



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1981041 B

(45) 授权公告日 2011.03.23

(21) 申请号 200580015328.X

A01H 5/10(2006.01)

(22) 申请日 2005.03.09

C12C 1/18(2006.01)

(30) 优先权数据

10/800,200 2004.03.11 US

(56) 对比文件

WO 02/053720 A, 2002.07.11, 全文.

CN 1131189 A, 1996.09.18, 全文.

(85) PCT申请进入国家阶段日

2006.11.13

Arasaratnam V et al. Corn malt extract for alcoholic and non-alcoholic beverages. Journal of Food Science and Technology-mysore35 5. 1998, 35(5), 全文.

(86) PCT申请的申请数据

PCT/DK2005/000160 2005.03.09

(87) PCT申请的公布数据

W02005/087934 EN 2005.09.22

审查员 闫珠君

(73) 专利权人 卡尔斯伯格公司

地址 丹麦瓦尔比

(72) 发明人 克劳斯·布雷达姆 奥利·奥尔森

伯吉特·斯卡德豪奇 芬恩·洛克

索伦·克努森 莱恩·M·贝克

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 张文辉 巫肖南

(51) Int. Cl.

C12N 15/82(2006.01)

权利要求书 3 页 说明书 64 页 序列表 12 页

附图 25 页

(54) 发明名称

产生风味稳定饮料的大麦

(57) 摘要

本发明提供了 LOX-1 无效大麦和它产生的植物产品,例如利用合成脂肪酸转换酶脂加氧酶-1 有缺陷的大麦颗粒制造的麦芽。所述酶解释说明了与亚油酸转化成脂加氧酶路径代谢物—9- 氢过氧十八碳二烯酸相关的主要活性,通过更进一步地酶反应或自发反应,9- 氢过氧十八碳二烯酸可以导致反式 2- 壬烯醛的出现。本发明使啤酒工人能够生产即使在延期储存饮料之后,仍缺乏可检测的反式 2- 壬烯醛特异异味的啤酒。

1. 大麦植物细胞,其在 LOX-1 基因中具有导致完全丧失功能的突变,其中所述突变生成编码由下述 LOX-1 N- 末端片段组成的 LOX-1 多肽形式的基因,该 LOX-1 N- 末端片段包含如 SEQ ID NO :3 所示的野生型大麦 LOX-1 的最多 665 个 N- 末端氨基酸,且其中该大麦细胞不是繁殖材料。

2. 权利要求 1 的大麦植物细胞,其中所述编码 LOX-1 的基因包含早熟无义密码子,早熟无义密码子位于所述起始密码子下游的最多 665 个密码子处。

3. 权利要求 1 的大麦植物细胞,其中编码所述植物细胞的 LOX-1 的基因包含无义密码子,所述密码子对应于 SEQ ID NO :1 的碱基 no. s 3572-3574。

4. 权利要求 1-3 中任一项的大麦植物细胞,其中编码所述植物细胞的 LOX-1 的基因包含 SEQ ID NO :1 的 3574 位点处 G 至 A 的替换。

5. 权利要求 1 的大麦植物细胞,其中编码所述植物细胞的 LOX-1 的基因包含 SEQ ID NO :5 的 2311 位点处 G 至 A 的替换。

6. 权利要求 1 的大麦植物细胞,其中所述 LOX-1 基因包含:

(i) 对应于 SEQ ID NO :1 的碱基 no. s 3572-3574 的无义密码子;或

(ii)SEQ ID NO :5 的碱基 no. 2311 位点处的 G 至 A 的替换。

7. 包含权利要求 1-6 任一项的大麦植物细胞的组合物。

8. 包含加工的大麦植物或其部分的磨碎的麦芽组合物,其中所述大麦植物在 LOX-1 基因中具有突变,所述突变生成编码由下述 LOX-1N- 末端片段组成的 LOX-1 多肽形式的基因,该 LOX-1N- 末端片段包含如 SEQ ID NO :3 所示的野生型大麦 LOX-1 的最多 665 个 N- 末端氨基酸。

9. 权利要求 8 的磨碎的麦芽组合物,其中 LOX-1 基因中的突变是

(a) 导致对应于 SEQ ID NO :1 的碱基 no. s 3572-3574 的无义密码子的突变,或

(b)SEQ ID NO :5 的碱基 no. 2311 位点处的 G 至 A 的替换。

10. 权利要求 8 或 9 的磨碎的麦芽组合物,其中所述大麦植物的所述部分是颗粒。

11. 利用大麦植物或其部分,或利用从所述大麦植物或其部分或其混合物制备的麦芽组合物制备的麦芽汁组合物,所述大麦植物在 LOX-1 基因中具有导致完全丧失功能的突变,所述突变生成编码由下述 LOX-1N- 末端片段组成的 LOX-1 多肽形式的 LOX-1 基因,该 LOX-1N- 末端片段包含如 SEQID NO :3 所示的野生型大麦 LOX-1 的最多 665 个 N- 末端氨基酸。

12. 权利要求 11 的麦芽汁组合物,其中所述 LOX-1 基因中的突变是根据权利要求 1-6 中任一项的突变。

13. 权利要求 11 的麦芽汁组合物,其中所述大麦植物的所述部分是颗粒。

14. 权利要求 11 的麦芽汁组合物,其中所述麦芽组合物是权利要求 8-10 中任一项的麦芽组合物。

15. 权利要求 11-14 中任一项的麦芽汁组合物,其中利用酶组合物或酶混合剂组合物制备所述组合物。

16. 从 (i) 包含权利要求 1-6 中任一项的大麦植物细胞的组合物和 (ii) 权利要求 8-10 中任一项的磨碎的麦芽组合物的混合物制备的组合物。

17. 从权利要求 16 的组合物制备的麦芽汁组合物或饮料。

18. 具有稳定感官品质的饮料,其中所述饮料是通过加工大麦植物或其部分获得的,所述大麦植物在 LOX-1 基因中具有导致完全丧失功能的突变,所述突变生成编码由下述 LOX-1 N- 末端片段组成的 LOX-1 多肽形式的 LOX-1 基因,该 LOX-1N- 末端片段包含如 SEQ ID NO :3 所示的野生型大麦 LOX-1 的最多 665 个 N- 末端氨基酸。

19. 权利要求 18 的饮料,其中所述 LOX-1 基因中的突变是根据权利要求 1-6 中任一项的突变。

20. 权利要求 18 的饮料,其中所述饮料是啤酒。

21. 权利要求 18 的饮料,其中所述饮料是利用从所述大麦植物的颗粒制备的麦芽制备的。

22. 权利要求 18 的饮料,其中所述饮料是利用从大麦植物或其部分制备的麦芽汁组合物,或者从所述大麦植物或其部分制备的麦芽组合物制备的。

23. 权利要求 18 的饮料,其中所述饮料是从未发芽的大麦植物或其部分制备的。

24. 权利要求 18-23 中任一项的饮料,其中所述饮料是非发酵饮料。

25. 权利要求 18-23 中任一项的饮料,所述饮料内 9,12,13- 三羟基十八碳烯酸与 9,10,13- 三羟基十八碳烯酸比例最大是 1.8。

26. 利用大麦植物或其部分生产

(i) 食物组合物 ;或

(ii) 饲料组合物 ;或

(iii) 香味原料组合物 ;或

(iv) (i) 到 (iii) 的任何组合的方法,所述大麦植物在 LOX-1 基因中具有导致完全丧失功能的突变,所述突变生成编码由下述 LOX-1N- 末端片段组成的 LOX-1 多肽形式的 LOX-1 基因,该 LOX-1N- 末端片段包含如 SEQ ID NO :3 所示的野生型大麦 LOX-1 的最多 665 个 N- 末端氨基酸。

27. 包含大麦植物或其部分的食物组合物、饲料组合物或香味原料组合物,所述大麦植物在 LOX-1 基因中具有导致完全丧失功能的突变,所述突变生成编码由下述 LOX-1N- 末端片段组成的 LOX-1 多肽形式的 LOX-1 基因,该 LOX-1N- 末端片段包含如 SEQ ID NO :3 所示的野生型大麦 LOX-1 的最多 665 个 N- 末端氨基酸。

28. 生产具有稳定感官品质的饮料的方法,所述方法包括步骤 :

(i) 制备包含大麦植物或其部分的组合物,所述大麦植物在 LOX-1 基因中具有导致完全丧失功能的突变,所述突变生成编码由下述 LOX-1N- 末端片段组成的 LOX-1 多肽形式的 LOX-1 基因,该 LOX-1N- 末端片段包含如 SEQ ID NO :3 所示的野生型大麦 LOX-1 的最多 665 个 N- 末端氨基酸 ;

(ii) 将 (i) 的组合物加工成饮料 ;

从而获得具有稳定感官品质的饮料。

29. 权利要求 28 的方法,其中步骤 (i) 包括从所述大麦植物或其部分的颗粒制备麦芽组合物。

30. 权利要求 28 和 29 中任一项的方法,其中该方法更进一步地包含与 LOX 抑制剂一起温育。

31. 权利要求 28 的方法,其中将组合物加工成饮料包括糖化步骤。

32. 权利要求 31 的方法, 其中在所述糖化步骤期间添加 LOX 抑制剂。

33. 产生没有 LOX-1 活性的麦芽组合物的方法, 所述方法包括步骤:

(i) 提供来自大麦植物的颗粒, 所述大麦植物在 LOX-1 基因中具有导致完全丧失功能的突变, 所述突变生成编码由下述 LOX-1N- 末端片段组成的 LOX-1 多肽形式的 LOX-1 基因, 该 LOX-1N- 末端片段包含如 SEQ ID NO :3 所示的野生型大麦 LOX-1 的最多 665 个 N- 末端氨基酸;

(ii) 浸泡所述颗粒;

(iii) 在预先确定的条件下使浸泡的颗粒萌发;

(iv) 热处理萌发的颗粒;

从而制造没有 LOX-1 活性或 LOX-1 活性低的麦芽组合物。

## 产生风味稳定饮料的大麦

### [0001] 1. 发明领域

[0002] 本发明涉及植物生物技术,它公开了脂加氧酶 (LOX) LOX-1 合成有缺陷的大麦和麦芽,因此为产业使用提供了一种新原料。例如:所述原材料可以用来制造没有或仅有可忽略量的异味 (off-flavor) 化合物——反式 2-壬烯醛 (T2N) 的一种新的有特色的风味稳定啤酒。所述 T2N 由 LOX 路径中的酶的依次作用形成,其中 LOX-1 代表主要活性,它使亚油酸双氧化产生 9-过氧氢十八碳二烯酸 (9-HPODE)。本发明的大麦和植物产品显示出无 9-HPODE 或仅有可忽略量的 9-HPODE。另外,本发明涉及利用所述大麦和 / 或麦芽产生的饮料。

### [0003] 2. 发明背景

[0004] 与现代啤酒生产相关的研究目标之一是确定影响啤酒质量和稳定性的分子因素。大部分啤酒是以大麦 (*Hordeum vulgare*, L) 为基础生产的。大麦是单子叶作物,它生长在世界上的许多地方,这不仅是因为它作为工业产品来源,例如啤酒来源的经济重要性,而且也因为它是动物饲料的来源。美国现在是麦芽大麦 (malting barley) 的领先生产者之一,占世界农作物的大约 13%;加拿大、澳大利亚和欧洲合在一起占生产的大约 70% (Bios Intern., 2001)。

[0005] 为了研制出农艺学上可靠的稳定高产的栽培品种,大麦育种者不断努力。为了完成这一目标,已经尝试通过化学处理引起随机诱变,或者通过辐射修饰有兴趣的特性,例如改变一般对植物生长和农作物生产率,以及使由该农作物制造的产品具有额外品质的特性可能有有害作用的特异基因的表达。叠氮化钠  $\text{NaN}_3$  是诱变大麦的有用化学制剂已经得以很好建立。特别地,已经利用  $\text{NaN}_3$  衍生的诱变来诱导大麦中的遗传变化,以产生花色素苷和原花色素合成受阻的突变体 (von Wettstein et al., 1977; von Wettstein et al., 1985; Jende-Strid, 1991; Jende-Strid, 1993; Olsen et al., 1993)。第二个实例涉及用  $\text{NaN}_3$  诱变处理的大麦颗粒筛选高水平游离磷酸盐 (phosphate), 旨在鉴定低肌醇六磷酸盐 (phytate) 突变体 (Rasmussen and Hatzak, 1998); 从 2,000 个筛选的颗粒中总共鉴定出 10 个突变体。虽然大麦遗传学的主要缺点是不能通过反向遗传学具体研究基因功能,但是,例如,  $\text{NaN}_3$  诱导诱变后的向前遗传筛选 (forward genetic screens) 继续考虑与大麦和麦芽的营养和产品质量参数有关的改进。

[0006] 除在大体和一般方式中外,育种人员在常规植物育种过程中不能预计正在发育的新植物系的结果。这种不可预知性主要是由缺乏细胞水平的对照引起的,更具体地是由缺乏核 DNA 水平的对照引起的,其中核 DNA 的复杂性很高。许多其他的因素,例如植物繁殖地理位置的气候和土壤质量影响植物育种过程的结果。因此,使用常规方法的不同大麦育种人员决不会研制出具有相同特性的植物。在常规育种过程中,最困难的任务是鉴定遗传优良植物,其中优良不仅与有价值 (interest) 的特性,而且也与植物生长关联的生理学问题相关。当其他混淆特性掩蔽了目的特性时,选择过程会特别艰难。当现代植物育种方法包括突变基因 DNA 序列的确定时,确定过程是在育种计划晚期,即在突变体表征鉴定之后进行,例如,最近已经描述在拟南芥属 (*Arabidopsis*) 及其他植物中筛选化学方法诱导的突

变 (Colbert et al., 2001)。

[0007] 到目前为止,已经报告在完整基因组规模上对酿酒酵母创造以基因索引 (gene-indexed) 的功能损失突变 (Giaever et al., 2002)。对植物 *Arabidopsis* 来说,通过插入土壤杆菌属 (*Agrobacterium*) T-DNA 序列已经使 ~ 29,454 个预计基因中的 21,700 个基因失活 (Alonso et al., 2003)。

[0008] 到目前为止,从首次诱变或杂交到销售植物或种子的常规育种过程占用 > 10 年的时间的情形并不是罕见的。具体地,利用检测与目的特性相关的基因中的突变的方法提供植物育种者可能是优良的方法。这种改进将增强育种方案中可预测性的水平,特别是,当突变体的筛选针对在目的基因的蛋白质编码部分具有无义突变的那些时也会出现这一情形。在其它情况下, DNA 突变的早期鉴定也是优选的,例如利用以目的基因的启动子突变或影响表达的其他 DNA 突变为特征的系撤消更进一步的育种,这只是因为环境或生理学因素可以使诱变剂诱导的特性回复。因此,需要发现在育种计划早期检测有价值突变的可选择方法。这将使整个育种过程更快,并产生更高的经济利益,从而使土地上生产的谷物的量最大化。

[0009] 生产的大麦的主要部分包含通过大麦的可控浸泡、萌发和干燥步骤能将其种子 (kernels) 变成麦芽的制麦芽品种 (malting varieties)。小部分麦芽被用作食品工业的配料,而大部分麦芽随后在麦芽衍生饮料,包括但不限于啤酒和威士忌的生产中被用作主要配料 (ingredient)。在啤酒厂,磨碎的麦芽进行糖化 (mashing) 步骤,该步骤包括逐步升高麦芽水悬浮液的温度使部分酶降解,以及提取,例如颗粒聚合淀粉和  $\beta$  葡聚糖。过滤后,用酒花煮沸含水的麦芽醪 (mash) 产生麦芽汁 (malt)。随后用酵母使所述麦芽汁发酵产生啤酒产品,当啤酒产品成熟时将其装入瓶中。该麦芽汁也可以用于生产非发酵麦芽饮料。

[0010] 饮料的可口性和风味稳定性是与大麦和麦芽组合物相关联的重要因素。这是因为来源于所述大麦和麦芽的天然风味分子,或者在从所述大麦和麦芽中提取的酶的作用下产生的天然风味分子可以赋予最终产物不受欢迎的味道特性 (Drost et al., 1990)。在这方面,产生纸板味样风味的挥发性化合物的形成似乎具有特殊的生物化学效益和经济利益。在 1970 年,已经分离负责纸板样风味的分子,经鉴定它是九碳 (C<sub>9</sub>) alkenal T2N (Jamieson 和 Gheluwe, 1970)。因为人体内 T2N 的味觉阈值水平非常低,以前确定大约是 0.7nM 或 0.1ppb (Meilgaard, 1975),因此平均醛浓度极低的产品会因为该产品的异常味道而被认为是老化产品。而且,啤酒储存期间分解 T2N 加合物释放 T2N 可以引起该产品变质 (Nyborg et al., 1999)。

[0011] 对植物组织的放射性标记研究已经确定壬烯醛 (壬烯醛 s) 来源于 C<sub>18</sub> 脂肪酸亚油酸,而已醛和壬二烯醛是从 C<sub>18</sub> 脂肪酸亚麻酸形成的 (Grosch and Schwartz, 1971; Phillips and Galliard, 1978)。已经将这些研究和随后的许多观察结果,例如 Tijet 等 (2001), Noordermeer 等 (2001) 和 Matsui 等 (2003) 概括的观察结果解释为 T2N 是由 LOX 路径特异酶的连续作用形成,且 LOX 的作用代表早期酶催化步骤的证据。与这一观念一致, Kurodo 等 (2003) 发现麦芽包含将 LOX 产生的产物转化成 T2N 必需的热稳定酶因子。

[0012] 大麦颗粒 (kernel) 包含被称为 LOX-1、LOX-2 和 LOX-3 的三种 LOX 酶 (van Mechelen et al., 1999)。LOX-1 催化从亚油酸形成 T2N 前体——9-HPODE 和三羟基十八碳烯酸 (缩写为 "THOEs" 或仅为 "THAs"), LOX-2 催化亚油酸转化成 13-HPODE,其中 13-HPODE 更进一步地被代谢为己醛 (图 1B),己醛是味觉阈值水平为大约 0.4ppm 的 C<sub>6</sub> 醛

(Meilgaard, 上文)。虽然 LOX-3 的产品特异性仍然难以捉摸,但是 van Mechelen 等(上文)显示对应基因的表达水平极低,这表明它对 T2N 形成的贡献是可忽略的。正在进行研究以确定 LOX 活性是否是产生与 T2N 特异异味形成相关联的亚油酸过氧化氢前体的唯一酶来源,或者确定脂肪酸自动氧化步骤是否也参与该过程。值得注意的是 C18 过氧化氢物可以被超过七个不同家族的植物和动物酶更进一步地转换,其中所有反应统称为 LOX 路径 (Feussner and Wasternack, 2002); 该路径也被称为 oxylipin 路径。Oxylipins 就象他们的名称暗示的那样,是氧化的类脂衍生分子,该分子由 LOX 反应氧化不饱和脂肪酸产生,而且包括来源于这种氧化分子的任何分子。

[0013] 在 Douma 等的以 W002/053721A1 公开的 PCT 申请 PCT/IB01/00207 中公开了具有活性降低的 LOX-1 蛋白质的大麦颗粒和大麦植物。但是,所述申请没有教导用失活的 LOX-1 酶来产生和分析大麦颗粒。

[0014] 合成低水平 LOX 的突变植物的几个实例已经已知。例如:在 20 世纪八十年代早期已经鉴定三个大豆系,每个系的成熟大豆种子中缺乏这三个 LOX 酶中的一个:

[0015] (i) LOX-1。虽然 LOX-1 无效突变的分子基础仍然不确定,但它与缺少对应的成熟 mRNA 相关联 (Hildebrandt and Hymowitz, 1982; Start et al. 1986);

[0016] (ii) LOX-2。检测突变基因的转录产物,观察到将组氨酸配体替换到铁活性部位的导致酶不稳定的单个碱基变化 (Davies and Nielsen, 1986; Wang et al., 1994);

[0017] (iii) LOX-3。LOX-3 无效突变体可能是由于基因启动子中的顺式作用元件而没有显示出可检测水平的对应转录产物 (Kitamura et al., 1983; Wang et al., 1995)。

[0018] 在豌豆种子中,发现 LOX-2 无效系携带导致大多数 LOX-2 蛋白质缺失的缺陷 (Forster et al., 1999)。因为该系显示 LOX-2 mRNA 的量大大下降,这表明突变导致 mRNA 稳定性显著降低。

[0019] 在稻中,提取物的免疫印迹筛选显示存在两个天然栽培变种, Daw Dam 和 CI-115, 其中每个都缺乏三种 LOX 酶中的一种 (Ramezanzadeh et al., 1999)。已经确定在存储期间,具有全部三种 LOXs 的正常稻中的己醛、戊醛和戊醇的量被显著诱导,而 Daw Dam 和 CI-115 中的量却减少了 66% -80% 的范围。尽管结果表明稻谷中缺乏 LOX 酶会减轻氧化变质,但赋予 Daw Dam 和 CI-115 更少 LOX 特性的分子决定因素仍然难以捉摸。

[0020] 已经证明反义介导和共抑制介导的 LOX 基因的转基因消耗对阐明特异 LOX 酶和他们的对应产物在植物防卫信号发送中的功能有用。例如在拟南芥属 (*Arabidopsis*) 中,消耗 LOX 酶导致伤口诱导的茉莉酮酸积聚减少 (Bellet et al., 1995)。而且反义介导 LOX 编码基因消耗的结果确定对真菌病原体有抗力的烟草植物的不相容特性涉及对应的酶 (Rance et al. 1998)。其中已经用转基因方法来阐明 LOX 功能的第三个实例与马铃薯植物生长发育中的名称为 LOX-H1 的马铃薯 LOX 的作用有关 (León et al., 2002)。已经显示 LOX-H1 消耗导致挥发性脂肪族 C6 醛,参与植物防卫反应和作为创伤诱导的基因表达的信号分子或作为抗微生物物质的化合物的显著减少。更进一步的研究显示 LOX 酶的基因表达耗尽的转基因马铃薯植物显示出块茎发育异常 (Kolomiets et al., 2001)。但是,没有鉴定出解释块茎表型的具体 oxylipins。在另一个研究中,反义介导的马铃薯 LOX-H3 的消耗抑制植物的可诱导防卫反应,而且伴有更高的块茎产量 (Royo et al., 1999)。这些数据共同表明编码 LOX 酶的基因的表达在植物发育过程中很重要,其中一些 LOX 酶可能显示出防卫病原体

的作用,而另外的 LOX 酶产生可调节细胞发育的产物。

[0021] 注意到两个 LOX 酶水平降低 2-20% 的番茄果实的风味挥发物与野生型果实相比没有显示出显著变化也具有重要意义 (Griffiths et al., 1999)。这些发现表明极低水平的 LOX 足以产生醛和醇 (alcohol), 或者其他 LOX 酶在产生这些化合物的过程中是有活性的。

[0022] 饮食工业越来越多的意识到氧化酶,因为他们对与植物衍生产品风味和颜色有关的重要方面有影响。在这方面, LOXs 由于具有诱导自由基形成的能力引起了大家的兴趣,其中自由基能攻击其他成分,例如维生素,着色剂,酚和蛋白质等等。值得注意的是认为一些自由基在游离脂肪酸的自动氧化中起作用。一些产生自由基的物质可以经受热处理,因此在加工食物中仍然保留足够的活性,在产品存储期间仍会启动变质。

[0023] 抗氧化剂被广泛用作 LOX 抑制剂,其中一些抑制剂也抑制 LOX 底物的自动氧化。但是,没有鉴定出有用的作为饮料风味改善添加剂的 LOX 抑制剂。

[0024] LOX 酶的作用也与啤酒制造领域以外的问题相关,例如与抑制真菌污染敏感植物中真菌毒素形成的过氧氢脂肪酸的 LOX 催化产生相关,在 Keller 的美国专利 No. 5, 942, 661 中已经公开这一点。虽然 LOX 酶在植物防卫和创伤反应中的作用仍然不太清楚,但创伤和病原体攻击时会诱导该酶产生 (Bell and Mullet, 1991 ; Bell and Mullet, 1993 ; Melan et al., 1993 ; Sarvitz and Siedow, 1996)。LOX 酶在创伤和植物防卫中的作用可以是产生对抗病原体的活性脂肪酸氢过氧化物 (Rogers et al., 1988)。另外,应激反应可以诱导 LOXs 产生信号分子,例如茉莉酮酸甲酯 (Bell et al., 上文)。

[0025] 也已经描述,将在 LOX 酶的作用下产生的 13-HPODE 作为过氧化氢转换酶产生风味活性醛的底物的策略 (Noordermeer et al., 2002 ; Husson and Belin, 2002)。在许多专利,例如 Häusler et al 的美国专利 No. 6, 150, 145 和 Holtz et al 的美国专利 No. 6, 274, 358 中公开了类似步骤。

[0026] 而且,也已经显示 LOX 酶为面包制作贡献了几个有益效果 (Casey, 1997)。而且, Handa 和 Kausch 的美国专利 No. 6, 355, 862B1 已经公开抑制 LOX 的产生可以增强果实品质,例如使产品的保存期更长。

[0027] 3. 发明概述

[0028] 因为从基本上没有 LOX-1 活性的大麦植物制备的饮料将具有极低水平的 T2N, 因此对这种植物仍存在未满足的需要。另外,本发明显示从这种植物制备的饮料将具有极低水平的 9, 12, 13-THOE。而且,这种植物可用于其他目的。

[0029] 令人惊讶地,本发明公开了制备没有或有极少 LOX-1 活性的大麦植物的方法。特别地本发明公开了 LOX-1 基因的无效突变。本发明的预期收益包括从 LOX 路径的对应支路完全消除 T2N, 因此本发明提供了大麦颗粒中 T2N 水平的优良方法 ; 而且由这些颗粒产生的啤酒在延期储存之后由显示出特别的味道稳定性,即使在高温条件下也是如此。

[0030] 有趣的是,本发明也提供了早期突变检测的方法,因此晚期突变体表征鉴定的缺点已经被本发明解决。本发明利用吸引人的新方法产生改进的麦芽 (malting) 大麦栽培变种,在育种过程的早期时间点插入连续使用的突变体群体中的目标基因的表型鉴定和 DNA 序列确定。利用多种的植物育种方法可以更进一步地改进分离的植物。

[0031] 本发明解决了目前与大麦中活性 LOX-1 酶的存在有关的问题、限制和缺点。首先,



本发明提供了显著降低筛选化学诱变大麦时间和劳动量的效率高的新筛选方法。第二,本发明包括 LOX-1 无效新大麦,例如对生产风味稳定啤酒有用的大麦。

[0032] 如上所述的植物 LOX 突变体的理论背景技术涉及 LOX 活性水平降低的植物。相反,本发明通过提供有效产生 LOX-1 无效大麦植物的方法克服了与低 LOX 活性或残留 LOX 活性相关的限制和缺点。具体的差异包括:

[0033] (i) 与 Douma 等的以 W002/053721A1 公开的 PCT 申请 PCT/IB01/00207 中公开的大麦植物相比,本发明的植物基本上不包含 LOX-1 活性,优选植物是真正的 LOX-1 无效植物,即显示出完全缺乏 LOX-1 蛋白质功能的植物;

[0034] (ii) 通过筛选对应基因中无义突变的存在可以鉴定出这里描述的真正 LOX-1 无效的特性。因此,具有那种特性的大麦植物纯合子中活性酶的合成将被完全阻断,阻断与生长条件或环境效应无关。这是植物育种技术中的理想特性,对比背景技术中大豆 LOX 突变体可能的分子方案,其中生命或无生命状态可以影响细胞生理状态的变化使随后翻译 LOX 的 mRNA 稳定;

[0035] (iii) 大豆和稻 LOX 突变体中的有关特性包括主食中气味强烈的化合物——己醛的水平降低,本发明与饮料中特有的味道化合物 T2N 的较低水平和饮料中 9,12,13-THOE 的较低水平有关;

[0036] (iv) 大豆和稻 LOX 突变体受 13-HPODE 下游的 LOX 路径分子的影响,而 LOX-1 无效的特性与包含 9-HPODE 下游的分子的 LOX 路径的支路有关;

[0037] (v) 而该大豆突变体包括 LOX 基因的辐射诱导的突变, Daw Dam 和 CI-115 代表选择的稻育种系的天然发生的栽培变种,具有 LOX-1 无效特性的大麦植物中的突变是由化学制剂  $\text{NaN}_3$  诱导的。

[0038] 因此,提供包含的 LOX-1 活性小于野生型大麦植物的 LOX-1 活性的 5%,优选小于 1%的大麦植物,其部分或片段是本发明的目标。

[0039] 从包含的 LOX-1 活性小于野生型大麦植物 LOX-1 活性的 5%,优选小于 1%的植物提供种子或颗粒(kernel)是本发明的第二个目标。

[0040] 提供含有包含的 LOX-1 活性小于野生型大麦植物的 LOX-1 活性的 5%,优选小于 1%的大麦植物,其部分或片段的组合物是本发明的第三个目标。

[0041] 提供含有包含的 LOX-1 活性小于野生型大麦植物的 LOX-1 活性的 5%,优选小于 1%的加工的大麦植物的麦芽组合物是本发明的更进一步的目标。麦芽组合物优选可以是纯麦芽组合物。但是,麦芽组合物也可以是大麦和麦芽混和混合物。

[0042] 提供感官品质稳定的饮料也是本发明的目标,其中利用本发明的大麦植物或其部分制造所述饮料。特别地,优选利用麦芽组合物,例如上述的纯麦芽组合物或大麦和麦芽的混合物制造所述的饮料。在本发明的优选实施例中,所述饮料由啤酒组成。

[0043] 提供感官品质稳定的饮料是本发明的另外目标,其中利用大麦植物制造所述饮料,所述饮料中 9,12,13-三羟基十八碳烯酸(trihydroxyoctadecenoic acid)(在这里缩写为 9,12,13-THOE 或只表示为 9,12,13-THA)与 9,10,13-三羟基十八碳烯酸(在这里缩写为 9,10,13-THOE 或仅 9,10,13-THA)的比例最大是 1.8。所述饮料优选是啤酒。

[0044] 而且,本发明的目的是提供组合物,例如包含本发明的大麦植物或其部分的食物组合物、饲料组合物或香原料组合物是本发明的目标。

[0045] 另外,提供在本发明的大麦植物中表达重组蛋白质的方法是本发明的目标,其中所述方法包括用包含操作性连接的在大麦植物或其部分中可表达的启动子成分,编码所述重组蛋白质的 DNA 序列和转录终止区域的核酸序列转化所述植物,使所述重组蛋白质在所述大麦植物中表达。

[0046] 更进一步地,提供降低本发明的大麦植物中的蛋白质水平的方法是本发明的目标,其中所述方法包括用包含操作性连接的在大麦植物或其部分中可表达的启动子成分, DNA 序列和转录终止区域的核酸序列转化所述植物,使所述 DNA 序列的表达通过反义抑制或共抑制或 RNA 干扰降低编码所述蛋白质的基因的表达。

[0047] 因此,提供制备包含的 LOX-1 活性小于野生型大麦植物的 5%,优选小于 1%的大麦植物的方法是本发明另外目标,它包括步骤:

[0048] (i) 确定野生型大麦颗粒 (kernel) 或其部分的 LOX-1 活性 ;和

[0049] (ii) 诱变处理大麦植物和 / 或大麦颗粒和 / 或大麦胚,从而获得 M0 代大麦 ;和

[0050] (iii) 繁殖所述诱变处理的大麦植物、颗粒和 / 或胚至少 2 代,获得 Mx 代大麦植物,其中 X 是  $\geq 2$  的整数 ;和

[0051] (iv) 从所述 Mx 大麦植物获取颗粒或其部分 ;和

[0052] (v) 确定所述颗粒或其部分的 LOX-1 活性 ;和

[0053] (vi) 选择诱变处理的颗粒或其部分的 LOX-1 活性小于野生型或其部分的 LOX-1 活性的 5%的植物 ;

[0054] 从而获取包含的 LOX-1 活性小于野生型大麦植物的 LOX-1 活性的 5%的大麦植物。

[0055] 更进一步,本发明的目标是提供制造具有稳定感官品质的饮料的方法,该方法包括步骤:

[0056] (i) 提供本发明的麦芽组合物 ;

[0057] (ii) 将所述麦芽组合物加工成饮料 ;

[0058] 从而获取感官 (organoleptic) 品质稳定的饮料。

[0059] 本发明的另外目标是提供产生 LOX-1 活性低的麦芽组合物的方法,该方法包括步骤:

[0060] (i) 提供本发明的颗粒 ;

[0061] (ii) 浸泡所述颗粒 ;

[0062] (iii) 在预先确定的状态下使浸泡的颗粒萌发 ;

[0063] (iv) 加热处理萌发的颗粒 (kernel) ;

[0064] 从而产生 LOX-1 活性低或没有 LOX-1 活性的麦芽组合物。

[0065] 在一个优选实施例中,本发明以大麦突变体 D112(在这里也称为“突变体 D112”或“大麦 D112”)的功能研究的不可预知的结果为基础,其中显示主要的 9-HPODE 形成酶 LOX-1 的功能完全丧失。在设计的确定的 LOX 催化亚油酸转化后的产物分布图的生物化学测定中检测到 9-HPODE : 13-HPODE 的分布是 10% : 90%,这是一个令人惊奇的发现。考虑到 T2N 的味觉阈值非常低,因此突变体 D112 的颗粒中残余的 9-HPODE 等等的降解仅引起从所述颗粒的麦芽制造的啤酒产物在陈酿 (aging) 期间释放极低的 T2N,使 T2N 正好低于味觉阈值,这一点更令人惊奇。

[0066] 对利用野生型和 LOX-1 无效颗粒进行分析的结果的调查为 LOX-1 活性高可以增强

T2N的不新鲜纸板风味提供了明显的证据,因此证实了 LOX 路径在控制 alkenal 形成中的重要作用。这一结论与建议 LOX 活性仅有助于小部分 T2N 前体分子的 Liégeois 等(上文)的意见对立。

[0067] LOX-1 无效的特性可以被引入任何其他大麦植物,例如确立的大麦品种,如确立的麦芽大麦品种,因此允许产生保存限期延长的风味稳定的饮料。例如,可以通过本领域技术人员熟知的常规繁育方法来完成这一过程。该方法不仅不依赖突变体 D112 衍生大麦生长的地理区域,而且不依赖制造突变体 D112 衍生啤酒和出售给顾客的场所。突变体 D112 大麦植物或其衍生植物是种植该农作物的农场主和利用它作为啤酒生产或基于大麦的其他饮料生产的原材料的啤酒厂的潜在重要的经济因素。也预料依赖没有 9-HPODE/9-HPOTE 形成活性的原材料的其他应用将从大麦突变体 D112 的特性中受益。

[0068] 依照本发明的一个实施方案提供了几个新的麦芽大麦突变体,例如大麦突变体 D112 或大麦突变体 A618(在这里也称为“突变体 A618”或“大麦 A618”)。本发明因此涉及大麦突变体 D112 或 A618 的颗粒,大麦 D112 或 A618 植物,将大麦突变体 D112 或 A618 与自身或另一个大麦系杂交,衍生产生大麦植物的方法。而且,本发明包括通过诱变或转化大麦突变体 D112 或 A618 产生的 LOX-1 无效变体。因此,利用大麦突变体 D112 或 A618 或其衍生物作为亲本株产生的所有植物都在本发明的范围内。

[0069] 另一方面,本发明提供供组织培养大麦突变体植物 D112 或 A618 使用的可再生细胞。组织培养优选用于再生具有上述大麦植物特征,包括形态学和遗传学特征的植物。在这种组织培养中再生的细胞可能是胚、原生质体、分生细胞、愈伤组织、花粉、花药等等。应理解本发明提供了从本发明的组织培养再生的大麦植物。

[0070] 在一个优选实施例中,本发明包含来源于 LOX-1 无效大麦颗粒的麦芽。

[0071] 本发明也涉及从 LOX-1 无效大麦植物或其部分或者从这种大麦植物制备的麦芽组合物制备的麦芽汁组合物。

[0072] 本发明更进一步地包括饮料,例如利用本发明的 LOX-1 无效大麦颗粒或来源于所述颗粒的麦芽制造的啤酒。

[0073] 另外,本发明涉及由 LOX-1 无效大麦植物或其部分产生的植物产品。所述植物产品可能是加工处理所述大麦植物或其部分产生的任何产品。优选的,所述植物产品选自由麦芽、麦芽汁、发酵饮料,例如啤酒、非发酵饮料、食物产品,例如大麦粉和饲料产物组成的组。

[0074] 提供显示出不能与野生型大麦植物相区别的抗病力水平或显示出具有改进的抗病力的 LOX-1 无效大麦颗粒也是本发明的目标。

[0075] 更进一步地,本发明包括 LOX-1 无效大麦颗粒和来源于所述颗粒的麦芽,其中颗粒和麦芽都显示真菌毒素水平降低。

[0076] 而且本发明也包括相对于野生型植物,抗病性增强的 LOX-1 无效大麦品种。更进一步地公开了相对于野生型植物,抗病性降低的 LOX-1 无效大麦品种,条件是所述植物的其他特性提供了比抗病性降低特性更重要的益处。

[0077] 另外,本发明提供可用于产生 LOX 路径衍生的香料,包括青香韵(greennote)化合物的 LOX-1 无效大麦颗粒。

[0078] 而且,本发明提供 LOX-1 无效大麦突变体 D112 或 A618 的转基因植物或其衍生植

物,其中插入的基因赋予如除草剂抗性、杀虫性、细菌、真菌或病毒疾病抗性、增强的营养价值和在产业中使用的特性。基因可以是内源大麦基因,或可选地通过基因工程方法插入的转基因。

[0079] 最后,本发明提供利用 LOX-1 抑制剂降低 LOX-1 活性的方法。通过所述方法获取的植物产品或来源于植物的产品,包括饮料和啤酒可以具有与以 LOX-1 无效大麦作为原材料制备的产物相似的特性。

[0080] 参照下列定义、说明书、实施例、附加的权利要求书,伴随的序列表和附图可以更好地理解本发明的这些及其他特征、方面和优点。

[0081] 3.1 定义

[0082] 在随后的说明书、附图和表中使用了许多术语。为了提供说明书和权利要求书,包括这些术语限定的范围,提供了下列定义:

[0083] 这里使用的“a”可以指一个或多个,这取决于使用它的上下文。

[0084] 术语“农学特性”描述的是有助于所述植物的性能或经济价值的植物表型特性。这种特性包括抗病性、杀虫性、抗病毒性、抗线虫性、干旱耐受性、高盐度耐受性、产量、株高、成熟天数、颗粒的等级(grading)(即颗粒的大小分级)、颗粒的含氮量等等。

[0085] “反义核苷酸序列”指方向与核苷酸序列正常编码的5' -3' 方向相反的序列。当存在于植物细胞中时,反义 DNA 序列优选抑制内源基因核苷酸序列的正常表达,因此可以破坏对应天然蛋白质的产生。

[0086] 与啤酒制造过程有关的术语“大麦”,特别是用来描述麦芽制造过程的术语“大麦”指大麦颗粒。在其他情形下,除非另作说明,否则“大麦”指包括任何品种的大麦植物(*Hordeum vulgare*, L)。

[0087] “抗病性”指植物避免出现是植物病原体相互作用结果的疾病症状。这样就可以阻止病原体引起植物疾病和相关的疾病症状,或疾病症状。或者,病原体引起的疾病症状被减到最低程度或降低了。

[0088] 在此公开文本中限定的“谷类”植物是禾本科(Graminae)植物家族的成员,其中耕种禾本科植物家族主要是为了获取他们的含淀粉种子。谷类植物包括,但不局限于大麦(*Hordeum*属)、小麦(*Triticum*属)、稻(*Oryza*属)、玉蜀黍(*Zea*属)、黑麦(*Secale*属)、燕麦(*Avena*属)、高粱(*Sorghum*属)、Triticale 和黑麦-小麦杂交种。

[0089] 在特定核酸上下文中的“编码”或“编码的”指包含翻译成特定蛋白质的信息。编码蛋白质的核酸在核酸翻译区内可以包含非翻译序列(例如,内含子),或者可以缺乏这种插入的非翻译序列(例如,在 cDNA 中)。利用密码子对编码蛋白质的信息进行说明。

[0090] 这里在核酸上下文中使用的“表达”应理解为来源于核酸片段的有义 mRNA 或反义 RNA 的转录和积聚。在蛋白质上下文中使用的“表达”指将 mRNA 翻译成多肽。

[0091] “风味分子”指制造的是植物中气味和/或味道成分的醛和/或醇(alcohol)。特别地,风味分子包括某些挥发性醇和醛。挥发性的风味分子的实例包括,但是不限于己醛、(3Z)-己烯醛、(2E)-己烯醛、(2E)-己烯醇、(3Z)-壬烯醛、(2E)-壬烯醛。本发明可用于调节植物中风味分子的水平。

[0092] 术语“基因”指参与产生多肽链的 DNA 片段;它包括在编码区之前和之后的区域(启动子和终止子)。真核基因间断编码蛋白质,由被内含子中断的外显子组成。在转录成

RNA 以后,通过拼接除去内含子产生成熟信使 RNA (mRNA)。典型地,通过作为拼接过程的拼接信号的共有序列确定外显子之间的“拼接位点”,拼接过程由从初级 RNA 转录产物缺失内含子和在切除的内含子的任一侧连接或融合剩余 RNA 的末端组成。有时轮流的拼接模式或不同的拼接模式可以从相同的单个 DNA 范围产生不同的蛋白质。天然基因被可以称为内源基因。

[0093] “基因沉默”是改变基因表达的方法。它指 RNA 沉默, RNA 沉默是各种生物体之间保守的翻译后基因沉默机制。该方法包括翻译后基因沉默 (PTGS) 和 RNA 干扰 (RNAi)。PTGS 是内源和外源同源基因的基因沉默现象。虽然关于 PTGS 的大多数实例与共抑制构建物或转基因反义方向的表达所引起的效果有关,但是在常规育种计划的植物中也已经观察到这一现象,例如在稻中的 Lgcl 突变 (Kusaba et al., 2003)。已经发现这一突变通过 RNA 沉默抑制谷蛋白表达,可能是由于在两个高度相似的谷蛋白基因之间删除 3.5kbp 后形成了尾到尾反向重复,而这种重复可以产生成为 RNA 沉默的有效诱导物的双链 RNA 分子。RNA 沉默的第二种形式被称为 RNA 干扰 (RNAi), RNAi 的基本前提是双链 RNA 注入或摄取到细胞中时具有特异阻断其同源基因表达的能力。

[0094] 这里使用的与核酸有关的“异源”指来源于外来物种的核酸,或者指来源于相同物种的,通过人的故意干预从组合物的天然形式和 / 或基因组位点获得的基本上被修饰的核酸。

[0095] 这里使用的术语“萌发”(germination)指在各种组合物中,例如在自然界中发现的普通土壤中,大麦颗粒开始或恢复生长。萌发也可以在放入生长室的盆的土壤中进行,或者,例如可以在放入标准实验室 Petri 培养皿的湿滤纸上进行。一般理解的萌发包括颗粒的水合作用、颗粒的膨胀和诱导胚生长。影响萌发的环境因素包括湿度、温度和含氧量。观察根和芽的发育。

[0096] “青香韵”是描述存在于许多植物中的挥发性风味和香料分子的术语,表现感官术语鲜绿和草绿的特性。植物中类脂和游离脂肪酸,例如亚油酸和亚麻酸的降解会产生这些分子。

[0097] 这里使用的术语“分离的”指从原料的原始环境中除去该原料。例如:存在于活生物中的天然发生的多核苷酸或者多肽不是分离的,而与天然系统中的一些或全部共存原料分离的相同的多核苷酸或多肽是分离的。这种多核苷酸可以是载体的一部分和 / 或这种多核苷酸或多肽可以是组合物的一部分,但他们仍然是分离的,因为这种载体或组合物不是它的天然环境的一部分。

