

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 99810309.8

C12N 15/55
C12N 15/54 C12N 15/82
C12N 15/11 C12N 9/26
C12N 5/10 C08B 30/00
A01H 5/00 A01H 5/10
A23L 1/0522

[43] 公开日 2001 年 10 月 3 日

[11] 公开号 CN 1316003A

[22] 申请日 1999.7.30 [21] 申请号 99810309.8

[30] 优先权

[32] 1998.7.31 [33] DE [31] 19836097.5

[86] 国际申请 PCT/EP99/05536 1999.7.30

[87] 国际公布 WO00/08175 德 2000.2.17

[85] 进入国家阶段日期 2001.2.28

[71] 申请人 阿温提斯作物科学有限公司

地址 德国法兰克福

[72] 发明人 C·弗罗伯格

[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 樊卫民

权利要求书 3 页 说明书 46 页 附图页数 1 页

[54] 发明名称 编码 α -葡糖苷酶的核酸分子,合成一种
改性淀粉的植物,植物的产生,其应用和
改性淀粉

[57] 摘要

本发明涉及编码具有 α -葡糖苷酶活性的来自马铃薯的蛋白质之核酸分子。本发明还涉及制备合成改性淀粉的转基因植物细胞及植物的方法。本发明还涉及含有根据本发明的核酸分子的载体和宿主细胞,用根据本发明的方法产生的植物细胞和植物,根据本发明的植物细胞和植物合成的淀粉。本发明还涉及产生所述淀粉的方法。

ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1. 一种编码具有马铃薯 α -葡糖苷酶功能的蛋白质之核酸分子，其选自

a) 编码一种蛋白质的核酸分子，所述蛋白质涵盖 SEQ ID NO.2 所述的氨基酸序列或其衍生物或部分，

b) 一种涵盖 SEQ ID NO.1 所述的核苷酸序列，或其衍生物或部分，或一种相应的核苷酸序列的核酸分子；

c) 一种核酸分子，其可与 a) 或 b) 所述核酸分子杂交或互补，优选地可特异性地与 a) 或 b) 所述核酸分子杂交；和

d) 核酸分子，由于遗传密码的简并性其核苷酸序列背离 a)、b) 或 c) 所述核酸分子的序列。

2. 一种重组核酸分子，其包含

a) 一种编码权利要求 1 的具有马铃薯 α -葡糖苷酶功能的蛋白质之核酸分子；和

b) 一种或多种核苷酸序列，其编码一种选自 A 组的蛋白质，包括具有下列功能的蛋白质：分支酶、ADP 葡萄糖焦磷酸化酶、颗粒结合淀粉合酶、可溶性淀粉合酶、脱支酶、歧化酶、质体淀粉磷酸化酶、R1 酶、淀粉酶、葡糖苷酶，所述核苷酸序列的片段，或可与所述核苷酸序列杂交的核酸分子。

3. 权利要求 1 或 2 的核酸分子，其为脱氧核糖核酸分子。

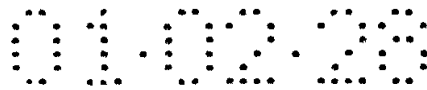
4. 权利要求 2 的核酸分子，其为 cDNA 分子。

5. 权利要求 1 的核酸分子，其为核糖核酸分子。

6. 一种核酸分子，其可与一种或多种权利要求 1-5 的核酸分子杂交，优选地特异性杂交。

7. 一种含有权利要求 1-6 中一项或多项的核酸分子的载体。

8. 一种含有权利要求 1-6 中一项或多项的核酸分子的载体，其中编码具有可溶性淀粉合酶 III 的功能的蛋白质或其部分的核苷酸序列为有义或反义反向。



9. 一种含有权利要求 1-6 中一项或多项的核酸分子的载体, 其中编码选自 A 组的一种或多种蛋白质之核苷酸序列或其部分为有义或反义反向。

10. 一种含有权利要求 1-6 中一项或多项的核酸分子的载体, 其中编码选自 A 组的一种或多种蛋白质之核苷酸序列部分呈有义方向, 部分呈反义反向。

11. 一种含有权利要求 1-6 中一项或多项的核酸分子的载体, 该分子与在原核或真核细胞中确保 RNA 转录和合成的调节元件连接, 所述 RNA 任选地可翻译。

12. 一种用权利要求 1-6 中一项或多项核酸分子或用权利要求 7-11 中的一项或多项载体转化的宿主细胞或来自这类细胞的宿主细胞。

13. 一种产生合成改性淀粉的转基因植物细胞的方法, 其中如权利要求 1-6 中的一项或多项核酸分子或权利要求 7-11 中的载体整合入植物细胞的基因组。

14. 一种可通过权利要求 13 的方法获得的植物细胞。

15. 一种产生合成改性淀粉的转基因植物的方法, 其中从权利要求 14 的细胞中再生完整植物。

16. 一种植物, 其含有权利要求 14 的植物细胞。

17. 权利要求 16 的植物, 其是有用的植物。

18. 权利要求 16-17 中一项或多项的植物, 它是一种淀粉贮藏植物。

19. 权利要求 16-18 中一项或多项的植物, 它是小麦、玉米、马铃薯或稻植物。

20. 权利要求 16-19 中一项或多项的植物的繁殖材料。

21. 一种通过本质上已知的方法制备淀粉的方法, 其中权利要求 14 的植物细胞, 权利要求 16-19 中一项或多项的植物, 或权利要求 20 的繁殖材料结合于该方法中。

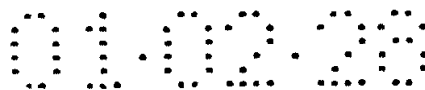
22. 一种淀粉, 其可获自权利要求 12 或 14 中的细胞, 权利要求

16-19 中一项或多项的植物，权利要求 20 的繁殖材料或权利要求 21 的方法。

23. 权利要求 22 中的淀粉在工业中，优选地在食品、包装材料或一次性物品生产中的应用。

24. 权利要求 1-6 中一项或多项的核酸分子或权利要求 7-11 中一项或多项的载体在产生转基因细胞，优选地细菌或植物细胞中的应用。

25. 权利要求 14 中的植物细胞，权利要求 16-19 中一项或多项的植物，或权利要求 20 的繁殖材料在淀粉生产中的应用。



说 明 书

编码 α -葡糖苷酶的核酸分子，合成一种改性淀粉的植物，
植物的产生，其应用和改性淀粉

本发明涉及编码具有马铃薯 α -葡糖苷酶活性的蛋白质的核酸分子，以及制备合成改性淀粉的转基因植物细胞及植物的方法。此外，本发明涉及含有根据本发明的核酸分子的载体和宿主细胞，用根据本发明的方法产生的植物细胞和植物，根据本发明的植物细胞和植物合成的淀粉，涉及产生所述淀粉的方法。

考虑到植物组分作为可再生资源的逐渐提高的重要性，生物技术研究努力使基于植物的粗原料符合加工工业的要求。因此，为了能在尽可能多的应用领域中利用可再生资源，必须能获得多种材料。

油、脂肪和蛋白质以及多糖组成了植物的重要可再生资源。多糖中的主要位置不仅被纤维素而且被淀粉所占据，淀粉是高等植物中最重要的贮藏物质之一。玉米、稻和小麦以及马铃薯尤其在淀粉生产中起重要作用。

多糖淀粉是化学均一单元—葡萄糖分子的多聚体。然而，它是在聚合程度和葡萄糖链中分支存在等方面不同的不同形式分子的高度复杂混合物。因此淀粉不是由均一的原料组成。具体地，我们区分为直链淀粉— α -1,4-糖苷键连接的葡萄糖分子的基本无分支的多聚体，和支链淀粉—其依次组成了不同分支的葡萄糖链的复杂混合物。由于额外 α -1,6-糖苷键的存在产生其它的分支。在用于淀粉生产的典型植物如玉米或马铃薯中，合成淀粉由大约 25% 的直链淀粉和大约 75% 的支链淀粉组成。

主要取决于分支程度、直链淀粉/支链淀粉比率、侧链的平均长度和分布以及磷酸基的存在的淀粉分子结构，分别对于淀粉及其水溶液的重要功能性质是最重要的。必须提到的重要功能性质是，例如，可溶性、退减性状、成膜特性、粘度、颜色稳定性、胶凝特性和结合及

粘附特性。淀粉颗粒大小对于不同用途也可能是重要的。富含直链淀粉的淀粉的产生对于某些用途也是特别有意义的。此外，植物细胞中所含的改性淀粉可有利地改变植物细胞在某些条件下的性质。例如，在进一步加工如淀粉提取之前，在含淀粉器官如种子或块茎的贮藏期间降低淀粉降解是可行的。生产改性淀粉使含该淀粉的植物细胞或植物器官更适于加工也是有意义的，例如在食品制造中，如由玉米制造爆米花或玉米片，或由马铃薯制造炸薯片、炸薯条或马铃薯粉。特别有意义的是淀粉在降低冷甜度方面的改进，即在低温下长时间贮藏后还原糖（特别是葡萄糖）的释放减少。马铃薯通常贮存于 4-8℃ 的温度下，以使贮存期间的淀粉降解减至最小。该过程中释放的还原糖特别是葡萄糖在炸薯片或炸薯条的生产中导致不希望的产褐色素反应（所谓的美拉（Maillard）反应）。

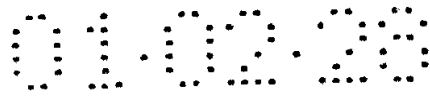
能从植物中分离的淀粉常通过化学修饰以符合特定工业目的，这种修饰通常需要时间和金钱。因此希望发现这种可能性，即产生可合成其性质已满足加工工业特殊需要的淀粉的植物，从而将经济与生态优势结合起来。

除了植物繁殖法外，产生这类植物的一种可能性是利用遗传工程方法直接遗传改变产淀粉植物的淀粉代谢。但是，其前提条件是参与淀粉合成修饰和淀粉降解（淀粉代谢）的酶的鉴定与表征，和编码这些酶的相应 DNA 序列的分离。

引起淀粉合成的生物化学途径基本已知。在植物细胞中，淀粉合成在质体中发生。在光合活性组织中，这些质体是叶绿体，在无光合活性组织中，淀粉贮藏组织是造粉体。

参与淀粉合成的重要酶是，例如分支酶、ADP 葡萄糖焦磷酸化酶、颗粒结合淀粉合酶、可溶性淀粉合酶、脱支酶、歧化酶、质体淀粉磷酸化酶、R1 酶（R1 蛋白）、淀粉酶或葡萄糖苷酶。

本发明的一个目的在于提供其它或备择的遗传工程方法，用于改变合成淀粉植物（例如黑麦、大麦、燕麦、玉米、小麦、高粱和谷子、西米、稻、豌豆、大豌豆（marrowfat peas）、木薯、马铃薯、番茄、



油籽油菜、大豆、大麻、亚麻、向日葵、豇豆、绿豆、菜豆、香蕉或竹芋 (arrowroot)) 中的淀粉代谢或适当的核酸分子, 借此能转化植物细胞, 使得能合成有利改变的淀粉变种。

这些改变的淀粉变种例如在其分支程度、直链淀粉/支链淀粉比率、磷酸含量、淀粉颗粒大小和/或侧链的平均长度和分布 (即侧链结构) 等方面显示改变。

本发明的另一目的在于提供能产生可合成一种经修饰的淀粉变种的转基因植物的方法。

令人惊讶地, 用根据本发明的核酸分子转化转基因植物合成一种淀粉, 其在物理化学性质和/或侧链结构方面以特殊方式被修饰, 使得通过提供权利要求书中详述的应用形式, 达到上述的这些目的。

因此本发明涉及一种编码具有马铃薯 α -葡糖苷酶功能的蛋白质之核酸分子, 其选自

a) 编码涵盖 SEQ ID NO.2 所述氨基酸序列或其衍生物或部分的蛋白质之核酸分子,

b) 涵盖 SEQ ID NO.1 所示核苷酸序列或其衍生物或部分, 或相应核苷酸序列的核酸分子;

c) 可与 a) 或 b) 中所述核酸分子杂交, 或与它们互补, 优选地与它们特异性杂交的核酸分子, 及

d) 核酸分子, 依照遗传密码的简并性其核苷酸序列背离 a)、b) 或 c) 中所述核酸分子的序列。

因此, 本发明涉及一种编码 α -葡糖苷酶的核酸分子, 其包括 SEQ ID NO.2 或其衍生物或部分的氨基酸序列, 如质粒的 cDNA 插入片段 (DSM No. 12348)。上述本发明的 α -葡糖苷酶参与马铃薯的淀粉代谢, 其直接或间接参与淀粉生物合成。

就本发明的 α -葡糖苷酶蛋白质 (或其多肽、氨基酸序列) 而言, 术语“衍生物”针对本发明的目的涵盖来源于 SEQ ID NO.2 的多肽, 其包括至少 163 个氨基酸残基, 优选至少 227 个, 特别是至少 293 个, 非常优选大约 309-322 个氨基酸残基, 其选自由 SEQ ID NO.2 的如下

氨基酸残基:

