



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104920425 B

(45)授权公告日 2018.06.19

(21)申请号 201510257136.5

A01H 1/02(2006.01)

(22)申请日 2015.05.20

A01H 4/00(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

A01G 13/00(2006.01)

申请公布号 CN 104920425 A

A01G 22/20(2018.01)

(43)申请公布日 2015.09.23

C12N 15/82(2006.01)

(73)专利权人 北京大北农科技集团股份有限公司

C12N 15/84(2006.01)

地址 100080 北京市海淀区中关村大街27号14层

C12N 15/89(2006.01)

专利权人 北京大北农生物技术有限公司

C12N 15/87(2006.01)

审查员 王莉敏

(72)发明人 杨旭 张爱红

(51)Int.Cl.

A01N 47/44(2006.01)

A01P 7/04(2006.01)

A01H 5/00(2018.01)

权利要求书1页 说明书21页

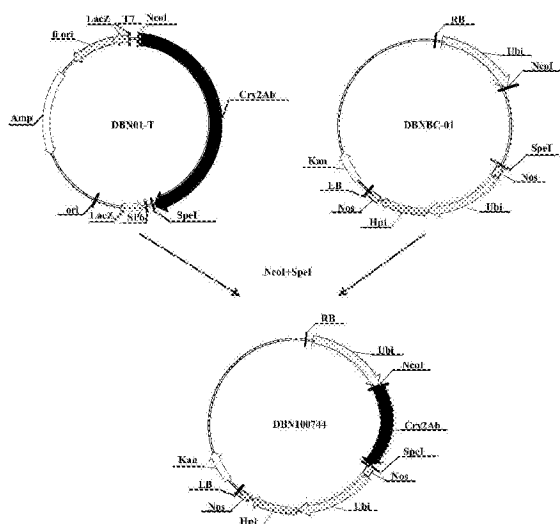
序列表15页 附图3页

(54)发明名称

杀虫蛋白的用途

(57)摘要

本发明涉及一种杀虫蛋白的用途,所述控制高粱条螟害虫的方法包括:将高粱条螟害虫至少与Cry2Ab蛋白接触。本发明通过植物体内产生能够杀死高粱条螟的Cry2Ab蛋白来控制高粱条螟害虫;与现有技术使用的农业防治方法、化学防治方法和物理防治方法相比,本发明对植物进行全生育期、全植株的保护以防治高粱条螟害虫的侵害,且无污染、无残留,效果稳定、彻底,简单、方便、经济。



1. 一种控制高粱条螟害虫的方法,其特征在于,包括高粱条螟害虫至少摄食Cry2Ab蛋白。
2. 根据权利要求1所述的控制高粱条螟害虫的方法,其特征在于,所述Cry2Ab蛋白存在于至少产生所述Cry2Ab蛋白的宿主细胞中,所述高粱条螟害虫通过摄食所述宿主细胞至少与所述Cry2Ab蛋白接触。
3. 根据权利要求2所述的控制高粱条螟害虫的方法,其特征在于,所述Cry2Ab蛋白存在于至少产生所述Cry2Ab蛋白的细菌或转基因植物中,所述高粱条螟害虫通过摄食所述细菌或转基因植物的组织至少与所述Cry2Ab蛋白接触,接触后所述高粱条螟害虫生长受到抑制和/或导致死亡,以实现高粱条螟危害植物的控制。
4. 根据权利要求3所述的控制高粱条螟害虫的方法,其特征在于,所述植物来自玉米、高粱、甘蔗、粟、麻或薏米。
5. 根据权利要求2至4任一项所述的控制高粱条螟害虫的方法,其特征在于,所述接触步骤之前的步骤为种植含有编码所述Cry2Ab蛋白的多核苷酸的植物。
6. 根据权利要求1至5任一项所述的控制高粱条螟害虫的方法,其特征在于,所述Cry2Ab蛋白的氨基酸序列具有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列。
7. 根据权利要求6所述的控制高粱条螟害虫的方法,其特征在于,所述Cry2Ab蛋白的核苷酸序列具有SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列。
8. 根据权利要求2至7任一项所述的控制高粱条螟害虫的方法,其特征在于,所述植物还可以包括至少一种不同于编码所述Cry2Ab蛋白的核苷酸的第二种核苷酸。
9. 根据权利要求8所述的控制高粱条螟害虫的方法,其特征在于,所述第二种核苷酸编码Cry类杀虫蛋白质、Vip类杀虫蛋白质、蛋白酶抑制剂、凝集素、 α -淀粉酶或过氧化物酶。
10. 根据权利要求9所述的控制高粱条螟害虫的方法,其特征在于,所述第二种核苷酸编码Cry1A.105蛋白。
11. 根据权利要求10所述的控制高粱条螟害虫的方法,其特征在于,所述Cry1A.105蛋白的氨基酸序列具有SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列。
12. 根据权利要求11所述的控制高粱条螟害虫的方法,其特征在于,所述第二种核苷酸具有SEQ ID NO:4所示的核苷酸序列。
13. 根据权利要求8所述的控制高粱条螟害虫的方法,其特征在于,所述第二种核苷酸为抑制目标昆虫害虫中重要基因的dsRNA。
14. 一种Cry2Ab蛋白质控制高粱条螟害虫的用途。

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Cry2Ab蛋白质通过在植物中表达来控制高粱条螟为害植物的用途。

背景技术

[0002] 高粱条螟*Chilo sacchariphagus*属鳞翅目,螟蛾科。又名甘蔗条螟,或高粱钻心虫。主要分布在东亚、南亚、东南亚及印度洋地区。国内分布极广,东北、华北、华东和华南大部份地区都有发生。可为害玉米、高粱、粟、麻、甘蔗等作物。在北方旱粮地区,主要为害玉米、高粱和粟等作物,并常和玉米螟混合发生,造成枯心苗;同时也是南方甘蔗上的主要害虫。

[0003] 玉米是中国重要的粮食作物,随着全球温室效应的加强,近两年温度不断上升,虫害发生种类及数量都有所提高。高粱条螟以幼虫在初期为害心叶,后期则可蛀食茎秆、叶鞘,阻碍养分输送,使茎秆易受风折断。对产量有严重影响,通常损失可达10%-40%。为了防治高粱条螟,人们通常采用的主要防治方法有:农业防治、化学防治和物理防治。

[0004] 农业防治是把整个农田生态系统多因素的综合协调管理,调控作物、害虫、环境因素、创造一个有利于作物生长而不利于高粱条螟发生的农田生态环境。在越冬幼虫化蛹与羽化之前,将高粱或玉米秸秆处理完毕,以减少越冬虫源。秸秆处理可采用粉碎、烧毁、沤肥、铡碎、泥封等不同方法。因农业防治必须服从作物布局和增产的要求,应用有一定的局限性,不能作为应急措施,在高粱条螟爆发时就显得无能为力。

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

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

[0007] 为了解决农业防治、化学防治和物理防治在实际应用中的局限性,科学家们经过研究发现将来自于苏云金芽孢杆菌的编码杀虫蛋白的抗虫基因转入植物中,可获得一些抗虫转基因植物以防治植物虫害。Cry2Ab杀虫蛋白是众多杀虫蛋白中的一种,是由苏云金芽孢杆菌产生的不溶性伴孢结晶蛋白。

[0008] Cry2Ab蛋白被昆虫摄入进入中肠,毒蛋白原毒素被溶解在昆虫中肠的碱性pH环境下。蛋白N-和C-末端被碱性蛋白酶消化,将原毒素转变成活性片段;活性片段和昆虫中肠上皮细胞膜上受体结合,插入肠膜,导致细胞膜出现穿孔病灶,破坏细胞膜内外的渗透压变化及pH平衡等,扰乱昆虫的消化过程,最终导致其死亡。

[0009] 已证明转Cry2Ab基因的植株可以抵抗草地贪食夜蛾害虫的侵害,然而,至今尚无关于通过产生表达Cry2Ab蛋白的转基因植株来控制高粱条螟对植物危害的报道。

发明内容

[0010] 本发明的目的是提供一种杀虫蛋白的用途,首次提供了通过产生表达Cry2Ab蛋白的转基因植株来控制高粱条螟对植物危害的方法,且有效克服现有技术农业防治、化学防治和物理防治等技术缺陷。

[0011] 为实现上述目的,本发明提供了一种控制高粱条螟害虫的方法,包括将高粱条螟害虫至少与Cry2Ab蛋白接触。

[0012] 进一步地,所述Cry2Ab蛋白存在于至少产生所述Cry2Ab蛋白的宿主细胞中,所述高粱条螟害虫通过摄食所述宿主细胞至少与所述Cry2Ab蛋白接触。

[0013] 更进一步地,所述Cry2Ab蛋白存在于至少产生所述Cry2Ab蛋白的细菌或转基因植物中,所述高粱条螟害虫通过摄食所述细菌或所述转基因植物的组织至少与所述Cry2Ab蛋白接触,接触后所述高粱条螟害虫生长受到抑制和/或导致死亡,以实现高粱条螟危害植物的控制。

[0014] 在上述技术方案中,所述转基因植物可以处于任意生育期;所述转基因植物的组织为根、叶片、茎秆、果实、雄穗、雌穗、花蕾、花药或花丝;所述对高粱条螟危害植物的控制不因种植地点和/或种植时间的改变而改变。

[0015] 所述植物来自玉米、高粱、甘蔗、粟、麻或薏米等禾本科作物。

[0016] 所述接触步骤之前的步骤为种植含有编码所述Cry2Ab蛋白的多核苷酸的植物。

[0017] 优选地,所述Cry2Ab蛋白的氨基酸序列具有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列。所述Cry2Ab蛋白的核苷酸序列具有SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列。

[0018] 在上述技术方案的基础上,所述植物还可以包括至少一种不同于编码所述Cry2Ab蛋白的核苷酸的第二种核苷酸。

[0019] 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。

[0020] 优选地,所述第二种核苷酸编码Cry1A.105蛋白。

[0021] 进一步地,所述Cry1A.105蛋白的氨基酸序列具有SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列。

[0022] 更进一步地,所述第二种核苷酸具有SEQ ID NO:4所示的核苷酸序列。

[0023] 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。

[0024] 为实现上述目的,本发明还提供了一种Cry2Ab蛋白质控制高粱条螟害虫的用途。

[0025] 为实现上述目的,本发明还提供了一种产生控制高粱条螟害虫的植物的方法,包括向所述植物的基因组中引入编码Cry2Ab蛋白的多核苷酸序列。

[0026] 为实现上述目的,本发明还提供了一种产生控制高粱条螟害虫的植物繁殖体的方

法,包括将由所述方法获得的第一植株与第二植株杂交,和/或取下由所述方法获得的植株上具有繁殖能力的组织进行培养,从而产生含有编码Cry2Ab蛋白的多核苷酸序列的植物繁殖体。

[0027] 为实现上述目的,本发明还提供了一种培养控制高粱条螟害虫的植物的方法,包括:

[0028] 种植至少一个植物繁殖体,所述植物繁殖体的基因组中包括编码Cry2Ab蛋白的多核苷酸序列;

[0029] 使所述植物繁殖体长成植株;

[0030] 使所述植株在人工接种高粱条螟害虫和/或高粱条螟害虫自然发生危害的条件下生长,收获与其他不具有编码Cry2Ab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。

