

(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
2016 年 8 月 18 日 (18.08.2016)



(10) 国际公布号
WO 2016/127866 A1

(51) 国际专利分类号:

C12N 9/02 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/53 (2006.01) A01H 5/00 (2006.01)
C12N 15/84 (2006.01) A01G 7/06 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2016/073181

(22) 国际申请日: 2016 年 2 月 2 日 (02.02.2016)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201510078628.8 2015 年 2 月 13 日 (13.02.2015) CN

(71) 申请人: 北京大北农科技集团股份有限公司 (BEIJING DABEINONG TECHNOLOGY GROUP CO., LTD.) [CN/CN]; 中国北京市海淀区中关村大街 27 号 14 层, Beijing 100080 (CN)。北京大北农生物技术有限公司 (BEIJING DABEINONG BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) [CN/CN]; 中国北京市海淀区圆明园西路 2 号院中国农业科学院原子能利用研究所 49 号楼, Beijing 100193 (CN)。

(72) 发明人: 吴业春 (WU, Yechun); 中国北京市海淀区圆明园西路 2 号院中国农业科学院原子能利用研究所 49 号楼, Beijing 100193 (CN)。牛晓广 (NIU,

Xiaoguang); 中国北京市海淀区圆明园西路 2 号院中国农业科学院原子能利用研究所 49 号楼, Beijing 100193 (CN)。陶青 (TAO, Qing); 中国北京市海淀区圆明园西路 2 号院中国农业科学院原子能利用研究所 49 号楼, Beijing 100193 (CN)。庞洁 (PANG, Jie); 中国北京市海淀区圆明园西路 2 号院中国农业科学院原子能利用研究所 49 号楼, Beijing 100193 (CN)。

(74) 代理人: 北京康信知识产权代理有限公司 (KANGXIN PARTNERS, P. C.); 中国北京市海淀区知春路甲 48 号盈都大厦 A 座 16 层, Beijing 100098 (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。

[见续页]

(54) Title: HERBICIDE RESISTANT PROTEIN AND ENCODING GENE AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 除草剂抗性蛋白质、其编码基因及用途

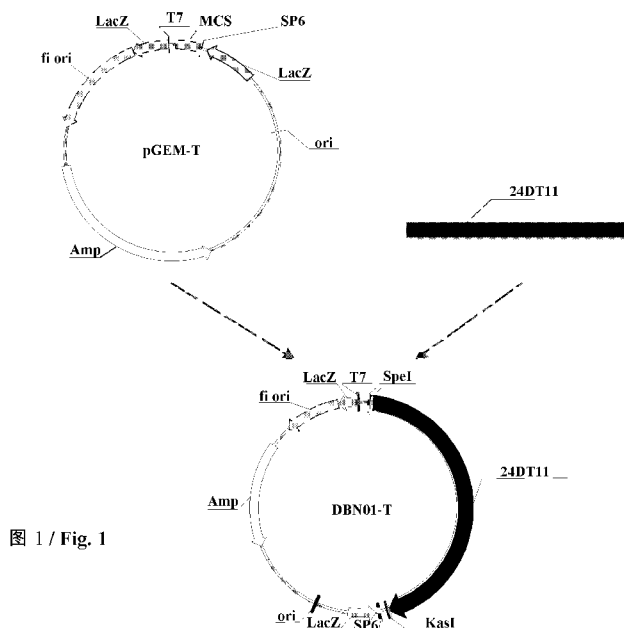


图 1 / Fig. 1

(57) Abstract: Provided are a protein having herbicide resistance and an encoding gene and an application thereof. The protein comprises: (a) a protein composed of an amino acid sequence shown by SEQ ID NO:2; or (b) a protein that is derived from (a) and provided with herbicide resistance activity through replacement and/or deficiency and/or addition of one or more amino acids of the amino acid sequence in (a). The protein having herbicide resistance is suitable for expression in plants, and can improve the resistance of plants to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D).

(57) 摘要: 提供一种具有除草剂抗性的蛋白质、其编码基因及用途, 该蛋白质包括: (a) 具有 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列组成的蛋白质; 或 (b) 在 (a) 中的氨基酸序列经过取代和/或缺失和/或添加一个或几个氨基酸且具有除草剂抗性活性的由 (a) 衍生的蛋白质。该具有除草剂抗性的蛋白质适合在植物中表达, 能够提升植物对 2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-D) 的抗性。



(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))。

除草剂抗性蛋白质、其编码基因及用途

5 技术领域

本发明涉及一种除草剂抗性蛋白质、其编码基因及用途，特别是涉及一种对 2,4-D 具有抗性的蛋白质、其编码基因及用途。

背景技术

- 10 杂草可以迅速耗尽土壤中作物和其它目的植物所需要的有价值的养分。目前有许多类型的除草剂用于控制杂草，一种特别流行的除草剂是草甘膦。已经开发了对草甘膦具有抗性的作物，如玉米、大豆、棉花、甜菜、小麦和水稻等。因此可以对种植草甘膦抗性作物的田地喷洒草甘膦以控制杂草而不显著损害作物。
- 15 草甘膦已经在全球广泛使用超过 20 年，由此导致对草甘膦和草甘膦耐性作物技术的过度依赖，并在野生杂草物种中对草甘膦天然更具耐受性或已经发展出抗草甘膦活性的植物施加了高选择压。已报道有少数杂草已发展出对草甘膦的抗性，包括阔叶杂草和禾本科杂草，如瑞士黑麦草、多花黑麦草、牛筋草、豚草、小飞蓬、野塘蒿和长叶车前。此外，在广泛使用草甘膦耐性
- 20 作物之前并不是农业问题的杂草也逐渐盛行，并且难于用草甘膦耐性作物控制，这些杂草主要与（但不仅与）难于控制的阔叶杂草一起出现，如苋属、藜属、蒲公英属和鸭跖草科物种。

- 在草甘膦抗性杂草或难于控制的杂草物种的地区，种植者可以通过罐混或换用能控制遗漏杂草的其它除草剂来弥补草甘膦的弱点。在多数情况下控制阔叶杂草的一种流行且有效的罐混伴侣为 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)。2,4-D 已经在农业和非作物条件下用于广谱阔叶杂草控制超过 65 年，仍是全球最广泛使用的除草剂之一。对进一步使用 2,4-D 的限制在于它在双子叶植物（如大豆或棉花）中的选择性非常低，因此 2,4-D 一般不用于（且一般不靠近）敏感性双子叶作物。此外，2,4-D 在禾本科作物中的用途在某种程度上受限于可能出现的作物损伤的性质。2,4-D 和草甘膦的组合已经用于在种植免耕大豆和棉花之前提供更强的灭生处理，然而，由于这些双子叶物种对 2,4-D 的敏感性，这些灭生处理必须在种植前 14-30 天进行。

- 和 MCPA、2-甲-4-氯丙酸和 2,4-D 丙酸一样，2,4-D 是苯氧酸类除草剂。2,4-D 用于在许多单子叶作物（如玉米、小麦和水稻）中选择性控制阔叶杂草而不严重损伤目的作物。2,4-D 是合成的植物生长素衍生物，其作用为使正常
- 35

的细胞激素内稳态失调，并阻碍平衡的受控生长。

2,4-D 对某些植物具有不同水平的选择性 (如双子叶植物比禾本科植物更敏感)。不同植物对 2,4-D 的不同代谢是不同水平选择性的一种解释。通常植物缓慢代谢 2,4-D，因此靶位点的不同活性更可能解释植物对 2,4-D 不同的应
5 答。2,4-D 的植物代谢一般通过两步代谢实现，一般是羟基化后接着与氨基酸或葡萄糖缀合。

随着时间的发展，微生物种群已经发展出降解此特定外来物的有效的替代途径，所述途径引起 2,4-D 的完全矿化。对微生物连续应用除草剂可用来选择能利用除草剂作为碳源用于生长 (从而使其在土壤中具有竞争优势) 的微
10 生物。因为这个原因，目前将 2,4-D 配制为具有相对短的土壤半衰期，并且对其后的作物没有遇到明显的遗留效应。这促进了 2,4-D 的除草剂应用。

已经广泛研究了其降解 2,4-D 能力的一种生物是真养雷氏菌 (*Ralstonia eutropha*)。编码矿化途径中的第一个酶促步骤的基因为 *tfdA*。*TfdA* 通过 α 酮戊二酸依赖性双加氧酶反应催化 2,4-D 酸转化成二氯苯酚 (DCP)。DCP
15 与 2,4-D 相比几乎不具有除草剂活性。*TfdA* 在转基因植物中用于向通常对 2,4-D 敏感的双子叶植物 (如棉花和烟草) 中输入 2,4-D 抗性。

已在环境中鉴定了大量编码能降解 2,4-D 的蛋白质的 *tfdA* 型基因。许多同系物与 *tfdA* 类似 (氨基酸同一性 >85%) 并具有与 *tfdA* 相似的酶活性。然而，不是所有具有 *TauD* 等结构域的蛋白质都具有 2,4-D 降解功能，并且有大量同系物与 *tfdA* 具有显著更低的同一性 (25-50%)，但却具有与 α 酮戊二酸
20 依赖性双加氧酶 Fe^{+2} 双加氧酶相关的特征残基。因此这些不同的双加氧酶的底物特异性是什么并不明确。与 *tfdA* 具有低同源性 (氨基酸同一性 28%) 的独特实例是来自 *Sphingobium herbicidovorans* 的 *rdpA*。已经显示此酶催化 (R)-2,4-D 丙酸 (和其它 (R)-苯氧丙酸) 以及 2,4-D (苯氧乙酸) 矿化的第一步。

25 随着草甘膦抗性杂草的出现和 2,4-D 除草剂的扩大应用，需要对 2,4-D 敏感的目的植物中输入 2,4-D 抗性。目前未发现 24DT11 除草剂抗性蛋白在植物中的表达水平和对除草剂的耐受性报道。

发明内容

30 本发明的目的是提供一种除草剂抗性蛋白质、其编码基因及用途，本发明旨在提供一种新的 24DT11 基因，所述 24DT11 蛋白在植物中对除草剂具有较高的耐受性。

为实现上述目的，本发明提供了一种除草剂抗性蛋白质，包括：

(a) 具有 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列组成的蛋白质；或

35 (b) 在 (a) 中的氨基酸序列经过取代和/或缺失和/或添加一个或几个氨

基酸且具有芳氧基链烷酸酯双加氧酶活性的由 (a) 衍生的蛋白质。

为实现上述目的，本发明提供了一种除草剂抗性基因，包括：

(a) 编码所述除草剂抗性蛋白质的核苷酸序列；或

5 (b) 在严格条件下与 (a) 限定的核苷酸序列杂交且编码具有芳氧基链烷酸酯双加氧酶活性的蛋白质的核苷酸序列；或

(c) 具有 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列。

所述严格条件可为在 6×SSC (柠檬酸钠)、0.5%SDS (十二烷基硫酸钠) 溶液中，在 65℃ 下杂交，然后用 2×SSC、0.1%SDS 和 1×SSC、0.1%SDS 各洗膜 1 次。

10 为实现上述目的，本发明还提供了一种表达盒，包含在有效连接的调控序列调控下的所述除草剂抗性基因。

为实现上述目的，本发明还提供了一种包含所述除草剂抗性基因或所述表达盒的重组载体。

15 为实现上述目的，本发明还提供了一种产生除草剂抗性蛋白质的方法，包括：

获得包含所述除草剂抗性基因或所述表达盒的转基因宿主生物的细胞；

在允许产生除草剂抗性蛋白质的条件下培养所述转基因宿主生物的细胞；

回收所述除草剂抗性蛋白质。

20 进一步地，所述转基因宿主生物包括植物、动物、细菌、酵母、杆状病毒、线虫或藻类。

优选地，所述植物为大豆、棉花、玉米、水稻、小麦、甜菜或甘蔗。

25 为实现上述目的，本发明还提供了一种增加耐受除草剂范围的方法，包括：将所述除草剂抗性蛋白质或所述表达盒编码的除草剂抗性蛋白质在植物中与至少一种不同于所述除草剂抗性蛋白质或所述表达盒编码的除草剂抗性蛋白质的第二种核苷酸一起表达。

进一步地，所述第二种核苷酸编码草甘膦抗性蛋白质、草铵膦抗性蛋白质、4-羟苯基丙酮酸双加氧酶、乙酰乳酸合酶、细胞色素类蛋白质或原卟啉原氧化酶。

30 在本发明中，24DT11 除草剂抗性蛋白质在一种转基因植物中的表达可以伴随着一个或多个草甘膦抗性蛋白质和/或草铵膦抗性蛋白质的表达。这种超过一种的除草剂抗性蛋白质在同一株转基因植物中共同表达可以通过遗传工程使植物包含并表达所需的基因来实现。另外，一种植物 (第 1 亲本) 可以通过遗传工程操作表达 24DT11 除草剂抗性蛋白质，第二种植物 (第 2 亲本)

35 可以通过遗传工程操作表达草甘膦抗性蛋白质和/或草铵膦抗性蛋白质。通过

第 1 亲本和第 2 亲本杂交获得表达引入第 1 亲本和第 2 亲本的所有基因的后代植物。

为实现上述目的，本发明还提供了一种选择转化的植物细胞的方法，包括：用所述除草剂抗性基因或所述表达盒转化多个植物细胞，并在允许表达
5 所述除草剂抗性基因或所述表达盒的转化细胞生长，而杀死未转化细胞或抑制未转化细胞生长的除草剂浓度下培养所述细胞，所述除草剂为苯氧基生长素。

为实现上述目的，本发明还提供了一种控制杂草的方法，包括：对种植作物的大田施用有效剂量的除草剂，所述作物包含所述除草剂抗性基因或所
10 述表达盒或所述重组载体。

优选地，所述除草剂为苯氧基生长素。

为实现上述目的，本发明还提供了一种用于保护植物免受由除草剂引起的损伤的方法，包括：将所述除草剂抗性基因或所述表达盒或所述重组载体
15 导入植物，使导入后的植物产生足够保护其免受除草剂损害量的除草剂抗性蛋白质。

优选地，所述除草剂为苯氧基生长素或芳氧基苯氧链烷酸酯。所述植物为大豆、棉花、玉米、水稻、小麦、甜菜或甘蔗。

为实现上述目的，本发明还提供了一种控制草甘膦耐性植物的大田中草甘膦抗性杂草的方法，包括：对种植草甘膦耐性植物的大田施用有效剂量的
20 除草剂，所述草甘膦耐性植物包含所述除草剂抗性基因或所述表达盒或所述重组载体。

