



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02820086.1

[43] 公开日 2005 年 7 月 6 日

[11] 公开号 CN 1635895A

[22] 申请日 2002.8.15 [21] 申请号 02820086.1
[30] 优先权
[32] 2001.10.10 [33] EP [31] 01124160.1
[86] 国际申请 PCT/EP2002/009148 2002.8.15
[87] 国际公布 WO2003/032713 英 2003.4.24
[85] 进入国家阶段日期 2004.4.9
[71] 申请人 雀巢产品有限公司
地址 瑞士沃韦
[72] 发明人 P·马拉奇尼 A·德塞
J·罗杰斯

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
代理人 黄革生 隗永良

权利要求书 1 页 说明书 11 页 序列表 10 页

[54] 发明名称 具有降低的 α -D-半乳糖苷酶活性的咖啡植物

[57] 摘要

本发明涉及通过降低 α -D-半乳糖苷酶活性的内源性水平对生咖啡豆中存在的半乳甘露聚糖的修饰。具体地说本发明涉及具有降低的 α -D-半乳糖苷酶活性的植物细胞和含有该植物细胞的植物。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 产生半乳甘露聚糖的咖啡植物细胞，其中半乳糖分支增加。
2. 根据权利要求 1 的咖啡植物细胞，其中 α -D-半乳糖苷酶活性的内源性水平降低。
3. 根据权利要求 1 或 2 的咖啡植物细胞，其包含转录为以下核糖核酸的核酸，其中所述的核糖核酸与由 α -D-半乳糖苷酶基因产生的 mRNA 或其部分反义。
4. 根据权利要求 3 的咖啡植物细胞，其中转录为以下核糖核酸的核酸位于组成型或诱导型启动子的调控下，其中所述的核糖核酸与由 α -D-半乳糖苷酶基因产生的 mRNA 或其部分反义。
5. 根据权利要求 5 的植物细胞，其中启动子为咖啡 csp1 启动子。
6. 包含根据以上权利要求中任意一项所述的植物细胞的咖啡植物。
7. 制备可溶性咖啡的方法，其包括使用来自根据权利要求 6 的咖啡植物的咖啡豆的步骤。
8. 增加咖啡可溶性的方法，其包括使用来自根据权利要求 6 的植物的咖啡豆的步骤。
9. 来自根据权利要求 6 的咖啡植物的咖啡豆的用途，用于制备可溶性咖啡。

具有降低的 α -D-半乳糖苷酶活性的咖啡植物

本发明涉及通过降低 α -D-半乳糖苷酶活性的内源性水平而修饰生咖啡豆中存在的半乳甘露聚糖。具体地说本发明涉及具有降低的 α -D-半乳糖苷酶活性的植物细胞和含有该植物细胞的植物。

在咖啡粒中，细胞壁多糖占成熟咖啡豆干重的大约 48%，其中甘露聚糖占大约一半。这些多糖的纯化形式基本上是不溶的并且具有很低的半乳糖分支 (Bradbury 和 Haliday, 农业食品化学杂志 (J. agric. Food Chem.) 38 (1990), 389-392)。认为甘露聚糖聚合物是在制备可溶性咖啡饮料时造成原来的生咖啡重量大量损失的主要原因。这些损失出现在最初提取时不溶解的物质仍为沉淀或在咖啡溶液贮存时产生沉淀和凝胶形式。甘露聚糖也显示是咖啡饮料放置期间形成混浊和沉淀的主要组分。

在一些植物中，认为甘露聚糖链上的半乳糖支化度部分取决于 α -D-半乳糖苷酶 (EC 3.2.1.22) 的活性。该酶能从贮存在植物种子贮藏组织或成熟的半乳甘露聚糖释放 α -1,6-连接的半乳糖单元 (Buckeridge 和 Dietrich, 植物科学 (Plant Sci.) 117 (1996), 33-43)。并且，在一些植物的胚乳或子叶组织中具有很低半乳糖/甘露糖比率的半乳甘露聚糖的累积显示出与这些组织成熟期间 α -D-半乳糖苷酶活性高峰相关，并且与其硬化和干燥有关 (Kontos 和 Spyropoulos, 植物生理生化 (Plant Physiol. Biochem.) 34 (1996), 787-793)。

α -D-半乳糖苷酶活性也与去除和半乳甘露聚糖多糖以 α -1,6-连接的半乳糖残基的能力有关，该活性导致所述聚合物的溶解性降低 (McCleary, Carb. Res. 92 (1981), 269-285)。此外，从半乳甘露聚糖去除半乳糖侧链似乎增强它与其它多糖相互作用的能力，例如与瓜尔豆中的黄原胶相互作用，伴随复合胶的形成。在成熟过程中，咖啡粒甘露聚糖上的半乳糖分支从未

