磁共振光谱数据的结构模型中是不明确的情况下, 并且在当真实时的情况下, 因此, 需要考虑这种情况, 以便正确估计所需接头的长度。从其位置定义明确的那些残基选择两个与链末端顺序接近的残基, 并且使用它们的c-α碳之间的距离来计算它们之间的接头的近似长度。使用计算出的长度作为指导, 然后选择具有一定范围数量的残基(每个残基使用2至3.8 Å计算)的接头。这些接头可以由原始序列组成, 必要时缩短或延长, 并且当延长时, 可以如上所述选择灵活的和亲水性的另外的残基; 或任选地, 原始序列可以用一系列接头取代, 一个实例是以上提及的Gly-Gly-Gly-Ser盒方法; 或任选地, 可以使用具有适当总长度的原始序列和新序列的组合。能够折叠到生物活性状态的杀有害生物多肽的序列可以通过从原始多肽链中开始(氨基末端)和末端(羧基末端)位置的适当选择, 同时使用如上所述的接头序列来制备。氨基和羧基末端使用下面所述的方法从称为断点区域的序列的常见延伸中选出。因此, 通过从同一断点区域内选择氨基和羧基末端来产生新颖的氨基酸序列。在许多情况下, 新末端的选择将使得羧基末端的原始位置紧邻氨基末端的位置。然而, 本领域技术人员将认识到, 区域内任何地方的末端的选择可能起作用, 并且这些将有效地导致新序列的氨基或羧基部分的缺失或添加。蛋白质的主要氨基酸序列决定了折叠至表达其生物功能所必需的三维结构是分子生物学的核心原则。本领域技术人员已知使用单一蛋白晶体的x射线衍射或蛋白质溶液的核磁共振光谱来获得和解释三维结构信息的方法。与断点区域的识别相关的结构信息的实例包括蛋白质二级结构的位置和类型(α和3-10个螺旋, 平行和反向平行β片材, 链逆转(chain reversal)和回转, 以及环; Kabsch和Sander, (1983) *Biopolymers* [生物聚合物] 22:2577-2637); 氨基酸残基的溶剂暴露程度、残基彼此之间相互作用的程度和类型(Chothia, (1984) *Ann. Rev. Biochem.* [生物化学年鉴] 53:537-572)以及沿多肽链的构象的静态和动态分布(Alber和Mathews, (1987) *Methods Enzymol.* [酶学方法] 154:511-533)。在某些情况下, 关于残基的溶剂暴露的其他信息是已知的; 一个例子是必须位于该蛋白质表面的碳水化合物的翻译后附着位点。当实验结构信息不可获得或不可能获得时, 也可以使用方法来分析初级氨基酸序列, 以便预测蛋白质三级和二级结构, 溶剂可及性以及回转和环的存在。当直接结构方法不可行时, 生物化学方法有时也适用于经验性地确定表

面暴露;例如,在有限的蛋白水解之后使用断链位点的识别来推断表面暴露(Gentile和Salvatore,(1993)Eur.J.Biochem.[欧洲生物化学杂志]218:603-621)。因此,使用实验衍生的结构信息或预测方法(例如,Srinivisan and Rose,(1995)Proteins:Struct.,Funct.&Genetics 22:81-99[Srinivisan和Rose,(1995),蛋白质:结构,功能和遗传学,22:81-99]),检查亲本氨基酸序列根据它们是否对维持二级和三级结构是必不可少的对区域进行分类。已知涉及周期性二级结构(α 和3-10个螺旋,平行和反平行 β 折叠)的区域的存在是应该避免的区域。相似地,观察或预测具有低溶剂暴露程度的氨基酸序列的区域更可能是蛋白质的所谓疏水核心的一部分,并且也应避免选择氨基和羧基末端。相比之下,已知或预测为表面回转或循环的那些区域,并且特别是已知生物活性所不需要的那些区域,是用于定位多肽链极端的优选位点。基于上述标准优选的氨基酸序列的连续延伸被称为断点区域。可以基本上遵循Mullins,et al.,(1994)J.Am.Chem.Soc.116:5529-5533[Mullins等人,(1994),美国化学会志,116:5529-5533]中所描述的方法制备编码具有新N末端/C末端的环形排列的IPD073多肽的多核苷酸,该多核苷酸包含将原C末端与N末端分隔开的连接区。聚合酶链反应(PCR)扩增的多个步骤用于重排编码蛋白质的一级氨基酸序列的DNA序列。可以基于Horlick,et al.,(1992)Protein Eng.5:427-431[Horlick等人,(1992),蛋白质工程,5:427-431]中所描述的串联重复方法制备编码具有新N末端/C末端的环形排列的IPD073多肽的多核苷酸,该多核苷酸包含将原C末端与N末端分隔开的连接区。使用串联重复的模板DNA进行新的N末端/C末端基因的聚合酶链反应(PCR)扩增。

[0098] 在另一方面,提供了融合蛋白,该融合蛋白包括杂其氨基酸序列内的包含IPD073多肽的氨基酸序列,该IPD073多肽包括但不限于SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:292-568中的任一个或SEQ ID NO:571的多肽及其活性片段。

[0099] 用于设计和构建融合蛋白(以及编码它们的多核苷酸)的方法是本领域技术人员已知的。编码IPD073多肽的多核苷酸可以融合到信号序列,这些信号序列将指导IPD073多肽定位于原核或真核细胞的特定区室和/或指导来自原核或真核细胞的实施例的IPD073多肽的分泌。例如,在大肠杆菌中,人们可能希望指导蛋白质表达至周质空间。IPD073多肽可以融合以便指导多肽表达至细菌周质空间的信号序列或蛋白质(或其片段)的实例包括但不限于:pe1B信号序列、麦芽糖结合蛋白(MBP)信号序列、MBP、ompA信号序列,周质性大肠杆菌不耐热肠毒素B亚基的信号序列和碱性磷酸酶的信号序列。用于构建将指导蛋白质定位的融合蛋白的若干种载体是可商购的,如可从New England Biolabs获得的pMAL系列的载体(特别是pMAL-p系列)。在具体实施例中,IPD073多肽可以与pe1B果胶酸裂解酶信号序列融合,以增加革兰氏阴性菌中这些多肽的表达和纯化的效率(参见,美国专利号5,576,195和5,846,818)。植物质体转运肽/多肽融合是本领域熟知的(参见,美国专利号7,193,133)。质外体转运肽如稻或大麦 α -淀粉酶分泌信号也是本领域熟知的。质体转运肽通常与待靶向的多肽(例如,融合配偶体)进行N末端融合。在一个实施例中,融合蛋白基本上由待靶向的质体转运肽和IPD073多肽组成。在另一个实施例中,融合蛋白包含待靶向的质体转运肽和多肽。在这样的实施例中,质体转运肽优选位于融合蛋白的N末端。然而,另外的氨基酸残基可以是在质体转运肽的N末端,条件是融合蛋白质至少部分地靶向质体。在具体实施例中,质体转运肽在融合蛋白的N末端一半处,N末端三分之一处或N末端四分之一处。当插入质体时,大部分或全部质体转运肽通常从融合蛋白上切割。由于特定的细胞间条件或所使

用的转运肽/融合配偶体的具体组合,在不同植物发育阶段,切割位置可能在植物物种之间略有变化。在一个实施例中,质体转运肽切割是均相的,使得切割位点在融合蛋白群体中是相同的。在另一个实施例中,质体转运肽不是均匀的,使得融合蛋白群体中切割位点相差1-10个氨基酸。质体转运肽可以以若干种方式之一重组融合到第二种蛋白质。例如,可以将限制性内切核酸酶识别位点引入到其C末端的相应位置的转运肽的核苷酸序列中,并且可以将相同或相容的位点工程化为在其N末端待靶向的蛋白质的核苷酸序列。必须注意设计这些位点,以确保转运肽和第二个蛋白质的编码序列保持“框架”,以允许合成所需的融合蛋白。在一些情况下,当引入新的限制性位点时,优选除去第二种蛋白质的引发剂甲硫氨酸密码子。在两个亲本分子上引入限制性内切核酸酶识别位点,以及它们随后通过重组DNA技术连接可导致在转运肽和第二蛋白质之间添加一个或多个额外的氨基酸。这通常不影响靶向活性,只要转运肽切割位点保持可及,并且通过在其N末端添加这些额外的氨基酸而不改变第二蛋白质的功能。可替代地,本领域技术人员可以使用基因合成(Stemmer, et al., (1995) Gene 164:49-53 [Stemmer等人, (1995), 基因, 164:49-53])或相似的方法在转运肽和第二蛋白质之间产生精确的切割位点(有或没有其引发剂甲硫氨酸)。此外,转运肽融合可以有意识地包括切割位点下游的氨基酸。成熟蛋白质N末端的氨基酸可影响转运肽将蛋白质靶向质体的能力和/或蛋白质进入后的切割效率。这可能取决于待靶向的蛋白质。参见,例如,Comai, et al., (1988) J. Biol. Chem. 263 (29):15104-9 [Comai等人, (1988), 生物化学杂志, 263 (29):15104-9]。

[0100] 在一些实施例中,提供包含IPD073多肽的融合蛋白,以及通过氨基酸接头连接的杀昆虫多肽。在一些实施例中,提供了由选自下组的化学式所示的融合蛋白,该组由以下各项组成:

[0101] R^1-L-R^2 、 R^2-L-R^1 、 R^1-R^2 或 R^2-R^1

[0102] 其中 R^1 是IPD073多肽, R^2 是目的蛋白质。该 R^1 多肽直接或通过接头(L)区段融合至 R^2 多肽。术语“直接”定义在没有肽接头的情况下多肽连接的融合。因此,“L”表示 R^1 和 R^2 在框架中融合的化学结合或多肽区段,最常见的是,L是 R^1 和 R^2 通过酰胺键将 R^1 的羧基末端连接到L的氨基末端并且将L的羧基末端连接到 R^2 的氨基末端的线性肽。“在框内融合”意指 R^1 和 R^2 的阅读框之间没有翻译终止或中断。连接基团(L)通常是长度在1至500个氨基酸之间的多肽。连接两个分子的接头优选设计成(1)允许两个分子彼此独立第折叠并且起作用,(2)不具有发展可能干扰两种蛋白质的功能结构域的有序二级结构的倾向,(3)具有可与功能性蛋白质结构域相互作用的最小的疏水或带电特征,并且(4)提供 R^1 和 R^2 的空间分离,使得 R^1 和 R^2 可以与单个细胞上的相应受体同时相互作用。通常,在柔性蛋白质区域中的表面氨基酸包括Gly、Asn和Ser。期望包含Gly、Asn和Ser的氨基酸序列的几乎任何排列满足上述接头序列的标准。其他中性的氨基酸,如Thr和Ala也可以用于接头序列中。由于在接头序列中添加了独特的限制性位点以便于构建融合体,另外的氨基酸也可以包括在接头中。

[0103] 在一些实施例中,接头包含选自以下组的化学式的序列: $(Gly_3Ser)_n$ 、 $(Gly_4Ser)_n$ 、 $(Gly_5Ser)_n$ 、 $(Gly_nSer)_n$ 或 $(AlaGlySer)_n$,其中n是整数。高度柔性接头的实例是存在于丝状噬菌体(例如,噬菌体M13或fd)的pIII蛋白质内的富含(GlySer)的间隔子(Schaller等人,1975)。该区域在pIII表面蛋白质的两个结构域之间提供长、柔性的间隔子区域。还包括接头,在接头中包括内肽酶识别序列。这样的切割位点对于分离融合物的各个组分以确定

它们在体外是否适当折叠和是否具有活性可能是有价值的。各种内肽酶的实例包括但不限于：纤溶酶、肠激酶、激肽释放酶、尿激酶、组织纤溶酶原激活剂、梭菌蛋白酶、凝乳酶、胶原酶、鲁塞尔氏蝰蛇毒蛋白酶、后脯氨酸切割酶、V8蛋白酶、凝血酶和因子Xa。在一些实施例中，接头包含来自多基因表达载体 (MGEV) 的氨基酸EEKKN (SEQ ID NO:578)，其如美国专利申请披露号US 2007/0277263中所披露的被液泡蛋白酶切割。在其他实施例中，来自重链免疫球蛋白IgG、IgA、IgM、IgD或IgE的铰链区域的肽接头区段在附着的多肽之间提供角度关系。特别有用的是那些半胱氨酸被丝氨酸替换的铰链区域。本披露的接头包括源自鼠IgG γ 2b铰链区域的序列，其中半胱氨酸已经被变为丝氨酸。融合蛋白不受所使用的接头序列的形式、大小或数目的限制，并且接头的唯一要求是功能上不会与融合的各个分子的折叠和功能产生不利的干扰。

[0104] 在另一个方面中，提供了通过连结IPD073基因的两个或多个部分而产生的嵌合IPD073多肽，该IPD073基因最初编码分离的IPD073蛋白以产生嵌合基因。嵌合基因的翻译产生具有衍生自原始多肽中的每个的区域、基序或结构域的单一嵌合IPD073多肽。在某些实施例中，该嵌合蛋白质包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:292-568中的任一个或SEQ ID NO:571的IPD073多肽的任意组合的部分、基序或结构域。

[0105] 应当认识到，可以通过各种方法改变DNA序列，并且这些改变可能导致编码具有与野生型(或天然)杀有害生物蛋白编码的氨基酸序列不同的氨基酸序列的蛋白质的DNA序列。在一些实施例中，IPD073多肽可以按各种方式改变，这些方式包括SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:292-568中的任一个或SEQ ID NO:571中的任一项相比，一个或多个氨基酸的氨基酸取代、缺失、截短和插入，包括高达2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145或更多个氨基酸取代、缺失和/或插入或其组合。

[0106] 在一些实施例中，IPD073多肽变体选自但不限于SEQ ID NO:292-568或SEQ ID NO:571中的任一个。

[0107] 这种操作的方法在本领域中是普遍已知的。例如，可以通过DNA中的突变来制备IPD073多肽的氨基酸序列变体。这还可以通过几种诱变形式之一和/或在定向进化中来完成。在一些方面，在该氨基酸序列中所编码的变化将基本上不影响该蛋白质的功能。这样的变体将具有所希望的杀有害生物活性。然而，应当理解，可以通过在本披露的组合物上使用这些技术改进IPD073多肽赋予杀有害生物活性的能力。

[0108] 例如，可以在一个或多个、非必需氨基酸残基处做出保守性氨基酸取代。“非必需”氨基酸残基是可以从IPD073的野生型序列改变而来的并且不改变生物活性的残基。“保守的氨基酸取代”是其中用具有相似侧链的氨基酸残基替换该氨基酸残基的取代。在本领域中已经限定了具有相似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括：具有碱性侧链的氨基酸(例如，赖氨酸、精氨酸、组氨酸)；具有酸性侧链的氨基酸(例如，天冬氨酸、谷氨酸)；具有极性的、带负电荷的残基及其酰胺的氨基酸(例如，天冬氨酸、天冬酰胺、谷氨酸、谷氨酰胺)；具有不带电极性侧链的氨基酸(例如，甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)；具有小脂肪族、非极性或非极性的残基的氨基酸(例如，丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、脯氨酸、甘氨酸)；具有非极性侧链的氨基酸(例如，丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、

酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)；具有大脂肪族、非极性残基的氨基酸(例如，甲硫氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、半胱氨酸)；具有 β -支链侧链的氨基酸(例如，苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)；具有芳香族侧链的氨基酸(例如，酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)；具有大芳香族侧链的氨基酸(例如，酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸)。

[0109] 氨基酸取代可以在保留功能的非保守性区域中进行。总体上，此类取代并非针对保守的氨基酸残基、或针对在一个保守基序内的氨基酸残基而进行，其中此类残基是蛋白质活性所必要的。保守的并且对于蛋白质活性可能是必需的残基的实例包括例如，在与实施例的序列相相似或相关的毒素的比对中所包含的全部蛋白质之间是相同的残基(例如，在同源蛋白比对中相同残基)。保守的但可能允许保守的氨基酸取代、并且仍保留活性的残基的实例包括例如，在与实施例的序列相相似或相关的毒素的比对中所包含的全部蛋白质之间仅具有保守性取代的残基(例如，在同源蛋白比对中所包含的全部蛋白质之间仅具有保守性取代的残基)。然而，本领域的技术人员应当理解，功能性变体在保守的残基中可以具有少量的保守的或非保守的改变。关于不影响感兴趣的蛋白质的生物活性的适当的氨基酸取代的指导可以发现于Dayhoff等人，(1978)Atlas of Protein Sequence and Structure [蛋白质序列和结构图谱] (国家生物医学研究基金会(Natl.Biomed.Res.Found.)，华盛顿)的模型中，将其通过引用结合在此。

[0110] 在进行这种变化时，可考虑氨基酸的亲水指数。亲水氨基酸指数在赋予蛋白质以交互性生物功能中的重要性在本领域中通常是被理解的(Kyte and Doolittle, (1982) J Mol Biol. 157 (1):105-32 [Kyte和Doolittle, (1982), 分子生物学杂志, 157 (1):105-32])。接受的是该氨基酸的相对亲水特征有助于所得蛋白的次级结构，该次级结构进而定义该蛋白与其他分子(例如酶、基质、受体、DNA、抗体、抗原等等)的相互作用。

[0111] 本领域已知某些氨基酸可以被具有相似亲水指数或评分的其他氨基酸取代，并且仍然产生具有相似生物学活性的蛋白质，即仍然获得生物功能等同的蛋白质。每个氨基酸基于其疏水性和电荷特征被指定亲水指数(Kyte和Doolittle, 同上)。这些是：异亮氨酸(+4.5)；缬氨酸(+4.2)；亮氨酸(+3.8)；苯丙氨酸(+2.8)；半胱氨酸/半胱氨酸(+2.5)；甲硫氨酸(+1.9)；丙氨酸(+1.8)；甘氨酸(-0.4)；苏氨酸(-0.7)；丝氨酸(-0.8)；色氨酸(-0.9)；酪氨酸(-1.3)；脯氨酸(-1.6)；组氨酸(-3.2)；谷氨酸(-3.5)；谷氨酰胺(-3.5)；天冬氨酸(-3.5)；天冬酰胺(-3.5)；赖氨酸(-3.9)和精氨酸(-4.5)。在进行这种变化时，优选亲水性指数在+2以内的氨基酸取代，特别优选在+1以内的氨基酸取代，并且甚至更特别优选+0.5以内的氨基酸取代。

[0112] 在本领域中可以理解，可以基于亲水性有效地进行类似氨基酸的取代。美国专利号4,554,101说明蛋白的最大局部平均亲水性(如由其相邻氨基酸的亲水性支配的)与该蛋白的生物特性相关。

[0113] 如美国专利号4,554,101中所详述的，以下亲水性值已被分配到氨基酸残基：精氨酸(+3.0)；赖氨酸(+3.0)；天冬氨酸(+3.0.+0.1)；谷氨酸(+3.0.+0.1)；丝氨酸(+0.3)；天冬酰胺(+0.2)；谷氨酰胺(+0.2)；甘氨酸(0)；苏氨酸(-0.4)；脯氨酸(-0.5.+0.1)；丙氨酸(-0.5)；组氨酸(-0.5)；半胱氨酸(-1.0)；甲硫氨酸(-1.3)；缬氨酸(-1.5)；亮氨酸(-1.8)；异亮氨酸(-1.8)；酪氨酸(-2.3)；苯丙氨酸(-2.5)；色氨酸(-3.4)。

[0114] 可替代地，可以在氨基或羧基的末端上对多种蛋白质的蛋白质序列进行改变，而

基本上不影响活性。这可以包括由现代分子方法所引入的插入、缺失或改变,这些方法如PCR,包括PCR扩增,这些PCR扩增借助于将氨基酸编码序列包括到在PCR扩增中所使用的寡核苷酸之中而改变或延长了这种蛋白质编码序列。可替代地,所添加的蛋白质序列可以包括完整的蛋白质编码序列,如在本领域内通常用于产生蛋白质融合物的那些序列。此类融合蛋白常常用于(1)增加目的蛋白质的表达;(2)引入结合结构域、酶活性或表位以促进蛋白质纯化、蛋白检测或本领域已知的其他实验用途;(3)将蛋白质的分泌或翻译靶向亚细胞器,如革兰氏阴性菌的周质空间,植物的线粒体或叶绿体或真核细胞的内质网,这些中的后者常常导致蛋白质的糖基化。

[0115] 本披露的变体核苷酸和氨基酸序列还涵盖了由诱变和引起重组的程序(如DNA改组)所衍生的序列。在这样的程序的情况下,可以使用编码区域的一种或多种不同的IPD073多肽来产生具有所需性质的新的IPD073多肽。以此方式,由一群相关的序列多核苷酸产生重组多核苷酸文库,这些多核苷酸包含具有基本序列同一性并且能够在体外或体内同源重组的序列区域。例如,使用这种方法,可以将编码目的结构域的序列基序在杀有害生物基因与其他已知的杀有害生物基因之间进行改组,以获得编码具有改进的目的性质(如增加的杀昆虫活性)的新基因。这种DNA改组的策略在本领域中是已知的。参见例如,Stemmer,(1994)Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]91:10747-10751;Stemmer,(1994)Nature[自然]370:389-391;Cramer等人,(1997)Nature Biotech.[自然生物技术]15:436-438;Moore等人,(1997)J Mol Biol[分子生物学杂志]272:336-347;Zhang等人,(1997)Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]94:4504-4509;Cramer,et al.,(1998)Nature 391:288-291[Cramer等人,(1998),自然,391:288-291];以及美国专利号5,605,793和5,837,458。

[0116] 结构域交换或改组是用于产生改变的IPD073多肽的另一种机制。可以在IPD073多肽之间交换结构域,导致具有改进的杀昆虫活性或靶谱的杂交或嵌合毒素。用于产生重组蛋白并测试其杀有害生物活性的方法是本领域熟知的(参见例如Naimov等人,(2001)Appl.Environ.Microbiol.[应用环境微生物学]67:5328-5330;de Maagd等人,(1996)Appl.Environ.Microbiol.[应用环境微生物学]62:1537-1543;Ge等人,(1991)J.Biol.Chem.[生物化学杂志]266:17954-17958;Schnepf等人,(1990)J.Biol.Chem.[生物化学杂志]265:20923-20930;Rang等人,(1999)Appl.Environ.Microbiol.[应用环境微生物学]65:2918-2925)。

[0117] IPD073同源物的的比对(图1)允许鉴定该家族中的同源物之间高度保守的残基。

[0118] 组合物

[0119] 还涵盖包含本披露的IPD073多肽的组合物。在一些实施例中,该组合物包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:292-568中的任一个、SEQ ID NO:571的IPD073多肽或其变体。在一些实施例中,该组合物包含IPD073融合蛋白。

[0120] 抗体

[0121] 还包括实施例的IPD073多肽的抗体或者IPD073多肽的变体或片段的抗体。本披露的抗体包括保留其结合昆虫肠道中发现的IPD073多肽的能力的多克隆和单克隆抗体及其片段。据信抗体、单克隆抗体或其片段能够与分子结合,前提是该抗体、单克隆抗体或其片段能够与该分子特异性反应,从而将该分子与抗体、单克隆抗体或其片段结合。术语“抗体”

(Ab)或“单克隆抗体”(Mab)意在包括能够结合半抗原的完整分子及其片段或结合区域或结构域(例如,像Fab和F(ab).sub.2片段)。此类片段通常通过蛋白水解切割(例如木瓜蛋白酶或胃蛋白酶)产生。可替代地,可以通过应用重组DNA技术或通过合成化学来产生半抗原结合片段。制备本披露的抗体的方法是本领域公知的。例如,参见Antibodies,A Laboratory Manual,Ed Harlow and David Lane (eds.)Cold Spring Harbor Laboratory,N.Y.(1988) [抗体,实验室手册,Ed Harlow和David Lane(编辑),冷泉港实验室,纽约州,(1988)],以及其中引用的参考文献。阐述免疫学的一般原则的标准参考文献包括:Klein,J.Immunology: The Science of Cell-Noncell Discrimination,John Wiley&Sons,N.Y.(1982) [Klein,J.免疫学:细胞-非细胞鉴别科学,纽约约翰威利父子公司(1982)];Dennett等人,Monoclonal Antibodies,Hybridoma:A New Dimension in Biological Analyses,Plenum Press,N.Y.(1980) [单克隆抗体,杂交瘤:生物分析中的新维度,纽约普莱南出版社(1980)]以及Campbell,“Monoclonal Antibody Technology[单克隆抗体技术]”,Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology,Vol.13[生物化学和分子生物学中的实验室技术],第13卷,Burdon等人(编辑),阿姆斯特丹爱思唯尔出版社(1984)。还参见,美国专利号4,196,265;4,609,893;4,713,325;4,714,681;4,716,111;4,716,117和4,720,459。IPD073多肽抗体或其抗原结合部分可以通过多种技术产生,这些技术包括常规单克隆抗体方法,例如以下文献中所述的标准体细胞杂交技术:Kohler和Milstein,(1975) Nature[自然]256:495。还可以使用产生单克隆抗体的其他技术,如B淋巴细胞的病毒或致癌性转化。用于制备杂交瘤的动物系统是小鼠系统。分离用于融合的免疫的脾细胞的免疫方案和技术是本领域已知的。融合配偶体(例如,小鼠骨髓瘤细胞)和融合方法也是已知的。本披露的抗体和单克隆抗体可以通过利用IPD073多肽作为抗原来制备。

[0122] 提供了用于检测样品中IPD073多肽的存在或检测编码IPD073多肽的核苷酸序列的存在的试剂盒。在一个实施例中,试剂盒提供了用于检测组织样品中IPD073多肽的存在的基于抗体的试剂。在另一个实施例中,试剂盒提供了用于检测编码IPD073多肽的一种或多种多核苷酸的存在经标记的核酸探针。将试剂盒与用于进行检测方法的适当的试剂和对照物,以及试剂盒的使用说明书一起提供。

[0123] 受体鉴别和分离

[0124] 还涵盖了针对实施例的IPD073多肽或其变体或片段的受体。用于鉴定受体的方法是本领域熟知的(参见,Hofmann,et.al.,(1988) Eur.J.Biochem.173:85-91;Gill,et al.,(1995) J.Biol.Chem.27277-27282 [Hofmann等人,(1988),欧洲生物化学杂志,173:85-91;Gill等人,(1995),生物化学杂志,27277-27282)可以使用来自易感昆虫的刷状缘膜囊泡用于鉴定和分离识别IPD073多肽的受体。除了引用文献中列出的放射性标记方法之外,可以将IPD073多肽用荧光染料和其他常见标记如链霉亲和素进行标记。可以根据参考文献中列出的方案制备易感昆虫(如大豆夜蛾和椿象)的刷状缘膜囊泡(BBMV),并在SDS-PAGE凝胶上分离,并在合适的膜上印迹。标记的IPD073多肽可以与BBMV的印迹膜一起孵育,并标记的IPD073多肽可以用标记的报道基因识别。与IPD073多肽相互作用的蛋白质带的鉴定可以通过基于N末端氨基酸气相测序或基于质谱的蛋白质鉴定方法进行检测(Patterson,(1998) 10.22,1-24,Current Protocol in Molecular Biology published by John Wiley&Son Inc [Patterson,(1998),10.22,1-24,由约翰&威利父子公司出版的当前分子生物学方

案])。一旦鉴定出蛋白质,可以从易感昆虫的基因组DNA或cDNA文库中克隆相应的基因,并且可以直接用IPD073多肽测量结合亲和力。通过IPD073多肽的杀昆虫活性的受体功能可以通过RNAi型的基因敲除法完成验证(Rajagopal, et al., (2002) J. Biol. Chem. 277:46849-46851 [Rajagopal等人, (2002), 生物化学杂志, 277:46849-46851])。

[0125] 核苷酸构建体、表达盒和载体

[0126] 在此使用术语“核苷酸构建体”并不旨在将实施例限制为包含DNA的核苷酸构建体。本领域普通技术人员将认识到,核苷酸构建体特别是由核糖核苷酸以及核糖核苷酸和脱氧核糖核苷酸的组合组成的多核苷酸和寡核苷酸也可用于在此披露的方法中。实施例的核苷酸构建体、核酸和核苷酸序列另外涵盖这种构建体、分子和序列的所有互补形式。此外,实施例的核苷酸构建体、核苷酸分子和核苷酸序列涵盖能用于实施例的转化植物方法的所有核苷酸构建体、分子和序列,包括但不限于由脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸及其组合所构成的那些。这种脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸既包括天然存在的分子也包括合成的类似物。实施例的核苷酸构建体、核酸和核苷酸序列还涵盖核苷酸构建体的所有形式,这些形式包括但不限于单链形式、双链形式、发夹、茎环结构等。

[0127] 另一实施例涉及经转化的生物体,如选自以下各项的生物体:植物和昆虫细胞、细菌、酵母、杆状病毒、原生动物、线虫和藻的生物体。转化的生物体包含实施例的DNA分子、包含DNA分子的表达盒或包含表达盒的载体,它可以稳定地并入所转化生物体的基因组。

[0128] 在DNA构建体中提供实施例的序列,用于在目的生物体中表达。该构建体将包括有效地连接至实施例的序列的5'和3'的调节序列。如在此使用的术语“有效地连接”是指启动子和第二序列之间的功能性连接,其中启动子序列启动并介导相应于第二序列的DNA序列的转录。通常,有效地连接意味着所连接的核酸序列是连续的,并且在必要时在相同阅读框中连接两个蛋白质编码区域。该构建体可以另外包含待共转化进生物体的至少一个另外的基因。可替代地,可以在多DNA构建体上提供另外的基因。

[0129] 这种DNA构建体具有多个用于插入IPD073多肽基因序列的限制性位点,该杀昆虫多肽基因序列将位于调节性区域的转录调节之下。该DNA构建体可另外包含可选标记基因。

[0130] 按5'到3'的转录方向,DNA构建体将通常包括:转录和翻译起始区域(即,启动子)、实施例的DNA序列以及在用作宿主的生物体内具有功能的转录和翻译终止区域(即,终止区域)。转录起始区域(即,启动子)对于实施例的宿主生物体和/或序列,可以是天然的、类似的、外源的或异源的。此外,该启动子可以是自然序列或者,可替代地,是合成序列。如在此使用的术语“外源”表示在引入启动子的天然生物体中没有发现启动子。在启动子对于实施例的序列而言是“外源的”或“异源的”的情况下,它是指该启动子对于实施例的有效地连接的序列而言不是天然的或天然存在的启动子。如在此使用的,嵌合基因包含有效地连接至与编码序列异源的转录起始区域的编码序列。当启动子是天然或自然的序列时,有效地连接的序列的表达改造自野生型表达,这导致表型的改变。

[0131] 在一些实施例中,DNA构建体还可以包括转录增强子序列。如在此使用的,术语“增强子”是指可以刺激启动子活性的DNA序列,并且可以是插入以增强启动子的水平或组织特异性的启动子的先天元件或异源元件。各种增强子是本领域已知的,包括例如,在植物中具有基因表达增强特性的内含子(美国专利申请公开号2009/0144863)、泛素内含子(即,玉蜀黍泛素内含子1(参见,例如,NCBI序列S94464))、 ω 增强子或 ω 主要增强子(Gallie, et

al., (1989) *Molecular Biology of RNA* ed. Cech (Liss, New York) 237-256 and Gallie, et al., (1987) *Gene* 60:217-25 [Gallie等人, (1989), RNA的分子生物学, 编辑: Cech (丽丝, 纽约) 237-256和Gallie等人, (1987), 基因, 60:217-25])、CaMV 35S增强子(参见, 例如, Benfey, et al., (1990) *EMBO J.* 9:1685-96 [Benfey等人, (1990), 欧洲分子生物学杂志, 9:1685-96])和也可以使用的美国专利号7,803,992的增强子, 其中每一个通过引用并入。以上转录增强子的列表并不意指是限制性的。任何合适的转录增强子都可用于实施例中。

[0132] 该终止区域可以与该转录起始区域一起是天然的, 可以与目的有效地连接的DNA序列一起是天然的, 可以与该宿主植物一起是天然的, 或者可以衍生自另一种来源(即, 对于该启动子、目的序列、该宿主植物、或其任何组合是外源的或异源的)。

[0133] 方便的终止区可获自根瘤农杆菌 (*A. tumefaciens*) 的Ti质粒, 诸如章鱼碱合酶和胭脂碱合酶终止区。还参见, Guerineau等人, (1991) *Mol. Gen. Genet.* [分子遗传和基因组学] 262:141-144; Proudfoot, (1991) *Cell* [细胞] 64:671-674; Sanfacon等人, (1991) *Genes Dev.* [基因与发展] 5:141-149; Mogen等人, (1990) *Plant Cell* [植物细胞] 2:1261-1272; Munroe等人, (1990) *Gene* [基因], 91:151-158; Ballas等人, (1989) *Nucleic Acids Res.* [核酸研究] 17:7891-7903以及Joshi等人, (1987) *Nucleic Acid Res.* [核酸研究] 15:9627-9639。

[0134] 适当时可以优化核酸以增加在宿主生物体中的表达。因此, 当宿主生物体是植物时, 合成核酸可以使用植物偏好性密码子合成以改进表达。对于宿主偏好性密码子使用的讨论, 参见, 例如, Campbell and Gowri, (1990) *Plant Physiol.* 92:1-11 [Campbell和Gowri, (1990), 植物生理学, 92:1-11]。例如, 虽然在单子叶和双子叶植物物种中均可以表达实施例的核酸序列, 但是可以改性序列, 以解决单子叶或双子叶植物特异的密码子偏好和GC含量偏好, 这是因为这些偏好已经表现出了差异 (Murray et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:477-498 [Murray等人, (1989), 核酸研究, 17:477-498])。因而, 特定氨基酸的玉米偏好性密码子可以源自玉米的已知基因序列。来自玉米植物的28种基因的玉米密码子使用在Murray等人(同上)的表4中列出。本领域中可获得用于合成植物偏好的基因的方法。参见, 例如, 美国专利号5,380,831, 和5,436,391, 以及Murray, et al., (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:477-498, and Liu H et al. *Mol. Bio. Rep.* 37:677-684, 2010 [Murray等人, (1989), 核酸研究, 17:477-498, 和Liu H等人, 分子生物学报告, 37:677-684, 2010], 通过引用结合在此。玉米密码子使用表也可以在kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=4577上找到, 其可以使用www前缀进行访问。大豆密码子使用表可以在kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=3847&aa=1&style=N上找到, 其可以使用www前缀进行访问。

[0135] 在一些实施例中, 编码IPD073多肽的重组核酸分子具有玉米优化的密码子。

[0136] 已知另外的序列修饰增强细胞宿主中的基因表达。这些包括清除序列, 这些序列编码假的聚腺苷化信号、外显子-内含子剪接位点信号、转座子样重复和可能不利于基因表达的其他良好表征的序列。可以将序列的GC含量调整至给定细胞宿主的平均水平, 如参考在该宿主细胞中表达的已知基因而计算的。如在此使用的术语“宿主细胞”是指包含载体并支持表达载体的复制和/或表达的细胞。宿主细胞可以是原核细胞如大肠杆菌, 或真核细胞如酵母、昆虫、两栖类或哺乳动物细胞、或单子叶或双子叶植物细胞。单子叶宿主细胞的实

例是玉米宿主细胞。当可能时,修饰序列以避免出现预测的发夹二级mRNA结构。

[0137] 表达盒可以另外包含5'前导序列。这些前导序列可以起到增强翻译的作用。翻译前导序列是本领域已知的并且包括:小核糖核酸病毒前导序列,例如,EMCV前导序列(脑心肌炎5'非编码区域)(Elroy-Stein,et al.,(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:6126-6130[Elroy-Stein等人,(1989),美国国家科学院院刊,86:6126-6130]);马铃薯Y病毒组前导序列,例如,TEV前导序列(烟草蚀纹病毒)(Gallie,et al.,(1995)Gene 165(2):233-238[Gallie等人,(1995),基因,165(2):233-238]);MDMV前导序列(玉米矮花叶病毒)、人类免疫球蛋白重链结合蛋白(BiP)(Macejak,et al.,(1991)Nature353:90-94[Macejak等人,(1991),自然,353:90-94]);来自苜蓿花叶病毒的外壳蛋白mRNA的非翻译前导序列(AMV RNA 4)(Jobling,et al.,(1987)Nature 325:622-625[Jobling等人,(1987),自然,325:622-625]);烟草花叶病毒前导序列(TMV)(Gallie,et al.,(1989)in Molecular Biology of RNA,ed.Cech(Liss,New York),pp.237-256[Gallie等人,(1989),在:RNA的分子生物学,编辑:Cech(丽丝,纽约),第237-256页]);和玉米褪绿斑驳病毒前导序列(MCMV)(Lommel,et al.,(1991)Virology 81:382-385[Lommel等人,(1991),病毒学,81:382-385])。还参见,Della-Cioppa,et al.,(1987)Plant Physiol.84:965-968[Della-Cioppa等人,(1987),植物生理学,84:965-968]。此类构建体还可以包含“信号序列”或“前导序列”,以促进该肽的共翻译成或翻译后运输至某些细胞内结构,如叶绿体(或其他质体)、内质网或高尔基体。

