

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 99812674.8

[51] Int. Cl.

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

C12N 9/00 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

C08B 30/00 (2006.01)

C07K 16/16 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 8 月 6 日

[11] 授权公告号 CN 100408687C

[51] Int. Cl. (续)

C12N 15/11 (2006.01)

[22] 申请日 1999.11.5 [21] 申请号 99812674.8

[30] 优先权

[32] 1998.11.9 [33] US [31] 60/107,883

[86] 国际申请 PCT/EP1999/008506 1999.11.5

[87] 国际公布 WO2000/028052 英 2000.5.18

[85] 进入国家阶段日期 2001.4.26

[73] 专利权人 拜尔生物科学有限公司

地址 德国波茨坦

[72] 发明人 C·福罗伯格

[56] 参考文献

WO9953072A1 1999.10.21

WO9711188A1 1997.3.27

WO9827212A1 1998.6.25

EP0321201B1 1994.12.21

审查员 黄磊

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 李瑛

权利要求书 3 页 说明书 46 页 附图 1 页

[54] 发明名称

来自稻米的核酸分子及其用于生产改性淀粉
的用途

[57] 摘要

本发明描述了编码来自稻米的淀粉颗粒结合蛋白的核酸分子以及用于生产合成改性淀粉的转基因植物细胞和植物的方法和重组 DNA 分子。此外，本发明描述了由这些方法生产的植物细胞和植物以及从中可获得的淀粉。

- 1.一种编码 R1-蛋白质的核酸分子，它选自下列核酸分子组成的组：
 - (a) 编码包括表示为 Seq. ID No.2 的氨基酸序列的蛋白质的核酸分子；
 - (b) 包括表示为 Seq. ID No.1 的核苷酸序列编码区的核酸分子；和
 - (c) 编码包括由质粒 DSM 12439 cDNA 插入片段编码的氨基酸序列的多肽的核酸分子；
 - (d) 包括质粒 DSM 12439 cDNA 插入片段编码区的核酸分子；
 - (e) (a) - (d) 中任一核酸分子的相应互补链；和
 - (f) 其序列因遗传密码的简并性而与 (e) 核酸分子序列不同的核酸分子。
- 2.一种含有权利要求 1 的核酸分子的载体。
- 3.权利要求 2 的载体，其中所述的核酸分子与确保真核细胞和原核细胞中转录的调节元件连接。
- 4.一种宿主细胞，它是用权利要求 1 的核酸分子或用权利要求 2 或 3 的载体进行遗传修饰的。
- 5.权利要求 4 的宿主细胞，其中由权利要求 1 的核酸分子编码的 R1-蛋白质的量与相应未进行遗传修饰的宿主细胞相比得到了增加。
- 6.权利要求 4 或 5 的宿主细胞，它是一种转基因植物细胞。
- 7.一种用于生产含有权利要求 6 的植物细胞的植物的方法，该方法包括下列步骤：将权利要求 1 的核酸分子引入植物细胞并从由此转化的细胞再生植物。
- 8.一种用于生产改性淀粉的方法，该方法包括从含有权利要求 6 的植物细胞的植物和/或从这类植物的贮存淀粉的部分中提取淀粉的步骤。
- 9.从权利要求 6 的植物细胞、从含有权利要求 6 的植物细胞的植物中或通过权利要求 8 的方法可获得的淀粉。
- 10.一种用于生产由权利要求 1 的核酸分子编码的蛋白质的方法，其中在使蛋白质得到表达的条件下培养权利要求 4 或 5 的宿主细胞且其中

从所述细胞和/或所述培养基中分离所述的蛋白质。

11.一种由权利要求1的核酸分子编码的或通过权利要求10的方法可获得的蛋白质。

12.一种编码与权利要求1的DNA分子转录物互补的反义-RNA的DNA分子。

13.一种编码RNA的DNA分子,所述的RNA在植物细胞中表达时因共抑制作用而导致对权利要求1的核酸分子的表达减少。

14.一种含有权利要求12或13的DNA分子的载体。

15.权利要求14的载体,其中所述的DNA分子与确保植物细胞中转录的调节DNA元件结合。

16.一种含有权利要求12或13的DNA分子或权利要求14或15的载体的宿主细胞。

17.一种转基因植物细胞,其中外源核酸分子的存在或表达使编码权利要求11的蛋白质的内源基因的表达受到抑制。

18.权利要求17的转基因植物细胞,其中所述的外源核酸分子选自下列分子组成的组:

(a) 编码反义-RNA的DNA分子,这种反义-RNA可以导致对编码权利要求11蛋白质的内源基因的表达减少;和

(b) 可以通过共抑制作用导致对编码权利要求11蛋白质的内源基因的表达减少的DNA分子。

19.一种通过转录权利要求12或13的DNA分子可获得的RNA分子。

20.一种用于生产合成改性淀粉的转基因植物细胞的方法,其特征在于以内源形式在所述细胞中合成的权利要求11的蛋白质的量在所述细胞中得到减少。

21.权利要求20的方法,其特征在于通过反义作用使细胞中的权利要求11的蛋白质的量得到减少。

22.权利要求20的方法,其特征在于通过核酶作用使细胞中的权利要求11的蛋白质的量得到减少。

23.权利要求20的方法,其特征在于通过共抑制作用使细胞中的权利要求11的蛋白质的量得到减少。

24.一种通过权利要求 20-23 中任意一项的方法可获得的植物细胞。

25.一种用于生产改性淀粉的方法，该方法包括从包含权利要求 17 或 18 的植物细胞的植物或包含权利要求 24 的植物细胞的植物和/或从这类植物的贮存淀粉的部分中提取淀粉的步骤。

26.从权利要求 17 或 18 或权利要求 24 的植物细胞中、从包含权利要求 17 或 18 的植物细胞的植物或包含权利要求 24 的植物细胞的植物中或通过权利要求 25 的方法可获得的淀粉。

27.权利要求 26 的淀粉，其特征在于它来源于稻米。

来自稻米的核酸分子 及其用于生产改性淀粉的用途

本发明涉及编码来自稻米的 R1-蛋白质的核酸分子以及用于生产合成改性淀粉的转基因植物细胞和植物的方法和重组 DNA 分子。本发明还涉及由这些方法生产的转基因植物细胞和植物及从所述转基因植物细胞和植物中可获得的淀粉。

构成植物中最重要的贮存物质之一的多糖淀粉不仅用于食品领域而且在工业化产品生产过程中作为再生材料起重要作用。为了能够尽可能在许多领域中应用这种原料，有必要获得大量种类的物质以及使这些物质适应加工工业的不同需求。

尽管淀粉由化学均质的基本成分，即葡萄糖组成，但是它不构成均质的原料。它是一种相当复杂的不同类型分子的混合物，这些分子彼此在聚合度和葡萄糖链的支化度上均不同。特别是人们可以区分直链淀粉，即基本上由 α -1,4-糖苷支化葡萄糖分子构成的非支化聚合物与又转过来是或多或少重度支化葡萄糖链的混合物的支链淀粉。这种支化是由 α -1,6-糖苷互连键的出现所导致的。主要由支化度，即直链淀粉/支链淀粉比、平均链长和磷酸盐基团的出现率确定的淀粉的分子结构分别对淀粉或其水溶液的重要功能特性来说有重要意义。例如，重要的功能特性是淀粉的溶解度、变稠倾向、成膜能力、粘度、糊化特性，即结合和粘合特性以及抗冷性。淀粉的颗粒大小对各种用途来说也有重要意义。具有高直链淀粉含量的淀粉的生产具有特别重要的意义。此外，在某些条件下，植物细胞中含有的改性淀粉可有利地改变植物细胞的性能。例如，能够在诸如种子和块茎这样的含淀粉的器官的贮存过程中在将其例如通过淀粉提取的进一步加工前减少淀粉的降解。此外，在一定程度上关注产生改性淀粉，它们可使含这种淀粉的植物细胞和植物器官更适合于进一步加工，诸如用于由玉米生产爆玉米花或玉米片或由马铃薯生产法式

炸薯条、炸薯片或马铃薯粉。特别关注以这种方式来改进所述的淀粉，即它们表现出降低的“冷甜性”，即在低温下长期贮存过程中还原糖（特别是葡萄糖）的释放减少。

此外，就稻米而言，已知淀粉的物理-化学特性的改变会影响米粒的烹调和食用质量。改变和精细调配这些特性使得开发具有特定质量类型的新型稻米品种成为可能。质量的类型通常基于煮熟稻米的淀粉特性或质地，特别是去壳米的表观淀粉含量（AC）、最终淀粉胶凝温度（GT）和凝胶稠度（GC）（Juliano, Cereal Foods World 43（1998），207-222）。

可以分离自植物的淀粉常常通过通常耗时而昂贵的化学修饰而适合于某些工业化目的。因此，需要找到生产可合成具有满足加工工业需要特性的淀粉的植物的可能性。

用于生产这类植物的常规方法是传统的繁育法和突变株的生产，然而，它们昂贵而费时。另一方面，通过重组 DNA 技术可以生产能合成具有改变特性的淀粉的植物。然而，为了利用重组 DNA 技术，需要 DNA 序列、特别是诸如稻米这样的合成淀粉的重要植物的序列，其基因产物会影响淀粉合成、淀粉改性或淀粉降解。

因此，以本发明为基础解决的问题就是提供以这样一种方式改变植物的核酸分子和方法，所述的方式即本发明提供的核酸分子和方法可合成其物理和/或化学特性（例如，这些特性又转过来影响这些植物可收获部分的烹调特性和/或营养价值）不同于在植物中天然合成的淀粉且由此该淀粉更适合于一般和/或特殊用途的淀粉。

根据权利要求中所述的实施方案可以解决这一问题。

因此，本发明涉及编码一种蛋白质、特别是来自稻米的蛋白质的核酸分子，它们包括 Seq. ID No. 2 中所示的氨基酸序列。这类蛋白质存在于植物细胞的质体中、特别是存在于稻米细胞的质体中。在本发明的范围内，由所述核酸分子编码的蛋白质称作 R1-蛋白质。据推测这种蛋白质以与淀粉颗粒结合的形式以及以可溶形式存在于质体中。此外，这种蛋白质参与淀粉的磷酸盐化。

本发明进一步涉及包括 Seq. ID No. 1 中所示的核苷酸序列、特别是

Seq. ID No. 1 中所示的编码区的核酸分子。

本发明还涉及编码一种多肽的核酸分子，这种多肽包括由质粒 DSM 12439 的 cDNA 插入片段编码的氨基酸序列。

此外，本发明涉及包括包含在质粒 DSM 12439 cDNA 插入片段中的编码区的核酸分子。

编码特别是来自稻米的蛋白质（出现在细胞的质体中）并与上述本发明核酸分子或其互补链杂交的核酸分子也是本发明的主题。在本文的上下文中，术语“杂交”指在常规杂交条件下、优选例如 Sambrook 等在 *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 第 2 版 (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY 中所述的严格条件下的杂交。

更优选杂交在下列条件下进行：

杂交缓冲液：	2 x SSC; 10 x Denhard's 溶液 (Fikoll 400+PEG+BSA; 比例 1:1:1) ; 0.1% SDS; 5mM EDTA; 50mM Na ₂ HPO ₄ ; 250μg/ml 鲑鱼 精子 DNA; 50μg/ml tRNA; 或 0.25M 磷酸钠缓冲液 pH 7.2 1mM EDTA 7% SDS
杂交温度 T	= 65 - 68°C
洗涤缓冲液：	0.2 x SSC; 0.1% SDS
洗涤温度 T	= 65 - 68°C

例如，可以从基因组或特别是从稻米细胞或组织中产生的 cDNA 文库中分离与本发明分子杂交的核酸分子。

这类核酸分子的鉴定和分离可以通过使用本发明的分子或这些分子的部分或，根据具体的情况，使用这些分子的反向互补链，例如通过按照标准方法（参见，例如 Sambrook 等，1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 第 2 版, Cold Spring Harbor Laboratory Press,

Cold Spring Harbor, NY) 杂交来进行。

例如, 作为用于杂交的探针, 可以使用确切地或基本地含有 Seq. ID No:1 中所示的核苷酸序列或其部分的核酸分子。用作杂交探针的 DNA 片段也可以是通过常规 DNA 合成方法产生的合成 DNA 片段且其序列与本发明的核酸分子的序列基本相同。在鉴定和分离与本发明核酸分子杂交的基因后, 必须测定序列且必须分析由该序列编码的蛋白质的特性。

这类杂交的核酸分子还包括编码上述蛋白质的上述核酸分子的片段、衍生物和等位变体。在本文的上下文中, 将片段描述为长度足以编码上述蛋白质的核酸分子的部分。术语衍生物指的是这些分子的序列在一个或多个位置上不同于上述核酸分子的序列且表现出与这些分子序列的高度同源性。同源性指的是在核苷酸水平上至少具有 90% 的序列同一性、特别是至少具有 93% 的同一性、优选 95% 以上且更优选 98% 以上的序列同一性, 且特别优选 99% 以上的序列同一性。优选通过将相应的序列与 SEQ ID NO: 1 编码区的核苷酸序列进行比较来确定同源性的程度。当所比较的两个序列不具有相同长度时, 同源性的程度优选指的是与较长序列中核苷酸残基相同的较短序列中的核苷酸残基的百分比。通常可以使用已知的计算机程序诸如 Bestfit 程序 (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711) 来测定同源性的程度。Bestfit 应用 Smith 和 Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2: 482-489 (1981) 的局部同源性算法来找到两个序列之间同源性的最佳片段。当应用 Bestfit 或任意其它序列对比程序来测定某一序列是否例如有 95% 与本发明的参考序列相同时, 优选设定参数以便在参考核苷酸序列的全长内计算同一性的百分比并使得同源性中的缺口不多于所述参考序列中核苷酸总数的 5%。当应用 Bestfit 时, 优选将所谓的“选择性参数”遗留在其错误值处。例如, 通过添加、缺失、取代、插入或重组可能已经导致在将给定的序列与上述本发明核酸分子比较时出现偏差。此外, 同源性优选指的是所编码的蛋白质显示出与 SEQ ID NO: 2 描述的氨基酸序列至少具有 90%、更优选至少具有 93