18 H, 25 R, 34 G, 37 H, 38 G,
 39 V, 41 L, 42 L, 44 S, 45 N, 46 G, 47 M, 48 D, 51 Y, 53 G, 55 R, 56 I, 58 Y,
 60 V, 61 I, 62 G, 63 G, 65 I, 66 D, 67 L, 68 Y, 70 F, 71 A, 72 G, 75 P, 78 V,
 81 Q, 83 T, 86 I, 87 G, 88 R, 89 P, 90 A, 92 M, 93 P, 94 Y, 95 W, 97 F, 98
 G, 99 F, 101 Q, 102 C, 103 R, 105 G, 106 Y, 115 V, 116 V, 119 Y, 120 A,
 124 I, 125 P, 126 L, 127 E, 128 V, 129 M, 130 W, 131 T, 132 D, 133 I, 134
 D, 135 Y, 136 M, 137 D, 140 K, 141 D, 142 F, 143 T, 144 L, 145 D, 146 P,
 147 V, 149 F, 150 P, 157 F, 161 L, 162 H, 164 N, 166 Q, 168 Y, 169 V, 171
 I, 173 D, 174 P, 175 G, 176 I, 182 Y, 184 T, 187 R, 188 G, 189 M, 193 V,
 194 F, 196 K, 197 R, 201 P, 202 Y, 204 G, 206 V, 207 W, 208 P, 209 G, 211
 V, 212 Y, 214 P, 215 D, 216 F, 217 L, 219 P, 224 F, 225 W, 228 E, 229 I,
 232 F, 237 P, 239 D, 240 G, 242 W, 244 D, 245 M, 246 N, 247 E, 249 S,
 250 N, 251 F, 252 I, 254 S, 260 S, 263 D, 265 P, 266 P, 267 Y, 268 K, 269
 I, 270 N, 271 N, 272 S, 273 G, 277 P, 278 I, 282 T, 284 P, 286 T, 289 H,
 291 G, 295 E, 296 Y, 299 H, 300 N, 301 L, 303 G, 305 L, 306 E, 310 T, 313
 A, 322 P, 323 F, 325 L, 327 R, 328 S, 329 T, 330 F, 333 S, 334 G, 336 Y,
 337 T, 339 H, 340 W, 341 T, 342 G, 343 D, 344 N, 345 A, 346 A, 348 W,
 350 D, 351 L, 353 Y, 354 S, 355 I, 356 P, 359 L, 361 F, 362 G, 363 L, 364
 F, 365 G, 367 P, 368 M, 370 G, 371 A, 372 D, 373 I, 374 C, 375 G, 376 F,
 380 T, 381 T, 382 E, 383 E, 384 L, 385 C, 387 R, 388 W, 389 I, 390 Q, 391
 L, 392 G, 393 A, 394 F, 395 Y, 396 P, 397 F, 399 R, 400 D, 401 H, 402 S,
 406 T, 409 Q, 410 E, 411 L, 412 Y, 414 W, 416 S, 417 V, 418 A, 421 A,
 424 V, 425 L, 426 G, 427 L, 428 R, 431 L, 432 L, 433 P, 436 Y, 438 L, 439
 M, 440 Y, 442 A, 446 G, 448 P, 449 I, 450 A, 451 R, 452 P, 453 L, 455 F,
 457 F, 458 P, 460 D, 463 T, 466 I, 469 Q, 470 F, 471 L, 473 G, 477 M, 479
 S, 480 P, 482 L, 485 G, 489 V, 491 A, 492 Y, 494 P, 496 G, 497 N, 498 W,
 501 L, 504 Y, 508 V, 513 G, 518 L, 521 P, 523 D, 524 H, 526 N, 527 V, 528
 H, 531 E, 532 G, 534 I, 537 M, 538 Q, 539 G, 541 A, 543 T, 544 T, 547 A,
 550 T, 554 L, 555 L, 556 V, 557 V, 559 S, 566 G, 567 E, 568 L, 569 F, 571
 D, 579 G, 583 G, 585 W, 586 T, 588 V, 590 F, 603 S, 605 V, 606 V, 611 A,
 620 K, 622 T, 625 G, 635 Y, 658 F, 664 S, 669 L, 671 G, 674 F 和 678 L

并且包含至少大约 1-69, 优选至少 139, 特别是至少 194, 更优选地 249, 非常特别优选地大约 263-274 个氨基酸残基, 其选自 SEQ ID NO.2 的 (此处显示氨基酸的单字母编码)

1 P, 2 K, 3 L, 4 R, 5 P, 6 R, 7 V, 8 H, 9 P, 10 S, 11 Q, 12 H, 13 H, 14 P, 15 I, 16 Q, 17 L, 19 R, 20 P, 21 P, 22 A, 23 L, 24 H, 27 Y, 28 S, 29 F, 30 R, 31 Y, 32 F, 35 V, 36 S, 43 S, 49 I, 50 V, 57 S, 64 L, 84 Q, 91 A, 109 I, 110 D, 112 V, 114 L, 118 S, 122 S, 152 E, 153 R, 154 V, 155 I, 156 F, 158 L, 159 R, 163 Q, 165 D, 172 V, 178 I, 180 N, 183 D, 186 R, 198 D, 199 N, 200 M, 203 Q, 205 V, 210 N, 221 T, 222 E, 223 V, 226 R, 230 E, 231 K, 236 V, 238 F, 243 L, 259 S, 262 F, 275 H, 280 Y, 281 R, 288 T, 293 T, 294 M, 311 Y, 312 S, 316 N, 317 V, 326 V, 331 L, 335 R, 338 S, 360 S, 378 S, 404 K, 408 P, 413 S, 420 A, 422 K, 430 Q, 437 M, 444 I, 445 K, 447 T, 461 A, 464 F, 465 D, 468 T, 478 I, 481 I, 487 T, 510 L, 511 N, 512 Q, 516 M, 536 V, 548 Q, 549 R, 551 A, 553 K, 558 L, 560 S, 561 S, 562 K, 570 V, 573 D, 574 D, 577 Q, 580 R, 581 E, 584 R, 591 N, 592 S, 593 N, 594 I, 595 I, 598 K, 599 I, 601 V, 602 K, 609 R, 612 L, 613 D, 615 G, 616 L, 618 L, 619 E, 623 L, 630 R, 631 G, 632 L, 634 S, 637 L, 638 V, 639 G, 641 H, 642 Q, 643 Q, 644 G, 645 N, 646 T, 647 T, 648 M, 649 K, 650 E, 651 S, 652 L, 653 K, 654 Q, 656 G, 657 Q, 659 V, 660 T, 661 M, 666 M, 668 I, 670 I, 679 Y, 680 I, 681 I, 682 T, 693 H, 700 R, 703 G, 705 H, 706 G, 707 V, 709 L, 710 L, 712 S, 713 N, 714 G, 715 M, 716 D, 718 Y, 720 G, 721 R, 722 I, 724 Y, 726 V, 727 I, 728 G, 729 G, 730 I, 731 D, 732 L, 733 Y, 734 F, 735 A, 736 G, 739 P, 742 V, 743 Q, 745 T, 747 I, 748 G, 749 R, 750 P, 751 A, 753 M, 754 P, 755 Y, 756 W, 757 F, 758 G, 759 F, 761 Q, 762 C, 763 R, 764 G, 765 Y, 768 V, 769 V, 771 Y, 772 A, 775 I, 776 P, 777 L, 778 E, 779 V, 780 M, 781 W, 782 T, 783 D, 784 I, 785 D, 786 Y, 787 M, 788 D, 789 K, 790 D, 791 F, 792 T, 793 L, 794 D, 795 P, 796 V, 798 F, 799 P, 804 F, 806 L, 807 H, 808 N, 810 Q, 812 Y, 813 V, 814 I, 816 D, 817 P, 818 G, 819 I, 821 Y, 822 T, 824 R, 825 G, 826 M, 828 V, 829 F, 831 K 和 832 R

就本发明的 α -葡糖苷酶蛋白质 (多肽、氨基酸序列) 而言, 术语“部分”针对本发明的目的包括一种多肽或寡肽, 其由本发明的核酸分子或其衍生物编码的 α -葡糖苷酶的至少约 10-50, 优选至少 100, 更优选至少 200, 特别是至少 400, 最优选大约 550-675 个氨基酸残基组

成。

本发明还涉及一种含有如质粒 DSM No.12347 的 cDNA 插入片段的 SEQ ID NO.1 的核酸分子之核酸分子，所述质粒 DSM No.12347 已于 1998 年 7 月 24 日保藏于 DSZM，或其衍生物或部分，特别是编码区或其衍生物或部分。

就本发明的核酸分子（核苷酸或多核苷酸）而言，术语“衍生物”针对本发明的目的涵盖一种包括至少 478 个核苷酸，优选至少 668 个，特别是至少 860 个，非常优选大约 907-945 个核苷酸的多核苷酸，其选自 SEQ ID NO.1 的如下核苷酸：

4 A, 6 A, 12

A, 13 C, 17 G, 25 C, 32 A, 34 C, 38 A, 45 T, 47 A, 49 C, 51 T, 56 G, 62 C, 65 C, 68 T, 73 C, 76 G, 77 G, 78 A, 79 T, 97 G, 100 G, 101 G, 106 A, 108 T, 109 C, 110 A, 111 T, 112 G, 113 G, 114 G, 115 G, 116 T, 119 T, 122 T, 125 T, 127 A, 130 A, 131 G, 132 C, 133 A, 134 A, 135 T, 136 G, 137 G, 139 A, 140 T, 141 G, 142 G, 143 A, 144 T, 146 T, 151 T, 152 A, 153 T, 157 G, 158 G, 161 A, 162 T, 164 G, 166 A, 167 T, 169 A, 171 T, 172 T, 173 A, 174 C, 175 A, 176 A, 178 G, 179 T, 181 A, 182 T, 183 T, 184 G, 185 G, 187 G, 188 G, 191 T, 193 A, 194 T, 195 T, 196 G, 197 A, 200 T, 202 T, 203 A, 206 T, 208 T, 209 T, 211 G, 212 C, 214 G, 215 G, 216 A, 217 C, 221 C, 223 C, 224 C, 226 G, 232 G, 233 T, 236 T, 237 G, 239 A, 241 C, 242 A, 243 G, 244 T, 247 A, 248 C, 249 T, 254 T, 256 A, 257 T, 259 G, 260 G, 263 G, 265 C, 266 C, 268 G, 269 C, 272 C, 274 A, 275 T, 276 G, 277 C, 278 C, 280 T, 281 A, 283 T, 284 G, 285 G, 289 T, 290 T, 292 G, 293 G, 297 T, 298 C, 299 A, 301 C, 302 A, 304 T, 305 G, 308 G, 310 T, 313 G, 314 G, 316 T, 317 A, 323 A, 324 T, 326 T, 331 G, 332 A, 335 T, 338 A, 343 G, 344 T, 346 G, 347 T, 349 G, 355 T, 356 A, 357 T, 358 G, 359 C, 360 A, 362 A, 365 C, 366 T, 370 A, 371 T, 373 C, 374 C, 377 T, 379 G, 380 A, 382 G, 383 T, 385 A, 386 T, 387 G, 388 T, 389 G, 390 G, 391 A, 392 C, 394 G, 395 A, 397 A, 398 T, 399 T, 400 G, 401 A, 402 T, 403 T, 404 A, 406 A, 407 T, 408 G, 409 G, 410 A, 411 T, 412 G, 415 T, 418 A, 419 A, 421 G, 422 A, 424 T, 425 T, 426 C, 427 A, 428 C, 431 T, 433 G, 434 A, 436 C, 437 C, 439 G, 440 T, 443 A, 445 T, 446 T, 448 C, 449 C, 454 G, 455 A, 459 G, 461 T, 469 T, 470 T, 471 T, 473 T, 478 A, 481 C, 482 T, 484 C, 485 A, 489 G, 490 A, 491 A, 492 T, 493 G, 496 C, 497 A, 499 A, 501 A, 502 T, 503 A, 505 G, 506 T, 511 A, 512 T, 515 T, 517 G, 518 A, 519 T, 520 C, 521 C, 523 G, 524 G, 526 A, 527 T, 536 A,

538 A, 542 C, 544 T, 545 A, 546 T, 547 G, 550 A, 551 C, 553 T, 556 A,
 559 A, 560 G, 562 G, 563 G, 565 A, 566 T, 567 G, 569 A, 570 A, 575 A,
 576 T, 577 G, 578 T, 580 T, 581 T, 584 T, 586 A, 587 A, 590 G, 593 A,
 594 T, 597 T, 601 C, 602 C, 604 T, 605 A, 607 C, 610 G, 611 G, 616 G,
 617 T, 619 T, 620 G, 621 G, 622 C, 623 C, 625 G, 626 G, 631 G, 632 T,
 634 T, 635 A, 637 T, 640 C, 641 C, 643 G, 644 A, 646 T, 647 T, 650 T, 653
 A, 655 C, 656 C, 659 C, 660 T, 662 C, 663 T, 670 T, 671 T, 673 T, 674 G,
 675 G, 680 A, 682 G, 683 A, 685 A, 686 T, 689 A, 690 G, 694 T, 695 T,
 697 C, 701 A, 704 T, 707 T, 709 C, 710 C, 713 T, 715 G, 716 A, 717 T,
 718 G, 719 G, 722 T, 724 T, 725 G, 726 G, 728 T, 730 G, 731 A, 733 A,
 734 T, 735 G, 736 A, 737 A, 739 G, 740 A, 745 T, 746 C, 748 A, 749 A,
 751 T, 752 T, 754 A, 755 T, 758 C, 759 T, 760 T, 761 C, 764 C, 766 C, 773
 C, 778 T, 779 C, 780 T, 782 C, 785 T, 787 G, 788 A, 791 A, 792 T, 793 C,
 794 C, 796 C, 797 C, 799 T, 800 A, 802 A, 803 A, 805 A, 806 T, 808 A,
 809 A, 811 A, 812 A, 814 T, 815 C, 817 G, 818 G, 820 G, 829 C, 830 C,
 832 A, 833 T, 835 A, 841 A, 844 A, 845 C, 848 T, 850 C, 851 C, 854 C,
 856 A, 857 C, 860 C, 862 A, 865 C, 866 A, 868 T, 870 T, 871 G, 872 G,
 875 A, 883 G, 884 A, 886 T, 887 A, 890 A, 891 T, 892 G, 895 C, 896 A,
 897 T, 898 A, 899 A, 902 T, 904 T, 906 T, 907 G, 908 G, 914 T, 916 G,
 917 A, 918 A, 920 C, 921 T, 924 A, 925 G, 927 C, 928 A, 929 C, 937 G,
 938 C, 941 T, 944 T, 953 C, 958 A, 962 G, 964 C, 965 C, 967 T, 968 T, 971
 T, 974 T, 979 A, 980 G, 982 T, 983 C, 985 A, 986 C, 988 T, 989 T, 990 T,
 995 G, 997 T, 998 C, 1000 G, 1001 G, 1003 A, 1006 T, 1007 A, 1008 C,
 1009 A, 1010 C, 1013 C, 1015 C, 1016 A, 1018 T, 1019 G, 1020 G, 1021
 A, 1022 C, 1024 G, 1025 G, 1027 G, 1028 A, 1029 T, 1030 A, 1031 A,
 1032 T, 1033 G, 1034 C, 1035 T, 1036 G, 1037 C, 1039 A, 1042 T, 1043
 G, 1044 G, 1046 A, 1048 G, 1049 A, 1052 T, 1057 T, 1058 A, 1059 C,
 1060 T, 1061 C, 1063 A, 1064 T, 1066 C, 1067 C, 1072 A, 1073 T, 1076 T,
 1080 C, 1081 T, 1082 T, 1083 T, 1084 G, 1085 G, 1088 T, 1090 T, 1091 T,
 1092 T, 1093 G, 1094 G, 1096 A, 1097 T, 1099 C, 1100 C, 1102 A, 1103
 T, 1104 G, 1106 T, 1108 G, 1109 G, 1111 G, 1112 C, 1114 G, 1115 A,
 1116 T, 1117 A, 1118 T, 1120 T, 1121 G, 1123 G, 1124 G, 1125 T, 1126 T,
 1127 T, 1138 A, 1139 C, 1141 A, 1142 C, 1144 G, 1145 A, 1147 G, 1148
 A, 1151 T, 1153 T, 1154 G, 1157 G, 1159 C, 1160 G, 1162 T, 1163 G,
 1164 G, 1165 A, 1166 T, 1168 C, 1169 A, 1170 G, 1171 C, 1172 T, 1174
 G, 1175 G, 1177 G, 1178 C, 1180 T, 1181 T, 1183 T, 1184 A, 1186 C,
 1187 C, 1189 T, 1190 T, 1193 C, 1195 A, 1196 G, 1198 G, 1199 A, 1201
 C, 1202 A, 1204 T, 1205 C, 1208 C, 1213 G, 1216 A, 1217 C, 1220 C,

