(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2019 年 12 月 12 日 (12.12.2019)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2019/233349 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 9/02 (2006.01) *C12N 15/82* (2006.01)
C12N 15/53 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/089512

(22) 国际申请日: 2019 年 5 月 31 日 (31.05.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201810565916.X 2018年6月4日 (04.06.2018) CN
201910077823.7 2019年1月28日 (28.01.2019) CN

(71) 申请人: 青岛清原化合物有限公司 (QINGDAO KINGAGROOT CHEMICAL COMPOUND CO., LTD.) [CN/CN]; 中国山东省青岛市黄岛区青龙河路53号, Shandong 266000 (CN)。

(72) 发明人: 连磊 (LIAN, Lei); 中国山东省青岛市黄岛区青龙河路53号, Shandong 266000 (CN)。 莫苏东 (MO, Sudong); 中国山东省青岛市黄岛区青龙河路53号, Shandong 266000 (CN)。 李华荣 (LI, Huarong); 中国山东省青岛市黄岛区青龙河路53号, Shandong 266000 (CN)。 苑广迪 (YUAN, Guangdi); 中国山东省青岛市黄岛区青龙河路53号, Shandong 266000 (CN)。 李振国 (LI, Zhenguo); 中国山东省青岛市黄岛区青龙河路53号, Shandong 266000 (CN)。 张俊杰 (ZHANG, Junjie); 中国山东省青岛市黄岛区青龙河路53号, Shandong 266000 (CN)。 丁德辉 (DING, Dehui); 中国山东省青岛市黄岛区青龙河路53号, Shandong 266000 (CN)。 陈波 (CHEN, Bo); 中国山东省青岛市黄岛区青龙河路53号, Shandong 266000 (CN)。 刘桂智 (LIU, Guizhi); 中国山东省青岛市黄岛区青龙河路53号, Shandong 266000 (CN)。 宋超 (SONG, Chao); 中国山东省青岛市黄岛区青龙河路53号, Shandong 266000 (CN)。 王蕾 (WANG, Lei); 中国山东省青岛市黄岛区青龙河路53号, Shandong 266000 (CN)。

(54) **Title:** MUTANT P-HYDROXYPHENYLPYRUVATE DIOXYGENASE, AND CODING NUCLEIC ACID AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶、其编码核酸以及应用

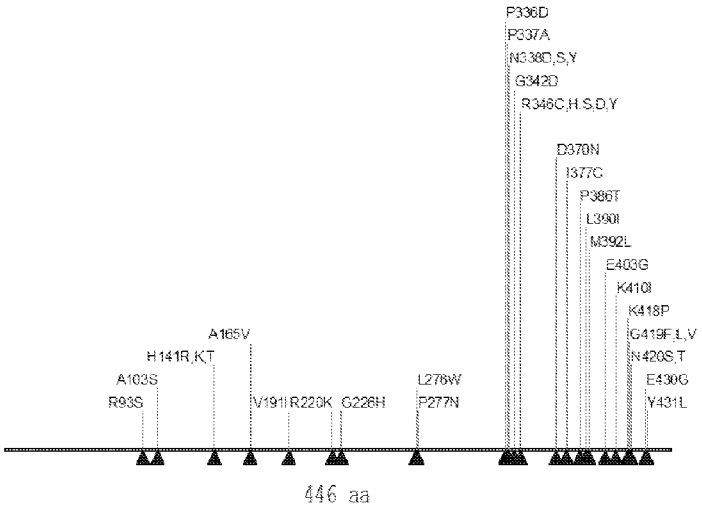


图 7

(57) **Abstract:** Disclosed are a mutant p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD) protein, a biologically active fragment thereof and an isolated polynucleotide comprising a nucleic acid sequence encoding the protein or fragment, wherein the mutant p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD) protein or the biologically active fragment thereof retains or enhances its property of catalyzing the conversion of p-hydroxyphenylpyruvic acid (HPP) into homogentisic acid, and is less sensitive to HPPD inhibitors than wild-type HPPD. Also disclosed are a nucleic acid construct, expression vector and host cell comprising the polynucleotide, as well as a method for producing a plant that has the property of catalyzing the conversion of p-hydroxyphenylpyruvic acid (HPP) into homogentisic acid, and at the same time, has a reduced sensitivity to HPPD inhibitory herbicides.

WO 2019/233349 A1

[见续页]

(81) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的国家保护)：AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的地区保护)：ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布：

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

— 在修改权利要求的期限届满之前进行，在收到该修改后将重新公布(细则48.2(h))。

— 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(57) 摘要：本发明公开了突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶(HPPD)蛋白、其生物活性片段以及包含编码所述蛋白或片段的核酸序列的分离的多核苷酸，其中所述突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶(HPPD)蛋白或其生物活性片段保留或加强了其催化对羟基苯基丙酮酸(HPP)转化为尿黑酸的性质，且对HPPD抑制剂的敏感性低于野生型HPPD。本发明还公开了包含所述多核苷酸的核酸构建体、表达载体和宿主细胞，以及生产具有催化对羟基苯基丙酮酸(HPP)转化为尿黑酸的性质、同时对HPPD抑制性除草剂的敏感性降低的植物的方法。

突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶、其编码核酸以及应用

技术领域

本发明属于农业基因工程领域，具体涉及向植物赋予 HPPD 抑制性除草剂抗性或耐受性的新型突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶（HPPD）、其编码核酸以及应用。

背景技术

对羟苯基丙酮酸双氧化酶（HPPD）是催化羟基苯丙酮酸（HPP）转化成尿黑酸盐的反应的酶。这个反应在酶结合的铁和氧的存在下发生。通过抑制 HPPD 而起作用的除草剂是熟知的，包括多种类型，比如异噁唑类、二酮腈类、三酮类以及吡唑啉盐类等。对 HPPD 的抑制作用阻断了从酪氨酸生物合成质体醌（PQ）。PQ 在类胡萝卜素色素的生物合成中是一种必需的辅因子，这些类胡萝卜素色素对于光合中心的光防护是必需的。抑制 HPPD 的除草剂是通过韧皮部可移动的漂白剂，它们引起暴露于光的新的分生组织和叶子显现出白色。在缺乏类胡萝卜素下，叶绿素是光破坏性的并且通过单线态氧的光敏作用而自身变成一种光化裂解剂。

用于提供耐受 HPPD 抑制性除草剂的植物的技术路线与方法同样是已知的，包括将 HPPD 酶过量表达从而在植物中产生大量的 HPPD 酶，这些 HPPD 酶与一种给定的除草剂是充分相关的从而具有足够的可供使用的功能性酶(尽管存在它的抑制剂)，或者是将目标 HPPD 酶突变成一种功能性的、但是对于除草剂更加不敏感的 HPPD。HPPD 抑制性除草剂是一个大类，它涵盖了许多不同类型。虽然一种给定的突变体 HPPD 酶可以提供对于一种或一些 HPPD 抑制性除草剂的一个有用水平的耐受性，但同一或单一突变体 HPPD 可能不足以提供对于另一种或另一类不同的、更希望的 HPPD 抑制性除草剂的商业水平的耐受性(参见例如美国申请公开号 2004/0058427；以及 PCT 申请公开号 WO98/20144 和 WO02/46387；还参见美国申请公开号 2005/0246800，它涉及作为相对耐受 HPPD 的大豆品种的鉴定和标记)。而且，不同 HPPD 抑制性除草剂可以在它们控制的杂草范围、使用的作物对象、制造成本以及环境益处方面是不同的。因此，本领域中仍然需要用于向不同的作物和作物品种赋予对 HPPD 抑制性除草剂的抗性/耐受性的新型突变 HPPD。

在创制除草剂耐受性作物和作物品种方面，转基因技术已广泛应用。但是，转基因作物的应用一直受到登记成本高的限制。以CRISPR/Cas 9为代表的基因编辑技术进步可以改变这一现状。CRISPR/Cas 9是2012年以来出现的新基因定点编辑技术（Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., and Charpentier, E. 2012. A programmable dual-RNA– guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science. 337: 816–821.；

Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A., and Zhang, F. 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science. 339: 819–823；Li, J. F., Norville, J. E., Aach, J., Mccormack, M., Zhang, D., Bush, J., Church, G. M., and Sheen, J. 2013. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in Arabidopsis and Nicotiana benthamiana using guide RNA and Cas9. Nat. Biotechnol. 31: 688.；Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., Dicarlo, J. E., Norville, J. E., and Church, G. M. 2013. RNA-guided human genome engineering via Cas9. Science. 339: 823.）。CRISPR/Cas 9系统对编辑靶点的识别是依靠核酸分子之间的碱基互补配对，可对任何紧跟PAM（NGG）的20bp的靶点序列进行编辑。另外，CRISPR/Cas 9系统操作简单，每次打靶只需替换原有载体上的20-30bp的靶向核苷酸序列，适宜高通量操作。可以同时编辑同一基因的多个位点以及多个不同的基因。目前，这项技术在生物医学、功能基因组学、动植物性状改良和新性状的创制等方面已显现出巨大的应用前景，正在对动植物育种产生革命性的促进作用（Hui Zhang，Jinshan Zhang, Zhaobo Lang, Jose Ramon Botellad, and Jian-Kang Zhu. 2017. Genome Editing—Principles and Applications for Functional Genomics Research and Crop Improvement, Critical Reviews in Plant Sciences, 36:4, 291-309, DOI:10.1080/07352689.2017. 1402989).

CRISPR/Cas 9 作为第三代基因编辑工具，主要是通过三种方式来实现定点编辑的。第一种是基因的定点敲除获得突变体。具体讲，Cas 9 在靶向 RNA（gRNA）的指导下识别和切割靶点，产生双链 DNA 断裂；断裂的 DNA 通常以非同源末端连接（NHEJ）来修复；在修复时容易产生移码突变以破坏这个基因。定点敲除的效率都较高。第二种是对靶标进行同源置换来更换靶标序列或者定点插入。在产生双链 DNA 断裂时，如果在附近存在同源修复模板，这时可能发生同源置换或定点插入。同源置换的效率较低，并随着要置换的序列的长度增长而变得更低。第三种是单碱基编辑（Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, Liu DR. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. Nature. 2016 May 19; 533(7603):420-4. doi: 10.1038/nature17946; Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, Packer MS, Badran AH, Bryson DI, Liu DR. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. Nature. 2017 Nov 23; 551(7681): 464-471. doi: 10.1038/nature 24644. Epub 2017 Oct 25. Erratum in: Nature. 2018 May 2）。单碱基编辑是利用 CRISPR/Cas 9 系统将脱氨酶靶向基因组中特定的位点从而对特定碱基进行修饰的基因编辑方法。此种方法已经在水稻中成功运用。如：Yan F., Kuang Y., Ren B., Wang J., Zhang D., Lin H., Yang B., Zhou X., and Zhou H. (2018). High-efficient A·T to G·C base

editing by Cas9n-guided tRNA adenosine deaminase in rice. Mol. Plant. doi: 10.1016/j.molp. 2018.02.008。

另外，CRISPR/Cpf1也同样可以用来做基因编辑(Zetsche, B., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Slaymaker, I.M., Makarova, K. S., Essletzbichler, P., Volz, S. E., Joung, J., Oost, J., Regev, A., Koonin, E. V., and Zhang, F. 2015. Cpf1is a single RNA-guided endonuclease of a Class 2 CRISPR Cas system. Cell. 163: 759–771；Endo, A., Masafumi, M., Kaya, H., and Toki, S. 2016a. Efficient targeted mutagenesis of rice and tobacco genomes usingCpf1 from Francisella novicida. Sci. Rep. 6: 38169.)。CRISPR/Cpf1有两个主要组成部分：Cpf1酶和决定系统特异性的crRNA。尽管CRISPR/Cpf1和CRISPR/Cas9系统相似，但还是有一些重要的差异(Hui Zhang, Jinshan Zhang, Zhaobo Lang, José Ramón Botella & Jian-Kang Zhu (2017) Genome Editing—Principles and Applications for Functional Genomics Research and Crop Improvement, Critical Reviews in Plant Sciences, 36:4, 291-309, DOI:10.1080/07352689.2017.1402989)。首先，CRISPR/Cpf1系统不需要反式激活crRNA（tracrRNA），但CRISP/Cas9却必须要。因此，它比较短小，只有42-44核苷酸，包括一个19核苷酸重复序列和1个23-25核苷酸长的间隔区。第三，不像Cas9在相同位置（PAM上游3-4 bp）剪切DNA双链产生平头末端，Cpf1的目标序列剪切位置在PAM序列下游23bp处，非目标单链为PAM序列下游18bp处，产生一个5bp突出的粘性末端。产生的粘性末端可以增加HDR介导的供体DNA插入到Cpf1剪切位点的效率。第四，CRISPR/Cpf1系统编辑多个目标或基因时只需要一个启动子来驱动多个小crRNAs阵列，很适合多靶点编辑。第五，CRISPR/Cas9系统在目标序列的3’端需要一个富含G (5’-NGG-3’)的PAM序列，CRISPR/Cpf1系统需要一个位于目标序列5’端富含T (5’-TTTN-3’ or 5’-TTN-3’)的PAM序列，适合于编辑多A/T的DNA或基因。目前已经开发出三种改造过的CRISPR/Cpf1系统，包括来自Francisella novicida（弗朗西斯氏菌）的FnCpf1，来自Acidaminococcus sp.（氨基酸球菌）的AsCpf1和来自Lachnospiraceae bacterium（毛螺菌）的LbCpf1。三种Cpf1系统已经在以下物种上用作植物基因组编辑：水稻、拟南芥、烟草和大豆(Endo, A., Masafumi, M., Kaya, H., and Toki, S. 2016a. Efficient targeted mutagenesis of rice and tobacco genomes usingCpf1 from Francisella novicida. Sci. Rep. 6: 38169；Kim, H., Kim, S. T., Ryu, J., Kang, B. C., Kim, J. S., and Kim, S.G. 2017. CRISPR/Cpf1-mediated DNA-free plant genome editing. Nat. Commun. 8: 14406.；Tang, X., Lowder, L. G., Zhang, T., Malzahn, A. A., Zheng, X., Voytas, D. F., Zhong, Z., Chen, Y., Ren, Q., and Li,Q. 2017. A CRISPR-Cpf1 system for efficient genome editing and transcriptional repression in plants. Nat.Plants. 3: 17018.；Wang, M., Mao, Y., Lu, Y., Tao, X., and Zhu, J. K. 2017a. Multiplex gene editing in rice using the CRISPR-Cpf1 system. Mol. Plant. 10: 1011–1013)。

通过基因编辑介导的同源置换、定点修饰或单碱基编辑提高重要农作物对除草剂的耐受性是当前基因编辑研究领域的热点之一，现已报道几个成功实例，但都集中在抗乙酰乳酸合成酶(*ALS*)抑制性除草剂（Yongwei Sun，Xin Zhang，Chuanyin Wu，ubing He，Youzhi Ma, Han Hou，Xiuping Guo, Wenming Du，Yunde Zhao and Lanqin Xia. 2016. Engineering Herbicide-Resistant Rice Plants through CRISPR/Cas9-Mediated Homologous Recombination of Acetolactate Synthase. Molecular Plant 9,628-631 doi.org/10.1016/j.molp.2016.01.001; Yiyu Chen, Zhiping Wang, Hanwen Ni, Yong Xu, Qijun Chen, Linjian Jiang. 2017. CRISPR/Cas9-mediated base-editing system efficiently generates gain-of-function mutations in *Arabidopsis*. Sci China Life Sci 60. doi: 10.1007/s11427-017-9021-5）和草甘膦除草剂(WO2017028768A1)。这就需要科学家们不断研究进而开发出新的提高农作物对不同类型除草剂耐受性的方法。

发明内容

基于此，本申请提供了一种向植物赋予 HPPD 抑制性除草剂抗性或耐受性的突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶（HPPD），所述突变型 HPPD 保留或加强了其催化对羟基苯基丙酮酸（HPP）转化为尿黑酸的性质，同时对 HPPD 抑制性除草剂的敏感性明显低于野生型 HPPD。本发明还涉及突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶的生物学活性片段，编码所述蛋白或片段的多核苷酸及其应用。

因此，本发明一方面提供了一种突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶（HPPD）蛋白，其在对应于 SEQ ID NO: 2 所示的野生型水稻对羟苯基丙酮酸双氧化酶蛋白氨基酸序列中的第 93、103、141、165、191、220、226、276、277、336、337、338、342、346、370、377、386、390、392、403、410、418、419、420、430 和 431 位中的一个或多个位置处具有选自下述中的一个或多个突变：93S、103S、141R、141K、141T、165V、191I、220K、226H、276W、277N、336D、337A、338D、338S、338Y、342D、346C、346D、346H、346S、346Y、370N、377C、386T、390I、392L、403G、410I、418P、419F、419L、419V、420S、420T、430G 和 431L。优选地，所述突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶（HPPD）蛋白的氨基酸序列进一步与 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%序列同一性。更优选地，所述突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶（HPPD）蛋白具有 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列，区别仅在于在对应于 SEQ ID NO: 2 所示的野生型水稻对羟苯基丙酮酸双氧化酶蛋白氨基酸序列中的第 93、103、141、165、191、220、226、276、277、336、337、338、342、346、370、377、386、390、392、403、410、418、419、420、430 和 431 位中的一个或多个位置处具有选自下述中的一个或多个突变：93S、103S、141R、141K、141T、

165V、191I、220K、226H、276W、277N、336D、337A、338D、338S、338Y、342D、346C、346D、346H、346S、346Y、370N、377C、386T、390I、392L、403G、410I、418P、419F、419L、419V、420S、420T、430G 和 431L。

本发明另一方面提供了突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶（HPPD）蛋白的生物学活性片段，其在所述蛋白的 N 和/或 C 末端缺失了一个或多个（例如 1－50 个、1－25 个、1－10 个或 1－5 个，例如 1、2、3、4 或 5 个）氨基酸残基的部分，但仍然保留了该全长蛋白的所需生物学活性，即保留或加强了其催化对羟基苯基丙酮酸（HPP）转化为尿黑酸的性质，同时对 HPPD 抑制性除草剂的敏感性明显低于野生型 HPPD 或其相应的生物学活性片段。

本发明另外涉及一种融合蛋白，其中包含有本发明的突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶（HPPD）蛋白或其生物学活性片段以及与之相融合的其它组分，例如肽或多肽组分。优选地，所述组分赋予该融合蛋白以希望的性质，例如便于其分离、纯化，提高其稳定性，延长其半寿期，提供另外的生物学活性，引导所融合的 HPPD 蛋白进入目标区域例如质体如叶绿体等。相应组分的选择是本领域技术人员熟知的。

本发明另一方面提供了包含编码所述突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶（HPPD）蛋白或其生物活性片段或者融合蛋白的核酸序列的分离的多核苷酸。

本发明还提供了包含所述多核苷酸以及与之可操作连接的调控元件的核酸构建体。

在进一步的方面，本发明提供了一种表达载体，其中包含所述多核苷酸以及与之可操作连接的表达调控元件。

在又一个方面，本发明提供了包含有所述多核苷酸、核酸构建体或表达载体的宿主细胞。

本发明还提供了一种生产对于 HPPD 抑制性除草剂的抗性或耐受性提高的植物的方法。

本发明另外涉及通过上述方法所生产的植物。

本发明还提供了一种提高植物对 HPPD 抑制性除草剂的抗性或耐受性的方法，其中包括在所述植物中表达本发明的突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶（HPPD）蛋白或其生物活性片段或者融合蛋白。

本发明另外提供了一种提高植物对 HPPD 抑制性除草剂的抗性或耐受性的方法，其中包括将表达本发明的突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶（HPPD）蛋白或其生物活性片段或者融合蛋白的植物与另一植物杂交。

本发明另外提供了一种提高植物对 HPPD 抑制性除草剂的抗性或耐受性的方法，其

中包括对所述植物细胞、植物组织、植物部分或植物的内源性 HPPD 蛋白进行基因编辑。

本发明另外涉及本发明的突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶（HPPD）蛋白或其生物活性片段或者融合蛋白用于提高植物的 HPPD 抑制性除草剂抗性或耐受性的用途。

本发明另外涉及一种控制植物场所的杂草的方法，其中包括对包含本发明的植物或种子的场所施用控制杂草有效量的一种或多种 HPPD 抑制性除草剂，并且不显著影响所述植物。

附图说明

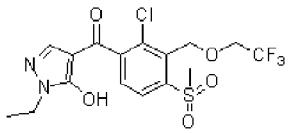
图 1 显示了在 96-孔板中培养的转化了野生型或突变型水稻 HPPD 基因的重组大肠杆菌培养液的颜色反应。其中重组大肠杆菌表达野生型水稻 HPPD（WT）或者单位点突变型水稻 HPPD 之一，将它们在培养液中含有不同浓度的除草剂环磺酮（左）或苯唑氟草酮代谢后产物（右，其结构式为：）的条件下培养，显示有不同程度的颜色变化。在有相同浓度的除草剂孔中，颜色越深代表对此除草剂的抗性/耐受性越高。

图 2 显示了在 96-孔板中培养的转化了野生型或突变型水稻 HPPD 基因的重组大肠杆菌培养液的颜色反应。其中重组大肠杆菌表达野生型水稻 HPPD（WT）和各个单位点突变型水稻 HPPD，将它们在培养液中含有不同浓度的除草剂环吡氟草酮（左）或苯唑草酮（右）的条件下培养，显示有不同程度的颜色变化。在有相同浓度的除草剂孔中，颜色越深代表对此除草剂的抗性/耐受性越高。

图 3 显示了在 96-孔板中培养的转化了野生型或突变型水稻 HPPD 基因的重组大肠杆菌培养液的颜色反应。其中重组大肠杆菌表达野生型水稻 HPPD（WT）和各个单位点突变型水稻 HPPD，将它们在培养液中含有不同浓度的除草剂硝磺草酮的条件下培养，显示有不同程度的颜色反应。在有相同浓度的除草剂孔中，颜色越深代表对此除草剂的抗性/耐受性越高。

图 4 显示了在 96-孔板中培养的转化了野生型或突变型水稻 HPPD 基因的重组大肠杆菌培养液的颜色反应。其中重组大肠杆菌表达野生型水稻 HPPD（WT）或者单位点突变型 H141R、G342D、D370N 之一或其组合，将它们在含有不同浓度的除草剂环磺酮（上）或苯唑氟草酮代谢后产物（下）的条件下培养，显示有不同程度的颜色变化。在有相同浓度的除草剂孔中，颜色越深代表对此除草剂的抗性/耐受性越高。

图 5 显示了在 96-孔板中培养的转化了野生型或突变型水稻 HPPD 基因的重组大肠杆

菌培养液的颜色反应。其中重组大肠杆菌表达野生型水稻 HPPD（WT）或者单位点突变型 H141R、G342D、D370N 或其组合（141+342 表示 H141R/G342D；141+370 表示 H141R/D370N；342+370 表示 G342D/D370N；141+342+370 表示 H141R/G342D/D370N），将它们在含有不同浓度除草剂环吡氟草酮（上）或苯唑草酮（下）的条件下培养，显示有不同程度的颜色变化。在有相同浓度的除草剂孔中，颜色越深代表对此除草剂的抗性/耐受性越高。

图 6 显示了在 96-孔板中培养的转化了野生型或突变型水稻 HPPD 基因的重组大肠杆菌培养液的颜色反应。其中重组大肠杆菌培养液表达野生型水稻 HPPD（WT）或者单位点突变型 H141R、G342D、D370N 或其组合，将它们在含有不同浓度除草剂硝磺草酮的条件下培养，显示不同程度的颜色变化。在有相同浓度的除草剂孔中，颜色越深代表对此除草剂的抗性/耐受性越高。

图 7 显示了水稻 HPPD 野生型酶蛋白上标注的所有的氨基酸突变。

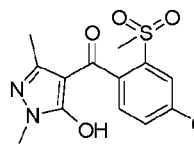
图 8 显示了在 96-孔板中培养的转化了突变型水稻 HPPD 基因的重组大肠杆菌培养液的颜色反应。其中重组大肠杆菌培养液表达相近突变点 336-338-342-346 各种组合与 141R+342D+370N 组合（336D、338D、338S、338Y、342D、346C、346H、346S 分别表示 P336D、N338D、N338S、N338Y、G342D、R346C、R346H、R346S；141R+342D+370N 表示 H141R/G342D/D370N），将它们在含有不同浓度除草剂双唑草酮代谢产物（代号为101，其结构式为：）的条件下培养，显示不同程度的颜色变化。在有相同浓度的除草剂孔中，颜色越深代表对此除草剂的抗性/耐受性越高。

图 9 显示了在 96-孔板中培养的转化了突变型水稻 HPPD 基因的重组大肠杆菌培养液的颜色反应。其中重组大肠杆菌培养液表达三、四个突变点各组合（141R、336D、338D、338S、338Y、342D、346C、346S、346H、370N、418P、419F 分别表示 H141R、P336D、N338D、N338S、N338Y、G342D、R346C、R346S、R346H、D370N、K418P、G419F），将它们在含有不同浓度除草剂双唑草酮代谢产物的条件下培养，显示不同程度的颜色变化。在有相同浓度的除草剂孔中，颜色越深代表对此除草剂的抗性/耐受性越高。

图 10 显示了双唑草酮代谢产物对 OsHPPD WT 以及各突变体的抑制曲线，横坐标表示化合物 101 浓度，纵坐标以抑制剂浓度为 0 时反应速率为 100%，表示在不同浓度 101 时酶的活性残余活性，图中数字代表各突变位点。从图中可以很直观的看出，野生型 WT 对 101 极为敏感，在 101 浓度约为 60 uM 时活性被完全抑制，而各突变体则表现出了较强的抗性提高。

根据此结果，可计算出 101 对各突变体活性抑制 IC50 值，同样证明了各突变体对野生型 OsHPPD 表现出明显提高的抗性（其中，141R、338D、342D、346C、346H、370N、386T、418P、419F、420S 分别表示 H141R、N338D、G342D、R346C、R346H、D370N、P386T、K418P、G419F、N420S）。

图 11 显示了转基因水稻（中花 11）对 HPPD 抑制剂除草剂环磺酮的敏感性。表达突变型水稻 OsHPPD3M（H141R/G342D/D370N）能在含 3uM 环磺酮培养基中保持绿色，但负对照（CK）表达 mCherry 的苗子在 1.0uM 的环磺酮的培养基也严重白化（药害）。

图 12 显示了转基因水稻（中花 11）对 HPPD 抑制剂除草剂双唑草酮的耐受性。T0 代植株表达水稻 OsHPPD3M 的植株能耐受 8-16 克有效成分双唑草酮/亩，但非转基因对照（CK）严重白化后很快死亡（A，B）；T1 代植株表达水稻 OsHPPD3M 的植株能耐受 32-64 克有效成分双唑草酮/亩，但非转基因对照严重白化后很快死亡（C，D）。

图 13 显示了水稻 HPPD 单碱基编辑载体。

图 14 显示了单碱基编辑水稻苗及其靶点 H141R（CAC>CGC)序列分析。

A：单碱基编辑苗：在 0.4uM 环磺酮存在的培养基里，编辑不成功者白化（药害），编辑成功者保持绿色；

B：单碱基编辑靶点的序列：水稻 HPPD 第 141 位氨基酸野生型为组氨酸 His，密码子为 CAC（上图），编辑后为精氨酸 Arg，密码子为 CGC（本例为杂合体，出现双峰）。

图 15 显示了水稻 hppd 基因(Oshppd>NC029257.1)的结构，展示两个外显子(exon)，一个内含子(intron)，三个突变位点（141，342，370）和设计的靶向切割位置(gRNA1-2,gRNA2-1)。

图 16 显示了模板 DNA 的结构。三个突变氨基酸 141-342-370 的核心置换区域的长度 1056bp，左右同源臂各 350bp，再加上从载体上切割后在左右两端各留下 6bp，模板总长 1768bp；为便于 PCR 扩增后对其 PCR 产物进行快速基因型鉴定，去掉了其中的 NcoI 酶切位点；同时为避免置换后又被重新切割，模板上的原切割位点处的 PAM（NGG）也被去掉。

图 17 显示了水稻 HPPD 基因同源置换三突变点（H141R-G342D-D370N）。

A：水稻 HPPD 基因编辑苗：在 0.4uM 环磺酮存在的培养基里，未成功编辑的（野生型 WT）白化（药害），编辑成功的 2 株苗（AW2，AW3）保持绿色；

B：同源置换后，氨基酸 342 和 370 位点的密码子变化，GGC 变为 GAC 和 GAC 变为 AAC（杂合体；导致部分 G342D 和 D370N）；H141R（CAC>CGC）也成功编辑（图中未列序列）。

发明详述

本说明书中使用的一些术语定义如下。

在本发明中，“HPPD 抑制性除草剂”是本身有除草活性的物质或者与能改变其效果的其他除草剂和/或添加剂合用的物质，其能够通过抑制 HPPD 而起作用。本身能够通过抑制 HPPD 而起除草作用的物质在本领域中是熟知的，包括许多类型，1）三酮类，例如，磺草酮（Sulcotrione，CAS 号：99105-77-8）；硝磺草酮（Mesotrione，CAS 号：104206-82-8）；氟吡草酮(bicyclopyrone，CAS 号：352010-68-5)；环磺酮（tembotrione，CAS 号：335104-84-2）；呋喃磺草酮（tefuryltrione，CAS 号：473278-76-1）；双环磺草酮（Benzobicyclon，CAS 号：156963-66-5）；2）二酮腈类，例如，2-氰基-3-环丙基-1-(2-甲基磺酰基-4-三氟甲基苯基)丙-1,3-二酮（CAS 号：143701-75-1）；2-氰基-3-环丙基-1-（2-甲基磺酰基-3,4-二氯苯基）丙-1,3-二酮（CAS 号：212829-55-5）；2-氰基-1-[4- (甲基磺酰基)-2-三氟甲基苯基]-3-(1-甲基环丙基)丙-1,3-二酮（CAS 号：143659-52-3）；3）异噁唑类，例如，异噁氟草(isoxaflutole，CAS 号：141112-29-0)；异噁氯草酮（isoxachlortole，CAS 号：141112-06-3）异恶草酮(clomazone，CAS 号：81777-89-1)；4）吡唑类，例如，苯唑草酮（topramezone，CAS 号：210631-68-8）；磺酰草吡唑（pyrasulfotole，CAS 号：365400-11-9）；苄草唑(pyrazoxyfen，CAS 号：71561-11-0)；吡唑特（pyrazolate，CAS 号：58011-68-0）；吡草酮（benzofenap，CAS 号：82692-44-2）；双唑草酮（CAS 号：1622908-18-2)；Tolpyralate（CAS 号：1101132-67-5)；苯唑氟草酮（CAS 号：1992017-55-6)；环吡氟草酮（CAS 号：1855929-45-1）；三唑磺草酮（CAS 号：1911613-97-2）；5）二苯酮类；6）其他类：lancotrione（CAS 号：1486617-21-3）；fenquinotrione（CAS 号：1342891-70-6）。优选地，所述除草剂是环磺酮、苯唑氟草酮、环吡氟草酮、苯唑草酮、硝磺草酮、双唑草酮或其任意组合等。

“对 HPPD 抑制性除草剂的耐受性增强”或“对 HPPD 抑制性除草剂的抗性增强”的植物是指这样的植物，其对所述 HPPD 抑制性除草剂的耐受性或抗性与含有野生型 HPPD 基因的植物相比提高。“对 HPPD 抑制性除草剂的耐受性增强”或“对 HPPD 抑制性除草剂的抗性增强”的 HPPD 酶是指这样的 HPPD 酶，其在已知会抑制相应野生型 HPPD 酶蛋白活性的除草剂浓度下，表现出比野生型 HPPD 酶高至少 10%、优选高至少 15%、更优选高至少 20%的酶活性。在本发明中，“HPPD 抑制性除草剂耐受性”和“HPPD 抑制性除草剂抗性”两个术语可以互换使用，均指的是对 HPPD 抑制性除草剂的耐受性和对 HPPD 抑制性除草剂的抗性。

术语“野生型”指的是可以在自然界中被发现存在的核酸分子或蛋白质。

术语“蛋白”、“多肽”和“肽”在本发明中可以互换使用，指的是氨基酸残基聚合物，包括其中一个或多个氨基酸残基是天然氨基酸残基的化学类似物的聚合物。本发明的蛋白

和多肽可以重组产生，也可以通过化学合成。术语“突变蛋白”或“突变型蛋白”指的是这样的蛋白质，其与野生型蛋白质的氨基酸序列相比，具有一个或多个氨基酸残基的取代、插入、缺失和/或添加。