[0098] 限定术语“颗粒”包括谷类颖果,也称为内部种子 (internal seed),外稃和内稃。在大多数大麦品种中,外稃和内稃附着于颖果,而且是脱粒后的颗粒的一部分。但是,存在裸大麦品种。在这些大麦中,颖果没有外稃和内稃,因此象小麦一样,捶击 (thresh out) 就可以释放颖果。术语“颗粒”和“谷粒”谷颗粒 (grain) 在这里可交换使用。

[0099] “颗粒成熟”或“谷物发育”指开始于储存可代谢的储备物,例如糖、低聚糖、淀粉、酚醛塑料、氨基酸和蛋白质的施肥,结束于颗粒(谷粒)脱水的周期,其中施肥过程有和没有液泡靶向到颗粒(谷粒)的各种组织,例如胚乳、外种皮、糊粉和角质鳞片,导致颗粒(谷粒)膨大、颗粒(谷粒)装满。

[0100] 术语“LOX-1 活性”指大麦 LOX-1 酶的酶活性。特别地,在本发明的上下文

中“ LOX-1 活性”是 LOX-1 酶催化亚油酸双氧化成 9-HPODE。即使 LOX-1 能够催化其他反应,但为了依照本发明确定 LOX-1 的活性仍应仅考虑形成 9-HPODE 的活性。图 1B 概述了把亚油酸转化为 T2N 的生物化学路径。

[0101] 术语“低 LOX”指在一个或几个内源基因中存在一个或几个突变,导致特定 LOX 酶的功能部分损失,优选指,但不局限于酶活性的损失。例如:在 Douma 等的以 W002/053721A1 公开 PCT 申请 PCT/IB01/00207 中公开的大麦植物产生了与对应的野生型酶相比,具有 10%残余活性的突变的 LOX-1 酶。“低 LOX”的植物指特定 LOX 酶功能部分损失的植物。

[0102] “麦芽制造”(maltng)是大麦颗粒在可控的环境条件下,包括但不限于在麦芽浸泡池和萌发箱中进行的特殊萌发形式。与本发明的这一步骤一致,萌发过程在浸泡大麦颗粒期间和/或已经浸泡大麦颗粒之后开始发生。可以通过干燥大麦颗粒停止萌发过程。应理解从 LOX-1 无效大麦制备的麦芽组合物包括 LOX-1 无效麦芽,例如纯 LOX-1 无效麦芽或包含 LOX-1 无效麦芽的任何混合物。

[0103] “糖化”(mashing)是在水中温育磨碎的麦芽。优选在特定的温度和特定体积的水中进行糖化。温度和水的体积很重要,因为他们会影响来源于麦芽的酶活性下降的速率,因此特别会影响发生的淀粉水解的量。存在添加剂时可以发生糖化,应理解添加剂包含除麦芽以外的任何碳水化合物来源,例如主要作为提取物的另外来源的大麦(包括 LOX-1 无效大麦)、玉蜀黍和稻添加剂。在啤酒厂加工处理添加剂的要求取决于使用的添加剂的状态和种类,特别是取决于淀粉胶化或液化的温度。如果胶化温度超过正常的麦芽糖化温度,那么在添加淀粉到碎麦芽中之前淀粉就被胶化和液化。

[0104] “突变”包括基因编码区和非编码区的缺失、插入、颠换和点突变。缺失可以是缺失整个基因或仅缺失基因的一部分。点突变可以产生终止密码子,移码突变或氨基酸替换。体细胞突变是那些仅仅发生在植物的某些细胞或组织中,但不遗传到下一代的突变。在植物的任何细胞中可以发现种系突变,这种突变可以遗传。

[0105] 术语“无效的 LOX”指在 LOX 编码基因内存在突变,导致编码的 LOX 酶的功能完全丧失。在编码 LOX 的基因中产生早熟终止(无意义)密码子的突变仅代表一个可以使功能完全丧失的机制。使 LOX 酶功能完全丧失的分子方法包括产生导致所述酶的转录产物完全缺失的突变,或产生使编码的酶完全失活的突变。“无效的 LOX”的植物指特定 LOX 酶功能完全丧失的植物。

[0106] “操作性连接”是用来指关联单个多核苷酸上的两个或更多个核酸片段,使一个片段的功能受另一个的影响的术语。例如:当启动子能够影响编码序列的表达,即编码序列位于启动子的转录控制下时,启动子是操作性地与编码序列连接的。可以以有义或反义方向将编码序列操作性地与调节序列连接。

[0107] “PCR”或“聚合酶链反应”是本领域熟练技术人员熟知的用于扩增特异 DNA 片段的技术(Mullis 等的美国专利号 Nos. 4,683,195 和 4,800,159)。

[0108] “植物”或“植物材料”包括植物细胞、植物原生质体、从中可以再生大麦植株的植物细胞组织培养物、植物愈伤组织,植物或植物部分,例如胚、花粉、胚珠、花、颗粒、叶、根、根尖、花药中完整的植物细胞,或植物的任何部分或产品。

[0109] 术语“植物产品”指由加工处理植物或植物部分产生的产品。因此所述植物产品

可以是麦芽、麦芽汁、发酵或非发酵饮料、食品或饲料产品。

[0110] 这里使用的与蛋白质有关的“重组体”指来源于外来物种的蛋白质，或者指来源于相同物种的，通过人的故意干预从组合物的天然形式获得的基本上被修饰的蛋白质。

[0111] “RNA 转录产物” (transcript) 指由 RNA 聚合酶催化 DNA 序列转录产生的产物。当 RNA 转录物是 DNA 序列的完全互补拷贝时，称它为初级转录产物。当 RNA 序列来源于初级转录物的翻译后处理时，称它为成熟 RNA。“信使 RNA”或“mRNA”指没有内含子，而且能够被细胞翻译成蛋白质的 RNA。“cDNA”指与来源于 mRNA 模板，与 mRNA 模板互补的 DNA。cDNA 可以是单链的，或者可以利用例如，DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段将其变成双链形式。“有义 RNA”指包括 mRNA，因此能被细胞翻译成多肽的 RNA 转录产物。“反义 RNA”指与初级靶转录产物或 mRNA 的全部或部分互补，而且能阻断靶基因表达的 RNA 转录产物。反义 RNA 的互补性可以指与特定核苷酸序列的任何一部分，即 5' 非编码序列、3' 非编码序列、内含子或蛋白质编码序列互补。“功能 RNA”指有义 RNA，反义 RNA，或者其他的可以不被翻译成蛋白质，但对细胞过程有影响的 RNA。

[0112] 除非另作说明，否则“T<sub>2</sub>N”指 T<sub>2</sub>N 的游离形式。术语“潜在 T<sub>2</sub>N” (T<sub>2</sub>Npotential) 描述的是具有在一个或多个反应中释放 T<sub>2</sub>N 的能力，或具有被转化成 T<sub>2</sub>N 的能力的化学物质。可以在高温（例如，100℃）和低酸度（例如 pH 4.0）条件下温育（例如，2h）的溶液，例如麦芽汁或啤酒中 T<sub>2</sub>N 的浓度测量潜在 T<sub>2</sub>N。样品处理使 T<sub>2</sub>N 从潜在的 T<sub>2</sub>N，例如从“T<sub>2</sub>N 加合物”释放，其中 T<sub>2</sub>N 加合物是用来描述连接到一种或多种物质，包括但不限于蛋白质、亚硫酸盐、细胞碎片、细胞壁等等上的 T<sub>2</sub>N 的术语。通常 T<sub>2</sub>N 加合物本身不会被人感觉到作为异味。但是，通过加热或酸从所述 T<sub>2</sub>N 加合物释放的 T<sub>2</sub>N 可以产生异味。

[0113] “组织培养”显示包含相同或不同类型的分离的细胞或这种细胞的集合的组合物构成植物的一部分，例如原生质体、愈伤组织、胚、花粉、花药等等。

[0114] “转化”指将 DNA 插入生物体中，以便将 DNA 作为染色体外元件（没有整合和稳定遗传）或染色体组成部分（遗传学上稳定遗传）保持。除非另有说明，否则这里使用的转化大肠杆菌的方法是 CaCl<sub>2</sub> 方法 (Sambrook and Russel, 上文)。为了转化大麦，除了使用另一个栽培变种，例如栽培变种 Golden Promise 作为宿主外，基本上可以按照 Tingay 等 (1997) 和 Wang 等 (2001) 的描述实施农杆菌介导的转化。

[0115] “转基因”是通过转化过程导入基因组的基因。

[0116] 这里使用的“转基因的”包括通过引入异源核酸已经被修饰的细胞或由这种修饰的细胞衍生而来的细胞。因此，例如：转基因细胞表达未以相同形式在细胞的天然形式中被发现的基因，或者表达由于人的故意干预另外异常表达、低表达或非根本不表达的天然基因。这里使用的术语“转基因”植物，特别是大麦植物不包括通过传统植物育种方法产生的细胞改变，例如 NaN<sub>3</sub> 衍生的诱变，以及通过天然发生事件，例如人没有故意创造发生的那些事件产生的细胞改变。

[0117] 术语“野生型大麦植物”指常规大麦植物，该术语优选指从中可以衍生本发明的大麦植物的大麦植物，即亲本株。在本发明的一个优选实施方案中，“野生型大麦植物”选自由 cv. sCeleste、Lux、Prestige、Saloon 和 Neruda 组成的组。更优选的“野生型大麦植物”是栽培变种 Barke。通常从普通的种子可获得野生型大麦栽培变种或者其种子。

[0118] 4. 序列表简述

[0119] 参考下列构成本申请一部分的详细的说明书和伴随的序列表(概括在表9中)可以更充分地理解本发明。所述的表列出了这里描述的核酸和多肽, cDNA 克隆的名称包括编码代表这些多肽的全部或重要(substantial)部分的多肽的核酸片段和对应的标识符[SEQ ID NO: ]。在此附上的序列说明和序列表遵守管理专利申请中核苷酸和/或氨基酸序列公开的规则。

[0120] 序列表包含限定和标准化介绍一致的核苷酸和氨基酸序列的一字母代码(Cornish-Bowden, 1985; IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature, 1984), 在此将其引入作为参考。核苷酸和氨基酸序列数据使用的符号和格式遵守管理专利申请中序列公开的规则。

[0121] 5. 附图简述

[0122] 图1被分成三个流程图表A、B和C。图1A显示怎样繁殖NaN3诱变处理的大麦颗粒。M0代的颗粒生长为形成M1代颗粒的植物。可以播种这些M1代颗粒, 让其发展成为产生M2代新颗粒的M1植物。接下来, M2植物生长, 并产生可以收获进行筛选分析的M3代颗粒。也可以播种M3种子, 利用对应植物的花进行杂交获取M4代植物。图1B是生物化学LOX路径怎样降解亚油酸, 并最终产生T2N的简化图表。图1C举例说明亚油酸怎样在LOX-1作用下被变成对应的9-过氧氢酸(9-hydroperoxy acid)(9-HPODE), 接下来是通过环氧醇合成酶(epoxy alcohol synthase)和环氧水解酶更进一步的酶转化变成9, 12, 13-三羟基-10-十八碳烯酸(9, 12, 13-THOE)。

[0123] 图2是测量的cv Barke、突变体D112的胚提取物和包含加热失活的cv. Barke胚提取物的对照样品的总LOX活性的图解比较。

[0124] 图3显示的是测量的突变体A618、cv. Neruda的胚提取物和包含加热失活的cv. Barke胚提取物的对照样品的总LOX活性的图解比较。

[0125] 图4显示的是测量的突变体D112的M4子代系的12个独立颗粒的总LOX活性的比较。由cv. Barke颗粒提取物组成的对照样品和cv. Barke加热失活的颗粒提取物的活性被归入进行比较。

[0126] 图5概括了对突变体D112的M5子代系的90个独立颗粒提取物的总LOX活性进行分析的结果。cv. Barke对照颗粒提取物和cv. Barke加热失活的颗粒提取物的活性被归入进行比较。

[0127] 图6对测量的突变体A618的M4子代系的40个独立颗粒的提取物的总LOX活性的比较进行了概括。对照样品cv. Barke颗粒提取物和cv. Barke加热失活的颗粒提取物的活性被归入进行比较。

[0128] 图7由两个分离的免疫印迹组成, 显示突变体D112, M3代的颗粒提取物中的免疫活性LOX-1蛋白质是不可检测的。每个免疫印迹用针对大麦LOX-1的抗体作探针, 样品由表达重组LOX-1的大肠杆菌细胞的提取物(第1道)、cv. Vintage(第2道)、突变系G(第3道和第7道)、cv. Barke(第6道和第8道)和突变体D112的分离系、M3代(第4-5和9-16道)的颗粒提取物组成。标明了免疫活性LOX-1蛋白质的位点。

[0129] 图8显示了详述突变体A618、M3和M4代的颗粒提取物中缺乏LOX-1的两个分离的免疫印迹。每个免疫印迹用针对大麦LOX-1的抗体作探针, 样品由突变系G(第1道)、



cv. Neruda(第6道和第16道)的颗粒提取物组成。分别在第2-5和8-12道分离了随机选择的没有通过 LOX 选择过程的 M3 和 M4 颗粒的提取物;所有这些提取物包含 LOX-1 免疫活性蛋白质。突变体 A618、M3 代(第7道)的颗粒提取物的 LOX-1 无效的表型在突变体 A618-82 的分离的 M4 子代系(8-12道)中被遗传。标明了免疫活性 LOX-1 蛋白质的位点。

[0130] 图9概略说明了从突变体 D112 到 cv. Prestige 的回交程序的遗传学。野生型 LOX-1 特性被指定为 NN,而 LOX-1 无效的突变体特性是 nn。对具有下划线所示基因型的植物进行杂交。

[0131] 图10提供了七个分离的免疫印迹的图,其中每个免疫印迹都用针对大麦 LOX-1 的抗体作探针。免疫印迹显示在突变体 D112 到 cv Prestige 的第一回交代的分离植物的颗粒(第1-6道和第9-14道)中存在或者缺少免疫活性 LOX-1 蛋白质,在突变体 D112 到 cv Prestige 的第二回交代的颗粒(第17-22道,第25-30道,第33-38道,第41-45道和第48-52道)中存在或者缺少免疫活性 LOX-1 蛋白质。缺乏免疫活性 LOX-1 的突变体 D112 的对照颗粒提取物(第7、15、23、31、39、46、53道)和包含免疫活性 LOX-1 的 cv. Prestige(第8、16、24、32、40、47、54道)被用作对照。标明了免疫活性 LOX-1 蛋白质的位点。

[0132] 图11是没有使用添加剂,但包括浸泡大麦谷粒(1)、发麦芽(malting)(2)、窑烘(kiln)(3)、碾磨干燥的麦芽(4)、糖化(5)、过滤(6)、在添加酒花的情况下煮沸麦芽汁(wort boiling)(7)、在存在酵母的情况下发酵(8)、啤酒成熟(9)、啤酒过滤(10)、包括但不限于包装到瓶,罐等容器中的包装(11)和贴标签(12)的啤酒生产过程的简单图解概述。这些独立的步骤可以集成包含生产麦芽(1-3)、生产麦芽汁(4-7)、发酵(8-9)和制备成品(finished)啤酒(10-12)的部分。

[0133] 图12集中描述了利用来源于 LOX-1 无效突变体 D112 的大麦的麦芽生产的啤酒的特征。图12A 举例说明了在 37°C 强迫陈酿 4 周期间游离 T2N 的积聚。测量了由 LOX-1 无效突变体 D112 的麦芽(▲)和 cv. Barke 的对照麦芽(●)制备的啤酒中的醛。啤酒中 T2N 的味觉阈值是大约 0.05ppb。图12B 提供了啤酒品尝小组对 20°C 温育 12 个月的啤酒的独立味道特征进行评价后搜集的数据的图解表示。啤酒是由来源于 cv. Barke 大麦(实心条)或 LOX-1 无效突变体 D112 的大麦(空心条)的麦芽制成的。

[0134] 图13显示了用来测定大麦组织中 9-和 13-HPODEs 形成的 HPLC 分析的色谱图。通过测量 234nm 处的吸光度对 HPODEs 水平进行分析,以毫吸光度单位(mAU)给出结果。用箭头标明了洗脱图中相当于 9-HPODE 和 13-HPODE 的峰。图13A 显示 9-HPODE 和 13-HPODE 标准品的色谱图。图13B 是从 cv. Barke 的成熟胚制备的提取物中形成的 HPODEs 的色谱图。图13C 是从低 LOX 颗粒的成熟胚制备的提取物中形成的 HPODEs 的色谱图。图13D 是从 LOX-1 无效突变体 D112 的成熟胚制备的提取物中形成的 HPODEs 的色谱图。

[0135] 图14描述了用来测定麦芽中 9-和 13-HPODEs 形成的 HPLC 分析的色谱图。通过测量 234nm 处的吸光度对所述 HPODEs 水平进行分析,以毫吸光度单位(mAU)给出结果。用箭头标明了洗脱图中相当于 9-HPODE 和 13-HPODE 的峰。图14A 显示 9-HPODE 和 13-HPODE 标准品的色谱图。用箭头标明了相当于 9-HPODE 和 13-HPODE 的色谱峰。图14B 是来自 cv. Barke 的麦芽的提取物中形成的 HPODEs 的色谱图。图14C 是来自低 LOX 大麦的麦芽的提取物中形成的 HPODEs 的色谱图。图14D 是来自 LOX-1 无效突变体 D112 的麦芽的提取物中形成的 HPODEs 的色谱图。

[0136] 图 15 是显示跨越起始密码子 (ATG) 和终止密码子 (TAA) 的大麦 LOX-1 基因结构的图。长 4,165bp 的序列的示意图显示出 7 个外显子 (填充盒) 和 6 个内含子 (线)。用箭头标明了经鉴定的 LOX-1 基因中的突变位点,即突变系 G (低 LOX), 突变体 A618 和突变体 D112 特异的突变位点。

[0137] 图 16 概括了预计的与野生型大麦植物、突变体 A618 和突变体 D112 大麦植物的 LOX-1 基因相关的分子差异。列在栏中的标明为“结果”、“氨基酸长度和”以 kDa 为单位的质量”的信息是从 DNA 序列预计的。

[0138] 图 17 提供了用来实施 RT-PCR 突变体分析和验证与编码 LOX-1 的大麦基因相关的转录产物的方法。A 中概略显示了用 RT-PCR 检测 cv. Vintage 和低 LOX-1 突变系 G 的正在发育的胚中的编码 LOX-1 的基因的特定转录产物的原理。引物由与位于长 83bp 的内含子 5 侧面的外显子复性的 FL821 [SEQ ID NO :11] 和 FL852 [SEQ ID NO :12] 组成;标明了使用基因组 DNA 模板或者 mRNA 模板的 PCR 产物的差异。B 显示了焦点在于检测正在发育的 cv. Vintage 和突变系 G 的胚中与编码 LOX-1 的基因相关的特定转录产物的 RT-PCR 琼脂糖凝胶分析的结果。第 1 和 5 道包含标记片段,第 2、3 和 4 道分别包含来源于开花 (DAF) 20、40 和 60 天后的 cv. Vintage 的胚组织的 PCR 产物。第 6、7 和 8 道分别包含来源于 DAF 20、40 和 60 天后的突变系 G 的胚组织的产物。在 C 中,第 1-5 道显示与 B 中第 1-5 道详述的实验类似的实验的结果,而第 6、7 和 8 道分别包含来源于 DAF 20、40 和 60 天后的突变体 D112 的胚特异的 LOX-1 基因转录产物的 RT-PCR 检测的产物。D 中显示了由 LOX-1 基因特有的 RT-PCR 片段的测序反应产生的电泳图谱。序列分析显示 RT-PCR 目标 RNA 中没有 DNA。黑色三角形指向显示转录产物正确拼接的拼接点。

[0139] 图 18 详述了大麦突变体 D112 的 SNP 协助检测的结果。分析以每个样品使用两组 PCR 反应产生特定的 PCR 片段模式为基础,在 A 中进行了大概说明 (引物组合 1 由 FL820 [SEQ ID NO :13] 和引物 FL823 [SEQ ID NO :15] 组成,引物组合 2 由 FL820 [SEQ ID NO :13] 和引物 FL825 [SEQ ID NO :14] 组成。B 中显示了良种育种材料的 PCR 模式分析的结果。对植物的基因组 DNA 进行 PCR 分析。利用引物组合 1 (偶数道) 或引物组合 2 (奇数道) 的结果显示在第 2-3 道 (植物 1)、第 4-5 道 (植物 2)、第 6-7 道 (植物 3)、第 8-9 道 (植物 4)、第 10-11 道 (植物 5)、第 12-13 道 (植物 6)、第 14-15 道 (植物 7)、第 16-17 道 (植物 8) 和第 18-19 道 (植物 9) 中。与 A 中显示的带型进行比较显示植物 1、2、4、5、7 和 8 是纯合子突变体,而植物 3、6 和 9 的基因型可以被分为纯合子野生型。在第 1 和 20 道分离了标记 DNA。

[0140] 图 19 表明了对包含突变体 G 或突变体 D112 的原料的大麦样品进行多重 SNP 分析的原理。使用多重 PCR 反应分析,这样使扩增片段的长度与所添加材料的基因型有关。370-bp 片段的扩增将显示麦芽样品包含来源于突变系 G 的材料,而 166-bp 片段的扩增将表明存在来源于突变体 D112 的材料。图 A 是详述特异引物怎样配对的简图,其中每个引物对都具有一个包含特异性针对目的突变体的序列的引物 (星号指突变系 G 的 LOX-1 的基因组克隆的核苷酸编号 2279 和突变体 D112 的位点 3574)。引物组合 FL918 [SEQ ID NO :16] 和 FL920 [SEQ ID NO :17] 用于检测突变系 G 特异突变,而 FL820 [SEQ ID NO :13] 和 FL823 [SEQ ID NO :15] 被用来检测突变体 D112 特异的碱基变化。B 中显示样品中突变体特异材料 (第 2-7 道:突变系 G;第 8-13 道:突变体 D112) 的相对量怎样增强特异 PCR 片段的合成 (第 2 和 8 道:没有添加突变体材料;第 3 和 9 道:添加了 20% 的突变体材料;第 3 和 9 道:添加

了 20% 的突变体材料 ;第 4 和 10 道 :添加了 40% 的突变体材料 ;第 5 和 11 道 :添加了 60% 的突变体材料 ;第 6 和 12 道 :添加了 80% 的突变体材料 ;第 7 和 13 道 :添加了 100% 的突变体材料)。第 1 道由标记片段组成。

[0141] 图 20 给出了来自用载体质粒 pET19b(第 2-5 道)、表达质粒 pETL1(第 6-10 道)和表达质粒 pETL2(第 11-15 道)转化的大肠杆菌细胞的亲和纯化的 His 标记的 LOX-1 的 SDS-PAGE 的结果。分析了来自包含非结合蛋白质(第 2,6,11 道);第一洗液(第 3,7,12 道);第二洗液(第 4,8,13 道);第一洗脱物(第 5,9,14 道)和第二洗脱物(第 10,15 道)的部分的蛋白质。上部的箭头标明了重组 LOX-1(相当于野生型 LOX-1)的位置,下部的箭头标明了截短的重组 LOX-1(相当于大麦突变体 D112 中 LOX-1)的位置。第 1 道包含分离的标记蛋白质。

[0142] 图 21 举例说明了转化大麦的质粒插入物。A 中举例说明了由玉蜀黍泛素 -1 启动子和内含子 1(一起称为 UBI 启动子)组成的指导 bar 基因(BAR)基本表达的表达盒,其中 bar 基因编码可选择的标记膦丝菌素乙酰转移酶。NOS 终止序列(N)提供转录终止。B 中举例说明了由上述 UBI 启动子组成的以有义或反义方向指导大麦 LOX-1 的 cDNA 序列的基本表达的表达盒。C 中举例说明了由 UBI 启动子组成的指导包含内含子的发夹式构建物的基本表达的表达盒,其中脂肪酸去饱和酶 FAD2 内含子 1(Int)的拟南芥基因的内含子 1 的序列的两侧侧接了 LOX-1 基因的大约 200-bp 长的片段的有义臂(→)和反义臂(←)。NOS 终止序列(N)提供转录终止。为了产生显示出 LOX-1 基因共抑制的大麦植物,使用了包含等量含有 A 和 B 中详述的插入物的表达质粒的质粒混合物。为了产生显示出 LOX-1 基因完全沉默的大麦植物,使用了包含等量含有 A 和 C 中的插入物的表达质粒的质粒混合物。

[0143] 图 22 详述了关于降低 LOX-1 活性的抑制剂的试验结果。A 中描述了在 10% SDS-PAGE 中进行的蛋白质电泳分离,分离的条带说明了来自大肠杆菌细胞的 His 标记的 LOX-1 的逐步纯化结果(参照实施例 18)。载体 pET19b 和质粒 pETL1 的转化体的粗提物中的蛋白质分别显示在第 1 道和第 2 道,第 3-5 道包含洗液 2,3 和 4 的分离的蛋白质。在第 6 道(洗脱物 1)、第 7 道(洗脱物 2)、第 8 道(洗脱物 3)和第 9 道(洗脱物 4)中分离了来自亲和层析柱的 1ml 洗脱物的 3ul 的样品等份。水平的箭头标明了重组 LOX-1 的位置。如 B 中概括的那样,用来自洗脱物 2 的等分 LOX-1 进行抑制剂研究。其中在抑制剂,NDGA(●)或没食子酸辛酯(▲)中的任何一个存在的情况下,温育 5ml 的 LOX-1(洗脱物 2)后测量剩余的 LOX-1 活性。

[0144] 图 23 提供了详述从没有添加抑制剂的糖化过程制备的麦芽汁样品(空心条)或存在 0.5mM 的 LOX-1 抑制剂没食子酸辛酯(实心条)时制备的麦芽汁样品中的 T2N 水平的概要。在开始糖化(37°C)后或者在煮沸(煮沸的麦芽汁)后提取的样品包括用大麦 cv. Barke 或 LOX-1 无效大麦突变体 D112 的麦芽得到的碎麦芽的麦芽汁。

[0145] 6. 发明详述

[0146] 将发明的详细描述分成了下列分部,其目的是为了描述清楚,而不是限制发明:

[0147] (i) 大麦植物;

[0148] (ii) 制备 LOX-1 无效大麦;

[0149] (iii) 组合物;

- [0150] (iv) 化学诱变；
- [0151] (v) 选择大麦突变体；
- [0152] (vi) 植物育种；
- [0153] (vii) 大麦杂交；
- [0154] (viii) LOX 酶；
- [0155] (ix) LOX 路径的产物；
- [0156] (x) 潜在的 T2N；
- [0157] (xi) 抗病性；
- [0158] (xii) 真菌毒素；
- [0159] (xiii) 香料；
- [0160] (xiv) 编码 LOX 基因的异源表达；
- [0161] (xv) LOX 抑制剂。
- [0162] 6.1 大麦植物

[0163] 认为“野生大麦”，“*Hordeum vulgare ssp. spontaneum*”是今天栽培的大麦类型的祖先。在长时间里已经接受开发这一谷类能提供解释在 FertileCrescent 上开始谷物耕作的钥匙。人类在长夏季节期间收集谷物的事实使他们成为预先适应的驯养候选人。对来自以色列、土耳其和伊朗的野生型大麦的研究 (Nevo, 1992) 支持早期的驯养植物可能在遗传上变化非常多的观点。已经发现野生大麦群体的等位基因含量大大不同。在 27 个均分位点的 127 个等位基因中，发现 65 个等位基因是独一无二的，即他们仅出现在一个国家。

[0164] 认为大麦从野生状态到耕种状态的转换与许多位点的等位基因频率的根本变化一致。珍贵的等位基因和新的突变事件被农场主积极挑选出来，其中农场主能很快确定表示为“大麦当地品种” (barley landraces) 的驯养植物群体中的新特性。与野生大麦相比较，这些大麦在遗传上与现代栽培变种更密切相关，而且他们代表对更进一步繁殖工作有用的等位基因的来源 (Ellis et al., 1998)。直到十九世纪晚期，大麦当地品种才作为近亲交配系的高度异种混合物和杂种分离子存在，在较早代的植物中几乎不包括来源于随机杂交的植物。通过纯系栽培变种已经将大部分当地品种转移到先进的农业中。中等水平或高水平的遗传多样性成为剩余当地品种的特性。

[0165] 最初、“现代大麦” (modern barley) 栽培变种代表来自当地品种的选择物。后来他们来源于确定的纯系，例如不同地理起源的那些纯系之间的逐次循环杂交。最后导致在许多，也可能是所有先进农业中遗传碱基明显变窄。和当地品种相比，现代大麦栽培变种具有许多改进的特性 (Nevo 1992 and von Bothmer et al., )，例如，但不是限于：

- [0166] (i) 隐蔽和裸露的颗粒
- [0167] (ii) 种子休眠
- [0168] (iii) 抗病性
- [0169] (iv) 赖氨酸及其他氨基酸比例
- [0170] (v) 蛋白含量
- [0171] (vi) 氮含量
- [0172] (vii) 碳水化合物组成
- [0173] (viii) 大麦醇溶蛋白模式

[0174] 因此在本发明的一个实施方案中,大麦植物是包含的 LOX-1 活性少于对应野生型大麦植物的 LOX-1 活性的 1% 的修饰的现代大麦栽培变种。因此在这个实施例中,大麦植物优选不是大麦当地品种。

[0175] 本发明涉及包含的 LOX-1 活性小于野生型大麦植物的 LOX-1 活性的 5%, 优选小于 4%, 更优选小于 3%, 更加优选小于 2%, 更优选小于 1% 的大麦植物和其部分。包含小于 1% 的 LOX-1 活性的本发明的大麦植物在这里也被称为“LOX-1 无效大麦植物”。

[0176] 大麦植物可以是任何适当形式。例如:本发明的大麦植物可以是有生活力的大麦植物、干燥的植物、均质化处理的植物,例如磨碎的大麦颗粒。植物可以是成熟植物、胚、萌发的颗粒、麦芽颗粒等等。

[0177] 大麦植物部分可以是该植物的任何适当的部分,例如颗粒、胚、叶、茎、根、花或其部分。例如,小部分可以颗粒、胚、叶、茎、根或花的一部分。大麦植物部分也可以是匀浆或磨碎的大麦植物或颗粒的小部分。

[0178] 在本发明的一个实施例中,大麦植物部分可以是所述大麦植物的细胞,优选是那些在体外组织培养中能繁殖的活细胞。

[0179] 在本发明的一个优选实施例中,LOX-1 无效大麦植物包含的 LOX-1 活性小于野生型大麦植物活性的 5%、优选小于 3%, 更优选小于 1%, 优选小于 0.5%, 更优选小于 0.1%。可以通过任何适当的方法确定活性,但是优选使用下文实施例 1 中的方法确定活性。在本发明的一个非常优选的实施例中,LOX-1 无效大麦植物基本上没有 LOX-1 活性,更优选根本没有 LOX-1 活性。“基本上没有 LOX-1 活性”指使用下文描述的 LOX-1 活性测定法时没有可检测的 LOX-1 活性。

[0180] 例如,LOX-1 无效大麦几乎缺乏 LOX-1 活性可能是所述大麦包含不起作用的 LOX-1 蛋白质,例如突变的 LOX-1 蛋白质的结果。但是,与野生型大麦植物相比,LOX-1 无效大麦仅包含微乎其微的 LOX-1 蛋白质,更优选不包含 LOX-1 蛋白质,例如包含小于 5%、优选小于 3%, 更优选小于 1%, 优选小于 0.5%, 更优选小于 0.1% 的 LOX-1 蛋白质。更优选地,LOX-1 无效大麦植物基本上不包含 LOX-1 蛋白质,最优选根本不包含 LOX-1 蛋白质。“基本上没有 LOX-1 蛋白质”指不包括可检测的 LOX-1 蛋白质。可以通过本领域熟练技术人员已知的任何合适的方法来检测 LOX-1 蛋白质,但是优选使用通过 LOX-1 特异性抗体检测 LOX-1 蛋白质的方法来进行检测。例如,所述方法可以是 Western 印迹或 ELISA。所述的特异性抗体可以是单克隆或多克隆抗体,但是优选识别 LOX-1 蛋白质内的几个不同表位的多克隆抗体。例如,也可以通过确定 LOX-1 活性的方法、检测编码 LOX-1 的基因中的突变的方法或检测 LOX-1 基因表达的方法间接检测 LOX-1 蛋白质。例如,可以通过对编码 LOX-1 的基因进行测序检测所述基因中的突变。例如,通过 Northern 印迹或 RT-PCR 可以检测 LOX-1 基因的表达。在本发明的一个优选实施例中,使用本公开文本的实施例 4 中列出的方法来检测 LOX-1 蛋白质。

[0181] 术语“LOX-1 蛋白质”包括 [SEQ ID NO :3] 或 [SEQ ID NO :7] 中列出的全长大麦 LOX-1 蛋白质或其功能同系物。LOX-1 的活性部位位于 LOX-1 的 C 末端部分。特别是与 LOX-1 的活性相关的跨越氨基酸残基 520-862 的区域或其部分。因此,在一个实施例中,LOX-1 无效大麦优选包含编码突变体形式 LOX-1 的基因,其中突变体形式的 LOX-1 缺乏 LOX-1 氨基酸 520-862 中的部分或全部。所述突变体 LOX-1 也可以缺乏存在于野生型 LOX-1 中的其他

的氨基酸残基。

[0182] 因此, LOX-1 无效大麦可以包含没有功能的截短形式的 LOX-1, 例如 N- 末端或 C 末端截短形式。所述截短形式优选包含不超过 800 个、更优选不超过 750 个、更加优选不超过 700 个、更优选不超过 690 个、更加优选不超过 680 个、更加优选不超过 670 个的 LOX-1 连续氨基酸, 例如包含不超过 665 个、不超过 650 个、不超过 600 个、不超过 550 个、不超过 500 个、不超过 450 个、不超过 425 个、不超过 399 个的 [SEQ ID NO :3] 的 LOX-1 的连续氨基酸。所述截短形式优选仅包含 LOX-1 的 N- 末端片段。所述截短形式优选包含最多 800 个、更优选最多 750 个、更加优选最多 700 个, 更优选最多 690 个、更加优选最多 680 个、更加优选最多 670 个、更加优选最多 665 个的 [SEQ ID NO :3] 的 N- 末端氨基酸, 例如包含不超过 665 个、不超过 650 个、不超过 600 个、例如最多 550 个、最多 500 个、最多 450 个、最多 425 个、最多 399 个的 [SEQ ID NO :3] 的 N- 末端氨基酸。

[0183] 在一个非常优选的实施例中, 截短形式可以由 [SEQ ID NO :3] 的 1-665 位氨基酸组成。

[0184] 在本发明的一个优选实施例中, 大麦植物包含能转录成编码 LOX-1 的 mRNA 的基因, 其中所述 mRNA 在野生型 LOX-1mRNA 的终止密码子的上游包含无义密码子或终止密码子。这种无义密码子在这里被命名为早熟无义密码子。所有转录成编码所述植物的 LOX-1 的 mRNA 的基因都包含早熟无义密码子或终止密码子是优选的。无义密码子或终止密码子优选位于起始密码子下游的最多 800 个、更优选最多 750 个、更加优选最多 700 个, 更优选最多 690 个、更加优选最多 680 个、更加优选最多 670 个、更加优选最多 665 个密码子中。[SEQ ID NO :1] 或 [SEQ ID NO :5] 中给出了编码 LOX-1 的野生型基因组 DNA 的序列。

[0185] 在一个优选实施例中, 大麦植物包含编码 LOX-1 的基因, 从所述基因转录的前 mRNA 包含相当于 [SEQ ID NO :2] 的核糖核酸序列。

[0186] 在本发明的另一个优选实施例中, 大麦植物包含编码突变 LOX-1 的基因, 所述基因在至少一个拼接位点, 例如 1、2、3 个拼接位点中包含至少一个突变, 例如 1、2、3、4、5 个突变。所述突变优选导致至少一个所述拼接位点无功能。因此从这种基因转录的 mRNA 将由于异常拼接而变得不正常。因此, 从本发明的 LOX-1 无效大麦植物的 LOX-1 基因转录的 mRNA 优选不编码蛋白质或编码仅包含 LOX-1N- 末端的蛋白质。所述蛋白质可以包含由不是来源于 LOX-1 基因的异常 mRNA 编码的其他序列。在这里, LOX-1 的 N- 末端包含氨基酸 1 到氨基酸 N, 其中 N 是 2-800, 更优选 2-750, 更优选 2-700, 更优选 2-650, 更优选 2-600, 更优选 2-550, 更优选 2-500, 更优选 2-450, 更优选 2-400, 更优选 2-378 范围内的整数。

[0187] 在本发明的一个实施例中, 大麦植物包含编码突变 LOX-1 的基因, 其中所述基因在拼接位点具有一个突变, 导致 mRNA 编码由 [SEQ ID NO :3] 的氨基酸 1-378, 以及不是来源于 LOX-1 的另外氨基酸序列组成的蛋白质。所述 LOX-1 突变体优选由 [SEQ ID NO :8] 中列出的序列组成。

[0188] 在本发明的一个非常优选的实施例中, 编码 LOX-1 无效大麦植物的 LOX-1 突变体的基因包含无义突变, 所述突变相当于 [SEQ ID NO :1] 的位点 3574 的 G → A 替换。更优选的 LOX-1 无效大麦植物是被命名为 D112 的植物, 该植物在美国标准菌库 (ATCC) 的保藏号是 No. PTA-5487。

[0189] 在本发明的另一个非常优选的实施例中, 编码 LOX-1 无效大麦植物的 LOX-1 的基

因包含无功能的内含子 3 供体拼接位点。因此所述植物的 LOX-1mRNA 编码包含 LOX-1 的氨基酸 1-378 和来自内含子 3 的另外氨基酸的包含在 [SEQ ID NO :8] 中的蛋白质。更优选的 LOX-1 无效大麦植物是被命名为 A618 的植物,该植物在美国标准菌库 (ATCC) 的保藏号是 No. PTA-5584。

[0190] 本发明的大麦植物也可以 LOX 无效大麦植物的子代。因此,大麦植物可以是被命名为 D112 的具有 ATCC 保藏号 No. PTA-5487 或被命名为 A618 的具有 ATCC 保藏号 No. PTA-5584 的植物的子代。

[0191] 采用本领域熟练技术人员所知的任何适当方法可以制备本发明的大麦植物,优选通过下文列出的方法中的一种来制备(例如,参见 6.2"制备 LOX-1 无效大麦")。

[0192] 在本发明的一个实施例中,本发明的 LOX-1 无效大麦植物优选具有可与野生型大麦相比较的植物生长生理学和谷物发育。因此 LOX-1 无效大麦植物在株高、每株植物的分蘖数,开花的起始和 / 或每一个穗的谷物数目方面与野生型大麦相似是优选的。

[0193] 提供 LOX-1 无效大麦植物也是本发明的一个方面,其中所述植物的特点在于:

[0194] (i) 具有增强的抗病性 ;或

[0195] (ii) 产生真菌毒素的潜能降低 ;或

[0196] (iii) 包含供组织培养使用的可再生细胞 ;或

[0197] (iv) (i) 到 (iii) 的特性的任何组合。

[0198] 在本发明的一个实施方案中,大麦植物是附带条件为所述大麦植物在内含子 5 的拼接供体部位不携带 G 突变的 LOX-1 无效大麦植物。本发明的一个实施方案也涉及从附带条件为所述大麦植物在内含子 5 的拼接供体部位不携带 G 突变的 LOX-1 无效大麦植物或其部分制备的植物产品,例如麦芽、麦芽汁、发酵或非发酵饮料、啤酒、食物或饲料产品。例如,所述 G 相当于 SEQ ID 1 的位点 2968 上的 G。通过采用本领域技术人员已知的常规方法从植物产品分离 DNA 并鉴定存在或不存在所述突变可以确定所述植物产品是否是从具有给定突变的大麦植物制备的。例如,可以通过冷冻干燥、在含水缓冲液中的重悬浮、氯仿 / 异戊醇抽提,以及随后的乙醇沉淀从麦芽汁、啤酒或另外的饮料中分离 DNA。例如:可以用与 Hirota 等在 W02004/085652 中的描述类似的方式鉴定内含子 5 的拼接供体部位的 G 突变。

[0199] 6.2 制备 LOX-1 无效大麦

[0200] 采用本领域熟练技术人员所知的任何适当方法可以制备本发明的大麦植物。优选通过包含诱变处理大麦植物或其部分,例如大麦颗粒的步骤的方法来制备本发明的大麦植物,其中诱变处理步骤后对大麦植物进行筛选和选择,以挑选出 LOX-1 活性小于 5% 的植物。有趣地是,本发明一方面涉及效率非常高的新筛选方法,例如显著优于 Douma 等在 W002/053721 中的描述的筛选方法。新的筛选方法允许重现性地鉴定没有 LOX-1 活性或有极低 LOX-1 活性的大麦植物。这种新筛选法包括从诱变处理的大麦获取颗粒或其部分,例如胚,以及确定所述颗粒或其部分中的 LOX-1 活性。

[0201] 因此,提供制备包含的 LOX-1 活性小于野生型大麦植物的 LOX-1 活性的 5% 的大麦植物的方法是本发明的目标,它包括步骤:

[0202] (i) 确定野生型大麦颗粒或其部分的 LOX-1 活性 ;和

[0203] (ii) 诱变处理大麦植物和 / 或大麦细胞和 / 或大麦组织和 / 或大麦颗粒和 / 或大麦胚,从而获得 M0 代大麦 ;和

[0204] (iii) 繁殖所述诱变处理的大麦植物、颗粒和 / 或胚至少 2 代, 获得  $M_x$  代大麦植物, 其中  $X$  是  $\geq 2$  的整数 ; 和

[0205] (iv) 从所述  $M_x$  大麦植物获取颗粒或其部分 ; 和

[0206] (v) 确定所述颗粒或其部分的 LOX-1 活性 ; 和

[0207] (vi) 选择诱变处理的颗粒或其部分的 LOX-1 活性小于野生型颗粒或其部分的 LOX-1 活性的 5% 的植物 ;

[0208] 从而获取包含的 LOX-1 活性小于野生型大麦植物的 LOX-1 活性的 5% 的大麦植物。

[0209] 上述列表中的步骤 (ii) 涉及诱变处理从由大麦细胞、大麦组织、大麦颗粒和大麦胚组成的组中选择出来的生活物质 (living material), 优选从由大麦植物、大麦颗粒和大麦胚组成的组中选择出来的生活物质, 更优选从大麦颗粒中选择出来的生活物质。用确定野生型大麦颗粒的 LOX-1 活性时所用材料的同类材料来确定诱变处理颗粒的 LOX-1 活性是优选的, 即步骤 (i) 的大麦颗粒或其部分是步骤 (iv) 中提到的大麦颗粒或其部分的同类是优选的。举例来说, 如果在野生型大麦的胚中确定野生型大麦的 LOX-1 活性, 那么步骤 (iv) 优选包括确定诱变处理的大麦植物的胚中的 LOX-1 活性。

[0210] 可以通过任何适当的方法完成诱变。在一个实施例中, 通过用诱变处理制剂温育大麦植物或其部分, 例如大麦颗粒或来自大麦的单独的细胞来完成诱变。所述制剂为本领域熟练技术人员所知, 例如: 不限于叠氮化钠 ( $\text{NaN}_3$ )、乙基甲磺酸盐 (EMS)、叠氮丙三醇 (AG, 3-叠氨基-1,2-丙二醇)、甲基亚硝基脲 (MNU) 和顺丁烯二酰肼 (MH)。

[0211] 在另一个实施例中, 通过照射, 例如通过 UV 照射大麦植物或其部分, 例如颗粒来完成诱变。在本发明的优选实施例中, 依照下文 6.4 "化学诱变" 中列出的任何方法来完成诱变。在实施例 1 中给出了适当诱变规程的非限制例子。

[0212] 优选利用筛选  $M_3$  大麦时, 使想要的突变体的期望频率达到每 10,000 谷物颗粒最少 0.5, 例如 0.5-5, 例如 0.9-2.3 的方式完成诱变。