1225 C, 1226 A, 1228 G, 1229 A, 1231 C, 1232 T, 1234 T, 1235 A, 1240
 T, 1241 G, 1242 G, 1243 G, 1244 A, 1246 T, 1247 C, 1249 G, 1250 T,
 1252 G, 1253 C, 1254 T, 1256 C, 1259 C, 1261 G, 1262 C, 1264 A, 1267
 A, 1270 G, 1271 T, 1274 T, 1276 G, 1277 G, 1279 C, 1280 T, 1281 C,
 1283 G, 1292 T, 1294 C, 1295 T, 1297 C, 1298 C, 1301 A, 1306 T, 1307 A,
 1309 A, 1313 T, 1315 A, 1316 T, 1317 G, 1318 T, 1319 A, 1321 G, 1322
 A, 1324 G, 1325 C, 1328 A, 1331 T, 1333 A, 1336 G, 1337 G, 1339 A,
 1342 C, 1343 C, 1345 A, 1346 T, 1348 G, 1349 C, 1351 C, 1352 G, 1354
 C, 1355 C, 1357 C, 1358 T, 1360 T, 1362 C, 1363 T, 1364 T, 1367 C, 1369
 T, 1370 T, 1372 C, 1373 C, 1376 A, 1378 G, 1379 A, 1387 A, 1388 C,
 1390 T, 1393 G, 1396 A, 1397 T, 1403 C, 1405 C, 1406 A, 1407 G, 1408
 T, 1409 T, 1412 T, 1415 T, 1417 G, 1418 G, 1420 A, 1422 A, 1424 G, 1427
 T, 1429 A, 1430 T, 1431 G, 1433 T, 1435 T, 1436 C, 1438 C, 1439 C,
 1444 C, 1445 T, 1448 A, 1450 C, 1453 G, 1454 G, 1456 G, 1463 C, 1465
 G, 1466 T, 1470 T, 1471 G, 1472 C, 1474 T, 1475 A, 1477 T, 1480 C, 1481
 C, 1486 G, 1487 G, 1488 A, 1489 A, 1490 A, 1492 T, 1493 G, 1494 G,
 1496 T, 1501 C, 1502 T, 1504 T, 1508 A, 1510 T, 1511 A, 1514 C, 1520 C,
 1522 G, 1523 T, 1527 T, 1533 T, 1537 G, 1538 G, 1540 A, 1544 A, 1547 T,
 1549 A, 1552 C, 1559 C, 1561 C, 1562 C, 1565 C, 1567 G, 1568 A, 1569
 T, 1570 C, 1571 A, 1575 T, 1577 A, 1578 A, 1579 G, 1580 T, 1582 C,
 1583 A, 1586 T, 1588 C, 1591 G, 1592 A, 1593 A, 1594 G, 1595 G, 1597
 A, 1600 A, 1601 T, 1604 T, 1605 G, 1606 G, 1609 A, 1610 T, 1611 G,
 1612 C, 1613 A, 1614 A, 1615 G, 1616 G, 1619 A, 1621 G, 1622 C, 1625
 T, 1626 G, 1627 A, 1628 C, 1630 A, 1631 C, 1636 G, 1639 G, 1640 C,
 1645 A, 1648 A, 1649 C, 1652 C, 1654 T, 1658 A, 1660 C, 1661 T, 1664 T,
 1666 G, 1667 T, 1669 G, 1670 T, 1675 A, 1676 G, 1689 C, 1690 A, 1692
 C, 1696 G, 1697 G, 1699 G, 1700 A, 1703 T, 1705 T, 1706 T, 1709 T, 1711
 G, 1712 A, 1715 A, 1717 G, 1724 A, 1727 T, 1732 A, 1733 T, 1735 G,
 1736 G, 1745 G, 1746 A, 1747 G, 1748 G, 1750 A, 1753 T, 1754 G, 1755
 G, 1756 A, 1757 C, 1760 T, 1762 G, 1763 T, 1765 A, 1768 T, 1769 T, 1775
 G, 1776 C, 1781 T, 1783 A, 1789 A, 1796 T, 1802 T, 1807 T, 1808 C, 1809
 A, 1810 G, 1811 A, 1813 G, 1814 T, 1816 G, 1817 T, 1828 T, 1830 T, 1831
 G, 1832 C, 1836 G, 1845 A, 1846 T, 1848 G, 1851 C, 1853 T, 1855 G,
 1858 A, 1859 A, 1862 T, 1864 A, 1865 C, 1868 T, 1871 T, 1873 G, 1874
 G, 1876 T, 1877 T, 1881 A, 1890 A, 1894 T, 1897 A, 1901 G, 1908 G,

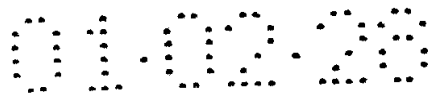
1925 A, 1929 A, 1945 A, 1953 T, 1958 A, 1966 G, 1972 T, 1973 T, 1976 T,
1984 G, 1988 T, 1990 T, 1991 C, 1997 T, 2006 T, 2009 T, 2011 G, 2012 G,
2020 T, 2021 T, 2024 A, 2027 T 和 2033 T

其还包括至少大约 1-93 个核苷酸，优选至少 187 个，特别是至少 261 个，更优选至少 336 个，以及非常优选大约 354-369 个核苷酸，其选自 SEQ ID NO.1 的如下核苷酸：

1 C, 10 A, 16 A, 19 G, 21 T, 23 A, 24 C, 26 C, 30 A, 33 A, 36 C, 39 T, 43 A, 48 G, 52 C, 53 A, 54 C, 57 T, 58 C, 59 C, 60 G, 63 G, 64 G, 66 G, 67 C, 69 C, 70 C, 71 A, 72 C, 74 G, 75 G, 80 A, 81 C, 86 T, 88 C, 89 G, 91 T, 93 C, 94 T, 96 C, 99 C, 102 A, 103 G, 104 T, 105 T, 107 G, 123 T, 128 G, 138 C, 145 A, 149 T, 156 G, 170 G, 189 G, 190 T, 192 A, 199 T, 201 G, 264 T, 271 G, 279 A, 291 C, 294 A, 309 G, 325 A, 327 T, 328 G, 333 T, 334 G, 340 C, 341 T, 342 G, 348 G, 354 T, 363 G, 364 T, 375 G, 384 T, 420 G, 429 A, 432 C, 438 A, 444 C, 456 G, 457 C, 458 G, 460 G, 462 A, 464 T, 465 T, 467 T, 468 T, 472 C, 476 G, 477 G, 480 G, 486 T, 487 C, 494 A, 507 A, 513 A, 514 G, 516 A, 522 A, 525 A, 534 C, 537 C, 540 T, 543 A, 549 C, 552 C, 557 G, 558 G, 564 C, 573 A, 592 G, 595 A, 596 A, 599 T, 603 C, 608 A, 609 A, 612 G, 614 T, 627 G, 636 T, 639 T, 651 A, 661 A, 665 A, 667 G, 668 T, 669 A, 678 A, 687 T, 688 G, 692 A, 706 G, 708 A, 727 C, 744 G, 771 A, 774 A, 775 T, 776 C, 783 C, 784 T, 798 C, 807 A, 813 C, 819 C, 825 C, 834 C, 838 T, 842 G, 843 A, 855 C, 858 T, 863 C, 864 A, 878 C, 879 A, 881 T, 882 G, 885 G, 888 T, 903 T, 912 A, 931 T, 934 A, 935 G, 940 T, 949 G, 954 T, 957 T, 976 G, 977 T, 987 T, 991 C, 1002 C, 1004 G, 1012 T, 1038 T, 1041 C, 1062 C, 1068 T, 1079 G, 1087 T, 1095 A, 1132 A, 1140 T, 1161 C, 1167 T, 1179 A, 1188 A, 1203 C, 1206 T, 1210 A, 1211 A, 1212 G, 1215 C, 1223 C, 1224 C, 1239 T, 1258 G, 1263 C, 1265 A, 1275 T, 1278 G, 1287 T, 1288 C, 1291 T,

1293 A, 1296 T, 1305 T, 1310 T, 1311 G, 1312 C, 1314 T, 1330 A, 1338 G,
 1340 C, 1341 T, 1344 C, 1347 T, 1353 A, 1356 C, 1386 G, 1389 A, 1391 T,
 1402 A, 1416 C, 1432 A, 1441 A, 1443 A, 1446 T, 1455 A, 1459 A, 1460
 C, 1461 C, 1467 T, 1497 T, 1500 C, 1503 C, 1518 C, 1521 T, 1528 T, 1530
 G, 1531 A, 1534 C, 1535 A, 1546 A, 1557 C, 1563 A, 1566 A, 1575 A,
 1581 A, 1590 T, 1596 G, 1602 A, 1603 T, 1607 T, 1608 C, 1632 A, 1641 T,
 1643 A, 1644 G, 1650 T, 1651 G, 1653 A, 1657 A, 1659 A, 1665 T, 1668
 C, 1672 C, 1678 A, 1680 C, 1681 A, 1683 C, 1684 A, 1695 A, 1698 A,
 1704 A, 1708 G, 1718 A, 1719 C, 1738 A, 1743 G, 1749 G, 1751 G, 1752
 G, 1758 G, 1761 A, 1772 A, 1773 C, 1774 A, 1784 T, 1785 T, 1788 C,
 1791 T, 1792 A, 1795 A, 1800 G, 1801 G, 1803 T, 1805 A, 1812 G, 1815
 T, 1825 C, 1834 C, 1837 G, 1842 A, 1843 G, 1847 T, 1852 C, 1857 A,
 1869 A, 1875 A, 1878 T, 1884 T, 1886 T, 1891 G, 1895 T, 1896 G, 1902 C,
 1903 T, 1904 A, 1905 T, 1906 G, 1909 C, 1911 T, 1913 T, 1914 T, 1915 G,
 1918 T, 1919 C, 1920 A, 1922 A, 1923 C, 1924 C, 1932 G, 1936 A, 1940
 C, 1948 G, 1949 A, 1955 T, 1957 A, 1959 G, 1960 C, 1962 G, 1964 G,
 1969 C, 1975 G, 1979 C, 1981 A, 1986 A, 1989 C, 1995 G, 1996 A, 2001
 A, 2002 A, 2005 T, 2007 G, 2008 A, 2035 T, 2038 A, 2040 C, 2042 T,
 2044 A, 2045 C, 2046 T, 2047 T 和 2048 A

在如上所示的 SEQ ID NO.1 或 SEQ ID NO.2 的本发明之核苷酸或氨基酸序列的独立元件中的位置之编码中, 根据本发明的所述序列之衍生物也应理解为这样的序列, 其中, 单个序列元件的编码可背离根据本发明的 SEQ ID NO.1 或 2 的那些。此处决定性的是至少一种序列区段(“部分”)与本发明序列的明显一致。这种一致可利用普通技术人员知识以简单的方法, 例如使用适当的计算机程序加以确定, 例如通过将本发明的序列与待比较的序列进行序列比较(所谓序列排列对比)。这类计算机程序例如为市售的(例如, Omega®, ver 1.1.3, Oxford Molecular Ltd., Oxford, 英国), 有时它也是序列数据库(例如, EMBL, GenBank)中的组成部分, 例如, 鉴定最可能的相同性程度, 或如果适当的话, 化学等效物, 序列元件, 特别是考虑特定的插入和/或缺失, 其可引起单独序列元件或序列区段的移码, 其可由此影响序列元件或序列区段的编号。



就本发明的编码 α -葡糖苷酶的核酸分子而言，术语“衍生物”进一步涵盖由添加、删除、插入或重组一种或多种核苷酸而背离 SEQ ID NO.1 的，且符合上述条件的核酸分子。

就本发明的编码 α -葡糖苷酶的核酸分子而言，术语“衍生物”进一步包括一种本发明的核酸分子的互补性或反向互补性序列（多核苷酸），或其衍生物或其部分。

关于根据编码 α -葡糖苷酶的本发明之核酸分子的术语“部分”，涵盖一种多核苷酸或寡核苷酸，其由编码 α -葡糖苷酶或其部分的本发明核酸分子的至少大约 15-35，优选至少大约 36-100，更优选至少 200，特别是至少 400，尤其特别是至少 800，及最优选大约 1400-1700 个核苷酸组成。