成熟粒中的大约 40%降低到在成熟粒中以低水平存在。同时，在咖啡粒成熟过程中 α -D-半乳糖苷酶的酶活性增强。

已经克隆了咖啡的 α -D-半乳糖苷酶 cDNA (Zhu 和 Goldstein, 基因 (Gene) 140 (1994), 227-231)。根据由其获得的信息推断成熟咖啡豆 α -D-半乳糖苷酶由 363 个氨基酸组成，并合成为 420 个残基的前酶原。生物合成后，两个蛋白酶切割去除一个分泌信号 (38 个残基) 和另一个信号肽 (19 个残基)，以产生显示有活性酶的 N-末端氨基酸序列特征的蛋白质。

由于已知半乳甘露聚糖对可溶性咖啡的制备和/或耐贮性的作用，需要在本领域中改善这种状况。

因此，本发明的一个目的是提供制备可溶性咖啡的改良方法，并同时避免贮存咖啡溶液时公知的缺陷。

以上问题通过分别提供其中半乳甘露聚糖的半乳糖分支增加的咖啡植物细胞、咖啡植物而得到解决。

根据一个优选的实施方案本目的可通过降低 α -D-半乳糖苷酶活性的内源性水平而达到。这可使用本领域有用的技术通过突变和筛选的常规方法来达到。因此，可对植物细胞进行诱变处理，例如通过将它们暴露于化学品或辐射使细胞的 DNA 改变。对这样处理的细胞随后进行筛选以获得所需特性。

根据另一个优选的实施方案降低 α -D-半乳糖苷酶活性的内源性水平可通过将包含这样的核酸或其部分的构建体导入到咖啡植物细胞而获得，其中所述的核酸转录为 α -D-半乳糖苷酶基因编码的 mRNA 的反义拷贝。

为了这个目的， α -D-半乳糖苷酶基因编码的 mRNA 的反义拷贝可为能在生理条件下形成二聚体的任意核糖核酸，即在细胞的优势条件下其可与 α -D-半乳糖苷酶基因编码的 mRNA 杂交。因此，反义拷贝不必与相应的配对物 100%同源，但需要提供足够的结合用以形成二聚体。因此，通过核苷酸的替换、缺失和/或插入而修饰的反义拷贝 (和由它们转录的相应核酸) 均正好在本发明的范围内。在这方面，也值得一提的是反义拷贝可代表 α -D-半乳糖苷酶基因编码的 mRNA 的全长配对物，即它可提供与编码 α -D-半

乳糖苷酶多肽的 mRNA 基本上具有相同长度的 RNA 分子。另一方面,反义拷贝可只覆盖编码 α -D-半乳糖苷酶多肽的 mRNA 的一部分。

编码如下核糖核酸的核酸可处于组成型或诱导型启动子的控制下,其中所述核糖核酸与 α -D-半乳糖苷酶基因编码的 mRNA 或其部分反义,这样可便于控制反义 RNA 的水平。但是,在所有的情况下反义拷贝的水平应足够高以至于降低可到达核糖体的编码 α -D-半乳糖苷酶多肽的 mRNA 拷贝数。

根据一个优选的实施方案,使用的启动子是产生足够高转录率的咖啡 cspl 启动子。

因此本发明分别提供了这样的经修饰咖啡植物细胞和咖啡植物,其中 α -D-半乳糖苷酶活性水平降低使最终的半乳-甘露聚糖上半乳糖分支增加。根据一个优选的实施方案该植物为转基因植物,其细胞含有能提供来源于 α -D-半乳糖苷酶基因的 mRNA 或其部分的反义拷贝的构建体。

本发明也提供了制备可溶性咖啡的方法,它包括使用来源于显示有降低的 α -D-半乳糖苷酶活性的植物的咖啡豆的步骤。在这方面本发明也提供了通过增加半乳糖分支增加咖啡可溶性的方法。

本发明目的在于通过增加半乳-甘露聚糖的半乳糖分支增加咖啡半乳-甘露聚糖的可溶性。所采用的策略是降低 α -D-半乳糖苷酶活性的内源性水平,优选地通过在咖啡 cspl 启动子控制下导入所述酶 cDNA 的反义拷贝。

已经对该 cspl 启动子的特性进行了描述 (Marraccini 等人,植物生理生化 (Plant Physiol. Biochem.) 37 (1999), 273-282), 该启动子调控编码咖啡 11S 贮藏蛋白的基因的表达。构建了包含所述启动子的盒并导入到来源于 pTiT37 质粒 (Bevan, 核酸研究 (Nucl. Acids Res) 12 (1984), 8711-8721) 的转化用双元载体的 T-DNA 区。该重组载体导入到用于转化咖啡外植体的根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 内。将含有插入其基因组的 T-DNA 的咖啡植物进行再生并分析其咖啡粒中的 α -D-半乳糖苷酶活性。

I. 成熟期间咖啡粒中 α -D-半乳糖苷酶活性的分析

从温室(温度大约 25℃、湿度 70%及自然光)中生长的阿拉伯咖啡 (*Coffea arabica*) 卡图拉 T2308 (Caturra T2308) 品种成熟的不同阶段 (年龄表示为开花后的周数: WAF) 收获果实。收获后的樱桃样果实于液氮中冷冻并置于-85℃保存直至应用。对于成熟研究, 将胚乳和外胚乳组织进行分离。