%、甚至更优选至少具有 95%、特别是至少具有 98% 且特别优选至少具有 99% 的序列同一性。

与本发明核酸分子杂交的序列优选包括与上述核酸分子至少具有 90%、优选至少具有 93%、更优选至少具有 95%、更优选至少具有 98% 且特别优选至少具有 99% 同一性的同源区，其中该同源区具有至少 500 个核苷酸的长度、更优选具有至少 600 个核苷酸的长度、甚至更优选具有至少 800 个核苷酸的长度且特别优选具有至少 1000 个核苷酸的长度。

此外，同源性指的是在相应核酸分子或它们编码的蛋白质之间存在功能和/或结构上的等同性。与上述核酸分子同源并代表这些分子衍生物的核酸分子一般是这些核酸分子的变化形式，它们可以构成发挥相同生物功能的修饰。这些变化形式可以是天然存在的变化形式或突变形式，由此这些突变形式可能已经天然发生或可能已经有意将它们引入。此外，这些变化形式可以是合成产生的序列。

等位变体可以天然存在且可以是合成产生的变体或通过重组 DNA 技术产生的变体。

在另一个优选的实施方案中，术语“衍生物”包括编码一种蛋白质的核酸分子，所述的蛋白质表现出与 SEQ ID NO: 2 描述的氨基酸序列的同源性至少为 60%、特别是同源性至少为 70%、优选 80% 以上且更优选同源性为 90% 以上且特别优选 95% 以上；而该蛋白质包括至少 1 种、更优选至少 3 种、甚至更优选至少 5 种、特别是至少 10 种且特别优选至少 20 种肽基元，它们选择下列基元组成的组：

- (a) PFIKS, (SEQ ID NO: 3);
- (b) QAIEF, (SEQ ID NO: 4);
- (c) NYAPE, (SEQ ID NO: 5);
- (d) ELQSE, (SEQ ID NO: 6);
- (e) KVAKNT, (SEQ ID NO: 7);
- (f) AADLV, (SEQ ID NO: 8);
- (g) QYQEI, (SEQ ID NO: 9);
- (h) ALLDY, (SEQ ID NO: 10);

- (i) DRPIH, (SEQ ID NO: 11);
- (j) QKDGL, (SEQ ID NO: 12);
- (k) IATCM, (SEQ ID NO: 13);
- (l) ARAEL, (SEQ ID NO: 14);
- (m) ALSTD, (SEQ ID NO: 15);
- (n) NRIDP, (SEQ ID NO: 16);
- (o) GYIVV, (SEQ ID NO: 17);
- (p) RNCKV, (SEQ ID NO: 18);
- (q) LGFPS, (SEQ ID NO: 19);
- (r) VILDY, (SEQ ID NO: 20);
- (s) FQKSI, (SEQ ID NO: 21);
- (t) EGAVK, (SEQ ID NO: 22);
- (u) VKEGK, (SEQ ID NO: 23) 和
- (v) KLYVV, (SEQ ID NO: 24)。

由本发明核酸分子的各种变体编码的蛋白质表现出某些共同特征。酶活性、分子量、免疫反应性、构象等属于这些特征以及诸如凝胶电泳中的迁移率这样的物理特性、层析特征、沉降系数、溶解度、光谱特性、稳定性、最适 pH、最适温度等。由本发明核酸分子编码的 R1-蛋白质优选与来自如 Lorberth 等 (Nature Biotechnology 16 (1998), 473-477) 所述的马铃薯的 R1-蛋白质具有相似特性。特别是, 由本发明核酸分子编码的蛋白质参与淀粉的磷酸盐化。通过在大肠杆菌中表达所述核酸分子并按照本领域技术人员众所周知或 WO 97/11188 中所述的方法分析由细菌合成的糖原的磷酸盐含量可以检测这种特性。

优选通过由下列方法可获得的多克隆抗体来识别由上述核酸分子之一编码的蛋白质:

在 pET21d (Novagen) 的 BamHI 限制位点上克隆来自 pSK-R1 (Lorberth 等, Nature Biotechnology 16 (1998), 473-477) 的 BamHI/BclI 片段, 在插入 R1 片段前通过重新连接补平的 HindIII 位点而从 pET21d 中除去 HindIII 限制位点, 以便生成 R1 表达载体。为了除去信号肽编码序

列，使用下列两种引物扩增 900bp 片段：

1) 5'-GAGACCATGGTACTTACCACTGATACC-3' (划线的是 NcoI 限制位点)
(SEQ ID NO: 25)

2) 5'-GTACTTGTACTGCAGGAC-3' (SEQ ID NO: 26)

将 NcoI/HindIII 切割的 PCR 片段连入 pET21dR1 用于构建 PET21dR1-tp。为了生产重组蛋白质，用这种表达载体转化 BL21 (DE3) 细胞。当 OD₆₀₀ 值达到 0.5 时，通过将 1mM IPTG (异丙基-β-D-硫代半乳糖苷) 加入到生长培养基 (过量肉汤: 60g 胰化蛋白胨、120g 酵母提取物、20ml 87% 的甘油、17mM KH₂PO₄、72mM K₂HPO₄) 中而启动 R1 蛋白质的表达。在通过离心沉淀细胞前，在 37℃ 下使蛋白质表达持续进行 3 小时。通过重新悬浮于样品缓冲液 (Laemmli, Nature 227 (1970), 680-685) 中来裂解细胞。通过在 95℃ 下培养 5 分钟使蛋白质提取物变性并通过 SDS PAGE 分离蛋白质。在考马斯染色后从凝胶中切下相当于 ~160kD R1 蛋白质的带，通过在水中将凝胶切片培养 2 天而除去 SDS。将该凝胶切片冷冻、压碎并用于免疫接种。

每次注射使用含有约 100μg R1 蛋白质的 PAA 部分。给家兔免疫接种 3 次。在首次免疫接种后 1 周进行第一次强化接种且在首次免疫接种后 2 周进行第二次强化接种。在第二次强化接种后 2 周进行最后放血、产生抗血清。为进行蛋白质印迹分析按 1: 500 稀释度使用所述的抗血清。

此外，本发明涉及核酸分子，其序列与上述分子的序列相比因遗传密码而被简并且编码一种存在于植物细胞质体中的蛋白质。

本发明还涉及存在于符合本发明核酸分子的基因组序列中的间插序列 (内含子) 的核苷酸序列。使用上述本发明的核酸分子、例如通过筛选合适的基因组文库可以分离这类间插序列。

例如，可以从天然来源中分离本发明的核酸分子；通过遗传工程方法、例如通过 PCR 或通过本领域技术人员已知的合成方法可以生产本发明的核酸分子。

本发明的核酸分子可以是诸如 cDNA 或基因组 DNA 这样的 DNA 分子以及 RNA 分子。特别是，这种核酸分子还可以是来自稻米的基因组序列，

它包括上述核酸分子之一或其部分的编码区和/或天然存在于稻米中的 R1 基因的间插序列（内含子）。

此外，本发明涉及载体、特别是质粒、粘粒、病毒、噬菌体和其它遗传工程中常用的载体，它们含有上述本发明的核酸分子。

在一个优选的实施方案中，所述载体中含有的核酸分子与确保原核细胞和真核细胞中可翻译 RNA 的转录和合成的调节元件连接。

在另一个实施方案中，本发明涉及已经用上述本发明的核酸分子或用本发明的载体转化和/或重组操作了的宿主细胞、特别是原核细胞或真核细胞；且本发明还涉及来源于这类细胞并含有本发明核酸分子或本发明载体的细胞。优选细菌细胞或植物细胞。

由本发明核酸分子编码的蛋白质可影响淀粉的合成或淀粉的改性。植物细胞中蛋白质的量的改变导致植物中的淀粉代谢改变，特别是合成具有改良的物理和化学特性的淀粉。

已经描述了马铃薯(Lorberth 等, Nature Biotechnology 16(1998), 473-477; WO 97/11188) 和玉米(WO 98/27212) 中与本申请中所述类似的蛋白质。然而，还没有描述稻米中存在这类蛋白质。通过提供本发明的核酸分子，能够通过重组 DNA 技术生产植物、特别是稻米植物，所述的重组 DNA 技术可合成其结构和其又转过来影响米粒的烹调特性的物理和化学特性不同于野生型植物中合成的淀粉的改性淀粉。为了这一目的，可以将本发明的核酸分子与确保植物细胞中转录和翻译的调节元件连接并引入植物细胞。

因此，本发明还涉及含有本发明核酸分子的转基因植物细胞，其中将所述核酸分子与确保植物细胞中转录的调节元件连接。该调节元件优选与所述核酸分子异源。特别是，本发明还涉及植物细胞，其中本发明核酸分子的表达与相应野生型细胞相比得到了增加。例如，可以通过诺慎印迹分析来检测这种增加。术语“增加”指的是本发明核酸分子转录物优选至少增加了 10%、更优选至少增加 50% 且甚至更优选至少增加 100%。

本发明还涉及植物细胞，其中由本发明核酸分子编码的蛋白质的量

与相应野生型细胞相比得到了增加。例如，可以通过蛋白质印迹分析来检测这种增加。这种抗体可以是一种多克隆抗体，上面已经描述了与本发明蛋白质特性相关的这种抗体的生产。术语“增加”指的是所述蛋白质的量优选至少增加了 10%、更优选至少增加 50% 且甚至更优选至少增加 100%。

本发明的这类植物细胞不同于包括天然存在的植物在内的植物的方面在于本发明核酸分子的至少一种拷贝被整合入其基因组、可能还包括天然存在的拷贝。此外，优选将这种/这些另外的拷贝在所述基因组中的某一位置上整合，在该位置上它们不会天然存在。例如，通过 DNA 印迹分析可以证明这一点。此外，通过下列特征中的至少一种可以将这类转基因植物细胞更好地与相应天然存在的植物细胞区别开来：如果引入植物细胞的本发明核酸分子与所述植物细胞异源，那么可以根据存在的来自本发明引入分子的转录物而将转基因细胞与非转化的细胞区别开来。例如，可以通过诺慎印迹分析来检测这类转录物。优选所述的转基因细胞另外含有由本发明核酸分子编码的蛋白质。例如，可以通过诸如蛋白质印迹分析这样的免疫法来检测存在的蛋白质。

如果引入细胞的本发明核酸分子与相应细胞同源，那么例如可以根据本发明核酸分子的额外的表达而将转基因细胞与非转化的细胞区别开来。特别是，该转基因细胞优选含有本发明核酸分子的更多的转录物。例如，可以通过 RNA 印迹分析来检测它们。“更多”优选指的是至少 10% 以上、更优选至少 20% 以上且甚至更优选至少 50% 以上。因此，这种转基因细胞优选含有比非转化细胞更多的蛋白质。例如，可以通过蛋白质印迹分析来检测它。优选所述细胞含有至少 10% 以上、更优选至少 20% 以上且甚至更优选至少 50% 以上的本发明蛋白质。

在一个优选的实施方案中，本发明的植物细胞是贮存淀粉组织的细胞，优选块茎或胚乳组织的细胞且甚至更优选稻米植物的胚乳组织的细胞。

由本发明核酸分子编码并在所述细胞中表达的蛋白质优选位于这些细胞的质体中。为了确保在所述质体中的位置，可以设想用另一种负责

转运至质体中的转运肽来取代 SEQ ID NO: 2 描述的序列中的前 40 - 120、更优选前 60 - 100 个氨基酸残基。这类肽的一个实例是质体铁氧还蛋白的转运肽：由 Jansen 等 (Current Genetics 13 (1988), 517-522) 描述的菠菜的 NADP⁺氧化还原酶 (FNR)。特别是，可以使用其中公开的 cDNA 序列的 -171 - 165 核苷酸范围的序列，它包括 5' 非翻译区以及编码转运肽的序列。另一个实例是包括成熟蜡质蛋白质前 34 个氨基酸残基的玉米蜡质蛋白质的转运肽 (Klöggen 等, Mol. Gen. Genet. 217 (1989), 155-161)。也能够使用这种不含所述成熟蛋白质前 34 个氨基酸残基的转运肽。此外，可以使用核酮糖二磷酸盐羧化酶小亚单位的信号肽 (Wolter 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988), 846-850; Nawrath 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (1994), 12760-12764)、NADP 苹果酸脱氢酶 (Gallardo 等, Planta 197 (1995), 324-332) 的信号肽或谷胱甘肽还原酶 (Creissen 等, Plant J. 8 (1995), 167-175) 的信号肽。

通过本领域技术人员已知的方法可以将转基因植物细胞再生成完整植物。通过使本发明转基因植物细胞再生可获得的植物也是本发明的主题。

本发明的另一个主题是含有上述转基因植物细胞的植物。转基因植物原则上可以是任意所需品种的植物，即它们可以是单子叶植物和双子叶植物。优选它们是有用的植物诸如蔬菜（例如番茄）且特别是合成淀粉或贮存淀粉的植物诸如谷类（黑麦、大麦、燕麦、小麦、小米、西米等）、玉米、豌豆、wrinkled peas、木薯、马铃薯、番茄、油菜、大豆、大麻、亚麻、向日葵、豇豆和竹芋。转基因植物还可以是类似于白三叶草、毒麦草或苜蓿的牧草。特别优选稻米、小麦、玉米和马铃薯植物。

在另一个优选的实施方案中，本发明的植物在与相应野生型植物比较时显示出本发明核酸分子的表达增加和/或编码蛋白质的量增加和/或它在贮存淀粉组织的细胞中的活性增加。优选贮存淀粉的组织是块茎组织或胚乳组织。

