



1. 一种对鳞翅目昆虫有害生物有毒的嵌合杀昆虫蛋白,所述嵌合杀昆虫蛋白在N-末端至C-末端方向上包含:

(a) 第一Cry1蛋白的N-末端区域,所述N-末端区域是SEQ ID NO:2的BT-0029蛋白或与其是至少90%同一的氨基酸序列的N-末端区域,所述N-末端区域融合至

(b) 不同Cry1蛋白的C-末端区域;

其中在所述第一Cry1蛋白和所述不同Cry1蛋白之间的交换位置位于保守区块3之中。

2. 根据权利要求1所述的嵌合杀昆虫蛋白,其中所述不同Cry1蛋白是a) Cry1F、Cry1G、Cry1I、Cry1K或Cry1C蛋白;或者b) Cry1Fa、Cry1Ia、Cry1If、Cry1Ka或Cry1Ca;或者c) SEQ ID NO:1的BT-0022蛋白。

3. 根据权利要求1所述的嵌合杀昆虫蛋白,其中所述不同Cry1蛋白的C-末端区域包含氨基酸序列,所述氨基酸序列对应于a) SEQ ID NO:8的从位置464至602的氨基酸序列或与其是至少80%同一的氨基酸序列;或者b) SEQ ID NO:1的从位置498至636的氨基酸序列或与其是至少80%同一的氨基酸序列。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的嵌合杀昆虫蛋白,其中所述第一Cry1蛋白的N-末端区域包含氨基酸序列,所述氨基酸序列对应于SEQ ID NO:2的从位置1至458的氨基酸序列或与其是至少90%同一的氨基酸序列。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的嵌合杀昆虫蛋白,其中所述嵌合杀昆虫蛋白在C-末端进一步包含来自Cry蛋白的原毒素尾部,所述原毒素尾部在被所述鳞翅目昆虫有害生物摄取后从所述原毒素中切割下来。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的嵌合杀昆虫蛋白,其中所述嵌合杀昆虫蛋白包含:

(a) SEQ ID NO:3的从位置1至597的氨基酸序列或其毒素片段,或者

(b) SEQ ID NO:3的氨基酸序列或其毒素片段;或者

(c) SEQ ID NO:9的从位置1至597的氨基酸序列或其毒素片段;或者

(d) SEQ ID NO:9的氨基酸序列或其毒素片段;或者

(e) 与(a)、(b)、(c)或(d)的氨基酸序列是至少80%同一的氨基酸序列。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的嵌合杀昆虫蛋白,其中所述嵌合杀昆虫蛋白针对草地贪夜蛾昆虫有害生物具有杀昆虫活性,所述草地贪夜蛾昆虫有害生物对Vip3A蛋白或Cry1F蛋白具有抗性。

8. 一种多核苷酸,所述多核苷酸包含(a) 编码根据权利要求1至7中任一项所述的嵌合杀昆虫蛋白的核苷酸序列;或者(b) 被密码子优化用于在植物中表达的(a)的核苷酸序列。

9. 根据权利要求8所述的多核苷酸,其中所述多核苷酸包含核苷酸序列,所述核苷酸序列包含:

(a) SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:14的核苷酸序列,或其毒素编码片段;

(b) 与(a)的核苷酸序列基本上同一的核苷酸序列;

(c) 在严格杂交条件下退火至(a)或(b)的核苷酸序列的核苷酸序列;或者

(d) 由于遗传密码的简并性而不同于(a)、(b)或(c)的核苷酸序列的核苷酸序列。

10. 一种核酸分子,所述核酸分子包含根据权利要求8或9所述的多核苷酸,所述多核苷

酸与异源植物可表达型启动子是可操作地相关联的。

11. 一种运载体,所述运载体包含根据权利要求10所述的核酸分子。

12. 一种转基因细胞,所述转基因细胞包含根据权利要求8或9所述的多核苷酸,其中所述转基因细胞是细菌细胞或植物细胞。

13. 根据权利要求12所述的转基因植物细胞,其中所述植物细胞是:

(a) 单子叶植物细胞,任选地是大麦细胞、玉蜀黍细胞、燕麦细胞、水稻细胞、高粱细胞、甘蔗细胞或小麦细胞;或者

(b) 双子叶植物细胞,任选地是大豆细胞、向日葵细胞、番茄细胞、芸苔属作物细胞、棉花细胞、糖用甜菜细胞或烟草细胞。

14. 一种转基因植物,所述转基因植物包含根据权利要求13所述的转基因植物细胞,其中所述植物是:

(a) 单子叶植物,任选地是大麦植物、玉蜀黍植物、燕麦植物、水稻植物、高粱植物、甘蔗植物或小麦植物;或者

(b) 双子叶植物,任选地是大豆植物、向日葵植物、番茄植物、芸苔属作物植物、棉花植物、糖用甜菜植物或烟草植物。

15. 根据权利要求14所述的转基因植物,其中所述转基因植物进一步包含编码第二昆虫控制剂的核苷酸序列。

16. 一种根据权利要求14所述的转基因植物的转基因植物部分,其中所述转基因植物部分包含所述嵌合杀昆虫蛋白。

17. 一种根据权利要求14所述的转基因植物的转基因种子。

18. 一种衍生自根据权利要求14所述的转基因植物的收获产物,其中所述收获产物包含所述嵌合杀昆虫蛋白。

19. 一种衍生自根据权利要求18所述的收获产物的加工产物,其中所述加工产物是面粉、粗粉、油、淀粉、或衍生自前述任一项的产物。

20. 一种杀昆虫组合物,所述杀昆虫组合物包含根据权利要求1至17中任一项所述的嵌合杀昆虫蛋白以及农业上可接受的载体。

21. 一种产生对鳞翅目昆虫有害生物具有增加的抗性的转基因植物的方法,所述方法包括:

(a) 通过用根据权利要求8或9所述的多核苷酸转化植物细胞来引入到植物中;或者使包含所述多核苷酸的第一植物与第二植物杂交,其中所述嵌合杀昆虫蛋白在所述植物中表达,从而产生对昆虫有害生物具有增加的抗性的转基因植物;并且任选地从所述转基因植物中获得子代植物,其中所述子代植物包含所述多核苷酸并且对昆虫有害生物具有增加的抗性;或者

(b) 种植包含所述多核苷酸的种子,并且使来自所述种子的转基因植物生长,其中所述转基因植物包含所述多核苷酸并产生所述嵌合杀昆虫蛋白。

22. 根据权利要求21所述的方法,其中所述方法进一步包括收获来自(b)的转基因植物的种子,其中所述收获种子包含所述嵌合杀昆虫蛋白。

23. 一种产生种子的方法,所述方法包括:

(a) 提供包含根据权利要求8或9所述的多核苷酸的转基因植物;和

(b) 收获来自 (a) 的转基因植物的种子,其中所述收获种子包含所述嵌合杀昆虫蛋白。

24. 一种产生杂交植物种子的方法,所述方法包括:

(a) 使第一近交植物杂交,所述第一近交植物是包含根据权利要求8或9所述的多核苷酸的转基因植物;和

(b) 允许形成杂交种子。

25. 一种控制鳞翅目昆虫有害生物的方法,所述方法包括向所述昆虫有害生物或其环境递送组合物,所述组合物包含有效量的根据权利要求1至7中任一项所述的嵌合杀昆虫蛋白,其中所述鳞翅目昆虫有害生物对Vip3蛋白或Cry1F蛋白具有易感性或抗性。

26. 一种减少对Vip3A蛋白或Cry1F蛋白的抗性在靶标鳞翅目昆虫有害生物群体中发展的方法,所述方法包括向所述靶标群体或其环境递送转基因植物,所述转基因植物包含:

(i) 根据权利要求8或9所述的多核苷酸;和

(ii) 包含编码Vip3A蛋白的核苷酸序列或编码Cry1F蛋白的核苷酸序列的多核苷酸;

其中所述嵌合杀昆虫蛋白和所述Vip3A蛋白或所述Cry1F蛋白在所述转基因植物中产生。

## 工程化的杀有害生物蛋白和控制植物有害生物的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及工程化的杀有害生物蛋白和编码它们的核酸分子,连同用于控制植物有害生物的组合物和方法。

### 背景技术

[0002] 苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)是一种革兰氏阳性的孢子形成的土壤细菌,其特征在于它产生晶体包含体的能力,所述晶体包含体对于某些目以及种的植物有害生物(包括昆虫)是特异地有毒的,但是对于植物和其他非靶标生物是无害的。出于这个原因,包括苏云金芽孢杆菌菌株或它们的杀昆虫蛋白的组合物可以用作环境上可接受的杀昆虫剂以控制农业昆虫有害生物或多种人或动物疾病的昆虫运载体。

[0003] 来自苏云金芽孢杆菌的晶体(Cry)蛋白主要针对鳞翅目的、双翅目的、以及鞘翅目的有害生物昆虫具有有力的杀昆虫活性。这些蛋白质还已经显示针对以下目的有害生物的活性:膜翅目、同翅目、毛虱目、食毛目、以及壁虱目,连同其他的无脊椎动物目,例如线虫动物门、扁形动物门、以及肉足鞭毛亚门(Feitelson, J. 1993. The *Bacillus Thuringiensis* family tree [苏云金芽孢杆菌家族树], 在: *Advanced Engineered Pesticides* [前沿的工程化的杀有害生物剂] 中. 马塞尔德克尔公司(Marcel Dekker, Inc.), 纽约, 纽约州)。这些蛋白质最初主要基于它们的杀昆虫活性而被分类为CryI至CryVI。主要的类别是鳞翅目特异性(I)、鳞翅目和双翅目特异性(II)、鞘翅目特异性(III)、双翅目特异性(IV)、以及线虫特异性(V)和(VI)。这些蛋白质进一步被分类为子族;在各个家族内的更高相关的蛋白质指定了区分的字母,如CryIA、CryIB、CryIC等。在各个区分内的甚至更紧密相关的蛋白质被给定名称,如CryIC(a)、CryIC(b)等。

[0004] 术语“Cry毒素”以及“ $\delta$ -内毒素”与术语“Cry蛋白”已可互换地使用。对于Cry蛋白和基因的当前新命名法基于氨基酸序列同源性而不是昆虫靶标特异性(Crickmore等人(1998) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* [微生物分子生物学评论] 62: 807-813)。在这个更可接受的分类中,每种毒素被指定唯一的名称,所述名称合并了初级等级(阿拉伯数字)、二级等级(大写字母)、三级等级(小写字母)、以及四级等级(另一个阿拉伯数字)。在当前分类中,在初级等级中罗马数字已经换为阿拉伯数字。例如,在旧命名法下的“CryIA(a)”现在在当前命名法下是“Cry1Aa”。根据Ibrahim等人(2010, *Bioeng. Bugs* [生物工程学害虫], 1: 31-50), Cry毒素仍然可以根据其昆虫宿主特异性被分为六个主要类别并且包括:组1-鳞翅目(例如Cry1、Cry9和Cry15);组2-鳞翅目和双翅目(例如Cry2);组3-鞘翅目(Cry3、Cry7和Cry8);组4-双翅目(Cry4、Cry10、Cry11、Cry16、Cry17、Cry19和Cry20);组5-鳞翅目和鞘翅目(Cry1I);以及组6-线虫(Cry6)。Cry1I、Cry2、Cry3、Cry10和Cry11毒素(73-82kDa)是独特的,因为它们似乎是更大Cry1和Cry4蛋白(130-140kDa)的天然截短。

[0005] Cry蛋白是在Bt的孢子形成阶段期间以晶态形式积聚为原毒素的球状蛋白质分子。在由有害生物摄取后,这些晶体典型地被溶解以释放原毒素,原毒素大小的范围可以为,例如,对于许多鳞翅目活性的Cry蛋白如Cry1和Cry9为从130-140kDa,并且对于鞘翅目

活性的Cry3蛋白及鳞翅目/双翅目活性的Cry2蛋白为60-80kDa。在这些晶体被易感昆虫溶解后,这些释放的原毒素被昆虫肠道中的蛋白酶例如胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶加工,以产生抗蛋白酶的核心Cry蛋白毒素。这种蛋白水解加工涉及从各种Cry原毒素的不同区域去除氨基酸。例如,为130-140kDa的Cry原毒素典型地通过蛋白水解移除25-30个氨基酸的N-末端肽以及C-末端的大约一半的剩余蛋白来激活,产生约60-70kDa成熟Cry毒素。为60-80kDa的原毒素(例如Cry2和Cry3)也被加工但是其程度不与更大的原毒素相同。与更大的原毒素相比,较小的原毒素典型地从N-末端去除相等或更多个氨基酸,但较少氨基酸被从C-末端去除。例如,Cry2家族成员的蛋白水解激活典型地涉及去除约40-50个N-末端氨基酸。许多Cry蛋白对特定的靶标昆虫是相当有毒的,但许多具有窄的活性谱。

[0006] Cry蛋白的毒素部分通常具有五个保守序列区块,以及三个保守结构性结构域(参见例如,de Maagd等人,(2001),Trends Genetics[遗传学趋势],17:193-199)。第一保守结构性结构域(称作结构域I)典型地由七个 $\alpha$ 螺旋组成并且参与膜插入以及孔形成。结构域II典型地由三个安排为希腊钥匙构型的 $\beta$ 片层组成,并且结构域III典型地由两个处于“果冻卷”(‘jelly-roll’)构造的反平行的 $\beta$ 片层组成(de Maagd等人,2001,同上)。结构域II和III参与受体识别和结合,并且因此被考虑为毒素特异性的决定物。

[0007] 五个保守序列区块从Cry蛋白的N-末端至C-末端编号为CB1至CB5(Hofte和Whitely,1989,Microbiol.Rev.[微生物学评论]53:242-255)。保守区块1(CB1)包含大约29个氨基酸、保守区块2(CB2)包含大约67个氨基酸、保守区块3(CB3)包含大约48个氨基酸、保守区块4(CB4)包含大约10个氨基酸以及保守区块5(CB5)包含大约12个氨基酸。这五个保守区块之前和之后的序列是高度可变的,并且因此被指定为“可变区”V1-V6。Bt $\delta$ -内毒素的结构域I典型地包含可变区1、保守区块1、可变区2、以及保守区块2的N-末端的52个氨基酸。结构域II典型地包含保守区块2的C-末端的大约15个氨基酸、可变区3、以及保守区块3的N-末端的大约10个氨基酸。结构域III典型地包含保守区块3的C-末端的大约38个氨基酸、可变区块4、保守区块4、可变区块5、以及保守区块5。Cry1鳞翅目活性的毒素在其他 $\delta$ -内毒素之外还具有可变区6,所述可变区6在结构域III之内具有大约1至3个氨基酸。

[0008] 众多商业上有价值的植物(包括普通的农作物)易受植物有害生物(包括昆虫和线虫有害生物)的攻击的影响,导致作物产量和品质的实质性降低。例如,植物有害生物是在全世界重要农作物损失中的主要因素。由于无脊椎有害生物(包括昆虫)的侵染,仅在美国每年就损失大约80亿美元。昆虫有害生物对于菜农和果农,对于观赏性花卉的生产商,以及对于家庭花匠也是负担。

[0009] 昆虫有害生物主要是通过密集使用化学杀有害生物剂来控制,这些化学杀有害生物剂通过抑制昆虫成长、预防昆虫摄食或繁殖、或者导致死亡而有效。生物性有害生物控制剂,如表达杀有害生物毒素(如Cry蛋白)的苏云金芽孢杆菌菌株,也已经应用至作物植物中,产生了令人满意的结果,提供化学杀有害生物剂的替代物或补充物。已经分离了编码这些Cry蛋白的一些的基因并且它们在异源性宿主(如转基因植物)中的表达已经显示出提供了另一种用于控制经济上重要的昆虫有害生物的手段。

[0010] 因此可以达到良好的昆虫控制,但是某些化学和生物控制方法的继续使用增加了昆虫有害生物对此类控制措施产生抗性的机会。通过各种抗性管理实践已部分地缓和了这种状况,但仍需要开发新的且有效的有害生物控制剂。特别需要的是可以靶向更广谱的经

济上重要的昆虫有害生物和/或有效控制昆虫品系的控制剂,这些昆虫品系对现有的昆虫控制剂是有抗性的或可以变得有抗性。

## 发明内容

[0011] 本发明提供了用于赋予细菌、植物、植物细胞、组织以及种子的杀有害生物活性(例如杀昆虫活性)的核酸、多肽、组合物以及方法。特别地,本发明提供了新颖嵌合杀有害生物蛋白(例如,嵌合杀昆虫蛋白),所述杀有害生物蛋白与亲本分子相比任选地具有改变的或增强的活性。

[0012] 在实施例中,本发明的嵌合蛋白对经济上重要的昆虫有害生物(特别是侵染植物的昆虫有害生物)是有毒的(例如,通过抑制昆虫有害生物存活、生长和/或繁殖的能力)。例如,在实施例中,本发明的嵌合杀昆虫蛋白可以用于控制一种或多种经济上重要的鳞翅目有害生物,这些鳞翅目有害生物包括但不限于黑色地老虎(black cutworm)(小地老虎(*Agrotis ipsilon*))、欧洲玉米蛀虫(European corn borer)(欧洲玉米螟(*Ostrinia nubilalis*))、秋黏虫(fall armyworm)(草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*))、玉米穗蛾(corn earworm)(玉米穗虫(*Helicoverpa zea*))、甘蔗螟(sugarcane borer)(小蔗螟(*Diatraea saccharalis*))、绒毛豆毛虫(velvetbean caterpillar)(黎豆夜蛾(*Anticarsia gemmatalis*))、大豆夜蛾(soybean looper)(大豆尺蠖(*Chrysodeixis includes*))、西南玉米蛀虫(southwest corn borer)(西南玉米螟(*Diatraea grandiosella*))、西部豆切根虫(western bean cutworm)(西方豆地香(*Richia albicosta*))、烟夜蛾(tobacco budworm)(烟芽夜蛾(*Heliothis virescens*))、亚洲玉米蛀虫(Asian corn borer)(亚洲玉米螟(*Ostrinia furnacalis*))、棉螟蛉(cotton bollworm)(棉铃虫(*Helicoverpa armigera*))、条纹蛀茎虫(striped stem borer)(二化螟(*Chilo suppressalis*))、粉蛀茎虫(pink stem borer)(非洲大螟(*Sesamia calamistis*))、水稻卷叶螟(rice leaf folder)(稻纵卷叶螟(*Cnaphalocrocis medinalis*))等。在实施例中,所述嵌合杀昆虫蛋白针对秋黏虫昆虫有害生物具有活性,所述秋黏虫昆虫有害生物对Vip3A蛋白和/或Cry1F蛋白具有抗性。

[0013] 因此,作为一方面,本发明提供了对鳞翅目昆虫有害生物有毒的嵌合杀昆虫蛋白,所述嵌合杀昆虫蛋白在N-末端至C-末端方向上包含:(a)第一Cry1蛋白的N-末端区域,所述N-末端区域任选地是SEQ ID NO:2或与其基本上同一的氨基酸序列的BT-0029蛋白的N-末端区域,所述N-末端区域融合至(b)不同Cry1蛋白的C-末端区域;其中在所述第一Cry1蛋白和所述不同Cry1蛋白之间的交换位置位于保守区块3之中。在代表性实施例中,所述不同Cry1蛋白是Cry1F(例如Cry1Fa)、Cry1G、Cry1I(例如Cry1Ia或Cry1If,如BT-0022)、Cry1C(例如Cry1Ca)或Cry1K蛋白。

[0014] 在实施例中,根据本发明的嵌合杀昆虫蛋白针对草地贪夜蛾昆虫有害生物或昆虫有害生物群体具有杀昆虫活性,所述草地贪夜蛾昆虫有害生物或昆虫有害生物群体对Vip3A蛋白和/或Cry1F蛋白具有抗性。

[0015] 作为另外的方面,本发明提供了编码本发明的嵌合杀昆虫蛋白的核苷酸序列,以及包含其的表达盒和运载体。在实施例中,所述多核苷酸被密码子优化用于在植物(例如单子叶植物如玉蜀黍或双子叶植物如大豆)中表达。

[0016] 作为另外的方面,本发明提供了转基因细胞(例如转基因植物细胞,如双子叶植物细胞或单子叶植物细胞,或转基因细菌细胞)、转基因植物部分、转基因植物培养物、以及转基因植物种子,其包含本发明的核苷酸序列、表达盒、运载体和/或嵌合杀昆虫蛋白。

[0017] 作为仍另外的方面,本发明涵盖转基因植物,所述转基因植物包含本发明的植物细胞、植物部分、核苷酸序列、表达盒、运载体和/或嵌合杀昆虫蛋白。

[0018] 作为另外的方面,涉及产生本发明的转基因植物的种子和由本发明的转基因植物产生的种子。

[0019] 还提供了衍生自本发明的转基因植物的收获产物,其中所述收获产物任选地包含本发明的核苷酸序列、表达盒、运载体和/或嵌合杀昆虫蛋白。进一步提供了衍生自本发明的收获产物的加工产物,其中所述收获产物任选地包含本发明的核苷酸序列、表达盒、运载体和/或嵌合杀昆虫蛋白。在实施例中,所述收获产物或加工产物包含本发明的嵌合杀昆虫蛋白,并且对昆虫有害生物(例如鳞翅目昆虫有害生物)具有增加的抗性。

[0020] 作为仍另外的方面,本发明提供了杀昆虫组合物,所述杀昆虫组合物包含本发明的嵌合杀昆虫蛋白和农业上可接受的载体。

[0021] 仍另外,本发明作为另外的方面,提供了产生对昆虫有害生物(例如鳞翅目昆虫有害生物)具有增加的抗性的转基因植物的方法。在实施例中,所述方法包括向植物中引入本发明的多核苷酸、表达盒或运载体,其中所述嵌合杀昆虫蛋白在植物中表达,从而产生对昆虫有害生物具有增加的抗性的转基因植物。任选地,所述引入步骤包括:(i)用多核苷酸、表达盒或运载体转化植物细胞并再生转基因植物;或者(ii)使包含多核苷酸、表达盒或运载体的第一植物与第二植物杂交。在实施例中,所述方法进一步包括产生来自转基因植物的种子。在实施例中,所述方法进一步包括从转基因植物中获得子代植物,其中所述子代植物包含多核苷酸、表达盒或运载体,表达嵌合杀昆虫蛋白,并且对昆虫有害生物具有增加的抗性。

[0022] 作为又另一个方面,本发明提供了产生对昆虫有害生物(例如鳞翅目昆虫有害生物)具有增加的抗性的转基因植物的方法,所述方法包括:(a)种植包含本发明的多核苷酸、表达盒或运载体的种子;和(b)使来自种子的转基因植物生长,其中所述转基因植物包含多核苷酸、表达盒或运载体并产生嵌合杀昆虫蛋白,并且对昆虫有害生物具有增加的抗性。在实施例中,所述方法进一步包括:(c)收获来自(b)的转基因植物的种子,其中所述收获种子包含多核苷酸、表达盒、运载体和/或嵌合杀昆虫蛋白。任选地,所述种子对昆虫有害生物(例如鳞翅目昆虫有害生物)具有增加的抗性。

[0023] 仍另外,作为另一个方面,本发明提供了产生种子的方法。在实施例中,所述方法包括:(a)提供包含本发明的多核苷酸、表达盒或运载体的转基因植物;和(b)收获来自(a)的转基因植物的种子,其中所述收获种子包含本发明的多核苷酸、表达盒或运载体和/或嵌合杀昆虫蛋白。任选地,所述种子对昆虫有害生物(例如鳞翅目昆虫有害生物)具有增加的抗性。

[0024] 本发明进一步考虑到产生杂交植物种子的方法。在代表性实施例中,所述方法包括:(a)使第一近交植物(其是包含本发明的多核苷酸、表达盒或运载体的转基因植物)与不同近交植物(其可以包含或不包含本发明的多核苷酸、表达盒或运载体)杂交;和(b)允许形成杂交种子。在实施例中,所述杂交种子包含本发明的多核苷酸、表达盒或运载体和/或嵌



合杀昆虫蛋白。任选地,所述种子对昆虫有害生物(例如鳞翅目昆虫有害生物)具有增加的抗性。

[0025] 作为另一个方面,本发明提供了控制昆虫有害生物(例如鳞翅目昆虫有害生物,如秋黏虫)的方法,所述方法包括向昆虫有害生物或其环境递送组合物,所述组合物包含有效量的本发明的嵌合杀昆虫蛋白或杀昆虫组合物。在实施例中,所述方法是控制对Vip3A蛋白和/或Cry1F蛋白具有抗性的鳞翅目昆虫有害生物(例如秋黏虫)的方法。

[0026] 因此,作为另一个方面,本发明提供了减少对Vip3A蛋白和/或Cry1F蛋白的抗性在靶标鳞翅目昆虫有害生物(例如秋黏虫)群体中发展的方法。在实施例中,所述方法包括向靶标群体或其环境递送转基因植物,所述转基因植物包含:(i)根据本发明的多核苷酸、表达盒或运载体;和(ii)包含编码Vip3A蛋白的核苷酸序列和/或编码Cry1F蛋白的核苷酸序列的多核苷酸;其中所述嵌合杀昆虫蛋白和Vip3A蛋白和/或Cry1F蛋白在所述转基因植物中产生。

[0027] 本发明还涉及使用本发明的多核苷酸的方法,例如在DNA构建体或表达盒或运载体中用于在生物(包括植物和微生物,如细菌)中进行转化和表达。核苷酸或氨基酸序列可以是已经被设计用于在生物(如植物或细菌)中表达的天然的或合成的序列。本发明进一步涉及制造本发明的杀昆虫蛋白的方法以及使用这些多核苷酸序列和杀昆虫蛋白的方法,例如,在微生物中控制昆虫或者在转基因植物中赋予保护免受昆虫损害。

[0028] 本发明的另一个方面包括杀昆虫组合物和配制品,所述组合物和配制品包含本发明的嵌合杀昆虫蛋白,以及使用这些组合物或配制品来控制昆虫群体的方法,例如通过将这些组合物或配制品应用至昆虫侵染的区域,或者应用至预防性处理易感昆虫的区域或植物以赋予针对昆虫有害生物的保护。任选地,除本发明的嵌合杀昆虫蛋白之外,本发明的组合物或配制品可以包含其他杀有害生物剂(如化学杀有害生物剂、其他杀有害生物蛋白或dsRNA),例如,以加强或增强组合物或配制品的昆虫控制能力和/或用于昆虫抗性管理。

[0029] 本发明的这些组合物和方法可用于控制攻击植物、特别是作物植物的昆虫有害生物。本发明的这些组合物对于检测商用产品或转基因生物中的嵌合杀昆虫蛋白或编码其的核酸的存在也是有用的。

[0030] 本发明还提供了本发明的嵌合杀昆虫蛋白、核酸、转基因植物、植物部分、种子和杀昆虫组合物的用途,例如,用于控制昆虫有害生物(如鳞翅目有害生物)。

[0031] 在实施例中,本发明提供了使用本发明的多核苷酸、表达盒、运载体或宿主细胞以产生用于控制昆虫有害生物(例如鳞翅目昆虫有害生物)的杀昆虫组合物的方法。

[0032] 在实施例中,本发明提供了使用本发明的多核苷酸、表达盒或运载体以产生转基因种子的方法,其中所述转基因种子生长成对昆虫有害生物具有增加的抗性的转基因植物。

[0033] 作为另一个方面,本发明还考虑了本发明的转基因植物用于产生转基因种子(其任选地是杂交种子)的用途。

[0034] 在实施例中,本发明提供了使用本发明的嵌合杀昆虫蛋白、多核苷酸、表达盒、运载体、转基因植物或杀昆虫组合物以预防对Vip3A蛋白和/或Cry1F蛋白的抗性在靶标鳞翅目昆虫有害生物群体中发展的方法。

[0035] 参考以下详细的说明和权利要求书,本发明的这些和其他特征、方面、以及优点将

变得更好理解。

### 附图说明

[0036] 图1A和1B显示了全长BT-0029 (SEQ ID NO:2)、BT-0022 (SEQ ID NO:1)、Cry1Fa (SEQ ID NO:8) 和Cry1Ka (SEQ ID NO:12) 的氨基酸序列的比对。示出了结构域III核心和保守区块3 (CB3)。比对序列中同一的氨基酸被遮蔽。

[0037] 图2A和2B显示了全长BT-0029 (SEQ ID NO:2) 与示例性BT-0029嵌合体:Bt29-Bt22 (SEQ ID NO:3)、Bt29-1Fa (SEQ ID NO:9) 和Bt29-1Ka (SEQ ID NO:13) 的氨基酸序列的比对。示出了结构域III核心和保守区块3 (CB3)。图中所示的结构域III核心衍生自第二Cry蛋白。比对序列中同一的氨基酸被遮蔽。

[0038] 图3A、3B、3C和3D显示了全长Bt29-Bt22嵌合体 (SEQ ID NO:3) 与一系列Bt29-Bt22嵌合体 (Bt29-Bt22Tr1 (SEQ ID NO:20)、Bt29-Bt22Tr2 (SEQ ID NO:21)、Bt29-Bt22Tr3 (SEQ ID NO:22)、Bt29-Bt22Tr4 (SEQ ID NO:23)、Bt29-Bt22Tr5 (SEQ ID NO:24) 和Bt29-Bt22Tr6 (SEQ ID NO:25)) 的比对,其中在BT-0029原毒素尾部内具有C-末端截短。

[0039] 序列表中序列的简要说明

[0040] SEQ ID NO:1是BT-0022蛋白的氨基酸序列。

[0041] SEQ ID NO:2是BT-0029蛋白的氨基酸序列。

[0042] SEQ ID NO:3是Bt29-Bt22嵌合体的氨基酸序列。所述BT-0022序列是氨基酸459-597。

[0043] SEQ ID NO:4是对SEQ ID NO:3的Bt29-Bt22嵌合体进行编码的核苷酸序列。

[0044] SEQ ID NO:5是对SEQ ID NO:3的Bt29-Bt22嵌合体进行编码的示例性玉蜀黍优化的序列。

[0045] SEQ ID NO:6是对SEQ ID NO:3的Bt29-Bt22嵌合体进行编码的示例性玉蜀黍优化的序列。

[0046] SEQ ID NO:7是对SEQ ID NO:3的Bt29-Bt22嵌合体进行编码的示例性玉蜀黍优化的序列。

[0047] SEQ ID NO:8是全长Cry1Fa的氨基酸序列。

[0048] SEQ ID NO:9是Bt29-1Fa嵌合体的氨基酸序列。所述Cry1Fa序列是氨基酸459-597。

[0049] SEQ ID NO:10是对SEQ ID NO:9的Bt29-1Fa嵌合体进行编码的核苷酸序列。

[0050] SEQ ID NO:11是对SEQ ID NO:9的Bt29-1Fa嵌合体进行编码的示例性玉蜀黍优化的序列。

[0051] SEQ ID NO:12是全长Cry1Ka的氨基酸序列。

[0052] SEQ ID NO:13是Bt29-1Ka嵌合体的氨基酸序列。所述Cry1Ka序列是氨基酸459-597。

[0053] SEQ ID NO:14是对SEQ ID NO:13的Bt29-1Ka嵌合体进行编码的核苷酸序列。

[0054] SEQ ID NO:15是Bt29-1Kav2嵌合体的氨基酸序列。

[0055] SEQ ID NO:16是对SEQ ID NO:15的Bt29-1Ka嵌合体进行编码的核苷酸序列。

[0056] SEQ ID NO:17是全长Cry1Ca的氨基酸序列。

- [0057] SEQ ID NO:18是Bt29-1Ca嵌合体的氨基酸序列。所述Cry1Ca序列是氨基酸459-597。
- [0058] SEQ ID NO:19是对SEQ ID NO:18的Bt29-1Ca嵌合体进行编码的核苷酸序列。
- [0059] SEQ ID NO:20是Bt29-Bt22Tr1蛋白的氨基酸序列。
- [0060] SEQ ID NO:21是Bt29-Bt22Tr2蛋白的氨基酸序列。
- [0061] SEQ ID NO:22是Bt29-Bt22Tr3蛋白的氨基酸序列。
- [0062] SEQ ID NO:23是Bt29-Bt22Tr4蛋白的氨基酸序列。
- [0063] SEQ ID NO:24是Bt29-Bt22Tr5蛋白的氨基酸序列。
- [0064] SEQ ID NO:25是Bt29-Bt22Tr6蛋白的氨基酸序列。
- [0065] SEQ ID NO:26是BT29BT22-TL22v1蛋白的氨基酸序列。
- [0066] SEQ ID NO:27是BT29BT22-TL22v2蛋白的氨基酸序列。
- [0067] SEQ ID NO:28是BT29BT22-TL22v3蛋白的氨基酸序列。
- [0068] SEQ ID NO:29是BT29BT22-TL22v4蛋白的氨基酸序列。
- [0069] SEQ ID NO:30是BT29BT22-TL22v5蛋白的氨基酸序列。
- [0070] SEQ ID NO:31是BT29BT22-TL22v6蛋白的氨基酸序列。
- [0071] SEQ ID NO:32是BT291FaTr1蛋白的氨基酸序列。
- [0072] SEQ ID NO:33是BT291FaTr2蛋白的氨基酸序列。
- [0073] SEQ ID NO:34是BT291FaTr3蛋白的氨基酸序列。
- [0074] SEQ ID NO:35是BT291FaTr4蛋白的氨基酸序列。

### 具体实施方式

[0075] 本说明不旨在是可以实施本发明的所有不同方式,或可以添加到本发明中的所有特征的详细目录。例如,关于一个实施例所说明的特征可以并入其他实施例中,并且关于一个特定实施例所说明的特征可以从那个实施例删除。因此,本发明考虑了,在本发明的一些实施例中,可以排除或省略在此陈述的任何特征或特征的组合。此外,鉴于本披露内容,在此建议的不同实施例的众多变化以及附加对于本领域技术人员是显而易见的,这不脱离本发明。因此,以下说明旨在阐述本发明的一些特定实施例,并且并没有穷尽地叙述其所有排列、组合和变化。

[0076] 除非另外定义,在此所使用的所有技术和科学术语均具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的相同的含义。在此本发明的说明中使用的术语是仅出于描述特定实施例的目的,且并不旨在限制本发明。

[0077] 在此引用的所有的公开、专利申请、专利以及其他参考文件对于引用中提及的有关句子和/或段落的传授内容通过引用以其全文结合在此。

[0078] 在此提供的核苷酸序列以5'至3'方向从左至右表示,并且使用代表核苷酸碱基的标准代码表示,如37CFR§§1.821-1.825和世界知识产权组织(WIPO)标准ST.25中所述,例如:腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)、胸腺嘧啶(T)、以及鸟嘌呤(G)。

[0079] 氨基酸同样使用WIPO标准ST.25来指示,例如:丙氨酸(Ala;A)、精氨酸(Arg;R)、天冬酰胺(Asn;N)、天冬氨酸(Asp;D)、半胱氨酸(Cys;C)、谷氨酰胺(Gln;Q)、谷氨酸(Glu;E)、甘氨酸(Gly;G)、组氨酸(His;H)、异亮氨酸(Ile;I)、亮氨酸(Leu;L)、赖氨酸(Lys;K)、甲

硫氨酸 (Met;M)、苯丙氨酸 (Phe;F)、脯氨酸 (Pro;P)、丝氨酸 (Ser;S)、苏氨酸 (Thr;T)、色氨酸 (Trp;W)、酪氨酸 (Tyr;Y)、以及缬氨酸 (Val;V)。

[0080] 除非上下文另外指示,明确地预期的是在此所述的本发明的不同特征可以按任何组合使用。而且,本发明还考虑到在本发明的一些实施例中,在此陈述的任何特征或特征的组合可以被排除或省略。举例说明,如果本说明书陈述组合物包含组分A、B和C,明确地预期A、B或C的任何一种或其组合可单一地或以任何组合被省略和放弃。

[0081] 定义.

[0082] 如在本发明的说明书和所附的权利要求中所使用的,单数形式“一个”、“一种”和“所述(the)”旨在也包括复数形式,除非上下文清楚地另外指示。

[0083] 如在此使用的,“和/或”是指并且涵盖一个或多个相关的列出项的任何及全部可能组合,连同当以可替代性(“或”)解释时组合的缺少。

[0084] 如在此使用的,术语“约”当是指一个可测量的值如剂量或时间段等时意在涵盖±20%、±10%、±5%、±1%、±0.5%、或甚至±0.1%的指定量的变化。如在此使用的,短语如“在约X和Y之间”意指“在约X和约Y之间”,并且短语如“从约X至Y”意指“从约X至约Y”。

[0085] 如在此使用的,短语如“从X至Y”应解释为包括X和Y,除非上下文另外指示。

[0086] 本发明的杀昆虫蛋白的“活性”意指杀昆虫蛋白作为口服活性的昆虫控制剂发挥作用,具有毒性作用,例如通过抑制昆虫有害生物存活、生长和/或繁殖(例如导致发病率和/或死亡率)的能力,和/或能够干扰和/或阻止昆虫摄食,这可能引起或者可能不引起昆虫的死亡。因此,当本发明的杀昆虫蛋白被递送至昆虫时,这种结果典型地是所述昆虫的发病和/或死亡,和/或所述昆虫减少或停止摄食使所述杀昆虫蛋白可供昆虫利用的来源。

[0087] 在本发明的上下文中,“嵌合”蛋白是通过融合至少两种不同蛋白质中的全部或部分而产生的蛋白质。在本发明的实施例中,所述嵌合蛋白是嵌合Cry蛋白,其包含融合在一起形成单一多肽的两种不同Cry蛋白的全部或部分。“嵌合杀昆虫蛋白”是具有杀昆虫活性的嵌合蛋白(如在此描述的)。

[0088] “编码序列”是转录成RNA(如mRNA、rRNA、tRNA、snRNA、正义RNA或反义RNA)的核酸序列。在实施例中,所述RNA随后被翻译以产生蛋白质。

[0089] 如在此使用的,“密码子优化的”核苷酸序列意指重组的、转基因的、或合成的多核苷酸的核苷酸序列,其中这些密码子被选择以反映宿主细胞或生物可以具有的特定的密码子偏好性。这典型地是以这样一种方式来完成,所述方式是为了保持由密码子优化的核苷酸序列所编码的多肽的氨基酸序列。在某些实施例中,针对所述构建体有待在其中进行表达的细胞(例如,动物、植物、真菌或细菌细胞)对核苷酸序列进行密码子优化。例如,有待在植物细胞中表达的构建体可以使其全部或部分序列进行密码子优化用于在植物中表达。参见例如,美国专利号6,121,014。在实施例中,本发明的多核苷酸被密码子优化用于在植物细胞(例如,双子叶植物细胞或单子叶植物细胞)或细菌细胞中表达。

[0090] “控制”昆虫有害生物意指通过毒性作用抑制昆虫有害生物存活、生长、摄食、和/或繁殖的能力,和/或限制由昆虫有害生物引起的昆虫相关的损害或作物植物损失,和/或保护在昆虫有害生物存在的条件下生长时由有害生物引起的作物的产量潜力。“控制”昆虫有害生物可以是或可以不是意指杀死昆虫,尽管在本发明的实施例中,“控制”昆虫意指杀死昆虫。

[0091] 术语“包含 (comprise)”、“包含 (comprises)”或“包含 (comprising)”当用于本说明书中时指示所说明的特征、整数、步骤、操作、要素、或组分的存在,但并不排除一个或多个其他特征、整数、步骤、操作、要素、组分、和/或其组的存在或添加。

[0092] 如在此使用的,过渡短语“基本上由...组成”(以及语法变体)意指,权利要求书的范围有待被解读为涵盖权利要求书中所列举的指定材料或步骤以及不实质上改变所要求的发明的一个或多个基本和新颖特征的那些。因此,当用于本发明的权利要求中时,术语“基本上由...组成”并不旨在被解释为等同于“包含 (comprising)”。

[0093] 在本发明的上下文中,“对应于 (corresponding to)”或“对应于 (corresponds to)”意指当经修饰的或同系物蛋白的氨基酸序列与彼此比对时,“对应于”在所述经修饰的或同系物蛋白中某些枚举的位置的氨基酸是与参考蛋白中的这些位置比对的那些,但在相对于本发明的特定参考氨基酸序列而言的相同精确的数字位置中是不必要的。例如,如果 SEQ ID NO:2 (BT-0029) 是参考序列并且与 SEQ ID NO:1 (BT-0022) 比对(如图1中所示),则紧随 SEQ ID NO:1 (BT-0022) 中的结构域 III 之后的序列 TLEAVT “对应于”紧随 SEQ ID NO:2 (BT-0029) 的结构域 III 之后的序列 TFEAEY。

[0094] 如在此使用的,术语“Cry 蛋白”意指苏云金芽孢杆菌晶体  $\delta$ -内毒素类型的杀昆虫蛋白。术语“Cry 蛋白”可以指原毒素形式或其任何杀昆虫活性片段或毒素,所述毒素包括部分加工的和成熟的毒素形式(例如,没有 N-末端肽基片段和/或 C-末端原毒素尾部)。

[0095] 如在此使用的,“递送 (deliver)”或“递送 (delivering)”(以及语法变体)组合物或杀昆虫蛋白意指所述组合物或杀昆虫蛋白与昆虫接触,这促进所述组合物或杀昆虫蛋白的经口摄取,产生对昆虫的毒性作用和控制。可以按照许多公认的方式,包括但不限于转基因植物表达、一种或多种配制的蛋白质组合物、一种或多种可喷雾的蛋白质组合物、诱饵基质、或任何其他本领域公认的蛋白质递送系统来递送所述组合物或杀昆虫蛋白。

[0096] 术语“结构域”是指沿着进化相关蛋白的序列的比对在特定位置处保守的一组氨基酸。虽然其他位置上的氨基酸可在同系物之间有所不同,但是在特定位置处高度保守的氨基酸指示在蛋白质的结构、稳定性或功能中很可能是必需的氨基酸。通过其在蛋白质同系物家族的经比对序列中的高度保守性进行鉴别,其可用作鉴别物 (identifier),用来确定所讨论的任何多肽是否属于先前鉴别的多肽组。

[0097] “控昆虫有效量”意指杀昆虫蛋白的浓度,其通过毒性作用抑制昆虫存活、生长、摄食和/或繁殖的能力,和/或限制昆虫相关的损害或作物植物损失。“控昆虫有效量”可以是或可以不是意指杀死昆虫,尽管在实施例中,它指示杀死昆虫。

[0098] 如在此使用的“表达盒”意指能够在适当的宿主细胞中指导至少一种感兴趣的多核苷酸(如编码本发明的杀昆虫蛋白的多核苷酸)的表达的核酸分子,所述核酸分子包含可操作地连接至感兴趣的多核苷酸(其可操作地连接至终止信号)的启动子。“表达盒”还典型地包含另外的多核苷酸以促进感兴趣的多核苷酸的正确翻译。所述表达盒还可以包含与感兴趣的多核苷酸的表达无关的但是由于用于从表达运载体去除表达盒的方便限制位点而存在的其他多核苷酸。在实施例中,表达盒中的至少一种组分相对于至少一种其他组分(例如,与感兴趣的多核苷酸可操作相关联的异源启动子)可以是异源的(即外来的)。该表达盒还可以是天然存在的但已经是以对于异源表达有用的重组形式而获得的表达盒。然而,典型地,所述表达盒相对于宿主是异源的,即所述表达盒(或甚至感兴趣的多核苷酸)不是天

然存在于宿主细胞中的,并且已经通过转化方法或育种方法引入到所述宿主细胞或其祖先细胞中。该表达盒中的一个或多个感兴趣的多核苷酸的表达通常是在启动子的控制下。在多细胞生物(如植物)的情况下,启动子还可能对于特定组织、或器官、或者发育阶段是特异性的或优先的(如在此更详细描述)。当被转化进植物中时,表达盒或其片段也可被称为“插入的多核苷酸”或者“插入多核苷酸”。

[0099] “基因”在此定义为包括一个或多个多核苷酸的遗传单位,该遗传单位占据染色体或质粒上特定位置并且包含用于生物中的特定特征或性状的遗传指令。

[0100] 如在此使用的,“肠蛋白酶”是指在昆虫的消化道中天然发现的蛋白酶。这种蛋白酶通常参与被摄取的蛋白质的消化。肠蛋白质酶的实例包括胰蛋白酶,其典型地切割赖氨酸(K)或精氨酸(R)残基的C-末端侧上的肽;以及胰凝乳蛋白酶,其典型地切割苯丙氨酸(F)、色氨酸(W)或酪氨酸(Y)的C-末端侧上的肽。

[0101] 如此处使用的,术语“异源的”意指外来的、外源的、非天然的和/或非天然发生的。在实施例中,“异源的”多核苷酸或多肽是不与将所述多核苷酸或多肽引入其中的宿主细胞天然相关联的多核苷酸或多肽,包括天然存在的核苷酸序列或多肽的非天然存在的多拷贝。在实施例中,核苷酸序列对于与其可操作相关联的另一序列是异源的,例如,启动子可以对于可操作相关联的编码序列是异源的(即外来的)。

[0102] 如此处使用的“同源的”意指天然的。例如,同源的核苷酸序列或氨基酸序列是与将它引入其中的宿主细胞天然相关联的核苷酸序列或氨基酸序列,同源的启动子序列是与编码序列天然相关联的启动子序列等。

[0103] 如在此使用的,术语“增加(increase、increasing、increased)”、“增强(enhance、enhanced、enhancing和enhancement)”(及其语法变体)和类似术语描述了在控制植物有害生物方面的升高,例如通过使植物与本发明的多肽接触(如例如,通过转基因表达或通过局部应用方法)。这种控制的增加可以参考在本发明多肽不存在的情况下植物有害生物的控制水平(例如,不是转基因表达多肽或不是用多肽局部处理的植物)。因此,在实施例中,术语“增加(increase、increasing、increased)”、“增强(enhance、enhanced、enhancing和enhancement)”(及其语法变体)和类似术语可以指示如与适合的对照(例如,不与本发明多肽接触的植物、植物部分、植物细胞)相比,至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、125%、150%、200%、300%、400%、500%或更多的升高。

[0104] 如在此使用的“杀昆虫”被定义为有毒的生物活性,其能够控制昆虫有害生物,任选地但优选地通过杀死它们来控制。

[0105] 当核酸序列编码了多肽(所述多肽与由参考核酸序列所编码的多肽具有相同的氨基酸序列)时,这种核苷酸序列与这种参考核酸序列“同类编码”。

[0106] 在代表性实施例中,本发明的这些核酸分子、多核苷酸或蛋白质是“分离的”。“分离的”核酸分子、多核苷酸或蛋白质等是不再存在于其天然环境中的核酸分子、多核苷酸或蛋白质等。本发明的分离的核酸分子、多核苷酸或蛋白质可以按照纯化的形式存在,或者可以存在于重组宿主中,例如转基因细菌或转基因植物中。在实施例中,分离的核酸分子、核苷酸序列或多肽以纯化形式存在,即与天然存在的生物或病毒的至少一些其他组分(例如,细胞或病毒结构组分或通常发现与所述多核苷酸相关联的其他多肽或核酸)至少部分地分

开。在其他实施例中，“分离的”核酸分子、核苷酸序列或多肽可以存在于非天然环境中，如例如重组宿主细胞。因此，例如，相对于核苷酸序列而言，术语“分离的”可以意指将所述核苷酸序列从它天然存在于其中的染色体和/或细胞中分离出。如果将多核苷酸从它天然存在于其中的染色体和/或细胞中分离出并且然后将其插入它并不天然存在于其中的遗传背景、染色体和/或细胞（例如，不同的宿主细胞、不同的调节序列、和/或与自然中发现的不同的基因组位置）中，则所述多核苷酸也是被分离的。因此，这些重组核酸分子、核苷酸序列以及它们所编码的多肽是“分离的”，因为它们通过人工方式从其天然环境中分开而存在并因此不是自然产物，然而，在一些实施例中，它们可以被引入到重组宿主细胞中并存在于所述重组宿主细胞中。在代表性实施例中，分离的核酸分子、分离的核苷酸序列和/或分离的多肽是至少约1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、或更纯的。

[0107] 术语“基序”或“共有序列”或“特征 (signature)”是指进化相关蛋白的序列中的短保守区。基序常常是结构域的高度保守部分，但是也可只包括结构域的一部分，或位于保守结构域外部（如果基序的所有氨基酸位于所限定结构域的外部）。

[0108] “天然”或“野生型”核酸、核苷酸序列、多肽或氨基酸序列是指天然存在的或内源性的核酸、核苷酸序列、多肽或氨基酸序列。因此，例如，“野生型mRNA”是天然存在于生物体中的或对生物体来说是内源性的mRNA。

[0109] 术语“核酸”、“核酸分子”、“核苷酸序列”、“寡核苷酸”以及“多核苷酸”在此可以互换地使用，除非上下文另外指示，并且是指核苷酸的杂聚物。这些术语包括但不限于DNA和RNA分子，包括cDNA、基因组DNA、合成的（例如，化学合成的）DNA和RNA、质粒DNA、mRNA、反义RNA和RNA/DNA杂交体，其中的任一项都可以是线状的或分支的、单链的或双链的、或其组合。当合成地产生dsRNA时，较少见的碱基，如肌苷，5-甲基胞嘧啶、6-甲基腺嘌呤、次黄嘌呤和其他也可以用于反义、dsRNA和核酶配对作用。例如，已经显示含有尿苷和胞苷的C-5丙炔类似物的多核苷酸以高亲和力结合RNA并且是基因表达的强力反义抑制剂。也可以作出其他修饰，如修饰磷酸二酯主链或RNA的核糖基团中的2'-羟基。在实施例中，“核酸”、“核酸分子”、“核苷酸序列”、“寡核苷酸”或“多核苷酸”是指DNA。

[0110] 如在此使用的“可操作地连接”或“可操作地相关联”意指所指定的元件是彼此功能上相关的，并且还通常是物理相关的。因此，如此处使用的术语“可操作地连接的”或“可操作地关联的”是指在功能上关联的一个单一核酸分子上的核苷酸序列。因此，可操作地连接至第二核苷酸序列的第一核苷酸序列是指当所述第一核苷酸序列被放入与所述第二核苷酸序列的功能关系中时的情况。例如，如果启动子影响核苷酸序列的转录或表达，则所述启动子与所述核苷酸序列可操作地关联。本领域普通技术人员将理解，控制序列（例如启动子）不需要和与其可操作地相关联的核苷酸序列邻接，只要所述控制序列能发挥指导其表达的功能。因此，例如，介入未翻译的、已转录的序列可以存在于启动子与核苷酸序列之间，并且所述启动子仍可以被认为“可操作地连接至”所述核苷酸序列上或与所述核苷酸序列“可操作地相关联”。

[0111] 如在此使用的“植物”是指处于任何发育阶段的任何植物。

[0112] 在实践本发明中可采用任何植物（或将植物分组为例如一个属或更高的目分类），包括被子植物或裸子植物、单子叶植物或双子叶植物。

[0113] 示例性植物包括但不限于玉米（玉蜀黍（*Zea mays*））、卡罗拉（canola）（欧洲油菜

(*Brassica napus*)、芜菁亚种(*Brassica rapa* ssp.)、苜蓿(紫花苜蓿(*Medicago saliva*))、水稻(栽培稻(*Oryza sativa*),包括但不限于籼稻和/或粳稻)、油菜(欧洲油菜)、黑麦(*rye, Secale cereale*)、高粱(两色蜀黍(*Sorghum bicolor*), *Sorghum vulgare*)、向日葵(*sunflower, Helianthus annuus*)、小麦(普通小麦(*Triticum aestivum*))、大豆(*soybean, Glycine max*)、烟草(普通烟草(*Nicotiana tabacum*))、马铃薯(洋芋(*Solanum tuberosum*))、花生(落花生(*Arachis hypogaea*))、棉花(陆地棉(*Gossypium hirsutum*))、甘薯(番薯(*Ipomoea batatas*))、木薯(树薯(*Manihot esculenta*))、咖啡(咖啡属亚种(*Cofea* spp.))、椰子(可可椰子(*Cocos nucifera*))、菠萝(凤梨(*Ananas comosus*))、柑桔树(柑橘属物种(*Citrus* spp.))、可可(*cocoa, Theobroma cacao*)、茶(茶树(*Camellia sinensis*))、香蕉(芭蕉属物种(*Musa* spp.))、鳄梨(*avocado, Persea americana*)、无花果(*fig, Ficus casica*)、番石榴(*guava, Psidium guajava*)、芒果(杧果(*Mangifera indica*))、橄榄(油橄榄(*Olea europaea*))、番木瓜(木瓜(*Carica papaya*))、腰果(*cashew, Anacardium occidentale*)、澳洲坚果(*macadamia, Macadamia integrifolia*)、扁桃(巴旦杏(*Prunus amygdalus*))、糖用甜菜(甜菜(*Beta vulgaris*))、苹果(*apple, Malus pumila*)、黑莓(悬钩子属(*Rubus*))、草莓(草莓属(*Fragaria*))、胡桃(普通胡桃(*Juglans regia*))、葡萄(酿酒葡萄(*Vitis vinifera*))、杏(*apricot, Prunus armeniaca*)、樱桃(李属(*Prunus*))、桃(碧桃(*Prunus persica*))、李(欧洲李(*Prunus domestica*))、梨(西洋梨(*Pyrus communis*))、西瓜(*watermelon, Citrullus vulgaris*)、浮萍(浮萍属(*Lemna* spp.))、燕麦(*oats, Avena sativa*)、大麦(*barley, Hordeum vulgare*)、蔬菜、观赏植物、针叶树和草坪草(例如观赏性、娱乐或饲料用)、以及生物质禾草(例如柳枝稷和芒草)。

[0114] 蔬菜包括但不限于茄属物种(例如西红柿、番茄(*Lycopersicon esculentum*))、莴苣(例如莴苣(*Lactuea sativa*))、胡萝卜(*Caucus carota*)、花椰菜(甘蓝(*Brassica oleracea*))、芹菜(旱芹(*Apium graveolens*))、茄子(*eggplant, Solanum melongena*)、芦笋(石刁柏(*Asparagus officinalis*))、秋葵(黄秋葵(*Abelmoschus esculentus*))、四季豆(菜豆(*Phaseolus vulgaris*))、青豆(*Phaseolus limensis*)、豌豆(香豌豆属(*Lathyrus* spp.))、南瓜属(*Cucurbita*)的成员如古巴瓜(*C. hubbard*)、冬南瓜(南瓜(*C. moschata*))、密生西葫芦(*zucchini*) (西葫芦(*C. pepo*))、曲颈南瓜(*C. crookneck*)、*C. argyrosperma*、*C. argyrosperma* ssp *sororia*、*C. digitata*、*C. ecuadorensis*、旱地油瓜(*C. foetidissima*)、*C. lundelliana*、以及*C. martinezii*、以及黄瓜属(*Cucumis*)的成员如黄瓜(*cucumber, Cucumis sativus*)、哈密瓜(*C. cantalupensis*)、以及甜瓜(香瓜(*C. melo*))。

[0115] 观赏植物包括但不限于杜鹃花(杜鹃属(*Rhododendron* spp.))、绣球花(*hydrangea, Macrophylla hydrangea*)、木槿(*Hibiscus rosasanensis*)、玫瑰(玫瑰属(*Rosa* spp.))、郁金香(郁金香属(*Tulipa* spp.))、水仙花(水仙属(*Narcissus* spp.))、矮牵牛(*petunias, Petunia hybrida*)、康乃馨(*carnation, Dianthus caryophyllus*)、猩猩木(一品红(*Euphorbia pulcherima*))、以及菊花。

[0116] 可以用于实践本发明的针叶树包括例如,松树如火炬松(*loblolly pine, Pinus taeda*)、湿地松(*slash pine, Pinus elliotii*)、杰克松(西黄松(*Pinus ponderosa*))、黑松(小干松(*Pinus contorta*))以及蒙特利松树(辐射松(*Pinus radiata*));花旗松(*Douglas-fir, Pseudotsuga menziesii*);美国西部铁杉(加拿大铁杉(*Tsuga canadensis*));美国西



加云杉(白云杉(*Picea glauca*));红杉(北美红杉(*Sequoia sempervirens*));冷杉如银杉(温哥华冷杉(*Abies amabilis*))和香脂冷杉(加拿大胶杉(*Abies balsamea*));以及雪松,如美国西部侧柏(北美香柏(*Thuja plicata*))以及阿拉斯加黄杉(Alaska yellow-cedar)(黄扁柏(*Chamaecyparis nootkatensis*))。

[0117] 草坪草包括但不限于结缕草、剪股颖、羊茅草、早熟禾、奥古斯丁草、百慕达草、*bufallograsses*、黑麦草、以及鸭茅。

[0118] 还包括的是主要充当实验室模式的植物,例如拟南芥。

[0119] “植物细胞”是植物的结构和生理单位,包含原生质体和细胞壁。植物细胞可以处于分离的单个细胞或培养细胞的形式,或者是作为较高级的组织单位(如例如,植物组织、植物器官、或全株植物)的一部分。

[0120] “植物细胞培养物”意指植物单元(如例如,原生质体、细胞培养物细胞、植物组织中的细胞、花粉、花粉管、胚珠、胚囊、接合子以及处于不同发育阶段的胚)的培养物。

[0121] “植物材料”是指叶、茎、根、花或花的部分、果实、花粉、卵细胞、接合子、种子、切条、细胞或组织培养物、或植物的任何其他部分或产物。

[0122] “植物器官”是植物的独特而明显的已结构化并且分化的部分,如根、茎、叶、花蕾或胚。

[0123] 如在此使用的,术语“植物部分”包括但不限于,胚、花粉、胚珠、种子、叶、花、枝、果实、茎秆、根、根尖、花药、和/或植物细胞(包括在植物和/或植物的部分中完整的植物细胞)、植物原生质体、植物组织、植物细胞组织培养物、植物愈伤组织、植物团(*plant clumps*)等。

[0124] 如在此使用的“植物组织”意指组织化成结构和功能单元的一组植物细胞。包括植物中或培养物中的任何植物组织。这个术语包括但不限于:全株植物、植物器官、植物种子、组织培养物以及被组织化成结构或功能单元的任何植物细胞群组。这个术语与如以上列出的或由该定义以其他方式涵盖的任何具体类型的植物组织的联合应用或单独应用并不旨在排除任何其他类型的植物组织。

[0125] “感兴趣的多核苷酸”是指任何多核苷酸,当其转移至生物(例如,植物)中时赋予所述生物所希望的特征,如昆虫抗性、疾病抗性、除草剂耐受性、抗生素抗性、改善的营养价值、工业过程中改善的性能、商业上有价值的酶或代谢物的生产、或者改变的繁殖能力等。

[0126] 本发明多肽的“部分”或“片段”将理解为意指相对于本发明多肽的参考氨基酸序列而言长度减少的氨基酸序列。根据本发明,在适宜的情况下,这种部分或片段可以包括于它作为组分的较大多肽内(例如,标记的或融合蛋白)。在实施例,所述“部分”或“片段”基本上保留了杀昆虫活性(例如,全长蛋白活性的至少40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%或甚至100%,或者具有比全长蛋白更高的杀昆虫活性)。

[0127] 术语“蛋白质”、“肽”和“多肽”在此可以互换地使用。

[0128] 如在此使用的术语“启动子”是指多核苷酸,典型地在编码多核苷酸的上游(5'),其通过提供对RNA聚合酶和其他转录机制的识别来控制所述编码多核苷酸的表达。

[0129] 如在此使用的“原生质体”是指分离的植物细胞,没有细胞壁或仅具有部分细胞壁。

[0130] 如在此使用的,术语“重组”是指核酸分子(例如,DNA或RNA)或蛋白质或生物的如

下形式,所述形式通常不会在自然界中发现并且正因为如此通过人类干预来产生。如在此使用的,“重组核酸分子”(和类似术语)是包含多核苷酸组合的核酸分子,这些多核苷酸不会天然地一起存在并且是人类干预的结果,例如,由至少两种彼此异源的多核苷酸的组合组成的核酸分子,或人工合成的并且包含偏离通常存在于自然界中的多核苷酸的多核苷酸的核酸分子,或包含人工掺入宿主细胞的基因组DNA中的转基因和所述宿主细胞基因组的相关侧翼DNA的核酸分子。重组核酸分子的实例是由将转基因插入至植物的基因组DNA中产生的DNA分子,其可以最终导致所述生物中的重组RNA/或蛋白质分子的表达。在实施例中,“重组”蛋白是通常不存在于自然界中或存在于非天然存在的环境中的蛋白质,并且由重组核酸分子表达。如在此使用的,“重组植物”是通常不会在自然界中存在的植物,是人类干预的结果,并且含有重组多核苷酸(例如,掺入其基因组中的转基因或异源核酸分子)。由于此类基因组改变,重组植物明显不同于相关的野生型植物。

[0131] 如在此使用的,术语“减少(reduce、reduced、reducing、reduction)”、“减小(diminish)”、和“抑制(suppress)”(及其语法变体)和类似术语是指植物有害生物的存活、生长和/或繁殖的减少,例如通过使植物与本发明的多肽接触(如例如,通过转基因表达或通过局部应用方法)。这种存活、生长和/或繁殖的减少可以参考在本发明多肽不存在的情况下观察到的水平(例如,不是转基因表达多肽或不是用多肽局部处理的植物)。因此,在实施例中,术语“减少(reduce、reduced、reducing、reduction)”、“减小(diminish)”、和“抑制(suppress)”(及其语法变体)和类似术语意指如与不与本发明多肽接触的植物(例如,不是转基因表达多肽或不是用多肽局部处理的植物)相比降低至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多。在代表性实施例中,所述减少导致无或基本上无(即不显著量,例如少于约10%、少于约5%或甚至少于约1%)可检测的植物有害生物的存活、生长和/或繁殖。

[0132] “调节元件”是指参与控制多核苷酸的表达的核苷酸序列。调节元件的实例包括促进多核苷酸正确翻译的启动子、终止信号和核苷酸序列。

[0133] 如在此使用的,“选择性标记(selectable marker)”意指如下核苷酸序列,当核苷酸序列表达时向表达所述标记的植物、植物部分和/或植物细胞赋予不同的表型,并且因此允许此类转化的植物、植物部分和/或植物细胞与不具有所述标记的那些区别开来。这样的核苷酸序列可以编码选择性或筛选性标记,这取决于该标记是否赋予可以通过化学手段而被选择的性状,如通过使用选择剂(例如,抗生素、除草剂等),或者取决于该标记是否仅是人们可以通过观察或测试而鉴别的性状,如通过筛选(例如,R基因座性状)。

[0134] 如在此使用的,“特异活性”是指具有杀昆虫效果所需的蛋白质的量。因此,当第一蛋白质具有比第二蛋白质更高的特异活性时,意指所述第一蛋白质比第二蛋白质采取更少的量而具有对相同百分比的昆虫的杀昆虫效果。

[0135] 在两个核酸或两个氨基酸序列的上下文中,短语“基本上同一的”是指当针对最大对应性进行比较和比对时具有至少约50%核苷酸或氨基酸残基同一性的两个或更多个序列或子序列,如使用以下序列比较算法之一或通过目测检查所测量的。在某些实施例中,基本上同一的序列具有至少约60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多的核苷酸或氨基酸残基同一性。在某些实施例中,在长度为至少约50个残基、100个残基、150

个残基、200个残基、250个残基、300个残基、350个残基、400个残基或更多的序列区域上存在基本上的同一性。在另外的实施例中,当这些序列在编码区的整个长度上时,这些序列是基本上同一的。

[0136] “同一性”或“百分比同一性”是指在两种核酸或氨基酸序列之间的同一性的程度。对于序列比较,典型地,一个序列充当与测试序列进行比较的参考序列。当使用序列比较算法时,将测试序列和参考序列输入到计算机中(如有必要,指定子序列坐标),并且指定序列算法程序的参数。然后,该序列比较算法基于所指定的程序参数来计算这个或这些测试序列相对于该参考序列的序列同一性百分比。

[0137] 对于序列比较,典型地,一个序列充当与测试序列进行比较的参考序列。当使用序列比较算法时,将测试序列和参考序列输入到计算机中(如有必要,指定子序列坐标),并且指定序列算法程序的参数。然后,该序列比较算法基于所指定的程序参数来计算这个或这些测试序列相对于该参考序列的序列同一性百分比。

[0138] 用于比较的序列的最佳比对可以按照以下方式进行,例如通过Smith和Waterman, *Adv. Appl. Math.* [应用数学进展] 2:482 (1981) 的局部同源性算法、通过Needleman和Wunsch, *J. Mol. Biol.* [分子生物学杂志] 48:443 (1970) 的同源比对算法、通过Pearson和Lipman, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* [美国国家科学院院刊] 85:2444 (1988) 的相似性方法的搜索,通过这些算法的计算机化实施(威斯康星州遗传学分析软件包中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA,遗传学计算机组(Genetics Computer Group),科学街575号(575Science Dr.),麦迪逊,威斯康星州),或通过目测检查(总体上参见Ausubel等人,下文)。

[0139] 适合于确定序列同一性百分比以及序列相似性的算法的一个实例是BLAST算法,其描述于以下文献中:Altschul等人, *J. Mol. Biol.* [分子生物学杂志] 215:403-410 (1990)。执行BLAST分析的软件可通过美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)公开地获得(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。这种算法涉及首先通过鉴定查询序列中具有长度W的短字码而鉴定得分高的序列对(HSP),这些得分高的序列对当与数据库序列中具有相同长度的字码(word)进行比对时匹配或满足一些正值阈值的得分T。T被称为邻近字码得分阈值(Altschul等人,1990)。这些初始的邻近字码命中充当种子用于起始搜索以发现含有它们的较长的HSP。然后,将这些字码命中在两个方向上沿着每个序列延伸直到累积的比对得分可以增加。对于核苷酸序列,使用参数M(对于一对匹配残基的奖赏得分;总是 $>0$ )和N(对于错配残基的罚分;总是 $<0$ )来计算累积得分。对于氨基酸序列,使用得分矩阵来计算累积得分。当累积的比对得分从它的最大达到值降低了数量X;由于累积一个或多个负得分的残基比对使累积得分趋于0或0以下;或者到达任一序列的末端时,停止这些字码命中在每个方向上的延伸。BLAST算法的参数W、T、以及X决定了比对的灵敏度与速度。BLASTN程序(对核苷酸序列来说)使用字长(W)为11、期望值(E)为10、截止值(cutoff)为100、M=5、N=-4、以及两条链的比较作为默认值。对于氨基酸序列,BLASTP程序使用字长(W)为3、期望值(E)为10、以及BLOSUM62评分矩阵作为默认值(参见Henikoff&Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* [美国国家科学院院刊] 89:10915 (1989))。

[0140] 除了计算序列同一性百分数之外,BLAST算法还进行两个序列之间相似性的统计分析(参见,例如Karlin和Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* [美国国家科学院院刊] 90:5873-5787 (1993))。由BLAST算法提供的相似性的一种量度是最小概率总和(P(N)),它提供

了了两个核苷酸或氨基酸序列之间会偶然发生匹配的概率的指示。例如,若在测试核酸序列与参考核酸序列的比较中最小概率总和小于约0.1、更优选地小于约0.01、并且最优选地小于约0.001,则所述测试核酸序列被认为是与所述参考序列相似的。

