

(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:

2005年2月17日(17.02.2005)

PCT

(10) 国际公布号:

WO 2005/014820 A1

- (51) 国际分类号<sup>7</sup>: C12N 15/54, 9/10, 15/82 Yiping) [CN/CN]; 中国北京市颐和园路5号, Beijing 100081 (CN)。
- (21) 国际申请号: PCT/CN2003/000651
- (22) 国际申请日: 2003年8月8日(08.08.2003)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 四川禾本生物工程有限公(SI CHUAN HEBEN BIOTIC ENGINEERING CO. LTD.) [CN/CN]; 中国四川省成都市科华北路99号, Sichuan 610064 (CN)。中国农业科学院生物技术研究所(BIOTECHNOLOGY RESEARCH INSTITUTE, CHINESE ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCE) [CN/CN]; 中国北京市中关村南大街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]; 中国北京市中关村南大街12号, Beijing 100081 (CN)。杨滔(YANG, Tao) [CN/CN]; 中国四川省成都市科华北路99号, Sichuan 610064 (CN)。曾昌耀(ZENG, Changyao) [CN/CN]; 中国四川省绵阳市临园路东段68号, Sichuan 621000 (CN)。唐克轩(TANG, Kexuan) [CN/CN]; 中国上海市邯郸路220号, Shanghai 200433 (CN)。朱玉(ZHU, Yu) [CN/CN]; 中国北京市海淀区中关村南大街12号, Beijing 100081 (CN)。王劲(WANG, Jin) [CN/CN]; 中国上海市邯郸路220号, Shanghai 200433 (CN)。王忆平(WANG, Yiping) [CN/CN]; 中国北京市颐和园路5号, Beijing 100081 (CN)。
- (74) 代理人: 上海专利商标事务所(SHANGHAI PATENT & TRADEMARK LAW OFFICE); 中国上海市桂平路435号徐迅, Shanghai 200233 (CN)。
- (81) 指定国(国家): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW
- (84) 指定国(地区): ARIPO专利(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI专利(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)
- 本国际公布:  
— 包括国际检索报告。
- 所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: 5-ENOLPYRUVYL-3-PHOSPHOSHIKIMATE SYNTHASE OF HIGH GLYPHOSATE-BIORESISTANCE AND CODING SEQUENCE

(54) 发明名称: 高抗草甘膦的 EPSP 合成酶及其编码序列

(57) Abstract: Present invention provides a new 5-enolpyruvyl-3-phosphoshikimate synthase (EPSP synthase for short), polynucleotide encoding the EPSP synthase and methods producing the EPSP synthase by recombinant technology. Present invention also provides the uses of the polynucleotide encoding the EPSP synthase.

(57) 摘要

本发明提供了一种新的 5-烯醇丙酮酸莽草酸-3-磷酸合酶(简称为“EPSP 合成酶”), 编码 EPSP 合成酶的多核苷酸和经重组技术产生这种 EPSP 合成酶的方法。本发明还公开了编码这种 EPSP 合成酶的多核苷酸的用途。

WO 2005/014820 A1

## 高抗草甘膦的 EPSP 合成酶及其编码序列

### 技术领域

本发明属于生物学领域，具体地说，本发明涉及从采用免培养技术构建的群落水平 DNA 库中分离的 5-烯醇丙酮酸莽草酸-3-磷酸合酶(EPSP 合成酶)基因及其蛋白产物。本发明还涉及此多核苷酸和多肽的用途和制备。具体地说，本发明的多肽是一种具有抗草甘膦抗性的酶。

### 背景技术

草甘膦(Glyphosate)为内吸传导型、广谱灭生性除草剂，其作用机制是通过抑制植物体内 5-烯醇丙酮酸莽草酸-3-磷酸合酶(EPSPS)活性，干扰植物体内芳香族氨基酸的生物合成，导致植物死亡。

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 合成酶的编码基因。近年来包括美国和中国在内的国家草甘膦产量急剧增加还与系列转基因抗草甘膦品种的选育和大面积的推广有直接的关系。美国 Mosanto 和 Calgene 等公司在 EPSP 合成酶的编码基因 *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。

我国在转基因抗草甘膦作物方面的研究已取得一定进展，但目前尚无转抗草甘膦基因作物进入商品化阶段的报道。同时，由于没有配套出口转基因抗除草剂种子的优势和抗草甘膦基因专利，与国外大公司在市场销售竞争中处于极为不利的地位。

因此，本领域迫切需要开发新的抗草甘膦的 5-烯醇丙酮酸莽草酸-3-磷酸合酶。

### 发明内容

本发明的目的是提供一种新的 5-烯醇丙酮酸莽草酸-3-磷酸合酶(简称为“EPSP 合成酶”)以及其片段、类似物和衍生物。

本发明的另一目的是提供编码这些多肽的多核苷酸。

本发明的另一目的是提供生产这些多肽的方法以及该多肽和编码序列的用途，尤其是在提高植物抗草甘膦抗性方面的用途。

在本发明的第一方面，提供新颖的分离出的 EPSP 合成酶多肽，它包含：具有 SEQ ID NO: 2 氨基酸序列的多肽、或其保守性变异多肽、或其活性片段、或其活性衍生物。较佳地，该多肽选自下组：(a)具有 SEQ ID NO: 2 氨基酸序列的多肽；

(b)将SEQ ID NO:2氨基酸序列经过一个或多个(较佳地1-20个)氨基酸残基的取代、缺失或添加而形成的,且具有抗草甘膦抗性和EPSP合成酶活性的由(a)衍生的多肽。

在本发明的第二方面,提供编码分离的这些多肽的多核苷酸,该多核苷酸包含一核苷酸序列,该核苷酸序列选自下组:(a)编码上述 EPSP 合成酶多肽的多核苷酸;和(b)与多核苷酸(a)互补的多核苷酸。较佳地,该多核苷酸编码具有 SEQ ID NO: 2 或 3 所示氨基酸序列的多肽。更佳地,该多核苷酸的序列是选自下组的一种:(a)具有 SEQ ID NO: 1 中 40-1371 位的序列;(b)具有 SEQ ID NO: 1 中 1-1500 位的序列。

