

4



证书号第 1247859 号



# 发明专利证书

发明名称：抗害虫的新颖苏云金芽孢杆菌菌株

发明人：曾经洲；高穗生

专利号：ZL 2008 1 0189500.9

专利申请日：2008 年 12 月 29 日

专利权人：行政院农业委员会农业药物毒物试验所

授权公告日：2013 年 08 月 07 日

本发明经过本局依照中华人民共和国专利法进行审查，决定授予专利权，颁发本证书并在专利登记簿上予以登记。专利权自授权公告之日起生效。

本专利的专利权期限为二十年，自申请日起算。专利权人应当依照专利法及其实施细则规定缴纳年费。本专利的年费应当在每年 12 月 29 日前缴纳。未按照规定缴纳年费的，专利权自应当缴纳年费期满之日起终止。

专利证书记载专利权登记时的法律状况。专利权的转移、质押、无效、终止、恢复和专利权人的姓名或名称、国籍、地址变更等事项记载在专利登记簿上。



局长





(12) 发明专利

010806087

(10) 授权公告号 CN 101768558 B

(45) 授权公告日 2013.08.07

- (21) 申请号 200810189500.9 1 页 .
- (22) 申请日 2008.12.29 US 7070982 B2, 2006.06.04, 全文 .  
US 6620988 B1, 2003.09.16, 说明书 1-5.
- (83) 生物保藏信息  
DSM 21764 2008.08.21 审查员 徐荣
- (73) 专利权人 行政院农业委员会农业药物毒物  
试验所  
地址 中国台湾台中县雾峰乡旧正村光明路  
11 号
- (72) 发明人 曾经洲 高穗生
- (74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理  
有限公司 11262  
代理人 陶贻丰 杨淑媛
- (51) Int. Cl.  
C12N 1/20 (2006.01)  
A01N 63/02 (2006.01)  
A01P 7/04 (2006.01)  
C12R 1/07 (2006.01)
- (56) 对比文件  
TW 224139, 1994.05.21, 全文 .  
CN 1337461 A, 2002.02.27, 摘要、说明书第

权利要求书1页 说明书14页 附图4页

(54) 发明名称

抗害虫的新颖苏云金芽孢杆菌菌株

(57) 摘要

本发明提供一种抗害虫的新颖苏云金杆菌菌株,其具有 cry1Aa、cry1Ab、cry1C、cry1D 及 cry1F 的基因片段。并且,本发明还提供一种应用该菌株控制害虫的方法与一种包含该菌株培养物与可接受载体的组合物。

1. 一种拮抗害虫的苏云金芽孢杆菌菌株,其生物材料样品保存编号为 DSM21764,其具有 cry1Aa、cry1Ab、cry1C、cry1D、cry1F 及 cry1Ad1 基因片段,且该害虫选自夜蛾科、螟蛾科、卷叶蛾科以及菜蛾科所组成组的其中之一。

2. 如权利要求 1 所述的苏云金芽孢杆菌菌株,其中该夜蛾科的昆虫包括甜菜夜蛾、斜纹夜蛾及粉纹夜蛾。

3. 如权利要求 1 所述的苏云金芽孢杆菌菌株,其中该螟蛾科的昆虫包括豆野螟及粉斑螟。

4. 如权利要求 1 所述的苏云金芽孢杆菌菌株,其中该卷叶蛾科的昆虫包括茶小卷叶蛾。

5. 如权利要求 1 所述的苏云金芽孢杆菌菌株,其中该菜蛾科的昆虫包括小菜蛾。

6. 一种控制害虫的方法,其包括下列步骤:

对受害虫侵袭区域与预防害虫寄生区域的其中之一施加有效量的苏云金芽孢杆菌菌株的培养物,其中该苏云金芽孢杆菌菌株的生物材料样品保存编号为 DSM21764,其具有 cry1Aa、cry1Ab、cry1C、cry1D、cry1F 及 cry1Ad1 基因片段,且该害虫选自夜蛾科、螟蛾科、卷叶蛾科以及菜蛾科所组成组的其中之一。

7. 如权利要求 6 所述的方法,其中该苏云金芽孢杆菌菌株用于控制害虫、制备抗虫害或控制害虫的代谢物、制备抗虫害的组合物其中之一。

8. 如权利要求 7 所述的方法,其中该代谢物为内毒素。

## 抗害虫的新颖苏云金芽孢杆菌菌株

### 技术领域

[0001] 本发明是关于一种新颖的苏云金芽孢杆菌菌株,特别是关于一种具有 cry1Aa、cry1Ab、cry1C、cry1D 以及 cry1F 的基因片段的苏云金芽孢杆菌菌株。

### 背景技术

[0002] 随着人们对于生活品质的重视以及环保意识的兴起,目前以生物性杀虫剂取代传统农药来避免食物链的最终累积的趋势已成为主流。其中,苏云金芽孢杆菌是生物性杀虫剂中最广为应用的,且使用简便又安全。

[0003] 苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 是一种昆虫病原细菌,为革兰氏阳性杆菌,在营养缺乏或环境不良的时候,苏云金芽孢杆菌会进入不分裂的半静止期,或是分化形成孢子和杀虫结晶蛋白。苏云金芽孢杆菌的杀虫结晶蛋白对于部分害虫有抑制其生长的作用,但对哺乳类动物及鸟类均无害。因此,过去 20 年来科学家已分离出许多苏云金芽孢杆菌内的杀虫基因,并研制成重组基因产品。

[0004] 苏云金芽孢杆菌的内毒素基因位于质体上,因此很容易进行转化基因工程。早期的内毒素重组基因大多限制于单一基因片段的转化。最近则利用多重内毒素基因或是差异性很大的基因,甚至是嵌合基因 (chimeric),以增强杀虫效果、扩大杀虫范围或是改良苏云金芽孢杆菌本身对于不良环境的抵抗力。

[0005] 各类苏云金芽孢杆菌毒蛋白间的类源关系,因其内含质体核酸序列的变异所产生的杀虫结晶蛋白不同,杀虫对象也不同,主要分成六大类 (Hofte 和 Whiteley, 1989. *Insecticidal crystal proteins of Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53: 242-255; Gill 等, 1992. *The mode of action of Bacillus thuringiensis endotoxins*. *Annu. Rev. Entomol.* 37: 615-636; Gleave 等, 1993. *Screening by polymerase chain reaction of Bacillus thuringiensis serotypes for the presence of cry V-like insecticidal protein genes and characterization of acry V gene cloned from B. thuringiensis subsp. kurstaki*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1683-1687; Lereclus 等, 1993. *Diversity of Bacillus thuringiensis toxins and genes*. pp. 37-69 *In "Bacillus thuringiensis, An Environmental Biopesticide: Theory and Practice"* P. F. Entwistle, J. S. Cory, M. J. Bailey and S. Higgs. Eds. John Wiley and Sons Ltd. Press, England; Shin 等, 1995. *Distribution of cry V-type insecticidal protein genes in Bacillus thuringiensis and cloning of cry V-type genes from Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki and Bacillus thuringiensis subsp. entomocidus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2402-2407; Kostichka 等, 1996. *Cloning of a cry V-type insecticidal protein gene from Bacillus thuringiensis: the cry V-encoded protein is expressed early in stationary phase*. *J. Bacteriol.* 178: 2141-2144), 其中 Cry1 类对鳞翅目有毒杀虫效果, Cry2 类对鳞翅目及双翅目或只对双翅目有效, Cry3 类只对鞘翅目有效, Cry4 只对双翅目有效, Cry5 不产生结晶,部分可杀鳞翅目和鞘翅目,部