[0138] 如在此使用的“信号序列”是指已知或怀疑导致跨细胞膜的共翻译或翻译后肽运输。在真核生物中,这典型地涉及分泌到高尔基体内,其中具有某些产生的糖基化。细菌的杀昆虫毒素经常被合成为原毒素,它们是在该靶标有害生物的肠中经蛋白水解激活(Chang,(1987)Methods Enzymol.153:507-516[Chang,(1987),酶学方法,153:507-516])。在一些实施例中,该信号序列位于该天然的序列中,或可以源自实施例的序列。如在此使用的术语“前导序列”是指当翻译时产生足以引发肽链与亚细胞器的共翻译转运的氨基酸序列的任何序列。因此,这包括通过进入内质网内、进入液泡、质体(包括叶绿体、线粒体)等中来对运输和/或糖基化进行靶向的前导序列。靶向叶绿体类囊体腔室的核编码蛋白具有由基质靶向信号肽和腔靶向信号肽组成的特征二分转运肽。基质靶向信息位于转运肽的氨基-近端部分。腔靶向信号肽位于转运肽的羧基近端部分,并且包含用于靶向腔的所有信息。最近对高等植物叶绿体的蛋白质组学的研究已经在许多核编码的腔蛋白质的识别中实现(Kieselbach et al.FEBS LETT 480:271-276,2000;Peltier et al.Plant Cell 12:319-341,2000;Bricker et al.Biochim.Biophys Acta 1503:350-356,2001[Kieselbach等人,欧洲生化学会联盟通讯,480:271-276,2000;Peltier等人,植物细胞,12:319-341,2000;Bricker等人,生物化学与生物物理学报,1503:350-356,2001]),根据本披露可能使用该核编码的腔蛋白质的腔靶向信号肽。Kieselbach et al.,Photosynthesis Research,78:249-264,2003[Kieselbach等人,“光合作用研究”,78:249-264,2003]报道了来自拟南芥属约80种蛋白质以及来自菠菜和豌豆的同源蛋白。特别地,该出版物的表2(其通过引用并入本说明书中)披露了通过其登录号鉴别的来自叶绿体腔的85种蛋白质(还参见美国专利申请公开2009/09044298)。此外,最近公开的稻基因组草拟版本(Goff et al,Science 296:92-100,2002[Goff等人,科学,296:92-100,2002])是可以根据本披露使用的用于腔靶

向信号肽的合适来源。

[0139] 本领域技术人员熟知的合适的叶绿体转运肽 (CTP) 还包含嵌合 CTP, 这些嵌合 CTP 包括但不限于: 来自以下各项的 CTP 的 N 末端结构域、中心结构域或 C 末端结构域: 稻 1-脱氧-D 木酮糖-5-磷酸合酶、稻-超氧化物歧化酶、稻-可溶性淀粉合酶、稻-NADP-依赖性苹果酸酶、稻-磷酸 2-脱氢-3-脱氧庚酸醛缩酶 2、稻-L-抗坏血酸过氧化物酶 5、稻-磷酸葡聚糖水二激酶、玉蜀黍 ssRUBISCO、玉蜀黍- β -葡糖苷酶、玉蜀黍-苹果酸脱氢酶、玉蜀黍硫氧还蛋白 M-型 (美国专利申请公开 2012/0304336)。

[0140] 可以针对在叶绿体中的表达来优化待靶向该叶绿体的 IPD073 多肽基因, 以解决植物核与该细胞器之间密码子使用的差异。以此方式, 目的核酸可使用叶绿体偏好性密码子进行合成。参见, 例如, 美国专利号 5,380,831, 其通过引用结合在此。

[0141] 在制备表达盒时, 可以操作各种 DNA 片段, 以提供处于适当方向以及合适时, 处于适当阅读框中的 DNA 序列。为此, 可使用衔接子 (adapter) 或接头以连接 DNA 片段, 或可以涉及其他操纵以提供方便的限制位点、去除多余的 DNA、去除限制位点等。出于这个目的, 可以涉及体外诱变、引物修复、限制性酶切 (restriction)、退火、再取代 (例如转换和颠换)。

[0142] 许多启动子可用于实施这些实施例。可基于所需结果, 选择启动子。核酸可与组成性、组织偏好性、可诱导的或其他启动子组合用于在宿主生物体中的表达。用于植物宿主细胞中的合适的组成型启动子包括, 例如 Rsyn7 启动子的核心启动子和其他在 WO 1999/43838 和美国专利号 6,072,050 中披露的组成型启动子; 核心 CaMV 35S 启动子 (Odell 等人, (1985) Nature [自然] 313:810-812); 稻肌动蛋白 (McElroy 等人, (1990) Plant Cell [植物细胞] 2:163-171); 泛素 (Christensen 等人, (1989) Plant Mol. Biol. [植物分子生物学] 12:619-632 以及 Christensen 等人, (1992) Plant Mol. Biol. [植物分子生物学] 18:675-689); pEMU (Last 等人, (1991) Theor. Appl. Genet. [理论与应用遗传学] 81:581-588); MAS (Velten 等人, (1984) EMBO J. [欧洲分子生物学学会杂志] 3:2723-2730); ALS 启动子 (美国专利号 5,659,026) 等。其他组成型启动子包括例如以下专利文献中所讨论的那些: 美国专利号 5,608,149; 5,608,144; 5,604,121; 5,569,597; 5,466,785; 5,399,680; 5,268,463; 5,608,142 和 6,177,611。

[0143] 根据期望的结果, 从诱导型启动子表达基因可能是有益的。用于调节植物中实施例的核苷酸序列表达的特别感兴趣的启动子是损伤诱导型启动子。这种损伤诱导型启动子可以对由昆虫取食引起的损害作出反应, 并且包括马铃薯蛋白酶抑制剂 (pin II) 基因 (Ryan, (1990) Ann. Rev. Phytopath. [植物病理学年鉴] 28:425-449; Duan 等人, (1996) Nature Biotechnology [自然生物技术] 14:494-498); wun1 和 wun2, 美国专利号 5,428,148; win1 和 win2 (Stanford 等人, (1989) Mol. Gen. Genet. [分子遗传和基因组学] 215:200-208); 系统素 (McGurl 等人, (1992) Science [科学] 225:1570-1573); WIP1 (Rohmeier 等人, (1993) Plant Mol. Biol. [植物分子生物学] 22:783-792; Eckelkamp 等人, (1993) FEBS Letters [欧洲生物学化学会联盟通讯] 323:73-76); MPI 基因 (Corderok 等人, (1994) Plant J. [植物杂志] 6 (2):141-150) 等, 以上文献通过引用并入本文。

[0144] 此外, 可以在实施例的方法和核苷酸构建体中使用病原体诱导型启动子。这些病原体诱导型启动子包括来自病程相关蛋白 (PR 蛋白) 的那些启动子, 其在被病原体感染后收到诱导; 例如, PR 蛋白、SAR 蛋白、 β -1,3-葡聚糖酶、几丁质酶等。参见, 例如 Redolfi 等人

(1983) *Neth. J. Plant Pathol.* [荷兰植物病理学杂志] 89:245-254; Uknes 等人 (1992) *Plant Cell* [植物细胞] 4:645-656; 以及 Van Loon (1985) *Plant Mol. Virol.* [植物分子病毒学] 4:111-116。还参见, WO 1999/43819, 其通过引用结合在此。

[0145] 目的是在病原体侵染部位处或附近局部表达的启动子。参见例如 Marineau 等人, (1987) *Plant Mol. Biol.* [植物分子生物学] 9:335-342; Matton 等人, (1989) *Molecular Plant-Microbe Interactions* [分子植物-微生物相互作用] 2:325-331; Somsisch 等人, (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* [美国国家科学院院刊] 83:2427-2430; Somsisch 等人, (1988) *Mol. Gen. Genet.* [分子遗传和基因组学] 2:93-98 以及 Yang, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* [美国国家科学院院刊] 93:14972-14977。还参见 Chen 等人, (1996) *Plant J.* [植物杂志] 10:955-966; Zhang 等人, (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* [美国国家科学院院刊] 91:2507-2511; Warner 等人, (1993) *Plant J.* [植物杂志] 3:191-201; Siebertz 等人, (1989) *Plant Cell* [植物细胞] 1:961-968; 美国专利号 5,750,386 (线虫诱导型) 及其中引用的参考文献。特别令人感兴趣的是玉米 PRms 基因的诱导型启动子, 其表达是由病原体串珠镰刀菌 (*Fusarium moniliforme*) 诱导的 (参见例如 Cordero 等人, (1992) *Physiol. Mol. Plant Pathol.* [生理学与分子植物病理学] 41:189-200)。

[0146] 可以使用化学调节型启动子通过应用外源化学调节剂来调节植物中的基因表达。根据目标, 启动子可以是化学诱导型启动子, 其中施用化学品来诱导基因表达, 或化学抑制型启动子, 其中施用化学品来抑制基因表达。化学诱导型启动子是本领域已知的, 并且包括但不限于由苯磺酰胺除草剂安全剂活化的玉米 In2-2 启动子、由用作萌前除草剂的疏水亲电子化合物活化的玉米 GST 启动子、以及由水杨酸活化的烟草 PR-1a 启动子。其他目的化学品调节型启动子包括类固醇应答启动子 (参见, 例如, Schena, et al., (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10421-10425 and McNellis, et al., (1998) *Plant J.* 14(2):247-257 [Schena 等人, (1991), 美国国家科学院院刊, 88:10421-10425 和 McNellis 等人, (1998), 植物杂志, 14(2):247-257] 中的糖皮质激素诱导型启动子) 以及四环素诱导型和四环素抑制型启动子 (参见, 例如, Gatz, et al., (1991) *Mol. Gen. Genet.* 227:229-237 [Gatz 等人, (1991), 分子遗传学和基因组学, 227:229-237], 以及美国专利号 5,814,618 和 5,789,156), 其通过引用结合在此。

[0147] 组织偏好性启动子可以用于靶向特定植物组织内的增强的 IPD073 多肽表达。组织偏好性启动子包括描述于以下文献中的那些: Yamamoto 等人, (1997) *Plant J.* [植物杂志] 12(2):255-265; Kawamata 等人 (1997) *Plant Cell Physiol.* [植物细胞生理学] 38(7):792-803; Hansen 等人 (1997) *Mol. Gen. Genet.* [分子和普通遗传学] 254(3):337-343; Russell 等人, (1997) *Transgenic Res.* [转基因研究] 6(2):157-168; Rinehart 等人, (1996) *Plant Physiol.* [植物生理学] 112(3):1331-1341; Van Camp 等人, (1996) *Plant Physiol.* [植物生理学] 112(2):525-535; Canevascini 等人, (1996) *Plant Physiol.* [植物生理学] 112(2):513-524; Yamamoto 等人, (1994) *Plant Cell Physiol.* [植物细胞生理学] 35(5):773-778; Lam, (1994) *Results Probl. Cell Differ.* [细胞分化的结果和问题] 20:181-96; Orozco 等人, (1993) *Plant Mol Biol.* [植物分子生物学] 23(6):1129-1138; Matsuoka 等人, (1993) *Proc Natl. Acad. Sci. USA* [美国国家科学院院刊] 90(20):9586-9590; 以及 Guevara-Garcia 等人, (1993) *Plant J.* [植物杂志] 4(3):495-505。必要的话, 此类启动子可经改性用于弱表

达。

[0148] 叶偏好性启动子是本领域已知的。参见,例如,Yamamoto等人,(1997) *Plant J.* [植物杂志] 12 (2) :255-265;Kwon等人,(1994) *Plant Physiol.* [植物生理学] 105:357-67; Yamamoto等人,(1994) *Plant Cell Physiol.* [植物细胞生理学] 35 (5) :773-778;Gotor等人,(1993) *Plant J.* [植物杂志] 3:509-18;Orozco等人,(1993) *Plant Mol.Biol.* [植物分子生物学] 23 (6) :1129-1138以及Matsuoka等人,(1993) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* [美国国家科学院院刊] 90 (20) :9586-9590。

[0149] 根偏好性或根特异性的启动子是已知的,并且可以从来自文献中的许多可获得的启动子来选择,或者从不同的相容物种从头分离。参见例如Hire等人,(1992) *Plant Mol.Biol.* [植物分子生物学] 20 (2) :207-218 (大豆根特异性谷氨酰胺合成酶基因);Keller和Baumgartner,(1991) *Plant Cell* [植物细胞] 3 (10) :1051-1061 (法国菜豆的GRP 1.8基因中的根特异性控制元件);Sanger等人,(1990) *Plant Mol.Biol.* [植物分子生物学] 14 (3) :433-443 (根癌土壤杆菌的甘露聚糖合成酶(MAS)基因的根特异性启动子)以及Miao等人,(1991) *Plant Cell* [植物细胞] 3 (1) :11-22 (编码细胞溶质谷氨酰胺合成酶(GS)的全长cDNA克隆,其在大豆的根和根瘤中表达)。还参见,Bogusz,et al.,(1990) *Plant Cell* 2 (7) :633-641 [Bogusz等人,(1990),植物细胞,2 (7) :633-641],其中描述了从来自固氮的非豆科植物榆科山黄麻(*Parasponia andersonii*)以及相关的非固氮的非豆科植物山黄麻(*Trema tomentosa*)的血红蛋白基因分离的两个根特异性启动子。这些基因的启动子被连接至 β -葡萄糖醛酸酶报道基因并且被引入非豆科植物烟草(*Nicotiana tabacum*)以及豆科植物百脉根(*Lotus corniculatus*)两者中,并且在两个实例中根特异性启动子活性被保留。Leach和Aoyagi (1991) 描述了他们对发根土壤杆菌的高表达的roIC和roID根诱导基因的启动子的分析(参见,*Plant Science (Limerick)* 79 (1) :69-76 [植物科学(利默里克) 79 (1) :69-76])。他们得出结论,增强子和组织偏好性DNA决定簇在这些启动子中是解离的。Teeri等人(1989) 使用与lacZ的基因融合以显示编码章鱼碱合酶的农杆菌属T-DNA基因尤其是在根尖的表皮中有活性,并且TR2'基因在完整植物中具有根特异性并且被叶组织中的创伤刺激,这是与杀昆虫的或杀幼虫的基因一起使用的特征的特别所希望的组合(参见,*EMBO J.* 8 (2) :343-350 [欧洲分子生物学杂志,8 (2) :343-350])。与nptII (新霉素磷酸转移酶II) 融合的TR1'基因显示相似的特征。另外的根优先的启动子包括VfENOD-GRP3基因启动子(Kuster,et al.,(1995) *Plant Mol.Biol.* 29 (4) :759-772 [Kuster等人,(1995),植物分子生物学,29 (4) :759-772]);和rolB启动子(Capana,et al.,(1994) *Plant Mol.Biol.* 25 (4) :681-691 [Capana等人,(1994),植物分子生物学,25 (4) :681-691])。还参见,美国专利号5,837,876;5,750,386;5,633,363;5,459,252;5,401,836;5,110,732和5,023,179。在US 20130117883中披露了拟南芥根偏好性调节序列。

[0150] “种子偏好性”启动子包括“种子特异性”启动子(在种子发育期间有活性的那些启动子如种子贮藏蛋白的启动子)以及“种子发芽性”启动子(在种子发芽期间有活性的那些启动子)。参见,Thompson,et al.,(1989) *BioEssays* 10:108 [Thompson等人,(1989),生物测定,10:108],其通过引用结合在此。这样的种子优选的启动子包括但不限于Cim1 (细胞分裂素诱导的信息);cZ19B1 (玉米19kDa玉米醇溶蛋白);和milps (肌醇-1-磷酸合酶) (参见,美国专利号6,225,529,其通过引用结合在此)。 γ -玉蜀黍蛋白和G1b-1是胚乳特异性启动

子。对于双子叶植物,种子特异性启动子包括但不限于,Kunitz型胰蛋白酶抑制剂3(KTi3)(Jofuku和Goldberg,(1989)Plant Cell[植物细胞]1:1079-1093)、菜豆 β -菜豆素、油菜籽蛋白、 β -伴大豆球蛋白、大豆球蛋白1、大豆凝集素、十字花科蛋白等。对于单子叶植物,种子特异性启动子包括但不限于玉米15kDa玉米醇溶蛋白、22kDa玉米醇溶蛋白、27kDa玉米醇溶蛋白、g-玉米醇溶蛋白、蜡质、收缩素1、收缩素2、球蛋白1等。还参见W0 2000/12733,其中披露了来自end1和end2基因的种子偏好性启动子;通过引用并入本文。在双子叶植物中,种子特异性启动子包括但不限于:来自拟南芥属的种皮启动子,pBAN;和来自拟南芥属的早期种子启动子,p26、p63、和p63tr(美国专利号7,294,760和7,847,153)。在特定组织中具有“优选”表达的启动子在该组织中比在至少一种其他植物组织中更大程度地表达。一些组织优先的启动子几乎专门在特定组织中表达。

[0151] 当希望低水平表达时,可使用弱启动子。通常,如在此使用的术语“弱启动子”是指以低水平驱动编码序列的表达的启动子。低水平表达旨在约1/1000转录物至约1/100,000转录物至约1/500,000转录物之间的水平。可替代地,应当认识到,术语“弱启动子”还涵盖仅在少数细胞中驱动表达但不在其他细胞中表达以给出完全低表达水平的启动子。当启动子以不可接受的高水平驱动表达时,可以删除或改性部分启动子序列以降低表达水平。

[0152] 这样的弱组成型启动子包括,例如,Rsyn7启动子的核心启动子(W01999/43838和美国专利号6,072,050),核心35S CaMV启动子等。其他组成型启动子包括,例如以下专利文献中所披露的那些:美国专利号5,608,149;5,608,144;5,604,121;5,569,597;5,466,785;5,399,680;5,268,463;5,608,142和6,177,611,通过引用结合在此。

[0153] 以上启动子的列表并不意指是限制性的。任何合适的启动子都可用于实施例中。

[0154] 通常,表达盒将包括可选标记基因,用于选择转化的细胞。利用可选标记基因来选择经转化的细胞或组织。标志物基因包括编码抗生素抗性的基因,如编码新霉素磷酸转移酶II(NEO)和潮霉素磷酸转移酶(HPT)的基因,以及赋予对除草剂化合物(如草胺磷、溴草腈、咪唑啉酮和2,4-二氯苯氧基乙酸(2,4-D))的抗性的基因。合适的可选标记基因的其他实例包括但不限于编码耐氯霉素的基因(Herrera Estrella等人,(1983)EMBO J.[欧洲分子生物学学会杂志]2:987-992);甲氨蝶呤(Herrera Estrella等人,(1983)Nature[自然]303:209-213和Meijer等人,(1991)Plant Mol.Biol.[植物分子生物学]16:807-820);链霉素(Jones等人,(1987)Mol.Gen.Genet.[分子遗传和基因组学]210:86-91);壮观霉素(Bretagne-Sagnard等人,(1996)Transgenic Res.[转基因研究]5:131-137);博来霉素(Hille等人,(1990)Plant Mol.Biol.[植物分子生物学]7:171-176);磺酰胺类(Guerineau等人,(1990)Plant Mol.Biol.[植物分子生物学]15:127-136);溴草腈(Stalker等人,(1988)Science[科学]242:419-423);草甘膦(Shaw等人,(1986)Science[科学]233:478-481以及美国专利申请序列号10/004,357和10/427,692);草丁膦(DeBlock等人,(1987)EMBO J.[欧洲分子生物学学会杂志]6:2513-2518)。主要参见Yarranton,(1992)Curr.Opin.Biotech.[生物技术新见]3:506-511;Christopherson等人(1992)Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]89:6314-6318;Yao等人(1992)Cell[细胞]71:63-72;Reznikoff(1992)Mol.Microbiol.[分子微生物学]6:2419-2422;Barkley等人(1980)The Operon[操纵子]中,第177-220页;Hu等人(1987)Cell[细胞]48:555-566;Brown等人(1987)Cell[细胞]49:603-612;Figge等人(1988)Cell[细胞]52:713-722;

Deuschle等人(1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美国国家科学院院刊] 86:5400-5404; Fuerst等人(1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美国国家科学院院刊] 86:2549-2553; Deuschle等人(1990) Science [科学] 248:480-483; Gossen(1993) 博士学位论文, 德国海德堡大学; Reines等人(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美国国家科学院院刊] 90:1917-1921; Labow等人(1990) Mol. Cell. Biol. [分子细胞生物学] 10:3343-3356; Zambretti等人(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美国国家科学院院刊] 89:3952-3956; Baim等人(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美国国家科学院院刊] 88:5072-5076; Wyborski等人(1991) Nucleic Acids Res. [核酸研究] 19:4647-4653; Hillenand-Wissman(1989) Topics Mol. Struc. Biol. [热点分子结构生物学] 10:143-162; Degenkolb等人(1991) Antimicrob. Agents Chemother. [抗微生物剂] 35:1591-1595; Kleinschmidt等人(1988) Biochemistry [生物化学] 27:1094-1104; Bonin(1993) 博士学位论文, 德国海德堡大学; Gossen等人(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美国国家科学院院刊] 89:5547-5551; Oliva等人(1992) Antimicrob. Agents Chemother. [抗微生物剂] 36:913-919; Hlavka等人(1985) Handbook of Experimental Pharmacology [实验药理学手册], 第78卷 (Springer-Verlag, Berlin [柏林施普林格出版社]) 和 Gill等人, (1988) Nature [自然] 334:721-724。这些披露内容以引用的方式并入本文。

[0155] 以上可选择标记基因的列表并不意指是限制性的。任何可选标记基因均可用于这些实施例中。

[0156] 植物转化

[0157] 这些实施例的方法涉及将多肽或多核苷酸引入到植物中。如在此使用的“引入”意指将该多核苷酸或多肽呈送给该植物, 以这样的方式使得该序列进入该植物细胞的内部。这些实施例的方法不取决于用于将多核苷酸或多肽引入植物中的具体方法, 只要该多核苷酸或多肽进入该植物的至少一个细胞的内部即可。将多核苷酸或多肽引入植物的方法是本领域已知的, 该方法包括但不限于稳定转化法、瞬时转化法和病毒介导法。

[0158] 如在此使用的“稳定转化”意指经引入植物中的核苷酸构建体合并到该植物的基因组中, 并且能够被其子代遗传。如本文所使用的, “瞬时转化”意指将多核苷酸引入该植物中并且不合并到该植物的基因组中, 或者将多肽引入植物中。如本文所使用的“植物”是指整株植物、植物器官(例如叶、茎、根等)、种子、植物细胞、繁殖体、及其胚胎和子代。植物细胞可以是分化的或未分化的(例如愈伤组织、悬浮培养细胞、原生质体、叶子细胞、根细胞、韧皮部细胞和花粉)。

[0159] 转化方案以及将核苷酸序列引入植物中的方案可以根据要进行转化的植物或植物细胞的类型(即, 单子叶植物或双子叶植物)而异。将核苷酸序列引入到植物细胞中并随后插入到植物基因组中的适合方法包括显微注射(Crossway等人, (1986) Biotechniques [生物技术] 4:320-334)、电穿孔(Riggs等人, (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美国国家科学院院刊] 83:5602-5606)、农杆菌介导的转化(美国专利号5,563,055和5,981,840)、直接基因转移(Paszkowski等人, (1984) EMBO J [欧洲分子生物学学会杂志] 3:2717-2722)以及弹道粒子加速(参见例如, 美国专利号4,945,050; 5,879,918; 5,886,244和5,932,782; Tomes等人(1995), Plant Cell, Tissue, and Organ Culture: Fundamental Methods [植物细胞、组织和器官培养: 基本方法], Gamborg和Phillips编辑 (Springer-Verlag, Berlin [德

国柏林施普林格出版公司]);和McCabe等人,(1988) *Biotechnology* [生物技术]6:923-926);以及Lecl转化法(WO 00/28058)。对于马铃薯转化法,参见Tu等人,(1998) *Plant Molecular Biology* [植物分子生物学]37:829-838和Chong等人,(2000) *Transgenic Research* [转基因研究]9:71-78。可以在以下文献中找到另外的转化方法:Weissinger等人,(1988) *Ann. Rev. Genet.* [遗传学年鉴]22:421-477;Sanford等人,(1987) *Particulate Science and Technology* [粒子科学与技术]5:27-37(洋葱);Christou等人,(1988) *Plant Physiol.* [植物生理学]87:671-674(大豆);McCabe等人,(1988) *Bio/Technology* [生物/技术]6:923-926(大豆);Finer和McMullen,(1991) *In Vitro Cell Dev. Biol.* [体外细胞和发育生物学]27P:175-182(大豆);Singh等人,(1998) *Theor. Appl. Genet.* [理论与应用遗传学]96:319-324(大豆);Datta等人,(1990) *Biotechnology* [生物技术]8:736-740(稻);Klein等人,(1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* [美国国家科学院院刊]85:4305-4309(玉米);Klein等人,(1988) *Biotechnology* [生物技术]6:559-563(玉米);美国专利号5,240,855;5,322,783和5,324,646;Klein等人,(1988) *Plant Physiol.* [植物生理学]91:440-444(玉米);Fromm等人,(1990) *Biotechnology* [生物技术]8:833-839(玉米);Hooykaas-Van Slogteren等人,(1984) *Nature* [自然] (伦敦) 311:763-764;美国专利号5,736,369(谷类);Bytebier等人,(1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* [美国国家科学院院刊]84:5345-5349(百合科);De Wet等人,(1985) *The Experimental Manipulation of Ovule Tissues* [胚珠组织的实验操作],Chapman等人编辑,(纽约朗文出版社),第197-209页(花粉);Kaeppler等人,(1990) *Plant Cell Reports* [植物细胞报告]9:415-418和Kaeppler等人,(1992) *Theor. Appl. Genet.* [理论与应用遗传学]84:560-566(晶体介导的转化);D'Halluin等人,(1992) *Plant Cell* [植物细胞]4:1495-1505(电穿孔法);Li等人,(1993) *Plant Cell Reports* [植物细胞报道]12:250-255以及Christou和Ford,(1995) *Annals of Botany* [植物学年报]75:407-413(稻);Osjoda等人,(1996) *Nature Biotechnology* [自然生物技术]14:745-750(经由根瘤土壤杆菌的玉米);以上所有文献都通过引用并入本文。

[0160] 在特定实施例中,可以使用各种瞬时转化法向植物提供这些实施例的序列。这种瞬时转化法包括但不限于将IPD073多肽或者其变体和片段直接引入植物中或将IPD073多核苷酸转录物引入植物中。此类方法包括例如显微注射或粒子轰击。参见,例如,Crossway等人,(1986) *Mol. Gen. Genet.* [分子和普通遗传学]202:179-185;Nomura等人,(1986) *Plant Sci.* [植物科学]44:53-58;Hepler等人,(1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.* [国家科学院院刊]91:2176-2180和Hush等人,(1994) *The Journal of Cell Science* [细胞科学杂志]107:775-784,以上所有文献都通过引用并入本文。可替代地,可以使用本领域已知的技术将IPD073多肽多核苷酸瞬时转化到植物中。此类技术包括病毒载体系统,和以阻止DNA后续释放的方式使多核苷酸沉淀。因此,可以从微粒结合的DNA进行转录,但其被释放以整合至基因组的频率大大降低了。这种方法包括使用包被有聚乙烯亚胺(PEI;西格玛(Sigma) # P3143)的粒子。

[0161] 用于在植物基因组的特定位置定向插入多核苷酸的方法是本领域已知的。在一个实施例中,利用位点特异性重组系统实现多核苷酸在所期望的基因组位置的插入。参见,例如,WO 1999/25821、WO 1999/25854、WO 1999/25840、WO 1999/25855和WO 1999/25853,其全部通过引用结合在此。简而言之,本实施例的多核苷酸可以包含在侧翼为两个不相同重

组位点的转移盒内。将转移盒引入植物中,该植物已经稳定地将靶位点并入其基因组,该靶位点侧接对应转移盒位点的两个不相同重组位点。提供了适当的重组酶,并且将该转移盒整合至靶位点。由此,感兴趣的多核苷酸被整合在植物基因组中特定的染色体位置。

[0162] 植物转化载体可以由对于实现植物转化所需要的一个或多个DNA载体构成。例如,使用由一个以上连续DNA区段构成的植物转化载体是本领域常见的实践。在本领域内,这些载体经常被称为“二元载体”。二元载体以及具有辅助质粒的载体最通常被用于农杆菌介导的转化,其中对于实现有效转化所需要的DNA区段的大小以及复杂度是相当大的,并且将功能分到分离的DNA分子上是有利的。二元载体典型地包含质粒载体,该质粒载体包含T-DNA转移所需的顺式作用序列(如,左边界和右边界)、被工程化能够在植物细胞中表达的可选择的标志物、以及“目的基因”(被工程化能够在植物细胞中表达的基因,对于该植物细胞,产生转基因植物是所希望的)。在这种质粒载体上还存在着细菌复制所需要的序列。这些顺式作用序列以一种方式进行排列以便允许有效转移到植物细胞中并在其中进行表达。例如,该可选标记基因以及该杀有害生物基因位于该左边界与右边界之间。通常第二质粒载体包含反式作用因子,这些反式作用因子介导从农杆菌属到植物细胞的T-DNA转化。这种质粒经常包含这些毒性功能(Vir基因),这些毒性功能允许由农杆菌属侵染植物细胞,并且通过在边界序列上的切割以及vir-介导的DNA转移来转移DNA,如在本领域中所理解的(Hellens and Mullineaux, (2000) Trends in Plant Science 5:446-451 [Hellens和Mullineaux, (2000), 植物科学趋势, 5:446-451])。若干种类型的农杆菌属菌株(例如, LBA4404、GV3101、EHA101、EHA105等)可以用于植物转化。该第二质粒载体是通过其他方法(如微粒轰击、显微注射、电穿孔、聚乙二醇等)转化这些植物所不必要的。

[0163] 总体上,植物转化方法涉及将异源DNA转移到目标植物细胞中(例如,未成熟的或成熟的胚、悬浮培养物、未分化的愈伤组织、原生质体等),随后应用最大阈值水平的适当选择(取决于可选标记基因)来从一组未转化的细胞物质中回收转化的植物细胞。在将异源外源DNA整合到植物细胞中之后,然后在该培养基中应用最大阈值水平的合适选择以杀灭这些未转化的细胞,并且通过定期转移到新鲜培养基中来分离和增殖从这种选择处理中存活的这些假定转化的细胞。通过连续传代和使用合适的选择进行攻击,识别并增殖了这些用该质粒载体转化的细胞。然后,可以使用分子和生物化学的方法来证实整合到该转基因植物的基因组中的目的异源基因的存在。

[0164] 典型地将外植体转移到新鲜供应的相同培养基中并将其常规培养。随后,在被置于补充有最大阈值水平的选择试剂的再生培养基上之后,这些转化的细胞分化成枝条。然后,将这些枝条转移到选择性生根培养基中用于回收已生根的枝条或小植株。然后,该转基因小植株长成成熟植物并且产生能育的种子(例如, Hiei, et al., (1994) The Plant Journal 6:271-282; Ishida, et al., (1996) Nature Biotechnology 14:745-750 [Hiei等人, (1994), 植物杂志, 6:271-282; Ishida等人, (1996), 自然生物科技, 14:745-750])。典型地将外植体转移到新鲜供应的相同培养基中并将其常规培养。用于生产转基因植物的技术和方法的一般描述发现于以下文献中: Ayres和Park, (1994) Critical Reviews in Plant Science [植物科学评论] 13:219-239以及 Bommineni和Jauhar, (1997) Maydica [美迪卡杂志] 42:107-120。由于已转化的材料含有许多细胞,已转化的和未转化的细胞都存在于任何一块受试的目标愈伤组织或组织或者细胞组中。杀灭未转化的细胞并允许已转化的细胞增

殖的能力产生已转化的植物培养物。通常,去除未转化的细胞的能力是对已转化的植物细胞的快速回收和转基因植物的成功产生的限制。

[0165] 可依据常规方式将已转化的细胞培育成植株。参见,例如,McCormick等人(1986) *Plant Cell Reports* [植物细胞报告] 5:81-84。这些植物然后可以生长,并且用同样转化的菌株或不同的菌株授粉,并且所得杂交体具有识别的所需表型特征的组成型或诱导型表达。可以培养两代或更多代,以确保所需表型特征的表达稳定地保持并遗传,并且然后收获种子以确保已经实现了所需表型特征的表达。

[0166] 可以通过使植物与病毒或者病毒核酸接触而向植物提供实施例的核苷酸构建体。通常,这类方法涉及将目的核苷酸构建体并入到病毒DNA或RNA分子中。应当认识到,实施例的重组蛋白最初可以被合成为病毒多蛋白的一部分,然后该病毒多蛋白的一部分可以通过在体内或体外蛋白水解加工,以产生所希望的IPD073多肽。还认识到,包含实施例的IPD073的至少一部分氨基酸序列的这种病毒多蛋白可具有所需的杀有害生物活性。这类病毒多蛋白和编码它们的核苷酸序列涵盖在这些实施例中。用于为植物提供核苷酸构建体并在这些植物中产生已编码的蛋白质的方法(涉及病毒DNA或RNA分子)是本领域已知的。参见例如美国专利号5,889,191;5,889,190;5,866,785;5,589,367和5,316,931;以上专利通过引用并入本文。

[0167] 用于转化叶绿体的方法是本领域已知的。参见例如,Svab等人,(1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* [美国国家科学院院刊] 87:8526-8530;Svab和Maliga,(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* [美国国家科学院院刊] 90:913-917;Svab和Maliga,(1993) *EMBO J.* [欧洲分子生物学学会杂志] 12:601-606。该方法依赖于粒子枪递送含有可选标记的DNA和通过同源重组将DNA靶向质体基因组。此外,通过组织优选表达核编码的和质体定向的RNA聚合酶,可以通过沉默的质体携带的转基因的反式激活来实现质体转化。这种系统已被报道于以下文献中:McBride等人,(1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* [美国国家科学院院刊] 91:7301-7305。

[0168] 这些实施例进一步涉及实施例的已转化的植物的植物繁殖材料,包括但不限于种子、块茎、球茎、鳞茎、叶以及根和芽的插条。

[0169] 这些实施例可用于转化任何植物物种,包括但不限于单子叶植物和双子叶植物。目的植物的实例包括但不限于玉米(玉蜀黍),芸苔属(例如,甘蓝型油菜、芜菁、芥菜)(特别是可用作种子油来源的那些芸苔属物种),苜蓿(紫花苜蓿(*Medicago sativa*)),稻(*rice*, *Oryza sativa*),黑麦(*rye*, *Secale cereale*),高粱(甜高粱(*Sorghum bicolor*)),高粱(*Sorghum vulgare*)),粟(例如,珍珠粟(御谷(*Pennisetum glaucum*))),黍(粟米(*Panicum miliaceum*)),粟(谷子(*Setaria italica*)),穆子(龙爪稷(*Eleusine coracana*))),向日葵(*sunflower*, *Helianthus annuus*),红花(*safflower*, *Carthamus tinctorius*),小麦(*wheat*, *Triticum aestivum*),大豆(*soybean*, *Glycine max*),烟草(*tobacco*, *Nicotiana tabacum*),马铃薯(*potato*, *Solanum tuberosum*),花生(*peanut*, *Arachis hypogaea*),棉花(海岛棉(*Gossypium barbadense*)),陆地棉(*Gossypium hirsutum*)),甘薯(番薯(*Ipomoea batatas*)),木薯(*cassava*, *Manihot esculenta*),咖啡(咖啡属(*Coffea* spp.)),椰子(*coconut*, *Cocos nucifera*),菠萝(*pineapple*, *Ananas comosus*),柑橘树(柑橘属(*Citrus* spp.)),可可(*cocoa*, *Theobroma cacao*),茶树(*tea*, *Camellia sinensis*),香蕉(芭蕉属