优选地，所述除草剂为苯氧基生长素。所述草甘膦耐性植物为单子叶植物或双子叶植物。

为实现上述目的，本发明还提供了一种赋予作物 2,4-D 除草剂抗性的方法，包括：将所述除草剂抗性基因或所述表达盒或所述重组载体导入植物。
25

优选地，所述植物为大豆、棉花、玉米、水稻、小麦、甜菜或甘蔗。

为实现上述目的，本发明还提供了一种除草剂抗性蛋白质耐受苯氧基生长素类除草剂的用途，所述除草剂抗性蛋白质包括：

- (a) 具有 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列组成的蛋白质；或
- 30 (b) 在 (a) 中的氨基酸序列经过取代和/或缺失和/或添加一个或几个氨基酸且具有芳氧基链烷酸酯双加氧酶活性的由 (a) 衍生的蛋白质。

将所述的除草剂抗性基因或所述的表达盒或所述的重组载体导入植物，在本发明中为将外源 DNA 导入植物细胞，常规转化方法包括但不限于，农杆菌介导的转化、微量发射轰击、直接将 DNA 摄入原生质体、电穿孔或晶须
35 硅介导的 DNA 导入。

本发明所述的 2,4-D 抗性基因及其后的抗性作物提供用于在作物中控制草甘膦抗性 (或高耐性和演替的) 阔叶杂草物种的优良选择。2,4-D 是广谱、相对便宜且强力的阔叶除草剂, 如果在双子叶和单子叶中同样能提供更强的作物耐受性, 则可为种植者提供优良的效用。2,4-D 耐性转基因双子叶植物还可
5 可在应用时间和用量上具有更高的灵活性。2,4-D 除草剂耐性性状的另一用途是它可用于预防 2,4-D 漂移、挥发、转化 (或其它远距离的移动现象)、误用、破坏等对正常敏感性作物的损害。已经广泛使用不同苯氧基生长素组合的多种混合物来处理不同地区特定的杂草谱和环境条件。在植物中使用 24DT11 基因可以提供对更广谱的苯氧基生长素除草剂的防护, 从而提高灵活性和可
10 控制的杂草谱, 提供对全范围市售苯氧基生长素的漂移或其它远距离苯氧基除草剂损伤的防护。

对于苯氧基生长素除草剂通常制成活性酸, 但也有一些商品化配制为多种相应酯制剂之一, 由于一般的植物酯酶在植物中将这些酯转换成活性酸, 因此这些也同样认为是在植物中 24DT11 酶的底物。类似的还可以是相应酸的
15 相应有机或无机盐。当表示手性丙酸、丙酸盐或丙酸酯除草剂时, 即使不同的 CAS 号可能对应于光学纯的化合物, 在命名这些除草剂时仍认为外消旋 (R , S) 或光学纯化的 (R 或 S) 对映体是同一除草剂。可能的用量范围可以是作物或非作物用途中单独处理或与其他除草剂组合。

现已鉴定了 24DT11 基因在遗传改造用于植物表达后具有允许在植物中
20 使用苯氧基生长素除草剂的特性, 所述植物中固有耐性不存在或不足以允许使用这些除草剂。此外, 24DT11 基因可以在天然耐性不足以允许选择性时在植物中提供对苯氧基生长素除草剂的防护。现在可以连续或罐混地与一种、两种或若干苯氧基生长素除草剂的组合处理仅含 24DT11 基因的植物。用于控制广谱双子叶杂草的每种苯氧基生长素除草剂的用量范围从 25 至 4000g
25 ae/ha, 更通常从 100 至 2000 g ae/ha。在同一大田里 (连续或罐混组合地) 组合这些不同化学类别和具有不同作用模式和范围的除草剂可以提供对大多数需要除草剂控制的潜在杂草的控制。

草甘膦被广泛地使用, 因为它控制非常广谱的阔叶和禾本科杂草物种。然而, 在草甘膦耐性作物和非作物应用中重复使用草甘膦已经 (而且仍将继续) 选择使杂草演替为天然更具有耐性的物种或草甘膦抗性生物型。多数除
30 草剂抗性管理策略建议使用有效用量的罐混除草剂伴侣作为延缓出现抗性杂草的方法, 所述除草剂伴侣提供对同一物种的控制, 但具有不同的作用模式。将 24DT11 基因与草甘膦耐性性状 (和/或其他除草剂耐性性状) 叠加可通过允许对同一作物选择性使用草甘膦和苯氧基生长素 (如 2,4-D) 而实现对草甘
35 膦耐性作物中草甘膦抗性杂草物种 (被一种或多种苯氧基生长素控制的阔叶

杂草物种)的控制。这些除草剂的应用可以是在含有不同作用模式的两种或更多除草剂的罐混合物中同时使用、在连续使用(如种植前、出苗前或出苗后)中单个除草剂组合物的单独使用(使用的间隔时间范围从2小时到3个月),或者备选地,可以在任何时间(从种植作物7个月内到收获作物时(或对于单个除草剂为收获前间隔,取最短者))使用代表可应用每种化合类别的任意数目除草剂的组合。

在控制阔叶杂草中具有灵活性是很重要的,即使用时间、单个除草剂用量和控制顽固或抗性杂草的能力。作物中与草甘膦抗性基因/24DT11基因叠加的草甘膦应用范围可以从250至2500 g ae/ha;苯氧基生长素除草剂(一种或多种)可按照从25-4000 g ae/ha。这些应用的时间的最佳组合取决于具体的条件、物种和环境。

除草剂制剂(如酯、酸或盐配方或可溶浓缩剂、乳化浓缩剂或可溶液体)和罐混添加剂(如佐剂或相容剂)可显著影响给定的除草剂或一种或多种除草剂的组合的杂草控制。任意前述除草剂的任意化学组合均在本发明的范围内。

本领域技术人员所熟知的,两种或更多作用模式的组合在提高受控杂草谱和/或天然更具耐性物种或抗性杂草物种上的益处还可扩展到通过人工(转基因或非转基因)在作物中产生除草甘膦耐性作物外的除草剂耐性的化学品。事实上,可以单独或以多重组合叠加编码以下抗性的性状以提供有效控制或防止杂草演替对任意前述类别的除草剂的抗性的能力:草甘膦抗性(如抗性植物或细菌 EPSPS、GOX、GAT)、草铵膦抗性(如 PAT、Bar)、乙酰乳酸合酶(ALS)抑制性除草剂抗性(如咪唑啉酮、磺酰脲、三唑嘧啶、磺苯胺、嘧啶硫代苯甲酸和其它化学品抗性基因如 AHAS、CsrI、SurA 等)、溴草腈抗性(如 Bxn)、对 HPPD(4-羟苯基丙酮酸双加氧酶)酶抑制剂的抗性、对八氢番茄红素去饱和酶(PDS)抑制剂的抗性、对光系统 II 抑制性除草剂的抗性(如 psbA)、对光系统 I 抑制性除草剂的抗性、对原卟啉原氧化酶 IX(PPO)抑制性除草剂抗性(如 PPO-1)、对苯脲除草剂的抗性(如 CYP76B1)、二氯甲氧苯酸降解酶等等。

关于其他除草剂,一些其它优选的 ALS 抑制剂包括三唑嘧啶磺苯胺(氯酯磺草胺、双氯磺草胺、唑嘧磺草胺、磺草唑胺和嘧啶并三唑类磺胺)、嘧啶硫代苯甲酸和氟唑磺隆。一些优选的 HPPD 抑制剂包括甲基磺草酮、异恶唑草酮和磺草酮。一些优选的 PPO 抑制剂包括丙炔氟草胺、氟丙嘧草酯、唑草酮、甲磺草胺和二苯醚(如三氟羧草醚、氟磺胺草醚、乳氟禾草灵和乙氧氟草醚)。

此外,可以将 24DT11 基因单独或与其它除草剂耐受作物特征叠加后再

与一种或多种其它输入（如昆虫抗性、真菌抗性或胁迫耐性等）或输出（如提高的产量、改进的油量、提高的纤维品质等）性状叠加。因此，本发明可用于提供以灵活且经济地控制任何数目的农学害虫的能力和提作物品质的完整农学解决方案。

- 5 本发明 24DT11 基因能降解 2,4-D，是重要的除草剂耐受作物和选择标记物特征可能性的基础。

本发明可进行转基因表达，可以控制几乎所有阔叶杂草的除草剂组合。24DT11 基因可作为优秀的除草剂耐受作物性状与例如其它除草剂耐受作物性状（如草甘膦抗性、草铵膦抗性、ALS 抑制剂（如咪唑啉酮类、磺酰脲类、
10 三唑并嘧啶磺酰胺类）抗性、溴草腈抗性、HPPD 抑制剂抗性、PPO 抑制剂抗性等）和昆虫抗性性状（Cry1Ab、Cry1F、Vip3、其它苏云金芽孢杆菌蛋白质或非芽孢杆菌属来源的昆虫抗性蛋白等）叠加。此外，24DT11 基因可作为选择标记物辅助选择用另一个基因或基因群遗传改造的植物的原代转化体。

苯氧基链烷酸酯基团可用于将稳定的酸官能团引入除草剂。酸性基团可
15 通过“酸捕获”输入韧皮部活性（除草剂作用所需的属性），从而可以为了活性目的而整合进新除草剂。存在很多可能为 24DT11 底物的市售和实验性除草剂。因此，使用本发明基因还可以得到对其它除草剂的耐性。

本发明的除草剂耐性作物性状可用在与其它除草剂耐性作物性状（包括但不限于草甘膦耐性）的新组合中。由于对除草剂（如草甘膦）的新获得的
20 抗性或固有的耐性，这些性状组合产生控制杂草物种的新方法。因此，除了除草剂耐性作物性状，本发明的范围包括使用除草剂控制杂草的新方法，其中通过转基因作物中的所述酶产生对所述除草剂的耐性。

本发明可应用于多种植物中，如拟南芥、烟草、大豆、棉花、稻、玉米和芸薹。本发明还可用于多种其它单子叶（如牧草禾本科或草坪草禾本科）
25 和双子叶作物（如苜蓿、三叶草、乔木物种等）。类似的，2,4-D（或其它 24DT11 底物）可更积极地用于耐性适中的禾本科作物中，由此性状得到的提高的耐性将为种植者提供能以更有效的用量和更广的施用时间来使用这些除草剂而无作物损伤风险的可能性。

本发明中所述的植物、植物组织或植物细胞的基因组，是指植物、植物
30 组织或植物细胞内的任何遗传物质，且包括细胞核和质体和线粒体基因组。

本发明中所述“抗性”是可遗传的，并允许植物在除草剂对给定植物进行一般除草剂有效处理的情况下生长和繁殖。正如本领域技术人员所认可的，即使植物受到除草剂处理的一定损伤程度明显，植物仍可被认为“抗性”。
35 本发明中术语“耐性”比术语“抗性”更广泛，并包括“抗性”，以及特定植物具有的抵抗除草剂诱导的各种程度损伤的提的能力，而在同样的除草

剂剂量下一般导致相同基因型野生型植物损伤。

本发明中所述的多核苷酸和/或核苷酸形成完整“基因”，在所需宿主细胞中编码蛋白质或多肽。本领域技术人员很容易认识到，可以将本发明的多核苷酸和/或核苷酸置于目的宿主中的调控序列控制下。

5 本领域技术人员所熟知的，DNA 典型的以双链形式存在。在这种排列中，一条链与另一条链互补，反之亦然。由于 DNA 在植物中复制产生了 DNA 的其它互补链。这样，本发明包括对序列表中示例的多核苷酸及其互补链的使用。本领域常使用的“编码链”指与反义链结合的链。为了在体内表达蛋白质，典型将 DNA 的一条链转录为一条 mRNA 的互补链，它作为模板翻译出蛋白质。mRNA 实际上是从 DNA 的“反义”链转录的。“有义”或“编码”链有一系列密码子(密码子是三个核苷酸，一次读三个可以产生特定氨基酸)，其可作为开放阅读框(ORF)阅读来形成目的蛋白质或肽。本发明还包括与示例的 DNA 有相当功能的 RNA 和 PNA(肽核酸)。

15 本发明中核酸分子或其片段在严格条件下与本发明除草剂抗性基因杂交。任何常规的核酸杂交或扩增方法都可以用于鉴定本发明除草剂抗性基因的存在。核酸分子或其片段在一定情况下能够与其他核酸分子进行特异性杂交。本发明中，如果两个核酸分子能形成反平行的双链核酸结构，就可以说这两个核酸分子彼此间能够进行特异性杂交。如果两个核酸分子显示出完全的互补性，则称其中一个核酸分子是另一个核酸分子的“互补物”。本发明中，当一个核酸分子的每一个核苷酸都与另一个核酸分子的对应核苷酸互补时，则称这两个核酸分子显示出“完全互补性”。如果两个核酸分子能够以足够的稳定性相互杂交从而使它们在至少常规的“低度严格”条件下退火且彼此结合，则称这两个核酸分子为“最低程度互补”。类似地，如果两个核酸分子能够以足够的稳定性相互杂交从而使它们在常规的“高度严格”条件下退火且彼此结合，则称这两个核酸分子具有“互补性”。从完全互补性中偏离是可以允许的，只要这种偏离不完全阻止两个分子形成双链结构。为了使一个核酸分子能够作为引物或探针，仅需保证其在序列上具有充分的互补性，以使得在所采用的特定溶剂和盐浓度下能形成稳定的双链结构。

25 本发明中，基本同源的序列是一段核酸分子，该核酸分子在高度严格条件下能够和相匹配的另一段核酸分子的互补链发生特异性杂交。促进 DNA 杂交的适合的严格条件，例如，大约在 45℃ 条件下用 6.0×氯化钠/柠檬酸钠(SSC)处理，然后在 50℃ 条件下用 2.0×SSC 洗涤，这些条件对本领域技术人员是公知的。例如，在洗涤步骤中的盐浓度可以选自低度严格条件的约 2.0×SSC、50℃ 到高度严格条件的约 0.2×SSC、50℃。此外，洗涤步骤中的温度条件可以从低度严格条件的室温约 22℃，升高到高度严格条件的约 65℃。温度条件和

35

盐浓度可以都发生改变，也可以其中一个保持不变而另一个变量发生改变。优选地，本发明所述严格条件可为在 $6\times\text{SSC}$ 、 $0.5\%\text{SDS}$ 溶液中，在 65°C 下与 SEQ ID NO:1 发生特异性杂交，然后用 $2\times\text{SSC}$ 、 $0.1\%\text{SDS}$ 和 $1\times\text{SSC}$ 、 $0.1\%\text{SDS}$ 各洗膜 1 次。

因此，具有除草剂耐受性活性并在严格条件下与本发明序列 1 杂交的序列包括在本发明中。这些序列与本发明序列至少大约 40%-50% 同源，大约 60%、65% 或 70% 同源，甚至至少大约 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更大的序列同源性。