分不可, CytA 则是无特定杀虫作用范围, 但会产生细胞溶解和溶血的效果 (cytolytic and hemolytic efficiency), 其中所编码 (encode) 的氨基酸以 cry1 最多, 而 cytA 最少。

[0006] 美国专利号 5, 827, 514 与 5, 965, 428 分别批露具有杀虫作用的 Cry1Ac 与 Cry1F 不同片段的嵌合蛋白; 美国专利号 7, 070, 982 更批露了 Cry1Ab、Cry1Ac 与 Cry1F 的杂合蛋白。台湾专利号 224139 更批露一种包含有 cry1Aa、cry1Ab、cry1C 与 cry1D 基因片段的单一菌株。由上述文献可知具有多重内毒素基因的产物的杀虫效果, 远大于单一基因产物的抗害虫作用。

[0007] 因此, 不论是以遗传工程的方式或是天然筛选所分离的具有多重内毒素基因的菌株, 仍为目前科学家所积极寻求的。

## 发明内容

[0008] 承上所述, 本发明首先提供一种抗害虫的苏云金芽孢杆菌菌株, 其具有 cry1Aa、cry1Ab、cry1C、cry1D 及 cry1F 基因片段。

[0009] 根据上述构想, 其中该苏云金芽孢杆菌菌株还含有 cry1Ad1 基因片段。

[0010] 本发明另提供一种用于控制害虫的组合物, 该组合物为可接受的载体及杀虫有效量的内毒素, 该内毒素得自具有 cry1Aa、cry1Ab、cry1C、cry1D 及 cry1F 基因片段的苏云金芽孢杆菌菌株。

[0011] 根据上述构想, 其中该苏云金芽孢杆菌菌株进一步含有 cry1Ad1 基因片段。

[0012] 本发明再提供一种控制害虫的方法, 其包括: 对受害虫侵袭的区域或预防害虫寄生的区域施加有效量的苏云金芽孢杆菌菌株及/或具其内毒素的组合物, 其特征在该苏云金芽孢杆菌菌株具有 cry1Aa、cry1Ab、cry1C、cry1D 及 cry1F 基因片段。

[0013] 根据上述构想, 其中该苏云金芽孢杆菌菌株进一步含 cry1Ad1 基因片段。

[0014] 本发明更提供一种分离的苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 菌株 A603 的代谢物, 苏云金芽孢杆菌 A603 依据布达佩斯条约, 于公元 2008 年 8 月 21 日保藏于德国微生物菌种保藏中心, 生物材料样品保藏编号为 DSM 21764。

[0015] 根据上述构想, 其中该苏云金芽孢杆菌菌株可用于控制害虫。

[0016] 根据上述构想, 其中该害虫选自鳞翅目的夜蛾科、螟蛾科、卷叶蛾科以及菜蛾科所组成组的其中之一。

[0017] 根据上述构想, 其中该害虫为夜蛾科的甜菜夜蛾。

[0018] 根据上述构想, 其中该害虫为夜蛾科的斜纹夜蛾。

[0019] 根据上述构想, 其中该害虫为夜蛾科的粉纹夜蛾。

[0020] 根据上述构想, 其中该害虫为螟蛾科的豆野螟。

[0021] 根据上述构想, 其中该害虫为螟蛾科的粉斑螟。

[0022] 根据上述构想, 其中该害虫为卷叶蛾科的茶小卷叶蛾。

[0023] 根据上述构想, 其中该害虫为菜蛾科的小菜蛾。

[0024] 为了易于说明, 本发明得通过下述的较佳实施例及图示而得到充分了解, 并使得熟习本技艺的人士可以据以完成, 然而本发明的实施方式并不限制于下列实施例中。

## 附图说明

- [0025] 图 1 为本发明的苏云金芽孢杆菌菌株 A603 的内毒素基因型的电泳分析图；  
[0026] 图 2 为本发明的苏云金芽孢杆菌菌株 A603 的内毒素表达的蛋白质电泳图；  
[0027] 图 3 为本发明以 PCR 扩增的 cry1Ad1 基因产物的电泳分析图；以及  
[0028] 图 4 为以不同 IPTG 浓度诱导 Cry1Ad1 表达的蛋白质电泳分析图。

### 具体实施方式

[0029] 本发明提供一种新颖的苏云金芽孢杆菌菌株，该苏云金芽孢杆菌菌株能够抑制害虫的生长。以下为该苏云金芽孢杆菌菌株的来源、纯化与分离方式、鉴定方式以及抗目标害虫的效果的详细说明。

#### [0030] 菌种采集

[0031] 由台湾云林县褒忠乡农会谷仓采集到的粉尘样品，每份样品约采集 10 克，以塑料袋封装后，保存于 4℃。

#### [0032] 菌种分离与鉴定

[0033] 将每份样品取 0.5 克重并剧烈振荡悬浮于 10 毫升的无菌水中，依据 Akiba 与 Katoh(1986. Microbial ecology of *Bacillus thuringiensis* V. Selectivemedium for *Bacillus thuringiensis* vegetative cells. Appl. Entomol. Zool. 21 :210-215)、Travers 等 (1987. Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp. Appl. Environ. Microbiol. 53 :1263-1266)、Chak 与 Yang(1990. Characterization of the *Bacillus thuringiensis* strains isolated from Taiwan. Proc. Natl. Sci. Counc. B. ROC 14 :175-182) 以及 Chilcott 与 Wigley(1993. Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from soil and insect habitats in New Zealand. J. Invertebr. Pathol. 61 :244-247) 等四种方法进行分离。经热处理过的悬浮土样品，涂布于 NA(nutrient agar) 平板培养基上，在 28℃ 下连续培养五天后，进行单菌落的筛选，在相差光学显微镜下，以 1,500 倍油镜进行观察，筛选条件为含有结晶蛋白以及孢子的菌株，分别编号后保存于 4℃ 下 (Kao 等, 1996. Isolation, characterization and cry gene typing of *Bacillus thuringiensis* isolates from stored product material samples collected around Taiwan, pp132-151. Proceedings, The Second Pacific Rim Conference on Biotechnology of *Bacillus thuringiensis* and its Impact to the Environment. November 4-8, 1996. Chiang Mai, Thailand)。

#### [0034] 菌种培养

[0035] 将各个经编号的菌株，分别以无菌水悬浮稀释，在 NA 平板培养基以划线法，再纯化 3 次并确认无污染后，挑单菌落，各别移到 5 毫升的 LB 液体培养基 (Luria-Bertani 培养基 :bacto-胰化蛋白胨 1%、bacto-酵母提取物 0.5% 以及 NaCl 1%，pH 7.0)，于恒温振荡培养箱 (28℃, 250rpm) 过夜培养，再取 0.5 毫升以同条件进行继代培养 (5 毫升) 3 小时。