[0213] 在优选实施例中, 对大麦颗粒实施诱变。诱变处理的颗粒被命名为  $M_0$  代 (也参见图 1A)。

[0214] 在诱变之后, 挑选出包含小于 5%, 优选小于 1% 的 LOX-1 活性的大麦植物或其部分。可以依照本领域熟练技术人员所知的任何适当方法完成选择。优选地, 选择包含从大麦植物, 例如大麦颗粒获取样品, 确定所述样品中的 LOX-1 活性和选择植物, 其中所述样品具有的 LOX-1 活性小于野生型大麦植物的 LOX-1 活性的 5%, 优选小于 1%。

[0215] 可以从所述植物的任何适当部分获取样品。但是, 样品优选取自颗粒, 更优选取自颗粒的胚组织, 样品更优选由颗粒的胚组织组成。通常, 在确定 LOX-1 活性之前, 必须使用任何适当的方法将样品匀化。

[0216] 在优选实施例中, 样品取自  $M_x$  代颗粒, 其中  $x$  是  $\geq 2$  的整数,  $x$  优选是 2-10 范围内的整数, 更优选是 3-8 范围内的整数。在非常优选的实施例中, 确定  $M_3$  颗粒或来源于颗粒的样品的 LOX-1 活性。在那个实施例中, 栽培诱变处理的大麦颗粒 ( $M_0$  代) 获取大麦植物是优选的, 杂交该大麦植物可获取颗粒  $M_1$ 。重复这一过程直到得到  $M_3$  颗粒 (参见图 1A)。

[0217] 使用任何适当的测定方法, 优选通过下文列出的方法中的一种, 可以实现对 LOX-1 活性的确定。特别地, 优选监测 LOX-1 将亚油酸双氧化成 9-HPODE 的测定方法。通常, 测定 (assaying) 因此涉及步骤:



[0218] (i) 提供从大麦颗粒或其部分制备的样品 ;和

[0219] (ii) 提供亚油酸 ;和

[0220] (iii) 用所述亚油酸温育所述样品 ;和

[0221] (iv) 检测亚油酸双氧化成 9-HPODE。

[0222] 可直接或间接完成检测。本发明可以使用任何适当的检测方法。在本发明的一个实施例中检测亚油酸氢过氧化物。例如,可以通过将所述亚油酸氢过氧化物(hydroperoxides)的降解与形成可检测化合物的氧化反应偶联来检测亚油酸氢过氧化物。例如 ;可以按照实施例 1 的描述来实施这一过程。在另一个实施例中,例如,通过实施例 9 中描写的分光光度分析法,HPLC 可直接检测 9-HPODE。在本发明的一个实施例中,通过确定来自大麦颗粒的样品中的 9-HPODE 的量来简单确定 LOX-1 活性。通过本领域普通技术人员所知的任何适当方法,例如实施例 9 中列出的方法可以完成这一过程。

[0223] 在什么 pH 条件下完成对 LOX-1 活性的确定很重要。优选在允许 LOX-1 活性高,但只允许 LOX-2 活性低的 pH 条件下完成所述确定。因此,优选在 3-6.5 的 pH 范围内,例如 3-4 的 pH 范围内,4-5 的 pH 范围内,5-6 的 pH 范围内,6-6.5 的 pH 范围内进行 LOX 活性确定。pH 优选是大约 3,例如大约 3.5,大约 4,大约 4.5,大约 5,大约 5.5,大约 6,大约 6.5,大约 7。也优选在适当的 pH,例如在 3-6.5 的 pH 范围内,例如 3-4 的 pH 范围内,4-5 的 pH 范围内,5-6 的 pH 范围内,6-6.5 的 pH 范围内制备所述样品。pH 优选是大约 3,例如大约 3.5,大约 4,大约 4.5,大约 5,大约 5.5,大约 6,大约 6.5,大约 7。

[0224] 在下文的 6.5" 选择大麦突变体" 部分中描述了依照本发明选择大麦植物的优选方法。

[0225] 在实施例 1 中给出了确定 LOX-1 活性的优选实例。

[0226] 这种选择方法适合于微滴定板分析程序或允许快速筛选许多样品的其他已知的高通量重复测定方式。优选分析至少 5,000 株、例如至少 7,500 株、例如至少 10,000 株、例如至少 15,000 株诱变处理的大麦植物的 LOX-1 活性。

[0227] 在挑选出有用的具有小于 5% LOX-1 活性的大麦植物之后,可以随意实施一种或多种另外的筛选。例如 ;可以更进一步地繁殖选择的突变体,并再一次筛选后代的 LOX-1 活性。

[0228] 在挑选出有用的大麦植物之后,可以使这些植物繁殖,例如常规繁殖。下文(6.6" 植物育种" 部分和 6.7" 大麦杂交" 部分)中描述了繁殖方法。

[0229] 但是,也可以用其他方法,例如导致 LOX-1 转录和 / 或翻译降低的方法来制备本发明的大麦植物。因此,用包含操作性连接的在大麦植物中可表达的启动子部分,DNA 序列和转录终止区域的核酸序列转化大麦植物可以制备 LOX-1 无效大麦植物,其中所述 DNA 序列的表达通过下列机制降低 LOX-1 编码基因的表达 :

[0230] (i) 反义沉默 ;或

[0231] (ii) 共抑制沉默 ;或

[0232] (iii) RNA 干扰。

[0233] 在一个实施方案中,通过涉及用能降低 LOX-1 编码基因转录或翻译的核酸序列,例如包含反义 LOX-1 序列的核酸序列转化大麦植物的方法,来制备本发明的大麦植物。例如 ;所述反义序列可以是 [SEQ ID NO :1] 的反义序列或其片段。反义序列应该操作性地与

在大麦植物中表达的基因的启动子序列连接。在下文的实施例 16 中列出了这种方法的非限制性例子。

[0234] 可以用任何有用的方法,例如根瘤土壤杆菌介导的转移或粒子轰击介导的 DNA 吸收来转化大麦植物。

[0235] 通过包含下列步骤的方法制备的 LOX-1 无效大麦植物也在本发明的范围内:

[0236] (i) 诱变处理大麦植物和 / 或大麦颗粒和 / 或大麦胚 ;和

[0237] (ii) 确定 LOX-1 基因中存在或缺少突变,其中所述突变导致 LOX-1 基因编码包含 SEQ ID NO :3 中所列出的序列的不到 700 个连续氨基酸的 LOX-1 多肽形式 ;所述多肽优选是包含 [SEQ ID NO :3] 的最多 700 个 N- 末端氨基酸的 LOX-1 的 N- 末端片段,

[0238] (iii) 选择携带所述突变的植物,从而获取包含的 LOX-1 活性小于野生型大麦植物的 LOX-1 活性的 5% 的大麦植物。

[0239] 更优选地,所述突变可以导致 LOX-1 基因编码上述任何一个 LOX-1N- 末端片段。

[0240] 可以使用任何适当的方法,例如,对 LOX-1 基因进行测序或单核苷酸多态性 (SNP) 分析来检测所述突变。在下文的实施例 13 和实施例 14 中描述了怎样实施 SNP 分析的实例。

[0241] 一旦制备出在 LOX-1 基因中具有特殊突变(例如,任何上述突变)的 LOX-1 无效大麦植物,就可以通过本领域熟练技术人员已知的常规繁育方法来产生具有相同突变的另外的大麦植物。例如:所述 LOX-1 无效大麦植物可以回交到另一个大麦栽培变种环境中。图 9 公开了这种回交的图解实例。

[0242] 6.3 组合物

[0243] 本发明也涉及包含如上所述的大麦植物或其部分的组合物,或者从所述大麦植物或其部分制备的组合物。因为所述大麦植物具有不到 5%、优选具有不到 1% 的 LOX-1 活性,因此包含所述大麦植物或其部分或由所述大麦植物或其部分制备的组合物通常包含极低水平的 T2N 和潜在 T2N。下文在这里描述了包含 LOX-1 无效大麦或由 LOX-1 无效大麦制备的有用组合物的实例。

[0244] 所述组合物与包含野生型大麦植物或由野生型大麦植物制备的相似组合物相比具有下列特点是优选的:

[0245] (i) 小于 30%、优选小于 20%、更优选小于 10%、更加优选小于 5%、例如小于 2%、小于 1% 的 T2N ;和 / 或

[0246] (ii) 小于 30%、优选小于 20%、更优选小于 10%、更加优选小于 5%、例如小于 2%、小于 1% 的潜在 T2N ;

[0247] 本发明一方面涉及与野生型颗粒相比包含的 LOX-1 活性小于 1% 的大麦颗粒。颗粒优选不包含 LOX-1 活性。本发明也涉及包含所述颗粒的组合物和从所述颗粒制备的组合物。

[0248] 一方面,本发明涉及通过发麦芽从 LOX-1 无效颗粒制备的麦芽组合物。应理解术语“发麦芽”指已浸泡的大麦颗粒在可控的环境条件下萌发(例如如图 11 中的步骤 2 和 3)。

[0249] 发麦芽 (malting) 是受控的浸泡和萌发过程,其中萌发后对大麦颗粒进行干燥。这一作业顺序对合成许多使谷物颗粒改良 (modification) 的酶很重要,其中谷物颗粒改良主要是解聚死胚乳细胞的细胞壁和动员颗粒营养素的过程。在随后的干燥过程中,由于化学褐变反应而产生风味和着色。虽然麦芽的主要用途是生产饮料,但是它也可以用于其

他工业过程,例如作为焙烤食品工业的酶来源、或者作为食品工业的调味品和着色剂、作为麦芽或麦芽粉、间接地作为麦芽糖浆等等。

[0250] 一方面,本发明涉及生产所述麦芽组合物的方法。该方法优选包含步骤:

[0251] (i) 提供 LOX-1 无效大麦颗粒;

[0252] (ii) 浸泡所述颗粒;

[0253] (iii) 在预先确定的条件下使浸泡的颗粒萌发;

[0254] (iv) 干燥所述萌发的颗粒;

[0255] 从而产生 LOX-1 活性低或没有 LOX-1 活性的麦芽组合物。例如:可以通过 Hosoney (1994) 中描述的任何方法来制备麦芽。但是,产生麦芽的任何其他合适的方法,例如产生特色麦芽的方法,包括但不限于焙烧 (roasting) 麦芽的方法也可以用于本发明。实施例 6 中描述了一个非限制性实例。

[0256] 另一方面,本发明涉及从麦芽组合物制备的麦芽汁组合物,其中麦芽组合物是从 LOX-1 无效颗粒制备的。可以从只有 LOX-1 无效颗粒的颗粒或包含其他颗粒的混合物制备所述麦芽。本发明也涉及使用 LOX-1 无效大麦或其部分制备的单独的或与其他组分混合的麦芽汁组合物。所述麦芽汁可以是第一和 / 或第二和 / 或更进一步的麦芽汁。通常麦芽汁组合物已经有高含量的氨基氮和发酵性糖,主要是麦芽糖。在图 11 中,步骤 4 到 6 举例说明了从麦芽制备麦芽汁的常见方法。通常,通过用水温育麦芽,即通过糖化制备麦芽汁。在糖化期间,麦芽 / 水组合物中可以补充另外的富含糖类的组合物,例如大麦、玉蜀黍或稻添加剂。未萌发的谷类添加剂通常不包含活性酶,因此依靠麦芽或外来酶来提供糖转化所必需的酶。

[0257] 通常,麦芽汁生产过程的第一步是碾磨麦芽,其目的在于让水在糖化期间可以进入谷物颗粒,而这基本上是用酶解聚底物的发麦芽过程的延伸。在糖化期间,用液体部分,例如水温育磨碎的麦芽。温度可以保持恒定(等温糖化)或逐渐升高。两种情况下,在通过过滤将液体部分分离成麦芽汁和被命名为酒糟的剩余固体颗粒之前,发麦芽和糖化过程中产生的可溶性物质已经被萃取到所述液体部分。这种麦芽汁也可以表示为初次麦芽汁。过滤后可以获取第二麦芽汁。通过重复这一过程可以制备更进一步的麦芽汁。在 Hosoney (上文) 中描述了制备麦芽汁的适当工序的非限制性实例。

[0258] 也可以通过用一种或多种适当的酶,例如酶组合物或酶混合剂组合物,例如 Ultraflo 或 Cereflo (Novozymes) 温育 LOX-1 无效大麦植物或其部分,例如未萌发的 LOX-1 无效大麦植物或其部分来制备麦芽汁组合物。也可以使用麦芽混合物和未萌发的大麦植物或其部分,通过在所述制备期间随意添加一种或多种适当的酶来制备麦芽汁组合物。

[0259] 本发明也涉及包含 LOX-1 无效大麦植物或其部分的食物组合物、饲料组合物或香原料组合物。例如,食物组合物可以包括,但不局限于萌发和未萌发的大麦颗粒、大麦粉、面包、粥、包含大麦的谷类混合物、保健品、例如包含大麦的饮料、大麦糖浆,以及薄片状、磨碎的或挤压的大麦组合物。例如,饲料组合物包括包含大麦颗粒和 / 或粗粉的组合物。下面将在这里描述香原料组合物。

[0260] 本发明也涉及本发明的组合物的混合物。例如:本发明一方面涉及通过混合 (i) 包含大麦植物或其部分的组合物,其包含的 LOX-1 活性小于野生型大麦植物的 LOX-1 活性的 5% 和 (ii) 从 LOX-1 无效颗粒制备的麦芽组合物制备得到的组合物。

[0261] 在优选方面,本发明涉及饮料、更优选的涉及麦芽衍生饮料、更加优选的涉及醇饮料,例如具有稳定感官品质的啤酒,其中所述饮料是使用 LOX-1 无效大麦或其部分制备的。因此,在本发明的一个优选实施例中,优选通过单独或与其他组分结合发酵 LOX-1 无效大麦或其部分或其提取物,例如发酵用麦芽生产的麦芽汁来制备饮料,其中麦芽是由 LOX-1 无效大麦产生的。

[0262] 但是,在本发明的其他实施例中,饮料是非发酵饮料,例如麦芽汁。从未萌发的大麦植物或其部分制备所述饮料也包括在本发明中。

[0263] 但是优选从麦芽组合物制备所述饮料,其中麦芽组合物是从 LOX-1 无效大麦颗粒制备的。所述饮料更优选是啤酒。可以是本领域熟练技术人员所知的任何一种啤酒。例如,在一个实施方案中,啤酒是贮藏(lager)啤酒。优选使用包含萌发的 LOX-1 无效大麦的麦芽组合物酿造啤酒。但是,麦芽组合物也可以包含其他组分,例如其他萌发的或未萌发的谷类,例如野生型大麦、LOX-1 无效大麦、小麦和 / 或黑麦,未萌发的含糖的原材料或来源于萌发的或未萌发的原材料的组合物,例如糖浆组合物。

[0264] “感官品质”指对嗅觉和味觉有吸引力的品质。例如,经过训练的品尝小组可以对他们进行分析。所述的经过训练的品尝小组进行过识别醛,例如 T2N 异味的特别训练是优选的。通常,品尝小组将由 3-30 名成员组成,例如由 5-15 名成员组成。品尝小组可以评估存在的各种风味,例如异味、似纸的、氧化的、老化的和面包样风味。在下文的实施例 6 中描述了确定饮料“感官品质”的方法。在优选实施例中,稳定的感官品质至少部分是产生的 T2N 或潜在 T2N 低的结果。

[0265] 因此,提供使用大麦植物制造的饮料(例如啤酒)是本发明的目标,其中饮料在储藏至少 1 周,优选至少 2 周,更优选至少 3 周,更优选至少 4 周,例如 1-3 个月,3-6 个月,6-12 个月,一年以上以后,与从野生型大麦制备的饮料相比优选包含小于 50%、优选小于 40%、更优选小于 35%、例如小于 30%、小于 20%、小于 10%、例如优选小于 5%、小于 2%、小于 1%的 T2N 和 / 或潜在 T2N。在 15-40°C,优选在 30-37°C 的温度范围,更优选在 37°C 进行储藏。本发明的饮料在 15-40°C,优选在 30-37°C 的温度范围,更优选在 37°C 储藏至少 1 周,优选至少 2 周,更优选至少 3 周,更加优选至少 4 周,例如 1-3 个月,3-6 个月,6-12 个月,一年以上以后优选包含最多 0.07、优选最多 0.06、更优选最多 0.05、更加优选最多 0.04,例如最多 0.03ppb(10 亿(billion)分之几)的游离 T2N。该饮料优选也包含 1-10ppm(百万分之几)、更优选 2-8ppm、更优选 3-7ppm、更加优选 4-6ppm 的亚硫酸盐。在一个优选实施例中,本发明的饮料在 37°C 储藏 2 周之后包含最多 0.04、更优选最多 0.03,例如最多 0.025ppb 的游离 T2N。在本发明的另一个优选实施例中,本发明的饮料在存在 4-6ppm 亚硫酸盐的情况下,在 37°C 储藏 4 周之后包含最多 0.07、优选最多 0.06,更优选最多 0.05,更加优选最多 0.04,例如最多 0.03ppb(10 亿分之几)的游离 T2N。

[0266] 本发明的饮料在 15-25°C,例如大约 20°C 储藏至少 10 个月后,与从除 LOX-1 无效大麦外的不同大麦制备的相似饮料相比具有较少的似纸味道是优选的。优选地,经过训练的品尝小组评估,所述似纸味道小于 90%、更优选小于 80%、例如小于 70%。

[0267] 在一个实施例中,本发明涉及具有低水平的某些三羟基十八碳烯酸的饮料,例如啤酒,特别涉及具有低水平 9,12,13-THOE 的饮料。三羟基十八碳烯酸具有苦味(Baur and Grosch,1977 and Baur et al.,1977),因此不受欢迎。

[0268] 因此,9,12,13-THOE 的水平尽可能低是合乎需要的,优选低于 1.3ppm,例如低于 1ppm。但是,麦芽衍生饮料(例如啤酒)中 9,12,13-THOE 的总浓度也依赖于用来制备所述具体饮料的麦芽的量。因此,通常,浓啤酒比淡些的啤酒含有更多的 9,12,13-THOE,而且在更浓的啤酒中可以接受总水平更高的 9,12,13-THOE。因此,与类似种类的正常啤酒相比,本发明的饮料优选包含更低水平的 9,12,13-THOE。通过使用制备所述饮料的 LOX-1 无效大麦可以获取这种饮料。因此,与内(internal)标准相比,本发明的优选饮料包含低比例的 9,12,13-THOE,其中内标准可校正制备所述饮料中使用的麦芽的量。例如,所述标准可以是另一个三羟基十八碳烯酸。

[0269] 因此,保持各种三羟基十八碳烯酸(THAs)的比例不超出特定范围,对饮料,例如啤酒的质量很重要。令人惊讶的是,除低水平的 T2N 之外,LOX-1 路径的产物(参见图 1B)--从本发明的 LOX-1 无效大麦制备的饮料也具有极低水平的 9,12,13-THOE(参见图 1C),因此 9,12,13-THA/9,10,13-THA 的比例极低。因此,本发明一方面涉及具有稳定感官品质的饮料,例如啤酒,其中利用大麦植物或其部分,优选 LOX-1 无效大麦制造所述饮料,所述饮料中 9,12,13-THA 与 9,10,13-THA 的比例最大是 1.8,优选最大是 1.7,更优选最大是 1.6,更优选最大是 1.5,更加优选最大是 1.4。因此所述比例在 0-1.8 的范围之内,优选在 0-1.6 的范围之内,例如在 0-1.4 的范围之内是非常优选的。在一个实施例中,所述比例是大约 1.3。通过标准方法,例如 Hamber,1991 中描写的气相色谱-质谱分析法可以确定饮料中 9,12,13-THOE 和 9,10,13-THOE 的量。

[0270] 所述 THAs 优选是亚油酸转化的 oxylipins。有趣地是,利用本发明的大麦植物可以制备具有这种 THA 比例的饮料。优选地,不使用除 LOX-1 无效大麦以外的其他大麦,例如不使用除从 LOX-1 无效大麦制备的麦芽以外的其他麦芽制备所述饮料。在本发明的一个优选实施例中,饮料包含:

[0271] (i) 如上所述的 9,12,13-THA/9,10,13-THA 比例;和

[0272] (ii) 储藏之后具有如上所述水平的游离 T2N。

[0273] 在一个实施例中,本发明涉及与相似的常规饮料相比,具有改进的泡沫稳定性的饮料,例如啤酒。例如,可以从 LOX-1 无效大麦或其部分,例如麦芽制备这种饮料。例如,可以按照 Brautechnische Analysenmethoden,2002 中的描述确定泡沫稳定性。

[0274] 本发明也涉及制造所述饮料的方法。该方法优选包含步骤:

[0275] (i) 提供包含萌发的 LOX-1 无效颗粒的麦芽组合物;

[0276] (ii) 将所述麦芽组合物加工成饮料;

[0277] 从而获取感官品质稳定的饮料。

[0278] 在一个优选实施例中,这种饮料是啤酒。在这种情况下,工艺步骤优选包含通过,例如上述的任何方法从所述麦芽组合物制备麦芽汁,以及发酵所述麦芽汁。

[0279] 一般说来,可以用萌发的和/或未萌发的大麦谷物制造醇饮料,例如啤酒。除酒花和酵母之外,麦芽也促成了啤酒的风味和颜色。而且,麦芽作为发酵性糖和酶的来源起作用。啤酒制造一般步骤的简略图显示在图 11 中,适当的萌发和酿造方法的例子的详细描述可以在例如, Hosney(上文)的近期出版物中找到。分析大麦、麦芽和啤酒产品的许多更新的方法已经存在[例如,但不限于;American Association of Cereal Chemist(1995) American Society of Brewing Chemists(1992);European Brewery Convention(1998);

Institute of Brewing(1997]。已经认识到给定的啤酒厂使用了许多有显著差异的具体过程,这些过程与当地的消费者喜好有关。本发明可以使用任何这种制造啤酒的方法。实施例 6 中描述了一个非限制性实例。

[0280] 例如,可以通过上述的任何方法获取适合制备所述饮料,例如啤酒、麦芽饮料或非发酵麦芽汁的麦芽组合物。可以从所述麦芽组合物制备麦芽汁,这一点上文已经描述。

[0281] 从麦芽汁生产啤酒的第一步优选涉及煮沸所述麦芽汁。在煮沸期间,可以添加其他组分,例如提供典型的苦啤酒和芳香啤酒特征的酒花。煮沸麦芽汁也会导致多酚和变性蛋白质之间形成主要在随后的麦芽汁冷却阶段沉淀的聚集物。在冷却之后,麦芽汁被转移到包含酵母的发酵罐中。所述酵母优选是啤酒酵母、卡尔酵母 (*Saccharomyces Carlsbergensis*)。麦芽汁可以发酵任何适当时间,一般发酵 1-100 天。在持续几天的发酵过程期间,糖被转变成乙醇和 CO<sub>2</sub>,同时伴随有一些调味剂的发生。

[0282] 随后可以更进一步处理啤酒。一般要冷却啤酒。也可以过滤和 / 或陈贮啤酒,陈贮 (lagered) 是产生令人愉快的芳香和风味,以及较少泡沫 (yeasty) 的过程。最后可以在包装 (例如装入瓶中或罐中) 前,将啤酒巴氏灭菌或过滤啤酒。

[0283] 尽管在啤酒制造领域已经取得进步,但降低啤酒中 T2N、T2N 前体和潜在 T2N 水平是有益的。因此,仍然对新原材料有需求,特别是有助于成品啤酒产生较少异味的大麦和麦芽。因此提供这种大麦和麦芽是本发明的目标。

[0284] 6.4 化学诱变

[0285] 一方面,本发明基于,至少部分基于使用大麦颗粒的化学诱变,其中化学诱变是已知的随机插入突变的方法。可以使用任何诱变处理化学制剂完成大诱变麦,但是优选通过用 NaN<sub>3</sub> 处理颗粒,使幸存的颗粒萌发,然后分析子代植物来完成大麦诱变。由诱变处理的颗粒长成的称为 M0 的一代植物包含任何给定突变的杂合子嵌合体。在自花传粉之后收集的子代称为 M1 代,分离给定突变的杂合子和纯合子 (参照图 1A 和 9)。

[0286] 用 NaN<sub>3</sub> 处理颗粒不等同于处理单个细胞,因为处理之后的颗粒将包含一些未突变细胞和具有 DNA 突变的多种细胞。因为那些不产生种系的细胞谱系的突变可能丢失,因此目标就是将诱变剂靶向那些发育为有助于产生 M1 代的再生组织的少数细胞。

[0287] 为了评价总的突变效率,白化 (albino) 嵌合体和白化植物分别被计算入 M0 和 M1 代。作为成活植物函数的记分突变体数给出了对突变效率的估计,而作为已处理种子函数的记分突变体数测量了突变效率和杀死的颗粒的组合。

[0288] 人们注意到事实上在每个基因表达步骤,细胞都具有可能缓和突变损害效果的质量保证机制。真核生物中的一个较好的研究例子是被命名为 NMD 的无义介导的 mRNA 衰退, NMD 防止合成潜在有害的截短的早熟蛋白质 (Maquat 和 Carmichael, 2001)。在 NMD 中,通过终止密码子相对于下游稳定元件的位置已经确定终止密码子早熟。在酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中,他们被宽松地限定为 mRNA 序列,在哺乳动物细胞中,他们是在前 mRNA 拼接期间存放在外显子 - 外显子接合处的蛋白质复合物。无义 mRNAs 怎样降解和他们生产的蛋白质怎样定位是将来研究的领域。

[0289] 产生早熟终止 (无义) 密码子 (PTCs) 的突变有时会增加那些跳过有害突变的替代拼接转录产物的水平,因此有可能补救蛋白质的功能 (Mendell and Dietz, 2001)。因为认为翻译和 RNA 拼接发生在不同的细胞室,因此发现无义密码子特异 mRNA 上调机制在哺乳动

物细胞中独立于拼接增强子破坏起作用矛盾的。但是,在当前发明的大麦植物和其他植物中都没有观察到这种机制。

[0290] NMD、PCT 等等在植物育种环境中具有特殊的意义,因为这种现象会增加待筛选的颗粒或谷物颗粒的数目以鉴定出有价值的新特性。

[0291] 6.5 大麦突变体的选择

[0292] 本发明一方面是提供 LOX-1 活性的筛选条件,在该条件下 LOX-2 的活性减弱。该方法基于待筛选的大麦组织的性质和反应条件可以增加来源于 LOX-1 酶的 LOX 活性和减弱来自 LOX-2 酶的 LOX 活性这一令人惊奇的发现。在 Douma 等的以 W002/053721A1 公开的 PCT 申请 PCT/IB01/00207 中详述的低 LOX 突变体的筛选使用了大麦叶尖的蛋白质提取物,而且在 pH7.5 时确定酶活性,而当前的公开文本详述了允许重复鉴定 LOX 无效大麦突变体的有利筛选参数。首先,筛选 LOX-1 活性时,使用大麦植物特异组织很重要。优选地,所述组织包含该大麦颗粒,更优选地包含大麦颗粒的胚。一般,对所述组织的提取物,即大麦颗粒或大麦胚的提取物进行筛选。更优选地,确定 LOX-1 活性的提取物包含干燥大麦颗粒的匀化胚组织,最优选地,提取物由干燥大麦颗粒的匀化胚组织组成。这样,仅仅是来源于 LOX-2 的边缘活性有助于活性确定。第二,优选在使丙二烯氧化物合酶失活的 pH 条件下完成 LOX-1 活性测定,这样可以提供产量优良的 HPODEs。

[0293] 6.6 植物育种

[0294] 本发明的一个实施例的目标是提供包含 LOX-1 无效特性的农艺学有用大麦植物。可以把农作物发育看做仅始于引入新特性的延伸步骤。植物育种家的观点认为这一步骤通常产生与现在的市场品种相比,具有较少合乎需要的农业性状总体轮廓的植物。

[0295] 除 LOX-1 无效特性之外,在本领域产生商业麦芽大麦品种中要考虑其他重要因素,例如颗粒产量、颗粒大小及涉及萌发性能的其他参数。因为已经证明许多这种特性——如果不是所有的这种特性处于遗传控制下,因此提供现代的纯合高产麦芽栽培变种是非常合乎需要的,其中的麦芽栽培变种是与当前文本中公开的 LOX-1 无效大麦植物杂交的结果。这种大麦植物的颗粒提供了没有或仅有最低的将亚油酸转化成 9-HPODE 能力的优越的新原材料。因此大麦育种人员必须选择和研制具有产生丧失 LOX-1 功能的优良栽培变种特性的大麦植物。或者,大麦育种人员可以利用本发明的植物进行更进一步的诱变以产生来源于 LOX-1 无效大麦的新栽培变种。

[0296] 可以依照任何适当的方案繁殖本发明的大麦植物。

[0297] 6.7 大麦杂交

[0298] 本发明的另一个目标是提供包含 LOX-1 无效特性的农艺学良种大麦植物。因此,本发明也涉及通过将第一亲代大麦植物与第二亲代大麦植物杂交产生 LOX-1 无效新大麦植物的方法,其中第一或第二植物是 LOX-1 无效大麦。另外,第一和第二亲代大麦植株都可以来自 LOX-1 无效大麦品种。因此,任何这种使用 LOX-1 无效大麦品种的方法都是本发明的一部分:自花授粉、回交、群体杂交等等。利用 LOX-1 无效大麦品种作为亲代产生的所有植物都在本发明的范围内,包括那些从衍生于 LOX-1 无效大麦品种的品种发展得到的植物。LOX-1 无效大麦还可以用于遗传转化,在这种情况下,外源 DNA 被导入 LOX-1 无效植物或植物组织,并在其中表达。

[0299] 本发明可以使用回交方法将突变大麦植物的 LOX 无效特性导入另一个品种,例如

都是当代高产麦芽大麦栽培品种的 cv. Scarlett 或 cv. Jersey 中。在标准回交操作规程, 有价值的原有 (original) 品种 (回归亲本) 与携带单个有意义的待转移基因的第二品种 (非回归亲本) 杂交。接着再一次将这次杂交产生的 LOX-1 无效子代与回归亲本杂交, 重复这一步骤直到获取其中基本上全部的回归亲本特有特征都在转换的植物中被恢复的大麦植物, 除转移的非回交亲本的 LOX-1 无效特性的遗传结构 (set-up) 外。然后, 最后的回交代自交可产生 LOX-1 无效特性的纯种繁育子代 (参照图 9)。

[0300] 适当的回归亲本对成功的回交过程很重要, 回交过程的目标将 LOX-1 无效特性导入原有品种。为了完成这一过程, 在基本保留来自原有品种的所有剩余特性时, 用来自非回交亲本的低 LOX-1 特性修饰回归品种的遗传结构。虽然当被转移的特征是显性等位基因时回交方法被简化, 但是回交那些隐性 (recessive) LOX-1 无效特性是可能的, 在这种情况下必须引入生化分析来评价想要的特征是否被转移。

[0301] 一种加快植物育种过程的方法包含通过应用组织培养和再生技术对所产生的突变体进行初始倍增。因此, 本发明另一个方面提供生长和分化时产生具有 LOX-1 无效特性的大麦植物的细胞。例如: 育种可以涉及传统杂交、制备可增殖的花药衍生植物或利用小孢子培养。

#### [0302] 6. 8LOX 酶

[0303] 本发明的一个重要目标是提供缺乏合成活性 LOX-1 酶能力的大麦植株。LOXs 是具有单个非血红素铁因子的大单体蛋白质。在 <http://www.rcsb.org/pdb> 对蛋白质数据库检查显示通过 X-射线晶体衍射已经确定几个 LOX 酶的结构。这些蛋白质共有全部折叠和域结构, 每一个折叠和域结构具有较小的 N-末端八链  $\beta$  桶状域和较大的主要由长  $\alpha$  螺旋组成的 C 末端域。铁原子位于 C 末端域, 在那里铁原子被配位到组氨酸残基和唯一的正好是异亮氨酸的多肽羧基末端上。蛋白质表面的几个通道通向铁位点附近, 推测这些通道为底物、多不饱和脂肪酸和分子氧到达活性部位提供了通路。因为黄瓜类脂体 LOX 结合脂质体和类脂体依赖于 N-末端  $\beta$  桶的存在 (May et al., 2000), 在通过钙离子增强的过程中大豆 LOX-1 结合双层膜 (Tatulian and Steczko, 1998), 因此可以推测 LOX 酶结合脂质双层膜, 而这很可能就是 N-末端域的功能。确定 LOX 活性的方法, 以及分离、特征鉴定和 LOX 催化作用的直接的下游产品的定量的方法本领域普通技术人员很容易得到。

#### [0304] 6. 9LOX 路径产品

[0305] 在各种实施例中, 本发明涉及形成链烃 T2N 的能力被阻断的大麦植物或其产品。LOX 酶通过顺式 -1, 顺式 -4 戊二烯系统催化不饱和脂肪酸双氧化。在植物中, C18 多不饱和脂肪酸亚油酸 ( $18:2 \Delta^{9,12}$ ) 和  $\alpha$  亚麻酸 ( $18:3 \Delta^{9,12,15}$ ) 是主要的 LOX 底物。脂肪酸代谢的脂加氧酶路径的起始于在酰基链的 C-9 或 C-13 位置添加分子氧产生对应的 9- 和 13- 亚油酸或亚麻酸氢过氧化物。当以亚油酸作底物时, 可以形成 9- 或 13- 亚油酸 (HPODEs) 中的任何一种, 而当底物是  $\alpha$  亚麻酸时, 形成的产品是 9- 或 13- 氢过氧亚麻酸 (HPOTEs)。在 LOX 路径的氢过氧化物裂解酶支路中, 随后 9- 和 13- 氢过氧化物可以被切割成短链酮酸和醛 (参照图 1B)。

[0306] 值得注意的是 9-HPODE 可以被进一步地代谢为 9, 12, 13-THOE (参照图 1C), 9, 12, 13-THOE 是具有苦味的 THOE (Baur et al., 1977; Baur and Grosch 1977)。因此, LOX-1 失活植物将形成比例不同于野生型植物中观察到的比例的 THOEs。



[0307] 已经认识到本发明包括影响 LOX-1 催化作用的下代谢物的生产,其中下游代谢物不是作为 LOX-1 催化反应的直接产物而产生的,它是涉及 LOX-1 催化作用的产物的一系列反应连续反应的结果。这些反应包括自发的、因子诱导的或酶催化的异构化。因此,通过调整氢过氧化物裂解酶 (HPL) 的表达可以影响这些下游代谢物的产生。

[0308] 假设亚油酸的自动氧化可以产生与 T2N 形成相关的前体分子,那么更进一步地降低 alkenal 的水平是可能的。特别地,预计编码  $\Delta 9$ -去饱和酶(将硬脂酸转换变成油酸)或  $\Delta 12$ 去饱和酶(将油酸转换变成亚油酸)基因的下调将通过降低有关酶下游脂肪酸的水平和增加中间脂肪酸底物的水平,改变 C18 脂肪酸(硬脂酸,油酸和亚油酸)相对比例。运用天然变体或诱发突变进行选择育种的例子被用来研制含油种子农作物中改进的油范围,其中含油种子农作物包括但不限于高硬脂酸(stearic)(HS)大豆(Graef et al.,1985)、高油酸(coleic)(HO)菜籽(Auld et al.,1992),以及 Osorio 等(1995)和 Soldatov(1976)分别研制的 HS 和 HO 向日葵。

[0309] 特别有价值的是本发明包括产生不是 LOX-1 作用直接产物的醛,这种醛是在 LOX 路径的酶的作用下产生的,或者是通过醛的异构化,例如图 1B 中提供的 (3Z)-壬烯醛到 (2E)-壬烯醛的异构化产生的。也承认本发明包括产生相当于 LOX 路径的酶产生的醛和/或相当于所述异构化产生的醛的醇。所述醇典型地是在醛-酮还原酶超家族的酶成员(Srivastava et al.,1999)的作用下产生的,例如通过酶将 (2E)-壬烯醛转化成 (2E)-壬烯醛产生的。

[0310] 6.10 潜在 T2N(T2N Potential)

[0311] 本发明更进一步的目标是降低或者消除与 T2N 形成,包括 T2N 前体和醛加合物的形成相关的分子。虽然与啤酒老化相关的几个化学反应仍然难以捉摸,但是认为氧化过程是啤酒产物中产生腐败味的主要原因(Narziss,1986;Ohtsu et al.,1986)。已经公知腐败味的主要的分子贡献者是 T2N,这一点在第 2 部分("发明背景")中已经详述描述。在制造啤酒的过程中,当在发酵前的生产阶段产生这种醛时,这种醛可以通过结合氨基酸和蛋白质参与加合物的形成(Noël and Collin,1995),但也可能结合核酸、谷胱甘肽等等,后来通过发酵酵母可以防止它还原或氧化(Lermusieau et al.,1999)。但是,在发酵期间还可以和亚硫酸盐形成 T2N 加合物使该醛保持风味非活性状态(Nyborg et al.,上文)。

[0312] 大部分 T2N 加合物被转入成品啤酒中,在成品啤酒中游离 T2N 被释放(Ligeois et al.,2002),酸度条件和温度条件是这一过程中的重要因素。T2N 加合物包含在限定的反应条件下,例如在 100°C,pH 4.0 的条件下温育 2h 会降解 T2N 加合物释放 T2N 的部分潜在 T2N。熟练技术人员知道如何将潜在 T2N 作为啤酒储藏期间怎样释放 T2N 的指示物,例如 Drost 等(上文)已经描述这一过程。

[0313] 当前发明的大麦颗粒在 LOX-1 催化形成 9-HPODE 方面受到限制,其中 9-HPODE 通常在 LOX 路径支路中作为产生 T2N 的前体分子起作用。因此利用 LOX 无效大麦颗粒生产的啤酒将不仅具有极低水平的 T2N,而且也具有极低水平的潜在 T2N。LOX-1 无效大麦颗粒产生的完全缺乏 T2N,或包含可忽略水平的潜在 T2N,包括 T2N 加合物的啤酒产物在本发明的范围内。因此,利用 LOX-1 无效大麦生产的啤酒在储藏期间基本上不产生或仅仅产生可忽略的 T2N 特异的异味。

[0314] 6.11 抗病性

[0315] 本发明更进一步地涉及抗病大麦。认为植物 LOXs 与活性抗病机制,总称为过敏反应 (HR) 的发展有关,其中过敏反应是程序性细胞死亡的一种形式 (Rustérucci et al., 1999) 在 HR 中,感染后位于传染位点附近的植物细胞的迅速死亡导致形成坏死斑。这样,病原体传播被限制,而且能防止对剩余植物器官的更进一步破坏。在几个植物病原体系统中,HR 与 LOXs 的表达相联系,其中 LOXs 具有产生 HPODE 而且 9-HPOTE 的特异性 (Rustérucci et al., 上文; Jalloul et al., 2002), 这可能是因为氢过氧脂肪酸的大量产生导致组织坏死。

[0316] 编码 LOX-1 的基因主要在大麦颗粒中表达,而许多另外的 LOX 酶在植物的叶中表达。因此,导致 9-HPODE、13-HPODE、9-HPOTE 和 13-HPODE 形成的 LOX 路径分支在大麦叶中是有功能的,而且不同的 oxylipins 组合反映单独的感染和创伤事件。已经描述马铃薯叶相似的分子方案 (Weber et al., 1999)。

[0317] 天然发生的挥发性醛抑制某些病原体在植物上生长,一些植物对特殊病原体的天然抵抗力可以归于挥发性醛的产生 (Croft et al., 1993; Bleéand Joyard, 1996; Vancanneyt et al., 2001)。因此,相对于野生型植物,本发明的 LOX-1 无效大麦植物的改变的 oxylipin 轮廓可以防止、降低、改善或消除病原体、病原体产物或植物-病原体相互作用产物的存在。病原体的一个非限制性例子是曲霉属 (*Aspergillus*) (参见下文)。

[0318] 因此,在一个实施例中,本发明涉及显示出抗病性增强的 LOX-1 无效大麦植物。

#### [0319] 6.12 真菌毒素

[0320] 本发明也公开了曲霉群 (clonization) 敏感度降低的大麦植物的用途。曲霉是大麦颗粒麻烦的殖民者,经常导致污染致癌真菌毒素 (mycotoxins) 黄曲霉毒素 (aflatoxin) 和柄曲菌素 (sterigmatocystin)。因为真菌产生黄曲霉毒素受高水平 9-HPODE、9-HPOTE、13-HPODE 和 13-HPOTE 的影响,因此 Keller 在美国专利 No. 5, 942, 661 中要求保护产生的所述氢过氧脂肪酸的量足以抑制真菌毒素产生的转基因农作物。另外,所述美国专利和 Burow 等 (2000) 的资料详细说明 13-HPODE 抑制黄曲霉毒素的产生,而 9-HPODE 增强黄曲霉毒素的产生。

[0321] 因为 LOX-1 无效颗粒缺乏活性 LOX-1 酶,因此所述颗粒包含比野生型植物水平略高的 13-HPODE,而且包含相对于所述颗粒的非遗传修饰亲本组织,水平较低的 9-HPODE。因此相对于野生颗粒,LOX-1 无效颗粒可以避免曲霉寄居,或者在曲霉污染后显示出水平降低的真菌毒素。

[0322] 因此,本发明涉及与野生型大麦植物相比,真菌毒素水平降低的大麦植物。

#### [0323] 6.13 香料

[0324] 利用 LOX-1 无效大麦生产香料和青香韵化合物也是本发明的一个方面。到目前为止,大多数与大麦 LOX 路径的各种支路相关的研究工作都集中在从 13-HPOTE 产生茉莉酮酸 (Turner et al., 2002) 和如上所述的抗病性方面。为了选择性的商业目的对大麦氢过氧脂肪酸的注意较少。但是,值得注意的是 LOX-1 无效大麦颗粒中完全缺少活性 LOX-1 预期会导致所述颗粒中富集 13-HPODE 和 13-HPOTE。以这种新特性为基础,新应用可能涉及大麦农作物的工业用途,例如用于生产短链脂族醛和乙醇 (例如,青香韵化合物己醛 / 己烯醛和己醇 / 己烯醇)。

[0325] 与生产青香韵相关的几个方面已经在专利,包括但不限于讨论的美国专利

No. s6, 008, 034、6, 150, 145 和 6, 274, 358 中公开。 Häusler 等的美国专利 No. 6, 008, 034 中公开了利用特异的氢过氧化物裂解酶生产青香韵化合物的过程, Häuser et al. 等的美国专利 No. 6, 150, 145 和 Holtz 等的美国专利 No. 6, 274, 358 中描述了利用标准植物原料的这一过程。利用 LOX-1 无效颗粒生产青香韵化合物包含为实现所述生产使用新原材料。不能认为来源于本发明的 LOX-1 无效大麦颗粒的新原材料是标准植物原料, 因为它是衍生自诱变操作规程后已经经过挑选的颗粒, 在本公开文本的 6. 4-6. 7 部分已经详述诱变操作规程。认为 LOX-1 无效大麦颗粒的工业用途超出了该专利前一段叙述的权利要求的范围, 主要因为由当前发明的 LOX-1 无效颗粒产生的新原材料将大大改进 LOX-1 催化产生 9-HPODE 和 9-HPOTE 过程强加的正常限制, 其中 9-HPODE 和 9-HPOTE 两氢过氧脂肪酸不能作为酶催化产生青香韵顺式 3- 己烯醛和顺式 3- 己烯醇的前体分子。

#### [0326] 6. 14 编码 LOX 的基因的异源表达

[0327] 在多个实施方案中, 本发明涉及具有 LOX-1 无效特性的转基因大麦植物。预想植物基因工程将来的发展将导致产生 LOX-1 合成被抑制的大麦植物。已经作为控制异味形成的方式提出这一概念, 但是还没有报道这种方法的结果 (McElroy and Jacobsen, 1995)。这里描述的发明可以与将来的这种改进结合使用, 以构建具有与 LOX-1 序列的信使 RNA (mRNA) 的至少一部分互补的反义构建物的反义 LOX-1 植物。构建与对应 mRNA 杂交的反义核苷酸与在转基因大麦中表达反义 SnRK1 蛋白激酶序列中的描述相似 (Zhang et al., 2001)。可以构造反义序列修饰, 只要该序列能与对应 mRNA 杂交并干扰对应 mRNA 的表达就可以。这样就可以使用与对应反义序列具有 70%、优选 80%、更优选 85% 的序列同一性的反义构建物。而且, 反义核苷酸的部分可以用来破坏靶基因的表达。通常可以使用至少 50 个核苷酸、100 个核苷酸、200 个核苷酸或更多个核苷酸的序列。因此, 本发明的适用范围并不仅限于那些通过常规诱变方法产生的植物。

