[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01817799.9

[51] Int. Cl.
C12N 15/82 (2006.01)
C08L 3/02 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)
C08B 30/00 (2006.01)
C12N 5/14 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 5 月 20 日

[11] 授权公告号 CN 100489106C

[22] 申请日 2001.10.22 [21] 申请号 01817799.9

[30] 优先权

[32] 2000.10.23 [33] DE [31] 10052492.3

[32] 2000.12.22 [33] DE [31] 10064805.3

[86] 国际申请 PCT/EP2001/012179 2001.10.22

[87] 国际公布 WO2002/034923 英 2002.5.2

[85] 进入国家阶段日期 2003.4.22

[73] 专利权人 拜尔作物科学股份公司

地址 德国法兰克福

[72] 发明人 G·舍韦 P·克尼斯
S·F·阿玛蒂 H·洛茨
D·贝克尔 V·兰德许茨
J·皮林

[56] 参考文献

WO9711188A1 1997.3.27

DE19653176A1 1998.6.25

审查员 吴汀晨

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所

代理人 程 泳

权利要求书 2 页 说明书 60 页 附图 6 页

[54] 发明名称

合成改性淀粉的单子叶植物细胞和植物

[57] 摘要

本发明涉及遗传修饰的单子叶植物细胞和植物，其中该遗传修饰包括导入编码具有 R1 蛋白生物活性的蛋白质的外源核酸分子。 本发明还涉及其生产手段和方法。 这类植物细胞和植物合成一种改性淀粉，其特征在于：与来自未遗传修饰的相应单子叶植物的淀粉相比，其磷酸含量升高，和/或磷酸化模式改变，和/或在 RVA 图中的终粘度提高，和/或在 DSC 分析中的峰值温度降低，和/或在结构分析中的凝胶强度提高。 因此，本发明也涉及由根据本发明的植物细胞和植物合成的淀粉，和生产这种淀粉的方法。 本发明还涉及含有这种改性淀粉的小麦粉，以及含有这种小麦粉和/或淀粉的食品和焙烤食品。

1. 一种小麦淀粉，其特征在于，在葡萄糖单体 C6 位其磷酸含量为至少 0.1nmol C6P mg^{-1} 淀粉，其中直链淀粉组分的 C6 位葡萄糖单体的 C6 磷酸含量与淀粉的 C6 位置的葡萄糖单体 C6 磷酸含量的比低于 0.75。

2. 权利要求 1 的小麦淀粉，其特征在于，在葡萄糖单体 C6 位的磷酸含量为至少 0.5 nmol C6P mg^{-1} 淀粉。

3. 权利要求 1 的小麦淀粉，其特征在于在葡萄糖单体 C6 位的磷酸含量至少为 1 nmol C6 P mg^{-1} 淀粉。

4. 权利要求 1 的小麦淀粉，其特征在于在葡萄糖单体 C6 位的磷酸含量至少为 2 nmol C6 P mg^{-1} 淀粉。

5. 一种玉米淀粉，其特征在于，在葡萄糖单体 C6 位其磷酸含量为至少 1.0nmol C6P mg^{-1} 淀粉，其中直链淀粉组分中 C6 位葡萄糖单体的 C6 磷酸含量与淀粉中 C6 位置的葡萄糖单体 C6 磷酸含量的比低于 0.75。

6. 权利要求 5 的玉米淀粉，其特征在于，在葡萄糖单体 C6 位的磷酸含量为至少 2.0 nmol C6P mg^{-1} 淀粉。

7. 权利要求 5 的玉米淀粉，其特征在于在葡萄糖单体 C6 位的磷酸含量至少为 5.0 nmol C6 P mg^{-1} 淀粉。

8. 一种水稻淀粉，其特征在于，在葡萄糖单体 C6 位其磷酸含量为至少 2.0nmol C6P mg^{-1} 淀粉，其中直链淀粉组分中 C6 位葡萄糖单体的 C6 磷酸含量与淀粉中 C6 位置的葡萄糖单体 C6 磷酸含量的比低于 0.75。

9. 小麦粉，其含有根据权利要求 1-4 中任一项的小麦淀粉。

10. 根据权利要求 9 的小麦粉或根据权利要求 1-4 中任一项的小麦淀粉在生产焙烤混合物和/或生产食品中的用途。

11. 一种焙烤混合物，其含有根据权利要求 9 的小麦粉或根据权利要求 1-4 中任一项的小麦淀粉。

12. 利用根据权利要求 9 的小麦粉，和/或利用根据权利要求 11 的焙烤混合物，和/或利用根据权利要求 1-4 中任一项的小麦淀粉生产的一种食品。

合成改性淀粉的单子叶植物细胞和植物

发明领域

本发明涉及遗传修饰的单子叶植物细胞和植物，其中该遗传修饰包括导入编码具有 R1 蛋白生物活性的蛋白质的外源核酸分子。本发明还涉及其生产手段和方法。这类植物细胞和植物合成一种改性淀粉，其特征在于：与来自未遗传修饰的相应单子叶植物的淀粉相比，其磷酸含量升高，和/或磷酸化模式改变，和/或在 RVA 图中的终粘度提高，和/或在 DSC 分析中的峰值温度降低，和/或在结构分析中的凝胶强度提高。因此，本发明也涉及由根据本发明的植物细胞和植物合成的淀粉，和生产这种淀粉的方法。本发明还涉及含有这种改性淀粉的小麦粉，以及含有这种小麦粉和/或淀粉的食品和焙烤食品。

发明背景

最近,随着作为原料可再生来源的植物内容物的重要性越来越高，生物技术研究的任务之一是努力使这些植物原料适应加工工业的需要。为了促进可再生原料在尽可能多的领域中应用，也必须提供相当多的物质。

除了油类、脂肪和蛋白质外，多糖也是来自植物的重要可再生原料。除纤维素之外，淀粉（高等植物中最重要的贮存物质之一）可能在多糖中占据中心地位。

多糖淀粉是化学均一的基本成分(即葡萄糖分子)的多聚体。然而，它是不同分子形式的极其复杂的混合物，在聚合程度和在葡萄糖链中出现分支区方面不同。因此淀粉不是一种均一的原料。两种化学上不同的淀粉成分——直链淀粉和支链淀粉之间存在差别。在用于生产淀粉的典型植物中，如玉米、小麦或马铃薯，合成的淀粉含有可达约 20%-30%的直链淀粉和可达约 70%-80%的支链淀粉。

有很长一段时间认为直链淀粉是由α-1,4-糖苷键合的α-D-葡萄糖单体组成的线性多聚体。然而，在最近的研究中，检测到存在大约0.1%的α-1,6 糖苷分支位点(Hizukuri 和 Takagi, Carbohydr. Res. 134，(1984)，1-10；Takeda 等人，Carbohydr Res. 132,(1984),83-92)。然而，完全分离直链淀粉与支链淀粉实际上非常困难，因此，直链淀粉的质量强烈依赖于所选择的分离方法的类型。与直链淀粉不同，支链淀粉分支更多，大约含有 4%的分支位点，它们是由于存在其它α-1,6 糖苷键而形成的。支链淀粉是不同分支的葡萄糖链的复合混合物。

这两种分子的另一个显著差异是它们的分子量。根据淀粉来源，直链淀粉的分子量为 5×10^5-10^6 Da，而支链淀粉为 10^7-10^8 Da。这两种大分子能根据其分子量和不同的物理化学性质区分，最易表现在不同的碘键合性质。

直链淀粉与支链淀粉的另一个显著差异在于可与这些大分子结合存在的痕量物质的相对含量。直链淀粉对疏水性分子有高亲和力。尤其在谷类中，直链淀粉能与含量相对较高的脂类复合(Morrison, Cereal Foods World 40, (1995), 437-446)。另一方面，支链淀粉能以淀粉磷酸单酯的形式含有共价键合的无机磷酸，这对于直链淀粉迄今尚未有描述。特别是在由块茎获得的淀粉中发现有高含量的磷酸单酯。在市售淀粉中，马铃薯淀粉磷酸含量最高，为 10-30 nmol mg^{-1} 淀粉。在姜黄属（Curcuma）的某些种类中，磷酸含量甚至高 2-4 倍(Bay-Smidt 等人，第 5 届 ISPMP 会议论文集, (1997), 741)，而在谷类中大约低 100 倍(Kasemsuwan 和 Jane, Cereal Chem. 73, (1996), 702-707)。与来自块茎、根和茎的淀粉不同，谷类淀粉(单子叶植物)中可检测到的磷酸很少是淀粉单酯衍生物的形式，而主要是磷脂的形式(Jane 等人, Cereal Foods World 41, (1996), 827-832)。

除了直链淀粉/支链淀粉比和磷酸含量之外，淀粉的功能性质也受其分子量、侧链分布模式、离子含量、脂类和蛋白质含量等的影响。在此应当提到的重要功能性质有溶解度、退化行为、吸水性、薄

膜形成特性、粘度、胶固特性、冻融稳定性、酸稳定性、凝胶强度等。淀粉颗粒大小对于不同的用途也可能是重要的。

原则上能通过遗传工程方法或通过天然淀粉随后的化学磷酸化改变磷酸含量(参见，例如:《淀粉化学和技术》，R. L. Whistler, J. N. BeMiller 和 E. F. Paschall 编著，Academic Press, New York, 1988, 349-364)。然而，化学修饰通常昂贵且耗时，而且产生的淀粉的理化性质可能与体内修饰的淀粉不同。

由于来源于单子叶野生型植物，特别是来源于谷类植物(小麦、水稻、玉米、燕麦、粟、黑麦)的淀粉，只含有极少量的淀粉磷酸单酯形式的磷酸(Lim 等人，Cereal Chem. 71, (1994), 488)，因此，本发明的一个目的在于提供单子叶植物，它们与相应的野生型植物细胞和植物相比，能合成磷酸含量 (淀粉磷酸单酯含量)提高且理化性质改变的淀粉。

发明内容

因此本发明的主要目的在于提供遗传修饰的单子叶植物细胞和植物，与未遗传修饰的相应野生型植物细胞和植物相比，它们能合成结构和/或功能性质发生改变的淀粉，本发明目的还在于提供淀粉，其结构和功能性质不同于来自未遗传修饰的相应野生型植物细胞和植物的淀粉和化学修饰的淀粉，因而更适于普通和/或特殊的工业用途。

此目的通过权利要求书所述的实施方案实现，因为已经惊讶地发现，向单子叶植物细胞和植物的基因组中导入外源核酸分子使得该单子叶植物细胞和植物中合成的淀粉的结构和/或功能性质改变。

外源核酸分子的表达主要在单子叶植物（特别是小麦植物）的淀粉贮藏器官中有利，而且使得自淀粉贮藏器官分离的淀粉与自未遗传修饰的相应野生型植物（特别是小麦植物）的淀粉贮藏器官分离的淀粉相比，磷酸含量提高，粘性改变。而且，根据本发明的淀粉与化学磷酸化的淀粉的区别在于改变的磷酸化模式和改变的粘性，在淀粉胶固和凝胶形成之后，区别还在于改变的凝胶强度。

因此，本发明涉及遗传修饰的单子叶植物细胞，其中该遗传修饰包括至少一种外源核酸分子的导入，该外源核酸分子选自：

a) 含有 Seq ID No.1 所示核苷酸序列的编码区的核酸分子；

b) 编码具有 Seq ID No.2 所示氨基酸序列的马铃薯(Solanum tuberosum) R1 蛋白的核酸分子；

c) 是 Seq ID No.1 所示核苷酸序列的衍生物的核酸分子；和

d) 是(a)、(b)或(c)所述核酸分子的片段的核酸分子。

在本发明中，术语“遗传修饰的”是指由于导入外源核酸分子，植物细胞的遗传信息改变，以及外源核酸分子的存在或表达导致表型改变。术语“表型改变”优选地是指细胞一种或多种功能的可测量的改变。例如，根据本发明的遗传修饰的植物细胞显示改变的表达模式。在本发明中，术语“遗传修饰”是指根据本发明的单子叶植物细胞至少含有一种以适当方式整合于基因组中的外源核酸分子。

在本发明中，可以认为术语“外源核酸分子”是指这样一种核酸分子，其编码一种具有 R1 蛋白生物活性的蛋白质，优选地来自马铃薯的 R1 蛋白，并且不在未遗传修饰的相应野生型植物细胞中天然存在。外源核酸分子优选地是由不同成分组成的重组分子，其组合或特异性空间排列不在植物细胞中天然存在。根据本发明的单子叶植物细胞至少含有一种外源核酸分子，其中后者优选地与确保在植物细胞中转录的调节 DNA 元件（特别是启动子）连接。

编码马铃薯 R1 蛋白的外源核酸分子的一个例子如 SEQ ID No.1 所示。WO 97/11188 A1 和 Lorberth 等人(Nature Biotech. 16, (1998), 473-477)也描述了编码马铃薯 R1 蛋白的核苷酸序列。

马铃薯 R1 蛋白的重要特征包括：i)其氨基酸序列(例如，见 SEQ ID No.2)；ii)它们在植物细胞质体基质中的位置，它们能以与淀粉粒结合的形式和可溶形式存在；和 iii)它们影响植物中淀粉磷酸化程度的能力。例如，在转基因马铃薯植物中编码马铃薯 R1 蛋白的 R1 基因的抑制导致可从马铃薯块茎中分离的淀粉磷酸含量减少。此外，Lorberth 等人表示，如果在大肠杆菌中表达相应的 R1 cDNA，马铃

薯 R1 蛋白能磷酸化细菌糖原(Lorberth 等人，Nature Biotech. 16, (1998), 473-477)。

Ritte 等人(Plant J. 21, (2000), 387-391)表示，马铃薯 R1 蛋白与马铃薯植物中的淀粉粒可逆结合，其中与淀粉粒的结合强度取决于植物的代谢状态。对于淀粉粒结合形式，马铃薯植物中的蛋白质主要存在于置于暗处的叶子中。然而，对叶子进行光照后，该蛋白质主要以不与淀粉粒结合的可溶形式存在。

而且，抑制马铃薯 R1 基因在转基因马铃薯植物中表达产生“淀粉过量”表型，即相应植物的叶子淀粉含量升高(Lorberth 等人，Nature Biotech. 16, (1998), 473-477)。除此之外，这类马铃薯植物的块茎的区别还在于，它们在冷藏后显示“冷诱导的甜化”降低(Lorberth 等人，Nature Biotech. 16, (1998), 473-477)。

原则上，编码 R1 蛋白的外源核酸分子能来源于任何种类的马铃薯或马铃薯植物，优选地来源于 Tomensa、Desiree、Tempora 和 Thomana 品种的马铃薯。

在一个优选实施方案中，外源核酸分子含有 SEQ ID No.1 所示的核苷酸序列。

在另一个优选实施方案中，本发明包括 SEQ ID No.1 所示核苷酸序列的编码区的外源核酸分子。

在本发明的另一个优选实施方案中，外源核酸分子编码一种来自马铃薯的 R1 蛋白，该蛋白具有 SEQ ID No.2 所示的氨基酸序列。

在本发明的另一个实施方案中，外源核酸分子包含成熟(不含质体信号肽)蛋白质的编码区(SEQ ID No.1 所示核苷酸序列的 bp 447-bp 4607)。在本发明该实施方案中，外源核酸分子包含一种异源质体信号序列，即不天然存在与成熟 R1 蛋白结合的信号序列，代替马铃薯 R1 蛋白的质体 N-端信号肽(由 SEQ ID No.1 所示核苷酸序列的核苷酸 216-446 编码的氨基酸 1-77)。质体信号序列本领域技术人员周知。

例如，来自 spinate 的铁氧还蛋白:$NADP^+$氧化还原酶(FNR)的信

号序列能用作质体信号序列。该序列包含 spinate 质体蛋白铁氧还蛋白:$NADP^+$氧化还原酶的 cDNA 的 5'-非翻译区及侧翼转运肽序列(核苷酸-171 到+165; Jansen 等人, Current Genetics 13, (1988), 517-522)。

另外, 例如, 玉米蜡样蛋白的转运肽加成熟蜡样蛋白的前 34 个氨基酸能用作信号序列(Klösgen 等人, Mol. Gen. Genet. 217, (1989), 155-161)。此外, 也能应用不含成熟蜡样蛋白前 34 个氨基酸的玉米蜡样蛋白的转运肽。

在本发明的另一个优选实施方案中, 外源核酸分子是 SEQ ID No.1 所示核苷酸序列的一种衍生物。

在本发明中, 表述 "衍生物" 是指这些分子的序列与 SEQ ID No.1 所示的核苷酸序列在一个或多个位点上不同, 并且显示与 SEQ ID No.1 所示核苷酸序列的编码区有高度同源性。另外, 衍生物的区别还在于它们编码一种具有 R1 蛋白生物活性的蛋白质, 优选地来自马铃薯的 R1 蛋白。

在本发明中, "同源性" 是指至少 65%, 特别是至少 85%, 更特别地至少 90%, 优选地高于 95%, 最优选地高于 98%的核苷酸序列的序列同一性。与上述核酸分子的不同可能是由于缺失、添加、置换、插入或重组。

同源性程度优选地如下确定: 将各自的核苷酸序列与 SEQ ID No.1 的编码区相比较, 特别是与编码 SEQ ID No.1 所示核苷酸序列的成熟蛋白质的 SEQ ID No. 1 区(bp447-bp4607)相比较。如果将要比较的序列长度不同, 同源性程度优选地是指较短核苷酸序列中与较长序列的核苷酸相同的核苷酸的百分数, 也就是说, 对各自的核苷酸序列重叠的区域测定序列同一性。序列比较能用周知的计算机程序进行, 如 ClustalW 程序(Thompson 等人, Nucleic Acids Research 22, (1994), 4673-4680), 该程序由 Julie Thompson (Thompson@EMBL-Heidelberg.DE)和 Toby Gibson (Gibson@EMBL-Heidelberg.DE; 欧洲分子生物学实验室, Meyerhofstrasse 1, D 69117 Heidelberg, 德国)