#### [0036] 菌种鉴定

[0037] 对继代培养后的菌株进行分析，挑选一菌株命名为 A603，进行菌种形态分析与后续实验。

#### [0038] DNA 聚合酶链式反应 (PCR) 与载体克隆

[0039] 本发明参照 Kalman 等 (1993. Cloning of a novel cryIC-type gene from a

strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1131-1137) 所发表的各个内毒素特异性的核苷酸引物(如下所示)的组合来确认本发明的苏云金芽孢杆菌 A603 中的内毒素基因型。

[0040] (1) cry1Aa 基因片段的扩增

[0041] 以 cry1 特异性序列作为反向引物 (SEQ ID NO. 1) 以及以 cry1Aa 特异性序列作为正向引物 (SEQ ID NO. 2) 进行复性与 PCR 放大反应来确认是否有 cry1Aa 基因片段的扩增。

[0042] (2) cry1Ac 基因片段的扩增

[0043] 以 cry1 特异性序列作为反向引物 (SEQ ID NO. 1) 以及以 cry1Ac 特异性序列作为正向引物 (SEQ ID NO. 3) 进行复性与 PCR 放大反应来确认是否有 cry1Ac 基因片段的扩增。

[0044] (3) cry1B 基因片段的扩增

[0045] 以 cry1 特异性序列作为反向引物 (SEQ ID NO. 1) 以及以 cry1B 特异性序列作为正向引物 (SEQ ID NO. 4) 进行复性与 PCR 放大反应来确认是否有 cry1B 基因片段的扩增。

[0046] (4) cry1C 基因片段的扩增

[0047] 以 cry1 特异性序列作为反向引物 (SEQ ID NO. 1) 以及以 cry1C 特异性序列作为正向引物 (SEQ ID NO. 5) 进行复性与 PCR 放大反应来确认是否有 cry1C 基因片段的扩增。

[0048] (5) cry1D 基因片段的扩增

[0049] 以 cry1 特异性序列作为反向引物 (SEQ ID NO. 1) 以及以 cry1D 特异性序列作为正向引物 (SEQ ID NO. 6) 进行复性与 PCR 放大反应来确认是否有 cry1D 基因片段的扩增。

[0050] (6) cry1E 基因片段的扩增

[0051] 以 cry1 特异性序列作为反向引物 (SEQ ID NO. 1) 以及以 cry1E 特异性序列作为正向引物 (SEQ ID NO. 7) 进行复性与 PCR 放大反应来确认是否有 cry1E 基因片段的扩增。

[0052] (7) cry1F 基因片段的扩增

[0053] 以 cry1 特异性序列作为反向引物 (SEQ ID NO. 1) 以及以 cry1F 特异性序列作为正向引物 (SEQ ID NO. 8) 进行复性与 PCR 放大反应来确认是否有 cry1F 基因片段的扩增。

[0054] (8) cry1Ab 基因片段的扩增

[0055] 以 cry1Ab 正向特异性序列作为正向引物 (SEQ ID NO. 9) 以及以 cry1Ab 反向特异性序列作为反向引物 (SEQ ID NO. 10) 进行复性与 PCR 放大反应来确认是否有 cry1Ab 基因片段的扩增。

[0056] (9) cry1Ad1 基因全长扩增与载体克隆

[0057] 发明人为进一步取得 cry1Ab 基因片段以进行基因重组实验,设计全长正向引物 (1A29A): ttaacacacctggatccaaaattgatattt (SEQ ID NO. 11, 下划线处为 BamHI 切割位点) 与全长反向引物 (1Ab37B1): tttgcattgcatatattattcctccataagaagtaatt (SEQ ID NO. 12, 下划线处为 SphI 切割位点) (陈等人, 2006. 台湾苏力菌 cry1Ac5 杀虫基因克隆及表达. 植保会刊. 48: 17-30), 进行复性与 PCR 放大反应时, 意外发现电泳图上出现有别于 cry1Ab 基因片段的泳带。

[0058] 因此, 以苏云金芽孢杆菌 A603 质体为模板, 利用 SEQ ID NO. 11 及 SEQ ID NO. 12 为引物扩增该泳带的全长基因, 利用 StrataClone PCR Cloning Kit (Stratagene) 将该泳带的基因片段构建至中间载体 pSC-A 后, 委托波仕特生物科技股份有限公司以大片段核酸测序 (primer walking) 进行全长测序。测序后的结果以电脑分析比对, 发现该泳带为 cry1Ad1

基因 (全长为 3704bp) (SEQ ID NO. 13), 因此, 将该表达载体命名为 pSC-A-cry1Ad1。

[0059] (10) Cry1Ad1 蛋白质的表达

[0060] 以 BamHI 以及 SphI 内切酶将 cry1Ad1 从 pSC-A-cry1Ad1 载体切下来, 构建至表达载体 pQE82。再将表达载体 pQE82-cry1Ad1 转化到大肠杆菌 (BL21) 以进行后续蛋白质表达。

[0061] 苏云金芽孢杆菌 A603 的内毒素基因组合

[0062] 请参阅图 1, 其为利用上述引物对进行 PCR 的筛选结果。根据 Kalman 等 (1993. Cloning of a novel cryIC-type gene from a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1131-1137), 已知 cry1Aa, cry1Ac, cry1B, cry1C, cry1D, cry1E, cry1F 以及 cry1Ab 基因的预期的特有片段长度分别为 724bp、487bp、830bp、288bp、414bp、883bp、368bp 以及 238bp。因此, 根据图 1 所示的片段长度可以得知本发明苏云金芽孢杆菌 A603 具有 cry1Aa, cry1Ab, cry1C, cry1D 以及 cry1F 的内毒素多重基因片段。图 1 的 M 为 DNA 梯形带 (DNA ladder), 单位为碱基对 (base pair, bp), 作为 DNA 分子量标准品。

[0063] 再请参阅图 2, 其为苏云金芽孢杆菌菌株 A603 全蛋白的电泳分析图。由图 2 所示的结果可以得知苏云金芽孢杆菌菌株 A603 确实能够表达内毒素蛋白, 且其分子量约为 130kDa。并且, 经由内毒素活性的试管试验 (未显示) 可以得知苏云金芽孢杆菌菌株 A603 所表达的内毒素确实具有抗害虫的活性。图 2 的 M 为蛋白质标记, 单位为千道尔顿 (kilodalton, kDa), 作为蛋白质分子量标准品。

[0064] 请参阅图 3, 其为 PCR 扩增的 cry1Ad1 基因产物的电泳分析图, 可以得知该基因全长为 3704bp。测序后的结果请参阅序列列表的 SEQ ID NO. 13。图 4 则为将表达载体转化到大肠杆菌后, 以不同浓度的 IPTG 诱导后的 Cry1Ad1 表达情况。图 3 的 M 为另一种 DNA 梯形带 (DNA ladder), 单位为千碱基对 (kilo base pair, kb), 同样作为 DNA 分子量标准品。由图 4 的结果可以得知, Cry1Ad1 确实能够大量表达。并且, 经由内毒素活性的试管试验 (未显示) 可以得知苏云金芽孢杆菌菌株 A603 所表达的 Cry1Ad1 内毒素具有抗害虫的活性。图 4 的 M 为蛋白质标记, 单位为千道尔顿 (kilodalton, kDa), 作为蛋白质分子量标准品。