[0328] 虽然经由同源重组的靶基因替换在酵母中非常容易, 但是它的效率在大多数多细胞真核生物中仍然有限, 而且还不允许产生这种大麦植物和一组基因组范围的基因破坏 (Parinov and Sundaresan, 2000)。最近已经在几个发育过程中利用基因沉默来研究秀丽隐杆线虫基因组的 86% 的预知基因的作用 (Ashrafi et al., ;Kamath et al., 2003)。为了产生具体基因, 例如 LOX-1 编码基因的功能完全丧失的大麦植物使用 RNA 干扰 (RNAi) 方法有几个缺点。这些缺点包括表型缺乏稳定遗传率、剩余基因活性水平不定 (Hannon, 2002 ;Bargman, 2001 ;Wesley et al., 2001), 而且不能同时沉默几个不相关基因 (Kamath et al., 2000)。

[0329] 也可以以有义方向使用本发明的核苷酸序列来抑制植物中编码 LOX 酶的内源基因的表达。以有义方向利用本核苷酸序列抑制植物中基因表达的方法本领域已经已知 (例如, 参见 Jorgensen 和 Napoli 的美国专利 5, 283, 184)。该方法通常涉及用 DNA 构建物转化植物, DNA 构建物包含操作性地与相应于内源基因转录产物的核苷酸序列的至少一部分连接的驱动植物中的表达的启动子。典型地, 这种核苷酸序列与内源基因的转录产物序列具有较高的序列同一性, 优选大于大约 65% 的序列同一性、更优选大于大约 85% 的序列同一性, 最优选大于大约 95% 的序列同一性。

[0330] 在 Cahoon 等的美国专利申请公布 No. 2003/0074693A1 中描述和公开了与编码 LOX

酶的基因的异源表达相关的各个方面。虽然所述专利申请叙述了关于大麦 LOX 酶的背景技术,并公开了许多编码 LOX 的基因序列,但是编码 LOX-1、LOX-2 和 LOX-3 的大麦基因中没有任何一个显示出包括在 Cahoon 等的美国专利申请公布 No. 2003/0074693A1 叙述的权利要求范围内的足够程度的同一性。

[0331] 当本发明已经在上述描述中进行详细描述时,认为相同的序列是作例证的,在性质上并不是限制性的,应理解来自本发明精神内的所有变化和修饰都是希望得到保护的。因此,在本发明的范围内实践某些变化和修饰,例如单个基因修饰和突变、somaclonal 变体、从当前的栽培品种的大量植物群体中选择的变体个体等等是很明显地,发明的范围只能由附加的权利要求的范围限定。参考下列具体的实施例更进一步地对本发明进行描述;提供这些实施例是更进一步地举例说明本发明,不应认为他们是限制本发明的范围

#### [0332] 6. 15LOX 抑制剂

[0333] 本发明也涉及降低或防止大麦 LOX-1 活性的方法。几个 LOX 抑制剂可以选自氧化还原和非氧化还原抑制剂类、抗氧化剂、铁螯合剂、包含咪唑的化合物、苯并吡喃衍生物等等。

[0334] 因此在一个实施例中,本发明涉及降低大麦 LOX(优选 LOX-1)活性的方法,包括步骤

[0335] (i) 提供大麦植物或其部分或从大麦制备的植物产品,

[0336] (ii) 提供 LOX 抑制剂

[0337] (iii) 用所述 LOX 抑制剂温育所述大麦植物或其部分或从大麦制备的植物产品,因此降低大麦 LOX(优选 LOX-1)的活性。

[0338] 在一个实施方案中,所述植物产品是麦芽,在糖化步骤期间将所述 LOX 抑制剂添加到所述麦芽中。这将优选导致所述糖化步骤产生的麦芽汁中的 T2N 水平低些。

[0339] 所述大麦植物或其部分或从大麦制备的植物产品可以是 LOX-1 无效大麦或其部分或从 LOX-1 无效大麦制备的植物产品。但是,其他大麦可以优选用于该方法。

[0340] 在多种 LOX 抑制剂中,氧化还原 LOX 抑制剂可以选自邻苯二酚丁烷(catecholbutane)衍生物,例如 Jordan 等的美国专利 No. s5, 008, 294, Allen 的美国专利 No. s4, 708, 964 和 Jordan 的美国专利 No. s4, 880, 637 中描述的任何一种,例如去甲二氢愈创木酸(nordihydroguaiaretic acid)(NDGA)或其 enantiomers 中的一个。

[0341] 抗氧化剂 LOX 抑制剂可方便地选自石炭酸、类黄酮等等。抗氧化剂 LOX 抑制剂也可以选自没食子酸盐,包括没食子酸辛酯。通过下文实施例 18 中描述的测定可证实实际上是 LOX 抑制剂的化合物。

[0342] 在工业上,没食子酸辛酯已知的大豆脂加氧酶抑制剂(Ha et al., 2004),具有特殊价值,现在允许将它作为食物中的抗氧化添加剂使用(Aruoma et al., 1993)。这一特性使得在存在公认的抑制剂没食子酸辛酯的情况下测试纯化的大麦 LOX-1 活性有意义。有趣的是,糖化期间存在没食子酸辛酯导致 T2N 水平较低。

[0343] 因此当前发明的实施方案提供了添加到碎麦(mash)芽中后将使 T2N 水平降低的 LOX-1 抑制剂及其用途。

#### [0344] 7. 实施例

[0345] 这里的例子举例说明了本发明的优选实施方式,不应认为是对本发明的限制。

[0346] 除非另有陈述, 否则是按照 Sambrook 等 (1989) 和 Sambrook and Russell (2001) 中的描述操作核酸和细菌, 完成基本的分子生物技术。

[0347] 将本部分的例子分成下列主题, 其目的是为了说明书清楚, 而不是限制发明:

[0348] (i) 筛选和突变体选择

[0349] (ii) 大麦突变体 D112 和 A618

[0350] (iii) 大麦突变体 D112 和 A618 的生理学特性

[0351] (iv) 突变体 D112 和 A618 是 LOX-1 无效植物

[0352] (v) 糖化

[0353] (vi) 利用野生型和突变体大麦的麦芽生产麦芽和啤酒

[0354] (vii) LOX-1 无效麦芽的啤酒中的三羟基十八碳烯酸

[0355] (viii) 啤酒中的三羟基十八碳烯

[0356] (ix) 大麦中来自 LOX 作用的酶产物的生化特征鉴定

[0357] (x) 突变大麦突变体 D112 中的 LOX-1 基因

[0358] (xi) 突变大麦突变体 A618 中的 LOX-1 基因

[0359] (xii) LOX-1 转录产物的 RT-PCR 检测

[0360] (xiii) 携带 D112 突变的大麦突变体的遗传检测

[0361] (xiv) 样品混合物中的突变体检测

[0362] (xv) 突变体 D112 的重组 LOX-1 是失活的

[0363] (xvi) 转基因大麦植物

[0364] (xvii) 青香韵化合物

[0365] (xviii) LOX-1 抑制剂

[0366] (xix) 用没食子酸辛酯糖化

[0367] 实施例 1

[0368] 筛选和突变体选择

[0369] 大麦诱变。依照 Kleinhofs 等 (1978) 提供的详细描述, 分别用诱变剂 NaN<sub>3</sub> 温育从 cv. s Barke Celeste, Lux Prestige, Saloon 和 Neruda 大麦植物收集的颗粒。选择这一过程是因为已知它会在大麦基因组 DNA 中诱导点突变, 并在诱变处理的 DNA 编码的那些蛋白质中产生氨基酸替换或截断。

[0370] 在当前公布的诱变实验中, 选择在实验点通过随后繁殖突变的 M1 代谷物颗粒两代, 最后产生高比例的供筛选的纯合子植物 (图 1A)。预计产生的 M3 代突变体谷物发生的频率为 0.9-2.3/10,000 谷物颗粒 (Kleinhofs et al., 上文)。值得注意的是没有筛选 M2 颗粒, 主要因为这些颗粒包含比例相对高的杂合点突变。

[0371] 筛选。目的在于研制检测缺乏 LOX-1 活性的 M3 突变体大麦颗粒的快速高通量筛选程序, 以避免使用已知的包含几种 LOX 活性的叶尖的麻烦的筛选程序 (在 Douma 等的以 W002/053721A1 公开的 PCT 申请 PCT/IB01/00207 中公开)。焦点在于确定成熟大麦颗粒的胚, 包括 scutellum 组织中的 LOX 活性。一般, 测定条件与 Anthon 和 Barrett (2001) 描述的那些条件相似。测定基于 LOX 催化产生亚油酸氢过氧化物, 亚油酸氢过氧化物在血红蛋白催化反应中将 3-甲基-2-苯噻唑啉酮 (benzothiazolinone) 与 3-(二甲氨基) 安息香酸氧化偶联, 导致形成分光光度计可以测量的蓝颜色。

[0372] 实际上,一个测定系列起始于将 96 个大麦胚组织,包括胚鳞 (scutellum) 分开均化成细粉组合物。这些细粉被转入冰冷的存储板 (ABgene),其中 1.2ml 的 96 个孔中的每一个孔都包含一个圆的 5-mm 的玻璃珠和 200ul 水。然后在 MM 300 实验型磨机 (Retsch) 中温育存储板 35 秒,电子调节摇动频率为 27 秒<sup>-1</sup>。随后,在 4℃ 用 Allegra 6R 离心机 (Beckman-Coulter) 以 4,000rpm 离心存储板 15 分钟沉淀不溶性物质,此后继续保存在冰上最多 120 分钟直到下一个步骤。

[0373] 96 孔板被转入能依照 Anthon 和 Barrett (上文) 中描述的 LOX 测定,按程序移液的 Biomek 2000 实验室自动化工作站 (Beckman-Coulter)。最后,96x26ul 的胚提取物被转入标准的 96 孔微量滴定板 (Nunc),接着添加 90ul 的试剂 A [12.5mM 3-(二甲氨基)安息香酸,0.625mM 亚油酸 (实施例 9 详细描述了其制备过程)] 和 90ul 试剂 B (0.25mM 3-甲基-2-苯噻唑啉腙 (benzothiazolinehydrazone),0.125mg/ml 血红蛋白);试剂 A 是通过先混合相当于 134mg 游离酸的 155ul 亚油酸 (Sigma, L-1376) 和 257ul Tween-20,然后加入水使体积达到 5ml,接下来添加 600ul 的 1M NaOH,当溶液变清澈时,用另外的水将其调节为 20ml 而制备的。利用 Flourostar Galaxy 分光光度计 (BMG Labtechnologies) 测量 96 孔板的每一孔中的 A<sub>595</sub>,其中氢过氧化物产物的颜色形成是测量存在的总 LOX 活性的尺度 [因此以 A<sub>595</sub> 单位 (A<sub>595</sub>U) 给出活性]。

[0374] 潜在突变体的鉴定。筛选大麦 cv. Barke (来源于总共 2,160 个系)、cv. Celeste (2,867 个系)、cv. Lux (2,625 个系)、cv. Prestige (1,379 个系)、cv. Saloon (1,743 个系) 和 cv. Neruda (3,780 个系) 的谷物颗粒的 LOX 活性,目的在于鉴定和野生型颗粒相比所述活性大大降低的颗粒。在 M3 代鉴定了总共 90 个潜在的未加工突变体 [cv. Barke (12 个系)、cv. Celeste (38 个系)、cv. Lux (9 个系)、cv. Prestige (16)、cv. Saloon (12 个系) 和 cv. Neruda (3 个系)]。从这些突变体中的每一个突变体获得的谷物被繁殖到 M4 代,然后再收获,筛选与极低 LOX 活性相关的特性。最后表明只有命名为突变体 D112 的一个 cv. Barke 系和命名为突变体 A618 的一个 cv. Neruda 系显示出所述总 LOX 活性极低。

[0375] 用成熟静态 (quiescence) 谷物的提取物来完成对 LOX 活性的详细测量,成熟静态谷物中的活性几乎专门由 LOX-1 提供 (Schmitt and van Mechelen, 1997)。按照如上所述的比色 LOX 测定确定的突变体 D112 的干燥成熟 M3 谷物胚的总 LOX 活性 (参照图 2;表 1) 是 0.407±5.8% A<sub>595</sub>U/胚,而 cv. Barke 的是 1.245±7.6% A<sub>595</sub>U/胚。在第二组实验中,发现突变体 A618 的 M3 代成熟干燥谷物的胚提取物中的 LOX 活性是 0.221±2.6% A<sub>595</sub>U/胚,而野生型 cv. Neruda 的提取物是 0.721±3.6% A<sub>595</sub>U/胚 (图 3,表 1)。

[0376] 实施例 2

[0377] 大麦突变体 D112 和 A618

[0378] 进行分析确定 M4 和 M5 代 LOX-1 无效植物是否是对应突变表型的纯合子。这类分析对确定 M3 代中的目的突变是隐性性状或显性性状有用。换句话说,如果 M3 代植物是显性突变的杂合体,那么后代将使那个表型分离开。

[0379] 测量大麦突变体 D112 和 A618 的 M3、M4 和 M5 代胚中的总 LOX 活性,并将活性与分别来自 cv. Barke 和 cv. Neruda 的活性进行比较。在当前公布文本的实施例 1 中描述了对 LOX 活性的确定。在所有实验中,来自 cv. Barke 胚的标准提取物和加热失活的来自

cv. Barke 胚的标准提取物被用作对照样品。

[0380] 突变体 D112M4 代谷物胚的平均总 LOX 活性是  $0.334 \pm 1.5\% A_{595}U$  ( $n = 12$ )，而对于突变体 D112M5 代胚的是  $0.294 \pm 4.1\% A_{595}U$  ( $n = 90$ )。对比的野生型 cv. Barke 的 M4 代胚和 M5 代胚分别产生  $0.738 \pm 3.2\% A_{595}U$  ( $n = 2$ ) 和  $0.963 \pm 7.5\% A_{595}U$  ( $n = 90$ ) (参照图 4 ;图 5 ;表 1,实验 1)。

[0381] 大麦突变体 A618 的 M4 代胚产生  $0.222 \pm 2.1\% A_{595}U$  的平均 LOX 活性 ( $n = 4$ )。这一实验的其他结果显示 cv. Neruda 胚中的 LOX 活性是  $0.684 \pm 5.8\% A_{595}U$  ( $n = 90$ )。结果概括在图 6,表 1 和实验 2 中。

[0382] 总之,实验数据证实突变体 D112 的 M4 和 M5 代谷粒是总 LOX 活性极低的特异遗传特性的纯合子。突变体 A618 的 M4 代谷物显示相同的特性。

[0383] 实施例 3

[0384] 大麦突变体 D112 和 A618 的生理学特性

[0385] 在温室繁殖植物。cv. Barke 和突变体 D112 的谷物 (M4 和 M5 代) 在温室中,在相对湿度为 65%,光照为 20h,温度为 12°C 的条件下萌发和生长。突变体 D112 和野生型 cv. Barke 植物的在株高、每株植物的分蘖数,开花的起始 (on-set) 和 / 或每一个穗的谷物数目方面的生长特点与野生型大麦相似。因此,不仅能推断出突变体 D112 具有野生型植物的生长生理学,而且可推断出突变体 D112 具有正常的谷物发育。

[0386] 突变体 A618 谷粒的 M4 代和 cv. Neruda 谷物在温室中,在相对湿度为 65%,光亮 / 黑暗条件为 20h/4h,温度为 12°C 的条件下萌发和生长。进行比较时,没有观察到突变体 A618 和 cv. Neruda 在株高、每株植物的分蘖数,开花的起始和 / 或每一个穗的谷粒数目方面存在差异。但是,突变体 A618 的背侧 (dorsal side) 谷物因为异常的洞样 (hole-like) 结构不同于母本 cv. Neruda。总之可以推断出突变体 A618 显示出与野生型植物类似的生长生理学,但是显示出异常的谷物发育。

[0387] 在田间条件下,突变体 D112 的农学性能。在田间试验中比较鉴定突变体 D112 和 cv. Barke 植物在株高、抽穗期、抗病性、倒伏 (lodging)、穗断裂、成熟时间和产量方面的可能差异 (参见表 2)。

[0388] 依照田间试验的标准程序完成该试验。因此,将等份的突变体 D112 和 cv. Barke 颗粒种植在 2 个地点的 7.88m<sup>2</sup> 地块里,其中每个样品包含 3 份复制。在整个生长季节,仔细地观察农学数据特征,重点是如上所述的特性。观察到的突变体 D112 和 cv. Barke 的农业性状都不是没有差异。

[0389] 实施例 4

[0390] 突变体 D112 和 A618 是 LOX-1 无效植物

[0391] 蛋白质分析。进行下列分析以表征突变体 D112 和 A618 的突变表型特征。对从静态大麦谷物中除去的胚的提取物进行 Western 印迹分析。在 mortar 中的 300ul 冰冷的水中提取一个胚,提取物被转入微量离心管中以 10,000g 的离心力离心。依照 Laemmli (1970) 提供的描述,通过十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离包含 10ul 粗提物的样品等分。此后,通过 Towbin 等 (1979) 已经详细描述在半干印迹将分离的蛋白质转移到硝酸纤维膜上。用 1 : 500 稀释的 LOX-1 特异单克隆抗体 5D2 (Holtman et al., 1996) 作为探针探察印迹,然后用与碱性磷酸酶偶连的山羊抗小鼠抗体温育,并用碱性磷酸酶底

物氮蓝四唑和 5-溴-4-氯-3-吲哚-磷酸盐进行检测,这一点 Holtman 等已经描述(上文)。通过 5D2 抗体识别 cv. Barke 胚的提取物中的 LOX-1,在 SDS-PAGE 中蛋白质的迁移与来自 cv. Vintage 的 LOX-1 相似。

[0392] 在突变体 D112 的样品中没有免疫可检测 LOX-1,但是在 cv. Barke、突变系 G 和 cv. Vintage 的提取物中可以鉴定这种蛋白质。cv. Barke 和突变体 D112 的 M4 子代系的 Western 分析显示来自 cv. Barke 胚的谷物中存在 LOX-1 蛋白质,而不是突变体 D112 的任何子代谷物中存在 LOX-1 蛋白质(图 7),因此证实 LOX-1 无效特性在遗传上是稳定的。通过卡方检验(chi-square)确定这些数据在统计上有显著意义( $p < 3.84$ )。如上所述,分析突变体 A618 和 cv. Neruda 的 M3 和 M4 代胚中的 LOX-1 蛋白质。在两代 cv. Neruda 的胚提取物中都可以检测到 LOX-1 蛋白质。但是,在未加工突变体 A618 和子代系的胚中(图 8)观察到非常模糊的 LOX-1 蛋白质条带,这可能是由于其他 LOX 酶的交叉反应引起的。

[0393] 回交。利用重复回交将 LOX-1 无效表型从突变体 D112 转移到回归亲本里(参照图 9),在本公开文本中回归亲本是 cv. Prestige。在图 9 中举例说明了计划的与选择有价值的特性结合的回交程序。目的是逐步用回归亲本的基因组取代突变体 D112 的基因组。这样,可以消除在 Na<sub>3</sub>N 诱变处理期间引入突变体 D112 基因组的其他潜在的不利突变。

[0394] 预计纯合的 LOX-1 无效突变体 D112(基因型表示为 nn)与 cv. Prestige(基因型表示为 NN)第一次回交的子代系包含杂合的基因型(基因型表示为 Nn)。值得注意的是由于低 LOX 表型是隐性性状,因此在是这种突变的杂合体的系中它将逃脱检测。预计自花传粉后代产生以正常孟德尔模式分离的植物群体,也就是比例为 1NN : 2Nn : 1nn 的植物群体。包含 LOX-1 无效基因型的由第一个回交产生的纯合 nn 基因型包含 cv. Prestige 的 50% 的遗传背景。在 10 轮回交之后,回归亲本背景预计达到 99.9%。

[0395] 在整个回交程序中,在温室繁殖 cv. Prestige 和 LOX-1 无效突变体 D112 的大麦植物。按照实施例 1 中的描述分析回交子代的胚提取物中 LOX-1 蛋白质的存在。在第一和第二回交代的分离的子代中 LOX-1 无效表型的期望频率是 25% 的隐性突变(图 10)。利用 western 印迹分析作为检测缺乏 LOX-1 蛋白质条带的大麦突变系的基础,第一回交代的频率相当于 3 个系/12 个总回交系。在第二回交代中,9 个系/28 个总回交系在 western 印迹分析中缺少 LOX-1 蛋白条带(图 10)。因为在第二回交子代中回归亲本背景达到大约 75%,因此 LOX-1 突变基因和对应 LOX-1 无效表型的共遗传证实了他们的遗传连锁。卡方检验显示观测到的数据统计上有显著意义。 $p$  值低( $< 3.84$ ), $p$  值是显示第一、第二、第三和第四回交代有意义的特性。

[0396] 回交程序表明产生 LOX-1 无效表型的突变体等位基因可以被转入替换的遗传背景中,而且以遵循孟德尔分离法则的隐性单因素方式遗传。

[0397] 实施例 5

[0398] 糖化

[0399] 制备麦芽汁。为了测试新大麦栽培品种的特性,制备了新大麦栽培品种的 25-225g 麦芽样品(参照图 11)。利用包含外部搅拌器和配备了恒温器的水浴装备的实验室麦芽糖化系统,可以小规模地完成糖化过程,其中恒温器能够以明确限定的梯度匀变温度。用纸过滤器过滤最后的碎麦芽。利用加热壁炉台和连接到回流冷凝器上的圆底烧瓶,以实验室规模完成麦芽汁煮沸。



[0400] 实施例 6

[0401] 利用野生型和突变体大麦的麦芽生产麦芽和啤酒

[0402] 为了获取足够的制麦芽和酿造的谷物原料,在田间繁殖 cv. Barke 和突变体 D112 大麦几季。对成品啤酒的 T2N 分析和感官分析表明用突变体 D112 麦芽酿造的啤酒具有改进的风味稳定性。

[0403] 使来源于突变体 D112 和 cv. Barke 的颗粒萌发。在麦芽作坊实施 20kg 规模的制麦芽过程,步骤如下:突变体 D112 大麦谷物(在 2003 年收获),cv. Barke 谷物(在 2002 年收获)。浸泡条件是:8h 湿润;14h 干燥;8h 湿润;10h 干燥;16°C 在浸泡水中润湿 4h。萌发条件是:18°C 12h;16°C 24h;14°C 24h;12°C 60h。干燥条件是:60°C 12h;68°C 3h;74°C 4h;80°C 3h。

[0404] 在表 3 中比较了利用来源于突变体 D112 和 cv. Barke 麦芽的麦芽样品进行麦芽制造分析的数据。结果表明突变体 D112 和 cv. Barke 的麦芽满足麦芽规范,而且证实这些麦芽适合酿造。突变体 D112 的麦芽与 cv. Barke 麦芽相比,其中 T2N 水平明显降低,相当于降低~64%(表 4)。

[0405] 用来源于突变体 D112 和 cv. Barke 的麦芽进行酿造。进行的 50-1 规模的酿造,涉及下列步骤:(i) 制备麦芽汁;(ii) 分离麦芽汁;(iii) 煮沸麦芽汁;(iv) 发酵;(v.) 贮藏;(vi) 浅色(bright)啤酒过滤;和(v) 装入瓶中。利用突变体 D112 或 cv. Barke 的麦芽制备麦芽汁,其中后者用作参比样品。每种酿造,总共使用 13.5kg 麦芽。按照 47°C 20 分钟,接着加热 18 分钟,其中加热过程中温度从 48°C 升高到 67°C;在 67°C 暂停 30 分钟;然后加热 5 分钟到 72°C;在 72°C 暂停 15 分钟,加热 6 分钟到 78°C;在 78°C 暂停 5 分钟的条件进行糖化。依照标准酿造实践的规范完成酿造步骤中的麦芽汁过滤和煮沸、涡流分离、发酵、贮藏和包装到绿玻璃瓶中。总共装瓶 331 啤酒。

[0406] 风味稳定性和 T2N 分析。如上所述利用突变体 D112 和 cv. Barke 的麦芽生产啤酒。新近装瓶的啤酒储存在 5°C,并在生产 2 个月内对其进行分析。在两个不同类型的啤酒储存条件后,评估新鲜和储存啤酒的风味稳定性。在一个试验系列中,让啤酒在 37°C 经受 1-4 周的强迫老化过程。

[0407] 基本上按照 GrÖnqvist 等的(1993)描述,在用 0-(2,3,4,5,6-五氟苯甲基)-羟胺衍生羰基后,通过用质谱检测的气相色谱法确定啤酒样品的 T2N 水平。

[0408] 受过训练的啤酒品尝小组评估啤酒的总风味得分。检查包括对啤酒中指示游离 T2N 的纸板风味的检测。值得注意的是,两种新鲜啤酒都包含相似水平的亚硫酸盐,即来源于突变体 D112 和 cv. Barke 麦芽的啤酒的亚硫酸盐分别是 4ppm 和 5ppm。

[0409] 强迫老化。研究和比较由 cv. Barke 麦芽和来源于突变体 D112 的麦芽生产的瓶装啤酒,有关在强迫老化期间游离 T2N 产生的特异数据显示在图 12A 和表 5 中。可以看到,啤酒在 T2N 的产生动力学方面有显著差异,因此能互相区分。参考啤酒的结果正如所料,在来源于突变体 D112 的啤酒中观察到出乎意料且显著低的 T2N 发生。

[0410] 强迫老化实验加强了两个啤酒之间的差异。在 2 周半之后,参考啤酒的 T2N 水平超过了味觉阈值水平,而利用突变体 D112 麦芽生产的啤酒在温育 2-3 周后, T2N 浓度稳定在 0.025ppb。

[0411] 考虑到味道和风味的稳定性,一组风味专家评估了利用 LOX-1 无效大麦突变体

D112 生产的啤酒。焦点集中在 37°C 经历了强迫老化的啤酒样品上。品尝小组发现新鲜和强迫老化啤酒两种类型都显示令人满意地风味轮廓。但是,参考啤酒的似纸味道评分高于利用 LOX 无效突变体 D112 麦芽生产的啤酒(表 5),即提及的异味在参考啤酒中具有更强烈的味道。一般,品尝小组优选由 LOX-1 无效突变体 D112 麦芽产生的啤酒(风味接受得分,表 5)。

[0412] 当在 20°C 温育了 12 个月时,10 位啤酒品尝者组成的小组比较了由 LOX-1 无效突变体 D112 和对照麦芽产生的啤酒,其中品尝者是经过训练的品尝啤酒异味的专家。对包括例如“似纸的”、“氧化的”、“老化的”、“面包样的”、“焦糖”、“烧焦”和“甜”的味道特征的全面评价显示对照啤酒中老化特异异味的水平高于从 LOX-1 无效麦芽制备的啤酒(图 12B)。

[0413] 利用标尺为 0-5 的等级评定,其中数值高是优选的,判定对照啤酒和用 LOX-1 无效大麦突变体 D112 的麦芽生产的啤酒的一般风味接受得分分别是 1.0 和 2.0。

[0414] 总之,从大麦突变体 D112 的麦芽酿造的啤酒的改进的风味稳定性是显著的,这主要是因为 37°C 贮藏后的啤酒中 T2N 水平低。集中于使用 LOX-1 无效大麦芽的酿造试验为制造麦芽和酿造过程中 LOX-1 的作用构成老化啤酒中主要的异味化合物 -T2N 出现的关键决定因素提供了证据。

[0415] 实施例 7

[0416] LOX-1 无效麦芽的啤酒中的三羟基十八碳烯酸

[0417] 在 30 多年前已经描述来源于亚油酸的啤酒特异的三羟基十八碳烯酸 (THAs ;也可以缩写为 THOEs) (Drost et al., 1974)。从那时起,多份报告已经证实啤酒中 THAs 的总量在 5.7-11.4  $\mu$ g/ml 间变化 (Hamberg 1991 ;和其中的参考文献)。9,12,13-THA 通常构成啤酒 THAs 的 75-85%,而 9,10,13-THA 通常只占 15-25%。也发现痕量的其他异构体。

[0418] 由大麦突变体 D112 的麦芽(即 LOX-1 无效制麦芽)产生的啤酒中的 9,12,13-THA 的浓度与由 cv. Barke 的麦芽制成的参考啤酒相比降低到了 20%(即几乎 5 倍),那就是说在利用 LOX 无效突变体 D112 麦芽生产的啤酒中,异构体 9,12,13-THA 和 9,10,13-THA 几乎等量存在。利用标准的 HPLC 质谱分析进行测量。

[0419] 实施例 8

[0420] 啤酒中的三羟基十八碳烯酸

[0421] 市场上可买到的啤酒样品的宽范围的 THAs 浓度显示在表 7 中。如表 7 所示,对啤酒样品中关于 THAs 的结果的严格检查显示 9,12,13-THA : 9,10,13-THA 的比例总是超过 3.5。相反,由 D112 产生的啤酒中 9,12,13-THA : 9,10,13-THA 的比例是 1.3。因此,由 LOX-1 无效大麦产生的啤酒包含显著降低的比例,确定 9,12,13-THA/9,10,13-THA 比例为确定啤酒是否是利用 LOX 无效大麦突变体的麦芽,例如大麦突变体 D112 的麦芽生产的提供了工具。值得注意的是,由来源于 LOX-1 无效突变体大麦 D112 的麦芽生产的啤酒与由正常麦芽产生的啤酒相比,具有显著低水平总 9,12,13-THA。

[0422] 实施例 9

[0423] 大麦中来自 LOX 作用的酶产物的生化特征鉴定

[0424] 成熟野生型大麦谷物包含来源于 LOX-1 和 LOX-2 酶的两种主要 LOX 活性。这种酶催化亚油酸双氧化成过氧氢亚油酸 (HPODEs),酶 LOX-1 催化形成 9-HPODE,酶 LOX-2 催化形

成 13-HPODE。在成熟谷物中, LOX 衍生活性限制在胚中。为了研究 LOX-1 基因的突变怎样影响 HPODE 形成, 利用高压液相色谱 (HPLC) 分析对来自 cv. Barke 的胚提取物, 来自大麦系 G (低 LOX 颗粒, 在 Douma 等的以 W002/053721A1 公开的 PCT 申请 PCT/IB01/00207 中) 和 LOX 无效突变体 D112 的胚提取物进行了研究。

[0425] 大麦胚。通过先利用解剖刀在胚鳞和胚乳之间切割, 从成熟大麦谷物分割出器官来从胚制备粗蛋白提取物。然后将每份由 4 个胚组成的样品放置在两张称重纸之间, 轻轻锤击产生同质粉末。将粉末转入 1.5ml 微量离心管中, 添加 200mM, pH 4.5 的乳酸缓冲液 600 $\mu$ l, 在利用塑料研棒更进一步均化之前, 将管在冰上放置 10 分钟。随后, 每个管中添加 600 $\mu$ l 水, 以 20,000g 离心样品 2 分钟。100 $\mu$ l 产生的上层清液等分被转入 15ml 离心管 [从 Greiner Bio-One 购买的 Cellstar (Cat. No. 188271) 中准备分析 LOX 作用后的反应产物。通过将 10ml 100mM, pH 6.5 的磷酸钠缓冲液与 100ml 24mM 的亚油酸原液混合, 制备 2ml 的包含 260mM 亚油酸 [底物, 通过先混合 155 $\mu$ l 亚油酸 (相当于 134mg 游离酸; Sigma, L-1376) 和 257 $\mu$ l Tween-20, 然后加入水使体积达到 5ml, 接下来添加 600 $\mu$ l 的 1M NaOH, 当溶液变清澈时, 用 H<sub>2</sub>O 将其最终容积调节为 20ml 而制备的] 的 pH 6.5 的 100mM 的磷酸钠缓冲液。在旋转振荡器上温育 15 分钟之后, 添加 2ml 乙酸乙酯, 为了提取 9-HPODE 和 13-HPODE, 通过用力摇振混合样品内容物。然后以 800g 离心样品 10 分钟, 将 1ml 乙酸乙酯转入 1.5ml 微量离心管中, 其中乙酸乙酯在氮气流作用下会蒸发。随后, 将 HPODEs 再悬浮在 300 $\mu$ l 甲醇中, 用 0.45 $\mu$ m 的膜 (Millex-HN 过滤器, Millipore) 过滤。

[0426] 通过 HPLC 完成对 HPODE 含量的分析。每个样品总共 15 $\mu$ l 被注入配备有 4.6 $\times$ 250mm Symmetry C18 柱 (Waters) 的 HPLC 仪器 (HP 1100 系列, Hewlett Packard) 中。使用的流动相是 16 : 12 : 12 : 10 : 0.5 (v : v : v : v : v) 的水 : 甲醇 : 乙腈 : 四氢呋喃 : 三氟乙酸的混合物。流动相的流量是每分钟 1ml, 柱前面测量的压力是 140bar。在 30 $^{\circ}$ C 完成分离。在 234nm 处完成对共轭双键氢过氧化物的检测。标准样品包含 9(S)-过氧氢-10(E), 12(Z)-十八碳二烯酸 [(9(S)-HPODE] 和 13(S)-过氧氢-9(Z), 11(E)-十八碳二烯酸 [(13(S)-HPODE] 的混合物, 图 13A 已经详细描述这一点。

[0427] 色谱图分析显示主要的 9-HPODE 由从 cv. Barke 的成熟大麦胚中提取的 LOX 酶形成 (图 13B), 而 9- 和 13-HPODE 都在低 LOX 系 G 的成熟胚的提取物中形成 (图 13C)。突变体 D112 胚的提取物形成极低量的 9-HPODE, 但是形成的 13-HPODE 的量高, 因此证实突变体 D112 缺乏 LOX-1 活性 (图 13D)。因此, 与野生型大麦系相比较, 突变体 D112 的胚提取物形成的 9-HPODE 较少。

[0428] 大麦芽。大麦芽包含来源于 LOX-1 和 LOX-2 酶的两类主要 LOX 活性。LOX-1 催化形成 9-HPODE, LOX-2 作用产生 13-HPODE。为了研究 LOX-1 编码基因的突变对麦芽提取物中 HPODE 形成的影响, 利用 HPLC 分析对从来源于 cv. Barke、低 LOX 系大麦和突变体 D112 的麦芽制备的提取物进行了分析。

[0429] 按照下列方法制备来自麦芽的粗蛋白提取物样品。将一个萌发的大麦颗粒放置在两张称重纸之间, 轻轻锤击产生同质粉末。所有后续工序、温育混合物和 HPLC 分析方法与本申请上述的与测量胚提取物中的 LOX 产物有关的实施例部分相同。

[0430] 为了进行 HPLC 分析, 使用了包含 9(S)-过氧氢-10(E), 12(Z)-十八碳二烯酸 [(9(S)-HPODE] 和 13(S)-过氧氢-9(Z), 11(E)-十八碳二烯酸 [(13(S)-HPODE] 的混合物的

标准样品,图 14A 中已经举例说明这一点。对萌发的 Barke、低 LOX 和 D112 的提取物中的 HPODE 形成活性的分析表明在 cv. barke 中 9- 和 13-HPODE 形成活性的分布为 60 : 40 (图 14B)、在衍生自低 LOX 大麦的麦芽中有一些 9-HPODE 形成活性 (图 14c),在突变体 D112 的麦芽中 9-HPODE 形成的水平极低 (图 14d)。这些数据表明与来源于其他大麦系的麦芽提取物相比,突变体 D112 的麦芽提取物中的 9-HPODE 的形成显著降低。

#### [0431] 实施例 10

[0432] 突变大麦突变体 D112 中的 LOX-1 基因

[0433] 获取突变体 D112 [SEQ ID NO :2] 和 cv. Barke [SEQ ID NO :1] 中的 LOX-1 基因的核苷酸序列,并进行比较以确定突变体 D112 LOX-1 无效表型的分子基础,已经发现 LOX-1 无效表型表现的特征是谷物颗粒中缺乏对应的 LOX-1 酶。

[0434] 利用植物 DNA 分离试剂盒 (Roche Applied Science),依照厂家的介绍,从幼苗的叶组织分离突变体 D112 和野生型 cv. Barke 的大麦基因组 DNA。利用引物 5' > GAAAGCGAGGAGAGGAGGCCAAGAACA < 3' [SEQ ID NO :9] 和 5' > TTATTCATCCATGGTTGCCGATGGCTTAGA < 3' [SEQ ID NO :10],通过 PCR 扩增突变体 D112 和 cv. Barke 基因组 DNA 中在 LOX-1 的蛋白质编码区侧面的 4,224-bp 的序列。引物序列的基础是 LOX-1 基因的基因组序列 (van Mechelen et al.,1995;Rouster et al.,1997,跨越 LOX-1 编码区的起始终止密码子的基因组序列的简图显示在图 15 中)。20ul 体积的 PCR 反应包括基因组 DNA 100ng,每个引物 5pmol 和伸展高保真度聚合酶 3.5U (Roche Applied Science)。在 MJ 循环控制装置中进行 PCR 扩增,利用下列循环参数 :96°C 2 分钟,1 个循环 ;95°C 1 分钟、69°C 1 分钟和 72°C 5 分钟,30 个循环 ;72°C 10 分钟,1 个循环。在 1.0% 的琼脂糖凝胶上分离 PCR 产物。利用 QiaexII 凝胶抽提试剂盒 (Qiagen) 纯化长度与被扩增区域对应的 DNA 片段,并将片段插入质粒载体 pCR2.1-TOPO (Invitrogen) 中。用特异的寡核苷酸引物,通过双脱氧核苷酸链终止反应确定编码区的两条链的核苷酸序列,在 MegaBACE 1000DNA 测序仪 (Amersham) 进行分析。利用 Lasergene 序列分析软件包 ver. 5 (DNASTAR) 完成序列比较。

[0435] 野生型 cv. Barke 的 LOX-1 序列 [SEQ ID NO :1] 和突变体 D112 的 LOX-1 序列 [SEQ ID NO :2] 之间的直接比较显示突变体的核苷酸序列在外显子 7 的位置 3574 处有一个 G → A 替换形式的点突变 (图 15 ;图 16)。野生型 LOX-1 序列编码长 862 个残基的预计分子量为 96.4kDa 的蛋白质 [SEQ ID NO :3]。相反,突变体 D112 的对应序列在位置 3574 处的突变导致引入早熟终止密码子。

[0436] 预计突变体 D112 的 LOX-1 编码基因中的终止密码子导致对应蛋白质 C 末端截断 197 个氨基酸,因此编码序列列在 [SEQ ID NO :4] 中的 74.2kDa 的蛋白质。

#### [0437] 实施例 11

[0438] 突变大麦突变体 A618 中的 LOX-1 基因

[0439] 大麦突变体 A618 和野生型 cv. Neruda 的基因组 DNA 的制备、PCR 反应、DNA 序列确定和基因组 DNA 分析与实施例 10 中描述的突变体 D112 和 cv. Barke 的相应处理相同。

[0440] 大麦突变体 A618 的 LOX-1 的核苷酸 [SEQ ID NO :6] 和亲本 cv. Neruda 的 LOX-1 的核苷酸 [SEQ ID NO :5] 之间的比较显示突变体序列有一个相当于基因组序列位置 2311 处的 G → A 替换的点突变 (图 15 ;图 16)。

[0441] cv. Neruda 的野生型 LOX-1 序列编码长 862 个残基的预计分子量为 96.4kDa 的蛋白质 [SEQ ID NO :7]。相反,突变体 A618 的对应序列在位置 2311 处的突变使内含子 3 供体部位发生了突变。这导致内含子 3 出现拼接错误,从理论上说,在翻译 399 个氨基酸之后会在内含子 3 中产生早熟终止密码子。

[0442] 突变体 A618LOX-1 基因结构内的终止密码子将产生 44.5kDa 的截短的翻译蛋白质 [SEQ ID NO :8]。

[0443] 实施例 12

[0444] LOX-1 转录产物的 RT-PCR 检测

[0445] 在 2002 年春季期间,在丹麦的哥本哈根将 cv. Vintage、突变系 G(低 LOX,在 Douma 等的以 W002/053721A1 公开的 PCT 申请 PCT/IB01/00207 中)、cv. Barke 和突变体 D112 的大麦植物栽培在温室中。在开花那天标记麦穗,在开花 (DAF) 20、40 和 60 天后收获麦穗。将麦穗保持在  $-80^{\circ}\text{C}$ ,直到可以同时处理全部样品。在每个时间点,从正在发育的颖果上分割出总共 10 个胚,利用 FastRNA、Green RNA 分离试剂盒 (Qbiogene),依据厂家的介绍提取 RNA。

[0446] RT-PCR 反应模板由 100ng 上述胚 RNA 组成。20 $\mu\text{l}$  RT-PCR 反应包含每个引物 50pmol, RT-PCR 酶混合物 5U (Promega)。在 MJ 循环控制装置中进行 RT-PCR 扩增:  $48^{\circ}\text{C}$  45 分钟,1 个循环;  $95^{\circ}\text{C}$  1 分钟,1 个循环;  $94^{\circ}\text{C}$  1 分钟、 $65^{\circ}\text{C}$  1 分钟和  $72^{\circ}\text{C}$  1 分钟,30 个循环;最后  $72^{\circ}\text{C}$  10 分钟,1 个循环。

[0447] 利用正向引物 5' > AGGGACTGCCGACGATCTCA < 3' [SEQ ID NO :11] 和反向引物 5' > GCCAGCTCCGGCACACTT < 3' [SEQ ID NO :12] 产生 292bp 的 RT-PCR 片段。在 1.0% 的琼脂糖凝胶上分离 RT-PCR 产物。利用 QiaexII 凝胶抽提试剂盒 (Qiagen) 纯化长度与被扩增区域对应的 DNA 片段,并将片段插入质粒载体 pCR2.1-TOPO (Invitrogen) 中。利用 ABI Prism 310 遗传分析器 (ABI) 对质粒插入物的核苷酸序列进行测序。利用 Lasergene 序列分析软件包 ver. 5 (DNASTAR) 完成 DNA 序列比较。

[0448] 产生的 PCR 产物跨越相当于基因组克隆 [SEQ ID NO :1] 的核苷酸位置 3283-3659 的区域。这一区域包含长 83bp 的内含子 5,而不含有 DNA 的 RNA 制备物的 RT-PCR 模板缺少内含子 5 (图 17A)。因为 DNA 序列分析证实分离的片段是 LOX-1 基因的组成部分,而且也证实缺少内含子 5 序列,因此可以排除错误扩增产生来自 LOX-2 酶的大麦基因片段 (图 17D)。因此,扩增的片段代表 RNA 转录产物扩增的产物。

[0449] 从 cv. Vintage 和突变系 G 的 20、40 和 60DAF 大麦胚纯化的 RNA 的 RT-PCR 比较分析显示,相似发育阶段的两个品种的 LOX-1 转录产物的水平相似。在从 20DAF 到 60DAF 的时间期限里 LOX-1 的转录产物水平逐步增加 (图 17B)。

[0450] 与此相反,当对 cv. Barke 和突变体 D112 的相似数据集进行研究时,却观察到显著差异。RT-PCR 实验显示和 cv. Barke 相比,突变体 D112 中的 LOX-1 转录产物的丰度基本上低于 cv. Barke (图 17C)。

[0451] 总之,用突变体 D112 的 LOX-1 基因的启动子区域的潜在突变可以解释这一观察结果。其他仍未知的因素也可能参与突变体 D112 中 LOX-1 基因的转录调节。在这方面,不能排除突变体 D112 的 LOX-1 的转录产物中的终止密码子产生了无义密码子介导的 mRNA 分解 (Isshiki et al., 2001)。

