



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1726282 B

(45) 授权公告日 2012.09.26

(21) 申请号 200380106525.3

(22) 申请日 2003.12.19

(30) 优先权数据

02028530.0 2002.12.19 EP

03090275.3 2003.08.29 EP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2005.06.17

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2003/014840 2003.12.19

(87) PCT申请的公布数据

W02004/056999 EN 2004.07.08

(73) 专利权人 拜尔作物科学股份公司

地址 德国蒙海姆

(72) 发明人 M·赫内 C·弗罗贝格

V·兰德许茨

(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 15/54 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

A01H 5/10 (2006.01)

A23L 1/0522 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 1316006 A, 2001.10.03, 说明书第3、9页, 表1.

WO 9966050 A1, 1999.12.23, 说明书全文.

WO 9720040 A1, 1997.06.05, 说明书全文.

WO 9634968 A2, 1996.11.07, 说明书全文.

ABEL G. J. W.. Cloning and functional analysis of a cDNA encoding a novel 139 kDa starch synthase from potato (*Solanum tuberosum* L.). THE PLANT JOURNAL 10 6. 1996, 10(6), 981-991.

SCHWALL G. P.. Production of very-high-amylose potato starch by inhibition of SBE A and B. NATURE BIOTECHNOLOGY 18. 2000, 18551-554.

EDWARDS A.. A combined reduction in activity of starch synthases II and III of potato has novel effects on the starch of tubers. THE PLANT JOURNAL 17 3. 1999, 17(3), 251-261.

审查员 丁海

权利要求书 1 页 说明书 33 页

序列表 22 页 附图 11 页

(54) 发明名称

合成终粘度增加的淀粉的植物细胞及植物

(57) 摘要

本发明涉及经遗传修饰的植物细胞, 与未被遗传修饰的野生型植物的相应植物细胞相比, 所述遗传修饰导致植物细胞中内源性存在的一种或多种 SSIII 蛋白、一种或多种 BEI 蛋白和一种或多种 BEII 蛋白的活性降低。本发明的其它方面涉及含有所述植物细胞的植物、产生这些植物细胞和植物的方法以及可获取自它们的淀粉。

1. 制备合成改性淀粉的遗传修饰的双子叶植物的方法,其中该改性的淀粉在水中以6%悬浮液糊化后形成的凝胶的凝胶强度与提取自未经遗传修饰的野生型植物的相应植物细胞的淀粉的凝胶强度相比增加至少300%,所述方法包括

a) 引入第一、第二和第三外源核酸分子至双子叶植物细胞中,

其中,(1)所述第一外源核酸分子是:

i) 编码至少一种反义RNA的DNA分子,所述反义RNA造成编码SSIII蛋白的至少一种内源基因的表达减少;

ii) 通过共抑制作用导致编码SSIII蛋白的至少一种内源基因表达减少的DNA分子;或

iii) 同时编码至少一种反义RNA和至少一种有义RNA的DNA分子,其中所述反义RNA和所述有义RNA形成导致编码SSIII蛋白的至少一种内源基因表达降低的双链RNA分子,

(2)所述第二外源核酸分子是:

i) 编码至少一种反义RNA的DNA分子,所述反义RNA造成编码BEI蛋白的至少一种内源基因的表达减少;

ii) 通过共抑制作用导致编码BEI蛋白的至少一种内源基因表达减少的DNA分子;或

iii) 同时编码至少一种反义RNA和至少一种有义RNA的DNA分子,其中所述反义RNA和所述有义RNA形成导致编码BEI蛋白的至少一种内源基因表达降低的双链RNA分子,

(3)所述第三外源核酸分子是:

i) 编码至少一种反义RNA的DNA分子,所述反义RNA造成编码BEII蛋白的至少一种内源基因的表达减少;

ii) 通过共抑制作用导致编码BEII蛋白的至少一种内源基因表达减少的DNA分子;或

iii) 同时编码至少一种反义RNA和至少一种有义RNA的DNA分子,其中所述反义RNA和所述有义RNA形成导致编码BEII蛋白的至少一种内源基因表达降低的双链RNA分子,

b) 利用或从根据a)产生的植物细胞再生植物;和

c) 从根据步骤b)产生的植物生成其它的植物。

2. 从根据权利要求1的方法获得的植物细胞或植物获得的淀粉。

3. 根据权利要求2的淀粉,其是马铃薯淀粉。

4. 制备根据权利要求2或3的淀粉的方法,其包括从根据权利要求1的方法获得的植物或从该植物的淀粉储藏部分或从该植物的植物细胞提取淀粉。

5. 植物淀粉的改性方法,包括使用根据权利要求1的方法产生植物,和从该植物或其淀粉储藏部分获得淀粉。

## 合成终粘度增加的淀粉的植物细胞及植物

### 技术领域

[0001] 本发明涉及经遗传修饰的植物细胞和植物,与未被遗传修饰的野生型植物的相应植物细胞相比,所述的遗传修饰导致 SSIII 蛋白和 BEI 蛋白及 BEII 蛋白的活性降低。此外,本发明涉及产生这类植物细胞和植物的手段和方法。所述植物细胞和植物合成改性的淀粉(modified starch),其特征在于:它的直链淀粉含量至少为 30%;与来自未经遗传修饰的相应野生型植物的淀粉相比,其磷酸含量增加;在 RVA 分析中它的终粘度高于现有技术产生的淀粉;而且/或者具有改变的侧链分布;而且/或者在质构分析仪中具有提高了的凝胶强度;以及/或者具有改变的颗粒形态和/或改变的平均粒度。本发明因此还涉及本发明的植物细胞和植物合成的淀粉,以及产生这种淀粉的方法。

### 背景技术

[0002] 鉴于目前植物成分作为可再生的原材料的重要性逐步提高,生物工程研究的一个任务是试图按加工工业的需求改进这些植物原材料。为了使可再生的原材料能用于尽可能多的应用领域内,另外还必需获得各种各样的物质。

[0003] 多糖淀粉是一种化学均一单位——葡萄糖分子——的多聚体。不过,它采取了不同形式分子的高度复杂的混合物形式,这些分子的聚合程度和葡萄糖链分支的出现都有所不同。因此淀粉是不均一的原材料。在化学上可以区分两种不同的淀粉成分:直链淀粉和支链淀粉。在诸如玉米、小麦或马铃薯等用于淀粉生产的典型植物中,直链淀粉约占合成的淀粉的 20-30%,支链淀粉约占 70-80%。长期以来直链淀粉被认为是由  $\alpha$ -1,4 糖苷键连接的  $\alpha$ -D-葡萄糖单体组成的线性多聚体。然而,更多新近的研究证实了  $\alpha$ -1,6-糖苷分支点的存在(约 0.1%)(Hizukuri 和 Takagi, Carbohydr. Res. 134, (1984), 1-10; Takeda 等, Carbohydr. Res. 132, (1984), 83-92)。

[0004] 有多种方法可用来测定直链淀粉的含量。这些方法中的一些基于直链淀粉的碘结合能力,这一能力可以通过电势测定法(Banks&Greenwood, in W. Banks & C. T. Greenwood, 淀粉及其组成(Starch and its components)(pp. 51-66), Edinburgh, 爱丁堡大学出版社)、电流分析法(Larson 等, 分析化学(Analytical Chemistry) 25(5), (1953), 802-804)或分光光度法(Morrison & Laignelet, J. Cereal Sc. 1(1983), 9-20)测定。还可通过 DSC(差示扫描量热法)检测方式从量热学上测定直链淀粉的含量(Kugimiya & Donovan, Journal of Food Science 46, (1981), 765-770; Sievert & Holm, Starch/Starke 45(4), (1993), 136-139)。而且可以使用天然淀粉或去分支淀粉的 SEC(大小排阻层析)层析测定直链淀粉的含量。此方法被特别推荐用于测定经遗传改性的淀粉中直链淀粉的含量(Gerard 等, Carbohydrate Polymers 44, (2001), 19-27)。

[0005] 与直链淀粉相反,支链淀粉显示出较高分支且具有由于额外的  $\alpha$ -1,6-糖苷键的出现而造成的约 4%的分支点。支链淀粉是具有不同分支模式的葡萄糖链的复杂混合物。直链淀粉和支链淀粉之间的另一重要差异是它们的分子量。直链淀粉分子量为  $5 \times 10^5$ - $10^6$ Da(取决于淀粉的来源),而支链淀粉的分子量在  $10^7$  至  $10^8$ Da 之间。可以基于它

们的分子量和它们不同的理化特性来区分这两种大分子,最简单显现差异的方式是通过它们不同的碘结合特性。

[0006] 除了直链淀粉 / 支链淀粉比率和磷酸含量外,淀粉的功能特性还在很大程度上受到分子量、侧链分布模式、离子含量、脂质和蛋白质含量、平均粒度和颗粒形态等因素的影响。在本文中可以提及的重要功能特性是溶解度、凝沉行为、持水性、成膜性、粘度、糊化特性、冻融稳定性、酸稳定性、凝胶强度等等。粒度还可能对于多种应用而言是重要的。

[0007] 本领域技术人员常常采取不同的方法来确定糊化特性,这些特性之一是终粘度。随所用方法的不同,同一淀粉样品的绝对值和相对值(特别是绝对值)可能有所不同。用于分析糊化特性的一种快速有效的方法是 RVA 分析。依赖于 RVA 分析中参数和温度分布的不同选择,可以从同一样品中得到不同的 RVA 谱。应当提及的是,某些情况下,测定糊化特性时在下文所提及的现有技术中使用了不同的谱。

[0008] Kossmann 和 Lloyd(2000,关于植物学的重要综述(Critical Reviews in Plant Sciences) 19(3), 171-126) 对其中参与淀粉生物合成的酶有所减少的不同植物种类进行了综述。

[0009] 迄今为止,文献中已报道了 SSIII 蛋白活性降低(Abel 等,1996, The Plant Journal 10(6), 9891-991 ;Lloyd 等,1999, Biochemical Journal 338, 515-521) 或 BEI 蛋白活性降低(Kossmann 等,1991, Mol Gen Genet 230, 39-44 ;Safford 等,1998, Carbohydrate Polymers 35, 155-168) 或 BEII 蛋白的活性降低(Jobling 等,1999, The Plant Journal 18) 或 BEI 和 BEII 蛋白活性降低(Schwall 等,2000, Nature Biotechnology 18, 551-554 ; W096/34968) 或 BEI 和 SSIII 蛋白的活性降低(W000/08184) 的植物。

[0010] 与相应的野生型植物相比,在 SSIII 蛋白活性降低的植物中观察到支链淀粉侧链相对的从较长的链向较短的链迁移(Lloyd 等,1999, Biochemical Journal 338, 515-521), 磷酸含量高 70%,直链淀粉含量没有变化(Abel 等,1996, The Plant Journal 10(6), 9891-991) 以及 RVA 分析中的终粘度降低(Abel,1995, 柏林 Freie 大学博士论文(PhD Thesis at the Freie University Berlin))。所述植物还在 W0 00/08184 中有所描述,与未转化的野生型植物相比,从这些植物分离的淀粉中,磷酸含量增加了 197%,直链淀粉含量增加了 123%,而 RVA 分析中的终粘度则下降到野生型的 76%。此外,在所述淀粉中凝胶强度下降到野生型的 84%。

[0011] 用 Morrison & Laignelet (1983, J. Cereal Sc. 1, 9-20) 的方法进行的分光光度分析显示,在 BEI 和 BEII 蛋白活性都降低的植物中,直链淀粉含量最高可达 89.14% (相当于野生型的 344%),淀粉磷酸含量最高达分离自相应野生型植物的淀粉的磷酸含量的 522%。RVA 分析显示这些淀粉中的终粘度值增加到最高达 237%。此外,分离自这些植物的淀粉颗粒中改变的颗粒形态具有如下特征,即在显微镜下用偏振光进行观察时可见所述颗粒中央有巨大的沟。

[0012] 因此,本领域技术人员熟悉这样一类植物细胞和植物及其合成的淀粉,该淀粉与未经遗传修饰的野生型植物相比,直链淀粉含量和磷酸含量提高,但 RVA 分析中终粘度的提高最大不超过 256%。迄今为止在 RVA 分析中还未得到更高的终粘度。但是,这是合乎需要的,因为在将淀粉用作如增稠剂、胶凝剂或粘合剂时需要使用较少的淀粉固体来达到期望效果。这可以例如减少人和动物食品、保健产品和化妆品中添加剂的量。还可能在将所

述淀粉用于胶水中时应用较少量的淀粉,从而降低如纸、纸板和绝缘板的成本。

## 发明内容

[0013] 本发明因此基于提供植物细胞、植物和来自适宜植物细胞或植物的淀粉的目的,所述的淀粉中直链淀粉和磷酸的含量增加,在 RVA 分析中终粘度至少增加 270%,且 / 或糊化淀粉的凝胶强度提高,且 / 或具有改变的颗粒形态。

[0014] 通过提供本专利申请中所详述的实施方案达到了此目的。

[0015] 因此,本发明的第一方面涉及经遗传修饰的植物细胞,与未被遗传修饰的野生型植物的相应植物细胞相比,所述的遗传修饰导致植物细胞中内源性存在的一种或多种 SSIII 蛋白、一种或多种 BEI 蛋白和一种或多种 BEII 蛋白的活性降低。

[0016] 在此文中,遗传修饰可以是导致与未被遗传修饰的野生型植物的相应植物细胞相比,植物细胞中内源性存在的一种或多种 SSIII 蛋白、一种或多种 BEI 蛋白和一种或多种 BEII 蛋白的活性降低的任何遗传修饰。

[0017] 为了达到本发明的目的,遗传修饰可以包括,例如,通过一个或多个基因的诱变,产生符合本发明的植物细胞。采用何种突变并不重要,只要它导致 SSIII 蛋白和 / 或 BEI 蛋白和 / 或 BEII 蛋白活性降低即可。就本发明而言,术语“诱变”应理解为意味着任何类型的突变,诸如缺失、点突变(核苷酸置换)、插入、倒位、基因转变或染色体易位。

[0018] 在本文中,可以通过使用化学试剂或高能辐射(例如 X 射线、中子、 $\gamma$  射线、UV 辐射)产生突变。已有文献描述了可用于产生化学诱发突变的试剂以及通过所述诱变剂作用而产生的突变,例如, Ehrenberg 和 Husain,1981, (Mutation Research 86,1-113); Muller,1972(Biologisches Zentralblatt 91(1),31-48)。描述用  $\gamma$  射线、甲基磺酸乙酯(EMS)、N-甲基-N-亚硝基脲或叠氮化钠( $\text{NaN}_3$ )产生稻突变体的文献有,例如, Jauhar 和 Siddiq(1999, Indian Journal of Genetics,59(1),23-28)、Rao(1977, Cytologica 42, 443-450)、Gupta 和 Sharma(1990, Oryza27,217-219) 和 Satoh 与 Omura(1981, Japanese Journal of Breeding 31(3),316-326)。Arora 等人(1992, Anals of Biology 8(1), 65-69)描述了利用  $\text{NaN}_3$  或马来酰肼产生小麦突变体。Scarascia-Mugnozza 等人(1993, Mutation Breeding Review 10,1-28)提供了用不同类型的高能辐射和化学试剂产生小麦突变体的综述。Svec 等人(1998, Cereal Research Communications 26(4),391-396)描述了利用 N-乙基-N-亚硝基脲产生黑小麦突变体。Shashidhara 等人(1990, Journal of Maharashtra Agricultural Universities 15(1),20-23)描述了利用 MMS 和  $\gamma$  辐射生产粟突变体。

[0019] 已有关于主要通过无性繁殖的植物的突变体的制备报道,例如,产生改性淀粉的马铃薯(Hovenkamp-Hermelink 等,1987, Theoretical and Applied Genetics 75,217-221)和产油量提高 / 油质量改进的薄荷(Dwivedi 等,2000, Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences 22,460-463)。所有这些方法原则上都适于产生符合本发明的植物细胞及它们所产生的淀粉。

[0020] 可借助本领域技术人员已知方法来鉴定相关基因中,尤其是编码 BEI 蛋白和 / 或 BEII 蛋白和 / 或 SSIII 蛋白的基因中的突变。尤其可以应用基于如下的分析方法:与探针杂交(DNA 印迹, Southern blot)、聚合酶链式反应扩增(PCR)、所述基因组序列的测

序和搜索单核苷酸置换。例如,借助杂交模式鉴定突变的一种方法是限制性片段长度多态性(RFLP)的搜索(Nam等,1989, The Plant Cell 1,699-705;Leister和Dean,1993, The Plant Journal 4(4),745-750)。基于PCR的方法的例子是扩增的片段长度多态性(AFLP)分析(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)。借助限制性内切酶切割的扩增片段(切割扩增多态序列,CAPS)也可用于鉴定突变(Konieczny和Ausubel,1993, The Plant Journal 4,403-410;Jarvis等,1994,Plant Molecular Biology 24,685-687;Bachem等,1996,The Plant Journal 9(5),745-753)。还有文献描述了鉴定SNPs的方法,其中,如Qi等人(2001,Nucleic Acids Research 29(22),e116)、Drenkard等人(2000,Plant Physiology 124,1483-1492)和Cho等人(1999,Nature Genetics 23,203-207)的文章。特别合适的方法是允许在短时间内分析大量植物内特定基因中的突变的方法。这样的方法,称为TILLING(基因组中的定向诱导局部损害),已被McCallum等人描述(2000,Plant Physiology 123,439-442)。

[0021] 所有这些方法原则上都适用于本发明的目的。

[0022] Hoogkamp等人(2000,Potato Research 43,179-189)已分离了所含淀粉中无直链淀粉的稳定的马铃薯突变体。这些植物不再合成颗粒结合淀粉合酶(granule-bound starch synthase)(GBSS I)的活性酶。将这些植物进行又一次诱变后,可以选择淀粉生物合成所涉及基因中还具有另外突变的那些植物。由此可能产生合成具有改良特性的淀粉的植物。利用合适的方法,还可以鉴定和分离产生本发明淀粉的本发明植物细胞。

[0023] 此外,借助于同源转座子(即天然存在于所述植物细胞中的转座子)也可产生本发明的植物细胞。此方法的详述见下文。

[0024] 所有上述方法原则上都适于产生符合本发明的植物细胞以及它们所合成的改性淀粉。因此本发明还涉及产生遗传修饰的植物细胞的方法,所述植物细胞合成改性的淀粉,该淀粉的特征在于它的直链淀粉含量至少为30%,与来自未经遗传修饰的相应野生型植物细胞的淀粉相比,它的磷酸含量增加且RVA分析中的终粘度提高。

[0025] 本发明的另一方面涉及产生能合成改性的淀粉的植物细胞的方法,包括植物细胞的遗传修饰,与未被遗传修饰的野生型植物的相应植物细胞相比,所述的遗传修饰导致植物细胞中内源性存在的一种或多种SSIII蛋白、一种或多种BEI蛋白和一种或多种BEII蛋白的活性降低。

[0026] 本发明的另一方面涉及产生遗传修饰的植物的方法,所述植物合成改性的淀粉,其中

[0027] a) 如上所述产生植物细胞;

[0028] b) 从(或利用)依照a)所产生的植物细胞再生植物;和

[0029] c) 如果合适,从依照步骤b)所产生的植物中产生其它的植物。

[0030] 就本发明而言,术语“遗传修饰”意味着植物细胞的遗传信息被改变了。

[0031] 在本文中,与未被遗传修饰的野生型植物的相应植物细胞相比,在本发明的植物细胞中观察到植物细胞中内源性存在的一种或多种SSIII蛋白、一种或多种BEI蛋白和一种或多种BEII蛋白的活性降低。

[0032] 可同时或以连续的步骤进行用于产生符合本发明的植物细胞的遗传修饰。在此文

中,每种遗传修饰可导致一种或多种 SSIII 蛋白和 / 或一种或多种 BEI 蛋白和 / 或一种或多种 BEII 蛋白的活性降低。起始材料可以是野生型植物或野生型植物细胞,其中并未进行事先的遗传修饰来使一种或多种 SSIII 蛋白和 / 或一种或多种 BEI 蛋白和 / 或一种或多种 BEII 蛋白的活性降低;或者起始材料可以是遗传修饰的植物细胞或植物,其中已通过遗传修饰操作了一种或多种 SSIII 蛋白和 / 或一种或多种 BEI 蛋白和 / 或一种或多种 BEII 蛋白的活性。如果将这样的遗传修饰植物(植物细胞)作为起始材料,随后进行的遗传修饰优选只涉及在每种情况下活性尚未被降低的一种或多种蛋白质(SSIII、BEI 或 BEII)的活性。

[0033] 例如,与未被遗传修饰的野生型植物的植物细胞相比,在本发明的遗传修饰的植物细胞中观察到植物细胞中内源性存在的一种或多种 SSIII 基因和一种或多种 BEI 基因和一种或多种 BEII 基因的表达降低以及 / 或者在每种情况下植物细胞中存在的一种或多种上述蛋白质的活性降低。

[0034] 就本发明的目的而言,术语“活性的降低”指编码 SSIII、BEI 和 / 或 BEII 蛋白的内源性基因的表达降低,和 / 或细胞中 SSIII、BEI 和 / 或 BEII 蛋白量的减少以及 / 或者细胞中 SSIII、BEI 和 / 或 BEII 蛋白的酶活性的降低。

[0035] 可通过例如 RNA 印迹分析或 RT-PCR 检测编码 SSIII、BEI 或 BEII 蛋白的转录物的量来测定表达的减少。在此上下文中,减少优选指与未被遗传修饰的相应细胞相比,转录物的量减少至少 50%,尤其是至少 70%,优选至少 85%和特别优选至少 95%。

[0036] 可通过例如蛋白质印迹分析、ELISA(酶联免疫吸附测定)或 RIA(放射免疫测定)之类的免疫学方法测定导致所述植物细胞中 SSIII、BEI 或 BEII 蛋白活性降低的这些蛋白质量的减少。在此上下文中,减少优选指与未被遗传修饰的相应细胞相比,SSIII、BEI 和 / 或 BEII 蛋白的量减少至少 50%,尤其是至少 70%,优选至少 85%和特别优选至少 95%。

[0037] 就本发明而言,SSIII 蛋白应理解为意指一类可溶性淀粉合酶(ADP-葡萄糖-1,4- $\alpha$ -D-葡聚糖-4- $\alpha$ -D-葡糖基转移酶;EC 2.4.1.21)。可溶性淀粉合酶催化糖基化反应,其中底物 ADP-葡萄糖的葡萄糖残基随  $\alpha$ -1,4-键的形成被转移至  $\alpha$ -1,4-连接的葡聚糖链(ADP 葡萄糖 + {(1,4)- $\alpha$ -D-葡糖基}(N)  $\leq$  ADP + {(1,4)- $\alpha$ -D-葡糖基}(N+1))。

[0038] SSIII 蛋白描述于,例如,Marshall 等(The Plant Cell 8;(1996);1121-1135)、Li 等(2000, Plant Physiology 123,613-624)、Abel 等(The Plant Journal 10(6);(1996);981-991)和 WO 0066745 中。SSIII 蛋白的结构常常显示出一系列的结构域。在 N 末端,SSIII 蛋白具有用于转运入质体的信号肽。向着 C 末端方向,依次是 N 末端区域、SSIII 特异区和催化结构域(Li 等,2000, Plant Physiology 123,613-624)。基于一级序列比对(<http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/PFSCAN>)的进一步分析揭示,马铃薯 SSIII 蛋白具有所谓的碳水化合物结合域(carbohydrate binding domain)(CBM)。此结构域(Pfam motif cbm 25)包括 Seq ID No. 2 中显示的马铃薯 SSIII 蛋白序列的第 377 至 437 位氨基酸。就本发明而言,SSIII 蛋白由此应理解为意指其序列与 Seq ID No. 3 中所示序列至少具有 50%同一性的淀粉合酶,优选同一性至少为 60%,尤其优选至少为 70%,更优选至少为 80%,尤其是至少为 90%。

[0039] 术语“同源性”或“同一性”应理解为意指以百分比表示的与其它蛋白质一致的氨基酸(相同)数目。优选借助计算机软件将 Seq. ID No. 3 与其它蛋白质进行比较来

测定同一性。如果相互比较的序列长度有所不同,则以短序列与较长序列共有的氨基酸数目来确定同一性百分率,从而确定同一性。可以常规地通过例如 ClustaIW 等公众可获得的已知计算机程序确定同一性(Thompson 等, *Nucleic Acids Research* 22(1994), 4673-4680)。ClustaIW 可通过 Julie Thompson(Thompson@EMBL-Heidelberg.DE) 和 Toby Gibson(Gibson@EMBL-Heidelberg.DE), 欧洲分子生物学实验室, Meyerhofstrasse 1, D69117 Heidelberg, Germany 公开获得。ClustaIW 也可从各网页上下载,其中有 IGBMC(Institut de Genetique et de BiologieMoleculaire 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/) 及 EBI 网页的所有镜像(欧洲生物信息研究所, Wellcome Trust GenomeCampus, Hinxton, Cambridge CB10 1SD, UK)。

[0040] 如果利用 ClustaIW 计算机版本 1.8 来确定如本申请中的参照蛋白质和其它蛋白质之间的同一性,则设以下参数:KTUPLE = 1, TOPDIAG = 5, WINDOW = 5, PAIRGAP = 3, GAPOPEN = 10, GAPEXTEND = 0.05, GAPDIST = 8, MAXDIV = 40, MATRIX = GONNET, ENDGAPS(OFF), NOPGAP, NOHGAP。

[0041] 发现相似序列的一个可能方案是进行序列数据库搜索。在此,键入一个或多个序列作为所谓的待查序列(query)。然后用计算机统计程序将此待查序列与所选定的数据库中的序列进行比较。这样的数据库查询(blast 搜索)是本领域技术人员所已知的且可以在不同供应商处进行。例如,若在 NCBI(National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 上进行所述的数据库查询,应采用针对相应的比较查询而设定的标准设置。对于蛋白质序列对比(blastp)而言,这些设置是:Limit entrez = not activated;Filter = low complexity activated;Expect value = 10;word size = 3;Matrix = BLOSUM62;Gap costs:Existence = 11,Extension = 1。除了其它参数外,所述查询的结果还有待查序列与数据库中找到的相似序列之间的同一性程度。

[0042] 因此,就本发明而言,SSIII 蛋白应理解为意指淀粉合酶,当利用至少一种上述方法测定该淀粉合酶与 Seq ID No. 3 中所示序列的同一性时,其具有至少 50% 同一性,优选至少为 60%,尤其优选至少为 70%,更优选至少为 80% 和特别是至少为 90% 的同一性。