本发明提供功能蛋白质。“功能活性”（或“活性”）在本发明中指本发明用途的蛋白质/酶（单独或与其它蛋白质组合）具有降解或减弱除草剂活性的能力。产生本发明蛋白质的植物优选产生“有效量”的蛋白质，从而在用除草剂处理植物时，蛋白质表达的水平足以给予植物对除草剂（若无特别说明则为一般用量）完全或部分的抗性或耐性。可以以通常杀死靶植物的用量、正常的大田用量和浓度使用除草剂。优选地，本发明的植物细胞和植物被保护免受除草剂处理引起的生长抑制或损伤。本发明的转化植物和植物细胞优选具有 2,4-D 除草剂的抗性或耐性，即转化的植物和植物细胞能在有效量的 2,4-D 除草剂存在下生长。

本发明中所述的基因和蛋白质不但包括特定的示例序列，还包括保存了所述特定示例的蛋白质的除草剂抗性活性特征的部分和/片段（包括与全长蛋白质相比在内和/或末端缺失）、变体、突变体、取代物（有替代氨基酸的蛋白质）、嵌合体和融合蛋白。所述“变体”或“变异”是指编码同一蛋白或编码有除草剂抗性活性的等价蛋白的核苷酸序列。所述“等价蛋白”是指与权利要求的蛋白具有相同或基本相同的除草剂耐受性的生物活性的蛋白。

本发明中所述的 DNA 分子或蛋白序列的“片段”或“截短”是指涉及的原始 DNA 或蛋白序列（核苷酸或氨基酸）的一部分或其人工改造形式（例如适合植物表达的序列），包括临近片段和与全长分子相比内部和/或末端的缺失，前述序列的长度可存在变化，但长度足以确保（编码）蛋白质为除草剂抗性蛋白质。在一些情况下（特别是植物中的表达），使用编码截短蛋白质的截短基因可能是有利的。优选的截短基因一般编码全长蛋白质的 40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98 或 99%。

由于遗传密码子的冗余性，多种不同的 DNA 序列可以编码相同的氨基酸序列。产生这些编码相同或基本相同的蛋白的可替代 DNA 序列正在本领域技

术人员的技术水平内。这些不同的 DNA 序列包括在本发明的范围内。所述基本上相同的”序列是指有氨基酸取代、缺失、添加或插入但实质上不影响除草剂抗性活性的序列，亦包括保留除草剂抗性活性的片段。

本发明中氨基酸序列的取代、缺失或添加是本领域的常规技术，优选这种氨基酸变化为：小的特性改变，即不显著影响蛋白的折叠和/或活性的保守氨基酸取代；小的缺失，通常约 1-30 个氨基酸的缺失；小的氨基或羧基端延伸，例如氨基端延伸一个甲硫氨酸残基；小的连接肽，例如约 20-25 个残基长。

保守取代的实例是在下列氨基酸组内发生的取代：碱性氨基酸（如精氨酸、赖氨酸和组氨酸）、酸性氨基酸（如谷氨酸和天冬氨酸）、极性氨基酸（如谷氨酰胺、天冬酰胺）、疏水性氨基酸（如亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸）、芳香氨基酸（如苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸），以及小分子氨基酸（如甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸和甲硫氨酸）。通常不改变特定活性的那些氨基酸取代在本领域内是众所周知的，并且已由，例如，N. Neurath 和 R. L. Hill 在 1979 年纽约学术出版社（Academic Press）出版的《Protein》中进行了描述。最常见的互换有 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu 和 Asp/Gly，以及它们相反的互换。

对于本领域的技术人员而言显而易见地，这种取代可以在对分子功能起重要作用的区域之外发生，而且仍产生活性多肽。对于由本发明的多肽，其活性必需的并因此选择不被取代的氨基酸残基，可以根据本领域已知的方法，如定点诱变或丙氨酸扫描诱变进行鉴定（如参见，Cunningham 和 Wells, 1989, Science 244: 1081-1085）。后一技术是在分子中每一个带正电荷的残基处引入突变，检测所得突变分子的除草剂抗性活性，从而确定对该分子活性而言重要的氨基酸残基。底物-酶相互作用位点也可以通过其三维结构的分析来测定，这种三维结构可由核磁共振分析、结晶学或光亲和标记等技术测定（参见，如 de Vos 等，1992, Science 255: 306-312；Smith 等，1992, J. Mol. Biol. 224:899-904；Wlodaver 等，1992, FEBS Letters 309: 59-64）。

因此，与序列 2 所示的氨基酸序列具有一定同源性的氨基酸序列也包括在本发明中。这些序列与本发明序列类似性/相同性典型的大于 60%，优选的大于 75%，更优选的大于 80%，甚至更优选的大于 90%，并且可以大于 95%。也可以根据更特定的相同性和/或类似性范围定义本发明的优选的多核苷酸和蛋白质。例如与本发明示例的序列有 49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、

91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的相同性和/或类似性。

本发明中所述调控序列包括但不限于启动子、转运肽、终止子，增强子，前导序列，内含子以及其它可操作地连接到所述 24DT11 基因的调节序列。

5 所述启动子为植物中可表达的启动子，所述的“植物中可表达的启动子”是指确保与其连接的编码序列在植物细胞内进行表达的启动子。植物中可表达的启动子可为组成型启动子。指导植物内组成型表达的启动子的示例包括但不限于，来源于花椰菜花叶病毒的 35S 启动子、玉米 Ubi 启动子、水稻 GOS2 基因的启动子等。备选地，植物中可表达的启动子可为组织特异的启动子，
10 即该启动子在植物的一些组织内如在绿色组织中指导编码序列的表达水平高于植物的其他组织(可通过常规 RNA 试验进行测定)，如 PEP 羧化酶启动子。备选地，植物中可表达的启动子可为创伤诱导启动子。创伤诱导启动子或指导创伤诱导的表达模式的启动子是指当植物经受机械或由昆虫啃食引起的创伤时，启动子调控下的编码序列的表达较正常生长条件下有显著提高。创伤
15 诱导启动子的示例包括但不限于，马铃薯和西红柿的蛋白酶抑制基因 (pin I 和 pin II) 和玉米蛋白酶抑制基因 (MPI) 的启动子。

所述转运肽 (又称分泌信号序列或导向序列) 是指导转基因产物到特定的细胞器或细胞区室，对受体蛋白质来说，所述转运肽可以是异源的，例如，
20 利用编码叶绿体转运肽序列靶向叶绿体，或者利用‘ KDEL’ 保留序列靶向内质网，或者利用大麦植物凝集素基因的 CTPP 靶向液泡。

所述前导序列包含但不限于，小 RNA 病毒前导序列，如 EMCV 前导序列 (脑心肌炎病毒 5’ 非编码区)；马铃薯 Y 病毒组前导序列，如 MDMV (玉米矮缩花叶病毒) 前导序列；人类免疫球蛋白重链结合蛋白质 (BiP)；苜蓿花叶病毒的外壳蛋白质 mRNA 的不翻译前导序列 (AMV RNA4)；烟草花
25 叶病毒 (TMV) 前导序列。

所述增强子包含但不限于，花椰菜花叶病毒 (CaMV) 增强子、玄参花叶病毒 (FMV) 增强子、康乃馨风花环病毒 (CERV) 增强子、木薯脉花叶病毒 (CsVMV) 增强子、紫茉莉花叶病毒 (MMV) 增强子、夜香树黄化曲叶病毒 (CmYLCV) 增强子、木尔坦棉花曲叶病毒 (CLCuMV)、鸭跖草黄斑驳病
30 毒 (CoYMV) 和花生褪绿线条花叶病毒 (PCLSV) 增强子。

对于单子叶植物应用而言，所述内含子包含但不限于，玉米 hsp70 内含子、玉米泛素内含子、Adh 内含子 1、蔗糖合酶内含子或水稻 Act1 内含子。对于双子叶植物应用而言，所述内含子包含但不限于，CAT-1 内含子、pKANNIBAL 内含子、PIV2 内含子和“ 超级泛素” 内含子。

35 所述终止子可以为在植物中起作用的适合多聚腺苷酸化信号序列，包括

但不限于，来源于农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 胭脂碱合成酶 (NOS) 基因的多聚腺苷酸化信号序列、来源于蛋白酶抑制剂 II (pin II) 基因的多聚腺苷酸化信号序列、来源于豌豆 ssRUBISCO E9 基因的多聚腺苷酸化信号序列和来源于 α -微管蛋白 (α -tubulin) 基因的多聚腺苷酸化信号序列。

5 本发明中所述“有效连接”表示核酸序列的联结，所述联结使得一条序列可提供对相连序列来说需要的功能。在本发明中所述“有效连接”可以为将启动子与感兴趣的序列相连，使得该感兴趣的序列的转录受到该启动子控制和调控。当感兴趣的序列编码蛋白并且想要获得该蛋白的表达时“有效连接”表示：启动子与所述序列相连，相连的方式使得得到的转录物高效翻译。

10 如果启动子与编码序列的连接是转录物融合并且想要实现编码的蛋白的表达时，制造这样的连接，使得得到的转录物中第一翻译起始密码子是编码序列的起始密码子。备选地，如果启动子与编码序列的连接是翻译融合并且想要实现编码的蛋白的表达时，制造这样的连接，使得 5' 非翻译序列中含有的第一翻译起始密码子与启动子相联结，并且连接方式使得得到的翻译产物与编

15 码想要的蛋白的翻译开放读码框的关系是符合读码框的。可以“有效连接”的核酸序列包括但不限于：提供基因表达功能的序列 (即基因表达元件，例如启动子、5' 非翻译区域、内含子、蛋白编码区域、3' 非翻译区域、聚腺苷酸化位点和/或转录终止子)、提供 DNA 转移和/或整合功能的序列 (即 T-DNA 边界序列、位点特异性重组酶识别位点、整合酶识别位点)、提供选择性功能的序列 (即抗生素抗性标记物、生物合成基因)、提供可计分标记物功能的序列、体外或体内协助序列操作的序列 (即多接头序列、位点特异性重组序列) 和提供复制功能的序列 (即细菌的复制起点、自主复制序列、着丝粒序列)。

20

本发明可赋予植物新除草剂抗性性状，并且未观察到对表型包括产量的不良影响。本发明中植物能耐受住如至少一种受试除草剂 2 $\times$ 、3 $\times$ 、4 $\times$ 或 5 $\times$ 一般应用水平。这些抗性水平的提高在本发明的范围之内。例如可对本领域已知的多种技术进行可预见到的优化和进一步发展，以增加给定基因的表达。

25

本发明中，所述除草剂抗性蛋白质为 24DT11 氨基酸序列，如序列表中 SEQ ID NO:2 所示。所述除草剂抗性基因为 24DT11 核苷酸序列，如序列表中 SEQ ID NO:1 所示。所述除草剂抗性基因为用于植物，除了包含由 24DT11 核苷酸序列编码的蛋白质的编码区外，也可包含其他元件，例如编码转运肽的编码区、编码选择性标记的蛋白质或赋予昆虫抗性的蛋白质的编码区。

30

本发明中 24DT11 除草剂抗性蛋白质对大多数苯氧基生长素除草剂具有耐性。本发明中的植物，在其基因组中含有外源 DNA，所述外源 DNA 包含

35

24DT11 核苷酸序列，通过表达有效量的该蛋白而保护其免受除草剂的威胁。有效量是指未损伤的或轻微损伤的剂量。同时，植物在形态上应是正常的，且可在常规方法下培养以用于产物的消耗和/或生成。

5 植物材料中除草剂抗性蛋白质的表达水平可通过本领域内所描述的多种方法进行检测，例如通过应用特异引物对组织内产生的编码除草剂抗性蛋白质的 mRNA 进行定量，或直接特异性检测产生的除草剂抗性蛋白质的量。

本发明提供了一种除草剂抗性蛋白质、其编码基因及用途，具有以下优点：

10 1、对除草剂抗性强。本发明除草剂抗性蛋白质 24DT11 对除草剂的抗性强，尤其是针对苯氧基生长素除草剂，特别是 2,4-D。

2、对除草剂抗性广。本发明除草剂抗性蛋白质 24DT11 蛋白可以对多种苯氧基植物生长素除草剂表现出较高的抗性，因此在植物上应用前景广阔。

下面通过附图和实施例，对本发明的技术方案做进一步的详细描述。

15 附图说明

图 1 为本发明除草剂抗性蛋白质、其编码基因及用途的含有 24DT11 核苷酸序列的重组克隆载体 DBN01-T 构建流程图；

图 2 为本发明除草剂抗性蛋白质、其编码基因及用途的含有 24DT11 核苷酸序列的重组表达载体 DBN100411 构建流程图；

20 图 3 为本发明除草剂抗性蛋白质、其编码基因及用途的含有对照序列的重组表达载体 DBN100411N 结构示意图；

图 4 为本发明除草剂抗性蛋白质、其编码基因及用途的转基因拟南芥 T₁ 植株除草剂抗性效果图；

25 图 5 为本发明除草剂抗性蛋白质、其编码基因及用途的转基因大豆 T₁ 植株除草剂抗性效果图；

图 6 为本发明除草剂抗性蛋白质、其编码基因及用途的含有 24DT11 核苷酸序列的重组表达载体 DBN100758 构建流程图；

图 7 为本发明除草剂抗性蛋白质、其编码基因及用途的含有对照序列的重组表达载体 DBN100758N 构建流程图。

30

具体实施方式

下面通过具体实施例进一步说明本发明除草剂抗性蛋白质、其编码基因及用途的技术方案。

第一实施例、24DT11 基因序列的获得和合成

35 1、获得 24DT11 基因序列

24DT11 除草剂抗性蛋白质的氨基酸序列 (292 个氨基酸) , 如序列表中 SEQ ID NO:2 所示 ;依据植物偏好性密码子获得编码相应于所述 24DT11 除草剂抗性蛋白质的氨基酸序列 (292 个氨基酸) 的核苷酸序列 (879 个核苷酸) , 如序列表中 SEQ ID NO:1 所示。

5 2、合成上述 24DT11 核苷酸序列

所述 24DT11 核苷酸序列 (如序列表中 SEQ ID NO:1 所示) 由南京金斯瑞生物科技有限公司合成 ;合成的所述 24DT11 核苷酸序列 (SEQ ID NO:1) 的 5' 端还连接有 SpeI 酶切位点 , 所述 24DT11 核苷酸序列 (SEQ ID NO:1) 的 3' 端还连接有 KasI 酶切位点。

10 第二实施例、拟南芥和大豆重组表达载体的构建

1、构建含有 24DT11 核苷酸序列的重组克隆载体 DBN01-T

将合成的 24DT11 核苷酸序列连入克隆载体 pGEM-T(Promega ,Madison , USA , CAT : A3600) 上 , 操作步骤按 Promega 公司产品 pGEM-T 载体说明书进行 , 得到重组克隆载体 DBN01-T , 其构建流程如图 1 所示 (其中 , Amp 表示氨苄青霉素抗性基因 ; f1 表示噬菌体 f1 的复制起点 ; LacZ 为 LacZ 起始密码子 , SP6 为 SP6 RNA 聚合酶启动子 , T7 为 T7 RNA 聚合酶启动子 , 24DT11 为 24DT11 核苷酸序列 (SEQ ID NO:1) ; MCS 为多克隆位点) 。