[0452] 实施例 13

[0453] 携带 D112 突变的大麦突变体的遗传检测

[0454] 现代大麦育种策略经常包含加速诱变到商业化过程的生物技术。因此,就检测有价值基因中的单核苷酸多态性而言,早期筛选植物材料是有用的。将这一技术用于基因组 DNA 技术,并将其与高通量系统结合有可能在幼苗期将培育系的数目减少 50%。

[0455] CAPS 测定。突变体 D112 子代系的 LOX-1 基因的克隆和测序已经显示突变被传送到下一代。这是一项费劲的技术,对实际的大麦育种没有用处。

[0456] 利用酶切扩增多态序列测定 (CAPS) 在育种材料中可以鉴定低 LOX 系 G 特异的突变,在 Douma 等的以 W002/053721A1 公开的 PCT 申请 PCT/IB01/00207 的实施例 4 中已经公开这一点。但是,突变体 D112 的 LOX-1 基因中的突变性质不能用来在包含该突变的 60-bp 的区域中产生改变的限制性酶切图谱。

[0457] SNP 测定。这种方法的备用方案是进行包含单个核苷酸多态性 (SNP) 的分析。SNP 是在一个位点表现出至少两个不同核苷酸的突变点。该分析以两组基因组 PCR 反应的组合为基础。两个反应都包含一个位点特异性引物,以及两个 SNP 引物中的一个(每个引物分别针对该系列的每个等位基因)。每个植物系进行两组 PCR 反应,PCR 反应的结果是 SNP 引物结合突变体等位基因的序列或者结合野生型等位基因的序列(图 18A)。在这几种方法的一种方法中,SNP 分析以电泳 PCR 产物后评估染色体带型鉴定突变系为基础。

[0458] 利用植物 DNA 分离试剂盒 (Roche Applied Science),依照厂家的介绍,从幼苗的叶组织分离 17 个培育系和野生型 cv. Barke 的大麦基因组 DNA。

[0459] 用来扩增野生型 LOX-1 基因的 SNP 的寡核苷酸引物是 5' > CAAGGTGCGGTTGCTGGTGTC < 3' [SEQ ID NO :13] 和 5' > CTCGCGGTCTCCTTCCAC < 3' [SEQ ID NO 14]。对应突变体 D112 基因的引物是 5' > CAAGGTGCGGTTGCTGGTGTC < 3' [SEQ ID NO :13] 和 5' > CTCGCGGTCTCCTTCCAT < 3' [SEQ ID NO :15]。

[0460] 在扩增包含突变体 D112 或 cv. Barke 的部分 LOX-1 编码区域的 166bp 的 DNA 片段的 PCR 反应中可以使用这些引物组合(图 18A)。

[0461] 依照厂家的说明,20ul 体积的 PCR 反应包括基因组 DNA100ng,25pmol 引物和 2.5U FastStart Taq DNA 聚合酶 (Roche)。在 MJ 循环控制装置中进行 PCR 扩增:96°C 5 分钟,1 个循环;95°C 1 分钟、70°C 1 分钟和 72°C 1min,20 个循环;最后 72°C 10 分钟,1 个循环。

[0462] 在 1.0% 琼脂糖凝胶上分离 PCR 产物。利用 Qiaex II 凝胶抽提试剂盒 (Qiagen) 纯化长度与被扩增区域对应的 DNA 片段。利用双脱氧核苷酸链终止反应,在 ABI Prism 310 遗传分析器 (ABI) 直接对 PCR 产物进行测序。利用 Lasergene 序列分析软件包 ver. 5 (DNASTAR) 完成序列比较。

[0463] SNP 分析筛选总共 17 个育种系的数据和直接对 PCR 产物测序的实验数据编辑后产生相同结果。以这些实验为基础推断出 SNP 技术可用于证实原材料包含和大麦突变体 D112 的 LOX-1 基因的序列相同的基因序列(图 18B)。

[0464] 实施例 14

[0465] 检测样品混合物中的突变体

[0466] 酿造工业可以使用大麦和麦芽的混合物来生产啤酒,这样可以掩蔽具体麦芽品种不需要的化学特性。单纯证实种子材料的用途可以包含通过 PCR 分析扩增突变基因。

[0467] 利用突变体 D112 和 cv. Barke 的样品混合物和突变系 G (Douma 等的以 WO02/053721A1 公开的 PCT 申请 PCT/IB01/00207) 和 cv. Barke 的样品混合物对麦芽混合物样品进行了 SNP 分析。分析了包含 0、20、40、60、80 和 100% 突变体 D112 谷物的六个大麦样品。在另一个系列中,分析了包含 0、20、40、60、80 和 100% 突变系 G 谷物的六个大麦样品。利用 NucleonPhytopure DNA 分离试剂盒 (Amersham), 依照厂家的介绍从磨碎的谷物中分离 DNA。

[0468] 用来扩增突变体 D112 的 LOX-1 基因的 166-bp 的 SNP 的寡核苷酸引物是 5' > CAAGGTGCGGTTGCTGGTGTC < 3' [SEQ ID NO:13] 和 5' > CTCGCGCGTCTCCTTCCAT < 3' [SEQ ID NO 15]。用来, 扩增突变系 G 的 LOX-1 基因的 370-bp 的 SNP 的引物是 5' > TACGTGCCGCGGGACGAGAAG < 3' [SEQ ID NO:16] 和 5' > TGATCATGACCGGGTTGACGT < 3' [SEQ ID NO 17]。同时利用四个引物以多重反应完成 PCRs (图 19A)。依照酶供应商提供的说明, 每个 20ul 体积的反应包括基因组 DNA 100ng, 每个引物 50pmol 和 10ul RedTaq 聚合酶溶液 (Sigma)。在 MJ 循环控制装置中进行 PCR 扩增: 95°C 1 分钟, 1 个循环; 94°C 1 分钟、66°C 1 分钟和 72°C 30 秒, 25 个循环; 最后 72°C 10 分钟, 1 个循环。在 1.0% 琼脂糖凝胶上分离 PCR 产物。利用 Qiaex II 凝胶抽提试剂盒 (Qiagen) 纯化长度与被扩增区域对应的 DNA 片段, 并将片段插入质粒载体 pCR2.1-TOPO (Invitrogen) 中。用特异的寡核苷酸引物, 通过双脱氧核苷酸链终止反应确定质粒插入物的两条链的核苷酸序列, 在 MegaBACE 1000DNA 测序仪 (Amersham) 进行分析。利用 Lasergene 序列分析软件包 ver. 5 (DNASTAR) 完成序列比较。

[0469] 存在于图 19B 中的凝胶分析显示所有来源于包含突变体 D112 谷物的混合物的样品的 SNP 分析都是阳性。类似地, 鉴定包含来自突变系 G 的材料样品也是可能的。总之, 遗传分析可以很容易地证实是否使用了包含突变系 G 或者突变体 D112 的突变体 LOX 植物的大麦混合物。

[0470] 实施例 15

[0471] 突变体 D112 的重组 LOX-1 是失活的

[0472] 已经显示突变体 D112 的 LOX-1 基因包含早熟终止密码子 (参照实施例 10)。因此, 期待该基因在植物中的表达会导致合成仅包含野生型 LOX-1 中发现的 665 个起始氨基酸残基的截短形式的对应 LOX 酶。在大肠杆菌细胞中表达限定截短形式的 LOX-1 的核苷酸序列以证实这种形式的 LOX-1 是失活的酶, 不能催化大麦突变体 D112 的细胞中形成 HPODEs。

[0473] 在大肠杆菌中表达野生型 LOX-1 和突变体 LOX-1 的质粒。通过使用标准的 PCR 规程扩增编码 LOX-1 的全部开放读框。使用的模板是大麦 cDNA (van Mechelen, 1999), 引物是 5' > CATATGCTGCTGGGAGGGCTG < 3' (SEQ ID NO:18; 起始密码子用黑体字标记; NdeI 位点下面划下划线) 和 5' > GAATTCTTAGATGGAGATGCTGTTGGG < 3' (SEQ ID NO:19; 用黑体字显示野生型终止密码子的互补序列; EcoRI 位点下面划下划线)。获取和纯化扩增的 2,597bp 的 DNA 片段。用 NdeI-EcoRI 消化 PCR 片段, 并将其连接到 pET19b 载体 (Novagen) 的大 NdeI-EcoRI 片段上, 产生在下游的长 10 个残基的 His 尾的编码序列的框架内克隆了 LOX-1 的 pETL1 表达质粒。DNA 测序分析证实质粒插入物包含正确的序列。

[0474] 下一个实验包含构建表达截短形式的 LOX-1 的质粒。目标是将 pETL1 中的 LOX-1 的开放读码框的 666 号密码子变成终止密码子, 这样使大肠杆菌细胞中蛋白质合成产生截

短形式的 LOX-1。为了完全防止大肠杆菌中核糖体读遍终止密码子,构建 pETL1 的 LOX-1 的 665 号密码子下游的所有密码子都被终止密码子 TGA 移走和取代的表达质粒。使用下列操作规程。在存在引物 5' > CTACCCGTACGCGGCGGACGGGCT < 3' ([SEQ ID NO:20], 退火连接突变体 D112 的 LOX-1 基因中突变上游的序列; BsiWI 位点下划下划线) 和 5' > TCCTGAATTCACGCCTGCACCTCCGTATCGC < 3' ([SEQ ID NO:21], EcoRI 位点下划下划线; 黑体字标明插入的终止密码子的互补序列) 的情况下,使用 PCR 从 pETL1 扩增 129bp 的片段。扩增将终止密码子和 EcoRI 位点插入片段中。随后用 BsiWI-EcoRI 消化片段,并将其与质粒 pETL1 的大 BsiWI-EcoRI 片段连接。得到的表达质粒被命名为 pETL2,而且通过 DNA 测序对插入物的正确序列进行了验证。

[0475] 转化的大肠杆菌细胞合成重组 LOX 蛋白质。用载体 pET19b,表达质粒 pETL1 和 pETL2(如上所述)分别转化从 Novagen 购买的大肠杆菌 BL21 细胞。在标准 Luria Broth(LB)培养基上接种包含质粒的细菌细胞,并在 37°C 生长 2h。此后,添加 1mM IPTG 诱导异源基因表达,并在 20°C 培养整夜。通过以 14,000g 离心 1 分钟收获细胞,接着将细胞团重悬浮在由 50mM 磷酸钠盐缓冲液组成的变性溶液中,其中磷酸钠盐缓冲液中补充有 6M 盐酸胍(hydrochloride)、0.3M NaCl 和 10mM 咪唑。在冰上声波处理后,14,000g 离心溶解的细胞 1 分钟,将上层清液与镍-树脂(Novagen)混合,接着在 4°C 温育 30 分钟。通过离心沉淀镍-树脂,用如上所述的变性溶液冲洗两次。最后,利用补充有 0.3M NaCl 和 0.5M 咪唑的 50mM 的磷酸钠缓冲液,从树脂洗脱 His 标记的蛋白质两次。通过 SDS-PAGE 分离等分的分级洗脱的样品(图 20)。从携带 pETL1 和 pETL2 中的细胞中分别获得 100kDa 的相当于 LOX-1 的清晰条带和 66kDa 的相当于计算的截短 LOX-1 的质量的清晰条带。携带 pET19b 的细胞在洗脱部分不产生条带。

[0476] 截短形式的 LOX-1 是失活的。在标准 LB 培养基上接种携带 pET19b、pETL1 和 pETL2 的大肠杆菌 BL21,并在 37°C 生长 2h。此后,添加 1mM IPTG 诱导异源基因表达,并在 20°C 培养整夜。通过以 14,000g 离心 1 分钟收获细胞,通过将细胞团重悬浮在 BugBuster 和 Benzonase(Novagen)的混合物中获取细胞溶解产物。利用包含 6.25mM 3-二甲氨基苯甲酸(dimethylaminobenzoic acid)、0.3125mM 亚油酸、0.1mM 3-甲基-2-苯噻唑啉酮(benzothiazolinehydrazone)和 0.05mg/ml 血红蛋白的脂加氧酶测定试剂测量溶解产物中的 LOX 活性。将 180ul 这种试剂与 10ul 各自的细胞溶解产物混合,在室温下温育 10 分钟。通过分光光度计测量 595nm 处的吸光度确定的温育期间产生的吡达胺的数值相当于细胞溶解产物的脂加氧酶活性。用 pETL1(产生 His 标记 LOX-1)转化的细胞显示出大的 LOX-1 活性,而生产突变体 D112 特异的截短 LOX-1 的细胞与仅用载体转化的对照细胞具有相同的 LOX 活性(表 8)。这表明大麦突变体 D112 的截短的 LOX-1 是失活的。

[0477] 实施例 16 转基因大麦植物

[0478] 质粒构建物。基因序列被插入标准质粒载体,例如 pUC18 的聚合接头区域。图 21 中列出了插入物。在一个构建物中(图 21A),包含相同基因的内含子 1 的玉蜀黍泛素-1 启动子(Christensen et al.,1992;Jensen et al.,1996)指导 bar 基因转录(White et al.,1990),其中 bar 基因编码可选择标记 phosphinothricin 乙酰转移酶(PAT)。在第二个构建物中,计划有义抑制 LOX-1 基因(Dougherty and Parks,1995),大麦 LOX-1 的开放阅读框被立即插入玉蜀黍泛素-1 启动子和内含子 1 的下游(图 21B)。图 21C 中显示了使大麦



LOX-1 基因表达沉默的构建物。大麦细胞中该构建物的表达通过形成内含子拼接的发夹式 RNA 使所述基因完全沉默,依照 Smith 等 (2000) 公开的图 1a 中详细描述的数据来设计该构建物。特别地,在图 21C 的构建物中表示为“内含子 1”的序列(上文)与 Smith 等(上文)公开的图 1a 中显示的内含子序列相同。图 21C 中的构建物的有义和反义臂代表相同的包含编码大麦 LOX-1 的开放阅读框节断的长 200bp 的片段的相反方向,阅读框的所述节段位于 LOX-1 开放阅读框的任何地方。或者,长 200bp 的序列是从大麦 LOX-1 编码基因的终止密码子下游的序列中选出来的。

[0479] 转化和再生转基因植物。为了共抑制编码 LOX-1 的大麦基因,用包含图 21A, B 中显示的插入物的质粒的混合物轰击温室生长的 cv. GoldenPromise 供体大麦植物的不成熟的大麦胚,以及为了沉默所述基因用图 21A, C 中显示的质粒混合物进行轰击。可以按照 Wan 和 Lemaux (1994) 和 Jensen 等(上文)的详细描述来完成转化、转化细胞的选择和转基因植物的繁殖。

[0480] 可以生长转基因植物几代,或者用不同的大麦 cv. 对它授粉,然后鉴定具有想要的表型的后代植物。可以生长两代或更多代以保证想要的表型特征的表达能稳定地保持和遗传。收获想要的表型特征已经实现的种子进行研究。

[0481] 为了研究编码 LOX-1 的大麦基因的共抑制或沉默效果,首先分析转基因颗粒来源于 LOX-1 的酶活力,本公开文本的实施例 1 中已经详述这一点。随后在制麦芽和酿造实验中研究没有或有极少 LOX-1 活性的转基因颗粒,本公开文本的实施例 5 和实施例 6 中已经详述了对 LOX-1 无效颗粒进行研究的方法。另外,对没有或有极少 LOX-1 活性的转基因颗粒的提取物进行分析,利用 Keller 的美国专利 No. 5, 942, 661 中描述的方法鉴定对曲霉生长有消极效果的提取物。

[0482] 实施例 17

[0483] 青香韵化合物

[0484] 生产青香韵化合物的过程包括:

[0485] (i) 将 LOX-1 无效大麦颗粒转换成磨得很细的粉末;

[0486] (ii) 将粉末悬浮到水里或指定的缓冲液中;

[0487] (iii) 温育悬浮液。或者,让粉末悬浮液和 (a) 脂肪酸(亚油酸或亚麻酸或其混合物);或 (b) 对 13-HPODE 或 13-HPOTE 或两者具有特异性的氢过氧化物裂解酶;或 (c) 包含所述脂肪酸和所述酶的混合物发生反应;

[0488] (iv) 让产生的醛与乙醇脱氢酶发生反应;

[0489] (v) 纯化醛或乙醇,制备有用的香料制品或香料组合物。

[0490] 实施例 18

[0491] LOX-1 抑制剂

[0492] 用新近制备的重组 LOX-1 溶液进行分析。在这一实验中,利用供应商 (Remel) 介绍制备 100ml 的补充有 100ug/ml 氨苄青霉素的 AB3 菌种生长培养基,然后接种用质粒 pETL1(编码 His 标记 LOX-1;参照实施例 15) 转化的整夜培养的大肠杆菌 BL21 (DE3) pLysS 细胞 5ml。在 37°C 繁殖获得的细菌培养物直到细胞密度达到 OD600 = 0.8。在 20°C 温育培养物 30 分钟,然后补充 0.4mM IPTG 诱导异源基因表达,在 20°C 温育整夜。

[0493] 离心 15 分钟使培养细胞形成小丸,然后将其再悬浮在 5ml

BugBusterHT (Novagen) 中,温育 20 分钟,同时温和摇振水解核酸。此后,通过离心除去细胞碎片,过滤通过 0.45  $\mu$ m 过滤器使上层清液清澈,将上层清液添加到等体积的结合缓冲液中(50mM 磷酸钠缓冲液、pH 7.5、补充有 0.3M NaCl、10mM 咪唑)。依照厂家的介绍,将得到的提取物加样到 HisTrap HP 柱 (Amersham Biosciences) 上,用洗涤缓冲液(和结合缓冲液相同,除 [咪唑 = 150mM 外])冲洗一次,用洗脱缓冲液(和结合缓冲液相同,除 [咪唑 = 500mM 外])洗脱结合的蛋白质。

[0494] 通过 SDS-PAGE 分析包含洗液和洗脱物蛋白质的 1ml 级分的 3ul 等分(图 22A),结果显示洗脱物 2 的 1ml 级分包含 ~ 0.7mg 的重组 LOX-1。

[0495] 随后纯化的 LOX-1 被用于确定选择的 LOX 抑制剂是否降低酶活性的测定中。首先,将亚油酸原液(按照实施例 9 的详细描述制备)稀释到初始浓度的 1/10,产生 2.4mM 的亚油酸溶液。45ul 的等份补充 5ul 包含 0、5、12 和 24mM 没食子酸辛酯或 NDGA(公认的 LOX-1 抑制剂)的乙醇溶液。10ul 等份的亚油酸抑制剂混合物被添加 990ul 的 100mM 的 pH 6.0 的磷酸钠缓冲液中,在添加 5ul 重组 LOX-1(洗脱物 2,参见上面)之前,在 20°C 温育 1 分钟。

[0496] 添加 LOX-1 后,记录 A2543 分钟。 $A_{254}$  对时间的曲线图的斜率决定 LOX-1 酶活力。结果概括在图 22B 中,显示微摩尔级浓度的抑制剂显著抑制 LOX-1。

[0497] 实施例 19

[0498] 用 LOX-1 抑制剂 -- 没食子酸辛酯糖化

[0499] 利用与实施例 5 中描述的设备相似的设备可以对 100ml 包含 25g 大麦 cv. Barke 的麦芽或 25g LOX-1 无效突变体 D112 的麦芽的液体进行糖化。37°C Mashing-in 15 分钟、68°C 糖化 30 分钟、77°C mashing-off 10 分钟,接下来最后煮沸麦芽汁 60 分钟;温度变化调节为 1°C / 分钟。

[0500] 为了测试存在 LOX-1 抑制剂时的糖化效果,大麦 cv. Barke 的麦芽的碎麦芽在 mashing-in 阶段补充 0.5mM 没食子酸辛酯。平行开动的糖化包含用没有添加没食子酸辛酯的大麦 cv. Barke 的麦芽进行试验,以及在存在或缺少 0.5mM 没食子酸辛酯的情形下用 LOX-1 无效大麦突变体 D112 的麦芽进行的糖化试验。

[0501] 在 15 分钟 mashing-in 阶段之后,在麦芽汁煮沸阶段之后收集所有四种糖化的样品等分,然后按照实施例 6 的描述确定 T2N 水平。结果概括在图 23 中。

[0502] 在存在没食子酸辛酯的情况下,观察到用大麦 cv. Barke 的麦芽进行糖化的麦芽汁样品中 T2N 明显下降,在 mashing-in 之后的样品和煮沸的麦芽汁样品中都是如此。此外,值得注意的是两种麦芽的煮沸的麦芽汁中的 T2N 浓度达到相似的水平。

[0503] 总之,在 mashing-in 期间补充 LOX-1 抑制剂到碎麦芽中提供了一种产生以 T2N 水平降低为特征的麦芽汁的新方法。

[0504] 表 1. 未加工突变体 (M3 代) 和子代 (M4 和 M5 代) 的胚提取物的总 LOX 活性

[0505]

胚提取物	总 LOX 活性	检测的 标准差	
	A <sub>595</sub> 单位	数量	%
<b>实验 1</b>			
M3 代			
突变体 D112	0.407	4	5.8
cv. Barke	1.245	4	7.6
cv. Barke(加热失活)	0.213	2	1.5
M4 代			
突变体 D112	0.335	12	1.5
cv. Barke	0.738	2	3.2
cv. Barke(加热失活)	0.168	4	6.5
M5 代			
突变体 D112	0.294	90	4.1
cv. Barke	0.963	90	7.5
cv. Barke(加热失活)	0.165	4	1.2
<b>实验 2</b>			
M3 代			
突变体 A618	0.221	4	2.6
cv. Neruda	0.721	7	3.6
cv. Barke(加热失活)	0.175	2	0.6
M4 代			
突变体 A618	0.222	40	2.1
cv. Neruda	0.684	90	5.8
cv. Barke(加热失活)	0.168	4	1.3

[0506] 表 2. 农学性能比较

[0507]

特性	突变体 D112	野生型 cv. Barke
播种日期 (2003 年)	3 月 21 日	3 月 21 日
成熟时的长度 (cm)	76	76
抽穗日期 (2003 年)	6 月 14 日	6 月 14 日
白粉病 (powdery mildew)	0	0
斑枯 (spot blotch) <sup>a</sup>	2	1
褐斑 (scald) <sup>a</sup>	2	3
叶锈病 (leaf rust) <sup>a</sup>	1	1
倒伏 <sup>a</sup>	1	1
成熟日期 (2003 年)	7 月 31 日	7 月 31 日
产量 <sup>b</sup>	100	100

[0508] a 在标尺上指 0-9, 0 代表没有感染或倒伏, 9 代表严重感染或倒伏。

[0509] b 两个不同地点的三个重复实验的相对平均产量。

[0510] 表 3. pilot 麦芽制造实验后的分析

特性	Cv. Barke, 2002 年在丹麦的收获物	突变体 D112, 2002/2003 年新西兰的收获物
大麦		
含水量(%)	11.2	12.1
[0511] 氮(%)	10.7	12.6
淀粉(%)	63.7	62.3
β-葡聚糖(%)	3.8	4.2
72 h 后萌发百分数(%)	98	96
萌发指数(标尺为 1-10)	7.3	5.6
水敏感性(%)	59	66
β 淀粉酶活性(U/g)	1032	1505

	预计的糖化力	382	555
	分级时>2.5 mm 的百分数(%)	95.9	96.6
	1000 粒颗粒的重量(g)	46.8	54.4
	<b>麦芽</b>		
	含水量(%)	4.3	4.6
	干燥的精提物(%)	82.31	80.22
	糖化作用(min)	10	10
	目视的麦芽汁清澈度	清澈	清澈
	麦芽汁清澈度(EBC 单位)	1.24	3.48
	麦芽汁颜色(EBC 单位)	2.5	2.3
[0512]	干燥的氮(%)	1.61	2.09
	可溶的氮(%)	0.64	0.65
	Kolbach 指数(%)	39	31
	麦芽汁中的 $\beta$ -葡聚糖(mg/l)	192	220
	脆性(%)	94.8	82.8
	修饰(%)	95	95
	均一性(%)	83	84
	pH	6.0	6.1
	$\beta$ 淀粉酶活性(U/g)	937	1336
	预计的糖化力(WK)	379	512
	$\alpha$ 淀粉酶活性(U/g)	179	238

[0513] 表 4. 突变体 D112 产物中 T2N 水平降低。

	游离 T2N	原材料	
		突变体	cv.
[0514]		D112	Barke
		<i>ppb</i>	
	麦芽	530	1488

[0515] 表 5. 啤酒储藏对风味的影响

[0516]

实验	游离 感官特性				
	T2N	似纸风味 <sup>a</sup>	氧化风味 <sup>a</sup>	老化风味 <sup>a</sup>	风味 <sup>b</sup>
	ppb	等级评定			
<b>用突变体 D112 酿造的啤酒</b>					
37°C 储存					
0 周(新鲜啤酒)	0.01	0.3	0.0	0.0	3.0
1 周	0.02	0.9	0.7	1.0	2.3
2 周	0.02	nd	nd	nd	nd
3 周	0.02	nd	nd	nd	nd
4 周	0.03	nd	nd	nd	nd
<b>用 cv. BARKE 酿造的对照啤酒</b>					
37°C 储存					
0 周(新鲜啤酒)	0.01	0.4	0.1	0.1	3.1
1 周	0.04	1.9	0.5	1.5	1.6
2 周	0.05	nd	nd	nd	nd
3 周	0.06	nd	nd	nd	nd
4 周	0.08	nd	nd	nd	nd

[0517] a 的等级评定标度 -0 :不存在 ;1 :弱 ;2 :显著 ;3 :中间 ;4 :强烈 ;5 :非常强烈。优选低值

[0518] b 的等级评定标度是 1-5, 优选的高值,

[0519] nd = 未确定

[0520] 表 6. 由正常大麦和突变体 D112 的麦芽产生的啤酒中的 THAs

麦芽种类	9,12,13-TH	9,10,13-TH	9,12,13-THA:9,10,13-THA
	A	A	
	ppm		比例
[0521] 对照	3.7	0.6	6.2
突变体	0.8	0.6	1.3
D112			

[0522] 表 7. 市场上可买到的啤酒中的 THAs

[0523]

商标	标签说明	9,12,13-THA	9,10,13-THA	9,12,13-THA:9,10,13-THA
		ppm		比例
Stella Artois (比利时)	12/12/03 4512:11	7.5	1.5	5.0
Kirin Beer (UK)	30/11/03 L2315 23:34	B 4.8	1.1	4.4
Pilsner Urquell	06.02.04 037	LC2 7.9	0.9	8.8
Faxe Fad	040204 E09:33	5.1	1.0	5.1
Carlsberg Light		2.7	0.4	6.2
Carls Special		5.8	1.0	5.7
Classic Hvede		6.7	0.8	8.6
Carls Lager		5.6	1.1	5.4
Blanche Honnelles	des best before 2007	7.3	0.7	10.9
Brasserie de L'abbaye des Rocs.				
San Miguel	280704 16:39	L11 7.7	1.4	5.5

	Peroni	Gran	06/04 L3 163 1	7.2	1.0	7.2
	Reserva Birra (意大利)					
	Heineken (丹麦)		08042004	3.4	0.7	4.8
	Labatt Blue		aug03 L27BN	2.8	0.7	3.9
	Kronenbourg		05/04 1400301	5.6	1.2	4.6
	1664					
	Newcastle Brown Ale		310504 L1475	3.1	0.7	4.5
	Anchor Liberty Ale		Feb 05	3.1	0.7	4.3
	Leffe		29/12/04 22:08	6.0	1.2	4.9
	De Koninck B.		14/02/04	4.8	1.1	4.3
	Anchor Steam Beer (USA)		Aug 04	3.4	0.7	4.7
[0524]	Foster's (Edinburgh, UK)		31/7/04 24 L211 21:58	3.9	0.9	4.1
	Pilsner (The Czech Republic)		Urquell L22.07.04	12.7	2.0	6.2
	Bombardier English Bitter (UK)		30/11/03 L3034 04:49	A 3.0	0.5	5.6
	Curim Celtic Beer (爱尔兰)		Gold L2689	12.9	0.9	14.4
	O'hara's Stout (爱尔兰)		Wheat BBDEEC03 L2701	7.8	0.8	9.6
	Erdinger Pikantus (德国)		01-2004 L105101	15.9	1.2	12.9
[0525]	Michelob Lager		12JUN03 A39	6.2	0.9	7.1



(UK)	10 DEC03					
Spaten München	04.04 L11833	4.2	1.0	4.2		
(德国)						
Kilkenny Draught	28/03/04	1.4	0.3	4.0		
(爱尔兰)	G310:00					
Guinness Draught	300504 G3	2.2	0.6	3.5		
(爱尔兰)	PD310803 07:01					
Oktoberfestbier	08.04 L21433	3.6	0.6	5.9		
Spaten München						
(Germany)						
Sol (墨西哥)	210204 DI	3.2	0.9	3.5		
	1023A2102*3					
Badger Golden	Jun04 13:35	3.5	0.5	7.3		
Champion Ale	L3150H					
(UK)						
Rolling Rock (比 利时 Interbrew )	04/2004 1 03153	5.9	0.9	6.8		
Bush Beer (比利 时)	不清楚	7.7	1.1	7.2		
Corona Extra (比 利时	DK 240404 03103:33	4.1	0.5	7.7		
Eorocermex. )						
Staropramen	05.06.04I 18:15	6.1	0.9	6.8		
Premium Prague Beer						
Miller Genuine	16-06-2004	2.9	0.6	4.8		
Draft (EU)	3F16 12:42					
Old Foghorn	Mar04	4.7	0.7	6.9		
Barley wine style Ale						

[0526] 表 8. 从携带标明的载体, 在 LB 和 IPTG 中生长过夜的细胞获取的细胞粗提物的脂加氧酶活性

[0527]

质粒	活性 <sup>a</sup>
pET19b	0.0723 ± 0.0002
pETL1	1.0612 ± 0.004
pETL2	0.0690 ± 0.0002

[0528] a 给出的是用方差标明的四个单独测量的平均值的结果。

[0529] 表 9. 序列表

[0530]

序列编号	序列类型	说明
NO :1	核酸	跨越 LOX-1 编码基因的起始和终止密码子的 cv. Barke 的大麦基因组序列
NO :2	核酸	跨越相当于 cv. Barke 的 LOX-1 编码基因的起始和终止密码子之间区域的片段的突变体 D112 的大麦基因组序列
NO :3	蛋白质	cv. Barke 的全长 LOX-1 蛋白质的序列
NO :4	蛋白质	截短失活的突变体 D112 的 LOX-1 的蛋白序列
NO :5	核酸	跨越 LOX-1 编码基因的起始密码子和终止密码子的 cv. Neruda 的大麦基因组序列
NO :6	核酸	跨越相当于 cv. Neruda 的 LOX-1 编码基因的起始和终止密码子之间区域的片段的突变体 A618 的大麦基因组序列
NO :7	蛋白质	cv. Neruda 的全长 LOX-1 蛋白质的序列
NO :8	蛋白质	截短失活的突变体 A618 的 LOX-1 的蛋白序列
NO :9	核酸	用于 PCR 扩增的寡核苷酸引物 (有义引物 ; 参照实施例 10)

NO :10	核酸	用于 PCR 扩增的寡核苷酸引物 (反义引物 ; 参照实施例 10)
NO :11	核酸	用于 PCR 扩增的寡核苷酸引物 (有义引物 ; 参照实施例 11, 图 17)

[0531]

NO :12	核酸	用于 PCR 扩增的寡核苷酸引物 (反义引物 ; 参照实施例 11, 图 17)
NO :13	核酸	用于 PCR 扩增的寡核苷酸引物 (有义引物 ; 参照实施例 12, 15, 和图 18, 20)
NO :14	核酸	用于 PCR 扩增的寡核苷酸引物 (反义引物 ; 参照实施例 12, 和图 18, )
NO :15	核酸	用于 PCR 扩增的寡核苷酸引物 (反义引物 ; 参照实施例 12, 15, 和图 18, 20)
NO :16	核酸	用于 PCR 扩增的寡核苷酸引物 (有义引物 ; 参照实施例 14, 和图 19)
NO :17	核酸	用于 PCR 扩增的寡核苷酸引物 (反义引物 ; 参照实施例 14, 和图 19)
NO :18	核酸	用于 PCR 扩增的寡核苷酸引物 (有义引物 ; 参照实施例 15)
NO :19	核酸	用于 PCR 扩增的寡核苷酸引物 (反义引物 ; 参照实施例 15)
NO :20	核酸	用于 PCR 扩增的寡核苷酸引物 (有义引物 ; 参照实施例 15)
NO :21	核酸	用于 PCR 扩增的寡核苷酸引物 (反义引物 ; 参照实施例 15)

[0532] 8. 保藏信息

[0533] 已经在美国的 Va. 20110 的 Manassas 的 Boulevard 大学 10801 的美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 对上面公开的并在附加权利要求中叙述的 Carlsberg A/S 所有大麦突变体 D112 进行保藏。保藏突变体 D112 的日期是 2003 年 9 月 11 日, 由本申请的申请日之

前取自在 Carlsberg A/S 的保藏物的 2,500 个颗粒组成。保藏突变体 A618 的日期是 2003 年 10 月 13 日,由本申请的申请日之前取自在 Carlsberg A/S 的保藏物的 2,500 个颗粒组成。为了满足专利程序和其规则(布达佩斯条约)的要求,按照布达佩斯条约中有关国际承认的微生物保存的条款来进行这些保藏。这种保藏保证从保藏日起的 30 年里保持保藏物存活。保藏要满足 37C.F.R § 1.801-1.809 的全部要求,包含提供样品成活的指征。突变体 D112 的 ATCC 登记号是 PTA-5487。突变体 A618 的 ATCC 登记号是 PTA-5584。通过说明登记号码和接受 ATCC 强加的标准限制,可以从 ATCC 获得等分的保藏材料。但是,应理解保藏物的可获得性不构成毁损政府行为授予的专利权而实施本发明主题的许可。

[0534] 在整个申请中,参考了多种出版物、专利和专利申请。为了更充分地描述本发明所属领域的现状,将这些出版物公开的内容在此全部引入本申请中作为参考。发明的上述说明书是示范性的,其目的是为了说明和解释发明。应理解可以不脱离本发明的精神和范围对本发明作各种修饰。因此欲将下列权利要求书解释为包含所有这种修饰。

[0535] 参考文献

[0536] 专利文件

[0537] US 4,683,195 ;Mullis, K. B. et al.

[0538] US 4,708,964 ;Allen, L. M.

[0539] US 4,800,159 ;Mullis, K. B. et al.

[0540] US 4,880,637 ;Jordan, R. T.

[0541] US 5,008,294 ;Jordan, R. T. et al.

[0542] US 5,283,184 ;Jorgensen, R. A. and Napoli, C. A.

[0543] US 5,942,661 ;Keller, N. P.

[0544] US 6,008,034 ;**Häusler** et al.

[0545] US 6,150,145 ;**Häusler**, A. et al.

[0546] US 6,274,358 ;Holtz, R. B. et al.

[0547] US 6,355,862 B1 ;Handa, A. K. and Kausch, K. D ;

[0548] US 专利申请 2003/0074693A1 ;Cahoon et al.

[0549] WO 02/053721A1 ;12/2000 ;PCT Int' l Appl. ;Douma, A. C. et al.

[0550] WO 2004/085652A1 ;10/2004 ;PCT Int' l Appl. ;Hirota, N. et al.

[0551] 其他出版物

[0552] Alonso, J.M. et al., " Genome-wide insertional mutagenesis of Arabidopsis thaliana. " Science 301,653-657,2003.

[0553] American Association of Cereal Chemists, " Approved methods of the American Association of Cereal Chemists. " ISBN 0-913250-86-4(1995).

[0554] American Society of Brewing Chemists, " Methods of analysis of the American Society of Brewing Chemists. " ISBN 1-881696-01-4(1992).

[0555] Anthon, G. E. and Barrett, D. M., " Colorimetric method for the determination of lipoxigenase activity. " J. Agric. Food Chem. 49 :32-37,2001. of lipoxigenase activity. " J. Agric. Food Chem. 49 :32-37,2001.

- [0556] Aruoma, O. I. et al., " Evaluation of the antioxidant and prooxidant actions of gallic acid and its derivatives." J. Agric. Food Chem. 41 :1880-1885, 1993.
- [0557] Ashrafi, K. et al., "**Genomewide** RNAi analysis of *Caenorhabditis elegans* fat regulatory genes." Nature 421 :268-272, 2003.
- [0558] Auld, D. L. et al., " Rapeseed mutants with reduced levels of polyunsaturated fatty acids and increased levels of oleic acid." Crop Sci. 32 : 657-662, 1992.
- [0559] Axelrod, B. et al., " Lipoxygenase from soybeans." Methods Enzymol. 71 : 442-451, 1981.
- [0560] Bargmann, C. I., "**Highthroughput** reverse genetics :RNAi screens in *Caenorhabditis elegans*." Genome Biol. 2 :Reviews1005. 1-1005. 3, 2001.
- [0561] Baur, C. and Grosch, W. " Investigation about the taste of di-, tri- and tetrahydroxy fatty acids." Z. Lebensm. Unters. Forsch. 165 :82-84, 1977a.
- [0562] Baur, C. et al. " Enzymatic oxidation of linoleic acid :Formation of bitter tasting fatty acids." Z. Lebensm. Unters. Forsch. 164 :171-176, 1977b.
- [0563] Bell, E. et al., " A chloroplast lipoxygenase is required for **woundinduced** jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 :8675-8679, 1995.
- [0564] Bell, E. and Mullet, J. E., " Lipoxygenase gene expression is modulated in plants by water deficit, wounding, and methyl jasmonate." Mol. Gen. Genet. 230 : 456-462, 1991.
- [0565] Bell, E. and Mullet, J. E., " Characterization of an *Arabidopsis* lipoxygenase gene responsive to methyl jasmonate and wounding." Plant Physiol. 103 :1133-1137, 1993.
- [0566] Bios International, " Data." Bios Intern. 4 :38-42, 2001.
- [0567] Blée, E. and Joyard, J., " Envelope membranes from spinach chloroplasts are a site of metabolism of fatty acid hydroperoxides." Plant Physiol. 110 : 445-454, 1996.
- [0568] Bohland, C. et al., " Differential induction of lipoxygenase isoforms in wheat upon treatment with rust fungus elicitor, chitin oligosaccharides, chitosan, and methyl jasmonate." Plant Physiol. 114 :679-685, 1997.
- [0569] Brautechnische Analysenmethoden, Band II, Methodensammlung der **Mitteleuropäischen** Brautechnischen Analysenkommission. Section 2.19 : " Schaum, " pp. 118-125. Selbstverlag der MEBAK. ISBN 3-9805814-5-4 (2002)
- [0570] Burow, G. B. et al., " A peanut seed lipoxygenase responsive to *Aspergillus* colonization." Plant Mol. Biol. 42 :689-701, 2000.
- [0571] Casey, R., " Lipoxygenases in the breadmaking process." In : " First

European Symposium on Enzymes and Grain Processing. " Angelino, S. A. G. F., van Hamer, R. J., Hartingsveldt, W., Heidekamp, F., van der Lugt, J. P., eds., pp. 188-194. TNO Nutrition and Food Research Institute. 1997. ISBN 90-75202-04-0.

[0572] Christensen, A. H. et al., " Maize polyubiquitin genes: Structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. " *Plant Mol. Biol.* 18 :675-689, 1992.

[0573] Colben, T. et al., " High-throughput screening for induced point mutations. " *Plant Physiol.* 126 :480-484, 2001.

[0574] Cornish-Bowden, A., " Nomenclature for incompletely specified bases in nucleic acid sequences: Recommendations 1984. " *Nucleic Acids Res.* 13 :3021-3030, 1985.

[0575] Croft, K. P. C. et al., " Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseoliola*. " *Plant Physiol.* 101 :13-24, 1993.

[0576] Davies, C. S. and Nielsen, N. C., " Genetic analysis of null-allele for lipoxygenase-2 in soybean. " *Crop Sci.* 26 :460-463, 1986.

[0577] Dougherty, W. G. and Parks, T. D., " Transgenes and gene suppression: Telling us something new? " *Curr. Opin. Cell Biol.* 7 :399-405, 1995.

[0578] Drost, B. W. et al., " Role of individual compounds in beer staling. " *Tech. Q. MBAA* 11 :127-134, 1974.

[0579] Drost, B. W. et al., " Flavor stability. " *J. Am. Soc. Bre W. Chem.* 48 :124-131, 1990.

[0580] Ellis, R. P. et al., " Barley domestication—*Hordeum spontaneum*, a source of new genes for crop improvement. " Scottish Crop Research Institute, Annual Report 1998/99 :97-100, 1999. Also available at <http://www.scri.sari.ac.uk/SCRI/upload/annualreportdocuments/99Indiv/14Barley.pdf>.

[0581] European Brewery Convention, " *Analytica-EBC*. " ISBN 3-418-00759-7 (1998).

[0582] Feussner, I. and Wasternack, C., " The lipoxygenase pathway. " *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 53 :275-297, 2002.

[0583] Forster, C. et al., " Molecular analysis of a null mutant for pea (*Pisum sativum* L.) seed lipoxygenase-2. " *Plant Mol. Biol.* 39 :1209-1220, 1999.

[0584] Gardner, H. W. and Grove, M. J., " Method to produce 9(S)-hydroperoxides of linoleic and linolenic acids by maize lipoxygenase. " *Lipids* 36 :529-533, 2001.

[0585] Giaever, G. et al., " Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. " *Nature* 418 :387-391, 2002.

[0586] Goenczy, P. et al., " Functional genomic analysis of cell division in *C. elegans* using RNAi of genes on chromosome III. " *Nature* 408 :331-336, 2000.

- [0588] Graef, G. L. et al. " Fatty acid development in a soybean mutant with highstearic acid. " J. Am. Oil Chem. Soc. 62 :773-775, 1985.
- [0589] Griffiths, A. et al., " Fruit-specific lipoxygenase suppression in antisense-transgenic tomatoes. " Postharvest Biol. Technol. 17 :163-173, 1999.
- [0590] Groenqvist, A. et al., " Carbonyl compounds during beer production in beer. " Proceedings of the 24th EBC Congress, Oslo, pp. 421-428, 1993.
- [0591] Grosch, W. and Schwartz, J. M., " Linoleic and linolenic acid as precursors of the cucumber flavor. " Lipids 6 :351-352, 1971.
- [0592] Ha, T. J. et al., " Lipoxygenase inhibitory activity of octyl gallate. " J. Agric. Food Chem. 52 :3177-3181, 2004.
- [0593] Hamberg, M., " Trihydroxyoctadecenoic acids in beer :Qualitative and quantitative analysis. " J. Agric. Food Chem. 39 :1568-1572, 1991.
- [0594] Hannon, G. J., " RNA interference. " Nature 418 :244-251, 2002.
- [0595] Hildebrand, D. F. and Hymowitz, T., " Inheritance of lipoxygenase-1 activity in soybean seeds. " Crop Sci. 22 :851-853, 1982.
- [0596] Holtman, W. L. et al., " Differential expression of lipoxygenase isoenzymes in embryos of germinating barley. " Plant Physiol. 111 :569-576, 1996.
- [0597] Husson, F. and Belin, J. M., " Purification of hydroperoxide lyase from green bell pepper (*Capsicum annuum* L.) fruits for the generation of C6-aldehydes in vitro. " J. Agric. Food Chem. 50 :1991-1995, 2002.
- [0598] Institute of Brewing, " Institute of Brewing. Methods of analysis. " IS BN0-900489-10-3 (1997).
- [0599] IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature, " Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. Recommendations 1983. " Biochem. J. 219 :345-373, 1984.
- [0600] Isshiki, M. et al., " Nonsense-mediated decay of mutant waxy mRNA in rice. " Plant Physiol. 125 :1388-1395, 2001.
- [0601] Jalloul, A. et al., " Lipid peroxidation in cotton :Xanthomonas interactions and the role of lipoxygenases during the hypersensitive reaction. " Plant J. 32 :1-12, 2002.
- [0602] Jamieson, A. M. and Van Gheluwe, J. E. A., " Identification of a compound responsible for cardboard flavor in beer. " Proc. Am. Soc. Brew. Chem. 29 : 192-197, 1970.
- [0603] Jende-Strid, B., " Gene-enzyme relations in the pathway of flavonoid biosynthesis in barley. " Theor. Appl. Genet. 81 :668-674, 1991.
- [0604] Jende-Strid, B., " Genetic control of flavonoid biosynthesis in barley. " Hereditas 119 :187-204, 1993.
- [0605] Jensen, L. G. et al., " Transgenic barley expressing a protein-engineered, thermostable (1,3-1,4)- $\alpha$ -glucanase during germination. Proc. Natl. Acad. Sci. USA

93,3487-3491,1996.

