

(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
2017年8月3日 (03.08.2017)



(10) 国际公布号
WO 2017/128302 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 15/31 (2006.01) *C12N 15/82* (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01) *A01H 5/00* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2016/072810
- (22) 国际申请日: 2016年1月29日 (29.01.2016)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (71) 申请人: 四川天豫兴禾生物科技有限公司 (GE-VOTO LLC) [CN/CN]; 中国四川省成都市青羊区腾飞大道51号6栋B座3楼, Sichuan 610073 (CN)。
- (72) 发明人: 余宗兰 (YU, Zonglan); 中国四川省成都市青羊区腾飞大道51号6栋B座3楼, Sichuan 610073 (CN)。 邓龙群 (DENG, Longqun); 中国四川省成都市青羊区腾飞大道51号6栋B座3楼, Sichuan 610073 (CN)。 胥南飞 (XU, Nanfei); 中国四川省成都市青羊区腾飞大道51号6栋B座3楼, Sichuan 610073 (CN)。
- (74) 代理人: 北京超凡志成知识产权代理事务所 (普通合伙) (CHOFN INTELLECTUAL PROPERTY); 中国北京市海淀区北四环西路68号左岸工社12层1215-1218室, Beijing 100080 (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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, 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))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(54) Title: METHOD FOR SCREENING GENE FOR RESISTANCE AGAINST HPPD INHIBITOR-TYPE HERBICIDE AND APPLICATION

(54) 发明名称: 筛选抗 HPPD 抑制剂类除草剂基因的方法及应用

(57) Abstract: The present invention discloses a method for screening a gene for resistance against an HPPD inhibitor-type herbicide. The method comprises high-throughput screening of a microorganism in a nutrient medium containing an HPPD inhibitor, using 16s rRNA sequencing to identify the screened microorganism, using the identification results to determine the species and genus of the screened microorganism, and cloning an HPPD gene for verification.

(57) 摘要: 本发明公开了一种筛选抗 HPPD 抑制剂类除草剂基因的方法, 该方法以含有 HPPD 抑制剂的培养基对微生物进行高通量筛选, 经 16s rRNA 测序法对筛选到的微生物进行鉴定, 通过鉴定结果确定其种属, 进而克隆到 HPPD 基因并进行验证。



WO 2017/128302 A1

筛选抗HPPD抑制剂类除草剂基因的方法及应用

技术领域

本发明涉及基因工程领域，具体而言，涉及一种筛选抗HPPD抑制剂类除草剂基因的方法及应用。

背景技术

对羟基苯基丙酮酸双氧化酶（4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, HPPD）存在于各种生物体中，它是一种铁-酪氨酸蛋白，在植物体内可将对羟基丙酮酸（4-Hydroxyphenylpyruvate, HPP）催化为尿黑酸（2,5-dihydroxyphenylacetate, HGA），进而转化为光合作用中电子传递所需要的重要物质质体醌和生育酚，其中质体醌还是影响八氢番茄红素去饱和酶催化的关键辅助因子。鉴于其上述重要作用和特点，HPPD成为继ALS、ACC以及Protox之后的又一新的除草剂靶标酶。由于该酶抑制剂用于除草方面时具有广谱、高效、残留低、环境相容性好、使用安全的特点，引起人们对其抑制剂研究的重视，该抑制剂的发现对环境的保护有重大作用，这也是未来除草剂生产发展的趋势。

抗除草剂农作物的种植，更充分地利用了除草剂的优势。在过去20年里，抗除草剂作物给农民和环境都带来了巨大利益。目前生产上种植最多的是抗草甘膦玉米和大豆，从而使草甘膦的施用非常广泛。随着草甘膦的大量使用，抗草甘膦杂草不断出现，从而影响了抗草甘膦作物的有效性。

因此，开发新型抗除草剂作物，如抗 HPPD 抑制剂类除草剂作物，势在必行。

本领域已有一些对抗除草剂 HPPD 基因的研究，但筛选抗除草剂 HPPD 基因仍然困难。用植物直接筛选虽然其结果可直接应用，但植物的生长繁殖周期长，传代慢，因此筛选效率非常低，难以用于实践。抗 HPPD 抑制剂类除草剂 HPPD 基因的初步筛选往往是在细菌中进行。但这些筛选都需要先分离微生物菌株或将 HPPD 基因克隆在细菌中，再进行单个评估。这种方法工作量大、范围广、没有针对性，难以进行大规模筛选或从稀有样品中进行筛选。

发明内容

本发明的目的在于提供一种筛选抗 HPPD 抑制剂类除草剂基因的方法，运用此种方法筛选抗 HPPD 抑制剂类除草剂基因，不用对分离的个别菌株筛选，较传统方法目标性强，操作简便，可在短时间内筛选得到较多的抗 HPPD 抑制剂类除草剂基因，也容易从稀有样品中筛选得到抗 HPPD 抑制剂类除草剂基因。

一种筛选抗 HPPD 抑制剂类除草剂基因的方法，包括如下步骤：

1)、将含有 HPPD 抑制剂类除草剂抗性微生物的多种微生物在含有 HPPD 抑制剂的抗性筛选培养基中培养，得到抗性菌种，并对其纯化培养获得单克隆；

2)、以所述单克隆的基因组为模板扩增该单克隆的 HPPD 基因的开放阅读框序列,将扩增产物连入质粒中并于细菌中进行原核表达,得到重组菌株;

