

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680040334.5

[51] Int. Cl.

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

C12N 9/04 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

C12P 19/04 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 10 月 29 日

[11] 公开号 CN 101297041A

[22] 申请日 2006.10.5

[21] 申请号 200680040334.5

[30] 优先权

[32] 2005.10.5 [33] EP [31] 05090278.2

[32] 2005.10.11 [33] US [31] 60/725,183

[86] 国际申请 PCT/EP2006/009774 2006.10.5

[87] 国际公布 WO2007/039315 德 2007.4.12

[85] 进入国家阶段日期 2008.4.28

[71] 申请人 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

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 林柏楠

权利要求书 2 页 说明书 48 页 序列表 16 页
附图 1 页

[54] 发明名称

具有增加的乙酰透明质酸 II 产量的植物

[57] 摘要

本发明涉及合成增加量的乙酰透明质酸的植物细胞和植物，还涉及制备此类植物的方法，以及借助这些植物细胞或植物制备乙酰透明质酸的方法。这里，根据本发明的植物细胞或遗传修饰的植物与野生型植物细胞或野生型植物相比具有乙酰透明质酸合酶活性和额外的增加的 UDP - 葡萄糖脱氢酶 (UDP - Glc - DH) 活性。本发明还涉及具有增加的乙酰透明质酸合成的植物在制备乙酰透明质酸和含有乙酰透明质酸的食品或饲料中的用途。

1. 遗传修饰的植物细胞，其具有稳定整合到它的基因组中的编码乙酰透明质酸合酶的核酸分子，其中所述植物细胞与对应的没有遗传修饰的野生型植物细胞相比额外具有升高活性的具有 UDP-葡萄糖脱氢酶(UDP-Glc-DH)活性的蛋白质。

2. 权利要求 1 所述的遗传修饰的植物细胞，其中具有 UDP-葡萄糖脱氢酶(UDP-Glc-DH)活性的蛋白质的升高的活性是由外源核酸分子向所述植物细胞的导入引起的。

3. 权利要求 1 所述的遗传修饰的植物细胞，其中所述外源核酸分子编码具有 UDP-葡萄糖脱氢酶(UDP-Glc-DH)的酶促活性的蛋白质。

4. 权利要求 1、2 或 3 任一项所述的遗传修饰的植物细胞，其与具有乙酰透明质酸合酶活性并且没有 UDP-葡萄糖脱氢酶(UDP-Glc-DH)的升高活性的植物细胞相比，合成增加量的乙酰透明质酸。

5. 包含如权利要求 1 到 4 任一项所述的遗传修饰的植物细胞的植物。

6. 如权利要求 5 所述的植物的繁殖材料，其包含如权利要求 1 到 4 任一项所述的遗传修饰的植物细胞。

7. 如权利要求 5 所述的植物的可收获的植物部分，其包含如权利要求 1 到 4 任一项所述的遗传修饰的植物细胞。

8. 产生合成乙酰透明质酸的植物的方法，其包括

a) 遗传修饰植物细胞，其中该遗传修饰包括下面的步骤 i 到 ii:

i) 向植物细胞中导入编码乙酰透明质酸合酶的外源核酸分子，

ii) 向植物细胞中导入遗传修饰，该遗传修饰与对应的没有遗传修饰的野生型植物细胞相比导致具有 UDP-葡萄糖脱氢酶(UDP-Glc-DH)的酶促活性的蛋白质的活性升高，

其中步骤 i 到 ii 可以以任何顺序各自进行，或者可以同时步骤 i 到 ii 的任一组合，

b) 从步骤 a) 的植物细胞再生植物；

如果合适,使用根据步骤 b)的植物产生进一步的植物,

c) 其中如果合适,从根据步骤 b)i)或 b)ii)得到的植物分离植物细胞,并重复方法步骤 a)到 c)直到产生植物,该植物与对应的没有遗传修饰的野生型植物细胞相比具有编码乙酰透明质酸合酶的外源核酸分子并且具有 GFAT 的酶促活性的蛋白质的升高的活性。

9. 制备乙酰透明质酸的方法,其包括从如权利要求 1 到 4 任一项所述的遗传修饰的植物细胞、如权利要求 5 所述的植物、如权利要求 6 所述的繁殖材料、如权利要求 7 所述的可收获的植物部分或通过如权利要求 8 所述的方法可以得到的植物提取乙酰透明质酸。

10. 权利要求 1 到 4 任一项所述的遗传修饰的植物细胞、权利要求 5 所述的植物、权利要求 6 所述的繁殖材料、权利要求 7 所述的可收获的植物部分或通过权利要求 8 所述的方法可以得到的植物用于制备乙酰透明质酸的用途。

11. 包含如权利要求 1 到 4 任一项所述的遗传修饰的植物细胞的组合物。

12. 制备包含乙酰透明质酸的组合物的方法,其中使用如权利要求 1 到 4 任一项所述的遗传修饰的植物细胞、如权利要求 5 所述的植物、如权利要求 6 所述的繁殖材料、如权利要求 7 所述的可收获的植物部分或通过如权利要求 8 所述的方法可以得到的植物。

13. 如权利要求 1 到 4 任一项所述的遗传修饰的植物细胞、如权利要求 5 所述的植物、如权利要求 6 所述的繁殖材料、如权利要求 7 所述的可收获的植物部分或通过如权利要求 8 所述的方法可以得到的植物在制备如权利要求 11 所述的组合物中的用途。

具有增加的乙酰透明质酸 II 产量的植物

本发明涉及合成增加量的乙酰透明质酸的植物细胞和植物，还涉及制备此类植物的方法，还涉及借助这些植物细胞或植物制备乙酰透明质酸的方法。这里，根据本发明的遗传修饰的植物细胞或植物与野生型植物细胞或野生型植物相比具有乙酰透明质酸合酶活性和额外增加的 UDP - 葡萄糖脱氢酶(UDP-Glc-DH)活性。本发明还涉及具有增加的乙酰透明质酸合成的植物用于制备乙酰透明质酸和含有乙酰透明质酸的食品或饲料的用途。

乙酰透明质酸是天然存在的不分枝的线性粘多糖（葡糖胺葡聚糖），其由葡糖醛酸和 N-乙酰基 - 葡糖胺的交替分子构造。乙酰透明质酸的基本构件由二糖葡糖醛酸- β - 1,3-N-乙酰基葡糖胺组成。在乙酰透明质酸中，这些重复单元通过 β - 1,4 键相互连接。

在药学中，通常使用术语透明质酸。因为乙酰透明质酸在多数情况中以聚阴离子存在而不是游离酸存在，所以在下文优选使用术语乙酰透明质酸，但是将理解每个术语都包括两种分子形式。

乙酰透明质酸具有不寻常的物理化学性质，例如聚电解质性质、粘弹性性质、结合水的高负载、凝胶形成性质，其除了乙酰透明质酸的其他性质外，描述于 Lapcik 等人(1998, Chemical Reviews 98(8), 2663-2684)的综述文章中。

乙酰透明质酸是脊椎动物的细胞外结缔组织和体液的组分。在人类中，透明质酸通过所有体细胞，特别是间充质细胞的细胞膜合成，普遍存在于身体中，在结缔组织、细胞外基质、脐带、关节液、软骨组织和皮肤和眼睛的玻璃体中浓度尤其高 (Bernhard Gebauer, 1998, Inaugural-Dissertation, Virchow-Klinikum Medizinische Fakultät Charité der Humboldt Universität zu Berlin; Fraser 等人, 1997, Journal of Internal

Medicine 242, 27-33)。

最近, 在动物非脊椎动物生物(软体动物)中也发现了乙酰透明质酸(Volpi 和 Maccari, 2003, Biochimie 85, 619-625)。

此外, 一些病原性革兰氏阳性细菌(A 和 C 组链球菌(*Streptococcus*)) 和革兰氏阴性细菌(巴斯德菌属)合成乙酰透明质酸作为表多糖, 其保护这些细菌免受它们的宿主免疫系统的攻击, 因为乙酰透明质酸是非免疫原性物质。

感染小球藻属(*Chlorella*)的单细胞绿藻的病毒的一些在草履虫属(*Paramecium*)种中作为内共生体存在, 病毒感染后赋予单细胞绿藻合成乙酰透明质酸的能力(Graves 等人, 1999, Virology 257, 15-23)。然而, 合成乙酰透明质酸不是表征所述藻类的特征。该藻类合成乙酰透明质酸的能力通过病毒的感染介导, 所述病毒的基因组具有编码乙酰透明质酸合酶的序列(DeAngelis, 1997, Science 278, 1800-1803)。此外, 所述病毒基因组含有编码 UDP 葡萄糖脱氢酶(UDP-Glc-DH)的序列。UDP-Glc-DH 催化合成 UDP 葡糖醛酸, 其被乙酰透明质酸合酶用作底物(DeAngelis 等人, 1997, Science 278, 1800-1803, Graves 等人, 1999, Virology 257, 15-23)。UDP-Glc-DH 在病毒感染的小球藻属细胞中表达以进行乙酰透明质酸合成的作用, 和它们是否是乙酰透明质酸合成所需的不是已知的。

天然存在的植物自身在它们的基因组中不具有编码催化乙酰透明质酸合成的蛋白质的核酸, 尽管已经描述和表征了许多植物糖类, 迄今还不可能在非感染的植物中检测到乙酰透明质酸或涉及乙酰透明质酸的分子(Graves 等人, 1999, Virology 257, 15-23)。

乙酰透明质酸合成的催化通过单个膜整合的或膜结合的酶乙酰透明质酸合酶实现。迄今为止被研究的乙酰透明质酸合酶可以分为两组: I 类乙酰透明质酸合酶和 II 类乙酰透明质酸合酶(DeAngelis, 1999, CMLS, Cellular and Molecular Life Sciences 56, 670-682)。

脊椎动物的乙酰透明质酸合酶可以通过所鉴定的同工酶进一步区分。用阿拉伯数字以它们的标识顺序引用不同的同工酶(例如, hsHAS1、

hsHAS2、hsHAS3)。

迄今还没有完全阐明合成的乙酰透明质酸分子通过细胞质膜向细胞周围介质转移的机理。以前的假说认为跨细胞膜运输通过乙酰透明质酸合酶自身实现。然而,更近的研究指出乙酰透明质酸分子跨细胞膜运输通过依赖能量的运输经由负责该作用的转运蛋白实现。从而,通过突变产生了链球菌菌株,其中活性转运蛋白的合成被抑制。这些菌株比对应的野生型细菌菌株合成较少的乙酰透明质酸(Ouskova 等人, 2004, *Glycobiology* 14(10), 931-938)。在人成纤维细胞中,借助特异抑制已知的转运蛋白,可能阐明可以减少所产生的乙酰透明质酸的量和乙酰透明质酸合酶活性(Prehm 和 Schumacher, 2004, *Biochemical Pharmacology* 68, 1401-1410)。能够运输乙酰透明质酸的转运蛋白以多少量(如果存在)存在于植物中是未知的。

乙酰透明质酸的不寻常的性质提供了在多种领域中应用的可能性,如应用于药学、化妆品工业、食品和饲料生产、技术应用(例如,作为润滑剂)等等。乙酰透明质酸当前的最重要的应用是药物和化妆品领域(见,例如, Lapcik 等人, 1998, *Chemical Reviews* 98(8), 2663-2684, Goa 和 Benfield, 1994, *Drugs* 47(3), 536-566)。

在医药领域,含有乙酰透明质酸的产品当前被用于关节内治疗关节病和在眼科中用于眼外科。乙酰透明质酸还被用于治疗赛马中的关节病症。此外,透明质酸是一些鼻科药物中的组分,例如,以眼滴剂和鼻滴剂(nasalia)的形式用于湿润干燥的粘膜。用于注射的含有乙酰透明质酸的溶液被用作镇痛剂和抗风湿剂。包含乙酰透明质酸或衍生的乙酰透明质酸的贴剂用于伤口愈合。作为皮肤用药,含有乙酰透明质酸的凝胶植入物被用于矫正整形外科中的皮肤变形。

对于药理学应用,优选使用具有高分子量的乙酰透明质酸。

在化妆品药物中,乙酰透明质酸制剂是最合适的皮肤填充材料。通过注射乙酰透明质酸,可能在有限的时间期限内光滑皱纹或者增加嘴唇体积。

在化妆品产品中,尤其在皮肤霜剂和洗剂中,乙酰透明质酸由于它的高水结合容量而经常用作湿润剂。

此外, 含有乙酰透明质酸的制剂以所称作的营养制品(食物补充剂)出售, 其也可以用于动物(例如, 狗、马)中预防和减轻关节病。

用于商业目的的乙酰透明质酸当前从动物组织(鸡冠)分离或者使用细菌培养发酵制备。

US 4,141,973 描述了从鸡冠或备选地从脐带分离乙酰透明质酸的方法。除了乙酰透明质酸外, 动物组织(例如, 鸡冠、脐带)也含有与乙酰透明质酸相关的其他粘多糖类, 如硫酸软骨素、硫酸皮肤素、硫酸角质素、硫酸乙酰肝素和肝素。此外, 动物有机体含有蛋白质(hyaladherins), 其特异结合乙酰透明质酸并且是生物中多数不同功能所需的, 如肝脏中乙酰透明质酸的降解、乙酰透明质酸作为细胞迁移的先导结构的功能、胞吞作用的调节、乙酰透明质酸在细胞表面的锚定或者乙酰透明质酸网络的形成(Turley, 1991, Adv Drug Delivery Rev 7, 257 ff.; Laurent 和 Fraser, 1992, FASEB J. 6, 183 ff.; Stamenkovic 和 Aruffo, 1993, Methods Enzymol. 245, 195 ff; Knudson 和 Knudson, 1993, FASEB 7, 1233 ff.)。

用于乙酰透明质酸的细菌生产的链球菌属菌株唯一地是病原性细菌。在培养期间, 这些细菌也产生(致热性)外毒素和溶血素类(链球菌溶血素, 尤其 α 和 β 溶血素)(Kilian, M.: Streptococcus 和 Enterococcus. 在: *Medical Microbiology*. Greenwood, D.; Slack, RCA; Peutherer, J.F. (Eds.). 第 16 章. Churchill Livingstone, Edinburgh, UK: pp. 174-188, 2002, ISBN 0443070776), 它们被释放到培养基中。这使得用链球菌菌株制备的乙酰透明质酸的纯化和分离更困难。尤其对于药物应用, 制剂中外毒素和溶血素的存在是个问题。

US 4,801,539 描述了通过发酵诱变的细菌菌株(*Streptococcus zooedemicus*)制备乙酰透明质酸。经诱变的细菌菌株不再合成 β 溶血素。实现的产率为每升培养物 3.6g 乙酰透明质酸。

EP 0694616 描述了培养 *Streptococcus zooedemicus* 或马链球菌(*Streptococcus equi*)的方法, 其中在所用的培养条件下, 不合成链球菌溶血素, 但是乙酰透明质酸的量增加。实现的产量为每升培养物 3.5g 乙酰

透明质酸。

在培养期间，链球菌菌株向培养基释放酶透明质酸酶，结果在该生产系统中，分子量在纯化期间也降低。在 US 4,782,046 中描述了使用透明质酸酶阴性链球菌菌株或者产生乙酰透明质酸的方法，其中培养期间透明质酸酶的产生被抑制。实现的产率高达每升培养物 2.5g 乙酰透明质酸，并且实现的最大平均分子量为 3.8×10^6 Da，分子量分布为 2.4×10^6 到 4.0×10^6 。

US 20030175902 和 WO 03 054163 描述了借助来自似马链球菌 (*Streptococcus equisimilis*) 的乙酰透明质酸合酶在枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 中的异源表达制备乙酰透明质酸。为了实现产生足够量的乙酰透明质酸，除了异源表达乙酰透明质酸合酶外，还需要在芽孢杆菌细胞中同时表达 UDP 葡萄糖脱氢酶。US 20030175902 和 WO 03 054163 没有陈述借助枯草芽孢杆菌在生产中得到的乙酰透明质酸的绝对量。实现的最大平均分子量为约 4.2×10^6 。然而，该平均分子量仅仅为重组芽孢杆菌菌株实现，其中编码来自似马链球菌的乙酰透明质酸合酶的基因和编码来自枯草芽孢杆菌的 UDP 葡萄糖脱氢酶的基因被整合到枯草芽孢杆菌基因组中处于 *amyQ* 启动子控制下，其中同时失活枯草芽孢杆菌内源 *cxpY* 基因（其编码细胞色素 P450 氧化酶）。

WO 05 012529 描述了转基因烟草植物的制备，其用编码来自感染小球藻的病毒的乙酰透明质酸合酶的核酸分子转化。在 WO 05 012529 中，一方面，利用编码小球藻病毒毒株 CVHI1 的乙酰透明质酸合酶的核酸序列，另一方面，利用小球藻病毒毒株 CVKA1 转化烟草植物。仅仅可以为用编码从小球藻病毒毒株 CVKA1 分离的乙酰透明质酸合酶的核酸转化的植物阐明乙酰透明质酸的合成。对于用编码从小球藻病毒毒株 CVHI1 分离的乙酰透明质酸合酶的核酸序列转化的烟草植物，在对应的转基因植物中不可能检测到乙酰透明质酸合成。在 WO 05 012529 中唯一的产生乙酰透明质酸的转基因烟草植物合成的乙酰透明质酸的量被陈述为每 ml 测量的体积约 4.2 μ g 乙酰透明质酸，考虑进行所述实验的描述，对应于每克鲜重植物材料产生最多 12 μ g 量的乙酰透明质酸。