[0606] Kamath, R. S. et al., " Effectiveness of specific **RNA-mediated** interference through ingested **double-stranded** RNA in *Caenorhabditis elegans*. " *Genome Biol.* 2 :Research0002.1-0002.10,2000.

[0607] Kamath, R. S. et al., " Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. " *Nature* 421 :231-237,2003.

[0608] Kitamura et al., " Genetic analysis of a null-allele for lipoxygenase-3 in soybean seeds. " *Crop Sci.* 23 :924-927,1983.

[0609] Kleinhofs, A. et al., " Induction and selection of specific gene mutations in *Hordeum* and *Pisum*. " *Mut. Res.* 51 :29-35,1978.

[0610] Kolomiets, M. V. et al., " Lipoxygenase is involved in the control of potato tuber development. " *Plant Cell* 13 :613-626,2001.

[0611] Kuroda et al., " Characterization of factors involved in the production of (E)-2-壬烯醛 during mashing. " *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67 :691-697,2003.

[0612] Kusaba, M. et al., " Low glutelin content 1: A dominant mutation that suppresses the Glutelin multigene family via RNA silencing in rice. " *Plant Cell* 15 :1455-1467,2003.

[0613] Laemmli, U. K., " Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. " *Nature* 227 :680-685,1970.

[0614] León, J. et al., " Lipoxygenase H1 gene silencing reveals a specific role in supplying fatty acid hydroperoxides for aliphatic aldehyde production. " *J. Biol. Chem.* 277 :416-423,2002.

[0615] Lermusieau, G. et al., " Nonoxidative mechanism for development of trans-2-壬烯醛 in beer. " *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 57(1) :29-33,1999.

[0616] Liégeois, C. et al., " Release of deuterated (E)-2-壬烯醛 during beer aging from labeled precursors synthesized before boiling. " *J. Agric. Food Chem.* 50 :7634-7638,2002.

[0617] Maquat, L. E. and Carmichael, G. G., " Quality control of mRNA function. " *Cell* 104 :173-176,2001.

[0618] Matsui, K. et al., " Effects of overexpression of fatty acid 9-hydroperoxidase in tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.). " *J. Agric. Food Chem.* 49 :5418-5424,2001.

[0619] May, C. et al., " The N-terminal  $\alpha$ -barrel structure of lipid body lipoxygenase mediates its binding to liposomes and lipid bodies. " *Eur. J. Biochem.* 267 :1100-1109,2000.

[0620] McElroy, D. and Jacobsen, J., " What ' s brewing in barley biotechnology ? " *Bio/Technology* 13 :245-249,1995.

[0621] Meilgaard, M. C., " Flavor chemistry of beer :Part II :Flavor and threshold of 239 aroma volatiles. " *Tech. Q. MBAA* 12 :151-167,1975.



- [0622] Melan, M. A. et al., " An Arabidopsis lipoxygenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid, and methyl jasmonate. *Plant Physiol.* 101 :441-450, 1993.
- [0623] Mendell, J. T. and Dietz, H. C., " When the message goes awry: Disease-producing mutations that influence mRNA content and performance. " *Cell* 107 :411-414, 2002.
- [0624] Narziss, L., " Centenary Review: Technological factors of flavour stability. " *J. Inst. Brew.* 92 :346-353, 1986.
- [0625] Nero, E., " Resources for Breeding of Wild Barley. " In: " Barley: Genetics, Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology. " Shewry, P. R., ed., pp. 3-18. C. A. B. International. ISBN 0-85198-725-7 (1992).
- [0626] Noël, S. and Collin, S., " Trans-2-壬烯醛 degradation products during mashing. " *Eur. Brew. Cony. Proc. Congr. 25th, Brussels* :483-490, 1995.
- [0627] Noordermeer, M. A. et al., " Fatty acid hydroperoxide lyase: A plant cytochrome P450 enzyme involved in wound healing and pest resistance. " *ChemBioChem* 2 :494-504, 2001.
- [0628] Noordermeer, M. A. et al., " Development of a biocatalytic process for the production of C6-aldehydes from vegetable oils by soybean lipoxygenase and recombinant hydroperoxide lyase. " *J. Agric. Food Chem.* 50 :4270-4274, 2002.
- [0629] Norden, A. J. et al., " Variability in oil quality among peanut genotypes in the Florida breeding program. " *Peanut Sci.* 14 :7-11, 1987.
- [0630] Nyborg, M. et al., " Investigations of the protective mechanism of sulfite against beer staling and formation of adducts with trans-2-壬烯醛. " *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 57 :24-28, 1999.
- [0631] Ohtsu, K. et al., " Flavor stability of packaged beer in relation to the oxidation of wort. " *Brew. Dig.* 61(6) :18-23, 1986.
- [0632] Olsen, O. et al., " Preferential generation of A•T G•C transitions in the barley Ant18 gene. " *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 :8043-8047, 1993.
- [0633] Osorio, J. et al., " Mutant sunflower with high concentration of saturated fatty acids in the oil. " *Crop Sci.* 35 :739-742, 1995.
- [0634] Parinov, S. and Sundaresan, V., " Functional genomics in Arabidopsis: **Largescale** insertional mutagenesis complements the genome sequencing project. " *Curr. Opin. Biotechnol.* 11 :157-161, 2000.
- [0635] Phillips, D. R. and Galliard, T., " Flavour biogenesis: partial purification and properties of a fatty acid hydroperoxide cleaving enzyme from fruits of cucumber. " *Phytochemistry* 17 :355-358, 1978.
- [0636] Ramezanzadeh, F. M. et al., " Prevention of oxidative rancidity in rice during storage. " *J. Agric. Food Chem.* 47 :2997-3000, 1999.
- [0637] Rancé, I. et al., " The incompatible interaction between *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* race 0 and tobacco is suppressed in

transgenic plantsexpressing antisense lipoxygenase sequences." Proc.Natl.Acad. Sci.USA95 :6554-6559,1998.

[0638] Rasmussen, S. K. and Hatzak, F., " Identification of two low-phytate barley(Hordeum vulgate L.)grain mutants by TLC and genetic analysis." Hereditas129 :107-112,1998.

[0639] Rogers, K. R. et al., " Lipid peroxidation is a consequence of elicitoractivity." Plant Physiol. 86 :547-553,1988.

[0640] Rouster, J. et al., " Identification of a methyl jasmonate-responsive region inthe promoter of a lipoxygenase 1 gene expressed in barley grain." Plant J. 11 :513-523,1997.

[0641] Royo, J. et al., "**Antisense**mediated depletion of a potato lipoxygenasereduces wound induction of proteinase inhibitors and increases weight gain ofinsect pests." Proc.Natl.Acad. Sci.USA 96 :1146-115,1999.

[0642] Rustérucci, C. et al., " Involvement of lipoxygenase-dependent production offatty acid hydroperoxides in the development of the hypersensitive cell deathinduced by cryptogein on tobacco leaves." J. Biol. Chem. 274 :36446-36455, 1999.

[0643] Sambrook, J. et al., " Molecular Cloning :A Laboratory Manual, 2nd Ed. " , Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. ISBN 0-87969-309-6.

[0644] Sambrook, J. and Russell, D. W., " Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd Ed. " , Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001. ISBN 0-87969-577-3.

[0645] Saravitz, D. M. and Siedow, J. N., " The differential expression of **woundinducible** lipoxygenase genes in soybean leaves." Plant Physiol. 110 : 287-299, 1996.

[0646] Schmitt, N. F. and Van Mechelen, J. R., " Expression of lipoxygenaseisoenzymes in developing barley grains." Plant Sci. 128 :141-150, 1997.

[0647] Soldatov, K. I., " Chemical mutagenesis in sunflower breeding." In: " Proceedings of the VIIth International Sunflower Conference, 27 **June**3 July, 1976, Krasnodar, USSR, Vol. 1 " , pp 352-357. International SunflowerAssociation, Toowoomba, Australia, 1976.

[0648] Srivastava, S. et al., " Structural and kinetic determinants of aldehydereduction by aldose reductase." Biochemistry 38 :42-54, 1999.

[0649] Start, W. G. et al., " Two soybean seed lipoxygenase nulls accumulate reducedlevels of lipoxygenase transcripts." Plant Mol. Biol. 7 :11-23, 1986.

[0650] Tatulian, S. A. et al., " Uncovering a calcium-regulated membrane-bindingmechanism for soybean lipoxygenase-1. " Biochemistry 37 :

15481-15490,1998.

[0651] Tijet, N. et al., " Biogenesis of volatile aldehydes from fatty acid hydroperoxides :Molecular cloning of a hydroperoxide lyase (CYP74C) with specificity for both the 9- and 13-hydroperoxides of linoleic and linolenic acids. " Arch. Biochem. Biophys. 386 :281-289, 2001.

[0652] Tingay, S. et al., " Agrobacterium tumefaciens-mediated barley transformation. " Plant J. 11 :1369-1376, 1997.

[0653] Towbin, H. et al., " Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets :Procedure and some applications. " Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 :4350-4354, 1979.

[0654] Turner, J. G. et al., " The jasmonate signal pathway. " Plant Cell 14 :S153-S164, 2002.

[0655] Vancanneyt, G. et al., " Hydroperoxide lyase depletion in transgenic potato plants leads to an increase in aphid performance. " Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 :8139-8144, 2001.

[0656] van Mechelen, J. R. et al., " Primary structure of a lipoxygenase from barley grain as deduced from its cDNA sequence. " Biochem. Biophys. Acta 1254 :221-225, 1995.

[0657] van Mechelen, J. R. et al., " Molecular characterization of two lipoxygenases from barley. " Plant Mol. Biol. 39 :1283-1298, 1999.

[0658] von Bothmer, R. et al., " Diversity in barley (Hordeum vulgare). " In: " Diversity in Barley (Hordeum vulgare). " von Bothmer, van Hintum, Knüpfner, H., Sato, K., eds., pp. 129-136. ISBN 0-444-50587-7 (2003). Also available at <http://www.genres.de/IGRREIHE/IGRREIHE/DDD/22-16.pdf>.

[0659] von Wettstein, D. et al., " Biochemical mutant in barley renders chemical stabilization of beer superfluous. " Carlsberg Res. Commun. 42 :341-351, 1977.

[0660] von Wettstein, D. et al., " Proanthocyanidin-free barley for brewing : Progress in breeding for high yield and research tool in polyphenol chemistry. " Tech. Q. MBAA 22 :41-52, 1985.

[0661] Wan, Y. and Lemaux, P. G., " Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants. " Plant Physiol. 104 :37-48, 1994.

[0662] Wang, J. et al., " Alternatively spliced TCR mRNA induced by disruption of reading frame. " Science 297 :108-110, 2002.

[0663] Wang, M.-B. et al., " Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of an elite Australian barley cultivar with virus resistance and reporter genes. " Aust. J. Plant Physiol. 28 :149-156, 2001.

[0664] Wang, W. H. et al., " Molecular basis of a null mutation in

soybeanlipoxygenase 2:Substitution of glutamine for an iron-ligand histidine." Proc.Natl.Acad. Sci.USA 91 :5828-5832,1994.

[0665] Wang, W.-H. et al., " Two **singlebase** substitutions involved in altering in a **pariedbox** of AAATAC in the promoter region of soybean lipoxygenase L-3 gene impair the promoter function in tobacco cells." Plant Sci.109 :67-73,1995.

[0666] Weber, H. et al., " Divinyl ether fatty acid synthesis in late **blightdiseased** potato leaves." Plant Cell 11 :485-493,1999.

[0667] Wesley, S. V. et al., " Construct design for efficient, effective and **highthroughput** gene silencing in plants." Plant J.27 :581-590,2001.

[0668] White, J. et al., " A cassette containing the bar gene of Streptomyceshygroscopicus :A selectable marker for plant transformation.Nucleic Acids Res.18 :1062,1990.

[0669] Zhang Y. et al., " Expression of antisense SnRK1 protein kinase sequence causes abnormal pollen development and male sterility in transgenic barley." Plant J.28 :431-441,2001.

[0001]

&lt;110&gt; 机构名称: 卡尔斯伯格公司 (Carlsberg A/S)

申请项目

&lt;120&gt; 题目: 产生风味稳定饮料的大麦 (Barley for production of flavor-stable beer)

&lt;130&gt; 申请案卷号: 1

&lt;140&gt; 当前申请号:

&lt;141&gt; 当前提交日: ----

序列

&lt;213&gt; 有机体名称: 大麦 (Hordeum vulgare) cv. Barke

&lt;400&gt; PreSequenceString :

```

atgctgctgg gagggtgat cgacaccctc acgggggcca acaagagcgc cggctcaag      60
ggcacggtgg tgctcatgcg caagaacgtg ctggacctca acgacttcgg cgccaccatc      120
atcgacggca tcggcgagtt cctcggcaag ggcgtcacct gccagcttat cagctccacc      180
gccgtcgacc aaggtaatca ctaccctcct ccggccttct cctctgttta caagatatag      240
tattctttc gtgtgggccc gcgccatgg atggatggat gtgtctggat cggctaaaga      300
agataggata gctagccctg gccggtcgtc ttacctgag catgggcata tgccatcgaa      360
aaaagagaca acagcatgca tgcattggtgc gcgcaccaga ccacgcagag caccggatgc      420
tcgagacaaa gcaacacaac aagcaaggac gacacgtcaa aagcaacaca acaagcaagg      480
acggcacgctc aaaagcaaca caaacctaaa ctaaagcaca aagacgtaag agcaagcaca      540
caatcagcag gctataaaca gttgtcatca aaaacaacgc tggaaagagag agagaaggaa      600
ggaagtagta gccatgaaaa attaaatcac cgggcggttc tctttgccca acaattaatc      660
aagcaggata cgtggcatgt atagtcttgc taagtaaact aagcatgtga tatgagaagg      720
tacgtggtgg tgcagacaac ggcggtcgcg ggaaggtggg cgcggaggcg gagctggagc      780
agtgggtgac gagcctgccg tcgctgacga cgggggagtc caagtccggc ctcaccttcg      840
actgggaggt ggagaagctc ggggtgccgg gcgccatcgt cgtcaacaac taccacagct      900
ccgagttcct gcttaaaacc atcacctccc acgacgtccc cggccgcagc ggcaacctca      960
ccttcgtcgc caactcatgg atctacccc cgccaacta ccgatacagc cgcgtcttct      1020
tcgccaacga cgtgcgtgga tttcctccta cttcctcctc ctttcatttt caccgccttc      1080
gtcattcatg tctgatcatt aagtcttgcc aggacaatag atgatgagct aggagtgggt      1140
accacttagc agtactgaca ttatttattc cgtgttggtg gaaaaggata tggtttggtg      1200
cagatcgaca caagattgaa tgaagttgc accgtggcac cgtggcagcg tggtaggtga      1260
aaataactgt tgcacggatc cacccacatg atgttttca tgaataaact ttttaaggat      1320
gtgtctagcc acatctagat gcatgtcaca taattattgc ataccaaac gattaatta      1380
agcataaaaa gaaaaggaaa aaaatactca catatctcga cgtaagatca atgatatagt      1440
atthagatat gcaatattta tcttacatct aaacctttct tcatcctaa atataagaca      1500
tttgtaagat ttcactatgg acaacatacg aaacaaaatc agtggatctc tctatgcatt      1560
cattatgtag tctataataa aatcttttaa agatcgtata ttttgcaac gagggagtaa      1620
aacataactt tttaatagta atgttgacg gctccacact cgcagacgta cctgccgagc      1680
cagatgccgg cggcgctgaa gccgtaccgc gacgacgagc tccggaacct gcgtggcgac      1740
gaccagcagg gcccgtacca ggagcacgac cgcatctacc gctacgacgt ctacaacgac      1800
ctcggcgagg gccgccccat cctcggcggc aactccgacc acccttaccg gcgcccgggc      1860
cgcacggagc gcaagcccaa cgccagcgac ccgagcctgg agagccggct gtcgctgctg      1920
gagcagatct acgtgccgcg ggacgagaag ttcggccacc tcaagacgtc cgacttcctg      1980
ggctactcca tcaaggccat cacgcagggc atcctgcccg ccgtgcgcac ctacgtggac      2040

```

[0002]

```

accacccccg gcgagttcga ctccctccag gacatcatca acctctatga gggcggcatc 2100
aagctgcccc aggtggccgc cctggaggag ctccgtaagc agttcccgtc ccagtcctac 2160
aaggacctcc tcccogtcgg cggcgactcc ctgcttaagc tcccogtgcc ccacatcatc 2220
caggagaaca agcaggcgtg gaggaccgac gaggagttcg cacgggaggt gctcggccgc 2280
gtcaacccgg tcatgatcac gcgtctcacg gtgagtcagc gattatttgt tcattgtgtg 2340
tglatggtgt ccatggtgag aaagtgcaga tcttgatttg cgttgggtcg catgcacgca 2400
tgctgcatgc atgcaggagt tcccgcctaa aagtagctcg gaccctagca agtttgggta 2460
ccacaccagc accatcacgg cggagcacat agagaagaac ctcgagggcc tcacggtgca 2520
gcaggtaatt ggtccaagcc atcgacatca actatgattt acctaggagt aattggtagc 2580
tglagataat tggcttcgt tgcaattaat ttgatgctgg ccgatcaagt gatcgtattg 2640
ggtttgaaat ttgcaggcgc tggaaagcaa caggctgiac atccttgatc accatgaccg 2700
gttcatgccg ttccgatcgc acgtcaacaa cctgcccggc aacttcatct acgccacgag 2760
gacctcttc ttccgctcgc gcgacggcag gctcacgccc ctcgccatcg agctgagcga 2820
gcccatactc caggcgggcc ttaccacggc caagagcaag gtttacacgc cggtgcccag 2880
cggctccgtc gaaggctggg tgtgggagct cgccaaggcc tacgtcggcc tcaatgactc 2940
cgggtggcac cagctcgtca gccactggta cgttctccac ggtcgatgtg attcagtcag 3000
tcgatgcaca acaactgatc gaaatatgat tgattgaaac gcgcaggctg aacactcacg 3060
cggtgatgga gccgttcgtg atctcgacga accggcacct tagcgtgacg caccgggtgc 3120
acaagctgct gagcccgcac taccgcgaca ccatgacat caacgcgctg gcgcggcaga 3180
cgctcatcaa cgccggcggc atcttcgaga tgacgggtgt cccgggcaag ttcgcgttgg 3240
ggaatgcggc cgtggtgtac aaggactgga agttcaccga gcagggactg ccggacgac 3300
tcalcaagag gtacgtacct ggtaaatgtt atgaatgtgt aaaacaaatt gggcgtctcg 3360
ctcactgaca ggaactgtgt aaaaaaaaa caggggcatg gcggtggagg acccgtcgag 3420
cccgtacaag gtgcggttgc tgggttcgga ctaccctgac gcggcggacg ggctggcgat 3480
ctggcacgcc attgagcagt acgtgagcga gtacctggcc atctactacc cgaacgacgg 3540
cgtgctgcag ggcgatacgg aggtgcaggc gtggtggaag gagacgcgcg aggtcgggca 3600
cggcgacctc aaggacgccc catggtggcc caagatgcaa agtgtgccgg agctggccaa 3660
ggcgtgcacc accatcatct ggatcgggtc ggcgctgcat gcggcagtc acttcgggca 3720
gtacccttac gcggggttcc tcccgaaccg gccgacggtg agccggcgcc gcatgccgga 3780
gcccggcacg gaggagtacg cggagctgga gcgcgacccg gagcgggctt tcatccacac 3840
catcacgagc cagatccaga ccatcatcgg cgtgctcgtc ctggagggtc tgtcgaagca 3900
ctcctccgac gagctgtacc tcgggcagcg ggacacgccg gagtggacct cggacccaaa 3960
ggccctggag gigttaagc ggttcagcga ccggctggtg gagatcgaga gcaaggtggt 4020
gggcatgaac catgaccggg agctcaagaa ccgcaacggc ccggctaagt tccctacat 4080
gctgctctac cccaacacct ccgaccacaa gggcgcggct gccgggctta ccgccaaggg 4140
catcccaac agcatctcca tctaa 4165

```

<212> 类型: DNA

<211> 长度: 4165

序列名称: SEQ ID NO: 1

序列描述: cv. Barke 大麦的基因组序列, 其跨越编码 LOX-1 的基因的起始密码子和终止密码子

序列

-----

<213> 生物体名称: 大麦(Hordeum vulgare)突变体 D112

<400> PreSequenceString :

atgctgctgg gagggtgat cgacaccctc acggggcgca acaagagcgc ccggctcaag 60

[0003]

ggcacggtgg	tgctcatgcg	caagaacgtg	ctggacctca	acgacttcgg	cgccaccatc	120
atcgacggca	tcggcgagtt	cctcggcaag	ggcgtcacct	gccagcttat	cagctccacc	180
gccgtcgacc	aaggtaatca	ctaccctcct	ccggccttct	cctctgttta	caagatatag	240
tatttctttc	gigtgggccc	gcggccatgg	atggatggat	gtgtctggat	cggctaaaga	300
agataggata	gctagccctg	gccggtcgtc	tttacctgag	catgggcata	tgccatcgaa	360
aaaagagaca	acagcatgca	tgcatggtgc	gcgcaccaga	ccacgcagag	caccggatgc	420
tcgagacaaa	gcaacacaac	aagcaaggac	gacacgtcaa	aagcaacaca	acaagcaagg	480
acggcacgtc	aaaagcaaca	caaacctaaa	ctaaagcaca	aagacgtaag	agcaagcaca	540
caatcagcag	gctataaaca	gttgtcatca	aaaacaacgc	tggaagagag	agagaaggaa	600
ggaagtagta	gccatgaaaa	attaaatcac	cgggcgttgc	tctttgccc	acaattaatc	660
aagcaggata	cgtggcatgt	atagttcttg	taagtaaact	aagcatgtga	tatgagaagg	720
tacgtggtgg	tgacagacaac	ggcggtcgcg	ggaagggtgg	cgcgaggcgc	gagctggagc	780
agtgggtgac	gagcctgccg	tcgctgacga	cgggggagtc	caagttcggc	ctcaccttcg	840
actgggaggf	ggagaagctc	ggggtgccgg	gcgccatcgt	cgtaacaac	taccacagct	900
ccgagttcct	gcttaaaacc	atcacctcc	acgacgtccc	cggccgcagc	ggcaacctca	960
ccttcgtcgc	caactcatgg	atctacccc	ccgccaacta	ccgatacagc	cgcgtcttct	1020
tcgccaacga	cgtgcgtgga	ttttcctcta	ctttcctctc	ctttcatttt	caccgccttc	1080
gtcattcatg	gtcgaicatt	aagtcttggc	aggacaatag	atgatgagct	aggagtgggt	1140
accacttagc	agtacgtaca	ttattttattc	cgtgttggtg	gaaaaggata	tggtttgggtg	1200
cagatcgaca	caagattgaa	tgaaagtgc	accgtggcac	cgtggcagcg	tggtaggatga	1260
aaaactatgt	tgacaggatc	caccacatg	atgtttttca	tgaataaact	ttttaaggat	1320
gtgtctagcc	acatctagat	gcatgtcaca	taattattgc	ataccaaaac	gattaatta	1380
agcataaaaa	gaaaaggaaa	aaaatactca	catactctga	cgtaagatca	atgatatagt	1440
atttagata	gcaatattta	tcttacaict	aaacctttct	tcatctctaa	atataagaca	1500
tttgaagat	ttcactatgg	acaacatacg	aaacaaaatc	agtggatctc	tctatgcatt	1560
cattatgtag	tctataataa	aatctttaaa	agatcgtata	ttttgcaacg	gagggagtaa	1620
aacataactt	tttaatagta	atgttgacag	gtccacact	cgacagcgtg	cctgccgagc	1680
cagatgccgg	cggcgtgaa	gccgtaccgc	gacgacgagc	tccggaacct	gcgtggcgac	1740
gaccagcagg	gcccgtacca	ggagcacgac	cgcactctacc	gtacgacgt	ctacaacgac	1800
ctcggcgagg	gcccgcccat	cctcggcggc	aactccgacc	accttacc	gcgcccgggc	1860
cgcacggagc	gcaagcccaa	cgccagcgac	ccgagcctgg	agagccggct	gtcgtctgtg	1920
gagcagatct	acgtgccgcg	ggacgagaag	ttcggccacc	tcaagacgtc	cgacttcctg	1980
ggctactcca	tcaaggccat	cacgcagggc	atcctgccgg	ccgtgcgcac	ctacgtggac	2040
accaccccc	gcgagttcga	ctccttccag	gacatcatca	acctctatga	ggcgggcatc	2100
aagctgccca	aggtggccgc	cctggaggag	ctccgtaagc	agttcccgct	ccagctcatc	2160
aaggacctcc	tccccgtcgg	cggcgactcc	ctgcttaagc	tccccgtgcc	ccacatcatc	2220
caggagaaca	agcaggcgtg	gaggaccgac	gaggagtctg	cacgggaggt	gtcgcgggc	2280
gtcaaccgg	tcatgatcac	gcgtctcag	gtgagtcagc	gattatttgt	tcatgtgtg	2340
tgtatggtgt	ccaatggtgag	aaagtgcaga	tcttgatttg	cgttgggtcg	catgcacgca	2400
tgctgcatgc	atgcaggagt	tccgcgcaaa	aagtagtctg	gacctagca	agtttggtga	2460
ccacaccagc	accatcacgg	cggagcacat	agagaagaac	ctcgagggcc	tcacggtgca	2520
gcaggtaatt	ggtccaagcc	atcgacatca	actatgattt	acctaggagt	aattggtagc	2580
tgtagataat	ttggcttctg	tgcaattaat	ttgatgctgg	ccgatcaagt	gatcgtattg	2640
ggtttgaaat	ttgcaggcgc	tgaaaagcaa	caggctgtac	atccttgatc	accatgaccg	2700
gttcatgccg	ttcctgatcg	acgtcaacaa	cctgcccggc	aacttcatct	acgccacgag	2760
gacctcttcc	ttcctgcgcg	gcgacggcag	gctcacgccg	ctcgccatcg	agctgagcga	2820
gccccatcatc	cagggcgggcc	ttaccacggc	caagagcaag	gtttacacgc	cgggtgccag	2880

[0004]

```

cggctccgct gaaggtcggg tgtgggagct cgccaaggcc tacgfcgccc tcaatgactc 2940
cgggtggcac cagctcgtca gccactggia cgttctccac ggtcgatgtg attcagtcag 3000
tcgatgcaca acaactgata gaaatatgat tgattgaaac gcgcaggctg aacactcacg 3060
cggigtatgga gccgttcgtg atctcgacga accggcacct tagcgtgacg caccgggtgc 3120
acaagctgct gagcccgcac taccgagaca ccatgacat caacgcgctg gcgcggcaga 3180
cgctcatcaa cgccggcggc atcttcgaga tgacgggtgt cccgggcaag ttcgctgtgg 3240
ggatgtcggc cgtgggtgtac aaggactgga agttcaccga gcagggactg ccggacgatc 3300
tcatcaagag gtacgtacct ggtaaatgtt atgaatgtgt aaaacaaatt gggcgtctcg 3360
ctcactgaca ggaacgtggt aaaaaaaaaat caggggcatg gcggtggagg acccgtcag 3420
cccgtacaag gtgcgggttc tgggttcgga ctaccctgac gcgcgagacg ggctggcgat 3480
ctggcagcgc attgagcagt acgtgagcga gtacctggcc atctactacc cgaacgacgg 3540
cgtgtgcag ggcgatacgg aggtgcaggc gtgatggaag gagacgcgcg aggtcgggca 3600
cggcgacctc aaggacgccc catgggtggc caagatgcaa agtglccgg agctggccaa 3660
ggcgtgcacc accatcatct ggatcgggtc ggctgtcat gcggcagtca acttcgggca 3720
gtacccttac gcggggttcc tcccgaaccg gccgacggtg agccggcgcc gcattccgga 3780
gcccggcagc gaggagtacg cggagctgga gcgcgacccg gagcgggctc tcatccacac 3840
catcacgagc cagatccaga ccatcatcgg cgtgtcgtg ctggagggtc tgtcgaagca 3900
ctctccgac gagctgtacc tcgggcagcg ggacacgccc gagtggacct cggacccaa 3960
ggccctggag gtgttcaagc ggttcagcga ccgctgggtg gagatcgaga gcaagggtgt 4020
gggatgaaac catgaccccg agctcaagaa ccgcaacggc ccgctaagt ttccctacat 4080
gctgtcttac cccaacacct ccgaccaca gggcgccgct gccgggctta ccgccaagg 4140
catcccaac agcatctcca tctaa 4165

```

<212> 类型: DNA

<211> 长度: 4165

序列名称: SEQ ID NO: 2

序列描述: 突变体 D112 大麦的基因组序列, 其跨越相应于编码 cv. Barke LOX-1 的基因的起始密码子和终止密码子之间区域的片段

## 序列

<213> 生物体名称: 大麦(Hordeum vulgare) cv. Barke

<400> PreSequenceString :

```

MLLGGLIDTL TGANKSARLK GTVVMRKNV LDLNDFGATI IDGIGEFGLK GVTCQLISST 60
AVDQDNGGRG KVGAEAELEQ WVTSLPSLTT GESKFGLTFD WEVEKLGVPV AIVVNNYHSS 120
EFLKLTITLH DVPGRSGNLT FVANSWIYPA ANYRYSRVFF ANDTYLPSQM PAALKPYRDD 180
ELRNLRGDDQ QGPYQEHDRY YRYDVYNDLG EGRPILGNS DHPYPRRGR ERKPNASDPS 240
LESRLSLEQ IYVPRDEKFG HKTSDFLGY SIKAITQGIL PAVRTYVDTT PGEFDSFQDI 300
INLYEGGIKL PKVAALEELR KQFPLQLIKD LLPVGGDSLL KLPVPHIIQE NKQAWRTDEE 360
FAREVLAVGN PVMITRLTEF PPKSSLDPSK FGDHTSTITA EHIEKNLEGL TVQQALESNR 420
LYILDHHDHF MPFLIDVNNL PGNFYIATRT LFFLRGDGRL TPLAIELSEP IIQGLTTAK 480
SKVYTPVPSG SVEGWVWELA KAYVAVNDSG WHQLVSHWLN THAVMEPFVI STNRHLSVTH 540
PVHKLLSPHY RDTMTINALA RQTLINAGGI FEMTVFPGKF ALGMSAVVYK DWKFTEQGLP 600
DDLKRGMAV EDPSSPYKVR LLVSDYPYAA DGLAIWHAIE QYVSEYLAIY YPNDGVLQGD 660
TEVQAWWKET REVGHGDLKD APWWPKMQSV PELAKACTTI IWIGSALHAA VNFGQYPYAG 720
FLPNRPTVSR RRMPEPGTEE YAELEDPER AFIHTITSQI QTIIGVSLLE VLSKHSSDEL 780
YLGQRDTPWE TSDPKALEVF KRFSRDLVEI ESKVGMNHD PELKNRNGPA KFPYMLLYPN 840
TSDHKGAAAG LTAKGIPNSI SI 862

```

[0005]



<212> 类型: PRT

<211> 长度: 862

序列名称: SEQ ID NO: 3

序列描述: cv. Barke LOX-1 全长蛋白的蛋白质序列

序列

<213> 生物体名称: 大麦(Hordeum vulgare) 突变体 D112

<400> PreSequenceString :

```

MLLGGLIDTL TGANKSARLK GTVVLMRKNV LDLNDFGATI IDGIGEFGLGK GVTCQLISST      60
AVDQDNGGRC KVGAAEAELEQ WVTSLPSLTT GESKFGLTFD WEVEKLGVPV AIVVNIVHSS      120
EFLKTLITLH DVPGRSGNLT FVANSWIYPA ANYRYSRVFF ANDTYLPSQM PAALKPYRDD      180
ELRNLRGDDQ QGPYQEHDRY YRYDVYNDLG EGRPILGGNS DHPYPRRGRT ERKPNASDPS      240
LESRLSLEEQ IYVPRDEKFG HLKTSDFLGY SIKAITQGIL PAVRTYVDTT PGEFDSFQDI      300
INLYEGGIKL PKVAALEELR KQFPLQLIKD LLPVGGDSL KLPVPHIQE NKQAWRTDEE      360
FAREVLAVGN PVMITRLTEF PPKSSLDPSK FGDHTSTITA EHIEKNLEGL TVQQALESNR      420
LYILDHHRDF MPFLIDVNNL PGNFYIATRT LFFLRGDGRL TPLAIELSEP IIQGGLTTAK      480
SKVYTPVPSG SVEGWVWELA KAYVAVNDSD WHQLVSHWLN THAVMEPFVI STNRHLSVTH      540
PVHKLSPHY RDTMTINALA RQTLINAGGI FEMTVFPGKF ALGMSAVVYK DWKFTEQGLP      600
DDLIRGMVAV EDPSSPYKVR LLVSDYPYAA DGLAIWHAIE QYVSEYLAIY YPNDGVLQGD      665
TEVQA

```

<212> 类型: PRT

<211> 长度: 665

序列名称: SEQ ID NO: 4

序列描述: 突变体 D112 的失活的、截短的 LOX-1 蛋白质序列

序列

<213> 生物体名称: 大麦(Hordeum vulgare) cv. Neruda

<400> PreSequenceString :

```

atgctgctgg gagggctgat cgacaccctc acggggcgca acaagagcgc cgggctcaag      60
ggcacggtgg tgctcatgcg caagaacgtg ctggacctca acgacttcgg cgccaccatc      120
atcgacggca tcggcgagtt cctcggcaag ggcgctacct gccagcttat cagctccacc      180
gccgtcgacc aaggtaataca ctaccctcct cgggccttct cctctgttta caagatatag      240
tatttctttc gtgtgggccc gcgccatgg atggatggat gtgtctggat cggctaaaga      300
agataggata gctagccctg gccggctcgc ttacctgag catgggcata tgccatcgaa      360
aaaagagaca acagcatgca tgcattgtgc gcgaccaga ccacgcagag caccggatgc      420
tcgagacaaa gcaacacaac aagcaaggac gacacgtcaa aagcaacaca acaagcaagg      480
acggcacgctc aaaagcaaca caaacctaaa ctaaagcaca aagacgtaag agcaagcaca      540
caatcagcag gctataaaca gttgtcatca aaaacaacgc tggaagagag agagaaggaa      600
ggaagtagta gccatgaaaa attaaatcac cgggcgcttg tctttgcca acaattaatc      660
aagcaggata cgtggcatgt atagttcttg taagtaact aagcatgtga tatgagaagg      720
tacgtggigg tgcagacaac ggcggtcgcg ggaaggtggg cgcggaggcg gagctggagc      780
agtgggtgac gagcctgccg tcgctgacga cgggggagtc caagtccgc ctcacctcgc      840
actgggaggt ggagaagctc ggggtgccgg gcgccatcgt cgtcaacaac taccacagct      900
ccgagttcct gcttaaaacc atcaccctcc acgacgtccc cggccgcagc ggcaacctca      960
ccttcgctgc caactcatgg atctacccc cggccaacta ccgatacagc cgcgtcttct      1020

```

[0006]

tcgccaacga	cggtgcgigga	ttttcctcta	ctttcctctc	ctttcatttt	caccgccttc	1080
gtcattcatg	gtcgaicatt	aagtcttgcc	aggacaatag	atgatgagct	aggagtgggt	1140
accacttagc	agtacgtaca	ttatttatlc	cglgttgga	gaaaaggata	tggtttgggtg	1200
cagatcgaca	caagattgaa	tgaaagtigc	accgtggcac	cgtggcagcg	tggtagggtga	1260
aaataactgt	igcacggatc	caccacatg	attgttttca	tgaataaact	ttttaaggat	1320
gtgtctagcc	acatctagat	gcatgtcaca	taattattgc	atacaaaaac	gattaaatta	1380
agcataaaaa	gaaaaggaaa	aaaatactca	cataictcga	cglaagatca	atgatatagt	1440
atttagatat	gcaatatit	tcttacatct	aaacctttct	tcatctctaa	ataaagaca	1500
tttgtaagat	ttcactatgg	acaacatacg	aaacaaaaac	agtggatctc	tctatgcatt	1560
cattatgtag	ictataataa	aatctttaa	agatcgtata	ttttgcaacg	gagggagtaa	1620
aacataaact	tttaatagta	atgttgacg	gtccacact	cgcagacgta	cctgcccagc	1680
cagatgccgg	cggtcgtgaa	gacctaccgc	gacgacgagc	tccggaacct	gcgtggcgac	1740
gaccagcagg	gcccgtacca	ggagcacgac	cgcatctacc	gctacgacgt	ctacaacgac	1800
ctcggcgagg	gcccggccat	cctcggcggc	aactccgacc	accttacc	gcgcccggc	1860
cgcacggagc	gcaagcccaa	cgcacgacg	ccgagcctgg	agagccggct	gtcgtgctg	1920
gagcagatct	acgtgccgg	ggacgagaag	ttcgccacc	teaagacgtc	cgacttctg	1980
ggctactcca	tcaaggccat	cacgagggc	atcctgccgg	ccgtgcgac	ctacgtggac	2040
accacccccg	gcgagttcga	ctccttcag	gacatcatca	acctctatga	ggcgggcatc	2100
aagctgccc	aggtggccgc	cctggaggag	ctccgtaagc	agtlcccgtc	ccagctcatc	2160
aaggacctcc	tccccgtcgg	cggcgactcc	ctgcttaagc	tcccgtgcc	ccacatcatc	2220
caggagaaca	agcaggcgtg	gaggaccgac	gaggagttcg	cacgggaggt	gctcggcggc	2280
gtcaaccggg	tcatgatcac	gcgtctcacg	gtgagtcagc	gattatttgt	tcatgtgtg	2340
tgtatgggtg	ccaigtgag	aaagtgcaga	tcttgatttg	cgttgggtcg	catgcacgca	2400
tgctgcattg	atgcaggagt	tcccggccaa	aagtagtctg	gacctagca	agtttgggtg	2460
ccacaccagc	accatcacgg	cggagcacat	agagaagaac	ctcaggggcc	tcacgggtgca	2520
gcagglaatt	ggtccaagcc	atcgacatca	actatgattt	acctaggagt	aattggtagc	2580
tgtagataat	ttggcttcgt	tgcaattaat	ttgatgctgg	ccgatcaagt	gatcgtattg	2640
ggtttgaaat	ttgcaggcgc	tggaaagcaa	caggctgtac	atccttgatc	accatgaccg	2700
gttcatgccg	ttcctgatcg	acgtcaacaa	cctgcccggc	aacttcatct	acgccacgag	2760
gacctcttc	ttcctgcgcg	gcgacggcag	gctcacgccc	ctcgccatcg	agctgagcga	2820
gccccatcat	caggggcgcc	ttaccacggc	caagagcaag	gtttacacgc	cggtgcccag	2880
cggctccgct	gaaggctggg	tgtgggagct	cgccaaggcc	tacgtcggcg	tcaatgactc	2940
cgggtggcac	cagctcgtca	gccactggta	cgttctccac	ggtcgaatgt	attcagtcag	3000
tcgatgcaca	acaactgatc	gaaatatgat	tgattgaaac	gcgcaggctg	aacactcacg	3060
cgggtgatgga	gcccgttcgt	atctcgacga	accggcacct	tagcgtgacg	caccgggtgc	3120
acaagctgct	gagcccgcac	taccgcgaca	ccatgacat	caacgcgctg	gcgcggcaga	3180
cgctcatcaa	cgccggcggc	atcttcgaga	tgacgggtgt	cccgggcaag	ttcgcgttgg	3240
ggaigtgcgg	cgtgggtgac	aaggactgga	agttcacgga	gcagggactg	ccggaagatc	3300
tcatcaagag	gtacgtacct	ggtaaatgtt	atgaatgtgt	aaaacaaatt	gggcgtctcg	3360
ctcactgaca	ggaacgtggt	aaaaaaaaat	caggggcatg	gcgggtggagg	acctgctcag	3420
cccgtacaag	gtcgggttgc	tgggtgtcga	ctaccctgac	gcggcggacg	ggctggcgat	3480
ctggcacgcc	atlgagcagt	acgtgagcga	gtacctggcc	atctactacc	cgaacgacgg	3540
cgtgctgcag	ggcgalacgg	agglgcaggc	gtggtggaag	gagacgcgcg	aggtcgggca	3600
cggcgacctc	aaggacgccc	catggtggcc	caagatgcaa	agtgtgccgg	agctggccaa	3660
ggcgtgcacc	accatcatct	ggatcgggtc	ggcgtgcat	gcggcagtc	acttcgggca	3720
gtaccctac	gcggggttcc	tccgaaccg	gccgacgggt	agccggcgcc	gcatgcccga	3780
gcccggcacg	gaggagtacg	cggagctgga	gcgcgacccg	gagcgggcct	tcatccacac	3840

[0007]

```

catcacgagc cagatccaga ccatcatcgg cgtgtcgtg ctggagggtgc tgtcgaagca 3900
ctcctccgac gagctgtacc tcgggcagcg ggacacgccg gaggtagcct cggacccaaa 3960
ggccctggag gtgttcaagc gggtcagcga ccggctgggt gagatcgaga gcaagggtgt 4020
gggcatgaac catgaccocgg agctcaagaa ccgcaacggc ccggctaagt tccctacat 4080
gctgtcttac cccaacacct ccgaccacaa gggcgcggct gccgggctta ccgccaaggg 4140
catccccaac agcatctcca tctaa 4165

```

<212> 类型: DNA

<211> 长度: 4165

序列名称: SEQ ID NO: 5

序列描述: cv. Neruda 的大麦基因组序列, 其跨越编码 LOX-1 的基因的起始密码子和终止密码子

序列

<213> 生物体名称: 大麦(Hordeum vulgare)突变体 A618

<400> PreSequenceString :

```

atgctgctgg gagggtgat cgacaccctc acgggggcga acaagagcgc ccggctcaag 60
ggcacggtag tgcctatcgc caagaacgtg ctggacctca acgacttcgg cgccaccatc 120
atcgacggca tcggcgagtt cctcggcaag ggctgcacct gccagcttat cagctccacc 180
gccgtcgacc aaggtaatca ctaccctcct ccggccttct cctctgttta caagatatag 240
tatttctttc gtgtgggccc ggcggcatgg atggatggat gtgtctggat cggctaaaga 300
agataggata gctagccctg gccggctcgc ttacctgag catgggcata tgccatcgaa 360
aaaagagaca acagcatgca tgcattggtc gcgcaccaga ccacgcagag caccggatgc 420
tcgagacaaa gcaacacaac aagcaaggac gacacgtcaa aagcaacaca acaagcaagg 480
acggcacgtc aaaagcaaca caaacctaaa ctaaagcaca aagacgtaag agcaagcaca 540
caatcagcag gctataaaca gttgtcatca aaaacaacgc tggaagagag agagaaggaa 600
ggaagtagta gccatgaaaa attaaatcac cgggcgttgc tctttgcca acaattaatc 660
aagcaggata cgtggcatgt atagttcttg taagtaaac aagcatgtga tatgagaagg 720
tacgtggtag tgacagcaac ggccggtcgc ggaaggtagg ccgggaggcg gagctggagc 780
agtgggtgac gagcctgccc tcgctgacga cgggggagtc caagttcggc ctcccttcg 840
actgggagggt ggagaagctc ggggtgccgg gcgccatcgt cgtcaacaac taccacagct 900
ccgagttcct gcttaaaacc atcacctcc acgacgtccc cggccgcagc ggcaacctca 960
ccttcgtcgc caactcatgg atctacccc cggccaacta ccgatacagc cgcgtcttct 1020
tcgccaacga cgtgcgtgga tttcctcta cttcctctc ctttcatitt caccgccttc 1080
gtcattcatg tgcgatcatt aagcttggc aggacaatag atgatgagct aggagtgggt 1140
accacttagc agtacgtaca ttatttattc cgtgttggtg gaaaaggata tggtttggtg 1200
cagatcgaca caagattgaa tgaagttgc accgtggcac cgtggcagcg tggtaggtga 1260
aaataactgt tgcacggatc caccacatg attgttttca tgaataaac ttttaaggat 1320
gtgtctagcc acatctagat gcatgtcaca taattattgc atacaaaac gattaaatta 1380
agcataaaaa gaaaaggaaa aaaactca catatctcga cgtaagatca atgatatagt 1440
atthagatat gcaatattta tctacatct aaaccttct tcatcctaa atataagaca 1500
tttgtaagat ttcactatgg acaacatacg aaacaaaatc agtggatctc tctatgcat 1560
cattatgtag tctataataa aatctttaa agatcgtata ttttgcaac gagggagtaa 1620
aacataactt ttaatatgta atgttgacg gctccacact cgcagacgta cctgccgagc 1680
cagatgccgg cggcgtgaa gccgtaccgc gacgacgagc tccggaacct gcgtggcgac 1740
gaccagcagg gcccgtagca ggagcacgac cgcatctacc gctacgacgt ctacaacgac 1800
ctcggcgagg gccgccccat cctcggcggc aactccgacc acccttacc gcgccggcg 1860