[0065] 苏云金芽孢杆菌 A603 抗目标害虫的活性

[0066] 本发明更进一步提供一种具有杀虫作用的组合物, 其中该组合物包含有效量的苏云金芽孢杆菌菌株 A603 的培养物以及可接受的载体。并且, 该培养物中包含有内毒素。采用工业上的标准培养方法及发酵方式放大本发明的苏云金芽孢杆菌菌株 A603 或其变异株。再将发酵后的培养物进行试验以确认其抗目标害虫的效果。

[0067] 实施例一: 甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*)

[0068] 大量发酵苏云金芽孢杆菌 A603 后, 取 5 公升的发酵培养物进行连续稀释后, 将不同稀释浓度的发酵培养物以饲料混拌法测试处理甜菜夜蛾第三龄初幼虫连续 120 小时后的生物活性 (每组实验的供试虫数为 20 只, 有更换饲料连续观察), 记录以苏云金芽孢杆菌处理前后的死亡虫数后, 计算幼虫死亡率。

[0069] 请参阅表一, 其为苏云金芽孢杆菌 A603 对于甜菜夜蛾的死亡率测试数据。由此结果可以得知苏云金芽孢杆菌 A603 确实具有害虫致死效果。

[0070] 表一、苏云金芽孢杆菌 A603 发酵培养物抗甜菜夜蛾的活性数据



	稀释倍数	供试虫数(只)	死亡率(%)
[0071]	对照组(水)	20	0
	350 (~140 IU/mg)	20	90
	700 (~70 IU/mg)	20	95
	1400 (~35 IU/mg)	20	80
	2800 (~17.5 IU/mg)	20	70
	5600 (~8.75 IU/mg)	20	20

[0072] 注:样品效价 (IU/mg) = [(Bta 标准品  $LC_{50}$ ) / (样品  $LC_{50}$ )] × Bta 标准品效价 (IU/mg), 测试昆虫为粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*)。

[0073] 实施例二:斜纹夜蛾 (*Spodoptera litura*)

[0074] 试验处理方式同实施例一。将稀释浓度后的发酵培养物以饲料混拌法测试处理斜纹夜蛾第三龄初幼虫连续 120 小时 (每组实验的供试虫数为 20 只, 有更换饲料连续观察), 记录以苏云金芽孢杆菌处理前后的虫重以及死亡虫数等生长情况。

[0075] 请参阅表二, 其为苏云金芽孢杆菌 A603 对于斜纹夜蛾的活性抑制数据。处理前斜纹夜蛾的平均虫重为 0.0025 克。成长倍数为处理后平均虫重除以处理前平均虫重。抑制率 (%) 为对照组的平均虫重减处理组的处理后平均虫重的差值除以对照组的平均虫重。根据表二的结果得知于相同稀释倍数下, 经由苏云金芽孢杆菌 A603 处理后的幼虫成长倍数降低, 同时抑制率也高于市售商品殊立菌 (Dipel), 因此其确实具有抗斜纹夜蛾幼虫的能力。

[0076] 表二、苏云金芽孢杆菌 A603 发酵培养抗斜纹夜蛾的活性数据与市售商品殊立菌 (Dipel) 的比较

[0077]

苏云金芽孢杆菌 A603					
稀释倍数	供试虫数	死亡率(%)	活虫重(g/重)	成长倍数	抑制率(%)
对照组 (水)	30	0	0.033	13.3	0
350 (~140 IU/mg)	20	75	0.002	0.96	93
700 (~70 IU/mg)	20	50	0.005	1.8	86

[0078] 殊立菌 (Dipel)

[0079]

稀释倍数	供试虫数	死亡率(%)	活虫重(g/重)	成长倍数	抑制率(%)
对照组 (水)	30	0	0.033	13.3	0
350 (~140 IU/mg)	20	65	0.004	1.48	89
700 (~70 IU/mg)	20	50	0.005	1.83	86

[0080] 注:样品效价 (IU/mg) = [(Bta 标准品  $LC_{50}$ ) / (样品  $LC_{50}$ )] × Bta 标准品效价 (IU/mg), 测试昆虫为粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*)。

[0081] 实施例三:豆野螟 (*Maruca vitrata*)

[0082] 试验处理方式同实施例一。将不同稀释浓度的发酵培养物以饲料混拌法分别测试处理豆野螟第二龄与第三龄初幼虫连续 120 小时 (每个浓度五只幼虫, 不更换饲料连续观察), 记录第 24 至 120 小时间死亡虫数的情况。

[0083] 由表三致死率的分布结果可以得知苏云金芽孢杆菌 A603 于处理幼虫 96 小时后, 即使在低处理浓度下, 也能达到将近 50% 抗豆野螟幼虫的能力。

[0084] 表三、苏云金芽孢杆菌 A603 发酵培养物抗豆野螟的活性数据

[0085]

		死亡率(%)									
		24 小时		48 小时		72 小时		96 小时		120 小时	
浓度(ppm)		2 龄	3 龄	2 龄	3 龄	2 龄	3 龄	2 龄	3 龄	2 龄	3 龄
		60	0	0	20	20	60	60	100	100	100
30	[0086]	0	0	0	20	40	40	100	80	100	80
15		0	0	0	0	40	20	60	40	100	80
7.5		0	0	0	0	20	20	60	40	80	40
3.75		0	0	0	0	20	20	40	40	80	40
对照组 (水)		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

[0087] 实施例四:粉斑螟 (*Ephestia cautella* Walker)

[0088] 试验处理方式同实施例一。将不同稀释浓度的发酵培养物以饲料混拌法分别测试处理粉斑螟孵化 14 天的幼虫连续 120 小时 (每个浓度十只幼虫, 每个浓度三重复, 不更换饲料连续观察), 并且以市面上常用的殊立菌同时进行测试, 分别记录其 120 小时后死亡虫数的情况。

[0089] 由表四死亡率的结果可以得知苏云金芽孢杆菌 A603 相对于市售商品殊立菌 (*Dipel*), 具有较佳的抗粉斑螟幼虫能力。

[0090] 表四、苏云金芽孢杆菌 A603 发酵培养物对于抗粉斑螟的活性数据

稀释倍数	死亡率(%)		
	苏云金芽孢杆菌 A603	珠立菌(Dipel)	对照组(水)
[0091]			
10	63	60	0
100	57	40	0

[0092] 实施例五：茶小卷叶蛾 (*Adoxophyes* sp.)