[0043] 就本发明的目的而言,术语 SSIII 基因应理解为意指编码 SSIII 蛋白的核酸分子(DNA、cDNA、RNA),优选来自马铃薯。已有文献描述了各种植物物种中编码 SSIII 蛋白的核酸分子,例如,马铃薯(Abel 等, *The Plant Journal* 10(6);(1996);981-991)、小麦(WO 00/66745, Li 等人,2000, *Plant Physiology* 123,613-624;GenBank 录入号 AF258608;GenBank 录入号 AF258609)、玉米(Gao 等,1998, *Plant Cell* 10(3),399-412;GenBank 录入号 AF023159)、豇豆(vignia)(GenBank 录入号 AJ225088)、稻(GenBank 录入号 AY100469;GenBank 录入号 AF43291) 和拟南芥(Arabidopsis)(GenBank 录入号 AC007296)。

[0044] 就本发明的目的而言,术语“分支酶”或“BE 蛋白质”(α-1,4-葡聚糖:α-1,4-葡聚糖-6-糖基转移酶, E. C. 2. 4. 1. 18) 应理解为指催化转糖基化反应的蛋白质,其中 α-1,4-葡聚糖供体的 α-1,4-键被水解,在此过程中释放的 α-1,4-葡聚糖链被转移至 α-1,4-葡聚糖受体链上,在那它们被转变成 α-1,6 键。

[0045] 就本发明的目的而言,术语“BEI 蛋白”应理解为意指同种型 I 分支酶(分支酶 = BE)。BEI 蛋白优选来自马铃薯植物。在此上下文中,术语同种型是以 Smith-White 和



Preiss 提出的命名法为基础的 (Smith-White 和 Preiss, *Plant Mol Biol. Rep.* 12, (1994), 67-71, Larsson 等, *Plant Mol Biol.* 37, (1998), 505-511)。这一命名法假设在氨基酸水平上与玉米 BEI 蛋白 (GenBank 录入号 D11081 ;Baba 等, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181(1), (1991), 87-94 ;Kim 等, *Gene* 216, (1998), 233-243) 的同源性 (同一性) 程度比与玉米 BEII 蛋白 (GenBank 录入号 AF072725、U65948) 的同源性程度高的所有酶都被称为同种型 I 分支酶, 缩写为 BEI 蛋白。

[0046] 就本发明的目的而言, 术语“BEII 蛋白”应理解为意指同种型 II 分支酶 (分支酶 = BE)。此酶优选来源于马铃薯植物。就本发明而言, 在氨基酸水平上与玉米 BEII 蛋白 (GenBank 录入号 AF072725、U65948) 的同源性 (同一性) 程度比与玉米 BEI 蛋白 (GenBank 录入号 D11081、AF072724) 的同源性程度高的所有酶都被称为 BEII 蛋白。

[0047] 就本发明的目的而言, 术语“BEI 基因”应理解为意指编码“BEI 蛋白”, 优选来自马铃薯植物的 BEI 蛋白的核酸分子 (cDNA、DNA)。许多植物中的这类核酸分子已被描述, 例如玉米 (GenBank 录入号 D11081、AF072724)、稻 (GenBank 录入号 D11082)、豌豆 (GenBank 录入号 X80010) 和马铃薯。来自马铃薯的许多形式的 BEI 基因或 BEI 蛋白已有所描述, 例如 :Khoshnoodi 等, *Eur. J. Biochem.* 242(1), 148-155(1996), GenBank 录入号 Y 08786 和 Kossmann 等, *Mol. Gen. Genet.* 230, (1991), 39-44)。在马铃薯植物中, BEI 基因主要表达于块茎中, 而在叶子中只有很微弱程度的表达 (Larsson 等, *Plant Mol. Biol.* 37, (1998), 505-511)。

[0048] 就本发明的目的而言, 术语“BEII 基因”应理解为意指编码“BEII 蛋白”, 优选来自马铃薯植物的 BEII 蛋白的核酸分子 (cDNA、DNA)。文献中已描述了许多植物中的此类核酸分子, 例如马铃薯 (GenBank 录入号 AJ000004、AJ011888、AJ011889、AJ011885、AJ011890、EMBL GenBankA58164)、玉米 (AF072725, U65948)、大麦 (AF064561)、稻 (D16201) 和小麦 (AF286319)。在马铃薯植物中, BEII 基因主要表达于块茎中, 而在叶子中很微弱程度地表达 (Larsson 等, *Plant Mol. Biol.* 37, (1998), 505-511)。

[0049] 在此上下文中, 术语“转基因”应理解为意指本发明植物细胞的遗传信息由于一种或数种外源核酸分子被引入细胞而偏离未被遗传修饰的相应植物细胞。

[0050] 在本发明进一步的实施方案中, 本发明转基因植物细胞的遗传修饰在于引入一种或多种外源核酸分子, 所述外源核酸分子的存在和 / 或表达导致 SSIII 和 BEI 和 BEII 蛋白的活性与未被遗传修饰的野生型植物的相应植物细胞相比有所下降。特别地, 术语“遗传操作”应理解为意指将已诱变的同源核酸分子和 / 或异源核酸分子和 / 或外源核酸分子引入植物细胞, 其中所述这些分子的引入导致 SSIII 蛋白和 / 或 BEI 蛋白和 / 或 BEII 蛋白的活性降低。

[0051] 就本发明的目的而言, 术语“外源核酸分子”或“外源核酸分子的”应理解为意指, 该分子非天然存在于所述植物细胞中, 或该分子不以此特殊的空间排列天然存在于该植物细胞中, 或该分子定位于该植物细胞基因组中非天然出现该分子的位点。外源核酸分子优选是由多种元件组成的重组分子, 所述元件的组合或特殊的空间排列不天然存在于植物细胞中。

[0052] 用于遗传修饰的外源核酸分子可采取杂种核酸构建体或多个分离的核酸构建体的形式, 尤其是所谓的单、双重和三重构建体。因此, 外源核酸分子可以是, 例如, 所谓的“三

重建体”，该构建体应理解为意指用于植物转化的单一载体，它不仅含有抑制一种或多种内源 SSIII 基因表达的遗传信息，还含有抑制一种或多种 BEI 基因表达和抑制一种或多种 BEII 基因表达的遗传信息，或者它的存在或表达将导致一种或多种 SSIII、BEI 和 BEII 蛋白质活性的降低。

[0053] 在进一步的实施方案中，外源核酸分子可以是所谓的“双重构建体”，它应理解为意指用于植物转化的载体，该载体含有用于抑制三种靶基因（SSIII、BEI、BEII 基因）中两种的表达的遗传信息或该载体的存在或表达将导致三种靶蛋白（SSIII、BEI、BEII 蛋白）中两种的活性降低。在本发明的此实施方案中，在含有抑制第三种靶基因的相关遗传信息的独立外源核酸分子的帮助下，第三种靶基因的表达被抑制和 / 或第三种靶蛋白的活性被降低。

[0054] 在本发明的另一实施方案中，并不是将三重构建体引入植物细胞的基因组中，而是将多个不同的外源核酸分子引入其中，这些外源核酸分子之一是，例如，作为导致一种或多种内源 SSIII 基因表达降低的共抑制构建体的 DNA 分子，而别的外源核酸分子是，例如，编码导致一种或多种内源 BEI 和 / 或 BEII 基因表达降低的反义 RNA 的 DNA 分子。不过，在构建外源核酸分子时，如果可以导致编码一种或多种 SSIII、BEI 及 BEII 蛋白质的内源基因表达同时降低或导致一种或多种 SIII、BEI 及 BEII 蛋白质的活性同时降低，在原则上反义、共抑制、核酶和双链 RNA 构建体或体内诱变的任何组合也是适用的。

[0055] 外源核酸分子可以同时（“共转染”）或一个接一个，即在不同时间接连（“超转化”）引入植物细胞的基因组中。

[0056] 外源核酸分子也可引入同一物种的不同植物个体中。这可以产生一种靶蛋白或两种靶蛋白（BEI、BEII、SSIII）活性降低的植物。随后的杂交可以产生所有三种靶蛋白的活性均降低的植物。

[0057] 代替野生型植物细胞或植物，可将已显示出一种或多种靶蛋白（BEI、BEII、SSIII）活性降低的突变体进一步用于引入外源核酸分子或用于产生本发明植物细胞或植物。所述突变体可以为自发产生的突变体形式或是通过特殊诱变剂的应用而产生的突变体的形式。上文中已对产生所述突变体的可能方案进行了进一步的描述。

[0058] 可以通过插入诱变产生或制备本发明的植物细胞和它们的淀粉（综述文章：Thornycroft 等, 2001, *Journal of experimental Botany* 52(361), 1593-1601)。插入诱变应理解为意指，尤其是，将转座子或转移 DNA (T-DNA) 插入编码 BEI 蛋白和 / 或 BEII 蛋白和 / 或 SSIII 蛋白的基因中，从而降低所述细胞中所述蛋白质的活性。

[0059] 转座子可以是天然存在于细胞中的转座子（内源转座子）或非天然存在于所述细胞中而是通过诸如转化所述细胞等重组方法引入该细胞的转座子（异源转座子）。通过转座子方式改变基因表达是本领域技术人员已知的。在植物生物学中利用内源和异源转座子作为工具的综述可参阅 Ramachandran 和 Sundaresan 的文章 (2001, *Plant Physiology and Biochemistry* 39, 234-252)。鉴定其中特异基因已通过转座子插入诱变而失活的突变体的可能方案参阅 Maes 等人的综述 (1999, *Trends in Plant Science* 4(3), 90-96)。Hirochika (2001, *Current Opinion in Plant Biology* 4, 118-122) 描述了借助内源转座子产生稻突变体。借助于内源性逆转录转座子对玉米基因的鉴定示于，例如，Hanley 等人的文章 (2000, *The Plant Journal* 22(4), 557-566)。Kumar 和 Hirochika 描述了利用逆转录转

座子产生突变体的可能方案和鉴定突变体的方法 (2001, Trends in Plant Science 6(3), 127-134)。异源转座子在双子叶植物和单子叶植物不同物种中的活性已有描述,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 (2000,Koprek 等,The Plant Journal 24(2),253-263)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) (Aarts 等,1993, Nature 363,715-717, Schmidt and 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)、西红柿 (Belzile 和 Yoder,1992,The Plant Journal 2(2),173-179) 和马铃薯 (Frey 等,1989,Molecular and General Genetics 217,172-177 ;Knapp 等,1988, Molecular and General Genetics 213,285-290)。

[0060] 原则上,可以借助同源和异源转座子产生或制备本发明的植物细胞和植物以及它们所产生的淀粉,利用同源转座子还包括已天然存在于植物基因组中的那些转座子。

[0061] T-DNA 插入诱变是以来自农杆菌的 Ti 质粒的某些区段 (T-DNA) 能整合入植物细胞基因组这一事实为基础的。整合入植物染色体的位点不是固定的,而是可能发生于任何位置处。如果 T-DNA 整合入染色体中赋予基因功能的区段,这就可能导致基因表达的改变并因此还导致所述基因编码的蛋白质活性改变。具体而言, T-DNA 整合入蛋白质编码区常常意味着在所述细胞中不再合成活性形式的所述蛋白质或根本不再合成该蛋白质。利用 T-DNA 的插入来产生突变体的描述有,例如,用于拟南芥的 (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,Current Opinion in Biotechnology 11,157-161) 和用于稻的 (Jeon 和 An,2001, Plant Science 161,211-219 ;Jeon 等,2000, The Plant Journal 22(6),561-570)。鉴定借助于 T-DNA 插入诱变产生的突变体的方法尤其描述于: Young 等 (2001,Plant Physiology 125,513-518)、Parinov 等 (1999,The Plant Cell 11, 2263-2270)、Thornycroft 等 (2001, Journal of Experimental Botany 52,1593-1601) 和 McKinney 等 (1995, The Plant Journal 8(4),613-622)。

[0062] 原则上, T-DNA 诱变适于产生本发明的植物细胞和生产它们所产生的淀粉。

[0063] 在本发明的另一实施方案中,一种或多种外源核酸分子的存在和 / 或表达引起了编码 SSIII 蛋白、BEI 蛋白和 BEII 蛋白的内源基因表达的抑制。

[0064] 可用本领域技术人员所熟悉的各种方法产生本发明的植物细胞,例如,造成编码 SSIII、BEI 或 BEII 蛋白的内源基因表达受抑制的那些方法。它们包括,例如,表达相应的反义 RNA 或双链 RNA 构建体;提供造成共抑制效果的分子或载体;表达特异切割编码 SSIII、BEI 或 BEII 蛋白的转录物的适当构建的核酶;或者“体内诱变”。此外,还可以通过同时表达待抑制的特异靶基因 (优选 SSHI 和 / 或 BEI 和 / 或 BEII 基因) 的有义和反义 RNA 分子来降低植物细胞中 SSIII 和 / 或 BEI 和 / 或 BEII 的活性。本领域技术人员对于这些方法是熟知的。

[0065] 此外,已知在植物中产生启动子序列的双链 RNA 分子可以反式导致该启动子同源拷贝的甲基化和转录失活 (Mette 等,EMBO J. 19, (2000),5194-5201)。

[0066] 降低蛋白质活性的其它方法参阅下文。

[0067] 所有这些方法基于将一种或多种外源核酸分子引入植物细胞基因组中。

[0068] 为了通过反义或共抑制技术抑制基因表达,可以在细胞中使用,例如,含有编码 SSIII 和 / 或 BEI 和 / 或 BEII 蛋白的所有序列的 DNA 分子,包括可能存在的任何侧翼序列;或使用只含有部分编码序列的 DNA 分子,但是该部分序列必须长到足以造成反义效果或共抑制作用。合适的序列通常具有不小于 15bp 的最小长度,优选 100-500bp 的长度,为了达到有效的反义抑制作用或共抑制效果,特别可以使用超过 500bp 的长度的序列。

[0069] 对于反义或共抑制方法合适的另一可能方案是:使用与编码 SSIII、BEI 或 BEII 蛋白且内源性存在于植物细胞中的内源序列具有高度同源性的 DNA 序列。最小同源程度应超过约 65%。优选使用同源水平至少为 90%,尤其是 95-100% 的序列。

[0070] 使用内含子,即,编码 SSIII、BEI 和 / 或 BEII 蛋白的基因的非编码区也可以达到反义或共抑制效果。

[0071] 利用内含子序列抑制编码淀粉生物合成蛋白质的基因的表达,描述于国际专利申请 W097/04112、W097/04113、W098/37213、W098/37214。

[0072] 本领域技术人员熟知实现反义和共抑制效果的方法。共抑制方法描述于,例如, Jorgensen (Trends Biotechnol. 8 (1990), 340-344)、Niebel 等 (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197 (1995), 91-103)、Flavell 等 (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197 (1995), 43-46)、Palaqui 和 Vaucheret (Plant. Mol. Biol. 29 (1995), 149-159)、Vaucheret 等 (Mol. Gen. Genet. 248 (1995), 311-317)、de Borne 等 (Mol. Gen. Genet. 243 (1994), 613-621)。

[0073] 本领域技术人员还知道表达核酶来降低细胞中特定的酶活性,该方法描述于,例如, EP-B1 0321201。植物细胞中核酶的表达已描述于,例如, Feyter 等的文章 (Mol. Gen. Genet. 250 (1996), 329-338)。

[0074] 此外,还可通过“体内诱变”造成植物细胞中 SSIII 和 / 或 BEI 和 / 或 BEII 活性的降低,其中通过转化细胞的方式将 RNA-DNA 寡核苷酸杂种 (“chimeroplast”) 引入细胞 (Kipp, P. B. 等,第五届植物分子生物学国际会议展板报告,1997年9月21日-27日,新加坡;R. A. Dixon 和 C. J. Arntzen,有关“转基因植物中的代谢工程”的会议报告,Keystone Symposia Copper Mountain, CO, 美国, TIBTECH 15, (1997), 441-447; 国际专利申请 WO 9515972; Kren 等, Hepatology 25, (1997), 1462-1468; Cole-Strauss 等, Science 273, (1996), 1386-1389; Beetham 等, 1999, PNAS 96, 8774-8778)。

[0075] RNA-DNA 寡核苷酸中 DNA 组分的部分与内源 SSIII、BEI 和 / 或 BEII 基因的核酸序列同源,但与内源 SSIII、BEI 和 / 或 BEII 基因的核酸序列相比含有突变或含有同源区域所环绕的异源区域。

[0076] 由于 RNA-DNA 寡核苷酸中的同源区与内源核酸分子的碱基配对,随后进行同源重组, RNA-DNA 寡核苷酸的 DNA 组分中所含的突变或异源区可被转移入植物细胞基因组中。这导致一种或多种 SSIII、BEI 和 / 或 BEII 蛋白活性的降低。

[0077] 此外,也可能通过同时表达待抑制的特异靶基因的有义和反义 RNA 分子造成植物细胞中 SSIII 和 / 或 BEI 和 / 或 BEII 活性的降低,所述的待抑制的特定靶基因优选 SSIII 和 / 或 BEI 和 / 或 BEII 基因。

[0078] 还可通过使用例如,含相应靶基因或部分靶基因的“反向重复”的嵌合构建体来达到此目的。嵌合构建体编码所述靶基因的有义和反义 RNA 分子。有义和反义 RNA 在植物内

作为一个 RNA 分子同时合成,有义和反义 RNA 可以通过一个间隔区相互分开并形成双链 RNA 分子。

[0079] 已证实在植物基因组中引入反向重复 DNA 构建体是抑制相应于此反向重复 DNA 构建体的基因的非常有效的方法 (Waterhouse 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, (1998), 13959-13964; Wang 和 Waterhouse, PlantMol. Biol. 43, (2000), 67-82; Singh 等, Biochemical Society Transactions 第 28 卷第 6 部分 (2000), 925-927; Liu 等, Biochemical Society Transactions 第 28 卷第 6 部分 (2000), 927-929; Smith 等, Nature 407, (2000), 319-320; 国际专利申请 W099/53050 A1)。靶基因的有义和反义序列还可通过相同或不同的启动子彼此独立的表达 (Nap, J-P 等, 第 6 届植物分子生物学国际会议, Quebec, 2000 年 6 月 18 日至 24 日; 展板 S7-27, 会议 S7)。

[0080] 因此也可通过产生 SSIII 和 / 或 BEI 和 / 或 BEII 基因的双链 RNA 分子使植物细胞中的 SSIII 和 / 或 BEI 和 / 或 BEII 活性降低。为此目的, 优选将 SSIII 和 / 或 BEI 和 / 或 BEII 基因或 cDNA 的反向重复 DNA 分子引入植物基因组中, 待转录的 DNA 分子 (SSIII、BEI 或 BEII 基因或 cDNA, 或这些基因或 cDNA 的片段) 处于控制所述 DNA 分子表达的启动子的调控下。

[0081] 此外, 在植物中形成启动子 DNA 分子的双链 RNA 分子, 也被已知可反式导致这些启动子的同源拷贝的甲基化和转录失活, 下文中称这些启动子为靶启动子 (Mette 等, EMBO J. 19, (2000), 5194-5201)。

[0082] 由此, 通过靶启动子的失活, 可以减少天然处于此靶启动子控制下的特异靶基因 (例如 SSIII、BEI 或 BEII 基因) 的表达。

[0083] 这意味着含待抑制基因 (靶基因) 的靶启动子的 DNA 分子在这种情况下——不同于植物中启动子的原初功能——不被用作基因或 cDNA 表达的调控元件, 而是用作可转录的 DNA 分子本身。

[0084] 为了在植物中产生双链靶启动子 RNA 分子 (其中它们可以以 RNA 发卡分子的形式存在), 优选使用含靶启动子 DNA 分子的反向重复的构建体, 靶启动子 DNA 分子处于控制所述靶启动子 DNA 分子基因表达的启动子的控制之下。这些构建体随后被引入植物基因组中。所述靶启动子 DNA 分子的反向重复的表达导致在植物中形成双链靶启动子 RNA 分子 (Mette 等, EMBO J. 19, (2000), 5194-5210)。靶启动子可因此被失活。

[0085] 因此也可通过产生 SSIII 和 / 或 BEI 和 / 或 BEII 基因启动子序列的双链 RNA 分子使植物细胞中的 SSIII 和 / 或 BEI 和 / 或 BEII 活性降低。为此目的, 优选将 SSIII 和 / 或 BEI 和 / 或 BEII 启动子的启动子 DNA 分子的反向重复引入植物基因组中, 待转录的靶启动子 DNA 分子 (SSIII、BEI 和 / 或 BEII 启动子) 处于控制所述靶启动子 DNA 分子表达的启动子的控制下。

[0086] 本领域技术人员另外还知道通过表达一种或多种 SSIII、BEI 和 / 或 BEII 蛋白质的非功能性衍生物 (尤其是反式显性突变体 (trans-dominant mutant)) 和 / 或通过表达所述蛋白质的拮抗物 / 抑制物来操作一种或多种 SSIII、BEI 和 / 或 BEII 蛋白的活性。

[0087] 所述蛋白质的拮抗物 / 抑制物包括, 例如抗体、抗体片段或具有相似结合特性的分子。例如, 在遗传修饰的烟草植物中应用胞质 scFv 抗体调控光敏色素 A 蛋白的活性 (Owen, Bio/Technology 10(1992), 790-4; 综述: Franken, E, Teuschel, U. 和 Hain,

R., *Current Opinion in Biotechnology* 8, (1997), 411-416; Whitelam, *Trends Plant Sci.* 1 (1996), 268-272)。

[0088] 对于降低靶基因活性的核酸表达, 有用的启动子是, 例如, 花椰菜花叶病毒 35S RNA 的启动子和玉米泛素启动子 (用于组成型表达), patatin 基因启动子 B33 (Rocha-Sosa 等, *EMBO J.* 8 (1989), 23-29), 马铃薯金属羧肽酶抑制剂基因的 MCPI 启动子 (匈牙利专利申请 HU9801674) 或马铃薯 GBSSI 启动子 (国际专利申请 WO 92/11376) (用于在马铃薯中块茎特异表达), 或者确保只在光合活性组织中表达的启动子, 例如 ST-LS1 启动子 (Stockhaus 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987), 7943-7947; Stockhaus 等, *EMBO J.* 8 (1989), 2445-2451)、Ca/b 启动子 (参阅, 例如, US 5656496、US 5639952、Bansal 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, (1992), 3654-3658) 和 Rubisco SSU 启动子 (参阅, 例如, US 5034322、US 4962028), 或者, 用于胚乳特异性表达的谷蛋白启动子 (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)、Shrunken-1 启动子 (Werr 等, *EMBO J.* 4, (1985), 1373-1380)、小麦 HMG 启动子、USP 启动子、菜豆蛋白启动子或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)。

[0089] 外源核酸分子在贮存淀粉的那些植物器官中表达是特别有利的。这些器官的实例是马铃薯的块茎或玉米、小麦或稻植物的种子或胚乳。这是为何优选使用在这些器官中表达的启动子的原因。

[0090] 不过, 还可以使用只在由外部因素所决定的时间点被激活的启动子 (参阅, 例如, WO 93/07279)。在此上下文中可能特别有意义的启动子是热休克蛋白的启动子, 它可以进行简单的诱导。其它可以的启动子是种子特异性启动子, 诸如, 蚕豆 USP 启动子, 它确保在蚕豆和其它植物中的种子特异性表达 (Fiedler 等, *Plant Mol. Biol.* 22, (1993), 669-679; Baumlein 等, *Mol. Gen. Genet.* 225, (1991), 459-467)。此外还可应用果实特异性启动子, 诸如 WO91/01373 中所述的那些启动子。

[0091] 另一可能存在的元件是终止序列, 它用于转录的正确终止和在转录物上添加 poly-A 尾, poly-A 尾被认为具有稳定转录物的功能。这样的元件描述于文献 (例如, Gielen 等, *EMBO J.* 8 (1989), 23-29) 并可按需要进行替代。

[0092] 本发明的转基因植物细胞合成改性的淀粉, 与野生型植物中合成的淀粉相比, 所述改性淀粉的理化特性, 尤其是直链淀粉含量和直链淀粉 / 支链淀粉比率、磷酸含量、粘性、凝胶强度、粒度和 / 或颗粒形态发生改变, 从而更适应于特定用途。

[0093] 因此本发明还涉及本发明的遗传修饰植物细胞, 尤其是转基因植物细胞, 其合成改性的淀粉。

[0094] 令人惊讶的是, 已发现在本发明的植物细胞中淀粉的组成发生改变, 即, 与相应野生型植物的植物细胞的淀粉相比, 改性淀粉中直链淀粉含量至少为 30% 且磷酸含量增加且 RVA 分析中的终粘度提高, 从而使这种淀粉更适于特定的用途。

[0095] 本发明的淀粉尤其具有尽管直链淀粉含量增加, 但仍然能够在标准条件下完全糊化的优势。与直链淀粉含量增加的其它淀粉相比较, 这显著提高了本发明淀粉的加工性能。因此温度提高或压力增大不是本发明的淀粉糊化所必需的。这就是为何在分解这些淀粉时无需使用诸如蒸汽加压锅、挤压机或压热器等特殊设备的原因。本发明的淀粉的另一优势

是,当用热轧机 (hot rollers) 进行加工时,它们可以以悬浮液的形式应用于这种机器上。其它直链淀粉含量增加的淀粉在进行此类加工时,即使有,也只是有限程度地糊化,且不能以糊或膜形式应用于所述轧机中。

[0096] 本发明的淀粉特别适用于所添加物质的增稠能力、糊化特性或粘合特性尤为重要的所有应用中。因此,本发明的淀粉尤其适用于生产食品,诸如烘焙品、速熟食品、牛奶冻 (blancmange)、汤、糖果、巧克力、冰激凌、用于鱼或肉的糊、冷冻甜食或挤压成形的点心。此外,本发明的淀粉适用于生产胶水,用于纺织品加工中,作为建筑材料添加剂,用于动物营养领域,作为化妆品的添加剂,以及用于造纸业中。

[0097] 分离自本发明的植物细胞的淀粉特别适用于生产预糊化的淀粉。预糊化淀粉是主要通过湿热处理而产生的物理改性淀粉。与天然淀粉相反的是,它们与冷水形成分散体/糊或凝胶,这取决于所用的预糊化淀粉的浓度并随生产预糊化淀粉的淀粉类型而变。由于这些特性,预糊化淀粉在食品工业和此外的许多工业领域内具有一系列可能的实用性。利用又称为冷溶胀淀粉的预糊化淀粉替代天然淀粉常常具有可以简化和缩短生产过程的好处。

[0098] 例如,速食甜食和速食牛奶冻的生产需要可以在混入冷的液体诸如水或牛奶等后在短时间内形成结实的凝胶(就象例如需要煮沸的牛奶冻一样)的预糊化淀粉。用小麦淀粉、马铃薯淀粉或玉米淀粉制备的商业预糊化淀粉不能满足这些要求。对于目前可以商品获得的预糊化淀粉,为了获得上述特性,需要在预糊化淀粉中加入诸如明胶、藻酸盐、角叉藻聚糖和/或无机盐等添加剂。而例如,在利用分离自本发明植物细胞的本发明淀粉生产预糊化淀粉后,则无需添加所谓的助剂。