在本文的上下文中，应指出本发明范围内的术语“野生型植物”或“野生型细胞”指的是用作生产本发明转基因植物或细胞的原料的植物

或细胞，即除为了制备这类植物或细胞而引入的核酸分子外与本发明转基因植物或细胞具有相同遗传信息的植物或细胞。

在一个特别优选的实施方案中，本发明的转基因植物是稻米植物。

本发明还涉及一种用于生产改性淀粉的方法，该方法包括从上述本发明植物中和/或从这类植物的贮存淀粉的部分中提取淀粉的步骤。这种方法优选另外包括栽培本发明植物并在提取淀粉前收获所栽培的植物和/或这些植物的贮存淀粉的部分的步骤。

从植物或从植物贮存淀粉的部分中提取淀粉的方法对本领域技术人员来说是众所周知的。例如，Eckhoff 等描述了从玉米种子中提取淀粉的方法（*Cereal Chem.* 73 (1996), 54-57）。通常用“湿磨法”进行工业化规模的玉米淀粉的提取。此外，例如，从各种贮存淀粉的植物中提取淀粉的方法描述在 *Starch: Chemistry and Technology* 中（编辑：Whistler, BeMiller 和 Paschall (1994) 第 2 版, Academic Press Inc. London LTD; ISBN 0-12-746270-8; 参见例如 Watson, S. A. 的第 XII 章, 第 417-468 页: *Corn and Sorghum Starches: Production*; Corbishley 和 Miller 的第 XIII 章, 第 469-479 页: *Tapioca, Arrowroot and Sago Starches: Production*; Mitch 的第 XIV 章, 第 479-490 页: *Potato Starches: Production and Uses*; Knight 和 Olson 的第 XV 章, 第 491-506 页: *Wheat Starches: Production, Modification and Uses*; 和 Rohwer 和 Klem 的第 XVI 章, 第 507-528 页: *Rice Starch: Production and Uses*）。在用于从植物材料中提取淀粉的方法中通常使用的装置是分离机、荡析器、水力旋流器和干燥淀粉用的不同种类的机器，例如，喷雾干燥机或喷射干燥机。

本发明还涉及从本发明转基因植物细胞和植物中或通过上述方法可获得的淀粉。由于本发明核酸分子的表达或额外的表达，所以本发明的转基因植物细胞和植物可合成一种与来自野生型植物，即非转化植物的淀粉相比时是改性的淀粉。

特别是，这种淀粉优选比由相应非转化细胞或植物合成的淀粉具有更高的磷酸盐含量。较高的磷酸盐含量优选指的是所述淀粉含有比来自

相应非转化细胞或植物至少多 10% 的磷酸盐、更优选至少多 30%、甚至更优选至少多 50% 且特别优选至少多 100% 的磷酸盐。例如，如 Lorberth 等（文献同上）或 Lim 等的 *Cereal Chem.* 71 (1994), 488 中所述可以测定淀粉中的磷酸盐含量。具有高磷酸盐含量的淀粉能够表现出提高的淀粉糊的透明度且它们对食品工业和造纸工业、例如制造纸面来说具有特别的意义。一般来说，造纸工业使用化学修饰淀粉、例如羟乙基化或磷酸盐化淀粉来进行表面上浆或涂层。在植物中产生高度磷酸盐化的淀粉由此可避免为适于造纸工业需求而对淀粉进行化学修饰的必要性。

因此，本发明还涉及这样一种淀粉，优选淀粉糊的透明度比野生型植物淀粉糊的透明度至少增加 20%、更优选至少增加 50%、甚至更优选至少增加 100%、特别优选至少增加 250% 且最优选至少增加 500%。通过下列方法测定淀粉糊的透明度（透光度）：为了测定透光度，制备 0.5% 的淀粉/水混悬液并在 90℃ 下加热 15 分钟以便诱发糊化。随后在 628nm 处测定分散液的吸收度（在约 85℃ 下）。

本发明还涉及可获自本发明转基因稻米植物的稻米谷粒，与野生型植物的谷粒相比它们优选表现出改变的烹调质量和/或提高的营养价值。在本发明的框架内，术语“烹调质量”包括诸如烹调时间、烹调速率、吸水性、体积膨胀率、（机械）硬度、粘着性、烹调过程中稻米谷粒的伸长率这样的特性。在一个优选的实施方案中，术语“烹调质量”指的是本发明的稻米谷粒显示出的最短烹调时间比相应野生型植物的谷粒的最短烹调时间减少了至少 5%、优选至少减少了 10%、更优选至少减少了 20% 且最优选至少减少了 30% 和/或该术语指的是它们表现出的吸水率比相应野生型植物的谷粒的吸水率至少增加了 1%、优选至少增加了 2%、更优选至少增加了 5% 且最优选至少增加了 10%。根据 Ranghino 的方法（*Riso* 15(1969), 117-127）可以测定最短烹调时间。例如，按照 Juliano（*IRRI Res. Paper Ser.* 77, *Int. Rice Res. Inst.* Los Banos, Laguna, Philippines, 28pp）或 Halick 和 Kelly（*Cereal Chemistry* 36 (1959), 91-98）所述进行吸水率的测定。

术语“营养价值”与可获得的微量营养物象稻米谷粒中的铁和锌的

量有关。在本发明的一个优选实施方案中，稻米谷粒中锌和/或铁和/或微量营养物的量得到了增加。在本文的上下文中，术语“增加”指的是当与相应野生型植物相比时锌、铁或微量营养物的量至少增加了 1%、优选至少增加了 5%、甚至更优选至少增加了 10% 且最优选至少增加了 20%。

用于测定微量营养物、锌和铁的量的方法对本领域技术人员来说是众所周知的。

本发明的另外的主题是一种由稻米生产 R1-蛋白质的方法，其中在使蛋白质得到表达的条件下培养本发明的宿主细胞且其中从所培养的细胞和/或培养基中分离所述蛋白质。

此外，本发明涉及由本发明核酸分子编码的蛋白质以及通过上述方法可得到的蛋白质。它们优选是来自稻米的由核基因编码的且集中在质体中的蛋白质。本发明的另一个主题是特异性识别本发明蛋白质的抗体。它们可以是单克隆和多克隆抗体。用于生产这类抗体的方法是本领域技术人员所公知的。

此外，通过降低由本发明核酸分子编码的蛋白质在细胞中的量能够影响植物细胞中合成的淀粉的特性。例如，通过反义表达本发明的核酸分子、表达合适的核酶、共抑制作用或通过所谓的“体内诱变”可以实现这种降低。

因此，编码与本发明 DNA 分子转录物或与相应基因组序列内含子序列互补的反义 RNA 的 DNA 分子以及这些反义分子也是本发明的主题。为了在植物细胞中的转录过程中产生反义作用，这类 DNA 分子具有的长度至少为 15bp、优选 100bp 以上长度且最优选 500bp 以上长度；然而，通常少于 5000bp、优选短于 2500bp。

本发明进一步涉及 DNA 分子，它在植物细胞中表达过程中导致合成在所述植物细胞中因共抑制作用而减少编码所述蛋白质的本发明核酸分子的表达的 RNA。这类 DNA 分子可以包括本发明核酸分子或其部分的编码区和/或相应基因组序列的内含子序列。本发明还涉及由它们编码的 RNA 分子。共抑制的一般原理和相应方法对本领域技术人员来说是众所周知

的且例如由 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), 43-56)、Palaqui 和 Vaucheret (Plant. Mol. Biol. 29 (1995), 149-159)、Vaucheret 等 (Mol. Gen. Genet. 248 (1995), 311-317) 和 de Borne 等 (Mol. Gen. Genet. 243 (1994), 613-621)、Smyth (Curr. Biol. 7 (1997), R793-R795) 和 Taylor (Plant Cell 9 (1997), 1245-1249) 描述。

为了借助于上述反义手段或用共抑制手段抑制本发明核酸分子在稻米植物细胞中的表达, 优选使用这样的 DNA 分子, 它们表现出与 SEQ ID NO: 1 中描述的核苷酸序列至少具有 90%、更优选至少具有 93%、甚至更优选至少具有 95% 且最优选至少具有 98% 的同源性。

在另一个实施方案中, 本发明涉及编码具有特异性裂解本发明 DNA 分子转录物的核酶活性的 RNA 分子的 DNA 分子以及这些编码的 RNA 分子。

核酶是能够裂解 RNA 分子和特异性靶序列的具有催化活性的 RNA 分子。通过重组 DNA 技术能够改变核酶的特异性。存在不同种类的核酶。为了特异性裂解某种基因转录物的实际应用目的, 优选使用由两组不同核酶的代表组成。第一组由属于 I 组内含子核酶类型的核酶组成。第二组由作为特征性结构特征而具有所谓“锤头”基元的核酶组成。通过改变位于该基元侧翼的序列可以改变对靶 RNA 分子的特异性识别。通过与靶分子中序列的碱基配对, 这些序列可确定发生催化反应并由此裂解所述靶分子的位置。由于有效裂解的序列需求较低, 所以一般能够开发用于各实际所需 RNA 分子的特异性核酶。

例如, 为了生产编码特异性裂解本发明 DNA 分子转录物的核酶的 DNA 分子, 使编码核酶催化结构域的 DNA 序列在双侧与和靶酶序列同源的 DNA 序列连接。例如, 编码所述催化结构域的序列可以是 SCMo 病毒的卫星 DNA 的催化结构域 (Davies 等, Virology 177 (1990), 216-224) 或 TobR 病毒的卫星 DNA 的催化结构域 (Steinecke 等, EMBO J. 11 (1992), 1525-1530; Haseloff 和 Gerlach, Nature 334 (1988), 585-591)。

位于该催化结构域侧翼的 DNA 序列优选来源于上述本发明的 DNA 分子。例如,核酶表达的一般原理和方法描述在 EP-B1 0 321 201 中。例如, Feyter 等描述了植物细胞中核酶的表达 (Mol. Gen. Genet. 250 (1996), 329-338)。

本发明蛋白质在植物细胞中活性的降低也可以通过所谓的“体内诱变”(也称作“嵌合体成形术 (Chimeraplasty)”)来实现。在这种方法中,将杂种 RNA/DNA 寡核苷酸(嵌合体)引入细胞(Kipp 等,在第 5 届植物分子生物学国际会议上的会议纲要(Poster Session at the 5th International Congress of Plant Molecular Biology), 1997 年 9 月 21-27 日,新加坡; Dixon 和 Arntzen, 有关“转基因植物代谢工程”(“Metabolic Engineering in Transgenic Plants”)的会议报告, Keystone Symposia, Copper Mountain, CO, USA, TIBTECH 15 (1997), 441-447; 国际专利申请 WO 95/15972; Kren 等, Hepatology 25 (1997), 1462-1468; Cole-Strauss 等, Science 273 (1996), 1386-1389; Zhu 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (1999), 8768-8773)。所述 RNA/DNA 寡核苷酸的一部分 DNA 成分与以内源方式出现在植物细胞中并编码本发明蛋白质的核苷酸序列同源但表现出突变或包括处于同源区内的异源部分。由于对与具有这些序列的内源序列同源的 RNA/DNA 寡核苷酸区进行碱基配对,随后进行同源重组,所以可以将寡核苷酸 DNA 成分中包含的突变引入植物细胞基因组。这导致本发明蛋白质活性的降低。

在另一个实施方案中,本发明涉及含有上述 DNA 分子、特别是那些所述 DNA 分子与确保植物细胞中转录的调节元件连接的 DNA 分子的载体。

此外,本发明涉及含有所述 DNA 分子或载体的宿主细胞。这种宿主细胞可以是诸如细菌细胞这样的原核细胞或真核细胞。优选真核宿主细胞是植物细胞。

此外,本发明涉及转基因植物细胞,其中外源核酸分子的存在或表达导致编码本发明蛋白质的内源基因表达受到抑制。

在一个优选的实施方案中,外源核酸分子选自下列分子组成的组:

(a) 编码反义-RNA 的 DNA 分子,这种反义-RNA 可以导致对编码本

发明蛋白质的内源基因的表达减少；

(b) 通过共抑制作用导致对编码本发明蛋白质的内源基因的表达减少的 DNA 分子；

(c) 编码可以特异性裂解编码本发明蛋白质的内源基因转录物的核酶的 DNA 分子；和

(d) 通过体内诱变引入的核酸分子，它可导致在编码本发明蛋白质的内源基因中发生突变或插入异源序列，由此导致对本发明蛋白质的表达减少或导致无活性蛋白质的合成。

按照众所周知的技术可以将这些转基因植物细胞再生成完整植物。因此，本发明还涉及可以通过从所述转基因植物细胞再生而获得的植物以及含有所述转基因植物细胞的植物。转基因植物自身可以是任意所需植物品种的植物，优选有用的植物诸如蔬菜（例如番茄）且特别是如上所述贮存淀粉的植物，而最优选稻米、玉米、小麦和马铃薯植物细胞。

此外，本发明涉及由所述 DNA 分子编码的反义 RNA 分子以及具有核酶活性的 RNA 分子和产生例如通过转录可获得的共抑制作用的 RNA 分子。

本发明的另一个主题是一种用于生产转基因植物细胞的方法，所述的转基因植物细胞与非转化的细胞相比可合成改性淀粉。在这种方法中，在植物细胞中减少了以内生形式存在于细胞中的本发明 DNA 分子所编码的蛋白质的量。

在一个优选的实施方案中，通过反义作用可以实现这种减少。为了这一目的，将本发明的 DNA 分子或其部分按照反义方向与确保植物细胞中转录的启动子连接并有可能与确保转录终止以及转录物聚腺苷酸化的终止信号连接。还能够使用相应基因组序列的内含子序列。为了在植物细胞中确保有效的反义作用，合成的反义 RNA 应具有的最小长度为 15 个核苷酸、优选至少 100 个核苷酸且最优选至少 500 个核苷酸。此外，编码该反义 RNA 的 DNA 序列应与待转化的植物品种同源。

在另一个实施方案中，减少由本发明 DNA 分子编码的蛋白质的量可以通过核酶作用来实现。核酶的基本作用以及编码这类 RNA 分子的 DNA 分子的构建如上所述。为了在转基因细胞中表达具有核酶活性的 RNA，将