[0031] 本发明中所述的“植物繁殖体”包括但不限于植物有性繁殖体和植物无性繁殖体。所述植物有性繁殖体包括但不限于植物种子;所述植物无性繁殖体是指植物体的营养器官或某种特殊组织,其可以在离体条件下产生新植株;所述营养器官或某种特殊组织包括但不限于根、茎和叶,例如:以根为无性繁殖体的植物包括草莓和甘薯等;以茎为无性繁殖体的植物包括甘蔗和马铃薯(块茎)等;以叶为无性繁殖体的植物包括芦荟和秋海棠等。

[0032] 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。

[0033] 本发明术语“控制”和/或“防治”是指高粱条螟害虫至少与Cry2Ab蛋白接触,接触后高粱条螟害虫生长受到抑制和/或导致死亡。进一步地,高粱条螟害虫通过摄食植物组织至少与Cry2Ab蛋白接触,接触后全部或部分高粱条螟害虫生长受到抑制和/或导致死亡。抑制是指亚致死,即尚未致死但能引起生长发育、行为、生理、生化和组织等方面的某种效应,如生长发育缓慢和/或停止。同时,植物在形态上应是正常的,且可在常规方法下培养以用于产物的消耗和/或生成。此外,含有编码Cry2Ab蛋白的多核苷酸序列的控制高粱条螟害虫的植物和/或植物种子,在人工接种高粱条螟害虫和/或高粱条螟害虫自然发生危害的条件下,与非转基因的野生型植株相比具有减弱的植物损伤,具体表现包括但不限于改善的茎秆抗性、和/或提高的籽粒重量、和/或增产等。Cry2Ab蛋白对高粱条螟的“控制”和/或“防治”作用是可以独立存在的,不因其它可“控制”和/或“防治”高粱条螟害虫的物质的存在而减弱和/或消失。具体地,转基因植物(含有编码Cry2Ab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,Cry2Ab蛋白和/或可控制高粱条螟害虫的另一种物质,则所述另一种物质的存在既不影响Cry2Ab蛋白对高粱条螟的“控制”和/或“防治”作用,也不能导致所述“控制”和/或“防治”作用完全和/或部分由所述另一种物质实现,而与Cry2Ab蛋白无关。通常情况下,在大田,高粱条螟害虫摄食植物组织的过程短暂且很难用肉眼观察到,因此,在人工接种高粱条螟害虫和/或高粱条螟害虫自然发生危害的条件下,如转基因植物(含有编码Cry2Ab蛋白的多核苷酸序列)的任何组织存在死亡的高粱条螟害虫、和/或在其上停留生长受到抑制的高粱条螟害虫、和/或与非转基因的野生型植株相比具有减弱的植物损伤,即为实现了本发明的方法和/或用途,即通过高粱条螟害虫至少与Cry2Ab蛋白

接触以实现控制高粱条螟害虫的方法和/或用途。

[0034] 在本发明中,Cry2Ab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Cry2Ab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。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。

[0035] 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。

[0036] 在分类系统上,一般主要根据成虫翅的脉序、连锁方式和触角的类型等形态特征,将鳞翅目分为亚目、总科、科等,而螟蛾科是鳞翅目中种类最多的科之一,全世界已发现1万种以上,仅中国记录就有几千条。大部分螟蛾科昆虫是农作物的害虫,多数以蛀茎形式为害,如二化螟和玉米螟。尽管高粱条螟与二化螟、玉米螟等同属于鳞翅目螟蛾科,除了在分类标准上存在相似性,在其它形态结构上则存在极大差异;就好比植物中的草莓与苹果一样(同属于蔷薇目蔷薇科),它们都有花两性,辐射对称,花瓣5片等特征,但是其果实以及植株形态却是千差万别。高粱条螟不管是从幼虫形态还是成虫形态上来看,都具有其独特的特征。如背部纵线,在农民中就有流传着“高粱玉米谷,背线三四五”,表示同属于螟蛾科的高粱条螟、玉米螟和粟灰螟在背线数量上就存在明显的差异。而背部纵线下就是背血管,背血管是昆虫循环器官的重要组成部分,内里充满了有昆虫“血液”之称的血淋巴。因此体表形态上看似细微的背线数量的差异,体现的却是背血管的差异,是昆虫循环系统上的差异。

[0037] 同属螟蛾科的昆虫不仅在形态特征上存在较大差异,同时在取食习性上,也存在差异。例如同为螟蛾科的三化螟仅为害水稻,极少为害其它禾本科作物。而高粱条螟未见有报道对水稻造成危害,更多的是对南方的甘蔗,北方的玉米、高粱和谷子造成危害。取食习性的不同,也暗示着体内消化系统所产生的酶和受体蛋白不同。而消化道中产生的酶是Bt基因起作用的关键点,只有能够与特异性Bt基因相结合的酶或受体蛋白,才有可能使得某个Bt基因对该害虫具有抗虫效果。越来越多的研究表明,同目不同科、甚至同科不同种的昆虫对同种Bt蛋白的敏感性表现不同。例如Vip3Aa基因对螟蛾科的二化螟*Chilo suppressalis*、亚洲玉米螟*Ostrinia furnacalis*都表现出了抗虫活性,但是对于同属螟蛾科的印度谷螟*Plodia interpunctella*以及欧洲玉米螟*Ostrinia nubilalis*却没有抗虫效果。上述四种害虫均属于鳞翅目螟蛾科,但同种Bt蛋白对四种螟蛾科害虫表现出不同的抗性效果。尤其是欧洲玉米螟和亚洲玉米螟在分类上甚至同属于螟蛾科秆野螟属(同目同科同属),但是其对同种Bt蛋白的反应却是截然不同的,更加充分说明了Bt蛋白与昆虫体内酶和受体的相互作用方式是复杂且难以预料的。

[0038] 与此同时,在苏云金芽孢杆菌的研究界,有一个普遍的认识,认为Cry2毒素对昆虫的作用方式是独特的,其与Cry1A型内毒素不仅在氨基酸序列上没有显著的同源性,并且还表现出不同的结合和孔形成特性,因此在已知Cry2毒素与Cry1A型内毒素组合使用以控制/防治Cry1A内毒素的靶标害虫时,无法确定Cry2毒素对所述靶标害虫是否具有控制/防治作用。

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

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

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

[0042] 本发明中核酸分子或其片段在严格条件下与本发明Cry2Ab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Cry2Ab基因的存在。核酸分子或其片段在一定情况下能够与其他核酸分子进行特异性杂交。本发明中,如果两个核酸分子能形成反平行的双链核酸结构,就可以说这两个核酸分子彼此间能够进行特异性杂交。如果两个核酸分子显示出完全的互补性,则称其中一个核酸分子是另一个核酸分子的“互补物”。本发明中,当一个核酸分子的每一个核苷酸都与另一个核酸分子的对应核苷酸互补时,则称这两个核酸分子显示出“完全互补性”。如果两个核酸分子能够以足够的稳定性相互杂交从而使它们在至少常规的“低度严格”条件下退火且彼此结合,则称这两个核酸分子为“最低程度互补”。类似地,如果两个核酸分子能够以足够的稳定性相互杂交从而使它们在常规的“高度严格”条件下退火且彼此结合,则称这两个核酸分子具有“互补性”。从完全互补性中偏离是可以允许的,只要这种偏离不完全阻止两个分子形成双链结构。为了使一个核酸分子能够作为引物或探针,仅需保证其在序列上具有充分的互补性,以使得在所采用的特定溶剂和盐浓度下能形成稳定的双链结构。

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

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

[0045] 本发明中所述的基因和蛋白质不但包括特定的示例序列,还包括保存了所述特定

示例的蛋白质的杀虫活性特征的部分和/或片段(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高粱条螟害虫的生物活性的蛋白。

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

[0047] 使用标准技术可以修饰基因和容易的构建基因变异体。例如,本领域熟知制造点突变的技术。又例如美国专利号5605793描述了在随机断裂后使用DNA重装配产生其它分子多样性的方法。可以使用商业化核酸内切酶制造全长基因的片段,并且可以按照标准程序使用核酸外切酶。例如,可以使用酶诸如Ba131或定点诱变从这些基因的末端系统地切除核苷酸。还可以使用多种限制性内切酶获取编码活性片段的基因。可以使用蛋白酶直接获得这些毒素的活性片段。

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

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

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

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

[0052] 对于本领域的技术人员而言显而易见地,这种取代可以在对分子功能起重要作用的区域之外发生,而且仍产生活性多肽。对于由本发明的多肽,其活性必需的并因此选择不被取代的氨基酸残基,可以根据本领域已知的方法,如定点诱变或丙氨酸扫描诱变进行鉴

定(如参见,Cunningham和Wells,1989,Science244:1081-1085)。后一技术是在分子中每一个带正电荷的残基处引入突变,检测所得突变分子的抗虫活性,从而确定对该分子活性而言重要的氨基酸残基。底物-酶相互作用位点也可以通过其三维结构的分析来测定,这种三维结构可由核磁共振分析、结晶学或光亲和标记等技术测定(参见,如de Vos等,1992,Science 255:306-312;Smith等,1992,J.Mol.Biol 224:899-904;Wlodaver等,1992,FEBS Letters 309:59-64)。

[0053] 在本发明中,Cry2Ab蛋白包括但不限于序列1,与序列1所示的氨基酸序列具有一定同源性的氨基酸序列也包括在本发明中。这些序列与本发明序列类似性/相同性典型的大于78%,优选的大于85%,更优选的大于90%,甚至更优选的大于95%,并且可以大于99%。也可以根据更特定的相同性和/或类似性范围定义本发明的优选的多核苷酸和蛋白质。例如与本发明示例的序列有78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的相同性和/或类似性。

[0054] 在本发明中,产生所述Cry2Ab蛋白的转基因植物包括但不限于Mon89034转基因玉米事件和/或包含Mon89034转基因玉米事件的植物材料(如在CN101495635A所描述的)、MON87751转基因大豆事件和/或包含MON87751转基因大豆事件的植物材料(如在USDA APHIS非管制状态申请13-337-01p所描述的)、或者Mon15985转基因棉花事件和/或包含Mon15985转基因棉花事件的植物材料(如在CN101413028B所描述的),其均可以实现本发明的方法和/或用途,即通过高粱条螟害虫至少与Cry2Ab蛋白接触以实现控制高粱条螟害虫的方法和/或用途。本领域技术人员所理解的,使上述转基因事件中的Cry2Ab蛋白在不同植物中表达亦能实现本发明的方法和/或用途。更具体地,所述Cry2Ab蛋白存在于至少产生所述Cry2Ab蛋白的转基因植物中,所述高粱条螟害虫通过摄食所述转基因植物的组织至少与所述Cry2Ab蛋白接触,接触后所述高粱条螟害虫生长受到抑制和/或导致死亡,以实现对于高粱条螟危害植物的控制。

[0055] 本发明中所述调控序列包括但不限于启动子、转运肽、终止子、增强子、前导序列、内含子以及其它可操作地连接到所述Cry2Ab蛋白的调节序列。

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

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

CTPP靶向液泡。

[0058] 所述前导序列包含但不限于,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;人类免疫球蛋白重链结合蛋白质(BiP);苜蓿花叶病毒的外壳蛋白质mRNA的不翻译前导序列(AMV RNA4);烟草花叶病毒(TMV)前导序列。

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

[0060] 对于单子叶植物应用而言,所述内含子包含但不限于,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。