[0099] 本发明还涉及含有颗粒形态改变的改性淀粉的本发明植物细胞。

[0100] 就本发明的目的而言,术语“颗粒形态”意指天然淀粉颗粒的大小和表面结构。淀粉以颗粒形式的晶体结构贮存于诸如植物的块茎、根、胚或胚乳之类的植物贮藏器官中。在淀粉从植物细胞中分离后仍保持这些颗粒结构的淀粉颗粒被称为天然淀粉 (native starch)。本发明的天然淀粉的平均粒度(用下述方法测定)明显低于分离自野生型植物的天然淀粉。在扫描电镜照片中(见图 4 和 5)明显可见本发明的天然淀粉颗粒具有令人惊讶的多孔的粗糙表面。相反,分离自野生型植物的天然淀粉颗粒的表面结构主要是平滑的且无可辨别的孔。

[0101] 由于以较小颗粒存在并且有带孔的粗糙表面,从而导致了在相同体积时,本发明的淀粉颗粒的表面积比分离自野生型植物的淀粉颗粒的表面积大许多。本发明的淀粉因此特别适于用作如调味剂、药理学活性物质、益生菌、益生微生物、酶或着色剂的载体。这些淀粉也特别适用于凝固物质和用于造纸。

[0102] 本发明淀粉的另一可能的应用是用于原材料的钻探领域。在钻探原油时,必须应用助剂和/或润滑剂以避免钻头或钻柱过热。由于其特殊的糊化特性,本发明的淀粉由此还特别适用于这一领域。

[0103] 本发明还涉及含有改性的淀粉的本发明植物细胞,与来自未经遗传修饰的野生型植物的相应植物细胞的淀粉相比,所述的改性淀粉中直链淀粉的含量至少为 30%,且磷酸含量增加,在 RVA 分析中的终粘度提高。

[0104] 在本发明中,用下文针对马铃薯淀粉进一步描述的 Hovenkamp-Hermelink 等人的

方法 (Potato Research 31, (1988), 241-246) 测定直链淀粉的含量。此方法还可用于从其它植物物种中分离的淀粉。分离淀粉的方法是本领域技术人员所已知的。

[0105] 就本发明的目的而言,淀粉的“磷酸含量”指以淀粉磷酸单酯的形式共价结合的磷酸含量。

[0106] 就本发明而言,术语“增加的磷酸含量”指,与来自相应野生型植物的植物细胞的淀粉相比,本发明植物细胞所合成的淀粉中共价结合的磷酸的总磷酸含量和 / 或 C-6 位置处的磷酸含量增加,优选至少增加 270%,更优选至少增加 300%,尤其优选至少增加 350%。

[0107] 就本发明的目的而言,“C6 位置处的磷酸含量”应理解为指与淀粉的葡萄糖单体的碳原子位置“6”键合的磷酸基团的含量。原则上,淀粉中葡萄糖单元的 C2、C3 和 C6 位置在体内都可以被磷酸化。就本发明而言,可利用可见酶学试验 (visual-enzymatic test) (Nielsen 等, Plant Physiol. Los, 105, (1994), 111-117) (见下文) 测定葡萄糖 -6- 磷酸,从而测定 C6 位置的磷酸含量 (= C6-P 含量)。

[0108] 就本发明而言,术语淀粉的“总磷酸含量”指以淀粉磷酸单酯的形式与葡萄糖单元的 C2、C3 和 C6 位置共价结合的磷酸的含量。依照本发明,诸如磷脂等磷酸化的非葡聚糖的含量不在术语“总磷酸含量”中。因此磷酸化的非葡聚糖必须在测定总磷酸含量前定量去除。将磷酸化非葡聚糖 (例如磷脂) 与淀粉分离的方法是本领域技术人员已知的。测定总磷酸含量的方法是本领域技术人员已知的且描述于下文。

[0109] 在本发明的另一实施方案中,本发明植物细胞合成了在淀粉葡萄糖单体的 C6 位置磷酸含量为每 mg 淀粉 40-120nmol, 尤其是 60-110nmol, 优选为 80-100nmol C6-P 的淀粉。

[0110] 进行 RVA 分析的方案在下文有进一步的描述。尤其必须提及,马铃薯淀粉的 RVA 分析常常用 8% 的淀粉悬浮液 (w/w) 进行操作。与设备“RVAsuper3”一起提供的文件 (说明书, Newport Scientific Pty Ltd., Investment Support Group, Warriewood NSW 2102, 澳大利亚) 推荐使用大约含 10% 淀粉的悬浮液来分析马铃薯淀粉。

[0111] 令人惊讶的是,已发现对于来自本发明的马铃薯植物的淀粉,不可能使用 8% 的淀粉悬浮液 (在 25ml 水中有 2g 淀粉) 来进行分析,因为终粘度达到的值超出了仪器的量程。这就是为何用仅 6% 的淀粉悬浮液 (在 25ml 水中有 1.5g 淀粉) 置换 8% 的淀粉悬浮液进行 RVA 分析的原因。就本发明而言,“RVA 分析中终粘度增加”因此应理解为指,与未经遗传修饰的野生型植物相比,终粘度提高至少 150%, 尤其是至少 200%, 尤其是至少 250%。在本文中,终粘度的增加与 6% 的淀粉悬浮液相关。

[0112] 此外,本发明马铃薯淀粉理解为指在用 6% 的淀粉含量进行的 RVA 分析中终粘度至少为 300RVU、尤其是 400RVU、特别是 500RVU 的马铃薯淀粉。RVU 值的测定将在下文详细讨论。

[0113] 在另一优选的实施方案中,本发明涉及合成改性的淀粉的本发明植物细胞,所述改性淀粉在水中糊化后形成的凝胶与未被遗传修饰的相应野生型植物细胞的淀粉形成的凝胶相比,其凝胶强度提高。

[0114] 就本发明的目的而言,术语“提高的凝胶强度”应理解为指,与来自未经遗传修饰的相应野生型植物细胞的淀粉的凝胶强度相比,凝胶强度优选提高至少 300%, 尤其是至少 500%, 更优选至少 700%, 特别优选至少 800%, 最高不超过 2000% 或不超过 1500%。



[0115] 就本发明而言,在下文所述条件下用质构分析仪(Texture Analyser)测定凝胶强度。

[0116] 为了制备淀粉凝胶,必须首先通过在水悬浮液中持续搅拌加热破坏天然淀粉的晶体结构。通过快速粘度分析仪(Rapid Visco Analyser)(Newport Scientific Pty Ltd., Investment Support Group, WarriewoodNSW 2102,澳大利亚)进行此项工作。正如上文已提及的,当淀粉来自马铃薯植物时,用仅6%的淀粉悬浮液代替8%的淀粉悬浮液,因为8%悬浮液的终粘度超出了仪器的测量范围。为了测定凝胶强度,将于快速粘度分析仪中糊化的淀粉悬浮液贮存一定的时间,然后用质构分析仪进行分析。因此,在测定凝胶强度时,8%的糊化淀粉悬浮液也被6%的糊化淀粉悬浮液所替代。

[0117] 在本发明的另一实施方案中,本发明植物细胞中合成的改性淀粉与相应野生型植物的淀粉的区别不仅在于直链淀粉的含量增加和磷酸含量增加及RVA分析中终粘度的提高,还在于改变的侧链分布。

[0118] 在另一实施方案中,本发明由此涉及合成改性的淀粉的本发明植物细胞,所述的改性淀粉的特征在于改变的侧链分布。在本发明的一个实施方案中,术语“改变的侧链分布”应理解指与来自野生型植物的支链淀粉中DP为6至11的短侧链的量相比,DP(=聚合度)为6至11的短侧链的量减少至少10%,优选至少15%,特别是至少30%和尤其优选至少50%,以及/或与来自野生型植物的支链淀粉中DP为16至22的短侧链的量相比,DP为6至22的短侧链的含量增加至少5%,优选至少10%,特别是至少15%和尤其优选至少30%。

[0119] 通过测定在所有侧链的总和中特定短侧链的百分数来确定短侧链的量。通过测定HPLC层析谱中代表DP6-26的聚合度的峰下总面积来确定所有侧链的总和。通过测定HPLC层析谱中代表某一特殊侧链的峰下的面积占总面积的比率来确定该侧链占有侧链总和的百分率。可用于确定峰面积的程序有,例如,来自美国Dionex的Chromelion 6.20。

[0120] 在本发明另外的实施方案中,合成于本发明植物细胞中的改性的淀粉与来自相应野生型植物的淀粉相比,其区别不仅在于直链淀粉含量增加和磷酸含量增加及RVA分析中的终粘度提高,还在于改变的“DP12至18的侧链分布”和/或改变的“DP19至24的侧链分布”和/或改变的“DP25至30的侧链分布”和/或改变的“DP37至42的侧链分布”和/或改变的“DP62至123的侧链分布”。

[0121] 就本发明而言,术语改变的“DP12至18的侧链分布”应理解为指,与来自野生型植物的DP为12至18的支链淀粉侧链的量相比,DP为12至18的支链淀粉侧链的量降低至少25%,优选至少35%,尤其优选至少45%和特别优选至少55%。

[0122] 就本发明而言,术语改变的“DP19至24的侧链分布”应理解为指,与来自野生型植物的DP为19至24的支链淀粉侧链的量相比,DP为19至24的支链淀粉侧链的量降低至少10%,优选降低至少20%,尤其优选降低至少30%。

[0123] 就本发明而言,术语改变的“DP25至30的侧链分布”应理解为指,与来自野生型植物的DP为25至30的支链淀粉侧链的量相比,DP为25至30的支链淀粉侧链的量降低至少5%。

[0124] 就本发明而言,术语改变的“DP37至42的侧链分布”应理解为指,与来自野生型植物的DP为37至42的支链淀粉侧链的量相比,DP为37至42的支链淀粉侧链的量增加至

少 5%，优选至少 10%，尤其优选至少 15%。

[0125] 就本发明而言，术语改变的“DP62 至 123 的侧链分布”应理解为指，与来自野生型植物的 DP 为 62 至 123 的支链淀粉侧链的量相比，DP 为 62 至 123 的支链淀粉侧链的量增加至少 20%，优选至少 35%，尤其优选至少 50%。

[0126] 通过测定 GPC 层析谱中一组特定侧链占有所有侧链总和的百分率来确定侧链的分布。为此目的，将 GPC 层析谱曲线下的总面积划分成各个区段，每一个代表不同长度的一组侧链。所选区段包括具有以下聚合度 (DP = 一条侧链中葡萄糖单体的数目) 的侧链：DP ≤ 11、DP12-18、DP19-24、DP25-30、DP31-36、DP37-42、DP43-48、DP49-55、DP56-61 和 DP62-123。为了将洗脱体积与分子量联系起来，用葡聚糖标准品 (Fluka, 产品编号 31430) 校准所用的 GPC 柱。所用的葡聚糖、它们的相关分子量和洗脱体积示于图 9。利用产生的校准曲线图，洗脱图按分子量分布显示。为了测定各个侧链的分子量，设定葡萄糖的分子量为 162。在 GPC 层析谱曲线下的总面积被设为 100%，基于占总面积的百分率来计算各个区段面积的百分率。

[0127] 在另一特别优选的实施方案中，与野生型植物支链淀粉中 DP 大于 123 的侧链的量相比，在来自本发明植物细胞或本发明植物的本发明淀粉中支链淀粉显示出 DP 大于 123 的支链淀粉侧链的量增加。

[0128] 本发明的植物细胞可用于整株植物的再生。

[0129] 可通过本发明的转基因植物细胞的再生获得的植物同样也是本发明的主题。

[0130] 本发明的植物细胞可属于任何植物物种，即，属于单子叶植物和双子叶植物。它们优选是农业上有用的植物，即，为了营养或技术（尤其是工业的目的）所种植的植物的植物细胞。本发明优选涉及形成纤维的植物（例如亚麻、大麻、棉）、贮油植物（例如油籽油菜 (oilseed rape)、向日葵、大豆）、贮糖植物（例如甜菜、甘蔗、糖粟 (sugar millet)）和贮存蛋白质的植物（例如豆类）。

[0131] 在另一优选的实施方案中，本发明涉及饲料植物，特别是青饲草和饲草（紫苜蓿、三叶草等等）和蔬菜植物（例如西红柿、莴苣、菊苣）。

[0132] 在另一优选的实施方案中，本发明涉及来自淀粉贮存植物（例如，小麦、大麦、燕麦、黑麦、马铃薯、玉米、稻、豌豆、木薯）的植物细胞，尤其优选来自马铃薯的植物细胞。

[0133] 有多种技术可用于将 DNA 引入植物宿主细胞中。这些技术包括通过 T-DNA 转化植物细胞（利用根癌农杆菌或发根农杆菌作为转化剂）、原生质体的融合、注射、DNA 的电穿孔、通过生物轰击方法引入 DNA 以及其它的可能方案。

[0134] 已对农杆菌介导的植物细胞转化的应用进行了深入的研究并充分描述于：EP 120516；Hoekema, 二元植物载体系统 (The Binary Plant Vector System) Offsetdrukkerij Kanters B. V., Alblasterdam (1985), 第五章；Fraley 等, Crit. Rev. Plant Sci. 4, 1-46 和 An 等, EMBO J. 4, (1985), 277-287。至于马铃薯的转化, 参阅, 例如, Rocha-Sosa 等, EMBO J. 8, (1989), 29-33)。

[0135] 利用载体基于农杆菌的转化来转化单子叶植物已有描述 (Chan 等, Plant Mol. Biol. 22, (1993), 491-506；Hiei 等, Plant J. 6, (1994) 271-282；Deng 等, Science in China 33, (1990), 28-34；Wilmink 等, Plant Cell Reports 11, (1992), 76-80；May 等, Bio/Technology 13, (1995), 486-492；Conner 和 Domisse, Int. J. Plant Sci. 153 (1992),

550-555 ;Ritchie等, *Transgenic Res.* 2, (1993), 252-265)。转化单子叶植物的备选体系是通过生物轰击方式进行转化 (Wan和Lemaux, *Plant Physiol.* 104, (1994), 37-48 ;Vasil等, *Bio/Technology* 11(1993), 1553-1558 ;Ritala等, *Plant Mol. Biol.* 24, (1994), 317-325 ;Spencer等, *Theor. Appl. Genet.* 79, (1990), 625-631)、原生质体转化、部分透化细胞的电穿孔、通过玻璃纤维方式引入DNA。尤其是玉米的转化在文献中已有反复的描述(参阅,例如, WO 95/06128、EP0513849、EP0465875、EP0292435 ;Fromm等, *Biotechnology* 8, (1990), 833-844 ;Gordon-Kamm等, *Plant Cell* 2, (1990), 603-618 ;Kozziel等, *Biotechnology* 11(1993), 194-200 ;Moroc等, *Theor. Appl. Genet.* 80, (1990), 721-726)。

[0136] 也已有对其它谷类物种的成功转化的描述,例如大麦(Wan和Lemaux, 见上文 ;Ritala等, 见上文 ;Krens等, *Nature* 296, (1982), 72-74)和小麦(Nehra等, *Plant J.* 5, (1994), 285-297)。所有上述方法都适用于本发明的目的。

[0137] 在植物细胞中具活性的任何启动子通常都适用于表达外源核酸分子。可以选择启动子,以便它可以在本发明植物中组成性表达,或在植物发育中特定的时间点或由外部因素决定的时间点,只在特定组织中表达。对于植物,启动子可以是同源或异源的。

[0138] 在本发明另一实施方案中,为了降低一种或多种 SSIII 蛋白和 / 或 BEI 蛋白和 / 或 BEII 蛋白的活性,至少一种反义 RNA 被表达于植物细胞中。

[0139] 本发明因此还涉及本发明植物细胞,其中所述外源核酸分子选自 :

[0140] a) 编码至少一种反义 RNA 的 DNA 分子,所述反义 RNA 造成编码 SSIII 蛋白和 / 或 BEI 蛋白和 / 或 BEII 蛋白的至少一种内源基因的表达减少 ;

[0141] b) 通过共抑制作用导致编码 SSIII 蛋白和 / 或 BEI 蛋白和 / 或 BEII 蛋白的至少一种内源基因表达减少的 DNA 分子 ;

[0142] c) 编码至少一种核酶的 DNA,所述核酶特异切割编码 SSIII 蛋白和 / 或 BEI 蛋白和 / 或 BEII 蛋白的至少一种内源基因的转录物 ;和

[0143] d) 通过体内诱变方式引入的核酸分子,所述核酸分子在编码 SSIII 蛋白和 / 或 BEI 蛋白和 / 或 BEII 蛋白的至少一种内源基因中导致突变或外源序列插入,该突变或插入造成编码 SSIII 蛋白和 / 或 BEI 蛋白和 / 或 BEII 蛋白的至少一种基因的表达减少,或合成无活性的 SSIII 和 / 或 BEI 和 / 或 BEII 蛋白。

[0144] e) 同时编码至少一种反义 RNA 和至少一种有义 RNA 的 DNA 分子,其中所述反义 RNA 和所述有义 RNA 形成导致编码 SSIII 蛋白和 / 或 BEI 蛋白和 / 或 BEII 蛋白的至少一种内源基因表达降低的双链 RNA 分子 ;

[0145] f) 含转座子的 DNA 分子,其中转座子序列的整合在编码 SSIII 蛋白和 / 或 BEI 蛋白和 / 或 BEII 蛋白的至少一种内源基因中导致突变或插入,所述突变或插入造成编码 SSIII 蛋白和 / 或 BEI 蛋白和 / 或 BEII 蛋白的至少一种基因表达降低或导致无活性 SSIII 和 / 或 BEI 和 / 或 BEII 蛋白合成 ;以及

[0146] g) T-DNA 分子,其中,该分子通过插入编码 SSIII 蛋白和 / 或 BEI 蛋白和 / 或 BEII 蛋白的至少一种内源基因中,导致编码 SSIII 蛋白和 / 或 BEI 蛋白和 / 或 BEII 蛋白的至少一种内源基因表达降低,或导致无活性的 SSIII 和 / 或 BEI 和 / 或 BEII 蛋白合成。

[0147] 另一方面,本发明涉及本发明植物的任何种类的繁殖材料。

[0148] 本发明的另一方面涉及利用本文所述核酸分子产生本发明的植物细胞和植物。

[0149] 本发明的又一方面涉及含有至少一种上述核酸分子的组合物,其中此至少一种核酸分子在引入植物细胞中后导致内源性存在于植物细胞中的至少一种 SSIII 蛋白和内源性存在于植物细胞中的至少一种 BEII 蛋白减少,以及优选地还导致内源性存在于植物细胞中的至少一种 BEI 蛋白减少。所述组合物可以包含一种或多种核酸构建体(参阅上文)。

[0150] 本发明的另一方面涉及利用本发明组合物产生本发明的植物细胞和植物,还涉及含有本发明的组合物的宿主细胞,尤其是植物细胞。

[0151] 而本发明另外的方面涉及植物细胞转化体系,其包括至少一种核酸分子和至少一种植物细胞,其中所述至少一种核酸分子导致在各种情况下内源性存在于植物细胞中的至少一种 SSIII、BEI 和 BEII 蛋白的活性降低,除非由于所述植物细胞中已有的遗传修饰,所述蛋白质的活性已被降低。就本发明的目的而言,“转化体系”由此涉及至少一种待转化的植物细胞和至少一种用于转化的上述核酸分子的组合。植物细胞转化领域内的本领域技术人员所熟悉的且是转化过程中所需要的其它组分,包括缓冲液等,可存在于本发明的转化体系中。

[0152] 附图描述

[0153] 图 1:

[0154] 马铃薯植物淀粉的粘度特性的图示。使用快速粘度分析仪(NewportScientific Pty Ltd., Investment Support Group, Warriwod NSW 2102, 澳大利亚)进行分析。分析进行的条件描述于“一般方法”一章中的 RVA 分析法 1。测试淀粉分离自野生型植物(WT)、SSIII 蛋白和 BEI 蛋白活性降低的植物(038VL008 和 038VL107)的块茎或分离自 SSIII 蛋白和 BEI 蛋白和 BEII 蛋白活性降低的植物(110CF003 和 108CF041)。通过描述于“实施例”、“马铃薯淀粉的提取方法”的方法分离淀粉。

[0155] 图 2:

[0156] 马铃薯植物淀粉的粘度特性的图示。使用快速粘度分析仪(NewportScientific Pty Ltd., Investment Support Group, Warriwod NSW 2102, 澳大利亚)进行分析。分析进行的条件描述于“一般方法”一章中的 RVA 分析法 2。测试淀粉分离自野生型植物(WT)、SSIII 蛋白和 BEI 蛋白活性降低的植物(038VL008 和 038VL107)或 SSIII 蛋白和 BEI 蛋白和 BEII 蛋白活性降低的植物(110CF003 和 108CF041)的块茎。通过描述于“实施例”、“马铃薯淀粉的提取方法”的方法分离淀粉。

[0157] 图 3:

[0158] 马铃薯植物淀粉的粘度特性的图示。使用快速粘度分析仪(NewportScientific Pty Ltd., Investmet Support Group, Warriwod NSW 2102, Australia)。分析所进行的条件描述于“一般方法”一章的 RVA 分析法 3。测试淀粉分离自野生型植物(WT)、具有降低的 SSIII 蛋白质和 BEI 蛋白质活性的植物(038VL008 和 038VL107)或具有降低的 SSIII 蛋白质和 BEI 蛋白质及 BEII 蛋白质活性的植物(110CF003 和 108CF041)的块茎,通过描述于“实施例”、“马铃薯淀粉的提取方法”的方法分离淀粉。

[0159] 图 4:

[0160] 分离自野生型植物的马铃薯淀粉颗粒的扫描电镜显微照片。

[0161] 图 5:

[0162] 分离自具有降低的 SSIII 蛋白质和 BEI 蛋白质及 BEII 蛋白质活性的植物

(110CF003) 的马铃薯淀粉颗粒的扫描电镜显微照片。

[0163] 图 6 :

[0164] 载体 pGSV71- $\alpha$ -BEII-basta 的示意图,该载体用于再转化已观察到 SSIII 蛋白质和 BEI 蛋白质活性降低的植物。

[0165] (RB:T-DNA 左边界, LB:T-DNA 右边界 ;CaMV35 :花椰菜花叶病毒 35S 启动子 ;NOS :根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 胭脂碱合酶基因的聚腺苷酸化序列 ;OCS :根癌农杆菌章鱼碱合酶基因的聚腺苷酸化序列 ;B33 :马铃薯 patatin 基因的启动子 ;BEII :马铃薯 BEII 基因的编码序列 ;bar :编码吸水链霉菌 (*Streptomyces hygrosopicus*) 膈丝菌素乙酰转移酶的序列)。

[0166] 图 7 :

[0167] 载体 pB33- $\alpha$ -BE- $\alpha$ -SSIII-Kan 的示意图,该载体用于产生具有降低的 SSIII 蛋白质和 BEI 蛋白质活性的转基因植物 (RB:T-DNA 左边界, LB:T-DNA 右边界 ;nos5' :根癌农杆菌胭脂碱合酶基因的启动子 ;nptII :编码新霉素磷酸转移酶活性的基因 ;nos3 :根癌农杆菌胭脂碱合酶基因的聚腺苷酸化序列 ;OCS :根癌农杆菌章鱼碱合酶基因的聚腺苷酸化序列 ;B33 :马铃薯 Patatin 基因的启动子 ;BE :马铃薯 BEI 基因的编码序列 ;SSIII :马铃薯 SSIII 基因的编码序列)。

[0168] 图 8 :

[0169] 此图显示来自 038VL008、108CF041 和野生型株系的淀粉的支链淀粉的完整洗脱图。如此图所示,与背景 038VL008 和 / 或相应的野生型相比,108CF041 系中较大侧链的数量明显更高。

[0170] 图 9 :

[0171] 具有相应葡聚糖标准的校准曲线和表格

[0172] 图 10 :

[0173] 此图显示来自 038VL008、108CF041 和野生型株系的淀粉的支链淀粉的完整洗脱图。与图 8 相反,该 x 轴不表示洗脱体积,而表示分子量。借助于图 9 校准图表,图 8 的洗脱图被显示为分子量分布的函数。

[0174] 图 11 :

[0175] 此图表示与来自野生型植物的支链淀粉的侧链分布相比,来自 038VL008 系植物的支链淀粉的侧链分布。

[0176] 图 12 :

[0177] 此图表示与来自野生型植物的支链淀粉的侧链分布相比,来自 108CF041 系植物的支链淀粉的侧链分布。

[0178] 序列说明

[0179] Seq ID 1 :

[0180] 马铃薯 (*Solanum tuberosum*) 淀粉合酶 SSIII 的核酸序列,其中指出编码相应 SSIII 蛋白质的序列。

[0181] Seq ID 2 :

[0182] 马铃薯 SSIII 蛋白质的氨基酸序列。

[0183] Seq ID 3 :

- [0184] 马铃薯 (*Solanum tuberosum*) SSIII 蛋白质 Pfam cbm25 结合域的氨基酸序列。
- [0185] Seq ID 4 :
- [0186] 马铃薯 (*Solanum tuberosum*) 分支酶 BEI 的核酸编码序列。
- [0187] Seq ID 5 :
- [0188] 马铃薯 (*Solanum tuberosum*) 分支酶 BEI 的氨基酸序列。
- [0189] Seq ID 6 :
- [0190] 马铃薯 (*Solanum tuberosum*) 分支酶 BEII 的核酸编码序列。
- [0191] Seq ID 7 :
- [0192] 马铃薯 (*Solanum tuberosum*) 分支酶 BEII 的氨基酸序列。
- [0193] Seq ID 8 :
- [0194] PCR 扩增的马铃薯 (*Solanum tuberosum*) 分支酶 BEII 核酸序列。
- [0195] 一般方法
- [0196] 以下方法被用于实施例中 :
- [0197] 淀粉分析
- [0198] a) 直链淀粉含量以及直链淀粉 / 支链淀粉比例的测定
- [0199] 通过标准方法从马铃薯植物中分离淀粉, 并通过 Hovenkamp-Hermelink 等人 (Potato Research 31, (1988), 241-246) 描述的方法测定直链淀粉含量和直链淀粉 : 支链淀粉比例。
- [0200] b) 磷酸含量测定
- [0201] 在淀粉中, 葡萄糖单元的 C2、C3 和 C6 位置可以被磷酸化。为了测定淀粉的 C6-P 含量, 于 95°C 在 500  $\mu$ l 0.7M HCl 中水解 50mg 淀粉 4h。然后以 15500g 对样品离心 10 分钟, 并移走上清液。将 7  $\mu$ l 上清液与 193  $\mu$ l 咪唑缓冲液 (100mM 咪唑, pH 7.4 ; 5mM MgCl<sub>2</sub>、1mM EDTA 和 0.4mM NAD) 混合。在光度计中于 340nm 进行测量。在确立基础吸收之后, 加入两单位葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (来自肠膜明串珠菌 (*Leuconostoc mesenteroides*), Boehringer Mannheim) 起始酶反应。吸收的改变与淀粉 G-6-P 含量的浓度直接成比例。
- [0202] 通过 Ames (Methods in Enzymology VIII, (1966), 115-118) 的方法直接测定磷酸总含量。
- [0203] 用 30  $\mu$ l 硝酸镁乙醇溶液处理约 50mg 淀粉并在马弗炉中于 500°C 灰化 3 小时。用 300  $\mu$ l 0.5M 的盐酸处理残余物并在 60°C 孵育 30 分钟。随后将一份等分试样补到 300  $\mu$ l 0.5M 的盐酸并加到 100  $\mu$ l 10% 的抗坏血酸和 600  $\mu$ l 0.42% 的钼酸铵 (于 2M 硫酸中) 的混合物中, 并在 45°C 孵育 20 分钟。
- [0204] 之后以一个磷酸校准系列为标准, 于 820nm 进行光度测定。
- [0205] c) 凝胶强度测定 (质构分析仪)
- [0206] 在 RVA 仪中, 于 25ml 水悬浮液中糊化 1.5g 淀粉 (DM) (温度程序 : 见条目 d : “通过 Rapid Visco Analyser (RVA) 测定粘度特性”) 并随后在密封的容器中于室温保藏 24 小时。将样品固定于来自 Stable Micro Systems (Surrey, UK) 的 Texture Analyser TA-XT2 的探头 (具有平坦表面的圆形活塞) 下并使用以下参数测定凝胶强度 :
- [0207] - 测试速度 0.5mm/s
- [0208] - 穿入深度 7mm