乙酰透明质酸合酶催化从原料UDP-N-乙酰基-葡萄糖胺和UDP-葡萄糖醛酸合成乙酰透明质酸。所提到的两种原料都存在于植物细胞中。

在植物细胞中,UDP-葡萄糖醛酸作为抗坏血酸的几种可能的合成途径之一的代谢物(Lorence 等人, 2004, *Plant Physiol* 134, 1200-1205)和作为细胞壁组分果胶和半纤维素合成的中心代谢物,它们在植物细胞的内质网中合成(Reiter, 1998, *Plant Physiol Biochem* 36(1), 167-176)。最重要的和最经常遇到的果胶单体是 D-半乳糖醛酸(2004, H. W. Heldt 在 “*Plant Biochemistry*”, 第三版, Academic Press, ISBN 0120883910),其使用UDP-葡萄糖醛酸合成。此外,还可能使用UDP-葡萄糖醛酸合成半纤维素和果胶合成的代谢物UDP-木糖、UDP-阿拉伯糖、UDP-半乳糖醛酸和UDP-芹菜糖(Seitz 等人, 2000, *Plant Journal*, 21(6), 537-546)。在植物细胞中,UDP-葡萄糖醛酸可以通过己糖磷酸代谢合成,所述代谢包括通过UDP-Glc-DH将UDP葡萄糖转化为UDP-葡萄糖醛酸,或通过氧化肌醇代谢途径,其包括通过葡萄糖醛酸1-磷酸尿苷酰(uridyl)转移酶将葡萄糖醛酸1-磷酸转化为UDP-葡萄糖醛酸。葡萄糖醛酸合成的两种代谢途径似乎相互独立地存在,或者备选地在拟南芥植物的不同组织/发育阶段存在(Seitz 等人, 2000, *Plant Journal* 21(6), 537-546)。所提到的两种代谢途径(己糖磷酸和氧化性肌醇代谢途径)关于UDP-葡萄糖醛酸合成的各自的贡献迄今还没有阐明(Kärkönen, 2005, *Plant Biosystems* 139(1), 46-49)。

酶UDP-Glc-DH催化UDP葡萄糖向UDP-葡萄糖醛酸的转化。Samac 等人(2004, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 113-116, Humana Press, Editor Ashok Mulehandani, 1167-1182)描述了来自大豆的UDP-Glc-DH在苜蓿的韧皮部细胞中的组织特异性过表达,目的是增加这些植物的茎干中的果胶含量。与对应的野生型植物相比,UDP-Glc-DH的活性可以被增加200%以上;然而,对应的植物产生的果胶的量低于对应的野生型植物产生的果胶的量。所述转基因植物的细胞壁级分中木糖和鼠李糖单体的量增加了,而细胞壁级分中甘露糖单体的量减少了。

UDP-Glc-DH在拟南芥植物中组成型过表达导致所述植物与对应的野

生型植物相比显示出异常生长并且具有矮小表型。对应植物的细胞壁级分与对应的野生型植物相比具有增加量的甘露糖和半乳糖和减少量的木糖、阿拉伯糖和糖醛酸类(Roman, 2004, "Studies on The Role of UDP-Glc-DH in Polysaccharide Biosynthesis", Dissertation, Acta Universitatis Upsaliensis, ISBN 91-554-6088-7, ISSN 0282-7476)。从而, 这些结果与 Samac 等人(2004, Applied Biochemistry and Biotechnology 113-116, Humana Press, Editor Ashok Mulehandani, 1167-1182)的结果至少部分矛盾, Samac 等人发现对应的转基因植物的细胞壁级分中减少量的甘露糖和增加量的木糖。

通过细菌菌株的发酵产生乙酰透明质酸与高成本相关, 因为细菌必须在密闭的无菌容器中以昂贵的受控的培养条件下发酵(见例如, US 4,897,349)。此外, 通过细菌菌株发酵产生的乙酰透明质酸的量受到每种情况下存在的生产设施的限制。这里, 必须考虑发酵罐, 由于物理法则, 其不能建造为过大的培养体积。特别可以提到的是从外界喂饲的物质(例如, 细菌的必需营养源、用于调节 pH 的试剂、氧)与有效生产所需的培养基的均匀混合, 其在大的发酵罐中只可以以大的技术消耗(如果存在)来确保。

由于在动物组织中存在其他粘多糖类和特异结合乙酰透明质酸的蛋白质, 从动物有机体纯化乙酰透明质酸复杂化。在患者中, 使用动物蛋白污染的含有乙酰透明质酸的药物制剂可以导致身体的不想要的免疫反应(US 4,141,973), 尤其患者对动物蛋白(例如, 鸡卵白)过敏的情况下。此外, 可以以满意的质量和纯度从动物组织得到的乙酰透明质酸的量(产率)是低的(鸡冠: 0.079% w/w, EP 0144019, US 4,782,046), 其使得必须处理大量的动物组织。从动物组织分离乙酰透明质酸的另一问题在于纯化期间乙酰透明质酸的分子量降低, 因为动物组织也含有乙酰透明质酸降解酶(透明质酸酶)。

除了所提到的透明质酸酶和外毒素外, 链球菌菌株还产生内毒素, 其当存在于药学产品中时, 对患者的健康造成危险。在科学研究中, 表明甚

至市场上的含有乙酰透明质酸的药品也含有可检测量的细菌外毒素(Dick 等人, 2003, *Eur J Ophthalmol.* 13(2), 176-184)。用链球菌菌株产生的乙酰透明质酸的另一缺点是分离的乙酰透明质酸具有比从鸡冠分离的乙酰透明质酸低的分子量(Lapcik 等人 1998, *Chemical Reviews* 98(8), 2663-2684)。US 20030134393 描述了使用链球菌菌株产生乙酰透明质酸, 其合成尤其显著的乙酰透明质酸荚膜(超荚膜化)。发酵后分离的乙酰透明质酸具有 9.1×10^6 的分子量。然而, 产量为每升仅仅 350mg。

通过细菌发酵或从动物组织分离产生乙酰透明质酸的一些缺点可以通过用转基因植物产生乙酰透明质酸来避免; 然而, 使用转基因植物可以产生的当前实现的乙酰透明质酸量将需要相对大面积的栽培以产生相对大量的乙酰透明质酸。此外, 从具有较低乙酰透明质酸含量的植物分离或纯化乙酰透明质酸被认为比从具有较高乙酰透明质酸含量的植物分离或纯化更复杂和昂贵。

尽管乙酰透明质酸具有不寻常的性质, 但是由于它的稀少性和高价格, 其很少(如果有)用于工业应用。

因此, 本发明的一个目的是提供手段和方法, 其允许以足够的量和质量提供乙酰透明质酸并且使得可能提供甚至用于工业应用和食品和饲料领域应用的乙酰透明质酸。

通过权利要求中列出的实施方案实现了该目的。

从而, 本发明涉及遗传修饰的植物细胞或遗传修饰的植物, 其具有稳定整合到它们的基因组中的核酸分子, 所述核酸分子编码乙酰透明质酸合酶, 其特征是所述植物细胞或所述植物与对应的没有遗传修饰的野生型植物细胞或没有遗传修饰的野生型植物相比, 额外具有升高活性的具有(酶促)UDP-葡萄糖脱氢酶(UDP-Glc-DH)活性的蛋白质。

这里, 根据本发明的遗传修饰的植物细胞或根据本发明的遗传修饰的植物的遗传修饰可以是任何遗传修饰, 其导致编码乙酰透明质酸合酶的核酸分子稳定整合到植物细胞或植物中, 并且与对应的没有遗传修饰的野生型植物细胞或没有遗传修饰的野生型植物相比, 在遗传修饰的植物细胞或

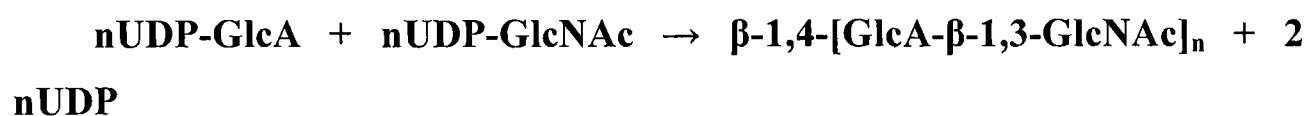
遗传修饰的植物中增加了具有 UDP-Glc-DH 的（酶促）活性的蛋白质的活性。

在本发明的上下文中，术语“野生型植物细胞”将被理解为指用作制备根据本发明的遗传修饰的植物细胞的原材料的植物细胞，即它们的遗传信息除了所导入的遗传修饰和导致编码乙酰透明质酸合酶的核酸分子稳定整合和增加具有 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质的活性外，对应于根据本发明的遗传修饰的植物细胞的遗传信息。

在本发明的上下文中，术语“野生型植物”将被理解为指用作制备根据本发明的遗传修饰的植物的原材料的植物，即它们的遗传信息除了所导入的遗传修饰和导致编码乙酰透明质酸合酶的核酸分子稳定整合和增加具有 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质的活性外，对应于根据本发明的遗传修饰的植物的遗传信息。

在本发明的上下文中，术语“对应的”指当比较多种目标时，被相互比较的所述目标处于相同的条件下。在本发明上下文中，在野生型细胞或野生型植物的上下文中的术语“对应的”指相互比较的植物细胞或植物在相同培养条件下培养并且它们具有相同的（培养）年龄。

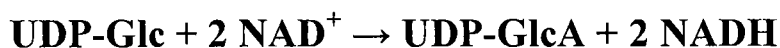
在本发明的上下文中，将术语“乙酰透明质酸合酶”(EC 2.4.1.212)理解为指从底物 UDP- 葡糖醛酸 (UDP-GlcA) 和 N- 乙酰基 - 葡糖胺 (UDP-GlcNAc) 合成乙酰透明质酸的蛋白质。根据下面的反应图催化乙酰透明质酸合成：



已经为下面的生物描述了编码乙酰透明质酸合酶的核酸分子和对应的蛋白质序列：兔(*Oryctolagus cuniculus*) ocHas2 (EMBL AB055978.1, US 20030235893)、ocHas3 (EMBL AB055979.1, US 20030235893); 狒狒(*Papio anubis*) paHas1 (EMBL AY463695.1); 蛙(*Xenopus laevis*) xlHas1 (EMBL M22249.1, US 20030235893)、xlHas2 (DG42) (EMBL AF168465.1)、xlHas3 (EMBL AY302252.1); 人(*Homo sapiens*) hsHAS1 (EMBL D84424.1, US

20030235893)、hsHAS2 (EMBL U54804.1, US 20030235893)、hsHAS3 (EMBL AF232772.1, US 20030235893);小鼠(*Mus musculus*), mmHas1 (EMBL D82964.1, US 20030235893)、mmHAS2 (EMBL U52524.2, US 20030235893)、mmHas3 (EMBL U86408.2, US 20030235893);牛(*Bos taurus*) btHas2 (EMBL AJ004951.1, US 20030235893);鸡(*Gallus gallus*) ggHas2 (EMBL AF106940.1, US 20030235893);大鼠(*Rattus norvegicus*) rnHas 1 (EMBL AB097568.1, Itano 等人, 2004, J. Biol. Chem. 279(18) 18679-18678)、rnHas2 (EMBL AF008201.1); rnHas 3 (NCBI NM_172319.1, Itano 等人, 2004, J. Biol. Chem. 279(18) 18679-18678), 马(*Equus caballus*) ecHAS2 (EMBL AY056582.1, GI:23428486),猪(*Sus scrofa*) sscHAS2 (NCBI NM_214053.1, GI:47522921)、sscHas 3 (EMBL AB159675), 斑马鱼(*Danio rerio*) brHas1 (EMBL AY437407), brHas2 (EMBL AF190742.1) brHas3 (EMBL AF190743.1);多杀巴斯德菌 (*Pasteurella multocida*) pmHas (EMBL AF036004.2);酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*) spHas (EMBL, L20853.1, L21187.1, US 6,455,304, US 20030235893);马链球菌 (*Streptococcus equis*) seHas (EMBL AF347022.1, AY173078.1), 乳房链球菌 (*Streptococcus uberis*) suHasA (EMBL AJ242946.2, US 20030235893), 似马链球菌 (*Streptococcus equisimilis*) seqHas (EMBL AF023876.1, US 20030235893); *Sulfolobus solfataricus* ssHAS (US 20030235893), *Sulfolobus tokodaii* stHas (AP000988.1), 缘草履虫 (*Paramecium bursaria*) 小球藻病毒 1, cvHAS (EMBL U42580.3, PB42580, US 20030235893)。

在本发明的上下文中, 将术语“UDP-葡萄糖脱氢酶(UDP-Glc-DH)” (E.C. 1.1.1.22)理解为指从 UDP-葡萄糖(UDP-Glc)和 NAD^+ 合成 UDP-葡萄糖醛酸(UDP-GlcA)和 NADH 的蛋白质。该催化根据下面的反应式进行:



在本发明的上下文中, 术语“具有 UDP-Glc-DH 的(酶促)活性的蛋白质的增加的活性”指编码具有 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质的内源基因的增加的表达和/或编码具有 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质的转录物的增加的

量和/或具有 UDP-Glc-DH 的蛋白质在细胞中增加的量和/或具有 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质在细胞中增加的酶促活性。

例如,通过测量编码具有 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质的转录物的量(例如,通过 RNA 印迹分析或 RT-PCR),可以测定增加的表达。这里,增加优选指与对应的没有遗传修饰的野生型植物细胞或没有遗传修饰的野生型植物相比,转录物的量增加至少 50%,尤其至少 70%,优选至少 85%,尤其优选至少 100%。编码具有 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质的转录物的量的增加也指没有可检测量的编码具有 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质的转录物的植物或植物细胞在根据本发明的遗传修饰后具有可检测量的编码具有 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质的转录物。

可以测定导致所述植物细胞中这些蛋白质的增加活性的具有 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质的量的增加,例如,可以通过免疫学方法,如蛋白质印迹分析、ELISA(酶联免疫吸附测定法)或者 RIA(放射免疫测定法)。制备与具体蛋白质特异反应,例如,特异结合所述蛋白质的抗体的方法是本领域技术人员已知的(见,例如, Lottspeich 和 Zorbas (Eds.), 1998, Bioanalytik [Bioanalysis], Spektrum akad. Verlag, Heidelberg, Berlin, ISBN 3-8274-0041-4)。一些公司(例如, Eurogentec, 比利时)提供此类抗体的制剂作为订单服务。这里,蛋白质量的增加优选指与对应的没有遗传修饰的野生型植物细胞或没有遗传修饰的野生型植物相比,具有 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质的量增加至少 50%,尤其至少 70%,优选至少 85%,尤其优选至少 100%。具有 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质的量的增加也指具有不可检测量的具有 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质的植物或植物细胞在根据本发明的遗传修饰后具有可检测量的具有 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质。

可以通过本领域技术人员已知的方法描述植物提取物中具有 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质的增加的活性,如 WO 00 11192 中所述。测定具有 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质的活性量的优选方法在一般方法(第 5 项)中给出。

具有 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质的增加量的(酶促)活性优选指此类蛋白质的活性与对应的没有遗传修饰的野生型植物细胞或者没有遗传修饰的野生型植物相比增加至少 50%，优选至少 70%，特别优选至少 85%，尤其优选至少 100%。具有 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质的增加量的(酶促)活性也指没有可检测量的具 UDP-Glc-DH 活性蛋白质的植物或植物细胞在根据本发明的遗传修饰后具有可检测量的具有 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质。

在本发明的上下文中，将术语“基因组”理解为指植物细胞中存在的全部遗传物质。本领域技术人员已知，除了细胞核，其他隔室(例如，质体、线粒体)也含有遗传物质。

在本发明的上下文中，将术语“稳定整合的核酸分子”理解为指核酸分子整合到植物基因组中。稳定整合的核酸分子的特征在于在对应的整合位点复制期间，它与宿主的整合位点边界的核酸序列一起复制，从而，复制的 DNA 链中的整合位点被作为复制模板的阅读链上相同的核酸序列包围。

用于将核酸分子稳定整合到植物宿主细胞的多种技术是可以得到的。这些技术包括使用根瘤土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)或发根土壤杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)作为转化工具用 t-DNA 转化植物细胞、原生质体融合、DNA 的注射、电穿孔、通过生物射弹方法导入 DNA，以及其他选择(“Transgenic Plants”, Leandro ed., Humana Press 2004, ISBN 1-59259-827-7 中综述)。

使用土壤杆菌介导的植物细胞转化已经进行了深入研究并且已经在 EP 120516; Hoekema, IN: The Binary Plant Vector System Offsetdrukkerij Kanters B.V. Alblasterdam (1985), Chapter V; Fraley 等人, Crit. Rev. Plant Sci. 4, 1-46 和在 An 等人 EMBO J. 4, (1985), 277-287 中详细描述。对于马铃薯的转化, 见例如 Rocha-Sosa 等人, EMBO J. 8, (1989), 29-33), 对于番茄植物的转化, 见例如 US 5,565,347。

也已经描述了使用基于土壤杆菌转化的载体转化单子叶植物(Chan 等人, Plant Mol. Biol. 22, (1993), 491-506; Hiei 等人, Plant J. 6, (1994)

271-282; Deng 等人, *Science in China* 33, (1990), 28-34; Wilmink 等人, *Plant Cell Reports* 11, (1992), 76-80; May 等人, *Bio/Technology* 13, (1995), 486-492; Conner and Domisse, *Int. J. Plant Sci.* 153 (1992), 550-555; Ritchie 等人, *Transgenic Res.* 2, (1993), 252-265)。转化单子叶植物的备选系统是使用生物射弹方法转化(Wan 和 Lemaux, *Plant Physiol.* 104, (1994), 37-48; Vasil 等人, *Bio/Technology* 11 (1993), 1553-1558; Ritala 等人, *Plant Mol. Biol.* 24, (1994), 317-325; Spencer 等人, *Theor. Appl. Genet.* 79, (1990), 625-631), 原生质体转化、部分透化细胞的电穿孔、使用玻璃纤维导入 DNA。具体地, 在文献中已经多次描述了玉米的转化(参考例如, WO95/06128, EP0513849, EP0465875, EP0292435; Fromm 等人, *Biotechnology* 8, (1990), 833-844; Gordon-Kamm 等人, *Plant Cell* 2, (1990), 603-618; Koziel 等人, *Biotechnology* 11 (1993), 194-200; Moroc 等人, *Theor. Appl. Genet.* 80, (1990), 721-726)。也已经描述了其他草, 如柳枝稷(*Panicum virgatum*)的转化(Richards 等人, 2001, *Plant Cell Reporters* 20, 48-54)。

也已经描述了其他谷类物种的成功的转化, 例如, 大豆(Wan 和 Lemaux, s.o.; Ritala 等人, s.o.; Krens 等人, *Nature* 296, (1982), 72-74) 和小麦(Nehra 等人, *Plant J.* 5, (1994), 285-297; Becker 等人, 1994, *Plant Journal* 5, 299-307)的转化。所有上面的方法在本发明的上下文中都是合适的。

