

(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
2009年5月14日 (14.05.2009)

PCT

(10) 国际公布号
WO 2009/059485 A1

(51) 国际专利分类号:

C12N 9/10 (2006.01) A01H 5/00 (2006.01)
C12N 15/54 (2006.01) A01H 1/00 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01) A01P 21/00 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2007/071071

(22) 国际申请日: 2007年11月16日 (16.11.2007)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

200710177090.1

2007年11月9日 (09.11.2007) CN

(71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 中国农业科学院生物技术研究所(BIOTECHNOLOGY RESEARCH INSTITUTE, THE CHINESE ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES) [CN/CN]; 中国北京市海淀区中关村南大街12号, Beijing 100081 (CN)。

(72) 发明人: 及

(75) 发明人/申请人 (仅对美国): 林敏(LIN, Min) [CN/CN]; 中国北京市海淀区中关村南大街12号, Beijing 100081 (CN)。 梁爱敏(LIANG, Aimin) [CN/CN]; 中国北京市海淀区中关村南大街12号, Beijing 100081 (CN)。 陆伟(LU, Wei) [CN/CN]; 中国北京市海淀区中关村南大街12号, Beijing 100081 (CN)。 李亮(LI, Liang) [CN/CN]; 中国北京市海淀区中关村南大街12号, Beijing 100081 (CN)。 陈明(CHEN, Ming) [CN/CN]; 中国北京市海淀区中关村南大街12号, Beijing 100081 (CN)。 张维(ZHANG, Wei) [CN/CN]; 中国北京市海淀区中关村南大街12

号, Beijing 100081 (CN)。 平淑珍(PING, Shuzhen) [CN/CN]; 中国北京市海淀区中关村南大街12号, Beijing 100081 (CN)。

(74) 代理人: 北京海虹嘉诚知识产权代理有限公司(BEIJING HAIHONG JIACHENG INTELLECTUAL PROPERTY & PARTNERS); 中国北京市海淀区北四环中路283号智凯大厦902室, Beijing 100083 (CN)。

(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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则4.17的声明:

— 发明人资格(细则4.17(iv))

本国际公布:

— 包括国际检索报告。

[见续页]

(54) Title: AN EPSP SYNTHASE WITH HIGH GLYPHOSATE RESISTANCE AND ITS ENCODED SEQUENCE

(54) 发明名称: 高耐受草甘膦的EPSP合酶及其编码序列

(57) Abstract: An EPSP synthase (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) with high glyphosate resistance and a nucleotide sequence encoding the synthase are disclosed. The gene encoding the EPSP synthase has low homology with the reported EPSP synthase. A transgenic plant obtained by the expression of the gene in plant has an increased resistance to glyphosate after experimental confirmation.

(57) 摘要:

本发明首次发现了一种新型高耐受草甘膦的 EPSP 合酶(5-烯醇式丙酮莽草酸-3-磷酸合酶), 以及编码该合酶的核苷酸序列。本发明发现的 EPSP 合酶编码基因与已报道的 EPSP 合酶同源性低。实验证实, 将本发明所述基因在植物中表达后, 所获得的转基因植物对草甘膦具有增强的耐受性。

WO 2009/059485 A1



-
- 包括以电子形式分开公布的说明书序列表部分，应要求可从国际局获得。

高耐受草甘膦的 EPSP 合酶及其编码序列

技术领域

本发明涉及一种新型高耐受草甘膦的 EPSP 合酶（5-烯醇式丙酮莽草酸-3-磷酸合酶），以及编码该合酶的核苷酸序列。

背景技术

草甘膦（glyphosate）为 Monsanto 公司产品 Roundup® 中的主要活性成分，该除草剂是一种广谱灭生性、内吸传导型优秀除草剂，是全世界使用量最大的除草剂品种之一。但是，该除草剂也是一种非选择性除草剂，对农作物同样有着杀死作用。为在农业生产中使用草甘膦，须培育出具有草甘膦抗性或降解性质农作物。

草甘膦抑制植物莽草酸代谢过程中 5-烯醇式丙酮莽草酸-3-磷酸合酶（EPSP）活性，进而阻断芳香族氨基酸的生物合成而使植物死亡（S.R. Padgett et al., in *Herbicide-Resistant Crops: Agricultural, Environmental, Economic, Regulatory, and Technical Aspects*, S. O. Duke, Ed. (CRC Press, Boca Raton, FL, 1996), pp. 53-84)，当前全球商业化种植的所有草甘膦抗性转基因作物均为针对 EPSP 所设计，是目前商业化转基因抗草甘膦作物的唯一作用机制。应用化学诱变细菌产生的 *aroA* 突变体，抗药性机理研究确证了 *aroA* 基因是草甘膦作用靶标 EPSP 合酶的编码基因。美国 Monsanto 和 Calgene 等公司在 EPSP 合酶的编码基因 *aroA* 及其抗草甘膦转基因植物等方面已申请了 100 余份专利，获得转基因抗草甘膦大豆、玉米、油菜、甜菜和棉花等作物系列品种，其中大豆等多种转基因作物已进入商品化生产。