开发。Clustal W 也能从不同的因特网站点下载，例如：IGBMC (Institut de G én étique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, B.P.163 , 67404 Illkirch Cedex , 法国； ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/) 和 EBI (欧洲生物信息学研究所)(ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/)，以及与 EBI 链接的因特网站点(欧洲生物信息学研究所，Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SD, UK)。

当采用 ClustalW 程序(1.8 版)时，各种参数使用缺省值。对于 DNA 序列比较，这些参数的值如下：KTUPLE=2，TOPDIAGS=4，PAIRGAP=5，DNAMATRIX:IUB，GAPOPEN=10，GAPEXT=5，MAXDIV=40，转换：未加权。

对于蛋白质序列的比较，ClustalW 程序的参数同样使用缺省值。这些参数的值如下：KTUPLE=1，TOPDIAG=5，WINDOW=5，PAIRGAP=3，GAPOPEN=10，GAPEXTEND=0.05，GAPDIST=8，MAXDIV=40 , MATRIX=GONNET , ENDGAPS(OFF) , NOPGAP，NOHGAP。

例如，同源性程度能用众所周知的计算机程序确定，如 Mview (http://www.sacseeucsf.edu/documentation/seqsoftware/mview ; Brown, N.P., Leroy C., Sander C.(1998). Mview：一个 Web 兼容的数据库搜索或多次比对浏览器。Bioinformatics，14(4):380-381)。

在本发明中，“同源性”也指在各自的核酸分子或它们编码的蛋白质之间具有功能和/或结构相当。与 SEQ ID No.1 所示核酸分子同源，并且是这些分子的衍生物的核酸分子，是这些分子的变体，它们具有行使相同生物功能的修饰，在体内也能提高单子叶植物中淀粉的磷酸含量。它们可能是天然存在的变体，例如来自其他种类马铃薯的序列，或突变，其中该突变可自然形成或者可通过定向诱变导入。

在本发明的另一个实施方案中，SEQ ID No.1 的衍生物包括 SEQ ID No.1 所示核酸分子的等位变体。

这些等位变体是天然存在的变体，能提高淀粉的磷酸含量。

在本发明的另一个实施方案中，外源核酸分子是根据本发明定义的外源核酸分子的片段。

在本发明中，术语“片段”是指外源核酸分子的部分，其编码具有生物活性，优选地酶活性的R1蛋白的部分。

R1蛋白生物活性部分的区别在于：由于外源核酸分子超表达，它在植物中能使磷酸含量提高，和/或在大肠杆菌中表达后促进糖原的磷酸化(见WO 97/11188 A1，实施例9)。

由外源核酸分子的不同变体(片段、衍生物、等位变体)编码的蛋白质显示明确的一般特征。后者的例子包括生物活性、酶活性或能利用上述蛋白质同源性比较方法研究的相似的一级结构。这些蛋白质的氨基酸序列显示至少60%、优选地至少85%、特别地至少95%、最优选地至少97%的相互同源性。

除了上述特征外，外源核酸分子的特征还在于：它们编码具有R1蛋白生物活性的蛋白质，该蛋白质至少含有1种、优选地至少5种、特别地至少10种、最优选地全部下列特有肽基序：

DKAAET(SEQ ID No.3)，IADME(SEQ ID No.4)，VWMRFM(SEQ ID No.5)，MQEWHQ(SEQ ID No.6)，LGHYM(SEQ ID No.7)，ERGYEE(SEQ ID No.No.8)，KAVLDR(SEQ ID No.9)，LSSLL(SEQ ID No.10)，IPDGAV(SEQ ID No.No.11)，KVCFAT(SEQ ID No.12)，ISADEF(SEQ ID No.13)，PFGVFE(SEQ ID No.14)，SSGDD(SEQ ID No.15)，SFICKK(SEQ ID No.16)。

在其它差别中，根据本发明的植物细胞与天然存在的植物细胞的区别还在于：它们含有不在这些细胞中天然存在的外源核酸分子，或者如此所述的一种分子整合到细胞基因组中一个不天然存在的位置，即不同的基因组环境中。而且，根据本发明的这类转基因植物细胞与天然存在的植物细胞的区别还在于：除了任选地如在细胞中天然存在的分子拷贝外，它们还含有以稳定方式整合到基因组中的至少一个拷贝的外源核酸分子。如果导入细胞中的核酸分子是细胞中天然存在的

分子的其它拷贝，根据本发明的植物细胞与天然存在的植物细胞的区别尤其在于：这些拷贝位于基因组中不天然存在的位点。例如，随后能利用 Southern 印迹分析检测。

此外，根据本发明的植物细胞与天然存在的植物细胞的区别优选地在于至少下列特征之一： 如果导入的核酸分子对于植物是异源的，根据本发明的转基因植物细胞含有导入的核酸分子的转录物，实际上甚至在野生型植物中检测不到转录物的器官中。根据本发明的植物细胞优选地含有外源核酸分子的转录物。例如，它们能通过 Northern 印迹分析检测。根据本发明的植物细胞优选地含有由导入的外源核酸分子编码的蛋白质。例如，这种添加的蛋白质能用免疫学方法检测，特别是通过 Western 印迹分析检测。

在一个优选实施方案中，根据本发明的植物细胞和植物显示比未遗传修饰的相应野生型植物细胞和野生型植物提高的 R1 蛋白生物活性。

对于本发明，例如，能通过测定在根据本发明的植物细胞和植物中合成的淀粉的磷酸含量确定“提高的 R1 蛋白生物活性”。与来自未遗传修饰的相应野生型植物细胞的淀粉相比，来自根据本发明的植物细胞的淀粉显示提高的 R1 蛋白生物活性，其区别在于，它们合成一种磷酸含量提高的淀粉，优选地，在葡萄糖单体 C6 位的磷酸含量提高。

而且，提高的 R1 蛋白生物活性也能如下测定：测定 R1-转录物的量，例如利用 Northern 印迹分析测定，与未遗传修饰的相应野生型植物中 R1-转录物的量相比较。

此外，提高的 R1 蛋白生物活性也能如下测定：测定 R1 蛋白的量，例如利用 Western 印迹分析测定，与未遗传修饰的相应野生型植物中 R1 蛋白的量相比较。

已经发现，根据本发明的单子叶植物细胞合成一种淀粉，该淀粉与来自未遗传修饰的相应野生型植物细胞的淀粉相比，在葡萄糖单体 C6 位的磷酸含量提高，和/或磷酸化模式改变，和/或粘性改变。

因此，本发明优选地涉及根据本发明的植物细胞，其合成一种淀粉，该淀粉与来自未遗传修饰的相应野生型植物细胞的淀粉相比，在葡萄糖单体 C6 位的磷酸含量提高，和/或磷酸化模式改变，和/或粘性改变。

在本发明中，术语“磷酸含量”是指以淀粉磷酸单酯形式共价键合的磷酸的含量。

在本发明中，术语“C6 位”是指磷酸基团，它在碳原子位点“6”处与淀粉的葡萄糖单体键合。

对于本发明，表述“提高的 C6 位的磷酸含量”是指利用光学-酶试验能在 C6 位检测到的葡萄糖单体磷酸基团(Nielsen 等人，Plant Physiol. 105,(1994),111-117，见方法)。表述“提高的 C6 位的磷酸含量”优选地是指，与来自未遗传修饰的相应野生型植物的淀粉的磷酸含量相比，淀粉在葡萄糖单体 C6 位的磷酸含量至少提高 20%，优选地至少 50%，最优选地至少 100%。原则上，淀粉中葡萄糖单位的 C2、C3 和 C6 位能在体内磷酸化。对于本发明，C6 位的磷酸含量(=C6 P 含量)能利用光学-酶试验通过葡萄糖-6-磷酸测定法测定(Nielsen 等人，Plant Physiol. 105,(1994),111-117)(见方法)。

在本发明中，术语“改变的磷酸化模式”是指相对于由来自未遗传修饰的相应植物的淀粉产生的化学磷酸化淀粉，与淀粉粒不同层内的淀粉共价键合的磷酸基团的总磷酸含量改变。化学磷酸化淀粉的区别在于淀粉粒内的磷酸梯度，其中外层一般比内层更强烈地磷酸化。相反，根据本发明的淀粉的区别在于，磷酸基团在淀粉粒不同层上分布不同，即，根据本发明的淀粉的特征可能在于，它们不含化学磷酸化淀粉特有的从外到内的梯度。

研究淀粉磷酸化模式的方法本领域技术人员周知(例如，见 Jane 和 Shen，Carbohydrate Research 247, (1993), 279-290; Gough 和 Pybus, Staerke 25, (1973), 123-130)。这些方法基于淀粉粒不同层的逐步化学胶固，在这些步骤中机械去除淀粉粒的胶固层。在此去壳步骤之后，利用标准方法测定不同淀粉粒层的总磷酸含量。

在本发明中，术语“化学磷酸化淀粉”是指通过来自未遗传修饰的相应植物细胞和/或植物的天然淀粉的化学磷酸产生的淀粉。对于本发明，化学磷酸化淀粉的区别优选地在于，与根据本发明的淀粉的直链淀粉含量相当的直链淀粉含量。在天然淀粉的化学磷酸化过程中，通过选择适当的试验条件调节 C6 位的磷酸含量，使得化学磷酸化淀粉 C6 位的磷酸含量与根据本发明的淀粉的葡萄糖单体 C6 位的磷酸含量相同和/或相当。

对于本发明，术语“改变的粘性”特别是指 RVA 图中终粘度的提高和/或 DSC 分析中峰值温度的降低。

在另一个优选实施方案中，根据本发明的植物细胞合成一种淀粉，与来自未遗传修饰的相应野生型植物的淀粉相比，其终粘度提高。

对于本发明，术语“终粘度”是指能根据粘度分布图(见图 1)确定的粘度，表示为“终粘度=Fin”。粘度分布图能用快速粘度分析仪(RVA) (Newport Scientific Pty Ltd, Investment Support Group, Warriewood, NSW 2102, 澳大利亚)获得。在小麦淀粉的分析中，粘度分布图通过下列步骤获得：2.5 g 淀粉(干物质)吸收于 25ml H_2O 中，用快速粘度分析仪 (Newport Scientific Pty Ltd, Investment Support Group, Warriewood, NSW 2102, 澳大利亚)分析。仪器按照使用说明书操作。完整的温度程序在图 1 中示意说明。下文详述了如何进行 RVA 分析(见方法)。

在本发明中，术语“提高的终粘度”是指与来自未遗传修饰的相应野生型植物细胞的淀粉相比，终粘度至少提高 10%，优选地至少 30%，特别地至少 50%，最优选地至少 80%，其中与来自未遗传修饰的相应野生型植物细胞的淀粉相比，终粘度最多能提高 1000%，优选地最多 500%，特别地最多 250%。

在另一个优选实施方案中，根据本发明的植物细胞合成一种淀粉，与来自未遗传修饰的相应野生型植物的淀粉相比，和/或与化学磷酸化淀粉相比，该淀粉在葡萄糖单体 C6 位有相同或相当的磷酸含

量，和/或峰值温度降低。

在本发明的上下文中，术语“峰值温度”应当是指温度 Tp，它能通过本领域技术人员周知的差示扫描量热法(DSC)测量。峰值温度是通常赋予 DSC 曲线第一峰最大值的温度。例如，能用大体积容器，用 Perkin Elmer 的仪器(仪器名称：DSC-7)测量，其中所研究的样品的淀粉与总含水量之比约为 1:4，以 10℃/min 的加热速度在 10℃-160℃温度范围内进行测量(见实施例 4)。

术语“降低的峰值温度”Tp 是指与来自未遗传修饰的相应野生型植物细胞的淀粉相比，峰值温度 Tp 至少降低 1.5℃，优选地至少 2.5℃，特别地至少 4℃，最优选地至少 6℃，最多降低 5℃、12℃或 9℃。

在另一个优选实施方案中，本发明涉及根据本发明的植物细胞，其合成一种淀粉，在胶固后形成凝胶，与来自未遗传修饰的相应野生型植物细胞的淀粉形成的凝胶相比，凝胶强度提高。

在本发明中，术语“提高的凝胶强度”是指与来自未遗传修饰的相应野生型植物细胞的淀粉的凝胶强度相比，凝胶强度至少提高 20%，特别地至少 50%，优选地至少 80%，最优选地至少 100%，最大值最多降低 500%，或最多 250%。

对于本发明，能在下述条件下利用结构分析仪测定凝胶强度(见方法)。

在本发明的另一个实施方案中，淀粉磷酸含量的提高可能与淀粉的支链淀粉成分有关。

因此，本发明也涉及根据本发明的植物细胞，它们合成一种淀粉，其支链淀粉成分磷酸化，与在葡萄糖单体 C6 位具有相同淀粉磷酸含量的相应化学磷酸化淀粉的直链淀粉成分相比，其直链淀粉成分的总磷酸含量降低。

因此，与在葡萄糖单体 C6 位具有相同淀粉磷酸含量的化学磷酸化淀粉不同，根据本发明的植物细胞的淀粉的区别在于：与化学磷酸化淀粉（在葡萄糖单体 C6 位具有相同磷酸含量，由来自未遗传修饰

的相应植物的淀粉产生，优选地具有相当的直链淀粉含量）的直链淀粉成分相比，来自根据本发明的植物细胞的淀粉的直链淀粉成分总磷酸含量降低，和/或葡萄糖单体 C6 位的磷酸含量降低。

对于本发明，术语“总磷酸含量”是指在葡萄糖单位 C2、C3 和 C6 位以淀粉磷酸单酯形式共价结合的磷酸的含量。根据本发明，术语“总磷酸含量”不包括磷酸化的非葡聚糖（如磷脂）的含量。因此，在测定总磷酸含量之前必须定量分离磷酸化的非葡聚糖。

从淀粉中分离磷酸化的非葡聚糖(例如磷脂)的方法本领域技术人员周知。

在本发明中，术语“降低的总磷酸含量”是指，与化学磷酸化淀粉（由来自未遗传修饰的相应植物的淀粉产生，具有相同的 C6 磷酸含量）直链淀粉成分的总磷酸含量相比，总磷酸含量至少降低 5%，特别地至少 20%，优选地至少 50%，最优选地至少 80%。

测定总磷酸含量的方法本领域技术人员周知，如下所述(见方法)。

在本发明中，可以认为术语“降低的葡萄糖单体 C6 位磷酸含量”是指，与化学磷酸化淀粉（由来自未遗传修饰的相应植物的淀粉产生，具有相同的 C6 磷酸含量）直链淀粉成分的总磷酸含量相比，直链淀粉成分的葡萄糖单体 C6 位的磷酸含量至少降低 10%，特别地至少 20%，优选地至少 50%，最优选地至少 80%。

测定葡萄糖单体 C6 位磷酸含量的方法本领域技术人员周知，如下所述(见方法)。

在本发明中，术语“支链淀粉成分”是指淀粉的支链淀粉。

在本发明中，术语“直链淀粉成分”是指淀粉的直链淀粉。

分离直链淀粉与支链淀粉的方法本领域技术人员周知。例如，直链淀粉成分能通过淀粉的水浸析获得，如 Roger 和 Colonna 所述 (International Journal of Biological Macromolecules 19, (1996), 51-61)。

在本发明的另一个优选实施方案中，根据本发明的淀粉的特征还

在于：直链淀粉成分 C6 位上葡萄糖单体的 C6 磷酸含量与淀粉 C6 位上葡萄糖单体的 C6 磷酸含量之比小于 0.75，特别是小于 0.5，优选地小于 0.25，最优选地小于 0.20。与化学磷酸化的淀粉不同，根据本发明的淀粉的区别在于，在淀粉的支链淀粉成分中检测到大部分葡萄糖单体 C6 位的磷酸，而在直链淀粉成分中未检测到。

根据本发明的植物细胞来源于单子叶植物。它们优选地是来自农业植物的植物细胞，即来自为了营养目的或技术目的，特别是工业目的人工培育的植物。因此，本发明优选地涉及来自淀粉合成或淀粉贮藏植物的植物细胞，例如黑麦、大麦、燕麦、小麦、粟、水稻或玉米。

在本发明的一个优选实施方案中，根据本发明的植物细胞来源于选自下列的植物：小麦、水稻、大麦、燕麦、黑麦和玉米。优选来自小麦、水稻和玉米植物的植物细胞；特别优选来自小麦植物的植物细胞。

在一个特别优选的实施方案中，根据本发明的植物细胞合成一种淀粉，该淀粉在葡萄糖单体 C6 位的磷酸含量至少为 0.1 nmol C6 P mg^{-1} 淀粉，特别地至少 0.5 nmol C6 P mg^{-1}，优选地至少 1 nmol C6 P mg^{-1} 淀粉，更优选地至少 2 nmol C6 P mg^{-1} 淀粉，最优选地至少 5 nmol C6 P mg^{-1} 淀粉，最特别优选地至少 10 nmol C6 P mg^{-1} 淀粉，其中根据本发明的植物细胞合成一种淀粉，该淀粉在葡萄糖单体 C6 位的磷酸含量最多为 100 nmol C6 P mg^{-1} 淀粉，特别地最多 50 nmol C6 P mg^{-1} 淀粉，最特别地最多 25 nmol C6 P mg^{-1} 淀粉。

在本发明的另一个实施方案中，根据本发明的植物细胞能合成一种在葡萄糖单体 C6 位的磷酸含量至少为 15 nmol C6 P mg^{-1} 淀粉的淀粉，其中根据本发明的植物细胞合成一种淀粉，该淀粉在葡萄糖单体 C6 位的磷酸含量最多为 100 nmol C6 P mg^{-1} 淀粉，特别地最多 50 nmol C6 P mg^{-1} 淀粉，最特别地最多 25 nmol C6 P mg^{-1} 淀粉。