[0209] - 接触表面 113mm<sup>2</sup>

[0210] - 压力 2g

[0211] d) 通过 Rapid Visco Analyser (RVA) 测定粘度特性

[0212] 标准方法

[0213] 将 2g 淀粉 (DM) 吸收进 25ml H<sub>2</sub>O (VE- 型水, 导电性至少 15 百万欧姆) 中, 并用于在 Rapid Visco Analyser (Newport Scientific Pty Ltd., Investmet Support Group, Warriewood NSW 2102, Australia) 中分析。按照制造商的说明操作仪器。根据制造商的操作手册 (将此作为参考整合进说明书), 以 RVU 表示粘度值。为了确定淀粉水溶液的粘度, 首先在 50°C 对淀粉悬浮液加热 1 分钟 (步骤 1), 然后以每分钟 12°C 的速率从 50°C 加热到 95°C (步骤 2)。然后将温度在 95°C 保持 2.5 分钟 (步骤 3)。随后以每分钟 12°C 的速率从 95°C 将溶液冷却到 50°C (步骤 4)。在整个过程中测定粘度。

[0214] 特别是在这些情况下, 即当应用 2.0g (DM) 淀粉于 25ml H<sub>2</sub>O (VE- 型水, 导电性至少 15mega ohm) 中而 RVA 的测量范围的界限不足时, 则只在 25ml H<sub>2</sub>O (VE- 型水, 导电性至少 15mega ohm) 中吸收进 1.5g 淀粉 (DM)。

[0215] 为了与现有技术相比较, 在某些情况下还使用了修改的温度曲线。以下温度曲线被使用:

[0216] RVA 分析法 1:

[0217] 为了测定 6% 淀粉水溶液的粘度, 首先以 960rpm 对淀粉悬浮液搅拌 10 秒钟, 并随后以 160rpm 的搅拌速度在 50°C 加热, 最初为 1 分钟 (步骤 1)。然后以每分钟 12°C 的加热速率将温度从 50°C 升高到 95°C (步骤 2)。将温度在 95°C 保持 2.5 分钟 (步骤 3) 并随后以每分钟 12°C 从 95°C 冷却到 50°C (步骤 4)。在最后的步骤中 (步骤 5), 将 50°C 的温度保持两分钟。

[0218] 程序结束之后, 移走搅拌器并盖住烧杯。24 小时之后即可获得用于质构分析的糊化淀粉。

[0219] RVA 分析法 2:

[0220] 为了测定 6% 淀粉水溶液的粘度, 首先以 960rpm 对淀粉悬浮液搅拌 10 秒钟, 并随后以 160rpm 的搅拌速度在 50°C 加热, 最初为两分钟 (步骤 1)。然后以每分钟 1.5°C 的加热速率将温度从 50°C 升高到 95°C (步骤 2)。将温度在 95°C 保持 15 分钟 (步骤 3) 并随后以每分钟 1.5°C 从 95°C 冷却到 50°C (步骤 4)。在最后的步骤中 (步骤 5), 将 50°C 的温度保持 15 分钟。

[0221] 程序结束之后, 移走搅拌器并盖住烧杯。24 小时之后即可获得用于质构分析的糊化淀粉。

[0222] RVA 分析法 3:

[0223] 为了测定 10% 淀粉水溶液的粘度, 首先以 960rpm 对淀粉悬浮液搅拌 10 秒钟, 并随后以 160rpm 的搅拌速度在 50°C 加热, 最初为两分钟 (步骤 1)。然后以每分钟 1.5°C 的加热速率将温度从 50°C 升高到 95°C (步骤 2)。将温度在 95°C 保持 15 分钟 (步骤 3) 并随后以每分钟 1.5°C 从 95°C 冷却到 50°C (步骤 4)。在最后的步骤中 (步骤 5), 将 50°C 的温度保持 15 分钟。该 RVA 分析谱相应于使用于 W09634968 的谱。

[0224] 程序结束之后, 移走搅拌器并盖住烧杯。24 小时之后即可获得用于质构分析的糊

化的淀粉。

[0225] 该 RVA 分析谱包括用于比较不同的测量和物质的参数。在本发明的上下文中,以下术语按如下理解:

[0226] 1. 最大粘度 (RVA Max)

[0227] 最大粘度被理解为以 RVU 测量的、在温度曲线的步骤 2 或 3 获得的最大粘度值。

[0228] 2. 最小粘度 (RVA Min)

[0229] 最小粘度被理解为以 RVU 测量的、于最大粘度之后在温度曲线中观察到的最小粘度值。通常,这发生在温度曲线的步骤 3。

[0230] 3. 终粘度 (RVA Fin)

[0231] 终粘度被理解为以 RVU 测量的、在测量结束时观察到的粘度值。

[0232] 4. 回拨 (Setback) (RVA Set)

[0233] 所谓“回拨”通过将曲线中最大粘度之后产生的最小值减去终粘度值而计算。

[0234] 5. 糊化温度 (RVA T)

[0235] 糊化温度被理解为温度曲线中的时间点,在此时间点,粘度首次在短时间内剧烈增加。

[0236] e) 通过离子交换层析分析支链淀粉的侧链分布

[0237] 为了分离直链淀粉和支链淀粉,于 50ml 反应容器内,使用 12ml 90% (v/v) 的 DMSO 水溶液溶解 200mg 淀粉。加入 3 倍体积的乙醇后,于室温 (RT) 以约 1800g 离心 10 分钟分离沉淀。然后用 30ml 乙醇洗涤沉淀,干燥并于 75°C 溶解于 40ml 1% (w/v) 的 NaCl 溶液。溶液冷却到 30°C 以后,缓慢加入约 90mg 麝香草酚,并在 30°C 对此溶液孵育至少 60h。然后以 2000g (RT) 对溶液离心 30 分钟。之后用 3 倍体积的乙醇处理上清液,并通过 2000g (RT) 离心 5 分钟分离沉淀出的支链淀粉。然后用乙醇洗涤沉淀 (支链淀粉) 并用丙酮干燥。通过向沉淀加入 DMSO,获得 1% 的溶液,200  $\mu$ l 的此溶液被 345  $\mu$ l 的水、10  $\mu$ l 的 0.5M 醋酸钠 (pH 3.5) 和 5  $\mu$ l 的异淀粉酶 (1 : 10 稀释, Megazyme) 处理,并于 37°C 孵育约 16 小时。随后通过 0.2  $\mu$ m 的滤器过滤此消化物 1 : 5 的水稀释液,并通过离子层析 (HPAEC-PAD, Dionex) 分析 100  $\mu$ l 的此滤液。使用 PA-100 柱 (具有适当的前置柱) 进行分离,而使用电流测定法进行检测。洗脱条件如下:

[0238] 溶液 A-0.15M NaOH

[0239] 溶液 B-1M 醋酸钠于 0.15M NaOH 中

[0240]

t (分钟)	溶液 A (%)	溶液 B (%)
5	0	100
35	30	70
45	32	68
60	100	0



70	100	0
72	0	100
80	0	100
终止		

[0241] 表 1:在 HPEAC-PAD Dionex 分析中,用于支链淀粉侧链分析的洗脱缓冲液在不同时间的组成。在所述时间之间,洗脱缓冲液的组成总是以线性变化。

[0242] 短侧链在所有侧链的总和中的相对量的测定是经由特定侧链在所有侧链总和中的百分数的测定来进行。所有侧链的总和是通过测定 HPLC 层析谱中表示 DP6 到 26 聚合度的峰之下的总面积来确定的。

[0243] 特定侧链在所有侧链的总和中的百分数是经由测定 HPLC 层析谱中表示该侧链的峰下面积与总面积的比例来确定的。来自 Dionex,USA 的程序 Chromelion 6.20 版本 6.20 被用于测定峰面积。

[0244] f) 粒度的测定

[0245] 通过标准方法从马铃薯块茎提取淀粉(见实施例)。

[0246] 然后利用软件 V. 2.3,使用来自 Retsch GmbH,Germany 的“LumosedFS1”型光电沉降仪 (photosedimentometer) 进行粒度测定。软件设置如下:

[0247] 物质数据: 校准 NO. 0  
 [0248] 密度 [kg/m<sup>3</sup>] 1500  
 [0249] 沉降液体 类型 水  
 [0250] 粘度 [Pa s] 0.001  
 [0251] 密度 [kg/m<sup>3</sup>] 1000  
 [0252] 添加物 -  
 [0253] 记录 5 分钟  
 [0254] 截断 [μm] 250  
 [0255] 通过 [%] 100  
 [0256] 测量范围 4.34-117.39 μm  
 [0257] 校准 N  
 [0258] 温度 20°C

[0259] 在水溶液中测定粒度分布,按照制造商的说明,基于如文献 H.Pitsch, **Korngrößenbestimmung** [粒度测定];LABO-1988/3 Fachzeitschrift für Labortechnik, Darmstadt 进行测定。

[0260] g) 扫描电镜显微照片 (SEM)

[0261] 为了研究淀粉样品的表面,使用导电粘合剂将淀粉样品撒于样品固定器表面。为了避免电荷,最后用 4nm 的 Pt 涂层喷镀样品固定器。使用场致发射扫描电子显微镜 JSM 6330 F(JeoI) 以 5kV 的加速电压研究淀粉样品。

[0262] h) SSIH、BEI 和 BEII 蛋白质的活性测定

[0263] 这些测定如实施例详细描述的进行。

[0264] 实施例

[0265] 表达载体 ME5/6 的产生

[0266] pGSV71 是质粒 pGSV7 的衍生物, pGSV7 质粒来自中间载体 pGSV1。pGSV1 是 pGSC1700 的衍生物, pGSC1700 的构建已由 Cornelissen 和 Vanderwiele (Nucleic Acid Research 17, (1989), 19-25) 描述。通过缺失羧苄青霉素抗性基因和缺失 pTiB6S3 质粒 TL-DNA 区的 T-DNA 序列, 从 pGSC1700 获得 pGSV1。

[0267] pGSV7 含有质粒 pBR322 (Bolivar 等人, Gene 2, (1977), 95-113) 的复制起点和假单胞菌 (*Pseudomonas*) 质粒 pVS1 (Itoh 等人, Plasmid 11, (1984), 206) 的复制起点。pGSV7 还含有来自肺炎克氏杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 转座子 Tn1331 的选择性标记基因 *aadA*, 该基因赋予抗生素 (壮观霉素和链霉素) 抗性 (Tolmasky, Plasmid 24(3), (1990), 218-226; Tolmasky 和 Crosa, Plasmid 29(1), (1993), 31-40)。

[0268] 通过在 pGSV7 边界区之间克隆嵌合 *bar* 基因, 获得 pGSV71 质粒。嵌合 *bar* 基因含有用于起始转录的花椰菜花叶病毒启动子序列 (Ode11 等人, Nature 313, (1985), 180)、吸水链霉菌 *bar* 基因 (Thompson 等人, Embo J. 6, (1987), 2519-2523) 和用于转录终止及聚腺苷酸化的 pTiT37T-DNA 胭脂碱 (*nopal*) 合酶基因的 3'-非翻译区。*bar* 基因赋予对草铵膦 (*glufosinate-ammonium*) 除草剂的耐受性。

[0269] T-DNA 在 198-222 位置含有来自质粒 pTiB6S3 (Gielen 等人, EMBO J. 3, (1984), 835-846) 的 TL-DNA 的右边界序列。多接头序列位于核苷酸 223-249 之间。核苷酸 250-1634 含有花椰菜花叶病毒 p35S3 启动子区 (Ode11 等人, 见上文)。吸水链霉菌膦丝菌素抗性基因 (*bar*) (Thompson 等人 1987, 见上文) 的编码序列被安排在核苷酸 1635-2186 之间。*bar* 野生型基因 5' 端的两个终止密码子被密码子 ATG 和 GAC 置换。多接头序列位于核苷酸 2187-2205 之间。来自 pTiT37 质粒 (Depicker 等人, J. Mol. Appl. Genet. 1, (1982), 561-573) T-DNA 的胭脂碱合酶基因非翻译 3' 端 (3' nos) 的 260bp *TaqI* 片段位于核苷酸 2206 和 2465 之间。核苷酸 2466-2519 含有多接头序列。pTiB6S3 TL-DNA (Gielen 等人, EMBO J. 3, (1984), 835-846) 的左边界序列位于核苷酸 2520-2544 之间。

[0270] 然后使用 *PstI* 酶切割载体 pGSV71 并平端化。然后以 *EcoRI*-*HindIII* 片段的形式从载体 pB33-Kan 上切下 B33 启动子和 *ocs* 盒, 平端化并插入进已经被 *PstI* 切割并平端化的 pGSV71 载体。产生的载体作为起始载体用于 ME5/6 的构建: 含有 *EcoRI*、*PacI*、*SpeI*、*SrfI*、*SpeI*、*NotI*、*PacI* 和 *EcoRI* 切割位点的寡核苷酸被引入进位于 B33 启动子和 *ocs* 元件之间的 ME4/6 载体的 *PstI* 切割位点, 复制此 *PstI* 切割位点。产生的表达载体被命名为 ME5/6。

[0271] 载体 pSK-Pac 说明:

[0272] pSK-Pac 是 pSK-Bluescript (Stratagene, USA) 的衍生物, 其中在多克隆位点 (MCS) 的两侧分别引入了一个 *PacI* 切割位点。

[0273] 具有降低的 BEI、SSIII 和 BEII 基因表达的转基因马铃薯植物的产生

[0274] 为了产生 BEI、SSIII 和 BEII 蛋白质活性降低的转基因植物, 第一步产生了具有降低的 BEI 和 SSIII 蛋白质活性的转基因植物。为此, 如 Rocha-Sosa 等人 (EMBO J. 8, (1989), 23-29) 的描述, 借助于农杆菌将质粒 pB33- $\alpha$  BEI- $\alpha$  SSIII-Kan 的 T-DNA 转移进马铃薯植物。

[0275] 为了构建质粒 pB33- $\alpha$  BEI- $\alpha$  SSIII-Kan( 见图 7), 在第一步中构建了表达载体 pBin33-Kan。为此, 马铃薯 patatin 基因 B33 (Rocha-Sosa 等人, 1989, 见上文) 的启动子以 DraI 片段 (核苷酸 -1512--+14) 的形式被连接进 SstI- 切割并借助 T4DNA 聚合酶平端化末端的载体 pUC19 (GenbankAcc. No. M77789)。由此产生质粒 pUC19-B33。使用 EcoRI 和 SmaI, 从这一质粒上切下 B33 启动子, 并连接进适当切割的载体 pBinAR。由此产生植物表达载体 pBin33-Kan。质粒 pBinAR 是载体质粒 pBin19 (Bevan, Nucl. Acid Research 12, (1984), 8711-8721) 的衍生物, 由 Hofgen 和 Willmitzer (Plant Sci. 66, (1990), 221-230) 构建。然后平端化含有编码马铃薯 BEI 酶 (Kossmann 等人, 1991, Mol. & Gen. Genetics 230(1-2) : 39-44) 的部分 cDNA 的 1631bp HindII 片段并以相对于 B33 启动子 (马铃薯 patatin 基因 B33 的启动子; Rocha-Sosa 等人, 1989) 的反义方向引入进之前被 SmaI 切割的载体 pBin33。使用 BamHI 切开产生的质粒。将含有编码马铃薯 SSIII 酶 (Abel 等人, 1996, 上述引文) 的部分 cDNA 的 1363bp BamHI 片段再次以相对于 B33 启动子的反义方向引入进切割位点。

[0276] 转化之后, 鉴定在其块茎中观察到 BEI 和 SSIII 蛋白质活性明显降低的转基因马铃薯植物的不同株系。从该转化中产生的植物被命名为 038VL。

[0277] 为了通过非变性凝胶电泳检测可溶性淀粉合酶 (SSIII) 活性, 在 50mM Tris-HCl (pH 7.6)、2mM DTT、2.5mM EDTA、10% 甘油和 0.4mM PMSF 中消化马铃薯块茎的组织样品。在 MiniProtean II 室 (BioRAD) 中进行电泳。厚度为 1.5mm 的凝胶的单体浓度总计达 7.5% (w/v), 并以 25mM Tris-甘氨酸 (pH 8.4) 作为凝胶和电泳缓冲液。对于每块凝胶, 使用等量的蛋白质提取物, 以 10mA 分离 2 小时。

[0278] 随后在 50mM Tricine-NaOH (pH 8.5)、25mM 醋酸钾、2mM EDTA、2mM DTT、1mM ADP-葡萄糖、0.1% (w/v) 支链淀粉和 0.5M 柠檬酸钠中孵育活性凝胶。形成的葡聚糖被 Lugol 氏溶液染色。

[0279] 同样借助于非变性凝胶电泳检测 BEI 活性:

[0280] 为了从植物中分离蛋白质, 使用杵和研钵在液氮中粉碎样品材料, 将材料吸收进抽提缓冲液 (50mM 柠檬酸钠, pH 6.5; 1mM EDTA、4mM DTT), 离心 (10 分钟, 14000g, 4°C), 然后直接用于根据 Bradford 方法的蛋白质浓度测量。然后用 4x 加样缓冲液 (20% 甘油、125mM TrisHCl, pH 6.8) 处理 5 到 20  $\mu$ g 全蛋白提取物 (按需要) 并应用于 BE 活性凝胶。电泳缓冲液 (RB) 组成如下: RB = 每一升水中 30.2g Tris 碱、pH 8.0、144g 甘氨酸。

[0281] 凝胶电泳结束后, 每块凝胶在 25ml “磷酸化酶缓冲液” (25ml 1M 柠檬酸钠 (pH 7.0)、0.47g 葡萄糖-1-磷酸、12.5mg AMP、2.5mg 来自兔的磷酸化酶 a/b) 中, 于 37°C 孵育过夜。使用 Lugol 氏溶液染色凝胶。

[0282] 更深入的分析表明从 BEI 和 SSIII 蛋白质都有所降低的 038VL008 和 038VL107 系分离的淀粉表现出所有研究的独立转化体中最高的磷酸含量。

[0283] 随后用如 Rocha-Sosa 等人 (EMBO J. 8, (1989), 23-29) 描述的 pGSV71- $\alpha$  BEII-basta 质粒转化这些株系的植物。

[0284] 通过用 DNA 片段筛选块茎特异的马铃薯 cDNA 文库, 从而构建 pGSV71- $\alpha$  BEII-basta 质粒, 所述 DNA 片段扩增自以块茎总 RNA 为模板, 根据标准方法的 RT-PCR (引物: 5' -gggggtgttgctttgacta 和 5' -cccttctctctctaatccca; Stratagene ProSTAR™ HF Single-Tube RT-PCR 系统)。如此, 分离出约 1250bp 的 DNA 片段 (SEQ ID

No. 8), 然后以 EcoRV-SmaI 片段的形式亚克隆进克隆载体 pSK-Pac (见上文) 的 EcoRV 切割位点, 并随后以 PacI 片段的形式, 以相对于启动子的反义方向连接进表达载体 ME5/6。由此产生质粒 pGSV71- $\alpha$  BEII-basta (见图 6)。

[0285] 从用质粒 pGSV71- $\alpha$  BEII-basta 转化获得的被称为 108CF 和 110CF 的植物中得到独立转化体的块茎组织样品, 并测定了它们的直链淀粉含量 (见方法)。来自其块茎具有最高直链淀粉含量的独立株系的淀粉被用于淀粉特性的进一步分析。为了证明在这些植物中, 不仅 BEI 和 SSIII 蛋白质的活性有所降低, 而且 BEII 蛋白质的活性也有所降低, 借助于非变性凝胶电泳进行了另一分析。除了非变性聚丙烯酰胺凝胶含有 0.5% 的麦芽糖糊精 (Beba, 用于新生儿的 15% 浓度的麦芽糖糊精溶液, Nestle) 及上述组成外, 按照上文已经进行的分析 BEI 活性降低的相同方法进行分析。加入糊精使凝胶在“磷酸化酶缓冲液”(25ml 1M 柠檬酸钠 (pH 7.0)、0.47g 葡萄糖-1-磷酸、12.5mg AMP、2.5mg 来自兔的磷酸化酶 a/b) 中于 37°C 过夜孵育, 并用 Lugol 氏溶液染色后, 能够显现出 BEI 和 BEII 蛋白质的不同活性。

#### [0286] 马铃薯淀粉提取方法

[0287] 在可商业获得的榨汁机 (Multipress automatic MP80, Braun) 中加工一个株系的所有块茎 (4 到 5kg)。将含有淀粉的果汁收集于含有 200ml 自来水和一满匙二亚硫酸钠 (sodium disulphite) (约 3-4 克) 的 10 升桶中 (桶高度: 桶直径的比例  $\approx$  约 1.1)。随后用自来水将此桶填满。在允许淀粉沉降两小时之后, 滗去上清液, 将淀粉重悬浮于 10 升的自来水中并倾倒在网孔大小为 125  $\mu$ m 的筛上。两小时后 (淀粉已经再次沉降于桶的底部), 再次滗去水性上清液。再重复这一洗涤步骤 3 次, 以便将淀粉总共 5 次重悬浮于新鲜自来水中。之后, 在 37°C 将淀粉干燥至 12-17% 的含水量并使用杵和研钵均化。至时, 淀粉可用于分析。

#### [0288] 实施例 2

[0289] 分析来自 BEI、SSIII 和 BEII 基因表达降低的植物的淀粉

[0290] 从马铃薯块茎中分离来自描述于实施例 1 的转化体 108CF 和 110CF 的不同独立株系的淀粉。随后分析此淀粉的理化性质。改性的淀粉的特征结果示于表 2 (Tab. 2), 作为选择的一些植物系的例子。通过上文描述的方法进行分析。

[0291] 以下表 2、3 和 4 概括基于来自野生型植物的淀粉的 RVA 分析结果:

#### [0292] RVA 分析法 1

#### [0293]

	RVA Max (%)	RVA Min (%)	RVA Fin (%)	RVA Set (%)	RVA T (%)	凝胶强度
cv. Desiree	100	100	100	100	100	100
038VL008	158.7	69.8	72.0	79.5	73.0	55.4
108CF041	59.6	89.9	227.5	693.7	150.2	532.3

038VL107	151.1	94.3	94.0	93.0	82.2	52.2
110CF003	106.4	158.6	265.0	625.7	151.5	737.1

[0294] 表 2:从野生型植物 (cv. Desiree)、具有降低的 SSIII 和 BEI 蛋白质活性的植物 (038VL008、038VL107), 以及具有降低的 SSIII、BEI 和 BEII 蛋白质活性的植物 (108CF041、110CF003) 中分离的淀粉的 RVA 分析参数, 所述参数以基于野生型淀粉数据的百分数表示。RVA 分析如分析法 1 中所描述的进行。

[0295] RVA 分析法 2

[0296]

	RVA Max(%)	RVA Min(%)	RVA Fin (%)	RVA Set(%)	RVA T (%)	凝胶强度
cv. Desiree	100	100	100	100	100	100
038VL008	167.1	40.4	52.6	77.6	54.2	63.0
108CF041	44.5	82.5	187.5	402.7	137.4	412.2
038VL107	152.0	76.1	81.9	93.8	76.9	51.7
110CF003	92.4	172.2	n. d.	n. d.	139.0	795.0

[0297] 表 3:从野生型植物 (cv. Desiree)、具有降低的 SSIII 和 BEI 蛋白质活性的植物 (038VL008、038VL107), 以及具有降低的 SSIII、BEI 和 BEII 蛋白质活性的植物 (108CF041、110CF003) 中分离的淀粉的 RVA 分析参数, 所述参数以基于野生型淀粉数据的百分数表示。RVA 分析如分析法 2 中所描述的进行。

[0298] RVA 分析法 3

[0299]

	RVA Max(%)	RVA Min(%)	RVA Fin (%)	RVA Set(%)	RVA T (%)	凝胶强度
cv. Desiree	100	100	100	100	100	100
038VL008	n. d.	50.2	76.5	127.8	77.0	100.5
108CF041	74.7	291.0	n. d.	205.7	236.0	630.3
038VL107	n. d.	84.5	86.4	90.1	102.3	58.1

110CF003	89.8	259.7	n. d.	n. d.	196.6	663.9
----------	------	-------	-------	-------	-------	-------

[0300] 表 4:从野生型植物 (cv. Desiree)、具有降低的 SSIII 和 BEI 蛋白质活性的植物 (038VL008、038VL107), 以及具有降低的 SSIII、BEI 和 BEII 蛋白质活性的植物 (108CF041、110CF003) 中分离的淀粉的 RVA 分析参数, 所述参数以基于野生型淀粉数据的百分数表示。RVA 分析如分析法 3 中所描述的进行。

[0301] 以下表 5、6 和 7 概括 RVA 分析的结果。数据不参照野生型, 而是实际的测量:

[0302] RVA 分析法 1 (也见图 1)

[0303]

	RVA Max (RVU)	RVA Min (RVU)	RVA Fin (RVU)	RVA Set (RVU)	RVA T (RVU)	凝胶 强度
cv. Desiree	255.05	162.33	210.25	47.92	4.6	25.1
038VL008	404.83	113.25	151.33	38.08	3.36	13.9
108CF041	152.08	145.92	478.33	332.42	6.91	133.6
038VL107	385.5	153	197.58	44.58	3.78	13.1
110CF003	271.5	257.42	557.25	299.83	6.97	185

