[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
C12N 15/82
C12N 15/29
C07K 14/415
A01H 5/00

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 00814057.X

[45] 授权公告日 2005 年 12 月 21 日

[11] 授权公告号 CN 1232646C

[22] 申请日 2000.8.5 [21] 申请号 00814057.X
[30] 优先权
[32] 1999.9.15 [33] DE [31] 19944212.6
[86] 国际申请 PCT/EP2000/007625 2000.8.5
[87] 国际公布 WO2001/020009 德 2001.3.22
[85] 进入国家阶段日期 2002.4.9
[71] 专利权人 巴斯福植物科学有限公司
地址 德国路德维西港
[72] 发明人 A·赖因德 P·L·盖根贝格
H-E·诺伊豪斯
K·格蕾威-卡芬克勒 T·莫曼
J·逖宅恩
审查员 王慧梅

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
代理人 黄革生 林柏楠

权利要求书 1 页 说明书 12 页 附图 4 页

[54] 发明名称 改变了氨基酸含量的植物及其生产方法

[57] 摘要

本发明涉及转化植物及其子代，在通过改变其 ATP/ADP-转运蛋白-基因调控序列和/或基因拷贝数之后，与未经转化的植物相比，同时表现出多种氨基酸含量的改变。本发明还进一步涉及生产该类植物的方法及其作为有用植物或者在饲料工业中的应用。

ISSN1008-4274

1. 生产转基因的植物或其种子的方法，与未转基因的植物或其种子相比，该转基因的植物或其种子中至少一种氨基酸含量增加，所述方法包括将编码ATP/ADP转运蛋白的来源于鼠耳芥的EMBL保藏号为Z49227的核苷酸序列导入所述植物或其种子中。

2. 权利要求1的方法，其中所述转基因植物或其种子中的叶绿体外膜对于ATP的转运活性增加。

3. 权利要求1的方法，其中所述氨基酸为必需氨基酸。

4. 权利要求1－3中任一项的方法，其中所述转基因的植物为作物。

5. 权利要求1－3中任一项的方法，其中所述转基因的植物为有用植物。

6. 由来源于鼠耳芥的EMBL保藏号为Z49227的核苷酸序列编码的ATP/ADP转运蛋白基因在生产转基因的植物或其种子中的用途，其中与未转基因的植物或其种子相比，该转基因的植物或其种子中至少一种氨基酸含量增加。

改变了氨基酸含量的植物及其生产方法

本发明涉及转化植物及其子代，在通过改变其ATP/ADP-转运蛋白-基因调控序列和/或基因拷贝数之后，与未经转化的植物相比，同时表现出多种氨基酸含量的改变。本发明还进一步涉及生产该类植物的方法及其作为有用植物或者在饲料工业中的应用。

人类和动物只能在体内合成20种氨基酸中的11种，因此其余9种氨基酸被称为必需氨基酸，只能通过食物获得。人类和家畜的基本营养大部分是建立在植物成分之上的。必需氨基酸有赖氨酸、色氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、苏氨酸、苯丙氨酸和组氨酸。

但问题是在食用植物中必需氨基酸的含量通常很底。因此，在以谷物和蔬菜为主的食物内经常要添加合成的氨基酸，以提高其营养成分。

很久以前，人们做了许多尝试，提高自由氨基酸的含量。然而，这些试验主要是停留在传统的变异品种的培育和筛选方法之上。

后来，人们越来越多地采用分子遗传学技术，以提高必需氨基酸的含量。WO 97/28247，WO 98/13506 和WO 97/35023 描述了最早的实验，它涉及到一种富含赖氨酸和甲硫氨酸的种子特异性贮藏蛋白质的异源性的表达。但也存在不利之处，即同时提高了结合氨基酸的含量。

近年来，有许多关于直接影响氨基酸合成的报道。他们描述了在植物中编码某一特定氨基酸合成酶的单个基因的高效（过度）表达，其结果是引起各自终末产物生物合成的增加。

另外，还有一些关于影响酶的动力学的实验报道，特别是所谓酶的产物抑制问题。例如Shaul 和 Galili（1993，Plant Mol Biol 23：759-768）以及Falco 等人（1995，Bio/Technology 13：577-582）报道了一种高产赖氨酸的植物，但他同时伴有自由苏氨酸生成的减少。在此，主要起作用的是天门冬氨酸激酶，该酶是那些由天门冬氨酸盐衍生的氨基酸的生物合成途径中的第一个酶，受赖氨酸的抑制。为了避免这一反馈抑制，实验在植

