



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101589149 B

(45) 授权公告日 2014. 05. 21

(21) 申请号 200880002776. X

A01H 5/00 (2006. 01)

(22) 申请日 2008. 01. 23

A01H 5/10 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C08B 30/00 (2006. 01)

07090009. 7 2007. 01. 26 EP

A23L 1/00 (2006. 01)

60/898, 427 2007. 01. 30 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2009. 07. 22

W0 2005095617 A2, 2005. 10. 13, 全文.

(86) PCT国际申请的申请数据

W0 2004056999 A1, 2004. 07. 08, 全文.

PCT/EP2008/000614 2008. 01. 23

;Nel Anterson Landerito 等.Preparation and Properties of Starch Phosphates Using Waxy, Common, and High-Amylose Corn Starches. 《cereal chemistry》. 2005, 第 82 卷 (第 3 期), 271-276.

(87) PCT国际申请的公布数据

W02008/090008 EN 2008. 07. 31

(73) 专利权人 拜尔作物科学股份公司

审查员 韦炜

地址 德国莱茵河畔蒙海姆

(72) 发明人 C·弗罗贝格 R-C·施密特

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 林柏楠

(51) Int. Cl.

C12N 15/82 (2006. 01)

C12N 9/10 (2006. 01)

C12N 9/12 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书42页

序列表54页 附图2页

(54) 发明名称

合成具有提高的溶胀力的低直链淀粉的经遗传修饰植物

(57) 摘要

本发明涉及经遗传修饰的单子叶植物细胞和植物,其淀粉具有小于 5% 重量的表观直链淀粉含量并且具有具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质提高的活性和具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质提高的活性。此类植物合成热水溶胀力提高的淀粉。用于产生 / 制备这些植物细胞、植物、淀粉和面粉的方法和工艺也是本发明的主题。

1. 产生经遗传修饰的单子叶植物的方法, 其中

a) 遗传修饰单子叶植物细胞, 所述的遗传修饰包括以下步骤 i) 至 iii) :

i) 将遗传修饰导入单子叶植物细胞, 其中与相应的非遗传修饰野生型单子叶植物细胞相比较, 所述的遗传修饰导致具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质的活性提高, 所述的遗传修饰是编码 SEQ ID NO. 4 或 SEQ ID NO. 6 所示氨基酸序列的蛋白质的外源核酸分子,

ii) 将遗传修饰导入单子叶植物细胞, 其中与相应的非遗传修饰野生型单子叶植物细胞相比较, 所述的遗传修饰导致具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质的活性提高, 所述的遗传修饰是编码 SEQ ID NO. 2 所示氨基酸序列的蛋白质的外源核酸分子,

iii) 将遗传修饰导入单子叶植物细胞, 其中与相应的非遗传修饰野生型单子叶植物细胞相比较, 所述的遗传修饰导致具有 GBSSI 活性的蛋白质的活性降低, 所述的遗传修饰是下调或敲除 GBSSI 蛋白质,

其中步骤 i) 至 iii) 可以按照任意所需顺序、各自地或作为步骤 i) 至 iii) 的任意所需组合同时地实施,

b) 从步骤 a) 的植物细胞再生出植物 ;

所述植物具有与相应的非遗传修饰野生型植物细胞相比较具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质提高的活性, 和与相应的非遗传修饰野生型植物细胞相比较具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质提高的活性以及与相应的非遗传修饰野生型植物细胞相比较具备 GBSSI 活性的蛋白质降低的活性。

2. 根据权利要求 1 的方法, 其还包括 c) 借助步骤 b) 的植物产生进一步的植物, 所述植物具有与相应的非遗传修饰野生型植物细胞相比较具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质提高的活性, 和与相应的非遗传修饰野生型植物细胞相比较具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质提高的活性以及与相应的非遗传修饰野生型植物细胞相比较具备 GBSSI 活性的蛋白质降低的活性。

3. 根据权利要求 1 或 2 的方法, 其还包括将植物细胞从根据步骤 b) 或 c) 的植物分离并且重复步骤 a) 至 b) 或步骤 a) 至 c), 直至已经产生下述植物, 所述植物具有与相应的非遗传修饰野生型植物细胞相比较具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质提高的活性, 和与相应的非遗传修饰野生型植物细胞相比较具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质提高的活性以及与相应的非遗传修饰野生型植物细胞相比较具备 GBSSI 活性的蛋白质降低的活性。

4. 用于制备改性淀粉的方法, 包括从通过如权利要求 1 至 3 中任一项所述方法获得的植物细胞或植物提取淀粉的步骤。

5. 通过权利要求 1 至 3 中任一项所述方法获得的植物细胞或植物的部分的用途, 用于制备淀粉。

6. 通过权利要求 4 所述的方法获得的改性淀粉, 其中所述改性淀粉是稻淀粉, 与分离自相应的非遗传修饰稻植物的淀粉相比较, 其具有 3.5 至 4.1% 重量的表观直链淀粉含量和 86.0 至 89.1g/g 的提高了的热热水溶胀力。

7. 用于制备衍生淀粉的方法, 其中权利要求 6 所述的改性淀粉随后被称作化学方法、酶方法、热方法或机械方法的衍生化而改变了特性, 获得衍生淀粉。

8. 衍生淀粉, 其通过权利要求 7 所述的方法获得。

9. 如权利要求 6 所述的改性淀粉的用途, 用于通过权利要求 7 所述的方法制备衍生淀

粉。

10. 面粉,其包含通过权利要求 4 所述方法获得的改性淀粉。

11. 面粉,其包含权利要求 6 所述的改性淀粉。

12. 用于制备面粉的方法,包括步骤:研磨通过权利要求 1 至 3 中任一项所述方法获得的植物细胞或植物的部分。

13. 通过权利要求 1 至 3 中任一项所述方法获得的单子叶植物细胞或植物的用途,用于产生面粉。

14. 淀粉产品,其包含如权利要求 6 所述的改性淀粉或如权利要求 8 所述的衍生淀粉,或包含通过权利要求 4 所述方法获得的改性淀粉。

15. 面粉产品,其包含如权利要求 10 或 11 中所述的面粉。

合成具有提高的溶胀力的低直链淀粉的经遗传修饰植物

[0001] 本发明涉及经遗传修饰的单子叶植物细胞和植物,其淀粉具有小于 5% 重量的表观直链淀粉含量和具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质提高的活性及具备葡聚糖 / 水双激酶 (glucan, water dikinase) 活性的蛋白质提高的活性。此类植物合成热水溶胀力提高的淀粉。用于产生 / 制备这些植物细胞、植物、淀粉及面粉的方法和工艺 (processes) 也是本发明的主题。

[0002] 除了油、脂肪和蛋白质之外,多糖也是来自植物的最重要的再生性资源。除纤维素之外,淀粉作为高等植物中最重要的储备材料之一在多糖中占据中心地位。

[0003] 此外,淀粉是人和动物食物的必需营养成分。食物中存在的淀粉的结构特征可以影响极广泛类型食物的功能属性 (例如持水力 (water-binding capacity)、溶胀力)、营养特征 (例如消化性、食物对血糖指数的影响) 或结构特征 (例如可切性、质构、稠度、可加工性)。食品因此经常包含具有特定结构特征的淀粉,所述的特定结构特征带来所讨论食品的所需特征。此外,植物组织中存在的淀粉可以影响包含淀粉贮藏性植物组织 (例如谷粒、果实、面粉) 的食物的特征。

[0004] 多糖淀粉是由化学均一的单位 - 葡萄糖分子构成的聚合物。然而,多糖淀粉构成不同形式分子的高度复杂混合物,所述的分子在聚合度、葡萄糖链分支的出现及其链长度方面是不同的,并且另外可以受到修饰,例如磷酸化。因此,淀粉不构成均一的原材料。尤其,可以区分直链淀粉和支链淀粉。在用于工业淀粉生产或用作食物的常见植物例如玉米、稻、小麦或马铃薯中,直链淀粉占所合成淀粉的大约 20% - 25% 并且支链淀粉占所合成淀粉的大约 70% - 80%。

[0005] 淀粉赋予功能、营养或结构的特征,例如溶解度、回生特性 (retrogradation behavior)、持水力、成膜特性、黏度、胶凝特性、冻融稳定性、酸稳定性、凝胶强度、溶胀力、消化性、淀粉的淀粉粒大小尤其受淀粉的结构特征如直链淀粉 / 支链淀粉比、葡萄糖聚合物的分子量、侧链分布模式、离子含量、脂质和蛋白质含量和 / 或淀粉粒形态影响。

[0006] 基于植物育种的方法可以用来修饰淀粉的所选结构特征并且因而修饰植物细胞中淀粉赋予功能、营养或结构的特征。然而,在目前,仅有可能修饰淀粉的所选结构特征 (例如支链淀粉 / 直链淀粉含量, US 5, 300, 145)。目前例如不可能仅通过植物育种方法影响植物中的淀粉磷酸酯含量。

[0007] 替代植物育种方法的是通过重组方法靶向修饰淀粉生产植物。然而,这样做的一个先决条件是鉴定并表征参与淀粉合成和 / 或淀粉改性的酶,以及它们在转基因植物中的后续功能性分析。

[0008] 表征不同反应的多种酶参与植物细胞中淀粉的合成。淀粉合酶 (EC2. 4. 1. 21, ADP- 葡萄糖 :1,4- α -D- 葡聚糖 4- α -D- 葡糖基转移酶) 通过将 ADP- 葡萄糖的葡糖基残基转移至 α -1,4- 葡聚糖而催化聚合反应,其中转移的葡糖基残基通过生成 α -1,4- 键与 α -1,4- 葡聚糖连接。已经在迄今研究的每一植物中鉴定到淀粉合酶的几种同工型。可以区分两类淀粉合酶:颗粒结合性淀粉合酶 (GBSS) 和可溶性淀粉合酶 (在本发明上下文中也缩写成“SS”)。颗粒结合性淀粉合酶催化直链淀粉的合成,而可溶性淀粉合酶参与支链

淀粉的合成 (Ball 和 Morell, 2003, *Annu. Rev. Plant Biol.* 54, 207-233; Teltow 等, 2004, *J. Expt. Bot.* 55 (406), 2131-2145)。可溶性淀粉合酶类具有几种同工型, 它们在专业文献中称作 SSI、SSII、SSIII、SSIV 和 SSV。淀粉合酶与各种同工型 (SSI、SSII、SSIII、SSIV、SSV) 的联系因所讨论酶的相应蛋白质序列的序列同源性而建立 (Ball 和 Morell, 2003, *Annu. Rev. Plant Biol.* 54, 207-233)。可溶性淀粉合酶的每种同工型已经根据目前教授内容赋予其在淀粉合成中的特定功能。在双子叶植物中仅检测到 SSI 蛋白的一种同工型, 与此同时, 已经在一些单子叶植物 (例如玉米) 中检测到两个不同类别的 SSII 蛋白, 它们分别称作 SSIIa 和 SSIIb。在单子叶植物中, SSIIa 偏好地在胚乳中表达, 而 SSIIb 偏好地在叶组织中表达 (Teltow 等, 2004, *J. Expt. Bot.* 55 (406) :2131-2145)。目前并没有充分解释尤其是各种可溶性淀粉合酶在淀粉合成中的具体功能 (Ball 和 Morell, 2003, *Annu. Rev. Plant Biol.* 54 :207-233)。

[0009] 淀粉赋予功能、营养或结构的特征也受非碳组分-磷酸酯的含量影响。这里, 必须区分与淀粉葡萄糖分子共价结合的单酯形式的磷酸酯 (在本发明上下文中称作淀粉磷酸酯) 和淀粉结合性磷脂形式的磷酸酯。

[0010] 淀粉磷酸酯 (starch phosphate) 含量因植物品种而变化。因此, 例如, 某些玉米突变体合成淀粉磷酸酯含量提高的淀粉 (蜡质玉米含 0.002% 的淀粉磷酸酯, 且高直链淀粉玉米含 0.013% 的淀粉磷酸酯), 而常规玉米品种仅含有痕量淀粉磷酸酯。类似地, 在小麦中仅存在少量淀粉磷酸酯 (0.001%), 而在燕麦 (oat) 和高粱 (Sorghum) 中检测不到淀粉磷酸酯。蜡质稻突变体中的淀粉磷酸酯 (0.003%) 比常规稻品种中的淀粉磷酸酯 (0.013%) 更少。在合成块茎或根淀粉贮藏植物例如木薯 (0.008%)、甜马铃薯 (0.011%)、竹芋 (0.021%) 或马铃薯 (0.089%) 检测到显著量的淀粉磷酸酯。以上提及的淀粉磷酸酯含量百分值在每种情况下指淀粉的干重, 并且已经由 Jane 等确定 (1996, *Cereal Foods World* 41(11), 827-832)。

[0011] 淀粉磷酸酯可以在聚合的葡萄糖单体的 C2、C3 或 C6 位置处以单酯形式存在 (Takeda 和 Hizukuri, 1971, *Starch/Stärke* 23, 267-272)。植物合成的淀粉中磷酸酯的分布一般以以下事实为特征: 即大约 30% -40% 的磷酸酯残基在葡萄糖分子的 C3 位置处共价结合并且大约 60% -70% 的磷酸酯残基在葡萄糖分子的 C6 位置处共价结合 (Blennow 等, 2000, *Int. J. of Biological Macromolecules* 27 :211-218)。Blennow 等 (2000, *Carbohydrate Polymers* 41 :163-174) 对多种淀粉确定了结合在葡萄糖分子 C6 位置处的淀粉磷酸酯含量, 所述的淀粉例如是马铃薯淀粉 (每毫克淀粉 7.8nmol-33.5nmol, 取决于品种)、来自姜黄属 (*Curcuma*) 多个物种的淀粉 (每毫克淀粉 1.8nmol-63nmol)、木薯淀粉 (每毫克淀粉 2.5nmol)、稻淀粉 (每毫克淀粉 1.0nmol)、绿豆淀粉 (每毫克淀粉 3.5nmol) 和高粱淀粉 (每毫克淀粉 0.9nmol)。这些作者没有在大麦淀粉和来自多种玉米蜡质突变体的淀粉中检测到在 C6 位置处结合的任何淀粉磷酸酯。仍没有建立植物基因型与淀粉磷酸酯含量之间的联系 (Jane 等, 1996, *Cereal Foods World* 41(11), 827-832)。

[0012] 迄今已经描述了两种蛋白质, 它们介导磷酸酯残基的共价键导入至淀粉的葡萄糖分子。第一种蛋白质具有 α -葡聚糖/水双激酶 (GWD, E. C. :2.7.9.4) 的酶活性 (Ritte 等, 2002, *PNAS* 99 :7166-7171), 常称作 R1, 尤其在较早的科学文献中是这样, 并且与马铃薯块茎中贮藏淀粉的淀粉粒结合 (Lorberth 等, 1998, *Nature Biotechnology* 16 :473-477)。

催化淀粉磷酸酯导入淀粉的文献中所述第二种蛋白质具有磷酸-葡聚糖/水双激酶 (phosphor-glucan, water dikinase; PWD, E. C. :2.7.9.5) 的酶活性 (**Kötting**等, 2005, Plant Physiol. 137 :2424-252, Baunsgaard 等, 2005, Plant Journal 41 :595-605)。

[0013] GWD 与 PWD 之间的一个重要差别是 GWD 能够利用非磷酸化淀粉作为底物, 即, 非磷酸化淀粉的从头磷酸化可以由 GWD 催化, 而 PWD 需要已经磷酸化的淀粉作为底物, 即, 把额外的磷酸酯导入已磷酸化的淀粉 (**Kötting**等, 2005, Plant Physiol. 137 :2424-252, Baunsgaard 等, 2005, Plant Journal 41 :595-605)。GWD 与 PWD 之间的又一个重要差别是 GWD 排他性地在淀粉的葡萄糖分子 C6 位置中导入磷酸酯基团, 而 PWD 排他性地磷酸化淀粉的葡萄糖分子 C3 位置 (Ritte 等, 2006, FEBS Letters 580 :4872-4876)。

[0014] 在 GWD 或 PWD 催化的反应中, 起始材料 α -1,4-葡聚糖 (在 GWD 的情况下)、腺苷三磷酸 (ATP) 和水以及磷酸化的 α -1,4-葡聚糖 (在 PWD 的情况下)、腺苷三磷酸 (ATP) 和水被转化成产物葡聚糖磷酸酯 (淀粉磷酸酯)、无机磷酸盐和腺苷单磷酸 (**Kötting**等, 2005, Plant Physiol. 137 :2424-252; Ritte 等, 2002, PNAS 99 :7166-7171)。

[0015] 在 WO 02/34923 中描述了因表达来自马铃薯的 GWD 编码基因而具有升高的 GWD 蛋白质活性的小麦植物。与不能检测到淀粉磷酸酯的相应野生型植物相比较, 这些植物合成在葡萄糖分子 C6 位置具有显著量淀粉磷酸酯的淀粉。

[0016] WO 05/002359 描述了在玉米植物中表达马铃薯 GWD, 其中所述的马铃薯 GWD 已经对于玉米植物中的密码子使用进行了优化。借助 ^{31}P NMR, 基于葡萄糖的量, 确定了所讨论玉米淀粉的 0.0736% (在葡萄糖分子 C6, C3 和 C2 位置处结合的) 磷酸酯的总磷酸酯含量。若假定磷酸 (H_3PO_4) 的分子量是 98, 则每毫克淀粉大约 7.5nmol 磷酸的总磷酸酯含量产生 0.0736% 的总磷酸酯含量, 这在 WO 05/002359 中已经对分离自转基因玉米植物的淀粉测定。在 WO 05/095617 中描述了因表达来自拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的 PWD 编码基因而显示提高的 PWD 蛋白质活性的植物。与相应的非转化野生型植物比较, 这些植物具有提高的淀粉磷酸酯含量。

[0017] 例如当食品工业中加工淀粉时, 一个重要功能特征是溶胀力。淀粉的多种结构特征, 如直链淀粉/支链淀粉比、侧链长度、淀粉聚合物的分子量分布、分支数目和淀粉磷酸酯的量, 影响功能特征, 尤其影响所讨论淀粉的溶胀力 (Narayana 和 Moorthy, 2002, Starch/ **Stärke** 54 :559-592)。

[0018] 直链淀粉长久以来被视为由 α -1,4-糖苷键连接的 α -D-葡萄糖单体组成的线性聚合物。然而近来的研究已经证实存在 α -1,6-糖苷分支点 (大约 0.1%) (Hizukuri 和 Takagi, Carbohydr. Res. 134, (1984), 1-10; Takeda 等, Carbohydr. Res. 132, (1984), 83-92)。

[0019] 支链淀粉构成具有不同支化模式的葡萄糖链的复杂混合物。与直链淀粉相反, 支链淀粉包含更多的分支。侧链通过 α -1,6-糖苷键与以 α -1,4-糖苷键连接的 α -D-葡萄糖单体的主链连接。根据文献 (Voet 和 Voet, 1990. Biochemistry, John Wiley & Sons), 平均每隔 24-30 个葡萄糖残基出现 α -1,6-分支。这对应于约 3%-4% 的支化程度。支化程度的数据可变并且取决于所讨论淀粉的来源 (例如植物物种、植物品种等)。在用于淀粉工业生产的常见植物例如玉米、小麦或马铃薯中, 直链淀粉占所合成淀粉的大约 20%-30% 并且支链淀粉占所合成淀粉的大约 70%-80%。

[0020] 直链淀粉与支链淀粉之间的另一个重要差异是它们的分子量。根据淀粉来源,直链淀粉具有 5×10^5 – 10^6 Da 的分子量,而支链淀粉的分子量是 10^7 – 10^8 Da。这两种大分子可以基于它们的分子量和它们不同的物理化学特征区分,并且观察这种区别的最简单方式是借助于它们不同的碘结合特征。

[0021] 多种技术用途仅需要支链淀粉,原因在于支链淀粉具有增稠作用。直链淀粉具有胶化作用并且因而对众多用途而言是不受欢迎的。纯的支链淀粉使得同时具备高黏度、稳定性及透明度的极均一性表面结构成为可能。这些淀粉的可能用途是在造纸业、粘合剂工业、纺织工业、建筑业及化妆品工业中。此外,支链淀粉是制备麦芽糖糊精的优选起始材料,原因是与从包含直链淀粉的淀粉制备的麦芽糖糊精相比较,支链淀粉所制备的麦芽糖糊精在水中的溶解度增加、对溶解稳定并且透明。

[0022] 在食品工业中,支链淀粉常用作稳定剂、粘合剂并用于改善质构。支链淀粉特别在其中巨大温度变化在加工及整饰期间出现(例如冻融稳定性)的那些加工步骤中是有利的。支链淀粉在食品工业中的用途正在增长,尤其考虑到对(半)成品日益增加的需求。

[0023] GBSSI(“颗粒结合性淀粉合酶 I”)参与直链淀粉形成。迄今,已经描述了其中颗粒结合性淀粉合酶 GBSSI 活性降低的植物(Shure 等,1983, Cell 35 :225–233; Hovenkamp–Hermelink 等,1987, Theoretical and Applied Genetics 75 :217–221; Visser 等,1991, Mol. Gen. Genet. 225 :289–296; Hergersberg, 1988, Thesis, University of Cologne; WO 92/11376)。此外,存在缺少有功能的 GBSSI 基因并且因而合成不含直链淀粉(=支链淀粉)的淀粉的已知突变体(Kossmann 和 Lloyd 2000, Critical Reviews in Plant Sciences, 19(3) :171–226)。玉米的相应 GBSSI 突变体的胚乳在外观上呈蜡质,这是为何引入术语“蜡质”胚乳作为不含直链淀粉的淀粉之同义词的原因。

[0024] 当描述淀粉的溶胀力时,必须区分在冷水(例如室温)中的溶胀力和在温水或热水中的溶胀力。天然淀粉在冷水中的溶胀力可忽略不计,假若存在的话,而物理改性(预胶化,干燥)淀粉甚至能够在冷水中溶胀。冷水溶胀性淀粉的制备方法例如在 US 4, 280, 851 中描述。在本发明的上下文中,术语“溶胀力”指淀粉在温/热的水质悬液中的性质。该溶胀力常规地通过如此方式确定:在过量水存在下加热淀粉粒,在离心所述悬液后除去非结合水并且从所得残余物的重量和所称重淀粉的重量获得该商(quotient)。当实施该方法时,加热淀粉悬液则造成淀粉粒的晶态区域溶解并造成水分子插入淀粉粒而不溶解淀粉粒自身的结构,即仅仅单个淀粉粒的溶胀发生。

[0025] 与来自谷类的淀粉相比较,从块茎或块茎样组织分离的淀粉具有显著较高的热水溶胀力。

[0026] 对于分离自多个品种的马铃薯淀粉而言,使用 Leach 等(1959, Cereal Chemistry 36 :534–544)方法,已经测得在 85℃ 的 74.15g/g 最大溶胀力(品种 Kufri Jyoti)(Singh 等,2002, Journal of the Science of Food and Agriculture 82 :1376–1383)。Takizawa 等(2004, Brazilian Archives of Biology and Technology 47(6) :921–931)测得马铃薯淀粉的 100g/g 溶胀力(90℃,使用上文的 Leach 等方法)。从多个栽培品种分离的小麦淀粉具有 16.6g/g–26.0g/g 的溶胀力(温度:沸腾的 0.1% AgNO₃ 水质悬液)(Yamamori 和 Quynh, 2000, Theor Appl Genet 100 :23–38)。从无壳大麦(hullless barley)的多个栽培品种分离的淀粉具有 16.5g/g 或 19.3g/g 的溶胀力,并且所述大麦的多个栽培品种的蜡质

或不含直链淀粉的淀粉具有 36.0g/g-55.7g/g 的溶胀力(温度:70℃,0.1% AgNO₃ 水溶液, Yasui 等,2002, Starch/ **Stärke** 54 :179-184)。对于玉米淀粉,已经测得 22.3g/g 的溶胀力,并且对于高含量直链淀粉的玉米淀粉,已经测得 9.6g/g(Hylon V)、6.1g/g(Hylon VII) 或 3.9g/g(LAPS = 低含量支链淀粉)(90℃, Shi 等,1998, J. Cereal Sci. 27 :289-299) 的溶胀力。US 6,299,907 描述了蜡质玉米淀粉的 35.4g/g 溶胀力。对于分离自多个稻栽培品种的淀粉,已经使用 Leach 等方法(上文)测得 26.0g/g-33.2g/g 的溶胀力(Sodhi 和 Singh, 2003, Food Chemistry 80 :99-108)。Chen 等(2003, Starch/ **Stärke** 55 :203-212) 对蜡质稻淀粉与高含量直链淀粉的稻淀粉的多种混合物测得大约 25g/g- 大约 49g/g 的溶胀力(95℃,水质悬液)。Yasui 等(2002, Starch/ **Stärke** 54 :179-184) 对无淀粉酶的稻淀粉测得 55.7g/g 的溶胀力(在沸水中于 0.1% 硝酸银水溶液中测量)。

[0027] 通过产生天然淀粉的衍生物,可以改变淀粉的功能特征。根据交联程度,交联小麦淀粉具有 6.8g/g-8.9g/g 的溶胀力;乙酰化小麦淀粉具有 10.3g/g 的最大溶胀力;并且既交联且乙酰化的小麦淀粉具有 9.4g/g 的溶胀力,而相应的非衍生化淀粉具有 8.8g/g 的溶胀力(在 90℃测量;Van Hung 和 Morita,2005, Starch/ **Stärke** 57 :413-420)。

[0028] 对于乙酰化的蜡质稻淀粉,已经测得大约 30g/g 的溶胀力,并且对于交联的蜡质稻淀粉,已经测得大约 15g/g 的溶胀力,而相应的非衍生化蜡质稻淀粉具有大约 41g/g 的溶胀力。乙酰化稻淀粉具有大约 20g/g 的溶胀力并且交联的稻淀粉具有大约 13g/g 的溶胀力,而相应的非衍生化稻淀粉具有大约 14g/g 的溶胀力(在 90℃测量, Liu 等,1999, Starch/ **Stärke** 52 :249-252)。US 6,299,907 描述了交联淀粉,其中在氢氧化钠/硫酸钠溶液中使所讨论的淀粉预溶胀后实施交联反应。根据交联程度,发现小麦淀粉具有 6.8g/g-7.3g/g 的溶胀力(相应的小麦非衍生化淀粉的溶胀力 14.7g/g),小麦羟丙基淀粉具有 9.7g/g 的溶胀力(相应的小麦非衍生化淀粉的溶胀力 22.9g/g),交联的玉米淀粉具有 5.9g/g 的溶胀力(相应的玉米非衍生化淀粉的溶胀力 16.7g/g),交联的蜡质玉米淀粉具有 8.3g/g 的溶胀力(相应的非衍生化蜡质玉米淀粉的溶胀力 35.4g/g),并且交联的马铃薯淀粉具有 6.7g/g 的溶胀力(没有详细说明相应的马铃薯非衍生化淀粉的溶胀力)(在 95℃测量)。这表明淀粉的溶胀力假如能够提高的话,不能通过现有的衍生方法显著提高。

[0029] 本发明的目的是提供具有改变的功能特征的改性蜡质淀粉,和提供合成具有改变的功能特征的蜡质淀粉的新植物细胞及植物以及用于产生所述植物和/或植物细胞的方法和手段。

[0030] 尤其,所述改变的功能特征在于以下事实,即改性淀粉具有提高的热水溶胀力。

[0031] 因此,本发明涉及经遗传修饰的单子叶植物细胞或经遗传修饰的单子叶植物,与相应的非遗传修饰野生型植物细胞或相应的非遗传修饰野生型植物相比较,其淀粉具有小于 5% 重量的表观直链淀粉含量,并且它们额外地具有具备淀粉合酶 II 酶活性的蛋白质提高的活性及额外地具有具备葡聚糖/水双激酶活性的蛋白质提高的活性。

[0032] 在本上下文中,遗传修饰可以是任意遗传修饰,其中与相应的非遗传修饰野生型植物细胞或野生型植物相比较,所述遗传修饰导致具有小于 5% 重量直链淀粉的淀粉在经遗传修饰的植物细胞或经遗传修饰的植物中合成,并且同时导致具备淀粉合酶 II 活性的至少一种蛋白质的活性和(同时)具备葡聚糖/水双激酶活性的至少一种蛋白质的活性提高。

[0033] 在本发明的上下文中,术语“野生型植物细胞”意指充当产生本发明植物细胞的起始材料的植物细胞,即该植物细胞的遗传信息与本发明植物细胞的遗传信息相对应,除了所导入的遗传修饰之外。

[0034] 在本发明的上下文中,术语“野生型植物”意指充当产生本发明植物的起始材料的植物,即该植物的遗传信息与本发明植物的遗传信息相对应,除了所导入的遗传修饰之外。

[0035] 在本发明的上下文中,术语“相应的”意指在比较几个对象时,相互比较的所讨论对象维持在相同条件下。在本发明的上下文中,术语“相应的”在野生型植物细胞或野生型植物的上下文中意指相互比较的植物细胞或植物在相同培养条件培育并具有相同的(栽培)年龄。

[0036] 术语“单子叶植物”指单子叶植物(monocot)。在植物学上,它们属于被子植物(木兰门(Magnoliophyta))的三个纲之一。与双子叶植物不同,单子叶植物以如下事实为特征:胚一般仅具有一个子叶原基(希腊语:monos = “单个”和 kotyledon = “子叶”)。此外,它们具有带鞘的维管束,即韧皮部与木质部不被分生组织隔开,这是单子叶植物的茎为何不可能次生加厚的原因。这类植物尤其包括莎草目(Cyperales)和禾本目(Poales)的草,以及许多个其他科。

[0037] 在本发明的上下文中,术语“具有淀粉合酶 II(酶)活性的至少一种蛋白质提高的活性”意指编码细胞中具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质的内源性基因表达增加和/或具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质的量增加和/或细胞中具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质的活性提高。

[0038] 在本发明的上下文中,术语“具有葡聚糖/水双激酶(酶)活性的蛋白质提高的活性”意指细胞中编码具备葡聚糖/水双激酶活性的蛋白质的内源性基因表达增加和/或具备葡聚糖/水双激酶活性的蛋白质的量增加和/或细胞中具备葡聚糖/水双激酶活性的蛋白质的活性提高。

[0039] 表达的增加可以例如通过测量转录物的量加以确定,其中所述的转录物编码具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质或具备葡聚糖/水双激酶活性的蛋白质。这可以例如通过 RNA 印迹分析或通过 Q-PCR(定量转录聚合酶链反应)进行。

[0040] 具备葡聚糖/水双激酶活性的蛋白质的量增加在本文中优选地意指与相应的非遗传修饰细胞相比较,所讨论蛋白质的量增加至少 50%,尤其至少 70%,优选至少 85%并且尤其优选至少 100%。

[0041] 具备葡聚糖/水双激酶活性的蛋白质的量增加还意指含有不可检测到量的具备葡聚糖/水双激酶活性的蛋白质的植物或植物细胞在经过本发明的遗传修饰后,含有可检测量的具备葡聚糖/水双激酶活性的蛋白质。

[0042] 用于产生与某蛋白质特异性反应即与该蛋白质特异性结合的抗体的方法是技术人员已知的(参见,例如 Lottspeich 和 Zorbas(编者),1998, Bioanalytik, Spektrum akad, Verlag, Heidelberg, Berlin, ISBN3-8274-0041-4)。可以委托一些公司(例如 Eurogentec, Belgian)产生此类抗体。Lorberth 等(1998, Nature Biotechnology 16:473-477)和 Ritte 等(2000, Plant Journal 21:387-391)描述了可以通过免疫学方法确定具备葡聚糖/水双激酶活性的蛋白质的量增加的抗体。Walter(“Untersuchungen derexpression und Funktion der**Stärke** synthase II(SSII)

aus Weizen(*Triticum aestivum*)[来自普通小麦(*Triticum aestivum*)的淀粉合酶 II(SSII)的表达及功能研究(Studies into the expression and function of starch synthase II(SSII)from wheat(*Triticum aestivum*))]",汉堡大学生物学系博士答辩论文,ISBN 3-8265-8212-8)描述了通过免疫学方法确定具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质的量增加的抗体。

[0043] 具备葡聚糖/水双激酶活性的蛋白质的活性的量例如可以如文献(Mikkelsen 等,2004,Biochemical Journal 377:525-532;Ritte 等,2002,PNAS 99:7166-7171)中所述检测。

[0044] 具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质的活性的量例如可以如文献(Nishi 等,2001,Plant Physiology 127:459-472)中所述确定。用于确定具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质的活性的量的优选方法在“一般方法”中描述。

[0045] 优选地,本发明的植物细胞或本发明的植物具有具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质的活性,其中与相应的非遗传修饰野生型植物细胞或野生型植物相比较,所述活性提高到至少 2 倍,优选至少 6 倍。

[0046] 具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质(ADP-葡萄糖:1,4- α -D-葡聚糖 4- α -D-葡糖基转移酶;EC 2.4.1.21)的结构显示一系列的某些结构域。在氨基端,它们具有一个转运入质体的信号肽。从氨基端至羧基端,依次存在氨基端区域和催化结构域(Li 等,2003,Funct Integr Genomics 3,76-85)。基于多种具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质的氨基酸序列比对(<http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/PFSCAN>),进一步分析表明:这些蛋白质具有 3 个特定结构域。在如 SEQ ID NO 4 所示的氨基酸序列中,第 322 位至第 351 位氨基酸代表结构域 1,第 423 位至第 462 位氨基酸代表结构域 2 并且第 641 位至第 705 位氨基酸代表结构域 3。结构域 1 由如 SEQ ID NO 3 所示的核酸分子序列第 1190 位至第 1279 位核苷酸编码,结构域 2 由此核酸分子序列第 1493 位至第 1612 位核苷酸编码,并且结构域 3 由此核酸分子序列第 2147 位至第 2350 位核苷酸编码。

[0047] 在本发明的上下文中,术语“具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质”理解为意指催化糖基化反应的蛋白质,在所述糖基化反应中底物 ADP-葡萄糖的葡萄糖残基转移至 α -1,4-连接的葡聚糖链上,从而形成 α -1,4-连接的(ADP-葡萄糖+{(1,4)- α -D-葡糖基}(N)<=>ADP+{(1,4)- α -D-葡糖基}(N+1)),其中具备淀粉合酶 II 蛋白质活性的蛋白质的氨基酸序列与如 SEQ ID NO 4 所示的氨基酸序列的第 322 位至第 351 位氨基酸(结构域 1)具有至少 86%、优选至少 93%、特别优选至少 95%、尤其优选至少 98% 的同一性,并且与如 SEQ ID NO 4 所示的氨基酸序列的第 423 位至第 462 位氨基酸(结构域 2)具有至少 83%、优选至少 86%、特别优选至少 95%、尤其优选至少 98% 的同一性,并且与如 SEQ ID NO 4 所示的氨基酸序列的第 641 位至第 705 位氨基酸(结构域 3)具有至少 70%、优选至少 82%、优选地 86%、特别优选地 95%、尤其优选至少 98% 的同一性。

