



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114304191 A

(43) 申请公布日 2022. 04. 12

(21) 申请号 202111516734.1

(22) 申请日 2021.12.13

(71) 申请人 北京大北农生物技术有限公司
地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号
院中国农业科学院原子能利用研究所
49号楼

(72) 发明人 常藤玉 王秦扬 张爱红 陶青

(51) Int.Cl.

A01N 63/50 (2020.01)

A01P 7/04 (2006.01)

A01H 1/02 (2006.01)

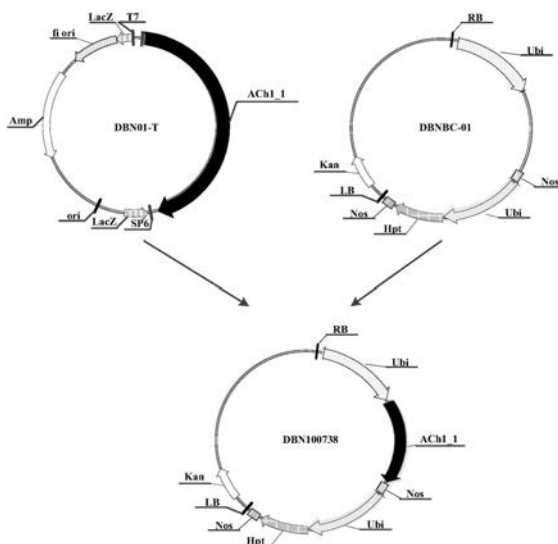
权利要求书1页 说明书14页
序列表6页 附图2页

(54) 发明名称

杀虫蛋白的用途

(57) 摘要

本发明涉及一种杀虫蛋白的用途,所述杀虫蛋白可用于控制蓟马害虫,所述控制蓟马害虫的方法包括:将蓟马害虫至少与ACh1蛋白接触。本发明通过细菌和/或植物体内产生能够杀死蓟马的ACh1蛋白来控制蓟马害虫;与现有技术使用的农业防治方法、化学防治方法、物理防治和生物防治方法相比,本发明对植物进行全生育期、全植株的保护以防治蓟马害虫的侵害,且无污染、无残留,效果稳定、彻底,简单、方便、经济。



1. 一种控制蓟马害虫的方法,其特征在于,包括将蓟马害虫至少与ACh1蛋白接触;
优选地,所述ACh1蛋白存在于至少产生所述ACh1蛋白的宿主细胞中,所述蓟马害虫通过摄食所述宿主细胞至少与所述ACh1蛋白接触;
更优选地,所述ACh1蛋白存在于至少产生所述ACh1蛋白的细菌或转基因植物中,所述蓟马害虫通过摄食所述细菌或所述转基因植物的组织至少与所述ACh1蛋白接触,接触后所述蓟马害虫生长受到抑制和/或导致死亡,以实现蓟马危害植物的控制。
2. 根据权利要求1所述的控制蓟马害虫的方法,其特征在于,所述转基因植物为玉米、大豆、棉花、油菜;
优选地,所述转基因植物的组织为叶片、茎秆、果实、雄穗、雌穗、花药或花丝。
3. 根据权利要求1或2所述的控制蓟马害虫的方法,其特征在于,所述ACh1蛋白为ACh1_1蛋白、ACh1_4蛋白。
优选地,所述ACh1蛋白氨基酸序列具有SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列;
更优选地,所述ACh1蛋白的核苷酸序列具有SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4所示的核苷酸序列。
4. 根据权利要求1至3任一项所述的控制蓟马害虫的方法,其特征在于,所述转基因植物还包括至少一种不同于编码所述ACh1蛋白的核苷酸的第二种核苷酸。
5. 根据权利要求4所述的控制蓟马害虫的方法,其特征在于,所述第二种核苷酸编码Cry类杀虫蛋白质、Vip类杀虫蛋白质、蛋白酶抑制剂、凝集素、 α -淀粉酶或过氧化物酶。
6. 根据权利要求4所述的控制蓟马害虫的方法,其特征在于,所述第二种核苷酸为抑制目标昆虫害虫中重要基因的dsRNA。
7. 根据权利要求1-6所述的控制蓟马害虫的方法,其特征在于,所述蓟马为玉米黄呆蓟马、禾蓟马、稻蓟马、西花蓟马。
8. 一种ACh1蛋白质控制蓟马害虫的用途。
9. 一种产生控制蓟马的植物的方法,其特征在于,包括向所述植物的基因组中引入编码ACh1蛋白的多核苷酸序列。
10. 一种产生控制蓟马害虫的植物种子的方法,其特征在于,包括将由权利要求9所述方法获得的第一植株与第二植株杂交,从而产生含有编码ACh1蛋白的多核苷酸序列的种子。
11. 一种培养控制蓟马害虫的植物的方法,其特征在于,包括:
种植至少一粒植物种子,所述植物种子的基因组中包括编码ACh1蛋白的多核苷酸序列;
使所述植物种子长成植株;
使所述植株在人工接种蓟马害虫和/或蓟马害虫自然发生危害的条件下生长,收获与其他不具有编码ACh1蛋白的多核苷酸序列的植株相比具有减弱的植物损伤和/或具有增加的植物产量的植株。

杀虫蛋白的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种杀虫蛋白的用途,特别是涉及一种ACh1蛋白质通过在植物中表达来控制蓟马为害植物的用途。

背景技术

[0002] 缨翅目昆虫的成虫都有两对缨翅,也就是翅的边缘有像红缨那样的流苏,所以这类昆虫被归类为“缨翅目”。另外,缨翅目昆虫的许多种类都喜欢在一类菊科植物——蓟,如大蓟、小蓟等的花中活动,故又被称为“蓟马”。

[0003] 蓟马为缨翅目(Thysanoptera)昆虫的统称,是重要的经济害虫。如玉米黄呆蓟马对玉米、小麦、大麦等禾本科作物产生为害,导致叶背面呈现断续的银白色条斑,伴随着小污点,叶正面与银白色相对的部分呈现黄色条斑,受害严重造成叶片黄色干枯,甚至毁种。

[0004] 西花蓟马(*frankliniella occidentalis* (Pergande))又名苜蓿蓟马,其食性杂,为原产于美洲地区,入侵至我国,现已在全国均有发现。西花蓟马为害玉米、棉花、大豆、黄瓜、番茄等作物,导致花瓣褪色、叶片皱缩、茎和果则形成伤疤,最终可能使植株枯萎,同时还传播番茄斑萎病毒在内的多种病毒。西花蓟马繁殖能力很强,个体细小,极具隐匿性,一般田间防治难以有效控制。在温室内的稳定温度下,一年可连续发生12-15代,雌虫行两性生殖和孤雌生殖。在15℃-35℃均能发育,从卵到成虫只需14天;27.2℃产卵最多,一只雌虫可产卵229个,在通常的寄主植物上,发育迅速,且繁殖能力极强。

[0005] 玉米是中国重要的粮食作物,每年因蓟马造成的粮食损失巨大,更甚者影响到当地人口的生存状况。为了防治蓟马,人们通常采用的主要防治方法有:农业防治、化学防治、物理防治和生物防治。

[0006] 农业防治是把整个农田生态系统多因素的综合协调管理,调控作物、害虫、环境因素、创造一个有利于作物生长而不利于蓟马发生的农田生态环境。例如加强水肥管理,促使植物生长健壮,减轻为害。但该方式需要耗费较多的人工,并不适用于当前农业工业化趋势。

[0007] 化学防治即农药防治,是利用化学杀虫剂来杀灭害虫,是蓟马综合治理的重要组成部分,它具有快速、方便、简便和高经济效益的特点,特别是蓟马大发生的情况下,是必不可少的应急措施。目前化学防治方法主要是使用吡虫啉、啶虫脒等常规药剂喷施。但由于蓟马繁殖周期短繁殖量大,耐药性产生快。且西花蓟马为害花器官,往往躲藏在花蕊、花瓣腋间,即使施药也很难接触,这也导致触杀型杀虫剂对西花蓟马的防效较低。

[0008] 物理防治主要根据害虫对环境条件中各种物理因素的反应,利用各种物理因素如光、电、色、温湿度等以及机械设备进行诱杀、辐射不育等方法来防治害虫。多数蓟马具有趋黄性,在温室种植时可采用挂黄板的方式来减轻蓟马的为害,但该方法实际在田间作用较小。

[0009] 生物防治是利用某些有益生物或生物代谢产物来控制害虫种群数量,以达到降低或消灭害虫的目的,如寄生性天敌、捕食性天敌和病原性天敌等来抑制有害生物的种群数

量或消灭有害生物的一种防治方法。其特点是对人、畜安全,对环境污染少,对某些害虫可达到长期控制的目的。对蓟马而言,有捕食性蝽、捕食螨、寄生蜂和寄生真菌等,其中最为有效的是捕食性天敌。但不管是哪种天敌,都需要适合的环境便于定植繁衍,而目前的农田生态系统并不适合大量天敌的定植,导致了生物防治需要多次施用,提升了使用成本,而且防治效果仍不理想。

[0010] 为了解决农业防治、化学防治、物理防治和生物防治在实际应用中的局限性,科学家们经过研究发现将编码杀虫蛋白的抗虫基因转入植物中,可获得一些抗虫转基因植物以防治植物虫害。

[0011] 通过将作物进行遗传工程改造,将苏云金芽孢杆菌(Bt)蛋白导入作物中,已经开发出抗害虫的作物。例如利用Cry1Ab开发了对玉米螟具有抗性的玉米。现在,这些转基因作物被广泛应用于农业中,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。虽然它们已被证明对鳞翅目害虫(玉米螟、棉铃虫等)具有相当好的防治效果,但目前尚未发现能够防控蓟马的转基因作物。这主要原因是至今尚未发现对蓟马具有毒力的Cry蛋白。