[0061] 所述终止子可以为在植物中起作用的适合多聚腺苷酸化信号序列,包括但不限于,来源于农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)胭脂碱合成酶(NOS)基因的多聚腺苷酸化信号序列、来源于蛋白酶抑制剂II(pin II)基因的多聚腺苷酸化信号序列、来源于豌豆ssRUBISCO E9基因的多聚腺苷酸化信号序列和来源于 α -微管蛋白(α -tubulin)基因的多聚腺苷酸化信号序列。

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

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

[0064] 本发明中Cry2Ab蛋白对高粱条螟害虫具有毒性。本发明中的植物,特别是玉米、甘蔗和高粱,在其基因组中含有外源DNA,所述外源DNA包含编码Cry2Ab蛋白的核苷酸序列,高

高粱条螟害虫通过摄食植物组织与该蛋白接触,接触后高粱条螟害虫生长受到抑制和/或导致死亡。抑制是指致死或亚致死。同时,植物在形态上应是正常的,且可在常规方法下培养以用于产物的消耗和/或生成。此外,该植物可基本消除对化学或生物杀虫剂的需要(所述化学或生物杀虫剂为针对Cry2Ab蛋白所靶向的高粱条螟害虫的杀虫剂)。

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

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

[0067] 本发明中,所述Cry2Ab蛋白可以具有序列中SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列。除了包含Cry2Ab蛋白的编码区外,也可包含其他元件,例如编码选择性标记的蛋白质。

[0068] 此外,包含编码本发明Cry2Ab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、对氨脲的抗性基因或谷氨酰胺合成酶抑制剂(如PPT)的抗性基因,从而获得既具有高杀虫活性、又具有除草剂抗性的转基因植物。

[0069] 本发明中,将外源DNA导入植物,如将编码所述Cry2Ab蛋白的基因或表达盒或重组载体导入植物细胞,常规的转化方法包括但不限于,农杆菌介导的转化、微量发射轰击、直接将DNA摄入原生质体、电穿孔或晶须硅介导的DNA导入。

[0070] 本发明提供了一种杀虫蛋白的用途,具有以下优点:

[0071] 1、内因防治。现有技术主要是通过外部作用即外因来控制高粱条螟害虫的危害,如农业防治、化学防治和物理防治;而本发明是通过植物体内产生能够杀死高粱条螟的Cry2Ab蛋白来控制高粱条螟害虫的,即通过内因来防治。

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

[0073] 3、全生育期防治。现有技术使用的控制高粱条螟害虫的方法都是阶段性的,而本发明是对植物进行全生育期的保护,转基因植物(Cry2Ab蛋白)从发芽、生长,一直到开花、结果,都可以避免遭受高粱条螟的侵害。

[0074] 4、全植株防治。现有技术使用的控制高粱条螟害虫的方法大多是局部性的,如叶面喷施;而本发明是对整个植株进行保护,如转基因植物(Cry2Ab蛋白)的根、叶片、茎秆、果实、雄穗、雌穗、花蕾、花药或花丝等都是可以抵抗高粱条螟侵害的。

[0075] 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Cry2Ab蛋白在植物体内进行表达,有效地避免了环境条件不稳定的缺陷,且本发明转基因植物(Cry2Ab蛋白)的防治效果在不同地点、不同时间、不同遗传背景也都是稳定一致的。

[0076] 6、简单、方便、经济。现有技术使用的物理防治方法在农业生产操作上具有一定的难度;本发明只需种植能够表达Cry2Ab蛋白的转基因植物即可,而不需要采用其它措施,从

而节省了大量人力、物力和财力。

[0077] 7、效果彻底。现有技术使用的控制高粱条螟害虫的方法,其效果是不彻底的,只起到减轻作用;而本发明转基因植物(Cry2Ab蛋白)可以造成高粱条螟初孵幼虫的大量死亡,且对少量存活幼虫发育进度造成极大的抑制,3天后幼虫基本仍处于初孵状态,都是明显的发育不良,且已停止发育,在田间自然环境中无法存活,而转基因植物大体上只受到轻微损伤。

[0078] 下面通过附图和实施例,对本发明的技术方案做进一步的详细描述。

附图说明

[0079] 图1为本发明杀虫蛋白的用途的含有Cry2Ab核苷酸序列的重组克隆载体DBN01-T构建流程图;

[0080] 图2为本发明杀虫蛋白的用途的含有Cry2Ab核苷酸序列的重组表达载体DBN100745构建流程图;

[0081] 图3为本发明杀虫蛋白的用途的转基因玉米植株接种高粱条螟的叶片损伤图。

具体实施方式

[0082] 下面通过具体实施例进一步说明本发明杀虫蛋白的用途的技术方案。

[0083] 第一实施例、基因的获得和合成

[0084] 1、获得核苷酸序列

[0085] Cry2Ab杀虫蛋白质的氨基酸序列(634个氨基酸),如序列表中SEQ ID NO:1所示;编码相应于所述Cry2Ab杀虫蛋白质的氨基酸序列的Cry2Ab核苷酸序列(1905个核苷酸),如序列表中SEQ ID NO:2所示。

[0086] Cry1A.105杀虫蛋白质的氨基酸序列(1177个氨基酸),如序列表中SEQ ID NO:3所示;编码相应于所述Cry1A.105杀虫蛋白质的氨基酸序列的Cry1A.105核苷酸序列(3534个核苷酸),如序列表中SEQ ID NO:4所示。

[0087] 2、合成上述核苷酸序列

[0088] 所述Cry2Ab核苷酸序列(如序列表中SEQ ID NO:2所示)和所述Cry1A.105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;合成的所述Cry2Ab核苷酸序列(SEQ ID NO:2)的5'端还连接有NcoI酶切位点,所述Cry2Ab核苷酸序列(SEQ ID NO:2)的3'端还连接有SpeI酶切位点;合成的所述Cry1A.105核苷酸序列(SEQ ID NO:4)的5'端还连接有NcoI酶切位点,所述Cry1A.105核苷酸序列(SEQ ID NO:4)的3'端还连接有HindIII酶切位点。

[0089] 第二实施例、重组表达载体的构建及重组表达载体转化农杆菌

[0090] 1、构建含有Cry2Ab基因的重组克隆载体

[0091] 将合成的Cry2Ab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SP6RNA聚合酶启动子;T7为T7RNA聚合酶启动子;Cry2Ab为Cry2Ab核苷酸序列(SEQ ID NO:2);MCS为多克隆位点)。

[0092] 然后将重组克隆载体DBN01-T用热激方法转化大肠杆菌T1感受态细胞(Transgen, Beijing, China, CAT:CD501),其热激条件为:50 μ l大肠杆菌T1感受态细胞、10 μ l质粒DNA(重组克隆载体DBN01-T),42 $^{\circ}$ C水浴30秒;37 $^{\circ}$ C振荡培养1小时(100rpm转速下摇床摇动),在表面涂有IPTG(异丙基硫代- β -D-半乳糖苷)和X-gal(5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷)的氨苄青霉素(100毫克/升)的LB平板(胰蛋白胨10g/L,酵母提取物5g/L,NaCl 10g/L,琼脂15g/L,用NaOH调pH至7.5)上生长过夜。挑取白色菌落,在LB液体培养基(胰蛋白胨10g/L,酵母提取物5g/L,NaCl 10g/L,氨苄青霉素100mg/L,用NaOH调pH至7.5)中于温度37 $^{\circ}$ C条件下培养过夜。碱法提取其质粒:将菌液在12000rpm转速下离心1min,去上清液,沉淀菌体用100 μ l冰预冷的溶液I(25mM Tris-HCl,10mM EDTA(乙二胺四乙酸),50mM葡萄糖,pH8.0)悬浮;加入200 μ l新配制的溶液II(0.2M NaOH,1%SDS(十二烷基硫酸钠)),将管子颠倒4次,混合,置冰上3-5min;加入150 μ l冰冷的溶液III(3M醋酸钾,5M醋酸),立即充分混匀,冰上放置5-10min;于温度4 $^{\circ}$ C、转速12000rpm条件下离心5min,在上清液中加入2倍体积无水乙醇,混匀后室温放置5min;于温度4 $^{\circ}$ C、转速12000rpm条件下离心5min,弃上清液,沉淀用浓度(V/V)为70%的乙醇洗涤后晾干;加入30 μ l含RNase(20 μ g/ml)的TE(10mM Tris-HCl,1mM EDTA,pH8.0)溶解沉淀;于温度37 $^{\circ}$ C下水浴30min,消化RNA;于温度-20 $^{\circ}$ C保存备用。

[0093] 提取的质粒经EcoRI和XhoI酶切鉴定后,对阳性克隆进行测序验证,结果表明重组克隆载体DBN01-T中插入的所述Cry2Ab核苷酸序列为序列表中SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列,即Cry2Ab核苷酸序列正确插入。

[0094] 按照上述构建重组克隆载体DBN01-T的方法,将合成的所述Cry1A.105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,Cry1A.105为Cry1A.105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Cry1A.105核苷酸序列正确插入。

[0095] 2、构建含有Cry2Ab基因的重组表达载体

[0096] 用限制性内切酶NcoI和SpeI分别酶切重组克隆载体DBN01-T和表达载体DBNBC-01(载体骨架:pCAMBIA2301(CAMBIA机构可以提供)),将切下的Cry2Ab核苷酸序列片段插到表达载体DBNBC-01的NcoI和SpeI位点之间,利用常规的酶切方法构建载体是本领域技术人员所熟知的,构建成重组表达载体DBN100744,其构建流程如图2所示(Kan:卡那霉素基因;RB:右边界;Ubi:玉米Ubiquitin(泛素)基因启动子(SEQ ID NO:5);Cry2Ab:Cry2Ab核苷酸序列(SEQ ID NO:2);Nos:胭脂碱合成酶基因的终止子(SEQ ID NO:6);Hpt:潮霉素磷酸转移酶基因(SEQ ID NO:7);LB:左边界)。

[0097] 将重组表达载体DBN100744用热激方法转化大肠杆菌T1感受态细胞,其热激条件为:50 μ l大肠杆菌T1感受态细胞、10 μ l质粒DNA(重组表达载体DBN100744),42 $^{\circ}$ C水浴30秒;37 $^{\circ}$ C振荡培养1小时(100rpm转速下摇床摇动);然后在含50mg/L卡那霉素(Kanamycin)的LB固体平板(胰蛋白胨10g/L,酵母提取物5g/L,NaCl 10g/L,琼脂15g/L,用NaOH调pH至7.5)上于温度37 $^{\circ}$ C条件下培养12小时,挑取白色菌落,在LB液体培养基(胰蛋白胨10g/L,酵母提取物5g/L,NaCl 10g/L,卡那霉素50mg/L,用NaOH调pH至7.5)中于温度37 $^{\circ}$ C条件下培养过夜。碱法提取其质粒。将提取的质粒用限制性内切酶NcoI和HindIII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DBN100744在NcoI和SpeI位点间的核苷酸序列为序列表中SEQ ID NO:2所示核苷酸序列,即Cry2Ab核苷酸序列。

[0098] 按照上述构建重组表达载体DBN100744的方法,将NcoI和HindIII酶切重组克隆载体DBN02-T切下的所述Cry1A.105核苷酸序列插入表达载体DBNBC-01,得到重组表达载体DBN100745。酶切和测序验证重组表达载体DBN100745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Cry2Ab核苷酸序列,所述Cry2Ab核苷酸序列可以连接所述Ubi启动子和Nos终止子。