目前尚未见到在核苷酸水平与已报道的 EPSP 合酶编码基因（*aroA*）同源性较低的抗草甘膦的 EPSP 合酶。

发明内容

本发明的目的是发现并人工合成新型高耐受草甘膦的 EPSP 合酶以及编码该合酶的核苷酸序列，并将该序列转入植物中，培育新型的高耐受草甘膦的转基因植物。

本发明首次发现了一种新型高耐受草甘膦的 EPSP 合酶，如 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列，以及编码该合酶的核苷酸序列，如 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 所示。经序列结构分析和序列比较分析（见图 3），显示该 EPSP 合酶属于 I 型 EPSP 合酶。

本发明采集草甘膦极端污染环境土壤样品，用免培养方法从中分离群落水平总 DNA，构建群落水平总 DNA 粘粒文库，并筛选草甘膦抗性转化子；将转化子点于含 20mM 草甘膦的 M9 固体培养基上筛选抗性转化子。本发明还进行了草甘膦耐受实验，结果表明上述转化子具有非常强的草甘膦耐受活性。

本发明还进行了高耐受草甘膦的 DNA 片段的全核苷酸序列测定。分析结果表明，插入的片段大小为 3151bp，其中包含了一个 1335bp 的阅读框，其序列如 SEQ ID NO:2 所示，它包含的核苷酸序列全长为 1335 个碱基，其开放读框位于 885-2220 位，编码全长为 445 个氨基酸的 EPSP 合酶（如 SEQ ID NO:1 所示）。

本发明对上述高耐受草甘膦的 EPSP 合酶基因进行了人工合成，其序列如 SEQ ID NO: 3 所示。将人工合成的 5' 和 3' 端酶切位点为 *Bam*HI 和 *Hind*III 位点 EPSP 基因，用于表达高耐受草甘膦的 EPSP 合酶以及构建相应的基因植物表达载体。将上述人工合成的 EPSP 基因，用 *Bam*HI 和 *Hind*III 酶切后，连入相同酶切的载体 pET28a 得到重组质粒 pETGR-79 并将其

转化大肠杆菌 BL21 (DE3) (Promega 公司)。

本发明还进行了 EPSP 的酶活测定和动力学参数的测定, 酶活性为 10.477U/mg。K_i/K_m 为 2.16。根据动力学参数可知, GR-79 EPSP 不仅具有较高的草甘膦抗性, 而且还保持着与 PEP 较强的亲和性, 这些特性将为用于转基因作物的培育提供可能。

本发明构建了高耐受草甘膦的 EPSP 合酶基因植物表达载体, 利用叶盘法转化构建抗草甘膦的转基因烟草, 经草甘膦抗性梯度实验证明, 转基因植物能在含 20mM 草甘膦的培养基上良好生长。

本发明还提供了一种重组载体, 它包含 SEQ ID NO:2 所述的 DNA。本发明用上述重组载体转化宿主细胞, 这些宿主包括原核细胞, 也包括真核细胞。

本发明还提供了一种利用转基因技术将 SEQ ID NO:2 转化入植物的方法, 以提高植物对草甘膦抗性, 其步骤如下:

(1) 将 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 所示序列可操作地连于植物表达调控序列, 形成植物表达载体;

(2) 将步骤 (1) 中的表达载体转入植物细胞;

(3) 经筛选获得转化细胞并最终再生转基因植株及其后代, 包括植物种子及植物组织。

上述“可操作地连于”表示如下情况: 即线性 DNA 序列的某些部分能够影响同一线性 DNA 序列其他部分的活性。例如, 如果信号肽 DNA 作为前体表达并参与多肽的分泌, 那么信号肽 (分泌前导序列) DNA 就是可操作地连于多肽 DNA; 如果启动子控制序列的转录, 那么它是可操作地连于编码序列; 如果核糖体结合位点被置于能使其翻译的位置时, 那么它是可操作地连于编码序列。一般, “可操作地连于”意味着相邻, 而对于分泌前导序列则意味着在阅读框中相邻。

上述载体可选用本领域已知的各种载体, 如市售的载体, 包括质粒, 粘粒等。

在本发明中, EPSP 合酶编码基因指编码具有 SEQ ID NO:1 蛋白活性的多肽的核苷酸序列及其简并序列。该简并序列是指所述序列中有一个或多个密码子被编码相同氨基酸的简并密码子所取代后而产生的序列。由于密码子的简并性, 所以与 SEQ ID NO: 2 同源性低至约 89%的简并序列也能编码出 SEQ ID NO:2 所述的序列。该术语还包括能在中度严谨条件下, 更佳的在高度严谨条件下与 SEQ ID NO:2 核苷酸序列杂交的核苷酸序列。该术语还包括与 SEQ ID NO:2 中的核苷酸序列的同源性至少 89%, 较佳地至少 80%, 更佳地至少 90%, 最佳地至少 95%的核苷酸序列。