术语“多核苷酸”和“核酸”可以互换使用，包括DNA、RNA或者其杂交体，可以是双链或单链的。

在本发明中，“宿主生物”应理解为可以引入突变型HPPD蛋白编码核酸的任何单细胞或多细胞生物，包括例如细菌如大肠杆菌，真菌如酵母（例如酿酒酵母）、霉菌（例如曲霉菌），植物细胞和植物等。

在本发明中，“植物”应理解为能够进行光合作用的任何分化的多细胞生物，特别是单子叶或双子叶植物，例如：（1）粮食作物：稻属(Oryza spp.)，例如稻(Oryza sativa)、阔叶稻(Oryza latifolia)、水稻(Oryza sativa)、光稃稻（Oryza glaberrima)；小麦属(Triticum spp.)，例如普通小麦(Triticum aestivum)、硬粒小麦(T.Turgidumssp.durum)；大麦属(Hordeum spp.)，例如大麦(Hordeum vulgare)、亚利桑那大麦（Hordeum arizonicum）；黑麦 (Secale cereale)；燕麦属(Avena spp.)，例如燕麦(Avena sativa)、野燕麦(Avena fatua)、比赞燕麦(Avena byzantina)、Avena fatua var.sativa、杂种燕麦(Avena hybrida)；稗属(Echinochloa spp.)，例如，珍珠粟(Pennisetum glaucum)、高粱(两色高粱(Sorghum bicolor)、高粱(Sorghum vulgare))、黑小麦、玉蜀黍或玉米、粟、稻(rice)、谷子、糜子、两色蜀黍(Sorghum bicolor)、黍子、荞麦属(Fagopyrum spp.)、黍(Panicum miliaceum)、小米(Setaria italica)、沼生菰(Zizania palustris)、埃塞俄比亚画眉草(Eragrostis tef)、稷(Panicum miliaceum)、龙爪稷(Eleusine coracana)；（2）豆类作物：大豆属(Glycine spp.)，例如大豆(Glycine max)、黄豆(Soja hispida)、Soja max)、野豌豆属(Vicia spp.)、豇豆属(Vigna spp.)、豌豆属(Pisum spp.)、芸豆(field bean)、羽扇豆属(Lupinus spp.)、蚕豆属(Vicia)、酸豆(Tamarindus indica)、兵豆(Lens culinaris)、山黧豆属(Lathyrus spp.)、扁豆属(Lablab)、蚕豆、绿豆、红豆、鹰嘴豆；（3）油料作物：花生(Arachis hypogaea)、落花生属(Arachis spp)、胡麻属(Sesamum spp.)、向日葵属(Helianthus spp.)(例如向日葵(Helianthus annuus))、油棕属(Elaeis)(例如油棕 (Eiaeis guineensis)、美洲油棕(Elaeis oleifera))、大豆(soybean)、油菜（Brassicanapus）、芸苔、芝麻、芥菜（Brassicajuncea）、油菜籽油菜(oilseedrape)、油茶、油棕、油橄榄、蓖麻、欧洲油菜（Brassica napus L.)、卡诺拉油菜（canola）；（4）纤维作物：剑麻(Agave sisalana)、棉属 (棉花、海岛棉(Gossypium barbadense)、陆地棉(Gossypium hirsutum))、红麻、剑麻、蕉麻、亚麻(Linum usitatissimum)、黄麻、苎麻、大麻(Cannabis sativa)、火麻；（5）水果类作物：枣属(Ziziphus spp.)、香瓜属(Cucumis spp.)、

鸡蛋果(Passiflora edulis)、葡萄属(Vitis spp.)、越桔属(Vaccinium spp.)、西洋梨(Pyrus communis)、李属 (Prunus spp.)、番石榴属(Psidium spp.)、石榴(Punica granatum)、苹果属(Malus spp.)、西瓜(Citrullus lanatus)、柑桔属(Citrus spp.)、无花果(Ficus carica)、金桔属 (Fortunella spp.)、草莓属(Fragaria spp.)、山楂属(Crataegus spp.)、柿树属(Diospyros spp.)、红仔果(Eugenia unifora)、枇杷(Eriobotrya japonica)、龙眼(Dimocarpus longan)、番木瓜(Carica papaya)、椰子属(Cocos spp.)、阳桃 (Averrhoa carambola)、狒猴桃属(Actinidia spp.)、扁桃(Prunus amygdalus)、芭蕉属(Musa spp.)（香蕉）、鳄梨属(Persea spp.)（鳄梨(Persea americana)）、番石榴(Psidium guajava)、曼密苹果(Mammea americana)、芒果(Mangifera indica)、橄榄(油橄榄(Oleaeuropaea))、番木瓜(Caricapapaya) 、椰子(Cocos nucifera)、凹缘金虎尾(Malpighia emarginata)、人心果(Manilkara zapota)、菠萝(Ananas comosus)、番荔枝属(Annona spp.)、柑桔树(柑桔属物种(Citrus spp.))、波罗蜜属(Artocarpus spp.)、荔枝(Litchi chinensis)、茶藨子属(Ribes spp.)、悬钩子属(Rubus spp.)、梨、桃、杏、梅、杨梅、柠檬、金橘、榴莲、橙、草莓(straw berry)、蓝莓、哈密瓜、甜瓜、椰枣、胡桃树、樱桃树；（6）根茎类作物：木薯属(Manihot spp.)、甘薯(Ipomoea batatas)、芋(Colocasia esculenta)、榨菜、洋葱、荸荠、油莎草、山药；（7）蔬菜类作物：菠菜属(Spinacia spp.)、菜豆属(Phaseolus spp.)、莴苣(Lactuca sativa)、苦瓜属(Momordica spp)、欧芹(Petroselinum crispum)、辣椒属(Capsicum spp.)、茄属(Solanum spp.) (例如马铃薯(Solanum tuberosum)、红茄(Solanum integrifolium)或蕃茄(Solanum lycopersicum))、蕃茄属(Lycopersicon spp.) (例如西红柿(Lycopersicon esculentum)、蕃茄(Lycopersicon lycopersicum)、梨形蕃茄 (Lycopersicon pyriforme))、硬皮豆属(Macrotyloma spp.)、无头甘蓝(kale)、棱角丝瓜(Luffa acutangula)、小扁豆(lentil)、秋葵 (okra)、洋葱(onion)、马铃薯(potato)、洋蓟(artichoke)、芦笋(asparagus)、 西兰花(broccoli)、球芽甘蓝(Brussels sprouts)、卷心菜(cabbage)、胡萝卜(carrot)、花椰菜(cauliflower)、芹菜(celery)、羽衣甘蓝(collard greens)、西葫芦 (squash)、冬瓜(Benincasa hispida)、石刁柏(Asparagus officinalis)、旱芹(Apium graveolens)、苋属(Amaranthus spp.)、葱属(Allium spp.)、秋葵属(Abelmoschus spp.)、苦苣(Cichorium endivia)、南瓜属(Cucurbita spp.)、芫荽(Coriandrum sativum)、埃塞俄比亚芥（B.carinata）、萝卜(Rapbanus sativus)、芸苔属(Brassica)物种(例如例如欧洲油菜(Brassica napus)、芜菁亚种(Brassica rapa ssp.)、卡诺拉油菜(canola)、油籽油菜 (oilseed rape)、芜菁油菜(turnip rape)、芥菜、甘蓝、黑芥、油菜籽油菜)、孢子甘蓝、茄科植物（茄子）、甜椒、黄瓜、丝瓜、白菜、油菜、甘蓝、葫芦、韭菜、莲、藕、生菜；（8）花卉作物：小金莲花(Tropaeolum minus)、金莲花 (Tropaeolum majus)、美人蕉(Canna indica)、

仙人掌属(Opuntia spp.)、万寿菊属(Tagetes spp.)、兰花、文殊兰、君子兰、朱顶红、玫瑰、月季、茉莉花、郁金香、樱花、牵牛花、金盏花、荷花、雏菊、康乃馨、矮牵牛花、郁金香、百合、梅花、水仙、迎春、报春、瑞香、山茶、白玉兰、紫玉兰、琼花、君子兰、海棠、牡丹、芍药、丁香、杜鹃、西洋杜鹃、含笑、紫荆、棣棠、锦带花、连翘、云南黄馨、金雀花、仙客来、蝴蝶兰、石斛、风信子、鸢尾、马蹄莲、金盏菊、百枝莲、四季海棠、吊钟海棠、竹节海棠、天竺葵；（9）药用作物：红花(Carthamus tinctorius)、薄荷属(Mentha spp.)、波叶大黄(Rheum rhabarbarum)、番红花(Crocus sativus)、枸杞、玉竹、黄精、知母、麦冬、川贝、郁金、砂仁、何首乌、大黄、甘草、黄芪、人参、三七、五加、当归、川芎、北柴胡、曼佗罗、洋金花、薄荷、益母草、藿香、黄芩、夏枯草、除虫菊、银杏、金鸡纳树、天然橡胶树、苜蓿、胡椒；（10）原料作物：橡胶、蓖麻(Ricinus communis)、油桐、桑、忽布、桦、棓木、漆树；（11）牧草作物：冰草属(Agropyron spp.)、车轴草属(Trifolium spp.)、芒(Miscanthus sinensis)、狼尾草属(Pennisetum sp.)、蘸草(Phalaris arundinacea)、柳枝稷(Panicum virgatum)、草原草(prairiegrasses)、印度草 (Indiangrass)、大须芒草(Big bluestem grass)、梯牧草(Phleum pratense)、草皮草(turf)、莎草科（高山嵩草、脚苔草(Carex pediformis）、低苔草）、苜蓿、梯牧草、紫花苜蓿、草木犀、紫云英、柽麻、田菁、红萍、水葫芦、紫穗槐、羽扇豆、三叶草、沙打旺、水浮莲、水花生、黑麦草；（12）糖料作物：甘蔗(甘蔗属物种(Saccharum spp.))、甜菜(Beta vulgaris)；（13）饮料作物：大叶茶(Camellia sinensis)、茶(Camellia Sinensis)、茶树(tea)、咖啡(咖啡属物种(Coffea spp.))、可可树 (Theobroma cacao)、蛇麻花（啤酒花）；（14）草坪植物：固沙草(Ammophila arenaria)、早熟禾属(Poa spp.)（草地早熟禾(Poa pratensis)(蓝草)）、剪股颖属物种(Agrostis spp.)(剪股颖、匍匐剪股颖（Agrostis palustris))、黑麦草属物种(Lolium spp.)(黑麦草)、羊茅属物种(Festuca spp.) (羊茅)、结缕草属物种(Zoysia spp.)(结缕草（Zoysiajaponica）)、狗牙根属物种(Cynodon spp.)(百慕大草、狗牙根)、侧钝叶草(Stenotaphrum secunda tum)(圣奥古斯丁草)、雀稗属物种(Paspalum spp.)(巴哈草)、假俭草(Eremochloa ophiuroides)(百足草)、地毯草属物种(Axonopus spp.)(地毯草)、指形垂穗草(Bouteloua dactyloides)(野牛草)、垂穗草属变种物种 (Bouteloua var.spp.)(格兰马草) 、马唐（Digitariasanguinalis）、香附子（Cyperusrotundus）、短叶水蜈蚣（Kyllingabrevifolia）、阿穆尔莎草（Cyperusamuricus）、加拿大飞蓬（Erigeroncanadensis）、天胡荽（Hydrocotylesibthorpioides）、鸡眼草（Kummerowiastriata）、地锦（Euphorbiahumifusa）、耕地堇菜（Violaarvensis）、白颖苔草、异穗苔草、草皮草（turf）；（15）树木作物：松属(Pinus spp.)、柳属(Salix sp.)、槭树属(Acer spp.)、木槿属(Hibiscus spp.)、桉属

(Eucalyptus sp.)、银杏(Ginkgo biloba)、箣竹属(Bambusa sp.)、杨属(Populus spp.)、牧豆树属(Prosopis spp.)、栎属(Quercus spp.)、刺葵属(Phoenix spp.)、山毛榉属 (Fagus spp.)、吉贝(Ceiba pentandra)、樟属(Cinnamomum spp.)、黄麻属(Corchorus sp.)、南方芦苇(Phragmites australis)、酸浆属(Physalis spp.)、山蚂蝗属(Desmodium spp.)、杨、常春藤、白杨、珊瑚树、银杏、栎类、臭椿、木荷、冬青、悬铃木、女贞、大叶黄扬、落叶松、黑荆树、马尾松、思茅松，云南松、南亚松、油松、红松、黑胡桃、柠檬、悬铃木、蒲桃、珙桐、木棉、爪哇木棉、洋紫荆、羊蹄甲、雨树、合欢、龙牙花、刺桐、广玉兰、苏铁、紫薇、针叶树、乔木、灌木；（16）坚果作物：巴西栗 (Bertholletia excelsea)、栗属(Castanea spp.)、榛属(Corylus spp.)、山核桃属 (Carya spp.)、核桃属(Juglans spp.)、阿月浑子(Pistacia vera)、腰果(Anacardium occidentale)、澳洲坚果(全缘叶澳洲坚果(Macadamia integrifolia))、碧根果、夏威夷果、开心果、巴旦木以及产生坚果的植物；（17）其他：拟南芥、臂形草、蒺藜草、大狗尾草、牛筋草、Cadaba farinosa、藻类(algae)、Carex elata、观赏植物、大果假虎刺(Carissa macrocarpa)、菜蓟属(Cynara spp.)、野胡萝卜(Daucus carota)、薯蓣属(Dioscorea spp.)、蔗茅属(Erianthus sp.)、苇状羊茅(Festuca arundinacea)、萱草(Hemerocallis fulva)、百脉根属(Lotus spp.)、Luzula sylvatica、紫苜蓿(Medicago sativa)、草木樨属(Melilotus spp.)、黑桑(Morus nigra)、烟草属(Nicotiana spp.)、木犀榄属(Olea spp.)、鸟足豆属(Ornithopus spp.)、欧防风(Pastinaca sativa)、接骨木属(Sambucus spp.)、白芥属(Sinapis sp.)、蒲桃属 (Syzygium spp.)、鸭茅状摩擦禾(Tripsacum dactyloides)、Triticosecale rimpaui、香堇(Viola odorata)等。

在本发明中，术语“植物组织”或“植物部分”包括植物细胞、原生质体、植物组织培养物、植物愈伤组织、植物块以及植物胚、花粉、胚珠、种子、叶、茎、花、枝、幼苗、果实、核、穗、根、根尖、花药等。

在本发明中，“植物细胞”应理解为来自或发现于植物的任何细胞，其能够形成例如：未分化组织如愈伤组织，分化组织如胚胎，植物的组成部分，植物或种子。

对于说明书中所用的有关氨基酸取代的术语，第一个字母代表特定序列某一位置上天然存在的氨基酸，后面的数字代表相对于 SEQ ID NO: 2 的位置，第二个字母代表取代该天然氨基酸的不同氨基酸。譬如 A103S 表示相对于 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列而言，第 103 位的丙氨酸被丝氨酸取代。对于第一个字母不存在的氨基酸取代，其指的是相对于其野生型蛋白的氨基酸序列而言，在对应于 SEQ ID NO: 2 的所述位置处，天然氨基酸被数字后的字母代表的氨基酸所取代。对于双重或多重突变，各突变之间以“/”隔开。例如，H141R/G342D/D370N 表示相对于 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列而言，第 141 位的组

氨酸被精氨酸取代，第 342 位的甘氨酸被天冬氨酸取代，以及第 370 位的天冬氨酸被天冬酰胺取代，全部三个突变均存在于所述具体的突变型 HPPD 蛋白内。

在一个方面，本发明公开了一种突变型 HPPD 蛋白或其生物活性片段，其与野生型对羟苯基丙酮酸双氧化酶蛋白相比保留了催化羟基苯丙酮酸（HPP）转变成尿黑酸的活性，同时对 HPPD 抑制性除草剂的抗性或耐受性有所提高。特别地，本发明的突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶（HPPD）蛋白在对应于 SEQ ID NO: 2 所示的野生型水稻对羟苯基丙酮酸双氧化酶蛋白氨基酸序列中的第 93、103、141、165、191、220、226、276、277、336、337、338、342、346、370、377、386、390、392、403、410、418、419、420、430 和 431 位中的一个或多个位置处具有选自下述中的一个或多个突变：93S、103S、141R、141K、141T、165V、191I、220K、226H、276W、277N、336D、337A、338D、338S、338Y、342D、346C、346D、346H、346S、346Y、370N、377C、386T、390I、392L、403G、410I、418P、419F、419L、419V、420S、420T、430G 和 431L。优选地，所述突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶（HPPD）蛋白的氨基酸序列进一步与 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%序列同一性。更优选地，所述突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶（HPPD）蛋白具有 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列，区别仅在于在对应于 SEQ ID NO: 2 所示的野生型水稻对羟苯基丙酮酸双氧化酶蛋白氨基酸序列中的第 93、103、141、165、191、220、226、276、277、336、337、338、342、346、370、377、386、390、392、403、410、418、419、420、430 和 431 位中的一个或多个位置处具有选自下述中的一个或多个突变：93S、103S、141R、141K、141T、165V、191I、220K、226H、276W、277N、336D、337A、338D、338S、338Y、342D、346C、346D、346H、346S、346Y、370N、377C、386T、390I、392L、403G、410I、418P、419F、419L、419V、420S、420T、430G 和 431L。

在一个实施方案中，本发明的突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶（HPPD）蛋白的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 2 所示的野生型水稻对羟苯基丙酮酸双氧化酶蛋白氨基酸序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%序列同一性，并且在对应于 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列中的第 93、103、141、165、191、220、226、276、277、336、337、338、342、346、370、377、386、390、392、403、410、418、419、420、430 和 431 位中的一个或多个位置处具有选自下述中的一个或多个突变：93S、103S、141R、141K、141T、165V、191I、220K、226H、276W、277N、336D、337A、338D、338S、338Y、342D、346C、346D、346H、346S、346Y、370N、377C、386T、390I、392L、403G、410I、418P、419F、419L、419V、420S、420T、430G

和 431L。优选地，本发明的突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶（HPPD）蛋白具有 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列，区别仅在于在对应于 SEQ ID NO: 2 所示的野生型水稻对羟苯基丙酮酸双氧化酶蛋白氨基酸序列中的第 93、103、141、165、191、220、226、276、277、336、337、338、342、346、370、377、386、390、392、403、410、418、419、420、430 和 431 位中的一个或多个位置处具有选自下述中的一个或多个突变 R93S、A103S、H141R、H141K、H141T、A165V、V191I、R220K、G226H、L276W、P277N、P336D、P337A、N338D、N338S、N338Y、G342D、R346C、R346D、R346H、R346S、R346Y、D370N、I377C、P386T、L390I、M392L、E403G、K410I、K418P、G419F、G419L、G419V、N420S、N420T、E430G 和 Y431L。

本发明所述蛋白质内的特定氨基酸位置（编号）是利用标准序列比对工具通过将目标蛋白质的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 2 进行比对而确定的，譬如用 Smith-Waterman 运算法则或用 CLUSTALW2 运算法则比对两个序列，其中当比对得分最高时认为所述序列是对准的。比对得分可依照 Wilbur, W. J. and Lipman, D. J.(1983)Rapid similarity searches of nucleic acid and protein data banks. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 726-730 中所述的方法进行计算。在 ClustalW2(1.82)运算法则中优选使用默认参数： 蛋白质缺口开放罚分 = 10.0; 蛋白质缺口延伸罚分 = 0.2; 蛋白质矩阵 = Gonnet; 蛋白质/DNA 端隙= -1; 蛋白质/DNA GAPDIST = 4。

优选采用 AlignX 程序(vectorNTI 组中的一部分)，以适于多重比对的默认参数(缺口开放罚分: 10 og 缺口延伸罚分 0.05)通过将蛋白质的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 2 进行比对来确定本发明所述蛋白质内特定氨基酸的位置。

氨基酸序列的同一性可以通过常规方法，参考例如 Smith and Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2:482，Pearson & Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444，Thompson et al., 1994, Nucleic Acids Res 22:467380 等的教导，通过计算机化运行运算法则(Wisconsin Genetics 软件包中的 GAP, BESTFIT, FASTA, 和 TFASTA，Genetics Computer Group)来确定。也可使用可从美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information www.ncbi.nlm.nih.gov/)获得的 BLAST 运算法则(Altschul et al., 1990, Mol. Biol. 215:403-10)，使用默认参数确定。

在进一步的实施方案中，本发明的突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶蛋白具有 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 36、SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO:

44、SEQ ID NO: 46、SEQ ID NO: 48、SEQ ID NO: 50、SEQ ID NO: 52、SEQ ID NO: 54、SEQ ID NO: 56、SEQ ID NO: 58、SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 62、SEQ ID NO: 64、SEQ ID NO: 66、SEQ ID NO: 68、SEQ ID NO: 70、SEQ ID NO: 72、SEQ ID NO: 74、SEQ ID NO: 76、SEQ ID NO: 78、SEQ ID NO: 80、SEQ ID NO: 82 或 SEQ ID NO: 84 所示的氨基酸序列。

在进一步的实施方案中，本发明的突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶（HPPD）蛋白在其氨基酸序列具有如下氨基酸突变：H141R/G342D、H141R/D370N、G342D/D370N、H141R/N338D 、 H141R/G342D 、 N338D/G342D 、 K418P/G419F 、 G419F/N420S 、 G342D/R346C 、 G342D/R346H 、 H141R/N420S 、 G338D/K418P 、 P277N/N338D 、 L276W/P277N、H141R/G342D/D370N、H141R/N338D/N420S、H141R/N338S/N420S、P336D/N338D/G342D 、 P336D/N338S/G342D 、 P336D/N338Y/G342D 、 N338D/G342D/R346C、N338D/G342D/R346H、N338D/G342D/R346S、N338S/G342D/R346C、N338S/G342D/R346H、N338S/G342D/R346S、N338Y/G342D/R346C、N338Y/G342D/R346H、N338Y/G342D/R346S 、 P336D/G342D/R346C 、 P336D/G342D/R346H 、 P336D/G342D/R346S 、 P336D/N338D/R346C 、 P336D/N338D/R346H 、 P336D/N338D/R346S 、 P336D/N338S/R346C、P336D/N338S/R346H、P336D/N338S/R346S、P336D/N338Y/R346C、P336D/N338Y/R346H 、 P336D/N338Y/R346S 、 H141R/N338D/G342D 、 H141R/G342D/K418P、H141R/G342D/G419F、H141R/G342D/P386T、K418P/G419F/N420T、K418T/G419F/N420T、H141R/G342D/R346C、H141R/G342D/R346H、H141R/G342D/N420S、H141R/G342D/P277N、H141R/G342D/P336D、H141R/G342D/L276W、H141R/G342D/R346S 、 H141R/G342D/L390I 、 H141R/G342D/I377C 、 H141R/G342D/M392L 、 H141R/P337A/G342D 、 H141R/N338S/G342D 、 H141R/N338Y/G342D 、 P277N/N338D/G342D、P277N/G342D/R346C、P277N/N338D/N420S、N338D/G342D/K418P、H141R/N338D/G342D/K418P 、 H141R/N338D/G342D/G419F 、 H141R/N338D/G342D/P386T 、 H141R/N338D/G342D/R346C 、 H141R/N338D/G342D/R346H 、 H141R/G342D/K418P/G419F 、 H141R/G342D/L276W/P277N 、 P336D/N338D/G342D/R346C 、 P336D/N338D/G342D/R346H 、 P336D/N338D/G342D/R346S 、 P336D/N338S/G342D/ R346C 、 P336D/N338S/G342D/R346H 、 P336D/N338S/G342D/R346S 、 P336D/N338Y/G342D/R346C、P336D/N338Y/G342D/R346H、P336D/N338Y/G342D/R346S、P277N/P336D/N338D/G342D 、 P277N/N338D/G342D/R346C 、 P277N/N338D/K418P/G419F 、 H141R/N338D/G342D/K418P/G419F、H141R/N338D/G342D/G419F/N420S、H141R/G336D/G342D/K418P/

G419F/N420S、H141R/N338D/G342D/K418P/G419F/N420S、H141R/N338D/G342D/K418P/G419F/N420T、H141R/N338D/G342D/R346C/K418P/G419F/N420S、H141R/N338D/G342D/R346H/K418P/G419F/N420S、H141R/P277N/N338D/G342D/K418P/G419F/N420S、H141R/P277N/P336D/N338D/G342D/K418P/G419F/N420S。

在更进一步的实施方案中，本发明的突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶（HPPD）蛋白具有 SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 86、SEQ ID NO: 88、SEQ ID NO: 90、SEQ ID NO: 92、SEQ ID NO: 94、SEQ ID NO: 96、SEQ ID NO: 98、SEQ ID NO: 100、SEQ ID NO: 102、SEQ ID NO: 104、SEQ ID NO: 106、SEQ ID NO: 108、SEQ ID NO: 110、SEQ ID NO: 112、SEQ ID NO: 114、SEQ ID NO: 116、SEQ ID NO: 118、SEQ ID NO: 120、SEQ ID NO: 122、SEQ ID NO: 124、SEQ ID NO: 126、SEQ ID NO: 128、SEQ ID NO: 130、SEQ ID NO: 132、SEQ ID NO: 134、SEQ ID NO: 136、SEQ ID NO: 138、SEQ ID NO: 140、SEQ ID NO: 142、SEQ ID NO: 144、SEQ ID NO: 146、SEQ ID NO: 148、SEQ ID NO: 150、SEQ ID NO: 152、SEQ ID NO: 154、SEQ ID NO: 156、SEQ ID NO: 158、SEQ ID NO: 160、SEQ ID NO: 162、SEQ ID NO: 164、SEQ ID NO: 166、SEQ ID NO: 168、SEQ ID NO: 170、SEQ ID NO: 172、SEQ ID NO: 174、SEQ ID NO: 176、SEQ ID NO: 178、SEQ ID NO: 180、SEQ ID NO: 182、SEQ ID NO: 184、SEQ ID NO: 186、SEQ ID NO: 188、SEQ ID NO: 190、SEQ ID NO: 192、SEQ ID NO: 194、SEQ ID NO: 196、SEQ ID NO: 198、SEQ ID NO: 200、SEQ ID NO: 202、SEQ ID NO: 204、SEQ ID NO: 206、SEQ ID NO: 208、SEQ ID NO: 210、SEQ ID NO: 212、SEQ ID NO: 214、SEQ ID NO: 216、SEQ ID NO: 218、SEQ ID NO: 220、SEQ ID NO: 222、SEQ ID NO: 224、SEQ ID NO: 226、SEQ ID NO: 228、SEQ ID NO: 230、SEQ ID NO: 232、SEQ ID NO: 234、SEQ ID NO: 236、SEQ ID NO: 238、SEQ ID NO: 240、SEQ ID NO: 242、SEQ ID NO: 244、SEQ ID NO: 246、SEQ ID NO: 248、SEQ ID NO: 250、SEQ ID NO: 252、SEQ ID NO: 254、SEQ ID NO: 256、SEQ ID NO: 258 或 SEQ ID NO: 260 所示的氨基酸序列。

在本发明中，野生型对羟苯基丙酮酸双氧化酶蛋白可以来源于任何植物，特别是前述单子叶或双子叶植物。现有技术文献中已经公开了一些来源的野生型对羟苯基丙酮酸双氧化酶蛋白序列以及编码序列，这些现有技术文献在此引入本文作为参考。

优选地，本发明的野生型对羟苯基丙酮酸双氧化酶蛋白来源于稻属，特别是水稻。更优选地，所述野生型对羟苯基丙酮酸双氧化酶蛋白具有 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列，或者与 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%序列同一性的氨基酸序列。

本领域技术人员还清楚的是，可以改变蛋白质的结构而不对其活性和功能性产生不利影响，例如可以在蛋白质氨基酸序列中引入一个或多个保守性氨基酸取代，而不会对蛋白质分子的活性和/或三维构型产生不利影响。本领域技术人员清楚保守性氨基酸取代的实例以及实施方式。具体的说，可以用与待取代位点属于相同组的另一氨基酸残基取代该氨基酸残基，即用非极性氨基酸残基取代另一非极性氨基酸残基，用极性不带电荷的氨基酸残基取代另一极性不带电荷的氨基酸残基，用碱性氨基酸残基取代另一碱性氨基酸残基，和用酸性氨基酸残基取代另一酸性氨基酸残基。只要取代不损害蛋白质的生物活性，则一种氨基酸被属于同组的其他氨基酸替换的保守取代落在本发明的范围内。

因此，本发明的突变型 HPPD 蛋白除了包含上述突变之外，还可以在氨基酸序列中包含一个或多个其他突变例如保守性取代。另外，本发明也涵盖还包含一个或多个其他非保守取代的突变型 HPPD 蛋白，只要该非保守取代不显著影响本发明的蛋白质的所需功能和生物活性即可。

如本领域中所熟知的，可以从蛋白质的 N 和/或 C 末端缺失一或多个氨基酸残基而仍保留其功能活性。因此，在另一方面，本发明还涉及从突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶（HPPD）蛋白的 N 和/或 C 末端缺失了一或多个氨基酸残基、同时保留了其所需功能活性的片段，它们也在本发明的范围内，被称为生物活性片段。在本发明中，“生物活性片段”是指本发明的突变型 HPPD 蛋白的一部分，其保留了本发明的突变型 HPPD 蛋白的生物学活性、同时对 HPPD 抑制剂的耐受性或抗性相比于不具有所述突变的 HPPD 片段有所提高。例如，突变型 HPPD 蛋白的生物学活性片段可以是在所述蛋白质的 N 和/或 C 末端缺失了一个或多个（例如 1－50 个、1－25 个、1－10 个或 1－5 个，例如 1、2、3、4 或 5 个）氨基酸残基的部分，但其仍然保留了全长蛋白的生物学活性。

本发明还提供了一种融合蛋白，其中包含本发明的突变型 HPPD 蛋白或其生物活性片段，以及与之融合的其它组分。在一个优选的实施方案中，所述其它组分是质体引导肽，例如引导到叶绿体内的肽，其将突变的 HPPD 蛋白靶向叶绿体。在另一个实施方案中，所述其它组分是标签肽，例如 6×His。在又一个实施方案中，所述其它组分是有助于提高所述突变型 HPPD 蛋白的溶解性的肽，例如 NusA 肽。

在又一方面，本发明提供了包含编码上述突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶（HPPD）蛋白或其生物学活性片段的核酸序列或者其互补序列的分离的多核苷酸。术语“分离的”多核苷酸是指该多核苷酸基本上不包含在天然存在环境中通常伴随着其的成分。在一个实施方案中，所述突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶（HPPD）蛋白的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、

至少 97%、至少 98%、至少 99%序列同一性的氨基酸序列，并且进一步地在对应于 SEQ ID NO: 2 所示的野生型水稻对羟苯基丙酮酸双氧化酶蛋白氨基酸序列中的第 93、103、141、165、191、220、226、276、277、336、337、338、342、346、370、377、386、390、392、403、410、418、419、420、430 和 431 位中的一个或多个位置处具有选自下述中的一个或多个突变：93S、103S、141R、141K、141T、165V、191I、220K、226H、276W、277N、336D、337A、338D、338S、338Y、342D、346C、346D、346H、346S、346Y、370N、377C、386T、390I、392L、403G、410I、418P、419F、419L、419V、420S、420T、430G 和 431L。优选地，所述突变是选自下述中的一个或多个突变：R93S、A103S、H141R、H141K、H141T、A165V、V191I、R220K、G226H、L276W、P277N、P336D、P337A、N338D、N338S、N338Y、G342D、R346C、R346D、R346H、R346S、R346Y、D370N、I377C、P386T、L390I、M392L、E403G、K410I、K418P、G419F、G419L、G419V、N420S、N420T、E430G 和 Y431L。更优选地，所述突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶（HPPD）蛋白或其生物活性片段衍生自水稻 HPPD 蛋白，并且具有选自上述的一个或多个氨基酸取代。

本领域技术人员十分清楚，由于遗传密码的简并性，有多种不同的核酸序列可以编码本文公开的氨基酸序列。产生编码相同蛋白质的其他核酸序列在本领域普通技术人员的能力范围内，因此本发明涵盖因遗传密码子的简并性而编码相同氨基酸序列的核酸序列。例如，为了在目标宿主生物例如植物中实现异源基因的高表达，可以对所述基因采用宿主生物偏好的密码子进行优化，以使其更好地表达。