[0093] 试验处理方式同实施例一。将不同稀释浓度的发酵培养物以饲料混拌法分别测试处理茶小卷叶蛾第三龄初幼虫连续 120 小时（每个浓度十只幼虫，每个浓度三重复，不更换饲料连续观察），记录死亡虫数的情况后，计算幼虫死亡率。

[0094] 由表五死亡率的结果可以得知苏云金芽孢杆菌 A603 于 144 小时后，即使于低处理浓度下，也可达到 50% 的抗茶小卷叶蛾幼虫的能力。

[0095] 表五、苏云金芽孢杆菌 A603 发酵培养物对于抗茶小卷叶蛾的活性数据

处理浓度(ppm)	处理后不同时间的死亡率(%)				
	120 h	144 h	168 h	192 h	216 h
60	73	77	77	83	87
30	67	67	67	70	77
[0096]					
15	50	57	63	63	73
7.5	60	67	67	67	73
3.75	47	47	57	60	67
1.875	43	50	53	53	60
对照组 (水)	0	0	0	0	0

[0097] 实施例六：小菜蛾 (*Plutella xylostella*)

[0098] 试验处理方式同实施例一。将不同稀释浓度的发酵培养物以饲料混拌法分别测试处理小菜蛾第三龄初幼虫连续 72 小时（每个浓度十只幼虫，每个浓度五重复，更换饲料连续观察），分别记录其 72 小时后死亡虫数的情况后，计算幼虫死亡率。

[0099] 由表六死亡率的结果得知苏云金芽孢杆菌 A603 确实具有抗小菜蛾幼虫的能力。

[0100] 表六、苏云金芽孢杆菌 A603 发酵培养物对于抗小菜蛾的活性数据

	苏云金芽孢杆菌	
	ppm ( $\mu\text{g/l}$ )	A603
	死亡率(%)	
[0101]	40	98
	20	84
	10	48
	对照组(水)	0

[0102] 实施例七:粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*)

[0103] 试验处理方式同实施例一。将不同稀释浓度的发酵培养物以饲料混拌法分别测试处理粉纹夜蛾第二龄初幼虫连续 72 小时 (每个浓度十只幼虫,每个浓度五重复,更换饲料连续观察),分别记录其 72 小时后死亡虫数的情况。

[0104] 由表七死亡率的结果得知苏云金芽孢杆菌 A603 于不同浓度的处理下,其相对于市售商品见达立 (Xentari) 和殊立菌 (Dipel) 具有较佳的抗粉纹夜蛾幼虫的能力。

[0105] 表七、苏云金芽孢杆菌 A603 发酵干物对于抗粉纹夜蛾的活性数据

	致死率(%)			
	ppm ( $\mu\text{g/l}$ )	苏云金芽孢杆菌 A603	见达立(Xentari)	殊立菌(Dipel)
[0106]	30	50	28	42
	15	34	20	30
	对照组(水)	0	0	0

[0107] 综上所述,本发明所分离纯化的苏云金芽孢杆菌 A603 确实为新颖的苏云金芽孢杆菌菌株,其含有 cry1Aa、cry1Ab、cry1C、cry1D、cry1F 以及 cry1Ad1 等内毒素基因片段。并且,本发明的苏云金芽孢杆菌菌株 A603 能够抗甜菜夜蛾、斜纹夜蛾、豆野螟、粉斑螟、茶小卷叶蛾、小菜蛾以及粉纹夜蛾等害虫的能力。

[0108] 以上所述的,仅为本发明的较佳实施例,并非用来限定本发明的实施范围。故凡依本发明申请专利范围所述的形状、构造、特征及精神所做的均等变化或修饰,均应包括于本发明的申请专利范围内。

[0109] 序列表

[0110] <110> 行政院农业委员会农业药物毒物试验所

[0111] <120> 抗害虫的新颖苏云金芽孢杆菌菌株

- [0112] <160>13  
[0113] <210>1  
[0114] <211>33  
[0115] <212>DNA  
[0116] <213> 人工  
[0117] <220>  
[0118] <223>cry1 基因的特异性序列  
[0119] <400>1  
[0120] atcactgagt cgcttcgcat gtttgacttt ctc  
[0121] <210>2  
[0122] <211>28  
[0123] <212>DNA  
[0124] <213> 人工  
[0125] <220>  
[0126] <223>cry1Aa 基因的特异性序列  
[0127] <400>2  
[0128] gagccaagca gctggagcag ttacacc  
[0129] <210>3  
[0130] <211>22  
[0131] <212>DNA  
[0132] <213> 人工  
[0133] <220>  
[0134] <223>cry1Ac 基因的特异性序列  
[0135] <400>3  
[0136] tcacttccca tcgacateta cc  
[0137] <210>4  
[0138] <211>27  
[0139] <212>DNA  
[0140] <213> 人工  
[0141] <220>  
[0142] <223>cry1B 基因的特异性序列  
[0143] <400>4  
[0144] gtcaacctta tgagtcacct gggcttc  
[0145] <210>5  
[0146] <211>23  
[0147] <212>DNA  
[0148] <213> 人工  
[0149] <220>  
[0150] <223>cry1C 基因的特异性序列

- [0151] <400>5  
[0152] caacctctat ttggtgcagg ttc  
[0153] <210>6  
[0154] <211>25  
[0155] <212>DNA  
[0156] <213> 人工  
[0157] <220>  
[0158] <223>cry1D 基因的特异性序列  
[0159] <400>6  
[0160] ggtacattta gatattcaca gccac  
[0161] <210>7  
[0162] <211>22  
[0163] <212>DNA  
[0164] <213> 人工  
[0165] <220>  
[0166] <223>cry1E 基因的特异性序列  
[0167] <400>7  
[0168] cttagggata aatgtagtac ag  
[0169] <210>8  
[0170] <211>25  
[0171] <212>DNA  
[0172] <213> 人工  
[0173] <220>  
[0174] <223>cry1F 基因的特异性序列  
[0175] <400>8  
[0176] ccggtgaccc attaacattc caatc  
[0177] <210>9  
[0178] <211>29  
[0179] <212>DNA  
[0180] <213> 人工  
[0181] <220>  
[0182] <223>cry1Ab 基因的正向特异性序列  
[0183] <400>9  
[0184] ggtcgtggct atatccttcg tgtcacagc  
[0185] <210>10  
[0186] <211>23  
[0187] <212>DNA  
[0188] <213> 人工  
[0189] <220>