然后将重组克隆载体 DBN01-T 用热激方法转化大肠杆菌 T1 感受态细胞 (Transgen , Beijing , China , CAT : CD501) , 其热激条件为 : 50 μ L 大肠杆菌 T1 感受态细胞、10 μ L 质粒 DNA (重组克隆载体 DBN01-T) , 42 $^{\circ}$ C 水浴 30 秒 ; 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 1 小时 (100rpm 转速下摇床摇动) , 在表面涂有 IPTG (异丙基硫代- β -D-半乳糖苷) 和 X-gal (5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷) 的氨苄青霉素 (100 mg/L) 的 LB 平板 (胰蛋白胨 10g/L , 酵母提取物 5g/L , NaCl 10g/L , 琼脂 15g/L , 用 NaOH 调 pH 至 7.5) 上生长过夜。挑取白色菌落 , 在 LB 液体培养基 (胰蛋白胨 10g/L , 酵母提取物 5g/L , NaCl 10g/L , 氨苄青霉素 100mg/L , 用 NaOH 调 pH 至 7.5) 中于温度 37 $^{\circ}$ C 条件下培养过夜。碱法提取其质粒 : 将菌液在 12000rpm 转速下离心 1min , 去上清液 , 沉淀菌体用 100 μ L 冰预冷的溶液 I (25mM Tris-HCl , 10mM EDTA (乙二胺四乙酸) , 50mM 葡萄糖 , pH8.0) 悬浮 ; 加入 200 μ L 新配制的溶液 II (0.2M NaOH , 1% SDS (十二烷基硫酸钠)) , 将管子颠倒 4 次 , 混合 , 置冰上 3-5min ; 加入 150 μ L 冰冷的溶液 III (3M 醋酸钾 , 5M 醋酸) , 立即充分混匀 , 冰上放置 5-10min ; 于温度 4 $^{\circ}$ C、转速 12000rpm 条件下离心 5min , 在上清液中加入 2 倍体积无水乙醇 , 混匀后室温放置 5min ; 于温度 4 $^{\circ}$ C、转速 12000rpm 条件下离心 5min , 弃上清液 , 沉淀用浓度 (V/V) 为 70% 的乙醇洗涤后晾干 ; 加入 30 μ L 含 RNase (20 μ g/mL) 的 TE (10mM Tris-HCl , 1mM EDTA , pH8.0) 溶解沉淀 ; 于温

度 37℃下水浴 30min，消化 RNA；于温度-20℃保存备用。

提取的质粒经 SpeI 和 KasI 酶切鉴定后，对阳性克隆进行测序验证，结果表明重组克隆载体 DBN01-T 中插入的所述 24DT11 核苷酸序列为序列表中 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列，即 24DT11 核苷酸序列正确插入。

5 2、构建含有 24DT11 核苷酸序列的拟南芥和大豆重组表达载体 DBN100411

用限制性内切酶 SpeI 和 KasI 分别酶切重组克隆载体 DBN01-T 和表达载体 DBNBC-01 (载体骨架：pCAMBIA2301 (CAMBIA 机构可以提供))，将切下的 24DT11 核苷酸序列片段插到表达载体 DBNBC-01 的 SpeI 和 KasI 位点之间，利用常规的酶切方法构建载体是本领域技术人员所熟知的，构建成重组表达载体 DBN100411，其构建流程如图 2 所示 (Kan：卡那霉素基因；RB：右边界；AtUbi10：拟南芥 Ubiquitin (泛素) 10 基因启动子 (SEQ ID NO:3)；24DT11：24DT11 核苷酸序列 (SEQ ID NO:1)；Nos：胭脂碱合成酶基因的终止子 (SEQ ID NO:4)；prCaMV35S：花椰菜花叶病毒 35S 启动子 (SEQ ID NO:5)；PAT：草丁膦乙酰转移酶基因 (SEQ ID NO:6)；tCaMV35S：花椰菜花叶病毒 35S 终止子 (SEQ ID NO:7)；LB：左边界)。

将重组表达载体 DBN100411 用热激方法转化大肠杆菌 T1 感受态细胞，其热激条件为：50μL 大肠杆菌 T1 感受态细胞、10μL 质粒 DNA (重组表达载体 DBN100411)，42℃水浴 30 秒；37℃振荡培养 1 小时 (100rpm 转速下摇床摇动)；然后在含 50mg/L 卡那霉素 (Kanamycin) 的 LB 固体平板 (胰蛋白胨 10g/L，酵母提取物 5g/L，NaCl 10g/L，琼脂 15g/L，用 NaOH 调 pH 至 7.5) 上于温度 37℃条件下培养 12 小时，挑取白色菌落，在 LB 液体培养基 (胰蛋白胨 10g/L，酵母提取物 5g/L，NaCl 10g/L，卡那霉素 50mg/L，用 NaOH 调 pH 至 7.5) 中于温度 37℃条件下培养过夜。碱法提取其质粒。将提取的质粒用限制性内切酶 SpeI 和 KasI 酶切后鉴定，并将阳性克隆进行测序鉴定，结果表明重组表达载体 DBN100411 在 SpeI 和 KasI 位点间的核苷酸序列为序列表中 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列，即 24DT11 核苷酸序列。

3、构建含有对照序列的拟南芥和大豆重组表达载体 DBN100411N

按照本发明第二实施例中 1 所述的构建含有 24DT11 核苷酸序列的重组克隆载体 DBN01-T 的方法，利用对照序列 (SEQ ID NO:8) 构建含有对照序列的重组克隆载体 DBN01R-T。对阳性克隆进行测序验证，结果表明重组克隆载体 DBN01R-T 中插入的对照序列为序列表中 SEQ ID NO:8 所示的核苷酸序列，即对照序列正确插入。

按照本发明第二实施例中 2 所述的构建含有 24DT11 核苷酸序列的重组表达载体 DBN100411 的方法，利用对照序列构建含有对照序列的重组表达载体

DBN100411N, 其载体结构如图 3 所示(载体骨架 :pCAMBIA2301(CAMBIA 机构可以提供) ;Kan :卡那霉素基因 ;RB :右边界 ;AtUbi10 :拟南芥 Ubiquitin (泛素) 10 基因启动子 (SEQ ID NO:3) ;mN :对照序列 (SEQ ID NO:8) ;Nos :胭脂碱合成酶基因的终止子 (SEQ ID NO:4) ;prCaMV35S :花椰菜花叶病毒 35S 启动子 (SEQ ID NO:5) ;PAT :草丁膦乙酰转移酶基因 (SEQ ID NO:6) ;tCaMV35S :花椰菜花叶病毒 35S 终止子 (SEQ ID NO:7) ;LB :左边界) 。对阳性克隆进行测序验证 , 结果表明重组表达载体 DBN100411N 中插入的对照序列为序列表中 SEQ ID NO:8 所示的核苷酸序列 , 即对照序列正确插入。

第三实施例、转入 24DT11 核苷酸序列的拟南芥植株的获得

1、重组表达载体转化农杆菌

对已经构建正确的重组表达载体 DBN100411 和 DBN100411N(对照序列) 用液氮法转化到农杆菌 GV3101 中 , 其转化条件为 : 100 μ L 农杆菌 GV3101、3 μ L 质粒 DNA(重组表达载体) ;置于液氮中 10 分钟 , 37 $^{\circ}$ C 温水浴 10 分钟 ; 将转化后的农杆菌 GV3101 接种于 LB 试管中于温度 28 $^{\circ}$ C、转速为 200rpm 条件下培养 2 小时 , 涂于含 50mg/L 的利福平 (Rifampicin) 和 50mg/L 的卡那霉素的 LB 平板上直至长出阳性单克隆 , 挑取单克隆培养并提取其质粒 , 用限制性内切酶 SmaI 和 EcoRV 酶切 DBN100411 后进行酶切验证 , 用限制性内切酶 SmaI 和 BglII 酶切 DBN100411N(对照序列) 后进行酶切验证 , 结果表明重组表达载体 DBN100411 和 DBN100411N(对照序列) 结构完全正确。

2、获得转基因拟南芥植株

将野生型拟南芥种子悬浮于 0.1% (w/v) 琼脂糖溶液中。将悬浮的种子在 4 $^{\circ}$ C 下保存 2 天以完成对休眠的需要以保证种子同步萌发。用蛭石混合马粪土并用水地下灌溉至湿润 , 使土壤混合物排水 24 小时。将预处理后的种子种在土壤混合物上并用保湿罩覆盖 7 天。使种子萌发并在恒温 (22 $^{\circ}$ C) 恒湿 (40-50%) 光强度为 120-150 μ mol/m² 秒的长日照条件 (16 小时光照/8 小时黑暗) 下在温室中培养植物。开始用霍格兰营养液灌溉植物 , 接着用去离子水灌溉 , 保持土壤潮湿但不湿透。

使用花浸泡法转化拟南芥。用选取的农杆菌菌落接种一份或多份 15-30ml 含卡那霉素 (50mg/L) 和利福平 (10mg/L) 的 YEP 培养液的预培养物。以 220rpm 将培养物在 28 $^{\circ}$ C 恒速摇动孵育过夜。每个预培养物用于接种两份 500ml 含卡那霉素 (50mg/L) 和利福平 (10mg/L) 的 YEP 培养液的培养物并将培养物在 28 $^{\circ}$ C 持续摇动孵育过夜。室温以约 8700 $\times$ g 离心 10 分钟沉淀细胞 , 弃去得到的上清液。将细胞沉淀轻柔重悬于 500mL 渗透培养基中 , 所述渗透培养基含有 1/2 $\times$ MS 盐/B5 维生素、10% (w/v) 蔗糖、0.044 μ M 苄氨基嘌呤

(10 μ L/L (1mg/mL DMSO 中的原液)) 和 300 μ L/L Silvet L-77。将约 1 月龄的植物在培养基中浸泡 15 秒，确保浸没最新的花序。接着将植物侧面放倒并覆盖 (透明或不透明) 24 小时，接着用水洗涤并竖直放置。在 22 $^{\circ}$ C 以 16 小时光照/8 小时黑暗的光周期培养植物。浸泡约 4 周后收获种子。

- 5 将新收获的 (24DT11 核苷酸序列和对照序列) T_1 种子在室温干燥 7 天。将种子种在 26.5 $\times$ 51cm 萌发盘中，每盘接受 200mg T_1 种子(约 10000 个种子)，所述种子事先已悬浮于 40mL 0.1% (w/v) 琼脂糖溶液并在 4 $^{\circ}$ C 下保存 2 天以完成对休眠的需要以保证种子同步萌发。

10 用蛭石混合马粪土并用水地下灌溉至湿润，利用重力排水。用移液管将预处理后的种子(每个 40mL)均匀地种在土壤混合物上，并用保湿罩覆盖 4-5 天。在使用出苗后喷洒草铵膦 (选择共转化的 PAT 基因) 进行最初转化体选择前 1 天移去罩。

在 7 个种植天数后 (DAP) 并于 11DAP 再次使用 DeVilbiss 压缩空气喷嘴以 10mL/盘 (703L/ha) 的喷洒体积用 Liberty 除草剂 (200g ai/L 的草铵膦) 15 的 0.2% 溶液喷洒 T_1 植物 (分别为子叶期和 2-4 叶期)，以提供每次应用 280g ai/ha 有效量的草铵膦。在最后喷洒后 4-7 天鉴定存活株 (生长活跃的植物)，并分别移植到用马粪土和蛭石制备的 7cm $\times$ 7cm 的方盆中 (每盘 3-5 棵)。用保湿罩覆盖移植的植物 3-4 天，并如前置于 22 $^{\circ}$ C 培养室中或直接移入温室。接着移去罩并在测试 24DT11 基因提供苯氧基生长素除草剂抗性的能力之前 20 至少 1 天将植物栽种到温室 (22 $\pm$ 5 $^{\circ}$ C，50 $\pm$ 30%RH，14 小时光照：10 小时黑暗，最小 500 μ E/m 2 s $^{-1}$ 天然+补充光)。

第四实施例、转基因拟南芥植株的除草剂抗性效果检测

用 24DT11 基因进行首次拟南芥转化。首先使用草铵膦选择方案从未转化种子背景中选择 T_1 转化体。筛选了约 20000 个 T_1 种子中并鉴定了 282 株 T_1 25 代阳性转化子 (PAT 基因)，约 1.4% 的转化效率。将转入 24DT11 核苷酸序列的拟南芥 T_1 植株、转入对照序列的拟南芥 T_1 植株和野生型拟南芥植株 (播种后 18 天) 分别对 2,4-D 二甲铵盐和二甲四氯进行除草剂抗性效果检测。

分别将转入 24DT11 核苷酸序列的拟南芥 T_1 植株、转入对照序列的拟南芥 T_1 植株和野生型拟南芥植株分别用 2,4-D 二甲铵盐 (560g ae/ha，1 倍大田 30 浓度)、二甲四氯 (560g ae/ha，1 倍大田浓度) 和空白溶剂 (水) 喷洒。喷施 7 天和 14 天后统计植株抗性情况：7 天后生长状况和空白溶剂 (水) 一致的划为高抗植株，7 天后有莲座叶卷曲的划为中抗植株，14 天后仍不能抽苔的划为低抗植株，14 天后死亡的划为不抗植株。由于每株拟南芥 T_1 植株是独立的转化事件，可以预计在给定剂量内个体 T_1 应答的显著差异。结果如表 1 35 和图 4 所示。

表 1、转基因拟南芥 T₁ 植株除草剂抗性实验结果

处理	拟南芥基因型	高抗	中抗	低抗	不抗	总计
空白溶剂 (水)	24DT11	32	0	0	0	32
	对照序列	32	0	0	0	32
	野生型	32	0	0	0	32
560g ae/ha	24DT11	26	2	1	3	32
2,4-D 二甲铵盐 (1x 2,4-D)	对照序列	0	0	0	32	32
	野生型	0	0	0	32	32
560g ae/ha	24DT11	22	4	2	3	31
二甲四氯 (1xMCPA)	对照序列	0	0	0	32	32
	野生型	0	0	0	32	32

对于拟南芥，560g ae/ha 2,4-D 和二甲四氯是将敏感植物与具有平均抗性水平的植物区分开来的有效剂量。表 1 和图 4 的结果表明：24DT11 基因赋予个体拟南芥植物除草剂抗性（只有部分植株具有抗性的原因是由于 T₁ 代植物插入位点是随机的，因而抗性基因的表达水平有差异，表现出抗性水平的差异），尤其是苯氧基生长素除草剂；而野生型拟南芥植株和转入对照序列的拟南芥 T₁ 植株则均不具有苯氧基生长素除草剂抗性。