3)、对重组菌株的 HPPD 抑制剂抗性进行验证,获得抗 HPPD 抑制剂类除草剂基因。

HPPD 即对羟基苯基丙酮酸双氧化酶 (4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase)。

本发明针对现有的抗 HPPD 抑制剂基因筛选方法中存在的不足,提供了一种快速而有效地高通量筛选抗 HPPD 抑制剂类除草剂基因的方法,运用此种方法筛选抗 HPPD 抑制剂类除草剂基因,不用对分离的个别菌株筛选,较传统方法目标性强,操作简便,可在短时间内筛选得到较多的抗 HPPD 抑制剂类除草剂基因。

优选的,如上所述的筛选抗 HPPD 抑制剂类除草剂基因的方法,在步骤 1) 中,所述培养的具体过程为:

将微生物样本于含有 HPPD 抑制剂的抗性筛选培养基中培养 1~10 次,且培养次数大于 1 次时,在每相邻两次培养所用抗性筛选培养基中,后一次培养的 HPPD 抑制剂浓度均不低于前一次,且后一次培养的菌种来源于前一次培养中存活下来的微生物菌种。

用此方法可筛选到针对不同浓度 HPPD 抑制剂敏感的菌种,亦即该体系能够快速筛选出不同程度的抗 HPPD 抑制剂类除草剂基因。

进一步优选的,在步骤 3) 中,抗性验证具体包括:

以步骤 1) 中筛选到的抗性菌种的 HPPD 抑制剂浓度为最高浓度设置 HPPD 抑制剂浓度梯度, 将步骤 3) 中所述重组菌株于 HPPD 抑制剂含量梯度设置的抗性筛选培养基中培养, 以筛选抗 HPPD 抑制剂类除草剂基因。

由于理论上重组菌株的 HPPD 抑制剂抗性不会高于抗性菌种的 HPPD 抑制剂抗性, 所以以抗性菌种的 HPPD 抑制剂浓度为最高浓度。例如筛选到的抗性菌种能够耐受的最高 HPPD 抑制剂为 10mM 硝磺草酮, 则在步骤 3) 中, 抗性筛选培养基的 HPPD 抑制剂浓度梯度可设置为 0.1mM、0.5mM、1mM、2mM、5mM、10mM 硝磺草酮。在具体的应用中, 步骤 3) 中用到的抗性筛选培养基可能与步骤 1) 中略有不同, 如在步骤 1) 中提供的抗性筛选培养基配方的基础上加上重组菌株所具有抗性对应的抗生素。

优选的, 如上所述的筛选抗 HPPD 抑制剂类除草剂基因的方法, 所述 HPPD 抑制剂为硝磺草酮或环磺酮。

硝磺草酮 (Mesotrione) 又名甲基磺草酮, 分子式 $C_{14}H_{13}NO_7S$, 分子量 339.32, CAS No: 104206-82-8。它是一类常用的 HPPD 抑制剂类除草剂的主要成分。

环磺酮 (Tembotrione), 是由拜耳公司报道的三酮类除草剂, 分子式 $C_{17}H_{16}ClF_3O_6S$, 分子量 440.82, CAS No:335104-84-2。

进一步优选的, 在步骤 1) 中:

HPPD 抑制剂含量的范围为 1~20mM 硝磺草酮或 0.25~5mM 环磺酮, 相邻浓度梯度设置的间距为 1.5~5 倍。

相邻浓度梯度设置的间距为 1.5~5 倍的含义即后一次培养中培养基的 HPPD 抑制剂浓度是前一次培养中培养基的 HPPD 抑制剂浓度的 1.5~5 倍。

优选的，如上所述的筛选抗 HPPD 抑制剂类除草剂基因的方法，所述抗性筛选培养基为含有 1~20mM 硝磺草酮或 0.25~5mM 环磺酮的 SMNT 基本培养基；

按体积份数计，所述 SMNT 基本培养基包括以下组份：

5×M9 盐溶液 200 份、245~255mM 的 MgSO₄ 溶液 4.8 份、97~103mM 的 CaCl₂ 溶液 1 份、0.128%酪氨酸溶液 778~784 份、水 9~11 份；

所述 5×M9 盐溶液中包括：Na₂HPO₄·7H₂O 60~68 g/L、KH₂PO₄ 14~16 g/L、NaCl 2.4~2.6 g/L、NH₄Cl 4.8~5.2 g/L；