物中高效（过度）表达了经过遗传学修饰的天门冬氨酸激酶基因（WO 94/25605）。这种被改变了的天门冬氨酸激酶，对赖氨酸和苏氨酸具有一个非常强的降低反馈抑制作用，其结果是导致赖氨酸生成的增加。另外，这种对于赖氨酸反馈抑制不敏感的天门冬氨酸激酶，与其他的生物合成酶一起业已得到高效（过度）表达。这一实验是通过棒状杆菌进行的（1991，Applied and Environmental Microbiology 57: 1746-1752）。然而，在棒状杆菌中，赖氨酸增加的同时，出现了细菌生长速度强烈的降低，这对赖氨酸的平衡有负的影响。

Shaul 和 Galili（1993，Plant Mol Biol 23: 759-768）曾经用这些不仅具有反馈-不敏感的天门冬氨酸激酶、而且带有反馈-不敏感的二氢-吡啶甲酸合成酶的植物进行实验，发现这两种酶在氨基酸生物合成途径中占据同一个关键位置。因此，高效表达这些"瓶颈"酶不会使两种氨基酸—赖氨酸和苏氨酸含量提高。多数情况下只见有游离赖氨酸的生成增加，同时伴有明显的游离苏氨酸含量的降低。

除了上述一种或两种氨基酸生物合成基因的过表达外，WO 98/56935，EP 0 854 189 和EP 0 485 970对多基因插入以高效表达一种或两种氨基酸含量进行了描述，其目的是为了在同一植物体内同时影响一种或多种氨基酸。这一实验是以对同一植物体内的许多基因进行修饰为前提，即必须制造一种带有多个转基因的植物体。这一过程不仅非常烦琐，而且对植物体遗传物质的大量侵入，隐藏着由许多不可遇见的副反应造成的危险性。

本发明的目的：提供一种转基因植物及其生产技术，而且不会产生上述的缺点。

令人惊奇的是，这一发明达到了预期的效果。在这种转基因植物体内，改变ATP/ADP-转运蛋白-基因的调控序列和/或拷贝数之后，与未经转化的植物相比，使一种直至多种氨基酸含量发生了变化。

本发明中的转基因植物体表明，它能够改变一种或多种必需氨基酸的含量。

与未经转化的植物相比，本发明中的转基因植物体还表明，特别能够提

高一种或多种必需氨基酸的含量。

本发明的转化植物是有用植物，主要是具有经济价值的作物，如马铃薯或玉米，但又不局限于以上各属。

本发明不仅涉及上述的转化植物，他们的种子和子代，而且还包括由这种转化植物产生的组织、细胞或者具有繁殖能力的物质。

在本发明的一个实施方案中，通过编码ATP/ADP-转运蛋白-基因在植物体内高效表达，以提高具有营养生理学和经济学价值的氨基酸的含量，如赖氨酸、甲硫氨酸、苏氨酸、缬氨酸、色氨酸、组氨酸、异亮氨酸和亮氨酸。

在被称作98系的转化植物体内的游离赖氨酸的含量提高28%，在被称作62系的转基因植物体内的游离赖氨酸的含量提高到25.75%。令人惊奇的是，在植物体内，当ATP/ADP-转运蛋白-活性提高50%时，赖氨酸的含量就已经提高了25%。而98系中，甲硫氨酸的含量提高11%。除此之外，其他必需氨基酸也得到了相应的提高，如缬氨酸（12.5%在98系中）、色氨酸(50%在98系中)、苏氨酸(12.5%在98系中)、组氨酸(23.5%在98系中,20%在62系中)、异亮氨酸(25%在98系中)和亮氨酸(40%在98系中)。

相应地，反义定位的ATP/ADP-转运蛋白的过表达只能导致在各自转基因植物体内的氨基酸含量的降低，它们分别被称作594系和595系。如赖氨酸的含量只有野生型的1/4，而甲硫氨酸的含量只有野生型的1/8。

表一概括了在野生马铃薯（*Solanum tuberosum*）内和转化马铃薯内的氨基酸种类及含量。与野生马铃薯相比，本发明中的转化马铃薯植物体内游离氨基酸的总含量提高了7%。