第五实施例、转基因大豆植株的获得及验证

1、重组表达载体转化农杆菌

对已经构建正确的重组表达载体 DBN100411 和 DBN100411N（对照序列）用液氮法转化到农杆菌 LBA4404（Invitrogen, Chicago, USA, CAT:18313-015）中，其转化条件为：100μL 农杆菌 LBA4404、3μL 质粒 DNA（重组表达载体）；置于液氮中 10 分钟，37℃温水浴 10 分钟；将转化后的农杆菌 LBA4404 接种于 LB 试管中于温度 28℃、转速为 200rpm 条件下培养 2 小时，涂于含 50mg/L 的利福平（Rifampicin）和 50mg/L 的卡那霉素的 LB 平板上直至长出阳性单克隆，挑取单克隆培养并提取其质粒，用限制性内切酶 SmaI 和 EcoRV 酶切 DBN100411 后进行酶切验证，用限制性内切酶 SmaI 和 BglII 酶切 DBN100411N（对照序列）后进行酶切验证，结果表明重组表达载体 DBN100411 和 DBN100411N（对照序列）结构完全正确。

2、获得转基因大豆植株

按照常规采用的农杆菌侵染法，将无菌培养的大豆品种中黄 13 的子叶节组织与本实施例中 1 所述的农杆菌共培养，以将第二实施例中 2 和 3 构建的重组表达载体 DBN100411 和 DBN100411N 中的 T-DNA（包括拟南芥

Ubiquitin10 基因的启动子序列、24DT11 核苷酸序列、对照序列、Nos 终止子、花椰菜花叶病毒 35S 启动子、草丁膦乙酰转移酶基因、花椰菜花叶病毒 35S 终止子)转入到大豆染色体组中,获得了转入 24DT11 和对照核苷酸序列的大豆植株;同时以野生型大豆植株作为对照。

5 对于农杆菌介导的大豆转化,简要地,将成熟的大豆种子在大豆萌发培养基(B5 盐 3.1g/L, B5 维他命,蔗糖 20g/L,琼脂 8g/L, pH5.6)中进行萌发,将种子接种于萌发培养基上,按以下条件培养:温度 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$;光周期(光/暗)为 16/8h。萌发 4-6 天后取鲜绿的子叶节处膨大的大豆无菌苗,在子叶节下 3-4 毫米处切去下胚轴,纵向切开子叶,去顶芽、侧芽和种子根。用解剖刀

10 的刀背在子叶节处进行创伤,用农杆菌悬浮液接触创伤过的子叶节组织,其中农杆菌能够将所述 24DT11 核苷酸序列传递至创伤过的子叶节组织(步骤 1:侵染步骤)在此步骤中,子叶节组织优选地浸入农杆菌悬浮液($\text{OD}_{660}=0.5-0.8$,侵染培养基(MS 盐 2.15g/L、B5 维他命、蔗糖 20g/L、葡萄糖 10g/L、乙酰丁香酮(AS)40mg/L、2-吗啉乙磺酸(MES)4g/L、玉米素(ZT)2mg/L, pH5.3)中以启动接种。子叶节组织与农杆菌共培养一段时期(3 天)(步骤 2:共培养步骤)。优选地,子叶节组织在侵染步骤后在固体培养基(MS 盐 4.3g/L、B5 维他命、蔗糖 20g/L、葡萄糖 10g/L、2-吗啉乙磺酸(MES)4g/L、玉米素 2mg/L、琼脂 8g/L, pH5.6)上培养。在此共培养阶段后,可以有一个选择性的“恢复”步骤。在“恢复”步骤中,恢复培养基(B5 盐 3.1g/L、B5 维他命、

20 2-吗啉乙磺酸(MES)1g/L、蔗糖 30g/L、玉米素(ZT)2mg/L、琼脂 8g/L, 头孢霉素 150mg/L, 谷氨酸 100mg/L, 天冬氨酸 100mg/L, pH5.6)中至少存在一种已知抑制农杆菌生长的抗生素(头孢霉素),不添加植物转化体的选择剂(步骤 3:恢复步骤)。优选地,子叶节再生的组织块在有抗生素但没有选择剂的固体培养基上培养,以消除农杆菌并为侵染细胞提供恢复期。接着,

25 子叶节再生的组织块在含选择剂(草丁膦)的培养基上培养并选择生长着的转化愈伤组织(步骤 4:选择步骤)。优选地,子叶节再生的组织块在有选择剂的筛选固体培养基(B5 盐 3.1g/L、B5 维他命、2-吗啉乙磺酸(MES)1g/L、蔗糖 30g/L、6-苄基腺嘌呤(6-BAP)1mg/L、琼脂 8g/L, 头孢霉素 150mg/L, 谷氨酸 100mg/L, 天冬氨酸 100mg/L, 草丁膦 6mg/L, pH5.6)上培养,导致

30 转化的细胞选择性生长。然后,转化的细胞再生成植物(步骤 5:再生步骤),优选地,在含选择剂的培养基上生长的子叶节再生的组织块在固体培养基(B5 分化培养基和 B5 生根培养基)上培养以再生植物。

筛选得到的抗性组织块转移到所述 B5 分化培养基(B5 盐 3.1g/L、B5 维他命、2-吗啉乙磺酸(MES)1g/L、蔗糖 30g/L、玉米素(ZT)1mg/L、琼脂

35 8g/L、头孢霉素 150mg/L、谷氨酸 50mg/L、天冬氨酸 50mg/L、赤霉素 1mg/L、

生长素 1mg/L、草丁膦 6mg/L , pH5.6) 上 , 25℃下培养分化。分化出来的小苗转移到所述 B5 生根培养基(B5 盐 3.1g/L、B5 维他命、2-吗啉乙磺酸(MES) 1g/L、蔗糖 30g/L、琼脂 8g/L、头孢霉素 150mg/L、吲哚-3-丁酸(IBA)1mg/L) , 在生根培养上 , 25℃下培养至约 10cm 高 , 移至温室培养至结实。在温室中 , 每天于 26℃下培养 16 小时 , 再于 20℃下培养 8 小时。

3、用 TaqMan 验证转基因大豆植株

分别取转入 24DT11 核苷酸序列的大豆植株和转入对照核苷酸序列的大豆植株的叶片约 100mg 作为样品 , 用 Qiagen 的 DNeasy Plant Maxi Kit 提取其基因组 DNA , 通过 Taqman 探针荧光定量 PCR 方法检测 PAT 基因拷贝数以确定 24DT11 基因的拷贝数。同时以野生型大豆植株作为对照 , 按照上述方法进行

检测 PAT 基因拷贝数的具体方法如下 :

步骤 11、分别取转入 24DT11 核苷酸序列的大豆植株、转入对照序列的大豆植株和野生型大豆植株的叶片各 100mg , 分别在研钵中用液氮研成匀浆 , 每个样品取 3 个重复 ;

步骤 12、使用 Qiagen 的 DNeasy Plant Mini Kit 提取上述样品的基因组 DNA , 具体方法参考其产品说明书 ;

步骤 13、用 NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) 测定上述样品的基因组 DNA 浓度 ;

步骤 14、调整上述样品的基因组 DNA 浓度至同一浓度值 , 所述浓度值的范围为 80-100ng/μL ;

步骤 15、采用 Taqman 探针荧光定量 PCR 方法鉴定样品的拷贝数 , 以经过鉴定已知拷贝数的样品作为标准品 , 以野生型大豆植株的样品作为对照 , 每个样品 3 个重复 , 取其平均值 ; 荧光定量 PCR 引物和探针序列分别是 :

以下引物和探针用来检测 PAT 核苷酸序列 :

引物 1 : GAGGGTGTGTGGCTGGTATTG 如序列表中 SEQ ID NO:11 所示 ;

引物 2 : TCTCAACTGTCCAATCGTAAGCG 如序列表中 SEQ ID NO:12 所示 ;

探针 1 : CTTACGCTGGGCCCTGGAAGGCTAG 如序列表中 SEQ ID NO:13 所示 ;

PCR 反应体系为 :

JumpStart™ Taq ReadyMix™ (Sigma) 10μL

50×引物/探针混合物 1μL

基因组 DNA 3μL

水 (ddH₂O) 6μL

所述 50×引物/探针混合物包含 1mM 浓度的每种引物各 45μL , 100μM 浓度的探针 50μL 和 860μL 1×TE 缓冲液, 并且在 4℃, 贮藏在琥珀试管中。

PCR 反应条件为:

5	步骤	温度	时间
	21	95℃	5 分钟
	22	95℃	30 秒
	23	60℃	1 分钟
	24	回到步骤 22, 重复 40 次	

10 利用 SDS2.3 软件 (Applied Biosystems) 分析数据。

通过分析 PAT 基因拷贝数的实验结果, 进而证实 24DT11 核苷酸序列均已整合到所检测的大豆植株的染色体组中, 而且转入 24DT11 核苷酸序列的大豆植株和转入对照序列的大豆植株均获得了单拷贝的转基因大豆植株。

第六实施例、转基因大豆植株的除草剂抗性效果检测

15 将转入 24DT11 核苷酸序列的大豆植株、转入对照序列的大豆植株和野生型大豆植株 (V3-V4 时期) 分别对 2,4-D 二甲铵盐和二甲四氯进行除草剂抗性效果检测。

分别取转入 24DT11 核苷酸序列的大豆植株、转入对照序列的大豆植株和野生型大豆植株, 并分别用 2,4-D 二甲铵盐 (2240g ae/ha, 4 倍大田浓度)、二甲四氯 (2240g ae/ha, 4 倍大田浓度) 和空白溶剂 (水) 喷洒。分别在喷施后 6 小时 (6HAT)、2 天 (2DAT)、7 天 (7DAT) 及 14 天 (14DAT) 后, 根据叶片卷曲程度和生长点损伤程度来统计每株植株受除草剂的损伤程度: 以叶片平整如野生型、生长点完好无损为 0%; 叶片卷曲萎蔫且生长点死亡为 100%。转入 24DT11 核苷酸序列的共 3 个株系 (S1、S2 和 S3), 转入对照序列的共 2 个株系 (S4 和 S5), 野生型的 (CK1) 共 1 个株系; 从每个株系选 10-15 株进行测试。结果如表 2 及图 5 所示。

表 2、转基因大豆 T₁ 植株除草剂抗性实验结果

处理	大豆基因型	平均损伤%	平均损伤%	平均损伤%	平均损伤%
		6HAT	2DAT	7DAT	14DAT
空白溶剂 (水)	S1	0	0	0	0
	S2	0	0	0	0
	S3	0	0	0	0
	S4	0	0	0	0
	S5	0	0	0	0

	CK1	0	0	0	0
2240 g ae/ha	S1	7	4	0	0
2,4-D 二甲铵盐	S2	5	2	0	0
(4x 2,4-D)	S3	13	6	2	0
	S4	46	76	96	100
	S5	53	77	91	100
	CK1	48	72	94	100
2240 g ae/ha	S1	12	7	0	0
二甲四氯	S2	9	5	0	0
(4x MCPA)	S3	19	12	7	4
	S4	38	69	87	100
	S5	47	74	92	100
	CK1	34	61	82	100

对于大豆, 2240g ae/ha 2,4-D 和二甲四氯是将敏感植物与具有平均抗性水平的植物区分开来的有效剂量。表 2 和图 5 的结果表明: 24DT11 基因赋予转基因大豆植物高水平除草剂抗性, 尤其是苯氧基生长素除草剂; 而野生型大豆植株和转入对照序列的大豆 T₁ 植株则均不具有苯氧基生长素除草剂抗性。

5 第七实施例、玉米重组表达载体的构建及重组表达载体转化农杆菌

1、构建含有 24DT11 核苷酸序列的玉米重组表达载体 DBN100758

用限制性内切酶 SpeI 和 KasI 分别酶切重组克隆载体 DBN01-T 和表达载体 DBNBC-02 (载体骨架: pCAMBIA2301 (CAMBIA 机构可以提供)), 将切下的 24DT11 核苷酸序列片段插到表达载体 DBNBC-02 的 SpeI 和 KasI 位点之间, 利用常规的酶切方法构建载体是本领域技术人员所熟知的, 表达载体 DBNBC-02 中的 SpeI 和 KasI 酶切位点也是利用常规的酶切方法引入的, 构建成重组表达载体 DBN100758, 其构建流程如图 6 所示 (Kan: 卡那霉素基因; RB: 右边界; Ubi: 玉米 Ubiquitin (泛素) 1 基因启动子 (SEQ ID NO:9); 24DT11: 24DT11 核苷酸序列 (SEQ ID NO:1); Nos: 胭脂碱合成酶基因的终止子 (SEQ ID NO:4); PMI: 磷酸甘露糖异构酶基因 (SEQ ID NO:10); LB: 左边界) 。

将重组表达载体 DBN100758 用热激方法转化大肠杆菌 T1 感受态细胞, 其热激条件为: 50μL 大肠杆菌 T1 感受态细胞、10μL 质粒 DNA (重组表达载体 DBN100758), 42℃ 水浴 30 秒; 37℃ 振荡培养 1 小时 (100rpm 转速下摇床摇动); 然后在含 50mg/L 卡那霉素 (Kanamycin) 的 LB 固体平板 (胰蛋

白朊 10g/L, 酵母提取物 5g/L, NaCl 10g/L, 琼脂 15g/L, 用 NaOH 调 pH 至 7.5) 于温度 37℃ 条件下培养 12 小时, 挑取白色菌落, 在 LB 液体培养基(胰蛋白胨 10g/L, 酵母提取物 5g/L, NaCl 10g/L, 卡那霉素 50mg/L, 用 NaOH 调 pH 至 7.5) 中于温度 37℃ 条件下培养过夜。碱法提取其质粒。将提取的质粒用限制性内切酶 SpeI 和 KasI 酶切后鉴定, 并将阳性克隆进行测序鉴定, 结果表明重组表达载体 DBN100758 在 SpeI 和 KasI 位点间的核苷酸序列为序列表中 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列, 即 24DT11 核苷酸序列。

2、构建含有对照序列的玉米重组表达载体 DBN100758N

按照本发明第二实施例中 1 所述的构建含有 24DT11 核苷酸序列的重组克隆载体 DBN01-T 的方法, 利用对照序列 (SEQ ID NO:8) 构建含有对照序列的重组克隆载体 DBN02R-T。对阳性克隆进行测序验证, 结果表明重组克隆载体 DBN02R-T 中插入的对照序列为序列表中 SEQ ID NO:8 所示的核苷酸序列, 即对照序列正确插入。