(*Musa* spp.)), 鳄梨 (avocado, *Persea americana*), 无花果 (fig 或 (*Ficus casica*)), 番石榴 (guava, *Psidium guajava*), 芒果 (mango, *Mangifera indica*), 橄榄 (olive, *Olea europaea*), 木瓜 (番木瓜 (*Carica papaya*)), 腰果 (cashew, *Anacardium occidentale*), 澳洲坚果 (macadamia, *Macadamia integrifolia*), 巴旦杏 (almond, *Prunus amygdalus*), 甜菜 (sugar beets, *Beta vulgaris*), 甘蔗 (甘蔗属 (*Saccharum* spp.)), 燕麦, 大麦, 蔬菜, 观赏植物和针叶树。

[0170] 蔬菜包括番茄 (tomatoes, *Lycopersicon esculentum*)、莴苣 (例如, 莴苣 (*Lactuca sativa*))、青豆 (菜豆 (*Phaseolus vulgaris*))、利马豆 (lima bean, *Phaseolus limensis*)、豌豆 (香豌豆属 (*Lathyrus* spp.)) 和考瓜属的成员诸如黄瓜 (cucumber, *C. sativus*)、香瓜 (cantaloupe, *C. cantalupensis*) 和甜瓜 (musk melon, *C. melo*)。观赏植物包括杜鹃 (杜鹃花属 (*Rhododendron* spp.))、绣球花 (hydrangea, *Macrophylla hydrangea*)、木槿 (hibiscus, *Hibiscus rosasanensis*)、玫瑰 (蔷薇属 (*Rosa* spp.))、郁金香 (郁金香属 (*Tulipa* spp.))、水仙 (水仙属 (*Narcissus* spp.))、矮牵牛 (petunias, *Petunia hybrida*)、康乃馨 (carnation, *Dianthus caryophyllus*)、一品红 (poinsettia, *Euphorbia pulcherrima*) 和菊花。可以用于实践实施例的针叶树包括 (例如) 松树诸如火炬松 (loblolly pine, *Pinus taeda*)、湿地松 (slash pine, *Pinus elliotii*)、西黄松 (ponderosa pine, *Pinus ponderosa*)、黑松 (lodgepole pine, *Pinus contorta*) 和辐射松 (Monterey pine, *Pinus radiata*)；花旗松 (Douglas-fir, *Pseudotsuga menziesii*)；西方铁杉 (Westem hemlock, *Tsuga canadensis*)；北美云杉 (白云杉 (*Picea glauca*))；红杉 (北美红杉 (*Sequoia sempervirens*))；枞树 (true firs) 诸如银杉 (胶冷杉 (*Abies amabilis*)) 和胶枞 (香脂冷杉 (*Abies balsamea*))；以及雪松, 如西方红雪松 (北美乔柏 (*Thuja plicata*)) 和阿拉斯加黄雪松 (黄扁柏 (*Chamaecyparis nootkatensis*))。这些实施例的植物包括作物植物 (例如玉米、苜蓿、向日葵、芸苔属、大豆、棉花、红花、花生、高粱、小麦、粟、烟草等), 例如玉米和大豆植物。

[0171] 草皮草包括但不限于: 一年生早熟禾 (annual bluegrass, *Poa annua*)；一年生黑麦草 (黑麦草 (*Lolium multiflorum*))；加拿大早熟禾 (Canada bluegrass, *Poa compressa*)；紫羊茅 (Chewing's fescue, *Festuca rubra*)；细弱翦股颖 (colonial bentgrass, *Agrostis tenuis*)；匍匐翦股颖 (creeping bentgrass, *Agrostis palustris*)；冰草 (沙生冰草 (*Agropyron desertorum*))；扁穗冰草 (fairway wheatgrass, *Agropyron cristatum*)；硬羊茅 (长叶羊茅 (*Festuca longifolia*))；草地早熟禾 (Kentucky bluegrass, *Poa pratensis*)；鸭茅 (orchardgrass, *Dactylis glomerata*)；多年生黑麦草 (perennial ryegrass, *Lolium perenne*)；红狐茅 (紫羊茅 (*Festuca rubra*))；小糠草 (redtop, *Agrostis alba*)；粗茎早熟禾 (rough bluegrass, *Poa trivialis*)；羊茅 (sheep fescue, *Festuca ovina*)；无芒雀麦 (smooth brome grass, *Bromus inermis*)；高羊茅 (tall fescue, *Festuca arundinacea*)；梯牧草 (timothy, *Phleum pratense*)；绒毛翦股颖 (velvet bentgrass, *Agrostis canina*)；碱茅 (weeping alkaligrass, *Puccinellia distans*)；蓝茎冰草 (western wheatgrass, *Agropyron smithii*)；狗牙根 (狗牙根属 (*Cynodon* spp.))；圣奥古斯丁草 (St. Augustine grass, *Stenotaphrum secundatum*)；结缕草 (结缕属 (*Zoysia* spp.))；百喜草 (Bahia grass, *Paspalum notatum*)；地毯草 (carpet grass, *Axonopus*

affinis);假俭草(centipede grass,*Eremochloa ophiuroides*);隐花狼尾草(kikuyu grass,*Pennisetum clandestinum*);海滨雀稗(seashore paspalum,*Paspalum vaginatum*);格兰马草(blue gramma,*Bouteloua gracilis*);野牛草(buffalo grass,*Buchloe dactyloids*);垂穗草(sideoats gramma,*Bouteloua curtipendula*)。

[0172] 感兴趣的植物包括提供感兴趣的种子的谷物类植物、油料种子植物和豆科植物。感兴趣的种子包括谷物种子,例如玉米、小麦、大麦、稻、高粱、黑麦、粟等。油料种子植物包括棉花、大豆、红花、向日葵、芸苔属、玉蜀黍、苜蓿、棕榈、椰子、亚麻、蓖麻、橄榄等。豆科植物包括豆类和豌豆。豆类包括瓜尔豆、槐豆、胡芦巴、大豆、四季豆、豇豆、绿豆、利马豆、蚕豆、小扁豆、鹰嘴豆等。

[0173] 植物转化评估

[0174] 在将异源外源DNA引入植物细胞后,通过各种方法(例如分析与已整合的基因相关的核酸、蛋白质和代谢物)证实异源基因在该植物基因组中的转化或整合。

[0175] PCR分析是在移植到土壤中之前的早期阶段检查已转化的细胞、组织或芽中已整合的基因存在的快速方法(Sambrook和Russell,(2001)*Molecular Cloning:A Laboratory Manual*[分子克隆:实验手册],Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY[纽约冷泉港冷泉港实验室出版社])。使用对感兴趣的基因或农杆菌载体背景等特异的寡核苷酸引物进行PCR。

[0176] 可以通过基因组DNA的DNA印迹分析来证实植物转化(Sambrook和Russell,(2001),同上)。通常,从转化体中提取总DNA,该转化体用适当的限制酶进行消化,在琼脂糖凝胶中进行分馏并且转到硝酸纤维素或尼龙膜上。然后,根据标准的技术,用例如放射性标记³²P的靶DNA片段来探测该膜或“印迹”以证实引入的基因整合到该植物基因组中(Sambrook和Russell,(2001),同上)。

[0177] 在RNA印迹分析中,从该转化体的特定组织中分离了RNA,在甲醛琼脂糖凝胶中进行分馏,并且根据本领域常规使用的标准程序来印迹到尼龙滤膜上(Sambrook和Russell,(2001),同上)。然后,通过在本领域内已知的方法,通过将该滤膜与源自杀有害生物基因的放射性探针进行杂交来测试由该杀有害生物基因所编码的RNA的表达(Sambrook和Russell,(2001),同上)。

[0178] 可以对转基因植物进行蛋白质印迹、生物化学测定以及类似测定,以便通过标准程序(Sambrook和Russell,(2001),同上)使用与IPD073多肽上存在的一个或多个表位结合的抗体来证实由该杀有害生物基因所编码的蛋白质的存在。

[0179] 转基因植物中性状的堆叠

[0180] 转基因植物可以包含在此披露的一种或多种杀昆虫多核苷酸与一种或多种另外的多核苷酸的堆叠,导致产生或抑制多个多肽序列。包含多核苷酸序列堆叠的转基因植物可以通过传统育种方法或通过遗传工程方法中的一种或两种获得。这些方法包含但不限于:育种各自包含感兴趣的多核苷酸的单个系,将包含在此披露的基因的转基因植物与随后的基因转化并将基因共转化为单个植物细胞。如在此使用的,术语“堆叠”包括在同一植物中存在多个性状(即,将两个性状并入核基因组中,将一个性状并入核基因组中,并且将一个性状并入质体的基因组中,或者这两种性状都被并入质体的基因组中)。在一个非限制性实例中,“堆叠性状”包括其中序列在物理上彼此相邻的分子堆叠。如在此使用的性状是

指源自特定序列或序列组群的表型。可以使用包含多个基因或在多个载体上分别携带的基因的单一转化载体进行基因的共转化。如果通过对该植物进行基因转化来堆叠这些序列，则可以在任何时间和以任何顺序组合目的这些多核苷酸序列。可以用共转化方案将这些性状与转化盒的任何组合所提供的目的多核苷酸一起引入。例如，若引入两个序列，则这两个序列可包含在分开的转化盒(反式)或包含在同一个转化盒(顺式)。这些序列的表达可以通过相同的启动子或通过不同的启动子驱动。在某些情况下，可能所希望的是引入一种将抑制所关注的聚核苷酸的表达的转化盒。此可以与其他抑制盒或过度表达盒的任何组合进行组合以在该植物中产生所需性状组合。进一步应当认识到，可以使用位点特异重组系统，来在希望的基因组位置堆叠多核苷酸序列。参见，例如，WO 1999/25821、WO 1999/25854、WO 1999/25840、WO 1999/25855和WO 1999/25853，其全部通过引用结合在此。

[0181] 在一些实施例中，编码本文披露的IPD073多肽、单独的或与一种或多种另外的昆虫抗性性状相堆叠的多核苷酸可以与一种或多种另外的投入性状(例如，除草剂抗性、真菌抗性、病毒抗性、胁迫耐受性、抗病性、雄性不育性、茎秆强度等)或产出性状(例如，增加的产量、改性的淀粉、改进的油特性、平衡的氨基酸、高赖氨酸或甲硫氨酸、增加的消化性、改进的纤维品质、抗旱性等)相堆叠。因此，多核苷酸实施例可用于提供具有灵活地且成本有效地防治任何数量的农艺有害生物的能力的经改进的作物品质的完整农艺学方案。

[0182] 可用于堆叠的转基因包括但不限于：

[0183] 1. 赋予昆虫抗性或抗病性并编码以下基因的转基因：

[0184] (A) 植物抗病性基因通常通过植物中抗病性基因(R)的产物与病原体中相应的无毒性(Avr)基因的产物之间的特异性相互作用来活化植物防御。可以用经克隆的抗性基因来转化植物变种，以工程化对特定病原菌株具有抗性的植物。参见，例如Jones等人(1994) *Science*[科学]266:789 (cloning of the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum*[克隆番茄Cf-9基因以抵抗番茄叶霉病菌])；Martin等人(1993) *Science*[科学]262:1432 (tomato Pto gene for resistance to *Pseudomonas syringae* pv. tomato encodes a protein kinase[用于抵抗丁香假单胞菌番茄致病变体的番茄Pto基因编码蛋白激酶])；Mindrinos等人，(1994) *Cell*[细胞]78:1089 (*Arabidopsis* RSP2 gene for resistance to *Pseudomonas syringae*[拟南芥RSP2基因用于对抗丁香假单胞菌])，McDowell和Woffenden，(2003) *Trends Biotechnol.*[生物科技趋势]21(4):178-83以及Toyoda等人，(2002) *Transgenic Res.*[转基因研究]11(6):567-82。与野生型植物相比，具有抗病性的植物对病原体更具抗性。

[0185] (B) 编码苏云金芽孢杆菌蛋白质的基因，其衍生物或其上建模的合成多肽。参见，例如，Geiser, et al., (1986) *Gene* 48:109[Geiser等人，(1986)，基因，48:109]，其披露了Bt δ -内毒素基因的克隆和核苷酸序列。此外，编码 δ -内毒素基因的DNA分子可购自美国典型培养物保藏中心(罗克维尔(Rockville)，马里兰州)，例如在ATCC[®]登录号40098、67136、31995和31998下。经遗传工程化的苏云金芽孢杆菌转基因的其他非限制性实例在以下专利和专利申请中给出，并且特此通过引用并入本文中：美国专利号5,188,960；5,689,052；5,880,275；5,986,177；6,023,013；6,060,594；6,063,597；6,077,824；6,620,988；6,642,030；6,713,259；6,893,826；7,105,332；7,179,965；7,208,474；7,227,056；7,288,643；7,323,556；7,329,736；7,449,552；7,468,278；7,510,878；7,521,235；7,544,862；7,

605,304、7,696,412、7,629,504、7,705,216、7,772,465、7,790,846、7,858,849和WO 1991/14778;WO 1999/31248;WO 2001/12731;WO 1999/24581和WO 1997/40162。

[0186] 也可以堆叠编码杀有害生物蛋白的基因,该基因包括但不限于:来自假单胞菌属的杀昆虫蛋白,如PSEEN3174 (Monalysin, (2011) PLoS Pathogens [PLoS病原体], 7:1-13), 来自假单胞菌蛋白菌菌株CHA0和Pf-5 (此前为荧光假单胞菌 (*fluorescens*)) (Pechy-Tarr, (2008) Environmental Microbiology [环境微生物学] 10:2368-2386:基因库登录号 EU400157);来自台湾假单胞菌 (*Pseudomonas Taiwanensis*) (Liu等人, (2010) J. Agric. Food Chem. [农业食品化学学报] 58:12343-12349) 和来自假产碱假单胞菌 (*Pseudomonas pseudoalcaligenes*) (Zhang等人, (2009) Annals of Microbiology [微生物学年报] 59:45-50和Li等人, (2007) Plant Cell Tiss. Organ Cult. [植物细胞组织和器官培养] 89:159-168);来自发光杆菌属和致病杆菌属的杀昆虫蛋白 (Hinchliffe等人, (2010) The Open Toxinology Journal [开放性毒理学杂志] 3:101-118和Morgan等人, (2001) Applied and Envir. Micro. [应用与环境微生物学] 67:2062-2069), 美国专利号6,048,838 和美国专利号6,379,946;美国专利公开号US 20140007292的PIP-1多肽;美国专利公开号 US 20140033361的AfIP-1A和/或AfIP-1B多肽;美国专利公开号US 20140274885和US 20160040184的PHI-4多肽;PCT公开号WO 2015/023846的PIP-47多肽、PCT公开号WO 2015/038734的PIP-72多肽;PCT公开号WO 2015/120270的PtIP-50多肽和PtIP-65多肽;PCT公开号WO 2015/120276的PtIP-83多肽;PCT序列号PCT/US 15/55502的PtIP-96多肽;US序列号 62/201977的IPD079多肽;US序列号62/269482的IPD082多肽;以及 δ -内毒素包括但不限于 Cry1、Cry2、Cry3、Cry4、Cry5、Cry6、Cry7、Cry8、Cry9、Cry10、Cry11、Cry12、Cry13、Cry14、Cry15、Cry16、Cry17、Cry18、Cry19、Cry20、Cry21、Cry22、Cry23、Cry24、Cry25、Cry26、Cry27、Cry28、Cry29、Cry30、Cry31、Cry32、Cry33、Cry34、Cry35、Cry36、Cry37、Cry38、Cry39、Cry40、Cry41、Cry42、Cry43、Cry44、Cry45、Cry46、Cry47、Cry49、Cry50、Cry51、Cry52、Cry53、Cry54、Cry55、Cry56、Cry57、Cry58、Cry59、Cry60、Cry61、Cry62、Cry63、Cry64、Cry65、Cry66、Cry67、Cry68、Cry69、Cry70、Cry71、和Cry72类的 δ -内毒素基因和苏云金芽孢杆菌溶细胞Cyt1和Cyt2基因。这些类别的苏云金芽孢杆菌杀昆虫蛋白的成员是本领域技术人员熟知的(参见, Crickmore等人, “Bacillus thuringiensis toxin nomenclature [苏云金芽孢杆菌毒素命名法]” (2011), 在lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/, 可以使用“www”前缀在万维网上访问该网址。

[0187] δ -内毒素的实例还包括但不限于:美国专利号5,880,275和7,858,849的Cry1A蛋白;美国专利号8,304,604和8.304,605的DIG-3或DIG-11毒素 (cry蛋白 (如Cry1A) 的 α 螺旋1和/或 α 螺旋2变体的N末端缺失), 美国专利申请序列号10/525,318的Cry1B;美国专利号6,033,874的Cry1C;美国专利号5,188,960、6,218,188的Cry1F;美国专利号7,070,982、6,962,705和6,713,063的Cry1A/F嵌合体;美国专利号7,064,249的Cry2蛋白如Cry2Ab蛋白;Cry3A蛋白,包括但不限于:通过融合至少两种不同Cry蛋白的可变区和保守区的独特组合产生的工程化杂合杀昆虫蛋白 (eHIP) (美国专利申请公开号2010/0017914);Cry4蛋白;Cry5蛋白;Cry6蛋白;美国专利号7,329,736、7,449,552、7,803,943、7,476,781、7,105,332、7,378,499和7,462,760的Cry8蛋白;Cry9蛋白如Cry9A、Cry9B、Cry9C、Cry9D、Cry9E和Cry9F家族的成员;Naimov, et al., (2008) Applied and Environmental Microbiology,

74:7145-7151 [Naimov等人, (2008), 应用与环境微生物学, 74:7145-7151]的Cry15蛋白; 美国专利号6,127,180、6,624,145和6,340,593的Cry22、Cry34Ab1蛋白; 美国专利号6,248,535、6,326,351、6,399,330、6,949,626、7,385,107和7,504,229的CryET33和CryET34蛋白; 美国专利公开号2006/0191034、2012/0278954, 和PCT公开号WO 2012/139004的CryET33和CryET34同源物; 美国专利号6,083,499、6,548,291和6,340,593的Cry35Ab1蛋白; Cry46蛋白、Cry51蛋白、Cry二元毒素; TIC901或相关毒素; US 2008/0295207的TIC807; PCT US 2006/033867的ET29、ET37、TIC809、TIC810、TIC812、TIC127、TIC128; 美国专利号8,236,757的AXMI-027、AXMI-036和AXMI-038; US 7,923,602的AXMI-031、AXMI-039、AXMI-040、AXMI-049; WO 2006/083891的AXMI-018、AXMI-020、和AXMI-021; WO 2005/038032的AXMI-010; WO 2005/021585的AXMI-003; US 2004/0250311的AXMI-008; US 2004/0216186的AXMI-006; US 2004/0210965的AXMI-007; US 2004/0210964的AXMI-009; US 2004/0197917的AXMI-014; US 2004/0197916的AXMI-004; WO 2006/119457的AXMI-028和AXMI-029; WO 2004/074462的AXMI-007、AXMI-008、AXMI-0080rf2、AXMI-009、AXMI-014和AXMI-004; 美国专利号8,084,416的AXMI-150; US 20110023184的AXMI-205; US 2011/0263488的AXMI-011、AXMI-012、AXMI-013、AXMI-015、AXMI-019、AXMI-044、AXMI-037、AXMI-043、AXMI-033、AXMI-034、AXMI-022、AXMI-023、AXMI-041、AXMI-063、和AXMI-064; US 2010/0197592的AXMI-R1和相关蛋白; WO 2011/103248的AXMI221z、AXMI222z、AXMI223z、AXMI224z和AXMI225z; WO 11/103247的AXMI218、AXMI219、AXMI220、AXMI226、AXMI227、AXMI228、AXMI229、AXMI230和AXMI231; 美国专利号8,334,431的AXMI-115、AXMI-113、AXMI-005、AXMI-163和AXMI-184; US 2010/0298211的AXMI-001、AXMI-002、AXMI-030、AXMI-035、和AXMI-045; US 20090144852的AXMI-066和AXMI-076; 美国专利号8,318,900的AXMI128、AXMI130、AXMI131、AXMI133、AXMI140、AXMI141、AXMI142、AXMI143、AXMI144、AXMI146、AXMI148、AXMI149、AXMI152、AXMI153、AXMI154、AXMI155、AXMI156、AXMI157、AXMI158、AXMI162、AXMI165、AXMI166、AXMI167、AXMI168、AXMI169、AXMI170、AXMI171、AXMI172、AXMI173、AXMI174、AXMI175、AXMI176、AXMI177、AXMI178、AXMI179、AXMI180、AXMI181、AXMI182、AXMI185、AXMI186、AXMI187、AXMI188、AXMI189; US 2010/0005543的AXMI079、AXMI080、AXMI081、AXMI082、AXMI091、AXMI092、AXMI096、AXMI097、AXMI098、AXMI099、AXMI100、AXMI101、AXMI102、AXMI103、AXMI104、AXMI107、AXMI108、AXMI109、AXMI110、AXMI111、AXMI112、AXMI114、AXMI116、AXMI117、AXMI118、AXMI119、AXMI120、AXMI121、AXMI122、AXMI123、AXMI124、AXMI1257、AXMI1268、AXMI127、AXMI129、AXMI164、AXMI151、AXMI161、AXMI183、AXMI132、AXMI138、AXMI137; 和Cry蛋白(如Cry1A和Cry3A), 其具有美国专利号8,319,019的经修饰的蛋白水解位点; 以及Cry1Ac、Cry2Aa和Cry1Ca毒素蛋白, 其来自美国专利申请公开号2011/0064710的苏云金芽孢杆菌菌株VBTS 2528。其他Cry蛋白是本领域技术人员熟知的(参见Crickmore等人, “*Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature [苏云金芽孢杆菌毒素命名法]” (2011), 网址为 lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/, 可以使用“www”前缀在万维网上进行访问)。Cry蛋白的杀昆虫活性是本领域技术人员所熟知的(回顾参见van Franckenhuyzen, (2009) *J. Invert. Path.* [无脊椎动物病理学杂志] 101:1-16)。使用Cry蛋白作为转基因植物性状是本领域技术人员所熟知的, 并且Cry转基因植物(包括但不限于Cry1Ac、Cry1Ac+Cry2Ab、Cry1Ab、Cry1A.105、Cry1F、Cry1Fa2、Cry1F+Cry1Ac、Cry2Ab、

Cry3A、mCry3A、Cry3Bb1、Cry34Ab1、Cry35Ab1、Vip3A、mCry3A、Cry9c和CBI-Bt)已获得监管部门的批准(参见, Sanahuja, (2011) Plant Biotech journal [植物生物技术杂志] 9:283-300和CERA (2010) 转基因作物数据库环境风险评估中心(CERA) (GM Crop Database Center for Environmental Risk Assessment), ILSI研究基金会, 华盛顿特区, 网址为cera-gmc.org/index.php?action=gm_crop_database, 可以使用“www”前缀在万维网上进行访问)。本领域技术人员熟知的多于一种杀有害生物蛋白也可以在植物中表达, 这些杀有害生物蛋白如Vip3Ab和Cry1Fa (US 2012/0317682)、Cry1BE和Cry1F (US 2012/0311746)、Cry1CA和Cry1AB (US2012/0311745)、Cry1F和CryCa (US 2012/0317681)、Cry1DA和Cry1BE (US 2012/0331590)、Cry1DA和Cry1Fa (US 2012/0331589)、Cry1AB和Cry1BE (US 2012/0324606)、以及Cry1Fa和Cry2Aa、Cry1I或Cry1E (US2012/0324605)。杀有害生物蛋白还包括杀昆虫脂肪酶, 这些杀昆虫脂肪酶包括美国专利号7,491,869的脂质酰基水解酶, 和胆固醇氧化酶, 如来自链霉菌属(Purcell et al. (1993) Biochem Biophys Res Commun 15:1406-1413 [Purcell等人, (1993), 生物化学与生物物理学研究通讯15:1406-1413])。杀有害生物蛋白还包括美国专利号5,877,012、6,107,279、6,137,033、7,244,820、7,615,686和8,237,020中的VIP(营养性杀昆虫蛋白)毒素等。其他VIP蛋白质是本领域技术人员所熟知的(参见lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/vip.html, 可以使用“www”前缀在万维网上进行访问)。杀有害生物蛋白还包括可从如下生物体获得的毒素复合物(TC)蛋白质:致病杆菌、发光杆菌和类芽孢杆菌(参见美国专利号7,491,698和8,084,418)。一些TC蛋白具有“独立”杀昆虫活性并且其他TC蛋白增强由相同给定生物体产生的独立毒素的活性。可以通过源自不同属的来源生物体的一种或多种TC蛋白“增效剂”来增强“独立”TC蛋白(例如来自发光杆菌属、致病杆菌属或类芽孢杆菌属)的毒性。有三种主要类型的TC蛋白。如在此所述,A类蛋白(“蛋白A”)是独立的毒素。B类蛋白(“蛋白B”)和C类蛋白(“蛋白C”)提高了A类蛋白的毒性。A类蛋白的实例是TcbA、TcdA、XptA1和XptA2。B类蛋白的实例是TcaC、TcdB、XptB1Xb和XptC1Wi。C类蛋白的实例是TccC、XptC1Xb和XptB1Wi。杀有害生物蛋白还包括蜘蛛、蛇和蝎毒蛋白。蜘蛛肽的实例包括但不限于莱科毒素-1肽及其突变体(美国专利号8,334,366)。

[0188] (C) 编码昆虫特异性激素或信息素(如蜕化类固醇和保幼激素)的多核苷酸,其变体,基于其的模拟物,或者其拮抗剂或激动剂。参见,例如Hammock等人,(1990) Nature [自然] 344:458,该文献披露了经克隆的保幼激素酯酶的杆状病毒表达是保幼激素的灭活剂。

[0189] (D) 编码昆虫特异性肽的多核苷酸,其在表达时破坏受影响有害生物的生理机能。例如,参见Regan,(1994) J. Biol. Chem. [生物化学杂志] 269:9的披露内容(表达克隆产生编码昆虫利尿激素受体的DNA);Pratt等人,(1989) Biochem. Biophys. Res. Comm. [生物化学与生物物理研究通讯] 163:1243(在Diptera puntata中识别出了阿洛斯德汀(allostatin));Chattopadhyay等人,(2004) Critical Reviews in Microbiology [微生物学评论] 30(1):33-54;Zjawiony,(2004) J Nat Prod [天然产物杂志] 67(2):300-310;Carlini和Grossi-de-Sa,(2002) Toxicon [毒素] 40(11):1515-1539;Ussuf等人,(2001) Curr Sci. [当代科学] 80(7):847-853以及Vasconcelos和Oliveira,(2004) Toxicon [毒素] 44(4):385-403。还参见,美国专利号5,266,317,作者Tomalski等人,他们披露了编码昆虫特异性毒素的基因。

[0190] (E) 编码如下酶的多核苷酸,该多核苷酸负责单萜、倍半萜烯、类固醇、异羟肟酸、苯丙素衍生物或具有杀昆虫活性的其他非蛋白质分子的超累积。

[0191] (F) 编码参与生物活性分子的修饰(包括翻译后修饰)的酶的多核苷酸;例如糖酵解酶、蛋白水解酶、脂肪分解酶、核酸酶、环化酶、转氨酶、酯酶、水解酶、磷酸酶、激酶、磷酸化酶、聚合酶、弹性蛋白酶、几丁质酶和葡聚糖酶,无论是天然还是合成的。参见,PCT申请WO 1993/02197,所属人为Scott等人,该文献披露了愈创葡聚糖酶(callase)基因的核苷酸序列。含有几丁质酶编码序列的DNA分子可以例如从登录号39637和67152下的ATCC[®]获得。还参见,Kramer,et al.,(1993) *Insect Biochem.Molec.Biol.*23:691[Kramer等人,(1993),昆虫生物化学与分子生物学,23:691],其教导编码烟草钩虫几丁质酶的cDNA的核苷酸序列,和Kawalleck,et al.,(1993) *Plant Molec.Biol.*21:673[Kawalleck等人,(1993)植物分子生物学,21:673],其提供欧芹ubi4-2多泛素基因的核苷酸序列,和美国专利号6,563,020、7,145,060和7,087,810。

[0192] (G) 编码刺激信号转导的分子的多核苷酸。例如,参见Botella等人,(1994) *Plant Molec.Biol.*[分子细胞生物学]24:757,该文献披露了绿豆钙调素cDNA克隆的核苷酸序列,以及Griess等人,(1994) *Plant Physiol.*[植物生理学]104:1467,他们提供了玉米钙调素cDNA克隆的核苷酸序列。

[0193] (H) 编码疏水时刻肽(moment peptide)的多核苷酸。参见,PCT申请WO 1995/16776和美国专利号5,580,852,速普肽(其抑制真菌植物病原体)的肽衍生物的披露和PCT申请WO 1995/18855和美国专利号5,607,914(教导了赋予疾病抗性的合成抗微生物肽)。

[0194] (I) 编码膜通透酶,通道形成剂或通道阻断剂的多核苷酸。例如,参见,由Jaynes, et al.,(1993) *Plant Sci.*89:43[Jaynes等人,(1993),植物科学,89:43]的,杀菌肽 β -溶解肽类似物的异源表达以使转基因烟草植物对青枯假单孢菌具有抗性的披露。

[0195] (J) 编码病毒侵入性蛋白质或其衍生的复合毒素的基因。例如,病毒外壳蛋白在转化的植物细胞中的积累赋予由外源蛋白基因来源的病毒以及由相关病毒导致的病毒侵染和/或疾病发展的抗性。参见,Beachy,et al.,(1990) *Ann.Rev.Phytopathol.*28:451[Beachy等人,(1990),植物病理学年评,28:451]。外壳蛋白介导的抗性已被赋予至转化植物抵抗以下各项:苜蓿花叶病毒、黄瓜花叶病毒、烟草线条病毒、马铃薯X病毒、马铃薯Y病毒、烟草蚀纹病毒、烟草脆裂病毒和烟草花叶病毒。同上。

[0196] (K) 编码昆虫特异性抗体或其衍生的免疫毒素的基因。因此,靶向昆虫肠道中关键代谢功能的抗体将使受影响的酶失活,从而杀灭昆虫。Cf.Taylor,et al.,Abstract# 497,SEVENTH INT'L SYMPOSIUM ON MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS[Cf.Taylor等人,摘要#497,分子植物-微生物相互作用的第七届国际研讨会](爱丁堡,苏格兰,1994)(通过生产单链抗体片段在转基因烟草中酶促失活)。

[0197] (L) 编码病毒特异性抗体的基因。参见,例如Tavladoraki等人,(1993) *Nature*[自然]366:469,其显示,表达重组抗体基因的转基因植物不受病毒侵袭。

[0198] (M) 编码由病原体或寄生虫在自然中产生的发育阻滞蛋白的多核苷酸。因此,真菌内 α -1,4-D-多聚半乳糖醛酸酶通过溶解植物细胞壁homo- α -1,4-D-半乳糖醛酸酶来促进真菌定植和植物营养释放。参见Lamb等人,(1992) *Bio/Technology*[生物技术]10:1436。以下文献描述了编码豆内聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白的基因的克隆和表征:Toubart等人,(1992)

Plant J. [植物杂志]2:367。

[0199] (N) 编码由植物在自然中产生的发育抑制蛋白的多核苷酸。例如,已在以下文献中表明表达大麦核糖体失活基因的转基因植物具有增加的对真菌疾病的抗性:Logemann等人,(1992)Bio/Technology[生物技术]10:305。

[0200] (O) 参与系统获得抗性(SAR)反应的基因和/或发病机制相关的基因。Briggs,(1995)Current Biology[当代生物学]5(2),Pieterse和Van Loon,(2004)Curr.Opin.Plant Bio.[植物生物学新观点]7(4):456-64,以及Somssich,(2003)Cell[细胞]113(7):815-6。

[0201] (P) 抗真菌基因(Cornelissen和Melchers,(1993)Pl.Physiol.[植物生理学]101:709-712,和Parijs等人,(1991)Planta[植物]183:258-264,以及Bushnell等人,(1998)Can.J.of Plant Path.[加拿大植物病理学杂志]20(2):137-149)。还参见,美国专利申请序列号09/950,933;11/619,645;11/657,710;11/748,994;11/774,121以及美国专利号6,891,085和7,306,946。LysM受体样激酶用于感知几丁质片段,作为植物对真菌病原体防御反应的第一步(US 2012/0110696)。

[0202] (Q) 解毒基因,如伏马菌素、白僵菌素、串珠镰刀菌素和玉米赤霉烯酮及其结构上相关的衍生物。例如,参见美国专利号5,716,820;5,792,931;5,798,255;5,846,812;6,083,736;6,538,177;6,388,171和6,812,380。

[0203] (R) 编码胱抑素和半胱氨酸蛋白酶抑制剂的多核苷酸。参见,美国专利号7,205,453。

[0204] (S) 防御素基因。参见,WO 2003/000863和美国专利号6,911,577;6,855,865;6,777,592和7,238,781。

[0205] (T) 赋予线虫抗性的基因。参见,例如PCT申请WO 1996/30517;PCT申请WO 1993/19181、WO 2003/033651,以及Urwin等人,(1998)Planta[植物]204:472-479,和Williamson,(1999)Curr Opin Plant Bio.[植物生物学新观点]2(4):327-31;美国专利号6,284,948和7,301,069以及miR164基因(WO 2012/058266)。

[0206] (U) 赋予对疫霉根腐病抗性的基因,如Rps 1、Rps 1-a、Rps 1-b、Rps1-c、Rps 1-d、Rps 1-e、Rps 1-k、Rps 2、Rps 3-a、Rps 3-b、Rps 3-c、Rps 4、Rps 5、Rps 6、Rps 7和其他Rps基因。参见,例如Shoemaker等人,Phytophthora Root Rot Resistance Gene Mapping in Soybean[大豆中疫霉根腐病抗性基因图谱],植物基因组第四次会议,加利福尼亚州圣地亚哥(San Diego,Calif.) (1995)。

[0207] (V) 赋予对褐茎腐病抗性的基因,如美国专利号5,689,035所述,并为此通过引入并入本文。

[0208] (W) 赋予对炭疽菌抗性的基因,如美国专利申请公开US 2009/0035765中所述,并为此通过引用并入本文。这包括可以用作单一基因座转化的Rcg基因座。

[0209] 2. 赋予对除草剂的抗性的转基因,例如:

[0210] (A) 编码对如下除草剂的抗性的多核苷酸,该除草剂抑制生长点或分生组织,如咪唑啉酮或磺酰脲。这个类别的实例性基因编码突变体ALS和AHAS酶,分别如以下文献中所述:Lee等人,(1988)EMBO J.[欧洲分子生物学学会杂志]7:1241和Miki等人,(1990)Theor.Appl.Genet.[理论与应用遗传学]80:449。还参见,美国专利号5,605,011;5,013,

659;5,141,870;5,767,361;5,731,180;5,304,732;4,761,373;5,331,107;5,928,937和5,378,824;美国专利申请序号11/683,737和国际公开WO 1996/33270。

