



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101228280 B

(45) 授权公告日 2013. 03. 20

(21) 申请号 200680026762. 2

(22) 申请日 2006. 07. 24

(30) 优先权数据

05090220. 4 2005. 07. 22 EP

05090349. 1 2005. 12. 23 EP

06090003. 2 2006. 01. 06 EP

60/701, 764 2005. 07. 22 US

60/757, 216 2006. 01. 06 US

60/757, 810 2006. 01. 10 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008. 01. 22

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2006/007389 2006. 07. 24

(87) PCT申请的公布数据

W02007/009823 EN 2007. 01. 25

(73) 专利权人 拜尔作物科学股份公司

地址 德国蒙海姆

(72) 发明人 C·弗罗贝格 R·C·施密特

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 林柏楠

(51) Int. Cl.

C12N 15/82 (2006. 01)

A01H 5/00 (2006. 01)

A01H 5/10 (2006. 01)

(56) 对比文件

W0 9745545 A, 1997. 12. 04, 权利要求 1-29、
说明书第 19 页.

US 6423886 B1, 2002. 07. 23, 权利要求
1-56.

W0 02079410 A, 2002. 10. 10, 权利要求
1-53.

审查员 孙彦珂

权利要求书 1 页 说明书 30 页

序列表 10 页 附图 3 页

(54) 发明名称

植物内淀粉合酶的过量表达

(57) 摘要

本发明涉及与来自相应未遗传修饰的野生型植物细胞的淀粉相比,用于通过导入编码可溶性淀粉合酶 II 的外来核酸分子而增加遗传修饰的植物细胞内淀粉的磷酸盐含量的方法。本发明还涉及这种淀粉合酶 II 在遗传修饰的植物细胞内的过量表达。此外,本发明涉及具有改良质量特性的稻淀粉和米粉,涉及包含这种稻淀粉的稻粒和在其上长有这些稻粒的稻植物。

1. 一种用于与来自相应未遗传修饰的野生型稻植物细胞的淀粉相比增加遗传修饰的稻植物细胞的淀粉磷酸盐含量至 150 至 500% 的方法, 其中

a) 稻植物细胞通过导入编码可溶性淀粉合酶 II 的外来核酸分子而受到遗传修饰, 并且

b) 这种可溶性淀粉合酶 II 被过量表达;

其中所述可溶性淀粉合酶 II 由 SEQ ID NO. 1 内所示的核苷酸序列的编码区编码或由 SEQ ID NO: 2 内所示的氨基酸序列组成。

2. 一种其淀粉由权利要求 1 的方法加以修饰的稻植物产生的稻淀粉, 具有在 70°C 和 80°C 之间的 DSC T_g 起始温度。

3. 权利要求 2 所述的稻淀粉, 其中 DSC T_g 起始温度在 72°C 和 79°C 之间。

4. 衍生的稻淀粉, 包含权利要求 2 或 3 所述的稻淀粉。

5. 一种组合物, 包含权利要求 2 至 4 中任一项所述的稻淀粉。

6. 一种米粉, 包含权利要求 2 或 3 所述的稻淀粉。

7. 一种组合物, 包含权利要求 6 所述的米粉。

8. 一种加工的稻粒, 所述稻粒包含权利要求 2 或 3 所述的稻淀粉。

9. 权利要求 8 的稻粒, 其为烹煮的。

10. 一种组合物, 包含至少一种权利要求 8 或 9 所述的稻粒。

植物内淀粉合酶的过量表达

[0001] 本发明涉及与来自相应未遗传修饰的野生型植物细胞的淀粉相比,用于增加遗传修饰的植物细胞内淀粉的磷酸盐含量的方法,其中植物细胞通过导入编码可溶性淀粉合酶 II 的外来核酸分子受到遗传修饰,并且这种淀粉合酶 II 得到过量表达。

[0002] 此外,本发明涉及具有改良质量特性的稻淀粉和米粉,涉及包含这种稻淀粉的稻粒和在其上长有这些稻粒的稻植物。

[0003] 稻是对超过半数的世界人口最重要的食物。在某些国家,稻米占据食物总摄入量的约 80%。世界范围的年生产量是 5.50 亿吨稻米。

[0004] 稻颖果由 76%淀粉和约 7-8%的蛋白质组成。它仅含有 1.3%的脂肪和多种痕量元素(0.6%)如磷、铁和镁。

[0005] 经济上最重要的稻物种是稻 (*Oryza sativa*),其基本品种可以分成两组:

[0006] “印度”组,该组仅包括长粒米,和

[0007] “日本”组,该组包含中等粒米和短粒米。

[0008] 长粒米(其米粒在烹煮时分散的稻品种)主要来自印度或爪哇;短粒米(如“短米”,即其谷粒在烹煮时粘稠的稻品种)主要来自日本。来自中国 and 东南亚的品种介于以上二者之间。

[0009] 而在所有品种内,存在两种主要类型:半透明米粒或不透明米粒。这些米粒主要在淀粉组成上不同:半透明米的淀粉由约 20%直链淀粉和多达 80%的支链淀粉组成,而不透明米的淀粉则实际上仅由支链淀粉组成。

[0010] 支链淀粉具有特异性的簇状结构并由四类酶:可溶性淀粉合酶(SS)、淀粉分支酶(SBE)、淀粉去分支酶(SDE)和ADP葡萄糖焦磷酸酶的多种亚基或同种型合成(Nakamura2002, *Plant Cell Physiol.* 43(7):718-725)。

[0011] 烹煮特性和口感特性主要由稻胚乳的直链淀粉含量决定。具有低含量直链淀粉的品种在烹煮后潮湿且粘稠,而具有高含量直链淀粉的米粒在烹煮时变干蓬松(H. ten Have, Hoffmann Mudra Plarre(HMP)1985: *Lehrbuch der Züchtung landw. Kulturpflanzen*, 第2卷,第110-123页)。

[0012] 谷粒质量不仅对消费者是重要的,而且也对制粉工业重要;谷粒特性如谷粒大小、谷粒形状和谷粒质量是重要特征,因为它们影响米粉产量和破损谷粒百分数(ten Have1985,同上)。

[0013] 米粉是味道相对中性的并且因此非常适合作为用于淡味产品的基质或作为掺合物。由于米粉的低致敏性,它还非常适用于婴儿配方食品或作为过敏患者的膳食。

[0014] 除油、脂肪和蛋白质之外,多糖是来自植物的最重要的可再生原料。除纤维素以外,作为高等植物内最重要的贮藏物质之一的淀粉在多糖中是极为重要的。

[0015] 多糖淀粉是化学均一的单元(葡萄糖分子)的聚合物。然而,多糖形成具有不同形式分子的高度复杂的混合物,其在聚合程度和葡萄糖链的分支发生率和链长度方面不同,并且还可以受到衍生化,例如磷酸化。因此,淀粉不构成均一的原料。尤其,直链淀粉与支链淀粉不同,其中直链淀粉是基本上不分支的 α -1,4-糖苷键连接的葡萄糖单元的聚合

物,支链淀粉则是不同分支的葡萄糖链的复杂混合物。分支因额外的 α -1,6-糖苷键存在而形成。在用于工业淀粉生产的常见植物例如玉米、小麦或马铃薯内,所合成的淀粉具有约 20% -25% 直链淀粉和约 70% -75% 支链淀粉。

[0016] 淀粉的功能性特性不仅极大地受直链淀粉 / 支链淀粉比和磷酸盐含量的影响,还受分子量、侧链分布样式、离子含量、脂类及蛋白质含量、淀粉粒平均粒度、淀粉粒形态学等影响。本文中提到的重要功能特性是例如溶解度、退化性能、水结合能力、成膜特性、粘度、糊化特性、冻融稳定性、酸稳定性、凝胶强度等。

[0017] 仅大致知道引起淀粉合成的基础生物化学合成途径。然而,存在一系列这样的步骤,在其中导致淀粉颗粒合成和淀粉合成的详细机制迄今未被阐明并因此仍是研究的主题。

[0018] 目前不可能仅通过植物育种而影响植物内共价结合的淀粉磷酸盐的含量。

[0019] 一种对植物育种方法的替代是通过重组方法定向修饰产生淀粉的植物。然而,前提是鉴定并表征参与淀粉合成和 / 或参与淀粉修饰的酶并分离编码这些酶的核酸分子,以及随后在转基因植物内的功能分析。

[0020] 在植物细胞内,淀粉合成在质体内发生,其中质体在光合活性组织内是叶绿体并且在非光合活性的淀粉贮藏组织内是造粉体。在淀粉合成中发挥作用的重要酶是 R1 蛋白质 (= α -葡聚糖水合二激酶, E.C. 2.7.9.4 ;Lorberth 等 (1998) *Nature Biotechnology* 16 :473-477)、淀粉合酶和分支酶 (= BE ;见例如, Ponstein 等, *Plant Physiol.* 29(1990), 234-241 ;Kossmann 等, 1991, *Mol. Gen. Genet.* 230, 39-44 ;Safford 等, 1998, *Carbohydrate Polymers* 35, 155-168 ;Jobling 等 1999, *The Plant Journal* 18(2) : 163-171)。分支酶催化 α -1,6-分支导入线性 α -1,4-葡聚糖。在淀粉合酶中,多种同种型已经得到描述,它们均通过转移来自 ADP-葡萄糖的葡萄糖基残基至 α -1,4-葡聚糖而催化聚合化反应。

[0021] 关于多种植物物种内分离的天然淀粉的概述可以在 Kossmann 和 Lloyd (2000, *Critical Reviews in Plant Sciences* 19(3) :171-226) 内找到,在所述植物物种中观察到在淀粉生物合成内发挥作用的酶的变异。

[0022] 淀粉合酶 (EC2.4.1.21) 可以分成两类:淀粉颗粒结合的淀粉合酶 (“颗粒结合性淀粉合酶 I”;GBSS I) 和可溶性淀粉合酶 (“可溶性淀粉合酶”;SSS, 也称作 “SS”)。这种区分在每种情况下不是界限分明的,因为某些淀粉合酶既以淀粉颗粒结合形式存在又以可溶性形式存在 (Denyer 等, *Plant J.* 4(1993), 191-198 ;Mu 等, *Plant J.* 6(1994), 151-159)。

[0023] 与导致直链淀粉合成的 GBSSI 不同,仍很少知道淀粉生物合成中多种类型可溶性淀粉合酶的确切酶功能。

[0024] 生物化学表征导致鉴定分子量在约 60 至约 180kDa 之间的可溶性淀粉合酶蛋白质。克隆编码淀粉合酶的 cDNA 有可能区分由于序列同源性和由于 (可溶性) 淀粉合酶的功能性特征而受到定义的不同类型。

[0025] 迄今,8 类淀粉合酶已经在高等植物内得以鉴定 (尤其由 Li 等 (2003) *Funct. Intergr. Genomics* 3 :76-85) :

[0026] - 淀粉 - 颗粒结合性淀粉合酶 I (颗粒结合性淀粉合酶 I = GBSS I) (稻:例如 Okagaki (1992) *Plant Mol Biol.* 19 :513-516 ;马铃薯:van der Leij 等 (1991) *Mol. Gen*

Genet. 228 :240-248 ;玉米 :例如 Kloesgen 等 (1986) Mol. GenGenet. 203 :237-244) ;

[0027] -可溶性淀粉合酶 I(= SSI ;稻 :Baba 等 (1993) Plant Physiol. 103 :565-573 ;马铃薯 :Kossmann 等 (1999) Planta 208 :503-511 ;玉米 :Knight 等 (1998) Plant J. 14 :613-622) ;

[0028] -可溶性淀粉合酶 II(= SSII ;豌豆 :Dry 等 (1992) Plant J. 2 :193-202, 马铃薯 :Edwards 等 (1995) Plant J. 8 :283-294, 玉米 :Harn 等, (1998) Plant Mol. Biol. 37 (4) :639-649 ;小麦 :Walter 等 (1996) Genbank 登录号 U66377 ;稻 :Yamamoto 和 Sasaki (1997) Plant Mol. Biol. 35 :135-144 和大麦 :Li 等 (2003), Funct. Integr. Genomics 3 :76-85) ;

[0029] -可溶性淀粉合酶 III(= SSIII ;马铃薯 :Abel 等 (1996) Plant J 10 :981-991 :饲用豌豆 :GenBank 登录号 AJ225088) ;

[0030] -可溶性淀粉合酶 IV(= SSIV ;小麦 :GenBank 登录号 AY044844) ;

[0031] -可溶性淀粉合酶 V(= SSV ;饲用豌豆 :GenBank 登录号 VUN006752 ;拟南芥 (Arabidopsis) :GenBank 登录号 AL021713 ;玉米 :W097/26362) 和

[0032] -dull (Gao 等 (1998) Plant Cell 10 :399-412 ;

[0033] -可溶性淀粉合酶 VI(= SSVI ;玉米 :W001/12826)。

[0034] 共价结合的淀粉磷酸的含量会取决于植物物种而变化。例如某些玉米突变体合成淀粉磷酸盐含量增加的淀粉(蜡质玉米为 0.002% 和高直链淀粉玉米为 0.013%) ,而常规玉米品种仅含有痕量的淀粉磷酸盐。在小麦中也找到少量淀粉磷酸盐(0.001%) ,而在燕麦和粟内未检测到淀粉磷酸盐。在稻突变体(蜡质稻 0.003%) 中存在的淀粉磷酸盐比传统稻品种(0.013%) 少。在合成块茎贮藏淀粉或根部贮藏淀粉的植物中检测到明显量的淀粉磷酸盐,如木薯(0.008%)、甜马铃薯(0.011%)、竹芋(arrowroot)(0.021%) 或马铃薯(0.089%)。在每一情况下,淀粉磷酸盐含量百分数基于淀粉干重并已经通过 Jane 等测定(1996, Cereal Foods World 41 (11), 827-832)。在 SSI 反义马铃薯上的研究表明其磷酸盐含量增加高于野生型达 30-70% (W096/15248)。

[0035] W000/08184 描述其中淀粉合酶 III(= SSIII) 活性及分支酶 I(= BEI) 活性均降低的植物。与来自野生型植物的淀粉相比,来自此类植物的淀粉具有升高的磷酸盐含量。在国际专利申请 W002/34923 内描述了因来自马铃薯的 RI 基因过量表达而具有增加的 RI 蛋白质活性和增加的淀粉磷酸盐含量的小麦植物。

[0036] 磷酸盐在已经由植物合成的淀粉(天然淀粉) 内的分布通常因如此事实得以区分,即约 30% 至 40% 的磷酸盐残基共价地在葡萄糖分子 C3 位置上结合并且约 60% 至 70% 的磷酸盐残基共价地在葡萄糖分子的 C6 位置上结合 (Blennow 等, 2000, Int. J. of Biological Macromolecules 27 :211-218)。相反,化学磷酸化的淀粉还具有在葡萄糖分子 C2 位置上结合的磷酸盐残基,因为化学反应以非定向方式进行。

[0037] W003/023024 公开了具有高达 69.5℃ 的 DSC T- 起始温度和高达 73.6℃ 的 DSC 峰值温度的稻淀粉 ;分析了日本组及印度组的总计约 400 个稻品种的这些特征。

[0038] Umemoto 等 (2002, Theor. Appl. Genet. 104 :1-8) 描述了对日本品种 (Nipponbare) 与印度品种 (Kasalath) 之间回交杂交品系的分析。他们从其结果中得出结论 :负责日本品种与印度品种之间不同的凝胶化起始温度 (DSCT- 起始) 的基因座 alk(t)、gel(t) 和 acl(t) 可能是淀粉合酶同种型 SSIIa。

[0039] W003/023024 描述了已经转入来自印度形式 IR36 的淀粉合酶 SSIIa (SSIIa) 基因的日本品种 (Kinmaze) 的稻转化体 (#78-1)。显示了在支链淀粉侧链图谱上的所得变化, 结果指示了从日本品种图谱至印度品种图谱的迁移 (W003/023024 内的图 22)。

[0040] W003/023024 未描述稻淀粉或米粉的磷酸盐含量、直链淀粉含量或流变特性。

[0041] 由 SSIIa 引起在支链淀粉侧链图谱上的变化与淀粉的 DSC T- 起始温度间的关系在最近出版的论文中再次得到证实 (Nakamura 等, (2005)PMB ;58(2) :213-27), 参考对转化体和对应“受体”及“供体”品系的值 (图 6B)。图 6B 显示对于所产生 SSIIa 转化体的淀粉的 DSC T- 起始的温度。DSC T- 起始温度毫无例外地比 70°C 高。该文中详述的最高 T- 起始值是 69.5°C, 还如 W003/023024 (第 21-24 页) 内所述。

[0042] 因此, W003/023024 和 Nakamura 等 (2005) 均没有教授借以可产生 DSC T- 起始温度超过 70°C 的稻淀粉的途径。