该术语还包括能编码具有与天然的 SEQ ID NO:1 相同功能的蛋白的 SEQ ID NO:2 中开放阅读框序列的变异形式。这些变异形式包括 (但并不限于): 若干个 (通常为 1-90 个, 较佳地 1-60 个, 更佳地 1-20 个, 最佳地 1-10 个) 核苷酸的缺失、插入和/或取代, 以及在 5' 和/或 3' 端添加数个 (通常为 60 个以内, 较佳地为 30 个以内, 更佳地为 10 个以内, 最佳地为 5 个以内) 核苷酸。

在本发明中, SEQ ID NO:1 蛋白还包括具有与 SEQ ID NO:1 的相同功能的变异形式。这些变异形式包括但并不限于若干个 (通常为 1-50 个, 较佳地 1-30 个, 更佳地 1-20 个, 最佳地 1-10 个) 氨基酸的缺失、插入和/或取代, 以及在 C 末端和/或 N 末端添加一个或数个 (通常为 20 个以内, 较佳地为 10 个以内, 更佳地为 5 个以内) 氨基酸。例如, 在所述蛋白中, 用性能相近或相似的氨基酸进行取代时, 通常不会改变蛋白质的功能。又比如, 在 C 末端和/或 N 末端添加一个或数个氨基酸通常也不会改变蛋白质的功能。该术语还包括 SEQ ID NO:1 蛋白的活性片段和活性衍生物。

所述多肽的变异形式包括: 同源序列、EPSP 合酶保守性变异多肽、等位变异体、天然

突变体、诱导突变体、在高或低的严谨条件下能与 SEQ ID NO: 2 杂交的 DNA 所编码的蛋白、以及利用 SEQ ID NO:1 多肽的抗血清获得的多肽或蛋白。

上述“EPSP合酶保守性变异多肽”指与SEQ ID NO:1的氨基酸序列相比,有至多10个,较佳地至多8个,更佳地至多5个,最佳地至多3个氨基酸被性质相似或相近的氨基酸所替换而形成多肽。这些保守性变异多肽可以根据表1进行氨基酸替换而产生。

表 1 氨基酸替换表

最初的残基	代表性的取代	优选的取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro; Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe	Leu
Leu (L)	Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala	Leu

附图说明

图 1 是 GR-79 克隆草甘膦抗性分析图,图中: GR-79-ER 菌株是土壤总 DNA 部分酶切后与载体 pACYC184 连接后转化入 EPSP 合酶缺陷型大肠杆菌 ER2799 菌株(NEB 公司)后获得的草甘膦抗性菌株。

CP4-ER 菌株是将来源于 *Agrobacterium sp. cp4* 的 EPSP 合酶基因与载体 pACYC184 连接后转化入 EPSP 合酶缺陷型大肠杆菌 ER2799 菌株(NEB 公司)后获得的草甘膦抗性菌株。本图中作为阳性对照。

pACYC184-ER 是含有 pACYC184 质粒(NEB 公司)的 EPSP 合酶缺陷型大肠杆菌 ER2799 菌株。本实验中作为阴性对照。

本图是将三株菌株分别接入到含有 0, 20, 50, 80, 100, 120, 150, 200, 250, 300mM 草甘膦浓度的限制性培养基 M9 中,经过 37℃、36h 的摇床培养后,测定菌液在 OD600 时的吸光度值,所绘制而成。

图中可见菌株 GR-79-ER 在含有 250mM 浓度的草甘膦的限制性培养基中能够生长,说明该菌株草甘膦抗性能达 250mM。说明质粒上携带的外源片段能够对缺陷型菌株 ER2799 进行功能互补。而阴性对照菌株不能在限制性培养基中生长,不能对缺陷型菌株进行功能互补。阳性对照菌株草甘膦抗性达 200mM。

图 2 是 GR-79 的 EPSP 合酶在不同时间的蛋白表达。

GR-79 菌株中的 EPSP 合酶基因与 pET28a 载体连接后转入 BL21 中,在 IPTG 的诱导下进行蛋白表达,取样时间分别间隔一小时。样品经过煮沸后经 SDS-PAGE 电泳分离。结果显示该菌株在 4 小时的蛋白表达量就已经达较高程度。表达的蛋白为可溶性蛋白。大小约 45kD。

图 3 是 GR-79 氨基酸序列与报道的 Class I 和 Class II 典型类型的氨基酸序列的比较。

比较结果显示 GR-79 的氨基酸序列属于 Class I 类型的 EPSP 合酶。并且 GR-79 的 EPSP 合酶是一种具有草甘膦抗性的 I 型酶。

具体实施方式

下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于举例说明本发明的方法,而不用来限制本发明的范围。凡未注明具体实验条件的,均为按照本领域技术人员熟知的常规条件。