[0304] 表 5:从野生型植物 (cv. Desiree)、具有降低的 SSIII 和 BEI 蛋白质活性的植物 (038VL008、038VL107), 以及具有降低的 SSIII、BEI 和 BEII 蛋白质活性的植物 (108CF041、110CF003) 中分离的淀粉的 RVA 分析参数, 所述参数以 RVU 表示。RVA 分析如分析法 1 中所描述的进行。

[0305] RVA 分析法 2 (也见图 2)

[0306]

	RVA Max (RVU)	RVA Min (RVU)	RVA Fin (RVU)	RVA Set (RVU)	RVA T (RVU)	凝胶强 度
cv. Desiree	212.17	113.75	169.25	55.5	28.78	23.8
038VL008	354.58	45.92	89	43.08	15.61	15
108CF041	94.33	93.83	317.33	223.5	39.53	98.1
038VL107	322.58	86.58	138.67	52.08	22.13	12.3

110CF003	196.08	195.92	n. d.	n. d.	39.99	189.2
----------	--------	--------	-------	-------	-------	-------

[0307] 表 6 :从野生型植物 (cv. Desiree)、具有降低的 SSIII 和 BEI 蛋白质活性的植物 (038VL008、038VL107), 以及具有降低的 SSIII、BEI 和 BEII 蛋白质活性的植物 (108CF041、110CF003) 中分离的淀粉的 RVA 分析参数, 所述参数以 RVU 表示。RVA 分析如分析法 2 中所描述的进行。

[0308] RVA 分析法 3 (也见图 3)

[0309]

	RVA Max (RVU)	RVA Min (RVU)	RVA Fin (RVU)	RVA Set (RVU)	RVA T (RVU)	凝胶强度
Desiree	819.67	207.67	314.25	106.58	16.88	56.5
038VL008	n. d.	104.17	240.33	136.17	12.99	56.8
108CF041	612.33	604.25	823.5	219.25	39.83	356.1
038VL107	n. d.	175.42	271.5	96.08	17.27	32.8
110CF003	736.08	539.42	n. d.	n. d.	33.18	375.1

[0310] 表 7 :从野生型植物 (cv. Desiree)、具有降低的 SSIII 和 BEI 蛋白质活性的植物 (038VL008、038VL107), 以及具有降低的 SSIII、BEI 和 BEII 蛋白质活性的植物 (108CF041、110CF003) 中分离的淀粉的 RVA 分析参数, 所述参数以 RVU 表示。RVA 分析如分析法 3 中所描述的进行。

[0311] 磷酸和直链淀粉分析的概括 :

[0312]

No.	基因型	C6 中的磷酸 (%)	总磷酸 (%)	直链淀粉 (%)	直链淀粉 (% WT)
1	cv. Desiree	100	100	22	100
2	038VL008	346.4	255.2	19.4	85.8
3	108CF041	557.3	427.6	36.8	162.8
4	038VL107	225.5	182.8	19.7	87.2
5	110CF003	446.4	348.3	34.6	153.1

[0313] 表 8 :从野生型植物 (cv. Desiree)、具有降低的 SSIII 和 BEI 蛋白质活性的植物 (038VL008、038VL107) 以及具有降低的 SSIII、BEI 和 BEII 蛋白质活性的植物 (108CF041、

110CF003) 中分离的淀粉的磷酸和直链淀粉含量。以基于来自野生型植物的淀粉的百分数表示葡萄糖单体 C6 位置的磷酸含量和淀粉中总的磷酸含量；以直链淀粉占淀粉总量的百分数，或者以基于野生型植物淀粉中直链淀粉含量的百分数表示直链淀粉含量。

[0314] 支链淀粉的侧链分布分析如上文描述的进行。下表是对各个峰面积贡献的概括：

[0315]

葡萄糖单元	cv. Desiree	038VL 008	108CF 041	038VL 107	110CF 003
dp 6	1.52	4.16	1.88	2.39	0.86
dp 7	1.4	1.4	0.63	1.42	0.59
dp 8	1.23	0.77	0.33	0.99	0.38
dp 9	2.05	1.42	0.74	1.79	0.75
dp 10	3.55	2.8	1.74	3.33	1.77
dp 11	5.16	4.41	2.92	4.96	3.46
dp 12	6.25	5.77	4.47	6.22	5.17
dp 13	6.71	6.7	5.63	6.87	6.35
dp 14	6.75	7.06	6.35	6.99	7.38
dp 15	6.48	6.76	6.62	6.65	7.63
dp 16	6.07	5.99	6.34	6.11	7.13
dp 17	5.6	5.21	5.81	5.49	6.3
dp 18	5.28	4.78	5.87	5.11	5.98
dp 19	4.99	4.74	6.17	4.94	5.91
dp 20	4.76	4.65	6.07	4.78	5.64
dp 21	4.5	4.46	5.65	4.5	5.26
dp 22	4.16	4.12	5.07	4.2	4.7
dp 23	3.77	3.68	4.59	3.78	4.19
dp 24	3.44	3.36	4.24	3.42	3.75



dp 25	3.08	3.09	3.86	3.07	3.49
dp 26	2.73	2.8	3.36	2.77	3.03
dp 27	2.39	2.58	2.95	2.37	2.65
dp 28	2.07	2.26	2.39	2.01	2.1
dp 29	1.67	1.87	1.87	1.71	1.69
dp 30	1.38	1.58	1.54	1.35	1.3
dp 31	1.07	1.28	1.02	1.04	0.87
dp 32	0.79	0.96	0.7	0.75	0.6
dp 33	0.57	0.69	0.6	0.51	0.51
dp 34	0.36	0.43	0.39	0.32	0.34
dp 35	0.22	0.22	0.19	0.17	0.2
总计	100	100	99.99	100.01	99.98

[0316] 表 9 :该表概括了野生型植物 (cv. Desiree)、038VL008 和 038VL107 植物 (具有降低的 SSIII 蛋白质和 BEI 蛋白质活性的马铃薯植物) 以及选择的 108CF 和 110CF 转化体系 (具有降低的 SSIII、BEI 和 BEII 蛋白质活性的马铃薯植物) 的 HPAEC 层析谱中各单个峰面积对总峰面积的贡献。各单个侧链中葡萄糖单体的数量表示为 dp。

[0317] 峰链长度是对 HPAEC 层析谱中峰下总面积贡献最大的两条链长度的平均值 (以 DP 表示), 就脱支链的支链淀粉而言, 野生型植物为  $DP = 13$ , 就 038VL 植物而言同样为  $DP = 13$ , 就 108CF 和 110CF 植物而言平均为 15。

[0318] 如果将转基因植物的峰链长度与野生型植物支链淀粉的峰链长度相比较, 以下的值得自峰链长度的比值 (PCL 比值) :

[0319] 038VL 的 PCL 比值 =  $13/13 = 1$

[0320] 108/110CF 的 PCL 比值 =  $15/13 = 1.15$

[0321] 另外, 使用扫描电子显微镜 (SEM) 分析了淀粉颗粒的形态。

[0322] 看起来 108/110CF 植物淀粉颗粒的表面布满或呈现出小孔的形成。

[0323] 此外, 使用来自 Retsch GmbH, Germany 的“Lumosed”型光电沉降仪测定粒度。

[0324] 测定了未处理淀粉样品的平均粒度 (表 3)。

[0325] 平均粒度 [ $\mu\text{m}$ ]

[0326]

样品	平均粒度

cv. Desiree	29.7
038VL008	21.5
108CF041	20.8
038VL107	22.9
110CF003	20.7

[0327] 表 10 :从野生型植物 (cv. Desiree)、具有降低的 SSIII 和 BEI 蛋白质活性的植物 (038VL008、038VL107), 以及具有降低的 SSIII、BEI 和 BEII 蛋白质活性的植物 (108CF041、110CF003) 中分离的淀粉的粒度平均值。

[0328] 实施例 3

[0329] 通过凝胶渗透层析分析支链淀粉的侧链分布

[0330] 为了分离直链淀粉和支链淀粉, 在恒定搅拌下将 100mg 淀粉溶解于 6ml 90% 浓度 (v/v) 的 DMSO。加入 3 倍体积的乙醇后, 通过室温下以 1800g 离心 10 分钟分离沉淀。随后用 30ml 乙醇洗涤沉淀, 干燥并溶解于 60°C 的 10ml 1% 浓度 (w/v) 的 NaCl 溶液。溶液冷却到 30°C 以后, 缓慢加入约 50mg 麝香草酚, 并在 30°C 将此溶液孵育 2-3 天。然后在室温以 2000g 对溶液离心 30 分钟。用 3 倍体积的乙醇处理上清液, 并通过在室温以 2000g 离心 5 分钟分离沉淀出的支链淀粉。用 10ml 70% 浓度 (v/v) 的乙醇洗涤沉淀 (支链淀粉), 在室温以 2000g 离心 10 分钟, 然后用丙酮干燥。

[0331] 随后将 10mg 支链淀粉在 70°C 于 250  $\mu$ l 90% 浓度 (v/v) 的 DMSO 中搅拌 10 分钟。向溶液加入 375  $\mu$ l 80°C 的水, 直到完全溶解。

[0332] 200  $\mu$ l 的此溶液用 300  $\mu$ l 16.6mM 醋酸钠溶液 (pH 3.5) 和 2  $\mu$ l 异淀粉酶 (0.24  $\mu$ g /  $\mu$ l, Megazyme, Sydney, Australia) 处理, 并在 37°C 将混合物孵育 15 小时。

[0333] 随后通过 0.2  $\mu$ m 的滤器过滤此水性异淀粉酶反应混合物 1 : 4 的 DMSO (含 90mM 硝酸钠) 稀释液, 并层析分析 24  $\mu$ l 的滤液。用串联连接的两个柱进行分离, 第一个是 Gram PSS3000 (Polymer Standards Service, 具有适当的前置柱), 之后是 Gram PSS100。通过折射指数探测器 (RI 71, Shodex) 检测。柱子用含有 90mM 硝酸钠的 DMSO 平衡。用含有 90mM 硝酸钠的 DMSO 以 0.7ml / 分钟的流速进行为期 1 小时的洗脱。

[0334] 为了将洗脱体积与分子量相联系, 使用葡聚糖标准对使用的柱进行校准, 使用的葡聚糖、它们的分子量和洗脱体积示于图 9。使用获得的校准图, 以分子量分布显示洗脱图 (图 10)。

[0335] 使用来自 Polymer Standards Service GmbH, Mainz, Germany 的 Wingpc Version 6 程序进一步评估获得的层析谱。

[0336] GPC 层析谱线下的总面积被分成各区段, 每一区段表示不同长度的侧链组。选择的区段含有具以下聚合度的葡聚糖链 (DP = 在一条侧链中葡聚糖单体的数目): DP  $\leq$  11、DP12-18、DP19-24、DP25-30、DP31-36、DP37-42、DP43-48、DP49-55、DP56-61 和 DP62-123。为了测定各侧链的分子量, 假定葡萄糖的分子量为 162。然后将 GPC 层析谱线下的总面积设定为 100%, 基于占总面积的百分数计算出各区段面积的百分数。从此分析中获得的结果显

示于表 11。

[0337]

	野生型	08CF041c
DP $\geq$ 11	100%	40%
DP12-18	100%	50%
DP19-24	100%	69%
DP25-30	100%	91%
DP31-36	100%	111%
DP37-42	100%	116%
DP43-48	100%	110%
DP49-55	100%	107%
DP56-61	100%	109%
DP62-123	100%	157%

[0338] 表 11 :从野生型植物 (cv. Desiree) 和具有降低的 SSIII、BEI 和 BEII 蛋白质活性的植物 (108CF041) 中分离的支链淀粉的侧链分布 DP 12 至 18、DP 19 至 24、DP 25 至 30、DP 31 至 36、DP 37 至 42、DP 43 至 48、DP 49 至 55、DP 56 至 61 及 DP 62 至 123。百分数表示基于从野生型植物分离的支链淀粉,各侧链分布的改变。

[0001]

## 序列表

<110> 拜尔作物科学有限公司 (Bayer CropScience GmbH)  
 <120> 合成终粘度增加的淀粉的植物细胞及植物  
 <130> BCS 02 5002 - PCT  
 <150> EP 02028530.0  
 <151> 2002-12-19  
 <150> EP 03090275.3  
 <151> 2003-08-29  
 <160> 8  
 <170> PatentIn version 3.1  
 <210> 1  
 <211> 4167  
 <212> DNA  
 <213> 马铃薯 (Solanum tuberosum)  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (207)..(3899)  
 <223>  
 <300>  
 <301> Abel,G.J., Springer,F., Willmitzer,L. and Kossmann,J.  
 <302> 编码新的139 kDa蛋白质的cDNA的克隆和功能分析  
 <303> Plant J.  
 <304> 10  
 <305> 6  
 <306> 981-991  
 <307> 1996  
 <308> X94400  
 <309> 1995-12-22  
 <313> (1)..(4167)  
 <300>  
 <308> EMBL / X94400  
 <309> 1997-04-16  
 <313> (1)..(4167)  
 <400> 1  
 ttttttaata gatttttaaa accccattaa agcaaatacg tatataattg cagcacagat 60  
 acagagaggg agagagaaag atagtgtggt gatgaaggag aagagagata tttcacatgg 120  
 gatgttctat ttgattctgt ggtgaacaag agttttacaa agaacattcc tttttctttt 180  
 tttcttgggt cttgtgtggg tcagcc atg gat gtt cca ttt cca ctg cat aga 233  
 Met Asp Val Pro Phe Pro Leu His Arg  
 1 5  
 cca ttg agt tgc aca agt gtc tcc aat gca ata acc cac ctc aag atc 281  
 Pro Leu Ser Cys Thr Ser Val Ser Asn Ala Ile Thr His Leu Lys Ile  
 10 15 20 25

[0002]

aaa cct ttt ctt ggg ttt gtc tct cat gga acc aca agt cta tca gta Lys Pro Phe Leu Gly Phe Val Ser His Gly Thr Thr Ser Leu Ser Val 30 35 40	329
caa tct tct tca tgg agg aag gat gga atg gtt act ggg gtt tca ttt Gln Ser Ser Ser Trp Arg Lys Asp Gly Met Val Thr Gly Val Ser Phe 45 50 55	377
cca ttt tgt gca aat ctc tcg gga aga aga cgg aga aaa gtt tca act Pro Phe Cys Ala Asn Leu Ser Gly Arg Arg Arg Arg Lys Val Ser Thr 60 65 70	425
act agg agt caa gga tct tca cct aag ggg ttt gtg cca agg aag ccc Thr Arg Ser Gln Gly Ser Ser Pro Lys Gly Phe Val Pro Arg Lys Pro 75 80 85	473
tca ggg atg agc acg caa aga aag gtt cag aag agc aat ggt gat aaa Ser Gly Met Ser Thr Gln Arg Lys Val Gln Lys Ser Asn Gly Asp Lys 90 95 100 105	521
gaa agt caa agt act tca aca tct aaa gaa tct gaa att tcc aac cag Glu Ser Gln Ser Thr Ser Thr Ser Lys Glu Ser Glu Ile Ser Asn Gln 110 115 120	569
aag acg gtt gaa gca aga gtt gaa act agt gac gat gac act aaa gta Lys Thr Val Glu Ala Arg Val Glu Thr Ser Asp Asp Asp Thr Lys Val 125 130 135	617
gtg gtg agg gac cac aag ttt ctg gag gat gag gat gaa atc aat ggt Val Val Arg Asp His Lys Phe Leu Glu Asp Glu Asp Glu Ile Asn Gly 140 145 150	665
tct act aaa tca ata agt atg tca cct gtt cgt gta tca tct caa ttt Ser Thr Lys Ser Ile Ser Met Ser Pro Val Arg Val Ser Ser Gln Phe 155 160 165	713
gtt gaa agt gaa gaa act ggt ggt gat gac aag gat gct gta aag tta Val Glu Ser Glu Glu Thr Gly Gly Asp Asp Lys Asp Ala Val Lys Leu 170 175 180 185	761
aac aaa tca aag aga tcg gaa gag agt gat ttt cta att gat tct gta Asn Lys Ser Lys Arg Ser Glu Glu Ser Asp Phe Leu Ile Asp Ser Val 190 195 200	809
ata aga gaa caa agt gga tct cag ggg gaa act aat gcc agt agc aag Ile Arg Glu Gln Ser Gly Ser Gln Gly Glu Thr Asn Ala Ser Ser Lys 205 210 215	857
gga agc cat gct gtg ggt aca aaa ctt tat gag ata ttg cag gtg gat Gly Ser His Ala Val Gly Thr Lys Leu Tyr Glu Ile Leu Gln Val Asp 220 225 230	905
gtt gag cca caa caa ttg aaa gaa aat aat gct ggg aat gtt gaa tac Val Glu Pro Gln Gln Leu Lys Glu Asn Asn Ala Gly Asn Val Glu Tyr 235 240 245	953
aaa gga cct gta gca agt aag cta ttg gaa att act aag gct agt gat Lys Gly Pro Val Ala Ser Lys Leu Leu Glu Ile Thr Lys Ala Ser Asp 250 255 260 265	1001
gtg gaa cac act gaa agc aat gag att gat gac tta gac act aat agt Val Glu His Thr Glu Ser Asn Glu Ile Asp Asp Leu Asp Thr Asn Ser	1049

[0003]

				270					275					280		
ttc	ttt	aaa	tca	gat	tta	att	gaa	gag	gat	gag	cca	tta	gct	gca	gga	1097
Phe	Phe	Lys	Ser	Asp	Leu	Ile	Glu	Glu	Asp	Glu	Pro	Leu	Ala	Ala	Gly	
			285					290					295			
aca	gtg	gag	act	gga	gat	tct	tct	cta	aac	tta	aga	ttg	gag	atg	gaa	1145
Thr	Val	Glu	Thr	Gly	Asp	Ser	Ser	Leu	Asn	Leu	Arg	Leu	Glu	Met	Glu	
		300					305					310				
gca	aat	cta	cgt	agg	cag	gct	ata	gaa	agg	ctt	gcc	gag	gaa	aat	tta	1193
Ala	Asn	Leu	Arg	Arg	Gln	Ala	Ile	Glu	Arg	Leu	Ala	Glu	Glu	Asn	Leu	
	315					320				325						
ttg	caa	ggg	atc	aga	tta	ttt	tgt	ttt	cca	gag	gtt	gta	aaa	cct	gat	1241
Leu	Gln	Gly	Ile	Arg	Leu	Phe	Cys	Phe	Pro	Glu	Val	Val	Lys	Pro	Asp	
330					335					340					345	
gaa	gat	gtc	gag	ata	ttt	ctt	aac	aga	ggt	ctt	tcc	act	ttg	aag	aat	1289
Glu	Asp	Val	Glu	Ile	Phe	Leu	Asn	Arg	Gly	Leu	Ser	Thr	Leu	Lys	Asn	
			350						355					360		
gag	tct	gat	gtc	ttg	att	atg	gga	gct	ttt	aat	gag	tgg	cgc	tat	agg	1337
Glu	Ser	Asp	Val	Leu	Ile	Met	Gly	Ala	Phe	Asn	Glu	Trp	Arg	Tyr	Arg	
			365					370						375		
tct	ttt	act	aca	agg	cta	act	gag	act	cat	ctc	aat	gga	gat	tgg	tgg	1385
Ser	Phe	Thr	Thr	Arg	Leu	Thr	Glu	Thr	His	Leu	Asn	Gly	Asp	Trp	Trp	
		380					385					390				
tct	tgc	aag	atc	cat	gtt	ccc	aag	gaa	gca	tac	agg	gct	gat	ttt	gtg	1433
Ser	Cys	Lys	Ile	His	Val	Pro	Lys	Glu	Ala	Tyr	Arg	Ala	Asp	Phe	Val	
	395					400					405					
ttt	ttt	aat	gga	caa	gat	gtc	tat	gac	aac	aat	gat	gga	aat	gac	ttc	1481
Phe	Phe	Asn	Gly	Gln	Asp	Val	Tyr	Asp	Asn	Asn	Asp	Gly	Asn	Asp	Phe	
410					415				420						425	
agt	ata	act	gtg	aaa	ggt	ggt	atg	caa	atc	att	gac	ttt	gaa	aat	ttc	1529
Ser	Ile	Thr	Val	Lys	Gly	Gly	Met	Gln	Ile	Ile	Asp	Phe	Glu	Asn	Phe	
				430				435					440			
ttg	ctt	gag	gag	aaa	tgg	aga	gaa	cag	gag	aaa	ctt	gct	aaa	gaa	caa	1577
Leu	Leu	Glu	Glu	Lys	Trp	Arg	Glu	Gln	Glu	Lys	Leu	Ala	Lys	Glu	Gln	
			445					450					455			
gct	gaa	aga	gaa	aga	cta	gcg	gaa	gaa	caa	aga	cga	ata	gaa	gca	gag	1625
Ala	Glu	Arg	Glu	Arg	Leu	Ala	Glu	Glu	Gln	Arg	Arg	Ile	Glu	Ala	Glu	
		460						465					470			
aaa	gct	gaa	att	gaa	gct	gac	aga	gca	caa	gca	aag	gaa	gag	gct	gca	1673
Lys	Ala	Glu	Ile	Glu	Ala	Asp	Arg	Ala	Gln	Ala	Lys	Glu	Glu	Ala	Ala	
	475					480					485					
aag	aaa	aag	aaa	gta	ttg	cga	gaa	ttg	atg	gta	aaa	gcc	acg	aag	act	1721
Lys	Lys	Lys	Lys	Val	Leu	Arg	Glu	Leu	Met	Val	Lys	Ala	Thr	Lys	Thr	
490				495					500					505		
cgt	gat	atc	acg	tgg	tac	ata	gag	cca	agt	gaa	ttt	aaa	tgc	gag	gac	1769
Arg	Asp	Ile	Thr	Trp	Tyr	Ile	Glu	Pro	Ser	Glu	Phe	Lys	Cys	Glu	Asp	
				510					515					520		

[0004]

aag gtc agg tta tac tat aac aaa agt tca ggt cct ctc tcc cat gct	1817
Lys Val Arg Leu Tyr Tyr Asn Lys Ser Ser Gly Pro Leu Ser His Ala	
525 530 535	
aag gac ttg tgg atc cac gga gga tat aat aat tgg aag gat ggt ttg	1865
Lys Asp Leu Trp Ile His Gly Gly Tyr Asn Asn Trp Lys Asp Gly Leu	
540 545 550	
tct att gtc aaa aag ctt gtt aaa tct gag aga ata gat ggt gat tgg	1913
Ser Ile Val Lys Lys Leu Val Lys Ser Glu Arg Ile Asp Gly Asp Trp	
555 560 565	
tgg tat aca gag gtt gtt att cct gat cag gca ctt ttc ttg gat tgg	1961
Trp Tyr Thr Glu Val Val Ile Pro Asp Gln Ala Leu Phe Leu Asp Trp	
570 575 580 585	
gtt ttt gct gat ggt cca ccc aag cat gcc att gct tat gat aac aat	2009
Val Phe Ala Asp Gly Pro Pro Lys His Ala Ile Ala Tyr Asp Asn Asn	
590 595 600	
cac cgc caa gac ttc cat gcc att gtc ccc aac cac att ccg gag gaa	2057
His Arg Gln Asp Phe His Ala Ile Val Pro Asn His Ile Pro Glu Glu	
605 610 615	
tta tat tgg gtt gag gaa gaa cat cag atc ttt aag aca ctt cag gag	2105
Leu Tyr Trp Val Glu Glu Glu His Gln Ile Phe Lys Thr Leu Gln Glu	
620 625 630	
gag aga agg ctt aga gaa gcg gct atg cgt gct aag gtt gaa aaa aca	2153
Glu Arg Arg Leu Arg Glu Ala Ala Met Arg Ala Lys Val Glu Lys Thr	
635 640 645	
gca ctt ctg aaa act gaa aca aag gaa aga act atg aaa tca ttt tta	2201
Ala Leu Leu Lys Thr Glu Thr Lys Glu Arg Thr Met Lys Ser Phe Leu	
650 655 660 665	
ctg tct cag aag cat gta gta tat act gag cct ctt gat atc caa gct	2249
Leu Ser Gln Lys His Val Val Tyr Thr Glu Pro Leu Asp Ile Gln Ala	
670 675 680	
gga agc agc gtc aca gtt tac tat aat ccc gcc aat aca gta ctt aat	2297
Gly Ser Ser Val Thr Val Tyr Tyr Asn Pro Ala Asn Thr Val Leu Asn	
685 690 695	
ggt aaa cct gaa att tgg ttc aga tgt tca ttt aat cgc tgg act cac	2345
Gly Lys Pro Glu Ile Trp Phe Arg Cys Ser Phe Asn Arg Trp Thr His	
700 705 710	
cgc ctg ggt cca ttg cca cct cag aaa atg tcg cct gct gaa aat ggc	2393
Arg Leu Gly Pro Leu Pro Pro Gln Lys Met Ser Pro Ala Glu Asn Gly	
715 720 725	
acc cat gtc aga gca act gtg aag gtt cca ttg gat gca tat atg atg	2441
Thr His Val Arg Ala Thr Val Lys Val Pro Leu Asp Ala Tyr Met Met	
730 735 740 745	
gat ttt gta ttt tcc gag aga gaa gat ggt ggg att ttt gac aat aag	2489
Asp Phe Val Phe Ser Glu Arg Glu Asp Gly Gly Ile Phe Asp Asn Lys	
750 755 760	
agc gga atg gac tat cac ata cct gtg ttt gga gga gtc gct aaa gaa	2537
Ser Gly Met Asp Tyr His Ile Pro Val Phe Gly Gly Val Ala Lys Glu	

[0005]

