[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 97180211.4

[51] Int. Cl.
C12N 15/00 (2006.01)
C12N 15/01 (2006.01)
A01H 1/00 (2006.01)
A01H 1/04 (2006.01)
A01H 1/06 (2006.01)
A01H 3/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 12 月 26 日

[11] 授权公告号 CN 100357432C

[51] Int. Cl. (续)
A01H 4/00 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)

[22] 申请日 1997.10.7 [21] 申请号 97180211.4

[30] 优先权

[32] 1996.10.8 [33] US [31] 60/028,264

[32] 1997.10.6 [33] US [31] 08/944,950

[86] 国际申请 PCT/US1997/018139 1997.10.7

[87] 国际公布 WO1998/015621 英 1998.4.16

[85] 进入国家阶段日期 1999.5.31

[73] 专利权人 埃克斯希德遗传有限公司

地址 美国衣阿华州

[72] 发明人 P·L·克林 F·G·敦拉普

M·常

审查员 李 岚

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 齐曾度

权利要求书 2 页 说明书 16 页

[54] 发明名称

在颗粒中具有蜡质蛋白的蜡质小麦淀粉类型

[57] 摘要

概括来说，本发明涉及多倍体谷类中的突变淀粉基因。 具体而言，本发明涉及突变型小麦植株、突变型小麦谷粒和其淀粉。

1.产生全突变型等位基因小麦材料的方法，所述方法包含以下步骤:

a）用诱变剂处理小麦起始材料，形成已处理的小麦材料，所述小麦起始材料一个染色体组的一个被选等位基因没有突变，但其它染色体组的所述等位基因全突变;

b）筛选所述已处理的小麦材料的子代，以鉴别在所述等位基因上全突变的小麦材料，其中该小麦材料的起始材料的所述染色体上没有突变的等位基因产生无活性蛋白;

c）选择在步骤b）中已鉴定的全突变小麦材料。

2.按照权利要求1的方法，其中所述小麦是六倍体。

3.按照权利要求2的方法，进一步在步骤a）前包括以下步骤:

选择所述等位基因只在一个染色体组上突变的小麦起始材料;

用诱变剂处理所述小麦起始材料;

筛选所述已处理小麦起始材料的子代，以鉴别具有双突变型等位基因的小麦起始材料; 和

选择所述双突变型的小麦起始材料用于步骤a）。

4.按照权利要求1的方法，其中所述诱变剂是甲磺酸乙酯。

5.按照权利要求1的方法，其中所述等位基因为蜡质等位基因。

6.按照权利要求1的方法，其中所述步骤b)包括不透明性的筛选或对所述子代使用碘。

7.按照权利要求6的方法，其中所述全突变的小麦材料具有使用碘时染成红色的淀粉。

8.按照权利要求1的方法，其中所述小麦起始材料选自种子、花粉和卵子。

9.按照权利要求1的方法，其中全突变的小麦材料包含: 同所述小麦起始材料等基因的染色体，以及在所述等位基因的至少一个诱变剂

诱导的突变。

10. 按照权利要求1的方法，其中所述无活性蛋白作为鉴别所述全突变的小麦材料的指纹。

在颗粒中具有蜡质蛋白的蜡质小麦淀粉类型

根据美国法典第35章第119(e)条，本申请要求在1996年10月8日提交的美国临时申请60/028264的利益。

发明领域

概括来说，本发明涉及使多倍体谷物中的淀粉基因突变。具体而言，本发明涉及突变型小麦植株、突变型小麦谷粒和其中的淀粉。

背景

诸如水稻、小麦、玉米和大麦的谷物有助于供养世界人口。这些谷物构成了大百分比的世界人口的主要粮食。加工这些谷物，制作出面包、谷类食品、面条、面粉等等。加工的谷物有不同的质量，这导致不同的产品应用。将小麦谷粒加工成小麦粉，所述面粉是营养素仓库。淀粉、蛋白、脂质、酶和营养素在不同程度上影响所述面粉制品。所述面粉制品中的淀粉在很大程度上影响其特征。面粉的消化率、加工温度、烹调特性全部受使用的淀粉类型影响。