在本发明的第三方面,提供了含有上述多核苷酸的载体,以及被该载体转化或转导的宿主细胞或者被上述多核苷酸直接转化或转导的宿主细胞。

在本发明的第四方面,提供了制备具有活性的多肽的方法,该方法包含:(a)在适合表达的条件下,培养上述被转化或转导的宿主细胞;(b)从培养物中分离出具有活性的多肽。在本发明的第五方面,提供了本发明多肽和编码序列的用途。

在本发明的第六方面,提供了一种改变植物抗草甘膦抗性的方法,它包括步骤:

(1)提供携带表达载体的农杆菌,所述的表达载体含有 EPSP 合成酶 DNA 编码序列,所述的 EPSP 合成酶选自下组:

(a)具有 SEQ ID NO: 2 氨基酸序列的多肽;

(b)将 SEQ ID NO:2 氨基酸序列经过一个或多个氨基酸残基的取代、缺失或添加而形成的,且具有抗草甘膦抗性和 EPSP 合成酶活性的由(a)衍生的多肽;

(2)将植物细胞或组织或器官与步骤(1)中的农杆菌接触,从而使 EPSP 合成酶 DNA 编码序列转入植物细胞,并且整合到植物细胞的染色体上;

(3)选择出转入 EPSP 合成酶 DNA 编码序列的植物细胞或组织或器官;

(4)将步骤(3)中的植物细胞或组织或器官再生成植株。

本发明的其它方面由于本文的技术的公开,对本领域的技术人员而言是显而易见的。

### 具体实施方式

本发明人经过广泛而深入的研究,首次从从采用免培养技术构建的群落水平 DNA 库中分离获得了新的 EPSP 合成酶,并且通过实验证实了它具有高抗草甘膦抗性,并且转入植物后,可导致植物抗草甘膦抗性的提高。在此基础上完成了本发明。

在本发明中,术语“EPSP 合成酶”、“EPSP 多肽”或“5-烯醇丙酮酸莽草

酸-3-磷酸合酶”可互换使用，都指具有 5-烯醇丙酮酸莽草酸-3-磷酸合酶 EPSPS 氨基酸序列(SEQ ID NO:2)的蛋白或多肽。它们包括含有或不含起始甲硫氨酸的 EPSP 合成酶。

如本文所用，“分离的”是指物质从其原始环境中分离出来(如果是天然物质，原始环境即是天然环境)。如活体细胞内的天然状态下的多聚核苷酸和多肽是没有分离纯化的，但同样的多聚核苷酸或多肽如从天然状态中同存在的其他物质中分开，则为分离纯化的。

如本文所用，“分离的 EPSP 合成酶或多肽”是指 EPSP 多肽基本上不含天然与其相关的其它蛋白、脂类、糖类或其它物质。本领域的技术人员能用标准的蛋白质纯化技术纯化 EPSP 合成酶。

本发明的多肽可以是重组多肽、天然多肽、合成多肽，优选重组多肽。本发明的多肽可以是天然纯化的产物，或是化学合成的产物，或使用重组技术从原核或真核宿主(例如，细菌、酵母、高等植物、昆虫和哺乳动物细胞)中产生。根据重组生产方案所用的宿主，本发明的多肽可以是糖基化的，或可以是非糖基化的。本发明的多肽还可包括或不包括起始的甲硫氨酸残基。

本发明还包括 EPSP 合成酶的片段、衍生物和类似物。如本文所用，术语“片段”、“衍生物”和“类似物”是指基本上保持本发明的天然 EPSP 合成酶相同的生物学功能或活性的多肽。本发明的多肽片段、衍生物或类似物可以是(i)有一个或多个保守或非保守性氨基酸残基(优选保守性氨基酸残基)被取代的多肽，而这样的取代的氨基酸残基可以是也可以不是由遗传密码编码的，或(ii)在一个或多个氨基酸残基中具有取代基团的多肽，或(iii)成熟多肽与另一个化合物融合所形成的多肽，或(iv)附加的氨基酸序列融合到此多肽序列而形成的多肽(如前导序列或分泌序列或用来纯化此多肽的序列)。根据本文的教导，这些片段、衍生物和类似物属于本领域熟练技术人员公知的范围。

在本发明中，术语“EPSP 多肽”指具有 EPSP 合成酶活性的 SEQ ID NO. 2 序列的多肽。该术语还包括具有与 EPSP 合成酶相同功能的、SEQ ID NO. 2 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 1-50 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，在本领域中，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 EPSP 合成酶的活性片段和活性衍生物。

该多肽的变异形式包括：同源序列、保守性变异体、等位变异体、天然突变体、诱导突变体、在高或低的严紧度条件下能与 EPSPS DNA 杂交的 DNA 所编码

的蛋白、以及利用抗 EPSP 多肽的抗血清获得的多肽或蛋白。本发明还提供了其他多肽，如包含 EPSP 多肽或其片段的融合蛋白。除了几乎全长的多肽外，本发明还包括了 EPSP 多肽的可溶性片段。通常，该片段具有 EPSP 多肽序列的至少约 10 个连续氨基酸，通常至少约 30 个连续氨基酸，较佳地至少约 50 个连续氨基酸，更佳地至少约 80 个连续氨基酸，最佳地至少约 100 个连续氨基酸。

发明还提供 EPSP 合成酶或多肽的类似物。这些类似物与天然 EPSP 多肽的差别可以是氨基酸序列上的差异，也可以是不影响序列的修饰形式上的差异，或者兼而有之。这些多肽包括天然或诱导的遗传变异体。诱导变异体可以通过各种技术得到。

在本发明中，“EPSP合成酶保守性变异多肽”指与SEQ ID NO: 2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最好根据表1进行氨基酸替换而产生。

表 1

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

本发明的多核苷酸可以是 DNA 形式或 RNA 形式。DNA 形式包括 cDNA、基因组 DNA 或人工合成的 DNA。DNA 可以是单链的或是双链的。DNA 可以是编码链或非编码链。编码成熟多肽的编码区序列可以与 SEQ ID NO:1 所示的编码区序列相同或者是简并的变异体。如本文所用，“简并的变异体”在本发明中是指编码具有 SEQ ID NO:2 的蛋白质，但与 SEQ ID NO:1 所示的编码区序列有差别的核酸序列。