实施例 1 高耐受草甘膦的 DNA 片段克隆

1、草甘膦极端污染环境中土壤样品的采集

从被 50%左右草甘膦污染达十年以上的土壤中(河北某化工有限公司草甘膦生产工厂开放式分装点)采集土壤样品。

2、采用免培养方法从草甘膦极端污染土壤样品中分离群落水平总 DNA

称取草甘膦污染土壤样品 2 克,加入 0.6g 细玻璃珠($d < 0.11\text{mm}$),4000 转/分振荡 2 次。加入 $300\ \mu\text{l}$ 12%SDS + 12%苯酚 Tris 缓冲液(pH8.0)溶液冰上 1 小时,加入等量苯酚 Tris 缓冲液, pH8.0 (约 700ml),充分混匀,经 $4\ ^\circ\text{C}$, 13,000rpm 离心 5 分钟。上层溶液加入 0.1 倍体积的 3M NaAc pH5.2,混匀后加入 0.6 倍体积异丙醇混匀。DNA 沉淀溶于 $200\ \mu\text{l}$ 1xTE (粗 DNA)。称 100mg 氯化铯置于一个新的 1.5ml Epp.离心管中,加入 $100\ \mu\text{l}$ 粗 DNA 轻轻混匀,室温黑暗条件下静置 1-3 小时。室温, 13,000rpm,离心 20 分钟。上清液中加入 $400\ \mu\text{l}$ 无菌去离子水和 $300\ \mu\text{l}$ 异丙醇,室温静置 30 分钟。室温, 13,000rpm,离心 20 分钟。沉淀溶于 $100\ \mu\text{l}$ 1xTE 和 $40\ \mu\text{l}$ 8M 醋酸钾(KAc),室温静置 15 分钟。 $4\ ^\circ\text{C}$, 13,000rpm 离心 15 分钟。上清液加入 0.6 倍体积异丙醇混匀。室温静置 30 分钟。室温, 15,000rpm 离心 20 分钟。DNA 沉淀溶于 $100\ \mu\text{l}$ 1xTE。

采用 Wizard spin column clean-up 分离试剂盒纯化 DNA 样品。纯化 DNA 溶于总体积为 $100\ \mu\text{l}$ 的 10mM Tris-EDTA (pH8.0) 缓冲液中。

3、群落水平总 DNA 粘粒文库的构建

土壤细菌 DNA 用 *Sau3AI* 在 $10\ \mu\text{l}$ 反应体系进行部分酶切试切,*Sau3AI* 酶按 1:100 稀释, $37\ ^\circ\text{C}$, 分别酶切 10min, 20min, 30min, 40min, 50min, 60min 后加入 $10\times$ loading buffer $1\ \mu\text{l}$ 终止反应,电泳检测最适酶切反应时间。而后选择相同的体系酶切 30 min 进行大量酶切。经琼脂糖凝胶电泳后切胶回收 2~6kb DNA 片段备用。质粒载体 pACYC184 (NEB 公司)用 *BamHI* 完全酶切后用 SAP 碱性磷酸脂酶进行末端去磷酸化,以减少载体自连。上述回收后的土壤细菌 DNA (200ng) 和末端去磷酸化的质粒载体 pACYC184 (150ng) 用 2U 的 T4 ligase 在 $4\ ^\circ\text{C}$ 下连接 16h。

上述连接产物转入 E.coli ER2799 (NEB 公司) 电击感受态细胞, 涂布 LB+Cm^r。然后将 LB 板上生长的克隆影印到 M9+Cm^r+50mM 草甘膦的平板, 37°C 培养 48h。将平板上生长的菌经 LB 平板划线培养后, 将这些菌落再接种到含不同草甘膦浓度的 M9 平板上 (100, 150mM 草甘膦)。将这些重组菌中的质粒抽提后重新转化 ER2799 后涂布 M9+Cm^r 平板验证 (ER2799+pACYC184 为对照), 同时进行重组质粒酶切验证。

4、筛选草甘膦抗性转化子

将转染细菌涂布含 Cm (氯霉素)、的 LB 平板上, 37°C 培养 20h 后, 约有 5000 个菌落生长, 将这些菌落影印到含 Cm^r 和 50mM 草甘膦的 M9 平板上培养 48h 后, 有三个菌落生长。将这三个菌落接种到含 100mM、150mM 的草甘膦的 M9 平板上培养, 发现只有 1 个克隆能在含 150mM 的草甘膦的 M9 平板上生长, 其所含的质粒被命名为 pACYCGR-79。从该克隆抽提的质粒 pACYCGR-79 转入大肠杆菌 ER2799 (NEB 公司) 或大肠杆菌 JM109 (Promega 公司) 中, 将转化子用无菌牙签点于含 20mM 草甘膦的 M9 固体培养基上检验抗性, 结果证明这个克隆所产生的转化子均具有抗草甘膦特性, 表明抗草甘膦特性确实是由于转入 pACYCGR-79 引起的。