所述 5×M9 盐溶液、MgSO₄ 溶液、CaCl₂ 溶液及 0.128%酪氨酸溶液所用溶剂均为水。

若所筛选的微生物具有 HPPD 抑制剂抗性，则可在所述抗性筛选培养基中利用酪氨酸，进而合成质体醌和生育酚从而存活下来。

优选的，如上所述的筛选抗 HPPD 抑制剂类除草剂基因的方法，在步骤 2) 中：

当所述单克隆种属未知时，则扩增所述单克隆的部分 16s rRNA 序列，并将扩增产物测序以确定所述单克隆种属；

根据得到的种属信息查询所述单克隆的 HPPD 基因序列并以此为模板设计引物扩增得到具有 HPPD 抑制剂抗性的 HPPD 基因片段并测序；

根据测序结果设计引物，将所述具有 HPPD 抑制剂抗性的 HPPD 基因的开放阅读框序列连入质粒中并于细菌中进行原核表达。

16s rRNA 普遍存在于所有细菌染色体基因中。rRNA 参与生物蛋白质的合成过程，其功能是一切生物都必不可少的，而且在生物进化的漫长历

程中其基因序列较为保守，变异较小，可看作为生物演变的时间钟，其可变区序列因细菌不同而异，恒定区序列基本保守，所以可利用恒定区序列设计引物，将 16s rDNA 片段扩增出来，利用可变区序列的差异来对不同菌属、菌种的细菌进行分类鉴定。扩增 16s rRNA 的引物如：

https://en.wikipedia.org/wiki/16S_ribosomal_RNA 中所述；

本申请优选了上游引物为 27F，下游引物为 1492R。

由于微生物基因组的多样性，网上查到的序列可能与实际不一致，所以对有些菌株需要先查到的基因序列上下游较远的地方设计引物将 HPPD 基因序列完整的克隆出来，再测序验证，进而获得正确的 HPPD 基因序列的开放阅读框序列。

优选的，如上所述的筛选抗 HPPD 抑制剂类除草剂基因的方法，在步骤 2) 中：

所述质粒为 pADV3；

所述 pADV3 的序列由原核表达载体 pUC57 改造而来，其改造方法为：将 pUC57 中的 MCS 序列替换为 SEQ ID NO: 1 所示序列。

改造后的 pADV3 与 pUC57 相比，只有 MCS (Multiple Cloning Site, 多克隆位点) 序列部分不一样。原核表达载体 pADV3 中启动子和终止子的增加，可以帮助抗 HPPD 抑制剂在大肠杆菌中更好的表达。

pADV3 可与大肠杆菌 Trans1-T1 搭配使用。

Trans1-T1 感受态细胞是目前生长速度最快的感受态细胞，在氨苄青霉素平板上，8~9h 可见克隆；用于蓝、白斑筛选，12h 可见蓝斑；将过夜培养的单克隆在 2ml 的 LB 培养基中培养 4~5h 即可进行小量质粒提取；适用

于高效的 DNA 克隆和质粒扩增，减少克隆 DNA 同源重组的发生，提高质粒 DNA 的产量和质量；具有 T1，T5 噬菌体抗性。使用 pUC19 质粒检测，转化效率可达 10^9 cfu/ μ g。

根据如上所述的筛选抗 HPPD 抑制剂类除草剂基因的方法获得的抗 HPPD 抑制剂类除草剂基因在培育抗 HPPD 抑制剂类除草剂植物品种中的应用。

根据如上所述的所述筛选方法获得的抗 HPPD 抑制剂类除草剂基因，其序列为 SEQ ID NO: 3 所示

与现有技术相比，本发明的有益效果为：

1)、本发明提供的方法可在短时间内筛选、分离和分析抗 HPPD 抑制剂基因，不用对分离的个别菌株筛选，较传统方法目标性强，操作简便，节约了大量的人力和物力。

2)、本发明提供的方法可从抗性微生物含量极低的稀有样品中筛选、分离出抗 HPPD 抑制剂的微生物及其基因。

3)、通过本申请提供的方法，可分离获得不同浓度抗性的菌株，具有很广阔的应用前景。

附图说明

图 1 为实施例 5 中以 pADV3-pfHPPD 转化的 Trans1-T1 大肠杆菌在培养基中的颜色变化结果。

具体实施方式

下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述，但是本领域技术人员将会理解，下列实施例仅用于说明本发明，而不应视为限制本发明的范围。实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市售购买获得的常规产品。

实施例 1

一种筛选抗 HPPD 抑制剂类除草剂基因的方法，包括如下步骤：

S11、将含有 HPPD 抑制剂类除草剂抗性微生物的多种微生物在含有 HPPD 抑制剂的抗性筛选培养基中培养，得到抗性菌种，并对其纯化培养获得单克隆；

S12、以所述单克隆的基因组为模板扩增该单克隆的 HPPD 基因的开放阅读框序列，将扩增产物连入质粒中并于细菌中进行原核表达，得到重组菌株；

S13、对重组菌株的 HPPD 抑制剂抗性进行验证，获得抗 HPPD 抑制剂类除草剂基因。

需要说明的是，若待测样本中含有 HPPD 抑制剂类除草剂抗性微生物，则用本方法即可筛选获得其抗 HPPD 抑制剂基因。HPPD 抑制剂抗性微生物的种属信息已知或未知均可，若种属信息未知，则步骤 S12 步骤会有所增加，具体参见实施例 3~4。