[0012] ACh1是一类全新杀虫蛋白,其与传统Bt蛋白完全不同。通过蛋白二级结构的分析,推测该蛋白属于 β -开孔蛋白。该类蛋白的作用机制一般为酶切活化、与受体结合、形成寡聚体、在膜表面开孔。其中昆虫肠道内的酶切活化、与昆虫肠道上的受体结合以及肠道内的理化环境决定了该蛋白能否在昆虫肠道细胞膜上完成开孔。该类蛋白由菌体分泌之后,需要在作用对象体内经酶切形成活性蛋白,酶切过程主要在蛋白的氨基端或羧基端进行,将该蛋白变成活性片段。活性蛋白与昆虫肠道上皮细胞膜上的受体结合,形成寡聚体,插入肠膜,导致细胞膜出现穿孔病征,破坏细胞膜内外的渗透压变化及pH平衡等,扰乱昆虫的消化过程,最终导致其死亡。

[0013] 已报道ACh1蛋白对家蚕、马铃薯甲虫害虫有抗虫效果。然而,至今尚无关于通过产生表达ACh1_1和ACh1_4蛋白的转基因植株可以控制蓟马对植物危害的报道。

发明内容

[0014] 本发明的目的是提供一种杀虫蛋白的用途,首次提供了通过产生表达ACh1蛋白来控制蓟马的方法,且有效克服现有技术农业防治、化学防治、物理防治和生物防治等技术缺陷。

[0015] 为实现上述目的,本发明提供了一种控制蓟马害虫的方法,包括将蓟马害虫至少与ACh1蛋白接触。

[0016] 进一步地,所述ACh1蛋白存在于至少产生所述ACh1蛋白的宿主细胞中,所述蓟马害虫通过摄食所述宿主细胞至少与所述ACh1蛋白接触。

[0017] 更进一步地,所述ACh1蛋白存在于至少产生所述ACh1蛋白的细菌或转基因植物中,所述蓟马害虫通过摄食所述细菌或所述转基因植物的组织至少与所述ACh1蛋白接触,接触后所述蓟马害虫生长受到抑制和/或导致死亡,以实现蓟马危害植物的控制。

[0018] 所述转基因植物可以处于任意生育期。

[0019] 所述转基因植物的组织为叶片、茎秆、果实、雄穗、雌穗、花药或花丝。

[0020] 所述对蓟马危害植物的控制不因种植地点和/或种植时间的改变而改变。

- [0021] 所述植物为玉米、大豆、棉花、油菜。
- [0022] 所述接触步骤之前的步骤为种植含有编码所述ACh1蛋白的多核苷酸的植物。
- [0023] 在上述技术方案的基础上,所述ACh1蛋白为ACh1_1蛋白、ACh1_4蛋白。
- [0024] 优选地,所述ACh1蛋白氨基酸序列具有SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列。
- [0025] 在上述技术方案的基础上,所述植物还包括至少一种不同于编码所述ACh1蛋白的核苷酸的第二种核苷酸。
- [0026] 进一步地,所述第二种核苷酸编码Cry类杀虫蛋白质、Vip类杀虫蛋白质、蛋白酶抑制剂、凝集素、 α -淀粉酶或过氧化物酶。
- [0027] 可选择地,所述第二种核苷酸为抑制目标昆虫害虫中重要基因的dsRNA。
- [0028] 所述蓟马为玉米黄呆蓟马、禾蓟马、稻蓟马、西花蓟马。
- [0029] 为实现上述目的,本发明还提供了一种ACh1蛋白质控制蓟马害虫的用途。
- [0030] 为实现上述目的,本发明还提供了一种产生控制蓟马害虫的植物的方法,包括向所述植物的基因组中引入编码ACh1蛋白的多核苷酸序列。
- [0031] 为实现上述目的,本发明还提供了一种产生控制蓟马害虫的植物种子的方法,包括将由所述方法获得的第一植株与第二植株杂交,从而产生含有编码ACh1蛋白的多核苷酸序列的种子。
- [0032] 为实现上述目的,本发明还提供了一种培养控制蓟马害虫的植物的方法,包括:
- [0033] 种植至少一粒植物种子,所述植物种子的基因组中包括编码ACh1蛋白的多核苷酸序列;
- [0034] 使所述植物种子长成植株;
- [0035] 使所述植株在人工接种蓟马害虫和/或蓟马害虫自然发生危害的条件下生长,收获与其他不具有编码ACh1蛋白的多核苷酸序列的植株相比具有减弱的植物损伤和/或具有增加的植物产量的植株。
- [0036] 本发明中所述的“接触”,是指昆虫和/或害虫触碰、停留和/或摄食植物、植物器官、植物组织或植物细胞,所述植物、植物器官、植物组织或植物细胞既可以是其体内表达杀虫蛋白,还可以是所述植物、植物器官、植物组织或植物细胞的表面具有杀虫蛋白和/或具有产生杀虫蛋白的微生物。
- [0037] 本发明术语“控制”和/或“防治”是指蓟马害虫至少与ACh1蛋白接触,接触后蓟马害虫生长受到抑制和/或导致死亡。进一步地,蓟马害虫通过摄食植物组织至少与ACh1蛋白接触,接触后全部或部分蓟马害虫生长受到抑制和/或导致死亡。抑制是指亚致死,即尚未致死但能引起生长发育、行为、生理、生化和组织等方面的某种效应,如生长发育缓慢和/或停止。同时,植物在形态上应是正常的,且可在常规方法下培养以用于产物的消耗和/或生成。此外,含有编码ACh1蛋白的多核苷酸序列的控制蓟马害虫的植物和/或植物种子,在人工接种蓟马害虫和/或蓟马害虫自然发生危害的条件下,与非转基因的野生型植株相比具有减弱的植物损伤,具体表现包括但不限于改善的茎秆抗性、和/或提高的籽粒重量、和/或增产等。ACh1蛋白对蓟马的“控制”和/或“防治”作用是可以独立存在的,不因其它可“控制”和/或“防治”蓟马害虫的物质的存在而减弱和/或消失。具体地,转基因植物(含有编码ACh1蛋白的多核苷酸序列)的任何组织同时和/或不同步地,存在和/或产生,ACh1蛋白和/或可

控制蓟马害虫的另一种物质,则所述另一种物质的存在既不影响ACh1蛋白对蓟马的“控制”和/或“防治”作用,也不能导致所述“控制”和/或“防治”作用完全和/或部分由所述另一种物质实现,而与ACh1蛋白无关。通常情况下,在大田,蓟马害虫摄食植物组织的过程短暂且很难用肉眼观察到,因此,在人工接种蓟马害虫和/或蓟马害虫自然发生危害的条件下,如转基因植物(含有编码ACh1蛋白的多核苷酸序列)的任何组织存在死亡的蓟马害虫、和/或在其上停留生长受到抑制的蓟马害虫、和/或与非转基因的野生型植株相比具有减弱的植物损伤,即为实现了本发明的方法和/或用途,即通过蓟马害虫至少与ACh1蛋白接触以实现控制蓟马害虫的方法和/或用途。

[0038] 在本发明中,ACh1蛋白在一种转基因植物中的表达可以伴随着一个或多个Cry类杀虫蛋白质和/或Vip类杀虫蛋白质的表达。这种超过一种的杀虫毒素在同一株转基因植物中共同表达可以通过遗传工程使植物包含并表达所需的基因来实现。另外,一种植物(第1亲本)可以通过遗传工程操作表达ACh1蛋白质,第二种植物(第2亲本)可以通过遗传工程操作表达Cry类杀虫蛋白质和/或Vip类杀虫蛋白质。通过第1亲本和第2亲本杂交获得表达引入第1亲本和第2亲本的所有基因的后代植物。

[0039] RNA干扰(RNA interference, RNAi)是指在进化过程中高度保守的、由双链RNA(double-stranded RNA, dsRNA)诱发的、同源mRNA高效特异性降解的现象。因此在本发明中可以使用RNAi技术特异性剔除或关闭目标昆虫害虫中特定基因的表达。

[0040] 本发明所述的西花蓟马(*frankliniella occidentalis* (Pergande))属于缨翅目蓟马科花蓟马属。卵,肾形,白色,0.25mm长,田间条件下卵期5~15天,而在25℃下平均2.6天。若虫:有2个龄期。若虫孵化后即开始取食,初孵若虫体白色,蜕皮前变为黄色,2龄若虫蜡黄色,非常活跃,取食量为1龄若虫的3倍,接近成熟时表现负趋光性,离开植物入土。若虫的发育起点温度为9.4℃,田间若虫的发育历期为9~12天,到冬季可延长至60天,而在恒温25℃条件下1龄和2龄若虫发育仅需2.3和3.7天,若虫和成虫常小群集取食。成虫细小,平均体长1.5mm。翅窄,翅前缘缨毛显著短于后缘缨毛。能飞、善跳,能借助气流作短距离迁移。体色从淡黄色至褐色,触角8节。雌虫经常将卵产在叶肉组织、花序或幼果内。

[0041] 西花蓟马食性杂,已知寄主植物多达500余种,包括重要的菊科、葫芦科、豆科、十字花科等作物,主要有李、桃、苹果、葡萄、草莓、茄、辣椒、生菜、番茄、豆、兰花、菊花等,随着西花蓟马的不断扩散蔓延,其寄主种类一直在持续增加。对于不同种类的寄主植物,西花蓟马虽有喜好程度的差别,但均能生存且具有相当的繁殖能力。西花蓟马以特殊的口器刺吸寄主植物的叶、芽、花或茄果汁液,被害叶片初呈白色斑点后连成片,叶片正面似斑点病害,叶背则有黑色虫粪,严重危害时叶片变小、皱缩,甚至黄花、干枯、调萎,花器受害呈白斑点或呈褐色,果实受害多留下创痕,甚至造成疮疤,花卉作物受害后表现为叶片和花瓣褪色并留下食痕,影响花卉的外观和商品价值,受侵染的花蕾花朵畸形,严重者造成花不能正常开放。西花蓟马远距离扩散主要依靠人为因素。种苗、花卉及其它农产品的调运,尤其是切花运输及人工携带是其远距离传播的主要方式。其生存能力强,经过辗转运销到外埠后西花蓟马仍能存活。另外,该害虫与很容易随风飘散,易随衣服、运输工具等携带传播。西花蓟马容易传播病毒病,我国已经将其列为检疫对象。