[0141] 用于进行序列比对的另一种被广泛使用和接受的计算机程序是CLUSTALW v1.6 (Thompson等人,Nuc.Acids Res.[核酸研究]22:4673-4680,1994)。将匹配的碱基或氨基酸的数目除以碱基或氨基酸的总数目并乘以100,以获得百分比同一性。例如,如果两个580个碱基对序列具有145个匹配的碱基,则它们会是25%同一的。如果两个进行比较的序列具有不同的长度,则将匹配的数目除以这两个长度中较短的一个。例如,如果在200个氨基酸的蛋白质与400个氨基酸的蛋白质之间存在100个匹配的氨基酸,则相对于较短的序列而言这两个蛋白质是50%同一的。如果所述较短的序列在长度上小于150个碱基或50个氨基酸,则将匹配的数目除以150(对于核酸碱基而言)或50(对于氨基酸而言)并乘以100,以获得百分比同一性。

[0142] 当两个核苷酸序列在严格条件下彼此杂交时,这两个核苷酸序列也可以被认为是基本上同一的。在代表性实施例中,被认为基本上同一的两个核苷酸序列在高严格条件下彼此杂交。

[0143] 术语“严格条件”或“严格杂交条件”包括指核酸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,至少2倍于非靶序列)的条件,并且任选地可以基本上排除与非靶序列的结合。严格条件是序列依赖性的并且在不同的情形下将会改变。通过控制杂交和/或洗涤条件的严格度,可以鉴定可以与参考核苷酸序列高达100%互补的靶序列。可替代地,可以使用中等或甚至低严格条件来允许序列中的一些不匹配,从而检测到较低程度的序列相似性。例如,本领域技术人员将理解,为了起到引物或探针的作用,核酸序列仅需要与靶序列充分互补以基本上与其结合,从而在采用的条件下形成稳定的双链结构。因此,可以在高、中等或甚至低严格条件下使用引物或探针。类似地,低或中等严格条件可以有利于检测同源物、直向同源物和/或旁系同源序列,所述同源物、直向同源物和/或旁系同源序列具有与在高严格条件下鉴定的较低的序列同一性程度。

[0144] 如在此使用的,术语“互补的(complementary)”或“互补性(complementarity)”(和类似术语)是指多核苷酸在容许性盐条件和温度条件下通过碱基配对发生天然结合。例如,序列“A-G-T”与互补序列“T-C-A”结合。两单链分子之间的互补性可以是部分的(partial),其中这些核苷酸中仅一些结合,或者当这些单链分子之间存在完全互补性时,这种互补性可以是完全的。核酸链之间的互补性程度对于分子之间杂交的效率和强度具有显著影响。如在此使用的,术语“基本上互补的”(和类似术语)意指两个核酸序列是至少约50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更多互补的。可替代地,术语“基本上互补的”(和类似术语)可以意指两个核酸序列在高严格条件(如在此描述的)下可以杂交在一起。

[0145] 如在此使用的,“特异性”或“选择性”杂交(和类似术语)是指分子在严格条件下与特定的核酸靶序列结合、双链化或杂交,这是在所述序列存在于复合混合物(例如,总细胞的DNA或RNA)中时进行的,以致于基本上排除非靶核酸,或甚至与非靶序列没有可检测的结合、双链化或杂交。特异性或选择性杂交序列典型地是至少约40%互补的并且任选地是基本上互补的或甚至完全互补的(即,100%同一的)。

[0146] 对于DNA-DNA杂交体,可从Meinkoth和Wahl, *Anal. Biochem.* [分析生物化学], 138: 267-84 (1984) 的方程粗略估计 $T_m: T_m = 81.5^\circ\text{C} + 16.6(\log M) + 0.41(\%GC) - 0.61(\% \text{甲酰胺}) - 500/L$ ; 其中M是一价阳离子的摩尔浓度, %GC是DNA中的鸟苷以及胞嘧啶核苷酸的百分比, %甲酰胺是杂交溶液中甲酰胺的百分比, 并且L是杂交体的长度(单位为碱基对)。 $T_m$ 是50%的互补靶序列与完美匹配的探针杂交时的温度(在限定的离子强度及pH下)。对于每1%错配,  $T_m$ 降低约 $1^\circ\text{C}$ ; 因此, 可调整 $T_m$ 、杂交和/或洗涤条件以便杂交至所希望的程度的同一性的序列。例如, 如果寻找具有>90%同一性的序列, 则可将 $T_m$ 降低 $10^\circ\text{C}$ 。一般来说, 将严格条件选择为比特定序列及其补体在限定的离子强度及pH下的热熔点( $T_m$ ) 低约 $5^\circ\text{C}$ 。然而, 高严格条件可利用在热熔点( $T_m$ ) 或者低于热熔点( $T_m$ )  $1^\circ\text{C}$ 、 $2^\circ\text{C}$ 、 $3^\circ\text{C}$ 或 $4^\circ\text{C}$ 的杂交和/或洗涤; 中等严格条件可利用低于热熔点( $T_m$ )  $6^\circ\text{C}$ 、 $7^\circ\text{C}$ 、 $8^\circ\text{C}$ 、 $9^\circ\text{C}$ 或 $10^\circ\text{C}$ 的杂交和/或洗涤; 低严格条件可利用低于热熔点( $T_m$ )  $11^\circ\text{C}$ 、 $12^\circ\text{C}$ 、 $13^\circ\text{C}$ 、 $14^\circ\text{C}$ 、 $15^\circ\text{C}$ 或 $20^\circ\text{C}$ 的杂交和/或洗涤。如果所希望的不匹配程度导致 $T_m$ 小于 $45^\circ\text{C}$  (水溶液) 或 $32^\circ\text{C}$  (甲酰胺溶液), 则任选地可以增加SSC浓度, 从而可以使用更高的温度。对核酸杂交的广泛指导见于Tijssen的 *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes* [生物化学和分子生物学实验室技术-使用核酸探针的杂交] 第I部分第2章“Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays [杂交原理和核酸探针测定策略综述]”, 爱思唯尔, 纽约(1993); *Current Protocols in Molecular Biology* [现代分子生物学实验技术], 第2章, Ausubel等人编著, Greene Publishing与Wiley-Interscience, 纽约(1995); 以及Green和Sambrook, In: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* [分子克隆, 实验手册], 第4版, 冷泉港实验室出版社, 冷泉港, 纽约(2012)。

[0147] 典型地, 严格条件是这些: 其中盐浓度小于约 $1.5\text{M}$  Na离子、典型地在约pH 7.0至pH 8.3下大约0.01至 $1.0\text{M}$ 钠离子浓度(或其他盐), 并且对于短探针(例如, 10至50个核苷酸)温度为至少约 $30^\circ\text{C}$ 而对于长探针(例如, 大于50个核苷酸)至少约 $60^\circ\text{C}$ 。通过添加不稳定剂如甲酰胺或Denhardt's (在500ml水中的5g聚蔗糖(Ficoll)、5g聚乙烯吡咯烷酮、5g牛血清白蛋白)也可以达到严格条件。示例性的低严格条件包括用30%至35%的甲酰胺、 $1\text{M}$  NaCl、1% SDS (十二烷基硫酸钠)的缓冲溶液中在 $37^\circ\text{C}$ 下杂交, 并且在1X至2X SSC (20X SSC =  $3.0\text{M}$  NaCl/0.3M枸橼酸钠)中在 $50^\circ\text{C}$ 至 $55^\circ\text{C}$ 下洗涤。示例性的中等严格条件包括在40%至45%甲酰胺、 $1\text{M}$  NaCl、1% SDS中在 $37^\circ\text{C}$ 下杂交, 并且在0.5X至1X SSC中在 $55^\circ\text{C}$ 至 $60^\circ\text{C}$ 下洗涤。示例性的高严格条件包括在50%甲酰胺、 $1\text{M}$  NaCl、1% SDS中在 $37^\circ\text{C}$ 下杂交, 并且在0.1X SSC在 $60^\circ\text{C}$ 至 $65^\circ\text{C}$ 下洗涤。高严格条件的另外的非限制性实例包括在4X SSC、5X Denhardt's、 $0.1\text{mg/ml}$ 煮沸鲑鱼精子DNA下杂交, 并在 $25\text{mM}$ 磷酸Na在 $65^\circ\text{C}$ 下洗涤, 并在0.1X SSC、0.1% SDS在 $65^\circ\text{C}$ 下洗涤。另一个高严格杂交条件的阐述包括在7% SDS、 $0.5\text{M}$   $\text{NaPO}_4$ 、 $1\text{mM}$  EDTA中在 $50^\circ\text{C}$ 下杂交, 在2X SSC、0.1% SDS中在 $50^\circ\text{C}$ 下洗涤, 可替代地在1X SSC、0.1% SDS中在 $50^\circ\text{C}$ 下洗涤, 可替代地在0.5X SSC、0.1% SDS中在 $50^\circ\text{C}$ 下洗涤, 或可替代地在0.1X SSC、0.1% SDS中在 $50^\circ\text{C}$ 下洗涤, 或甚至在0.1X SSC、0.1% SDS中在 $65^\circ\text{C}$ 下洗涤。本领域技术人员将会理解特异性典型地是杂交后的洗涤的作用, 关键因素是最终洗涤溶液的离子强度以及温度。

[0148] 如果在严格条件下彼此不杂交的核酸所编码的蛋白质是基本上同一的, 则它们仍

然是基本上同一的(例如,由于遗传密码的简并性)。

[0149] 两个核酸序列或蛋白质基本上同一的另一个指示是由第一核酸编码的蛋白质与由第二核酸编码的蛋白质进行免疫性交联反应。因此,蛋白质典型地是与第二蛋白质实质上同一的,例如其中这两种蛋白质仅区别于保守性取代。

[0150] 如在此使用的,如果经修饰的多肽或片段(等)“基本上保留”杀昆虫活性,意思是所述经修饰的多肽或片段保留参考蛋白的至少约40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%或甚至100%的杀昆虫活性,或者具有甚至更高的杀昆虫活性。

[0151] “合成的”是指如下核苷酸序列,所述核苷酸序列包含在天然序列中不存在的碱基或者一个或多个结构特征。例如,编码本发明的蛋白的人工序列(其更类似于双子叶植物或单子叶植物基因的G+C含量和正常密码子分布)被表述为合成的。

[0152] 如在此使用的,对昆虫有害生物是“有毒的”蛋白是一种口服活性的昆虫控制剂,所述昆虫控制剂可杀死昆虫有害生物,导致昆虫有害生物生长和/或繁殖的减少和/或能够破坏或阻止昆虫摄食,后两者可能引起或者可能不引起昆虫的死亡。当本发明的蛋白质被递送至昆虫或昆虫与所述蛋白质进行接触时,结果典型地是所述昆虫的死亡、所述昆虫的生长和/或繁殖减慢、和/或所述昆虫减少或停止以使有毒的蛋白质可供昆虫利用的来源为食。

[0153] 术语“毒素片段”和“毒素部分”在此可以互换地使用,是指本发明的较长(例如,全长)嵌合杀昆虫蛋白的片段或部分,其中所述“毒素片段”或“毒素部分”保留杀昆虫活性。例如,在本领域中已知,天然Cry蛋白被表达为原毒素,所述原毒素在N-末端和C-末端被加工以产生成熟毒素。在实施例中,本发明的嵌合杀昆虫蛋白的“毒素片段”或“毒素部分”在N-末端和/或C-末端被截短。在实施例中,所述“毒素片段”或“毒素部分”在N-末端被截短以去除部分或全部N-末端肽基片段,并且任选地包含在此所明确描述的嵌合杀昆虫蛋白的至少约400、425、450、475、500、510、520、530、540、550、560、570、580或590个连续氨基酸或与其基本上同一的氨基酸序列。因此,在实施例中,嵌合杀昆虫蛋白的“毒素片段”或“毒素部分”在N-末端被截短(例如,以省略部分或全部肽基片段),例如,一个氨基酸或多于一个氨基酸的N-末端截短,例如多达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个或更多个氨基酸的N-末端截短。在实施例中,嵌合杀昆虫蛋白的“毒素片段”或“毒素部分”在C-末端被截短(例如,以省略部分或全部原毒素尾部),例如,一个氨基酸或多于一个氨基酸的C-末端截短,例如多达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、70、80、90、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、525、550、560个或更多个氨基酸的C-末端截短。在实施例中,所述“毒素片段”或“毒素部分”包含结构域1和2,以及核心结构域III(例如,如图2所示)。在实施例中,所述“毒素片段”或“毒素部分”是成熟的(即,加工的)毒素(例如,Cry毒素)。

[0154] “转化”是用于将异源核酸引入到宿主细胞或生物的方法。在特定的实施例中,“转化”意指DNA分子稳定地整合到感兴趣生物(例如,植物细胞)的基因组中。

[0155] 在此使用的术语“转化的”和“转基因的”是指引入了异源核酸分子的宿主生物,如

细菌或植物。所述核酸分子可以被稳定地整合到宿主的基因组中,或者所述核酸分子还可以作为染色体外分子存在。这种染色体外分子能够自主复制。“转化的”或“转基因的”细胞、组织或植物应当理解为不仅涵盖转化过程的终产物,而且涵盖包含所述异源核酸分子的其子代。“非转化的”或“非转基因的”宿主是指不含所述异源核酸分子的野生型生物,例如细菌或植物。

[0156] 术语“运载体”是指用于将一种核酸(或多种核酸)转移、递送或引入到细胞中的组合物。运载体包含核酸分子,所述核酸分子包含有待被转移、递送或引入的一个或多个核苷酸序列。

[0157] 嵌合杀昆虫蛋白。

[0158] 本发明提供了新颖嵌合杀昆虫蛋白,所述新颖嵌合杀昆虫蛋白包含来自第一Cry蛋白(例如,BT-0029蛋白[SEQ ID NO:2]及其基本上同一的变体)的至少一个区域。在实施例中,本发明提供了嵌合杀昆虫蛋白,所述嵌合杀昆虫蛋白包含来自两种或更多种不同Cry蛋白的区域。在实施例中,如与一种或多种(或甚至全部)亲本蛋白相比,所得的嵌合杀昆虫蛋白针对一种或多种昆虫有害生物具有增加的活性(例如,增强的活性或针对新的靶标有害生物的活性)和/或针对一种或多种昆虫有害生物具有不同的作用方式。在代表性实施例中,所述嵌合杀昆虫蛋白是包含来自两种不同Cry(例如Cry1)蛋白的区域的嵌合体,并且如与两种亲本蛋白相比,所述嵌合体针对一种或多种昆虫有害生物具有增加的杀昆虫活性。

[0159] 在实施例中,本发明的嵌合杀昆虫蛋白可以提供针对一种或多种靶标昆虫有害生物的新的作用方式。例如,所述嵌合杀昆虫蛋白可以针对昆虫有害生物或集落具有杀昆虫活性,所述昆虫有害生物或集落通常对另一种试剂(例如,杀昆虫蛋白,包括但不限于Bt蛋白,如Cry蛋白或Vip蛋白)的杀昆虫活性具有抗性。在实施例中,这些亲本蛋白本身对抗性昆虫有害生物或集落不具有杀昆虫活性或仅具有弱活性,这可以表明所述嵌合体如与这些亲本蛋白相比具有新颖的作用方式。例如,如果这些亲本蛋白针对靶标昆虫有害生物(“易感的”)具有活性,但对抗性对应物不具有活性,并且所述嵌合杀昆虫蛋白对抗性昆虫有害生物具有活性,那么这指示所述嵌合杀昆虫蛋白通过新颖的作用方式对抗性有害生物是有毒的。

[0160] 因此,在实施例中,本发明提供了对昆虫有害生物(例如,鳞翅目昆虫有害生物)有毒的嵌合杀昆虫蛋白,所述嵌合杀昆虫蛋白包含来自BT-0029蛋白(SEQ ID NO:2)或与来自BT-0029蛋白的区域基本上同一的多肽的区域。在实施例中,所述嵌合杀昆虫蛋白包含第一Cry1蛋白的N-末端区域,所述第一Cry1蛋白任选地是BT-0029蛋白(SEQ ID NO:2)或包含与BT-0029蛋白的N-末端区域基本上同一的氨基酸序列的多肽。在实施例中,所述第一Cry蛋白的N-末端区域与来自不同Cry蛋白(例如,不同Cry1蛋白)的C-末端区域融合以形成嵌合杀昆虫蛋白(例如,嵌合杀昆虫Cry蛋白)。

[0161] 在代表性实施例中,所述来自不同Cry蛋白的C-末端区域可以是来自不同Cry1蛋白或多肽(所述多肽包含与来自不同Cry1蛋白的C-末端区域基本上同一的氨基酸序列)的C-末端区域。

[0162] 因此,在代表性实施例中,本发明的嵌合杀昆虫蛋白在N-末端至C-末端方向上包含以下、基本上由以下组成、或由以下组成:(a)第一Cry蛋白(例如,Cry1蛋白)的N-末端区域,其任选地是BT-0029蛋白或与BT-0029蛋白的N-末端区域基本上同一的氨基酸序列的N-

末端区域,所述N-末端区域融合至(b)不同Cry蛋白(例如,不同Cry1蛋白)的C-末端区域。

[0163] 在代表性实施例中,基于来自不同Cry蛋白的C-末端区域和来自第一Cry蛋白(例如,Cry1蛋白)的相应区域的比对来选择不同Cry蛋白(例如,Cry1蛋白),例如,参见图1A和1B中的示例性比对。在实施例中,不同Cry蛋白被选择,使得不同Cry蛋白的C-末端区域的氨基酸序列与第一Cry蛋白的相应区域是基本上同一的。在示例性实施例中,不同Cry蛋白(例如,Cry1蛋白)的C-末端区域的氨基酸序列与来自第一Cry蛋白的相应C-末端区域的氨基酸序列是至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同一的。横跨比对区域比对并确定氨基酸序列同一性的方法是本领域技术人员熟知的。

[0164] 在实施例中,所述不同Cry1蛋白包括但不限于Cry1F蛋白(例如,Cry1Fa或Cry1Fb蛋白),Cry1G蛋白(例如,Cry1Ga、Cry1Gb或Cry1Gc蛋白),Cry1I蛋白(例如,Cry1Ia蛋白、Cry1Ib蛋白、Cry1Ic蛋白、Cry1Id蛋白、Cry1Ie蛋白、Cry1If蛋白或Cry1Ig蛋白),Cry1K(例如,Cry1Ka蛋白)或Cry1C(例如,Cry1Ca蛋白)。在实施例中,所述不同Cry1蛋白是Cry1If蛋白,任选地是BT-0022蛋白(SEQ ID NO:1)。在实施例中,不同Cry1蛋白是Cry1Fa蛋白(SEQ ID NO:8)。在实施例中,不同Cry1蛋白是Cry1K蛋白(SEQ ID NO:12)。在实施例中,不同Cry1蛋白是Cry1Ca蛋白(SEQ ID NO:17)。

[0165] 术语“N-末端区域”和“C-末端区域”不一定指示全长蛋白的大多数N-末端或C-末端氨基酸(例如,N-末端或C-末端)分别包括在所述区域内。例如,本领域技术人员熟知的是,在N-末端和C-末端加工Cry原毒素以产生成熟的(即,加工的)毒素。因此,在实施例中,所述“N-末端区域”和/或“C-末端区域”省略了原毒素的部分或全部加工过的部分,使得所述嵌合杀昆虫蛋白包含成熟的毒素蛋白(例如,Cry蛋白结构域I、II和III)(所述成熟的毒素蛋白不具有部分或全部的N-末端肽基片段和/或C-末端原毒素尾部),或者与成熟毒素蛋白基本上同一的多肽。在实施例中,所述嵌合杀昆虫蛋白包含肽基片段和/或原毒素尾部。在实施例中,所述嵌合杀昆虫蛋白不包含肽基片段或原毒素尾部,即对应于成熟加工的毒素。

[0166] 在实施例中,所述第一Cry1蛋白的N-末端区域包含以下、基本上由以下组成、或由以下组成:一种多肽,所述多肽对应于SEQ ID NO:2(全长BT-0029)的从约位置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或40至约位置430、431、432、433、434、435、436、437、438、439、440、441、442、443、444、445、446、447、448、449、450、451、452、453、454、455、456、457、458、459、460、461、462、463、464、465、466、467、468、469、470、471、472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、482、483、484、485、486、487、488、489、490、491、492、493、494、495、496、497、498、499或500,以及较低和较高位置的任何组合(如同每个这样的组合在此明确地陈述)的氨基酸序列。

[0167] 在实施例中,所述第一Cry1蛋白的N-末端区域包含以下、基本上由以下组成、或由以下组成:一种多肽,所述多肽对应于SEQ ID NO:2的从约位置1至约位置430、431、432、433、434、435、436、437、438、439、440、441、442、443、444、445、446、447、448、449、450、451、452、453、454、455、456、457、458、459、460、461、462、463、464、465、466、467、468、469、470、471、472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、482、483、484、485、486、487、488、489、



490或491的氨基酸序列。

[0168] 在代表性实施例中,所述第一Cry1蛋白的N-末端区域包含以下、基本上由以下组成、或由以下组成:一种氨基酸序列,所述氨基酸序列对应于SEQ ID NO:2的从约位置1至约氨基酸位置458的氨基酸序列。

[0169] 在代表性实施例中,所述第二Cry1蛋白的C-末端区域包含以下、基本上由以下组成、或由以下组成:一种多肽,所述多肽对应于SEQ ID NO:8(全长Cry1Fa)的从约位置435、436、437、438、439、440、441、442、443、444、445、446、447、448、449、450、451、452、453、454、455、456、457、458、449、450、451、452、453、454、455、456、457、458、459、460、461、462、463、464、465、466、467、468、469、470、471、472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、482、483、484、485、486、487、488、489、490、491、492、493、494、495、496、497、498、499或500至约位置580、581、582、583、584、585、586、587、588、589、590、591、592、593、594、595、596、587、598、599、600、601、602、603、604、605、606、607、608、609、610、611、612、613、614、615、616、617、618、619或620,以及较低和较高位置的任何组合(如同每个这样的组合在此明确地陈述)的氨基酸序列。

[0170] 在实施例中,所述第二Cry1蛋白的C-末端区域包含以下、基本上由以下组成、或由以下组成:一种多肽,所述多肽对应于SEQ ID NO:8的从约位置464至约位置580、581、582、583、584、585、586、587、588、589、590、591、592、593、594、595、596、587、598、599、600、601、602、603、604、605、606、607、608、609、610、611、612、613、614、615、616、617、618、619或620的氨基酸序列。

[0171] 在实施例中,所述第二Cry1蛋白的C-末端区域包含以下、基本上由以下组成、或由以下组成:一种多肽,所述多肽对应于SEQ ID NO:8的从约位置435、436、437、438、439、440、441、442、443、444、445、446、447、448、449、450、451、452、453、454、455、456、457、458、449、450、451、452、453、454、455、456、457、458、459、460、461、462、463、464、465、466、467、468、469、470、471、472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、482、483、484、485、486、487、488、489、490、491、492、493、494、495、496、497、498、499或500至约位置602的氨基酸序列。

[0172] 在实施例中,所述第二Cry1蛋白的C-末端区域包含以下、基本上由以下组成、或由以下组成:一种多肽,所述多肽对应于SEQ ID NO:8的从约位置464至约位置602的氨基酸序列。

[0173] 在代表性实施例中,所述第二Cry1蛋白的C-末端区域包含以下、基本上由以下组成、或由以下组成:一种多肽,所述多肽对应于SEQ IDNO:1(全长BT-0022)的从约位置470、471、472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、482、483、484、485、486、487、488、489、490、491、492、493、494、495、496、497、498、499、500、501、502、503、504、505、506、507、508、509、510、511、512、513、514、515、516、517、518、519、520、521、522、523、524、525、526、527、528、529、530、531、532、533、534或535至约位置615、616、617、618、619、620、621、622、623、624、625、626、627、628、629、630、631、632、633、634、635、636、637、638、639、640、641、642、643、644、645、646、647、648、649、650、651、652、653、654或655,以及较低和较高位置的任何组合(如同每个这样的组合在此明确地陈述)的氨基酸序列。

[0174] 在实施例中,所述第二Cry1蛋白的C-末端区域包含以下、基本上由以下组成、或由以下组成:一种多肽,所述多肽对应于SEQ ID NO:1的从约位置498至约位置615、616、617、

618、619、620、621、622、623、624、625、626、627、628、629、630、631、632、633、634、635、636、637、638、639、640、641、642、643、644、645、646、647、648、649、650、651、652、653、654或655的氨基酸序列。

[0175] 在实施例中，所述第二Cry1蛋白的C-末端区域包含以下、基本上由以下组成、或由以下组成：一种多肽，所述多肽对应于SEQ ID NO:1的从约位置470、471、472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、482、483、484、485、486、487、488、489、490、491、492、493、494、495、496、497、498、499、500、501、502、503、504、505、506、507、508、509、510、511、512、513、514、515、516、517、518、519、520、521、522、523、524、525、526、527、528、529、530、531、532、533、534或535至约位置636的氨基酸序列。

[0176] 在实施例中，所述第二Cry1蛋白的C-末端区域包含以下、基本上由以下组成、或由以下组成：一种多肽，所述多肽对应于SEQ ID NO:1的从约位置498至约位置636的氨基酸序列。

[0177] 在代表性实施例中，所述第二Cry1蛋白的C-末端区域包含以下、基本上由以下组成、或由以下组成：一种多肽，所述多肽对应于SEQ ID NO:12(全长Cry1Ka)的从约位置472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、482、483、484、485、486、487、488、489、490、491、492、493、494、495、496、497、498、499、500、501、502、503、504、505、506、507、508、509、510、511、512、513、514、515、516、517、518、519、520、521、522、523、524、525、526、527、528、529、530、531、532、533、534、535、536或537至约位置590、591、592、593、594、595、596、597、598、599、600、601、602、603、604、605、606、607、608、609、610、611、612、613、614、615、616、617、618、619、620、621、622、623、624、625、626、627、628、629、630、631、632、633、634、635、636、637、638、639、640、641、642、643、644、645、646、647、648、649、650、651、652、653、654、655、656或657，以及较低和较高位置的任何组合(如同每个这样的组合在此明确地陈述)的氨基酸序列。

[0178] 在实施例中，所述第二Cry1蛋白的C-末端区域包含以下、基本上由以下组成、或由以下组成：一种多肽，所述多肽对应于SEQ ID NO:12的从约位置500至约位置590、591、592、593、594、595、596、597、598、599、600、601、602、603、604、605、606、607、608、609、610、611、612、613、614、615、616、617、618、619、620、621、622、623、624、625、626、627、628、629、630、631、632、633、634、635、636、637、638、639、640、641、642、643、644、645、646、647、648、649、650、651、652、653、654、655、656或657的氨基酸序列。

[0179] 在实施例中，所述第二Cry1蛋白的C-末端区域包含以下、基本上由以下组成、或由以下组成：一种多肽，所述多肽对应于SEQ ID NO:12的从约位置472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、482、483、484、485、486、487、488、489、490、491、492、493、494、495、496、497、498、499、500、501、502、503、504、505、506、507、508、509、510、511、512、513、514、515、516、517、518、519、520、521、522、523、524、525、526、527、528、529、530、531、532、533、534、535、536、537至约位置597的氨基酸序列。

[0180] 在实施例中，所述第二Cry1蛋白的C-末端区域包含以下、基本上由以下组成、或由以下组成：一种多肽，所述多肽对应于SEQ ID NO:12的从约位置472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、482、483、484、485、486、487、488、489、490、491、492、493、494、495、496、497、498、499、500、501、502、503、504、505、506、507、508、509、510、511、512、513、514、

515、516、517、518、519、520、521、522、523、524、525、526、527、528、529、530、531、532、533、534、535、536、537至约位置610的氨基酸序列。

[0181] 在实施例中,所述第二Cry1蛋白的C-末端区域包含以下、基本上由以下组成、或由以下组成:一种多肽,所述多肽对应于SEQ ID NO:12的从约位置500至约位置597的氨基酸序列。

[0182] 在实施例中,所述第二Cry1蛋白的C-末端区域包含以下、基本上由以下组成、或由以下组成:一种多肽,所述多肽对应于SEQ ID NO:12的从约位置500至约位置610的氨基酸序列。

[0183] 在代表性实施例中,所述第二Cry1蛋白的C-末端区域包含以下、基本上由以下组成、或由以下组成:一种多肽,所述多肽对应于SEQ ID NO:17(全长Cry1Ca)的从约位置435、436、437、438、439、440、441、442、443、444、445、446、447、448、449、450、451、452、453、454、455、456、457、458、449、450、451、452、453、454、455、456、457、458、459、460、461、462、463、464、465、466或467至约位置580、581、582、583、584、585、586、587、588、589、590、591、592、593、594、595、596、597、598、599、600、601、602、603、604、605、606、607、608、609、610、611、612、613、614、615、616或617,以及较低和较高位置的任何组合(如同每个这样的组合在此明确地陈述)的氨基酸序列。

[0184] 在实施例中,所述第二Cry1蛋白的C-末端区域包含以下、基本上由以下组成、或由以下组成:一种多肽,所述多肽对应于SEQ ID NO:17的从约位置467至约位置580、581、582、583、584、585、586、587、588、589、590、591、592、593、594、595、596、597、598、599、600、601、602、603、604、605、606、607、608、609、610、611、612、613、614、615、616或617的氨基酸序列。

[0185] 在实施例中,所述第二Cry1蛋白的C-末端区域包含以下、基本上由以下组成、或由以下组成:一种多肽,所述多肽对应于SEQ ID NO:17的从约位置435、436、437、438、439、440、441、442、443、444、445、446、447、448、449、450、451、452、453、454、455、456、457、458、449、450、451、452、453、454、455、456、457、458、459、460、461、462、463、464、465、466或467至约位置617的氨基酸序列。

[0186] 在实施例中,所述第二Cry1蛋白的C-末端区域包含以下、基本上由以下组成、或由以下组成:一种多肽,所述多肽对应于SEQ ID NO:17的从约位置467至约位置617的氨基酸序列。

[0187] 如本领域中所熟知的,来自Bt的Cry蛋白具有由更多可变区分离的5个保守序列结构域(保守区块[CB]1至5)(Hofte和Whitely,1989,Microbiol.Rev.[微生物学评论]53:242-255)以及三个保守结构性结构域(结构域I、II和III)(de Maagd等人,2001,Trends Genetics[遗传学趋势],17:193-199)。图1A和1B显示了Cry蛋白BT-0029、BT-0022、Cry1Fa和Cry1Ka的比对,指示了CB3和结构域III。本领域技术人员可以使用可用于Cry蛋白的熟知序列和结构信息以产生根据本发明的嵌合杀昆虫Cry蛋白,例如,以选择两个Cry蛋白之间的合适的一个或多个交换区。在实施例中,交换区位于保守区块内,例如,在CB3内。术语“在保守区块内”包括保守区块每个末端处的位置。举例说明,术语“在CB3内”包括紧接在保守区块3之前(例如,在图2A的BT-0029序列中的序列VPMFSW内的甲硫氨酸和苯丙氨酸残基之间)和紧接在保守区块3之后(例如,在图2A的BT-0029序列中的序列RRTNVG内的苏氨酸和天冬酰胺残基之间)的位置。图2A和2B显示了根据本发明的示例性嵌合杀昆虫蛋白,其中在

CB3内具有交换区。

[0188] 参考图2A,在实施例中,交换位于如下位置,所述位置对应于CB3中紧接在氨基酸残基1之前或紧接在氨基酸残基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或51之后的位置,或其任何组合。在实施例中,交换位于与CB3的氨基酸残基2至氨基酸残基7、8、9或10相对应的区域内(包括所述区域每个末端处的残基),位于与CB3的氨基酸残基11至氨基酸残基14、15、16、17或18相对应的区域内,位于与CB3的氨基酸残基19至氨基酸残基27、28、29、30、31、32、33、34、35或36相对应的区域内,和/或位于与氨基酸残基37、38或39至氨基酸残基51相对应的区域内,以及这些区域的任何组合内。在代表性实施例中,交换位于如下区域内的位置处,所述区域对应于CB3中的氨基酸残基19至氨基酸残基51、氨基酸残基19至氨基酸残基33、氨基酸残基19至氨基酸残基28、氨基酸残基19至氨基酸残基27、或氨基酸残基19至氨基酸残基26。在实施例中,交换位置位于CB3中的氨基酸残基18和氨基酸残基19之间的特定位点(例如,明确地是在BT-0029 (SEQ ID NO:2)的序列DPDVITQ中的缬氨酸和异亮氨酸之间)。

[0189] 所述嵌合杀昆虫蛋白也可以相对于衍生自每个亲本分子的结构域来定义。例如,在实施例中,所述第一Cry蛋白的N-末端区域包含第一Cry蛋白的结构域I以及全部或基本上全部的结构域II。在实施例中,所述不同Cry蛋白的C-末端区域包含不同Cry蛋白的全部或基本上全部的结构域III。本领域技术人员理解的是,在描述Cry蛋白结构域III的末端以及这些结构域之间的接头区的精确位置(例如,结构域II和III之间的接头区末端以及结构域III的开始处的位置)方面存在一些可变性,尽管结构域III的核心对于本领域技术人员来说是容易鉴定的(例如,对应于如图1A和图2A所示的核心结构域III的位置)。在实施例中,所述第一Cry蛋白的N-末端区域和衍生自不同Cry蛋白的C-末端区域之间的交换位于CB3中。

[0190] 在代表性实施例中,基于来自不同Cry蛋白的结构域III(例如,如图1A所示的核心结构域III)和来自第一Cry蛋白(例如,Cry1蛋白,如BT-0029)的相应结构域III序列的比对来选择不同Cry蛋白(例如,Cry1蛋白)的C-末端区域,例如,参见图1A和1B中的示例性比对,其中明确地指示了结构域III。在实施例中,选择不同Cry蛋白,使得不同Cry蛋白的结构域III的氨基酸序列与第一Cry蛋白(BT-0029)的相应结构域III区域是基本上同一的。在示例性实施例中,不同Cry蛋白(例如,Cry1蛋白)的结构域III区域的氨基酸序列与来自第一Cry蛋白的相应结构域III区域的氨基酸序列是至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同一的。横跨比对区域比对并确定氨基酸序列同一性的方法是本领域技术人员熟知的。

[0191] 在特定的实施例中,本发明的嵌合杀昆虫蛋白包含以下、基本上由以下组成、或由以下组成:(a) SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:13的氨基酸1至597,或者SEQ ID NO:15的氨基酸1至610,或者SEQ ID NO:18的氨基酸1至617中任一项的氨基酸序列,或者SEQ ID No:3、9、13、15或18中任一项的毒素片段;或者(b)与(a)的氨基酸序列基本上同一的氨基酸序列。

[0192] 在特定的实施例中,本发明的嵌合杀昆虫蛋白包含以下、基本上由以下组成、或由以下组成:(a) SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:13的氨基酸1至603,或者SEQ ID

NO:15或SEQ ID NO:18的氨基酸1至615中任一项的氨基酸序列,或其毒素片段;或者(b)与(a)的氨基酸序列基本上同一的氨基酸序列。

[0193] 在特定的实施例中,本发明的嵌合杀昆虫蛋白包含以下、基本上由以下组成、或以下组成:(a)SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:13的氨基酸1至607,或者SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:18的氨基酸1至620中任一项的氨基酸序列,或其毒素片段;或者(b)与(a)的氨基酸序列基本上同一的氨基酸序列。

[0194] 在特定的实施例中,本发明的嵌合杀昆虫蛋白包含以下、基本上由以下组成、或以下组成:(a)SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:13的氨基酸1至610,或者SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:18的氨基酸1至620中任一项的氨基酸序列,或其毒素片段;或者(b)与(a)的氨基酸序列基本上同一的氨基酸序列。

[0195] 如本领域技术人员所理解的,天然Cry毒素被表达为原毒素,这些原毒素通过切割N-末端肽基片段和C-末端原毒素尾部而被加工以产生成熟加工的毒素。N-末端肽基片段和/或C-末端原毒素尾部可以起到增强Cry毒素的稳定性和/或杀昆虫活性的作用。在本发明的实施例中,所述嵌合杀昆虫蛋白包含全部或部分的N-末端肽基片段和/或原毒素尾部。在实施例中,所述嵌合杀昆虫蛋白不包含完整的N-末端肽基片段和/或完整的原毒素尾部。在实施例中,所述嵌合杀昆虫蛋白不包含N-末端肽基片段或原毒素尾部,即对应于成熟加工的毒素。

[0196] 在实施例中,所述N-末端肽基片段衍生自Cry蛋白(例如,来自第一Cry蛋白,其任选地是Cry1蛋白)。在其他实施例中,所述N-末端肽基片段与第一Cry蛋白是异源的,例如,并非衍生自Cry蛋白和/或是部分或完全合成的。在实施例中,所述肽基片段包含至少约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或更多个氨基酸,其任选地来自第一Cry蛋白,包括但不限于第一Cry1蛋白(例如,BT-0029,SEQ ID NO:2)。在实施例中,所述肽基片段包含第一Cry蛋白(例如,Cry1蛋白如BT-0029)的如下氨基酸:从约氨基酸1至约氨基酸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或60。

[0197] 在实施例中,本发明的嵌合杀昆虫蛋白在C-末端包含Bt Cry蛋白的原毒素尾部区域,包括与天然Cry蛋白原毒素尾部基本上同一的天然Cry蛋白原毒素尾部的修饰。在实施例中,所述原毒素尾部是来自具有鳞翅目活性的Cry蛋白。在实施例中,所述原毒素尾部并非衍生自Cry蛋白和/或是部分或完全合成的。在实施例中,所述Cry蛋白与第一Cry蛋白和/或不同Cry蛋白是异源的。在实施例中,所述原毒素尾部来自Cry1蛋白,例如BT-0029、BT-0022、Cry1F(例如,Cry1Fa)、Cry1I(例如,Cry1Ia或Cry1If)、Cry1K(例如,Cry1Ka)、或Cry1C(例如,Cry1Ca),或者是与来自前述中任一项的原毒素尾部(或其片段)基本上同一的多肽。原毒素尾部区域可包含Cry蛋白或其任何部分的完整原毒素尾部。在实施例中,所述原毒素尾部区域包含Cry蛋白原毒素尾部(例如,Cry1原毒素尾部,如BT-0029)的至少约5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、38、40、45、50或更多个连续氨基酸,例如,如针对图1A中的各种Cry蛋白所示。在实施例中,所述原毒素尾部包含至少约5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、38、40、45、50或更多个连续氨基酸,这些连续氨基酸以SEQ ID NO:2

(BT-0029)的氨基酸位置598或来自另一种Cry蛋白(如Cry1蛋白(例如,BT-0022、Cry1I、Cry1F、Cry1K或Cry1C蛋白))的相应区域开始。在实施例中,所述原毒素尾部包含SEQ ID NO:2(BT-0029)的氨基酸598至1169、或598至652、或598至636、或598至622、或598至610、或598至607、或598至603、或598至600,或者来自另一种Cry蛋白的相应区域(参见,例如,图1A和1B中BT-0029与BT-0022、Cry1Fa和Cry1Ka的比对)。在一些实施例中,所述嵌合杀昆虫蛋白包含SEQ ID No:20-25或SEQ ID No:32-35中的任一项。在其他实施例中,所述原毒素尾部包含SEQ ID NO:1(BT-0022)的氨基酸637至715、或637至691、或637至675、或637至661、或637至649、或637至646、或637至642。在仍其他实施例中,本发明的嵌合杀昆虫蛋白包含以下、基本上由以下组成、或由以下组成:SEQ ID No:26-31中的任一项。

[0198] 因此,在实施例中,本发明的嵌合杀昆虫蛋白包含以下、基本上由以下组成、或由以下组成:(a)SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:18、SEQ ID No:20-35中任一项的氨基酸序列,或其毒素片段;或者(b)与(a)的氨基酸序列基本上同一的氨基酸序列。在任选的实施例中,本发明的嵌合杀昆虫蛋白包含以下、基本上由以下组成、或由以下组成:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:18或SEQ ID No:20-35的氨基酸中的任一项的氨基酸序列。

[0199] 本领域技术人员将理解的是,本发明的嵌合杀昆虫蛋白可以进一步包含其他功能结构域和/或肽标签,例如N-末端和/或C-末端上的肽标签。例如,用可以被可商购的抗体(例如,FLAG基序)识别的肽标签或用促进纯化(例如,通过添加聚-His标签)和/或检测的肽标签表达所述嵌合杀昆虫蛋白可能是有用的。可替代地,可以将表位引入所述嵌合蛋白中以促进抗体的产生,这些抗体特异性识别经修饰的嵌合蛋白以将经修饰的嵌合蛋白与未经修饰的嵌合体 and/或一个亲本蛋白或多个亲本蛋白区分开来。例如,一个或多个氨基酸可以被取代到天然序列的抗原环中以产生新的表位。在一个实施例中,所述抗原环位于天然Cry蛋白的结构域I的外部的非保守区中。在实施例中,所述抗原环不是参与Cry蛋白的昆虫肠受体识别的环和/或不参与Cry蛋白的蛋白酶激活。在其他实施例中,所述嵌合蛋白可以被修饰以增强其稳定性,例如,通过将麦芽糖结合蛋白(MBP)或谷胱甘肽-S-转移酶融合到多肽。作为另一个替代方案,所述融合蛋白可包含报道分子。

[0200] 通过在一个或多个适当位置处引入或消除蛋白酶加工位点来修饰的以提供或消除昆虫、植物和/或微生物蛋白酶的蛋白水解切割的嵌合杀昆虫蛋白也在本发明的范围内。在实施例中,所述经修饰的嵌合杀昆虫蛋白基本上保留了杀昆虫活性。在实施例中,如与不含此类修饰以引入/消除蛋白酶切割位点的嵌合杀昆虫蛋白相比,此类经修饰的嵌合蛋白的稳定性和/或杀昆虫活性增加。

[0201] 因此,本发明涵盖多肽(这些多肽具有与在此明确披露的氨基酸序列基本上同一的氨基酸序列,及其毒素片段)。应当理解的是,在此明确披露的嵌合杀昆虫蛋白将典型地允许在氨基酸序列中的修饰并基本上保留生物活性(例如,杀昆虫活性)。此类修饰包括一个或多个氨基酸的插入、缺失(包括任一末端处的截短)和取代,包括多达约2、约3、约4、约5、约6、约7、约8、约9、约10、约15、约20、约25、约30、约35、约40、约45、约50、约55、约60、约65、约70、约75、约80、约85、约90、约100、约105、约110、约115、约120、约125、约130、约135、约140、约145、约150、约155个、或更多个氨基酸的取代、缺失和/或插入。

[0202] 为了鉴定与在此明确披露的嵌合杀昆虫蛋白基本上同一的多肽,氨基酸取代可以

基于本领域中已知的任何特性,包括氨基酸侧链取代基的相对相似性或差异,例如其疏水性、亲水性、电荷、尺寸等。

[0203] 例如,在鉴定编码除在此明确披露的那些之外的杀昆虫多肽的氨基酸序列时,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(参见Kyte和Doolittle, (1982), *J.Mol.Biol.* [分子生物学杂志] 157:105;通过引用以其全文结合在此)。接受的是所述氨基酸的相对亲水特征有助于所得蛋白的次级结构,所述次级结构进而定义蛋白与其他分子(例如酶、基质、受体、DNA、抗体、抗原等)的相互作用。

[0204] 每种氨基酸已基于其疏水性和电荷特征被指定了亲水指数(Kyte和Doolittle, Id.), 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/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);谷氨酸盐(-3.5);谷氨酰胺(-3.5);天冬氨酸盐(-3.5);天冬酰胺(-3.5);赖氨酸(-3.9);和精氨酸(-4.5)。

[0205] 因此,当修饰在此明确披露的嵌合多肽时,可以考虑氨基酸(或氨基酸序列)的亲水指数。

[0206] 在本领域中也理解氨基酸的取代可基于亲水性进行。美国专利号4,554,101说明蛋白质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)与所述蛋白质的生物特性相关。

[0207] 如在美国专利号4,554,101中详述的,已将以下亲水性值指定给氨基酸残基:精氨酸(+3.0);赖氨酸(+3.0);天冬氨酸盐(+3.0);谷氨酸盐(+3.0);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);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)。

[0208] 因此,当鉴定除在此明确披露的那些之外的另外的杀昆虫多肽时,可以考虑氨基酸(或氨基酸序列)的亲水性。

[0209] 本发明的嵌合杀昆虫蛋白,包括在此明确披露的嵌合多肽的修饰和毒素片段,可以通过任何本领域已知的适合的方法来制备,通常通过修饰编码核酸序列来制备。操作和修饰核酸以实现所希望的修饰的方法是本领域熟知的。此外,也可以使用基因编辑技术产生本发明的嵌合杀昆虫蛋白或对其进行进一步修饰。

[0210] 作为另一种途径,可以在如下宿主细胞中表达待修饰的多肽,所述宿主细胞在DNA复制过程中展现高比率的碱基错误结合,如XL-1Red(斯特塔杰公司(Stratagene),拉荷亚(La Jolla),加利福尼亚州)。在此类菌株中繁殖之后,可以分离出DNA(例如通过制备质粒DNA,或通过PCR扩增并且将所得的PCR片段克隆到运载体中),在非诱变菌株中培养这些蛋白突变体,并且鉴定具有杀昆虫活性的经突变的基因,例如通过进行对杀昆虫活性进行测试的测定。在示例性方法中,在摄食测定中混合并使用了所述蛋白质。参见例如Marrone等人, (1985), *J. of Economic Entomology* [经济昆虫学杂志] 78:290-293。此类测定可以包括使植物与一种或多种有害生物接触,并且确定该植物存活或引起这些有害生物死亡的能力。导致毒性提高的突变的实例见于Schnepf等人, (1998), *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* [微生物分子生物学综述] 62:775-806中。

[0211] 在实施例中,分离出本发明的嵌合杀昆虫蛋白(包括基本上类似的多肽和毒素片段)。在实施例中,本发明的嵌合杀昆虫蛋白(包括基本上类似的多肽和毒素片段)是重组蛋白。

[0212] 本发明的嵌合杀昆虫蛋白针对鳞翅目有害生物具有杀昆虫活性。在实施例中,所述嵌合杀昆虫蛋白针对鳞翅目有害生物的一个或多个以下非限制性实例具有活性:玉米螟属物种,如欧洲玉米螟(欧洲玉米蛀虫)和/或亚洲玉米螟(亚洲玉米蛀虫);菜蛾属物种,如小菜蛾(*P.xylostella*, diamondback moth);灰翅夜蛾属物种(*Spodoptera* spp.),如草地贪夜蛾(秋黏虫)、海灰翅夜蛾(*S.littoralis*) (埃及棉树叶虫(Egyptian cotton leafworm))、黄条粘虫(*S.ornithogalli*, yellowstriped armyworm)、西部黄条粘虫(*S.praefica*, western yellowstriped armyworm)、南部粘虫(*S.eridania*, southern armyworm)和/或甜菜夜蛾(*S.exigua*, beet armyworm);地老虎属物种,如小地老虎(*A.ipsilon*) (黑色地老虎)、普通地老虎(*A.segetum*, common cutworm)、泥背地老虎(*A.gladiaria*, claybacked cutworm)和/或西部灰地老虎(*A.orthogonia*, pale western cutworm);切根虫属物种(*Striacosta* spp.),如豆白缘切根虫(*S.albicosta*) (西部豆切根虫(western bean cutworm));铃夜蛾属物种(*Helicoverpa* spp.),如玉米穗虫(玉米穗蛾)、茶色铃夜蛾(*H.punctigera*) (原生夜蛾(native budworm))和/或棉铃虫(棉螟蛉);实夜蛾属物种(*Heliothis* spp.),如烟芽夜蛾(烟夜蛾);蔗螟属物种(*Diatraea* spp.),如西南玉米螟(西南玉米蛀虫)和/或小蔗螟(甘蔗螟);粉纹夜蛾属物种(*Trichoplusia* spp.),如粉纹夜蛾(*T.ni*, cabbage looper);蛀茎夜蛾属物种(*Sesamia* spp.),如地中海玉米螟(*S.nonagroides*, Mediterranean corn borer)和/或非非洲大螟(粉蛀茎虫);红铃虫属物种(*Pectinophora* spp.),如棉红铃虫(*P.gossypiella*, pink bollworm);纹卷蛾属物种(*Cochylis* spp.),如向日葵细卷叶蛾(*C.hospes*, banded sunflower moth);天蛾属物种(*Manduca* spp.),如烟草天蛾(*M.sexata*, tobacco hornworm)和/或番茄天蛾(*M.quinquemaculata*, tomato hornworm);玉米苗斑螟属物种(*Elasmopalpus* spp.),如南美玉米苗斑螟(*E.Lignosellus*) (小玉米茎蛀虫(lesser cornstalk borer));尺夜蛾属物种(*Pseudoplusia* spp.),如大豆尺蠖(*P.includens*) (大豆夜蛾);干煞夜蛾属物种(*Anticarsia* spp.),如黎豆夜蛾(绒毛豆毛虫);绿夜蛾属物种(*Plathypena* spp),如苜蓿绿夜蛾(*P.scabra*, green cloverworm);马醉木属物种(*Pieris* spp.),如大菜粉蝶(*P.brassicae*) (纹白蝶(cabbage butterfly));夜蛾属物种(*Papaipema* spp.),如蛀茎夜蛾(*P.nebris*, stalk borer);黏虫属物种(*Pseudaletia* spp.),如一星黏虫(*P.unipuncta*) (普通黏虫);疆夜蛾属物种(*Peridroma* spp.),如杂色地老虎(*P.saucia*, variegated cutworm);茄茎麦蛾属物种(*Keiferia* spp.),如番茄蠹蛾(*K.lycopersicella*, tomato pinworm);菜粉蝶属物种(*Artogeia* spp.),如菜粉蝶(*A.rapae*, imported cabbageworm);茄麦蛾属物种(*Phthorimaea* spp.),如马铃薯麦蛾(*P.operculella*, potato tuberworm);裸蚊夜蛾属物种(*Chrysodeixis* spp.),如大豆尺蠖(大豆夜蛾);脏切叶蛾属物种(*Feltia* spp.),如脏切夜蛾(*F.ducens*, dingy cutworm);禾草螟属物种(*Chilo* spp.),如二化螟(条纹蛀茎虫);稻纵卷叶螟属物种(*Cnaphalocrocis* spp.),如稻纵卷叶螟(水稻卷叶螟),或前述的任何组合。

[0213] 任选地,如与一种或多种亲本分子(例如,第一Cry蛋白和不同Cry蛋白)相比,所述



嵌合杀昆虫蛋白针对一种或多种鳞翅目有害生物具有增加的活性。在实施例中,如与BT-0029相比,所述嵌合杀昆虫蛋白针对一种或多种鳞翅目有害生物具有增加的活性。在实施例中,如与BT-0022、Cry1Fa、Cry1Ia、Cry1If、Cry1Ka、或Cry1C相比,所述嵌合杀昆虫蛋白针对一种或多种鳞翅目有害生物具有增加的活性。

[0214] 在实施例中,如与一种或多种亲本分子(例如,第一Cry蛋白和不同Cry蛋白)相比,所述嵌合杀昆虫蛋白针对秋黏虫(草地贪夜蛾)具有增强的杀昆虫活性。在实施例中,如与BT-0029相比,所述嵌合杀昆虫蛋白针对秋黏虫具有增加的活性。在实施例中,如与BT-0022、Cry1Fa、Cry1Ia、Cry1If、Cry1Ka和/或Cry1Ca相比,所述嵌合杀昆虫蛋白针对秋黏虫具有增加的活性。根据前述实施例,所述嵌合杀昆虫蛋白可任选地针对秋黏虫昆虫有害生物或集落具有杀昆虫活性,所述秋黏虫昆虫有害生物或集落对另一种杀昆虫剂(包括另一种杀昆虫蛋白(如,例如Bt蛋白))具有抗性。在实施例中,所述嵌合杀昆虫蛋白针对秋黏虫集落具有杀昆虫活性,所述秋黏虫集落对Vip3A蛋白(例如Vip3Aa,包括但不限于玉蜀黍事件MIR162)或Cry1F蛋白(例如Cry1Fa,包括但不限于玉蜀黍事件TC1507)具有抗性。在实施例中,如与一种或多种亲本分子(例如,BT-0029、BT-0022、Cry1Fa、Cry1Ia、Cry1If、Cry1Ka和/或Cry1Ca)相比,所述嵌合杀昆虫蛋白对抗性秋黏虫集落具有增强的活性。

[0215] 本发明还涵盖特异性结合本发明的嵌合杀昆虫蛋白的抗体。所述抗体可任选地是单克隆抗体或多克隆抗血清。在实施例中,所述抗体对于所述嵌合蛋白具有选择性,并且不结合一个或多个亲本分子(例如,BT-0029、BT-0022、Cry1Fa等),并且可用于将嵌合蛋白与亲本蛋白区分开来。此类抗体可以使用生产多克隆抗血清的标准免疫学技术生产,并且如果需要的话,无限增殖免疫宿主的抗体产生细胞用于单克隆抗体生产源。用于生产针对任何感兴趣物质的抗体的技术是熟知的,例如如在以下文献中所描述的:Harlow和Lane(1988, *Antibodies a laboratory manual*. [抗体:实验室手册],第726页,冷泉港实验室)以及如在Goding (*Monoclonal Antibodies:Principles&practice*[单克隆抗体:原理与实践]1986,学术出版社公司(Academic Press, Inc.), 奥兰多,佛罗里达州)。本发明还涵盖杀昆虫蛋白,所述杀昆虫蛋白与抗体、特别是单克隆抗体交叉反应,产生了针对本发明的嵌合杀昆虫蛋白的一种或多种。

[0216] 根据本发明的抗体可用于例如在免疫测定中确定例如生物样品中本发明的嵌合杀昆虫蛋白或抗原相关多肽的量或存在。此类测定在质量控制生产含有本发明的嵌合杀昆虫蛋白中的一种或多种或抗原相关多肽的组合物中也是有用的。此外,这些抗体可以用来评估本发明的嵌合蛋白中的一种或多种或抗原相关多肽的重组生产的功效,以及用于筛选表达文库以确定编码本发明的嵌合蛋白中的一种或多种或抗原相关多肽的核苷酸序列的存在。抗体进一步可作为亲和配体用于纯化或分离本发明的蛋白质中的任何一种或多种或抗原相关多肽。

[0217] 核酸、表达盒和运载体。

[0218] 作为另外的方面,本发明提供了编码本发明多肽(包括如在此描述的经修饰的多肽和毒素片段)的核酸。

[0219] 根据一些实施例,本发明提供了包含核苷酸序列的核酸分子,所述核苷酸序列包含以下、基本上由以下组成、或由以下组成:(a) 编码SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:18、SEQ ID No:20-35的氨基酸序列的核苷酸序列,或其

毒素片段；(b) 编码与 (a) 的氨基酸序列基本上同一的氨基酸序列的核苷酸序列；(c) 在严格杂交条件下退火至 (a) 或 (b) 的核苷酸序列的核苷酸序列；或者 (d) 由于遗传密码的简并性而不同于 (a)、(b) 或 (c) 的核苷酸序列的核苷酸序列。

[0220] 在实施例中，所述核酸分子包含核苷酸序列，所述核苷酸序列包含以下、基本上由以下组成、或由以下组成：(a) SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:14、或SEQ ID NO:16的核苷酸序列，或其毒素编码片段；(b) 与 (a) 的核苷酸序列基本上同一的核苷酸序列；(c) 在严格杂交条件下退火至 (a) 或 (b) 的核苷酸序列的核苷酸序列；或者 (d) 由于遗传密码的简并性而不同于 (a)、(b) 或 (c) 的核苷酸序列的核苷酸序列。任选地，所述核苷酸序列包含以下、基本上由以下组成、或由以下组成：SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:16的核苷酸序列。

[0221] 在实施例中，所述核苷酸序列是部分或完全合成的序列，例如，其具有用于在宿主生物（例如，在细菌宿主或植物宿主中（例如，转基因单子叶植物宿主或转基因双子叶植物宿主）中表达而进行了优化的密码子。用于在玉蜀黍植物中表达而被密码子优化的核苷酸序列的非限制性实例包括SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:11。

[0222] 在代表性实施例中，修饰和/或优化了本发明的核苷酸序列用于在转基因植物中表达。例如，尽管在许多情况下，来自微生物生物的基因能够在植物中高水平表达而无需修饰，但在转基因植物中的低表达可能是由于微生物核苷酸序列的缘故，这些序列具有在植物中并不优选的密码子。在本领域中已知，活生物具有特定的密码子使用偏好，而且在本发明中所描述的这些核苷酸序列的密码子可以被改变以符合植物偏好，同时维持由其编码的氨基酸。此外，在本领域中已知，在植物（例如玉米植物）中高表达可以是由如下编码序列实现的，所述编码序列具有至少约35%、或至少约45%、或至少约50%、或至少约60%的GC含量。具有低GC含量的微生物核苷酸序列在植物中也许表达欠佳。尽管某些核苷酸序列均可以在单子叶植物和双子叶植物物种两者中充分表达，但是可以对序列进行修饰以便迎合单子叶植物或双子叶植物特定的密码子偏好以及GC含量偏好，因为这些偏好已经被证明是不同的（Murray等人，Nucl. Acids Res. [核酸研究]17:477-498 (1989)）。此外，在实施例中，修饰所述核苷酸序列以去除可能导致消息平截（message truncation）的不正常剪接位点。使用描述于例如美国专利号5,625,136、5,500,365和6,013,523中的方法，使用熟知的定点诱变、PCR以及合成基因构建技术，可以对这些核苷酸序列做出此类修饰。

[0223] 在一些实施例中，本发明提供了根据披露于美国专利号5,625,136中的程序制备的合成编码序列或多核苷酸。在这个程序中，使用了玉蜀黍优选的密码子，即最频繁地编码玉蜀黍中的氨基酸的单一密码子。针对特定的氨基酸的玉蜀黍偏好的密码子可衍生自例如来自玉蜀黍的已知基因序列。例如，针对来自玉蜀黍植物的28个基因的玉蜀黍密码子使用发现于以下文献中：Murray等人，Nucleic Acids Research [核酸研究]17:477-498 (1989)。应当认识到，密码子进行优化用于在一种植物物种中的表达也将作用于其他植物物种，但密码子进行优化用于表达的植物物种可能不在相同水平。以这种方式，这些核苷酸序列可以进行优化用于在任何植物中表达。应当认识到，核苷酸序列的全部或任何部分可以是优化的或合成的。也就是说，多核苷酸可以包含作为部分天然序列和部分密码子优化序列的核苷酸序列。

[0224] 在代表性实施例中,本发明的多核苷酸是分离的多核苷酸。在实施例中,本发明的多核苷酸是重组多核苷酸。

[0225] 在实施例中,本发明进一步提供了核酸分子,所述核酸分子包含与启动子(例如异源启动子)可操作地相关联的多核苷酸。例如,启动子可以包括组成性的、诱导性的、时间调节的、发育调节的、化学调节的、组织优选的和/或组织特异性的启动子。在特定方面,适用于本发明的启动子是能够在植物细胞中(例如在单子叶植物(例如玉蜀黍或水稻)或双子叶植物(例如大豆、棉花)的细胞中)启动核苷酸序列的转录的启动子。

[0226] 在实施例中,异源启动子是植物可表达型启动子(例如,单子叶植物可表达型或双子叶植物可表达型启动子)。例如但不限于,该植物可表达型启动子可以选自以下启动子:泛素、夜香树属黄病毒、玉米TrpA、OsMADS 6、玉蜀黍H3组蛋白、噬菌体T3基因9' 5' UTR、玉米蔗糖合成酶1、玉米醇脱氢酶1、玉米捕光复合物、玉米热休克蛋白、玉蜀黍mt1、豌豆小亚基RuBP羧化酶、水稻肌动蛋白、水稻亲环蛋白、Ti质粒甘露碱合酶、Ti质粒胭脂碱合酶、矮牵牛查尔酮异构酶、豆类富甘氨酸蛋白1、马铃薯糖蛋白(potato patatin)、凝集素、CaMV 35S以及S-E9小亚基RuBP羧化酶启动子。

[0227] 尽管已经显示来自双子叶植物的很多启动子在单子叶植物中是可操作的并且反之亦然,但在实施例中,选择双子叶植物启动子用于在双子叶植物中表达,并且选择单子叶植物启动子用于在单子叶植物中表达。然而,对所选择的启动子的起源并没有限制,足够的是它们在驱动核苷酸序列在所希望的细胞中的表达中是操作性的。

[0228] 启动子的选择可以依赖于表达的时间和空间需要而变化,并且还依赖于有待转化的宿主细胞而变化。因此,例如,本发明的核苷酸序列的表达可以处于任何植物和/或植物部分中(例如,处于叶子中、处于茎秆或茎中、处于穗中、处于花序中(例如,穗状花序、圆锥花序、穗轴等)、处于根、种子和/或幼苗等中)。例如,在希望在特异性组织或器官中表达的情况下,可以使用组织特异性或组织优选的启动子(例如,根特异性或优选的启动子)。相比之下,在希望响应刺激而表达的情况下,可以使用可由刺激或化学物诱导的启动子。在希望在植物的所有细胞中以相对恒定水平连续表达的情况下,可以选择组成型启动子。

[0229] 适用于本发明的启动子包括但不限于组成性地驱动核苷酸序列的表达的那些启动子、在诱导时驱动表达的那些启动子、以及以组织或发育特异性方式驱动表达的那些启动子。这些不同类型的启动子在本领域是已知的。

[0230] 适合的组成型启动子包括例如CaMV 35S启动子(Odell等人,Nature[自然]313:810-812,1985);拟南芥At6669启动子(参见PCT公开号W0 04081173A2);玉蜀黍Ubi 1(Christensen等人,Plant Mol.Biol.[植物分子生物学]18:675-689,1992);水稻肌动蛋白(McElroy等人,Plant Cell[植物细胞]2:163-171,1990);pEMU(Last等人,Theor.Appl.Genet.[理论与应用遗传学]81:581-588,1991);CaMV 19S(Nilsson等人,Physiol.Plant[植物生理学]100:456-462,1997);GOS2(de Pater等人,Plant J[植物杂志]11月;2(6):837-44,1992);泛素(Christensen等人,Plant Mol.Biol.[植物分子生物学]18:675-689,1992);水稻亲环蛋白(Bucholz等人,Plant Mol.Biol.[植物分子生物学]25(5):837-43,1994);玉蜀黍H3组蛋白(Lepetit等人,Mol.Gen.Genet.[分子遗传学与普通遗传学]231:276-285,1992);肌动蛋白2(An等人,Plant J.[植物杂志]10(1):107-121,1996)、组成型根尖CT2启动子(SEQ ID NO:1535;还参见PCT申请号IL/2005/000627)以及

Synthetic Super MAS (Ni等人, *The Plant Journal* [植物杂志] 7:661-76, 1995)。其他组成性启动子包括美国专利号5,659,026、5,608,149、5,608,144、5,604,121、5,569,597、5,466,785、5,399,680、5,268,463、以及5,608,142中的那些。

[0231] 对于在植物(任选地是玉蜀黍)中表达本发明的多肽是有用的组织特异性的或组织优选的启动子包括那些直接在根、髓、叶或花粉中表达的启动子。适合的组织特异性启动子包括但不限于叶特异性启动子(如例如由Yamamoto等人, *Plant J.* [植物杂志] 12:255-265, 1997; Kwon等人, *Plant Physiol.* [植物生理学] 105:357-67, 1994; Yamamoto等人, *Plant Cell Physiol.* [植物细胞生理学] 35:773-778, 1994; Gotor等人, *Plant J.* [植物杂志] 3:509-18, 1993; Orozco等人, *Plant Mol. Biol.* [植物分子生物学] 23:1129-1138, 1993; 以及Matsuoka等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* [美国国家科学院院刊] 90:9586-9590, 1993所描述), 种子优选启动子(例如来自种子特异性基因; Simon等人, *Plant Mol. Biol.* [植物分子生物学] 5:191, 1985; Scofield等人, *J. Biol. Chem.* [生物化学杂志] 262:12202, 1987; Baszczynski等人, *Plant Mol. Biol.* [植物分子生物学] 14:633, 1990)、巴西坚果白蛋白(Pearson等人, *Plant Mol. Biol.* [植物分子生物学] 18:235-245, 1992)、豆球蛋白(Ellis等人, *Plant Mol. Biol.* [植物分子生物学] 10:203-214, 1988)、谷蛋白(Takaiwa等人, *Mol. Gen. Genet.* [分子遗传学与普通遗传学] 208:15-22, 1986; Takaiwa等人, *FEBS Letts.* [欧洲生化学会联合会快报] 221:43-47, 1987)、玉米蛋白(Matzke等人, *Plant Mol Biol* [植物分子生物学], 143) .323-32 1990)、napA(Stalberg等人, *Planta* [植物] 199:515-519, 1996)、小麦SPA(Albanietal, *Plant Cell* [植物细胞], 9:171-184, 1997)、向日葵油体蛋白(oleosin)(Cummins等人, *Plant Mol. Biol.* [植物分子生物学] 19:873-876, 1992), 胚乳特异性启动子(例如, 小麦LMW和HMW、麦谷蛋白-1 (*Mol Gen Genet* [分子遗传学与普通遗传学] 216:81-90, 1989; NAR 17:461-2)、小麦a、b和g麦醇溶蛋白(EMB03:1409-15, 1984)、大麦1tr1启动子、大麦B1、C、D大麦醇溶蛋白(*Theor Appl Gen* [理论与应用遗传学] 98:1253-62, 1999; *Plant J* [植物杂志] 4:343-55, 1993; *Mol Gen Genet* [分子遗传学与普通遗传学] 250:750-60, 1996)、大麦DOF(Mena等人, *The Plant Journal* [植物杂志] 116(1):53-62, 1998)、Biz2(EP 99106056.7)、合成启动子(Vicente-Carbajosa等人, *Plant J.* [植物杂志] 13:629-640, 1998)、水稻谷醇溶蛋白NRP33、水稻-球蛋白G1b-1(Wu等人, *Plant Cell Physiology* [植物细胞生理学] 39(8)885-889, 1998)、水稻 $\alpha$ -球蛋白REB/OHP-1(Nakase等人, *Plant Mol. Biol.* [植物分子生物学] 33:513-S22, 1997)、水稻ADP-葡萄糖PP(*Trans Res* 6:157-68, 1997)、玉蜀黍ESR基因家族(*Plant J* [植物杂志] 12:235-46, 1997)、高粱 $\gamma$ -高粱醇溶蛋白(*Plant Mol. Biol* [植物分子生物学] 32:1029-35, 1996), 胚特异性启动子(例如, 水稻OSH1(Sato等人, *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* [美国国家科学院院刊] 93:8117-8122)、KNOX(Postma-Haarsma等人, *Plant Mol. Biol.* [植物分子生物学] 39:257-71, 1999)、水稻油体蛋白(Wu等人, *J. Biochem.* [生物化学杂志], 123:386, 1998), 花特异性启动子(例如, AtPRP4, 查尔酮合酶(chalene synthase; chsA)(Van der Meer等人, *Plant Mol. Biol.* [植物分子生物学] 15, 95-109, 1990), LAT52(Twell等人, *Mol. Gen. Genet.* [分子遗传学与普通遗传学] 217:240-245; 1989), apetala-3, 以及植物繁殖组织特异性的启动子(例如, OsMADS启动子(美国专利公开2007/0006344))。