[0048] 与结构域 1、2 和 3 具有所述同一性并编码具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质的核酸序列及对应氨基酸序列是技术人员已知的,并且例如作为登录号 AY133249(大麦(*Hordeum vulgare*))、登录号 AY133248(粗山羊草(*Aegilops tauschii*))、登录号 XP467757、AAK64284(稻(*Oryza sativa*))、登录号 AAK81729(稻)、登录号 AAD13341、AAS77569、登录号 AAD13342(玉米(*Zea mays*))、登录号 AAF13168(木薯(*Manihot esculenta*))、登录号

BAD18846(菜豆(*Phaseolus vulgaris*))、登录号 CAA61241(马铃薯(*Solanum tuberosum*))、登录号 CAA61269(豌豆(*Pisum sativum*))、登录号 AAC19119(甘薯(*Ipomea batatas*))、登录号 AAF 26156(拟南芥)、登录号 AA P41030(芋(*Colocasia esculenta*))、登录号 AAS88880(*Ostraeococcus tauri*)或登录号 AAC17970(莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*))公开。上文提及的编码具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质的核酸分子序列及氨基酸序列可通过 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>) 获得并且通过引用的方式明白无误地并入本申请的说明书中。

[0049] 为了本发明的目的,术语“具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质”理解为意指将来自 ATP 的 β -磷酸残基转移至淀粉的蛋白质。从拟南芥 *sex1-3* 突变体的叶分离的淀粉不含有可检测量的共价结合的磷酸酯残基,但是在体外由具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质磷酸化。这意味非磷酸化的淀粉,例如从拟南芥 *sex1-3* 突变体的叶分离的淀粉,可用作具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质所催化的磷酸化反应中的底物。

[0050] 具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质将 ATP 的 β -磷酸残基转移至淀粉的葡萄糖 C6 位置上,并将 ATP 的 γ -磷酸残基转移至水。产生的另一种反应产物是 AMP(腺苷单磷酸)。具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质因此也称作 [α -1,4-葡聚糖]:水双激酶,或又叫作淀粉:水双激酶(E.C.:2.7.9.4;Ritte 等,2002,PNAS 99:7166-7171)。

[0051] 由具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质催化的淀粉的磷酸化排他地在葡萄糖分子 C6 位置产生额外的磷酸单酯键(Ritte 等,2006,FEBS Letters 580:4872-4876)。具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质催化淀粉的磷酸化反应则产生磷酸化蛋白中间体,其中 ATP 的 β -磷酸残基与具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质的氨基酸共价结合(Ritte 等,2002,PNAS 99,7166-7171)。该中间体通过具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质自身磷酸化作用形成,即具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白自身催化产生该中间体的反应。编码具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质的氨基酸序列含有磷酸组氨酸结构域。磷酸组氨酸结构域例如由 Tien-Shin Yu 等(2001,Plant Cell 13,1907-1918)描述。在具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质自身磷酸化过程中,编码具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质的氨基酸序列中磷酸组氨酸结构域中的组氨酸残基被磷酸化(Mikkelsen 等,2004,Biochemical Journal 377:525-532)。在来自马铃薯的具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质的氨基酸序列中,例如 SEQ ID NO 2 所示,第 1064 位至第 1075 位氨基酸构成磷酸组氨酸结构域。若另一种氨基酸替换磷酸组氨酸结构域的保守组氨酸残基(例如 SEQ ID NO 2 所示的蛋白质序列中的第 1069 位氨基酸),则诱变的蛋白质不再发生自身磷酸化和由此的葡聚糖磷酸化(Mikkelsen 等,2004,Biochemical Journal 377:525-532)。此外,具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质以如下事实为特征,即该蛋白质具有由 SEQ ID NO 2 所示氨基酸序列中第 1121 位至第 1464 位氨基酸所包含的羧基末端核苷酸结合结构域。此核苷酸结合结构域的缺失导致具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质失活(Mikkelsen 和 Blennow,2005,Biochemical Journal 385,355-361)。具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质在其氨基末端具有由 SEQ ID NO 2 所示的氨基酸序列中第 78 位至第 362 位氨基酸包含的糖结合结构域(CBM)。该糖结合结构域尤其因以下事实区分:它们的氨基酸序列含有保守的色氨酸残基。若用其他氨基酸替换这些保守氨基酸残基,则所述糖结合结构域丧失结合葡聚糖的能力。因此,例如,替换如 SEQ ID NO 2 所示氨基酸序列中的氨基酸 W139 或 W194 则导致这个糖结

合结构域的功能丧失。然而,若缺失葡聚糖 / 水双激酶的糖结合结构域(例如缺失第 1 位至第 362 位氨基酸,其中如 SEQ ID NO 2 所示氨基酸序列中第 1 位至第 77 位氨基酸构成质体信号肽),则这不会导致该酶的磷酸化活性失活(Mikkelsen 等,2006,Biochemistry 45 : 4674-4682)。

[0052] 描述了来自不同物种的编码具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质的核酸序列及其对应氨基酸序列,所述物种例如是马铃薯(WO 97/11188、GenBank 登录号:AY027522、Y09533)、小麦(WO 00/77229、US 6,462,256、GenBank 登录号:AAN93923、GenBank 登录号:AR236165)、稻(GenBank 登录号:AAR61445、GenBank 登录号:AR400814)、玉米(GenBank 登录号:AAR61444、GenBank 登录号:AR400813)、大豆(GenBank 登录号:AAR61446、GenBank 登录号:AR400815;柑橘属(citrus)(GenBank 登录号:AY094062)、拟南芥属(GenBank 登录号:AF312027)和绿藻 *Ostreococcus tauri*(GenBank 登录号:AY570720.1)。上文提及的编码具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质的核酸分子序列和氨基酸序列尤其由 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>) 公开并且通过引用的方式明白无误地并入本申请的说明书中。

[0053] 在本发明的上下文中,术语“GBSSI”应当理解为意指属于颗粒结合性淀粉合酶同工型 I(EC 2.4.1.21) 组的任意酶。

[0054] 在本发明的上下文中,术语“GBSSI 基因”理解为意指编码颗粒结合性淀粉合酶 I(GBSS I)的核酸分子或多核苷酸(cDNA, DNA)。Seq ID NO 7-12 包含这样的核酸分子序列或氨基酸序列,在每种情况下它们编码来自稻、小麦和玉米的具有 GBSS I 活性的蛋白质。

[0055] 描述了多种单子叶植物物种的编码 GBSS I 的多核苷酸,例如玉米(GenBank 登录号 AF079260、AF079261)、小麦(GenBank 登录号 AB019622、AB019623、AB019624)、稻(GenBank 登录号 AF092443、AF092444、AF031162)、大麦(GenBank 登录号 X07931、X07932)、双色蜀黍(*Sorghum bicolor*)(GenBank 登录号 U23945)和硬粒小麦(*durumwheat*)(GenBank 登录号 AB029063)。上文提及的编码具备 GBSS I 活性的蛋白质的核酸分子序列和氨基酸序列尤其由 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>) 公开并且通过引用的方式明白无误地并入本申请的说明书中。

[0056] 缺少功能性 GBSS I 基因的突变体合成不含直链淀粉的淀粉(=蜡质淀粉)。对一系列作物描述了此类突变体,例如对于玉米(例如 Sprague 等,1943, J. Am. Soc. Agron. 35 : 817-822;Shure 等 1983, Cell 35 :225-233)、稻(Sano 1984, Theor. Appl. Genet. 68 : 467-473;Villareal 和 Juliano1986, Starch/Staerke 38 :118-119)、大麦(Rohde 等 1988, Nucleic Acids Res16 :7185-7186),小麦(Nakamura 等 1995, Mol. Gen. Genet. 248 : 253-259)、马铃薯(Hovenkamp-Hermelink 等 1987, Theor. Appl. Genet. 75 :217-221)和谷子(millet)(Okuno 和 Sakaguchi 1982, J. Hered 73 :467)。术语“蜡质突变体”以同义方式使用,原因是胚乳在玉米中具有蜡质外观。GBSS I 蛋白也常称作“蜡质蛋白质”(Kossmann 和 Lloyd 2000 “理解并影响淀粉生物化学(Understanding and Influencing Starch Biochemistry)”, Critical Reviews in Plant Sciences, 19(3) :171-226)。

[0057] 用于产生本发明的植物细胞和植物的合适植物细胞或植物是在它们所合成的淀粉中显示表观直链淀粉含量降低至小于 5% 重量的那些植物细胞或植物。

[0058] 在本发明的一个实施方案中,对本发明植物细胞的或对本发明植物的遗传修饰通

过诱变一个或多个 GBSSI 基因引起。所述突变的本质不重要,只要它导致 GBSSI 活性降低或完全消失并且因此降低本发明植物中存在的淀粉的表观直链淀粉含量至小于 5%重量。

[0059] 导致本发明的植物细胞和植物中 GBSSI 活性降低并且导致淀粉的表观直链淀粉含量下降至小于 5%重量的突变可以自发出现,并且可以借助下文所述方法选择并增殖所讨论的植物。

[0060] 为本发明的目的,“蜡质突变体”理解为意指其淀粉具有小于 5%重量的表观直链淀粉含量的植物。同样,“蜡质淀粉”指有小于 5%重量的表观直链淀粉含量的淀粉。

[0061] 在本发明的上下文中,术语“诱变”理解为意指所导入的任意类型突变,例如缺失、点突变(核苷酸替换)、插入、倒位、基因转换或染色体易位。

[0062] 可以用于产生化学诱导突变的物质并且因而通过所讨论的诱变剂作用而获得的突变类型例如由 Ehrenberg 和 Husain(1981, Mutation Research 86:1-113) 和 Müller(1972, Biologisches Zentralblatt 91(1):31-48) 描述。使用 γ 射线、甲磺酸乙酯(EMS)、N-甲基-N-亚硝基脲或叠氮钠(NaN_3)产生稻突变体例如 Jauhar 和 Siddiq(1999, Indian Journal of Genetics, 59(1):23-28)、Rao(1977, Cytologica 42:443-450)、Gupta 和 Sharmna(1990, Oryza 27:217-219) 以及 Satoh 和 Omura(1981, Japanese Journal of Breeding 31(3):316-326) 描述。使用 NaN_3 或顺丁烯二酸酐产生小麦突变体由 Arora 等(1992, Annals of Biology 8(1):65-69) 描述。使用多种类型的高能辐射和化学剂产生小麦突变体的综述由 Scarascia-Mugnozza 等(1993, Mutation Breeding Review 10:1-28) 描述。Svec 等(1998, Cereal Research Communications 26(4):391-396) 描述了使用 N-乙基-N-亚硝基脲产生小黑麦中的突变体。使用 MMS(甲基甲磺酸)和 γ 辐射产生谷子突变体由 Shashidhara 等(1990, Journal of Maharashtra Agricultural Universities 15(1):20-23) 描述。

[0063] 合成具有小于 5%重量的表观直链淀粉含量的淀粉的单子叶植物细胞和植物(=蜡质植物或蜡质植物细胞)也可以通过使用所谓插入诱变法(综述:Thorneycroft 等, 2001, Journal of Experimental Botany 52(361):1593-1601)产生。“插入诱变”理解为尤其意指转座子或所谓转移 DNA(T-DNA)插入基因内。

[0064] 转座子可以采取在(野生型)植物细胞中天然存在的转座子(内源性转座子)形式;或不在所述细胞中天然存在,但已经通过重组方法(例如通过转化该细胞)导入细胞的转座子(异源转座子)形式。通过转座子调节基因表达是技术人员已知的。关于植物生物技术中利用内源性和异源性转座子作为工具的综述可以在 Ramachandran 和 Sundaresan(2001, Plant Physiology and Biochemistry 39, 234-252) 中找到。可以在 Maes 等(1999, Trends in Plant Science 4(3), 90-96) 的综述中找到鉴定其中已经通过转座子插入诱变致使特定基因失活的突变体的可能性。借助内源性转座子产生稻突变体由 Hirochika(2001, Current Opinion in Plant Biology 4, 118-122) 描述。借助内源性逆转座子鉴定玉米基因例如在 Hanley 等(2000, The Plant Journal 22(4), 557-566) 中显示。借助逆转座子产生突变体的可能性和用于鉴定突变体的方法由 Kumar 和 Hirochika(2001, Trends in Plant Science 6(3), 127-134) 描述。已经对双子叶植物和对单子叶植物描述了异源转座子在不同物种中的活性,其中所述植物例如稻(Greco 等, 2001, Plant Physiology 125, 1175-1177; Liu 等, 1999, Molecular and General Genetics

262,413-420 ;Hiroyuki 等,1999, The Plant Journal 19(5),605-613 ;Jeon 和 Gynheung, 2001, Plant Science 161,211-219)、大麦 (Koprek 等,2000, ThePlant Journal 24(2), 253-263)、拟南芥 (Aarts 等,1993, Nature 363,715-717, Schmidt 和 Willmitzer,1989, Molecular and General Genetics 220,17-24 ;Altmann 等,1992, Theoretical and Applied Genetics 84,371-383 ;Tissier 等,1999, The Plant Cell 11,1841-1852)、番茄 (Belzile 和 Yoder,1992, ThePlant Journal 2(2),173-179) 和 马 铃 薯 (Frey 等, 1989, Molecular andGeneral Genetics 217,172-177 ;Knapp 等,1988, Molecular and GeneralGenetics 213,285-290)。

[0065] 原则上,单子叶“蜡质”植物细胞和植物可以借助同源转座子和异源转座子、使用同源转座子(也包括使用已经天然存在于植物基因组中的那些转座子)产生。原则上,T-DNA 诱变也适于产生“蜡质”植物细胞和植物。

[0066] T-DNA 插入诱变基于以下事实,即来自农杆菌 (Agrobacterium) 的 Ti 质粒的某些节段 (T-DNA) 能够整合至植物细胞的基因组中。整合至植物染色体的位点是不固定的,不过可以在任何位置处出现。若 T-DNA 整合至染色体中构成基因功能的节段,则可以导致基因表达的调节并且因此导致由所讨论基因编码的蛋白质的活性改变。尤其,T-DNA 整合至基因编码区内往往意味所讨论的蛋白质不能再以活性形式合成,或根本不被所讨论的细胞合成。使用 T-DNA 插入以产生突变体例如已对拟南芥 (Krysan 等,1999, The Plant Cell 11,2283-2290 ;Atipiroz-Leehan和Feldmann,1997,Trends in Genetics 13(4),152-156 ;Parinov 和 Sundaresan,2000, CurrentOpinion in Biotechnology 11,157-161) 和 稻 (Jeon 和 An,2001,Plant Science161,211-219 ;Jeon 等,2000,The Plant Journal 22(6), 561-570) 进行了描述。用于鉴定已经借助 T-DNA 插入诱变法产生的突变体的方法尤其由 Young 等 (2001,Plant Physiology 125,513-518)、Parinov 等 (1999,The PlantCell 11, 2263-2270)、Thorncroft 等 (2001,Journal of ExperimentalBotany 52,1593-1601) 和 McKinney 等 (1995, The Plant Journal18(4),613-622) 描述。

[0067] 可以借助技术人员熟悉的方法找到相应基因中的突变。例如,可以使用基于采用探针的杂交 (“DNA 印迹”)、基于借助聚合酶链反应 (PCR) 的扩增、基于对合适的基因组核酸片段测序的分子分析法和单个核苷酸置换搜索法。借助杂交模式鉴定突变的方法的实例是限制性片段长度多态性 (RFLP) 搜索法 (Nam 等,1989,The Plant Cell 1:699-705 ;Leister 和 Dean,1993,The Plant Journal 4(4) :745-750)。基于 PCR 的方法例如是扩增片段长度多态性 (AFLP) 分析法 (Castiglioni 等,1998,Genetics 149 :2039-2056 ;Meksem 等,2001, Molecular Genetics and Genomics 265 :207-214 ;Meyer 等1998,Molecular and General Genetics 259 :150-160)。利用已经以限制性核酸内切酶切割的扩增片段 (“切割的扩增多态性序列”,CAPS) 是鉴定突变的又一种可能选择 (Konieczny 和 Ausubel,1993, The Plant Journal 4 :403-410 ;Jarvis 等,1994,Plant Mol. Biol. 24 :685-687 ;Bachem 等,1996, The Plant Journal 9(5) :745-753)。确定 SNP 的方法尤其已经由 Qi 等 (2001,Nucleic Acids Research 29(22) :116)、Drenkard 等 (2000,Plant Physiology124 :1483-1492) 和 Cho 等 (1999,Nature Genetics 23 :203-207) 描述。特别合适的方法是允许短时间内研究大量植物在某些基因内的突变的那些方法。称作 TILLING (“基因组中靶向诱导的局部损伤”) 的这种方法已经由 McCallum 等 (2000,Plant Physiology 123 :439-442) 描述。

[0068] 技术人员知道上文所述的突变原则上是隐性突变。为表现蜡质表型,因此需要产生不分离的(纯合)植物细胞或植物。产生不分离的植物的方法是技术人员已知的。

[0069] 纯合“蜡质”突变体可以通过用碘染色淀粉而鉴定。为此目的,包含淀粉的组织样品(例如胚乳,花粉)用碘溶液染色并且例如在显微镜下研究。蜡质淀粉染成棕色(与野生型染成蓝色相对比)。

[0070] 在本发明的又一个实施方案中,一种或多种外源核酸分子/多核苷酸的导入、一种或多种外源核酸分子/多核苷酸的存在和/或表达导致编码 GBSSI 蛋白的内源性基因表达抑制并导致本发明植物细胞或本发明植物中存在的淀粉的表现直链淀粉含量降低至小于 5%重量。

[0071] 这可以通过技术人员熟悉的多种方法进行。这些方法包括例如表达合适的反义 RNA 或表达双链 RNA,提供赋予共抑制效应的分子或载体、表达可特异性切割编码 GBSSI 的转录物的适当构建的核酶或称作“体内诱变法”的方法。此外,降低植物细胞中 GBSSI 活性/诸活性和/或降低 GBSSI 基因的基因表达也可以通过同时表达待抑制的特定靶基因、优选 GBSSI 基因的有义和反义 RNA 分子而引致。这些方法是技术人员已知的。

[0072] 此外,已知启动子序列的双链 RNA 的反式(in trans)形成可以引起该启动子在植物中(in planta)的同源拷贝甲基化和转录性失活(Mette 等,2000,EMBO J. 19: 5194-5201)。

[0073] 为通过反义或共抑制技术抑制基因表达,例如,可以使用包含完整 GBSSI 编码序列(包括存在的任意侧翼序列)的 DNA 分子,或使用仅包含所述编码序列的部分的 DNA 分子,其中这些部分必须足够长以在细胞中产生反义作用或共抑制作用。通常适用的是最小长度 15bp、优选最小长度 20-30bp,尤其优选长度 100-500bp 的序列,并且对于高度有效的反义抑制或共抑制抑制,长度大于 500bp 的序列尤其是适用的。

[0074] 使用与内源性序列具有高度同一性的多核苷酸序列也适用于反义抑制或共抑制方法,其中所述的内源性序列存在于植物细胞中并且编码 GBSSI。最小同一性应当大于约 65%。优选使用具有至少 90%、尤其 95%-100%同一性的序列。

[0075] 为实现反义作用或共抑制作用,也可行的是使用内含子,即来自编码 GBSSI 的基因的非编码区的序列。

[0076] 用于抑制编码淀粉生物合成蛋白的基因表达的内含子序列的用途在 WO 97/04112、WO 97/04113、WO 98/37213、WO 98/37214 中描述。

[0077] 技术人员知道如何实现反义作用和共抑制作用。共抑制的方法已经例如由 Jorgensen(1990, Trends Biotechnol. 8:340-344)、Niebel 等(1995, Top. Microbiol. Immunol. 197:91-103)、Flavell 等(1995, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197:43-46)、Palauqui 和 Vaucheret(1995, Plant Mol. Biol. 29:149-159)、Vaucheret 等(1995, Mol. Gen. Genet. 248:311-317)、de Borne 等(1994, Mol. Gen. Genet. 243:613-621)描述。

[0078] 此外,降低植物细胞中的 GBSSI 活性也可以通过同时表达待抑制的特定靶基因、优选 GBSSI 基因的有义和反义 RNA 分子引起。

[0079] 这可以例如通过使用嵌合构建体实现,其中所述的嵌合构建体包含所讨论靶基因或该靶基因部分的“反向重复序列”。该嵌合构建体编码所讨论靶基因的有义和反义 RNA 分子。使有义和反义 RNA 在植物中(in planta)作为一个 RNA 分子同时合成,有可能通过间

隔序列使有义和反义 RNA 相互隔开以形成双链 RNA 分子 (RNAi 技术)。

[0080] 已经证实将反向重复的 DNA 构建体导入植物基因组是用于抑制与所述反向重复 DNA 构建体相应的基因的高度有效方法 (Waterhouse 等, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 13959-13964; Wang 和 Waterhouse, 2000, *Plant Mol. Biol.* 43, 67-82; Singh 等, 2000, *Biochemical Society Transactions* 28(6), 925-927; Liu 等, 2000, *Biochemical Society Transactions* 28(6), 927-929; Smith 等, 2000, *Nature* 407, 319-320; W099/53050)。靶基因或诸多靶基因的有义和反义序列也可以通过相同或不同启动子彼此独立地表达 (Nap 等, 第六届植物分子生物学大会, 2000 年 6 月 18-24 日, 魁北克, Poster S7-27, 系列讲座 S7)。

[0081] 细胞中表达核酶以降低特定酶的活性也是技术人员已知的并且在例如 EP-B1 0321201 中描述。核酶在植物细胞中的表达已经例如由 Feyter 等 (1996, *Mol. Gen. Genet.* 250 :329-338) 描述。

[0082] 此外, 降低 GBSSI 活性和 / 或降低植物细胞中存在的淀粉的表观直链淀粉含量至小于 5% 重量也可以通过所谓“体内”诱变法实现, 其通过转化细胞将 RNA-DNA 寡核苷酸杂合体 (“嵌合体 (chimeroplast)”) 导入细胞 (Kipp 等, 在第五届植物分子生物学大会, 1997 年 9 月 21-27 日的 Poster Session, 新加坡; R. A. Dixon 和 C. J. Arntzen, 转基因植物中的代谢工程会议报告 (Meeting report regarding Metabolic Engineering in Transgenic Plants), Keystone Symposia, Copper Mountain, CO, USA, 1997, TIBTECH 15 : 441-447; W0 95/15972; Kren 等, 1997, *Hepatology* 25 :1462-1468; Cole-Strauss 等, 1996, *Science* 273 :1386-1389; Beetham 等, 1999, *PNAS* 96 :8774-8778)。

[0083] 所述 RNA-DNA 寡核苷酸的 DNA 组分的部分与内源性 GBSSI 基因的多核苷酸序列同源, 但是与内源性 GBSSI 基因的多核苷酸序列相比较包含突变或包含被同源区包围的异源区。由于该 RNA-DNA 寡核苷酸的同源区与所述内源性多核苷酸的同源区发生碱基配对, 随后经同源重组, 在所述 RNA-DNA 寡核苷酸的 DNA 组分中存在的突变或异源区可以转移至植物细胞的基因组中。

[0084] 因此, 降低植物细胞中的 GBSSI 活性也可以通过产生 GBSSI 基因的双链 RNA 分子实现。为此目的, 优选将 DNA 分子的反向重复序列导入植物的基因组, 其中所述 DNA 分子从 GBSSI 基因所形成的核苷酸序列或此类基因所形成的 cDNA 中衍生, 其中待转录的所述 DNA 分子处于控制所述 RNA 分子表达的启动子控制下。

[0085] 降低植物细胞或植物中蛋白质活性的又一种可能性是称作免疫调节的方法。已知在植物中表达特异性地识别植物蛋白质的抗体导致相应植物细胞或植物中该蛋白质的活性因形成蛋白质 / 抗体复合物而降低 (Conrad 和 Manteufel, 2001, *Trends in Plant Science* 6 :399-402; De Jaeger 等, 2000, *Plant Molecular Biology* 43 :419-428; Jobling 等, 2003, *Nature Biotechnology* 21 :77-80)。

[0086] 上文提及的全部方法基于导入一种或多种外源核酸分子至植物细胞或植物的基因组并且因此原则上适用于产生本发明的植物细胞和本发明的植物。

[0087] 所述表达的降低可以通过测量编码所讨论酶的转录物的量加以确定, 例如通过 RNA 印迹分析或定量 RT-PCR 确定。

[0088] GBSSI 蛋白的量降低可以例如由免疫学方法如蛋白质印迹分析、ELISA (“酶联免

疫吸附测定”)或RIA(“放射免疫测定”)测定。

[0089] 本发明植物细胞或植物中GBSSI活性的降低也可以通过定量GBSSI蛋白的反应产物直链淀粉间接地检测。技术人员知道用于确定植物淀粉中直链淀粉含量的多种方法。对于谷物,尤其稻,表观直链淀粉含量优选地通过与Juliano(1971,Cereal Science Today 16(10):334-340)方法相似的方法确定,如在下文“材料和方法”章节中进一步描述的那样。

[0090] 在产生本发明植物细胞或本发明植物的又一个实施方案中,可以使用以下事实为特征的突变体替代野生型植物细胞或野生型植物,即该突变体已经合成了表观直链淀粉含量小于5%重量的淀粉和/或具有具备葡聚糖/水双激酶活性的蛋白质提高的活性和/或具备淀粉合酶II活性的蛋白质提高的活性。这些突变体可以是天然存在的突变体或是通过定向使用诱变剂所产生的那些突变体。产生此类突变体的可能性已经在上文中描述。

[0091] 本发明还包含本发明的经遗传修饰单子叶植物细胞或植物,它们的遗传修饰在于导入至少一种外源核酸分子至用于转化的植物的基因组中。

[0092] 作为导入外源核酸分子的结果是,改变了本发明植物细胞的或本发明植物的遗传信息。至少一种外源核酸分子的存在导致改变的“表型”。这里,“改变的表型”意指一种或多种细胞功能的可测量性改变。例如,本发明的经遗传修饰植物细胞和本发明的经遗传修饰植物因存在所导入的外源核酸分子或在该核酸分子表达的情况下,显示具备葡聚糖/水双激酶活性的蛋白质的活性提高和具备淀粉合酶II活性的蛋白质的活性提高和/或具有GBSSI活性的蛋白质的活性降低。

[0093] 在本发明的上下文中,术语“外源核酸分子”理解为意指这样的分子,其不在用于转化的植物细胞中天然存在,或不以特定空间排列在用于转化的植物细胞中天然存在,或处在转化用植物细胞的基因组中的该分子并不天然存在于其中的基因座处。该外源核酸分子优选地是由多种元件组成的重组分子,其中所述多种元件的组合或特定空间排列不在植物细胞中天然地存在。因此,除了编码具备葡聚糖/水双激酶活性的蛋白质和/或具备淀粉合酶II活性的蛋白质的核酸分子和/或引起GBSSI活性降低的核酸分子之外,重组核酸分子也可以例如具有不天然地与上文所提及的核酸分子组合存在的额外核酸分子序列。上文提及的额外核酸分子序列可以是任意序列,其中所述的额外核酸分子序列与编码具备葡聚糖/水双激酶活性的蛋白质和/或具备淀粉合酶II活性的蛋白质的核酸分子组合或与适用于介导降低具备GBSSI活性的蛋白质的活性的核酸分子组合存在于重组核酸分子上。它们可以是例如基因组和/或植物核酸分子序列。优选地,这些额外的核酸分子序列是调节序列(启动子、终止信号、增强子),特别优选地是在植物组织中有活性的调节序列;尤其优选地是组织特异性调节序列。

[0094] 产生重组核酸分子的方法是技术人员已知的并且包括基因工程方法,例如通过连接作用连接核酸分子、遗传重组或核酸分子的从头合成(参见,例如,Sambrook等,Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第三版(2001)Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY, ISBN:0879695773;Ausubel等,Short Protocols in Molecular Biology, JohnWiley&Sons;第五版(2002), ISBN:0471250929)。

[0095] 在本发明的上下文中,术语“基因组”理解为意指植物细胞中存在的全部遗传材料。技术人员知道不仅细胞核包含遗传材料,其他区室(例如质体、线粒体)也包含遗传材

料。

[0096] 原则上,外源核酸分子可以是这样的任意核酸分子,其在植物细胞或植物中引起具备葡聚糖/水双激酶活性的蛋白质的活性和具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质的活性提高,并且引起具备 GBSSI 活性的蛋白质的活性降低。

[0097] 在一个优选的实施方案中,编码具备葡聚糖/水双激酶活性的蛋白质外源核酸分子采取来自多个植物物种的已提及的核酸分子形式,其中所述核酸分子是技术人员已知的。在本上下文中特别优选来自马铃薯的编码具备葡聚糖/水双激酶活性的蛋白质的核酸分子,尤其优选具有 SEQ ID NO 2 中所示氨基酸序列或由 SEQ ID NO 1 中所示核酸分子序列编码的具备葡聚糖/水双激酶活性的蛋白质。

[0098] 在又一个优选的实施方案中,编码具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质的外源核酸分子采取来自多个植物物种的已提及的核酸分子形式,其中所述核酸分子是技术人员已知的。在本上下文中特别优选来自小麦的编码具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质的核酸分子,尤其优选具有 SEQ ID NO 4 中所示氨基酸序列或由 SEQ ID NO 3 中所示核酸分子序列编码的具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质。

[0099] 又一个优选的实施方案采取来自稻的核酸分子形式,其中所述核酸分子编码具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质、尤其优选地编码具有 SEQ ID NO 6 中所示氨基酸序列或由 SEQ ID NO 5 中所示核酸分子序列编码的具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质。

[0100] 在又一个优选的实施方案中,编码具备 GBSSI 活性的蛋白质的外源核酸分子采取来自多个植物物种的已提及的核酸分子形式,其中所述核酸分子是技术人员已知的。在本上下文中特别优选来自稻的编码具备 GBSSI 活性的蛋白质的核酸分子,尤其优选具有 SEQ ID NO 8 中所示氨基酸序列或由 SEQ ID NO 7 中所示核酸分子序列编码的具备 GBSSI 活性的蛋白质。

[0101] 又一个优选的实施方案采取来自小麦的核酸分子形式,其中所述核酸分子编码具备 GBSSI 活性的蛋白质、尤其优选地编码具有 SEQ ID NO 10 中所示氨基酸序列或由 SEQ ID NO 9 中所示核酸分子序列编码的具备 GBSSI 活性的蛋白质。

[0102] 又一个优选的实施方案采取来自玉米的核酸分子形式,其中所述核酸分子编码具备 GBSSI 活性的蛋白质、尤其优选地编码具有 SEQ ID NO 12 中所示氨基酸序列或由 SEQ ID NO 11 中所示核酸分子序列编码的具备 GBSSI 活性的蛋白质。

[0103] 在又一个实施方案中,本发明的植物细胞和植物是对蜡质突变纯合的并且以因而合成其表观直链淀粉含量小于 5% 重量的淀粉。

[0104] 在本发明的上下文中,术语“对蜡质突变纯合的”理解为意指植物对于无功能性 GBSSI 基因进行纯合育种 (breeds true)。对技术人员而言,纯合性意指在细胞的遗传材料中,关于特定性状的全部等位基因是相同的,换句话说,某个基因的两个或多个相同拷贝存在于染色体的两条染色单体上,其中所述染色单体包含该基因。它们对于这个基因是纯合的 (= 纯种) 并且在自交时,把所讨论的性状传递至全部子代。技术人员知道多倍体植物 (例如小麦) 可以在某些环境下需要纯和形式的 3 个无功能性 GBSSI 等位基因 (在亚基因组 A、B 和 D) 以表现蜡质表型。

[0105] 出于遗传修饰目的而向表现蜡质表型的植物细胞或植物导入的外源核酸分子可以采取单个核酸分子或多个核酸分子的形式。它们可以采取这样的核酸分子形式,其中所

述的核酸分子包含编码具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质的核酸分子序列和编码具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质的核酸分子序列,也包含在所述核酸分子中,编码具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质的核酸分子序列和编码具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质的核酸分子序列存在于不同的核酸分子上。例如,编码具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质的核酸分子序列和编码具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质的核酸分子序列可以同时存在于一个载体、质粒或线性核酸分子中(“双重构建体”)或作为在每一情况下均分开的两个载体、质粒或线性核酸分子的组分。

[0106] 若编码具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质的核酸分子序列和编码具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质的核酸分子序列存在于两个分开的核酸分子中,则它们可以同时地(“共转化”)或先后即时间上间隔地(“超转化(supertransformation)”)被导入所述植物细胞或植物的基因组。独立的核酸分子也可以导入某物种的各个不同植物细胞或植物。因此,可以产生其中具备葡聚糖 / 水双激酶活性的至少一种蛋白质的活性升高或具备淀粉合酶 II 活性的至少一种蛋白质的活性升高的植物细胞或植物。随后可以按照以下方式产生本发明的植物,即通过将其中具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质的活性升高的那些植物随后与其中具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质的活性升高的那些植物杂交。选择用于所讨论方法步骤的参数在下文进一步定义。

[0107] 在又一个实施方案中,本发明植物细胞或植物的蜡质表型因通过导入适用于降低 GBSSI 活性的一种或多种重组核酸分子引起。

[0108] 出于遗传修饰目的而向野生型植物细胞或植物导入的外源核酸分子可以采取单个核酸分子或多个核酸分子的形式。它们可以采取这样的核酸分子形式,其中所述的核酸分子包含编码具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质的核酸分子序列和编码具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质的核酸分子序列,并且额外地包含适用于抑制 GBSSI 活性的核酸分子序列(三重构建体)。同样地,它们也可以采取这样的核酸分子形式,在所述核酸分子中编码具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质的核酸分子序列和编码具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质的核酸分子序列存在于不同的核酸分子上,其中这两种核酸分子中的一种或另一种额外地包含适用于抑制 GBSSI 活性的核酸序列。另外,它们也可以采取这样的核酸分子形式,在所述核酸分子中编码具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质的核酸分子序列和编码具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质的核酸分子序列存在于一个核酸分子中并且适用于抑制 GBSSI 活性的核酸分子存在于不同的核酸分子上(一个双重构建体和一个简单构建体的三重变体)。

[0109] 在又一个实施方案中,它们也可以采取 3 种不同核酸分子的形式,其中一种核酸分子包含编码葡聚糖 / 水双激酶蛋白质的核酸分子序列,另一种核酸分子包含编码淀粉合酶 II 的核酸分子序列并且又一种核酸分子包含适用于抑制 GBSSI 活性的核酸分子序列(3 个简单构建体)。