5、草甘膦耐受实验

将大肠杆菌 ER2799 (含携带有新克隆的 pACYCGR-79 质粒) 接种到含 0~200mM 草甘膦的 M9 液体培养基 (Cm^r) 中, 经过 37°C、36h 的摇床培养后, 测定培养物的 OD600。同时以无插入片段的质粒的大肠杆菌 ER2799 为阴性对照。

结果: 将 ER2799 (携带 pACYCGR-79 质粒) 接种到含 0~300mM 草甘膦的 M9 液体培养基 (Cm^r) 中, 经过 37°C、36h 的摇床培养后, 发现阴性对照在 M9 中几乎不能生长; 而 ER2799 (pACYCGR-79) 在含有 250mM 草甘膦的 M9 液体培养基中还能生长 (见图 1)。这一结果说明 pACYCGR-79 上携带的外源片段具有非常强的草甘膦耐受活性。而带有 CP4 质粒阳性对照菌只能在 200mM 的液体培养基中生长。

实施例 2 高耐受草甘膦的 DNA 片段的序列分析及其 EPSP 合酶功能验证

1、高耐受草甘膦的 DNA 片段的序列分析

对实施例 1 中所亚克隆的高耐受草甘膦 DNA 片段进行全核苷酸序列测定。分析结果表明, 插入的片段大小为 3151bp, 其中包含了一个 1335bp 的阅读框, 其序列如序列 1 所示, 它包含的多核苷酸序列全长为 1335 个碱基, 其开放读框位于 885-2220 位, 编码全长为 445 个氨基酸的 EPSP 合酶。

将所亚克隆的高耐受草甘膦编码序列与已报道的 EPSP 合酶编码基因 (*aroA*) 比较, 在核苷酸水平同源性较低。

氨基酸序列同源性分析结果表明, GR-79 氨基酸序列与已报道的典型的 I 型 EPSP 合酶的氨基酸同源率均高于该酶与 II 型 EPSP 合酶的氨基酸序列的同源率, 并且 GR79 氨基酸序列中不含有 II 型酶中典型的保守氨基酸区段, 而含有的保守氨基酸区段类似于 I 型酶。说明 GR-79 EPSP 属于 I 类 EPSP。GR-79 EPSP 与典型的 I 型和 II 型 EPSP 合酶的系统发育比较结果, 如图 3 所示。

实施例 3 高耐受草甘膦的 EPSP 合酶基因的人工合成

根据已完成的含 1335bp 编码区的核苷酸序列, 首先分 8 个区段分别根据正链和副链序列, 分别合成出长度约 150-200bp、具有粘性末端的单链寡核苷酸片段。将正链和副链各一对应的 8 个互补的单链寡核苷酸片段分别退火, 形成 8 个带有粘性末端的双链寡核苷酸片

段。混合双链寡核苷酸片段，经 T4 DNA 连接酶催化组装成一个完整的 EPSP 合酶基因。该合成的 DNA 片段含有 SEQ ID NO:2 中 1-335 位的核苷酸序列，并且合成基因的上下游两端含 *Bam*HI 和 *Hind*III 位点。如 SEQ ID NO:2 所示。

将上述人工合成的 5' 和 3' 端酶切位点为 *Bam*HI 和 *Hind*III 位点 EPSP 基因，用于表达高耐受草甘膦的 EPSP 合酶以及构建相应的基因植物表达载体。

实施例 4 高耐受草甘膦的 EPSP 表达

上述人工合成的 5' 和 3' 端酶切位点为 *Bam*HI 和 *Hind*III 位点 EPSP 基因，用 *Bam*HI 和 *Hind*III 酶切后，连入相同酶切的载体 pET28a (NEB 公司) 得到重组质粒 pETGR-79 并将其转化大肠杆菌 BL21 (DE3) (Promega 公司)。将转化子先在 LB + Km^r 培养基中 37°C, 200rpm 培养至 OD600 值约 0.5，加入 IPTG (终浓度为 0.75mmol/L) 后转入 37°C 诱导蛋白表达，SDS-PAGE 电泳检测。

经 SDS-PAGE 电泳检测，含有 pETGR-79 的大肠杆菌 BL21 (DE3) (Promega 公司) 在 37°C 经 IPTG 诱导 4h 后表达量即达到最高值。目的蛋白为可溶性蛋白；大小约 45kD，与预测值相符 (见图 2)。

实施例 5 EPSP 的酶活测定和动力学参数的测定

1、测定方法

无机磷标准曲线：10mM 无机磷标准液按 1:10 稀释，分别取 0、1、2、3...20 μ l 于 1.5ml Eppendorf 离心管中，加入 milli-Q 纯水至 100 μ l 混匀，加入 MAT 溶液 0.8ml 混匀，计时三分钟后加入 34% SC 溶液 100 μ l 迅速混匀，室温静置 20min 后测定 OD660 值。重复三次。以无机磷浓度为横坐标，OD660 值为纵坐标作图得到无机磷标准曲线。