在另一个实施方案中，本发明涉及一种生产根据本发明的植物细胞的方法，其中遗传修饰单子叶植物细胞，此遗传修饰包括至少一种

外源核酸分子的导入。

有多种技术可用于向植物宿主细胞中转移 DNA。这些技术包括：用根瘤农杆菌（*Agrobacterium tumefaciens*）或毛根农杆菌（*Agrobacterium rhizogenes*）作为转化剂，用 T-DNA 转化植物细胞，原生质体融合，注射，DNA 的电穿孔，利用 biolistic 技术和其它可能的技术导入 DNA。

已经广泛研究了农杆菌介导的植物细胞转化的应用，在下列文献中描述，例如：EP 120516；Hoekema，《二元植物载体系统》，Offsetdrukkerij Kanters B.V.，Alblasserdam(1985)，第 V 章；Fraley 等人，Crit. Rev. Plant Sci. 4, 1-46，An 等人，EMBO J. 4，(1985)，277-287。关于马铃薯的转化，例如见 Rocha-Sosa 等人，EMBO J. 8,(1989),29-33)。

单子叶植物的转化同时用 biolistic 技术并利用农杆菌常规进行(Komari 等人，(1998)，谷类基因转移进展；《现代植物生物技术观点》，第 161 页；Bilang 等人，(1999)，谷类的转化，《基因工程》，12，第 113-148 页，编者：JK Setlow, Kluwer Academic / Plenum Publisher，纽约)。基于农杆菌的载体已经描述(Chan 等人，Plant Mol. Biol. 22, (1993), 491-506；Hiei 等人，Plant J. 6, (1994) 271-282；Deng 等人, Science in China 33, (1990), 28-34；Wilmink 等人, Plant Cell Reports 11, (1992), 76-80；May 等人, Bio/Technology 13, (1995), 486-492；Conner 和 Domisse, Int. J. Plant Sci. 153 (1992), 550-555；Ritchie 等人, Transgenic Res. 2, (1993), 252-265)。用于单子叶植物转化的备选系统包括：利用 biolistic 技术转化(Wan 和 Lemaux，Plant Physiol. 104, (1994), 37-48；Vasil 等人，Bio/Technology 11 (1993), 1553-1558；Ritala 等人, Plant Mol. Biol. 24, (1994), 317-325；Spencer 等人, Theor. Appl. Genet. 79, (1990), 625-631)，原生质体转化，部分透化细胞的电穿孔，利用玻璃纤维导入 DNA。特别是，玉米的转化已在文献中多次描述(例如：WO 95/06128，EP 0513849，EO 0465875，EP 292435；Fromm 等人，

Biotechnology 8, (1990), 833-844; Gordon-Kamm 等人, Plant Cell 2, (1990), 603-618; Koziel 等人, Biotechnology 11 (1993), 194-200; Moroc 等人, Theor. Appl. Genet. 80, (1990), 721-726)。

其它种类谷类的成功转化也有描述，例如，对于大麦(Wan 和 Lemaux，见上文；Ritala 等人，见上文；Krens 等人, Nature 296, (1982), 72-74)，对于小麦(Becker 等人, Plant J. 5 (2), (1994), 229-307; Nehra 等人, Plant J. 5, (1994), 285-297)。

已经描述了用于水稻的多种转化方法，例如，农杆菌介导的转化(Hiei 等人, Plant J. 6 (1994), 271-282; Hiei 等人, Plant Mol. Biol. 35 (1997), 205-218; Park 等人, J. Plant Biol. 38 (1995), 365-371)，原生质体转化(Datta，《向植物中的基因转移》，Potrykus, Spangenberg(编写)，Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1995, 66-75; Datta 等人, Plant Mol. Biol. 20 (1992), 619-629; Sadasivam 等人, Plant Cell Rep. 13 (1994), 394-396)，用于植物转化的 biolistic 技术(Li 等人, Plant Cell Rep. 12 (1993), 250-255; Cao 等人, Plant Cell Rep. 11 (1992), 586-591; Christou, Plant Mol. Biol. (1997), 197-203)，电穿孔(Xu 等人,《向植物中的基因转移》，Potrykus, Spangenberg(编写)，Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1995, 201-208)。

本发明还涉及包含根据本发明的植物细胞的植物和/或能通过根据本发明的植物细胞再生产生的植物。这些植物优选地是有用的单子叶植物，例如：黑麦、大麦、燕麦、小麦，粟、水稻和玉米。优选小麦、水稻和玉米，特别优选小麦。

根据本发明的植物合成一种改性淀粉，其磷酸含量和/或磷酸化模式和/或粘性不同于来自未遗传修饰的相应野生型植物的淀粉，如对于根据本发明的植物细胞所述。

因此，本发明也涉及根据本发明的植物，其合成一种淀粉，与来自未遗传修饰的相应植物的淀粉相比，该淀粉在葡萄糖单体 C6 位的磷酸含量提高，和/或显示改变的磷酸化模式和/或改变的粘性。

对根据本发明的植物细胞所作的描述，在淀粉葡萄糖单体 C6 位

磷酸含量的提高、磷酸化模式的改变和淀粉粘性的改变等方面是适用的。

本发明优选地涉及根据本发明的植物，其合成一种淀粉，在胶固后形成凝胶，与来自未遗传修饰的相应野生型植物的淀粉形成的凝胶相比，凝胶强度提高。

术语 提高的凝胶强度”对根据本发明的植物细胞定义。

在本发明的另一个优选实施方案中，根据本发明的植物优选地是小麦植物，其合成一种淀粉，优选地小麦淀粉，在葡萄糖单体 C6 位的磷酸含量至少为 0.1 nmol C6 P mg^{-1} 淀粉，特别地至少 0.5 nmol C6 P mg^{-1}，优选地至少 1 nmol C6 P mg^{-1} 淀粉，最优选地至少 2 nmol C6 P mg^{-1} 淀粉，特别地至少 5 nmol C6 P mg^{-1} 淀粉，最优选地至少 10 nmol C6 P mg^{-1} 淀粉，其中根据本发明的植物合成一种淀粉，该淀粉在葡萄糖单体 C6 位的磷酸含量最多为 100 nmol C6 P mg^{-1} 淀粉，特别地最多 50 nmol C6 P mg^{-1} 淀粉，或最多 25 nmol C6 P mg^{-1} 淀粉。

在本发明的另一个实施方案中，根据本发明的植物能合成一种在葡萄糖单体 C6 位的磷酸含量至少为 15 nmol C6 P mg^{-1} 淀粉的淀粉，其中根据本发明的植物合成一种淀粉，该淀粉在葡萄糖单体的 C6 位的磷酸含量最多为 100 nmol C6 P mg^{-1} 淀粉，特别地最多 50 nmol C6 P mg^{-1} 淀粉，或最多 25 nmol C6 P mg^{-1} 淀粉。

在本发明的另一个优选实施方案中，根据本发明的植物在根据本发明的植物的淀粉贮藏器官中合成根据本发明的淀粉。

在一个最优选的实施方案中，根据本发明的植物在其淀粉贮藏器官中合成一种淀粉，与来自未遗传修饰的相应野生型植物的淀粉贮藏器官的淀粉相比，该淀粉在葡萄糖单体 C6 位的磷酸含量提高，和/或磷酸化模式改变，和/或粘性改变。

就此而言，表述 “淀粉贮藏器官 ”是指与只暂时合成淀粉的器官（如叶子）不同，含有贮藏淀粉的那些器官，例如玉米、水稻、和小麦植物的谷粒。

外源核酸分子的表达在单子叶植物（尤其小麦植物）的淀粉贮藏器官中特别有利，而且使得能从淀粉贮藏器官分离的淀粉与能从未遗传修饰的相应野生型植物（特别是小麦植物）的淀粉贮藏器官分离的淀粉相比，磷酸含量提高。

外源核酸分子在单子叶植物的淀粉贮藏器官中的表达首先能利用组成型启动子实现，例如花椰菜花叶病毒 35S RNA 启动子(参见例如 US-A-5,352,605)和玉米遍在蛋白启动子(参见例如 US-A-5,614,399)。

优选地使用淀粉贮藏器官特异的启动子，例如：胚乳特异的启动子，如谷蛋白启动子(Leisy 等人, Plant Mol. Biol. 14, (1990), 41-50; Zheng 等人, Plant J. 4, (1993), 357-366; Yoshihara 等人, FEBS Lett. 383, (1996), 213-218)，shrunken-1 启动子(Werr 等人, EMBO J. 4, (1985), 1373-1380)，小麦 HMW 启动子(Anderson Anderson, Theoretical and Applied Genetics 96, (1998), 568-576, Thomas, Plant Cell 2 (12), (1990), 1171-1180)，USP 启动子，菜豆蛋白启动子(Sengupta-Gopalan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985), 3320-3324, Bustos, Plant Cell 1 (9) (1989), 839-853)，或来自玉米的玉米醇溶蛋白基因启动子(Pedersen 等人, Cell 29, (1982), 1015-1026; Quatroccio 等人, Plant Mol. Biol. 15 (1990), 81-93)，或小麦 GBSSI (颗粒结合的淀粉合酶 I)(DE10041861.9)和 SSII(可溶性淀粉合酶 II)的颖果特异性启动子(DE10032379.0)。

在一个特别优选的实施方案中，根据本发明的植物在该植物的淀粉贮藏器官中显示 R1 基因表达。

R1 基因的表达能如下测定，例如：测定 R1 转录物的量，例如通过 Northern 印迹分析测定，与野生型植物的 R1 转录物的量相比较。

而且，对于本发明，R1 基因的表达能如下测定：测定 R1 蛋白的量，例如通过 Western 印迹分析测定。优选地利用从胚乳植物细胞分离的蛋白质提取物测定 R1 蛋白的量。

在本发明的另一个实施方案中，根据本发明的植物在该植物的淀

粉贮藏器官中显示 R1 基因表达，与未遗传修饰的相应野生型植物的淀粉贮藏器官中的 R1 基因表达相比，优选地至少提高 50%，最优选地至少 100%，特别地至少 250%，最特别地至少 500%。

在一个最优选的实施方案中，根据本发明的植物显示外源核酸分子在根据本发明的植物的淀粉贮藏器官中器官特异的表达。

在本发明中，术语“器官特异的”是指与成熟的叶子相比，选择的启动子更偏好在淀粉贮藏器官中表达外源核酸分子，并且导致表达程度显著提高，如表达水平至少提高 2-5 倍，优选地 5-10 倍，最优选地 10-100 倍。

在本发明该实施方案中，根据本发明的植物的区别在于，由于外源核酸分子器官特异地表达，它们显示 R1 基因在淀粉贮藏器官中的表达高于内源 R1 基因在未遗传修饰的相应野生型植物的淀粉贮藏器官中的基因表达。在本发明该实施方案中，R1 基因在根据本发明的植物叶子中表达的提高不能与在淀粉贮藏器官中的表达同等检测。R1 基因表达的提高优选地只与淀粉贮藏器官有关。

在本发明的一个优选实施方案中，根据本发明的植物是选自小麦、水稻、大麦，粟、燕麦、黑麦和玉米的植物。优选小麦、水稻和玉米植物；特别优选小麦植物。

本发明也涉及一种生产根据本发明定义的植物的方法，其中：

(a) 遗传修饰一种单子叶植物细胞，其中该遗传修饰包括导入至少一种外源核酸分子；

(b) 由根据步骤(a)的细胞再生的一种植物；和任选地

(c) 由根据步骤(b)生产的植物生产的其它植物。

本发明还涉及一种生产根据本发明定义的植物的方法，在该植物的淀粉贮藏器官中合成一种淀粉，与来自野生型植物淀粉贮藏器官的淀粉相比，该淀粉的磷酸含量提高，和/或磷酸化模式改变，和/或终粘度提高，和/或峰值温度降低，其中：

(a) 遗传修饰一种单子叶植物细胞，其中该遗传修饰包括导入至少一种根据本发明定义的外源核酸分子；

(b) 由根据步骤(a)的细胞再生的一种植物；和任选地

(c) 由根据步骤(b)生产的植物生产的其它植物。

同样适用于根据步骤(a)导入的遗传修饰，如上对于根据本发明的植物细胞和植物所述。

根据步骤(b)的植物再生能用本领域技术人员周知的方法完成。

按照根据本发明的方法的步骤(c)生产其它植物能如下完成，例如：通过无性繁殖，例如通过插枝、块茎或通过愈伤组织培育和完整植物的再生，或通过有性繁殖。有性繁殖优选地以受控方式发生，即，具有确定特性的所选植物彼此杂交、繁殖。

在本发明的一个优选实施方案中，根据本发明的方法的区别在于：导入根据步骤(a)的植物细胞的外源核酸分子选自：

(i)含有 Seq ID No.1 所示核苷酸序列的编码区的核酸分子；

(ii)编码具有 Seq ID No.2 所示氨基酸序列的马铃薯 R1 蛋白的核酸分子；

(iii)作为 Seq ID No.1 所示核苷酸序列的衍生物的核酸分子；和

(iv)作为(i)、(ii)或(iii)所示核酸分子的片段的核酸分子。

在一个特别优选的实施方案中，根据本发明的方法的区别在于：外源核酸分子受控于一种启动子，优选地胚乳-特异和/或颖果-特异的启动子，它器官特异性地促进 R1 基因在淀粉贮藏组织中的表达。

这种类型的启动子，如胚乳-特异和颖果-特异的启动子，已在上文对于根据本发明的植物描述。

在另一个实施方案中，根据本发明的方法涉及有用的单子叶植物，例如：黑麦、大麦、燕麦、小麦、粟、水稻和玉米。优选小麦、水稻和玉米；特别优选小麦。

本发明也涉及能利用根据本发明的方法获得的植物。

本发明也涉及含有根据本发明的植物细胞的植物的繁殖材料，和利用根据本发明的方法生产的植物。在本发明中，术语“繁殖材料”包括适于通过无性或生殖途径生产或繁殖的植物的任何成分。例如，插条、愈伤组织培养物、根茎或块茎适于无性繁殖。其它繁殖材料包

括，例如：果实、种子、幼苗、原生质体、细胞培养物等。种子是优选的繁殖材料。

在一个优选实施方案中，本发明涉及玉米粒。

在一个最优选的实施方案中，本发明涉及小麦粒。

根据本发明的玉米和小麦粒特别适于饲料和食品的生产。

本发明还涉及根据本发明定义的外源核酸分子在生产根据本发明的植物，优选地小麦、玉米和水稻植物，最优选地小麦植物，或在生产根据本发明的单子叶植物细胞中的用途。

根据本发明的植物细胞和植物合成，特别是在淀粉贮藏器官中合成一种淀粉，与在野生型植物中合成的淀粉相比，以及与化学磷酸化的淀粉相比，其理化性质，特别是磷酸含量和/或粘性行为和/或磷酸化模式改变。

因此，本发明也涉及能从根据本发明的植物细胞、植物和/或繁殖材料获得的淀粉。

在本发明的一个优选实施方案，根据本发明的淀粉的特征在于：与来自未遗传修饰的相应野生型植物的淀粉相比，其在葡萄糖单体 C6 位的磷酸含量提高，和/或磷酸化模式改变，和/或终粘度提高，和/或峰值温度降低。

本发明也涉及如下淀粉，其特征在于：与来自未遗传修饰的相应野生型植物的淀粉相比，其在葡萄糖单体 C6 位的磷酸含量提高，和/或磷酸化模式改变，和/或终粘度提高，和/或峰值温度降低。

对于根据本发明的植物细胞所做的描述适用于 C6 位磷酸含量的提高、磷酸化模式的改变和粘性(终粘度、峰值温度)的改变。

在另一个实施方案中，本发明涉及淀粉，优选地小麦淀粉，其特征在于：在葡萄糖单体 C6 位的磷酸含量至少为 0.1 nmol C6 P mg^{-1} 淀粉，特别地至少 0.5 nmol C6 P mg^{-1} 淀粉，优选地至少 1 nmol C6 P mg^{-1} 淀粉，最优选地至少 2 nmol C6 P mg^{-1} 淀粉，最特别地至少 5 nmol C6 P mg^{-1} 淀粉，最优选地至少 10 nmol C6 P mg^{-1} 淀粉，和/或终粘度提高，和/或峰值温度降低，其中根据本发明的淀粉在葡萄糖

单体 C6 位的磷酸含量最多为 100 nmol C6 P mg^{-1} 淀粉，特别地最多 50 nmol C6 P mg^{-1} 淀粉，或最多 25 nmol C6 P mg^{-1} 淀粉。

在本发明的另一个实施方案中，根据本发明的淀粉的特征在于：在葡萄糖单体 C6 位的磷酸含量至少为 15 nmol C6 P mg^{-1} 淀粉，其中根据本发明的淀粉在葡萄糖单体 C6 位的磷酸含量最多为 100 nmol C6 P mg^{-1} 淀粉，特别地最多 50 nmol C6 P mg^{-1} 淀粉，或最多 25 nmol C6 P mg^{-1} 淀粉。

在另一个优选实施方案中，根据本发明的淀粉，优选地小麦淀粉，其特征在于：根据本发明的淀粉在胶固后形成凝胶，与具有相同磷酸含量的相应化学磷酸化淀粉的凝胶相比，和/或与来自未遗传修饰的相应植物的淀粉的凝胶相比，凝胶强度提高。

在本发明的另一个优选实施方案中，根据本发明的淀粉的特征在于：大部分磷酸基团与淀粉的支链淀粉成分键合，而直链淀粉只含有极少量的共价键合的淀粉单磷酸酯。与具有相似 C-6 磷酸含量的化学磷酸化淀粉相比，根据本发明的植物细胞产生的根据本发明的淀粉的区别在于，根据本发明的淀粉的直链淀粉比支链淀粉成分磷酸化强度低。