本发明还有一个特别的优点：通过单个基因，即ATP/ADP-转运蛋白的表达之效率的提高，可以达到同时提高多个氨基酸、主要是必需氨基酸含量的目的。

本发明的转化植物的特征还在于，叶绿体膜中ATP的转运容量得到提高。

本发明涉及到作为上述植物的插入物的ATP/ADP-转运蛋白-基因，这一基因带有来源于鼠耳芥的、编码附图1所示氨基酸序列的核苷酸序列。

按照本发明，，原则上来说，只要是具有叶绿体的生物体，其ATP/ADP

转运基因的利用都是可行的。优选的生物体主要是植物，绿藻或者藓类。

一般认为，ATP/ADP-转运蛋白-基因存在于内部的叶绿体膜之中。这一部位主要是起转运ATP和ADP的作用。此处，叶绿体的ADP通过与ATP交换的形式被运往胞质体。通过提高ATP/ADP-转运蛋白-活性，使叶绿体内ATP含量增高（Neuhaus et al. 1993, The Plant Journal, 11:73-82）。Tjaden等人（1998, Plant Journal 16:531-540）曾经指出，由于ATP/ADP-转运蛋白的高效表达，使从马铃薯内叶绿体ATP的摄入平均超出野生型的摄入容量的50%。富含能量的ATP分子的增加，能够促进淀粉和脂肪酸的合成（Möhlmann et al., 1994, Planta, 194:492-497; Neuhaus et al. 1993, Plant Physiology 101:573-578; Tjaden et al. 1998, Plant Neuhaus et al. 1993, Plant 16:531-540）。

本发明认为，只要基本功能相同，ATP/ADP-转运蛋白-基因可以是自然的、化学合成的、修饰的、人工制造的核苷酸序列，或者用异源性的编码ATP/ADP-转运蛋白的核苷酸序列，或者等位变异基因，或者同功型，或者用他们的混合体。

具有基本相同功能的编码ATP/ADP-转运蛋白基因的序列，就是这样的序列，即使其核苷酸序列不同，但是却具有相同的所期待的功能。相同作用的等效物既包括自然出现的上述序列的变异体，又包括人工的核苷酸序列，例如通过化学合成的、与植物密码子-使用相一致的序列。

人们可以这样理解相同作用的核苷酸序列，即最初分离的、为ATP/ADP-转运蛋白-编码的序列的自然的或人工的突变体，而这些序列仍然具有所期待的功能。突变包括某个或者多个氨基酸残基的置换、附加、缺失、替换或者插入。例如，本发明也包括通过对ATP/ADP-转运蛋白核苷酸序列修饰而得到的核苷酸序列。修饰之目的或是限制其中的编码序列或是嵌入多个限制酶的酶切位点。

相同作用的核苷酸序列也可以是这样的变异体，与出发基因，或者说得更确切些，基因片段相比较而言，他们的功能得到了削弱或加强。

另外，如上所述，只要人工的DNA-序列能够表现出所期待的特性，便可以认为是合适的。比如，这类人工合成的DNA-序列能够通过利用分子模型

手段构建的具有ATP/ADP转运蛋白活性的蛋白质的逆翻译或者通过体外筛选来确定。特别合适者是按照对于寄主植物特异性的密码子-使用的多肽的逆翻译而得到的编码DNA-序列。一个熟练的植物遗传学者通过计算机分析转化植物的其它已知基因，便可很容易得到这一特异性的密码子使用。

本发明还包括一个与调节核苷酸序列有效连接的ATP/ADP-转运蛋白基因。该调节序列也包括一个可能在植物体内表达的上游的启动子。

所谓有效的连接，即为序列是这样排列的，比如将启动子、编码序列、终止子以及可能的其他调节元件进行如此之排列，以使调节元件的每一部分在编码序列的表达时，都能按照预先的设计而实现其功能。作为启动子，可以采用任何一个能够在植物体内控制外来基因表达的启动子。优先选用的是植物的启动子或者是一个来自植物病毒的启动子，尤其优选的则是来自花椰菜花叶病毒的CaMV35S启动子（Frank et al. Ce11,1980,21:285-294）。已知这种启动子含有一些对于转录效应子的识别序列，并且能够引起导入基因的永久和组成型表达。

为了达到有效的连接，人们还常常连上这样一些序列，如转录终止子和翻译加强子，类似烟草-花叶-病毒5'端的引导序列（Gallie et al.Nucl.Acids Res.1987, 15: 8693-8711）。

对于DNA-片段的相互连接可以在他们之间连上衔接子或者接头。优先的是启动子-和终止子-区域在转录方向能够装上一个接头或多接头，而这个接头应含有用于这段序列插入的一个或多个酶切位点。一般说来，这段接头应有1-10个，较好的有1-8个，最好有2-6个酶切位点。通常，接头包括调控区域在内应少于100个bp，常见的少于60个bp，然而最少为5bp。对于寄主来说，启动子不仅可以是天然的和同源的，而且也可以是外来的和异源的。