```

[0008]

```

cgcaocggagc gcaagcccaa cgccagcgac ccgagcctgg agagccggct gtcgctgctg 1920
gagcagatct acgtgccgcg ggacgagaag ttcggccacc tcaagacgtc cgacttcctg 1980
ggctactcca tcaaggccat cacgcagggc atcctgccgg ccgtgcgcac ctacgtggac 2040
accacccccg gcgagttcga ctccctccag gacatcatca acctctatga gggcggcatc 2100
aagctgcccc aggtggccgc cctggaggag ctccgtaagc agttcccgct ccagctcatc 2160
aaggacctcc tccccgtcgg cggcgactcc ctgcttaagc tccccgtgcc ccacatcatc 2220
caggagaaca agcaggcgtg gaggaccgac gaggagtcc caccggagggt gctcggcggc 2280
gtcaaccggg tcatgatcac gcgtctcacg atgagtcagc gattatttgt tcattgtgtg 2340
tgtatggtgt ccatggtgag aaagtgcaga tcttgatttg cgttgggtcg catgcacgca 2400
tgctgcatgc atgcaggagt tcccgccaaa aagtagtctg gaccctagca agtttgggtg 2460
ccacaccagc accatcacgg cggagcacat agagaagaac ctcgagggcc tcacggtgca 2520
gcaggtaatf ggtccaagcc atcgacatca actatgattt acctaggagt aattggtagc 2580
tgtagataat ttggcttcgt tgcaatlaa tttgatgctgg ccgatcaagt gatcgtattg 2640
ggtttgaaa tggcagggcg tggaaagcaa caggctgtac atccttgatc accatgaccg 2700
gttcatgccc ttccctgatcg acgtcaacaa cctgcccgcc aacttcatct acgccacgag 2760
gaccctcttc ttccctgcgc gcgacggcag gctcacgccg ctgccatcg agctgagcga 2820
gccccatcat caggggcggc ttaccacggc caagagcaag gtttacacgc cggtgcccag 2880
cggctccgct gaaggctggg tgtgggagct cgccaaggcc tacgtccggc tcaatgactc 2940
cgggtggcac cagctcgtca gccactggta cgtctccac ggtcgatgtg attcagtcag 3000
tcgatgcaca acaactgac gaaatattgat tgaatgaaac gcgcaggctg aacactcacg 3060
cggtgatgga gccgttcgtg atctcgacga accggcacct tagcgtgacg caccgggtgc 3120
acaagctgct gagcccgcac taccgagaca ccatgacat caacgcgctg gcgcggcaga 3180
cgctcatcaa cgccggcggc atcttcgaga tgacgggtgt cccgggcaag ttcgcttgg 3240
ggaatgctggc cgtgggtgac aaggactgga agttaccga gcagggactg ccggacgatc 3300
tcalcaagag gtacgtacct gglaaatgtt atgaatgtgt aaaacaaatt gggcgtctcg 3360
ctcactgaca ggaacgtggt aaaaaaaaaatg caggggcatg gcggtggagg acccgtcgag 3420
cccgtacaag gtgcgggtgc tgggtgcgga ctaccctgac gcggcggacg ggctggcgtat 3480
ctggcacgcc aitgagcagt acgtgagcga gtaccctggc atctactacc cgaacgacgg 3540
cgtgctgcag ggcgatcagg aggtgcaggc gtggtggaag gagacgcgcg aggtcgggca 3600
cgggcacctc aaggacgccc catggtggcc caagatgcaa agtgtgccgg agctggccaa 3660
ggcgtgcacc accatcatct ggatcgggtc ggcgtgcat gcggcagtca acttcgggca 3720
gtacccttac gcggggttcc tccgaaccg gccgacggtg agccggcgcc gcatgccgga 3780
gccccgcacg gaggagtagc cggagctgga gcgcgacccg gagcgggacct tcatccacac 3840
catcacgagc cagatccaga ccatcatcgg cgtgtcgtg ctggagggtc tgtcgaagca 3900
ctccctccgac gagctgtacc tggggcagcg ggacacgccg gagtggacct cggaccacaa 3960
ggccctggag gtgttcaagc ggttcagcga ccggctgggt gagatcgaga gcaagggtgt 4020
gggcatgaac catgaccgag agctcaagaa ccgcaacggc ccggctaagt tccctacat 4080
gctgctctac cccaacacct ccgaccacaa gggcgccgct gccgggctta ccgccaaggg 4140
catecccaac agcatctcca tctaa 4165

```

<212> 类型: DNA

<211> 长度: 4165

序列名称: SEQ ID NO: 6

序列描述: 突变体 A618 大麦的基因组序列, 其跨越相应于编码 cv. Neruda LOX-1 的基因的起始密码子和终止密码子之间区域的片段

序列

[0009]

<213> 生物体名称: 大麦(*Hordeum vulgare*) cv. Neruda

<400> PreSequenceString :

MLLGGGLIDTL TGANKSARLK GTVVLMRKNV LDLNDFGATI IDGIGEFGLGK GVTCQLISST	60
AVDQDNGGRG KVGAEAELEQ WVTSLPSLTT GESKFGLTFD WEVEKLGVPK AIVVNNYHSS	120
EFLKKTITLH DVPGRSGNLT FVANSWIYPA ANYRYSRVFF ANDTYLPSQM PAALKPYRDD	180
ELRNLRGDDQ QGPYQEHDR I YRYDVYNDLG EGRPILGGNS DHPYPRRGRT ERKPNASDPS	240
LESRLSLEEQ IYVPRDEKFG HLTSDFLGY SIKAITQGIL PAVRTYVDTT PGEFDSFQDI	300
INLYEGGIKL PKVAALEELR KQFPLQLIKD LLPVGDSLL KLPVPHIIQE NKQAWRTDEE	360
FAREVLAVGN PVMITRLTEF PPKSSLDPSK FGDHTSTITA EHIEKNLEGL TVQQALESNR	420
LYILDHHRDF MPFLIDVNNL PGNFYIATRT LFFLRGDGRL TPLAIELSEP IIQGLTTAK	480
SKVYTPVPSG SVEGWVWELA KAYVAVND SG WHQLVSHWLN THAVMEPFVI STNRHLSVTH	540
PVHKLLSPHY RDTMTINALA RQTLINAGGI FEMTVFPGKF ALGMSAVVYK DWKFTEQGLP	600
DDLKRGMAV EDPSSPYKVR LLVSDYPYAA DGLAIWHAIE QYVSEYLAII YPNDGVLQGD	660
TEVQAWWKET REVGHGDLKD APWWPKMQSV PELAKACTTI IWIGSALHAA VNFQQYPYAG	720
FLPNRPTVSR RRMPEPGTEE YAELEDPER AFIHTITSQI QTIIGVSLLE VLSKHSSDEL	780
YLGQRDTP EW TSDPKALEVF KRFSRDLVEI ESKVVGMNHD PELKNRNGPA KFPYMLLYPN	840
TSDHKGAAAG LTAKGIPNSI SI	862

<212> 类型: PRT

<211> 长度: 862

序列名称: SEQ ID NO: 7

序列描述: cv. Neruda LOX-1 全长蛋白的蛋白质序列

序列

-----

<213> 生物体名称: 大麦(*Hordeum vulgare*) 突变体 A618

<400> PreSequenceString :

MLLGGGLIDTL TGANKSARLK GTVVLMRKNV LDLNDFGATI IDGIGEFGLGK GVTCQLISST	60
AVDQDNGGRG KVGAEAELEQ WVTSLPSLTT GESKFGLTFD WEVEKLGVPK AIVVNNYHSS	120
EFLKKTITLH DVPGRSGNLT FVANSWIYPA ANYRYSRVFF ANDTYLPSQM PAALKPYRDD	180
ELRNLRGDDQ QGPYQEHDR I YRYDVYNDLG EGRPILGGNS DHPYPRRGRT ERKPNASDPS	240
LESRLSLEEQ IYVPRDEKFG HLTSDFLGY SIKAITQGIL PAVRTYVDTT PGEFDSFQDI	300
INLYEGGIKL PKVAALEELR KQFPLQLIKD LLPVGDSLL KLPVPHIIQE NKQAWRTDEE	360
FAREVLAVGN PVMITRLTMS QRLFVHCVCV MVMVRKCRS	399

<212> 类型: PRT

<211> 长度: 399

序列名称: SEQ ID NO: 8

序列描述: 突变体 A618 的失活的、截短的 LOX-1 蛋白质序列

序列

-----

<213> 生物体名称: 寡核苷酸

<400> PreSequenceString :

gaaagcgagg agaggaggcc aagaacaa	28
--------------------------------	----

<212> 类型: DNA

<211> 长度: 28

序列名称: SEQ ID NO: 9

序列描述: 用于 PCR 扩增的寡核苷酸引物 (有义引物)

[0010]

## 序列

-----  
 <213> 生物体名称: 寡核苷酸  
 <400> PreSequenceString :  
 ttattcatcc atggttgccg atggcttaga 30  
 <212> 类型: DNA  
 <211> 长度: 30  
 序列名称: SEQ ID NO: 10  
 序列描述: 用于 PCR 扩增的寡核苷酸引物 (反义引物)

## 序列

-----  
 <213> 生物体名称: 寡核苷酸  
 <400> PreSequenceString :  
 agggactgcc ggacgatctc a 21  
 <212> 类型: DNA  
 <211> 长度: 21  
 序列名称: SEQ ID NO: 11  
 序列描述: 用于 PCR 扩增的寡核苷酸引物 (有义引物)

## 序列

-----  
 <213> 生物体名称: 寡核苷酸  
 <400> PreSequenceString :  
 gccagctccg gcacactt 18  
 <212> 类型: DNA  
 <211> 长度: 18  
 序列名称: SEQ ID NO: 12  
 序列描述: 用于 PCR 扩增的寡核苷酸引物 (反义引物)

## 序列

-----  
 <213> 生物体名称: 寡核苷酸  
 <400> PreSequenceString :  
 caaggtgctg ttgctggtgt c 21  
 <212> 类型: DNA  
 <211> 长度: 21  
 序列名称: SEQ ID NO: 13  
 序列描述: 用于 PCR 扩增的寡核苷酸引物 (有义引物)

## 序列

-----  
 <213> 生物体名称: 寡核苷酸  
 <400> PreSequenceString :  
 ctcgcgctc tccttcac 19  
 <212> 类型: DNA

[0011]

<211> 长度: 19  
 序列名称: SEQ ID NO: 14  
 序列描述: 用于 PCR 扩增的寡核苷酸引物 (反义引物)

序列

-----  
 <213> 生物体名称: 寡核苷酸  
 <400> PreSequenceString :  
 ctcgcgctc tccttccat 19  
 <212> 类型: DNA  
 <211> 长度: 19  
 序列名称: SEQ ID NO: 15  
 序列描述: 用于 PCR 扩增的寡核苷酸引物 (反义引物)

序列

-----  
 <213> 生物体名称: 寡核苷酸  
 <400> PreSequenceString :  
 tacgtgccgc gggacgagaa g 21  
 <212> 类型: DNA  
 <211> 长度: 21  
 序列名称: SEQ ID NO: 16  
 序列描述: 用于 PCR 扩增的寡核苷酸引物 (有义引物)

序列

-----  
 <213> 生物体名称: 寡核苷酸  
 <400> PreSequenceString :  
 tgatcatgac cgggttgacg t 21  
 <212> 类型: DNA  
 <211> 长度: 21  
 序列名称: SEQ ID NO: 17  
 序列描述: 用于 PCR 扩增的寡核苷酸引物 (反义引物)

序列

-----  
 <213> 生物体名称: 寡核苷酸  
 <400> PreSequenceString :  
 catatgctgc tgggaggct g 21  
 <212> 类型: DNA  
 <211> 长度: 21  
 序列名称: SEQ ID NO: 18  
 序列描述: 用于 PCR 扩增的寡核苷酸引物 (有义引物)

序列

-----  
 <213> 生物体名称: 寡核苷酸

[0012]

<400> PreSequenceString :  
 gaattccttag atggagatgc tgttggg 27  
 <212> 类型: DNA  
 <211> 长度: 27  
 序列名称: SEQ ID NO: 19  
 序列描述: 用于 PCR 扩增的寡核苷酸引物 (反义引物)

序列

-----

<213> 生物体名称: 寡核苷酸  
 <400> PreSequenceString :  
 ctacccttac gcggcggacg ggct 24  
 <212> 类型: DNA  
 <211> 长度: 24  
 序列名称: SEQ ID NO: 20  
 序列描述: 用于 PCR 扩增的寡核苷酸引物 (有义引物)

序列

-----

<213> 生物体名称: 寡核苷酸  
 <400> PreSequenceString :  
 tcctgaattc acgcctgcac ctccgtatcg c 31  
 <212> 类型: DNA  
 <211> 长度: 31  
 序列名称: SEQ ID NO: 21  
 序列描述: 用于 PCR 扩增的寡核苷酸引物 (反义引物)