[0110] 适于产生本发明植物细胞或植物的核酸分子可以存在于例如载体、质粒或线性核酸分子中。

[0111] 若待用以产生本发明植物细胞或植物的构建体存在于两个或三个独立的核酸分子中,则它们可以同时地(“共转化”)或先后即时间上间隔地(“超转化”)被导入所述植物细胞或植物的基因组。独立的核酸分子也可以导入某物种的各个不同植物细胞或植物。因此,可以产生这样的植物细胞或植物,其中具备葡聚糖 / 水双激酶活性的至少一种蛋白

质和 / 或具备淀粉合酶 II 活性的至少一种蛋白质的活性升高和 / 或具有 GBSSI 活性的至少一种蛋白质减少至如此程度,从而由所述植物细胞或植物合成的淀粉具有小于 5% 重量的表观直链淀粉含量。本发明的植物随后可以通过使所述植物杂交而产生。

[0112] 此外,也可以产生这样的植物,在所述植物中具有 GBSSI (酶) 活性的至少一种蛋白质的活性降低至如此程度,从而由所述植物细胞或植物合成的淀粉具有小于 5% 重量的表观直链淀粉含量,并且在又一个步骤中,通过与其中具备淀粉合酶 II 活性的至少一种蛋白质的活性升高的植物杂交,产生本发明的植物细胞或植物。

[0113] 当下述一种或多种核酸分子在一个方法学步骤中 / 同时导入植物细胞基因组的情况下,本发明的植物可以从所述转化产生的植物中直接选出,其中所述一种或多种核酸分子包含适用于提高植物细胞中具备葡聚糖 / 水双激酶和 / 或淀粉合酶 II 活性的至少一种蛋白质的活性和降低植物细胞中 GBSSI 的活性至由所述植物细胞或植物合成的淀粉具有小于 5% 的表观直链淀粉含量的核酸分子序列。

[0114] 在又一个实施方案中,本发明的植物细胞和本发明的植物包含了编码具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质的至少一种外源核酸分子和编码具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质的第二外源核酸分子。在又一个实施方案中,本发明的植物细胞和本发明的植物包含了编码具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质的第一外源核酸分子和编码具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质的第二外源核酸分子。

[0115] 多种技术可用于将 DNA 导入植物宿主细胞。这些技术包括使用根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 或发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 作为转化剂,以 T-DNA 转化植物细胞、原生质体融合、注射法、DNA 电穿孔法、通过生物射弹法导入 DNA 和其他可能方法。

[0116] 使用农杆菌介导植物细胞转化已经得到深入研究并且尤其已在 EP120516 ; Hoekema (在: *The Binary Plant Vector System*, Offsetdrukkerij Kanters B. V. Alblaserdam (1985), 第 V 章中) ; Fraley 等, *Crit. Rev. Plant Sci.* 4 :1-46) 中,并且由 An 等 (1985, *EMBO J.* 4 :277-287) 中描述。

[0117] 还已经描述了借助基于农杆菌转化的载体对单子叶植物的转化 (Chan 等 1993, *Plant Mol. Biol.* 22 :491-506 ; Hiei 等, 1994, *Plant J.* 6, 271-282 ; Deng 等, 1990, *Science in China* 33 :28-34 ; Wilkink 等, 1992, *Plant Cell Reports* 11 :76-80 ; May 等, 1995, *Bio/Technology* 13 :486-492 ; Conner 和 Domisse, 1992, *Int. J. Plant Sci.* 153 :550-555 ; Ritchie 等, 1993, *Transgenic Res.* 2 :252-265)。用于转化单子叶植物的备选方法是生物射弹转化法 (Wan 和 Lemaux, 1994, *Plant Physiol.* 104 :37-48 ; Vasil 等, 1993, *Bio/Technology* 11 :1553-1558 ; Ritala 等, 1994, *Plant Mol. Biol.* 24 :317-325 ; Spencer 等, 1990, *Theor. Appl. Genet.* 79 :625-631)、原生质体转化法、部分透化细胞的电穿孔法或通过玻璃纤维导入 DNA。尤其,玉米的转化在文献中反复描述 (参考,例如, W095/06128, EP0513849, EP0465875, EP0292435 ; Fromm 等, 1990, *Biotechnology* 8 :833-844 ; Gordon-Kamm 等, 1990, *Plant Cell* 2 :603-618 ; Kozziel 等, 1993, *Biotechnology* 11 :194-200 ; Moroc 等, 1990, *Theor. Appl. Genet.* 80 :721-726)。

[0118] 还已经描述了其他谷类物种的成功转化,例如在大麦 (Wan 和 Lemaux, s. o. ; Ritala 等, s. o. ; Krens 等, 1982, *Nature* 296 :72-74) 和小麦 (Nehra 等, 1994, *Plant J.* 5 :

285-297 ;Becker 等,1994, Plant Journal 5 :299-307) 的情形中。在本发明的范围内,上文方法均是适用的。

[0119] 其淀粉具有小于 5% 重量的直链淀粉含量并且受到遗传修饰的植物细胞和植物(其中所述遗传修饰因导入编码具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质的基因和 / 或编码具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质的基因所致) 尤其可以因它们包含不在野生型植物细胞或野生型植物中天然存在的至少一种外源核酸分子或因这种分子存在于本发明植物细胞的基因组或本发明植物的基因组中如此位置处而与野生型植物细胞或野生型植物区分,其中所述分子不在所述野生型植物细胞或野生型植物的所述位置处存在,即处在不同的基因组环境中。此外,本发明的这类植物细胞或本发明的这类植物可以因以下事实而与野生型植物细胞或野生型植物区分,即它们包含稳定整合在其基因组内的至少一个拷贝的所述外源核酸分子,以及根据需要额外地包含在所述野生型植物细胞或野生型植物中天然存在的此种分子的多个拷贝。若已经导入本发明植物细胞或本发明植物的外源核酸分子采取额外拷贝的形式,除了在所述野生型植物细胞或野生型植物中天然存在的分子之外,本发明的植物细胞和本发明的植物尤其可以因以下事实而与野生型植物细胞或野生型植物区分,即这种额外的拷贝或这些额外的拷贝处于基因组中的如此位置处,其中所述拷贝在该野生型植物细胞或野生型植物的所述位置处不存在。这可以例如借助 DNA 印迹分析法验证。

[0120] 本发明的植物细胞或本发明的植物还可以优选地因至少一个以下特征与野生型植物细胞或野生型植物区分:若已导入的外源核酸分子相对于植物细胞或植物是异源的,则本发明的植物细胞或本发明的植物包含已导入的核酸分子的转录物。这些转录物可以例如通过 RNA 印迹分析或通过 RT-PCR(逆转录聚合酶链反应) 检测。

[0121] 表达反义转录物和 / 或 RNAi 转录物的本发明植物细胞或本发明植物可以例如借助与编码所述蛋白质(并且天然存在于所述植物细胞中)的 RNA 互补的特异性核酸探针进行检测。优选地,本发明的植物细胞和本发明的植物包含由已导入的核酸分子编码的蛋白质。这种蛋白质可以例如通过免疫学方法、尤其通过蛋白质印迹分析法检测。

[0122] 优选地,本发明的植物细胞或本发明的植物包含由已导入的核酸分子编码的蛋白质。这种蛋白质可以例如通过免疫学方法、尤其通过蛋白质印迹分析法检测。

[0123] 若已导入的外源核酸分子相对于所述植物细胞或植物是同源的,则本发明的植物细胞或本发明的植物可以例如基于已导入的所述外源核酸分子的额外表达与野生型植物细胞或野生型植物区分。本发明的植物细胞和本发明的植物优选地包含该外源核酸分子的转录物。这可以例如通过 RNA 印迹分析法或借助称为定量 PCR 法的方法检测。

[0124] 本发明的又一个主题涉及经遗传修饰的单子叶植物细胞或经遗传修饰的单子叶植物,其合成与从相应的非遗传修饰野生型植物细胞分离或从相应的非遗传修饰野生型植物分离的淀粉相比较的被改性淀粉。

[0125] 本发明还涉及包含本发明植物细胞的经遗传修饰单子叶植物。此类植物可以通过再生从本发明的植物细胞产生。

[0126] 原则上,本发明的植物可以采取任意单子叶植物的形式。优选地,它们采取单子叶作物植物的形式,即出于营养目的或出于技术目的,尤其工业目的而人工培育的植物。

[0127] 在又一个实施方案中,本发明的植物采取贮藏淀粉的单子叶植物形式,或本发明的植物细胞源自淀粉贮藏植物。

[0128] 在本发明的上下文中,术语“淀粉贮藏植物”意指具有包含贮藏淀粉的植物部分的所有植物,例如玉米、稻、小麦、黑麦、燕麦、大麦、西米(sago)、芋头(taro)和谷子/高粱。

[0129] 在优选的实施方案中,本发明涉及(系统命名(systematic))禾本科(Poaceae)单子叶植物。这些植物特别优选地采取稻、玉米或小麦植物的形式。这些植物非常特别优选地采取稻植物形式。

[0130] 在本发明的上下文中,术语“小麦植物”意指小麦属(Triticum)植物物种或源于与小麦属植物杂交的植物,尤其是农业中出于商业目的而培育的小麦属植物物种,或源于与小麦属植物杂交、尤其优选与普通小麦杂交的植物。

[0131] 在本发明的上下文中,术语“玉米植物”意指玉米属(Zea)植物物种,尤其是农业中出于商业目的而培育的玉米属植物物种,特别优选地是玉米。

[0132] 在本发明的上下文中,术语“稻植物”意指稻属(Oryza)植物物种,尤其是农业中出于商业目的而培育的稻属植物物种,特别优选地是稻。

[0133] 本发明也涉及包含经遗传修饰植物细胞的单子叶植物的繁殖材料。

[0134] 这里,术语“繁殖材料”包括植物中适用于通过无性途径或有性途径产生子代的那些部分。适于无性繁殖的繁殖材料实例是插条、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、籽苗、原生质体、细胞培养物等。

[0135] 在又一个实施方案中,本发明涉及能够从本发明植物中收获的植物部分,如果实、贮藏根、根、花、芽、枝条或茎,优选种子或核仁,能够收获的这些部分包含本发明的植物细胞。

[0136] 在又一个实施方案中,本发明的经遗传修饰单子叶植物细胞以以下事实为特征,即它们合成热水溶胀力升高并且直链淀粉含量小于5%重量的(蜡质)淀粉。

[0137] 在一个优选的实施方案中,经遗传修饰单子叶植物细胞以以下事实为特征,即它包含具有60-100g/g热水溶胀力的蜡质淀粉。

[0138] 在本上下文中特别优选70-95g/g、非常特别优选80-95g/g并且异乎寻常地优选80-90g/g的热水溶胀力。

[0139] 本发明的又一主题涉及产生经遗传修饰单子叶植物的方法,其中

[0140] a) 对植物细胞进行遗传修饰,所述的遗传修饰包括以下的步骤i至iii:

[0141] i) 向所述植物细胞导入遗传修饰,其中与相应的非遗传修饰野生型植物细胞相比较,所述遗传修饰导致具备淀粉合酶II活性的蛋白质的活性提高,

[0142] ii) 向所述植物细胞导入遗传修饰,其中与相应的非遗传修饰野生型植物细胞相比较,所述遗传修饰导致具备葡聚糖/水双激酶活性的蛋白质的活性提高,

[0143] iii) 向所述植物细胞导入遗传修饰,其中与相应的非遗传修饰野生型植物细胞相比较,所述遗传修饰导致具备GBSSI活性的蛋白质的活性降低,

[0144] 其中步骤i至iii可以按照任意想要的顺序,单独地或作为步骤i至iii的任意想要的组合同时地实施,

[0145] b) 从步骤a)的植物细胞再生出植物;

[0146] c) 根据需要,借助步骤b)的植物产生进一步的植物,

[0147] 其中根据需要,从根据步骤b)或c)的植物分离植物细胞并且重复方法步骤a)至c)直至产生这样的植物,其与相应的非遗传修饰野生型植物细胞相比具有具备淀粉合酶

II 活性的蛋白质提高的活性,并且与相应的非遗传修饰野生型植物细胞相比具有降低的具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质的活性,以及与相应的非遗传修饰野生型植物细胞相比具有降低的具备 GBSSI 活性的蛋白质的活性。

[0148] 另外,本发明也涉及产生经遗传修饰植物的方法,在所述经遗传修饰植物中其淀粉具有小于 5% 重量的直链淀粉含量的植物细胞受到遗传修饰,其中所述遗传修饰以任意想要的顺序分别或同时包括以下步骤 a) 和 b) :

[0149] a) 向所述植物细胞导入遗传修饰,其中与相应的非遗传修饰野生型植物细胞相比较,所述遗传修饰导致具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质的活性提高,

[0150] b) 向所述植物细胞导入遗传修饰,其中与相应的非遗传修饰野生型植物细胞相比较,所述遗传修饰导致具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质的活性提高,并且

[0151] c) 从步骤 a) 和 b) 的植物细胞再生出植物;

[0152] d) 根据需要,借助来自步骤 a) 和 b) 的植物产生进一步的植物,

[0153] 其中根据需要,从根据步骤 a) 或 b) 的植物分离植物细胞并且重复方法步骤 a) 至 c) 直至产生这样的植物,其包含编码具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质的外源核酸分子和编码具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质的外源核酸分子。

[0154] 本发明的优选主题涉及产生单子叶植物的方法,其中

[0155] a) 遗传修饰植物细胞,其中所述的遗传修饰以任意想要的顺序包括以下步骤 i 至 iii,或单独地或同时地实施以下步骤 i 至 iii 的任意所需组合

[0156] i) 向所述植物细胞导入遗传修饰,其中与相应的非遗传修饰野生型植物细胞相比较,所述遗传修饰导致具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质的活性提高,

[0157] ii) 向所述植物细胞导入遗传修饰,其中与相应的非遗传修饰野生型植物细胞相比较,所述遗传修饰导致具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质的活性提高,

[0158] iii) 向所述植物细胞导入遗传修饰,其中与相应的非遗传修饰野生型植物细胞相比较,所述遗传修饰导致具备 GBSSI 活性的蛋白质的活性降低,

[0159] b) 从包含根据以下步骤遗传修饰的植物细胞再生出植物

[0160] i) a) i

[0161] ii) a) ii

[0162] iii) a) iii

[0163] iv) a) i 与 a) ii,

[0164] v) a) i 与 a) iii,

[0165] vi) a) ii 与 a) iii,或

[0166] vii) a) i 和 a) ii 及 a) iii

[0167] c) 向根据以下前者步骤的植物的植物细胞导入以下后者的遗传修饰

[0168] i) b) i, 根据步骤 a) ii 的遗传修饰,

[0169] ii) b) i, 根据步骤 a) iii 的遗传修饰,

[0170] iii) b) i, 根据步骤 a) ii 的遗传修饰和同时根据步骤 a) iii 的遗传修饰,

[0171] iv) b) ii, 根据步骤 a) i 的遗传修饰,

[0172] v) b) ii, 根据步骤 a) iii 的遗传修饰,

[0173] vi) b) ii, 根据步骤 a) i 的遗传修饰和同时根据步骤 a) iii 的遗传修饰,

- [0174] vii)b)iii,根据步骤 a)i 的遗传修饰,
- [0175] viii)b)iii,根据步骤 a)ii 的遗传修饰,
- [0176] ix)b)iii,根据步骤 a)i 的遗传修饰和同时根据步骤 a)ii 的遗传修饰,
- [0177] x)b)iv,根据步骤 a)iii 的遗传修饰,
- [0178] xi)b)v,根据步骤 a)ii 的遗传修饰,或
- [0179] xii)b)vi,根据步骤 a)i 的遗传修饰
- [0180] 并且使所述植物再生,
- [0181] d) 向根据以下前者步骤的植物的植物细胞导入以下后者的遗传修饰
- [0182] i)c)i,根据步骤 a)iii 的遗传修饰,
- [0183] ii)c)ii,根据步骤 a)ii 的遗传修饰,
- [0184] iii)c)iv,根据步骤 a)iii 的遗传修饰,
- [0185] iv)c)v,根据步骤 a)ii 的遗传修饰,
- [0186] v)c)vii,根据步骤 a)ii 的遗传修饰,
- [0187] vi)c)vii,根据步骤 a)i 的遗传修饰,或
- [0188] vii)c)ix,根据步骤 a)ii 的遗传修饰,
- [0189] 并且使植物再生,
- [0190] 根据需要,借助根据步骤 b)vii、c)iii、c)vi、c)x、c)xi、c)xii 之一步骤或根据步骤 d)i-d)vii 之任意步骤的植物产生进一步的植物。
- [0191] 根据步骤 a) 导入所述植物细胞的遗传修饰原则上可以采取任意类型的修饰形式,其中所述的修饰导致具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质的活性提高和 / 或导致具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质的活性提高和 / 或导致具备 GBSSI 活性的蛋白质的活性降低。
- [0192] 根据本发明方法的步骤 b)-e) 的植物再生可以通过技术人员已知的方法实现(例如在" Plant Cell Culture Protocols", 1999, R. D. Hall 编辑, Humana Press, ISBN 0-89603-549-2 中描述)。
- [0193] 通过本发明方法产生进一步的植物可以例如通过无性繁殖(例如通过插条、块茎或通过愈伤组织培养物并且再生出完整植物)或通过有性繁殖完成。有性繁殖优选地以受控方式进行,即具有特定特征的所选择植物相互杂交并繁殖。所述选择优选地以这样的方式进行,从而所述进一步的植物(其取决于方法,根据步骤 c) 或步骤 d) 或步骤 e) 产生)具有在先前步骤中导入的修饰。
- [0194] 用于选择可以通过杂交或通过转化而产生的本发明植物细胞或植物的参数于下文详述:
- [0195] 在其中仅具备葡聚糖 / 水双激酶活性的至少一种蛋白质增加的情况下,合适的植物或植物细胞是具有在淀粉 C6 位置处每 mg 淀粉至少 2.5nmol 的磷酸酯含量的那些植物或植物细胞。在其中仅具备淀粉合酶 II 活性的至少一种蛋白质增加的情况下,合适的植物或植物细胞是具有以下 SSII 活性的植物或植物细胞,其中所述的 SSII 活性提高到用于导入本发明核酸分子或用于杂交的植物细胞或植物中的 SSII 活性至少 2 倍。
- [0196] 在其中具备葡聚糖 / 水双激酶活性的至少一种蛋白质和具备淀粉合酶 II 活性的至少一种蛋白质增加的情况下,合适的植物或植物细胞是具有在淀粉 C6 位置处每 mg 淀粉至少 2.5nmol 的磷酸酯含量并且额外具有以下 SSII 活性的植物或植物细胞,其中它们的

SSII 活性提高到用于导入本发明核酸分子或用于杂交的植物细胞或植物中的 SSII 活性至少 2 倍。

[0197] 在其中 GBSSI 活性降低或使用蜡质突变体的情况下,当突变以纯合形式存在时,合适的植物是具有小于 5% 重量的表观直链淀粉含量的那些植物。

[0198] 另一个合适的选择标准是在 C6 位置中淀粉磷酸酯含量的水平。优选选择的植物是这样的植物,它们包含根据步骤 a) 和 b) 的遗传修饰并且其淀粉磷酸酯含量是至少 2.5nmol C6P/mg 淀粉并且其淀粉具有小于 5% 重量的表观直链淀粉含量。

[0199] 在用于产生经遗传修饰植物的本发明方法中,用于产生本发明的经遗传修饰植物细胞的遗传修饰可以同时地或在连续步骤中实施。在这个上下文中,就导致具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质的活性提高的遗传修饰和 / 或就导致具备 GBSSI 活性的蛋白质的活性降低的遗传修饰而言,相同方法是否用于导致具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质的活性提高的连续遗传修饰是不重要的。

[0200] 可以选择多种选择标准以选择本发明的植物或用于进一步修饰的那些植物。

[0201] 在用于产生经遗传修饰植物的本发明方法的又一个实施方案中,方法步骤 c)-1 在步骤 c) 后进行,其中选择这样的植物,其淀粉具有小于 5% 重量的表观直链淀粉含量并且具有根据步骤 a) i) 的具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质的活性提高和 / 或具有根据步骤 a) ii) 的具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质的活性提高。所选择的植物随后用于其他方法步骤。

[0202] 在用于产生经遗传修饰植物的本发明方法的又一个实施方案中,至少一种外源核酸分子编码来自马铃薯、小麦、稻、玉米、大豆、柑桔、姜黄属 (*Curcuma*) 或拟南芥属 (*Arabidopsis*) 的具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质。优选地,至少一种外源核酸分子编码来自马铃薯的具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质并且尤其优选地编码具有 SEQ ID NO 2 中所示氨基酸序列或由 SEQ ID NO 1 中所示核酸分子序列编码的蛋白质。已经在上文详述了核酸分子序列的参考,其中所述的核酸分子序列编码来自上文提及植物的具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质。

[0203] 在用于产生经遗传修饰植物的本发明方法的又一个实施方案中,至少一种外源核酸分子编码来自小麦、大麦、山羊草属 (*Aegilops*)、稻、玉米、木薯 (*cassava*)、豆类 (*bean*)、马铃薯、豌豆 (*pea*)、甜马铃薯、拟南芥属、西米、*Ostreococcus* 或衣藻属 (*Chlamydomonas*) 的具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质。优选地,至少一种外源核酸分子编码来自小麦的具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质并且尤其优选地编码具有 SEQ ID NO 3 的蛋白质。已经在上文进一步详述了核酸分子序列的参考,其中所述的核酸分子序列编码来自上文提及植物的具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质。

[0204] 如上文已经对出于遗传修饰目的而导入植物细胞或植物的外源核酸分子所描述的那样,用于产生经遗传修饰植物的本发明方法的步骤 a) 中的核酸分子可以采取单个核酸分子或多个核酸分子的形式,其中所述经遗传修饰植物的淀粉具有小于 5% 重量的直链淀粉含量。因此,编码具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质或编码具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质的外源核酸分子可以共同存在于一个单一核酸分子上或它们可以存在于分立的核酸分子上。若编码具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质或编码具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质的核酸分子存在于多个核酸分子上,则这些核酸分子可以同时地或以连续步骤导入植

物细胞。

[0205] 在用于产生本发明经遗传修饰植物的本发明方法的又一个实施方案 - 中, 至少一种外源核酸分子编码来自单子叶植物、优选来自稻、小麦、大麦、玉米、山羊草属植物、高粱或燕麦的具备 GBSSI 活性的蛋白质。

[0206] 已经在上文中进一步详述了上文提及的核酸序列的参考, 其中所述的核酸分子序列编码来自上文提及植物的具备 GBSSI 活性的蛋白质。

[0207] 优选地, 至少一种外源核酸分子编码来自稻的具备 GBSSI 活性的蛋白质并且尤其优选地编码由 SEQ ID NO 7 中所示核酸序列或由 SEQ ID NO 8 中所示氨基酸序列所编码的蛋白质。

[0208] 在又一个优选的实施方案中, 至少一种外源核酸分子编码来自小麦的具备 GBSSI 活性的蛋白质并且尤其优选地编码由 SEQ ID NO 9 中所示或 SEQ ID NO 10 中所示氨基酸序列所编码的蛋白质。

[0209] 在又一个优选的实施方案中, 至少一种外源核酸分子编码来自玉米的具备 GBSSI 活性的蛋白质并且尤其优选地编码由 SEQ ID NO 11 中所示核酸序列或由 SEQ ID NO 12 中所示氨基酸序列所编码的蛋白质。

[0210] 这里, 所述外源核酸分子导致 GBSSI 的活性抑制并且因此导致具有小于 5% 重量的直链淀粉含量的淀粉合成。上文已经就所讨论核酸分子用于产生本发明植物细胞或植物的用途而描述的内容也类似地适用于此处。

[0211] 用于遗传修饰的外源核酸分子可以采取一个组合的核酸构建体形式或采取多个分立的核酸构建体, 特别采取所谓简单构建体、二重构建体或三重构建体形式。因此, 所述外源核酸分子可以是所谓的“三重构建体”, 这理解为意指用于转化植物的单个载体, 其中所述单个载体不仅包含用于抑制内源性 GBSSI 基因表达的遗传信息, 还包含用于过量表达一个或多个 SSII 基因和用于过量表达一个或多个 GWD 基因的信息。

[0212] 构建外源核酸分子用于抑制 GBSSI 活性的基本原理是使用反义、共抑制、核酶和双链 RNA 构建体和有义构建体, 所述的使用导致编码 GBSSI 的内源性基因的表达降低并同时导致具有 SSII 和 / 或 GWD 活性的蛋白质的活性提高。

[0213] 在本上下文中, 所述外源核酸分子可以可以同时地 (“共转化”) 或先后即时间上间隔地 (“超转化”) 导入所述植物细胞的基因组。

[0214] 外源核酸分子也可以导入一个物种的不同单个植物。以这种方式, 可以产生这样的植物, 其中具备 GBSSI 活性的蛋白质的活性降低和 / 或具有 SSII 或 GWD 活性的蛋白质的活性提高。随后, 可以接着进行杂交以产生这样的植物, 其中具备 GBSSI 活性的蛋白质的活性降低并且具有 SSII 和 GWD 活性的蛋白质的活性提高。

[0215] 在本发明的上下文中, 术语“同一性”理解为意指与其他蛋白质 / 核酸分子一致 (相同性) 的氨基酸 / 核苷酸的数目, 以百分数表述。

[0216] 优选地, 借助计算机程序, 具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质的同一性通过 SEQ ID NO 4 或 SEQ ID NO 6 中详述的氨基酸序列与其他蛋白质比较而确定, 或编码具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质的核酸分子的同一性通过 SEQ ID NO 3 或 SEQ ID NO 5 中详述的核酸序列与其他核酸比较而确定, 并且具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质的同一性通过 SEQ ID NO 2 中详述的氨基酸序列与其他蛋白质比较而确定, 或编码具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋

白质的核酸分子的同一性通过 SEQ ID NO 1 中详述的核酸序列与其他核酸比较而确定,并且编码具备 GBSSI 活性的蛋白质的核酸分子的同一性通过 SEQ ID NO 7 或 SEQ ID NO 9 或 SEQ ID NO 11 中详述的核酸序列与其他核酸比较而确定,或具备 GBSSI 活性的蛋白质的同一性通过 SEQ ID NO 8 或 SEQ ID NO 10 或 SEQ ID NO 12 中详述的氨基酸序列与其他蛋白质比较而确定。

[0217] 若相互比较的序列具有不同长度,则同一性将以如此方式确定,从而较短序列同较长序列共有的氨基酸/核苷酸的数目决定同一性百分数。同一性优选地通过公众可获得的已知计算机程序例如 ClustalW(Thompson 等, Nucleic Acids Research 22(1994), 4673-4680) 确定。ClustalW 由德国海德堡 Meyerhofstrasse 1, D 69117, 欧洲分子生物学实验室的 JulieThompson(Thompson@EMBL-Heidelberg.DE) 和 Toby Gibson(Gibson@EMBL-Heidelberg.DE) 向公众发布。ClustalW 也可从多个互联网页面下载,尤其从 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/) 以及 EBI 的全部镜像互联网页面(欧洲生物信息研究所, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SD, UK) 下载。

[0218] 为确定本发明范围内所述蛋白质与其他蛋白质之间的同一性,优选地使用 ClustalW 计算机程序 1.8 版。设置如下参数:KTUPLE = 1, TOPDIAG = 5, WINDOW = 5, PAIRGAP = 3, GAOPEN = 10, GAPEXTEND = 0.05, GAPDIST = 8, MAXDIV = 40, MATRIX = GONNET, ENDGAPS(OFF), NOPGAP, NOHGAP。

[0219] 为确定例如本发明范围内所述核酸分子的核苷酸序列与其他核酸分子的核苷酸序列之间的同一性,优选地使用 ClustalW 计算机程序 1.8 版。设置如下参数:KTUPLE = 2, TOPDIAGS = 4, PAIRGAP = 5, DNAMATRIX:IUB, GAOPEN = 10, GAPEXT = 5, MAXDIV = 40, TRANSITIONS:非加权。

[0220] 同一性还意指所讨论的核酸分子之间或由它们编码的蛋白质之间存在功能性和/或结构性等同。与以上所述分子同源并且作为这些分子的衍生物的核酸分子原则上会采取相对于这些分子的变异形式,其中所述的变异是具有相同生物学功能的修饰。这些变异可以采取天然存在的变异形式,例如来自其他物种的序列或采取突变的形式,其中这些突变已经天然地存在或可能通过特定诱变导入。此外,变异可以采取人工合成的序列形式。等位变体可以采取天然存在的变体形式,或采取人工产生的变体或已通过重组 DNA 技术产生的变体形式。衍生物的具体形式例如是因遗传密码子的简并性而与本发明范围内所述核酸分子不同的核酸分子。

[0221] 在本发明的范围内,术语“杂交”意指在常规杂交条件,优选在严格条件下杂交,如在例如 Sambrook 等, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第三版 (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. ISBN:0879695773; Ausubel 等, Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons; 第 5 版 (2002), ISBN:0471250929 中描述。特别优选地,“杂交”意指如下条件下杂交:

[0222] 杂交缓冲液:

[0223] 2×SSC; 10×Denhardt 溶液(菲克 400+PEG+BSA; 比例 1:1:1); 0.1% SDS; 5mM EDTA; 50mM Na₂HPO₄; 250 μg/ml 鲑精 DNA; 50 μg/ml tRNA; 或

[0224] 25M 磷酸钠缓冲液 pH7.2 ;1mM EDTA ;7% SDS

[0225] 杂交温度 :

[0226] $T = 65-68^{\circ}\text{C}$

[0227] 洗涤缓冲液 :0.1×SSC ;0.1% SDS

[0228] 洗涤温度 : $T = 65-68^{\circ}\text{C}$ 。

[0229] 与上文提及的分子杂交的核酸分子可以从例如基因组文库或从 cDNA 文库分离。此类核酸分子的鉴定和分离可以使用上文提及的核酸分子或这些分子的部分或使用这些分子的反向互补物,例如通过根据标准方法杂交或借助 PCR 扩增而实现。

[0230] 可以用于分离编码具备淀粉合酶 II 活性或葡聚糖 / 水双激酶活性或 GBSSI 活性的蛋白质的核酸序列的杂交探针例如是完全具有或基本上具有在 SEQ ID NO 3 或 SEQ ID NO 5 (淀粉合酶 II) 中或在 SEQ ID NO 1 (葡聚糖 / 水双激酶) 中或在 SEQ ID NO 7,9 或 11 (GBSSI) 中详述的核苷酸序列或这些序列之部分的核酸分子。

[0231] 用作杂交探针的片段也可以采取已借助常规合成技术产生并且其序列与本发明范围内所述核酸分子的序列基本上一致的合成性片段或寡核苷酸形式。当已经分离并鉴定与本发明范围内所述核酸序列杂交的基因时,应当对该序列实施测序并且分析由该序列编码的蛋白质的特征,以确证这些蛋白质分别是具备淀粉合酶 II 活性或葡聚糖 / 水双激酶活性或 GBSSI 活性的蛋白质。

[0232] 与本发明范围内所述核酸分子杂交的分子尤其包含上文所提及核酸分子的片段、衍生物和等位变体。在本发明的上下文中,术语“衍生物”意指在这些分子的一个或多个位置处与上文所述核酸分子的序列不同并且与这些序列具有高度同一性的序列。与上文所述核酸分子的差异可以通过例如缺失、添加、替换、插入或重组产生。

[0233] 为表达编码具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质和 / 或具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质和 / 或具备 GBSSI 活性的蛋白质的本发明核酸分子,这些分子优选地与确保在植物细胞中转录的调节 DNA 序列连接。这些调节 DNA 序列尤其包括启动子。通常,在植物细胞中有活性的任意启动子适用于表达。

[0234] 所述启动子可以按照这样的方式选择,从而表达以组成型方式发生或仅在某种组织中、在植物发育的某个时间点或在由外界因素决定的某个时间点处发生。启动子可以与所述植物或与所述核酸分子是同源的或异源的。

[0235] 合适启动子的实例是:旨在组成型表达的花椰菜花叶病毒 35S RNA 启动子和玉米遍在蛋白启动子、稻遍在蛋白启动子 (Liu 等, Plant Science 165, (2003)、稻肌动蛋白启动子 (Zhang 等, Plant Cell 3 :1150-1160, 1991)、木薯脉花叶病毒 (Cassava Vein Mosaic Virus ;CVMV) 启动子 (Verdaguer 等, Plant Mol. Biol. 31 :1129-1139)、玉米组蛋白 H3C4 启动子 (US6, 750, 378) 或夜香树属 (Cestrum) YLCV 启动子 (黄叶卷曲病毒 ;WO 0173087 ;Stavolone 等, 2003, Plant Mol. Biol. 53, 703-713)。也可以使用确保仅在光合活跃组织中表达的启动子,如 ST-LS1 启动子 (Stockhaus 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 7943-7947 ;Stockhaus 等, EMBO J. 8 (1989), 2445-2451), 或对于胚乳特异性表达,使用小麦 HMW 启动子、蚕豆 (Vicia faba) USP 启动子 (Fiedler 等, 1993, Plant Mol. Biol. 22 :669-679 ;**Bäumlein** 等, 1991, Mol. Gen. Genet. 225 :459-467)、菜豆的菜豆球蛋白启动子、来自玉米的玉米醇溶蛋白基因启动子 (Pedersen 等, Cell 29 (1982), 1015-1026 ;Quatroccio 等,

Plant Mol. Biol. 15(1990), 81-93)、谷蛋白启动子 (Leisy 等, Plant Mol. Biol. 14(1990), 41-50; Zheng 等, Plant J. 4(1993), 357-366; Yoshihara 等, FEBS Lett. 383(1996), 213-218)、球蛋白启动子 (Nakase 等, 1996, Gene 170(2):223-226), 谷醇溶蛋白启动子 (Qu 和 Takaiwa, 2004, Plant Biotechnology Journal 2(2):113-125)。然而, 也可使用仅在由外界因素影响决定的一个时间点处活化的启动子 (参见例如 WO 9307279)。也有兴趣的启动子是使简单诱导成为可能的热休克蛋白启动子。此外, 可以使用种子特异性启动子, 如蚕豆 USP 启动子 (见上文)。

[0236] 也可以存在终止序列 (聚腺苷酸化信号)。这种序列的作用是向转录物添加聚腺苷酸尾。认为聚腺苷酸尾具有稳定转录物的功能。此类元件在文献中描述 (参考 Gielen 等, 1989, EMBO J. 8:23-29) 并且可以根据需要进行交换。