[0232] 适用于在绿色组织中优选表达的启动子的实例包括调节参与光合作用的基因的

许多启动子,并且这些中的许多已经从单子叶植物和双子叶植物两者中得以克隆。一个这样的启动子是来自磷酸烯醇羧化酶基因的玉蜀黍PEPC启动子(Hudspeth和Grula, *Plant Molec. Biol.* [植物分子生物学]12:579-589(1989))。另一种用于根特异性表达的启动子是由de Framond (FEBS 290:103-106(1991)或美国专利号5,466,785)描述的启动子。另一种在本发明中有用的启动子是描述于美国专利号5,625,136中的茎特异性启动子,它天然地驱动玉蜀黍trpA基因的表达。

[0233] 此外,可以使用在质体中发挥作用的启动子。此类启动子的非限制性实例包括噬菌体T3基因9' 5' UTR以及其他的披露于美国专利号7,579,516中的启动子。适用于本发明的其他启动子包括但不限于S-E9小亚基RuBP羧化酶启动子和Kunitz胰蛋白酶抑制剂基因启动子(Kti3)。

[0234] 在本发明的一些实施例中,可以使用诱导型启动子。因此,例如,可以使用化学调节的启动子以通过应用外源化学调节物来调节植物中的基因表达。本发明的核苷酸序列的表达经由化学调节过的启动子进行的调节使得本发明的多肽仅当用诱导的化学物处理作物植物时能被合成。取决于目的,在应用化学物诱导基因表达时启动子可以是化学诱导型启动子,或者在应用化学物阻抑基因表达时启动子可以是化学阻抑型启动子。用于基因表达的化学诱导的此类技术的实例详述于公开申请EP 0 332 104和美国专利号5,614,395中。

[0235] 化学诱导型启动子在本领域是已知的,并且包括但不限于玉蜀黍In2-2启动子(其由苯磺酰胺除草剂安全剂激活)、玉蜀黍GST启动子(其由用作发芽前除草剂的疏水亲电子化合物激活)、以及烟草PR-1启动子(其由水杨酸激活)(例如,PR1a系统)、类固醇反应性启动子(参见例如,Schena等人(1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* [美国国家科学院院刊]88, 10421-10425和McNellis等人(1998) *Plant J.* [植物杂志]14, 247-257中的糖皮质激素诱导型启动子)以及四环素诱导型启动子和四环素-阻抑型启动子(参见例如,Gatz等人(1991) *Mol. Gen. Genet.* [分子遗传学]227, 229-237和美国专利号5,814,618和5,789,156)、Lac阻遏物系统启动子、铜诱导型系统启动子、水杨酸诱导型系统启动子(例如,PR1a系统)、糖皮质激素诱导型启动子(Aoyama等人(1997) *Plant J.* [植物杂志]11:605-612)以及蜕皮激素诱导型系统启动子。

[0236] 诱导型启动子的其他非限制性实例包括ABA诱导型和细胞膨胀诱导型启动子、植物生长素结合蛋白基因启动子(Schwob等人(1993) *Plant J.* [植物杂志]4:423-432)、UDP葡萄糖类黄酮糖基转移酶启动子(Ralston等人(1988) *Genetics* [遗传]119:185-197)、MPI蛋白酶抑制剂启动子(Cordero等人(1994) *Plant J.* [植物杂志]6:141-150)以及甘油醛-3-磷酸脱氢酶启动子(Kohler等人(1995) *Plant Mol. Biol.* [植物分子生物学]29:1293-1298; Martinez等人(1989) *J. Mol. Biol.* [分子生物学杂志]208:551-565;和Quigley等人(1989) *J. Mol. Evol.* [分子进化杂志]29:412-421)。还包括苯磺酰胺诱导型(美国专利号5,364,780)和乙醇诱导型(国际专利申请公开号W0 97/06269和W0 97/06268)系统和谷胱甘肽S-转移酶启动子。同样地,可以使用描述于以下文献中的诱导型启动子中的任一种:Gatz (1996) *Current Opinion Biotechnol.* [生物技术新见]7:168-172和Gatz (1997) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* [植物生理学与植物分子生物学年度综述]48: 89-108。适用于指导本发明的核苷酸序列在植物中的表达的其他化学诱导型启动子披露于

美国专利5,614,395中。基因表达的化学诱导还详述于EP 0 332 104(授予汽巴-嘉基公司(Ciba-Geigy))和美国专利5,614,395中。

[0237] 另一类在本发明中有用的启动子是创伤诱导型启动子。已经描述了数量众多的在创伤部位并且还在植物病原菌感染的部位表达的启动子。理想的是,这样的启动子在昆虫入侵的部位应该仅有局部活性,并且以此方式这些杀昆虫蛋白仅在需要合成这些杀昆虫蛋白的细胞中积聚以杀死入侵的昆虫有害生物。这类启动子的实例包括由以下文献所描述的那些:Stanford等人,Mol.Gen.Genet.[分子遗传学与普通遗传学]215:200-208(1989);Xu等人,Plant Molec.Biol.[植物分子生物学]22:573-588(1993);Logemann等人,Plant Cell[植物细胞]1:151-158(1989);Rohrmeier和Lehle,Plant Molec.Biol.[植物分子生物学]22:783-792(1993);Firek等人,Plant Molec.Biol.[植物分子生物学]22:129-142(1993)以及Warner等人,Plant J.[植物杂志]3:191-201(1993)。

[0238] 在实施例中,本发明的核酸可以包含表达盒,基本上由其组成,或由其组成,或者可以包含在表达盒内。

[0239] 包含感兴趣的多核苷酸的表达盒可以是嵌合的,意味着它的组分中的至少一种相对于它的其他组分中的至少另外一种是异源的。表达盒还可以是天然存在但已经是适用于异源表达的重组形式获得的表达盒。典型地,所述表达盒相对于宿主而言是异源的,即所述表达盒的特定核酸序列不是天然存在于宿主细胞中的,并且必须已经通过转化事件引入到宿主细胞或宿主细胞的祖先中。

[0240] 除与本发明的核苷酸序列可操作地相关联的启动子之外,本发明的表达盒还可以包括其他调节元件。调节元件包括但不限于增强子、内含子、翻译前导序列、终止信号、以及多腺苷酸化信号序列。适合的转录终止子信号的实例是可获得的并且在本领域中是已知的(例如来自CaMV的tm1,来自rbcS的E9)。任何已知在植物中发挥作用的可供使用的终止子均可以在本发明的上下文中使用。

[0241] 可以将数量众多的其他序列掺入本发明所描述的表达盒中。这些序列包括已经显示出增强表达的序列,如内含子序列(例如,来自Adh1和bronze1)以及病毒的前导序列(例如,来自TMV、MCMV、和AMV)。

[0242] 为了更加有效的翻译起始,可修饰与起始甲硫氨酸相邻的序列。例如,它们可以通过包含已知在植物中有效的序列而被修饰。Joshi已经提出了针对植物的适当的共有序列(NAR 15:6643-6653(1987)),并且Clonetech提出了另一种共有翻译起始子(1993/1994目录,第210页)。这些共有序列适于与本发明的核苷酸序列一起使用。将这些序列掺入至包含核苷酸序列的构建体中,达到ATG并且包括ATG(同时保持不修饰第二氨基酸),或者可替代地达到ATG后的GTC并且包括ATG后的GTC(具有修饰该转基因的第二氨基酸的可能性)。

[0243] 在实施例中,希望的是将本发明的多肽的表达靶向至植物细胞中的特定细胞定位。在一些情况下,在胞质溶胶中的定位可能是令人希望的,而在其他情况下,在某个亚细胞器中的定位可能是优选的。用于靶向例如植物中的基因产物的任何机构都可以用于实践本发明,并且已知此类机构存在于植物中并且已经相当详细地表征了控制这些机构的功能的序列。已经表征了导致将基因产物靶向其他细胞区室的序列。例如,氨基末端序列可以负责将感兴趣的蛋白质靶向细胞区室,如植物细胞的液泡、线粒体、过氧化物酶体、蛋白体、内质网、叶绿体、淀粉颗粒、淀粉体、质外体或细胞壁(例如Unger等人,Plant Molec.Biol.[植

物分子生物学]13:411-418(1989);Rogers等人,(1985)Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]82:6512-651;美国专利号7,102,057;WO 2005/096704)。任选地,信号序列可以是来自waxy的N-末端信号序列、来自 $\gamma$ -玉米蛋白的N-末端信号序列、淀粉结合结构域、C-末端淀粉结合结构域、将成熟蛋白引入叶绿体的叶绿体靶向序列(Comai等人(1988)J.Biol.Chem.[生物化学杂志]263:15104-15109;van den Broeck等人(1985)Nature[自然]313:358-363;美国专利号5,639,949)或来自糊粉细胞的分泌信号序列(Koehler和Ho,Plant Cell[植物细胞]2:769-783(1990))。另外,与羧基末端序列结合的氨基末端序列负责基因产物的液泡靶向,并且可以随本发明一起使用(Shinshi等人,(1990)Plant Molec.Biol.[植物分子生物学]14:357-368)。在一个实施例中,所选择的信号序列包括已知的切割位点,并且构建的融合体考虑了在一个或多个切割位点之后的需要切割的任何氨基酸。在一些情况下,这个要求可以通过在切割位点与转基因ATG之间添加小数目的氨基酸,或可替代地置换转基因序列内的一些氨基酸来满足。这些构建技术在本领域是熟知的并且同样适用于任何细胞区室。

[0244] 应认识到,用于细胞靶向的上述机制不仅可以与其同源启动子结合使用,还可以与异源启动子结合使用,从而在启动子的转录调节下实现特定的细胞靶向目标,该启动子具有不同于自其衍生靶向信号的启动子的表达谱。

[0245] 本发明的表达盒还可以包括用于选择性标记的核苷酸序列,所述选择性标记可以用于选择转化的植物、植物部分和/或植物细胞。适合的选择性标记的许多例子是本领域已知的并且可以用于在此描述的表达盒中。

[0246] 选择性标记的实例包括但不限于,编码neo或nptII的核苷酸序列,其赋予对卡那霉素、G418等的抗性(Potrykus等人,(1985)Mol.Gen.Genet[分子与普通遗传学]199:183-188);编码bar的核苷酸序列,其赋予对草丁膦的抗性;编码改变的5-烯醇丙酮莽草酸-3-磷酸合酶(EPSP)的核苷酸序列,其赋予对草甘膦的抗性(Hinchee等人,(1988),Biotech.[生物技术]6:915-922);编码腈水解酶(如来自臭鼻克雷白氏杆菌的bxn)的核苷酸序列,其赋予对溴草膦的抗性(Stalker等人,(1988),Science[科学]242:419-423);编码改变的乙酰乳酸合酶(ALS)的核苷酸序列,其赋予对咪唑啉酮、磺酰脲或其他ALS-抑制化学物的抗性(欧洲专利申请号154204);编码甲氨蝶呤-抗性的二氢叶酸还原酶(DHFR)的核苷酸序列(Thillet等人,(1988),J.Biol.Chem.[生物化学杂志]263:12500-12508);编码茅草枯脱卤素酶的核苷酸序列,其赋予对茅草枯的抗性;编码甘露糖-6-磷酸异构酶(也称为磷酸甘露糖异构酶(PMI))的核苷酸序列,其赋予代谢甘露糖的能力(美国专利号5,767,378与5,994,629);编码改变的邻氨基苯甲酸盐合酶的核苷酸序列,其赋予对5-甲基色氨酸的抗性;或编码hph的核苷酸序列,其赋予对潮霉素的抗性。本领域技术人员能够选择用于在本发明的表达盒中使用的适合的选择性标记。

[0247] 另外的选择性标记包括但不限于:编码 $\beta$ -葡萄糖醛酸酶的核苷酸序列或编码对于多种显色底物已知的酶的uidA(GUS);编码在植物组织中对花色苷色素(红色)进行调节的产物的R基因座核苷酸序列(Dellaporta等人,“Molecular cloning of the maize R-nj allele by transposon-tagging with Ac”263-282In:Chromosome Structure and Function:Impact of New Concepts[《染色体结构与功能:新概念的影响》]中的263-282“通过Ac转座子标签技术对玉蜀黍R-nj等位基因的分子克隆”),18th Stadler Genetics

Symposium (第18届斯特德莱遗传学专题讨论会) (Gustafson和Appels编辑, Plenum Press (Plenum出版社) (1988)); 编码 $\beta$ -内酰胺酶的核苷酸序列, 对于 $\beta$ -内酰胺酶而言多种显色底物是已知的 (例如, PADAC, 一种显色头孢菌素) (Sutcliffe (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美国国家科学院院刊] 75:3737-3741); 编码xy1E的核苷酸序列, xy1E对儿茶酚双加氧酶进行编码 (Zukowsky等人, (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美国国家科学院院刊] 80:1101-1105); 编码酪氨酸酶的核苷酸序列, 酪氨酸酶能够氧化酪氨酸成为DOPA以及多巴醌, 其进而缩合形成黑色素 (Katz等人, (1983) J. Gen. Microbiol. [普通微生物学杂志] 129:2703-2714); 编码 $\beta$ -半乳糖苷酶的核苷酸序列, 对于 $\beta$ -半乳糖苷酶而言存在显色底物; 编码荧光素酶 (lux) 的核苷酸序列, 荧光素酶允许生物发光检测 (Ow等人, (1986) Science [科学] 234:856-859); 编码水母发光蛋白的核苷酸序列, 水母发光蛋白可以在钙敏感的生物发光检测中采用 (Prasher等人, (1985) Biochem. Biophys. Res. Comm. [生物化学与生物物理学研究通讯] 126:1259-1268); 或编码绿色荧光蛋白的核苷酸序列 (Niedz等人, (1995) Plant Cell Reports [植物细胞报道] 14:403-406)。本领域技术人员能够选择用于在本发明的表达盒中使用的适合的选择性标记。

[0248] 在一些实施例中, 本发明的表达盒还可以包括编码除本发明的嵌合杀昆虫蛋白之外的其他所希望的性状的多核苷酸。此类其他多核苷酸的实例包括编码多肽或dsRNA以获得感兴趣的其他所希望的性状的那些。此类包含“叠加”性状的表达盒可以用来例如产生具有所希望的具有叠加性状 (即, 分子叠加) 的表型的植物、植物部分或植物细胞。植物中的此类叠加的组合还可以通过其他方法来产生, 包括但不限于通过任何常规的方法学来杂交育种植物 (即, 育种叠加)。如果是通过遗传转化这些植物来进行叠加的, 感兴趣的核苷酸序列可以在任何时间并且以任何次序进行组合。例如, 包含一种或多种所希望的性状的转基因植物可以用作通过后续转化而引入另外的性状的靶标。另外的核苷酸序列可以在共转化方案中与由表达盒的任何组合提供的本发明的核苷酸序列、核酸分子、核酸构建体、或组合物同时引入。例如, 如果将引入两个核苷酸序列, 则它们可以合并并在分开的盒 (反式) 中或可以合并并在相同的盒 (顺式) 上。多核苷酸的表达可以通过相同的启动子或通过不同的启动子驱动。进一步认识到多核苷酸可以使用位点特异性重组系统在所希望的基因组位置处叠加。参见, 例如, 国际专利申请公开号W0 99/25821、W0 99/25854、W0 99/25840、W0 99/25855以及W0 99/25853。

[0249] 在代表性实施例中, 所述表达盒还可以包括用于农艺性状 (例如, 主要受益者是种子公司、栽培者或谷物加工者的农艺性状) 的感兴趣的一种或多种多肽或双链RNA分子 (dsRNA) 的另外的编码序列。感兴趣的多肽可以是由感兴趣的核苷酸序列编码的任何多肽。适合用于在植物中生产的感兴趣的多肽的非限制性实例包括产生农艺学重要性状的那些多肽, 这些性状如除草剂抗性 (有时也称为“除草剂耐受性”)、病毒抗性、细菌病原体抗性、昆虫抗性、线虫抗性、或真菌抗性。参见, 例如, 美国专利号5,569,823、5,304,730、5,495,071、6,329,504、以及6,337,431。在实施例中, 感兴趣的多肽可以是提高植物活力或产量 (包括允许植物在不同的温度、土壤条件以及日光和沉淀水平下生长的性状) 的多肽、或是允许对展现感兴趣的性状 (例如, 选择性标记、种皮颜色等) 的植物进行鉴定的多肽。不同的感兴趣的多肽, 连同用于将这些多肽引入植物中的方法描述于例如美国专利号4,761,373、4,769,061、4,810,648、4,940,835、4,975,374、5,013,659、5,162,602、5,276,268、5,304,



730、5,495,071、5,554,798、5,561,236、5,569,823、5,767,366、5,879,903、5,928,937、6,084,155、6,329,504和6,337,431,连同美国专利公开号2001/0016956中。还参见互联网上 [lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/)。

[0250] 赋予对抑制生长点或分生组织的除草剂(如咪唑啉酮或磺酰脲)的抗性/耐受性的多核苷酸也可以适用于本发明的一些实施例中。对于突变型ALS和AHAS酶在这一分类号中的示例性多核苷酸如描述于例如,美国专利号5,767,366和5,928,937中。美国专利号4,761,373和5,013,659针对抵抗不同的咪唑啉酮或磺酰脲除草剂的植物。美国专利号4,975,374涉及含有如下核酸的植物细胞和植物,所述核酸编码突变型谷氨酰胺合成酶(GS),所述突变型谷氨酰胺合成酶抵抗已知抑制GS的除草剂(例如,草丁膦和甲硫氨酸磺基胍(methionine sulfoximine))的抑制作用。美国专利号5,162,602披露了抵抗环己二酮和芳氧苯氧丙酸除草剂的抑制作用的植物。该抗性由改变的乙酰辅酶A羧化酶(ACCase)赋予。

[0251] 赋予对草甘膦抗性的由核苷酸序列编码的多肽也适用于本发明。参见,例如,美国专利号4,940,835和美国专利号4,769,061。美国专利号5,554,798披露了抗草甘膦的转基因玉蜀黍植物,该抗性由改变的5-烯醇丙酮莽草酸-3-磷酸(EPSP)合成酶基因赋予。

[0252] 编码对磷酰基化合物(如草铵膦或草丁膦、以及吡啶氧丙酸或苯氧丙酸以及环己酮)的抗性的多核苷酸也是适合的。参见欧洲专利申请号0 242 246。还参见美国专利号5,879,903、5,276,268和5,561,236。

[0253] 其他适合的多核苷酸包括编码对抑制光合作用的除草剂(如三嗪和苯基氰(腈水解酶))的抗性的那些。参见美国专利号4,810,648。编码用于除草剂抗性的另外的适合的多核苷酸包括编码对2,2-二氯丙酸、烯禾啶、吡氟氯禾灵、咪唑啉酮除草剂、磺酰脲除草剂、三唑并嘧啶除草剂、均三嗪除草剂以及溴草腈的抗性的那些。同样适合的是赋予对原卟啉原氧化酶的抗性或者提供增强的对植物疾病的抗性、增强的对不利环境条件(非生物胁迫)的耐受性(这些条件包括但不限于干旱、极冷、极热、或极端的土壤盐度或极端的酸度或碱度)、以及在植物构造或发育中的改变(包括发育时间方面的变化)的多核苷酸。参见例如,美国专利公开号2001/0016956和美国专利号6,084,155。

[0254] 另外的适合的多核苷酸包括对杀有害生物(例如杀昆虫)多肽进行编码的那些。这些多肽可以按足以控制例如昆虫有害生物的量(即,昆虫控制量)进行生产。在实施例中,所述多肽是鳞翅目活性的、鞘翅目活性的、半翅目活性的和/或双翅目活性的多肽,或其任何组合。应当认识到在植物中对控制昆虫或其他有害生物必要的杀有害生物多肽的生产量可以变化,这取决于栽培品种、有害生物的类型、环境因素等。有用于另外的昆虫或有害生物抗性的多核苷酸包括例如编码芽孢杆菌属(*Bacillus*)生物中鉴定到的毒素的那些。已经克隆了包含编码来自几个亚种的苏云金芽孢杆菌(*Bt*)Cry蛋白的核苷酸序列的多核苷酸,并且已经发现这些重组克隆对鳞翅目、双翅目和鞘翅目昆虫幼虫是有毒的。此类Bt杀昆虫蛋白的实例包括如下Cry蛋白,如Cry1Aa、Cry1Ab、Cry1Ac、Cry1B、Cry1C、Cry1D、Cry1Ea、Cry1Fa、Cry3A、Cry9A、Cry9B、Cry9C等,连同营养期杀昆虫蛋白如Vip1、Vip2、Vip3等,以及前述Bt杀昆虫蛋白的任何组合。Bt来源的蛋白的完整清单可以在万维网在苏塞克斯大学(University of Sussex)维护的苏云金芽孢杆菌毒素命名法数据库中找到(还参见,Crickmore等人,(1998),*Microbiol.Mol.Biol.Rev.*[微生物分子生物学综述]62:807-813)。

[0255] 在实施例中,另外的多肽是衍生自非Bt来源的杀昆虫多肽,包括但不限于: $\alpha$ 淀粉酶、过氧化物酶、胆固醇氧化酶、马铃薯糖蛋白、蛋白酶、蛋白酶抑制剂、脲酶、 $\alpha$ -淀粉酶抑制剂、成孔蛋白、几丁质酶、凝集素、工程化抗体或抗体片段、蜡样芽孢杆菌杀昆虫蛋白、致病杆菌属物种(如嗜线虫致病杆菌(*X.nematophila*)或伯氏致病杆菌(*X.bovienii*))杀昆虫蛋白、发光杆菌属物种(如发光杆菌(*P.luminescens*或*P.asymbiotica*))杀昆虫蛋白、短芽孢杆菌属物种(如侧孢短芽孢杆菌(*B.laterosporous*))杀昆虫蛋白、赖氨酸芽孢杆菌属物种(*Lysinibacillus* spp.) (如球形赖氨酸芽孢杆菌(*L.Sphaericus*))杀昆虫蛋白、色杆菌属物种(如*C.subtsugae*或*C.piscinae*)杀昆虫蛋白、耶尔森菌属物种(如耶尔森噬虫霉(*Y.entomophaga*))杀昆虫蛋白、类芽孢杆菌属物种(如丙型类芽孢杆菌属(*P.propylaea*))杀昆虫蛋白、梭菌属物种(如双酶梭菌(*C.bifermentans*))杀昆虫蛋白、假单胞菌属物种(*Pseudomonas* spp.) (如荧光假单胞菌(*P.fluorescens*))杀昆虫蛋白和木质素。

[0256] 适合在植物中生产的多肽进一步包括改善或通过其他方式促进收获的植物或植物部分转化成为商业上有用的产品(包括例如增加的或改变的碳水化合物含量或分布、改善的发酵特性、增加的油含量、增加的蛋白质含量、改善的消化率、以及增加的营养成分含量(例如,增加的植物甾醇含量、增加的生育酚含量、增加的甾烷醇含量或增加的维生素含量))的那些。感兴趣的多肽还包括,例如在收获的作物中导致或促成不需要的成分(例如植酸、或降解糖的酶类)的含量降低的那些。“导致(resulting in)”或“促成(contributing to)”是指这种感兴趣的多肽可以直接或间接地促成感兴趣的性状的存在(例如,通过异源纤维素酶的使用来增加纤维素降解)。

[0257] 在一些实施例中,多肽促成了食品或饲料的改进的可消化度。木聚糖酶是半纤维素分解酶,这些酶改进了植物细胞壁的分解,这导致动物更好地利用这些植物营养素。这导致了改进的生长率和饲料转化。同样,可以减小含有木聚糖的饲料的粘度。在植物细胞内异源产生木聚糖酶也可以促进木质纤维素转化成工业加工中的可发酵糖。

[0258] 来自真菌和细菌微生物的众多木聚糖酶已经得到鉴别和表征(参见例如,美国专利号5,437,992;Coughlin等人,(1993),“Proceedings of the Second TRICEL Symposium on *Trichoderma reesei* Cellulases and Other Hydrolases”[“里氏木霉纤维素酶和其他水解酶的第二TRICEL研讨会论文集”],埃斯波(Espoo);Souminen和Reinikainen编著,(1993)生物技术和工业发酵研究基金会(Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research)8:125-135;美国专利公开号2005/0208178;以及PCT公开号W0 03/16654)。具体地说,在里氏木霉(*T.reesei*)中已经鉴别出三种特异性木聚糖酶(XYL-I、XYL-II、和XYL-III)(Tenkanen等人(1992)Enzyme Microb.Technol.[酶与微生物技术]14:566;Torrönen等人(1992)Bio/Technology[生物/技术]10:1461;以及Xu等人(1998)Appl.Microbiol.Biotechnol.[应用微生物与生物技术]49:718)。

[0259] 在其他实施例中,对于本发明有用的多肽可以是多糖降解酶。产生这样一种酶的本发明的植物对于产生例如用于生物加工的发酵原料会是有用的。在一些实施例中、可用于发酵过程的酶包括 $\alpha$ 淀粉酶、蛋白酶、支链淀粉酶、异淀粉酶、纤维素酶、半纤维素酶、木聚糖酶、环糊精糖基转移酶、脂肪酶、植酸酶、漆酶、氧化酶、酯酶、角质酶、颗粒淀粉水解酶以及其他葡糖淀粉酶。

[0260] 多糖降解酶包括:淀粉降解酶类,如 $\alpha$ -淀粉酶类(EC 3.2.1.1)、葡萄糖醛酸酶类

(E.C.3.2.1.131); 外-1,4- $\alpha$ -D葡聚糖酶类,如淀粉糖化酶类以及葡糖淀粉酶(EC 3.2.1.3)、 $\beta$ -淀粉酶类(EC 3.2.1.2)、 $\alpha$ -糖苷酶类(EC 3.2.1.20)、以及其他外-淀粉酶类;淀粉脱支酶类,如a) 异淀粉酶(EC 3.2.1.68)、支链淀粉酶(EC 3.2.1.41)等;b) 纤维素酶类,如外-1,4-3-纤维素二糖水解酶(EC 3.2.1.91)、外-1,3- $\beta$ -D-葡聚糖酶(EC 3.2.1.39)、 $\beta$ -糖苷酶(EC 3.2.1.21);c) L-阿拉伯糖酶类(arabinases),如内-1,5- $\alpha$ -L-阿拉伯糖酶(EC 3.2.1.99)、 $\alpha$ -阿拉伯糖苷酶类(EC 3.2.1.55)等;d) 半乳聚糖酶类(galactanases),如内-1,4- $\beta$ -D-半乳聚糖酶(EC 3.2.1.89)、内-1,3- $\beta$ -D-半乳聚糖酶(EC 3.2.1.90)、 $\alpha$ -半乳糖苷酶(EC 3.2.1.22)、 $\beta$ -半乳糖苷酶(EC 3.2.1.23)等;e) 甘露聚糖酶类(mannanases),如内-1,4- $\beta$ -D-甘露聚糖酶(EC 3.2.1.78)、 $\beta$ -甘露糖苷酶(EC 3.2.1.25)、 $\alpha$ -甘露糖苷酶(EC 3.2.1.24)等;f) 木聚糖酶类,如内-1,4- $\beta$ -木聚糖酶(EC 3.2.1.8)、 $\beta$ -D-木糖苷酶(EC 3.2.1.37)、1,3- $\beta$ -D-木聚糖酶等;以及g) 其他酶类,如 $\alpha$ -L-岩藻糖苷酶(EC 3.2.1.51)、 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶(EC 3.2.1.40)、果聚糖酶(EC 3.2.1.65)、菊粉酶(EC 3.2.1.7)等。在一个实施例中,所述 $\alpha$ -淀粉酶是描述于美国专利号8,093,453中的合成 $\alpha$ -淀粉酶Amy797E。

[0261] 可以与本发明一起使用的另外的酶包括蛋白酶,如真菌和细菌蛋白酶。真菌蛋白酶包括但不限于从曲霉属(*Aspergillus*)、木霉属(*Trichoderma*)、毛霉属(*Mucor*)和根霉属(*Rhizopus*),如黑曲霉(*A.niger*)、泡盛曲霉(*A.awamori*)、米曲霉(*A.oryzae*)和米黑毛霉(*M.miehei*)获得的那些。在一些实施例中,本发明的多肽可以是纤维二糖水解酶(CBH)(EC 3.2.1.91)。在一个实施例中,该纤维二糖水解酶可以是CBH1或CBH2。

[0262] 与本发明一起使用的其他酶包括但不限于半纤维素酶,如甘露聚糖酶和阿拉伯呋喃糖苷酶(EC 3.2.1.55);木质素酶;脂肪酶(例如,E.C.3.1.1.3)、葡糖氧化酶、果胶酶、木聚糖酶、转葡糖苷酶、 $\alpha$ 1,6葡糖苷酶(例如,E.C.3.2.1.20);酯酶,如阿魏酸酯酶(EC 3.1.1.73)和乙酰基木聚糖酯酶(EC 3.1.1.72);以及角质酶(例如,E.C.3.1.1.74)。

[0263] 与本发明一起使用的双链RNA(dsRNA)分子包括但不限于抑制靶标有害生物(例如昆虫)基因的那些。在实施例中,所述dsRNA靶向鳞翅目、鞘翅目、半翅目或双翅目昆虫有害生物中的基因,或前述的任何组合。如在此使用的词语“基因抑制”当一起考虑时旨在是指用于减少作为基因转录为mRNA和该mRNA的后续翻译的结果而产生的蛋白质的水平的任何熟知的方法。基因抑制还旨在意指减少从基因或编码序列表达蛋白质,包括转录后基因抑制和转录抑制。转录后基因抑制由从靶向抑制的基因或编码序列转录的mRNA的全部或其一部分与用于抑制的相应双链RNA之间的同源性介导,并且是指细胞中可供被核糖体结合使用的可获得的mRNA的量的实质且可测量的减少。经转录的RNA可以处于正义方向而发挥作用,称为共抑制,处于反义方向而发挥作用,称为反义抑制,或在两个方向上产生dsRNA而发挥作用,称为RNA干扰(RNAi)。转录抑制由细胞中存在作为基因抑制剂的与启动子DNA序列或其补体展示出实质序列同一性而发挥作用的dsRNA介导,称为启动子反式抑制。针对与性状相关联的天然植物基因,基因抑制可以是有效的,例如,以提供具有减少水平的由所述天然基因编码的蛋白质或具有增强或减少水平的受影响代谢物的植物。针对植物有害生物中的靶基因,基因抑制也可以是有效的,这些有害生物可以摄取或接触含有基因抑制剂的植物材料,这些基因抑制剂专门设计用于阻抑或抑制一种或多种同源或互补序列在该有害生物的细胞中的表达。靶向抑制的此类基因可以编码必需蛋白质,其预测功能选自下组,该组由以下组成:肌肉形成、保幼激素形成、保幼激素调节、离子调节和转运、消化酶合成、细

胞膜电势的维持、氨基酸生物合成、氨基酸降解、精子形成、外激素 (pheromone) 合成、外激素感测、触角形成、翼形成、腿形成、发育和分化、卵形成、幼虫成熟、消化酶形成、血淋巴合成、血淋巴维持、神经传递、细胞分裂、能量代谢、呼吸以及凋亡。

[0264] 在实施例中,本发明的核酸可进一步包含运载体,基本上由其组成或由其组成。在实施例中,本发明的多核苷酸和表达盒包含在运载体中。用于在植物和其他生物的转化中使用的运载体在本领域是熟知的。一般类别的运载体的非限制性实例包括质粒、噬菌体运载体、噬菌粒运载体、粘粒运载体、福斯质粒、噬菌体、人工染色体或病毒运载体。在实施例中,所述运载体是植物运载体,例如用于植物转化。在实施例中,所述运载体是细菌运载体,例如用于细菌转化。适用于植物、细菌和其他生物的运载体是本领域已知的。

[0265] 转基因植物、植物部分、植物细胞、种子。

[0266] 本发明还涵盖了如下转基因非人类宿主细胞,所述转基因非人类宿主细胞包含本发明的多核苷酸、核酸分子、表达盒、运载体或多肽。转基因非人类宿主细胞可以包括但不限于植物细胞(包括单子叶植物细胞和/或双子叶植物细胞)、酵母细胞、细菌细胞或昆虫细胞。因此,在一些实施例中,本发明提供了选自以下属的细菌细胞:芽孢杆菌属(Bacillus)、短芽孢杆菌属(Brevibacillus)、梭菌属(Clostridium)、致病杆菌属(Xenorhabdus)、发光杆菌属(Photorhabdus)、巴斯德氏芽菌属(Pasteuria)、埃希氏菌属(Escherichia)、假单胞菌属(Pseudomonas)、欧文氏菌属(Erwinia)、沙雷氏菌属(Serratia)、克雷伯菌属(Klebsiella)、沙门氏菌属(Salmonella)、巴氏杆菌属(Pasteurella)、黄单胞菌属(Xanthomonas)、链霉菌属(Streptomyces)、根瘤菌属(Rhizobium)、红假单胞菌属(Rhodopseudomonas)、嗜甲基菌属(Methylophilus)、农杆菌属(Agrobacterium)、醋杆菌属(Acetobacter)、乳杆菌属(Lactobacillus)、节杆菌属(Arthrobacter)、固氮菌属(Azotobacter)、明串珠菌属(Leuconostoc)或产碱杆菌属(Alcaligenes)。因此,例如,作为生物昆虫控制剂,本发明的嵌合杀昆虫蛋白可以通过在细菌细胞中表达编码本发明的嵌合杀昆虫蛋白的多核苷酸而产生。例如,在一些实施例中,提供了包含编码本发明的嵌合杀昆虫蛋白的多核苷酸的苏云金芽孢杆菌细胞。

[0267] 在实施例中,所述转基因植物细胞是双子叶植物细胞或单子叶植物细胞。在另外的实施例中,所述双子叶植物细胞是大豆细胞、向日葵细胞、番茄细胞、芸苔属作物细胞、棉花细胞、糖用甜菜细胞或烟草细胞。在另外的实施例中,所述单子叶植物细胞是大麦细胞、玉蜀黍细胞、燕麦细胞、水稻细胞、高粱细胞、甘蔗细胞或小麦细胞。在实施例中,本发明提供了多个双子叶植物细胞或单子叶植物细胞,这些细胞包含表达本发明的嵌合杀昆虫蛋白的多核苷酸。在实施例中,将所述多个细胞并列以形成质外体并且使其在自然光照中生长。在实施例中,所述转基因植物细胞不能再生全株植物。

[0268] 在本发明的实施例中,在高等生物(例如,植物)中表达本发明的杀昆虫蛋白。在这种情况下,表达有效量的杀昆虫蛋白的转基因植物保护自身免受植物有害生物如昆虫有害生物的伤害。当昆虫开始摄食这样一种转基因植物时,它摄取了所表达的杀昆虫蛋白。这可以妨碍昆虫进一步咬食植物组织或者甚至可以伤害或杀死昆虫。在实施例中,本发明的多核苷酸被插入表达盒中,然后所述表达盒被稳定地整合到植物的基因组中。在其他实施例中,该多核苷酸被包括在非致病性自我复制病毒中。

[0269] 在本发明的一些实施例中,包含本发明的核酸分子或多肽的转基因植物细胞是植

物部分、植物器官或植物培养物(各自如在此描述的)的细胞,包括但不限于根、叶、种子、花、果实、花粉细胞、器官或植物培养物等,或愈伤组织细胞或培养物。

[0270] 根据本发明的转基因植物或植物细胞可以是单子叶植物或双子叶植物或植物细胞,并且包括但不限于玉米(玉蜀黍)、大豆、水稻、小麦、大麦、黑麦、燕麦、高粱、粟、向日葵、红花、糖用甜菜、棉花、甘蔗、油菜、苜蓿、烟草、花生、蔬菜(包括甘薯、豆类、豌豆、菊苣、莴苣、甘蓝、花椰菜、西兰花、芜菁、胡萝卜、茄子、黄瓜、萝卜、菠菜、马铃薯、番茄、芦笋、洋葱、大蒜、瓜类、胡椒、芹菜、南瓜、西葫芦、绿皮西葫芦等)、水果(包括苹果、梨、榲桲、李子、樱桃、桃、蜜桃、杏、草莓、葡萄、覆盆子、黑莓、菠萝、鳄梨、番木瓜、芒果、香蕉等)和特种植物或植物细胞(如拟南芥),或者木本植物或植物细胞(如针叶树和/或落叶树)。在实施例中,本发明的植物或植物细胞是作物植物或植物细胞,如玉蜀黍、高粱、小麦、向日葵、番茄、十字花科植物、胡椒、马铃薯、棉花、水稻、大豆、糖用甜菜、甘蔗、烟草、大麦、油菜植物或植物细胞等。

[0271] 本发明进一步提供了本发明的转基因植物的一部分。任选地,所述植物部分包含本发明的嵌合杀昆虫蛋白和/或编码其的核酸。

[0272] 本发明进一步提供了本发明的转基因植物的种子或产生本发明的转基因植物的种子。任选地,所述种子包含本发明的嵌合杀昆虫蛋白和/或编码其的核酸。

[0273] 本发明的另外的实施例包括从本发明的转基因植物、植物部分或种子产生的收获产物,连同从所述收获产物产生的加工产物。收获产物可以是如在此描述的全株或任何植物部分。因此,在一些实施例中,收获产物的非限制性实例包括种子、果实、花或其部分(例如,花药、柱头等)、叶、茎等。在其他实施例中,加工产物包括但不限于由收获的本发明的种子或其他植物部分产生的细粉、粗粉、油、淀粉、谷物等。任选地,所述收获产物或加工产物包含本发明的嵌合杀昆虫蛋白和/或编码其的核酸。

[0274] 在其他实施例中,本发明提供了来自本发明的转基因植物、植物部分的提取物,任选地其中所述提取物包含本发明的嵌合杀昆虫蛋白和/或编码其的核酸。可以根据本领域熟知的程序制备来自植物或植物部分的提取物(参见,de la Torre等人,Food, Agric. Environ. [食品农业与环境] 2 (1):84-89 (2004); Guidet, Nucleic Acids Res. [核酸研究] 22 (9):1772-1773 (1994); Lipton等人,Food Agric. Immun. [食品农业通讯] 12:153-164 (2000))。

[0275] 所述嵌合杀昆虫蛋白可以作为昆虫控制剂在植物部分、植物细胞、植物器官、种子、收获产物、加工产物或提取物等中起作用。换言之,所述嵌合杀昆虫蛋白可以继续执行它在转基因植物中具有杀昆虫功能。所述核酸可以起到表达所述嵌合杀昆虫蛋白的作用。作为编码本发明的杀昆虫蛋白的替代方案,所述核酸可用于鉴定本发明的转基因植物部分、植物细胞、植物器官、种子、收获产物、加工产物或提取物。

[0276] 在实施例中,本发明的转基因植物、植物部分、植物细胞、植物器官或种子对于本发明的多核苷酸或表达盒是半合子的。在实施例中,本发明的转基因植物、植物部分、植物细胞、植物器官或种子对于本发明的多核苷酸或表达盒是纯合的。

[0277] 在实施例中,如与不包含编码本发明杀昆虫蛋白的核酸的适合的对照相比,转基因植物、植物部分、植物细胞、植物器官、种子、收获产物、加工产物或提取物对一种或多种昆虫有害生物(例如鳞翅目有害生物,如秋黏虫)具有增加的抗性。

[0278] 植物转化。

[0279] 用于转化植物的程序在本领域中是熟知且常规的并且普遍描述于文献中。用于植物转化的方法的非限制性实例包括通过以下的转化：细菌介导的核酸递送（例如，经由农杆菌）、病毒介导的核酸递送、碳化硅或核酸须晶介导的核酸递送、脂质体介导的核酸递送、微注射、微粒轰击、磷酸钙介导的转化、环糊精介导的转化、电穿孔、纳米粒子介导的转化、超声处理、渗入、PEG介导的核酸吸收、连同使得核酸引入到植物细胞中的任何其他电学的、化学的、物理的（机械的）或生物的机制，包括其任何组合。对于本领域已知的不同植物转化方法的一般指导包括以下文献：Miki等人（Glick, B.R. 和Thompson, J.E. 编辑的Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology[植物分子生物学与生物技术方法]中的“Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants[用于将外来DNA引入植物中的程序]”（CRC出版公司（CRC Press, Inc.），波卡拉顿，1993），第67-88页）和Rakowoczy-Trojanowska（Cell.Mol.Biol.Lett.[细胞与分子生物学快报]7:849-858（2002））。

[0280] 对于农杆菌介导的转化，二元运载体或携带至少一个T-DNA边界序列的运载体通常是适合的，而对于直接基因转移（例如，微粒轰击等），任何运载体都是适合的，并且可以使用仅含有感兴趣的构建体的线性DNA。在直接基因转移的情况下，可以使用以单个DNA物种的转化或共转化（Schocher等人，Biotechnology[生物技术]4:1093-1096（1986））。对于直接基因转移以及农杆菌介导的转移二者，转化通常（但不是必需的）用如下选择性标记进行，所述选择性标记可以是正向选择（例如，磷甘露糖异构酶），提供对抗生素（例如，卡那霉素、潮霉素或甲氨蝶呤）或除草剂（例如，草甘膦或草丁膦）的抗性。然而，选择性标记的选择对于本发明并不是至关重要的。

[0281] 农杆菌介导的转化是用于转化植物的常用方法，因为它的高转化效率以及因为它与许多不同物种的广泛实用性。农杆菌介导的转化典型地涉及将携带感兴趣的外来DNA的二元运载体转移至适当的农杆菌菌株，这可能取决于由宿主农杆菌菌株在共同存在的Ti质粒上或在染色体上携带的vir基因的互补物（Uknes等人（1993）Plant Cell[植物细胞]5:159-169）。将该重组二元运载体转移至农杆菌可以使用携带该重组二元运载体的大肠杆菌、辅助大肠杆菌菌株（该辅助菌株携带能够将该重组二元运载体移动到靶标农杆菌菌株中的质粒）通过三亲本交配程序实现。可替代地，可以通过核酸转化将所述重组二元运载体转移至农杆菌中（**Höfgen**和Willmitzer,（1988）Nucleic Acids Res.[核酸研究]16:9877）。

[0282] 可以使用农杆菌转化双子叶植物以及单子叶植物。用于农杆菌介导的水稻转化方法包括熟知的水稻转化方法，如任何以下文献中描述的那些：欧洲专利申请EP 1198985 A1, Aldemita和Hodges（Planta[植物]199:612-617, 1996）；Chan等人（Plant Mol Biol[植物分子生物学]22（3）:491-506, 1993），Hiei等人（Plant J[植物杂志]6（2）:271-282, 1994），将这些披露通过引用结合在此，其引用程度如同完全阐明一样。在玉米转化的情况下，优选方法是如Ishida等人（Nat. Biotechnol[自然生物技术]14（6）:745-50, 1996）或Frame等人（Plant Physiol[植物生理学]129（1）:13-22, 2002）中所描述的，将这些披露通过引用结合在此，其引用程度如同完全阐明一样。所述方法例如在B. Jenes等人，Techniques for Gene Transfer[基因转移技术]，在：Transgenic Plants[转基因植物]，第1卷，Engineering and Utilization[工程化以及利用]中，S.D.Kung和R.Wu编著，学术出

版社(1993)128-143以及在Potrykus *Annu.Rev.Plant Physiol.Plant Molec.Biol.*[植物生理学年评和植物分子生物学]42(1991)205-225)中进一步描述。有待表达的核酸或构建体优选地克隆至适合于转化根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)的运载体例如pBin19中(Bevan等人,*Nucl.Acids Res.*[核酸研究]12(1984)8711)。然后,能够以已知的方式使用由这种运载体转化的农杆菌来转化植物,如用作模型植物(如拟南芥)或作物植物(如烟草植物),方法是例如通过将捣碎的叶或切碎的叶浸没于农杆菌溶液中,并且然后在适合的培养基中培养。例如,借助于根癌农杆菌来转化植物由Hagen和Willmitzer描述于*Nucl.Acid Res.*[核酸研究](1988)16,9877中或尤其自以下文献已知:F.F.White, *Vectors for Gene Transfer in Higher Plants;in Transgenic Plants*[用于高等植物中的基因转移的运载体],第1卷,Engineering and Utilization[工程化以及利用],编辑S.D.Kung和R.Wu,学术出版社(Academic Press),1993,第15-38页。

[0283] 通过重组农杆菌进行的植物转化通常涉及该农杆菌与来自该植物的外植体的共培养,并且遵循本领域熟知的方法。在携带位于这些二元质粒T-DNA边界之间的抗生素或除草剂抗性标记的选择培养基上对转化的组织进行再生。

[0284] 如先前所讨论的,另一种用于转化植物、植物部分和植物细胞的方法涉及在植物组织和细胞上推进惰性或生物活性的粒子。参见例如,美国专利号4,945,050、5,036,006和5,100,792。通常,这种方法涉及在有效于穿透该细胞的外表面并提供掺入在其内部中的条件下在植物细胞处推进惰性或生物活性的粒子。当使用惰性粒子时,可以通过用含有感兴趣的核酸的运载体包被这些粒子而将所述运载体引入所述细胞中。可替代地,一个或多个细胞可以被该运载体围绕以使得该运载体通过该粒子的激发而被带入该细胞中。也可以将生物活性的粒子(例如,干酵母细胞、干细菌或噬菌体,各自含有一种或多种被试图引入的核酸)推进到植物组织中。

[0285] 在其他实施例中,本发明的多核苷酸可以被直接转化进质体基因组中。质体转化的主要优点在于质体通常能够表达细菌基因而无需实质性的修饰,而且质体能够在单个启动子的控制下表达多个开放阅读框。在美国专利号5,451,513、5,545,817和5,545,818中,在PCT申请号W0 95/16783中,以及在McBride等人,(1994),*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*[美国国家科学院院刊]91,7301-7305中广泛描述了质体转化技术。基本的叶绿体转化技术涉及将位于选择性标记侧翼的经克隆的质体DNA区连同感兴趣的基因一起引入适合的靶组织中,这是例如使用生物射弹(biolistic)或原生质体转化(例如,氯化钙或PEG介导的转化)来进行的。这些1至1.5kb的侧翼区(被命名为靶向序列)促进了与质体基因组的同源重组,并且因而允许置换或修饰原质体(plastome)的特定区域。最初,可以将叶绿体16S rRNA和rps12基因(赋予针对大观霉素或链霉素的抗性)的点突变用作供转化用的选择性标记(Svab,Z.,Hajdukiewicz,P.和Maliga,P.,(1990),*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*[美国国家科学院院刊]87,8526-8530);Staub,J.M.和Maliga,P.,(1992),*Plant Cell*[植物细胞]4,39-45)。在这些标记之间克隆位点的存在允许建立质体靶向运载体用于外来基因的引入(Staub,J.M.和Maliga,P.(1993)*EMBO J.*[欧洲分子生物学杂志]12,601-606)。转化频率的实质性增加可以通过用显性选择性标记(细菌aadA基因,其编码了大观霉素-解毒酶氨基糖苷-3'-腺苷酰转移酶)来置换这些隐性rRNA或r-蛋白抗生素抗性基因(Svab,Z.和Maliga,P.(1993)*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*[美国国家科学院院刊]90,913-917)。先前,这

种标记已经被成功地用于莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 这种绿藻的质体基因组的高频率转化 (Goldschmidt-Clermont, M. (1991) *Nucl. Acids Res.* [核酸研究] 19:4083-4089)。有用于质体转化的其他选择性标记在本领域是已知的, 并且被包括在本发明的范围之内。典型地, 转化之后需要大约15-20个细胞分裂循环以便达到同质状态。质体表达 (其中基因通过同源重组被插入到在每个植物细胞中存在的所有数千个环状质体基因组的拷贝中) 利用了超过核表达的基因的庞大的拷贝数目的优点, 以便允许能够很容易超过总的可溶性植物蛋白的10%的表达水平。在一个实施例中, 可以将本发明的多核苷酸插入质体靶向运载体中并转化进所希望的植物宿主的质体基因组中。因此, 可以获得与含有本发明的核苷酸序列的质体基因组同型的植物, 这些植物能够高表达该多核苷酸。

[0286] 选择转化的转基因植物、植物细胞或植物组织培养物的方法在本领域中是常规的, 并且可以用于在此提供的本发明的方法中。例如, 本发明的重组运载体还可以包括包含用于选择性标记的核苷酸序列的表达盒, 该选择性标记可以用于选择转化的植物、植物部分或植物细胞。

[0287] 此外, 如本领域中所熟知的, 完整的转基因植物可以使用多种已知技术中的任何技术从转化的植物细胞、植物组织培养物或培养的原生质体再生而来。在以下文献中描述了从植物细胞、植物组织培养物或培养的原生质体进行的植物再生: 例如, Evans等人 (*Handbook of Plant Cell Cultures* [植物细胞培养物手册], 第1卷, 麦克米兰出版公司 (MacMilan Publishing Co.), 纽约 (1983)); 以及 Vasil I.R. (编辑) (*Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants* [植物的细胞培养和体细胞遗传学], 学术出版社, 奥兰多, 第I卷 (1984) 和第II卷 (1986))。

[0288] 另外, 工程化进以上所述的本发明的转基因种子和植物、植物部分或植物细胞中的遗传特性可以通过有性生殖或营养生长来传递, 并且因此可以在子代植物中维持并传代。通常, 维持和传代利用了被开发以适合特定目的 (如收获、播种或耕作) 的已知农业方法。

[0289] 因此, 可以按本领域熟知的任何数目的方法 (如上所述的) 将多核苷酸引入该植物、植物部分或植物细胞中。因此, 没有依赖于将一种或多种多核苷酸引入植物中的特定方法, 相反可以使用允许将该一种或多种多核苷酸稳定地整合到该植物的基因组中的任何方法。在有待引入一种以上多核苷酸的情况下, 这些对应的多核苷酸可以作为单一核酸分子的一部分、或者作为分开的核酸分子而进行组装, 并且可以位于相同的或不同的核酸分子上。因此, 可以在单个转化事件中、在分开的转化事件中、或者例如作为育种方案的一部分在植物中, 将这些多核苷酸引入感兴趣的细胞中。

[0290] 一旦所希望的多核苷酸已经被转化进特定的植物物种中, 便可以使用传统的育种技术将其在该物种中繁殖或将其转移到相同物种的其他品种中, 特别是包括商业品种。

[0291] 杀昆虫组合物。

[0292] 在一些实施例中, 本发明提供了杀昆虫组合物, 所述杀昆虫组合物包含农业上可接受的载体中的本发明的嵌合杀昆虫蛋白。如在此使用的“农业上可接受的载体”可以包括与活性蛋白组合以促进它应用至植物或其部分或者在植物或其部分中应用的天然或合成的有机或无机材料。农业上可接受的载体的实例包括但不限于粉剂、尘剂、丸剂、颗粒剂、喷雾剂、乳剂、胶体以及溶液。农业上可接受的载体进一步包括但不限于可用于农业配制品中



的惰性组分、分散剂、表面活性剂、佐剂、增粘剂、粘着剂、粘合剂或其组合。此类组合物可以按使杀昆虫蛋白或其他有害生物控制剂与这些有害生物接触的任何方式施用。因此，可以将这些组合物施用于植物或植物部分的表面，包括种子、叶、花、茎、块茎、根等。在其他实施例中，在植物体内产生本发明的杀昆虫蛋白的植物是被表达的杀昆虫蛋白的农业上可接受的载体。在实施例中，本发明的组合物和农业上可接受的载体不包括转基因植物。

[0293] 在另外的实施例中，所述杀昆虫组合物包含细菌细胞或本发明的转基因细菌细胞，其中所述细菌细胞或转基因细菌细胞产生本发明的杀昆虫蛋白。这样一种杀昆虫组合物可以通过脱水、冷冻干燥、均化、提取、过滤、离心、沉降或浓缩苏云金芽孢杆菌(Bt)的培养物(包括转基因Bt培养物)而制备。在实施例中，本发明的组合物可包含按重量计至少约1%、至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%、至少约97%或至少99%的本发明的多肽。在另外的实施例中，所述组合物包含按重量计从约1%至约99%的本发明的杀昆虫蛋白。

[0294] 本发明的杀昆虫蛋白可以与其他有害生物控制剂组合使用，以增加有害生物靶标谱和/或用于预防或管理昆虫抗性。此外，本发明的杀昆虫蛋白与杀昆虫剂(其具有不同的作用方式或靶向昆虫肠中不同的受体)相组合进行使用对于预防和/或管理昆虫抗性而言具有特定的功用。

[0295] 因此，在一些实施例中，本发明提供了控制一种或多种植物有害生物(例如昆虫有害生物，如鳞翅目昆虫有害生物、鞘翅目昆虫有害生物、半翅目昆虫有害生物和/或双翅目昆虫有害生物)的组合物，其中所述组合物包含第一有害生物控制剂(其是本发明的嵌合杀昆虫蛋白)和至少第二有害生物控制剂(其不同于所述第一有害生物控制剂)。在其他实施例中，该组合物是用于局部施用至植物的配制品。在仍其他实施例中，该组合物是转基因植物。在另外的实施例中，该组合物是局部施用至转基因植物的配制品的组合。在一些实施例中，当所述转基因植物包含所述第二有害生物控制剂时，所述配制品包含所述第一有害生物控制剂(其是本发明的嵌合杀昆虫蛋白)。在其他实施例中，当所述转基因植物包含所述第一有害生物控制剂(其是本发明的嵌合杀昆虫蛋白)时，所述配制品包含所述第二有害生物控制剂。

[0296] 在一些实施例中，所述第二有害生物控制剂可以是以下中的一种或多种：化学杀有害生物剂(如杀昆虫剂)、苏云金芽孢杆菌(Bt)杀昆虫蛋白、和/或非Bt杀有害生物剂，包括但不限于致病杆菌属杀昆虫蛋白、发光杆菌属杀昆虫蛋白、侧孢短芽孢杆菌(*Brevibacillus laterosporus*)杀昆虫蛋白、球形芽孢杆菌(*Bacillus sphaericus*)杀昆虫蛋白、蛋白酶抑制剂(丝氨酸和半胱氨酸类型两者)、凝集素、 $\alpha$ -淀粉酶、过氧化物酶、胆固醇氧化酶或双链RNA(dsRNA)分子。

[0297] 在其他实施例中，所述第二有害生物控制剂是一种或多种化学杀有害生物剂，其任选地是种子包衣。化学杀有害生物剂的非限制性实例包括拟除虫菊酯、氨基甲酸酯、新烟碱、神经元钠通道阻断剂、杀昆虫大环内酯、 $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)拮抗剂、杀昆虫脲以及保幼激素模拟物。在其他实施例中，所述化学杀有害生物剂是以下中的一种或多种：阿巴美丁、乙酰甲胺磷、啉虫脒、磺胺喹啉酯(amidoflumet)(S-1955)、除虫菌素(ivermectin)、印楝素、甲基谷硫磷、联苯菊酯、联苯肼酯(binfenazate)、噻嗪酮、克百威、溴虫腈、定虫隆、毒死蜱、

甲基毒死蜱、环虫酰肼、噻虫胺、氟氯氰菊酯、 $\beta$ -氟氯氰菊酯、三氯氟氰菊酯、 $\lambda$ -三氯氟氰菊酯、氯氰菊酯、灭蝇胺、溴氰菊酯、杀螨隆、二嗪磷、除虫脲、乐果、苯虫醚、甲氨基阿维菌素、硫丹、高氰戊菊酯、乙虫腈、苯硫威 (fenothicarb)、苯氧威、甲氰菊酯、啮螨酯、氰戊菊酯、氟虫腈、氟啉虫酰胺、氟氰戊菊酯、 $\tau$ -氟胺氰菊酯、啮虫胺 (UR-50701)、氟虫脲、地虫硫磷、氯虫酰肼、氟铃脲、吡虫啉、茚虫威、异柳磷、虱螨脲、马拉硫磷、聚乙醛、甲胺磷、杀扑磷、灭多威、烯虫酯、甲氧氯、久效磷、甲氧虫酰肼、噻虫啉 (nithiazin)、双苯氟脲、多氟脲 (XDE-007)、杀线威、对硫磷、甲基对硫磷、氯菊酯、甲拌磷、伏杀磷、亚胺硫磷、磷胺、抗蚜威、丙溴磷、吡蚜酮、啉虫丙醚、蚊蝇醚、鱼藤酮、多杀菌素、螺甲螨酯 (spiromesifin) (BSN 2060)、硫丙磷、虫酰肼、伏虫隆、七氟菊酯、特丁硫磷、杀虫畏、噻虫啉、噻虫嗪、硫双威、杀虫双 (thiosultap-sodium)、四溴菊酯、敌百虫和杀铃脲、涕灭威、杀线威、苯线磷、双甲脞、灭螨猛、乙酯杀螨醇、三环锡、三氯杀螨醇、除螨灵、依杀螨、啮螨醚、苯丁锡、甲氰菊酯、啮螨酯、噻螨酮、克螨特、啮螨灵以及吡螨胺。在仍其他实施例中,所述化学杀有害生物剂选自以下中的一种或多种:氯氰菊酯、三氯氟氰菊酯、氟氯氰菊酯和 $\beta$ -氟氯氰菊酯、高氰戊菊酯、氰戊菊酯、四溴菊酯、苯硫威、灭多威、杀线威、硫双威、噻虫胺、吡虫啉、噻虫啉、茚虫威、多杀菌素、阿巴美丁、除虫菌素 (avermectin)、甲氨基阿维菌素、硫丹、乙虫腈、氟虫腈、氟虫脲、杀铃脲、苯虫醚、蚊蝇醚、吡蚜酮以及双甲脞。

[0298] 在另外的实施例中,所述第二有害生物控制剂可以是任何数目的苏云金芽孢杆菌杀昆虫蛋白中的一种或多种,包括但不限于Cry蛋白、营养期杀昆虫蛋白 (VIP) 以及任何前述杀昆虫蛋白的杀昆虫嵌合体。在其他实施例中,所述第二有害生物控制剂是选自以下的Cry蛋白:Cry1Aa、Cry1Ab、Cry1Ac、Cry1Ad、Cry1Ae、Cry1Af、Cry1Ag、Cry1Ah、Cry1Ai、Cry1Aj、Cry1Ba、Cry1Bb、Cry1Bc、Cry1Bd、Cry1Be、Cry1Bf、Cry1Bg、Cry1Bh、Cry1Bi、Cry1Ca、Cry1Cb、Cry1Da、Cry1Db、Cry1Dc、Cry1Dd、Cry1Ea、Cry1Eb、Cry1Fa、Cry1Fb、Cry1Ga、Cry1Gb、Cry1Gc、Cry1Ha、Cry1Hb、Cry1Hc、Cry1Ia、Cry1Ib、Cry1Ic、Cry1Id、Cry1Ie、Cry1If、Cry1Ig、Cry1Ja、Cry1Jb、Cry1Jc、Cry1Jd、Cry1Ka、Cry1La、Cry1Ma、Cry1Na、Cry1Nb、Cry2Aa、Cry2Ab、Cry2Ac、Cry2Ad、Cry2Ae、Cry2Af、Cry2Ag、Cry2Ah、Cry2Ai、Cry2Aj、Cry2Ak、Cry2Al、Cry2Ba、Cry3Aa、Cry3Ba、Cry3Bb、Cry3Ca、Cry4Aa、Cry4Ba、Cry4Ca、Cry4Cb、Cry4Cc、Cry5Aa、Cry5Ab、Cry5Ac、Cry5Ad、Cry5Ba、Cry5Ca、Cry5Da、Cry5Ea、Cry6Aa、Cry6Ba、Cry7Aa、Cry7Ab、Cry7Ac、Cry7Ba、Cry7Bb、Cry7Ca、Cry7Cb、Cry7Da、Cry7Ea、Cry7Fa、Cry7Fb、Cry7Ga、Cry7Gb、Cry7Gc、Cry7Gd、Cry7Ha、Cry7Ia、Cry7Ja、Cry7Ka、Cry7Kb、Cry7La、Cry8Aa、Cry8Ab、Cry8Ac、Cry8Ad、Cry8Ba、Cry8Bb、Cry8Bc、Cry8Ca、Cry8Da、Cry8Db、Cry8Ea、Cry8Fa、Cry8Ga、Cry8Ha、Cry8Ia、Cry8Ib、Cry8Ja、Cry8Ka、Cry8Kb、Cry8La、Cry8Ma、Cry8Na、Cry8Pa、Cry8Qa、Cry8Ra、Cry8Sa、Cry8Ta、Cry9Aa、Cry9Ba、Cry9Bb、Cry9Ca、Cry9Da、Cry9Db、Cry9Dc、Cry9Ea、Cry9Eb、Cry9Ec、Cry9Ed、Cry9Ee、Cry9Fa、Cry9Ga、Cry10Aa、Cry11Aa、Cry11Ba、Cry11Bb、Cry12Aa、Cry13Aa、Cry14Aa、Cry14Ab、Cry15Aa、Cry16Aa、Cry17Aa、Cry18Aa、Cry18Ba、Cry18Ca、Cry19Aa、Cry19Ba、Cry19Ca、Cry20Aa、Cry20Ba、Cry21Aa、Cry21Ba、Cry21Ca、Cry21Da、Cry21Ea、Cry21Fa、Cry21Ga、Cry21Ha、Cry22Aa、Cry22Ab、Cry22Ba、Cry22Bb、Cry23Aa、Cry24Aa、Cry24Ba、Cry24Ca、Cry25Aa、Cry26Aa、Cry27Aa、Cry28Aa、Cry29Aa、Cry29Ba、Cry30Aa、Cry30Ba、Cry30Ca、Cry30Da、Cry30Db、Cry30Ea、Cry30Fa、Cry30Ga、Cry31Aa、Cry31Ab、Cry31Ac、Cry31Ad、Cry32Aa、Cry32Ab、Cry32Ba、Cry32Ca、Cry32Cb、Cry32Da、Cry32Ea、

Cry32Eb、Cry32Fa、Cry32Ga、Cry32Ha、Cry32Hb、Cry32Ia、Cry32Ja、Cry32Ka、Cry32La、Cry32Ma、Cry32Mb、Cry32Na、Cry32Oa、Cry32Pa、Cry32Qa、Cry32Ra、Cry32Sa、Cry32Ta、Cry32Ua、Cry33Aa、Cry34Aa、Cry34Ab、Cry34Ac、Cry34Ba、Cry35Aa、Cry35Ab、Cry35Ac、Cry35Ba、Cry36Aa、Cry37Aa、Cry38Aa、Cry39Aa、Cry40Aa、Cry40Ba、Cry40Ca、Cry40Da、Cry41Aa、Cry41Ab、Cry41Ba、Cry42Aa、Cry43Aa、Cry43Ba、Cry43Ca、Cry43Cb、Cry43Cc、Cry44Aa、Cry45Aa、Cry46Aa、Cry46Ab、Cry47Aa、Cry48Aa、Cry48Ab、Cry49Aa、Cry49Ab、Cry50Aa、Cry50Ba、Cry51Aa、Cry52Aa、Cry52Ba、Cry53Aa、Cry53Ab、Cry54Aa、Cry54Ab、Cry54Ba、Cry55Aa、Cry56Aa、Cry57Aa、Cry57Ab、Cry58Aa、Cry59Aa、Cry59Ba、Cry60Aa、Cry60Ba、Cry61Aa、Cry62Aa、Cry63Aa、Cry64Aa、Cry65Aa、Cry66Aa、Cry67Aa、Cry68Aa、Cry69Aa、Cry69Ab、Cry70Aa、Cry70Ba、Cry70Bb、Cry71Aa、Cry72Aa、Cry73Aa, 或前述的任何组合。在实施例中, 所述Cry蛋白是Cry1Fa, 例如, 如由玉蜀黍事件TC1507所代表的。

[0299] 在另外的实施例中, 所述第二有害生物控制剂是选自以下的一种或多种Vip3营养期杀昆虫蛋白: Vip3Aa1、Vip3Aa2、Vip3Aa3、Vip3Aa4、Vip3Aa5、Vip3Aa6、Vip3Aa7、Vip3Aa8、Vip3Aa9、Vip3Aa10、Vip3Aa11、Vip3Aa12、Vip3Aa13、Vip3Aa14、Vip3Aa15、Vip3Aa16、Vip3Aa17、Vip3Aa18、Vip3Aa19、Vip3Aa20、Vip3Aa21、Vip3Aa22、Vip3Aa23、Vip3Aa24、Vip3Aa25、Vip3Aa26、Vip3Aa27、Vip3Aa28、Vip3Aa29、Vip3Aa30、Vip3Aa31、Vip3Aa32、Vip3Aa33、Vip3Aa34、Vip3Aa35、Vip3Aa36、Vip3Aa37、Vip3Aa38、Vip3Aa39、Vip3Aa40、Vip3Aa41、Vip3Aa42、Vip3Aa43、Vip3Aa44、Vip3Ab1、Vip3Ab2、Vip3Ac1、Vip3Ad1、Vip3Ad2、Vip3Ae1、Vip3Af1、Vip3Af2、Vip3Af3、Vip3Ag1、Vip3Ag2、Vip3Ag3、Vip3Ag4、Vip3Ag5、Vip3Ah1、Vip3Ba1、Vip3Ba2、Vip3Bb1、Vip3Bb2、Vip3Bb3, 或前述的任何组合。在实施例中, 所述Vip3蛋白是Vip3Aa (美国专利号6, 137, 033), 例如, 如由玉米事件MIR162 (美国专利号8, 232, 456; 美国专利号8, 455, 720; 和美国专利号8, 618, 272) 所代表的。

[0300] 在实施例中, 所述第二有害生物控制剂可以衍生自除苏云金芽孢杆菌外的来源。例如, 所述第二有害生物控制剂可以是 $\alpha$ 淀粉酶、过氧化物酶、胆固醇氧化酶、马铃薯糖蛋白、蛋白酶、蛋白酶抑制剂、脲酶、 $\alpha$ -淀粉酶抑制剂、成孔蛋白、几丁质酶、凝集素、工程化抗体或抗体片段、蜡样芽孢杆菌杀昆虫蛋白、致病杆菌属物种 (如嗜线虫致病杆菌 (*X.nematophila*) 或伯氏致病杆菌 (*X.bovienii*)) 杀昆虫蛋白、发光杆菌属物种 (如发光杆菌 (*P.luminescens*) 或 *P.asymbiotica*) 杀昆虫蛋白、短芽孢杆菌属物种 (如侧孢短芽孢杆菌 (*B.laterosporous*)) 杀昆虫蛋白、赖氨酸芽孢杆菌属物种 (*Lysinibacillus* spp.) (如球形赖氨酸芽孢杆菌 (*L.Sphaericus*)) 杀昆虫蛋白、色杆菌属物种 (如 *C.subtsugae* 或 *C.piscinae*) 杀昆虫蛋白、耶尔森菌属物种 (如耶尔森噬虫霉 (*Y.entomophaga*)) 杀昆虫蛋白、类芽孢杆菌属物种 (如丙型类芽孢杆菌属 (*P.propylaea*)) 杀昆虫蛋白、梭菌属物种 (如双酶梭菌 (*C.bifermentans*)) 杀昆虫蛋白、假单胞菌属物种 (*Pseudomonas* spp.) (如荧光假单胞菌 (*P.fluorescens*) 杀昆虫蛋白和木质素。在其他实施例中, 所述第二试剂可以是至少一种衍生自杀昆虫毒素复合物 (Tc) (所述复合物来自发光杆菌属、异短杆菌属 (*Xenorhabdus*)、沙雷氏菌属或耶尔森菌属) 的杀昆虫蛋白。在其他实施例中, 所述杀昆虫蛋白可以是衍生自杀昆虫细菌 (如发光杆菌属物种) 的ADP-核糖基转移酶。在其他实施例中, 所述杀昆虫蛋白可以是VIP蛋白 (如来自蜡样芽孢杆菌 (*B.cereus*) 的VIP1和/或VIP2)。在仍其他实施例中, 所述杀昆虫蛋白可以是衍生自杀昆虫细菌 (如来自侧孢短芽孢杆菌的ISP1A