[0042] 本发明中所述的ACh1蛋白是一类 β -开孔蛋白,而昆虫肠道内的酶切活化、与昆虫肠道上的受体结合以及肠道内的理化环境是 β -开孔蛋白起作用的关键点,只有能够将 β -开

孔蛋白进行酶切成活性片段后,并与昆虫肠道上皮细胞膜上的受体结合,才有可能使得某个 β -开孔蛋白对该害虫具有抗虫效果。受体结合过程需要精确匹配,往往开孔蛋白或受体蛋白上的一个氨基酸差异就能造成与同一受体的结合发生改变。例如同属于 β -开孔蛋白的气溶素蛋白(aerolysin)在R336A突变后,对CTLL-2细胞系的毒力产生了质的变化(Osusky, Teschk等,2008)。同样由于受体发生了变化也可导致同一个 β -开孔蛋白的毒力发生变化。例如采用dsRNA将MDCK细胞系上的HAVCR1基因进行抑制,导致了 ϵ -毒蛋白(epsilon-toxin)对细胞的毒力产生了百倍差异(Ivie, Fennessey等,2011)。这充分说明了 β -开孔蛋白与昆虫体内酶和受体的相互作用方式是复杂且难以预料的。

[0043] 本发明中所述的植物、植物组织或植物细胞的基因组,是指植物、植物组织或植物细胞内的任何遗传物质,且包括细胞核和质体和线粒体基因组。

[0044] 本发明中所述的多核苷酸和/或核苷酸形成完整“基因”,在所需宿主细胞中编码蛋白质或多肽。本领域技术人员很容易认识到,可以将本发明的多核苷酸和/或核苷酸置于目的宿主中的调控序列控制下。

[0045] 本领域技术人员所熟知的,DNA典型的以双链形式存在。在这种排列中,一条链与另一条链互补,反之亦然。由于DNA在植物中复制产生了DNA的其它互补链。这样,本发明包括对序列表中示例的多核苷酸及其互补链的使用。本领域常使用的“编码链”指与反义链结合的链。为了在体内表达蛋白质,典型将DNA的一条链转录为一条mRNA的互补链,它作为模板翻译出蛋白质。mRNA实际上是从DNA的“反义”链转录的。“有义”或“编码”链有一系列密码子(密码子是三个核苷酸,一次读三个可以产生特定氨基酸),其可作为开放阅读框(ORF)阅读来形成目的蛋白质或肽。本发明还包括与示例的DNA有相当功能的RNA。

[0046] 本发明中核酸分子或其片段在严格条件下与本发明ACh1基因杂交。任何常规的核酸杂交或扩增方法都可以用于鉴定本发明ACh1基因的存在。核酸分子或其片段在一定情况下能够与其他核酸分子进行特异性杂交。本发明中,如果两个核酸分子能形成反平行的双链核酸结构,就可以说这两个核酸分子彼此间能够进行特异性杂交。如果两个核酸分子显示出完全的互补性,则称其中一个核酸分子是另一个核酸分子的“互补物”。本发明中,当一个核酸分子的每一个核苷酸都与另一个核酸分子的对应核苷酸互补时,则称这两个核酸分子显示出“完全互补性”。如果两个核酸分子能够以足够的稳定性相互杂交从而使它们在至少常规的“低度严格”条件下退火且彼此结合,则称这两个核酸分子为“最低程度互补”。类似地,如果两个核酸分子能够以足够的稳定性相互杂交从而使它们在常规的“高度严格”条件下退火且彼此结合,则称这两个核酸分子具有“互补性”。从完全互补性中偏离是可以允许的,只要这种偏离不完全阻止两个分子形成双链结构。为了使一个核酸分子能够作为引物或探针,仅需保证其在序列上具有充分的互补性,以使得在所采用的特定溶剂和盐浓度下能形成稳定的双链结构。

[0047] 本发明中,基本同源的序列是一段核酸分子,该核酸分子在高度严格条件下能够和相匹配的另一段核酸分子的互补链发生特异性杂交。促进DNA杂交的适合的严格条件,例如,大约在45°C条件下用 $6.0 \times$ 氯化钠/柠檬酸钠(SSC)处理,然后在50°C条件下用 $2.0 \times$ SSC洗涤,这些条件对本领域技术人员是公知的。例如,在洗涤步骤中的盐浓度可以选自低度严格条件的约 $2.0 \times$ SSC、50°C到高度严格条件的约 $0.2 \times$ SSC、50°C。此外,洗涤步骤中的温度条件可以从低度严格条件的室温约22°C,升高到高度严格条件的约65°C。温度条件和盐浓

度可以都发生改变,也可以其中一个保持不变而另一个变量发生改变。优选地,本发明所述严格条件可为在 $6\times\text{SSC}$ 、 0.5% SDS溶液中,在 65°C 下发生特异性杂交,然后用 $2\times\text{SSC}$ 、 0.1% SDS和 $1\times\text{SSC}$ 、 0.1% SDS各洗膜1次。

[0048] 因此,具有抗虫活性并在严格条件下与本发明SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4杂交的序列包括在本发明中。这些序列与本发明序列至少大约 40% - 50% 同源,大约 60% 、 65% 或 70% 同源,甚至至少大约 75% 、 80% 、 85% 、 90% 、 91% 、 92% 、 93% 、 94% 、 95% 、 96% 、 97% 、 98% 、 99% 或更大的序列同源性。

[0049] 本发明中所述的基因和蛋白质不但包括特定的示例序列,还包括保存了所述特定示例的蛋白质的杀虫活性特征的部分和/片段(包括与全长蛋白质相比在内和/或末端缺失)、变体、突变体、取代物(有替代氨基酸的蛋白质)、嵌合体和融合蛋白。所述“变体”或“变异”是指编码同一蛋白或编码有杀虫活性的等价蛋白的核苷酸序列。所述“等价蛋白”是指与权利要求的蛋白具有相同或基本相同的抗蓟马害虫的生物活性的蛋白。

[0050] 本发明中所述的DNA分子或蛋白序列的“片段”或“截短”是指涉及的原始DNA或蛋白序列(核苷酸或氨基酸)的一部分或其人工改造形式(例如适合植物表达的序列),前述序列的长度可存在变化,但长度足以确保(编码)蛋白质为昆虫毒素。

[0051] 使用标准技术可以修饰基因和容易的构建基因变异体。例如,本领域熟知制造点突变的技术。又例如美国专利号5605793描述了在随机断裂后使用DNA重装配产生其它分子多样性的方法。可以使用商业化核酸内切酶制造全长基因的片段,并且可以按照标准程序使用核酸外切酶。例如,可以使用酶诸如Ba131或定点诱变从这些基因的末端系统地切除核苷酸。还可以使用多种限制性内切酶获取编码活性片段的基因。可以使用蛋白酶直接获得这些毒素的活性片段。

[0052] 本发明可以从 β -开孔蛋白分离物和/或DNA文库衍生出等价蛋白和/或编码这些等价蛋白的基因。有多种方法获取本发明的杀虫蛋白。例如,可以使用本发明公开和要求保护的杀虫蛋白的抗体从蛋白质混合物鉴定和分离其它蛋白。特别地,抗体可能是由蛋白最恒定和与其它 β -开孔蛋白最不同的蛋白部分引起的。然后通过免疫沉淀、酶联免疫吸附测定(ELISA)或western印迹方法使用这些抗体专一地鉴定有特征活性的等价蛋白。可使用本领域标准程序容易的制备本发明中公开的蛋白或等价蛋白或这类蛋白的片段的抗体。然后可以从微生物中获得编码这些蛋白的基因。

[0053] 由于遗传密码子的丰余性,多种不同的DNA序列可以编码相同的氨基酸序列。产生这些编码相同或基本相同的蛋白的可替代DNA序列正在本领域技术人员的技术水平内。这些不同的DNA序列包括在本发明的范围内。所述“基本上相同的”序列是指有氨基酸取代、缺失、添加或插入但实质上不影响杀虫活性的序列,亦包括保留杀虫活性的片段。

[0054] 本发明中氨基酸序列的取代、缺失或添加是本领域的常规技术,优选这种氨基酸变化为:小的特性改变,即不显著影响蛋白的折叠和/或活性的保守氨基酸取代;小的缺失,通常约1-30个氨基酸的缺失;小的氨基或羧基端延伸,例如氨基端延伸一个甲硫氨酸残基;小的连接肽,例如约20-25个残基长。

[0055] 保守取代的实例是在下列氨基酸组内发生的取代:碱性氨基酸(如精氨酸、赖氨酸和组氨酸)、酸性氨基酸(如谷氨酸和天冬氨酸)、极性氨基酸(如谷氨酰胺、天冬酰胺)、疏水性氨基酸(如亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸)、芳香氨基酸(如苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸),以

及小分子氨基酸(如甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸和甲硫氨酸)。通常不改变特定活性的那些氨基酸取代在本领域内是众所周知的,并且已由,例如,N.Neurath和R.L.Hill在1979年纽约学术出版社(Academic Press)出版的《Protein》中进行了描述。最常见的互换有Ala/Ser,Val/Ile,Asp/Glu,Thu/Ser,Ala/Thr,Ser/Asn,Ala/Val,Ser/Gly,Tyr/Phe,Ala/Pro,Lys/Arg,Asp/Asn,Leu/Ile,Leu/Val,Ala/Glu和Asp/Gly,以及它们相反的互换。

[0056] 对于本领域的技术人员而言显而易见地,这种取代可以在对分子功能起重要作用的区域之外发生,而且仍产生活性多肽。对于由本发明的多肽,其活性必需的并因此选择不被取代的氨基酸残基,可以根据本领域已知的方法,如定点诱变或丙氨酸扫描诱变进行鉴定(如参见,Cunningham和Wells,1989,Science 244:1081-1085)。后一技术是在分子中每一个带正电荷的残基处引入突变,检测所得突变分子的抗虫活性,从而确定对该分子活性而言重要的氨基酸残基。底物-酶相互作用位点也可以通过其三维结构的分析来测定,这种三维结构可由核磁共振分析、结晶学或光亲和标记等技术测定(参见,如de Vos等,1992,Science 255:306-312;Smith等,1992,J.Mol.Biol 224:899-904;Wlodaver等,1992,FEBS Letters 309:59-64)。