将植物材料在液氮中研碎并用冰冷的酶提取缓冲液 (甘油 10% v/v、偏亚硫酸氢钠 10mM、EDTA 5mM、MOPS(NaOH) 40mM、pH 6.5) 以大约 20mg 每 100 μ l 的比例进行提取。混合物置冰上搅拌 20 分钟, 离心 (12,000 g x 30 分钟), 分装并置于-85℃保存直至应用。用底物对硝基苯基- α -D-半乳糖苷 (pNGP) 在分光光度计上检测 α -D-半乳糖苷酶活性。

反应混合物包含 200 μ l 在 McIlvaine's 缓冲液 (柠檬酸 100mM- Na_2HPO_4 200 mM pH 6.5) 中的 pNGP 100 mM, 用酶提取物加至终体积 1 ml。在 26℃维持反应, 加入酶起始反应以及加入 4 倍体积的终止液 (Na_2CO_3 - NaHCO_3 100 mM pH 10.2) 终止反应。在 405 nm 读吸光值。硝基苯基的形成用摩尔消光系数 $\epsilon = 18300$ (pH 10.2 时的特定值) 进行计算并转换为 mmol/分钟/mg 蛋白质。通过 Bradford 法 (生物化学分析 (Anal. Biochem.) 72 (1976), 248-254) 对含水缓冲液提取的样品的总蛋白量进行测定。对于活性的表达, 将每一样品进行提取并分装, 每个分析进行 3 次重复, 结果用平均值表示。

在未成熟粒阶段 α -D-半乳糖苷酶活性非常低或检测不到, 该酶活性在果皮颜色变红的同时达到高峰。在晚期阶段当樱桃样果实仍然为红色时活性降低。对咖啡植物的不同组织中的活性进行了比较。外胚乳、根和叶中的活性特别低, 接近最低检出量。但是, 胚乳中记录到高活性, 活性在大约 36 WAF 达到高峰, 吸水后的发芽粒也记录到高活性。

II. 从阿拉伯咖啡分离 α -半乳糖苷酶全长 cDNA

虽然在文献可获得几种咖啡 α -D-半乳糖苷酶 cDNA 序列, 但其中咖啡材料的来源没有指明。为了了解阿拉伯咖啡和坎尼佛拉咖啡 (*C. canephora*) 之间氨基酸和核酸序列的差异, 决定对两个物种的 α -D-半乳

糖苷酶 cDNAs 进行克隆。

根据 Rogers 等人所述 (植物生理生化 (Plant Physiol Biochem), 37 (1999), 261-272) 用在开花后 30 周提取的 polyA+mRNA 构建了阿拉伯咖啡卡图拉 T2308 品种的 cDNA 文库。该质粒 cDNA 文库 (10 ng) 用直接从咖啡 α -D-半乳糖苷酶 cDNA 序列 (Zhu 和 Goldstein, 1994) 推导的引物 BETA1 (SEQ ID NO: 2) 和 BETA3 (SEQ ID NO: 3) 进行 PCR 检测。引物 BETA1 位于 SEQ ID NO: 1 序列内的核苷酸 177 和 193 位之间。引物 BETA3 位于 SEQ ID NO: 1 序列内的核苷酸 1297 和 1313 位之间。用 Pfu DNA 聚合酶 (Stratagene, 11011 North Torrey Pines Road, La Jolla, 加利福尼亚 92037, 美国) 在适当的 1 X 缓冲液、每种 dNTP 0.2 mM 和每种寡核苷酸 0.25 μ M 中进行 PCR 反应。变性、退火和延伸温度分别为 94 $^{\circ}$ C、30 秒, 46 $^{\circ}$ C、30 秒和 72 $^{\circ}$ C、3 分钟。该循环用 Robocycler Statagene (美国) 重复 30 次。PCR 产物用 Microcon 100 (Millipore SA, BP307 Saint Quentin Yvelines cedex 78054, 法国) 柱纯化并按 Stratagene (美国) 所述连接到 pCR-Script SK(+) 中。然后将连接混合物转化大肠杆菌菌株 XLI-Blue MRF' 并将包含 α -D-半乳糖苷酶片段的重组载体进行纯化并克隆至 pCR-Script SK Amp (+) 的 SfrI 位点。其序列位于序列 SEQ ID NO: 1 的 177 和 1313 位之间。

根据文献, α -D-半乳糖苷酶 cDNA 的 5' 末端包含位于引物 BETA1 5' 末端上游的 198 bp。为了从我们的基因型中克隆该序列, 我们用引物 BETA100 (SEQ ID NO: 3) 和 BETA101 (SEQ ID NO: 4) 又进行了一次如前所述的 PCR。将该阿拉伯咖啡序列克隆至 pCR Script Amp SK (+) 载体得到 pLPI, 其对应于 SEQ ID NO: 1。