和ISP2A或来自球形芽孢杆菌的BinA和BinB)的二元毒素。在仍其他实施例中,所述杀昆虫蛋白可以被工程化或可以是前述杀昆虫蛋白中的任一个的杂交体或嵌合体。

[0301] 在一些实施例中,所述第二杀有害生物剂可以是非蛋白质的(例如干扰RNA分子,如dsRNA),其可以被转基因表达或作为组合物的一部分应用(例如,使用局部方法)。干扰RNA分子典型地包含针对靶基因的至少一种RNA片段、间隔序列、和与第一RNA片段互补的第二RNA片段,从而可以形成双链RNA结构。当生物识别双链RNA(dsRNA)分子并水解它们时,RNA干扰(RNAi)发生。所得的水解产物是约19-24个核苷酸长度的小RNA片段,这些小RNA片段被称为小干扰RNA(siRNA)。然后这些siRNA扩散或被携带至整个生物,包括越过细胞膜,在那里它们与mRNA(或其他的RNA)杂交并且导致RNA的水解。干扰RNA由RNA干扰沉默复合体(RISC)识别,RNA的效应链(或“引导链”)位于所述复合体中。此引导链充当双链体序列的识别和破坏模板。每次siRNA与其互补RNA靶标杂交,此过程都被重复,有效防止那些mRNA被翻译,并且因此“沉默”mRNA自其中转录的特异性基因的表达。本领域已知干扰RNA可用于昆虫控制(参见例如,出版物WO2013/192256,其通过引用结合在此)。设计用于昆虫控制的干扰RNA产生非天然存在的双链RNA,其利用昆虫中的天然RNAi途径来触发靶基因的下调,这可能导致停止摄食和/或生长并可能导致昆虫有害生物死亡。干扰RNA分子可赋予针对与本发明蛋白质相同的靶标有害生物的昆虫抗性,或可靶向不同的有害生物。靶标昆虫植物有害生物可以通过咀嚼、吸吮或刺穿来摄食。本领域已知干扰RNA可用于昆虫控制。在实施例中,可用于昆虫控制的dsRNA描述于2016年8月5日提交的美国临时申请号62/371,259、62/371,261或62/371,262中。在实施例中,可用于昆虫控制的dsRNA描述于美国专利号9,238,8223、9,340,797或8,946,510中。在实施例中,可用于昆虫控制的dsRNA描述于美国专利申请号12/868,994、13/831,230、14/207,313或14/207318中。在其他实施例中,干扰RNA可赋予针对非昆虫植物有害生物(如线虫有害生物或病毒有害生物)的抗性。

[0302] 在仍另外的实施例中,在转基因植物中共表达所述第一昆虫控制剂(其是本发明的嵌合杀昆虫蛋白)和所述第二有害生物控制剂。可以通过将植物遗传工程化以含有并表达编码昆虫控制剂的核酸序列来实现一种以上杀有害生物成分在相同转基因植物中的共表达。例如,一种以上杀有害生物剂在相同转基因植物中的共表达可以通过制备单一的重组运载体(其在分子叠加(molecular stack)中包含一种以上杀有害生物剂的编码序列)并对植物进行遗传工程化以在所述转基因植物中含有并表达所有的杀有害生物剂而实现。此类分子叠加还可以通过使用微型染色体进行制备,如在例如美国专利7,235,716中所述的。可替代地,可以将植物(亲本1)遗传工程化,用于本发明的嵌合杀昆虫蛋白的表达。可以将第二植物(亲本2)遗传工程化,用于第二有害生物控制剂的表达。通过将亲本1与亲本2杂交,获得了表达来自亲本1和亲本2二者的昆虫控制剂的子代植物。

[0303] 在其他实施例中,本发明提供了对植物有害生物侵染有抗性的叠加性转基因植物,所述植物包含编码用于在靶标有害生物中抑制必需基因的dsRNA的核酸(例如DNA)序列和编码针对所述靶标有害生物展示出杀昆虫活性的本发明的嵌合杀昆虫蛋白的核酸例如(DNA)序列。已经报道,dsRNA对抗某些鳞翅目有害生物是无效的(Rajagopol等人2002J.Biol.Chem.[生物化学杂志]277:468-494),这可能是由于中肠中的高pH使得dsRNA不稳定。因此,在一些靶标有害生物是鳞翅目有害生物的实施例中,本发明的嵌合杀昆虫蛋白起作用以瞬时降低中肠pH,这用于稳定共摄取的dsRNA,从而使得所述dsRNA有效沉默靶

基因。

[0304] 包含和/或表达本发明的杀昆虫蛋白的转基因植物或种子还可以用杀昆虫剂或杀昆虫种子包衣进行处理,如美国专利号5,849,320和5,876,739中所述的。在实施例中,在本发明的杀昆虫剂或杀昆虫种子包衣以及转基因植物或种子针对相同靶标昆虫例如鳞翅目有害生物(例如秋黏虫)具有活性的情况下,所述组合(i)在用于进一步增强本发明的组合物针对所述靶标昆虫的活性的方法中和/或(ii)在用于通过提供针对所述靶标昆虫的又另一种作用机制而预防对本发明的组合物产生抗性的方法中是有用的。因此,在实施例中,本发明提供了增强鳞翅目昆虫群体的控制的方法,所述方法包括提供本发明的转基因植物或种子并且向所述植物或种子施用本发明的杀昆虫剂或杀昆虫种子包衣。

[0305] 即使在杀昆虫剂或杀昆虫种子包衣针对不同昆虫具有活性的情况下,所述杀昆虫剂或杀昆虫种子包衣对于扩展昆虫控制的范围是有用的,例如通过将针对鞘翅目昆虫具有活性的杀昆虫剂或杀昆虫种子包衣添加到本发明的转基因种子(在一些实施例中针对鳞翅目昆虫具有活性)中,所产生的包被的转基因种子控制鳞翅目和鞘翅目昆虫有害生物两者。

[0306] 制备和使用嵌合杀昆虫蛋白、核酸和转基因植物的方法。

[0307] 本发明还涵盖产生抗昆虫(例如,抗鳞翅目昆虫)的转基因植物的方法。在代表性实施例中,所述方法包括:向植物中引入包含编码本发明的嵌合杀昆虫蛋白的核苷酸序列(包括与在此明确披露的多肽基本上同一的毒素片段和修饰形式)的本发明的多核苷酸、表达盒或运载体,其中所述核苷酸序列被表达于所述植物中以产生本发明的嵌合杀昆虫蛋白,从而赋予所述植物对昆虫有害生物的抗性,并且产生抗昆虫的转基因植物(例如,如与适合的对照植物相比,如不包含本发明的多核苷酸、表达盒或运载体和/或不表达本发明多肽的植物)。

[0308] 在实施例中,向所述植物中引入本发明的多核苷酸、表达盒或运载体的方法包含首先用多核苷酸、表达盒或运载体转化植物细胞并由此再生转基因植物,其中所述转基因植物包含多核苷酸、表达盒或运载体,并表达本发明的嵌合杀昆虫蛋白。

[0309] 可替代地或另外地,所述引入步骤可以包含使包含多核苷酸、表达盒或运载体的第一植物与第二植物(例如,与第一植物不同的植物,例如不包含多核苷酸、表达盒或运载体的植物)杂交,并且任选地,产生包含多核苷酸、表达盒或运载体并表达本发明的嵌合杀昆虫蛋白的子代植物,从而导致对至少一种昆虫有害生物的增加的抗性。因此,本发明的转基因植物涵盖是转化事件的直接结果的植物及其(任一代)子代,所述植物及其子代包含多核苷酸、表达盒或运载体并任选地表达嵌合杀昆虫蛋白,导致对至少一种昆虫有害生物的增加的抗性。

[0310] 本发明进一步提供了鉴定本发明的转基因植物的方法,所述方法包括检测植物(或由其衍生的植物细胞、植物部分等)中的本发明的多核苷酸、表达盒、运载体或嵌合杀昆虫蛋白的存在,从而基于本发明的多核苷酸、表达盒、运载体或嵌合杀昆虫蛋白的存在将所述植物鉴定为本发明的转基因植物。

[0311] 本发明进一步提供了产生对至少一种昆虫有害生物(例如,至少一种鳞翅目有害生物)具有增加的抗性的转基因植物的方法,所述方法包括:种植包含本发明的多核苷酸、表达盒或运载体的种子,并且使来自所述种子的转基因植物生长,其中所述转基因植物包含多核苷酸、表达盒或运载体并产生嵌合杀昆虫蛋白。

[0312] 在实施例中,通过本发明的方法产生的转基因植物包含本发明的多核苷酸、表达盒或运载体。在实施例中,通过本发明的方法产生的转基因植物包含本发明的嵌合杀昆虫蛋白,并且任选地对至少一种昆虫有害生物具有增加的抗性。

[0313] 产生在此描述的转基因植物的方法任选地包括从所述转基因植物中收获种子的另外的步骤,其中所述种子包含多核苷酸、表达盒或运载体并产生嵌合杀昆虫蛋白。任选地,所述种子产生另外的转基因植物,所述转基因植物包含多核苷酸、表达盒或运载体并产生嵌合杀昆虫蛋白,从而对至少一种昆虫有害生物具有增加的抗性。

[0314] 本发明进一步提供了通过本发明的方法生产的转基因植物的植物部分、植物细胞、植物器官、植物培养物、种子、植物提取物、收获产物和加工产物。

[0315] 作为另外的方面,本发明还提供了产生种子的方法,所述方法包括:提供包含本发明的多核苷酸、表达盒或运载体的转基因植物,并且收获来自所述转基因植物的种子,其中所述种子包含多核苷酸、表达盒、运载体并产生嵌合杀昆虫蛋白。任选地,所述种子产生另外的转基因植物,所述转基因植物包含多核苷酸、表达盒或运载体并产生嵌合杀昆虫蛋白,从而对至少一种昆虫有害生物具有增加的抗性。在代表性实施例中,提供所述转基因植物的步骤包括种植产生所述转基因植物的种子。

[0316] 本发明进一步提供了产生杂交植物种子的方法,所述方法包括:使第一近交植物(其是包含本发明的多核苷酸、表达盒或运载体并任选地表达本发明的嵌合杀昆虫蛋白的转基因植物)与不同近交植物(例如,不包含本发明的多核苷酸、表达盒或运载体的近交植物)杂交,并且允许形成杂交种子。任选地,所述方法进一步包括收获杂交种子。在实施例中,所述杂交种子包含本发明的多核苷酸、表达盒或运载体,并且在实施例中可进一步包含本发明的嵌合杀昆虫蛋白并任选地对昆虫有害生物具有增加的抗性。在实施例中,所述杂交种子产生转基因植物,所述转基因植物包含本发明的多核苷酸、表达盒或运载体,表达本发明的嵌合杀昆虫蛋白,以及对至少一种昆虫有害生物具有增加的抗性。

[0317] 在一些实施例中,本发明的转基因植物对至少一种鳞翅目昆虫有害生物(如在此描述的)具有抗性。在实施例中,所述转基因植物控制秋黏虫昆虫有害生物或集落,所述秋黏虫昆虫有害生物或集落对Vip3A(例如,Vip3Aa蛋白,例如,如在玉蜀黍事件MIR162中表达的)和/或Cry1F蛋白(例如,Cry1Fa蛋白,例如,如在玉蜀黍事件TC1507中表达的)具有抗性。

[0318] 在另外的实施例中,控制至少一种昆虫有害生物(例如,至少一种鳞翅目昆虫有害生物,如秋黏虫)的方法包括提供本发明的嵌合杀昆虫蛋白。在实施例中,所述方法包括向昆虫有害生物或其环境递送(例如,经口递送)有效量的本发明的嵌合杀昆虫蛋白。通常,为了有效,所述多肽被昆虫经口摄取。然而,所述嵌合杀昆虫蛋白可以按许多公认的方式被递送至昆虫。用于将蛋白质经口递送至昆虫的方式包括但不限于将该蛋白质提供于(1)转基因植物中,其中该昆虫取食(摄取)该转基因植物的一个或多个部分,由此摄取在该转基因植物中表达的多肽;(2)一种或多种配制的蛋白质组合物中,它们可以被施用至或掺入例如昆虫生长介质中;(3)一种或多种蛋白质组合物中,它们可以被施用至表面,例如喷雾在植物部分的表面,然后当该昆虫取食喷雾的一个或多个植物部分时组合物被该昆虫摄取;(4)饵基;或(5)任何其他本领域公认的蛋白质递送系统。因此,可以使用经口递送至昆虫的任何方法来递送本发明的毒性蛋白。在一些特定实施例中,将本发明的嵌合杀昆虫蛋白经口递送至昆虫,其中所述昆虫摄取本发明的转基因植物的一个或多个部分。

[0319] 在其他实施例中,将本发明的杀昆虫蛋白经口递送至昆虫,其中所述昆虫摄取用包含本发明的杀昆虫蛋白的组合物喷雾的植物的一个或多个部分。可以使用本领域技术人员已知的用于将化合物、组合物、配制品等应用于植物表面的任何方法将本发明的组合物递送至植物表面。递送至或接触植物或其部分的一些非限制性实例包括喷雾、撒粉、喷洒、分散、下雾、雾化、撒播、浸泡、土壤注入、土壤掺入、浸透(例如,根、土壤处理)、浸渍、灌注、涂覆、叶或茎渗透、侧施或种子处理等及其组合。用于使植物或其部分与一种或多种化合物、一种或多种组合物或一种或多种配制品接触的这些和其他程序是本领域技术人员熟知的。

[0320] 在另外的实施例中,本发明提供了控制鳞翅目昆虫有害生物的方法,所述鳞翅目昆虫有害生物对Vip3A蛋白(例如,Vip3Aa蛋白,例如,如在玉蜀黍事件MIR162中表达的)和/或Cry1F蛋白(例如,Cry1Fa蛋白,例如,如在玉蜀黍事件TC1507中表达的)具有抗性,所述方法包括向鳞翅目昆虫或其环境递送有效量的本发明的嵌合杀昆虫蛋白或组合物。在代表性实施例中,所述抗性昆虫有害生物是抗性秋黏虫昆虫有害生物或集落。

[0321] 在其他实施例中,本发明提供了预防对在转基因植物中表达的Vip3A(例如,Vip3Aa蛋白,例如,如在玉蜀黍事件MIR162中表达的)和/或Cry1F(例如,Cry1Fa蛋白,例如,如在玉蜀黍事件TC1507中表达的)蛋白的抗性在靶标鳞翅目昆虫有害生物群体中发展的方法,所述方法包括向靶标群体递送转基因植物,所述转基因植物包含多核苷酸,所述多核苷酸包含编码Vip3A蛋白的核苷酸序列和/或编码Cry1F蛋白的核苷酸序列;以及表达本发明的嵌合杀昆虫蛋白的本发明的多核苷酸、表达盒或运载体。在一些实施例中,所述靶标鳞翅目昆虫有害生物是秋黏虫。根据前述实施例,所述转基因植物可包含两种或更多种杀昆虫性状的育种叠加,两种或更多种杀昆虫性状的分子堆叠,或两者的组合。

[0322] 在一些实施例中,本发明涵盖为农民提供控制昆虫有害生物(例如,鳞翅目有害生物,如秋黏虫)的手段的方法,所述方法包括向农民供应或出售植物材料如种子,所述植物材料包含能够表达本发明的嵌合杀昆虫蛋白的多核苷酸、表达盒、运载体。在实施例中,所述植物材料包含本发明的嵌合杀昆虫蛋白,并且任选地对至少一种昆虫有害生物具有增加的抗性。在实施例中,所述植物材料是种子,并且从所述种子生长的植物包含本发明的多核苷酸、表达盒或运载体,表达本发明的嵌合杀昆虫蛋白,以及对至少一种昆虫有害生物具有增加的抗性。

[0323] 除了提供组合物之外,本发明还提供了产生对鳞翅目有害生物有毒的嵌合杀昆虫蛋白的方法。这样一种方法包括在转基因非人类宿主细胞产生对鳞翅目有害生物有毒的嵌合杀昆虫蛋白的条件下培养宿主细胞,所述宿主细胞包含本发明的多核苷酸、表达盒或运载体并表达本发明的嵌合杀昆虫蛋白。在一些实施例中,该转基因非人类宿主细胞是植物细胞。在一些其他实施例中,该植物细胞是玉蜀黍细胞。在其他实施例中,植物细胞或玉蜀黍细胞在其下生长的条件包括自然光照。在其他实施例中,该转基因非人类宿主细胞是细菌细胞。在仍其他实施例中,该转基因非人类宿主细胞是酵母细胞。

[0324] 在一些实施例中,本发明的方法提供对至少一种鳞翅目昆虫有害生物的控制,所述鳞翅目昆虫有害生物包括但不限于以下中的一种或多种:玉米螟属物种,如欧洲玉米螟(欧洲玉米蛀虫)和/或亚洲玉米螟(亚洲玉米蛀虫);菜蛾属物种,如小菜蛾(*P. xylostella*, diamondback moth);灰翅夜蛾属物种(*Spodoptera* spp.),如草地贪夜蛾(秋黏虫)、海灰翅

夜蛾 (*S.littoralis*) (埃及棉树叶虫 (Egyptian cotton leafworm))、黄条粘虫 (*S.ornithogalli*, yellowstriped armyworm)、西部黄条粘虫 (*S.praefica*, western yellowstriped armyworm)、南部粘虫 (*S.eridania*, southern armyworm) 和/或甜菜夜蛾 (*S.exigua*, beet armyworm); 地老虎属物种, 如小地老虎 (*A.ipsilon*) (黑色地老虎)、普通地老虎 (*A.segetum*, common cutworm)、泥背地老虎 (*A.gladiaria*, claybacked cutworm) 和/或西部灰地老虎 (*A.orthogonia*, pale western cutworm); 切根虫属物种 (*Striacosta* spp.), 如豆白缘切根虫 (*S.albicosta*) (西部豆切根虫 (western bean cutworm)); 铃夜蛾属物种 (*Helicoverpa* spp.), 如玉米穗虫 (玉米穗蛾)、茶色铃夜蛾 (*H.punctigera*) (原生夜蛾 (native budworm)) 和/或棉铃虫 (棉螟蛉); 实夜蛾属物种 (*Heliothis* spp.), 如烟芽夜蛾 (烟夜蛾); 蔗螟属物种 (*Diatraea* spp.), 如西南玉米螟 (西南玉米蛀虫) 和/或小蔗螟 (甘蔗螟); 粉纹夜蛾属物种 (*Trichoplusia* spp.), 如粉纹夜蛾 (*T.ni*, cabbage looper); 蛀茎夜蛾属物种 (*Sesamia* spp.), 如地中海玉米螟 (*S.nonagroides*, Mediterranean corn borer) 和/或非洲大螟 (粉蛀茎虫); 红铃虫属物种 (*Pectinophora* spp.), 如棉红铃虫 (*P.gossypiella*, pink bollworm); 纹卷蛾属物种 (*Cochylis* spp.), 如向日葵细卷叶蛾 (*C.hospes*, banded sunflower moth); 天蛾属物种 (*Manduca* spp.), 如烟草天蛾 (*M.sexta*, tobacco hornworm) 和/或番茄天蛾 (*M.quinquemaculata*, tomato hornworm); 玉米苗斑螟属物种 (*Elasmopalpus* spp.), 如南美玉米苗斑螟 (*E.Lignosellus*) (小玉米茎蛀虫 (lesser cornstalk borer)); 尺夜蛾属物种 (*Pseudoplusia* spp.), 如大豆尺蠖 (*P.includens*) (大豆夜蛾); 干煞夜蛾属物种 (*Anticarsia* spp.), 如黎豆夜蛾 (绒毛豆毛虫); 绿夜蛾属物种 (*Plathypena* spp), 如苜蓿绿夜蛾 (*P.scabra*, green cloverworm); 马醉木属物种 (*Pieris* spp.), 如大菜粉蝶 (*P.brassicae*) (纹白蝶 (cabbage butterfly)); 夜蛾属物种 (*Papaipema* spp.), 如蛀茎夜蛾 (*P.nebris*, stalk borer); 黏虫属物种 (*Pseudaletia* spp.), 如一星黏虫 (*P.unipuncta*) (普通黏虫); 疆夜蛾属物种 (*Peridroma* spp.), 如杂色地老虎 (*P.saucia*, variegated cutworm); 茄茎麦蛾属物种 (*Keiferia* spp.), 如番茄蠹蛾 (*K.lycopersicella*, tomato pinworm); 菜粉蝶属物种 (*Artogeia* spp.), 如菜粉蝶 (*A.rapae*, imported cabbageworm); 茄麦蛾属物种 (*Phthorimaea* spp.), 如马铃薯麦蛾 (*P.operculella*, potato tuberworm); 裸蚊夜蛾属物种 (*Chrysodeixis* spp.), 如大豆尺蠖 (大豆夜蛾); 脏切叶蛾属物种 (*Feltia* spp.), 如脏切夜蛾 (*F.ducens*, dingy cutworm); 禾草螟属物种 (*Chilo* spp.), 如二化螟 (条纹蛀茎虫); 稻纵卷叶螟属物种 (*Cnaphalocrocis* spp.), 如稻纵卷叶螟 (水稻卷叶螟), 或前述的任何组合。在实施例 1 中, 本发明的方法提供对秋黏虫昆虫有害生物或集落的控制, 所述秋黏虫昆虫有害生物或集落对 Vip3A (例如, Vip3Aa 蛋白, 例如, 如在玉蜀黍事件 MIR162 中表达的) 和/或 Cry1F 蛋白 (例如, Cry1Fa 蛋白, 例如, 如在玉蜀黍事件 TC1507 中表达的) 具有抗性。

[0325] 本发明还提供了本发明的嵌合杀昆虫蛋白、核酸、转基因植物、植物部分、种子和杀昆虫组合物的用途, 例如, 用于控制昆虫有害生物 (如鳞翅目有害生物) (如在此描述的)。

[0326] 在实施例 1 中, 本发明提供了使用本发明的多核苷酸、表达盒、运载体或宿主细胞以产生用于控制昆虫有害生物 (例如鳞翅目昆虫有害生物) 的杀昆虫组合物的方法。

[0327] 在实施例 1 中, 本发明提供了使用本发明的多核苷酸、表达盒或运载体以产生转基因种子的方法, 其中所述转基因种子生长成对昆虫有害生物具有增加的抗性的转基因植



物。

[0328] 作为另一个方面,本发明还考虑了本发明的转基因植物用于产生转基因种子(其任选地是杂交种子)的用途。

[0329] 在实施例中,本发明提供了使用本发明的嵌合杀昆虫蛋白、多核苷酸、表达盒、运载体、转基因植物或杀昆虫组合物以预防对Vip3A蛋白和/或Cry1F蛋白的抗性在靶标鳞翅目昆虫有害生物群体中发展的方法(各自如在此描述的)。

[0330] 本发明的陈述包括但不限于:

[0331] 1. 一种对鳞翅目昆虫有害生物有毒的嵌合杀昆虫蛋白,所述嵌合杀昆虫蛋白在N-末端至C-末端方向上包含:(a) 第一Cry1蛋白的N-末端区域,所述N-末端区域是SEQ ID NO:2的BT-0029蛋白或与其是至少90%同一的氨基酸序列的N-末端区域,所述N-末端区域融合至(b) 不同Cry1蛋白的C-末端区域;其中在所述第一Cry1蛋白和所述不同Cry1蛋白之间的交换位置位于保守区块3之中。

[0332] 2. 根据陈述1所述的嵌合杀昆虫蛋白,其中所述不同Cry1蛋白是Cry1F、Cry1G、Cry1I或Cry1K蛋白。

[0333] 3. 根据陈述1所述的嵌合杀昆虫蛋白,其中所述不同Cry1蛋白是Cry1Fa蛋白。

[0334] 4. 根据陈述1所述的嵌合杀昆虫蛋白,其中所述不同Cry1蛋白是Cry1Ia或Cry1If蛋白。

[0335] 5. 根据陈述1所述的嵌合杀昆虫蛋白,其中所述不同Cry1蛋白是SEQ ID NO:1的BT-0022蛋白。

[0336] 6. 根据陈述1所述的嵌合杀昆虫蛋白,其中所述不同Cry1蛋白的C-末端区域包含氨基酸序列,所述氨基酸序列对应于SEQ ID NO:8的从位置464至602的氨基酸序列或与其是至少80%同一的氨基酸序列。

[0337] 7. 根据陈述1所述的嵌合杀昆虫蛋白,其中所述不同Cry1蛋白的C-末端区域包含氨基酸序列,所述氨基酸序列对应于SEQ ID NO:1的从位置498至636的氨基酸序列或与其是至少80%同一的氨基酸序列。

[0338] 8. 根据陈述1至7中任一项所述的嵌合杀昆虫蛋白,其中所述第一Cry1蛋白的N-末端区域包含氨基酸序列,所述氨基酸序列对应于SEQ ID NO:2的从位置1至458的氨基酸序列或与其是至少90%同一的氨基酸序列。

[0339] 9. 根据陈述1至8中任一项所述的嵌合杀昆虫蛋白,其中所述嵌合杀昆虫蛋白在N-末端进一步包含肽基片段,所述肽基片段在被所述鳞翅目昆虫有害生物摄取后从所述原毒素中切割下来。

[0340] 10. 根据陈述1至9中任一项所述的嵌合杀昆虫蛋白,其中所述嵌合杀昆虫蛋白在C-末端进一步包含来自Cry蛋白的原毒素尾部,所述原毒素尾部在被所述鳞翅目昆虫有害生物摄取后从所述原毒素中切割下来。

[0341] 11. 根据陈述1至10中任一项所述的嵌合杀昆虫蛋白,其中所述嵌合杀昆虫蛋白包含:(a) SEQ ID NO:3的从位置1至597的氨基酸序列或其毒素片段,或者(b) 与(a)的氨基酸序列是至少80%同一的氨基酸序列。

[0342] 12. 根据陈述1至11中任一项所述的嵌合杀昆虫蛋白,其中所述嵌合杀昆虫蛋白包含:(a) SEQ ID NO:3的氨基酸序列或其毒素片段;或者(b) 与(a)的氨基酸序列是至少80%

同一的氨基酸序列。

[0343] 13. 根据陈述1至10中任一项所述的嵌合杀昆虫蛋白,其中所述嵌合杀昆虫蛋白包含:(a) SEQ ID NO:9的从位置1至597的氨基酸序列或其毒素片段;或者(b)与(a)的氨基酸序列是至少80%同一的氨基酸序列。

[0344] 14. 根据陈述1至10或13中任一项所述的嵌合杀昆虫蛋白,其中所述嵌合杀昆虫蛋白包含:(a) SEQ ID NO:9的氨基酸序列或其毒素片段;或者(b)与(a)的氨基酸序列是至少80%同一的氨基酸序列。

[0345] 15. 根据陈述1至14中任一项所述的嵌合杀昆虫蛋白,其中所述嵌合杀昆虫蛋白包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

[0346] 16. 根据陈述1至15中任一项所述的嵌合杀昆虫蛋白,其中所述嵌合杀昆虫蛋白针对草地贪夜蛾(秋黏虫)、大豆尺蠖(大豆夜蛾)、小蔗螟(甘蔗螟)、西南玉米螟(西南玉米蛀虫)和小地老虎(黑色地老虎)中的一种或多种具有杀昆虫活性。

[0347] 17. 根据陈述1至16中任一项所述的嵌合杀昆虫蛋白,其中所述嵌合杀昆虫蛋白针对草地贪夜蛾昆虫有害生物或集落具有杀昆虫活性,所述草地贪夜蛾昆虫有害生物或集落对Vip3A蛋白和/或Cry1F蛋白具有抗性。

[0348] 18. 一种多核苷酸,所述多核苷酸包含编码根据陈述1至17中任一项所述的嵌合杀昆虫蛋白的核苷酸序列。

[0349] 19. 根据陈述18所述的多核苷酸,其中所述多核苷酸被密码子优化用于在植物中表达。

[0350] 20. 根据陈述18或陈述19所述的多核苷酸,其中所述多核苷酸包含核苷酸序列,所述核苷酸序列包含:(a) SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:14的核苷酸序列,或其毒素编码片段;(b)与(a)的核苷酸序列基本上同一的核苷酸序列;或者(c)在严格杂交条件下退火至(a)或(b)的核苷酸序列的核苷酸序列;或者(d)由于遗传密码的简并性而不同于(a)、(b)或(c)的核苷酸序列的核苷酸序列。

[0351] 21. 根据陈述18或陈述19所述的多核苷酸,其中所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:14的核苷酸序列。

[0352] 22. 一种核酸分子,所述核酸分子包含根据陈述18至21中任一项所述的与异源启动子可操作地相关联的多核苷酸。

[0353] 23. 根据陈述22所述的核酸分子,其中所述异源启动子是植物可表达型启动子。

[0354] 24. 一种运载体,所述运载体包含根据陈述18至21中任一项所述的多核苷酸或根据陈述22或陈述23所述的核酸分子。

[0355] 25. 一种转基因细胞,所述转基因细胞包含根据陈述18至21中任一项所述的多核苷酸、根据陈述22或陈述23所述的核酸分子、或根据陈述24所述的运载体。

[0356] 26. 根据陈述25所述的转基因细胞,其中所述细胞是转基因细菌细胞。

[0357] 27. 根据陈述25所述的转基因细胞,其中所述细胞是转基因植物细胞。

[0358] 28. 根据陈述27所述的转基因植物细胞,其中所述植物细胞是:(i)单子叶植物细胞,任选地是大麦细胞、玉蜀黍细胞、燕麦细胞、水稻细胞、高粱细胞、甘蔗细胞或小麦细胞;

或者 (ii) 双子叶植物细胞, 任选地是大豆细胞、向日葵细胞、番茄细胞、芸苔属作物细胞、棉花细胞、糖用甜菜细胞或烟草细胞。

[0359] 29. 一种转基因植物, 所述转基因植物包含根据陈述27或陈述28所述的转基因植物细胞。

[0360] 30. 根据陈述29所述的转基因植物, 其中所述植物是: (i) 单子叶植物, 任选地是大麦植物、玉蜀黍植物、燕麦植物、水稻植物、高粱植物、甘蔗植物或小麦植物; 或者 (ii) 双子叶植物, 任选地是大豆植物、向日葵植物、番茄植物、芸苔属作物植物、棉花植物、糖用甜菜植物或烟草植物。

[0361] 31. 根据陈述28或陈述29所述的转基因植物, 其中所述转基因植物包含另外的编码第二昆虫控制剂的核苷酸序列。

[0362] 32. 一种根据陈述29至31中任一项所述的转基因植物的转基因植物部分, 其中所述转基因植物部分包含所述嵌合杀昆虫蛋白。

[0363] 33. 一种根据陈述29至31中任一项所述的转基因植物的转基因种子。

[0364] 34. 一种收获产物, 所述收获产物衍生自根据陈述29至31中任一项所述的转基因植物、根据陈述32所述的转基因植物部分、或根据陈述33所述的转基因种子, 其中所述收获产物包含所述嵌合杀昆虫蛋白。

[0365] 35. 一种衍生自根据陈述34所述的收获产物的加工产物, 其中所述加工产物是面粉、粗粉、油、淀粉、或衍生自前述任一项的产物。

[0366] 36. 一种杀昆虫组合物, 所述杀昆虫组合物包含根据陈述1至17中任一项所述的嵌合杀昆虫蛋白以及农业上可接受的载体。

[0367] 37. 根据陈述36所述的杀昆虫组合物, 其中所述农业上可接受的载体是粉剂、尘剂、丸剂、颗粒剂、喷雾剂、乳剂、胶体或溶液。

[0368] 38. 根据陈述36或陈述37所述的杀昆虫组合物, 其中所述组合物是脱水的、冷冻干燥的、均化的、提取的、过滤的、离心的和/或沉降的组合物和/或是细菌培养浓缩物。

[0369] 39. 根据陈述36至38中任一项所述的杀昆虫组合物, 其中所述组合物包含产生所述嵌合杀昆虫蛋白的转基因细菌细胞。

[0370] 40. 根据陈述36至39中任一项所述的杀昆虫组合物, 其中所述组合物包含按重量计从约1%至约99%的嵌合杀昆虫蛋白。

[0371] 41. 根据陈述36至40中任一项所述的杀昆虫组合物, 其中所述组合物包含第二昆虫控制剂。

[0372] 42. 一种产生对鳞翅目昆虫有害生物具有增加的抗性的转基因植物的方法, 所述方法包括向植物中引入根据陈述18至21中任一项所述的多核苷酸、根据陈述22或陈述23所述的核酸分子、或根据陈述24所述的运载体, 其中所述嵌合杀昆虫蛋白在所述植物中表达, 从而产生对昆虫有害生物具有增加的抗性的转基因植物。

[0373] 43. 根据陈述42所述的方法, 其中所述引入步骤包括: (i) 用所述多核苷酸、核酸分子或运载体转化植物细胞并再生转基因植物; 或者 (ii) 使包含所述多核苷酸、核酸分子或运载体的第一植物与第二植物杂交。

[0374] 44. 根据陈述42或陈述43所述的方法, 其中所述方法进一步包括从所述转基因植物中获得子代植物, 其中所述子代植物包含所述多核苷酸、核酸分子或运载体, 并且对昆虫

有害生物具有增加的抗性。

[0375] 45. 一种产生对鳞翅目昆虫有害生物具有增加的抗性的转基因植物的方法, 所述方法包括: (a) 种植种子, 所述种子包含根据陈述18至21中任一项所述的多核苷酸、根据陈述22或陈述23所述的核酸分子、或根据陈述24所述的运载体; 和 (b) 使来自所述种子的转基因植物生长, 其中所述转基因植物包含所述多核苷酸、核酸分子或运载体并产生所述嵌合杀昆虫蛋白。

[0376] 46. 根据陈述45所述的方法, 其中所述方法进一步包括: (c) 收获来自 (b) 的转基因植物的种子, 其中所述收获种子包含所述嵌合杀昆虫蛋白。

[0377] 47. 一种产生种子的方法, 所述方法包括: (a) 提供转基因植物, 所述转基因植物包含根据陈述18至21中任一项所述的多核苷酸、根据陈述22或陈述23所述的核酸分子、或根据陈述24所述的运载体; 和 (b) 收获来自 (a) 的转基因植物的种子, 其中所述收获种子包含所述嵌合杀昆虫蛋白。

[0378] 48. 一种产生杂交植物种子的方法, 所述方法包括: (a) 使第一近交植物与不同近交植物杂交, 所述第一近交植物是转基因植物, 所述转基因植物包含根据陈述18至21中任一项所述的多核苷酸、根据陈述22或陈述23所述的核酸分子、或根据陈述24所述的运载体; 和 (b) 允许形成杂交种子。

[0379] 49. 一种控制鳞翅目昆虫有害生物的方法, 所述方法包括向所述昆虫有害生物或其环境递送组合物, 所述组合物包含有效量的根据陈述1至17中任一项所述的嵌合杀昆虫蛋白或根据陈述36至41中任一项所述的杀昆虫组合物。

[0380] 50. 一种控制对Vip3A蛋白和/或Cry1F蛋白具有抗性的鳞翅目昆虫有害生物的方法, 所述方法包括向所述抗性鳞翅目昆虫有害生物或其环境递送根据陈述1至17中任一项所述的杀昆虫蛋白或根据陈述36至41中任一项所述的杀昆虫组合物。

[0381] 51. 一种减少对Vip3A蛋白和/或Cry1F蛋白的抗性在靶标鳞翅目昆虫有害生物群体中发展的方法, 所述方法包括向所述靶标群体或其环境递送转基因植物, 所述转基因植物包含: (i) 根据陈述18至21中任一项所述的多核苷酸、根据陈述22或陈述23所述的核酸分子、或根据陈述24所述的运载体; 和 (ii) 包含编码Vip3A蛋白的核苷酸序列和/或编码Cry1F蛋白的核苷酸序列的多核苷酸; 其中所述嵌合杀昆虫蛋白和Vip3A蛋白和/或Cry1F蛋白在所述转基因植物中产生。

[0382] 52. 根据陈述42至51中任一项所述的方法, 其中所述鳞翅目昆虫有害生物包括草地贪夜蛾(秋黏虫)、大豆尺蠖(大豆夜蛾)、小蔗螟(甘蔗螟)、西南玉米螟(西南玉米蛀虫)和小地老虎(黑色地老虎)中的一种或多种。

[0383] 53. 根据陈述42至52中任一项所述的方法, 其中所述鳞翅目昆虫有害生物包括对Vip3A蛋白和/或Cry1F蛋白具有抗性的草地贪夜蛾(秋黏虫)。

[0384] 54. 根据陈述42至53中任一项所述的方法, 其中所述植物是: (i) 单子叶植物, 任选地是大麦植物、玉蜀黍植物、燕麦植物、水稻植物、高粱植物、甘蔗植物或小麦植物; 或者 (ii) 双子叶植物, 任选地是大豆植物、向日葵植物、番茄植物、芸苔属作物植物、棉花植物、糖用甜菜植物或烟草植物。

[0385] 55. 根据陈述42至54中任一项所述的方法, 其中所述植物是玉蜀黍植物。

[0386] 现在将参考以下实例描述本发明。本领域技术人员应理解的是, 这些实例并非将

权利要求书的范围限于本发明,反而旨在成为某些实施例的示例。本发明的其他实施例可以在不偏离本发明的精神和范围的情况下进行实践,其范围是由本披露和所附权利要求书限定的。

[0387] 实例

[0388] 实例1.具有针对秋黏虫的杀昆虫活性的嵌合BT-0029蛋白、Bt29-Bt22的发现

[0389] 来自苏云金芽孢杆菌(Bt)的两种具有鳞翅目活性的蛋白质,BT-0022(SEQ ID NO:1;最近已知的Cry家族成员Cry1If)和BT-0029(SEQ ID NO:2;最近已知的Cry家族成员Cry1Gb),已披露于PCT/US16/038947中。

[0390] 如下表1中所示,用于BT-0022和BT-0029的昆虫谱数据指示BT-0022不具有秋黏虫(FAW草地贪夜蛾)活性,并且BT-0029仅具有弱的FAW活性。其他测试的鳞翅目昆虫有害生物是:欧洲玉米蛀虫(ECB;欧洲玉米螟)、黑色地老虎(BCW;小地老虎)、玉米穗蛾(CEW;玉米穗虫)、甘蔗螟(SCB;小蔗螟)、西南玉米蛀虫(SWCB;西南玉米螟)、西部豆切根虫(WBCW;西部豆夜蛾)、大豆夜蛾(SBL;大豆尺蠖)、绒毛豆毛虫(VBC;黎豆夜蛾)以及烟夜蛾(TBW;烟芽夜蛾)。

[0391] 表1.BT-0022和BT-0029针对各种鳞翅目昆虫的杀昆虫活性。

[0392]

	死亡率%									
	ECB	BCW	FAW	CEW	SCB	SWCB	WBCW	SBL	VBC	TBW
BT-0022	100	100	0	20 (M)	92	100	0	100	0	42 (S)
BT-0029	0	25	25	8	33	17	ND	100	100	ND

[0393] M-中等大小的幼虫

[0394] S-小型幼虫

[0395] ND-未确定

[0396] 使用蛋白质工程方法以试图增强BT-0029的FAW活性。使用BT-0029作为模板,通过来自不同Cry蛋白的结构域III置换BT-0029的结构域III(DIII)来设计六种工程化的蛋白质。表2说明了六种嵌合蛋白及其结构域组成信息。表3提供了全长蛋白的序列信息。

[0397] 表2.通过结构域交换的工程化的BT-0029蛋白

[0398]

名称	结构域I	结构域II	结构域III	原毒素尾部
Bt29-1Ab	BT-0029	BT-0029	Cry1Ab	BT-0029
Bt29-Bt22	BT-0029	BT-0029	BT-0022	BT-0029
Bt29-Bt67	BT-0029	BT-0029	BT-0067	BT-0029
Bt29-Bt51	BT-0029	BT-0029	BT-0051	BT-0029
Bt29-8D	BT-0029	BT-0029	Cry8D	BT-0029
Bt29-3A	BT-0029	BT-0029	Cry3A	BT-0029

[0399] 表3.全长蛋白序列信息。

[0400]

名称	最近的Cry家族成员	序列
BT-0029	Cry1Gb	SEQ ID NO:2

Cry1Ab	不适用	Genbank登录号AAA22330.1
BT-0022	Cry1If	SEQ ID NO:1
Bt-0067	Cry9Eb	W02016/094165
Bt-0051	Cry9Ca	W02016/094159
Cry8D	不适用	Genbank登录号BAF93483.1
Cry3A	不适用	Genbank登录号AAA22336.1
Cry1Ca	不适用	Genbank登录号AF362020.1

[0401] 通过金唯智公司(Genewiz)(南普兰菲尔德,新泽西州)合成编码工程化的蛋白质的cDNA,并将其克隆到含有Cry1Ac启动子但不含终止子的苏云金芽孢杆菌(Bt)表达载体中。通过电穿孔介导的转化方法将质粒DNA引入到Bt菌株AB227中。所有六种工程化的蛋白质都在Bt中作为晶体蛋白产生。从培养物中纯化晶体蛋白,并将晶体蛋白溶解在含有50mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(pH 11.0)、2mM DTT的缓冲液中。然后在昆虫生物测定中评估每种可溶性蛋白质。

[0402] 简言之,通过基于人工饲料的昆虫生物测定检验嵌合蛋白的杀昆虫活性,其中将溶解的晶体蛋白覆盖在人工昆虫饲料的表面,终浓度为2-3.2μg/cm<sup>2</sup>。将用于溶解Bt晶体蛋白的缓冲液(50mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(pH 11.0)、2mM DTT)用作阴性对照。将全长Cry1Fa蛋白(SEQ ID NO:8)用作FAW活性的阳性对照。每种嵌合蛋白一式两份进行测试。在第7天评估昆虫死亡率。

[0403] 结果示出在表4中。当在昆虫生物测定中测试嵌合蛋白时,Bt29-Bt22嵌合体(SEQ ID NO:3)显示出针对FAW的强杀昆虫活性,而另外两种嵌合蛋白(Bt29-Bt67和Bt29-3A)显示出针对有害生物仅有很小的活性。Bt29-1Ab嵌合体未显示任何可检测的FAW活性。

[0404] 对于这一测试,没有产生足够的Bt29-Bt51和Bt29-8D嵌合体的蛋白质来评估杀昆虫活性。

[0405] 表4:针对秋黏虫的杀昆虫活性

[0406]

处理	FAW 死亡率%	处理	FAW 死亡率%
缓冲液(阴性对照)	8	Bt29-Bt67	17
Cry1Fa(全长;阳性对照)	100	Bt29-3A	25
Bt29-Bt22	100	Bt29-3A	33
Bt29-Bt22	83	Bt29-1Ab	0
Bt29-Bt67	8	Bt29-1Ab	0
Bt29-Bt67	17		

[0407] 实例2:嵌合BT-0029蛋白针对各种鳞翅目有害生物的杀昆虫活性

[0408] 使用本领域公认的人工饲料生物测定方法检验实例1中描述的四种嵌合蛋白(Bt29-3A、Bt29-Bt22、Bt29-1Ab和Bt29-Bt67)对下列鳞翅目有害生物的杀昆虫活性:甘蔗螟(SCB;小蔗螟)、西南玉米蛀虫(SWCB;西南玉米螟)、大豆夜蛾(SBL;大豆尺蠖)、玉米穗蛾(CEW;玉米穗虫)、烟夜蛾(TBW;烟芽夜蛾)、黑色地老虎(BCW;小地老虎)以及欧洲玉米蛀虫(ECB;欧洲玉米螟)。

[0409] 如表5中所示,测试的所有四种嵌合蛋白保留了天然BT-0029的强SBL活性。Bt29-Bt22和Bt29-Bt67具有与天然BT-0029相当的弱SCB活性,而Bt29-3A和Bt29-1Ab基本上丧失

了所有SCB活性。与全长BT-0029相比,在Bt29-Bt67中观察到略微增加的SWCB活性。与表1中天然BT-0029的结果相当一致,仅观察到Bt29-3A、Bt29-Bt22和Bt29-Bt67的弱BCW活性,并且嵌合体均不具有CEW、TBW或ECB活性。

[0410] 表5:BT-0029嵌合蛋白针对鳞翅目有害生物的杀昆虫活性

[0411]

处理	死亡率%						
	SCB	SWCB	SBL	CEW	TBW	BCW	ECB
缓冲液(阴性对照)	0	17	0	0	0	8	0
Cry1Fa(全长;阳性对照)	25	42	100	73	100	42	100
Bt29-3A	0	42	100	0	0	8	0
Bt29-3A	8	25	100	0	0	25	0
Bt29-Bt22	50	17	100	0	0	17	0
Bt29-Bt22	33	67	100	0	0	25	0
Bt29-Bt67	25	58	100	0	0	33	0
Bt29-Bt67	42	73	100	0	0	8	0
Bt29-1Ab	8	0	100	0	0	0	0
Bt29-1Ab	0	0	100	0	0	0	0
Bt29-1Fa	100	100	100	0	0	0	75

[0412] 实例3:Bt29-1F具有针对秋黏虫的杀昆虫活性

[0413] 为了检验其他嵌合蛋白,设计并测试了第二组BT-0029嵌合蛋白(表6)。Bt29-1Fa是嵌合蛋白,其中BT-0029的结构域III被Cry1Fa的结构域III置换。Cry1Fa的全长氨基酸序列作为SEQ ID NO:8提供(还参见Genbank登录号AAB00376.1)。Bt29-1Fa嵌合体的氨基酸序列作为SEQ ID NO:9提供,其中所述Cry1Fa序列是氨基酸459至597。

[0414] Bt29-1Ka是嵌合蛋白,其中BT-0029的结构域III被Cry1Ka的结构域III置换。Cry1Ka的全长氨基酸序列作为SEQ ID NO:12提供(还参见Genbank登录号AAB00376.1)。Bt29-1Ka嵌合体的氨基酸序列作为SEQ ID NO:13提供,其中所述Cry1Ka序列是氨基酸459至597。Bt29-1Ka嵌合蛋白的第二个版本(在此指定为Bt29-1Kav2)是通过移动交换接点而制备的,所述交换接点位于从氨基酸598(第一Bt29-1Ka嵌合体的交换)至氨基酸610的结构域III的C-末端的Cry1Ka序列和BT-0029序列之间。Bt29-1Kav2嵌合体的氨基酸序列作为SEQ ID NO:15提供,其中所述Cry1Ka序列是氨基酸459至609。

[0415] Bt29-1Ca是嵌合蛋白,其中Bt-0029的结构域III被Cry1Ca的结构域III置换。Cry1Ca的全长氨基酸序列作为SEQ ID NO:17提供(还参见Genbank登录号AF362020.1)。Bt29-1Ca嵌合体的氨基酸序列作为SEQ ID NO:18提供,其中所述Cry1Ca序列是氨基酸467至617。

[0416] 表6.通过结构域III交换的工程化的BT-0029蛋白

名称	结构域 I	结构域 II	结构域 III	原毒素尾部
Bt29-1Fa	BT-0029	BT-0029	Cry1Fa	BT-0029
Bt29-1Ka	BT-0029	BT-0029	Cry1Ka	BT-0029
Bt29-1Ca	BT-0029	BT-0029	Cry1Ca	BT-0029

[0418] 通过基于人工饲料的昆虫生物测定检验Bt29-1Fa(SEQ ID NO:9)、Bt29-1Ka(SEQ

ID NO:13)、Bt29-1Kav2 (SEQ ID NO:16) 和Bt29-1Ca (SEQ ID NO:18) 嵌合体的杀昆虫活性, 其中将溶解的蛋白质覆盖在人工昆虫饲料的表面上, 终浓度为 $2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。将用于溶解Bt晶体蛋白的缓冲液 (50mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (pH 10.5)、2mM DTT) 用作阴性对照。将全长Cry1Fa蛋白 (SEQ ID NO:8) 用作FAW活性的阳性对照。每种嵌合蛋白一式三份进行测试。在第7天将杀昆虫活性评估为有效死亡率 (具有生长抑制和濒死的幼虫被评分为有效死亡)。

[0419] 如表7所示, 指定为Bt29-1Fa的嵌合蛋白显示出针对FAW的强活性。

[0420] 在这一测试中, 没有产生足够的Bt29-1Ka蛋白以在生物测定中评估。出人意料地, 所述Bt29-1Kav2嵌合体产生蛋白质并且针对秋黏虫具有活性 (参见表7)。

[0421] 表7: Bt29-1Fa杂交体针对秋黏虫的杀昆虫活性

处理	FAW 死亡率%
<b>Bt29-1Fa</b>	<b>100</b>
<b>Bt29-1Fa</b>	<b>100</b>
<b>Bt29-1Fa</b>	<b>100</b>
<b>Bt29-1Ca</b>	<b>100</b>
<b>Bt29-1Kav2</b>	<b>75</b>
<b>Cry1Fa (全长; 阳性对照)</b>	<b>100</b>
<b>缓冲液 (阴性对照)</b>	<b>8</b>

[0422] 实例4: Bt29-Bt22和Bt29-1Fa具有针对Cry1F抗性秋黏虫的杀昆虫活性

[0424] 为了确定BT-0029嵌合蛋白对FAW的毒性是否通过不同于Cry1Fa的作用方式 (MOA), 如实例1中所述产生两种嵌合蛋白Bt29-Bt22和Bt29-1Fa, 并且分离并纯化晶体蛋白。将纯化的晶体溶解于缓冲液1 (50mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$  (pH 11)、2mM DTT) 中, 并且使用BioRad Experion系统 (伯乐公司 (BioRad), 赫拉克勒斯, 加利福尼亚州) 监测溶解的蛋白质制剂的纯度。

[0425] 测试纯化的蛋白质针对FAW菌株的功效, 所述FAW菌株对杀昆虫毒素Cry1Fa具有抗性。基本上如实例1中所述, 用各种剂量的每种纯化的毒素 ( $125\text{ng}/\text{cm}^2$ 、 $500\text{ng}/\text{cm}^2$  和  $2000\text{ng}/\text{cm}^2$ ) 进行饲料覆盖测定。将Vip3A蛋白 (阳性对照) 溶解在PBS中, 并将其他蛋白质溶解于缓冲液1 (50mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$  (pH 11)、2mM DTT) 中。两种阴性对照处理是PBS和缓冲液1。还测试了对Cry1Fa或Vip3A易感的FAW群体 (即, FAW易感菌株)。每种蛋白一式两份进行测试。在第7天将杀昆虫活性评估为有效死亡率 (具有生长抑制和濒死的幼虫计为有效死亡)。

[0426] 如表8所示, 即使在最低浓度下, 易感的FAW幼虫也受Cry1Fa、Vip3A、Bt29-Bt22和Bt29-1Fa控制。相反, 所述Cry1F抗性FAW菌株不受任何剂量的测试的Cry1Fa控制, 这证明所述菌株对该毒素具有抗性 (表9)。出人意料地, 如表9所示, 即使在 $125\text{ng}/\text{cm}^2$ 的极低剂量下, Bt29-Bt22和Bt29-1Fa也能高度有效地控制Cry1F抗性FAW, 这表明这两种嵌合蛋白针对抗性FAW的作用方式不同于Cry1Fa蛋白的作用方式。

[0427] 表8: 不同浓度下Bt29-Bt22和Bt29-1Fa针对易感秋黏虫的杀昆虫活性



处理	剂量 (ng/cm <sup>2</sup> )	死亡率%
Vip3Aa	125	100
Vip3Aa	500	100
Vip3Aa	2000	100
Cry1Fa	125	100
Cry1Fa	500	100
Cry1Fa	2000	100
Bt29-Bt22	125	90
Bt29-Bt22	500	96
Bt29-Bt22	2000	100
Bt29-1Fa	125	92
Bt29-1Fa	500	100
Bt29-1Fa	2000	100
缓冲液 1		0
PBS		0

[0429] 表9: Bt29-Bt22和Bt29-1Fa针对Cry1Fa抗性秋黏虫的杀昆虫活性

处理	剂量 (ng/cm <sup>2</sup> )	死亡率%
Vip3Aa	125	100
Vip3Aa	500	100
Vip3Aa	2000	100
Cry1Fa	125	0
Cry1Fa	500	0
Cry1Fa	2000	0
Bt29-Bt22	125	100
Bt29-Bt22	500	100
Bt29-Bt22	2000	100
Bt29-1Fa	125	100
Bt29-1Fa	500	100
Bt29-1Fa	2000	100
缓冲液 1		0
PBS		0

[0431] 实例5: Bt29-Bt22和Bt29-1Fa具有针对Vip3A抗性秋黏虫的杀昆虫活性

[0432] 为了确定BT-0029嵌合蛋白的毒性是否通过不同于Vip3A蛋白的MOA, 如实例1中所述产生Bt29-Bt22和Bt29-1Fa蛋白, 并且分离并纯化晶体蛋白。将纯化的晶体溶解于缓冲液1 (50mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> (pH 11)、2mM DTT) 中, 并且使用Bio-Rad Experion系统(伯乐公司(BioRad), 赫拉克勒斯, 加利福尼亚州) 监测溶解的蛋白质制剂的纯度。

[0433] 测试纯化的蛋白质针对FAW菌株的功效, 所述FAW菌株对杀昆虫毒素Vip3A具有抗性。基本上如实例1中所述, 用各种剂量的每种纯化的毒素 (125ng/cm<sup>2</sup>、500ng/cm<sup>2</sup>和2000ng/cm<sup>2</sup>) 进行饲料覆盖测定。将Vip3A蛋白溶解在PBS中, 并将其他蛋白质溶解于缓冲液1 (50mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> (pH 11)、2mM DTT) 中。两种阴性对照处理是PBS和缓冲液1。将Cry1Fa蛋白用

作Vip3A抗性FAW菌株的阳性对照。每种蛋白一式两份进行测试。在第7天将杀昆虫活性评估为有效死亡率(具有生长抑制和濒死的幼虫被评分为有效死亡)。

[0434] 所述Vip3A抗性FAW菌株不受任何剂量的测试的Vip3A控制,这证明所述菌株对该毒素具有抗性(表10)。相比之下,Bt29-Bt22和Bt29-1Fa二者均表现出针对Vip3A抗性FAW的高度功效,这表明这两种嵌合蛋白对抗性FAW的作用方式不同于Vip3A蛋白的作用方式。

[0435] 表10:Bt29-Bt22和Bt29-1Fa针对Vip3A抗性秋黏虫的杀昆虫活性

处理	剂量 (ng/cm <sup>2</sup> )	死亡率%
Vip3Aa	125	0
Vip3Aa	500	0
Vip3Aa	2000	0
Cry1Fa	125	100
Cry1Fa	500	100
Cry1Fa	2000	100
Bt29-Bt22	125	100
Bt29-Bt22	500	100
Bt29-Bt22	2000	100
Bt29-1Fa	125	100
Bt29-1Fa	500	100
Bt29-1Fa	2000	100
缓冲液 1		0
PBS		0

[0437] 实例6. 在原毒素尾部区域的截短

[0438] 熟知的是,在N-末端和C-末端加工Bt Cry蛋白的原毒素形式以产生成熟的毒素。如图3所示制备包含BT-0029原毒素尾部区域的Bt29-Bt22(SEQ ID NO:3)嵌合体的六个C-末端截短形式。在所有截短的版本中,在此指定为Bt29-Bt22Tr1(SEQ ID NO:20)、Bt29-Bt22Tr2(SEQ ID NO:21)、Bt29-Bt22Tr3(SEQ ID NO:22)、Bt29-Bt22Tr4(SEQ ID NO:23)、Bt29-Bt22Tr5(SEQ ID NO:24)、Bt29-Bt22Tr6(SEQ ID NO:25),保留了BT-0022的结构域III(以PVTA结尾)和BT-0029原毒素尾部(TFEAEY)的至少前6个氨基酸。本领域技术人员将理解,对于在此描述的BT-0029或嵌合体,尚未精确描绘结构域III的末端和原毒素尾部的起点。图1A和1B中所示的核心结构域III基于与其他Cry蛋白的比对,其中已描绘了结构域III区域。

[0439] 当作为大肠杆菌裂解物测试时,Bt29-Bt22Tr1、Bt29-Bt22Tr2、Bt29-Bt22Tr4和Bt29-Bt22Tr5截短形式均显示在昆虫生物测定中评估为生长抑制(非死亡率)的FAW活性。Bt29-Bt22Tr1和Bt29-Bt22Tr4形式是最有希望的,这证明在该测定中具有最高活性(分别为67%和75%生长抑制)。

[0440] 制备第二Bt29-Bt22全长嵌合体,其中所述原毒素尾部区域来自BT-0022(Cry1I)而不是BT-0029(Cry1G)。制备这种全长嵌合体的六个C-末端截短形式(在此呈现为SEQ ID No:26-31),并针对秋黏虫和大豆夜蛾进行测试。将Cry1Fa用作阳性对照。结果示出在表11中。

[0441] 表11. 具有截短的BT-0022原毒素尾部的Bt29-Bt22针对秋黏虫和大豆夜蛾的杀昆虫活性。

嵌合体	SEQ ID NO:	有效死亡率 (%)	
		FAW	SBL
<b>BT29BT22-TL22v1</b>	<b>26</b>	<b>75</b>	<b>100</b>
<b>BT29BT22-TL22v2</b>	<b>27</b>	<b>63</b>	<b>100</b>
<b>BT29BT22-TL22v3</b>	<b>28</b>	<b>50</b>	<b>100</b>
<b>BT29BT22-TL22v4</b>	<b>29</b>	<b>58</b>	<b>100</b>
<b>BT29BT22-TL22v5</b>	<b>30</b>	<b>54</b>	<b>100</b>
<b>BT29BT22-TL22v6</b>	<b>31</b>	<b>83</b>	<b>100</b>
<b>缓冲液</b>	<b>NA</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Cry1Fa</b>	<b>8</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

[0443] 在大肠杆菌表达系统中产生Bt29-1Fa (SEQ ID NO:9) 的四个截短形式,其包含BT-0029原毒素尾部区域,在此呈现为Bt29-1FaTr1 (SEQ ID NO:32)、Bt29-1FaTr2 (SEQ ID NO:33)、Bt29-1FaTr3 (SEQ ID NO:34) 和Bt29-1FaTr4 (SEQ ID NO:35),并针对秋黏虫测试裂解物。结果示出在表12中。

[0444] 表12. 截短的Bt29-1Fa嵌合蛋白的杀昆虫活性。

[0445]

嵌合蛋白	SEQ ID NO:	FAW死亡率%
Bt29-1FaTr1	32	17
Bt29-1FaTr2	33	8
Bt29-1FaTr3	34	42
Bt29-1FaTr4	35	58
Cry11Fa	8	100
缓冲液	NA	0
pET29	NA	0

[0446] 实例7. 嵌合Bt29-Bt22和Bt29-Cry1Fa蛋白在玉蜀黍植物中的表达及活性

[0447] 在植物中表达之前,在自动化基因合成平台(金斯瑞公司(Genscript, Inc.), 皮斯卡塔韦, 新泽西州)上合成包含编码Bt29-Bt22和Bt29-1Fa嵌合体的核苷酸序列的合成多核苷酸。针对这个实例,制备包含可操作地连接至Bt29-Bt22或Bt29-1Fa嵌合编码序列(所述嵌合编码序列可操作地连接至玉蜀黍泛素终止子)的玉蜀黍泛素启动子(Ubi1)的第一和第二表达盒,并且制备包含可操作地连接至磷酸甘露糖异构酶(PMI)编码序列(所述编码序列可操作地连接至Ubi终止子)的Ubi1启动子的第三表达盒。PMI的表达允许在甘露糖上正向选择转基因植物。对于植物转化,将第一和第三表达盒以及第二和第三表达盒克隆到适合的运载体中用于农杆菌介导的玉蜀黍转化。

[0448] 未成熟的玉蜀黍胚的转化基本上如在以下文献中描述的来进行:Negrotto等人, 2000, Plant Cell Reports [植物细胞报告] 19:798-803。简言之,使包含表达Bt29-Bt22或Bt29-Cry1Fa的表达运载体的农杆菌菌株LBA4404 (pSB1) 在28°C下在YEP (酵母提取物 (5g/L)、蛋白胨 (10g/L)、NaCl (5g/L)、15g/1琼脂, pH 6.8) 固体培养基上生长2-4天。将大约0.8X

$10^9$ 个农杆菌细胞悬浮于补充有 $100\mu\text{M}$  As的LS-inf培养基中。在这个培养基中对细菌预诱导大约30-60分钟。

[0449] 将来自近交玉蜀黍系的未成熟胚从8-12天龄的穗中切除到液体LS-inf+ $100\mu\text{M}$  As中。用新鲜的感染培养基漂洗这些胚。然后添加农杆菌溶液,并且将这些胚涡旋30秒并且允许其与细菌一起沉降5分钟。然后将这些胚盾片向上地转移到LSA培养基中,并且在暗处培养两到三天。随后,将每皮氏板 (petri plate) 大约20与25个之间的胚转移至补充有头孢噻肟 ( $250\text{mg}/1$ ) 和硝酸银 ( $1.6\text{mg}/1$ ) 的LSDc培养基中,并且在大约 $28^\circ\text{C}$ 下在黑暗中培养10天。

[0450] 将产生胚性愈伤组织的未成熟胚转移至LSD1M0.5S培养基中。在这种培养基上对培养物进行持续大约6周的选择,在约3周时进行传代培养步骤。将存活的愈伤组织转移至补充有甘露糖的Reg1培养基中。之后在光照中(16小时光照/8小时黑暗方案)培养之后,将绿色组织转移至没有生长调节剂的Reg2培养基,孵育大约1至2周。将这些小植株转移至含有Reg3培养基的Magenta GA-7盒(马真塔公司(Magenta Corp),芝加哥,伊利诺伊州)中并使其在光照中生长。约2-3周之后,通过PCR测试植物中PMI基因和嵌合Bt cry基因的存在。将来自PCR测定的阳性植物转移至温室用于进一步评估。

[0451] 在叶切除生物测定中,针对拷贝数(通过Taqman分析确定)、蛋白质表达水平(通过ELISA确定)和针对感兴趣的昆虫物种的功效对转基因植物进行评估。确切地说,从单拷贝事件(V3-V4阶段)中切取植物组织(叶或花丝)并且用靶标有害生物的新生幼虫侵染,然后在室温下孵育5天。针对秋黏虫(草地贪夜蛾,FAW)测试来自表达每种嵌合Bt蛋白的转基因植物的叶圆片。

[0452] 结果证实这些转基因植物表达本发明的嵌合蛋白并且针对昆虫有害生物具有活性。Bt29-Bt22嵌合体在转基因事件中的蛋白质表达范围为约 $25-125\text{ng}/\text{mg}$ 总可溶性蛋白质(TSP),以及Bt29-1Fa嵌合体在转基因事件中的蛋白质表达范围为约 $25-290\text{ng}/\text{mg}$  TSP。分别表达Bt29-Bt22和Bt29-1Fa嵌合体的转基因事件中的约90%和92%对秋黏虫产生100%的死亡率和幼虫生长抑制。

[0453] 以上实例清楚地说明本发明的优点。虽然已经参考某些实施例的具体细节描述本发明,但不希望此类细节被视为对要求保护的本发明范围的限制,除非它们被包括在所附权利要求书中或到它们被包括在所附权利要求书中的程度。

## 序列表

<110> Syngenta Participations AG

Chae, Hyunsook Sarah

<120> 工程化的杀有害生物蛋白和控制植物有害生物的方法

<130> 81090-W0-REG-ORG-P-1

<150> US 62/432,909

<151> 2016-12-12

<160> 35

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 715

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 组装自芽孢杆菌基因组挖掘的BT-0022序列

<400> 1

```

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

```

Leu Pro Ile Tyr Ala Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Leu Leu Leu Arg  
 180 185 190  
 Asp Ala Ser Ile Phe Gly Lys Glu Trp Gly Leu Ser Asp Ser Glu Ile  
 195 200 205  
 Ser Thr Phe Tyr Asn Arg Gln Val Glu Arg Thr Ser Asp Tyr Ser Asp  
 210 215 220  
 His Cys Thr Lys Trp Phe Asp Thr Gly Leu Asn Arg Leu Lys Gly Ser  
 225 230 235 240  
 Asn Ala Glu Ile Trp Val Lys Tyr Asn Gln Phe Arg Arg Asp Met Thr  
 245 250 255  
 Leu Met Val Leu Asp Leu Val Ala Leu Phe Gln Ser Tyr Asp Thr His  
 260 265 270  
 Met Tyr Pro Ile Lys Thr Thr Ala Gln Leu Thr Arg Glu Val Tyr Thr  
 275 280 285  
 Asn Ala Ile Gly Thr Val His Pro His Pro Ser Phe Thr Ser Thr Thr  
 290 295 300  
 Trp Tyr Asn Asn Asn Ala Pro Ser Phe Ser Ala Ile Glu Ala Ala Val  
 305 310 315 320  
 Ile Arg Ser Pro His Leu Leu Asp Phe Leu Glu Gln Val Thr Ile Tyr  
 325 330 335  
 Ser Leu Leu Ser Arg Trp Ser Asn Thr Gln Tyr Met Asn Met Trp Gly  
 340 345 350  
 Gly His Lys Leu Glu Phe Arg Thr Ile Gly Gly Thr Leu Asn Thr Ser  
 355 360 365  
 Thr Gln Gly Ser Thr Asn Thr Ser Ile Asn Pro Val Thr Leu Pro Phe  
 370 375 380  
 Thr Ser Arg Asp Ile Tyr Arg Thr Glu Ser Leu Ala Gly Leu Asn Leu  
 385 390 395 400  
 Phe Leu Thr Gln Pro Val Asn Gly Val Pro Arg Val Asp Phe His Trp  
 405 410 415  
 Lys Phe Val Thr His Pro Ile Ala Ser Asp Asn Phe Tyr Tyr Pro Gly  
 420 425 430  
 Tyr Ala Gly Ile Gly Thr Gln Leu Gln Asp Ser Glu Asn Glu Leu Pro  
 435 440 445  
 Pro Glu Thr Thr Gly Gln Pro Asn Tyr Glu Ser Tyr Ser His Arg Leu  
 450 455 460  
 Ser His Ile Gly Leu Ile Ser Ala Ser His Val Lys Ala Leu Val Tyr  
 465 470 475 480  
 Ser Trp Thr His Arg Ser Ala Asp Arg Thr Asn Thr Ile His Ser Asp