上述编码核酶的 DNA 分子与确保植物细胞中转录的 DNA 元件连接、特别是与启动子和终止信号连接。在植物细胞中合成的核酶可使以内生形式存在于植物细胞中的本发明 DNA 分子的转录物裂解。

为减少由本发明核酸分子编码的蛋白质的量的另外的可能性是共抑制。因此，通过本发明方法可获得的植物细胞是另一个主题。这些植物细胞的特征在于它们的由本发明 DNA 分子编码的蛋白质的量得到减少且与野生型细胞相比它们可合成改性淀粉。

优选所述的转基因细胞具有的编码本发明蛋白质的转录物的量比相应非转化细胞至少减少 30%、更优选至少减少 50%、甚至更优选至少减少 70% 且最优选至少减少 90%。例如，通过诺慎印迹分析可以测定转录物的量。此外，所述细胞优选表现出本发明蛋白质的量的相应减少。例如，通过诸如蛋白质印迹分析这样的免疫法可以测定它。可用于这类蛋白质印迹分析的抗体的一个实例是多克隆抗体，与本发明蛋白质特性相关的该抗体的生产已经在上面描述。

此外，应用这类方法的植物细胞是稻米植物细胞。

此外，本发明涉及通过再生所述植物细胞可获得的植物以及含有本发明所述细胞的植物。

本发明还涉及一种用于生产改性淀粉的方法，该方法包括从上述本发明的植物和/或从这类植物的贮存淀粉的部分中提取淀粉的步骤。优选这类方法另外包括下列步骤：栽培本发明的植物；并在提取淀粉前收获所栽培的植物和/或这些植物的贮存淀粉的部分。

本发明还涉及可获自所述转基因植物细胞和植物或通过上述方法可获得的淀粉。由于在转基因植物细胞中编码反义 RNA、核酶或共抑制 RNA 的所述 DNA 分子的表达，所以由以内生形式存在于细胞中的本发明 DNA 分子编码的蛋白质的量得到了减少。优选这种减少可导致植物细胞中合成的淀粉的物理和化学特性急剧改变。当与来自非转化细胞或植物的淀粉比较时，改性淀粉优选表现出改变的糊化特性，即改变的淀粉水溶液的粘度和/或改变的、特别是减少的磷酸盐含量。在一个优选的实施方案中，磷酸盐含量比可获自相应非转化植物细胞或植物的淀粉的磷酸盐含

量至少减少了 5%、更优选至少减少了 20% 且甚至更优选至少减少了 50%。如上文所述可以测定磷酸盐含量。

此外，本发明涉及可获自上述本发明转基因稻米植物的稻米谷粒，它表现出比野生型植物谷粒改变的烹调质量。在本发明的框架内，术语“烹调质量”包括诸如烹调时间、烹调速率、吸水性、体积膨胀率、（机械）硬度、粘着性、烹调过程中米粒的伸长率这样的特性。

优选术语“烹调质量”指的是本发明的稻米谷粒表现出的吸水率比相应野生型植物的谷粒至少减少了 1%、优选至少减少了 2%、更优选至少减少了 5% 且甚至更优选至少减少了 10%。用于测定谷粒吸水度的方法对本领域技术人员来说是众所周知的。

本发明核酸分子的表达一般可以发生在任意种类的植物品种中。优选单子叶植物和双子叶植物，特别是有用的植物诸如蔬菜（例如番茄）且优选贮存淀粉的植物诸如谷类（黑麦、大麦、燕麦、小麦、小米、西米等）、玉米、豌豆、wrinkled peas、木薯、马铃薯、番茄、油菜、大豆、大麻、亚麻、向日葵、豇豆、竹芋、和诸如三叶草、毒麦草或苜蓿这样的牧草。

特别优选稻米、小麦、玉米和马铃薯植物。

在本发明框架内，术语“确保植物细胞中转录的 DNA 调节元件”是使植物细胞中的转录开始或终止的 DNA 区。确保转录开始的 DNA 区特别是启动子。

为了在植物中表达上述本发明的各种 DNA 分子，可以使用在植物细胞中起作用的任意启动子。这种启动子可以与所用的植物品种同源或异源。例如，可以使用可确保所有植物组织中组成型表达的花椰菜花叶病毒的 35S 启动子（Odell 等，Nature 313（1985），810-812；Mitsuhara 等，Plant and Cell Physiology 37（1996），49-59）和 WO /9401571 中所述的启动子构建体。然而，还可以使用仅在通过外生因素（诸如在 WO /9307279 中）或在植物的特定组织中（参见，例如 Stockhaus 等，EMBO J. 8（1989），2245-2251）测定的时间点处导致随后序列表达的启动子。优选使用在待转化的植物的贮存淀粉部分中起作用的启动子。就玉米而

言, 这些部分是玉米的种子; 就马铃薯而言是块茎。为了转化马铃薯, 可以特别而非排除地使用块茎特异性B33-启动子(Rocha-Sosa等, EMBO J. 8 (1989), 23-29)。除启动子外, 启动转录的DNA区还可以含有确保转录进一步增加的DNA序列, 诸如所谓的增强子-元件。

为了在植物细胞且特别是在稻米细胞中表达, 可以使用下列启动子: 35S启动子(Odell等, 文献同上; Mitsuhara等, 文献同上); 遍在蛋白质启动子(美国专利5,614,399; Christensen等, Plant Mol. Biol. 18 (1992), 675-689; Takimoto等, Plant Mol. Biol. 26 (1994), 1007-1012; Cornejo等, Plant Mol. Biol. 23 (1993), 567-581; Toki等, Plant Phys. 100 (1992), 1503-1507); 用于胚乳特异性表达的谷蛋白启动子(Leisy等, Plant Mol. Biol. 14 (1990), Zheng等, Plant J. 4 (1993) 357-366; Kononowicz等, 美国植物生理学家协会和加拿大植物生理学家协会联合年会, Minneapolis, Minnesota, USA, 1993年7月1日至8月4日, Plant Physiol. 102 (增刊) (1993), 166; Zhao等, 美国植物生理学家协会年会, Pittsburgh, Pennsylvania, USA, 1992年8月1日至5日, Plant Physiol. 99 (增刊1) (1992), 85; Yoshihara等, FEBS Lett. 383 (1996), 213-218); 来自玉米的玉米醇溶蛋白基因的启动子 HMG 启动子(Pedersen等, Cell 29 (1982), 1015-1026; Quatroccio等, Plant Mol. Biol. 15 (1990), 81-93); shrunken-1启动子(Werr等, EMBO J. 4 (1985), 1373-1380); 还有肌动蛋白启动子(McElroy等, Plant Cell 2 (1990), 163-171); cab-6启动子(Plant and Cell Physiology 35 (1994), 773-778); RTBV启动子(Yin等, Plant J. 12 (1997), 1179-1188); CVMV启动子(Verdaguer等, Plant Mol. Biol. 31 (1996), 1129-1139); rab 16B启动子(Plant Physiol. 112 (1996), 483-491); psbD-C操纵子的启动子(To等, Plant and Cell Physiology 37 (1996), 660-666); Tpi启动子(Snowden等, Plant Mol. Biol. 31 (1996), 689-692); Osgrp1启动子(Xu等, Plant Mol. Biol. 28 (1995), 455-471); Ltp2启动子(Kalla等, Plant J. 6 (1994), 849-860); ADH1启动子(Kyozuka等, Mol. Gen. Genet. 228 (1991),

40-48) 和 LHCP 启动子 (EMBO J. 10 (1991), 1803-1808)。为了在光合活性细胞中表达, 可以使用 Ca/b 启动子 (参见, 例如 US 5 656 496; US 5 639 952; Bansal 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992), 3654-3658) 和 Rubisco SSU 启动子 (参见, 例如 US 5 034 322 和 US 4 962 028)。为了进行种子特异性表达, 可以使用蚕豆 (*Vicia faber*) 的 USP 启动子 (Fiedler 等, Plant Mol. Biol. 22 (1993), 669-679; Bäumllein 等, Mol. Gen. Genet. 225 (1991), 459-467)。

此外, 术语“DNA 调节元件”还可以包括终止信号, 该终止信号用于正确终止转录并将聚腺苷酸尾加入到转录物中, 认为它可使转录物保持稳定。在文献中描述了这类元件并根据需要可以调换。这类终止序列的实例是包括胭脂氨酸合酶基因 (NOS 基因) 或来自土壤杆菌属的章鱼氨酸合酶基因 (Gielen 等, EMBO J. 8 (1989), 23-29) 的腺苷酸化信号的 3'-非翻译区或来自大豆的贮存蛋白基因以及核酮糖-1, 5-二磷酸盐羧化酶小亚单位 (ssRUBISCO) 基因的 3'-非翻译区。

优选使用质粒将本发明的 DNA 分子引入植物细胞。优选将确保将 DNA 稳定整合入植物基因组的质粒。

为了准备在高等植物中引入外来基因, 有大量克隆载体供使用, 它们含有大肠杆菌复制信号和选择转化细菌细胞的标记基因。这类载体的实例是 pBR322、pUC 系列、M13mp 系列、pACYC184 等。可以在合适的限制位点上将所需序列整合入所述载体。将所得的质粒用于转化大肠杆菌细胞。在合适的培养基中培养转化的大肠杆菌细胞且随后收集它们并裂解。通过标准方法回收质粒。作为用于对获得的质粒 DNA 进行特征记述的分析方法, 一般应用限制分析和序列分析。在各项操作后, 可以将质粒 DNA 切割并可以将所得的 DNA 片段与其它 DNA 序列连接。

为了将 DNA 引入植物宿主细胞, 有大量技术供使用。这些技术包括通过使用根癌土壤杆菌或发根病土壤杆菌作为转化培养基转化含有 T-DNA 的植物细胞; 原生质体融合法; DNA 的注射法和电穿孔法; 通过生物溶解 (biolistic) 法引入 DNA 以及另外可能的方法。

就将 DNA 注射和电穿孔入植物细胞而言, 对所用质粒没有特殊要求。

可以使用诸如 pUC 衍生物这样的简单质粒。然而, 在欲以这种方式从所转化细胞再生完整植物的情况中, 应存在选择性标记基因。

根据将所需基因引入植物细胞的方法的不同, 另外的 DNA 序列可能是必不可少的。例如, 如果将 Ti-或 Ri-质粒用于转化植物细胞, 那么必须至少使 Ti-或 Ri-质粒 T-DNA 的右缘与将引入作为侧翼区的外来基因连接; 然而, 更常见的是必须使 Ti-或 Ri-质粒 T-DNA 的右缘和左缘与将引入作为侧翼区的外源基因连接。

如果将土壤杆菌属用于转化, 那么必须将欲引入的 DNA 克隆入特殊质粒、即克隆入中间载体或克隆入二元载体。由于序列与 T-DNA 内的序列同源, 所以可以由于同源重组而将中间载体整合入土壤杆菌属的 Ti-或 Ri-质粒。它还包含转移 T-DNA 所必不可少的 *vir*-区。中间载体不能在土壤杆菌属中复制。通过辅助质粒可以将中间载体转移入根癌土壤杆菌(接合)。二元载体可以在大肠杆菌以及土壤杆菌属中复制。它们含有选择性标记基因以及由 T-DNA 右缘和左缘区构成的接头或多接头。可以将它们直接转化入土壤杆菌属(Holsters 等, *Mol. Gen. Genet.* 163 (1978), 181-187)。用于转化土壤杆菌属的质粒进一步包括诸如用于筛选转化细菌的 NPT II 基因这样的选择性标记基因。该质粒可以包括另外的选择性标记基因诸如那些对壮观霉素产生抗性的选择性标记基因(Svab 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87(1990), 8526-8530; Svab 等, *Plant Mol. Biol.* 14 (1990), 197-206)、对链霉素产生抗性的选择性标记基因(Jones 等, *Mol. Gen. Genet.* 91 (1987), 86-91; Svab 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87(1990), 8526-8530; Svab 等, *Plant Mol. Biol.* 14 (1990), 197-206)、对膦丝菌素产生抗性的选择性标记基因(De Block 等, *EMBO J.* 6 (1987), 2513-2518)、对草甘磷产生抗性的选择性标记基因(Thompson 等, *EMBO J.* 6 (1987), 2519-2523; Thompson 等, *Weed Sci.* 35 (1987), 19-23(增刊))或对潮霉素产生抗性的选择性标记基因(Waldron 等, *Plant Mol. Biol.* 5 (1985), 103-108)。起宿主细胞作用的土壤杆菌属应含有携带 *vir*-区的质粒。这种 *vir*-区是将 T-DNA 转移入植物细胞所必不可少的。另外可以含有 T-DNA。将以这种方式转化的土壤杆菌属用于转化植

物细胞。

在下列文献中深入研究并充分描述了 T-DNA 用于转化植物细胞的用途：EP 120 516；Hoekema 的“*The Binary Plant Vector System* Offsetdrukkerij Kanters B. V., Alblasterdam (1985)，第 V 章”；Fraley 等, *Crit. Rev. Plant. Sci.* 4, 1-46 和 An 等, *EMBO J.* 4 (1985), 277-287。通过商购方式可能已经获得了某些二元载体诸如 pBIN19 (Clontech Laboratories, Inc., USA)。

为将 DNA 转移入植物细胞，可以适当将植物的外植体与根癌土壤杆菌或发根病土壤杆菌一起共同栽培。然后在可含有筛选转化细胞的抗生素或杀生物剂的合适培养基中可以从感染植物材料（例如叶片、茎节段、根、还有原生质体或悬浮栽培的植物细胞）再生完整的植物。接着检验以这种方式获得的植物是否存在引入的 DNA。为通过使用生物溶解 (biolistic) 法或通过转化原生质体法引入外来 DNA 的其它可能性是本领域技术人员所公知的（参见，例如 Willmitzer, L., 1993 *Transgenic plants*. 见: *Biotechnology, A Multi-Volume Comprehensive Treatise* (H. J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Stadler 编辑), 第 2 卷, 627-659, VCH Weinheim-New York-Basel-Cambridge)。