此外，本发明也涉及一种含有ATP/ADP-转运蛋白-基因，以及与这个基因有效连接的调控基因的基因结构，以及一种含有ATP/ADP转运蛋白基因或上述基因结构的载体。这里的载体可含有一个附加的调控核苷酸序列，优先考虑的是来源于启动子、终止子或者翻译加强子的核苷酸序列，也可含有用于在适宜宿主细胞中复制的或者用于在基因组内整合的核苷酸序列。

应用已知的重组和克隆技术能够将这一基因结构克隆到一个合适的载体上，这个载体能够在宿主细胞中繁殖，这些宿主细胞可以是植物、植物组织或者细胞。合适的载体的选用可以参照“植物分子生物学和生物工程方法”（CRC Press，1998）一书中的第6-7章的71-119页。

如果用大肠杆菌（*E.coli*）作为寄主细胞，则应首选pBR332，pUC-系列，M13mp -系列和pACYC1 84作为克隆载体。特别是双载体，这些载体既能够在大肠杆菌又能够在根瘤农杆菌细胞内复制。可提到的双载体的例子是pBIN19（Bevan et al.Nucl.Acids Rse.12，1984，871 1）。例如，本发明中的基因结构也能被装入烟草转化载体pBIN-AR-TP之中。

此外，本发明还涉及以上提到的转化植物的生产方法。在这一方法中，一个ATP/ADP-转运蛋白-基因，基因结构、或者一个上述种类的载体，通过遗传学技术被导入植物或组织或细胞。就此而言，DNA的转移通常可以理解为植物、植物组织以及植物细胞的转化。

为瞬时或稳定地从植物组织或植物细胞转化和再生植物的合适的方法是通过聚乙二醇诱导的DNA-吸收原生质体转化，采用基因枪的基因枪技术，即所谓的微粒轰击法，电穿孔法，干燥的胚胎在含有DNA溶液中孵化，微注射和通过农杆菌介导的基因转移。B.Jenes等人曾对以上的方法进行了详尽的描述（Techniques for Gene Transfer， in: Transgenic Plants，Vol.1，Engineering and Utilization，S.D.Kung R.Wu撰写，Academic Press，1993，128143以及in Potrykus，Annu.Rev.Plant Physiol.Plant Molec.Biol.42，1991，205225）。

通过本发明的技术，可以生产高经济价值的有用植物，这些植物的特征在于其氨基酸，特别是必需氨基酸的含量显著提高。

另外，本发明也涉及转化植物作为有用-或者饲料植物的应用。因为，按照本发明的方法生产的有用植物中多种必需氨基酸含量增加，所以，当用它作为饲料时，其优点是可以无须再往饲料中添加含有多种氨基酸的营养强化剂，按照传统的方法只能先分开生产各个氨基酸，然后再进行混合复配。

此外，按照本发明的方法生产的转化植物，他们的种子和子代以及组织或从中提取的细胞，可广泛应用于农业、饲料工业、药业或健康保健等。

下面通过实施例更详细地说明本发明，但它们并非用于限制本发明的范围。

1. 一般的克隆方法

克隆方法如酶切、琼脂糖凝胶电泳，DNA片段的纯化，核苷酸的硝酸纤维素膜和尼龙膜转移，DNA片段的连接，大肠杆菌细胞的转化，细菌培养，噬菌体繁殖和重组DNA的分析均按Sambrook等人所描述的进行的（1989,Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6）。

本发明所采用的细菌菌株（E.coli，XL-1兰色）由Stratagene（海德堡）和Qiagen（Hilden）提供。植物转化采用的受体菌—农杆菌（土壤农杆菌，C58C1带有质粒pGV2260或pGV3850kan）已被Deblaere等人详细介绍过（Nucl.Acids Res.13，1985，4777）。作为替代，也可选择农杆菌菌株LBA4404（Clontech）或者其他合适的菌种。

作为克隆的载体可以采用pUC 19(Yanish-Perron,Gene 33,1985,103-119),pBluescripSK-(Stratagene),pGEM-T(Promega),pZER O(Invitrogen),pBin 19(Bevan et al. Nucl. Acids Res.12, 1984, 8711-8720) 和 pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Science 66,1990,221-230)。

2.农杆菌的转化

土壤农杆菌的转化是参照Höfgen und Willmitzer的方法进行（Nucl. Acids Res.1988，16，9877）。农杆菌的培养采用的是YEB培养基（Vervliet et al. J.Gen.Virol.1975，26，33）。

3.重组DNA的序列分析

重组DNA分子的序列按照Sanger的方法（Sanger等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA74(1977), 5463-5467），采用Licor激光荧光-DNA-序列仪（通过MWG Biotech., Ebersbach销售）分析。