	485	490	495
Ser Ile Thr Gln Ile Pro Leu Val Lys Ala His Thr Leu Gln Ser Gly			
	500	505	510
Thr Thr Val Val Lys Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu Arg			
	515	520	525
Arg Thr Ser Gly Gly Pro Phe Ala Phe Ser Asn Val Asn Leu Asp Trp			
	530	535	540
Asn Leu Ser Gln Arg Tyr Arg Ala Arg Ile Arg Tyr Ala Ser Thr Thr			
545	550	555	560
Asn Leu Arg Met Tyr Val Thr Ile Ala Gly Glu Arg Ile Phe Ala Gly			
	565	570	575
Gln Phe Asn Lys Thr Met Asn Thr Gly Asp Pro Leu Thr Phe Gln Ser			
	580	585	590
Phe Ser Tyr Ala Thr Ile Asp Thr Ala Phe Thr Phe Pro Thr Lys Ala			
	595	600	605
Ser Ser Leu Thr Val Gly Ala Asp Thr Phe Ser Ser Gly Asn Glu Val			
	610	615	620
Tyr Val Asp Arg Phe Glu Leu Ile Pro Val Thr Ala Thr Leu Glu Ala			
625	630	635	640
Val Thr Asp Leu Glu Arg Ala Gln Lys Ala Val His Glu Leu Phe Thr			
	645	650	655
Ser Thr Asn Pro Gly Gly Leu Lys Thr Asp Val Ala Lys Asp His Tyr			
	660	665	670
Thr Asn Thr Ile Ser Lys Ser Val Gln Ser Val Phe Arg Cys Arg Cys			
	675	680	685
Ser Glu Arg Thr Arg Ile Tyr Arg Trp Gly Tyr Pro Ser Lys Lys Glu			
	690	695	700
Tyr Trp Tyr Ile Trp Gly Tyr Thr Ser Lys Tyr			
705	710	715	
<210> 2			
<211> 1169			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 组装自芽孢杆菌基因组挖掘的BT-0029序列			
<400> 2			
Met Glu Ile Asn Asn Gln Asn Gln Cys Val Pro Tyr Asn Cys Leu Asn			
1	5	10	15
Asn Pro Glu Ser Glu Ile Leu Asn Val Ala Ile Phe Ser Ser Glu Gln			

20	25	30
Val Ala Glu Ile His Leu Lys Ile Thr Arg Leu Ile Leu Glu Asn Phe		
35	40	45
Leu Pro Gly Gly Ser Phe Ala Phe Gly Leu Phe Asp Leu Ile Trp Gly		
50	55	60
Ile Phe Asn Glu Asp Gln Trp Ser Ala Phe Leu Arg Gln Val Glu Glu		
65	70	75
80		
Leu Ile Asn Gln Arg Ile Thr Glu Phe Ala Arg Gly Gln Ala Ile Gln		
	85	90
95		
Arg Leu Val Gly Phe Gly Arg Ser Tyr Asp Glu Tyr Ile Leu Ala Leu		
100	105	110
Lys Glu Trp Glu Asn Asp Pro Asp Asn Pro Ala Ser Lys Glu Arg Val		
115	120	125
Arg Thr Arg Phe Arg Thr Thr Asp Asp Ala Leu Leu Thr Gly Val Pro		
130	135	140
Leu Met Ala Ile Pro Gly Phe Glu Leu Ala Thr Leu Ser Val Tyr Ala		
145	150	155
160		
Gln Ser Ala Asn Leu His Leu Ala Leu Leu Arg Asp Ala Val Phe Phe		
	165	170
175		
Gly Glu Arg Trp Gly Leu Thr Gln Thr Asn Ile Asn Asp Leu Tyr Ser		
180	185	190
Arg Leu Lys Asn Ser Ile Arg Asp Tyr Thr Asn His Cys Val Arg Phe		
195	200	205
Tyr Asn Ile Gly Leu Gly Asn Leu Asn Val Ile Arg Pro Glu Tyr Tyr		
210	215	220
Arg Phe Gln Arg Glu Leu Thr Ile Ser Val Leu Asp Leu Val Ala Leu		
225	230	235
240		
Phe Pro Asn Tyr Asp Ile Arg Thr Tyr Pro Ile Pro Thr Lys Ser Gln		
	245	250
255		
Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Asp Pro Ile Ile Ser Pro Gly Ala Gln		
260	265	270
Ala Gly Tyr Thr Leu Gln Asp Val Leu Arg Glu Pro His Leu Met Asp		
275	280	285
Phe Leu Asn Arg Leu Ile Ile Tyr Thr Gly Glu Tyr Arg Gly Ile Arg		
290	295	300
His Trp Ala Gly His Glu Val Glu Ser Ser Arg Thr Gly Met Met Thr		
305	310	315
320		
Asn Ile Arg Phe Pro Leu Tyr Gly Thr Ala Ala Thr Ala Glu Pro Thr		
	325	330
335		



Arg Phe Ile Thr Pro Ser Thr Phe Pro Gly Leu Asn Leu Phe Tyr Arg  
 340 345 350  
 Thr Leu Ser Ala Pro Ile Phe Arg Asp Glu Pro Gly Ala Asn Ile Ile  
 355 360 365  
 Ile Arg Tyr Arg Thr Ser Leu Val Glu Gly Val Gly Phe Ile Gln Pro  
 370 375 380  
 Asn Asn Gly Glu Gln Leu Tyr Arg Val Arg Gly Thr Leu Asp Ser Leu  
 385 390 395 400  
 Asp Gln Leu Pro Leu Glu Gly Glu Ser Ser Leu Thr Glu Tyr Ser His  
 405 410 415  
 Arg Leu Cys His Val Arg Phe Ala Gln Ser Leu Arg Asn Ala Glu Pro  
 420 425 430  
 Leu Asp Tyr Ala Arg Val Pro Met Phe Ser Trp Thr His Arg Ser Ala  
 435 440 445  
 Thr Pro Thr Asn Thr Ile Asp Pro Asp Val Ile Thr Gln Ile Pro Leu  
 450 455 460  
 Val Lys Ala Phe Asn Leu His Ser Gly Ala Thr Ile Val Lys Gly Pro  
 465 470 475 480  
 Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr Asn Val Gly Ser Phe  
 485 490 495  
 Gly Asp Met Arg Val Asn Ile Thr Ala Pro Leu Ser Gln Arg Tyr Arg  
 500 505 510  
 Val Arg Ile Arg Tyr Ala Ser Thr Thr Asp Leu Gln Phe Tyr Thr Asn  
 515 520 525  
 Ile Asn Gly Thr Thr Ile Asn Ile Gly Asn Phe Ser Ser Thr Met Asp  
 530 535 540  
 Ser Gly Asp Asp Leu Gln Tyr Gly Arg Phe Arg Val Ala Gly Phe Thr  
 545 550 555 560  
 Thr Pro Phe Thr Phe Ser Asp Ala Met Ser Thr Phe Thr Ile Gly Ala  
 565 570 575  
 Phe Ser Phe Ser Ser Asn Asn Glu Val Tyr Ile Asp Arg Ile Glu Phe  
 580 585 590  
 Val Pro Ala Glu Val Thr Phe Glu Ala Glu Tyr Asp Leu Glu Lys Ala  
 595 600 605  
 Gln Lys Ala Val Asn Ala Leu Phe Thr Ser Ser Asn Gln Ile Gly Leu  
 610 615 620  
 Lys Thr Asp Val Thr Asp Tyr His Ile Asp Lys Val Ser Asn Leu Val  
 625 630 635 640  
 Glu Cys Leu Ser Asp Glu Phe Cys Leu Asp Glu Lys Arg Glu Leu Ser

	645	650	655
Glu Lys Val	Lys His Ala Lys Arg Leu	Cys Asp Glu Arg Asn Leu	Leu
	660	665	670
Gln Asp Pro	Asn Phe Arg Gly Ile Asn Arg Gln Pro Asp Arg Gly Trp		
	675	680	685
Arg Gly Ser	Thr Asp Ile Thr Ile Gln Gly Gly Asp Asp Val Phe Lys		
	690	695	700
Glu Asn Tyr	Val Thr Leu Pro Gly Thr Phe Asp Glu Cys Tyr Pro Thr		
705	710	715	720
Tyr Leu Tyr	Gln Lys Ile Asp Glu Ser Lys Leu Lys Ala Tyr Thr Arg		
	725	730	735
Tyr Glu Leu	Arg Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln Asp Leu Glu Ile Tyr		
	740	745	750
Leu Ile Arg	Tyr Asn Ala Lys His Glu Thr Val Asn Val Pro Gly Thr		
	755	760	765
Gly Ser Leu	Trp Pro Leu Ser Ala Gln Ser Pro Ile Gly Lys Cys Gly		
	770	775	780
Glu Pro Asn	Arg Cys Ala Thr His Leu Glu Trp Asn Pro Asp Leu Asp		
785	790	795	800
Cys Ser Cys	Arg Asp Gly Glu Lys Cys Ala His His Ser His His Phe		
	805	810	815
Ser Leu Asp	Ile Asp Val Gly Cys Thr Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly		
	820	825	830
Val Trp Val	Ile Phe Lys Ile Lys Thr Gln Asp Gly His Ala Arg Leu		
	835	840	845
Gly Asn Leu	Glu Phe Leu Glu Glu Lys Pro Leu Val Gly Glu Ala Leu		
	850	855	860
Ala Arg Val	Lys Arg Ala Glu Lys Lys Trp Arg Asp Lys Arg Glu Lys		
865	870	875	880
Leu Glu Leu	Glu Thr Asn Ile Val Tyr Lys Glu Ala Lys Lys Ser Val		
	885	890	895
Asp Ala Leu	Phe Val Asn Ser Gln Tyr Asp Arg Leu Gln Ala Asp Thr		
	900	905	910
Asn Ile Ala	Ile Ile His Ala Ala Asp Lys Arg Val His Ser Ile Arg		
	915	920	925
Glu Ala Tyr	Leu Pro Glu Leu Ser Val Ile Pro Gly Val Asn Ala Ala		
	930	935	940
Ile Phe Glu	Glu Leu Glu Gly Arg Ile Phe Thr Ala Tyr Ser Leu Tyr		
945	950	955	960

Asp Ala Arg Asn Val Ile Lys Asn Gly Asp Phe Asn Asn Gly Leu Ser  
                                   965                                  970                                  975  
 Cys Trp Asn Val Lys Gly His Val Asp Val Glu Glu Gln Asn Asn His  
                                   980                                  985                                  990  
 Arg Ser Val Leu Val Val Pro Glu Trp Glu Ala Glu Val Ser Gln Glu  
                                   995                                  1000                                  1005  
 Val Arg Val Cys Pro Gly Arg Gly Tyr Ile Leu Arg Val Thr Ala  
                                   1010                                  1015                                  1020  
 Tyr Lys Glu Gly Tyr Gly Glu Gly Cys Val Thr Ile His Glu Ile  
                                   1025                                  1030                                  1035  
 Glu Asp Asn Thr Asp Glu Leu Lys Phe Ser Asn Cys Val Glu Glu  
                                   1040                                  1045                                  1050  
 Glu Ile Tyr Pro Asn Asn Thr Val Thr Cys Asn Asp Tyr Thr Ala  
                                   1055                                  1060                                  1065  
 Thr Gln Glu Glu Tyr Glu Gly Thr Tyr Thr Ser Arg Asn Arg Gly  
                                   1070                                  1075                                  1080  
 Tyr Asp Gly Ala Tyr Glu Ser Asn Ser Ser Val Pro Ala Asp Tyr  
                                   1085                                  1090                                  1095  
 Ala Ser Ala Tyr Glu Glu Lys Ala Tyr Thr Asp Gly Arg Arg Asp  
                                   1100                                  1105                                  1110  
 Asn Thr Cys Glu Ser Asn Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Thr Pro Leu  
                                   1115                                  1120                                  1125  
 Pro Ala Gly Tyr Val Thr Lys Glu Leu Glu Tyr Phe Pro Glu Thr  
                                   1130                                  1135                                  1140  
 Asp Lys Val Trp Ile Glu Ile Gly Glu Thr Glu Gly Thr Phe Ile  
                                   1145                                  1150                                  1155  
 Val Asp Ser Val Glu Leu Leu Leu Met Glu Glu  
                                   1160                                  1165  
 <210> 3  
 <211> 1169  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> Bt29-Bt22嵌合蛋白  
 <400> 3  
 Met Glu Ile Asn Asn Gln Asn Gln Cys Val Pro Tyr Asn Cys Leu Asn  
 1                                  5                                  10                                  15  
 Asn Pro Glu Ser Glu Ile Leu Asn Val Ala Ile Phe Ser Ser Glu Gln  
                                   20                                  25                                  30

Val Ala Glu Ile His Leu Lys Ile Thr Arg Leu Ile Leu Glu Asn Phe  
 35 40 45  
 Leu Pro Gly Gly Ser Phe Ala Phe Gly Leu Phe Asp Leu Ile Trp Gly  
 50 55 60  
 Ile Phe Asn Glu Asp Gln Trp Ser Ala Phe Leu Arg Gln Val Glu Glu  
 65 70 75 80  
 Leu Ile Asn Gln Arg Ile Thr Glu Phe Ala Arg Gly Gln Ala Ile Gln  
 85 90 95  
 Arg Leu Val Gly Phe Gly Arg Ser Tyr Asp Glu Tyr Ile Leu Ala Leu  
 100 105 110  
 Lys Glu Trp Glu Asn Asp Pro Asp Asn Pro Ala Ser Lys Glu Arg Val  
 115 120 125  
 Arg Thr Arg Phe Arg Thr Thr Asp Asp Ala Leu Leu Thr Gly Val Pro  
 130 135 140  
 Leu Met Ala Ile Pro Gly Phe Glu Leu Ala Thr Leu Ser Val Tyr Ala  
 145 150 155 160  
 Gln Ser Ala Asn Leu His Leu Ala Leu Leu Arg Asp Ala Val Phe Phe  
 165 170 175  
 Gly Glu Arg Trp Gly Leu Thr Gln Thr Asn Ile Asn Asp Leu Tyr Ser  
 180 185 190  
 Arg Leu Lys Asn Ser Ile Arg Asp Tyr Thr Asn His Cys Val Arg Phe  
 195 200 205  
 Tyr Asn Ile Gly Leu Gly Asn Leu Asn Val Ile Arg Pro Glu Tyr Tyr  
 210 215 220  
 Arg Phe Gln Arg Glu Leu Thr Ile Ser Val Leu Asp Leu Val Ala Leu  
 225 230 235 240  
 Phe Pro Asn Tyr Asp Ile Arg Thr Tyr Pro Ile Pro Thr Lys Ser Gln  
 245 250 255  
 Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Asp Pro Ile Ile Ser Pro Gly Ala Gln  
 260 265 270  
 Ala Gly Tyr Thr Leu Gln Asp Val Leu Arg Glu Pro His Leu Met Asp  
 275 280 285  
 Phe Leu Asn Arg Leu Ile Ile Tyr Thr Gly Glu Tyr Arg Gly Ile Arg  
 290 295 300  
 His Trp Ala Gly His Glu Val Glu Ser Ser Arg Thr Gly Met Met Thr  
 305 310 315 320  
 Asn Ile Arg Phe Pro Leu Tyr Gly Thr Ala Ala Thr Ala Glu Pro Thr  
 325 330 335  
 Arg Phe Ile Thr Pro Ser Thr Phe Pro Gly Leu Asn Leu Phe Tyr Arg

	340		345		350										
Thr	Leu	Ser	Ala	Pro	Ile	Phe	Arg	Asp	Glu	Pro	Gly	Ala	Asn	Ile	Ile
	355		360		365										
Ile	Arg	Tyr	Arg	Thr	Ser	Leu	Val	Glu	Gly	Val	Gly	Phe	Ile	Gln	Pro
	370		375		380										
Asn	Asn	Gly	Glu	Gln	Leu	Tyr	Arg	Val	Arg	Gly	Thr	Leu	Asp	Ser	Leu
385			390		395		400								
Asp	Gln	Leu	Pro	Leu	Glu	Gly	Glu	Ser	Ser	Leu	Thr	Glu	Tyr	Ser	His
	405		410		415										
Arg	Leu	Cys	His	Val	Arg	Phe	Ala	Gln	Ser	Leu	Arg	Asn	Ala	Glu	Pro
	420		425		430										
Leu	Asp	Tyr	Ala	Arg	Val	Pro	Met	Phe	Ser	Trp	Thr	His	Arg	Ser	Ala
	435		440		445										
Thr	Pro	Thr	Asn	Thr	Ile	Asp	Pro	Asp	Val	Ile	Thr	Gln	Ile	Pro	Leu
	450		455		460										
Val	Lys	Ala	His	Thr	Leu	Gln	Ser	Gly	Thr	Thr	Val	Val	Lys	Gly	Pro
465			470		475		480								
Gly	Phe	Thr	Gly	Gly	Asp	Ile	Leu	Arg	Arg	Thr	Ser	Gly	Gly	Pro	Phe
	485		490		495										
Ala	Phe	Ser	Asn	Val	Asn	Leu	Asp	Trp	Asn	Leu	Ser	Gln	Arg	Tyr	Arg
	500		505		510										
Ala	Arg	Ile	Arg	Tyr	Ala	Ser	Thr	Thr	Asn	Leu	Arg	Met	Tyr	Val	Thr
	515		520		525										
Ile	Ala	Gly	Glu	Arg	Ile	Phe	Ala	Gly	Gln	Phe	Asn	Lys	Thr	Met	Asn
	530		535		540										
Thr	Gly	Asp	Pro	Leu	Thr	Phe	Gln	Ser	Phe	Ser	Tyr	Ala	Thr	Ile	Asp
545			550		555		560								
Thr	Ala	Phe	Thr	Phe	Pro	Thr	Lys	Ala	Ser	Ser	Leu	Thr	Val	Gly	Ala
	565		570		575										
Asp	Thr	Phe	Ser	Ser	Gly	Asn	Glu	Val	Tyr	Val	Asp	Arg	Phe	Glu	Leu
	580		585		590										
Ile	Pro	Val	Thr	Ala	Thr	Phe	Glu	Ala	Glu	Tyr	Asp	Leu	Glu	Lys	Ala
	595		600		605										
Gln	Lys	Ala	Val	Asn	Ala	Leu	Phe	Thr	Ser	Ser	Asn	Gln	Ile	Gly	Leu
	610		615		620										
Lys	Thr	Asp	Val	Thr	Asp	Tyr	His	Ile	Asp	Lys	Val	Ser	Asn	Leu	Val
625			630		635		640								
Glu	Cys	Leu	Ser	Asp	Glu	Phe	Cys	Leu	Asp	Glu	Lys	Arg	Glu	Leu	Ser
	645		650		655										

Glu Lys Val Lys His Ala Lys Arg Leu Cys Asp Glu Arg Asn Leu Leu  
 660 665 670  
 Gln Asp Pro Asn Phe Arg Gly Ile Asn Arg Gln Pro Asp Arg Gly Trp  
 675 680 685  
 Arg Gly Ser Thr Asp Ile Thr Ile Gln Gly Gly Asp Asp Val Phe Lys  
 690 695 700  
 Glu Asn Tyr Val Thr Leu Pro Gly Thr Phe Asp Glu Cys Tyr Pro Thr  
 705 710 715 720  
 Tyr Leu Tyr Gln Lys Ile Asp Glu Ser Lys Leu Lys Ala Tyr Thr Arg  
 725 730 735  
 Tyr Glu Leu Arg Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln Asp Leu Glu Ile Tyr  
 740 745 750  
 Leu Ile Arg Tyr Asn Ala Lys His Glu Thr Val Asn Val Pro Gly Thr  
 755 760 765  
 Gly Ser Leu Trp Pro Leu Ser Ala Gln Ser Pro Ile Gly Lys Cys Gly  
 770 775 780  
 Glu Pro Asn Arg Cys Ala Thr His Leu Glu Trp Asn Pro Asp Leu Asp  
 785 790 795 800  
 Cys Ser Cys Arg Asp Gly Glu Lys Cys Ala His His Ser His His Phe  
 805 810 815  
 Ser Leu Asp Ile Asp Val Gly Cys Thr Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly  
 820 825 830  
 Val Trp Val Ile Phe Lys Ile Lys Thr Gln Asp Gly His Ala Arg Leu  
 835 840 845  
 Gly Asn Leu Glu Phe Leu Glu Glu Lys Pro Leu Val Gly Glu Ala Leu  
 850 855 860  
 Ala Arg Val Lys Arg Ala Glu Lys Lys Trp Arg Asp Lys Arg Glu Lys  
 865 870 875 880  
 Leu Glu Leu Glu Thr Asn Ile Val Tyr Lys Glu Ala Lys Lys Ser Val  
 885 890 895  
 Asp Ala Leu Phe Val Asn Ser Gln Tyr Asp Arg Leu Gln Ala Asp Thr  
 900 905 910  
 Asn Ile Ala Ile Ile His Ala Ala Asp Lys Arg Val His Ser Ile Arg  
 915 920 925  
 Glu Ala Tyr Leu Pro Glu Leu Ser Val Ile Pro Gly Val Asn Ala Ala  
 930 935 940  
 Ile Phe Glu Glu Leu Glu Gly Arg Ile Phe Thr Ala Tyr Ser Leu Tyr  
 945 950 955 960  
 Asp Ala Arg Asn Val Ile Lys Asn Gly Asp Phe Asn Asn Gly Leu Ser

	965		970		975
Cys Trp Asn Val Lys Gly His Val Asp Val Glu Glu Gln Asn Asn His					
	980		985		990
Arg Ser Val Leu Val Val Pro Glu Trp Glu Ala Glu Val Ser Gln Glu					
	995		1000		1005
Val Arg Val Cys Pro Gly Arg Gly Tyr Ile Leu Arg Val Thr Ala					
	1010		1015		1020
Tyr Lys Glu Gly Tyr Gly Glu Gly Cys Val Thr Ile His Glu Ile					
	1025		1030		1035
Glu Asp Asn Thr Asp Glu Leu Lys Phe Ser Asn Cys Val Glu Glu					
	1040		1045		1050
Glu Ile Tyr Pro Asn Asn Thr Val Thr Cys Asn Asp Tyr Thr Ala					
	1055		1060		1065
Thr Gln Glu Glu Tyr Glu Gly Thr Tyr Thr Ser Arg Asn Arg Gly					
	1070		1075		1080
Tyr Asp Gly Ala Tyr Glu Ser Asn Ser Ser Val Pro Ala Asp Tyr					
	1085		1090		1095
Ala Ser Ala Tyr Glu Glu Lys Ala Tyr Thr Asp Gly Arg Arg Asp					
	1100		1105		1110
Asn Thr Cys Glu Ser Asn Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Thr Pro Leu					
	1115		1120		1125
Pro Ala Gly Tyr Val Thr Lys Glu Leu Glu Tyr Phe Pro Glu Thr					
	1130		1135		1140
Asp Lys Val Trp Ile Glu Ile Gly Glu Thr Glu Gly Thr Phe Ile					
	1145		1150		1155
Val Asp Ser Val Glu Leu Leu Leu Met Glu Glu					
	1160		1165		

<210> 4

<211> 3510

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Bt29-Bt22嵌合蛋白的编码序列

<400> 4

```

atggagatta ataatcagaa ccaatgtgtc cttataatt gtttgaataa tcctgaaagc 60
gagatattaa acgttgcaat ttttagtagc gaacaggtag cagaaattca cttaaagatc 120
acgcgcttaa ttttagagaa tttttacca ggtgggagtt ttgcattcgg cttatttgat 180
ttaatatggg ggatttttaa tgaagatcaa tggagcgcac ttcttcggca ggtagaagaa 240
ttaattaatc aaaggataac ggaattcgca agagggcaag caattcagag actagtaggg 300

```

ttggaagga gttatgatga atatatttta gcactaaaag aatgggaaaa cgatcctgat 360  
 aaccagctt caaaggaaag agtgcgcact cgatttcgga caactgatga tgccttgcta 420  
 accggtgttc ctcttatggc aattccagggt tttgaattag ctactttatc tgtttatgct 480  
 caatcagcca atctacattt agccctatta agagatgctg tttttttgg ggagagatgg 540  
 ggattgacac aaacaaatat aatgattta tatagtagat taaaaactc cattcgtgat 600  
 tatacaaatc attgtgttcg tttttataat ataggtttag ggaatttaa tgttataaga 660  
 ccagagtatt accgtttcca aagagaatta acaatatctg tcttagatct tntagctctt 720  
 tttccaaatt acgatatccg aacatatcca ataccaacta aaagtcaatt aacaagagaa 780  
 atttatacag atccgattat ttcacctggg gcacaggcag gttatactct tcaagatggt 840  
 ttgagagAAC cacaccttat ggacttttta aaccgactta ttatttatac tggtagatg 900  
 cgcggaattc gtactgggc aggacatgaa gtagaatcta gtagaacagg tatgatgact 960  
 aatataagat ttcttttga tggAACagcc gcaacagcag aaccaacag atttataact 1020  
 cctagtactt ttctgtgtct taatttattt tatagaacat taccagctcc tttttttaga 1080  
 gatgaaccgg gagctaatat tattattaga tatagaacga gtttgggtgga aggagtagga 1140  
 tttattcaac caaataacgg tgaacagctt tacagagtga gaggaacatt agattctctt 1200  
 gatcaattac cacttgaggg tgagagtagt ctaactgaat atagtcatcg attatgcat 1260  
 gttagatttg cgcaatcatt gaggaatgca gaacctttag attatgcaag gtttccgatg 1320  
 ttttcttggA cacatcgtag tgcaaccctt acaatacaa ttgatccaga tgcctacc 1380  
 caaataccgt tagtaaaagc acataccctt cagtcaggtA ctactgttgt aaaagggccA 1440  
 gggtttacag gtggagatat cctccgacga actagtggag gaccatttgc ttttagtaat 1500  
 gttAatttag actggaactt gtcacaaaga tatcgtgcta gaataccta tgcttctact 1560  
 actaatctaa gaatgtactg aacgattgca gggAACgaa tttttgctgg tcaatttaat 1620  
 aaaacaatga atactggtga tccattaaca ttccaattt ttagttacgc aactattgat 1680  
 acagcattta cattccaac gaaagcgagc agcttgactg taggtgctga tacttttagc 1740  
 tcaggtaatg aagtttatgt agatagattt gaattgatcc cagttactgc aacatttgag 1800  
 gcagaatatg atttagagaa agctcagaaa gcggtgaatg cgctgtttac ttcttccaat 1860  
 caaatcgggt taaaaacaga tgtgacggac tatcatattg ataaagtatc caatctagtt 1920  
 gagtgtttat cagatgaatt ttgtctagat gaaaagcgag aattgtccga gaaagtcaaa 1980  
 catgcgaagc gactctgtga tgagcggAat ttacttcaag atccaaactt cagaggcatc 2040  
 aatagacaac cagaccgtgg ttggagagga agtacggata ttaccatcca aggaggagat 2100  
 gacgtattca aagagaatta cgttacgcta ccgggtacct ttgatgagtg ctatccaacg 2160  
 tatttatatc aaaaaataga tgagtcgaaa ttaaaagcct ataccgcta tgaattaaga 2220  
 gggtatatcg aggatagtca agacttagaa atctatttaa ttcgctacaa tgcaaaacat 2280  
 gaaacagtaa atgtgccagg tacgggttcc ttatggccgc tttcagccca aagtccaatc 2340  
 ggaaagtgtg gagaaccgaa tcgatgtgcg acacacctg aatggaatcc tgacttagat 2400  
 tgttcgtgta gggatggaga aaagtgtgcc catcattcgc atcatttctc cttagacatt 2460  
 gatgtaggat gtacagacct aaatgaggac ctaggtgtat gggtagctt taagattaag 2520  
 acgcaagatg gtcatgcgag actaggaAat ctagaatttc tcgaagagaa accattagta 2580  
 ggagaagcgc tagctcgtgt gaagagagcg gAaaaaaat ggagagacaa acgcgaaaaa 2640



ttggaattgg aaacaaatat tgtttataaa gaggcaaaaa aatctgtaga tgctttattt 2700  
 gtgaactctc aatatgatag attacaagcg gatacgaata tcgcgataat tcatgcgga 2760  
 gataaacgcg ttcatagcat tcgagaagca tatcttcag agttgtctgt aattccgggt 2820  
 gtaaatgcag ctatttttga agaattagag ggacgtattt tcacagccta ctctctatat 2880  
 gatgcgagaa atgtcattaa aaatggcgat ttcaataatg gcttatcatg ctggaacgtg 2940  
 aaagggcatg tagatgtaga agaacagaac aaccatcgtt cggtccttgt tgttccagaa 3000  
 tggaagcag aagtgtcaca agaggttcgt gtctgtccag gtcgtggcta tatccttcgt 3060  
 gttacagcgt acaaagaggg atatggagag ggctgtgtaa cgattcatga gatcgaagac 3120  
 aatacagacg aactgaaatt cagcaactgt gtagaagagg aatatatcc aaacaacacg 3180  
 gtaacgtgta atgattatac tgcgactcaa gaagaatag agggtagta cacttctcgt 3240  
 aatcgaggat atgacggagc ctatgaaagc aattcttctg taccagctga ttatgcatca 3300  
 gcctatgaag aaaaagcgta tacagatgga agaagagaca atacttgtga atctaacaga 3360  
 ggatatgggg attacacacc actaccagct ggctatgtga caaagaatt agagtacttc 3420  
 ccagaaaccg ataaggtatg gattgagatt ggagaaacgg aaggaacatt tatcgtggac 3480  
 agcgtggaat tactccttat ggaggaatag 3510

<210> 5

<211> 3510

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Bt29-Bt22嵌合蛋白的玉蜀黍优化的编码序列

<400> 5

atggaaatca acaaccagaa ccagtgcgtg ccgtacaact gcctcaacaa ccccgagtcc 60  
 gagatcctga acgtggccat cttctccagc gagcaggtcg cggagatcca cctcaagatc 120  
 acgcgctga tcctcgagaa cttctgccc ggcggtcctc tcgctttcgg cctgttcgac 180  
 ctcatctggg gcatcttcaa cgaggaccag tggagcgcgt tcctcaggca ggtggaggag 240  
 ctgatcaacc agcgcacac ggagttgcc aggggcccagg ctatccagcg gctggtgggc 300  
 ttcggcaggt cctacgacga atacatcctg gcctcaagg agtgggagaa cgaccccacg 360  
 aacccggcca gcaaggagcg cgtgaggacc cgcttcagga ccaccgacga cgctctcctg 420  
 acggcgctcc ccctcatggc tateccgggc ttgagctgg ccaccctctc ggtgtacgct 480  
 cagtcggcca acctgcacct cgccctcctg cgggacgctg tgttcttcgg cgagaggtgg 540  
 ggctgaccc aaaccaacat caacgacctc tactccaggc tgaagaacag catccgacg 600  
 tacacgaacc actgcgtgcg cttctacaac atcggcctgg gcaacctcaa cgtcatcagg 660  
 ccggaatact accgcttcca gagggagctg accatcagcg tgctggacct cgtcgccctg 720  
 ttcccact acgacatccg cacgtaccg atccccacca agtcccagct cacgaggag 780  
 atctacaccg accgatcat ctgcccggc gccagggccg gctacacct gcaggacgct 840  
 ctgagggagc cccacctgat ggacttctg aacaggctca tcatctacac cggcgagtac 900  
 aggggcatca ggcaactggc gggccacgag gtggagtcca gcaggacggg catgatgacc 960  
 aacatccgct tcccgtctc cggcaccgcg gccacggccg agccaaccg cttcatcac 1020

ccgtccacct tccccggcct gaacctcttc tacaggacce tgtcggctcc catcttccgc 1080  
 gacgagccgg gcgcgaacat catcatccgc tacaggacct ccctcgtgga gggcgtcggc 1140  
 ttcatccagc cgaacaacgg cgagcagctg taccgcgtga ggggcacgct ggacagcctg 1200  
 gaccagctcc cactggaggg cgagtccagc ctaccagagt actcgcacag gctgtgccac 1260  
 gtcaggttcg cccagagcct caggaacgcg gagcccctgg actacgccag ggtgcccatg 1320  
 ttcagctgga cccacaggtc ggctacccc accaacacca tcgaccaga cgtgatcacg 1380  
 cagatcccgc tcgtcaaggc ccacacctg cagtcgggca ccaccgtggt caaggcccc 1440  
 ggcttcacgg gcggcgacat cctgaggagg acctccggcg gccattcgc cttcagcaac 1500  
 gtcaacctcg actggaacct gtcccagcgc tacagggcgc gcatcaggta cgccagcacc 1560  
 acgaacctgc gcatgtatgt gaccatcgcg ggcgagagga tcttcgccgg ccagttcaac 1620  
 aagacgatga acaccggcga cccgctcacc ttccagtect tcagctacgc gacgatcgc 1680  
 accgccttca cgttccccac gaaggctec agctgaccg tgggcgccga caccttctcc 1740  
 agcggcaacg aggtctacgt ggaccgcttc gagctgatec cggtgacggc gaccttcgag 1800  
 gccgagtacg acctggagaa ggcccagaag gcggtcaacg ccctcttcac ctccagcaac 1860  
 cagatcggcc tgaagacgga cgtgaccgac taccacatcg acaaggtgtc caacctcgtc 1920  
 gagtgcctga gcgacgagtt ctgcctcgcg gagaagaggg agctgtccga gaaggtcaag 1980  
 cacgccaagc gcctctgcga cgagaggaac ctctcgcagg acccgaactt caggggcatc 2040  
 aaccgccagc cggacagggg ctggaggggc agcaccgaca tcaccatcca gggcggcgac 2100  
 gacgtgttca aggagaacta cgtcacgctc ccgggcacct tcgacgagtg ctaccccacg 2160  
 tacctgtacc agaagatcga cgagtccaag ctcaaggcct acaccgcta cgagctgagg 2220  
 ggctacatcg aggacagcca ggacctcgag atctacctga tccgctaaa cgcaagcac 2280  
 gagacggtga acgtccccgg cacgggctcc ctgtggcccc tctcggctca gtcgccgatc 2340  
 ggcaagtgcg gcgagcccaa caggtgcgcc acccactcg agtggaaacc ggacctggac 2400  
 tgctcctgcc gggacggcga gaagtgcgct caccactccc accactttag cctggacatc 2460  
 gacgtgggct gcacggacct caacgaggac ctgggcgtgt gggatcatctt caagatcaag 2520  
 acgcaggacg gccacgctag gctgggcaac ctcgagttcc tggaggagaa gccgctggtg 2580  
 ggcgaggctc tggccagggt caagagggcg gagaagaagt ggcgcgaaa gagggagaag 2640  
 ctggagctgg agacgaacat cgtctacaag gaggccaaga agtccgtgga cgcgctcttc 2700  
 gtcaacagcc agtacgacag gctgcaggcg gacaccaaca tcgcatcat ccacgcccg 2760  
 gacaagcgcg tgactccat cagggaggcc tacctcccc agctgagcgt gatccccggc 2820  
 gtcaacgctg ccatcttcga ggagctggag ggccgcatct tcaccgcta ctccctgtac 2880  
 gacgcgagga acgtcatcaa gaacggcgac ttcaacaacg gcctcagctg ctggaacgtg 2940  
 aagggccacg tggacgtcga ggagcagaac aaccaccgct cgggtgctggt ggtccccgag 3000  
 tgggaggctg aggtcagcca ggaggtgcgc gtctgcccgg gcaggggcta catctccgc 3060  
 gtgaccgctg acaaggaggg ctacggcgag ggctgcgtca cgatccacga gatcgaggac 3120  
 aacaccgacg agctgaagtt ctccaactgc gtggaggagg agatctacc gaacaacacg 3180  
 gtcacctgca acgactacac ggccaccag gaggagtac agggcacgta cacgtcgagg 3240  
 aacaggggct acgacggcgc ttacgagtc aacagctcgg tgccggccga ctacgctagc 3300  
 gcgtacgagg agaaggccta cacggacggc cgcagggaca acacctgcga gtcgaacagg 3360

ggctacggcg actacacgcc gctcccggcc ggctacgtga ccaaggagct ggagtacttc 3420  
 ccggagacgg acaaggtctg gatcgagatc ggcgagacgg agggcacctt catcgtggac 3480  
 agcgtcgagc tgctgctcat ggaggagtag 3510  
 <210> 6  
 <211> 3510  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> BT29-BT22嵌合蛋白的玉蜀黍优化的编码序列  
 <400> 6  
 atggaatca acaaccagaa ccagtgcgtg ccgtacaact gccttaacaa ccccgagtcc 60  
 gagatcctga acgtggccat cttctccagc gagcaggtcg cggagatcca cctcaagatc 120  
 acgcgcctga tcctcgagaa cttctgccc ggcggtctct tcgctttcgg cctgttcgac 180  
 ctcatctggg gcattctcaa cgaggaccag tggagcgcgt tcctcaggca ggtggaggag 240  
 ctgatcaacc agcgcacac ggagttcgcc aggggccagg ctatccagcg gctggtgggc 300  
 ttcggcaggt cctacgacga atacatcctg gccctcaagg agtgggagaa cgaccccgac 360  
 aaccggcca gcaaggagcg cgtgaggacc cgcttcagga ccaccgacga cgctctcctg 420  
 acgggcgtcc ccctcatggc tatcccgggc ttcgagctgg ccaccctctc ggtgtacgct 480  
 cagtcggcca acctgcacct cgccctcctg cgggacgctg tgtttctcgg cgagaggtgg 540  
 ggctgacct aaaccaacat caacgacctc tactccaggc tgaagaacag catccgcgac 600  
 tacacgaacc actgctgctg cttctacaac atcggcctgg gcaacctcaa cgtcatcagg 660  
 ccggaatact accgcttcca gagggagctg accatcagcg tgctggacct cgtcgccctg 720  
 ttcccact acgacatccg cacgtaccgg atccccacca agtcccagct cacgaggag 780  
 atctacaccg acccgatcat ctgcccgggc gccaggccg gctacacct gcaggacgtc 840  
 ctgagggagc cccacctgat ggacttctg aacaggtca tcatttacac cggcgagtac 900  
 aggggcatca ggcaactggc gggccacgag gtggagtcca gcaggacggg catgatgacc 960  
 aacatccgct tcccgtctta cggcaccgcg gccacggccg agccaacctg cttcatcacg 1020  
 ccgtccacct tcccggcct gaacctctc tacaggacct tgtcggctcc catcttccgc 1080  
 gacgagccgg gcgcgaacat catcatccgc tacaggacct cctcgtgga gggcgtcggc 1140  
 ttcatccagc cgaacaacgg cgagcagctg taccgctga ggggcacgct ggacagcctg 1200  
 gaccagctcc cactggaggg cgagtccagc ctaccaggt actcgcacag gctgtgccac 1260  
 gtcaggttcg cccagagcct caggaacgcg gageccctgg actacgccag ggtgcccatg 1320  
 ttcagctgga cccacaggtc ggctacccc accaacacca tcgaccaga cgtgatcacg 1380  
 cagatcccgc tcgtcaaggc ccacacctg cagtcgggca ccaccgtggt caaggcccc 1440  
 ggcttcacgg gcggcgacat cctgaggagg acctccggcg gccattcgc cttcagcaac 1500  
 gtcaacctcg actggaacct gtcccagcgc tacagggcgc gcacaggtta cgcagcacc 1560  
 acgaacctgc gcattgatgt gaccatcgcg ggcgagagga tcttcgccgg ccagttcaac 1620  
 aagacgatga acaccggcga cccgctcacc ttccagtctc tcagctacgc gacgatcgc 1680  
 accgccttca cgttccccac gaaggcctcc agcctgaccg tgggcgccga caccttctcc 1740

agcggcaacg aggtctacgt ggaccgcttc gagctgatcc cggtgacggc gaccttcgag 1800  
 gccgagtacg acctggagaa ggcccagaag gcggtcaacg ccctcttcac ctccagcaac 1860  
 cagatcggcc tgaagacgga cgtgaccgac taccacatcg acaaggtgtc caacctcgtc 1920  
 gagtgccctga gcgacgagtt ctgcctcgac gagaagaggg agctgtccga gaaggtcaag 1980  
 cacgccaagc gcctctgcga cgagaggaac ctctgcagg acccgaactt caggggcatc 2040  
 aaccgccagc cggacagggg ctggaggggc agcaccgaca tcaccatcca gggcggcgac 2100  
 gacgtgttca aggagaacta cgtcacgctc ccgggcacct tcgacgagtg ctaccccacg 2160  
 tacctgtacc agaagatcga cgagtccaag ctcaaggcct acaccgcta cgagctgagg 2220  
 ggctacatcg aggacagcca ggacctcgag atctacctga tccgctacaa cgcaagcac 2280  
 gagacggtga acgtccccgg cacgggctcc ctgtggcccc tctcggctca gtcgccgatc 2340  
 ggcaagtgcg gcgagcccaa caggtgcgcc acccactcg agtggaaacc ggacctggac 2400  
 tgctcctgcc gggacggcga gaagtgcgct caccactccc accacttcag cctggacatc 2460  
 gacgtgggct gcacggacct caacgaggac ctgggcgtgt gggtcatctt caagatcaag 2520  
 acgcaggacg gccacgctag gctgggcaac ctcgagtcc tggaggagaa gccgctggtg 2580  
 ggcgaggctc tggccagggt caagagggcg gagaagaagt ggcgcgacaa gagggagaag 2640  
 ctggagctgg agacgaacat cgtctacaag gaggccaaga agtccgtgga cgcgctcttc 2700  
 gtcaacagcc agtacgacag gctgcaggcg gacaccaaca tcgccatcat ccacgcccg 2760  
 gacaagcgcg tgcactccat cagggaggcc tacctcccc agctgagcgt gatccccggc 2820  
 gtcaacgctg ccatcttca ggagctggag ggccgcatct tcaccgcta ctccctgtac 2880  
 gacgcgagga acgtcatcaa gaacggcgac ttcaacaacg gcctcagctg ctggaacgtg 2940  
 aagggccacg tggacgtcga ggagcagaac aaccaccgct cgggtgctggt ggtccccgag 3000  
 tgggaggctg aggtcagcca ggaggtgcgc gtctgccccg gcaggggcta catcctccgc 3060  
 gtgaccgctg acaaggaggg ctacggcgag ggctgcgtca cgatccacga gatcgaggac 3120  
 aacaccgacg agctgaagtt ctccaactgc gtggaggagg agatctacc gaacaacacg 3180  
 gtcacctgca acgactacac ggccaccag gaggagtac agggcacgta cacgtcgagg 3240  
 aacaggggct acgacggcgc ttacgagtcc aacagctcgg tgccggccga ctacgctagc 3300  
 gcgtacgagg agaaggccta cacggacggc cgcagggaca acacctgca gtcgaacagg 3360  
 ggctacggcg actacagcc gctcccggcc ggctacgtga ccaaggagct ggagtacttc 3420  
 ccggagacgg acaaggtctg gatcgagatc ggcgagacgg agggcacctt catcgtggac 3480  
 tcagtgcgac tgctgctcat ggaggagtag 3510  
 <210> 7  
 <211> 3510  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> Bt29-Bt22嵌合蛋白的玉蜀黍优化的编码序列  
 <400> 7  
 atggagatca acaaccagaa ccagtgcgtg ccgtacaact gccttaacaa ccccgagtcc 60  
 gagatcctga acgtggccat cttctccagc gagcaggtcg cggagatcca cctcaagatc 120

acgcgcctga tcctcgagaa cttcctgccg ggcggctcct tcgctttcgg cctgttcgac 180  
 ctcatctggg gcatcttcaa cgaggaccag tggagcgcgt tcctcaggca ggtggaggag 240  
 ctgatcaacc agcgcatac gtagttcgcc aggggccagg ctatccagcg gctggtgggc 300  
 ttccggcagg cctacgacga gtacatcctg gccctcaagg agtgggagaa cgacccccgac 360  
 aacccggcca gcaaggagcg cgtgaggacc cgcttcagga ccaccgacga cgctctcctg 420  
 acgggcgtcc ccctcatggc tatcccgggc ttgagctgg ccaccctctc ggtgtacgct 480  
 cagtcggcca acctgcacct cgccctcctg cgggacgctg tgttcttcgg cgagaggtgg 540  
 ggctgacct agacgaacat caacgacctc tactccaggc tgaagaacag catccgcgac 600  
 tacacgaacc actgcgtgcg cttctacaac atcggcctgg gcaacctcaa cgtcatcagg 660  
 ccggagtact accgcttcca gagggagctg accatcagcg tgctggacct cgtcgccctg 720  
 ttcccact acgacatccg cacgtaccg atcccacca agtcccagct cagcaggagg 780  
 atctacaccg acccgatcat ctgcggggc gccaggccg gctacacct gcaggacgtc 840  
 ctgagggagc cccacctgat ggacttctg aacaggctca tcatctacac cggcgagtac 900  
 aggggcatca ggcaactggc gggccacgag gtggagtcca gcaggacggg catgatgacc 960  
 aacatccgct tcccgtctc cggcaccgcg gccacggccg agccaaccg ctctatcacg 1020  
 ccgtccacct tcccggcct gaacctctc tacaggacc tgtcggctcc catcttccgc 1080  
 gacgagccgg gcgcgaacat catcatccgc tacaggacct cctcgtgga gggcgtcggc 1140  
 ttcatccagc cgaacaacgg cgagcagctg taccgctga gggcacgct ggacagcctg 1200  
 gaccagctcc cactggaggg cgagtccagc ctaccaggt actcgcacag gctgtgccac 1260  
 gtcaggttcg cccagagcct caggaacgcg gagcccctgg actacgccag ggtgccccatg 1320  
 ttcagctgga cccacagtc ggctacccc accaacacca tcgaccaga cgtgatcacg 1380  
 cagatcccgc tcgtcaaggc ccacacctg cagtcggga ccaccgtggt caaggcccc 1440  
 ggcttcacgg gcggcgacat cctgaggagg acctccggcg gccattcgc cttagcaac 1500  
 gtcaacctcg actggaacct gtcccagcgc tacagggcgc gcatcaggta cgcagcacc 1560  
 acgaacctgc gcatgtatgt gaccatcgcg ggcgagagga tcttcgccg ccagttcaac 1620  
 aagacgatga acaccggcga cccgctcacc ttccagtct tcagctacgc gacgatcgac 1680  
 accgccttca cgttccccac gaaggcctc agcctgacc tgggcgccga caccttctc 1740  
 agcggcaacg aggtctacgt ggaccgctc gagctgatcc cggtagcggc gaccttcgag 1800  
 gccgagtacg acctggagaa ggcccagaag gcggtcaac cctcttcac ctccagcaac 1860  
 cagatcggcc tgaagacgga cgtgaccgac taccatcgc acaaggtgtc caacctcgtc 1920  
 gagtgcctga gcgacgagtt ctgcctcgc gagaagagg agctgtccga gaaggtcaag 1980  
 cacgccaagc gcctctgcga cgagaggaa ctctgcagg accgaactt caggggaatc 2040  
 aaccgccagc cggacagggg ctggaggggc agcaccgaca tcaccatcca gggcggcgac 2100  
 gacgtgttca aggagaacta cgtcacgctc ccggcacct tcgacgagtg ctacccccag 2160  
 tacctgtacc agaagatcga cgagtccaag ctcaaggcct acaccgcta cgagctgagg 2220  
 ggatacatcg aggacagcca ggacctcgag atctacctga tccgctaaa cgcgaagcac 2280  
 gagacggtga acgtccccgg cacgggctcc ctgtggcccc tctcggctca gtcgccgatc 2340  
 ggcaagtgcg gcgagcccaa caggtgcgcc acccactcg agtgaacc ggacctggac 2400  
 tgctcctgcc gggacggcga gaagtgcgct caccactccc accactttag cctggacatc 2460

gacgtgggct gcacggacct caacgaggac ctgggcgtgt gggatcatctt caaaatcaag 2520  
 acgcaggacg gccacgctag gctgggcaac ctcgagttcc tggaggagaa gccgctgggtg 2580  
 ggcgaggctc tggccagggt caagagggcg gagaagaagt ggcgcgacaa gagggagaag 2640  
 ctggagctgg agacgaacat cgtctacaag gaggccaaga agtccctgga cgcgctcttc 2700  
 gtcaacagcc agtacgacag gctgcaggcg gacaccaaca tcgcatcat ccacgccgcg 2760  
 gacaagcgcg tgcactccat cagggaggcc tacctccccg agctgagcgt gatccccggc 2820  
 gtcaacgctg ccatcttcga ggagctggag ggccgcatct tcaccgcta ctccctgtac 2880  
 gacgcgagga acgtcatcaa gaacggcgac ttcaacaacg gcctcagctg ctggaacgtg 2940  
 aagggccacg tggacgtcga ggagcagaac aaccaccgct cgggtgctggg ggtccccgag 3000  
 tgggaggctg aggtcagcca ggaggtgctg gtctgcccgg gcaggggata catcctccgc 3060  
 gtgaccgctg acaaggaggg ctacggcgag ggctgcgtca cgatccacga gatcgaggac 3120  
 aacaccgacg agctgaagtt ctccaactgc gtggaggagg agatctacc gaacaacacg 3180  
 gtcacctgca acgactacac ggccaccag gaggagtac agggcacgta cacgtcgagg 3240  
 aacaggggct acgacggcgc ttacgagtc aacagctcgg tgccggccga ctacgctagc 3300  
 gcgtacgagg agaaggccta cacggacggc cgcagggaca acacctgca gtcgaacagg 3360  
 ggctacggcg actacacgcc gctccccgcc ggctacgtga ccaaggagct ggagtacttc 3420  
 ccggagacgg acaaggtctg gatcgagatc ggcgagacgg agggcacctt catcgtggac 3480  
 tcagtcgagc tgctgctcat ggaggagtag 3510

<210> 8

<211> 1174

<212> PRT

<213> 苏云金芽孢杆菌

<400> 8

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

Arg Ile Arg Phe Ala Asn Thr Asp Asp Ala Leu Ile Thr Ala Ile Asn  
 130 135 140  
 Asn Phe Thr Leu Thr Ser Phe Glu Ile Pro Leu Leu Ser Val Tyr Val  
 145 150 155 160  
 Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser Leu Leu Arg Asp Ala Val Ser Phe  
 165 170 175  
 Gly Gln Gly Trp Gly Leu Asp Ile Ala Thr Val Asn Asn His Tyr Asn  
 180 185 190  
 Arg Leu Ile Asn Leu Ile His Arg Tyr Thr Lys His Cys Leu Asp Thr  
 195 200 205  
 Tyr Asn Gln Gly Leu Glu Asn Leu Arg Gly Thr Asn Thr Arg Gln Trp  
 210 215 220  
 Ala Arg Phe Asn Gln Phe Arg Arg Asp Leu Thr Leu Thr Val Leu Asp  
 225 230 235 240  
 Ile Val Ala Leu Phe Pro Asn Tyr Asp Val Arg Thr Tyr Pro Ile Gln  
 245 250 255  
 Thr Ser Ser Gln Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Ser Ser Val Ile Glu  
 260 265 270  
 Asp Ser Pro Val Ser Ala Asn Ile Pro Asn Gly Phe Asn Arg Ala Glu  
 275 280 285  
 Phe Gly Val Arg Pro Pro His Leu Met Asp Phe Met Asn Ser Leu Phe  
 290 295 300  
 Val Thr Ala Glu Thr Val Arg Ser Gln Thr Val Trp Gly Gly His Leu  
 305 310 315 320  
 Val Ser Ser Arg Asn Thr Ala Gly Asn Arg Ile Asn Phe Pro Ser Tyr  
 325 330 335  
 Gly Val Phe Asn Pro Gly Gly Ala Ile Trp Ile Ala Asp Glu Asp Pro  
 340 345 350  
 Arg Pro Phe Tyr Arg Thr Leu Ser Asp Pro Val Phe Val Arg Gly Gly  
 355 360 365  
 Phe Gly Asn Pro His Tyr Val Leu Gly Leu Arg Gly Val Ala Phe Gln  
 370 375 380  
 Gln Thr Gly Thr Asn His Thr Arg Thr Phe Arg Asn Ser Gly Thr Ile  
 385 390 395 400  
 Asp Ser Leu Asp Glu Ile Pro Pro Gln Asp Asn Ser Gly Ala Pro Trp  
 405 410 415  
 Asn Asp Tyr Ser His Val Leu Asn His Val Thr Phe Val Arg Trp Pro  
 420 425 430  
 Gly Glu Ile Ser Gly Ser Asp Ser Trp Arg Ala Pro Met Phe Ser Trp

435	440	445
Thr His Arg Ser Ala Thr Pro Thr Asn Thr Ile Asp Pro Glu Arg Ile		
450	455	460
Thr Gln Ile Pro Leu Val Lys Ala His Thr Leu Gln Ser Gly Thr Thr		
465	470	475
Val Val Arg Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr		
485	490	495
Ser Gly Gly Pro Phe Ala Tyr Thr Ile Val Asn Ile Asn Gly Gln Leu		
500	505	510
Pro Gln Arg Tyr Arg Ala Arg Ile Arg Tyr Ala Ser Thr Thr Asn Leu		
515	520	525
Arg Ile Tyr Val Thr Val Ala Gly Glu Arg Ile Phe Ala Gly Gln Phe		
530	535	540
Asn Lys Thr Met Asp Thr Gly Asp Pro Leu Thr Phe Gln Ser Phe Ser		
545	550	555
Tyr Ala Thr Ile Asn Thr Ala Phe Thr Phe Pro Met Ser Gln Ser Ser		
565	570	575
Phe Thr Val Gly Ala Asp Thr Phe Ser Ser Gly Asn Glu Val Tyr Ile		
580	585	590
Asp Arg Phe Glu Leu Ile Pro Val Thr Ala Thr Phe Glu Ala Glu Tyr		
595	600	605
Asp Leu Glu Arg Ala Gln Lys Ala Val Asn Ala Leu Phe Thr Ser Ile		
610	615	620
Asn Gln Ile Gly Ile Lys Thr Asp Val Thr Asp Tyr His Ile Asp Gln		
625	630	635
Val Ser Asn Leu Val Asp Cys Leu Ser Asp Glu Phe Cys Leu Asp Glu		
645	650	655
Lys Arg Glu Leu Ser Glu Lys Val Lys His Ala Lys Arg Leu Ser Asp		
660	665	670
Glu Arg Asn Leu Leu Gln Asp Pro Asn Phe Lys Gly Ile Asn Arg Gln		
675	680	685
Leu Asp Arg Gly Trp Arg Gly Ser Thr Asp Ile Thr Ile Gln Arg Gly		
690	695	700
Asp Asp Val Phe Lys Glu Asn Tyr Val Thr Leu Pro Gly Thr Phe Asp		
705	710	715
Glu Cys Tyr Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln Lys Ile Asp Glu Ser Lys Leu		
725	730	735
Lys Pro Tyr Thr Arg Tyr Gln Leu Arg Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln		
740	745	750



Asp Leu Glu Ile Tyr Leu Ile Arg Tyr Asn Ala Lys His Glu Thr Val	755	760	765
Asn Val Leu Gly Thr Gly Ser Leu Trp Pro Leu Ser Val Gln Ser Pro	770	775	780
Ile Arg Lys Cys Gly Glu Pro Asn Arg Cys Ala Pro His Leu Glu Trp	785	790	795
Asn Pro Asp Leu Asp Cys Ser Cys Arg Asp Gly Glu Lys Cys Ala His	805	810	815
His Ser His His Phe Ser Leu Asp Ile Asp Val Gly Cys Thr Asp Leu	820	825	830
Asn Glu Asp Leu Asp Val Trp Val Ile Phe Lys Ile Lys Thr Gln Asp	835	840	845
Gly His Ala Arg Leu Gly Asn Leu Glu Phe Leu Glu Glu Lys Pro Leu	850	855	860
Val Gly Glu Ala Leu Ala Arg Val Lys Arg Ala Glu Lys Lys Trp Arg	865	870	875
Asp Lys Arg Glu Lys Leu Glu Leu Glu Thr Asn Ile Val Tyr Lys Glu	885	890	895
Ala Lys Glu Ser Val Asp Ala Leu Phe Val Asn Ser Gln Tyr Asp Gln	900	905	910
Leu Gln Ala Asp Thr Asn Ile Ala Met Ile His Ala Ala Asp Lys Arg	915	920	925
Val His Arg Ile Arg Glu Ala Tyr Leu Pro Glu Leu Ser Val Ile Pro	930	935	940
Gly Val Asn Val Asp Ile Phe Glu Glu Leu Lys Gly Arg Ile Phe Thr	945	950	955
Ala Phe Phe Leu Tyr Asp Ala Arg Asn Val Ile Lys Asn Gly Asp Phe	965	970	975
Asn Asn Gly Leu Ser Cys Trp Asn Val Lys Gly His Val Asp Val Glu	980	985	990
Glu Gln Asn Asn His Arg Ser Val Leu Val Val Pro Glu Trp Glu Ala	995	1000	1005
Glu Val Ser Gln Glu Val Arg Val Cys Pro Gly Arg Gly Tyr Ile	1010	1015	1020
Leu Arg Val Thr Ala Tyr Lys Glu Gly Tyr Gly Glu Gly Cys Val	1025	1030	1035
Thr Ile His Glu Ile Glu Asn Asn Thr Asp Glu Leu Lys Phe Ser	1040	1045	1050
Asn Cys Val Glu Glu Glu Val Tyr Pro Asn Asn Thr Val Thr Cys			



Arg Thr Arg Phe Arg Thr Thr Asp Asp Ala Leu Leu Thr Gly Val Pro  
 130 135 140  
 Leu Met Ala Ile Pro Gly Phe Glu Leu Ala Thr Leu Ser Val Tyr Ala  
 145 150 155 160  
 Gln Ser Ala Asn Leu His Leu Ala Leu Leu Arg Asp Ala Val Phe Phe  
 165 170 175  
 Gly Glu Arg Trp Gly Leu Thr Gln Thr Asn Ile Asn Asp Leu Tyr Ser  
 180 185 190  
 Arg Leu Lys Asn Ser Ile Arg Asp Tyr Thr Asn His Cys Val Arg Phe  
 195 200 205  
 Tyr Asn Ile Gly Leu Gly Asn Leu Asn Val Ile Arg Pro Glu Tyr Tyr  
 210 215 220  
 Arg Phe Gln Arg Glu Leu Thr Ile Ser Val Leu Asp Leu Val Ala Leu  
 225 230 235 240  
 Phe Pro Asn Tyr Asp Ile Arg Thr Tyr Pro Ile Pro Thr Lys Ser Gln  
 245 250 255  
 Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Asp Pro Ile Ile Ser Pro Gly Ala Gln  
 260 265 270  
 Ala Gly Tyr Thr Leu Gln Asp Val Leu Arg Glu Pro His Leu Met Asp  
 275 280 285  
 Phe Leu Asn Arg Leu Ile Ile Tyr Thr Gly Glu Tyr Arg Gly Ile Arg  
 290 295 300  
 His Trp Ala Gly His Glu Val Glu Ser Ser Arg Thr Gly Met Met Thr  
 305 310 315 320  
 Asn Ile Arg Phe Pro Leu Tyr Gly Thr Ala Ala Thr Ala Glu Pro Thr  
 325 330 335  
 Arg Phe Ile Thr Pro Ser Thr Phe Pro Gly Leu Asn Leu Phe Tyr Arg  
 340 345 350  
 Thr Leu Ser Ala Pro Ile Phe Arg Asp Glu Pro Gly Ala Asn Ile Ile  
 355 360 365  
 Ile Arg Tyr Arg Thr Ser Leu Val Glu Gly Val Gly Phe Ile Gln Pro  
 370 375 380  
 Asn Asn Gly Glu Gln Leu Tyr Arg Val Arg Gly Thr Leu Asp Ser Leu  
 385 390 395 400  
 Asp Gln Leu Pro Leu Glu Gly Glu Ser Ser Leu Thr Glu Tyr Ser His  
 405 410 415  
 Arg Leu Cys His Val Arg Phe Ala Gln Ser Leu Arg Asn Ala Glu Pro  
 420 425 430  
 Leu Asp Tyr Ala Arg Val Pro Met Phe Ser Trp Thr His Arg Ser Ala

435	440	445
Thr Pro Thr Asn Thr Ile Asp	Pro Asp Val Ile Thr Gln Ile Pro Leu	
450	455	460
Val Lys Ala His Thr Leu Gln Ser Gly Thr Thr Val Val Arg Gly Pro		
465	470	475
Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr Ser Gly Gly Pro Phe		
485	490	495
Ala Tyr Thr Ile Val Asn Ile Asn Gly Gln Leu Pro Gln Arg Tyr Arg		
500	505	510
Ala Arg Ile Arg Tyr Ala Ser Thr Thr Asn Leu Arg Ile Tyr Val Thr		
515	520	525
Val Ala Gly Glu Arg Ile Phe Ala Gly Gln Phe Asn Lys Thr Met Asp		
530	535	540
Thr Gly Asp Pro Leu Thr Phe Gln Ser Phe Ser Tyr Ala Thr Ile Asn		
545	550	555
Thr Ala Phe Thr Phe Pro Met Ser Gln Ser Ser Phe Thr Val Gly Ala		
565	570	575
Asp Thr Phe Ser Ser Gly Asn Glu Val Tyr Ile Asp Arg Phe Glu Leu		
580	585	590
Ile Pro Val Thr Ala Thr Phe Glu Ala Glu Tyr Asp Leu Glu Lys Ala		
595	600	605
Gln Lys Ala Val Asn Ala Leu Phe Thr Ser Ser Asn Gln Ile Gly Leu		
610	615	620
Lys Thr Asp Val Thr Asp Tyr His Ile Asp Lys Val Ser Asn Leu Val		
625	630	635
Glu Cys Leu Ser Asp Glu Phe Cys Leu Asp Glu Lys Arg Glu Leu Ser		
645	650	655
Glu Lys Val Lys His Ala Lys Arg Leu Cys Asp Glu Arg Asn Leu Leu		
660	665	670
Gln Asp Pro Asn Phe Arg Gly Ile Asn Arg Gln Pro Asp Arg Gly Trp		
675	680	685
Arg Gly Ser Thr Asp Ile Thr Ile Gln Gly Gly Asp Asp Val Phe Lys		
690	695	700
Glu Asn Tyr Val Thr Leu Pro Gly Thr Phe Asp Glu Cys Tyr Pro Thr		
705	710	715
Tyr Leu Tyr Gln Lys Ile Asp Glu Ser Lys Leu Lys Ala Tyr Thr Arg		
725	730	735
Tyr Glu Leu Arg Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln Asp Leu Glu Ile Tyr		
740	745	750

Leu Ile Arg Tyr Asn Ala Lys His Glu Thr Val Asn Val Pro Gly Thr  
 755 760 765  
 Gly Ser Leu Trp Pro Leu Ser Ala Gln Ser Pro Ile Gly Lys Cys Gly  
 770 775 780  
 Glu Pro Asn Arg Cys Ala Thr His Leu Glu Trp Asn Pro Asp Leu Asp  
 785 790 795 800  
 Cys Ser Cys Arg Asp Gly Glu Lys Cys Ala His His Ser His His Phe  
 805 810 815  
 Ser Leu Asp Ile Asp Val Gly Cys Thr Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly  
 820 825 830  
 Val Trp Val Ile Phe Lys Ile Lys Thr Gln Asp Gly His Ala Arg Leu  
 835 840 845  
 Gly Asn Leu Glu Phe Leu Glu Glu Lys Pro Leu Val Gly Glu Ala Leu  
 850 855 860  
 Ala Arg Val Lys Arg Ala Glu Lys Lys Trp Arg Asp Lys Arg Glu Lys  
 865 870 875 880  
 Leu Glu Leu Glu Thr Asn Ile Val Tyr Lys Glu Ala Lys Lys Ser Val  
 885 890 895  
 Asp Ala Leu Phe Val Asn Ser Gln Tyr Asp Arg Leu Gln Ala Asp Thr  
 900 905 910  
 Asn Ile Ala Ile Ile His Ala Ala Asp Lys Arg Val His Ser Ile Arg  
 915 920 925  
 Glu Ala Tyr Leu Pro Glu Leu Ser Val Ile Pro Gly Val Asn Ala Ala  
 930 935 940  
 Ile Phe Glu Glu Leu Glu Gly Arg Ile Phe Thr Ala Tyr Ser Leu Tyr  
 945 950 955 960  
 Asp Ala Arg Asn Val Ile Lys Asn Gly Asp Phe Asn Asn Gly Leu Ser  
 965 970 975  
 Cys Trp Asn Val Lys Gly His Val Asp Val Glu Glu Gln Asn Asn His  
 980 985 990  
 Arg Ser Val Leu Val Val Pro Glu Trp Glu Ala Glu Val Ser Gln Glu  
 995 1000 1005  
 Val Arg Val Cys Pro Gly Arg Gly Tyr Ile Leu Arg Val Thr Ala  
 1010 1015 1020  
 Tyr Lys Glu Gly Tyr Gly Glu Gly Cys Val Thr Ile His Glu Ile  
 1025 1030 1035  
 Glu Asp Asn Thr Asp Glu Leu Lys Phe Ser Asn Cys Val Glu Glu  
 1040 1045 1050  
 Glu Ile Tyr Pro Asn Asn Thr Val Thr Cys Asn Asp Tyr Thr Ala