1) 酶活测定：酶粗提物蛋白定量采用考马斯亮蓝 G-250 染色法 (Bradford, 1976)。在冰上于 1.5ml Eppendorf 离心管中加入以下溶液：10mM PEP 溶液 2 μ l，10mM S3P 溶液 2 μ l，0.5M HEPES 溶液 2 μ l，1mM (NH₄)₆MO₇O₂₄·4H₂O 溶液 2 μ l 和 milli-Q 纯水 12 μ l 混匀，于 28°C 温浴 5min 后各管样品间隔 2S 加入 1 μ l 粗酶液并计时，2min 后再间隔 2S 依次加入 200 μ l MAT 溶液，显色 3min 后再间隔 2S 依次加入 20 μ l 34% SC 溶液迅速混匀，室温显色 20min 后测定 OD660 值。对照除不加酶液外，其余同样品管。样品管与对照管的 OD660 值相减后，对照无机磷标准曲线即可求得反应释放出的无机磷摩尔量，再除以反应时间和酶蛋白量就得到该酶的酶活力 (U/mg)。

2) 半抑制剂量 (IC₅₀) 测定：上述反应液中添加 0、10⁻³、10⁻²、10⁻¹、1、10、100、500mM 草甘膦，所得酶比活力数据以草甘膦浓度为 X 轴，采用对数坐标，以反应速度 V (U/mg) 为 Y 轴作图。

3) K_m (PEP) 测定：将 S3P 溶液浓度恒定于 1mM，在不同 PEP 浓度 (0.05、0.067、0.1、0.2、0.5、1.0mM) 下按上述反应体系测定酶反应速度，所测数值按 V-v/[S] (Eadic-Hofstee) 法作图。

K_i (glyphosate) 测定：在不同草甘膦浓度 (0、10、50、100 μ M) 下测定 PEP 浓度为 66.7、100、200、500 μ M 时 EPSP 的酶反应速度。采用双对数作图，得到 1/V-1/[S] 直线，再将各直线的斜率作为纵坐标，草甘膦浓度作为横坐标得到一条新的直线，该直线与 X 轴的交点即为 K_i (glyphosate) 值。

2、结果

GR-79 EPSP 的酶活性为 10.477U/mg，GR-79 EPSP 测定如表 2 所示：

表 2 GR-79 EPSP 的动力学参数

动力学参数	测定值
IC ₅₀ (glyphosate; mM)	12.65±0.012
K _m (PEP; mM)	0.0792±0.032
K _i (glyphosate; mM)	0.171±0.002
K _i /K _m	2.16

根据 GR-79 EPSP 的动力学参数可知, GR-79 EPSP 不仅具有较高的草甘膦抗性, 而且还保持着与 PEP 较强的亲和性, 这些特性将为将 GR-79 EPSP 用于转基因作物的培育提供可能。

实施例 6 高耐受草甘膦的 EPSP 合酶基因植物表达载体的构建

高耐受草甘膦的 EPSP 合酶基因植物表达载体构建的具体方法如下:

A. pBI121 (ClonTech 公司) 和 pCAMBIA2301 (ClonTech 公司) 用 *Hind*III 和 *Eco*RI 双酶切, 将 pBI121 带有 p35S-GUS- Nos-ter 的片段连入 pCAMBIA2301, 形成中间载体 p35S-2301-GUS;

B. 用 *Xba*I 和 *Sac*I 双切 p35S-2301-GUS 和上述人工合成的 EPSP 基因, 用 EPSP 置换 p35S-2301-GUS 相应酶切位点的 GUS, 从而获得高耐受草甘膦的 EPSP 合酶基因植物表达载体。再将其转入农杆菌中, 用于转化模式植物烟草。

实施例 7 利用叶盘法转化构建抗草甘膦的转基因烟草

(1) 用无菌牙签挑取 YPE 选择平板上的实施例 5 中制备的阳性克隆, 接种于 2MLYPE 液体 (Sm^r, Kan^r), 28°C, 200rpm 振荡培养 24-36 小时;

(2) 室温下 4, 000g 离心 10 分钟;

(3) 弃上清, 菌体用 1 / 2MS 液体培养基悬浮, 稀释到原体积的 5-20 倍, 使菌体的 OD600 在 0.5 左右;

(4) 取生长两周左右的烟草的无菌叶片, 去掉其主叶脉, 将其剪成约 1cm² 见方的小叶片;

(5) 将叶片放入制备好的菌液中, 浸泡 2-5 分钟, 在无菌滤纸上吸干菌液; 把经浸染的叶片放于 MS 培养基上, 28°C 暗培养 48 小时;