鉴于借助于根癌土壤杆菌通过 Ti-质粒-载体系统转化双子叶植物是一种充分确立的方法，所以近来更多的研究表明就单子叶植物而言也可以使用以土壤杆菌属为基础的载体进行转化 (Chan 等, *Plant Mol. Biol.* 22 (1993), 491-506; Hiei 等, *Plant J.* 6 (1994), 271-282)。

用于转化单子叶植物的可选择系统是通过生物溶解 (biolistic) 手段的转化、原生质体转化、部分透化细胞的电穿孔、通过玻璃纤维引入 DNA。

在具体论述玉米转化的相关文献中存在不同的参考资料（参见，例如 W095/06128、EP 0513 849、EP 0465 875）。在 EP 292 435 中描述了一种方法，通过该方法可以从无粘液易脆性颗粒状玉米愈伤组织获得能育植物。在本文的上下文中，由 Shillito 等 (*Bio/Technology* 7 (1989), 581) 进一步观察到：为了再生能育植物，必须以愈伤组织悬浮培养物作

为原料, 从该培养物中可以生成能够再生成植物的分裂原生质体的培养物。在体外栽培 7-8 个月后, Shillito 等获得了具有能存活后代的植物, 然而, 它们在形态学和繁殖力方面表现出异常。

Prioli 和 Söndahl (Bio/Technology 7 (1989), 589) 已经描述了如何从 Cateto 玉米近交 Cat 100-1 的玉米原生质体再生并获得能育植物。作者假定原生质体再生成能育植物取决于许多不同的因素诸如基因型、供体细胞的生理状态和栽培条件。就稻米而言可以应用不同的转化方法, 例如通过土壤杆菌属介导的基因转移法转化 (Hiei 等, Plant J. 6 (1994), 271-282; Hiei 等, Plant Mol. Biol. 35 (1997), 205-218; Park 等, J. Plant Biol. 38 (1995), 365-371)、原生质体转化法 (Datta 在 “Gene transfer to plants” 中所述, I. Potrykus, G. Spangenberg (编辑), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1995, 66-75 页; Datta 等, Plant Mol. Biol. 20 (1992), 619-629; Sadasivam 等, Plant Cell Rep. (1994), 394-396)、生物溶解 (bilistic) 法 (Li 等, Plant Cell Rep. 12 (1993), 250-255; Cao 等, Plant Cell Rep. 11 (1992), 586-591; Christou, Plant Mol. Biol. (1997), 197-203) 和电穿孔法 (Xu 等在 “Gene transfer to plants” 中所述, I. Potrykus, G. Spangenberg (编辑), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, (1995), 201-208)。

一旦在植物细胞的基因组中整合了引入的 DNA, 那么它通常在其中持续保持稳定并保留在原始转化细胞的后代内。它通常含有使转化的植物细胞对杀生物剂或诸如卡那霉素、G418、博来霉素、潮霉素或膦丝菌素等这样的抗生素产生抗性的选择性标记。因此各自选择的标记应当用于选择转化的细胞而淘汰缺乏引入的 DNA 的细胞。

转化的细胞在植物内以通常方式生长 (也参见 McCormick 等, Plant Cell Reports. 5 (1986), 81-84)。将所得植物以通常方式栽培并与具有相同转化遗传继承物或另一种遗传继承物的植物杂交。所得的杂交个体具有相应的表型特性。

应使两代或多代生长以便确保表型特征是否得到稳定保持和是否将其转移。此外, 应收获种子以便确保相应的表型或其它特性将保留。

由本发明植物细胞或植物可获得或通过本发明方法可获得的淀粉因其特性而不仅适合于本文所述的特定目的，而且适用于各种工业化用途。

基本上，可以将淀粉再分成两个主要应用领域。一个应用领域包括淀粉和所谓天然淀粉的水解产物。水解产物主要包括通过酶促或化学方法获得的葡萄糖和葡聚糖成分。可以将它们用于进一步的工艺诸如发酵和化学修饰。在本文中，可以以简单而低廉的方式进行水解过程可能是重要的。目前，基本上使用淀粉葡糖苷酶以酶促方式来进行该过程。可以想象因淀粉结构的改变通过使用较少量的酶来水解可能会降低成本，例如增加限制所用酶的可接近性的谷粒的表面、因分支较少而改善的可消化性或空间结构。

所谓天然淀粉的应用因其聚合物结构而可以被再分成两个进一步的应用领域：

(a) 食物中的应用

淀粉是各种食物的传统添加剂，其中它基本上用于粘合含水添加剂和/或使粘度增加或凝胶形成增加的目的。重要的特征特性是流动性和吸附性、溶胀和糊化温度、粘度和增稠特性、淀粉的溶解度、透明度和淀粉糊的结构、耐热、耐剪切和耐酸性、变稠倾向、成膜能力、抗冷冻/解冻性、可消化性以及例如与无机或有机离子形成配合物的能力。例如，可以将特别是可获自稻米的本发明淀粉用于制备称作中国面条或亚洲面条的面条。此外，可以将本发明的淀粉用作脂肪替代物。

(b) 非食物中的应用

其它主要应用领域是将淀粉用作各种生产过程中的辅助剂或用作工业产品中的添加剂。首先，淀粉用作辅助剂的主要应用领域是造纸和卡片纸板业。在该领域中，主要将淀粉用于保持（保留传动测固体）、用于填料和细颗粒上浆、用作固化物质和用于脱水。此外，就劲度、硬度、固定性、粘着力、光泽、平滑性、撕裂强度以及表面而言，利用淀粉这些有利的特性。

在纸张生产工艺中，可以在四种应用领域，即表面、涂层、整体和喷涂之间进行区分。

就表面处理而言对淀粉的要求主要是有高度的光泽、相应的粘度、高粘度稳定性、良好的成膜能力以及低粉尘形成。当用于涂布固体内含物时，相应的粘度、高粘合能力以及高色素亲和性起重要作用。作为整体的添加剂，在纸浆中快速、均匀、无损耗分散、高机械稳定性和完整保持性是重要的。当以喷涂方式使用淀粉时，相应的固体含量、高粘度以及高粘合能力也具有重要意义。

例如，一个主要应用领域是在粘合剂工业中，其中将该应用领域再分成四个领域：用作纯淀粉胶、用于以特种化学药品制备的淀粉胶、淀粉用作合成树脂和聚合物分散液的添加剂以及淀粉用作合成粘合剂的补充剂。可以将所有以淀粉为基础的粘合剂的 90% 用于生产瓦楞纸板、纸袋和包、纸和铝用复合材料、纸盒和用于信封、邮票等的不干胶。

另一种作为辅助剂和添加剂的可能的应用是在生产纺织品和纺织品护理用产品中。在纺织品工业中，可以在下列四个应用领域进行区分：淀粉用作浆料，即用作修正和强化用于防止在编织中活跃的张力以及增加编织过程中耐磨性的除草刺性能的辅助剂；淀粉用作主要在诸如漂白、染色等这样的使质量降低的预处理后改善纺织品的试剂；淀粉用作生产防止染料扩散的染料浆的增稠剂和淀粉用作缝线用整经剂的添加剂。

此外，可以将淀粉用作建筑材料的添加剂。一个实例是生产石膏板，其中混入稀石膏糊中的淀粉用水糊化、在石膏板表面上扩散并由此使纸板与纸板粘合。其它应用领域是将淀粉与石膏和矿物纤维混合。在已经混合的混凝土中，可以将淀粉用于减缓上浆过程。

此外，所述的淀粉有利于生产用于在人为地层移动(artificial earth shifting)中暂时防止水进入土壤颗粒的地面稳定化用具。根据现有的知识，可以将由淀粉和聚合物乳液组成的混合产品看作与迄今为止所用产品具有相同的减少侵蚀和结壳的作用；不过，它们相当低廉。

另一个应用领域是淀粉在植物防护剂中的应用以改良这些制品的特定特性。例如，将淀粉用于改善植物防护剂和肥料的湿润性；用于活性成分的定量释放；用于将液体、挥发性和/或有气味的活性成分转化成微晶、稳定、可变形的物质；用于混合不相容的组合物和用于因崩解减缓

而延长作用期限。

还可以将淀粉用于药物、医药领域和化妆品工业。在制药工业中，可以将淀粉用作片剂的粘合剂或用于稀释胶囊中的粘合剂。此外，淀粉适合用作片剂的崩解剂，这是因为在溶胀时它可吸收液体并在短时间里迅速溶胀使活性组分释放。由于质量的原因，药用助流剂和扑粉是另外的应用领域。在化妆品领域中，例如可以将淀粉用作粉末添加剂的载体诸如香料和水杨酸。淀粉的相对广泛的应用领域是牙膏。

淀粉用作煤和煤砖的添加剂也是可以想象的。通过加入淀粉，可以使煤定量结块和/或以高质量团成煤球，由此防止煤砖过早崩裂。烧烤煤含有 4-6% 的添加淀粉；发热 (calorated) 煤含有 0.1-0.5% 的添加淀粉。此外，淀粉适合用作粘合剂，这是因为将它加入煤和煤砖可以大大减少毒性物质的发散。

此外，可以将淀粉用作加工矿石和煤泥的絮凝剂。

另一个应用领域是将淀粉用作加工铸造用材料的添加剂。对于不同的铸造工艺来说，需要由混有粘合剂的沙子生产的芯。目前，最常用的粘合剂是混有改性淀粉、大部分是溶胀淀粉的膨润土。

添加淀粉的目的在于增加流阻并改善粘合强度。此外，溶胀淀粉可以满足生产过程中的更多应预先具备的要求，诸如在冷水中的分散性、再水合性、在沙子中的良好混合性和较高的结合水的能力。

在橡胶工业中，可以将淀粉用于改善技术和光学质量。使用它的原因是有改善的表面光泽、粘着力和外观。为了这一目的，在冷硫化前将淀粉分散在橡胶物质的粘性橡胶化表面上。还可以将淀粉用于改善橡胶的可印性。

改性淀粉的另一个应用领域是生产皮革替代物。

在塑料市场上，存在下列应用领域：将来源于淀粉的产物并入加工过程（淀粉只是一种填料，在合成聚合物与淀粉之间不存在直接的键）或另一方面将来源于淀粉的产物并入聚合物的产生（淀粉和聚合物形成稳定的键）。

淀粉用作纯填料不能与其它诸如滑石这样的物质竞争。当特定的淀

粉特性变得有效且终产物的特性分布由此明确改变时，这种情况是不同的。一个实例是淀粉产品在加工热塑性材料诸如聚乙烯中的应用。因此，按照 1: 1 的比例、通过共表达来混合淀粉和合成聚合物形成‘主批料’，使用颗粒化聚乙烯通过常规技术由‘主批料’生产不同的产品。将淀粉并入聚乙烯薄膜可以导致空心体中物质的渗透性增加、水蒸汽渗透性改善、抗静态性能改善、抗阻断性能改善以及使用含水染料的可印性改善。

另一种可能性是将淀粉用于聚氨酯泡沫塑料。由于采用淀粉衍生物及由于优化加工技术，所以能够特别控制合成聚合物与淀粉的羟基间的反应。结果是聚氨酯泡沫塑料因使用了淀粉而具有下列特性分布：热膨胀系数降低；收缩性能降低；压力/张力性能改善；水蒸汽渗透性增加而水的接受性没有改变；可燃性和裂化密度下降；无易燃部分剥离；不含卤化物且老化减少。目前仍然存在的缺陷在于压力和冲击强度降低。

薄膜产品的开发不是唯一的选择。还可以用超过 50% 含量的淀粉来生产固体塑料产品诸如锅、盘和碗。此外，淀粉/聚合物混合物产生的优点在于它们极易于生物降解。

此外，淀粉接枝聚合物因其结合水的能力极强而已经具有极端的重要性。这些是具有淀粉骨架和根据自由基链机制的原则接枝的合成单体侧晶格的产品。目前可得到的淀粉接枝聚合物的特征在于结合和保留能力增加到 1000g 水/g 淀粉的高粘度。主要将这些超级吸附剂用于卫生学领域、例如用于诸如尿布和床单这样的产品中以及农业部门例如用于种粒中。

一方面，对于使用由重组 DNA 技术改性的新淀粉决定性的的是结构、含水量、蛋白质含量、脂类含量、纤维含量、灰分/磷酸盐含量、直链淀粉/支链淀粉比例、相对摩尔质量分布、支化度、颗粒大小和形状以及结晶；而另一方面，产生下列特征的特性：流动性和吸附性、糊化温度、粘度、增稠性、溶解性、淀粉糊的结构、透明度、耐热性、耐剪切性和耐酸性、变稠倾向、凝胶形成能力、抗冷/融化性、配合物形成能力、结合碘的能力、成膜性、粘合强度、酶稳定性、可消化性和反应性。最明显的特征是粘度。

此外，可以对获自本发明植物细胞的改性淀粉进行进一步的化学修饰，这种修饰导致某些上述应用领域的质量进一步改善。这些化学修饰对本领域技术人员来说一般是已知的。它们特别是用下列方法进行的修饰：

- 酸处理
- 氧化和
- 酯化（形成磷酸盐、硝酸酯、硫酸酯、黄原酸酯、乙酸酯和柠檬酸酯淀粉。此外还可以将有机酸用于酯化。）
- 形成淀粉醚类（淀粉烷基醚、O-烯丙基醚、羟烷基醚、O-羧甲基醚、含N的淀粉醚类、含S的淀粉醚类）
- 形成支链淀粉
- 形成淀粉接枝聚合物。

本发明还涉及本发明植物的繁殖材料诸如种子、果实、插枝、块茎或根状茎，其中这种繁殖材料含有本发明的植物细胞。

于1998年10月1日将本发明中所述的质粒 p0s_R1 按照布达佩斯条约的要求保藏在联邦德国的 Braunschweig 的 Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)、其保藏号为 DSM 12439。

附图1以图解方式表示质粒 pco0s_R1 的结构。

A: CaMV 35S 终止信号 (Topfer 等, Nucleic Acids Res. 15 (1987), 5890)

B: pat 基因

C: CaMV 35S 启动子 (Odell 等, Nature 313 (1985), 180)