获得的 cDNA 包含一个 1263 bp 的开放读码框, 在序列 SEQ ID NO: 1 的 51 位起始并在 1313 位结束。该翻译产物对应于序列 SEQ ID NO: 2, 提示咖啡 α -D-半乳糖苷酶用 51 位的翻译起始密码 ATG 而不是 126 位的 ATG 合成前酶原。另一方面, 对从坎尼佛拉咖啡克隆的 α -D-半乳糖苷酶 cDNA 的分析显示其翻译产物与阿拉伯咖啡发现的蛋白质非常同源 (相似

性 > 99%)。

III. 咖啡粒成熟期间 α -D-半乳糖苷酶基因的表达

对不同发育阶段, 即开花后 (WAF) 9、12、16、30 和 35 周收获的阿拉伯咖啡卡图拉咖啡豆中编码 α -半乳糖苷酶基因的表达进行监控。为此, 这些咖啡豆的 10 μ g 总 RNAs 在存在甲酰胺 (50%) 和甲醛 (终浓度 0.66 M) 的 1 x MOPS 缓冲液 (20 mM MOPS、5 mM 乙酸钠、1 mM EDTA、pH 7) 中 65°C 变性 15 分钟。然后将它们在存在 1 x MOPS 缓冲液时, 于包含终浓度为 2.2 M 甲醛的 1.2-% 琼脂糖凝胶上, 以 2.5V/cm 电泳 6 小时进行分离。

迁移后, 根据 Sambrook 等人所述 (分子克隆, 实验室手册, 冷泉港实验室出版社, 美国 1989, 9.31 至 9.51 章) 将 RNAs 用溴化乙锭 (BET) 染色。这使沉积在凝胶上的 18S 和 25S 核糖体 RNAs 的荧光强度的量能标准化。根据 Boehringer Mannheim (Roche-Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica, Postfach 310120, Mannheim 31, DE) 提供的建议, 然后将总 RNAs 转移并固定到带正电荷的尼龙膜上。根据上述条件进行预杂交和杂交。

Northern 印迹结果证实在胚乳发育的早期阶段有基因表达高峰。在温室条件下特异 mRNA 表达峰出现在约 26 WAF, 并与酶活性开始增强相应。mRNA 表达的高峰阶段与在这些条件下成熟粒内发生的胚乳扩张和硬化的主要时期相应。 α -半乳糖苷酶特异的 mRNA 的峰表达与 11S 粒贮藏蛋白 mRNA 的峰表达一致或稍晚。这些结果导致了构建在 11S 咖啡启动子控制下编码 α -半乳糖苷酶的咖啡 cDNA 的反义盒, 以降低成熟咖啡粒中 α -半乳糖苷酶活性水平。

IV. α -半乳糖苷酶反义盒的构建

用与序列 SEQ ID NO: 7 相应的特异引物 UP210-1 和与序列 SEQ ID NO: 8 相应的特异引物 BAGUS2, 对咖啡的 11S 启动子序列 (Marraccini 等人, 植物生理生化 37 (1999), 273-282) 进行扩增。寡核苷酸 UP210-1 与 Marraccini 等人 (见上) 发表的核苷酸 24 和 76 位之间的序列相应, 并

且在其 5'末端包含合成序列 CGGGGTACCCCG, 其中所述合成序列包含一个 KpnI 限制性位点并与序列 SEQ ID NO: 9 对应。引物 BAGUS2 在其 5'末端包含的合成序列 CGCGGATCCGCG 与有一个 BamHI 限制性位点的序列 SEQ ID NO: 10 对应。该引物也包含 Marraccini 等人 (1999) 所发表序列的核苷酸 998 至 976 位。该反应在存在 Pfu DNA 聚合酶 (3 个单位), 含 10ng pCSPP4 (WO99/02688), 10 mM KCl、6mM (NH₄)₂SO₄、20 mM Tris-HCl, pH 8.0、0.1% Triton X-100、2 mM MgCl₂、10 μg/ml BSA、每种 dNTP 0.2 mM、每种寡核苷酸 0.25 μM, 终体积为 50 μl 时如上所述进行。然后将该反应混合物孵育 30 个循环 (94℃、60 秒, 55℃、60 秒, 72℃、3 分钟) 接着 72℃、7 分钟进行最后的延伸循环。

约 950 bp 的 PCR 片段在 Microcon 100 柱 (Millipore, 法国) 上进行纯化, 并根据供应商提供的建议, 在 T4 DNA 连接酶存在下连接至 pCR-Script Amp SK (+) 载体 (Promega Corporation, 2800 Woods Hollow Road, Madison, 威斯康辛 53711 美国)。然后, 将所有的连接混合物转化大肠杆菌菌株 XL1-Blue MRF'。筛选一个转化子并纯化其质粒, 对插入序列进行测定, 以确定 PCR 片段的方向。该分析使筛选质粒 pLP7 成为可能。