编码 SEQ ID NO:2 的成熟多肽的多核苷酸包括：只编码成熟多肽的编码序列；成熟多肽的编码序列和各种附加编码序列；成熟多肽的编码序列(和任选的附加编码序列)以及非编码序列。

术语“编码多肽的多核苷酸”可以是包括编码此多肽的多核苷酸，也可以是还包括附加编码和/或非编码序列的多核苷酸。

本发明还涉及上述多核苷酸的变异体，其编码与本发明有相同的氨基酸序列的多肽或多肽的片段、类似物和衍生物。此多核苷酸的变异体可以是天然发生的等位变异体或非天然发生的变异体。这些核苷酸变异体包括取代变异体、缺失变异体和插入变异体。如本领域所知的，等位变异体是一个多核苷酸的替换形式，它可能是一个或多个核苷酸的取代、缺失或插入，但不会从实质上改变其编码的多肽的功能。

本发明还涉及与上述的序列杂交且两个序列之间具有至少 50%，更佳地至少 70%，更佳地至少 80%相同性的多核苷酸。本发明特别涉及在严格条件下与本发明所述多核苷酸可杂交的多核苷酸。在本发明中，“严格条件”是指：(1)在较低离子强度和较高温度下的杂交和洗脱，如 0.2×SSC, 0.1%SDS, 60℃；或(2)杂交时加有变性剂，如 50%(v/v)甲酰胺，0.1%小牛血清/0.1% Ficoll, 42℃等；或(3)仅在两条序列之间的相同性至少在 90%以上,更好是 95%以上时才发生杂交。并且，可杂交的多核苷酸编码的多肽与 SEQ ID NO:2 所示的成熟多肽有相同的生物学功能和活性。

本发明还涉及与上述的序列杂交的核酸片段。如本文所用，“核酸片段”的长度至少含 15 个核苷酸，较好是至少 30 个核苷酸，更好是至少 50 个核苷酸，最好是至少 100 个核苷酸以上。核酸片段可用于核酸的扩增技术(如 PCR)以确定和/或分离编码 EPSP 合成酶的多聚核苷酸。

本发明中的多肽和多核苷酸优选以分离的形式提供，更佳地被纯化至均质。

本发明的 EPSPS 核苷酸全长序列或其片段通常可以用人工合成、PCR 扩增法、或重组法的方法获得。例如首先根据 SEQ ID NO:1 的序列进行全序列合成。

对于PCR扩增法，可根据本发明所公开的有关核苷酸序列，尤其是开放阅读框序列来设计引物，并用人工合成的EPSPS核苷酸全长序列或其片段作为模板，扩增而得有关序列。

一旦获得了有关的序列，就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体，再转入细胞，然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。

此外，还可用人工合成的方法来合成有关序列，尤其是片段长度较短时。通常，通过先合成多个小片段，然后再进行连接可获得序列很长的片段。

目前，已经可以完全通过化学合成来得到编码本发明蛋白(或其片段和衍生物)的DNA序列。然后可将该DNA序列引入本领域中已知的各种现有的DNA分子(或如载体)和细胞中。此外，还可通过化学合成将突变引入本发明蛋白序列中。

本发明也涉及包含本发明的多核苷酸的载体，以及用本发明的载体或EPSP合成酶编码序列经基因工程产生的宿主细胞，以及经重组技术产生本发明所述多肽的方法。

通过常规的重组DNA技术(Science, 1984; 224: 1431)，可利用本发明的多聚核苷酸序列用来表达或生产重组的EPSP多肽。一般来说有以下步骤：

- (1).用本发明的编码EPSP多肽的多核苷酸(或变异体)，或用含有该多核苷酸的重组表达载体转化或转导合适的宿主细胞；
- (2).在合适的培养基中培养的宿主细胞；
- (3).从培养基或细胞中分离、纯化蛋白质。

本发明中，EPSP合成酶多核苷酸序列可插入到重组表达载体中。术语“重组表达载体”指本领域熟知的细菌质粒、噬菌体、酵母质粒、植物细胞病毒、哺乳动物细胞病毒或其他载体。总之，只要能在宿主体内复制和稳定，任何质粒和载体都可以用。表达载体的一个重要特征是通常含有复制起点、启动子、标记基因和翻译控制元件。

本领域的技术人员熟知的方法能用于构建含EPSP合成酶编码DNA序列和合适的转录/翻译控制信号的表达载体。这些方法包括体外重组DNA技术、DNA合成技术、体内重组技术等。所述的DNA序列可有效连接到表达载体中的适当启动子上，以指导mRNA合成。表达载体还包括翻译起始用的核糖体结合位点和转录终止子。

此外，表达载体优选地包含一个或多个选择性标记基因，以提供用于选择转化的宿主细胞的表型性状，如真核细胞培养用的二氢叶酸还原酶、新霉素抗性以及绿色荧光蛋白(GFP)，或用于大肠杆菌的四环素或氨苄青霉素抗性。

包含上述的适当DNA序列以及适当启动子或者控制序列的载体，可以用于转化适当的宿主细胞，以使其能够表达蛋白质。

宿主细胞可以是原核细胞，如细菌细胞；或是低等真核细胞，如酵母细胞；

或是高等真核细胞，如植物细胞。代表性例子有：大肠杆菌，链霉菌属、农杆菌；真菌细胞如酵母；植物细胞；昆虫细胞等。

本发明的多核苷酸在高等真核细胞中表达时，如果在载体中插入增强子序列时将会使转录得到增强。增强子是 DNA 的顺式作用因子，通常大约有 10 到 300 个碱基对，作用于启动子以增强基因的转录。

本领域一般技术人员都清楚如何选择适当的载体、启动子、增强子和宿主细胞。

用重组 DNA 转化宿主细胞可用本领域技术人员熟知的常规技术进行。当宿主为原核生物如大肠杆菌时，能吸收 DNA 的感受态细胞可在指数生长期后收获，用  $\text{CaCl}_2$  法处理，所用的步骤在本领域众所周知。另一种方法是使用  $\text{MgCl}_2$ 。如果需要，转化也可用电穿孔的方法进行。当宿主是真核生物，可选用如下的 DNA 转染方法：磷酸钙共沉淀法，常规机械方法如显微注射、电穿孔、脂质体包装等。转化植物也可使用农杆菌转化或基因枪转化等方法，例如叶盘法。对于转化的植物细胞、组织或器官可以用常规方法再生成植株，从而获得抗草甘膦抗性提高的植物。