4. AATPI有义定位的植物转化载体的构建

用于植物转化载体的设计：将一个来源于鼠耳芥 的AATP1-cDNA（来源于鼠耳芥的AATP1的克隆见Kampfenkel et al. FEBS Letters 374, 1995, 351-355 和 Neuhaus et al. The Plant Journal 11: 73-82）的、长为2230bp的EcoRV/BamH1-片段插入一个经Sma1/EcoRV 和BamH1酶切的载体pBIN AR（Höfgen und Willmitzer, Plant Sci. 1990, 66: 223-230）。通过cDNA-片段的插入出现一个基因构建体，它含有来源于花菜花叶病毒的35S-启动子（540bp）和来源于*鼠耳芥*的ADP/ATP-转运蛋白1的蛋白质编码区（AATP1）。这一cDNA-片段在有义方向与35S-启动子在pBinAR融合。在插入的AATP1-片段的3’端带有来自土壤农杆菌的章鱼碱-合成酶基因的PolyA信号（215bp）。

质粒pBINAR-AATP1的大小为14.2kb（图3）。

5. 质粒pBINAR-AATP1（图3）插入马铃薯基因组

参照Rocha-Sosa等人的方法，借助于土壤农杆菌的帮助将质粒转移到马铃薯植物体内（EMBO J. 1989, 8: 23-29）。作为阳性转化的对照，转基因马铃薯植物显示出一个质体的ADP/ATP-转运蛋白 1的mRNA的升高。采用Northern 印迹分析转化结果。为此，按照标准化的方法从马铃薯的叶-和茎组织中提取RNA。50μg RNA进行琼脂糖凝胶分离（1.5%琼脂糖，1×MEN-缓冲液，16.6%甲醛）。电泳之后，采用毛细管印迹法将RNA（溶于20×SSC）转移至尼龙膜上（Hybond N, Amersham, UK）。用紫外线照射固定尼龙膜上的RNA，尼龙膜于磷酸杂交缓冲液（Sambrook et al. 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6））中预杂交2小时，紧

接着加入放射标记的探针杂交10小时。

6.AATPI反义定位的植物转化载体的构建

植物转化载体的设计：将一个1265bp长的BamH/Nde1-片段，在此片段中Nde1-切点用T4-聚合酶补平成为平末端，从来自S.tuberosum的AATP-cDNA（有关马铃薯AATPI克隆的描述见Tjaden et al. 1998, The Plant Journal16:531-540）的编码区插入一个用Sma1/BamH1切割的载体 pBIN AR的一边（Höfgen und Willmitzer,Plant Sci.1990,66: 221-230）。Nde1-切点位于AATP-cDNA中，BamH1-酶切位点来源于载体pTM1(Tjaden et al. 1998, The Plant Journal16:531-540)。通过cDNA-片段的插入，产生一种基因构建体，它含有反义定位的来源于花椰菜花叶病毒的35S-启动子（540bp）和来源于S.tuberosum的ADP/ATP-转运蛋白1 的1265bp长的区域（AATP1 S.t.）。这一cDNA-片段与35S-启动子在pBinAR融合。在插入的AATP1-片段的3'端带有来自土壤农杆菌的章鱼碱-合成酶基因的PolyA信号（215bp）。

质粒pBIN AR-AS-AATP1的大小为13.3kb（图4）。

7.质粒pBIN AR-AS-AATP1导入马铃薯基因组

质粒转移的方法与第5.相似。

采用Northern 印迹分析转化结果，发现转基因马铃薯植物的质体ADP/ATP-转运蛋白的mRNA含量降低。为此，按照标准化的方法从马铃薯的叶-和茎组织中提取RNA。50μg RNA进行琼脂糖胶分离（1.5%琼脂糖，1×MEN-缓冲液，16.6%甲醛）。电泳之后，采用毛细管印迹法将RNA（溶于20×SSC）转移至尼龙膜上（Hybond N, Amersham, UK）。用紫外线照射固定尼龙膜上的RNA，尼龙膜于磷酸杂交缓冲液(Sambrook et al.1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6））中预杂交2小时，紧接着加入放射标记的探针杂交10小时。

8.氨基酸的分析

按照Geinenberger等人的方法，采用高效液相色谱技术（HPLC）对氨基酸（除外脯氨酸）的乙醇提取物进行了分析（Plant Cell & Environ, 1996, 19: 43-55）.