D: 遍在蛋白质启动子 (Toki 等, Plant Phys. 100 (1992), 1503-1507)

E: 遍在蛋白质内含子 (Christensen 等, Plant Mol. Biol. 18 (1992), 675-689)

F: p0s_R1 的 SmaI/SnaBI-片段 (4427bp)

G: nos 终止子 (Depicker 等, J. Appl. Genet. 1 (1982) 561-573)

LB: T-DNA 左缘

RB: T-DNA 右缘

下列实施例解释本发明。

实施例 1

编码 R1 酶的稻米 cDNA 的克隆

按照公开的方法 (Logemann 等, Anal. Biochem. 163 (1987), 21-26) 制备来源于 8 周龄稻米植物绿色部分的总 RNA。将 1mg 的总 RNA 用作按照制造商的说明用 Oligotex mRNA 纯化试剂盒 (Qiagen) 制备 poly A⁺ RNA 的来源。根据制造商的说明 (ZAP cDNA 合成试剂盒 [Stratagene]) 将 5μg poly A⁺ RNA 用于构建 cDNA 文库。

在重组噬菌体中 cDNA 插入片的平均大小为 1.3kb。使用 Hybond N 滤膜 (Amersham) 对未扩增文库的约 2×10^5 重组噬菌体进行噬菌斑提取 (Plaque lifting)。

在 42°C 下的缓冲液 A (5 x SSC、0.5% BSA、5 x Denhardt、1% SDS、pH 7.2 的 40mM 磷酸盐缓冲液、100mg/1 鲑鱼精子 DNA、25% 甲酰胺) 中预杂交 4 小时后, 将滤膜与来自玉米的 R1 cDNA 的放射性标记的 (随机引物 DNA 标记试剂盒) 947bp EcoRI/XhoI 片段杂交 (WO 98/27212)。在 42°C 下杂交 8 小时后, 在 50°C 的含有 3 x SSC、0.5% SDS 的缓冲液中将滤膜洗涤 3 次、持续 20 分钟。通常使 X-射线照相曝光进行 14 小时。

重新筛选和纯化强力杂交的噬菌斑。按照制造商的说明通过体内切除法分离质粒并通过限制作图进行表征。对含有最长 cDNA 插入片段的质粒进行 DNA 序列分析。它们中命名为 pOs_R1 的一个质粒含有 Seq. ID No: 2 中所示的核苷酸序列信息。

在一部分 5'-末端缺失的限度内, cDNA 只是部分的。然而, 通过本领域众所周知的方法诸如 5'-RACE (cDNA 末端快速扩增法) 可以分离缺失的 5'-末端。使用这种方法能够通过利用聚合酶链反应扩增 cDNA 的缺失的 5'-末端。使用 Clontech 的 "Marathon cDNA 扩增试剂盒" 可以实施这种方法。用于克隆缺失的 5'-末端的其它可能性是其它的 PCR 反应, 例如通过使用 λgt11 稻米 cDNA 文库 (Clontech, Palo Alto, CA, USA)。

进行免疫筛选或通过使用例如 Sambrook 等在 *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 第2版(1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY 中所述的标准杂交方法。

实施例 2

用于共抑制稻米中 R1 基因的构建体

为了能够生产具有减少量的由实施例 1 中所述 cDNA 编码的蛋白质的稻米植物, 构建了允许在植物细胞中获得共抑制作用的质粒。可以用于转化植物细胞的该质粒包括下列序列:

- CaMV 的 35S 启动子 (Odell 等, *Nature* 313 (1985), 180);
 - 35S 终止序列 (Topfer 等, *Nucl. Acids Res.* 15 (1987), 5890);
 - 作为选择标记的 pat 基因;
 - 遍在蛋白质启动子 (Toki 等, *Plant Physiol.* 100 (1992), 1503-1507)
 - 遍在蛋白质内含子 (Christensen 等, *Plant Mol. Biol.* 18 (1992), 675-689);
 - 含有实施例 1 中所述 cDNA 的质粒 pOs_R1 的 SmaI/SnaBI-片段 (4427bp)
 - nos 终止子 (Depicker 等, *J. Appl. Genet.* 1 (1982), 561-573);
- 和
- T-DNA 左缘和右缘序列。

命名为 pcoOs_R1 的质粒结构如附图 1 中所示。

例如, 通过土壤杆菌属介导的基因转移或通过粒子轰击将该质粒用于转化稻米植物细胞并再生转化的稻米植物。

序列表

<110> PlantTec Biotechnologie GmbH Forschung und Entwicklung

<120> 来自稻米的核酸分子及其用于生产改性淀粉的用途

<130> C 2328 PCT

<140>

<141>

<160> 26

<170> PatentIn 2.1 版

<210> 1

<211> 4643

<212> DNA

<213> 稻米

<220>

<221> CDS

<222> (2)..(4375)

<400> 1

```

g aat tcg gca cga gcc gcg gca gct gct gcg gcc gag cgg tgc gcg ctc 49
  Asn Ser Ala Arg Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Glu Arg Cys Ala Leu
    1             5             10             15

ggc ctc ggc gtc cac gcg cgc ccc gcc tgg ccc tgg ccg gcg ctg ctc 97
Gly Leu Gly Val His Ala Arg Pro Ala Ser Pro Ser Pro Ala Leu Leu
      20             25             30

ccg ccg gcg gct ctc cgc cgc ggc cgc cgc ctc ccc gcg gcc acc acc 145
Pro Pro Ala Ala Leu Arg Arg Gly Arg Arg Leu Pro Ala Ala Thr Thr
      35             40             45

acc ctc gcc gtc tcc cgt cgg agc ctc ctc gcc cct cgc gcc atc gcc 193
Thr Leu Ala Val Ser Arg Arg Ser Leu Leu Ala Pro Arg Ala Ile Ala
      50             55             60

gct tcc acc ggc cgc gcc tcc ccg ggc ctt gtc gga agg ttc acc ctg 241
Ala Ser Thr Gly Arg Ala Ser Pro Gly Leu Val Gly Arg Phe Thr Leu
      65             70             75

gat gcc aac tcc gag ctt aag gtg aca ttg aac cca gca ccg cag ggt 289
Asp Ala Asn Ser Glu Leu Lys Val Thr Leu Asn Pro Ala Pro Gln Gly
      85             90             95

tcg gtg gcg gag atc aat cta gag gca act aac acc agc ggc tcc ctg 337
Ser Val Ala Glu Ile Asn Leu Glu Ala Thr Asn Thr Ser Gly Ser Leu
      100            105            110

ata ctg cat tgg ggc gcc ctt cgc ccg gat aga gga gaa tgg ctc cta 385
Ile Leu His Trp Gly Ala Leu Arg Pro Asp Arg Gly Glu Trp Leu Leu
      115            120            125

cca tcc ccg aaa cca gat ggc acg aca gtg tac aag aac agg gct ctt 433
Pro Ser Arg Lys Pro Asp Gly Thr Thr Val Tyr Lys Asn Arg Ala Leu
      130            135            140

agg acg cct ttt ata aag tca ggt gat aac tcc acg ctg aaa att gag 481

```

Arg Thr Pro Phe Ile Lys Ser Gly Asp Asn Ser Thr Leu Lys Ile Glu	
145	150 155 160
ata gat gat cct gca gtg caa gcc att gag ttc ctc ata ttt gat gag	529
Ile Asp Asp Pro Ala Val Gln Ala Ile Glu Phe Leu Ile Phe Asp Glu	165 170 175
gca cgg aat aat tgg tac aaa aac aat ggc cag aat ttc caa att cag	577
Ala Arg Asn Asn Trp Tyr Lys Asn Asn Gly Gln Asn Phe Gln Ile Gln	180 185 190
cta caa gcg agc caa tat caa ggg cag ggt aca tct act gct act tct	625
Leu Gln Ala Ser Gln Tyr Gln Gly Gln Gly Thr Ser Thr Ala Thr Ser	195 200 205
tct act gtg gtt cca gag gat ctt gtg cag ata caa tca tat ctt cgg	673
Ser Thr Val Val Pro Glu Asp Leu Val Gln Ile Gln Ser Tyr Leu Arg	210 215 220
tgg gaa aga aag gga aag cag tca tat aca cct gag caa gag aag gag	721
Trp Glu Arg Lys Gly Lys Gln Ser Tyr Thr Pro Glu Gln Glu Lys Glu	225 230 235 240
gag tat gaa gca gca cga act gag ttg ata gag gaa tta aac aag ggt	769
Glu Tyr Glu Ala Ala Arg Thr Glu Leu Ile Glu Glu Leu Asn Lys Gly	245 250 255
gtt tct ttg gag aag cta cga gcg aaa ctg aca aag aca cct gag gca	817
Val Ser Leu Glu Lys Leu Arg Ala Lys Leu Thr Lys Thr Pro Glu Ala	260 265 270
act gat agt aat gct cct gca tct gaa agc act gtg act act aaa gtc	865
Thr Asp Ser Asn Ala Pro Ala Ser Glu Ser Thr Val Thr Thr Lys Val	275 280 285
cca gag gaa ctt gta caa gtc cag gct tac ata agg tgg gag aaa gca	913
Pro Glu Glu Leu Val Gln Val Gln Ala Tyr Ile Arg Trp Glu Lys Ala	290 295 300
ggc aag cca aat tat gcc cca gag aag caa ttg gtc gag ttt gag gaa	961
Gly Lys Pro Asn Tyr Ala Pro Glu Lys Gln Leu Val Glu Phe Glu Glu	305 310 315 320
gca agg aag gaa ctg cag tct gag ttg gat aag ggg acc tca gtt gag	1009
Ala Arg Lys Glu Leu Gln Ser Glu Leu Asp Lys Gly Thr Ser Val Glu	325 330 335
cag ttg agg aac aaa att ttg aaa ggg aac att gag aca aaa gtt tcc	1057
Gln Leu Arg Asn Lys Ile Leu Lys Gly Asn Ile Glu Thr Lys Val Ser	340 345 350
aag cag ctg aag gac aaa aaa tac ttt tct gtg gaa aga att cag cgg	1105
Lys Gln Leu Lys Asp Lys Lys Tyr Phe Ser Val Glu Arg Ile Gln Arg	355 360 365
aaa aaa cga gat att gtg caa cta ctt aaa aaa cac aag cct act gtt	1153
Lys Lys Arg Asp Ile Val Gln Leu Leu Lys Lys His Lys Pro Thr Val	370 375 380
atg gaa gcg caa gca gag act cct aaa caa ccc act gtt ctg gat ctc	1201
Met Glu Ala Gln Ala Glu Thr Pro Lys Gln Pro Thr Val Leu Asp Leu	385 390 395 400

ttc aca aag tca tta cag gag cag gat aac tgt gag gtt cta agc aga	1249
Phe Thr Lys Ser Leu Gln Glu Gln Asp Asn Cys Glu Val Leu Ser Arg	
405 410 415	
aag ctt ttc aag ttc ggt gac aag gag ata ctg gga att acc acc gtt	1297
Lys Leu Phe Lys Phe Gly Asp Lys Glu Ile Leu Gly Ile Thr Thr Val	
420 425 430	
gct cta gga aaa acc aaa gtt cac ttg gca aca aac tat atg gag cca	1345
Ala Leu Gly Lys Thr Lys Val His Leu Ala Thr Asn Tyr Met Glu Pro	
435 440 445	
ctt ata ctt cac tgg gcg ttg tca aaa gag aat gga gag tgg cag gca	1393
Leu Ile Leu His Trp Ala Leu Ser Lys Glu Asn Gly Glu Trp Gln Ala	
450 455 460	
cct ccc tca agc ata ttg cca tct ggt tca tca ttg cta gac aag gca	1441
Pro Pro Ser Ser Ile Leu Pro Ser Gly Ser Ser Leu Leu Asp Lys Ala	
465 470 475 480	
tgt gaa act tca ttc agt gaa tat gaa ttg aat ggt ctg cat tgt cag	1489
Cys Glu Thr Ser Phe Ser Glu Tyr Glu Leu Asn Gly Leu His Cys Gln	
485 490 495	
gtt gtt gag atc gag ctt gac gat ggt gga tac aag cgg atg ccc ttt	1537
Val Val Glu Ile Glu Leu Asp Asp Gly Gly Tyr Lys Arg Met Pro Phe	
500 505 510	
gtt ctc cgg tct ggt gaa aca tgg atg aaa aat aat ggc tct gac ttt	1585
Val Leu Arg Ser Gly Glu Thr Trp Met Lys Asn Asn Gly Ser Asp Phe	
515 520 525	
tac ttg gat ttc agc acc aaa gtt gca aaa aat aca aag gat act ggt	1633
Tyr Leu Asp Phe Ser Thr Lys Val Ala Lys Asn Thr Lys Asp Thr Gly	
530 535 540	
gat gct ggt aaa ggc act gct aag gcc ttg ctt gaa aga ata gca gat	1681
Asp Ala Gly Lys Gly Thr Ala Lys Ala Leu Leu Glu Arg Ile Ala Asp	
545 550 555 560	
cta gag gaa gat gcc caa cga tct ctt atg cac aga ttc aat att gca	1729
Leu Glu Glu Asp Ala Gln Arg Ser Leu Met His Arg Phe Asn Ile Ala	
565 570 575	
gca gat cta gtt gac caa gca aga gat aat gga tta ttg ggt att att	1777
Ala Asp Leu Val Asp Gln Ala Arg Asp Asn Gly Leu Leu Gly Ile Ile	
580 585 590	
gga att ttt gtt tgg att agg ttc atg gct aca agg caa cta ata tgg	1825
Gly Ile Phe Val Trp Ile Arg Phe Met Ala Thr Arg Gln Leu Ile Trp	
595 600 605	
aac aag aac tac aat gtg aag cca cgt gag ata agc aaa gca caa gat	1873
Asn Lys Asn Tyr Asn Val Lys Pro Arg Glu Ile Ser Lys Ala Gln Asp	
610 615 620	
agg ttt aca gat gat ctt gag aat atg tac aga act tac cca caa tat	1921
Arg Phe Thr Asp Asp Leu Glu Asn Met Tyr Arg Thr Tyr Pro Gln Tyr	
625 630 635 640	
cag gag atc tta aga atg ata atg tct gct gtt ggt cgg gga ggt gaa	1969
Gln Glu Ile Leu Arg Met Ile Met Ser Ala Val Gly Arg Gly Gly Glu	
645 650 655	