[0099] 按照上述构建重组表达载体DBN100744的方法,将NcoI和HindIII、NcoI和SpeI分别酶切重组克隆载体DBN01-T和DBN02-T切下的所述Cry2Ab核苷酸序列和Cry1A.105核苷酸序列插入表达载体DBNBC-01,得到重组表达载体DBN100029。酶切和测序验证重组表达载体DBN100029中的核苷酸序列含有为序列表中SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:4所示核苷酸序列,即Cry2Ab核苷酸序列和Cry1A.105核苷酸序列,所述Cry2Ab核苷酸序列和所述Cry1A.105核苷酸序列可以连接所述Ubi启动子和Nos终止子。

[0100] 3、重组表达载体转化农杆菌

[0101] 对已经构建正确的重组表达载体DBN100744、DBN100745和DBN100029用液氮法转化到农杆菌LBA4404 (Invitrogen, Chicago, USA, CAT:18313-015) 中,其转化条件为:100 μ L农杆菌LBA4404、3 μ L质粒DNA(重组表达载体);置于液氮中10分钟,37 $^{\circ}$ C温水浴10分钟;将转化后的农杆菌LBA4404接种于LB试管中于温度28 $^{\circ}$ C、转速为200rpm条件下培养2小时,涂于含50mg/L的利福平(Rifampicin)和100mg/L的卡那霉素(Kanamycin)的LB平板上直至长出阳性单克隆,挑取单克隆培养并提取其质粒,用限制性内切酶AhdI和XhoI对重组表达载体DBN100744、DBN100745和DBN100029酶切后进行酶切验证,结果表明重组表达载体DBN100744、DBN100745和DBN100029结构完全正确。

[0102] 第三实施例、转基因植株的获得

[0103] 1、获得转基因玉米植株

[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所述的农杆菌共培养,以将第二实施例中2构建的重组表达载体DBN100744、DBN100745和DBN100029中的T-DNA(包括玉米Ubiquitin基因的启动子序列、Cry2Ab核苷酸序列、Cry1A.105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Cry2Ab核苷酸序列的玉米植株、转入Cry1A.105核苷酸序列的玉米植株和转入Cry1A.105-Cry2Ab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Cry2Ab核苷酸序列、Cry1A.105核苷酸序列和Cry1A.105-Cry2Ab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、植物凝胶3g/L,pH5.8)中至少存在一种已知抑制农杆菌生长的抗生素(头孢霉

素),不添加植物转化体的选择剂(步骤3:恢复步骤)。优选地,幼胚在有抗生素但没有选择剂的固体培养基上培养,以消除农杆菌并为侵染细胞提供恢复期。接着,接种的幼胚在含选择剂(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、蔗糖30g/L、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)1mg/L、植物凝胶3g/L,pH5.8)上培养,导致转化的细胞选择性生长。然后,愈伤组织再生成植物(步骤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、植物凝胶3g/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、植物凝胶3g/L,pH5.8)上,25℃下培养至约10cm高,移至温室培养至结实。在温室中,每天于28℃下培养16小时,再于20℃下培养8小时。

[0107] 2、获得转基因高粱植株

[0108] 参考Molecular Biology and Genetic Engineering ISSN 2053-5767的高粱转化方法。收集高粱品种APKI的种子,并用清水冲洗数次;浸泡于tween-20浸润液中5分钟;之后用双蒸水悬浮清洗,并在通风橱中干燥;种子表面用70%(v/v)乙醇消毒30秒,紧接着用0.1%(w/v)HgCl₂消毒6分钟;再用双蒸水清洗5-6次;将种子铺于含有MS基础固体培养基(pH5.8)的培养皿中,将培养皿摆放于温度为24±2℃、相对湿度为70%、光周期(光/暗)为12:12的培养间中;3-5天后,种子发芽,取茎尖外植体浸泡于农杆菌中30分钟;取出浸泡后的外植体摆放于已灭菌的滤纸上;黑暗条件下共培养72小时;愈伤组织用含有500mg/L头孢霉素的无菌水清洗3-5次;将清洗后的愈伤组织转移至诱导培养基上培养7天;再转移至筛选培养基上2-3周,重复筛选3次;抗性愈伤被转移至再生培养基上;再生出叶片等,将小苗移至生根培养基上,待生根后移栽至温室中。培养基配方参考Molecular Biology and Genetic Engineering ISSN 2053-5767,其中筛选剂根据本发明中转基因载体所用,更换为潮霉素。由此获得了转入Cry2Ab核苷酸序列的高粱植株、转入Cry1A.105核苷酸序列的高粱植株和转入Cry1A.105-Cry2Ab核苷酸序列的高粱植株;同时以野生型高粱植株作为对照。

[0109] 3、获得转基因甘蔗植株

[0110] 转化方法主要参考广西大学2012级硕士李燦学位论文第22页至24页。取甘蔗顶端新生茎节,去掉蔗梢和叶鞘,留下茎尖生长锥及心叶茎段。在超净工作台上,用75%(v/v)酒精棉球对表面进行擦拭消毒,用已灭菌的镊子小心剥去心叶外层,取中间5—7cm长的心叶段,横切成厚度约3mm的薄片接种于诱导培养基上,温度26℃条件下,黑暗培养20天。挑选生长情况良好的愈伤组织转移到新的MS培养基中预培养4天,再用于转化试验;转化时,在超净工作台中将待侵染的愈伤组织用已灭菌的镊子夹出,放在干净的滤纸上面静置2小时,至表面完全干燥,稍有收缩;将干燥的甘蔗愈伤组织放入侵染液中浸泡30分钟,同时放在摇床上缓慢摇动;将愈伤组织捞出并转移到干净的滤纸上,在超净工作台中完全吹干,直至愈伤组织表面干燥、无水膜。把愈伤组织块切成0.6*0.6cm的小块,之后转移到含有100μmol/L乙酰丁香酮(AS)的MR固体培养基中,温度23℃暗培养3天;把侵染后的愈伤组织夹出,置于滤

纸上在超净工作台上吹干,直到材料表面干爽后,将材料转移到含有500mg/L头孢霉素和潮霉素筛选的分化培养基中;每隔2周更换一次培养基,期间把被污染的愈伤组织剔除,当幼苗长约3cm高的时候,转移到含有潮霉素筛选剂的生根培养基中诱导生根。由此获得了转入Cry2Ab核苷酸序列的甘蔗植株、转入Cry1A.105核苷酸序列的甘蔗植株和转入Cry1A.105-Cry2Ab核苷酸序列的甘蔗植株;同时以野生型甘蔗植株作为对照。

[0111] 第四实施例、用TaqMan验证转基因植株

[0112] 分别取转入Cry2Ab核苷酸序列的玉米植株、转入Cry1A.105核苷酸序列的玉米植株和转入Cry1A.105-Cry2Ab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Cry2Ab基因和Cry1A.105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。

[0113] 检测Cry2Ab基因和Cry1A.105基因拷贝数的具体方法如下:

[0114] 步骤11、分别取转入Cry2Ab核苷酸序列的玉米植株、转入Cry1A.105核苷酸序列的玉米植株、转入Cry1A.105-Cry2Ab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;

[0115] 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;

[0116] 步骤13、用NanoDrop 2000 (Thermo Scientific)测定上述样品的基因组DNA浓度;

[0117] 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;

[0118] 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:

[0119] 以下引物和探针用来检测Cry2Ab核苷酸序列:

[0120] 引物1:CTGATACCCTTGCTCGCGTC如序列表中SEQ ID NO:8所示;

[0121] 引物2:CACTTGGCGGTTGAACTCCTC如序列表中SEQ ID NO:9所示;

[0122] 探针1:CGCTGAGCTGACGGGTCTGCAAG如序列表中SEQ ID NO:10所示;

[0123] 以下引物和探针用来检测Cry1A.105核苷酸序列:

[0124] 引物3:GCGCATCCAGTTCAACGAC如序列表中SEQ ID NO:11所示;

[0125] 引物4:GTTCTGGACGGCGAAGAGTG如序列表中SEQ ID NO:12所示;

[0126] 探针2:TGAACAGCGCCTGACCACCG如序列表中SEQ ID NO:13所示;

[0127] PCR反应体系为:

	JumpStart™ Taq ReadyMix™ (Sigma)	10 μ l
[0128]	50 \times 引物/探针混合物	1 μ l
	基因组DNA	3 μ l
[0129]	水 (ddH ₂ O)	6 μ l

[0130] 所述50 \times 引物/探针混合物包含1mM浓度的每种引物各45 μ l,100 μ M浓度的探针50 μ l和860 μ l 1 \times TE缓冲液,并且在4 $^{\circ}$ C,贮藏在琥珀试管中。

[0131] PCR反应条件为:

	步骤	温度	时间
	21	95°C	5 分钟
[0132]	22	95°C	30 秒
	23	60°C	1 分钟
	24	回到步骤 22, 重复 40 次	

[0133] 利用SDS2.3软件(Applied Biosystems)分析数据。

[0134] 实验结果表明,Cry2Ab核苷酸序列、Cry1A.105核苷酸序列和Cry1A.105-Cry2Ab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Cry2Ab核苷酸序列的玉米植株、转入Cry1A.105核苷酸序列的玉米植株和转入Cry1A.105-Cry2Ab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。

[0135] 按照上述用TaqMan验证转基因玉米植株的方法,对转基因高粱植株和转基因甘蔗植株进行检测分析。实验结果表明,Cry2Ab核苷酸序列、Cry1A.105核苷酸序列和Cry1A.105-Cry2Ab核苷酸序列均已分别整合到所检测的高粱植株和甘蔗植株的染色体组中,而且转入Cry2Ab核苷酸序列的高粱植株、转入Cry1A.105核苷酸序列的高粱植株、转入Cry1A.105-Cry2Ab核苷酸序列的高粱植株、转入Cry2Ab核苷酸序列的甘蔗植株、转入Cry1A.105核苷酸序列的甘蔗植株和转入Cry1A.105-Cry2Ab核苷酸序列的甘蔗植株均获得了单拷贝的转基因植株。

[0136] 第五实施例、转基因植株的抗虫效果检测

[0137] 将转入Cry2Ab核苷酸序列的玉米植株、转入Cry1A.105核苷酸序列的玉米植株、转入Cry1A.105-Cry2Ab核苷酸序列的玉米植株;转入Cry2Ab核苷酸序列的高粱植株、转入Cry1A.105核苷酸序列的高粱植株、转入Cry1A.105-Cry2Ab核苷酸序列的高粱植株;转入Cry2Ab核苷酸序列的甘蔗植株、转入Cry1A.105核苷酸序列的甘蔗植株、转入Cry1A.105-Cry2Ab核苷酸序列的甘蔗植株;相应的野生型玉米植株、高粱植株和甘蔗植株,以及经Taqman鉴定为非转基因的玉米植株、高粱植株和甘蔗植株对高粱条螟进行抗虫效果检测。