按照本发明本实施例中 1 所述的构建含有 24DT11 核苷酸序列的重组表达载体 DBN100758 的方法, 利用对照序列构建含有对照序列的重组表达载体 DBN100758N, 其载体结构如图 7 所示(载体骨架 : pCAMBIA2301 (CAMBIA 机构可以提供) ; Kan : 卡那霉素基因 ; RB : 右边界 ; Ubi : 玉米 Ubiquitin (泛素) 1 基因启动子 (SEQ ID NO:9) ; mN : 对照序列 (SEQ ID NO:8) ; Nos : 胭脂碱合成酶基因的终止子 (SEQ ID NO:4) ; PMI : 磷酸甘露糖异构酶基因 (SEQ ID NO:10) ; LB : 左边界)。对阳性克隆进行测序验证, 结果表明重组表达载体 DBN100758N 中插入的对照序列为序列表中 SEQ ID NO:8 所示的核苷酸序列, 即对照序列正确插入。

3、玉米重组表达载体转化农杆菌

对已经构建正确的重组表达载体 DBN100758 和 DBN100758N (对照序列) 用液氮法转化到农杆菌 LBA4404 (Invitrogen , Chicago , USA , CAT : 18313-015) 中, 其转化条件为 : 100μL 农杆菌 LBA4404、3μL 质粒 DNA (重组表达载体) ; 置于液氮中 10 分钟, 37℃ 温水浴 10 分钟; 将转化后的农杆菌 LBA4404 接种于 LB 试管中于温度 28℃、转速为 200rpm 条件下培养 2 小时, 涂于含 50mg/L 的利福平 (Rifampicin) 和 50mg/L 的卡那霉素的 LB 平板上直至长出阳性单克隆, 挑取单克隆培养并提取其质粒, 用限制性内切酶 SmaI 和 EcoRV 酶切 DBN100758 后进行酶切验证, 用限制性内切酶 SmaI 和 BglII 酶切 DBN100758N (对照序列) 后进行酶切验证, 结果表明重组表达载体 DBN100758 和 DBN100758N (对照序列) 结构完全正确。

第八实施例、转入 24DT11 核苷酸序列的玉米植株的获得及验证

按照常规采用的农杆菌侵染法, 将无菌培养的玉米品种综 31 (Z31) 的幼

胚与第七实施例中 3 所述的农杆菌共培养，以将第七实施例中 1 和 2 构建的重组表达载体 DBN100758 和 DBN100758N (对照序列) 中的 T-DNA (包括玉米 Ubiquitin1 基因的启动子序列、24DT11 核苷酸序列、对照序列、PMI 基因和 Nos 终止子序列) 转入到玉米染色体组中，获得了转入 24DT11 核苷酸序列的玉米植株和转入对照序列的玉米植株；同时以野生型玉米植株作为对照。

对于农杆菌介导的玉米转化，简要地，从玉米中分离未成熟的幼胚，用农杆菌悬浮液接触幼胚，其中农杆菌能够将 24DT11 核苷酸序列传递至幼胚之一的至少一个细胞 (步骤 1：侵染步骤)。在此步骤中，幼胚优选地浸入农杆菌悬浮液 ($OD_{660}=0.4-0.6$ ，侵染培养基 (MS 盐 4.3g/L、MS 维他命、干酪素 300mg/L、蔗糖 68.5g/L、葡萄糖 36g/L、乙酰丁香酮 (AS) 40mg/L、2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-D) 1mg/L，pH5.3)) 中以启动接种。幼胚与农杆菌共培养一段时期 (3 天) (步骤 2：共培养步骤)。优选地，幼胚在侵染步骤后在固体培养基 (MS 盐 4.3g/L、MS 维他命、干酪素 300mg/L、蔗糖 20g/L、葡萄糖 10g/L、乙酰丁香酮 (AS) 100mg/L、2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-D) 1mg/L、琼脂 8g/L，pH5.8) 上培养。在此共培养阶段后，可以有一个选择性的“恢复”步骤。在“恢复”步骤中，恢复培养基 (MS 盐 4.3g/L、MS 维他命、干酪素 300mg/L、蔗糖 30g/L、2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-D) 1mg/L、植物凝胶 3g/L，pH5.8) 中至少存在一种已知抑制农杆菌生长的抗生素 (头孢霉素)，不添加植物转化体的选择剂 (步骤 3：恢复步骤)。优选地，幼胚在有抗生素但没有选择剂的固体培养基上培养，以消除农杆菌并为侵染细胞提供恢复期。接着，接种的幼胚在含选择剂 (甘露糖) 的培养基上培养并选择生长着的转化愈伤组织 (步骤 4：选择步骤)。优选地，幼胚在有选择剂的筛选固体培养基 (MS 盐 4.3g/L、MS 维他命、干酪素 300mg/L、蔗糖 30g/L、甘露糖 12.5g/L、2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-D) 1mg/L、植物凝胶 3g/L，pH5.8) 上培养，导致转化的细胞选择性生长。然后，愈伤组织再生成植物 (步骤 5：再生步骤)，优选地，在含选择剂的培养基上生长的愈伤组织在固体培养基 (MS 分化培养基和 MS 生根培养基) 上培养以再生植物。

筛选得到的抗性愈伤组织转移到所述 MS 分化培养基 (MS 盐 4.3g/L、MS 维他命、干酪素 300mg/L、蔗糖 30g/L、6-苄基腺嘌呤 2mg/L、甘露糖 5g/L、植物凝胶 3g/L，pH5.8) 上，25℃下培养分化。分化出来的小苗转移到所述 MS 生根培养基 (MS 盐 2.15g/L、MS 维他命、干酪素 300mg/L、蔗糖 30g/L、吲哚-3-乙酸 1mg/L、植物凝胶 3g/L，pH5.8) 上，25℃下培养至约 10cm 高，移至温室培养至结实。在温室中，每天于 28℃下培养 16 小时，再于 20℃下培养 8 小时。

2、用 TaqMan 验证转入 24DT11 核苷酸序列的玉米植株

分别取转入 24DT11 核苷酸序列的玉米植株和转入对照序列的玉米植株的叶片约 100mg 作为样品，用 Qiagen 的 DNeasy Plant Maxi Kit 提取其基因组 DNA，通过 Taqman 探针荧光定量 PCR 方法检测 PMI 基因拷贝数以确定 24DT11 基因的拷贝数。同时以野生型玉米植株作为对照，按照上述方法进行

检测 PMI 基因拷贝数的具体方法如下：

步骤 31、分别取转入 24DT11 核苷酸序列的玉米植株、转入对照序列的玉米植株和野生型玉米植株的叶片各 100mg，分别在研钵中用液氮研成匀浆，每个样品取 3 个重复；

步骤 32、使用 Qiagen 的 DNeasy Plant Mini Kit 提取上述样品的基因组 DNA，具体方法参考其产品说明书；

步骤 33、用 NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) 测定上述样品的基因组 DNA 浓度；

步骤 34、调整上述样品的基因组 DNA 浓度至同一浓度值，所述浓度值的范围为 80-100ng/ μ L；

步骤 35、采用 Taqman 探针荧光定量 PCR 方法鉴定样品的拷贝数，以经过鉴定已知拷贝数的样品作为标准品，以野生型玉米植株的样品作为对照，每个样品 3 个重复，取其平均值；荧光定量 PCR 引物和探针序列分别是：

以下引物和探针用来检测 PMI 核苷酸序列：

引物 3：GCTGTAAGAGCTTACTGAAAAAATTAACA 如序列表中 SEQ ID NO:14 所示；

引物 4：CGATCTGCAGGTCGACGG 如序列表中 SEQ ID NO:15 所示；

探针 2：TCTCTTGCTAAGCTGGGAGCTCGATCC 如序列表中 SEQ ID NO:16 所示；

PCR 反应体系为：

JumpStart™ Taq ReadyMix™ (Sigma)	10 μ L
50 $\times$ 引物/探针混合物	1 μ L
基因组 DNA	3 μ L
水 (ddH ₂ O)	6 μ L

所述 50 $\times$ 引物/探针混合物包含 1mM 浓度的每种引物各 45 μ L，100 μ M 浓度的探针 50 μ L 和 860 μ L 1 $\times$ TE 缓冲液，并且在 4℃，贮藏在琥珀试管中。

PCR 反应条件为：

步骤	温度	时间
41	95℃	5 分钟

42 95℃ 30 秒
 43 60℃ 1 分钟
 44 回到步骤 42，重复 40 次

利用 SDS2.3 软件 (Applied Biosystems) 分析数据。

- 5 通过分析 PMI 基因拷贝数的实验结果，进而证实 24DT11 核苷酸序列均已整合到所检测的玉米植株的染色体组中，而且转入 24DT11 核苷酸序列的玉米植株和转入对照序列的玉米植株均获得了单拷贝的转基因玉米植株。

第九实施例、转基因玉米植株的除草剂抗性效果检测

- 10 将转入 24DT11 核苷酸序列的玉米植株、转入对照序列的玉米植株和野生型玉米植株 (V3-V4 时期) 分别对 2,4-D 二甲铵盐和二甲四氯进行除草剂抗性效果检测。

- 15 分别取转入 24DT11 核苷酸序列的玉米植株、转入对照序列的玉米植株和野生型玉米植株，并分别用 2,4-D 二甲铵盐 (8960g ae/ha，16 倍大田浓度)、二甲四氯 (8960g ae/ha，16 倍大田浓度) 和空白溶剂 (水) 喷洒。喷施 21 天后统计支撑根发育情况。转入 24DT11 核苷酸序列的共 3 个株系 (S6、S7 和 S8)，转入对照序列的共 2 个株系 (S9 和 S10)，野生型的 (CK2) 共 1 个株系；从每个株系选 10-15 株进行测试。结果如表 3 所示。

表 3、转基因玉米 T₁ 植株除草剂抗性实验结果

处理	玉米基因型	支撑根发育正常	支撑根发育异常	支撑根正常发育比例
空白溶剂 (水)	S6	12	0	100.00%
	S7	11	0	100.00%
	S8	13	0	100.00%
	S9	12	0	100.00%
	S10	14	0	100.00%
	CK2	12	0	100.00%
8960g ae/ha 2,4-D 二甲铵盐 (16x 2,4-D)	S6	15	0	100.00%
	S7	13	0	100.00%
	S8	12	0	100.00%
	S9	0	13	0%
	S10	0	12	0%
	CK2	0	14	0%
8960g ae/ha	S6	11	0	100.00%

二甲四氯 (16x MCPA)	S7	11	0	100.00%
	S8	12	0	100.00%
	S9	0	14	0%
	S10	0	12	0%
	CK2	0	15	0%

表 3 的结果表明 24DT11 基因赋予转基因玉米植物除草剂的高水平抗性，尤其是苯氧基生长素除草剂（由于单子叶植物本身对苯氧基生长素除草剂具有一定抗性，因而表现出高水平抗性）；而野生型玉米植株和转入对照序列的玉米植株则均不具有高水平的苯氧基生长素除草剂抗性。

5 综上所述，转入 24DT11 核苷酸序列的玉米植株、大豆植株和拟南芥植株都具有较高除草剂抗性能力。本发明 24DT11 除草剂抗性基因采用植物的偏好密码子，使得本发明除草剂抗性基因特别适合在植物中表达，本发明 24DT11 除草剂抗性蛋白质对除草剂抗性广，尤其苯氧基生长素除草剂。

10 最后所应说明的是，以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制，尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明，本领域的普通技术人员应当理解，可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换，而不脱离本发明技术方案的精神和范围。

权 利 要 求 书

1.一种除草剂抗性蛋白质，其特征在于，包括：

(a) 具有 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列组成的蛋白质；或

(b) 在 (a) 中的氨基酸序列经过取代和/或缺失和/或添加一个或几个氨基酸且具有芳氧基链烷酸酯双加氧酶活性的蛋白质。

2.一种除草剂抗性基因，其特征在于，包括：

(a) 编码权利要求 1 所述的除草剂抗性蛋白质的核苷酸序列；或

(b) 在严格条件下与 (a) 限定的核苷酸序列杂交且编码具有芳氧基链烷酸酯双加氧酶活性的蛋白质的核苷酸序列；或

(c) 具有 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列。

3.一种表达盒，其特征在于，包含调控序列和权利要求 2 所述的除草剂抗性基因。

4.一种重组载体，其特征在于，包含权利要求 2 所述的除草剂抗性基因或权利要求 3 所述的表达盒。

5.一种产生除草剂抗性蛋白质的方法，其特征在于，包括以下步骤：

获得包含权利要求 2 所述的除草剂抗性基因或权利要求 3 所述的表达盒的转基因宿主生物的细胞；

在允许产生除草剂抗性蛋白质的条件下培养所述转基因宿主生物的细胞；

回收所述除草剂抗性蛋白质。

6.根据权利要求 5 所述的方法，其特征在于，所述转基因宿主生物包括植物、动物、细菌、酵母、杆状病毒、线虫或藻类。

7.根据权利要求 6 所述的方法，其特征在于，所述植物为大豆、棉花、玉米、水稻、小麦、甜菜或甘蔗。

8.一种增加除草剂耐受范围的方法，其特征在于，包括：将权利要求 1 所述的除草剂抗性蛋白质或权利要求 3 所述表达盒编码的除草剂抗性蛋白质在植物中与第二种核苷酸编码的蛋白质一起表达，所述第二种核苷酸编码至少一种不同于权利要求 1 所述除草剂抗性蛋白质或权利要求 3 所述表达盒编码的除草剂抗性蛋白质的蛋白质。

9.根据权利要求 8 所述的方法，其特征在于，所述第二种核苷酸编码草甘膦抗性蛋白质、草铵膦抗性蛋白质、4-羟苯基丙酮酸双加氧酶、乙酰乳酸合酶、细胞色素类蛋白质或原卟啉原氧化酶。

10.一种转化的植物细胞的选择方法，其特征在于，包括：用权利要求 2 所述的除草剂抗性基因或权利要求 3 所述的表达盒转化多个植物细胞，并在

允许表达所述除草剂抗性基因或所述表达盒的转化细胞生长，而杀死未转化细胞或抑制未转化细胞生长的除草剂浓度下培养所述细胞，所述除草剂为苯氧基生长素。

5 11.一种控制杂草的方法，其特征在于，包括：对种植作物的大田施用有效剂量的除草剂，所述作物包含权利要求 2 所述的除草剂抗性基因或权利要求 3 所述的表达盒或权利要求 4 所述的重组载体。

12.根据权利要求 11 所述的方法，其特征在于，所述除草剂为苯氧基生长素。

10 13.一种用于保护植物免受由除草剂引起的损伤的方法，其特征在于，包括：将权利要求 2 所述的除草剂抗性基因或权利要求 3 所述的表达盒或权利要求 4 所述的重组载体导入植物。