与现有技术相比, 根据本发明的遗传修饰的植物细胞或根据本发明的遗传修饰的植物提供了如下优点: 它们比仅仅具有乙酰透明质酸合酶活性的植物产生更高量的乙酰透明质酸。这允许以很小的支出产生乙酰透明质酸, 因为从具有较高乙酰透明质酸含量的植物分离乙酰透明质酸较不复杂并且更划算。此外, 与现有技术中描述的植物相比, 使用根据本发明的遗传修饰的植物需要较小的栽培区面积来产生乙酰透明质酸。这导致可能甚至对于工业应用以足够的量提供乙酰透明质酸, 在工业应用中, 由于它的稀少和高价格而在当前没有使用乙酰透明质酸。小球藻属的病毒感染的植

物生物不适于产生相对大量的乙酰透明质酸。在乙酰透明质酸的生产中，病毒感染的藻类具有乙酰透明质酸合成所需的基因不稳定整合到它们的基因组中的缺点(Van Etten 和 Meints, 1999, *Annu. Rev. Microbiol.* 53, 447-494)，因此，为了产生乙酰透明质酸，必须重复病毒感染。因此，不可能分离连续合成所希望的质量和数量的乙酰透明质酸的个别小球藻细胞。此外，在病毒感染的小球藻中，仅在有限的时间内产生乙酰透明质酸，并且由于病毒引起的裂解，仅仅在感染后约 8 小时藻类就被杀死(Van Etten 等人, 2002, *Arch Virol* 147, 1479-1516)。相比，本发明提供了如下优点：根据本发明的遗传修饰的植物细胞和根据本发明的遗传修饰的植物以无限制的方式进行无性或有性繁殖并且它们连续产生乙酰透明质酸。

WO 05 012529 中描述了转基因植物，其具有编码乙酰透明质酸合酶的核酸分子，合成相对小量的乙酰透明质酸。相比，本发明提供了如下优点：根据本发明的遗传修饰的植物细胞和根据本发明的遗传修饰的植物合成明显更高量的乙酰透明质酸。

因此，本发明还提供了根据本发明的遗传修饰的植物细胞或根据本发明的遗传修饰的植物，其合成乙酰透明质酸。

已经观察到乙酰透明质酸随着发育时间在植物组织中积累；因此，将特别优选在所述植物细胞或所述植物收获期间或者收获前(1 或 2)天测定根据本发明的遗传修饰的植物细胞或根据本发明的遗传修饰的植物鲜重或干重中乙酰透明质酸的量。这里，就将用于进一步处理的乙酰透明质酸的量而言，尤其使用植物材料(例如，块茎、种子、叶子)。

合成乙酰透明质酸的根据本发明的遗传修饰的植物细胞或根据本发明的遗传修饰的植物可以通过分离它们合成的乙酰透明质酸和证明其结构来鉴定。

因为植物组织具有不含有透明质酸酶的优点，所以可以用简单而快速的方法证实在根据本发明的遗传修饰的植物细胞或根据本发明的遗传修饰的植物中存在乙酰透明质酸。为此，向待检查的植物组织加入水，然后机械捣碎(借助例如，玻璃研磨机、打浆机、韦林搅切器、液汁提取器等)

植物组织。如果需要，然后向混悬液加入更多水，并通过离心或过筛除去细胞残渣和水不溶性组分。使用例如特异结合乙酰透明质酸的蛋白质可以阐明离心后得到的上清液中乙酰透明质酸的存在。借助特异结合乙酰透明质酸的蛋白质检测乙酰透明质酸的方法描述于例如 US 5,019,498。用于实施 US 5,019,498 中所述方法的测试试剂盒可通过商业途径获得（例如，来自 Corgenix, Inc., Colorado, USA 的透明质酸（HA）测试试剂盒，产品号 029-001）；也见一般方法第 4 项）。平行地，可以用透明质酸酶最初消化所得离心上清液的等分试样，然后借助特异结合乙酰透明质酸的蛋白质证实乙酰透明质酸的存在，如上述。通过平行批中透明质酸酶的作用，降解其中存在的乙酰透明质酸，从而完全消化后，不再可能显著检测显著量的乙酰透明质酸。

离心上清液中乙酰透明质酸的存在可以进一步使用其他分析方法来证明，所述方法为例如 IR、NMR 或者质谱法。

如上文已经提到的，迄今还没有阐明哪条代谢途径（己糖磷酸或氧化性肌醇代谢途径）是用于在植物细胞中合成 UDP-葡萄糖醛酸的主要途径，和两条代谢途径是否对于 UDP-葡萄糖醛酸的合成取决于植物的组织和/或发育阶段而具有不同量的贡献。此外，UDP-Glc-DH 在转基因植物中的过表达不得到一致的结果，并且不能使用此类方法实现增加细胞壁的果胶含量的目的。此外，使用 UDP-Glc-DH 的活性对蛋白质活性的调节受到 UDP-木糖的抑制。这对于来自 procaryonts (Campbell 等人, 1997, J. Biol. Chem. 272(6), 3416-3422; Schiller 等人, 1973, Biochim. Biophys Acta 293(1), 1-10)、来自动物生物 (Balduini 等人, 1970, Biochem. J. 120(4), 719-724) 和来自植物 (Hinterberg, 2002, Plant Physiol. Biochem. 40, 1011-1017) 的所述蛋白质进行了阐明。

在文献中没有阐明什么可能限制植物细胞中合成的乙酰透明质酸的量。

因此，已经令人惊奇地发现与（仅）具有乙酰透明质酸合酶活性的遗传修饰的植物细胞或遗传修饰的植物相比，具有编码乙酰透明质酸的核酸

分子并且额外具有增加的 UDP-Glc-DH 活性的遗传修饰的植物细胞或遗传修饰的植物产生明显更高量的乙酰透明质酸。

在优选实施方案中，本发明涉及根据本发明的遗传修饰的植物细胞或根据本发明的遗传修饰的植物，其特征在于它们与（仅）具有乙酰透明质酸合酶活性的遗传修饰的植物或遗传修饰的植物细胞相比或者与具有乙酰透明质酸合酶活性并且具有 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质活性没有增加的遗传修饰的植物或遗传修饰的植物细胞相比产生增加量的乙酰透明质酸。

在本发明的上下文中，术语“（仅）具有乙酰透明质酸合酶活性的植物细胞或植物”将被理解为指遗传修饰的植物细胞或遗传修饰的植物，其中所述遗传修饰在于与对应的没有遗传修饰的野生型植物细胞或没有遗传修饰的野生型植物相比，它包含编码乙酰透明质酸合酶的核酸分子。

具体地，“（仅）具有乙酰透明质酸合酶活性的植物细胞或植物”的特征在于它们合成乙酰透明质酸并且它们除了将编码乙酰透明质酸合酶的核酸分子导入没有遗传修饰的野生型植物细胞或没有遗传修饰的野生型植物之外没有额外的遗传修饰。优选地，此类植物不具有增加活性的具有 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质。

植物细胞或植物产生的乙酰透明质酸的量可以借助上面已经描述的方法测定，例如，使用商业测试试剂盒（例如，来自 Corgenix, Inc., Colorado, USA 的透明质酸(HA)测试试剂盒，产品号 029-001）。在本发明上下文中优选用于测定植物细胞或植物中乙酰透明质酸含量的方法在下面的一般方法（第 4 项）中描述。

在本发明的另一实施方案中，根据本发明的遗传修饰的植物细胞或根据本发明的遗传修饰的植物分别是合成乙酰透明质酸的绿色陆生植物的植物细胞或绿色陆生植物。

在本发明的上下文中，将术语“绿色陆生植物（有胚植物）”理解为如 Strasburger, “Lehrbuch der Botanik” [植物学课本], 第 34 版, Spektrum Akad. Verl., 1999, (ISBN 3-8274-0779-6)中定义。

本发明的优选实施方案涉及多细胞植物的根据本发明的遗传修饰的植

物细胞或根据本发明的遗传修饰的植物，其是多细胞生物。因此，该实施方案涉及不来自单细胞植物（原生生物）或不是原生生物的植物细胞或植物。

根据本发明的遗传修饰的植物细胞或根据本发明的遗传修饰的植物原则上可以分别是任何植物种类，即单子叶或双子叶植物的植物细胞或植物。它们优选是作物植物，即为了人和动物的食物或为了产生生物量和/或为了制备用于技术、工业目的的物质而被人类栽培的植物（例如，玉米、稻、小麦、苜蓿、黑麦、燕麦、大麦、树薯、马铃薯、番茄、柳枝稷(*Panicum virgatum*)、西米、绿豆、pas、高粱、胡萝卜、茄子、小萝卜、油籽油菜、大豆、花生、黄瓜、南瓜、甜瓜、韭葱、大蒜、卷心菜、菠菜、红薯、芦笋、小西葫芦、莴苣、朝鲜蓟、甜玉米、欧洲防风、鸭葱属、耶路撒冷洋蓟、香蕉、甜菜、甘蔗、甜菜根、绿花椰菜、卷心菜、洋葱、黄甜菜、蒲公英、草莓、苹果、杏子、李子、桃、葡萄树、花椰菜、芹菜、青椒、蕉青甘蓝、大黄）。尤其优选番茄或马铃薯植物。

在优选实施方案中，本发明涉及根据本发明的遗传修饰的植物细胞或根据本发明的遗传修饰的植物，其中编码乙酰透明质酸合酶的核酸分子的特征在于它编码病毒乙酰透明质酸合酶。编码乙酰透明质酸合酶的核酸分子优选编码感染藻类的病毒的乙酰透明质酸合酶。

关于感染藻类的病毒，编码乙酰透明质酸合酶的核酸分子优选编码感染小球藻的病毒的乙酰透明质酸合酶，尤其优选缘草履虫小球藻病毒1的乙酰透明质酸合酶，特别优选缘草履虫小球藻病毒的 H1 毒株的乙酰透明质酸合酶。

在另一优选的实施方案中，本发明涉及根据本发明的遗传修饰的植物细胞或根据本发明的遗传修饰的植物，其中编码乙酰透明质酸合酶的核酸分子的特征在于编码乙酰透明质酸合酶的核酸分子的密码子与编码该乙酰透明质酸合酶所来源的生物的乙酰透明质酸合酶的核酸分子的密码子相比被修饰。特别优选地，已经修饰了乙酰透明质酸合酶的密码子使得它们适于植物细胞或植物的密码子使用频率，所述密码子被整合或将整合在所述

植物细胞或植物的基因组中。

由于遗传密码简并性，氨基酸可以由一种或多种密码子编码。在不同的生物中，编码氨基酸的密码子以不同的频率使用。编码核酸序列的密码子对它们在植物细胞或植物（待表达的序列将整合在它们的基因组中）中使用的频率的适应可以促进在特定植物细胞或植物细胞中增加量的翻译的蛋白质和/或所述 mRNA 的稳定性。密码子在所讨论的植物细胞或植物中的使用频率可以由技术人员确定，他们通过对所述生物中尽可能多的编码核酸序列检查用于编码某个氨基酸的某些密码子的频率来确定。某些生物中密码子使用频率是本领域技术人员已知的并且可以使用计算机程序用简单和快速的方式确定。合适的计算机程序可以公开获得并且在因特网上自由提供（例如，<http://gcua.schoedl.de/>；<http://www.kazusa.or.jp/codon/>；<http://www.entelechon.com/eng/cutanalysis.html>）。

通过体外诱变或优选地，基因序列的从头合成可以进行编码核酸序列的密码子与它们在植物细胞或植物中频率的适应，其中所述序列将在所述植物细胞或植物的基因组中表达或整合到基因组中。从头合成核酸序列的方法是本领域技术人员公知的。例如，通过最初合成各核酸寡核苷酸，将这些与其互补寡核苷酸杂交，从而它们形成 DNA 双链，然后连接各双链寡核苷酸使得得到所希望的核酸序列，可以进行从头合成。从头合成核酸序列（包括将密码子使用的频率与某种靶标生物相适应）也可以由提供这些服务的公司完成（例如，Entelechon GmbH, Regensburg, 德国）。

编码乙酰透明质酸合酶的核酸分子的特征优选在于它编码乙酰透明质酸合酶，其氨基酸序列与 SEQ ID NO 2 所示的氨基酸序列具有至少 70 %、优选至少 80 %、优选至少 90 %，特别优选至少 95 % 同一性。在尤其优选的实施方案中，编码乙酰透明质酸合酶的核酸分子的特征在于它编码具有 SEQ ID NO 2 中所示氨基酸序列的乙酰透明质酸合酶。

在进一步的实施方案中，编码乙酰透明质酸合酶的核酸分子与 SEQ ID NO 1 或 SEQ ID NO 3 所示的核酸序列具有至少 70 %、优选至少 80 %、优选至少 90 %，特别优选至少 95 % 同一性。在尤其优选的实施方案中，编码

乙酰透明质酸合酶的核酸分子的特征在于它具有 SEQ ID NO 3 中所示的核酸序列。

在 2004 年 8 月 25 日, 根据布达佩斯条约将质粒 IC 341-222 (包含编码缘草履虫小球藻病毒乙酰透明质酸合酶的合成的核酸分子) 保藏在德意志微生物保藏中心 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Brunswick, 德国), 保藏号为 DSM16664。SEQ ID NO 2 中所示的氨基酸序列可以来自整合到质粒 IC 341-222 中的核酸序列的编码区并且编码缘草履虫小球藻病毒乙酰透明质酸合酶。

因此, 本发明还涉及根据本发明的遗传修饰的植物细胞或根据本发明的遗传修饰的植物, 其中编码乙酰透明质酸合酶的核酸分子的特征在于它编码的蛋白质的氨基酸序列可以来自插入到质粒 DSM16664 中的核酸序列的编码区或者它编码的蛋白质的氨基酸序列与可以来自插入到质粒 DSM16664 的核酸序列的编码区的氨基酸序列具有至少 70%、优选至少 80%、优选至少 90%, 特别优选至少 95% 同一性。

本发明还涉及根据本发明的遗传修饰的植物细胞或根据本发明的遗传修饰的植物, 其中编码乙酰透明质酸合酶的核酸分子的特征在于它是整合到质粒 DSM16664 中的乙酰透明质酸合酶编码核酸或者它可以与整合到质粒 DSM16664 中的核酸序列具有至少 70%、优选至少 80%、优选至少 90%, 特别优选至少 95% 同一性。

本发明还涉及根据本发明的遗传修饰的植物细胞或根据本发明的遗传修饰的植物, 其特征不在于它们与对应的没有遗传修饰的野生型植物细胞或对应的没有遗传修饰的野生型植物相比具有稳定整合到它们的基因组中的外源核酸分子, 所述外源核酸分子增加具有 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质的活性。

在本发明的上下文中, 将术语“外源核酸分子”理解为指分子, 其不天然存在于对应的野生型植物细胞中或者不以野生型植物细胞的具体空间排列天然存在或位于野生型植物细胞的基因组中它不天然存在的位置上。优

选地，所述外源核酸分子是重组分子，其包含多种元件，它们的组合或特定空间排列不天然存在于植物细胞中。

在本发明的上下文中，将术语“重组核酸分子”理解为指包含多种核酸分子的核酸分子，所述多种核酸分子天然存在的组合不像重组核酸分子中存在的组合。从而，重组核酸分子除了包含编码乙酰透明质酸合酶和/或具有 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质的核酸分子外，还包含不与所提到的核酸分子组合天然存在的核酸序列。与编码乙酰透明质酸合酶或具有 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质的核酸分子组合的重组核酸分子上存在的所述额外核酸序列可以是任何序列。例如，它们可以是基因组的植物核酸序列。额外的核酸序列可以优选是调节序列（启动子、终止信号、增强子），尤其优选在植物组织中有活性的调节序列，尤其优选在植物组织中有活性的调节序列，特别优选在植物组织中有活性的组织特异性调节序列。产生重组核酸分子的方法是本领域技术人员已知的并且包括遗传工程方法，如通过连接方法连接核酸分子、遗传重组或从头合成核酸分子（见，例如，Sambrook 等人, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 第三版 (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. ISBN: 0879695773, Ausubel 等人, *Short Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons; 第五版(2002), ISBN: 0471250929)。

分别与对应的没有遗传修饰的野生型植物细胞或没有遗传修饰的野生型植物相比在基因组中稳定整合外源核酸分子或者在基因组中整合多个外源核酸分子（所述核酸分子编码乙酰透明质酸合酶并且增加具有 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质的活性）的遗传修饰的植物细胞和遗传修饰的植物可以与所述野生型植物细胞或所述野生型植物分别通过如下事实相区别：它们包含不天然存在于野生型植物细胞或野生型植物中的外源核酸分子，或者这种分子整合在根据本发明的遗传修饰的植物细胞的基因组中或根据本发明的遗传修饰的植物的基因组中的它分别不在野生型植物细胞和野生型植物中发生的位置上，即处于不同的基因组环境中。此外，此类根据本发明的遗传修饰的植物细胞和根据本发明的遗传修饰的植物可以分别

与没有遗传修饰的野生型植物细胞和没有遗传修饰的野生型植物相区别，因为它们（如果合适）除了天然存在于野生型植物细胞或野生型植物中的这种分子的拷贝外，还包含稳定整合到它们基因组中的外源核酸分子的至少一个拷贝。如果导入根据本发明的遗传修饰的植物细胞或根据本发明的遗传修饰的植物的外源核酸分子是已经天然存在于野生型植物细胞或野生型植物中的额外拷贝，那么根据本发明的遗传修饰的植物细胞和根据本发明的遗传修饰的植物可以分别与野生型植物细胞和野生型植物通过如下事实相区别：该额外的拷贝/这些额外的拷贝位于基因组中的位置上，在所述位置上它们分别不存在于野生型植物细胞和野生型植物中。