在本发明的一个优选实施方案中，本发明的术语“衍生物”和/或“部分”涵盖如上所述的多核苷酸，或者多肽或寡肽，其显示获自马铃薯的 α -葡糖苷酶基因（即：编码 α -葡糖苷酶的核酸分子）或 α -葡糖苷酶多肽的功能和/或结构等效物。术语“功能和/或结构等效物”一般为同义，是指目标创造性分子的等效物或相似的功能，如适当，尤其是指生物学功能。

本发明还涉及重组核酸分子，包括 a) 一种核苷酸分子，其编码一种具有 α -葡糖苷酶功能的蛋白质，优选地来自马铃薯，或所述核苷酸序列的部分，以及 b) 一种或多种核苷酸序列，其编码一种选自 A 组的蛋白质，包括分支酶、ADP 葡萄糖焦磷酸化酶、颗粒结合淀粉合酶、可溶性淀粉合酶、脱支酶、歧化酶、质体淀粉磷酸化酶、R1 酶、淀粉酶、葡糖苷酶，或编码选自 A 组的蛋白质的核苷酸序列的片段，和可与这些核苷酸序列或其片段之一杂交的核酸分子，优选地脱氧核糖核酸分子或核糖核酸分子，特别优选地 cDNA 分子。特别优选的是可与这些核苷酸序列或其部分之一特异性杂交的核酸分子。

根据本发明的核苷酸分子编码一种具有如 SEQ ID NO.1 所示的马铃薯 α -葡糖苷酶之功能的蛋白质，该蛋白质由 SEQ ID NO.2 的核苷酸序列编码。

Seq. ID No. 1:

cgaatacgaataaccgacgctaaccatcaacgatgggaagtgccggaagaaattctccac
 cgtccaccaccgcccgtcgcgcgctcaacctccaactcctcatcagaaaaccactcccca
 attaccctctctaaccctaaactcagacctagaggttcacccttcacaacaccatcccattc
 agcttcaccgtccgcccggcgtccaccggggatactcttttcgatacttcgccggagtta
 gtcattgggggttttgcttctgagtagcaatggcatggatattgtgtatacgggtgatagga
 ttagttacaagggtgattggagggttaattgatttgatttctttgccggaccttcgccgg
 aaatggtggtggatcagtatactcagcttattggctcgtcctgctgctatgccatattggt
 ctttcggatttcaccaatgccggtgggggttacaagaatattgatgatgttgaactggtag
 tggatagttatgcaaagtctagaataccgctggagggttatgtggactgatattgattaca
 tggatgggtttaaggacttcacactcgatccagttaacttcccactggagcgggtaattt
 ttttctcaggaagcttcacagaatgatcagaaatatgtactaatagtagatccaggaa
 ttagcatcaacaatacatatgacacctataggagaggcatggaagcagatgtcttcataa
 aacgcgataatatgccctaccaaggggtgtttggccagggaatgtttattatcctgatt
 ttctaaatccagctactgaagtatttggagaaatgaaattgagaagttccaggatctcg
 taccttttgatggcctgtggcttgacatgaatgaattgtcaaacttcataacttcccctc
 ctacaccatcatctacctttgatgatcctccctacaagataaacaactctggcgatcact
 tgcccatcaattatagaacagttccagccacttctacacattttggtgatacaatggagt
 ataatgtccataacctttatggattacttgaatctagagccacttatagtgcattgggta
 atgtcactggtaaaaggccattcattcttgaagatcaacttttcttggctctggcagat
 acacgtcacattggactggagataatgctgctacctggaacgatttggcatactccattc
 ctactatcttgagctttggattgtttggaattccaatggttggagctgatatatgtgggt
 tttaagtaacactactgaagagctttgccgcccgtggattcagcttggagcattctatc
 catttgcaagagaccactctgctaaggacacaccccccaagagctctatagttgggatt
 cagttgctgcagcagccaagaaagtcccttgggctccgatatcagttacttccatactttt
 atatgcttatgtacgaggcacatataaaagggactcccattgcacgaccttcttctct
 ctttccctcaagatgccaagacatttgatatcagcacacagttccttctcggtaaagggtg
 tcatgatctcacctatacttaagcaaggagcaacctctgttgatgcatatttccctgctg
 gaaactgggttgacctcttcaattactctcgctctgtgagttgaatcaaggaacatata
 tgacacttgacgcaccaccagatcatataaatgtacatgttcgtgaagggaacatattgg

tcatgcaaggggaagcaatgacaacacaagctgctcagaggactgcattcaaactccttg
 tcgtgctgagcagcagcaaaaacagcacaggagaactatttgtggacgatgacgatgagg
 tgcagatgggaagagaggggagggaggtggacgctagttaagtttaacagcaatatcattg
 gcaataaaattgtggttaaatacagaggttgtgaatggacgatatgcgctggatcaaggat
 tggtccttgaaaagggtgacattattgggatttgaaaatgtgagaggattgaagagctatg
 agcttgttgatcacaccagcaaggggaacacaacaatgaaggaaagtcttaagcagagtg
 gacagtttgttactatggaaatctcagggatgtcaatattgatagggaaagagttcaaata
 tggagctatacatcattacttaacaaatgaattaagttatatacgcttgtgtatgaaat
 ttctttcatttatcaatgcagtttaatttatgataaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

Seq. ID No. 2:

PKLRPRVHPSQHHPIQLHRPPALHRGYSFRYFAGVSHGVLLLSSNGMDIVYTGDRIYSYKV
 IGLLIDLYFFAGPSPPEMVVDQYTQLIGRPAAMPYWSFGFHQCRWGYKNIDDELVDVSYA
 KSRIPLEVMWTDIDYMDGFKDFTLDPVNFPLERVIFFLRKLHQNDQKYVLIVDPGISINN
 TYDTYRRGMEADVFIKRDNMPYQGVVWPGNVYYPDFLNPATEVFWRNEIEKFQDLVPFDG
 LWLDMNELSNFITSPPTPSSTFDDPPYKINNSGDHLPINYRTVPATSTHFGDTMEYNVHN
 LYGLLES RATYSALVNVTGKRPFILVRSTFLGSGRYTSHWTGDNAATWNDLAYS IPTILS
 FGLFGIPMVGADICGFSSNTTEELCRRWIQLGAFYPPFARDHSAKD TTPQELYSWDSVAAA
 AKKVLGLRYQLLPYFYMLMYEAIKGTPIARPLFFSFPQDAKTFDISTQFLLGKGVMISP
 ILKQGATSVDAYFPAGNWFDFNFYSRSVSLNQGTYMTLDAPPDHINVHVREGNILVMQGE
 AMTTQAAQRTAFKLLVVLSSSKNSTGELFVDDDDDEVQMGREGGRWTLVKFNSNIIGNKIV
 VKSEVVNGRYALDQGLVLEKVTLLGFENVRLKSYELVGS HQGNTTMKESLKQSGQFVT
 MEISGMSILIGKEFKLELYIIT

根据本发明的 α -葡糖苷酶核苷酸序列显示与已知 α -葡糖苷酶编
 码分子的相对较少的序列同源性 (Taylor 等, 1998, 植物学杂志, 13:
 419-424; Sugimoto 等, 1997, 植物分子生物学, 33, 765-768; EMBL
 Datenbank-Eintrag: U22450, P10253, D86624)。此外, 该氨基酸序
 列与现有技术中所述的 α -葡糖苷酶明显不同, 特别是在 5' 区域, 如

用 SEQ ID No.2 的序列对比所示。

适用于本发明并且编码一种选自 A 组的蛋白质的核苷酸序列是，例如，可溶性淀粉合酶（I、II、III 或 IV）或颗粒结合淀粉合酶同工型（例如，Hergersberg, 1988, 博士论文, Cologne 大学; Abel, 1995, 博士论文, FU Berlin; Abel 等人, 1996, 植物杂志 (Plant Journal) 10(6):981-991; Visser 等人, 1989, 植物科学 (Plant Sci.) 64:185-192; van der Leij 等人, 1991, 分子与普通遗传学 (Mol. Gen. Genet.) 228:240-248; EP-A-0779363; WO 92/11376; WO 96/15248, WO 97/26362; WO 97/44472; WO 97/45545; Delrue 等人, 1992, 细菌学杂志 (J. Bacteriol.) 174:3612-3620; Baba 等人, 1993, 植物生理学 (Plant Physiol.) 103:565-573; Dry 等人, 1992, 植物杂志 2,2:193-202, 或 EMBL 数据库条目 X74160; X58453; X88789)、分支酶同工型（分支酶 I、IIa、IIb）、脱支酶同工型（脱支酶、异淀粉酶、支链淀粉酶 RI 酶）或歧化酶同工型，如 WO 92/14827、WO 95/07335、WO 95/09922、WO 96/19581、WO 97/22703、WO 97/32985、WO 97/42328、Takaha 等人, 1993, 生物学与化学杂志 (J. Biol. Chem.) 268:1391-1396 或 EMBL 数据库条目 X83969 所述，和 ADP 葡萄糖焦磷酸化酶、质体淀粉磷酸化酶同工型，如 EP-A-0368506; EP-A-0455316; WO 94/28146; DE 19653176.4; WO 97/11188; Brisson 等人, 1989, 植物细胞 (The Plant Cell) 1:559-566; Buchner 等人, 1996, 植物 (Planta) 199:64-73; Camirand 等人, 1989, 植物生理学 89(增 4):61; Bhatt 和 Knowler, 实验植物学杂志 (J. Exp. Botany) 41(增):5-7; Lin 等人, 1991, 植物生理学 95:1250-1253; Sonnewald 等人, 1995, 植物分子生物学 (Plant Mol. Biol.) 27:567-576; DDBJ 号 D23280; Loberth 等人, 1998, 自然生物技术 (Nature Biotechnology) 16:473-477 所述。

可按照本发明适当使用的核苷酸序列是原核或真核来源的，优选地是细菌、真菌或植物来源的。

对于本发明，术语“核苷酸序列的部分”是指根据本发明的或将按照本发明使用的核苷酸序列的部分，其长度至少 15bp，优选地至少

150bp, 特别优选地至少 500bp, 但通常不超过 5000bp, 优选地 2500bp.

对于本发明, 术语“杂交”是指在常规杂交条件下优选地在严格条件下的杂交, 如 Sambrook 等人(《分子克隆, 实验室指南》, 第二版(1989), 冷泉港实验室出版社, 冷泉港, NY)所述。

特别优选地, “特异性杂交”在下列高度严格条件下发生:

杂交缓冲液: 2×SSC; 10×Denhardt 溶液(Ficoll 400 + PEG + BSA; 比例 1:1:1); 0.1% SDS; 5mM EDTA; 50mM Na₂HPO₄; 250μg/ml 鲑精 DNA; 50μg/ml tRNA; 或 0.25M 磷酸钠缓冲液 pH7.2; 1mM EDTA; 7% SDS,

杂交温度 T=55-68℃

洗涤缓冲液: 0.2×SSC; 0.1% SDS 和

洗涤温度: T=40-68℃

可与根据本发明的核酸分子杂交的分子也包括根据本发明的核酸分子的片段、衍生物和等位变体。“片段”可理解为不只是指长度足以编码所述蛋白质功能活性部分的核酸分子的部分。术语“衍生物”在本发明说明书中是指, 这些分子的序列在一个或多个位置上不同于根据本发明的核酸分子的序列, 并显示与这些序列有高度同源性。同源性是指至少 60%, 优选地超过 70%, 特别优选地超过 85%的序列相同性。相对于根据本发明的核酸分子的差异可通过缺失、置换、插入(添加)或重组产生。

此外, 同源性还指在所述核酸分子与其编码的蛋白质之间存在功能和/或结构等同性。同源性还指, 目标核酸分子或其所编码的蛋白质之间存在的功能和/或结构等同性。与根据本发明的分子同源, 并组成这些分子的衍生物的核酸分子, 通常是这些分子的变异, 它们构成行使相同的生物功能的修饰。它们可以是天然发生的变异, 例如其它种的序列, 或突变, 这些突变可能是天然发生的或经定向诱变引入的。变异另外还可以是合成序列。等位变体可以是天然发生的变体或合成变体或通过重组 DNA 技术产生的变体。

根据本发明的核酸分子可以是 DNA 分子, 特别是 cDNA 分子,

或者是基因组分子。根据本发明的核酸分子还可以是 RNA 分子。根据本发明的核酸分子或其片段可以例如从天然来源获得、利用重组技术产生或合成产生。

为了在植物细胞中以有义或反义方向表达根据本发明的核酸分子，将其与确保可在植物细胞中转录的调节 DNA 元件连接。这些元件特别包括启动子。在植物细胞中有活性的任何启动子通常都适于表达。可选择启动子，使得表达为组成型的，或仅发生于特定组织中、植物发育的特定时间或可能是例如化学或生物诱导性的外界因素所确定的时间。相对于被转化的植物，启动子可能是同源或异源的，如同核苷酸序列一样。合适的启动子的实例是用于组成型表达的花椰菜花叶病毒 35S RNA 启动子，用于在马铃薯中块茎特异性表达的 patatin 启动子 B33 (Rocha-Sosa 等人, 1989, EMBO J. 8:23-29)，或确保只在光合活性组织中表达的启动子，例如 ST-LS1 启动子 (Stockhaus 等人, 1987, 美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 84:7943-7947; Stockhaus 等人, 1989, EMBO J. 8:2445-2451)、或用于胚乳特异性表达，小麦 HMG 启动子或玉米醇溶蛋白基因的启动子。

终止根据本发明的核酸分子的终止序列可用来正确地终止转录并向转录物添加 poly-A 尾，这被认为具有稳定转录物的作用。这些元件已在文献 (参见 Gielen 等人, 1989, EMBO J. 8: 23-29) 中描述，通常在希望时是可交换的。