实施例 2

本实施例为抗 HPPD 抑制剂类除草剂菌株的筛选步骤。

具体方法如下：

S21、抗性筛选培养基配置

5×M₉S (M9 盐)：

Na₂HPO₄·7H₂O 64.0 g/L

KH₂PO₄ 15.0 g/L

NaCl 2.5 g/L

NH₄Cl 5.0 g/L

121℃，灭菌 20min。

SMNT（盐培养基（Salt Medium）、氮（Nitrogen）和酪氨酸（Tyrosine））

基本培养基：

5×M₉ 盐 200ml

250 mM MgSO 48ml

100 mM CaCl₂ 1ml

0.128% 酪氨酸（Tyrosine） 781ml

H₂O 10ml

将以上试剂混合后添加 HPPD 抑制剂类除草剂即得到抗性筛选培养基。

以硝磺草酮（Mesotrione, MT）为例将筛选培养基配制成不同浓度梯度的

筛选培养基：

SMNT-MT1（TM1）：在 SMNT 培养基中加入 1mM 的硝磺草酮；

TM5：在 SMNT 培养基中加入 5mM 的硝磺草酮。

S22、抗 HPPD 抑制剂类除草剂菌株的筛选及抗性测试

取 0.1-5g 样品加入 5ml 筛选培养基 TM5 中, 300r/min 30℃ 培养 24-48h;

取上清液 100 μ l 接种于 5ml 的 TM5 中, 300r/min 30℃ 培养 24-48h;

待菌长出后取上清液 5 μ l 接种于 2ml 的 TM5 中, 300r/min 30℃ 培养 24-48h, 当菌长到半饱和及以上时, 保存菌。此时得到的菌为抗 TM5 的菌。

分别接种 2.5 μ l TM5 菌株于 1ml TM10、TM20 以及更高的 TM 培养基中, 300r/min 30℃ 培养 72h 后观察菌的生长情况, 若菌长到半饱和及以上, 保存菌。综上, 不同浓度抗性的菌也就分离得到。

本领域技术人员可根据实际情况, 将本实施例中的硝磺草酮替换为 0.25~5mM 的环磺酮或其他浓度范围的其他 HPPD 抑制剂。

实施例 3

本实施例为分离菌株的鉴定步骤。

具体方法如下:

S31、固体 LB 培养基的配制:

胰蛋白胨(Tryptone)	10g/L
酵母提取物(Yeast extract)	5g/L
氯化钠(NaCl)	10g/L
琼脂粉	13g/L

121℃, 灭菌 20min。

将保存的菌株划线接种于 LB 固体培养基上, 30℃ 培养 24~48h。

S32、分离菌株的鉴定:

使用 16s rRNA 引物进行鉴定。

16s rRNA 引物序列如下：

16S-27F: 5-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3;

16S-1492R: 5-GGTTACCTTGTTACGACTT-3。

PCR 反应体系：

10×反应缓冲液 (Reaction Buffer) 5.0 μ L

2.5mM dNTP 4.0 μ L

10 μ M 正向引物 16S-27F 1.0 μ L

10 μ M 反向引物 16S-1492R 1.0 μ L

5U/ μ L Taq 聚合酶 0.8 μ L

DMSO 1 μ L

50ng/ μ L 模版 DNA 2.0 μ L

补无菌双蒸水至 50 μ L。

PCR 反应程序：

①94 $^{\circ}$ C 5min

②94 $^{\circ}$ C 30s

③51 $^{\circ}$ C 30s

④72 $^{\circ}$ C 1min30s

⑤重复②③④ 进行 30 个循环

⑥72 $^{\circ}$ C 10min

⑦4 $^{\circ}$ C 保存

S33、琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增结果，并送样测序。数据的处理使用 NCBI blastn 分析分离菌株的同源性，对分离的菌株进行分类整理。测序结果为如 SEQ ID NO: 2 所示的核苷酸序列。

实施例 4

本实施例为 HPPD 基因的克隆步骤。

S41、HPPD 基因的克隆

根据实施例 3 中 16s rRNA 鉴定结果，判断该微生物为 MTCC5279（恶臭假单胞菌，*Pseudomonas putida*）。根据在 NCBI 中找到的该菌株的 HPPD 基因序列设计引物，并以查到的 HPPD 基因为模版，进行 PCR 扩增，PCR 产物取 5 μ L 进行琼脂糖凝胶电泳后，剩余的 PCR 产物送测序。

由于微生物基因组的多样性，网上查到的序列可能与实际不一致，所以对有些菌株需要先查到的基因序列上下游较远的地方设计引物将 HPPD 基因序列完整的克隆出来，再测序验证。测序结果为 SEQ ID NO: 3 所示的核苷酸序列。

根据测序结果，选取该 HPPD 基因的开放阅读框（ORF）设计引物，扩增目的基因。

引物设计如下：

HPPD-F: 5-ATGGCTGATATCTTCGACAACCCG-3

HPPD-R: 5-TTATTCGACGTTTCAGGACGCCGC-3

以菌株 MTCC5279 为模板，克隆 HPPD 基因。

PCR 反应体系如下：

2×KOD 缓冲液	25 μ L
2.5mM dNTPs	8 μ L
10 μ M 前引物 HPPD-F	1.5 μ L
10 μ M 后引物 HPPD-R	1.5 μ L
KOD 酶	1 μ L
50 ng/ μ L 模版 DNA	2.0 μ L