[0043] 然而, 较高的 DSC T- 起始温度迄今为止是受欢迎的, 因为它是改良的淀粉热稳定性的重要特征并且也是因热效应所致在结晶体结构上的变化的重要特征。

[0044] 因此, 本发明的目标是提供具有新特性、尤其具有改良的热稳定性的稻淀粉和米粉以及制备它们的手段和方法。

[0045] 迄今不知道增加可溶性淀粉合酶 II 的基因表达怎样影响植物内的淀粉特性。高磷酸盐含量是需要的, 因为这产生淀粉的改良物理化学特征并且因此产生淀粉的新应用。

[0046] 因此, 本发明的又一个目标是提供借以能够在体内增加植物淀粉的磷酸盐含量的方法。

[0047] 这些目标通过使用在专利权利要求书内详述的用途形式而实现。

[0048] 本发明涉及与来自相应未遗传修饰的野生型植物细胞的淀粉相比 (100%), 用于增加遗传修饰的植物细胞的淀粉的磷酸盐含量至 150-500% 的方法, 其中

[0049] a) 植物细胞通过导入编码可溶性淀粉合酶 II 的外来核酸分子而受到遗传修饰, 并且

[0050] b) 这种可溶性淀粉合酶 II 得到过量表达。

[0051] 在本发明的上下文中, 术语“淀粉的磷酸盐含量”理解为意指与淀粉的葡萄糖单体共价结合的磷酸基团。

[0052] 在本发明的上下文中, 术语“淀粉的磷酸盐含量增加”理解为意指与来自相应野生型植物细胞的淀粉 (100%) 相比, 在 C6 位置上磷酸盐含量增加至 150-500%, 优选地至 160-400% 并且尤其优选地至 170-380%。

[0053] 在本发明的上下文中, 术语“在 C6 位置上磷酸盐含量”理解为意指如此磷酸基团的含量, 其中所述的磷酸基团结合在淀粉的葡萄糖单体的碳原子位置“6”上。原则上, 葡萄糖单元的位置 C3 和 C6 可以在淀粉内被体内磷酸化。在本发明的上下文中, 位置 C6 上的磷酸盐含量 (= C-6-P 含量) 借助下文所述的目视酶测定法 (Nielsen 等, 1994, Plant Physiol. 105, 111-117) 通过测定葡萄糖 -6- 磷酸而确定; (测定在位置 C6 上的磷酸盐含量 (C-6-P 含量))。

[0054] 本发明中非常令人吃惊的是与野生型 (100%) 相比, 有可能增加磷酸盐含量至明显大于 150%。

[0055] 在本发明的上下文中, 淀粉的磷酸盐含量升高是在体内实现, 而不是在体外例如

通过使预提取的淀粉化学磷酸化而实现。因此,本发明的优点是可以省去用于化学磷酸化的化学剂。

[0056] 在本发明的上下文中,术语“遗传修饰的植物细胞”意指植物细胞受到遗传修饰,所述的遗传修饰导致与相应未遗传修饰的野生型植物细胞的可溶性淀粉合酶 II (= SSII) 活性相比,SSII 活性增加。

[0057] 在本发明的上下文中,术语“野生型植物细胞”意指充当用于本发明方法的原材料的植物细胞,即除已经导入并导致可溶性淀粉合酶 II (= SSII) 活性增加的遗传修饰之外,它们的遗传信息与遗传修饰的植物细胞的遗传信息相对应。

[0058] 在本发明的上下文中,术语“相对应”意指当比较多个对象时,彼此相互加以比较的所讨论对象维持在相同条件下。在本发明的上下文中,在野生型植物细胞上下文中的术语“相对应”意指彼此相互加以比较的植物细胞在相同条件下培养并且它们优选地具有(在培养中的)相同年龄。

[0059] 术语“培养年龄”理解为意指(植物)生物在营养培养基内度过或生长的时间段。这可以是例如从播种至收获的时间段或植物细胞在组织培养基内受到培养直至某个发育期期间的时段。在本发明的上下文中,这意指彼此相互加以比较的植物细胞在相同培养条件下度过相同的发育时间段。

[0060] 在本发明的上下文中,术语“外来核酸分子”理解为意指这样的分子,所述分子不天然地于相应野生型植物细胞内、或不天然地在相应野生型植物细胞内以具体空间排列而存在、或者该分子位于植物细胞基因组里此分子不天然存在于其中的位置内。外来核酸分子/多核苷酸优选地是由如此不同元件组成的重组分子,其中所述不同元件的组合或具体空间排列不天然存在于植物细胞内。这可以通过例如 Southern 印迹分析进行验证。

[0061] 在本发明的上下文中,术语“得到过量表达”意指与相应的未遗传修饰的野生型植物细胞相比,遗传修饰的植物细胞内 SSII 蛋白质的酶活性增加。为了本发明的目的,术语“得到过量表达”还进一步意指天然地没有任何可检测到的 SSII 活性的植物或植物细胞在根据本发明受到遗传修饰(即其中将编码可溶性淀粉合酶 II 的外来核酸分子导入植物细胞基因组)后,具有可通过酶谱法检测的 SSII 活性。细胞内 SSII 蛋白质的酶活性增加优选地借助如下文所述的酶谱法来测定(“通过活性凝胶测定 SSII 活性”)。

[0062] 在本上下文中,SSII 活性增加意指与相应未遗传修饰的细胞相比,SSII 活性增加到至少 200%、特别地到 350-2000%、优选地到 600-1500% 并且尤其优选地到 700-1200%。在本发明的上下文中,“SSII 活性增加”还意指没有可检测到的 SSII 活性的植物或植物细胞在根据本发明受到遗传修饰(即其中将编码可溶性淀粉合酶的外来核酸分子导入植物细胞基因组)后,具有可检测到的 SSII 活性。

[0063] 在本发明的上下文中,术语“可溶性淀粉合酶 II”理解为意指 II 类可溶性淀粉合酶蛋白质(ADP-葡萄糖 1,4- α -D-葡聚糖 4- α -D-葡萄糖糖基转移酶;EC2.4.1.21)。可溶性淀粉合酶催化其中底物 ADP-葡萄糖的葡萄糖残基转移至 α -1,4 连接的葡聚糖链而形成 α -1,4-键(ADP-葡萄糖 + {(1,4)- α -D-葡糖基} (N) $\rightleftharpoons$ ADP + {(1,4)- α -D-葡糖基} (N+1)) 的糖基化反应。

[0064] SSII 蛋白质的结构显示具有特异性结构域的序列。在“N”末端,SSII 蛋白质具有用于转运至质体的信号肽。在羧基末端后是氨基端区和催化结构域(Li 等,2000,Plant

Physiology123,613-624)。基于多种 SSII 蛋白质的一级序列比较 (<http://hits.isb-sib.ch/cqi-bin/PFSCAN>) 的其它分析已经揭示 SSII 蛋白质具有三个特定结构域。这些结构域包含由 Seq ID No. 1 内所示的小麦 SSII 基因序列的核苷酸 bp1190 至 1279 (=区域 1)、bp1493 至 1612(区域 2) 和 bp2147 至 2350(区域 3) 编码的氨基酸。

[0065] 在本发明的上下文中, SSII 蛋白质因此理解为意指这样的可溶性淀粉合酶, 它的氨基酸序列与 Seq ID No. 3 内所示的区域 1 具有至少 86%、优选至少 93% 并且尤其优选 100% 的同一性, 以及与 Seq ID No. 4 内所示的区域 2 具有至少 83%、优选至少 86% 并且尤其优选 100% 的同一性, 以及与 Seq ID No. 5 内所示的区域 3 具有至少 70%、优选至少 82%、优选 86%、特别优选 98% 并且尤其优选 100% 的同一性。

[0066] 在本发明的上下文中, 术语“同一性”理解为意指与其它蛋白质的氨基酸相一致的氨基酸的百分数(同一性)。同一性优选地借助计算机程序确定。当彼此加以比较的序列具有不同长度时, 以如此方式确定同一性以至于较短序列与较长序列共有的氨基酸数目决定同一性百分数。同一性可以通过公共可获得的已知计算机程序例如 ClustalW(Thompson 等, (1994)Nucleic Acids Research 22:4673-4680) 常规地确定。

[0067] ClustalW 由欧洲分子生物学实验室(Meyerhofstrasse1, D69117, 海德堡)的 Julie Thompson(Thompson@EMBL-Heidelberg.DE) 和 TobyGibson(Gibson@EMBL-Heidelberg.DE) 对公众开放。ClustalW 还可从多个互联网网页中下载, 尤其 IGBMC(Institut de Génétique et de BiologieMoléculaire et Cellulaire, B.P.163, 67404 Illkirch Cedex, 法国; <ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/>) 和 EBI(<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/>), 以及 EBI 的全部镜像互联网网页(欧洲生物信息研究所, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB101SD, UK)。

[0068] 优选地使用 ClustalW 计算机程序 1.8 版来确定本文中所述蛋白质与其它蛋白质之间的同一性。将设置如下参数:KTUPLE = 1、TOPDIAG = 5、WINDOW = 5、PAIRGAP = 3、GAOPEN = 10、GAPEXTEND = 0.05、GAPDIST = 8、MAXDIV = 40、MATRIX = GONNET、ENDGAPS(OFF)、NOPGAP、NOHGAP。

[0069] 优选地使用 ClustalW 计算机程序 1.8 版来确定例如本文中所述核酸分子的核苷酸序列与其它核酸分子的核苷酸序列之间的同一性。将设置如下参数:KTUPLE = 2、TOPDIAGS = 4、PAIRGAP = 5、DNAMATRIX:IUB、GAOPEN = 10、GAPEXT = 5、MAXDIV = 40、TRANSITIONS:未加权。

[0070] 在本发明的上下文中, 术语“增加 SSII 活性”意指与相应未遗传修饰的野生型稻植物或野生型稻植物细胞相比, 增加 SSII 活性至少 100%、特别是 200% -2000%, 优选 400% -1400% 并且尤其优选 500% -900%。在本发明的上下文中, SSII 活性使用下文所述方法(“通过活性凝胶测定 SSII 活性”)检测。在本发明的上下文中, “增加 SSII 活性”还意指没有可检测到的 SSII 活性的植物或植物细胞在根据本发明受到遗传修饰(其中将编码可溶性淀粉合酶的外来核酸分子导入植物细胞基因组)后, 显示可检测到的 SSII 活性。

[0071] 在优选的实施方案中, 本发明的方法还是其中外来核酸分子采取异源的可溶性淀粉合酶 II 的编码区形式的一种方法。

[0072] 在本发明的上下文中, “异源的可溶性淀粉合酶 II”理解为意指这样的可溶性淀粉合酶 II, 它不天然存在于植物细胞内, 但是它的编码性 DNA 序列通过重组方法(例如细胞的

转化)被导入细胞。在本上下文中,编码性 DNA 序列源于除所转化的植物细胞或植物以外的植物物种,或不处在自身启动子的控制下。编码性 DNA 序列优选地源于除所转化的植物细胞或植物以外的植物属。

[0073] 在本发明的上下文中,术语“植物属”理解为意指生物系统的分级水平。属包含一个或多个物种。属的实例是小麦属(*Triticum* L.(小麦))。属内的全部物种具有双名名称,其除包含属名以外,还含有种名。因此,普通小麦(*Triticum aestivum* L.)(普通面包小麦)是小麦属的一个种。

[0074] 在本发明的上下文中,术语“SSH 基因”理解为意指编码“可溶性淀粉合酶 II”的核酸分子或多核苷酸(DNA,cDNA)。在又一个实施方案中,SSII 基因源自单子叶植物。在优选的实施方案中,SSII 基因源自小麦。

[0075] 在又一个优选实施方案中,本发明的方法是其中使用来自单子叶植物的可溶性淀粉合酶 II 的一种方法。在尤其优选的实施方案中,SSII 由 SEQID No. 1 内所示的核苷酸序列的编码区编码或具有 SEQ ID No. 2 内所示的氨基酸序列。

[0076] 其淀粉由本发明方法加以修饰的遗传修饰植物可以属于任何植物物种,即属于单子叶植物和双子叶植物。植物优选地是农用作物植物形式,即由人培育的用于营养目的或用于技术、尤其工业目的植物或它们的细胞。本发明的方法优选地在淀粉贮藏植物(例如豌豆、马铃薯、甜马铃薯、木薯、玉米和稻)内应用。

[0077] 在尤其优选的实施方案中,本发明的方法在稻植物上实施。

[0078] 本发明还涉及 DSC T- 起始温度在 70°C 和 80°C 之间的稻淀粉。

[0079] 稻胚乳淀粉的热特征和米粉的热特征可以通过差示扫描量热法(=DSC)分析。这些热特征显示为具有值 DSC T- 起始(=最低凝胶化温度)和 DSC T- 峰值(=最高凝胶化温度)的凝胶化温度。

[0080] 在本发明的上下文中,术语“DSC T- 起始温度”因此理解为意指代表淀粉样品或粉末样品开始相变的温度。其特征基线在于基线的投射和在峰的上升侧越过拐点的切线。

[0081] 令人惊讶地是本发明的稻植物合成 DSC T- 起始温度在 70°C 和 80°C 之间、特别在 77°C 和 80°C 之间的淀粉。本发明的稻淀粉特别具有在 72 和 79°C 之间、优选在 74°C 和 79°C 之间、极特别优选在 76°C 和 78°C 之间 DSC T- 起始温度。

[0082] 在又一个实施方案中,本发明的稻淀粉具有升高的 DSC 峰值温度(DSCT- 峰值)。

[0083] 令人惊讶地是本发明的稻植物合成 DSC T- 峰值温度在 80°C 和 87°C 之间、优选在 81°C 和 86°C 之间的淀粉。尤其优选 DSC T- 峰值温度在 82°C 和 83°C 之间的本发明稻淀粉。

[0084] 在本发明的上下文中,术语“DSC T- 峰值温度”理解为意指这样的温度,在该温度上 DSC 曲线已经达到最大值并且曲线的一阶微分是零。

[0085] 在本发明的上下文中,“DSC T- 起始”和“DSC T- 峰值”温度由下文所述方法(“通过差示扫描量热法对米粉/淀粉的热分析”)定义。

[0086] 本发明稻淀粉的 DSC T- 起始温度升高到如此度数的事实令本领域技术人员非常惊讶,特别是因为发明稻淀粉的淀粉磷酸盐含量同时升高。这是因为迄今已经推测增加的磷酸化程度导致淀粉颗粒内的双螺旋和晶序不稳定,这将导致降低的 DSC T- 起始温度(Safford 等,(1998)Carbohydrate Polymers 35:155-168)。磷酸化程度高的天然淀粉通常在与可比较的低磷酸盐含量淀粉相比的明显较低温度上丧失它们的结晶性。

[0087] 然而,在种类众多的热加工步骤和应用中需要使用粒状稻淀粉。因此特别有利的是本发明稻淀粉令人吃惊的高 DSC T- 起始温度或峰值温度,也即在本发明米粉的 RV 分析期间令人吃惊的高成糊温度,因此这种特性有可能在升高的加工温度上保持淀粉颗粒的结构。

[0088] 在又一个实施方案中,本发明的稻淀粉具有在位置 C6(C-6-P) 上每毫克水解淀粉 0.70nmol 与 2.5nmol 磷酸盐之间的磷酸盐含量。

[0089] 在优选的实施方案中,本发明的稻淀粉具有在位置 C6 上每毫克淀粉 0.9nmol 与 2.3nmol 磷酸盐之间的磷酸盐含量。在尤其优选的实施方案中,位置 C6 的磷酸盐含量在每毫克淀粉 1.5nmol 与 2.0nmol 磷酸盐之间。

[0090] 此外,本发明延伸至包含本发明稻淀粉的衍生的稻淀粉。

[0091] 在本发明的上下文中,术语“衍生的稻淀粉”意指其特性在从植物细胞中分离后例如借助热加工、化学加工、酶加工或机械性加工而已经改性的本发明稻淀粉。

[0092] 本发明的稻淀粉比常规淀粉更适合作为制备衍生的稻淀粉的原材料,原因在于它们因较高的淀粉磷酸盐含量而含有更高比例的活性官能团,并且因为本发明的稻淀粉比含有可比较的磷酸盐含量的淀粉具有更高成糊温度或更高热稳定性。

[0093] 本发明因此还涉及产生本发明的衍生的稻淀粉的方法,其中本发明的稻淀粉随后受到改性。尤其,本发明的衍生的稻淀粉采取的形式是经热和 / 或用酸处理的淀粉。

[0094] 在又一个实施方案中,衍生的稻淀粉采取的形式是淀粉醚,尤其是淀粉烷醚、0- 烯丙基醚、羟烷基醚、0- 羧甲基醚、含氮的淀粉醚、含磷酸的淀粉醚或含硫的淀粉醚。