14.根据权利要求 13 所述的方法，其特征在于，所述除草剂为苯氧基生长素。

15 15.根据权利要求 13 或 14 所述的方法，其特征在于，所述植物为大豆、棉花、玉米、水稻、小麦、甜菜或甘蔗。

16.一种控制草甘膦耐性植物的大田中草甘膦抗性杂草的方法，其特征在于，包括：对种植草甘膦耐性植物的大田施用有效剂量的除草剂，所述草甘膦耐性植物包含权利要求 2 所述的除草剂抗性基因或权利要求 3 所述的表达盒或权利要求 4 所述的重组载体。

20 17.根据权利要求 16 所述的方法，其特征在于，所述除草剂为苯氧基生长素。

18.根据权利要求 16 或 17 所述的方法，其特征在于，所述草甘膦耐性植物为单子叶植物或双子叶植物。

25 19.一种赋予作物 2,4-D 除草剂抗性的方法，其特征在于，包括：将权利要求 2 所述的除草剂抗性基因或权利要求 3 所述的表达盒或权利要求 4 所述的重组载体导入所述作物。

20.根据权利要求 19 所述的方法，其特征在于，所述作物为大豆、棉花、玉米、水稻、小麦、甜菜或甘蔗。

30 21.一种除草剂抗性蛋白质耐受苯氧基生长素类除草剂的用途，其特征在于，所述除草剂抗性蛋白质包括：

(a) 具有 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列组成的蛋白质；或

(b) 在 (a) 中的氨基酸序列经过取代和/或缺失和/或添加一个或几个氨基酸且具有芳氧基链烷酸酯双加氧酶活性的蛋白质。

35 22.一种如权利要求 1 所述的除草剂抗性蛋白质在控制杂草、保护植物免受由除草剂引起的损伤方面的应用。

23. 根据权利要求 22 所述的应用，其特征在于，所述控制杂草的应用包括：对种植作物的大田施用有效剂量的除草剂，所述作物包含权利要求 2 所述的除草剂抗性基因或权利要求 3 所述的表达盒或权利要求 4 所述的重组载体。

5 24. 根据权利要求 23 所述的应用，其特征在于，所述除草剂为苯氧基生长素。

25. 根据权利要求 22 所述的应用，其特征在于，所述保护植物免受由除草剂引起的损伤的应用包括：将权利要求 2 所述的除草剂抗性基因或权利要求 3 所述的表达盒或权利要求 4 所述的重组载体导入植物。

10 26. 根据权利要求 25 所述的应用，其特征在于，所述除草剂为苯氧基生长素。

27. 根据权利要求 25 或 26 所述的应用，其特征在于，所述植物为大豆、棉花、玉米、水稻、小麦、甜菜或甘蔗。

15 28. 根据权利要求 22 所述的应用，其特征在于，所述控制杂草的应用为控制草甘膦耐性植物的大田中草甘膦抗性杂草，包括：对种植草甘膦耐性植物的大田施用有效剂量的除草剂，所述草甘膦耐性植物包含权利要求 2 所述的除草剂抗性基因或权利要求 3 所述的表达盒或权利要求 4 所述的重组载体。