因此，在一些实施方案中，本发明的多核苷酸具有选自下述的核酸序列：

(1) 编码 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 36、SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 44、SEQ ID NO: 46、SEQ ID NO: 48、SEQ ID NO: 50、SEQ ID NO: 52、SEQ ID NO: 54、SEQ ID NO: 56、SEQ ID NO: 58、SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 62、SEQ ID NO: 64、SEQ ID NO: 66、SEQ ID NO: 68、SEQ ID NO: 70、SEQ ID NO: 72、SEQ ID NO: 74、SEQ ID NO: 76、SEQ ID NO: 78、SEQ ID NO: 80、SEQ ID NO: 82、SEQ ID NO: 84、SEQ ID NO: 86、SEQ ID NO: 88、SEQ ID NO: 90、SEQ ID NO: 92、SEQ ID NO: 94、SEQ ID NO: 96、SEQ ID NO: 98、SEQ ID NO: 100、SEQ ID NO: 102、SEQ ID NO: 104、SEQ ID NO: 106、SEQ ID NO: 108、SEQ ID NO: 110、SEQ ID NO: 112、SEQ ID NO: 114、SEQ ID NO: 116、SEQ ID NO: 118、SEQ ID NO: 120、SEQ ID NO: 122、SEQ ID NO: 124、

SEQ ID NO: 126、SEQ ID NO: 128、SEQ ID NO: 130、SEQ ID NO: 132、SEQ ID NO: 134、SEQ ID NO: 136、SEQ ID NO: 138、SEQ ID NO: 140、SEQ ID NO: 142、SEQ ID NO: 144、SEQ ID NO: 146、SEQ ID NO: 148、SEQ ID NO: 150、SEQ ID NO: 152、SEQ ID NO: 154、SEQ ID NO: 156、SEQ ID NO: 158、SEQ ID NO: 160、SEQ ID NO: 162、SEQ ID NO: 164、SEQ ID NO: 166、SEQ ID NO: 168、SEQ ID NO: 170、SEQ ID NO: 172、SEQ ID NO: 174、SEQ ID NO: 176、SEQ ID NO: 178、SEQ ID NO: 180、SEQ ID NO: 182、SEQ ID NO: 184、SEQ ID NO: 186、SEQ ID NO: 188、SEQ ID NO: 190、SEQ ID NO: 192、SEQ ID NO: 194、SEQ ID NO: 196、SEQ ID NO: 198、SEQ ID NO: 200、SEQ ID NO: 202、SEQ ID NO: 204、SEQ ID NO: 206、SEQ ID NO: 208、SEQ ID NO: 210、SEQ ID NO: 212、SEQ ID NO: 214、SEQ ID NO: 216、SEQ ID NO: 218、SEQ ID NO: 220、SEQ ID NO: 222、SEQ ID NO: 224、SEQ ID NO: 226、SEQ ID NO: 228、SEQ ID NO: 230、SEQ ID NO: 232、SEQ ID NO: 234、SEQ ID NO: 236、SEQ ID NO: 238、SEQ ID NO: 240、SEQ ID NO: 242、SEQ ID NO: 244、SEQ ID NO: 246、SEQ ID NO: 248、SEQ ID NO: 250、SEQ ID NO: 252、SEQ ID NO: 254、SEQ ID NO: 256、SEQ ID NO: 258 或 SEQ ID NO: 260 所示氨基酸序列的核酸序列或其互补序列；

(2) SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 43、SEQ ID NO: 45、SEQ ID NO: 47、SEQ ID NO: 49、SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 53、SEQ ID NO: 55、SEQ ID NO: 57、SEQ ID NO: 59、SEQ ID NO: 61、SEQ ID NO: 63、SEQ ID NO: 65、SEQ ID NO: 67、SEQ ID NO: 69、SEQ ID NO: 71、SEQ ID NO: 73、SEQ ID NO: 75、SEQ ID NO: 77、SEQ ID NO: 79、SEQ ID NO: 81、SEQ ID NO: 83、SEQ ID NO: 85、SEQ ID NO: 87、SEQ ID NO: 89、SEQ ID NO: 91、SEQ ID NO: 93、SEQ ID NO: 95、SEQ ID NO: 97、SEQ ID NO: 99、SEQ ID NO: 101、SEQ ID NO: 103、SEQ ID NO: 105、SEQ ID NO: 107、SEQ ID NO: 109、SEQ ID NO: 111、SEQ ID NO: 113、SEQ ID NO: 115、SEQ ID NO: 117、SEQ ID NO: 119、SEQ ID NO: 121、SEQ ID NO: 123、SEQ ID NO: 125、SEQ ID NO: 127、SEQ ID NO: 129、SEQ ID NO: 131、SEQ ID NO: 133、SEQ ID NO: 135、SEQ ID NO: 137、SEQ ID NO: 139、SEQ ID NO: 141、SEQ ID NO: 143、SEQ ID NO: 145、SEQ ID NO: 147、SEQ ID NO: 149、SEQ ID NO: 151、SEQ ID NO: 153、SEQ ID NO: 155、SEQ ID NO: 157、SEQ ID NO: 159、SEQ ID NO: 161、SEQ ID NO: 163、SEQ ID NO: 165、SEQ ID NO:

167、SEQ ID NO: 169、SEQ ID NO: 171、SEQ ID NO: 173、SEQ ID NO: 175、SEQ ID NO: 177、SEQ ID NO: 179、SEQ ID NO: 181、SEQ ID NO: 183、SEQ ID NO: 185、SEQ ID NO: 187、SEQ ID NO: 189、SEQ ID NO: 191、SEQ ID NO: 193、SEQ ID NO: 195、SEQ ID NO: 197、SEQ ID NO: 199、SEQ ID NO: 201、SEQ ID NO: 203、SEQ ID NO: 205、SEQ ID NO: 207、SEQ ID NO: 209、SEQ ID NO: 211、SEQ ID NO: 213、SEQ ID NO: 215、SEQ ID NO: 217、SEQ ID NO: 219、SEQ ID NO: 221、SEQ ID NO: 223、SEQ ID NO: 225、SEQ ID NO: 227、SEQ ID NO: 229、SEQ ID NO: 231、SEQ ID NO: 233、SEQ ID NO: 235、SEQ ID NO: 237、SEQ ID NO: 239、SEQ ID NO: 241、SEQ ID NO: 243、SEQ ID NO: 245、SEQ ID NO: 247、SEQ ID NO: 249、SEQ ID NO: 251、SEQ ID NO: 253、SEQ ID NO: 255、SEQ ID NO: 257 或 SEQ ID NO: 259 所示的核酸序列或其互补序列；

(3) 在严谨条件下与(1)或(2)所示序列杂交的核酸序列；和

(4) 因遗传密码的简并性而与(1)或(2)所示序列编码相同氨基酸序列的核酸序列，或其互补序列。

进一步优选地，所述多核苷酸具有选自 SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 43、SEQ ID NO: 45、SEQ ID NO: 47、SEQ ID NO: 49、SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 53、SEQ ID NO: 55、SEQ ID NO: 57、SEQ ID NO: 59、SEQ ID NO: 61、SEQ ID NO: 63、SEQ ID NO: 65、SEQ ID NO: 67、SEQ ID NO: 69、SEQ ID NO: 71、SEQ ID NO: 73、SEQ ID NO: 75、SEQ ID NO: 77、SEQ ID NO: 79、SEQ ID NO: 81、SEQ ID NO: 83、SEQ ID NO: 85、SEQ ID NO: 87、SEQ ID NO: 89、SEQ ID NO: 91、SEQ ID NO: 93、SEQ ID NO: 95、SEQ ID NO: 97、SEQ ID NO: 99、SEQ ID NO: 101、SEQ ID NO: 103、SEQ ID NO: 105、SEQ ID NO: 107、SEQ ID NO: 109、SEQ ID NO: 111、SEQ ID NO: 113、SEQ ID NO: 115、SEQ ID NO: 117、SEQ ID NO: 119、SEQ ID NO: 121、SEQ ID NO: 123、SEQ ID NO: 125、SEQ ID NO: 127、SEQ ID NO: 129、SEQ ID NO: 131、SEQ ID NO: 133、SEQ ID NO: 135、SEQ ID NO: 137、SEQ ID NO: 139、SEQ ID NO: 141、SEQ ID NO: 143、SEQ ID NO: 145、SEQ ID NO: 147、SEQ ID NO: 149、SEQ ID NO: 151、SEQ ID NO: 153、SEQ ID NO: 155、SEQ ID NO: 157、SEQ ID NO: 159、SEQ ID NO: 161、SEQ ID NO: 163、SEQ ID NO: 165、SEQ ID NO: 167、SEQ ID NO: 169、SEQ ID NO: 171、SEQ ID NO: 173、SEQ ID NO: 175、SEQ ID NO: 177、SEQ ID NO: 179、SEQ ID NO: 181、SEQ ID

NO: 183、SEQ ID NO: 185、SEQ ID NO: 187、SEQ ID NO: 189、SEQ ID NO: 191、SEQ ID NO: 193、SEQ ID NO: 195、SEQ ID NO: 197、SEQ ID NO: 199、SEQ ID NO: 201、SEQ ID NO: 203、SEQ ID NO: 205、SEQ ID NO: 207、SEQ ID NO: 209、SEQ ID NO: 211、SEQ ID NO: 213、SEQ ID NO: 215、SEQ ID NO: 217、SEQ ID NO: 219、SEQ ID NO: 221、SEQ ID NO: 223、SEQ ID NO: 225、SEQ ID NO: 227、SEQ ID NO: 229、SEQ ID NO: 231、SEQ ID NO: 233、SEQ ID NO: 235、SEQ ID NO: 237、SEQ ID NO: 239、SEQ ID NO: 241、SEQ ID NO: 243、SEQ ID NO: 245、SEQ ID NO: 247、SEQ ID NO: 249、SEQ ID NO: 251、SEQ ID NO: 253、SEQ ID NO: 255、SEQ ID NO: 257 或 SEQ ID NO: 259 所示核酸序列、其简并序列或者它们的互补序列的核酸序列。

优选地，所述严谨条件可以指 6M 尿素、0.4％SDS、0.5×SSC 的条件或与其同等的杂交条件，也可以指严谨性更高的条件，例如 6M 尿素、0.4％SDS、0.1×SSC 或与其同等的杂交条件。在各种条件中，温度可约为 40℃以上，如需要严谨性更高的条件时，温度例如可约为 50℃，进一步可约为 65℃。

更进一步优选地，所述氨基酸突变位点所对应的野生型和突变型密码子如下：

氨基酸突变位点	野生型密码子	突变型密码子
A103S	GCC	TCG;TCA;TCC;TCT;AGC;AGT
H141R	CAC	CCG;CGA;CGC;CGT;AGG;AGA
H141K	CAC	AAG;AAA
H141T	CAC	ACC;ACT;ACA;ACG
A165V	GCG	GTG;GTA;GTC;GTT
V191I	GTC	ATA;ATC;ATT
R220K	CGG	AAG;AAA
G342D	GGC	GAC;GAT
D370N	GAC	AAC;AAT
K410I	AAG	ATA;ATC;ATT
R93S	CGC	AGC;AGT;TCA;TCC;TCG;TCT
G226H	GGC	CAC;CAT
L276W	CTG	TGG
P277N	CCG	AAC;AAT
P336D	CCG	GAT;GAC

P337A	CCC	GCA;GCC;GCG;CGT
N338D	AAC	GAC;GAT
N338S	AAC	AGC;TCG;TCA;TCC;TCT;AGT
N338Y	AAC	TAC;TAT
G342D	GGC	GAC;GAT
R346C	CGC	TGC;TGT
R346H	CGC	CAC;CAT
R346S	CGC	AGC;TCG;TCA;TCC;TCT;AGT
R346D	CGC	GAC;GAT
R346Y	CGC	TAC;TAT
I377C	ATC	TGC;TGT
P386T	CCA	ACA;ACC;ACG;ACT
L390I	TTG	ATA;ATC;ATT
M392L	ATG	CTA;CTC;CTG;CTT;TTA;TTG
E403G	GAG	GGA;GGC;GGG;GGT
P418P	AAG	CCA;CCC;CCG;CCT
G419F	GGC	TTC;TTT
G419L	GGC	CTA;CTC;CTG;CTT;TTA;TTG
G419V	GGC	GTA;GTC;GTG;GTT
N420S	AAC	AGC;TCG;TCA;TCC;TCT;AGT
N420T	AAC	ACA;ACC;ACG;ACT
E430G	GAG	GGA;GGC;GGG;GGT
Y431L	TAT	CTA;CTC;CTG;CTT;TTA;TTG

本发明还提供了一种核酸构建体，其中包含编码本发明的突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶蛋白或其生物活性片段或者融合蛋白的核酸序列以及与之可操作连接的一个或多个调控元件。术语“调控元件”在本发明中指的是能够调节与之可操作连接的核酸的转录和/或翻译的核酸序列。

调控元件可能是适当的启动子序列，被宿主细胞识别用于表达编码本发明蛋白质的核酸序列。启动子序列包含介导蛋白质表达的转录调控序列。 启动子可以是在选定宿主细胞内显示转录活性的任何核苷酸序列，包括突变的、截短的和杂合的启动子，并且可

能获自与宿主细胞同源或异源的编码细胞外或细胞内多肽的基因。作为在植物细胞或植物中表达的启动子，可使用对羟苯基丙酮酸双氧化酶天然的启动子，或者在植物中具有活性的异源启动子。所述启动子可以是组成型表达的，或者可以是诱导型表达的。启动子的实例包括例如组蛋白启动子，水稻肌动蛋白启动子，植物病毒启动子例如花椰菜花叶病毒启动子等。

调控元件也可以是合适的转录终止子序列，被宿主细胞识别来终止转录的序列。终止子序列与编码本发明蛋白质的核酸序列的 3' 末端可操作性的连接。在选定宿主细胞内起作用的任何终止子均可用于本发明中。

调控元件也可能是合适的前导序列，即对于宿主细胞的翻译而言非常重要的 mRNA 非翻译区。前导序列与编码本发明蛋白质的核酸序列的 5'末端可操作性连接。在选定宿主细胞内起作用的任何前导序列均可用于本发明中。

调控元件还可以是多聚腺苷酸化序列，即是与核酸序列的 3'末端可操作性连接并且在转录时被宿主细胞识别为添加多聚腺苷酸残基至被转录 mRNA 的信号的序列。在选定宿主细胞内起作用的任何多聚腺苷酸化序列均可用于本发明中。

调控元件也可以是编码与蛋白质的氨基末端连接的氨基酸序列并指导所编码蛋白质进入细胞分泌途径的信号肽编码区。核酸序列的编码序列的 5'末端可能固有的包含在翻译读码框架内与编码所述分泌多肽的编码区部分天然连接的信号肽编码区。或者，编码序列的 5'末端可能包含对于编码序列而言是外来的信号肽编码区。在编码序列天然不包含信号肽编码区的情况下可能需要外源的信号肽编码区。或者，外源的信号肽编码区可能简单地替代天然信号肽编码区以便促进所述多肽的分泌。无论如何，指导被表达多肽进入选定宿主细胞之分泌途径即分泌入培养基中的任何信号肽编码区均可能用于本发明中。

还可适当的添加允许所述多肽表达相对于宿主细胞的生长进行调节的调节序列。调节系统有例如使得基因表达响应化学或物理刺激物(包括调节化合物的存在)而开启或关闭的调节系统，例如 lac, tec, 和 tip 操纵子系统，ADH2 系统或 GAL1 系统等。其它的调控序列的例子有允许进行基因扩增的那些调控序列。在真核体系内，这些包括在氨甲喋呤存在下被扩增的二氢叶酸还原酶基因，由于重金属而被扩增的金属硫蛋白基因。在这些案例中，编码多肽的核苷酸序列将可操作性的与所述调控序列连接。

在本发明中，调控元件也可以是转录激活剂即增强子，例如 WO87/07644 中描述的烟草花叶病毒翻译激活剂，或内含子等，例如玉米的 adh1 内含子、玉米青铜色 1 基因(maize bronze 1 gene)内含子或水稻肌动蛋白内含子 1。它们可以增强本发明的突变型 HPPD 蛋

白、其生物活性片段或者融合蛋白在转基因植物中的表达。

本发明还提供了一种表达载体，其中包含有编码本发明的突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶蛋白或其生物活性片段或者融合蛋白的核酸序列以及与之可操作连接的表达调控元件。表达载体中还至少含有一个复制起点，以实现自我复制。载体的选择通常取决于载体与该载体待引入之宿主细胞的相容性。载体可能是自主复制载体，即作为染色体外实体存在的载体，它的复制不依赖于染色体的复制，例如质粒、染色体外元件、微型染色体或人工染色体。该载体可能包含保证自我复制的任何元件。或者，所述载体可能是当引入宿主细胞时被整合入基因组中并与其所整合入的染色体一起复制的载体。此外，可使用单个载体或质粒或者一起包含待引入宿主细胞基因组之总 DNA 的两个或更多个载体或质粒，或者转座子。或者，所述载体也可以是对宿主细胞内源性的 HPPD 基因进行基因编辑的载体。

载体可以是例如质粒、病毒、粘粒、噬菌体等类型，它们是本领域技术人员所熟知的，在本领域中众多描述。优选地，本发明中的表达载体是质粒。表达载体可包含启动子、翻译起始的核糖体结合位点、聚腺苷酸化位点、转录终止子、增强子等。表达载体中也可以含有一个或多个可选择标记基因以便用于选择包含载体的宿主细胞。这种可选择的标记包括编码二氢叶酸还原酶的基因，或赋予新霉素耐受性的基因，赋予对四环素或氨苄青霉素耐受性的基因等。

本发明的载体可以包含允许载体整合入宿主细胞基因组或在细胞内不依赖于基因组而自主复制的元件。对于整合进入宿主细胞基因组的方面，所述载体可依靠编码多肽的多核苷酸序列或适于通过同源或非同源重组整合入基因组的载体的任何其它元件。或者，载体可包含用于指导在染色体的准确位置通过同源重组整合入宿主细胞基因组的附加的核苷酸序列。为了提高在准确位置处整合的可能性，整合元件应优选包含足够数目的核酸，譬如 100 至 10,000 个碱基对，优选 400 至 10,000 个碱基对，更优选 800 至 10,000 个碱基对，它们与相应的靶序列具有高度的同一性以提高同源重组的概率。整合元件可能是与宿主细胞基因组内靶序列同源的任何序列。此外，整合元件可能是非编码的或编码的核苷酸序列。另一方面，载体可能通过非同源重组整合入宿主细胞的基因组内。对于自主复制而言，载体可能进一步包含能使载体在所述宿主细胞内自主复制的复制起点。复制起点可能是在细胞内发挥作用的介导自主复制的任何质粒复制子。术语 "复制起点" 或 "质粒复制子" 在此定义为能使质粒或载体在体内进行复制的核苷酸序列。

可将一拷贝以上的本发明之多核苷酸插入宿主细胞中以提高基因产物的产量。可通过将至少一个额外拷贝的序列整合入宿主细胞基因组中或者通过将可扩增的可选择标记

基因与所述多核苷酸包含在一起来达到多核苷酸拷贝数目的增加，在后一情形下，包含扩增拷贝的选择标记基因以及由此而来的附加拷贝的多核苷酸的细胞可通过在适当的可选择制剂存在的条件下人工培养所述细胞进行选择。

本发明的核酸序列可通过多种方法插入载体中，例如通过用适当的限制性核酸内切酶消化插入物和载体后进行连接。多种克隆技术在本领域中是已知的，这些均在本领域技术人员的知识范围内。

本发明中适用的载体包括可从商业渠道获得的质粒，例如但不限于：pBR322(ATCC 37017)， pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals， Uppsala， Sweden)，GEM1(Promega Biotec， Madison，WI，USA)pQE70，pQE60，pQE-9(Qiagen)，pD10，psiX174 pBluescript II KS，pNH8A，pNH16a，pNH18A，pNH46A(Stratagene)， ptrc99a，pKK223-3，pKK233-3，pDR540，pRIT5(Pharmacia)，pKK232-8，pCM7，pSV2CAT，pOG44，pXT1，pSG (Stratagene)，pSVK3，pBPV，pMSG，和 pSVL(Pharmacia)等。

本发明还提供了包含本发明核酸序列、核酸构建体或表达载体的宿主细胞。将包含编码本发明的载体引入宿主细胞中使得载体作为染色体整合体的一部分存在或如早先所述作为自我复制的染色体外载体存在，或者载体可以对宿主细胞内源性的 HPPD 基因进行基因编辑。宿主细胞可以是本领域技术人员熟悉的任何宿主细胞，包括原核生物细胞和真核食物细胞，例如细菌细胞、真菌细胞、酵母细胞、哺乳动物细胞、昆虫细胞或植物细胞，其实例有大肠杆菌(E.coli)、链霉菌(Streptomyces)、枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)、鼠伤寒沙门氏菌(Salmonella typhimurium)、假单胞菌属 (Pseudomonas)、链霉菌属(Streptomyces)、葡萄球菌属(Staphylococcus)、Spodoptera Sf9、CHO、COS 等。适当宿主细胞的选择在本领域技术人员的能力范围内。

在本发明中，术语“宿主细胞”还涵盖由于复制期间发生的突变而与亲本细胞不完全相同的任何亲本细胞后代。

本发明的核酸序列、核酸构建体或表达载体可以通过多种技术导入宿主细胞，包括转化、转染、转导、病毒感染、基因枪或 Ti-质粒介导的基因传递，以及钙磷酸盐转染、DEAE-葡聚糖介导的转染、脂转染或电穿孔等(参考 Davis，L.， Dibner，M.，Battey，I.，Basic Methods in Molecular Biology, 1986)。

在一个具体实施方案中，本发明的突变型 HPPD 蛋白可以被靶向植物内的质体，例如叶绿体。这可以通过将编码本发明的突变型 HPPD 蛋白的核酸序列与编码质体引导肽例如叶绿体转运肽的核酸序列阅读框一致地连接来实现。或者，可以将本发明的多核苷酸、核酸构建体或表达载体直接转化植物细胞的叶绿体基因组来实现。本领域技术人员

清楚可用于转化植物细胞叶绿体基因组的载体和方法。例如，可以通过将 DNA 包被的离子轰击目标植物的树叶，并通过同源重组或非同源重组而整合编码本发明突变型 HPPD 蛋白的核酸序列。

在适当的情况下，转化的宿主细胞可以在常规的营养培养基中培养。在转化适合的宿主细胞并培养宿主细胞至适当的细胞密度后，可以用适当的方法例如温度改变或化学诱导等诱导所选择的启动子，并可另外培养细胞一段时间以使其产生本发明的突变型 HPPD 蛋白或其生物活性片段或融合蛋白。

因此，本发明还涉及产生本发明的突变型 HPPD 蛋白或其生物活性片段或融合蛋白的方法，包括：(a)在有助于所述突变型 HPPD 蛋白或其生物活性片段或融合蛋白生产的条件下培养上述宿主细胞；和(b)回收所述突变型 HPPD 蛋白或其生物活性片段或融合蛋白。

在本发明的生产方法中，用本领域众所周知的方法将所述细胞培养于适于所述多肽产生的营养培养基上。例如，在实验室或工业发酵罐中以合适的培养基并且在允许所述多肽表达和/或分离的条件下通过摇瓶培养和小规模或大规模发酵(包括连续的、分批的、分批投料或固态发酵)培养细胞。用本领域已知的步骤在包含碳和氮源以及无机盐的合适营养培养基上进行培养。合适的培养基可购自供应商或依照已发表的组成配制(例如，在美国典型培养物保藏(American Type Culture Collection)的目录上)。若所述多肽被分泌入营养培养基中，则可直接从培养基中回收该多肽。若所述多肽不分泌到培养基中，则可从细胞裂解物中回收它。

可用本领域已知特异于所述多肽的方法检测该多肽。这些检测方法可包括使用特异抗体、形成酶产物或酶底物的消失。

产生的多肽可用本领域已知的方法回收。例如，可以通过离心收获细胞，用物理的或化学的方法使之破碎， 并保留得到的粗提取液以进一步纯化。可以用任何方便的方法裂解表达本发明的突变型 HPPD 蛋白或其生物活性片段或融合蛋白的转化宿主细胞，包括冻融循环、超声波、机械破碎或使用细胞溶解剂。这些方法是本领域技术人员熟知的。可以从转化宿主细胞的培养物中回收和纯化本发明的突变型 HPPD 蛋白或其生物活性片段，采用的方法包括硫酸铵或乙醇沉淀、酸提取、阴离子或阳离子交换层析、磷酸纤维素层析、疏水作用层析、亲合层析、羟磷灰石层析和植物血凝素层析等等。

本发明还涉及一种制备对 HPPD 抑制型除草剂具有耐受性或抗性的宿主生物特别是植物细胞、植物组织、植物部分或植物的方法，其中包括用包含本发明的突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶蛋白或其生物活性片段的编码核酸序列、包含所述核酸序列的核酸构

建体或表达载体对所述宿主生物进行转化。宿主细胞例如植物细胞的转化方法是现有技术中已知的，包括例如原生质体转化、融合、注射、电穿孔、PEG 介导的转化、离子轰击、病毒转化、农杆菌介导的转化、电穿孔或轰击等。现有技术中描述了一系列这样的转化方法，例如 EP1186666 中描述了大豆转化的技术，WO 92/09696 中描述了单子叶植物特别是水稻转化的合适技术等。还可以有利地用根癌农杆菌或发根农杆菌培养植物外植体，以将 DNA 转移进植物细胞。然后可以在合适的培养基中从感染的植物材料部分(如叶碎片、茎节段、根以及原生质体或悬浮培养的细胞)再生完整植物，所述培养基可以含有用于选择的抗生素或杀虫剂。转化细胞以通常的方式在植物中生长，它们可以形成生殖细胞并将转化的性状传递到子代植物。这样的植物能以正常方式培养并与具有相同转化遗传因子或其他遗传因子的植物杂交。得到的杂合个体具有相应的表型特性。

本发明还提供了一种制备对 HPPD 抑制型除草剂具有耐受性或抗性的宿主生物特别是植物细胞、植物组织、植物部分或植物的方法，其中包括将本发明的突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶蛋白或其生物活性片段的编码核酸整合到宿主生物的基因组中并使之表达。合适的载体和选择标记是本领域技术人员所熟知的，例如 WO06/108830 中描述了一种整合入烟草基因组中的方法，其公开内容通过引用并入本文中作为参考。目的基因在植物细胞中优选由组成型或诱导型启动子表达。mRNA 一旦表达之后，就被翻译成蛋白质，从而将目的氨基酸掺入蛋白质中。在植物细胞中表达的编码蛋白质的基因可以在组成型启动子、组织特异性启动子或诱导型启动子的控制下。例如可以使用细菌来源的启动子，如章鱼碱合酶启动子、胭脂碱合酶启动子、甘露碱合酶启动子；病毒来源的启动子，如花椰菜花叶病毒(35S 和 19S)、35T(再改造的 35S 启动子，参阅美国专利 No.6,166,302，特别是实施例 7E)等。也可以使用植物启动子调节元件，包括但不仅限于核酮糖-1，6-二磷酸(RUBP)羧化酶小亚基(ssu)、β-伴大豆球蛋白(conglycinin)启动子、β-菜豆素启动子、ADH 启动子、热休克启动子和组织特异性启动子。还可以使用组成型启动子调节元件从而指导在所有细胞类型和所有时间的持续基因表达(如肌动蛋白、泛素、CaMV35S 等)。组织特异性启动子调节元件在本发明中也是适用的，其负责在特定细胞或组织类型(如叶或种子)中的基因表达(如玉米醇溶蛋白、油质蛋白、napin、ACP、球蛋白等)。同样的，还可以使用在植物发育的某些阶段有活性(或无活性)的启动子调节元件。这些启动子调节元件的实例包括但不仅限于花粉特异性、胚胎特异性、玉米穗丝特异性、棉花纤维特异性、根特异性、种子胚乳特异性或无性繁殖期特异性启动子调节元件等。在某些情况下可能需要使用诱导型启动子调节元件，其负责应答于特定信号(如物理刺激(热休克基因)、光(RUBP 羧化酶)、激素(Em)、代谢物、化学品(四环素应答)和胁迫)的基

因表达。可以使用在植物中发挥功能的其他所需的转录和翻译元件。

本发明还提供了一种提高植物细胞、植物组织、植物部分或植物的 HPPD 抑制性除草剂耐受性或抗性的方法，其中包括用包含本发明的突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶蛋白或其生物活性片段或者融合蛋白的编码核酸序列的核酸分子转化所述植物或其部分，并使之表达。所述核酸分子可以作为染色体外实体存在而进行表达，或者可以整合到植物细胞的基因组中实现表达，特别是通过同源重组整合到植物细胞的内源基因位置处实现表达。这些实施方式均在本发明的范围之内。

本发明还提供了一种提高植物或其部分的 HPPD 抑制性除草剂耐受性或抗性的方法，其中包括将表达本发明的突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶（HPPD）蛋白或其生物活性片段或者融合蛋白的植物与另一植物杂交，以及筛选具有提高的 HPPD 抑制性除草剂抗性或耐受性的植物或其部分。

本发明还提供了一种提高植物细胞、植物组织、植物部分或植物中的 HPPD 抑制性除草剂耐受性或抗性的方法，其中包括对所述植物细胞、植物组织、植物部分或植物的内源性 HPPD 蛋白进行基因编辑，以实现在其中表达本发明的突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶蛋白或其生物活性片段或者融合蛋白。

本发明还涉及通过传统育种技术制备除草剂耐受性或抗性提高的植物的方法，其中包括用在基因组中整合了本发明的突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶蛋白或其生物活性片段的编码核酸序列的植物自交或者杂交，并筛选杂合或纯合地包含了所述编码核酸序列的后代。

本发明进一步涉及通过上述方法获得的植物细胞、植物组织、植物部分和植物，及其后代。

优选地，可以将转化了本发明多核苷酸的植物细胞、植物组织或植物部分再生为整个植株。本发明包括细胞培养物，包括组织细胞培养物、液体培养物和固体平板培养物。由本发明植物所产生和/或用于再生本发明植物的种子也包括在本发明范围内。其他植物组织和部分也包括在本发明中。本发明同样包括产生含有本发明核酸分子的植物或细胞的方法。产生这类植物的一种优选方法为通过种植本发明的种子。以这种方式转化的植物可以获得对多种具有不同作用模式的除草剂的抗性。

例如，对于用农杆菌转化植物细胞，可以将外植体与转化的农杆菌混合并孵育足够的时间以允许其转化。转化后，通过用适当抗生素的选择杀死农杆菌，并用适当的选择培养基培养植物细胞。一但形成愈伤组织，可以根据植物组织培养和植物再生领域熟知的方法通过使用适当的植物激素促进芽形成。然而，愈伤组织中间期并不总是必要的。

芽形成以后，可以将所述植物细胞转移到促进根形成的培养基，从而完成植物再生。然后可以培养植物产生种子，所述种子可以用于建立将来的世代。不论转化技术如何，优选将编码细菌蛋白质的基因整合进基因转移载体中，通过在载体中纳入植物启动子调节元件以及3'非翻译转录终止区(如Nos等)使所述转移载体适于在植物细胞中表达该基因。

本发明还提供了一种控制植物场所的杂草的方法，其中包括对包含本发明的植物或种子的场所施用控制杂草有效量的一种或多种HPPD抑制性除草剂。

在本发明中，术语"场所"包括栽培本发明植物的场地例如土壤，也包括例如植物种子、植物苗以及长成的植物。术语"控制杂草有效量"指的是除草剂的量足以影响目标杂草的生长或发育，例如阻止或抑制目标杂草的生长或发育，或者杀灭所述杂草。有利地，所述控制杂草有效量不会显著影响本发明植物种子、植物苗或植物的生长和/或发育。本领域技术人员可以通过常规实验确定这样的控制杂草有效量。

本发明还提供了一种制备保留或加强了催化对羟基苯基丙酮酸（HPP）转化为尿黑酸的性质、且对HPPD抑制型除草剂的敏感性明显低于野生型HPPD的突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶（HPPD）蛋白的方法，其中包括对编码野生型HPPD的核酸进行突变，将突变核酸在表达载体中与编码提高溶解度的组分的核酸序列读框一致地融合和连接形成融合蛋白编码序列，将所获得的重组表达载体转化到宿主细胞中，在含有所述HPPD抑制型除草剂和HPPD酶促底物的合适的条件下表达所述融合蛋白以及筛选保留或加强了催化对羟基苯基丙酮酸（HPP）转化为尿黑酸的性质、且对HPPD抑制型除草剂的敏感性明显降低的突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶（HPPD）蛋白的步骤。优选地，所述提高溶解度的组分是NusA，其与本发明的突变型HPPD蛋白构成融合蛋白。更优选地，所述表达载体是pET-44a载体。所述宿主细胞可以是细菌细胞、真菌细胞或植物细胞。

除非具体说明或暗示，如本文中所用，术语"一"、"一个/一种"和"所述"表示"至少一个"。本文提到或引用的所有专利、专利申请和出版物整体引入本文作为参考，其引用程度如同单独地个别引用一样。