核酸分子向植物细胞或植物的基因组的稳定整合可以通过遗传方法和/或分子生物学方法阐明。核酸分子向植物细胞基因组或植物基因组的稳定整合的特征在于在已经遗传了所述核酸分子的后代中，稳定整合的核酸分子存在于与亲代相同的遗传环境中。核酸序列在植物细胞基因组中或植物基因组中稳定整合的存在可以使用本领域技术人员已知的方法阐明，如借助 DNA 印迹分析或 RFLP(限制性片段长度多态性)分析 (Nam 等人, 1989, *The Plant Cell* 1, 699-705; Leister and Dean, 1993, *The Plant Journal* 4 (4), 745-750), 使用基于 PCR 的方法，如扩增片段长度差异分析 (扩增片段长度多态性, AFLP) (Castiglioni 等人, 1998, *Genetics* 149, 2039-2056; Meksem 等人, 2001, *Molecular Genetics and Genomics* 265, 207-214; Meyer 等人, 1998, *Molecular and General Genetics* 259, 150-160)或使用限制性内切核酸酶切割的扩增片段 (切割扩增的多态性序列, CAPS) (Konieczny 和 Ausubel, 1993, *The Plant Journal* 4, 403-410; Jarvis 等人, 1994, *Plant Molecular Biology* 24, 685-687; Bachem 等人, 1996, *The Plant Journal* 9 (5), 745-753)。

原则上，外源核酸分子可以是任一核酸分子，其在植物细胞或植物中增加具有 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质的活性。

在本发明上下文中，通过使用插入诱变可以制备根据本发明的遗传修饰的植物细胞和根据本发明的遗传修饰的植物（综述：Thornycroft 等人，

2001, *Journal of experimental Botany* 52 (361), 1593-1601)。在本发明上下文中，将插入诱变理解为具体指转座子或转移 DNA(t-DNA)向编码具有 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质的基因中或基因附近的插入，从而增加具有 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质在所述细胞中的活性。

转座子可以是天然存在于细胞中的转座子（内源转座子）或者不天然存在于所述细胞中而是通过遗传工程，如细胞的转化导入细胞中的那些转座子（异源转座子）。通过转座子对基因表达的修饰是本领域技术人员已知的。内源和异源转座子作为植物生物技术中工具的综述在 Ramachandran 和 Sundaresan (2001, *Plant Physiology and Biochemistry* 39, 234-252)中给出。

t-DNA 插入诱变是基于来自土壤杆菌的 Ti 质粒的某些片段(t-DNA)可以整合到植物细胞的基因组这一事实。在植物染色体中的整合位点不是固定的，整合可以是在任何位置。如果 t-DNA 整合到代表基因功能的染色体区段中或附近，那么这可以导致增加的基因表达从而导致所述基因编码的蛋白质活性的改变。

插入基因组（尤其转座子或 t-DNA）的序列的特征在于它们包含导致编码具有 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质的基因的调节序列的活化（“活化标记”）。优选地，插入基因组中的序列（尤其转座子或 t-DNA）的特征在于它们整合到植物细胞或植物基因组中内源核酸分子附近，所述核酸分子编码具有 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质。

根据本发明的遗传修饰的植物细胞和根据本发明的遗传修饰的植物可以例如使用活化标记方法产生（见例如，Walden 等人, *Plant J.* (1991), 281-288; Walden 等人, *Plant Mol. Biol.* 26 (1994), 1521-1528)。该方法是基于增强子序列如花椰菜花叶病毒的 35S RNA 启动子增强子或章鱼碱合酶增强子对内源启动子的活化。

在本发明的上下文中，将术语“t-DNA 活化标记”理解为指 t-DNA 片段包含增强子序列，并且，通过整合到植物细胞的基因组中，增加了具有 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质的活性。

在本发明的上下文中，将术语“转座子活化标记”理解为指转座子，其包含增强子序列，并且，通过整合到植物细胞的基因组中，增加了具有 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质的活性。

本发明的尤其优选的实施方案涉及根据本发明的遗传修饰的植物细胞或根据本发明的遗传修饰的植物，其特征在于外源核酸分子编码具有 UDP-Glc-DH 的酶促活性的蛋白质。

根据本发明，编码具有 UDP-Glc-DH 的酶促活性的蛋白质的外源核酸分子可以来自任何生物；优选地，所述核酸分子来自细菌、真菌、动物、植物或病毒，尤其优选来自细菌、植物或病毒，特别优选来自病毒。

关于病毒，编码具有 UDP-Glc-DH 的酶促活性的蛋白质的外源核酸分子优选来自感染藻类的病毒，优选来自感染小球藻属藻类的病毒，尤其优选来自缘草履虫小球藻病毒，特别优选来自 H1 毒株的缘草履虫小球藻病毒。

也可能将通过诱变产生的核酸分子代替编码具有 UDP-Glc-DH 的酶促活性的蛋白质的天然存在的核酸分子导入根据本发明的遗传修饰的植物细胞或根据本发明的遗传修饰的植物，其中所述经诱变的外源核酸分子的特征在于它编码具有 UDP-Glc-DH 的酶促活性的蛋白质，该蛋白质受到代谢物的抑制减小（例如，葡萄糖醛酸代谢抑制）。

编码具有 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质的核酸分子在文献中描述并且是本领域技术人员已知的。从而，编码具有 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质的核酸分子从如下生物描述：病毒，如小球藻病毒 1(NCBI acc No NC_000852.3)、细菌，如大肠杆菌(EMBL acc No: AF176356.1)、真菌，如黑曲霉 (*Aspergillus niger*) (EMBL acc No AY594332.1)、新型隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*) (EMBL acc No AF405548.1)、昆虫，如黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) (EMBL acc No AF001310.1)、脊椎动物，如人 (*Homo sapiens*) (EMBL acc No AF061016.1)、小家鼠 (*Mus musculus*) (EMBL acc No AF061017.1)、欧洲牛 (*Bos taurus*) (EMBL acc No AF095792.1)、光滑爪蟾(*Xenopus laevis*) (EMBL acc No AY762616.1)，或

植物, 例如白杨(EMBL acc No AF053973.1)、芋头 (*Colocasia esculenta*) (EMBL acc No AY222335.1)、盐生杜氏藻 (*Dunaliella salina*) (EMBL acc No AY795899.1)、大豆 (*Glycine max*) (EMBL acc No U53418.1)。

在优选实施方案中, 本发明涉及根据本发明的遗传修饰的植物细胞和根据本发明的遗传修饰的植物, 其中编码具有 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质的外源核酸分子选自:

- a) 编码具有 SEQ ID NO 5 给出的氨基酸序列的蛋白质的核酸分子;
- b) 编码蛋白质的核酸分子, 所述蛋白质的序列与 SEQ ID NO 5 给出的氨基酸序列具有至少 60 % 同一性;
- c) 包含 SEQ ID NO 4 中所示核苷酸序列的核酸分子或者与其互补的序列或者 SEQ ID NO 6 所示的核苷酸序列或者其互补序列;
- d) 与 a) 或 c) 中所述核酸序列具有至少 70 % 同一性的核酸分子;
- e) 与 a) 或 c) 中所述核酸序列的至少一条链在严格条件下杂交的核酸分子;
- f) 核酸分子, 其核苷酸序列由于遗传密码简并性而从 a) 或 c) 所提到的核酸分子的序列衍生得到;
- g) 核酸分子, 其是 a)、b)、c)、d)、e) 或 f) 提到的核酸分子的片段、等位基因变体和/或衍生物。

在本发明的上下文中, 术语“杂交”指在常规杂交条件下, 优选在严格条件下杂交, 如 Sambrock 等人, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2 ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) 中所述。“杂交”尤其优选指在下面的条件下杂交:

杂交缓冲液:

2xSSC; 10xDenhardt 溶液(Fikoll 400+PEG+BSA; 比例 1:1:1); 0.1% SDS; 5 mM EDTA; 50 mM Na₂HPO₄; 250 µg/ml 鲑精 DNA; 50 µg/ml tRNA; 或

25 M 磷酸钠缓冲液 pH 7.2; 1 mM EDTA; 7% SDS

杂交温度:

T=65 到 68°C

洗涤缓冲液: 0.1xSSC; 0.1% SDS

洗涤温度: T=65 到 68°C。

与编码具有 **UDP-Glc-DH** 活性的蛋白质的核酸分子杂交的核酸分子可以来自任何生物; 因此, 它们可以来自细菌、真菌、动物、植物或病毒。

与编码具有 **UDP-Glc-DH** 活性的蛋白质的核酸分子杂交的核酸分子优选来自感染藻类的病毒, 优选来自感染小球藻属藻类的病毒, 尤其优选来自缘草履虫小球藻病毒, 最优选来自缘草履虫小球藻病毒的 **H1** 毒株。

与所提到的分子杂交的核酸分子可以例如从基因组或 **cDNA** 文库分离。此类核酸分子可以用所提到的核酸分子或者这些分子的部分或者这些分子的反向互补序列, 例如, 通过根据标准方法杂交 (见例如, **Sambrook** 等人, 1989, **Molecular Cloning, A Laboratory Manual**, 第二版, **Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY**) 或通过用 **PCR** 扩增进行鉴定和分离。

作为分离编码具有 **UDP-Glc-DH** 活性的蛋白质的核酸序列的杂交样品, 可能使用例如精确地或基本上具有 **SEQ ID NO 4** 或 **SEQ ID NO 6** 给出的核苷酸序列的核酸分子, 或者这些序列的部分。

用作杂交样品的片段可以是使用常规合成技术制备的合成片段或寡核苷酸, 其序列与本发明的上下文中描述的核酸分子基本上相同。一旦鉴定和分离了与本发明上下文中描述的核酸序列杂交的基因, 应该测定序列并分析该序列编码的蛋白质的性质以确定它们是否具有 **UDP-Glc-DH** 活性的蛋白质。怎样确定蛋白质是否具有 **UDP-Glc-DH** 活性的蛋白质的活性的方法 (例如, **De Luca** 等人, 1976, **Connective Tissue Research** 4, 247-254; **Bar-Peled** 等人, 2004, **Biochem. J.** 381, 131-136; **Turner** 和 **Botha**, 2002, **Archives Biochem. Biophys.** 407, 209-216) 是本领域技术人员已知的并且在文献中广泛描述。

与本发明上下文中描述的核酸分子杂交的分子包含所提到的核酸分子

的具体片段、衍生物和等位基因变体。在本发明上下文中，术语“衍生物”指那些分子的序列与上述核酸分子的序列在一个或多个位置不同并且与这些序列高度同一。与上述核酸分子的不同可以是例如由于缺失、添加、替代、插入或重组。

在本发明的上下文中，术语“同一性”指核酸分子的编码区的全长上或者编码至少 60%，尤其至少 70%，优选至少 80%，尤其优选至少 90%，特别优选至少 95%同一性的蛋白质的氨基酸序列全长上的序列同一性。在本发明的上下文中，将术语“同一性”理解为指与其他蛋白质/核酸的相同氨基酸/核苷酸数目（同一性），以百分比表示。优选地，与具有 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质的同一性通过与 SEQ ID NO 5 给出的氨基酸序列比较来确定，并且与编码具有 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质核酸分子的同一性通过 SEQ ID NO 4 或 SEQ ID NO 6 给出的核酸序列与其他蛋白质/核酸借助比较程序比较来确定。如果将相互比较的序列为不同的长度，那么将通过确定较短序列与较长序列共有的氨基酸数目的同一性（百分比）来确定同一性。优选地，使用已知的和可公开得到的计算机程序 ClustalW (Thompson 等人, Nucleic Acids Research 22 (1994), 4673-4680)确定同一性。ClustalW 可以从 Julie Thompson (Thompson@EMBL-Heidelberg.DE) 和 Toby Gibson (Gibson@EMBL-Heidelberg.DE), European Molecular Biology Laboratory, Meyerhofstrasse 1, D 69117 Heidelberg, 德国公开获得。ClustalW 也可以从多个因特网网页,如从 IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, B.P.163, 67404 Illkirch Cedex, France; <ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/>) 和 EBI (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/>) 和 EBI 的所有镜像因特网网页 (European Bioinformatics Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SD, UK)获得。

优选地，使用 ClustalW 计算机程序 1.8 版来确定本发明上下文中描述的蛋白质和其他蛋白质之间的同一性。这里，如下设置参数：

KTUPLE=1, TOPDIAG=5, WINDOW=5, PAIRGAP=3,

GAPOPEN=10, GAPEXTEND=0.05, GAPDIST=8, MAXDIV=40, MATRIX=GONNET, ENDGAPS(OFF), NOPGAP, NOHGAP.

优选地,使用 ClustalW 计算机程序 1.8 版来确定例如本发明上下文中描述的核酸分子的核苷酸序列和其他核酸分子的核苷酸序列之间的同一性。这里,如下设置参数:

KTUPLE=2, TOPDIAGS=4, PAIRGAP=5, DNAMATRIX:IUB, GAPOPEN=10, GAPEXT=5, MAXDIV=40, TRANSITIONS: 不加权。

同一性还指在所述核酸分子或它们编码的蛋白质之间存在功能和/或结构等同物。与上述分子同源并且代表这些分子的衍生物的核酸分子通常是这些分子的变体,其代表具有相同生物学功能的修饰。它们可以是天然存在的变异,例如,来自其他物种的序列,或者是突变,其中这些突变以天然的方式发生或者通过定向诱变导入。此外,变体可以是合成产生的序列。等位基因变体可以是天然存在的变体或者合成产生的变体或者通过重组 DNA 技术产生的变体。特定形式的衍生物是例如由于遗传密码简并性而与本发明上下文所述的核酸分子不同的核酸分子。

编码具有 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质的核酸分子的多种衍生物具有某些共同特征。

这些可以是例如生物活性、底物特异性、分子量、免疫反应性、构象,等等,以及物理性质,如凝胶电泳中的迁移率性质、层析行为、沉降系数、溶解度、光谱性质、稳定性、最适 pH、最适温度,等等。具有 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质的优选性质是本领域技术人员已知的,已经在上文提到并且将在本文以类似的方式应用。

在另一优选实施方案中,本发明涉及根据本发明的遗传修饰的植物细胞或根据本发明的遗传修饰的植物,其中编码具有 UDP-Glc-DH 的酶促活性的蛋白质的核酸分子的特征在于所述核酸分子的密码子与编码具有亲本生物的 UDP-Glc-DH 的酶促活性的所述蛋白质的核酸分子的密码子不同。尤其优选地,改变编码具有 UDP-Glc-DH 的酶促活性的蛋白质的核酸分子的密码子使得它们适应植物细胞或植物的密码子使用频率,所述植物细胞

或植物的基因组中被整合或将被整合所述核酸分子。

本发明还提供了根据本发明的遗传修饰的植物细胞或根据本发明的遗传修饰的植物，其特征在于稳定整合到植物细胞或植物的基因组中的编码乙酰透明质酸合酶和/或编码具有 **UDP-Glc-DH** 的酶促活性的蛋白质的外源核酸分子连接到启动植物细胞中转录的调节元件（启动子）。这些可以是同源或异源启动子。启动子可以是组成型的、组织特异性的、发育特异性的启动子或者受到外界因素的调节（例如，应用化学物质后、受到非生物因子作用，如热和/或冷、干旱、疾病等等的调节）。这里，编码乙酰透明质酸合酶或者具有 **UDP-Glc-DH** 的酶促活性的蛋白质的核酸分子可以在每种情况中连接到相同的启动子，或者各序列可以连接到不同的启动子，所述核酸分子整合到根据本发明的遗传修饰的植物细胞或根据本发明的遗传修饰的植物的基因组中。

本发明的优选实施方案涉及根据本发明的遗传修饰的植物细胞或根据本发明的遗传修饰的植物，其中选自编码乙酰透明质酸合酶或具有 **UDP-Glc-DH** 的酶促活性的蛋白质的至少一种外源核酸分子，尤其优选至少两种外源核酸分子，特别优选三种外源核酸分子连接到组织特异性启动子。优选的组织特异性启动子是在植物块茎、叶、果实或种子细胞中特异启动转录的启动子。

为了表达编码乙酰透明质酸合酶或具有 **UDP-Glc-DH** 的酶促活性的蛋白质的核酸分子，这些优选连接到调节 **DNA** 序列，确保植物细胞中的转录。这些包括具体的启动子。通常，在植物细胞中有活性的任何启动子都适于表达。

这里，可以选择启动子使得表达是组成型的或者仅在某个组织中，在植物的特定发育点或者在外界因素决定的时间点。对于植物和待表达的核酸分子，启动子可以是同源的或异源的。

合适的启动子是例如，用于组成型表达的花椰菜花叶病毒的 **35S RNA** 启动子或者玉米或洋丁香（*Cestrum*）**YLCV** 的泛蛋白启动子（黄缩叶病毒（**Yellow Leaf Curling Virus**）；**WO 01 73087**；**Stavolone** 等人，2003, **Plant**

Mol. Biol. 53, 703-713), 用于在马铃薯中块茎特异性表达的 *patatingen* 启动子 B33 (Rocha-Sosa 等人, EMBO J. 8 (1989), 23-29), 或者番茄的果实特异性启动子, 如来自番茄的聚半乳糖醛酸酶启动子 (Montgomery 等人, 1993, Plant Cell 5, 1049-1062) 或番茄的 E8 启动子 (Metha 等人, 2002, Nature Biotechnol. 20(6), 613-618) 或者来自桃的 ACC 氧化酶启动子 (Moon 和 Callahan, 2004, J. Experimental Botany 55 (402), 1519-1528), 或者确保仅在光合活性组织中表达的启动子, 例如 ST-LS1 启动子 (Stockhaus 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 7943-7947; Stockhaus 等人, EMBO J. 8 (1989), 2445-2451) 或用于胚乳特异性表达, 如来自小麦的 HMWG 启动子、USP 启动子、菜豆蛋白启动子、来自玉米的玉米醇溶蛋白基因的启动子 (Pedersen 等人, Cell 29 (1982), 1015-1026; Quatroccio 等人, Plant Mol. Biol. 15 (1990), 81-93)、谷蛋白启动子 (Leisy 等人, Plant Mol. Biol. 14 (1990), 41-50; Zheng 等人, Plant J. 4 (1993), 357-366; Yoshihara 等人, FEBS Lett. 383 (1996), 213-218), *shrunk-1* 启动子 (Werr 等人, EMBO J. 4 (1985), 1373-1380), 球蛋白启动子 (Nakase 等人, 1996, Gene 170(2), 223-226) 或醇溶蛋白启动子 (Qu 和 Takaiwa, 2004, Plant Biotechnology Journal 2(2), 113-125)。然而, 还可能使用仅在外界因素决定的时间点有活性的启动子 (见例如, WO 9307279)。这里尤其重要的是热休克蛋白启动子, 其允许简单的诱导。还可能使用种子特异性启动子, 如来自蚕豆 (*Vicia faba*) 的 USP 启动子, 其确保在蚕豆和其他植物中的种子特异性表达 (Fiedler 等人, Plant Mol. Biol. 22 (1993), 669-679; Bäumlein 等人, Mol. Gen. Genet. 225 (1991), 459-467)。