除了用具有核酸序列 SEQ ID NO: 11 的引物 UP213-1 代替引物 UP210-1 外, 用同样的方法扩增较短的 11S 启动子。该引物与 Marraccini 等人 (见上) 发表的核苷酸 754 和 777 位之间的序列对应, 并在其 5'末端包含合成序列 SEQ ID NO: 9。这导致扩增出 p11S 咖啡启动子的 250bp 片段, 将该片段按如前所述进行克隆获得质粒 pLP8。

除了应用具有核酸序列 SEQ ID NO: 12 的引物 TNOS1 和具有核酸序列 SEQ ID NO: 13 的引物 TNOS2 外, 按扩增 p11S 启动子所描述的方法扩增 TNOS 终止子。TNOS1 在其 5'末端包含序列 SEQ ID NO: 10。TNOS2 在其 5'末端包含序列 SEQ ID NO: 9。这些引物导致从 p35SGFP 商品化载体 (Clontech Laboratories Inc., 1020 East Meadow Circle, Palo Alto, 加利福尼亚 94303-4230 美国) 扩增到 TNOS 序列。如上所述, 将该 PCR 产物克隆至 pCRScript Amp SK (+) 载体, 获得名为 pLP32 的重组载体并

进行测序以确定其方向。该载体然后用 BamHI 消化以移出 TNOS 序列，然后将该 TNOS 序列用 T4 DNA 聚合酶处理以提供平端。

另一方面，pLP7 和 pLP8 载体用 EcoRI 线性化并也用 T4 DNA 聚合酶处理以提供平端。然后将 TNOS 终止子以正确的方向克隆至 pLP7 和 pLP8 载体，分别获得载体 p11STNOS7 和 p11STNOS7+。

除了应用具有核酸序列 SEQ ID NO: 14 的引物 BETA100B1 和具有核酸序列 SEQ ID NO: 15 的引物 BETA101B1 外，用上述条件从之前分离的载体 pLP1 扩增 α -半乳糖苷酶 cDNA。这些寡核苷酸对应于之前所用的引物 BETA 101 和 BETA 100，只不过是在这些寡核苷酸的 5'末端导入了对应于序列 SEQ ID NO: 10 的 BamHI 限制性位点。如前所述，将该 PCR 产物克隆入 pCR-Script Amp SK (+) 载体，获得重组载体 pLP20。

质粒用 BamHI 消化以释放 α -半乳糖苷酶 cDNA。在另一面，受体载体 p11STNOS7 和 p11STNOS7+独立地用同样的限制性酶消化并根据供应商建议(Promega, 美国)用 CIAP 处理去磷酸化。将该 α -半乳糖苷酶 cDNA 以反义方向分别克隆至 p11STNOS7 和 p11STNOS7+ 载体，获得名为 pALPHA1 和 pALPHA9 的载体。

为了将这些盒克隆入咖啡细胞悬液转化期间应用的双元载体内，用具有核酸序列 SEQ ID NO: 16 的引物 UPSAL1 和具有核酸序列 SEQ ID NO: 17 的引物 UPSAL2，使用 pfu DNA 聚合酶进行最后的 PCR 反应。这两条寡核苷酸都包含一个 SalI 限制性位点并识别 pCR Script Amp SK (+) 载体中 11S 启动子和 NOS 终止子 (TNOS) DNA 区侧翼的 DNA 序列。此外，该限制性位点在欲导入到双元质粒的 T-DNA 的序列中不存在。这些 PCR 产物再克隆至 pCR-Script Amp SK (+)载体，该载体用 SalI 消化以证实该限制性位点在盒的侧翼。获得的质粒称为 pALP414 和 pALP50，分别来自于 pALPHA1 和 pALPHA9。

V. 克隆该 α -半乳糖苷酶反义盒于用于转化的双元载体中

对载体 pALP414 和 pALP50 包含的 α -半乳糖苷酶盒进行序列测定以验证其完整性，特别是确定在 PCR 扩增循环期间没有发生点突变或重排。

然后通过将 pALP414 和 pALP50 载体用 *Sa*II 限制性酶消化而对这些盒进行纯化并单独克隆到 pBin 19 衍生质粒, 所述质粒涉及 Leroy 等人所述的载体 (Plant Cell Rep.19 (1999), 382-389), 除了 *cry*IAc 基因不存在外。为此, 载体用可识别 *uidA* 和 *csr*1-1 基因之间单一位点的 *Sa*II 限制性酶消化并去磷酸化。连接后, 对载体 pBIA121、pBIA126 和 pBIA9 进行筛选。在 pBIA121 载体中, 从 pALP414 获得的 *Sa*II 盒以 [LB] Gus-内含子>p11S(长) 反义 α -半乳糖苷酶 cDNA > *csr*1-1 [RB] 的方向进行克隆。但是, 同样的盒以反方向克隆至 pBIA126 载体中。另一方面, 从 pALP50 获得的 *Sa*II 盒以下列方向克隆至 pBIA9 载体中: [LB]Gus-内含子>p11S (短) 反义 α -半乳糖苷酶 cDNA > *csr*1-1 [RB]。