获得的转化子可以用常规方法培养，表达本发明的基因所编码的多肽。根据所用的宿主细胞，培养中所用的培养基可选自各种常规培养基。在适于宿主细胞生长的条件下进行培养。当宿主细胞生长到适当的细胞密度后，用合适的方法(如温度转换或化学诱导)诱导选择的启动子，将细胞再培养一段时间。

在上面的方法中的重组多肽可在细胞内、或在细胞膜上表达、或分泌到细胞外。如果需要，可利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离和纯化重组的蛋白。这些方法是本领域技术人员所熟知的。这些方法的例子包括但并不限于：常规的复性处理、用蛋白沉淀剂处理(盐析方法)、离心、渗透破菌、超处理、超离心、分子筛层析(凝胶过滤)、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析(HPLC)和其它各种液相层析技术及这些方法的结合。

另一方面，本发明还包括对 EPSP 合成酶 DNA 或是其片段编码的多肽具有特异性的多克隆抗体和单克隆抗体，尤其是单克隆抗体。较佳地，指那些能与 EPSP 合成酶基因产物或片段结合但不识别和结合于其它非相关抗原分子的抗体。本发明中抗体包括那些能够结合并抑制 EPSP 合成酶分子，也包括那些并不影响 EPSP 合成酶功能的抗体。本发明还包括那些能与修饰或未经修饰形式的 EPSP 合成酶基因产物结合的抗体。

本发明不仅包括完整的单克隆或多克隆抗体，而且还包括具有免疫活性的抗体片段、或嵌合抗体。

本发明的抗体可以通过本领域内技术人员已知的各种技术进行制备。例如，纯化的 EPSP 合成酶基因产物或者其具有抗原性的片段，可被施用于动物以诱导多

克隆抗体的产生。与之相似的，表达 EPSP 合成酶或其具有抗原性的片段的细胞可用于免疫动物来生产抗体。此类单克隆抗体可以利用杂交瘤技术来制备。本发明的各类抗体可以利用 EPSP 合成酶基因产物的片段或功能区，通过常规免疫技术获得。这些片段或功能区可以利用重组方法制备或利用多肽合成仪合成。与 EPSP 合成酶基因产物的未修饰形式结合的抗体可以用原核细胞(例如 *E. Coli*)中生产的基因产物来免疫动物而产生；与翻译后修饰形式结合的抗体(如糖基化或磷酸化的蛋白或多肽)，可以用真核细胞(例如酵母或昆虫细胞)中产生的基因产物来免疫动物而获得。抗 EPSP 合成酶的抗体可用于检测样品中的 EPSP 合成酶。

多克隆抗体的生产可用 EPSP 合成酶或多肽免疫动物，如家兔，小鼠，大鼠等。多种佐剂可用于增强免疫反应，包括但不限于弗氏佐剂等。

本发明还涉及定量和定位检测 EPSP 合成酶水平的测试方法。这些试验是本领域所熟知的，且包括 FISH 测定和放射免疫测定。

一种检测检测样品中是否存在 EPSP 合成酶的方法是利用 EPSP 合成酶的特异性抗体进行检测，它包括：将样品与 EPSP 合成酶特异性抗体接触；观察是否形成抗体复合物，形成了抗体复合物就表示样品中存在 EPSP 合成酶。

本发明的多核苷酸的一部分或全部可作为探针固定在微阵列(microarray)或 DNA 芯片(又称为“基因芯片”)上，用于基因的表达分析。用 EPSP 合成酶特异的引物进行 RNA-聚合酶链反应(RT-PCR)体外扩增也可检测 EPSP 合成酶的转录产物。

在本发明的一个实例中，提供了一种分离的多核苷酸，它编码具有 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的多肽。本发明的多核苷酸是从采用免培养技术构建的群落水平 DNA 库中分离的并人工全合成的。其序列如 SEQ ID NO:1 所示，它包含的多核苷酸序列全长为 1500 个碱基，其开放读框位于 40-1371 位，编码全长为 444 个氨基酸的 EPSP 合成酶(SEQ ID NO: 2)。

本发明的 EPSP 合成酶具有如下特性：A)草甘膦抗性功能明确，且显示了高于以前报道 5-10 倍的抗草甘膦能力；B)结构新，在核酸水平上与已见报道的 EPSP 合成酶编码基因无任何同源性，在氨基酸水平上与根瘤杆菌 C58 的同源性为 60.79%，与 Monsanto 公司专利报道的根瘤杆菌 CP4 的同源性为 24.53%，且不含有专利保护序列和突变位点。

EPSP 合成酶为改变植物的抗草甘膦抗性提供了新的途径，因而具有巨大的应用前景。可以通过将 EPSP 合成酶的编码基因导入，改变现有优良农作物品种的抗草甘膦抗性，可获得抗草甘膦的小麦、水稻或其它农作物品种，解决农业生产中存在的实际问题。

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明

本发明而不用来限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件如 Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。

### **实施例 1：高抗草甘膦的 DNA 片段克隆**

#### **1、草甘膦极端污染环境土壤中土壤样品的采集**

自然环境中特别是在长期使用草甘膦等除草剂地区的土壤中，存在种类繁多的能耐受草甘膦或其它除草剂的细菌菌株。从被 50%左右草甘膦污染达十年以上的土壤中(河北奇峰化工有限公司草甘膦生产工厂开放式分装点)采集样品。

#### **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/振荡 2 次。加入 300  $\mu\text{l}$  2% 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  $\mu\text{l}$  18M 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**

采用粘粒 SuperCos1 Cosmid Vector Kit (购自 Stratagene 公司) 构建群落水平总 DNA 的粘粒文库。采用 0.006 $\mu\text{g}$  DNA 的 Sau3A I 酶量大量酶切纯化的群落水平总 DNA，冻融法回收 40 kb 左右的部分酶切片段，与载体 SuperCos1/ BamHI 片段连接。按公司提供的试剂盒说明书构建粘粒文库。由于本实验要筛选草甘膦抗性克隆，而草甘膦只能在限制型培养基(如 M9、MOPS)上起作用，因此本实验采用能在限制性培养基上生长的大肠杆菌 JM109 作为受体菌株，将群落水平总 DNA 片段与载体的连接产物用噬菌体包装蛋白包装后，转入大肠杆菌 JM109 中。将转染的大肠杆菌 JM109 涂布于四环素抗性 LB 固体培养基上，将长出的菌落分别点于四环素抗性和四环素加卡那霉素抗性的 LB 固体培养基上，在两种抗性培