[0138] 1、转基因玉米植株的抗虫效果检测

[0139] 分别取转入Cry2Ab核苷酸序列的玉米植株、转入Cry1A.105核苷酸序列的玉米植株、转入Cry1A.105-Cry2Ab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(展开嫩叶)的新鲜叶片,用无菌水冲洗干净并用纱布将叶片上的水吸干,然后将玉米叶片剪成约1cm×2cm的长条状,取1片剪后的长条状叶片放入圆形塑料培养皿底部的保湿滤纸上,每个培养皿中放10头高粱条螟(初孵幼虫),虫试培养皿加盖后,在温度22-26°C、相对湿度70%-80%、光周期(光/暗)0:24的条件下放置3天后,根据高粱条螟幼虫发育进度、死亡率和叶片损伤率三项指标,获得抗性总分(满分300分):抗性总分=100×死亡率+[100×死亡率+90×(初孵虫数/接虫总数)+60×(初孵-阴性对照虫数/接虫总数)+10×(阴性对照虫数/接虫总数)]+100×(1-叶片损伤率)。转入Cry2Ab核苷酸序列的共3个转化事件株系(S1、S2和S3),转入Cry1A.105核苷酸序列的共3个转化事件株系(S4、S5和S6),转入Cry1A.105-Cry2Ab核苷酸序列的共3个转化事件株系(S7、S8和S9),经Taqman鉴定为非转基因的(NGM1)共1个株系,野生型的(CK1)共1个株系;从每个株系选3株进行测试,每

株重复6次。结果如表1和图3所示。

[0140] 表1、转基因玉米植株接种高粱条螟的抗虫实验结果

[0141]

植株	叶片 损伤 率 (%)	高粱条螟发育进度 (单株系)			高粱条螟致死情况 (单株系)		总分 (单株 系)	平均 总分
		初孵	初孵-阴	≥阴性	接虫 总数	死亡率 (%)		
			性对照	对照				
S1	5	4	0	0	10	60	251	
S2	5	3	0	0	10	70	262	266
S3	5	1	0	0	10	90	284	
S4	10	0	3	0	10	70	248	
S5	5	3	1	0	10	60	248	252
S6	5	2	1	0	10	70	259	
S7	5	1	1	0	10	80	270	
S8	1	1	0	0	10	90	288	281
S9	5	1	0	0	10	90	284	
NGM1	92	0	0	10	10	0	18	18
CK1	90	0	0	10	10	0	20	20

[0142] 表1的结果表明：转入Cry2Ab核苷酸序列的玉米植株、转入Cry1A.105核苷酸序列的玉米植株和转入Cry1A.105-Cry2Ab核苷酸序列的玉米植株对高粱条螟均具有较好的杀虫效果，高粱条螟的平均死亡率基本上可达70%以上，其抗性总分也基本上可达均在250分左右；而经Taqman鉴定为非转基因的玉米植株和野生型玉米植株的抗性总分一般在20分左右。

[0143] 图3的结果表明：与野生型玉米植株相比，转入Cry2Ab核苷酸序列的玉米植株、转入Cry1A.105核苷酸序列的玉米植株和转入Cry1A.105-Cry2Ab核苷酸序列的玉米植株可以造成高粱条螟初孵幼虫的大量死亡，且对少量存活幼虫发育进度造成极大的抑制，发育迟缓，同时表现出极弱的生命力；且转入Cry2Ab核苷酸序列的玉米植株、转入Cry1A.105核苷

酸序列的玉米植株和转入Cry1A.105-Cry2Ab核苷酸序列的玉米植株大体上只受到轻微损伤,被取食面积很小,其叶片损伤率均在10%以下。

[0144] 由此证明转入Cry2Ab核苷酸序列的玉米植株、转入Cry1A.105核苷酸序列的玉米植株和转入Cry1A.105-Cry2Ab核苷酸序列的玉米植株都显示出高抗高粱条螟的活性,这种活性足以对高粱条螟的生长产生不良效应从而使其在田间得以控制。同时通过控制高粱条螟的钻蛀为害,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。

[0145] 2、转基因甘蔗植株的抗虫效果检测

[0146] 分别取转入Cry2Ab核苷酸序列的甘蔗植株、转入Cry1A.105核苷酸序列的甘蔗植株、转入Cry1A.105-Cry2Ab核苷酸序列的甘蔗植株、野生型甘蔗植株和经Taqman鉴定为非转基因的甘蔗植株(展开嫩叶)的新鲜叶片,用无菌水冲洗干净并用纱布将叶片上的水吸干,然后将甘蔗叶片剪成约1cm×2cm的长条状,取1片剪后的长条状叶片放入圆形塑料培养皿底部的保湿滤纸上,每个培养皿中放10头高粱条螟(初孵幼虫),虫试培养皿加盖后,在温度22-26℃、相对湿度70%-80%、光周期(光/暗)0:24的条件下放置3天后,根据高粱条螟幼虫发育进度、死亡率和叶片损伤率三项指标,获得抗性总分(满分300分):抗性总分=100×死亡率+[100×死亡率+90×(初孵虫数/接虫总数)+60×(初孵-阴性对照虫数/接虫总数)+10×(阴性对照虫数/接虫总数)]+100×(1-叶片损伤率)。转入Cry2Ab核苷酸序列的共3个转化事件株系(S10、S11和S12),转入Cry1A.105核苷酸序列的共3个转化事件株系(S13、S14和S15),转入Cry1A.105-Cry2Ab核苷酸序列的共3个转化事件株系(S16、S17和S18),经Taqman鉴定为非转基因的(NGM2)共1个株系,野生型的(CK2)共1个株系;从每个株系选3株进行测试,每株重复6次。结果如表2所示。

[0147] 表2、转基因甘蔗植株接种高粱条螟的抗虫实验结果

[0148]

植株	叶片 损伤 率 (%)	高粱条螟发育进度 (单株系)			高粱条螟致死情况 (单株系)		总分 (单 株系)	平均 总分
		初孵 性对照	初孵-阴 性对照	≥阴性 对照	接虫 总数	死亡率 (%)		
S10	5	1	1	0	10	80	270	
S11	5	3	1	0	10	60	248	263
S12	5	1	1	0	10	80	270	
S13	1	1	0	0	10	90	288	
S14	10	2	2	0	10	60	240	266
S15	5	1	1	0	10	80	270	
S16	1	0	0	0	10	100	299	
S17	1	0	0	0	10	100	299	294
S18	5	1	0	0	10	90	284	
NGM2	70	0	0.7	8.7	10	6	55	55
CK2	80	0	1	9	10	0	35	35

[0149] 表2的结果表明:转入Cry2Ab核苷酸序列的甘蔗植株、转入Cry1A.105核苷酸序列的甘蔗植株和转入Cry1A.105-Cry2Ab核苷酸序列的甘蔗植株对高粱条螟均具有较好的杀虫效果,高粱条螟的平均死亡率基本上均在80%以上,其抗性总分也基本上均在250分左右;而经Taqman鉴定为非转基因的甘蔗植株和野生型甘蔗植株的抗性总分一般在50分以下。

[0150] 与野生型甘蔗植株相比,转入Cry2Ab核苷酸序列的甘蔗植株、转入Cry1A.105核苷酸序列的甘蔗植株和转入Cry1A.105-Cry2Ab核苷酸序列的甘蔗植株可以造成高粱条螟初

孵幼虫的大量死亡,且对少量存活幼虫发育进度造成明显的抑制,生长发育迟缓,同时表现出较弱的生命力,且转入Cry2Ab核苷酸序列的甘蔗植株、转入Cry1A.105核苷酸序列的甘蔗植株和转入Cry1A.105-Cry2Ab核苷酸序列的甘蔗植株大体上只受到轻微损伤,被取食面积很小,其叶片损伤率均在10%以下。

[0151] 由此证明转入Cry2Ab核苷酸序列的甘蔗植株、转入Cry1A.105核苷酸序列的甘蔗植株和转入Cry1A.105-Cry2Ab核苷酸序列的甘蔗植株都显示出高抗高粱条螟的活性,这种活性足以对高粱条螟的生长产生不良效应从而使其在田间得以控制。同时通过控制高粱条螟的钻蛀为害,也有可能降低甘蔗上病害的发生,极大的提高甘蔗的产量及品质。

[0152] 3、转基因高粱植株的抗虫效果检测

[0153] 分别取转入Cry2Ab核苷酸序列的高粱植株、转入Cry1A.105核苷酸序列的高粱植株、转入Cry1A.105-Cry2Ab核苷酸序列的高粱植株、野生型高粱植株和经Taqman鉴定为非转基因的高粱植株(展开嫩叶)的新鲜叶片,用无菌水冲洗干净并用纱布将叶片上的水吸干,然后将高粱叶片剪成约1cm×2cm的长条状,取1片剪后的长条状叶片放入圆形塑料培养皿底部的保湿滤纸上,每个培养皿中放10头高粱条螟(初孵幼虫),虫试培养皿加盖后,在温度22-26℃、相对湿度70%-80%、光周期(光/暗)0:24的条件下放置3天后,根据高粱条螟幼虫发育进度、死亡率和叶片损伤率三项指标,获得抗性总分(满分300分):抗性总分=100×死亡率+[100×死亡率+90×(初孵虫数/接虫总数)+60×(初孵-阴性对照虫数/接虫总数)+10×(阴性对照虫数/接虫总数)]+100×(1-叶片损伤率)。转入Cry2Ab核苷酸序列的共3个转化事件株系(S19、S20和S21),转入Cry1A.105核苷酸序列的共3个转化事件株系(S22、S23和S24),转入Cry1A.105-Cry2Ab核苷酸序列的共3个转化事件株系(S25、S26和S27),经Taqman鉴定为非转基因的(NGM3)共1个株系,野生型的(CK3)共1个株系;从每个株系选3株进行测试,每株重复6次。结果如表3所示。

[0154] 表3、转基因高粱植株接种高粱条螟的抗虫实验结果

[0155]

植株	叶片 损伤 率 (%)	高粱条螟发育进度		高粱条螟致死情况			总分 (单株 系)	平均 总分
		(单株系)		(单株系)				
		初孵 初孵	初孵-阴 性对照	≥阴性 对照	接虫 总数	死亡率 (%)		
S19	5	2	0	0	10	80	273	
S20	5	3	0	0	10	70	262	269
S21	5	2	0	0	10	80	273	
S22	10	2	2	0	10	60	240	
S23	1	1	0	0	10	90	288	261
S24	5	1	2	0	10	70	256	
S25	5	1	0	0	10	90	284	
S26	5	0	1	0	10	90	281	288
S27	1	0	0	0	10	100	299	
NGM3	93.3	0	0.3	9.3	10	4	26	26
CK3	95	0	0	10	10	0	15	15

[0156] 表3的结果表明:转入Cry2Ab核苷酸序列的高粱植株、转入Cry1A.105核苷酸序列的高粱植株和转入Cry1A.105-Cry2Ab核苷酸序列的高粱植株对高粱条螟均具有较好的杀虫效果,高粱条螟的平均死亡率基本上均在70%以上,其抗性总分也基本上均在270分以上;而经Taqman鉴定为非转基因的高粱植株和野生型高粱植株的抗性总分一般在20分左右。

[0157] 与野生型高粱植株相比,转入Cry2Ab核苷酸序列的高粱植株、转入Cry1A.105核苷酸序列的高粱植株和转入Cry1A.105-Cry2Ab核苷酸序列的高粱植株可以造成高粱条螟初孵幼虫的大量死亡,且对少量存活幼虫发育进度造成明显的抑制,生长发育迟缓,同时表现出很弱的生命力,且转入Cry2Ab核苷酸序列的高粱植株、转入Cry1A.105核苷酸序列的高粱植株和转入Cry1A.105-Cry2Ab核苷酸序列的高粱植株大体上只受到轻微损伤,被取食面积很小,其叶片损伤率均在10%以下。