补无菌双蒸水至 50 μ L。

PCR 反应程序：

- ①94 $^{\circ}$ C 3min
- ②98 $^{\circ}$ C 10s
- ③62 $^{\circ}$ C 30s
- ④68 $^{\circ}$ C 1min20s
- ⑤重复②③④ 进行 40 个循环
- ⑥68 $^{\circ}$ C 10min
- ⑦4 $^{\circ}$ C 保存

取 5 μ L PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测后，将剩余 PCR 产物送测序；测序结果为如 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列。

S42、HPPD 基因表达载体的构建

测序确定该基因为 HPPD 基因后，使用 PCR 产物纯化试剂盒 (Omega) 回收 PCR 产物，再使用不同限制性内切酶 (*Pac1* 和 *Sbf1*) 酶切纯化的 PCR

产物，形成粘性末端；酶切的片段和经过同样酶切处理过的细菌表达载体 pADV3 进行连接，16℃ 过夜。构建得到表达载体 pADV3-MT79HPPD。

引物设计如下：

MT79-F：

5-ACGAAAAACCTTAATTAATGGCTGATATCTTCGACAACCCG-3

PacI

MT79-R：

5-ACTAAAAAACCTGCAGGTTATTCGACGTTTCAGGACGCCGC-3

SbfI

划线处为酶切位点 *PacI* 和 *SbfI*，前面的序列为保护碱基序列。以菌株 MTCC5279 为模板，克隆 HPPD 基因。

PCR 反应体系如下：

2×KOD 缓冲液	25μL
2.5mM dNTPs	8μL
10μM 前引物 MT79-F	1.5μL
10 μM 后引物 MT79-R	1.5μL
KOD 酶	1μL
50 ng/μL 模版 DNA	2.0μL

补无菌双蒸水至 50μL。

PCR 反应程序：

①94℃	3min
②98℃	10s

- ③62℃ 30s
④68℃ 1min20s
⑤重复②③④ 进行 40 个循环
⑥68℃ 10min
⑦4℃保存

酶切体系如下：

1×CutSmart	10μl
<i>Sbf</i> 1	1μl
<i>Pac</i> 1	1μl
DNA	50μl

加双蒸水至 100 μl。

连接体系如下：

10×T4 DNA 连接酶缓冲液 (ligase Buffer)	1μl
目的片段 (99ng/μl)	5μl
pADV3 (17ng/μl)	3.5μl
T4 DNA 连接酶 (ligase)	0.5μl

16℃连接过夜。

实施例 5

本实施例为克隆到的 HPPD 基因的抗性测试步骤。

将细菌表达载体 pADV3-MT79HPPD 用热激法转入大肠杆菌 Trans1-T1 感受态细胞，PCR 及其酶切验证转化结果后做抗性测试。由于 pADV3 载体

可以在大肠杆菌 Trans1-T1 细胞中表达，因此，将检测阳性 pADV3-MT79HPPD 转化的 Trans1-T1 大肠杆菌细胞直接做抗性测试即可。

首先，将单克隆细胞在液体 LB 培养基中活化过夜；

其次，将活化的菌转接入 TM0、TM1、TM5、TM10 以及 TM20 抗性测试培养基中，以 pADV3-pfHPPD 转化的 Trans1-T1 大肠杆菌为阳性对照，以空载 pADV3 质粒转化的 Trans1-T1 大肠杆菌为阴性对照，于 37℃，300r/min 摇床中培养并观察颜色的变化。

根据所述抗性筛选培养基颜色的深浅程度对其 HPPD 抑制剂抗性进行打分评级，若培养基的颜色变为深色，则表示 HPPD 基因能在加了除草剂的培养基中生长，即该 HPPD 基因抗该除草剂，颜色越深，则表示 HPPD 抑制剂抗性越强。若测定的培养基的颜色无变化，而阳性对照的培养基变为深色，则表示该基因不抗测定的除草剂，该实施例的培养基颜色变化结果如图 1 所示。

尽管已用具体实施例来说明和描述了本发明，然而应意识到，在不背离本发明的精神和范围的情况下可以作出许多其它的更改和修改。因此，这意味着在所附权利要求中包括属于本发明范围内的所有这些变化和修改。

权利要求

1、一种筛选抗 HPPD 抑制剂类除草剂基因的方法，其特征在于，包括如下步骤：

1)、将含有 HPPD 抑制剂类除草剂抗性微生物的多种微生物在含有 HPPD 抑制剂的抗性筛选培养基中培养，得到抗性菌种，并对其纯化培养获得单克隆；

2)、以所述单克隆的基因组为模板扩增该单克隆的 HPPD 基因的开放阅读框序列，将扩增产物连入质粒中并于细菌中进行原核表达，得到重组菌株；

3)、对重组菌株的 HPPD 抑制剂抗性进行验证，获得抗 HPPD 抑制剂类除草剂基因。

2、根据权利要求 1 所述的筛选抗 HPPD 抑制剂类除草剂基因的方法，其特征在于，在步骤 1) 中，所述培养的具体过程为：

将微生物样本于含有 HPPD 抑制剂的抗性筛选培养基中培养 1~10 次，且培养次数大于 1 次时，在每相邻两次培养所用抗性筛选培养基中，后一次培养的 HPPD 抑制剂浓度均不低于前一次，且后一次培养的菌种来源于前一次培养中存活下来的微生物菌种。