培养基上生长的转化子为粘粒载体自连转化，减去背景菌落数，根据经验公式计算滴度(pfu/ml)为  $4 \times 10^6$  (大于  $10^6$ )，表明文库构建符合要求。

#### 4、筛选草甘膦抗性转化子

将转染细菌涂布于加入磷酸盐和 10mM 草甘膦的 MOPS 固体培养基上，两天后生长出十余个菌落，用无菌牙签点于含有不同浓度草甘膦的 MOPS 固体培养基上，挑选出一个抗性最高的克隆 pGR1，可以耐受 60mM 草甘膦，提取这个克隆的质粒，电激法将 pGR1 和载体质粒 pLA2917 转回大肠杆菌 JM109 中，将转化子用无菌牙签点于含 20mM 草甘膦的 MOPS 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 pGR1 引起的。

#### 5. 高抗草甘膦的 DNA 片段的亚克隆及抗性验证

将草甘膦抗性克隆质粒 pGR1 用限制性内切酶 HindIII、PstI、HindIII+PstI 消化与克隆载体质粒(pBlueScript KS, pGEM-3zf)连接，转化大肠杆菌 JM109,涂布于含 Amp 的 LB 固体培养基上,挑取白色菌落煮沸法提质粒筛选不同的重组子,并在含有 20mM 草甘膦的 MOPS 固体培养基上筛选抗性亚克隆，得到一个抗草甘膦亚克隆 pGRH1。提取质粒后重新转化大肠杆菌 JM109，以载体质粒为阴性对照。

结果表明，这个亚克隆所产生的转化子均具有抗草甘膦特性，这证明抗草甘膦特性确实是由于转入 pGRH1 引起的。

酶切分析表明，所亚克隆的高抗草甘膦 DNA 片段大小为 2.4kb。将 OD 值相同的 pGR1、pGRH1 和载体对照 pGEM-3zf 菌液以 1%的接种量分别接种于含有 50mM、150mM 草甘膦的 MOPS 液体培养基中，37℃振荡培养 24 小时，于 600nm 波长测定 OD 值，EPSP 合成酶的克隆 pGR1 及亚克隆 pGRH1 均能耐受 150mM 浓度的草甘膦，生长状况良好，而载体对照不能生长。

### 实施例 2：高抗草甘膦的 DNA 片段的序列分析及其 EPSP 合成酶功能验证

#### 1、高抗草甘膦的 DNA 片段的序列分析

对实施例 1 中所亚克隆的高抗草甘膦 DNA 片段进行全核苷酸序列测定。分析结果表明，其序列如 SEQ ID NO:1 所示，它包含的多核苷酸序列全长为 1500 个碱基，其开放读框位于 40-1371 位，编码全长为 444 个氨基酸的 EPSP 合成酶(SEQ ID NO: 2)。

将所亚克隆的高抗草甘膦编码序列与已报道的 EPSP 合成酶编码基因(aroA)比较，在核苷酸水平几乎没有任何同源性。

氨基酸序列同源性分析结果表明，与已知的 ClassI EPSP 合成酶(来源于大肠

杆菌、鼠伤寒沙门氏菌等)氨基酸同源性并不高,与大肠杆菌和鼠伤寒沙门氏菌来源的 EPSP 合成酶氨基酸同源性分别为 30.4%和 31.7%。与 Monsanto 公司专利报道的根癌农杆菌 CP4 的 EPSP 合成酶同源性为 24.53%,且没有发生 80-120(-L-G-N-A-A-T-A)的氨基酸取代,与 170-210(-A-L-L-M-x.sub.1 -A-P-L-T-)的序列也不同。与之同源性最高的是根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)C58,同源性为 60.79%,与同一属的鼻疽假单胞菌的 EPSP 合成酶同源性为 20.53%。

## 2、高抗草甘膦的 DNA 片段的 EPSP 合成酶功能验证

序列分析结果显示抗性克隆中含有 EPSP 合成酶的 ORF,为了证实其具有 EPSP 合成酶活性,本实验以大肠杆菌 EPSP 合成酶缺陷型菌株 ER2799 为受体菌株,采用  $\text{CaCl}_2$  法将草甘膦抗性亚克隆 pGRH1 转入,用无菌牙签将转化子菌落点于 MOPS 固体培养基上,受体菌株 ER2799、含有载体质粒(pBuleScript KS、pGEM-3zf)的 ER2799 为阴性对照,如抗草甘膦亚克隆含有可表达的 EPSP 合成酶基因,互补了受体菌的缺陷,则能够利用限制性培养基的无机物合成氨基酸并生长,否则就不能生长。

试验结果表明,草甘膦抗性亚克隆 R3H1 和 R7H1 中所含的 DNA 片段均能在功能上互补 EPSP 合成酶缺陷型菌株,因此,可以确定亚克隆 pGRH1 中含有完整功能的 EPSP 合成酶基因。

## 实施例 3: 高抗草甘膦的 EPSP 合成酶基因的人工合成

根据已完成的含 1335 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 T4DNA 连接酶催化组装成一个完整的 EPSP 合成酶基因。该合成的 DNA 片段含有 SEQ ID NO:1 中 40-1374 位的核苷酸序列,并且合成基因的两端含 XbaI 和 SacI 位点。

将上述人工合成的 5'和 3'端酶切位点为 XbaI 和 SacI 位点 EPSP 基因,用于下面高抗草甘膦的 EPSP 合成酶基因植物表达载体的构建。

## 实施例 4: 高抗草甘膦的 EPSP 合成酶基因植物表达载体的构建

高抗草甘膦的 EPSP 合成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 HindIII 和 EcoRI 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 XbaI 和 SacI 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，从而获得高抗草甘膦的 EPSP 合成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 5：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<sup>+</sup>,Kan<sup>+</sup>),28℃, 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 1cm<sup>2</sup> 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℃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℃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 15mM 草甘膦的培养基上良好生长。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