感染藻类的病毒基因组中存在的启动子的使用也适于在植物中表达核酸序列 (Mitra 等人, 1994, Biochem. Biophys Res Commun 204(1), 187-194; Mitra and Higgins, 1994, Plant Mol Biol 26(1), 85-93, Van Etten 等人, 2002, Arch Virol 147, 1479-1516)。

在本发明的上下文中, 将术语“组织特异性”理解为指表现 (例如, 转录起始) 基本上局限于特定组织。

在本发明的上下文中，将术语“块茎、果实或种子细胞”理解为指块茎、果实或种子中存在的所有细胞。

在本发明的上下文中，将术语“同源启动子”理解为指天然存在于用于制备根据本发明的遗传修饰的植物细胞或根据本发明的遗传修饰的植物中的植物细胞或植物的启动子（关于植物细胞或植物是同源的）或者指调节生物中基因表达的启动子，其中所述序列从所述生物分离（关于待表达的核酸分子是同源的）。

在本发明的上下文中，将术语“异源启动子”理解为指不天然存在于用于制备根据本发明的遗传修饰的植物细胞或根据本发明的遗传修饰的植物中的植物细胞或植物的启动子（关于所述植物细胞或植物是异源的）或指启动子，其在从中分离待表达的核酸序列的生物中不是天然存在用于调节所述核酸序列的表达（关于待表达的核酸分子是异源的）。

还存在终止序列（多聚腺苷酸化信号），其用作在转录物加入多聚 A 尾。认为多聚 A 尾用于稳定转录物。此类元件在文献中描述（参考 Gielen 等人, EMBO J. 8 (1989), 23-29)并且可以如所希望的交换。

还可能的是内含子序列存在于启动子和编码区之间。此类内含子序列可以导致表达的稳定性和植物中增加的表达(Callis 等人, 1987, Genes Devel. 1, 1183-1200; Luehrsen,和 Walbot, 1991, Mol. Gen. Genet. 225, 81-93; Rethmeier 等人, 1997; Plant Journal 12(4), 895-899; Rose 和 Beliakoff, 2000, Plant Physiol. 122 (2), 535-542; Vasil 等人, 1989, Plant Physiol. 91, 1575-1579; XU 等人, 2003, Science in China Series C Vol.46 No.6, 561-569)。合适的内含子序列是例如来自玉米的 sh1 基因的第一个内含子、来自玉米的多聚泛蛋白基因 1 的第一个内含子、来自稻的 EPSPS 基因的第一个内含子或者来自拟南芥的 PAT1 基因的前两个内含子之一。

本发明还涉及包含根据本发明的遗传修饰的植物细胞的植物。此类植物可以通过从根据本发明的遗传修饰的植物细胞再生产生。

本发明还涉及根据本发明的遗传修饰的植物的可处理的或可消费的部分，其包含根据本发明的遗传修饰的植物细胞。

在本发明的上下文中，将术语“可加工的部分”理解为指植物部分，其用于制备食品或饲料，它们用作工业过程的原材料来源，或者作为制备药品的原材料来源或者作为制备化妆品的原材料来源。

在本发明的上下文中，将术语“可消费的部分”理解为指用作人类食品或者用作动物饲料的植物部分。

本发明还涉及根据本发明的遗传修饰的植物的繁殖材料，其包含根据本发明的遗传修饰的植物细胞。

这里，术语“繁殖材料”包含适于通过无性或生殖途径产生后代的植物的那些组分。适于无性繁殖的是例如插条、愈伤组织培养物、根茎或块茎。其他繁殖材料包括例如，果实、种子、幼苗、原生质体、细胞培养物等等。繁殖材料优选可以为块茎、果实或种子的形式。

在另一实施方案中，本发明涉及根据本发明的遗传修饰的植物的可收获的植物部分，如果实、储藏根和其他根、花、芽、枝条、叶子或茎，优选种子、果实或块茎，这些可收获的部分包含根据本发明的遗传修饰的植物细胞。

优选地，本发明涉及包含乙酰透明质酸的根据本发明的繁殖材料或者根据本发明的植物的可收获部分。尤其优选合成乙酰透明质酸的根据本发明的繁殖材料或根据本发明的植物的可收获部分。

在本发明的上下文中，将术语“马铃薯植物”或“马铃薯”理解为指茄属 (*Solanum*) 的植物种类，尤其茄属的产生块茎的物种，尤其马铃薯 (*Solanum tuberosum*)。

在本发明的上下文中，将术语“番茄植物”或“番茄”理解为指番茄属 (*Lycopersicon*)，尤其番茄 (*Lycopersicon esculentum*) 的植物物种。

本发明的另一优点是根据本发明的遗传修饰的植物的可收获的部分、繁殖材料、可加工的部分或可消费的部分包含比文献中描述的合成乙酰透明质酸的转基因植物更多的乙酰透明质酸。因此，根据本发明的遗传修饰的植物不仅尤其适于用作分离乙酰透明质酸的原材料，而且也可以直接用作食品/饲料或用于制备具有预防或治疗特征（例如，用于骨关节炎预防，

US 6,607,745)的食品/饲料。因为根据本发明的遗传修饰的植物具有比文献中描述的植物更高的乙酰透明质酸含量,所以此类食品/饲料的制备需要较低量的根据本发明的遗传修饰的植物的可收获的部分、繁殖材料、可加工的部分或可消费的部分。如果根据本发明的遗传修饰的植物的可消费的部分被直接作为所称作的“营养治疗剂”消费,那么甚至通过摄入相对少量的物质也可能实现积极效果。这在动物饲料生产中可以是尤其重要的,因为具有太高含量的植物组分的动物饲料不适于作为多种动物物种的饲料。

由于乙酰透明质酸结合水的高容量,根据本发明的遗传修饰的植物的可收获的部分、繁殖材料、可加工的部分或可消费的部分还具有如下优点:当产生固化食品/饲料时需要减少的增稠剂。从而,例如,胶冻剂的产生需要较少的糖,其与对健康的额外的积极作用有关。在需要天然植物材料脱水的食品/饲料生产中,使用根据本发明的遗传修饰的植物的可收获的部分、繁殖材料、可加工的部分或可消费的部分的优点是需要从所述植物材料除去较少的水,导致较低的生产成本,并且由于更温和的制备方法(例如,较低和/或较短的热输入),导致所述食品/饲料的升高的营养价值。从而,例如,在番茄酱的生产中,可以引入较少的能量来实现所希望的稠度。

本发明还提供了制备合成乙酰透明质酸的植物的方法,其包括

a) 遗传修饰植物细胞,其中该遗传修饰包括下面的步骤 i 到 ii

i) 向植物细胞中导入编码乙酰透明质酸合酶的外源核酸分子,

ii) 向植物细胞中导入遗传修饰,该遗传修饰导致具有 UDP-Glc-DH 的酶促活性的蛋白质的活性与对应的没有遗传修饰的野生型植物细胞相比活性升高

其中步骤 i 到 ii 可以以任何顺序单独地进行或者可以同时步骤 i 到 ii 的任一组合,

b) 从步骤 a)的植物细胞再生植物;

c) 如果合适,使用根据步骤 b)的植物再生进一步的植物,

其中如果合适,从根据步骤 b)i)或 b)ii)的植物分离植物细胞并重复方法步骤 a)到 c)直到产生了具有编码乙酰透明质酸合酶的外源核酸分子并

且与对应的没有遗传修饰的野生型植物细胞相比具有 UDP-Glc-DH 的酶促活性的蛋白质活性增加的植物。

本发明优选涉及制备合成乙酰透明质酸的植物的方法，其包括

a) 遗传修饰植物细胞，其中该遗传修饰包含下面任一顺序的步骤 i 到 ii，或者可以单独或同时进行下面步骤 i 到 ii 的任一组合，

i) 向植物细胞中导入编码乙酰透明质酸合酶的外源核酸分子，

ii) 向植物细胞中导入遗传修饰，该遗传修饰导致与对应的没有遗传修饰的野生型植物细胞相比具有 UDP-Glc-DH 的酶促活性的蛋白质活性增加，

b) 从植物细胞再生植物，所述植物细胞包含根据下面步骤的遗传修饰

i) a) i

ii) a) ii

iii) a) i 和 a) ii,

c)

i) 向根据步骤 b)i 的植物的植物细胞导入根据步骤 a ii)的遗传修饰，

ii) 向根据步骤 b)ii 的植物的植物细胞导入根据步骤 a i)的遗传修饰，并再生植物，

d) 如果合适，借助步骤 b) iii 或 c)i 或 c) ii 的任一个得到的植物再生进一步的植物。

向植物细胞导入的根据步骤 a) 的遗传修饰原则上可以是任一类型的修饰，其导致具有 UDP-Glc-DH 的酶促活性的蛋白质的增加的活性。

根据本发明方法的根据步骤 b)和如果合适步骤 c)的植物的再生可以用本领域技术人员已知的方法进行（描述于例如“Plant Cell Culture Protocols”，1999, R.D. Hall 编著, Humana Press, ISBN 0-89603-549-2）。

根据本发明方法的进一步的植物的产生（取决于步骤 c）或步骤 d)的方法）可以例如通过无性繁殖（例如，通过插条、块茎或者愈伤组织培养和再生完整植物）或者通过有性繁殖进行。在该上下文中，优选在受控的

条件下进行有性繁殖，即，将具有特定特征的所选植物相互杂交并增殖。优选以这样的方式发生选择使得进一步的植物（取决于根据步骤 c）或步骤 d)产生的方法）包含在前面步骤中引入的修饰。

在根据本发明的用于制备合成乙酰透明质酸的植物的方法中，用于产生根据本发明的遗传修饰的植物细胞的遗传修饰可以同时进行或以连续步骤进行。这里，是否使用与将编码乙酰透明质酸合酶的外源核酸分子导入植物细胞中的遗传修饰相同的方法进行连续的遗传修饰以导致具有 UDP-Glc-DH 的酶促活性的蛋白质的增加的活性不是重要的。

在用于制备合成乙酰透明质酸的植物的根据本发明方法的另一实施方案中，所述遗传修饰在于将外源核酸分子导入植物细胞的基因组中，其中外源核酸分子的存在或表达导致植物细胞中具有 UDP-Glc-DH 的酶促活性的蛋白质的增加的活性。

如上面关于被导入植物细胞或植物以进行遗传修饰的外源核酸分子所述的，在根据本发明的方法的步骤 a)中为制备合成乙酰透明质酸的植物而导入的是单个核酸分子或多个核酸分子。从而，编码乙酰透明质酸合酶和/或编码具有 UDP-Glc-DH 的酶促活性的蛋白质的外源核酸分子可以一起存在于单个核酸分子上，或者它们可以存在于分开的核酸分子上。如果编码乙酰透明质酸合酶和编码具有 UDP-Glc-DH 的酶促活性的蛋白质的核酸分子存在于多个核酸分子上，那么这些核酸分子可以同时或者以连续的步骤导入植物细胞中。

此外，为了在用于制备合成乙酰透明质酸的根据本发明方法的实践中导入外源核酸分子，可以使用突变细胞或突变体代替野生型植物细胞或野生型植物，所述突变细胞或突变体与野生型植物细胞或野生型植物是不同的，因为它们的具有 UDP-Glc-DH 的酶促活性的蛋白质的活性已经升高了。如果突变体细胞或突变体与对应的野生型植物细胞或野生型植物相比具有 UDP-Glc-DH 的酶促活性的蛋白质的活性已经升高了，那么实施用于产生合成乙酰透明质酸的植物的本发明的方法以向所述突变体细胞或突变体中导入编码乙酰透明质酸合酶的外源核酸分子是足够的。

上面关于使用突变体制备根据本发明的遗传修饰的植物细胞或根据本发明的遗传修饰的植物所述的其他内容都在此处以类似的方式应用。

在优选实施方案中，本发明涉及用于产生合成乙酰透明质酸的植物的本发明方法，其中步骤 a) 中编码乙酰透明质酸合酶的核酸分子选自：

- a) 核酸分子，其特征在于它们编码病毒乙酰透明质酸合酶，
- b) 核酸分子，其特征在于它们编码感染小球藻的病毒的乙酰透明质酸合酶，
- c) 核酸分子，其特征在于它们编码缘草履虫小球藻病毒 1 的乙酰透明质酸合酶，
- d) 核酸分子，其特征在于它们编码缘草履虫小球藻病毒 1 的毒株 H1 的乙酰透明质酸合酶，
- e) 核酸分子，其特征在于编码乙酰透明质酸合酶的核酸分子的密码子与编码该乙酰透明质酸合酶的亲本生物中编码该乙酰透明质酸合酶的核酸分子的密码子相比被修饰，
- f) 核酸分子，其特征在于乙酰透明质酸合酶的密码子已经被修饰，从而它们适应植物细胞或植物的密码子的使用频率，在所述植物细胞或植物的基因组中整合了或将整合所述核酸分子，
- g) 核酸分子，其特征在于它们编码具有 SEQ ID NO 2 中所示氨基酸序列的乙酰透明质酸合酶或者它们编码乙酰透明质酸合酶，其氨基酸序列与 SEQ ID NO 2 中所示氨基酸序列具有至少 70% 同一性，优选至少 80%，尤其优选至少 90%，特别优选至少 95% 同一性，
- h) 核酸分子，其特征在于它们编码蛋白质，该蛋白质的氨基酸序列可以来自插入质粒 DSM16664 的核酸序列的编码区或者它编码蛋白质，该蛋白质的氨基酸序列与可以来自插入质粒 DSM16664 的核酸序列的编码区的氨基酸序列具有至少 70%，优选至少 80%，尤其优选至少 90%，特别优选至少 95% 同一性，
- i) 核酸分子，其包含 SEQ ID NO 1 或 SEQ ID NO 3 中所示的核酸序列或者与 SEQ ID NO 1 或 SEQ ID NO 3 中所示核酸序列具有至少 70

%, 优选至少 80 %, 优选至少 90 %, 特别优选至少 95 % 同一性,

j) 核酸分子, 其包含插入质粒 DSM16664 的核酸序列或者与插入质粒 DSM16664 的核酸序列具有至少 70 %, 优选至少 80 %, 优选至少 90 %, 特别优选至少 95 % 同一性,

k) 编码乙酰透明质酸合酶的核酸分子, 其中编码乙酰透明质酸合酶的核酸序列连接到启动植物细胞中转录的调节元件(启动子)或者

l) 根据 k) 的核酸分子, 其中所述启动子是组织特异性启动子, 尤其优选在植物块茎、果实或种子细胞中特异启动转录起始的启动子。

在优选实施方案中, 本发明涉及用于产生合成乙酰透明质酸的植物的根据本发明的方法, 其中编码具有 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质的外源核酸分子选自:

a) 核酸分子, 其特征在于它们编码具有来自病毒、细菌、动物或植物的 UDP-Glc-DH 的活性的蛋白质,

b) 核酸分子, 其特征在于它们编码具有感染小球藻的病毒的 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质,

c) 核酸分子, 其特征在于它们编码具有缘草履虫小球藻病毒的 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质,

d) 核酸分子, 其特征在于编码具有 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质的核酸分子的密码子与编码具有亲本生物 UDP-Glc-DH 活性的对应蛋白质的核酸分子的密码子相比被修饰,

e) 核酸分子, 其特征在于具有 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质的密码子被修饰使得它们适应植物细胞或植物中所述密码子的使用频率, 其中所述核酸分子将整合到或已经整合到所述植物细胞或植物的基因组中,

f) 编码具有 SEQ ID NO 5 所述氨基酸序列的蛋白质的核酸分子;

g) 编码蛋白质的核酸分子, 其序列与 SEQ ID NO 5 中所示氨基酸序列具有至少 70 %, 优选至少 80 %, 优选至少 90 %, 特别优选至少 95 % 同一性;

h) 包含 SEQ ID NO 4 所示核苷酸序列或者其互补序列的核酸分子

或者 SEQ ID NO 6 所示核苷酸序列或其互补序列;

i) 与 h)所述核酸序列具有至少 70%, 优选至少 80%, 优选至少 90%, 特别优选至少 95% 同一性的核酸分子;

j) 与 f)或 h)中所述的核酸分子的至少一条链在严格条件下杂交的核酸分子;

k) 核酸分子, 其核苷酸序列由于遗传密码简并性而与 f)或 h)所提到的核酸分子的序列不同; 和

l) 核酸分子, 其是 a)、b)、c)、d)、e)、f) 或 h)提到的核酸分子的片段、等位基因变体和/或衍生物;

m) 编码具有 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质的核酸分子, 其中编码具有 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质的核酸序列连接到在植物细胞中启动转录的调节元件(启动子); 或

n) 根据 m)的核酸分子, 其中所述启动子是组织特异性的启动子, 尤其优选在植物块茎、叶子、果实或种子细胞中特异启动转录起始的启动子。

在尤其优选的实施方案中, 用于产生合成乙酰透明质酸的植物的本发明方法用于产生根据本发明的遗传修饰的植物。

本发明还提供了通过用于产生合成乙酰透明质酸的植物的本发明方法可以得到的植物。

本发明还涉及产生乙酰透明质酸的方法, 其包括从根据本发明的遗传修饰的植物细胞、从根据本发明的遗传修饰的植物、从根据本发明的繁殖材料、从根据本发明的可收获的植物部分或从通过用于产生合成乙酰透明质酸的植物的本发明方法可以得到的植物或这些植物部分提取乙酰透明质酸的步骤。

优选地, 这种方法还包括在提取乙酰透明质酸之前收获根据本发明的遗传修饰的植物细胞、根据本发明的遗传修饰的植物、根据本发明的繁殖材料、根据本发明的可收获的植物部分、根据本发明的可加工的植物部分的步骤, 尤其优选还包括在收获前培养根据本发明的遗传修饰的植物细胞或根据本发明的遗传修饰的植物的步骤。

与细菌或动物组织相比，植物组织没有透明质酸酶并且不含有任何 hyaladherins。因此，如上面已经描述的，使用相对简单的方法从植物组织提取乙酰透明质酸是可能的。如果需要，可以使用本领域技术人员已知的方法进一步纯化上述含有乙酰透明质酸的植物细胞或组织的水性提取物，如用乙醇反复沉淀。优选的纯化乙酰透明质酸的方法在一般方法第3项中描述。