具体实施方式

以下结合实施例对本发明做进一步说明。在这些实施例中描述的所有方法和操作是以举例方式提供的，其不应被理解为限制性的。有关DNA操作的方法可参考Current Protocols in Molecular Biology，第1和2卷，Ausubel F.M., Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, 1989, Molecular Cloning, T. Maniatis et al., 1982，或者Sambrook J. and Russell D., 2001， Molecular Cloning: a laboratory manual, version 3。

实施例

实施例 1 水稻 *HPPD* (*OsHPPD*) 基因的克隆

水稻（*Oryza sativa Japonica* Group）对羟苯基丙酮酸双氧化酶（4-*hydroxyphenylpyruvate dioxygenase*，*HPPD*）基因位于第二染色体 Os02g0168100 位点。根据其 cDNA 序列（NCBI 编号 XP_015626163.1）直接合成其编码区域 DNA（OsHPPD）（通用生物，中国，安徽，滁州）当作 PCR 模板。根据载体 pET-44a（Novagen）和 XP_015626163.1 序列，设计和合成引物 NusOsF: acg att gat gac gac gac aag ATGCCTCCCACTCCCACCCC 和 NusOsR: tccacgagctcccggactcTTA CTAGGATCCTTGAA CTGTAG。用这些引物，合成的模板和 Q5 DNA 聚合酶（NEB, New England Biolabs, Boston, USA）进行 PCR 扩增。扩增条件为：98℃ 2 分钟；然后 98℃ 20 秒，65℃ 30 秒和 72℃ 60 秒，重复 35 次；最后 72℃ 2 分钟。扩增片段在琼脂糖凝胶电泳中显示为 1.3Kb，回收后通过紫外吸收法确定其 DNA 浓度。

pET-44a（Novagen）质粒经 BoxI（Thermo Fisher Scientific，中国，上海）在 37℃酶切 1 小时后，加热至 65℃失活 BoxI。取等量 *OsHPPD* DNA 片段与 BoxI 线性化的 pET-44a 载体混合，加入等体积 2×Gibson Assembly Master Mix（汉恒生物，中国，上海），混匀后，于 50℃孵育一个小时，取 5ul 连接产物来转化 *E. coli* DH5a 感受态，将菌液涂布至含 100 ppm 氨苄青霉素的 LB 固体培养基平板表面，在 37℃过夜培养。第二天，经单菌落 PCR 确定正确克隆后，在 37℃下过夜培养三个正确克隆，提取足够质粒 DNA 送到擎科生物技术公司（中国，北京）用 sanger 法测序。测序结果证明得到了正确的全长水稻 HPPD 编码区 DNA。

实施例 2 水稻 *HPPD* (*OsHPPD*) 蛋白中每一氨基酸的饱和随机突变

水稻全长 OsHPPD 酶有 446 个氨基酸，其氨基酸序列示于 SEQ ID NO: 2 中。其中氨基酸 1－50 被认为构成信号肽，负责指引到叶绿体中（Siehl et al. Plant Physiol. 2014 Nov; 166(3): 1162-1176.）。所以，从第 51 位氨基酸开始直到第 446 位氨基酸，对每一个氨基酸都做了饱和随机突变。这是通过用一个含有将需要突变的氨基酸编码子改为 NNK 的引物与另一适当的常规引物做搭桥 PCR 来实现的。在 NNK 中，N 代表 A/T/G/C，K 代表 G/T，因此 NNK 密码子可以编码 20 种氨基酸以及终止子中的任何一个，所以这是饱和突变。参考 Kille S, Acevedo-Rocha CG, Parra LP, Zhang ZG, Opperman DJ, Reetz MT, Acevedo JP (2013) Reducing codon redundancy and screening effort of combinatorial protein libraries created by saturation mutagenesis. ACS Synth Biol 2(2):83-92； Directed Evolution Library Creation: methods and protocols 2nd ed. Edited by Elizabeth M.J. Gillam, Janine N. Copp and David F. Ackerley New York, NY United States: Springer, 2014.

doi:10.1007/978-1-4939-1053-3。这将产生大量的突变体。将突变体克隆到线性化 pET-44a 载体内，再转化到大肠杆菌里，用 96-孔板在有 HPPD 抑制剂除草剂（比如环磺酮，1-2μM）和底物酪氨酸（1 克/升）的 2×YT 培养液里，28℃ 150 转/分钟摇床上培养 24 小时，表达，再根据其颜色变褐快速筛选这些突变体。我们用这样的方法，筛选到 10 个单氨基酸突变体，它们是 A103S，H141R，H141K，H141T，A165V，V191I，R220K，G342D，D370N 和 K410I。这些抗性突变体相对于野生型对环磺酮和苯唑氟草酮代谢后产物的颜色反应如图 1 所示，其中，H141R 和 G342D 颜色变化最为显著，明显深于野生型。

本专利的方法通过将 NusA 与水稻 HPPD 蛋白融合的方式提高了 HPPD 在细菌中表达的溶解度，从而可以在 28 摄氏度同时表达蛋白和进行酶促反应，大大节约筛选时间和步骤。

同样地，测试了这些突变体对另外三种 HPPD 抑制剂除草剂环吡氟草酮、苯唑草酮和硝磺草酮的颜色反应，参考图 2 和图 3。根据其颜色深浅，对各个突变体针对这 5 种除草剂的抗性/耐受性进行了粗约估计，结果示于表 1 中。加号“+”越多，相对于野生型的颜色越深，抗性/耐受性就越高。

表 1. 水稻 HPPD 单位点突变体及其对 5 种 HPPD 抑制剂除草剂相对抗性

位置	野生型氨基酸残基	突变氨基酸残基	环磺酮	苯唑氟草酮代谢后产物	环吡氟草酮	苯唑草酮	硝磺草酮
野生型	--	--	+	+	+	+	+
103	A	S	2+	2+	+	2+	3+
141	H	R；K；T	141R：6+	141R：6+	141R：6+	141R：2+	141R：5+
165	A	V	3+	3+	5+	2+	5+
191	V	I	2+	2+	3+	2+	4+
220	R	K	2+	2+	3+	2+	4+
342	G	D	6+	6+	3+	2+	2+
370	D	N	2+	2+	3+	2+	2+
410	K	I	2+	2+	2+	2+	1+

以下以 H141R 突变体的产生和筛选为例说明其整个过程。

1、以 NusOsF 和 OsHPPD-H141R-R：CACCGCGAGGCCGTGGTCC 为引物，合成的全长 *OsHPPD* 模板和 Q5 DNA 聚合酶（NEB，New England Biolabs, Boston, USA）进行 PCR 扩增，得到前一个片段 DNA。扩增条件为：98℃/2 分；98℃/20 秒→65℃/30 秒→72℃/60 秒（重复 35 次）；72℃/2 秒。通过琼脂糖凝胶电泳检测后，回收大小正确的条带。并通过紫外吸收法确定浓度。同样地，以 NusOsR 和 OsHPPD-H141R-F：CACGGCCTCGCGGTG**NNK**GCCGTGGCGC TGCGCG 为引物，合成的全长 *OsHPPD* 模板和 Q5 DNA 聚合酶（NEB，New England Biolabs, Boston, USA）进行 PCR 扩增，得到后一个 DNA 片段。

2、前一个片段和后一个片段在中间（OsHPPD-H141R-F 与 OsHPPD-H141R-R）有19 个碱基重叠。因此，将这两个片段各取等摩尔数混合，加入等体积的 2×Glodstar MasterMix（康为世纪生物科技有限公司，北京），再加入 10 pmol NusOsF 和 NusOsR 引物，做搭桥 PCR 反应。扩增条件为：96℃ 2 分；96℃ 20 秒，65℃ 30 秒 ，72℃ 60 秒，重复 30 次；最后 72℃ 5 分。通过琼脂糖凝胶电泳检测后，回收 1.3Kb 大小正确的条带，并通过紫外吸收法确定浓度。

3、取等量 *OsHPPDMut* DNA 片段与上述线性化 pET-44a 载体混合，加入等体积 2×Gibson Assembly Master Mix（汉恒生物），于 50℃孵育一个小时后，取 5ul 连接产物转化 *E. coli* DH5a 感受态，将菌液涂布到含 100 ppm 氨苄青霉素的 LB 固体培养基平板表面，在 37℃过夜培养。将平板上所有克隆(菌落)刮下，提取质粒，并用紫外吸收法定量 DNA，取 100ng 质粒转化至 BL21（DE3）感受态中，涂布平板，37℃过夜培养，暂时保存这些转化后的大肠杆菌平板在 4℃下供突变体筛选用。

4、通过颜色反应筛选 HPPD 抑制剂除草剂抗性突变体

HPPD抑制性除草剂抑制HPPD酶活性，当酪氨酸在酪氨酸转氨酶作用下生成4-羟基苯丙酮酸（HPP）时，失活的HPPD无法将4-羟基苯丙酮酸氧化为尿黑酸（HGA）。尿黑酸呈黑褐色。所以，如果一个HPPD突变体抗或耐除草剂，在大肠杆菌里表达后，还能氧化4-羟基苯丙酮酸为尿黑酸而显现黑褐色。因此，我们用96-孔板在有HPPD抑制剂除草剂和底物酪氨酸的2×YT培养液里，培养大肠杆菌，表达HPPD，再根据其颜色变化快速筛选这些突变体。

（1）配制2×YT培养基（加入1g/L L-Tyr、0.1mM IPTG、0.01mM $MnCl_2$和氨苄青霉素100mg/L）。

（2）在96-孔板中每孔加入上述培养基0.1mL，从上述转化获得的大肠杆菌平板上，挑取OsHPPD 野生型或突变体（OsHPPD Mut）表达克隆进行96-孔板液体培养。根据筛选药物的不同加入终浓度1uM-20uM的HPPD抑制剂，例如：环磺酮终浓度为1.7uM、硝磺草酮终浓度为10uM等。当所有组分加好后，盖上强透气封板膜（索来保生物制剂公司，中国，北京）。

（3）将96-孔板置于28℃ 150转/分钟摇床上培养24小时。用目视或检测培养物在400nM的光吸收，用接种环挑取产生黑色素明显的克隆，进一步培养，提取其质粒DNA进行测序和进一步研究，比如 OsHPPD 蛋白表达，纯化和酶活性测试。

用同样的方法，用表2所述引物我们分别得到了A103S、A165V、V191I、R220K、D370N、K410I单位点突变体和H141R/G342D/D370N三位点突变体。

表2 用于制备HPPD突变体的引物

引物名称	引物序列(5'-3')
NusOsF	acg att gat gac gac gac aag ATGCCTCCCACTCCCACCCC
NusOsR	tccacgagctcccggactcTTA CTAGGATCCTTGAACTGTAG
OsHPPD-H141R-F	CACGGCCTCGCGGTGNNKGCCGTGGCGCTGCGCG
OsHPPD-H141R-R	CACCGCGAGGCCGTGGTCC
OsHPPD-A103S-F	GCGTTCCTCTTCACCNNKCCCTACGGCGGCGACCACG
OsHPPD-A103S-R	GGTGAAGAGGAACGCGACGGAGGC
OsHPPD-A165V-F	TCGCGGCCGGTGCGCGCCCGNNKTTCCAGCCCG
OsHPPD-A165V-R	CGGGCGCGCACCGGCCGCGAC
OsHPPD-V191I-F	GTCGTGCTCCGCTTCNNKAGCCACCCGG
OsHPPD-V191I-R	GAAGCGGAGCACGACGTCGCC
OsHPPD-R220K-F	CGCCGTGGACTACGGCCTCCGCNNKTTCGACCACG
OsHPPD-R220K-R	GCGGAGGCCGTAGTCCACGGCGC
OsHPPD-D370N-F	CTCGTGGACAGGGATNNKCAGGGGGTGTTGCTCCAGATCT
OsHPPD-D370N-R	ATCCCTGTCCACGAGCACCCC
OsHPPD-K410I-F	TGGGCAGGAGTACCAGNNKGGCGGCTGCGGCG
OsHPPD-K410I-R	CTGGTACTCCTGCCCACTCTCATCC
OsHPPD-H141R/G342D/D370N-F	GGCCTCAACTCGGTGGTGCTCG
OsHPPD-H141R/G342D/D370N-R	GCGAGCACCACCGAGTTGAGGC

另外，又通过类似桥式 PCR 的方式制备了单突变组合成的一些双突变体，比如 H141R/G342D，H141R/D370N 和 G342D/D370N。

实施例 3 水稻 *HPPD* (*OsHPPD*) 蛋白多位点突变组合

本发明在不同时间不同 96-孔板上还测试了 H141R、G342D、D370N 及其复合位点突变型 HPPD 蛋白对五种 HPPD 抑制性除草剂环磺酮、苯唑氟草酮代谢后产物、环吡氟草酮、苯唑草酮和硝磺草酮的颜色反应。测试结果示于图 4、图 5 和图 6。表 3 中显示了根据其颜色深浅粗约估计的这些突变体对相应除草剂的抗性/耐受性。从表 3 中可以看出，双位点突变体以及三位点突变体也展现出较高的耐药性，可见，水稻 HPPD (OsHPPD) 蛋白中的氨基酸突变可以组合存在，其同样能实现更高的 HPPD 抑制性除草剂抗性/耐受性。

表 3. 单位点及多位点突变型水稻 HPPD 对 5 种除草剂的抗性

复合位点	环磺酮	苯唑氟草酮代谢后产物	环吡氟草酮	苯唑草酮	硝磺草酮
野生型（WT）	+	+	+	+	+
H141R	2+	5+	20+	15+	20+
G342D	3+	5+	10+	7+	20+
D370N	1.5+	2+	5+	5+	5+
H141R/G342D	10+	10+	30+	25+	30+
H141R/D370N	3+	4+	20+	20+	10+
G342D/D370N	2+	4+	5+	5+	6+
H141R/G342D/D370N	10+	10+	30+	30+	30+

实施例 4. 在 3 点突变 H141R-G342D-D370N 基础上再次进行饱和突变。

1、在大肠杆菌表达 3 点突变 OsHPPD H141R-G342D-D370N 的颜色反应中，用双唑草酮代谢产物（代号 101）来抑制时，需要 120uM 的浓度才无明显颜色反应。因此，我们用 120uM 的 101 做初始筛选。用前述的技术路线，针对氨基酸 51-446 的每一个氨基酸

（141R，342D，370N 位点除外）分别设计一对引物，其中一个引物在要饱和突变的氨基酸位点用 NNK 表示，PCR 扩增，产生一系列的突变体，将这些突变体在大肠杆菌 BL21（DE3）里表达，表达后用 120uM 的化合物 101 进行反复的筛选。完成所有单点突变筛选后得到 18 个新的突变位点。这些新位点是 R93S，G226H，L276W，P277N，P336D，P337A，N338D，N338S，N338Y，R346C，R346D，R346H，R346S，R346Y，I377C，P386T，L390I，M392L，E403G，K418P，G419F，G419L，G419V，N420S，N420T，E430G，Y431L。这些新突变点的氨基酸变化和核苷酸（碱基）以及产生这些新突变点所用的引物列在表 4 中，以及引物序列在表 5 中。综上，如图 7 所示，总共筛选得到 26 个突变点，其中，有的位点可以从原来的氨基酸变为多个不同氨基酸，比如 H141R,K,T；N338D,S,Y；R346C,D,H,S,Y；G419F,L,V 和 N420S,T。

表 4. 新筛选出的所有突变位点氨基酸、碱基变化及所用引物

位置	野生型		突变体		引物名
	氨基酸	碱基	氨基酸	碱基	
93	R	CGC	S	TCC	93F
					93R
226	G	GGC	H	CAC	226F
					226R
276	L	CTG	W	TGG	276F
					276R
277	P	CCG	N	AAT	277F
					277R
336	P	CCG	D	GAT	336F
					336R
337	P	CCC	A	GCC	337F
					337R
338	N	AAC	D,S,Y	GAC,AGC,TAC	338F
					338R
346	R	CGC	C,H,S,D,Y	TGC,CAC,AGC,GAC,TAT	346F
					346R
377	I	ATC	C	TGC	377F
					377R
386	P	CCA	T	ACA	386F
					386R
390	L	TTG	I	ATT	390F
					390R
392	M	ATG	L	CTG	392F
					392R
403	E	GAG	G	GGG	403F
					403R
418	K	AAG	P	CCG	418F
					418R
419	G	GGC	F,L,V	TTC,TTG,GTG	419F
					419R
420	N	AAC	S,T	AGC,ACC	420F
					420R
430	E	GAG	G	GGG	430F
					430R

431	Y	TAT	L	CTG	431F 431R

表 5. 新筛选出的所有突变位点位置及所用引物序列

氨基酸位置	引物及序列（5’→3’）
93	93-F:CGCACGCCTCCCTCCTCCTCNNKTCCGCCTCCGTCGCGTTCCTC 93-R:GAGGAGGAGGGAGGCGTGCG
226	226-F:GCCGGTTCGACCACGTCGTCNNKAACGTGCCGG 226-R:GACGACGTGGTCGAACCGGC
276	276-F:ACAACGCGGAGACCGTGCTGNNKCCGCTCAACG 276-R:CAGCACGGTCTCCGCGTTGT
277	277-F:ACGCGGAGACCGTGCTGCTGNNKCTCAACGAGCCGGTGCACGG 277-R:CAGCAGCACGGTCTCCGCGTTG
336	336-F:TCGAGTTCTTGGCGCCGCCGNNKCCCAACTACTACGACGGCGTG 336-R:CGGCGGCGCCAAGAACTCGAAG
337	337-F:AGTTCTTGGCGCCGCCGCCGNNKAACTACTACGACGGCGTGCG 337-R:CGGCGGCGGCGCCAAGAACTC
338	338-F:TCTTGGCGCCGCCGCCGCCCNNKTACTACGACGGCGTGCGGCG 338-R:GGGCGGCGGCGGCGCCAAGAAC
346	346-F:ACTACGACGGCGTGCGGCGGNNKGCCGGGGACGTGCTCTCGGAG 346-R:CCGCCGCACGCCGTCGTAGTAG
377	377-F:ACCAGGGGGTGTTGCTCCAGNNKTTCACCAAGC 377-R:CTGGAGCAACACCCCCTGGT
386	386-F:CCAAGCCAGTAGGAGACAGGNNKACCTTTTTCTTGGAGATGATAC 386-R:CCTGTCTCCTACTGGCTTGG
390	390-F:GAGACAGGCCAACCTTTTTCNNKGAGATGATAC 390-R:GAAAAAGGTTGGCCTGTCTC
392	392-F:AGGCCAACCTTTTTCTTGGAGNNKATACAAAGGA 392-R:CTCCAAGAAAAAGGTTGGCCTG
403	403-F:TTGGGTGCATGGAGAAGGATNNKAGTGGGCAGGAGTACCAGAAG 403-R:ATCCTTCTCCATGCACCCAATC
418	418-F:GCGGCTGCGGCGGGTTTGGGNNKGGCAACTTCTCGGAGCTGTTC 418-R:CCCAAACCCGCCGCAGCCGC
419	419-F:GGCTGCGGCGGGTTTGGGAAGNNKAACTTCTCGGAGCTGTTCAAG 419-R:CTTCCCAAACCCGCCGCAGCC
420	420-F:GCGGCGGGTTTGGGAAGGGCNNKTTCTCGGAGCTGTTCAAGTC 420-R:GCCCTTCCCAAACCCGCCGC
430	430-F:AGCTGTTCAAGTCCATTGAGNNKTATGAGAAATCCCTTGAAGC 430-R:CTCAATGGACTTGAACAGCTC
431	431-F:TGTTCAAGTCCATTGAGGAGNNKGAGAAATCCCTTGAAGCCAAG 431-R:CTCCTCAATGGACTTGAACAG

实施例 5. 突变位点的组合

基于以下三个原则对突变位点进行组合：位点相近便于基因编辑时的同源置换，编辑效率高；碱基改变同为 A→G/T→C 或 C→T/G→A 便于单碱基编辑；以及抗性位点尽量少便于编辑和避免可能的负面影响。分别按上述原则来设计组合、相应的引物和构建原核表达载体，再进行颜色反应筛选，找出适合于编辑和抗性高的组合来实施基因编辑。

（1）按相近距离原则设计了 33 个组合，其中 24 个组合有 3 个突变位点，9 个组合有 4 个突变位点。表 6 展示了这些组合及其所用引物序列。

表 6 相近原则设计的突变位点组合（三和四个突变位点）

三/四突变位点组合	引物及序列(5'→3')
P336D/N338D/G342D	1-336D-F1：TCGAGTTCTTGGCGCCGCCGGATCCCGAC TACTACGACGACG 1-336D-R1：CGGCGGCGCCAAGAACTCG
P336D/N338S/G342D	1-338S-F1：TCTTGGCGCCGCCGGATCCCAGCTACTAC GACGACGTGCGGCG 1-338S-R1：GGGATCCGGCGGCGCCAAG
P336D/N338Y/G342D	1-338Y-F2： TCTTGGCGCCGCCGGATCCCTACTACTACGACGACGTGCGGCG 1-338S-R1：GGGATCCGGCGGCGCCAAG
N338D/G342D/R346C	346-F-2： CTACGACGACGTGCGGCGGTGCGCCGGGGACGTGCTCTCG 346-R-2：CCGCCGCACGTCGTCGTAG
N338D/G342D/R346H	346-F-3： CTACGACGACGTGCGGCGGCACGCCGGGGACGTGCTCTCG 346-R-2：CCGCCGCACGTCGTCGTAG
N338D/G342D/R346S	1-346S-F1： CTACGACGACGTGCGGCGGAGCGCCGGGGACGTGCTCTCG 346-R-2：CCGCCGCACGTCGTCGTAG
N338S/G342D/R346C	2-338S-F1： CTTGGCGCCGCCGCCGCCCAGCTACTACGACGACGTGCGGC 2-338S-R1：GGGCGGCGGCGGCGCCAAG
N338S/G342D/R346H	2-338S-F1： CTTGGCGCCGCCGCCGCCCAGCTACTACGACGACGTGCGGC 2-338S-R1：GGGCGGCGGCGGCGCCAAG
N338S/G342D/R346S	2-338S-F1： CTTGGCGCCGCCGCCGCCCAGCTACTACGACGACGTGCGGC 2-338S-R1：GGGCGGCGGCGGCGCCAAG
N338Y/G342D/R346C	2-338Y-F2： CTTGGCGCCGCCGCCGCCCTACTACTACGACGACGTGCGGC 2-338S-R1：GGGCGGCGGCGGCGCCAAG
N338Y/G342D/R346H	2-338Y-F2：

	CTTGGCGCCGCCGCCGCCCTACTACTACGACGACGTGCGGC 2-338S-R1：GGGCGGCGGCGGCGCCAAG
N338Y/G342D/R346S	2-338Y-F2： CTTGGCGCCGCCGCCGCCCTACTACTACGACGACGTGCGGC 2-338S-R1：GGGCGGCGGCGGCGCCAAG
P336D/G342D/R346C	2-336D-F1： TCGAGTTCTTGGCGCCGCCGGATCCCAACTACTACGACGAC 1-336D-R1：CGGCGGCGCCAAGAACTCG
P336D/G342D/R346H	2-336D-F1： TCGAGTTCTTGGCGCCGCCGGATCCCAACTACTACGACGAC 1-336D-R1：CGGCGGCGCCAAGAACTCG
P336D/G342D/R346S	2-336D-F1： TCGAGTTCTTGGCGCCGCCGGATCCCAACTACTACGACGAC 1-336D-R1：CGGCGGCGCCAAGAACTCG
P336D/N338D/R346C	2-346C-F2： CTACGACGGCGTGCGGCGGTGCGCCGGGGACGTGCTCTCGG 2-346C-R2：CCGCCGCACGCCGTCGTAG
P336D/N338D/R346H	2-346H-F2： ACTACGACGGCGTGCGGCGGCACGCCGGGGACGTGCTCTCGG 2-346C-R2：CCGCCGCACGCCGTCGTAG
P336D/N338D/R346S	2-346S-F2： ACTACGACGGCGTGCGGCGGAGCGCCGGGGACGTGCTCTCGG 2-346C-R2：CCGCCGCACGCCGTCGTAG
P336D/N338S/R346C	2-346C-F2： CTACGACGGCGTGCGGCGGTGCGCCGGGGACGTGCTCTCGG 2-346C-R2：CCGCCGCACGCCGTCGTAG
P336D/N338S/R346H	2-346H-F2： ACTACGACGGCGTGCGGCGGCACGCCGGGGACGTGCTCTCGG 2-346C-R2：CCGCCGCACGCCGTCGTAG
P336D/N338S/R346S	2-346S-F2： ACTACGACGGCGTGCGGCGGAGCGCCGGGGACGTGCTCTCGG 2-346C-R2：CCGCCGCACGCCGTCGTAG
P336D/N338Y/R346C	2-346C-F2： CTACGACGGCGTGCGGCGGTGCGCCGGGGACGTGCTCTCGG 2-346C-R2：CCGCCGCACGCCGTCGTAG
P336D/N338Y/R346H	2-346H-F2： ACTACGACGGCGTGCGGCGGCACGCCGGGGACGTGCTCTCGG 2-346C-R2：CCGCCGCACGCCGTCGTAG
P336D/N338Y/R346S	2-346S-F2： ACTACGACGGCGTGCGGCGGAGCGCCGGGGACGTGCTCTCGG 2-346C-R2：CCGCCGCACGCCGTCGTAG
P336D/N338D/G342D/R346C	1-336D-F1：TCGAGTTCTTGGCGCCGCCGGATCCCGACTACTAC GACGACG 1-336D-R1：CGGCGGCGCCAAGAACTCG
P336D/N338D/G342D/R346H	1-336D-F1： TCGAGTTCTTGGCGCCGCCGGATCCCGACTACTACGACGACG 1-336D-R1：CGGCGGCGCCAAGAACTCG
P336D/N338D/G342D/R346S	1-336D-F1： TCGAGTTCTTGGCGCCGCCGGATCCCGACTACTACGACGACG 1-336D-R1：CGGCGGCGCCAAGAACTCG
P336D/N338S/G342D/R346C	2-336D-F2： TCGAGTTCTTGGCGCCGCCGGATCCCAGCTACTACGACGACG

	1-336D-R1：CGGCGGCGCCAAGAACTCG
P336D/N338S/G342D/R346H	2-336D-F2： TCGAGTTCTTGGCGCCGCCGGATCCCAGCTACTACGACGACG 1-336D-R1：CGGCGGCGCCAAGAACTCG
P336D/N338S/G342D/R346S	2-336D-F2： TCGAGTTCTTGGCGCCGCCGGATCCCAGCTACTACGACGACG 1-336D-R1：CGGCGGCGCCAAGAACTCG
P336D/N338Y/G342D/R346C	3-336D-F3： TCGAGTTCTTGGCGCCGCCGGATCCCTACTACTACGACGACG 1-336D-R1：CGGCGGCGCCAAGAACTCG
P336D/N338Y/G342D/R346H	3-336D-F3： TCGAGTTCTTGGCGCCGCCGGATCCCTACTACTACGACGACG 1-336D-R1：CGGCGGCGCCAAGAACTCG
P336D/N338Y/G342D/R346S	3-336D-F3： TCGAGTTCTTGGCGCCGCCGGATCCCTACTACTACGACGACG 1-336D-R1：CGGCGGCGCCAAGAACTCG

如图 8 所示，这些相近突变位点的各种组合，经克隆、表达和颜色反应比较后发现，其中，三个组合 N338D/G342D/R346C、N338D/G342D/R346H 和 N338S/G342D/R346C 的抗性最高，在高达 1000-1500uM 的双唑草酮代谢产物 101 存在下还有明显颜色反应；其次为两个各有四个相互接近的突变位点的组合 P336D/N338D/G342D/R346C 和 P336D/N338D/G342D/R346H。（2）按有利于单碱基编辑原则，设计了 6 个组合：同为 A→G/T→C 的 H141R/N338D/N420S，H141R/N338S/N420S，H141R/N338D 和 H141R/N420S，G342D/ R346C 和同为 C→T/G→A 的 G342D/R346H。表 7 列出了产生这些组合的引物及序列。

表 7. 有利于单碱基编辑原则设计的突变位点组合

突变位点组合	引物名及序列(5'→3')
H141R/N338D/N420S	420-AGC-F:GCGGCGGGTTTGGGAAGGGCAGCTTCTCGGAGCTGTTCAAGTC 420-R:GCCCTTCCCAAACCCGCCGC
H141R/N338S/N420S	338-AGC-F:TCTTGGCGCCGCCGCCGCCCAGCTACTACGACGGCGTGCGGCG 338-R:GGGCGGCGGCGGCGCCAAGAAC
H141R/N338D	338-GAC-F:TCTTGGCGCCGCCGCCGCCCGACTACTACGACGGCGTGCGGCG 338-R:GGGCGGCGGCGGCGCCAAGAAC
H141R/N420S	420-AGC-F:GCGGCGGGTTTGGGAAGGGCAGCTTCTCGGAGCTGTTCAAGTC 420-R:GCCCTTCCCAAACCCGCCGC
G342D/R346C	346-F-2：CTACGACGACGTGCGGCGGTGCGCCGGGGACGTGCTCTCG 346-R-2：CCGCCGCACGTCGTCGTAG
G342D/R346H	346-F-3：CTACGACGACGTGCGGCGGCACGCCGGGGACGTGCTCTCG 346-R-2：CCGCCGCACGTCGTCGTAG

经测试发现，上述 6 个组合的颜色反应也都较强，除草剂 101 浓度在 600-1000uM 的大肠杆菌培养液还能辨别有颜色反应。

（3）其它组合如表 8 所示。

表 8. 两、三、四个等突变位点的组合

突变位点组合	引物及序列（5’→3’）
H141R/N338D	338-GAC-F:TCTTGGCGCCGCCGCCGCCCGACTACTACGACGGCGTGCGGCG 338-R:GGGCGGCGGCGGCGCCAAGAAC
H141R/G342D	342-GAC-F:CGCCGCCCAACTACTACGACGACGTGCGGCGGCGCGCCGGGGAC 342-R:GTCGTAGTAGTTGGGCGGCG
N338D/G342D	338-GAC-342-GAC-F:TCTTGGCGCCGCCGCCGCCCGACTACTACGACGACGTGCGGCG 338-R:GGGCGGCGGCGGCGCCAAGAAC
K418P/G419F	418-CCG-419-TTC-F:CGGCTGCGGCGGGTTTGGGCCGTTCAACTTCTCGGAGCTGTTCAAG 418-R:CCCAAACCCGCCGCAGCCGC
G419F/N420S	419-TTC-420-TCG-F:GCGGCGGGTTTGGGAAGTTCTCGTTCTCGGAGCTGTTCAAG 419-TTC-420-TCG-R:GAACTTCCCAAACCCGCCGC
G342D/R346C	346-F-2：CTACGACGACGTGCGGCGGTGCGCCGGGGACGTGCTCTCG 346-R-2：CCGCCGCACGTCGTCGTAG
G342D/R346H	346-F-3：CTACGACGACGTGCGGCGGCACGCCGGGGACGTGCTCTCG 346-R-2：CCGCCGCACGTCGTCGTAG
H141R/N420S	420-AGC-F:GCGGCGGGTTTGGGAAGGGCAGCTTCTCGGAGCTGTTCAAGTC 420-R:GCCCTTCCCAAACCCGCCGC
G338D/K418P	418-CCG-F:GCGGCTGCGGCGGGTTTGGGCCGGGCAACTTCTCGGAGCTGTTC 418-R:CCCAAACCCGCCGCAGCCGC
P277N/N338D	277-AAT-F:GCGGAGACCGTGCTGCTGAATCTCAACGAGCCGGTGCACG 277-R:CAGCAGCACGGTCTCCGCGTTGTTG
L276W/P277N	276-TGG-F:CAACGCGGAGACCGTGCTGTGGCCGCTCAACGAGCCGGTGC 276-R:CAGCACGGTCTCCGCGTTGTTGGCG
H141R/N338D/G342D	338-GAC-342-GAC-F:TCTTGGCGCCGCCGCCGCCCGACTACTACGACGACGTGCGGCG 338-R:GGGCGGCGGCGGCGCCAAGAAC
H141R/G342D/K418P	418-CCG-F:GCGGCTGCGGCGGGTTTGGGCCGGGCAACTTCTCGGAGCTGTTC 418-R:CCCAAACCCGCCGCAGCCGC
H141R/G342D/G419F	419-TTC-F:GCTGCGGCGGGTTTGGGAAGTTCAACTTCTCGGAGCTGTTCAAG 419-R:CTTCCCAAACCCGCCGCAGC
H141R/G342D/P386T	338-AAC-F:TCTTGGCGCCGCCGCCGCCCAACTACTACGACGGCGTGCGGCG 338-R:GGGCGGCGGCGGCGCCAAGAAC
K418P/G419F/N420T	418-419-420-ACT-F： GCGGCGGGTTTGGGCCGTTCACTTTCTCGGAGCTGTTCAAGTC 418-419-420-R：GAACGGCCCAAACCCGCCGC