淀粉由两个组分组成：直链淀粉和支链淀粉。在多种具有淀粉突变的二倍体谷物中改变至少一个这些组分。一种淀粉突变叫做蜡质突变。具有所述蜡质突变的谷物形成直链淀粉低的淀粉。在都是二倍体物种的水稻和玉米中广为知道天然产生的蜡质突变体。然而，在多倍体物种中不知道天然产生的淀粉突变体。在多倍体物种中改变所述淀粉需要几个独立的突变。小麦很少有天然产生的突变体，因为软质小麦和硬质小麦都是六倍体，尽管硬粒小麦是四倍体。没有发现一个天然产生的蜡质小麦(waxy wheat)。

小麦(*Triticum aestivum L.*)有得自三种不同物种的三个染色体

组。每个染色体组具有一个基因组字母：A、B或D。一个小麦蜡质突变体在每个A、B和D染色体组中均有纯合的蜡质等位基因。通过在各个A、B和D基因组中的蛋白特征鉴定鉴别小麦中的突变。直至1992年，这些蛋白特征鉴定只检测出一条单蜡质蛋白带。所述实验不能分辨出所述三个基因组中每一个的蛋白带。如果所述三个基因组中的一个不产生蛋白，该实验就不能检测到它。使用具有低BIS丙烯酰胺浓度的SDS-PAGE的修改检测系统和双向凝胶电泳(2-D PAGE)显示了期望的三条蛋白带中的两条。通过第一向使用等电聚焦(IEF)、而第二向使用所述修改的SDS-PAGE检测到第三条带。所述修改的检测系统检测出三条蛋白带。每条蛋白带对应于A、B和D染色体组中的一个。通过检测各个蛋白，可以筛选小麦系的无效蜡质等位基因。在某个染色体上的该等位基因上，无效等位基因不产生一定的蛋白。在所述许多染色体中的任一染色体中，无效突变体均不产生一定的蛋白。这同确实产生该蛋白、但该蛋白处于无活性状态的非无效突变体相反。

一旦确定显示三条带的实验，一些研究人员开始筛选蜡质小麦的无效等位基因。当小麦淀粉中缺少单独的淀粉蛋白时，使单无效等位基因定位。只在大约10%的美国冬小麦种质中鉴别出单无效蜡质等位基因。其余的小麦是具有三个功能性wx基因座的野生型。R.A. Graybosch报告了A和B两个基因组中的少数单无效蜡质等位基因。已知在D基因组中只存在两个单无效蜡质等位基因。日本报告了一个单无效D基因组蜡质等位基因，加拿大报告了一个。

最近，研究人员在小麦中发现了四个独立的双无效蜡质等位基因。每个这些双无效蜡质等位基因(部分突变型)对所述A和B基因组中的蜡质等位基因无效。日本人报告了Kanto系79、107、Saikai 173，而R.A. Graybosch报告了Ike。由堪萨斯大学育种计划研制的Ike是公开的品系(public line)。这些双无效蜡质部分突变体只有一个是已知存在的。然而随着筛选步骤的修改，研究人员可以期望发现另外的单和双无效等位基因。同单蜡质无效一样，这些新发现的双无效蜡质部

分突变体在D等位基因中仍然生产蜡质蛋白，并因此仍有显著的直链淀粉含量。然而，可识别出双无效蜡质部分突变体的直链淀粉含量少于单蜡质无效。

即使在发现所述双无效后，仍然需要蜡质小麦突变型植株，所述蜡质小麦突变型植株在所有三个基因组中均有蜡质突变。在1994年产生了没有蜡质蛋白的蜡质小麦植株。将没有蜡质蛋白的中国栽培品种Bai Huo同Kanto 107和Saikia 173杂交。在720粒F2种子中，14粒没有Wx蛋白。