[0211] (B) 编码草甘膦抗性的蛋白质的多核苷酸(5-烯醇式丙酮酰-3-磷酸莽草酸合酶(EPSP)和aroA基因给予的抗性)和其他膦酰基化合物如草胺膦(草胺膦乙酰转移酶(PAT)和吸水链霉菌草胺膦乙酰转移酶(bar)基因),以及吡啶氧基或苯氧基丙酸和环己酮(ACC酶抑制剂编码基因)。参见,例如Shah等人的美国专利号4,940,835,其披露了EPSPS形式的能赋予草甘膦抗性的核苷酸序列。Barry等人的美国专利号5,627,061也描述了编码EPSPS酶的基因。还参见,美国专利号6,566,587;6,338,961;6,248,876B1;6,040,497;5,804,425;5,633,435;5,145,783;4,971,908;5,312,910;5,188,642;5,094,945;4,940,835;5,866,775;6,225,114 B1;6,130,366;5,310,667;4,535,060;4,769,061;5,633,448;5,510,471;Re.36,449;RE 37,287 E和5,491,288以及国际公开EP 1173580;WO 2001/66704;EP 1173581和EP 1173582,为此目的将以上各项通过引用并入本文。还给予植物草甘膦抗性,使该植物表达编码草甘膦氧化还原酶的基因,这在美国专利号5,776,760和5,463,175中进行了更全面地描述,为此目的将这两份专利以引用方式并入本文。另外,可通过过量表达编码草甘膦N-乙酰转移酶的基因,来给予植物草甘膦抗性。参见例如美国专利号7,462,481;7,405,074以及美国专利申请公开号2008/0234130。编码突变aroA基因的DNA分子可以在ATCC[®]登录号39256下获得,并且该突变基因的核苷酸序列披露于授予Comai的美国专利号4,769,061中。欧洲申请号0 333 033(Kumada等人)和美国专利号4,975,374(Goodman等人)披露了赋予除草剂(如L-草胺膦)抗性的谷氨酰胺合成酶基因的核苷酸序列。EP申请号0 242 246和0 242 236至Leemans等人中提供了草丁膦乙酰基转移酶基因的核苷酸序列;De Greef, et al., (1989) *Bio/Technology* 7:61[De Greef等人, (1989), 生物/技术, 7:61]描述了表达编码草丁膦乙酰转移酶活性的嵌合bar基因的转基因植物的生产。还参见,美国专利号5,969,213;5,489,520;5,550,318;5,874,265;5,919,675;5,561,236;5,648,477;5,646,024;6,177,616 B1和5,879,903,为此目的将以上各项通过引用并入本文。赋予苯氧基丙酸和环己酮(如稀禾啶和吡氟氯禾灵)抗性的示例性基因是Acc1-S1、Acc1-S2和Acc1-S3基因,其描述于以下文献中:Marshall等人, (1992) *Theor. Appl. Genet.* [理论与应用遗传学]83:435。

[0212] (C) 编码对抑制光合作用的除草剂具有抗性的蛋白质的多核苷酸,例如三嗪(psbA和gs+基因)和苜蓿(脲水解酶基因)。Przibilla等人, (1991) *Plant Cell* [植物细胞]3:169,描述了用编码突变体psbA基因的质粒对衣藻进行转化。针对脲水解酶基因的核苷酸序列披露在美国专利号4,810,648(Stalker)中,并且含有这些基因的DNA分子可以在ATCC[®]登录号53435,67441和53435,67442下获得。编码谷胱甘肽S-转移酶的DNA的克隆和表达描述于以下文献中:Hayes等人, (1992) *Biochem. J.* [生物化学杂志]285:173。

[0213] (D) 已经发现,编码对乙酰醇酸合成酶具有抗性的蛋白质的多核苷酸能产生表达这种对多种类型的除草剂具有抗性的酶的植物,并已将该多核苷酸引入到多种植物中(参见,例如Hattori等人(1995) *Mol Gen Genet.* [分子和普通遗传学]246:419)。赋予除草剂抗性的其他基因包括:编码大鼠细胞色素P4507A1和酵母NADPH-细胞色素P450氧化还原酶的嵌合蛋白的基因(Shiota等人, (1994) *Plant Physiol* [植物生理学]106:17),针对谷胱甘肽

还原酶和超氧化物歧化酶的基因 (Aono等人, (1995) *Plant Cell Physiol* [植物细胞生理学]36:1687) 和各种磷酸转移酶的基因 (Datta等人, (1992) *Plant Mol Biol* [植物分子生理学]20:619)。

[0214] (E) 编码靶向原卟啉原氧化酶 (protox) (对于生产叶绿素所必需的) 的除草剂抗性的多核苷酸。原卟啉原氧化酶 (protox) 作为针对各种除草化合物的靶标。这些除草剂还抑制存在的所有不同种类的植物的生长, 导致其完全破坏。含有对这些除草剂具有抗性的经改变的原卟啉原氧化酶 (protox) 活性的植物的发育描述于以下文献中: 美国专利号6,288,306 B1; 6,282,837 B1和5,767,373, 以及国际公开W0 2001/12825。

[0215] (F) aad-1基因 (最初来自鞘脂单胞菌 (*Sphingobium herbicidovorans*)) 编码芳氧基链烷酸酯双加氧酶 (AAD-1) 蛋白。该性状赋予对2,4-二氯苯氧基乙酸和芳氧基苯氧基丙酸酯 (通常称为“fop”除草剂, 例如啶禾灵) 除草剂的耐受性。用于植物中除草剂耐受性的 aad-1基因本身首先在W0 2005/107437中披露 (还参见US 2009/0093366)。来自食酸丛毛单胞菌的aad-12基因, 其编码芳氧基链烷酸酯双加氧酶 (AAD-12) 蛋白, 该蛋白通过用芳氧基链烷酸酯部分 (包括苯氧基生长素 (例如2,4-D, MCPA) 以及吡啶氧基生长素 (例如氯氟吡氧乙酸, 三氯吡氧乙酸)) 使几种除草剂失活来赋予对2,4-二氯苯氧基乙酸和吡啶氧基乙酸酯除草剂的耐受性。

[0216] (G) 美国专利申请公开2003/0135879中所披露的用于给予麦草畏耐受性的编码除草剂抗性的麦草畏单加氧酶的多核苷酸。

[0217] (H) 美国专利号4,810,648中所披露的用于给予溴苯腈耐受性的编码溴苯腈水解酶 (Bxn) 的多核苷酸分子。

[0218] (I) 用于达草灭耐受性的编码八氢番茄红素 (crt1) 的多核苷酸分子描述于以下文献中: Misawa等人, (1993) *Plant J.* [植物杂志]4:833-840和Misawa等人, (1994) *Plant J.* [植物杂志]6:481-489。

[0219] 3. 赋予或贡献于改变的谷物特征的转基因

[0220] 如:

[0221] (A) 改变的脂肪酸, 例如, 通过以下各项:

[0222] (1) 下调硬脂酰-ACP以增加植物的硬脂酸含量。参见, Knultzon, et al., (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:2624 and W0 1999/64579 [Knultzon等人, (1992), 美国国家科学院院刊, 89:2624和W0 1999/64579] (改变玉米脂质谱的基因)。

[0223] (2) 通过FAD-2基因修饰提高油酸和/或通过FAD-3基因修饰降低亚麻酸 (参见, 美国专利号6,063,947、6,323,392、6,372,965和W0 1993/11245)。

[0224] (3) 改变共轭亚麻酸或亚油酸含量, 如在W0 2001/12800中。

[0225] (4) 改变LEC1, AGP, Dek1, Superall, mil ps, 各种Ipa基因如Ipa1、Ipa3、hpt或hggT。例如, 参见, W0 2002/42424、W0 1998/22604、W02003/011015、W0 2002/057439、W0 2003/011015、美国专利号6,423,886、6,197,561、6,825,397和美国专利申请公开号US 2003/0079247、US 2003/0204870和Rivera-Madrid, et al., (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92:5620-5624 [Rivera-Madrid等人, (1995), 美国国家科学院院刊, 92:5620-5624]。

[0226] (5) 编码用于制备长链多不饱和脂肪酸的 δ -8去饱和酶 (美国专利号8,058,571和

8,338,152),用于降低饱和脂肪的 δ -9去饱和酶(美国专利号8,063,269),用于改进 ω -3脂肪酸谱的报春花属 Δ 6-去饱和酶的基因。

[0227] (6)与脂质和糖代谢调节相关的分离的核酸和蛋白质,具体地,在生产转基因植物和调节种子储存化合物(包括脂质、脂肪酸、淀粉或种子贮藏蛋白)的水平的方法中使用的和在调节植物的种子大小、种子数、种子重量、根长和叶片大小的方法中使用的脂质代谢蛋白(LMP)(EP 2404499)。

[0228] (7)改变植物中糖诱导型2(HSI2)蛋白的高水平表达以增加或减少植物中HSI2的表达。增加HSI2的表达增加油含量,然而降低HSI2的表达降低脱落酸敏感性和/或增加抗旱性(美国专利申请公开号2012/0066794)。

[0229] (8)细胞色素b5(Cb5)单独的或与FAD2一起的表达调节植物种子中的油含量,特别是提高 ω -3脂肪酸的水平,并提高 ω -6脂肪酸与 ω -3脂肪酸的比例(美国专利申请公开号2011/0191904)。

[0230] (9)编码用于调节糖代谢的皱纹1样多肽的核酸分子(美国专利号8,217,223)。

[0231] (B)经改变的磷含量,例如,通过

[0232] (1)引入植酸酶编码基因将促进植酸盐的分解,向经转化的植物中添加更多的游离磷酸盐。例如,参见Van Hartingsveldt等人,(1993)Gene[基因]127:87,该文献披露了黑曲霉植酸酶基因的核苷酸序列。

[0233] (2)调节降低植酸盐含量的基因。例如,这可以在玉米中通过以下方法来完成:克隆然后重新引入与一个或多个等位基因相关联的DNA,例如在以低水平的植酸为特征的玉米突变体中经识别的LPA等位基因,例如WO 2005/113778中所述;和/或改变肌醇激酶活性,如WO 2002/059324、美国专利申请公开号2003/0009011、WO 2003/027243、美国专利申请公开号2003/0079247、WO 1999/05298、美国专利号6,197,561、美国专利号6,291,224、美国专利号6,391,348、WO 2002/059324、美国专利申请公开号2003/0079247、WO 1998/45448、WO 1999/55882、WO 2001/04147中所述。

[0234] (C)例如,通过改变影响淀粉分支模式的酶的基因而影响的改变的碳水化合物,或改变硫氧还蛋白如NTR和/或TRX(参见,美国专利号6,531,648,以此目的其通过引用结合)和/或 γ 玉蜀黍蛋白敲除或突变体如cs27或TUSC27或en27的基因(参见,美国专利号6,858,778和美国专利申请公开号2005/0160488、美国专利申请公开号2005/0204418,以此目的其通过引用结合)。参见,Shiroza,et al.,(1988)J.Bacteriol.170:810[Shiroza等人,(1988),细菌学杂志,170:810](链球菌突变果糖基转移酶基因的核苷酸序列),Steinmetz,et al.,(1985)Mol.Gen.Genet.200:220[Steinmetz等人,(1985),分子遗传学和基因组学,200:220](枯草芽孢杆菌果聚糖蔗糖酶基因的核苷酸序列),Pen,et al.,(1992)Bio/Technology 10:292[Pen等人,(1992),生物/技术,10:292](生产表达地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶的转基因植物),Elliot,et al.,(1993)PlantMolec.Biol.21:515[Elliot等人,(1993),植物分子生物学,21:515](番茄转化酶基因的核苷酸序列),Sogaard,et al.,(1993)J.Biol.Chem.268:22480[Sogaard 等人,(1993),生物化学杂志,268:22480](大麦 α -淀粉酶基因的定点诱变)和Fisher,et al.,(1993)Plant Physiol.102:1045[Fisher等人,(1993),植物生理学,102:1045](玉米胚乳淀粉分支酶II),WO 1999/10498(通过修饰UDP-

D-木糖4-差向异构酶、脆性1和2、Ref1、HCHL、C4H改进的消化性和/或淀粉提取),美国专利号6,232,529(通过改变淀粉水平(AGP)生产高油种子的方法)。在此提及的脂肪酸修饰基因也可用于通过淀粉和油途径的相互关系影响淀粉含量和/或组成。

[0235] (D)改变的抗氧化剂含量或组成,如改变生育酚或生育三烯酚。例如,参见,涉及操作抗氧化剂水平的美国专利号6,787,683、美国专利申请公开号2004/0034886和WO 2000/68393,和通过改变尿黑酸香叶基转移酶(hggt)的WO 2003/082899。

[0236] (E)改变的必需种子氨基酸。例如,参见,美国专利号6,127,600(增加种子中必需氨基酸积累的方法),美国专利号6,080,913(增加种子中必需氨基酸积累的二元方法),美国专利号5,990,389(高赖氨酸),WO 1999/40209(种子中氨基酸组成的变化),WO 1999/29882(用于改变蛋白质氨基酸含量的方法),美国专利号5,850,016(种子中氨基酸组成的改变),WO 1998/20133(具有增加必需氨基酸水平的蛋白质),美国专利号5,885,802(高甲硫氨酸),美国专利号5,885,801(高苏氨酸),美国专利号6,664,445(植物氨基酸生物合酶),美国专利号6,459,019(增加的赖氨酸和苏氨酸),美国专利号6,441,274(植物色氨酸合酶 β 亚基),美国专利号6,346,403(甲硫氨酸代谢酶),美国专利号5,939,599(高硫),美国专利号5,912,414(增加的甲硫氨酸),WO 1998/56935(植物氨基酸生物合酶),WO 1998/45458(具有较高百分比必需氨基酸的工程化种子蛋白),WO 1998/42831(增加的赖氨酸),美国专利号5,633,436(增加的硫氨基酸含量),美国专利号5,559,223(具有包含可编程水平的必需氨基酸的所定义结构的合成贮藏蛋白,用于改进植物的营养价值),WO 1996/01905(增加的苏氨酸),WO 1995/15392(增加的赖氨酸),美国专利申请公开号2003/0163838,美国专利申请公开号2003/0150014,美国专利申请公开号2004/0068767,美国专利号6,803,498,WO 2001/79516。

[0237] 4.控制雄性不育的基因:

[0238] 有几种赋予遗传性雄性不育的方法,例如赋予雄性不育的基因组内单独位置处的多个突变基因,如Brar等人在美国专利号4,654,465和4,727,219中所披露的,以及染色体易位,如Patterson在美国专利号3,861,709和3,710,511中所述。除了这些方法之外,Albertsen等人在美国专利号5,432,068中描述了细胞核雄性不育的系统,该系统包括:识别对雄性生育力至关重要的基因;沉默这种对雄性生育力至关重要的天然基因;从必需的雄性生育力基因中除去天然启动子并用诱导型启动子取代;将这种遗传工程化基因插回入该植物中;并因此产生雄性不育的植物,因为诱导型启动子不是“开”的,导致雄性生育力基因不被转录。通过诱导或将启动子打“开”来恢复生育力,该启动子反过来又允许赋予雄性生育力的基因被转录。

[0239] (A)在绒毡层特异性启动子的控制下并施用化学品N-Ac-PPT来引入脱乙酰酶基因(WO 2001/29237)。

[0240] (B)引入各种雄蕊特异性启动子(WO 1992/13956,WO 1992/13957)。

[0241] (C)引入barnase和barstar基因(Paul等人,(1992)Plant Mol.Biol.[植物分子生物学]19:611-622)。

[0242] 关于细胞核雄性和雌性不育系统和基因的另外的实例,也可参见美国专利号5,859,341;6,297,426;5,478,369;5,824,524;5,850,014和6,265,640,所有这些专利都通过引用并入本文。

[0243] 5. 创建用于位点特异性DNA整合的位点的基因

[0244] 这包括引入可能用于FLP/FRT系统中的FRT位点和可能用于Cre/Loxp系统中的Lox位点。例如,参见Lyznik等人(2003) Plant Cell Rep[植物细胞报告]21:925-932和WO 1999/25821,以上文献通过引用并入本文。可以使用的其他系统包括噬菌体Mu的Gin重组酶(Maeser, et al., (1991) Vicki Chandler, The Maize Handbook ch.118 [Maeser等人, (1991), Vicki Chandler, 玉米手册, 第118章] (施普林格出版社, 1994))、大肠杆菌的Pin重组酶(Enomoto等人, 1983)和pSRi质粒的R/RS系统(Araki等人, 1992)。

[0245] 6. 影响非生物胁迫抗性的基因

[0246] 包括但不限于开花, 穗和种子发育, 提高氮利用效率, 改变氮反应性, 抗旱性或耐旱性, 抗寒性或耐寒性, 抗盐性或耐盐性以及胁迫下产量的增加。

[0247] (A) 例如, 参见: WO 2000/73475, 其中通过改变苹果酸来改变用水效率; 美国专利 5,892,009、5,965,705、5,929,305、5,891,859、6,417,428、6,664,446、6,706,866、6,717,034、6,801,104、WO 2000/060089、WO 2001/026459、WO 2001/035725、WO 2001/034726、WO 2001/035727、WO 2001/036444、WO 2001/036597、WO 2001/036598、WO 2002/015675、WO 2002/017430、WO 2002/077185、WO 2002/079403、WO 2003/013227、WO 2003/013228、WO 2003/014327、WO 2004/031349、WO 2004/076638、WO 199809521。

[0248] (B) WO 199938977描述了基因(包括CBF基因)以及有效减轻冷冻、高盐度和干旱对植物的负面影响以及赋予植物表型其他积极作用的转录因子。

[0249] (C) 美国专利申请公开号2004/0148654和WO 2001/36596, 其中脱落酸在植物中被改变, 导致改进的植物表型, 如增加的产量和/或增加的对非生物胁迫的耐受性。

[0250] (D) WO 2000/006341、WO 2004/090143、美国专利号7,531,723和6,992,237, 其中细胞分裂素表达被修饰, 导致具有增加的胁迫耐受性的植物, 如耐旱性和/或增加的产量。还参见, WO 2002/02776、WO 2003/052063、JP 2002/281975、美国专利号6,084,153、WO 2001/64898、美国专利号6,177,275和美国专利号6,107,547(提高氮利用率和改变的氮反应性)。

[0251] (E) 对于乙烯改变, 参见美国专利申请公开号2004/0128719、美国专利申请公开号2003/0166197和WO 2000/32761。

[0252] (F) 对于植物转录因子或非生物胁迫的转录调节子, 参见, 例如, 美国专利申请公开号2004/0098764或美国专利申请公开号2004/0078852。

[0253] (G) 增加液泡焦磷酸酶如AVP1表达以提高产量的基因, (美国专利号8,058,515); 编码HSFA4或HSFA5的核酸(A4或A5类的热休克因子)多肽, 寡肽转运蛋白(OPT4样)多肽的核酸; 间隔期2样(PLA2样)多肽或Wuschel相关同源框1样(WOX1样)多肽(美国专利申请公开号US 2011/0283420)。

[0254] (H) 下调编码聚(ADP-核糖)聚合酶(PARP)蛋白的多核苷酸以调节程序性细胞死亡(美国专利号8,058,510)以增加活力。

[0255] (I) 编码用于赋予抗旱性的DTP21多肽的多核苷酸(美国专利申请公开号US 2011/0277181)。

[0256] (J) 编码ACC合酶3(ACS3)蛋白质的核苷酸序列, 用于调节发育、调节胁迫应答和调节胁迫耐受性(美国专利申请公开号US 2010/0287669)。

[0257] (K) 编码赋予耐旱表型 (DTP) 的蛋白质以赋予抗旱性的多核苷酸 (WO 2012/058528)。

[0258] (L) 赋予耐旱性和耐盐性的生育酚环化酶 (TC) 基因 (美国专利申请公开号2012/0272352)。

[0259] (M) CAAX氨基末端家族蛋白质,用于胁迫耐受性 (美国专利号8,338,661)。

[0260] (N) SAL1编码基因中的突变具有增加的胁迫耐受性,包括增加的抗旱性 (美国专利申请公开号2010/0257633)。

[0261] (O) 编码增加产量相关性状的多肽 (选自由GRF多肽、RAA1样多肽、SYR多肽、ARKL多肽和YTP多肽组成的组) 的核酸序列的表达 (美国专利申请公开号2011/0061133)。

[0262] (P) 调节植物中编码III类海藻糖磷酸酯酶 (TPP) 多肽的核酸的表达,用于增强植物中产量相关的性状,特别是增加种子产量 (美国专利申请公开号2010/0024067)。

[0263] 影响植物生长和农艺性状的其他基因和转录因子如产量,开花,植物生长和/或植物结构可以被引入或渗入植物,参见,例如,WO 1997/49811 (LHY)、WO 1998/56918 (ESD4)、WO 1997/10339和美国专利号6,573,430 (TFL)、美国专利号6,713,663 (FT)、WO 1996/14414 (CON)、WO 1996/38560、WO 2001/21822 (VRN1)、WO 2000/44918 (VRN2)、WO 1999/49064 (GI)、WO 2000/46358 (FR1)、WO 1997/29123、美国专利号6,794,560、美国专利号6,307,126 (GAI)、WO 1999/09174 (D8和Rht) 和WO 2004/076638和WO 2004/031349 (转录因子)。

[0264] 7. 赋予增加的产量的基因

[0265] (A) 由1-氨基环丙烷-1-羧酸脱氨酶多肽 (ACCDP) 编码核酸转化的转基因作物植物,其中在作物植物中核酸序列的表达导致与植物的野生型品种相比,植物的根生长增加和/或增加的产量,和/或对环境胁迫的耐受性增加 (美国专利号8,097,769)。

[0266] (B) 已显示,使用种子偏好性启动子的玉米锌指蛋白基因 (Zm-ZFP1) 的过表达能促进植物生长、增加每株植物的核数和总核重量 (美国专利申请公开号2012/0079623)。

[0267] (C) 已显示,玉米侧生器官界限 (LOB) 结构域蛋白 (Zm-LOBDP1) 的组成型过表达能增加每株植物的核数和总核重量 (美国专利申请公开号2012/0079622)。

[0268] (D) 通过调节植物中编码VIM1 (甲基化1中的变体) 样多肽或VTC2样 (GDP-L-半乳糖磷酸化酶) 多肽或DUF1685多肽或ARF6样 (生长素应答因子) 多肽 (WO 2012/038893) 的核酸的表达来增强植物中产量相关的性状。

[0269] (E) 调节植物中编码Ste20样多肽或其同系物的核酸的表达,得到相对于对照植物具有增加的产量的植物 (EP 243 1472)。

[0270] (F) 编码用于修饰植物根系结构的核苷二磷酸酶激酶 (NDK) 多肽及其同系物的基因 (美国专利申请公开号2009/0064373)。

[0271] 8. 赋予植物消化性的基因

[0272] (A) 通过调节木聚糖合成酶的表达来改变存在于植物细胞壁中的木聚糖水平 (美国专利号8,173,866)。

[0273] 在一些实施例中,堆叠的性状可以是已经获得包括但不限于具有监管许可的事件的监管许可的性状或事件,这些监管许可是本领域技术人员熟知的并且可以在环境风险评估中心 (cera-gmc.org/?action=gm_crop_database,其可以使用www前缀进行访问) 和在国际农业生物技术应用服务部门 (isaaa.org/gmaprovaldatabase/default.asp,其可以

使用www前缀进行访问)找到。

[0274] 基因沉默

[0275] 在一些实施例中,堆叠的性状可以处于一种或多种目的多核苷酸沉默的形式,导致抑制一种或多种靶标有害生物多肽。在一些实施例中,通过使用抑制DNA构建体来实现该沉默。

[0276] 在一些实施例中,将编码IPD073多肽的多肽或其片段或变体的一种或多种多核苷酸可以与编码具有如上所述的杀昆虫活性或农艺性状的一种或多种多肽的一种或多种多核苷酸堆叠,并且任选地可以进一步包括提供如下文所述一种或多种靶多核苷酸的基因沉默的一种或多种多核苷酸。

[0277] “抑制DNA构建体”是重组DNA构建体,当被转化或稳定整合到植物的基因组中时,导致该植物中靶基因的“沉默”。该靶基因对于该植物可以是内源性的或转基因的。本文中关于靶基因使用的“沉默”通常是指抑制由该靶基因表达的mRNA或蛋白质/酶的水平,和/或酶活性或蛋白质功能性的水平。术语“抑制”包括调低、降低、下降、减少、抑制、消除和预防。“沉默”或“基因沉默”并没有指定机制,并且包括但不限于反义、共抑制、病毒抑制、发夹抑制、茎环抑制、基于RNAi的方法和基于小RNA的方法。

[0278] 抑制DNA构建体可以包含衍生自目的靶基因的区域,并且可以包含目的靶基因的正义链(或反义链)的全部或部分核酸序列。取决于将要使用的方法,该区域可以与目的基因的全部或部分正义链(或反义链)100%相同或小于100%相同(例如,至少50%或者51%和100%相同之间的任何整数)。

[0279] 抑制DNA构建体是本领域所熟知的,一旦选择了目的靶基因就很容易构建,并且包括但不限于共抑制构建体、反义构建体、病毒抑制构建体、发夹抑制构建体、茎环抑制构建体、产生双链RNA的构建体、以及(更普遍地)RNAi(RNA干扰)构建体和小RNA构建体(如siRNA(短干扰RNA)构建体和miRNA(微小RNA)构建体)。

[0280] “反义抑制”是指能够抑制靶蛋白表达的反义RNA转录物的产生。

[0281] “反义RNA”是指与靶标初级转录物或mRNA的全部或部分互补、并且阻断靶标分离的核酸片段表达的RNA转录物(美国专利号5,107,065)。反义RNA可与特定基因转录物的任何部分,即5'非编码序列、3'非编码序列、内含子或编码序列互补。

[0282] “共抑制”是指能够抑制靶蛋白表达的正义RNA转录物的产生。“正义”RNA是指包括mRNA并且可在细胞内或体外翻译成蛋白质的RNA转录物。此前,已通过着眼于以正义方向过表达与天然mRNA具有同源性的核酸序列(其导致与过表达的序列具有同源性的所有RNA减少)设计出了植物中的共抑制构建体(参见,Vaucheret, et al., (1998) Plant J. 16:651-659 and Gura, (2000) Nature 404:804-808 [Vaucheret等人, (1998), 植物杂志, 16:651-659 和Gura, (2000), 自然, 404:804-808])。

[0283] 另一种变型描述了将植物病毒序列用于引导对近端mRNA编码序列的抑制(PCT公开W0 1998/36083)。

[0284] 最近的工作已经描述了并入互补方向上的全部或部分mRNA编码序列的“发夹”结构的用途,该“发夹”结构产生了已表达的RNA的潜在“茎-环”结构(PCT公开W0 1999/53050)。在这种情况下,该茎由对应于相对于启动子在正义或反义方向上插入的目的基因的多核苷酸形成,并且该环由目的基因的一些多核苷酸形成,这些多核苷酸在该构建体中

不具有互补序列。这增加了已回收的转基因植物中共抑制或沉默的频率。对于发夹抑制的综述,参见Wesley等人,(2003) *Methods in Molecular Biology, Plant Functional Genomics: Methods and Protocols* [分子生物学中的方法,植物功能基因组:方法和方案] 236:273-286。

[0285] 具有由来自待抑制的基因的至少30个核苷酸形成的茎和由随机核苷酸序列形成环的构建体也已被有效地用于抑制(PCT公开WO 1999/61632)。

[0286] 已经描述了使用聚-T和聚-A序列产生茎环结构中的茎(PCT公开WO 2002/00894)。

[0287] 然而另一种变型包括使用合成的重复序列来促进茎环结构中的茎的形成。已经证实,用这样的重组DNA片段制备的转基因生物体具有降低水平的由形成环的核苷酸片段编码的蛋白,如PCT公开WO 2002/00904中所述。

[0288] RNA干扰是指由短干扰性RNA (siRNA) 介导的动物中序列特异性转录后基因沉默的过程(Fire等人,(1998),自然,391:806)。在植物中的对应过程通常称为转录后基因沉默(PTGS)或RNA沉默,并且在真菌中又称为压制(quelling)。据信转录后基因沉默过程是用于防止外源基因表达的进化保守性细胞防御机制,并且通常由不同植物区系和门所共有(Fire, et al., (1999) *Trends Genet.* 15:358 [Fire等人,(1999),遗传学趋势,15:358])。这种防止外源基因表达的保护可能已经响应于双链RNA (dsRNA) 的产生而演变,这些双链RNA源自病毒侵染或源自通过细胞应答将转座子元件随机整合到宿主基因组中,该细胞应答特异性地破坏病毒基因组RNA的同源单链RNA。dsRNA在细胞中的存在通过尚未完全表征的机制来触发RNAi应答。

[0289] 细胞中长dsRNA的存在刺激被称为切丁酶(dicer)的核糖核酸酶III酶的活性。切丁酶参与将dsRNA加工成称为短干扰RNA (siRNA) 的dsRNA短片(Berstein等人,(2001) *Nature* [自然] 409:363)。衍生自切丁酶活性的短干扰RNA的长度通常为约21至约23个核苷酸并且包含约19个碱基对双链体(Elbashir等人,(2001) *Genes Dev.* [基因与发展] 15:188)。切丁酶也已经涉及从涉及翻译控制的保守结构的前体RNA中切除21-和22-核苷酸时序小RNA (stRNA) (Hutvagner等人,(2001) *Science* [科学] 293:834)。RNAi应答也是内切核酸酶复合物的特点,该内切核酸酶复合物通常被称为RNA诱导的沉默复合物(RISC),其介导与siRNA双链体的反义链具有序列互补性的单链RNA的切割。靶RNA的切割发生在与siRNA双链体的反义链互补的区域的中间(Elbashir等人,(2001) *Genes Dev.* [基因与发展] 15:188)。此外,RNA干扰还可以涉及小RNA (例如miRNA) 介导的基因沉默,推测是通过调节染色质结构的细胞机制,并且从而防止靶基因序列的转录(参见例如,Allshire,(2002) *Science* [科学] 297:1818-1819; Volpe等人,(2002) *Science* [科学] 297:1833-1837; Jenuwein,(2002) *Science* [科学] 297:2215-2218以及Hall等人,(2002) *Science* [科学] 297:2232-2237)。因此,本披露的miRNA分子可用于经由与RNA转录物的相互作用或者通过与特定基因序列的相互作用来介导基因沉默,其中这种相互作用导致转录或转录后水平的基因沉默。

[0290] 进一步提供了允许产生自沉默元件的RNAi增加的方法和组合物。在这类实施例中,这些方法和组合物采用第一多核苷酸,其包含有效地连接于在植物细胞中有活性的启动子的靶标有害生物序列的沉默元件;以及第二多核苷酸,其包含抑制增强子元件,该抑制增强子元件包含靶标有害生物序列或者与在植物细胞中有活性的启动子有效地连接的活性变体或其片段。具有抑制增强子元件的沉默元件的组合表达导致从该沉默元件产生的抑

制性RNA的扩增增加超过了仅单独通过该沉默元件的表达可实现的增加程度。除了特异性RNAi物种本身的扩增增加之外,这些方法和组合物进一步允许产生可以增强破坏靶基因表达的有效性的多种RNAi物种群体。正如,当抑制增强子元件在植物细胞中与沉默元件组合表达时,这些方法和组合物可以允许在整个植物内系统地产生RNAi;生产比仅单独用沉默元件构建体所能观察到的更大量的RNAi;以及更多的RNAi加载入植物韧皮部中,从而通过RNAi方法更好地防治取食韧皮部的昆虫。因此,各种方法和组合物提供了将抑制性RNA递送至靶生物体的改进方法。参见,例如,美国专利申请公开2009/0188008。

[0291] 如本文所使用的,“抑制增强子元件”包含如下多核苷酸,该多核苷酸包含待抑制的靶序列或者其活性片段或变体。应当认识到,抑制增强子元件不需要与靶序列相同,但是该抑制增强子元件可以包含该靶序列的变体,只要该抑制增强子元件与靶序列具有足够的序列同一性,以允许由该沉默元件产生的RNAi的水平增加超过仅通过该沉默元件的表达可达到的增加程度。类似地,该抑制增强子元件可以包含该靶序列的片段,其中该片段具有足够的长度以允许由该沉默元件产生的RNAi的水平增加超过仅通过该沉默元件表达可实现的增加程度。

[0292] 应当认识到,可以使用来自相同靶序列或来自不同靶序列或者来自相同靶序列的不同区域的多种抑制增强子元件。例如,所使用的抑制增强子元件可以包含衍生自靶序列的不同区域(即来自3'UTR、编码序列、内含子和/或5'UTR)的靶序列片段。此外,如本文别处所述,该抑制增强子元件可以包含在表达盒中,并且在具体实施例中,该抑制增强子元件在与该沉默元件相同或不同的DNA载体或构建体上。该抑制增强子元件可以有效地连接到如本文披露的启动子上。应当意识到,可以组成型或替代地表达抑制增强子元件,或可任选地,它可以以阶段特异性方式使用在此别处讨论的各种可诱导或组织优先的或发育调节的启动子产生。

[0293] 在具体实施例中,使用沉默元件和抑制增强子元件两者时,RNAi的系统性产生发生在整个植物中。在另外的实施例中,本披露的植物或植物部分具有比用单独的沉默元件构建体的表达所能观察到的更多的RNAi加载入植物韧皮部中,并且从而通过RNAi方法更好地防治取食韧皮部的昆虫。在具体实施例中,本披露的植物、植物部分和植物细胞可以进一步被表征为允许产生可以增强破坏靶基因表达的有效性的RNAi物种的多样性。

[0294] 在具体实施例中,沉默元件和抑制增强子元件的组合表达使植物细胞、植物、植物部分、植物组织或韧皮部中抑制性RNA的浓度增加超过单独表达该沉默元件时所能达到的增加水平。

[0295] 如本文所使用的,当与适当的对照植物相比时,“抑制性RNA的水平增加”包括在具有该组合表达的植物中产生的RNAi水平的任何统计学上显著的增加。例如,当与适当的对照相比时,植物、植物部分或植物细胞中RNAi水平的增加可以包含植物、植物部分、植物细胞或韧皮部中RNAi水平的至少约1%、约1%-5%、约5%-10%、约10%-20%、约20%-30%、约30%-40%、约40%-50%、约50%-60%、约60%-70%、约70%-80%、约80%-90%、约90%-100%或更高的增加。在其他实施例中,当与适当的对照相比时,植物、植物部分、植物细胞或韧皮部中RNAi水平的增加可以包含植物、植物部分、植物细胞或韧皮部中RNAi水平的至少约1倍、约1倍-5倍、约5倍-10倍、约10倍-20倍、约20倍-30倍、约30倍-40倍、约40倍-50倍、约50倍-60倍、约60倍-70倍、约70倍-80倍、约80倍-90倍、约90倍-100倍或更多倍的增加。用于控制

蟋象和草盲蟋的沉默元件与抑制增强子元件的组合表达的实例可以在美国专利申请公开2011/0301223和美国专利申请公开2009/0192117中找到。

[0296] 一些实施例涉及通过干扰核糖核酸 (RNA) 分子下调昆虫有害生物物种中靶基因的表达。PCT公开W0 2007/074405描述了抑制包括科罗拉多马铃薯甲虫在内的无脊椎动物有害生物中靶标基因表达的方法。PCT公开W0 2005/110068描述了抑制无脊椎动物有害生物 (特别是包括西方玉米根虫) 中靶标基因表达的方法, 该方法作为防治昆虫侵染的手段。此外, PCT公开W0 2009/091864描述了用于抑制来自昆虫有害生物物种 (包括来自草盲蟋属的有害生物) 的靶标基因的组合物和方法。核酸分子包括用于靶向液泡ATP酶H亚基的RNAi, 可用于控制如美国专利申请公开号2012/0198586中所述的鞘翅目有害生物群体和侵染。PCT公开W0 2012/055982描述了抑制或下调如下靶标基因的表达的核糖核酸 (RNA或双链RNA), 该靶标基因编码: 昆虫核糖体蛋白, 如核糖体蛋白L19、核糖体蛋白L40或核糖体蛋白S27A; 昆虫蛋白酶体亚基, 如Rpn6蛋白, Pros 25, Rpn2蛋白, 蛋白酶体 β 1亚基蛋白或Pros β 2蛋白; COPI囊泡的昆虫 β -外被体, COPI囊泡的 γ -外被体, COPI囊泡的 β' -外被体蛋白或 ζ -外被体; 昆虫四跨膜蛋白2A蛋白, 其是假定跨膜结构域蛋白; 属于肌动蛋白家族的昆虫蛋白, 如肌动蛋白5C; 昆虫泛素-5E蛋白; 昆虫Sec23蛋白, 其是参与细胞内蛋白质转运的GTP酶活化剂; 涉及运动活性的作为非常规肌球蛋白的昆虫皱纹蛋白质; 涉及核替代mRNA剪接调节的昆虫曲颈蛋白; 昆虫液泡H⁺-ATP酶G亚基蛋白和昆虫Tbp-1如Tat结合蛋白。美国专利申请公开2012/029750, US 20120297501、和2012/0322660描述了干扰核糖核酸 (RNA或双链RNA), 其在昆虫有害生物物种摄取时起作用以下调所述昆虫有害生物中靶基因的表达, 其中该RNA包含至少一个沉默元件, 其中该沉默元件是包含退火的互补链的双链RNA的区域, 该双链RNA中的一条链包含与靶基因内的靶核苷酸序列至少部分互补的核苷酸序列或由其组成。美国专利申请公开2012/0164205描述了用于干扰双链核糖核酸 (用于抑制无脊椎动物有害生物) 的潜在靶标, 包括: Chd3同源序列、 β -微管蛋白同源序列、40kDa V-ATP酶同源序列、EF1 α 同源序列、26S蛋白质体亚基p28同源序列、保幼激素环氧化物酶水解酶同源序列、溶胀依赖氯通道蛋白同源序列、葡萄糖-6-磷酸1-脱氢酶蛋白同源序列、Act42A蛋白同源序列、ADP-核糖因子1同源序列、转录因子IIB蛋白同源序列、几丁质酶同源序列、泛素缀合酶同源序列、甘油醛-3-磷酸脱氢酶同源序列、泛素B同源序列、保幼激素酯酶同系物、和 α 微管蛋白同源序列。