[0057] 在本发明中,ACh1蛋白包括但不限于SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2,与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列具有一定同源性的氨基酸序列也包括在本发明中。这些序列与本发明序列类似性/相同性典型的大于78%,优选的大于85%,更优选的大于90%,甚至更优选的大于95%,并且可以大于99%。也可以根据更特定的相同性和/或类似性范围定义本发明的优选的多核苷酸和蛋白质。例如与本发明示例的序列有78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的相同性和/或类似性。

[0058] 本发明中所述调控序列包括但不限于启动子、转运肽、终止子、增强子、前导序列、内含子以及其它可操作地连接到所述ACh1蛋白的调节序列。

[0059] 所述启动子为植物中可表达的启动子,所述的“植物中可表达的启动子”是指确保与其连接的编码序列在植物细胞内进行表达的启动子。植物中可表达的启动子可为组成型启动子。指导植物内组成型表达的启动子的示例包括但不限于,来源于花椰菜花叶病毒的35S启动子、玉米Ubi启动子、水稻GOS2基因的启动子等。备选地,植物中可表达的启动子可为组织特异的启动子,即该启动子在植物的一些组织内如在绿色组织中指导编码序列的表达水平高于植物的其他组织(可通过常规RNA试验进行测定),如PEP羧化酶启动子。备选地,植物中可表达的启动子可为创伤诱导启动子。创伤诱导启动子或指导创伤诱导的表达模式的启动子是指当植物经受机械或由昆虫啃食引起的创伤时,启动子调控下的编码序列的表达较正常生长条件下有显著提高。创伤诱导启动子的示例包括但不限于,马铃薯和西红柿的蛋白酶抑制基因(pinI和pinII)和玉米蛋白酶抑制基因(MPI)的启动子。

[0060] 所述转运肽(又称分泌信号序列或导向序列)是指导转基因产物到特定的细胞器或细胞区室,对受体蛋白质来说,所述转运肽可以是异源的,例如,利用编码叶绿体转运肽序列靶向叶绿体,或者利用‘KDEL’保留序列靶向内质网,或者利用大麦植物凝集素基因的CTPP靶向液泡。

[0061] 所述前导序列包含但不限于,小RNA病毒前导序列,如EMCV前导序列(脑心肌炎病毒5'非编码区);马铃薯Y病毒组前导序列,如MDMV(玉米矮缩花叶病毒)前导序列;人类免疫

球蛋白质重链结合蛋白质 (BiP) ; 苜蓿花叶病毒的外壳蛋白质mRNA的不翻译前导序列 (AMV RNA4) ; 烟草花叶病毒 (TMV) 前导序列。

[0062] 所述增强子包含但不限于, 花椰菜花叶病毒 (CaMV) 增强子、玄参花叶病毒 (FMV) 增强子、康乃馨风花环病毒 (CERV) 增强子、木薯脉花叶病毒 (CsVMV) 增强子、紫茉莉花叶病毒 (MMV) 增强子、夜香树黄化曲叶病毒 (CmYLCV) 增强子、木尔坦棉花曲叶病毒 (CLCuMV)、鸭跖草黄斑驳病毒 (CoYMV) 和花生褪绿线条花叶病毒 (PCLSV) 增强子。

[0063] 对于单子叶植物应用而言, 所述内含子包含但不限于, 玉米hsp70内含子、玉米泛素内含子、Adh内含子1、蔗糖合酶内含子或水稻Act1内含子。对于双子叶植物应用而言, 所述内含子包含但不限于, CAT-1内含子、pKANNIBAL内含子、PIV2内含子和“超级泛素”内含子。

[0064] 所述终止子可以为在植物中起作用的适合多聚腺苷酸化信号序列, 包括但不限于, 来源于农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 胭脂碱合成酶 (NOS) 基因的多聚腺苷酸化信号序列、来源于蛋白酶抑制剂 II (pin II) 基因的多聚腺苷酸化信号序列、来源于豌豆 ssRUBISCO E9基因的多聚腺苷酸化信号序列和来源于 α -微管蛋白 (α -tubulin) 基因的多聚腺苷酸化信号序列。

[0065] 本发明中所述“有效连接”表示核酸序列的联结, 所述联结使得一条序列可提供对相连序列来说需要的功能。在本发明中所述“有效连接”可以为将启动子与感兴趣的序列相连, 使得该感兴趣的序列的转录受到该启动子控制和调控。当感兴趣的序列编码蛋白并且想要获得该蛋白的表达时“有效连接”表示: 启动子与所述序列相连, 相连的方式使得得到的转录物高效翻译。如果启动子与编码序列的连接是转录物融合并且想要实现编码的蛋白的表达时, 制造这样的连接, 使得得到的转录物中第一翻译起始密码子是编码序列的起始密码子。备选地, 如果启动子与编码序列的连接是翻译融合并且想要实现编码的蛋白的表达时, 制造这样的连接, 使得5'非翻译序列中含有的第一翻译起始密码子与启动子相联结, 并且连接方式使得得到的翻译产物与编码想要的蛋白的翻译开放读码框的关系是符合读码框的。可以“有效连接”的核酸序列包括但不限于: 提供基因表达功能的序列 (即基因表达元件, 例如启动子、5'非翻译区域、内含子、蛋白编码区域、3'非翻译区域、聚腺苷化位点和/或转录终止子)、提供DNA转移和/或整合功能的序列 (即T-DNA边界序列、位点特异性重组酶识别位点、整合酶识别位点)、提供选择性功能的序列 (即抗生素抗性标记物、生物合成基因)、提供可计分标记物功能的序列、体外或体内协助序列操作的序列 (即多接头序列、位点特异性重组序列) 和提供复制功能的序列 (即细菌的复制起点、自主复制序列、着丝粒序列)。

[0066] 本发明中所述的“杀虫”或“抗虫”是指对农作物害虫是有毒的, 从而实现“控制”和/或“防治”农作物害虫。优选地, 所述“杀虫”或“抗虫”是指杀死农作物害虫。更具体地, 目标昆虫是蓟马害虫。

[0067] 本发明中ACh1蛋白对蓟马害虫具有毒性。本发明中的植物, 特别是玉米、大豆和棉花, 在其基因组中含有外源DNA, 所述外源DNA包含编码ACh1蛋白的核苷酸序列, 蓟马害虫通过摄食植物组织与该蛋白接触, 接触后蓟马害虫生长受到抑制和/或导致死亡。抑制是指致死或亚致死。同时, 植物在形态上应是正常的, 且可在常规方法下培养以用于产物的消耗和/或生成。此外, 该植物可基本消除对化学或生物杀虫剂的需要 (所述化学或生物杀虫剂

为针对ACh1蛋白所靶向的蓟马害虫的杀虫剂)。

[0068] 植物材料中杀虫蛋白(β -开孔蛋白)的表达水平可通过本领域内所描述的多种方法进行检测,例如通过应用特异引物对组织内产生的编码杀虫蛋白质的mRNA进行定量,或直接特异性检测产生的杀虫蛋白质的量。

[0069] 可以应用不同的试验测定植物中 β -开孔蛋白的杀虫效果。本发明中目标昆虫主要为蓟马。

[0070] 本发明中,所述ACh1蛋白可以具有序列中SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列。除了包含ACh1蛋白的编码区外,也可包含其他元件,例如编码选择性标记的蛋白质。

[0071] 此外,包含编码本发明ACh1蛋白的核苷酸序列的表达盒在植物中还可以与至少一种编码除草剂抗性基因的蛋白质一起表达,所述除草剂抗性基因包括但不限于,草胺磷抗性基因(如bar基因、pat基因)、苯敌草抗性基因(如pmpH基因)、草甘膦抗性基因(如EPSPS基因)、溴苯腈(bromoxynil)抗性基因、磺酰脲抗性基因、对除草剂茅草枯的抗性基因、对氨基脲的抗性基因或谷氨酰胺合成酶抑制剂(如PPT)的抗性基因,从而获得既具有高杀虫活性、又具有除草剂抗性的转基因植物。

[0072] 本发明中,将外源DNA导入植物,如将编码所述ACh1蛋白的基因或表达盒或重组载体导入植物细胞,常规的转化方法包括但不限于,农杆菌介导的转化、微量发射轰击、直接将DNA摄入原生质体、电穿孔或晶须硅介导的DNA导入。

[0073] 本发明提供了一种杀虫蛋白的用途,具有以下优点:

[0074] 1、内因防治。现有技术主要是通过外部作用即外因来控制蓟马害虫的危害,如农业防治、化学防治、物理防治和生物防治;而本发明是通过植物体内产生能够杀死蓟马的ACh1蛋白来控制蓟马害虫的,即通过内因来防治。

[0075] 2、无污染、无残留。现有技术使用的化学防治方法虽然对控制蓟马害虫的危害起到了一定作用,但同时也对人、畜和农田生态系统带来了污染、破坏和残留;使用本发明控制蓟马害虫的方法,可以消除上述不良后果。

[0076] 3、全生育期防治。现有技术使用的控制蓟马害虫的方法都是阶段性的,而本发明是对植物进行全生育期的保护,转基因植物(ACh1蛋白)从发芽、生长,一直到开花、结果,都可以避免遭受蓟马的侵害。

[0077] 4、全植株防治。现有技术使用的控制蓟马害虫的方法大多是局部性的,如叶面喷施;而本发明是对整个植株进行保护,如转基因植物(ACh1蛋白)的根、叶片、茎秆、果实、雄穗、雌穗、花药或花丝等都是可以抵抗蓟马侵害的。