在本发明的另一个实施方案中，根据本发明的淀粉的特征在于，与优选地在葡萄糖单体 C6 位具有相同磷酸含量的化学磷酸化淀粉的直链淀粉成分相比，该淀粉的直链淀粉成分的总磷酸含量降低。

总磷酸含量的测定方法本领域技术人员周知，如下所述(见方法)。

在本发明的另一个实施方案中，根据本发明的淀粉的特征在于：与化学磷酸化淀粉（由未遗传修饰的相应植物的淀粉产生，在葡萄糖单体 C6 位磷酸含量相同）的直链淀粉成分相比，能用 ^{31}P NMR (Kasemsuwan 和 Jane (Cereal Chemistry 73 (6), (1996), 702-707)检测的淀粉直链淀粉成分的总磷酸含量至少减少 5%，优选地至少 20%，特别地至少 50%，最优选地至少 80%。

在本发明的一个优选实施方案中，根据本发明的淀粉的特征在

于，与化学磷酸化淀粉相比，它们显示改变的磷酸化模式。

术语"改变的磷酸化模式"已经对根据本发明的植物细胞定义。

在本发明的一个优选实施方案中，淀粉是来自有用单子叶植物的淀粉，如黑麦、大麦、燕麦、小麦、粟、水稻和玉米淀粉。优选小麦、水稻和玉米淀粉；特别优选小麦淀粉。

本发明进一步涉及一种生产根据本发明的淀粉的方法，包括从如上所述的植物或植物细胞中，和/或从所述植物的淀粉贮藏部分中，和/或从根据本发明的繁殖材料中提取淀粉的步骤。如此所述的一种方法优选地也包括在提取淀粉之前收获培育的植物和/或该植物的淀粉贮藏部分的步骤，最优选地还包括在收获之前培育根据本发明的植物和/或根据本发明的繁殖材料的步骤。从植物或植物的淀粉贮藏部分提取淀粉的方法本领域技术人员周知。从不同淀粉贮藏植物提取淀粉的方法也在下列文献中描述，例如：《淀粉：化学与技术》(编者：Whistler, BeMiller 和 Paschall(1994)，第二版，Academic Press Inc. London Ltd；ISBN 0-12-746270-8；见第 XII 章，第 412 -468 页，例如："玉米和高粱淀粉：生产"；Watson；第 XIII 章，第 469-479 页："木薯、竹芋和西米淀粉：生产"；Corbishley 和 Miller；第 XIV 章，第 479-490 页："马铃薯淀粉：生产和用途"；Mitch；第 XV 章，第 491-506 页："小麦淀粉：生产、修饰和用途"；Knight 和 Oson；第 XVI 章，第 507-528 页："水稻淀粉：生产和用途"；Rohmer 和 Klem；参见"玉米淀粉"：Eckhoff 等人，Cereal Chem. 73 (1996) 54-57。工业规模的玉米淀粉提取通常用被称为"湿磨"的方法实现。常用于从植物材料中提取淀粉的装置包括：磨粉机、分离器、倾析器、水力旋流器、喷雾干燥机和液化床干燥机。

本发明也涉及能用上述根据本发明的方法获得的根据本发明的淀粉。

随后能用本领域技术人员周知的方法修饰根据本发明的淀粉，其未修饰或修饰的形式适于食品或非食品部门的不同用途。

因此，本发明也涉及随后经化学和/或物理修饰的根据本发明定义的淀粉。

能用于化学和/或物理修饰的不同选项在下文详述。

通过对植物进行基因工程操作生产改性淀粉首先能改变从植物获得的淀粉的性质，从而似乎不再需要用化学或物理方法进一步修饰。其次，利用基因工程方法修饰的淀粉能进一步进行化学和/或物理修饰，进一步提高质量，用于上述某些应用领域。这些化学和物理修饰基本已知。具体而言，包括用下列方法修饰:

- 热处理，
- 酸处理，
- 淀粉醚的生产，

淀粉烷基醚，O-烯丙醚，羟烷基醚，O-羧甲基醚，含氮淀粉醚，含磷淀粉醚，含硫淀粉醚，

- 交联淀粉的生产，
- 淀粉接枝聚合物的生产，
- 氧化，和
- 用于生产磷酸、硝酸、硫酸、黄原酸、醋酸和柠檬酸淀粉的酯化操作。其它有机酸也能用于酯化。

在另一个实施方案中，本发明涉及根据本发明的淀粉在工业，优选地在食品生产中的用途。

在另一个实施方案中，本发明涉及含有根据本发明的淀粉的小麦粉。在其他特性中，根据本发明的小麦粉与普通小麦粉的区别在于焙烤特性改变。由小麦粒生产小麦粉的方法本领域技术人员周知。通过这些方法，能从根据本发明的植物细胞和植物以及从根据本发明的繁殖材料中分离根据本发明的小麦粉。

因此，本发明也涉及能从根据本发明的植物细胞和植物以及从根据本发明的繁殖材料中获得的小麦粉。

与来自未遗传修饰的相应野生型植物的淀粉相比，根据本发明的面粉的区别尤其在于它们的吸水性提高。测定吸水性的方法本领域技

术人员周知，在下文详述(见方法)。

在本发明的一个优选实施方案中，与来自未遗传修饰的相应小麦植物的小麦粉相比，该小麦粉显示吸水性至少提高 5%，特别地至少 15%，优选地至少 20%，最优选地至少 25%。

由于具有强吸水性，根据本发明的面粉在生面团的工业生产中具有在生面团生产期间只需向面粉中添加少量水的优点。

在另一个实施方案中，本发明涉及根据本发明的小麦粉和/或根据本发明的淀粉在生产焙烤混合物和/或生产食品中的用途。

在另一个实施方案中，本发明涉及根据本发明的小麦粉和/或根据本发明的淀粉在包装的包衣中的用途。

在一个特别优选的实施方案中，本发明涉及一种含有根据本发明的小麦粉和/或根据本发明的淀粉的焙烤混合物。就此而言，术语“焙烤混合物”是指能用于生产生面团(例如酵母生面团、干面食生面团、酥皮糕点、酸生面团等)和/或焙烤食品的任何混合物(例如面包、蛋糕、面卷、新月形面包等)。

在另一个特别优选的实施方案中，本发明涉及一种食品，优选地焙烤食品和发面食品(例如干面食)，它是用根据本发明的小麦粉和/或根据本发明的焙烤混合物和/或根据本发明的淀粉生产的。

与使用未遗传修饰的相应野生型小麦植物的小麦粉生产的焙烤食品相比，根据本发明的焙烤食品和/或食品在贮藏上的区别在于焙烤食品经历的陈化（ageing）过程减缓。

焙烤食品的陈化过程与淀粉的支链淀粉成分的退化(再结晶)紧密相关。假定随着焙烤食品和/或食品的陈化过程进行，支链淀粉成分的退化程度越高。能用 DSC 测定的支链淀粉的熔解焓提供了关于支链淀粉退化程度的信息。因此，通过用 DSC（=差示扫描量热法）分析测定特定时间点上支链淀粉的熔解焓，能测定焙烤食品的陈化程度（见方法）。

如果在贮藏 3 天和/或 7 天和/或 13 天后测定根据本发明的焙烤食品和/或食品的支链淀粉的熔解焓，例如，一般发现，与储存相同时

间、基于未遗传修饰的相应野生型植物的小麦粉的焙烤食品和/或食品的支链淀粉相比，该支链淀粉的熔解焓减少。

附图说明

图 1：RVA 图的示意图；

图 2：载体 pUbi2afp 的质粒图谱

图 3：载体 pUbiR1 的质粒图谱

图 4：载体 p35SAcS 的质粒图谱(pUC18 的一种衍生物(Pietrzak M.等人, Nucleic Acids Res.14,(1986),5857-5868)：含有在 CaMV35S 启动子控制下的绿色产色链霉菌（Streptomyces viridochromogenes）pat 基因(Wohlleben 等人, Gene 70, (1988), 25-37)。

图 5：载体 pAct1-Fneo/CaIgus 的质粒图谱(pUC19-衍生物(Yannish-Perron 等人, 1985, Gene 33: 103-119)：由 pAct1- Fneo (Müller 等人, Plant Science 114, (1996), 71-82)和 pCaIgus 形成，含有 CaMV35S 启动子(参见例如 US-A-5,352,605)、玉米 AdhI 内含子(Genes Dev 1987 Dec;1(10):1183-200)和β-葡糖醛酸糖苷酶(GUS)基因(GUS 报道系统，作为研究植物基因表达的工具，《GUS 方案：使用 GUS 基因作为基因表达报道基因》，Academic Press (1992), 23-43)。

图 6：显示贮藏 1、3、7、13 天后面包屑的焓。

方法：

淀粉葡萄糖单体 C6 位磷酸含量(=C6 P 含量) 的测定(Nielsen 等人, Plant Physiol. 105, (1994), 111-117)：

为了测定淀粉的 C6 P 含量，50 mg 淀粉在 500μl 0.7 M HCl 中 95℃水解 4 小时。随后以 15500 g 离心该批 10 分钟，吸出上清液。7 μl 上清液与 193μl 咪唑缓冲液(100 mM 咪唑，pH 7.4；5 mM $MgCl_2$，1 mM EDTA 和 0.4 mM NAD)混合。在 340 nm 下用光度计进行测量。在建立基线吸光度后，通过加入 2 U 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶

(来自肠膜样明串珠菌(Leuconostoc mesenteroides), Boehringer Mannheim)启动酶促反应。吸光度的改变与淀粉的 C-6 P 含量的浓度成正比。

淀粉总磷酸含量的测定:

在测定淀粉的总磷酸含量之前，必须从磷酸化的非葡聚糖（如磷脂）中完全分离淀粉。

总磷酸含量的测定通过 Ames 的方法进行(Methods in Enzymology VIII, (1966), 115-118)，如下:

约 50 mg 淀粉用 30μl 10%乙醇硝酸镁溶液处理，在马弗炉中燃烧 3 小时。残余物用 500μl 0.5 M 盐酸处理，在 60℃下温育 30 分钟。然后加入 0.5 M 盐酸使 20μl 等份至 300μl，加至 100μl 10%抗环血酸和 600μl 0.42%钼酸铵的混合物中，在 45℃下温育 20 分钟。之后用磷酸校准系列作为标准，在 820 nm 下进行光度测量。

凝胶强度的测定(结构分析仪):

2.5 g 淀粉(TS)在 RVA 仪器(参见利用 Rapid Visco 分析仪(RVA)测定粘性)中在 25 ml H_2O 中胶固，之后在室温下贮存 24 小时。样品在 Stable Micro Systems (Surrey, UK)的 TA-XT2 结构分析仪的传感器(具有一个平面的圆柱形活塞)下固定，用下列仪器设置测量凝胶强度:

- 测试速度 0.5 mm/s
- 刺入深度 7 mm
- 接触面积 113 mm^2
- 压力 2 g

利用 Rapid Visco 分析仪(RVA)测定粘性(例如终粘度):

2.5 g 淀粉(干重)吸收 25 ml H_2O，用于在 Rapid Visco 分析仪(Newport Scientific Pty Ltd., Investment Support Group, Warriewod NSW 2102, 澳大利亚)中分析。仪器按照使用说明书操作。为了测定淀粉水溶液的粘度，首先加热淀粉悬液 1 分钟至 50℃，然后以每分钟 12℃的速度从 50℃加热到 95℃。在 95℃下保温 2.5 分钟。之后，

溶液以每分钟 12℃的速度从 95℃冷却到 50℃。最后，在 50℃下再保温 6 分钟。在整个试验期间测定粘度。

通过水浸析分离淀粉的直链淀粉成分:

众所周知，通过水浸析（Roger 和 Colonna (International Journal of Biological Macromolecules 19, (1996), 51-61)能从淀粉中获得直链淀粉。

为了分离淀粉的直链淀粉成分，制备 25 ml 淀粉水悬液(10% w/v)，随着搅拌在 RVA (Newport Scientific)中加热，使用下列参数:

时间[min]	类型	值[℃]或[rpm]
0	温度	30℃
0	速度	960rpm
0.5	速度	300rpm
10	温度	95℃

在悬液或溶液的粘度超过 200 cP 之后,立即终止程序,并将淀粉悬液或溶液转移到一个预冷的 50 ml 反应管中，与 25 ml 冷水混合，并在冰浴中冷却 10 分钟至大约室温(RT)。之后，未溶解的葡聚糖经离心(20 min，2300 g，RT)形成沉淀，澄清的上清液用 10 mg NaCl/ml 处理。然后在冰上用 80%乙醇沉淀溶解的葡聚糖，再次用乙醇洗涤，在 37℃下干燥 3 天。随后研磨沉淀(15 s 30 Hz，在德国 Retsch 的振动磨中使用碳化钨球)，将 25 mg 沉淀悬浮于 500μl 0.7 M HCl 中，在 95℃下水解 4 小时。然后离心去除未溶解的颗粒，酶学测定葡萄糖-6P 的含量(见上文: 葡萄糖单体 C6 位磷酸含量的测定")。

对小麦粉进行的小规模吸水试验程序:

材料

来自 Sarsted 的带有螺帽的 Eppendorf 管(2 ml)。

Eppendorf 离心机(Sigma 202)

振荡器(Wilten)

分析天平(Mettler)

方法

用分析天平称量 Eppendorf 管重量，保留小数点后四位。

向 Eppendorf 管中填充 100-110 mg 面粉，注意精确的重量。

将带有面粉的管置于振荡涡旋器上，边振荡边加入 1.0ml 水。

持续振荡 10 秒钟。

加入 0.9 ml 水，用螺帽拧紧 Eppendorf 管，

等待 10 分钟。

将 Eppendorf 管放入离心机的 6*10 转子中(转位式)。

以 10000 转/分离心 30 分钟(约 8600*g)。

从管中倒出水。

用滤纸吸干管的内部，不干扰湿残余物。

用分析天平称量带有湿面粉的 Eppendorf 管的重量，保留小数点后四位。

计算吸收的水的重量。

测量每种面粉的吸水量 10 次，计算平均值。

差示扫描量热法:

差示扫描量热法(DSC)是一种研究热转化的技术，此处研究面包屑。

利用该技术以连续(相对较低)的加热速度测量流入样品中的热量。基线的峰值(距基线的偏移(内热))或梯级(玻璃转换)决定转换。

相对于基线的峰面积取积分产生转换的焓。对于面包屑，通常观察到 40-70℃(60℃峰值)的支链淀粉熔解热和大约 120℃的直链淀粉-脂质解络合。

不同面粉样品之间支链淀粉熔解热的不同表明退化行为的不同，因而表明面包已变得不新鲜。支链淀粉晶体的熔解焓随着焙烤后贮藏时间的延长而升高。贮藏期间熔解焓的升高是再结晶的支链淀粉的量随时间增加的量度。为了根据含湿量不同进行修正，以干物质为基础计算焓(j/g)。

DSC 测量用配有 LNCA 冷却单元的 TA Instruments Type 2920 热量计进行。这个冷却单元使用液氮在实验后快速冷却。

样品(40-50 mg 面包屑)置于 DSC 锅中，用指甲手工压缩。用压缩单位密封 DSC 锅后，将样品置于 DSC-装置中。

样品(40-50 mg 面包屑)在密封的不锈钢锅(Perkin Elmer)中以 7.5℃/min 的速度从 20℃加热到 160℃。以填充 100mg 铝的中压锅(120μl 体积)作为参照。

在贮藏 1、3、7、14 天后单次测量小面包碎屑的焓。

下列实施例用来解释本发明，而不在任何方面进行限制:

实施例 1

用于小麦植物转化的载体 pUbiR1 的制备

为了制备载体 pUbiR1，首先如下制备载体 pUbi.cas:

载体 pUbi2afp (见图 2)用限制酶 PstI/EcoRI 部分酶切。产生的 4.19 Kb 片段包含 pUC19 载体(Yannish-Perron 等人, 1985, Gene 33: 103-119)、1.5 Kb 遍在蛋白启动子和 ubi 基因的第一个外显子和缩短的遍在蛋白 1 内含子(ClaI 缺失)(Christensen 等人, Plant Mol. Biol. 18, (1992), 675-689)，在凝胶洗脱后使用。

nos 终止子作为 PstI/EcoRI 片段从载体 pAct.cas (产品号 Cambia TG0063，Cambia，GPO Box 3200，Canberra ACT 2601，澳大利亚)上分离，连接两个片段产生载体 pUbi.cas。

随后，马铃薯 R1 基因的 cDNA (SEQ ID No.1)作为部分消化物(SmaI/Asp718 片段)从载体 pRL2 (WO97/11188，实施例 4，在德国微生物保藏中心保藏号为 DSM 10225)上分离，整合到载体 pUbi.cas (用 SmaI/Asp718 限制酶切)上。产生的构建体命名为 pUbiR1 (见图 3)。该构建体包含马铃薯 R1 cDNA 的编码区，它受遍在蛋白启动子控制(Christensen 等人, 1992, Plant Mol. Biol. 18: 675-689)，也包含 ubi 基因的第一个外显子(Christensen 等人, 1992, Plant Mol. Biol. 18: 675-689)和缩短的第一个内含子(Christensen 等人, 1992, Plant Mol. Biol. 18: 675-689)，内部 ClaI 片段缺失)作为另外的调节单位。