[0158] 由此证明转入Cry2Ab核苷酸序列的高粱植株、转入Cry1A.105核苷酸序列的高粱植株和转入Cry1A.105-Cry2Ab核苷酸序列的高粱植株都显示出高抗高粱条螟的活性,这种活性足以对高粱条螟的生长产生不良效应从而使其在田间得以控制。同时通过控制高粱条螟的钻蛀为害,也有可能降低高粱上病害的发生,极大的提高高粱的产量及品质。

[0159] 上述实验结果还表明转入Cry2Ab核苷酸序列的玉米植株、转入Cry1A.105核苷酸序列的玉米植株、转入Cry1A.105-Cry2Ab核苷酸序列的玉米植株、转入Cry2Ab核苷酸序列的甘蔗植株、转入Cry1A.105核苷酸序列的甘蔗植株、转入Cry1A.105-Cry2Ab核苷酸序列的甘蔗植株、转入Cry2Ab核苷酸序列的高粱植株、转入Cry1A.105核苷酸序列的高粱植株和转入Cry1A.105-Cry2Ab核苷酸序列的高粱植株对高粱条螟的控制/防治显然是因为植物本身可产生Cry2Ab蛋白,所以,本领域技术人员熟知的,根据Cry2Ab蛋白对高粱条螟的相同毒杀作用,可产生类似的可表达Cry2Ab蛋白的转基因植株能够用于控制/防治高粱条螟的危害。本发明中Cry2Ab蛋白包括但不限于具体实施方式中所给出氨基酸序列的Cry2Ab蛋白,同时转基因植株还可以产生至少一种不同于Cry2Ab蛋白的第二种杀虫蛋白质,如Cry1Fa蛋白、Cry1A.105蛋白或Vip3A蛋白等。

[0160] 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高粱条螟的Cry2Ab蛋白来控制高粱条螟害虫;与现有技术使用的农业防治方法、化学防治方法和物理防治方法相比,本发明对植物进行全生育期、全植株的保护以防治高粱条螟害虫的侵害,且无污染、无残留,效果稳定、彻底,简单、方便、经济。

[0161] 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。

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

	gcgcattgac caticagctt ccagcacaag agcctcgaca ctgttcagaa ggagtggacg	120
	gagtggaaga agaacaacca cagcctgtac ctggacccca tegteggcac ggtggccagc	180
	ttcettctca agaaggtegg ctctctcgtc gggaaagcga tectctegga actccgcaac	240
	ctgatcttcc catctggetc caccaaectc atgcaagaca tectcagga gaccgagaag	300
	tttctcaacc agcgcctcaa cactgatacc cttgctcgcg tcaacgctga gctgacgggt	360
	ctgcaagcaa acgtggagga gttcaaccgc caagtggaca acttctcaa ccccaaccgc	420
	aatgcggtgc ctctgtccat cacttcttcc gtgaacacca tgcaacaact gttctcaac	480
	cgcttgctc agttccagat gcaaggctac cagctgctcc tgetgccact ctttgetcag	540
	gctgccaacc tgcacctctc cttcattcgt gacgtgatcc tcaacgctga cgagtggggc	600
	atctctgcag ccacgctgag gacctaccgc gactacctga agaactaac cagggaactac	660
	tccaactatt gcatcaaac ctaccagtcg gccttcaagg gctcaatac gaggttccac	720
	gacatgctgg agttcaggac ctacatgttc ctgaaagctg tegagtacgt cagcatctgg	780
	tcgctcttca agtaccagag cctgctgggtg tccagcggcg ccaacctcta cgccagcggc	840
	tctggteccc aacaaaacta gagcttcacc agccaggact ggccattcct gtattcgttg	900
	ttccaagtea actccaacta cgtctcaaac ggcttctctg gtgctcgctt ctccaacacc	960
	ttcccaaca ttgttggect ccccgctcc accacaactc atgctctgct tgctgccaga	1020
	gtgaactact ccggcggcat ctcgagcggc gacattgggtg catgccggtt caaccagaac	1080
[0004]	ttcaactget ccaccttctt gccgcgctg ctacccccgt tegtagggtc ctggctcgac	1140
	agcggctccg accgcgaggg cgtggccacc gtcaccaact ggcaaaccga gtccttcgag	1200
	accacccttg gctccggag cggcgcttc acggcgctg gaaattetaa ctacttccc	1260
	gactacttca tcaggaacat ctctgggtgt cctctcgctg tccgcaacga ggacctccg	1320
	cgtccactgc actacaacga gatcaggaac atcgctctc cgtccgggac gcccggaggt	1380
	gcaaggcgtt acatggtgag cgtccataac aggaagaaca acatccaagc tgtgcatgag	1440
	aacggctcca tgatccacct ggcgcccatt gattacaccg gcttaccat ctctcaaatc	1500
	cacgccacc cagtgaaaca ccagacacgc acctctatct ccgagaagtt ccgcaaccag	1560
	ggcgactccc tgaggttcca gcagaacaac accaccgcca ggtacacct gcgcggcaac	1620
	ggcaacagct acaacctgta cctgcgcgtc agctccattg gcaactccac catcagggtc	1680
	accatcaacg ggagggtgta cacagcacc aatgtgaaca cgacgaccaa caatgatggc	1740
	gtcaacgaca acggcgccc cttcagcgac atcaacattg gcaacgtggt ggccagcagc	1800
	aactccagc tcccgtgga catcaacgtg acctgaact ctggcaccca gttcgacctc	1860
	atgaacatca tgetggtgcc aactaacatc tcgccctgt actga	1905

<210> 3

<211> 1177

<212> PRT

	245	250	255
	Ile Arg Thr Val Ser Gln Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Asn Pro Val		
	260	265	270
	Leu Glu Asn Phe Asp Gly Ser Phe Arg Gly Ser Ala Gln Gly Ile Glu		
	275	280	285
	Gly Ser Ile Arg Ser Pro His Leu Met Asp Ile Leu Asn Ser Ile Thr		
	290	295	300
	Ile Tyr Thr Asp Ala His Arg Gly Glu Tyr Tyr Trp Ser Gly His Gln		
	305	310	315
	Ile Met Ala Ser Pro Val Gly Phe Ser Gly Pro Glu Phe Thr Phe Pro		
	325	330	335
	Leu Tyr Gly Thr Met Gly Asn Ala Ala Pro Gln Gln Arg Ile Val Ala		
	340	345	350
	Gln Leu Gly Gln Gly Val Tyr Arg Thr Leu Ser Ser Thr Leu Tyr Arg		
	355	360	365
	Arg Pro Phe Asn Ile Gly Ile Asn Asn Gln Gln Leu Ser Val Leu Asp		
	370	375	380
[0006]	Gly Thr Glu Phe Ala Tyr Gly Thr Ser Ser Asn Leu Pro Ser Ala Val		
	385	390	395
	Tyr Arg Lys Ser Gly Thr Val Asp Ser Leu Asp Glu Ile Pro Pro Gln		
	405	410	415
	Asn Asn Asn Val Pro Pro Arg Gln Gly Phe Ser His Arg Leu Ser His		
	420	425	430
	Val Ser Met Phe Arg Ser Gly Phe Ser Asn Ser Ser Val Ser Ile Ile		
	435	440	445
	Arg Ala Pro Met Phe Ser Trp Ile His Arg Ser Ala Glu Phe Asn Asn		
	450	455	460
	Ile Ile Ala Ser Asp Ser Ile Thr Gln Ile Pro Leu Val Lys Ala His		
	465	470	475
	Thr Leu Gln Ser Gly Thr Thr Val Val Arg Gly Pro Gly Phe Thr Gly		
	485	490	495
	Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr Ser Gly Gly Pro Phe Ala Tyr Thr Ile		
	500	505	510
	Val Asn Ile Asn Gly Gln Leu Pro Gln Arg Tyr Arg Ala Arg Ile Arg		
	515	520	525
	Tyr Ala Ser Thr Thr Asn Leu Arg Ile Tyr Val Thr Val Ala Gly Glu		

	820	825	830	
	Asp Val Gly Cys Thr Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly Val Trp Val Ile			
	835	840	845	
	Phe Lys Ile Lys Thr Gln Asp Gly His Ala Arg Leu Gly Asn Leu Glu			
	850	855	860	
	Phe Leu Glu Glu Lys Pro Leu Val Gly Glu Ala Leu Ala Arg Val Lys			
	865	870	875	880
	Arg Ala Glu Lys Lys Trp Arg Asp Lys Arg Glu Lys Leu Glu Trp Glu			
	885	890	895	
	Thr Asn Ile Val Tyr Lys Glu Ala Lys Glu Ser Val Asp Ala Leu Phe			
	900	905	910	
	Val Asn Ser Gln Tyr Asp Gln Leu Gln Ala Asp Thr Asn Ile Ala Met			
	915	920	925	
	Ile His Ala Ala Asp Lys Arg Val His Ser Ile Arg Glu Ala Tyr Leu			
	930	935	940	
	Pro Glu Leu Ser Val Ile Pro Gly Val Asn Ala Ala Ile Phe Glu Glu			
	945	950	955	960
[0008]	Leu Glu Gly Arg Ile Phe Thr Ala Phe Ser Leu Tyr Asp Ala Arg Asn			
	965	970	975	
	Val Ile Lys Asn Gly Asp Phe Asn Asn Gly Leu Ser Cys Trp Asn Val			
	980	985	990	
	Lys Gly His Val Asp Val Glu Glu Gln Asn Asn Gln Arg Ser Val Leu			
	995	1000	1005	
	Val Val Pro Glu Trp Glu Ala Glu Val Ser Gln Glu Val Arg Val			
	1010	1015	1020	
	Cys Pro Gly Arg Gly Tyr Ile Leu Arg Val Thr Ala Tyr Lys Glu			
	1025	1030	1035	
	Gly Tyr Gly Glu Gly Cys Val Thr Ile His Glu Ile Glu Asn Asn			
	1040	1045	1050	
	Thr Asp Glu Leu Lys Phe Ser Asn Cys Val Glu Glu Glu Ile Tyr			
	1055	1060	1065	
	Pro Asn Asn Thr Val Thr Cys Asn Asp Tyr Thr Val Asn Gln Glu			
	1070	1075	1080	
	Glu Tyr Gly Gly Ala Tyr Thr Ser Arg Asn Arg Gly Tyr Asn Glu			
	1085	1090	1095	
	Ala Pro Ser Val Pro Ala Asp Tyr Ala Ser Val Tyr Glu Glu Lys			

1100	1105	1110
Ser Tyr Thr Asp Gly Arg Arg Glu Asn Pro Cys Glu Phe Asn Arg		
1115	1120	1125
Gly Tyr Arg Asp Tyr Thr Pro Leu Pro Val Gly Tyr Val Thr Lys		
1130	1135	1140
Glu Leu Glu Tyr Phe Pro Glu Thr Asp Lys Val Trp Ile Glu Ile		
1145	1150	1155
Gly Glu Thr Glu Gly Thr Phe Ile Val Asp Ser Val Glu Leu Leu		
1160	1165	1170
Leu Met Glu Glu		
1175		

<210> 4
 <211> 3534
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

[0009]