1055	1060	1065
Thr Gln Glu Glu Tyr Glu Gly Thr Tyr Thr Ser Arg Asn Arg Gly		
1070	1075	1080
Tyr Asp Gly Ala Tyr Glu Ser Asn Ser Ser Val Pro Ala Asp Tyr		
1085	1090	1095
Ala Ser Ala Tyr Glu Glu Lys Ala Tyr Thr Asp Gly Arg Arg Asp		
1100	1105	1110
Asn Thr Cys Glu Ser Asn Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Thr Pro Leu		
1115	1120	1125
Pro Ala Gly Tyr Val Thr Lys Glu Leu Glu Tyr Phe Pro Glu Thr		
1130	1135	1140
Asp Lys Val Trp Ile Glu Ile Gly Glu Thr Glu Gly Thr Phe Ile		
1145	1150	1155
Val Asp Ser Val Glu Leu Leu Leu Met Glu Glu		
1160	1165	
<210> 10		
<211> 3510		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> BT29-Cry1Fa1编码序列		
<400> 10		
atggagatta ataatcagaa ccaatgtgtc cttataatt gtttgaataa tcctgaaagc 60		
gagatattaa acgttgcaat ttttagtagc gaacaggtag cagaaattca cttaaagatc 120		
acgcgcttaa ttttagagaa tttttacca ggtgggagtt ttgcattcgg cttatttgat 180		
ttaatatggg ggatttttaa tgaagatcaa tggagcgcac ttcttcggca ggtagaagaa 240		
ttaattaatc aaaggataac ggaattcgca agagggcaag caattcagag actagtaggg 300		
tttgaagga gttatgatga atatatttta gactaaaag aatgggaaaa cgatcctgat 360		
aaccagctt caaaggaaa agtgcgcact cgatttcgga caactgatga tgccttgcta 420		
accggtgttc ctcttatggc aattccaggt tttgaattag ctactttatc tgtttatgct 480		
caatcagcca atctacattt agccctatta agagatgctg tattttttgg ggagagatgg 540		
ggattgacac aaacaaatat aaatgattta tatagtagat taaaaactc cattcgtgat 600		
tatacaaate attgtgttcg tttttataat ataggtttag ggaatttaa tgttataaga 660		
ccagagtatt accgtttcca aagagaatta acaatatctg tcttagatct ttagatctct 720		
tttccaaatt acgatatccg aacatatcca ataccacta aaagtcaatt aacaagagaa 780		
atttatacag atccgattat ttcacctggt gcacagcgag gttatactct tcaagatggt 840		
ttgagagaac cacaccttat ggacttttta aaccgactta ttatttatac tggtagtat 900		
cgcggaattc gtcactgggc aggacatgaa gtagaatcta gtagaacagg tatgatgact 960		
aatataagat ttcctttgta tggaacagcc gcaacagcag aaccaacag atttataact 1020		

cctagtactt ttcttggctt taatttattt tatagaacat tatcagctcc tattttttaga 1080  
gatgaaccgg gagctaatat tattattaga tatagaacga gtttggtgga aggagtagga 1140  
tttattcaac caaataacgg tgaacagctt tacagagtga gaggaacatt agattctctt 1200  
gatcaattac cacttgaggg tgagagtagt ctaactgaat atagtcatcg attatgccat 1260  
gtagatttg cgcaatcatt gaggaatgca gaacctttag attatgcaag ggttccgatg 1320  
ttttcttggg cacatcgtag tgcaaccctt acaatacaa ttgatccaga tgtcatcacc 1380  
caaataccgt tagtaaaaagc acatacactt cagtcaggtg ctactgttgt aagagggccc 1440  
gggtttacgg gaggagatat tcttcgacga acaagtggag gaccatttgc ttatactatt 1500  
gttaatatata atgggcaatt accccaaagg tatcgtgcaa gaataccta gcctctact 1560  
acaaatctaa gaatttacgt aacggttgca ggtgaacgga tttttgctgg tcaatttaac 1620  
aaaacaatgg ataccgggtg cccattaaca ttccaatctt ttagttacgc aactattaat 1680  
acagctttta cattcccaat gagccagagt agtttcacag taggtgctga tacttttagt 1740  
tcagggaatg aagtttata agacagattt gaattgattc cagttactgc aacatttgag 1800  
gcagaatatg atttagagaa agctcagaaa gcggtgaatg cgctgtttac ttcttccaat 1860  
caaatcgggt taaaaacaga tgtgacggac tatcatattg ataaagtatc caatctagtt 1920  
gagtgtttat cagatgaatt ttgtctagat gaaaagcgag aattgtccga gaaagtcaaa 1980  
catgcgaagc gactctgtga tgagcgggat ttacttcaag atccaaactt cagaggcatc 2040  
aatagacaac cagaccgtgg ttggagagga agtacggata ttaccatcca aggaggagat 2100  
gacgtattca aagagaatta cgttacgcta ccgggtacct ttgatgagtg ctatccaacg 2160  
tatttatatc aaaaaataga tgagtcaaaa ttaaaagcct ataccgcta tgaattaaga 2220  
gggtatatcg aggatagtca agacttagaa atctatthaa ttcgctacaa tgcaaaacat 2280  
gaaacagtaa atgtgccagg tacgggttcc ttatggccgc tttcagccca aagtccaatc 2340  
ggaaagtgtg gagaaccgaa tcgatgtgag acacacctg aatggaatcc tgacttagat 2400  
tgttcgtgta gggatggaga aaagtgtgcc catcattcgc atcatttctc cttagacatt 2460  
gatgtaggat gtacagacct aaatgaggac ctaggtgtat ggggtgatctt taagattaag 2520  
acgcaagatg gtcatgcgag actaggaaat ctagaatttc tcgaagagaa accattagta 2580  
ggagaagcgc tagctcgtgt gaagagagcg gagaaaaaat ggagagacaa acgcaaaaaa 2640  
ttggaattgg aaacaaatat tgtttataaa gaggcaaaaa aatctgtaga tgctttattt 2700  
gtgaactctc aatatgatag attacaagcg gatacgaata tcgagataat tcatgcggca 2760  
gataaacgag ttcatagcat tcgagaagca tatcttcag agttgtctgt aattccgggt 2820  
gtaaatacgag ctatthttga agaattagag ggacgtattt tcacagccta ctctctatat 2880  
gatgcgagaa atgtcattaa aaatggcgat ttcaataatg gcttatcatg ctggaacgtg 2940  
aaagggcatg tagatgtaga agaacagAAC aaccatcgtt cggtccttgt tgttccagaa 3000  
tggaagcag aagtgtcaca agaggttcgt gtctgtccag gtcgtggcta tacccttcgt 3060  
gttacagcgt acaaaagagg atatggagag ggctgtgtaa cgattcatga gatcgaagac 3120  
aatacagacg aactgaaatt cagcaactgt gtagaagagg aatatatcc aaacaacacg 3180  
gtaacgtgta atgattatac tgcgactcaa gaagaatatg aggttacgta cacttctcgt 3240  
aatcgaggat atgacggagc ctatgaaagc aattcttctg taccagctga ttatgcatca 3300  
gcctatgaag aaaaagcgtg tacagatgga agaagagaca atacttgtga atctaacaga 3360

ggatatgggg attacacacc actaccagct ggctatgtga caaagaatt agagtacttc 3420  
 ccagaaaccg ataaggtatg gattgagatt ggagaaacgg aaggaacatt tatcgtggac 3480  
 agcgtggaat tactccttat ggaggaatag 3510

<210> 11

<211> 3510

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> BT29-Cry1Fa1的玉蜀黍优化的编码序列

<400> 11

atggaatca acaaccagaa ccagtgcgtg ccgtacaact gcctcaaca ccccgagtcc 60  
 gagatcctga acgtggccat cttctccagc gagcaggtcg cggagatcca cctcaagatc 120  
 acgcgcctga tcctcgagaa cttctgccc ggcggtctct tcgctttcgg cctgttcgac 180  
 ctcatctggg gcattctcaa cgaggaccag tggagcgcgt tcctcaggca ggtggaggag 240  
 ctgatcaacc agcgcacac ggagttcgcc aggggccagg ctatccagcg gctggtgggc 300  
 ttcggcaggt cctacgacga atacatcctg gccctcaagg agtgggagaa cgaccccgac 360  
 aacccggcca gcaaggagcg cgtgaggacc cgcttcagga ccaccgacga cgctctcctg 420  
 acgggcgtcc ccctcatggc tatcccgggc ttcgagctgg ccaccctctc ggtgtacgct 480  
 cagtcggcca acctgcacct cgccctcctg cgggacgctg tgtttctcgg cgagaggtgg 540  
 ggctgacct aaaccaacat caacgacctc tactccagcg tgaagaacag catccgcgac 600  
 tacacgaacc actgcgtgcg cttctacaac atcggcctgg gcaacctcaa cgtcatcagg 660  
 ccggaatact accgcttcca gagggagctg accatcagcg tgctggacct cgtcgccctg 720  
 ttcccact acgacatccg cacgtaccgg atccccacca agtcccagct cacgaggag 780  
 atctacaccg acccgatcat ctgcccgggc gccaggccg gctacacct gcaggacgtc 840  
 ctgagggagc cccacctgat ggacttctg aacaggtca tcattacac cggcgagtac 900  
 aggggcatca ggcaactggc gggccacgag gtggagtcca gcaggacggg catgatgacc 960  
 aacatccgct tcccgtctca cggcaccgcg gccaggccg agccaacctg cttcatcacg 1020  
 ccgtccacct tcccggcct gaacctctc tacaggacct tgtcggctcc catcttccgc 1080  
 gacgagccgg gcgcgaacat catcatccgc tacaggacct cctcgtgga gggcgtcggc 1140  
 ttcatccagc cgaacaacgg cgagcagctg taccgctga ggggcacgct ggacagcctg 1200  
 gaccagctcc cactggaggg cgagtccagc ctaccaggt actcgcacag gctgtgccac 1260  
 gtcaggttcg cccagagcct caggaacgcg gageccctgg actacgccag ggtgcccatg 1320  
 ttcagctgga cccacaggtc ggctacccc accaacacca tcgaccaga cgtgatcacg 1380  
 cagatcccgc tcgtcaaggc ccacacctg cagtcgggca ccaccgtggt ccgcggccca 1440  
 ggcttcaccg gcggcgacat cctgaggagg acgagcggcg gccccttcgc ttacaccatc 1500  
 gtcaacatca acggccagct gccacagagg tacagggcgc gcacaggtta cgcctccacc 1560  
 acgaacctgc gcattctacgt gaccgtggcg ggcgagagga tcttcgccgg ccagttcaac 1620  
 aagacgatgg acaccggcga cccgctgacc ttccagtctc tcagctacgc gacgatcaac 1680  
 accgccttca cgttcccct gagccagctc agcttcaccg tgggcgccga cacgttctcc 1740



agcggcaacg aggtgtacat cgaccgcttc gagctgatcc cggtgacggc gaccttcgag 1800  
 gccgagtacg acctggagaa ggcccagaag gcggtcaacg ccctcttcac ctccagcaac 1860  
 cagatcggcc tgaagacgga cgtgaccgac taccacatcg acaaggtgtc caacctcgtc 1920  
 gagtgccctga gcgacgagtt ctgcctcgac gagaagaggg agctgtccga gaaggtcaag 1980  
 cacgccaagc gcctctgcga cgagaggaac ctctgcagg acccgaactt caggggcatc 2040  
 aaccgccagc cggacagggg ctggaggggc agcaccgaca tcaccatcca gggcggcgac 2100  
 gacgtgttca aggagaacta cgtcacgctc ccgggcacct tcgacgagtg ctaccccacg 2160  
 tacctgtacc agaagatcga cgagtccaag ctcaaggcct acaccgcta cgagctgagg 2220  
 ggctacatcg aggacagcca ggacctcgag atctacctga tccgctacaa cgcaagcac 2280  
 gagacggtga acgtccccgg cacgggctcc ctgtggcccc tctcggctca gtcgccgatc 2340  
 ggcaagtgcg gcgagcccaa caggtgcgcc acccactcg agtggaaacc ggacctggac 2400  
 tgctcctgcc gggacggcga gaagtgcgct caccactccc accacttcag cctggacatc 2460  
 gacgtgggct gcacggacct caacgaggac ctgggcgtgt gggtcatctt caagatcaag 2520  
 acgcaggacg gccacgctag gctgggcaac ctcgagtcc tggaggagaa gccgctggtg 2580  
 ggcgaggctc tggccagggt caagagggcg gagaagaagt ggcgcgaaa gagggagaag 2640  
 ctggagctgg agacgaacat cgtctacaag gaggccaaga agtccgtgga cgcgctcttc 2700  
 gtcaacagcc agtacgacag gctgcaggcg gacaccaaca tcgccatcat ccacgcccg 2760  
 gacaagcgcg tgcactccat cagggaggcc tacctcccc agctgagcgt gatccccggc 2820  
 gtcaacgctg ccatcttca ggagctggag ggccgcatct tcaccgcta ctccctgtac 2880  
 gacgcgagga acgtcatcaa gaacggcgac ttcaacaacg gcctcagctg ctggaacgtg 2940  
 aagggccacg tggacgtcga ggagcagaac aaccaccgct cgggtgctggt ggtccccgag 3000  
 tgggaggctg aggtcagcca ggaggtgcgc gtctgccccg gcaggggcta catcctccgc 3060  
 gtgaccgctg acaaggaggg ctacggcgag ggctgcgta cgatccacga gatcgaggac 3120  
 aacaccgacg agctgaagtt ctccaactgc gtggaggagg agatctacc gaacaacacg 3180  
 gtcacctgca acgactacac ggccaccag gaggagtac agggcacgta cacgtcgagg 3240  
 aacaggggct acgacggcgc ttacgagtcc aacagctcg tgccggccga ctacgctagc 3300  
 gcgtacgagg agaaggccta cacggacggc cgcagggaca acacctgca gtcgaacagg 3360  
 ggctacggcg actacagcc gctccccgcc ggctacgtga ccaaggagct ggagtacttc 3420  
 ccggagacgg acaaggtctg gatcgagatc ggcgagacgg agggcacctt catcgtggac 3480  
 agcgtcgagc tgctgctcat ggaggagtag 3510

<210> 12

<211> 1215

<212> PRT

<213> 苏云金芽孢杆菌

<400> 12

Met Asn Ser Asn Arg Lys Asn Glu Asn Glu Ile Ile Asn Ala Leu Ser  
 1                   5                   10                   15  
 Ile Pro Ala Val Ser Asn His Ser Ala Gln Met Asp Leu Ser Pro Asp  
                   20                   25                   30

Ala Arg Ile Glu Asp Ser Leu Cys Val Ala Glu Gly Asn Asn Ile Asp  
 35 40 45  
 Pro Phe Val Ser Ala Ser Thr Val Gln Thr Gly Ile Ser Ile Ala Gly  
 50 55 60  
 Arg Ile Leu Gly Val Leu Gly Val Pro Phe Ala Gly Gln Leu Ala Ser  
 65 70 75 80  
 Phe Tyr Ser Phe Leu Val Gly Glu Leu Trp Pro Ser Gly Arg Asp Pro  
 85 90 95  
 Trp Glu Ile Phe Met Glu His Val Glu Gln Ile Val Arg Gln Gln Gln  
 100 105 110  
 Ile Thr Asp Ser Val Arg Asp Thr Ala Ile Ala Arg Leu Glu Gly Leu  
 115 120 125  
 Gly Arg Gly Tyr Arg Ser Tyr Gln Gln Ala Leu Glu Thr Trp Leu Asp  
 130 135 140  
 Asn Arg Asn Asp Ala Arg Ser Arg Ser Ile Ile Arg Glu Arg Tyr Ile  
 145 150 155 160  
 Ala Leu Glu Leu Asp Ile Thr Thr Ala Ile Pro Leu Phe Ser Ile Arg  
 165 170 175  
 Asn Glu Glu Val Pro Leu Leu Met Val Tyr Ala Gln Ala Ala Asn Leu  
 180 185 190  
 His Leu Leu Leu Leu Arg Asp Ala Ser Leu Phe Gly Ser Glu Trp Gly  
 195 200 205  
 Met Ser Ser Ala Asp Val Asn Gln Tyr Tyr Gln Glu Gln Ile Arg Tyr  
 210 215 220  
 Thr Glu Glu Tyr Ser Asn His Cys Val Gln Trp Tyr Asn Thr Gly Leu  
 225 230 235 240  
 Asn Arg Leu Arg Gly Thr Thr Ala Glu Thr Trp Val Arg Tyr Asn Gln  
 245 250 255  
 Phe Arg Arg Asp Leu Thr Leu Gly Val Leu Asp Leu Val Ala Leu Phe  
 260 265 270  
 Pro Ser Tyr Asp Thr Arg Thr Tyr Pro Ile Pro Thr Thr Ala Gln Leu  
 275 280 285  
 Thr Arg Glu Val Tyr Thr Asp Pro Asn Gly Val Val Ala Gly Pro Asn  
 290 295 300  
 Asn Ser Trp Phe Arg Asn Gly Ala Ser Phe Ser Ala Ile Glu Asn Ala  
 305 310 315 320  
 Ile Ile Arg Gln Pro His Leu Tyr Asp Phe Leu Thr Asn Leu Thr Ile  
 325 330 335  
 Tyr Thr Arg Arg Ser Gln Val Gly Thr Thr Ile Met Asn Leu Trp Ala

	340		345		350
Gly His Arg	Ile Thr Phe Asn Arg	Ile Gln Gly Gly Ser Thr Ser	Glu		
	355		360		365
Met Val Tyr	Gly Ala Ile Thr Asn Pro Val Ser Val Ser Asp Ile Pro				
	370		375		380
Phe Val Asn Arg Asp Val Tyr Arg Thr Val Ser Leu Ala Gly Gly Leu					
385		390		395	400
Gly Ser Leu Ser Gly Ile Arg Tyr Gly Leu Thr Arg Val Asp Phe Asp					
	405		410		415
Met Ile Phe Arg Asn His Pro Asp Ile Val Thr Gly Leu Phe Tyr His					
	420		425		430
Pro Gly His Ala Gly Ile Ala Thr Gln Val Lys Asp Ser Asp Thr Glu					
	435		440		445
Leu Pro Pro Glu Thr Thr Glu Gln Pro Asn Tyr Arg Ala Phe Ser His					
	450		455		460
Leu Leu Ser His Ile Ser Met Gly Pro Thr Thr Gln Asp Val Pro Pro					
465		470		475	480
Val Tyr Ser Trp Thr His Gln Ser Ala Asp Arg Thr Asn Thr Ile Asn					
	485		490		495
Ser Asp Arg Ile Thr Gln Ile Pro Leu Val Lys Ala His Thr Leu Gln					
	500		505		510
Ser Gly Thr Thr Val Val Lys Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile					
	515		520		525
Leu Arg Arg Thr Ser Gly Gly Pro Phe Ala Phe Ser Asn Val Asn Leu					
	530		535		540
Asp Phe Asn Leu Ser Gln Arg Tyr Arg Ala Arg Ile Arg Tyr Ala Ser					
545		550		555	560
Thr Thr Asn Leu Arg Ile Tyr Val Thr Val Ala Gly Glu Arg Ile Phe					
	565		570		575
Ala Gly Gln Phe Asp Lys Thr Met Asp Ala Gly Ala Pro Leu Thr Phe					
	580		585		590
Gln Ser Phe Ser Tyr Ala Thr Ile Asn Thr Ala Phe Thr Phe Pro Glu					
	595		600		605
Arg Ser Ser Ser Leu Thr Ile Gly Ala Asp Thr Phe Ser Ser Gly Asn					
	610		615		620
Glu Val Tyr Val Asp Arg Phe Glu Leu Ile Gln Val Thr Ala Thr Phe					
625		630		635	640
Glu Ala Glu Ser Asp Leu Glu Arg Ala Arg Lys Ala Val Asn Ala Leu					
	645		650		655

Phe Thr Ser Thr Asn Pro Arg Gly Leu Lys Thr Asp Val Thr Asp Tyr  
 660 665 670  
 His Ile Asp Gln Val Ser Asn Leu Val Glu Cys Leu Ser Asp Glu Phe  
 675 680 685  
 Cys Leu Asp Lys Lys Arg Glu Leu Leu Glu Glu Val Lys Tyr Ala Lys  
 690 695 700  
 Arg Leu Ser Asp Glu Arg Asn Leu Leu Gln Asp Pro Thr Phe Thr Ser  
 705 710 715 720  
 Ile Ser Gly Gln Thr Asp Arg Gly Trp Ile Gly Ser Thr Gly Ile Ser  
 725 730 735  
 Ile Gln Gly Gly Asp Asp Ile Phe Lys Glu Asn Tyr Val Arg Leu Pro  
 740 745 750  
 Gly Thr Val Asp Glu Cys Tyr Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln Lys Ile Asp  
 755 760 765  
 Glu Ser Gln Leu Lys Ser Tyr Thr Arg Tyr Gln Leu Arg Gly Tyr Ile  
 770 775 780  
 Glu Asp Ser Gln Asp Leu Glu Ile Tyr Leu Ile Arg Tyr Asn Ala Lys  
 785 790 795 800  
 His Glu Thr Leu Ser Val Pro Gly Thr Glu Ser Pro Trp Pro Ser Ser  
 805 810 815  
 Gly Val Tyr Pro Ser Gly Arg Cys Gly Glu Pro Asn Arg Cys Ala Pro  
 820 825 830  
 Arg Ile Glu Trp Asn Pro Asp Leu Asp Cys Ser Cys Arg Tyr Gly Glu  
 835 840 845  
 Lys Cys Val His His Ser His His Phe Ser Leu Asp Ile Asp Val Gly  
 850 855 860  
 Cys Thr Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly Val Trp Val Ile Phe Lys Ile  
 865 870 875 880  
 Lys Thr Gln Asp Gly His Ala Lys Leu Gly Asn Leu Glu Phe Ile Glu  
 885 890 895  
 Glu Lys Pro Leu Leu Gly Lys Ala Leu Ser Arg Val Lys Arg Ala Glu  
 900 905 910  
 Lys Lys Trp Arg Asp Lys Tyr Glu Lys Leu Gln Leu Glu Thr Lys Arg  
 915 920 925  
 Val Tyr Thr Glu Ala Lys Glu Ser Val Asp Ala Leu Phe Val Asp Ser  
 930 935 940  
 Gln Tyr Asp Lys Leu Gln Ala Asn Thr Asn Ile Gly Ile Ile His Gly  
 945 950 955 960  
 Ala Asp Lys Gln Val His Arg Ile Arg Glu Pro Tyr Leu Ser Glu Leu

	965	970	975
Pro Val Ile	Pro Ser Ile	Asn Ala Ala	Ile Phe Glu Glu Leu Glu Gly
	980	985	990
His Ile Phe	Lys Ala Tyr	Ser Leu Tyr	Asp Ala Arg Asn Val Ile Lys
	995	1000	1005
Asn Gly Asp	Phe Asn Asn	Gly Leu Ser	Cys Trp Asn Val Lys Gly
1010		1015	1020
His Val Asp	Val Gln Gln	Asn His His	Arg Ser Val Leu Val Leu
1025		1030	1035
Ser Glu Trp	Glu Ala Glu	Val Ser Gln	Lys Val Arg Val Cys Pro
1040		1045	1050
Asp Arg Gly	Tyr Ile Leu	Arg Val Thr	Ala Tyr Lys Glu Gly Tyr
1055		1060	1065
Gly Glu Gly	Cys Val Thr	Ile His Glu	Phe Glu Asp Asn Thr Asp
1070		1075	1080
Val Leu Lys	Phe Arg Asn	Phe Val Glu	Glu Glu Val Tyr Pro Asn
1085		1090	1095
Asn Thr Val	Thr Cys Asn	Asp Tyr Thr	Thr Asn Gln Ser Ala Glu
1100		1105	1110
Gly Ser Thr	Asp Ala Cys	Asn Ser Tyr	Asn Arg Gly Tyr Glu Asp
1115		1120	1125
Gly Tyr Glu	Asn Arg Tyr	Glu Pro Asn	Pro Ser Ala Pro Val Asn
1130		1135	1140
Tyr Thr Pro	Thr Tyr Glu	Glu Gly Met	Tyr Thr Asp Thr Gln Gly
1145		1150	1155
Tyr Asn His	Cys Val Ser	Asp Arg Gly	Tyr Arg Asn His Thr Pro
1160		1165	1170
Leu Pro Ala	Gly Tyr Val	Thr Leu Glu	Leu Glu Tyr Phe Pro Glu
1175		1180	1185
Thr Glu Gln	Val Trp Ile	Glu Ile Gly	Glu Thr Glu Gly Thr Phe
1190		1195	1200
Ile Val Gly	Ser Val Glu	Leu Leu Leu	Met Glu Glu
1205		1210	1215
<210>	13		
<211>	1169		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	工程化的BT29-Cry1Ka1嵌合蛋白		

&lt;400&gt; 13

Met Glu Ile Asn Asn Gln Asn Gln Cys Val Pro Tyr Asn Cys Leu Asn  
 1                   5                   10                   15  
 Asn Pro Glu Ser Glu Ile Leu Asn Val Ala Ile Phe Ser Ser Glu Gln  
                   20                   25                   30  
 Val Ala Glu Ile His Leu Lys Ile Thr Arg Leu Ile Leu Glu Asn Phe  
                   35                   40                   45  
 Leu Pro Gly Gly Ser Phe Ala Phe Gly Leu Phe Asp Leu Ile Trp Gly  
                   50                   55                   60  
 Ile Phe Asn Glu Asp Gln Trp Ser Ala Phe Leu Arg Gln Val Glu Glu  
 65                   70                   75                   80  
 Leu Ile Asn Gln Arg Ile Thr Glu Phe Ala Arg Gly Gln Ala Ile Gln  
                   85                   90                   95  
 Arg Leu Val Gly Phe Gly Arg Ser Tyr Asp Glu Tyr Ile Leu Ala Leu  
                   100                   105                   110  
 Lys Glu Trp Glu Asn Asp Pro Asp Asn Pro Ala Ser Lys Glu Arg Val  
                   115                   120                   125  
 Arg Thr Arg Phe Arg Thr Thr Asp Asp Ala Leu Leu Thr Gly Val Pro  
                   130                   135                   140  
 Leu Met Ala Ile Pro Gly Phe Glu Leu Ala Thr Leu Ser Val Tyr Ala  
 145                   150                   155                   160  
 Gln Ser Ala Asn Leu His Leu Ala Leu Leu Arg Asp Ala Val Phe Phe  
                   165                   170                   175  
 Gly Glu Arg Trp Gly Leu Thr Gln Thr Asn Ile Asn Asp Leu Tyr Ser  
                   180                   185                   190  
 Arg Leu Lys Asn Ser Ile Arg Asp Tyr Thr Asn His Cys Val Arg Phe  
                   195                   200                   205  
 Tyr Asn Ile Gly Leu Gly Asn Leu Asn Val Ile Arg Pro Glu Tyr Tyr  
                   210                   215                   220  
 Arg Phe Gln Arg Glu Leu Thr Ile Ser Val Leu Asp Leu Val Ala Leu  
 225                   230                   235                   240  
 Phe Pro Asn Tyr Asp Ile Arg Thr Tyr Pro Ile Pro Thr Lys Ser Gln  
                   245                   250                   255  
 Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Asp Pro Ile Ile Ser Pro Gly Ala Gln  
                   260                   265                   270  
 Ala Gly Tyr Thr Leu Gln Asp Val Leu Arg Glu Pro His Leu Met Asp  
                   275                   280                   285  
 Phe Leu Asn Arg Leu Ile Ile Tyr Thr Gly Glu Tyr Arg Gly Ile Arg  
 290                   295                   300

His Trp Ala Gly His Glu Val Glu Ser Ser Arg Thr Gly Met Met Thr  
 305 310 315 320  
 Asn Ile Arg Phe Pro Leu Tyr Gly Thr Ala Ala Thr Ala Glu Pro Thr  
 325 330 335  
 Arg Phe Ile Thr Pro Ser Thr Phe Pro Gly Leu Asn Leu Phe Tyr Arg  
 340 345 350  
 Thr Leu Ser Ala Pro Ile Phe Arg Asp Glu Pro Gly Ala Asn Ile Ile  
 355 360 365  
 Ile Arg Tyr Arg Thr Ser Leu Val Glu Gly Val Gly Phe Ile Gln Pro  
 370 375 380  
 Asn Asn Gly Glu Gln Leu Tyr Arg Val Arg Gly Thr Leu Asp Ser Leu  
 385 390 395 400  
 Asp Gln Leu Pro Leu Glu Gly Glu Ser Ser Leu Thr Glu Tyr Ser His  
 405 410 415  
 Arg Leu Cys His Val Arg Phe Ala Gln Ser Leu Arg Asn Ala Glu Pro  
 420 425 430  
 Leu Asp Tyr Ala Arg Val Pro Met Phe Ser Trp Thr His Arg Ser Ala  
 435 440 445  
 Thr Pro Thr Asn Thr Ile Asp Pro Asp Val Ile Thr Gln Ile Pro Leu  
 450 455 460  
 Val Lys Ala His Thr Leu Gln Ser Gly Thr Thr Val Val Lys Gly Pro  
 465 470 475 480  
 Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr Ser Gly Gly Pro Phe  
 485 490 495  
 Ala Phe Ser Asn Val Asn Leu Asp Phe Asn Leu Ser Gln Arg Tyr Arg  
 500 505 510  
 Ala Arg Ile Arg Tyr Ala Ser Thr Thr Asn Leu Arg Ile Tyr Val Thr  
 515 520 525  
 Val Ala Gly Glu Arg Ile Phe Ala Gly Gln Phe Asp Lys Thr Met Asp  
 530 535 540  
 Ala Gly Ala Pro Leu Thr Phe Gln Ser Phe Ser Tyr Ala Thr Ile Asn  
 545 550 555 560  
 Thr Ala Phe Thr Phe Pro Glu Arg Ser Ser Ser Leu Thr Ile Gly Ala  
 565 570 575  
 Asp Thr Phe Ser Ser Gly Asn Glu Val Tyr Val Asp Arg Phe Glu Leu  
 580 585 590  
 Ile Gln Val Thr Ala Thr Phe Glu Ala Glu Tyr Asp Leu Glu Lys Ala  
 595 600 605  
 Gln Lys Ala Val Asn Ala Leu Phe Thr Ser Ser Asn Gln Ile Gly Leu

610	615	620
Lys Thr Asp Val Thr Asp Tyr His Ile Asp Lys Val Ser Asn Leu Val		
625	630	635
Glu Cys Leu Ser Asp Glu Phe Cys Leu Asp Glu Lys Arg Glu Leu Ser		
	645	650
Glu Lys Val Lys His Ala Lys Arg Leu Cys Asp Glu Arg Asn Leu Leu		
	660	665
Gln Asp Pro Asn Phe Arg Gly Ile Asn Arg Gln Pro Asp Arg Gly Trp		
	675	680
Arg Gly Ser Thr Asp Ile Thr Ile Gln Gly Gly Asp Asp Val Phe Lys		
	690	700
Glu Asn Tyr Val Thr Leu Pro Gly Thr Phe Asp Glu Cys Tyr Pro Thr		
705	710	715
Tyr Leu Tyr Gln Lys Ile Asp Glu Ser Lys Leu Lys Ala Tyr Thr Arg		
	725	730
Tyr Glu Leu Arg Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln Asp Leu Glu Ile Tyr		
	740	745
Leu Ile Arg Tyr Asn Ala Lys His Glu Thr Val Asn Val Pro Gly Thr		
	755	760
Gly Ser Leu Trp Pro Leu Ser Ala Gln Ser Pro Ile Gly Lys Cys Gly		
	770	775
Glu Pro Asn Arg Cys Ala Thr His Leu Glu Trp Asn Pro Asp Leu Asp		
785	790	795
Cys Ser Cys Arg Asp Gly Glu Lys Cys Ala His His Ser His His Phe		
	805	810
Ser Leu Asp Ile Asp Val Gly Cys Thr Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly		
	820	825
Val Trp Val Ile Phe Lys Ile Lys Thr Gln Asp Gly His Ala Arg Leu		
	835	840
Gly Asn Leu Glu Phe Leu Glu Glu Lys Pro Leu Val Gly Glu Ala Leu		
	850	855
Ala Arg Val Lys Arg Ala Glu Lys Lys Trp Arg Asp Lys Arg Glu Lys		
865	870	875
Leu Glu Leu Glu Thr Asn Ile Val Tyr Lys Glu Ala Lys Lys Ser Val		
	885	890
Asp Ala Leu Phe Val Asn Ser Gln Tyr Asp Arg Leu Gln Ala Asp Thr		
	900	905
Asn Ile Ala Ile Ile His Ala Ala Asp Lys Arg Val His Ser Ile Arg		
	915	920
		925



Glu Ala Tyr Leu Pro Glu Leu Ser Val Ile Pro Gly Val Asn Ala Ala  
 930 935 940  
 Ile Phe Glu Glu Leu Glu Gly Arg Ile Phe Thr Ala Tyr Ser Leu Tyr  
 945 950 955 960  
 Asp Ala Arg Asn Val Ile Lys Asn Gly Asp Phe Asn Asn Gly Leu Ser  
 965 970 975  
 Cys Trp Asn Val Lys Gly His Val Asp Val Glu Glu Gln Asn Asn His  
 980 985 990  
 Arg Ser Val Leu Val Val Pro Glu Trp Glu Ala Glu Val Ser Gln Glu  
 995 1000 1005  
 Val Arg Val Cys Pro Gly Arg Gly Tyr Ile Leu Arg Val Thr Ala  
 1010 1015 1020  
 Tyr Lys Glu Gly Tyr Gly Glu Gly Cys Val Thr Ile His Glu Ile  
 1025 1030 1035  
 Glu Asp Asn Thr Asp Glu Leu Lys Phe Ser Asn Cys Val Glu Glu  
 1040 1045 1050  
 Glu Ile Tyr Pro Asn Asn Thr Val Thr Cys Asn Asp Tyr Thr Ala  
 1055 1060 1065  
 Thr Gln Glu Glu Tyr Glu Gly Thr Tyr Thr Ser Arg Asn Arg Gly  
 1070 1075 1080  
 Tyr Asp Gly Ala Tyr Glu Ser Asn Ser Ser Val Pro Ala Asp Tyr  
 1085 1090 1095  
 Ala Ser Ala Tyr Glu Glu Lys Ala Tyr Thr Asp Gly Arg Arg Asp  
 1100 1105 1110  
 Asn Thr Cys Glu Ser Asn Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Thr Pro Leu  
 1115 1120 1125  
 Pro Ala Gly Tyr Val Thr Lys Glu Leu Glu Tyr Phe Pro Glu Thr  
 1130 1135 1140  
 Asp Lys Val Trp Ile Glu Ile Gly Glu Thr Glu Gly Thr Phe Ile  
 1145 1150 1155  
 Val Asp Ser Val Glu Leu Leu Leu Met Glu Glu  
 1160 1165

<210> 14

<211> 3510

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> BT29-Cry1Ka1编码序列

<400> 14

atggagatta ataatcagaa ccaatgtgtc ccttataatt gtttgaataa tcctgaaagc 60  
gagatattaa acgttgcaat ttttagtagc gaacaggtag cagaaattca cttaaagatc 120  
acgcgcttaa ttttagagaa tttttacca ggtgggagtt ttgcattcgg cttatttgat 180  
ttaatatggg ggatttttaa tgaagatcaa tggagcgcac ttcttcggca ggtagaagaa 240  
ttaattaatc aaaggataac ggaattcgca agagggcaag caattcagag actagtaggg 300  
tttggaaagga gttatgatga atatatatta gcactaaaag aatgggaaaa cgatcctgat 360  
aaccagcctt caaaggaaaag agtgcgcact cgatttcgga caactgatga tgccttgcta 420  
accggtgttc ctcttatggc aattccaggt tttgaattag ctactttatc tgtttatgct 480  
caatcagcca atctacattt agccctatta agagatgctg tttttttgg ggagagatgg 540  
ggattgacac aaacaaatat aatgattta tatagtagat taaaaactc cattcgtgat 600  
tatacaaatc atttgtttcg tttttataat ataggtttag ggaatttaa tgttataaga 660  
ccagagtatt accgtttcca aagagaatta acaatatctg tcttagatct tgtagctctt 720  
tttccaaatt acgatatccg aacatatcca ataccaacta aaagtcaatt aacaagagaa 780  
atttatacag atccgattat ttcacctggt gcacaggcag gttatactct tcaagatggt 840  
ttgagagaac cacaccttat ggacttttta aaccgactta ttatttatac tggtagtat 900  
cgcggaattc gtcactgggc aggacatgaa gtagaatcta gtagaacagg tatgatgact 960  
aatataagat ttcttttcta tggaacagcc gcaacagcag aaccaacacg atttataact 1020  
cctagtactt ttcttggctt taatttattt tatagaacat tatcagctcc ttttttaga 1080  
gatgaaccgg gagctaatat tattattaga tatagaacga gtttggtgga aggagtagga 1140  
tttattcaac caaataacgg tgaacagctt tacagagtga gaggaacatt agattctctt 1200  
gatcaattac cacttgaggg tgagagtagt ctaactgaat atagtcatcg attatgccat 1260  
gtagatttg cgcaatcatt gaggaatgca gaacctttag attatgcaag ggttccgatg 1320  
ttttcttggg cacatcgtag tgcaaccctt acaatacaa ttgatccaga tgcctcacc 1380  
caaataccgt tagtaaaggc gcataccctc caatcgggta caactgtagt aaaaggcca 1440  
gggtttacag gaggggatat cctccgtcga acaagtggag gaccatttgc ttttagtaat 1500  
gtaaatctag attttaactt gtcacaaagg tatcgtgcta gaattcgta tgcctctact 1560  
actaacctaa gaatttacgt aacggttgca ggtgaacgaa tttttgctgg tcaatttgac 1620  
aaaacgatgg atgctggtgc cccattaaca ttccaatctt ttagttacgc aactattaat 1680  
acagctttta cattcccaga aagatcgagc agcttgacta taggtgccga tacgttttagt 1740  
tcaggtaatg aagtttatgt agatagattt gaattaatcc aagttactgc aacatttgag 1800  
gcagaatatg atttagagaa agctcagaaa gcggtgaatg cgctgtttac ttcttccaat 1860  
caaatcgggt taaaaacaga tgtgacggac tatcatattg ataaagtatc caatctagtt 1920  
gagtgtttat cagatgaatt ttgtctagat gaaaagcgag aattgtccga gaaagtcaaa 1980  
catgcgaagc gactctgtga tgagcggaat ttacttcaag atccaaactt cagaggcatc 2040  
aatagacaac cagaccgtgg ttggagagga agtacggata ttaccatcca aggaggagat 2100  
gacgtattca aagagaatta cgttacgcta ccgggtacct ttgatgagtg ctatccaacg 2160  
tatttatatc aaaaaataga tgagtcgaaa ttaaaagcct ataccgcta tgaattaaga 2220  
gggtatatcg aggatagtca agacttagaa atctatttaa ttcgctacaa tgcaaaacat 2280  
gaaacagtaa atgtgccagg tacgggttcc ttatggccgc tttcagccca aagtccaatc 2340

ggaaagtgtg gagaaccgaa tcgatgtgcg acacaccttg aatggaatcc tgacttagat 2400  
 tgttcgtgta gggatggaga aaagtgtgcc catcattcgc atcatttctc ctagacatt 2460  
 gatgtaggat gtacagacct aatgaggac ctaggtgtat gggatgatctt taagattaag 2520  
 acgcaagatg gtcatgagcg actaggaat ctagaatttc tcgaagagaa accattagta 2580  
 ggagaagcgc tagctcgtgt gaagagagcg gagaaaaat ggagagacaa acgcgaaaaa 2640  
 ttggaattgg aaacaaatat tgtttataaa gaggcaaaaa aatctgtaga tgctttattt 2700  
 gtgaactctc aatatgatag attacaagcg gatacgaata tcgcgataat tcatgaggca 2760  
 gataaacgcg ttcatagcat tcgagaagca tatcttcag agttgtctgt aattccgggt 2820  
 gtaaatgcag ctatttttga agaattagag ggacgtattt tcacagccta ctctctatat 2880  
 gatgagagaa atgtcattaa aatggcgat ttcaataatg gcttatcatg ctggaacgtg 2940  
 aaaggcatg tagatgtaga agaacagaac aaccatcgtt cggtccttgt tgttcagaa 3000  
 tgggaagcag aagtgtcaca agaggttcgt gtctgtccag gtcgtggcta tctcttcgt 3060  
 gttacagcgt acaaagaggg atatggagag ggctgtgtaa cgattcatga gatcgaagac 3120  
 aatacagacg aactgaaatt cagcaactgt gtagaagagg aatatatcc aaacaacacg 3180  
 gtaacgtgta atgattatac tgcgactcaa gaagaatag aggttacgta cacttctcgt 3240  
 aatcgaggat atgacggagc ctatgaaagc aattcttctg taccagctga ttatgcatca 3300  
 gcctatgaag aaaaagcgta tacagatgga agaagagaca atacttgtga atctaacaga 3360  
 ggatatgggg attacacacc actaccagct ggctatgtga caaagaatt agagtacttc 3420  
 ccgaaaccg ataaggtatg gattgagatt ggagaaacgg aaggaacatt tatcgtggac 3480  
 agcgtggaat tactccttat ggaggaatag 3510

<210> 15

<211> 1169

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Bt29-1Kav2嵌合蛋白

<400> 15

Met	Glu	Ile	Asn	Asn	Gln	Asn	Gln	Cys	Val	Pro	Tyr	Asn	Cys	Leu	Asn
1				5					10					15	
Asn	Pro	Glu	Ser	Glu	Ile	Leu	Asn	Val	Ala	Ile	Phe	Ser	Ser	Glu	Gln
				20					25					30	
Val	Ala	Glu	Ile	His	Leu	Lys	Ile	Thr	Arg	Leu	Ile	Leu	Glu	Asn	Phe
				35				40						45	
Leu	Pro	Gly	Gly	Ser	Phe	Ala	Phe	Gly	Leu	Phe	Asp	Leu	Ile	Trp	Gly
				50				55						60	
Ile	Phe	Asn	Glu	Asp	Gln	Trp	Ser	Ala	Phe	Leu	Arg	Gln	Val	Glu	Glu
65					70					75				80	
Leu	Ile	Asn	Gln	Arg	Ile	Thr	Glu	Phe	Ala	Arg	Gly	Gln	Ala	Ile	Gln
				85						90				95	

Arg Leu Val Gly Phe Gly Arg Ser Tyr Asp Glu Tyr Ile Leu Ala Leu		
100	105	110
Lys Glu Trp Glu Asn Asp Pro Asp Asn Pro Ala Ser Lys Glu Arg Val		
115	120	125
Arg Thr Arg Phe Arg Thr Thr Asp Asp Ala Leu Leu Thr Gly Val Pro		
130	135	140
Leu Met Ala Ile Pro Gly Phe Glu Leu Ala Thr Leu Ser Val Tyr Ala		
145	150	155
Gln Ser Ala Asn Leu His Leu Ala Leu Leu Arg Asp Ala Val Phe Phe		
165	170	175
Gly Glu Arg Trp Gly Leu Thr Gln Thr Asn Ile Asn Asp Leu Tyr Ser		
180	185	190
Arg Leu Lys Asn Ser Ile Arg Asp Tyr Thr Asn His Cys Val Arg Phe		
195	200	205
Tyr Asn Ile Gly Leu Gly Asn Leu Asn Val Ile Arg Pro Glu Tyr Tyr		
210	215	220
Arg Phe Gln Arg Glu Leu Thr Ile Ser Val Leu Asp Leu Val Ala Leu		
225	230	235
Phe Pro Asn Tyr Asp Ile Arg Thr Tyr Pro Ile Pro Thr Lys Ser Gln		
245	250	255
Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Asp Pro Ile Ile Ser Pro Gly Ala Gln		
260	265	270
Ala Gly Tyr Thr Leu Gln Asp Val Leu Arg Glu Pro His Leu Met Asp		
275	280	285
Phe Leu Asn Arg Leu Ile Ile Tyr Thr Gly Glu Tyr Arg Gly Ile Arg		
290	295	300
His Trp Ala Gly His Glu Val Glu Ser Ser Arg Thr Gly Met Met Thr		
305	310	315
Asn Ile Arg Phe Pro Leu Tyr Gly Thr Ala Ala Thr Ala Glu Pro Thr		
325	330	335
Arg Phe Ile Thr Pro Ser Thr Phe Pro Gly Leu Asn Leu Phe Tyr Arg		
340	345	350
Thr Leu Ser Ala Pro Ile Phe Arg Asp Glu Pro Gly Ala Asn Ile Ile		
355	360	365
Ile Arg Tyr Arg Thr Ser Leu Val Glu Gly Val Gly Phe Ile Gln Pro		
370	375	380
Asn Asn Gly Glu Gln Leu Tyr Arg Val Arg Gly Thr Leu Asp Ser Leu		
385	390	395
Asp Gln Leu Pro Leu Glu Gly Glu Ser Ser Leu Thr Glu Tyr Ser His		

	405	410	415
Arg Leu Cys His Val Arg Phe Ala Gln Ser Leu Arg Asn Ala Glu Pro			
	420	425	430
Leu Asp Tyr Ala Arg Val Pro Met Phe Ser Trp Thr His Arg Ser Ala			
	435	440	445
Thr Pro Thr Asn Thr Ile Asp Pro Asp Val Ile Thr Gln Ile Pro Leu			
	450	455	460
Val Lys Ala His Thr Leu Gln Ser Gly Thr Thr Val Val Lys Gly Pro			
465	470	475	480
Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr Ser Gly Gly Pro Phe			
	485	490	495
Ala Phe Ser Asn Val Asn Leu Asp Phe Asn Leu Ser Gln Arg Tyr Arg			
	500	505	510
Ala Arg Ile Arg Tyr Ala Ser Thr Thr Asn Leu Arg Ile Tyr Val Thr			
	515	520	525
Val Ala Gly Glu Arg Ile Phe Ala Gly Gln Phe Asp Lys Thr Met Asp			
	530	535	540
Ala Gly Ala Pro Leu Thr Phe Gln Ser Phe Ser Tyr Ala Thr Ile Asn			
545	550	555	560
Thr Ala Phe Thr Phe Pro Glu Arg Ser Ser Ser Leu Thr Ile Gly Ala			
	565	570	575
Asp Thr Phe Ser Ser Gly Asn Glu Val Tyr Val Asp Arg Phe Glu Leu			
	580	585	590
Ile Gln Val Thr Ala Thr Phe Glu Ala Glu Ser Asp Leu Glu Arg Ala			
	595	600	605
Arg Lys Ala Val Asn Ala Leu Phe Thr Ser Ser Asn Gln Ile Gly Leu			
	610	615	620
Lys Thr Asp Val Thr Asp Tyr His Ile Asp Lys Val Ser Asn Leu Val			
625	630	635	640
Glu Cys Leu Ser Asp Glu Phe Cys Leu Asp Glu Lys Arg Glu Leu Ser			
	645	650	655
Glu Lys Val Lys His Ala Lys Arg Leu Cys Asp Glu Arg Asn Leu Leu			
	660	665	670
Gln Asp Pro Asn Phe Arg Gly Ile Asn Arg Gln Pro Asp Arg Gly Trp			
	675	680	685
Arg Gly Ser Thr Asp Ile Thr Ile Gln Gly Gly Asp Asp Val Phe Lys			
	690	695	700
Glu Asn Tyr Val Thr Leu Pro Gly Thr Phe Asp Glu Cys Tyr Pro Thr			
705	710	715	720

Tyr Leu Tyr Gln Lys Ile Asp Glu Ser Lys Leu Lys Ala Tyr Thr Arg  
 725 730 735  
 Tyr Glu Leu Arg Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln Asp Leu Glu Ile Tyr  
 740 745 750  
 Leu Ile Arg Tyr Asn Ala Lys His Glu Thr Val Asn Val Pro Gly Thr  
 755 760 765  
 Gly Ser Leu Trp Pro Leu Ser Ala Gln Ser Pro Ile Gly Lys Cys Gly  
 770 775 780  
 Glu Pro Asn Arg Cys Ala Thr His Leu Glu Trp Asn Pro Asp Leu Asp  
 785 790 795 800  
 Cys Ser Cys Arg Asp Gly Glu Lys Cys Ala His His Ser His His Phe  
 805 810 815  
 Ser Leu Asp Ile Asp Val Gly Cys Thr Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly  
 820 825 830  
 Val Trp Val Ile Phe Lys Ile Lys Thr Gln Asp Gly His Ala Arg Leu  
 835 840 845  
 Gly Asn Leu Glu Phe Leu Glu Glu Lys Pro Leu Val Gly Glu Ala Leu  
 850 855 860  
 Ala Arg Val Lys Arg Ala Glu Lys Lys Trp Arg Asp Lys Arg Glu Lys  
 865 870 875 880  
 Leu Glu Leu Glu Thr Asn Ile Val Tyr Lys Glu Ala Lys Lys Ser Val  
 885 890 895  
 Asp Ala Leu Phe Val Asn Ser Gln Tyr Asp Arg Leu Gln Ala Asp Thr  
 900 905 910  
 Asn Ile Ala Ile Ile His Ala Ala Asp Lys Arg Val His Ser Ile Arg  
 915 920 925  
 Glu Ala Tyr Leu Pro Glu Leu Ser Val Ile Pro Gly Val Asn Ala Ala  
 930 935 940  
 Ile Phe Glu Glu Leu Glu Gly Arg Ile Phe Thr Ala Tyr Ser Leu Tyr  
 945 950 955 960  
 Asp Ala Arg Asn Val Ile Lys Asn Gly Asp Phe Asn Asn Gly Leu Ser  
 965 970 975  
 Cys Trp Asn Val Lys Gly His Val Asp Val Glu Glu Gln Asn Asn His  
 980 985 990  
 Arg Ser Val Leu Val Val Pro Glu Trp Glu Ala Glu Val Ser Gln Glu  
 995 1000 1005  
 Val Arg Val Cys Pro Gly Arg Gly Tyr Ile Leu Arg Val Thr Ala  
 1010 1015 1020  
 Tyr Lys Glu Gly Tyr Gly Glu Gly Cys Val Thr Ile His Glu Ile

1025	1030	1035
Glu Asp Asn Thr Asp Glu	Leu Lys Phe Ser Asn	Cys Val Glu Glu
1040	1045	1050
Glu Ile Tyr Pro Asn Asn	Thr Val Thr Cys Asn	Asp Tyr Thr Ala
1055	1060	1065
Thr Gln Glu Glu Tyr Glu	Gly Thr Tyr Thr Ser	Arg Asn Arg Gly
1070	1075	1080
Tyr Asp Gly Ala Tyr Glu	Ser Asn Ser Ser Val	Pro Ala Asp Tyr
1085	1090	1095
Ala Ser Ala Tyr Glu Glu	Lys Ala Tyr Thr Asp	Gly Arg Arg Asp
1100	1105	1110
Asn Thr Cys Glu Ser Asn	Arg Gly Tyr Gly Asp	Tyr Thr Pro Leu
1115	1120	1125
Pro Ala Gly Tyr Val Thr	Lys Glu Leu Glu Tyr	Phe Pro Glu Thr
1130	1135	1140
Asp Lys Val Trp Ile Glu	Ile Gly Glu Thr Glu	Gly Thr Phe Ile
1145	1150	1155
Val Asp Ser Val Glu Leu	Leu Leu Met Glu Glu	
1160	1165	

<210> 16

<211> 3510

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Bt29-1Ka嵌合体

<400> 16

```

atggagatta ataatcagaa ccaatgtgtc cttataatt gtttgaataa tcctgaaagc 60
gagatattaa acgttgcaat ttttagtagc gaacaggtag cagaaattca cttaaagatc 120
acgcgcttaa ttttagagaa tttttacca gtggggagtt ttgcattcgg cttatttgat 180
ttaatatggg ggatttttaa tgaagatcaa tggagcgcac ttcttcggca ggtagaagaa 240
ttaattaatc aaaggataac ggaattcgca agagggcaag caattcagag actagtaggg 300
tttgaagga gttatgatga atatatttta gcactaaaag aatgggaaaa cgatcctgat 360
aaccagctt caaaggaaaag agtgcgcact cgatttcgga caactgatga tgccttgcta 420
accggtgttc ctcttatggc aattccaggt tttgaattag ctactttatc tgtttatgct 480
caatcagcca atctacattt agccctatta agagatgctg tattttttgg ggagagatgg 540
ggattgacac aaacaaatat aaatgattta tatagtagat taaaaaactc cattcgtgat 600
tatacaaate attgtgttcg tttttataat ataggtttag ggaatttaa tgttataaga 660
ccagagtatt accgtttcca aagagaatta acaatatctg tcttagatct tgtagctctt 720
tttccaaatt acgatatccg aacatatcca ataccaacta aaagtcaatt aacaagagaa 780

```

atttatacag atccgattat ttcacctggt gcacaggcag gttatactct tcaagatggt 840  
ttgagagaac cacaccttat ggacttttta aaccgactta ttatttatac tggtagtat 900  
cgcggaattc gtcactgggc aggacatgaa gtagaatcta gtagaacagg tatgatgact 960  
aatataagat ttcctttgta tggaacagcc gcaacagcag aaccaacacg atttataact 1020  
cctagtactt ttcctggtct taatttattt tatagaacat tatcagctcc tatttttaga 1080  
gatgaaccgg gagctaatat tattattaga tatagaacga gtttggtgga aggagtagga 1140  
tttattcaac caaataacgg tgaacagctt tacagagtga gaggaacatt agattctctt 1200  
gatcaattac cacttgaggg tgagagtagt ctaactgaat atagtcacg attatgcat 1260  
gtagatttg cgcaatcatt gaggaatgca gaaccttag attatgcaag ggttccgatg 1320  
ttttcttggc cacatcgtag tgcaaccctt acaatacaa ttgatccaga tgtcatcacc 1380  
caaataccgt tagtaaaagc acataccctt cagtcaggta ctactgttgt aaaagggcca 1440  
gggtttacag gtggagatat cctccgacga actagtggag gaccatttgc ttttagtaat 1500  
gttaatttag actttaactt gtcacaaaga tatcgtgcta gaataccta tgcttctact 1560  
actaatctaa gaatttacgt aacggtagca ggggaacgaa tttttgctgg tcaatttgat 1620  
aaaacaatgg atgcaggtag accattaaca ttccaatctt ttagttacgc aactattaat 1680  
acagcattta cattcccaga aagaagtagc agcttgacta ttggtgctga tacttttagc 1740  
tcaggtaatg aagtttatgt agatagattt gaattgatcc aggttactgc aacatttgag 1800  
gcagaatcag atttagagag agcacgaaaa gcggtgaatg cgctgtttac ttcttccaat 1860  
caaatcgggt taaaaacaga tgtgacggac tatcatattg ataaagtatc caatctagtt 1920  
gagtgtttat cagatgaatt ttgtctagat gaaaagcgag aattgtccga gaaagtcaaa 1980  
catgcgaagc gactctgtga tgagcggaat ttacttcaag atccaaactt cagaggcatc 2040  
aatagacaac cagaccgtgg ttggagagga agtacggata ttaccatcca aggaggagat 2100  
gacgtattca aagagaatta cgttacgcta ccgggtacct ttgatgagtg ctatccaacg 2160  
tatttatatc aaaaaataga tgagtcaaaa ttaaagcctt ataccgcta tgaattaaga 2220  
gggtatatcg aggatagtca agacttagaa atctatntaa ttcgctacaa tgcaaaacat 2280  
gaaacagtaa atgtgccagg tacgggttcc ttatggccgc tttcagccca aagtccaatc 2340  
ggaaagtgtg gagaaccgaa tcgatgtgag acacacctg aatggaatcc tgacttagat 2400  
tgttcgtgta gggatggaga aaagtgtgcc catcattcgc atcatttctc ctagacatt 2460  
gatgtaggat gtacagacct aaatgaggac ctaggtgat gggtagctt taagattaag 2520  
acgcaagatg gtcatgcgag actaggaaat ctagaatttc tcgaagagaa accattagta 2580  
ggagaagcgc tagctcgtgt gaagagagcg gagaaaaat ggagagacaa acgcaaaaa 2640  
ttggaattgg aaacaaatat tgtttataaa gaggcaaaaa aatctgtaga tgctttattt 2700  
gtgaactctc aatatgatag attacaagcg gatacgaata tcgagataat tcatgcggca 2760  
gataaacgcg ttcatagcat tcgagaagca tatcttcag agttgtctgt aattccgggt 2820  
gtaaagtgcag ctatttttga agaattagag ggacgtattt tcacagccta ctctctatat 2880  
gatgcgagaa atgtcattaa aaatggcgat ttcaataatg gcttatcatg ctggaacgtg 2940  
aaagggcatg tagatgtaga agaacagAAC aaccatcgtt cggtccttgt tgttccagaa 3000  
tggaagcag aagtgtcaca agaggttctg gtctgtccag gtcgtggcta tatcttctgt 3060  
gttacagcgt acaaagaggg atatggagag ggctgtgtaa cgattcatga gatcgaagac 3120



aatacagacg aactgaaatt cagcaactgt gtagaagagg aatatatcc aaacaacacg 3180  
 gtaacgtgta atgattatac tgcgactcaa gaagaatag agggtagcgt cacttctcgt 3240  
 aatcgaggat atgacggagc ctatgaaagc aattcttctg taccagctga ttatgcatca 3300  
 gcctatgaag aaaaagcgtg tacagatgga agaagagaca atacttgtga atctaacaga 3360  
 ggatatgggg attacacacc actaccagct ggctatgtga caaagaatt agagtacttc 3420  
 ccagaaaccg ataaggtatg gattgagatt ggagaaacgg aaggaacatt tatcgtggac 3480  
 agcgtggaat tactccttat ggaggaatag 3510

<210> 17

<211> 1189

<212> PRT

<213> 苏云金芽孢杆菌

<400> 17

Met	Glu	Glu	Asn	Asn	Gln	Asn	Gln	Cys	Ile	Pro	Tyr	Asn	Cys	Leu	Ser
1			5					10						15	
Asn	Pro	Glu	Glu	Val	Leu	Leu	Asp	Gly	Glu	Arg	Ile	Ser	Thr	Gly	Asn
			20					25						30	
Ser	Ser	Ile	Asp	Ile	Ser	Leu	Ser	Leu	Val	Gln	Phe	Leu	Val	Ser	Asn
			35					40						45	
Phe	Val	Pro	Gly	Gly	Gly	Phe	Leu	Val	Gly	Leu	Ile	Asp	Phe	Val	Trp
			50					55						60	
Gly	Ile	Val	Gly	Pro	Ser	Gln	Trp	Asp	Ala	Phe	Leu	Val	Gln	Ile	Glu
65						70					75				80
Gln	Leu	Ile	Asn	Glu	Arg	Ile	Ala	Glu	Phe	Ala	Arg	Asn	Ala	Ala	Ile
						85					90				95
Ala	Asn	Leu	Glu	Gly	Leu	Gly	Asn	Asn	Phe	Asn	Ile	Tyr	Val	Glu	Ala
														100	
Phe	Lys	Glu	Trp	Glu	Glu	Asp	Pro	Asn	Asn	Pro	Ala	Thr	Arg	Thr	Arg
														115	
Val	Ile	Asp	Arg	Phe	Arg	Ile	Leu	Asp	Gly	Leu	Leu	Glu	Arg	Asp	Ile
														130	
Pro	Ser	Phe	Arg	Ile	Ser	Gly	Phe	Glu	Val	Pro	Leu	Leu	Ser	Val	Tyr
145														150	
Ala	Gln	Ala	Ala	Asn	Leu	His	Leu	Ala	Ile	Leu	Arg	Asp	Ser	Val	Ile
														165	
Phe	Gly	Glu	Arg	Trp	Gly	Leu	Thr	Thr	Ile	Asn	Val	Asn	Glu	Asn	Tyr
														180	
Asn	Arg	Leu	Ile	Arg	His	Ile	Asp	Glu	Tyr	Ala	Asp	His	Cys	Ala	Asn
														195	
Thr	Tyr	Asn	Arg	Gly	Leu	Asn	Asn	Leu	Pro	Lys	Ser	Thr	Tyr	Gln	Asp

210	215	220
Trp Ile Thr Tyr Asn Arg Leu Arg Arg Asp Leu Thr Leu Thr Val Leu		
225	230	235
Asp Ile Ala Ala Phe Phe Pro Asn Tyr Asp Asn Arg Arg Tyr Pro Ile		
	245	250
Gln Pro Val Gly Gln Leu Thr Arg Glu Val Tyr Thr Asp Pro Leu Ile		
	260	265
Asn Phe Asn Pro Gln Leu Gln Ser Val Ala Gln Leu Pro Thr Phe Asn		
	275	280
Val Met Glu Ser Ser Ala Ile Arg Asn Pro His Leu Phe Asp Ile Leu		
290	295	300
Asn Asn Leu Thr Ile Phe Thr Asp Trp Phe Ser Val Gly Arg Asn Phe		
305	310	315
Tyr Trp Gly Gly His Arg Val Ile Ser Ser Leu Ile Gly Gly Gly Asn		
	325	330
Ile Thr Ser Pro Ile Tyr Gly Arg Glu Ala Asn Gln Glu Pro Pro Arg		
	340	345
Ser Phe Thr Phe Asn Gly Pro Val Phe Arg Thr Leu Ser Asn Pro Thr		
	355	360
Leu Arg Leu Leu Gln Gln Pro Trp Pro Ala Pro Pro Phe Asn Leu Arg		
370	375	380
Gly Val Glu Gly Val Glu Phe Ser Thr Pro Thr Asn Ser Phe Thr Tyr		
385	390	395
Arg Gly Arg Gly Thr Val Asp Ser Leu Thr Glu Leu Pro Pro Glu Asp		
	405	410
Asn Ser Val Pro Pro Arg Glu Gly Tyr Ser His Arg Leu Cys His Ala		
	420	425
Thr Phe Val Gln Arg Ser Gly Thr Pro Phe Leu Thr Thr Gly Val Val		
	435	440
Phe Ser Trp Thr His Arg Ser Ala Thr Leu Thr Asn Thr Ile Asp Pro		
450	455	460
Glu Arg Ile Asn Gln Ile Pro Leu Val Lys Gly Phe Arg Val Trp Gly		
465	470	475
Gly Thr Ser Val Ile Thr Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu		
	485	490
Arg Arg Asn Thr Phe Gly Asp Phe Val Ser Leu Gln Val Asn Ile Asn		
	500	505
Ser Pro Ile Thr Gln Arg Tyr Arg Leu Arg Phe Arg Tyr Ala Ser Ser		
515	520	525

Arg Asp Ala Arg Val Ile Val Leu Thr Gly Ala Ala Ser Thr Gly Val  
 530 535 540  
 Gly Gly Gln Val Ser Val Asn Met Pro Leu Gln Lys Thr Met Glu Ile  
 545 550 555 560  
 Gly Glu Asn Leu Thr Ser Arg Thr Phe Arg Tyr Thr Asp Phe Ser Asn  
 565 570 575  
 Pro Phe Ser Phe Arg Ala Asn Pro Asp Ile Ile Gly Ile Ser Glu Gln  
 580 585 590  
 Pro Leu Phe Gly Ala Gly Ser Ile Ser Ser Gly Glu Leu Tyr Ile Asp  
 595 600 605  
 Lys Ile Glu Ile Ile Leu Ala Asp Ala Thr Phe Glu Ala Glu Ser Asp  
 610 615 620  
 Leu Glu Arg Ala Gln Lys Ala Val Asn Ala Leu Phe Thr Ser Ser Asn  
 625 630 635 640  
 Gln Ile Gly Leu Lys Thr Asp Val Thr Asp Tyr His Ile Asp Gln Val  
 645 650 655  
 Ser Asn Leu Val Asp Cys Leu Ser Asp Glu Phe Cys Leu Asp Glu Lys  
 660 665 670  
 Arg Glu Leu Ser Glu Lys Val Lys His Ala Lys Arg Leu Ser Asp Glu  
 675 680 685  
 Arg Asn Leu Leu Gln Asp Pro Asn Phe Arg Gly Ile Asn Arg Gln Pro  
 690 695 700  
 Asp Arg Gly Trp Arg Gly Ser Thr Asp Ile Thr Ile Gln Gly Gly Asp  
 705 710 715 720  
 Asp Val Phe Lys Glu Asn Tyr Val Thr Leu Pro Gly Thr Val Asp Glu  
 725 730 735  
 Cys Tyr Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln Lys Ile Asp Glu Ser Lys Leu Lys  
 740 745 750  
 Ala Tyr Thr Arg Tyr Glu Leu Arg Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln Asp  
 755 760 765  
 Leu Glu Ile Tyr Leu Ile Arg Tyr Asn Ala Lys His Glu Ile Val Asn  
 770 775 780  
 Val Pro Gly Thr Gly Ser Leu Trp Pro Leu Ser Ala Gln Ser Pro Ile  
 785 790 795 800  
 Gly Lys Cys Gly Glu Pro Asn Arg Cys Ala Pro His Leu Glu Trp Asn  
 805 810 815  
 Pro Asp Leu Asp Cys Ser Cys Arg Asp Gly Glu Lys Cys Ala His His  
 820 825 830  
 Ser His His Phe Thr Leu Asp Ile Asp Val Gly Cys Thr Asp Leu Asn

835	840	845
Glu Asp Leu Gly Val Trp	Val Ile Phe Lys Ile Lys Thr Gln Asp Gly	
850	855	860
His Ala Arg Leu Gly Asn	Leu Glu Phe Leu Glu Glu Lys Pro Leu Leu	
865	870	875
Gly Glu Ala Leu Ala Arg	Val Lys Arg Ala Glu Lys Lys Trp Arg Asp	
885	890	895
Lys Arg Glu Lys Leu Gln	Leu Glu Thr Asn Ile Val Tyr Lys Glu Ala	
900	905	910
Lys Glu Ser Val Asp Ala	Leu Phe Val Asn Ser Gln Tyr Asp Arg Leu	
915	920	925
Gln Val Asp Thr Asn Ile	Ala Met Ile His Ala Ala Asp Lys Arg Val	
930	935	940
His Arg Ile Arg Glu Ala	Tyr Leu Pro Glu Leu Ser Val Ile Pro Gly	
945	950	955
Val Asn Ala Ala Ile Phe	Glu Glu Leu Glu Gly Arg Ile Phe Thr Ala	
965	970	975
Tyr Ser Leu Tyr Asp Ala	Arg Asn Val Ile Lys Asn Gly Asp Phe Asn	
980	985	990
Asn Gly Leu Leu Cys Trp	Asn Val Lys Gly His Val Asp Val Glu Glu	
995	1000	1005
Gln Asn Asn His Arg Ser	Val Leu Val Ile Pro Glu Trp Glu Ala	
1010	1015	1020
Glu Val Ser Gln Glu Val	Arg Val Cys Pro Gly Arg Gly Tyr Ile	
1025	1030	1035
Leu Arg Val Thr Ala Tyr	Lys Glu Gly Tyr Gly Glu Gly Cys Val	
1040	1045	1050
Thr Ile His Glu Ile Glu	Asp Asn Thr Asp Glu Leu Lys Phe Ser	
1055	1060	1065
Asn Cys Val Glu Glu Glu	Val Tyr Pro Asn Asn Thr Val Thr Cys	
1070	1075	1080
Asn Asn Tyr Thr Gly Thr	Gln Glu Glu Tyr Glu Gly Thr Tyr Thr	
1085	1090	1095
Ser Arg Asn Gln Gly Tyr	Asp Glu Ala Tyr Gly Asn Asn Pro Ser	
1100	1105	1110
Val Pro Ala Asp Tyr Ala	Ser Val Tyr Glu Glu Lys Ser Tyr Thr	
1115	1120	1125
Asp Gly Arg Arg Glu Asn	Pro Cys Glu Ser Asn Arg Gly Tyr Gly	
1130	1135	1140

Asp Tyr Thr Pro Leu Pro Ala Gly Tyr Val Thr Lys Asp Leu Glu  
 1145 1150 1155  
 Tyr Phe Pro Glu Thr Asp Lys Val Trp Ile Glu Ile Gly Glu Thr  
 1160 1165 1170  
 Glu Gly Thr Phe Ile Val Asp Ser Val Glu Leu Leu Leu Met Glu  
 1175 1180 1185  
 Glu  
 <210> 18  
 <211> 1181  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 工程化的Bt29-1Ca嵌合蛋白  
 <400> 18  
 Met Glu Ile Asn Asn Gln Asn Gln Cys Val Pro Tyr Asn Cys Leu Asn  
 1 5 10 15  
 Asn Pro Glu Ser Glu Ile Leu Asn Val Ala Ile Phe Ser Ser Glu Gln  
 20 25 30  
 Val Ala Glu Ile His Leu Lys Ile Thr Arg Leu Ile Leu Glu Asn Phe  
 35 40 45  
 Leu Pro Gly Gly Ser Phe Ala Phe Gly Leu Phe Asp Leu Ile Trp Gly  
 50 55 60  
 Ile Phe Asn Glu Asp Gln Trp Ser Ala Phe Leu Arg Gln Val Glu Glu  
 65 70 75 80  
 Leu Ile Asn Gln Arg Ile Thr Glu Phe Ala Arg Gly Gln Ala Ile Gln  
 85 90 95  
 Arg Leu Val Gly Phe Gly Arg Ser Tyr Asp Glu Tyr Ile Leu Ala Leu  
 100 105 110  
 Lys Glu Trp Glu Asn Asp Pro Asp Asn Pro Ala Ser Lys Glu Arg Val  
 115 120 125  
 Arg Thr Arg Phe Arg Thr Thr Asp Asp Ala Leu Leu Thr Gly Val Pro  
 130 135 140  
 Leu Met Ala Ile Pro Gly Phe Glu Leu Ala Thr Leu Ser Val Tyr Ala  
 145 150 155 160  
 Gln Ser Ala Asn Leu His Leu Ala Leu Leu Arg Asp Ala Val Phe Phe  
 165 170 175  
 Gly Glu Arg Trp Gly Leu Thr Gln Thr Asn Ile Asn Asp Leu Tyr Ser  
 180 185 190  
 Arg Leu Lys Asn Ser Ile Arg Asp Tyr Thr Asn His Cys Val Arg Phe