实施例 2

表达马铃薯 R1 基因的小麦植物的生产，和这些植物的淀粉的磷酸含量分析

用 biolistic 转化法进行小麦的转化(Becker 等人, Plant J. 5 (2), (1994), 229-307)。用于 biolistic 共转化的载体 pUbiR1 和载体 p35SacS (见图 4)或 pAct1-Fneo/CaIgus (Müller 等人, Plant Science 114, (1996), 71-82, 见图 5)在 DNA 颗粒沉淀批次中以相同摩尔比使用。

载体 p35SAcS 如下制备：绿色产色链霉菌的 pat 基因(Wohlleben 等人, Gene 70, (1988), 25-37)通过聚合酶链反应扩增。设计使用的引物，使得在扩增物两侧产生 BamHI 酶切位点。随后将 BamHI 片段克隆到置于载体 pDH51 (Pietzrak 等人, Nucleic Acids Res. 14, (1986), 5857-5868)的 35S 启动子与 35S 终止子之间的 BamHI 酶切位点。将含有 35S 启动子、pat 基因和 35S 终止子的盒切割为 EcoRI 片段，克隆到载体 pUC18 的 EcoRI 酶切位点(Pietzrak 等人, Nucleic Acids Res. 14, (1986), 5857-5868)。

用来自小麦植物的 14 天的不成熟胚芽的盾片作为转化的靶细胞。转化后在含有 2mg/l 2,4-D(=2,4 二氯苯氧乙酸)的 MS^-培养基(PCT/EP97/02793)上进行体外培养。转化两周后，在已添加 2 mg/l 膦丝菌素或 150 mg/l 硫酸卡那霉素的相同培养基上进行传代培养。再两周后，将发育的愈伤组织移植到再生培养基上(含有 0.1 mg/l 2,4-D 和 2 mg/l PPT 或 150 mg/l 卡那霉素的 MS^-培养基)。将发育的幼芽转移到不含 2,4-D 和膦丝菌素或卡那霉素的半浓缩 MS^-培养基中，然后转移到土壤中。在土壤中生长约 14 天后，喷洒分别含有 150 和 200 mg/l 膦丝菌素、0.1% Tween 20(ICI America，相当于聚山梨醇酯 20)的水溶液两次，或喷洒 2.5%硫酸卡那霉素、0.1% Tween 20 两次，鉴定转基因植物。

马铃薯 R1 基因在 T_0 植物中的表达

马铃薯 R1 基因在转基因小麦 T_0 植物中的表达通过 Nortern 和

Western 印迹分析检测，并酶学测定颖果淀粉葡萄糖单体 C6 位的磷酸含量(Nielsen 等人, Plant Physiol. 105, (1994), 111-117)。

利用抗马铃薯 R1 蛋白抗体检测转基因小麦植物中的 R1 蛋白(Ritte 等人, Plant J. 21(4), (2000), 387-391)。

用来自约 20 天的不成熟颖果的胚芽的蛋白质提取物筛选转基因植物。

为了测定 C6 磷酸，从不成熟和成熟的小麦颖果中分离来自转基因 T_0 植物的淀粉。颖果在研钵中磨碎，形成粉末。在加入 15 ml 100 mM Tris 缓冲液(pH 8.0)后，悬液通过 100μm 筛过滤，离心沉淀淀粉(2600 g，5 min，4℃)。弃去上清液。然后将淀粉沉淀重悬浮于 2 ml 100 mM Tris 缓冲液（pH 8.0）中，转移到 8 ml Percoll 梯度中。在 4℃下以 170 g 离心 15 分钟沉淀淀粉。用 10 ml 100 Tris 缓冲液（pH 8.0）洗涤淀粉沉淀三次。最后，通过丙酮温育使淀粉脱脂并干燥。

以上述方法利用光学-酶试验(Nielsen 等人, Plant Physiol. 105, (1994), 111-117)通过葡萄糖-6-磷酸测定法测定 C6 P 含量。

试验表明，在 Southern 印迹分析中产生阳性结果的小麦 T_0 植物中，有大约 50%的系在颖果中合成一种淀粉，它与来自未遗传修饰的相应 Florida 品种野生型植物的淀粉相比，在葡萄糖单体 C6 位的磷酸含量提高。表 1 给出了选择的某些系的数据。

自然子代的分析

播种从表达 R1 的亲代系自然获得的种子，确定分离比。通过 Southern 和 Northern 印迹分析能检测 R1 基因在不同系的 T_1 子代中的整合和表达。测定这些系在淀粉 C6 位的磷酸含量。表 1 显示选择的某些系的数据。

表 1:

系编号	C6 P nmol/mg	基因-分配	标准差
野生型 Florida 品种	不可检测	-	0.0
19	2.8	T0	0.2
20-25	6.7	T1	0.2
37	1.4	T0	0.3
40A-11-8	10.7	T2	0.7

实施例 3

来自表达马铃薯 R1 基因的转基因小麦植物的植物淀粉的 RVA 分析，和凝胶强度的研究

来自实施例 1 和 2 所述小麦植物的淀粉进行 RVA 分析。

RVA 分析结果(实验：见方法)表明，与来自未遗传修饰的相应野生型小麦植物(Florida 品种)的淀粉相比，来自表达马铃薯 R1 基因的转基因小麦植物的淀粉的粘性行为显著改变(见表 2)。

表 2:

系编号	RVA Max (%)	RVA Min (%)	RVA Fin (%)	RVA Set (%)	RVA T (%)
野生型 (Florida)	100	100	100	100	100
19 (T0)	98.7	113.8	116.8	120.7	102
20-25 (T1)	155.3	190	193.8	198.8	99
37 (T0)	143.8	156.2	148.8	139	101
40-11-8 (T2)	156.2	185.5	187.7	190.6	97

图例:

RVA= Rapid Visco 分析仪

Max =见图 1

Min =见图 1

Fin =终粘度，见图 1

Set = Setback = Min 与 Fin 之差，见图 1

T= 胶固温度，见图 1

百分比相对于野生型(=100%)。

来自表达马铃薯 R1 基因的转基因小麦植物的淀粉的凝胶强度(凝胶强度的测定：见方法)不同于随后化学磷酸化的来自未遗传修饰的相应野生型小麦植物(Florida 品种)的淀粉和野生型淀粉(Florida 品种)(见表 3)。

与在葡萄糖单体 C6 位有相似磷酸含量的化学磷酸化淀粉不同，在胶固后，根据本发明的淀粉的凝胶显示凝胶强度高于野生型植物的淀粉的凝胶。与此不同，将利用 Lim 所述方法生产的化学磷酸化淀粉与野生型植物的淀粉的凝胶相比较。

表 3:

系编号	凝胶强度 (TA)(%)	C6 位的磷酸含量 μmol 磷酸/g 淀粉
野生型 (Florida)	100	不可检测
19 (T0)	167	2.8
20-25 (T1)	192	6.7
37 (T0)	168	1.4
40-11-8 (T2)	224	10.7
化学磷酸化的野生型(Florida) 淀粉		
STMP1	84	2.1
STMP6	75	6.5
STMP8	67	11.5

TA=结构分析仪

百分比相对于野生型(=100%)。

实施例 4

来自表达马铃薯 R1 基因的转基因小麦植物的植物淀粉的 DSC

分析

来自实施例 1 和 2 所述小麦植物的淀粉进行 DSC 分析。

用 Perkin Elmer 的仪器(仪器名称: DSC-7)用大体积容器测量峰值温度，其中所研究的样品的淀粉与总含水量之比约为 1:4，并且以 10℃/min 的加热速度在 10℃-160℃温度范围内进行测量。

DSC 分析结果(表 4)显示，与来自未遗传修饰的相应野生型小麦植物(Florida 品种)的淀粉相比，与随后化学磷酸化的、在葡萄糖单体 C6 位有相似磷酸含量的淀粉相比，来自表达马铃薯 R1 基因的转基因小麦植物的淀粉的峰值温度 Tp 降低。

表 4:

样品	样品的含水量 (%)	淀粉(干重): 水(总含水量)	峰值温度 °C (第一峰最大值)	其它峰最大值 °C
野生型 (Florida)	16.6	1 : 4.01	61	101
19 (T0)	10.5	1 : 3.99	58	100
20-25 (T1)	16.9	1 : 4.05	55	100
40-11-8 (T2)	16.9	1 : 3.98	56	100
STMP2*	10.9	1 : 4.00	60	101
STMP6	10.7	1 : 4.00	61	101

*化学磷酸化淀粉 STMP2 在 C6 位的磷酸含量为 3.0 μ mol 磷酸/g 淀粉。表 3 列出了其它所有磷酸数据。

实施例 5

不同淀粉的直链淀粉成分的 C6 P 含量测定

除了来自表达马铃薯 R1 基因的转基因小麦植物的淀粉之外，还研究了两种化学磷酸化淀粉(STMP3 和 STPP4)。化学磷酸化用 Lim 和 Seib (Cereal Chem. 70 (2), (1993), 137-144)所述的方法实现，其中淀粉在 pH 6 下反应 2 小时产生 STMP3，而在 pH 8 下反应 30 分钟产生 STPP4。缩写 STMP 代表选择的磷酸化试剂，即三间磷酸钠; STPP 代表三聚磷酸钠。

不同淀粉的直链淀粉成分如上所述分离(淀粉的直链淀粉成分通

过水浸析分离)。

C6 位的磷酸含量如上所述测定(葡萄糖单体 C6 位磷酸含量的测定)。

表 5:

样品	C6 P 含量 μmol 磷酸/g 淀粉	C6 P 含量 μmol 磷酸/g 直链淀粉	直链淀粉的 C6 P 含量/淀粉的 C6 P 含量
40-11-8 (T2)	10.7	1.9	0.18
STPP4	20.5	20.4	0.99
STMP3	6.0	5.1	0.85

可以看出，在化学磷酸化淀粉中，直链淀粉的 C6 P 含量与淀粉的 C6 P 含量之比大大高于来自超表达马铃薯 R1 基因的转基因小麦植物的淀粉。化学磷酸化淀粉中磷酸化直链淀粉的含量高于来自转基因小麦植物的淀粉。

实施例 6

由不同来源的面粉生产的小面包面包屑的 DSC 分析

用来自野生型小麦植物(Florida 品种)和超表达马铃薯 R1 基因的遗传修饰小麦植物的小麦粉生产小面包，采用下列食谱:

小麦粉 10.00 g

酵母 0.25 g

盐 0.20 g

葡萄糖 0.10 g

抗坏血酸 20 ppm

水 在吸水试验中确定并且根据稠度修正的水量(见方法"对小麦粉进行的小规模吸水试验程序")

遗传修饰的小麦植物的生面团在混合过程中变得非常粘。为了获得具有正确操作特性的生面团，使用少量的水。根据生面团硬度的技术感官知觉修正生面团的稠度。

生面团在验证箱中验证 45 分钟(28℃)，手工操作，第二次验证 15 分钟(28℃)，形成并置于烤罐中。随后对生面团进行 60 分钟的最

后验证(28℃)。面包在烤箱中焙烤 15 分钟(200℃)，罐嵌入潮湿的木框中。这样嵌入的目的是为烤罐遮挡辐射出的大量热量。最后，在没有木框的情况下烘焙面包 5 分钟，使面包皮变为棕色。

利用差示扫描量热法(DSC)(见方法)测定面包屑的热转化。在贮藏 1、3、7、14 天后测量面包屑的焓(图 6)。

图 6 显示贮藏的面包屑在贮藏 1、3、7、13 天后支链淀粉熔解峰的焓(40℃-70℃)，表示陈化作用。用野生型（Florida）面粉制成的面包屑的焓高于由超表达马铃薯 R1 基因的两种不同遗传修饰小麦植物系(GMO1 和 GMO2)的面粉制成的相同时间长度的面包屑。这表明，面包含有较低水平的再结晶淀粉，较少的淀粉退化和较少的陈化。

序列表:

SEQ ID No.1 (R1 cDNA 马铃薯，核苷酸序列 5061 bp，编码区：bp 216-bp 4607):

gaattgtaatacgactcactatagggcgaattgggtaccgggccccccctcgaggtcgacggtatcgataagctt
gatatcgaattcgcggccgcttttgcttcgtgaattcatcttcatcgaatttctcgacgcttcttcgctaatttcctcgttact
tcactagaaatcgacgtttctagctgaacttgagtgaattaagccagtgggaggatatgagtaattccttagggaat
aacttgctgtaccagggattcctaacctcaacagtgttggaacataaaagtagaatcagtcctccttgtgttggagg
caattctttgtttcaacaacaagtgatctcgaaatcacctttatcaactgagtttcgaggtaacaggttaaaggtgca
gaaaaagaaaatacctatgggaaagaaccgtgctttttctagttctcctcatgctgtacttaccactgatacctcttct
gagctagcagaaaagttcagtctagaagggaatattgagctacaggttgatgttaggcctcccacttcaggtgatg
tgtcctttgtggattttcaagctacaaatggtagtgataaactgtttttgcactgggggcagtaaagttcggaaaag
aaacatggtctcttcctaatgatcgtccagatgggaccaaagtgtacaagaacaaagcacttagaactccatttgtt
aaatctggctctaactccatcctgagactggagatacgggacactgctatcgaagctattgagtttctcatatacgat
gaagcctacgataaatggataaagaataatggtggcaattttcgtgtcaaattgtcaagaaaagagatacgagg
cccagatgtttcagttcctgaggagcttgtacagatccaatcatatttgaggtgggagaggaagggaaaacagaa
ttacacccctgagaaagagaaggaggaatatgaggctgctcgaactgagctacaggaggaaatagctcgtggt
gcttccatacaggacattcgagcaaggctaacaaaaactaatgataaaagtcaaagcaaagaagagcctcttc

gccgaactatcctccagaaaagcaaattgaagaactcgaagaagcaagaagagaattgcaacttgagcttga
gaaaggcattacccttgatgagttgcggaaaaagattacaaaaggggagataaaaactaaggcggaaaagc
acgtgaaaagaagctcttttgccgttgaaagaatccaaagaaagaagagagactttgggcagcttattaataagt
atccttccagtcctgcagtacaagtacaaaaggtcttggaagaaccaccagccttatctaaaattaagctgtatgc
caaggagaaggaggagcagattgatgatccgatccttaataaaaagatctttaaggtcgatgatggggagctac
tggtactggtagcaaagtcctctgggaagacaaaagtacatatagctacagatctgaatcagccaattactcttca
ctgggcattatccaaaagtcgtggagagtggatggtaccaccttcaagcatattgcctcctggatcaattattttaga
caaggctgccgaaacacctttttccgccagttcttctgatggtctaacttctaaggtacaatctttggatatagtaattg
aagatggcaattttgtggggatgccatttgttcttttgtctggtgaaaaatggattaagaaccaagggtcggatttctat
gttgacttcagtgctgcatccaaattagcactcaaggctgctggggatggcagtggaactgcaaagtctttactgg
ataaaatagcagatatggaaagtgaggctcagaagtcatttatgcaccggtttaatattgctgctgacttgatagaa
gatgccactagtgctggtgaacttggttttactggaattcttgtatggatgaggttcatggctacaaggcaactgatat
ggaacaaaaactataacgtaaaaccacgtgaaataagcaaggctcaggacagacttacagacttgttgcaga
atgctttcaccagtcaccctcaataccgtgaaattttgcggatgattatgtcaactgttggacgtggaggtgaaggg
gatgtaggacagcgaattagggatgaaattttggtcatccagaggaaaaatgactgcaagggtggtatgatgga
agaatggcatcagaaattgcataataatactagtcctgatgatgttgtgatctgtcaggcattgattgactacatcaa
gagtgattttgatcttggtgtttattggaaaaccctgaatgagaacggaataacaaaagagcgtcttttgagttatga
ccgtgctatccattctgaaccgaattttagaggagatcaaaagaatggtcttttgcgtgatttaggtcactatatgaga
acattgaaggctgttcattcaggtgcagatcttgagtctgctattgcaaactgcatgggctacaaaactgagggag
aaggctttatggttggagtccagataaatcctgtatcaggcttgccatctggctttcagggcctcctccattttgtcttag
accatgtggaagataaaaatgtggaaactcttcttgagggattgctagaggctcgtgaggagcttaggcccttgctt
ctcaaaccaaacaaccgtctaaaggatctgctgtttttggacatagcacttgattctacagttagaacagcagtaga
aaggggatatgaagaattgaacaacgctaatcctgagaaaatcatgtacttcatctccctcgttcttgaaaatctcg
cactctctgtggacgataatgaagatcttgtttattgcttgaagggatggaatcaagctctttcaatgtccaatggtgg
agacaaccattgggctttatttgcaaaagctgtacttgacagaatccgtcttgcacttgcaagcaaggcagagtgg
taccatcacttattgcagccatctgccgaatatctaggatcaatccttggggtggaccaatgggctttgaacatattta
ctgaagaaattatacgtgctggatcagcagcttcattatcctctcttcttaatagactcgatcccgtgcttcggaaaac
tgcaaatctaggaagttggcagattatcagtccagttgaagccgttggatatgttgtcgttgtggatgagttgctttca
gttcagaatgaaatctacaagaagcccacgatcttagtagcaaactctgttaaaggagaggaggaaattcctgat
ggtgctgttgccctgataacaccagacatgccagatgttctttcacatgtttctgttcgagctagaaatgggaaggttt
gctttgctacatgctttgatcccaatatattggctgacctccaagcaaaggaaggaaggattttgctcttaaagccta
caccttcagacataatctatagtgaggtgaatgagattgagctccaaagttcaagtaacttggtagaagctgaaac

atggttggagctaaatcacgtaatattgcatatctgaaaggaaaagtgccttcctcggtgggaattcctacgtcagt
agctcttccatttggagtctttgagaaagtactttcagacgacataaatcagggagtggcaaaagagttgcaaattc
tgacgaaaaaactatctgaaggagacttcagcgctcttggtgaaattcgcacaacgattttagatctttcagcacca
gctcaattggtcaaagagctgaaggaaaagatgcagggttctggcatgccttggcctggtgatgaaggtccaaa
gcggtgggaacaagcatggatggccataaaaaaggtgtgggcttcaaaatggaatgagagagcatacttcag
cacaaggaaggtgaaactggatcatgactatctgtgcatggctgtccttgttcaagaaataataaatgctgattatg
catttgtcattcacacaaccaacccatcttccggagacgactcagaaatatatgccgaggtggtcaggggccttg
gggaaacacttgttggagcttacccaggacgtgctttgagttttatctgcaagaaaaaggatctcaactctcctcaa
gtgttaggttacccaagcaaaccgatcggccttttcataaaaagatctatcatcttccgatctgattccaatggggaa
gatttggaaggttatgccggtgctggcctctacgacagtgtaccaatggatgaggaggaaaaagttgtaattgatt
actcttccgacccattgataactgatggtaacttccgccagacaatcctgtccaacattgctcgtgctggacatgcta
tcgaggagctatatggctctcctcaagacatcgagggtgtagtgagggatggaaagatttatgtcgttcagacaag
acctcagatgtgatcatattctcgttgtatgttgttcagagaagaccatagatgtgatcatattctcatggtatcagatct
gtgaccacttacctcccatgaagttgcctgtatgattatacgtgatccaaagccatcacatcatgttcaccttcagcta
ttggaggagaagtgagaagtaggaattgcaatatgaggaataataagaaaaactttgtagaagttaaattagctg
ggtatgatatagggagaaatgtgtaaacattgtactatatatagtatacacacgcattatgtatttgcattatgcactg
aataatatcgcagcatcaaagaagaaatcctttgagtggtttcaattgccgcggccgcgaattcctgcagcccgg
gggatccactagttctagagcggccgccaccgcggtggagctccagcttttgttccctttagtgagggttaatttt