[0237] 内含子序列也有可能存在于启动子与编码区之间。此类内含子序列可以在植物中导致表达稳定和导致表达增加 (Callis 等, 1987, Genes Devel. 1, 1183-1200; Luehrsen 和 Walbot, 1991, Mol. Gen. Genet. 225, 81-93; Rethmeier 等, 1997; Plant Journal. 12(4):895-899; Rose 和 Beliakoff, 2000, Plant Physiol. 122(2), 535-542; Vasil 等, 1989, Plant Physiol. 91, 1575-1579; Xu 等, 2003, 中国科学 C 第 46 卷 (6), 561-569)。合适内含子序列的实例是玉米 sh1 基因的第一内含子、玉米多聚遍在蛋白基因 1 的第一内含子、稻 EPSPS 基因的第一内含子或拟南芥 PAT1 基因的头两个内含子之一。

[0238] 本发明的又一个实施方案涉及产生本发明的经遗传修饰单子叶植物的方法, 其中其淀粉具有小于 5% 重量的表观直链淀粉含量的植物细胞

[0239] a) 受到遗传修饰, 其中与相应的非遗传修饰野生型植物细胞相比较, 所述遗传修饰导致具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质的活性提高;

[0240] b) 从步骤 a) 的植物细胞再生出植物;

[0241] c) 根据需要, 借助步骤 b) 的植物产生进一步的植物, 和

[0242] d) 根据步骤 b) 或 c) 获得的植物与这样的植物杂交, 其中所述植物与相应的非遗传修饰野生型植物细胞相比较显示具备葡聚糖 / 水双激酶 I 活性的蛋白质的活性提高。

[0243] 本发明的又一个实施方案涉及产生本发明的经遗传修饰单子叶植物的方法, 其中其淀粉具有小于 5% 重量的表观直链淀粉含量的植物细胞

[0244] a) 受到遗传修饰, 其中与相应的非遗传修饰野生型植物细胞相比较, 所述遗传修饰导致具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质的活性提高;

[0245] b) 从步骤 a) 的植物细胞再生出植物;

[0246] c) 根据需要, 借助步骤 b) 的植物产生进一步的植物, 和

[0247] d) 根据步骤 b) 或 c) 获得的植物的植物与这样的植物杂交, 其中所述植物与相应的非遗传修饰野生型植物细胞相比较显示具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质的活性提高。

[0248] 本发明的又一个实施方案涉及产生本发明的经遗传修饰单子叶植物的方法, 其中植物细胞受到遗传修饰, 其中与相应的非遗传修饰野生型植物细胞相比较,

[0249] a) i) 所述遗传修饰导致具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质的活性提高;

[0250] a) ii) 实施导致具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质的活性提高的又一种遗传修饰;

[0251] 其中步骤 a) i) 和 ii) 可以按照想要的任意顺序实施,

[0252] b) 从步骤 a) i) 和 ii) 的植物细胞再生出植物;

[0253] c) 根据需要,借助步骤 b) 的植物产生进一步的植物,和

[0254] d) 根据步骤 a) 至 c) 获得的植物与这样的植物杂交,其中与相应的非遗传修饰野生型植物细胞相比较,所述植物的淀粉因而具有小于 5% 重量的直链淀粉含量。

[0255] 在上文所提的产生经遗传修饰植物的最后三种方法中,所述植物可以受到如上所述根据步骤 a) 的遗传修饰。根据步骤 b) 使植物再生和根据步骤 c) 和 d) 产生进一步的植物也已经在上文中详细描述。

[0256] 根据头两个实施方案的步骤 d) 与从步骤 b) 或 c) 获得的植物或其子代杂交的植物可以是任意植物,其中与相应的野生型植物相比较,所述的任意植物显示具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质的活性提高或具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质的活性提高。具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质的活性提高或具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质的活性提高可以由导致相应植物中所讨论蛋白质的活性提高的任意修饰引起。这些植物可以采取突变体或已经由重组方法修饰的植物形式。所述突变体可以采取自发(天然)存在的突变体形式或采取已经通过定向使用诱变剂(如化学品、离子辐射)或重组方法(例如转座子激活标签法、T-DNA 激活标签法、体内(in vivo)诱变法)产生的那些突变体形式。

[0257] 在所提到的最后 2 个本发明方法中优选用于杂交的植物是这样的植物,它们具有具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质的活性,其中与相应的非遗传修饰野生型植物相比较,所述活性提高到至少 3 倍、优选 6 倍、优选至少 8 倍并且特别优选至少 10 倍。

[0258] 具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质的活性提高的此类所讨论植物在所提到的最后 2 个本发明方法中用于杂交并且优选地是合成下述淀粉的植物,其中所述淀粉具有至少 2.5nmol C6P/mg 淀粉的淀粉磷酸酯含量。

[0259] 在一个优选的实施方案中,本发明方法用于产生经遗传修饰植物,其中所述的经遗传修饰植物用于产生本发明的植物或用于产生具有本发明植物特征的植物。

[0260] 本发明也涉及通过本发明方法可获得的植物。

[0261] 出人意料地,已经发现本发明的植物细胞和本发明的植物合成改性淀粉,其中所述植物细胞和植物的淀粉具有小于 5% 重量的表观直链淀粉含量和具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质提高的活性和具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质提高的活性。由本发明植物细胞或本发明植物合成的淀粉具有提高的热水溶胀力的事实特别出人意料。可以从本发明植物细胞或本发明植物分离的淀粉的提高了的热水溶胀力赋予本发明淀粉这样的特性,所述特性使本发明淀粉比常规淀粉更好地适合某些用途。如淀粉用作增稠剂,则所述淀粉提高的热水溶胀力意味着需要少得多的淀粉以实现同样的增稠力。

[0262] 本发明的又一个主题涉及具有小于 5% 重量的表观直链淀粉含量和提高的热水溶胀力的改性淀粉。与分离自相应的非遗传修饰野生型植物细胞或分离自相应的非遗传修饰野生型植物的淀粉相比较,本发明改性淀粉的热水溶胀力优选地提高到至少 1.5 倍、特别优选地至少 2 倍、尤其优选地至少 2.5 倍并且非常特别优选地至少 3 倍。

[0263] 用于确定热水溶胀力的方法是技术人员已知的并且在文献(例如 Leach 等, 1959, Cereal Chemistry 36 :534-544) 中描述。在下文“一般方法”中进一步描述根据本发明优选地使用以确定热水溶胀力的方法。

[0264] 本发明的又一个主题涉及从单子叶植物细胞或从单子叶植物分离的改性淀粉,所述改性淀粉具有 5% 重量的表观直链淀粉含量并且具有从至少 60g/g、优选从 60-100g/g、

特别优选从 70-95g/g、尤其优选从 80-95g/g 和特别优选从 80-90g/g 的热水溶胀力。

[0265] 本发明的又一个主题涉及从稻植物细胞或稻植物分离的改性淀粉,所述改性淀粉具有 5%重量的表观直链淀粉含量并且具有从至少 60g/g、优选从 60-100g/g、特别优选从 70-95g/g、尤其优选从 80-95g/g 和特别优选从 80-90g/g 的热水溶胀力。

[0266] 由本发明的经遗传修饰植物细胞或本发明的经遗传修饰植物合成的淀粉优选地具有淀粉 C6 位置处升高的磷酸酯含量。本文中,从本发明植物细胞和本发明植物分离的淀粉的淀粉磷酸酯含量明显比基于所讨论亲代植物的总淀粉磷酸酯含量在开展杂交后本应预期到的淀粉磷酸酯含量显著更高。

[0267] 结合于葡萄糖分子 C6 位置处的淀粉磷酸酯的量可以通过技术人员已知的方法测定,例如按照由 Kasemusuan 和 Jane(1996, Cereal Chemistry 73 :702-707) 描述的方法,通过偶联酶测定法或借助 ^{31}P NMR 以光度测定方式测定。在本发明的上下文中,结合于葡萄糖分子 C6 位置处的淀粉磷酸酯的量优选地如“一般方法”中所述测定。

[0268] 本发明的又一个优选主题涉及本发明的改性淀粉,所述改性淀粉已经从单子叶植物细胞或从单子叶植物分离并且具有每 mg 淀粉至少 1.5nmol、特别优选每 mg 淀粉至少 2.5nmol 的结合于淀粉的葡萄糖分子 C6 位置处的淀粉磷酸酯含量。本发明的这种改性淀粉特别优选地采取玉米淀粉、稻淀粉或小麦淀粉形式。

[0269] 在本发明的又一个实施方案,本发明的改性淀粉采取天然淀粉形式。

[0270] 在本发明的上下文中,术语“天然淀粉”意指通过本领域技术人员已知的方法从本发明植物、本发明的可收获植物部分、本发明的淀粉贮藏部分或本发明的植物繁殖材料分离的淀粉。

[0271] 本发明也涉及这样的本发明改性淀粉,所述改性淀粉可从本发明植物细胞或本发明植物、从本发明的繁殖材料或从本发明的可收获植物部分获得,或可从已经使用产生经遗传修饰植物的本发明方法所产生的植物获得。

[0272] 合成本发明改性淀粉的植物细胞或植物也是本发明的主题。

[0273] 本发明还涉及产生改性淀粉的方法,包括从本发明植物细胞或本发明植物、从这种植物的本发明繁殖材料和 / 或从这种植物的本发明可收获植物部分,优选从这种植物的本发明淀粉贮藏部分提取淀粉的步骤。优选地,这种方法也包括在提取淀粉前收获已经生长的植物或植物部分和 / 或这些植物的繁殖材料的步骤,并且特别优选地还包括在收获前生长本发明植物的步骤。

[0274] 用于从植物或从淀粉贮藏性植物部分提取淀粉的方法是技术人员已知的。此外,用于从多种淀粉贮藏性植物提取淀粉的方法已经描述,例如在《淀粉:化学和技术》(Starch:Chemistry and Technology)(编者:Whistler, BeMiller 和 Paschall(1994),第二版,Academic Press Inc.London Ltd;ISBN 0-12-746270-8;参见,例如第十二章第 412-468 页 Watson 所著《玉米淀粉和高粱淀粉:生产》(Mais and Sorghum Starches:Production);第十三章第 469-479 页 Corbishley 和 Mille 所著《木薯、菊芋和西米淀粉:生产》(Tapioca,Arrowroot and Sago Starches:Production);第十四章第 479-490 页 Mitch 所著《马铃薯淀粉:生产和用途》(Potato starch:Production and Uses);第十五章第 491 至 506 页 Knight 和 Oson 所著《小麦淀粉:生产、改性和用途》(Wheat starch:Production,Modification and Uses)以及第十六章第 507 至 528 页 Rohmer 和 Klem 所著《稻淀粉:生

产和用途》(Rice starch :Production and Uses) ;Eckhoff 等玉米淀粉 (Maize starch) : Cereal Chem. 73(1996), 54-57, 玉米淀粉的工业规模提取一般通过所谓“湿磨法”完成) 中描述。在用于从植物材料中提取淀粉的工艺中通常使用的装置是分离器、倾析器、水力旋流器、喷雾干燥器和流化床干燥器。

[0275] 在本发明的上下文中, 术语“淀粉贮藏部分”理解为意指植物的这些部分, 在所述部分中与暂时性叶淀粉不同, 淀粉作为储藏物质被贮藏, 用于存活更长时间。优选的淀粉贮藏性植物部分例如是块茎、贮藏根和谷粒, 特别优选包含胚乳的谷粒, 尤其优选来自玉米、稻或小麦植物的包含胚乳的谷粒。

[0276] 在一个优选的实施方案中, 用于制备改性淀粉的本发明方法用来制备本发明的淀粉。

[0277] 可通过制备改性淀粉的本发明方法获得的改性淀粉也是本发明的主题。

[0278] 本发明的植物细胞或本发明植物用于制备改性淀粉的用途也是本发明的主题。

[0279] 本领域技术人员知道淀粉的特性可以例如通过热、化学、酶或机械衍生作用改变。衍生淀粉特别适合在食品和 / 或非食品领域中的多种用途。本发明淀粉比常规淀粉更好地适合作为起始材料用于制造衍生淀粉, 原因是它们例如因淀粉磷酸酯含量较高而包含较高比例的活性官能团。由于本发明淀粉的热水溶胀力提高, 衍生过程还可以在较高的温度上进行, 而淀粉粒结构没有受到明显程度的破坏。

[0280] 本发明因此也涉及用于制备衍生淀粉的方法, 其中本发明的改性淀粉随后进行衍生化。本发明还涉及通过已知方法之一制备的衍生淀粉。

[0281] 在本发明的上下文中, 术语“衍生淀粉 (derivatized starch)”理解为意指在淀粉从植物细胞分离后已经借助化学方法、酶方法、热方法或机械方法改变了特性的本发明改性淀粉。

[0282] 在本发明的另一个实施方案中, 本发明的衍生淀粉是用热处理和 / 或酸处理的淀粉。

[0283] 在又一个实施方案中, 所述衍生淀粉采取以下形式: 淀粉醚, 尤其淀粉烷基醚、0- 烯丙基醚、羟烷基醚、0- 羧甲基醚、含氮的淀粉醚、含磷酸的淀粉醚或含硫的淀粉醚。

[0284] 在又一个实施方案中, 所述衍生淀粉采取交联淀粉的形式。

[0285] 在又一个实施方案中, 所述衍生淀粉采取淀粉接枝聚合物的形式。

[0286] 在又一个实施方案中, 所述衍生淀粉采取氧化淀粉的形式。

[0287] 在又一个实施方案中, 所述衍生淀粉采取淀粉酯的形式, 尤其采取已经使用有机酸导入淀粉的淀粉酯形式。它们特别优选地采取称为磷酸酯淀粉、硝酸酯淀粉、硫酸酯淀粉、黄原酸酯淀粉、乙酸酯淀粉或柠檬酸酯淀粉的形式。

[0288] 本发明的衍生淀粉适合制药工业、食品领域和 / 或非食品领域中的多种用途。制备本发明衍生淀粉的方法是技术人员已知的, 并且广泛地在一般文献中描述。制备衍生淀粉的综述可以在 Orthoefer (1987 年 Watson 和 Ramstad 编辑的《Corn, Chemistry and Technology》第 16 章第 479-499 页) 中找到。

[0289] 通过用于制备衍生淀粉的本发明方法可获得的衍生淀粉是本发明的又一主题。

[0290] 本发明改性淀粉用于制备衍生淀粉的用途是本发明的又一主题。

[0291] 本发明也包括了包含本发明淀粉的产品。

[0292] 本发明也包括了包含本发明淀粉的混合物。

[0293] 淀粉贮藏性植物部分经常加工成面粉。从中制备面粉的植物部分的实例是例如马铃薯植物的块茎和谷类植物的谷粒。为从谷类植物制备面粉,将这些植物的含胚乳的谷粒研磨并过筛。淀粉是胚乳的主要组分。在不包含胚乳但包含其他淀粉贮藏部分(例如块茎或根)的其他植物中,经常通过粉碎、干燥并随后研磨所讨论的贮藏器官制备面粉。胚乳或存在于淀粉贮藏性植物部分中的淀粉占据从所讨论植物部分中制备的面粉的绝大部分。面粉的特性因而也受到所讨论面粉中存在的淀粉影响。与相应的非遗传修饰野生型植物细胞或非遗传修饰野生型植物相比较,本发明的植物细胞和本发明的植物合成改性淀粉。从本发明植物细胞、本发明植物、本发明的繁殖材料或本发明的可收获部分制备的面粉因而具有改变的特性。也可以通过将淀粉与面粉混合或通过混入特性不同的面粉来影响面粉的特性。

[0294] 本发明的又一个主题因此涉及包含本发明淀粉的面粉。

[0295] 本发明的又一个主题涉及可以从本发明植物细胞、本发明植物、本发明的淀粉贮藏性植物部分、从本发明繁殖材料或从本发明的可收获植物部分制备的面粉。用于制备面粉的本发明优选的淀粉贮藏性植物部分是块茎、贮藏根和包含胚乳的谷粒。在本发明上下文中,特别优选来自(系统命名法)禾本科植物的谷粒;尤其优选地,从玉米、稻或小麦植物获得谷粒。

[0296] 在本发明的上下文中,术语“面粉”理解为意指可以通过研磨植物部分获得的粉末。根据需要,植物部分在研磨前进行干燥和过筛。

[0297] 由于存在于本发明面粉中的本发明淀粉,本发明的面粉以如下事实为特征,即它们具有提高的热热水溶胀力。这在例如食品工业中为多种用途而加工面粉,尤其在焙烤商品生产中是受欢迎的。

[0298] 本发明的优选主题涉及从单子叶蜡质植物的谷粒中制备的面粉,其中所述面粉具有至少 25g/g,优选 25-50g/g,特别优选 30-45g/g 并且尤其优选 35-45g/g 的热热水溶胀力。

[0299] 在本上下文中,面粉的热热水溶胀力测定以类似于上文所述测定淀粉的热热水溶胀力的方法进行,不同之处在于使用面粉替代淀粉。测定面粉的热热水溶胀力的优选方法在“一般方法”中描述。

[0300] 本发明的又一个主题是制备面粉的方法,包括步骤:研磨本发明的植物细胞、本发明的植物、本发明的植物部分、本发明的淀粉贮藏性植物部分、本发明的繁殖材料或本发明的可收获材料。

[0301] 面粉可以通过研磨本发明的淀粉贮藏性植物部分产生。技术人员知道如何产生面粉。优选地,产生面粉的方法也包括在研磨前收获所生长的植物或植物部分和/或这些植物的繁殖材料和/或淀粉贮藏部分的步骤,并且特别优选地还包括在收获前生长本发明的植物。

[0302] 包含本发明面粉的产品也是本发明的主题。

[0303] 在本发明的又一个实施方案,用于产生面粉的方法包括在研磨前加工本发明的植物、本发明的淀粉贮藏性植物部分、本发明的繁殖材料或本发明的可收获材料。

[0304] 在这个上下文中,加工可以是热处理和/或干燥步骤。在干燥热处理的材料后,热处理例如用于从贮藏根或块茎例如从马铃薯块茎产生面粉,随后进行研磨。研磨前,粉碎本

发明的植物、本发明的淀粉贮藏性植物部分、本发明的繁殖材料或本发明的可收获材料也可以构成本发明意思范围内的加工。在研磨前除去植物组织（例如谷粒脱皮）也构成本发明意思范围内的加工。

[0305] 在本发明的又一个实施方案中，用于制造面粉的方法包括研磨后加工研磨料（mill base）。在此上下文中，可以在研磨后筛分所述研磨料以制备多种类型的面粉。

[0306] 本发明也包括包含本发明面粉的混合物。

[0307] 本发明的又一个主题是本发明的经遗传修饰植物细胞、本发明的植物、本发明的植物部分、本发明的淀粉贮藏性植物部分、本发明的繁殖材料或本发明的可收获材料用于制造面粉的用途。

[0308] 本专利申请中所引用的全部文件的公开内容旨在整合入本发明说明书的公开内容中。

[0309] 序列描述

[0310] SEQ ID NO 1:编码具备来自马铃薯的葡聚糖/水双激酶活性的蛋白质的核酸序列

[0311] SEQ ID NO 2:由 SEQ ID NO 1 编码的具备来自马铃薯的葡聚糖/水双激酶活性的蛋白质的氨基酸序列。

[0312] SEQ ID NO 3:编码具备来自普通小麦的淀粉合酶 II 活性的蛋白质的核酸序列。

[0313] SEQ ID NO 4:由 SEQ ID NO 3 编码的具备来自普通小麦的淀粉合酶 II 活性的蛋白质的氨基酸序列。

[0314] SEQ ID NO 5:编码具备来自稻的淀粉合酶 II 活性的蛋白质的核酸序列。

[0315] SEQ ID NO 6:由 SEQ ID NO 5 编码的具备来自稻的淀粉合酶 II 活性的蛋白质的氨基酸序列。

[0316] SEQ ID NO 7:编码具备来自稻的 GBSS I 活性的蛋白质的核酸序列。

[0317] SEQ ID NO 8:由 SEQ ID NO 7 编码的具备来自稻的 GBSS I 活性的蛋白质的氨基酸序列。

[0318] SEQ ID NO 9:编码具备来自普通小麦的 GBSS I 活性的蛋白质的核酸序列。

[0319] SEQ ID NO 10:由 SEQ ID NO 9 编码的具备来自普通小麦的 GBSS I 活性的蛋白质的氨基酸序列。

[0320] SEQ ID NO 11:编码具备来自玉米的 GBSS I 活性的蛋白质的核酸序列。

[0321] SEQ ID NO 12:由 SEQ ID NO 11 编码的具备来自玉米的 GBSS I 活性的蛋白质的氨基酸序列。

[0322] 一般方法

[0323] 在下文将描述可以用于实施本发明方法/工艺的方法。这些方法是本发明的具体实施方案，然而本发明不限于这些方法。技术人员知道可以通过修改所述方法和/或通过用备选的方法部分替换所述方法的各个部分而以相同方式实施本发明。全部所引用出版物的内容通过引用的方式并入本申请的描述内容。

[0324] 1. 稻植物的转化和再生

[0325] 稻植物通过 Hiei 等 (1994, Plant Journal 6(2), 271-282) 描述的方法进行转化。

[0326] 温室中稻植物的方案涉及以下条件:播种:基质:1.6L 玫瑰钵(制造商:H. Meyer, 德国)中 100%水藓泥炭与 100L 沙/m²及 180kg/m²粘土的混合物, pH:5.4-6.2;绿肥:

Hakaphos (Compo, 德国) 14% N-16% P-18% K+2% Mg; 2kg/m²;

[0327] 施肥: 3.5g/ 每株植物, 直至开花: NH₄NO₃ (1.75g) 和 Flory 2 基础混合物 (制造商: Euflo, 德国): 1.75g; 3% N-16% P-15% K+5% Mg。

[0328] 温度: 白昼 28°C / 夜晚: 24°C (16 小时 / 8 小时); 相对空气湿度: 85-95%;

[0329] 光照: 16 小时, 350 μ Einstein/s $\times$ m²

[0330] 2. 用于转化的序列及构建体的来源

[0331] 来自小麦的序列 T. a. -SSIIa 用于稻的转化。该序列如 WO 97-45545 中所述进行分离和克隆 (以其当时名称 "pTaSS1")。所用转化载体 AH32-191 在实施例 2 中描述。

[0332] 还使用来自马铃薯的葡聚糖 / 水双激酶的序列 (R1St)。该序列如实施例 5 中所述进行分离和克隆。所用转化载体 pML82 在 WO 05/095619 中描述。

[0333] 蜡质性状通过实施例 1 中描述的合适突变体导入。

[0334] 3. 通过 RNA 印迹法分析基因的表达水平

[0335] 通过 RNA 印迹分析法研究编码蛋白质的核酸的表达。为此目的, 收获通过转化所获得的每个单独植物的不成熟的 3 粒稻谷粒 (开花后大约 15 日) 并在液氮中冷冻。为均化该材料, 在 96 孔微量滴定平板中用 Retsch 磨 (型号 MM300) 使用 4.5mm 钢球以 30 赫兹频率粉碎冷冻的稻谷粒 30 秒。此后, 通过 Promega RNA 提取试剂盒, 按照制造商说明书 (SV 96 总 RNA 分离系统, 订单号 Z3505, Promega, Mannheim) 分离 RNA。各个样品中 RNA 的浓度通过测光方式测量 260nm 处的吸收确定。

[0336] 对于每个样品, 将 2 μ g RNA 调整至均一体积并且用相同体积的 RNA 样品缓冲液 (65% (v/v) 甲酰胺, 8% 甲醛, 13% (v/v) 凝胶缓冲液 (见上文), 50 μ g/ml 溴乙锭) 处理。在加热 (10 分钟, 65°C) 并立即在冰上冷却后, 该 RNA 使用 1.2% (w/v) 琼脂糖凝胶 (20mM MOPS pH 8.0, 5mM 乙酸钠, 1mM EDTA, 6% (v/v) 甲醛), 利用 RNA 运行缓冲液 (20mM MOPS pH 8.0, 5mM 乙酸钠, 1mM EDTA) 以 50-80mA 的恒定电流分离大约 2 小时。

[0337] 此后, 将该 RNA 通过使用 10 $\times$ SSC (1.5M NaCl, 150mM 柠檬酸钠 pH7.0) 的扩散印迹法转移至 Hybond N 膜并且通过 UV 照射固定在该膜上。

[0338] 用于检测核酸分子表达的 RNA 印迹物的杂交利用了质粒 AH32-191 中包含 cDNA 5' 区域的约 1kb SpeI/BspHI 片段 (第 4568-5686bp), 其中所述的核酸分子编码来自小麦的具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质。该 DNA 片段通过来自 Roche 的随机引发 DNA 标记试剂盒 (订单号 1004760), 使用 ³²P- α -dCTP 并按照制造商说明书进行放射标记。

[0339] 包含转移的 RNA 的尼龙膜在 60°C 的水浴中与杂交缓冲液 (250mM 磷酸钠缓冲液 pH 7.2, 1mM EDTA, 6% (w/v) SDS, 1% (w/v) BSA) 温育 4 小时, 轻轻摇动, 同时将放射标记的 DNA 添加至该杂交缓冲液。温育 16 小时后, 除去杂交缓冲液, 并将所述膜在 60°C 依次用 3 $\times$ SSC 洗涤一次及用 2 $\times$ SSC (见上文) 洗涤一次, 同时柔和摇动, 旨在除去非特异性结合的 DNA 分子。

[0340] 为检测标记的 RNA, 此尼龙膜在 -70°C 于 X 射线胶片上放射自显影 1 至 3 日。

[0341] 4. 通过活性凝胶 (酶谱) 法确定具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质的活性

[0342] 通过活性凝胶 (酶谱) 法检测不成熟稻谷粒中具有淀粉合酶活性的蛋白质的活性, 其中蛋白质提取物在天然条件下的聚丙烯酰胺凝胶中分离并且随后与适宜底物温育。凝胶中形成的反应产物 (α -葡聚糖) 使用鲁戈溶液 (Lugol's solution) 染色。

[0343] 将单个不成熟的稻谷粒（开花后约 15 日）在液氮中冷冻并在 150–200 μ l 的冷提取缓冲液（50mM Tris/HCl pH 7.6, 2.5mM EDTA, 2mM DTT, 4mM PMSF, 0.1% (w/v) 糖原, 10% (v/v) 甘油）中均化。离心（15 分钟, 13000g, 4℃）后, 将清亮上清液转移至一只新的反应容器内, 并且该提取物的等份试样用于通过 Bradford 法（1976, Anal Biochem 72 :248–254）确定蛋白质含量。

[0344] 所述蛋白质提取物通过 7.5% 强度连续聚丙烯酰胺凝胶（7.5% 丙烯酰胺：双丙烯酰胺 37.5 : 1; 25mM Tris/HCl pH 7.6, 192mM 甘氨酸, 0.1% (w/v) APS, 0.05% (v/v) TEMED）, 使用单一浓度的运行缓冲液（25mM Tris/HCl, 192mM 甘氨酸）进行分离。对于每个样品, 在每种情况下使用与 15 μ g 蛋白质相应的量, 并且在 4℃ 进行电泳 2–2.5 小时。

[0345] 此后, 凝胶在室温于 15ml 温育缓冲液（0.5mM 柠檬酸钠 pH 7.0, 25mM 乙酸钾, 2mM EDTA, 2mM DTT, 0.1% (w/v) 支链淀粉, 50mM 三（羟甲基）甲基甘氨酸 /NaOH pH 8.5, 1mM ADP- 葡萄糖）中温育过夜, 持续摇动。形成的淀粉借助鲁戈溶液染色。

[0346] 为确定与相应的非遗传修饰野生型植物相比较, 具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质的活性提高多少倍, 来自经遗传修饰品系的蛋白质提取物在每种情况下作连续稀释并且根据上文所述的方法通过电泳分离。其余步骤如上文已描述那样实施。在酶谱已经用鲁戈溶液染色后, 对于来自经遗传修饰植物的蛋白质提取物的不同稀释度, 目视比较由具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质产生的有色产物的强度（由图 1 中箭头确定）与非稀释的野生型蛋白质提取物的相关产物。因为产物的颜色强度与具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质的活性直接相关, 故具有相同强度的产物条带具有相同的活性。若稀释的蛋白质提取物中具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质的产物条带与来自野生型植物的相应的非稀释蛋白质提取物的对应产物条带具有相同的强度, 则稀释倍数与相应的经遗传修饰植物中活性提高的程度相对应（关于比较, 参见图 1）。

[0347] 5. 从分离的稻胚产生植物（胚拯救）

[0348] 从穗中取出种子并除去外壳。将胚乳用手术刀片从胚中切下并且用于合适的分析法。为改善湿润度, 该胚用 70% 乙醇短暂处理并且随后在包含 2% NaOCl 和一滴市售洗涤剂溶液中温育 20 分钟以使胚消毒。

[0349] 此后, 尽可能地除去消毒液, 并且将胚用无菌去离子水洗涤一次 1 分钟, 以及洗涤两次, 每次 10 分钟。将种子铺在培养皿内的琼脂固化培养基上, 所述的琼脂固化培养基在每种情况下包含 MS 培养基（Murashige–Skoog 培养基）的四分之一盐浓度和 4% 蔗糖。此后, 培养皿用石蜡膜密封并在 23℃ 于黑暗中温育。在萌发后（所述胚铺种后约 5–7 日）, 将培养皿转移至光照下。当籽苗的下胚轴长度达到约 2cm 时, 将植物转移至包含了具有 2% 蔗糖的琼脂固化 MS 培养基的罐内。在足够的根已经发育后, 植物可以盆栽于混合肥料中。

[0350] 6. 稻谷粒的加工以及稻粉的制备

[0351] 为准备足够量的试验材料, 将稻植物在温室中培育并且在充分成熟时收获。成熟的稻谷粒在 37℃ 贮藏 3–7 日以使其进一步干燥。

[0352] 此后, 所述谷粒通过去皮机（Laboratory Paddy sheller, Grainman, 迈阿密, 佛罗里达州, 美国）与外壳分离, 并且获得的糙米通过精碾 1 分钟（Pearlest Rice Polisher, Kett, Villa Park, CA, USA）进行加工以产生白米。对于谷粒组成研究和淀粉特性研究, 将白色谷粒借助实验磨（Cyclotec, Sample mill, Foss, Denmark）研磨以产生所称的稻粉。

[0353] 7. 从稻粉中提取稻淀粉

[0354] 通过与 Wang 和 Wang(2004 ;Journal of Cereal Science 39 :291-296) 所述方法相似的方法从稻粉中提取稻淀粉。

[0355] 约 10g 稻粉在室温于摇床上与 40ml 0.05% (w/v)NaOH 温育 16-18 小时。此后,将悬液转移至 Waring 搅拌机以完成消化,并且在低速度上混合 15 秒并随后在高速度上混合 45 秒。为除去粗成分(例如细胞壁),将悬液依次倾入经过具有 125 μ m 和 63 μ m 筛目大小的筛子。1500 转/分钟离心 15 分钟(Microfuge 3.0R ;Heraeus)后,倾析出上清液,并且使用刮铲除去沉积物顶部的蛋白质层。沉积物的剩余部分重悬于 0.05% (w/v)NaOH 中,并且重复上文所述过程。此后,将沉积物重悬于水中并使用 HCl 调节悬液的 pH 至 6.5 至 7。获得的稻淀粉用水共洗涤三次,其中每个洗涤步骤包括沉淀(在室温于 1500 转/分钟离心 15 分钟)、弃去上清液并且将沉积物重悬于新鲜水中。在最后的洗涤步骤前,再次检查 pH,并根据需要用 HCl 调节至 pH 7。将最后洗涤步骤的沉积物重悬于丙酮中,沉淀并且弃去上清液。在沉积物再次重悬于丙酮后,将悬液倾入培养皿并且在通风橱内于室温干燥至少 18 小时。

[0356] 在最后步骤中,将所得稻淀粉通过在研钵(pestel and mortar)中粉碎产生细粉末,并且这种粉末可以直接用于其他研究。

[0357] 8. 热水溶胀力(SP)的确定

[0358] 将 100mg 样品(淀粉或面粉)悬浮在 10ml 水中并且随后在 92.5°C 溶胀 20 分钟。样品在 92.5°C 温育期间,通过小心地 360° 转动样品容器而反复混合悬液(在头 2 分钟内连续地混合,随后在第 3、4、5、10、15 和 25 分钟混合)。在 92.5°C 温育总计 30 分钟后,悬液在冰水中冷却约 1 分钟,随后在 25°C 温育 5 分钟。离心(室温,1000 $\times$ g,15 分钟)后,将获得的上清液从凝胶样沉积物小心地移去,并且测定沉积物重量。使用以下公式计算热水溶胀力:

[0359] $SP = (\text{凝胶样沉积物的重量}) / (\text{称重样品(面粉或淀粉)的重量})$

[0360] 9. 葡萄糖分子中 C6 位置的淀粉磷酸酯含量的确定

[0361] 淀粉中,葡萄糖单位的位置 C2、C3 和 C6 可以被磷酸化。为确定淀粉或面粉的 C6-P 含量(Nielsen 等,1994,Plant Physiol. 105 :111-117 的改良方法),50mg 稻粉或稻淀粉在 95°C 于 500 μ l 0.7M HCl 中水解 4 小时,同时持续摇动。此后,该混合物在 15500 $\times$ g 离心 10 分钟,并且借助滤膜(0.45 μ M)滤除上清液的悬浮物质和云雾状物质。20 μ l 清亮的水解产物与 180 μ l 咪唑缓冲液(300mM 咪唑,pH 7.4 ;7.5mM MgCl₂,1mM EDTA 和 0.4mM NADP)混合,并且样品在 340nm 处于光度计中测量。在记录基础吸收后,通过添加 2 单位葡萄糖 6-磷酸脱氢酶(来自肠膜明串珠菌(Leuconostoc mesenteroides),Boehringer Mannheim)启动酶反应。所测量的变化(OD)是基于等摩尔地转换葡萄糖 6-磷酸和 NADP 以产生 6-磷酸葡萄糖酸和 NADPH,其中在上文提及的波长处记录 NADPH 的形成。监测该反应直至已经达到终点。这种测量的结果可以用于计算水解产物中的葡萄糖 6-磷酸含量:

[0362]

$$\text{nmol 葡萄糖 6-磷酸/mg FW} = \frac{\text{OD} \times \text{测量体积 (200 } \mu\text{l)} \times \text{水解产物体积 (500 } \mu\text{l)}}{\text{消光系数} \times \text{样品体积 (20 } \mu\text{l)} \times \text{mg (50 mg) 中称重的材料}}$$

[0363] 随后确定水解程度,旨在避免因(面粉或淀粉)称重材料中淀粉的不完全水解所致的错误结果。为此目的,从已测量其葡萄糖 6-磷酸含量的相应水解产物中取出 10 μ l 水解产物,以 10 μ l 的 0.7M NaOH 中和并用水稀释至 2ml 终体积(稀释度 1 : 200)。4 μ l 这种稀释物以 196 μ l 测量缓冲液(100mM 咪唑 pH 6.9 ;5mM MgCl₂, 1mM ATP, 0.4mM NADP) 处理并用于葡萄糖含量的光度测定。确定在 340nm 处的基础吸收后,通过添加 2 μ l 酶混合物(测量缓冲液中的己糖激酶 1 : 10 ;来自酵母的葡萄糖 6-磷酸脱氢酶 1 : 10) 在光度计(340nm) 中监测该反应直至达到终点。测量原理与第一反应的测量原理对应。使用获得的数据,可以计算所讨论样品的葡萄糖量:

[0364]

$$\text{mmol 葡萄糖/g FW} = \frac{\text{OD} \times \text{测量体积 (200 } \mu\text{l)} \times \text{水解物体积 (500 } \mu\text{l)} \times \text{稀释物总体积 (2 ml)}}{\text{消光系数} \times \text{样品体积 (20 } \mu\text{l)} \times \text{用于稀释的体积 (10 } \mu\text{l)} \times \text{mg (50 mg) 中称重的材料}}$$

[0365] 各个样品中检测到的葡萄糖的量对应于可用于 C6-磷酸测定的淀粉的量。为简化后续计算,将葡萄糖含量转换成淀粉含量。

[0366]

$$\text{淀粉含量 (\%)} = \frac{\text{葡萄糖含量 (mmol/g FW)} \times \text{淀粉中葡萄糖的分子量 (162 g/mol)} \times \text{转换系数 (\%=100)}}{\text{转换系数 (mmol 至 mol =1000)}}$$

[0367] 在下文中,测量葡萄糖 6-磷酸的结果与所讨论样品的淀粉含量以如下方式相关,所述方式表述为每毫克水解淀粉的葡萄糖 6-磷酸含量:

[0368]

$$\text{nmol Glc-6 P/mg 淀粉} = \frac{\text{nmol 葡萄糖 6-磷酸 /mg 称重材料} \times \text{淀粉含量 (mg 淀粉 / 100 mg 称重材料)}}{\text{淀粉含量 (mg 淀粉 / 100 mg 称重材料)}}$$

[0369] 与葡萄糖 6-磷酸的量和称重的样品(面粉或淀粉)的重量相关这一点不同的是,这种类型的计算仅将葡萄糖 6-磷酸的量与已经被彻底水解以产生葡萄糖的淀粉的量相关。

[0370] 10. 表观直链淀粉含量的确定

[0371] 通过与 Juliano (1971, Cereal Science Today 16(10) :334-340) 类似的方法实施表观直链淀粉含量的确定。

[0372] 对于每个样品,重复两次在 100ml 锥形瓶称取 50mg 稻粉,并且使稻粉依次用 1ml

95%浓度乙醇和 9ml 1M NaOH 湿润。

[0373] 平行地,含有定义量的来自马铃薯的纯直链淀粉的烧瓶按照与针对面粉样品相同的方式处理,旨在建立标准曲线。将烧瓶短暂旋转以混合内容物并且随后在沸水浴中温育 20 分钟,同时温和振荡。在室温冷却 5-10 分钟后,用水补足体积至 100ml。

[0374] 100 μ l 等分试样用 1ml 测量溶液 (10mM 乙酸,0.004% (w/v) I_2 ;0.04% (w/v) KI) 处理,彻底混合,并且在 620nm 处针对合适的空白测定吸收。借助用于建立标准曲线的直链淀粉标准品实施直链淀粉含量的确定。

[0375] 11. 定量 PCR

[0376] 从各粒不成熟的稻种子 (开花后 10-12 日) 制备 RNA。已经在液氮中冷冻的所述种子使用 4mm 钢球 (Retsch 磨,30Hz,45 秒) 均化后,使用 Promega 的“SV 96 总 RNA 分离系统”,按照第 294 号方案 (Promega) 制备 RNA。在每种情况下,将 RNA 用 10 μ l “RQ1 无 RNA 酶的 DNA 酶” (Promega) 按照制造商说明书处理。

[0377] 在每种情况下,将相等量的来自一株植物的四粒种子的 RNA 合并。

[0378] 定量 RT-PCR 用 Promega “Access RT-PCR 系统”的试剂实施。

[0379] RT-PCR 的反应条件是:55 $^{\circ}$ C,30 分钟;94 $^{\circ}$ C,2 分钟;40 次 $\times$ (94 $^{\circ}$ C,15 秒;60 $^{\circ}$ C,1 分钟)。在每种情况下,使用 ABI Prism 7700 仪 (Applied Biosystems) 记录合并的退火/延伸阶段期间的荧光信号。

[0380] 本方法中使用的对照在每种情况下是无逆转录酶的混合物。

[0381] 相对表达如 M. W. Pfaffi (2001,用于实时 RT-PCR 中相对定量的新算术模型 (A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR), Nucleic Acids Research 29, No 900) 所述进行计算。

实施例

[0382] 1. 蜡质 (GBSSI 敲除) 突变体的产生和选择

[0383] 蜡质突变体源于农杆菌介导的稻转化。对子代的分析表明:稻谷粒的蜡质表型独立于随所述转化导入的草铵膦抗性而遗传。GBSSI (蜡质) 基因的序列分析表明:蜡质表型基因的表现可以归因于两个核苷酸的交换,其结果是产生提前终止的终止密码子,从而产生截短且可能无活性的蛋白质。稻谷粒中存在的淀粉的表观直链淀粉含量的 RFLP 分析证实小于 5% 重量的值,这意味着所鉴定的突变体是“蜡质”突变体。因此,术语“蜡质表型”理解为意指其淀粉具有小于 5% 的表观直链淀粉含量的蜡质突变体。

[0384] 对上文提及的突变为纯合的品系 738-104 和 738-106 用于与转基因方法联合。

[0385] BamHI

[0386] M202 GAG TGG GAT CCT AGC

[0387] 蜡质_突变体 GAG TGA AAT CCT AGC

[0388] 终止

[0389] 2. 制备植物表达载体 pAH32-191,该植物表达载体包含具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质的编码序列

[0390] 通过限制性核酸内切酶 Eco1136II 和 Xho I 从质粒 pCF31 (其在 W097/45545 中以名称 pTaSS1 描述) 中切下来自小麦的具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质的完整编

码序列 (T. a. -SSII), 并且克隆入已经用限制性核酸内切酶 EcoRV 和 XhoI 切割的质粒 pIR103-123(其在 WO 05/030941 中描述)。获得的表达载体命名为 pAH32-191。植物表达载体 pIR103-123 用于使得靶基因在源自稻的胚乳特异性球蛋白启动子 (Nakase 等 (1996) Gene 170 (2) :223-226) 控制下发生胚乳特异性表达。此外, 植物表达载体 pIR103-123 包含在 CaMV 35S 启动子控制下的 bar 基因, 其中所述 bar 基因用作植物转化的选择标记。

[0391] 3. 稻植物的产生, 所述的稻植物具有具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质提高的活性

[0392] 通过包含质粒 pAH32-191 的农杆菌, 使用由 Hiei 等 (1994, Plant Journal 6(2), 271-282) 描述的方法转化稻植物 (品种 M202)。所得植物命名为 oe-SSII-0. s. -X, 其中 X 意指从所述转化中获得的独立植物。

[0393] 4. 已用表达载体 pAH32-191 转化的稻植物的分析

[0394] 在温室中的土壤培育名为 oe-SSII-0. s. -X 并源自用表达载体 pAH32-191 所转化品系的稻植物 (T0 植物)。将 RNA 从多种品系的不成熟谷粒 (T1 种子) 分离, 并且使用 SSII 特异性探针, 根据“一般方法”中描述的方法实施 RNA 印迹分析。鉴定到与相应的非遗传修饰野生型植物相比较, 具有小麦淀粉合酶 II 的转录物的量增加的多个品系 (见通过举例方式在图 2 中显示的图形)。

[0395] 此外, 通过酶谱确定了不成熟 T1 种子的蛋白质提取物中具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质提高的活性, 其中所述的不成熟 T1 种子来自上文所提及转化的不同品系 (见通过举例方式在图 1 和图 2 中显示的图形)。所述分析通过如“一般方法”中所述的酶谱实施。

[0396] 基于所描述分析的结果, 选择以下品系用于与其他方法组合:

[0397] oe-SSII-0. s.-01502

[0398] 在多种分析的基础上, 可以显示这个品系对载体 pAH32-191 的 T-DNA 整合是纯合的。

[0399] 5. 稻植物的产生, 所述的稻植物具有具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质提高的活性

[0400] 通过包含质粒 pML82 (在 WO 05/095619 中描述) 的农杆菌, 使用由 Hiei 等 (1994, Plant Journal 6(2), 271-282) 描述的方法转化稻植物 (品种 M202)。所得植物命名为 oe-GWD-0. s. -X, 其中 X 意指从所述转化中获得的独立植物。

[0401] 6. 已用表达载体 pML82 转化的稻植物的分析

[0402] 在温室中的土壤培育名为 oe-GWD-0. s. -X 并且源于用表达载体 pML82 所转化品系的稻植物 (T0 植物)。将来自不同品系的各成熟谷粒 (T1 种子) 制成面粉。为此目的, 将各谷粒在 Eppendorf 反应容器内的球磨 (来自 Retsch, 型号 MM300) 中使用碳化钨球以 30 赫兹频率粉碎 30 秒。随后如“一般方法”中所述确定存在于该面粉中的淀粉的葡萄糖分子 C6 位置处的淀粉磷酸酯含量。

[0403] 对所选植物获得以下结果:

[0404]

品系	nmol C6P/mg 称重材料
oe-GWD-0. s. -2	1. 68
oe-GWD-0. s. -4	1. 70

[0405]

oe-GWD-0. s. -9	1.47
WT	0.30

[0406] 表 1 :与品种 M202 的相应非遗传修饰野生型植物 (WT) 的种子相比较,来自名为 oe-GWD-0. s. -X 的不同品系的各 T1 种子的葡萄糖分子 C6 位置的淀粉磷酸酯含量。

[0407] 从表 1 可以看出,可以鉴定到这样的独立品系,其是用植物表达载体 pML82 转化的结果并且与相应的非遗传修饰野生型植物相比较,在葡萄糖分子 C6 位置具有提高的淀粉磷酸酯含量。已知与相应的非遗传修饰野生型植物相比较,具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质表达提高的植物细胞合成了淀粉磷酸酯含量更高的淀粉 (见,例如 WO 02/34923)。

[0408] 基于上文所述分析,选择以下品系用于与其他方法组合 :

[0409] oe-GWD-0. s. -2

[0410] oe-GWD-0. s. -4

[0411] oe-GWD-0. s. -9

[0412] 在多种分析的基础上,可以证实这些品系对载体 pML82 的 T-DNA 整合是纯合的。

[0413] 7. 产生具有蜡质表型和具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质的活性提高的植物

[0414] 实施以下杂交 :

[0415]

谱系杂交		雌性亲本名称	雌性亲本质粒	雄性亲本名称	雄性亲本质粒
XPOS0001		M202 蜡质	---	oe-GWD-0. s.	pML82
	-01	738-106	---	oe-GWD-0. s-2	pML82
	-02	738-104	---	oe-GWD-0. s-2	pML82
	-03	738-104	---	oe-GWD-0. s-4	pML82
	-04	738-106	---	oe-GWD-0. s-4	pML82
	-05	738-104	---	oe-GWD-0. s-9	pML82
	-06	738-106	---	oe-GWD-0. s-9	pML82

[0416] 表 2 :738-104/4(M202 蜡质) 与 oe GWD 0. s 组合的杂交。

[0417] 研究了作为杂交结果的 F1 种子的胚乳中葡萄糖分子 C6 位置的淀粉磷酸酯含量 (C6P)。通过组织培养技术使与雌性亲本相比淀粉磷酸酯含量 (C6P) 明显提高的那些谷粒的胚萌发。在已经达到足够尺度后,将相关植物转移至温室以产生 F2 种子。

[0418] 通过目视评分从成熟的 F2 种子中选出具有蜡质表型的谷粒并且置于温室中。在萌发后,对植物喷洒 Basta® (Bayer CropScience), 并且从 Basta® - 耐受植物获取

叶样品。使用针对 bar 基因的侵入物技术 (invadertechnology) (http://www.twt.com/invader_chemistry/invaderchem.htm;Ledford 等 (2000, J.of Mol.Diagnostics 2(2) : 97-104 ;Mein 等,2000, Genome Res. 10 :330-343),通过拷贝数测定法鉴定对于载体 pML82 的 TDNA 整合为纯合的植物。如此选出的植物在温室中生长以产生 F3 种子。

[0419] 分别研究潜在双重纯合的植物的一些成熟 F3 种子的淀粉磷酸酯 (C6P) 含量。保留其中全部谷粒具有所预期的高淀粉磷酸酯 (C6P) 含量的那些植物。

[0420] 汇集亲本组合的全部双重纯合植物的种子并用于进一步繁殖和用于分析谷粒和面粉特性。

[0421] 对于与品系 oe-SSII-0. s 的组合而言,选择对于蜡质突变和对于载体 pML82 的 T-DNA 均为纯合的事件 XPOS0001-05。

[0422] 8. 植物的产生,所述的植物具有蜡质表型并且具有具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质提高的活性及具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质提高的活性

[0423] 实施以下杂交 :

[0424]

谱系杂交	雌性亲本	雌性亲本的 质粒	雄性亲本	雄性亲本的 质粒
XPOS0025-01	oe-SSII-0. s. -01502	pAH31-191	XPOS0001-05	pML82
XPOS0026-01	XPOS0001-05	pML82	oe-SSII-0. s. -01502	pAH32-191

[0425] 表 3 :oe-SSII-0. s. 与 XPOS0001-05 组合的杂交

[0426] 通过测量 F1 胚乳的淀粉磷酸酯含量而鉴定杂交中的成功事件,原因在于该组合的淀粉磷酸酯含量明显高于亲本品系。

[0427] 9. 对植物的分析,所述的植物具有蜡质表型并且具有具备葡聚糖 / 水双激酶活性的蛋白质提高的活性及具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质提高的活性。

[0428] 通过组织培养技术使 F1 种子的胚萌发,其中所述 F1 种子的胚乳具有大于 5nmol C6P/mg 淀粉的淀粉磷酸酯含量并且因此明显高于两个亲本的淀粉磷酸酯含量 (对于 oe-GWD-0. s. 是 2.5nmol/mg 淀粉,并且对于 oe SSII0. s. 是至少 0.8nmol/mg 淀粉),并且所讨论的植物一旦达到合适尺度,则转移至温室以产生 F2 种子。

[0429] 为鉴定对两种转基因以及对蜡质突变均为纯合的子代,对于已经就“蜡质表型”进行过目视预选择的 F2 种子重复上文所述过程,包括胚拯救。

[0430] 10. F2 植物的选择和分析

[0431] 基于淀粉磷酸酯测量结果,选择 F2 种子 ($C6P > 8nmol/mg$ 淀粉),使其胚萌发并且在温室中生长所讨论的 F2 植物。

[0432] 从 F2 植物的叶材料提取基因组 DNA,并且通过定量 PCR 测定所述两种转基因的拷贝数及 bar 基因的拷贝数 (对于这两种转基因的总值)。

[0433] 使用 RFLP (Bam HI) 在所述蜡质突变体的 GBSSI 基因 (定义和 / 或方法) 中证明蜡质突变为纯合的。

[0434] 在温室中生长对两种转基因为潜在纯合并对蜡质 RFLP 为纯合的 F2 植物并且用于产生 F3 种子。

[0435] 11. F3 植物的选择 /F3 种子的分析

[0436] 为鉴定三重纯合品系,以目视方式检验适宜选择的植物的一些单个谷粒的蜡质表型并且随后研究它们的淀粉磷酸酯含量。若全部谷粒具有蜡质表型,并且若发现一株植物的全部谷粒具有大致同样的高淀粉磷酸酯含量,则可以推定该植物对蜡质突变且对 pML82 及 pAH32-191 的 T-DNA 是纯合的。

[0437] 12. F4 材料的产生

[0438] 在上文提及的分析中发现以下品系是三重纯合的:

[0439] XP0S002501-1-37

[0440] XP0S002501-1-13

[0441] XP0S002601-1-19

[0442] 来自这些品系的植物在温室中生长,并且收获并干燥产生的 F4 种子,并且随后汇集为用于全部后代的一个品系。

[0443] 13. F4 材料中成分的功能性和分析

[0444] a) 谷粒组成

[0445] 表观直链淀粉含量:

[0446]

样品名称	稻粉的表现直链淀粉 含量 (%直链淀粉 /FW)	稻淀粉的表现直链淀粉 含量 (%直链淀粉 /FW)
野生型	8.9	11.8
oe-GWD-0. s. -4	10.6	14.4
oe-GWD-0. s. -9	10.6	14.3
oe-SSII-0. s. -01502	6.6	9.2
738-104/6	2.3	2.2
XP0S025-01-1-37	3.7	3.5
XP0S025-01-1-13	3.7	3.7
XP0S026-01-1-19	3.9	4.1

[0447] 表 4:单基因方法和三重组合的稻粉和稻淀粉中的表观直链淀粉含量

[0448] 显示出组合 XP0S0025/6 具有高于蜡质突变体 (738-104/6) 的淀粉酶含量。

[0449] 淀粉磷酸酯含量 (C6P 含量)

[0450]

样品名称	稻粉中存在的淀粉 C6 位置的淀粉磷酸酯含量 (nmol C6P/mg 淀粉)	稻淀粉的 C6 位置 淀粉磷酸酯含量 (nmol C6P/mg 淀粉)
野生型	0.46	0.37
0e-GWD-0. s. -4	2.85	2.65
0e-GWD-0. s. -9	3.27	2.56
0e-SSII- 0. s. -01502	1.22	0.91

[0451]

738-104/6	0.52	0.38
XPOS02501-1-37	11.45	9.50
XPOS02501-1-13	11.20	10.24
XPOS02601-1-19	11.06	10.23

[0452] 表 5 :对于单基因方法和对于三重组合的稻粉或淀粉的 C6 位置的淀粉磷酸酯含量

[0453] 三重组合的 C6 位置的淀粉磷酸酯含量明显地高于单基因方法的 C6 位置的淀粉磷酸酯含量。

[0454] b) 稻粉和稻淀粉的功能性

[0455] 热水溶胀力

[0456]

样品名称	稻粉的热水溶胀力 (g/g)	稻淀粉的热水溶胀力 (g/g)
野生型	15.7	31.9
oe-GWD-0. s. -4	21.6	38.6
oe-GWD-0. s. -9	21.3	39.9
oe-SSII-0. s. -01502	20.2	40.8
738-104/6	19.9	47.3

XPOS025-01-1-37	40.6	86.0
XPOS025-01-1-13	41.9	89.1
XPOS026-01-1-19	38.3	87.2

[0457] 表 6 :单基因方法和三重组合的稻粉或稻淀粉的热水溶胀力

[0458] 如“一般方法”中所述完成面粉或淀粉的热水溶胀力测定,其中所述的面粉或淀粉从上文提及的品系的 F4 种子和从野生型植物制备。

[0459] 三重组合的热水溶胀力明显高于单基因方法的热水溶胀力。

[0460] 附图简述

[0461] 图 1 显示用于确定与野生型相比较,具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质的活性的酶谱。所用材料是来自野生型植物 (WT) 和三株独立的经遗传修饰植物的不成熟谷粒 (开花后 15 日) 的总蛋白提取物,其中所述的经遗传修饰植物是用表达载体 AH32-191 (oe-SSII-0. s. -5、oe-SSII-0. s. -12、oe-SSII-0. s. -19) 转化的结果。在泳道 WT 和 pur 中,在每种情况下应用相同量的来自各提取物的蛋白质。将经遗传修饰植物的蛋白质提取物进行连续稀释 (1 : 2、1 : 4、1 : 6、1 : 8、1 : 10、1 : 20、1 : 50 或 1 : 100),并且将这些稀释物通过电泳分开,并且还彼此相互分开。与野生型植物相比的淀粉合酶 II 活性提高可以通过比较来自野生型植物的蛋白质提取物的特定产物的强度与来自经遗传修饰植物的蛋白质提取物的相应条带的强度进行确定,其中所述的特定产物存在于经鲁戈溶液染色后的酶谱中并且已经由 (箭头标记的) 具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质合成。相同强度意指相同活性。

[0462] 图 2 显示与非遗传修饰的野生型植物 (WT) 相比较,稻品系 oe-SSII-0. s. -19、oe-SSII-0. s. -20、oe-SSII-0. s. -21、oe-SSII-0. s. -22、oe-SSII-0. s. -23 的不成熟 T1 种子的 RNA 印迹分析的放射自显影图。为此目的,在每种情况下,RNA 提取自独立地源自用表达载体 AH32-191 转化的品系的三颗种子并且根据一般方法第 8 项中所述的方法进行分析。与标记的核酸探针杂交的条带鉴定为 SSII,其中所述的核酸探针编码来自小麦的具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质。

[0463] 图 3 显示用鲁戈溶液染色后,与非遗传修饰野生型植物 (WT) 的种子相比较,稻品系 oe-SSII-0. s. -8、oe-SSII-0. s. -19、oe-SSII-0. s. -23 的不成熟 T1 种子的蛋白质提取物的酶谱。每个品系分析来自两颗 (oe-SSII-0. s. -8) 或三颗 (oe-SSII-0. s. -19、oe-SSII-0. s. -23) 不同谷粒的蛋白质提取物。按照在一般方法第 9 项中所述的方法进行借助酶谱的分析。酶谱中对具备淀粉合酶 II 活性的蛋白质为特异的条带鉴定为 SSII。

[0001]

序 列 表

<110> 拜尔作物科学股份公司

<120> 合成具有提高的溶胀力的低直链淀粉的经遗传修饰植物

<130> BCS 07-5002 PCT

<150> EP 07090009.7

<151> 2007-01-26

<150> US 60/898,427

<151> 2007-01-30

<160> 12

<170> PatentIn 版本 3.3

<210> 1

<211> 4851

<212> DNA

<213> 马铃薯 (Solanum tuberosum)

<220>

<221> transit_peptide

<222> (1)..(77)

<220>

<221> CDS

<222> (105)..(4499)

<300>

<308> EMBL / Y09533

<309> 1998-07-30

<313> (1)..(4499)

<400> 1

caatcttcate gaatttctcg aagctttcttc gctaatttcc tggtttcttc actcaaaatc 60

gacgttticta gctgaacttg agtgaattaa gccagtggga ggat atg agt aat tcc 116

Met Ser Asn Ser

1

tta ggg aat aac ttg ctg tac cag gga ttc cta acc tca aca gtg ttg 164

Leu Gly Asn Asn Leu Leu Tyr Gln Gly Phe Leu Thr Ser Thr Val Leu

5

10

15

20

gaa cat aaa agt aga atc agt cct cct tgt gtt gga ggc aat tct ttg 212

Glu His Lys Ser Arg Ile Ser Pro Pro Cys Val Gly Gly Asn Ser Leu

[0002]

25	30	35	
ttt caa caa caa gtg atc tcg aaa tca cct tta tca act gag ttt cga			260
Phe Gln Gln Gln Val Ile Ser Lys Ser Pro Leu Ser Thr Glu Phe Arg			
40	45	50	
ggt aac agg tta aag gtg cag aaa aag aaa ata cct atg gaa aag aag			308
Gly Asn Arg Leu Lys Val Gln Lys Lys Lys Ile Pro Met Glu Lys Lys			
55	60	65	
cgt gct ttt tct agt tct cct cat gct gta ctt acc act gat acc tct			356
Arg Ala Phe Ser Ser Ser Pro His Ala Val Leu Thr Thr Asp Thr Ser			
70	75	80	
tct gag cta gca gaa aag ttc agt cta ggg ggg aat att gag cta cag			404
Ser Glu Leu Ala Glu Lys Phe Ser Leu Gly Gly Asn Ile Glu Leu Gln			
85	90	95	100
gtt gat gtt agg cct ccc act tca ggt gat gtg tcc ttt gtg gat ttt			452
Val Asp Val Arg Pro Pro Thr Ser Gly Asp Val Ser Phe Val Asp Phe			
105	110	115	
caa gta aca aat ggt agt gat aaa ctg ttt ttg cac tgg ggg gca gta			500
Gln Val Thr Asn Gly Ser Asp Lys Leu Phe Leu His Trp Gly Ala Val			
120	125	130	
aaa ttc ggg aaa gaa aca tgg tct ctt ccg aat gat cgt cca gat ggg			548
Lys Phe Gly Lys Glu Thr Trp Ser Leu Pro Asn Asp Arg Pro Asp Gly			
135	140	145	
acc aaa gtg tac aag aac aaa gca ctt aga act cca ttt gtt aaa tct			596
Thr Lys Val Tyr Lys Asn Lys Ala Leu Arg Thr Pro Phe Val Lys Ser			
150	155	160	
ggc tct aac tcc atc ctg aga ctg gag ata cga gac act gct atc gaa			644
Gly Ser Asn Ser Ile Leu Arg Leu Glu Ile Arg Asp Thr Ala Ile Glu			
165	170	175	180
gct att gag ttt ctc ata tac gat gaa gcc cac gat aaa tgg ata aag			692
Ala Ile Glu Phe Leu Ile Tyr Asp Glu Ala His Asp Lys Trp Ile Lys			
185	190	195	
aat aat ggt ggt aat ttt cgt gtc aaa ttg tca aga aaa gag ata cga			740
Asn Asn Gly Gly Asn Phe Arg Val Lys Leu Ser Arg Lys Glu Ile Arg			
200	205	210	
ggc cca gat gtt tct gtt cct gag gag ctt gta cag atc caa tca tat			788
Gly Pro Asp Val Ser Val Pro Glu Glu Leu Val Gln Ile Gln Ser Tyr			
215	220	225	

[0003]

ttg agg tgg gag agg aag gga aaa cag aat tac ccc cct gag aaa gag Leu Arg Trp Glu Arg Lys Gly Lys Gln Asn Tyr Pro Pro Glu Lys Glu 230 235 240	836
aag gag gaa tat gag gct gct cga act gtg cta cag gag gaa ata gct Lys Glu Glu Tyr Glu Ala Ala Arg Thr Val Leu Gln Glu Glu Ile Ala 245 250 255 260	884
cgt ggt gct tcc ata cag gac att cga gca agg cta aca aaa act aat Arg Gly Ala Ser Ile Gln Asp Ile Arg Ala Arg Leu Thr Lys Thr Asn 265 270 275	932
gat aaa agt caa agc aaa gaa gag cct ctt cat gta aca aag agt gat Asp Lys Ser Gln Ser Lys Glu Glu Pro Leu His Val Thr Lys Ser Asp 280 285 290	980
ata cct gat gac ctt gcc caa gca caa gct tac att agg tgg gag aaa Ile Pro Asp Asp Leu Ala Gln Ala Gln Ala Tyr Ile Arg Trp Glu Lys 295 300 305	1028
gca gga aag ccg aac tat cct cca gaa aag caa att gaa gaa ctc gaa Ala Gly Lys Pro Asn Tyr Pro Pro Glu Lys Gln Ile Glu Glu Leu Glu 310 315 320	1076
gaa gca aga aga gaa ttg caa ctt gag ctt gag aaa ggc att acc ctt Glu Ala Arg Arg Glu Leu Gln Leu Glu Leu Glu Lys Gly Ile Thr Leu 325 330 335 340	1124
gat gag ttg cgg aaa acg att aca aaa ggg gag ata aaa act aag gtg Asp Glu Leu Arg Lys Thr Ile Thr Lys Gly Glu Ile Lys Thr Lys Val 345 350 355	1172
gaa aag cac ctg aaa aga agt tct ttt gcc gtt gaa aga atc caa aga Glu Lys His Leu Lys Arg Ser Ser Phe Ala Val Glu Arg Ile Gln Arg 360 365 370	1220
aag aag aga gac ttt ggg cat ctt att aat aag tat act tcc agt cct Lys Lys Arg Asp Phe Gly His Leu Ile Asn Lys Tyr Thr Ser Ser Pro 375 380 385	1268
gca gta caa gta caa aag gtc ttg gaa gaa cca cca gcc tta tct aaa Ala Val Gln Val Gln Lys Val Leu Glu Glu Pro Pro Ala Leu Ser Lys 390 395 400	1316
att aag ctg tat gcc aag gag aag gag gag cag att gat gat ccg atc Ile Lys Leu Tyr Ala Lys Glu Lys Glu Glu Gln Ile Asp Asp Pro Ile 405 410 415 420	1364
cta aat aaa aag atc ttt aag gtc gat gat ggg gag cta ctg gta ctg Leu Asn Lys Lys Ile Phe Lys Val Asp Asp Gly Glu Leu Leu Val Leu	1412

[0004]

425	430	435	
gta gca aag tcc tct ggg aag aca aaa gta cat cta gct aca gat ctg			1460
Val Ala Lys Ser Ser Gly Lys Thr Lys Val His Leu Ala Thr Asp Leu			
440	445	450	
aat cag cca att act ctt cac tgg gca tta tcc aaa agt cct gga gag			1508
Asn Gln Pro Ile Thr Leu His Trp Ala Leu Ser Lys Ser Pro Gly Glu			
455	460	465	
tgg atg gta cca cct tca agc ata ttg cct cct ggg tca att att tta			1556
Trp Met Val Pro Pro Ser Ser Ile Leu Pro Pro Gly Ser Ile Ile Leu			
470	475	480	
gac aag gct gcc gaa aca cct ttt tca gcc agt tct tct gat ggt cta			1604
Asp Lys Ala Ala Glu Thr Pro Phe Ser Ala Ser Ser Ser Asp Gly Leu			
485	490	495	500
act tct aag gta caa tct ttg gat ata gta att gaa gat ggc aat ttt			1652
Thr Ser Lys Val Gln Ser Leu Asp Ile Val Ile Glu Asp Gly Asn Phe			
505	510	515	
gtg ggg atg cca ttt gtt ctt ttg tct ggt gaa aaa tgg att aag aac			1700
Val Gly Met Pro Phe Val Leu Leu Ser Gly Glu Lys Trp Ile Lys Asn			
520	525	530	
caa ggg tgg gat ttc tat gtt ggc ttc agt gct gca tcc aaa tta gca			1748
Gln Gly Ser Asp Phe Tyr Val Gly Phe Ser Ala Ala Ser Lys Leu Ala			
535	540	545	
ctc aag gct gct ggg gat ggc agt gga act gca aag tct tta ctg gat			1796
Leu Lys Ala Ala Gly Asp Gly Ser Gly Thr Ala Lys Ser Leu Leu Asp			
550	555	560	
aaa ata gca gat atg gaa agt gag gct cag aag tca ttt atg cac cgg			1844
Lys Ile Ala Asp Met Glu Ser Glu Ala Gln Lys Ser Phe Met His Arg			
565	570	575	580
ttt aat att gca gct gac ttg ata gaa gat gcc act agt gct ggt gaa			1892
Phe Asn Ile Ala Ala Asp Leu Ile Glu Asp Ala Thr Ser Ala Gly Glu			
585	590	595	
ctt ggt ttt gct gga att ctt gta tgg atg agg ttc atg gct aca agg			1940
Leu Gly Phe Ala Gly Ile Leu Val Trp Met Arg Phe Met Ala Thr Arg			
600	605	610	
caa ctg ata tgg aac aaa aac tat aac gta aaa cca cgt gaa ata agc			1988
Gln Leu Ile Trp Asn Lys Asn Tyr Asn Val Lys Pro Arg Glu Ile Ser			
615	620	625	

[0005]

aag gct cag gac aga ctt aca gac ttg ttg cag aat gct ttc acc agt Lys Ala Gln Asp Arg Leu Thr Asp Leu Leu Gln Asn Ala Phe Thr Ser 630 635 640	2036
cac cct cag tac cgt gaa att ttg cgg atg att atg tca act gtt gga His Pro Gln Tyr Arg Glu Ile Leu Arg Met Ile Met Ser Thr Val Gly 645 650 655 660	2084
cgt gga ggt gaa ggg gat gta gga cag cga att agg gat gaa att ttg Arg Gly Gly Glu Gly Asp Val Gly Gln Arg Ile Arg Asp Glu Ile Leu 665 670 675	2132
gic atc cag agg aac aat gac tgc aag ggt ggt atg atg caa gaa tgg Val Ile Gln Arg Asn Asn Asp Cys Lys Gly Gly Met Met Gln Glu Trp 680 685 690	2180
cat cag aaa ttg cat aat aat act agt cct gat gat gtt gtg atc tgt His Gln Lys Leu His Asn Asn Thr Ser Pro Asp Asp Val Val Ile Cys 695 700 705	2228
cag gca tta att gac tac atc aag agt gat ttt gat ctt ggt gtt tat Gln Ala Leu Ile Asp Tyr Ile Lys Ser Asp Phe Asp Leu Gly Val Tyr 710 715 720	2276
tgg aaa acc ctg aat gag aac gga ata aca aaa gag cgt ctt ttg agt Trp Lys Thr Leu Asn Glu Asn Gly Ile Thr Lys Glu Arg Leu Leu Ser 725 730 735 740	2324
tat gac cgt gct atc cat tct gaa cca aat ttt aga gga gat caa aag Tyr Asp Arg Ala Ile His Ser Glu Pro Asn Phe Arg Gly Asp Gln Lys 745 750 755	2372
ggt ggt ctt ttg cgt gat tta ggt cac tat atg aga aca ttg aag gca Gly Gly Leu Leu Arg Asp Leu Gly His Tyr Met Arg Thr Leu Lys Ala 760 765 770	2420
glt cat tca ggt gca gat ctt gag tct gct att gca aac tgc atg ggc Val His Ser Gly Ala Asp Leu Glu Ser Ala Ile Ala Asn Cys Met Gly 775 780 785	2468
tac aaa act gag gga gaa ggc ttt atg gtt gga gtc cag ata aat cct Tyr Lys Thr Glu Gly Glu Gly Phe Met Val Gly Val Gln Ile Asn Pro 790 795 800	2516
gta tca ggc ttg cca tct ggc ttt cag gac ctc ctc cat ttt gtc tta Val Ser Gly Leu Pro Ser Gly Phe Gln Asp Leu Leu His Phe Val Leu 805 810 815 820	2564
gac cat gtg gaa gat aaa aat gtg gaa act ctt ctt gag aga ttg cta Asp His Val Glu Asp Lys Asn Val Glu Thr Leu Leu Glu Arg Leu Leu	2612

[0006]