K418T/G419F/N420T	418-419-420-ACT-F：GCGGCGGGTTTGGGCCGTTCACTTTCTCGGAGCTGTTCAAGTC 418-419-420-R：GAACGGCCCAAACCCGCCGC
H141R/G342D/R346C	346-F-2：CTACGACGACGTGCGGCGGTGCGCCGGGGACGTGCTCTCG 346-R-2：CCGCCGCACGTCGTCGTAG
H141R/G342D/R346H	346-F-3：CTACGACGACGTGCGGCGGCACGCCGGGGACGTGCTCTCG 346-R-2：CCGCCGCACGTCGTCGTAG
H141R/G342D/N420S	420-AGC-F:GCGGCGGGTTTGGGAAGGGCAGCTTCTCGGAGCTGTTCAAGTC 420-R:GCCCTTCCCAAACCCGCCGC
H141R/G342D/P277N	277-AAT-FGCGGAGACCGTGCTGCTGAATCTCAACGAGCCGGTGCACG 277-R:CAGCAGCACGGTCTCCGCGTTGTTG
H141R/G342D/P336D	336-GAC-F:GAGTTCTTGGCGCCGCCGGATCCCAACTACTACGACGACG 336-R:CGGCGGCGCCAAGAACTCGAAGCCGC
H141R/G342D/L276W	276-TGG-F:CAACGCGGAGACCGTGCTGTGGCCGCTCAACGAGCCGGTGC 276-R:CAGCACGGTCTCCGCGTTGTTGGCG
H141R/G342D/R346S	346-AGC-F:CTACGACGACGTGCGGCGGAGTGCCGGGGACGTGCTCTC 346-R:CCGCCGCACGTCGTCGTAGTAG
H141R/G342D/L390I	390-ATT-F:GAGACAGGCCAACCTTTTTCATTGAGATGATACAAAGGATTGG 390-R:GAAAAAGGTTGGCCTGTCTC
H141R/G342D/I377C	377-TGT-F:ACCAGGGGGTGTTGCTCCAGTGTTTCACCAAGCCAGTAGGAGAC 377-R:CTGGAGCAACACCCCCTGGTC
H141R/G342D/M392L	392-CTG-F:GGCCAACCTTTTTCTTGGAGCTGATACAAAGGATTGGGTGCATG 392-R:CTCCAAGAAAAAGGTTGGCC
H141R/P337A/G342D	337-GCC-F:AGTTCTTGGCGCCGCCGCCGGCCAACTACTACGACGACGTGCG 337-R:CGGCGGCGGCGCCAAGAACTC
H141R/N338S/G342D	338-AGC-F:TCTTGGCGCCGCCGCCGCCCAGCTACTACGACGGCGTGCGGCG 338-R:GGGCGGCGGCGGCGCCAAGAAC
H141R/N338Y/G342D	338-TAC-F:CTTGGCGCCGCCGCCGCCCTACTACTACGACGACGTGCG 338-R:GGGCGGCGGCGGCGCCAAGAACTCG
P277N/N338D/G342D	277-AAT-F:GCGGAGACCGTGCTGCTGAATCTCAACGAGCCGGTGCACG 277-R:CAGCAGCACGGTCTCCGCGTTGTTG
P277N/G342D/R346C	277-AAT-F:GCGGAGACCGTGCTGCTGAATCTCAACGAGCCGGTGCACG 277-R:CAGCAGCACGGTCTCCGCGTTGTTG
P277N/N338D/N420S	277-AAT-F:GCGGAGACCGTGCTGCTGAATCTCAACGAGCCGGTGCACG 277-R:CAGCAGCACGGTCTCCGCGTTGTTG
N338D/G342D/K418P	418-CCG-F:GCGGCTGCGGCGGGTTTGGGCCGGGCAACTTCTCGGAGCTGTTC 418-R:CCCAAACCCGCCGCAGCCGC
H141R/N338D/G342D/K418P	418-CCG-F:GCGGCTGCGGCGGGTTTGGGCCGGGCAACTTCTCGGAGCTGTTC

	418-R:CCCAAACCCGCCGCAGCCGC
H141R/N338D/G342D/G419F	419-TTC-F:GCTGCGGCGGGTTTGGGAAGTTCAACTTCTCGGAGCTGTTCAAG 419-R:CTTCCCAAACCCGCCGCAGC
H141R/N338D/G342D/P386T	370-GAC-F:GGGTGCTCGTGGACAGGGATGACCAGGGGGTGTTGCTCCAGATC 370-R:ATCCCTGTCCACGAGCACCC
H141R/N338D/G342D/R346C	346-F-2：CTACGACGACGTGCGGCGGTGCGCCGGGGACGTGCTCTCG 346-R-2：CCGCCGCACGTCGTCGTAG
H141R/N338D/G342D/R346H	346-F-3：CTACGACGACGTGCGGCGGCACGCCGGGGACGTGCTCTCG 346-R-2：CCGCCGCACGTCGTCGTAG
H141R/G342D/K418P/G419F	418-CCG-419-TTC-F:CGGCTGCGGCGGGTTTGGGCCGTTCAACTTCTCGGAGCTGTTCAAG 418-R:CCCAAACCCGCCGCAGCCGC
H141R/G342D/L276W/P277N	276-TGG-277-AAT-F:GCGGAGACCGTGCTGCTGAATCTCAACGAGCCGGTGCACG 276-277-R:CCACAGCACGGTCTCCGCGTTGTTGGC
H141R/N338D/G342D/K418P/G419F	418-CCG-419-TTC-F:CGGCTGCGGCGGGTTTGGGCCGTTCAACTTCTCGGAGCTGTTCAAG 418-R:CCCAAACCCGCCGCAGCCGC
H141R/N338D/G342D/G419F/N420S	419-TTC-420-TCG-F:GCGGCGGGTTTGGGAAGTTCTCGTTCTCGGAGCTGTTCAAG 419-TTC-420-TCG-R:GAACTTCCCAAACCCGCCGC
H141R/N338D/G342D/K418P/G419F/N420S	418-419-420-TCG-F：GCGGCGGGTTTGGGCCGTTCTCGTTCTCGGAGCTGTTCAAGTC 418-419-420-R：GAACGGCCCAAACCCGCCGC
H141R/N338D/G342D/K418P/G419F/N420T	418-419-420-ACT-F： GCGGCGGGTTTGGGCCGTTCACTTTCTCGGAGCTGTTC AAGTC 418-419-420-R：GAACGGCCCAAACCCGCCGC
H141R/N338D/G342D/R346C/K418P/G419F/N420S	346-F-2：CTACGACGACGTGCGGCGGTGCGCCGGGGACGTGCTCTCG 346-R-2：CCGCCGCACGTCGTCGTAG
H141R/N338D/G342D/R346H/K418P/G419F/N420S	346-F-3：CTACGACGACGTGCGGCGGCACGCCGGGGACGTGCTCTCG 346-R-2：CCGCCGCACGTCGTCGTAG
P277N/P336D/N338D/G342D	277-AAT-F:GCGGAGACCGTGCTGCTGAATCTCAACGAGCCGGTGCACG 277-R:CAGCAGCACGGTCTCCGCGTTGTTG
P277N/N338D/G342D/R346C	277-AAT-F:GCGGAGACCGTGCTGCTGAATCTCAACGAGCCGGTGCACG 277-R:CAGCAGCACGGTCTCCGCGTTGTTG
P277N/N338D/K418P/G419F	277-AAT-F:GCGGAGACCGTGCTGCTGAATCTCAACGAGCCGGTGCACG 277-R:CAGCAGCACGGTCTCCGCGTTGTTG
H141R/P277N/N338D/G342D/K418P/G419F/N420S	277-AAT-F:GCGGAGACCGTGCTGCTGAATCTCAACGAGCCGGTGCACG 277-R:CAGCAGCACGGTCTCCGCGTTGTTG
H141R/P277N/P336D/N338D/G342	1-336D-F1： TCGAGTTCTTGGCGCCGCCGGATCCCGACTACTACGACGACG

D/K418P/G419F/N420S	1-336D-R1：CGGCGGCGCCAAGAACTCG
H141R/G336D/G342D/K418P/G419F/N420S	336-GAC-F:GAGTTCTTGGCGCCGCCGGATCCCAACTACTACGACGACG 336-R:CGGCGGCGCCAAGAACTCGAAGCCGC

经测试发现，肉眼可辨上述两点组合的颜色反应较弱，都在 100uM 的 101 以内；三点、四点及更多位点的组合中，H141R/G342D/N338D/R346C、H141R/G342D/N338D/R346H、H141R/G342D/N338D/K418P、H141R/G342D/N338D/G419F 和 H141R/G342D/N338D/G419F/N420S 的颜色反应都很强，即使在 1000-2000uM 的 101 浓度下都有颜色（如图 9 所示）。

综上所述，单位点的抗性均在 10-20uM；两位点抗性在 20-120um 左右，均比单位点强，100uM 时颜色较淡；H141R/N338D/G342D、H141R/G342D/K418P、H141R/G342D/G419F、338D/342D/346C/H、H141R/G342D/N420S、H141R/N338D/N420S 等三位点组合排序抗性较好，可到 1000uM 仍有淡的颜色；H141R/N338D/G342D/K418P、H141R/G342D/K418P/G419F、H141R/N338D/G342D/R346C、H141R/N338D/G342D/R346H、H141R/N338D/G342D/K418P/G419F、H141R/N338D/G342D/G419F/N420S、H141R/N338D/G342D/K418P/G419F/N420S 等四或更多位组合的抗性较高，在高达 2500uM 的 101 时颜色仍很明显。

实施例 6. OsHPPD 酶蛋白的表达、分离和纯化

水稻 OsHPPD 蛋白和尿黑酸氧化酶 HGD（homogentisate 1,2-dioxygenase）是由大肠杆菌异源表达，将基因插入到 pET-15b 表达载体中，利用 BL21（DE3）表达菌株进行表达，再经过 Ni-NTA resin 纯化获得。

（1）将阳性克隆的 HPPD 开放读码框（ORF）再克隆至 pET-15b 载体中形成 6His-HPPD 表达载体，并转化至 BL21（DE3）细胞中。接种表达菌株至 10mL 2×YT 培养液，37℃，200 转/分钟摇床上培养过夜。将 10mL 培养物接种至 1L 2×YT 培养液中，培养到 OD_{600} 达到 0.6-0.8 时，降温到 16℃，0.2 mM IPTG（异丙基硫代半乳糖苷）诱导表达过夜，2800xg 离心收菌。

（2）将收集好的菌体利用 buffer A（50 mM Tris pH 8.0, 500 mM NaCl, 20mM 咪唑）重悬，加入终浓度为 1 mM PMSF（苯甲基磺酰氟），250 ul protease inhibitor cocktail（多种蛋白酶抑制剂混合物），混匀。在冰浴里用超声破碎细胞（40%总功率，3 秒工作/6 秒间隙，2x30 分钟(宁波新芝科技有限公司，中国，宁波)）；在 12000 转/分钟，4℃，30 分钟，离心，取上清液，用 0.22uM 滤膜过滤。

（3）Ni-NTA 柱纯化，将上述上清液与 Ni-NTA resin 结合后，用含有 50 mM 咪唑的 buffer A 洗杂，最后用含 400 mM 咪唑的洗脱缓冲液洗脱。

（4）SDS-PAGE 分析目标蛋白的大致纯度，将含有目的蛋白的洗脱液合并后用超滤管（10 kDa molecular weight cut-off, Amicon Ultra）浓缩。并用 20mM Tris-HCl，pH 7.5 溶液至少 3 次更换溶液和脱盐。用 BCA 法确定总蛋白浓度。所有表达、纯化的水稻 HPPD 野生型和各种突变体如表 9 所示。

表 9. 水稻 HPPD 野生型和各突变位点组合

序号	突变体
1	WT
2	H141R/G342D/G419F
3	H141R/N338D/G342D
4	H141R/G342D/K418P
5	H141R/N338D/G342D/P386T
6	N338D/G342D/R346C
7	N338D/G342D/R346H
8	H141R/N338D/G342D/R346C
9	H141R/N338D/G342D/R346H
10	H141R/N338D/G342D/K418P
11	H141R/N338D/G342D/K418P/G419F/N420S
12	H141R/G342D/P277N
13	N338D/G342D
14	G342D/R346C
15	H141R/N338D/N420S

（5）透析或过脱盐柱，将缓冲液换为贮存液 50 mM Tris pH 8.0, 500 mM NaCl。BCA 法测定浓度，分装后用液氮速冻后，保存于-80°C 冰箱。

实施例 7. 化合物对 OsHPPD 蛋白各种酶学参数的测定

1、HPPD 活性是通过检测 HPPD 酶催化 4-HPP（4-羟基苯丙酮酸）转化为 HGA（尿黑酸），HGA（尿黑酸）在尿黑酸氧化酶的催化下转化为 MAA（马来酰乙酰乙酸），马来酰乙酰乙酸在 318nm 有最大吸收，吸收常数为 14.7OD M^{-1} cm^{-1}。

2、在酶标板中加入 6ul 50 倍底物终浓度的 4-HPP，通过一次加入 294 uL 终浓度为 25 mM HEPES（羟乙基哌嗪乙硫磺酸），pH 7，2 mM 维生素 C，10 mM FeSO4，50 nM 尿黑酸氧化酶（homogentisate dioxygenase）和 5 至 240 nM HPPD 酶。反应底物 4-HPP 的终浓度一般在 1 至 100uM。

3、用紫外酶标检测仪（ReadMax1900 型光吸收型全波长酶标仪）（上海）连续监测反应孔在 318nm 的吸光度变化。

4、OsHPPD K_m、K_{cat} 和 K_{cat}/K_m 测定：

V_{max} 是酶催化时所能达到的最大催化反应速率，米氏常数 K_m 是酶催化反应达到最大速率（V_{max}）一半时所需底物的浓度，K_m 值是一个常数，与酶浓度无关，随测定的底物种类、反应的温度、pH 及离子强度而改变。K_{cat} 是酶的催化常数，表示每秒钟内一个酶分子或者酶活性中心能催化多少个底物发生反应。K_{cat}/K_m 表示酶的催化效率。如表 10 所示，测定了水

稻 HPPD 野生型（WT）和各种突变体的这些酶学参数。从表中数据可以看出，绝大多数突变体 HPPD 的催化效率都有所增强。

表 10 最大反应速率 V_{max} 及米氏常数 K_m 值测定

OsHPPD	K_{cat}	K_m	K_{cat}/K_m
WT	914	6.7	136
H141R/G342D/D370N	1596	10.9	146
H141R/G342D/G419F	3211	7.9	406
H141R/N338D/G342D	2730	6.3	433
H141R/G342D/K418P	2999	30.6	98
H141R/N338D/G342D/P386T	3018	9.7	311
N338D/G342D/R346C	980	9.5	103
N338D/G342D/R346H	941	6.3	149
H141R/N338D/G342D/R346C	1739	7.4	235
H141R/N338D/G342D/R346H	2151	7.6	283
H141R/N338D/G342D/K418P	2001	18.8	106
H141R/N338D/G342D/K418P/G419F/N420S	935	23	41
H141R/G342D/P277N	186	1.1	169
N338D/G342D	206	2.1	98
G342D/R346C	220	5.9	37
H141R/N338D/N420S	823	5.1	161

5、除草剂 101 和环吡氟草酮对 OsHPPD 蛋白抑制能力 IC50 测定

通过对双唑草酮代谢产物 101 和环吡氟草酮对水稻野生型（WT）和各种突变型 OsHPPD 蛋白的抑制作用测定，如图 10 和表 11 所示，各突变体对 101 和环吡氟草酮除草剂化合物的 IC50 值相对于野生型都有明显提高，例如，H141R/N338D/G342D/K418P/G419F/N420S 突变体对 101 除草剂化合物的 IC50 值相对于野生型提高至 13.7 倍，对环吡氟草酮的 IC50 值提高至 1.8 倍。IC50 值的增加表明这些突变体对 HPPD 除草剂的耐受性增加，因 101 和环吡氟草酮各自的独特性质等，其增加程度在这两种 HPPD 除草剂之间并非完全一致。

表 11. 抑制剂 101 和环吡氟草酮对野生型 WT、各突变型 OsHPPDIC50 值

OsHPPD	IC50			
	101 (uM)	倍数	环吡(uM)	倍数
WT	7.6	1.0	1.1	1.0
H141R/G342D/D370N	41	5.4	8.7	7.9
H141R/G342D/G419F	43	5.7	4.1	3.7
H141R/N338D/G342D	24	3.2	4.9	4.5
H141R/G342D/K418P	72	9.5	13	11.8
H141R/N338D/G342D/P386T	51	6.7	14	12.7
N338D/G342D/R346C	50	6.6	5.9	5.4
N338D/G342D/R346H	85	11.2	8.7	7.9
H141R/N338D/G342D/R346C	57	7.5	4.8	4.4
H141R/N338D/G342D/R346H	72	9.5	6.8	6.2
H141R/N338D/G342D/K418P	93	12.2	6.0	5.5
H141R/N338D/G342D/K418P/G419F/N420S	104	13.7	2.0	1.8
H141R/G342D/P277N	93	12.2	27.0	24.5
N338D/G342D	122	16.1	15.0	13.6

G342D/R346C	44	5.8	3.1	2.8
H141R/N338D/N420S	18	2.4	1.0	0.9

6、OsHPPD 蛋白对抑制剂适合度（Enzyme Fitness）测定

酶适合度（Enzyme Fitness）是酶对抑制剂适应性强弱的一个指标，值越大代表该酶对抑制剂抗性越强，由于反应时底物浓度远远大于 K_m 值，且不同 OsHPPD 突变体反应条件相同，所以 K_{cat} 可用相同浓度酶（500 nM）催化时的速率 V_{max} 值代替。Enzyme Fitness = $K_{cat} * K_m^{-1} * Ki$，$Ki=IC50/(1+S/K_m)$（抑制常数）。我们测试了除草剂化合物 101 和环吡氟草酮对水稻 HPPD 野生型（WT）和各种突变体的抑制常数和酶适合度，来进一步评估这些突变体对除草剂的耐受性。如表 12 所述结果表明，所有突变体的 Enzyme Fitness 与野生型相比都有不同程度的增强，确证其耐受性增强。

表 12. OsHPPD 对不同化合物的酶适合度（Enzyme Fitness）测定

OsHPPD	K_{cat}	K_m	K_{cat}/K_m	Ki		Enzyme Fitness	
				101	环吡氟草酮	101	环吡氟草酮
WT	914	6.7	136	0.25	0.036	34	4.9
H141R/G342D/D370N	1596	10.9	146	2.12	0.450	310	66
H141R/G342D/G419F	3211	7.9	406	1.63	0.156	664	63
H141R/N338D/G342D	2730	6.3	433	0.73	0.150	318	65
H141R/G342D/K418P	2999	30.6	98	9.55	1.725	936	169
H141R/N338D/G342D/P386T	3018	9.7	311	2.36	0.648	734	201
N338D/G342D/R346C	980	9.5	103	2.27	0.268	234	28
N338D/G342D/R346H	941	6.3	149	2.60	0.266	388	40
H141R/N338D/G342D/R346C	1739	7.4	235	2.03	0.171	478	40
H141R/N338D/G342D/R346H	2151	7.6	283	2.64	0.249	746	70
H141R/N338D/G342D/K418P	2001	18.8	106	7.99	0.516	851	55
H141R/N338D/G342D/K418P/G419F/N420S	935	23	41	10.73	0.206	436	8.4
H141R/G342D/P277N	186	1.1	169	0.25	0.036	86.0	25.0
N338D/G342D	206	2.1	98	0.51	0.148	124.4	15.3
G342D/R346C	220	5.9	37	1.27	0.156	47.0	3.3
H141R/N338D/N420S	823	5.1	161	1.26	0.089	72.2	4.0

综上所述，通过一系列酶学测试证明，水稻 OsHPPD 各突变体耐药性相对野生型 WT 均有提高。其中，在颜色反应中显示出最强抗性的四突变体 H141R/N338D/G342D/K418P，在体外酶活实验中也有较高的抗性，且结果显示带有 K418P 位点突变的突变体，抗性提高都比较好，但是底物亲和性（K_m）有所降低；而突变体 H141R/G342D/P277N 与 H141R/N338D/G342D/K418P 抗性相当，并且没有底物亲和性（K_m）变低的问题；另外，三突变体 H141R/N338D/G342D 和四突变体 H141R/N338D/G342D/P386T 也具有较强抗性，且 K_m 没有降低；最短三突变体 N338D/G342D/R346H，同样具有较好抗性，且易于编辑。

因此，优先考虑 N338D/G342D/R346H（最短，适合同源置换 HDR）、H141R/N338D/G342D（较短，也适合做同源置换）以及 H141R/N338D/N420S（适合单碱基编辑，抗性较强）进行下一步试验，做转基因和基因编辑植物后，再测试去耐受性变化。

实施例 8. 转基因水稻过表达三点突变体 OsHPPD3M

1、过表达载体的构建

1）引物：根据选取的酶切位点以及基因本身的核苷酸序列，设计引物用于扩增三点突变型 HPPD（H141R/G342D/D370N）（OsHPPD3M）。设计的引物由北京擎科新业生物技术有限公司合成：HPPD –F，GATAGCCGGTACGGGTTCGAGCCACC ATGCCTCCCACT CCCACCC，HPPD –R，GATCTTTGTAATCGGGGTACCTAGGATCCTTGAACTGTAGGGGC。

2）PCR 扩增：利用合成的引物和 Q5 DNA 聚合酶（NEB, New England Biolabs, Boston, USA）扩增目的基因。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测，按照 TIANquick Midi Purification kit 操作说明，回收产物。回收完成后，用 Nanodrop 检测提取的 DNA 浓度。

3）水稻过表达载体构建：将经 KpnI 和 HindIII 酶切后回收的 HPPD 片段和质粒 pCAMBIA1301，采用汉恒生物科技（上海）有限公司的 HB-in fusion™ 无缝克隆试剂盒构建水稻过表达载体 pCAMBIA1301-OsHPPD3M。经转化到感受态的 *E. coli* DH5α，得到阳性克隆，再经测序验证和限制性内切酶酶切验证后，转化农杆菌。

2、水稻愈伤的农杆菌转化和转基因事件产生：

1）水稻过表达载体 pCAMBIA1301-OsHPPD3M 以及空载只表达 mCherry（荧光蛋白标记基因）的 pCAMBIA1301，各 1ug 加入到农杆菌 EH105 感受态中，放在冰上 5 分钟，浸入液态氮中速冻 5 分钟，捞出放在 37℃下 5 分钟，最后放置在冰上 5 分钟。加入 500μl YEB 液体培养基(无抗生素)，置于 28℃、200 转/分摇床中培养 2~3h；用 3500 转/分离心收集菌体，将收集的菌体涂布于 YEB（卡拉霉素+利福平）平板上，28℃培养箱培养 2 天；挑取单克隆至液体培养基培养，-80℃保菌。

2）农杆菌的培养：挑取转化后的农杆菌单克隆，YEB 液体培养基（卡拉霉素+利福平）中 28℃振荡培养至 OD600 为 0.5，3500 转/分收集菌落，等量 AAM（1ml AAM+1μl 1000×AS）液体培养基稀释后侵染愈伤组织。

3）诱导水稻中花 11 愈伤组织：在准备农杆菌之前，先要准备水稻愈伤。剥取水稻种子，无菌水清洗种子，直至洗后的水变清澈，不限次数，70%酒精消毒 30 秒，之后 5%次氯酸钠置于水平摇床摇晃培养 20 分，次氯酸钠消毒后无菌水清洗 5 次，置于无菌吸水纸，风干种子表面水分，接种于诱导培养基上在 28℃下培养愈伤。

4）农杆菌侵染水稻愈伤：选取继代培养 10 天，直径为 3mm 的淮稻 5 号愈伤组织，将愈伤组织收集至 50ml 的离心管中；将已调制浓度的农杆菌菌液倒入含有愈伤组织的离心管中，置于 28℃、200 转/分摇床中侵染 20 分；侵染完毕，倒掉菌液，将愈伤组织放置于无菌滤纸上风干 20min 左右，置于共同培养基平板上共同培养，平板上铺有一张 AAM（1ml AAM+30μl

1000×AS）液体培养基浸湿的无菌滤纸；侵染 3 天后，清洗去除农杆菌（先用无菌水洗 5 遍，再用 500mg/L 的头孢抗生素清洗 20 分钟），置于 50mg/L 潮霉素筛选培养基上筛选培养。

5）抗性愈伤的筛选、分化和生根：将共培养后的愈伤组织移至筛选培养基进行第一轮筛选（2 周）；第一轮筛选完毕后将新长出的愈伤移至筛选培养基（含 50mg/L 潮霉素）进行第二轮筛选（2 周）；筛选完成后，挑取生长状态良好的黄白色愈伤组织进行分化，分化培养基中添加 1 uM-5 uM 的环磺酮进行除草剂抗性筛选，3~4 周后可以获得 1cm 左右的幼苗；将分化出的幼苗移至生根培养基进行生根培养；将生根完成的幼苗进行炼苗处理后，移至装有土壤的花盆中置温室进行培养；获得 OsHPPD3M 55 株幼苗或事件。

3、转基因苗（T0 代）除草剂抗性初步检测：在分化培养基中添加 1-5 uM 的环磺酮，结果显示空载体对照对环磺酮没有耐受性，过表达 3 点突变 HPPD（H141R/G342D/D370N）的转化苗可以耐受 3 uM 的环磺酮，如图 11 所示。

4、转基因苗（T0 代）除草剂抗性再次检测：T0 代转基因苗移栽到温室的大的塑料桶里培育以求得到 T1 代种子。在拔节期从过表达突变型的事件中，随机各选出 2 个事件，加一组非转基因的中花 11 相同生育期的稻苗，进行除草剂抗性测定。所用除草剂是双唑草酮，其田间剂量通常是每亩 4 克有效成分（4 g，a.i./mu）。本次实验双唑草酮的剂量是 8 和 16 克/亩。

抗性检测结果：喷施后第 5 天（16 克/亩）、7 天（8 克/亩）时，非转基因水稻苗开始显现白化症状，但转基因的过表达突变型的 Event 1、Event 2、Event 3 和 Event 4 都保持正常绿色。直到 32 天后，喷过药的非转基因苗接近死亡，但转基因过表达突变型的，不论 8 克/亩，还是 16 克/亩处理，都继续保持绿色，生长也正常，并开始抽穗（如图 12A、12B 所示）。

5、转基因苗（T1 代）除草剂抗性再次检测：

a）转基因过表达突变型 HPPD 的三个事件 Event 20、Event 28、Event 37，加上非转基因野生型的淮稻 5 号（淮稻 5 号对 HPPD 双唑草酮的天然耐受性高于中花 11，因此不能以淮稻 5 号做基数计算抗性倍数，实际抗性应该更高）。

b）所用双唑草酮的剂量为 0、4、8、16、32 到 64 克/亩，由于冬季温室的温度较低，光照弱，药害症状显现慢。到喷药后第 14 天，在 32 和 64 克/亩处理下的非转基因淮稻 5 号显现症状，但转基因的事件都没有症状，仍为绿色（如图 12C、12D 所示）。

综上，过表达三点突变型 OsHPPD3M（H141R/G342D/D370N）都增强了转基因水稻对 HPPD 抑制性除草剂的抗性，抗性倍数至少是 4 倍。从 T0 代和 T1 代的转基因苗生长发育、开花结实的初步观察，大部分事件植株都很正常。

实施例 9 转基因水稻过表达 HPPD 拷贝数测定

潮霉素抗性基因：水稻 *hppd*（*Oshppd*）基因的 GC 含量很高，影响 PCR 扩增效率，另外

水稻内源也有一个拷贝的 *hppd*。因此，我们选择筛选标记基因潮霉素抗性基因 *hyg* 作为外源基因，蔗糖磷酸合成酶基因（sucrose phosphate synthase, *SPS*）作为内源参照基因进行拷贝数估算。蔗糖磷酸合成酶(SPS)基因是水稻特有的基因，并且为单拷贝，可以作为水稻的内源参照基因（Ding Jiayu， Jia Junwei, Yang Li tao et al. Validation of a rice specific gene, sucrose phosphate synthase, used as the endogenous reference gene for qualitative and real-time quantitative PCR detection of transgenes[J] .J. Agric. Food Chem., 2004, 52: 3372-7）。可以通过测定转基因水稻筛选标记的潮霉素基因（*hyg*）的拷贝数来间接评估过表达 *hppd* 的拷贝数。

基因组 DNA：利用天根生化科技（北京）公司的植物基因组 DNA 提取试剂盒，对水稻叶片基因组 DNA 进行提取和纯化，利用纳米滴核酸蛋白测定仪（nanodrop）对 DNA 的含量和纯度进行检测，当 OD260/OD280 的比值在 1.8-2.0 范围内，OD260/OD230 的比值在 2.0 左右时认为纯度较好。

引物：设计两对引物：Hyg-F：5'-GTACACAAATCGCCCGCAG-3'，Hyg-R: 5'-TCTATTTCTTTGCCCTCGGAC-3'，扩增潮霉素抗性基因 111bp 长的片段；Sps-F: 5'-GTACACAAATCGCCCGCAG-3'，Sps-R: 5'- TCTATTTCTTTGCCCTCGGAC-3'，扩增蔗糖磷酸合成酶(SPS)基因 170bp 的片段。

定量 PCR 反应体系：按 SYBR Premix ExTaq II 体系配制反应液（20μL），进行实时荧光定量 PCR。PCR 扩增程序：预变性 95℃/30S，再经 95℃/5S→55℃/30S→72℃/30S，40 个循环。

标准曲线的制作：分别选取 *SPS* 基因和 *HYG* 基因的 400bp 的序列，所选取的序列需包含定量 PCR 扩增的片段，并通过同源重组的方式将其连接在一起，然后将其连接进入 pClone007 载体内。将构建好的含有 *HYG* 基因和 *SPS* 基因的标准品质粒用限制性内切酶 Psha Ⅰ酶切为线性化 DNA，用核酸蛋白检测仪测定浓度，用 ddH_2O 梯度稀释为 10^6 拷贝/μL、10^5 拷贝/μL、10^4 拷贝/μL、10^3 拷贝/μL、10^2 拷贝/μL。将 5 个不同稀释度的标准品与空白对照同时进行扩增，每个样品设置三个技术重复。然后按照上述方法进行 PCR 扩增。浓度与拷贝数换算公式：拷贝数（拷贝/mL）= (6.02×1023 拷贝/mol)×(DNA 浓度 g/ml)/(MW g/mol)。平均分子量(MW g/mol)：dsDNA=(碱基数)×(660 dalton/bp)。

转基因拷贝数的计算：每一个被检测样本在达到阈值时都有一个循环数 Ct，将 Ct 值代入标准曲线中得到该样本的起始模板量，目的基因与内源基因起始模板量的比值即是目的基因的拷贝数。实验所得数据经过软件输出后采用 Excel 进行数据分析。

实时荧光定量 PCR：采用 qRT-PCR 方法，对转基因水稻相关基因表达量进行分析，验证基因过表达的效率。选用水稻的 *UBQ5* 基因作为内参基因。按配制反应液，进行实时荧光定

量 PCR。按 SYBR Premix ExTaq II 体系配制反应液（20μL）。qRT-PCR 扩增程序设定为：95℃预变性，30 s；95℃变性，5 s；60℃退火，30 s；65℃延伸 5min，共进行 40 次循环。实验所得数据经过软件输出后采用 Excel 进行数据分析，运用△△CT 对基因的相对表达量进行计算。所有样品均设置 3 次独立生物学重复。

在本实验中，选取 54 株 PCR 检测为阳性的植株和 4 株非转基因对照植株，利用植物基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA，每个样品做 3 个重复，进行定量 PCR 反应，获得扩增曲线，荧光域值的设定与制作基因标准曲线时相同，获得待测样品的 Ct 值，并由方程：$HYG_0=10^{(-0.260CT+10.442)}$ 计算出该样品 *HYG* 基因的起始模板数，由方程：$SPS_0=10^{(-0.260CT+10.172)}$ 计算出该样品 *Sps* 基因的起始模板数。由于水稻内参基因 *Sps* 是纯合二倍体，而转基因当代的外源目的基因是纯合体的几率极小，因此 HYG 起始模板数除以 SPS 起始模板数所获得的数据，乘以 2 就是目的基因在水稻基因组中的拷贝数。通过目的基因 *Hyg* 和水稻内源参照基因 *Sps* 起始模板数的比较，由表 13 结果显示：在 54 株转基因株系中，有 36 株拷贝数为 1，有 13 株拷贝数为 2，拷贝数为 3 的有 4 株，拷贝数为 4 的有 1 株，而所检测阴性对照拷贝数为 0。