(6) 将叶片转到愈伤培养基 (MS+6-BA 1.0mg/l+NAA 0.1mg/l+Kan 50mg/l+羧苄青霉素 250mg/l) 上, 25-28°C 光照下培养, 7-15 天可见愈伤组织的形成;

(7) 约 20 天后可见分化芽长出, 待芽长大后, 切下, 置于生根培养基 (1 / 2MS+NAA 0.5mg/l+Kan 25mg/l) 上进行生根培养, 2-7 天左右生根;

(8) 待根系发达后, 将植株取出, 用无菌水洗净附着着的固体培养基, 移入土壤中, 刚开始几天用玻璃罩罩几天, 待植株健壮后再取下玻璃罩, 转移至在含 10mM 的草甘膦的固体培养基中筛选草甘膦抗性的植株。

(9) 抗性植株经 Southern、Northern 杂交以及 Western blot 验证为转基因的抗性植株。

(10) 在温室中经草甘膦抗性梯度实验证明, 转基因植物能在含 20mM 草甘膦的培养基上良好生长。

权利要求

1. 一种高耐受草甘膦的 EPSP 合酶的氨基酸序列，如 SEQ ID NO:1 所示。
2. 编码权利要求 1 所述氨基酸序列的 DNA 序列，如 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 所示。
3. 包含权利要求 2 所述 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的 DNA 序列的重组载体。
4. 用权利要求 3 所述的重组载体转化的宿主细胞，包括原核细胞和真核细胞。
5. 权利要求 2 所述的 DNA 序列用于培育高耐受草甘膦植物的用途。