<220>
 <223> CryIA.105 核苷酸序列

<400> 4

```

atggacaaca acccaaacat caacgagtgc atcccgtaca actgcctcag caaccctgag      60
gtcgagggtgc tegggcgtga ggcgatcgag accggttaca ccccatcga catctccctc      120
tccctcaagc agttcctget cagcgagttc gtgccaggcg ctggttcgt cctgggcctc      180
gtggacatca tctggggcat ctttggcccc tcccagtggg acgcttctct ggtgcaaate      240
gagcagctca teaaccagag gatcgaggag ttegccagga accaggccat cagccgcctg      300
gagggcctca gcaaccteta ccaaatctac getgagagct tccgcgagtg ggaggccgac      360
cccactaacc cagctctcag cgaggagatg cgcattcagt tcaacgacat gaacagcgc      420
ctgaccaccg ccateccaet cttegccgtc cagaactacc aagteccgct cctgtccgtg      480
tacgtcagg ccgccaacct gcacctcagc gtgctgaggg acgtcagcgt gtttgccag      540
aggtgggget tegacgcgc caccatcaac agecgttaca acgacctca caggetgate      600
ggcaactaca ccgaccacgc tgtccgctgg tacaacactg gcctggagcg cgtctggggc      660
cctgatteta gagaactggat tctgtacaac cagttcaggc gcgagctgac cctcaecgtc      720
ctggacattg tgtccctctt cccgaactac gactcccga cctaccgat ccgcaccgtg      780
tcccactga cccgcgaaat ctacaacca cccgtcctgg agaacttega cggtagcttc      840
aggggcagcg cccagggeat cgagggetcc atcaggagcc cacacctgat ggacatectc      900
    
```


	aacagcatca ctatctacac cgatgcccac cggggcgagt actactggtc cggccaccag	960
	atcatggcct ccccggtegg cttcagcggc cccgagttta cctttcctct ctacggcaeg	1020
	atgggcaacg ccgctccaca acaacgcate gtcgctcage tgggcccagg cgtctacegc	1080
	accctgagct ccaccctgta ccgcaggccc ttcaacatcg gtatcaacaa ccagcagctg	1140
	tccgtcctgg atggcaactga gttegcctac ggcacctcct ccaacctgcc ctcgctgtc	1200
	taccgcaaga ggggcacggt ggattccctg gacgagatcc caccacagaa caacaatgtg	1260
	ccccccaggc agggtttttc ccacaggetc agccacgtgt ceatgttccg ctcggcttc	1320
	agcaactegt ccgtgagcat catcagaget cctatgttct cttggataca ccgtagtgt	1380
	gagttcaaca acatcattgc atccgacagc attactcaaa tacccttggg gaaagccat	1440
	acacttcagt caggtactac tgttgtcaga ggtccagggt ttacaggagg agacattctt	1500
	cgtcgcacaa gtggaggacc ctttgcctac actattgtta acatcaatgg ccaattgccc	1560
	caaaggtatc gtgcaagaat ccgctatgcc tetactacaa atctcaggat ctactgtact	1620
	gttgcaggtg aaaggatctt tgctggteag ttcaacaaga ctatggatac cggtgacct	1680
	ttgacattec aatcttttag ctacgcaact atcaacacag cttttacatt cccaatgagc	1740
	cagagtaget tcacagtagg tgctgacact ttcagctcag ggaatgaagt ttacatcgac	1800
	aggtttgaat tgattccagt tactgcaacc ctcgaggctg agtacaacct tgagagagcc	1860
	cagaaggctg tgaacgccct ctttacctcc accaatcagc ttggcttgaa aactaacggt	1920
[0010]	actgactatc acattgacca agtgtccaac ttggctcacct acctagcga tgagtctgc	1980
	ctcgacgaga agcgtgaact ctccgagaaa gttaaacacg ccaagegtct cagcgacgag	2040
	aggaatctct tgcaagacte caacttcaaa gacatcaaca ggcagccaga acgtggttgg	2100
	ggtggaagca ccgggatcac catccaagga ggcgacgatg tgttcaagga gaactacgtc	2160
	accctctccg gaactttcga cgagtgtctac cctacctact tgtaccagaa gatcgatgag	2220
	tccaaactca aagccttcae caggtatcaa cttagaggct acatogaaga cagccaagac	2280
	cttgaatct actcgatcag gtacaatgcc aagcacgaga ccgtgaatgt ccaggtact	2340
	ggttccctct ggccactttc tgcccactct cccattggga agtgtggaga gcctaacaga	2400
	tgcgctccac accttgagtg gaatcctgac ttggactgct cctgcaggga tgcgagaag	2460
	tgtgcccacc attctcatca cttctccttg gacatcgatg tgggatgtac tgacctgaat	2520
	gaggaccteg gagtctgggt catcttcaag atcaagacc cagacggaca cgaagactt	2580
	ggcaaccttg agtttctega agagaaacca ttggctgggt aagetctcgc tcgtgtgaag	2640
	agagcagaga agaagtggag ggacaaacgt gagaaactcg aatgggaaac taacatcgtt	2700
	tacaaggagg ccaaagagtc cgtggatgct ttgttctgta actcccata tgateagttg	2760
	caagccgaca ccaacatcgc catgatecac gccgcagaca aacgtgtgca cagcattcgt	2820
	gaggcttact tgccctgagtt gtcogtgate cctggigtga acgetgccat cttcgaggaa	2880
	cttgagggac gtatctttac cgcattctcc ttgtacgatg ccagaaacgt cateaagaac	2940
	ggtgaettca acaatggcct cagctgctgg aatgtgaaag gtcatgtgga cgtggaggaa	3000
	cagaacaate agcgttccgt cctggttgtg cctgagtggt aagetgaagt gtcceaagag	3060

gfttagagtct	gtccaggtag	aggetacatt	ctccgtgtga	ccgettacaa	ggagggatac	3120
ggtgagggtt	gctgacccat	ccacgagatc	gagaacaaca	ccgacgagct	taagttctcc	3180
aactgctctg	aggaagaaat	ctatcccaac	aacaccgtta	cttgaacga	ctacactgtg	3240
aatcaggaag	agtacggagg	tgcctacact	agccgtaaca	gaggttacia	cgaagctctt	3300
tccgttctctg	ctgactatgc	ctccgtgtac	gaggagaaat	cctacacaga	tggcagacgt	3360
gagaaccctt	gegagtteaa	cagaggttac	agggactaca	caccacttcc	agttggctat	3420
gttaccaagg	agcttgagta	ctttctctgag	accgacaaag	tgtggatcga	gatecggtaa	3480
accgagggaa	ccttcatcgt	ggacagcgtg	gagcttctct	tgatggagga	ataa	3534

<210> 5

<211> 1992

<212> DNA

<213> Zea mays

<400> 5

[0011]

ctgcagtca	gcgtgaccg	gtcgtgcccc	tctctagaga	taatgagcat	tgcattgtcta	60
agttataaaa	aattaccaca	tatttttttt	gtcacacttg	tttgaagtgc	agtttatcta	120
tctttataca	tatatttaaa	ctttactcta	cgaataatat	aattctatagt	actacaataa	180
tatcagtgtt	ttagagaate	atataaatga	acagttagac	atggctctaaa	ggacaattga	240
gtattttgac	aacaggacte	tacagtttta	tcttttttagt	gtgcatgtgt	tctctttttt	300
ttttgcaaat	agcttcaect	atataaact	tcatccattt	tattagtaca	tccatttagg	360
gttttagggt	aatggttttt	atagactaat	tttttttagta	catctatttt	attctatttt	420
agctctctaaa	ttaagaaaac	taaaacteta	tttttagtttt	tttatttaat	aatttagata	480
taaaatagaa	taaaataaag	tgactaaaaa	ttaaacaat	accctttaag	aaattaaaaa	540
aactaaggaa	acatttttct	tgtttctgagt	agataatgcc	agcctgttaa	acgccgtcga	600
cgagtctaac	ggacaccaac	cagcgaacca	gcagcgtcgc	gtcgggcca	gcgaagcaga	660
cggcacgcea	tctctgtctc	tgcctctgga	ccctctctga	gagttccgct	ccaccgttgg	720
acttctctcc	ctgtctggcat	ccagaaattg	cgtggcggag	cggcagacgt	gagccggcac	780
ggcagcgge	ctctctctcc	tctcaccgca	cggcagctac	gggggattcc	tttcccaccg	840
ctctctctct	ttctctctct	cgcctctctg	aataaataga	cacccctctc	acaccctctt	900
tctctctct	cgtgttctct	ggagcgcaca	cacacacaac	cagatctctc	ccaaatccac	960
ccgtctctcc	ctctctctcc	aggtaaccgc	ctctctctcc	cccccccccc	ctctctctct	1020
tctctagatc	ggcgttctcg	tccatggtta	gggcccggta	gttctacttc	tgttcatgtt	1080
tgtgttagat	ccgtgttctg	gttagatctc	tctctctctc	gttctctctc	ggatctctcc	1140
tgtactctag	acaccctctg	attgctctct	tgcctctctt	tctctctctg	gaatctctgg	1200

```

atggctctag cegttccgca gacgggateg atttcatgat ttttttggt tegttgcata 1260
gggtttgggt tgcctttte ctttatttca atatatgccg tgcacttggt tgcgggtca 1320
tcttttcatg ctttttttg tcttggttgt gatgatgtgg tetggttggg cggtegttct 1380
agatcggagt agaattctgt ttcaactac ctgggtgatt tattaatttt ggatctgtat 1440
gtgtgtgcca tacatattca tagttacgaa ttgaagatga tggatggaaa tatcgatcta 1500
ggataggtat acatgttgat gcgggtttta ctgatgcata tacagagatg cttttgttc 1560
gettggttgt gatgatgtgg tgtggttggg cggtegttca ttcgttctag atcggagtag 1620
aatactgttt caaactacct ggtgtatita ttaattttgg aactgtatgt gtgtgcata 1680
catettcata gttacgagtt taagatggat ggaaatatcg atctaggata ggtatacatg 1740
ttgatgtggg ttttactgat gcatatacat gatggcatat gcagcatcta ttcatatgct 1800
ctaaccctga gtacctatct attataataa acaagtatgt ttataatta tttgatctt 1860
gatatacttg gatgatggee tatgcagcag ctatatgtgg attttttag ceetgecttc 1920
atacctatt tatttcttg gtactgttct ttttctgat getcaccctg ttgtttggtg 1980
ttacttctgc ag 1992

```

[0012]

```

<210> 6
<211> 253
<212> DNA
<213> Agrobacterium tumefaciens

```

```

<400> 6
gatcgttcaa acatttgcca ataaagtctt ttaagattga atcctgttgc cggctttgcg 60
atgattatca tataatttct gttgaattac gttaagcatg taataattaa catgtaatgc 120
atgacgttat ttatgagatg ggtttttatg attagagtcc cgcaattata catttaatac 180
gcgatagaaa acaaaatata gcgcgcaaac taggataaat tctcgcgcgc ggtgtcatct 240
atgttactag atc 253

```

```

<210> 7
<211> 1026
<212> DNA
<213> Salmonella enterica

```

```

<400> 7
atgaaaaage ctgaactcac cgcgaactct gtcgagaagt ttctgatcga aaagttegac 60