[0095] 在又一个实施方案中,衍生的稻淀粉采取的形式是交联淀粉。

[0096] 在又一个实施方案中,衍生的稻淀粉采取的形式是淀粉接枝聚合物。

[0097] 在又一个实施方案中,衍生的稻淀粉采取的形式是氧化淀粉。

[0098] 在又一个实施方案中,衍生的稻淀粉采取的形式是淀粉酯,特别是通过使用有机酸引入淀粉的淀粉酯。这些淀粉酯尤其优选地采取磷酸酯、硝酸酯、硫酸酯、黄原酸酯、乙酸酯或柠檬酸酯的形式。

[0099] 本发明的衍生的稻淀粉适用于制药工业、食品领域和 / 或非食品领域内多种应用。用于制造本发明衍生淀粉的方法是本领域技术人员已知的并且在一般文献中被充分描述。对衍生淀粉制造的综述可在 Orthoefer(Corn, Chemistry and Technology, 1987 年,编者 Watson 和 Ramstad,第 16 章,第 479-499 页) 内找到。稻淀粉的衍生化作用还在例如 Shih 和 Daigle(2003, Nahrung 47(1) :64-67) 内描述。

[0100] 本发明还涉及本发明的稻淀粉用于制备衍生淀粉的用途。

[0101] 处于天然形式或衍生形式下的本发明稻淀粉适于食品领域或非食品领域内的多种应用。另一个实施方案包含本发明的衍生性稻淀粉在工业领域内的用途。由于本发明稻淀粉具有小的粒度,本发明的稻淀粉还特别适用于制造照相纸。

[0102] 本发明还延伸至包含本发明稻淀粉的组合物。

[0103] 在又一个实施方案中,本发明延伸至包含本发明稻淀粉的米粉。

[0104] 在又一个实施方案中,本发明的米粉具有在 72°C 和 81°C 之间、优选在 74°C 和 80°C 之间、特别在 77°C 和 80°C 之间的 DSC T- 起始温度的淀粉。尤其优选 DSC T- 起始温度在 76°C 和 79°C 之间的本发明米粉。

[0105] 在又一个实施方案中,本发明的米粉具有在 81℃和 90℃之间,优选在 82℃和 86℃之间的 DSC T- 峰值温度的淀粉。尤其优选 DSC T- 峰值温度在 82℃和 85℃之间的本发明米粉。

[0106] 在又一个实施方案中,本发明的米粉在 RVA(快速粘度分析仪)分析内具有在 75℃和 90℃之间、优选在 78℃和 88℃之间、特别在 83℃和 86℃之间并且尤其优选在 80℃和 85℃之间的 RVA PT 成糊温度。

[0107] 在本发明的上下文中,术语“成糊温度”(RVA PT)意指根据 RVA 分析在粘度发展开始时所测量的值是这样的温度,在该温度上加热过程期间的粘度曲线离开基线并且粘度在 0.1 分钟时间内改变超过 36cP。

[0108] 在本发明的上下文中,“RVA PT 成糊温度”以“通过快速粘度分析仪(RVA)分析米粉”的方法加以测定。

[0109] 与来自相应野生型稻植物的米粉相比,本发明的米粉具有升高的成糊温度(RVA PT)。

[0110] 在本发明的上下文中,术语“升高的成糊温度(RVA PT)”意指与来自相应野生型稻植物的米粉的成糊温度相比,成糊温度(RVA PT)高 5℃至 15℃,特别是 6℃至 14℃,优选 8℃至 12℃。

[0111] 在又一个实施方案中,本发明米粉的特征是在达到成糊温度与达到峰值粘度之间缩短的时间段。

[0112] 在本发明的上下文中,术语“在达到成糊温度与达到峰值粘度之间缩短的时间段”(峰时间-成糊时间)意指在根据如下文所述 RVA 分析的时间方面的差异等于 40 秒至 130 秒,尤其优选 50-100 秒并且尤其优选 60-75 秒。

[0113] 在又一个实施方案中,本发明涉及制备本发明米粉的方法,其中将本发明的稻米、优选本发明的精米研磨。用于精制及研磨稻米的方法是技术人员已知的并例如在 Fitzgerald 等(2003, J. of Agrocult. And FoodChemistry 51 :2295-2299)或在 Ramesh 等(1999, Carbohydrate Polymers 38 :337-347)内描述。

[0114] 技术人员知道“稻米”意指稻植物成熟的受精的花。

[0115] 本发明还延伸至本发明的米粉用于制备食物和 / 或动物饲料的用途。

[0116] 本发明还涉及包含本发明米粉的组合物。

[0117] 在又一个实施方案中,本发明延伸至包含本发明稻淀粉的稻粒。

[0118] 在优选的实施方案中,稻粒的形式是加工的米粒。

[0119] 技术人员理解加工意指将粗稻(稻谷)转换成糙米或精米;加工方法是技术人员已知的并且尤其在 Fitzgerald 等(2003, J. of Agrocult. and FoodChemistry 51 : 2295-2299)或在 Ramesh 等(1999, Carbohydrate Polymers 38 :337-347)内描述。

[0120] 在本发明的又一个实施方案中,本发明的稻粒可以用于烹煮。

[0121] 在又一个实施方案中,稻米具有在烹煮后改变的特性。

[0122] 在本发明的上下文中,“在烹煮后改变的特性”理解为意指与质量有关的米粒特征(例如烹煮后米粒、特别是已烹煮的米在冷却后或在加热后的质构或米粒硬度及粘度)的改变。

[0123] 在优选的实施方案中,根据本发明的米粒具有 -10g 至 -200g, 优选地 -12g

至 -150g, 尤其优选地 -15g 至 -130g (以 g 张力度量) 的粘度。

[0124] 技术人员理解术语“粘度”意指在烹煮期间的水摄取及加热效应和米粒的均一性以及烹煮后必然伴有的米粒与其它米粒或其它表面 (例如叉、筷子等) 的黏附。在本发明的上下文中, 粘度将理解为意指如方法“测定烹煮特征和烹煮的米粒的质构”内所述, 在事先压缩最佳烹煮的米粒之后, 通过质构仪测量的最大反向力 (张力)。在本上下文中, 高的负值意指高于较低负值的粘度。在本发明的上下文中, “最佳烹煮的米粒”理解为意指在达到最小烹煮时间 (如由 Juliano 1984 ; J. of Tex. Studies 15 : 357-376 描述, 当 90% 的稻米不再具有白色中心时) 后再烹煮 2 分钟的米粒。

[0125] 在本发明中, 粘度在最佳烹煮的米粒, 即已经在 4℃ 贮藏 22 小时并随后加温至室温的米粒, 或在 4℃ 贮藏 (22 小时) 后已经在烤箱内于 80℃ 再加热 5 分钟或在 4℃ 贮藏 (22 小时) 后已经借助微波炉再加热 5 分钟 (600W/3 分钟) 的米粒上测量。

[0126] 技术人员理解再加热意指对已经使用微波炉、烤箱、水浴或热柜烹煮的稻米再加热 1 次到 4 次, 并且在再加热期间例如通过置于室温而冷却; 优选地, 再加热理解为意指单次再加热途径。

[0127] 由于“粘度”是稻米的重要品质参数, 故本发明的米粒提供有利的用途。这尤其包括在半成品应用的领域, 其中所述的半成品在生产时仅得到短暂烹煮, 随后再次被干燥并仅在它们最终消费 (例如在家用、或在流动餐室内) 之前才得到再加热或煮沸, 而对风味和均一性无任何不利影响。

[0128] 在本上下文中的又一个品质参数是在水中煮沸时米粒尺度在纵轴方向上的延伸。形状上的这种变化是重要的视观品质参数, 尤其在长粒米的情况下。在本发明的又一个实施方案中, 本发明的米粒通过如此的事实区分, 即它们具有从 1.50 至 1.90、尤其优选从 1.55 至 1.80 并特别优选从 1.60 至 1.70 的延伸率 (ER)。

[0129] 在本发明的又一个实施方案中, 本发明的米粒与相应野生型稻植物的米粒相比具有增加的延伸率。

[0130] 在本发明的上下文中, 增加的延伸率理解为意指增加 5% 至 25%, 优选 10% 至 20%, 尤其优选 4% 至 18% 的延伸率。

[0131] 在本上下文中, “延伸率”理解为意指已烹煮米粒粒长与未烹煮米粒粒长的比率。粒长如所述在方法“测量因烹煮所致的米粒尺度上的变化”内以 mm 度量; 测量优选地使用游标卡尺实施。

[0132] 在又一个实施方案中, 本发明的米粒具有从 2.8 至 6.2, 优选从 3.5 至 5.5 并且尤其优选从 4.0 至 5.0 的 CDC 值。

[0133] “CDC 值”(CDC = 尺度变化系数) 理解为意指因烹煮所致沿长度的尺度变化对沿宽度的尺度变化的比率, 即烹煮状态下的粒长 (Lc) 对未烹煮状态下粒长 (Lu) 的比率相对于烹煮状态下的粒宽 (Wc) 对未烹煮状态下的粒宽 (Wu) 比率 = $(Lc/Lu)/(Wc/Wu)$ 。

[0134] 本发明的又一个主题涉及包含至少一种本发明稻粒的组合物。

[0135] 本发明还包含其上长有至少一种本发明稻粒的和 / 或包含本发明稻淀粉的稻植物。

[0136] 在又一个实施方案中, 本发明包含遗传修饰的稻植物细胞和稻植物, 其中与相应未遗传修饰的野生型稻植物或野生型稻植物细胞相比, 遗传修饰导致增加的可溶性淀粉合

酶 II (SSII) 活性。

[0137] 还令人惊讶的是与来自相应的野生型植物细胞或野生型植物的稻淀粉相比,本发明的稻淀粉具有某些侧链的改良分布。

[0138] 在本发明的又一个实施方案中,已经显示与来自相应野生型稻植物的稻淀粉相比,具有从 20 至 25dp (=聚合程度) 的支链淀粉侧链的含量增加 5-35%。

[0139] 在本发明的上下文中,术语“有从 20 至 25dp (=聚合程度) 的支链淀粉侧链的含量”意指与来自相应野生型稻植物细胞或野生型稻植物的支链淀粉的具有 20-25DP 的侧链含量相比,增加具有 20-25DP 的支链淀粉的侧链含量 5% -35%,优选 6% -30%,尤其优选 8% -24%。

[0140] 在本发明的又一个实施方案中,具有从 6 至 10 的支链淀粉的侧链含量降低。

[0141] 在本发明的上下文中,术语“降低具有从 6 至 10 的支链淀粉的侧链含量”意指与来自相应野生型稻植物细胞或野生型稻植物的支链淀粉的具有 6-10DP 的侧链含量相比,降低具有 6-10DP 的支链淀粉的侧链含量 20% -60%,优选 25% -55%,尤其优选 30% -55%。

[0142] 在本发明的上下文中,侧链分布的测量通过下文所述的方法(“加工米粉/淀粉以便通过高压阴离子交换色谱分析支链淀粉的侧链分布”)实施。短侧链的百分数通过测定全部侧链总数内特定侧链的百分数而测定。全部侧链总数通过测定 HPLC 色谱内代表从聚合程度 DP6-48 的峰下总面积而测定。全部侧链总数内特定侧链的百分数通过测定 HPLC 色谱内代表该侧链的峰下面积相对于总面积的比率而测定。为了测定峰面积,例如可以使用来自 Dionex, USA 的程序 Chromelion6.60。

[0143] 在本发明的上下文中,术语“野生型稻植物”意指充当用于本发明稻植物的原材料的稻植物,即除所导入的导致可溶性淀粉合酶 II (= SSII) 活性增加的遗传修饰之外,它们的遗传信息与遗传修饰的稻植物的遗传信息相对应。

[0144] 优选地,术语“野生型稻植物”指品种 M202,这是具有值为 25.2% 的 S- 型支链淀粉的稻品种,该品种的谷粒已经在 2005 年 11 月 17 日保藏在 NCIMB Ltd. 保藏单位, Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, Scotland, AB219YA, United Kingdom, 编号 NCIMB41352。

[0145] 在本发明方法的上下文中,遗传修饰优选地包含导入至少一种编码可溶性淀粉合酶 II (SSII) 的外来核酸分子至植物细胞的基因组内,所述的导入至少一种外来核酸分子引起如此事实,即从遗传修饰的植物细胞中及从该植物细胞内再生的植物里可得到的淀粉因为已经导入的 SSII 表达而与来自相应未遗传修饰的野生型植物细胞内的淀粉相比,具有在 C6 位置上增加的磷酸盐含量。

[0146] 在本发明的又一个实施方案中,至少一种外来核酸分子的导入导致本发明的稻淀粉合成。

[0147] 在优选的实施方案中,本发明的稻植物和稻植物细胞是其中外来核酸分子是异源可溶性淀粉合酶 II 的编码区的那些稻植物和稻植物细胞。

[0148] 多种技术是可获得用于导入 DNA 至植物宿主细胞的。这些技术包含使用根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 或发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 作为转化介质以 T-DNA 转化植物细胞、原生质体融合、注射、DNA 的电穿孔、通过生物射弹法导入 DNA 和其它可能技术。

[0149] 通过基于农杆菌转化的载体对单子叶植物的转化已经例如在 Chan 等, 1993, *Plant Mol. Biol.* 22 :491-506 ;Hiei 等, 1994, *Plant J.* 6 :271-282 ;Deng 等, 1990, *Science in China* 33 :28-34 ;Wilink 等, 1992, *Plant Cell Reports* 11 :76-80 ;May 等, 1995, *Bio/Technology* 13 :486-492 ;Conner 和 Domisse, 1992, *Int. J. Plant Sci.* 153 :550-555 并在 Ritchie 等, 1993, *Transgenic Res.* 2 :252-265 内描述。用于转化单子叶植物的备选系统是 :通过生物射弹法的转化 (Wan 和 Lemaux, 1994, *Plant Physiol.* 104 :37-48 ;Vasil 等, 1993, *Bio/Technology* 11 :1553-1558 ;Ritala 等, 1994, *Plant Mol. Biol.* 24 :317-325 ;Spencer 等, 1990, *Theor. Appl. Genet.* 79 :625-631)、原生质体转化、电穿孔部分透化的细胞以及通过玻璃纤导入 DNA。已对多种禾谷类物种的成功转化已经例如对大麦 (Wan 和 Lemaux, 同上 ;Ritala 等, 同上 ;Krens 等, 1982, *Nature* 296 :72-74)、对小麦 (Nehra 等, 1994, *Plant J.* 5 :285-297)、稻 (Ishida 等, 1996, *Nature Biotechnology* 14(6) :745-750) 和玉米 (Kozziel 等 (1993), *Biotechnology* 11 :194-200) 作了描述。

[0150] 再生本发明方法所产生的遗传修饰的植物细胞导致产生这样的遗传修饰的植物, 其中所述植物的遗传信息与相应非遗传修饰的野生型植物的遗传信息对应并且该植物含有导入的用于增加可溶性淀粉合酶 II 的活性的相同遗传修饰, 其中所述的可溶性淀粉合酶 II 已经存在于本发明方法所产生的遗传修饰的植物细胞内。

[0151] 在优选的实施方案中, 本发明涉及来自日本组 (粳稻) 的稻植物, 所述的日本组包含短粒稻品种和中粒稻品种, 例如糯稻 (glutinous rice)、短粒稻、日本糯稻 (mochi rice)、nishiki 稻、ribe 稻、红稻 (red rice)、黑稻 (black rice)、寿司稻 (sushi rice)。在本发明尤其优选的实施方案中, 来自日本组的稻野生型植物用作产生本发明稻植物的原材料。

[0152] 在又一个更尤其优选的实施方案中, 本发明涉及具有 S- 型支链淀粉的稻植物。

[0153] 在稻支链淀粉中, 可区分 L 型和 S 型。L 型支链淀粉主要存在于来自印度组的稻中, 而相反, S- 型支链淀粉则主要存在于来自日本组的稻内。在本发明的上下文中, 通过如此事实区分 S- 型支链淀粉, 即与 L 型相比, 短 α -1,4- 葡聚糖链 ($DP \leq 10$) 的量超过 20% 的总 α -1,4- 葡聚糖链 ($DP \leq 24$) (Nakamura 2002, *Starch* 54 :117-131)。

[0154] 在甚至尤其优选的实施方案中, 本发明包含遗传修饰的稻植物 (粳稻 (*Oryza sativa* var. japonica)) 即转化体 GAOS0353-02301, GAOS0353-01301 和 GAOS0353-01502。转化体 M202GAOS0353-01502 的种子于 2005 年 11 月 17 日以编号 NCIMB41353 保藏在 NCIMB Ltd., Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, Scotland, AB219YA, United Kingdom。