3、根据权利要求 2 所述的筛选抗 HPPD 抑制剂类除草剂基因的方法，其特征在于，在步骤 3) 中，抗性验证具体包括：

以步骤 1) 中筛选到的抗性菌种的 HPPD 抑制剂浓度为最高浓度设置 HPPD 抑制剂浓度梯度, 将步骤 3) 中所述重组菌株于 HPPD 抑制剂含量梯度设置的抗性筛选培养基中培养, 以筛选抗 HPPD 抑制剂类除草剂基因。

4、根据权利要求 1~3 中任一项所述的筛选抗 HPPD 抑制剂类除草剂基因的方法, 其特征在于, 所述 HPPD 抑制剂为硝磺草酮或环磺酮。

5、根据权利要求 4 所述的筛选抗 HPPD 抑制剂类除草剂基因的方法, 其特征在于:

在步骤 1) 中, HPPD 抑制剂含量的范围为 1~20mM 硝磺草酮或 0.25~5mM 环磺酮, 相邻浓度梯度设置的间距为 1.5~5 倍。

6、根据权利要求 1 所述的筛选抗 HPPD 抑制剂类除草剂基因的方法, 其特征在于, 所述抗性筛选培养基为含有 1~20mM 硝磺草酮或 0.25~5mM 环磺酮的 SMNT 基本培养基;

按体积份数计, 所述 SMNT 基本培养基包括以下组份:

5×M9 盐溶液 190~210 份、245~255mM 的 $MgSO_4$ 溶液 4.5~5.0 份、97~103mM 的 $CaCl_2$ 溶液 0.8~1.2 份、0.128%酪氨酸溶液 778~784 份、水 9~11 份;

所述 5×M9 盐溶液中包括: $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 60~68 g/L、 KH_2PO_4 14~16 g/L、NaCl 2.4~2.6 g/L、 NH_4Cl 4.8~5.2 g/L;

所述 5×M9 盐溶液、 $MgSO_4$ 溶液、 $CaCl_2$ 溶液及 0.128%酪氨酸溶液所用溶剂均为水。

7、根据权利要求 1 所述的筛选抗 HPPD 抑制剂类除草剂基因的方法, 其特征在于, 在步骤 2) 中:

当所述单克隆种属未知时，则扩增所述单克隆的部分 16s rRNA 序列，并将扩增产物测序以确定所述单克隆种属；

根据得到的种属信息查询所述单克隆的 HPPD 基因序列并以此为模板设计引物扩增得到具有 HPPD 抑制剂抗性的 HPPD 基因片段并测序；

根据测序结果设计引物，将所述具有 HPPD 抑制剂抗性的 HPPD 基因的开放阅读框序列连入质粒中并于细菌中进行原核表达。

8、根据权利要求 7 所述的筛选抗 HPPD 抑制剂类除草剂基因的方法，其特征在于，在步骤 2) 中：

所述质粒为 pADV3；

所述 pADV3 的序列由原核表达载体 pUC57 改造而来，其改造方法为：将 pUC57 中的 MCS 序列替换为 SEQ ID NO: 1 所示序列。

9、根据权利要求 1~8 中任一项所述筛选方法获得的抗 HPPD 抑制剂类除草剂基因在培育抗 HPPD 抑制剂类除草剂植物品种中的应用。

10、根据权利要求 1~8 中任一项所述筛选方法获得的抗 HPPD 抑制剂类除草剂基因，其序列为 SEQ ID NO: 3 所示。

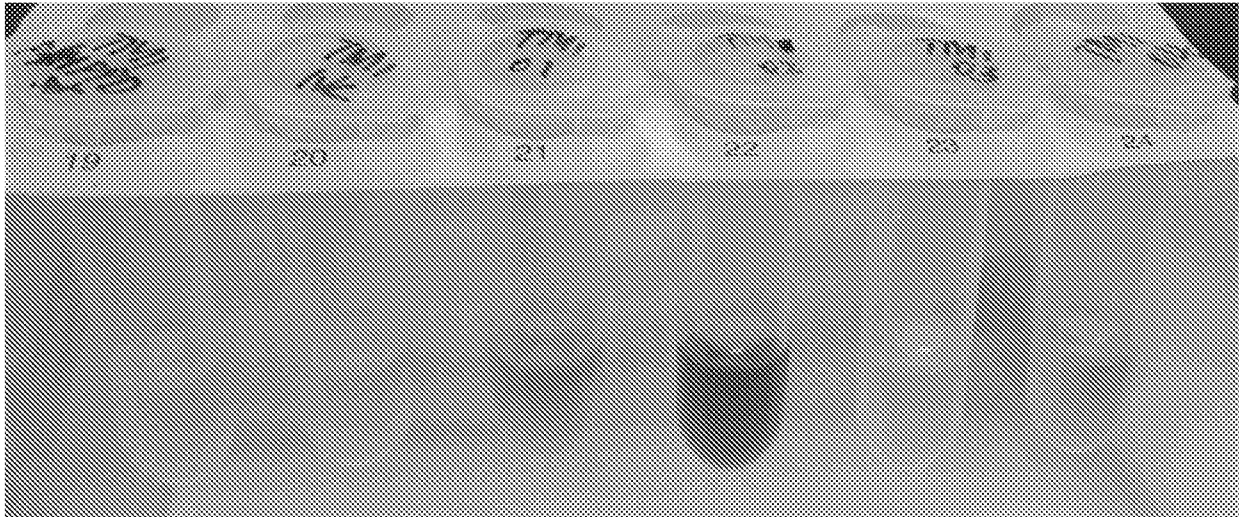


图 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/072810

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/31 (2006.01) i; C12N 15/10 (2006.01) i; C12N 15/82 (2006.01) i; A01H 5/00 (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; 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)