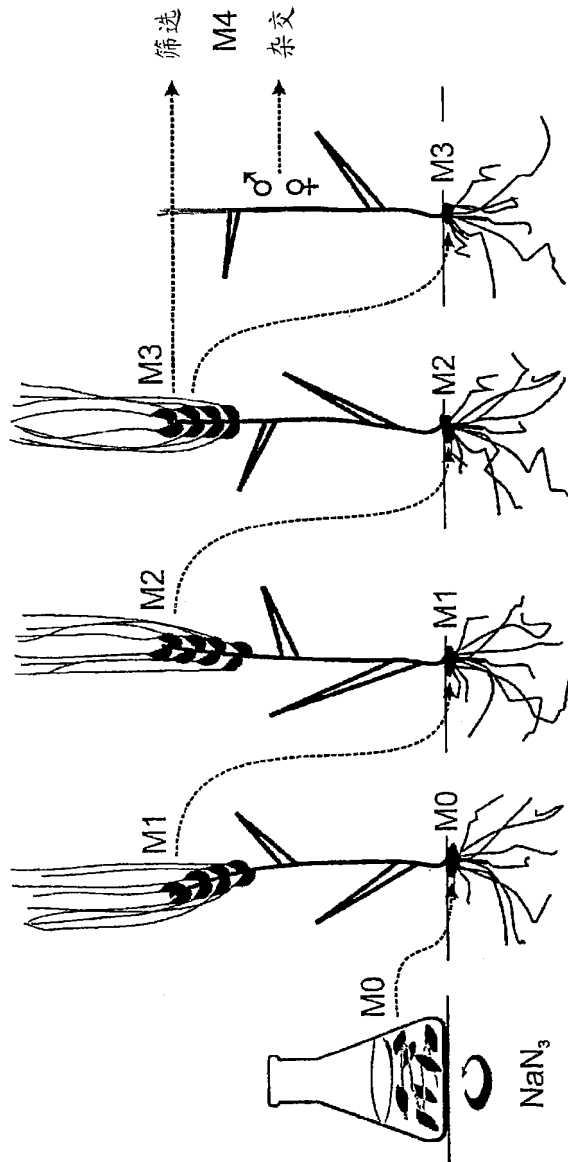


图 1A

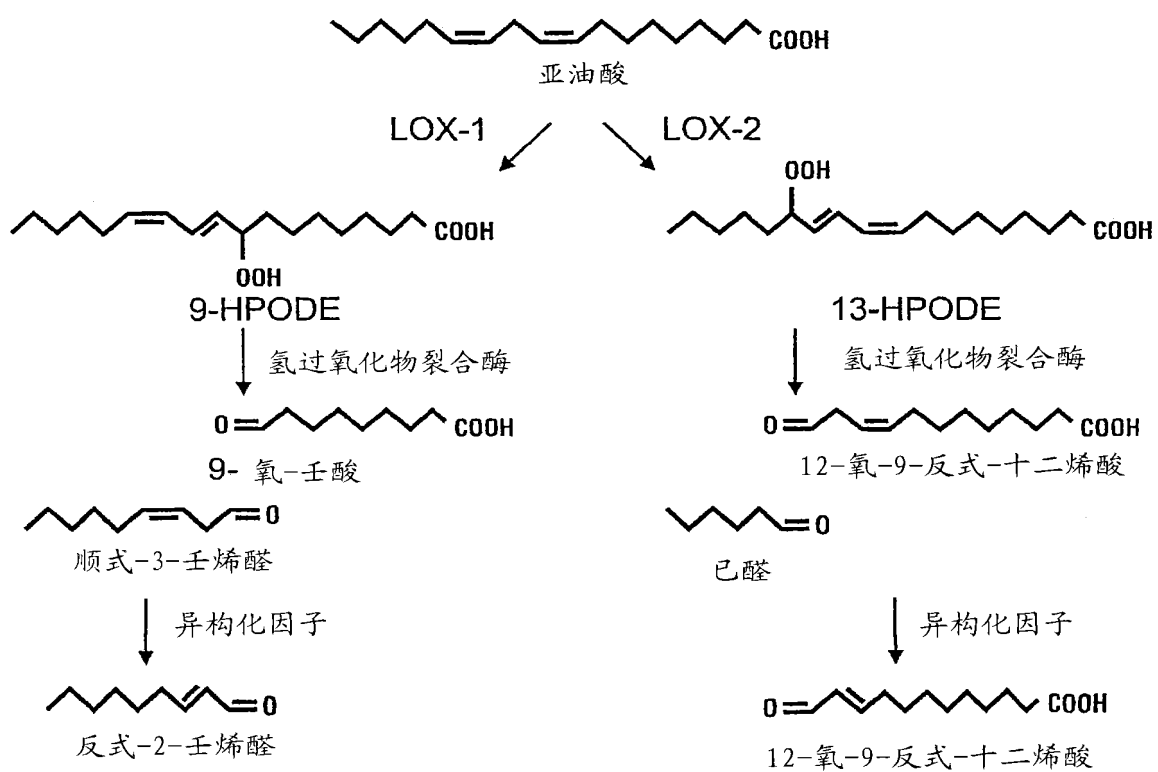


图 1B

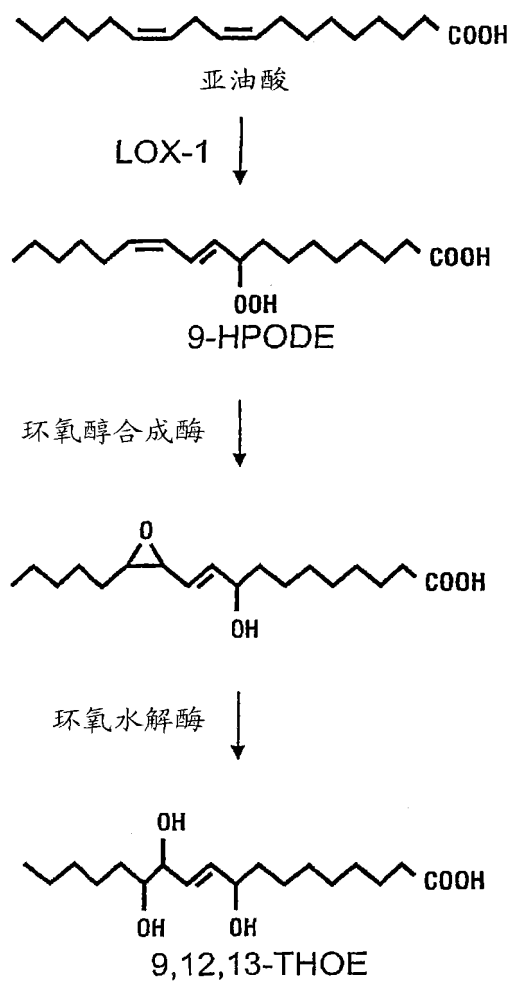


图 1C

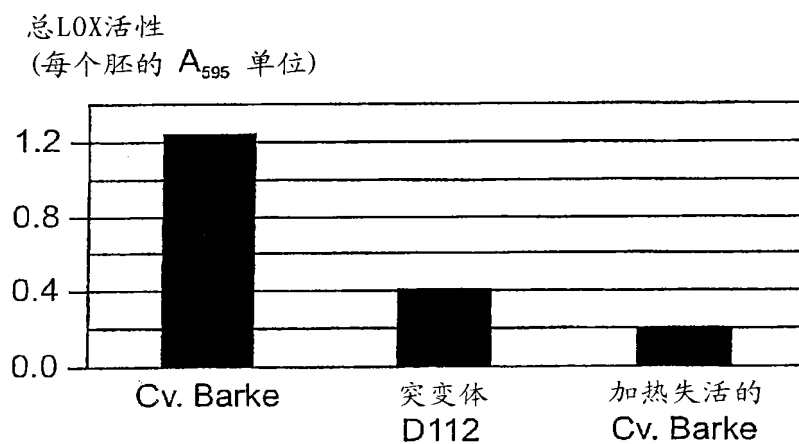


图 2

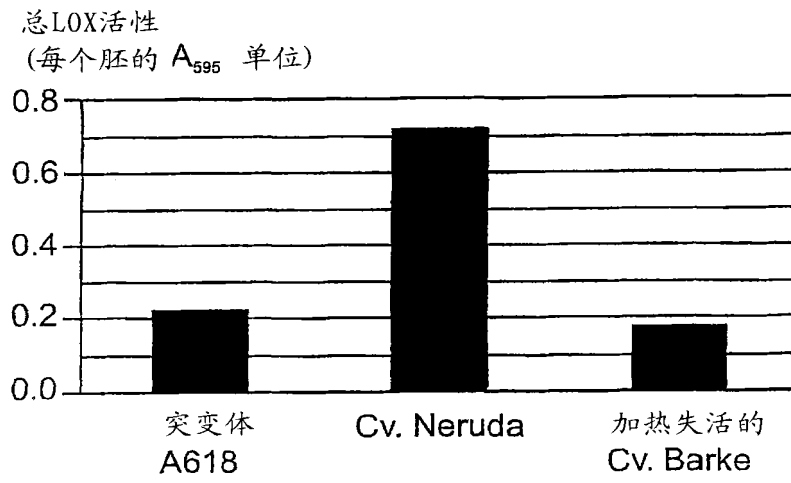


图 3

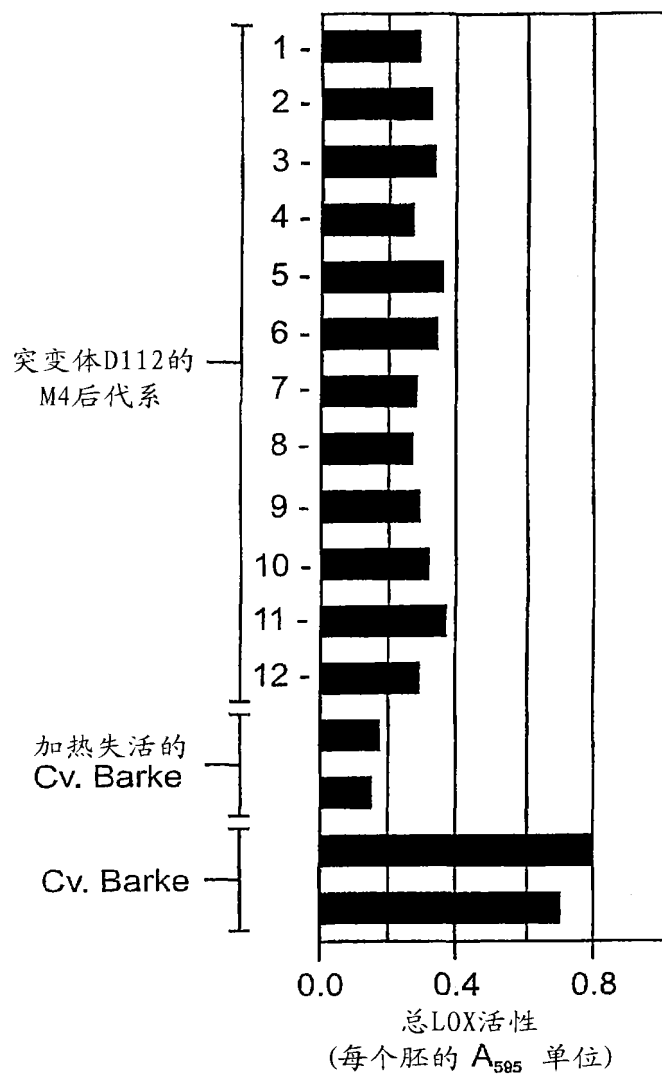


图 4

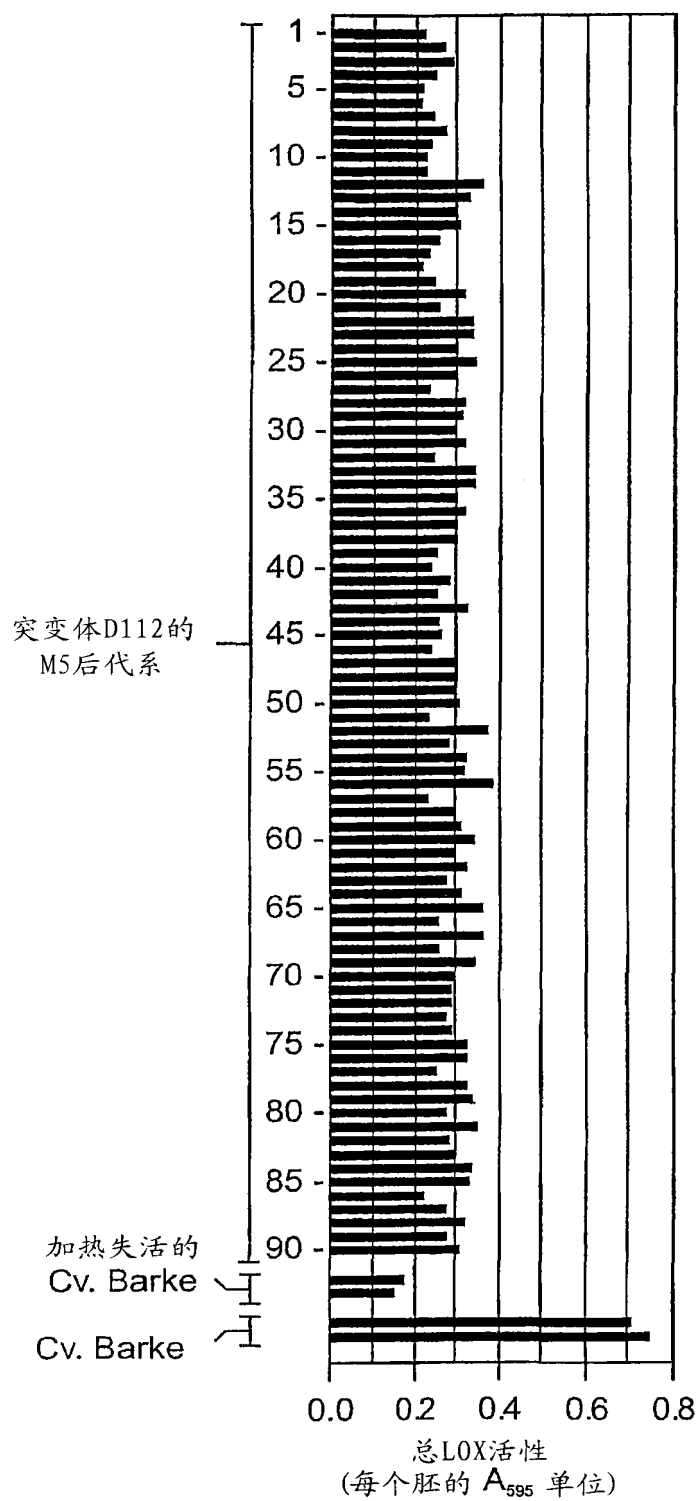


图 5

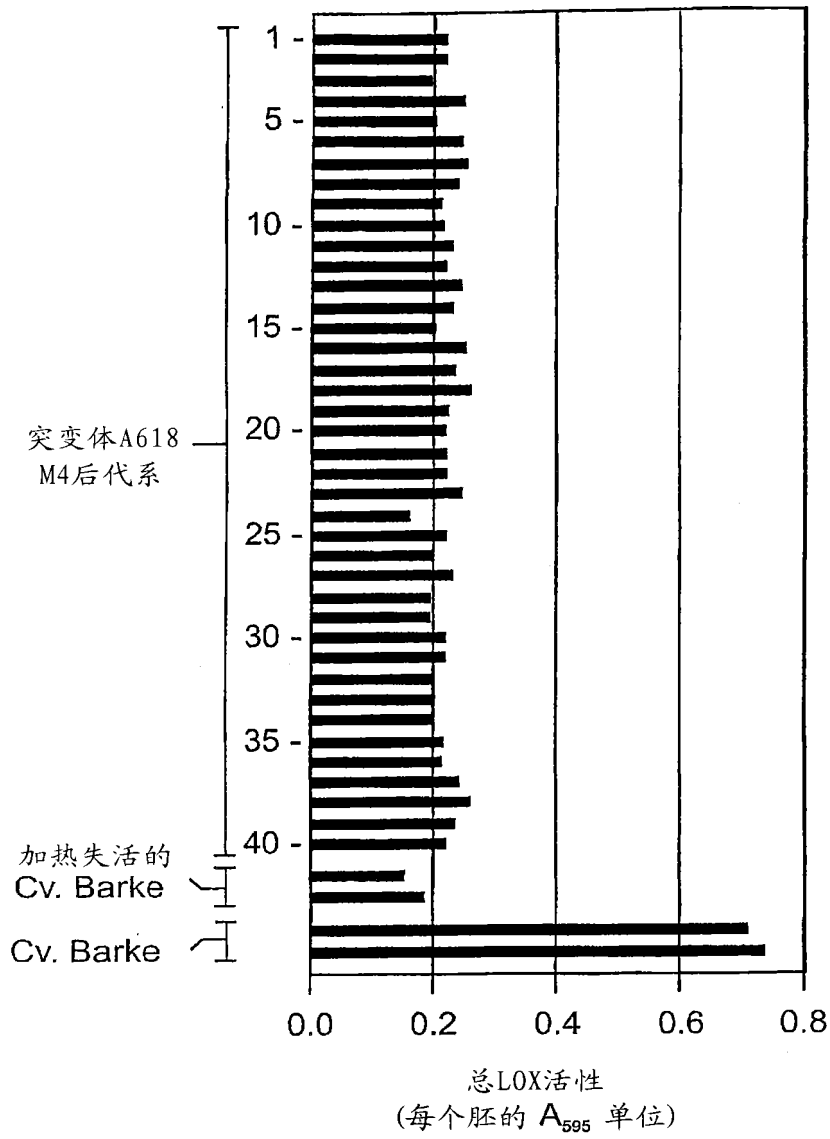


图 6

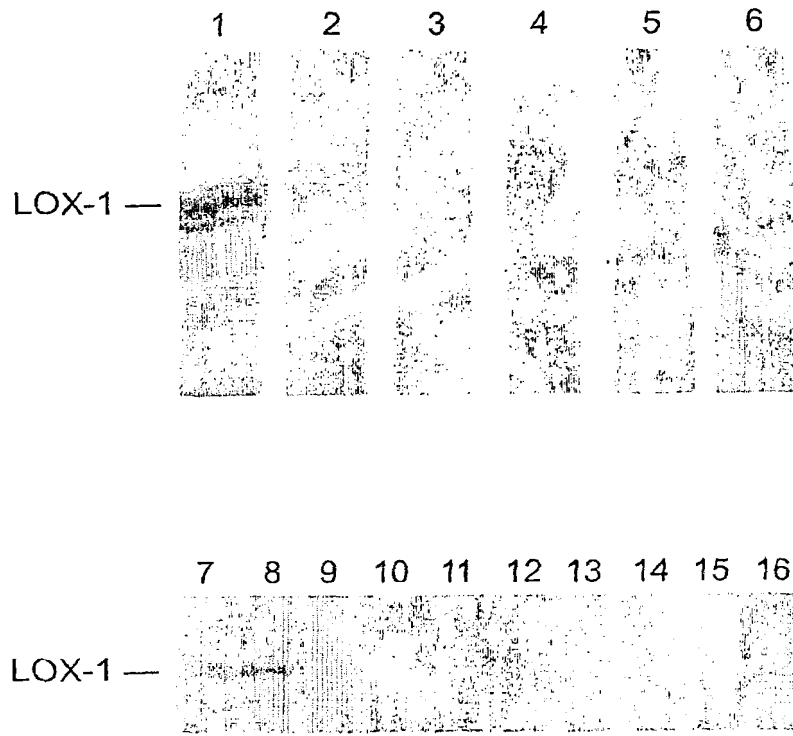


图 7

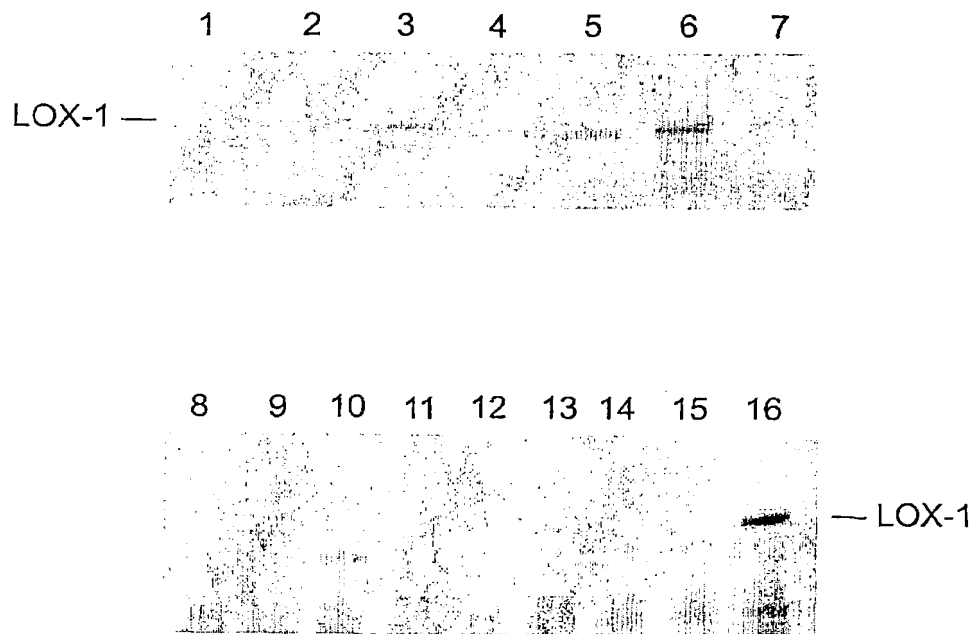


图 8



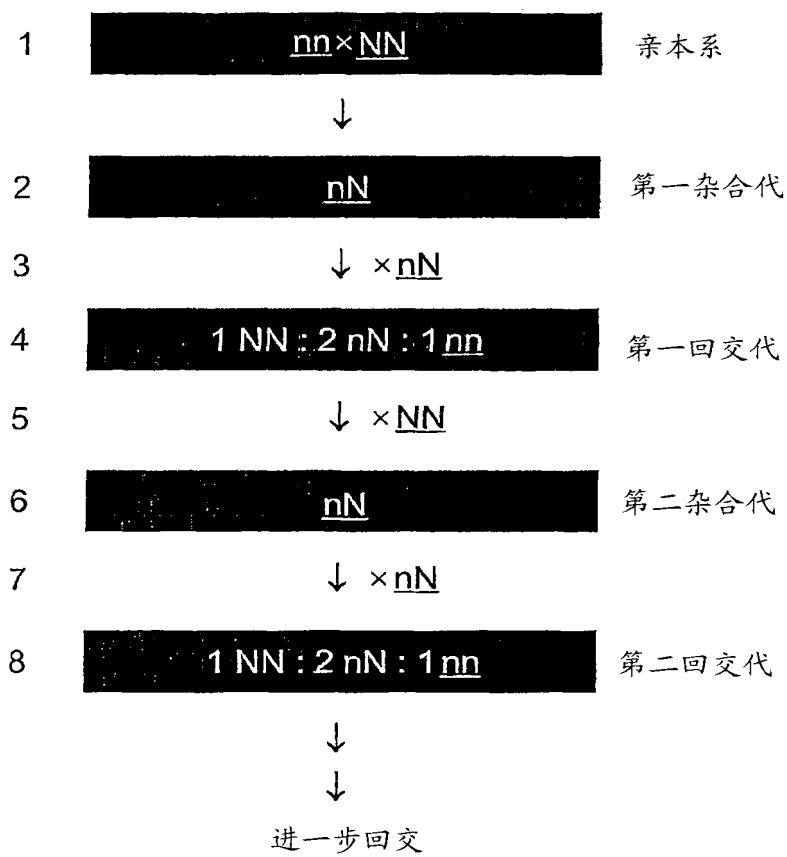


图 9

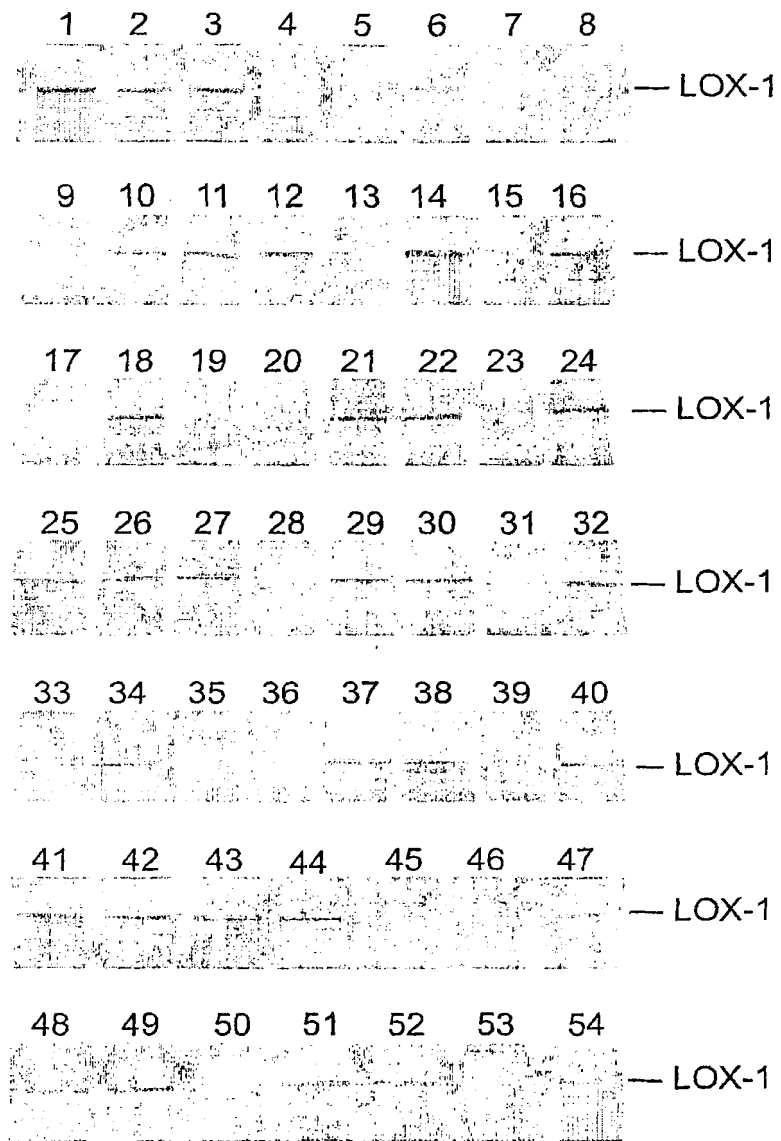


图 10

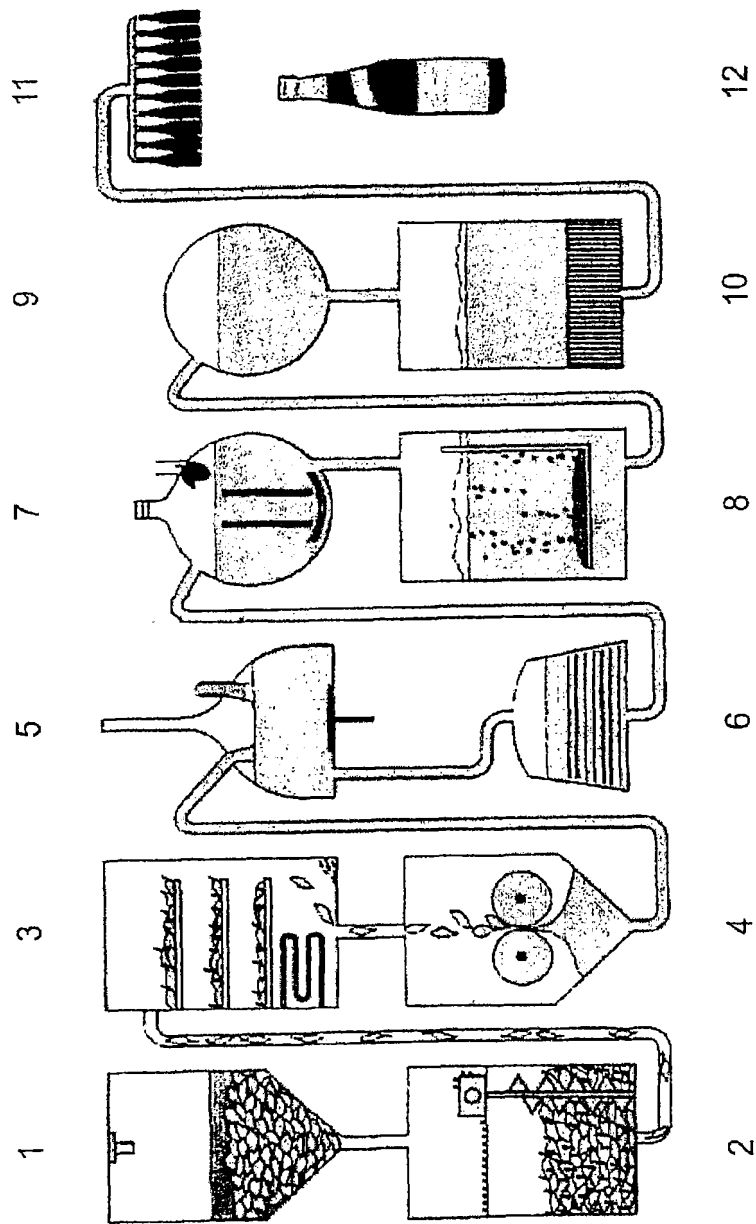


图 11

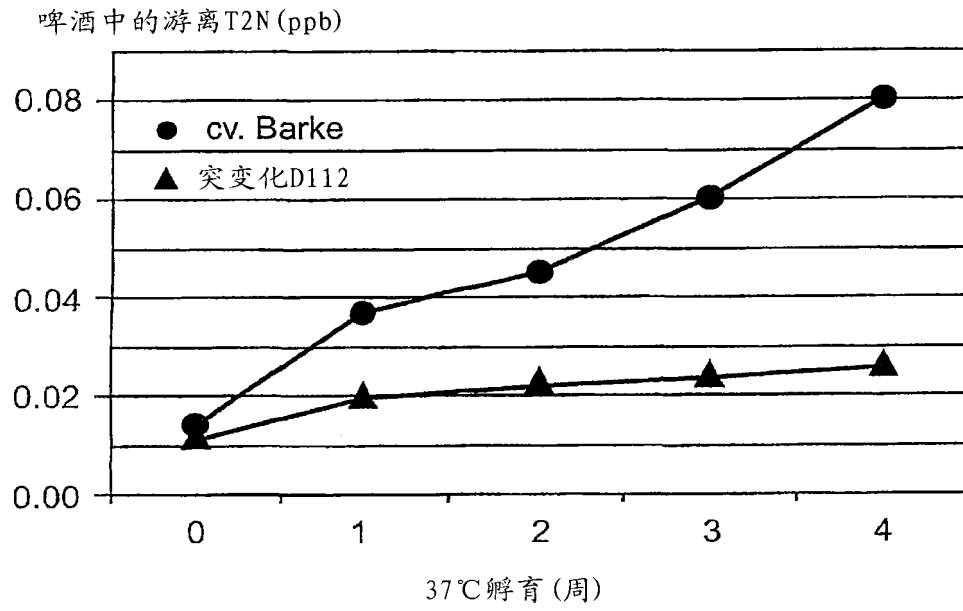


图 12A

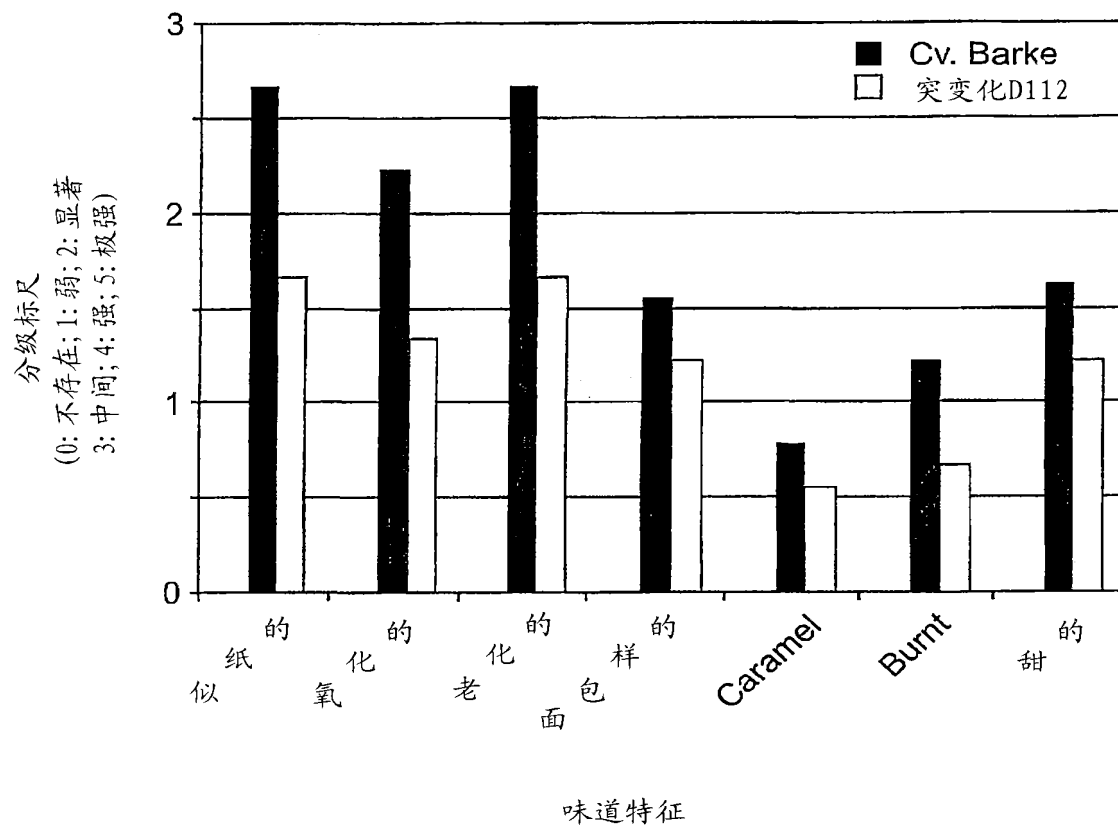


图 12B

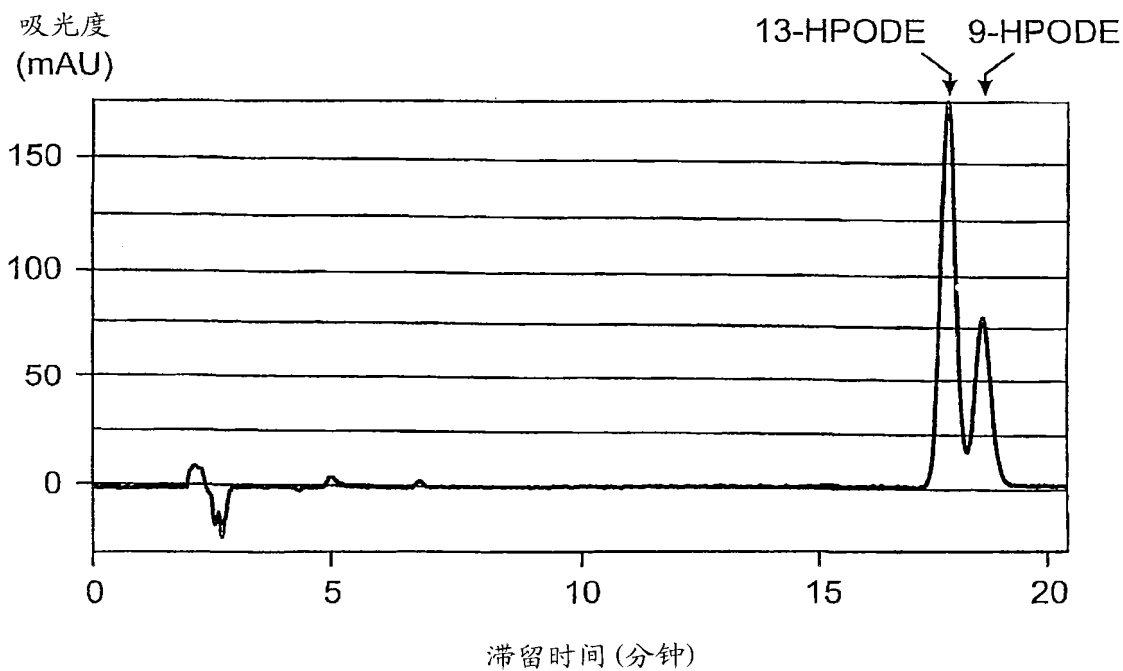


图 13A

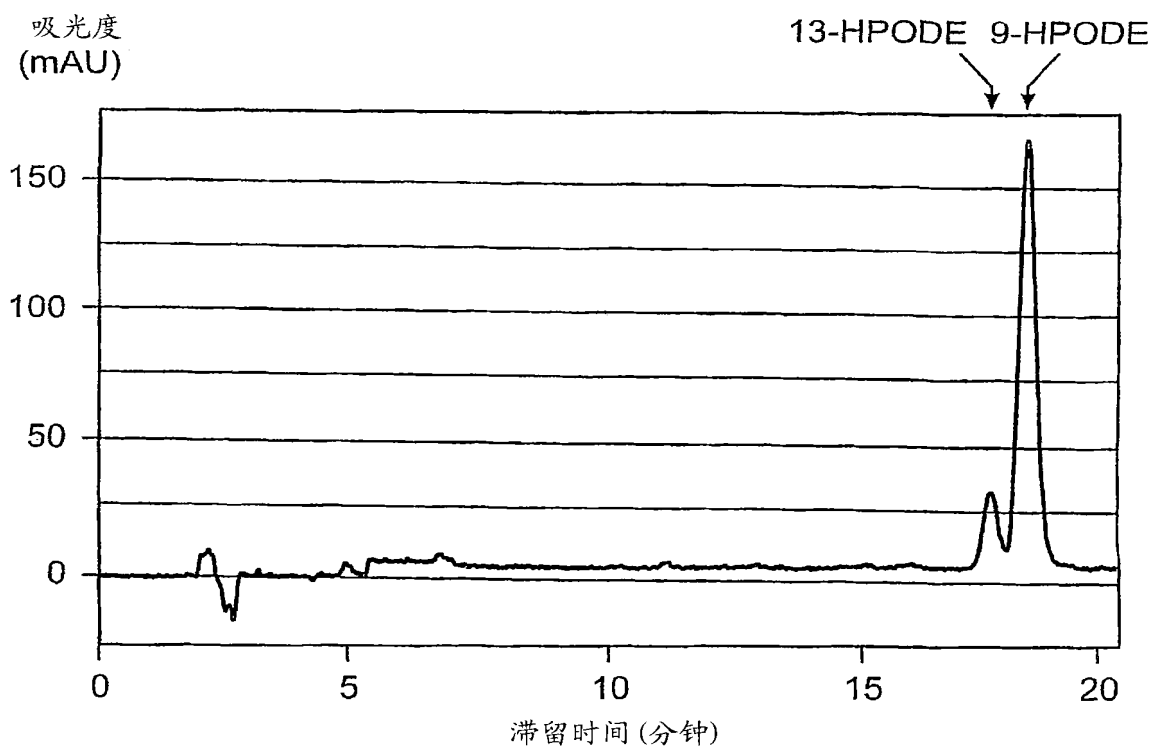


图 13B

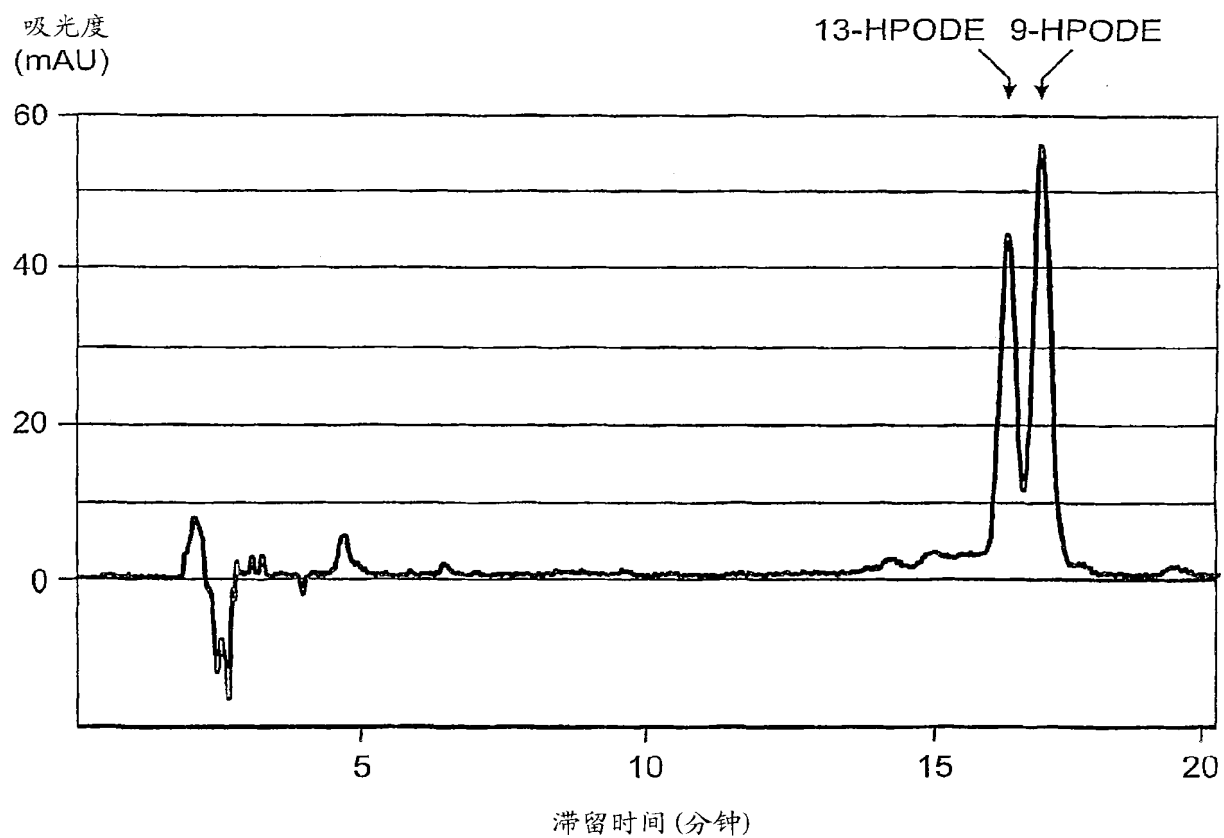


图 13C

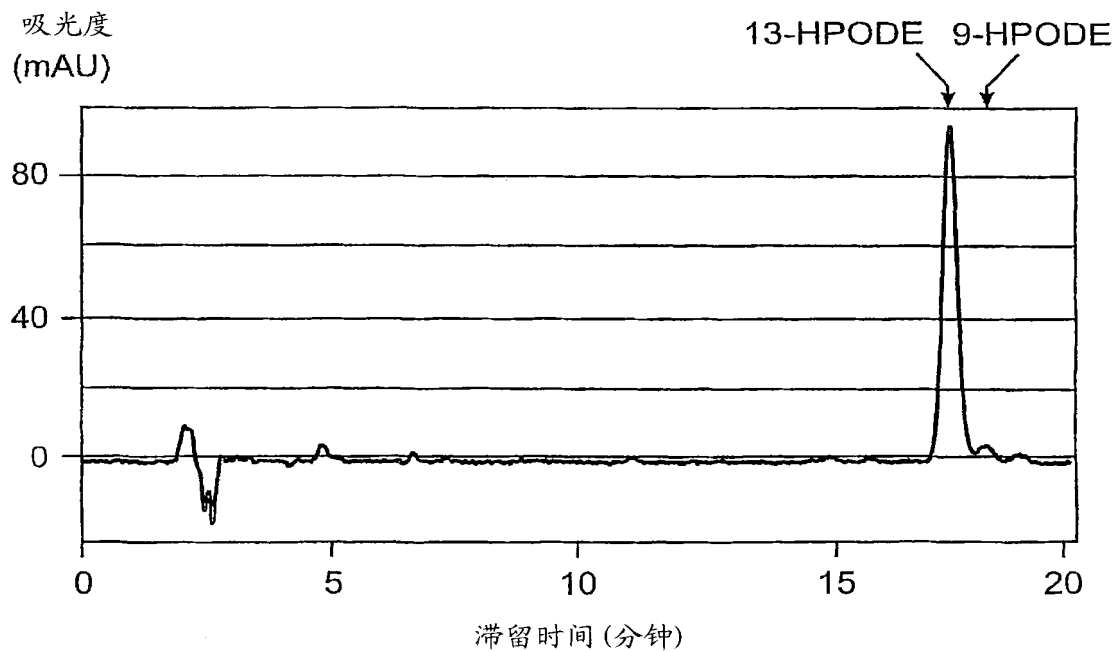


图 13D

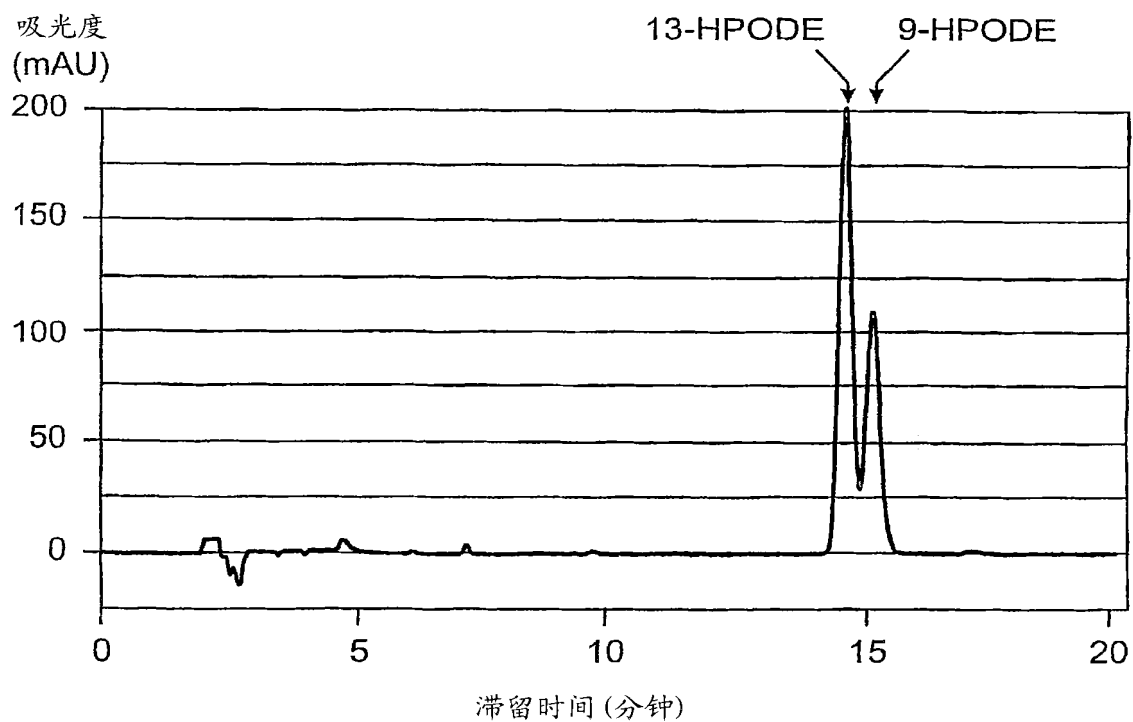


图 14A

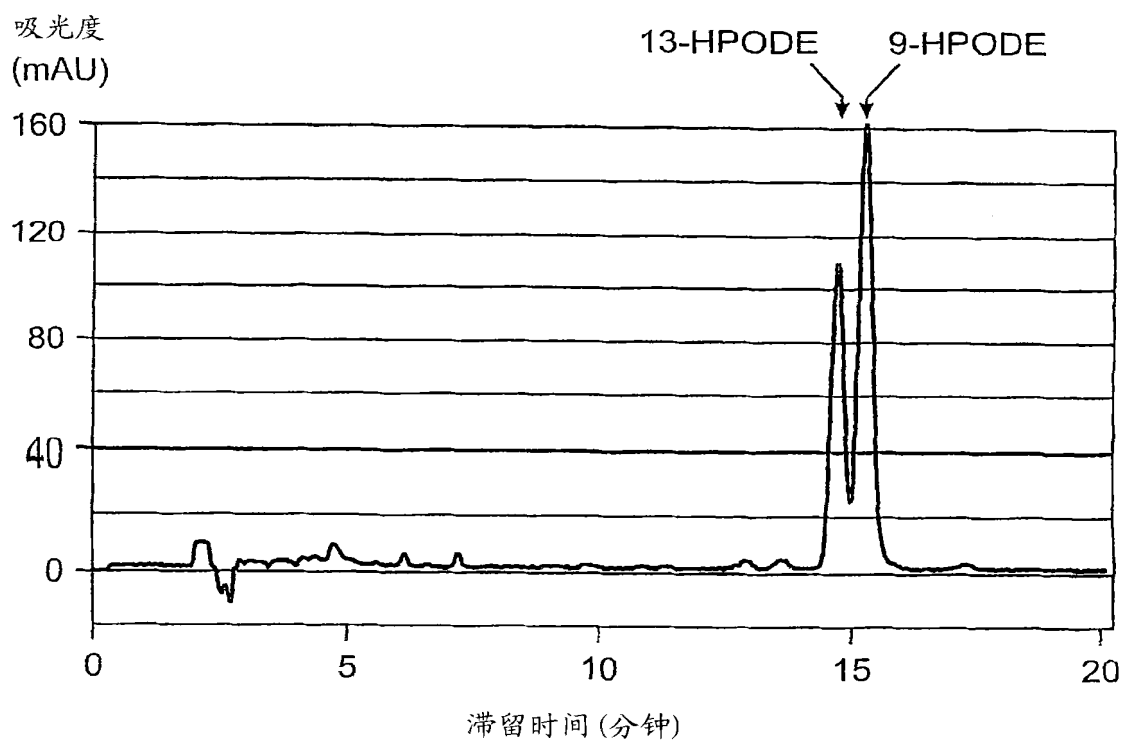


图 14B



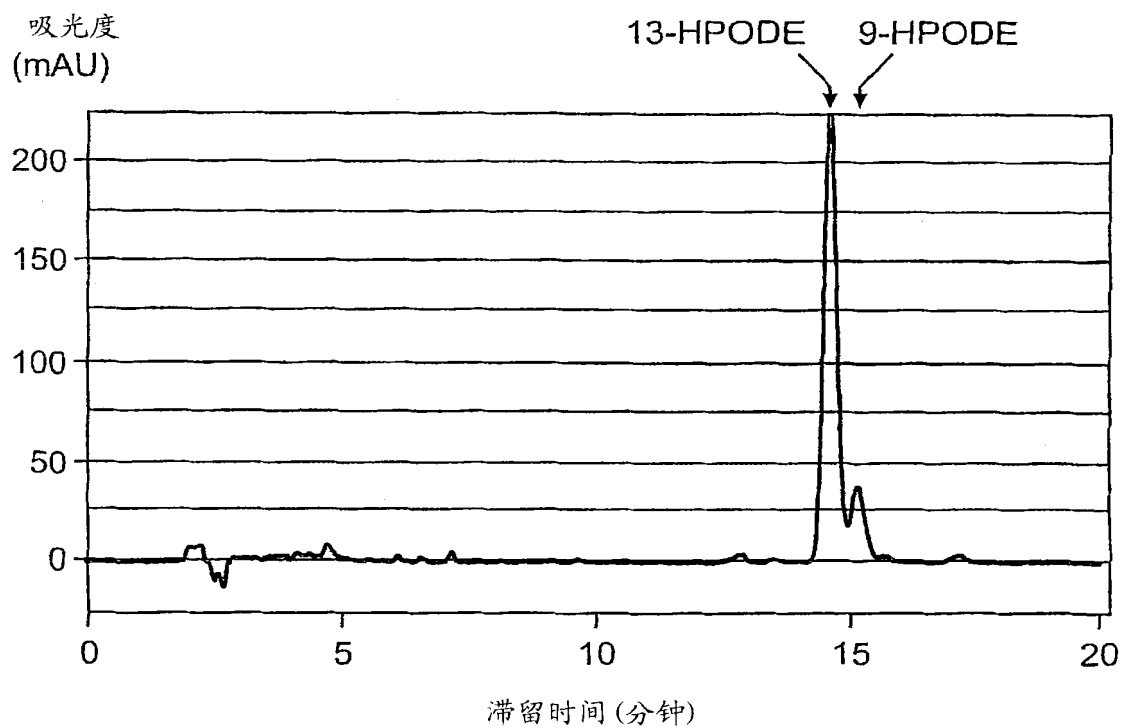


图 14C

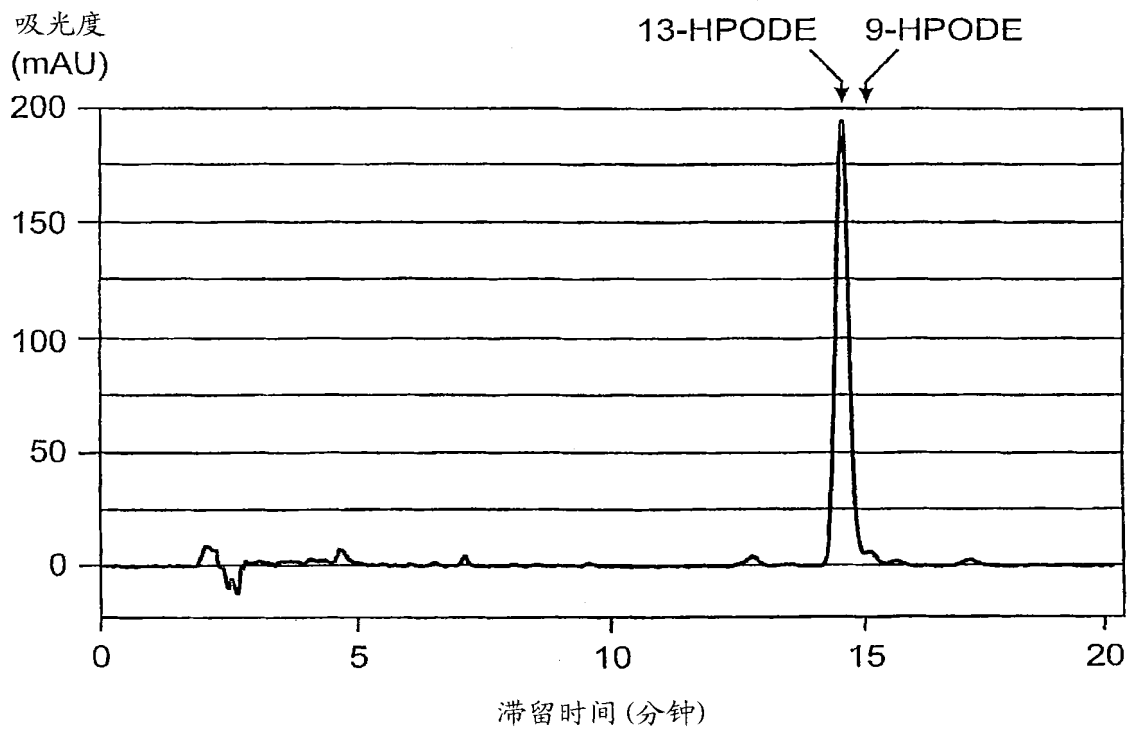


图 14D

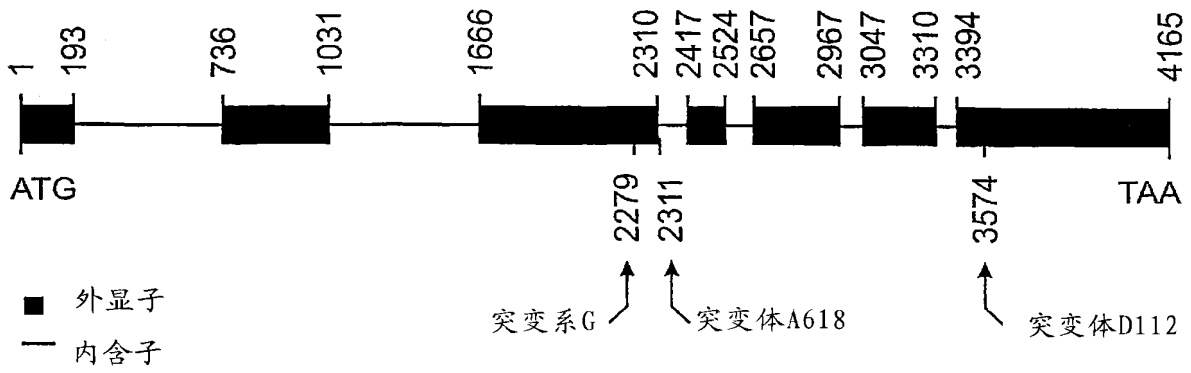


图 15

基因		蛋白质		
变化	在基因组DNA中的位置	结果	氨基酸长度	以kDa为单位的重量
野生型	—	—	862	96.4
突变体A618	G→A	2311 RNA拼接错误, 翻译停止	399	44.5
突变体D112	G→A	3574 翻译停止	665	74.2

图 16

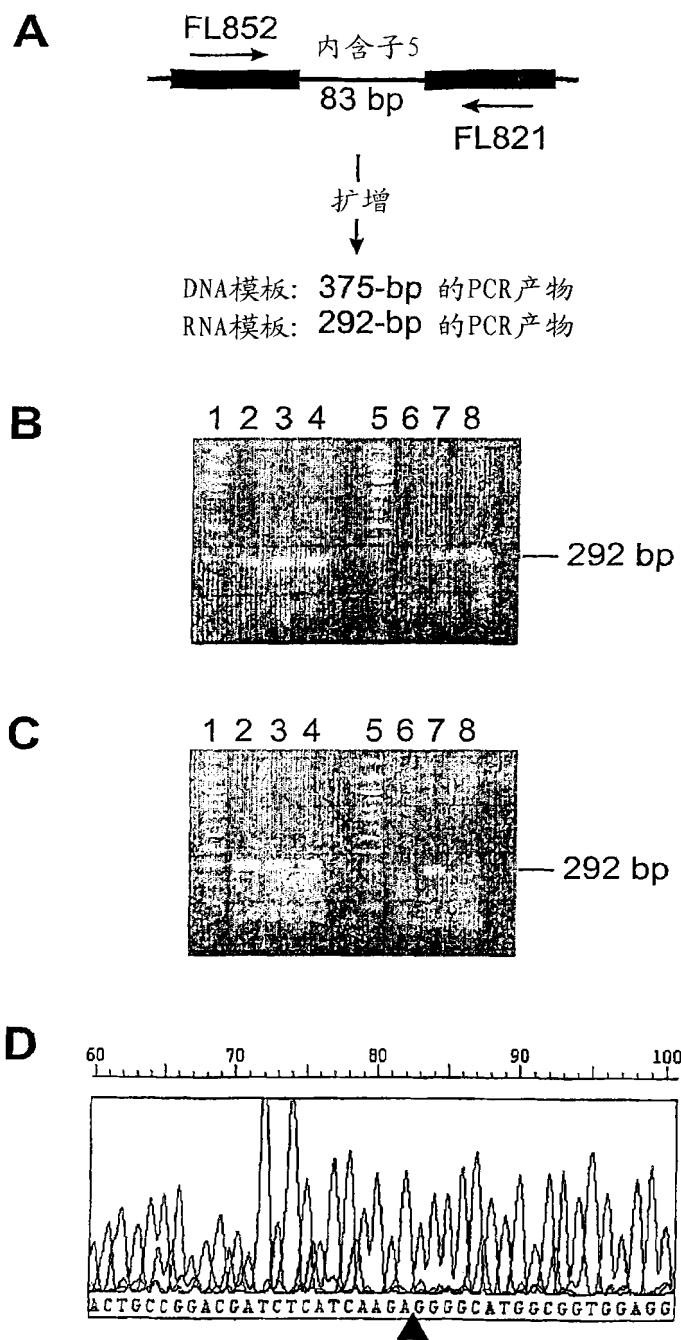


图 17

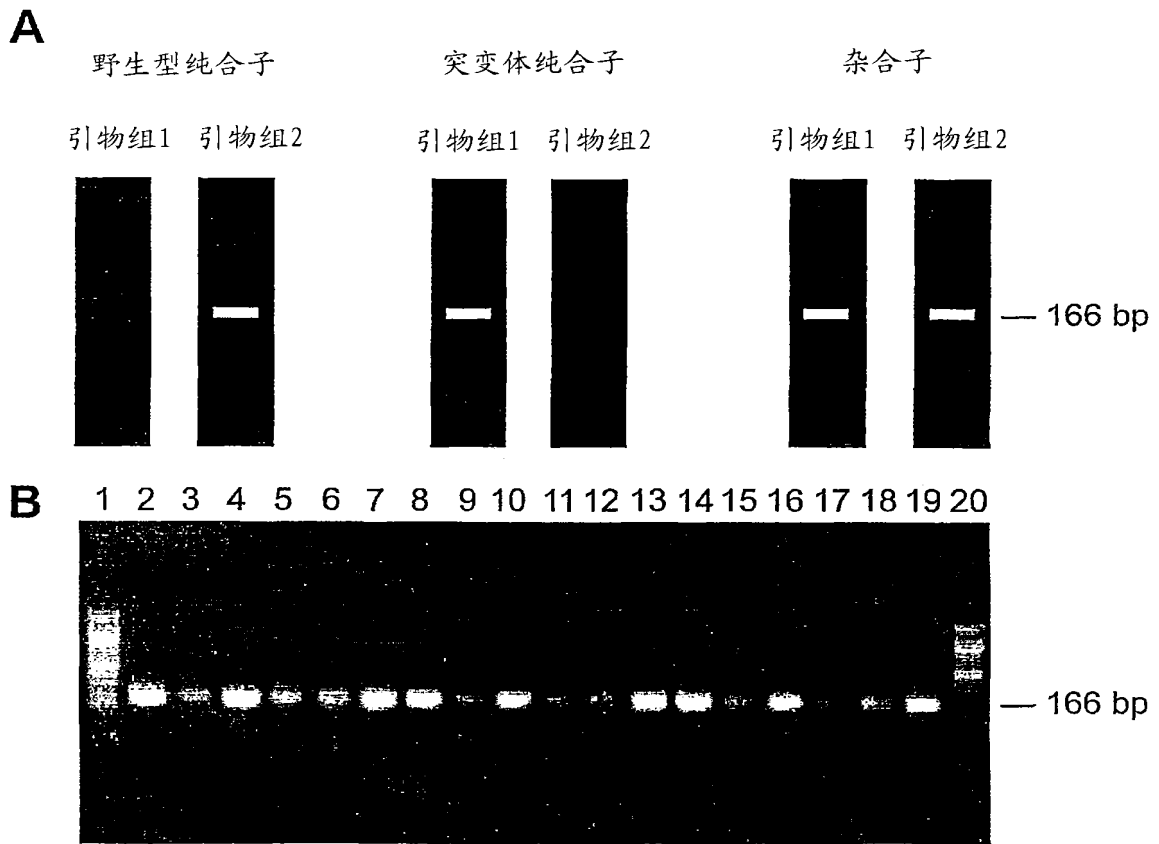


图 18

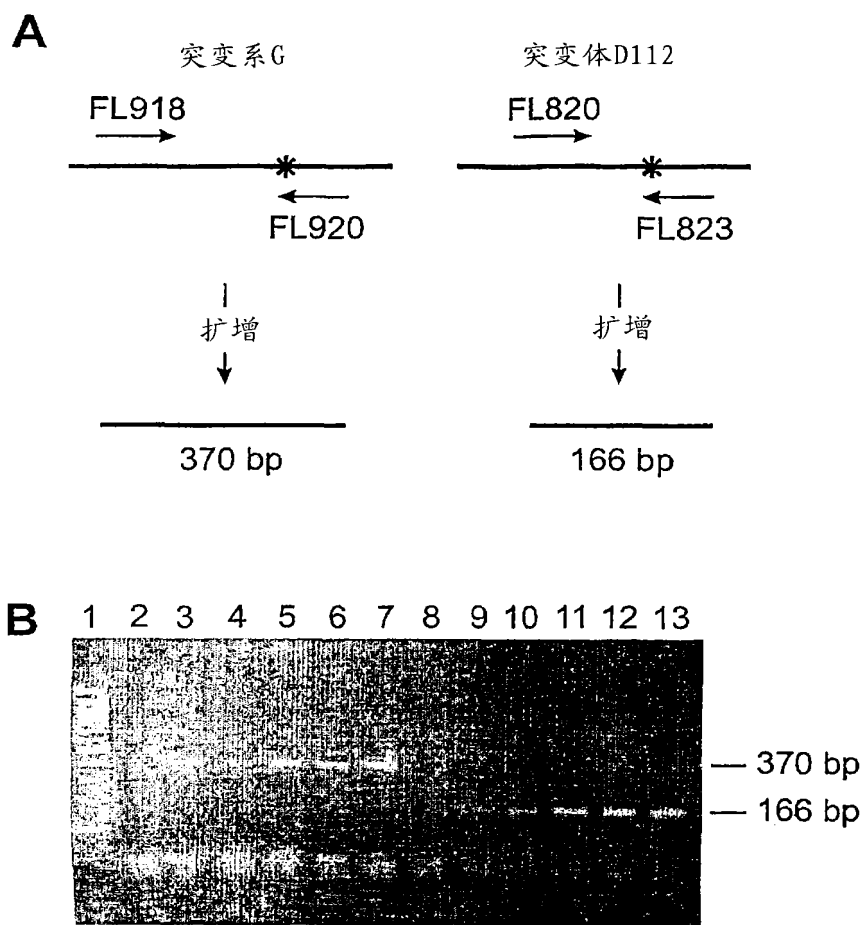


图 19

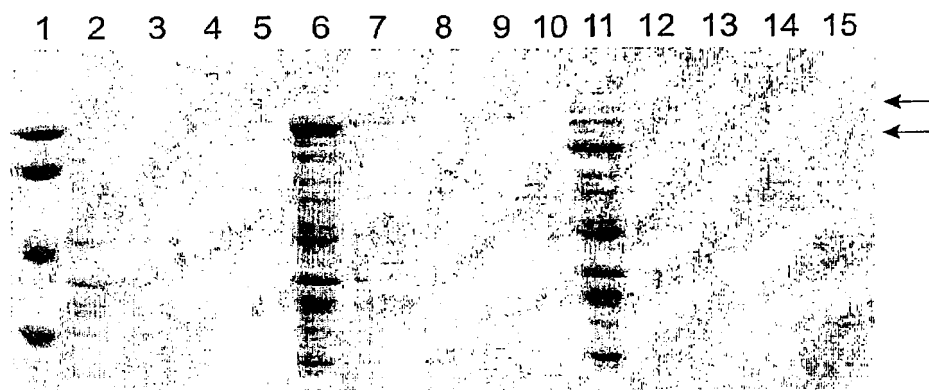


图 20

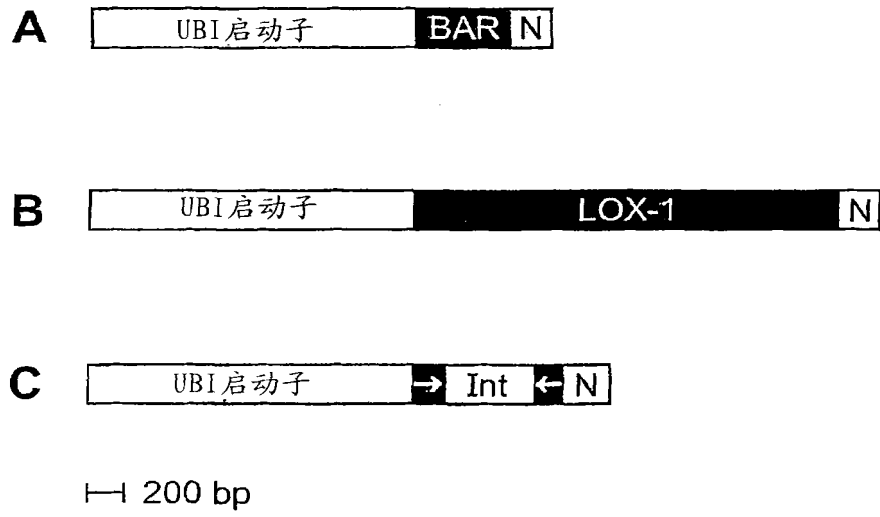
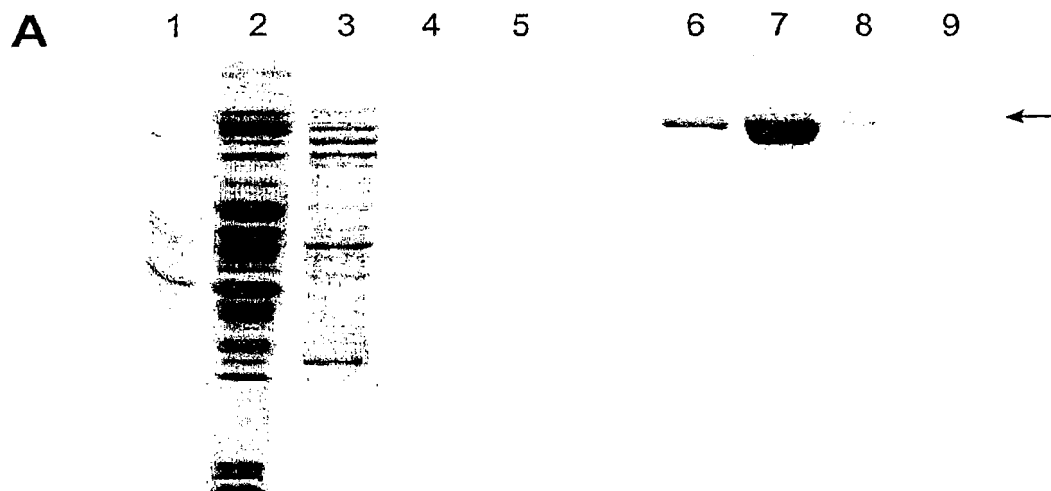


图 21



**B** 相对的LOX-1活性 (%)

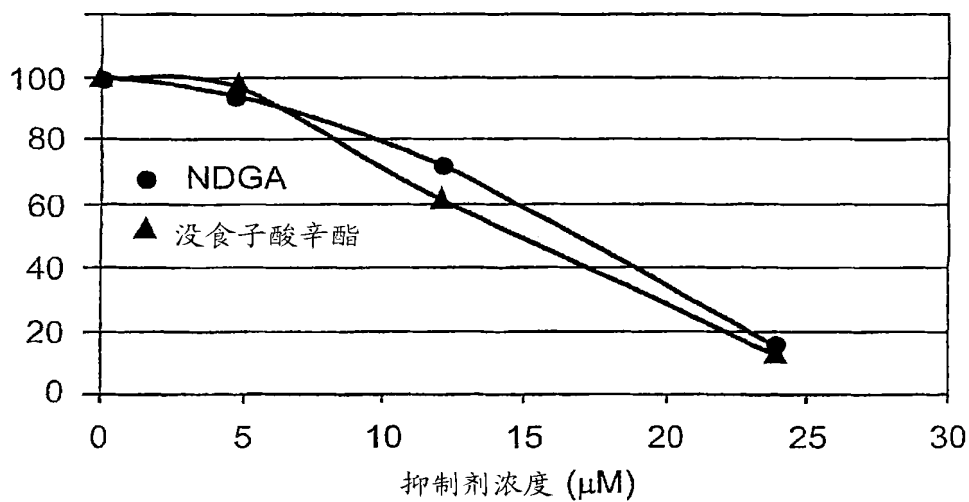


图 22



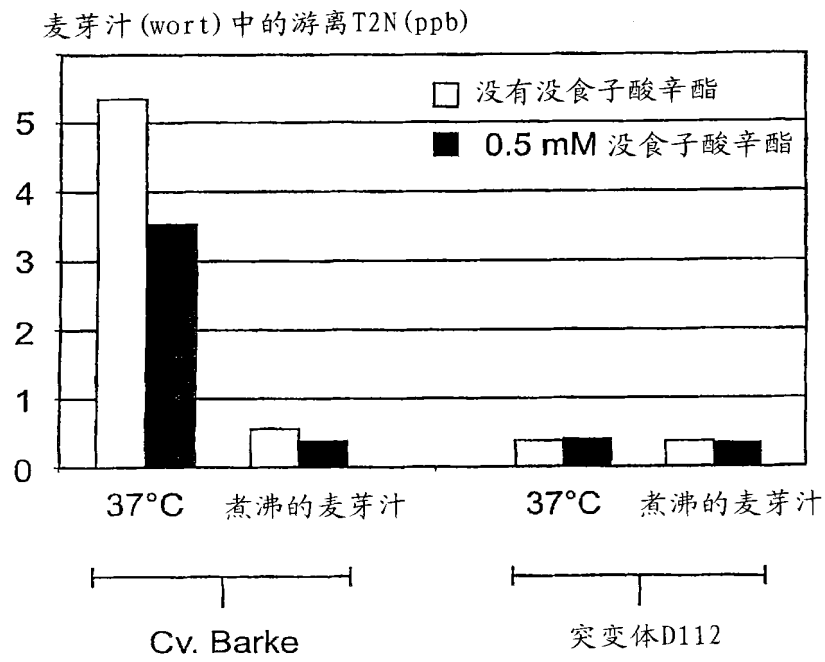


图 23