29. 根据权利要求 28 所述的应用，其特征在于，所述除草剂为苯氧基生长素。

20 30. 根据权利要求 28 或 29 所述的应用，其特征在于，所述草甘膦耐性植物为单子叶植物或双子叶植物。

31. 根据权利要求 22 所述的应用，其特征在于，所述保护植物免受由除草剂引起的损伤的应用包括赋予作物 2,4-D 除草剂抗性。

25 32. 根据权利要求 31 所述的应用，其特征在于，所述作物为大豆、棉花、玉米、水稻、小麦、甜菜或甘蔗。

说明书附图

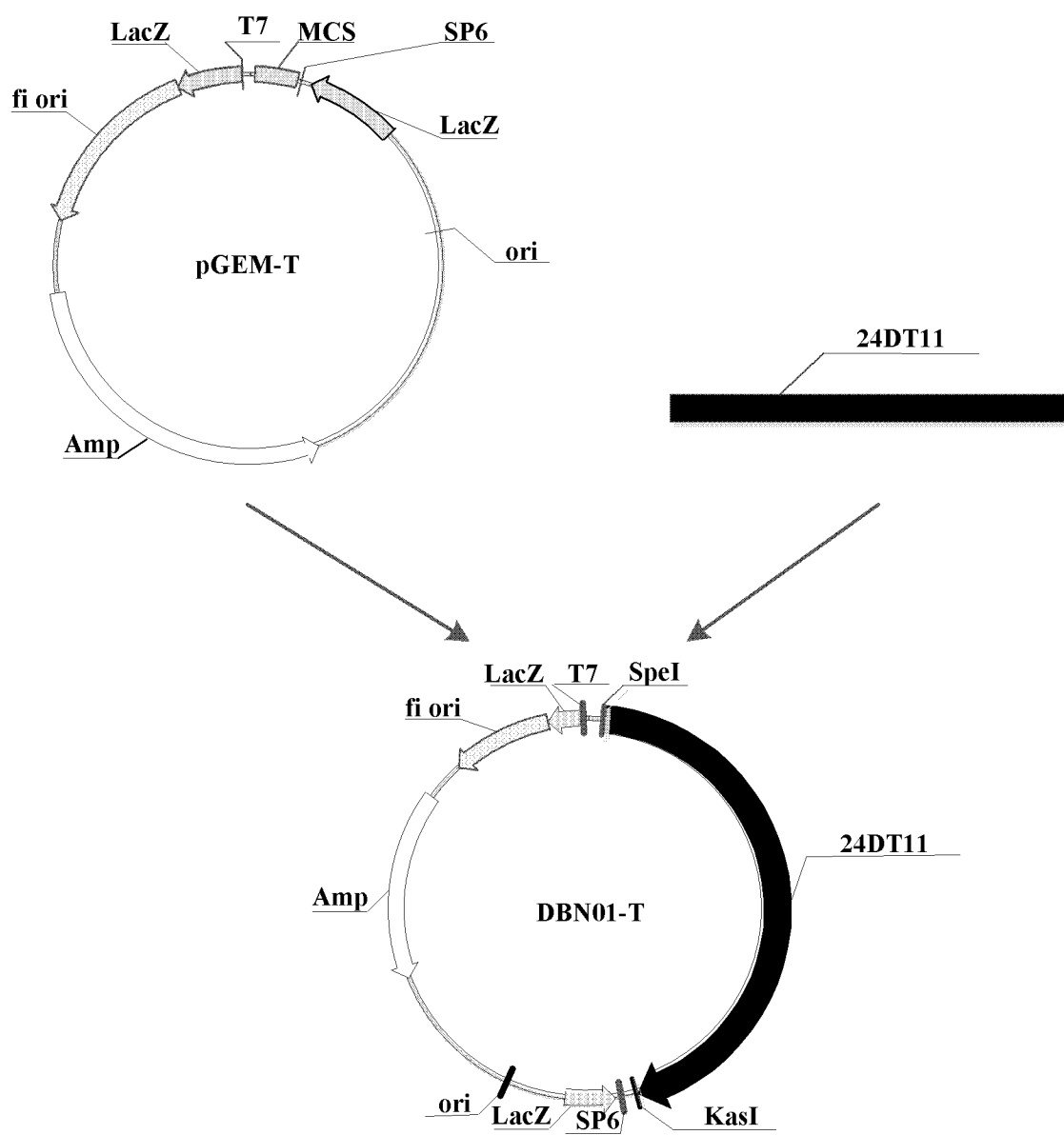


图 1

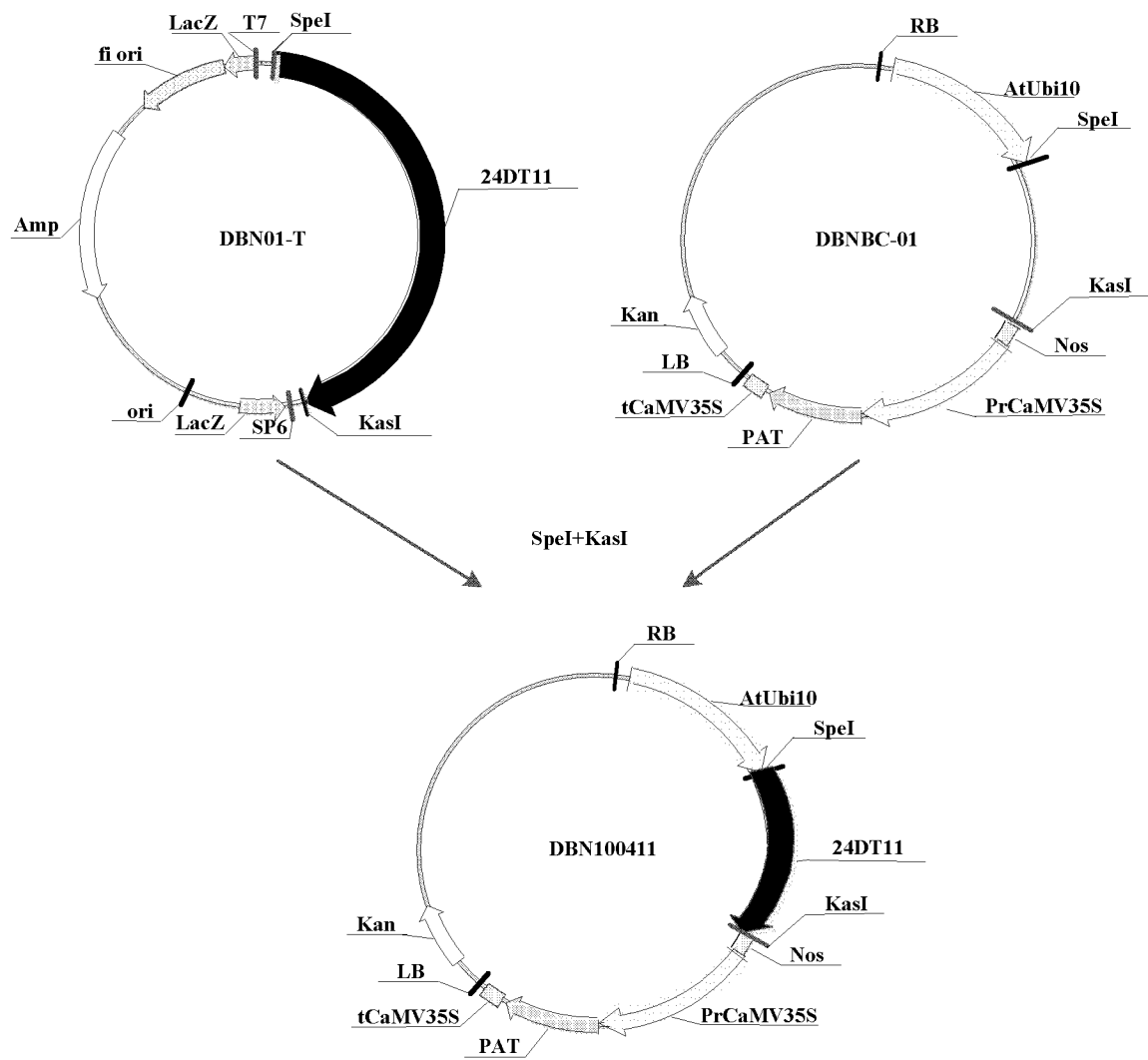


图 2

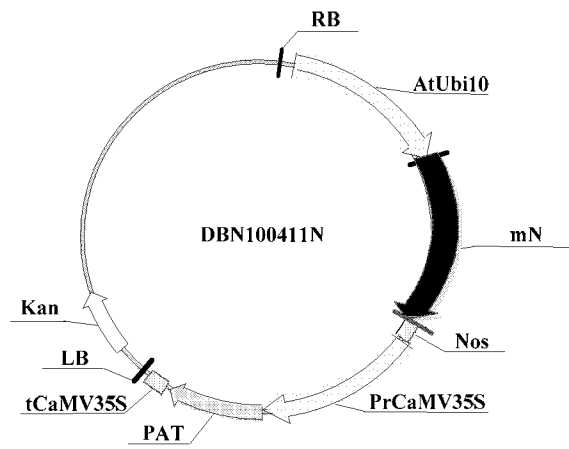


图 3



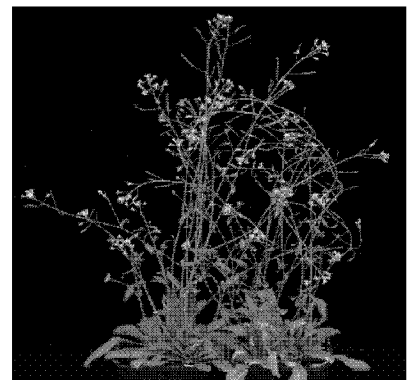
1x 2,4-D 1xMCPA
24DT11



1x 2,4-D 1xMCPA
野生型

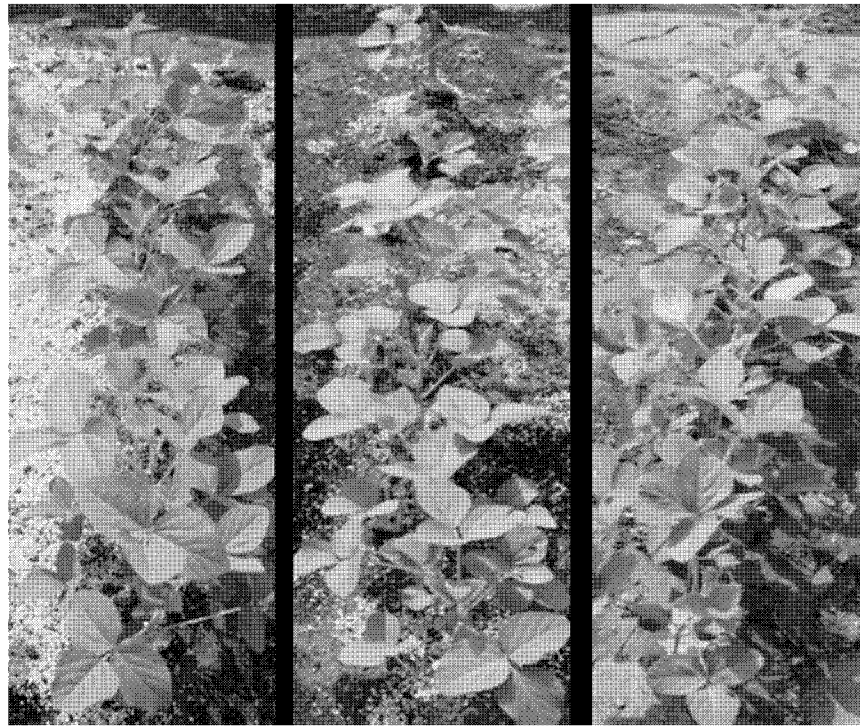


水
24DT11



水
野生型

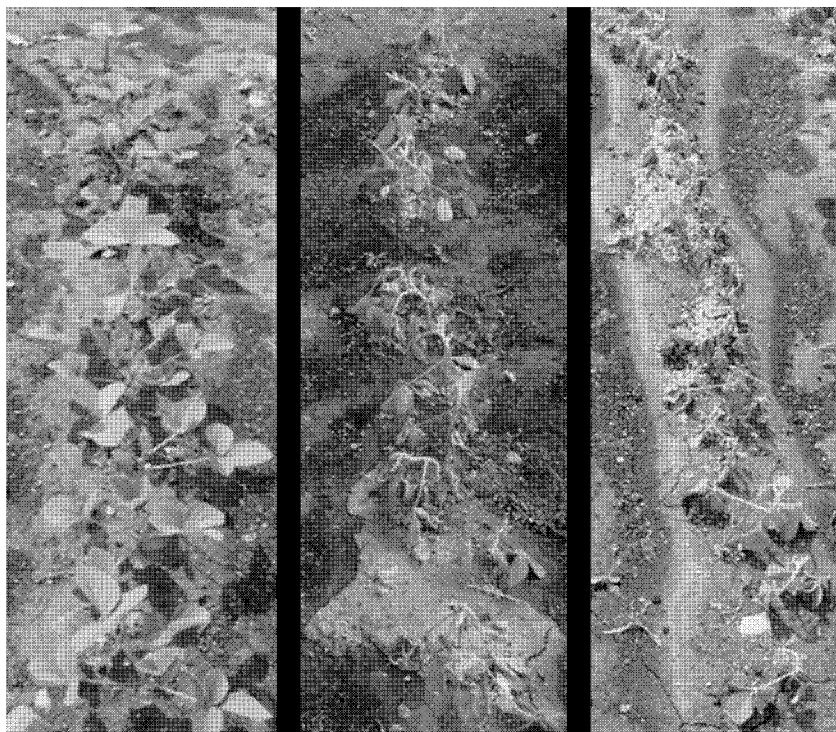
图 4



24DT11

对照序列
水

野生型



24DT11

对照序列
4X 2,4-D

野生型

图 5

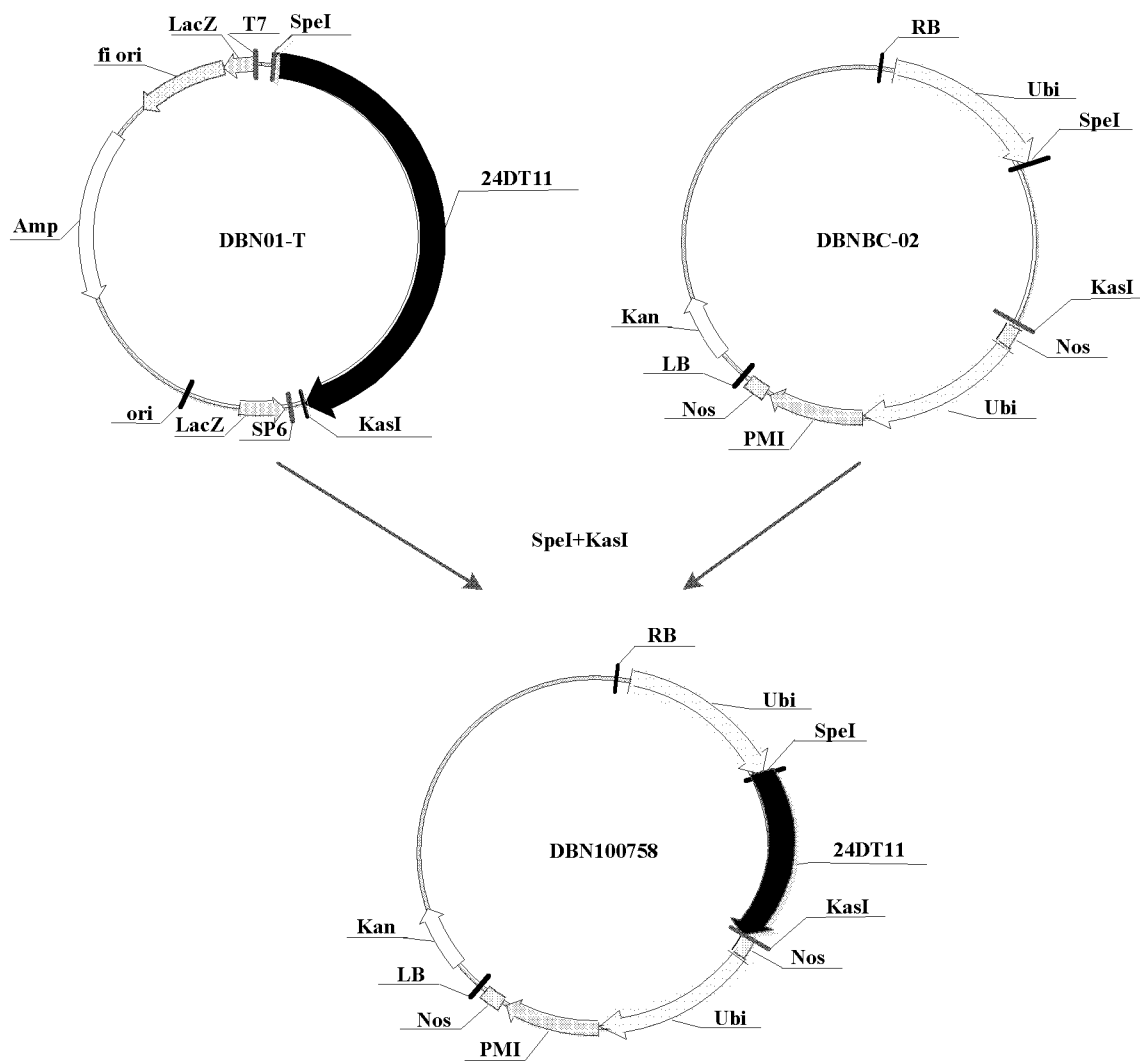


图 6

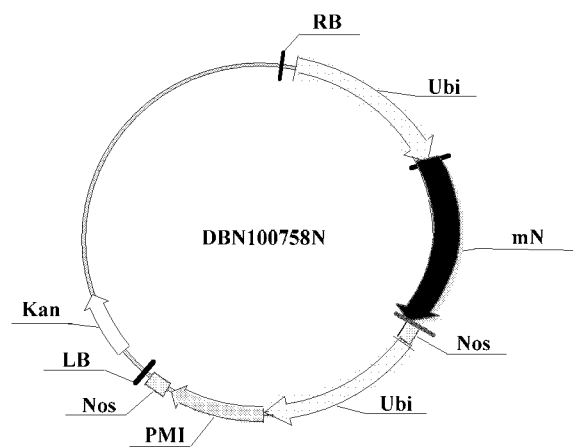


图 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/073181

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 9/02 (2006.01) i; C12N 15/53 (2006.01) i; C12N 15/84 (2006.01) i; C12N 5/10 (2006.01) i; A01H 5/00 (2006.01) i; A01G 7/06 (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, A01G

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)

CPEA, DWPI, JPABS, SIPOABS, VEN, CPRSABS, MOABS, CNABS, TWABS, CJFD, CSCD, SIPONPL USTXT, JPTXT, EPTXT, WOTXT, CNTXT, cnki, isi web of knowledge: 2,4-d, 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, dioxygenase, resistance, gene; GenBank + EMBL + DDBJ: search on SEQ ID NOs: 1 and 2

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 104611307 A (BEIJING DABEINONG TECHNOLOGY GROUP CO., LTD. et al.), 13 May 2015 (13.05.2015), see claims 1-21	1-32
Y	CN 103013938 A (BEIJING DABEINONG TECHNOLOGY GROUP CO., LTD. et al.), 03 April 2013 (03.04.2013), see claims 1-18	8-32
Y	CN 103740666 A (BEIJING DABEINONG TECHNOLOGY GROUP CO., LTD. et al.), 23 April 2014 (23.04.2014), see claims 1-20	8-32
Y	CN 103740663 A (BEIJING DABEINONG TECHNOLOGY GROUP CO., LTD. et al.), 23 April 2014 (23.04.2014), see claims 1-20	8-32
Y	CN 103361316 A (DOW AGROSCIENCES LLC), 23 October 2013 (23.10.2013), see claims 1-88	8-32

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 26 April 2016 (26.04.2016)	Date of mailing of the international search report 05 May 2016 (05.05.2016)
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 WANG, Qiyang Telephone No.: (86-10) 62088409

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/073181

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	"2, 4-dichlorophenoxyacetate dioxygenase [Hydrogenophaga sp.PBC]", NCBI Reference Sequence: WP_009515748.1, 01 August 2013 (01.08.2013), see sequence and relevant information	1-7
Y	"2, 4-dichlorophenoxyacetate dioxygenase [Hydrogenophaga sp.PBC]", NCBI Reference Sequence: WP_009515748.1, 01 August 2013 (01.08.2013), see sequence and relevant information	8-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2016/073181

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 104611307 A	13 May 2015	None	
CN 103013938 A	03 April 2013	US 2014179534 A1	26 June 2014
		CA 2838523 A1	25 June 2014
		CN 103013938 B	17 December 2014
		BR 102013033373 A2	14 July 2015
CN 103740666 A	23 April 2014	None	
CN 103740663 A	23 April 2014	CN 103740663 B	20 April 2016
CN 103361316 A	23 October 2013	CN 101553111 A	07 October 2009
		CA 2628263 A1	10 May 2007
		CN 101553111 B	26 June 2013
		US 2011203017 A1	18 August 2011
		US 2013035233 A1	07 February 2013
		US 8283522 B2	09 October 2012
		EP 1947926 B1	26 November 2014
		AR 056590 A1	10 October 2007
		US 8916752 B2	23 December 2014
		JP 5647204 B2	24 December 2014
		JP 5155869 B2	06 March 2013
		NZ 608188 A	31 October 2014
		AU 2006308959 B2	06 September 2012
		ZA 200803982 A	25 February 2009
		WO 2007053482 A2	10 May 2007
		EP 2484202 A1	08 August 2012
		JP 2013046624 A	07 March 2013
		WO 2007053482 A3	30 April 2009
		JP 2009513139 A	02 April 2009
		NZ 595200 A	26 April 2013
		NZ 567807 A	30 September 2011
		EP 1947926 A2	30 July 2008
		ES 2528914 T3	13 February 2015
		AU 2006308959 A1	10 May 2007
		EP 1947926 A4	18 November 2009
		BR PI0618025 A2	16 August 2011
		DK 1947926 T3	26 January 2015
		EP 2484767 A1	08 August 2012
		US 2015080218 A1	19 March 2015

A. 主题的分类		
C12N 9/02(2006.01)i; C12N 15/53(2006.01)i; C12N 15/84(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; A01H 5/00(2006.01)i; A01G 7/06(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, A01H, A01G		
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))		
CPEA, DWPI, JPABS, SIPOABS, VEN, CPRSABS, MOABS, CNABS, TWABS, CJFD, CSCD, SIPONPL USTXT, JPTXT, EPTXT, WOTXT, CNTXT, cnki, isi web of knowledge:2,4-d,2,4-二氯苯氧乙酸,2,4-dichlorophenoxy acetic acid, dioxygenase, 双加氧酶, 抗性, resistance, 基因, gene; GenBank+EMBL+DDBJ; 关于SEQ ID NOs:1和2的检索		
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
PX	CN 104611307 A (北京大北农科技集团股份有限公司等) 2015年 5月 13日 (2015 - 05 - 13) 参见权利要求1-21	1-32
Y	CN 103013938 A (北京大北农科技集团股份有限公司等) 2013年 4月 3日 (2013 - 04 - 03) 参见权利要求1-18	8-32
Y	CN 103740666 A (北京大北农科技集团股份有限公司等) 2014年 4月 23日 (2014 - 04 - 23) 参见权利要求1-20	8-32
Y	CN 103740663 A (北京大北农科技集团股份有限公司等) 2014年 4月 23日 (2014 - 04 - 23) 参见权利要求1-20	8-32
Y	CN 103361316 A (美国陶氏益农公司) 2013年 10月 23日 (2013 - 10 - 23) 参见权利要求1-88	8-32
☒ 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
2016年 4月 26日		2016年 5月 5日
ISA/CN的名称和邮寄地址		授权官员
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		王启扬
传真号 (86-10)62019451		电话号码 (86-10)62088409

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
X	"2, 4-dichlorophenoxyacetate dioxygenase[Hydrogenophaga sp. PBC]" NCBI Reference Sequence: WP_009515748.1, 2013年 8月 1日 (2013 - 08 - 01), 参见序列和相关信息	1-7
Y	"2, 4-dichlorophenoxyacetate dioxygenase[Hydrogenophaga sp. PBC]" NCBI Reference Sequence: WP_009515748.1, 2013年 8月 1日 (2013 - 08 - 01), 参见序列和相关信息	8-32

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/073181

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	104611307	A	2015年 5月 13日	无			
CN	103013938	A	2013年 4月 3日	US	2014179534	A1	2014年 6月 26日
				CA	2838523	A1	2014年 6月 25日
				CN	103013938	B	2014年 12月 17日
				BR	10201303373	A2	2015年 7月 14日
CN	103740666	A	2014年 4月 23日	无			
CN	103740663	A	2014年 4月 23日	CN	103740663	B	2016年 4月 20日
CN	103361316	A	2013年 10月 23日	CN	101553111	A	2009年 10月 7日
				CA	2628263	A1	2007年 5月 10日
				CN	101553111	B	2013年 6月 26日
				US	2011203017	A1	2011年 8月 18日
				US	2013035233	A1	2013年 2月 7日
				US	8283522	B2	2012年 10月 9日
				EP	1947926	B1	2014年 11月 26日
				AR	056590	A1	2007年 10月 10日
				US	8916752	B2	2014年 12月 23日
				JP	5647204	B2	2014年 12月 24日
				JP	5155869	B2	2013年 3月 6日
				NZ	608188	A	2014年 10月 31日
				AU	2006308959	B2	2012年 9月 6日
				ZA	200803982	A	2009年 2月 25日
				WO	2007053482	A2	2007年 5月 10日
				EP	2484202	A1	2012年 8月 8日
				JP	2013046624	A	2013年 3月 7日
				WO	2007053482	A3	2009年 4月 30日
				JP	2009513139	A	2009年 4月 2日
				NZ	595200	A	2013年 4月 26日
				NZ	567807	A	2011年 9月 30日
				EP	1947926	A2	2008年 7月 30日
				ES	2528914	T3	2015年 2月 13日
				AU	2006308959	A1	2007年 5月 10日
				EP	1947926	A4	2009年 11月 18日
				BR	PI0618025	A2	2011年 8月 16日
				DK	1947926	T3	2015年 1月 26日
				EP	2484767	A1	2012年 8月 8日
				US	2015080218	A1	2015年 3月 19日