CNMED; CPRSABS; CNABS; DWPI; SIP0ABS; USTXT; WOTXT; EPTXT; CNKI; Pubmed; Google scholar; NCBI Blast; hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, herbicide, gene, microorganism, culture, amplification, HPPD, inhibitor, suppressor, pseudomonas, resistan+, toleran+, screening, cloning, search based on sequence SEQ ID 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.
Y	WU, Dandan; "Screening, Identification and Its Gene Cloning of Glyphosate Resistant Strains", Science-Engineering (A), China Master'S Theses Full-Text Database, no. 02, 15 February 2014 (15.02.2014), see chapters 2. 2-2.4	1-9
Y	CN 1192243 A (RHONE-POULENC AGROCHIMIE), 02 September 1998 (02.09.1998), see description, paragraphs 2-11	1-9
A	CN 104736699 A (BAYER CROPSCIENCE LP; BAYER CROPSCIENCE AG), 24 June 2015 (24.06.2015), see the whole document	1-10
A	CN 101063174 A (RUBBER RESEARCH INSTITUTE, CHINESE ACADEMY OF TROPICAL AGRICULTURAL SCIENCES), 31 October 2007 (31.10.2007), see the whole document	1-10

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 October 2016 (25.10.2016)

Date of mailing of the international search report
07 November 2016 (07.11.2016)

Name and mailing address of the ISA/CN:
State Intellectual Property Office of the P. R. China
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao
Haidian District, Beijing 100088, China
Facsimile No.: (86-10) 62019451

Authorized officer
LI, Kangqi
Telephone No.: (86-10) **62411034**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2016/072810

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 1192243 A	02 September 1998	CO 4520296 A1 PL 323679 A1 SK 161597 A3 CN 1206358 C ES 2297840 T3 BR 9608375 A PL 189955 B1 EP 0828837 B1 DK 0828837 T3 CA 2219979 C DE 69637402 D1 PT 828837 E HU 9900450 A2 US 6268549 B1 BG 102131 A FR 2734842 A1 HU 9900450 A3 NZ 311055 A MA 23884 A1 WO 9638567 A3 AR 002169 A1 WO 9638567 A2 CZ 9703809 A3 HR P960245 A2 CA 2219979 A1 EP 0828837 A2 AU 6228696 A MX 9709310 A AU 718982 B2 BR 9608375 B1 KR 100431366 B1 DE 69637402 T2 JP H11505729 A AT 383431 T FR 2734842 B1 TR 9701492 T1	15 October 1997 14 April 1998 08 July 1998 15 June 2005 01 May 2008 05 January 1999 31 October 2005 09 January 2008 19 May 2008 14 December 2010 21 February 2008 14 April 2008 28 May 1999 31 July 2001 31 July 1998 06 December 1996 29 July 2002 28 February 2000 31 December 1996 22 May 1997 07 January 1998 05 December 1996 18 March 1998 31 August 1997 05 December 1996 18 March 1998 18 December 1996 28 February 1998 04 May 2000 05 May 2009 16 July 2004 02 January 2009 25 May 1999 15 January 2008 27 February 1998 21 February 1998
CN 104736699 A	24 June 2015	CA 2884895 A1 UY 35035 A AU 2013315385 A1 EP 2895601 A1 KR 20150070148 A MX 2015003322 A US 2015267180 A1 JP 2015528310 A AR 092564 A1 WO 2014043435 A1 PH 12015500549 A1 CL 2015000640 A1 EA 201590367 A1	20 March 2014 30 April 2014 30 April 2015 22 July 2015 24 June 2015 14 August 2015 24 September 2015 28 September 2015 22 April 2015 20 March 2014 04 May 2015 22 July 2016 30 December 2015
CN 101063174 A	31 October 2007	None	