825	830	835	
gag gct cgt gag gag ctt agg ccc ttg ctt ctc aaa cca aac aac cgt			2660
Glu Ala Arg Glu Glu Leu Arg Pro Leu Leu Leu Lys Pro Asn Asn Arg			
840	845	850	
cta aag gat ctg ctg ttt ttg gac ata gca ctt gat tct aca gtt aga			2708
Leu Lys Asp Leu Leu Phe Leu Asp Ile Ala Leu Asp Ser Thr Val Arg			
855	860	865	
aca gca gta gaa agg gga tat gaa gaa ttg aac aac gct aat cct gag			2756
Thr Ala Val Glu Arg Gly Tyr Glu Glu Leu Asn Asn Ala Asn Pro Glu			
870	875	880	
aaa atc atg tac ttc atc tcc ctc gtt ctt gaa aat ctc gca ctc tct			2804
Lys Ile Met Tyr Phe Ile Ser Leu Val Leu Glu Asn Leu Ala Leu Ser			
885	890	895	900
gtg gac gat aat gaa gat ctt gtt tat tgc ttg aag gga tgg aat caa			2852
Val Asp Asp Asn Glu Asp Leu Val Tyr Cys Leu Lys Gly Trp Asn Gln			
905	910	915	
gct ctt tca atg tcc aat ggt ggg gac aac cat tgg gct tta ttt gca			2900
Ala Leu Ser Met Ser Asn Gly Gly Asp Asn His Trp Ala Leu Phe Ala			
920	925	930	
aaa gct gtg ctt gac aga acc cgt ctt gca ctt gca agc aag gca gag			2948
Lys Ala Val Leu Asp Arg Thr Arg Leu Ala Leu Ala Ser Lys Ala Glu			
935	940	945	
tgg tac cat cac tta ttg cag cca tct gcc gaa tat cta gga tca ata			2996
Trp Tyr His His Leu Leu Gln Pro Ser Ala Glu Tyr Leu Gly Ser Ile			
950	955	960	
ctt ggg gtg gac caa tgg gct ttg aac ata ttt act gaa gaa att ata			3044
Leu Gly Val Asp Gln Trp Ala Leu Asn Ile Phe Thr Glu Glu Ile Ile			
965	970	975	980
cgt gct gga tca gca gct tca tta tcc tct ctt ctt aat aga ctc gat			3092
Arg Ala Gly Ser Ala Ala Ser Leu Ser Ser Leu Leu Asn Arg Leu Asp			
985	990	995	
ccc gtg ctt cgg aaa act gca aat cta gga agt tgg cag att atc			3137
Pro Val Leu Arg Lys Thr Ala Asn Leu Gly Ser Trp Gln Ile Ile			
1000	1005	1010	
agt cca gtt gaa gcc gtt gga tat gtt gtc gtt gtg gat gag ttg			3182
Ser Pro Val Glu Ala Val Gly Tyr Val Val Val Val Asp Glu Leu			
1015	1020	1025	

[0007]

ctt tca gtt cag aat gaa atc tac gag aag ccc acg atc tta gta	3227
Leu Ser Val Gln Asn Glu Ile Tyr Glu Lys Pro Thr Ile Leu Val	
1030 1035 1040	
gca aaa tct gtt aaa gga gag gag gaa att cct gat ggt gct gtt	3272
Ala Lys Ser Val Lys Gly Glu Glu Glu Ile Pro Asp Gly Ala Val	
1045 1050 1055	
gcc ctg ata aca cca gac atg cca gat gtt ctt tca cat gtt tct	3317
Ala Leu Ile Thr Pro Asp Met Pro Asp Val Leu Ser His Val Ser	
1060 1065 1070	
gtt cga gct aga aat ggg aag gtt tgc ttt gct aca tgc ttt gat	3362
Val Arg Ala Arg Asn Gly Lys Val Cys Phe Ala Thr Cys Phe Asp	
1075 1080 1085	
ccc aat ata ttg gct gac ctc caa gca aag gaa gga agg att ttg	3407
Pro Asn Ile Leu Ala Asp Leu Gln Ala Lys Glu Gly Arg Ile Leu	
1090 1095 1100	
ctc tta aag cct aca cct tca gac ata atc tat agt gag gtg aat	3452
Leu Leu Lys Pro Thr Pro Ser Asp Ile Ile Tyr Ser Glu Val Asn	
1105 1110 1115	
gag att gag ctc caa agt tca agt aac ttg gta gaa gct gaa act	3497
Glu Ile Glu Leu Gln Ser Ser Ser Asn Leu Val Glu Ala Glu Thr	
1120 1125 1130	
tca gca aca ctt aga ttg gtg aaa aag caa ttt ggt ggt tgt tac	3542
Ser Ala Thr Leu Arg Leu Val Lys Lys Gln Phe Gly Gly Cys Tyr	
1135 1140 1145	
gca ata tca gca gat gaa ttc aca agt gaa atg gtt gga gct aaa	3587
Ala Ile Ser Ala Asp Glu Phe Thr Ser Glu Met Val Gly Ala Lys	
1150 1155 1160	
tca cgt aat att gca tat ctg aaa gga aaa gtg cct tcc tcg gtg	3632
Ser Arg Asn Ile Ala Tyr Leu Lys Gly Lys Val Pro Ser Ser Val	
1165 1170 1175	
gga att cct acg tca gta gct ctt cca ttt gga gtc ttt gag aaa	3677
Gly Ile Pro Thr Ser Val Ala Leu Pro Phe Gly Val Phe Glu Lys	
1180 1185 1190	
gta ctt tca gac gac ata aat cag gga gtg gca aaa gag ttg caa	3722
Val Leu Ser Asp Asp Ile Asn Gln Gly Val Ala Lys Glu Leu Gln	
1195 1200 1205	
att ctg atg aaa aaa cta tct gaa gga gac ttc agc gct ctt ggt	3767
Ile Leu Met Lys Lys Leu Ser Glu Gly Asp Phe Ser Ala Leu Gly	

[0008]

1210	1215	1220	
gaa att cgc aca acg gtt tta gat ctt tca gca cca gct caa ttg			3812
Glu Ile Arg Thr Thr Val Leu Asp Leu Ser Ala Pro Ala Gln Leu			
1225	1230	1235	
gtc aaa gag ctg aag gag aag atg cag ggt tct ggc atg cct tgg			3857
Val Lys Glu Leu Lys Glu Lys Met Gln Gly Ser Gly Met Pro Trp			
1240	1245	1250	
cct ggt gat gaa ggt cca aag cgg tgg gaa caa gca tgg atg gcc			3902
Pro Gly Asp Glu Gly Pro Lys Arg Trp Glu Gln Ala Trp Met Ala			
1255	1260	1265	
ata aaa aag gtg tgg gct tca aaa tgg aat gag aga gca tac ttc			3947
Ile Lys Lys Val Trp Ala Ser Lys Trp Asn Glu Arg Ala Tyr Phe			
1270	1275	1280	
agc aca agg aag gtg aaa ctg gat cat gac tat ctg tgc atg gct			3992
Ser Thr Arg Lys Val Lys Leu Asp His Asp Tyr Leu Cys Met Ala			
1285	1290	1295	
gtc ctt gtt caa gaa ata ata aat gct gat tat gca ttt gtc att			4037
Val Leu Val Gln Glu Ile Ile Asn Ala Asp Tyr Ala Phe Val Ile			
1300	1305	1310	
cac aca acc aac cca tct tcc gga gac gac tca gaa ata tat gcc			4082
His Thr Thr Asn Pro Ser Ser Gly Asp Asp Ser Glu Ile Tyr Ala			
1315	1320	1325	
gag gtc gtc agg ggc ctt ggg gaa aca ctt gtt gga gct tat cca			4127
Glu Val Val Arg Gly Leu Gly Glu Thr Leu Val Gly Ala Tyr Pro			
1330	1335	1340	
gga cgt gct ttg agt ttt atc tgc aag aaa aag gat ctc aac tct			4172
Gly Arg Ala Leu Ser Phe Ile Cys Lys Lys Lys Asp Leu Asn Ser			
1345	1350	1355	
cct caa gtg tta ggt tac cca agc aaa ccg atc ggc ctt ttc ata			4217
Pro Gln Val Leu Gly Tyr Pro Ser Lys Pro Ile Gly Leu Phe Ile			
1360	1365	1370	
aaa aga tct atc atc ttc cga tct gat tcc aat ggg gaa gat ttg			4262
Lys Arg Ser Ile Ile Phe Arg Ser Asp Ser Asn Gly Glu Asp Leu			
1375	1380	1385	
gaa ggt tat gcc ggt gct ggc ctc tac gac agt gta cca atg gat			4307
Glu Gly Tyr Ala Gly Ala Gly Leu Tyr Asp Ser Val Pro Met Asp			
1390	1395	1400	

[0009]

gag gag gaa aaa gtt gta att gat tac tct tcc gac cca ttg ata	4352
Glu Glu Glu Lys Val Val Ile Asp Tyr Ser Ser Asp Pro Leu Ile	
1405 1410 1415	
act gat ggt aac ttc cgc cag aca atc ctg tcc aac att gct cgt	4397
Thr Asp Gly Asn Phe Arg Gln Thr Ile Leu Ser Asn Ile Ala Arg	
1420 1425 1430	
gct gga cat gct atc gag gag cta tat ggc tct cct caa gac att	4442
Ala Gly His Ala Ile Glu Glu Leu Tyr Gly Ser Pro Gln Asp Ile	
1435 1440 1445	
gag ggt gta gtg agg gat gga aag att tat gtc gtt cag aca aga	4487
Glu Gly Val Val Arg Asp Gly Lys Ile Tyr Val Val Gln Thr Arg	
1450 1455 1460	
cca cag atg tga ttatattctc gtigtatgtt gticagagaa gaccacagat	4539
Pro Gln Met	
gigatcatat tctcattgta tcagatctgt gaccacttac ctgatacctc ccatgaagtt	4599
acctglatga ttatacgtga tccaaagcca tcacatcatg ttcaccttca gctattggag	4659
gagaagtgag aagtaggaat tgcaatatga ggaataataa gaaaaacttt gtaaaagcta	4719
aattagctgg gtaigatata gggagaaatg tgtaaacatt gtactatata tagtatatac	4779
acacgcattt tgtattgcat tatgcactga ataatatcgc agcatcaaag aagaaatcct	4839
ttgggtggtt tc	4851

<210> 2

<211> 1464

<212> PRT

<213> 马铃薯

<400> 2

Met Ser Asn Ser Leu Gly Asn Asn Leu Leu Tyr Gln Gly Phe Leu Thr
1 5 10 15

Ser Thr Val Leu Glu His Lys Ser Arg Ile Ser Pro Pro Cys Val Gly
20 25 30

Gly Asn Ser Leu Phe Gln Gln Gln Val Ile Ser Lys Ser Pro Leu Ser
35 40 45

[0010]

Thr Glu Phe Arg Gly Asn Arg Leu Lys Val Gln Lys Lys Lys Ile Pro
50 55 60

Met Glu Lys Lys Arg Ala Phe Ser Ser Ser Pro His Ala Val Leu Thr
65 70 75 80

Thr Asp Thr Ser Ser Glu Leu Ala Glu Lys Phe Ser Leu Gly Gly Asn
85 90 95

Ile Glu Leu Gln Val Asp Val Arg Pro Pro Thr Ser Gly Asp Val Ser
100 105 110

Phe Val Asp Phe Gln Val Thr Asn Gly Ser Asp Lys Leu Phe Leu His
115 120 125

Trp Gly Ala Val Lys Phe Gly Lys Glu Thr Trp Ser Leu Pro Asn Asp
130 135 140

Arg Pro Asp Gly Thr Lys Val Tyr Lys Asn Lys Ala Leu Arg Thr Pro
145 150 155 160

Phe Val Lys Ser Gly Ser Asn Ser Ile Leu Arg Leu Glu Ile Arg Asp
165 170 175

Thr Ala Ile Glu Ala Ile Glu Phe Leu Ile Tyr Asp Glu Ala His Asp
180 185 190

Lys Trp Ile Lys Asn Asn Gly Gly Asn Phe Arg Val Lys Leu Ser Arg
195 200 205

Lys Glu Ile Arg Gly Pro Asp Val Ser Val Pro Glu Glu Leu Val Gln
210 215 220

Ile Gln Ser Tyr Leu Arg Trp Glu Arg Lys Gly Lys Gln Asn Tyr Pro
225 230 235 240

[0011]

Pro Glu Lys Glu Lys Glu Glu Tyr Glu Ala Ala Arg Thr Val Leu Gln
245 250 255

Glu Glu Ile Ala Arg Gly Ala Ser Ile Gln Asp Ile Arg Ala Arg Leu
260 265 270

Thr Lys Thr Asn Asp Lys Ser Gln Ser Lys Glu Glu Pro Leu His Val
275 280 285

Thr Lys Ser Asp Ile Pro Asp Asp Leu Ala Gln Ala Gln Ala Tyr Ile
290 295 300

Arg Trp Glu Lys Ala Gly Lys Pro Asn Tyr Pro Pro Glu Lys Gln Ile
305 310 315 320

Glu Glu Leu Glu Glu Ala Arg Arg Glu Leu Gln Leu Glu Leu Glu Lys
325 330 335

Gly Ile Thr Leu Asp Glu Leu Arg Lys Thr Ile Thr Lys Gly Glu Ile
340 345 350

Lys Thr Lys Val Glu Lys His Leu Lys Arg Ser Ser Phe Ala Val Glu
355 360 365

Arg Ile Gln Arg Lys Lys Arg Asp Phe Gly His Leu Ile Asn Lys Tyr
370 375 380

Thr Ser Ser Pro Ala Val Gln Val Gln Lys Val Leu Glu Glu Pro Pro
385 390 395 400

Ala Leu Ser Lys Ile Lys Leu Tyr Ala Lys Glu Lys Glu Glu Gln Ile
405 410 415

Asp Asp Pro Ile Leu Asn Lys Lys Ile Phe Lys Val Asp Asp Gly Glu
420 425 430

Leu Leu Val Leu Val Ala Lys Ser Ser Gly Lys Thr Lys Val His Leu
435 440 445

[0012]

Ala Thr Asp Leu Asn Gln Pro Ile Thr Leu His Trp Ala Leu Ser Lys
450 455 460

Ser Pro Gly Glu Trp Met Val Pro Pro Ser Ser Ile Leu Pro Pro Gly
465 470 475 480

Ser Ile Ile Leu Asp Lys Ala Ala Glu Thr Pro Phe Ser Ala Ser Ser
485 490 495

Ser Asp Gly Leu Thr Ser Lys Val Gln Ser Leu Asp Ile Val Ile Glu
500 505 510

Asp Gly Asn Phe Val Gly Met Pro Phe Val Leu Leu Ser Gly Glu Lys
515 520 525

Trp Ile Lys Asn Gln Gly Ser Asp Phe Tyr Val Gly Phe Ser Ala Ala
530 535 540

Ser Lys Leu Ala Leu Lys Ala Ala Gly Asp Gly Ser Gly Thr Ala Lys
545 550 555 560

Ser Leu Leu Asp Lys Ile Ala Asp Met Glu Ser Glu Ala Gln Lys Ser
565 570 575

Phe Met His Arg Phe Asn Ile Ala Ala Asp Leu Ile Glu Asp Ala Thr
580 585 590

Ser Ala Gly Glu Leu Gly Phe Ala Gly Ile Leu Val Trp Met Arg Phe
595 600 605

Met Ala Thr Arg Gln Leu Ile Trp Asn Lys Asn Tyr Asn Val Lys Pro
610 615 620

Arg Glu Ile Ser Lys Ala Gln Asp Arg Leu Thr Asp Leu Leu Gln Asn
625 630 635 640

[0013]

Ala	Phe	Thr	Ser	His	Pro	Gln	Tyr	Arg	Glu	Ile	Leu	Arg	Met	Ile	Met
				645					650					655	
Ser	Thr	Val	Gly	Arg	Gly	Gly	Glu	Gly	Asp	Val	Gly	Gln	Arg	Ile	Arg
			660					665					670		
Asp	Glu	Ile	Leu	Val	Ile	Gln	Arg	Asn	Asn	Asp	Cys	Lys	Gly	Gly	Met
			675				680						685		
Met	Gln	Glu	Trp	His	Gln	Lys	Leu	His	Asn	Asn	Thr	Ser	Pro	Asp	Asp
			690				695					700			
Val	Val	Ile	Cys	Gln	Ala	Leu	Ile	Asp	Tyr	Ile	Lys	Ser	Asp	Phe	Asp
	705					710					715				720
Leu	Gly	Val	Tyr	Trp	Lys	Thr	Leu	Asn	Glu	Asn	Gly	Ile	Thr	Lys	Glu
					725					730					735
Arg	Leu	Leu	Ser	Tyr	Asp	Arg	Ala	Ile	His	Ser	Glu	Pro	Asn	Phe	Arg
				740					745						750
Gly	Asp	Gln	Lys	Gly	Gly	Leu	Leu	Arg	Asp	Leu	Gly	His	Tyr	Met	Arg
			755					760					765		
Thr	Leu	Lys	Ala	Val	His	Ser	Gly	Ala	Asp	Leu	Glu	Ser	Ala	Ile	Ala
			770					775					780		
Asn	Cys	Met	Gly	Tyr	Lys	Thr	Glu	Gly	Glu	Gly	Phe	Met	Val	Gly	Val
	785						790				795				800
Gln	Ile	Asn	Pro	Val	Ser	Gly	Leu	Pro	Ser	Gly	Phe	Gln	Asp	Leu	Leu
				805						810					815
His	Phe	Val	Leu	Asp	His	Val	Glu	Asp	Lys	Asn	Val	Glu	Thr	Leu	Leu
				820					825					830	
Glu	Arg	Leu	Leu	Glu	Ala	Arg	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro	Leu	Leu	Leu	Lys
				835					840						845

[0014]

Pro Asn Asn Arg Leu Lys Asp Leu Leu Phe Leu Asp Ile Ala Leu Asp
850 855 860

Ser Thr Val Arg Thr Ala Val Glu Arg Gly Tyr Glu Glu Leu Asn Asn
865 870 875 880

Ala Asn Pro Glu Lys Ile Met Tyr Phe Ile Ser Leu Val Leu Glu Asn
885 890 895

Leu Ala Leu Ser Val Asp Asp Asn Glu Asp Leu Val Tyr Cys Leu Lys
900 905 910

Gly Trp Asn Gln Ala Leu Ser Met Ser Asn Gly Gly Asp Asn His Trp
915 920 925

Ala Leu Phe Ala Lys Ala Val Leu Asp Arg Thr Arg Leu Ala Leu Ala
930 935 940

Ser Lys Ala Glu Trp Tyr His His Leu Leu Gln Pro Ser Ala Glu Tyr
945 950 955 960

Leu Gly Ser Ile Leu Gly Val Asp Gln Trp Ala Leu Asn Ile Phe Thr
965 970 975

Glu Glu Ile Ile Arg Ala Gly Ser Ala Ala Ser Leu Ser Ser Leu Leu
980 985 990

Asn Arg Leu Asp Pro Val Leu Arg Lys Thr Ala Asn Leu Gly Ser Trp
995 1000 1005

Gln Ile Ile Ser Pro Val Glu Ala Val Gly Tyr Val Val Val Val
1010 1015 1020

Asp Glu Leu Leu Ser Val Gln Asn Glu Ile Tyr Glu Lys Pro Thr
1025 1030 1035

[0015]

Ile Leu Val Ala Lys Ser Val	Lys Gly Glu Glu Glu	Ile Pro Asp
1040	1045	1050
Gly Ala Val Ala Leu Ile Thr	Pro Asp Met Pro Asp	Val Leu Ser
1055	1060	1065
His Val Ser Val Arg Ala Arg	Asn Gly Lys Val Cys	Phe Ala Thr
1070	1075	1080
Cys Phe Asp Pro Asn Ile Leu	Ala Asp Leu Gln Ala	Lys Glu Gly
1085	1090	1095
Arg Ile Leu Leu Leu Lys Pro	Thr Pro Ser Asp Ile	Ile Tyr Ser
1100	1105	1110
Glu Val Asn Glu Ile Glu Leu	Gln Ser Ser Ser Asn	Leu Val Glu
1115	1120	1125
Ala Glu Thr Ser Ala Thr Leu	Arg Leu Val Lys Lys	Gln Phe Gly
1130	1135	1140
Gly Cys Tyr Ala Ile Ser Ala	Asp Glu Phe Thr Ser	Glu Met Val
1145	1150	1155
Gly Ala Lys Ser Arg Asn Ile	Ala Tyr Leu Lys Gly	Lys Val Pro
1160	1165	1170
Ser Ser Val Gly Ile Pro Thr	Ser Val Ala Leu Pro	Phe Gly Val
1175	1180	1185
Phe Glu Lys Val Leu Ser Asp	Asp Ile Asn Gln Gly	Val Ala Lys
1190	1195	1200
Glu Leu Gln Ile Leu Met Lys	Lys Leu Ser Glu Gly	Asp Phe Ser
1205	1210	1215
Ala Leu Gly Glu Ile Arg Thr	Thr Val Leu Asp Leu	Ser Ala Pro
1220	1225	1230

[0016]

Ala Gln	Leu Val	Lys Glu	Leu Lys	Glu Lys	Met Gln	Gly Ser	Gly
1235			1240			1245	
Met Pro	Trp Pro	Gly Asp	Glu Gly	Pro Lys	Arg Trp	Glu Gln	Ala
1250			1255			1260	
Trp Met	Ala Ile	Lys Lys	Val Trp	Ala Ser	Lys Trp	Asn Glu	Arg
1265			1270			1275	
Ala Tyr	Phe Ser	Thr Arg	Lys Val	Lys Leu	Asp His	Asp Tyr	Leu
1280			1285			1290	
Cys Met	Ala Val	Leu Val	Gln Glu	Ile Ile	Asn Ala	Asp Tyr	Ala
1295			1300			1305	
Phe Val	Ile His	Thr Thr	Asn Pro	Ser Ser	Gly Asp	Asp Ser	Glu
1310			1315			1320	
Ile Tyr	Ala Glu	Val Val	Arg Gly	Leu Gly	Glu Thr	Leu Val	Gly
1325			1330			1335	
Ala Tyr	Pro Gly	Arg Ala	Leu Ser	Phe Ile	Cys Lys	Lys Lys	Asp
1340			1345			1350	
Leu Asn	Ser Pro	Gln Val	Leu Gly	Tyr Pro	Ser Lys	Pro Ile	Gly
1355			1360			1365	
Leu Phe	Ile Lys	Arg Ser	Ile Ile	Phe Arg	Ser Asp	Ser Asn	Gly
1370			1375			1380	
Glu Asp	Leu Glu	Gly Tyr	Ala Gly	Ala Gly	Leu Tyr	Asp Ser	Val
1385			1390			1395	
Pro Met	Asp Glu	Glu Glu	Lys Val	Val Ile	Asp Tyr	Ser Ser	Asp
1400			1405			1410	

[0017]

Pro Leu Ile Thr Asp Gly Asn Phe Arg Gln Thr Ile Leu Ser Asn
1415 1420 1425

Ile Ala Arg Ala Gly His Ala Ile Glu Glu Leu Tyr Gly Ser Pro
1430 1435 1440

Gln Asp Ile Glu Gly Val Val Arg Asp Gly Lys Ile Tyr Val Val
1445 1450 1455

Gln Thr Arg Pro Gln Met
1460

<210> 3
<211> 3000
<212> DNA
<213> 普通小麦 (Triticum aestivum)

<220>
<221> CDS
<222> (227)..(2623)

<400> 3
ctccaccgcg gtggcgcccg ctctagaact agtggatccc ccgggctgca ggaattcggc 60
acgagcttcg gcctgacccc gttcgtttac cccacacag agcacactcc agtcagttcc 120
agcccactgc caccgcgcta ctctccactc ccactgccac cacctccgcc tgcgccgcgc 180
tcggggcgga ccaaccgcg aaccgtacca tctcccgccc cgatcc atg tcg tcg 235
Met Ser Ser
1
gcg gtc gcg tcc gcc gca tcc ttc ctc gcg ctc gcg tca gcc tcc ccc 283
Ala Val Ala Ser Ala Ala Ser Phe Leu Ala Leu Ala Ser Ala Ser Pro
5 10 15
ggg aga tca cgc agg cgg gcg agg gtg agc gcg cag cca ccc cac gcc 331
Gly Arg Ser Arg Arg Arg Ala Arg Val Ser Ala Gln Pro Pro His Ala
20 25 30 35
ggg gcc ggc agg ttg cac tgg ccg ccg tgg ccg ccg cag cgc acg gct 379
Gly Ala Gly Arg Leu His Trp Pro Pro Trp Pro Pro Gln Arg Thr Ala
40 45 50
cgc gac gga gct gtg gcg gcg ctc gcc gcc ggg aag aag gac gcg ggg 427

[0018]

Arg Asp Gly Ala Val Ala Ala Leu Ala Ala Gly Lys Lys Asp Ala Gly	
55 60 65	
atc gac gac gcc gcc gcg tcc gtg agg cag ccc cgc gca ctc cgc ggt	475
Ile Asp Asp Ala Ala Ala Ser Val Arg Gln Pro Arg Ala Leu Arg Gly	
70 75 80	
ggc gcc gcc acc aag gtc gcg gag cga agg gat ccc gtc aag acg ctc	523
Gly Ala Ala Thr Lys Val Ala Glu Arg Arg Asp Pro Val Lys Thr Leu	
85 90 95	
gac cgc gac gcc gcg gaa ggc ggc ggg ccg tcc ccg ccg gca gcg agg	571
Asp Arg Asp Ala Ala Glu Gly Gly Gly Pro Ser Pro Pro Ala Ala Arg	
100 105 110 115	
cag gac gcc gcc cgt ccg ccg agt atg aac ggc atg ccg gtg aac ggc	619
Gln Asp Ala Ala Arg Pro Pro Ser Met Asn Gly Met Pro Val Asn Gly	
120 125 130	
gag aac aaa tct acc ggc ggc ggc ggc gcg act aaa gac agc ggg ctg	667
Glu Asn Lys Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ala Thr Lys Asp Ser Gly Leu	
135 140 145	
ccc acg ccc gca cgc gcg ccc cat ccg tcc acc cag aac aga gca ccg	715
Pro Thr Pro Ala Arg Ala Pro His Pro Ser Thr Gln Asn Arg Ala Pro	
150 155 160	
gtg aac ggt gaa aac aaa gct aac gtc gcc tcc ccg ccg acg agc ata	763
Val Asn Gly Glu Asn Lys Ala Asn Val Ala Ser Pro Pro Thr Ser Ile	
165 170 175	
gcc gag gcc gcg gct tcc gat tcc gca gct acc att tcc atc agc gac	811
Ala Glu Ala Ala Ala Ser Asp Ser Ala Ala Thr Ile Ser Ile Ser Asp	
180 185 190 195	
aag gcg ccg gag tcc gtt gtc cca gct gag aag acg ccg ccg tcc tcc	859
Lys Ala Pro Glu Ser Val Val Pro Ala Glu Lys Thr Pro Pro Ser Ser	
200 205 210	
ggc tca aat ttc gag tcc tcc gcc tct gct ccc ggg tct gac act gtc	907
Gly Ser Asn Phe Glu Ser Ser Ala Ser Ala Pro Gly Ser Asp Thr Val	
215 220 225	
agc gac gtg gaa caa gaa ctg aag aag ggt gcg gtc gtt gtc gaa gaa	955
Ser Asp Val Glu Gln Glu Leu Lys Lys Gly Ala Val Val Val Glu Glu	
230 235 240	
gct cca aag cca aag gct ctt tcc ccg cct gca gcc ccc gct gta caa	1003
Ala Pro Lys Pro Lys Ala Leu Ser Pro Pro Ala Ala Pro Ala Val Gln	
245 250 255	

[0019]

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

[0020]

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

[0021]

cag cac ttc gag cgg gag cac cac gac aag gtg cgc ggg tgg gtg ggg Gln His Phe Glu Arg Glu His His Asp Lys Val Arg Gly Trp Val Gly 660 665 670 675	2251
ttc tcc gtg cgc ctg gcg cac cgg atc acg gcg ggg gcg gac gcg ctc Phe Ser Val Arg Leu Ala His Arg Ile Thr Ala Gly Ala Asp Ala Leu 680 685 690	2299
ctc atg ccc tcc cgg ttc gag ccg tgc ggg ctg aac cag ctc tac gcc Leu Met Pro Ser Arg Phe Glu Pro Cys Gly Leu Asn Gln Leu Tyr Ala 695 700 705	2347
atg gcc tac ggc acc gtc ccc gtc gtg cac gcc gtc ggc ggc ctc agg Met Ala Tyr Gly Thr Val Pro Val Val His Ala Val Gly Gly Leu Arg 710 715 720	2395
gac acc gtg ccg ccg ttc gac ccc ttc aac cac tcc ggg ctc ggg tgg Asp Thr Val Pro Pro Phe Asp Pro Phe Asn His Ser Gly Leu Gly Trp 725 730 735	2443
acg ttc gac cgc gcc gag gcg cac aag ctg atc gag gcg ctc ggg cac Thr Phe Asp Arg Ala Glu Ala His Lys Leu Ile Glu Ala Leu Gly His 740 745 750 755	2491
tgc ctc cgc acc tac cga gac ttc aag gag agc tgg agg gcc ctc cag Cys Leu Arg Thr Tyr Arg Asp Phe Lys Glu Ser Trp Arg Ala Leu Gln 760 765 770	2539
gag cgc ggc atg tgc cag gac ttc agc tgg gag cac gcc gcc aag ctc Glu Arg Gly Met Ser Gln Asp Phe Ser Trp Glu His Ala Ala Lys Leu 775 780 785	2587
tac gag gac gtc ctc gtc aag gcc aag tac cag tgg tgaacgctag Tyr Glu Asp Val Leu Val Lys Ala Lys Tyr Gln Trp 790 795	2633
ctgctagccg ctccagcccc gcattgcgtgc atgacaggat ggaactgcat tgcgcacgca	2693
ggaaagtgcc atggagcgcc ggcatccgcg aaglacagtg acatgaggtg tgtgtggttg	2753
agacgctgat tccaatccgg cccgtagcag agtagagcgg aggtatatgg gaatcttaac	2813
ttggtaattgt aatttgttat gtttgtgtgca ttattacaat gttgttactt attcttgta	2873
agtcggaggc caagggcgaa agctagctca catgtctgat ggaatgcacgt gccatggttg	2933
gtttggtagc gcagtgcaaa cggcaagaat gggaagtga ttcctccctg cttgaaaaaa	2993
aaaaaaaa	3000

[0022]

<210> 4
<211> 799
<212> PRT
<213> 普通小麦

<400> 4

Met Ser Ser Ala Val Ala Ser Ala Ala Ser Phe Leu Ala Leu Ala Ser
1 5 10 15

Ala Ser Pro Gly Arg Ser Arg Arg Arg Ala Arg Val Ser Ala Gln Pro
20 25 30

Pro His Ala Gly Ala Gly Arg Leu His Trp Pro Pro Trp Pro Pro Gln
35 40 45

Arg Thr Ala Arg Asp Gly Ala Val Ala Ala Leu Ala Ala Gly Lys Lys
50 55 60

Asp Ala Gly Ile Asp Asp Ala Ala Ala Ser Val Arg Gln Pro Arg Ala
65 70 75 80

Leu Arg Gly Gly Ala Ala Thr Lys Val Ala Glu Arg Arg Asp Pro Val
85 90 95

Lys Thr Leu Asp Arg Asp Ala Ala Glu Gly Gly Gly Pro Ser Pro Pro
100 105 110

Ala Ala Arg Gln Asp Ala Ala Arg Pro Pro Ser Met Asn Gly Met Pro
115 120 125

Val Asn Gly Glu Asn Lys Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ala Thr Lys Asp
130 135 140

Ser Gly Leu Pro Thr Pro Ala Arg Ala Pro His Pro Ser Thr Gln Asn
145 150 155 160

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

[0023]

165	170	175
Thr Ser Ile Ala Glu Ala Ala Ala Ser Asp Ser Ala Ala Thr Ile Ser 180	185	190
Ile Ser Asp Lys Ala Pro Glu Ser Val Val Pro Ala Glu Lys Thr Pro 195	200	205
Pro Ser Ser Gly Ser Asn Phe Glu Ser Ser Ala Ser Ala Pro Gly Ser 210	215	220
Asp Thr Val Ser Asp Val Glu Gln Glu Leu Lys Lys Gly Ala Val Val 225	230	235 240
Val Glu Glu Ala Pro Lys Pro Lys Ala Leu Ser Pro Pro Ala Ala Pro 245	250	255
Ala Val Gln Glu Asp Leu Trp Asp Phe Lys Lys Tyr Ile Gly Phe Glu 260	265	270
Glu Pro Val Glu Ala Lys Asp Asp Gly Arg Ala Val Ala Asp Asp Ala 275	280	285
Gly Ser Phe Glu His His Gln Asn His Asp Ser Gly Pro Leu Ala Gly 290	295	300
Glu Asn Val Met Asn Val Val Val Val Ala Ala Glu Cys Ser Pro Trp 305	310	315 320
Cys Lys Thr Gly Gly Leu Gly Asp Val Ala Gly Ala Leu Pro Lys Ala 325	330	335
Leu Ala Lys Arg Gly His Arg Val Met Val Val Val Pro Arg Tyr Gly 340	345	350
Asp Tyr Glu Glu Ala Tyr Asp Val Gly Val Arg Lys Tyr Tyr Lys Ala 355	360	365

[0024]

Ala Gly Gln Asp Met Glu Val Asn Tyr Phe His Ala Tyr Ile Asp Gly			
370	375	380	
Val Asp Phe Val Phe Ile Asp Ala Pro Leu Phe Arg His Arg Gln Glu			
385	390	395	400
Asp Ile Tyr Gly Gly Ser Arg Gln Glu Ile Met Lys Arg Met Ile Leu			
	405	410	415
Phe Cys Lys Ala Ala Val Glu Val Pro Trp His Val Pro Cys Gly Gly			
	420	425	430
Val Pro Tyr Gly Asp Gly Asn Leu Val Phe Ile Ala Asn Asp Trp His			
435	440	445	
Thr Ala Leu Leu Pro Val Tyr Leu Lys Ala Tyr Tyr Arg Asp His Gly			
450	455	460	
Leu Met Gln Tyr Thr Arg Ser Ile Met Val Ile His Asn Ile Ala His			
465	470	475	480
Gln Gly Arg Gly Pro Val Asp Glu Phe Pro Phe Thr Glu Leu Pro Glu			
	485	490	495
His Tyr Leu Glu His Phe Arg Leu Tyr Asp Pro Val Gly Gly Glu His			
	500	505	510
Ala Asn Tyr Phe Ala Ala Gly Leu Lys Met Ala Asp Gln Val Val Val			
515	520	525	
Val Ser Pro Gly Tyr Leu Trp Glu Leu Lys Thr Val Glu Gly Gly Trp			
530	535	540	
Gly Leu His Asp Ile Ile Arg Gln Asn Asp Trp Lys Thr Arg Gly Ile			
545	550	555	560
Val Asn Gly Ile Asp Asn Met Glu Trp Asn Pro Glu Val Asp Ala His			

[0025]