[0155] 在又一个实施方案中, 本发明的米粉比来自相应野生型稻植物的米粉具有更低的表现直链淀粉含量。在本发明的上下文中, 表现直链淀粉含量优选地由下文所述的方法“测定表现直链淀粉含量”测定。在优选的实施方案中, 本发明米粉的表现直链淀粉含量与来自相应野生型稻植物的米粉内的表现直链淀粉含量相比, 降低 10% 至 20%, 尤其优选 12% 至 18% 并且甚至尤其优选 13% 至 15%。

[0156] 在本发明的又一个实施方案中, 所导入的编码可溶性淀粉合酶 II 的外来核酸分子处在胚乳特异性启动子控制下。与相应野生型植物的胚乳相比, 胚乳特异性启动子有可能增加本发明植物的胚乳内编码可溶性淀粉合酶 II 的外来核酸分子转录物的量。

[0157] 优选使用用于胚乳特异性表达的启动子,例如来自稻的谷蛋白启动子 (Leisy 等 (1990) *Plant Mol. Biol.* 14 :41-50 ;Zheng 等 (1993) *Plant J.* 4 :357-366)、来自小麦的HMWG启动子 (Anderson 等 (1989) *Nucleic Acid Res* 17 :461-462)、来自小麦的GBSSII启动子 (W002/02785)、USP启动子 (B Ö umlein 等 (1991) *Mol. Gen. Genetics* 225 :121-128)、来自豆的菜豆蛋白启动子 (Kawagoe 和 Murai (1992) *Plant J* 2 (6) :927-36)、来自玉米的玉米醇溶蛋白基因的启动子 (Pedersen 等, (1982) *Cell* 29 :1015-1026 ;Quatroccio 等, (1990) *Plant Mol. Biol.* 15 :81-93)、来自玉米的皱缩 -1 启动子 (sh-1) (Werr 等 (1985) *EMBO J.* 4 :1373-1380) 或来自稻的谷醇溶蛋白启动子 (Qu 和 Takaiwa (2004) *Plant Biotechnology Journal*, 2 :113-125)。

[0158] 尤其优选使用来自稻的球蛋白启动子 (Nakase 等 (1996) *Gene* 170 (2) :223-226)。

[0159] 在又一个实施方案中,本发明涉及产生本发明的稻植物的方法,其中本发明的稻植物从本发明的稻植物细胞中再生,并且其中于再生后,选择其中可溶性淀粉合酶 II 的过量表达导致 SSII 活性增加的那些稻植物。

[0160] 在本发明的上下文中,术语“选择”意指在群体内,主观选择的性状是这样的标准,其中根据该标准,培育表现这种性状的植物,而弃去未表现所需性状的那些植物。

[0161] 在本发明的上下文中,受到选择的植物是具有 SSII 活性增加的性状的那些植物。

[0162] 本发明还涉及本发明遗传修饰的稻植物的繁殖材料,其含有本发明的稻植物细胞。

[0163] 在该上下文中,术语“繁殖材料”包含适用于通过营养途径或有性途径产生子代的植物的那些部分。通过营养繁殖的那些部分例如是插枝或愈伤组织培养物。繁殖材料包含例如果实、种子、幼苗、原生质体、细胞培养物等。繁殖材料优选地是含有胚乳的谷粒。

[0164] 包含遗传修饰的植物细胞的本发明稻植物的稻粒是本发明的又一个主题。

[0165] 在又一个实施方案中,本发明包含产生本发明的改性稻淀粉的方法,包括从本发明的稻植物和 / 或从本发明的米粒和 / 或从本发明的米粉中提取淀粉。提取方法是技术人员已知的并例如在 Wang 和 Wang (2004, *Journal of Cereal Science* 39 :291-296) 或 Patindol 和 Wang (2003, *J. Agric Food Chem.* 51 :2777-2784) 内描述。

[0166] 在又一个实施方案中,本发明涉及抗性淀粉,其中与来自野生型植物内的淀粉的可消化性相比,所述抗性淀粉的可消化性降低。

[0167] 食物的可消化性尤其由食物包含的淀粉类型决定。很多食物成分甚至在抵达胃和小肠的途中就被降解,并在胃和小肠内被降解。然而,一些淀粉仅在大肠内降解并且因此称作抗性淀粉 (= RS)。这些淀粉可以分成四种类型。第一类型 (RS1) 包括封闭在完整细胞内的淀粉。因此这种淀粉很少接触到消化酶。这适用于例如完整谷物颖果或粗磨的谷物颖果内的淀粉和豆类内的部分淀粉。第二类型 (RS2) 包括在小肠内不以天然形式被消化的淀粉。在这种情况下其原因在于淀粉粒的结构和淀粉粒内淀粉分子的排列所致。第二类型包括例如生马铃薯、绿色香蕉或直链淀粉丰富的玉米品种 (直链淀粉玉米 (amylomaize)) 内的淀粉。第三类型 (RS3) 包括所谓的回生淀粉。这种类型的淀粉在已加热的含淀粉食物如面包和烹煮的马铃薯冷却后产生。在此期间,一些淀粉分子重排,并且晶态带形成以及不能够接触消化酶 (例如直链淀粉)。第四类型 (RS4) 包括例如通过交联或酯化 (乙酰化等) 所产生的不可消化的化学改性淀粉。

[0168] 抗性淀粉的促健康效应尤其由其发酵影响细菌反应、增加粪便重量并导致产生代表大肠粘膜细胞的主要能源供应者的短链脂肪酸组成。此外,在肿瘤抑制中的作用归因于丁酸(进一步细节将尤其在 Wisker(2001), UGB-Forum01:75-77 内找到)。

[0169] 例如在含有高比例全谷粒(及因此 RS1)的面包的消费者内葡萄糖和/或胰岛素水平低于由精制谷物组成的面包的消费者内葡萄糖和/或胰岛素水平。已经发现血液葡萄糖的较少增加似乎与众多豆类有关。这显示 1 型抗性淀粉影响食物对血液葡萄糖具有的效应。除血液葡萄糖和胰岛素之外,糖类对消耗脂肪也非常重要。持续波动的胰岛素水平干扰脂肪的消耗并且还引起增加的饥饿感。为此,可消化性低或下降并且因此仅导致胰岛素水平轻微上升的糖类是有利的。因此在合适产品内的此类淀粉有可能满足有关吸收少量糖类(“低糖”)的膳食的全部要求。

[0170] 已经预计与野生型淀粉相比,根据本发明方法产生的淀粉显示明显减少的可消化性。当研究分离的淀粉时,这显而易见(图 3)。因此,根据本发明方法产生的淀粉表现出有可能在纤维增加的膳食中及“低糖”领域内及其它领域内利用的高营养品质。

[0171] 本领域技术人员根据消化所需要的时间区分淀粉:用 20 分钟消化的淀粉称作“快速消化淀粉(RDS)”,用 60 分钟的淀粉称作“缓慢可消化淀粉(SDS)”并且在 120 分钟后剩下的淀粉称作“抗性淀粉(RS)”。

[0172] 令人惊讶的是,分离的淀粉的可消化性减少。优选可消化性与野生型相比减少 10 至 65%的淀粉,特别优选可消化性减少 10 至 55%,极特别优选可消化性减少 12 至 45%并且最特别优选可消化性减少 15 至 30%。

[0173] 这意指与野生型淀粉相比,本发明的淀粉内抗性淀粉 RS 百分数增加。RS 含量测定为从总淀粉干重(100%)中减去 120 分钟后自总淀粉中所释放的葡萄糖的百分数的差异(如下文方法 15 内所述)。在该上下文中,增加意指 RS 含量增加到 100-750%、优选地到 150-700%并且尤其优选到 200-600%。

[0174] 在另一个实施方案中,本发明的稻淀粉显示 15%-45%、优选 17%-40%并最优选 20%-38%的 RS 含量。

[0175] 本发明还包括包含如此淀粉的植物和植物细胞,其中所述的淀粉已经通过本发明方法产生并表现与来自相应野生型植物或野生型植物的淀粉相比,减少的可消化性。

[0176] 材料和方法

[0177] 在实施例中使用如下方法。这些方法可以用于实施本发明的方法;它们代表本发明的具体实施方案,但是不使本发明限于这些方法。技术人员知道可以通过修改所述的方法和/或通过将单个方法学部分替换成另外的方法学部分而等效实施本发明。仅一个例外是“测定淀粉结合性葡萄糖-6-磷酸含量”的方法,在本发明的上下文中,该方法仅以下文在 14 下所述的方式实施。

[0178] 1) 植物材料和栽培

[0179] 稻植物:粳稻,品种 M202。

[0180] 种子在 2005 年 11 月 17 日保藏于 NCIMB Ltd. (National Collection of Industrial Bacteria, Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn; Aberdeen, AB219YA, UK)。品种 M202-野生型的种子给予保藏号 NCIMB41352;转化体 M202-GAOS0353-01502 的种子给予保藏号 NCIMB41353。

[0181] 稻植物在温室内在如下方案条件下培育:播种:基质:在 1.6l 玫瑰花盆(制造商:H. Meyer,德国)内 100%水藓泥炭和 100l 砂/qm 与粘土:180kg/qm 的混合物。pH:5.4-6.2;谷物肥料:Hakaphos(Compo,德国)14% N-16% P-18% K+2% Mg;2kg/qm;

[0182] 施肥:3.5g/植物直至开花: NH_4NO_3 (1.75g)和 Flory2Basis(制造商:Euflo,德国):1.75g;3% N-16% P-15% K+5% Mg。

[0183] 温度:白昼 28°C / 夜晚:24°C (16 小时/8 小时);相对空气湿度:85-95%;

[0184] 光照:16 小时,350 μ 爱因斯坦/平方米秒。

[0185] 2) 序列的来源和用于转化的构建体

[0186] 使用来自小麦的序列 Ta_SSIIa 以转化稻。分离及克隆如 W097-45545 内所述实施(此后称为“pTaSS1”)。所用的转化载体 AH32-191 在实施例 1 内描述。

[0187] 3) 稻植物的转化及再生

[0188] 稻植物通过 Ishida 等(1996, Nature BioTechnology, 14(6):745-750)所述的方法得以转化及再生。

[0189] 4) 稻粒的加工

[0190] 为产生足够量的研究材料,稻植物在室温条件下培育并在充分成熟时收获。为进一步干燥,成熟(即充分发育的)稻粒在 37°C 贮藏 3-7 日。

[0191] 此后,通过脱壳机(Laboratory Paddy sheller, Grainman, Miami, Florida, USA)从谷壳中释放米粒,并且通过碾制 1 分钟(Pearlest Rice Polisher, Kett, Villa Park, CA)加工得到的糙米以产生精制米。精制米用于完整谷粒的分析(例如碱消值、米粒尺度、粒重等)的原材料。

[0192] 为研究谷粒组成以及淀粉和米粉的特征,精米通过实验磨粉机(Cyclotec, Sample mill, Foss, 丹麦)磨碎以产生米粉。实验磨粉机的原理是磨料仅当达到小于 0.5mm 粒度时才离开。磨粉过程在全部样品材料离开磨腔时结束。

[0193] 5) 通过 Northern 印迹分析淀粉合酶 II 的表达水平

[0194] 通过 Northern 印迹分析稻内来自小麦的淀粉合酶 II 的表达。为此目的,对于每种独立转基因事件,研究三粒未成熟的稻粒(开花后约 15 日)。通过匀浆方式,将冷冻的稻粒在 Retsch 磨粉机(型号 MM300)内在具有 4.5mm 钢球的 96 孔平板内以频率 30 赫兹振摇 30 秒。此后,通过 96 孔规模的 Promega RNA 提取试剂盒,按制造商说明分离 RNA(SV96 总 RNA 分离系统,定货号 Z3505, Promega, Mannheim)。

[0195] 每样品 2 μ g RNA 形成相同体积并用相等体积的 RNA 样品缓冲液(65% (v/v) 甲酰胺、8% 甲醛、13% (v/v) 凝胶缓冲液(见上文)、50 μ g/ml 溴化乙啶)处理。加热(10 分钟, 65°C)并立即在冰上冷却后,使用 RNA 运行缓冲液(20mM MOPS pH8.0、5mM 乙酸钠、1mM EDTA),使 RNA 在恒定电流 50-80mA 在 1.2% 浓度(w/v) 琼脂糖凝胶(20mM MOPS pH8.0、5mM 乙酸钠、1mM EDTA、6% (v/v) 甲醛)上分离 2 小时。

[0196] 此后,将 RNA 使用 10 $\times$ SSC(1.5M NaCl, 150mM 柠檬酸钠 pH7.0)通过扩散印迹法转移至 Hybond N 膜上并通过紫外线照射固定在该膜上。

[0197] 质粒 AH32-191(Bp4568-5686)内构成 SSII cDNA 的 5' 区域的约 1kbSpeI/BspHI 片段用于杂交 Northern 印迹膜。该 DNA 片段借助来自 Roche 的随机引发 DNA 标记试剂盒(订货编号 1004760),使用 32P- α -dCTP,根据制造商说明进行放射标记。

[0198] 在添加放射标记的 DNA 用于杂交之前,将 Northern 印迹膜在水浴内与杂交缓冲液(250mM 磷酸钠缓冲液 pH7.2、1mM EDTA、6% (w/v) SDS、1% (w/v) BSA) 在 60℃ 预温育 4 小时,温和振摇。在温育 16 小时后,移走杂交溶液,并将膜在水浴内依次与 3×SSC 和 2×SSC(见上文)在 60℃ 洗涤并温和振摇,以除去非特异性结合的 DNA 分子。为检测标记的 RNA,将膜在 X 射线胶片上在 -70℃ 放射自显影 1 至 3 日。

[0199] 6) 通过活性凝胶法测定 SSII 活性

[0200] 不成熟稻粒内的不同淀粉合酶活性通过活性凝胶(酶谱)法检测,其中蛋白质提取物在聚丙烯酰胺凝胶内于天然条件下分离并随后与合适的底物温育。形成的反应产物(淀粉)在凝胶内通过 Lugol' s 溶液(2% (w/v) KI ;0.2% (w/v) I₂) 染色。

[0201] 单个不成熟的稻粒(开花后约 15 日,从开花期开始日起测量)在液氮内速冻并在 150-200 μ l 冷的提取缓冲液(50mM Tris/HCl pH7.6、2.5mM EDTA、2mM DTT、4mM PMSF、0.1% (w/v) 糖原、10% (v/v) 甘油)内匀浆。在离心(15 分钟,13000g,4℃)后,将清亮的上清液转移至新鲜反应容器内并将一个等分试样的提取液用于通过 Bradford 的方法(1976, AnalBiochem 72:248-254)测定蛋白质含量。

[0202] 蛋白质提取物通过 7.5% 浓度的连续聚丙烯酰胺凝胶(7.5% AA/BAA37.5 : 1 ; 25mM Tris/HCl pH7.6、192mM 甘氨酸、0.1% (w/v) APS、0.05% (v/v) TEMED),使用工作浓度的运行缓冲液(25mM Tris/HCl、192mM 甘氨酸)加以分离。凝胶在上样前,在 8mA 并在 4℃ 实施预电泳 30 分钟以便除去游离基。对每个样品,施加 15 μ g 蛋白质并在 4℃ 电泳 2-2.5 小时。

[0203] 此后,凝胶在室温在 15ml 温育缓冲液(0.5M 柠檬酸钠 pH7.0、25mM 乙酸钾、2mM EDTA、2mM DTT、0.1% (w/v) 支链淀粉、50mM 三(羟甲基)甲基甘氨酸 /NaOH pH8.5、1mM ADP- 葡萄糖)内温育过夜并持续振摇。形成的淀粉借助 Lugol' s 溶液染色。

[0204] 为通过酶谱法测定 SSII 活性增加的程度,将遗传修饰的株系的蛋白质提取物进行逐步稀释并根据以上所述方法使用。用 Lugol' s 溶液染色酶谱后,活性增加的程度通过目视比较不同稀释物与未稀释野生型的 SSII 带的密度而确定。

[0205] 7) 从米粉中提取稻淀粉

[0206] 从米粉中提取稻淀粉由类似于 Wang 和 Wang(2004 ;Journal of CerealScience39 :291-296)所述的方法实施。

[0207] 10g 米粉与 40ml 0.05% (w/v) NaOH 在振荡器上室温温育 16-18 小时。此后,将混悬液转移至 Warring 搅拌器以完成消化,并低速混合 15 秒然后高速 45 秒。为除去较粗糙的成分(例如细胞壁),使混悬液通过 125 μ m 筛目的筛子和随后通过 63 μ m 筛目的筛子。在 1500 转 / 分钟离心 15 分钟后(Microfuge3.0R ;Heraeus),倾析上清液并使用铲子移走位于沉淀表面的蛋白质层。沉淀的剩余部分在 0.05% (w/v) NaOH 内重悬,并且重复上文所述方法。此后,沉淀重悬于水中,并且使用 HCl 调整混悬液的 pH 至 6.5-7。用水(总共 3 次)洗涤获得的稻淀粉,每个洗涤步骤包含离心沉淀(1500 转 / 分钟,15 分钟,室温)、弃去上清液并重悬于新鲜水内。在最后洗涤步骤之前,再次检查 pH 并根据需要用 HCl 调整至 pH7。将最后洗涤步骤后的稻淀粉沉淀重悬于丙酮内并进行离心沉淀,并且弃去上清液。在将沉淀再次重悬于丙酮内后,将混悬液倾入培养皿并在通风柜内室温干燥至少 18 小时。