[0078] 5、效果稳定。现有技术使用的无论是农业防治方法还是物理防治方法都需要利用环境条件对害虫进行防治,可变因素较多;本发明是使所述ACh1蛋白在植物体内进行表达,有效地克服了环境条件不稳定的缺陷,且本发明转基因植物(ACh1蛋白)的防治效果在不同地点、不同时间、不同遗传背景也都是稳定一致的。

[0079] 6、简单、方便、经济。本发明只需种植能够表达ACh1蛋白的转基因植物即可,而不需要采用其它措施,从而节省了大量人力、物力和财力。

[0080] 7、效果彻底。现有技术使用的控制蓟马害虫的方法,其效果是不彻底的,只起到减轻作用;而本发明转基因植物(ACh1蛋白)可以造成蓟马幼虫的大量死亡。

[0081] 下面通过附图和实施例,对本发明的技术方案做进一步的详细描述。

附图说明

[0082] 图1为本发明杀虫蛋白的用途的含有ACh1核苷酸序列的重组表达载体DBN01-T构建流程图;

[0083] 图2为本发明杀虫蛋白的用途的含有ACh1核苷酸序列的重组表达载体DBN01-B构建流程图。

具体实施方式

[0084] 下面通过具体实施例进一步说明本发明杀虫蛋白的用途的技术方案。

[0085] 第一实施例、基因的获得和合成

[0086] 1、获得核苷酸序列

[0087] ACh1_1杀虫蛋白质的氨基酸序列(309个氨基酸),如序列表中SEQ ID NO:1所示;编码相应于所述ACh1_1杀虫蛋白质的氨基酸序列的ACh1_1核苷酸序列(930个核苷酸),如序列表中SEQ ID NO:3所示。

[0088] ACh1_4杀虫蛋白质的氨基酸序列(309个氨基酸),如序列表中SEQ ID NO:2所示;编码相应于所述ACh1_4杀虫蛋白质的氨基酸序列的ACh1_4核苷酸序列(930个核苷酸),如序列表中SEQ ID NO:4所示。

[0089] 2、合成上述核苷酸序列

[0090] 所述ACh1_1核苷酸序列(如序列表中SEQ ID NO:3所示)、所述ACh1_4核苷酸序列(如序列表中SEQ ID NO:4所示)由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

[0091] 第二实施例、重组表达载体的构建及重组表达载体转化农杆菌

[0092] 1、构建含有ACh1基因的重组克隆载体

[0093] 将合成的ACh1_1核苷酸序列连入克隆载体pGEM-T(Promega, Madison, USA, CAT: A3600)上,操作步骤按Promega公司产品pGEM-T载体说明书进行,得到重组克隆载体DBN01-T,其构建流程如图1所示(其中,Amp表示氨苄青霉素抗性基因;f1表示噬菌体f1的复制起点;LacZ为LacZ起始密码子;SP6为SP6 RNA聚合酶启动子;T7为T7 RNA聚合酶启动子;ACh1_1为ACh1_1核苷酸序列(SEQ ID NO:3);MCS为多克隆位点)。

[0094] 然后将重组克隆载体DBN01-T用热激方法转化大肠杆菌T1感受态细胞(Transgen, Beijing, China, CAT:CD501),挑取白色菌落,在LB液体培养基(胰蛋白胨10g/L、酵母提取物5g/L、NaCl 10g/L、氨苄青霉素100mg/L,用NaOH调pH至7.5)中于温度37℃条件下培养过夜。碱法提取其质粒,于温度-20℃保存备用。

[0095] 提取的质粒经酶切鉴定后,对阳性克隆进行测序验证,结果表明重组克隆载体DBN01-T中插入的所述ACh1_1核苷酸序列为序列表中(SEQ ID NO:3)所示的核苷酸序列,即ACh1_1核苷酸序列正确插入。

[0096] 按照上述构建重组克隆载体DBN01-T的方法,将合成的所述ACh1_4核苷酸序列连入克隆载体pGEM-T上,得到重组克隆载体DBN02-T,其中,ACh1_4为ACh1_4核苷酸序列(SEQ ID NO:4)。酶切和测序验证重组克隆载体DBN02-T中所述ACh1_4核苷酸序列正确插入。

[0097] 2、构建含有ACh1基因的重组表达载体

[0098] 用限制性内切酶分别酶切重组克隆载体DBN01-T和表达载体DBNBC-01(载体骨架:pCAMBIA2301(CAMBIA机构可以提供)),将切下的ACh1_1核苷酸序列片段插到表达载体DBNBC-01的限制性内切酶酶切位点间,利用常规的酶切方法构建载体是本领域技术人员所熟知的,构建成重组表达载体DBN01-B,其构建流程如图2所示(Kan:卡那霉素基因;RB:右边界;prUbi:玉米泛素(Ubiquitin)基因启动子(SEQ ID NO:5);ACh1_1:ACh1_1核苷酸序列(SEQ ID NO:3);tNos:胭脂碱合成酶基因的终止子(SEQ ID NO:6);Hpt:潮霉素磷酸转移酶基因(SEQ ID NO:7);LB:左边界)。

[0099] 将重组表达载体DBN01-B用热激方法转化大肠杆菌T1感受态细胞,挑取白色菌落,在LB液体培养基(胰蛋白胨10g/L、酵母提取物5g/L、NaCl 10g/L、卡那霉素50mg/L,用NaOH调pH至7.5)中于温度37℃条件下培养过夜,碱法提取其质粒。将提取的质粒用限制性内切酶酶切后鉴定,并将阳性克隆进行测序鉴定,结果表明重组表达载体DBN01-B中的核苷酸序列含有为序列表中SEQ ID NO:3所示核苷酸序列,即ACh1_1核苷酸序列。

[0100] 按照上述构建重组表达载体DBN01-B的方法,将酶切重组克隆载体DBN02-T切下的所述ACh1_4核苷酸序列插入表达载体DBNBC-01,得到重组表达载体DBN02-B。酶切和测序验证重组表达载体DBN02-B中的核苷酸序列含有为序列表中SEQ ID NO:4所示核苷酸序列,即ACh1_4核苷酸序列。所述ACh1_4核苷酸序列可以连接所述Ubi启动子和Nos终止子。

[0101] 3、重组表达载体转化农杆菌

[0102] 对已经构建正确的重组表达载体DBN01-B、DBN02-B用液氮法转化到农杆菌LBA4404(Invitrogen,Chicago,USA,CAT:18313-015)中,其转化条件为:100μl农杆菌LBA4404、3μl质粒DNA(重组表达载体);置于液氮中10分钟,37℃温水浴10分钟;将转化后的农杆菌LBA4404接种于LB试管中于温度28℃、转速为200rpm条件下培养2小时,涂于含50mg/L的利福平(Rifampicin)和100mg/L的卡那霉素的LB平板上直至长出阳性单克隆,挑取单克隆培养并提取其质粒,用限制性内切酶对重组表达载体DBN01-B、DBN02-B酶切后进行验证,结果表明重组表达载体DBN01-B、DBN02-B结构完全正确。

[0103] 第三实施例、转基因玉米植株的获得

[0104] 按照常规采用的农杆菌侵染法,将无菌培养的玉米品种综31(Z31)的幼胚与第二实施例中3所述的重组表达载体转化的农杆菌共培养,以将第二实施例中2构建的重组表达载体DBN01-B、DBN02-B中的T-DNA(包括玉米Ubiquitin基因的启动子序列、ACh1_1核苷酸序列、ACh1_4核苷酸序列、Hpt基因和Nos终止子序列)转入到玉米染色体组中,获得了转入ACh1_1核苷酸序列的玉米植株、转入ACh1_4核苷酸序列的玉米植株;同时以野生型玉米植株作为对照。

[0105] 对于农杆菌介导的玉米转化,简要地,从玉米中分离未成熟的幼胚,用农杆菌悬浮液接触幼胚,其中农杆菌能够将ACh1_1核苷酸序列和/或ACh1_4核苷酸序列传递至幼胚之一的至少一个细胞(步骤1:侵染步骤),在此步骤中,幼胚优选地浸入农杆菌悬浮液($OD_{660} = 0.4-0.6$,侵染培养基(MS盐4.3g/L、MS维他命、干酪素300mg/L、蔗糖68.5g/L、葡萄糖36g/L、乙酰丁香酮(AS)40mg/L、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)1mg/L,pH5.3)中以启动接种。幼胚与农杆菌共培养一段时期(3天)(步骤2:共培养步骤)。优选地,幼胚在侵染步骤后在固体培养基(MS盐4.3g/L、MS维他命、干酪素300mg/L、蔗糖20g/L、葡萄糖10g/L、乙酰丁香酮(AS)100mg/L、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)1mg/L、琼脂8g/L,pH5.8)上培养。在此共培养阶段后,

可以有一个选择性的“恢复”步骤。在“恢复”步骤中,恢复培养基(MS盐4.3g/L、MS维他命、干酪素300mg/L、蔗糖30g/L、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D) 1mg/L、琼脂8g/L, pH5.8)中至少存在一种已知抑制农杆菌生长的抗生素(头孢霉素),不添加植物转化体的选择剂(步骤3:恢复步骤)。优选地,幼胚在有抗生素但没有选择剂的固体培养基上培养,以消除农杆菌并为感染细胞提供恢复期。接着,接种的幼胚在含选择剂(潮霉素)的培养基上培养并选择生长着的转化愈伤组织(步骤4:选择步骤)。优选地,幼胚在有选择剂的筛选固体培养基(MS盐4.3g/L、MS维他命、干酪素300mg/L、蔗糖5g/L、潮霉素50mg/L、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D) 1mg/L、琼脂8g/L, pH5.8)上培养,导致转化的细胞选择性生长。然后,愈伤组织再生成植物(步骤5:再生步骤),优选地,在含选择剂的培养基上生长的愈伤组织在固体培养基(MS分化培养基和MS生根培养基)上培养以再生植物。