VI. 根癌农杆菌的转化

根据 An 等人所述的直接转化法(植物分子生物学手册(Plant Mol. Biol. Manuel), Gelvin, Schilperoort 和 Verma 编辑, Kluwer Academic Publishers Dordrecht, 荷兰 A3 (1993), 1-19), 将上述用于转化的 pBIA121、pBIA126 和 pBIA9 双元载体独立地导入到卸甲根癌农杆菌菌株 LBA4404 中。对于每次转化, 重组根癌农杆菌克隆在添加卡那霉素 (50 μ g/ml)、链霉素 (100 μ g/ml) 和利福平 (50 μ g/ml) 的 LB 培养基上进行筛选。

为了检查导入到根癌农杆菌中的质粒的结构, 将质粒通过快速小量制备技术进行提取并在反转化至大肠杆菌菌株 XL2 Blue MRF' 后通过限制性图谱进行分析。

VII. 咖啡物种的转化

将叶外植体进行培养并每隔 5 周进行传代培养, 培养 3 至 5 个月直至外植体边缘出现体细胞胚。在鱼雷期收获体细胞胚, 用无菌手术刀割破并在包含 OD_{600nm} 为 0.3 至 0.5 的重组根癌农杆菌菌株 LBA4404 的 0.9% NaCl 溶液中浸泡 2 小时。在黑暗中于没有激素的半固体 MS 培养基上共培养 3 天, 然后用包含头孢噻肟 (1gr/l) 的液体 MS 培养基在持续但温和的搅拌下洗涤 3 至 5 小时。胚在存在头孢噻肟 (400mg/l) 的含 5 μ M BAP、90 μ M 蔗糖的半固体培养基上在低光照条件下(每天 16 小时的光周期)进行培养。

3至4周后,将它们转移到添加头孢噻肟(400mg/l)和氯磺隆(chlorsulfuron)(80mg/l)的MS选择培养基。然后,每个月将它们转移到新的选择培养基直至愈伤组织再生。然后将愈伤组织周围生长的转化胚在有Morel维生素(1 μ M BAP和30 μ M蔗糖)的半固体MS培养基上进行培养以诱导它们发芽。这个步骤后,将它们转移到上述没有BAP的培养基所对应的生根培养基上。

为检查转化的效果,通过GUS组织化学法(Jefferson等人,欧洲分子生物学组织杂志(J.EMBO)6(1987),3901-3907)对愈伤组织、茎干、根和叶常规检测uidA报道基因的表达。

在这个步骤后,筛选几株单植株并通过微切体外繁殖。它们中的一些转移到温室内完成它们的发育。没有观察到形态学异常。

VIII. 来自转化咖啡植物的体细胞胚的分析

也从叶外植体诱导体细胞胚以检测 α -半乳糖苷酶反义mRNA的存在。在体细胞胚内也检测到了11S咖啡贮藏蛋白(Yuffa等人,Plant Cell Rep.13(1994)197-202),提示cspl启动子在该组织内有活性。如果这样的话,从未成熟转基因咖啡植物的叶诱导的体细胞胚的分析使得检测 α -半乳糖苷酶反义mRNA的存在要比检测咖啡豆中的存在早。

然后按上述从100mg经转化的体细胞胚提取总RNAs并用Access RT-PCR系统试剂盒(Promega,美国)进行RT-PCR检测。首先,11S特异mRNA的存在通过用位于11S cDNA编码序列中的引物进行RT-PCR得到证实。用对应于序列SEQ ID NO: 18的引物SO11和对应于序列SEQ ID NO: 19的引物SO2-1进行该反应。引物SO11对应于Marraccini等人(见上文)所发表序列的核苷酸1035和1059位之间的序列。另一方面,引物SO2-1对应于所发表序列的最后24个核苷酸。第一链cDNA的合成(反转录步骤)按供应商所述进行(48 $^{\circ}$ C、45分钟)。PCR反应应用下列参数:45个循环(变性94 $^{\circ}$ C、60秒,退火52 $^{\circ}$ C、90秒,延伸68 $^{\circ}$ C、4分钟)最后68 $^{\circ}$ C延伸7分钟。

从本实验获得了侧翼为引物SO11和SO2-1的11S cDNA序列相对应

的 1590 bpPCR 产物。结果证实检测的所有组织即根、叶、花都不存在 11S mRNA，但 11S mRNA 在坎尼佛拉咖啡的体细胞胚和在 27 WAF 的咖啡豆中有效存在。

其次，在反转录阶段（条件 1）期间，只用对应于序列 SEQ ID NO: 21 的引物 B33 进行 RT-PCR 反应检测 α -半乳糖苷酶有意义 mRNA 的存在。该引物对应于序列 SEQ ID NO: 1 的核苷酸 1286 至 1314 位的互补序列。