565	570	575
Leu Lys Ser Asp Gly Tyr Thr Asn Phe Ser Leu Arg Thr Leu Asp Ser 580	585	590
Gly Lys Arg Gln Cys Lys Glu Ala Leu Gln Arg Glu Leu Gly Leu Gln 595	600	605
Val Arg Ala Asp Val Pro Leu Leu Gly Phe Ile Gly Arg Leu Asp Gly 610	615	620
Gln Lys Gly Val Glu Ile Ile Ala Asp Ala Met Pro Trp Ile Val Ser 625	630	635 640
Gln Asp Val Gln Leu Val Met Leu Gly Thr Gly Arg His Asp Leu Glu 645	650	655
Ser Met Leu Gln His Phe Glu Arg Glu His His Asp Lys Val Arg Gly 660	665	670
Trp Val Gly Phe Ser Val Arg Leu Ala His Arg Ile Thr Ala Gly Ala 675	680	685
Asp Ala Leu Leu Met Pro Ser Arg Phe Glu Pro Cys Gly Leu Asn Gln 690	695	700
Leu Tyr Ala Met Ala Tyr Gly Thr Val Pro Val Val His Ala Val Gly 705	710	715 720
Gly Leu Arg Asp Thr Val Pro Pro Phe Asp Pro Phe Asn His Ser Gly 725	730	735
Leu Gly Trp Thr Phe Asp Arg Ala Glu Ala His Lys Leu Ile Glu Ala 740	745	750
Leu Gly His Cys Leu Arg Thr Tyr Arg Asp Phe Lys Glu Ser Trp Arg 755	760	765

[0026]

Ala Leu Gln Glu Arg Gly Met Ser Gln Asp Phe Ser Trp Glu His Ala
770 775 780

Ala Lys Leu Tyr Glu Asp Val Leu Val Lys Ala Lys Tyr Gln Trp
785 790 795

<210> 5

<211> 2433

<212> DNA

<213> 稻 (Oryza sativa)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2430)

<400> 5

atg tct agc gcg gtg gtt gcg tcc agc aca act ttt ctc gtc gca ctt 48
Met Ser Ser Ala Val Val Ala Ser Ser Thr Thr Phe Leu Val Ala Leu
1 5 10 15

gcc tct agc gcg agc cgg ggc ggg cca cgt agg ggg cgc gtc gtg ggc 96
Ala Ser Ser Ala Ser Arg Gly Gly Pro Arg Arg Gly Arg Val Val Gly
20 25 30

gtg gcc gct ccc cca gcc ctc ctg tat gac ggg aga gct ggc agg cta 144
Val Ala Ala Pro Pro Ala Leu Leu Tyr Asp Gly Arg Ala Gly Arg Leu
35 40 45

gcc ctg cgc gcc cct ccg cca ccc cgc cct aga cct agg cgc agg gat 192
Ala Leu Arg Ala Pro Pro Pro Pro Arg Pro Arg Pro Arg Arg Arg Asp
50 55 60

gcg ggt gtt gtc agg cgg gct gat gac ggg gag aac gag gcc gca gtg 240
Ala Gly Val Val Arg Arg Ala Asp Asp Gly Glu Asn Glu Ala Ala Val
65 70 75 80

gag cgg gcc ggc gag gac gat gac gag gag gag gag ttc tcg tcc ggg 288
Glu Arg Ala Gly Glu Asp Asp Asp Glu Glu Glu Glu Phe Ser Ser Gly
85 90 95

gcc tgg cag cca ccg cgt tca agg cgc ggt gga gtt ggc aag gtc ctc 336
Ala Trp Gln Pro Pro Arg Ser Arg Arg Gly Gly Val Gly Lys Val Leu
100 105 110

aaa cgt cgc ggt acc gtg ccg cca gtc gga agg tac ggc tcc ggt gga 384
Lys Arg Arg Gly Thr Val Pro Pro Val Gly Arg Tyr Gly Ser Gly Gly

[0027]

115	120	125	
gac gcc gct cgg gtg aga gga gcc gcg gca ccc gct cca gca ccg acg Asp Ala Ala Arg Val Arg Gly Ala Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pro Thr 130	135	140	432
caa gac gca gcg tcg tct aag aat ggc gcg ctt ttg tca ggc agg gat Gln Asp Ala Ala Ser Ser Lys Asn Gly Ala Leu Leu Ser Gly Arg Asp 145	150	155	480
gac gac aca cct gcc tca cgg aac gga tcg gtc gtt acc ggc gcc gac Asp Asp Thr Pro Ala Ser Arg Asn Gly Ser Val Val Thr Gly Ala Asp 165	170	175	528
aag cct gcc gcc gcc acg ccg ccg gtg acc ata acg aag ctc cca gcg Lys Pro Ala Ala Ala Thr Pro Pro Val Thr Ile Thr Lys Leu Pro Ala 180	185	190	576
ccg gac tcc ccc gtg atc ctt cca tcc gta gac aag ccg cag ccg gag Pro Asp Ser Pro Val Ile Leu Pro Ser Val Asp Lys Pro Gln Pro Glu 195	200	205	624
ttc gtc atc cca gac gcg acg gcg ccg gcg ccg cca ccg ccc ggt tca Phe Val Ile Pro Asp Ala Thr Ala Pro Ala Pro Pro Pro Pro Gly Ser 210	215	220	672
aat ccc agg tcg tcc gct cct ctc ccc aag cct gac aat tcg gaa ttt Asn Pro Arg Ser Ser Ala Pro Leu Pro Lys Pro Asp Asn Ser Glu Phe 225	230	235	720
gca gag gat aag agc gca aaa gtt gtt gag agt gct ccg aag cca aag Ala Glu Asp Lys Ser Ala Lys Val Val Glu Ser Ala Pro Lys Pro Lys 245	250	255	768
ggc act aga tct tcc cct att cct gcg gta gaa gag gag acg tgg gat Ala Thr Arg Ser Ser Pro Ile Pro Ala Val Glu Glu Glu Thr Trp Asp 260	265	270	816
ttc aag aaa tat ttt gat ctg aac gaa ccg gac gcc gcg gag gat ggc Phe Lys Lys Tyr Phe Asp Leu Asn Glu Pro Asp Ala Ala Glu Asp Gly 275	280	285	864
gat gac gat gat gac tgg gct gat tca gat gcg tca gat tct gag atc Asp Asp Asp Asp Asp Trp Ala Asp Ser Asp Ala Ser Asp Ser Glu Ile 290	295	300	912
gac cag gat gac gat tcg ggt cct ttg gct ggg gag aat gtc atg aac Asp Gln Asp Asp Asp Ser Gly Pro Leu Ala Gly Glu Asn Val Met Asn 305	310	315	960
		320	

[0028]

gtg atc gtg gtg gct gct gaa tgt tct ccc tgg tgc aaa aca ggt ggg Val Ile Val Val Ala Ala Glu Cys Ser Pro Trp Cys Lys Thr Gly Gly 325 330 335	1008
ctt gga gat gtt gca ggt gct tta ccc aag gct ttg gcg agg aga gga Leu Gly Asp Val Ala Gly Ala Leu Pro Lys Ala Leu Ala Arg Arg Gly 340 345 350	1056
cat cgt gtt atg gtt gtc gta cca agg tac ggt gat tac gcg gaa gcc His Arg Val Met Val Val Val Pro Arg Tyr Gly Asp Tyr Ala Glu Ala 355 360 365	1104
cag gat gta gga atc agg aaa tac tac aag gct gct gga cag gat ctg Gln Asp Val Gly Ile Arg Lys Tyr Tyr Lys Ala Ala Gly Gln Asp Leu 370 375 380	1152
gaa gtg aaa tat ttc cat gca ttt atc gac gga gtt gat ttt gtg ttc Glu Val Lys Tyr Phe His Ala Phe Ile Asp Gly Val Asp Phe Val Phe 385 390 395 400	1200
att gac gct cct ctc ttc cgt cac cgt cag gat gac atc tat ggg ggg Ile Asp Ala Pro Leu Phe Arg His Arg Gln Asp Asp Ile Tyr Gly Gly 405 410 415	1248
aac aga cag gaa atc atg aag cgc atg att ctg ttt tgt aag gct gct Asn Arg Gln Glu Ile Met Lys Arg Met Ile Leu Phe Cys Lys Ala Ala 420 425 430	1296
gtt gag gtt cct tgg cac gtt cca tgc ggt ggt gtg ccc tat ggg gat Val Glu Val Pro Trp His Val Pro Cys Gly Gly Val Pro Tyr Gly Asp 435 440 445	1344
ggc aac ttg gtg ttc ctt gca aac gat tgg cac act gca ctc ctg cct Gly Asn Leu Val Phe Leu Ala Asn Asp Trp His Thr Ala Leu Leu Pro 450 455 460	1392
glt tat ctg aag gca tat tac aga gac aat ggc atg atg cag tac act Val Tyr Leu Lys Ala Tyr Tyr Arg Asp Asn Gly Met Met Gln Tyr Thr 465 470 475 480	1440
cgc tct gtc ctt gtg ata cat aat atc gct tac cag ggc cgt ggc cca Arg Ser Val Leu Val Ile His Asn Ile Ala Tyr Gln Gly Arg Gly Pro 485 490 495	1488
gta gat gaa ttc ccc tac atg gaa ttg ccg gag cac tac ctg gat cac Val Asp Glu Phe Pro Tyr Met Glu Leu Pro Glu His Tyr Leu Asp His 500 505 510	1536
ttc aag ctg tac gac ccc gtc ggc ggc gag cac gcc aac atc ttc ggc Phe Lys Leu Tyr Asp Pro Val Gly Gly Glu His Ala Asn Ile Phe Gly	1584

[0029]

515	520	525	
gcg ggc ctg aag atg gcg gac cgg gtg gtg acc gtg agc ccc ggc tac			1632
Ala Gly Leu Lys Met Ala Asp Arg Val Val Thr Val Ser Pro Gly Tyr			
530	535	540	
ctc tgg gag ctg aag acg acg gag ggc ggc tgg ggc ctc cac gac atc			1680
Leu Trp Glu Leu Lys Thr Thr Glu Gly Gly Trp Gly Leu His Asp Ile			
545	550	555	560
ata cgg gag aac gac tgg aag atg aac ggc atc gtg aac ggc atc gac			1728
Ile Arg Glu Asn Asp Trp Lys Met Asn Gly Ile Val Asn Gly Ile Asp			
565	570	575	
tac cgg gag tgg aac ccg gag gtg gac gtg cac ctg cag tcc gac ggc			1776
Tyr Arg Glu Trp Asn Pro Glu Val Asp Val His Leu Gln Ser Asp Gly			
580	585	590	
tac gcc aac tac acc gtg gcc tcg ctg gac tcc agc aag ccg cgg tgc			1824
Tyr Ala Asn Tyr Thr Val Ala Ser Leu Asp Ser Ser Lys Pro Arg Cys			
595	600	605	
aag gcg gcg ctg cag cgc gag ctg ggg ctg gag gtg cgc gac gac gtg			1872
Lys Ala Ala Leu Gln Arg Glu Leu Gly Leu Glu Val Arg Asp Asp Val			
610	615	620	
ccg ctg atc ggg ttc atc ggg cgg ctc gac ggg cag aaa ggt gtg gac			1920
Pro Leu Ile Gly Phe Ile Gly Arg Leu Asp Gly Gln Lys Gly Val Asp			
625	630	635	640
atc atc ggc gac gcg atg ccg tgg atc gcc ggg cag gac gtg cag ctg			1968
Ile Ile Gly Asp Ala Met Pro Trp Ile Ala Gly Gln Asp Val Gln Leu			
645	650	655	
gtg ctg ctg ggc tcc ggc cgc cgc gac ctg gag gtg atg ctg cag cgg			2016
Val Leu Leu Gly Ser Gly Arg Arg Asp Leu Glu Val Met Leu Gln Arg			
660	665	670	
ttc gag gcg cag cac aac agc aag gtg cgc ggg tgg gtg ggg ttc tcg			2064
Phe Glu Ala Gln His Asn Ser Lys Val Arg Gly Trp Val Gly Phe Ser			
675	680	685	
gtg aag atg gcg cac cgg atc acg gcg ggc gcc gac gtg ctg gtc atg			2112
Val Lys Met Ala His Arg Ile Thr Ala Gly Ala Asp Val Leu Val Met			
690	695	700	
ccg tcg cgg ttc gag ccg tgc ggc ctc aac cag ctc tac gcc atg gcg			2160
Pro Ser Arg Phe Glu Pro Cys Gly Leu Asn Gln Leu Tyr Ala Met Ala			
705	710	715	720

[0030]

tac ggc acc gtc ccc gtc gtg cac gcc gtc ggc ggg ctg agg gac acc 2208
Tyr Gly Thr Val Pro Val Val His Ala Val Gly Gly Leu Arg Asp Thr
725 730 735

gtg tgc gcg ttc gac ccg ttc gag gac acc ggc ctc ggg tgg acg ttc 2256
Val Ser Ala Phe Asp Pro Phe Glu Asp Thr Gly Leu Gly Trp Thr Phe
740 745 750

gac cgc gcc gag ccg cac aag ctc atc gag gcg ctc ggc cac tgc ctg 2304
Asp Arg Ala Glu Pro His Lys Leu Ile Glu Ala Leu Gly His Cys Leu
755 760 765

gag acg tac cgc aag tac aag gag agc tgg agg ggg ctc cag gtg cgc 2352
Glu Thr Tyr Arg Lys Tyr Lys Glu Ser Trp Arg Gly Leu Gln Val Arg
770 775 780

ggc atg tgc cag gac ctc agc tgg gac cac gcc gcc gag ctc tac gag 2400
Gly Met Ser Gln Asp Leu Ser Trp Asp His Ala Ala Glu Leu Tyr Glu
785 790 795 800

gag gtc ctt gtc aag gcc aag tac caa tgg tga 2433
Glu Val Leu Val Lys Ala Lys Tyr Gln Trp
805 810

<210> 6
<211> 810
<212> PRT
<213> 稻

<400> 6

Met Ser Ser Ala Val Val Ala Ser Ser Thr Thr Phe Leu Val Ala Leu
1 5 10 15

Ala Ser Ser Ala Ser Arg Gly Gly Pro Arg Arg Gly Arg Val Val Gly
20 25 30

Val Ala Ala Pro Pro Ala Leu Leu Tyr Asp Gly Arg Ala Gly Arg Leu
35 40 45

Ala Leu Arg Ala Pro Pro Pro Pro Arg Pro Arg Pro Arg Arg Asp
50 55 60

Ala Gly Val Val Arg Arg Ala Asp Asp Gly Glu Asn Glu Ala Ala Val
65 70 75 80

[0031]

Glu Arg Ala Gly Glu Asp Asp Asp Glu Glu Glu Glu Phe Ser Ser Gly
85 90 95

Ala Trp Gln Pro Pro Arg Ser Arg Arg Gly Gly Val Gly Lys Val Leu
100 105 110

Lys Arg Arg Gly Thr Val Pro Pro Val Gly Arg Tyr Gly Ser Gly Gly
115 120 125

Asp Ala Ala Arg Val Arg Gly Ala Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pro Thr
130 135 140

Gln Asp Ala Ala Ser Ser Lys Asn Gly Ala Leu Leu Ser Gly Arg Asp
145 150 155 160

Asp Asp Thr Pro Ala Ser Arg Asn Gly Ser Val Val Thr Gly Ala Asp
165 170 175

Lys Pro Ala Ala Ala Thr Pro Pro Val Thr Ile Thr Lys Leu Pro Ala
180 185 190

Pro Asp Ser Pro Val Ile Leu Pro Ser Val Asp Lys Pro Gln Pro Glu
195 200 205

Phe Val Ile Pro Asp Ala Thr Ala Pro Ala Pro Pro Pro Gly Ser
210 215 220

Asn Pro Arg Ser Ser Ala Pro Leu Pro Lys Pro Asp Asn Ser Glu Phe
225 230 235 240

Ala Glu Asp Lys Ser Ala Lys Val Val Glu Ser Ala Pro Lys Pro Lys
245 250 255

Ala Thr Arg Ser Ser Pro Ile Pro Ala Val Glu Glu Glu Thr Trp Asp
260 265 270

[0032]

Phe Lys Lys Tyr Phe Asp Leu Asn Glu Pro Asp Ala Ala Glu Asp Gly
275 280 285

Asp Asp Asp Asp Asp Trp Ala Asp Ser Asp Ala Ser Asp Ser Glu Ile
290 295 300

Asp Gln Asp Asp Asp Ser Gly Pro Leu Ala Gly Glu Asn Val Met Asn
305 310 315 320

Val Ile Val Val Ala Ala Glu Cys Ser Pro Trp Cys Lys Thr Gly Gly
325 330 335

Leu Gly Asp Val Ala Gly Ala Leu Pro Lys Ala Leu Ala Arg Arg Gly
340 345 350

His Arg Val Met Val Val Val Pro Arg Tyr Gly Asp Tyr Ala Glu Ala
355 360 365

Gln Asp Val Gly Ile Arg Lys Tyr Tyr Lys Ala Ala Gly Gln Asp Leu
370 375 380

Glu Val Lys Tyr Phe His Ala Phe Ile Asp Gly Val Asp Phe Val Phe
385 390 395 400

Ile Asp Ala Pro Leu Phe Arg His Arg Gln Asp Asp Ile Tyr Gly Gly
405 410 415

Asn Arg Gln Glu Ile Met Lys Arg Met Ile Leu Phe Cys Lys Ala Ala
420 425 430

Val Glu Val Pro Trp His Val Pro Cys Gly Gly Val Pro Tyr Gly Asp
435 440 445

Gly Asn Leu Val Phe Leu Ala Asn Asp Trp His Thr Ala Leu Leu Pro
450 455 460

Val Tyr Leu Lys Ala Tyr Tyr Arg Asp Asn Gly Met Met Gln Tyr Thr
465 470 475 480

[0033]

Arg Ser Val Leu Val Ile His Asn Ile Ala Tyr Gln Gly Arg Gly Pro
485 490 495

Val Asp Glu Phe Pro Tyr Met Glu Leu Pro Glu His Tyr Leu Asp His
500 505 510

Phe Lys Leu Tyr Asp Pro Val Gly Gly Glu His Ala Asn Ile Phe Gly
515 520 525

Ala Gly Leu Lys Met Ala Asp Arg Val Val Thr Val Ser Pro Gly Tyr
530 535 540

Leu Trp Glu Leu Lys Thr Thr Glu Gly Gly Trp Gly Leu His Asp Ile
545 550 555 560

Ile Arg Glu Asn Asp Trp Lys Met Asn Gly Ile Val Asn Gly Ile Asp
565 570 575

Tyr Arg Glu Trp Asn Pro Glu Val Asp Val His Leu Gln Ser Asp Gly
580 585 590

Tyr Ala Asn Tyr Thr Val Ala Ser Leu Asp Ser Ser Lys Pro Arg Cys
595 600 605

Lys Ala Ala Leu Gln Arg Glu Leu Gly Leu Glu Val Arg Asp Asp Val
610 615 620

Pro Leu Ile Gly Phe Ile Gly Arg Leu Asp Gly Gln Lys Gly Val Asp
625 630 635 640

Ile Ile Gly Asp Ala Met Pro Trp Ile Ala Gly Gln Asp Val Gln Leu
645 650 655

Val Leu Leu Gly Ser Gly Arg Arg Asp Leu Glu Val Met Leu Gln Arg
660 665 670

[0034]

Phe Glu Ala Gln His Asn Ser Lys Val Arg Gly Trp Val Gly Phe Ser
675 680 685

Val Lys Met Ala His Arg Ile Thr Ala Gly Ala Asp Val Leu Val Met
690 695 700

Pro Ser Arg Phe Glu Pro Cys Gly Leu Asn Gln Leu Tyr Ala Met Ala
705 710 715 720

Tyr Gly Thr Val Pro Val Val His Ala Val Gly Gly Leu Arg Asp Thr
725 730 735

Val Ser Ala Phe Asp Pro Phe Glu Asp Thr Gly Leu Gly Trp Thr Phe
740 745 750

Asp Arg Ala Glu Pro His Lys Leu Ile Glu Ala Leu Gly His Cys Leu
755 760 765

Glu Thr Tyr Arg Lys Tyr Lys Glu Ser Trp Arg Gly Leu Gln Val Arg
770 775 780

Gly Met Ser Gln Asp Leu Ser Trp Asp His Ala Ala Glu Leu Tyr Glu
785 790 795 800

Glu Val Leu Val Lys Ala Lys Tyr Gln Trp
805 810

<210> 7
<211> 1830
<212> DNA
<213> 稻

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (1827)

<400> 7
atg tcg gct ctc acc acg tcc cag ctc gcc acc tcg gcc acc ggc ttc
Met Ser Ala Leu Thr Thr Ser Gln Leu Ala Thr Ser Ala Thr Gly Phe
1 5 10 15

48

[0035]

ggc atc gcc gac agg tgc gcg ccg tgc tgc ctg ctc cgc cac ggg ttc Gly Ile Ala Asp Arg Ser Ala Pro Ser Ser Leu Leu Arg His Gly Phe 20 25 30	96
cag ggc ctc aag ccc cgc agc ccc gcc ggc ggc gac gcg acg tgc ctc Gln Gly Leu Lys Pro Arg Ser Pro Ala Gly Gly Asp Ala Thr Ser Leu 35 40 45	144
agc gtg acg acc agc gcg cgc gcg acg ccc aag cag cag cgg tgc gtg Ser Val Thr Thr Ser Ala Arg Ala Thr Pro Lys Gln Gln Arg Ser Val 50 55 60	192
cag cgt ggc agc cgg agg ttc ccc tcc gtc gtc gtg tac gcc acc ggc Gln Arg Gly Ser Arg Arg Phe Pro Ser Val Val Val Tyr Ala Thr Gly 65 70 75 80	240
gcc ggc atg aac gtc gtg ttc gtc ggc gcc gag atg gcc ccc tgg agc Ala Gly Met Asn Val Val Phe Val Gly Ala Glu Met Ala Pro Trp Ser 85 90 95	288
aag acc ggc ggc ctc ggt gac gtc ctc ggt ggc ctc ccc cct gcc atg Lys Thr Gly Gly Leu Gly Asp Val Leu Gly Gly Leu Pro Pro Ala Met 100 105 110	336
gct gcg aat ggc cac agg gtc atg gtg atc tct cct cgg tac gac cag Ala Ala Asn Gly His Arg Val Met Val Ile Ser Pro Arg Tyr Asp Gln 115 120 125	384
tac aag gac gct tgg gat acc agc gtt gtg gct gag atc aag gtt gca Tyr Lys Asp Ala Trp Asp Thr Ser Val Val Ala Glu Ile Lys Val Ala 130 135 140	432
gac agg tac gag agg gtc agg ttt ttc cat tgc tac aag cgt gga gtc Asp Arg Tyr Glu Arg Val Arg Phe Phe His Cys Tyr Lys Arg Gly Val 145 150 155 160	480
gac cgt gtg ttc atc gac cat ccg tca ttc ctg gag aag gtt tgg gga Asp Arg Val Phe Ile Asp His Pro Ser Phe Leu Glu Lys Val Trp Gly 165 170 175	528
aag acc ggt gag aag atc tac gga cct gac act gga gtt gat tac aaa Lys Thr Gly Glu Lys Ile Tyr Gly Pro Asp Thr Gly Val Asp Tyr Lys 180 185 190	576
gac aac cag atg cgt ttc agc ctt ctt tgc cag gca gca ctc gag gct Asp Asn Gln Met Arg Phe Ser Leu Leu Cys Gln Ala Ala Leu Glu Ala 195 200 205	624
cct agg atc cta aac ctc aac aac aac cca tac ttc aaa gga act tat	672

[0036]

Pro Arg Ile Leu Asn Leu Asn Asn Asn Pro Tyr Phe Lys Gly Thr Tyr 210	215	220	
ggt gag gat gtt gtg ttc gtc tgc aac gac tgg cac act ggc cca ctg Gly Glu Asp Val Val Phe Val Cys Asn Asp Trp His Thr Gly Pro Leu 225	230	235	720
gcg agc tac ctg aag aac aac tac cag ccc aat ggc atc tac agg aat Ala Ser Tyr Leu Lys Asn Asn Tyr Gln Pro Asn Gly Ile Tyr Arg Asn 245	250	255	768
gca aag gtt gct ttc tgc atc cac aac atc tcc tac cag ggc cgt ttc Ala Lys Val Ala Phe Cys Ile His Asn Ile Ser Tyr Gln Gly Arg Phe 260	265	270	816
gct ttc gag gat tac cct gag ctg aac ctc tcc gag agg ttc agg tca Ala Phe Glu Asp Tyr Pro Glu Leu Asn Leu Ser Glu Arg Phe Arg Ser 275	280	285	864
tcc ttc gat ttc atc gac ggg tat gac acg ccg gtg gag ggc agg aag Ser Phe Asp Phe Ile Asp Gly Tyr Asp Thr Pro Val Glu Gly Arg Lys 290	295	300	912
atc aac tgg atg aag gcc gga atc ctg gaa gcc gac agg gtg ctc acc Ile Asn Trp Met Lys Ala Gly Ile Leu Glu Ala Asp Arg Val Leu Thr 305	310	315	960
gtg agc ccg tac tac gcc gag gag ctc atc tcc ggc atc gcc agg gga Val Ser Pro Tyr Tyr Ala Glu Glu Leu Ile Ser Gly Ile Ala Arg Gly 325	330	335	1008
tgc gag ctc gac aac atc atg cgg ctc acc ggc atc acc ggc atc gtc Cys Glu Leu Asp Asn Ile Met Arg Leu Thr Gly Ile Thr Gly Ile Val 340	345	350	1056
aac ggc atg gac gtc agc gag tgg gat ccc agc aag gac aag tac atc Asn Gly Met Asp Val Ser Glu Trp Asp Pro Ser Lys Asp Lys Tyr Ile 355	360	365	1104
acc gcc aag tac gac gca acc acg gca atc gag gcg aag gcg ctg aac Thr Ala Lys Tyr Asp Ala Thr Thr Ala Ile Glu Ala Lys Ala Leu Asn 370	375	380	1152
aag gag gcg ttg cag gcg gag gcg ggt ctt ccg gtc gac agg aaa atc Lys Glu Ala Leu Gln Ala Glu Ala Gly Leu Pro Val Asp Arg Lys Ile 385	390	395	1200
cca ctg atc gcg ttc atc ggc agg ctg gag gaa cag aag ggc tct gac Pro Leu Ile Ala Phe Ile Gly Arg Leu Glu Glu Gln Lys Gly Ser Asp 405	410	415	1248

[0037]

gtc atg gcc gcc gcc atc ccg gag ctc atg cag gag gac gtc cag atc Val Met Ala Ala Ala Ile Pro Glu Leu Met Gln Glu Asp Val Gln Ile 420 425 430	1296
gll ctt ctg ggt act gga aag aag aag ttc gag aag ctg ctc aag agc Val Leu Leu Gly Thr Gly Lys Lys Lys Phe Glu Lys Leu Leu Lys Ser 435 440 445	1344
aig gag gag aag tat ccg ggc aag gtg agg gcc gtg gtg aag ttc aac Met Glu Glu Lys Tyr Pro Gly Lys Val Arg Ala Val Val Lys Phe Asn 450 455 460	1392
geg ccg ctt gct cat ctc atc atg gcc gga gcc gac gtg ctc gcc gtc Ala Pro Leu Ala His Leu Ile Met Ala Gly Ala Asp Val Leu Ala Val 465 470 475 480	1440
ccc agc cgc ttc gag ccc tgt gga ctc atc cag ctg cag ggg atg aga Pro Ser Arg Phe Glu Pro Cys Gly Leu Ile Gln Leu Gln Gly Met Arg 485 490 495	1488
tac gga acg ccc tgt gct tgc gcg tcc acc ggt ggg ctc gtg gac acg Tyr Gly Thr Pro Cys Ala Cys Ala Ser Thr Gly Gly Leu Val Asp Thr 500 505 510	1536
gtc atc gaa ggc aag act ggt ttc cac atg ggc cgt ctc agc gtc gac Val Ile Glu Gly Lys Thr Gly Phe His Met Gly Arg Leu Ser Val Asp 515 520 525	1584
tgc aag gtg gtg gag cca agc gac gtg aag aag gtg gcg gcc acc ctg Cys Lys Val Val Glu Pro Ser Asp Val Lys Lys Val Ala Ala Thr Leu 530 535 540	1632
aag cgc gcc atc aag gtc gtc ggc acg ccg gcg tac gag gag atg gtc Lys Arg Ala Ile Lys Val Val Gly Thr Pro Ala Tyr Glu Glu Met Val 545 550 555 560	1680
agg aac tgc atg aac cag gac ctc tcc tgg aag ggg cct gcg aag aac Arg Asn Cys Met Asn Gln Asp Leu Ser Trp Lys Gly Pro Ala Lys Asn 565 570 575	1728
tgg gag aat gtg ctc ctg ggc ctg ggc gtc gcc ggc agc gcg ccg ggg Trp Glu Asn Val Leu Leu Gly Leu Gly Val Ala Gly Ser Ala Pro Gly 580 585 590	1776
atc gaa ggc gac gag atc gcg ccg ctc gcc aag gag aac gtg gct gct Ile Glu Gly Asp Glu Ile Ala Pro Leu Ala Lys Glu Asn Val Ala Ala 595 600 605	1824
cc1 tga	1830

[0038]

Pro

<210> 8

<211> 609

<212> PRT

<213> 稻

<400> 8

Met Ser Ala Leu Thr Thr Ser Gln Leu Ala Thr Ser Ala Thr Gly Phe
1 5 10 15

Gly Ile Ala Asp Arg Ser Ala Pro Ser Ser Leu Leu Arg His Gly Phe
20 25 30

Gln Gly Leu Lys Pro Arg Ser Pro Ala Gly Gly Asp Ala Thr Ser Leu
35 40 45

Ser Val Thr Thr Ser Ala Arg Ala Thr Pro Lys Gln Gln Arg Ser Val
50 55 60

Gln Arg Gly Ser Arg Arg Phe Pro Ser Val Val Val Tyr Ala Thr Gly
65 70 75 80

Ala Gly Met Asn Val Val Phe Val Gly Ala Glu Met Ala Pro Trp Ser
85 90 95

Lys Thr Gly Gly Leu Gly Asp Val Leu Gly Gly Leu Pro Pro Ala Met
100 105 110

Ala Ala Asn Gly His Arg Val Met Val Ile Ser Pro Arg Tyr Asp Gln
115 120 125

Tyr Lys Asp Ala Trp Asp Thr Ser Val Val Ala Glu Ile Lys Val Ala
130 135 140

Asp Arg Tyr Glu Arg Val Arg Phe Phe His Cys Tyr Lys Arg Gly Val
145 150 155 160

[0039]

Asp Arg Val Phe Ile Asp His Pro Ser Phe Leu Glu Lys Val Trp Gly
165 170 175

Lys Thr Gly Glu Lys Ile Tyr Gly Pro Asp Thr Gly Val Asp Tyr Lys
180 185 190

Asp Asn Gln Met Arg Phe Ser Leu Leu Cys Gln Ala Ala Leu Glu Ala
195 200 205

Pro Arg Ile Leu Asn Leu Asn Asn Asn Pro Tyr Phe Lys Gly Thr Tyr
210 215 220

Gly Glu Asp Val Val Phe Val Cys Asn Asp Trp His Thr Gly Pro Leu
225 230 235 240

Ala Ser Tyr Leu Lys Asn Asn Tyr Gln Pro Asn Gly Ile Tyr Arg Asn
245 250 255

Ala Lys Val Ala Phe Cys Ile His Asn Ile Ser Tyr Gln Gly Arg Phe
260 265 270

Ala Phe Glu Asp Tyr Pro Glu Leu Asn Leu Ser Glu Arg Phe Arg Ser
275 280 285

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

Ile Asn Trp Met Lys Ala Gly Ile Leu Glu Ala Asp Arg Val Leu Thr
305 310 315 320

Val Ser Pro Tyr Tyr Ala Glu Glu Leu Ile Ser Gly Ile Ala Arg Gly
325 330 335

Cys Glu Leu Asp Asn Ile Met Arg Leu Thr Gly Ile Thr Gly Ile Val
340 345 350

Asn Gly Met Asp Val Ser Glu Trp Asp Pro Ser Lys Asp Lys Tyr Ile

[0040]

355	360	365
Thr Ala Lys Tyr Asp Ala Thr Thr Ala Ile Glu Ala Lys Ala Leu Asn 370	375	380
Lys Glu Ala Leu Gln Ala Glu Ala Gly Leu Pro Val Asp Arg Lys Ile 385	390	395 400
Pro Leu Ile Ala Phe Ile Gly Arg Leu Glu Glu Gln Lys Gly Ser Asp 405	410	415
Val Met Ala Ala Ala Ile Pro Glu Leu Met Gln Glu Asp Val Gln Ile 420	425	430
Val Leu Leu Gly Thr Gly Lys Lys Lys Phe Glu Lys Leu Leu Lys Ser 435	440	445
Met Glu Glu Lys Tyr Pro Gly Lys Val Arg Ala Val Val Lys Phe Asn 450	455	460
Ala Pro Leu Ala His Leu Ile Met Ala Gly Ala Asp Val Leu Ala Val 465	470	475 480
Pro Ser Arg Phe Glu Pro Cys Gly Leu Ile Gln Leu Gln Gly Met Arg 485	490	495
Tyr Gly Thr Pro Cys Ala Cys Ala Ser Thr Gly Gly Leu Val Asp Thr 500	505	510
Val Ile Glu Gly Lys Thr Gly Phe His Met Gly Arg Leu Ser Val Asp 515	520	525
Cys Lys Val Val Glu Pro Ser Asp Val Lys Lys Val Ala Ala Thr Leu 530	535	540
Lys Arg Ala Ile Lys Val Val Gly Thr Pro Ala Tyr Glu Glu Met Val 545	550	555 560

[0041]

Arg Asn Cys Met Asn Gln Asp Leu Ser Trp Lys Gly Pro Ala Lys Asn
565 570 575

Trp Glu Asn Val Leu Leu Gly Leu Gly Val Ala Gly Ser Ala Pro Gly
580 585 590

Ile Glu Gly Asp Glu Ile Ala Pro Leu Ala Lys Glu Asn Val Ala Ala
595 600 605

Pro

<210> 9

<211> 1818

<212> DNA

<213> 普通小麦

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1815)