[0106] 筛选得到的抗性愈伤组织转移到所述MS分化培养基(MS盐4.3g/L、MS维他命、干酪素300mg/L、蔗糖30g/L、6-苄基腺嘌呤2mg/L、潮霉素50mg/L、琼脂8g/L, pH5.8)上,25℃下培养分化。分化出来的小苗转移到所述MS生根培养基(MS盐2.15g/L、MS维他命、干酪素300mg/L、蔗糖30g/L、吲哚-3-乙酸1mg/L、琼脂8g/L, pH5.8)上,25℃下培养至约10cm高,移至温室培养至结实。在温室中,每天于28℃下培养16小时,再于20℃下培养8小时。

[0107] 第四实施例、用TaqMan验证转基因玉米植株

[0108] 分别取转入ACh1_1核苷酸序列、ACh1_4核苷酸序列的玉米植株的叶片约100mg作为样品,用Qiagen的DNeasy Plant Maxi Kit提取其基因组DNA,通过Taqman探针荧光定量PCR方法检测Hpt基因的拷贝数以确定ACh1_1基因、ACh1_4基因的拷贝数。同时以野生型玉米植株作为对照,按照上述方法进行检测分析。实验设3次重复,取平均值。

[0109] 检测Hpt基因拷贝数的具体方法如下:

[0110] 步骤11、分别取转入ACh1_1核苷酸序列、ACh1_4核苷酸序列的玉米植株和野生型玉米植株的叶片各100mg,分别在研钵中用液氮研成匀浆,每个样品取3个重复;

[0111] 步骤12、使用Qiagen的DNeasy Plant Mini Kit提取上述样品的基因组DNA,具体方法参考其产品说明书;

[0112] 步骤13、用NanoDrop 2000(Thermo Scientific)测定上述样品的基因组DNA浓度;

[0113] 步骤14、调整上述样品的基因组DNA浓度至同一浓度值,所述浓度值的范围为80-100ng/ μ l;

[0114] 步骤15、采用Taqman探针荧光定量PCR方法鉴定样品的拷贝数,以经过鉴定已知拷贝数的样品作为标准品,以野生型玉米植株的样品作为对照,每个样品3个重复,取其平均值;荧光定量PCR引物和探针序列分别是:

[0115] 以下引物和探针用来检测Hpt核苷酸序列:

[0116] 引物1:cagggtgtcacgttgcaaga如序列表中SEQ ID NO:8所示;

[0117] 引物2:ccgctcgtctggctaagatc如序列表中SEQ ID NO:9所示;

[0118] 探针1:tgctgaaaccgaactgcccgtg如序列表中SEQ ID NO:10所示;

[0119] PCR反应体系为:

	JumpStart™ Taq ReadyMix™ (Sigma)	10 μl
[0120]	50×引物/探针混合物	1 μl
	基因组 DNA	3 μl
	水 (ddH ₂ O)	6 μl

[0121] 所述50×引物/探针混合物包含1mM浓度的每种引物各45μl, 100μM浓度的探针50μl和860μl 1×TE缓冲液, 并且在4℃, 贮藏在离心管中。

[0122] PCR反应条件为:

	步骤	温度	时间
	21	95℃	5 分钟
[0123]	22	95℃	30 秒
	23	60℃	1 分钟
	24	回到步骤 22, 重复 40 次	

[0124] 利用SDS2.3软件(Applied Biosystems)分析数据。

[0125] 通过分析Hpt基因拷贝数的实验结果表明, ACh1_1核苷酸序列、ACh1_4核苷酸序列均已整合到所检测的玉米植株的染色体组中, 而且转入ACh1_1核苷酸序列的玉米植株、ACh1_4核苷酸序列的玉米植株均获得了单拷贝的转基因玉米植株。

[0126] 第五实施例、转基因玉米植株的抗虫效果检测

[0127] 将转入ACh1_1核苷酸序列的玉米植株、转入ACh1_4核苷酸序列的玉米植株; 相应的野生型玉米植株, 以及经Taqman鉴定为非转基因的玉米植株对西花蓟马进行抗虫效果检测。

[0128] 分别取转入ACh1_1核苷酸序列的玉米植株、转入ACh1_4核苷酸序列的玉米植株、野生型玉米植株和经Taqman鉴定为非转基因的玉米植株(V3-V4期)的新鲜叶片(心叶), 用无菌水冲洗干净并用纱布将叶片上的水吸干, 然后将玉米叶片去除叶脉, 同时剪成约1cm×4cm的长条状, 取1片剪后的长条状叶片放入圆形塑料培养皿底部的保湿滤纸上, 每个培养皿中放10头西花蓟马(幼虫), 虫试培养皿加盖后, 在温度26±1℃, 相对湿度70%-80%、光周期(光/暗)16:8的条件下放置5天后, 统计西花蓟马幼虫的致死率和叶片损伤情况, 致死率=死亡虫数/接虫总数×100%。转入ACh1_1核苷酸序列的共3个株系(S1、S2和S3), 转入ACh1_4核苷酸序列的共3个株系(S4、S5和S6), 经Taqman鉴定为非转基因的(NGM)共1个株系, 野生型的(CK)共1个株系; 从每个株系选5株进行测试, 每株重复3次。结果如表1所示。

[0129] 表1、转基因玉米植株接种西花蓟马的抗虫实验结果

	蛋白编号	供试昆虫
		西花蓟马
[0130]	ACh1_1	+
	ACh1_4	+
	NGM	-
	CK	-

[0131] “+”代表有抗虫效果；“-”代表无抗虫效果

[0132] 表1的结果表明：转入ACh1_1核苷酸序列的玉米植株、转入ACh1_4核苷酸序列的玉米植株对西花蓟马均具有较好的杀虫效果；而野生型玉米植株及Taqman鉴定为非转基因的植株的西花蓟马幼虫基本不致死。

[0133] 检测结果还表明，转入ACh1_1核苷酸序列的玉米植株、转入ACh1_4核苷酸序列玉米植株大体上只受到轻微损伤。

[0134] 由此证明转入ACh1_1核苷酸序列的玉米植株、转入ACh1_4核苷酸序列玉米植株都显示出抗蓟马的活性，这种活性足以对蓟马的生长产生不良效应从而使其在田间得以控制。同时通过控制蓟马为害，也有可能降低玉米上病害的发生，极大的提高玉米的产量及品质。

[0135] 综上所述，本发明杀虫蛋白的用途通过植物体内产生能够杀死蓟马的ACh1蛋白来控制蓟马害虫；与现有技术使用的农业防治方法、化学防治方法、物理防治方法和生物防治方法相比，本发明对植物进行全生育期、全植株的保护以防治蓟马害虫的侵害，且无污染、无残留，效果稳定、彻底，简单、方便、经济。

[0136] 最后所应说明的是，以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制，尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明，本领域的普通技术人员应当理解，可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换，而不脱离本发明技术方案的精神和范围。

序列表

<110> 北京大北农生物技术有限公司

<120> 杀虫蛋白的用途

<130> DBNBC160

<160> 10

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 309

<212> PRT

<213> 人工序列-ACh1_1氨基酸序列(Artificial Sequence)

<400> 1

```

Met Ile Phe Leu Ala Ile Leu Asp Leu Lys Ser Leu Val Leu Asn Ala
1           5           10           15
Ile Asn Tyr Trp Gly Pro Lys Asn Asn Asn Gly Ile Gln Gly Gly Asp
           20           25           30
Phe Gly Tyr Pro Ile Ser Glu Lys Gln Ile Asp Thr Ser Ile Ile Thr
           35           40           45
Ser Thr His Pro Arg Leu Ile Pro His Asp Leu Thr Ile Pro Gln Asn
           50           55           60
Leu Glu Thr Ile Phe Thr Thr Thr Gln Val Leu Thr Asn Asn Thr Asp
65           70           75           80
Leu Gln Gln Ser Gln Thr Val Ser Phe Ala Lys Lys Thr Thr Thr Thr
           85           90           95
Thr Ser Thr Ser Thr Thr Asn Gly Trp Thr Glu Gly Gly Lys Ile Ser
           100          105          110
Asp Thr Leu Glu Glu Lys Val Ser Val Ser Ile Pro Phe Ile Gly Glu
           115          120          125
Gly Gly Gly Lys Asn Ser Thr Thr Ile Glu Ala Asn Phe Ala His Asn
           130          135          140
Ser Ser Thr Thr Thr Phe Gln Gln Ala Ser Thr Asp Ile Glu Trp Asn
145          150          155          160
Ile Ser Gln Pro Val Leu Val Pro Pro Arg Lys Gln Val Val Ala Thr
           165          170          175
Leu Val Ile Met Gly Gly Asn Phe Thr Ile Pro Met Asp Leu Met Thr
           180          185          190
Thr Ile Asp Ser Thr Glu His Tyr Ser Gly Tyr Pro Ile Leu Thr Trp
           195          200          205
Ile Ser Ser Pro Asp Asn Ser Tyr Asn Gly Pro Phe Met Ser Trp Tyr

```

210	215	220
Phe Ala Asn Trp Pro Asn Leu Pro Ser Gly Phe Gly Pro Leu Asn Ser		
225	230	235
Asp Asn Thr Val Thr Tyr Thr Gly Ser Val Val Ser Gln Val Ser Ala		
	245	250
Gly Val Tyr Ala Thr Val Arg Phe Asp Gln Tyr Asp Ile His Asn Leu		
	260	265
Arg Thr Ile Glu Lys Thr Trp Tyr Ala Arg His Ala Thr Leu His Asn		
	275	280
Gly Lys Lys Ile Ser Ile Asn Asn Val Thr Glu Met Ala Pro Thr Ser		
290	295	300
Pro Ile Lys Thr Asn		
305		
<210> 2		
<211> 309		
<212> PRT		
<213> 人工序列-ACh1_4氨基酸序列(Artificial Sequence)		
<400> 2		
Met Ile Phe Leu Ala Ile Leu Asp Leu Lys Ser Leu Val Leu Asn Ala		
1	5	10
Ile Asn Tyr Trp Gly Pro Lys Asn Asn Asn Gly Ile Gln Gly Gly Asp		
	20	25
Phe Gly Tyr Pro Ile Ser Glu Ala Gln Ile Asp Thr Ser Ile Ile Thr		
	35	40
Ser Thr His Pro Arg Leu Ile Pro His Asp Leu Thr Ile Pro Gln Asn		
	50	55
Leu Glu Thr Ile Phe Thr Thr Thr Gln Val Leu Thr Asn Asn Thr Asp		
65	70	75
Leu Gln Gln Ser Gln Thr Val Ser Phe Ala Lys Lys Thr Thr Thr Thr		
	85	90
Thr Ser Thr Ser Thr Thr Asn Gly Trp Thr Glu Gly Gly Ala Ile Ser		
	100	105
Asp Thr Leu Glu Glu Lys Val Ser Val Ser Ile Pro Phe Ile Gly Glu		
	115	120
Gly Gly Gly Lys Asn Ser Thr Thr Ile Glu Ala Asn Phe Ala His Asn		
	130	135
Ser Ser Thr Thr Thr Phe Gln Gln Ala Ser Thr Asp Ile Glu Trp Asn		
145	150	155
Ile Ser Gln Pro Val Leu Val Pro Pro Ala Lys Gln Val Val Ala Thr		