部分无效突变体同单无效等位基因的常规杂交的确产生蜡质小麦。它也在产生的蜡质小麦的染色体中产生全新的基因组合。使用植物育种，由产生的蜡质小麦植株产生有用的株系。使所述蜡质小麦自交，并在所有繁殖世代选择具有农艺性状和蜡质性状的子代。虽然利用碘测试容易鉴别出具有蜡质突变的常规育成的植株，但是鉴别农艺性状则更加困难。农艺性状经常是多基因的，而在小麦中三个独立的染色体组使其更加复杂。利用常规的育种或者甚至利用双单倍体重建所述三个染色体组是费时的并采用多次杂交。即使在多次杂交之后，所述蜡质小麦也基本上和一个亲本不相同的，它只是同该亲本相似。

同所述亲本植株基本相同的植株是等基因系。等基因系的特征在于基因基本相同。形成同其亲本等基因的蜡质小麦回避了常规育种的问题。需要一个形成蜡质小麦的方法，所述方法在所述蜡质小麦的染色体中不产生全新的基因组合。需要在多倍体谷物中有效地由双染色体突变体形成全突变体、或由单染色体突变体形成双染色体突变体的方法。换句话说，需要形成包含突变的等基因多倍体系的方法。

一旦等基因淀粉突变用于商业，则产生另外的需要。育种者将用该等基因种质育种，以将所述淀粉突变插入到其它种质中。为了维持种质安全，需要鉴别所述突变的方法。如果鉴别出所述突变，那么就可以鉴别出种质的错用。

发明概述

本发明的一个目的是形成多倍体等基因种子和植株的方法，所述种子和植株与其亲本的差别在于其是淀粉突变体。

本发明的另一个目的是产生蜡质淀粉的等基因小麦种子和植株。

本发明的再一目的是通过对所述系产生的修饰淀粉的指纹分析鉴别等基因系的方法。

本发明的又一目的是在至少一个蜡质基因座中包含无活性蛋白的蜡质小麦淀粉。

另外，本发明的另一个目的是使多倍体谷物突变以形成修饰淀粉的方法。

本发明广义上包括制备全突变型等位基因多倍性谷物种子的方法。该方法包括以下步骤：用诱变剂处理多倍体植物材料中的双突变型等位基因，这形成了处理的植物材料；然后筛选所述处理的植物材料，以鉴别全突变型等位基因植物材料；选择所述全突变型等位基因植物材料。本方法也可以包括另外的步骤：选择具有单突变型等位基因的多倍体植物材料，并用诱变剂处理此植物材料，然后筛选所述植物材料以鉴别包含双突变型等位基因的植物材料。然后在前述方法使用该植物材料，形成所述全突变型等位基因。可以使用多种诱变剂，但优选的是EMS诱变剂，因为它产生点突变。可以在诸如小麦种子的植物材料中进行所述方法。在该方法中，所述双突变型等位基因可以是双无效等位基因(alleleor)，所述双无效等位基因可以是双无效蜡质等位基因。所述筛选可以包括不透明性试验。所述筛选步骤也可以包括用碘测试淀粉。当用碘测试时，所述全突变型等位基因种子染为红色。

本发明也包括一个这样的产品，即多倍性植物材料，所述材料在所有染色体组中的一个等位基因中或者没有产生的蛋白、或者产生无活性蛋白，并且其至少一个等位基因中包含由于诱变剂作用引起的点

突变。该植物材料也可以在一个染色体组包括由于所述点突变引起的至少一个产生无活性蛋白的等位基因。

按照本发明的多倍体植物材料包括等基因多倍体植物材料，所述等基因多倍体植物材料包含在至少一个染色体组中的特定等位基因中的至少一个诱变剂诱导的点突变、和在不同染色体组的同一特定等位基因中的至少一个天然产生的突变。另外，本发明包括由所述多倍体植物材料产生的淀粉。该植物材料的子代也在本发明范围内。

更准确地说，本发明包括多倍性植物材料中的双无效突变型等位基因，用诱变剂使所述多倍性植物材料形成全突变型等位基因。具体地说，本发明包括蜡质60突变型植物材料和其淀粉。该蜡质60突变体可以由多种蜡质部分突变体形成。具体地说，它可以由IKE形成。本发明包括与小麦亲本系等基因的、包含全突变型蜡质等位基因的株系。具体地说，本发明包括和IKE、Kanto系79、107、Saikai 173和Bia Huo等基因、包含全突变型蜡质等位基因的株系和其蜡质淀粉。本发明也包括具有全突变型淀粉等位基因和至少一种指纹蛋白的等基因小麦植株。