195	200	205
Tyr Asn Ile Gly Leu Gly Asn Leu Asn Val Ile Arg Pro Glu Tyr Tyr		
210	215	220
Arg Phe Gln Arg Glu Leu Thr Ile Ser Val Leu Asp Leu Val Ala Leu		
225	230	235
Phe Pro Asn Tyr Asp Ile Arg Thr Tyr Pro Ile Pro Thr Lys Ser Gln		
245	250	255
Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Asp Pro Ile Ile Ser Pro Gly Ala Gln		
260	265	270
Ala Gly Tyr Thr Leu Gln Asp Val Leu Arg Glu Pro His Leu Met Asp		
275	280	285
Phe Leu Asn Arg Leu Ile Ile Tyr Thr Gly Glu Tyr Arg Gly Ile Arg		
290	295	300
His Trp Ala Gly His Glu Val Glu Ser Ser Arg Thr Gly Met Met Thr		
305	310	315
Asn Ile Arg Phe Pro Leu Tyr Gly Thr Ala Ala Thr Ala Glu Pro Thr		
325	330	335
Arg Phe Ile Thr Pro Ser Thr Phe Pro Gly Leu Asn Leu Phe Tyr Arg		
340	345	350
Thr Leu Ser Ala Pro Ile Phe Arg Asp Glu Pro Gly Ala Asn Ile Ile		
355	360	365
Ile Arg Tyr Arg Thr Ser Leu Val Glu Gly Val Gly Phe Ile Gln Pro		
370	375	380
Asn Asn Gly Glu Gln Leu Tyr Arg Val Arg Gly Thr Leu Asp Ser Leu		
385	390	395
Asp Gln Leu Pro Leu Glu Gly Glu Ser Ser Leu Thr Glu Tyr Ser His		
405	410	415
Arg Leu Cys His Val Arg Phe Ala Gln Ser Leu Arg Asn Ala Glu Pro		
420	425	430
Leu Asp Tyr Ala Arg Val Pro Met Phe Ser Trp Thr His Arg Ser Ala		
435	440	445
Thr Pro Thr Asn Thr Ile Asp Pro Asp Val Ile Thr Gln Ile Pro Leu		
450	455	460
Val Lys Gly Phe Arg Val Trp Gly Gly Thr Ser Val Ile Thr Gly Pro		
465	470	475
Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu Arg Arg Asn Thr Phe Gly Asp Phe		
485	490	495
Val Ser Leu Gln Val Asn Ile Asn Ser Pro Ile Thr Gln Arg Tyr Arg		
500	505	510

Leu Arg Phe Arg Tyr Ala Ser Ser Arg Asp Ala Arg Val Ile Val Leu  
 515 520 525  
 Thr Gly Ala Ala Ser Thr Gly Val Gly Gly Gln Val Ser Val Asn Met  
 530 535 540  
 Pro Leu Gln Lys Thr Met Glu Ile Gly Glu Asn Leu Thr Ser Arg Thr  
 545 550 555 560  
 Phe Arg Tyr Thr Asp Phe Ser Asn Pro Phe Ser Phe Arg Ala Asn Pro  
 565 570 575  
 Asp Ile Ile Gly Ile Ser Glu Gln Pro Leu Phe Gly Ala Gly Ser Ile  
 580 585 590  
 Ser Ser Gly Glu Leu Tyr Ile Asp Lys Ile Glu Ile Ile Leu Ala Asp  
 595 600 605  
 Ala Thr Phe Glu Ala Glu Tyr Asp Leu Glu Lys Ala Gln Lys Ala Val  
 610 615 620  
 Asn Ala Leu Phe Thr Ser Ser Asn Gln Ile Gly Leu Lys Thr Asp Val  
 625 630 635 640  
 Thr Asp Tyr His Ile Asp Lys Val Ser Asn Leu Val Glu Cys Leu Ser  
 645 650 655  
 Asp Glu Phe Cys Leu Asp Glu Lys Arg Glu Leu Ser Glu Lys Val Lys  
 660 665 670  
 His Ala Lys Arg Leu Cys Asp Glu Arg Asn Leu Leu Gln Asp Pro Asn  
 675 680 685  
 Phe Arg Gly Ile Asn Arg Gln Pro Asp Arg Gly Trp Arg Gly Ser Thr  
 690 695 700  
 Asp Ile Thr Ile Gln Gly Gly Asp Asp Val Phe Lys Glu Asn Tyr Val  
 705 710 715 720  
 Thr Leu Pro Gly Thr Phe Asp Glu Cys Tyr Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln  
 725 730 735  
 Lys Ile Asp Glu Ser Lys Leu Lys Ala Tyr Thr Arg Tyr Glu Leu Arg  
 740 745 750  
 Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln Asp Leu Glu Ile Tyr Leu Ile Arg Tyr  
 755 760 765  
 Asn Ala Lys His Glu Thr Val Asn Val Pro Gly Thr Gly Ser Leu Trp  
 770 775 780  
 Pro Leu Ser Ala Gln Ser Pro Ile Gly Lys Cys Gly Glu Pro Asn Arg  
 785 790 795 800  
 Cys Ala Thr His Leu Glu Trp Asn Pro Asp Leu Asp Cys Ser Cys Arg  
 805 810 815  
 Asp Gly Glu Lys Cys Ala His His Ser His His Phe Ser Leu Asp Ile

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
Arg Ala Glu Lys Lys Trp Arg Asp Lys Arg Glu Lys Leu Glu Leu Glu		
885	890	895
Thr Asn Ile Val Tyr Lys Glu Ala Lys Lys Ser Val Asp Ala Leu Phe		
900	905	910
Val Asn Ser Gln Tyr Asp Arg Leu Gln Ala Asp Thr Asn Ile Ala Ile		
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
Leu Glu Gly Arg Ile Phe Thr Ala Tyr 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 His 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 Asp 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 Ala Thr Gln Glu		
1070	1075	1080
Glu Tyr Glu Gly Thr Tyr Thr Ser Arg Asn Arg Gly Tyr Asp Gly		
1085	1090	1095
Ala Tyr Glu Ser Asn Ser Ser Val Pro Ala Asp Tyr Ala Ser Ala		
1100	1105	1110
Tyr Glu Glu Lys Ala Tyr Thr Asp Gly Arg Arg Asp Asn Thr Cys		
1115	1120	1125



Glu Ser Asn Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Thr Pro Leu Pro Ala Gly  
 1130 1135 1140  
 Tyr Val Thr Lys Glu Leu Glu Tyr Phe Pro Glu Thr Asp Lys Val  
 1145 1150 1155  
 Trp Ile Glu Ile Gly Glu Thr Glu Gly Thr Phe Ile Val Asp Ser  
 1160 1165 1170  
 Val Glu Leu Leu Leu Met Glu Glu  
 1175 1180

<210> 19

<211> 3546

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Bt29-1Ca嵌合体

<400> 19

atggagatta ataatcagaa ccaatgtgtc cttataatt gtttgaataa tcctgaaagc 60  
 gagatattaa acgttgcaat ttttagtagc gaacaggtag cagaaattca cttaaagatc 120  
 acgcgcttaa ttttagagaa tttttacca ggtgggagtt ttgcattcgg cttatttgat 180  
 ttaatatggg ggatttttaa tgaagatcaa tggagcgcac ttcttcggca ggtagaagaa 240  
 ttaattaatc aaaggataac ggaattcgca agagggaag caattcagag actagtaggg 300  
 tttggaagga gttatgatga atatatttta gcactaaaag aatgggaaa cgatcctgat 360  
 aaccagcctt caaaggaaag agtgcgcact cgatttcgga caactgatga tgccttgcta 420  
 accggtgttc ctcttatggc aattccaggt tttgaattag ctactttatc tgtttatgct 480  
 caatcagcca atctacattt agccctatta agagatgctg tattttttgg ggagagatgg 540  
 ggattgacac aaacaaatat aatgattta tatagtagat taaaaactc cattcgtgat 600  
 tatacaaatc atttgtttcg tttttataat ataggtttag ggaatttaa tgttataaga 660  
 ccagagtatt accgtttcca aagagaatta acaatatctg tcttagatct tgtagctctt 720  
 tttccaaatt acgatatccg aacatatcca ataccaacta aaagtcaatt aacaagagaa 780  
 atttatacag atccgattat ttcacctggt gcacaggcag gttatactct tcaagatggt 840  
 ttgagagaac cacaccttat ggacttttta aaccgactta ttatttatac tggtagatg 900  
 cgcggaattc gtcactgggc aggacatgaa gtagaatcta gtagaacagg tatgatgact 960  
 aatataagat ttcttttcta tggaacagcc gcaacagcag aaccaacacg atttataact 1020  
 cctagtactt ttcttggctt taatttattt tatagaacat tatcagctcc tattttttaga 1080  
 gatgaaccgg gagctaatat tattattaga tatagaacga gtttggtgga aggagtagga 1140  
 tttattcaac caaataacgg tgaacagctt tacagagtga gaggaacatt agattctctt 1200  
 gatcaattac cacttgaggg tgagagtagt ctaactgaat atagtcatcg attatgcat 1260  
 gttagatttg cgcaatcatt gaggaatgca gaacctttag attatgcaag gtttccgatg 1320  
 ttttcttgga cacatcgtag tgcaaccctt acaatacaa ttgatccaga tgtcatcacc 1380  
 caaataccgc tggtgaaagg ctttcgcgtg tggggcggca ccagcgtgat taccgccccg 1440

ggctttaccg gcggcgatat tctgcgccgc aacacctttg gcgatthttgt gagcctgcag 1500  
gtgaacatta acagcccgat taccagcgc tatcgctgc gctttcgcta tgcgagcagc 1560  
cgcgatgcmc gcgtgattgt gctgaccggc gcggcgagca ccggcgtggg cggccaggtg 1620  
agcgtgaaca tgccgctgca gaaaaccatg gaaattggcg aaaacctgac cagccgcacc 1680  
tttcgctata ccgattttag caaccgtht agctttcgcg cgaaccgga tattattggc 1740  
attagcgaac agccgctgtt tggcgcgggc agcattagca gcggcgaact gtatattgat 1800  
aaaattgaaa ttattctggc ggatgcgaca thtgaggcag aatatgattt agagaaagct 1860  
cagaaaagcgg tgaatgcgct gthtacttct tccaatcaaa tcgggtthaa aacagatgtg 1920  
acggactatc atattgataa agtatccaat ctagttagt gthtatcaga tgaattttgt 1980  
ctagatgaaa agcagaaatt gtccgagaaa gtcaaactg cgaagcgact ctgtgatgag 2040  
cggaatttac thcaagatcc aaacttcaga ggcatcaata gacaaccaga ccgtggttg 2100  
agaggaagta cggatattac catccaagga ggagatgacg tattcaaga gaattacgtt 2160  
acgctaccgg gtacctthga tgagtgetat ccaacgtatt tatatcaaaa aatagatgag 2220  
tcgaaattaa aagcctatac ccgctatgaa thagagggt atatcgagga tagtcaagac 2280  
ttagaaatct atttaattcg ctacaatgca aaactgaaa cagthaatgt gccaggtacg 2340  
ggttccttat ggccgctthc agcccaaagt ccaatcgaa agtgtggaga accgaatcga 2400  
tgtgcgacac acctggaatg gaatcctgac thagattgtt cgtgtaggga tggagaaaag 2460  
tgtgcccac attcgatca thtctctta gacattgat taggatgtac agacctaat 2520  
gaggacctag gtgtatgggt gatctthaag athagacgc aagatggtca tgcgagacta 2580  
ggaaatctag aattthctga agagaaacca thagtaggag aagcgtagc tcgtgtgaag 2640  
agagcggaga aaaaatggag agacaaacgc gaaaattgg aattggaaac aatattgtt 2700  
tataaagagg caaaaaaatc thtagatgct thattthga actctcaata tgatagatta 2760  
caagcggata cgaatatcgc gataattcat gcggcagata aacgcgttca tagcattcga 2820  
gaagcatatc thccagagth gtctgthatt ccgggtgthaa atgcagctat ththgaagaa 2880  
thagagggac gtattthcac agcctactct ctatatgat cgagaaatgt cattaanaat 2940  
ggcgattthc athaatggct atcatgctgg aacgtgaaag ggcatgthaga ththagaagaa 3000  
cagaacaacc atcgthcgtt cthgtthgtt ccagaatggg aagcagaagt gtcacaagag 3060  
gthcgtgtct gtccaggtcg thgctatath cthcgtgthaa cagcgtacaa agagggath 3120  
ggagagggtc gtgthaacgat thcatgagath gaagacaata cagacgaact gaaattcagc 3180  
aactgtgthag aagaggaaat athatccaac aacacgthaa cgtgthaatg ththactgcg 3240  
actcaagaag aatathaggg thcgtacact thcgtgthaatc gaggaththga cggagcctat 3300  
gaaagcaatt cthctgtacc agctgathat gcatcagcct athagaaaa agcgtataca 3360  
gatggaagaa gagacaatac thgtgathct aacagaggat athgggthata cacaccacta 3420  
ccagctggct atgtgacaaa agaatthag thactthccag aaaccgthaa ggtatggath 3480  
gagathggag aaacggaagg aacaththac thggacagcg thggaathact cththggag 3540  
gaatag 3546  
<210> 20  
<211> 652  
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Bt29-Bt22Tr1

<400> 20

```

Met Glu Ile Asn Asn Gln Asn Gln Cys Val Pro Tyr Asn Cys Leu Asn
1           5           10           15
Asn Pro Glu Ser Glu Ile Leu Asn Val Ala Ile Phe Ser Ser Glu Gln
          20           25           30
Val Ala Glu Ile His Leu Lys Ile Thr Arg Leu Ile Leu Glu Asn Phe
          35           40           45
Leu Pro Gly Gly Ser Phe Ala Phe Gly Leu Phe Asp Leu Ile Trp Gly
          50           55           60
Ile Phe Asn Glu Asp Gln Trp Ser Ala Phe Leu Arg Gln Val Glu Glu
65           70           75           80
Leu Ile Asn Gln Arg Ile Thr Glu Phe Ala Arg Gly Gln Ala Ile Gln
          85           90           95
Arg Leu Val Gly Phe Gly Arg Ser Tyr Asp Glu Tyr Ile Leu Ala Leu
          100          105          110
Lys Glu Trp Glu Asn Asp Pro Asp Asn Pro Ala Ser Lys Glu Arg Val
          115          120          125
Arg Thr Arg Phe Arg Thr Thr Asp Asp Ala Leu Leu Thr Gly Val Pro
          130          135          140
Leu Met Ala Ile Pro Gly Phe Glu Leu Ala Thr Leu Ser Val Tyr Ala
145          150          155          160
Gln Ser Ala Asn Leu His Leu Ala Leu Leu Arg Asp Ala Val Phe Phe
          165          170          175
Gly Glu Arg Trp Gly Leu Thr Gln Thr Asn Ile Asn Asp Leu Tyr Ser
          180          185          190
Arg Leu Lys Asn Ser Ile Arg Asp Tyr Thr Asn His Cys Val Arg Phe
          195          200          205
Tyr Asn Ile Gly Leu Gly Asn Leu Asn Val Ile Arg Pro Glu Tyr Tyr
          210          215          220
Arg Phe Gln Arg Glu Leu Thr Ile Ser Val Leu Asp Leu Val Ala Leu
225          230          235          240
Phe Pro Asn Tyr Asp Ile Arg Thr Tyr Pro Ile Pro Thr Lys Ser Gln
          245          250          255
Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Asp Pro Ile Ile Ser Pro Gly Ala Gln
          260          265          270
Ala Gly Tyr Thr Leu Gln Asp Val Leu Arg Glu Pro His Leu Met Asp

```

275	280	285
Phe Leu Asn Arg Leu Ile Ile Tyr Thr Gly Glu Tyr Arg Gly Ile Arg		
290	295	300
His Trp Ala Gly His Glu Val Glu Ser Ser Arg Thr Gly Met Met Thr		
305	310	315
Asn Ile Arg Phe Pro Leu Tyr Gly Thr Ala Ala Thr Ala Glu Pro Thr		
325	330	335
Arg Phe Ile Thr Pro Ser Thr Phe Pro Gly Leu Asn Leu Phe Tyr Arg		
340	345	350
Thr Leu Ser Ala Pro Ile Phe Arg Asp Glu Pro Gly Ala Asn Ile Ile		
355	360	365
Ile Arg Tyr Arg Thr Ser Leu Val Glu Gly Val Gly Phe Ile Gln Pro		
370	375	380
Asn Asn Gly Glu Gln Leu Tyr Arg Val Arg Gly Thr Leu Asp Ser Leu		
385	390	395
Asp Gln Leu Pro Leu Glu Gly Glu Ser Ser Leu Thr Glu Tyr Ser His		
405	410	415
Arg Leu Cys His Val Arg Phe Ala Gln Ser Leu Arg Asn Ala Glu Pro		
420	425	430
Leu Asp Tyr Ala Arg Val Pro Met Phe Ser Trp Thr His Arg Ser Ala		
435	440	445
Thr Pro Thr Asn Thr Ile Asp Pro Asp Val Ile Thr Gln Ile Pro Leu		
450	455	460
Val Lys Ala His Thr Leu Gln Ser Gly Thr Thr Val Val Lys Gly Pro		
465	470	475
Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr Ser Gly Gly Pro Phe		
485	490	495
Ala Phe Ser Asn Val Asn Leu Asp Trp Asn Leu Ser Gln Arg Tyr Arg		
500	505	510
Ala Arg Ile Arg Tyr Ala Ser Thr Thr Asn Leu Arg Met Tyr Val Thr		
515	520	525
Ile Ala Gly Glu Arg Ile Phe Ala Gly Gln Phe Asn Lys Thr Met Asn		
530	535	540
Thr Gly Asp Pro Leu Thr Phe Gln Ser Phe Ser Tyr Ala Thr Ile Asp		
545	550	555
Thr Ala Phe Thr Phe Pro Thr Lys Ala Ser Ser Leu Thr Val Gly Ala		
565	570	575
Asp Thr Phe Ser Ser Gly Asn Glu Val Tyr Val Asp Arg Phe Glu Leu		
580	585	590

Ile Pro Val Thr Ala Thr Phe Glu Ala Glu Tyr Asp Leu Glu Lys Ala  
 595 600 605  
 Gln Lys Ala Val Asn Ala Leu Phe Thr Ser Ser Asn Gln Ile Gly Leu  
 610 615 620  
 Lys Thr Asp Val Thr Asp Tyr His Ile Asp Lys Val Ser Asn Leu Val  
 625 630 635 640  
 Glu Cys Leu Ser Asp Glu Phe Cys Leu Asp Glu Lys  
 645 650  
 <210> 21  
 <211> 636  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> Bt29-Bt22Tr2  
 <400> 21  
 Met Glu Ile Asn Asn Gln Asn Gln Cys Val Pro Tyr Asn Cys Leu Asn  
 1 5 10 15  
 Asn Pro Glu Ser Glu Ile Leu Asn Val Ala Ile Phe Ser Ser Glu Gln  
 20 25 30  
 Val Ala Glu Ile His Leu Lys Ile Thr Arg Leu Ile Leu Glu Asn Phe  
 35 40 45  
 Leu Pro Gly Gly Ser Phe Ala Phe Gly Leu Phe Asp Leu Ile Trp Gly  
 50 55 60  
 Ile Phe Asn Glu Asp Gln Trp Ser Ala Phe Leu Arg Gln Val Glu Glu  
 65 70 75 80  
 Leu Ile Asn Gln Arg Ile Thr Glu Phe Ala Arg Gly Gln Ala Ile Gln  
 85 90 95  
 Arg Leu Val Gly Phe Gly Arg Ser Tyr Asp Glu Tyr Ile Leu Ala Leu  
 100 105 110  
 Lys Glu Trp Glu Asn Asp Pro Asp Asn Pro Ala Ser Lys Glu Arg Val  
 115 120 125  
 Arg Thr Arg Phe Arg Thr Thr Asp Asp Ala Leu Leu Thr Gly Val Pro  
 130 135 140  
 Leu Met Ala Ile Pro Gly Phe Glu Leu Ala Thr Leu Ser Val Tyr Ala  
 145 150 155 160  
 Gln Ser Ala Asn Leu His Leu Ala Leu Leu Arg Asp Ala Val Phe Phe  
 165 170 175  
 Gly Glu Arg Trp Gly Leu Thr Gln Thr Asn Ile Asn Asp Leu Tyr Ser  
 180 185 190

Arg Leu Lys Asn Ser Ile Arg Asp Tyr Thr Asn His Cys Val Arg Phe  
 195 200 205  
 Tyr Asn Ile Gly Leu Gly Asn Leu Asn Val Ile Arg Pro Glu Tyr Tyr  
 210 215 220  
 Arg Phe Gln Arg Glu Leu Thr Ile Ser Val Leu Asp Leu Val Ala Leu  
 225 230 235 240  
 Phe Pro Asn Tyr Asp Ile Arg Thr Tyr Pro Ile Pro Thr Lys Ser Gln  
 245 250 255  
 Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Asp Pro Ile Ile Ser Pro Gly Ala Gln  
 260 265 270  
 Ala Gly Tyr Thr Leu Gln Asp Val Leu Arg Glu Pro His Leu Met Asp  
 275 280 285  
 Phe Leu Asn Arg Leu Ile Ile Tyr Thr Gly Glu Tyr Arg Gly Ile Arg  
 290 295 300  
 His Trp Ala Gly His Glu Val Glu Ser Ser Arg Thr Gly Met Met Thr  
 305 310 315 320  
 Asn Ile Arg Phe Pro Leu Tyr Gly Thr Ala Ala Thr Ala Glu Pro Thr  
 325 330 335  
 Arg Phe Ile Thr Pro Ser Thr Phe Pro Gly Leu Asn Leu Phe Tyr Arg  
 340 345 350  
 Thr Leu Ser Ala Pro Ile Phe Arg Asp Glu Pro Gly Ala Asn Ile Ile  
 355 360 365  
 Ile Arg Tyr Arg Thr Ser Leu Val Glu Gly Val Gly Phe Ile Gln Pro  
 370 375 380  
 Asn Asn Gly Glu Gln Leu Tyr Arg Val Arg Gly Thr Leu Asp Ser Leu  
 385 390 395 400  
 Asp Gln Leu Pro Leu Glu Gly Glu Ser Ser Leu Thr Glu Tyr Ser His  
 405 410 415  
 Arg Leu Cys His Val Arg Phe Ala Gln Ser Leu Arg Asn Ala Glu Pro  
 420 425 430  
 Leu Asp Tyr Ala Arg Val Pro Met Phe Ser Trp Thr His Arg Ser Ala  
 435 440 445  
 Thr Pro Thr Asn Thr Ile Asp Pro Asp Val Ile Thr Gln Ile Pro Leu  
 450 455 460  
 Val Lys Ala His Thr Leu Gln Ser Gly Thr Thr Val Val Lys Gly Pro  
 465 470 475 480  
 Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr Ser Gly Gly Pro Phe  
 485 490 495  
 Ala Phe Ser Asn Val Asn Leu Asp Trp Asn Leu Ser Gln Arg Tyr Arg

500	505	510
Ala Arg Ile Arg Tyr Ala Ser Thr Thr Asn Leu Arg Met Tyr Val Thr		
515	520	525
Ile Ala Gly Glu Arg Ile Phe Ala Gly Gln Phe Asn Lys Thr Met Asn		
530	535	540
Thr Gly Asp Pro Leu Thr Phe Gln Ser Phe Ser Tyr Ala Thr Ile Asp		
545	550	555
Thr Ala Phe Thr Phe Pro Thr Lys Ala Ser Ser Leu Thr Val Gly Ala		
565	570	575
Asp Thr Phe Ser Ser Gly Asn Glu Val Tyr Val Asp Arg Phe Glu Leu		
580	585	590
Ile Pro Val Thr Ala Thr Phe Glu Ala Glu Tyr Asp Leu Glu Lys Ala		
595	600	605
Gln Lys Ala Val Asn Ala Leu Phe Thr Ser Ser Asn Gln Ile Gly Leu		
610	615	620
Lys Thr Asp Val Thr Asp Tyr His Ile Asp Lys Val		
625	630	635
<210> 22		
<211> 622		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> Bt29-Bt22Tr3		
<400> 22		
Met Glu Ile Asn Asn Gln Asn Gln Cys Val Pro Tyr Asn Cys Leu Asn		
1	5	10
Asn Pro Glu Ser Glu Ile Leu Asn Val Ala Ile Phe Ser Ser Glu Gln		
20	25	30
Val Ala Glu Ile His Leu Lys Ile Thr Arg Leu Ile Leu Glu Asn Phe		
35	40	45
Leu Pro Gly Gly Ser Phe Ala Phe Gly Leu Phe Asp Leu Ile Trp Gly		
50	55	60
Ile Phe Asn Glu Asp Gln Trp Ser Ala Phe Leu Arg Gln Val Glu Glu		
65	70	75
Leu Ile Asn Gln Arg Ile Thr Glu Phe Ala Arg Gly Gln Ala Ile Gln		
85	90	95
Arg Leu Val Gly Phe Gly Arg Ser Tyr Asp Glu Tyr Ile Leu Ala Leu		
100	105	110
Lys Glu Trp Glu Asn Asp Pro Asp Asn Pro Ala Ser Lys Glu Arg Val		

115	120	125
Arg Thr Arg Phe Arg Thr Thr	Asp Asp Ala Leu Leu Thr Gly Val Pro	
130	135	140
Leu Met Ala Ile Pro Gly Phe Glu Leu Ala Thr Leu Ser Val Tyr Ala		
145	150	155
Gln Ser Ala Asn Leu His Leu Ala Leu Leu Arg Asp Ala Val Phe Phe		
165	170	175
Gly Glu Arg Trp Gly Leu Thr Gln Thr Asn Ile Asn Asp Leu Tyr Ser		
180	185	190
Arg Leu Lys Asn Ser Ile Arg Asp Tyr Thr Asn His Cys Val Arg Phe		
195	200	205
Tyr Asn Ile Gly Leu Gly Asn Leu Asn Val Ile Arg Pro Glu Tyr Tyr		
210	215	220
Arg Phe Gln Arg Glu Leu Thr Ile Ser Val Leu Asp Leu Val Ala Leu		
225	230	235
Phe Pro Asn Tyr Asp Ile Arg Thr Tyr Pro Ile Pro Thr Lys Ser Gln		
245	250	255
Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Asp Pro Ile Ile Ser Pro Gly Ala Gln		
260	265	270
Ala Gly Tyr Thr Leu Gln Asp Val Leu Arg Glu Pro His Leu Met Asp		
275	280	285
Phe Leu Asn Arg Leu Ile Ile Tyr Thr Gly Glu Tyr Arg Gly Ile Arg		
290	295	300
His Trp Ala Gly His Glu Val Glu Ser Ser Arg Thr Gly Met Met Thr		
305	310	315
Asn Ile Arg Phe Pro Leu Tyr Gly Thr Ala Ala Thr Ala Glu Pro Thr		
325	330	335
Arg Phe Ile Thr Pro Ser Thr Phe Pro Gly Leu Asn Leu Phe Tyr Arg		
340	345	350
Thr Leu Ser Ala Pro Ile Phe Arg Asp Glu Pro Gly Ala Asn Ile Ile		
355	360	365
Ile Arg Tyr Arg Thr Ser Leu Val Glu Gly Val Gly Phe Ile Gln Pro		
370	375	380
Asn Asn Gly Glu Gln Leu Tyr Arg Val Arg Gly Thr Leu Asp Ser Leu		
385	390	395
Asp Gln Leu Pro Leu Glu Gly Glu Ser Ser Leu Thr Glu Tyr Ser His		
405	410	415
Arg Leu Cys His Val Arg Phe Ala Gln Ser Leu Arg Asn Ala Glu Pro		
420	425	430



Leu Asp Tyr Ala Arg Val Pro Met Phe Ser Trp Thr His Arg Ser Ala  
 435 440 445  
 Thr Pro Thr Asn Thr Ile Asp Pro Asp Val Ile Thr Gln Ile Pro Leu  
 450 455 460  
 Val Lys Ala His Thr Leu Gln Ser Gly Thr Thr Val Val Lys Gly Pro  
 465 470 475 480  
 Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr Ser Gly Gly Pro Phe  
 485 490 495  
 Ala Phe Ser Asn Val Asn Leu Asp Trp Asn Leu Ser Gln Arg Tyr Arg  
 500 505 510  
 Ala Arg Ile Arg Tyr Ala Ser Thr Thr Asn Leu Arg Met Tyr Val Thr  
 515 520 525  
 Ile Ala Gly Glu Arg Ile Phe Ala Gly Gln Phe Asn Lys Thr Met Asn  
 530 535 540  
 Thr Gly Asp Pro Leu Thr Phe Gln Ser Phe Ser Tyr Ala Thr Ile Asp  
 545 550 555 560  
 Thr Ala Phe Thr Phe Pro Thr Lys Ala Ser Ser Leu Thr Val Gly Ala  
 565 570 575  
 Asp Thr Phe Ser Ser Gly Asn Glu Val Tyr Val Asp Arg Phe Glu Leu  
 580 585 590  
 Ile Pro Val Thr Ala Thr Phe Glu Ala Glu Tyr Asp Leu Glu Lys Ala  
 595 600 605  
 Gln Lys Ala Val Asn Ala Leu Phe Thr Ser Ser Asn Gln Ile  
 610 615 620  
 <210> 23  
 <211> 610  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> Bt29-Bt22Tr4  
 <400> 23  
 Met Glu Ile Asn Asn Gln Asn Gln Cys Val Pro Tyr Asn Cys Leu Asn  
 1 5 10 15  
 Asn Pro Glu Ser Glu Ile Leu Asn Val Ala Ile Phe Ser Ser Glu Gln  
 20 25 30  
 Val Ala Glu Ile His Leu Lys Ile Thr Arg Leu Ile Leu Glu Asn Phe  
 35 40 45  
 Leu Pro Gly Gly Ser Phe Ala Phe Gly Leu Phe Asp Leu Ile Trp Gly  
 50 55 60

Ile Phe Asn Glu Asp Gln Trp Ser Ala Phe Leu Arg Gln Val Glu Glu			
65	70	75	80
Leu Ile Asn Gln Arg Ile Thr Glu Phe Ala Arg Gly Gln Ala Ile Gln			
	85	90	95
Arg Leu Val Gly Phe Gly Arg Ser Tyr Asp Glu Tyr Ile Leu Ala Leu			
	100	105	110
Lys Glu Trp Glu Asn Asp Pro Asp Asn Pro Ala Ser Lys Glu Arg Val			
	115	120	125
Arg Thr Arg Phe Arg Thr Thr Asp Asp Ala Leu Leu Thr Gly Val Pro			
	130	135	140
Leu Met Ala Ile Pro Gly Phe Glu Leu Ala Thr Leu Ser Val Tyr Ala			
145	150	155	160
Gln Ser Ala Asn Leu His Leu Ala Leu Leu Arg Asp Ala Val Phe Phe			
	165	170	175
Gly Glu Arg Trp Gly Leu Thr Gln Thr Asn Ile Asn Asp Leu Tyr Ser			
	180	185	190
Arg Leu Lys Asn Ser Ile Arg Asp Tyr Thr Asn His Cys Val Arg Phe			
	195	200	205
Tyr Asn Ile Gly Leu Gly Asn Leu Asn Val Ile Arg Pro Glu Tyr Tyr			
	210	215	220
Arg Phe Gln Arg Glu Leu Thr Ile Ser Val Leu Asp Leu Val Ala Leu			
225	230	235	240
Phe Pro Asn Tyr Asp Ile Arg Thr Tyr Pro Ile Pro Thr Lys Ser Gln			
	245	250	255
Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Asp Pro Ile Ile Ser Pro Gly Ala Gln			
	260	265	270
Ala Gly Tyr Thr Leu Gln Asp Val Leu Arg Glu Pro His Leu Met Asp			
	275	280	285
Phe Leu Asn Arg Leu Ile Ile Tyr Thr Gly Glu Tyr Arg Gly Ile Arg			
	290	295	300
His Trp Ala Gly His Glu Val Glu Ser Ser Arg Thr Gly Met Met Thr			
305	310	315	320
Asn Ile Arg Phe Pro Leu Tyr Gly Thr Ala Ala Thr Ala Glu Pro Thr			
	325	330	335
Arg Phe Ile Thr Pro Ser Thr Phe Pro Gly Leu Asn Leu Phe Tyr Arg			
	340	345	350
Thr Leu Ser Ala Pro Ile Phe Arg Asp Glu Pro Gly Ala Asn Ile Ile			
	355	360	365
Ile Arg Tyr Arg Thr Ser Leu Val Glu Gly Val Gly Phe Ile Gln Pro			

370	375	380
Asn Asn Gly Glu Gln Leu Tyr Arg Val Arg Gly Thr Leu Asp Ser Leu		
385	390	395
Asp Gln Leu Pro Leu Glu Gly Glu Ser Ser Leu Thr Glu Tyr Ser His		400
	405	410
Arg Leu Cys His Val Arg Phe Ala Gln Ser Leu Arg Asn Ala Glu Pro		415
	420	425
Leu Asp Tyr Ala Arg Val Pro Met Phe Ser Trp Thr His Arg Ser Ala		430
	435	440
Thr Pro Thr Asn Thr Ile Asp Pro Asp Val Ile Thr Gln Ile Pro Leu		445
	450	455
Val Lys Ala His Thr Leu Gln Ser Gly Thr Thr Val Val Lys Gly Pro		460
465	470	475
Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr Ser Gly Gly Pro Phe		480
	485	490
Ala Phe Ser Asn Val Asn Leu Asp Trp Asn Leu Ser Gln Arg Tyr Arg		495
	500	505
Ala Arg Ile Arg Tyr Ala Ser Thr Thr Asn Leu Arg Met Tyr Val Thr		510
	515	520
Ile Ala Gly Glu Arg Ile Phe Ala Gly Gln Phe Asn Lys Thr Met Asn		525
	530	535
Thr Gly Asp Pro Leu Thr Phe Gln Ser Phe Ser Tyr Ala Thr Ile Asp		540
545	550	555
Thr Ala Phe Thr Phe Pro Thr Lys Ala Ser Ser Leu Thr Val Gly Ala		560
	565	570
Asp Thr Phe Ser Ser Gly Asn Glu Val Tyr Val Asp Arg Phe Glu Leu		575
	580	585
Ile Pro Val Thr Ala Thr Phe Glu Ala Glu Tyr Asp Leu Glu Lys Ala		590
	595	600
		605
Gln Lys		
610		
<210> 24		
<211> 607		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> Bt29-Bt22Tr5		
<400> 24		
Met Glu Ile Asn Asn Gln Asn Gln Cys Val Pro Tyr Asn Cys Leu Asn		

1	5	10	15
Asn Pro Glu Ser Glu Ile Leu Asn Val Ala Ile Phe Ser Ser Glu Gln			
	20	25	30
Val Ala Glu Ile His Leu Lys Ile Thr Arg Leu Ile Leu Glu Asn Phe			
	35	40	45
Leu Pro Gly Gly Ser Phe Ala Phe Gly Leu Phe Asp Leu Ile Trp Gly			
	50	55	60
Ile Phe Asn Glu Asp Gln Trp Ser Ala Phe Leu Arg Gln Val Glu Glu			
65	70	75	80
Leu Ile Asn Gln Arg Ile Thr Glu Phe Ala Arg Gly Gln Ala Ile Gln			
	85	90	95
Arg Leu Val Gly Phe Gly Arg Ser Tyr Asp Glu Tyr Ile Leu Ala Leu			
	100	105	110
Lys Glu Trp Glu Asn Asp Pro Asp Asn Pro Ala Ser Lys Glu Arg Val			
	115	120	125
Arg Thr Arg Phe Arg Thr Thr Asp Asp Ala Leu Leu Thr Gly Val Pro			
	130	135	140
Leu Met Ala Ile Pro Gly Phe Glu Leu Ala Thr Leu Ser Val Tyr Ala			
145	150	155	160
Gln Ser Ala Asn Leu His Leu Ala Leu Leu Arg Asp Ala Val Phe Phe			
	165	170	175
Gly Glu Arg Trp Gly Leu Thr Gln Thr Asn Ile Asn Asp Leu Tyr Ser			
	180	185	190
Arg Leu Lys Asn Ser Ile Arg Asp Tyr Thr Asn His Cys Val Arg Phe			
	195	200	205
Tyr Asn Ile Gly Leu Gly Asn Leu Asn Val Ile Arg Pro Glu Tyr Tyr			
	210	215	220
Arg Phe Gln Arg Glu Leu Thr Ile Ser Val Leu Asp Leu Val Ala Leu			
225	230	235	240
Phe Pro Asn Tyr Asp Ile Arg Thr Tyr Pro Ile Pro Thr Lys Ser Gln			
	245	250	255
Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Asp Pro Ile Ile Ser Pro Gly Ala Gln			
	260	265	270
Ala Gly Tyr Thr Leu Gln Asp Val Leu Arg Glu Pro His Leu Met Asp			
	275	280	285
Phe Leu Asn Arg Leu Ile Ile Tyr Thr Gly Glu Tyr Arg Gly Ile Arg			
	290	295	300
His Trp Ala Gly His Glu Val Glu Ser Ser Arg Thr Gly Met Met Thr			
305	310	315	320

Asn Ile Arg Phe Pro Leu Tyr Gly Thr Ala Ala Thr Ala Glu Pro Thr		
	325	330 335
Arg Phe Ile Thr Pro Ser Thr Phe Pro Gly Leu Asn Leu Phe Tyr Arg		
	340	345 350
Thr Leu Ser Ala Pro Ile Phe Arg Asp Glu Pro Gly Ala Asn Ile Ile		
	355	360 365
Ile Arg Tyr Arg Thr Ser Leu Val Glu Gly Val Gly Phe Ile Gln Pro		
	370	375 380
Asn Asn Gly Glu Gln Leu Tyr Arg Val Arg Gly Thr Leu Asp Ser Leu		
385	390	395 400
Asp Gln Leu Pro Leu Glu Gly Glu Ser Ser Leu Thr Glu Tyr Ser His		
	405	410 415
Arg Leu Cys His Val Arg Phe Ala Gln Ser Leu Arg Asn Ala Glu Pro		
	420	425 430
Leu Asp Tyr Ala Arg Val Pro Met Phe Ser Trp Thr His Arg Ser Ala		
	435	440 445
Thr Pro Thr Asn Thr Ile Asp Pro Asp Val Ile Thr Gln Ile Pro Leu		
	450	455 460
Val Lys Ala His Thr Leu Gln Ser Gly Thr Thr Val Val Lys Gly Pro		
465	470	475 480
Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr Ser Gly Gly Pro Phe		
	485	490 495
Ala Phe Ser Asn Val Asn Leu Asp Trp Asn Leu Ser Gln Arg Tyr Arg		
	500	505 510
Ala Arg Ile Arg Tyr Ala Ser Thr Thr Asn Leu Arg Met Tyr Val Thr		
	515	520 525
Ile Ala Gly Glu Arg Ile Phe Ala Gly Gln Phe Asn Lys Thr Met Asn		
	530	535 540
Thr Gly Asp Pro Leu Thr Phe Gln Ser Phe Ser Tyr Ala Thr Ile Asp		
545	550	555 560
Thr Ala Phe Thr Phe Pro Thr Lys Ala Ser Ser Leu Thr Val Gly Ala		
	565	570 575
Asp Thr Phe Ser Ser Gly Asn Glu Val Tyr Val Asp Arg Phe Glu Leu		
	580	585 590
Ile Pro Val Thr Ala Thr Phe Glu Ala Glu Tyr Asp Leu Glu Lys		
	595	600 605

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 603

&lt;212&gt; PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Bt29-Bt22Tr6

<400> 25

```

Met Glu Ile Asn Asn Gln Asn Gln Cys Val Pro Tyr Asn Cys Leu Asn
1           5           10           15
Asn Pro Glu Ser Glu Ile Leu Asn Val Ala Ile Phe Ser Ser Glu Gln
          20           25           30
Val Ala Glu Ile His Leu Lys Ile Thr Arg Leu Ile Leu Glu Asn Phe
          35           40           45
Leu Pro Gly Gly Ser Phe Ala Phe Gly Leu Phe Asp Leu Ile Trp Gly
          50           55           60
Ile Phe Asn Glu Asp Gln Trp Ser Ala Phe Leu Arg Gln Val Glu Glu
65           70           75           80
Leu Ile Asn Gln Arg Ile Thr Glu Phe Ala Arg Gly Gln Ala Ile Gln
          85           90           95
Arg Leu Val Gly Phe Gly Arg Ser Tyr Asp Glu Tyr Ile Leu Ala Leu
          100          105          110
Lys Glu Trp Glu Asn Asp Pro Asp Asn Pro Ala Ser Lys Glu Arg Val
          115          120          125
Arg Thr Arg Phe Arg Thr Thr Asp Asp Ala Leu Leu Thr Gly Val Pro
          130          135          140
Leu Met Ala Ile Pro Gly Phe Glu Leu Ala Thr Leu Ser Val Tyr Ala
145          150          155          160
Gln Ser Ala Asn Leu His Leu Ala Leu Leu Arg Asp Ala Val Phe Phe
          165          170          175
Gly Glu Arg Trp Gly Leu Thr Gln Thr Asn Ile Asn Asp Leu Tyr Ser
          180          185          190
Arg Leu Lys Asn Ser Ile Arg Asp Tyr Thr Asn His Cys Val Arg Phe
          195          200          205
Tyr Asn Ile Gly Leu Gly Asn Leu Asn Val Ile Arg Pro Glu Tyr Tyr
          210          215          220
Arg Phe Gln Arg Glu Leu Thr Ile Ser Val Leu Asp Leu Val Ala Leu
225          230          235          240
Phe Pro Asn Tyr Asp Ile Arg Thr Tyr Pro Ile Pro Thr Lys Ser Gln
          245          250          255
Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Asp Pro Ile Ile Ser Pro Gly Ala Gln
          260          265          270
Ala Gly Tyr Thr Leu Gln Asp Val Leu Arg Glu Pro His Leu Met Asp

```

275	280	285
Phe Leu Asn Arg Leu Ile Ile Tyr Thr Gly Glu Tyr Arg Gly Ile Arg		
290	295	300
His Trp Ala Gly His Glu Val Glu Ser Ser Arg Thr Gly Met Met Thr		
305	310	315
Asn Ile Arg Phe Pro Leu Tyr Gly Thr Ala Ala Thr Ala Glu Pro Thr		
325	330	335
Arg Phe Ile Thr Pro Ser Thr Phe Pro Gly Leu Asn Leu Phe Tyr Arg		
340	345	350
Thr Leu Ser Ala Pro Ile Phe Arg Asp Glu Pro Gly Ala Asn Ile Ile		
355	360	365
Ile Arg Tyr Arg Thr Ser Leu Val Glu Gly Val Gly Phe Ile Gln Pro		
370	375	380
Asn Asn Gly Glu Gln Leu Tyr Arg Val Arg Gly Thr Leu Asp Ser Leu		
385	390	395
Asp Gln Leu Pro Leu Glu Gly Glu Ser Ser Leu Thr Glu Tyr Ser His		
405	410	415
Arg Leu Cys His Val Arg Phe Ala Gln Ser Leu Arg Asn Ala Glu Pro		
420	425	430
Leu Asp Tyr Ala Arg Val Pro Met Phe Ser Trp Thr His Arg Ser Ala		
435	440	445
Thr Pro Thr Asn Thr Ile Asp Pro Asp Val Ile Thr Gln Ile Pro Leu		
450	455	460
Val Lys Ala His Thr Leu Gln Ser Gly Thr Thr Val Val Lys Gly Pro		
465	470	475
Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr Ser Gly Gly Pro Phe		
485	490	495
Ala Phe Ser Asn Val Asn Leu Asp Trp Asn Leu Ser Gln Arg Tyr Arg		
500	505	510
Ala Arg Ile Arg Tyr Ala Ser Thr Thr Asn Leu Arg Met Tyr Val Thr		
515	520	525
Ile Ala Gly Glu Arg Ile Phe Ala Gly Gln Phe Asn Lys Thr Met Asn		
530	535	540
Thr Gly Asp Pro Leu Thr Phe Gln Ser Phe Ser Tyr Ala Thr Ile Asp		
545	550	555
Thr Ala Phe Thr Phe Pro Thr Lys Ala Ser Ser Leu Thr Val Gly Ala		
565	570	575
Asp Thr Phe Ser Ser Gly Asn Glu Val Tyr Val Asp Arg Phe Glu Leu		
580	585	590

Ile Pro Val Thr Ala Thr Phe Glu Ala Glu Tyr  
 595 600  
 <210> 26  
 <211> 676  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> BT29BT22-TL22v1  
 <400> 26  
 Met Glu Ile Asn Asn Gln Asn Gln Cys Val Pro Tyr Asn Cys Leu Asn  
 1 5 10 15  
 Asn Pro Glu Ser Glu Ile Leu Asn Val Ala Ile Phe Ser Ser Glu Gln  
 20 25 30  
 Val Ala Glu Ile His Leu Lys Ile Thr Arg Leu Ile Leu Glu Asn Phe  
 35 40 45  
 Leu Pro Gly Gly Ser Phe Ala Phe Gly Leu Phe Asp Leu Ile Trp Gly  
 50 55 60  
 Ile Phe Asn Glu Asp Gln Trp Ser Ala Phe Leu Arg Gln Val Glu Glu  
 65 70 75 80  
 Leu Ile Asn Gln Arg Ile Thr Glu Phe Ala Arg Gly Gln Ala Ile Gln  
 85 90 95  
 Arg Leu Val Gly Phe Gly Arg Ser Tyr Asp Glu Tyr Ile Leu Ala Leu  
 100 105 110  
 Lys Glu Trp Glu Asn Asp Pro Asp Asn Pro Ala Ser Lys Glu Arg Val  
 115 120 125  
 Arg Thr Arg Phe Arg Thr Thr Asp Asp Ala Leu Leu Thr Gly Val Pro  
 130 135 140  
 Leu Met Ala Ile Pro Gly Phe Glu Leu Ala Thr Leu Ser Val Tyr Ala  
 145 150 155 160  
 Gln Ser Ala Asn Leu His Leu Ala Leu Leu Arg Asp Ala Val Phe Phe  
 165 170 175  
 Gly Glu Arg Trp Gly Leu Thr Gln Thr Asn Ile Asn Asp Leu Tyr Ser  
 180 185 190  
 Arg Leu Lys Asn Ser Ile Arg Asp Tyr Thr Asn His Cys Val Arg Phe  
 195 200 205  
 Tyr Asn Ile Gly Leu Gly Asn Leu Asn Val Ile Arg Pro Glu Tyr Tyr  
 210 215 220  
 Arg Phe Gln Arg Glu Leu Thr Ile Ser Val Leu Asp Leu Val Ala Leu  
 225 230 235 240



Phe Pro Asn Tyr Asp Ile Arg Thr Tyr Pro Ile Pro Thr Lys Ser Gln  
 245 250 255  
 Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Asp Pro Ile Ile Ser Pro Gly Ala Gln  
 260 265 270  
 Ala Gly Tyr Thr Leu Gln Asp Val Leu Arg Glu Pro His Leu Met Asp  
 275 280 285  
 Phe Leu Asn Arg Leu Ile Ile Tyr Thr Gly Glu Tyr Arg Gly Ile Arg  
 290 295 300  
 His Trp Ala Gly His Glu Val Glu Ser Ser Arg Thr Gly Met Met Thr  
 305 310 315 320  
 Asn Ile Arg Phe Pro Leu Tyr Gly Thr Ala Ala Thr Ala Glu Pro Thr  
 325 330 335  
 Arg Phe Ile Thr Pro Ser Thr Phe Pro Gly Leu Asn Leu Phe Tyr Arg  
 340 345 350  
 Thr Leu Ser Ala Pro Ile Phe Arg Asp Glu Pro Gly Ala Asn Ile Ile  
 355 360 365  
 Ile Arg Tyr Arg Thr Ser Leu Val Glu Gly Val Gly Phe Ile Gln Pro  
 370 375 380  
 Asn Asn Gly Glu Gln Leu Tyr Arg Val Arg Gly Thr Leu Asp Ser Leu  
 385 390 395 400  
 Asp Gln Leu Pro Leu Glu Gly Glu Ser Ser Leu Thr Glu Tyr Ser His  
 405 410 415  
 Arg Leu Cys His Val Arg Phe Ala Gln Ser Leu Arg Asn Ala Glu Pro  
 420 425 430  
 Leu Asp Tyr Ala Arg Val Pro Met Phe Ser Trp Thr His Arg Ser Ala  
 435 440 445  
 Thr Pro Thr Asn Thr Ile Asp Pro Asp Val Ile Thr Gln Ile Pro Leu  
 450 455 460  
 Val Lys Ala His Thr Leu Gln Ser Gly Thr Thr Val Val Lys Gly Pro  
 465 470 475 480  
 Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr Ser Gly Gly Pro Phe  
 485 490 495  
 Ala Phe Ser Asn Val Asn Leu Asp Trp Asn Leu Ser Gln Arg Tyr Arg  
 500 505 510  
 Ala Arg Ile Arg Tyr Ala Ser Thr Thr Asn Leu Arg Met Tyr Val Thr  
 515 520 525  
 Ile Ala Gly Glu Arg Ile Phe Ala Gly Gln Phe Asn Lys Thr Met Asn  
 530 535 540  
 Thr Gly Asp Pro Leu Thr Phe Gln Ser Phe Ser Tyr Ala Thr Ile Asp

545	550	555	560
Thr Ala Phe Thr Phe Pro Thr Lys Ala Ser Ser Leu Thr Val Gly Ala			
	565	570	575
Asp Thr Phe Ser Ser Gly Asn Glu Val Tyr Val Asp Arg Phe Glu Leu			
	580	585	590
Ile Pro Val Thr Ala Thr Leu Glu Ala Val Thr Asp Leu Glu Arg Ala			
	595	600	605
Gln Lys Ala Val His Glu Leu Phe Thr Ser Thr Asn Pro Gly Gly Leu			
	610	615	620
Lys Thr Asp Val Ala Lys Asp His Tyr Thr Asn Thr Ile Ser Lys Ser			
625	630	635	640
Val Gln Ser Val Phe Arg Cys Arg Cys Ser Glu Arg Thr Arg Ile Tyr			
	645	650	655
Arg Trp Gly Tyr Pro Ser Lys Lys Glu Tyr Trp Tyr Ile Trp Gly Tyr			
	660	665	670
Thr Ser Lys Tyr			
	675		
<210> 27			
<211> 644			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> BT29BT22-TL22v2			
<400> 27			
Met Glu Ile Asn Asn Gln Asn Gln Cys Val Pro Tyr Asn Cys Leu Asn			
1	5	10	15
Asn Pro Glu Ser Glu Ile Leu Asn Val Ala Ile Phe Ser Ser Glu Gln			
	20	25	30
Val Ala Glu Ile His Leu Lys Ile Thr Arg Leu Ile Leu Glu Asn Phe			
	35	40	45
Leu Pro Gly Gly Ser Phe Ala Phe Gly Leu Phe Asp Leu Ile Trp Gly			
	50	55	60
Ile Phe Asn Glu Asp Gln Trp Ser Ala Phe Leu Arg Gln Val Glu Glu			
65	70	75	80
Leu Ile Asn Gln Arg Ile Thr Glu Phe Ala Arg Gly Gln Ala Ile Gln			
	85	90	95
Arg Leu Val Gly Phe Gly Arg Ser Tyr Asp Glu Tyr Ile Leu Ala Leu			
	100	105	110
Lys Glu Trp Glu Asn Asp Pro Asp Asn Pro Ala Ser Lys Glu Arg Val			

115	120	125
Arg Thr Arg Phe Arg Thr Thr	Asp Asp Ala Leu Leu Thr Gly Val Pro	
130	135	140
Leu Met Ala Ile Pro Gly Phe Glu Leu Ala Thr Leu Ser Val Tyr Ala		
145	150	155
Gln Ser Ala Asn Leu His Leu Ala Leu Leu Arg Asp Ala Val Phe Phe		
165	170	175
Gly Glu Arg Trp Gly Leu Thr Gln Thr Asn Ile Asn Asp Leu Tyr Ser		
180	185	190
Arg Leu Lys Asn Ser Ile Arg Asp Tyr Thr Asn His Cys Val Arg Phe		
195	200	205
Tyr Asn Ile Gly Leu Gly Asn Leu Asn Val Ile Arg Pro Glu Tyr Tyr		
210	215	220
Arg Phe Gln Arg Glu Leu Thr Ile Ser Val Leu Asp Leu Val Ala Leu		
225	230	235
Phe Pro Asn Tyr Asp Ile Arg Thr Tyr Pro Ile Pro Thr Lys Ser Gln		
245	250	255
Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Asp Pro Ile Ile Ser Pro Gly Ala Gln		
260	265	270
Ala Gly Tyr Thr Leu Gln Asp Val Leu Arg Glu Pro His Leu Met Asp		
275	280	285
Phe Leu Asn Arg Leu Ile Ile Tyr Thr Gly Glu Tyr Arg Gly Ile Arg		
290	295	300
His Trp Ala Gly His Glu Val Glu Ser Ser Arg Thr Gly Met Met Thr		
305	310	315
Asn Ile Arg Phe Pro Leu Tyr Gly Thr Ala Ala Thr Ala Glu Pro Thr		
325	330	335
Arg Phe Ile Thr Pro Ser Thr Phe Pro Gly Leu Asn Leu Phe Tyr Arg		
340	345	350
Thr Leu Ser Ala Pro Ile Phe Arg Asp Glu Pro Gly Ala Asn Ile Ile		
355	360	365
Ile Arg Tyr Arg Thr Ser Leu Val Glu Gly Val Gly Phe Ile Gln Pro		
370	375	380
Asn Asn Gly Glu Gln Leu Tyr Arg Val Arg Gly Thr Leu Asp Ser Leu		
385	390	395
Asp Gln Leu Pro Leu Glu Gly Glu Ser Ser Leu Thr Glu Tyr Ser His		
405	410	415
Arg Leu Cys His Val Arg Phe Ala Gln Ser Leu Arg Asn Ala Glu Pro		
420	425	430

Leu Asp Tyr Ala Arg Val Pro Met Phe Ser Trp Thr His Arg Ser Ala  
 435 440 445  
 Thr Pro Thr Asn Thr Ile Asp Pro Asp Val Ile Thr Gln Ile Pro Leu  
 450 455 460  
 Val Lys Ala His Thr Leu Gln Ser Gly Thr Thr Val Val Lys Gly Pro  
 465 470 475 480  
 Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr Ser Gly Gly Pro Phe  
 485 490 495  
 Ala Phe Ser Asn Val Asn Leu Asp Trp Asn Leu Ser Gln Arg Tyr Arg  
 500 505 510  
 Ala Arg Ile Arg Tyr Ala Ser Thr Thr Asn Leu Arg Met Tyr Val Thr  
 515 520 525  
 Ile Ala Gly Glu Arg Ile Phe Ala Gly Gln Phe Asn Lys Thr Met Asn  
 530 535 540  
 Thr Gly Asp Pro Leu Thr Phe Gln Ser Phe Ser Tyr Ala Thr Ile Asp  
 545 550 555 560  
 Thr Ala Phe Thr Phe Pro Thr Lys Ala Ser Ser Leu Thr Val Gly Ala  
 565 570 575  
 Asp Thr Phe Ser Ser Gly Asn Glu Val Tyr Val Asp Arg Phe Glu Leu  
 580 585 590  
 Ile Pro Val Thr Ala Thr Leu Glu Ala Val Thr Asp Leu Glu Arg Ala  
 595 600 605  
 Gln Lys Ala Val His Glu Leu Phe Thr Ser Thr Asn Pro Gly Gly Leu  
 610 615 620  
 Lys Thr Asp Val Ala Lys Asp His Tyr Thr Asn Thr Ile Ser Lys Ser  
 625 630 635 640  
 Val Gln Ser Val  
 <210> 28  
 <211> 634  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> BT29BT22-TL22v3  
 <400> 28  
 Met Glu Ile Asn Asn Gln Asn Gln Cys Val Pro Tyr Asn Cys Leu Asn  
 1 5 10 15  
 Asn Pro Glu Ser Glu Ile Leu Asn Val Ala Ile Phe Ser Ser Glu Gln  
 20 25 30  
 Val Ala Glu Ile His Leu Lys Ile Thr Arg Leu Ile Leu Glu Asn Phe

35	40	45
Leu Pro Gly Gly Ser Phe	Ala Phe Gly Leu Phe	Asp Leu Ile Trp Gly
50	55	60
Ile Phe Asn Glu Asp Gln Trp	Ser Ala Phe Leu Arg	Gln Val Glu Glu
65	70	80
Leu Ile Asn Gln Arg Ile Thr	Glu Phe Ala Arg Gly	Gln Ala Ile Gln
85	90	95
Arg Leu Val Gly Phe Gly Arg	Ser Tyr Asp Glu Tyr	Ile Leu Ala Leu
100	105	110
Lys Glu Trp Glu Asn Asp Pro	Asp Asn Pro Ala Ser	Lys Glu Arg Val
115	120	125
Arg Thr Arg Phe Arg Thr Thr	Asp Asp Ala Leu Leu	Thr Gly Val Pro
130	135	140
Leu Met Ala Ile Pro Gly Phe	Glu Leu Ala Thr Leu	Ser Val Tyr Ala
145	150	160
Gln Ser Ala Asn Leu His Leu	Ala Leu Leu Arg Asp	Ala Val Phe Phe
165	170	175
Gly Glu Arg Trp Gly Leu Thr	Gln Thr Asn Ile Asn	Asp Leu Tyr Ser
180	185	190
Arg Leu Lys Asn Ser Ile Arg	Asp Tyr Thr Asn His	Cys Val Arg Phe
195	200	205
Tyr Asn Ile Gly Leu Gly Asn	Leu Asn Val Ile Arg	Pro Glu Tyr Tyr
210	215	220
Arg Phe Gln Arg Glu Leu Thr	Ile Ser Val Leu Asp	Leu Val Ala Leu
225	230	240
Phe Pro Asn Tyr Asp Ile Arg	Thr Tyr Pro Ile Pro	Thr Lys Ser Gln
245	250	255
Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr	Asp Pro Ile Ile Ser	Pro Gly Ala Gln
260	265	270
Ala Gly Tyr Thr Leu Gln Asp	Val Leu Arg Glu Pro	His Leu Met Asp
275	280	285
Phe Leu Asn Arg Leu Ile Ile	Tyr Thr Gly Glu Tyr	Arg Gly Ile Arg
290	295	300
His Trp Ala Gly His Glu Val	Glu Ser Ser Arg Thr	Gly Met Met Thr
305	310	320
Asn Ile Arg Phe Pro Leu Tyr	Gly Thr Ala Ala Thr	Ala Glu Pro Thr
325	330	335
Arg Phe Ile Thr Pro Ser Thr	Phe Pro Gly Leu Asn	Leu Phe Tyr Arg
340	345	350

Thr Leu Ser Ala Pro Ile Phe Arg Asp Glu Pro Gly Ala Asn Ile Ile  
 355 360 365  
 Ile Arg Tyr Arg Thr Ser Leu Val Glu Gly Val Gly Phe Ile Gln Pro  
 370 375 380  
 Asn Asn Gly Glu Gln Leu Tyr Arg Val Arg Gly Thr Leu Asp Ser Leu  
 385 390 395 400  
 Asp Gln Leu Pro Leu Glu Gly Glu Ser Ser Leu Thr Glu Tyr Ser His  
 405 410 415  
 Arg Leu Cys His Val Arg Phe Ala Gln Ser Leu Arg Asn Ala Glu Pro  
 420 425 430  
 Leu Asp Tyr Ala Arg Val Pro Met Phe Ser Trp Thr His Arg Ser Ala  
 435 440 445  
 Thr Pro Thr Asn Thr Ile Asp Pro Asp Val Ile Thr Gln Ile Pro Leu  
 450 455 460  
 Val Lys Ala His Thr Leu Gln Ser Gly Thr Thr Val Val Lys Gly Pro  
 465 470 475 480  
 Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr Ser Gly Gly Pro Phe  
 485 490 495  
 Ala Phe Ser Asn Val Asn Leu Asp Trp Asn Leu Ser Gln Arg Tyr Arg  
 500 505 510  
 Ala Arg Ile Arg Tyr Ala Ser Thr Thr Asn Leu Arg Met Tyr Val Thr  
 515 520 525  
 Ile Ala Gly Glu Arg Ile Phe Ala Gly Gln Phe Asn Lys Thr Met Asn  
 530 535 540  
 Thr Gly Asp Pro Leu Thr Phe Gln Ser Phe Ser Tyr Ala Thr Ile Asp  
 545 550 555 560  
 Thr Ala Phe Thr Phe Pro Thr Lys Ala Ser Ser Leu Thr Val Gly Ala  
 565 570 575  
 Asp Thr Phe Ser Ser Gly Asn Glu Val Tyr Val Asp Arg Phe Glu Leu  
 580 585 590  
 Ile Pro Val Thr Ala Thr Leu Glu Ala Val Thr Asp Leu Glu Arg Ala  
 595 600 605  
 Gln Lys Ala Val His Glu Leu Phe Thr Ser Thr Asn Pro Gly Gly Leu  
 610 615 620  
 Lys Thr Asp Val Ala Lys Asp His Tyr Thr  
 625 630

<210> 29

<211> 622

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> BT29BT22-TL22v4

<400> 29

```

Met Glu Ile Asn Asn Gln Asn Gln Cys Val Pro Tyr Asn Cys Leu Asn
1           5           10           15
Asn Pro Glu Ser Glu Ile Leu Asn Val Ala Ile Phe Ser Ser Glu Gln
          20           25           30
Val Ala Glu Ile His Leu Lys Ile Thr Arg Leu Ile Leu Glu Asn Phe
          35           40           45
Leu Pro Gly Gly Ser Phe Ala Phe Gly Leu Phe Asp Leu Ile Trp Gly
          50           55           60
Ile Phe Asn Glu Asp Gln Trp Ser Ala Phe Leu Arg Gln Val Glu Glu
65           70           75           80
Leu Ile Asn Gln Arg Ile Thr Glu Phe Ala Arg Gly Gln Ala Ile Gln
          85           90           95
Arg Leu Val Gly Phe Gly Arg Ser Tyr Asp Glu Tyr Ile Leu Ala Leu
          100          105          110
Lys Glu Trp Glu Asn Asp Pro Asp Asn Pro Ala Ser Lys Glu Arg Val
          115          120          125
Arg Thr Arg Phe Arg Thr Thr Asp Asp Ala Leu Leu Thr Gly Val Pro
          130          135          140
Leu Met Ala Ile Pro Gly Phe Glu Leu Ala Thr Leu Ser Val Tyr Ala
145          150          155          160
Gln Ser Ala Asn Leu His Leu Ala Leu Leu Arg Asp Ala Val Phe Phe
          165          170          175
Gly Glu Arg Trp Gly Leu Thr Gln Thr Asn Ile Asn Asp Leu Tyr Ser
          180          185          190
Arg Leu Lys Asn Ser Ile Arg Asp Tyr Thr Asn His Cys Val Arg Phe
          195          200          205
Tyr Asn Ile Gly Leu Gly Asn Leu Asn Val Ile Arg Pro Glu Tyr Tyr
          210          215          220
Arg Phe Gln Arg Glu Leu Thr Ile Ser Val Leu Asp Leu Val Ala Leu
225          230          235          240
Phe Pro Asn Tyr Asp Ile Arg Thr Tyr Pro Ile Pro Thr Lys Ser Gln
          245          250          255
Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Asp Pro Ile Ile Ser Pro Gly Ala Gln
          260          265          270
Ala Gly Tyr Thr Leu Gln Asp Val Leu Arg Glu Pro His Leu Met Asp

```

275	280	285
Phe Leu Asn Arg Leu Ile Ile Tyr Thr Gly Glu Tyr Arg Gly Ile Arg		
290	295	300
His Trp Ala Gly His Glu Val Glu Ser Ser Arg Thr Gly Met Met Thr		
305	310	315
Asn Ile Arg Phe Pro Leu Tyr Gly Thr Ala Ala Thr Ala Glu Pro Thr		
325	330	335
Arg Phe Ile Thr Pro Ser Thr Phe Pro Gly Leu Asn Leu Phe Tyr Arg		
340	345	350
Thr Leu Ser Ala Pro Ile Phe Arg Asp Glu Pro Gly Ala Asn Ile Ile		
355	360	365
Ile Arg Tyr Arg Thr Ser Leu Val Glu Gly Val Gly Phe Ile Gln Pro		
370	375	380
Asn Asn Gly Glu Gln Leu Tyr Arg Val Arg Gly Thr Leu Asp Ser Leu		
385	390	395
Asp Gln Leu Pro Leu Glu Gly Glu Ser Ser Leu Thr Glu Tyr Ser His		
405	410	415
Arg Leu Cys His Val Arg Phe Ala Gln Ser Leu Arg Asn Ala Glu Pro		
420	425	430
Leu Asp Tyr Ala Arg Val Pro Met Phe Ser Trp Thr His Arg Ser Ala		
435	440	445
Thr Pro Thr Asn Thr Ile Asp Pro Asp Val Ile Thr Gln Ile Pro Leu		
450	455	460
Val Lys Ala His Thr Leu Gln Ser Gly Thr Thr Val Val Lys Gly Pro		
465	470	475
Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr Ser Gly Gly Pro Phe		
485	490	495
Ala Phe Ser Asn Val Asn Leu Asp Trp Asn Leu Ser Gln Arg Tyr Arg		
500	505	510
Ala Arg Ile Arg Tyr Ala Ser Thr Thr Asn Leu Arg Met Tyr Val Thr		
515	520	525
Ile Ala Gly Glu Arg Ile Phe Ala Gly Gln Phe Asn Lys Thr Met Asn		
530	535	540
Thr Gly Asp Pro Leu Thr Phe Gln Ser Phe Ser Tyr Ala Thr Ile Asp		
545	550	555
Thr Ala Phe Thr Phe Pro Thr Lys Ala Ser Ser Leu Thr Val Gly Ala		
565	570	575
Asp Thr Phe Ser Ser Gly Asn Glu Val Tyr Val Asp Arg Phe Glu Leu		
580	585	590