## 权 利 要 求

1.一种分离的EPSP合成酶多肽,其特征在于,它包含:具有SEQ ID NO:2氨基酸序列的多肽、或其保守性变异多肽、或其活性片段、或其活性衍生物。

2.如权利要求1所述的多肽,其特征在于,该多肽选自下组:

(a)具有SEQ ID NO:2氨基酸序列的多肽;

(b)将SEQ ID NO:2氨基酸序列经过一个或多个氨基酸残基的取代、缺失或添加而形成的,且具有抗草甘膦抗性和EPSP合成酶活性的由(a)衍生的多肽。

3.一种分离的多核苷酸,其特征在于,它包含一核苷酸序列,该核苷酸序列选自下组:

(a)编码如权利要求1和2所述多肽的多核苷酸;

(b)与多核苷酸(a)互补的多核苷酸。

4.如权利要求3所述的多核苷酸,其特征在于,该多核苷酸编码具有SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的多肽。

5.如权利要求3所述的多核苷酸,其特征在于,该多核苷酸的序列选自下组的一种:

(a)具有SEQ ID NO:1中40-1371位的序列;

(b)具有SEQ ID NO:1中1-1500位的序列。

6.一种载体,其特征在于,它含有权利要求3所述的多核苷酸。

7.一种遗传工程化的宿主细胞,其特征在于,它含有权利要求6所述的载体。

8.一种具有EPSP合成酶活性的多肽的制备方法,其特征在于,该方法包含:

(a)在适合表达的条件下,培养权利要求7所述的宿主细胞;

(b)从培养物中分离出具有EPSP合成酶活性的多肽。

9.一种能与权利要求1所述的EPSP合成酶特异性结合的抗体。

10.一种改变植物抗草甘膦抗性的方法,其特征在于,它包括步骤:

(1)提供携带表达载体的农杆菌,所述的表达载体含有EPSP合成酶DNA编码序列,所述的EPSP合成酶选自下组:

(a)具有SEQ ID NO:2氨基酸序列的多肽;

(b)将SEQ ID NO:2氨基酸序列经过一个或多个氨基酸残基的取代、缺失或添加而形成的,且具有抗草甘膦抗性和EPSP合成酶活性的由(a)衍生的多肽;

(2)将植物细胞或组织或器官与步骤(1)中的农杆菌接触,从而使EPSP合成酶DNA编码序列转入植物细胞,并且整合到植物细胞的染色体上;

(3)选择出转入EPSP合成酶DNA编码序列的植物细胞或组织或器官;

(4)将步骤(3)中的植物细胞或组织或器官再生成植株。

## 序列表

<110> 四川禾本生物工程有限公司  
中国农业科学院生物技术研究所

<120> 高抗草甘膦的 EPSP 合成酶及其编码序列

<130> 033655

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1500

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> CDS

<222> (40)..(1371)

<223> EPSP 合成酶编码序列

<400> 1

```

ctcctacagt tagggcaagt cccccaccac tcgacaagc atg gcg tgt ttg cct      54
                                     Met Ala Cys Leu Pro
                                     1           5

gat gat tcg ggt ccg cat gtc ggc cac tcc acg cca cct cgc ctt gac      102
Asp Asp Ser Gly Pro His Val Gly His Ser Thr Pro Pro Arg Leu Asp
                10           15           20

cag gag cct tgt acc ttg agt tcg cag aaa acc gtg acc gtt aca ccg      150
Gln Glu Pro Cys Thr Leu Ser Ser Gln Lys Thr Val Thr Val Thr Pro
                25           30           35

ccc aac ttc ccc ctc act ggc aag gtc gcg ccc ccc ggc tcc aaa tcc      198
Pro Asn Phe Pro Leu Thr Gly Lys Val Ala Pro Pro Gly Ser Lys Ser
                40           45           50

att acc aac cgt gcg ctg ttg ctg gcg gca ttg gcc aag ggc acc agc      246
Ile Thr Asn Arg Ala Leu Leu Leu Ala Ala Leu Ala Lys Gly Thr Ser
                55           60           65

cgt ttg agc ggt gcg ctc aaa agc gat gac acg cgc cac atg tcg gtc      294
Arg Leu Ser Gly Ala Leu Lys Ser Asp Asp Thr Arg His Met Ser Val
                70           75           80           85

gcc ctg cgg cag atg ggc gtc acc atc gac gag ccg gac gac acc acc      342
Ala Leu Arg Gln Met Gly Val Thr Ile Asp Glu Pro Asp Asp Thr Thr
                90           95           100

```

ttt gtg gtc acc agc caa ggc tcg ctg caa ttg ccg gcc cag ccg ttg Phe Val Val Thr Ser Gln Gly Ser Leu Gln Leu Pro Ala Gln Pro Leu 105 110 115	390
ttc ctc ggc aac gct ggc acc gcc atg cgc ttt ctc acg gct gcc gtg Phe Leu Gly Asn Ala Gly Thr Ala Met Arg Phe Leu Thr Ala Ala Val 120 125 130	438
gcc acc gtg caa ggc acc gtg gta ctg gac ggc gac gag tac atg caa Ala Thr Val Gln Gly Thr Val Val Leu Asp Gly Asp Glu Tyr Met Gln 135 140 145	486
aaa cgc ccg att ggc ccg ctg ctg gct acc ctg ggc cag aac ggc atc Lys Arg Pro Ile Gly Pro Leu Leu Ala Thr Leu Gly Gln Asn Gly Ile 150 155 160 165	534
cag gtc gac agc ccc acc ggt tgc cca ccg gtc acc gtg cac ggc atg Gln Val Asp Ser Pro Thr Gly Cys Pro Pro Val Thr Val His Gly Met 170 175 180	582
ggc aag gtc cag gcc aag cgt ttc gag att gat ggt ggt ttg tcc agc Gly Lys Val Gln Ala Lys Arg Phe Glu Ile Asp Gly Gly Leu Ser Ser 185 190 195	630
cag tac gta tcg gcc ctg ctg atg ctc gcg gcg tgc ggc gaa gcg ccg Gln Tyr Val Ser Ala Leu Leu Met Leu Ala Ala Cys Gly Glu Ala Pro 200 205 210	678
att gaa gtg gcg ctg acc ggc aag gat atc ggt gcc cgt ggc tac gtg Ile Glu Val Ala Leu Thr Gly Lys Asp Ile Gly Ala Arg Gly Tyr Val 215 220 225	726
gac ctg acc ctc gac tgc atg cgt gcc ttc ggg gcc cag gtg gac gcc Asp Leu Thr Leu Asp Cys Met Arg Ala Phe Gly Ala Gln Val Asp Ala 230 235 240 245	774
gtg gac gac acc acc tgg cgc gtc gcc ccc acc ggc tat acc gcc cat Val Asp Asp Thr Thr Trp Arg Val Ala Pro Thr Gly Tyr Thr Ala His 250 255 260	822
gat tac ctg atc gaa ccc gat gcg tcc gcc gcc acg tat ttg tgg gcc Asp Tyr Leu Ile Glu Pro Asp Ala Ser Ala Ala Thr Tyr Leu Trp Ala 265 270 275	870
gca gaa gtg ctg acc ggt ggg cgt atc gac atc ggc gta gcc gcg cag Ala Glu Val Leu Thr Gly Gly Arg Ile Asp Ile Gly Val Ala Ala Gln 280 285 290	918
gac ttc acc cag ccc gac gcc aag gcc cag gcc gtg att gcg cag ttc Asp Phe Thr Gln Pro Asp Ala Lys Ala Gln Ala Val Ile Ala Gln Phe	966