	165		170		175
Leu Val Ile Met Gly Gly Asn Phe Thr Ile Pro Met Asp Leu Met Thr					
	180		185		190
Thr Ile Asp Ser Thr Glu His Tyr Ser Gly Tyr Pro Ile Leu Thr Trp					
	195		200		205
Ile Ser Ser Pro Asp Asn Ser Tyr Asn Gly Pro Phe Met Ser Trp Tyr					
	210		215		220
Phe Ala Asn Trp Pro Asn Leu Pro Ser Gly Phe Gly Pro Leu Asn Ser					
225		230		235	240
Asp Asn Thr Val Thr Tyr Thr Gly Ser Val Val Ser Gln Val Ser Ala					
	245		250		255
Gly Val Tyr Ala Thr Val Arg Phe Asp Gln Tyr Asp Ile His Asn Leu					
	260		265		270
Ala Thr Ile Glu Lys Thr Trp Tyr Ala Arg His Ala Thr Leu His Asn					
	275		280		285
Gly Lys Lys Ile Ser Ile Asn Asn Val Thr Glu Met Ala Pro Thr Ser					
	290		295		300

Pro Ile Lys Thr Asn

305

<210> 3

<211> 930

<212> DNA

<213> 人工序列-ACh1_1核苷酸序列(Artificial Sequence)

<400> 3

```

atgatttttt tggctatact agatttaaaa tcaactggtgt tgaatgcat caactattgg 60
gggccgaaaa acaacaacgg tattcagggt ggtgattttg gttaccgat tagcgaaaag 120
cagattgaca ccagcattat tacctctacc caccgcgctc tgattccgca tgatcttacg 180
atccccgaga atttggaaac ctttttacc actacgcaag tcctgacgaa caacaccgac 240
ctgcagcaaa gccaaaccgt tagctttgct aaaaagacca ctaccacgac ctgcacctt 300
acgacgaacg gctggaccga gggcggcaag atctccgata ccttgaggga aaaggtgtcc 360
gtgtctatcc cgttcacgga cgaaggcggc ggtaagaact ccaccacaat cgaggcgaat 420
ttcgcgcata actcctcaac gaccacattt caacaggcaa gcaccgacat cgagtggaaat 480
atctcccaac cggttctggt gccgccgcgc aaacagggtg ttgcgacctt ggttattatg 540
ggcggcaatt tcaccatccc gatggattta atgaccacga tcgacagcac tgagcactac 600
agcggttacc cgatcctgac ctggattagc agccccgata actcctacaa tggccccattc 660
atgagctggt acttcgcgaa ctggccgaat ctgccgagcg gtttcggccc actgaacagc 720
gacaacacgg ttacctatac cggtagcgtt gtctcgcaag tgagcgcggg ggtgtatgcc 780
acgggtgcgtt ttgatcagta tgacatccac aatctgcgca ccatcgagaa gacctgttac 840
gcccgtcatg ctaccctgca caacggtaaa aaaatcagca tcaataacgt gaccgaaatg 900

```

gcaccgacct ctccgatcaa aaccaactaa 930

<210> 4

<211> 930

<212> DNA

<213> 人工序列-ACh1_4核苷酸序列(Artificial Sequence)

<400> 4

atgattttttt tggctatact agatttaaaa tccttggttt tgaatgcgat caactactgg 60
 ggtccgaaga acaacaacgg catccaaggt ggtgatttcg gttatccgat cagcgaagcc 120
 cagattgaca cctcaatcat cacctccacc catccgcgcc tgattccgca cgatttgacc 180
 atcccgcaaa acttggaac catctttacc acgaccagg tactgaccaa caacaccgac 240
 ctgcaacaga gccaaaccgt gtcttttctgt aaaaagacta ccacgacgac ctctacctct 300
 acaacgaacg gctggaccga ggggtggcgca atctccgaca cctggagga aaaggtgagc 360
 gtttctatcc cgttcattgg tgaaggcggc ggaaaaaaca gcactacgat tgaagcgaac 420
 ttcgcgcaca acagcagcac tacgaccttt cagcaagcga gcaccgatat tgagtggaat 480
 atttcccagc cggttctggt gccgcctgca aagcaggtcg tggccactct ggttattatg 540
 ggtggtaatt tcaccatacc gatggattta atgaccacga ttgatagcac cgagcactac 600
 agcggctacc cgatcctgac ctggattagc agcccggata atagttataa tggtccttcc 660
 atgagctggt acttcgcaa ctggccaaat cttccgagcg gctttggccc actgaattct 720
 gacaacaccg tgacctatac cggtagcgtg gtctcgaag tgagcgcggg tgtttatgcg 780
 accgttcggt ttgaccagta cgacatccac aatctcgcga ccatcgagaa aacctggtac 840
 gctcgtcatg ctacctgca taacggcaaa aagatcagca ttaataactg tacggagatg 900
 gcaccgacct caccgattaa aaccaactaa 930

<210> 5

<211> 1992

<212> DNA

<213> 启动子prUbi (Zea mays)

<400> 5

ctgcagtgca gcgtgaccgg gtcgtgcccc tctctagaga taatgagcat tgcattgtcta 60
 agttataaaa aattaccaca tatttttttt gtcacacttg tttgaagtgc agtttatcta 120
 tctttataca tatatttaaa ctttactcta cgaataatat aatctatagt actacaataa 180
 tatcagtgtt ttagagaatc atataaatga acagtttagc atggtctaaa ggacaattga 240
 gtattttgac aacaggactc tacagtttta tcttttttagt gtgcattgtg tctctttttt 300
 ttttgcaaat agcttcacct atataatact tcatccattt tattagtaca tccatttagg 360
 gtttaggggt aatggttttt atagactaat ttttttagta catctatttt attctatttt 420
 agcctctaaa ttaagaaaac taaaactcta ttttagtttt tttatttaat aatttagata 480
 taaaatagaa taaaataaag tgactaaaaa ttaaacaat accctttaag aaattaaaaa 540
 aactaaggaa acatttttct tgtttcgagt agataatgcc agcctgttaa acgccgtcga 600
 cgagtctaac ggacaccaac cagcgaacca gcagcgtcgc gtcgggcca gcaagcaga 660
 cggcacggca tctctgtcgc tgcctctgga cccctctcga gagttccgct ccaccgttgg 720

acttgctccg ctgtcggcat ccagaaattg cgtggcggag cggcagacgt gagccggcac 780
 ggcaggcggc ctctcctcc tctcacggca ccggcagcta cgggggattc ctttcccacc 840
 gctccttcgc tttcccttcc tcgcccggc taataaatag acaccccctc cacaccctct 900
 ttccccaacc tcgtgttggt cggagcgcac acacacacia ccagatctcc cccaaatcca 960
 cccgctcggca cctccgcttc aaggtacgcc gctcgtcctc ccccccccc ctctctacct 1020
 tctctagatc ggcgttccgg tccatggta gggcccggta gttctacttc tgttcatggt 1080
 tgtgttagat ccgtgtttgt gttagatccg tgctgctagc gttcgtacac ggatgcgacc 1140
 tgtacgtcag acacgttctg attgctaact tgccagtgtt tctctttggg gaatcctggg 1200
 atggctctag ccgttccgca gacgggatcg atttcatgat tttttttggt tcgttgcata 1260
 gggtttggtt tgcccttttc ctttatttca atatatgccg tgcacttggt tgcgggtca 1320
 tcttttcatg ctttttttg tcttggttgt gatgatgtgg tctggttggg cggtcgttct 1380
 agatcggagt agaattctgt ttcaaacctac ctggtggatt tattaatfff ggatctgtat 1440
 gtgtgtgcca tacatattca tagttacgaa ttgaagatga tggatggaaa tatcgatcta 1500
 ggataggtat acatgttgat gcgggtttta ctgatgcata tacagagatg ctttttgttc 1560
 gcttggttgt gatgatgtgg tgtggttggg cggtcgttca ttcgttctag atcggagtag 1620
 aatactgttt caaacctacct ggtgtattta ttaatfffgg aactgtatgt gtgtgtcata 1680
 catcttcata gttacgagtt taagatggat ggaaatatcg atctaggata ggtatacatg 1740
 ttgatgtggg ttttactgat gcatatacat gatggcatat gcagcatcta ttcatatgct 1800
 ctaaccttga gtacctatct attataataa acaagtatgt tttataatta ttttgatctt 1860
 gatatacttg gatgatggca tatgcagcag ctatatgtgg attttttttag ccctgccttc 1920
 atacgctatt tatttgcttg gtactgtttc tttgtcgat gtcaccctg ttgtttgggt 1980
 ttacttctgc ag 1992

<210> 6

<211> 253

<212> DNA

<213> 胭脂碱合成酶基因的终止子 (*Agrobacterium tumefaciens*)