根据本发明的核酸分子能用于产生显示 α -葡糖苷酶活性的增加或减少，或者 α -葡糖苷酶和至少另一种淀粉代谢酶活性提高和/或降低的转基因植物细胞和植物。为此，将根据本发明的核酸分子引入含有在植物细胞中有效转录所必需的调节核酸序列的适当载体中，并引入植物细胞中。另一方面，能用根据本发明的核酸分子抑制细胞中内源性 α -葡糖苷酶的合成，或内源性 α -葡糖苷酶和至少另一种选自 A 组的蛋白质的合成。这可借助于反义构建体、体内诱变、发生的共抑制作用或利用适当构建的核酶来实现。另一方面，根据本发明的核酸分子能用于在转基因植物细胞中表达 α -葡糖苷酶，或表达 α -葡糖苷酶

和至少另一种选自 A 组的蛋白质，从而导致在每种情况中表达的酶在细胞中的活性都提高。

另外，存在利用根据本发明的核酸分子抑制细胞中内源性 α -葡糖苷酶合成和至少另一种选自 A 组的蛋白质过量表达的可能性。

最后，根据本发明的核酸分子也可用于在转基因植物细胞中表达 α -葡糖苷酶和抑制至少另一种选自 A 组的蛋白质。于是最后提到的两个本发明的实施方案在细胞中导致分别被抑制或表达的酶的活性同时抑制和提高。

本发明还涉及一种包含根据本发明的核酸分子的载体。

术语“载体”包括质粒、粘粒、病毒、噬菌体和遗传工程中常规使用的其它载体，它们包含根据本发明的核酸分子且适于转化细胞。这些载体优选地适用于转化植物细胞。特别优选地，它们允许将根据本发明的核酸分子，适当与侧翼调节区一起，整合到植物细胞基因组中。实例是二元载体如 pBinAR 或 pBinB33，它们能用于土壤杆菌介导的基因转移。

在一个优选实施方案中，根据编码一种具有 α -葡糖苷酶功能的蛋白质的核苷酸序列或其片段以有义或反义方向存在这一事实区别根据本发明的载体。

在另一个优选实施方案中，根据编码一种或多种选自 A 组的蛋白质的核苷酸序列或其片段以有义或反义方向存在这一事实区别根据本发明的载体。

在再另一个优选实施方案中，根据编码多种选自 A 组的蛋白质的核苷酸序列或其片段部分以有义方向、部分以反义方向存在这一事实区别根据本发明的载体。

极特别优选地，根据本发明的载体包含一种或多种确保 RNA 在原核或真核细胞中转录和合成的调节元件。

另外，能利用分子生物学常规技术（见，例如，Sambrook 等人，1989，《分子克隆，实验室指南》，第二版，冷泉港实验室出版社，冷泉港，NY）向根据本发明的 DNA 序列中引入多个突变，这导致生物

学性质可被改变的蛋白质的合成。一方面，能产生缺失突变体，其中的序列通过可引起类似截短的蛋白质合成的编码 DNA 序列 5' 或 3' 端的渐进缺失产生。例如，DNA 序列 5' 端的这些缺失允许定向产生这样的酶，由于有关转运序列或信号序列的去除其不再位于其原始（同源）区室中而定位于细胞溶胶中，或者由于其它信号序列的添加而定位于一种或多种其它（异源）区室（例如质体、液泡、线粒体、质外体）中。

另一方面，在改变的氨基酸序列可影响如酶活性或酶调节的位置处引入点突变也是可行的。因此，能产生如 K_M 或 k_{cat} 值改变或不再经受细胞中正常存在的调节机制如经过别构调节或共价修饰的突变。

对于原核细胞中的遗传工程操作，能向质粒中引入根据本发明的 DNA 序列或这些序列的片段，这允许诱变或通过 DNA 序列重组改变序列。利用标准分子生物学方法（参见 Sambrook 等人，1989，同前）可进行碱基互换或添加天然或合成序列。为了使 DNA 部分彼此连接，可将连接体或接头与这些部分连接。此外，还可进行提供适当限制酶切位点或除去过量 DNA 或不再需要的限制酶切位点的操作。在适用插入、缺失或置换时，也可使用体外诱变、引物修复、限制酶切或连接。通常使用的分析方法是序列分析、限制酶切分析及适当时其它生物化学和分子生物学方法。

本发明还涉及一种宿主细胞，特别是原核或真核细胞，优选地细菌或植物细胞（例如大肠杆菌、土壤杆菌、茄科（Solanaceae）、Poideae、黑麦、大麦、燕麦、玉米、小麦、高粱和谷子、西米、稻、豌豆、大豌豆、木薯、马铃薯、番茄、油籽油菜、大豆、大麻、亚麻、向日葵、豇豆、绿豆、菜豆、香蕉或竹芋的细胞），它们含有根据本发明的核酸分子，或根据本发明的载体或来源于这种细胞，其已用本发明的核酸分子或载体转化。

本发明还涉及多种宿主细胞，特别是原核或真核细胞，优选地细菌或植物细胞（例如大肠杆菌、土壤杆菌、茄科、Poideae、黑麦、大麦、燕麦、玉米、小麦、高粱和谷子、西米、稻、豌豆、大豌豆、木

薯、马铃薯、番茄、油菜、大豆、大麻、亚麻、向日葵、豇豆、绿豆、菜豆、香蕉或竹芋的细胞)，它们除了一种编码具有 β -淀粉酶功能的蛋白质的核苷酸序列或其片段，含有一种或多种编码选自A组的蛋白质的核苷酸序列或其片段，或可与这些核酸分子杂交的核苷酸序列的重组核酸分子。

根据本发明的宿主细胞不仅可用根据本发明的核酸分子产生，而且也可利用连续转化（例如所谓的“超级转化”）产生，其中在多个连续细胞转化步骤中使用根据本发明的核苷酸序列或包含根据核苷酸序列的载体，这些核苷酸序列编码一种具有如下功能的蛋白质，分支酶、ADP 葡萄糖焦磷酸化酶、颗粒结合淀粉合酶、可溶性淀粉合酶 I、II、III、IV、脱支酶、歧化酶、质体淀粉磷酸化酶、R1 酶淀粉酶、葡糖苷酶、其部分，和可与所述核苷酸序列或其部分之一杂交的核酸分子。本发明的另一个实施方案涉及一种产生可合成改性淀粉的转基因植物细胞的方法，其包括向植物细胞基因组中整合根据本发明的核酸分子或根据本发明的载体。

通过遗传工程方法能使根据本发明的核酸分子使得参与植物的淀粉代谢，并将其改变，这样引起改性淀粉的合成，相对于野生型植物中合成的淀粉该改性淀粉在以下方面得到改变，例如，结构、含水量、蛋白含量、脂含量、纤维含量、灰分/磷酸含量、直链淀粉/支链淀粉比率、分子量分布、分支程度、颗粒大小、颗粒形状及结晶，或其物理化学性质，如流动及吸收状态、胶凝温度、粘度、增稠能力、溶解度、凝胶结构、透明度、热稳定性、剪切稳定性、酸稳定性、退减的趋势、胶凝作用、冻融稳定性、复合体形成、碘结合、薄膜形成、粘合力、酶稳定性、可消化性或反应性。通过提高参与淀粉代谢的蛋白质的活性，例如过量表达适当的核酸分子，或提供不再经历细胞调节机制和/或显示与其活性有关的不同温度依赖性的突变，也能够提高适当遗传改造的植物中的产量。特别明显的产量提高可能是由于提高了一种或多种参与淀粉代谢的蛋白质在被转化植物淀粉贮藏组织的特殊细胞中，如在马铃薯的块茎或玉米或小麦的胚乳中的活性。这些参与淀粉

代谢的可能性的经济重要性和优点是明显的。

当在植物中表达根据本发明的核酸分子时，所合成的蛋白质原则上能定位于植物细胞的任何希望的区室中。为了实现在特定区室（细胞溶胶、液泡、质外体、质体、线粒体）中的定位，必要时必须缺失（除去）确保定位的转运或信号序列，并且在必要时必须将剩余的编码区与确保在特定细胞区室中定位的 DNA 序列连接。这些序列已知（见，例如，Braun 等人，EMBO J. 11（1992），3219-3227；Wolter 等人，美国国家科学院院刊 85（1988），846-850；Sonnewald 等人，植物杂志 1（1991），95-106）。

例如，通过使用根据本发明的核酸分子，表达适当的反义 RNA、有义 RNA 以实现共抑制作用、体内诱变，或表达适当构建的可特异酶切编码参与淀粉代谢的蛋白质之一的转录物的核酶，优选地通过表达一种反义转录物，能实现参与淀粉代谢的蛋白质活性降低的植物细胞的产生。

为此，一方面，能使用一种 DNA 分子，其包含编码一种参与淀粉代谢的蛋白质的所有序列，包括可能存在的任何侧翼序列，也能使用只包含编码序列部分的 DNA 分子，这些部分的最小长度为 15bp，优选地至少 100-500bp，特别是超过 500bp。通常使用短于 5000bp，优选地短于 2500bp 的 DNA 分子。

也能使用显示与根据本发明的 DNA 分子的序列有高度同源性，但与之不完全相同的 DNA 序列。最小同源性应当超过约 65%。优选使用具有 75%，特别是 80%同源性的序列。

用于降低细胞中特定蛋白质活性的核酶表达为本领域技术人员所周知，并在如 EP-B1-0 321-201 中有述。例如，Feyter 等人（分子与普通遗传学 250（1996），329-338）描述了植物细胞中核酶的表达。

也可通过所谓的“体内诱变”在根据本发明的植物细胞中减少参与淀粉代谢的蛋白质，其中通过细胞转化向细胞中引入杂合 RNA-DNA-寡核苷酸（“chimeroplast”）（Kipp P.B.等人，“第五届国际植物分子生物学大会”的招贴会议，21-27，1997 年 9 月，新加坡；R. A. Dixon

和 C. J. Arntzen, “转基因植物的代谢工程”上的会议报告, 重要座谈会, Copper Mountain, CO, USA, TIBTECH 15 (1997), 441-447; 国际专利申请 WO 95/15972; Kren 等人, 肝脏病学 (Hepatology) 25 (1997), 1462-1468; Cole-Strauss 等人, 科学 273(1996), 1386-1389)。

用于该目的的 RNA-DNA-寡核苷酸的一部分 DNA 组分与内源蛋白质的核酸序列同源, 但与内源蛋白质的核酸序列相比显示一种突变, 或者含有被同源区包围的异源区。

RNA-DNA-寡核苷酸的同源区与内源核酸分子的碱基配对及随后的同源重组, 使得 RNA-DNA-寡核苷酸的 DNA 组分中包含的突变或异源区能被转移到植物细胞基因组中。这导致参与淀粉代谢的蛋白质活性的降低。

此外, 也可利用共抑制作用降低在植物细胞中参与淀粉代谢的酶活性。这些方法为本领域技术人员已知, 例如, Jorgensen (生物技术趋势 (Trends Biotechnol.) 8 (1990), 340-344)、Neibel 等人 (现代微生物学与免疫学观点 (Curr. Top. Microbiol. Immunol.) 197 (1995), 91-103)、Flavell 等人 (现代微生物学与免疫学观点 197(1995), 43-46)、Palaqui 和 Vaucheret (植物分子生物学 29(1995), 149-159)、Vaucheret 等人 (分子与普通遗传学 248 (1995), 311-317)、de Borne 等人 (分子与普通遗传学 243 (1994), 613-621) 描述了该方法。

为了抑制被转化植物中参与淀粉生物合成的多种酶的合成, 能使用同时含有反义方向并处于适当启动子控制下的编码相关酶的多种区域的 DNA 分子进行转化。每种序列可受其自身启动子的控制, 或者这些序列另外可由一种连接启动子作为融合体转录, 使得所述蛋白质的合成被抑制到大致相同或不同的程度。至于在这种构建体中使用的个别编码区的长度, 以上关于产生反义构建体的叙述也适用于此。原则上, 从这种 DNA 分子中启动子开始转录的反义片段的数量没有上限。但是, 产生的转录物长度通常不应超过 25kb, 优选地 15kb。

因此, 根据本发明的核酸分子使得转化植物细胞并同时抑制多种酶的合成成为可能。

分子转录。例如，这能通过 Northern 印迹分析检测。例如，根据本发明的植物细胞含有一种或多种由已引入的根据本发明的核酸分子编码的蛋白质。例如，这能通过免疫学方法特别是 Western 印迹分析检测。

如果已被引入的根据本发明的核酸分子相对于植物细胞同源，则根据根据本发明的核酸分子的额外表达，能将根据本发明的细胞与天然存在的细胞相区别。例如，转基因植物含有更多或更少的根据本发明的核酸分子的转录物。例如，这能通过 Northern 印迹分析检测。“更多”或“更少”在本说明书中意思是比相应的未转化细胞优选地至少多或少 10%，优选地至少多或少 20%，特别优选地至少多或少 50% 的转录物。此外，这些细胞优选地显示由引入的核酸分子编码的蛋白质含量相应提高或降低（至少 10%、20% 或 50%）。

利用本领域技术人员周知的技术能使转基因植物细胞再生为完整的植物。可通过再生根据本发明的转基因植物细胞获得的植物，和通过由根据本发明的植物细胞再生为完整的植物产生转基因植物的方法，也是本发明的主题。本发明的另一主题是含有根据本发明的转基因植物细胞的植物。原则上，转基因植物可以是任何种的植物，即，不仅可以是单子叶植物，也可以是双子叶植物。植物优选地是有益植物和淀粉贮藏植物，如谷物类种（黑麦、大麦、燕麦、玉米、小麦、高粱和谷子等）、西米、稻、豌豆、大豌豆、木薯、马铃薯、番茄、油籽油菜、大豆、大麻、亚麻、向日葵、豇豆、绿豆或竹芋。

本发明也涉及根据本发明的植物的繁殖材料，例如果实、种子、块茎、根状茎、幼苗、插条、愈伤组织、原生质体、细胞培养物等。

改变参与淀粉代谢的酶的酶促活性导致在通过根据本发明的方法产生的植物中合成结构改变的淀粉。

大量克隆载体可用于准备向高等植物中引入外源基因，载体含有大肠杆菌复制信号，和用于筛选被转化细菌细胞的标记基因。这些载体的实例是 pBR322、pUC 系列、M13mp 系列、pACYC184 等。能将希望的序列引入载体的适当限制酶切位点处。用所获得的质粒转化大肠杆菌细胞。被转化的大肠杆菌细胞在适当培养基中生长，然后收获