[0208] 在最后步骤中,在研钵内研磨稻淀粉以产生直接用于全部后续分析的精细粉末。

[0209] 8) 加工米粉 / 淀粉用于通过高压阴离子交换色谱而研究支链淀粉侧链分布

[0210] 对于每种样品,将 10mg 米粉或稻淀粉在 2ml Eppendorf 杯内称重并用 250 μ l 90% (v/v) DMSO 处理。样品在 60℃ 振摇溶解后,添加 375 μ l 水并将混合物在 95℃ 温育 1 小时。300 μ l 的 16.7mM 乙酸钠, pH3.5 和 0.5U 来自假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) 的异淀粉酶 (Megazyme ;Bray, 爱尔兰) 添加至 200 μ l 反应混合物内。在 37℃ 温育 24 小时后,再添加 0.5U 异淀粉酶,并且再继续温育 24 小时。

[0211] 对于色谱,将 100 μ l 反应混合物用水 1 : 5 稀释并随后经 Ultrafree-MC 滤管 (Millipore) 过滤。注射约 90 μ l 的滤液。

[0212] 色谱:

[0213] 方法:

[0214] HPLC 系统 :GP50Dionex 梯度泵

[0215] ED50Dionex 电化学检测器 /PAD

[0216] AS50 自动进样器

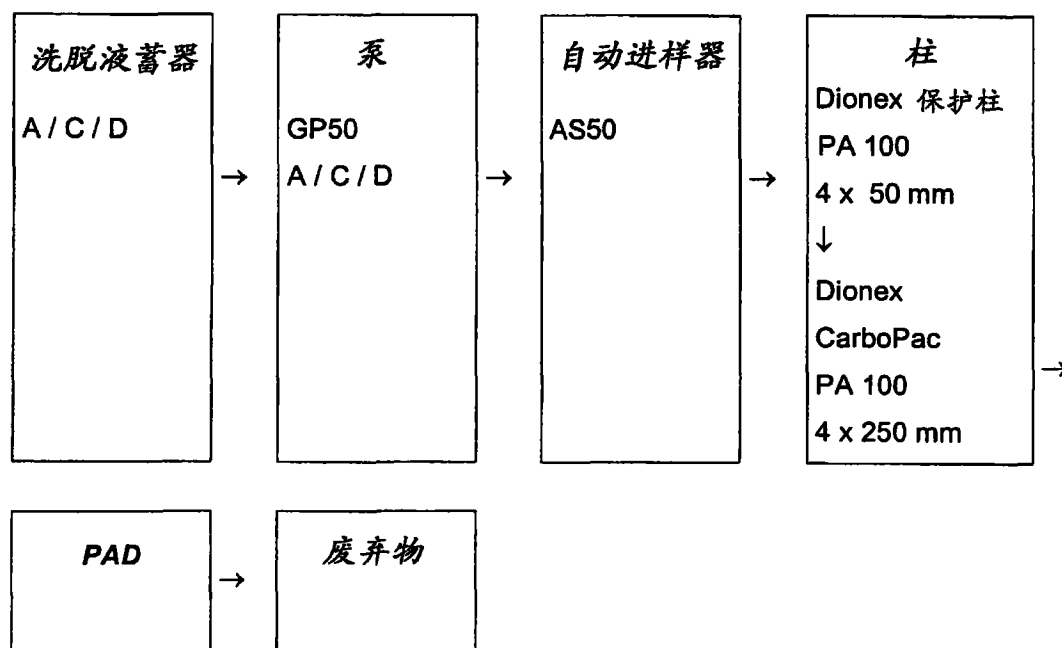
[0217] 柱温箱

[0218] 柱 :Dionex CarboPac PA1004 $\times$ 250mm (P/N046110),

[0219] 具有保护柱 PA1004 $\times$ 50mm (P/N046115)

[0220] 设备设置:

[0221]



[0222] HPAEC 程序:

[0223] 压力. 低限 = 50

[0224] 压力. 高限 = 3500

[0225] % A. Equate = " NaOH0.15M "

[0226] % B. Equate = " 醋酸钠 1.0M "

[0227] % C. Equate = " 在 NaOH0.15M 内的醋酸钠 1.0M "

[0228] % D. Equate = " Millipore 水 "

[0229] ECD. 数据收集速率 = 1.0
[0230] 波形时间 = 0.00, 电位 = 0.05
[0231] 波形时间 = 0.20, 电位 = 0.05, 积分 = 开始
[0232] 波形时间 = 0.40, 电位 = 0.05, 积分 = 结束
[0233] 波形时间 = 0.41, 电位 = 0.75
[0234] 波形时间 = 0.60, 电位 = 0.75
[0235] 波形时间 = 0.61, 电位 = -0.15
[0236] 波形时间 = 1.00, 电位 = -0.15
[0237] 池 = 开
[0238] 洗液体积 = 500
[0239] 等待冲洗状态
[0240] 针高度 = 2
[0241] CutSegmentVolume = 10
[0242] 注射速度 = 4 ;
[0243] 循环 = 0
[0244] 等待温度 = 否
[0245] 等待样品准备完毕
[0246] 0.000 流速 = 1.00
[0247] % B = 0.0
[0248] % C = 0.0
[0249] % D = 0.0
[0250] 曲线 = 5
[0251] 上载
[0252] 进样
[0253] 等待
[0254] ECD 自动为零
[0255] ECD_1.AcqOn
[0256] 流速 = 1.00
[0257] % B = 0.0
[0258] % C = 0.0
[0259] % D = 0.0
[0260] 曲线 = 5
[0261] 5.000 流速 = 1.00
[0262] % B = 11.0
[0263] % C = 0.0
[0264] % D = 0.0
[0265] 曲线 = 5
[0266] 流速 = 1.00
[0267] % B = 11.0

[0268] % C = 0.0
[0269] % D = 0.0
[0270] 曲线 = 4
[0271] 130.000 流速 = 1.00
[0272] % B = 35.0
[0273] % C = 0.0
[0274] % D = 0.0
[0275] 曲线 = 4
[0276] 132.000 流速 = 1.00
[0277] % B = 0.0
[0278] % C = 100.0
[0279] % D = 0.0
[0280] 曲线 = 5
[0281] 133.000 流速 = 1.00
[0282] % B = 0.0
[0283] % C = 100.0
[0284] % D = 0.0
[0285] 曲线 = 5
[0286] 142.000 流速 = 1.00
[0287] % B = 0.0
[0288] % C = 0.0
[0289] % D = 0.0
[0290] 曲线 = 5
[0291] 143.000 流速 = 1.00
[0292] % B = 0.0
[0293] % C = 0.0
[0294] % D = 95.0
[0295] 曲线 = 5
[0296] 152.000 流速 = 1.00
[0297] % B = 0.0
[0298] % C = 0.0
[0299] % D = 95.0
[0300] 曲线 = 5
[0301] ECD_1.AcqOff
[0302] 结束

[0303] 数据评估使用 Dionex Chromeleon v6.60 (Dionex Corporation, Sunnyvale, California, USA) 执行。“2004 年 3 月的 6.60 版“指导及用户手册”可以从 Dionex 获得或从主页 (<http://www.dionex.com>) 下载。

[0304] 为了相互比较图谱, 将已鉴定的不同麦芽寡糖的峰对每一图谱进行均值归一化

(全部峰面积的总和 = 1)。评估基于如 Dionex Chromeleon v. 6.60 内所述用于“对数基线”的“力共同基线”。为如此评估,将对数基线紧挨第一侧链峰之前并直达测量路径的最短图谱的最末可估值峰放置;这形成用于对全部图谱计算最末可估值峰的格式。

[0305] 9) 测定已烹煮米粒的烹煮特征和质构

[0306] 使用已经如在 4) “米粒的加工”下所述加工的精制米粒以便测定烹煮特征。在烹煮之前,测定米粒尺度和粒重。烹煮以 20 : 1 的水 - 米比率进行。

[0307] 将水煮至沸腾,加入米,并减少热输入量以至于水轻微沸腾(在此期间,每隔 3 分钟搅动米)。最短烹煮时间通过如 Juliano(1984 ;J. of Tex. Studies 15 :357-376) 所述的玻璃板试验测定。为了测定,在每一例子中,将 10 粒米以 1 分钟间隔夹在两片玻璃板之间。在 90% 的米粒不再显示白色中心的时间点上达到最短烹煮时间。通过再延长烹煮过程 2 分钟而达到最佳烹煮时间。米粒通过筛子得到粗滤并在室温冷却。此后,再次测定已烹煮米粒的米粒尺度及重量。用新烹煮的米粒(烹煮后约 1 小时),在已于 4℃ 贮藏 22 小时并随后再加热至室温的米粒,或在 4℃ 贮藏(22 小时)并随后使用烤箱或微波炉再加热的米粒上测定质构。为在烤箱内再加热烹煮的米粒,将烹煮的米粒放入已经用铝箔密封的铝盘内以避免水分丧失。铝盘在烤箱内在 80℃ 温育 20 分钟。米粒在微波炉内的再加热于合适的微波炉容器内在 360 瓦上实施 3 分钟。在两种再加热过程后,将米粒在室温贮藏 30 分钟以确保测量期间米粒的均一温度。

[0308] 使用直径 2.5cm 的圆环状探头的质构仪 TAXT2(Stable Micro Systems, Godalming, UK) 和(从 Champagne 等(1998) Cereal Chem. 75(2) :181-186 中改良)双压缩试验作为测量方法,测量来自以上所述实验中的已烹煮稻米的质构。为了测量,稻米在第一轮中被压缩,随后解压缩并再次压缩,连续记录米粒施加至探头的力(压力或拉力)。在每一例子中待分析的每种样品在 3 粒米上测量 10 次,米粒以如此方式放在探头下以至于米粒既不相互接触,也不超过探头的边缘。记录的参数是已烹煮米粒的硬度(H)(在第一压缩步骤期间的最大力)和粘度(-H)(在第一压缩步骤期间的最小力),见图 2。单独评估一个样品的全部量值并随后建立所讨论参数的平均值。

[0309] 10) 测量因烹煮所致的米粒尺度的变化

[0310] 使用来自 Systat(Erkrath, 德国)的软件“SigmaScan Pro”版本 5.0.0 测量米粒尺度(长度、宽度和面积)。为了测量,在每一例子中,扫描 30 颗(未烹煮和烹煮的)米并且形成的图像通过该软件评估。记录或计算如下参数:

[0311] L_u - 未烹煮米的粒长 W_u - 未烹煮米的粒宽

[0312] L_c - 烹煮米的粒长 W_c 烹煮米的粒宽

[0313] L/W 比 = L_u/W_u 或 L/W_c

[0314] ER - 延伸率 = L_c/L_u

[0315] CDC - 尺度变化系数 = $(L_c - L_u)/(W_c - W_u)$

[0316] 11) 通过差示扫描量热法(= DSC)对米粉/淀粉的热分析

[0317] 约 10mg(干重)的米粉或稻淀粉在不锈钢盘(Perkin Elmer, “大体积不锈钢盘”[03190218], 体积 60 μ l)内于过量的双蒸水(优选 30 μ l)内称重并且将该盘牢牢密封。样品在金刚石型 DSC 仪器(Perkin Elmer)内从 20℃ 至 150℃ 以热速率 10℃ / 分钟加热。使用空的密封不锈钢盘作为对照。该系统使用确定量的钢进行校正。

[0318] 通过来自 Pyris (Perkin Elmer, 7.0 版) 的软件程序分析数据。通过分析单个峰的一级相变至 T- 起始 (°C)、T- 峰 (°C)、T- 结束 (°C) 和 dH(J/g) (标准是平直基线) 加工可估值的原始数据。

[0319] DSC T- 起始的特征在于基线的投射和在峰的上升侧越过拐点的切线。DSC T- 起始表征相变的开始。

[0320] 最大温度 DSCT- 峰值指 DSC 曲线已经达到最大值的最大温度 (即曲线的一阶微分是零的温度)。

[0321] 对于 Pyris 内所用的功能 (计算 - 峰面积), 手工输入起始温度和终末温度用作基线拟合。

[0322] 12) 测定表观直链淀粉含量

[0323] 表观直链淀粉含量由来自 Juliano (1971, Cereal Science Today 16(10): 334-340) 的改良方法测定。

[0324] 对于每一样品, 在 100ml Erlenmeyer 烧瓶内 (两次) 称重 50mg 米粉并将其随后用 1ml 95% 浓度乙醇和 9ml 1M NaOH 湿润。

[0325] 以对米粉样品的相同方式平行处理具有确定量的纯直链淀粉的烧瓶, 以建立标准曲线。烧瓶进行短暂溶胀以混合样品并随后在沸水浴内温育 20 分钟, 温和振摇。在室温冷却 5-10 分钟后, 用水补足体积至 100ml。

[0326] 100 μ l 等分试样用 1ml 试验溶液 (10mM 乙酸、0.004% (w/v) I_2 ; 0.04% (w/v) KI) 处理, 充分混合并且在 620nm 上对相应空白值测定吸收率。直链淀粉含量借助用于建立校正曲线的直链淀粉标准物加以计算。

[0327] 13) 通过快速粘度分析仪 (RVA) 分析米粉

[0328] 本项分析的原理基于使水和米粉的混悬液接受定义的温度和剪切方法处理, 在此期间连续记录混悬液的粘度。所用的测量仪器是来自 Newport Scientific (Macclesfield, UK) 的具有相应软件 "Thermocline for Windows", 2.3 版的 RVA Super3。

[0329] 为了分析, 将 3g 米粉 (作为样品材料的纯干重进行称重, 校正为 0% 水分) 在分析容器内称重, 用 25ml 水处理, 并且将分析容器引导至已经提供搅拌器后的仪器内。

[0330] 施加如下的温度和剪切曲线:

[0331]

时间	类型	值
00:00:00	温度	50℃
00:00:00	速度	960 转/分钟
00:00:10	速度	160 转/分钟
00:01:00	温度	50℃
00:04:48	温度	95℃
00:07:18	温度	95℃
00:11:06	温度	50℃
00:12:30	试验结束	

[0332] 在测量结束后,确定如下参数:

[0333] 峰值粘度(测量时间 2 分钟至 7 分钟期间的最高粘度)

[0334] 低谷粘度(测量时间 7 分钟至 12 分钟期间的最低粘度)

[0335] 终粘度(在测量结束时的粘度)

[0336] 破损值=峰值粘度-低谷粘度

[0337] 回值=终粘度-低谷粘度

[0338] 成糊温度(在 0.1 分钟时间间隔期间粘度变化超过 36cp 的温度)

[0339] 峰值时间(达到峰值粘度的时间)。

[0340] 14) 测定 C6 位置上的磷酸盐含量(C6-P 含量)

[0341] 在淀粉内,葡萄糖单元的位置 C3 和 C 可以被磷酸化。为测定淀粉的 C6-P 含量(Nielsen 等,1994, Plant Physiol. 105:111-117 的改良方法),50g 米粉在 95℃ 于 500 μ 10.7M HCl 内水解 4 小时,连续振摇。此后,样品在 15,500g 离心 10 分钟,并且将混浊物从上清液内通过滤膜(0.45 μ M) 除去。20 μ 1 清亮的水解产物与 180 μ 1 咪唑缓冲液(300mM 咪唑, pH7.4; 7.5mM MgCl₂, 1mM EDTA 和 0.4mM NADP) 混合。测量在光度计内在 340nm 处实施。在已经记录基础吸收率后,通过添加 2 单位葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(来自肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*), Boehringer Mannheim) 启动酶反应。吸收率变化的原因是葡萄糖-6-磷酸与 NADP 等摩尔地转换成 6-磷酸葡萄糖酸和 NADPH,在以上提及的波长上记录 NADPH 的形成。该反应受到监测直至达到平台期。该测量的结果给出在水解产物内的葡萄糖-6-磷酸含量。水解的程度从相同水解产物相对于所释放的葡萄糖的含量而确定。水解的程度用于建立葡萄糖-6-磷酸含量与来自新鲜重量内已水解淀粉的百分数的联系。为此目的,10 μ 1 水解产物用 10 μ 10.7M NaOH 中和并随后用水 1:100 稀释。4 μ 1 这种稀释物用 196 μ 1 测量缓冲液(100mM 咪唑 pH6.9; 5mM MgCl₂, 1mM ATP, 0.4mM NADP) 处理并用于测定基础吸收率。反应通过添加 2 μ 1 酶混合物(测量缓冲液内的己糖激酶 1:10; 来自酵母的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 1:10) 并且在 340nm 处监测直至达到平台期。测量的原理与第一次反应的原理相对应。