8.1乙醇提取物的制备

取2片马铃薯片（共约0.2g鲜重）先后放入7ml 80%和 7ml 50%的乙醇（v/v）中，于80℃分别萃取30分钟。总共提取物约为 14 ml，备用。

8.2 HPLC测定氨基酸的含量

经用邻苯二醛(OPA)预柱衍生伯氨基后，经荧光检测器测定氨基酸。35μl乙醇提取物于35 μl OPA-反应液中，4℃下作用108秒，由自动进样器（自动进样器465，Kontron，Eching）进样20μl。

OPA-反应液组成: 5%OPA溶于甲醇(g/v)，0.8 M硼酸盐缓冲液(pH 10.4，于KOH之中），3-巯基丙酸；比例为10: 90: 1（v : v : v）。

流动相A:	12 mM 磷酸钠（pH6.8）	1000 ml
	四氢呋喃	1.6 ml
流动相B:	12 mM 磷酸钠（pH6.8）	250 ml
	甲醇	175 ml
	乙晴	110 ml

分离条件: 0-2分钟，等度期 0% B; 2-11分钟，线形梯度 0 - 10% B; 11-17 min，线形梯度 10% B; 17-27 min，线形梯度 10 - 50% B; 27-38 min，线形梯度 50 -60% B; 38-44，线性梯度60-100% B; 44-46 min，线形梯度

100% B; 46-48 min，线形梯度100 - 0% B; 48-60 min，0% B。

分离柱（Hypersil ODS-柱，Knauer 股份有限公司，柏林）：颗粒大小3μm，长 150mm， 直径 4.6mm。

荧光检测器（SFM25，Kontron，Eching）：激发波长=330nm，吸收波长=450nm。

经荧光检测器检测之后所得到的信号，由数据分析系统450-MT（Kontron，Eching）整和分析。

8.3 脯氨酸含量的测定

脯氨酸含量的测定是参照 Bates等人的方法进行的(Plant Soil，1973，39：205-207）。

取200μl乙醇提取物，加入500μl 6M H_3PO_4与75%乙酸的混合溶液（2：3），再加入500μl茚三酮溶液（600mg/20ml75%乙酸），于95-100℃作用45分钟后，将上述混合物置于冰上，与300μl甲苯混合，待出现明显的分层时，将上清夜移置微量比色皿中，于515nm下测定OD，通过与标准曲线（1-50μg 脯氨酸）的比较得出脯氨酸的含量。

表1：Solanum tuberosum 野生型、带有有义定位（有义98和有义62）和反义定位（反义594和反义595）的ATP/ADP-转运蛋白-基因的相应的经转化马铃薯植株中氨基酸含量一览表

基因型	天冬氨酸盐	谷氨酸盐	天冬氨酸	丝氨酸	谷氨酸
野生型	2.020	2.090	11.190	1.066	5.586
有义-98	1.656	2.238	8.986	1.008	7.409
有义-62	1.924	1.540	12.533	0.838	6.949
反义-594	0.746	4.123	1.256	0.875	5.633
反义-595	0.880	4.670	4.344	1.057	6.931
基因型	酪氨酸	缬氨酸	蛋氨酸	色氨酸	苯丙氨酸
野生型	1.201	3.589	0.986	0.519	1.544
有义-98	1.840	4.010	1.098	0.780	2.286
有义-62	1.440	3.633	0.920	0.506	1.620
反义-594	0.474	2.620	0.403	0.143	2.039
反义-595	0.228	2.340	0.510	0.019	1.716
基因型	甘氨酸	苏氨酸	组氨酸	丙氨酸	精氨酸
野生型	0.473	1.168	0.699	1.036	1.809
有义-98	0.507	1.318	0.865	1.694	2.122
有义-62	0.442	1.197	0.838	1.165	2.008
反义-594	0.448	0.612	0.265	1.824	0.493
反义-595	0.641	0.574	0.292	1.562	0.396
基因型	异亮氨酸	亮氨酸	赖氨酸	脯氨酸	总游离氨基酸
野生型	1.450	0.212	1.027	0.595	41.7
有义-98	1.819	0.296	1.310	0.552	44.7
有义-62	1.445	0.195	1.291	0.546	43.9
反义-594	0.681	0.142	0.270	0.451	27.7
反义-595	0.535	0.124	0.228	0.470	33.0

单位: $\mu mol/g\ FW^{-1}$

FW(鲜重/湿重)