本发明也包括通过分离所述淀粉的所述指纹蛋白而鉴定多倍体材料世系(ancestry)的方法。另外，本发明包括鉴定蜡质小麦淀粉中的指纹蛋白的方法。

发明详述

定义

单无效*等位基因－在一个染色体组的一个等位基因中没有蛋白产生。

双无效*等位基因－在两个染色体组的一个等位基因中没有蛋白产生。

全无效*等位基因－在所有染色体组的一个等位基因中没有蛋白产生。

单无活性*等位基因－在一个染色体组的一个等位基因中产生无活性蛋白。

双无活性*等位基因－在两个染色体组的一个等位基因中产生无活性蛋白。

全无活性*等位基因－在所有染色体组的一个等位基因中产生无活性蛋白。

单突变型*等位基因－在一个染色体组的一个等位基因中没有蛋白产生，或者在一个染色体组的一个等位基因中产生无活性蛋白。

双突变型*等位基因－在两个染色体组的一个等位基因中没有蛋白产生，或者在两个染色体组的一个等位基因中产生无活性蛋白。

全突变型*等位基因－在所有染色体组的一个等位基因中没有蛋白产生，或者在所有染色体组的一个等位基因中产生无活性蛋白。

蜡质部分突变型－在两个染色体组的一个等位基因中没有产生蜡质蛋白或者产生无活性蜡质蛋白。

蜡质60突变型－在所有染色体组的一个等位基因中或者没有产生蜡质蛋白，或者产生无活性蜡质蛋白，但至少在一个染色体组的一个等位基因中产生无活性蜡质蛋白。

新全突变型－在所有染色体组的一个等位基因中或者没有产生蛋白，或者产生无活性蛋白，但在至少一个染色体组的一个等位基因产生无活性蛋白。

*标记的术语可以增加诸如淀粉、蜡质、ae、dull、含糖(sugary)2等等。

广义来说，本发明在多倍体谷物中通过诱变产生突变淀粉植物。比通过常规育种或乃至生物技术辅助的育种产生的淀粉突变型植物更有效地产生这种新的淀粉突变型植物。本发明所述突变型植物改变了所述淀粉。一种类型的改变淀粉是蜡质淀粉。本发明特别包括蜡质多倍体植物的产生。更准确地说，本发明包括蜡质小麦植株。更准确地说是蜡质60突变型多倍体谷物。

由甲磺酸乙酯(EMS)突变的双无效蜡质等位基因小麦形成本发明的蜡质小麦植株。产生的蜡质60突变型小麦植株产生包含60kDa束缚淀粉合酶蛋白(它不是对所有3个蜡质等位基因均无效)的蜡质淀粉。该无活性的60kDa束缚淀粉合酶蛋白鉴别了本发明。可以通过该无活性60kDa束缚淀粉合酶蛋白的淀粉提取物的存在，区分本发明的蜡质小麦和现有的蜡质小麦。同所有的蜡质小麦淀粉一样，用碘将本发明的小麦淀粉染成红色。这个红色染色鉴别出所述淀粉为蜡质淀粉。和所有现有的蜡质小麦淀粉不同，当提取并利用SDS凝胶电泳分离所述淀粉蛋白时，本发明有一个60kDa蜡质蛋白带出现。也可以通过使用针对所述蜡质蛋白的特异性抗体鉴别本发明的该指纹蛋白。

在罕见的情况下，所述EMS突变可以阻止所述60kDa蛋白在所述淀粉形成。该少有的植株在蜡质等位基因中可能是三无效，没有指纹。三无效蜡质植物和在所述蜡质等位基因中具有无活性60kDa蛋白的双无效植物，除后者淀粉中存在60kDa蛋白之外，产生同样的蜡质淀粉。尽管在这种罕见的情况下所述蜡质淀粉似乎和现有技术的淀粉一样，但所述植物仍然很不同。等基因植物是基因基本相同的植物。本发明的植物是等基因的，而且通过育种和单倍性形成的植物是来自两个来源的基因的混合物。术语植物包括所有的植物部分，包括细胞、叶、根、分生组织、茎、花、种子和花粉。