<400> 6

gatcgttcaa acatttgca ataaagtffc ttaagattga atcctgttgc cggctttgcg 60
 atgattatca tataatftct gttgaattac gtttagcatg taataattaa catgtaatgc 120
 atgacgttat ttatgagatg ggtttttatg attagatgcc cgcaattata catttaatac 180
 gcgatagaaa acaaaaatata gcgcgcaaac taggataaat tatcgcgcgc ggtgtcatct 240
 atgttactag atc 253

<210> 7

<211> 1026

<212> DNA

<213> 潮霉素磷酸转移酶基因 (*Salmonella enterica*)

<400> 7

atgaaaaagc ctgaactcac cgcgacgtct gtcgagaagt ttctgatcga aaagttcgac 60
 agcgtctccg acctgatgca gctctcggag ggcaagaat ctcgtgcttt cagcttcgat 120

gtaggagggc gtggatatgt cctgcgggta aatagctgcg ccgatggttt ctacaaagat 180
 cgttatgttt atcggcactt tgcacggcc gcgctcccga ttccggaagt gcttgacatt 240
 ggggaattca gcgagagcct gacctattgc atctcccgc gtgcacaggg tgtcacgttg 300
 caagacctgc ctgaaaccga actgcccgt gttctgcagc cggctcgcga ggccatggat 360
 gcgatcgctg cggccgatct tagccagacg agcgggttcg gccattcgg accgcaagga 420
 atcggtcaat aactacatg gcgtgattc atatgcgcga ttgctgatcc ccatgtgtat 480
 cactggcaaa ctgtgatgga cgacaccgtc agtgcgtccg tcgctcaggc tctcgatgag 540
 ctgatgcttt gggccgagga ctgccccgaa gtccggcacc tcgtgcacgc ggatttcggc 600
 tccaacaatg tcctgacgga caatggccgc ataacagcgg tcattgactg gagcgaggcg 660
 atgttcgggg attcccata cgaggtcgcc aacatcttct tctggaggcc gtggttggt 720
 tgtatggagc agcagacgcg ctacttcgag cggaggcacc cggagcttgc aggatcgccg 780
 cggctccggg cgtatatget ccgcattggt cttgaccaac tctatcagag cttggttgac 840
 ggcaatttcg atgatgcagc ttgggcgcag gtcgatgagc acgcaatcgt ccgatccgga 900
 gccgggactg tcgggcgtac acaaatcgcc cgcagaagcg cggccgtctg gaccgatggc 960
 tgtgtagaag tactcgccga tagtggaaac cgacgcccc gcactcgtcc gagggcaag 1020
 gaatag 1026

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列-检测Hpt的引物1(Artificial Sequence)

<400> 8

caggggtgtca cgttgcaaga 20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列-检测Hpt的引物2(Artificial Sequence)

<400> 9

ccgctcgtct ggctaagatc 20

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列-检测Hpt的探针1(Artificial Sequence)

<400> 10

tgccctgaaac cgaactgccc gctg 24

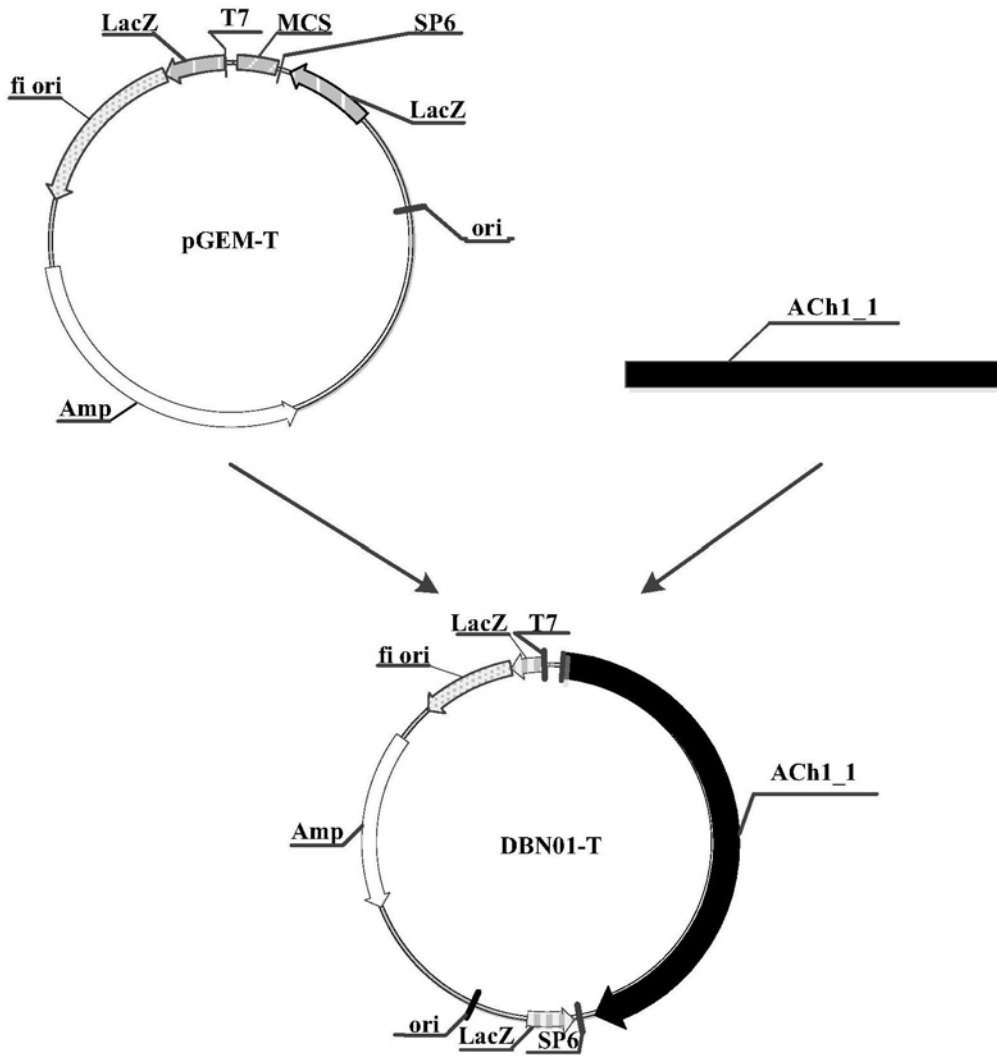


图1

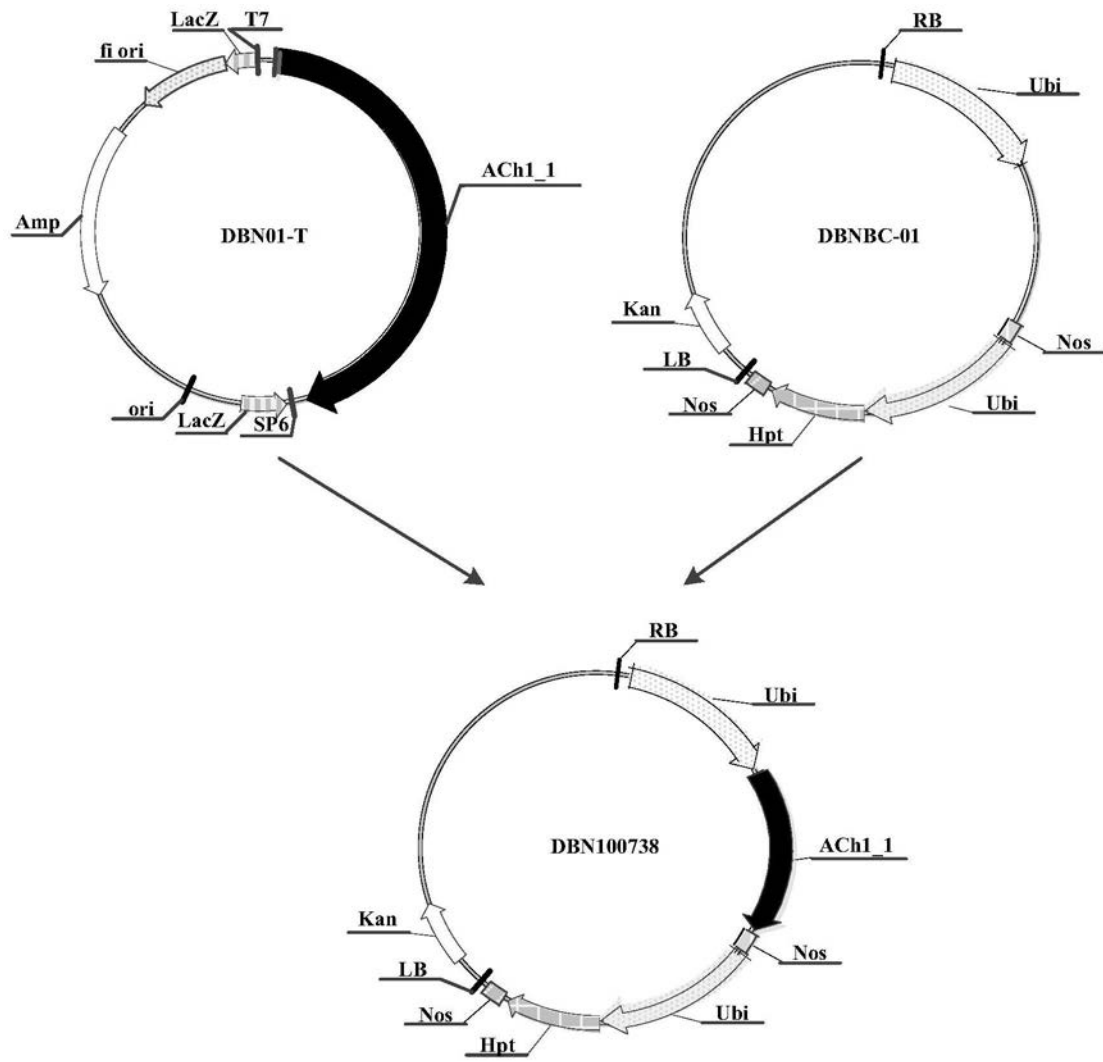


图2