765					770					775						
cct	cca	atg	cat	att	gtc	cat	att	gct	gtc	gaa	atg	gca	cca	att	gca	2585
Pro	Pro	Met	His	Ile	Val	His	Ile	Ala	Val	Glu	Met	Ala	Pro	Ile	Ala	
		780						785					790			
aag	gtg	gga	ggc	ctt	ggt	gat	gtt	gtt	act	agt	ctt	tcc	cgt	gct	gtt	2633
Lys	Val	Gly	Gly	Leu	Gly	Asp	Val	Val	Thr	Ser	Leu	Ser	Arg	Ala	Val	
		795				800					805					
caa	gat	tta	aac	cat	aat	gtg	gat	att	atc	tta	cct	aag	tat	gac	tgt	2681
Gln	Asp	Leu	Asn	His	Asn	Val	Asp	Ile	Ile	Leu	Pro	Lys	Tyr	Asp	Cys	
810						815				820					825	
ttg	aag	atg	aat	aat	gtg	aag	gac	ttt	cgg	ttt	cac	aaa	aac	tac	ttt	2729
Leu	Lys	Met	Asn	Asn	Val	Lys	Asp	Phe	Arg	Phe	His	Lys	Asn	Tyr	Phe	
				830					835					840		
tgg	ggt	ggg	act	gaa	ata	aaa	gta	tgg	ttt	gga	aag	gtg	gaa	ggt	ctc	2777
Trp	Gly	Gly	Thr	Glu	Ile	Lys	Val	Trp	Phe	Gly	Lys	Val	Glu	Gly	Leu	
			845					850					855			
tcg	gtc	tat	ttt	ttg	gag	cct	caa	aac	ggg	tta	ttt	tcg	aaa	ggg	tgc	2825
Ser	Val	Tyr	Phe	Leu	Glu	Pro	Gln	Asn	Gly	Leu	Phe	Ser	Lys	Gly	Cys	
		860						865					870			
gtc	tat	ggt	tgt	agc	aat	gat	ggt	gaa	cga	ttt	ggt	ttc	ttc	tgt	cac	2873
Val	Tyr	Gly	Cys	Ser	Asn	Asp	Gly	Glu	Arg	Phe	Gly	Phe	Phe	Cys	His	
		875				880					885					
gcg	gct	ttg	gag	ttt	ctt	ctg	caa	ggt	gga	ttt	agt	ccg	gat	atc	att	2921
Ala	Ala	Leu	Glu	Phe	Leu	Leu	Gln	Gly	Gly	Phe	Ser	Pro	Asp	Ile	Ile	
890					895				900						905	
cat	tgc	cat	gat	tgg	tct	agt	gct	cct	gtt	gct	tgg	ctc	ttt	aag	gaa	2969
His	Cys	His	Asp	Trp	Ser	Ser	Ala	Pro	Val	Ala	Trp	Leu	Phe	Lys	Glu	
				910					915					920		
caa	tat	aca	cac	tat	ggt	cta	agc	aaa	tct	cgt	ata	gtc	ttc	acg	ata	3017
Gln	Tyr	Thr	His	Tyr	Gly	Leu	Ser	Lys	Ser	Arg	Ile	Val	Phe	Thr	Ile	
			925					930					935			
cat	aat	ctt	gaa	ttt	ggg	gca	gat	ctc	att	ggg	aga	gca	atg	act	aac	3065
His	Asn	Leu	Glu	Phe	Gly	Ala	Asp	Leu	Ile	Gly	Arg	Ala	Met	Thr	Asn	
		940				945						950				
gca	gac	aaa	gct	aca	aca	gtt	tca	cca	act	tac	tca	cag	gag	gtg	tct	3113
Ala	Asp	Lys	Ala	Thr	Thr	Val	Ser	Pro	Thr	Tyr	Ser	Gln	Glu	Val	Ser	
		955				960						965				
gga	aac	cct	gta	att	gcg	cct	cac	ctt	cac	aag	ttc	cat	ggt	ata	gtg	3161
Gly	Asn	Pro	Val	Ile	Ala	Pro	His	Leu	His	Lys	Phe	His	Gly	Ile	Val	
970					975				980					985		
aat	ggg	att	gac	cca	gat	att	tgg	gat	cct	tta	aac	gat	aag	ttc	att	3209
Asn	Gly	Ile	Asp	Pro	Asp	Ile	Trp	Asp	Pro	Leu	Asn	Asp	Lys	Phe	Ile	
				990					995					1000		
ccg	att	ccg	tac	acc	tca	gaa	aac	gtt	gtt	gaa	ggc	aaa	aca	gca		3254
Pro	Ile	Pro	Tyr	Thr	Ser	Glu	Asn	Val	Val	Glu	Gly	Lys	Thr	Ala		
			1005					1010					1015			

[0006]



gcc aag gaa gct ttg cag cga aaa ctt gga ctg aaa cag gct gac Ala Lys Glu Ala Leu Gln Arg Lys Leu Gly Leu Lys Gln Ala Asp 1020 1025 1030	3299
ctt cct ttg gta gga att atc acc cgc tta act cac cag aaa gga Leu Pro Leu Val Gly Ile Ile Thr Arg Leu Thr His Gln Lys Gly 1035 1040 1045	3344
atc cac ctc att aaa cat gct att tgg cgc acc ttg gaa cgg aac Ile His Leu Ile Lys His Ala Ile Trp Arg Thr Leu Glu Arg Asn 1050 1055 1060	3389
gga cag gta gtc ttg ctt ggt tct gct cct gat cct agg gta caa Gly Gln Val Val Leu Leu Gly Ser Ala Pro Asp Pro Arg Val Gln 1065 1070 1075	3434
aac gat ttt gtt aat ttg gca aat caa ttg cac tcc aaa tat aat Asn Asp Phe Val Asn Leu Ala Asn Gln Leu His Ser Lys Tyr Asn 1080 1085 1090	3479
gac cgc gca cga ctc tgt cta aca tat gac gag cca ctt tct cac Asp Arg Ala Arg Leu Cys Leu Thr Tyr Asp Glu Pro Leu Ser His 1095 1100 1105	3524
ctg ata tat gct ggt gct gat ttt att cta gtt cct tca ata ttt Leu Ile Tyr Ala Gly Ala Asp Phe Ile Leu Val Pro Ser Ile Phe 1110 1115 1120	3569
gag cca tgt gga cta aca caa ctt acc gct atg aga tat ggt tca Glu Pro Cys Gly Leu Thr Gln Leu Thr Ala Met Arg Tyr Gly Ser 1125 1130 1135	3614
att cca gtc gtg cgt aaa act gga gga ctt tat gat act gta ttt Ile Pro Val Val Arg Lys Thr Gly Gly Leu Tyr Asp Thr Val Phe 1140 1145 1150	3659
gat gtt gac cat gac aaa gag aga gca caa cag tgt ggt ctt gaa Asp Val Asp His Asp Lys Glu Arg Ala Gln Gln Cys Gly Leu Glu 1155 1160 1165	3704
cca aat gga ttc agc ttt gat gga gca gat gct ggc gga gtt gat Pro Asn Gly Phe Ser Phe Asp Gly Ala Asp Ala Gly Gly Val Asp 1170 1175 1180	3749
tat gct ctg aat aga gct ctc tct gct tgg tac gat ggt cgg gat Tyr Ala Leu Asn Arg Ala Leu Ser Ala Trp Tyr Asp Gly Arg Asp 1185 1190 1195	3794
tgg ttc aac tct tta tgc aag cag gtc atg gaa caa gat tgg tct Trp Phe Asn Ser Leu Cys Lys Gln Val Met Glu Gln Asp Trp Ser 1200 1205 1210	3839
tgg aac cga cct gct ctt gat tat ttg gag ctt tac cat gct gct Trp Asn Arg Pro Ala Leu Asp Tyr Leu Glu Leu Tyr His Ala Ala 1215 1220 1225	3884
aga aag tta gaa tag ttagtttgtag agatgctagc agaaaaattc acgagatctg Arg Lys Leu Glu 1230	3939
caatctgtac aggttcagtg tttgcgtctg gacagctttt ttatttccta tatcaaagta	3999

[0007]

taaatacaagt ctacactgag atcaatagca gacagtcctc agttcatttc attttttgtg 4059  
 caacatatga aagagcttag cctctaataa tgtagtcatt gatgattatt tgttttggga 4119  
 agaaatgaga aatcaaagga tgcaaaatac tctgaaaaaa aaaaaaaa 4167

<210> 2  
 <211> 1230  
 <212> PRT  
 <213> 马铃薯

<400> 2

Met Asp Val Pro Phe Pro Leu His Arg Pro Leu Ser Cys Thr Ser Val  
 1 5 10 15

Ser Asn Ala Ile Thr His Leu Lys Ile Lys Pro Phe Leu Gly Phe Val  
 20 25 30

Ser His Gly Thr Thr Ser Leu Ser Val Gln Ser Ser Ser Trp Arg Lys  
 35 40 45

Asp Gly Met Val Thr Gly Val Ser Phe Pro Phe Cys Ala Asn Leu Ser  
 50 55 60

Gly Arg Arg Arg Arg Lys Val Ser Thr Thr Arg Ser Gln Gly Ser Ser  
 65 70 75 80

Pro Lys Gly Phe Val Pro Arg Lys Pro Ser Gly Met Ser Thr Gln Arg  
 85 90 95

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

Ser Lys Glu Ser Glu Ile Ser Asn Gln Lys Thr Val Glu Ala Arg Val  
 115 120 125

Glu Thr Ser Asp Asp Asp Thr Lys Val Val Val Arg Asp His Lys Phe  
 130 135 140

Leu Glu Asp Glu Asp Glu Ile Asn Gly Ser Thr Lys Ser Ile Ser Met  
 145 150 155 160

Ser Pro Val Arg Val Ser Ser Gln Phe Val Glu Ser Glu Glu Thr Gly  
 165 170 175

Gly Asp Asp Lys Asp Ala Val Lys Leu Asn Lys Ser Lys Arg Ser Glu  
 180 185 190

[0008]

Glu Ser Asp Phe Leu Ile Asp Ser Val Ile Arg Glu Gln Ser Gly Ser  
 195 200 205

Gln Gly Glu Thr Asn Ala Ser Ser Lys Gly Ser His Ala Val Gly Thr  
 210 215 220

Lys Leu Tyr Glu Ile Leu Gln Val Asp Val Glu Pro Gln Gln Leu Lys  
 225 230 235 240

Glu Asn Asn Ala Gly Asn Val Glu Tyr Lys Gly Pro Val Ala Ser Lys  
 245 250 255

Leu Leu Glu Ile Thr Lys Ala Ser Asp Val Glu His Thr Glu Ser Asn  
 260 265 270

Glu Ile Asp Asp Leu Asp Thr Asn Ser Phe Phe Lys Ser Asp Leu Ile  
 275 280 285

Glu Glu Asp Glu Pro Leu Ala Ala Gly Thr Val Glu Thr Gly Asp Ser  
 290 295 300

Ser Leu Asn Leu Arg Leu Glu Met Glu Ala Asn Leu Arg Arg Gln Ala  
 305 310 315 320

Ile Glu Arg Leu Ala Glu Glu Asn Leu Leu Gln Gly Ile Arg Leu Phe  
 325 330 335

Cys Phe Pro Glu Val Val Lys Pro Asp Glu Asp Val Glu Ile Phe Leu  
 340 345 350

Asn Arg Gly Leu Ser Thr Leu Lys Asn Glu Ser Asp Val Leu Ile Met  
 355 360 365

Gly Ala Phe Asn Glu Trp Arg Tyr Arg Ser Phe Thr Thr Arg Leu Thr  
 370 375 380

Glu Thr His Leu Asn Gly Asp Trp Trp Ser Cys Lys Ile His Val Pro  
 385 390 395 400

Lys Glu Ala Tyr Arg Ala Asp Phe Val Phe Phe Asn Gly Gln Asp Val  
 405 410 415

Tyr Asp Asn Asn Asp Gly Asn Asp Phe Ser Ile Thr Val Lys Gly Gly  
 420 425 430

Met Gln Ile Ile Asp Phe Glu Asn Phe Leu Leu Glu Glu Lys Trp Arg  
 435 440 445

[0009]

Glu Gln Glu Lys Leu Ala Lys Glu Gln Ala Glu Arg Glu Arg Leu Ala  
 450 455 460

Glu Glu Gln Arg Arg Ile Glu Ala Glu Lys Ala Glu Ile Glu Ala Asp  
 465 470 475 480

Arg Ala Gln Ala Lys Glu Glu Ala Ala Lys Lys Lys Lys Val Leu Arg  
 485 490 495

Glu Leu Met Val Lys Ala Thr Lys Thr Arg Asp Ile Thr Trp Tyr Ile  
 500 505 510

Glu Pro Ser Glu Phe Lys Cys Glu Asp Lys Val Arg Leu Tyr Tyr Asn  
 515 520 525

Lys Ser Ser Gly Pro Leu Ser His Ala Lys Asp Leu Trp Ile His Gly  
 530 535 540

Gly Tyr Asn Asn Trp Lys Asp Gly Leu Ser Ile Val Lys Lys Leu Val  
 545 550 555 560

Lys Ser Glu Arg Ile Asp Gly Asp Trp Trp Tyr Thr Glu Val Val Ile  
 565 570 575

Pro Asp Gln Ala Leu Phe Leu Asp Trp Val Phe Ala Asp Gly Pro Pro  
 580 585 590

Lys His Ala Ile Ala Tyr Asp Asn Asn His Arg Gln Asp Phe His Ala  
 595 600 605

Ile Val Pro Asn His Ile Pro Glu Glu Leu Tyr Trp Val Glu Glu Glu  
 610 615 620

His Gln Ile Phe Lys Thr Leu Gln Glu Glu Arg Arg Leu Arg Glu Ala  
 625 630 635 640

Ala Met Arg Ala Lys Val Glu Lys Thr Ala Leu Leu Lys Thr Glu Thr  
 645 650 655

Lys Glu Arg Thr Met Lys Ser Phe Leu Leu Ser Gln Lys His Val Val  
 660 665 670

Tyr Thr Glu Pro Leu Asp Ile Gln Ala Gly Ser Ser Val Thr Val Tyr  
 675 680 685

[0010]

Tyr Asn Pro Ala Asn Thr Val Leu Asn Gly Lys Pro Glu Ile Trp Phe  
 690 695 700

Arg Cys Ser Phe Asn Arg Trp Thr His Arg Leu Gly Pro Leu Pro Pro  
 705 710 715 720

Gln Lys Met Ser Pro Ala Glu Asn Gly Thr His Val Arg Ala Thr Val  
 725 730 735

Lys Val Pro Leu Asp Ala Tyr Met Met Asp Phe Val Phe Ser Glu Arg  
 740 745 750

Glu Asp Gly Gly Ile Phe Asp Asn Lys Ser Gly Met Asp Tyr His Ile  
 755 760 765

Pro Val Phe Gly Gly Val Ala Lys Glu Pro Pro Met His Ile Val His  
 770 775 780

Ile Ala Val Glu Met Ala Pro Ile Ala Lys Val Gly Gly Leu Gly Asp  
 785 790 795 800

Val Val Thr Ser Leu Ser Arg Ala Val Gln Asp Leu Asn His Asn Val  
 805 810 815

Asp Ile Ile Leu Pro Lys Tyr Asp Cys Leu Lys Met Asn Asn Val Lys  
 820 825 830

Asp Phe Arg Phe His Lys Asn Tyr Phe Trp Gly Gly Thr Glu Ile Lys  
 835 840 845

Val Trp Phe Gly Lys Val Glu Gly Leu Ser Val Tyr Phe Leu Glu Pro  
 850 855 860

Gln Asn Gly Leu Phe Ser Lys Gly Cys Val Tyr Gly Cys Ser Asn Asp  
 865 870 875 880

Gly Glu Arg Phe Gly Phe Phe Cys His Ala Ala Leu Glu Phe Leu Leu  
 885 890 895

Gln Gly Gly Phe Ser Pro Asp Ile Ile His Cys His Asp Trp Ser Ser  
 900 905 910

Ala Pro Val Ala Trp Leu Phe Lys Glu Gln Tyr Thr His Tyr Gly Leu  
 915 920 925

Ser Lys Ser Arg Ile Val Phe Thr Ile His Asn Leu Glu Phe Gly Ala  
 930 935 940

[0011]

Asp Leu Ile Gly Arg Ala Met Thr Asn Ala Asp Lys Ala Thr Thr Val  
 945 950 955 960

Ser Pro Thr Tyr Ser Gln Glu Val Ser Gly Asn Pro Val Ile Ala Pro  
 965 970 975

His Leu His Lys Phe His Gly Ile Val Asn Gly Ile Asp Pro Asp Ile  
 980 985 990

Trp Asp Pro Leu Asn Asp Lys Phe Ile Pro Ile Pro Tyr Thr Ser Glu  
 995 1000 1005

Asn Val Val Glu Gly Lys Thr Ala Ala Lys Glu Ala Leu Gln Arg  
 1010 1015 1020

Lys Leu Gly Leu Lys Gln Ala Asp Leu Pro Leu Val Gly Ile Ile  
 1025 1030 1035

Thr Arg Leu Thr His Gln Lys Gly Ile His Leu Ile Lys His Ala  
 1040 1045 1050

Ile Trp Arg Thr Leu Glu Arg Asn Gly Gln Val Val Leu Leu Gly  
 1055 1060 1065

Ser Ala Pro Asp Pro Arg Val Gln Asn Asp Phe Val Asn Leu Ala  
 1070 1075 1080

Asn Gln Leu His Ser Lys Tyr Asn Asp Arg Ala Arg Leu Cys Leu  
 1085 1090 1095

Thr Tyr Asp Glu Pro Leu Ser His Leu Ile Tyr Ala Gly Ala Asp  
 1100 1105 1110

Phe Ile Leu Val Pro Ser Ile Phe Glu Pro Cys Gly Leu Thr Gln  
 1115 1120 1125

Leu Thr Ala Met Arg Tyr Gly Ser Ile Pro Val Val Arg Lys Thr  
 1130 1135 1140

Gly Gly Leu Tyr Asp Thr Val Phe Asp Val Asp His Asp Lys Glu  
 1145 1150 1155

Arg Ala Gln Gln Cys Gly Leu Glu Pro Asn Gly Phe Ser Phe Asp  
 1160 1165 1170

[0012]

Gly Ala Asp Ala Gly Gly Val Asp Tyr Ala Leu Asn Arg Ala Leu  
 1175 1180 1185

Ser Ala Trp Tyr Asp Gly Arg Asp Trp Phe Asn Ser Leu Cys Lys  
 1190 1195 1200

Gln Val Met Glu Gln Asp Trp Ser Trp Asn Arg Pro Ala Leu Asp  
 1205 1210 1215

Tyr Leu Glu Leu Tyr His Ala Ala Arg Lys Leu Glu  
 1220 1225 1230

<210> 3  
 <211> 61  
 <212> PRT  
 <213> 马铃薯

<400> 3

Arg Ser Phe Thr Thr Arg Leu Thr Glu Thr His Leu Asn Gly Asp Trp  
 1 5 10 15

Trp Ser Cys Lys Ile His Val Pro Lys Glu Ala Tyr Arg Ala Asp Phe  
 20 25 30

Val Phe Phe Asn Gly Gln Asp Val Tyr Asp Asn Asn Asp Gly Asn Asp  
 35 40 45

Phe Ser Ile Thr Val Lys Gly Gly Met Gln Ile Ile Asp  
 50 55 60

<210> 4  
 <211> 1641  
 <212> DNA  
 <213> 马铃薯

<400> 4

atgaagcaca gttcagctat ttccgctggt ttgaccgatg acaattcgac aatggcacc 60

ctagaggaag atgtcaacac tgaaaatatt ggctctctaa atttgatcc aactttggaa 120

ccttatctag atcacttcag acacagaatg aagagatatg tggatcagaa aatgctcatt 180

gaaaaaatatg agggaccct tgaggaattt gctcaagggtt atttaaaatt tggattcaac 240

aggggaagatg gttgcatagt ctatcgtgaa tgggctcctg ctgctcagga agcagaagtt 300

attggcgatt tcaatggtag gaacggttct aaccacatga tggagaagga ccagtttgggt 360

gtttggagta ttagaattcc tgatgttgac agtaagccag tcattccaca caactccaga 420

gttaagtttc gtttcaaaca tggtaatgga gtgtgggtag atcgtatccc tgcttggata 480

[0013]

```

aagtatgcc a ctgcagacgc cacaaagttt gcagcaccat atgatggtgt ctactgggac 540
ccaccacctt cagaaaggta ccacttcaaa taccctcgcc ctcccaaacc cggagcccca 600
cgaatctacg aagcacatgt cggcatgagc agctctgagc cacgtgtaaa ttcgtatcgt 660
gagtttgcag atgatgtttt acctcggatt aaggcaaata actataatac tgtccagttg 720
atggccataa tggaacattc ttactatgga tcatttggat atcatgttac aaactttttt 780
gctgtgagca atagatatgg aaaccgggag gacctaaagt atctgataga taaagcacat 840
agcttggggt tacaggttct ggtggatgta gttcacagtc atgcaagcaa taatgtcact 900
gatggcctca atggctttga tattggccaa gtttctcaag aatcctactt tcatgctgga 960
gagcgagggt accataagtt gtgggatagc aggctgttca actatgcca ttgggaggtt 1020
cttcgtttcc ttctttccaa cttgaggtgg tggctagaag agtataactt tgacggattt 1080
cgatttgatg gaataacttc tatgctgtat gttcatcatg gaatcaatat gggatttaca 1140
ggaaactata atgagtattt cagcgaggct acagatggtg atgctgtggt ctatttaatg 1200
ttggccaata atctgattca caagattttc ccagacgcaa ctgttattgc cgaagatgtt 1260
tctggtatgc cgggccttag cgggcctggt tctgagggag gaattggttt tgattaccgc 1320
ctggcaatgg caatcccaga taagtggata gattatntaa agaataagaa tgatgaagat 1380
tggatcatga aggaagtaac atcgagtttg acaaatagga gatatacaga gaagtgtata 1440
gcatatgogg agagccatga tcagtctatt gtcggtgaca agaccattgc atttctccta 1500
atgaacaaag agatgtattc tggcatgtct tgcttgacag atgcttctcc tgttggtgat 1560
gcaggaattg cgcttgacaa gatgatccat ttttttcaca atggccttgg gaggagaggg 1620
gtacctcaat ttcatgggta a 1641

```

```

<210> 5
<211> 546
<212> PRT
<213> 马铃薯

```

```

<300>
<308> Swiss Prot / P30924
<309> 1993-07-26

```

```

<400> 5

```

```

Met Lys His Ser Ser Ala Ile Ser Ala Val Leu Thr Asp Asp Asn Ser
1           5           10           15

```

```

Thr Met Ala Pro Leu Glu Glu Asp Val Asn Thr Glu Asn Ile Gly Leu
          20           25           30

```

```

Leu Asn Leu Asp Pro Thr Leu Glu Pro Tyr Leu Asp His Phe Arg His
          35           40           45

```

[0014]



Arg Met Lys Arg Tyr Val Asp Gln Lys Met Leu Ile Glu Lys Tyr Glu  
 50 55 60

Gly Pro Leu Glu Glu Phe Ala Gln Gly Tyr Leu Lys Phe Gly Phe Asn  
 65 70 75 80

Arg Glu Asp Gly Cys Ile Val Tyr Arg Glu Trp Ala Pro Ala Ala Gln  
 85 90 95

Glu Ala Glu Val Ile Gly Asp Phe Asn Gly Arg Asn Gly Ser Asn His  
 100 105 110

Met Met Glu Lys Asp Gln Phe Gly Val Trp Ser Ile Arg Ile Pro Asp  
 115 120 125

Val Asp Ser Lys Pro Val Ile Pro His Asn Ser Arg Val Lys Phe Arg  
 130 135 140

Phe Lys His Gly Asn Gly Val Trp Val Asp Arg Ile Pro Ala Trp Ile  
 145 150 155 160

Lys Tyr Ala Thr Ala Asp Ala Thr Lys Phe Ala Ala Pro Tyr Asp Gly  
 165 170 175

Val Tyr Trp Asp Pro Pro Pro Ser Glu Arg Tyr His Phe Lys Tyr Pro  
 180 185 190

Arg Pro Pro Lys Pro Arg Ala Pro Arg Ile Tyr Glu Ala His Val Gly  
 195 200 205

Met Ser Ser Ser Glu Pro Arg Val Asn Ser Tyr Arg Glu Phe Ala Asp  
 210 215 220

Asp Val Leu Pro Arg Ile Lys Ala Asn Asn Tyr Asn Thr Val Gln Leu  
 225 230 235 240

Met Ala Ile Met Glu His Ser Tyr Tyr Gly Ser Phe Gly Tyr His Val  
 245 250 255

Thr Asn Phe Phe Ala Val Ser Asn Arg Tyr Gly Asn Pro Glu Asp Leu  
 260 265 270

Lys Tyr Leu Ile Asp Lys Ala His Ser Leu Gly Leu Gln Val Leu Val  
 275 280 285

[0015]

Asp Val Val His Ser His Ala Ser Asn Asn Val Thr Asp Gly Leu Asn  
 290 295 300

Gly Phe Asp Ile Gly Gln Gly Ser Gln Glu Ser Tyr Phe His Ala Gly  
 305 310 315 320

Glu Arg Gly Tyr His Lys Leu Trp Asp Ser Arg Leu Phe Asn Tyr Ala  
 325 330 335

Asn Trp Glu Val Leu Arg Phe Leu Leu Ser Asn Leu Arg Trp Trp Leu  
 340 345 350

Glu Glu Tyr Asn Phe Asp Gly Phe Arg Phe Asp Gly Ile Thr Ser Met  
 355 360 365

Leu Tyr Val His His Gly Ile Asn Met Gly Phe Thr Gly Asn Tyr Asn  
 370 375 380

Glu Tyr Phe Ser Glu Ala Thr Asp Val Asp Ala Val Val Tyr Leu Met  
 385 390 395 400

Leu Ala Asn Asn Leu Ile His Lys Ile Phe Pro Asp Ala Thr Val Ile  
 405 410 415

Ala Glu Asp Val Ser Gly Met Pro Gly Leu Ser Arg Pro Val Ser Glu  
 420 425 430

Gly Gly Ile Gly Phe Asp Tyr Arg Leu Ala Met Ala Ile Pro Asp Lys  
 435 440 445

Trp Ile Asp Tyr Leu Lys Asn Lys Asn Asp Glu Asp Trp Ser Met Lys  
 450 455 460

Glu Val Thr Ser Ser Leu Thr Asn Arg Arg Tyr Thr Glu Lys Cys Ile  
 465 470 475 480

Ala Tyr Ala Glu Ser His Asp Gln Ser Ile Val Gly Asp Lys Thr Ile  
 485 490 495

Ala Phe Leu Leu Met Asn Lys Glu Met Tyr Ser Gly Met Ser Cys Leu  
 500 505 510

Thr Asp Ala Ser Pro Val Val Asp Ala Gly Ile Ala Leu Asp Lys Met  
 515 520 525

Ile His Phe Phe His Asn Gly Leu Gly Arg Arg Gly Val Pro Gln Phe  
 530 535 540

[0016]

His Gly  
545

<210> 6  
<211> 2649  
<212> DNA  
<213> 马铃薯

<300>  
<308> EMBL / AJ011890  
<309> 1999-04-07

<300>  
<302> 改进植物淀粉的组成  
<308> EMBL / A58164  
<309> 1998-03-05  
<310> WO 96 34968  
<311> 1996-05-03  
<312> 1996-11-07