- [0190] <223>cry1Ab 基因的反向特异性序列
- [0191] <400>10
- [0192] gaattgcttt cataggctcc gtc
- [0193] <210>11
- [0194] <211>29
- [0195] <212>DNA
- [0196] <213> 人工
- [0197] <220>
- [0198] <223>cry1Ab 基因的全长正向特异性序列
- [0199] <400>11
- [0200] ttaacaccct ggatccaaaa ttgatattt
- [0201] <210>12
- [0202] <211>37
- [0203] <212>DNA
- [0204] <213> 人工
- [0205] <220>
- [0206] <223>cry1Ab 基因的全长反向特异性序列
- [0207] <400>12
- [0208] tttgcatgca tatattattc ctccataaga agtaatt
- [0209] <210>13
- [0210] <211>3704
- [0211] <212>DNA
- [0212] <213> 苏云金芽孢杆菌
- [0213] <220>
- [0214] <223>cry1Ad1 基因的全长序列
- [0215] <400>13
- [0216] ttaacaccct ggatccaaaa ttgatattta gtaaattcgg ttgcactttg 50
- [0217] tgtatatttt cataagatga gtcatatgta ttaaactgtg gtgaaaaaca 100
- [0218] gcaacatagt ataagaactt ttgtatttca ataaaaaatg gaggtatttt 150
- [0219] atggagataa tgaataatca gaatcaatgc gttccttata actgtttgaa 200
- [0220] tgatccgaca attgaaatat tagaaggaga aagaatagaa actggttaca 250
- [0221] cccaataga tatttccttg tcgctaacgc aatttctgtt gagtgaattt 300
- [0222] gtcccacgtg ctgggtttgt attaggttta attgatttaa tatgggggtt 350
- [0223] tgtgggtccc tctcaatggg atgcatttct tgtgcaaatt gaacagttaa 400
- [0224] ttaaccaaag aatagaggaa ttcgctagga accaagcaat ttctagatta 450
- [0225] gaagggctaa gcaaccttta tcaaatttac gcagaagctt ttagagagtg 500
- [0226] ggaagcagat cctactaatc cagcattaac agaagagatg cgtattcagt 550
- [0227] tcaatgacat gaacagtgct cttacaaccg ctattcctct ttttacagtt 600
- [0228] caaaattatc aagtacctct tctatcagta tatgttcaag ctgcaaattt 650

[0229]	acatttatcg	gttttgagag	atgtttcagt	gtttggacaa	cgttggggat	700
[0230]	ttgatgtagc	aacaatcaat	agtcgttata	atgatttaac	taggcttatt	750
[0231]	ggcacctata	cagattatgc	tgtacgctgg	tataatacgg	gattagaacg	800
[0232]	tgtatgggga	ccggattcta	gagattgggt	aagggtataat	caatttagaa	850
[0233]	gagagctaac	actaactgta	ttagatatcg	tttctctggt	cccgaactat	900
[0234]	gatagtagaa	cgtatccaat	tcgaacagtt	tcccaattaa	ctagagaaat	950
[0235]	ttatacaaac	ccagtattag	aaaattttga	tggtagtttt	cgtggaatgg	1000
[0236]	ctcagagaat	agaacagaat	attaggcaac	cacatcttat	ggatctcctt	1050
[0237]	aatagtataa	ccatttatac	tgatgtgcat	agaggcttta	attattggtc	1100
[0238]	aggacatcaa	ataacagctt	ctcctgtcgg	ttttgcgggg	ccagaattta	1150
[0239]	cttttctag	atatggaacc	atgggaaatg	ctgctccacc	cgtactgac	1200
[0240]	tcaactactg	gtttggggat	ttttagaaca	ttatcttcac	ctctttacag	1250
[0241]	aagaattata	cttggttcag	gcccataata	tcagaacctg	tttgtccttg	1300
[0242]	atggaacgga	attttctttt	gcctccctaa	cagccgattt	accttctact	1350
[0243]	atatacagac	aaaggggaac	ggtcgattca	ctagatgtaa	taccgccaca	1400
[0244]	ggataatagt	gtgccagcac	gtgcgggatt	tagtcatcga	ttaagtcatg	1450
[0245]	ttacaatgct	gagccaagca	gctggagcag	tttacacctt	gagagctcca	1500
[0246]	acgttttctt	ggcgacatcg	tagtgctgaa	ttctctaacc	taattccttc	1550
[0247]	atcacaatc	acacagatac	ctttaacaaa	gtctattaat	cttggtctg	1600
[0248]	ggacctctgt	tgttaaagga	ccaggattta	caggaggaga	tattcttcca	1650
[0249]	agaacttcac	ctggccagat	ttcaacctta	agagtgacta	ttactgcacc	1700
[0250]	attatcacia	agatatcgcg	taagaattcg	ctacgcttct	actacaaatt	1750
[0251]	tacaattcca	tacatcaatt	gacggaagac	ctattaatca	ggggaatttt	1800
[0252]	tcagcaacta	tgagtagtgg	gggtaattta	cagtccggaa	gctttaggac	1850
[0253]	tgcaggtttt	actactccgt	ttaacttttc	aatggatca	agtatattta	1900
[0254]	cgtttaagtgc	tcattgtctt	aattcaggca	atgaagtta	tatagatcga	1950
[0255]	attgaatttg	ttccggcaga	agtaacattt	gaggcggaat	atgatttaga	2000
[0256]	aagagcgcaa	gaggcgggta	atgctctggt	tacttcttcc	aatcaactag	2050
[0257]	gattaaaaac	aatgtgacg	gactatcata	ttgatcaagt	gtccaatcta	2100
[0258]	gtcgaatgtt	tatccgggta	attctgtctg	gatgaaaaga	gagaattgtc	2150
[0259]	cgagaaagtc	aaacatgcga	agcgactcag	tgatgagcgg	aatttacttc	2200
[0260]	aagacccaaa	cttcagaggc	atcaatagac	aaccagaccg	tggctggaga	2250
[0261]	ggcagtacgg	atattaccat	ccaaggagga	gatgacgtat	tcaaagagaa	2300
[0262]	ttacgtcaca	ctaccgggta	cctttaatga	gtgttatect	acgtatctgt	2350
[0263]	atcaaaaaat	agatgagtcg	aaattaaaag	cctatacccg	ttaccaatta	2400
[0264]	agagggtaca	tcgaggatag	tcaagactta	gaaatctatt	taattcgcta	2450
[0265]	caatacaaaa	cacgaaacag	taaatgtgcc	aggtacgggt	tccttatggc	2500
[0266]	cgctttcagt	cgaaaatcca	attggaaagt	gcggaagaac	aatcgatgc	2550
[0267]	gcaccacaac	ttgaatggaa	tcctgatcta	gattgttctt	gcagagacgg	2600



[0268] ggaaaaatgt gcacatcaact cccatcattt ctccttggac attgatattg 2650  
[0269] gatgtacaga tttaaagtgg aacttaggtg tatgggtgat attcaaaatt 2700  
[0270] aagacgcaag atggtcacgc aagactaggt aatctagagt ttctcgaaga 2750  
[0271] gaaaccatta gtaggcgaat cgtagcacg cgtgaagaga gcggagaaga 2800  
[0272] agtggagaga caaacgagag aaattgcaag tggaaacaaa tatcgtttat 2850  
[0273] aaagaggcaa aagaatctgt agatgcttta tttgtgaact ctcaatatga 2900  
[0274] tagattacaa gcggataccg acatcgcgat gattcatgcg gcagataaac 2950  
[0275] gcgttcatcg aattcgagaa gcatacttc cagagttatc tgtaattccg 3000  
[0276] ggtgtcaatg cgggcatttt tgaagaatta gagggacgta ttttcacagc 3050  
[0277] ctactcttta tatgatgca gaaatgtcat taaaaatggc gatttcaata 3100  
[0278] atggcttatc atgctggaac gtgaaagggc atgtagatgt agaagaacaa 3150  
[0279] aacaaccacc gttcggttct tgttgtcccg gaatgggaag cagaggtgtc 3200  
[0280] acaagagggt cgtgtctgtc caggtcgtgg ctatatccta cgtgttacag 3250  
[0281] cgtacaaaga gggatatgga gaaggttgcg taacgattca tgagatcga 3300  
[0282] gacaatacag acgaactgaa attcagcaac tgtgtagaag aggaagtata 3350  
[0283] tccaaacaac acggtaacgt gtaatgatta tactgcaaat caagaagaat 3400  
[0284] acgggggtgc gtacacttct cgtaatcgtg gatatgggtga atcttatgaa 3450  
[0285] agtaattctt ccataccagc tgagtatgcg ccagtttatg aggaagcata 3500  
[0286] tatagatgga agaaaagaga atccttgtga atctaacaga ggatatgggg 3550  
[0287] attacacgcc actaccagct ggttatgtga caaaagaatt agagtacttc 3600  
[0288] ccagaaaccg ataaggtatg gattgagatc ggggaaacgg aaggaacatt 3650  
[0289] catcgtggat agcgtggaat tacttcttat ggaggaataa tatatgcatg 3700  
[0290] caaa 3704