```

agcgtctccg accatgatgca gctctcggag ggccaagaat etcgtgcttt cagcttcgat	120
gtaggagggc gtggatatgt cctgcgggta aatagctgeg cegatggttt ctacaaagat	180
cgttatgttt atcggcaett tgeatcggcc gcctccccga ttccggaagt gcttgacatt	240
ggggaattca gegagagcct gacctattgc atctcccgcc gtgcacaggg tgtcacgttg	300
caagacctge ctgaaaccga actgcccctt gttctgcage cggtecgga ggccatggat	360
gcgategetg eggccgatct tagccagacg agcgggttcg gcccattegg accgcaagga	420
atcgggtcaat acactacatg gcgtgatttc atatgcgcga ttgctgatcc ceatgtgtat	480
cactggcaaa ctgtgatgga cgacaccgtc agtgcgtccg tcgctcaggg tctcgatgag	540
ctgatgcttt gggccgagga ctgccccgaa gtccggcacc tcgtgcacgc ggatttcggc	600
tccaacaatg tcttgacgga caatggccgc ataacagcgg tcattgactg gagegaggcg	660
atgttcgggg attcccata cgaggtegcc aacatcttct tctggaggcc gtggttgct	720
tgtatggagc agcagacgeg ctacttcgag cggaggcacc eggagcttgc aggatcggc	780
cggctccggg cgtatatget ccgcattggt cttgaccaac tctatcagag cttggttgac	840
ggcaatttcg atgatgcage ttgggcgcag ggtcgatgcg acgcaatcgt ccgatccgga	900
gccgggactg tcgggcgtac acaaatcgcc cgcagaagcg cggccgtctg gaccgatggc	960
tgtgtagaag tactcgcga tagtggaac cgacgcccc a geactcgtcc gagggcaag	1020
gaatag	1026

[0013]

<210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> 引物 1

<400> 8
 ctgataccct tgcctcgcgtc 20

<210> 9
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> 引物 2

[0014]

<400> 9

cacttggcgg ttgaactcct c 21

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 探针 1

<400> 10

cgetgagctg aegggtetgc aag 23

<210> 11

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 引物 3

<400> 11

gegcatccag ttaacgac 19

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 引物 4

<400> 12

gttctggacg gcaagagtg 20

[0015]

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 探针 2

<400> 13

tgaacagcgc cctgaccacc g

21

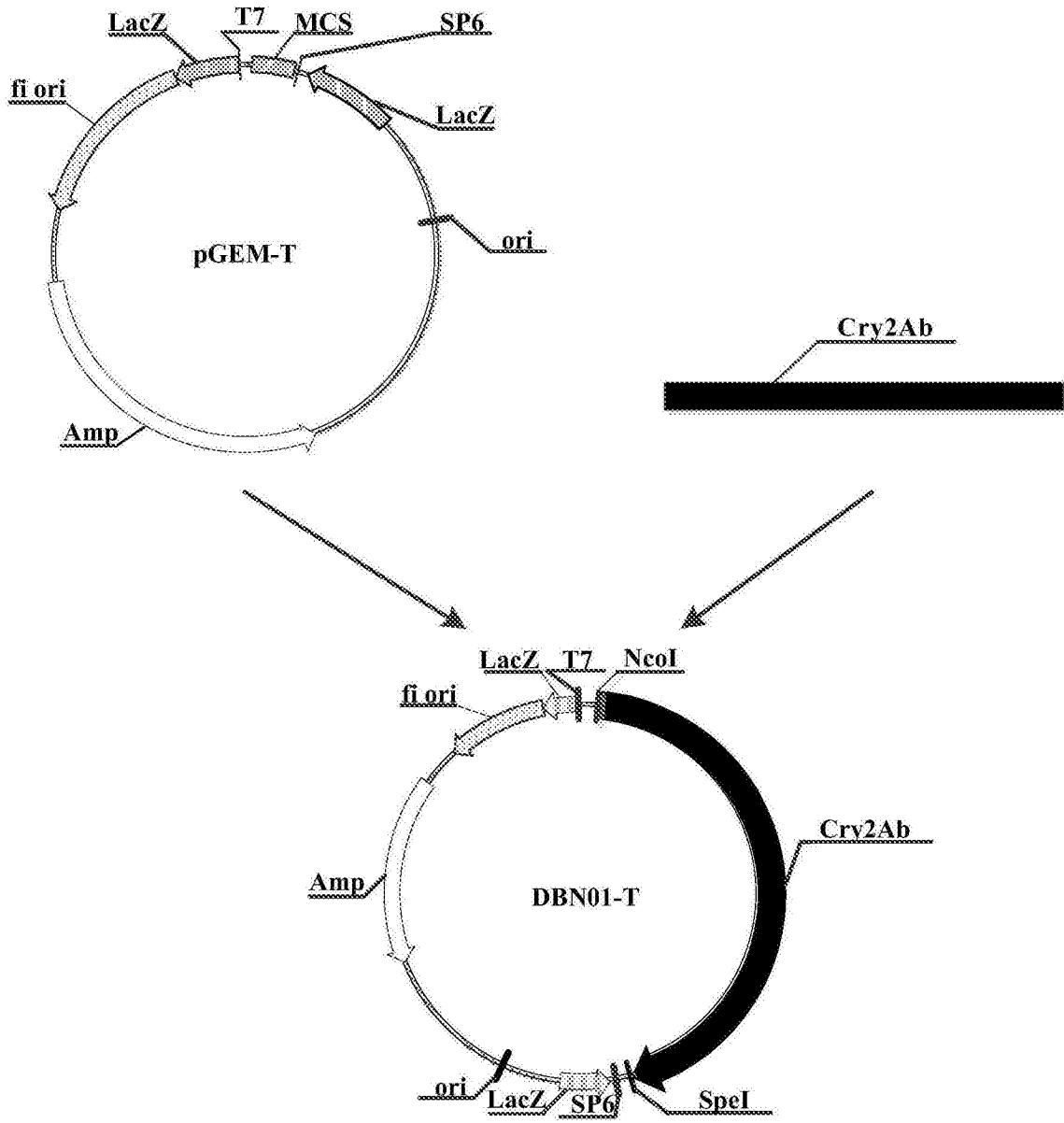


图1

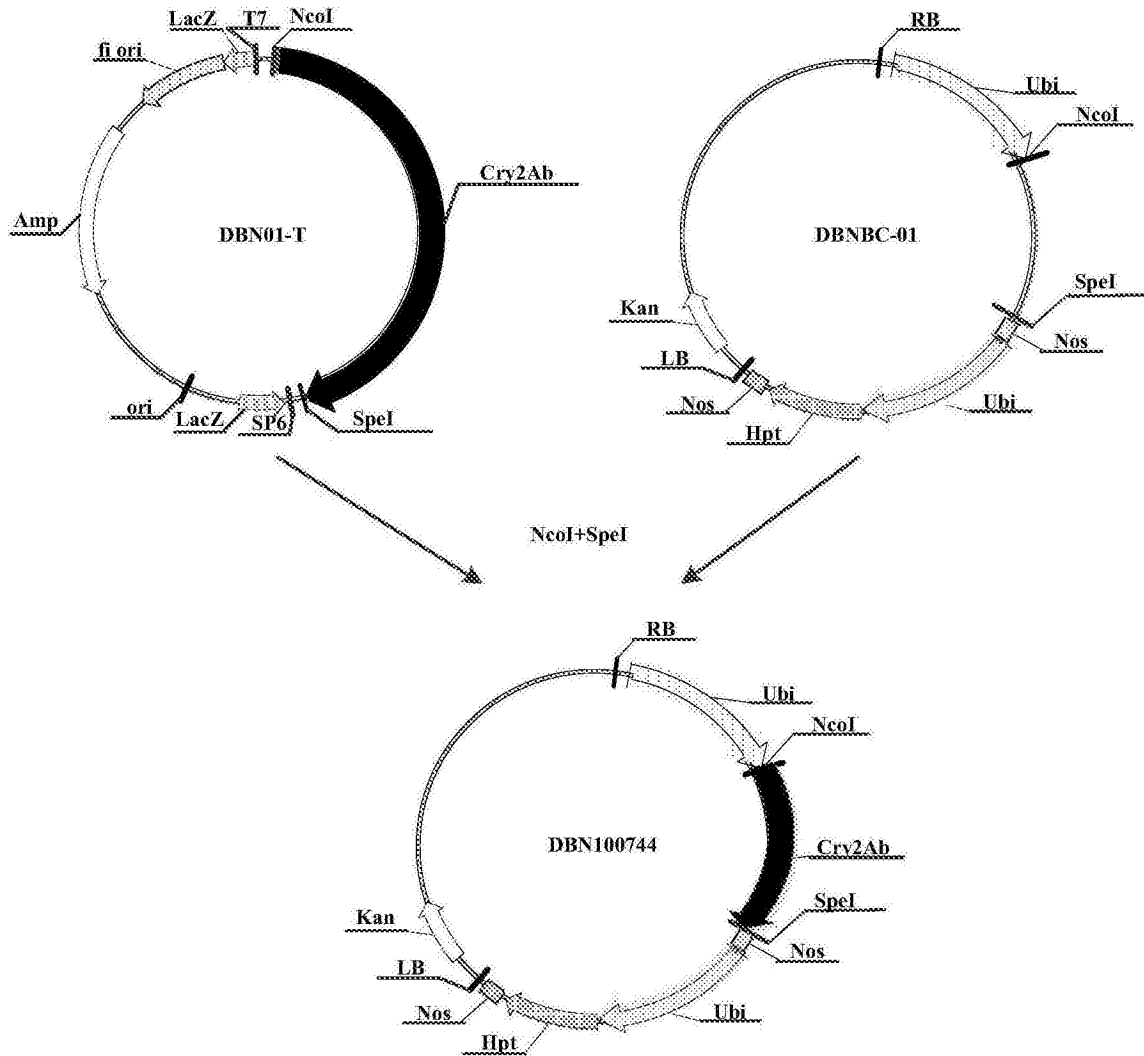
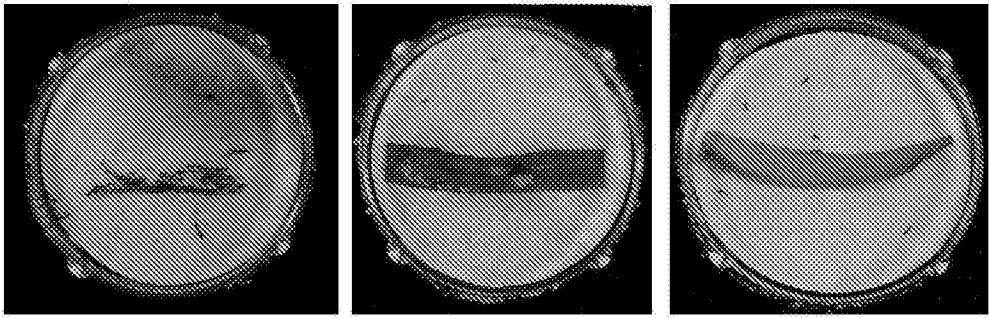


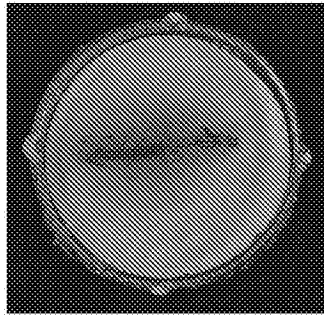
图2



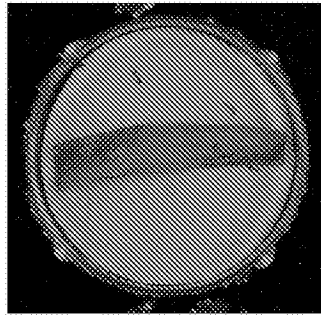
CK1

Zm-Cry2Ab

Zm-Cry1A.105-Cry2Ab



NGM1



Zm-Cry1A.105

图3