ggt gat gtt ggt caa cgc att cgt gat gag ata tta gta atc cag aga	2017
Gly Asp Val Gly Gln Arg Ile Arg Asp Glu Ile Leu Val Ile Gln Arg	
660 665 670	
aat aat gac tgc aaa ggt gga atg atg gag gag tgg cac cag aaa ctg	2065
Asn Asn Asp Cys Lys Gly Gly Met Met Glu Glu Trp His Gln Lys Leu	
675 680 685	
cac aac aat aca agc cca gat gat gta gtg atc tgc cag gcc cta ctt	2113
His Asn Asn Thr Ser Pro Asp Asp Val Val Ile Cys Gln Ala Leu Leu	
690 695 700	
gat tat atc aag agt gat ttt gat att ggt gtt tac tgg gac acc ttg	2161
Asp Tyr Ile Lys Ser Asp Phe Asp Ile Gly Val Tyr Trp Asp Thr Leu	
705 710 715 720	
aaa aaa gat ggt ata aca aaa gag cgt cta ttg agc tat gat cga ccg	2209
Lys Lys Asp Gly Ile Thr Lys Glu Arg Leu Leu Ser Tyr Asp Arg Pro	
725 730 735	
att cat tca gag cca aat ttc agg agt gaa cag aaa gat ggc tta ctc	2257
Ile His Ser Glu Pro Asn Phe Arg Ser Glu Gln Lys Asp Gly Leu Leu	
740 745 750	
cgt gac ttg ggc aat tat atg aga agc ctc aag gca gtg cat tct ggt	2305
Arg Asp Leu Gly Asn Tyr Met Arg Ser Leu Lys Ala Val His Ser Gly	
755 760 765	
gct gat ctt gaa tct gct ata gca act tgc atg gga tac aaa tca gag	2353
Ala Asp Leu Glu Ser Ala Ile Ala Thr Cys Met Gly Tyr Lys Ser Glu	
770 775 780	
ggt gaa ggt ttc atg gtt ggt gtt cag att aat cca gtg aag ggt ttg	2401
Gly Glu Gly Phe Met Val Gly Val Gln Ile Asn Pro Val Lys Gly Leu	
785 790 795 800	
cca tct gga ttt cct aaa ttg ctt gaa ttt gta ctt gac cat gtt gag	2449
Pro Ser Gly Phe Pro Lys Leu Leu Glu Phe Val Leu Asp His Val Glu	
805 810 815	
gat aaa tca gca gaa cca ctt ctt gag ggg tta ttg gag gct cga gct	2497
Asp Lys Ser Ala Glu Pro Leu Leu Glu Gly Leu Leu Glu Ala Arg Ala	
820 825 830	
gaa cta cac cct ttg ctc ctt ggc tct cct gaa cgc atg aag gat ctt	2545
Glu Leu His Pro Leu Leu Leu Gly Ser Pro Glu Arg Met Lys Asp Leu	
835 840 845	
atc ttt tta gac att gct ctt gat tct act ttc agg aca gca gtt gaa	2593
Ile Phe Leu Asp Ile Ala Leu Asp Ser Thr Phe Arg Thr Ala Val Glu	
850 855 860	
aga tca tat gag gag ctc aat aat gta gaa cca gag aaa att atg tac	2641
Arg Ser Tyr Glu Glu Leu Asn Asn Val Glu Pro Glu Lys Ile Met Tyr	
865 870 875 880	
ttc atc agt ctt gtc ctt gaa aat ctt gct tta tcc acc gac gac aat	2689
Phe Ile Ser Leu Val Leu Glu Asn Leu Ala Leu Ser Thr Asp Asp Asn	
885 890 895	
gaa gat atc cta tat tgc tta aag gga tgg aat caa gcc ttg gaa atg	2737
Glu Asp Ile Leu Tyr Cys Leu Lys Gly Trp Asn Gln Ala Leu Glu Met	

	900	905	910	
	gct aaa cag aaa aac aac caa tgg gct ctc tat gct aaa gca ttt ctg Ala Lys Gln Lys Asn Asn Gln Trp Ala Leu Tyr Ala Lys Ala Phe Leu 915	920	925	2785
	gac aga acc aga ctt gcc ctt gca agc aag gga gaa caa tac tat aat Asp Arg Thr Arg Leu Ala Leu Ala Ser Lys Gly Glu Gln Tyr Tyr Asn 930	935	940	2833
	ttg atg cag ccc tca gct gaa tat ctt ggc tgg tta ctt aac att gac Leu Met Gln Pro Ser Ala Glu Tyr Leu Gly Ser Leu Leu Asn Ile Asp 945	950	955	2881
	caa tgg gca gtt aat atc ttt aca gaa gaa att att cgt ggt gga tca Gln Trp Ala Val Asn Ile Phe Thr Glu Glu Ile Ile Arg Gly Gly Ser 965	970	975	2929
	gct gct acc ctg tct gct ctt ctg aat cgg att gat cct gtt ctt agg Ala Ala Thr Leu Ser Ala Leu Leu Asn Arg Ile Asp Pro Val Leu Arg 980	985	990	2977
	aat gtt gca cag ctt gga agt tgg cag gtt ata agc cca gtt gaa gta Asn Val Ala Gln Leu Gly Ser Trp Gln Val Ile Ser Pro Val Glu Val 995	1000	1005	3025
	tca ggt tac att gta gtg gtt gat gaa ttg ctt gct gtt caa aac aaa Ser Gly Tyr Ile Val Val Val Asp Glu Leu Leu Ala Val Gln Asn Lys 1010	1015	1020	3073
	tcc tat gat aaa cca act atc ctt gtg gca aag agt gtc aag gga gag Ser Tyr Asp Lys Pro Thr Ile Leu Val Ala Lys Ser Val Lys Gly Glu 1025	1030	1035	3121
	gaa gaa ata cca gat gga gtt gtt ggt gtt att aca cct gat atg cca Glu Glu Ile Pro Asp Gly Val Val Gly Val Ile Thr Pro Asp Met Pro 1045	1050	1055	3169
	gat gtt ctc tcc cat gta tca gtc cga gca agg aat tgc aag gtt tta Asp Val Leu Ser His Val Ser Val Arg Ala Arg Asn Cys Lys Val Leu 1060	1065	1070	3217
	ttt gca aca tgc ttt gat cct aac acc ttg tct gaa ctc caa gga cat Phe Ala Thr Cys Phe Asp Pro Asn Thr Leu Ser Glu Leu Gln Gly His 1075	1080	1085	3265
	gat ggg aaa gtg ttt tcc ttc aaa cct act tct gca gat atc acc tat Asp Gly Lys Val Phe Ser Phe Lys Pro Thr Ser Ala Asp Ile Thr Tyr 1090	1095	1100	3313
	agg gag att cca gag agt gaa ctg caa tca ggt tct cta aat gca gaa Arg Glu Ile Pro Glu Ser Glu Leu Gln Ser Gly Ser Leu Asn Ala Glu 1105	1110	1115	3361
	gct ggc cag gca gtg cca tct gtg tca tta gtc aag aag aag ttt ctt Ala Gly Gln Ala Val Pro Ser Val Ser Leu Val Lys Lys Lys Phe Leu 1125	1130	1135	3409
	gga aaa tat gca ata tca gca gaa gaa ttc tct gag gaa atg gtt ggg Gly Lys Tyr Ala Ile Ser Ala Glu Glu Phe Ser Glu Glu Met Val Gly 1140	1145	1150	3457
	gcc aag tct cgc aac gta gca tac ctc aaa gga aaa gta ccc tca tgg			3505

Ala Lys Ser Arg Asn Val Ala Tyr Leu Lys Gly Lys Val Pro Ser Trp	
1155	1160 1165
ggt ggt gtc cct aca tca gtt gcg att cca ttt ggg acc ttt gag aag	3553
Val Gly Val Pro Thr Ser Val Ala Ile Pro Phe Gly Thr Phe Glu Lys	
1170	1175 1180
ggt ttg tct gat gaa atc aat aag gaa gtc gcg caa acc ata caa atg	3601
Val Leu Ser Asp Glu Ile Asn Lys Glu Val Ala Gln Thr Ile Gln Met	
1185	1190 1195 1200
ctg aag gga aaa ctt gct caa gat gat ttt agt gct cta ggc gaa ata	3649
Leu Lys Gly Lys Leu Ala Gln Asp Asp Phe Ser Ala Leu Gly Glu Ile	
	1205 1210 1215
cgg aaa act gtt ctc aat tta act gct cct act caa ctg atc aag gaa	3697
Arg Lys Thr Val Leu Asn Leu Thr Ala Pro Thr Gln Leu Ile Lys Glu	
	1220 1225 1230
ctg aag gag aag atg cta ggc tct gga atg ccc tgg cct gga gat gaa	3745
Leu Lys Glu Lys Met Leu Gly Ser Gly Met Pro Trp Pro Gly Asp Glu	
	1235 1240 1245
ggt gac caa cgt tgg gag caa gca tgg atg gca att aaa aag gtt tgg	3793
Gly Asp Gln Arg Trp Glu Gln Ala Trp Met Ala Ile Lys Lys Val Trp	
	1250 1255 1260
gcg tca aaa tgg aat gaa aga gca tat ttt agc act cgt aag gtg aag	3841
Ala Ser Lys Trp Asn Glu Arg Ala Tyr Phe Ser Thr Arg Lys Val Lys	
	1265 1270 1275 1280
ctt gat cat gac tac ctt tcc atg gct gta ctt gta caa gaa att gtc	3889
Leu Asp His Asp Tyr Leu Ser Met Ala Val Leu Val Gln Glu Ile Val	
	1285 1290 1295
aac gca gac tat gcc ttt gtc att cat act act aac cca tca tcg gga	3937
Asn Ala Asp Tyr Ala Phe Val Ile His Thr Thr Asn Pro Ser Ser Gly	
	1300 1305 1310
gat tcg tct gag ata tat gct gaa gtg gtg aaa ggg ctt gga gaa aca	3985
Asp Ser Ser Glu Ile Tyr Ala Glu Val Val Lys Gly Leu Gly Glu Thr	
	1315 1320 1325
ctt gta gga gcc tat cct ggt cgc gcc atg agc ttt gta tgt aag aaa	4033
Leu Val Gly Ala Tyr Pro Gly Arg Ala Met Ser Phe Val Cys Lys Lys	
	1330 1335 1340
aac gac ctt gat tct ccc aag gta ctg ggt ttc cca agc aag cca att	4081
Asn Asp Leu Asp Ser Pro Lys Val Leu Gly Phe Pro Ser Lys Pro Ile	
	1345 1350 1355 1360
ggt ctc ttc ata aag aga tca atc atc ttt cgt tca gat tcc aac ggt	4129
Gly Leu Phe Ile Lys Arg Ser Ile Ile Phe Arg Ser Asp Ser Asn Gly	
	1365 1370 1375
gag gat tta gaa ggg tat gct gga gca gga ctg tat gat agt gtc cct	4177
Glu Asp Leu Glu Gly Tyr Ala Gly Ala Gly Leu Tyr Asp Ser Val Pro	
	1380 1385 1390
atg gat gag gaa gat gaa gtc ata ctc gac tac acc acc gac ccc ctc	4225
Met Asp Glu Glu Asp Glu Val Ile Leu Asp Tyr Thr Thr Asp Pro Leu	
	1395 1400 1405

```

att aca gat cag gga ttc caa aaa tct atc ctc tcg agc att gca cgg 4273
Ile Thr Asp Gln Gly Phe Gln Lys Ser Ile Leu Ser Ser Ile Ala Arg
    1410                1415                1420

gct ggt cat gcc att gag gag ctt tat ggg tcc cca cag gat gtt gag 4321
Ala Gly His Ala Ile Glu Glu Leu Tyr Gly Ser Pro Gln Asp Val Glu
1425                1430                1435                1440

ggt gca gtg aag gaa ggg aag cta tac gta gta cag aca aga cca cag 4369
Gly Ala Val Lys Glu Gly Lys Leu Tyr Val Val Gln Thr Arg Pro Gln
                1445                1450                1455

atg taa tctatatgta tttttatag ccaagtcaat caggcaatgt tgtagagtaa 4425
Met

gatatacggg ccgtgggaca tgtataacac gttacgcctt tttttttatt atttgctttc 4485

atactcacaa tacactaatt tatagggcctt attttatcgc caataagtgt aatctgacta 4545

tgatcataaa taagcctcct aggctactga aaaccattaa aggttatttt gatcaaaaaa 4605

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aactcgag 4643

<210> 2
<211> 1457
<212> PRT
<213> 稻米

<400> 2
Asn Ser Ala Arg Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Glu Arg Cys Ala Leu
 1                5                10                15

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

Pro Pro Ala Ala Leu Arg Arg Gly Arg Arg Leu Pro Ala Ala Thr Thr
                35                40                45

Thr Leu Ala Val Ser Arg Arg Ser Leu Leu Ala Pro Arg Ala Ile Ala
 50                55                60

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

Asp Ala Asn Ser Glu Leu Lys Val Thr Leu Asn Pro Ala Pro Gln Gly
                85                90                95

Ser Val Ala Glu Ile Asn Leu Glu Ala Thr Asn Thr Ser Gly Ser Leu
                100                105                110

Ile Leu His Trp Gly Ala Leu Arg Pro Asp Arg Gly Glu Trp Leu Leu
                115                120                125

Pro Ser Arg Lys Pro Asp Gly Thr Thr Val Tyr Lys Asn Arg Ala Leu
 130                135                140

Arg Thr Pro Phe Ile Lys Ser Gly Asp Asn Ser Thr Leu Lys Ile Glu
145                150                155                160

Ile Asp Asp Pro Ala Val Gln Ala Ile Glu Phe Leu Ile Phe Asp Glu
                165                170                175