平行地，在反转录阶段（条件 2）期间，只用引物 B11 进行 α -半乳糖苷酶反义 mRNA 的检测。该引物对应于序列 SEQ ID NO: 1 的核苷酸 50 至 78 位之间的序列。反转录后（48℃、45 分钟），反应混合物 94℃处理 1 分钟以灭活 MMLV 反转录酶。加入条件 1 中消耗的寡核苷酸 B 11 和条件 2 中消耗的寡核苷酸 B33，并继续进行 PCR 反应：45 个循环（变性 94℃、60 秒，退火 45℃、90 秒，延伸 68℃、4 分钟）最后 68℃延伸 7 分钟。用来自未转化阿拉伯咖啡的体细胞，在条件 1 但不是条件 2 的实验观察到 1310bp 的扩增产物。但是，对于从 pBIA9 载体转化的咖啡苗获得的体细胞胚，在实验用的条件 2 期间可检测到扩增产物，证实存在 α -半乳糖苷酶反义 mRNA。

<110> 雀巢产品有限公司

<120> 具有降低的 α -D-半乳糖苷酶活性的咖啡植物

<130> 80331W0

<150> EP 01124160

<151> 2001-10-10

<160> 21

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1442

<212> DNA

<213> 阿拉伯咖啡 (Coffea arabica)

<400> 1

tgctccacaa agcagtggca attgagtiga ttgatcaaca ccaatttacc atggccgctg	60
cttattacta ccttttttct agtaaaaaaa gccaccaaaa gctggtgctc cgagcttcgt	120
tattgatgtt tttatgttcc ttggcgggtg aaaacgttgg tgcttccgct cgccggatgg	180
tgaagtctcc aggaacagag gattacactc gcaggagcct tttagcaaata gggcttggtc	240
taacaccacc gatgggggtg aacagctgga atcatttcag ttgtaatcct gatgagaaat	300
tgatcaggga aacagccgat gcaatggcat caaaggggct tgctgcactg ggatataagt	360
acatcaatct tgatgactgt tgggcagaaac ttaacagaga ttcacagggg aatttggttc	420
ctaaagggtc aacattccca tcagggatca aagccttagc agattatgtt cacagcaaag	480
gcctaaagct tggaatttac tctgatgctg gaactcagac atgtagtaaa actatgccag	540
gttcattagg acacgaagaa caagatgccaa aaacctttgc ttcattggggg gttgattact	600
taaagtatga caactgtaac gacaacaaca taagccccaa ggaaaggat ccaatcatga	660
gtaaagcatt gttgaactct ggaagggtcca tatttttctc tctatgtgaa tggggagatg	720

```

aagatccagc aacatgggca aaagaagttg gaaacagttg gagaaccact ggagatatag    780
atgacagttg gagtagcatg acttctcggg cagatatgaa cgacaaatgg gcatcttatg    840
ctgggtcccgg tggatggaat gatcctgaca tgttggaggt gggaaatgga ggcatgacta    900
caacggaata tcgatcccat ttcagcattt gggcattagc aaaagcacct ctactgattg    960
gctgtgacat tcgatccatt gacggtgcga ctttccaact gttaagcaat gcggaagtta   1020
ttgcgggtaa ccaagataaa cttggcggtc aagggaaaaa ggtaagact tacggagatt   1080
tggaggtgtg ggctggacct cttagtggaa agagagtagc tgtcgctttg tggaatagag   1140
gatcttcac  ggctactatt accgcgtatt ggtccgacgt aggcctcccg tccacggcag   1200
tggttaatgc acgagactta tgggcgcatt caaccgaaaa atcagtcaa  ggacaaatct   1260
cagctgcagt agatgccac  gattcgaaaa tgtatgtcct aacccacag tgattaacag   1320
gagaatgcag aagacaagtg atggttggtc ctttcaagga ttgattacc ttaaagaatt   1380
tttcacatgt tatgaatcaa ttcaaagcaa ttatgtgttt tgaagagatt aagtcaataa   1440
at                                                                    1442

```

<210> 2

<211> 420

<212> PRT

<213> 阿拉伯咖啡

<400> 2

```

Met Ala Ala Ala Tyr Tyr Tyr Leu Phe Ser Ser Lys Lys Ser His Gln
1              5              10              15

```

```

Lys Leu Val Leu Arg Ala Ser Leu Leu Met Phe Leu Cys Phe Leu Ala
                20              25              30