[0297] 在有害生物控制方面的用途

[0298] 在有害生物控制或使其他生物体工程化中使用包含实施例的核酸序列或其变体的菌株作为杀有害生物剂的一般方法是本领域已知的。参见例如美国专利号5,039,523和EP 0480762 A2。

[0299] 可以选择已知占据一种或多种目的作物的“植物圈”(叶面、叶际、根际和/或根面)的微生物宿主。选择这些微生物以便能够在具体环境中成功地与野生型微生物竞争, 为表达IPD073多肽的基因供给稳定的维持和表达, 并且理想的是, 增加对该杀有害生物剂的保护使其不受环境降解和失活的影响。

[0300] 可替代地, 通过将异源基因引入细胞宿主中来产生IPD073多肽。异源基因的表达直接或间接地导致杀有害生物剂在细胞内产生和维持。然后当将该细胞应用于一种或多种靶标有害生物的环境中时, 在延长该细胞中所产生的毒素的活性的条件下处理这些细胞。

所得产物保留该毒素的毒性。然后可以根据常规技术配制这些天然包封的IPD073多肽,以施用于靶标有害生物所寄宿的环境(例如,土壤、水和植物的叶子)中。参见,例如EPA 0192319及其中引用的参考文献。

[0301] 杀有害生物组合物

[0302] 在一些实施例中,活性成分可以以组合物的形式施用并且可以与其他化合物同时或相继施用于需要处理的作物区域或植物。这些化合物可以是在单次施用该配制品后允许长期对目标区域进行给予的肥料、除草剂、冷冻保护剂、表面活性剂、洗涤剂、杀有害生物肥皂、休眠油、聚合物和/或延时释放的或可生物降解的载体配制品。它们还可以是选择性除草剂、化学杀昆虫剂、杀病毒剂、杀微生物剂、杀变形虫剂、杀有害生物剂、杀真菌剂、杀细菌剂、杀线虫剂、杀软体动物剂或这些制剂中的若干种的混合物,如果希望的话,与在配制品领域内通常使用的其他农业上可接受的载体、表面活性剂或促进施用的佐剂一起。合适的载体和佐剂可以是固体或液体,并且相应于在配制技术中常常采用的物质,例如天然的或再生的矿物质、溶剂、分散剂、湿润剂、增粘剂、粘合剂或肥料。同样地,可将这些配制品制备成可食用的“诱饵”或塑造成有害生物“陷阱”以允许由靶有害生物来摄食或摄取该杀有害生物配制品。

[0303] 施用含有由细菌菌株产生的IPD073多肽中的至少一种的活性成分或农用化学组合物的方法包括叶子施用、种子包衣和土壤施用。施用次数和施用速度取决于相应有害生物侵染的强度。

[0304] 可以将组合物配制成粉末、尘剂、丸剂、颗粒、喷雾、乳液、胶体、溶液等,并且可以通过干燥、冻干、匀浆、萃取、过滤、离心、沉降或浓缩包含该多肽的细胞培养物等常规方法进行制备。在所有这类含有至少一种这样的杀有害生物多肽的组合物中,该多肽可以以按重量计从约1%至约99%的浓度存在。

[0305] 可以通过本披露的方法在给定区域中杀灭鳞翅目、双翅目、异翅目、线虫、半翅目或鞘翅目有害生物或减少其数量,或者可以预防性地将其施用于环境区域以防止易感有害生物的侵染。优选地,该有害生物摄入杀有害生物有效量的多肽或与其接触。本文所使用的“杀有害生物有效量”是指能够对至少一种有害生物造成死亡或显著减少有害生物生长、取食或正常生理发育的有害生物的量。该量将根据例如待防治的具体靶标有害生物,待处理的特定环境、地点、植物、作物或农业场所,环境条件以及杀有害生物有效的多肽组合物施用的方法、速率、浓度、稳定性和数量等因素而变化。配制品也可以根据气候条件、环境因素和/或施用频率和/或有害生物侵染的严重程度而变化。

[0306] 可以通过用所需的农业上可接受的载体配制细菌细胞、晶体和/或孢子悬浮液或分离的蛋白质组分来制备所需的杀有害生物剂组合物。可以在施用之前以适当方式(如冻干、冷冻干燥、干燥)或者在水性载体、培养基或合适的稀释剂(例如盐水或其他缓冲液)中配制这些组合物。配制的组合物可以是尘剂或颗粒状物质的形式或者在油(植物或矿物)或水或油/水乳液中的悬浮液或者作为可湿性粉剂或者与适用于农业应用的任何其他载体材料组合的形式。合适的农业载体可以是固体或液体,并且是本领域公知的。术语“农业上可接受的载体”涵盖通常用于杀有害生物剂配制品技术的所有佐剂、惰性组分、分散剂、表面活性剂、增粘剂、粘合剂等;这些是杀有害生物剂配制品技术人员所熟知的。配制品可以与一种或多种固体或液体佐剂混合,并通过各种方法(例如通过使用常规配制品技术将杀有

害生物组合物与合适的佐剂均匀混合、共混和/或研磨)制备。美国专利号6,468,523中描述了合适的配制品和施用方法,其通过引用并入本文。还可以用一种或多种化学组合物处理植物,该化学组合物包括一种或多种除草剂、杀昆虫剂或杀真菌剂。示例性化学组合物包括:果实/蔬菜除草剂:莠去津、除草定、敌草隆、草甘膦、利谷隆、嗪草酮、西玛津、氟乐灵、吡氟禾草灵、草铵膦、氯吡嘧磺隆Gowan、百草枯、戊炔草胺、烯禾啶、氟丙嘧草酯、氯吡嘧磺隆、茚嗪氟草胺 (Indaziflam); 果实/蔬菜杀昆虫剂:涕灭威、苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuriangiensis*)、甲萘威、克百威、毒死蜱、氯氰菊酯、溴氰菊酯、二嗪磷、马拉硫磷、阿维菌素、氟氯氰菊酯/ β -氟氯氰菊酯、高氰戊菊酯、 λ -氯氟氰菊酯、灭螨醌、联苯肼酯、甲氧虫酰肼、双苯氟脲、环虫酰肼、噻虫啉、呋虫胺、啉啉酯、啉啉酰胺、噻虫胺、螺螨酯、 γ -氯氟氰菊酯、螺甲螨酯、多杀菌素、氯虫酰胺、氰虫酰胺、Spinoteram、杀虫脒、螺虫乙酯、吡虫啉、氯虫双酰胺、硫双威、氰氟虫脒、氟啶虫胺脒、丁氟螨酯、Cyanopyrafen、吡虫啉、噻虫胺、噻虫啉、Spinotoram、硫双威、氟啶虫酰胺、甲硫威、因灭汀-苯甲酸盐、茚虫威、噻唑磷、苯线磷、硫线磷、蚊蝇醚、苯丁锡、噻螨酮、灭多威、4-[[(6-氯吡啶-3-基) 甲基] (2,2-二氟乙基) 氨基] 呋喃-2 (5H) -酮; 果实/蔬菜杀真菌剂:多菌灵、百菌清、EBDC、硫、甲基硫菌灵、啉菌酯、霜脍氰、氟啶胺、乙膦酸、异菌脲、醚菌酯、甲霜灵/精甲霜灵、肟菌酯、噻唑菌胺、丙森锌、肟菌酯、环酰菌胺、富马酸噁咪唑、氰霜唑、咪唑菌酮、苯酰菌胺、啉氧菌酯、吡唑醚菌酯、环氟菌胺、啉酰菌胺; 谷物除草剂:异丙隆、溴苯腈、碘苯腈、苯氧基类、氯磺隆、炔草酸、禾草灵、吡氟草胺、噁唑禾草灵、双氟磺草胺、氟草烟、甲磺隆、醚苯磺隆、氟酮磺隆、碘磺隆、丙苯磺隆、氟吡啶草胺、甲磺胺磺隆、氟丁酰草胺、啉啉草酯、啉啉磺隆、噻吩磺隆甲基、苯磺隆、氟啶嘧磺隆、磺酰磺隆、磺酰草吡啶、甲氧磺草胺、氟噻草胺、肟草酮、吡咯磺隆; 谷物杀真菌剂:多菌灵、百菌清、啉菌酯、环唑醇、啉菌环胺、丁苯吗啉、氟环唑、醚菌酯、啉氧灵、戊唑醇、肟菌酯、硅氟唑、啉氧菌酯、吡唑醚菌酯、醚菌胺、丙硫菌唑、氟啉菌酯; 谷物杀昆虫剂:乐果、 λ -氯氟氰菊酯、溴氰菊酯、 α -氯氟氰菊酯、 β -氟氯氰菊酯、联苯菊酯、吡虫啉、噻虫胺、噻虫啉、噻虫啉、啉啉酰胺、呋虫胺、Clorphyriphos、甲胺磷、乙酰甲胺磷、抗蚜威、甲硫威; 玉米除草剂:莠去津、甲草胺、溴苯腈、乙草胺、麦草畏、二氯吡啶酸、(S-) 二甲酚草胺、草铵膦、草甘膦、异噁唑草酮、(S-) 异丙甲草胺、甲基磺草酮、烟嘧磺隆、氟啉磺隆、砒啉磺隆、磺草酮、甲酰胺磺隆、苯吡啶草酮、环磺酮 (Tembotrione)、啉啉肟草酯、酮脲磺草吩酯、氟噻草胺、吡咯磺隆; 玉米杀昆虫剂:克百威、毒死蜱、联苯菊酯、氟虫脒、吡虫啉、 λ -氯氟氰菊酯、七氟菊酯、特丁硫磷、噻虫啉、噻虫胺、螺甲螨酯、氯虫双酰胺、杀虫脒、氯虫酰胺、溴氰菊酯、硫双威、 β -氟氯氰菊酯、氯氟菊酯、联苯菊酯、虱螨脲、杀虫隆、七氟菊酯、啉丙磷、乙虫脒、氰虫酰胺、噻虫啉、啉啉酰胺、呋虫胺、阿维菌素、甲硫威、螺螨酯、螺虫乙酯; 玉米杀真菌剂:种衣酯、福美双、丙硫菌唑、戊唑醇、肟菌酯; 稻除草剂:丁草胺、敌稗、四唑嘧磺隆、苄嘧磺隆、氰氟草酯、杀草隆、四唑酰草胺、啉啉磺隆、苯噻草胺、去稗安、吡啉磺隆、稗草畏、二氯喹啉酸、禾草丹、茚草酮、氟噻草胺、四唑酰草胺、氯吡嘧磺隆、去稗安、苯并双环酮、环酯草醚、五氟磺草胺、双草醚、丙炔噁草酮、乙氧嘧磺隆、丙草胺、甲基磺草酮、特呋三酮、噁草酮、噁唑禾草灵、吡丙醚; 稻杀昆虫剂:二嗪磷、杀螟硫磷、仲丁威、久效磷、丙硫克百威、噻嗪酮、呋虫胺、氟虫脒、吡虫啉、异丙威、噻虫啉、环虫酰肼、噻虫啉、呋虫胺、噻虫胺、乙虫脒、氯虫双酰胺、氯虫酰胺、溴氰菊酯、啉啉酰胺、噻虫啉、氰虫酰胺、多杀菌素、Spinotoram、因灭汀-苯甲酸盐、氯氟菊酯、毒死蜱、杀螟丹、甲胺磷、醚菊酯、三唑磷、4-[[(6-氯吡啶-3-基) 甲基] (2,2-二氟乙基) 氨基]

呋喃-2 (5H) - 酮、克百威、丙硫克百威；稻杀真菌剂：甲基硫菌灵、嘧菌酯、环丙酰菌胺、敌瘟磷、嘧菌胺、异稻瘟净、稻瘟灵、戊菌隆、噻菌灵、咯啶酮、三环唑、肟菌酯、双氯氰菌胺、氰菌胺、硅氟唑、噻酰菌胺；棉花除草剂：敌草隆、伏草隆、MSMA、乙氧氟草醚、扑草净、氟乐灵、唑草酮、烯草酮、吡氟禾草灵-丁基、草甘膦、达草灭、二甲戊乐灵、嘧硫草醚钠、三氟啶磺隆、得杀草、草铵膦、丙炔氟草胺、塞苯隆；棉花杀昆虫剂：乙酰甲胺磷、涕灭威、毒死蜱、氯氰菊酯、溴氰菊酯、马拉硫磷、久效磷、阿维菌素、啉虫脒、因灭汀-苯甲酸盐、吡虫啉、茚虫威、 λ -氯氟氰菊酯、多杀菌素、硫双威、 γ -氯氟氰菊酯、螺甲螨酯、啉虫丙醚、氟啉虫酰胺、氯虫双酰胺、杀虫脒、氯虫酰胺、 β -氟氯氰菊酯、螺虫乙酯、噻虫胺、噻虫嗪、噻虫啉、呋虫胺、氯虫双酰胺、氰虫酰胺、多杀菌素、Spinotoram、 γ -氯氟氰菊酯、4-[[(6-氯吡啶-3-基) 甲基] (2,2-二氟乙基) 氨基]呋喃-2 (5H) - 酮、硫双威、阿维菌素、氟啉虫酰胺、啉虫丙醚、螺甲螨酯、氟啉虫胺腈、丙溴磷、三唑磷、硫丹；棉花杀真菌剂：土菌灵、甲霜灵、啶硫磷；大豆除草剂：甲草胺、灭草松、氟乐灵、氯嘧磺隆-乙基、氯酯磺草胺、噁唑禾草灵、氟磺胺草醚、吡氟禾草灵、草甘膦、甲氧咪草烟、灭草嗪、咪草烟、(S-) 异丙甲草胺、嗪草酮、二甲戊乐灵、得杀草、草铵膦；大豆杀昆虫剂： λ -氯氟氰菊酯、灭多威、对硫磷、硫威 (Thiocarb)、吡虫啉、噻虫胺、噻虫嗪、噻虫啉、啉虫脒、呋虫胺、氯虫双酰胺、氯虫酰胺、氰虫酰胺、多杀菌素、Spinotoram、因灭汀-苯甲酸盐、氟虫腈、乙虫腈、溴氰菊酯、 β -氟氯氰菊酯、 γ 和 λ 氯氟氰菊酯、4-[[(6-氯吡啶-3-基) 甲基] (2,2-二氟乙基) 氨基]呋喃-2 (5H) - 酮、螺虫乙酯、螺螨酯、杀虫脒、氟啉虫酰胺、硫双威、 β -氟氯氰菊酯；大豆杀真菌剂：嘧菌酯、环唑醇、氟环唑、粉唑醇、吡唑醚菌酯、戊唑醇、肟菌酯、丙硫菌唑、四氟醚唑；甜菜除草剂：杀草敏、甜菜安、乙氧氟草黄、甜菜宁、野麦畏、二氯吡啶酸、吡氟禾草灵、环草定、苯嗪草酮、啶草酸、噻草酮、氟胺磺隆、得杀草、啶禾灵；甜菜杀昆虫剂：吡虫啉、噻虫胺、噻虫嗪、噻虫啉、啉虫脒、呋虫胺、溴氰菊酯、 β -氟氯氰菊酯、 γ / λ 氯氟氰菊酯、4-[[(6-氯吡啶-3-基) 甲基] (2,2-二氟乙基) 氨基]呋喃-2 (5H) - 酮、七氟菊酯、氯虫酰胺、氰虫酰胺、氟虫腈、克百威；卡诺拉除草剂：二氯吡啶酸、禾草灵、吡氟禾草灵、草铵膦、草甘膦、吡草胺、氟乐灵、胺苯磺隆、啶草酸、啶禾灵、烯草酮、得杀草；卡诺拉杀真菌剂：嘧菌酯、多菌灵、咯菌腈、异菌脲、丙氯灵、烯菌酮；卡诺拉杀昆虫剂：克百威、有机磷酸盐类、拟除虫菊酯、噻虫啉、溴氰菊酯、吡虫啉、噻虫胺、噻虫嗪、啉虫脒、呋虫胺、 β -氟氯氰菊酯、 γ 以及 λ 氯氟氰菊酯、 τ -氟氰胺菊酯、乙虫腈、多杀菌素、Spinotoram、氯虫双酰胺、氯虫酰胺、氰虫酰胺、4-[[(6-氯吡啶-3-基) 甲基] (2,2-二氟乙基) 氨基]呋喃-2 (5H) - 酮。

[0307] 在一些实施例中，除草剂是莠去津、除草定、敌草隆、氯磺隆、甲磺隆、噻吩磺隆甲基、苯磺隆、乙草胺、麦草畏、异噁唑草酮、烟嘧磺隆、砒嘧磺隆、嘧硫草醚钠、丙炔氟草胺、氯嘧磺隆-乙基、嗪草酮、啶禾灵、精-异丙甲草胺、环己通 (Hexazinne) 或其组合。

[0308] 在一些实施例中，杀昆虫剂是高氰戊菊酯、氯虫苯甲酰胺、灭多威、茚虫威、草氨酰或其组合。

[0309] 杀有害生物和杀昆虫活性

[0310] “有害生物”包括但不限于：昆虫、真菌、细菌、线虫、螨、蛭等。昆虫有害生物包括选自以下各目的昆虫：鞘翅目、双翅目、膜翅目、鳞翅目、食毛目、同翅目、半翅目、直翅目、缨翅目、革翅目、等翅目、虱目、蚤目、毛翅目等，特别是鳞翅目和鞘翅目。

[0311] 本领域的技术人员会知道，不是所有的化合物均对所有有害生物同样有效。实施例的化合物显示针对昆虫有害生物的活性，其可以包括经济上重要的农艺学、森林、温室、

苗圃观赏植物、食物和纤维,公共和动物健康,国内和商业结构,家庭和储存产品有害生物。

[0312] 鳞翅目幼虫包括但不限于:夜蛾科(Noctuidae)中的夜蛾、地老虎、尺蠖和实夜蛾亚科,草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda* JE Smith)(秋夜蛾(fall armyworm));甜菜夜蛾(*S.exigua* Hübner)(甜菜夜蛾(beet armyworm));斜纹夜蛾(*S.litura* Fabricius)(斜纹夜蛾(tobacco cutworm),茶蚕(cluster caterpillar));蓓带夜蛾(*Mamestra configurata* Walker)(披肩粘虫(bertha armyworm));甘蓝夜蛾(*Mbrassicae* Linnaeus)(菜夜蛾(cabbage moth));小地老虎(*Agrotis ipsion* Hufnagel)(黑切根虫(black cutworm));西方灰地老虎(*A.orthogonia* Morrison)(西部切根虫(western cutworm));粒肤地老虎(*A.subterranea* Fabricius)(粒肤切根虫(granulate cutworm));棉叶波纹夜蛾(*Alabama argillacea* Hübner)(棉叶虫(cotton leaf worm));粉纹夜蛾(*Trichoplusiani* Hübner)(甘蓝银纹夜蛾(cabbage looper));大豆尺夜蛾(大豆夜蛾);梨豆夜蛾(黎豆夜蛾);粗长须夜蛾(*Hypena scabra* Fabricius)(苜蓿绿夜蛾(green cloverworm));烟芽夜蛾(*Heliothis virescens* Fabricius)(烟青虫(tobacco budworm));一星黏虫(*Pseudaletia unipuncta* Haworth)(夜蛾);粗皮委夜蛾(*Athetis mindara* Barnes and McDunnough)(粗皮切根虫(rough skinned cutworm));暗缘地老虎(*Euxoa messoria* Harris)(暗黑切根虫(darksided cutworm));棉斑实蛾(*Earias insulana* Boisduval)(多刺螟蛉(spiny bollworm));翠纹钻夜蛾(*E.vittella* Fabricius)(斑点螟蛉(spotted bollworm));棉铃虫(*Helicoverpa armigera* Hübner)(美洲螟蛉(American bollworm));玉米穗虫(玉米穗蛾(corn earworm)或棉螟蛉(cotton bollworm));斑马纹夜蛾(*Melanchra picta* Harris)(斑马纹夜蛾(zebra caterpillar));柑橘夜蛾(*Egira(Xylomyges) curialis* Grote)(柑橘地老虎(citrus cutworm));来自螟蛾科欧洲玉米螟(*Ostrinia nubilalis* Hübner,European corn borer)的螟虫、鞘蛾、结网虫、锥形虫(coneworms)、和雕叶虫(skeletonizers);脐橙螟蛾(*Amyelois transitella* Walker)(脐橙螟(navah orange worm));地中海粉螟(*Anagasta kuehniella* Zeller)(地中海粉斑螟(Mediterranean flour moth));干果斑螟(*Cadra cautella* Walker)(粉斑螟(almond moth));二化螟(*Chilo suppressalis* Walker)(稻螟虫(rice stem borer));斑禾草螟(*C.partellus*)(高粱螟(sorghum borer));米螟(*Corcyra cephalonica* Stainton)(米蛾(rice moth));玉米根草螟(*Crambus caliginosellus* Clemens)(玉米根网虫(corn root webworm));早熟禾草螟(*C.teterrellus* Zincken)(早熟禾草螟(bluegrass webworm));稻纵卷叶螟(*Cnaphalocrocis medinalis* Guenée)(稻纵卷叶螟(rice leaf roller))葡萄里予螟(*Desmia funeralis* Hübner)(葡萄野螟(grape leaf folder));甜瓜绢野螟(*Diaphania hyalinata* Linnaeus)(甜瓜野螟(melon worm));黄瓜绢野螟(*D.nitidalis* Stoll)(泡菜虫(pickle worm));巨座玉米螟(*Diatraea grandiosella* Dyar)(西南玉米秆草螟(southwestern corn borer));蔗螟(*D.saccharalis* Fabricius)(甘蔗螟虫(surgarcane borer));墨西哥稻螟(*Eoreuma loftini* Dyar)(墨西哥稻螟(Mexican rice borer));烟草粉斑螟(*Ephestia elutella* Hübner)(烟草飞蛾(tobacco(cacao) moth));大蜡螟(*Galleria mellonella* Linnaeus)(大蜡蛾(greater wax moth));稻切叶野螟(*Herpetogrammalicarsialis* Walker)(草地螟(sod webworm));向日葵同斑螟(*Homoeosoma electellum* Hulst)(向日葵螟(sunflower moth));南美玉米苗斑螟

(*Elasmopalpus lignosellus* Zeller) (小玉米茎蛀虫 (lesser cornstalk borer)); 小蜡螟 (*Achroia grisella* Fabricius) (小蜡蛾 (lesser wax moth)); 草地螟 (*Loxostege sticticalis* Linnaeus) (草地螟 (beet webworm)); 茶树螟 (*Orthaga thyrisalis* Walker) (茶树蛾 (tea tree web moth)); 豆荚野螟 (*Maruca testulalis* Geyer) (豆荚蛀螟 (bean pod borer)); 印度谷螟 (*Plodia interpunctella* Hübner) (印度谷螟 (Indian meal moth)); 三化螟 (*Scirpophaga incertulas* Walker) (三化螟 (yellow stem borer)); 温室螟 (*Udea rubigalis* Guenée) (芹菜卷叶螟 (celery leaf tier)); 和卷蛾科 (*Tortricidae*) 中的卷叶虫、蚜虫、种实虫以及果实虫, 西部黑头长翅卷蛾 (*Accleris gloverana* Walsingham) (西部黑头蚜虫 (Western blackheaded budworm)); 东部黑头长翅卷蛾 (*A. variana* Fernald) (东部黑头蚜虫 (Eastern blackheaded budworm)); 果树黄卷蛾 (*Archips argyrospila* Walker) (果树卷叶蛾 (fruit tree leaf roller)); 罗萨娜黄卷蛾 (*A. rosana* Linnaeus) (欧洲卷叶蛾 (European leaf roller)); 和其他黄卷蛾属物种, 苹小卷叶蛾 (*Adoxophyes orana* Fischer von **Rösslerstamm**) (苹果小卷蛾 (summer fruit tortrix moth)); 条纹向日葵螟 (*Cochylis hospes* Walsingham) (带状向日葵斑蛾 (banded sunflower moth)); 榛小卷蛾 (*Cydia latiferreana* Walsingham) (filbertworm); 苹果蠹蛾 (*C. pomonella* Linnaeus) (苹果蚕蛾 (codling moth)); 杂色卷叶蛾 (*Platynota flavedana* Clemens) (色稻纵卷叶螟 (variegated leafroller)); 荷兰石竹小卷蛾 (*P. stultana* Walsingham) (杂食卷叶蛾 (omnivorous leafroller)); 鲜食葡萄小卷蛾 (*Lobesia botrana* Denis & Schiffermüller) (欧洲葡萄蛾 (European grape vine moth)); 苹白小卷蛾 (*Spilonota ocellana* Denis & Schiffermüller) (苹果芽小卷叶蛾 (eyespot bud moth)); 葡萄果实虫主虫 (*Endopiza viteana* Clemens) (葡萄小卷叶蛾 (grape berry moth)); 女贞细卷蛾 (*Eupoecilia ambiguella* Hübner) (葡萄果蠹蛾 (vine moth)); 巴西苹果卷叶虫 (*Bonagota salubricola* Meyrick) (巴西苹果小卷叶蛾 (Brazilian apple leafroller)); 东方果实蛾 (*Grapholita molesta* Busck) (梨小食心虫 (oriental fruit moth)); 向日葵芽蛾 (*Suleima helianthana* Riley) (向日葵芽蛾 (sunflower bud moth)); 带卷蛾属物种; 卷叶蛾属物种。

[0313] 鳞翅目中选择的其他农艺学有害生物包括但不限于秋星尺蠖 (*Alsophila pometaria* Harris) (秋星尺蠖 (fall cankerworm)); 桃条麦蛾 (*Anarsia lineatella* Zeller) (桃条麦蛾 (peach twig borer)); 栎橙纹犀额蛾 (*Anisota senatoria* J.E. Smith) (橙色斑纹橡木虫 (orange striped oakworm)); 柞蚕 (*Antheraea pernyi* Guérin-Méneville) (中橡木柞蚕虫 (Chinese Oak Tussock Moth)); 家蚕 (*Bombyx mori* Linnaeus) (桑蚕 (Silkworm)); 棉潜蛾 (*Bucculatrix thurberiella* Busck) (棉叶潜蛾 (cotton leaf perforator)); 纹黄豆粉蝶 (*Colias eurytheme* Boisduval) (苜蓿粉蝶 (alfalfa caterpillar)); 核桃舟蛾 (*Datana integerrima* Grote & Robinson) (核桃天社蛾 (walnut caterpillar)); 落叶松毛虫 (*Dendrolimus sibiricus* Tschetwerikov) (西伯利亚蚕蛾 (Siberian silk moth)); 白尺蠖蛾 (*Ennomos subsignaria* Hübner) (榆角尺蠖 (elm spanworm)); 菩提尺蠖 (*Erannis tiliaria* Harris) (椴尺蠖 (linden looper)); 黄毒蛾 (*Euproctis chrysorrhoea* Linnaeus) (棕尾毒蛾 (browntail moth)); 黑拟蛉蛾 (*Harrisina americana* Guérin-Méneville) (野棉花夜蛾 (grapeleaf skeletonizer)); 牧

草天蚕蛾 (*Hemileuca oliviae* Cockrell) (牧草天蚕蛾 (range caterpillar)); 美国白蛾 (*Hyphantria cunea* Drury) (美国白蛾 (fall webworm)); 番茄茎麦蛾 (*Keiferia lycopersicella* Walsingham) (番茄蛴虫 (tomato pinworm)); 东部铁杉尺蠖 (*Lambdina fiscellaria fiscellaria* Hulst) (东部铁杉尺蠖 (Eastern hemlock looper)); 西部铁杉尺蠖 (*L.fiscellaria lugubrosa* Hulst) (西部铁杉尺蠖 (Western hemlock looper)); 柳毒蛾 (*Leucoma salicis* Linnaeus) (雪毒蛾 (satin moth)); 舞毒蛾 (*Lymantria dispar* Linnaeus) (舞毒蛾 (gyPsy moth)); 番茄天蛾 (*Manduca quinquemaculata* Haworth, five spotted hawk moth, tomato hornworm); 烟草天蛾 (*M.sexata* Haworth) (番茄天蛾 (tomato hornworm), 烟草天蛾 (tobacco hornworm)); 冬尺蠖蛾 (*Operophtera brumata* Linnaeus) (冬尺蠖蛾 (winter moth)); 春尺蠖 (*Paleacrita vernata* Peck) (春尺蠖 (spring cankerworm)); 美洲大芷凤蝶 (*Papilio cresphontes* Cramer) (大黄带凤蝶 (giant swallowtail), 柑桔凤蝶 (orange dog)); 加州木角斗蛾 (*Phryganidia californica* Packard) (加州榲蛾 (California oakworm)); 柑桔潜蛾 (*Phyllocnistis citrella* Stainton) (柑桔潜叶蛾 (citrus leafminer)); 斑幕潜叶蛾 (*Phyllonorycter blancardella* Fabricius) (斑幕潜叶虫 (spotted tentiform leafminer)); 欧洲粉蝶 (*Pieris brassicae* Linnaeus) (大白粉蝶 (large white butterfly)); 菜青虫 (*P.rapae* Linnaeus) (小白粉蝶 (small white butterfly)); 暗脉菜粉蝶 (*P.napi* Linnaeus) (绿脉菜粉蝶 (green veined white butterfly)); 洋蓟葱羽蛾 (*Platyptilia carduidactyla* Riley) (洋蓟羽蛾 (artichoke plume moth)); 小菜蛾 (*Plutella xylostella* Linnaeus) (小菜蛾 (diamondback moth)); 棉红铃虫 (*Pectinophora gossypiella* Saunders) (粉螟蛉 (pink bollworm)); 多形云粉蝶 (*Pontia protodice* Boisduval and Leconte) (南方菜青虫 (Southern cabbageworm)); 杂食尺蠖 (*Sabulodes aegrotata* Guenée) (杂食尺蠖 (omnivorous looper)); 红抚天社蛾 (*Schizura concinna* J.E.Smith) (红疣天社蛾 (red humped caterpillar)); 麦蛾 (*Sitotroga cerealella* Olivier) (麦蛾 (Angoumois grain moth)); 松异带蛾 (*Thaumetopoea pityocampa* Schiffermuller) (松树列队毛虫 (pine processionary caterpillar)); 幕谷蛾 (*Tineola bisselliella* Hummel) (负袋夜蛾 (webbing clothesmoth)); 番茄斑潜蝇 (*Tuta absoluta* Meyrick) (番茄斑潜蝇 (tomato leafminer)); 苹果巢蛾 (*Yponomeuta padella* Linnaeus) (巢蛾 (ermine moth)); *Heliothis subflexa* Guenée; 天幕毛虫属 (*Malacosoma*) 物种和古毒蛾属 (*Orgyia*) 物种

[0314] 目的是鞘翅目的幼虫和成体, 其包括来自长角象科 (*Anthribidae*)、豆象科 (*Bruchidae*) 和象甲科 (*Curculionidae*) 的象鼻虫 (包括但不限于: 墨西哥棉铃象 (*Anthonomus grandis* Boheman) (棉铃象甲 (boll weevil)); 稻水象甲 (*Lissorhoptrus oryzophilus* Kuschel) (稻水象虫 (rice water weevil)); 谷象 (*Sitophilus granarius* Linnaeus) (谷象 (granary weevil)); 米象 (*S.oryzae* Linnaeus) (米象 (rice weevil)); 三叶草叶象 (*Hypera punctata* Fabricius) (车轴草叶象虫 (clover leaf weevil)); 密点细枝象 (*Cylindrocopturus adspersus* LeConte) (向日葵茎象鼻虫 (sunflower stem weevil)); 黄褐小爪象 (*Smicronyx fulvus* LeConte) (红葵花籽象甲 (red sunflower seed weevil)); 灰色小爪象 (*S.sordidus* LeConte) (灰葵花籽象甲 (gray sunflower seed weevil)); 玉米隐啄象 (*Sphenophorus maidis* Chittenden) (玉米象虫 (maize

billbug))) ; 叶甲科 (Chrysomelidae) 的跳甲、黄瓜叶甲、根虫、叶甲、马铃薯叶甲以及潜叶虫 (包括但不限于: 马铃薯叶甲 (*Leptinotarsa decemlineata* Say) (马铃薯甲虫 (Colorado potato beetle)); 玉米根萤叶甲 (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) (西方玉米根虫); 北方玉米根虫 (*D. barberi* Smith and Lawrence) (北方玉米根虫 (northern corn rootworm)); 黄瓜十一星叶甲食根亚种 (*D. undecimpunctata howardi* Barber) (南方玉米根虫 (southern corn rootworm)); 玉米铜色跳甲 (*Chaetocnema pulicaria* Melsheimer) (玉米跳甲 (corn flea beetle)); 十字花科跳甲 (*Phyllotreta cruciferae* Goeze) (十字花科蔬菜跳甲 (Crueifer flea beetle)); 黄曲条跳甲 (*Phyllotreta striolata*) (黄曲条跳甲 (stripped flea beetle)); 肖叶甲褐斑 (*Colaspis brunnea* Fabricius) (葡萄肖叶甲 (grape colaspis)); 橙足负泥虫 (*Oulema melanopus* Linnaeus) (谷叶甲虫 (cereal leaf beetle)); 向日葵叶甲 (*Zygogramma exclamationis* Fabricius) (向日葵叶甲 (sunflower beetle))) ; 来自瓢虫科 (Coccinellidae) 的甲虫 (包括但不限于: 墨西哥豆瓢虫 (*Epilachna varivestis* Mulsant) (墨西哥豆瓢虫 (Mexican bean beetle))) ; 金龟子和来自金龟子科 (Scarabaeidae) 的其他甲虫 (包括但不限于: 日本丽金龟 (*Popillia japonica* Newman) (日本金龟子 (Japanese beetle)); 北方圆头犀金龟 (*Cyclocephala borealis* Arrow) (北方独角仙 (northern masked chafer), 白蛴螬 (white grub)); 南方圆头犀金龟 (*C. immaculata* Olivier) (南方独角仙 (southern masked chafer), 白蛴螬 (white grub)); 欧洲切根鳃金龟 (*Rhizotrogus majalis* Razoumowsky) (欧洲金龟子 (European chafer)); 长毛食叶然金龟 (*Phyllophaga crinita* Burmeister) (白蛴螬 (white grub)); 胡萝卜金龟 (*Ligyrus gibbosus* De Geer) (胡萝卜金龟 (carrot beetle))) ; 来自皮蠹科的皮蠹; 来自叩甲科, 伪金针虫属物种, 梳爪叩头虫属物种的金针虫; 宽胸叩头虫属物种; *Limonius* 属物种; 缺隆叩甲属物种; *Ctenicera* 属物种; *Aeolus* 属物种; 来自小蠹科 (Scolytidae) 的树皮甲虫和来自拟步甲科 (Tenebrionidae) 的甲虫。