[0342] 本次测量的结果给出在水解期间从原材料内存在的淀粉中已经释放的葡萄糖的

量（单位 mg）。

[0343] 此后，将两次测量的结果彼此建立联系以便表示为每毫克已水解淀粉的葡萄糖-6-磷酸盐含量。与建立葡萄糖-6-磷酸的量与样品鲜重的联系不同，本计算仅建立葡萄糖-6-磷酸的量与淀粉内如此部分的联系，其中所述的部分已经被充分水解以产生葡萄糖并可以因此还视作葡萄糖-6-磷酸的来源。

[0344] 15) 测定抗性淀粉含量（可消化性）

[0345] 抗性淀粉含量通过以 Englyst 等 (1992, Europ. J. of Clinical Nutrition, 46/2 : 33-50) 所述方法为基础并具有如下所述修改的方法而测定。

[0346] 酶溶液通过在 37℃ 于 8ml 水内 10 分钟提取 1.2g 胰酶 (Merck) 而制备。在离心 (3000 转 / 分钟 ; 室温, 10 秒), 5.4ml 上清液与 84U 淀粉糖苷酶 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) 混合并用水补足至终体积 7ml。平行地, 将每份样品 (鲜重) 10mg 稻淀粉在 2ml 反应容器内与 0.75ml 乙酸钠缓冲液 (0.1M 乙酸钠, pH5.2 ; 4mM CaCl_2) 混合并在 37℃ 温育 5 分钟以使混合物温暖。

[0347] 淀粉的消化通过向每种混合物添加 0.25ml 酶溶液而启动。对照混合物含有水以替代所添加酶溶液。100 μl 等分试样在 20、60 和 120 分钟后取出并直接添加至 4 倍体积乙醇内, 因而使酶灭活。这种稀释物用于测量葡萄糖含量。

[0348] 为此目的, 2 μl 稀释的样品与 200 μl 测量缓冲液 (100mM 咪唑 / HCl pH6.9、5mM MgCl_2 、1mM ATP、2mM NADP) 混合, 并在 340nm 处测量样品的吸收率。葡萄糖的转化通过添加 2 μl 酶混合物 (10 μl 己糖激酶、10 μl 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、80 μl 测量缓冲液) 而启动, 并且随后在 340nm 处测定 NADP 向 NADPH 的等摩尔转换直至达到平台期。在测量的葡萄糖量与 (从鲜重减去水含量中计算的) 淀粉干重之间的联系产生在适当时间后作为葡萄糖释放的样品的比例。

[0349] 抗性淀粉的量计算如下 :

[0350] $\text{RS}[\%] = 100 \times \text{释放的葡萄糖 (mg)} / \text{淀粉干重 (mg)}$

[0351] 实施例

[0352] 实施例 1 : IIa 用于在稻内表达小麦淀粉合酶 II 的载体

[0353] 使用稻转化载体 IR103-123 (在 W005/030941 内描述) 和质粒 CF31-191 (在 W097/45545 内以 pTaSS1 名称描述)。稻转化载体 IR103-123 的作用是通过来自稻的球蛋白启动子使靶基因胚乳特异性表达。在第一步骤 a) 中, 载体 IR103-123 用限制酶 EcoRV 和 XhoI 进行线性化。质粒 CF31-191 含有来自普通小麦的淀粉合酶 II (SSII) 的 cDNA。在第二步骤 a) 中, 使用限制酶 EcoRV 和 XhoI 从质粒 CF31-191 中切下 SSII 的 cDNA。连接在步骤 a) 内已线性化的载体 IR103-123 与在步骤 a) 内获得的质粒 CF31-191 的片段, 产生载体 AH32-191。

[0354] 实施例 2 : 产生具有增加的 SSII 活性的遗传修饰的稻植物

[0355] 为产生具有增加的 SSII 活性 (SSII) 的遗传修饰的稻植物, 质粒 AH32-191 的 T-DNA 如 Ishida 所述 (1996, Nature Biotechnology 14(6) : 745-750) 通过农杆菌转移至稻植物内。SSII 活性增加通过酶谱法测定。

[0356] 图 1 显示与野生型相比, 三种用于测定 SSII 活性的遗传修饰的稻品系的酶谱。所用的材料是从野生型和相应遗传修饰系的不成熟谷粒 (开始开花后 15 日) 中提取的量相

同的总蛋白质。将来自遗传修饰系的蛋白质提取物逐步稀释,并且活性增加的程度通过目视比较这些泳道内与野生型泳道内 SSII 带的密度而确定。系 GAOS0353-01502 的 SSII 活性高达野生型的谷粒内 SSII 活性的 10 倍,而系 GAOS0353-01301 的 SSII 活性高达野生型的谷粒内 SSII 活性的 6 倍并且系 GAOS0353-02301 的 SSII 活性高达野生型的谷粒内 SSII 活性的 2 倍。

[0357] 实施例 3:来自具有不同 SSII 活性水平的不同转基因系的稻淀粉的特征

[0358] 稻粒从如实施例 2 内所产生的植物内收获并随后通过上述方法(“4)加工稻粒”)加工以产生米粉。米粉内的淀粉成分随后通过上述方法(“7)测定 C6 位置上磷酸盐含量(C6-P 含量)”)对 C6 位置上的磷酸盐含量进行分析。

[0359] 表 1:SSII 活性增加的稻淀粉的特征

[0360]

系	SS2 表达(野生型的倍数)	C-6-P(野生型的%)
野生型	1	100
GAOS0353-01301	6	184
GAOS0353-02501	10	358

[0361] 表 1:与野生型(wt)相比,SSII 活性增加的稻淀粉的特征。所示数据显示 SSII 活性(作为野生型的倍数)和淀粉结合性葡萄糖-6-磷酸(C-6-P)的含量。

[0362] 可以看到淀粉合酶 II 的活性水平与 C6 位置上的磷酸盐含量相关。系 GAOS0353-01301 的 SSII 表达增加 6 倍,而 C-6-P 含量与野生型相比几乎加倍。最明显的效应由系 GAOS0353-02501 显示,它的 SSII 表达增加 10 倍,而 C-6-P 含量与野生型(100%)相比增加超过 350%。

[0363] 实施例 4:具有不同 SSII 表达水平的不同遗传修饰系的稻粒、稻淀粉和米粉的特性列表

[0364] 表 2:与野生型相比,来自具有改良 SSII 表达的稻粒内稻淀粉的特性:

[0365]

系	SSII 表达 (×野生型的倍 数)	增加的 AP-SC 范围	减少的 AP-SC 范围	C6P(nmol/ mg 淀粉)	DSC T _{起始}	DSC T _{峰值}	DSC T _{起始} (%)	DSC T _{峰值} (%)
野生型	1	x	x	0.50	64.1	69.5	100	100
GAOS0353 -02301	2	10-26	6-9	0.74	76.2	80.8	119	116
GAOS0353 -01301	6	11-29	6-9	0.92	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GAOS0353 -01502	10	12-31	6-10	1.80	77.6	82.5	121	119

[0366] 给出的数据是不成熟稻粒内的 SSII 活性（作为野生型的倍数）、显现超过野生型的改性淀粉内的支链淀粉侧链淀粉的范围（AP-SC）、磷酸盐含量（C6P）和以℃和%为单位的稻淀粉 DSC 值（与野生型相比）。（n. d. = 未检测）。

[0367] 与野生型相比，作为 SSII 活性水平函数的来自遗传修饰系的淀粉的 C6 位置磷酸盐含量显著增加。

[0368] 表 3：与野生型相比，来自具有改良 SSII 表达的稻粒中的米粉的特性：

[0369]

系	SSII 表达 (野生型的倍数)	DSC T _{起始}	DSC T _{峰值}	DSC T _{起始} (%)	DSC T _{峰值} (%)	直链淀粉 (%)	直链淀粉 (% WT)
野生型	1	65.6	71.5	100	100	14.0	100
GAOS 0353- 02301	2	77.4	82.0	118	115	12.5	89
GAOS 0353- 01301	6	77.6	82.5	118	115	12.5	89
GAOS 0353- 01502	10	78.8	84.6	120	118	11.7	84

[0370] 给出的数据是不成熟稻粒内的 SSII 表达（作为野生型的倍数）、以℃和以野生型百分数（%）为单位的米粉 DSC 值的变化。

[0371] 遗传修饰系的表现直链淀粉含量仅显示轻微的改变；它们均比野生型的表现直链淀粉含量略低。

[0372] 作为 SSII 活性函数的米粉的热稳定性和从米粉中分离的淀粉的热稳定性在不同遗传修饰系内逐渐增加（比较图 1 和表 1 和 2）。SSII 活性增加 10 倍的系显示最大程度的 DSC T- 起始和 DSC T- 峰值增加。以野生型为基础，数据在每种情况下是约 120%。

[0373] 实施例 5：与野生型（WT）相比，不同遗传修饰的稻系在活性水平和支链淀粉侧链方面的比较。

[0374] 表 4 显示与野生型相比的不同遗传修饰的稻的支链淀粉侧链分布。所示的曲线是已分析葡聚糖的链长度（单位 DP = 聚合程度）对全部已测试 DP 总数内特定 DP 的百分数作图的结果。

[0375] 表 4：与野生型（WT）米粉相比，遗传修饰系的支链淀粉的侧链曲线分布，以不同聚合程度分成四组。

[0376]

聚合程度 (dp)	% 基于野生型米粉		
	GAOS0353-2301	GAOS 0253-1301	GAOS 0253-1502
dp 6-10	81.4	66.3	47.0
dp20-25	108.7	115.7	123.8

[0377] 可以看到增加 SSII 活性伴随着支链淀粉侧链分布上不相关联的变化。SSII 活性的增加导致 DP6-10 之间的侧链逐步不同程度地减少以及 DP20-25 的侧链增加。

[0378] 实施例 6 : 已烹煮米粒的质构

[0379] 不同遗传修饰系的米粒和相对应野生型的米粒烹煮持续至多到所讨论的最佳烹煮时间（见方法“测定已烹煮米粒的特征”）。质构在烹煮后已于 4℃ 贮藏 22 小时（表 5a，所示数据是每份样品 10 个量值（在每种情况下 3 粒米）的平均值）的米粒上或在新鲜烹煮的米粒（烹煮后约 1 小时）上或已经在冷却下贮藏（4℃，22 小时）并随后在烤箱或微波炉内再加热的米粒（表 5b）上进行测定。

[0380] 表 5a : 烹煮后 4℃ 贮藏 22 小时的米粒的质构

[0381]

样品	力 2(单位为 g 的粘度)	力 1(单位为 g 的米粒硬度)
平均野生型 M202	-239.5	1164.6
平均 GAOS0353-02301	-137.0	1393.0
平均 GAOS0353-01301	-82.0	1775.4
平均 GAOS0353-01502	-18.3	1735.3

[0382] 已烹煮米粒的粘度随着 SSII 活性的增加而下降（表 5a）。在 GAOS0353-02301 系内粘度减少约一半，在 GAOS0353-01301 系内粘度减少约 3 倍，并且在 GAOS0353-01502 系内粘度减少约 13 倍。

[0383] 表 5b : 新鲜烹煮或再加热的米粒的质构

[0384]

试验米粒的加工	样品	粘度(g)	粘度(%)
新鲜烹煮	野生型 M202	235.8	100.0
	GAOS0353-01502	121.4	51.5
烤箱内再加热 80℃ / 5 分钟	野生型 M202	230.5	100.0
	GAOS0353-01502	95.0	41.2
微波炉内再加热 600W / 3 分钟	野生型 M202	182.2	100.0
	GAOS0353-01502	85.3	46.8

[0385] 汇总在烹煮及 (4℃ 贮藏 22 小时后) 在烤箱或微波炉内再加热之后测定已烹煮米粒的粘度的数据。在每种加工变例中, GAOS0353-01502 的粘度明显低于野生型的粘度。

[0386] 实施例 7 : 测定未烹煮米粒和已烹煮米粒的米粒尺度

[0387] 遗传修饰系和相对应野生型的未烹煮米粒和已烹煮米粒的米粒尺度使用 SigmScan 软件测定。结果和从所述结果中衍生的参数示于表 6a 和 6b 内。

[0388] 表 6a : 测定未烹煮米粒和已烹煮米粒的米粒尺度的数据汇总

[0389]

	野生型	GAOS0353-	GAOS0353-	GAOS0353-
--	-----	-----------	-----------	-----------

[0390]

		02301	01301	01502
Lu(mm)	5.36	4.81	4.94	4.87
Wu(mm)	2.60	2.58	2.65	2.50
Lc(mm)	7.59	7.50	8.18	7.87
Wc(mm)	3.74	3.61	3.23	3.26
ER	1.41	1.56	1.65	1.62
Lc/Wc	2.05	2.10	2.56	2.43
CDC	2.20	2.95	4.92	4.39

[0391] 所示数据是 30 个独立量值的平均值 (L = 粒长 ; W = 粒宽 ; u = 未烹煮 ; c = 烹煮 ; ER = 延伸率 (Lc/Lu) ; CDC = 尺度变化系数 (Lc/Lu) / (Wc/Wu))。

[0392] 表 6b : 与野生型相比的米粒尺度的相对变化

[0393]

	野生型	GAOS0353- 02301	GAOS0353- 01301	GAOS0353- 01502
Lu	0	-10.3	-7.8	-9.1
Wu	0	-0.8	1.9	-3.8
Lc	0	-1.2	7.8	3.7
Wc	0	-3.5	-13.6	-12.8
ER	0	10.6	17.0	14.9
Lc/Wc	0	2.4	24.9	18.5
CDC	0	34.1	123.6	99.5

[0394] 全部数据均为百分数： $\% \text{变化} = (\text{样品} - \text{野生型}) / \text{野生型} * 100$ 。

[0395] 在已烹煮米粒的米粒尺度方面，稻内增加的 SSII 活性导致米粒在烹煮期间沿纵轴显著较高地延伸。从增加的延伸率 (ER) 和增加的长度 / 宽度比 (Lc/Wc) 中，这是显而易见的。活性增加 2 倍的系 (GAOS0353-02301) 在上述参数上再次显示较少程度的变化，而 SSII 活性增加 6 倍 (GAOS0353-01301) 或 10 倍 (GAOS0353-01502) 的系具有更明显的表现。

[0396] 实施例 8：通过快速粘度分析仪 (RVA) 分析米粉的物理化学特征

[0397] 如方法“通过 RVA 分析米粉”内所述，对来自不同遗传修饰系的米粉和来自相应野生型的米粉分析它们的物理化学特征。

[0398] 在定义的温度和剪切程序内记录米粉 / 水混悬液的粘度。不同系的曲线和分析数据在表 7a+b 内显示。

[0399] 表 7a：在测定米粉的粘度特征中所得数据的汇总，其中所述的米粉由来自具有不同 SSII 活性的稻粒制成。

[0400]

样品:	野生型	353-02301	353-01301	353-01502
峰值粘度(cP)	4767	4626	4322	3787
低谷粘度(cP)	2122	1755	1647	1515
破损值(cP)	2645	2871	2675	2272
终粘度(cP)	2934	2338	2249	2065
回值(cP)	812	583	602	550
回值 稻(cP)	-1833	-2288	-2073	-1722
峰值时间(分钟)	5.36	5.02	5.04	4.56
成糊温度(°C)	72.8	82.3	81.7	83.9
成糊时间(分钟)	2.56	3.36	3.4	3.48
峰值时间-成糊时间(秒)	144.0	73.2	76.8	64.8

[0401] 表 7b :与野生型相比的 RVA 的相对变化

[0402]

样品:	野生型	353-02301	353-01301	353-01502
峰值粘度(cP)	0.0	-3.0	-9.3	-20.6
低谷粘度(cP)	0.0	-17.3	-22.4	-28.6

[0403]

破损值(cP)	0.0	8.5	1.1	-14.1
终粘度(cP)	0.0	-20.3	-23.3	-29.6
回值(cP)	0.0	-28.2	-25.9	-32.3
回值稻(cP)	0.0	24.8	13.1	-6.1
峰值时间(分钟)	0.0	-9.5	-9.5	-12.0
成糊温度(°C)	0.0	13.0	12.2	15.2
成糊时间(分钟)	0.0	32.8	31.3	35.9
峰值时间-成糊时间(分钟)	0.0	-49.2	-46.7	-55.0