本发明的等基因系一旦产生，则可以通过传统育种方法或标记育种方法育种，以将所述淀粉突变型等位基因转移到不同的小麦种质中，或者将不同的等位基因转移到淀粉突变型小麦中。如果碘染成红色，则在所述育种过程中保留了蜡质性状。

本发明是一个可重现的使多倍体植物突变形成具有淀粉突变的等基因植物的方法。选择在一个染色体组中至少有一个淀粉突变的多倍性植物。用EMS使该植物突变。该诱变方法形成具有点突变的等基因植物。根据产生所需淀粉的所需点突变筛选产生的植物。如果所述蜡质突变是所需突变，那么所述筛选根据种子的不透明性。通过用碘将

所述种子中的淀粉染色，可以实现对这些种子的进一步筛选。淀粉染成红色的种子是蜡质的。

那么一般来说，本发明方法是选择至少一个染色体组中存在淀粉突变的多倍体植物，使选择的植物突变，并根据在其它染色体组中的突变筛选。所述方法的每一步都可以稍微改变。例如，可以通过诸如修改的SDS-PAGE的蛋白分离试验或通过表现型试验进行所述选择。一旦选择了多倍体植物，则可能不得不使所述种质增加，以具有足够的植物材料进行所述突变步骤。

可以通过多种诱变方法进行所述突变步骤。这些方法用合适的诱变剂使植物材料突变。可以将这些诱变剂用于不同植物的花粉、果实、花药、种子和卵。最优选的方法是用所述诱变剂处理种子或花粉。所述诱变剂可以是化学的或者物理的。可以使用化学试剂，包括但不限于甲磺酸乙酯、重氮试剂、N-亚硝基、N-甲基甘氨酸、补骨脂素，也可以使用物理的，如紫外线、X-射线、γ射线和其它任何具有相似效果的试剂。更优选的一组诱变剂包括使用叠氮化钠或亚硝基胍，或任何象甲磺酸乙酯(EMS)的烷化剂。最优选的试剂是EMS。在Maize Genetic Newletter 45, 第146页(1971)中的Neuffer的论文中概述了所述EMS方法。

所述EMS方法在基因的核苷酸序列中产生点突变。其它一些方法比点突变引起更多的基因破坏。EMS突变更具体，并对所述植物基因组的大部分没有改变。因此本发明形成了同亲本系等基因并包括新的点突变的株系。所述点突变是在所述植物的DNA中可遗传的遗传变化。所述遗传变化叫做诱导突变型等位基因，这表示在所述植物基因组中通过应用诱变剂而不通过转化而将所述突变导入到所述植物或所述植物的祖先中的突变。

最后的步骤是筛选以鉴别由在另一染色体组中携带淀粉突变的突变种子培育的植株。所述筛选可以以表型性状、淀粉组分、淀粉特征等为基础。

用由多倍体谷物形成等基因系的通用方法，产生同IKE等基因的蜡质小麦。在该方法的该具体应用中，选择IKE这个双无效蜡质等位基因(A、B双无效小麦种子)。种植IKE种子并收获自花授粉种子。用EMS使收获的谷粒(或种子)突变。处理的种子数大到足以产生期望的突变事件。期望的突变事件的可能数随遗传和多倍性变化。本领域技术人员可以计算该数目。当使Ike突变时，在所有600株植株中的1株中发生所述期望的事件，即在D基因组的蜡质等位基因中的一个点突变。这些植株带有一个单无活性蜡质等位基因和一个双无效蜡质等位基因。为了最大限度增加蜡质60突变型植物(在所述D基因组的蜡质等位基因中有另一突变)，在EMS溶液中使15磅Ike种子突变16小时，然后彻底清洗。种植处理的种子。培育所述小麦种子，适当地对其施肥、除草剂处理和杀虫剂处理。当准备收获时人工收获所述小麦。可以使用机器收获，但可能导致可利用的种子较少。除去所述种子的谷壳以筛选种子。根据期望的淀粉性状，通过检查灯箱上的种子筛选种子，并从少量种子中选出60个不透明的种子。然后用碘将这些选择的种子染色。在远离胚的地方用剃刀切开所述种子。对所述种子的切割部分用碘染色。如果所述染色是红色，则种子是蜡质小麦，如果所述染色不是红色，则废弃所述种子。种植选择的蜡质60突变型IKE种子以增加种子。