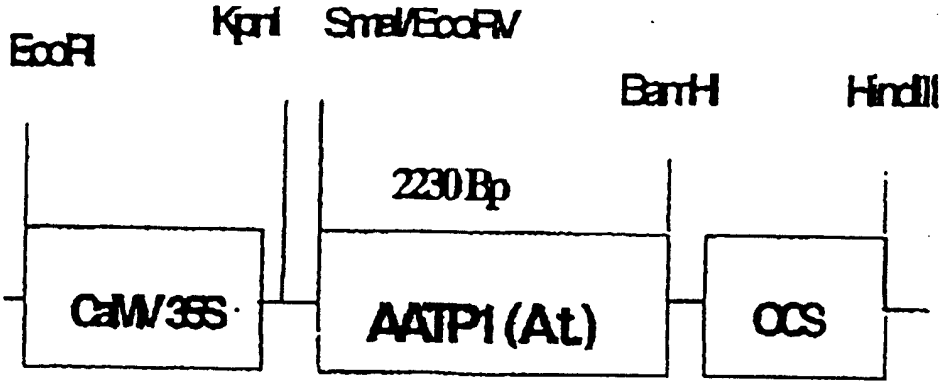
图1：对应于叶绿体ATP/ADP-转运蛋白 1 的编码区的鼠耳芥 cDNA（EMBL Accession No. Z49227）

atggaagctgtgattcaaaccagagggcttctctctttacccaccaaaacccatcggagtgagaagcca
acttcagccttcccatggcttaaagcagagacttttcgccgcgaagccaagaaatctacatgggtgtct
ctatcctttaacgggcacaagaaatttcaaaccttgagccaaccctgcatgggatttcgatttcccaca
aagagagaagcaccgagttcatatgcaaggcggaggcgcggctgctggcgacggagctgtcttcg
gcgaagcgattccgcagctgttgtagcctcgcggaagattttcggtgtggaggttgcaaccttgaaaaa
gattatccctttaggattgatgttcttttgtattcttttcaattacacaattctgagggatacaaaggatgtcttg
gtggtgacggcgaaaggaagttctgctgagattatacctttcttgaagacttgggtgaatcttcctatggc
cattgggtttatgctcctctacactaaactctccaatgttctctccaagaaggctctgttttacactgttattgtc
cctttcatcatctactttgggggctttggtttcgtcatgtaccctctcagcaactatattcacccggaagctct
cgcagataagctccttacaaccctcggcccaagattcatgggtcctattgcaatattgcggatttggagtt
tctgtttgttttatgttatggctgagctttggggtagtgtggtggtctcagttctcttctggggctttgctaatcag
atcacaactgtggatgaagccaagaaattctatcctttgttcggcattggagccaatgttgcactgattttc
tcaggaagaaccgtgaaatacttctctaacttgagaaagaatcttggtcctggagttgacggcagtttcg
ttgaaagccatgatgagcattgtggtgggaatgggactcgcatttgtctctctattggtgggtcgaataga
tatgttcctcttccaacccgtagcaagaacaagaaggagaaaccgaagatgggaacgatggaaag
cttgaagttcttggtatcatcaccatacattagagatcttgctactttagtggtggcatacggtattagtatca
atcttgtggaagtcacatggaaatcaaagcttaaagctcagttccctagcccgaatgagtactcagcatt
tatgggagcattctcaacctgcacgggtgttgcaacattcacaatgatgcttctcagccaatacgtattca
ataagtatggttggggagtagctgcaaagatcaccccaactgttctgctattgactggtgttgcgttcttct
ctctaatattgtttggcggcccattcgcaccacttgttgccaagcttggtatgacaccgctacttgcagctgt
gtatgtcggtgcccttcagaatatcttcagcaagagtgccaagtacagcttgttcgacccttgcaaagaa
atggcctatatcccattggatgaggacaccaaggttaaaggcaaagctgcgattgacgtggtctgcaa
cccattaggaaaatcaggggagctttaatacagcagttcatgatcttatcctttggatcactagcgaatt
caacgccgtatctaggaatgatcttgttggttattgtcactgcgtggttagctgcagctaagtcgctggag
ggacagttcaacagcttgcgtctgaagaagagcttgagaaggaaatggagagagcttcatcggtga