295	300	305	
ccg aac atg caa gcc acg gtg gta ggc tcg caa atg cag gat gcg atc			1014
Pro Asn Met Gln Ala Thr Val Val Gly Ser Gln Met Gln Asp Ala Ile			
310	315	320	325
ccg acc ctg gcg gtg ctc gcc gcg ttc aac aac acc ccg gtg cgt ttc			1062
Pro Thr Leu Ala Val Leu Ala Ala Phe Asn Asn Thr Pro Val Arg Phe			
	330	335	340
act gaa ctg gcg aac ctg cgc gtc aag gaa tgt gac cgc gtg cag gcg			1110
Thr Glu Leu Ala Asn Leu Arg Val Lys Glu Cys Asp Arg Val Gln Ala			
	345	350	355
ctg cac gat ggc ctc aac gaa att cgc ccg ggc ctg gcg acc atc gag			1158
Leu His Asp Gly Leu Asn Glu Ile Arg Pro Gly Leu Ala Thr Ile Glu			
	360	365	370
ggc gat gac ctg ctg gtc gcc agc gac ccg gcc ctg gca ggc acc gcc			1206
Gly Asp Asp Leu Leu Val Ala Ser Asp Pro Ala Leu Ala Gly Thr Ala			
	375	380	385
tgc acc gca ctg atc gac acc cac gcc gac cat cgc atc gcc atg tgc			1254
Cys Thr Ala Leu Ile Asp Thr His Ala Asp His Arg Ile Ala Met Cys			
	390	395	400
ttt gcc ctg gcc ggg ctt aaa gtc tcg ggc att cgc att caa gac ccg			1302
Phe Ala Leu Ala Gly Leu Lys Val Ser Gly Ile Arg Ile Gln Asp Pro			
	410	415	420
gac tgc gtg gcc aag acc tac cct gac tac tgg aaa gcc tgg ccc agc			1350
Asp Cys Val Ala Lys Thr Tyr Pro Asp Tyr Trp Lys Ala Trp Pro Ser			
	425	430	435
ctg ggc gtt cac cta aac gac tgacacacaa aacctgtagc agagcttgct			1401
Leu Gly Val His Leu Asn Asp			
	440		
cgcgaaaaac gcacacgtgc cgcgtttggt caggaaacac gcgttatcgt tgacgtttat			1461
cgagctaage tcgctcctac atttgcagc gagatcttg			1500
<210> 2			
<211> 444			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<221> MISC_FEATURE			
<222> (1)..(444)			
<223> EPSP 合成酶			

&lt;400&gt; 2

Met Ala Cys Leu Pro Asp Asp Ser Gly Pro His Val Gly His Ser Thr  
 1 5 10 15

Pro Pro Arg Leu Asp Gln Glu Pro Cys Thr Leu Ser Ser Gln Lys Thr  
 20 25 30

Val Thr Val Thr Pro Pro Asn Phe Pro Leu Thr Gly Lys Val Ala Pro  
 35 40 45

Pro Gly Ser Lys Ser Ile Thr Asn Arg Ala Leu Leu Leu Ala Ala Leu  
 50 55 60

Ala Lys Gly Thr Ser Arg Leu Ser Gly Ala Leu Lys Ser Asp Asp Thr  
 65 70 75 80

Arg His Met Ser Val Ala Leu Arg Gln Met Gly Val Thr Ile Asp Glu  
 85 90 95

Pro Asp Asp Thr Thr Phe Val Val Thr Ser Gln Gly Ser Leu Gln Leu  
 100 105 110

Pro Ala Gln Pro Leu Phe Leu Gly Asn Ala Gly Thr Ala Met Arg Phe  
 115 120 125

Leu Thr Ala Ala Val Ala Thr Val Gln Gly Thr Val Val Leu Asp Gly  
 130 135 140

Asp Glu Tyr Met Gln Lys Arg Pro Ile Gly Pro Leu Leu Ala Thr Leu  
 145 150 155 160

Gly Gln Asn Gly Ile Gln Val Asp Ser Pro Thr Gly Cys Pro Pro Val  
 165 170 175

Thr Val His Gly Met Gly Lys Val Gln Ala Lys Arg Phe Glu Ile Asp  
 180 185 190

Gly Gly Leu Ser Ser Gln Tyr Val Ser Ala Leu Leu Met Leu Ala Ala  
 195 200 205

Cys Gly Glu Ala Pro Ile Glu Val Ala Leu Thr Gly Lys Asp Ile Gly  
 210 215 220

Ala Arg Gly Tyr Val Asp Leu Thr Leu Asp Cys Met Arg Ala Phe Gly  
 225 230 235 240