<p>A. 主题的分类</p> <p>C12N 15/31(2006.01)i; C12N 15/10(2006.01)i; C12N 15/82(2006.01)i; A01H 5/00(2006.01)i</p> <p>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</p>																	
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C12N; A01H</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>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))</p> <p>CNMED; CPRSABS; CNABS; DWPI; SIPOABS; USTXT; WOTXT; EPTXT; CNKI; Pubmed; Google scholar; NCBI Blast: 羧基苯丙酮酸双加氧酶, 除草剂, 抑制剂, 基因, 微生物, 假单胞菌, 耐受, 抗性, 抵抗, 筛选, 培养, 克隆, 扩增, HPPD, inhibitor, supressor, pseudomonas, resistan+, toleran+, screening, cloning, 基于序列SEQ ID NO:1-3的检索</p>																	
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>吴丹丹. “草甘膦抗性菌株的筛选、鉴定及抗性基因的克隆” 中国优秀硕士论文全文数据库: 理工A辑, 第02期, 2014年 2月 15日 (2014 - 02 - 15), 参见第2.2节-第2.4节</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 1192243 A (罗纳-普朗克农业化学公司) 1998年 9月 2日 (1998 - 09 - 02) 参见说明书第2-11段</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 104736699 A (拜尔作物科学有限合伙公司 拜尔作物科学股份公司) 2015年 6月 24日 (2015 - 06 - 24) 参见全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 101063174 A (中国热带农业科学院橡胶研究所) 2007年 10月 31日 (2007 - 10 - 31) 参见全文</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	Y	吴丹丹. “草甘膦抗性菌株的筛选、鉴定及抗性基因的克隆” 中国优秀硕士论文全文数据库: 理工A辑, 第02期, 2014年 2月 15日 (2014 - 02 - 15), 参见第2.2节-第2.4节	1-9	Y	CN 1192243 A (罗纳-普朗克农业化学公司) 1998年 9月 2日 (1998 - 09 - 02) 参见说明书第2-11段	1-9	A	CN 104736699 A (拜尔作物科学有限合伙公司 拜尔作物科学股份公司) 2015年 6月 24日 (2015 - 06 - 24) 参见全文	1-10	A	CN 101063174 A (中国热带农业科学院橡胶研究所) 2007年 10月 31日 (2007 - 10 - 31) 参见全文	1-10
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
Y	吴丹丹. “草甘膦抗性菌株的筛选、鉴定及抗性基因的克隆” 中国优秀硕士论文全文数据库: 理工A辑, 第02期, 2014年 2月 15日 (2014 - 02 - 15), 参见第2.2节-第2.4节	1-9															
Y	CN 1192243 A (罗纳-普朗克农业化学公司) 1998年 9月 2日 (1998 - 09 - 02) 参见说明书第2-11段	1-9															
A	CN 104736699 A (拜尔作物科学有限合伙公司 拜尔作物科学股份公司) 2015年 6月 24日 (2015 - 06 - 24) 参见全文	1-10															
A	CN 101063174 A (中国热带农业科学院橡胶研究所) 2007年 10月 31日 (2007 - 10 - 31) 参见全文	1-10															
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																	
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“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)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” 同族专利的文件</p>																	
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2016年 10月 25日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2016年 11月 7日</p>															
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>受权官员</p> <p>李康琦</p> <p>电话号码 (86-10)62411034</p>															

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/072810

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)
CN	1192243	A	1998年 9月 2日	CO	4520296	A1	1997年 10月 15日
				PL	323679	A1	1998年 4月 14日
				SK	161597	A3	1998年 7月 8日
				CN	1206358	C	2005年 6月 15日
				ES	2297840	T3	2008年 5月 1日
				BR	9608375	A	1999年 1月 5日
				PL	189955	B1	2005年 10月 31日
				EP	0828837	B1	2008年 1月 9日
				DK	0828837	T3	2008年 5月 19日
				CA	2219979	C	2010年 12月 14日
				DE	69637402	D1	2008年 2月 21日
				PT	828837	E	2008年 4月 14日
				HU	9900450	A2	1999年 5月 28日
				US	6268549	B1	2001年 7月 31日
				BG	102131	A	1998年 7月 31日
				FR	2734842	A1	1996年 12月 6日
				HU	9900450	A3	2002年 7月 29日
				NZ	311055	A	2000年 2月 28日
				MA	23884	A1	1996年 12月 31日
				WO	9638567	A3	1997年 5月 22日
				AR	002169	A1	1998年 1月 7日
				WO	9638567	A2	1996年 12月 5日
				CZ	9703809	A3	1998年 3月 18日
				HR	P960245	A2	1997年 8月 31日
				CA	2219979	A1	1996年 12月 5日
				EP	0828837	A2	1998年 3月 18日
				AU	6228696	A	1996年 12月 18日
				MX	9709310	A	1998年 2月 28日
				AU	718982	B2	2000年 5月 4日
				BR	9608375	B1	2009年 5月 5日
				KR	100431366	B1	2004年 7月 16日
				DE	69637402	T2	2009年 1月 2日
				JP	H11505729	A	1999年 5月 25日
				AT	383431	T	2008年 1月 15日
				FR	2734842	B1	1998年 2月 27日
				TR	9701492	T1	1998年 2月 21日
CN	104736699	A	2015年 6月 24日	CA	2884895	A1	2014年 3月 20日
				UY	35035	A	2014年 4月 30日
				AU	2013315385	A1	2015年 4月 30日
				EP	2895601	A1	2015年 7月 22日
				KR	20150070148	A	2015年 6月 24日
				MX	2015003322	A	2015年 8月 14日
				US	2015267180	A1	2015年 9月 24日
				JP	2015528310	A	2015年 9月 28日
				AR	092564	A1	2015年 4月 22日
				WO	2014043435	A1	2014年 3月 20日
				PH	12015500549	A1	2015年 5月 4日
				CL	2015000640	A1	2016年 7月 22日
				EA	201590367	A1	2015年 12月 30日
CN	101063174	A	2007年 10月 31日	无			

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)