图2：对应于叶绿体ATP/ADP-转运蛋白 1 的编码区的马铃薯cDNA（EMBL Accession No.Y10821）

atggaaggtgttttacaaacaagagggcttctttctttgccttctaaacccaaaatcaaggctttttacccat
tgcctcaaggggtctaaggaacagattcaattctttaagtagtttaaagcctaatcctcttaatggggttt
ctttatcttcaaatgggtttcaaaaagttcaaggctttgacacaaagcctcagttgtttggccaaaagaag
aggtgttttccaatatgcaaagctgaggctgctgctgctgctggtgcagctgatggacagccacttttgtt
gaaaaggagcaacctaagtttatggggattgaacttgtgacccttaagaaaattataccacttggggcg
atgttcttttgtatttctgtttaattatacaatccttagggatactaaggatgtgttggttgtaacagctaaaggg
tccagtgctgagattatccctttcttgaaaacttgggtgaatttgcctatggctattggattcatgcttttgtac
acaaagttggctaatgtgttgtcaaaggaggctcttttttatactgttatacttccttttattgcatttctttggggc
gtttggttttgttttgtatcctcttagcaattactttcaccctacagcttttgctgataagcttctcaatacccttgg
tccaagatttcttggaccaattgctattctgaggatctggagtttctgcttgttctatgtcatggctgagctttg
gggaagtgtggtggtttcagtactcttttggggatttgctaatcagatcacgactgtcgatgaggctaaga
gattctatccttttgtttggacttggagcgaatgttgctcttatttttctctggtcgcacagtgaagtacttttctag
cttgagaagctctttaggtcctggagttgatggttgggctatctccctgaaaggaatgatgagtattgttgt
gatgatgggtggggcaatctgtttcttttactggtgggtgaatagaaatgttgctctcccaactcgtagcaa
gaagaagaaggtaaaacctaacatgaccacaatggagagcttgaagttcttggtctcttcaaaatatat
cagggatcttgccacattggttgtagcatatggcattagtatcaaccttgttgaagttacatggaagtcaa
agctcaaagctcagttcccaagccccaatgaatactcctcattcatgggtgacttctcaactgctactgg
aatagcaactttcacaatgatgttgttaagtcaatggatttcgacaagtatgggtggggagcagcagcc
aagataacacctacagtcttgctccttaccggagttggtttcttctccctgcttttgtttggggcacctctagc
acctactcttgcgaagtttggaatgactcctcttctagcagctgtctatgtgggtgcaatgcagaacattttc
agtaagagtgcaaagtatagtttgtttgaccccctgcaaagaaatggcctacattcctttggatgaggaca
ccaaggttaaagggaaggcagcaatcgatgttgtctgcaatccactgggaaagtctggaggagctttg
atacaacagttcatgattttgacttttggttcacttgccagctcgacaccctaccttggcggtgtgctcttagt
aattgttcttgcatggttgggagcagccaagtctttggatggacagttcactcaattacgccaagaagaa
gatcttgagaaggaaatggagagagcatcgttgaagatccctgtcgtgtctcaaaatgaaaatggaa
atggtcctctctcaagtgagtcatcactaaatcccgctggaggtgactctaccaacgcttcatcggaacc
ctcctccccaaggagcctgtaa

图3：用于表达有义定位的ATP/ADP-转运蛋白的植物转化载体pBIN-AR-AATP1



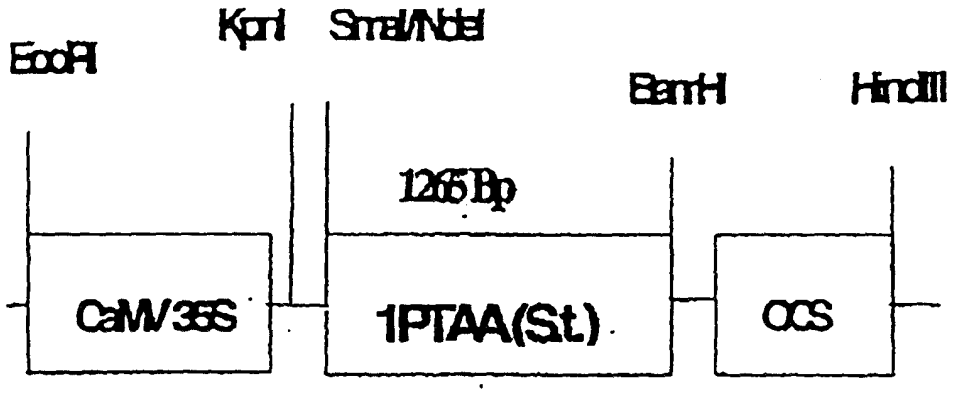
CaMV 35S: 35S-启动子（来源于花椰菜花叶病毒）

AATP1(A.t.): 有义定位的ATP/ADP-转运蛋白-基因的EcoRV/BamH1-片段（来源于鼠耳芥）

OCS: 章鱼碱-合成酶-基因的PolyA信号（来自土壤农杆菌）

另外，图中所标的酶切位点只对载体进行一次切割。

图4：用于表达反义定位的ATP/ADP-转运蛋白的植物转化载体 pBIN-AR-AATP1-AS



CaMV 35S: 35S-启动子（来源于花椰菜花叶病毒）

1PTAA(S.t.): 反义定位的ATP/ADP-转运蛋白-基因的BamH1/Nde1-片段（来源于马铃薯）

OCS: 章鱼碱-合成酶-基因的PolyA信号（来自土壤农杆菌）

另外，图中所标的酶切位点只对载体进行一次切割。