并裂解。回收该质粒。表征所获质粒 DNA 的分析方法通常是限制酶切分析、凝胶电泳和其它生物化学及分子生物学方法 (Sambrook 等人, 同前)。每种操作后, 能酶切质粒 DNA, 并将获得的 DNA 片段与其它 DNA 序列连接。每种质粒 DNA 序列都能被克隆到同一或其它质粒中。

有许多技术可用于向植物宿主细胞中引入 DNA 这些技术包括用根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 或发根土壤杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 作为转化体用 T-DNA 转化植物细胞, 利用聚乙二醇 (PEG) 的原生质体融合, 注射, DNA 电穿孔, 利用 biolistic 法引入 DNA, 及其它可能性。

向植物细胞中注射和电穿孔 DNA 不需所用质粒或 DNA 的特殊方面。能使用简单的质粒如 pUC 衍生物。但是, 如果欲由这些转化细胞再生为完整植物, 则需要选择性标记基因的存在。

根据向植物细胞中引入希望的基因的方法, 可需要其它的 DNA 序列。例如, 如果用 Ti 或 Ri 质粒转化植物细胞, 则 Ti 和 Ri 质粒 T-DNA 的至少右边界, 但通常是左右边界必须与欲作为侧翼区引入的基因相连接。如果用土壤杆菌转化, 则必须将欲引入的 DNA 克隆到特定质粒, 中间载体或二元载体中。通过与 T-DNA 序列同源的序列的同源重组, 能将中间载体整合到土壤杆菌 Ti 或 Ri 质粒中。前者也含有 T-DNA 转移所需的 *vir* 区。中间载体不能在土壤杆菌中复制。也能利用辅助质粒 (接合) 将中间载体转移到根癌土壤杆菌中。二元载体能在大肠杆菌和土壤杆菌中复制。它们含有处于左右 T-DNA 边界区之中的一种选择性标记基因和一种接头或多接头。它们可被直接转化到土壤杆菌中 (Holsters 等人 (1978) 分子与普通遗传学 163: 181-187)。用作宿主细胞的土壤杆菌应含有一种携带 *vir* 区的质粒。*vir* 区是向植物细胞中转移 T-DNA 所必需的。也可存在其它 T-DNA。用这样转化的土壤杆菌转化植物细胞。

T-DNA 在转化植物细胞中的应用已进行了大量研究, 描述于 EP 120516; Hoekema, 《二元植物载体系统》Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasterdam (1985), 第 5 章; Fraley 等人, 植物科学评述 (Crit. Rev.

Plant Sci.) 4: 1-46 和 An 等人 (1985) EMBO J. 4:277-287.

为了向植物细胞中转移 DNA, 能方便地将植物外植体与根癌土壤杆菌或发根土壤杆菌共培养。然后能在含有如用于筛选转化细胞的抗生素或杀生物剂的适当培养基中, 由被感染的植物材料 (例如叶切片、茎切片、根, 以及原生质体, 或在悬浮培养液中生长的植物细胞) 再生为完整植物。然后可检查得到的植物是否存在引入的 DNA。用 biolistic 法或原生质体转化引入外源 DNA 的其它可能性也已知 (参见, 例如, Willmitzer, L, 1993, 转基因植物。于: 《生物技术》, 一部多卷综合论文 (H.J. Rehm, G. Reed, A. Puhler, P. Stadler 编) 第二卷, 627-659, VCH Weinheim-New York-Basel-Cambridge)。

利用根癌土壤杆菌经 Ti 质粒载体系统转化双子叶植物已较明确, 而最近的研究表明, 利用基于土壤杆菌的载体甚至也使单子叶植物实际上可被转化 (Chan 等人, 植物分子生物学 22 (1993), 491-506; Hiei 等人, 植物杂志 6 (1994), 271-282)。

用于单子叶植物转化的备择系统是利用 biolistic 法的转化、原生质体转化、部分通透细胞的电穿孔和利用玻璃纤维引入 DNA。

文献中已描述了用于玉米转化的特别不同的方法 (参见, 例如, WO95/06128, EP 0 513 849, EP 0 465 875)。EP 292 435 描述了一种方法, 利用它能从无粘液、脆性、颗粒状玉米愈伤组织获得能育植物。在该说明书中, Shillito 等人 (生物技术 7 (1989), 581) 发现, 再生为能育植物的能力需要从愈伤组织悬浮培养液开始, 由其能制备具有再生植物能力的分裂的原生质体培养物。Prioli 和 Sondahl (生物技术 7 (1989), 589) 也描述了从玉米原生质体再生并获得能育玉米植物。

被引入的 DNA 整合到植物细胞基因组中后, 通常稳定于此, 并且也保持于最初转化的细胞的子代中。其通常含有一种选择性标记, 该选择性标记介导被转化的植物细胞对杀生物剂或抗生素如卡那霉素、G418、博来霉素、潮霉素或膦丝菌素等的抗性。因此所选的各个标记应使得能在缺乏引入 DNA 的细胞中筛选被转化的细胞。

在植物中, 被转化的细胞以常规方式生长 (参见, McCormick 等

人 (1986) 植物细胞报道 (Plant Cell Reports) 5:81-84)。产生的植物能正常生长，并与具有相同转化种质或其它种质的植物杂交。得到的杂种具有相应的表型特征。

应生长两代或多代以确保表型特征能稳定保持并遗传。另外应收获种子等以确保能保持所述表型或其它特征。

本发明的另一主题是一种以本质上已知的方式生产淀粉的方法，其中在该方法中处理或结合根据本发明的宿主细胞、植物细胞、植物、植物部分或繁殖材料。

从植物或淀粉贮藏植物器官中提取淀粉的方法为本领域技术人员所周知。例如，Eckhoff 等人 (谷物化学 (Cereal Chem.) 73 (1996) 54-57) 描述了从玉米粒中提取淀粉的方法。工业规模的玉米淀粉提取通常以湿磨法进行。另外，从多种淀粉贮藏植物中提取淀粉的方法描述于例如《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，例如，第 12 章，412-468 页；“玉米与高粱淀粉：生产”，Watson，第 13 章，469-479 页；“木薯、竹芋及西米淀粉：生产”，Corbishley 和 Miller，第 14 章，479-490 页；“马铃薯淀粉：生产与应用”，Mitch，第 15 章，491-506 页；“小麦淀粉：生产、改性与应用”，Knight 和 Oson，第 16 章，507-528 页；Rohmer 和 Klem 的“稻淀粉：生产与应用”)。在从植物材料中提取淀粉的方法中常用的装置是分离器、倾析器、旋液分离器、喷雾干燥器和流化床干燥器。

由于根据本发明的核酸分子的表达，根据本发明的转基因植物细胞和植物合成一种淀粉，例如，与野生型植物中合成的淀粉相比，其物理化学性质已改变。

本发明的另一主题是从根据本发明的植物细胞和植物、其繁殖材料中或通过根据本发明的方法获得的淀粉。

本发明的另一实施方案也包括根据本发明的淀粉在工业上，优选地在生产食品、包装材料或一次性产品生产中的应用。

根据本发明的淀粉能用本领域技术人员周知的方法化学和/或物理修饰，其未修饰和或修饰的形式适用于食品或非食品方面的多种用途。

根据本发明的淀粉的可能应用大体上可分为两个重要方面。一方面包括通过酶法或化学法获得的淀粉水解产物，主要是葡萄糖和葡萄糖单元。它们作为原材料用于其它化学修饰和如发酵的方法。此处重要的是水解法的简单性与便宜的设计，因为目前基本上用淀粉葡萄糖苷酶酶促进行。利用较少的酶节约经费是可行的。这可能是由于改变了淀粉的结构，例如提高了颗粒的表面积，由于较低程度的分支更好的可降解性，或限制与所用酶接近的空间结构。

根据本发明的淀粉能用作所谓的天然淀粉的另一方面，由于其聚合结构，可分为另外两个应用领域：

1. 食品工业

淀粉是许多食品的一种传统添加剂，其功能基本上是结合含水添加剂或提高粘度或提高胶凝能力。重要特性是流动特性、吸附特性、溶胀温度、胶凝温度、粘度、增稠能力、淀粉可溶性、透明度、凝胶结构、热稳定性、剪切稳定性、酸稳定性、退减的趋势、成膜能力、冻融稳定性、可消化性和与如无机或有机离子形成复合体的能力。

2. 非食品工业

在此重要方面，淀粉用作多种制造方法的助剂，或用作产品添加剂。当用淀粉作为助剂时，特别是必须提到纸与纸板制造工业。淀粉主要用于缓聚目的（保持固态）、结合填充颗粒和细粉、作为硬化剂及用于脱水。而且，淀粉的有利特性涉及劲度、硬度、声音、触感、光泽、平滑度、粘合强度和表面。

2.1. 纸与纸板制造工业

在造纸方法中，必须区分四个应用领域，即，表面、包涂、块状和喷涂。表面淀粉通常占最大的淀粉量，消费的 80%，8%用作包涂淀粉，7%为块状淀粉，5%为喷涂淀粉。

对淀粉在表面处理方面的要求一般是高白度、适当的粘度、高度

稳定的粘度、良好的成膜性和较低的粉尘形成。当用于包涂时，固体含量、适当的粘度、高结合力和高色素亲合力起重要作用。当用作团块添加剂时，重要的是在纸织物中的快速、均匀、无损耗的分布、高机械强度和完整保持。如果淀粉用于喷涂方面，则适度的固体含量、高粘度和高结合力是重要的。

2.2.粘合剂工业

淀粉的一个重要应用领域是粘合剂工业，其潜在用途可分为四个部分：作为纯浆糊的应用、在用专业化学药品处理过的浆糊中的应用、淀粉作为合成树脂和乳聚橡胶的添加剂的应用，和淀粉作为合成粘合剂的补充剂的应用。90%基于淀粉的粘合剂用于波面纸板生产、纸袋生产、纸铝复合材料的生产、用于信封、邮票的盒纸板和粘合剂的生产等。

2.3.纺织工业和纺织品护理产品工业

淀粉作为助剂和添加剂的一个重要应用领域是纺织品和纺织品护理产品的生产。在纺织工业中必须区分下面四个应用领域：淀粉作为胶粘剂的应用，即作为助剂用于减轻和加强燃烧性能，以保护其免于纺织中施加的张力，并用于在纺织中增强耐磨性，淀粉作为织物整理剂的应用，特别是在降低质量的预处理如漂白、染色等之后，淀粉作为增稠剂在用于预防出血的染料浆制造中的应用，及淀粉作为用于缝纫线的弯曲剂的添加剂的应用。

2.4.建筑材料工业

第四个应用领域是淀粉在建筑材料中作为添加剂的应用。一个实例是石膏板的生产，其中与石膏浆混合的淀粉与水胶化，扩散到石膏核心表面，并且石膏板与核心结合。其它应用领域是与炼油和矿物纤维的混合。在预拌混凝土中，淀粉产品用于延缓结合。

2.5.土壤稳定

淀粉产品的一个有限市场是土壤稳定剂的生产，其用于当土壤被人工破坏时对土壤颗粒的暂时防水保护。根据本说明书，淀粉与合成胶乳的产品组合在其防止腐蚀和结硬皮作用方面等同于以前使用的产

品，但明显更便宜。

2.6.在作物保护产品和肥料中的应用

使用淀粉的一个应用领域是用于改变产品特殊性质的作物保护产品。因此，淀粉用于提高作物保护产品和肥料的湿润性，用于测量有效成分的释放，用于将液体有效成分、挥发性有效成分和/或具有异味的有效成分转化为微晶、稳定、成形的物质，用于混合不相容的化合物，用于通过减少分解延长作用时间。

2.7. 医药及化妆品工业

另一应用领域是医药及化妆品工业。在制药工业中，淀粉用作片剂的粘合剂或用于稀释胶囊中的粘合剂。另外，淀粉也用作片剂分解剂，因为它们在与水接触后吸收液体并在短时间内膨胀，使有效成分释放。医用润滑粉和创伤粉由于质量原因是基于淀粉的。在化妆品方面，例如，淀粉用作粉状添加剂如香料和水杨酸的载体。淀粉的一个相对较大的应用领域是牙膏。

2.8.淀粉向煤和煤砖中的添加

淀粉的一个应用领域是向煤和煤砖中的添加。加入淀粉后，由于较大的数量，煤能聚集或成块，从而防止煤砖的早期分解。在烧烤煤中，淀粉添加可达 4-6%，在铝化煤中为 0.1-0.5%。另外，淀粉作为粘合剂也是重要的，因为当向煤和煤砖中添加淀粉时，能明显减少有害物质的释放。

2.9.矿石和煤泥滓的制造

另外，淀粉能用作矿石和煤泥滓的制造中的絮凝剂。

2.10.铸造助剂

另一个应用领域是作为铸造助剂的添加剂。多种铸造方法需要由粘合剂处理的沙子制成的核心。现在主要使用的粘合剂是用改性淀粉，在大多数情况下用溶胀淀粉处理的膨润土。加入淀粉的目的在于提高流动性并提高结合力。另外，可溶胀淀粉能满足生产工程的其它要求，如可用冷水分散，可再水合，易于与沙子混合，并具有较高水结合力。

2.11.在橡胶工业中的应用

在橡胶工业中，淀粉用于提高技术与视觉质量。原因是表面光泽的改善，触感与外观的改善，为此在冷熟化之前将淀粉分散于橡胶材料的粘胶表面，以及橡胶可印性的改善。

2.12. 皮革替代品的生产

改性淀粉另外还可用于皮革替代品的生产。

2.13. 合成聚合物中的淀粉

在聚合物方面，可设想以下应用领域：淀粉降解产物在加工方法中的应用（淀粉只是填充物，在合成聚合物与淀粉之间没有直接的键），或淀粉降解产物在聚合物生产中的应用（淀粉与聚合物形成稳定的键）。