SEQ ID No. 2(马铃薯 R1 蛋白，氨基酸序列：1464 个氨基酸)

MsnslgnnllyqgfltstvlehksrisppcvggnslfqqqviskspIstefrgnrlkvqkkkipMgknrafsssphavl
ttdtsselaekfslegnielqvdvrpptsgdvsfvdfqatngsdklflhwgavkfgketwslpndrpdgtkvyknkal
rtpfvksgsnsilrleirdtaieaiefliydeaydkwiknnggnfrvklsrkeirgpdvsvpeelvqiqsylrwerkgkq
nytpekekeeyeaartelqeeiargasiqdirarltktndksqskeeplhvtkseipddlaqaqayirwekagkpn
yppekqieeleearrelqlelekgitldelrkkitkgeiktkaekhvkrssfaveriqrkkrdfgqlinkypsspavqvq
kvleeppalskiklyakekeeqiddpilnkkifkvddgellvlvakssgktkvhiatdlnqpitlhwalsksrgewMv
ppssilppgsiildkaaetpfsasssdgltskvqsldiviedgnfvgMpfvllsgekwiknqgsdfyvdfsaasklal
kaagdgsgtakslldkiadMeseaqksfMhrfniaadliedatsagelgftgilywMrfMatrqliwnknynvkpr
eiskaqdrltdllqnaftshpqyreilrMiMstvgrggegdvgqrirdeilviqrkndckggMMeewhqklhnnts
pddvvicqalidyiksdfdlgvywktlnengitkerllsydraihsepnfrgdqkngllrdlghyMrtlkavhsgadle
saiancMgyktegegfMvgvqinpvsglpsgfqgllhfvldhvedknvetllegllearеelrplllkpnnrlkdllfld

drirlalaskaewyhhllqpsaeylgsilgvdqwalnifteeiiragsaaslssllnrldpvlrktanlgswqiispveav
gyvvvvvdellsvqneiykkptilvansvkgeeeipdgavalitpdMpdvlshvsvrarngkvcfatcfdpniladlq
akegrilllkptpsdiiysevneielqsssnlveaetsatlrlvkkqfggcyaisadeftseMvgaksrniaylkgkvp
ssvgiptsvalpfgvfekvlsddinqgvakelqiltkklsegdfsalgeirttildlsapaqlvkelkekMqgsgMpw
pgdegpkrweqawMaikkvwaskwnerayfstrkvkldhdylcMavlvqeiinadyafvihttnpssgddsei
yaevvrglgetlvgaypgralsfickkkdlnspqvlgypskpiglfikrsiifrsdsngedlegyagaglydsvpMde
eekvvidyssdplitdgnfrqtilsniaraghaieelygspqdiegvvrdgkiyvvqtrpqM

序列表

<110> Aventis CropScience GmbH

<120> 合成改性淀粉的单子叶植物细胞和植物

<130> 2000/M 233

<140>
<141>

<150> DE 10052492.3

<151> 2000-10-23

<150> DE 10064805.3

<151> 2000-12-22

<160> 16

<170> Patent in Ver. 2.1

<210> 1
<211> 5061
<212> DNA
<213> 马铃薯 (Solanum tuberosum)

<220>
<221> CDS
<222> (216)..(4607)

<400> 1
gaattgtaat acgactcact atagggcgaa ttgggtaccg ggcccccccct cgaggtcgac 60

ggtatcgata agcttgatat cgaattcgcg gccgcttttg cttcgtgaat tcatcttcat 120

cgaatttctc gacgcttctt cgctaatttc ctcgttactt cactagaaat cgacgtttct 180

agctgaactt gagtgaatta agccagtggg aggat atg agt aat tcc tta ggg 233
Met Ser Asn Ser Leu Gly
1 5

aat aac ttg ctg tac cag gga ttc cta acc tca aca gtg ttg gaa cat 281
Asn Asn Leu Leu Tyr Gln Gly Phe Leu Thr Ser Thr Val Leu Glu His
10 15 20

```
aaa agt aga atc agt cct cct tgt gtt gga ggc aat tct ttg ttt caa   329
Lys Ser Arg Ile Ser Pro Pro Cys Val Gly Gly Asn Ser Leu Phe Gln
         25                  30                  35

caa caa gtg atc tcg aaa tca cct tta tca act gag ttt cga ggt aac   377
Gln Gln Val Ile Ser Lys Ser Pro Leu Ser Thr Glu Phe Arg Gly Asn
     40                  45                  50

agg tta aag gtg cag aaa aag aaa ata cct atg gga aag aac cgt gct   425
Arg Leu Lys Val Gln Lys Lys Lys Ile Pro Met Gly Lys Asn Arg Ala
 55                  60                  65                  70

ttt tct agt tct cct cat gct gta ctt acc act gat acc tct tct gag   473
Phe Ser Ser Ser Pro His Ala Val Leu Thr Thr Asp Thr Ser Ser Glu
                 75                  80                  85

cta gca gaa aag ttc agt cta gaa ggg aat att gag cta cag gtt gat   521
Leu Ala Glu Lys Phe Ser Leu Glu Gly Asn Ile Glu Leu Gln Val Asp
             90                  95                 100

gtt agg cct ccc act tca ggt gat gtg tcc ttt gtg gat ttt caa gct   569
Val Arg Pro Pro Thr Ser Gly Asp Val Ser Phe Val Asp Phe Gln Ala
        105                 110                 115

aca aat ggt agt gat aaa ctg ttt ttg cac tgg ggg gca gta aag ttc   617
Thr Asn Gly Ser Asp Lys Leu Phe Leu His Trp Gly Ala Val Lys Phe
    120                 125                 130

gga aaa gaa aca tgg tct ctt cct aat gat cgt cca gat ggg acc aaa   665
Gly Lys Glu Thr Trp Ser Leu Pro Asn Asp Arg Pro Asp Gly Thr Lys
135                 140                 145                 150

gtg tac aag aac aaa gca ctt aga act cca ttt gtt aaa tct ggc tct   713
Val Tyr Lys Asn Lys Ala Leu Arg Thr Pro Phe Val Lys Ser Gly Ser
                155                 160                 165

aac tcc atc ctg aga ctg gag ata cgg gac act gct atc gaa gct att   761
Asn Ser Ile Leu Arg Leu Glu Ile Arg Asp Thr Ala Ile Glu Ala Ile
            170                 175                 180

gag ttt ctc ata tac gat gaa gcc tac gat aaa tgg ata aag aat aat   809
Glu Phe Leu Ile Tyr Asp Glu Ala Tyr Asp Lys Trp Ile Lys Asn Asn
        185                 190                 195
```

```
ggt ggc aat ttt cgt gtc aaa ttg tca aga aaa gag ata cga ggc cca   857
Gly Gly Asn Phe Arg Val Lys Leu Ser Arg Lys Glu Ile Arg Gly Pro
    200                 205                 210

gat gtt tca gtt cct gag gag ctt gta cag atc caa tca tat ttg agg   905
Asp Val Ser Val Pro Glu Glu Leu Val Gln Ile Gln Ser Tyr Leu Arg
215                 220                 225                 230

tgg gag agg aag gga aaa cag aat tac acc cct gag aaa gag aag gag   953
Trp Glu Arg Lys Gly Lys Gln Asn Tyr Thr Pro Glu Lys Glu Lys Glu
                235                 240                 245

gaa tat gag gct gct cga act gag cta cag gag gaa ata gct cgt ggt   1001
Glu Tyr Glu Ala Ala Arg Thr Glu Leu Gln Glu Glu Ile Ala Arg Gly
            250                 255                 260

gct tcc ata cag gac att cga gca agg cta aca aaa act aat gat aaa   1049
Ala Ser Ile Gln Asp Ile Arg Ala Arg Leu Thr Lys Thr Asn Asp Lys
        265                 270                 275

agt caa agc aaa gaa gag cct ctt cat gta aca aag agt gaa ata cct   1097
Ser Gln Ser Lys Glu Glu Pro Leu His Val Thr Lys Ser Glu Ile Pro
    280                 285                 290

gat gac ctt gcc caa gca caa gct tac att agg tgg gag aaa gca gga   1145
Asp Asp Leu Ala Gln Ala Gln Ala Tyr Ile Arg Trp Glu Lys Ala Gly
295                 300                 305                 310


aag ccg aac tat cct cca gaa aag caa att gaa gaa ctc gaa gaa gca   1193
Lys Pro Asn Tyr Pro Pro Glu Lys Gln Ile Glu Glu Leu Glu Glu Ala
                315                 320                 325

aga aga gaa ttg caa ctt gag ctt gag aaa ggc att acc ctt gat gag   1241
Arg Arg Glu Leu Gln Leu Glu Leu Glu Lys Gly Ile Thr Leu Asp Glu
            330                 335                 340

ttg cgg aaa aag att aca aaa ggg gag ata aaa act aag gcg gaa aag   1289
Leu Arg Lys Lys Ile Thr Lys Gly Glu Ile Lys Thr Lys Ala Glu Lys
        345                 350                 355

cac gtg aaa aga agc tct ttt gcc gtt gaa aga atc caa aga aag aag   1337
His Val Lys Arg Ser Ser Phe Ala Val Glu Arg Ile Gln Arg Lys Lys
    360                 365                 370
```

```
aga gac ttt ggg cag ctt att aat aag tat cct tcc agt cct gca gta   1385
Arg Asp Phe Gly Gln Leu Ile Asn Lys Tyr Pro Ser Ser Pro Ala Val
375                 380                 385                 390

caa gta caa aag gtc ttg gaa gaa cca cca gcc tta tct aaa att aag   1433
Gln Val Gln Lys Val Leu Glu Glu Pro Pro Ala Leu Ser Lys Ile Lys
                395                 400                 405

ctg tat gcc aag gag aag gag gag cag att gat gat ccg atc ctt aat   1481
Leu Tyr Ala Lys Glu Lys Glu Glu Gln Ile Asp Asp Pro Ile Leu Asn
            410                 415                 420

aaa aag atc ttt aag gtc gat gat ggg gag cta ctg gta ctg gta gca   1529
Lys Lys Ile Phe Lys Val Asp Asp Gly Glu Leu Leu Val Leu Val Ala
        425                 430                 435

aag tcc tct ggg aag aca aaa gta cat ata gct aca gat ctg aat cag   1577
Lys Ser Ser Gly Lys Thr Lys Val His Ile Ala Thr Asp Leu Asn Gln
    440                 445                 450

cca att act ctt cac tgg gca tta tcc aaa agt cgt gga gag tgg atg   1625
Pro Ile Thr Leu His Trp Ala Leu Ser Lys Ser Arg Gly Glu Trp Met
455                 460                 465                 470

gta cca cct tca agc ata ttg cct cct gga tca att att tta gac aag   1673
Val Pro Pro Ser Ser Ile Leu Pro Pro Gly Ser Ile Ile Leu Asp Lys
                475                 480                 485

gct gcc gaa aca cct ttt tcc gcc agt tct tct gat ggt cta act tct   1721
Ala Ala Glu Thr Pro Phe Ser Ala Ser Ser Ser Asp Gly Leu Thr Ser
            490                 495                 500

aag gta caa tct ttg gat ata gta att gaa gat ggc aat ttt gtg ggg   1769
Lys Val Gln Ser Leu Asp Ile Val Ile Glu Asp Gly Asn Phe Val Gly
        505                 510                 515

atg cca ttt gtt ctt ttg tct ggt gaa aaa tgg att aag aac caa ggg   1817
Met Pro Phe Val Leu Leu Ser Gly Glu Lys Trp Ile Lys Asn Gln Gly
    520                 525                 530

tcg gat ttc tat gtt gac ttc agt gct gca tcc aaa tta gca ctc aag   1865
Ser Asp Phe Tyr Val Asp Phe Ser Ala Ala Ser Lys Leu Ala Leu Lys
535                 540                 545                 550
```

```
gct gct ggg gat ggc agt gga act gca aag tct tta ctg gat aaa ata   1913
Ala Ala Gly Asp Gly Ser Gly Thr Ala Lys Ser Leu Leu Asp Lys Ile
                555                 560                 565

gca gat atg gaa agt gag gct cag aag tca ttt atg cac cgg ttt aat   1961
Ala Asp Met Glu Ser Glu Ala Gln Lys Ser Phe Met His Arg Phe Asn
            570                 575                 580

att gct gct gac ttg ata gaa gat gcc act agt gct ggt gaa ctt ggt   2009
Ile Ala Ala Asp Leu Ile Glu Asp Ala Thr Ser Ala Gly Glu Leu Gly
        585                 590                 595

ttt act gga att ctt gta tgg atg agg ttc atg gct aca agg caa ctg   2057
Phe Thr Gly Ile Leu Val Trp Met Arg Phe Met Ala Thr Arg Gln Leu
    600                 605                 610

ata tgg aac aaa aac tat aac gta aaa cca cgt gaa ata agc aag gct   2105
Ile Trp Asn Lys Asn Tyr Asn Val Lys Pro Arg Glu Ile Ser Lys Ala
615                 620                 625                 630

cag gac aga ctt aca gac ttg ttg cag aat gct ttc acc agt cac cct   2153
Gln Asp Arg Leu Thr Asp Leu Leu Gln Asn Ala Phe Thr Ser His Pro
                635                 640                 645

caa tac cgt gaa att ttg cgg atg att atg tca act gtt gga cgt gga   2201
Gln Tyr Arg Glu Ile Leu Arg Met Ile Met Ser Thr Val Gly Arg Gly
            650                 655                 660

ggt gaa ggg gat gta gga cag cga att agg gat gaa att ttg gtc atc   2249
Gly Glu Gly Asp Val Gly Gln Arg Ile Arg Asp Glu Ile Leu Val Ile
        665                 670                 675

cag agg aaa aat gac tgc aag ggt ggt atg atg gaa gaa tgg cat cag   2297
Gln Arg Lys Asn Asp Cys Lys Gly Gly Met Met Glu Glu Trp His Gln
    680                 685                 690

aaa ttg cat aat aat act agt cct gat gat gtt gtg atc tgt cag gca   2345
Lys Leu His Asn Asn Thr Ser Pro Asp Asp Val Val Ile Cys Gln Ala
695                 700                 705                 710

ttg att gac tac atc aag agt gat ttt gat ctt ggt gtt tat tgg aaa   2393
Leu Ile Asp Tyr Ile Lys Ser Asp Phe Asp Leu Gly Val Tyr Trp Lys
                715                 720                 725

acc ctg aat gag aac gga ata aca aaa gag cgt ctt ttg agt tat gac   2441
```

```
Thr Leu Asn Glu Asn Gly Ile Thr Lys Glu Arg Leu Leu Ser Tyr Asp
            730                 735                 740

cgt gct atc cat tct gaa ccg aat ttt aga gga gat caa aag aat ggt   2489
Arg Ala Ile His Ser Glu Pro Asn Phe Arg Gly Asp Gln Lys Asn Gly
        745                 750                 755

ctt ttg cgt gat tta ggt cac tat atg aga aca ttg aag gct gtt cat   2537
Leu Leu Arg Asp Leu Gly His Tyr Met Arg Thr Leu Lys Ala Val His
    760                 765                 770

tca ggt gca gat ctt gag tct gct att gca aac tgc atg ggc tac aaa   2585
Ser Gly Ala Asp Leu Glu Ser Ala Ile Ala Asn Cys Met Gly Tyr Lys
775                 780                 785                 790


act gag gga gaa ggc ttt atg gtt gga gtc cag ata aat cct gta tca   2633
Thr Glu Gly Glu Gly Phe Met Val Gly Val Gln Ile Asn Pro Val Ser
                795                 800                 805

ggc ttg cca tct ggc ttt cag ggc ctc ctc cat ttt gtc tta gac cat   2681
Gly Leu Pro Ser Gly Phe Gln Gly Leu Leu His Phe Val Leu Asp His
            810                 815                 820

gtg gaa gat aaa aat gtg gaa act ctt ctt gag gga ttg cta gag gct   2729
Val Glu Asp Lys Asn Val Glu Thr Leu Leu Glu Gly Leu Leu Glu Ala
        825                 830                 835

cgt gag gag ctt agg ccc ttg ctt ctc aaa cca aac aac cgt cta aag   2777
Arg Glu Glu Leu Arg Pro Leu Leu Leu Lys Pro Asn Asn Arg Leu Lys
    840                 845                 850

gat ctg ctg ttt ttg gac ata gca ctt gat tct aca gtt aga aca gca   2825
Asp Leu Leu Phe Leu Asp Ile Ala Leu Asp Ser Thr Val Arg Thr Ala
855                 860                 865                 870

gta gaa agg gga tat gaa gaa ttg aac aac gct aat cct gag aaa atc   2873
Val Glu Arg Gly Tyr Glu Glu Leu Asn Asn Ala Asn Pro Glu Lys Ile
                875                 880                 885

atg tac ttc atc tcc ctc gtt ctt gaa aat ctc gca ctc tct gtg gac   2921
Met Tyr Phe Ile Ser Leu Val Leu Glu Asn Leu Ala Leu Ser Val Asp
            890                 895                 900

gat aat gaa gat ctt gtt tat tgc ttg aag gga tgg aat caa gct ctt   2969
```

```
Asp Asn Glu Asp Leu Val Tyr Cys Leu Lys Gly Trp Asn Gln Ala Leu
        905                 910                 915

tca atg tcc aat ggt gga gac aac cat tgg gct tta ttt gca aaa gct   3017
Ser Met Ser Asn Gly Gly Asp Asn His Trp Ala Leu Phe Ala Lys Ala
    920                 925                 930

gta ctt gac aga atc cgt ctt gca ctt gca agc aag gca gag tgg tac   3065
Val Leu Asp Arg Ile Arg Leu Ala Leu Ala Ser Lys Ala Glu Trp Tyr
935                 940                 945                 950

cat cac tta ttg cag cca tct gcc gaa tat cta gga tca atc ctt ggg   3113
His His Leu Leu Gln Pro Ser Ala Glu Tyr Leu Gly Ser Ile Leu Gly
                955                 960                 965

gtg gac caa tgg gct ttg aac ata ttt act gaa gaa att ata cgt gct   3161
Val Asp Gln Trp Ala Leu Asn Ile Phe Thr Glu Glu Ile Ile Arg Ala
            970                 975                 980

gga tca gca gct tca tta tcc tct ctt ctt aat aga ctc gat ccc gtg   3209
Gly Ser Ala Ala Ser Leu Ser Ser Leu Leu Asn Arg Leu Asp Pro Val
        985                 990                 995

ctt cgg aaa act gca aat cta gga agt tgg cag att atc agt cca gtt   3257
Leu Arg Lys Thr Ala Asn Leu Gly Ser Trp Gln Ile Ile Ser Pro Val
   1000                1005                1010

gaa gcc gtt gga tat gtt gtc gtt gtg gat gag ttg ctt tca gtt cag   3305
Glu Ala Val Gly Tyr Val Val Val Val Asp Glu Leu Leu Ser Val Gln
1015                1020                1025                1030


aat gaa atc tac aag aag ccc acg atc tta gta gca aac tct gtt aaa   3353
Asn Glu Ile Tyr Lys Lys Pro Thr Ile Leu Val Ala Asn Ser Val Lys
               1035                1040                1045

gga gag gag gaa att cct gat ggt gct gtt gcc ctg ata aca cca gac   3401
Gly Glu Glu Glu Ile Pro Asp Gly Ala Val Ala Leu Ile Thr Pro Asp
           1050                1055                1060

atg cca gat gtt ctt tca cat gtt tct gtt cga gct aga aat ggg aag   3449
Met Pro Asp Val Leu Ser His Val Ser Val Arg Ala Arg Asn Gly Lys
       1065                1070                1075

gtt tgc ttt gct aca tgc ttt gat ccc aat ata ttg gct gac ctc caa   3497
```

```
Val Cys Phe Ala Thr Cys Phe Asp Pro Asn Ile Leu Ala Asp Leu Gln
  1080                1085                1090

gca aag gaa gga agg att ttg ctc tta aag cct aca cct tca gac ata   3545
Ala Lys Glu Gly Arg Ile Leu Leu Leu Lys Pro Thr Pro Ser Asp Ile
1095              1100                1105                1110

atc tat agt gag gtg aat gag att gag ctc caa agt tca agt aac ttg   3593
Ile Tyr Ser Glu Val Asn Glu Ile Glu Leu Gln Ser Ser Ser Asn Leu
              1115                1120                1125

gta gaa gct gaa act tca gca aca ctt aga ttg gtg aaa aag caa ttt   3641
Val Glu Ala Glu Thr Ser Ala Thr Leu Arg Leu Val Lys Lys Gln Phe
          1130                1135                1140

ggt ggt tgt tac gca ata tca gca gat gaa ttc aca agt gaa atg gtt   3689
Gly Gly Cys Tyr Ala Ile Ser Ala Asp Glu Phe Thr Ser Glu Met Val
      1145                1150                1155

gga gct aaa tca cgt aat att gca tat ctg aaa gga aaa gtg cct tcc   3737
Gly Ala Lys Ser Arg Asn Ile Ala Tyr Leu Lys Gly Lys Val Pro Ser
  1160                1165                1170

tcg gtg gga att cct acg tca gta gct ctt cca ttt gga gtc ttt gag   3785
Ser Val Gly Ile Pro Thr Ser Val Ala Leu Pro Phe Gly Val Phe Glu
1175              1180                1185                1190

aaa gta ctt tca gac gac ata aat cag gga gtg gca aaa gag ttg caa   3833
Lys Val Leu Ser Asp Asp Ile Asn Gln Gly Val Ala Lys Glu Leu Gln
              1195                1200                1205

att ctg acg aaa aaa cta tct gaa gga gac ttc agc gct ctt ggt gaa   3881
Ile Leu Thr Lys Lys Leu Ser Glu Gly Asp Phe Ser Ala Leu Gly Glu
          1210                1215                1220

att cgc aca acg att tta gat ctt tca gca cca gct caa ttg gtc aaa   3929
Ile Arg Thr Thr Ile Leu Asp Leu Ser Ala Pro Ala Gln Leu Val Lys
      1225                1230                1235

gag ctg aag gaa aag atg cag ggt tct ggc atg cct tgg cct ggt gat   3977
Glu Leu Lys Glu Lys Met Gln Gly Ser Gly Met Pro Trp Pro Gly Asp
  1240                1245                1250

gaa ggt cca aag cgg tgg gaa caa gca tgg atg gcc ata aaa aag gtg   4025
Glu Gly Pro Lys Arg Trp Glu Gln Ala Trp Met Ala Ile Lys Lys Val
```

```
1255                1260                1265                1270

tgg gct tca aaa tgg aat gag aga gca tac ttc agc aca agg aag gtg   4073
Trp Ala Ser Lys Trp Asn Glu Arg Ala Tyr Phe Ser Thr Arg Lys Val
                1275                1280                1285

aaa ctg gat cat gac tat ctg tgc atg gct gtc ctt gtt caa gaa ata   4121
Lys Leu Asp His Asp Tyr Leu Cys Met Ala Val Leu Val Gln Glu Ile
            1290                1295                1300

ata aat gct gat tat gca ttt gtc att cac aca acc aac cca tct tcc   4169
Ile Asn Ala Asp Tyr Ala Phe Val Ile His Thr Thr Asn Pro Ser Ser
        1305                1310                1315

gga gac gac tca gaa ata tat gcc gag gtg gtc agg ggc ctt ggg gaa   4217
Gly Asp Asp Ser Glu Ile Tyr Ala Glu Val Val Arg Gly Leu Gly Glu
    1320                1325                1330

aca ctt gtt gga gct tac cca gga cgt gct ttg agt ttt atc tgc aag   4265
Thr Leu Val Gly Ala Tyr Pro Gly Arg Ala Leu Ser Phe Ile Cys Lys
1335                1340                1345                1350

aaa aag gat ctc aac tct cct caa gtg tta ggt tac cca agc aaa ccg   4313
Lys Lys Asp Leu Asn Ser Pro Gln Val Leu Gly Tyr Pro Ser Lys Pro
                1355                1360                1365

atc ggc ctt ttc ata aaa aga tct atc atc ttc cga tct gat tcc aat   4361
Ile Gly Leu Phe Ile Lys Arg Ser Ile Ile Phe Arg Ser Asp Ser Asn
            1370                1375                1380

ggg gaa gat ttg gaa ggt tat gcc ggt gct ggc ctc tac gac agt gta   4409
Gly Glu Asp Leu Glu Gly Tyr Ala Gly Ala Gly Leu Tyr Asp Ser Val
        1385                1390                1395

cca atg gat gag gag gaa aaa gtt gta att gat tac tct tcc gac cca   4457
Pro Met Asp Glu Glu Glu Lys Val Val Ile Asp Tyr Ser Ser Asp Pro
    1400                1405                1410

ttg ata act gat ggt aac ttc cgc cag aca atc ctg tcc aac att gct   4505
Leu Ile Thr Asp Gly Asn Phe Arg Gln Thr Ile Leu Ser Asn Ile Ala
1415                1420                1425                1430

cgt gct gga cat gct atc gag gag cta tat ggc tct cct caa gac atc   4553
Arg Ala Gly His Ala Ile Glu Glu Leu Tyr Gly Ser Pro Gln Asp Ile
```