[0315] 双翅目 (Diptera) 的成体和未成熟体是目的, 包括潜叶虫美洲黍潜叶蝇 (*Agromyza parvicornis* Loew) (玉米斑潜叶蝇 (corn blotch leafminer)); 摇蚊科 (包括但不限于: 高粱瘿蚊 (*Contarinia sorghicola* Coquillett) (高粱瘿蚊 (sorghum midge)); 黑森瘿蚊 (*Mayetiola destructor* Say) (黑森蝇 (Hessian fly)); 麦红吸浆虫 (*Sitodiplosis mosellana* Géhin) (小麦吸浆虫 (wheat midge)); 葵花籽蚊 (*Neolasioptera murtfeldtiana* Felt), (向日葵籽瘿蚊 (sunflower seed midge))) ; 果蝇 (实蝇科 (Tephritidae))、瑞典麦秆蝇 (*Oscinella frit* Linnaeus) (果蝇 (frit flies)); 蛆虫 (包括但不限于: 灰地种蝇 (*Delia platura* Meigen) (种蝇 (seedcorn maggot)); 麦地种蝇 (*D. coarctata* Fallen) (麦种蝇 (wheat bulb fly)) 和其他地种蝇属, 美洲麦秆蝇 (*Meromyza americana* Fitch) (美洲麦秆蝇 (wheat stemmaggot)); 家蝇 (*Musca domestica* Linnaeus) (家蝇 (house flies)); 夏厕蝇 (*Fannia canicularis* Linnaeus)、小舍蝇 (*F. femoralis* Stein) (小家蝇 (lesser houseflies)); 厩螯蝇 (*Stomoxys calcitrans* Linnaeus) (螯蝇 (stable flies)); 秋家蝇, 角蝇, 绿头苍蝇, 金蝇属; 蝇属物种和其他麝香蝇 (muscoïd fly) 有害生物、马蝇虻属 (*Tabanus*) 物种; 肤蝇胃蝇属 (*Gastrophilus*) 物种; 狂蝇属 (*Oestrus*) 物种; 纹皮蝇皮蝇属 (*Hypoderma*) 物种; 鹿蝇斑虻属 (*Chrysops*) 物种; 绵羊虱蝇 (*Melophagus ovinus* Linnaeus) (绵羊虻) 和其他短角亚目, 蚊子伊蚊属 (*Aedes*) 物种; 疟

蚊属 (*Anopheles*) 物种;家蚊属 (*Culex*) 物种;黑蝇原蚋属 (*Prosimulium*) 物种;蚋属 (*Simulium*) 物种;吸血蠓、沙蝇、眼菌蚊 (*sciarid*) 和其他长角亚目 (*Nematocera*)。

[0316] 作为目的昆虫包括了半翅目和同翅目的成体和若虫,如但不限于:来自球蚜科 (*Adelgidae*) 的球蚜、来自盲蝽科 (*Miridae*) 的盲蝽、来自蝉科 (*Cicadidae*) 的蝉、叶蝉、小绿叶蝉属 (*Empoasca*) 物种;来自叶蝉科的,来自菱蜡蝉科 (*Cixiidae*)、青翅飞虱科 (*Flatidae*)、蜡蝉总科 (*Fulgoroidea*)、瓢蜡蝉科 (*Issidae*) 和 (*Delphacidae*) 的飞虱,来自角蝉科 (*Membracidae*) 的角蝉,来自木虱科 (*Psyllidae*) 的木虱,来自粉虱科 (*Aleyrodidae*) 的粉虱,来自蚜科 (*Aphididae*) 的蚜虫,来自根瘤蚜科 (*Phylloxeridae*) 的葡萄根瘤蚜,来自粉蚧科 (*Pseudococcidae*) 的粉蚧,来自链介壳虫科 (*Asterolecanidae*)、蚧科 (*Coccidae*)、粉蚧科 (*Dactylopiidae*)、盾蚧科 (*Diaspididae*)、绒蚧科 (*Eriococcidae*)、旌介壳虫科 (*Ortheziidae*)、刺葵介壳虫科 (*Phoenicococcidae*) 和绵蚧科 (*Margarodidae*) 的介壳虫,来自网蝽科的网蝽,来自蝽科 (*Pentatomidae*) 的椿象,长蝽 (*cinch bug*),土长蝽属物种;和来自长蝽科的其他长蝽,来自沫蝉科的沫蝉,来自缘蝽科的瓜椿象和来自红蝽科的秋恙蝽和污棉虫。

[0317] 来自同翅目的农艺重要成员进一步包括但不限于:豌豆蚜 (*Acyrtosiphon pisum* Harris) (豌豆蚜虫 (*pea aphid*));黑豆蚜 (*Aphis craccivora* Koch) (蚕豆蚜 (*cowpea aphid*));黑豆蚜 (*A.fabae* Scopoli) (蚕豆蚜 (*black bean aphid*));棉蚜 (*A.gossypii* Glover) (棉蚜 (*cotton aphid*)),瓜叶菊蚜虫 (*melon aphid*));玉米根蚜 (*A.maidiradicis* Forbes) (玉米根蚜 (*corn root aphid*));苹果黄蚜 (*A.pomi* De Geer) (苹蚜 (*apple aphid*));绣线菊蚜 (*A.spiraecola* Patch) (绣线菊蚜 (*spirea aphid*));茄粗额蚜 (*Aulacorthum solani* Kalténbach) (指顶花无网长管蚜 (*foxglove aphid*));草莓钉蚜 (*Chaetosiphon fragaefolii* Cockerell) (草莓毛管蚜 (*strawberry aphid*));麦双尾蚜 (*Diuraphis noxia* Kurdjumov/Mordvilko) (俄罗斯小麦蚜虫 (*Russian wheat aphid*));车前圆尾蚜 (*Dysaphis plantaginea* Paaserini) (苹粉红劣蚜 (*rosy apple aphid*));苹果绵蚜 (*Eriosoma lanigerum* Hausmann) (苹果绵蚜 (*woolly apple aphid*));甘蓝蚜 (*Brevicoryne brassicae* Linnaeus) (菜蚜 (*cabbage aphid*));桃粉大尾蚜 (*Hyalopterus pruni* Geoffroy) (桃大尾蚜 (*mealy plum aphid*));萝卜蚜 (*Lipaphis erysimi* Kalténbach) (萝卜蚜 (*turnip aphid*));麦无网长管蚜 (*Metopolophium dirrhodum* Walker) (麦蚜虫 (*cereal aphid*));马铃薯长管蚜 (*Macrosiphum euphorbiae* Thomas) (马铃薯蚜 (*potato aphid*));桃蚜 (*Myzus persicae* Sulzer) (桃蚜 (*peach-potato aphid*, *green peach aphid*));莴苣衲长管蚜 (*Nasonovia ribisnigri* Mosley) (莴苣蚜 (*lettuce aphid*));瘿绵对属 (*Pemphigus*) 物种 (根蚜虫 (*root aphids*) 和倍蚜 (*gall aphids*));玉米蚜 (*Rhopalosiphum maidis* Fitch) (玉米蚜 (*corn leaf aphid*));禾谷缢管蚜 (*R.padi* Linnaeus) (禾谷缢管蚜 (*bird cherry-oat aphid*));麦二叉蚜 (*Schizaphis graminum* Rondani) (麦二叉蚜 (*greenbug*));牛鞭草蚜 (*Sipha flava* Forbes) (甘蔗黄蚜 (*yellow sugarcane aphid*));麦长管蚜 (*Sitobion avenae* Fabricius) (麦长管蚜 (*English grain aphid*));苜蓿斑蚜 (*Therioaphis maculata* Buckton) (苜蓿斑蚜 (*spotted alfalfa aphid*));茶二叉蚜 (*Toxoptera aurantii* Boyer de Fonscolombe) (黑色柑橘蚜 (*black citrus aphid*) 和褐色橘蚜 (*T.citricida* Kirkaldy) (桔二叉蚜 (*brown citrus aphid*));

球属 (*Adelges*) 物种 (球蚜 (*adelgids*)); 长山核桃根瘤蚜 (*Phylloxera devastatrix* Pergande) (山胡桃根瘤蚜 (*pecan phylloxera*)); 烟粉虱 (*Bemisia tabaci* Gennadius) (烟粉虱 (*tobacco whitefly*), 甘薯粉虱 (*sweetpotato whitefly*)); 银叶粉虱 (*B. argentifolii* Bellows & Perring) (银叶粉虱 (*silverleaf whitefly*)); 柑橘粉虱 (*Dialeurodes citri* Ashmead) (柑桔粉虱 (*citrus whitefly*)); 结翅白粉虱 (*Trialeurodes abutiloneus*) (带状翅白粉虱 (*bandedwinged whitefly*)) 和温室粉虱 (*T. vaporariorum* Westwood) (温室粉虱 (*greenhouse whitefly*)); 马铃薯小绿叶蝉 (*Empoasca fabae* Harris) (马铃薯叶蝉 (*potato leafhopper*)); 灰飞虱 (*Laodelphax striatellus* Fallen) (灰飞虱 (*smaller brown planthopper*)); 二点叶蝉 (*Macrolestes quadrilineatus* Forbes) (紫菀叶蝉 (*aster leafhopper*)); 黑尾叶蝉 (*Nephotettix cincticeps* Uhler) (绿叶蝉 (*green leafhopper*)); 二条斑黑尾叶蝉 (*N. nigropictus* Stål) (稻叶蝉 (*rice leafhopper*)); 褐飞虱 (*Nilaparvata lugens* Stål) (褐飞虱 (*brown planthopper*)); 玉米蜡蝉 (*Peregrinus maidis* Ashmead) (玉米飞虱 (*corn planthopper*)); 白背飞虱 (*Sogatella furcifera* Horvath) (白背飞虱 (*white-backed planthopper*)); 稻条背飞虱 (*Sogatodes orizicola* Muir) (稻飞虱 (*rice delphacid*)); 苹果白叶蝉 (*Typhlocyba pomaria* McAtee) (苹白小叶蝉 (*white apple leafhopper*)); 葡萄斑叶蝉属 (*Erythroneoura*) 物种 (葡萄叶蝉 (*grape leafhoppers*)); 十七年蝉 (*Magicicada septendecim* Linnaeus) (周期蝉 (*periodical cicada*)); 吹绵蚧 (*Icerya purchasi* Maskell) (吹绵蚧 (*cottony cushion scale*)); 梨圆蚧 (*Quadraspidiotus perniciosus* Comstock) (梨圆蚧 (*San Jose scale*)); 臀纹粉蚧 (*Planococcus citri* Risso) (桔粉蚧 (*citrus mealybug*)); 粉蚧属 (*Pseudococcus*) 物种 (其他粉蚧系群); 梨木虱 (*Cacopsylla pyricola* Foerster) (梨木虱 (*pear psylla*)); 柿木虱 (*Trioza diospyri* Ashmead) (柿木虱 (*persimmon psylla*))。

[0318] 来自半翅目的目的农艺重要物种包括但不限于: 拟绿蝽 (*Acrosternum hilare* Say) (稻绿蝽 (*green stink bug*)); 南瓜缘蝽 (*Anasa tristis* De Geer) (南瓜虫 (*squash bug*)); 美洲谷长蝽 (*Blissus leucopterus leucopterus* Say) (麦长蝽 (*chinch bug*)); 方翅网蝽 (*Corythuca gossypii* Fabricius) (棉网蝽 (*cotton lace bug*)); 番茄蝽 (*Cyrtopeltis modesta* Distant) (番茄蝽 (*tomato bug*)); 棉蝽 (*Dysdercus suturellus* Herrich-Schäffer) (棉红蝽 (*cotton stainer*)); 褐臭蝽 (*Euschistus servus* Say) (褐臭蝽 (*brown stink bug*)); 一斑臭蝽 (*E. variolarius* Palisot de Beauvois) (一斑臭蝽 (*one-spotted stink bug*)); 长蝽属 (*Graptostethus*) 物种 (果实蝽系群 (*complex of seed bugs*)); 松叶根蝽 (*Leptoglossus corculus* Say) (松叶根蝽 (*leaf-footed pine seed bug*)); 美洲牧草盲蝽 (*Lygus lineolaris* Palisot de Beauvois) (牧草盲蝽 (*tarnished plant bug*)); 牧草盲蝽 (*L. hesperus* Knight) (西部牧草盲蝽 (*Western tarnished plant bug*)); 牧草盲蝽 (*L. pratensis* Linnaeus) (牧草盲蝽 (*common meadow bug*)); 长毛草盲蝽 (*L. rugulipennis* Poppius) (长毛草盲蝽 (*European tarnished plant bug*)); 长绿盲蝽 (*Lygocoris pabulinus* Linnaeus) (苹绿盲蝽 (*common green capsid*)); 稻绿蝽 (*Nezara viridula* Linnaeus) (南方绿椿象 (*southern green stink bug*)); 美洲稻蝽 (*Oebalus pugnax* Fabricius) (稻褐蝽 (*rice stink bug*)); 马利筋长蝽 (*Oncopeltus fasciatus*

Dallas) (大马利筋长蝽 (large milkweed bug)); 棉跳盲蝽 (*Pseudatomoscelis seriatus* Reuter) (棉跳盲蝽 (cotton fleahopper))。

[0319] 此外, 实施例可以对半翅目有效, 如草莓蝽 (*Calocoris norvegicus* Gmelin) (草莓长蝽 (strawberry bug)); *Orthops campestris* Linnaeus; 苹果盲蝽 (*Plesiocoris rugicollis* Fallen) (苹盲蝽 (apple capsid)); 番茄蝽 (*Cyrtopeltis modestus* Distant) (番茄蝽 (tomato bug)); 黑斑烟盲蝽 (*Cyrtopeltis notatus* Distant) (吸蝇 (suckfly)); 白斑盲蝽 (*Spanagonicus albofasciatus* Reuter) (白斑盲蝽 (whitemarked fleahopper)); 皂荚蝽 (*Diaphnocoris chlorionis* Say) (皂角蝽 (honeylocust plant bug)); 洋葱蝽 (*Labopidicola allii* Knight) (葱盲蝽 (onion plant bug)); 棉盲蝽 (*Pseudatomoscelis seriatus* Reuter) (棉盲蝽 (cotton fleahopper)); 苜蓿褐盲蝽 (*Adelphocoris rapidus* Say) (苜蓿褐盲蝽 (rapid plant bug)); 四线盲蝽 (*Poecilocapsus lineatus* Fabricius) (四线叶虫 (four-lined plant bug)); 小长蝽 (*Nysius ericae* Schilling) (多彩长蝽 (false chinch bug)); 假麦长蝽 (*Nysius raphanus* Howard) (假麦长蝽 (false chinch bug)); 稻绿蝽 (*Nezara viridula* Linnaeus) (南方绿椿象 (Southern green stink bug)); 扁盾蝽属 (*Eurygaster* spp.) 物种; 缘蝽属 (*Coreidae* spp.) 物种; 红蝽属 (*Pyrrhocoridae* spp.) 物种; 谷蛾属 (*Tinidae* spp.) 物种; *Blostomatidae* 属物种; 猎蝽科 (*Reduviidae*) 物种和臭虫科 (*Cimicidae*) 物种。

[0320] 另外, 包括蜱螨目 (*Acari*) (螨类) 的成体和幼虫, 如小麦瘤瘿螨 (*Aceria tosichella* Keifer) (小麦卷叶螨 (wheat curl mite)); 麦岩螨 (*Petrobia latens* Müller) (褐色小麦螨 (brown wheat mite)); 在叶螨科 (*Tetranychidae*) 中蜘蛛螨和红螨, 苹果全爪螨 (*Panonychus ulmi* Koch) (欧洲红螨 (European red mite)); 二斑叶螨 (*Tetranychus urticae* Koch) (二点叶螨 (two spotted spider mite)); 迈叶螨 (*T. mcdanieli* McGregor) (迈叶螨 (McDaniel mite)); 朱砂叶螨 (*T. cinnabarinus* Boissduval) (朱砂叶螨 (carmine spider mite)); 土耳其斯坦叶螨 (*T. turkestanii* Ugarov & Nikolski) (土耳其斯坦叶螨 (strawberry spider mite)); 细须螨科中的葡萄短须螨, 桔短须螨 (*Brevipalpus lewisi* McGregor) 桔短须螨 (citrus flat mite); 瘿螨科 (*Eriophyidae*) 中的锈螨和芽瘿螨以及其他食叶螨和对人类和动物健康重要的螨, 即表皮螨科 (*Epidermoptidae*) 的尘螨、蠕形螨科 (*Demodicidae*) 的毛囊螨、食甜螨科 (*Glycyphagidae*) 的谷螨, 硬蜱科 (*Ixodidae*) 的蜱。黑脚硬蜱 (*Ixodes scapularis* Say) (鹿蜱 (deer tick)); 全环硬蜱 (*I. holocyclus* Neumann) (澳大利亚致瘫痪蜱 (Australian paralysis tick)); 变异矩头蜱 (*Dermacentor variabilis* Say) (美洲犬蜱 (American dog tick)); 美洲钝眼蜱 (*Amblyomma americanum* Linnaeus) (孤星蜱 (lone star tick)) 以及在痒螨科、蒲螨科和疥螨科中的痒螨和疥螨。

[0321] 缨尾目 (*Thysanura*) 的昆虫有害生物是目的, 如衣鱼 (*Lepisma saccharina* Linnaeus) (蠹虫 (silverfish)); 斑衣鱼 (*Thermobia domestica* Packard) (小灶衣鱼 (firebrat))。

[0322] 所覆盖的另外节肢动物有害生物包括: 蛛蛛目中的蜘蛛如褐隐毒蛛 (*Loxosceles reclusa* Gertsch and Mulaik) (褐皮花蛛 (brown recluse spider)) 和黑寡妇蜘蛛 (*Latrodectus mactans* Fabricius) (黑寡妇毒蛛 (black widow spider)), 以及蛭蜒目

(Scutigera) 中的蜈蚣如蚰蜒 (*Scutigera coleoptrata* Linnaeus) (蚰蜒 (house centipede))。

[0323] 感兴趣的昆虫包括椿象和其他相关昆虫的超家族,包括但不限于属于以下各科的物种:蝽科(稻绿蝽、茶翅蝽 (*Halyomorpha halys*)、*Piezodorus guildini*、褐臭蝽、拟绿蝽、英雄美洲蝽 (*Euschistus heros*)、美洲蝽 (*Euschistus tristigma*)、拟绿蝽、褐蝽 (*Dichelops melacanthus*)、和蓓蝽 (*Bagrada hilaris*) (蓓蝽 (*Bagrada* Bug)))、龟蝽科 (*Plataspidae*) (筛豆龟蝽 (*Megacocta cribraria*) - 豆平腹蝽 (Bean plataspid)) 和土蝽科 (*Scaptocoris castanea*-Root stink bug), 以及鳞翅目物种包括但不限于:小菜蛾,例如,玉米穗虫;大豆夜蛾,例如,大豆尺夜蛾和黎豆夜蛾,例如,梨豆夜蛾。

[0324] 用于测量杀有害生物活性的方法是本领域中所熟知的。参见,例如,Czapla和Lang, (1990) *J. Econ. Entomol.* [经济昆虫学杂志] 83:2480-2485; Andrews等人, (1988) *Biochem. J.* [生物化学杂志] 252:199-206; Marrone等人, (1985) *J. of Economic Entomology* [经济昆虫学杂志] 78:290-293以及美国专利号5,743,477,所有这些通过引用一起全文结合在此。总体上,在摄食测定中混合并使用了这种蛋白质。参见,例如, Marrone, et al., (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293 [Marrone等人, (1985), 经济昆虫学杂志, 78:290-293]。此类测定可以包括将植物与一种或多种有害生物接触,并且确定该植物存活和/或造成这些有害生物死亡的能力。

[0325] 线虫包括寄生线虫如根结线虫、胞囊线虫、和腐线虫,包括异皮线虫属物种、根结线虫属物种、和球异皮线虫属物种;特别是胞囊线虫的成员,包括但不限于:大豆异皮线虫 (大豆胞囊线虫);甜菜异皮线虫 (甜菜胞囊线虫);燕麦异皮线虫 (谷物胞囊线虫 (cereal cyst nematode)) 和马铃薯金线虫 (*Globodera rostochiensis*) 和马铃薯白线虫 (*Globodera pailida*) (马铃薯胞囊线虫 (potato cyst nematodes))。腐线虫包括短体线虫属物种。

[0326] 种子处理

[0327] 为了保护并提高产量生产和性状技术,种子处理方案可以为昆虫、杂草和疾病提供另外的作物计划灵活性和成本有效的控制。种子材料可以用包含化学或生物除草剂、除草剂安全剂、杀昆虫剂、杀真菌剂、发芽抑制剂和增强剂、营养素、植物生长调节剂和活化剂、杀细菌剂、杀线虫剂、杀鸟剂和/或杀软体动物剂的组合的组合物进行处理,通常进行表面处理。这些化合物通常与配制品领域中通常使用的其他载体、表面活性剂或促进施用的佐剂一起配制。这些包衣可通过用液体配制品浸渍增殖材料或通过用组合的湿或干配制品进行涂覆来施加。在以下提供了可用作种子处理的各种类型的化合物的实例: *The Pesticide Manual: A World Compendium*, C.D.S. Tomlin Ed., Published by the British Crop Production Council [农药手册:世界纲要, C.D.S. 汤姆林编辑, 由英国作物生产委员会出版], 其通过引用结合在此。

[0328] 可用于作物种子的一些种子处理包括但不限于下列一种或多种:脱落酸、阿拉酸式苯-S-甲基、阿维菌素、杀草强、阿扎康唑、固氮螺菌属、印楝素、噬菌酯、芽孢杆菌属物种 (包括蜡状芽孢杆菌, 坚果芽孢杆菌, 巨大芽孢杆菌, 短小芽孢杆菌, 球形芽孢杆菌, 枯草芽孢杆菌和/或苏云金芽孢杆菌物种中的一种或多种), 短根瘤菌属物种 (包括 *bradyrhizobium betae*, *bradyrhizobium canariense*、埃氏慢生根瘤菌、西表岛慢生根瘤

菌、慢生型大豆根瘤菌、bradyrhizobium liaonigense、bradyrhizobium pachyrhizi和/或
圆明慢生根瘤菌),克菌丹,萎锈灵,壳聚糖,噻虫胺,铜,溴氰虫酰胺,苯醚甲环唑,氯唑灵,
氟虫腈,咯菌腈,氟啶菌酯,氟啶唑,解草胺,氟草肟,超敏蛋白,抑霉唑,吡虫啉,种菌唑,
isoflavenoids,脂质几丁寡糖,代森锰锌,锰,代森锰,精甲霜灵,甲霜灵,叶菌唑,腈菌唑,
PCNB,氟唑菌苯胺,青霉菌属,吡噻菌胺,氯菊酯,啉氧菌酯,丙硫菌唑,唑菌胺酯,氯虫苯甲
酰胺,S-metolachlor,皂苷,氟唑环菌胺,TCMTB,戊唑醇,噻苯咪唑,噻苯哒唑,硫威,福美
双,甲基立枯磷,三唑醇,木霉属,肟菌酯,灭菌唑和/或锌.PCNB种皮是指包含啉硫磷和氯唑
灵,EPA注册号00293500419.TCMTB是指2-(硫氰基甲基硫代)苯并噻唑。

[0329] 可以测试具有特定转基因性状的种子品种和种子以确定哪些种子处理方案和施
用率可以补充这些品种和转基因性状以增加产量。例如,具有良好产量潜力但丝黑穗病易
感性的品种可以受益于使用提供针对丝黑穗病的保护的种子处理,具有良好产量潜力但胞
囊线虫易感性的品种可以受益于使用提供针对胞囊线虫的保护的种子处理等。同样,涵盖
赋予昆虫抗性的转基因性状的品种可以从种子处理赋予的第二种作用方式中获益,涵盖赋
予除草剂抗性的转基因性状的品种可以从用安全剂的种子处理中获益,这种安全剂增强植
物对该除草剂的抗性等。此外,当与种子处理组合时,正确使用种子处理所产生的良好根系
建立和早期出苗可能导致更有效的氮利用,更好的抗干旱能力以及包含某种性状的一种或
多种品种的产量潜力的总体增加。

[0330] 用于杀灭昆虫有害生物和控制昆虫群体的方法

[0331] 在一些实施例中,提供了用于杀灭昆虫有害生物的方法,该方法包括将昆虫有害
生物同时地或依次地与杀昆虫有效量的重组IPD073多肽接触。在一些实施例中,提供了用
于杀灭昆虫有害生物的方法,该方法包括将昆虫有害生物与杀昆虫有效量的SEQ ID NO:2、
SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:292-568中的任一个、SEQ ID NO:571的重组杀昆虫
蛋白或其变体接触。

[0332] 在一些实施例中,提供了用于控制昆虫有害生物群体的方法,该方法包括将昆虫
有害生物群体同时地或依次地与杀昆虫有效量的重组IPD073多肽接触。在一些实施例中,
提供了用于控制昆虫有害生物群体的方法,该方法包括将昆虫有害生物群体与杀昆虫有效
量的SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:292-568中的任一个、SEQ ID
NO:571的重组IPD073多肽或其变体接触。如在此使用的,“控制有害生物群体”或“控制有害
生物”是指对有害生物的任何影响,导致对有害生物造成的损害的限制。控制有害生物包
括但不限于以一定方式杀灭有害生物、抑制有害生物发育、改变有害生物能育性或生长,使
得有害生物对植物造成较少的损害,减少所产生后代的数量,产生适应力较弱的有害生物,
产生易受捕食者攻击的有害生物或阻止有害生物啃食植物。

[0333] 在一些实施例中,提供了用于控制对杀有害生物蛋白具有抗性的昆虫有害生物群
体的方法,该方法包括将昆虫有害生物群体同时地或依次地与杀昆虫有效量的重组IPD073
多肽接触。在一些实施例中,提供了用于控制对杀有害生物蛋白具有抗性的昆虫有害生物
群体的方法,该方法包括将昆虫有害生物群体与杀昆虫有效量的SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:
4、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:292-568中的任一个、SEQ ID NO:571重组IPD073多肽或其变体
接触。

[0334] 在一些实施例中,提供了用于保护植物免受昆虫有害生物侵害的方法,该方法包

括在植物或其细胞中使至少一种编码IPD073多肽的重组多核苷酸表达。在一些实施例中，提供了用于保护植物免受昆虫有害生物侵害的方法，该方法包括在植物或其细胞中使编码SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:292-568中的任一个、SEQ ID NO:571的IPD073多肽或其变体的重组多核苷酸表达。

[0335] 昆虫抗性管理 (IRM) 策略

[0336] 苏云金芽孢杆菌 δ -内毒素在转基因玉米植物中的表达已被证明是控制农业重要昆虫有害生物的有效手段 (Perlak等人, 1990; 1993)。然而, 昆虫已经进化, 这些昆虫对在转基因植物中表达的苏云金芽孢杆菌 δ -内毒素是具有抗性的。如果这种抗性普遍存在, 它将明显限制包含编码这种苏云金芽孢杆菌 δ -内毒素的基因的种质的商业价值。

[0337] 增加转基因杀昆虫剂对靶标有害生物的有效性并且同时减少杀昆虫剂抗性有害生物发展的一种方法是提供非转基因 (即, 非杀昆虫蛋白) 庇护所 (一部分非杀昆虫作物/玉米) 用于与生产对靶标有害生物具有活性的单一杀昆虫蛋白的转基因作物一起使用。美国环境保护局 (epa.gov/oppbppdl/biopesticides/pips/bt_corn_refuge_2006.htm, 其可以使用www前缀进行访问) 发布与生产一种对靶标有害生物具有活性的单一Bt蛋白的转基因作物一起使用的要求。另外, 国家玉米种植者协会在他们的网站上也提供了有关庇护所要求的类似指导: (ncga.com/insect-resistance-management-fact-sheet-bt-corn, 其可以使用www前缀进行访问)。由于庇护区内的昆虫所造成的损失, 较大的庇护所可能会降低总产量。

[0338] 增加转基因杀昆虫剂对靶标有害生物的有效性并且同时减少杀昆虫剂抗性有害生物发展的另一种方法是具有杀昆虫基因的储存库, 该储存库可以有效地对抗昆虫有害生物的组, 并通过不同的作用方式显现其作用。

[0339] 在植物中表达对相同昆虫物种有毒的两种或更多种杀昆虫组合物, 每种杀昆虫剂以有效水平表达是实现对抗性发展的控制的另一种方法。这是基于以下原则: 对两种不同行动模式的抗性演变比仅一种远远更不可能。例如, Rouss概述了用于管理杀昆虫转基因作物的双毒素策略, 也称为“金字塔结构”或“堆叠”。(The Royal Society.Phil.Trans.R.Soc.Lond.B.[皇家学会伦敦皇家学会哲学会刊B系列], (1998) 353:1777-1786)。每种都能有效抵抗靶标有害生物并几乎没有或没有交叉抗性的两种不同蛋白质的堆叠或金字塔可以允许使用较小的庇护所。美国环境保护局要求所种植非Bt玉米的结构性庇护所 (通常为5%) 比单一性状产品 (通常为20%) 显著更少。存在提供庇护所的IRM效应的各种方法, 包括在田地中的各种几何种植模式和包装好 (in-bag) 的种子混合物, 如进一步通过Roush所讨论的。

[0340] 在一些实施例中, 本披露的IPD073多肽可用作与其他杀有害生物蛋白 (包括但不限于Bt毒素、致病杆菌属或发光杆菌属杀昆虫蛋白等) 组合 (即, 金字塔化) 的昆虫抗性管理策略。

[0341] 提供了在促进昆虫抗性管理的转基因植物中控制鳞翅目和/或鞘翅目昆虫侵染的方法, 该方法包括在植物中使具有不同作用模式的至少两种不同的杀昆虫蛋白表达。

[0342] 在一些实施例中, 控制转基因植物中鳞翅目和/或鞘翅目昆虫侵染并促进昆虫抗性管理的方法包括在植物中使至少两种不同杀昆虫蛋白表达, 这些杀昆虫蛋白具有不同作用方式, 其中至少一种杀昆虫蛋白包含对鳞翅目和/或鞘翅目昆虫具有杀昆虫作用的

IPD073多肽。

[0343] 在一些实施例中,控制转基因植物中鳞翅目和/或鞘翅目昆虫侵染并促进昆虫抗性管理的方法包括在植物中使至少两种不同杀昆虫蛋白表达,这些杀昆虫蛋白具有不同作用方式,其中至少一种杀昆虫蛋白包含对鳞翅目和/或鞘翅目昆虫具有杀昆虫作用的SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:292-568中的任一个、SEQ ID NO:571的IPD073多肽或其变体。

[0344] 在一些实施例中,控制转基因植物中鳞翅目和/或鞘翅目昆虫侵染并促进昆虫抗性管理的方法包括在该转基因植物中表达IPD073多肽和对具有不同作用模式的鳞翅目和/或鞘翅目昆虫具有杀昆虫作用的Cry蛋白质。

[0345] 在一些实施例中,控制转基因植物中鳞翅目和/或鞘翅目昆虫侵染并促进昆虫抗性管理的方法包括在转基因植物中表达SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:292-568中的任一个、SEQ ID NO:571的IPD073多肽或其变体,以及对具有不同作用模式的鳞翅目和/或鞘翅目昆虫具有杀昆虫作用的Cry蛋白质。

[0346] 还提供了降低鳞翅目和/或鞘翅目昆虫对在这些植物中表达杀昆虫蛋白以控制这些昆虫物种的转基因植物产生抗性的可能性的方法,该方法包括表达与具有不同作用方式的第二种杀昆虫蛋白组合的、对这些昆虫物种具有杀昆虫作用的IPD073多肽。

[0347] 还提供了用于转基因植物的有效鳞翅目和/或鞘翅目昆虫抗性管理的手段,该手段包括在植物中以高水平共表达对鳞翅目和/或鞘翅目具有毒性的两种或更多种杀昆虫蛋白,但是每种都展现出不同的实行其杀灭活性的模式,其中两种或更多种杀昆虫蛋白包含IPD073多肽和Cry蛋白质。还提供了转基因植物的有效鳞翅目和/或鞘翅目昆虫抗性管理的手段,该手段包括在植物中以高水平共表达对鳞翅目和/或鞘翅目具有毒性的两种或更多种杀昆虫蛋白,但是每种都展现出不同的实行其杀灭活性的模式,其中这两种或更多种杀昆虫蛋白包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:292-568中的任一个、SEQ ID NO:571的IPD073多肽及其变体以及Cry蛋白质。

[0348] 此外,提供了用于获得让监管部门批准种植或商业化表达对鳞翅目和/或鞘翅目昆虫具有杀昆虫作用的蛋白的植物的方法,包括参考、提交或依据昆虫测定结合数据的步骤,该数据显示IPD073多肽不与此类昆虫中的Cry蛋白质的结合位点竞争。此外,提供了用于获得让监管部门批准种植或商业化表达对鳞翅目和/或鞘翅目昆虫具有杀昆虫作用的蛋白的植物的方法,包括参考、提交或依据昆虫测定结合数据的步骤,该数据显示SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:292-568中的任一个、SEQ ID NO:571的IPD073多肽或其变体不与此类昆虫中的Cry蛋白质的结合位点竞争。

[0349] 提高植物产量的方法

[0350] 提供了用于提高植物产量的方法。这些方法包括提供表达编码本文披露的杀有害生物多肽序列的多核苷酸的植物或植物细胞,并在有害生物(该多肽对其具有杀有害生物活性)侵染的田地中种植该植物或其种子。在一些实施例中,该多肽对鳞翅目、鞘翅目、双翅目、半翅目或线虫有害生物具有杀有害生物活性,并且用鳞翅目、半翅目、鞘翅目、双翅目或

线虫有害生物侵染该田地。

[0351] 如本文所定义的,植物的“产量”是指该植物生产的生物质的质量和/或数量。本文所使用的“生物质”是指任何经测量的植物产物。生物质产量的增加是所测量的植物产物的产量上的任何改进。提高植物产量具有几个商业应用。例如,增加植物叶片生物质可以增加用于人或动物消耗的叶菜类的产量。此外,增加叶片生物质可用于增加植物衍生的药物或工业产品的产量。产量上的增加可以包括任何统计学上显著的增加,包括但不限于,与不表达杀有害生物序列的植物相比,产量上至少增加1%、至少增加3%、至少增加5%、至少增加10%、至少20%增加、至少30%、至少50%、至少70%、至少100%或更大的增加。

[0352] 在具体方法中,由于表达本文披露的IPD073多肽的植物的经改进的有害生物抗性使得植物产量得到提高。IPD073多肽的表达导致有害生物侵染植物或在该植物上取食的能力下降,从而提高植物产量。

[0353] 加工方法

[0354] 进一步提供了加工植物、植物部分或种子以从包含IPD073多肽的植物、植物部分或种子获得食物或饲料产品的方法。可以对本文提供的植物、植物部分或种子进行加工以产生通过加工具有商业价值的植物、植物部分或种子获得的衍生物的油、蛋白质产物和/或副产物。非限制性实例包括包含编码IPD073多肽的核酸分子的转基因种子,其可以被加工以产生大豆油、大豆产品和/或大豆副产品。

[0355] “加工”是指用于获得任何大豆产品的任何物理和化学方法,包括但不限于热调节(heat conditioning)、剥落和研磨、挤出、溶剂萃取或水性浸泡以及全部或部分种子萃取。

[0356] 以下实例是通过说明的方式但不是通过限制的方式来提供的。

[0357] 实验

[0358] 实例1识别来自菌株LBV2669的、对西方玉米根虫(WCRW)具有活性的杀昆虫蛋白

[0359] 通过蛋白纯化、液相色谱质谱(LC-MS/MS)和PCR克隆从如下荧光假单胞菌菌株LBV2669中识别出WCRW(玉米根萤叶甲)活性蛋白IPD073Aa(SEQ ID NO:2):