与其它物质如滑石相比，淀粉作为纯填充物的应用是没有竞争力的。当淀粉的特性影响从而显著改变终产物的特性谱时，这有所不同。一个实例是淀粉产物在热塑塑料如聚乙烯加工中的应用。在此通过按 1:1 比例共表达结合淀粉与合成聚合物，得到母炼胶，用常规技术由之生产多种产品和粒状聚乙烯。通过在聚乙烯薄膜中应用淀粉，能实现中空体中物质通透性的提高，水蒸汽通透性提高，抗静电力的提高，防粘连性能的提高和墨水可印性的提高。当前的缺点涉及透明度不足，拉伸强度降低和弹性降低。

另一种可能性是淀粉在聚氨酯泡沫塑料中的应用。通过改变淀粉衍生物和工艺流程优化，能以直接方式控制合成聚合物与淀粉羟基的反应。由于淀粉的使用，这产生具有下列特性谱的聚氨酯薄膜：热伸展系数减小，收缩行为减小，压力-张力增高，不改变水吸收的情况下对水蒸汽的通透性提高，可燃性降低，极限拉伸强度降低，易燃部分无水滴形成，不含卤素，老化减缓。仍存在的缺点是可印性降低和冲击强度降低。当前产品的发展已不再限于薄膜。也可制造含有 50% 以上淀粉含量的固体聚合物产品如罐、板和盘。另外，淀粉/聚合物混合物因其生物降解性更高故被认为是有利的。

淀粉接枝聚合物因其极高的水结合能力而变得非常重要。它们是具有按照自由基链机制原则接枝的一条淀粉骨架和一条合成单体侧链

的产物。根据可达每克淀粉 1000 克水的较好的结合与保持能力，结合高粘度，能区分当前可利用的淀粉接枝聚合物。这些超级吸收剂的应用领域在最近已大大扩大，在卫生领域，是产品尿布和垫布，在农业领域，例如是种子涂层。

对于新型遗传工程淀粉的应用要确定的是，一方面，结构、含水量、蛋白含量、脂含量、纤维含量、灰分/磷酸含量、直链淀粉/支链淀粉比率、分子量分布、分支程度、颗粒大小、颗粒形状及结晶，另一方面，还有影响下列特征的性质：流动及吸收状态、胶凝温度、粘度、增稠能力、可溶性、凝胶结构、透明度、热稳定性、剪切稳定性、酸稳定性、退减的趋势、凝胶形成、冻融稳定性、复合体形成、碘结合、薄膜形成、粘合力、酶稳定性、可消化性和反应性。

利用遗传工程方法生产改性淀粉一方面能改变例如植物产生的淀粉的性质，这样不再需要利用化学或物理改变的其它修饰。另一方面，已用遗传工程方法改变的淀粉可进行进一步的化学修饰，这可导致质量的进一步提高，以用于上述某些应用领域。这些化学修饰大都已知。特别是，通过加热及压力处理、有机酸或无机酸处理、酶处理、氧化或酯化的修饰，这导致例如磷酸淀粉、硝酸淀粉、硫酸淀粉、黄酸淀粉、乙酸淀粉和柠檬酸淀粉的形成。另外，在强酸存在下一元醇或多元醇可用于制备淀粉醚，产生淀粉烷基醚、邻烯丙醚、羟烷基醚、O-羧甲基醚、含氮淀粉醚、含磷淀粉醚、含硫淀粉醚、交联淀粉或淀粉接枝聚合物。

根据本发明的淀粉的应用是在工业用途中，优选地用于食品或包装材料 and 一次性物品的生产。

下面的实施例用来说明本发明，而决不是限制。

缩写：

BE	分支酶
bp	碱基对
GBSS	颗粒结合淀粉合酶
IPTG	异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷

SS 可溶性淀粉合酶

PMSF 苯甲基磺酰氟

实施例中使用的培养基与溶液:

20×SSC 175.3g NaCl
88.2g 柠檬酸钠
加重蒸馏水至 1000ml
用 10N NaOH 调至 pH7.0

缓冲液 A 50mM Tris-HCl pH8.0
2.5mM DTT
2mM EDTA
0.4mM PMSF
10%甘油
0.1%连二亚硫酸钠

缓冲液 B 50mM Tris-HCl pH7.6
2.5mM DTT
2mM EDTA

缓冲液 C 0.5M 柠檬酸钠 pH7.6
50mM Tris-HCl pH7.6
2.5mM DTT
2mM EDTA

10×TBS 0.2M Tris-HCl pH7.5
5.0M NaCl

10×TBST 10×TBS
0.1% (v/v) 吐温 20

洗脱缓冲液 25mM Tris pH8.3
250mM 甘氨酸

透析缓冲液 50mM Tris-HCl pH7.0
50mM NaCl
2mM EDTA

	14.7mM β -巯基乙醇
	0.5mM PMSF
蛋白质缓冲液	50mM 磷酸钠缓冲液 pH7.2
	10mM EDTA
	0.5mM PMSF
	14.7mM β -巯基乙醇

附图描述

图 1 显示示意 RVA 温度分布图 (粘度对时间[min]), 粘度测定参数: T=胶凝温度, 胶凝开始时的温度; Max 是指最大粘度; Min 是指最小粘度; Fin 是指测定结束时的粘度; Set 是 Min 与 Fin 的差 (Δ) (回退值)。

在实施例中使用下列方法:

1. 克隆方法

载体 pBluescript II SK (Stratagene) 用于克隆到大肠杆菌中。

对于植物的转化, 将基因构建体克隆到二元载体 pBinAR Hyg (Hofgen 和 Willmitzer, 1990, 植物科学 6: 221-230) 和 pBinB33-Hyg 中。

2. 细菌菌株与质粒

对于 pBluescript 载体 pBluescript II KS (Stratagene) 和 pBinAR Hyg 和 pBinB33 Hyg 构建体使用大肠杆菌 DH5 α 株 (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburgh, USA)。体内切除使用大肠杆菌 XL1-Blue 株。

pBinAR

质粒 pBinAR 是二元载体质粒 pBin19 (Bevan, 1984) 的衍生物, 其如下构建:

从质粒 pDH51 中分离包含花椰菜花叶病毒 35S 启动子的核苷酸 6909-7437 的 529bp 片段作为 EcoRI/KpnI 片段 (Pietrzak 等人, 1986), 连接于 pUC18 多接头的 EcoRI 与 KpnI 酶切位点之间, 命名为质粒 pUC18-35S。利用限制性内切核酸酶 HindIII 和 PvuII, 从质粒 pAGV40

(Herrera-Estrella 等人, 1983) 中分离 192bp 片段, 其包含 Ti 质粒 pTiACH5 (Gielen 等人, 1984) 的 DNA (核苷酸 11749-11939)。待 PvuII 酶切位点具有 SphI 接头后, 将该片段连接于 pUC18-35S 的 SphI 与 HindIII 酶切位点之间, 将其命名为质粒 pA7。另外, 用 EcoRI 和 HindIII 切下包含 35S 启动子和 ocs 终止子的完整多接头, 连接于适当酶切的 pBin19 中。这产生植物表达载体 pBinAR (Hofgen 和 Willmitzer, 1990)。

pBinB33

将马铃薯 (*Solanum tuberosum*) patatin 基因 B33 (Rocha-Sosa 等人, 1989) 的启动子作为 DraI 片段 (核苷酸 -1512-+14) 连接于 SstI 酶切的载体 pUC19 中, 该载体已用 T4 DNA 聚合酶处理成平端。这产生质粒 pUC19-B33。用 EcoRI 和 SmaI 从该质粒上切下 B33 启动子, 将其连接于适当酶切的载体 pBinAR 中。这产生植物表达载体 pBinB33。

pBinAR-Hyg

从质粒 pA7 (参见载体 pBinAR 的描述) 开始, 将包含 35S 启动子、ocs 终止子和位于 35S 启动子与 ocs 终止子之间的多接头部分的 EcoRI-HindIII 片段引入适当酶切的质粒 pBin-Hyg 中。

pBinB33-Hyg

从质粒 pBinB33 开始, 切下包含 B33 启动子、多接头部分和 ocs 终止子的 EcoRI-HindIII 片段, 连接于适当酶切的载体 pBin-Hyg 中。这产生植物表达载体 pBinB33-Hyg。

3. 根癌土壤杆菌的转化

按照 Hofgen 和 Willmitzer (1988, 核酸研究 16: 9877) 的方法通过直接转化转移 DNA。按照 Birnboim 和 Doly (1979, 核酸研究 7: 1513-1523) 的方法分离被转化的土壤杆菌的质粒 DNA, 进行适当的限制酶切, 然后经凝胶电泳分析。

4. 马铃薯的转化

借助于根癌土壤杆菌 C58C1 株, 将质粒转化到马铃薯植物中

(*Solanum tuberosum* L.cv. Desiree, Vereinigte Saatzuchten eG, Ebstorf) (Dietze 等人 (1995), 《植物的基因转移》24-29 页, 编者: Potrykus, I. 和 Spangenberg, G., Springer Verlag, Deblaere 等人, 1985, 核酸研究 13: 4777-4788)。

将用解剖刀创伤的不育马铃薯培养物的 10 片小叶子置于补加有 2 % 蔗糖并含有 50ml 在选择条件下生长的根癌土壤杆菌过夜培养物的 10ml MS 培养基 (Murashige 和 Skoog (1962) 植物生理学 15: 473) 中。轻摇培养物 3-5 分钟后, 在暗处温育 2 天多。对于愈伤组织诱导, 将叶子置于补加有 1.6 % 葡萄糖、5mg/l 萘乙酸、0.2mg/l 苄氨基嘌呤、250mg/l claforan、50mg/l 卡那霉素和 0.80% Bacto 琼脂的 MS 培养基中。将叶子在 25℃ 和 3000Lux 下温育 1 周后, 将其置于补加有 1.6% 葡萄糖、1.4mg/l 玉米素核糖、20mg/l 萘乙酸、20mg/l 赤霉酸、250mg/l claforan、50mg/l 卡那霉素和 0.80% Bacto 琼脂的 MS 培养基上, 诱导发芽。

5. 植物培养方案

按下列方案将马铃薯植物保持于温室中:

光照期 25,000 Lux 和 22℃ 16 小时

黑暗期 15℃ 8 小时

大气湿度 60 %

6. DNA 片段的放射性标记

按照使用说明书, 用 Boehringer Mannheim (德国) 的 DNA 随机引物标记试剂盒放射性标记 DNA 片段。

7. 淀粉合酶活性的测定

如 Denyer 和 Smith, 1992, 植物 186: 609-617 所述, 通过测定 ADP[¹⁴C 葡萄糖]的 ¹⁴C 葡萄糖向甲醇/KCl-不溶性产物中的掺入, 进行淀粉合酶活性的测定。

8. 非变性凝胶中可溶性淀粉合酶的检测

为了用非变性凝胶电泳检测可溶性淀粉合酶的活性, 在 50mM Tris-HCl pH7.6、2mM DTT、2.5mM EDTA、10 % 甘油和 0.4mM PMSF

中水解马铃薯块茎的组织样品。电泳在 MiniProtean II 容器 (BioRAD) 中进行。1.5mm 厚凝胶的单体浓度是 7.5% (w/v), 用 25mM Tris-甘氨酸 pH8.4 作为凝胶缓冲液和电泳缓冲液。每块凝胶加样相同量的蛋白提取物, 并在 10mA 下分离 2 小时。

随后将活性凝胶在 50mM Tricine-NaOH pH8.5、25mM 乙酸钾、2mM EDTA、2mM DTT、1mM ADP-葡萄糖、0.1% (w/v) 支链淀粉和 0.5M 柠檬酸钠中温育。用鲁戈士溶液染色形成的葡聚糖。

9. 淀粉分析

用下列方法表征转基因马铃薯植物形成的淀粉:

a) 马铃薯植物的淀粉中直链淀粉/支链淀粉比率的测定

用标准方法从马铃薯植物中分离淀粉, 并用 Hovenkamp-Hermelink 等人 (马铃薯研究 (Potato Research) 31 (1988) 241-246) 所述的方法测定直链淀粉:支链淀粉比率。

b) 磷酸含量的测定

在马铃薯淀粉中, 某些葡萄糖单元可能在 C2、C3 和 C6 位碳原子上磷酸化。为了测定葡萄糖 C6 位磷酸化的程度, 将 100mg 淀粉在 1ml 0.7M HCl 中 95℃ 水解 4 小时 (Nielsen 等人 (1994) 植物生理学 105: 111-117)。用 0.7M KOH 中和后, 对 50ml 水解产物进行目视酶检测, 以测定葡萄糖-6-磷酸。监测所测批次 (100mM 咪唑/HCl; 10mM MgCl₂; 0.4mM NAD; 2 单位肠系膜明串球菌 (Leuconostoc mesenteroides) 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶; 30℃) 在 334nm 处的吸光度改变。

如 Ames, 1996, 酶学方法 (Methods in Enzymology) VIII, 115-118 所述测定总磷酸。

c) 支链淀粉侧链的分析

为了分析淀粉样品中侧链的分布和长度, 在 100mM 柠檬酸钠缓冲液 pH3.5 中用 0.4 单位异淀粉酶 (Megazyme International Ireland Ltd., Bray, 爱尔兰) 37℃ 消化 1ml 0.1% 淀粉溶液过夜。

除非另外指明, 否则其余分析如 Tomlinson 等人 (1997) 植物杂

志 11: 31-47 所述进行。

d) 颗粒大小的测定

用德国 Retsch GmbH 的 "lumosed" 光沉降仪测定颗粒大小。为此, 将 0.2g 淀粉悬浮于约 150ml 水中并立即测定。厂商提供的程序计算淀粉颗粒的平均直径, 假定平均淀粉密度为 1.5g/l。

e) 胶凝性质

用德国 Brabender OHG 的 Viskograph E 或使用快速粘度分析仪, Newport Scientific Pty Ltd, Investment Support Group, Warriewood NSW 2102, 澳大利亚, 记录淀粉的胶凝性质或粘性。当使用 Viskograph E 时, 对溶于 450ml 水的 20g 淀粉悬液进行下列加热程序: 以 3℃/分钟从 50℃ 加热到 96℃, 保持恒定 30 分钟, 以 3℃/分钟冷却到 30℃, 再次保持恒定 30 分钟。温度分布型显示特征性胶凝性质。