```

```

Val Glu Asn Val Gly Ala Ser Ala Arg Arg Met Val Lys Ser Pro Gly

```

35	40	45
Thr Glu Asp Tyr Thr Arg Arg Ser Leu Leu Ala Asn Gly Leu Gly Leu		
50	55	60
Thr Pro Pro Met Gly Trp Asn Ser Trp Asn His Phe Ser Cys Asn Leu		
65	70	75
Asp Glu Lys Leu Ile Arg Glu Thr Ala Asp Ala Met Ala Ser Lys Gly		
85	90	95
Leu Ala Ala Leu Gly Tyr Lys Tyr Ile Asn Leu Asp Asp Cys Trp Ala		
100	105	110
Glu Leu Asn Arg Asp Ser Gln Gly Asn Leu Val Pro Lys Gly Ser Thr		
115	120	125
Phe Pro Ser Gly Ile Lys Ala Leu Ala Asp Tyr Val His Ser Lys Gly		
130	135	140
Leu Lys Leu Gly Ile Tyr Ser Asp Ala Gly Thr Gln Thr Cys Ser Lys		
145	150	155
Thr Met Pro Gly Ser Leu Gly His Glu Glu Gln Asp Ala Lys Thr Phe		
165	170	175
Ala Ser Trp Gly Val Asp Tyr Leu Lys Tyr Asp Asn Cys Asn Asp Asn		
180	185	190
Asn Ile Ser Pro Lys Glu Arg Tyr Pro Ile Met Ser Lys Ala Leu Leu		
195	200	205
Asn Ser Gly Arg Ser Ile Phe Phe Ser Leu Cys Glu Trp Gly Asp Glu		

210	215	220
Asp Pro Ala Thr Trp	Ala Lys Glu Val Gly	Asn Ser Trp Arg Thr Thr
225	230	235 240
Gly Asp Ile Asp Asp	Ser Trp Ser Ser Met Thr	Ser Arg Ala Asp Met
	245	250 255
Asn Asp Lys Trp Ala	Ser Tyr Ala Gly Pro Gly	Gly Trp Asn Asp Pro
	260	265 270
Asp Met Leu Glu Val	Gly Asn Gly Gly Met Thr	Thr Thr Glu Tyr Arg
	275	280 285
Ser His Phe Ser Ile	Trp Ala Leu Ala Lys	Ala Pro Leu Leu Ile Gly
	290	295 300
Cys Asp Ile Arg Ser	Ile Asp Gly Ala Thr	Phe Gln Leu Leu Ser Asn
305	310	315 320
Ala Glu Val Ile Ala	Val Asn Gln Asp Lys	Leu Gly Val Gln Gly Lys
	325	330 335
Lys Val Lys Thr Tyr	Gly Asp Leu Glu Val	Trp Ala Gly Pro Leu Ser
	340	345 350
Gly Lys Arg Val Ala	Val Ala Leu Trp Asn	Arg Gly Ser Ser Thr Ala
	355	360 365
Thr Ile Thr Ala Tyr	Trp Ser Asp Val Gly	Leu Pro Ser Thr Ala Val
	370	375 380
Val Asn Ala Arg Asp	Leu Trp Ala His Ser	Thr Glu Lys Ser Val Lys

385	390	395	400
Gly Gln Ile Ser Ala Ala Val Asp Ala His Asp Ser Lys Met Tyr Val			
	405	410	415
Leu Thr Pro Gln			
	420		
<210> 3 <211> 17 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 引物 BETA1 <400> 3 atggtgaagt ctccagg			
			17
<210> 4 <211> 17 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 引物 BETA3 <400> 4 tcactgtggg gttagga			
			17
<210> 5 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 引物 BETA100 <400> 5			

tgctccacaa agcagtggca att

23

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 BETA101

<400> 6

atattattgac ttaatctctt caa

23

<210> 7

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 210-1

<400> 7

cggggtaccc cgcctctttt cttttggagt acaag

35

<210> 8

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 BAGUS2

<400> 8

cgcggtatccg cgtctctgac aacagaggag agtgt

35

<210> 9

<211> 12

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> KpnI

<400> 9

cggggtaccc cg

12

<210> 10

<211> 12

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> BamHI

<400> 10

cgcggatccg cg

12

<210> 11

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 UP213-1

<400> 11

cggggtaccc cgacaaaaga ttgaacaata catgtc

36

<210> 12

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 TNOS1

<400> 12

cgcggatccg cggagctcga atttccccga tcgtt

35

<210> 13

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 TNOS2

<400> 13

cggggtaccc cggaattccc gatctagtaa catag

35

<210> 14

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 BETA100BI

<400> 14

cgcggatccg cgtgctccac aaagcagtgg caatt

35

<210> 15

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 BETA101BI

<400> 15

cgcggatccg cgatttattg acttaatctc ttcaa

35

<210> 16

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 UPSAL1

<400> 16

cacgcgtcga cgctccaccg cggtggcggc cgctc

35

<210> 17

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 UPSAL2

<400> 17

gggccccccc tcgaggtcga cgg

23

<210> 18

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 S011

<400> 18

ttcttttgtt cctcggtgt ttg

23

<210> 19

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 S02-1

<400> 19

ccaaacatca aacttctcgc aatc

24

<210> 20

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>		
<223>	引物 BETA11	
<400>	20	
atggcgcgtg	cttattacta	ccttttt
		27
<210>	21	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物 BETA33	
<400>	21	
tcactgtggg	gttaggacat	acatttt
		27