[0360] 假单胞菌属菌株LBV2669在ISP-2培养基(酵母提取物4.0g/L、麦芽提取物10.0g/L、右旋糖4.0g/L)中在25℃下以及250rpm下生长2天。通过离心收集细胞,并在-70℃下储存之前将细胞沉淀用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤一次。对于纯化,将细胞解冻并重悬于含有来自CalBiochem的蛋白酶抑制剂混合物V的25mM的Tris缓冲液(pH 8)(缓冲液A)中。通过使细胞通过30,000psi的均化器,然后以13,800×g离心20分钟获得粗澄清裂解液。将上清液加载在POROS®HQ柱(阳离子交换,生命科技公司(Life Technologies)),并用在缓冲液A中0.5M NaCl的线性梯度进行洗脱。将级分脱盐并经受杀昆虫活性鉴定。合并活性级分,并添加硫酸铵至1M的浓度。将蛋白质进一步溶解在苯基-HP柱(疏水作用色谱,通用电气医疗公司(GE Healthcare)),该柱在缓冲液A(含有1M硫酸铵)中平衡。将蛋白质用缓冲液A中的从1M至0M硫酸铵的线性梯度洗脱。脱盐后,在人工饲料昆虫摄食测定中识别出活性成分。通过高分辨率阳离子交换色谱使用Mono Q®柱(通用电气医疗公司(GE Healthcare))和在缓冲液A中从0至500mM NaCl的线性盐梯度实现进一步纯化。

[0361] 通过SDS-PAGE分析高浓度的活性级分。将蛋白条带切除,用胰蛋白酶消化并且通过纳米液相色谱/电喷雾串联质谱法(纳米-LC/ESI-MS/MS)在Thermo Q Exactive™ Orbitrap质谱仪(赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher Scientific)),该质谱仪与

Eksigent NanoLC 1-D Plus nano-1c系统(爱博才思公司(AB Sciex), 弗雷明汉(Framingham), 马萨诸塞州01701, 美国)接口。在MS1全谱扫描(survey scan)之后, 然后以数据依赖性采集模式收集产品离子谱。

[0362] 通过使用Mascot软件(矩阵科学公司(Matrix Science), 波士顿, 马萨诸塞州02110, 美国)的数据库搜索进行蛋白质识别。针对结合内部细菌蛋白质序列的内部数据库和SWISS-PROT蛋白质数据库识别了通过菌株LBV2669编码的新颖基因, 其被命名为IPD073Aa (SEQ ID NO:1)。

[0363] 使用与熔融的低熔点的WCRW饮食(南国产品公司(Southland Products Inc.), 湖村, 阿肯色州)以96孔格式混合的10微升细胞裂解液样品进行WCRW生物测定。将西方玉米根虫新生昆虫置于96孔板的每个孔中。测定在25°C下运行四天, 并且然后对昆虫死亡率和昆虫生长发育迟缓进行评分。得分记录为死亡、严重发育迟缓(很少或没有生长, 但还活着)、发育迟缓(生长到二龄但不等同于对照)或没有活性。

[0364] 根据制造商的说明书, 用Sigma细菌基因组DNA提取试剂盒(目录号NA2110-KT, 西格玛-奥德里奇公司(Sigma-Aldrich), 邮政信箱14508, 圣路易, 密苏里州63178)提取菌株LBV2669的基因组DNA。使用NanoDrop™分光光度计(赛默科技公司(Thermo Scientific), 西尔维路3411号(3411 Silverside Road), 班克罗夫特大厦(Bancroft Building), 100号套房, 威明顿市, 多佛州, 19810)确定DNA浓度, 并将基因组DNA用无菌水稀释至40ng/ul。通过组合80ng基因组DNA, 2ul (5uM) 16S核糖体DNA引物TACCTTGTTACGACTT (SEQ ID NO:572) 和AGAGTTTGATCMTGGCTCAG (SEQ ID NO:573), 1ul 10cmM dNTP, 1x Phusion® HF缓冲液, 和1单位Phusion®高保真DNA聚合酶来建立25ul PCR反应(新英格兰生物实验室(New England Biolabs), 目录号M0530L, 县公路240号, 伊普斯威奇, 马萨诸塞州, 01938-2723)。PCR反应在MJ Research PTC-200热循环仪(伯乐实验室有限公司(Bio-Rad Laboratories, Inc.), 阿尔弗雷德诺贝尔道1000号, 赫拉克勒斯, 加利福尼亚州, 94547, 美国)中按以下程序运行: 96°C 1分钟; 30个循环: 96°C 15秒, 52°C 2分钟和72°C 2分钟; 72°C 10分钟; 并且保持在4°C。PCR产物用QIAquick® DNA纯化试剂盒(目录号28104, 凯杰公司(QIAGEN Inc.), 坦伯利车道27220号, 瓦伦西亚 (Valencia), 加利福尼亚州91355)纯化。对经纯化的PCR样品进行DNA测序, 并依靠表明LBV2669是荧光假单胞菌菌株的NCBI数据库, 对所得16S核糖体DNA序列进行BLAST搜索。

[0365] 还根据依诺米那公司(Illumina)开发的文库构建方案制备分离的菌株LBV2669基因组DNA, 并使用Illumina® Genome分析仪IIx进行测序。组装核酸重叠群序列并产生可读框。

[0366] 实例2识别IPD073Aa同源物

[0367] 可以通过在默认参数下进行BLAST(基本局部比对20搜索工具; Altschul等人, (1993) J. Mol. Biol. [分子生物学杂志] 215:403-410; 还参见ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/, 可以通过使用www前缀登录该网址)搜索来确定基因同一性以获得与包含于公开可用的BLAST“nr”数据库(包括源自3维结构布鲁克海文蛋白质数据库(25SWISS-PROT蛋白质序列数据库的最后一个主要版本)、EMBL和DDBJ数据库的所有非冗余基因库CDS翻译、序列)中的序列的相似性。除了公共数据库之外, 还搜索了内部的数据库。分析多核苷酸序列SEQ ID NO:1。

表1显示IPD073Aa多肽同源物及其来源。表2显示IPD073多肽同源物的氨基酸序列同一性百分比。

[0368] 表1

名称	与 IPD073Aa 的同一 性%	来源	物种
IPD073Aa SEQ ID NO: 2	100	LBV2669 42 kD	荧光假单胞菌
IPD073Ab SEQ ID NO: 4	95	LBV6019	南极假单胞菌
IPD073Ca SEQ ID NO: 6	80	NCBI-假定蛋白 A936- 14979	肠杆菌属 Ag1
IPD073Cb SEQ ID NO: 8	80	内部收集 JH34920-1	阿氏肠杆菌
IPD073Cc SEQ ID NO: 10	79	NCBI 假定蛋白 JT31_02480	奈氏西地西菌
IPD073Cd SEQ ID NO: 12	74	内部收集, 宏基因组分 析	土壤衍生的细菌分 离物
IPD073Ea SEQ ID NO: 14	49	NCBI.假定蛋白 STIAU_2982	橙色标柱菌 (<i>Stigmatella aurantiaca</i>)

[0370] 表2

	IPD073Aa SEQ ID NO: 2	IPD073Ab SEQ ID NO: 4	IPD073Ca SEQ ID NO: 6	IPD073Cb SEQ ID NO: 8	IPD073Cc SEQ ID NO: 10	IPD073Cd SEQ ID NO: 12	IPD073Ea SEQ ID NO: 14
IPD073Aa SEQ ID NO: 2		95	80	80	79	74	49
IPD073Ab SEQ ID NO: 4			79	80	80	73	50
IPD073Ca SEQ ID NO: 6				98	97	73	49
IPD073Cb SEQ ID NO: 8					97	72	49
IPD073Cc SEQ ID NO: 10						73	50
IPD073Cd SEQ ID NO: 12							44

[0373] 实例3IPD073Aa和同源蛋白在大肠杆菌中的表达

[0374] 使用表3所示的正向引物和反向引物,使用从菌株LBV2669分离的基因组DNA通过PCR扩增IPD073Aa基因(SEQ ID NO:1)。将所得PCR产物经DNA序列验证,并克隆到具有C末端His标签框的pET24 (Novagen) 中进行纯化。使用来自内部菌株LBV6019的基因组DNA制剂作为模板用于基因扩增,通过使用表3所示的引物序列的PCR,将编码IPD073Ab的基因(SEQ ID NO:3) 克隆在pET24中。从NCBI序列数据库中识别出IPD073Ca (SEQ ID NO:6) 和IPD073Ea (SEQ ID NO:14),并通过合成(包括相容5'和3'端用于下游克隆到pET24中)获得其基因(分别为SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:13)。

[0375] 表3

基因	正向引物	反向引物
IPD073Aa	GCATGCATATGTCATGGACTT TCTATCTAACAATTACC SEQ ID NO: 574	TTATATCTCGAGGGACATTTTT AATTGGGTATGTACGC SEQ ID NO: 575
IPD073Ab	GCATGCATATGGCCTGGACAT TTGAGCTGAACATTAC SEQ ID NO: 576	TTATATGGATCCGGGGGCCGT TGGGTCTTCGTGATTCC SEQ ID NO: 577
IPD073Ca	合成基因	
IPD073Cb	合成基因	
IPD073Ea	合成基因	

[0377] 将含有相应的IPD073基因插入物的pET24质粒DNA转化到感受态BL21-DE3大肠杆菌细胞中用于重组蛋白质表达。将大肠杆菌细胞在37℃下用40μg/ml卡那霉素选择生长过夜,然后接种到新鲜的2xYT培养基(1:25)中,并进一步生长至约0.8的光密度。在该点,细胞在1mM的ITPG的存在下进行冷却,并在16℃下进一步生长16小时以诱导蛋白质表达。根据制造商的方案,通过使用Ni-NTA琼脂糖(Qiagen®, 德国)的固定化金属离子色谱纯化经大肠杆菌表达的蛋白质

[0378] 实例4IPD073Aa和同源蛋白的杀昆虫活性

[0379] 测定针对鞘翅类昆虫、鳞翅类和半翅目昆虫(豆荚盲蝽(*Lygus hespera*))物种的纯化的IPD073Aa(SEQ ID NO:2)、IPD073Ab(SEQ ID NO:4)、IPD073Ca(SEQ ID NO:6)、IPD073Cb(SEQ ID NO:8)和IPD073Ea(SEQ ID NO:14)蛋白质的一系列浓度。在两个独立实验中计算用于抑制50%个体的浓度(IC50)。这些结果显示在表4中。

[0380] 为了测量针对WCRW(玉米根萤叶甲)的杀昆虫活性,在每个96孔生物测定板(BD Falcon 353910)中,使用10μl的经纯化的蛋白质样品与50μl的人工WCRW饮食(基于Bio-Serv F9800B)混合来进行生物测定。将可变数量的玉米根萤叶甲新生虫(3至9只)置于96孔板的每个孔中。将测定在25℃无光照下运行四天,并且然后对死亡率和发育迟缓进行评分。

[0381] 以相似的方式评估SCRW(斑点黄瓜甲虫)、北方玉米根虫(NCRW, *Diabrotica barberi*)、圣安东尼奥甲虫(南美叶甲(*Diabrotica speciosa*))敏感性。在每个96孔生物测定板(BD Falcon 353910)中,使用10μl的经纯化的蛋白质样品与50μl的人工SCRW饮食(基于Bio-Serv F9800B)混合。将来自根萤叶甲属物种的可变数量(3至5只)新生虫放入96孔板的每个孔中。将测定在25℃无光照下运行四天,并且然后对死亡率和发育迟缓进行评分。

[0382] 在96孔板装置中的人工饮食上进行鳞翅目取食测定。将经纯化的蛋白质与鳞翅目特异性人工饮食以10 μ l蛋白质和40 μ l饮食混合物的比例掺入。在每个孔放置两至五只新生幼虫,让其任意取食5天。结果表示为幼虫反应(如发育迟缓)呈阳性和/或死亡率。如果幼虫与正在取食仅施用上述缓冲液的饮食的阴性对照相似,那么结果表示为阴性。

[0383] 在欧洲玉米螟(玉米螟)、玉米穗蛾(玉米穗虫)、黑切根虫(小地老虎)、秋夜蛾(草地贪夜蛾)和大豆夜蛾(大豆尺夜蛾)上测定IPD073蛋白质。在所测试的浓度下,没有IPD073蛋白质显示针对鳞翅目有害生物的活性。

[0384] 表4

蛋白质	昆虫	IC50 ppm	效应
IPD073Aa SEQ ID NO: 2	WCRW	5-10	死亡
IPD073Aa SEQ ID NO: 2	SCRW	约 100	生长迟缓
IPD073Aa SEQ ID NO: 2	NCRW	10-25	死亡
IPD073Aa SEQ ID NO: 2	南美叶甲	22-29	死亡
IPD073Aa SEQ ID NO: 2	草盲蝽属		在 500 ppm 未检出活性
IPD073Aa SEQ ID NO: 2	SBL		在 500 ppm 未检出活性
IPD073Aa SEQ ID NO: 2	ECB		在 500 ppm 未检出活性
IPD073Aa SEQ ID NO: 2	FAW		在 500 ppm 未检出活性
IPD073Aa SEQ ID NO: 2	CEW		在 500 ppm 未检出活性
[0385] IPD073Ab SEQ ID NO: 4	WCRW	5-10	死亡
IPD073Ab SEQ ID NO: 4	草盲蝽属		在 160 ppm 未检出活性
IPD073Ab SEQ ID NO: 4	SBL		在 530 ppm 未检出活性
IPD073Ab SEQ ID NO: 4	FAW		在 530 ppm 未检出活性
IPD073Ab SEQ ID NO: 4	SCRW	> 167	在高剂量 (167 ppm) 下 适度生长延缓
IPD073Ca SEQ ID NO: 6	WCRW	5-10	死亡
IPD073Ca SEQ ID NO: 6	草盲蝽属		在 500 ppm 未检出活性
IPD073Ca SEQ ID NO: 6	FAW		在 470 ppm 未检出活性
IPD073Ca SEQ ID NO: 6	SBL		在 470 ppm 未检出活性
IPD073Ca SEQ ID NO: 6	SCRW	> 133 ppm	在 133 pm 适度生长延缓

	IPD073Cb SEQ ID NO: 8	WCRW	5-10	死亡
	IPD073Cb SEQ ID NO: 8	FAW		在 416 ppm 未检出活性
[0386]	IPD073Cb SEQ ID NO: 8	SBL		在 416 ppm 未检出活性
	IPD073Cb SEQ ID NO: 8	CEW		在 416 ppm 未检出活性
	IPD073Ea SEQ ID NO: 14	WCRW		在 400 ppm 未检出活性

[0387] 实例5在WCRW的mCry3A抗性菌株中没有IPD073Aa的交叉耐药性

[0388] 通过在mCry3A转基因玉米植物上选择WCRW来开发抗mCry3A的WCRW菌株,其中该转基因玉米植物在根部>10,000 ppm的总蛋白质下具有T0水平的mCry3A表达。在F3、F6、F7、F8、F10、F12、F14幼虫中做了7个选择。与易感实验室菌落相比,Cry3A抗性昆虫的F16个卵对mCry3A具有>46倍的抗性比率(RR),并用于IPD073Aa(SEQ ID NO:2)的交叉抗性测试。使用标准化的WCRW饮食掺入生物测定来评估IPD073Aa(SEQ ID NO:2)对WCRW幼虫的影响。将WCRW新生幼虫置于含有生物测定饮食和杀昆虫蛋白的平板上,每个浓度处理重复4次,每次生物测定开始后持续3天。对昆虫死亡率和严重发育迟缓进行评分,并用于计算基于概率分析的抑制浓度(IC50和LC50)。抗性比率(RR)计算如下:RR=(抗性WCRW的LC/IC 50)/(易感WCRW的LC/IC 50)。如表5所示,Cry3A抗性WCRW昆虫对IPD073Aa(SEQ ID NO:2)敏感。

[0389] 表5

WCRW 菌株	LC/IC	敏感性, ppm	范围, ppm	抗性比率
[0390] Cry3 敏感	LC50	37	23-60	1
	IC50	8	4-11	1
Cry3 抗性	LC50	48	31-74	1.29
	IC50	6	4-9	0.85

[0391] 实例6-农杆菌介导的玉米的稳定转化

[0392] 对于农杆菌介导的具有IPD073Aa(SEQ ID NO:1)的玉米转化,使用Zhao的方法(美国专利号5,981,840和国际专利公开号WO 1998/32326,其内容通过引用结合在此)。简而言之,从玉米中分离未成熟的胚,并且将胚与农杆菌属悬浮液接触,其中该细菌能够将IPD073Aa转移至至少一种未成熟胚的至少一个细胞中(步骤1:侵染步骤)。在该步骤中,将未成熟胚胎浸泡在农杆菌悬液中,引发接种。使这些胚胎与农杆菌共培养一段时间(步骤2:共培养步骤)。将这些未成熟的胚胎在有抗生素但没有选择剂的固体培养基上培养,以消除农杆菌并用于经侵染的细胞的静置期。接着,在含有选择剂的培养基上培养经接种的胚胎,并且回收生长的经转化的愈伤组织(步骤4:选择步骤)。在含选择剂的固体培养基上培养这些未成熟胚胎,使经转化的细胞选择性生长。然后将愈伤组织再生成植物(步骤5:再生步骤),并将生长在在选择培养基上的愈伤组织在固体培养基上培养以再生植物。

[0393] 为了检测叶组织中的IPD073Aa蛋白质(SEQ ID NO:2),将4个冻干叶穿孔/样品粉碎并重新悬浮于含有0.1%Tween 20的100μL PBS(PBST)、含有1片/7mL完整的迷你蛋白酶抑制剂(罗氏公司1183615301)的1%β-巯基乙醇中。将悬浮液超声处理2分钟,并且然后在4℃、20,000g下离心15分钟。向上清液等份1/3体积的3X NuPAGE® LDS样品缓冲液

(Invitrogen™,加利福尼亚州,美国)中,添加含有1片7mL完整迷你蛋白酶抑制剂的1%β-ME。将反应物在80℃下加热10min,并且然后离心。将上清液样品按照制造商(Invitrogen™)说明书装载在具有MES运行缓冲液的4%-12%Bis-Tris Midi凝胶上,并使用iBlot®装置(Invitrogen™)转移到硝酸纤维素膜上。将硝酸纤维素膜在含有5%脱脂奶粉的PBST中孵育2小时,然后在PBST中亲和纯化的兔抗IPD073Aa中孵育过夜。将膜用PBST冲洗三次,并且然后在PBST中孵育15分钟,并且然后冲洗两次5分钟,然后孵育2小时在具有山羊抗兔HRP的PBST中持续3小时。使用ECL蛋白质印迹试剂(GE医疗集团,目录号RPN2106)和Kodak® Biomax® Mr膜可以观察到所检测的蛋白质。为了检测根中的IPD073Aa蛋白,将根冻干,并且将每个样品2mg粉末重新悬浮于LDS中,添加含有1片/7mL完整迷你蛋白酶抑制剂的1%β-巯基乙醇。将反应在80℃下加热10分钟,并且然后在4℃、20,000g下离心15分钟。将上清液样品按照制造商(Invitrogen™)说明书装载在具有MES运行缓冲液的4%-12%Bis-Tris Midi凝胶上,并使用iBlot®装置(Invitrogen™)转移到硝酸纤维素膜上。将硝酸纤维素膜在含有5%脱脂奶粉的PBST中孵育2小时,然后在PBST中亲和纯化的多克隆兔抗IPD073Aa抗体中孵育过夜。膜用PBST冲洗三次,并且然后在PBST中孵育15分钟,并且然后冲洗两次5分钟,然后孵育2小时,在具有山羊抗兔HRP的PBST中持续3小时。使用ECL™蛋白质印迹试剂(GE医疗集团,目录号RPN2106)和Kodak® Biomax® Mr膜可以检测到抗体结合杀昆虫蛋白。

[0394] 使用本领域已知的标准生物测定法测试杀昆虫蛋白表达阳性的转基因玉米植物的杀有害生物活性。这些方法包括例如根切除生物测定和全植物生物测定。参见例如,美国专利号7,030,295和国际公开号W0 2003/018810。

[0395] 实例7-用于在植物中表达IPD073Aa的表达载体构建体

[0396] 在与增强子元件组合的BSV (AY) TR启动子(美国专利8338662B2)的控制下,将植物表达载体PHP61755构建成包括含有PD073Aa基因(SEQ ID NO:569)的转基因盒。将此构建体用于产生转基因玉米事件,以评估对玉米根虫的植物效力。

[0397] 图2显示了从PHP61755产生的事件的事件的T0 GH效力结果。观察到相对于阴性对照事件的功效,如通过西方玉米根虫的根保护测量的。使用由Olson,等人,(2005),[J.Econ Entomol.(经济昆虫学期刊)98(1):1-8]开发的方法,根据损伤的根节点数测量根保护(CRWNIS=玉米根虫节点损伤评分)。根损伤评分测量为从“0”到“3”,其中“0”表示无可见根损伤,“1”表示1个根损害节点,“2”表示2个节点或根损害,并且“3”表示3个节点的根损害的最大得分。中间得分(例如1.5)表示损害节点的额外分数(例如1.5个所损伤的节点)。

[0398] 实例8-产生具有多个氨基酸取代的IPD073多肽改组的变体

[0399] 为了产生具有多个氨基酸取代的IPD073多肽变体,通过编码IPD073Aa(SEQ ID NO:2)、IPD073Ab(SEQ ID NO:4)、IPD073Ca(SEQ ID NO:6)和IPD073Ea(SEQ ID NO:14)的多核苷酸的家族改组产生变体文库(Chia-Chun J.Chang等人,1999,Nature Biotechnology [自然生物技术]17,793-797)。制得两种类型的文库。在第一种文库中,将IPD073Aa(SEQ ID NO:1)、IPD073Ab(SEQ ID NO:3)和IPD073Ca(SEQ ID NO:5)用作亲本基因。在第二个类型的文库中,将IPD073Ab(SEQ ID NO:4)或IPD073Ca(SEQ ID NO:5)用作骨架亲本,并且通过从其他三种IPD073同源物(Stutzman-Engwall K.等人,2005,Metabolic Engineering[代谢

工程]7(1)27-37)中的携带多样性的DNA寡核苷酸引入突变。将文库变体转化为大肠杆菌细胞后,挑取菌落并在96孔板中培养以进行蛋白质表达。通过来自赛默科技公司(Thermo Scientific)(3747N Meridian Rd,罗克福德(Rockford),ILUSA 61101)的**B-PER®**蛋白质提取试剂中产生细胞裂解物病筛选用于WCRW杀昆虫活性。对活性变体进行测序并识别氨基酸取代。总共筛选1702个文库变体,并回收277个活性变体(表6)。

[0400] 表6

[0401]	变体名称	基因 SEQ ID NO	多肽 SEQ ID NO	变体名称	基因 SEQ ID NO	多肽 SEQ ID NO

[0402]

变体名称	基因 SEQ ID NO	多肽 SEQ ID NO	变体名称	基因 SEQ ID NO	多肽 SEQ ID NO
IPD073act- Ab-04	Seq No: 15	Seq No: 292	IPD073- QCL1-28	Seq No: 154	Seq No: 431
IPD073act- Ab-07	Seq No: 16	Seq No: 293	IPD073- QCL1-29	Seq No: 155	Seq No: 432
IPD073act- Ab-08	Seq No: 17	Seq No: 294	IPD073- QCL1-32	Seq No: 156	Seq No: 433
IPD073act- Ab-09	Seq No: 18	Seq No: 295	IPD073- QCL1-33	Seq No: 157	Seq No: 434
IPD073act- Ab-10	Seq No: 19	Seq No: 296	IPD073- QCL1-35	Seq No: 158	Seq No: 435
IPD073act- Ab-11	Seq No: 20	Seq No: 297	IPD073- QCL1-36	Seq No: 159	Seq No: 436
IPD073act- Ab-12	Seq No: 21	Seq No: 298	IPD073- QCL1-37	Seq No: 160	Seq No: 437
IPD073act- Ab-13	Seq No: 22	Seq No: 299	IPD073- QCL1-39	Seq No: 161	Seq No: 438
IPD073act- Ab-14	Seq No: 23	Seq No: 300	IPD073- QCL1-40	Seq No: 162	Seq No: 439
IPD073act- Ab-16	Seq No: 24	Seq No: 301	IPD073- QCL1-41	Seq No: 163	Seq No: 440
IPD073act- Ab-18	Seq No: 25	Seq No: 302	IPD073- QCL1-42	Seq No: 164	Seq No: 441
IPD073act- Ab-19	Seq No: 26	Seq No: 303	IPD073- QCL1-43	Seq No: 165	Seq No: 442
IPD073act- Ab-20	Seq No: 27	Seq No: 304	IPD073- QCL1-44	Seq No: 166	Seq No: 443
IPD073act- Ab-21	Seq No: 28	Seq No: 305	IPD073- QCL1-46	Seq No: 167	Seq No: 444
IPD073act- Ab-23	Seq No: 29	Seq No: 306	IPD073- QCL1-48	Seq No: 168	Seq No: 445
IPD073act- Ab-24	Seq No: 30	Seq No: 307	IPD073- QCL2-1	Seq No: 169	Seq No: 446
IPD073act- Ab-28	Seq No: 31	Seq No: 308	IPD073- QCL2-2	Seq No: 170	Seq No: 447
IPD073act- Ab-30	Seq No: 32	Seq No: 309	IPD073- QCL2-3	Seq No: 171	Seq No: 448
IPD073act- Ab-31	Seq No: 33	Seq No: 310	IPD073- QCL2-4	Seq No: 172	Seq No: 449
IPD073act- Ab-34	Seq No: 34	Seq No: 311	IPD073- QCL2-5	Seq No: 173	Seq No: 450
IPD073act- Ab-39	Seq No: 35	Seq No: 312	IPD073- QCL2-7	Seq No: 174	Seq No: 451

[0403]

变体名称	基因 SEQ ID NO	多肽 SEQ ID NO	变体名称	基因 SEQ ID NO	多肽 SEQ ID NO
IPD073act- Ab-41	Seq No: 36	Seq No: 313	IPD073- QCL2-9	Seq No: 175	Seq No: 452
IPD073act- Ab-43	Seq No: 37	Seq No: 314	IPD073- QCL2-10	Seq No: 176	Seq No: 453
IPD073act- Ab-47	Seq No: 38	Seq No: 315	IPD073- QCL2-12	Seq No: 177	Seq No: 454
IPD073act- Ab-48	Seq No: 39	Seq No: 316	IPD073- QCL2-13	Seq No: 178	Seq No: 455
IPD073act- Ab-49	Seq No: 40	Seq No: 317	IPD073- QCL2-14	Seq No: 179	Seq No: 456
IPD073act1D2 -01	Seq No: 41	Seq No: 318	IPD073- QCL2-16	Seq No: 180	Seq No: 457
IPD073act1D2 -02	Seq No: 42	Seq No: 319	IPD073- QCL2-18	Seq No: 181	Seq No: 458
IPD073act1D2 -03	Seq No: 43	Seq No: 320	IPD073- QCL2-19	Seq No: 182	Seq No: 459
IPD073act1D2 -04	Seq No: 44	Seq No: 321	IPD073- QCL2-21	Seq No: 183	Seq No: 460
IPD073act1D2 -05	Seq No: 45	Seq No: 322	IPD073- QCL2-22	Seq No: 184	Seq No: 461
IPD073act1D2 -06	Seq No: 46	Seq No: 323	IPD073- QCL2-24	Seq No: 185	Seq No: 462
IPD073act1D2 -07	Seq No: 47	Seq No: 324	IPD073- QCL2-25	Seq No: 186	Seq No: 463
IPD073act1D2 -08	Seq No: 48	Seq No: 325	IPD073- QCL2-26	Seq No: 187	Seq No: 464
IPD073act1D2 -09	Seq No: 49	Seq No: 326	IPD073- QCL2-28	Seq No: 188	Seq No: 465
IPD073act1D2 -10	Seq No: 50	Seq No: 327	IPD073- QCL2-29	Seq No: 189	Seq No: 466
IPD073act1D2 -11	Seq No: 51	Seq No: 328	IPD073- QCL2-30	Seq No: 190	Seq No: 467
IPD073act1D2 -12	Seq No: 52	Seq No: 329	IPD073- QCL2-31	Seq No: 191	Seq No: 468
IPD073act1D2 -13	Seq No: 53	Seq No: 330	IPD073- QCL2-32	Seq No: 192	Seq No: 469
IPD073act1D2 -14	Seq No: 54	Seq No: 331	IPD073- QCL2-33	Seq No: 193	Seq No: 470
IPD073act1D2 -15	Seq No: 55	Seq No: 332	IPD073- QCL2-34	Seq No: 194	Seq No: 471
IPD073act1D2 -16	Seq No: 56	Seq No: 333	IPD073- QCL2-35	Seq No: 195	Seq No: 472

[0404]

变体名称	基因 SEQ ID NO	多肽 SEQ ID NO	变体名称	基因 SEQ ID NO	多肽 SEQ ID NO
IPD073act1D2 -17	Seq No: 57	Seq No: 334	IPD073- QCL2-36	Seq No: 196	Seq No: 473
IPD073act1D2 -19	Seq No: 58	Seq No: 335	IPD073- QCL2-37	Seq No: 197	Seq No: 474
IPD073act1D2 -20	Seq No: 59	Seq No: 336	IPD073- QCL2-38	Seq No: 198	Seq No: 475
IPD073act1D2 -21	Seq No: 60	Seq No: 337	IPD073- QCL2-39	Seq No: 199	Seq No: 476
IPD073act1D2 -22	Seq No: 61	Seq No: 338	IPD073- QCL2-40	Seq No: 200	Seq No: 477
IPD073act1D2 -23	Seq No: 62	Seq No: 339	IPD073- QCL2-42	Seq No: 201	Seq No: 478
IPD073act1D2 -24	Seq No: 63	Seq No: 340	IPD073- QCL2-43	Seq No: 202	Seq No: 479
IPD073act1D2 -25	Seq No: 64	Seq No: 341	IPD073- QCL2-45	Seq No: 203	Seq No: 480
IPD073act1D2 -26	Seq No: 65	Seq No: 342	IPD073- QCL2-46	Seq No: 204	Seq No: 481
IPD073act1D2 -27	Seq No: 66	Seq No: 343	IPD073- QCL2-47	Seq No: 205	Seq No: 482
IPD073act1D2 -28	Seq No: 67	Seq No: 344	IPD073- QCL2-48	Seq No: 206	Seq No: 483
IPD073act1D2 -29	Seq No: 68	Seq No: 345	IPD073- QCLrearay-1	Seq No: 207	Seq No: 484
IPD073act1D2 -30	Seq No: 69	Seq No: 346	IPD073- QCLrearay-2	Seq No: 208	Seq No: 485
IPD073act1D2 -31	Seq No: 70	Seq No: 347	IPD073- QCLrearay-3	Seq No: 209	Seq No: 486
IPD073act1D2 -32	Seq No: 71	Seq No: 348	IPD073- QCLrearay-6	Seq No: 210	Seq No: 487
IPD073act1D2 -33	Seq No: 72	Seq No: 349	IPD073- QCLrearay-7	Seq No: 211	Seq No: 488
IPD073act1D2 -34	Seq No: 73	Seq No: 350	IPD073- QCLrearay-9	Seq No: 212	Seq No: 489
IPD073act1D2 -37	Seq No: 74	Seq No: 351	IPD073- QCLrearay- 10	Seq No: 213	Seq No: 490
IPD073act1D2 -38	Seq No: 75	Seq No: 352	IPD073- QCLrearay- 11	Seq No: 214	Seq No: 491

[0405]

变体名称	基因 SEQ ID NO	多肽 SEQ ID NO	变体名称	基因 SEQ ID NO	多肽 SEQ ID NO
IPD073act1D2 -39	Seq No: 76	Seq No: 353	IPD073- QCLrearay- 12	Seq No: 215	Seq No: 492
IPD073act1D2 -40	Seq No: 77	Seq No: 354	IPD073- QCLrearay- 14	Seq No: 216	Seq No: 493
IPD073act1D2 -41	Seq No: 78	Seq No: 355	IPD073- QCLrearay- 15	Seq No: 217	Seq No: 494
IPD073act1D2 -42	Seq No: 79	Seq No: 356	IPD073- QCLrearay- 16	Seq No: 218	Seq No: 495
IPD073act1D2 -44	Seq No: 80	Seq No: 357	IPD073- QCLrearay- 17	Seq No: 219	Seq No: 496
IPD073act1D2 -45	Seq No: 81	Seq No: 358	IPD073- QCLrearay- 18	Seq No: 220	Seq No: 497
IPD073act1D2 -46	Seq No: 82	Seq No: 359	IPD073- QCLrearay- 20	Seq No: 221	Seq No: 498
IPD073act1D2 -47	Seq No: 83	Seq No: 360	IPD073- QCLrearay- 25	Seq No: 222	Seq No: 499
IPD073act1D2 -48	Seq No: 84	Seq No: 361	IPD073- QCLrearay- 26	Seq No: 223	Seq No: 500
IPD073act1E1 2-01	Seq No: 85	Seq No: 362	IPD073- QCLrearay- 27	Seq No: 224	Seq No: 501
IPD073act1E1 2-02	Seq No: 86	Seq No: 363	IPD073- QCLrearay- 28	Seq No: 225	Seq No: 502
IPD073act1E1 2-03	Seq No: 87	Seq No: 364	IPD073- QCLrearay- 29	Seq No: 226	Seq No: 503
IPD073act1E1 2-04	Seq No: 88	Seq No: 365	IPD073- QCLrearay- 31	Seq No: 227	Seq No: 504
IPD073act1E1 2-05	Seq No: 89	Seq No: 366	IPD073- QCLrearay- 33	Seq No: 228	Seq No: 505

[0406]

变体名称	基因 SEQ ID NO	多肽 SEQ ID NO	变体名称	基因 SEQ ID NO	多肽 SEQ ID NO
IPD073act1E1 2-06	Seq No: 90	Seq No: 367	IPD073- QCLrearay- 34	Seq No: 229	Seq No: 506
IPD073act1E1 2-07	Seq No: 91	Seq No: 368	IPD073- QCLrearay- 35	Seq No: 230	Seq No: 507
IPD073act1E1 2-08	Seq No: 92	Seq No: 369	IPD073- QCLrearay- 36	Seq No: 231	Seq No: 508
IPD073act1E1 2-09	Seq No: 93	Seq No: 370	IPD073- QCLrearay- 37	Seq No: 232	Seq No: 509
IPD073act1E1 2-10	Seq No: 94	Seq No: 371	IPD073- QCLrearay- 38	Seq No: 233	Seq No: 510
IPD073act1E1 2-12	Seq No: 95	Seq No: 372	IPD073- QCLrearay- 39	Seq No: 234	Seq No: 511
IPD073act1E1 2-13	Seq No: 96	Seq No: 373	IPD073- QCLrearay- 40	Seq No: 235	Seq No: 512
IPD073act1E1 2-14	Seq No: 97	Seq No: 374	IPD073- QCLrearay- 41	Seq No: 236	Seq No: 513
IPD073act1E1 2-15	Seq No: 98	Seq No: 375	IPD073- QCLrearay- 42	Seq No: 237	Seq No: 514
IPD073act1E1 2-16	Seq No: 99	Seq No: 376	IPD073- QCLrearay- 43	Seq No: 238	Seq No: 515
IPD073act1E1 2-17	Seq No: 100	Seq No: 377	IPD073- QCLrearay- 44	Seq No: 239	Seq No: 516
IPD073act1E1 2-18	Seq No: 101	Seq No: 378	IPD073- QCLrearay- 45	Seq No: 240	Seq No: 517
IPD073act1E1 2-19	Seq No: 102	Seq No: 379	IPD073- QCLrearay- 46	Seq No: 241	Seq No: 518
IPD073act1E1 2-20	Seq No: 103	Seq No: 380	IPD073- QCLrearay- 47	Seq No: 242	Seq No: 519

[0407]