1435 1440 1445

gag ggt gta gtg agg gat gga aag att tat gtc gtt cag aca aga cct 4601
Glu Gly Val Val Arg Asp Gly Lys Ile Tyr Val Val Gln Thr Arg Pro
1450 1455 1460

cag atg tgatcatatt ctcgttgtat gttgttcaga gaagaccata gatgtgatca 4657
Gln Met

tattctcatg gtatcagatc tgtgaccact tacctcccat gaagttgcct gtatgattat 4717

acgtgatcca aagccatcac atcatgttca ccttcagcta ttggaggaga agtgagaagt 4777

aggaattgca atatgaggaa taataagaaa aactttgtag aagttaaatt agctgggtat 4837

gatataggga gaaatgtgta aacattgtac tatatatagt atacacacgc attatgtatt 4897

tgcattatgc actgaataat atcgcagcat caaagaagaa atcctttgag tggtttcaat 4957

tgccgcggcc gcgaattcct gcagcccggg ggatccacta gttctagagc ggccgccacc 5017

gcggtggagc tccagctttt gttcccttta gtgagggtta attt 5061

<210> 2
<211> 1464
<212> PRT
<213> 马铃薯

<400> 2
Met Ser Asn Ser Leu Gly Asn Asn Leu Leu Tyr Gln Gly Phe Leu Thr
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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


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

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

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

Arg Trp Glu Lys Ala Gly Lys Pro Asn Tyr Pro Pro Glu Lys Gln Ile
```

305 310 315 320

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Lys Leu Ala Leu Lys Ala Ala Gly Asp Gly Ser Gly Thr Ala Lys

545 550 555 560

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

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

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

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

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

Ala Phe Thr Ser His Pro Gln Tyr Arg Glu Ile Leu Arg Met Ile Met
645 650 655

Ser Thr Val Gly Arg Gly Gly Glu Gly Asp Val Gly Gln Arg Ile Arg
660 665 670

Asp Glu Ile Leu Val Ile Gln Arg Lys Asn Asp Cys Lys Gly Gly Met
675 680 685

Met Glu Glu Trp His Gln Lys Leu His Asn Asn Thr Ser Pro Asp Asp
690 695 700

Val Val Ile Cys Gln Ala Leu Ile Asp Tyr Ile Lys Ser Asp Phe Asp
705 710 715 720

Leu Gly Val Tyr Trp Lys Thr Leu Asn Glu Asn Gly Ile Thr Lys Glu
725 730 735

Arg Leu Leu Ser Tyr Asp Arg Ala Ile His Ser Glu Pro Asn Phe Arg
740 745 750

Gly Asp Gln Lys Asn Gly Leu Leu Arg Asp Leu Gly His Tyr Met Arg
755 760 765

Thr Leu Lys Ala Val His Ser Gly Ala Asp Leu Glu Ser Ala Ile Ala
770 775 780

```
Asn Cys Met Gly Tyr Lys Thr Glu Gly Glu Gly Phe Met Val Gly Val
785                 790                 795                 800

Gln Ile Asn Pro Val Ser Gly Leu Pro Ser Gly Phe Gln Gly Leu Leu
                805                 810                 815

His Phe Val Leu Asp His Val Glu Asp Lys Asn Val Glu Thr Leu Leu
            820                 825                 830

Glu Gly Leu Leu Glu Ala Arg Glu Glu Leu Arg Pro Leu Leu Leu Lys
        835                 840                 845

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

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

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


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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Leu Leu Ser Val Gln Asn Glu Ile Tyr Lys Lys Pro Thr Ile Leu
1025 1030 1035 1040

Val Ala Asn Ser Val Lys Gly Glu Glu Glu Ile Pro Asp Gly Ala Val
1045 1050 1055

Ala Leu Ile Thr Pro Asp Met Pro Asp Val Leu Ser His Val Ser Val
1060 1065 1070

Arg Ala Arg Asn Gly Lys Val Cys Phe Ala Thr Cys Phe Asp Pro Asn
1075 1080 1085

Ile Leu Ala Asp Leu Gln Ala Lys Glu Gly Arg Ile Leu Leu Leu Lys
1090 1095 1100

Pro Thr Pro Ser Asp Ile Ile Tyr Ser Glu Val Asn Glu Ile Glu Leu
1105 1110 1115 1120

Gln Ser Ser Ser Asn Leu Val Glu Ala Glu Thr Ser Ala Thr Leu Arg
1125 1130 1135

Leu Val Lys Lys Gln Phe Gly Gly Cys Tyr Ala Ile Ser Ala Asp Glu
1140 1145 1150

Phe Thr Ser Glu Met Val Gly Ala Lys Ser Arg Asn Ile Ala Tyr Leu
1155 1160 1165

Lys Gly Lys Val Pro Ser Ser Val Gly Ile Pro Thr Ser Val Ala Leu
1170 1175 1180

Pro Phe Gly Val Phe Glu Lys Val Leu Ser Asp Asp Ile Asn Gln Gly
1185 1190 1195 1200

Val Ala Lys Glu Leu Gln Ile Leu Thr Lys Lys Leu Ser Glu Gly Asp
1205 1210 1215

Phe Ser Ala Leu Gly Glu Ile Arg Thr Thr Ile Leu Asp Leu Ser Ala
1220 1225 1230

Pro Ala Gln Leu Val Lys Glu Leu Lys Glu Lys Met Gln Gly Ser Gly
1235 1240 1245

Met Pro Trp Pro Gly Asp Glu Gly Pro Lys Arg Trp Glu Gln Ala Trp
1250 1255 1260

Met Ala Ile Lys Lys Val Trp Ala Ser Lys Trp Asn Glu Arg Ala Tyr
1265 1270 1275 1280

Phe Ser Thr Arg Lys Val Lys Leu Asp His Asp Tyr Leu Cys Met Ala
1285 1290 1295

Val Leu Val Gln Glu Ile Ile Asn Ala Asp Tyr Ala Phe Val Ile His
1300 1305 1310

Thr Thr Asn Pro Ser Ser Gly Asp Asp Ser Glu Ile Tyr Ala Glu Val
1315 1320 1325

Val Arg Gly Leu Gly Glu Thr Leu Val Gly Ala Tyr Pro Gly Arg Ala
1330 1335 1340

Leu Ser Phe Ile Cys Lys Lys Lys Asp Leu Asn Ser Pro Gln Val Leu
1345 1350 1355 1360

Gly Tyr Pro Ser Lys Pro Ile Gly Leu Phe Ile Lys Arg Ser Ile Ile
1365 1370 1375

Phe Arg Ser Asp Ser Asn Gly Glu Asp Leu Glu Gly Tyr Ala Gly Ala
1380 1385 1390

Gly Leu Tyr Asp Ser Val Pro Met Asp Glu Glu Glu Lys Val Val Ile
1395 1400 1405

Asp Tyr Ser Ser Asp Pro Leu Ile Thr Asp Gly Asn Phe Arg Gln Thr
1410 1415 1420

Ile Leu Ser Asn Ile Ala Arg Ala Gly His Ala Ile Glu Glu Leu Tyr
1425 1430 1435 1440

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

Val Val Gln Thr Arg Pro Gln Met
1460

<210> 3
<211> 6

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：部分序列

<400> 3
Asp Lys Ala Ala Glu Thr
1 5

<210> 4
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：部分序列
<400> 4
Ile Ala Asp Met Glu
1 5

<210> 5
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：部分序列

<400> 5
Val Trp Met Arg Phe Met
1 5

<210> 6
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：部分序列

<400> 6

Met Gln Glu Trp His Gln
1 5

<210> 7
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：部分序列
<400> 7
Leu Gly His Tyr Met
1 5

<210> 8
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：部分序列
<400> 8
Glu Arg Gly Tyr Glu Glu
1 5

<210> 9
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：部分序列

<400> 9
Lys Ala Val Leu Asp Arg
1 5

<210> 10
<211> 5
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：部分序列
<400> 10
Leu Ser Ser Leu Leu
1 5

<210> 11
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：部分序列

<400> 11
Ile Pro Asp Gly Ala Val
1 5

<210> 12
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：部分序列
<400> 12
Lys Val Cys Phe Ala Thr
1 5

<210> 13
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：部分序列

<400> 13
Ile Ser Ala Asp Glu Phe
1 5

<210> 14
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：部分序列
<400> 14
Pro Phe Gly Val Phe Glu
1 5

<210> 15
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：部分序列
<400> 15
Ser Ser Gly Asp Asp
1 5