已经关于从根据本发明的遗传修饰的植物细胞或根据本发明的遗传修饰的植物提取乙酰透明质酸描述的方法也适于从根据本发明的繁殖材料、从根据本发明的可收获的植物部分或从通过制备合成乙酰透明质酸的本发明方法可以得到的植物或这些植物的部分分离乙酰透明质酸。

本发明还提供了根据本发明的遗传修饰的植物细胞、根据本发明的遗传修饰的植物、根据本发明的繁殖材料、根据本发明的可收获的植物部分、根据本发明的可加工的部分或通过制备乙酰透明质酸的本发明方法可以得到的植物的用途。

本发明还涉及包含根据本发明的遗传修饰的植物细胞的组合物。这里，植物细胞是完整的还是不再是完整的并不是重要的，因为它们已经例如被处理破坏。所述组合物优选是食品或饲料、药品或化妆品。

本发明优选提供了组合物，其包含根据本发明的遗传修饰的植物细胞、根据本发明的遗传修饰的植物或根据本发明的繁殖材料、根据本发明的可收获的植物部分、或根据本发明方法可以得到的植物的组分，并且包含重组核酸分子，其中所述重组核酸分子的特征在于它们包含编码乙酰透明质酸合酶和具有 UDP-Glc-DH 的酶促活性的蛋白质的核酸分子。

外源核酸分子向植物细胞或植物的基因组中的稳定整合导致所述外源核酸分子被整合到植物细胞或植物的基因组中后侧翼为基因组植物核酸序列。

因此，在优选实施方案中，根据本发明的组合物的特征在于根据本发明的组合物中存在的重组核酸分子侧翼是基因组植物核酸序列。

这里，基因组植物核酸序列可以是天然存在于用于制备所述组合物的

植物细胞或植物的基因组中的任何序列。

根据本发明的组合物中存在的重组核酸分子可以是单个或多种重组核酸分子，所述编码乙酰透明质酸合酶和具有 UDP-Glc-DH 的酶促活性的蛋白质的核酸分子存在于单个核酸分子上，或者这些核酸分子可以存在于分开的重组核酸分子上。取决于编码乙酰透明质酸合酶或编码具有 UDP-Glc-DH 的酶促活性的蛋白质的核酸分子怎样存在于根据本发明的组合物中，它们侧翼可以是相同或不同的基因组植物核酸序列。

可以使用本领域技术人员已知的方法阐明根据本发明的组合物包含重组核酸分子，如基于杂交的方法，或优选使用基于 PCR(聚合酶链式反应)的方法。

优选地，根据本发明的组合物包含至少 0.005%，优选至少 0.01%，尤其优选至少 0.05%，特别优选至少 0.1% 的乙酰透明质酸。

如上文已经提到的，可能使用根据本发明的遗传修饰的植物细胞、根据本发明的遗传修饰的植物、根据本发明的繁殖材料、根据本发明的可收获的植物部分、根据本发明的可加工的植物部分、根据本发明的可消费的植物部分或根据本发明方法可以得到的植物制备食品或饲料。然而，分离乙酰透明质酸而用作工业应用的原料也是可能的。从而，例如，根据本发明的遗传修饰的植物或根据本发明的遗传修饰的植物的部分可以引用于农业栽培区域以实现土壤的增加的水结合。此外，根据本发明的遗传修饰的植物或根据本发明的遗传修饰的植物细胞可以用于制备干燥剂（例如，当运输水分敏感产品时使用）或者作为液体吸收剂（例如，用于尿布或用于吸收泄漏的水性液体）。对于此类应用，如果需要，可能使用根据本发明的完整的遗传修饰的植物、根据本发明的遗传修饰的植物的部分或捣碎（例如，碾磨）的根据本发明的遗传修饰的植物或根据本发明的植物部分。适于在使用碾磨的植物或植物部分的应用中使用的尤其是含有乙酰透明质酸但是仅仅含有低比例水的植物部分。这些优选是谷类植物（玉米、稻、小麦、黑麦、燕麦、大麦、西米或高粱）的谷粒。因为根据本发明的遗传修饰的植物细胞和根据本发明的遗传修饰的植物比文献中描述的转基因植

物具有更高的乙酰透明质酸含量，相比，当使用根据本发明的遗传修饰的植物细胞或根据本发明的遗传修饰的植物时，可以在工业应用中使用较少的这些材料。

本发明还提供了制备根据本发明的组合物的方法，其中使用根据本发明的遗传修饰的植物细胞、根据本发明的遗传修饰的植物、根据本发明的繁殖材料、根据本发明的可收获的植物部分、根据本发明的可加工的植物部分、根据本发明的可消费的植物部分或用于产生合成乙酰透明质酸的植物的根据本发明方法可以得到的植物。用于制备本发明组合物的方法优选是制备食品或饲料的方法、制备药品的方法或制备化妆品的方法。

制备食品或饲料的方法是本领域技术人员已知的。在工业领域使用根据本发明的遗传修饰的植物或根据本发明的遗传修饰的植物部分的方法是本领域技术人员已知的并且包括捣碎或碾磨根据本发明的遗传修饰的植物或根据本发明的植物部分；然而，它们不限于这些。在上文已经描述了使用根据本发明的主题制备食品/饲料或用于工业领域产生的一些优点。

用于制备组合物的本发明方法尤其优选是制备包含乙酰透明质酸的组合物的方法。

通过制备根据本发明的组合物的方法可以得到的组合物同样可以由本发明提供。

本发明还涉及根据本发明的遗传修饰的植物细胞、根据本发明的遗传修饰的植物、根据本发明的繁殖材料、根据本发明的可收获的植物部分、根据本发明的可加工的植物部分、根据本发明的可消费的植物部分或根据本发明的产生合成乙酰透明质酸的植物的方法可以得到的植物的用途，用于制备根据本发明的组合物。优选使用根据本发明的遗传修饰的植物细胞、根据本发明的遗传修饰的植物、根据本发明的繁殖材料、根据本发明的可收获的植物部分、根据本发明的可加工的植物部分、根据本发明的可消费的植物部分或根据本发明的产生合成乙酰透明质酸的植物的方法可以得到的植物制备食品或饲料、制备药品或制备化妆品。

序列描述

SEQ ID NO 1: 编码缘草履虫小球藻病毒 1 的乙酰透明质酸合酶的核酸序列。

SEQ ID NO 2: 缘草履虫小球藻病毒 1 的乙酰透明质酸合酶的氨基酸序列。所示氨基酸序列可以来自 SEQ ID NO 1。

SEQ ID NO 3: 编码缘草履虫小球藻病毒 1 的乙酰透明质酸合酶的合成的核酸序列。可以进行所示序列的密码子的合成使得它适于植物细胞中密码子的用法。所示的核酸序列编码具有 SEQ ID NO 2 中所示氨基酸序列的蛋白质。

SEQ ID NO 4: 编码具有缘草履虫小球藻病毒 1 的 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质的核酸序列。

SEQ ID NO 5: 具有缘草履虫小球藻病毒 1 的 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质的氨基酸序列。所示的氨基酸序列可以来自 SEQ ID NO 4。

SEQ ID NO 6: 编码具有缘草履虫小球藻病毒 1 的 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质的合成的核酸序列。进行所示序列密码子的合成使得它适于植物细胞中密码子的用法。所示的核酸序列编码具有 SEQ ID NO 5 中所示氨基酸序列的蛋白质。

SEQ ID NO 7: 用于实施例 1 的合成寡核苷酸。

SEQ ID NO 8: 用于实施例 1 的合成寡核苷酸。

附图描述

图 1: 显示了用于计算植物组织中乙酰透明质酸含量的校准曲线和回归线的对应方程。使用商业测试试剂盒(透明质酸(HA)测试试剂盒, 来自 Corgenix Inc., Colorado, USA, 产品号 029-001)和随之提供的标准溶液建立校准曲线。

一般方法

在下文描述可以用于本发明的方法。这些方法是特定实施方案；然而，本发明不限于这些方法。本领域技术人员已知通过修改所述方法和/或通过用备选方法或方法的备选部分代替各自方法或方法的部分可以以相同方式实施本发明。

1. 马铃薯植物的转化

用土壤杆菌转化马铃薯植物，如 Rocha-Sosa 等人(EMBO J. 8, (1989), 23-29)中所述。

2. 从植物组织分离乙酰透明质酸

为了检测乙酰透明质酸的存在和确定植物组织中的乙酰透明质酸含量，如下建立植物材料：向约 0.3 g 块茎材料加入 200 μ l 水（去矿物质，电导率 ≥ 18 M Ω ），并将混合物在实验室摆动式球磨机(MM200, 来自 Retsch, 德国)中捣碎(30 Hz 下 30 秒)。然后再加入 800 μ l 水(去矿物质，电导率 ≥ 18 M Ω)，并将混合物充分混合（使用例如，Vortex 混合器）。通过在 16 000 xg 下离心 5 分钟分离细胞残渣和不溶组分与上清液。

3. 乙酰透明质酸的纯化

将约 100g 块茎去皮，切成约 1 cm³ 大小的块，加入 100ml 水（去矿物质的，电导率 ≥ 18 M Ω ），以约 30 秒的最大速度在韦林搅切器中捣碎。然后使用茶筛除去细胞碎片。将除去的细胞碎片重悬浮在 300 ml 水（去矿物质的，电导率 ≥ 18 M Ω ）中，并再次使用茶筛（tea sieve）除去。将得到的两个悬浮液（100ml+ 300 ml）合并并以 13 000 xg 离心 15 分钟。向所得的离心上清液中加入 NaCl 直到达到 1% 的终浓度。NaCl 进入溶液后，通过加入两倍体积的乙醇，接着充分混合并在 -20°C 过夜温育进行沉淀。然后以 13 000 xg 离心混合物 15 分钟。将该离心后得到的沉降的沉淀物溶解在 100ml 缓冲液(50 mM Tris HCl, pH 8, 1mM CaCl₂)中，然后加入蛋白酶 K 至终浓度为 100 μ g/ml 并在 42°C 下温育溶液 2 小时。接着在 95°C 温育 10 分钟。再次向该溶液中加入 NaCl 直到达到终浓度 1%。NaCl 进入溶液后，通过加入两倍体积的乙醇，充分混合并在 -20°C 再次温育约 96 小时进行另一次沉淀。接着以 13 000 xg 离心 15 分钟。将该离心后得到的沉降的

沉淀物溶解在 30ml 水（去矿物质的，电导率 $\geq 18\text{ M}\Omega$ ）中，再次加入 NaCl 至终浓度 1%。通过加入两倍体积的乙醇，充分混合并在 -20°C 过夜温育后，进行另一次沉淀。将随后在 $13\,000\text{ xg}$ 下离心 15 分钟后得到的沉淀溶解在 20ml 水（去矿物质的，电导率 $\geq 18\text{ M}\Omega$ ）中。

通过离心过滤进行进一步的纯化。为此，在每种情况中，对滤膜（CentriconAmicon, 孔宽度 $10\,000\text{ NMWL}$, 产品号 UCF8 010 96）应用 5ml 溶解的沉淀物，并将样品以 2200 xg 离心直到在滤器上保留约 3ml 溶液。再进行两次如下操作：在每种情况下向膜上的溶液加入 3ml 水（去矿物质的，电导率 $\geq 18\text{ M}\Omega$ ）并且在每种情况下在相同条件下再次离心直到最后在滤器上仅仅保留约 3ml 溶液。取走离心过滤后仍然存在于膜上方的溶液，用约 1.5ml 水（去矿物质的，电导率 $\geq 18\text{ M}\Omega$ ）反复冲洗（3 到 5 次）膜。将仍然存在于膜上方的所有溶液和冲洗得到的溶液合并，加入 NaCl 至终浓度 1%，NaCl 进入溶液中后，加入两倍体积的乙醇，混合样品并通过在 -20°C 下过夜保存得到沉淀物。将以 $13\,000\text{ xg}$ 离心 15 分钟后得到的沉淀物溶解在 4ml 水（去矿物质的，电导率 $\geq 18\text{ M}\Omega$ ）中，然后冻干（0.37 毫巴压力下 24 小时，来自 Christ, Osterode, 德国的冻干装置 Christ Alpha 1-4）。

4. 乙酰透明质酸的检测和乙酰透明质酸含量的测定

使用商业试剂盒（透明质酸（HA）测试试剂盒，来自 Corgenix, Inc., Colorado, USA, 产品号 029-001）根据生产商的使用说明（将其引入本文作为参考）检测乙酰透明质酸。测试原理是基于特异结合乙酰透明质酸的蛋白质（HABP）的可得性并且与 ELISA 类似的进行，其中颜色反应表明所检测的样品中的乙酰透明质酸含量。因此，为了定量测定乙酰透明质酸，待测量的样品应该以所述极限内的浓度使用（例如：稀释所述样品或者使用较少的水从植物组织提取乙酰透明质酸，这取决于极限是被超过还是没有达到）。

在平行的批次中，将待测定样品的等分试样最初进行透明质酸酶消化，然后使用商业测试试剂盒（来自 Corgenix, Inc., Colorado, USA 的透明质酸（HA）测试试剂盒，产品号 029-001）测量。通过加入 $5\text{ }\mu\text{g}$ （~3 单位）透

明质酸酶 (来自 Sigma 的透明质酸酶 III 型, 产品号 H 2251), 使用透明质酸酶缓冲液 (0.1M 磷酸钾缓冲液, pH 5.3; 150 mM NaCl) 中的 400 μ l 番茄块茎提取物并在 37°C 下温育 30 分钟进行透明质酸酶消化。

在每种情况下, 在 1:10 的稀释液中, 所有样品用于测定乙酰透明质酸含量。

5. UDP-Glc-DH 活性的测定

如 Spicerl 等人(1998, J. Bacteriol. 273 (39), 25117-25124)中所述的测定具有 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质的活性。

实施例

1. 植物表达载体 IR 47-71 的制备

质粒 pBinAR 是双元载体质粒 pBin19 (Bevan, 1984, Nucl Acids Res 12: 8711-8721)的衍生物, 其可以如下构建:

将包含花椰菜花叶病毒的 35S 启动子的核苷酸 6909-7437 的 529 bp 长的片段分离为来自质粒 pDH51 的 *EcoR* I/*Kpn* I 片段(Pietrzak 等人, 1986 Nucleic Acids Res. 14, 5858)并连接在 pUC18 的多聚接头的 *EcoR* I 和 *Kpn* I 限制性位点之间。以这种方式, 形成质粒 pUC18-35S。使用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Pvu* II, 从质粒 pAGV40 分离 192 bp 长的片段, 其包括 Ti 质粒 pTiACH5(Gielen 等人, 1984, EMBO Journal 3, 835-846)的 T-DNA 的章鱼碱合酶基因(基因 3)的多聚腺苷酸化信号 (3' 末端) (核苷酸 11 749-11 939) (Herrera-Estrella 等人, 1983 Nature, 303, 209-213)。在 *Pvu* II 限制性位点加入 *Sph* I 接头后, 将片段连接在 pUC18-35S 的 *Sph* I 和 *Hind* III 限制性位点之间。这得到质粒 pA7。这里, 使用 *EcoR* I 和 *Hind* III 除去包含 35S 启动子和 Ocs 终止子的完整多聚接头并将其连接到适当切割的载体 pBin19 中。这得到植物表达载体 pBinAR (Höfgen 和 Willmitzer, 1990, Plant Science 66, 221-230)。

将来自马铃薯的 patatin 基因 B33 的启动子(Rocha-Sosa 等人, 1989, EMBO J. 8, 23-29)作为 *Dra* I 片段 (核苷酸-1512 - +14)连接到 *Sst* I-切割的

载体 pUC19 中, 该载体的末端已经使用 T4-DNA 聚合酶平末端化。这得到质粒 pUC19-B33。使用 *EcoR* I 和 *Sma* I 从该质粒除去 B33 启动子并连接到适当限制性消化的载体 pBinAR 中。这得到植物表达载体 pBinB33。

为了方便进一步克隆步骤, 将 MCS(多克隆位点)延伸。为此, 合成两个互补的寡核苷酸, 在 95℃加热 5 分钟, 缓慢冷却到室温以允许良好的退火并克隆到 pBinB33 的 *Sal* I 和 *Kpn* I 限制性位点中。用于该目的的寡核苷酸具有下面的序列:

5'-TCg ACA ggC CTg gAT CCT TAA TTA AAC TAg TCT CgA ggA gCT Cgg TAC-3'

5'-CgA gCT CCT CgA gAC TAg TTT AAT TAA ggA TCC Agg CCT g-3'

将所得的质粒命名为 IR 47-71。

2. 植物表达载体 pBinARHyg 的制备

使用限制性内切核酸酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 从 pA7 除去包含 35S 启动子、Ocs 终止子和整个多克隆位点的片段并将其克隆到载体 pBIBHyg (Becker, 1990, Nucleic Acids Res. 18, 203)中, 该载体已经用相同的限制性内切核酸酶切割。将所得的质粒命名为 pBinARHyg。

3. 核酸分子的合成

a) 编码缘草履虫小球藻病毒 1 的乙酰透明质酸合酶的核酸分子的合成

由 Medigenomix GmbH (Munich, 德国)合成编码缘草履虫小球藻病毒 1 的乙酰透明质酸合酶的核酸序列并将其克隆到来自 Invitrogen 的载体 pCR2.1(产品号 K2000-01)中。将得到的质粒命名为 IC 323-215。编码来自缘草履虫小球藻病毒 1 的 HAS 蛋白质的合成核酸序列在 SEQ ID NO 3 中显示。最初从缘草履虫小球藻病毒 1 分离的对应的核酸序列在 SEQ ID NO 1 中显示。

b) 编码具有缘草履虫小球藻病毒 1 的 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质的核酸分子的合成

由 Entelechon GmbH 合成编码具有缘草履虫小球藻病毒 1 的 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质的核酸序列并将其克隆到来自 Invitrogen 的载体 pCR4Topo 中 (产品号 K4510-20)。将得到的质粒命名为 IC 339-222。编码来自缘草履虫小球藻病毒 1 的 UDP-Glc-DH 蛋白质的合成的核酸序列在 SEQ ID NO 6 中显示。最初从缘草履虫小球藻病毒 1 分离的对应的核酸序列在 SEQ ID NO 4 中显示。