表13 转基因植株目的基因拷贝数的估算

株系	SPS_0	HYG_0	$2\times HYG_0/SPS_0$	目的基因拷贝数
中花 11	314808.9	13585.07	0.086	0
WT-4	794343.5	5099.921	0.013	0
WT-7	82126.33	4772.3	0.116	0
WT-8	107315	3540.487	0.066	0
2-1	86158.95	70975.65	1.648	2
2-2	116048.5	97043.28	1.672	2
2-3	98298.14	52089.59	1.060	1
2-4	95761.67	48540.84	1.014	1
2-5	99197.34	49539.5	0.999	1
2-6	114053.7	180145.4	3.159	3
2-8	126539	105285.7	1.664	2
2-9	98094.43	98837.9	2.015	2
2-10	87087.68	116834.4	2.683	3
2-11	92351.87	144727.1	3.134	3
2-12	78140.72	83886.76	2.147	2
2-13	158780.3	113069.3	1.424	1
2-14	192380.3	58948.64	0.613	1
2-15	238932	74397.84	0.623	1
2-16	161045.9	85497.1	1.062	1
2-17	35298.61	17620.82	0.998	1
2-18	213886.9	61843.61	0.578	1
2-19	176775.1	57200.14	0.647	1
2-20	621936.9	368999.1	1.187	1
2-21	594530.9	305098.9	1.026	1
2-22	224816.7	117195.8	1.043	1
2-23	77450.64	40664.82	1.050	1

2-24	269156.5	150371.3	1.117	1
2-25	208228.7	75186.45	0.722	1
2-26	169627	60077.38	0.708	1
2-27	56297.91	34315.9	1.219	1
2-28	653765.2	400797.1	1.226	1
2-29	80636.42	39719.64	0.985	1
2-30	82451.61	36849.85	0.894	1
2-31	201228.8	71250.85	0.708	1
2-32	101126.2	45752.07	0.905	1
2-33	278596	162471.6	1.166	1
2-34	114698	91280.03	1.592	2
2-35	116576.8	52873.89	0.907	1
2-36	82680.12	37455.65	0.906	1
2-37	568452.8	344492.4	1.212	1
2-38	69154.81	85884.22	2.484	2
2-39	105306.9	87417.86	1.660	2
2-40	239703.1	371019.4	3.096	3
2-41	278420.5	545540.6	3.919	4
2-42	238414.5	124542.9	1.045	1
2-43	228641.5	127467.9	1.115	1
2-44	231265.5	119998.8	1.038	1
2-45	274609.7	136861.8	0.997	1
2-46	188432.1	99115.91	1.052	1
2-47	240136.8	197426.1	1.644	2
2-48	221332.8	230365.3	2.082	2
2-49	236717.4	131366	1.110	1
2-50	167319.1	77703.63	0.929	1
2-51	170851.6	197936.8	2.317	2
2-52	149266.1	132152.6	1.771	2
2-53	139016	135037	1.943	2
2-54	183699.9	77684.4	0.846	1
2-55	182604.6	98325.76	1.077	1

注：HYG_0 和 SPS_0 分别表示 *Hyg* 和 *Sps* 基因在 PCR 反应中的起始模板数。

实施例 10. 水稻基因编辑抗 HPPD 抑制性除草剂

在上述突变、筛选水稻 HPPD 基因，得到三点突变 141、342、370 及其组合，在离体测定中能耐受 HPPD 抑制性除草剂的基础上，先用转基因水稻过表达一个突变体组合 OsHPPD3M（H141R/G342D/D370N）确证其对 HPPD 抑制性除草剂的高耐受性，稍后又对 HPPD 开展了基因编辑以得到非转基因的耐受 HPPD 抑制性除草剂的水稻品种。首先针对氨基酸 141、342、370 三位点分别进行单碱基编辑和 141-342-370 三位点的同源置换，其基因编辑过程及结果如下：

（1）单碱基编辑是利用 CRISPR/Cas9 系统将脱氨酶靶向基因组中特定的位点从而对特定碱基进行修饰的基因编辑方法。此种方法已经在水稻中成功运用。如：Yan F., Kuang Y., Ren B., Wang J., Zhang D., Lin H., Yang B., Zhou X., and Zhou H. (2018). High-efficient A·T to G·C base editing by Cas9n-guided tRNA adenosine deaminase in rice. Mol. Plant. doi:

10.1016/j.molp.2018.02.008。

在本实施例中，对水稻 HPPD 基因位于第二染色体 Os02g0168100 位点中第 141、342 和 370 位的氨基酸分别进行编辑。水稻对 HPPD 基因 141 位氨基酸残基的组氨酸（Histidine；密码子 CAC）通过单碱基编辑的方法编辑为精氨酸（Arginine；密码子 CGC，将原来的 A 变为 G）。同样地，将第 342 位氨基酸残基的甘氨酸（Glycine；密码子 GGC）编辑为天冬氨酸（Aspartic acid；密码子 GAC，将原来的 G 变为 A）；将第 370 位氨基酸残基天冬氨酸（Aspartic acid；密码子 GAC）编辑为天冬酰胺（Asparagine；密码子 AAC，将原来的 G 变为 A）。选择具有更广泛 PAM 的 Cas9 蛋白的突变型蛋白 xCas9（3.7）-ABE 作为编辑工具（Hu, J.H. et al. Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. Nature http://dx.doi.org/10.1038/nature26155 (2018) ）。

根据水稻 HPPD 基因第 141 位氨基酸附近的 DNA 序列，设计了 sgRNA 的靶位点：GGTGCaCGCCGTGGCGCTGC-GCG, 其中 a 为 ABE 的作用位点，以实现 A 碱基至 G 碱基的编辑。此 sgRNA 的 PAM 为 GCG 符合 xCas9 (3.7)的要求。

同理，根据水稻 *HPPD* 基因第 342 位氨基酸附近的 DNA 序列，设计了 sgRNA 的靶位点：GCACGcCGTCGTAGTAGTTG GGC, 其中 c 为 CBE 的作用位点，以实现 C 碱基至 T 碱基的编辑。此 sgRNA 的 PAM 为 GGC 符合 xCas9 (3.7)的要求。

分析水稻 *HPPD* 基因第 370 位氨基酸附近的的 DNA 序列，设计了 sgRNA 的靶位点：CCTGGTcATCCCTGTCCACG AGC, 其中 c 为 CBE 的作用位点，以实现 C 碱基至 T 碱基的编辑。此 sgRNA 的 PAM 为 GGC 也符合 xCas9 (3.7)的要求。

因此，我们合成三对引物 141GE-F: ggcgGTGCaCGCCGTGGCGCTGC 和 141GE-R：aaacGCAGCGCCACGGCGtGCAC；342GE-F：ggcgCACGcCGTCGTAGTAGTTG 和 342GE-R: aaacCAACTACTACGACGgCGTG; 370GE-F：ggcg CCTGGTcATCCCTGTCCACG 和 370GE-R: aaacCGTGGACAGGGATgACCAGG。以超纯水稀释至 10uM 后，等量混合后置于沸水浴中，待其自然冷却至室温后备用。将 1ug pQY000140 载体经过 BsaI 酶 37℃切割一小时，通过琼脂糖凝胶电泳检测后，回收目的片段，并通过紫外吸收法确定浓度。与煜火片段 1：10 混合，以 T4 DNA 连接酶（NEB，New England Biolabs, Boston, USA）于 16℃连接 2 小时。转化 Trans5a 感受态细胞(全式基因，北京)，置于 37℃培养过夜。挑取单克隆通过 sanger 测序单碱基编辑载体序列是否正确。构建载体 pQY000141 如图 13 所示。将测序正确的大肠杆菌克隆提取质粒，转化至 EH105 农杆菌（唯地生物，上海）。

按前述水稻愈伤农杆菌转化方法，对淮稻 5 号愈伤（至少 3000 愈伤）进行转化。农杆菌侵染后，将侵染后的愈伤转到 50mg/L hyg 筛选培养基上筛选培养。三轮（15 天 x3）筛选后，

挑取生长状态良好的黄白色愈伤组织在分化培养基上进行分化，在分化过程中加入 0.2uM 环磺酮进行筛选 3~4 周后获得 1cm 左右的幼苗约 1500 株。在这约 1500 株分化苗中，绝大多数已白化，只有 4 株任是正常绿色。将这 4 株绿色苗移植到含有 0.4uM 的环磺酮的生根培养基中继续培养 2 周，其中两株也白化，只有 2 株还保持绿色（图 14A）。取少量叶片以 CTAB 法提取基因组 DNA。以引物 oshppd54F：TTCCACCACGTCGAGCTC 和 Oshppd356R：GGTGAACCCGGAGATGTACG 进行 PCR。扩增产物以 1%琼脂糖电泳检测后，进行 sanger 测序。

测序结果表明，这 2 株绿色苗（QY000141-1 和 QY000141-2）在氨基酸 141 位点都有成功编辑（图 14B）而白化苗是野生型。

（2）CRISPR/cas9 介导的水稻 HPPD 突变体同源置换以获得除草剂抗性

在获得转基因事件过表达 3 点突变体 H141R/G342D/D370N 后，我们也对这 3 突变点组合进行同源置换，以期获得抗除草剂的非转基因水稻。

水稻 hppd 基因有两个外显子（exon），一个内含子（intron）。三个靶标位点 H141、G342 和 D370 都位于第一外显子。

gRNA 设计：在 H141 的上游和 D370 的下游至少各设计一个 gRNA，拟各切一刀，再用同源置换的方法把三个位点同时置换。把外显子 1 序列输入到 http://crispor.tefor.net/ 评估所有可能的 gRNA. 根据特异性分数值大于 90（Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, Li Y, Fine EJ, Wu X, Shalem O, Cradick TJ, Marraffini LA, Bao G, Zhang F. Nat Biotechnol. 2013 Sep;31(9):827-32. doi: 10.1038/nbt.2647. Epub 2013 Jul 21），尽量避免脱靶效应和缩短其长度等原则，选择了下列 2 个 gRNA：OshppdgRNA-PAM1-2: 5'-GGAACGCGAGCGCCTGGAAC CGG-3' (GC=70%) (bottom strand)；

OshppdgRNA-PAM2-1 (GC=39%): 5'-CACCTCTTTCATGATGAAAA TGG-3'(top strand)；

有下划线的为 PAM 序列，加粗表示的 **G** 是指设计置换模板 DNA 时，在置换模板上这个 **G** 将被变为其它碱基，以破坏这些 PAM，避免置换后又被重新切开。

这两个 gRNA1-2 和 gRNA2-1 在水稻基因组 DNA 上的分布如图 15 所示。

模板供体 DNA 设计如图 16 所示：根据赵云德实验室（Sun Y, Zhang X, Wu C, He Y, Ma Y, Hou H, Guo X, Du W, Zhao Y, Xia L.Engineering Herbicide-Resistant Rice Plants through CRISPR/Cas9-Mediated Homologous Recombination of Acetolactate Synthase. Mol Plant. 2016 Apr 4;9(4):628-31. doi: 10.1016/j.molp.2016.01.001. Epub 2016 Jan 6），我们先将同源臂设计在 350bp；为增加同源置换可能性，为每个编辑载体都设计了两个版本的模板供体：将模板直接

连在编辑载体上，这样 gRNA、Cas9 和模板同时进入同一细胞，一旦 Cas9 和 gRNA 把细胞基因组靶标 DNA 切割后，模板供体 DNA 能及时修复；另一版本是通过 PCR 扩增而产生的自由的模板供体 DNA，这些额外的修复模板，将以 20：1（自由修复模板：编辑载体，摩尔比）与编辑载体混合，再用基因枪轰击。三个突变氨基酸 141-342-370 的核心置换区域的长度是由两个选定的靶向 RNA 切割位置所确定（1056bp），左右同源臂各 350bp，再加上从载体上切割后在左右两端各留下 6bp，模板总长 1768bp；为便于 PCR 扩增后对其 PCR 产物进行快速基因型鉴定，去掉了其中的 NcoI 酶切位点；同时为避免置换后又被重新切割，模板上的原切割位点处的 PAM（NGG）也被去掉。

编辑载体：用水稻 U3 启动子分别表达 gRNA1-2 和 gRNA2-1。因此，将这两个 gRNA 表达框与模板连接在一起后送到金斯瑞生物科技公司（南京）合成。合成后 DNA 片段再用无缝克隆技术在 KpnI 处连接到骨架载体 pCXUN-Cas9（来自华中农业大学和玉兵博士, Mol Plant. 2016 Apr 4;9(4):628-31. doi: 10.1016/j.molp.2016.01.001. Epub 2016 Jan 6.）产生编辑载体。

基因枪转化、筛选、分化、生根和土培苗：上述构建的编辑载体经测序和多酶切验证后，与通过 PCR 扩增而产生的自由的模板供体 DNA，以 20：1（自由修复模板：编辑载体，摩尔比）与编辑载体混合，用基因枪转化淮稻 5 号愈伤。约 3000 愈伤被转化后，转到 50mg/L hyg 筛选培养基上筛选培养以期先得到转基因植株。三轮（15 天 x3）筛选后，挑取生长状态良好的黄白色愈伤组织在分化培养基上进行分化，在分化过程中加入 0.2uM 环磺酮进行筛选 3~4 周后获得 1cm 左右的幼苗约 1000 株。在这约 1000 株分化苗中，绝大多数已白化，但有 21 株还保持绿色。将这 21 株绿色苗转移到含 0.4uM 环磺酮的生根培养基中继续培养，促进根系生长。两周后，又有 19 株白化，将剩下的 2 株绿苗（编号 AW2 和 AW3）移栽到花盆中，置温室培养。移栽前拍摄的绿色苗如图 17A 所示。

编辑苗的 hppd 基因型鉴定：为鉴定其基因型，我们设计了三对 PCR 引物来分别扩增 342-370 突变位点区域、342-370 区域+部分下游基因组 DNA 序列和 141 单点。这些引物对是 290-F：AGATACAGACGTACCTGGACCACCA 与 1553-R：GCCGGCAAAAAGGAACTGGG（342-370 突变位点区域）、90-F：AGATACAGACGTACCTGGACCACCA 与 donor-out-R：AGTGATTGTACCATCATTTGTC（342-370 区域+部分下游基因组 DNA 序列），以及 54-F：TTCCACCACGTCGAGCTC 与 356-R：GGTGAACCCGGAGATGTACG（141 单点）。

鉴定结果显示：这 2 株绿苗确有成功编辑（图 17B）。PCR 产物用 NcoI 酶切后产生的条带符合预期；测序结果也显示在 141 点由野生型的组氨酸 His 变为精氨酸 Arg（密码子从 CAC 变为 CGC）、在 342 点由野生型的甘氨酸 Gly 变为天冬氨酸 Asp（密码子从 GGC 变为 GAC），在 370 点由野生型天冬氨酸 Asp 变为天冬酰胺 Asn（密码子从 GAC 变为 AAC）。

同时经过很多测试发现，将本发明所述基因导入拟南芥、二穗短柄草等模式植物中，都产生了相应水平的耐药性提升。另外，经 CRISPR/Cpf1 系统来编辑上述突变位点及组合也在应用中。由此可知，将其转基因或者基因编辑到其他前述的植物，如粮食作物、豆类作物、油料作物、纤维作物、水果类作物、根茎类作物、蔬菜类作物、花卉作物、药用作物、原料作物、牧草作物、糖料作物、饮料作物、草坪植物、树木作物、坚果作物等，也会产生相应的抗性性状，具有良好的产业价值。

说明书中提及的所有出版物和专利申请均通过引用并入本文，如同每篇出版物或专利申请被单独、特别地通过引用并入本文一样。

尽管为清楚理解起见，前述发明已通过举例说明和实施例的方式较为详细地进行了描述，但显而易见的是，可以在所附权利要求书的范围内实施某些改变和修改，这样的改变和修改均在本发明的范围之内。

权 利 要 求 书

1. 一种突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶（HPPD）蛋白或其生物活性片段，其中所述突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶（HPPD）蛋白的氨基酸序列与野生型水稻对羟苯基丙酮酸双氧化酶蛋白的氨基酸序列相比，在对应于 SEQ ID NO: 2 所示的野生型水稻对羟苯基丙酮酸双氧化酶蛋白氨基酸序列中的第 93、103、141、165、191、220、226、276、277、336、337、338、342、346、370、377、386、390、392、403、410、418、419、420、430 和 431 位中的一个或多个位置处具有选自下述中的一个或多个突变：93S、103S、141R、141K、141T、165V、191I、220K、226H、276W、277N、336D、337A、338D、338S、338Y、342D、346C、346D、346H、346S、346Y、370N、377C、386T、390I、392L、403G、410I、418P、419F、419L、419V、420S、420T、430G 和 431L。

2. 权利要求 1 所述的突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶（HPPD）蛋白或其生物活性片段，其中所述突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶蛋白的氨基酸序列进一步与 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%序列同一性的氨基酸序列。

3. 权利要求 1 所述的突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶（HPPD）蛋白或其生物活性片段，其中所述突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶蛋白具有 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列，区别在于具有权利要求 1 中所定义的一个或多个氨基酸突变。

4. 权利要求 1—3 中任一项所述的突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶（HPPD）蛋白或其生物活性片段，其中所述突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶蛋白的氨基酸序列在对应于 SEQ ID NO: 2 所示的野生型水稻对羟苯基丙酮酸双氧化酶蛋白氨基酸序列中的第 93、103、141、165、191、220、226、276、277、336、337、338、342、346、370、377、386、390、392、403、410、418、419、420、430 和 431 位中的一个或多个位置处具有选自下述中的一个或多个突变：R93S、A103S、H141R、H141K、H141T、A165V、V191I、R220K、G226H、L276W、P277N、P336D、P337A、N338D、N338S、N338Y、G342D、R346C、R346D、R346H、R346S、R346Y、D370N、I377C、P386T、L390I、M392L、E403G、K410I、K418P、G419F、G419L、G419V、N420S、N420T、E430G 和 Y431L。

5. 权利要求 4 所述的突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶（HPPD）蛋白或其生物活性片段，其中所述突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶蛋白具有 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 36、SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 44、SEQ ID NO: 46、SEQ ID NO: 48、SEQ ID NO: 50、SEQ ID NO: 52、SEQ ID NO: 54、SEQ ID NO: 56、SEQ

ID NO: 58、SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 62、SEQ ID NO: 64、SEQ ID NO: 66、SEQ ID NO: 68、SEQ ID NO: 70、SEQ ID NO: 72、SEQ ID NO: 74、SEQ ID NO: 76、SEQ ID NO: 78、SEQ ID NO: 80、SEQ ID NO: 82 或 SEQ ID NO: 84 所示的氨基酸序列。

6. 权利要求 4 所述的突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶（HPPD）蛋白或其生物活性片段，其中所述突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶蛋白的氨基酸序列具有如下氨基酸突变：H141R/G342D 、 H141R/D370N 、 G342D/D370N 、 H141R/N338D 、 H141R/G342D 、 N338D/G342D 、 K418P/G419F 、 G419F/N420S 、 G342D/R346C 、 G342D/R346H 、 H141R/N420S、G338D/K418P、P277N/N338D、L276W/P277N、H141R/G342D/D370N、H141R/N338D/N420S 、 H141R/N338S/N420S 、 P336D/N338D/G342D 、 P336D/N338S/G342D、P336D/N338Y/G342D、N338D/G342D/R346C、N338D/G342D/R346H、N338D/G342D/R346S 、 N338S/G342D/R346C 、 N338S/G342D/R346H 、 N338S/G342D/R346S 、 N338Y/G342D/R346C 、 N338Y/G342D/R346H 、 N338Y/G342D/R346S 、 P336D/G342D/R346C 、 P336D/G342D/R346H 、 P336D/G342D/R346S 、 P336D/N338D/R346C 、 P336D/N338D/R346H、P336D/N338D/R346S、P336D/N338S/R346C、P336D/N338S/R346H、P336D/N338S/R346S、P336D/N338Y/R346C、P336D/N338Y/R346H、P336D/N338Y/R346S、H141R/N338D/G342D、H141R/G342D/K418P、H141R/G342D/G419F、H141R/G342D/P386T、K418P/G419F/N420T 、 K418T/G419F/N420T 、 H141R/G342D/R346C 、 H141R/G342D/R346H、H141R/G342D/N420S、H141R/G342D/P277N、H141R/G342D/P336D、H141R/G342D/L276W 、 H141R/G342D/R346S 、 H141R/G342D/L390I 、 H141R/G342D/I377C 、 H141R/G342D/M392L 、 H141R/P337A/G342D 、 H141R/N338S/G342D 、 H141R/N338Y/G342D、P277N/N338D/G342D、P277N/G342D/R346C、P277N/N338D/N420S、N338D/G342D/K418P 、 H141R/N338D/G342D/K418P 、 H141R/N338D/G342D/G419F 、 H141R/N338D/G342D/P386T 、 H141R/N338D/G342D/R346C 、 H141R/N338D/G342D/R346H 、 H141R/G342D/K418P/G419F 、 H141R/G342D/L276W/P277N 、 P336D/N338D/G342D/R346C、P336D/N338D/G342D/R346H、P336D/N338D/G342D/R346S、P336D/N338S/G342D/R346C、P336D/N338S/G342D/R346H、P336D/N338S/G342D/R346S、P336D/N338Y/G342D/R346C、P336D/N338Y/G342D/R346H、P336D/N338Y/G342D/R346S、P277N/P336D/N338D/G342D 、 P277N/N338D/G342D/R346C 、 P277N/N338D/K418P/G419F 、 H141R/N338D/G342D/K418P/G419F、H141R/N338D/G342D/G419F/N420S、H141R/G336D/G342D/K418P/G419F/N420S、H141R/N338D/G342D/K418P/G419F/N420S、H141R/N338D/G342D/K418P/G419F/N420T、H141R/N338D/G342D/R346C/K418P/G419F/N420S、H141R/N338D/G342D/

R346H/K418P/G419F/N420S、H141R/P277N/N338D/G342D/K418P/G419F/N420S、H141R/P277N/P336D/N338D/G342D/K418P/G419F/N420S。

7. 权利要求 6 所述的突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶（HPPD）蛋白或其生物活性片段，其中所述突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶蛋白具有 SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 86、SEQ ID NO: 88、SEQ ID NO: 90、SEQ ID NO: 92、SEQ ID NO: 94、SEQ ID NO: 96、SEQ ID NO: 98、SEQ ID NO: 100、SEQ ID NO: 102、SEQ ID NO: 104、SEQ ID NO: 106、SEQ ID NO: 108、SEQ ID NO: 110、SEQ ID NO: 112、SEQ ID NO: 114、SEQ ID NO: 116、SEQ ID NO: 118、SEQ ID NO: 120、SEQ ID NO: 122、SEQ ID NO: 124、SEQ ID NO: 126、SEQ ID NO: 128、SEQ ID NO: 130、SEQ ID NO: 132、SEQ ID NO: 134、SEQ ID NO: 136、SEQ ID NO: 138、SEQ ID NO: 140、SEQ ID NO: 142、SEQ ID NO: 144、SEQ ID NO: 146、SEQ ID NO: 148、SEQ ID NO: 150、SEQ ID NO: 152、SEQ ID NO: 154、SEQ ID NO: 156、SEQ ID NO: 158、SEQ ID NO: 160、SEQ ID NO: 162、SEQ ID NO: 164、SEQ ID NO: 166、SEQ ID NO: 168、SEQ ID NO: 170、SEQ ID NO: 172、SEQ ID NO: 174、SEQ ID NO: 176、SEQ ID NO: 178、SEQ ID NO: 180、SEQ ID NO: 182、SEQ ID NO: 184、SEQ ID NO: 186、SEQ ID NO: 188、SEQ ID NO: 190、SEQ ID NO: 192、SEQ ID NO: 194、SEQ ID NO: 196、SEQ ID NO: 198、SEQ ID NO: 200、SEQ ID NO: 202、SEQ ID NO: 204、SEQ ID NO: 206、SEQ ID NO: 208、SEQ ID NO: 210、SEQ ID NO: 212、SEQ ID NO: 214、SEQ ID NO: 216、SEQ ID NO: 218、SEQ ID NO: 220、SEQ ID NO: 222、SEQ ID NO: 224、SEQ ID NO: 226、SEQ ID NO: 228、SEQ ID NO: 230、SEQ ID NO: 232、SEQ ID NO: 234、SEQ ID NO: 236、SEQ ID NO: 238、SEQ ID NO: 240、SEQ ID NO: 242、SEQ ID NO: 244、SEQ ID NO: 246、SEQ ID NO: 248、SEQ ID NO: 250、SEQ ID NO: 252、SEQ ID NO: 254、SEQ ID NO: 256、SEQ ID NO: 258 或 SEQ ID NO: 260 所示的氨基酸序列。

8. 一种融合蛋白，其中包含权利要求 1-7 中任一项所述的突变型 HPPD 蛋白或其生物活性片段，以及与之融合的其它组分，例如标签肽如 6×His，或者质体引导肽例如引导到叶绿体内的肽。

9. 一种分离的多核苷酸，其中包含编码权利要求 1-7 中任一项的突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶（HPPD）蛋白或其生物活性片段或者权利要求 8 中所述的融合蛋白的核酸序列或者其互补序列；所述的多核苷酸优选是 DNA、RNA 或者其杂合体；所述的多核苷酸优选是单链的或双链的。

10. 权利要求 9 所述的多核苷酸，其具有选自下述的核酸序列：

(1) 编码 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 36、SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 44、SEQ ID NO: 46、SEQ ID NO: 48、SEQ ID NO: 50、SEQ ID NO: 52、SEQ ID NO: 54、SEQ ID NO: 56、SEQ ID NO: 58、SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 62、SEQ ID NO: 64、SEQ ID NO: 66、SEQ ID NO: 68、SEQ ID NO: 70、SEQ ID NO: 72、SEQ ID NO: 74、SEQ ID NO: 76、SEQ ID NO: 78、SEQ ID NO: 80、SEQ ID NO: 82、SEQ ID NO: 84、SEQ ID NO: 86、SEQ ID NO: 88、SEQ ID NO: 90、SEQ ID NO: 92、SEQ ID NO: 94、SEQ ID NO: 96、SEQ ID NO: 98、SEQ ID NO: 100、SEQ ID NO: 102、SEQ ID NO: 104、SEQ ID NO: 106、SEQ ID NO: 108、SEQ ID NO: 110、SEQ ID NO: 112、SEQ ID NO: 114、SEQ ID NO: 116、SEQ ID NO: 118、SEQ ID NO: 120、SEQ ID NO: 122、SEQ ID NO: 124、SEQ ID NO: 126、SEQ ID NO: 128、SEQ ID NO: 130、SEQ ID NO: 132、SEQ ID NO: 134、SEQ ID NO: 136、SEQ ID NO: 138、SEQ ID NO: 140、SEQ ID NO: 142、SEQ ID NO: 144、SEQ ID NO: 146、SEQ ID NO: 148、SEQ ID NO: 150、SEQ ID NO: 152、SEQ ID NO: 154、SEQ ID NO: 156、SEQ ID NO: 158、SEQ ID NO: 160、SEQ ID NO: 162、SEQ ID NO: 164、SEQ ID NO: 166、SEQ ID NO: 168、SEQ ID NO: 170、SEQ ID NO: 172、SEQ ID NO: 174、SEQ ID NO: 176、SEQ ID NO: 178、SEQ ID NO: 180、SEQ ID NO: 182、SEQ ID NO: 184、SEQ ID NO: 186、SEQ ID NO: 188、SEQ ID NO: 190、SEQ ID NO: 192、SEQ ID NO: 194、SEQ ID NO: 196、SEQ ID NO: 198、SEQ ID NO: 200、SEQ ID NO: 202、SEQ ID NO: 204、SEQ ID NO: 206、SEQ ID NO: 208、SEQ ID NO: 210、SEQ ID NO: 212、SEQ ID NO: 214、SEQ ID NO: 216、SEQ ID NO: 218、SEQ ID NO: 220、SEQ ID NO: 222、SEQ ID NO: 224、SEQ ID NO: 226、SEQ ID NO: 228、SEQ ID NO: 230、SEQ ID NO: 232、SEQ ID NO: 234、SEQ ID NO: 236、SEQ ID NO: 238、SEQ ID NO: 240、SEQ ID NO: 242、SEQ ID NO: 244、SEQ ID NO: 246、SEQ ID NO: 248、SEQ ID NO: 250、SEQ ID NO: 252、SEQ ID NO: 254、SEQ ID NO: 256、SEQ ID NO: 258 或 SEQ ID NO: 260 所示氨基酸序列的核酸序列或其互补序列；

(2) SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 43、SEQ ID NO: 45、SEQ ID NO: 47、SEQ ID NO: 49、SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 53、SEQ

ID NO: 55、SEQ ID NO: 57、SEQ ID NO: 59、SEQ ID NO: 61、SEQ ID NO: 63、SEQ ID NO: 65、SEQ ID NO: 67、SEQ ID NO: 69、SEQ ID NO: 71、SEQ ID NO: 73、SEQ ID NO: 75、SEQ ID NO: 77、SEQ ID NO: 79、SEQ ID NO: 81、SEQ ID NO: 83、SEQ ID NO: 85、SEQ ID NO: 87、SEQ ID NO: 89、SEQ ID NO: 91、SEQ ID NO: 93、SEQ ID NO: 95、SEQ ID NO: 97、SEQ ID NO: 99、SEQ ID NO: 101、SEQ ID NO: 103、SEQ ID NO: 105、SEQ ID NO: 107、SEQ ID NO: 109、SEQ ID NO: 111、SEQ ID NO: 113、SEQ ID NO: 115、SEQ ID NO: 117、SEQ ID NO: 119、SEQ ID NO: 121、SEQ ID NO: 123、SEQ ID NO: 125、SEQ ID NO: 127、SEQ ID NO: 129、SEQ ID NO: 131、SEQ ID NO: 133、SEQ ID NO: 135、SEQ ID NO: 137、SEQ ID NO: 139、SEQ ID NO: 141、SEQ ID NO: 143、SEQ ID NO: 145、SEQ ID NO: 147、SEQ ID NO: 149、SEQ ID NO: 151、SEQ ID NO: 153、SEQ ID NO: 155、SEQ ID NO: 157、SEQ ID NO: 159、SEQ ID NO: 161、SEQ ID NO: 163、SEQ ID NO: 165、SEQ ID NO: 167、SEQ ID NO: 169、SEQ ID NO: 171、SEQ ID NO: 173、SEQ ID NO: 175、SEQ ID NO: 177、SEQ ID NO: 179、SEQ ID NO: 181、SEQ ID NO: 183、SEQ ID NO: 185、SEQ ID NO: 187、SEQ ID NO: 189、SEQ ID NO: 191、SEQ ID NO: 193、SEQ ID NO: 195、SEQ ID NO: 197、SEQ ID NO: 199、SEQ ID NO: 201、SEQ ID NO: 203、SEQ ID NO: 205、SEQ ID NO: 207、SEQ ID NO: 209、SEQ ID NO: 211、SEQ ID NO: 213、SEQ ID NO: 215、SEQ ID NO: 217、SEQ ID NO: 219、SEQ ID NO: 221、SEQ ID NO: 223、SEQ ID NO: 225、SEQ ID NO: 227、SEQ ID NO: 229、SEQ ID NO: 231、SEQ ID NO: 233、SEQ ID NO: 235、SEQ ID NO: 237、SEQ ID NO: 239、SEQ ID NO: 241、SEQ ID NO: 243、SEQ ID NO: 245、SEQ ID NO: 247、SEQ ID NO: 249、SEQ ID NO: 251、SEQ ID NO: 253、SEQ ID NO: 255、SEQ ID NO: 257 或 SEQ ID NO: 259 所示的核酸序列或其互补序列；

(3) 在严谨条件下与(1)或(2)所示序列杂交的核酸序列；和

(4) 因遗传密码的简并性而与(1)或(2)所示序列编码相同氨基酸序列的核酸序列，或其互补序列。

11. 权利要求 10 所述的多核苷酸，所述核酸序列被优化用于在植物细胞中表达。

12. 一种核酸构建体，其中包含权利要求 9-11 中任一项所述的多核苷酸以及与之可操作连接的调控元件。

13. 一种表达载体，其中包含有权利要求 9-11 中任一项所述的多核苷酸以及与之可操作连接的表达调控元件。

14. 一种宿主细胞，其中包含有权利要求 9-11 中任一项所述的多核苷酸、权利要求 12 所述的核酸构建体或权利要求 13 所述的表达载体，优选地，所述的宿主细胞是植物