<210> 16
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：部分序列

<400> 16
Ser Phe Ile Cys Lys Lys
1 5

图1

RVA-图

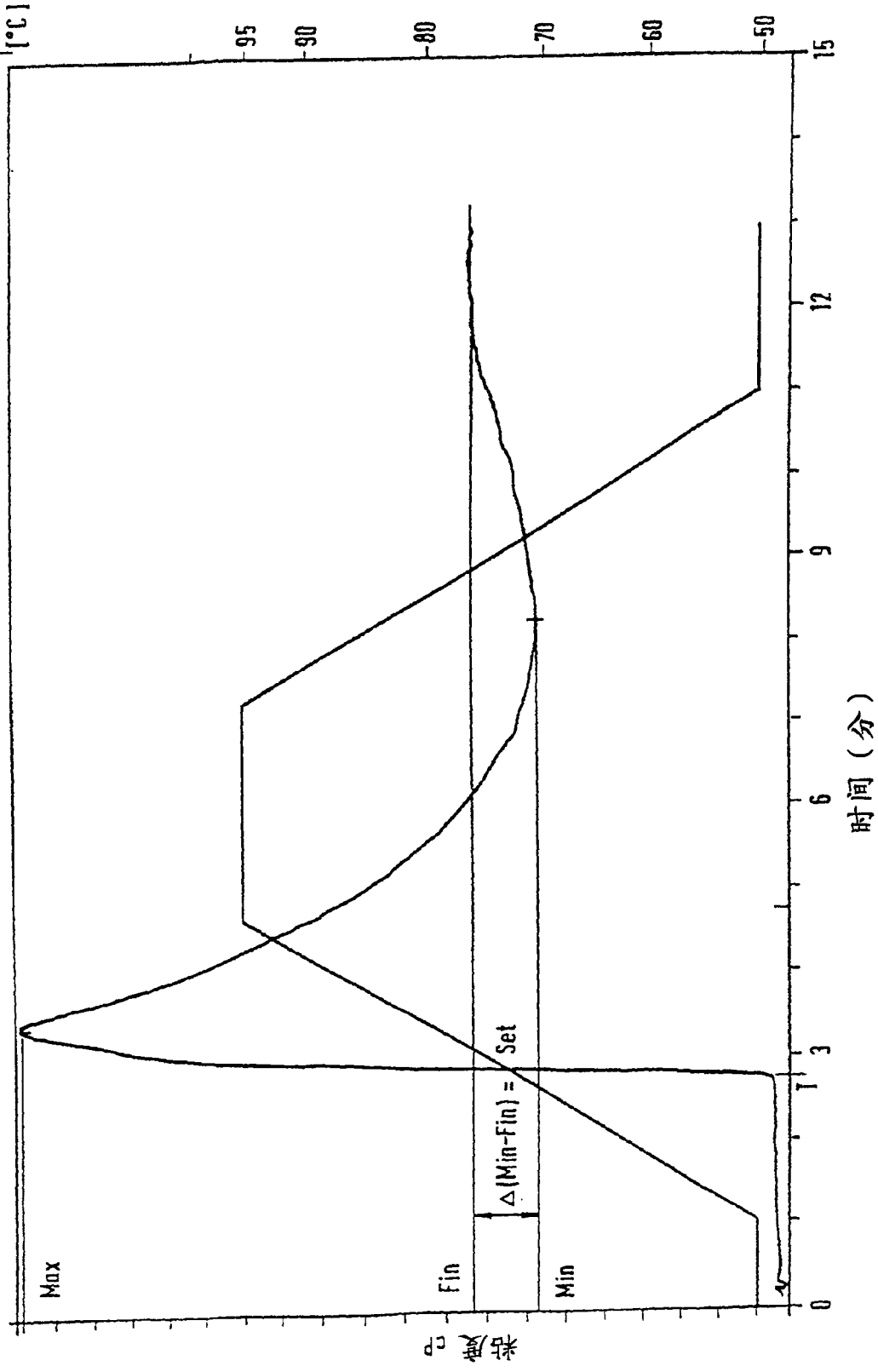


图 2

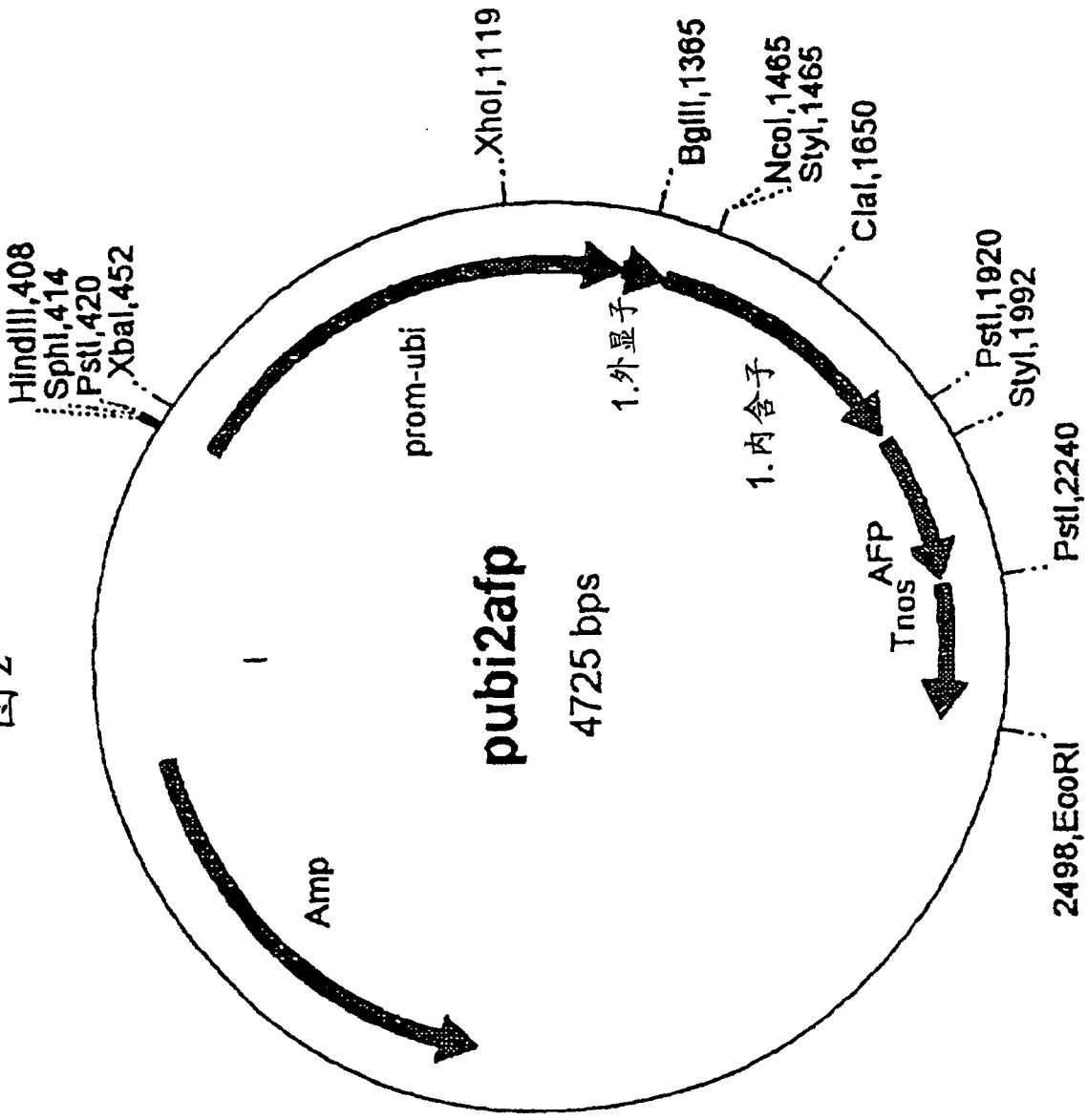

pubi2afp
4725 bps
prom-ubi
1.外显子
1.内含子
AFP
Tnos
Amp
HindIII,408
SphI,414
PstI,420
XbaI,452
XhoI,1119
BglII,1365
NcoI,1465
StyI,1465
ClaI,1650
PstI,1920
StyI,1992
PstI,2240
2498,EcoRI

图 3

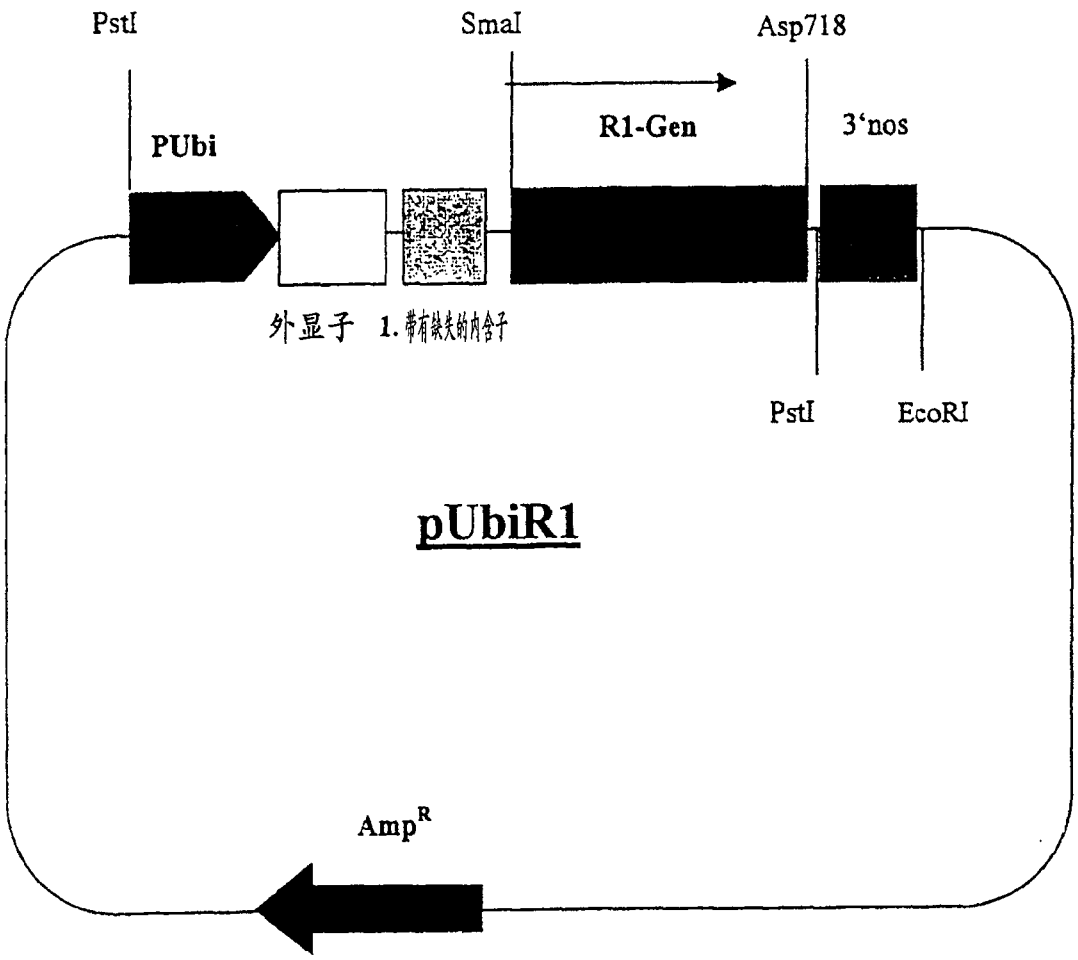

PstI
SmaI
Asp718
PUbi
R1-Gen
3'nos
外显子 1.带有缺失的内含子
PstI
EcoRI
pUbiR1
Amp^R

图4

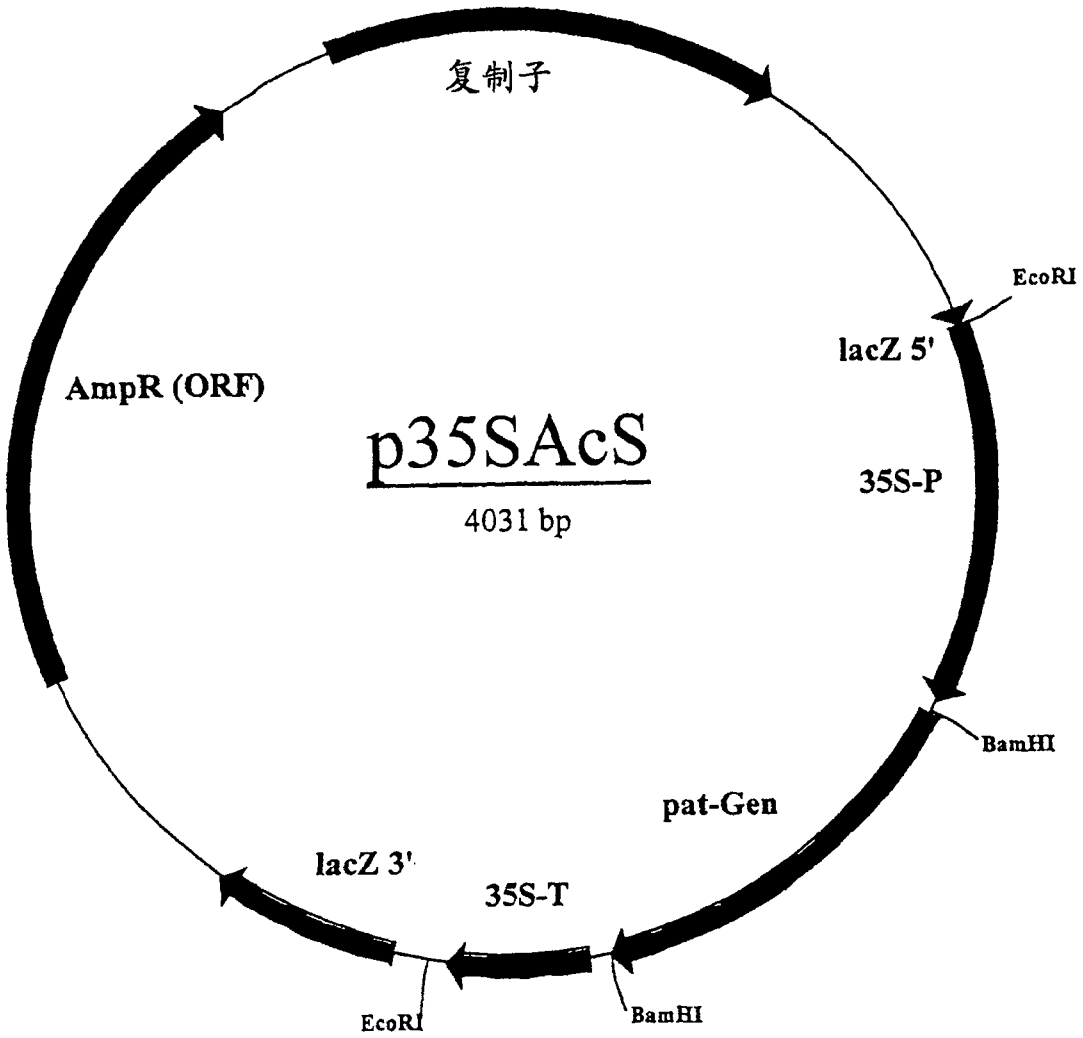

复制子
EcoRI
lacZ 5'
AmpR (ORF)
p35SAcS
4031 bp
35S-P
BamHI
pat-Gen
lacZ 3'
35S-T
EcoRI
BamHI

图5

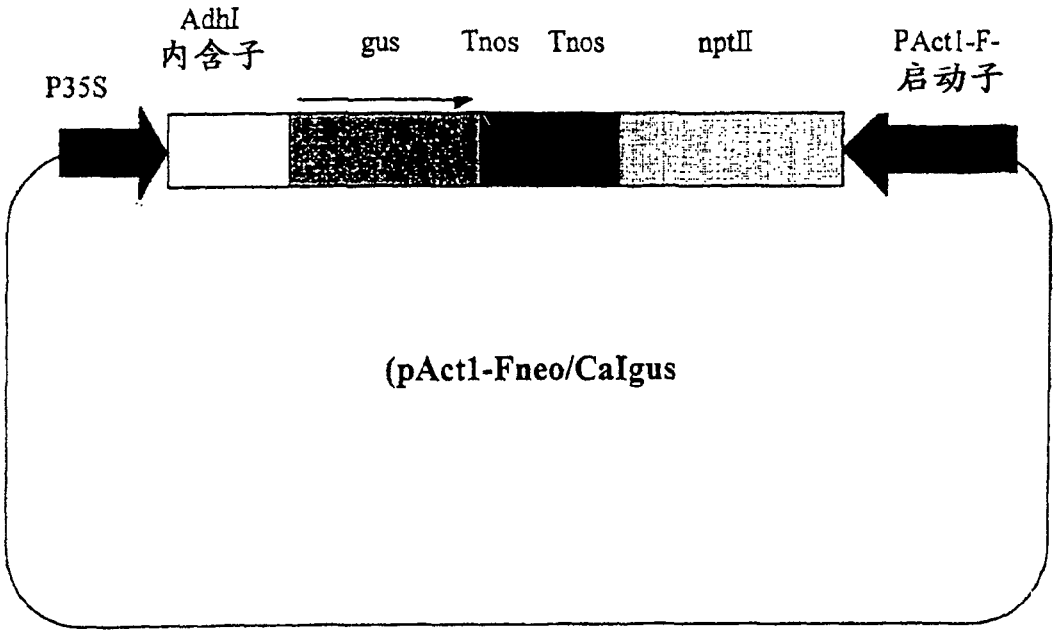

AdhI
内含子
gus
Tnos
Tnos
nptII
PAct1-F-
启动子
P35S
(pAct1-Fneo/CaIgus

图6