实施例一

使IKE突变

在15.4升水中的77克液体EMS中浸泡15磅Ike小麦种子。开始的9升水有77克加入的EMS。将所述EMS滴到容器的底部。用一根空气软管在溶液中鼓泡,使所述EMS混合均匀。然后向溶液中加入另外的6.4升水。EMS溶液的浓度是77g/15400 ml = 0.5%。然后向溶液中加入所述15磅Ike种子。每个种子的EMS的量是77,000 mg/24,160 = 0.32mg/每个种子。

用空气对溶液中的种子鼓泡20小时。用筛子将所述种子从溶液中

取出。将所述种子同中国制造的 #97591型大粒粗沙混合，以吸收表面水份并干燥所述种子。

将种子从水中取出后六个小时内将所述种子直接种植在大田中。所述处理的种子的发芽率良好。种植所述种子，并除了在成熟期人工收获麦穗(wheat heads)之外，以处理一般冬小麦的方法处理所述种子。人工收获避免了对所述麦穗的过分伤害。

可以用任何双无效小麦系重复该实施例。该步骤形成具有增加的点突变的等基因种子。然后根据产生所述蜡质突变的点突变筛选所述等基因种子。

实施例二

根据蜡质筛选

在实施例一所述处理后，分别将收获的小麦脱粒。用脱粒机(Almaco, Inc.)对所述麦穗脱粒，所述脱粒机利用两条在同一方向以不同速度运行的皮带产生的锉磨运动。吹去谷壳，同时将来自每个麦穗的种子储存在压花信封(coin envelope)中。

通过根据不透明性筛选种子，分析种子的蜡质淀粉。用偏振荧光照明检测种子的不透明性。用荧光灯箱和偏振片，目视筛选各个麦穗的种子。鉴别那些不透明的种子。然后将这些不透明的种子分离，以进一步检测。

用碘染色方法测试所述不透明种子。切下一块胚乳，并在2μl碘化钾(在1升H_2O中的 2g I_2，20g KI)液滴下暴露10秒钟。在低倍显微镜下观察这部分胚乳的颜色变化。淡红棕色表示大约具100%支链淀粉(蜡质)的胚乳淀粉，而蓝色表示它不是蜡质。这两个筛选证实在诱变的小麦种子中存在所述蜡质突变体。

本发明产生的蜡质小麦产生蜡质淀粉。现有技术一般通过将双A、B无效植株同D无效植株杂交育种，形成蜡质小麦。然而，在本发明和现有技术之间有许多差异。一个差异是本发明极少形成无效突变。

本发明所述突变是非无效的。现有技术是全无效突变。

本发明形成等基因植株和种子。换句话说，除了包括该点突变外，本发明的等基因植物和种子基本上和它的亲本相同。相反，现有技术不形成等基因植株。现有技术的植株和两个亲本相似。

本发明在淀粉中形成无活性蛋白。现有技术不是这样。本发明的无活性蛋白是其淀粉的指纹。换句话说，通过其淀粉可以分辨本发明的等基因植株和现有技术的等基因植株。鉴别可用于保护种质。如果将本发明的等基因系用于育种程序，以将蜡质性状渐渗入新系中，那么新系中将存在指纹蛋白。因此蜡质突变源可以鉴别为来自本发明的等基因系。通过指纹蛋白可以追踪种质的错用。甚至可以用指纹蛋白进行更精细的种质鉴别。该蛋白的氨基酸序列有一个相对于野生型氨基酸序列的点突变。因此如果可疑植株淀粉中的氨基酸序列有与突变植株淀粉相同的氨基酸，那么就知道所述植物家系来自本发明的植物。