附图

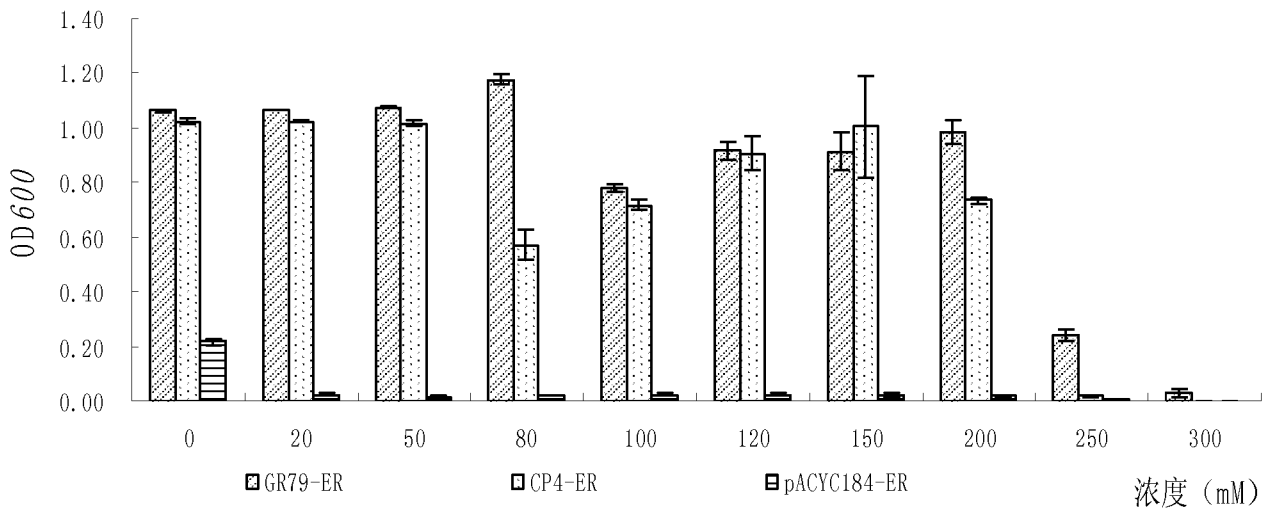


图 1

M 0h 1h 2h 3h 4h 5h 6h 7h 8h

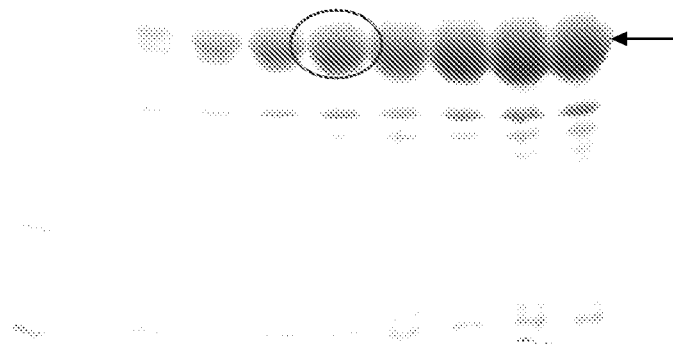


图 2

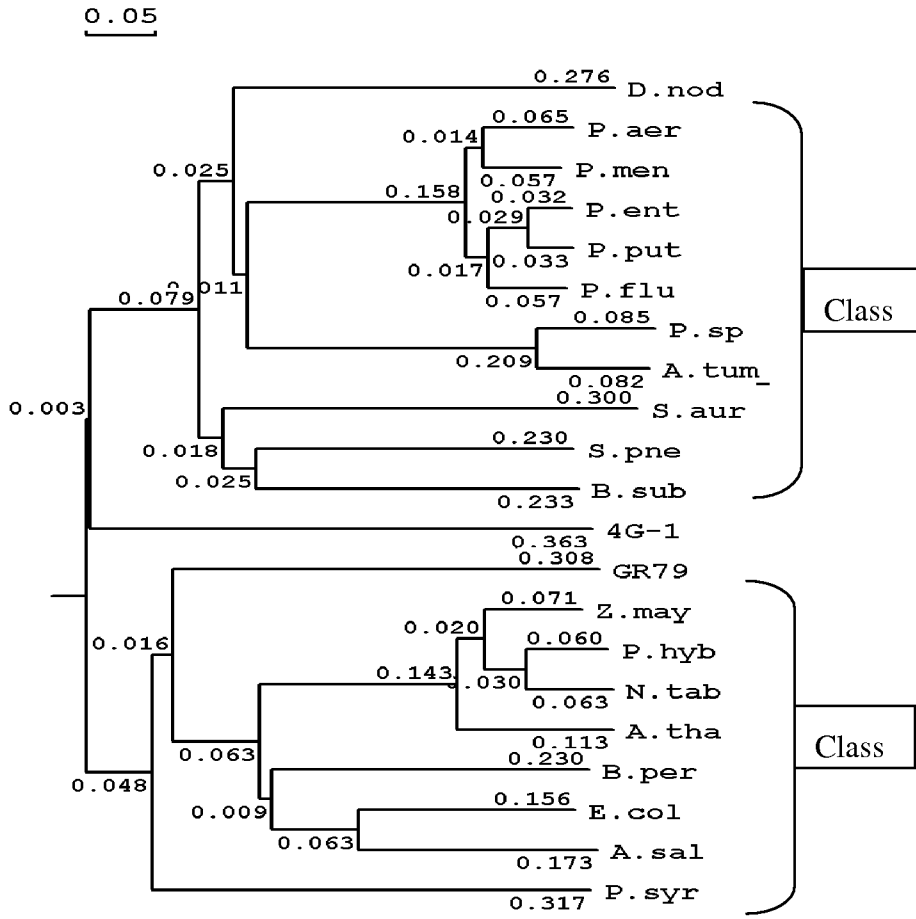


图3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2007/071071

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

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)

IPC: C12N A01H

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)

WPI, EPODOC, PAJ, CNPAT(CPRS), CNKI, CA, BA, GENBANK, EMBL, DDBJ, ISI WEB OF KNOWLEDGE,
ELSEVIER SCIENCE DIRECT, PUBMED, MEDLINE
Epsp synthase transferase glyphosate phosphonomethyl lw glycine etc.
Searching on sequence nos. 1-3

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN1664095A (BIOTECHNOLOGY RES INST CAAS) 07Sep.2005(07.09.2005) see claims and examples	1-5
A	WO2007064828A (ATHENIX CORP) 07 June 2007(07.06.2007) see the whole documen-	1-5
A	CN1952152A (BIOTECHNOLOGY RES INST CAAS) 25 April 2007(25.04.2007) see the whole document	1-5

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&”document member of the same patent family</p>
--	--

Date of the actual completion of the international search 25 July 2008(25.07.2008)	Date of mailing of the international search report 14 Aug. 2008 (14.08.2008)
---	--

Name and mailing address of the ISA/CN The State Intellectual Property Office, the P.R.China 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China 100088 Facsimile No. 86-10-62019451	Authorized officer DING, Huiping Telephone No. (86-10)62411092
--	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2007/071071

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN1664095A	07.09.2005	CN1289664C	13.12.2006
WO2007064828A	07.06.2007	AU2006320516A	07.06.2007
		US2007136840A	14.06.2007
		AR057205A	21.11.2007
CN1952152A	25.04.2007	none	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2007/071071

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N9/10 (2006.01)i

C12N15/54 (2006.01)i

C12N15/82 (2006.01)i

A01H5/00 (2006.01)i

A01H1/00 (2006.01)i

A01P21/00 (2006.01)i

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2007/071071

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN1664095A	07. 09. 2005	CN1289664C	13. 12. 2006
W02007064828A	07. 06. 2007	AU2006320516A	07. 06. 2007
		US2007136840A	14. 06. 2007
		AR057205A	21. 11. 2007
CN1952152A	25. 04. 2007	无	

A. 主题的分类

C12N9/10 (2006.01)i

C12N15/54 (2006.01)i

C12N15/82 (2006.01)i

A01H5/00 (2006.01)i

A01H1/00 (2006.01)i

A01P21/00 (2006.01)i