[0404] (全部数据均为百分数)%变化=(样品-野生型)/野生型*100

[0405] 来自野生型和遗传修饰系的米粉的粘度曲线在多个参数上不同。遗传修饰的样品在明显较晚的时间点上开始成糊,这可以从增加的“成糊温度”中看出。随后粘度发展进行得非常迅速直至峰值粘度,如可以从遗传修饰的样品的较短“峰值时间”中看出。全部其它粘度参数(峰值、低谷、终点)在遗传修饰的样品的例子中比野生型的例子内低。必须提到的是超过野生型的变化程度与 SSII 活性的水平相关。具有最高 SSII 活性的系(GAOS0353-1502)显示最低的峰粘度、低谷粘度和终粘度,具有超过 10℃ 的值,这是成糊温度上的最高差异。

[0406] 另一个非常明显的方面是遗传修饰的样品的粘度快速发展,这在成糊起始时间与峰值粘度时间间极其短暂的间隔上反映。这个参数再次显示对 SSII 活性增加程度影响的明显依赖性。

[0407] 实施例 9 :分离的淀粉的可消化性

[0408] 与野生型相比,转化体 GAOS353-2501 和 GAOS353-1301 的淀粉显示明显减少的可消化性。

[0409] 相对于野生型,在转化体 GAOS353-1301 的例子中分离的淀粉的酶降解在 20 分钟后是 53%,在 60 分钟后是 67%并且在 120 分钟后是 84%。

[0410] 相对于野生型,在转化体 GAOS353-2501 的例子中分离的淀粉的酶降解在 20 分钟后是 39%,在 60 分钟后是 49%并且在 120 分钟后是 68% (图 3)。

[0411] 表 8 :稻淀粉的 RS 含量

[0412]

	RS 含量(%)
野生型	6.2
353-2501	35.8
353-1301	20.8

序列表

<110> 拜耳作物科学股份公司 (Bayer CropScience GmbH)

<120> 植物内淀粉合酶的过量表达

<130>BCS 05-5006-PCT

<150>EP05090220.4

<151>2005-07-22

<150>US 60/701,764

<151>2005-07-22

<150>EP05090349.1

<151>2005-12-23

<150>US 60/757,216

<151>2006-01-06

<150>EP06090003.2

<151>2006-01-06

<150>US 60/757,810

<151>2006-01-10

<160>5

<170>PatentIn 版本 3.1

<210>1

<211>3006

<212>DNA

<213> 普通小麦 (*Triticum aestivum*)

<220>

<221>CDS

<222> (227).. (2623)

<223>

<220>

<221> 区域 1

<222> (1190).. (1279)

<223>

<220>

<221> 区域 2

<222> (1493).. (1612)

<223>

<220>

<221> 区域 3

<222> (2147).. (2350)

<223>

<300>

<302> 编码来自小麦的参与淀粉合成的酶的核酸分子

<308> Derwent/AAV01528

<309> 1998-05-21

<310> wo 97 45545

<311> 1997-05-28

<312> 1997-12-04

<313> (1).. (2825)

<400> 1

ctccaccgcg gtggcgcccg ctctagaact agtggatccc ccgggctgca ggaattcggc 60

acgagcttcg gcctgacccc gttegtttac cccacacacag agcacactcc agtccagtcc 120

agcccactgc caccgcgcta ctctccactc ccactgccac cacctccgcc tgcgccgcgc 180

tctgggcgga ccaaccgcg aaccgtacca tctcccgccc cgatcc atg tcg tcg 235

Met Ser Ser

1

gcg gtc gcg tcc gcc gca tcc ttc ctc gcg ctc gcg tca gcc tcc ccc 283

Ala Val Ala Ser Ala Ala Ser Phe Leu Ala Leu Ala Ser Ala Ser Pro

5

10

15

ggg aga tca cgc agg cgg gcg agg gtg agc gcg cag cca ccc cac gcc 331

Gly Arg Ser Arg Arg Arg Ala Arg Val Ser Ala Gln Pro Pro His Ala

20

25

30

35

ggg gcc ggc agg ttg cac tgg ccg ccg tgg ccg ccg cag cgc acg gct 379

Gly	Ala	Gly	Arg	Leu	His	Trp	Pro	Pro	Trp	Pro	Pro	Gln	Arg	Thr	Ala				
				40				45											
cgc	gac	gga	gct	gtg	gcg	gcg	ctc	gcc	gcc	ggg	aag	aag	gac	gcg	ggg	427			
Arg	Asp	Gly	Ala	Val	Ala	Ala	Leu	Ala	Ala	Gly	Lys	Lys	Asp	Ala	Gly				
				55				60				65							
atc	gac	gac	gcc	gcc	gcg	tcc	gtg	agg	cag	ccc	cgc	gca	ctc	cgc	ggt	475			
Ile	Asp	Asp	Ala	Ala	Ala	Ser	Val	Arg	Gln	Pro	Arg	Ala	Leu	Arg	Gly				
				70				75				80							
ggc	gcc	gcc	acc	aag	gtc	gcg	gag	cga	agg	gat	ccc	gtc	aag	acg	ctc	523			
Gly	Ala	Ala	Thr	Lys	Val	Ala	Glu	Arg	Arg	Asp	Pro	Val	Lys	Thr	Leu				
				85				90				95							
gac	cgc	gac	gcc	gcg	gaa	ggc	ggc	ggg	ccg	tcc	ccg	ccg	gca	gcg	agg	571			
Asp	Arg	Asp	Ala	Ala	Glu	Gly	Gly	Gly	Pro	Ser	Pro	Pro	Ala	Ala	Arg				
				100				105				110				115			
cag	gac	gcc	gcc	cgt	ccg	ccg	agt	atg	aac	ggc	atg	ccg	gtg	aac	ggc	619			
Gln	Asp	Ala	Ala	Arg	Pro	Pro	Ser	Met	Asn	Gly	Met	Pro	Val	Asn	Gly				
				120				125				130							
gag	aac	aaa	tct	acc	ggc	ggc	ggc	ggc	gcg	act	aaa	gac	agc	ggg	ctg	667			
Glu	Asn	Lys	Ser	Thr	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Thr	Lys	Asp	Ser	Gly	Leu				
				135				140				145							
ccc	acg	ccc	gca	cgc	gcg	ccc	cat	ccg	tcg	acc	cag	aac	aga	gca	ccg	715			
Pro	Thr	Pro	Ala	Arg	Ala	Pro	His	Pro	Ser	Thr	Gln	Asn	Arg	Ala	Pro				
				150				155				160							
gtg	aac	ggt	gaa	aac	aaa	gct	aac	gtc	gcc	tcg	ccg	ccg	acg	agc	ata	763			
Val	Asn	Gly	Glu	Asn	Lys	Ala	Asn	Val	Ala	Ser	Pro	Pro	Thr	Ser	Ile				
				165				170				175							
gcc	gag	gcc	gcg	gct	tcg	gat	tcc	gca	gct	acc	att	tcc	atc	agc	gac	811			
Ala	Glu	Ala	Ala	Ala	Ser	Asp	Ser	Ala	Ala	Thr	Ile	Ser	Ile	Ser	Asp				
				180				185				190				195			
aag	gcg	ccg	gag	tcc	gtt	gtc	cca	gct	gag	aag	acg	ccg	ccg	tcg	tcc	859			
Lys	Ala	Pro	Glu	Ser	Val	Val	Pro	Ala	Glu	Lys	Thr	Pro	Pro	Ser	Ser				
				200				205				210							
ggc	tea	aat	ttc	gag	tcc	tcg	gcc	tct	gct	ccc	ggg	tct	gac	act	gtc	907			
Gly	Ser	Asn	Phe	Glu	Ser	Ser	Ala	Ser	Ala	Pro	Gly	Ser	Asp	Thr	Val				
				215				220				225							
agc	gac	gtg	gaa	caa	gaa	ctg	aag	aag	ggt	gcg	gtc	gtt	gtc	gaa	gaa	955			
Ser	Asp	Val	Glu	Gln	Glu	Leu	Lys	Lys	Gly	Ala	Val	Val	Val	Glu	Glu				
				230				235				240							
gct	cca	aag	cca	aag	gct	ctt	tcg	ccg	cct	gca	gcc	ccc	gct	gta	caa	1003			

Ala	Pro	Lys	Pro	Lys	Ala	Leu	Ser	Pro	Pro	Ala	Ala	Pro	Ala	Val	Gln	
245				250				255								
gaa	gac	ctt	tgg	gat	ttc	aag	aaa	tac	att	ggt	ttc	gag	gag	ccc	gtg	1051
Glu	Asp	Leu	Trp	Asp	Phe	Lys	Lys	Tyr	Ile	Gly	Phe	Glu	Glu	Pro	Val	
260				265				270				275				
gag	gcc	aag	gat	gat	ggc	cgg	gct	gtc	gca	gat	gat	gcg	ggc	tcc	ttt	1099
Glu	Ala	Lys	Asp	Asp	Gly	Arg	Ala	Val	Ala	Asp	Asp	Ala	Gly	Ser	Phe	
				280				285				290				
gaa	cac	cac	cag	aat	cac	gac	tcc	gga	cct	ttg	gca	ggg	gag	aat	gtc	1147
Glu	His	His	Gln	Asn	His	Asp	Ser	Gly	Pro	Leu	Ala	Gly	Glu	Asn	Val	
				295				300				305				
atg	aac	gtg	gtc	gtc	gtg	gct	gct	gag	tgt	tct	ccc	tgg	tgc	aaa	aca	1195
Met	Asn	Val	Val	Val	Val	Ala	Ala	Glu	Cys	Ser	Pro	Trp	Cys	Lys	Thr	
				310				315				320				
ggt	ggt	ctg	gga	gat	gtt	gcg	ggt	gct	ctg	ccc	aag	gct	ttg	gca	aag	1243
Gly	Gly	Leu	Gly	Asp	Val	Ala	Gly	Ala	Leu	Pro	Lys	Ala	Leu	Ala	Lys	
				325				330				335				
aga	gga	cat	cgt	gtt	atg	gtt	gtg	gta	cca	agg	tat	ggg	gac	tat	gaa	1291
Arg	Gly	His	Arg	Val	Met	Val	Val	Val	Pro	Arg	Tyr	Gly	Asp	Tyr	Glu	
340				345				350				355				
gaa	gcc	tac	gat	gtc	gga	gtc	cga	aaa	tac	tac	aag	gct	gct	gga	cag	1339
Glu	Ala	Tyr	Asp	Val	Gly	Val	Arg	Lys	Tyr	Tyr	Lys	Ala	Ala	Gly	Gln	
				360				365				370				
gat	atg	gaa	gtg	aat	tat	ttc	cat	gct	tat	atc	gat	gga	gtt	gat	ttt	1387
Asp	Met	Glu	Val	Asn	Tyr	Phe	His	Ala	Tyr	Ile	Asp	Gly	Val	Asp	Phe	
				375				380				385				
gtg	ttc	att	gac	gct	cct	ctc	ttc	cga	cac	cgt	cag	gaa	gac	att	tat	1435
Val	Phe	Ile	Asp	Ala	Pro	Leu	Phe	Arg	His	Arg	Gln	Glu	Asp	Ile	Tyr	
				390				395				400				
ggg	ggc	agc	aga	cag	gaa	att	atg	aag	cgc	atg	att	ttg	ttc	tgc	aag	1483
Gly	Gly	Ser	Arg	Gln	Glu	Ile	Met	Lys	Arg	Met	Ile	Leu	Phe	Cys	Lys	
405				410				415								
gcc	gct	gtt	gag	gtt	cca	tgg	cac	gtt	cca	tgc	ggc	ggt	gtc	cct	tat	1531
Ala	Ala	Val	Glu	Val	Pro	Trp	His	Val	Pro	Cys	Gly	Gly	Val	Pro	Tyr	
420				425				430				435				
ggg	gat	gga	aat	ctg	gtg	ttt	att	gca	aat	gat	tgg	cac	acg	gca	ctc	1579
Gly	Asp	Gly	Asn	Leu	Val	Phe	Ile	Ala	Asn	Asp	Trp	His	Thr	Ala	Leu	
				440				445				450				
ctg	cct	gtc	tat	ctg	aaa	gca	tat	tac	agg	gac	cat	ggt	ttg	atg	cag	1627

Leu	Pro	Val	Tyr	Leu	Lys	Ala	Tyr	Tyr	Arg	Asp	His	Gly	Leu	Met	Gln	
455				460				465								
tac	act	cgg	tcc	att	atg	gtg	ata	cat	aac	atc	gct	cac	cag	ggc	cgt	1675
Tyr	Thr	Arg	Ser	Ile	Met	Val	Ile	His	Asn	Ile	Ala	His	Gln	Gly	Arg	
470				475				480								
ggc	cct	gta	gat	gaa	ttc	ccg	ttc	acc	gag	ttg	cct	gag	cac	tac	ctg	1723
Gly	Pro	Val	Asp	Glu	Phe	Pro	Phe	Thr	Glu	Leu	Pro	Glu	His	Tyr	Leu	
485				490				495								
gaa	cac	ttc	aga	ctg	tac	gac	ccc	gtg	ggt	ggt	gaa	cac	gcc	aac	tac	1771
Glu	His	Phe	Arg	Leu	Tyr	Asp	Pro	Val	Gly	Gly	Glu	His	Ala	Asn	Tyr	
500				505				510				515				
ttc	gcc	gcc	ggc	ctg	aag	atg	gcg	gac	cag	gtt	gtc	gtg	gtg	agc	ccc	1819
Phe	Ala	Ala	Gly	Leu	Lys	Met	Ala	Asp	Gln	Val	Val	Val	Val	Ser	Pro	
520				525				530								
ggg	tac	ctg	tgg	gag	ctg	aag	acg	gtg	gag	ggc	ggc	tgg	ggg	ctt	cac	1867
Gly	Tyr	Leu	Trp	Glu	Leu	Lys	Thr	Val	Glu	Gly	Gly	Trp	Gly	Leu	His	
535				540				545								
gac	atc	ata	cgg	cag	aac	gac	tgg	aag	acc	cgc	ggc	atc	gtc	aac	ggc	1915
Asp	Ile	Ile	Arg	Gln	Asn	Asp	Trp	Lys	Thr	Arg	Gly	Ile	Val	Asn	Gly	
550				555				560								
atc	gac	aac	atg	gag	tgg	aac	ccc	gag	gtg	gac	gcc	cac	ctc	aag	tcg	1963
Ile	Asp	Asn	Met	Glu	Trp	Asn	Pro	Glu	Val	Asp	Ala	His	Leu	Lys	Ser	
565				570				575								
gac	ggc	tac	acc	aac	ttc	tcc	ctg	agg	acg	ctg	gac	tcc	ggc	aag	cgg	2011
Asp	Gly	Tyr	Thr	Asn	Phe	Ser	Leu	Arg	Thr	Leu	Asp	Ser	Gly	Lys	Arg	
580				585				590				595				
cag	tgc	aag	gag	gcc	ctg	cag	cgc	gag	ctg	ggc	ctg	cag	gtc	cgc	gcc	2059
Gln	Cys	Lys	Glu	Ala	Leu	Gln	Arg	Glu	Leu	Gly	Leu	Gln	Val	Arg	Ala	
600				605				610								
gac	gtg	ccg	ctg	ctc	ggc	ttc	atc	ggc	cgc	ctg	gac	ggg	cag	aag	ggc	2107
Asp	Val	Pro	Leu	Leu	Gly	Phe	Ile	Gly	Arg	Leu	Asp	Gly	Gln	Lys	Gly	
615				620				625								
gtg	gag	atc	atc	gcg	gac	gcc	atg	ccc	tgg	atc	gtg	agc	cag	gac	gtg	2155
Val	Glu	Ile	Ile	Ala	Asp	Ala	Met	Pro	Trp	Ile	Val	Ser	Gln	Asp	Val	
630				635				640								
cag	ctg	gtg	atg	ctg	ggc	acc	ggg	cgc	cac	gac	ctg	gag	agc	atg	ctg	2203
Gln	Leu	Val	Met	Leu	Gly	Thr	Gly	Arg	His	Asp	Leu	Glu	Ser	Met	Leu	
645				650				655								
cag	cac	ttc	gag	cgg	gag	cac	cac	gac	aag	gtg	cgc	ggg	tgg	gtg	ggg	2251