<400> 9

atg gcg gct ctg gtc acg tcg cag ctc gcc acc tcc ggc acc gtc ctc 48
Met Ala Ala Leu Val Thr Ser Gln Leu Ala Thr Ser Gly Thr Val Leu
1 5 10 15

ggc atc acc gac agg ttc cgg cgt gca ggt ttt cag ggt gtg agg ccc 96
Gly Ile Thr Asp Arg Phe Arg Arg Ala Gly Phe Gln Gly Val Arg Pro
20 25 30

cgg agc ccg gca gat gcg ccg ctc ggc atg agg act acc gga gcg agc 144
Arg Ser Pro Ala Asp Ala Pro Leu Gly Met Arg Thr Thr Gly Ala Ser
35 40 45

gcc gcc ccg aag caa caa agc cgg aaa gcg cac cgc ggg acc cgg cgg 192
Ala Ala Pro Lys Gln Gln Ser Arg Lys Ala His Arg Gly Thr Arg Arg
50 55 60

tgc ctc tcc atg gtg gtg cgc gcc acg ggc agc gcc ggc atg aac ctc 240
Cys Leu Ser Met Val Val Arg Ala Thr Gly Ser Ala Gly Met Asn Leu
65 70 75 80

gig ttc gtc ggc gcc gag atg gcg ccc tgg agc aag acc ggc ggc ctc 288
Val Phe Val Gly Ala Glu Met Ala Pro Trp Ser Lys Thr Gly Gly Leu

[0042]

85	90	95	
ggc gac gtc ctc ggg ggc ctc ccc cca gcc atg gcc gcc aac ggt cac			336
Gly Asp Val Leu Gly Gly Leu Pro Pro Ala Met Ala Ala Asn Gly His			
100	105	110	
cgg gtc atg gtc atc tcc ccg cgc tac gac cag tac aag gac gcc tgg			384
Arg Val Met Val Ile Ser Pro Arg Tyr Asp Gln Tyr Lys Asp Ala Trp			
115	120	125	
gac acc agc gtc gtc tcc gag atc aag gtc gcg gac gag tac gag agg			432
Asp Thr Ser Val Val Ser Glu Ile Lys Val Ala Asp Glu Tyr Glu Arg			
130	135	140	
gig agg tac ttc cac tgc tac aag cgc ggg gtg gac cgc gtg ttc gtc			480
Val Arg Tyr Phe His Cys Tyr Lys Arg Gly Val Asp Arg Val Phe Val			
145	150	155	160
gac cac ccg tgc ttc ctg gag aag gtc ccg ggc aag acc aag gag aag			528
Asp His Pro Cys Phe Leu Glu Lys Val Arg Gly Lys Thr Lys Glu Lys			
165	170	175	
atc tac ggg ccc gat gcc ggc acg gac tac gag gac aac cag cta cgc			576
Ile Tyr Gly Pro Asp Ala Gly Thr Asp Tyr Glu Asp Asn Gln Leu Arg			
180	185	190	
ttc agc ctg ctc tgc cag gca gcg ctt gag gca ccc agg atc ctc gac			624
Phe Ser Leu Leu Cys Gln Ala Ala Leu Glu Ala Pro Arg Ile Leu Asp			
195	200	205	
ctc aac aac aac cca tac ttc tcc gga ccc tac ggg gaa gac gtg gtg			672
Leu Asn Asn Asn Pro Tyr Phe Ser Gly Pro Tyr Gly Glu Asp Val Val			
210	215	220	
ttc gtg tgc aac gac tgg cac acg ggc ctt ctg gcc tgc tac ctc aag			720
Phe Val Cys Asn Asp Trp His Thr Gly Leu Leu Ala Cys Tyr Leu Lys			
225	230	235	240
agc aac tac cag tcc agt ggc atc tat agg acg gcc aag gta gcg ttc			768
Ser Asn Tyr Gln Ser Ser Gly Ile Tyr Arg Thr Ala Lys Val Ala Phe			
245	250	255	
tgc atc cac aac atc tcg tat cag ggc cgc ttc tcc ttc gac gac ttc			816
Cys Ile His Asn Ile Ser Tyr Gln Gly Arg Phe Ser Phe Asp Asp Phe			
260	265	270	
gcg cag ctc aac ctg ccc gac agg ttc aag tcg tcc ttc gac ttc atc			864
Ala Gln Leu Asn Leu Pro Asp Arg Phe Lys Ser Ser Phe Asp Phe Ile			
275	280	285	

[0043]

gac ggc tac gac aag ccg gtg gag ggg cgc aag atc aac tgg atg aag Asp Gly Tyr Asp Lys Pro Val Glu Gly Arg Lys Ile Asn Trp Met Lys 290 295 300	912
gcc ggg atc ctg cag gcc gac aag gtg ctc acg gtg agc ccc tac tac Ala Gly Ile Leu Gln Ala Asp Lys Val Leu Thr Val Ser Pro Tyr Tyr 305 310 315 320	960
gcg gag gag ctc atc tcc ggc gaa gcc agg ggc tgc gag ctc gac aac Ala Glu Glu Leu Ile Ser Gly Glu Ala Arg Gly Cys Glu Leu Asp Asn 325 330 335	1008
atc atg cgc ctc acg ggc atc acc ggc atc gtc aac ggc atg gac gtc Ile Met Arg Leu Thr Gly Ile Thr Gly Ile Val Asn Gly Met Asp Val 340 345 350	1056
agc gag tgg gac ccc gcc aag gac aag ttc ctc gcc gcc aac tac gac Ser Glu Trp Asp Pro Ala Lys Asp Lys Phe Leu Ala Ala Asn Tyr Asp 355 360 365	1104
gtc acc acc gcg ttg gag ggg aag gcg ctg aac aag gag gcg ctg cag Val Thr Thr Ala Leu Glu Gly Lys Ala Leu Asn Lys Glu Ala Leu Gln 370 375 380	1152
gcc gag gtg ggg ctg ccg gtg gac cgg aag gtg ccc ctg gtg gcc ttc Ala Glu Val Gly Leu Pro Val Asp Arg Lys Val Pro Leu Val Ala Phe 385 390 395 400	1200
atc ggc agg ctg gag gag cag aag ggc ccc gac gtg atg atc gcc gcc Ile Gly Arg Leu Glu Glu Gln Lys Gly Pro Asp Val Met Ile Ala Ala 405 410 415	1248
atc ccg gag atc ttg aag gag gag gac gtc cag atc gtt ctc ctg gcc Ile Pro Glu Ile Leu Lys Glu Glu Asp Val Gln Ile Val Leu Leu Gly 420 425 430	1296
acc ggg aag aag aag ttt gag cgg ctg ctc aag agc gtg gag gag aag Thr Gly Lys Lys Lys Phe Glu Arg Leu Leu Lys Ser Val Glu Glu Lys 435 440 445	1344
ttc ccg agc aag gtg agg gcc gtg gtc agg ttc aac gcg ccg ctg get Phe Pro Ser Lys Val Arg Ala Val Val Arg Phe Asn Ala Pro Leu Ala 450 455 460	1392
cac cag atg atg gcc ggc gcc gac gtg ctc gcc gtc acc agc cgc ttc His Gln Met Met Ala Gly Ala Asp Val Leu Ala Val Thr Ser Arg Phe 465 470 475 480	1440
gag ccc tgc ggc ctc atc cag ctc cag ggg atg cgc tac gga acg ccg Glu Pro Cys Gly Leu Ile Gln Leu Gln Gly Met Arg Tyr Gly Thr Pro	1488

[0044]

485	490	495	
tgc gcg tgc gcg tcc acc ggc ggg ctc gtc gac acg atc atg gag ggc			1536
Cys Ala Cys Ala Ser Thr Gly Gly Leu Val Asp Thr Ile Met Glu Gly			
500	505	510	
aag acc ggg ttc cac atg ggc cgc ctc agc gtc gac tgc aac gtg gtg			1584
Lys Thr Gly Phe His Met Gly Arg Leu Ser Val Asp Cys Asn Val Val			
515	520	525	
gag ccg gcc gac gtg aag aag gtg gtg acc acc ctg aag cgc gcc gtc			1632
Glu Pro Ala Asp Val Lys Lys Val Val Thr Thr Leu Lys Arg Ala Val			
530	535	540	
aag gtc gtc ggc acg cca gcc tac cat gag atg gtc aag aac tgc atg			1680
Lys Val Val Gly Thr Pro Ala Tyr His Glu Met Val Lys Asn Cys Met			
545	550	555	560
atc cag gat ctc tcc tgg aag ggg cca gcc aag aac tgg gag gac gtg			1728
Ile Gln Asp Leu Ser Trp Lys Gly Pro Ala Lys Asn Trp Glu Asp Val			
565	570	575	
ctt ctc gaa ctg ggg gtc gag ggg agc gag cca ggg gtc atc ggc gag			1776
Leu Leu Glu Leu Gly Val Glu Gly Ser Glu Pro Gly Val Ile Gly Glu			
580	585	590	
gag att gcg ccg ctc gcc atg gag aac gtc gcc gct ccc tga			1818
Glu Ile Ala Pro Leu Ala Met Glu Asn Val Ala Ala Pro			
595	600	605	
<210> 10			
<211> 605			
<212> PRT			
<213> 普通小麦			
<400> 10			
Met Ala Ala Leu Val Thr Ser Gln Leu Ala Thr Ser Gly Thr Val Leu			
1	5	10	15
Gly Ile Thr Asp Arg Phe Arg Arg Ala Gly Phe Gln Gly Val Arg Pro			
20	25	30	
Arg Ser Pro Ala Asp Ala Pro Leu Gly Met Arg Thr Thr Gly Ala Ser			
35	40	45	

[0045]

Ala Ala Pro Lys Gln Gln Ser Arg Lys Ala His Arg Gly Thr Arg Arg
50 55 60

Cys Leu Ser Met Val Val Arg Ala Thr Gly Ser Ala Gly Met Asn Leu
65 70 75 80

Val Phe Val Gly Ala Glu Met Ala Pro Trp Ser Lys Thr Gly Gly Leu
85 90 95

Gly Asp Val Leu Gly Gly Leu Pro Pro Ala Met Ala Ala Asn Gly His
100 105 110

Arg Val Met Val Ile Ser Pro Arg Tyr Asp Gln Tyr Lys Asp Ala Trp
115 120 125

Asp Thr Ser Val Val Ser Glu Ile Lys Val Ala Asp Glu Tyr Glu Arg
130 135 140

Val Arg Tyr Phe His Cys Tyr Lys Arg Gly Val Asp Arg Val Phe Val
145 150 155 160

Asp His Pro Cys Phe Leu Glu Lys Val Arg Gly Lys Thr Lys Glu Lys
165 170 175

Ile Tyr Gly Pro Asp Ala Gly Thr Asp Tyr Glu Asp Asn Gln Leu Arg
180 185 190

Phe Ser Leu Leu Cys Gln Ala Ala Leu Glu Ala Pro Arg Ile Leu Asp
195 200 205

Leu Asn Asn Asn Pro Tyr Phe Ser Gly Pro Tyr Gly Glu Asp Val Val
210 215 220

Phe Val Cys Asn Asp Trp His Thr Gly Leu Leu Ala Cys Tyr Leu Lys
225 230 235 240

Ser Asn Tyr Gln Ser Ser Gly Ile Tyr Arg Thr Ala Lys Val Ala Phe
245 250 255

[0046]

Cys Ile His Asn Ile Ser Tyr Gln Gly Arg Phe Ser Phe Asp Asp Phe
260 265 270

Ala Gln Leu Asn Leu Pro Asp Arg Phe Lys Ser Ser Phe Asp Phe Ile
275 280 285

Asp Gly Tyr Asp Lys Pro Val Glu Gly Arg Lys Ile Asn Trp Met Lys
290 295 300

Ala Gly Ile Leu Gln Ala Asp Lys Val Leu Thr Val Ser Pro Tyr Tyr
305 310 315 320

Ala Glu Glu Leu Ile Ser Gly Glu Ala Arg Gly Cys Glu Leu Asp Asn
325 330 335

Ile Met Arg Leu Thr Gly Ile Thr Gly Ile Val Asn Gly Met Asp Val
340 345 350

Ser Glu Trp Asp Pro Ala Lys Asp Lys Phe Leu Ala Ala Asn Tyr Asp
355 360 365

Val Thr Thr Ala Leu Glu Gly Lys Ala Leu Asn Lys Glu Ala Leu Gln
370 375 380

Ala Glu Val Gly Leu Pro Val Asp Arg Lys Val Pro Leu Val Ala Phe
385 390 395 400

Ile Gly Arg Leu Glu Glu Gln Lys Gly Pro Asp Val Met Ile Ala Ala
405 410 415

Ile Pro Glu Ile Leu Lys Glu Glu Asp Val Gln Ile Val Leu Leu Gly
420 425 430

Thr Gly Lys Lys Lys Phe Glu Arg Leu Leu Lys Ser Val Glu Glu Lys
435 440 445

[0047]

Phe Pro Ser Lys Val Arg Ala Val Val Arg Phe Asn Ala Pro Leu Ala
450 455 460

His Gln Met Met Ala Gly Ala Asp Val Leu Ala Val Thr Ser Arg Phe
465 470 475 480

Glu Pro Cys Gly Leu Ile Gln Leu Gln Gly Met Arg Tyr Gly Thr Pro
485 490 495

Cys Ala Cys Ala Ser Thr Gly Gly Leu Val Asp Thr Ile Met Glu Gly
500 505 510

Lys Thr Gly Phe His Met Gly Arg Leu Ser Val Asp Cys Asn Val Val
515 520 525

Glu Pro Ala Asp Val Lys Lys Val Val Thr Thr Leu Lys Arg Ala Val
530 535 540

Lys Val Val Gly Thr Pro Ala Tyr His Glu Met Val Lys Asn Cys Met
545 550 555 560

Ile Gln Asp Leu Ser Trp Lys Gly Pro Ala Lys Asn Trp Glu Asp Val
565 570 575

Leu Leu Glu Leu Gly Val Glu Gly Ser Glu Pro Gly Val Ile Gly Glu
580 585 590

Glu Ile Ala Pro Leu Ala Met Glu Asn Val Ala Ala Pro
595 600 605

<210> 11
<211> 1818
<212> DNA
<213> 玉米 (Zea mays)

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1815)

[0048]

<400> 11	
atg gcg gct ctg gcc acg tcg cag ctc gtc gca acg cgc gcc ggc ctg Met Ala Ala Leu Ala Thr Ser Gln Leu Val Ala Thr Arg Ala Gly Leu 1 5 10 15	48
ggc gtc ccg gac gcg tcc acg ttc cgc cgc ggc gcc gcg cag ggc ctg Gly Val Pro Asp Ala Ser Thr Phe Arg Arg Gly Ala Ala Gln Gly Leu 20 25 30	96
agg ggg gcc cgg gcg tcg gcg gcg gcg gac acg ctc agc atg cgg acc Arg Gly Ala Arg Ala Ser Ala Ala Ala Asp Thr Leu Ser Met Arg Thr 35 40 45	144
agc gcg cgc gcg gcg ccc agg cac cag cag cag gcg cgc cgc ggg ggc Ser Ala Arg Ala Ala Pro Arg His Gln Gln Gln Ala Arg Arg Gly Gly 50 55 60	192
agg ttc ccg tcg ctc gtc gtg tgc gcc agc gcc ggc atg aac gtc gtc Arg Phe Pro Ser Leu Val Val Cys Ala Ser Ala Gly Met Asn Val Val 65 70 75 80	240
ttc gtc ggc gcc gag atg gcg ccg tgg agc aag acc ggc ggc ctc ggc Phe Val Gly Ala Glu Met Ala Pro Trp Ser Lys Thr Gly Gly Leu Gly 85 90 95	288
gac gtc ctc ggc ggc ctg ccg ccg gcc atg gcc gcg aac ggg cac cgt Asp Val Leu Gly Gly Leu Pro Pro Ala Met Ala Ala Asn Gly His Arg 100 105 110	336
gtc atg gtc gtc tct ccc cgc tac gac cag tac aag gac gcc tgg gac Val Met Val Val Ser Pro Arg Tyr Asp Gln Tyr Lys Asp Ala Trp Asp 115 120 125	384
acc agc gtc gtg tcc gag atc aag atg gga gac ggg tac gag acg gtc Thr Ser Val Val Ser Glu Ile Lys Met Gly Asp Gly Tyr Glu Thr Val 130 135 140	432
agg ttc ttc cac tgc tac aag cgc gga gtg gac cgc gtg ttc gtt gac Arg Phe Phe His Cys Tyr Lys Arg Gly Val Asp Arg Val Phe Val Asp 145 150 155 160	480
cac cca ctg ttc ctg gag agg gtt tgg gga aag acc gag gag aag atc His Pro Leu Phe Leu Glu Arg Val Trp Gly Lys Thr Glu Glu Lys Ile 165 170 175	528
tac ggg cct gtc gct gga acg gac tac agg gac aac cag ctg cgg ttc Tyr Gly Pro Val Ala Gly Thr Asp Tyr Arg Asp Asn Gln Leu Arg Phe 180 185 190	576
agc ctg cta tgc cag gca gca ctt gaa gct cca agg atc ctg agc ctc	624

[0049]

Ser Leu Leu Cys Gln Ala Ala Leu Glu Ala Pro Arg Ile Leu Ser Leu	
195 200 205	
aac aac aac cca tac ttc tcc gga cca tac ggg gag gac gtc gtg ttc	672
Asn Asn Asn Pro Tyr Phe Ser Gly Pro Tyr Gly Glu Asp Val Val Phe	
210 215 220	
gtc tgc aac gac tgg cac acc ggc cct ctc tcg tgc tac ctc aag agc	720
Val Cys Asn Asp Trp His Thr Gly Pro Leu Ser Cys Tyr Leu Lys Ser	
225 230 235 240	
aac tac cag tcc cac ggc atc tac agg gac gca aag acc gct ttc tgc	768
Asn Tyr Gln Ser His Gly Ile Tyr Arg Asp Ala Lys Thr Ala Phe Cys	
245 250 255	
atc cac aac atc tcc tac cag ggc cgg ttc gcc ttc tcc gac tac ccg	816
Ile His Asn Ile Ser Tyr Gln Gly Arg Phe Ala Phe Ser Asp Tyr Pro	
260 265 270	
gag ctg aac ctc ccg gag aga ttc aag tcg tcc ttc gat ttc atc gac	864
Glu Leu Asn Leu Pro Glu Arg Phe Lys Ser Ser Phe Asp Phe Ile Asp	
275 280 285	
ggc tac gag aag ccc gtg gaa ggc cgg aag atc aac tgg atg aag gcc	912
Gly Tyr Glu Lys Pro Val Glu Gly Arg Lys Ile Asn Trp Met Lys Ala	
290 295 300	
ggg atc ctc gag gcc gac agg gtc ctc acc gtc agc ccc tac tac gcc	960
Gly Ile Leu Glu Ala Asp Arg Val Leu Thr Val Ser Pro Tyr Tyr Ala	
305 310 315 320	
gag gag ctc atc tcc ggc atc gcc agg ggc tgc gag ctc gac aac atc	1008
Glu Glu Leu Ile Ser Gly Ile Ala Arg Gly Cys Glu Leu Asp Asn Ile	
325 330 335	
atg cgc ctc acc ggc atc acc ggc atc gtc aac ggc atg gac gtc agc	1056
Met Arg Leu Thr Gly Ile Thr Gly Ile Val Asn Gly Met Asp Val Ser	
340 345 350	
gag tgg gac ccc agc agg gac aag tac atc gcc gtg aag tac gac gtg	1104
Glu Trp Asp Pro Ser Arg Asp Lys Tyr Ile Ala Val Lys Tyr Asp Val	
355 360 365	
tcg acg gcc gtg gag gcc aag gcg ctg aac aag gag gcg ctg cag gcg	1152
Ser Thr Ala Val Glu Ala Lys Ala Leu Asn Lys Glu Ala Leu Gln Ala	
370 375 380	
gag gtc ggg ctc ccg gtg gac cgg aac atc ccg ctg gtg gcg ttc atc	1200
Glu Val Gly Leu Pro Val Asp Arg Asn Ile Pro Leu Val Ala Phe Ile	
385 390 395 400	

[0050]

ggc agg ctg gaa gag cag aag ggc ccc gac gtc atg gcg gcc gcc atc Gly Arg Leu Glu Glu Gln Lys Gly Pro Asp Val Met Ala Ala Ala Ile 405 410 415	1248
ccg cag ctc atg gag atg gtg gag gac gtg cag atc gtt ctg ctg ggc Pro Gln Leu Met Glu Met Val Glu Asp Val Gln Ile Val Leu Leu Gly 420 425 430	1296
acg ggc aag aag aag ttc gag cgc atg ctc atg agc gcc gag gag aag Thr Gly Lys Lys Lys Phe Glu Arg Met Leu Met Ser Ala Glu Glu Lys 435 440 445	1344
ttc cca ggc aag gtg cgc gcc gtg gtc aag ttc aac gcg gcg ctg gcg Phe Pro Gly Lys Val Arg Ala Val Val Lys Phe Asn Ala Ala Leu Ala 450 455 460	1392
cac cac atc atg gcc ggc gcc gac gtg ctc gcc gtc acc agc cgc ttc His His Ile Met Ala Gly Ala Asp Val Leu Ala Val Thr Ser Arg Phe 465 470 475 480	1440
gag ccc tgc ggc ctc atc cag ctg cag ggg atg cga tac gga acg ccc Glu Pro Cys Gly Leu Ile Gln Leu Gln Gly Met Arg Tyr Gly Thr Pro 485 490 495	1488
tgc gcc tgc gcg tcc acc ggt gga ctc gtc gac acc atc atc gaa ggc Cys Ala Cys Ala Ser Thr Gly Gly Leu Val Asp Thr Ile Ile Glu Gly 500 505 510	1536
aag acc ggg ttc cac atg ggc cgc ctc agc gtc gac tgt aac gtc gtg Lys Thr Gly Phe His Met Gly Arg Leu Ser Val Asp Cys Asn Val Val 515 520 525	1584
gag ccg gcg gac gtc aag aag gtg gcc acc aca ttg cag cgc gcc atc Glu Pro Ala Asp Val Lys Lys Val Ala Thr Thr Leu Gln Arg Ala Ile 530 535 540	1632
aag gtg gtc ggc acg ccg gcg tac gag gag atg gtg agg aac tgc atg Lys Val Val Gly Thr Pro Ala Tyr Glu Glu Met Val Arg Asn Cys Met 545 550 555 560	1680
atc cag gat ctc tcc tgg aag ggc cct gcc aag aac tgg gag aac gtg Ile Gln Asp Leu Ser Trp Lys Gly Pro Ala Lys Asn Trp Glu Asn Val 565 570 575	1728
ctg ctc agc ctc ggg gtc gcc ggc ggc gag cca ggg gtc gaa ggc gag Leu Leu Ser Leu Gly Val Ala Gly Gly Glu Pro Gly Val Glu Gly Glu 580 585 590	1776
gag atc gcg ccg ctc gcc aag gag aac gtg gcc gcg ccc tga	1818

[0051]

Glu Ile Ala Pro Leu Ala Lys Glu Asn Val Ala Ala Pro
595 600 605

<210> 12
<211> 605
<212> PRT
<213> 玉米

<400> 12

Met Ala Ala Leu Ala Thr Ser Gln Leu Val Ala Thr Arg Ala Gly Leu
1 5 10 15

Gly Val Pro Asp Ala Ser Thr Phe Arg Arg Gly Ala Ala Gln Gly Leu
20 25 30

Arg Gly Ala Arg Ala Ser Ala Ala Ala Asp Thr Leu Ser Met Arg Thr
35 40 45

Ser Ala Arg Ala Ala Pro Arg His Gln Gln Gln Ala Arg Arg Gly Gly
50 55 60

Arg Phe Pro Ser Leu Val Val Cys Ala Ser Ala Gly Met Asn Val Val
65 70 75 80

Phe Val Gly Ala Glu Met Ala Pro Trp Ser Lys Thr Gly Gly Leu Gly
85 90 95

Asp Val Leu Gly Gly Leu Pro Pro Ala Met Ala Ala Asn Gly His Arg
100 105 110

Val Met Val Val Ser Pro Arg Tyr Asp Gln Tyr Lys Asp Ala Trp Asp
115 120 125

Thr Ser Val Val Ser Glu Ile Lys Met Gly Asp Gly Tyr Glu Thr Val
130 135 140

Arg Phe Phe His Cys Tyr Lys Arg Gly Val Asp Arg Val Phe Val Asp
145 150 155 160

[0052]

His Pro Leu Phe Leu Glu Arg Val Trp Gly Lys Thr Glu Glu Lys Ile
165 170 175

Tyr Gly Pro Val Ala Gly Thr Asp Tyr Arg Asp Asn Gln Leu Arg Phe
180 185 190

Ser Leu Leu Cys Gln Ala Ala Leu Glu Ala Pro Arg Ile Leu Ser Leu
195 200 205

Asn Asn Asn Pro Tyr Phe Ser Gly Pro Tyr Gly Glu Asp Val Val Phe
210 215 220

Val Cys Asn Asp Trp His Thr Gly Pro Leu Ser Cys Tyr Leu Lys Ser
225 230 235 240

Asn Tyr Gln Ser His Gly Ile Tyr Arg Asp Ala Lys Thr Ala Phe Cys
245 250 255

Ile His Asn Ile Ser Tyr Gln Gly Arg Phe Ala Phe Ser Asp Tyr Pro
260 265 270

Glu Leu Asn Leu Pro Glu Arg Phe Lys Ser Ser Phe Asp Phe Ile Asp
275 280 285

Gly Tyr Glu Lys Pro Val Glu Gly Arg Lys Ile Asn Trp Met Lys Ala
290 295 300

Gly Ile Leu Glu Ala Asp Arg Val Leu Thr Val Ser Pro Tyr Tyr Ala
305 310 315 320

Glu Glu Leu Ile Ser Gly Ile Ala Arg Gly Cys Glu Leu Asp Asn Ile
325 330 335

Met Arg Leu Thr Gly Ile Thr Gly Ile Val Asn Gly Met Asp Val Ser
340 345 350

Glu Trp Asp Pro Ser Arg Asp Lys Tyr Ile Ala Val Lys Tyr Asp Val

[0053]

355	360	365
Ser Thr Ala Val Glu Ala Lys Ala Leu Asn Lys Glu Ala Leu Gln Ala 370	375	380
Glu Val Gly Leu Pro Val Asp Arg Asn Ile Pro Leu Val Ala Phe Ile 385	390	395 400
Gly Arg Leu Glu Glu Gln Lys Gly Pro Asp Val Met Ala Ala Ala Ile 405	410	415
Pro Gln Leu Met Glu Met Val Glu Asp Val Gln Ile Val Leu Leu Gly 420	425	430
Thr Gly Lys Lys Lys Phe Glu Arg Met Leu Met Ser Ala Glu Glu Lys 435	440	445
Phe Pro Gly Lys Val Arg Ala Val Val Lys Phe Asn Ala Ala Leu Ala 450	455	460
His His Ile Met Ala Gly Ala Asp Val Leu Ala Val Thr Ser Arg Phe 465	470	475 480
Glu Pro Cys Gly Leu Ile Gln Leu Gln Gly Met Arg Tyr Gly Thr Pro 485	490	495
Cys Ala Cys Ala Ser Thr Gly Gly Leu Val Asp Thr Ile Ile Glu Gly 500	505	510
Lys Thr Gly Phe His Met Gly Arg Leu Ser Val Asp Cys Asn Val Val 515	520	525
Glu Pro Ala Asp Val Lys Lys Val Ala Thr Thr Leu Gln Arg Ala Ile 530	535	540
Lys Val Val Gly Thr Pro Ala Tyr Glu Glu Met Val Arg Asn Cys Met 545	550	555 560

[0054]

Ile	Gln	Asp	Leu	Ser	Trp	Lys	Gly	Pro	Ala	Lys	Asn	Trp	Glu	Asn	Val
				565					570					575	

Leu	Leu	Ser	Leu	Gly	Val	Ala	Gly	Gly	Glu	Pro	Gly	Val	Glu	Gly	Glu
			580					585					590		

Glu	Ile	Ala	Pro	Leu	Ala	Lys	Glu	Asn	Val	Ala	Ala	Pro
		595					600					605

在转基因品系中确定SS2活性

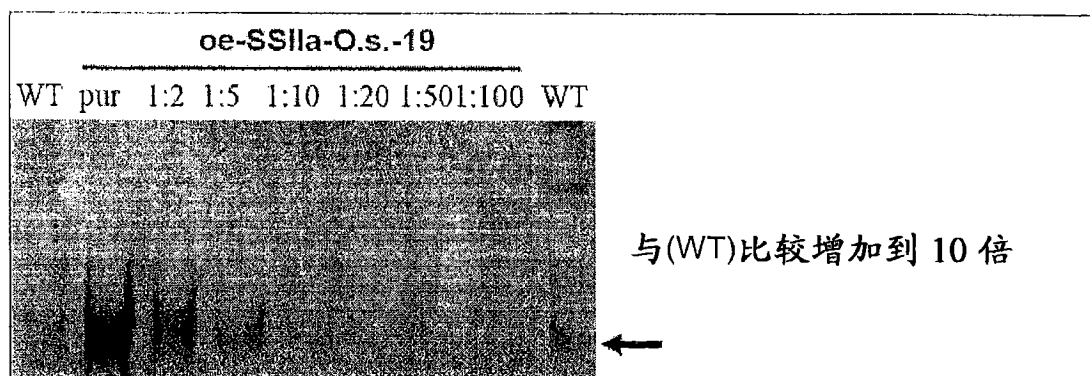
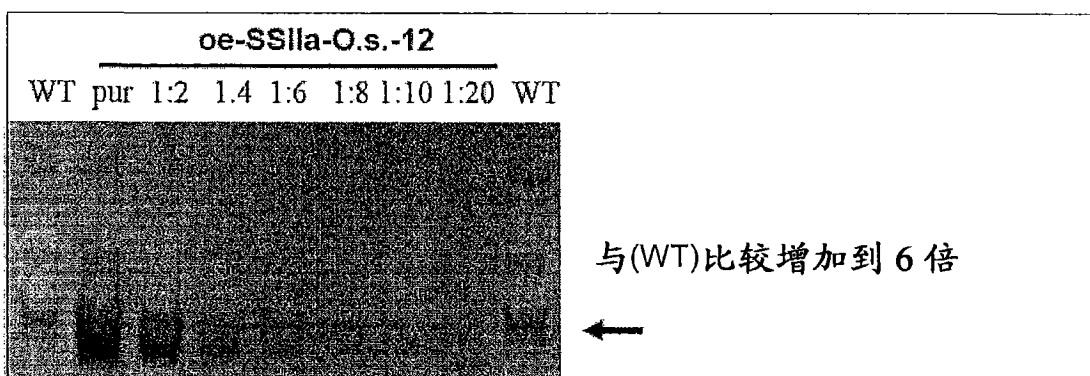
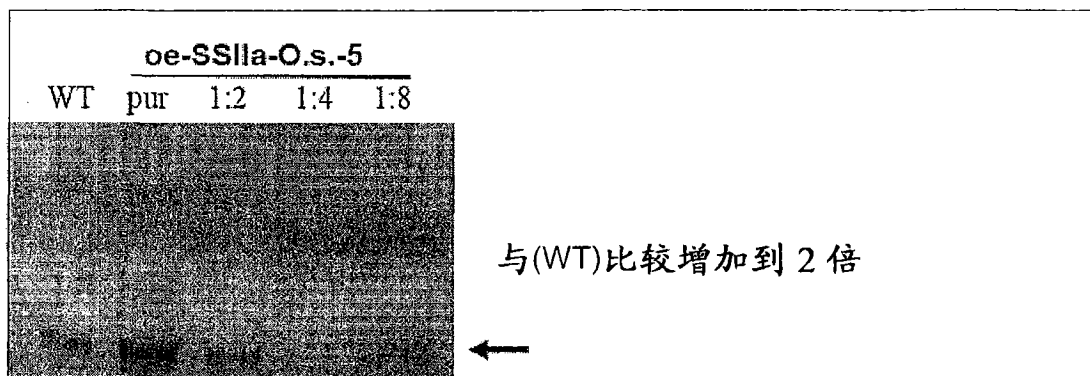


图 1

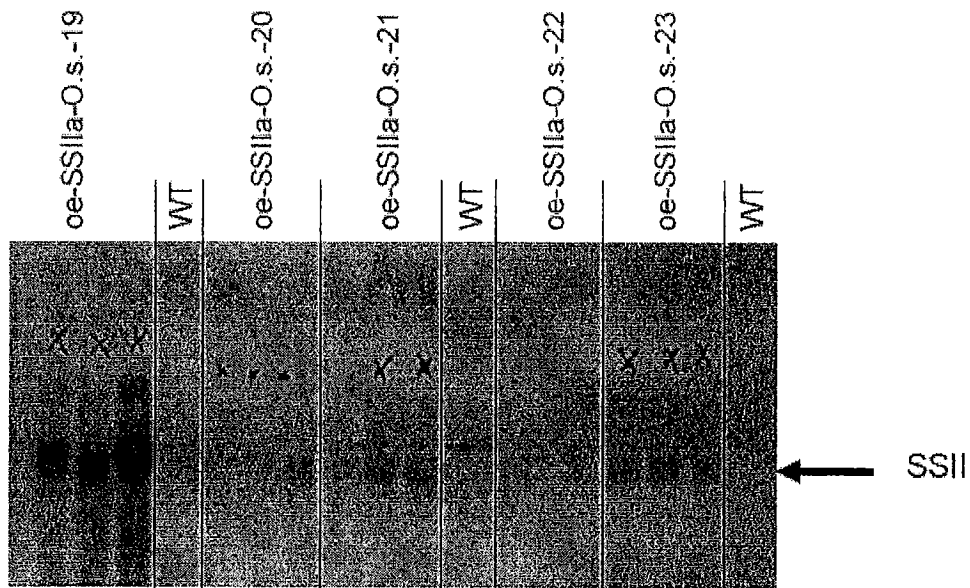


图 2

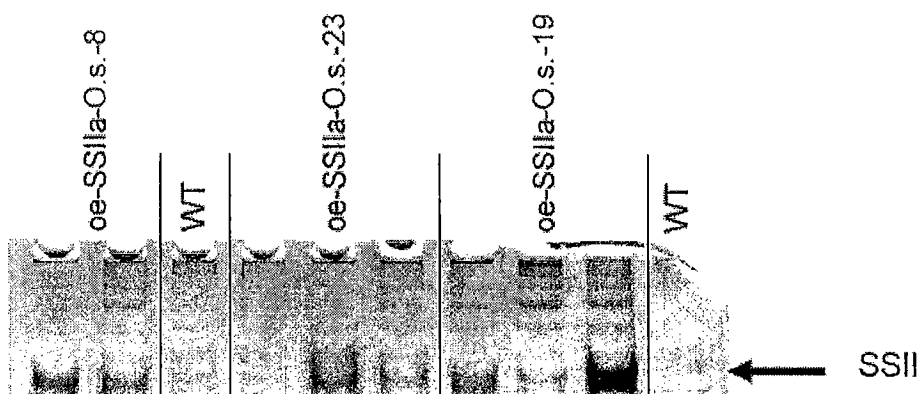


图 3