<400> 6  
atgggtgata cactctctgg agttcgtttt cctactgttc catcagtgta caaatctaata 60  
ggattcagca gtaatgggta tcggaggaat gctaattgttt ctgtattcctt gaaaaagcac 120  
tctctttcac ggaagatcctt ggctgaaaag tcttcttaca attccgaatt ccgaccttct 180  
acagttgcag catcggggaa agtccttgtg cctggaacctc agagtgatag ctccatcc 240  
tcaacagacc aatttgagtt cactgagaca tctccagaaa attccccagc atcaactgat 300  
gtagatagtt caacaatgga acacgctagc cagattaaaa ctgagaacga tgacgttgag 360  
ccgtcaagtg atcttacagg aagtgttgaa gagctggatt ttgcttcatc actacaacta 420  
caagaagggtg gtaaactgga ggagtctaaa acattaaata cttctgaaga gacaattatt 480  
gatgaatctg ataggatcag agagaggggc atccctccac ctggacttgg tcagaagatt 540  
tatgaaatag accccctttt gacaaactat cgtcaacacc ttgattacag gtattcacag 600  
tacaagaaac tgagggaggc aattgacaag tatgaggggtg gtttggaagc cttttctcgt 660  
ggttatgaaa aatggggttt cactcgtagt gctacaggta tcaactaccg tgagtgggct 720  
cttggtgccc agtcagctgc cctcattgga gatttcaaca attgggacgc aaatgctgac 780  
attatgactc ggaatgaatt tgggtgtctgg gagatTTTTc tgccaaataa tgtggatggt 840  
tctcctgcaa ttctcatgg gtccagagtg aagatacgta tggacactcc atcaggtggt 900  
aaggattcca ttctgcttg gatcaactac tctttacagc ttctgatga aattccatat 960  
aatggaatac attatgatcc acccgaagag gagaggtata tcttccaaca cccacggcca 1020  
aagaaaccaa agtcgctgag aatatatgaa tctcatattg gaatgagtag tccggagcct 1080  
aaaattaact catacgtgaa ttttagagat gaagttcttc ctgcataaa aaagcttggg 1140

[0017]

tacaatgcgc tgcaaattat ggctattcaa gagcattcctt attacgctag ttttggttat	1200
catgtcaciaa atttttttgc accaagcagc cgttttgga cgcgcgacga ccttaagtct	1260
ttgattgata aagctcatga gctaggaatt gttgtttctca tggacattgt tcacagcoat	1320
gcatcaaata atactttaga tggactgaac atgtttgact gcaccgatag ttgttacttt	1380
cactctggag ctctgtggtta tcattggatg tgggattccc gcctctttaa ctatggaaac	1440
tgggaggtac ttaggtatct tctctcaaat gcgagatggt ggttgatgc gttcaaattt	1500
gatggattta gatttgatgg tgtgacatca atgatgtata ttcaccacgg attatcggtg	1560
ggattcactg ggaactacga ggaatacttt ggactcgcaa ctgatgtgga tgctgtttgtg	1620
tatctgatgc tggtaacga tcttattcat gggcttttcc cagatgcaat taccattggt	1680
gaagatgtta gcggaatgcc gacattttgt attcccgtcc aagagggggg tgttggttt	1740
gactatcggc tgcatatggc aattgctgat aaacggattg agttgctca gaaacgggat	1800
gaggattgga gagtgggtga tattgttcat acactgacaa atagaagatg gtcggaaaag	1860
tgtgtttcat acgctgaaag tcatgatcaa gctctagtcg gtgataaac tatagcattc	1920
tggctgatgg acaaggatat gtatgatttt atggctctgg atagaccgtc aacatcatta	1980
atagatcgtg ggatagcatt gcacaagatg attaggcttg taactatggg attaggagga	2040
gaagggtacc taaatttcat gggaaatgaa ttcggccacc ctgagtggat tgatttcctt	2100
agggtgaac aacacctctc tgatggctca gtaatccccg gaaaccaatt ccgttatgat	2160
aatgcagac ggagatttga cctgggagat gcagaatatt taagataccg tgggttgcaa	2220
gaatttgacc ggcctatgca gtatcttgaa gataaatatg agtttatgac ttcagaacac	2280
cagttcatat cacgaaagga tgaaggagat aggatgattg tatttgaaaa aggaaaccta	2340
gtttttgtct ttaattttca ctggacaaaa agctattcag actatcgcac agcctgcctg	2400
aagcctggaa aataccgggt tgccttgac tcagatgatc cactttttgg tggcttcggg	2460
agaattgatc ataatgccga atatttcacc tttgaaggat ggtatgatga tcgtcctcgt	2520
tcaattatgg tgtatgcacc ttgtaaaaca gcagtggtct atgcactagt agacaaagaa	2580
gaagaagaag aagaagaaga agaagaagaa gtagcagcag tagaagaagt agtagtagaa	2640
gaagaatga	2649

<210> 7  
 <211> 882  
 <212> PRT  
 <213> 马铃薯

<400> 7

Met Val Tyr Thr Leu Ser Gly Val Arg Phe Pro Thr Val Pro Ser Val

[0018]

1	5	10	15
Tyr Lys Ser	Asn Gly Phe Ser Ser	Asn Gly Asp Arg Arg	Asn Ala Asn
	20	25	30
Val Ser Val	Phe Leu Lys Lys His Ser	Leu Ser Arg Lys	Ile Leu Ala
	35	40	45
Glu Lys Ser Ser	Tyr Asn Ser Glu Phe Arg Pro Ser	Thr Val Ala Ala	
	50	55	60
Ser Gly Lys Val	Leu Val Pro Gly Thr Gln Ser Asp Ser Ser Ser	Ser	Ser
	65	70	75
Ser Thr Asp Gln	Phe Glu Phe Thr Glu Thr Ser Pro Glu Asn Ser Pro		
	85	90	95
Ala Ser Thr Asp	Val Asp Ser Ser Thr Met Glu His Ala Ser Gln Ile		
	100	105	110
Lys Thr Glu Asn	Asp Asp Val Glu Pro Ser Ser Asp Leu Thr Gly Ser		
	115	120	125
Val Glu Glu Leu	Asp Phe Ala Ser Ser Leu Gln Leu Gln Glu Gly Gly		
	130	135	140
Lys Leu Glu Glu	Ser Lys Thr Leu Asn Thr Ser Glu Glu Thr Ile Ile		
	145	150	155
Asp Glu Ser Asp	Arg Ile Arg Glu Arg Gly Ile Pro Pro Pro Gly Leu		
	165	170	175
Gly Gln Lys Ile	Tyr Glu Ile Asp Pro Leu Leu Thr Asn Tyr Arg Gln		
	180	185	190
His Leu Asp Tyr	Arg Tyr Ser Gln Tyr Lys Lys Leu Arg Glu Ala Ile		
	195	200	205
Asp Lys Tyr Glu	Gly Gly Leu Glu Ala Phe Ser Arg Gly Tyr Glu Lys		
	210	215	220
Met Gly Phe Thr	Arg Ser Ala Thr Gly Ile Thr Tyr Arg Glu Trp Ala		
	225	230	235
Leu Gly Ala Gln	Ser Ala Ala Leu Ile Gly Asp Phe Asn Asn Trp Asp		
	245	250	255

[0019]

Ala Asn Ala Asp Ile Met Thr Arg Asn Glu Phe Gly Val Trp Glu Ile  
260 265 270

Phe Leu Pro Asn Asn Val Asp Gly Ser Pro Ala Ile Pro His Gly Ser  
275 280 285

Arg Val Lys Ile Arg Met Asp Thr Pro Ser Gly Val Lys Asp Ser Ile  
290 295 300

Pro Ala Trp Ile Asn Tyr Ser Leu Gln Leu Pro Asp Glu Ile Pro Tyr  
305 310 315 320

Asn Gly Ile His Tyr Asp Pro Pro Glu Glu Glu Arg Tyr Ile Phe Gln  
325 330 335

His Pro Arg Pro Lys Lys Pro Lys Ser Leu Arg Ile Tyr Glu Ser His  
340 345 350

Ile Gly Met Ser Ser Pro Glu Pro Lys Ile Asn Ser Tyr Val Asn Phe  
355 360 365

Arg Asp Glu Val Leu Pro Arg Ile Lys Lys Leu Gly Tyr Asn Ala Leu  
370 375 380

Gln Ile Met Ala Ile Gln Glu His Ser Tyr Tyr Ala Ser Phe Gly Tyr  
385 390 395 400

His Val Thr Asn Phe Phe Ala Pro Ser Ser Arg Phe Gly Thr Pro Asp  
405 410 415

Asp Leu Lys Ser Leu Ile Asp Lys Ala His Glu Leu Gly Ile Val Val  
420 425 430

Leu Met Asp Ile Val His Ser His Ala Ser Asn Asn Thr Leu Asp Gly  
435 440 445

Leu Asn Met Phe Asp Cys Thr Asp Ser Cys Tyr Phe His Ser Gly Ala  
450 455 460

Arg Gly Tyr His Trp Met Trp Asp Ser Arg Leu Phe Asn Tyr Gly Asn  
465 470 475 480

Trp Glu Val Leu Arg Tyr Leu Leu Ser Asn Ala Arg Trp Trp Leu Asp  
485 490 495

Ala Phe Lys Phe Asp Gly Phe Arg Phe Asp Gly Val Thr Ser Met Met

[0020]

500					505					510							
Tyr	Ile	His	His	Gly	Leu	Ser	Val	Gly	Phe	Thr	Gly	Asn	Tyr	Glu	Glu		
		515					520					525					
Tyr	Phe	Gly	Leu	Ala	Thr	Asp	Val	Asp	Ala	Val	Val	Tyr	Leu	Met	Leu		
	530					535					540						
Val	Asn	Asp	Leu	Ile	His	Gly	Leu	Phe	Pro	Asp	Ala	Ile	Thr	Ile	Gly		
545					550					555					560		
Glu	Asp	Val	Ser	Gly	Met	Pro	Thr	Phe	Cys	Ile	Pro	Val	Gln	Glu	Gly		
				565					570					575			
Gly	Val	Gly	Phe	Asp	Tyr	Arg	Leu	His	Met	Ala	Ile	Ala	Asp	Lys	Arg		
			580					585						590			
Ile	Glu	Leu	Leu	Lys	Lys	Arg	Asp	Glu	Asp	Trp	Arg	Val	Gly	Asp	Ile		
		595					600					605					
Val	His	Thr	Leu	Thr	Asn	Arg	Arg	Trp	Ser	Glu	Lys	Cys	Val	Ser	Tyr		
	610					615					620						
Ala	Glu	Ser	His	Asp	Gln	Ala	Leu	Val	Gly	Asp	Lys	Thr	Ile	Ala	Phe		
625					630					635					640		
Trp	Leu	Met	Asp	Lys	Asp	Met	Tyr	Asp	Phe	Met	Ala	Leu	Asp	Arg	Pro		
				645					650					655			
Ser	Thr	Ser	Leu	Ile	Asp	Arg	Gly	Ile	Ala	Leu	His	Lys	Met	Ile	Arg		
			660					665					670				
Leu	Val	Thr	Met	Gly	Leu	Gly	Gly	Glu	Gly	Tyr	Leu	Asn	Phe	Met	Gly		
		675					680					685					
Asn	Glu	Phe	Gly	His	Pro	Glu	Trp	Ile	Asp	Phe	Pro	Arg	Ala	Glu	Gln		
	690					695					700						
His	Leu	Ser	Asp	Gly	Ser	Val	Ile	Pro	Gly	Asn	Gln	Phe	Arg	Tyr	Asp		
705					710					715					720		
Lys	Cys	Arg	Arg	Arg	Phe	Asp	Leu	Gly	Asp	Ala	Glu	Tyr	Leu	Arg	Tyr		
				725					730					735			
Arg	Gly	Leu	Gln	Glu	Phe	Asp	Arg	Pro	Met	Gln	Tyr	Leu	Glu	Asp	Lys		
		740						745					750				

[0021]

Tyr Glu Phe Met Thr Ser Glu His Gln Phe Ile Ser Arg Lys Asp Glu  
 755 760 765

Gly Asp Arg Met Ile Val Phe Glu Lys Gly Asn Leu Val Phe Val Phe  
 770 775 780

Asn Phe His Trp Thr Lys Ser Tyr Ser Asp Tyr Arg Ile Ala Cys Leu  
 785 790 795 800

Lys Pro Gly Lys Tyr Pro Val Ala Leu Asp Ser Asp Asp Pro Leu Phe  
 805 810 815

Gly Gly Phe Gly Arg Ile Asp His Asn Ala Glu Tyr Phe Thr Phe Glu  
 820 825 830

Gly Trp Tyr Asp Asp Arg Pro Arg Ser Ile Met Val Tyr Ala Pro Cys  
 835 840 845

Lys Thr Ala Val Val Tyr Ala Leu Val Asp Lys Glu Glu Glu Glu Glu  
 850 855 860

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Val Ala Ala Val Glu Glu Val Val Val Glu  
 865 870 875 880

Glu Glu

<210> 8  
 <211> 1255  
 <212> DNA  
 <213> 马铃薯

<400> 8  
 attttgtatt cccgttcaag atgggggtgt tggctttgac tatcggctgc atatggcaat 60  
 tgctgataaa tggattgagt tgctcaagaa acgggatgag gattggagag tgggtgatat 120  
 tgttcataca ctgacaaata gaagatggtc ggaaaagtgt gtttcatacg ctgaaagtca 180  
 tgatcaagct ctagtcggtg ataaaactat agcattctgg ctgatggaca aggatatgta 240  
 tgattttatg gctttggata gaccgtcaac atcattaata gatcgtggga tagcattgca 300  
 caagatgatt aggcttgtaa ctatgggatt aggaggagaa gggtagcctaa atttcatggg 360  
 aatgaattc ggccaccctg agtggattga tttccctagg gctgaacaac acctctctga 420  
 tggctcagta attcccggaa accaattcag ttatgataaa tgcagacgga gatttgacct 480  
 gggagatgca gaatatttaa gataccgtgg gttgcaagaa tttgaccggg ctatgcagta 540  
 tcttgaagat aaatatgagt ttatgacttc agaacaccag ttcatatcac gaaaggatga 600

[0022]



---

aggagatagg atgattgtat ttgaaaaagg aaacctagtt tttgtcttta attttactg	660
gacaaaaagc tattcagact atcgcatagg ctgcctgaag cctggaaaat acaaggttgc	720
cttgactca gatgatccac tttttggtgg cttcgggaga attgatcata atgccgaatg	780
ttcaccttt gaaggatggt atgatgatcg tcctcgttca attatggtgt atgcacctag	840
tagaacagca gtggtctatg cactagtaga caaagaagaa gaagaagaag aagtagcagt	900
agtagaagaa gtagtagtag aagaagaatg aacgaacttg tgatcgcggtt gaaagatttg	960
aacgctacat agagcttctt gacgtatctg gcaatattgc atcagtcttg gcggaatttc	1020
atgtgacaaa aggtttgcaa ttctttccac tattagtagt gcaacgatat acgcagagat	1080
gaagtgctga acaaacatat gtaaaatcga tgaatttatg tcgaatgctg ggacgggctt	1140
cagcaggttt tgcttagtga gttctgtaaa ttgtcatctc tttatatgta cagccaacta	1200
gaaatcaatt atgtgagacc taaaatacaa taaccataaa atggaaatag tgctg	1255

**RVA-分析法 1**

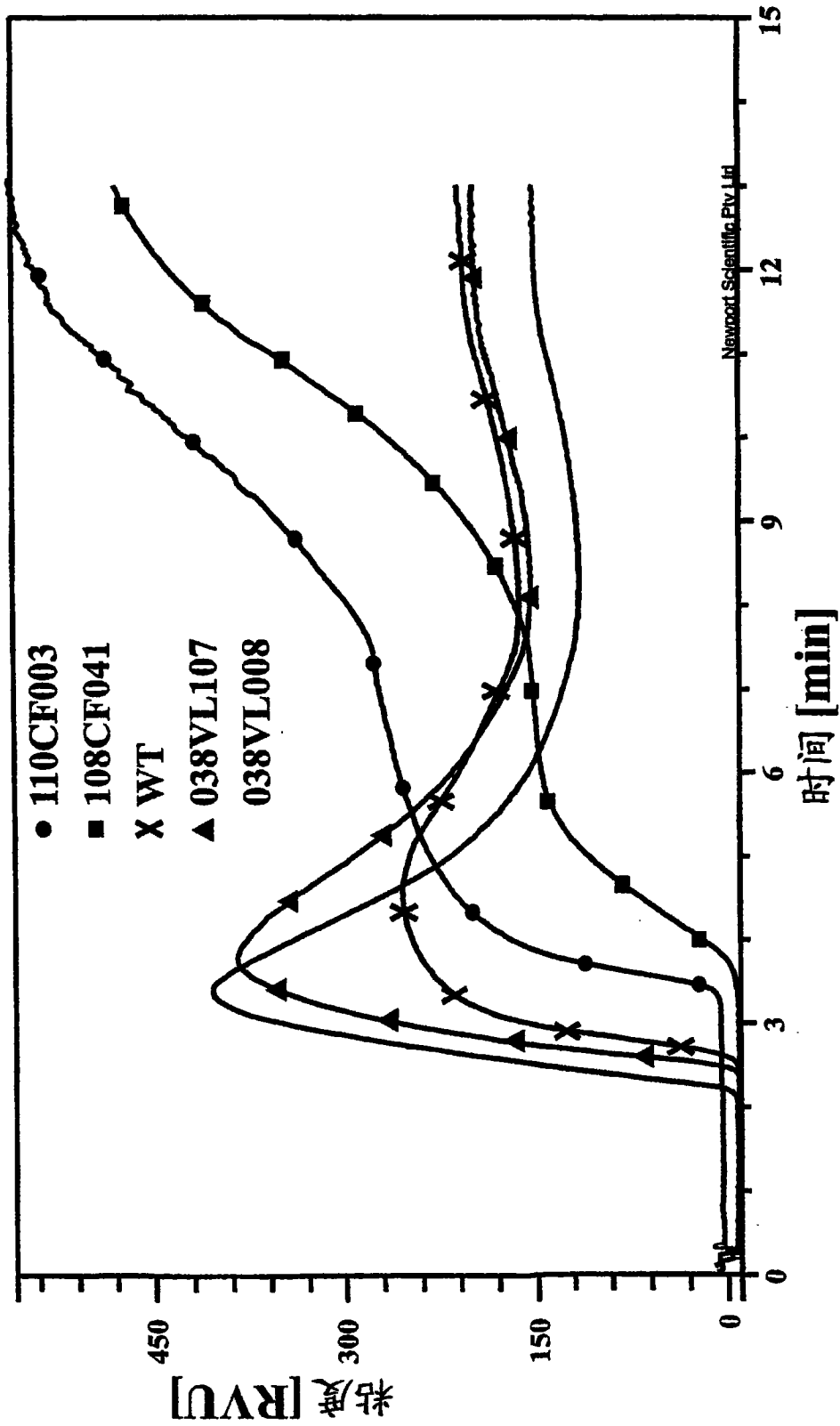


图 1

**RVA-分析法2**

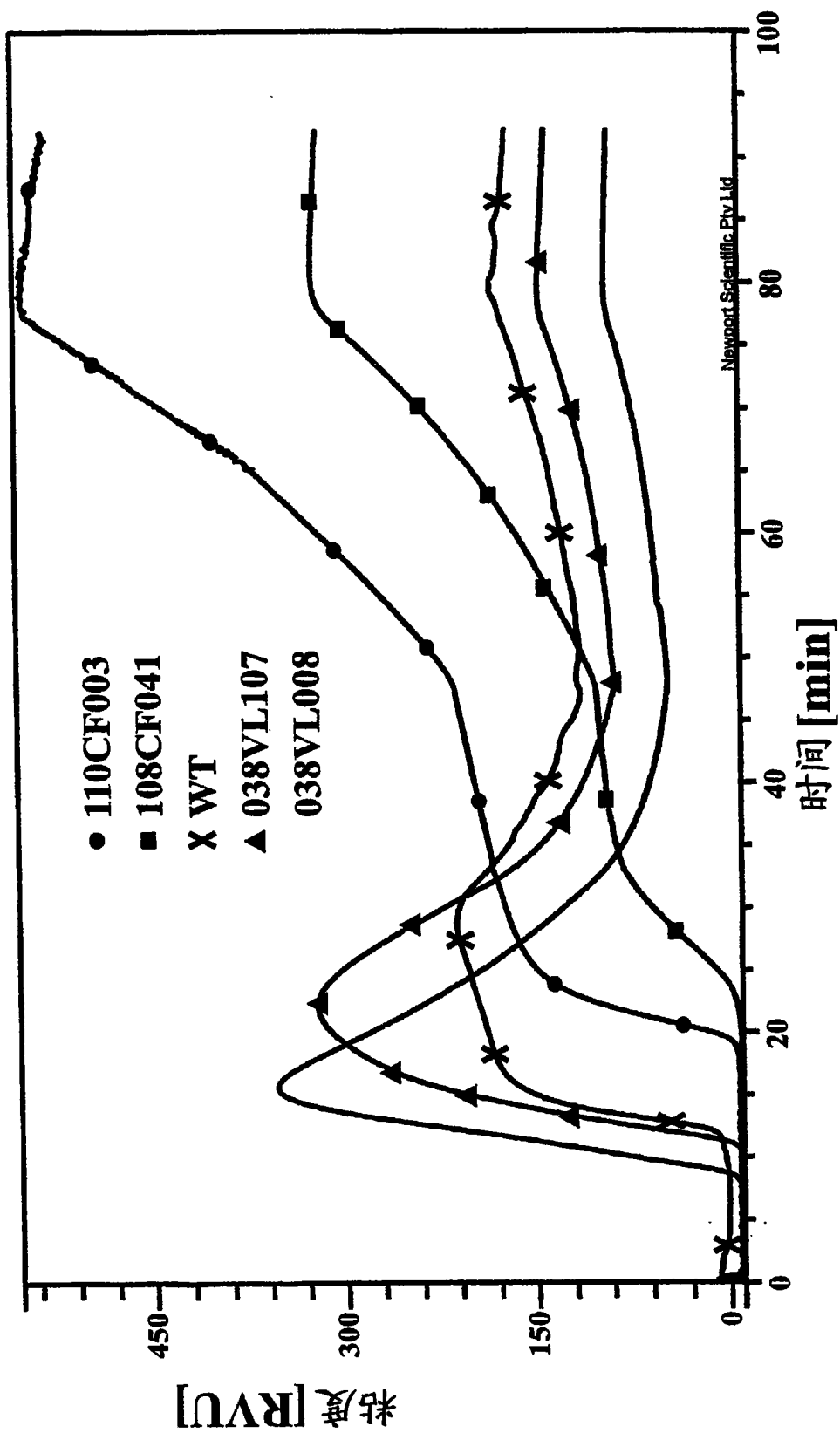


图 2

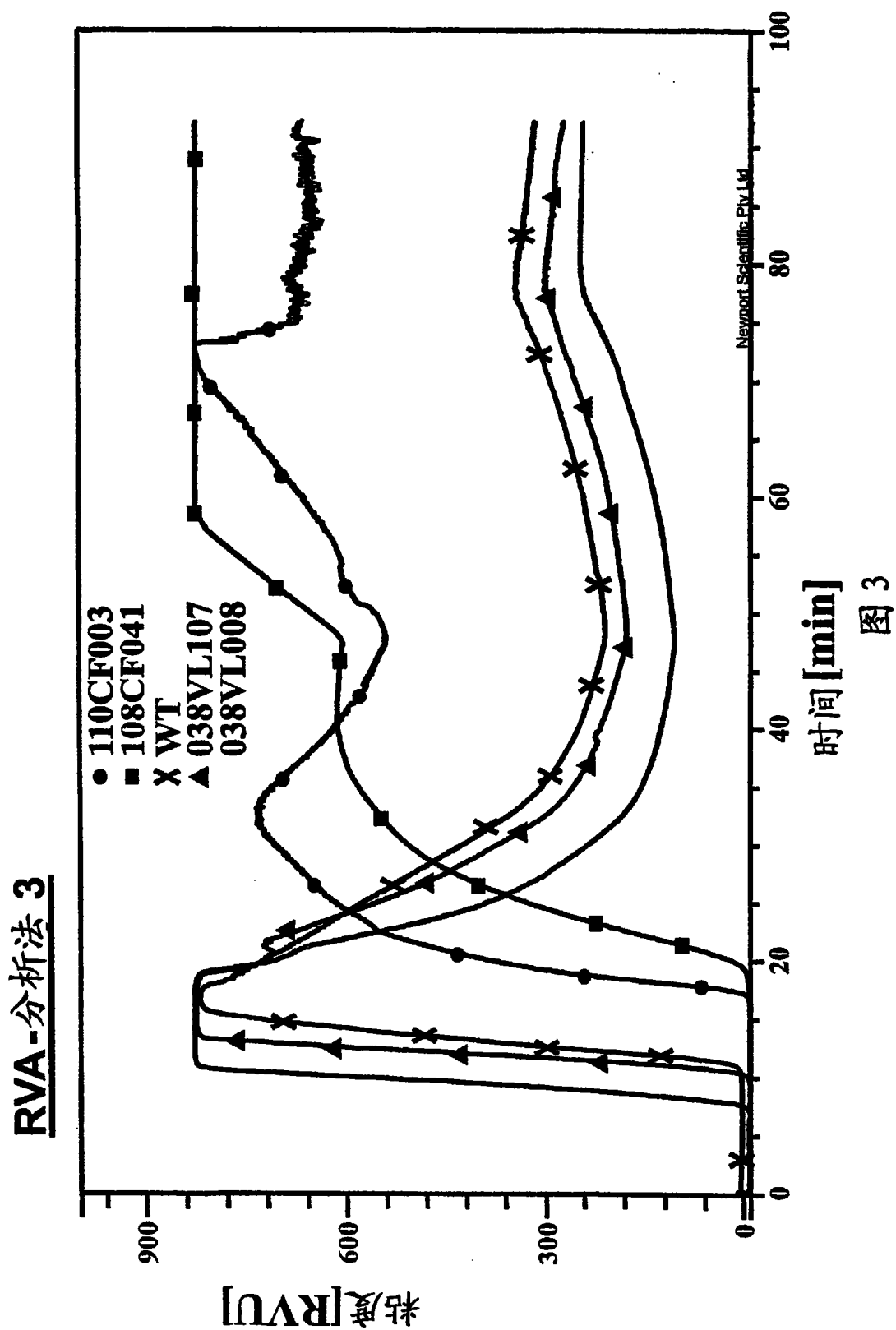
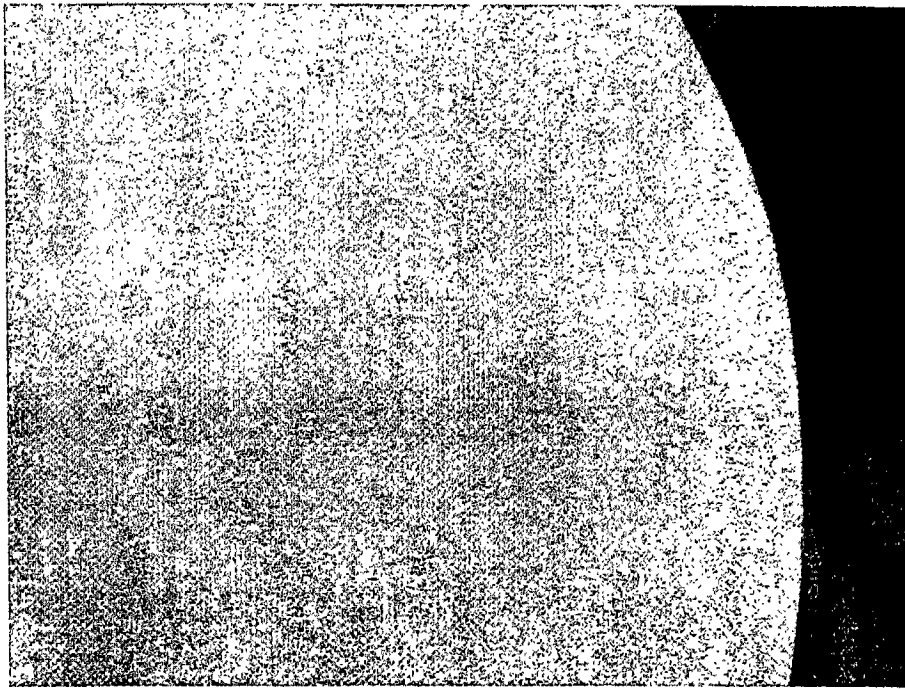
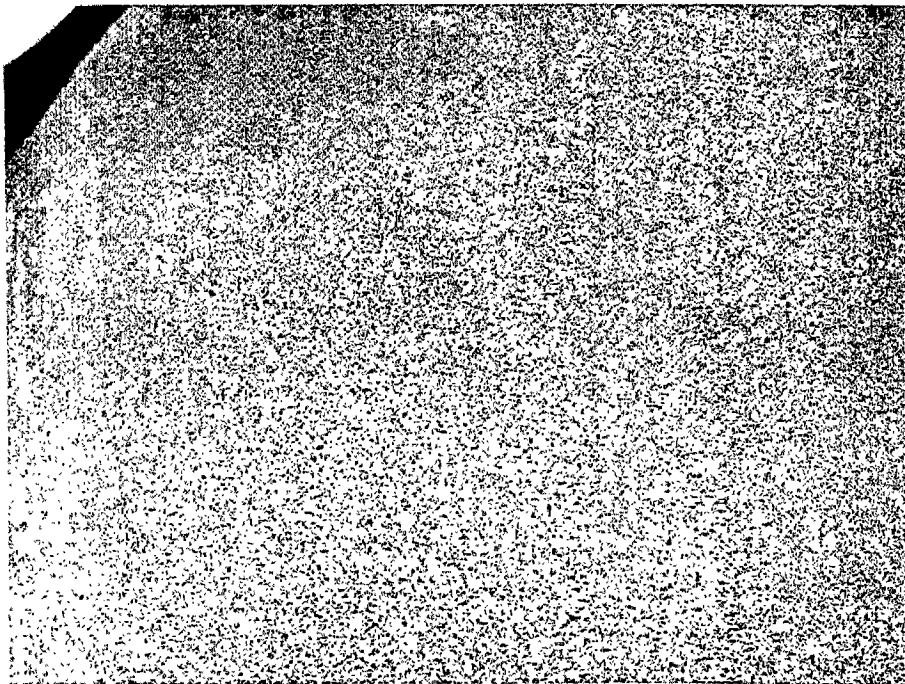