Gln	His	Phe	Glu	Arg	Glu	His	His	Asp	Lys	Val	Arg	Gly	Trp	Val	Gly	
660					665					670					675	
ttc	tcc	gtg	cgc	ctg	gcg	cac	cgg	atc	acg	gcg	ggg	gcg	gac	gcg	ctc	2299
Phe	Ser	Val	Arg	Leu	Ala	His	Arg	Ile	Thr	Ala	Gly	Ala	Asp	Ala	Leu	
				680						685					690	
ctc	atg	ccc	tcc	cgg	ttc	gag	ccg	tgc	ggg	ctg	aac	cag	ctc	tac	gcc	2347
Leu	Met	Pro	Ser	Arg	Phe	Glu	Pro	Cys	Gly	Leu	Asn	Gln	Leu	Tyr	Ala	
				695						700					705	
atg	gcc	tac	ggc	acc	gtc	ccc	gtc	gtg	cac	gcc	gtc	ggc	ggc	ctc	agg	2395
Met	Ala	Tyr	Gly	Thr	Val	Pro	Val	Val	His	Ala	Val	Gly	Gly	Leu	Arg	
				710						715					720	
gac	acc	gtg	ccg	ccg	ttc	gac	ccc	ttc	aac	cac	tcc	ggg	ctc	ggg	tgg	2443
Asp	Thr	Val	Pro	Pro	Phe	Asp	Pro	Phe	Asn	His	Ser	Gly	Leu	Gly	Trp	
							</									

<210>2

<211>799

<212>PRT

<213> 普通小麦

<400>2

Met	Ser	Ser	Ala	Val	Ala	Ser	Ala	Ala	Ser	Phe	Leu	Ala	Leu	Ala	Ser
1				5					10					15	
Ala	Ser	Pro	Gly	Arg	Ser	Arg	Arg	Arg	Ala	Arg	Val	Ser	Ala	Gln	Pro
				20					25					30	
Pro	His	Ala	Gly	Ala	Gly	Arg	Leu	His	Trp	Pro	Pro	Trp	Pro	Pro	Gln
				35					40					45	
Arg	Thr	Ala	Arg	Asp	Gly	Ala	Val	Ala	Ala	Leu	Ala	Ala	Gly	Lys	Lys
				50					55					60	
Asp	Ala	Gly	Ile	Asp	Asp	Ala	Ala	Ala	Ser	Val	Arg	Gln	Pro	Arg	Ala
65									70					75	80
Leu	Arg	Gly	Gly	Ala	Ala	Thr	Lys	Val	Ala	Glu	Arg	Arg	Asp	Pro	Val
									85					90	95
Lys	Thr	Leu	Asp	Arg	Asp	Ala	Ala	Glu	Gly	Gly	Gly	Gly	Pro	Ser	Pro
									100					105	110
Ala	Ala	Arg	Gln	Asp	Ala	Ala	Arg	Pro	Pro	Ser	Met	Asn	Gly	Met	Pro
									115					120	125
Val	Asn	Gly	Glu	Asn	Lys	Ser	Thr	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Thr	Lys
									130					135	140
Ser	Gly	Leu	Pro	Thr	Pro	Ala	Arg	Ala	Pro	His	Pro	Ser	Thr	Gln	Asn
145									150					155	160
Arg	Ala	Pro	Val	Asn	Gly	Glu	Asn	Lys	Ala	Asn	Val	Ala	Ser	Pro	Pro
									165					170	175
Thr	Ser	Ile	Ala	Glu	Ala	Ala	Ala	Ser	Asp	Ser	Ala	Ala	Thr	Ile	Ser
									180					185	190
Ile	Ser	Asp	Lys	Ala	Pro	Glu	Ser	Val	Val	Pro	Ala	Glu	Lys	Thr	Pro
									195					200	205
Pro	Ser	Ser	Gly	Ser	Asn	Phe	Glu	Ser	Ser	Ala	Ser	Ala	Pro	Gly	Ser
									210					215	220
Asp	Thr	Val	Ser	Asp	Val	Glu	Gln	Glu	Leu	Lys	Lys	Gly	Ala	Val	Val
225									230					235	240
Val	Glu	Glu	Ala	Pro	Lys	Pro	Lys	Ala	Leu	Ser	Pro	Pro	Ala	Ala	Pro
									245					250	255
Ala	Val	Gln	Glu	Asp	Leu	Trp	Asp	Phe	Lys	Lys	Tyr	Ile	Gly	Phe	Glu
									260					265	270
Glu	Pro	Val	Glu	Ala	Lys	Asp	Asp	Gly	Arg	Ala	Val	Ala	Asp	Asp	Ala
									275					280	285
Gly	Ser	Phe	Glu	His	His	Gln	Asn	His	Asp	Ser	Gly	Pro	Leu	Ala	Gly
									290					295	300

Glu Asn Val Met Asn Val Val Val Val Ala Ala Glu Cys Ser Pro Trp			
305	310	315	320
Cys Lys Thr Gly Gly Leu Gly Asp Val Ala Gly Ala Leu Pro Lys Ala			
	325	330	335
Leu Ala Lys Arg Gly His Arg Val Met Val Val Val Pro Arg Tyr Gly			
	340	345	350
Asp Tyr Glu Glu Ala Tyr Asp Val Gly Val Arg Lys Tyr Tyr Lys Ala			
	355	360	365
Ala Gly Gln Asp Met Glu Val Asn Tyr Phe His Ala Tyr Ile Asp Gly			
	370	375	380
Val Asp Phe Val Phe Ile Asp Ala Pro Leu Phe Arg His Arg Gln Glu			
385	390	395	400
Asp Ile Tyr Gly Gly Ser Arg Gln Glu Ile Met Lys Arg Met Ile Leu			
	405	410	415
Phe Cys Lys Ala Ala Val Glu Val Pro Trp His Val Pro Cys Gly Gly			
	420	425	430
Val Pro Tyr Gly Asp Gly Asn Leu Val Phe Ile Ala Asn Asp Trp His			
	435	440	445
Thr Ala Leu Leu Pro Val Tyr Leu Lys Ala Tyr Tyr Arg Asp His Gly			
	450	455	460
Leu Met Gln Tyr Thr Arg Ser Ile Met Val Ile His Asn Ile Ala His			
465	470	475	480
Gln Gly Arg Gly Pro Val Asp Glu Phe Pro Phe Thr Glu Leu Pro Glu			
	485	490	495
His Tyr Leu Glu His Phe Arg Leu Tyr Asp Pro Val Gly Gly Glu His			
	500	505	510
Ala Asn Tyr Phe Ala Ala Gly Leu Lys Met Ala Asp Gln Val Val Val			
	515	520	525
Val Ser Pro Gly Tyr Leu Trp Glu Leu Lys Thr Val Glu Gly Gly Trp			
	530	535	540
Gly Leu His Asp Ile Ile Arg Gln Asn Asp Trp Lys Thr Arg Gly Ile			
545	550	555	560
Val Asn Gly Ile Asp Asn Met Glu Trp Asn Pro Glu Val Asp Ala His			
	565	570	575
Leu Lys Ser Asp Gly Tyr Thr Asn Phe Ser Leu Arg Thr Leu Asp Ser			
	580	585	590
Gly Lys Arg Gln Cys Lys Glu Ala Leu Gln Arg Glu Leu Gly Leu Gln			
	595	600	605
Val Arg Ala Asp Val Pro Leu Leu Gly Phe Ile Gly Arg Leu Asp Gly			

<212>PRT

<213> 普通小麦

<400>4

Glu	Val	Pro	Trp	His	Val	Pro	Cys	Gly	Gly	Val	Pro	Tyr	Gly	Asp	Gly
1				5					10					15	
Asn	Leu	Val	Phe	Ile	Ala	Asn	Asp	Trp	His	Thr	Ala	Leu	Leu	Pro	Val
			20					25					30		
Tyr	Leu	Lys	Ala	Tyr	Tyr	Arg	Asp								
		35					40								

<210>5

<211>68

<212>PRT

<213> 普通小麦

<400>5

Gln	Asp	Val	Gln	Leu	Val	Met	Leu	Gly	Thr	Gly	Arg	His	Asp	Leu	Glu
1				5					10					15	
Ser	Met	Leu	Gln	His	Phe	Glu	Arg	Glu	His	His	Asp	Lys	Val	Arg	Gly
			20					25					30		
Trp	Val	Gly	Phe	Ser	Val	Arg	Leu	Ala	His	Arg	Ile	Thr	Ala	Gly	Ala
		35					40					45			
Asp	Ala	Leu	Leu	Met	Pro	Ser	Arg	Phe	Glu	Pro	Cys	Gly	Leu	Asn	Gln
		50				55					60				
Leu	Tyr	Ala	Met												
65															

测定遗传修饰系内的 SSII 活性

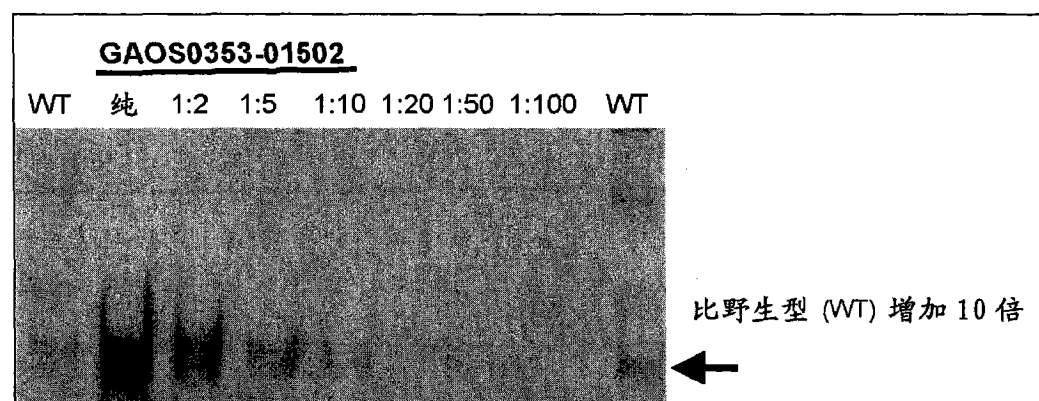
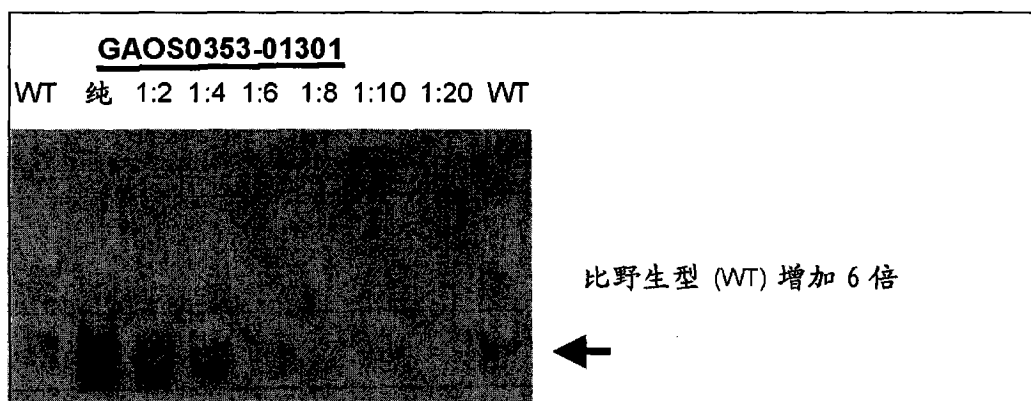
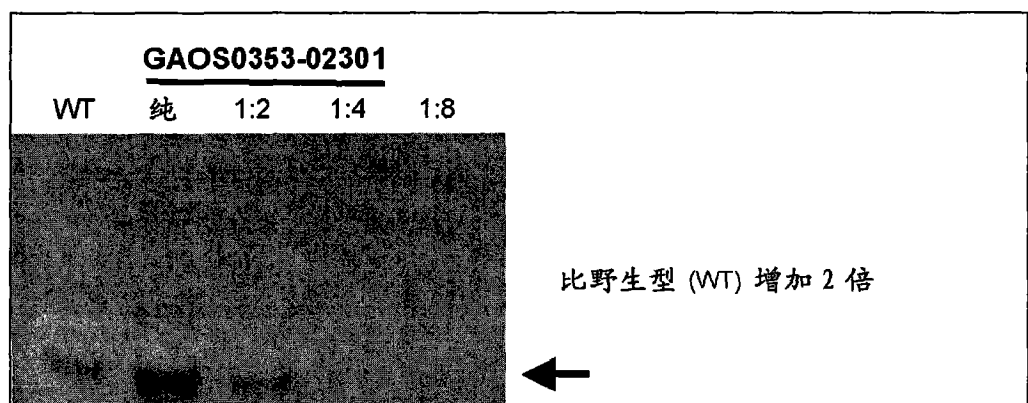


图 1

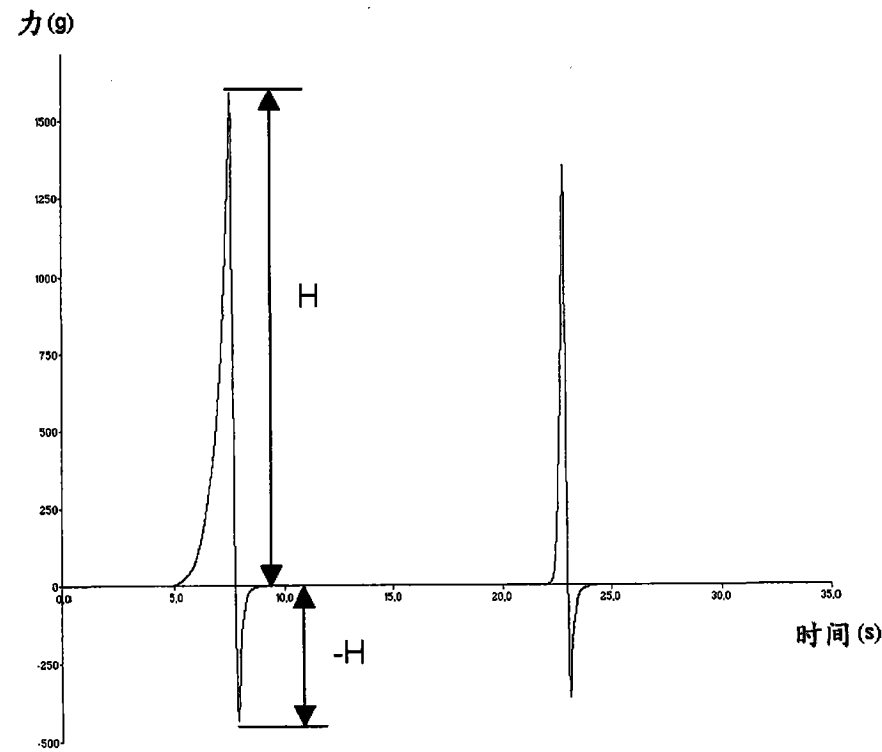


图 2 测定稻粒的质构

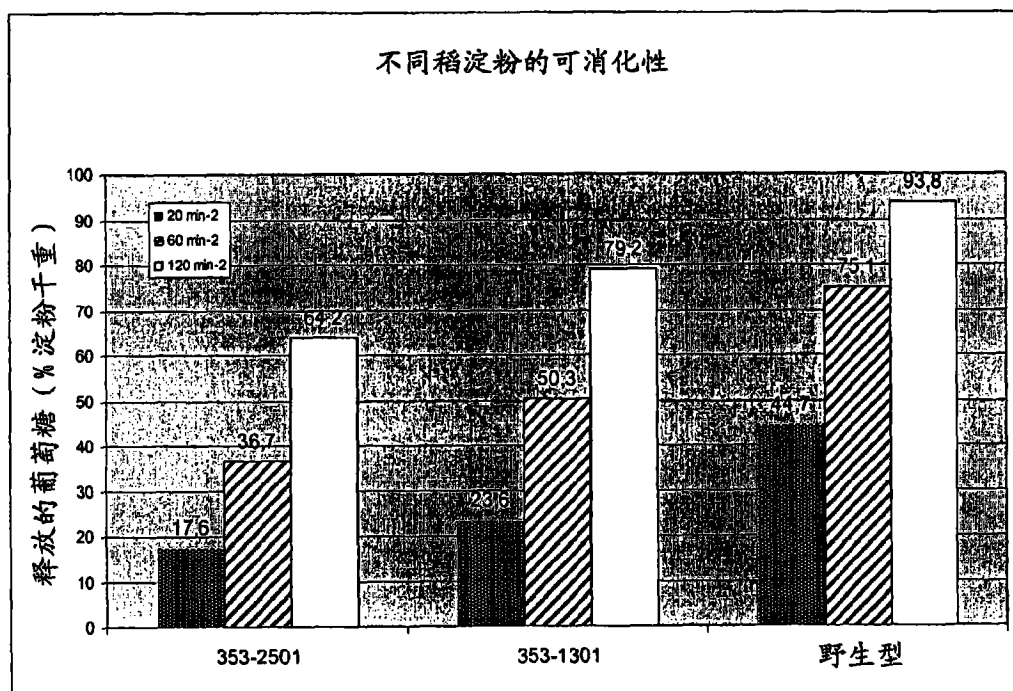


图 3 来自米粉中分离的淀粉在 20, 60 和 120 分钟后的可消化性
(测量为释放的葡萄糖占淀粉干重的百分数)
野生型与转化体 GAOS353-1301 和 GAOS353-2501 之间的比较