变体名称	基因 SEQ ID NO	多肽 SEQ ID NO	变体名称	基因 SEQ ID NO	多肽 SEQ ID NO
IPD073act1E1 2-21	Seq No: 104	Seq No: 381	IPD073- QCLrearay- 48	Seq No: 243	Seq No: 520
IPD073act1E1 2-22	Seq No: 105	Seq No: 382	IPD073- QCLrearay- 49	Seq No: 244	Seq No: 521
IPD073act1E1 2-23	Seq No: 106	Seq No: 383	IPD073- QCLrearay- 52	Seq No: 245	Seq No: 522
IPD073act1E1 2-24	Seq No: 107	Seq No: 384	IPD073- QCLrearay- 55	Seq No: 246	Seq No: 523
IPD073act1E1 2-25	Seq No: 108	Seq No: 385	IPD073- QCLrearay- 56	Seq No: 247	Seq No: 524
IPD073act1E1 2-27	Seq No: 109	Seq No: 386	IPD073- QCLrearay- 57	Seq No: 248	Seq No: 525
IPD073act1E1 2-29	Seq No: 110	Seq No: 387	IPD073- QCLrearay- 58	Seq No: 249	Seq No: 526
IPD073act1E1 2-30	Seq No: 111	Seq No: 388	IPD073- QCLrearay- 59	Seq No: 250	Seq No: 527
IPD073act1E1 2-31	Seq No: 112	Seq No: 389	IPD073- QCLrearay- 60	Seq No: 251	Seq No: 528
IPD073act1E1 2-32	Seq No: 113	Seq No: 390	IPD073- QCLrearay- 61	Seq No: 252	Seq No: 529
IPD073act1E1 2-33	Seq No: 114	Seq No: 391	IPD073- QCLrearay- 62	Seq No: 253	Seq No: 530
IPD073act1E1 2-34	Seq No: 115	Seq No: 392	IPD073- QCLrearay- 63	Seq No: 254	Seq No: 531
IPD073act1E1 2-35	Seq No: 116	Seq No: 393	IPD073- QCLrearay- 66	Seq No: 255	Seq No: 532
IPD073act1E1 2-36	Seq No: 117	Seq No: 394	IPD073- QCLrearay- 67	Seq No: 256	Seq No: 533

[0408]

变体名称	基因 SEQ ID NO	多肽 SEQ ID NO	变体名称	基因 SEQ ID NO	多肽 SEQ ID NO
IPD073act1E1 2-38	Seq No: 118	Seq No: 395	IPD073- QCLrearay- 68	Seq No: 257	Seq No: 534
IPD073act1E1 2-39	Seq No: 119	Seq No: 396	IPD073- QCLrearay- 69	Seq No: 258	Seq No: 535
IPD073act1E1 2-40	Seq No: 120	Seq No: 397	IPD073- QCLrearay- 70	Seq No: 259	Seq No: 536
IPD073act1E1 2-41	Seq No: 121	Seq No: 398	IPD073- QCLrearay- 71	Seq No: 260	Seq No: 537
IPD073act1E1 2-42	Seq No: 122	Seq No: 399	IPD073- QCLrearay- 72	Seq No: 261	Seq No: 538
IPD073act1E1 2-43	Seq No: 123	Seq No: 400	IPD073- QCLrearay- 73	Seq No: 262	Seq No: 539
IPD073act1E1 2-44	Seq No: 124	Seq No: 401	IPD073- QCLrearay- 74	Seq No: 263	Seq No: 540
IPD073act1E1 2-45	Seq No: 125	Seq No: 402	IPD073- QCLrearay- 75	Seq No: 264	Seq No: 541
IPD073act1E1 2-46	Seq No: 126	Seq No: 403	IPD073- QCLrearay- 76	Seq No: 265	Seq No: 542
IPD073act1E1 2-47	Seq No: 127	Seq No: 404	IPD073- QCLrearay- 77	Seq No: 266	Seq No: 543
IPD073act- Ab-01*	Seq No: 128	Seq No: 405	IPD073- QCLrearay- 78	Seq No: 267	Seq No: 544
IPD073act- Ab-02*	Seq No: 129	Seq No: 406	IPD073- QCLrearay- 79	Seq No: 268	Seq No: 545
IPD073act- Ab-03*	Seq No: 130	Seq No: 407	IPD073- QCLrearay- 81	Seq No: 269	Seq No: 546
IPD073- QCL1-4	Seq No: 131	Seq No: 408	IPD073- QCLrearay- 82	Seq No: 270	Seq No: 547

[0409]

变体名称	基因 SEQ ID NO	多肽 SEQ ID NO	变体名称	基因 SEQ ID NO	多肽 SEQ ID NO
IPD073- QCL1-5	Seq No: 132	Seq No: 409	IPD073- QCLrearay- 84	Seq No: 271	Seq No: 548
IPD073- QCL1-6	Seq No: 133	Seq No: 410	IPD073- QCLrearay- 86	Seq No: 272	Seq No: 549
IPD073- QCL1-7	Seq No: 134	Seq No: 411	IPD073- QCLrearay- 88	Seq No: 273	Seq No: 550
IPD073- QCL1-8	Seq No: 135	Seq No: 412	IPD073- QCLrearay- 89	Seq No: 274	Seq No: 551
IPD073- QCL1-9	Seq No: 136	Seq No: 413	IPD073- QCLrearay- 90	Seq No: 275	Seq No: 552
IPD073- QCL1-11	Seq No: 137	Seq No: 414	IPD073- QCLrearay- 91	Seq No: 276	Seq No: 553
IPD073- QCL1-12	Seq No: 138	Seq No: 415	IPD073- QCLrearay- 92	Seq No: 277	Seq No: 554
IPD073- QCL1-13	Seq No: 139	Seq No: 416	IPD073- QCLrearay- 94	Seq No: 278	Seq No: 555
IPD073- QCL1-14	Seq No: 140	Seq No: 417	IPD073- QCLrearay- 95	Seq No: 279	Seq No: 556
IPD073- QCL1-15	Seq No: 141	Seq No: 418	IPD073- QCLrearay- 96	Seq No: 280	Seq No: 557
IPD073- QCL1-16	Seq No: 142	Seq No: 419	IPD073-lib1- 1-31	Seq No: 281	Seq No: 558
IPD073- QCL1-17	Seq No: 143	Seq No: 420	IPD073-lib1- 1-34	Seq No: 282	Seq No: 559
IPD073- QCL1-18	Seq No: 144	Seq No: 421	IPD073-lib1- 1-52	Seq No: 283	Seq No: 560
IPD073- QCL1-19	Seq No: 145	Seq No: 422	IPD073-lib1- 1-54	Seq No: 284	Seq No: 561
IPD073- QCL1-20	Seq No: 146	Seq No: 423	IPD073-lib1- 1-60	Seq No: 285	Seq No: 562
IPD073- QCL1-21	Seq No: 147	Seq No: 424	IPD073-lib1- 1-87	Seq No: 286	Seq No: 563

变体名称	基因 SEQ ID NO	多肽 SEQ ID NO	变体名称	基因 SEQ ID NO	多肽 SEQ ID NO
IPD073- QCL1-22	Seq No: 148	Seq No: 425	IPD073- 1C11	Seq No: 287	Seq No: 564
IPD073- QCL1-23	Seq No: 149	Seq No: 426	IPD073-1D2	Seq No: 288	Seq No: 565
IPD073- QCL1-24	Seq No: 150	Seq No: 427	IPD073- 1E12	Seq No: 289	Seq No: 566
IPD073- QCL1-25	Seq No: 151	Seq No: 428	IPD073-2A5	Seq No: 290	Seq No: 567
IPD073- QCL1-26	Seq No: 152	Seq No: 429	IPD073-2E4	Seq No: 291	Seq No: 568
IPD073- QCL1-27	Seq No: 153	Seq No: 430			

[0411] 使用Needleman-Wunsch算法来计算IPD073Aa的活性变体的序列同一性,如Needle程序(EMBOSS工具套件)中所应用的。与IPD073Aa (SEQ ID NO:2) 相比,在每个百分比识别水平识别的变体数目的百分比同一性和变体名称总结在表7中。

[0412] 表7

与 IPD073Aa 的同一性%	变体编号	变体名称

[0414]

与 IPD073Aa 的同一性%	变体编号	变体名称
80	41	IPD073-1C11、IPD073-2A5、IPD073-2A6、IPD073-2E4、IPD073-lib1-1-34、IPD073-lib1-1-52、IPD073-lib1-1-87、IPD073-QCL1-18、IPD073-QCL1-19、IPD073-QCL1-24、IPD073-QCL1-28、IPD073-QCL1-29、IPD073-QCL1-32、IPD073-QCL1-33、IPD073-QCL1-35、IPD073-QCL1-44、IPD073-QCL1-46、IPD073-QCL1-5、IPD073-QCL1-7、IPD073-QCL2-12、IPD073-QCL2-13、IPD073-QCL2-2、IPD073-QCL2-25、IPD073-QCL2-34、IPD073-QCL2-37、IPD073-QCL2-38、IPD073-QCL2-7、IPD073-QCLrearay-12、IPD073-QCLrearay-14、IPD073-QCLrearay-3、IPD073-QCLrearay-38、IPD073-QCLrearay-44、IPD073-QCLrearay-59、IPD073-QCLrearay-69、IPD073-QCLrearay-70、IPD073-QCLrearay-75、IPD073-QCLrearay-79、IPD073-QCLrearay-82、IPD073-QCLrearay-88、IPD073-QCLrearay-94、IPD073act-Ab-03*

[0415]

与 IPD073Aa 的同一性%	变体编号	变体名称
81	63	IPD073-QCL1-14 、 IPD073-QCL1-20 、 IPD073-QCL1-21 、 IPD073-QCL1-26 、 IPD073-QCL1-37 、 IPD073-QCL1-39 、 IPD073-QCL1-41 、 IPD073-QCL1-48 、 IPD073-QCL1-6 、 IPD073-QCL2-18 、 IPD073-QCL2-24 、 IPD073-QCL2-30 、 IPD073-QCL2-32 、 IPD073-QCL2-33 、 IPD073-QCL2-35 、 IPD073-QCL2-42 、 IPD073-QCL2-47 、 IPD073-QCLrearay-1 、 IPD073-QCLrearay-11 、 IPD073-QCLrearay-15 、 IPD073- QCLrearay-17 、 IPD073-QCLrearay-2 、 IPD073-QCLrearay-25 、 IPD073-QCLrearay-26 、 IPD073-QCLrearay-27 、 IPD073- QCLrearay-29 、 IPD073-QCLrearay-31 、 IPD073-QCLrearay- 33 、 IPD073-QCLrearay-34 、 IPD073-QCLrearay-35 、 IPD073- QCLrearay-36 、 IPD073-QCLrearay-39 、 IPD073-QCLrearay- 40 、 IPD073-QCLrearay-41 、 IPD073-QCLrearay-42 、 IPD073- QCLrearay-43 、 IPD073-QCLrearay-47 、 IPD073-QCLrearay- 52 、 IPD073-QCLrearay-55 、 IPD073-QCLrearay-57 、 IPD073- QCLrearay-58 、 IPD073-QCLrearay-6 、 IPD073-QCLrearay-60 、 IPD073-QCLrearay-61 、 IPD073-QCLrearay-63 、 IPD073- QCLrearay-66 、 IPD073-QCLrearay-67 、 IPD073-QCLrearay- 68 、 IPD073-QCLrearay-7 、 IPD073-QCLrearay-71 、 IPD073- QCLrearay-72 、 IPD073-QCLrearay-73 、 IPD073-QCLrearay- 76 、 IPD073-QCLrearay-77 、 IPD073-QCLrearay-78 、 IPD073- QCLrearay-81 、 IPD073-QCLrearay-84 、 IPD073-QCLrearay- 86 、 IPD073-QCLrearay-90 、 IPD073-QCLrearay-91 、 IPD073- QCLrearay-95 、 IPD073-QCLrearay-96 、 IPD073act-Ab-02*

[0416]

与 IPD073Aa 的同一性%	变体编号	变体名称
82	21	IPD073-QCL1-12 、 IPD073-QCL1-17 、 IPD073-QCL1-25 、 IPD073-QCL1-27 、 IPD073-QCL1-40 、 IPD073-QCL2-14 、 IPD073-QCL2-26 、 IPD073-QCL2-36 、 IPD073-QCL2-48 、 IPD073-QCLrearay-18 、 IPD073-QCLrearay-20 、 IPD073-QCLrearay-28 、 IPD073-QCLrearay-45 、 IPD073-QCLrearay-46 、 IPD073-QCLrearay-48 、 IPD073-QCLrearay-49 、 IPD073-QCLrearay-56 、 IPD073-QCLrearay-62 、 IPD073-QCLrearay-74 、 IPD073-QCLrearay-92 、 IPD073act1E12-05
83	2	IPD073-QCL1-13、IPD073-QCLrearay-16
84	4	IPD073-QCL1-15、IPD073-QCL2-29、IPD073-QCLrearay-37、IPD073-QCLrearay-9
86	13	IPD073-1E12 、 IPD073act1E12-02 、 IPD073act1E12-08 、 IPD073act1E12-10 、 IPD073act1E12-12 、 IPD073act1E12-13 、 IPD073act1E12-33 、 IPD073act1E12-36 、 IPD073act1E12-39 、 IPD073act1E12-41 、 IPD073act1E12-42 、 IPD073act1E12-43 、 IPD073act1E12-47
87	22	IPD073-1D2 、 IPD073act1D2-14 、 IPD073act1E12-04 、 IPD073act1E12-06 、 IPD073act1E12-07 、 IPD073act1E12-14 、 IPD073act1E12-15 、 IPD073act1E12-17 、 IPD073act1E12-18 、 IPD073act1E12-19 、 IPD073act1E12-21 、 IPD073act1E12-24 、 IPD073act1E12-25 、 IPD073act1E12-27 、 IPD073act1E12-29 、 IPD073act1E12-31 、 IPD073act1E12-32 、 IPD073act1E12-34 、 IPD073act1E12-35 、 IPD073act1E12-40 、 IPD073act1E12-45 、 IPD073act-Ab-01*

与 IPD073Aa 的同一性%	变体编号	变体名称
88	36	IPD073act1D2-07 、 IPD073act1D2-11 、 IPD073act1D2-12 、 IPD073act1D2-16 、 IPD073act1D2-17 、 IPD073act1D2-20 、 IPD073act1D2-22 、 IPD073act1D2-23 、 IPD073act1D2-25 、 IPD073act1D2-26 、 IPD073act1D2-27 、 IPD073act1D2-29 、 IPD073act1D2-30 、 IPD073act1D2-31 、 IPD073act1D2-32 、 IPD073act1D2-33 、 IPD073act1D2-34 、 IPD073act1D2-37 、 IPD073act1D2-38 、 IPD073act1D2-39 、 IPD073act1D2-40 、 IPD073act1D2-41 、 IPD073act1D2-42 、 IPD073act1D2-45 、 IPD073act1D2-46 、 IPD073act1D2-47 、 IPD073act1D2-48 、 IPD073act1E12-03 、 IPD073act1E12-09 、 IPD073act1E12-16 、 IPD073act1E12-20 、 IPD073act1E12-22 、 IPD073act1E12-23 、 IPD073act1E12-30、 IPD073act1E12-38、 IPD073act1E12-46、
89	15	IPD073act1D2-01 、 IPD073act1D2-02 、 IPD073act1D2-03 、 IPD073act1D2-04 、 IPD073act1D2-06 、 IPD073act1D2-08 、 IPD073act1D2-09 、 IPD073act1D2-10 、 IPD073act1D2-13 、 IPD073act1D2-15 、 IPD073act1D2-19 、 IPD073act1D2-28 、 IPD073act1D2-44、 IPD073act1E12-01、 IPD073act1E12-44
90	2	IPD073act1D2-21、 IPD073act1D2-24
94	19	IPD073act-Ab-04 、 IPD073act-Ab-07 、 IPD073act-Ab-09 、 IPD073act-Ab-16 、 IPD073act-Ab-18 、 IPD073act-Ab-19 、 IPD073act-Ab-20 、 IPD073act-Ab-21 、 IPD073act-Ab-23 、 IPD073act-Ab-24 、 IPD073act-Ab-30 、 IPD073act-Ab-31 、 IPD073act-Ab-34 、 IPD073act-Ab-39 、 IPD073act-Ab-41 、 IPD073act-Ab-43 、 IPD073act-Ab-47 、 IPD073act-Ab-48 、 IPD073act-Ab-49
95	6	IPD073act-Ab-10 、 IPD073act-Ab-11 、 IPD073act-Ab-12 、 IPD073act-Ab-13、 IPD073act-Ab-14IPD073act-Ab-28
98	2	IPD073-lib1-1-31、 IPD073-lib1-1-54
99	1	IPD073-lib1-1-60

[0417] 实例9:大豆(*Glycine max*)的转化和再生

[0419] 通过粒子枪轰击法(Klein等人,Nature[自然](伦敦)327:70-73(1987);美国专利号4,945,050),使用BIORAD Biolistic PDS1000/He仪以及质粒或片段DNA之一来产生转基因大豆系。以下储备溶液和培养基用于大豆植物的转化和再生:

[0420] 储备溶液:

- [0421] 硫酸盐100X储备:
- [0422] 37.0g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、1.69g $MnSO_4 \cdot H_2O$ 、0.86g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.0025g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$
- [0423] 卤化物100X储备:
- [0424] 30.0g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 、0.083g KI、0.0025g $CoCl_2 \cdot 6H_2O$
- [0425] P,B,Mo 100X储备:
- [0426] 18.5g KH_2PO_4 、0.62g H_3BO_3 、0.025g $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$
- [0427] Fe EDTA 100X储备:
- [0428] 3.724g Na2EDTA、2.784g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$
- [0429] 2,4-D储备:
- [0430] 10mg/mL维生素
- [0431] 维生素B5、1000X储备:
- [0432] 100.0g肌醇、1.0g烟酸、1.0g吡哆醇HCl、10g硫酸HCL。
- [0433] 培养基(每升):
- [0434] SB199固体培养基:
- [0435] 1包MS盐(Gibco/BRL-目录号11117-066)、1mL维生素B51000X储备、30g蔗糖、4ml 2,4-D(40mg/L最终浓度)、pH 7.0、2gm脱乙酰吉兰糖胶
- [0436] SB1固体培养基:
- [0437] 1包MS盐(Gibco/BRL-目录号11117-066)、1mL维生素B51000X储备、31.5g葡萄糖、2mL 2,4-D(20mg/L最终浓度)、pH 5.7、8g TC琼脂
- [0438] SB196:
- [0439] 10mL的以上储备液1-4的每种、1mL维生素B5储备、0.463g $(NH_4)_2SO_4$ 、2.83g KNO_3 、1mL 2,4D储备、1g天冬氨酸、10g蔗糖、pH 5.7
- [0440] SB71-4:
- [0441] Gamborg's B5盐、20g蔗糖、5g TC琼脂、pH 5.7。
- [0442] SB103:
- [0443] 1pk.Murashige和Skoog盐混合物、1mL维生素B5储备、750mgMgCl2六水合物、60g麦芽糖、2g脱乙酰吉兰糖胶、pH 5.7。
- [0444] SB166:
- [0445] 补充有5g每升活性炭的SB103。
- [0446] 大豆胚胎悬浮培养起始:
- [0447] 种植后45-55天从可利用的大豆植物中挑出未成熟种子的豆荚,从其壳中取出并放入灭菌的品红盒中。将大豆种子通过在具有1滴IvoryTM皂(即95mL高压蒸汽处理的蒸馏水加5mLClorox®和1滴皂,充分混合)的5%Clorox®溶液中振荡15分钟进行灭菌。使用2L无菌蒸馏水冲洗种子,将少于3mm的那些放置在各个显微镜载玻片上。将种子的小端切割,并将子叶从种皮中压出。将子叶转移到含有SB199培养基的板上(每板25个至30个子叶)持续2周,然后转移至SB1持续2周至4周。将板用纤维带包裹。在这个时间之后,将次级胚切割并置于SB196液体培养基中持续7天。
- [0448] 培养条件:
- [0449] 将大豆胚胎悬浮培养液(cv.93Y21)维持在50mL液体培养基SB196中(在旋转式摇

床中,100rpm-150rpm,26℃,在80-100 μ E/m²/s的光强度的16小时:8小时白天/夜光周期下)。通过将1/2硬币尺寸量的组织(团块一起堆积)接种至50mL新鲜液体SB196中,每7天至14天传代培养培养物。

[0450] 制备DNA用于轰击:

[0451] 在粒子枪轰击程序中,可以使用纯化的1) 整个质粒DNA;或2) 仅含有一个或多个目的重组DNA表达盒的DNA片段。对于每十七次轰击转换,制备每个DNA质粒的每对碱基对含有1皮克至90皮克(pg)的质粒DNA的85 μ L悬浮液。如以下,将DNA质粒或片段共沉淀在金颗粒上。将悬浮中的DNA添加至50 μ L的10mg/mL-60mg/mL 0.6 μ m金颗粒悬浮液中,并随后与50 μ L CaCl₂ (2.5M) 和20 μ L亚精胺(0.1M) 合并。将混合物涡旋5秒,在微量离心机中旋转5秒,除去上清液。然后将DNA涂覆的颗粒用150 μ L的100%乙醇洗涤一次,再次在微量离心机中涡旋并旋转,然后在85 μ L的无水乙醇中重悬浮。然后将5 μ L的DNA涂覆的金颗粒加载在每个载体盘上。

[0452] 用DNA进行组织制备和轰击:

[0453] 将大约100mg的两周龄的悬浮培养物置于一个空的60mm X 15mm培养皿中,并且用移液管从组织中除去残余的液体。将组织放置在距离挡板大约3.5英寸处,并将组织的每个板轰击一次。膜破裂压力设定在650psi,并将该箱抽至-28英寸Hg。轰击后,将来自每个板的组织分开在两个烧瓶之间,放回液体培养基中,并如上所述进行培养。

[0454] 转化胚胎和植物再生的选择:

[0455] 轰击后,将来自每个轰击板的组织分开,并放置在每板轰击的组织的SB196液体培养维持培养基的两个烧瓶中。轰击后7天,每个烧瓶中的液体培养基被补充有100ng/ml选择剂(选择培养基)的新鲜SB196培养维持培养基替代。为了选择转化的大豆细胞,所用的选择剂可以是具有化学名称2-氯-N-((4-甲氧基-6甲基-1,3,5-三嗪-2-基) 氨基) 苯磺酰胺(常用名:DPX-W4189和氯磺隆)的磺酰脲类(SU) 化合物。氯磺隆是杜邦公司(DuPont) 磺酰脲除草剂GLEAN®中的活性成分。每两周更换含有SU的选择培养基,持续8周。在8周选择期后,观察到从未转化的坏死胚发生簇中生长的绿色转化组织岛。将这些假定的转基因事件分离并保存在具有100ng/ml的SU的SB196液体培养基中另外5周,每1-2周更换培养基以产生新的、克隆繁殖的转化的胚发生悬浮培养物。胚胎与SU接触总共约13周的时间。将悬浮培养物传代培养,并保持为未成熟胚芽簇,并还通过各个体细胞胚的成熟和萌芽再生为整个植物。

[0456] 在成熟培养基(在SB166上1周,随后在SB103上3周) 四周后,体细胞胚适应于发芽。然后将它们从成熟培养基中取出并在空的培养皿中干燥长达七天。然后将干燥的胚胎种植在SB71-4培养基中,在与上述相同的光和温度条件下,使其在这些培养基中发芽。将发芽的胚胎转移到灌封培养基中并生长成熟以用于种子生产。

[0457] 应理解,本披露不局限于所描述的特定方法、方案、细胞系、属、以及试剂,因此可以变化。还应当理解的是在此使用的术语是仅为了描述具体实施例的目的,并且不旨在限制本披露的范围。

[0458] 如本文所用,单数形式“一个/种(a/an)”以及“该”包括复数个指示物,除非上下文中另外明确指明。因此,例如,提及“细胞”包括多个这样的细胞,并且提及“蛋白质”包括本领域技术人员已知的一种或多种蛋白质及其等效物等。在此所使用的所有技术和科学术语

具有与本披露所属领域的普通技术人员通常所理解相同的含义,除非另有明确说明。

[0459] 对本披露的不同所示实施例的上述描述并不旨在是详尽的或者限制范围于所披露的精确形式。虽然为了说明目的而在此描述了具体实施例和实例,但是在本披露范围内,如相关领域的技术人员将认识到的,不同的等效修饰是可能的。本文提供的教导可以应用于除了上述实例之外的其他目的。根据上述教导,许多修改和变化是可能的,因此它们在所附权利要求书的范围内。

[0460] 可以根据上述详细描述进行这些改变和其他改变。通常,在以下权利要求书中,所使用的术语不应被解释为将范围限制于说明书和权利要求书中披露的具体实施例。

[0461] 背景技术、详细描述和实例中引用的每个文献(包括专利、专利申请、杂志文章、摘要、手册、书籍或其他披露内容)的全部披露内容通过引用以其整体结合在此。

[0462] 就使用的数字(例如量、温度、浓度等)而言,已努力确保其准确性,但仍应允许有一些实验误差和偏差。除非另有说明,份为重量份,分子量为平均分子量;温度是摄氏度;并且压力为大气压或接近大气压。


```

1                               50
IPD073Aa (1) ---MSWTFYLTITNGTDRLEVTSKSIEWGTWYRDSODDNGP-CSIAPNT
IPD073Ab (1) MKNMSWTFYLTITNGTDRLEVTSKSIEWGTWYRDSODDRGP-CSIIPNT
IPD073Ca (1) ---MAWTFYLTITNATDRVLEVDSSSIEWGTWYRNSVDDRGP-ISIEPNA
IPD073Cb (1) ---MAWTFYLTITNATDRVLEVDSSSIEWGTWYRNSVDDRGP-ISIEPNA
IPD073Cc (1) ---MAWTFYLTITNATDRVLEVDSSSIEWGTWYRNSVDGRGP-ISIEPNA
IPD073Cd (1) ---MSWTFYLTITNATDRKLKENSSSIEWGTWYRNSSDNEGP-VDIEPHS
IPD073Ea (1) ---MAWTFELNITNGTKRRIVLSSKKLSWGYWNRDGVEGQTPIAVIEPNA

51                               100
IPD073Aa (47) TIQALGIRAARGTWTGYECHAQWKDOVPPGEKGYGAVTLMIDVPFSGSND
IPD073Ab (50) TIQALGIRAARGTWTGYECHAQWKDOVPPGEKGYGAITLMIDVPFSGSNA
IPD073Ca (47) TVQALGIRAARGTWTGYECHAQWKDKVPPGOKGYGAVSLMIDVPFSGSND
IPD073Cb (47) TVQSLGIRAARGTWTGYECHAQWKDKVPPGOKGYGAVSLMIDVPFSGSND
IPD073Cc (47) TVQALGIRAARGTWTGYECHAQWKDKVPPGOKGYGAVSLMIDVPFSGSND
IPD073Cd (47) TIQALGIRAAKGTWTGYECHAQWRDVPPRGEKGYGAVTLMISVPFSADNK
IPD073Ea (48) TVHALGVKAARGTWTGYEFSCSWKDDAPPGEKSYGTLDLSIDVPYSGSNK

101                              150
IPD073Aa (97) SSLTSGGALTCYGWONLPSGGHDFNRSITIRAGRDKKLLEEE-----
IPD073Ab (100) SSLTSGGALTTYGWODLPSGGHDFNRSITIRAGRDKKLLEEC-----
IPD073Ca (97) SSLSAGGALTASGWTNLPSSGGHDFSRSITIRAGRDKKLLVEDEGII-PVK
IPD073Cb (97) SSLIAGGALTASGWTNLPSSGGHDFSRSITIRAGRDKKLLILDEGVT-PVN
IPD073Cc (97) SSLVAGGALTASGWTDLPGGGHDFSRSITIRAGRDKKLLILDEGVI-PVK
IPD073Cd (97) SSETAGGALTATGWFDLPTSGHDFNRSVTIRAGRDKQLVVEENTMPNPAE
IPD073Ea (98) SSCTATGGLRISGWDSLPASGHNFVRSIVILAGPOKKAAMVEP---SA

151                              200
IPD073Aa (140) --ALDPVEQEYRDYLLEFAAKNPDVRDWDQVEKELTQVDDFNPLQYIPDG
IPD073Ab (143) --SMDPVEQEYREYLLEFAAKNPDVRDWDQVEKDLTEVDDFNPLKYIPEG
IPD073Ca (146) VKENDAVEEEYRAWLLEVAAKNPDVRNWSDVEKDLOAIDDFNPLQYIPDG
IPD073Cb (146) IKENDAVEEEYRTWLLELAAKNPDVRNWSDVEKDLOAIDDFNPLQYIPDG
IPD073Cc (146) VOKTDAVEEEYRTWLLELAAKNPDVRNWSDVEKDLOAIDDFNPLQYIPDG
IPD073Cd (147) KVKLDLVDAEYKNYLLEFAAKNPDVRNWKDIESRLEQVDDFNPLMYIPDG
IPD073Ea (144) RAFAETDPDELAYQDYORALKAVDVEKWSVDKKLKPIKDFIVQEEHPAN

201                              250
IPD073Aa (188) PTLSRLLARSEPLVIEPELWDGIGDVDYPTPYAQDLFLDEYFAVAIYSV
IPD073Ab (191) PTLSRLLARSEPLVIEPELWDGIGDVDYPTPYAQDLFLDEYFAVAIYSV
IPD073Ca (196) PYLTKRLLARSEPLVVEPALWEGIGDVDYPTPYAQDLFLDEYFAVAIYSV
IPD073Cb (196) PYLTKRLLARSEPLVVEPALWEGIGDVDYPTPYAQDLFLDEYFAVAIYSV
IPD073Cc (196) PYLTKRLLARSEPLVVEPALWEGIGDVDYPTPYAQDLFLDEYFAVAIYSV
IPD073Cd (197) PFTARRLLARSDRYVIEPYLWOGIGDSDYPSPYAKDLFVDEYFAVAIYSV
IPD073Ea (194) VNLTOALVARSEPVDIEQHLWGGIGDPDYPNPYAQELFVKRYFAVAIHSV

```

图1A

```

                251                                     300
IPD073Aa (238) GTDPRSF INIPAGSSRKTSEKITVTS AIKNVLT VSWSLKTS LSEKAVEPV
IPD073Ab (241) GTDPRSF INIPAGSSRKTSEKITVTS AIKNVLT LNWSLKTS LSEKAVEPV
IPD073Ca (246) GNNPRTF INVPAGSTRSTSEKVTVTSA IKNVLT VNWSLKTS LSEKAADPI
IPD073Cb (246) GNNPRTF INVPAGSTRSTSEKVTVTSA IKNVLT VNWSLKTS LSEKAADPI
IPD073Cc (246) GNNPRTF INVPAGSTRSTSEKVTVTSA IKNVLT VNWSLKTS LSEKAADPI
IPD073Cd (247) GNNPRTF INVPAGSTRRTNERVTVTSA IKNILT ISWSLKTS LSKASDPV
IPD073Ea (244) ATNNREI ISLVRTOTQEE SKKI QVTSS IKNVLE TTS I KKS L TQSAE EPL

                301                                     350
IPD073Aa (288) SGSEVAST LDM EFGVTDV LEVSRESVTE SIVEQEF KAPDDSDV L IVPWVF
IPD073Ab (291) SGSEVAST LDM EFGVTDV LEVSRESVTE SIVEQEF KAPEDSDV L IVPWVF
IPD073Ca (296) TGSEVASS MDMEFGVT NVLEVSRESVTE KIVEESFT APDSDV L IVPWVF
IPD073Cb (296) TGSEVASS MDMEFGVT NVLEVSRESVTE KIVEESFT APDSDV L IVPWVF
IPD073Cc (296) TGSEVASS MDMEFGVT NVLEVSRESVTE KIVEESFT APDSDV L IVPWVF
IPD073Cd (297) SGSEVASS LDMEFGVTDVLETS RESVKE TIIIEEF TAPADSDV L IVPWVF
IPD073Ea (294) SGTKVAST LNMEFGVKNVLEVS I K VSE E T I K O T T F T A P S D K D M L I V P W V F

                351                                     400
IPD073Aa (338) STAVIYRRT KKGK VSLVAVSEWAQM OFFKSYRV ETOLKMS -----
IPD073Ab (341) STAVIYRRT KKGK VSLVAVSEWAQM OFFKSYRV ETOLKLS -----
IPD073Ca (346) STAVVIYRRT KKGNVSLVAVSEWAQM OFFKSYRV OTL FKLESGDAS ----
IPD073Cb (346) STAVVIYRRT KKGNVSLVAVSEWAQM OFFKSYRV OTL FKLESGDAS ----
IPD073Cc (346) STAVVIYRRT KKGNVSLVAVSEWAQM OFFKSYRV OTL FKLESGDAS ----
IPD073Cd (347) SKAVIYRRS KKGNI SLVAVSDWADM OFFKSYRV STOTLOS GE-----
IPD073Ea (344) STAVLIYHE DIENNVN LIAASEWAET QIFSSYVKEKND RRFEGN HEDPTAP

```

图1B

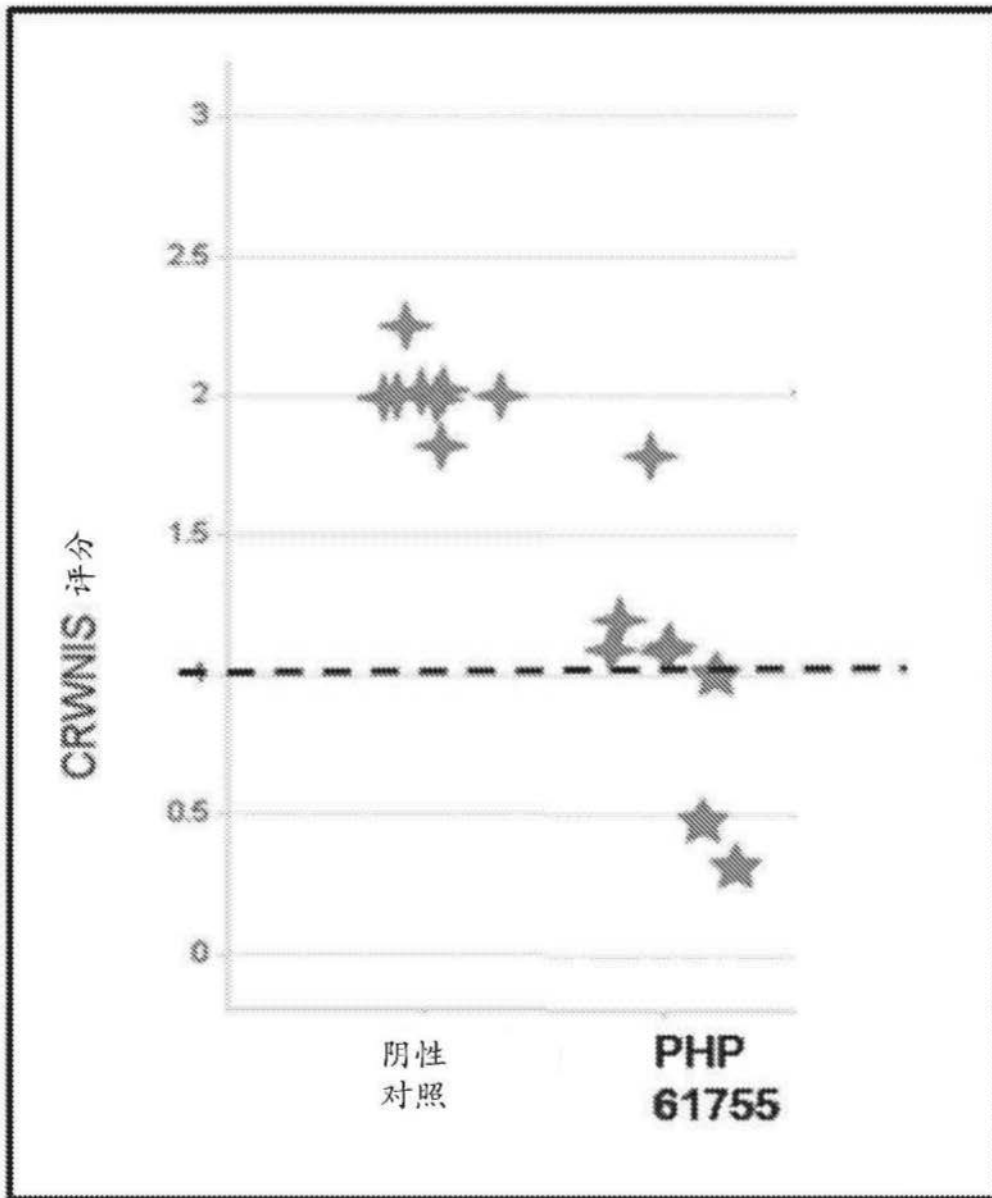


图2