Ala Gln Val Asp Ala Val Asp Asp Thr Thr Trp Arg Val Ala Pro Thr  
 245 250 255

Gly Tyr Thr Ala His Asp Tyr Leu Ile Glu Pro Asp Ala Ser Ala Ala  
 260 265 270

Thr Tyr Leu Trp Ala Ala Glu Val Leu Thr Gly Gly Arg Ile Asp Ile  
 275 280 285

Gly Val Ala Ala Gln Asp Phe Thr Gln Pro Asp Ala Lys Ala Gln Ala  
 290 295 300

Val Ile Ala Gln Phe Pro Asn Met Gln Ala Thr Val Val Gly Ser Gln  
 305 310 315 320

Met Gln Asp Ala Ile Pro Thr Leu Ala Val Leu Ala Ala Phe Asn Asn  
 325 330 335

Thr Pro Val Arg Phe Thr Glu Leu Ala Asn Leu Arg Val Lys Glu Cys  
 340 345 350

Asp Arg Val Gln Ala Leu His Asp Gly Leu Asn Glu Ile Arg Pro Gly  
 355 360 365

Leu Ala Thr Ile Glu Gly Asp Asp Leu Leu Val Ala Ser Asp Pro Ala  
 370 375 380

Leu Ala Gly Thr Ala Cys Thr Ala Leu Ile Asp Thr His Ala Asp His  
 385 390 395 400


Arg Ile Ala Met Cys Phe Ala Leu Ala Gly Leu Lys Val Ser Gly Ile  
 405 410 415

Arg Ile Gln Asp Pro Asp Cys Val Ala Lys Thr Tyr Pro Asp Tyr Trp  
 420 425 430

Lys Ala Trp Pro Ser Leu Gly Val His Leu Asn Asp  
 435 440

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/CN03/00651

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>  <p style="text-align: center;">C12N15/54, C12N9/10, C12N15/82</p> <p style="text-align: center;">According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>				
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>  <p style="text-align: center;">Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)</p> <p style="text-align: center;">C12N</p> <p style="text-align: center;">Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</p> <p style="text-align: center;">CA, CNKI</p> <p style="text-align: center;">Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)</p> <p style="text-align: center;">Database: WPI、PAJ、EPODOC、CNPAT、Genebank; Kw: EPSP synthase, glyphosate, Inhibit*</p>				
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>				
Category*  A	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  US,A,5866775 (Monsanto Company) Feb 2, 1999 (02.02.99), abstract and figures 1A, 1B	Relevant to claim No.		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.				
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none; vertical-align: top;">                     * 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                 </td> <td style="width: 50%; border: none; vertical-align: top;">                     "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                      "&amp;" document member of the same patent family                 </td> </tr> </table>			* 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
* 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 <p style="text-align: center;">20.Apr.2004</p>		Date of mailing of the international search report <p style="text-align: center;">13 · MAY 2004 (13 · 05 · 2004)</p>		
Name and mailing address of the ISA/CN 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, 100088 Beijing, China Facsimile No. 86-10-62019451		Authorized officer   Telephone No. 86-10-62085078		

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/CN03/00651

US5866775A	1999-02-02	US6225114 B1	2001-05-01
		WO9206201 A	1992-04-16
		AU8719291 A	1992-04-28
		EP0550633 A1	1993-07-14
		JP6501615T	1994-02-24
		EP0550633 B1	1995-02-22
		DE69107621E	1995-03-30

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT


International application No.  
PCT/CN03/00651

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item item1.b of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
  - a. type of material
    - a sequence listing
    - table(s) related to the sequence listing
  - b. format of material
    - in written format
    - in computer readable form
  - c. time of filing/furnishing
    - contained in the international application as filed
    - filed together with the international application in computer readable form
    - furnished subsequently to this Authority for the purposes of search
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

国际检索报告

国际申请号  
PCT/CN03/00651

<p><b>A. 主题的分类</b></p> <p style="text-align: center;">C12N15/54, C12N9/10, C12N15/82</p> <p>按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类</p>								
<p><b>B. 检索领域</b></p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p style="text-align: center;">C12N</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 style="text-align: center;">中国非专利文献, 化学文摘</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 style="text-align: center;">Database: WPI、PAJ、EPODOC、CNPAT、Genebank; Kw: EPSP synthase, glyphosate, Inhibit*</p>								
<p><b>C. 相关文件</b></p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 15%;">类 型*</th> <th style="width: 60%;">引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th style="width: 25%;">相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">A</td> <td>US,A,5866775 (Monsanto 公司) 1999 年 2 月 2 日 (02.02.99), 摘要及图 1A、1B</td> <td></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	A	US,A,5866775 (Monsanto 公司) 1999 年 2 月 2 日 (02.02.99), 摘要及图 1A、1B	
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求						
A	US,A,5866775 (Monsanto 公司) 1999 年 2 月 2 日 (02.02.99), 摘要及图 1A、1B							
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。                      <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, 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</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>“&amp;” 同族专利的文件</p>								
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p style="text-align: center;">20. 4 月 2004</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p style="text-align: center;">13. 5 月 2004 (13. 05. 2004)</p>						
<p>中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)</p> <p>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>授权官员</p> <p style="text-align: center;">  </p> <p>电话号码: (86-10)62085078</p>						

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号  
PCT/CN03/00651

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
US5866775A	1999-02-02	US6225114 B1	2001-05-01
		WO9206201 A	1992-04-16
		AU8719291 A	1992-04-28
		EP0550633 A1	1993-07-14
		JP6501615T	1994-02-24
		EP0550633 B1	1995-02-22
		DE69107621E	1995-03-30

## 第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列表(接第1页第1(b)项)

1、关于国际申请中所公开的是对要求保护的发明所必要的核苷酸和/或氨基酸序列表,国际检索是在下列基础上进行的:

a. 材料的类型

序列表

与序列表相关的表格

b. 材料的形式

书面形式

计算机可读形式

c. 提交/提供时间

包括于已提交的国际申请。

以计算机可读形式与国际申请一起提交。

为检索之用随后提交本国际检索单位。

2、 另外,在提交/提供了多个序列表和/或与其相关的表格的版本或副本的情况下,提

供了关于后提交的或附加的副本与已提交之国际申请中的序列表相同或未超出国际申请中序列表范围(如适用)的声明。

3. 补充意见