```

Ala Arg Asn Asn Trp Tyr Lys Asn Asn Gly Gln Asn Phe Gln Ile Gln
180 185 190

Leu Gln Ala Ser Gln Tyr Gln Gly Gln Gly Thr Ser Thr Ala Thr Ser
195 200 205

Ser Thr Val Val Pro Glu Asp Leu Val Gln Ile Gln Ser Tyr Leu Arg
210 215 220

Trp Glu Arg Lys Gly Lys Gln Ser Tyr Thr Pro Glu Gln Glu Lys Glu
225 230 235 240

Glu Tyr Glu Ala Ala Arg Thr Glu Leu Ile Glu Glu Leu Asn Lys Gly
245 250 255

Val Ser Leu Glu Lys Leu Arg Ala Lys Leu Thr Lys Thr Pro Glu Ala
260 265 270

Thr Asp Ser Asn Ala Pro Ala Ser Glu Ser Thr Val Thr Thr Lys Val
275 280 285

Pro Glu Glu Leu Val Gln Val Gln Ala Tyr Ile Arg Trp Glu Lys Ala
290 295 300

Gly Lys Pro Asn Tyr Ala Pro Glu Lys Gln Leu Val Glu Phe Glu Glu
305 310 315 320

Ala Arg Lys Glu Leu Gln Ser Glu Leu Asp Lys Gly Thr Ser Val Glu
325 330 335

Gln Leu Arg Asn Lys Ile Leu Lys Gly Asn Ile Glu Thr Lys Val Ser
340 345 350

Lys Gln Leu Lys Asp Lys Lys Tyr Phe Ser Val Glu Arg Ile Gln Arg
355 360 365

Lys Lys Arg Asp Ile Val Gln Leu Leu Lys Lys His Lys Pro Thr Val
370 375 380

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

Phe Thr Lys Ser Leu Gln Glu Gln Asp Asn Cys Glu Val Leu Ser Arg
405 410 415

Lys Leu Phe Lys Phe Gly Asp Lys Glu Ile Leu Gly Ile Thr Thr Val
420 425 430

Ala Leu Gly Lys Thr Lys Val His Leu Ala Thr Asn Tyr Met Glu Pro
435 440 445

Leu Ile Leu His Trp Ala Leu Ser Lys Glu Asn Gly Glu Trp Gln Ala
450 455 460

Pro Pro Ser Ser Ile Leu Pro Ser Gly Ser Ser Leu Leu Asp Lys Ala
465 470 475 480

Cys Glu Thr Ser Phe Ser Glu Tyr Glu Leu Asn Gly Leu His Cys Gln
485 490 495

Val Val Glu Ile Glu Leu Asp Asp Gly Gly Tyr Lys Arg Met Pro Phe
500 505 510

Val Leu Arg Ser Gly Glu Thr Trp Met Lys Asn Asn Gly Ser Asp Phe
 515 520 525
 Tyr Leu Asp Phe Ser Thr Lys Val Ala Lys Asn Thr Lys Asp Thr Gly
 530 535 540
 Asp Ala Gly Lys Gly Thr Ala Lys Ala Leu Leu Glu Arg Ile Ala Asp
 545 550 555 560
 Leu Glu Glu Asp Ala Gln Arg Ser Leu Met His Arg Phe Asn Ile Ala
 565 570 575
 Ala Asp Leu Val Asp Gln Ala Arg Asp Asn Gly Leu Leu Gly Ile Ile
 580 585 590
 Gly Ile Phe Val Trp Ile Arg Phe Met Ala Thr Arg Gln Leu Ile Trp
 595 600 605
 Asn Lys Asn Tyr Asn Val Lys Pro Arg Glu Ile Ser Lys Ala Gln Asp
 610 615 620
 Arg Phe Thr Asp Asp Leu Glu Asn Met Tyr Arg Thr Tyr Pro Gln Tyr
 625 630 635 640
 Gln Glu Ile Leu Arg Met Ile Met Ser Ala Val Gly Arg Gly Gly Glu
 645 650 655
 Gly Asp Val Gly Gln Arg Ile Arg Asp Glu Ile Leu Val Ile Gln Arg
 660 665 670
 Asn Asn Asp Cys Lys Gly Gly Met Met Glu Glu Trp His Gln Lys Leu
 675 680 685
 His Asn Asn Thr Ser Pro Asp Asp Val Val Ile Cys Gln Ala Leu Leu
 690 695 700
 Asp Tyr Ile Lys Ser Asp Phe Asp Ile Gly Val Tyr Trp Asp Thr Leu
 705 710 715 720
 Lys Lys Asp Gly Ile Thr Lys Glu Arg Leu Leu Ser Tyr Asp Arg Pro
 725 730 735
 Ile His Ser Glu Pro Asn Phe Arg Ser Glu Gln Lys Asp Gly Leu Leu
 740 745 750
 Arg Asp Leu Gly Asn Tyr Met Arg Ser Leu Lys Ala Val His Ser Gly
 755 760 765
 Ala Asp Leu Glu Ser Ala Ile Ala Thr Cys Met Gly Tyr Lys Ser Glu
 770 775 780
 Gly Glu Gly Phe Met Val Gly Val Gln Ile Asn Pro Val Lys Gly Leu
 785 790 795 800
 Pro Ser Gly Phe Pro Lys Leu Leu Glu Phe Val Leu Asp His Val Glu
 805 810 815
 Asp Lys Ser Ala Glu Pro Leu Leu Glu Gly Leu Leu Glu Ala Arg Ala
 820 825 830
 Glu Leu His Pro Leu Leu Leu Gly Ser Pro Glu Arg Met Lys Asp Leu
 835 840 845

Ile Phe Leu Asp Ile Ala Leu Asp Ser Thr Phe Arg Thr Ala Val Glu
 850 855 860
 Arg Ser Tyr Glu Glu Leu Asn Asn Val Glu Pro Glu Lys Ile Met Tyr
 865 870 875 880
 Phe Ile Ser Leu Val Leu Glu Asn Leu Ala Leu Ser Thr Asp Asp Asn
 885 890 895
 Glu Asp Ile Leu Tyr Cys Leu Lys Gly Trp Asn Gln Ala Leu Glu Met
 900 905 910
 Ala Lys Gln Lys Asn Asn Gln Trp Ala Leu Tyr Ala Lys Ala Phe Leu
 915 920 925
 Asp Arg Thr Arg Leu Ala Leu Ala Ser Lys Gly Glu Gln Tyr Tyr Asn
 930 935 940
 Leu Met Gln Pro Ser Ala Glu Tyr Leu Gly Ser Leu Leu Asn Ile Asp
 945 950 955 960
 Gln Trp Ala Val Asn Ile Phe Thr Glu Glu Ile Ile Arg Gly Gly Ser
 965 970 975
 Ala Ala Thr Leu Ser Ala Leu Leu Asn Arg Ile Asp Pro Val Leu Arg
 980 985 990
 Asn Val Ala Gln Leu Gly Ser Trp Gln Val Ile Ser Pro Val Glu Val
 995 1000 1005
 Ser Gly Tyr Ile Val Val Val Asp Glu Leu Leu Ala Val Gln Asn Lys
 1010 1015 1020
 Ser Tyr Asp Lys Pro Thr Ile Leu Val Ala Lys Ser Val Lys Gly Glu
 025 1030 1035 1040
 Glu Glu Ile Pro Asp Gly Val Val Gly Val Ile Thr Pro Asp Met Pro
 1045 1050 1055
 Asp Val Leu Ser His Val Ser Val Arg Ala Arg Asn Cys Lys Val Leu
 1060 1065 1070
 Phe Ala Thr Cys Phe Asp Pro Asn Thr Leu Ser Glu Leu Gln Gly His
 1075 1080 1085
 Asp Gly Lys Val Phe Ser Phe Lys Pro Thr Ser Ala Asp Ile Thr Tyr
 1090 1095 1100
 Arg Glu Ile Pro Glu Ser Glu Leu Gln Ser Gly Ser Leu Asn Ala Glu
 105 1110 1115 1120
 Ala Gly Gln Ala Val Pro Ser Val Ser Leu Val Lys Lys Lys Phe Leu
 1125 1130 1135
 Gly Lys Tyr Ala Ile Ser Ala Glu Glu Phe Ser Glu Glu Met Val Gly
 1140 1145 1150
 Ala Lys Ser Arg Asn Val Ala Tyr Leu Lys Gly Lys Val Pro Ser Trp
 1155 1160 1165
 Val Gly Val Pro Thr Ser Val Ala Ile Pro Phe Gly Thr Phe Glu Lys
 1170 1175 1180

Val Leu Ser Asp Glu Ile Asn Lys Glu Val Ala Gln Thr Ile Gln Met
 185 1190 1195 1200
 Leu Lys Gly Lys Leu Ala Gln Asp Asp Phe Ser Ala Leu Gly Glu Ile
 1205 1210 1215
 Arg Lys Thr Val Leu Asn Leu Thr Ala Pro Thr Gln Leu Ile Lys Glu
 1220 1225 1230
 Leu Lys Glu Lys Met Leu Gly Ser Gly Met Pro Trp Pro Gly Asp Glu
 1235 1240 1245
 Gly Asp Gln Arg Trp Glu Gln Ala Trp Met Ala Ile Lys Lys Val Trp
 1250 1255 1260
 Ala Ser Lys Trp Asn Glu Arg Ala Tyr Phe Ser Thr Arg Lys Val Lys
 265 1270 1275 1280
 Leu Asp His Asp Tyr Leu Ser Met Ala Val Leu Val Gln Glu Ile Val
 1285 1290 1295
 Asn Ala Asp Tyr Ala Phe Val Ile His Thr Thr Asn Pro Ser Ser Gly
 1300 1305 1310
 Asp Ser Ser Glu Ile Tyr Ala Glu Val Val Lys Gly Leu Gly Glu Thr
 1315 1320 1325
 Leu Val Gly Ala Tyr Pro Gly Arg Ala Met Ser Phe Val Cys Lys Lys
 1330 1335 1340
 Asn Asp Leu Asp Ser Pro Lys Val Leu Gly Phe Pro Ser Lys Pro Ile
 345 1350 1355 1360
 Gly Leu Phe Ile Lys Arg Ser Ile Ile Phe Arg Ser Asp Ser Asn Gly
 1365 1370 1375
 Glu Asp Leu Glu Gly Tyr Ala Gly Ala Gly Leu Tyr Asp Ser Val Pro
 1380 1385 1390
 Met Asp Glu Glu Asp Glu Val Ile Leu Asp Tyr Thr Thr Asp Pro Leu
 1395 1400 1405
 Ile Thr Asp Gln Gly Phe Gln Lys Ser Ile Leu Ser Ser Ile Ala Arg
 1410 1415 1420
 Ala Gly His Ala Ile Glu Glu Leu Tyr Gly Ser Pro Gln Asp Val Glu
 425 1430 1435 1440
 Gly Ala Val Lys Glu Gly Lys Leu Tyr Val Val Gln Thr Arg Pro Gln
 1445 1450 1455

Met

<210> 3
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 稻米

<400> 3
 Pro Phe Ile Lys Ser
 1 5

<210> 4
<211> 5
<212> PRT
<213> 稻米

<400> 4
Gln Ala Ile Glu Phe
1 5

<210> 5
<211> 5
<212> PRT
<213> 稻米

<400> 5
Asn Tyr Ala Pro Glu
1 5

<210> 6
<211> 5
<212> PRT
<213> 稻米

<400> 6'
Glu Leu Gln Ser Glu
1 5

<210> 7
<211> 6
<212> PRT
<213> 稻米

<400> 7
Lys Val Ala Lys Asn Thr
1 5

<210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> 稻米

<400> 8
Ala Ala Asp Leu Val
1 5

<210> 9
<211> 5
<212> PRT
<213> 稻米

<400> 9
Gln Tyr Gln Glu Ile
1 5

<210> 10
<211> 5
<212> PRT
<213> 稻米

<400> 10
Ala Leu Leu Asp Tyr
1 5

<210> 11
<211> 5
<212> PRT
<213> 稻米

<400> 11
Asp Arg Pro Ile His
1 5

<210> 12
<211> 5
<212> PRT
<213> 稻米

<400> 12
Gln Lys Asp Gly Leu
1 5

<210> 13
<211> 5
<212> PRT
<213> 稻米

<400> 13
Ile Ala Thr Cys Met
1 5

<210> 14
<211> 5
<212> PRT
<213> 稻米

<400> 14
Ala Arg Ala Glu Leu
1 5

<210> 15
<211> 5

<212> PRT

<213> 稻米

<400> 15

Ala Leu Ser Thr Asp

1 5

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> 稻米

<400> 16

Asn Arg Ile Asp Pro

1 5

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> 稻米

<400> 17

Gly Tyr Ile Val Val

1 5

<210> 18

<211> 5

<212> PRT

<213> 稻米

<400> 18

Arg Asn Cys Lys Val

1 5

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> 稻米

<400> 19

Leu Gly Phe Pro Ser

1 5

<210> 20

<211> 5

<212> PRT

<213> 稻米

<400> 20

Val Ile Leu Asp Tyr

1 5

<210> 21
<211> 5
<212> PRT
<213> 稻米

<400> 21
Phe Gln Lys Ser Ile
1 5

<210> 22
<211> 5
<212> PRT
<213> 稻米

<400> 22
Glu Gly Ala Val Lys
1 5

<210> 23
<211> 5
<212> PRT
<213> 稻米

<400> 23
Val Lys Glu Gly Lys
1 5

<210> 24
<211> 5
<212> PRT
<213> 稻米

<400> 24
Lys Leu Tyr Val Val
1 5

<210> 25
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 人工

<400> 25
gagacatgg tacttaccac tgatacc

27

<210> 26
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 人工

<400> 26

gtacttgtac tgcaggac

18