所述指纹有两个主要用途，一个是对世系的指纹鉴定，二是鉴别期望的淀粉突变。如果本发明是等基因IKE蜡质，那么所述淀粉只包含一种无活性60kDa蛋白。如果已知只有一种蛋白，则可以用标准SDS-PAGE分离所述蛋白。下文概述了标准SDS-PAGE。如果有不止一种可能的蛋白，则应当使用在MAKOTO YAMAMORI和TOSHIKI NAKAMURA.(1994)Waxy Wheat by Genetically Eliminating Wx Proteins. Gamma Field Symposia No. 33 Institute of Radiation Breeding NIAR，MAFF日本，第63-74页中所述修改的SDS-PAGE和2D-PAGE。(在KAGAWA，H.， HIRANO，H.和KIKUCHI,F.(1988).Variation of glutelin seed storage protein in rice (*oryza sativa* L.).日本 J. Breed. 38:327-332和O'FARRELL, P.H. (1975),蛋白的高分辨率双向电泳. J. Biol. Chem. 250:4007-4021中更详尽地描述了这些现有技术方法的细节)。如果通过简单目测试验鉴别期望的淀粉突变，那么可能不需要分离蛋白。但是多倍体谷物中的许多淀粉突变是不能目测鉴

别的。对于这些淀粉突变型，可以分离和鉴别所述种子的蛋白。以下给出了从淀粉颗粒中分离蛋白的方法：

淀粉颗粒蛋白的分离：

在韦林氏搅拌器中以1分钟的搅拌间隔于25 ml提取缓冲液(50mM Tris乙酸盐，pH7.5，1mM EDTA，1mM DTT)中匀浆12.5克谷粒3×20秒。将样品保持在冰上。

通过mira cloth过滤，并以6,000 rpm离心30分钟。

弃去上清液，并刮去覆盖白色淀粉沉淀的变色固体。

在25 ml缓冲液中重悬浮沉淀并再离心。再重复清洗两次。

在20℃丙酮中重悬浮已清洗的沉淀，将沉淀在-20℃沉降。重复。

在气流下干燥淀粉(储存在-20℃)。

蛋白的提取

在微量离心管(eppendorf)中将50 mg淀粉同1 ml 2% SDS混合。

涡旋混合，于4℃以18,000 rpm离心5分钟。倒掉上清液。重复两次。

加入1 ml样品缓冲液(4 ml蒸馏水，1 ml 0.5M Tris-HCl，pH6.8，0.8 ml甘油，1.6 ml 10% SDS，0.4 ml B-巯基乙醇，0.2 ml 0.5% 溴酚蓝)。

在支架的孔中将微量管煮沸10分钟。

冷却，10,000 rpm离心10分钟。将上清液轻轻倒入新微量离心管中。煮沸4分钟。冷却。

SDS-PAGE凝胶：

	10%分离胶	4%浓缩胶
Acryl/Bis 40% 原液	2.5 ml	1.0 ml
1.5 M Tris pH 8.8	2.5 ml	-

0.5 M Tris pH 8.8	-	2.5 ml
10% SDS	100 μl	100 μl
水	4.845 ml	6.34 ml
脱气15分钟		
10%过硫酸铵	50 μl	50 μl
TEMED	5 μl	10 μl

Mini-protean Ⅱ双板电泳槽(Dual Slab Cell)， 3.5 ml 10% 丙烯酰胺分离缓冲液/凝胶。顶部为4%丙烯酰胺浓缩胶。200V恒压。

10x 电泳缓冲液(250 mM Tris，1.92M甘氨酸，1% SDS，pH8.3)。

束缚淀粉合酶

1．提取物的制备

a) 组织浓度为100 mg/2 ml提取缓冲液。

b) 于4℃用Polytron全速破碎(Polytron)20秒。

c) 于4℃在SM24转子中以17500 rpm离心20分钟。

d) 贮存提取物用于可溶性酶分析，并在2 ml提取缓冲液中重悬浮沉淀，再如上处理。

e) 再重复清洗两次，并在最终的1 ml体积中重悬浮。

2．测定(200 μl)