4. 包含缘草履虫小球藻病毒 1 的乙酰透明质酸合酶的编码核酸序列的植物表达载体 IC 341-222 的制备

使用 *BamH* I 和 *Xho* I 进行限制性消化, 从质粒 IC 323-215 分离包含乙酰透明质酸合酶的编码序列的核酸分子并将其克隆到质粒 IR 47-71 的 *BamH* I 和 *Xho* I 限制性位点中。将得到的植物表达载体命名为 IC 341-222。

5. 制备包含具有缘草履虫小球藻病毒 1 的 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质的编码核酸序列的植物表达载体 IC 349-222

用 *BamH* I 和 *Kpn* I 进行限制性消化, 从质粒 IC 339-222 分离包含具有缘草履虫小球藻病毒 1 的 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质的编码序列的核酸分子并将其克隆到已经通过相同的限制性内切酶切割的质粒 pA7 中。将所得的质粒命名为 IC 342-222。

通过用 *Xba* I 和 *Kpn* I 限制性消化从质粒 IC 342-222 分离包含具有缘草履虫小球藻病毒 1 的 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质的编码序列的核酸分子并将其克隆到已经用 *Xba* I 和 *Kpn* I 切割的表达载体 pBinARHyg 中。将所得的质粒命名为 IC 349-222。

6. 用包含编码乙酰透明质酸合酶的核酸分子的植物表达载体转化植物

用一般方法第 1 项中给出的方法, 使用植物表达载体 IC 341-222 转化马铃薯植物(cv Désirée), 所述载体包含来自缘草履虫小球藻病毒 1 的乙酰透明质酸合酶的编码核酸序列, 其处于来自马铃薯的 patatin 基因 B33 的控制下(Rocha-Sosa 等人, 1989, EMBO J. 8, 23-29)。得到用质粒 IC 341-222 转化的转基因马铃薯植物, 将该植物命名为 365 ES。

7. 用包含编码乙酰透明质酸合酶的核酸分子的植物表达载体转化的转基因植物的分析

a) 校准曲线的构建

使用随商业测试试剂盒(来自 Corgenix, Inc., Colorado, USA 的透明质酸(HA)测试试剂盒, 产品号 029-001)通过的标准溶液, 根据生产商描述的方法构建校准曲线。为了测定 1600 ng/ml 乙酰透明质酸的消光, 使用基于生产商指出的标准供应量的两倍量, 所述标准供应量包含 800 ng/ml 乙酰透明质酸。在每种情况下, 进行三次独立的测量系列, 并且测定对应的平均值。这得到下面的校准曲线:

乙酰透明质酸浓度	独立的各个测量			平均值	标准差
	E _{450nm}	E _{450nm}	E _{450nm}		
0 ng/ml	0.100	0.096	0.096	0.097	0.002
50 ng/ml	0.224	0.183	0.222	0.210	0.023
100 ng/ml	0.396	0.263	0.377	0.345	0.072
200 ng/ml	0.554	0.443	0.653	0.550	0.105
500 ng/ml	1.231	0.850	1.221	1.101	0.217
800 ng/ml	1.465	1.265	1.795	1.508	0.268
1600 ng/ml	2.089	2.487	3.170	2.582	0.547

表1: 构建校准曲线的值, 所述校准曲线用于定量测定植物组织中的乙酰透明质酸含量。借助软件(Microsoft Office Excel 2002, SP2), 所得到的测量值进入简图中并确定趋势线函数方程(见图1)。E_{450nm}指在450 nm波长下的消光, 标准差是各个值的理论平均值的标准差。

b) 株系 365 ES 的马铃薯块茎的分析

在温室中, 在6cm盆的土壤中栽培株系365 ES的个体植物。在每种情况中, 根据一般方法第2项中描述的方法处理各植物的约0.3mg马铃薯块茎材料。使用一般方法第4项中描述的方法, 借助实施例7a)和图1中所示的校准曲线测定各自植物提取物中存在的乙酰透明质酸的量。这里, 离心后得到的上清液以1:10的稀释度使用, 用以测定乙酰透明质酸含量。对应所选的植物, 得到下面的结果:

植物名称	使用的植物材料的重量[g]	消光 E450	乙酰透明质酸的量 [ng/ml]	基于植物材料鲜重的乙酰透明质酸 [μg/g]
365 ES 13	0.297	2.746	14038	47
365 ES 74	0.306	4.000	20816	68
野生型	0.305	0.111	n.d.	n.d.

表2: 株系 365 ES 的独立的转基因植物产生的乙酰透明质酸的量(每 g 鲜重乙酰透明质酸的 μg 数)。第一列指用于收获块茎材料的植物(这里,“野生型”指未转化的植物,然而其具有用作转化的起始材料的基因型)。第二列指出用于测定乙酰透明质酸含量的所述植物的块茎的量。第 3 列含有各自植物提取物的 1:10 稀释度下测量的消光。第 4 列是借助回归线方程计算的(见图 1),考虑稀释系数,如下: $((\text{第 3 列值} - 0.149)/0.00185) \times 10$ 。第 5 列指出基于使用的鲜重的乙酰透明质酸的量,并且如下计算: $(\text{第 4 列值}/\text{第 2 列值})/1000$ 。“n.d.”是检测不到的量。

8. 用包含具有 UDP-Glc-DH 活性的蛋白质的编码核酸序列的植物表达载体转化合成乙酰透明质酸的植物

使用一般方法第 1 项中给出的方法,在每种情况下用植物表达载体 349-222 转化株系 365 ES 13 和 365 ES 74 的马铃薯植物。

〈110〉 拜尔作物科学股份公司

<120> 具有增加的乙酰透明质酸 II 产量的植物

<130> BCS 05-5009 PCT

<150> EP 05090278.2

<151> 2005-10-02

<150> US 60/725,183

<151> 2005-10-11

<160> 8

<170> PatentIn 版本 3.3

 $\langle 210 \rangle$ 1

<211> 1707

<212> DNA

<213> 缘草履虫小球藻病毒 1

 $\langle 220 \rangle$

<221> CDS

<222> (1)..(1707)

 $\langle 300 \rangle$

<308> PB42580

<309> 1995-12-24

<313> (50903).. (52609)

 $\langle 400 \rangle$ 1

atg ggt aaa aat ata atc ata atg gtt tcg tgg tac acc atc ata act 48
Met Gly Lys Asn Ile Ile Ile Met Val Ser Trp Tyr Thr Ile Ile Thr
1 5 10 15

tca aat cta atc gcg gtt gga gga gcc tct cta atc ttg gct ccg gca 96
Ser Asn Leu Ile Ala Val Gly Gly Ala Ser Leu Ile Leu Ala Pro Ala
20 25 30

att act ggg tat gtt cta cat tgg aat att gct ctc tcg aca atc tgg Ile Thr Gly Tyr Val Leu His Trp Asn Ile Ala Leu Ser Thr Ile Trp 35 40 45	144
gga gta tca gct tat ggt att ttc gtt ttt ggg ttt ttc ctt gca caa Gly Val Ser Ala Tyr Gly Ile Phe Val Phe Gly Phe Phe Leu Ala Gln 50 55 60	192
gtt tta ttt tca gaa ctg aac agg aaa cgt ctt cgc aag tgg att tct Val Leu Phe Ser Glu Leu Asn Arg Lys Arg Leu Arg Lys Trp Ile Ser 65 70 75 80	240
ctc aga cct aag ggt tgg aat gat gtt cgt ttg gct gtg atc att gct Leu Arg Pro Lys Gly Trp Asn Asp Val Arg Leu Ala Val Ile Ile Ala 85 90 95	288
gga tat cgc gag gat cct tat atg ttc cag aag tgc ctc gag tct gta Gly Tyr Arg Glu Asp Pro Tyr Met Phe Gln Lys Cys Leu Glu Ser Val 100 105 110	336
cgt gac tct gat tat ggc aac gtt gcc cgt ctg att tgt gtg att gac Arg Asp Ser Asp Tyr Gly Asn Val Ala Arg Leu Ile Cys Val Ile Asp 115 120 125	384
ggt gat gag gac gat gat atg agg atg gct gcc gtt tac aag gcg atc Gly Asp Glu Asp Asp Asp Met Arg Met Ala Ala Val Tyr Lys Ala Ile 130 135 140	432
tac aat gat aat atc aag aag ccc gag ttt gtt ctg tgt gag tca gac Tyr Asn Asp Asn Ile Lys Lys Pro Glu Phe Val Leu Cys Glu Ser Asp 145 150 155 160	480
gac aag gaa ggt gaa cgc atc gac tct gat ttc tct cgc gac att tgt Asp Lys Glu Gly Glu Arg Ile Asp Ser Asp Phe Ser Arg Asp Ile Cys 165 170 175	528
gtc ctc cag cct cat cgt gga aaa cgg gag tgt ctt tat act ggg ttt Val Leu Gln Pro His Arg Gly Lys Arg Glu Cys Leu Tyr Thr Gly Phe 180 185 190	576
caa ctt gca aag atg gac ccc agt gtc aat gct gtc gtt ctg att gac Gln Leu Ala Lys Met Asp Pro Ser Val Asn Ala Val Val Leu Ile Asp 195 200 205	624

agc gat acc gtt ctc gag aag gat gct att ctg gaa gtt gta tac cca Ser Asp Thr Val Leu Glu Lys Asp Ala Ile Leu Glu Val Val Tyr Pro 210 215 220	672
ctt gca tgc gat ccc gag atc caa gcc gtt gca ggt gag tgt aag att Leu Ala Cys Asp Pro Glu Ile Gln Ala Val Ala Gly Glu Cys Lys Ile 225 230 235 240	720
tgg aac aca gac act ctt ttg agt ctt ctc gtc gct tgg cgg tac tat Trp Asn Thr Asp Thr Leu Leu Ser Leu Leu Val Ala Trp Arg Tyr Tyr 245 250 255	768
tct gcg ttt tgt gtg gag agg agt gcc cag tct ttt ttc agg act gtt Ser Ala Phe Cys Val Glu Arg Ser Ala Gln Ser Phe Phe Arg Thr Val 260 265 270	816
cag tgc gtt ggg ggg cca ctg ggt gcc tac aag att gat atc att aag Gln Cys Val Gly Gly Pro Leu Gly Ala Tyr Lys Ile Asp Ile Ile Lys 275 280 285	864
gag att aag gac ccc tgg att tcc cag cgc ttt ctt ggt cag aag tgt Glu Ile Lys Asp Pro Trp Ile Ser Gln Arg Phe Leu Gly Gln Lys Cys 290 295 300	912
act tac ggt gac gac cgc cgg cta acc aac gag atc ttg atg cgt ggt Thr Tyr Gly Asp Asp Arg Arg Leu Thr Asn Glu Ile Leu Met Arg Gly 305 310 315 320	960
aaa aag gtt gtg ttc act cca ttt gct gtt ggt tgg tct gac agt ccg Lys Lys Val Val Phe Thr Pro Phe Ala Val Gly Trp Ser Asp Ser Pro 325 330 335	1008
acc aat gtg ttt cgg tac atc gtt cag cag acc cgc tgg agt aag tcg Thr Asn Val Phe Arg Tyr Ile Val Gln Gln Thr Arg Trp Ser Lys Ser 340 345 350	1056
tgg tgc cgc gaa att tgg tac acc ctc ttc gcc gcg tgg aag cac ggt Trp Cys Arg Glu Ile Trp Tyr Thr Leu Phe Ala Ala Trp Lys His Gly 355 360 365	1104
ttg tct gga att tgg ctg gcc ttt gaa tgt ttg tat caa att aca tac Leu Ser Gly Ile Trp Leu Ala Phe Glu Cys Leu Tyr Gln Ile Thr Tyr 370 375 380	1152

ttc ttc ctc gtg att tac ctc ttt tct cgc cta gcc gtt gag gcc gac	1200
Phe Phe Leu Val Ile Tyr Leu Phe Ser Arg Leu Ala Val Glu Ala Asp	
385 390 395 400	
cct cgc gcc cag aca gcc acg gtg att gtg agc acc acg gtt gca ttg	1248
Pro Arg Ala Gln Thr Ala Thr Val Ile Val Ser Thr Thr Val Ala Leu	
405 410 415	
att aag tgt ggg tat ttt tca ttc cga gcc aag gat att cgg gcg ttt	1296
Ile Lys Cys Gly Tyr Phe Ser Phe Arg Ala Lys Asp Ile Arg Ala Phe	
420 425 430	
tac ttt gtg ctt tat aca ttt gtt tac ttt ttc tgt atg att ccg gcc	1344
Tyr Phe Val Leu Tyr Thr Phe Val Tyr Phe Phe Cys Met Ile Pro Ala	
435 440 445	
agg att act gca atg atg acg ctt tgg gac att ggc tgg ggt act cgc	1392
Arg Ile Thr Ala Met Met Thr Leu Trp Asp Ile Gly Trp Gly Thr Arg	
450 455 460	
ggt gga aac gag aag cct tcc gtt ggc acc cgg gtc gct ctg tgg gca	1440
Gly Gly Asn Glu Lys Pro Ser Val Gly Thr Arg Val Ala Leu Trp Ala	
465 470 475 480	
aag caa tat ctc att gca tat atg tgg tgg gcc gcg gtt gtt ggc gct	1488
Lys Gln Tyr Leu Ile Ala Tyr Met Trp Trp Ala Ala Val Val Gly Ala	
485 490 495	
gga gtt tac agc atc gtc cat aac tgg atg ttc gat tgg aat tct ctt	1536
Gly Val Tyr Ser Ile Val His Asn Trp Met Phe Asp Trp Asn Ser Leu	
500 505 510	
tct tat cgt ttt gct ttg gtt ggt att tgt tct tac att gtt ttt att	1584
Ser Tyr Arg Phe Ala Leu Val Gly Ile Cys Ser Tyr Ile Val Phe Ile	
515 520 525	
gtt att gtg ctg gtg gtt tat ttc acc ggc aaa att acg act tgg aat	1632
Val Ile Val Leu Val Val Tyr Phe Thr Gly Lys Ile Thr Thr Trp Asn	
530 535 540	
ttc acg aag ctt cag aag gag cta atc gag gat cgc gtt ctg tac gat	1680
Phe Thr Lys Leu Gln Lys Glu Leu Ile Glu Asp Arg Val Leu Tyr Asp	
545 550 555 560	

gca act acc aat gct cag tct gtg tga 1707
Ala Thr Thr Asn Ala Gln Ser Val
565

<210> 2
<211> 568
<212> PRT
<213> 缘草履虫小球藻病毒 1

<400> 2

Met Gly Lys Asn Ile Ile Ile Met Val Ser Trp Tyr Thr Ile Ile Thr
1 5 10 15

Ser Asn Leu Ile Ala Val Gly Gly Ala Ser Leu Ile Leu Ala Pro Ala
20 25 30

Ile Thr Gly Tyr Val Leu His Trp Asn Ile Ala Leu Ser Thr Ile Trp
35 40 45

Gly Val Ser Ala Tyr Gly Ile Phe Val Phe Gly Phe Phe Leu Ala Gln
50 55 60

Val Leu Phe Ser Glu Leu Asn Arg Lys Arg Leu Arg Lys Trp Ile Ser
65 70 75 80

Leu Arg Pro Lys Gly Trp Asn Asp Val Arg Leu Ala Val Ile Ile Ala
85 90 95

Gly Tyr Arg Glu Asp Pro Tyr Met Phe Gln Lys Cys Leu Glu Ser Val
100 105 110

Arg Asp Ser Asp Tyr Gly Asn Val Ala Arg Leu Ile Cys Val Ile Asp
115 120 125

Gly Asp Glu Asp Asp Asp Met Arg Met Ala Ala Val Tyr Lys Ala Ile
130 135 140

Tyr Asn Asp Asn Ile Lys Lys Pro Glu Phe Val Leu Cys Glu Ser Asp
145 150 155 160

Asp Lys Glu Gly Glu Arg Ile Asp Ser Asp Phe Ser Arg Asp Ile Cys
165 170 175

Val Leu Gln Pro His Arg Gly Lys Arg Glu Cys Leu Tyr Thr Gly Phe
180 185 190

Gln Leu Ala Lys Met Asp Pro Ser Val Asn Ala Val Val Leu Ile Asp
195 200 205

Ser Asp Thr Val Leu Glu Lys Asp Ala Ile Leu Glu Val Val Tyr Pro
210 215 220

Leu Ala Cys Asp Pro Glu Ile Gln Ala Val Ala Gly Glu Cys Lys Ile
225 230 235 240

Trp Asn Thr Asp Thr Leu Leu Ser Leu Leu Val Ala Trp Arg Tyr Tyr
245 250 255

Ser Ala Phe Cys Val Glu Arg Ser Ala Gln Ser Phe Phe Arg Thr Val
260 265 270

Gln Cys Val Gly Gly Pro Leu Gly Ala Tyr Lys Ile Asp Ile Ile Lys
275 280 285

Glu Ile Lys Asp Pro Trp Ile Ser Gln Arg Phe Leu Gly Gln Lys Cys
290 295 300

Thr Tyr Gly Asp Asp Arg Arg Leu Thr Asn Glu Ile Leu Met Arg Gly
305 310 315 320

Lys Lys Val Val Phe Thr Pro Phe Ala Val Gly Trp Ser Asp Ser Pro
325 330 335

Thr Asn Val Phe Arg Tyr Ile Val Gln Gln Thr Arg Trp Ser Lys Ser
340 345 350

Trp Cys Arg Glu Ile Trp Tyr Thr Leu Phe Ala Ala Trp Lys His Gly
355 360 365

Leu Ser Gly Ile Trp Leu Ala Phe Glu Cys Leu Tyr Gln Ile Thr Tyr
370 375 380

Phe Phe Leu Val Ile Tyr Leu Phe Ser Arg Leu Ala Val Glu Ala Asp
385 390 395 400

Pro Arg Ala Gln Thr Ala Thr Val Ile Val Ser Thr Thr Val Ala Leu
405 410 415

Ile Lys Cys Gly Tyr Phe Ser Phe Arg Ala Lys Asp Ile Arg Ala Phe
420 425 430

Tyr Phe Val Leu Tyr Thr Phe Val Tyr Phe Phe Cys Met Ile Pro Ala
435 440 445

Arg Ile Thr Ala Met Met Thr Leu Trp Asp Ile Gly Trp Gly Thr Arg
450 455 460

Gly Gly Asn Glu Lys Pro Ser Val Gly Thr Arg Val Ala Leu Trp Ala
465 470 475 480

Lys Gln Tyr Leu Ile Ala Tyr Met Trp Trp Ala Ala Val Val Gly Ala
485 490 495

Gly Val Tyr Ser Ile Val His Asn Trp Met Phe Asp Trp Asn Ser Leu
500 505 510

Ser Tyr Arg Phe Ala Leu Val Gly Ile Cys Ser Tyr Ile Val Phe Ile
515 520 525

Val Ile Val Leu Val Val Tyr Phe Thr Gly Lys Ile Thr Thr Trp Asn
530 535 540

Phe Thr Lys Leu Gln Lys Glu Leu Ile Glu Asp Arg Val Leu Tyr Asp
545 550 555 560

Ala Thr Thr Asn Ala Gln Ser Val
565

- <210> 3
- <211> 1707
- <212> DNA
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 编码缘草履虫小球藻病毒乙酰透明质酸合酶蛋白质的合成序列