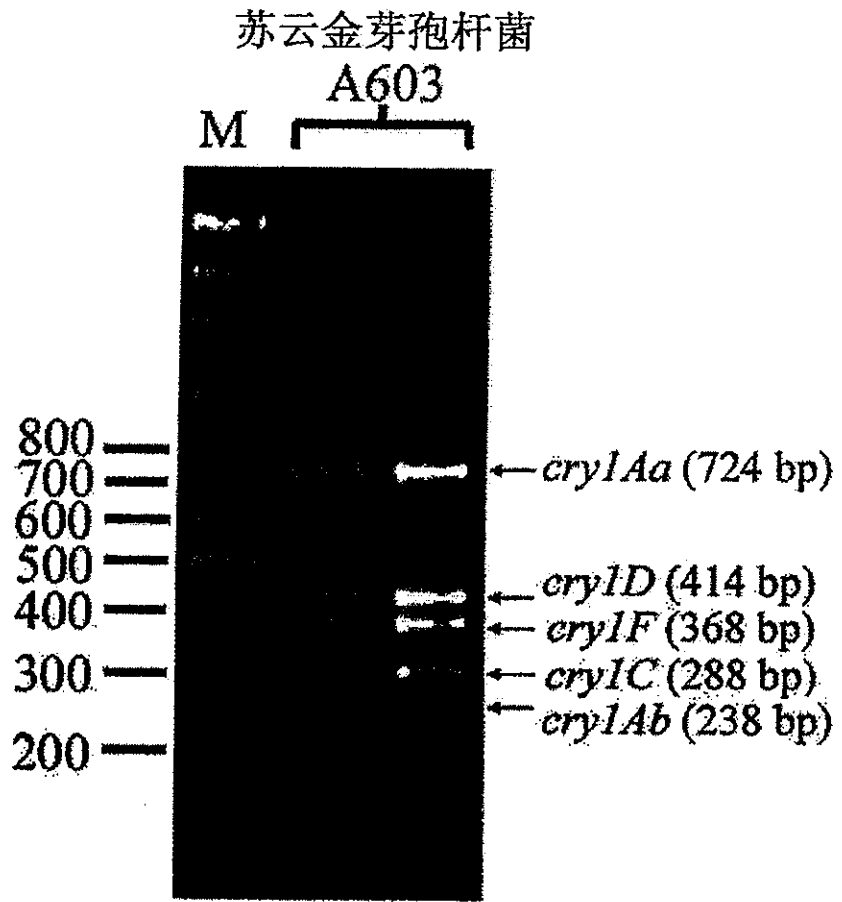


图 1

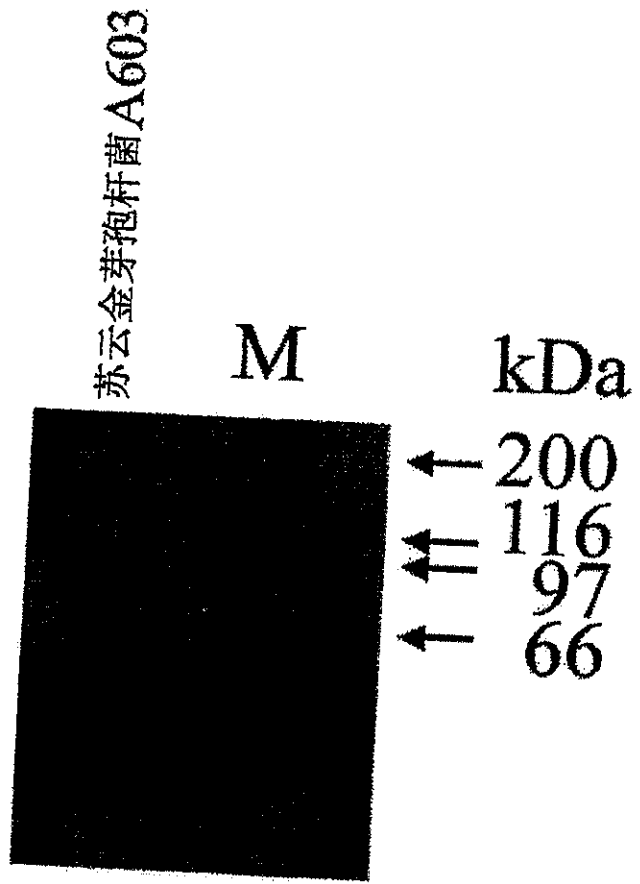


图 2



图 3

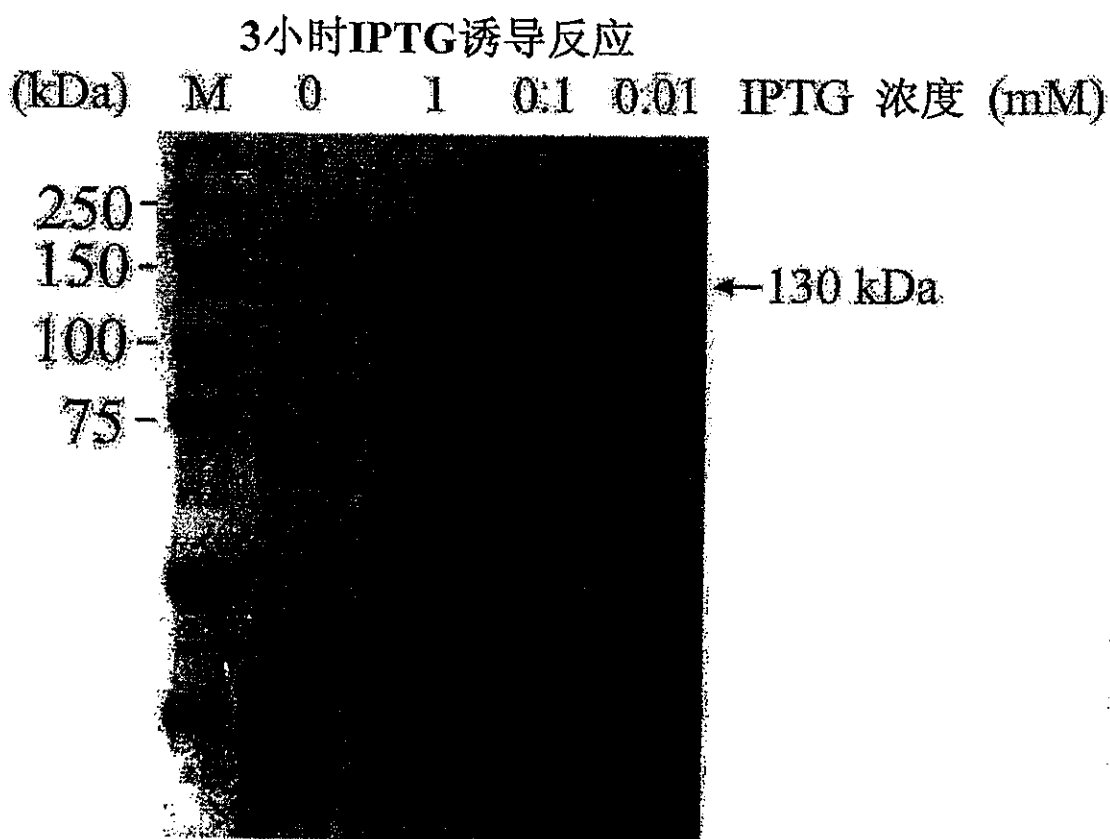


图 4

# 道 法 通 知 書

DEEP & FAR

台北市104中山北路3段27號13樓

Tel:(02)25856688 Fax:(02)25989900

E-mail: [email@deepnfar.com.tw](mailto:email@deepnfar.com.tw) Web Site: <http://www.deepnfar.com.tw>

毒物所/曾經洲 先生 鈞鑑

中華民國 102 年 9 月 24 日

一· 案件名稱：抗害蟲的新穎蘇雲金芽孢桿菌菌株 (102)道專(晉)字第 J0448 號  
(大陸 專利發明新型新式樣  
商標著作權)

貴單位編號：

本所編號：PECA82502/4778

簡旨：專利證書

二· 有關 貴單位委辦之上述案件，本所頃於日前接獲國外代理人來函稱：

- |                         |                    |
|-------------------------|--------------------|
| ( ) 本案已提出申請             | (✓) 本案已獲核准         |
| ( ) 本案須提出申請/補正/答辯       | ( ) 本案已寄發國外代理人     |
| ( ) 本案遭致核駁/審定/判決        | (✓) 本案已繳納領證費       |
| ( ) 本案已提出答辯/訴願/再訴願/行政訴訟 | (✓) 本案已繳納年費 (第5年)  |
| ( ) 本案遭致評定/舉發           | (✓) 本案已核發證書/註冊證/謄本 |

三· 需處理 (補正/審定答辯) 或報告事項：

1. 原由/說明：

報告使用專利應注意事項如下：

**【1】** 在專利物品、包裝上或刊登之廣告上，均應載明專利證號。

其格式如下：「大陸發明專利第 ZL 2008 1 0189500.9 號 or

PRC Patent No. ZL 2008 1 0189500.9 or

PRC Pat. No. ZL 2008 1 0189500.9」

如此，專用權人對他人之侵害方得請求排除或損害賠償。

**【2】** 本案核發之專利證書明細如下：

(1) 發明人：曾經洲；高穗生

(2) 專利權人：行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所

(3) 申請日期：2008年12月29日

(4) 專利號碼：ZL 2008 1 0189500.9

(5) 發證日期：2013年8月7日

(6) 專利權期間：2008年12月29日~2028年12月28日

(7) 年費期限：每年12月29日前一個月內

(8) 下次繳費期限：2014年12月29日(第6年)

**【3】** 專利證書記載事項有變更時，請即通知本所辦理變更登記。

隨函檢附國外代理人來函影本及於2013年8月7日公告之授權公告第CN 101768558B號影本。如仍有任何疑問，請不吝賜教。

2. 費用

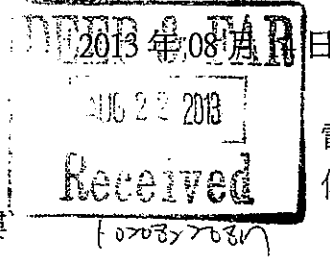
(✓) 本通知無費用！