试剂	浓度	总量
N-二甘氨酸(pH8.3)	100 mM	20 μmole
EDTA	4.5 mM	0.9 μmole
KCL	25 Mm	5 μmole
谷胱甘肽	10 mM	2 μmole
糖原	10 mg/ml	2 mg
ADPG [14C]	7.5 mM(444 dpm/nmol)	1500 nmole (88,800 dpm)

3．母液

A)	缓冲液	对于50 ml
	200mM N-二甘氨酸(pH8.3)	1.632 g
	9 mM EDTA.Na_2	167 mg
	50 mM KCL	186 mg
	20 mM GSH	307 mg*

*以30.7 mg/5 ml的比率新加入

B) 糖原

160 mg/2 ml(与牡蛎比较优选兔肝)

C)	ADPG [14C]	对于1.25 ml一批
	60.0 mM ADPG	53.5mg ADPG(检查纯度和理论MW) 理论MW = 684.9，纯度 = 96% + 77 μl/2μCi ADPG[14C] + 1.173 ml H_2O。储存在-20℃。

4．步骤

A) 向微量离心管加入100 μl缓冲液(在测定温度预温育)

25 μl糖原

50 μl提取物

B) 在需要的温度温育离心管2分钟。

C) 通过加入25 μl ADPG[14C]开始反应。

D) 20分钟后，通过加入100 μl .025N NaOH，1.0 ml甲醇终止反应。

E) -在冰上保持5分钟，

-于4℃在微量离心机中以全速离心5分钟，

-吸出废弃上清液，

-通过溶于300 μl 0.1N NaOH中清洗沉淀2次，

-用1.0 ml 甲醇重沉淀。

F) 在1 ml 1.0M HCl中溶解沉淀并煮沸10分钟。

G) 冷却溶液并向小瓶中加入0.9 ml反应混合物和加入10 ml "Ready Safe" 混合物(cocktail)。

5. 计算

0.9 ml(计数部分)× 2(稀释因数)× 1000 μl(总提取物体积)× 1000 mg

1.0ml(总体积)× 50 μl(测定提取物体积)× 50 mg (组织重量)× 20(分钟)

其它实施例

部分蜡质小麦 -- 描述

已知几个单无效等位基因小麦，并可以根据得自六倍体小麦的A、B或D基因组的蜡质蛋白通过筛选淀粉而发现这些小麦。使用诱变剂，使用和本文所述相同的用于双无效等位基因基因型的方法和技术，可以将这样的单无效等位基因基因型转化成部分蜡质类型。除了筛选最终产品不同，使单无效等位基因突变形成双无效等位基因的方法是相同的。通常不能用所述修改的SDS-PAGE鉴别这个带有一个额外的淀粉突变的等基因系。所述带有点突变的新基因系将产生这样的淀粉，所述淀粉和来自非EMS处理的植株的淀粉有同样的蛋白带。鉴别不同染色体组的蜡质等位基因中具有点突变的单无效等位基因需要不同的试验。在所述蜡质淀粉突变中，所述鉴别试验是在EMS处理的具有所需突变的植株的淀粉中直链淀粉的百分比减少。当然，一旦用所述EMS方法形成部分突变体，那么可以用所述部分突变体形成全蜡质突变体。使所述部分蜡质突变，并用上文所述的灯箱和碘测试筛选。

因此，可以看出这个可重现的方法将产生小麦变种和低直链淀粉含量。这样的蜡质小麦淀粉可以用在各种各样的食品和饲料应用上。在多种食品和饲料应用上，例如在延长各种各样的焙烤产品和胶化馅

饼的储存期限方面，蜡质小麦淀粉可以代替蜡质玉米。

虽然上文所述包含实施例，但这些实施例不应解释为限制本发明的范围。它们提供了一些本发明目前最佳实施方案的说明。