细胞。

15. 一种生产对于除草剂的抗性或耐受性提高的植物的方法，其中包括将权利要求14所述的植物细胞再生成植物。

16. 通过权利要求15所述的方法所生产的植物。

17. 一种提高植物细胞、植物组织、植物部分或植物的HPPD抑制性除草剂抗性或耐受性的方法，其中包括在所述植物细胞、植物组织、植物部分或植物中表达权利要求1-7中任一项所述的突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶（HPPD）蛋白或其生物活性片段或者权利要求8中所述的融合蛋白；

或者，其中包括将表达权利要求1-7中任一项所述的突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶（HPPD）蛋白或其生物活性片段或者权利要求8所述的融合蛋白的植物与另一植物杂交，以及筛选具有提高的HPPD抑制性除草剂抗性或耐受性的植物或其部分；

或者，其中包括对所述植物细胞、植物组织、植物部分或植物的内源性HPPD蛋白进行基因编辑，以实现在其中表达权利要求1-7中任一项所述的突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶蛋白或其生物活性片段或者权利要求8所述的融合蛋白。

18. 权利要求1-7中任一项所述的突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶（HPPD）蛋白或其生物活性片段、权利要求8中所述的融合蛋白或者权利要求9-11中任一项所述的多核苷酸用于提高宿主细胞或者植物细胞、植物组织、植物部分或植物对HPPD抑制性除草剂的抗性或耐受性的用途，优选地，所述宿主细胞是细菌细胞或真菌细胞。

19. 一种控制植物栽培场所的杂草的方法，其中所述植物包括权利要求16所述的植物或者通过权利要求15和17中任一项的方法制备的植物，所述方法包括对所述栽培场所施用控制杂草有效量的一种或多种HPPD抑制性除草剂；优选地，所述HPPD抑制性除草剂包含以下有效成分中的至少一种：1）三酮类：磺草酮、硝磺草酮、氟吡草酮、环磺酮、呋喃磺草酮、双环磺草酮；2）二酮腈类：2-氰基-3-环丙基-1-(2-甲基磺酰基-4-三氟甲基苯基)丙-1,3-二酮、2-氰基-3-环丙基-1-（2-甲基磺酰基-3,4-二氯苯基）丙-1,3-二酮、2-氰基-1-[4-(甲基磺酰基)2-三氟甲基苯基]-3-(1-甲基环丙基)丙 1,3-二酮；3）异噁唑类：异噁氟草、异噁氯草酮、异恶草酮；4）吡唑类：苯唑草酮、磺酰草吡唑、苄草唑、吡唑特、吡草酮、双唑草酮、Tolpyralate、苯唑氟草酮、环吡氟草酮、三唑磺草酮；5）二苯酮类；6）其他类：lancotrione、fenquinotrione；更优选地，所述HPPD抑制性除草剂包含以下有效成分中的至少一种：环磺酮、苯唑氟草酮、环吡氟草酮、苯唑草酮、硝磺草酮、双唑草酮。

20. 权利要求16所述的植物、权利要求17和19中任一项所述的方法或者权利要求

18 所述的用途，其中所述植物是双子叶植物或单子叶植物，例如粮食作物、豆类作物、油料作物、纤维作物、水果类作物、根茎类作物、蔬菜类作物、花卉作物、药用作物、原料作物、牧草作物、糖料作物、饮料作物、草坪植物、树木作物、坚果作物等。

21. 一种制备保留或加强了催化对羟基苯基丙酮酸（HPP）转化为尿黑酸的性质、且对 HPPD 抑制型除草剂的敏感性明显低于野生型 HPPD 的突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶（HPPD）蛋白的方法，其中包括对编码野生型 HPPD 的核酸进行突变，将突变核酸在表达载体中与编码提高溶解度的组分的核酸序列读框一致地融合和连接形成融合蛋白编码序列，将所获得的重组表达载体转化到宿主细胞中，在含有所述 HPPD 抑制型除草剂和 HPPD 酶促底物的合适的条件下表达所述融合蛋白以及筛选保留或加强了催化对羟基苯基丙酮酸（HPP）转化为尿黑酸的性质、且对 HPPD 抑制型除草剂的敏感性明显降低的突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶（HPPD）蛋白的步骤；所述提高溶解度的组分优选 NusA，其与本发明的突变型 HPPD 蛋白构成融合蛋白；所述表达载体优选 pET-44a 载体；所述宿主细胞优选细菌细胞、真菌细胞或植物细胞。

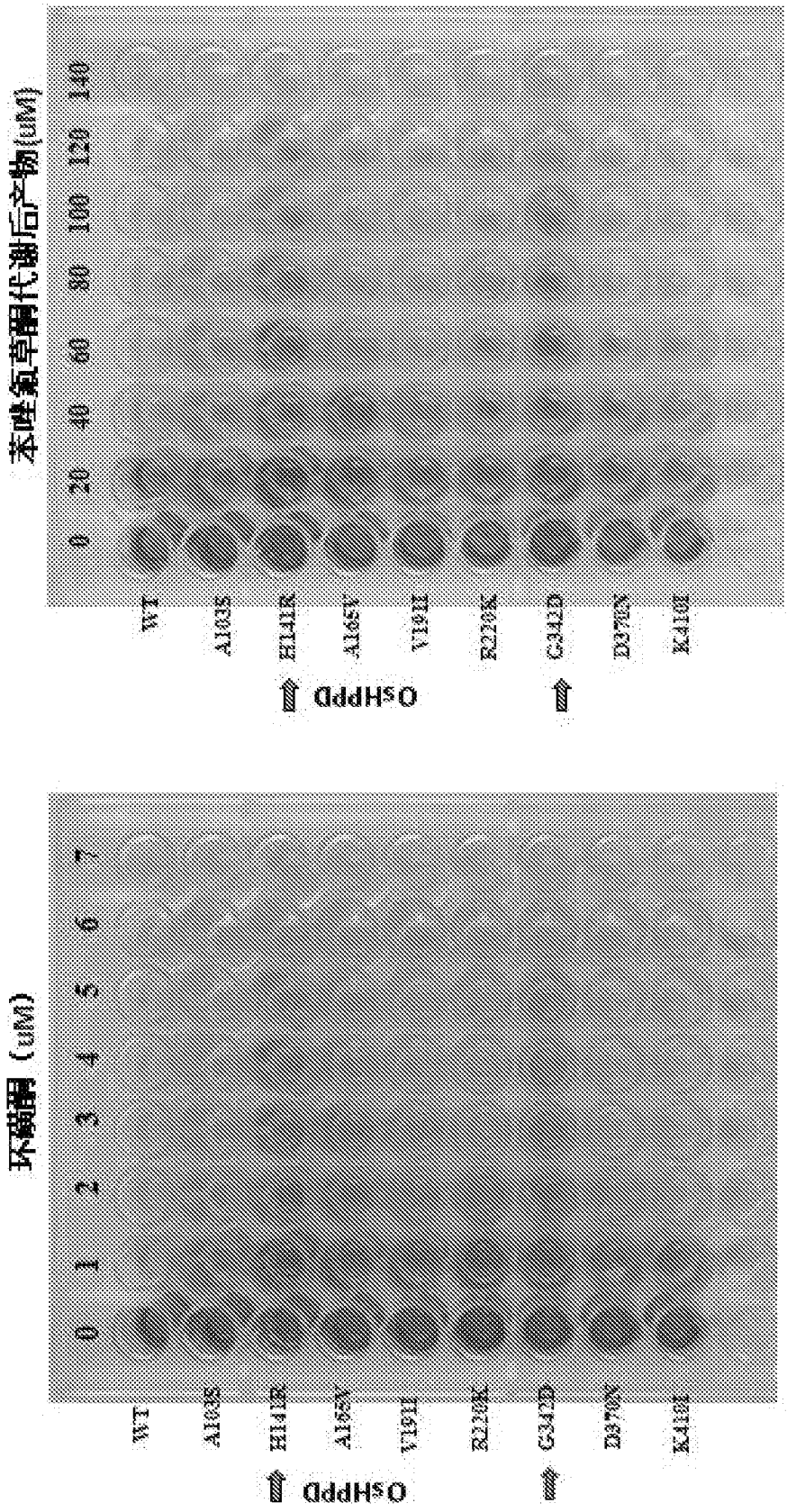

苯唑氟草酮代谢后产物(uM)
0 20 40 60 80 100 120 140
WT
A103S
H141R
A165V
V191I
R220K
G342D
D376N
K416I
OsHPPD
环磺酮（uM）
0 1 2 3 4 5 6 7
WT
A103S
H141R
A165V
V191I
R220K
G342D
D376N
K416I
OsHPPD

图 1

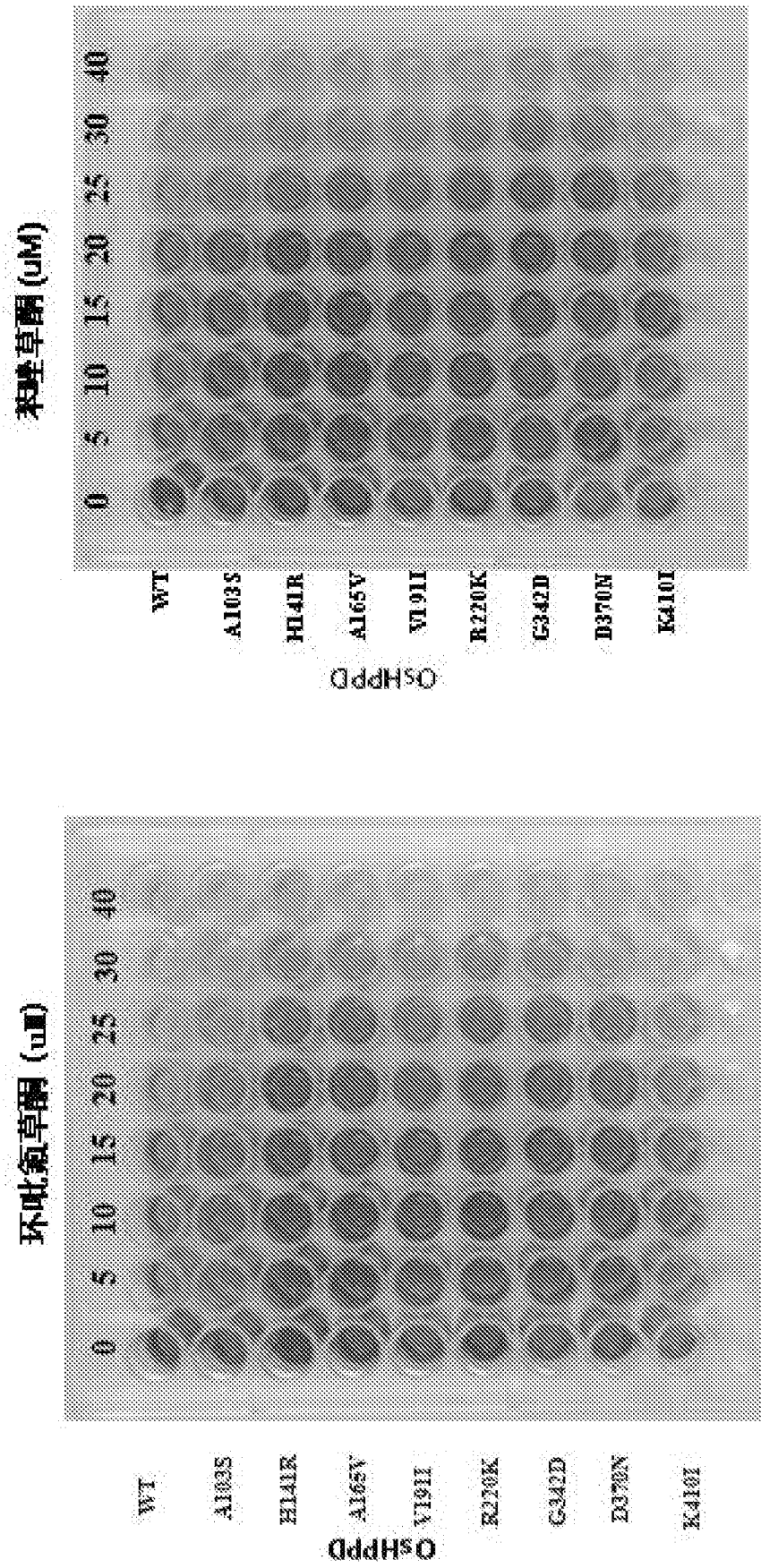

环吡氟草酮 (uM)
0 5 10 15 20 25 30 40
OsHPPD
WT
A103S
H141R
A165V
V191I
R220K
G342D
D370N
K410I

图 2

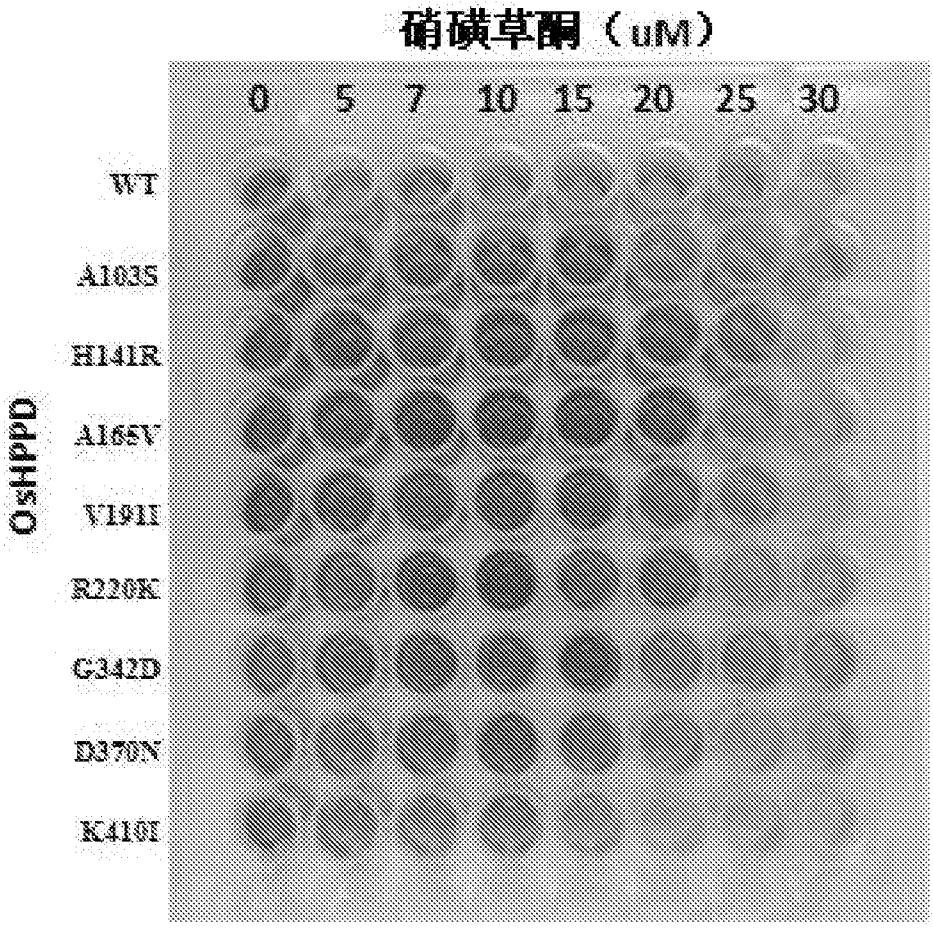

硝磺草酮（uM）
0
5
7
10
15
20
25
30
OsHPPD
WT
A103S
H141R
A165V
V191I
R220K
G342D
D370N
K410I

图 3

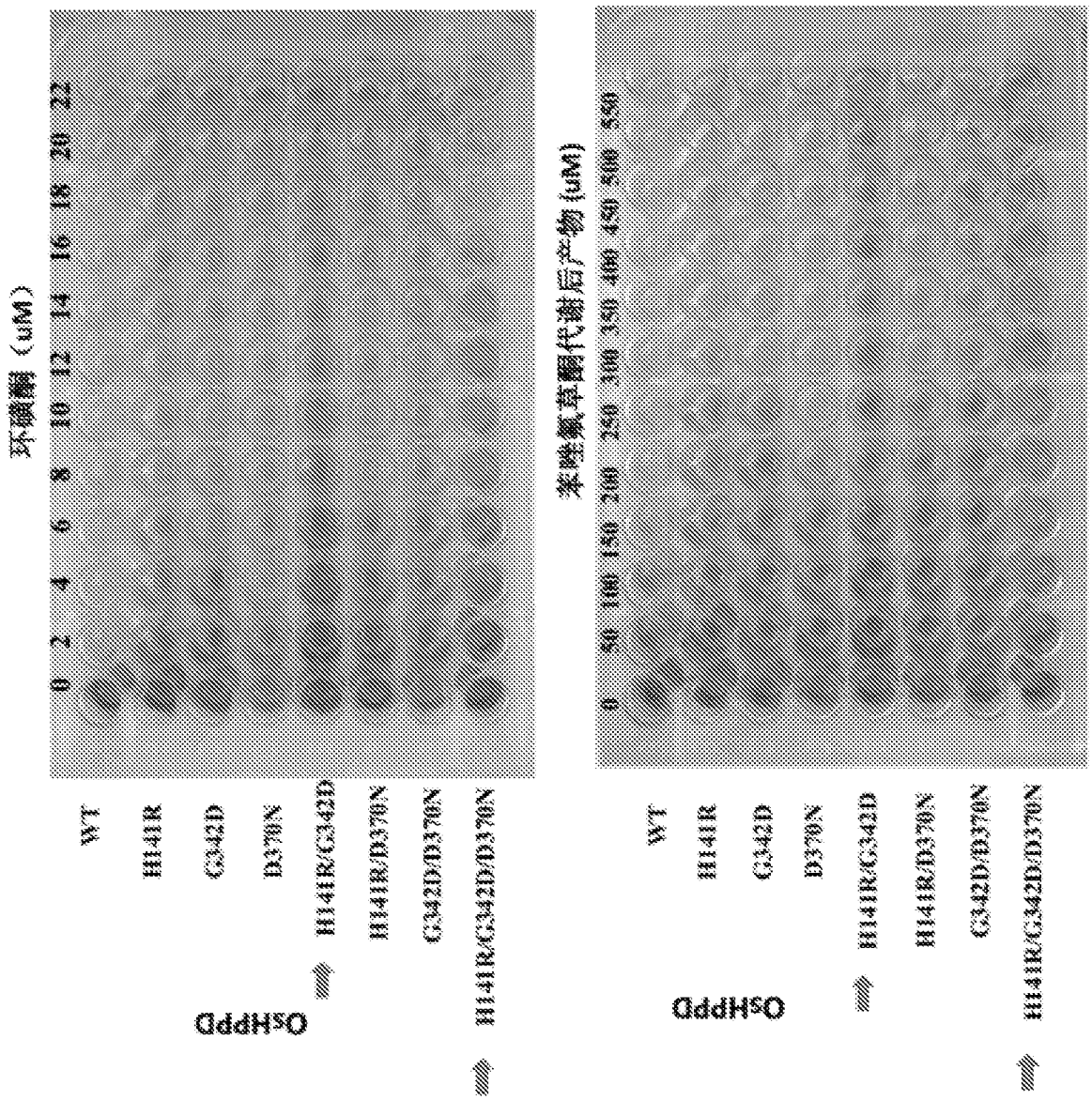

环磺酮（uM）
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22
苯唑氧草酮代谢后产物 (uM)
0 50 100 150 200 250 300 350 400 450 500 550
OsHPPD
WT
H141R
G342D
D370N
H141R/G342D
H141R/D370N
G342D/D370N
H141R/G342D/D370N

图 4

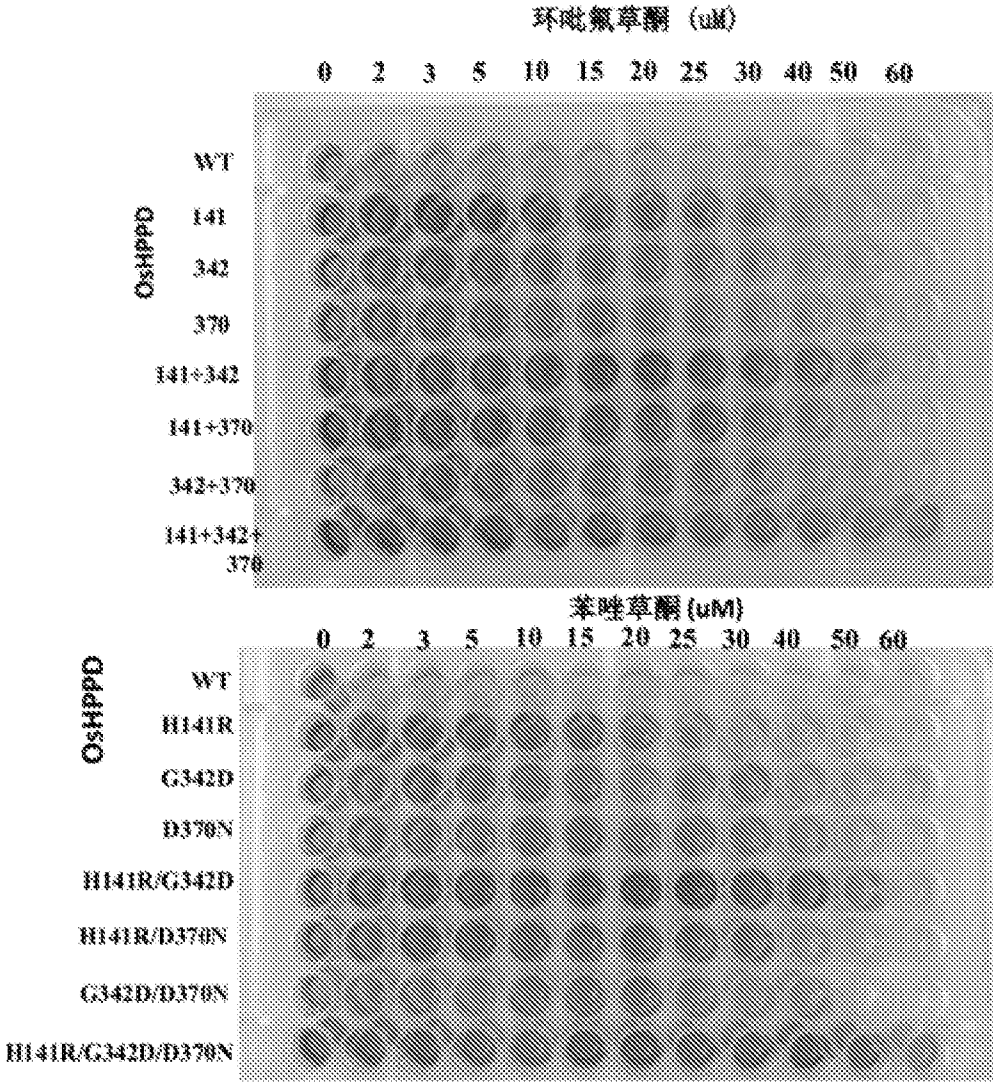

环吡氟草酮（uM）
0 2 3 5 10 15 20 25 30 40 50 60
OsHPPD
WT
141
342
370
141+342
141+370
342+370
141+342+370
苯唑草酮(uM)
0 2 3 5 10 15 20 25 30 40 50 60
OsHPPD
WT
H141R
G342D
D370N
H141R/G342D
H141R/D370N
G342D/D370N
H141R/G342D/D370N

图 5

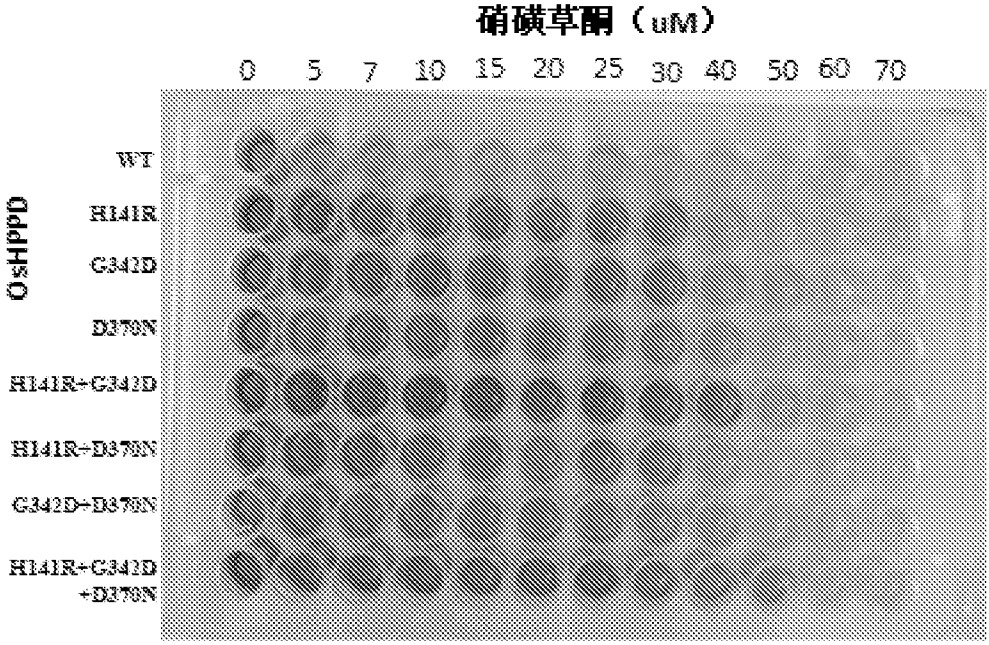

硝磺草酮（uM）
0 5 7 10 15 20 25 30 40 50 60 70
OsHPPD
WT
H141R
G342D
D370N
H141R+G342D
H141R+D370N
G342D+D370N
H141R+G342D+D370N

图 6

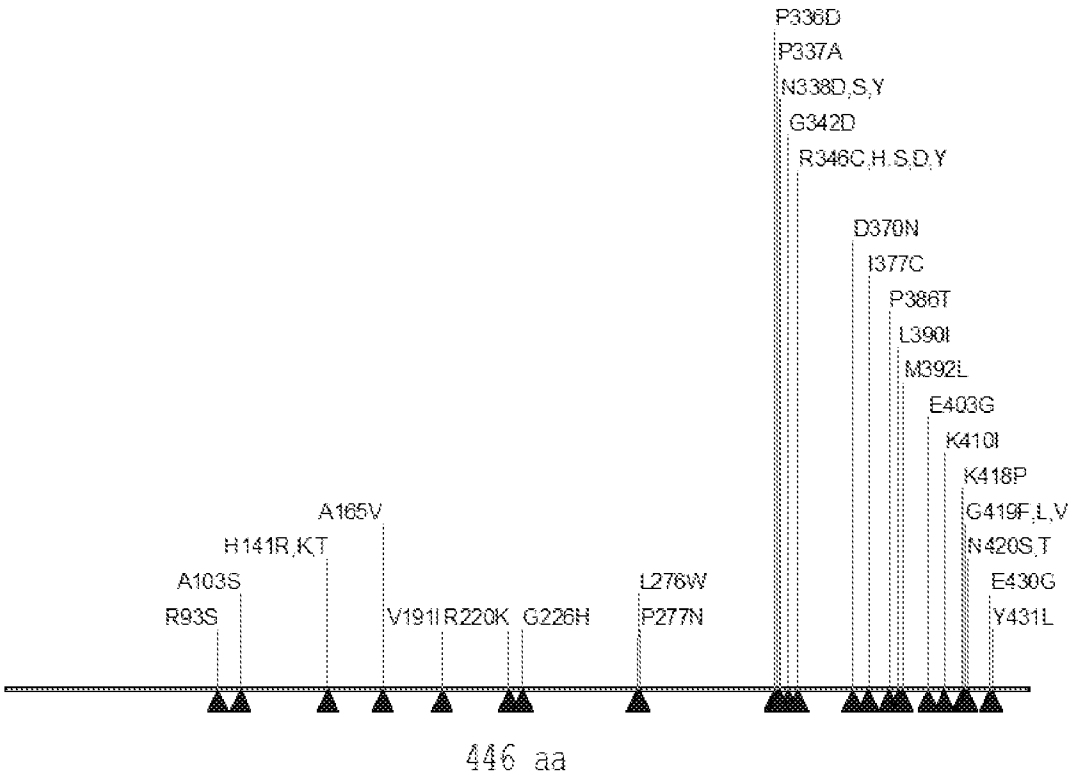

P336D
P337A
N338D,S,Y
G342D
R346C,H,S,D,Y
D370N
I377C
P386T
L390I
M392L
E403G
K410I
K418P
G419F,L,V
N420S,T
E430G
Y431L
A165V
H141R,K,T
A103S
R93S
V191I
R220K
G226H
L276W
P277N
446 aa

图 7

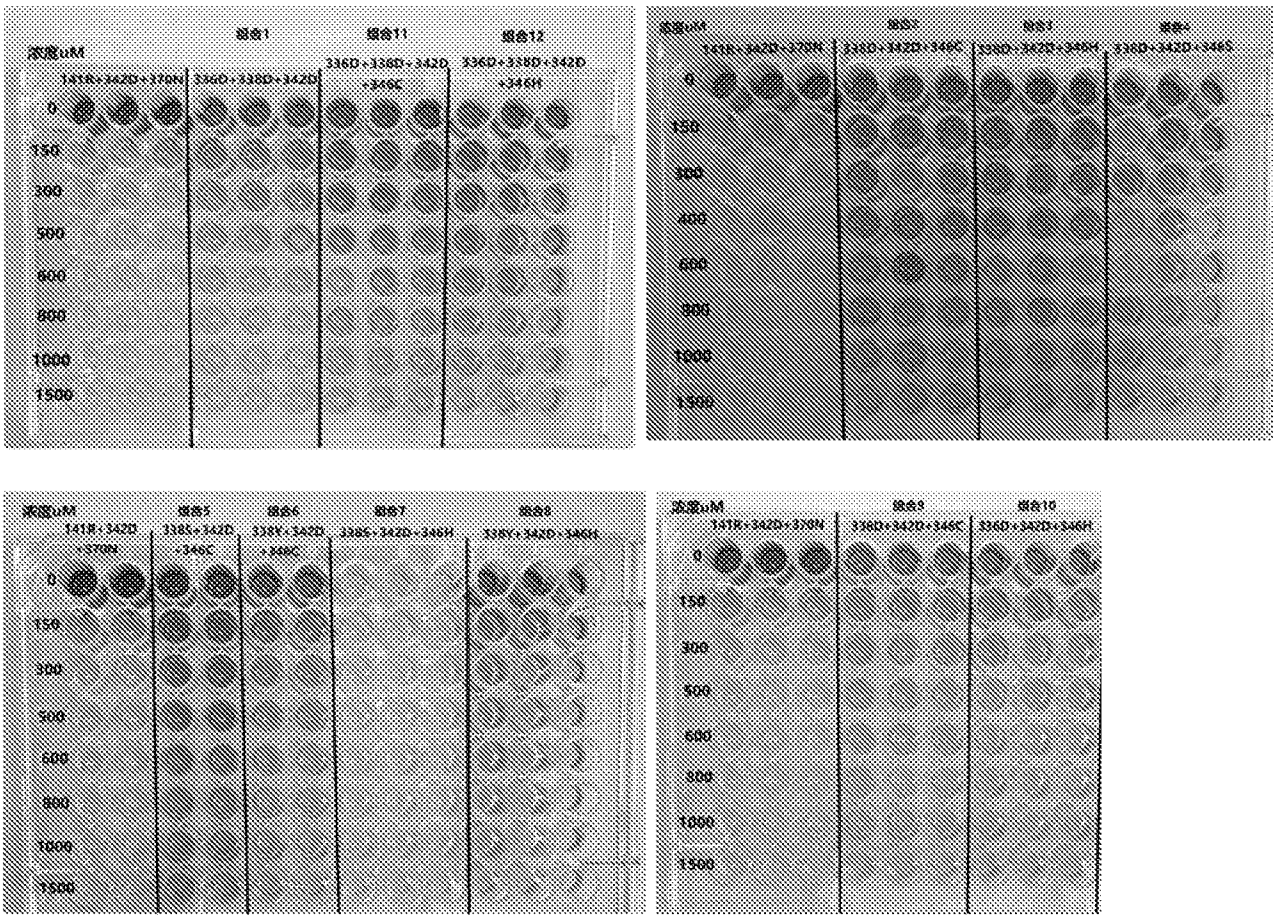

浓度uM
141R+342D+370N
336D+338D+342D
336D+338D+342D +346C
336D+338D+342D +346H
0
150
300
500
600
800
1000
1500

图 8

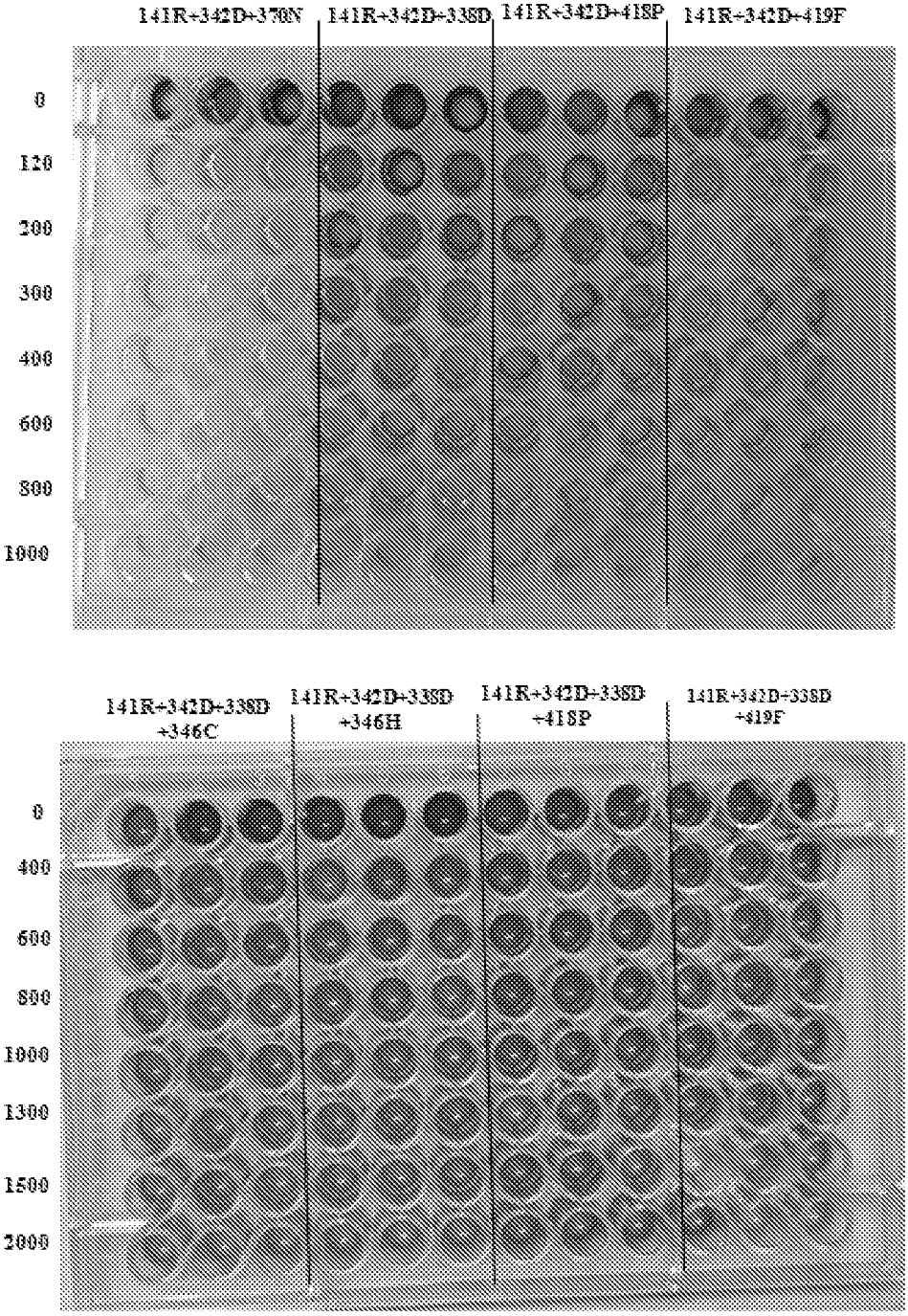

141R+342D+370N
141R+342D+338D
141R+342D+418P
141R+342D+419F
0
120
200
300
400
600
800
1000
141R+342D+338D +346C
141R+342D+338D +346H
141R+342D+338D +418P
141R+342D+338D +419F
0
400
600
800
1000
1300
1500
2000