图 3



—— 1 μm

图 4



—— 1 μm

图 5

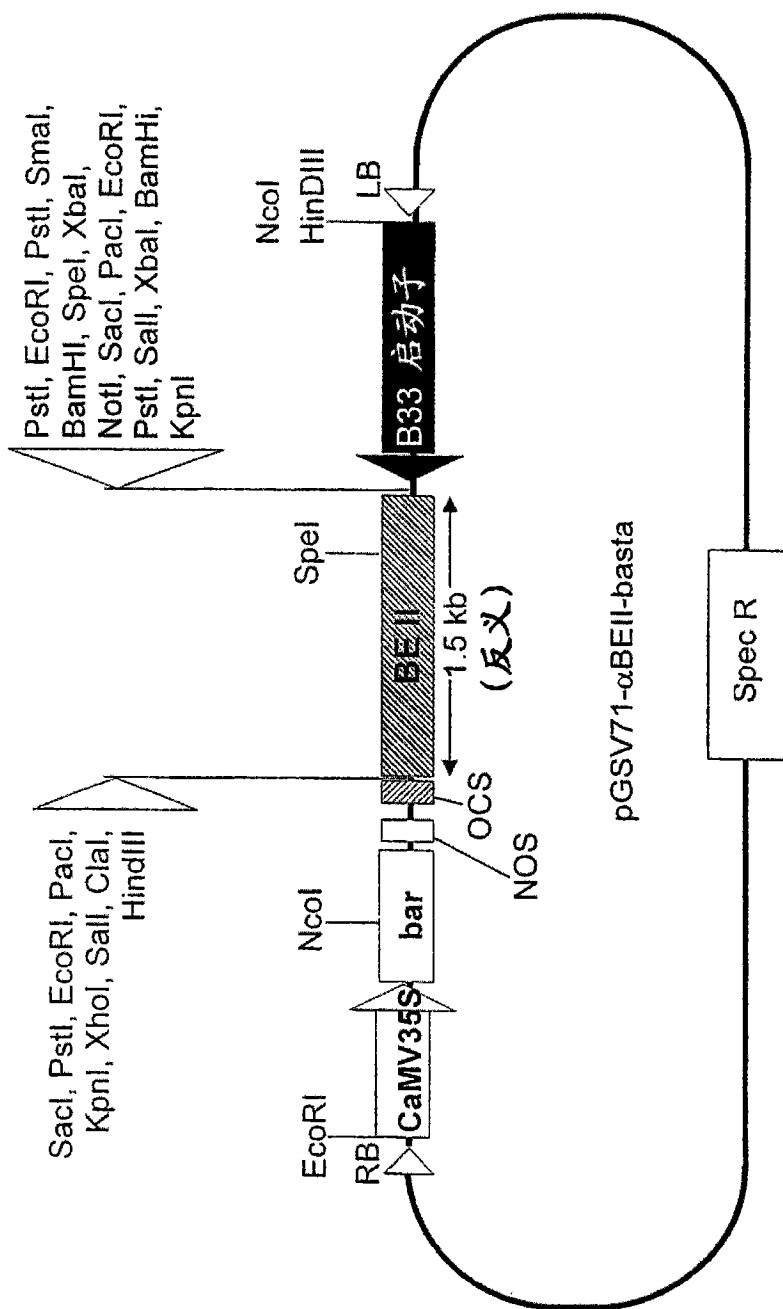


图 6

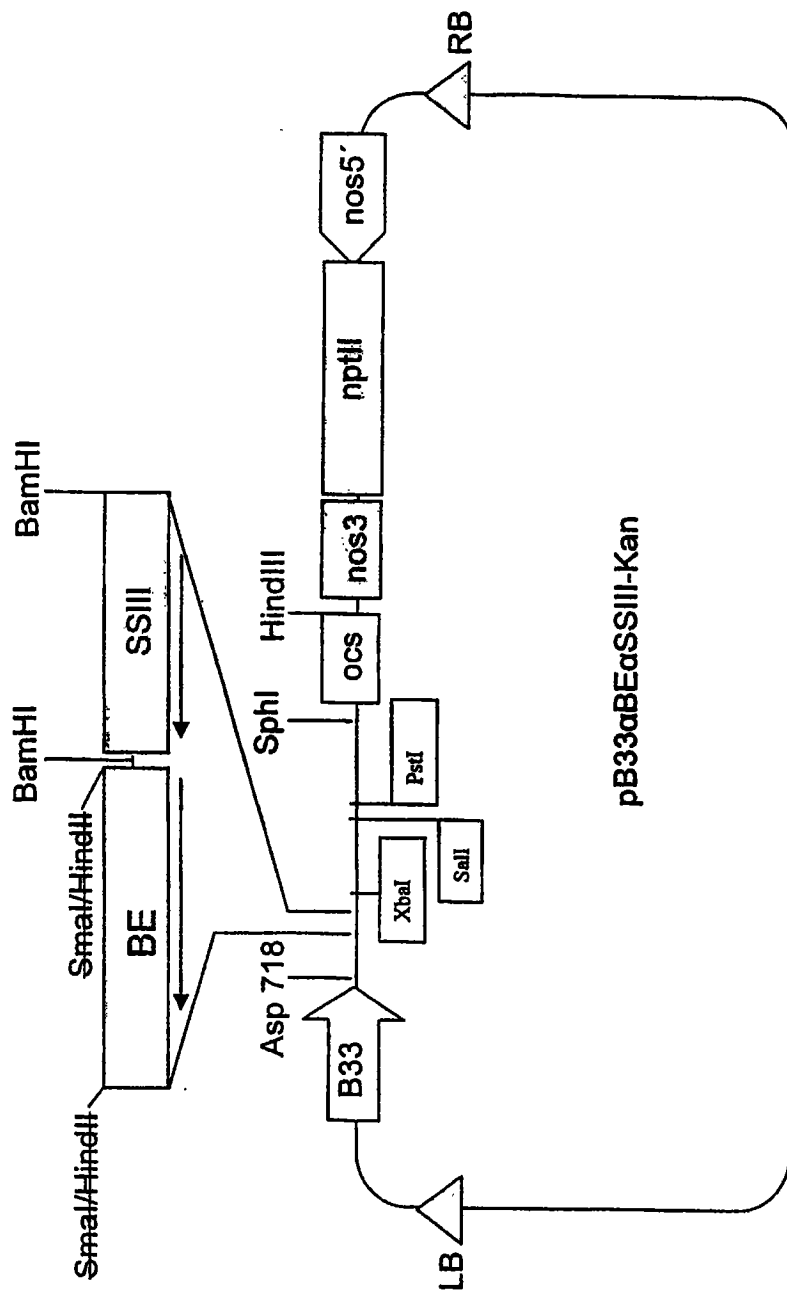


图 7

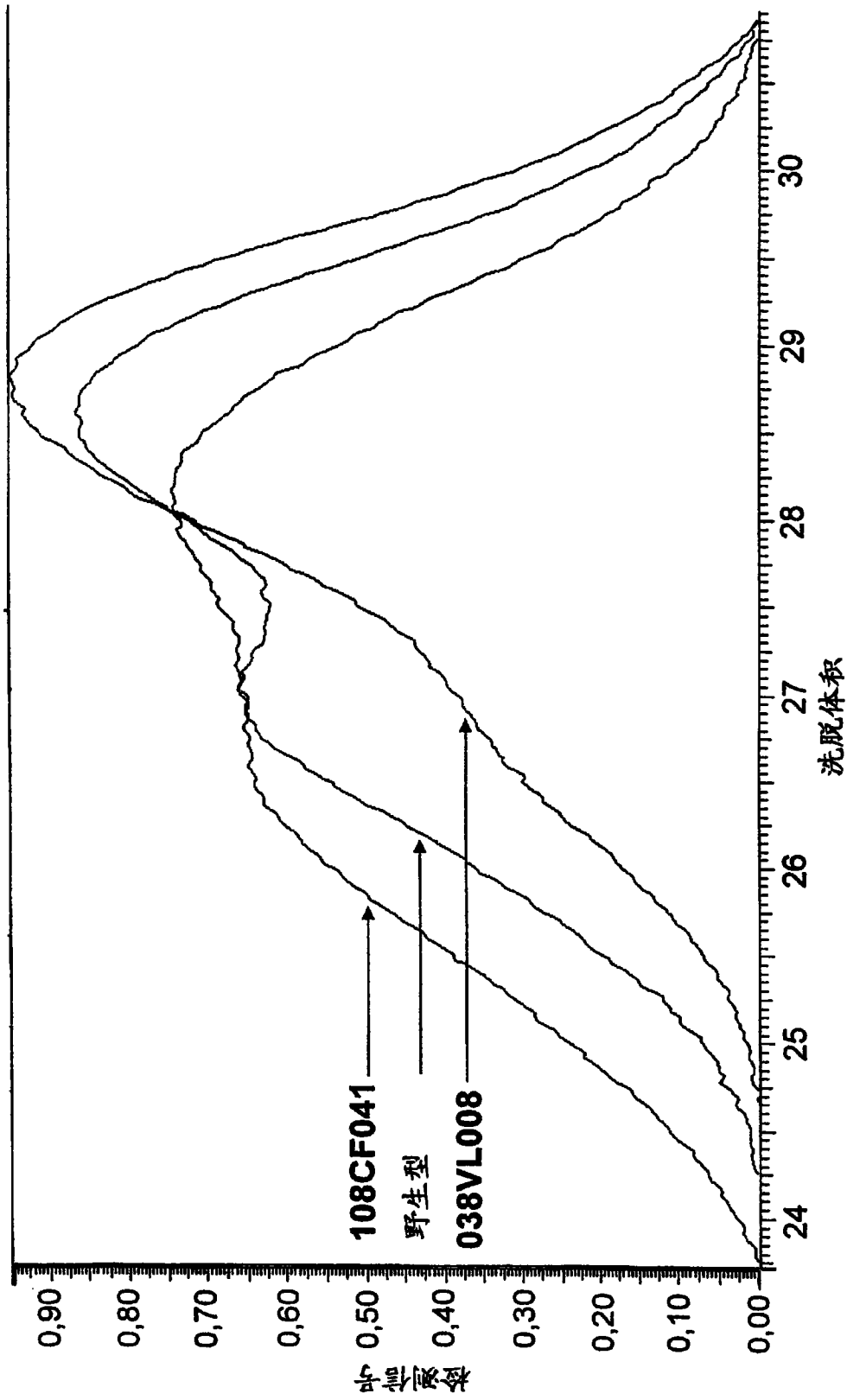
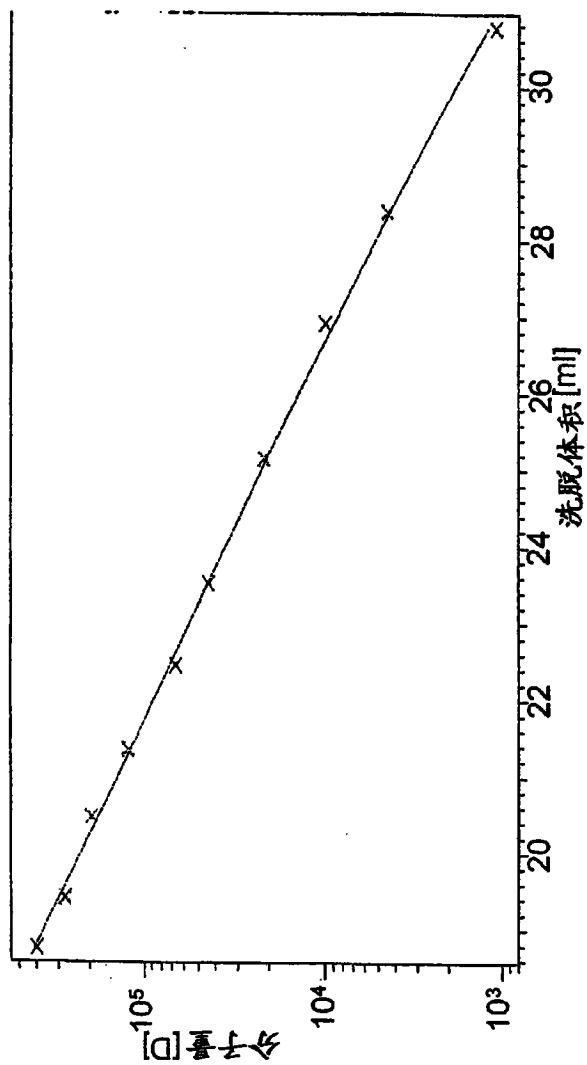


图 8





校正:

洗脱体积 [ml]	分子量 [D]	样品名
18.76	401300	葡聚糖 T670
19.41	276500	葡聚糖 T410
20.49	196300	葡聚糖 T270
21.35	123600	葡聚糖 T150
22.45	66700	葡聚糖 T80
23.52	43500	葡聚糖 T50
25.15	21400	葡聚糖 T25
26.92	9890	葡聚糖 T12
28.38	4440	葡聚糖 T5
30.77	1080	葡聚糖 T1

图 9

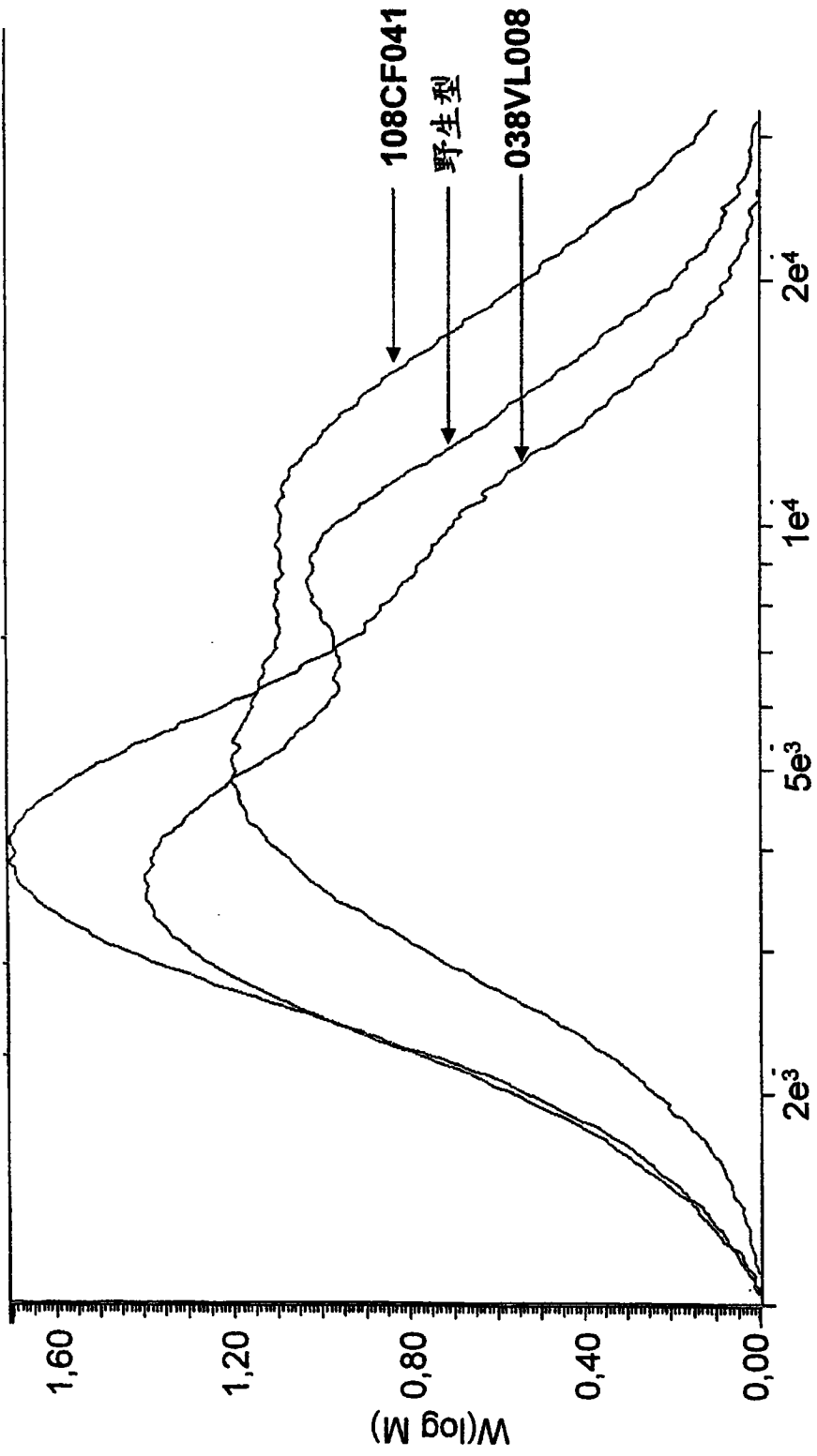


图 10

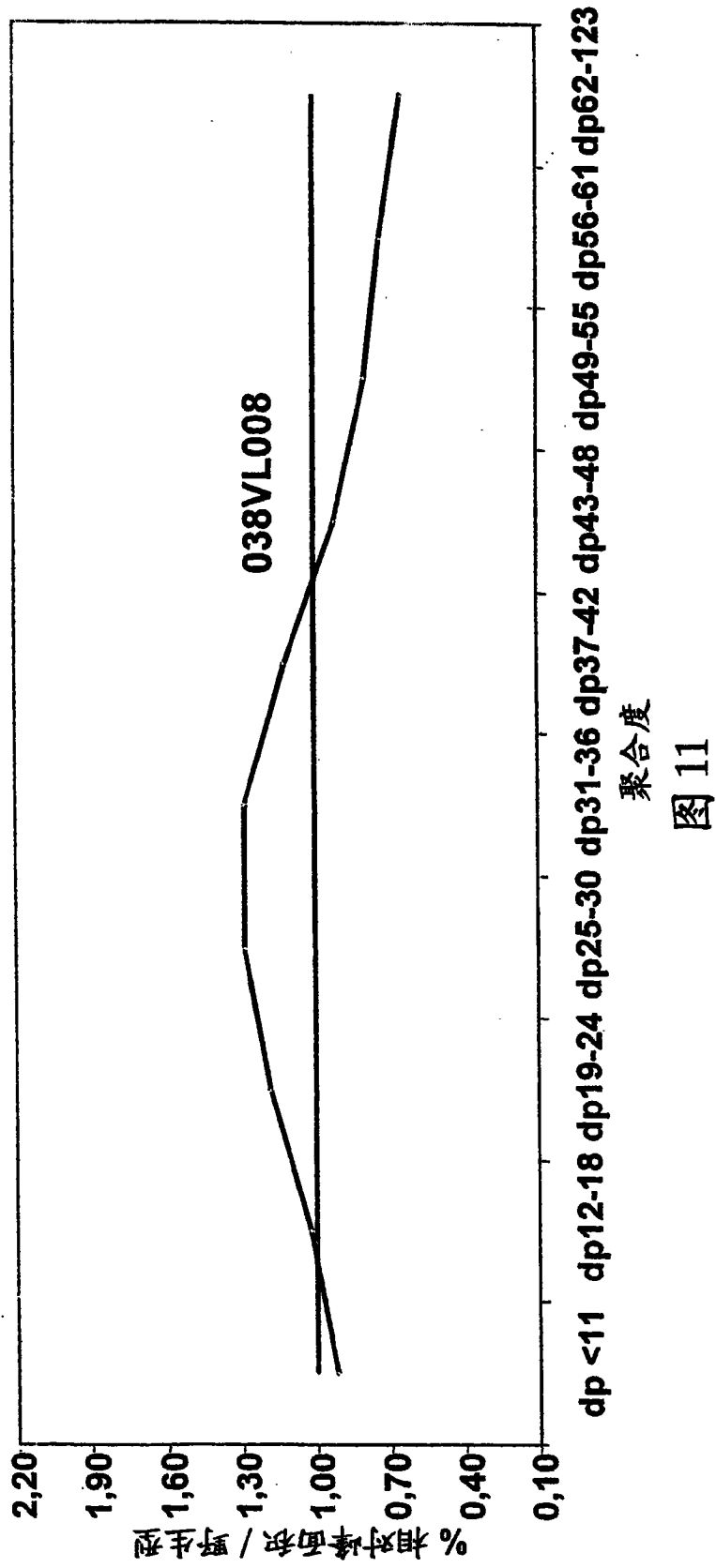
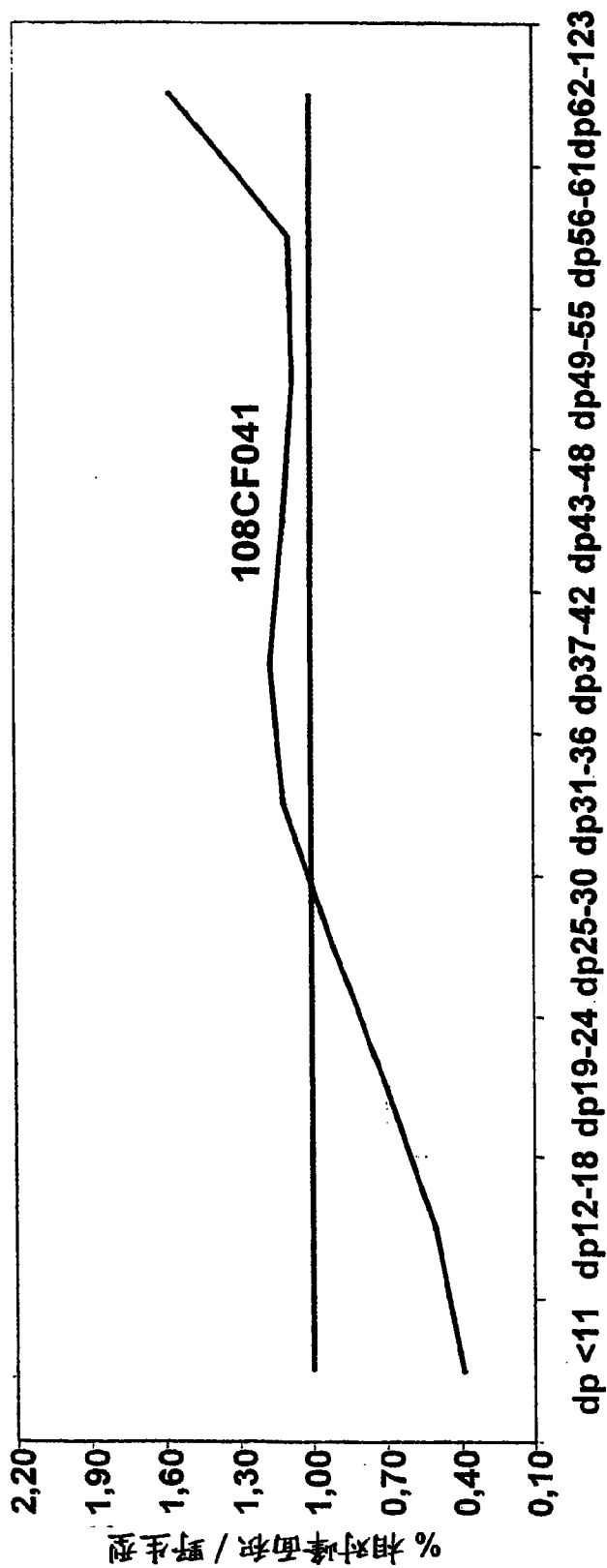


图 11



聚合度  
图 12