<400> 3
atgggtaaga acattatcat tatggtgtcc tggtaacaa ttattacaag taatctcatc 60
gcagttggtg gtgcatctct tattctcgct ccagctatca ctggatatgt tcttcactgg 120
aacatcgccc tctcaactat ttggggagtt tccgcataag gtatTTTTGT tttcgggttc 180
TTTTGGCTC aggttctgtt ctcagagctc aatcgtaaga gactcaggaa gtggattagc 240
cttagaccaa aggggtggaa tgacgttcgt ctcgctgtca ttatcgctgg ctaccgtgaa 300
gatccttaca tgtttcaaaa gtgcttggaa tcagttaggg atagtgatta tggcaacgtc 360

gctagactga tctgtgtgat tgatggagat gaggacgacg atatgaggat ggcagctgtt	420
tataaggcta tctataatga taacattaag aagcctgaat ttgttctttg cgagtctgat	480
gacaaggaag gagaacggat tgattcagat ttctcacgtg atatctgcgt tctccaacct	540
catcgtggga agcgtgaatg tctttataca ggtttccaac tcgccaaaat ggacccatca	600
gtgaacgctg tggttcttat cgatagtgat actgtgctgg agaaagatgc tatcttggag	660
gttgtttacc ctcttgctg tgatcctgaa attcaagctg tggctggaga gtgcaagatc	720
tggaacacag atactcttct ttctctgctt gtcgcatgga gatattactc cgcattctgt	780
gtggagagga gcgctcaatc ctttttccgt accgttcaat gcgttggtgg tcctttggga	840
gcttacaaaa ttgatatcat caaggagatt aaggacccat ggattagtca aaggtttctt	900
ggtcagaagt gcacttatgg cgatgatcgt agattgacta acgaaatcct tatgaggggc	960
aagaaagtcg tttttactcc atttgctgtc ggatggctctg attcacctac aaatgttttc	1020
cgttatattg tgcaacaaac acgttggagt aagagctggg gtagggagat ctggtacact	1080
ttgttcgctg cttggaagca cgggcttagc ggaatttggc ttgcttttga atgcctttac	1140
cagattacat actttttctt ggtgatctat ttgttttcac gtcttgccgt cgaggctgac	1200
cctagagcac agactgcaac tgtgattgtt tctactacag tcgcacttat taagtgtggc	1260
tatttcagtt ttagagcaaa agatattaga gccttctatt ttgttttgta cacatttgtt	1320
tatttctttt gcatgattcc agctcgtatt accgctatga tgaccttggt ggacatcgga	1380
tggggaacta gaggtggtaa cgaaaagcct tctgtgggaa caagggtggc cctttgggca	1440
aaacaatatc tcatcgcta catgtgtgtg gccgctgtcg ttggtgccgg agtgtactca	1500
atcggtcata actggatgtt tgactggaac tctttgagct atcgtttcgc tcttgtgggt	1560
atttgttctt acattgtttt catcgtgatt gtgctcgttg tgtatttcac tggtaaaatc	1620
acaacctgga atttactaa acttcaaaag gaattgattg aagacagggt tctgtatgat	1680

gctactacca acgcccagtc agtttaa

1707

<210> 4

<211> 1260

<212> DNA

<213> 缘草履虫小球藻病毒 1

<220>

<221> CDS

<222> (62)..(1228)

<300>

<308> U42580.4

<309> 2004-09-20

<313> (291749.)..(292918)

<400> 4

atcaacgtga tttatatattt aaacaaagac cattcacatc tttagtactt aattaattat 60

a atg tca cga atc gca gtc gtt ggt tgt ggt tac gtc gga acc gct tgt 109
 Met Ser Arg Ile Ala Val Val Gly Cys Gly Tyr Val Gly Thr Ala Cys
 1 5 10 15

gca gta ctt ctt gct caa aaa aac gaa gtc atc gtg ctt gat att agc 157
 Ala Val Leu Leu Ala Gln Lys Asn Glu Val Ile Val Leu Asp Ile Ser
 20 25 30

gaa gac cgt gtt caa cta atc aag aac aag aag agt cca atc gag gac 205
 Glu Asp Arg Val Gln Leu Ile Lys Asn Lys Lys Ser Pro Ile Glu Asp
 35 40 45

aag gaa atc gaa gag ttt ctc gaa acg aaa gac ctg aac ctg acc gcg 253
 Lys Glu Ile Glu Glu Phe Leu Glu Thr Lys Asp Leu Asn Leu Thr Ala
 50 55 60

acg act gac aag gtt ctt gca tac gaa aac gcc gaa ttt gtc atc atc 301
 Thr Thr Asp Lys Val Leu Ala Tyr Glu Asn Ala Glu Phe Val Ile Ile
 65 70 75 80

gca acc ccg act gac tat gac gtg gtt act agg tat ttt aac acg aaa 349
 Ala Thr Pro Thr Asp Tyr Asp Val Val Thr Arg Tyr Phe Asn Thr Lys

85	90	95	
tct gtg gaa aac gtc att ggg gac gtg atc aaa aat aca cag acc cat			397
Ser Val Glu Asn Val Ile Gly Asp Val Ile Lys Asn Thr Gln Thr His			
100	105	110	
cca act atc gtg att aaa tct acc atc ccc att gga ttt gtt gat aag			445
Pro Thr Ile Val Ile Lys Ser Thr Ile Pro Ile Gly Phe Val Asp Lys			
115	120	125	
gtt cgt gag caa ttc gac tac caa aat atc att ttc tcc cca gaa ttt			493
Val Arg Glu Gln Phe Asp Tyr Gln Asn Ile Ile Phe Ser Pro Glu Phe			
130	135	140	
ctg cgt gaa ggt aga gcc ttg tat gat aat ctc tac cca tcc cgt atc			541
Leu Arg Glu Gly Arg Ala Leu Tyr Asp Asn Leu Tyr Pro Ser Arg Ile			
145	150	155	160
atc gta gga gat gat tcc ccc att gcg ctt aag ttc gca aac ctt ctc			589
Ile Val Gly Asp Asp Ser Pro Ile Ala Leu Lys Phe Ala Asn Leu Leu			
165	170	175	
gtt gaa ggt tct aaa act ccg ctt gcc cct gtc ctg acg atg gga act			637
Val Glu Gly Ser Lys Thr Pro Leu Ala Pro Val Leu Thr Met Gly Thr			
180	185	190	
cgc gaa gcc gag gcc gtc aaa cta ttc tct aac acg tat ctt gca atg			685
Arg Glu Ala Glu Ala Val Lys Leu Phe Ser Asn Thr Tyr Leu Ala Met			
195	200	205	
cga gtt gca tac ttc aac gaa cta gat aca ttc gca atg tct cac ggt			733
Arg Val Ala Tyr Phe Asn Glu Leu Asp Thr Phe Ala Met Ser His Gly			
210	215	220	
atg aat gcg aaa gaa atc att gat ggt gtg act ctg gag cct cgc att			781
Met Asn Ala Lys Glu Ile Ile Asp Gly Val Thr Leu Glu Pro Arg Ile			
225	230	235	240
ggt cag ggg tac tca aac cct tcg ttc ggt tat gga gct tat tgc ttt			829
Gly Gln Gly Tyr Ser Asn Pro Ser Phe Gly Tyr Gly Ala Tyr Cys Phe			
245	250	255	
cca aag gat acg aag caa ctg ctg gct aat ttc gag gga gtg cct caa			877
Pro Lys Asp Thr Lys Gln Leu Leu Ala Asn Phe Glu Gly Val Pro Gln			

260	265	270	
gat atc atc gga gca att gta gaa tca aat gag act cgc aag gaa gtg			925
Asp Ile Ile Gly Ala Ile Val Glu Ser Asn Glu Thr Arg Lys Glu Val			
275	280	285	
att gtg agt gaa gta gaa aat cgt ttc ccc acg act gtt ggt gtg tat			973
Ile Val Ser Glu Val Glu Asn Arg Phe Pro Thr Thr Val Gly Val Tyr			
290	295	300	
aag ctc gcc gct aaa gcg ggt tct gat aat ttt cgg agt tct gca att			1021
Lys Leu Ala Ala Lys Ala Gly Ser Asp Asn Phe Arg Ser Ser Ala Ile			
305	310	315	320
gta gac ata atg gag cga ctt gca aac aag ggt tat cac att aag att			1069
Val Asp Ile Met Glu Arg Leu Ala Asn Lys Gly Tyr His Ile Lys Ile			
325	330	335	
ttc gaa cca act gtg gaa caa ttc gaa aac ttt gaa gtt gat aac aac			1117
Phe Glu Pro Thr Val Glu Gln Phe Glu Asn Phe Glu Val Asp Asn Asn			
340	345	350	
ctg aca aca ttt gcg act gag agc gat gta att atc gca aac aga gtt			1165
Leu Thr Thr Phe Ala Thr Glu Ser Asp Val Ile Ile Ala Asn Arg Val			
355	360	365	
ccc gtt gaa cat cgc att ctc ttt ggt aaa aaa tta atc aca cgt gat			1213
Pro Val Glu His Arg Ile Leu Phe Gly Lys Lys Leu Ile Thr Arg Asp			
370	375	380	
gta tat ggc gat aac taaatgttt tcaatatgat gttgttaatg at			1260
Val Tyr Gly Asp Asn			
385			

<210> 5

<211> 389

<212> PRT

<213> 缘草履虫小球藻病毒 1

<400> 5

Met Ser Arg Ile Ala Val Val Gly Cys Gly Tyr Val Gly Thr Ala Cys

1

5

10

15

Ala Val Leu Leu Ala Gln Lys Asn Glu Val Ile Val Leu Asp Ile Ser
20 25 30

Glu Asp Arg Val Gln Leu Ile Lys Asn Lys Lys Ser Pro Ile Glu Asp
35 40 45

Lys Glu Ile Glu Glu Phe Leu Glu Thr Lys Asp Leu Asn Leu Thr Ala
50 55 60

Thr Thr Asp Lys Val Leu Ala Tyr Glu Asn Ala Glu Phe Val Ile Ile
65 70 75 80

Ala Thr Pro Thr Asp Tyr Asp Val Val Thr Arg Tyr Phe Asn Thr Lys
85 90 95

Ser Val Glu Asn Val Ile Gly Asp Val Ile Lys Asn Thr Gln Thr His
100 105 110

Pro Thr Ile Val Ile Lys Ser Thr Ile Pro Ile Gly Phe Val Asp Lys
115 120 125

Val Arg Glu Gln Phe Asp Tyr Gln Asn Ile Ile Phe Ser Pro Glu Phe
130 135 140

Leu Arg Glu Gly Arg Ala Leu Tyr Asp Asn Leu Tyr Pro Ser Arg Ile
145 150 155 160

Ile Val Gly Asp Asp Ser Pro Ile Ala Leu Lys Phe Ala Asn Leu Leu
165 170 175

Val Glu Gly Ser Lys Thr Pro Leu Ala Pro Val Leu Thr Met Gly Thr
180 185 190

Arg Glu Ala Glu Ala Val Lys Leu Phe Ser Asn Thr Tyr Leu Ala Met
195 200 205

Arg Val Ala Tyr Phe Asn Glu Leu Asp Thr Phe Ala Met Ser His Gly
210 215 220

Met Asn Ala Lys Glu Ile Ile Asp Gly Val Thr Leu Glu Pro Arg Ile
225 230 235 240

Gly Gln Gly Tyr Ser Asn Pro Ser Phe Gly Tyr Gly Ala Tyr Cys Phe
245 250 255

Pro Lys Asp Thr Lys Gln Leu Leu Ala Asn Phe Glu Gly Val Pro Gln
260 265 270

Asp Ile Ile Gly Ala Ile Val Glu Ser Asn Glu Thr Arg Lys Glu Val
275 280 285

Ile Val Ser Glu Val Glu Asn Arg Phe Pro Thr Thr Val Gly Val Tyr
290 295 300

Lys Leu Ala Ala Lys Ala Gly Ser Asp Asn Phe Arg Ser Ser Ala Ile
305 310 315 320

Val Asp Ile Met Glu Arg Leu Ala Asn Lys Gly Tyr His Ile Lys Ile
325 330 335

Phe Glu Pro Thr Val Glu Gln Phe Glu Asn Phe Glu Val Asp Asn Asn
340 345 350

Leu Thr Thr Phe Ala Thr Glu Ser Asp Val Ile Ile Ala Asn Arg Val
355 360 365

Pro Val Glu His Arg Ile Leu Phe Gly Lys Lys Leu Ile Thr Arg Asp
370 375 380

Val Tyr Gly Asp Asn
385

<210> 6
<211> 1170
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码具有 UDP-Glc-DH 活性的缘草履虫小球藻病毒蛋白质的合成序列

<400> 6
atgtctcgca tagctgttgt aggatgtggc tatgtgggaa ctgcatgtgc ggttctactt 60
gctcaaaaga acgaagttat tgtgcttgat attagtgaag accgtgttca acttattaag 120
aacaagaagt ctctattga ggataaggaa atcgaagagt tcttggaac aaaggatctt 180
aatcttactg cgactacaga taaggttctt gcctacgaga acgctgagtt tgtgataatc 240
gctacaccaa ccgattacga cgttgtgact cgataattca ataccaaac cgtggaaaac 300
gttataggag atgttatcaa gaacactcaa acccacccta ctatcgtcat caagtcaca 360
attcccatcg gtttcgttga taaggtcaga gaggcagttg attatcaaaa cattatcttc 420
tcacctgagt tcttaaggga gggtcgtgct ctctacgata atttgtatcc gtcccgtatt 480
atcgttggcg acgattctcc tatcgctctc aagttcgcaa atctcttagt tgagggtagt 540
aagaccctt tggctcctgt ttgacaatg ggaaccagag aagcagaagc tgtcaagcta 600
ttctctaata cctaccttgc catgagggta gcatacttta acgaacttga tacatttgct 660
atgtcgcatg gtatgaatgc caaggagatt atagatggtg tcactttaga gcccaggatc 720
ggtaaggat attctaacc atcattcggc tatggagctt actgctttcc taaggacact 780

aagcagttgc tggcaaactt cgagggagtt cctcaagaca tcataggcgc tattgtggag 840
tcaaacgaaa caaggaaaga ggtgatagtt agtgaggtag agaatcgttt cccaacgaca 900
gtcgggtgttt acaaactggc agctaaagct ggtagcgata acttcaggtc aagtgtctatt 960
gtcgacatca tggaacgcct ggctaacaaa ggttaccaca ttaagatctt tgagccaact 1020
gtagagcagt tcgaaaattt cgaagttgac aataacttga caacgtttgc tactgagtca 1080
gacgttatta tcgcaaatcg tgtccctgtg gaacatagaa tcctatttgg aaagaagctc 1140
attaccagag atgtttacgg tgataattaa 1170

<210> 7
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 7
tcgacaggcc tggatcctta attaaactag tctcgaggag ctcggtac 48

<210> 8
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 8
cgagctcctc gagactagtt taattaagga tccaggcctg 40

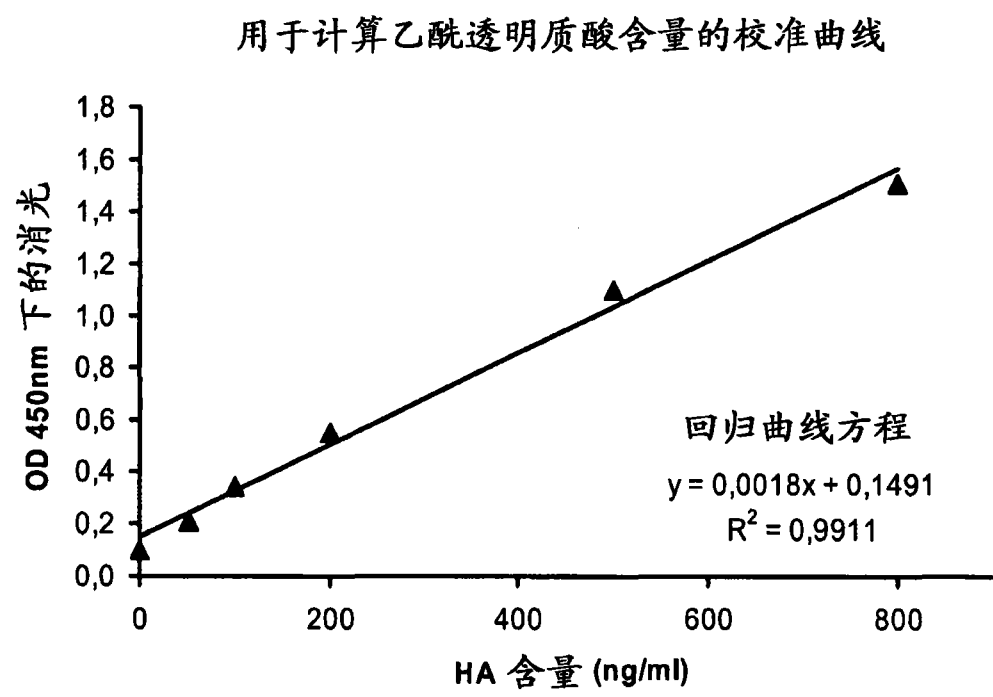


图 1