图 9

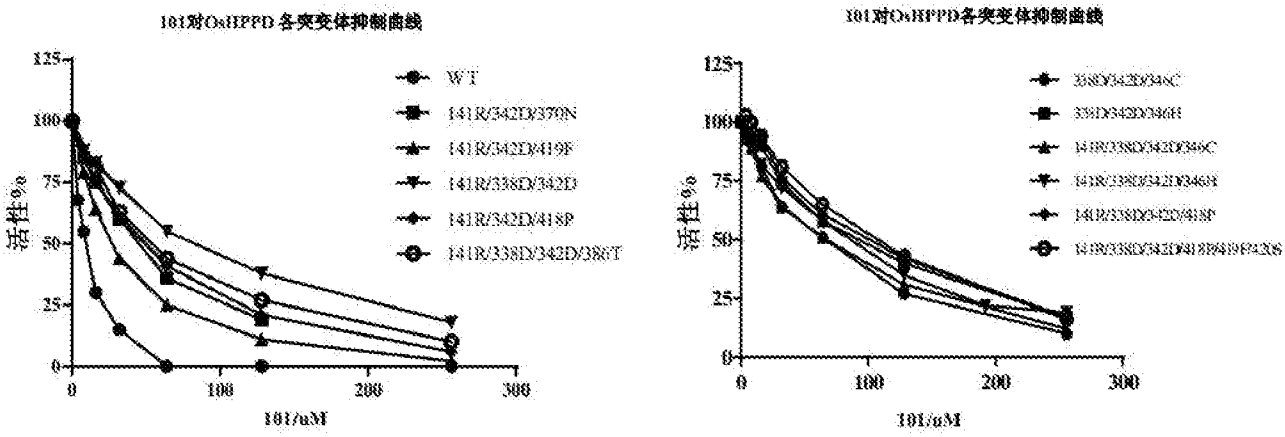

101对OsHPPD各突变体抑制曲线
活性%
101/uM
WT
141R/342D/370N
141R/342D/419F
141R/338D/342D
141R/342D/418P
141R/338D/342D/386T
101对OsHPPD各突变体抑制曲线
活性%
101/uM

图 10

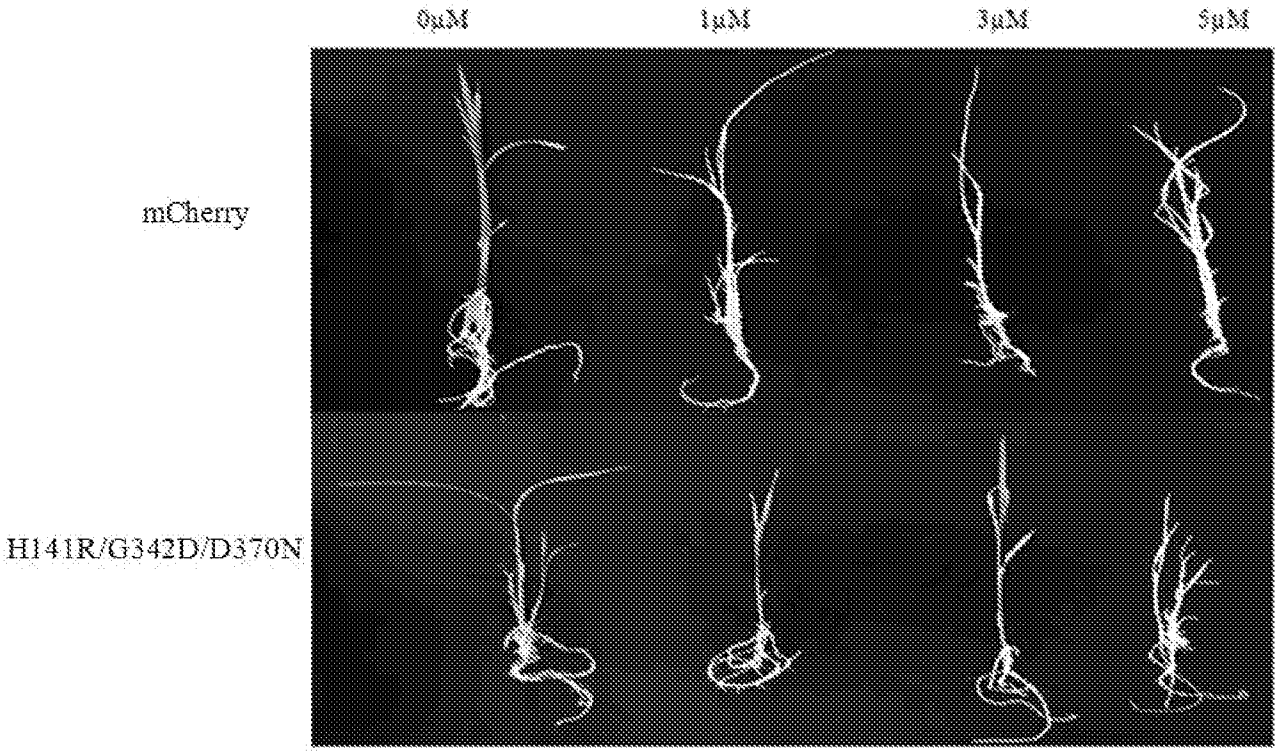

0μM
1μM
3μM
5μM
mCherry
H141R/G342D/D370N

图 11

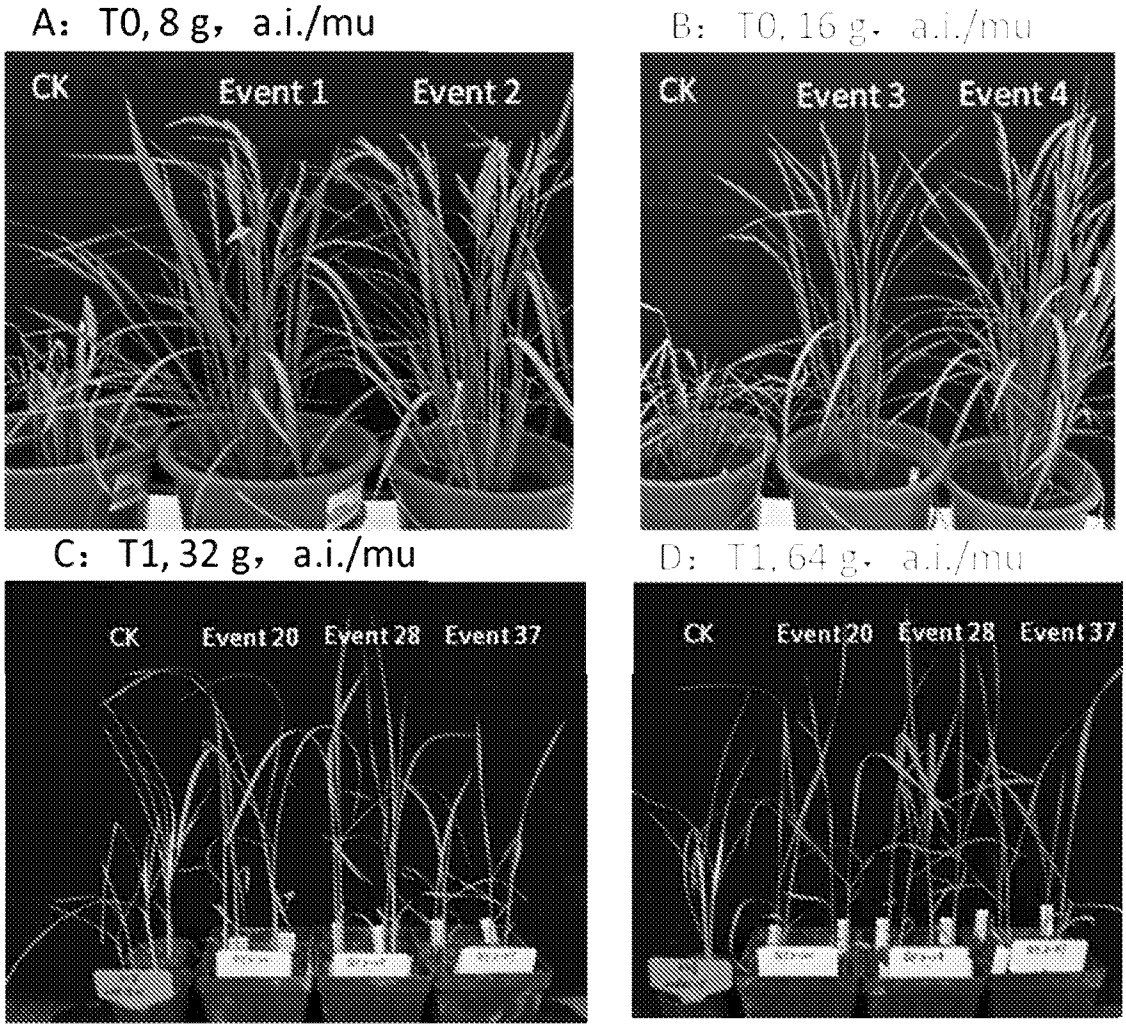

A：T0, 8 g， a.i./mu
CK
Event 1
Event 2
B：T0, 16 g， a.i./mu
CK
Event 3
Event 4
C：T1, 32 g， a.i./mu
CK
Event 20
Event 28
Event 37
D：T1, 64 g， a.i./mu
CK
Event 20
Event 28
Event 37

图 12

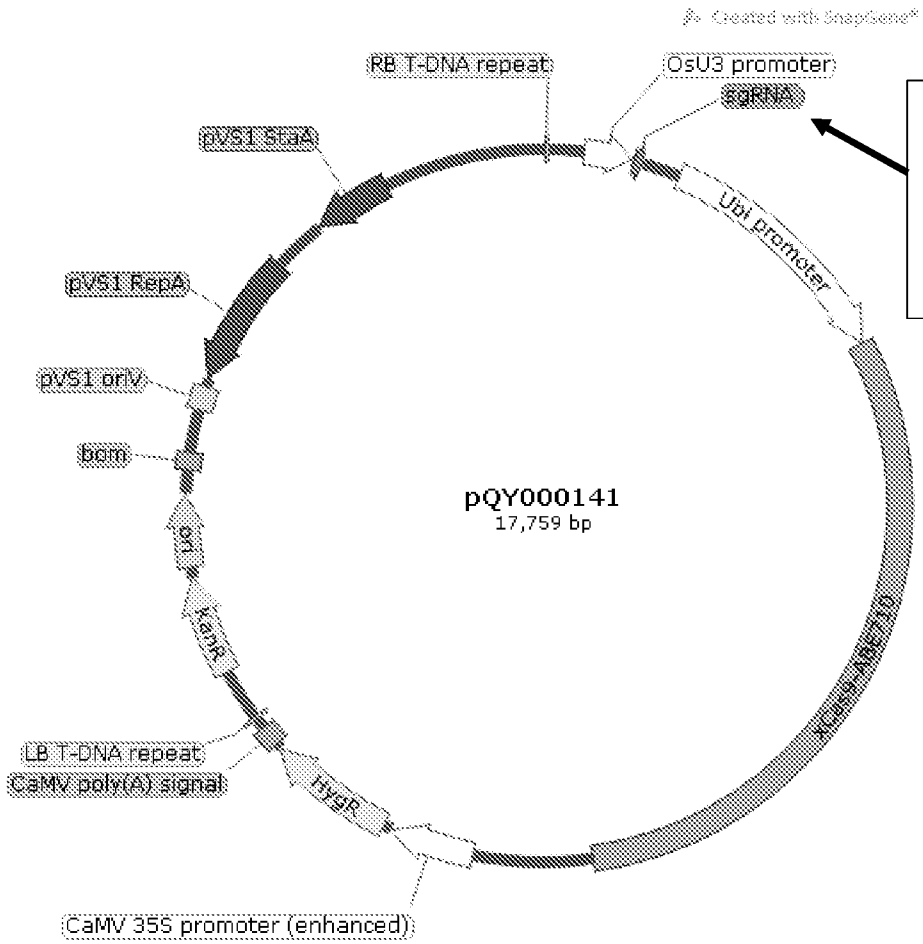
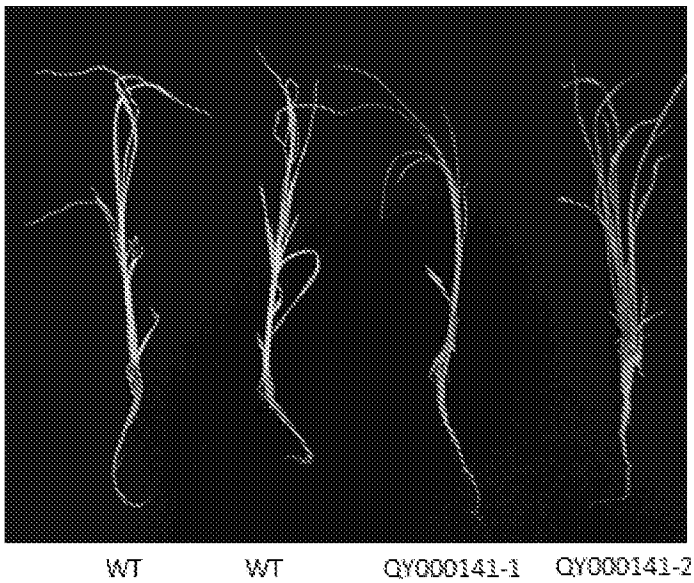


图 13

A：单碱基编辑的稻苗



B：单碱基编辑靶点的序列

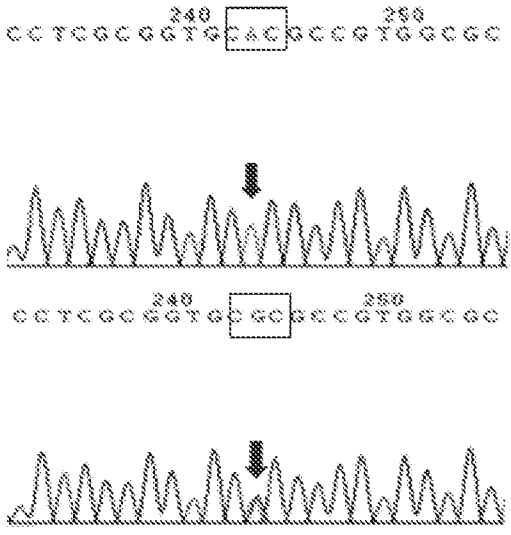


图 14

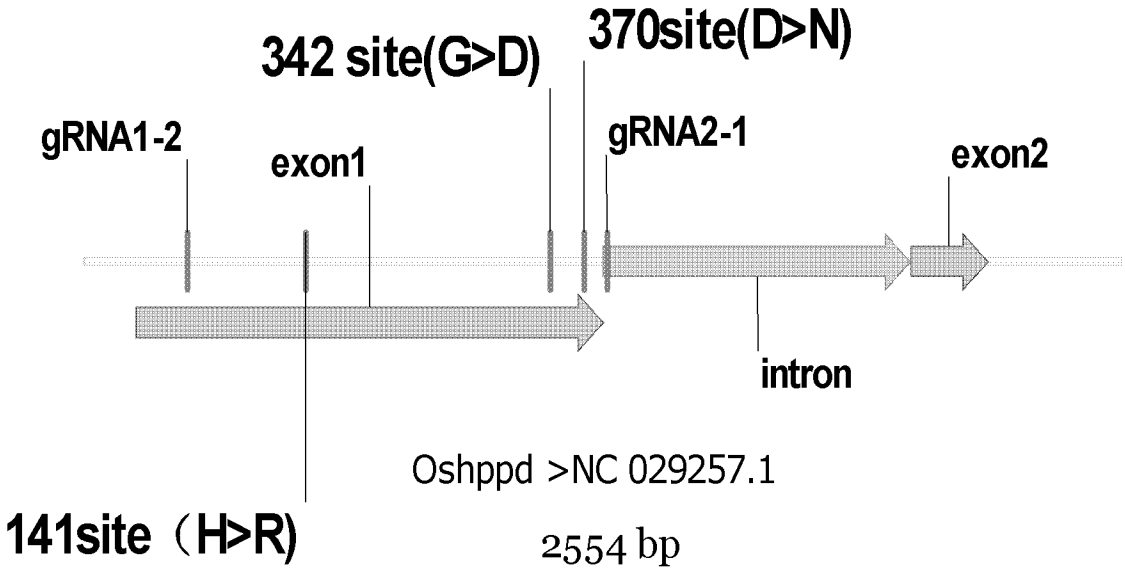

342 site(G>D)
370site(D>N)
gRNA1-2
exon1
gRNA2-1
exon2
intron
Oshppd >NC 029257.1
141site（H>R)
2554 bp

图 15

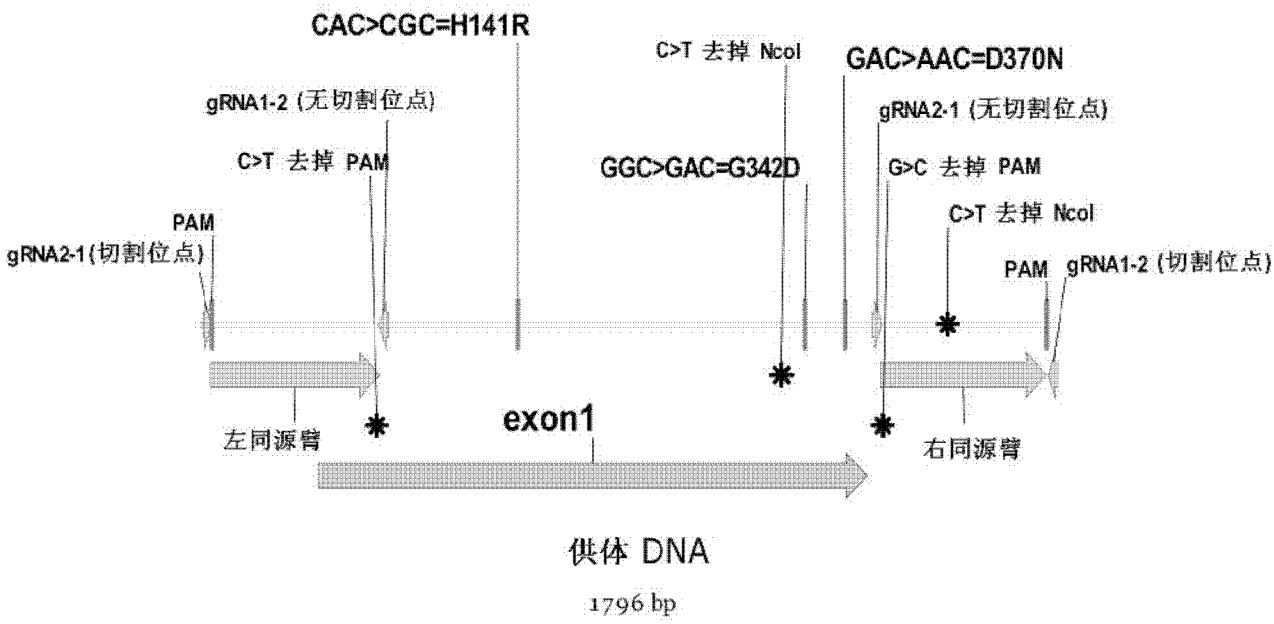
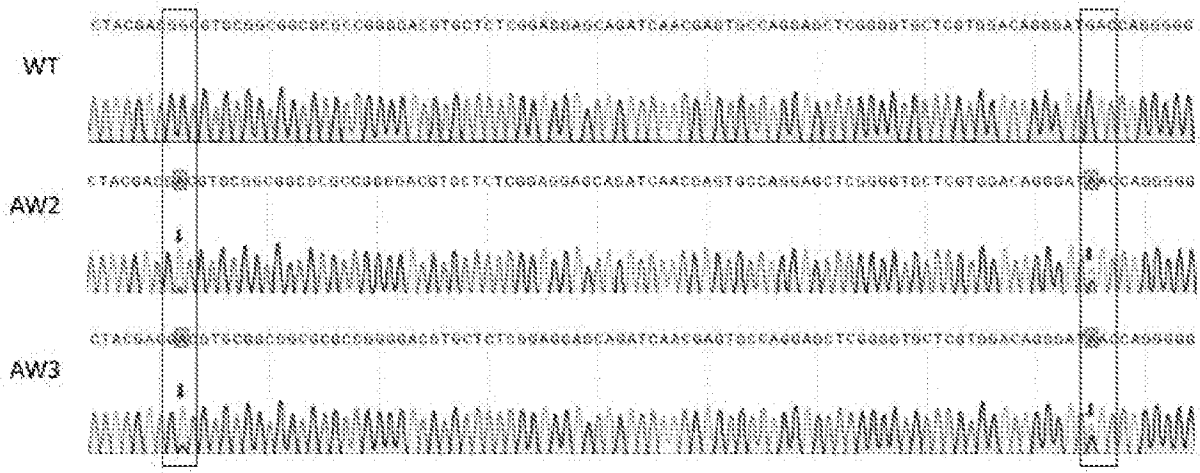

CAC>CGC=H141R
C>T 去掉 NcoI
GAC>AAC=D370N
gRNA1-2 (无切割位点)
gRNA2-1 (无切割位点)
C>T 去掉 PAM
GGC>GAC=G342D
G>C 去掉 PAM
C>T 去掉 NcoI
PAM
gRNA2-1(切割位点)
PAM
gRNA1-2 (切割位点)
左同源臂
exon1
右同源臂
供体 DNA
1796 bp

图 16



A：同源置换的稻苗



B：HPPD G342D(GGC>GAC)，D370N(GAC>AAC) 靶点的序列

图 17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2019/089512

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 9/02(2006.01)i; C12N 15/53(2006.01)i; C12N 15/82(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CPRSABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, WOTXT, EPTXT, USTXT, CNKI, 百度学术搜索, BAIDU SCHOLAR SEARCH, WEB OF SCIENCE, PUBMED: 对羟苯基丙酮酸双氧化酶, HPPD, 羟苯基丙酮酸双加氧酶, 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, 水稻, rice GenBank; EMBL: search based on SEQ ID NOs: 2-260 search for SEQ ID NO: 2-260

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2013064964 A1 (BASF SE ET AL.) 10 May 2013 (2013-05-10) see entire document	1-15, 17-21
A	WO 2011145015 A1 (BASF SE ET AL.) 24 November 2011 (2011-11-24) see entire document	1-15, 17-21
A	CN 108866092 A (INSTITUTE OF GENETICS AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES ET AL.) 23 November 2018 (2018-11-23) see entire document	1-15, 17-21

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
29 August 2019	**25 October 2019**

Name and mailing address of the ISA/CN	Authorized officer
China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088** **China**	
Facsimile No. **(86-10)62019451**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2019/089512

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2019/089512

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☑ Claims Nos.: **16,20(部分)**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] Claims 16 and 20 (in part) relate to plant varieties (PCT Rule 39.1(ii)).

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

[1] 1) the technical solution in claims 1-15 and 17-21 relating to a mutant 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD) protein having a mutation at 93 with respect to a wild-type sequence, or a biologically active fragment thereof;

[2] 2) the technical solution in claims 1-15 and 17-21 relating to a mutant 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD) protein having a mutation at 103 with respect to a wild-type sequence, or a biologically active fragment thereof;

[3] 3) the technical solution in claims 1-15 and 17-21 relating to a mutant 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD) protein having a mutation at 141 with respect to a wild-type sequence, or a biologically active fragment thereof;

[4] 4)……25)

[5] 26) the technical solution in claims 1-15 and 17-21 relating to a mutant 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD) protein having a mutation at 431 with respect to a wild-type sequence, or a biologically active fragment thereof;

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2019/089512

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

1. ☑ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☑ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2019/089512

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2013064964	A1	10 May 2013	ZA	201403938	B	23 December 2015
				EA	201490872	A1	30 September 2014
				MX	2014005241	A	02 June 2015
				US	2014357487	A1	04 December 2014
				AU	2012330779	A1	03 April 2014
				EP	2773764	A1	10 September 2014
				EP	2773764	A4	11 November 2015
				DE	112012004586	T5	21 August 2014
				AR	088651	A1	25 June 2014
				UY	34434	A	31 May 2013
				BR	112014009771	A2	07 August 2018
				JP	2014534973	A	25 December 2014
				CN	103930548	A	16 July 2014
				CA	2849060	A1	10 May 2013
				AU	2012330779	A8	05 June 2014
WO	2011145015	A1	24 November 2011	EP	2566968	A4	12 February 2014
				ZA	201209112	B	26 February 2014
				DE	112011101566	T5	08 May 2013
				TW	201144441	A	16 December 2011
				BR	112012028132	A2	15 September 2015
				EA	201291165	A1	30 May 2013
				CN	102971428	A	13 March 2013
				JP	2013529074	A	18 July 2013
				AR	081343	A1	08 August 2012
				US	2013053243	A1	28 February 2013
				UY	33368	A	31 October 2011
				EP	2566968	A1	13 March 2013
				AU	2011254317	A1	22 November 2012
				MX	2012012775	A	17 December 2012
				CA	2798067	A1	24 November 2011
CN	108866092	A	23 November 2018	WO	2018205995	A1	15 November 2018

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2019/089512

A. 主题的分类

C12N 9/02(2006.01)i; C12N 15/53(2006.01)i; C12N 15/82(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12N

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

CNABS,CPRSABS,SIPOABS,DWPI,CNTXT,WOTXT,EPTXT,USTXT,CNKI,百度学术搜索,WEB OF SCIENCE,PubMed：对羟苯基丙酮酸双氧化酶,HPPD,羟苯基丙酮酸双加氧酶，水稻，rice GenBank; EMBL：基于SEQ ID NOs: 2-260的序列检索

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	WO 2013064964 A1 (BASF SE等) 2013年 5月 10日 (2013-05-10) 参见全文	1-15，17-21
A	WO 2011145015 A1 (BASF SE等) 2011年 11月 24日 (2011-11-24) 参见全文	1-15，17-21
A	CN 108866092 A (中国科学院遗传与发育生物学研究所等) 2018年 11月 23日 (2018-11-23) 参见全文	1-15，17-21

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2019年 8月 29日	2019年 10月 25日

ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员
中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	赵彦豪
传真号 (86-10)62019451	电话号码 62411043

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2015年1月)

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2019/089512

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☑ 权利要求： 16,20(部分)
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

[1] 权利要求16,20(部分)涉及植物品种（PCT实施细则39.1（ii））。

2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：

3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

[1] 1) 权利要求1-15,17-21中涉及的相对于野生型序列在第93位具有突变的突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶(HPPD)蛋白或其生物活性片段的相关技术方案；

[2] 2) 权利要求1-15,17-21中涉及的相对于野生型序列在第103位具有突变的突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶(HPPD)蛋白或其生物活性片段的相关技术方案；

[3] 3）权利要求1-15,17-21中涉及的相对于野生型序列在第141位具有突变的突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶(HPPD)蛋白或其生物活性片段的相关技术方案；

[4] 4)……25）

[5] 26）权利要求1-15,17-21中涉及的相对于野生型序列在第431位具有突变的突变型对羟苯基丙酮酸双氧化酶(HPPD)蛋白或其生物活性片段的相关技术方案；

1. ☑ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。

2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何加费。

3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求，具体地说，是权利要求：

4. ☐ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：

对异议的意见

☑ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。
☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2019/089512

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2013064964	A1	2013年 5月 10日	ZA	201403938	B	2015年 12月 23日
				EA	201490872	A1	2014年 9月 30日
				MX	2014005241	A	2015年 6月 2日
				US	2014357487	A1	2014年 12月 4日
				AU	2012330779	A1	2014年 4月 3日
				EP	2773764	A1	2014年 9月 10日
				EP	2773764	A4	2015年 11月 11日
				DE	112012004586	T5	2014年 8月 21日
				AR	088651	A1	2014年 6月 25日
				UY	34434	A	2013年 5月 31日
				BR	112014009771	A2	2018年 8月 7日
				JP	2014534973	A	2014年 12月 25日
				CN	103930548	A	2014年 7月 16日
				CA	2849060	A1	2013年 5月 10日
				AU	2012330779	A8	2014年 6月 5日
WO	2011145015	A1	2011年 11月 24日	EP	2566968	A4	2014年 2月 12日
				ZA	201209112	B	2014年 2月 26日
				DE	112011101566	T5	2013年 5月 8日
				TW	201144441	A	2011年 12月 16日
				BR	112012028132	A2	2015年 9月 15日
				EA	201291165	A1	2013年 5月 30日
				CN	102971428	A	2013年 3月 13日
				JP	2013529074	A	2013年 7月 18日
				AR	081343	A1	2012年 8月 8日
				US	2013053243	A1	2013年 2月 28日
				UY	33368	A	2011年 10月 31日
				EP	2566968	A1	2013年 3月 13日
				AU	2011254317	A1	2012年 11月 22日
				MX	2012012775	A	2012年 12月 17日
				CA	2798067	A1	2011年 11月 24日
CN	108866092	A	2018年 11月 23日	WO	2018205995	A1	2018年 11月 15日