( ) 關於此通知，日後將可能接獲代理人請款，則本所服務費為新台幣          元，而國外代理人費用則實報實銷。



AFD China Intellectual Property  
北京安信方達知識產權代理有限公司

中国北京海淀区北清路 8 号科技财富中心  
B 座 16 层 1601A 室, 100192  
Tel: +86 (10) 8273-0790 (中継多线)  
Fax: +86 (10) 8273-0820, 8273-2710  
Email: info@anxinfonda.com www.afdip.com



送呈：林明燕女士  
道法法律事務所  
臺北市中山北路三段 27 號 13 樓

電子郵件、傳真及郵寄  
傳真號: 00886 2 2598-9900

CONFIRMATION

事由：中國發明專利證書匯報  
名稱：抗害蟲的新穎蘇雲金芽孢桿菌菌株  
專利號：ZL200810189500.9  
專利權人：行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所  
貴方案號：PECA 82502/4778  
我方案號：010806087-E

林明燕女士 大鑒：

我們很高興地通知您，題述申請已由國家知識產權局正式簽發專利證書，專利權自授權公告日起生效，專利權期限為二十年(2008 年 12 月 29 日起至 2028 年 12 月 28 日)。隨函附上證書原件，敬請查收並妥善保存。

敬請注意：申請人應當於每年 12 月 29 日前一個月內繳納年費，未按照規定繳納年費的，專利權自應當繳納年費期滿之日起終止。題述專利第 6 年度的年費繳納時限為 2013 年 12 月 29 日。

您對上述事宜有任何疑問或指示，敬請與我們聯繫。

順頌商祺！

北京安信方達知識產權代理有限公司

周建東  
申請部 周建東 敬上

Zjd/Sy

附件（郵寄）：專利證書原件。

# 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所

## 專利證書財產入籍管理表

名稱：抗害虫的新穎蘇雲金芽地桿菌菌株

證書號碼	專利號 ZL 2008101895500.9, 中國發明專利證書 12478	
專利權人	行政院農業委員會 農業藥物毒物試驗所	
創作人	曾經洲, 高禮生	
專利權期間	2008.12.29 - 2028.12.28	
專利區域	中華人民共和國	
登記成本	取得費用	備註
規費	30000	
專利代理費	85704	
模型		
圖標製作費		
第1年年費		
其他( )		
其他( )		
其他( )		
其他( )		
總計		

創作人： 研究員  
兼組長 曾經洲

單位主管：

行政院主計處92年6月6日處會字第0920003716號函略以：「凡以自行研發方式取得並歸屬國有之專利權，僅得以向政府機關申請登記之成本，認列為取得成本」，該函所稱「申請登記之成本」，係指取得財產時必要之申請登記成本，例如規費、專利代理費、模型、圖標製作費等，惟取得財產後每年繳交之年費，由於僅有一年之效期，尚無須資本化列入財產價值，宜以當年度費用列帳。





# 发明专利证书

Certificate of Invention Patent

中华人民共和国国家知识产权局

STATE INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE OF THE PEOPLE'S REPUBLIC OF CHINA