Ile Pro Val Thr Ala Thr Leu Glu Ala Val Thr Asp Leu Glu Arg Ala  
 595 600 605  
 Gln Lys Ala Val His Glu Leu Phe Thr Ser Thr Asn Pro Gly  
 610 615 620  
 <210> 30  
 <211> 610  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> BT29BT22-TL22v5  
 <400> 30  
 Met Glu Ile Asn Asn Gln Asn Gln Cys Val Pro Tyr Asn Cys Leu Asn  
 1 5 10 15  
 Asn Pro Glu Ser Glu Ile Leu Asn Val Ala Ile Phe Ser Ser Glu Gln  
 20 25 30  
 Val Ala Glu Ile His Leu Lys Ile Thr Arg Leu Ile Leu Glu Asn Phe  
 35 40 45  
 Leu Pro Gly Gly Ser Phe Ala Phe Gly Leu Phe Asp Leu Ile Trp Gly  
 50 55 60  
 Ile Phe Asn Glu Asp Gln Trp Ser Ala Phe Leu Arg Gln Val Glu Glu  
 65 70 75 80  
 Leu Ile Asn Gln Arg Ile Thr Glu Phe Ala Arg Gly Gln Ala Ile Gln  
 85 90 95  
 Arg Leu Val Gly Phe Gly Arg Ser Tyr Asp Glu Tyr Ile Leu Ala Leu  
 100 105 110  
 Lys Glu Trp Glu Asn Asp Pro Asp Asn Pro Ala Ser Lys Glu Arg Val  
 115 120 125  
 Arg Thr Arg Phe Arg Thr Thr Asp Asp Ala Leu Leu Thr Gly Val Pro  
 130 135 140  
 Leu Met Ala Ile Pro Gly Phe Glu Leu Ala Thr Leu Ser Val Tyr Ala  
 145 150 155 160  
 Gln Ser Ala Asn Leu His Leu Ala Leu Leu Arg Asp Ala Val Phe Phe  
 165 170 175  
 Gly Glu Arg Trp Gly Leu Thr Gln Thr Asn Ile Asn Asp Leu Tyr Ser  
 180 185 190  
 Arg Leu Lys Asn Ser Ile Arg Asp Tyr Thr Asn His Cys Val Arg Phe  
 195 200 205  
 Tyr Asn Ile Gly Leu Gly Asn Leu Asn Val Ile Arg Pro Glu Tyr Tyr  
 210 215 220

Arg Phe Gln Arg Glu Leu Thr Ile Ser Val Leu Asp Leu Val Ala Leu  
 225 230 235 240  
 Phe Pro Asn Tyr Asp Ile Arg Thr Tyr Pro Ile Pro Thr Lys Ser Gln  
 245 250 255  
 Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Asp Pro Ile Ile Ser Pro Gly Ala Gln  
 260 265 270  
 Ala Gly Tyr Thr Leu Gln Asp Val Leu Arg Glu Pro His Leu Met Asp  
 275 280 285  
 Phe Leu Asn Arg Leu Ile Ile Tyr Thr Gly Glu Tyr Arg Gly Ile Arg  
 290 295 300  
 His Trp Ala Gly His Glu Val Glu Ser Ser Arg Thr Gly Met Met Thr  
 305 310 315 320  
 Asn Ile Arg Phe Pro Leu Tyr Gly Thr Ala Ala Thr Ala Glu Pro Thr  
 325 330 335  
 Arg Phe Ile Thr Pro Ser Thr Phe Pro Gly Leu Asn Leu Phe Tyr Arg  
 340 345 350  
 Thr Leu Ser Ala Pro Ile Phe Arg Asp Glu Pro Gly Ala Asn Ile Ile  
 355 360 365  
 Ile Arg Tyr Arg Thr Ser Leu Val Glu Gly Val Gly Phe Ile Gln Pro  
 370 375 380  
 Asn Asn Gly Glu Gln Leu Tyr Arg Val Arg Gly Thr Leu Asp Ser Leu  
 385 390 395 400  
 Asp Gln Leu Pro Leu Glu Gly Glu Ser Ser Leu Thr Glu Tyr Ser His  
 405 410 415  
 Arg Leu Cys His Val Arg Phe Ala Gln Ser Leu Arg Asn Ala Glu Pro  
 420 425 430  
 Leu Asp Tyr Ala Arg Val Pro Met Phe Ser Trp Thr His Arg Ser Ala  
 435 440 445  
 Thr Pro Thr Asn Thr Ile Asp Pro Asp Val Ile Thr Gln Ile Pro Leu  
 450 455 460  
 Val Lys Ala His Thr Leu Gln Ser Gly Thr Thr Val Val Lys Gly Pro  
 465 470 475 480  
 Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr Ser Gly Gly Pro Phe  
 485 490 495  
 Ala Phe Ser Asn Val Asn Leu Asp Trp Asn Leu Ser Gln Arg Tyr Arg  
 500 505 510  
 Ala Arg Ile Arg Tyr Ala Ser Thr Thr Asn Leu Arg Met Tyr Val Thr  
 515 520 525  
 Ile Ala Gly Glu Arg Ile Phe Ala Gly Gln Phe Asn Lys Thr Met Asn



				165					170					175				
Gly	Glu	Arg	Trp	Gly	Leu	Thr	Gln	Thr	Asn	Ile	Asn	Asp	Leu	Tyr	Ser			
				180					185					190				
Arg	Leu	Lys	Asn	Ser	Ile	Arg	Asp	Tyr	Thr	Asn	His	Cys	Val	Arg	Phe			
				195					200					205				
Tyr	Asn	Ile	Gly	Leu	Gly	Asn	Leu	Asn	Val	Ile	Arg	Pro	Glu	Tyr	Tyr			
				210					215					220				
Arg	Phe	Gln	Arg	Glu	Leu	Thr	Ile	Ser	Val	Leu	Asp	Leu	Val	Ala	Leu			
225									230					235				240
Phe	Pro	Asn	Tyr	Asp	Ile	Arg	Thr	Tyr	Pro	Ile	Pro	Thr	Lys	Ser	Gln			
				245					250					255				
Leu	Thr	Arg	Glu	Ile	Tyr	Thr	Asp	Pro	Ile	Ile	Ser	Pro	Gly	Ala	Gln			
				260					265					270				
Ala	Gly	Tyr	Thr	Leu	Gln	Asp	Val	Leu	Arg	Glu	Pro	His	Leu	Met	Asp			
				275					280					285				
Phe	Leu	Asn	Arg	Leu	Ile	Ile	Tyr	Thr	Gly	Glu	Tyr	Arg	Gly	Ile	Arg			
				290					295					300				
His	Trp	Ala	Gly	His	Glu	Val	Glu	Ser	Ser	Arg	Thr	Gly	Met	Met	Thr			
305									310					315				320
Asn	Ile	Arg	Phe	Pro	Leu	Tyr	Gly	Thr	Ala	Ala	Thr	Ala	Glu	Pro	Thr			
				325					330					335				
Arg	Phe	Ile	Thr	Pro	Ser	Thr	Phe	Pro	Gly	Leu	Asn	Leu	Phe	Tyr	Arg			
				340					345					350				
Thr	Leu	Ser	Ala	Pro	Ile	Phe	Arg	Asp	Glu	Pro	Gly	Ala	Asn	Ile	Ile			
				355					360					365				
Ile	Arg	Tyr	Arg	Thr	Ser	Leu	Val	Glu	Gly	Val	Gly	Phe	Ile	Gln	Pro			
				370					375					380				
Asn	Asn	Gly	Glu	Gln	Leu	Tyr	Arg	Val	Arg	Gly	Thr	Leu	Asp	Ser	Leu			
385									390					395				400
Asp	Gln	Leu	Pro	Leu	Glu	Gly	Glu	Ser	Ser	Leu	Thr	Glu	Tyr	Ser	His			
				405					410					415				
Arg	Leu	Cys	His	Val	Arg	Phe	Ala	Gln	Ser	Leu	Arg	Asn	Ala	Glu	Pro			
				420					425					430				
Leu	Asp	Tyr	Ala	Arg	Val	Pro	Met	Phe	Ser	Trp	Thr	His	Arg	Ser	Ala			
				435					440					445				
Thr	Pro	Thr	Asn	Thr	Ile	Asp	Pro	Asp	Val	Ile	Thr	Gln	Ile	Pro	Leu			
				450					455					460				
Val	Lys	Ala	His	Thr	Leu	Gln	Ser	Gly	Thr	Thr	Val	Val	Lys	Gly	Pro			
465									470					475				480

Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr Ser Gly Gly Pro Phe  
 485 490 495  
 Ala Phe Ser Asn Val Asn Leu Asp Trp Asn Leu Ser Gln Arg Tyr Arg  
 500 505 510  
 Ala Arg Ile Arg Tyr Ala Ser Thr Thr Asn Leu Arg Met Tyr Val Thr  
 515 520 525  
 Ile Ala Gly Glu Arg Ile Phe Ala Gly Gln Phe Asn Lys Thr Met Asn  
 530 535 540  
 Thr Gly Asp Pro Leu Thr Phe Gln Ser Phe Ser Tyr Ala Thr Ile Asp  
 545 550 555 560  
 Thr Ala Phe Thr Phe Pro Thr Lys Ala Ser Ser Leu Thr Val Gly Ala  
 565 570 575  
 Asp Thr Phe Ser Ser Gly Asn Glu Val Tyr Val Asp Arg Phe Glu Leu  
 580 585 590  
 Ile Pro Val Thr Ala Thr Leu Glu  
 595 600  
 <210> 32  
 <211> 610  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> Bt29-1FaTr1  
 <400> 32  
 Met Glu Ile Asn Asn Gln Asn Gln Cys Val Pro Tyr Asn Cys Leu Asn  
 1 5 10 15  
 Asn Pro Glu Ser Glu Ile Leu Asn Val Ala Ile Phe Ser Ser Glu Gln  
 20 25 30  
 Val Ala Glu Ile His Leu Lys Ile Thr Arg Leu Ile Leu Glu Asn Phe  
 35 40 45  
 Leu Pro Gly Gly Ser Phe Ala Phe Gly Leu Phe Asp Leu Ile Trp Gly  
 50 55 60  
 Ile Phe Asn Glu Asp Gln Trp Ser Ala Phe Leu Arg Gln Val Glu Glu  
 65 70 75 80  
 Leu Ile Asn Gln Arg Ile Thr Glu Phe Ala Arg Gly Gln Ala Ile Gln  
 85 90 95  
 Arg Leu Val Gly Phe Gly Arg Ser Tyr Asp Glu Tyr Ile Leu Ala Leu  
 100 105 110  
 Lys Glu Trp Glu Asn Asp Pro Asp Asn Pro Ala Ser Lys Glu Arg Val  
 115 120 125

Arg Thr Arg Phe Arg Thr Thr Asp Asp Ala Leu Leu Thr Gly Val Pro  
 130 135 140  
 Leu Met Ala Ile Pro Gly Phe Glu Leu Ala Thr Leu Ser Val Tyr Ala  
 145 150 155 160  
 Gln Ser Ala Asn Leu His Leu Ala Leu Leu Arg Asp Ala Val Phe Phe  
 165 170 175  
 Gly Glu Arg Trp Gly Leu Thr Gln Thr Asn Ile Asn Asp Leu Tyr Ser  
 180 185 190  
 Arg Leu Lys Asn Ser Ile Arg Asp Tyr Thr Asn His Cys Val Arg Phe  
 195 200 205  
 Tyr Asn Ile Gly Leu Gly Asn Leu Asn Val Ile Arg Pro Glu Tyr Tyr  
 210 215 220  
 Arg Phe Gln Arg Glu Leu Thr Ile Ser Val Leu Asp Leu Val Ala Leu  
 225 230 235 240  
 Phe Pro Asn Tyr Asp Ile Arg Thr Tyr Pro Ile Pro Thr Lys Ser Gln  
 245 250 255  
 Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Asp Pro Ile Ile Ser Pro Gly Ala Gln  
 260 265 270  
 Ala Gly Tyr Thr Leu Gln Asp Val Leu Arg Glu Pro His Leu Met Asp  
 275 280 285  
 Phe Leu Asn Arg Leu Ile Ile Tyr Thr Gly Glu Tyr Arg Gly Ile Arg  
 290 295 300  
 His Trp Ala Gly His Glu Val Glu Ser Ser Arg Thr Gly Met Met Thr  
 305 310 315 320  
 Asn Ile Arg Phe Pro Leu Tyr Gly Thr Ala Ala Thr Ala Glu Pro Thr  
 325 330 335  
 Arg Phe Ile Thr Pro Ser Thr Phe Pro Gly Leu Asn Leu Phe Tyr Arg  
 340 345 350  
 Thr Leu Ser Ala Pro Ile Phe Arg Asp Glu Pro Gly Ala Asn Ile Ile  
 355 360 365  
 Ile Arg Tyr Arg Thr Ser Leu Val Glu Gly Val Gly Phe Ile Gln Pro  
 370 375 380  
 Asn Asn Gly Glu Gln Leu Tyr Arg Val Arg Gly Thr Leu Asp Ser Leu  
 385 390 395 400  
 Asp Gln Leu Pro Leu Glu Gly Glu Ser Ser Leu Thr Glu Tyr Ser His  
 405 410 415  
 Arg Leu Cys His Val Arg Phe Ala Gln Ser Leu Arg Asn Ala Glu Pro  
 420 425 430  
 Leu Asp Tyr Ala Arg Val Pro Met Phe Ser Trp Thr His Arg Ser Ala

435	440	445
Thr Pro Thr Asn Thr Ile Asp Pro Asp Val Ile Thr Gln Ile Pro Leu		
450	455	460
Val Lys Ala His Thr Leu Gln Ser Gly Thr Thr Val Val Arg Gly Pro		
465	470	475
Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr Ser Gly Gly Pro Phe		
485	490	495
Ala Tyr Thr Ile Val Asn Ile Asn Gly Gln Leu Pro Gln Arg Tyr Arg		
500	505	510
Ala Arg Ile Arg Tyr Ala Ser Thr Thr Asn Leu Arg Ile Tyr Val Thr		
515	520	525
Val Ala Gly Glu Arg Ile Phe Ala Gly Gln Phe Asn Lys Thr Met Asp		
530	535	540
Thr Gly Asp Pro Leu Thr Phe Gln Ser Phe Ser Tyr Ala Thr Ile Asn		
545	550	555
Thr Ala Phe Thr Phe Pro Met Ser Gln Ser Ser Phe Thr Val Gly Ala		
565	570	575
Asp Thr Phe Ser Ser Gly Asn Glu Val Tyr Ile Asp Arg Phe Glu Leu		
580	585	590
Ile Pro Val Thr Ala Thr Phe Glu Ala Glu Tyr Asp Leu Glu Arg Ala		
595	600	605
Gln Lys		
610		
<210> 33		
<211> 607		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> Bt29-1FaTr2		
<400> 33		
Met Glu Ile Asn Asn Gln Asn Gln Cys Val Pro Tyr Asn Cys Leu Asn		
1	5	10
Asn Pro Glu Ser Glu Ile Leu Asn Val Ala Ile Phe Ser Ser Glu Gln		
20	25	30
Val Ala Glu Ile His Leu Lys Ile Thr Arg Leu Ile Leu Glu Asn Phe		
35	40	45
Leu Pro Gly Gly Ser Phe Ala Phe Gly Leu Phe Asp Leu Ile Trp Gly		
50	55	60
Ile Phe Asn Glu Asp Gln Trp Ser Ala Phe Leu Arg Gln Val Glu Glu		

65	70	75	80
Leu Ile Asn Gln Arg	Ile Thr Glu Phe Ala Arg Gly Gln Ala Ile Gln		
	85	90	95
Arg Leu Val Gly Phe Gly Arg Ser Tyr Asp Glu Tyr Ile Leu Ala Leu			
	100	105	110
Lys Glu Trp Glu Asn Asp Pro Asp Asn Pro Ala Ser Lys Glu Arg Val			
	115	120	125
Arg Thr Arg Phe Arg Thr Thr Asp Asp Ala Leu Leu Thr Gly Val Pro			
	130	135	140
Leu Met Ala Ile Pro Gly Phe Glu Leu Ala Thr Leu Ser Val Tyr Ala			
145	150	155	160
Gln Ser Ala Asn Leu His Leu Ala Leu Leu Arg Asp Ala Val Phe Phe			
	165	170	175
Gly Glu Arg Trp Gly Leu Thr Gln Thr Asn Ile Asn Asp Leu Tyr Ser			
	180	185	190
Arg Leu Lys Asn Ser Ile Arg Asp Tyr Thr Asn His Cys Val Arg Phe			
	195	200	205
Tyr Asn Ile Gly Leu Gly Asn Leu Asn Val Ile Arg Pro Glu Tyr Tyr			
	210	215	220
Arg Phe Gln Arg Glu Leu Thr Ile Ser Val Leu Asp Leu Val Ala Leu			
225	230	235	240
Phe Pro Asn Tyr Asp Ile Arg Thr Tyr Pro Ile Pro Thr Lys Ser Gln			
	245	250	255
Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Asp Pro Ile Ile Ser Pro Gly Ala Gln			
	260	265	270
Ala Gly Tyr Thr Leu Gln Asp Val Leu Arg Glu Pro His Leu Met Asp			
	275	280	285
Phe Leu Asn Arg Leu Ile Ile Tyr Thr Gly Glu Tyr Arg Gly Ile Arg			
	290	295	300
His Trp Ala Gly His Glu Val Glu Ser Ser Arg Thr Gly Met Met Thr			
305	310	315	320
Asn Ile Arg Phe Pro Leu Tyr Gly Thr Ala Ala Thr Ala Glu Pro Thr			
	325	330	335
Arg Phe Ile Thr Pro Ser Thr Phe Pro Gly Leu Asn Leu Phe Tyr Arg			
	340	345	350
Thr Leu Ser Ala Pro Ile Phe Arg Asp Glu Pro Gly Ala Asn Ile Ile			
	355	360	365
Ile Arg Tyr Arg Thr Ser Leu Val Glu Gly Val Gly Phe Ile Gln Pro			
	370	375	380



Asn Asn Gly Glu Gln Leu Tyr Arg Val Arg Gly Thr Leu Asp Ser Leu																			
385						390					395								400
Asp Gln Leu Pro Leu Glu Gly Glu Ser Ser Leu Thr Glu Tyr Ser His																			
						405					410								415
Arg Leu Cys His Val Arg Phe Ala Gln Ser Leu Arg Asn Ala Glu Pro																			
						420					425								430
Leu Asp Tyr Ala Arg Val Pro Met Phe Ser Trp Thr His Arg Ser Ala																			
						435					440								445
Thr Pro Thr Asn Thr Ile Asp Pro Asp Val Ile Thr Gln Ile Pro Leu																			
						450					455								460
Val Lys Ala His Thr Leu Gln Ser Gly Thr Thr Val Val Arg Gly Pro																			
465						470					475								480
Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr Ser Gly Gly Pro Phe																			
						485					490								495
Ala Tyr Thr Ile Val Asn Ile Asn Gly Gln Leu Pro Gln Arg Tyr Arg																			
						500					505								510
Ala Arg Ile Arg Tyr Ala Ser Thr Thr Asn Leu Arg Ile Tyr Val Thr																			
						515					520								525
Val Ala Gly Glu Arg Ile Phe Ala Gly Gln Phe Asn Lys Thr Met Asp																			
						530					535								540
Thr Gly Asp Pro Leu Thr Phe Gln Ser Phe Ser Tyr Ala Thr Ile Asn																			
545						550					555								560
Thr Ala Phe Thr Phe Pro Met Ser Gln Ser Ser Phe Thr Val Gly Ala																			
						565					570								575
Asp Thr Phe Ser Ser Gly Asn Glu Val Tyr Ile Asp Arg Phe Glu Leu																			
						580					585								590
Ile Pro Val Thr Ala Thr Phe Glu Ala Glu Tyr Asp Leu Glu Arg																			
						595					600								605
<210> 34																			
<211> 603																			
<212> PRT																			
<213> 人工序列																			
<220>																			
<223> Bt29-1FaTr3																			
<400> 34																			
Met Glu Ile Asn Asn Gln Asn Gln Cys Val Pro Tyr Asn Cys Leu Asn																			
1						5					10								15
Asn Pro Glu Ser Glu Ile Leu Asn Val Ala Ile Phe Ser Ser Glu Gln																			
						20					25								30

Val Ala Glu Ile His Leu Lys Ile Thr Arg Leu Ile Leu Glu Asn Phe  
 35 40 45  
 Leu Pro Gly Gly Ser Phe Ala Phe Gly Leu Phe Asp Leu Ile Trp Gly  
 50 55 60  
 Ile Phe Asn Glu Asp Gln Trp Ser Ala Phe Leu Arg Gln Val Glu Glu  
 65 70 75 80  
 Leu Ile Asn Gln Arg Ile Thr Glu Phe Ala Arg Gly Gln Ala Ile Gln  
 85 90 95  
 Arg Leu Val Gly Phe Gly Arg Ser Tyr Asp Glu Tyr Ile Leu Ala Leu  
 100 105 110  
 Lys Glu Trp Glu Asn Asp Pro Asp Asn Pro Ala Ser Lys Glu Arg Val  
 115 120 125  
 Arg Thr Arg Phe Arg Thr Thr Asp Asp Ala Leu Leu Thr Gly Val Pro  
 130 135 140  
 Leu Met Ala Ile Pro Gly Phe Glu Leu Ala Thr Leu Ser Val Tyr Ala  
 145 150 155 160  
 Gln Ser Ala Asn Leu His Leu Ala Leu Leu Arg Asp Ala Val Phe Phe  
 165 170 175  
 Gly Glu Arg Trp Gly Leu Thr Gln Thr Asn Ile Asn Asp Leu Tyr Ser  
 180 185 190  
 Arg Leu Lys Asn Ser Ile Arg Asp Tyr Thr Asn His Cys Val Arg Phe  
 195 200 205  
 Tyr Asn Ile Gly Leu Gly Asn Leu Asn Val Ile Arg Pro Glu Tyr Tyr  
 210 215 220  
 Arg Phe Gln Arg Glu Leu Thr Ile Ser Val Leu Asp Leu Val Ala Leu  
 225 230 235 240  
 Phe Pro Asn Tyr Asp Ile Arg Thr Tyr Pro Ile Pro Thr Lys Ser Gln  
 245 250 255  
 Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Asp Pro Ile Ile Ser Pro Gly Ala Gln  
 260 265 270  
 Ala Gly Tyr Thr Leu Gln Asp Val Leu Arg Glu Pro His Leu Met Asp  
 275 280 285  
 Phe Leu Asn Arg Leu Ile Ile Tyr Thr Gly Glu Tyr Arg Gly Ile Arg  
 290 295 300  
 His Trp Ala Gly His Glu Val Glu Ser Ser Arg Thr Gly Met Met Thr  
 305 310 315 320  
 Asn Ile Arg Phe Pro Leu Tyr Gly Thr Ala Ala Thr Ala Glu Pro Thr  
 325 330 335  
 Arg Phe Ile Thr Pro Ser Thr Phe Pro Gly Leu Asn Leu Phe Tyr Arg

340	345	350
Thr Leu Ser Ala Pro Ile Phe Arg Asp Glu Pro Gly Ala Asn Ile Ile		
355	360	365
Ile Arg Tyr Arg Thr Ser Leu Val Glu Gly Val Gly Phe Ile Gln Pro		
370	375	380
Asn Asn Gly Glu Gln Leu Tyr Arg Val Arg Gly Thr Leu Asp Ser Leu		
385	390	395
Asp Gln Leu Pro Leu Glu Gly Glu Ser Ser Leu Thr Glu Tyr Ser His		
405	410	415
Arg Leu Cys His Val Arg Phe Ala Gln Ser Leu Arg Asn Ala Glu Pro		
420	425	430
Leu Asp Tyr Ala Arg Val Pro Met Phe Ser Trp Thr His Arg Ser Ala		
435	440	445
Thr Pro Thr Asn Thr Ile Asp Pro Asp Val Ile Thr Gln Ile Pro Leu		
450	455	460
Val Lys Ala His Thr Leu Gln Ser Gly Thr Thr Val Val Arg Gly Pro		
465	470	475
Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr Ser Gly Gly Pro Phe		
485	490	495
Ala Tyr Thr Ile Val Asn Ile Asn Gly Gln Leu Pro Gln Arg Tyr Arg		
500	505	510
Ala Arg Ile Arg Tyr Ala Ser Thr Thr Asn Leu Arg Ile Tyr Val Thr		
515	520	525
Val Ala Gly Glu Arg Ile Phe Ala Gly Gln Phe Asn Lys Thr Met Asp		
530	535	540
Thr Gly Asp Pro Leu Thr Phe Gln Ser Phe Ser Tyr Ala Thr Ile Asn		
545	550	555
Thr Ala Phe Thr Phe Pro Met Ser Gln Ser Ser Phe Thr Val Gly Ala		
565	570	575
Asp Thr Phe Ser Ser Gly Asn Glu Val Tyr Ile Asp Arg Phe Glu Leu		
580	585	590
Ile Pro Val Thr Ala Thr Phe Glu Ala Glu Tyr		
595	600	

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 600

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Bt29-1FaTr4

&lt;400&gt; 35

Met Glu Ile Asn Asn Gln Asn Gln Cys Val Pro Tyr Asn Cys Leu Asn  
 1                    5                    10                    15  
 Asn Pro Glu Ser Glu Ile Leu Asn Val Ala Ile Phe Ser Ser Glu Gln  
                   20                    25                    30  
 Val Ala Glu Ile His Leu Lys Ile Thr Arg Leu Ile Leu Glu Asn Phe  
                   35                    40                    45  
 Leu Pro Gly Gly Ser Phe Ala Phe Gly Leu Phe Asp Leu Ile Trp Gly  
                   50                    55                    60  
 Ile Phe Asn Glu Asp Gln Trp Ser Ala Phe Leu Arg Gln Val Glu Glu  
 65                    70                    75                    80  
 Leu Ile Asn Gln Arg Ile Thr Glu Phe Ala Arg Gly Gln Ala Ile Gln  
                   85                    90                    95  
 Arg Leu Val Gly Phe Gly Arg Ser Tyr Asp Glu Tyr Ile Leu Ala Leu  
                   100                    105                    110  
 Lys Glu Trp Glu Asn Asp Pro Asp Asn Pro Ala Ser Lys Glu Arg Val  
                   115                    120                    125  
 Arg Thr Arg Phe Arg Thr Thr Asp Asp Ala Leu Leu Thr Gly Val Pro  
                   130                    135                    140  
 Leu Met Ala Ile Pro Gly Phe Glu Leu Ala Thr Leu Ser Val Tyr Ala  
 145                    150                    155                    160  
 Gln Ser Ala Asn Leu His Leu Ala Leu Leu Arg Asp Ala Val Phe Phe  
                   165                    170                    175  
 Gly Glu Arg Trp Gly Leu Thr Gln Thr Asn Ile Asn Asp Leu Tyr Ser  
                   180                    185                    190  
 Arg Leu Lys Asn Ser Ile Arg Asp Tyr Thr Asn His Cys Val Arg Phe  
                   195                    200                    205  
 Tyr Asn Ile Gly Leu Gly Asn Leu Asn Val Ile Arg Pro Glu Tyr Tyr  
                   210                    215                    220  
 Arg Phe Gln Arg Glu Leu Thr Ile Ser Val Leu Asp Leu Val Ala Leu  
 225                    230                    235                    240  
 Phe Pro Asn Tyr Asp Ile Arg Thr Tyr Pro Ile Pro Thr Lys Ser Gln  
                   245                    250                    255  
 Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Asp Pro Ile Ile Ser Pro Gly Ala Gln  
                   260                    265                    270  
 Ala Gly Tyr Thr Leu Gln Asp Val Leu Arg Glu Pro His Leu Met Asp  
                   275                    280                    285  
 Phe Leu Asn Arg Leu Ile Ile Tyr Thr Gly Glu Tyr Arg Gly Ile Arg  
                   290                    295                    300

His Trp Ala Gly His Glu Val Glu Ser Ser Arg Thr Gly Met Met Thr																			
305					310						315								320
Asn Ile Arg Phe Pro Leu Tyr Gly Thr Ala Ala Thr Ala Glu Pro Thr																			
					325						330								335
Arg Phe Ile Thr Pro Ser Thr Phe Pro Gly Leu Asn Leu Phe Tyr Arg																			
					340						345								350
Thr Leu Ser Ala Pro Ile Phe Arg Asp Glu Pro Gly Ala Asn Ile Ile																			
					355						360								365
Ile Arg Tyr Arg Thr Ser Leu Val Glu Gly Val Gly Phe Ile Gln Pro																			
					370						375								380
Asn Asn Gly Glu Gln Leu Tyr Arg Val Arg Gly Thr Leu Asp Ser Leu																			
385					390						395								400
Asp Gln Leu Pro Leu Glu Gly Glu Ser Ser Leu Thr Glu Tyr Ser His																			
					405						410								415
Arg Leu Cys His Val Arg Phe Ala Gln Ser Leu Arg Asn Ala Glu Pro																			
					420						425								430
Leu Asp Tyr Ala Arg Val Pro Met Phe Ser Trp Thr His Arg Ser Ala																			
					435						440								445
Thr Pro Thr Asn Thr Ile Asp Pro Asp Val Ile Thr Gln Ile Pro Leu																			
					450						455								460
Val Lys Ala His Thr Leu Gln Ser Gly Thr Thr Val Val Arg Gly Pro																			
465					470						475								480
Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr Ser Gly Gly Pro Phe																			
					485						490								495
Ala Tyr Thr Ile Val Asn Ile Asn Gly Gln Leu Pro Gln Arg Tyr Arg																			
					500						505								510
Ala Arg Ile Arg Tyr Ala Ser Thr Thr Asn Leu Arg Ile Tyr Val Thr																			
					515						520								525
Val Ala Gly Glu Arg Ile Phe Ala Gly Gln Phe Asn Lys Thr Met Asp																			
					530						535								540
Thr Gly Asp Pro Leu Thr Phe Gln Ser Phe Ser Tyr Ala Thr Ile Asn																			
545					550						555								560
Thr Ala Phe Thr Phe Pro Met Ser Gln Ser Ser Phe Thr Val Gly Ala																			
					565						570								575
Asp Thr Phe Ser Ser Gly Asn Glu Val Tyr Ile Asp Arg Phe Glu Leu																			
					580						585								590
Ile Pro Val Thr Ala Thr Phe Glu																			
					595						600								

```

1  --MEINNON-----Q--CVPYNCINNPESEILNVAIFS-----SEQVAEIHKLKTRLIILENPLPGGSFAFGLFDLIWGFNEDQWSAF
1  --MKSQN--MHQSLNNAIVDKNFTGLENNTTELQNFHEG--IEFFVSVSTIQTIGIAGKILGNLGVFPAGQVASYLSFLLGELWPKGKSQWEIF
1  --MENNION-----Q--CVPYNCINNPEVEIINPERST-----GRPLDISLSTRFLLESEFVPGVGFGLFDLIWGFITPDSWSLF
1  MNSNRKNENEIINALSIPAVSHNSAQMDLSPDARIEDSLCVAEGNIDPFVSASIVQIGISIAGRILGVLGVFPAGQVASYLSFLLGELWPKGSRDPWEIF

75  LRQVEELIN-QRITFARGQAIQRLVGFGRSYDEYIILAKEWENDPDNPASKERVTRFRRTDDALLTGVPMLAIPGFELATLSVYAOSANLHLALLLRDA
96  MEHVEELIN-QKISTYARNKALADLKGDLALAYHESLESWIKNRNTRRSVVKSQYITLELMEVQSLPSEFVSGEEVPLLPYIAQAANLHLALLLRDA
75  LLQIEQLIE-QRIETLERNRATILRGLADSYEYIEALREWEANPNNAQLREDVIRFANTDDALITAINNFLLTSFEIPLLSVYVQAANLHLALLLRDA
101 MEHVEQIVRQQITDSVRDTAITARLEGLGRGYSYQQALETWLDNRNDARSRSIIRERYIALELDITTAIFLSIRNEEVPLLMVYAQAANLHLALLLRDA

174 VFFGERWGLTQININDLYSRLKNSIRDYTNHCVRFYNI GLGNLNVIRP-----EYRFQRELTISVLDLVALFPNDIRTYPIPTKSQLTREIYTDPIISP
195 SIFGKEWGLSDSEISTFYNRQVERTSDYSDHCKWFDTGLNRLKGSNAEILWKYNQFRRDMLMVLDLVALFQSYDTHMYPKIKTAQLTREVYTNAGITV
174 VFGQGWGLDIAIVNHNRLINLIHRYTKHCLDTYNQGLNLRGTNTQWARFNQFRDLTLVLDIVALFPNDVRYTYPIQISSQLTREIYTSVIED
201 SLFGSEWGMSSADVNYQEQIRYTEEYSNHCVMYNTGLNRLRGTIAETWVRYNQFRDLTLGVLDLVALFQSYDTRTYPIPTAQLTREVYTDPNQGVV

270 GAQAG-----YTLQDVLREPHLMDFLNRLIITYGEYRIRHWAGHEVESRRTGMNIRFPLYGTAATAEPTRFITPSTFPGLMLFYRTL
295 HPHPSFTSTWYNNNAFSFAIEAAVIRSPHLLDFLEQVIYLSLRSWNTQYMMWGG-HKLEFRIGG-TLNTSQGSTNTSINPVTLPFTSRDIYRT
274 SPVSAN-----IFENFRNRAEFGVRPHLMDFMNLSLFTAETVRSQTVWGGHLVSS-RNTAGNRINFPVSYGFNPGGAIWADEDPRP----FYRTL
301 AGP-----NNSWFRNGASFSAIENAIIRQPHLYDFLTLNLTIIYTRRS-QVGTIIMNLWAG-HRITTFNRIOGGSTSEMYGAIITNPSVSDIPIFVNRDVYRT

355 SAPIFRDEPGANIIIRYRTSLVEGVGFIQPNNGEQLYRVRGTLDSLQDPLEGES--SLTEYSHRCHVRFQAQSLRNAEPLDYARVPMFSWTHRSATPTN
393 ESLAGLNLFLIQPVNGVPRVDFHWKVFVTHP-IASDNFYYPGYAGIGTQLODSENELEPPETTGQPNYESYSHRSLHIGLISASHVKALVYSWTHRSADRIN
360 SDPVEVRGGFGNPHYVLGLRGVAFQQTG--TNHTRFRNSGTIDSLDEIIPQDNSGAPWNDYSHVLNHTVFRWPGEISGSDSWRAPMFSWTHRSATPTN
394 VSLAGGLSLSGIRYGLTRVDFDMIFRNHPDIVTGLFYHPGHAGIATQVXKSDTELPETTEQPNRYRAFSHLLSLHISMGPTTQDVPFVYSWTHOSADRIN

453 TIDPDVITQIPLVKAFNLHSGATIIVKGGPGFTGGDILRRTNVGSGDMRVNITAPLSQRVYRIRYASTDLOFYTNINGTTINIGNFSSTMDSGDDLQYQ
492 TIHSDSIQIPLVKAHTLQSGTIVVKGPGFTGGDILRRTSGGPFVAFSNVLDWNLSQRVYRIRYASTNLRMYVTIAGERIFAGQFNKTMNTGDLTFQ
458 TIDPERITQIPLVKAHTLQSGTIVVKGPGFTGGDILRRTSGGPFAYTIVNINGQLPQRYRARIYASTNLRRIYTVAGERIFAGQFNKTMNTGDLTFQ
494 TINSDRITQIPLVKAHTLQSGTIVVKGPGFTGGDILRRTSGGPFVAFSNVLDNLSQRVYRARIYASTNLRRIYTVAGERIFAGQFNKTMNDAGAPLTFQ

553 RFRVAGFTTPTFFSDANSTFTIGAFSFSNNNEVYIDRIEFVPAEVTFAEYDLEKAQKAVNALFTSSNOIGLKTDTV--DYHIDKVSNLVECLSDDEFCLDE
592 SFSYATIDTAFIFPTKASSLTVGADTFSSGNEVYVDRFELIPVTATLEAVTDLERAQKAVHELFTSINFGGLKTDVAKDHYTNTISKSQSVFRRCSESR
558 SFSYATINTAFTFPMSQSSFTVGADTFSSGNEVYIDRFELIPVTATFAEYDLERAQKAVNALFTSINOIGLKTDTV--DYHIDQVSNLVDCLSDDEFCLDE
594 SFSYATINTAFTFPERSSLLTIGADTFSSGNEVYVDRFELIQVTATFAESDLERARKAVNALFTSINPRGLKTDVT--DYHIDQVSNLVECLSDDEFCLDK

```

CB3

结构域 III

结构域 III

图1A

```

BT-0029 652 KRELSEKVKHAKRLCDERNLQDPNFRGINRQPDGRWRSIDITIQGGDDVFKENYYVTLPGTFDECYPTLYLQKIDESKLKAYTRYELRGYIEDSQDLEI
BT-0022 692 TR-----IYRWGYPKKEYWYIWGYTSKY-----
Cry1Fa 657 KRELSEKVKHAKRLSDERNLQDPNFKGINRQLDRGWRGSDITIQRGDDVFKENYYVTLPGTFDECYPTLYLQKIDESKLPYTRYQLRGYIEDSQDLEI
Cry1Ka 693 KRELLEEVKYAKRLSDERNLQDPFTFTSISGQTRGWIGSGTISIQGGDDIFKENYYVRLPGTVDECYPTLYLQKIDESQLKSYTRYQLRGYIEDSQDLEI

BT-0029 752 YLIRYNAKHETVNVPGTGLWPLSAQSPIGKCGEPNRCATHLEWNPDLDCSCRDGEKCAHSHHFSLDIDVGCIDLNEDLGVVWVIFKIKIQDGHARLGNL
BT-0022 716 -----
Cry1Fa 757 YLIRYNAKHETVNLGIGSLWPLSVQSPIRKCGEPNRCAPHLEWNPDLDCSCRDGEKCAHSHHFSLDIDVGCIDLNEDLDVVWVIFKIKIQDGHARLGNL
Cry1Ka 793 YLIRYNAKHETLSVPGTIESPWPSSGVYPSGRCGEPNRCAPRIEWNPDLDCCRYGKCVHSHHFSLDIDVGCIDLNEDLGVVWVIFKIKIQDGHARLGNL

BT-0029 852 EFLEEKPLVGEALARVKRAEKKWRDKREKLELETNIVYKEAKKSVDAFVNSQYDRLQADTNIA--IHAADKRVHSIREAYLPELSPVPGVNAAFEELEEG
BT-0022 716 -----
Cry1Fa 857 EFLEEKPLVGEALARVKRAEKKWRDKREKLELETNIVYKEAKESVDALFVNSQYDQLQADTNIAMIHAAADKRVHRIREAYLPELSPVPGVNVDFEELKKG
Cry1Ka 893 EFIEEKPLLKALSRVKRAEKKWRDKYEKLQLETKRKYTEAKESVDALFVDSQYDKLQANTNIGIIHGADKQVHRIREPYLELSPVIPSINAAIFEELEEG

BT-0029 952 RIFTAYSLYDARNVIKNGDFNNGLSCWNVKGVHDVVEEQNNHRSVLVVPWEAEVSQEVRCVPCGRGYILRVTAAYKEGYGEGCVTIHIEIEDNTDELKFSNCV
BT-0022 716 -----
Cry1Fa 957 RIFTAFFLYDARNVIKNGDFNNGLSCWNVKGVHDVVEEQNNHRSVLVVPWEAEVSQEVRCVPCGRGYILRVTAAYKEGYGEGCVTIHIEIENNTDELKFSNCV
Cry1Ka 993 HIFKAYSLYDARNVIKNGDFNNGLSCWNVKGVHDVQQN--HHRSVLVLSEMAEVSQKVRVCPDRGYILRVTAAYKEGYGEGCVTIHEFEDNTDVLKFRNFV

BT-0029 1052 EEEIYPNNTVTCNDYTAQTQEEYEGTYTSRNR-----GYDGAYESNSSVPADYASAYEEKAYTDGRRDNTCESNRGYGDYTPLPAGYVTKELEYFPETDK
BT-0022 710 -----
Cry1Fa 1057 EEEVYPNNTVTCNDYTANQEEYGGAYTSRNR-----GYDETYGSNSSVPADYASVYEEKSYTDGRRDNPESNRGYGDYTPLPAGYVTKELEYFPETDK
Cry1Ka 1092 EEEVYPNNTVTCNDYTTNQSAEGSDACNSYNRGYEDGYENRYEPNPSAPVNYTPTYEEGMYDTQGYNHCVSDRGYRNHTPLPAGYVTLELEYFPETEEO

BT-0029 1146 VWIEIGETEGTFIVDSVELLLMEE
BT-0022 716 -----
Cry1Fa 1151 VWIEIGETEGTFIVDSVELLLMEE
Cry1Ka 1192 VWIEIGETEGTFIVGSVELLLMEE

```

图1B

```

1  MEINNQCVPYNCLNPESEILNVAIFSSSEQVAEIHUKITRILILENFPGGSAFGLFDLIWGFNEDQWSAFLRQVEELINQRITTEFARQQAIOQLV
BT-0029
1  MEINNQCVPYNCLNPESEILNVAIFSSSEQVAEIHUKITRILILENFPGGSAFGLFDLIWGFNEDQWSAFLRQVEELINQRITTEFARQQAIOQLV
BT29-BT22
1  MEINNQCVPYNCLNPESEILNVAIFSSSEQVAEIHUKITRILILENFPGGSAFGLFDLIWGFNEDQWSAFLRQVEELINQRITTEFARQQAIOQLV
BT29-1Fa
1  MEINNQCVPYNCLNPESEILNVAIFSSSEQVAEIHUKITRILILENFPGGSAFGLFDLIWGFNEDQWSAFLRQVEELINQRITTEFARQQAIOQLV
BT29-1Ka

101  FGRSYDEYIILALKEWENDPONPASKERVTRFRRTDDALLTGVPMLAIPGFELATLSVYAQSANLHLALLRDAVFFGERWGLTQTNINDLYSRLKNSIRD
BT-0029
101  FGRSYDEYIILALKEWENDPONPASKERVTRFRRTDDALLTGVPMLAIPGFELATLSVYAQSANLHLALLRDAVFFGERWGLTQTNINDLYSRLKNSIRD
BT29-BT22
101  FGRSYDEYIILALKEWENDPONPASKERVTRFRRTDDALLTGVPMLAIPGFELATLSVYAQSANLHLALLRDAVFFGERWGLTQTNINDLYSRLKNSIRD
BT29-1Fa
101  FGRSYDEYIILALKEWENDPONPASKERVTRFRRTDDALLTGVPMLAIPGFELATLSVYAQSANLHLALLRDAVFFGERWGLTQTNINDLYSRLKNSIRD
BT29-1Ka

201  YTNHCVRFYNIGLGNLVIRPEYRFQRELTISVLDLVALFPNYDIRIYPTKSQLTREIYTDPIISPGAQAGYTLQDVLREPHLMDFLNRLIYYTGEY
BT-0029
201  YTNHCVRFYNIGLGNLVIRPEYRFQRELTISVLDLVALFPNYDIRIYPTKSQLTREIYTDPIISPGAQAGYTLQDVLREPHLMDFLNRLIYYTGEY
BT29-BT22
201  YTNHCVRFYNIGLGNLVIRPEYRFQRELTISVLDLVALFPNYDIRIYPTKSQLTREIYTDPIISPGAQAGYTLQDVLREPHLMDFLNRLIYYTGEY
BT29-1Fa
201  YTNHCVRFYNIGLGNLVIRPEYRFQRELTISVLDLVALFPNYDIRIYPTKSQLTREIYTDPIISPGAQAGYTLQDVLREPHLMDFLNRLIYYTGEY
BT29-1Ka

301  RGIRHWAGHEVESRTGMMTNIREFLYGTAATAEPTRFITPSTFPGLNLFYRILSAPIFRDEPGANIIIRYRISLVEGVGFIQPNNGEQLYRVRGTLDSL
BT-0029
301  RGIRHWAGHEVESRTGMMTNIREFLYGTAATAEPTRFITPSTFPGLNLFYRILSAPIFRDEPGANIIIRYRISLVEGVGFIQPNNGEQLYRVRGTLDSL
BT29-BT22
301  RGIRHWAGHEVESRTGMMTNIREFLYGTAATAEPTRFITPSTFPGLNLFYRILSAPIFRDEPGANIIIRYRISLVEGVGFIQPNNGEQLYRVRGTLDSL
BT29-1Fa
301  RGIRHWAGHEVESRTGMMTNIREFLYGTAATAEPTRFITPSTFPGLNLFYRILSAPIFRDEPGANIIIRYRISLVEGVGFIQPNNGEQLYRVRGTLDSL
BT29-1Ka

401  DQLPLEGESLLEYSHRKLCHVRFQAQSLRNAEPLDYARVPMFSWTHRSATPTNTIDPDVITQIPLVKAFNLHSGATIIVKGGPFTGGDILRRIIVGSGFGDMR
BT-0029
401  DQLPLEGESLLEYSHRKLCHVRFQAQSLRNAEPLDYARVPMFSWTHRSATPTNTIDPDVITQIPLVKAFNLHSGATIIVKGGPFTGGDILRRIIVGSGFGDMR
BT29-BT22
401  DQLPLEGESLLEYSHRKLCHVRFQAQSLRNAEPLDYARVPMFSWTHRSATPTNTIDPDVITQIPLVKAFNLHSGATIIVKGGPFTGGDILRRIIVGSGFGAFSN
BT29-1Fa
401  DQLPLEGESLLEYSHRKLCHVRFQAQSLRNAEPLDYARVPMFSWTHRSATPTNTIDPDVITQIPLVKAFNLHSGATIIVKGGPFTGGDILRRIIVGSGFPAYTI
BT29-1Ka

501  VNITAPLSQRYRIRIYASTTDLOFYTNINGTTINIGNFSSIMDSGDDLOQYGRFVAGFTTPTFFSDAMSTFTIGAFSFSNNEVYIDRIEFVPAEVTFFE
BT-0029
501  VNLDWNLSQRYRIRIYASTTNLRMYVTIAGERIFAGQFNKMTNDGDLTFQSFYATIDTAFITPDKASSLTVGADTFSSGNEVYVDRFELIPVTATFFE
BT29-BT22
501  VNINGQLPQRYRIRIYASTTNLRIVTVAGERIFAGQFNKMTNDGDLTFQSFYATINTAFITPMSQSFTVGDATFSSGNEVYIDRFELIPVTATFFE
BT29-1Fa
501  VNLDNFLSQRYRIRIYASTTNLRIVTVAGERIFAGQFNKMTNDGDLTFQSFYATINTAFITPERSSLTIGADTFSSGNEVYVDRFELIQVTATFFE
BT29-1Ka

601  AeyDLEKAQKAVNALFSSNQIGLKTdVTDYHIDKVSNLVECLSDDEFCLDEKRELSEKVKHAKRKLCDERNLLODPNFRGINRQPDGRGWRGSTDITIQGGD
BT-0029
601  AeyDLEKAQKAVNALFSSNQIGLKTdVTDYHIDKVSNLVECLSDDEFCLDEKRELSEKVKHAKRKLCDERNLLODPNFRGINRQPDGRGWRGSTDITIQGGD
BT29-BT22
601  AeyDLEKAQKAVNALFSSNQIGLKTdVTDYHIDKVSNLVECLSDDEFCLDEKRELSEKVKHAKRKLCDERNLLODPNFRGINRQPDGRGWRGSTDITIQGGD
BT29-1Fa
601  AeyDLEKAQKAVNALFSSNQIGLKTdVTDYHIDKVSNLVECLSDDEFCLDEKRELSEKVKHAKRKLCDERNLLODPNFRGINRQPDGRGWRGSTDITIQGGD
BT29-1Ka

```

CB3  
结构域 III

结构域 III

图2A



BT-0029 701 DVFKENYVTLPGTFDECYPTYLYQKIDESKLYKAYTRYELRGYIEDSQDLEIYLIRYNAKHETVNPVPTGS\_WPLSAQSPIGKCGEPNRCATHLEWNPDLDD  
 BT29-BT22 701 DVFKENYVTLPGTFDECYPTYLYQKIDESKLYKAYTRYELRGYIEDSQDLEIYLIRYNAKHETVNPVPTGS\_WPLSAQSPIGKCGEPNRCATHLEWNPDLDD  
 BT29-1Fa 701 DVFKENYVTLPGTFDECYPTYLYQKIDESKLYKAYTRYELRGYIEDSQDLEIYLIRYNAKHETVNPVPTGS\_WPLSAQSPIGKCGEPNRCATHLEWNPDLDD  
 BT29-1Ka 701 DVFKENYVTLPGTFDECYPTYLYQKIDESKLYKAYTRYELRGYIEDSQDLEIYLIRYNAKHETVNPVPTGS\_WPLSAQSPIGKCGEPNRCATHLEWNPDLDD  
  
 BT-0029 801 CSCRDGKCAHHSHHFSLDIDVGCIDLNEDLGVWVIFKIKTQDGHARLGNLEFLEEKPLVGEALARVKRAEKKWRDRKREKLELETNIVYKEAKKSDVDALE  
 BT29-BT22 801 CSCRDGKCAHHSHHFSLDIDVGCIDLNEDLGVWVIFKIKTQDGHARLGNLEFLEEKPLVGEALARVKRAEKKWRDRKREKLELETNIVYKEAKKSDVDALE  
 BT29-1Fa 801 CSCRDGKCAHHSHHFSLDIDVGCIDLNEDLGVWVIFKIKTQDGHARLGNLEFLEEKPLVGEALARVKRAEKKWRDRKREKLELETNIVYKEAKKSDVDALE  
 BT29-1Ka 801 CSCRDGKCAHHSHHFSLDIDVGCIDLNEDLGVWVIFKIKTQDGHARLGNLEFLEEKPLVGEALARVKRAEKKWRDRKREKLELETNIVYKEAKKSDVDALE  
  
 BT-0029 901 VNSQYDRLQADTNIAIIHAADKRVHSIREAYLPELSVIPGVNAAIFEELEGRIFTAYSLYDARNVIKNGDFNNGLSWNVKGVHDVEEQNNHRSVLVVP  
 BT29-BT22 901 VNSQYDRLQADTNIAIIHAADKRVHSIREAYLPELSVIPGVNAAIFEELEGRIFTAYSLYDARNVIKNGDFNNGLSWNVKGVHDVEEQNNHRSVLVVP  
 BT29-1Fa 901 VNSQYDRLQADTNIAIIHAADKRVHSIREAYLPELSVIPGVNAAIFEELEGRIFTAYSLYDARNVIKNGDFNNGLSWNVKGVHDVEEQNNHRSVLVVP  
 BT29-1Ka 901 VNSQYDRLQADTNIAIIHAADKRVHSIREAYLPELSVIPGVNAAIFEELEGRIFTAYSLYDARNVIKNGDFNNGLSWNVKGVHDVEEQNNHRSVLVVP  
  
 BT-0029 1001 WEAESQEVVRCVPCGRGYILRVTAKEGYGEGCVTIHEIEDNTDELKFSNCVVEEIIYPNNTVTCNDYTATQEEYEGTYTSRNRGYDGYESNSSVPADYAS  
 BT29-BT22 1001 WEAESQEVVRCVPCGRGYILRVTAKEGYGEGCVTIHEIEDNTDELKFSNCVVEEIIYPNNTVTCNDYTATQEEYEGTYTSRNRGYDGYESNSSVPADYAS  
 BT29-1Fa 1001 WEAESQEVVRCVPCGRGYILRVTAKEGYGEGCVTIHEIEDNTDELKFSNCVVEEIIYPNNTVTCNDYTATQEEYEGTYTSRNRGYDGYESNSSVPADYAS  
 BT29-1Ka 1001 WEAESQEVVRCVPCGRGYILRVTAKEGYGEGCVTIHEIEDNTDELKFSNCVVEEIIYPNNTVTCNDYTATQEEYEGTYTSRNRGYDGYESNSSVPADYAS  
  
 BT-0029 1101 AYEKAYTDGRRDNTCESNRGYDXYTLPAGYVTKELYFPETDKVWIEIGETEGTFIVDSVELLME  
 BT29-BT22 1101 AYEKAYTDGRRDNTCESNRGYDXYTLPAGYVTKELYFPETDKVWIEIGETEGTFIVDSVELLME  
 BT29-1Fa 1101 AYEKAYTDGRRDNTCESNRGYDXYTLPAGYVTKELYFPETDKVWIEIGETEGTFIVDSVELLME  
 BT29-1Ka 1101 AYEKAYTDGRRDNTCESNRGYDXYTLPAGYVTKELYFPETDKVWIEIGETEGTFIVDSVELLME

图2B

SEQ ID NO: 3	1	MEINNQCVPYNCLNPNPESEILNVAIFSSSEQVAEIHHLKITRILILENFLPGGSFAFGLFDLIWGFNEDQWSAFLRQVEE
SEQ ID NO: 20	1	MEINNQCVPYNCLNPNPESEILNVAIFSSSEQVAEIHHLKITRILILENFLPGGSFAFGLFDLIWGFNEDQWSAFLRQVEE
SEQ ID NO: 21	1	MEINNQCVPYNCLNPNPESEILNVAIFSSSEQVAEIHHLKITRILILENFLPGGSFAFGLFDLIWGFNEDQWSAFLRQVEE
SEQ ID NO: 22	1	MEINNQCVPYNCLNPNPESEILNVAIFSSSEQVAEIHHLKITRILILENFLPGGSFAFGLFDLIWGFNEDQWSAFLRQVEE
SEQ ID NO: 23	1	MEINNQCVPYNCLNPNPESEILNVAIFSSSEQVAEIHHLKITRILILENFLPGGSFAFGLFDLIWGFNEDQWSAFLRQVEE
SEQ ID NO: 24	1	MEINNQCVPYNCLNPNPESEILNVAIFSSSEQVAEIHHLKITRILILENFLPGGSFAFGLFDLIWGFNEDQWSAFLRQVEE
SEQ ID NO: 25	1	MEINNQCVPYNCLNPNPESEILNVAIFSSSEQVAEIHHLKITRILILENFLPGGSFAFGLFDLIWGFNEDQWSAFLRQVEE
Bt 29-Bt 22	81	LINQRITFEFARGQAIQRLVGFGRSYDEYILALKKEWENPDNPASKERVTRFRITDDALLTGVPPLMAIPGFELATLSVYA
SEQ ID NO: 20	81	LINQRITFEFARGQAIQRLVGFGRSYDEYILALKKEWENPDNPASKERVTRFRITDDALLTGVPPLMAIPGFELATLSVYA
SEQ ID NO: 21	81	LINQRITFEFARGQAIQRLVGFGRSYDEYILALKKEWENPDNPASKERVTRFRITDDALLTGVPPLMAIPGFELATLSVYA
SEQ ID NO: 22	81	LINQRITFEFARGQAIQRLVGFGRSYDEYILALKKEWENPDNPASKERVTRFRITDDALLTGVPPLMAIPGFELATLSVYA
SEQ ID NO: 23	81	LINQRITFEFARGQAIQRLVGFGRSYDEYILALKKEWENPDNPASKERVTRFRITDDALLTGVPPLMAIPGFELATLSVYA
SEQ ID NO: 24	81	LINQRITFEFARGQAIQRLVGFGRSYDEYILALKKEWENPDNPASKERVTRFRITDDALLTGVPPLMAIPGFELATLSVYA
SEQ ID NO: 25	81	LINQRITFEFARGQAIQRLVGFGRSYDEYILALKKEWENPDNPASKERVTRFRITDDALLTGVPPLMAIPGFELATLSVYA
SEQ ID NO: 3	161	QSANLHLALLRDAVFFGERWGLTQTNINDLYSRLKNSIRDYTNHCVRFYNIGLGNLNVIRPEYYRFORELTIISVLDLVAL
SEQ ID NO: 20	161	QSANLHLALLRDAVFFGERWGLTQTNINDLYSRLKNSIRDYTNHCVRFYNIGLGNLNVIRPEYYRFORELTIISVLDLVAL
SEQ ID NO: 21	161	QSANLHLALLRDAVFFGERWGLTQTNINDLYSRLKNSIRDYTNHCVRFYNIGLGNLNVIRPEYYRFORELTIISVLDLVAL
SEQ ID NO: 22	161	QSANLHLALLRDAVFFGERWGLTQTNINDLYSRLKNSIRDYTNHCVRFYNIGLGNLNVIRPEYYRFORELTIISVLDLVAL
SEQ ID NO: 23	161	QSANLHLALLRDAVFFGERWGLTQTNINDLYSRLKNSIRDYTNHCVRFYNIGLGNLNVIRPEYYRFORELTIISVLDLVAL
SEQ ID NO: 24	161	QSANLHLALLRDAVFFGERWGLTQTNINDLYSRLKNSIRDYTNHCVRFYNIGLGNLNVIRPEYYRFORELTIISVLDLVAL
SEQ ID NO: 25	161	QSANLHLALLRDAVFFGERWGLTQTNINDLYSRLKNSIRDYTNHCVRFYNIGLGNLNVIRPEYYRFORELTIISVLDLVAL
SEQ ID NO: 3	241	FPNYDIRTYPIPTKSQLTREIYTDPIISPGAQAGYTLQDVLREPHLMDFLNRLIYTGTYRGIHGWAGHEVESSRTGMMT
SEQ ID NO: 20	241	FPNYDIRTYPIPTKSQLTREIYTDPIISPGAQAGYTLQDVLREPHLMDFLNRLIYTGTYRGIHGWAGHEVESSRTGMMT
SEQ ID NO: 21	241	FPNYDIRTYPIPTKSQLTREIYTDPIISPGAQAGYTLQDVLREPHLMDFLNRLIYTGTYRGIHGWAGHEVESSRTGMMT
SEQ ID NO: 22	241	FPNYDIRTYPIPTKSQLTREIYTDPIISPGAQAGYTLQDVLREPHLMDFLNRLIYTGTYRGIHGWAGHEVESSRTGMMT
SEQ ID NO: 23	241	FPNYDIRTYPIPTKSQLTREIYTDPIISPGAQAGYTLQDVLREPHLMDFLNRLIYTGTYRGIHGWAGHEVESSRTGMMT
SEQ ID NO: 24	241	FPNYDIRTYPIPTKSQLTREIYTDPIISPGAQAGYTLQDVLREPHLMDFLNRLIYTGTYRGIHGWAGHEVESSRTGMMT
SEQ ID NO: 25	241	FPNYDIRTYPIPTKSQLTREIYTDPIISPGAQAGYTLQDVLREPHLMDFLNRLIYTGTYRGIHGWAGHEVESSRTGMMT

图3A

```

321 NIREPLYGTAATAEPTRFITPSTFPGLNLFYRTLSTLVEGVGFIRDEPGANIIRYRTSLVEGVGFIPQNNGEQLYRVRGTLDSL
SEQ ID NO: 3
321 NIREPLYGTAATAEPTRFITPSTFPGLNLFYRTLSTLVEGVGFIRDEPGANIIRYRTSLVEGVGFIPQNNGEQLYRVRGTLDSL
SEQ ID NO: 20
321 NIREPLYGTAATAEPTRFITPSTFPGLNLFYRTLSTLVEGVGFIRDEPGANIIRYRTSLVEGVGFIPQNNGEQLYRVRGTLDSL
SEQ ID NO: 21
321 NIREPLYGTAATAEPTRFITPSTFPGLNLFYRTLSTLVEGVGFIRDEPGANIIRYRTSLVEGVGFIPQNNGEQLYRVRGTLDSL
SEQ ID NO: 22
321 NIREPLYGTAATAEPTRFITPSTFPGLNLFYRTLSTLVEGVGFIRDEPGANIIRYRTSLVEGVGFIPQNNGEQLYRVRGTLDSL
SEQ ID NO: 23
321 NIREPLYGTAATAEPTRFITPSTFPGLNLFYRTLSTLVEGVGFIRDEPGANIIRYRTSLVEGVGFIPQNNGEQLYRVRGTLDSL
SEQ ID NO: 24
321 NIREPLYGTAATAEPTRFITPSTFPGLNLFYRTLSTLVEGVGFIRDEPGANIIRYRTSLVEGVGFIPQNNGEQLYRVRGTLDSL
SEQ ID NO: 25

401 DQPLEGESLLEYSHRLCHVRFVFAQSLRFAQSLRVAEPLDYARVPMFSWTHRSATPTNTIDPDVITQIPLVKAHTLQSGTTVVKGP
SEQ ID NO: 3
401 DQPLEGESLLEYSHRLCHVRFVFAQSLRFAQSLRVAEPLDYARVPMFSWTHRSATPTNTIDPDVITQIPLVKAHTLQSGTTVVKGP
SEQ ID NO: 20
401 DQPLEGESLLEYSHRLCHVRFVFAQSLRFAQSLRVAEPLDYARVPMFSWTHRSATPTNTIDPDVITQIPLVKAHTLQSGTTVVKGP
SEQ ID NO: 21
401 DQPLEGESLLEYSHRLCHVRFVFAQSLRFAQSLRVAEPLDYARVPMFSWTHRSATPTNTIDPDVITQIPLVKAHTLQSGTTVVKGP
SEQ ID NO: 22
401 DQPLEGESLLEYSHRLCHVRFVFAQSLRFAQSLRVAEPLDYARVPMFSWTHRSATPTNTIDPDVITQIPLVKAHTLQSGTTVVKGP
SEQ ID NO: 23
401 DQPLEGESLLEYSHRLCHVRFVFAQSLRFAQSLRVAEPLDYARVPMFSWTHRSATPTNTIDPDVITQIPLVKAHTLQSGTTVVKGP
SEQ ID NO: 24
401 DQPLEGESLLEYSHRLCHVRFVFAQSLRFAQSLRVAEPLDYARVPMFSWTHRSATPTNTIDPDVITQIPLVKAHTLQSGTTVVKGP
SEQ ID NO: 25

481 GFTGGDILRRTSGGPFVAFSNVNDWNLSQRYRARIYASTTNLRMYVTIAGERIFAGQFNKTMNTGDPPLIFQSFYSYATID
SEQ ID NO: 3
481 GFTGGDILRRTSGGPFVAFSNVNDWNLSQRYRARIYASTTNLRMYVTIAGERIFAGQFNKTMNTGDPPLIFQSFYSYATID
SEQ ID NO: 20
481 GFTGGDILRRTSGGPFVAFSNVNDWNLSQRYRARIYASTTNLRMYVTIAGERIFAGQFNKTMNTGDPPLIFQSFYSYATID
SEQ ID NO: 21
481 GFTGGDILRRTSGGPFVAFSNVNDWNLSQRYRARIYASTTNLRMYVTIAGERIFAGQFNKTMNTGDPPLIFQSFYSYATID
SEQ ID NO: 22
481 GFTGGDILRRTSGGPFVAFSNVNDWNLSQRYRARIYASTTNLRMYVTIAGERIFAGQFNKTMNTGDPPLIFQSFYSYATID
SEQ ID NO: 23
481 GFTGGDILRRTSGGPFVAFSNVNDWNLSQRYRARIYASTTNLRMYVTIAGERIFAGQFNKTMNTGDPPLIFQSFYSYATID
SEQ ID NO: 24
481 GFTGGDILRRTSGGPFVAFSNVNDWNLSQRYRARIYASTTNLRMYVTIAGERIFAGQFNKTMNTGDPPLIFQSFYSYATID
SEQ ID NO: 25

561 TAFTFPTKASLLTVGADTFSSGNEVYVDRFELIPVTATFEAEYDLEKAQKAVNALFTSSNQIGLKTIDVTDYHIDKVSNLV
SEQ ID NO: 3
561 TAFTFPTKASLLTVGADTFSSGNEVYVDRFELIPVTATFEAEYDLEKAQKAVNALFTSSNQIGLKTIDVTDYHIDKVSNLV
SEQ ID NO: 20
561 TAFTFPTKASLLTVGADTFSSGNEVYVDRFELIPVTATFEAEYDLEKAQKAVNALFTSSNQIGLKTIDVTDYHIDKV-----
SEQ ID NO: 21
561 TAFTFPTKASLLTVGADTFSSGNEVYVDRFELIPVTATFEAEYDLEKAQKAVNALFTSSNQI-----
SEQ ID NO: 22
561 TAFTFPTKASLLTVGADTFSSGNEVYVDRFELIPVTATFEAEYDLEKAQK-----
SEQ ID NO: 23
561 TAFTFPTKASLLTVGADTFSSGNEVYVDRFELIPVTATFEAEYDLEK-----
SEQ ID NO: 24
561 TAFTFPTKASLLTVGADTFSSGNEVYVDRFELIPVTATFEAEY-----
SEQ ID NO: 25

```

图3B

SEQ ID NO:3	641	ECLSDEFCLDEKRELSEKVKHAKRLCDERNLLQDPNFRGINRQPD RGWRGSTDITIQGGDDVFKENYVTLPGTFDECYPT
SEQ ID NO:20	641	ECLSDEFCLDEK
SEQ ID NO:21	637	-----
SEQ ID NO:22	623	-----
SEQ ID NO:23	611	-----
SEQ ID NO:24	608	-----
SEQ ID NO:25	604	-----
SEQ ID NO:3	721	YLYQIDESKLIKAYTRYELRGYIEDSQDLEIYLIRYNAKHETVNVPGTGLWPLSAQSPIGKCGEPNRCATHLEWNPDL
SEQ ID NO:20	653	-----
SEQ ID NO:21	637	-----
SEQ ID NO:22	623	-----
SEQ ID NO:23	611	-----
SEQ ID NO:24	608	-----
SEQ ID NO:25	604	-----
SEQ ID NO:3	801	CSCRDGKCAHSHHFSLDIDVGCTDLNEDLGVWVIFKIKTQDGHARLGNLEFLEEKPLVGEALARVKRAEKKWRDKREK
SEQ ID NO:20	653	-----
SEQ ID NO:21	637	-----
SEQ ID NO:22	623	-----
SEQ ID NO:23	611	-----
SEQ ID NO:24	608	-----
SEQ ID NO:25	604	-----
SEQ ID NO:3	881	LELETNIVYKEAKKSDALFVNSQYDRLQADTNIAIHAADKRVHSIREAYLPELSVIPGVNAAIFEELEGRIFTAYS
SEQ ID NO:20	653	-----
SEQ ID NO:21	637	-----
SEQ ID NO:22	623	-----
SEQ ID NO:23	611	-----
SEQ ID NO:24	608	-----
SEQ ID NO:25	604	-----

图3C

```

Bt29-Bt22
SEQ ID NO:20
SEQ ID NO:21
SEQ ID NO:22
SEQ ID NO:23
SEQ ID NO:24
SEQ ID NO:25
961 DARNVIKNGDFNNGLSWNVKGVHVDVEEQNNHRSVLVVPWEAEVSEQEVRVCPGRGYILRVTAKEGYGEGCVTIHEIED
653 -----
637 -----
623 -----
611 -----
608 -----
604 -----

Bt29-Bt22
SEQ ID NO:20
SEQ ID NO:21
SEQ ID NO:22
SEQ ID NO:23
SEQ ID NO:24
SEQ ID NO:25
1041 NTDELKFSNCVEEIIYPNNTVTCNDYTATQEEYEGTYSRNRGYDGAYESNSSVPADYASAYEEKAYTDGRRDNTCESNR
653 -----
637 -----
623 -----
611 -----
608 -----
604 -----

Bt29-Bt22
SEQ ID NO:20
SEQ ID NO:21
SEQ ID NO:22
SEQ ID NO:23
SEQ ID NO:24
SEQ ID NO:25
1121 GYGDYTPLPAGYVTKELYFPETDKVWIEIGETEGTFIVDSVELLMEE
653 -----
637 -----
623 -----
611 -----
608 -----
604 -----

```

图3D