当用快速粘度分析仪 (RVA) 测定时, 对溶于 25ml 水的 2g 淀粉悬液进行下列加热程序: 于 50℃ 悬浮 60 秒, 以 12℃/分钟从 50℃ 加热到 95℃, 保持恒定 2.5 分钟, 以 12℃/分钟冷却到 50℃, 再次保持恒定 2 分钟。RVA 温度分布型显示所测淀粉的粘度测定参数, 最大粘度 (Max)、终末粘度 (Fin)、胶凝温度 (T)、最大粘度后发生的最小粘度 (Min), 和最小粘度与终末粘度的差 (回退值, Set) (参见表 1 和图 1)。

f) 凝胶强度的测定

为了用结构分析仪测定凝胶强度, 使 2 克淀粉在 25ml 水中凝胶化 (参见 RVA 测定), 然后排除空气在密封容器中 25℃ 贮存 24 小时。将样品置于结构分析仪 TA-XT2 (Stable Micro Systems) 的探头 (圆形印章) 之下, 按下列参数设置测定凝胶强度:

检测速度	0.5mm
刺入深度	7mm
(印章) 接触面积	113mm ²
压力/接触面积	2g

10. 葡萄糖、果糖和蔗糖的检测

为了测定葡萄糖、果糖和蔗糖含量，将马铃薯块茎的小块茎部分（直径约 10mm）在液氮中冷冻，然后用 0.5ml 10mM HEPES, pH7.5、80%（v/v）乙醇 80℃ 抽提 30 分钟。移出含有可溶物的上清液并测定其体积。该上清液用于测定可溶性糖的量。在具有下列组成的批次中进行可溶性葡萄糖、果糖和蔗糖的定量测定：

100.0	mM 咪唑/HCl, pH6.9
1.5	mM MgCl ₂
0.5	mM NADP ⁺
1.3	mM ATP
10-50	μl 样品
1.0	单位酵母葡萄糖-6-磷酸脱氢酶

该批次在室温下温育 5 分钟。随后在连续加入下列酶后通过测定 340nm 的吸光度光测糖：

1.0	单位酵母己糖激酶（测定葡萄糖）
1.0	单位酵母葡萄糖磷酸异构酶（测定果糖）和
1.0	单位酵母蔗糖酶（测定蔗糖）

应用实施例

实施例 1 编码马铃薯 α-葡糖苷酶的 cDNA 片段的分离

通过标准方法制备直接在下面产生幼芽的马铃薯块茎组织的总 RNA（Sambrook 等，1989，出处同上）。

用纯化的总 RNA 作为起始材料用于 poly A+RNA（Oligotex, mRNA 纯化试剂盒，根据制造商指示）。用 5μg polyA+ RNA 产生 cDNA 文库（λZAPII, Stratagene）。

根据制造商（Stratagene）指示，将此未扩增 cDNA 文库（原代文库）的大约 3×10^5 个噬斑形成单位（pfu）种板。用于噬斑杂交放射性标记的探针（随机引物 DNA 标记试剂盒，根据制造商指示）为 Genbank 保藏号 T76451 的序列。将滤膜于 42℃ 预杂交（缓冲液：5 X SSC，

0.5%BSA, 5 X Denhardt, 1%SDS, 40mM 磷酸缓冲液, pH7.2, 100mg/ml 鲑精 DNA, 25%甲酰胺), 随后在相同温度杂交 14 个小时。杂交后, 将滤膜用 3 X SSC, 0.5% SDS 在 42℃ 洗涤 20 分钟, 共三次, 放射自显影。挑出杂交噬斑, 分离的噬菌斑遵照制造商指示用于体内切割。分离来自所获细菌菌落的质粒 DNA, 用于序列分析, 鉴定为 SEQ ID NO.1。

用这种方法分离的质粒于 1998 年 7 月 24 日保藏于德意志微生物保藏中心 (DSMZ), FRG, 保藏号 DSM12347。

实施例 2: 质粒 p35S α SSI-Hyg 的制备

将含有编码马铃薯 SSS I (Abel, G. (1995), 博士论文, Freie Universitat Berlin) 的部分 cDNA 的 1831bp Asp718/XbaI 片段以相对于 35S 启动子的反义方向引入载体 pBinAR-Hyg 的 Asp718 与 XbaI 酶切位点之间。

实施例 3: 质粒 p35S-SSI-Kan 的制备

使含有编码马铃薯 SS I (Abel, 1995, 同前) 的 cDNA 的 2384bp EcoRI 片段成为平端, 并以相对于 35S 启动子的有义方向引入预先用 SmaI 酶切的载体 pBinAR 中。

实施例 4: 质粒 p35S α SSII-Kan 的制备

使含有编码马铃薯 SS II (Abel, 1995, 此处称为 GBSS II) 的部分 cDNA 的 1959bp SmaI/Asp718 片段成为平端, 并以相对于 35S 启动子的反义方向引入载体 pBinAR 的 SmaI 酶切位点中。

实施例 5: 质粒 pB33-SSII-Hyg 的制备

将含有编码马铃薯 SS II (Abel, 1995, 同前) 的 cDNA 的 2619bp SmaI/SalI 片段以相对于 B33 启动子的有义方向引入预先用 SmaI 和 SalI 酶切的载体 pBinB33-Hyg 中。

实施例 6: 质粒 p35S α SSIII-Hyg 的制备

将含有编码马铃薯 SS III (Abel 等人, 1996, 植物杂志 10 (6): 981-991) 的 cDNA 的 4212bp Asp718/XbaI 片段以相对于 35S 启动子的反义方向插入载体 pBinAR-Hyg 的 Asp718 与 XbaI 酶切位点之间。

实施例 7: 质粒 p35S-SSIII-Kan 的制备

使含有编码马铃薯 SS III (Abel 等人, 1996, 同前) 的 cDNA 的 4191bp EcoRI 片段成为平端, 并以相对于 35S 启动子的有义方向引入载体 pBinAR 的 SmaI 酶切位点中。

实施例 8: 质粒 pB33 α BE α SSIII-Kan 的制备

使含有编码马铃薯 BE 酶 (Kossmann 等人, 1991, 分子与普通遗传学 230 (1-2): 39-44) 的部分 cDNA 的 1650bp HindIII 片段成为平端, 并以相对于 B33 启动子的反义方向引入预先用 SmaI 酶切的载体 pBinB33 中。用 BamHI 切开产生的质粒。再将含有编码马铃薯 SS III 酶 (Abel 等人, 1996, 同前) 的部分 cDNA 的 1362bp BamHI 片段以相对于 B33 启动子的反义方向引入该酶切位点中。

实施例 9: 质粒 p35S α SSII- α SSIII-Kan 的制备

将含有编码马铃薯 SS II (Abel, 1995, 同前) 的部分 cDNA 的 1546bp EcoRV/HincII 片段克隆到已用 EcoRV/HincII 酶切的载体 pBluescript II KS 中, 然后经 Asp718/BamHI 消化切下, 以相对于 35S 启动子的反义方向引入以相同方式消化的载体 pBinAR 中。然后, 再将含有编码马铃薯 SS III (Abel 等人, 1996, 同前) 的部分 cDNA 的 1356bp BamHI 片段以相对于 35S 启动子的反义方向引入载体 pBinAR-SSII 的 BamHI 酶切位点中。

实施例 10: 质粒 pB33 α SSI α SSIII-Kan 的制备

使含有编码马铃薯 SS I (Abel, 1995, 同前) 的 cDNA 的 2384bp EcoRI 片段成为平端, 并以相对于 B33 启动子的反义方向克隆到 pBinB33 载体的 SmaI 酶切位点中。再将含有编码马铃薯 SS III (Abel 等人, 1996, 同前) 的部分 cDNA 的 1362bp BamHI 片段以相对于 B33 启动子的反义方向引入产生的载体的 BamHI 酶切位点中。

实施例 11 质粒 p35S α SSII-Hyg 的制备

使含有编码 SS II (Abel, 1995, 同前) 的部分 cDNA 的 1959bp SmaI/Asp718 片段成为平端, 并以相对于 35S 启动子的反义方向引入 pBinAR-Hyg 载体的 SmaI 酶切位点中。

实施例 12: 质粒向马铃薯细胞基因组中的引入

将实施例 1-11 所得到的质粒单个和/或连续地转移到土壤杆菌中, 由此如上所述转化马铃薯细胞。随后由被转化的植物细胞再生为完整植物。

实施例 13: 改性淀粉的物理化学表征

转化产生的转基因马铃薯植物显示其合成的改性淀粉的物理化学的改变。由这些植物形成的淀粉例如与野生型植物就其磷酸或直链淀粉含量、RVA 测定的粘度或胶凝化性质及其层析行为而言不同。

序列表

<110> Hoechst Schering AgrEvo GmbH

<120> 编码 α -葡糖苷酶的核酸分子, 合成改性淀粉的植物, 植物的
制备, 其用途, 及改性淀粉

<130> AGR 1998/M 225
<150> DE 19836097.5
<151> 1998-07-31

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 2272
<212> DNA

<213> 马铃薯

<400> 1

CGAATACGAA TAACCGACGC TAACCATCAA CGATGGGAAG TGCCGGAAGA AATTCTCCAC	60
CGTCCACCAC CGCCGTCGCC GCCGTCAACC TCCAACCTCCT CATCAGAAAA CCACTCCCCA	120
ATTACCCTCT CTAACCCAAA CTCAGACCTA GAGTTCACCC TTCACAACAC CATCCCATTG	180
AGCTTCACCG TCCGCCGGCG CTCCACCGGG GATACTCTTT TCGATACTTC GCCGGAGTTA	240
GTCATGGGGT TTTGCTTCTG AGTAGCAATG GCATGGATAT TGTGTATACG GGTGATAGGA	300
TTAGTTACAA GGTGATTGGA GGGTTAATTG ATTTGTATTT CTTTGCCGGA CCTTCGCCGG	360
AAATGGTGGT GGATCAGTAT ACTCAGCTTA TTGGTCGTCC TGCTGCTATG CCATATTGGT	420
CTTTCGGATT TCACCAATGC CGGTGGGGTT ACAAGAATAT TGATGATGTT GAACTGGTAG	480
TGGATAGTTA TGCAAAGTCT AGAATACCGC TGGAGGTTAT GTGGACTGAT ATTGATTACA	540
TGGATGGTTT TAAGGACTTC AACTCGATC CAGTTAACTT CCCACTGGAG CGGGTAATTT	600
TTTTTCTCAG GAAGCTTCAT CAGAATGATC AGAAATATGT ACTAATAGTA GATCCAGGAA	660
TTAGCATCAA CAATACATAT GACACCTATA GGAGAGGCAT GGAAGCAGAT GTCTTCATAA	720
AACGCGATAA TATGCCCTAC CAAGGGGTTG TTTGGCCAGG GAATGTTTAT TATCCTGATT	780
TTCTAAATCC AGCTACTGAA GTATTTTGGG GAAATGAAAT TGAGAAGTTC CAGGATCTCG	840
TACCTTTTGA TGGCCTGTGG CTTGACATGA ATGAATTGTC AACTTCATA ACTTCCCCTC	900

```

CTACACCATC ATCTACCTTT GATGATCCTC CCTACAAGAT AAACAACCTCT GCGCATCACT      960
TGCCCATCAA TTATAGAACA GTTCCAGCCA CTTCTACACA TTTTGGTGAT ACAATGGAGT      1020
ATAATGTCCA TAACCTTTAT GGATTACTTG AATCTAGAGC CACTTATAGT GCATTGGTTA      1080
ATGTCACTGG TAAAAGGCCA TTCATTCTTG TAAGATCAAC TTTTCTTGGC TCTGGCAGAT      1140
ACACGTCACA TTGGACTGGA GATAATGCTG CTACCTGGAA CGATTGGCA TACTCCATTC      1200
CTACIATCTT GAGCTTTGGA TTGTTTGGA TTCCAATGGT TGGAGCTGAT ATATGTGGTT      1260
TTTCAAGTAA CACTACTGAA GAGCTTTGCC GCCGCTGGAT TCAGCTTGA GCATTCTATC      1320
CATTTCGAAG AGACCACTCT GCTAAGGACA CAACCCCCCA AGAGCTCTAT AGTTGGGATT      1380
CAGTTGCTGC AGCAGCCBAG AAAGTCCTTG GGCTCCGATA TCAGTTACTT CCATACTTTT      1440
ATATGCTTAT GTACGAGGCA CATATAAAG GGACTCCCAT TGCACGACCC CTCTTCTTCT      1500
CTTCCCTCA AGATGCCAAG ACATTGATA TCAGCACACA GTTCCTTCTC GGTAAAGGTG      1560
TCATGATCTC ACCTATACTT AAGCAAGGAG CAACCTCTGT TGATGCATAT TTCCCTGCTG      1620
GAAACTGGTT TGACCTCTTC AATTACTCTC GCTCTGTGAG TTTGAATCAA GGAACATATA      1680
TGACACTTGA CGCACCACCA GATCATATAA ATGTACATGT TCGTGAAGGG AACATATTGG      1740
TCATGCAAGG GGAAGCAATG ACAACACAAG CTGCTCAGAG GACTGCATTC AAACCTCTTG      1800
TCGTGCTGAG CAGCAGCAAA AACAGCACAG GAGAACTATT TGTGGACGAT GACGATGAGG      1860
TGCAGATGGG AAGAGAGGGA GGGAGGTGGA CGCTAGTTAA GTTTAACAGC AATATCATTG      1920
GCAATAAAAT TGTGGTTAAA TCAGAGGTG TGAATGGACG ATATGCGCTG GATCAAGGAT      1980
TGGTCCTTGA AAAGGTGACA TTATTGGGAT TTGAAAATGT GAGAGGATTG AAGAGCTATG      2040
AGCTTGTTGG ATCACACCAG CAAGGGAACA CAACAATGAA GGAAAGTCTT AAGCAGAGTG      2100
GACAGTTTGT TACTATGGAA ATCTCAGGGA TGTCAATATT GATAGGGAAA GAGTTCAAT      2160
TGGAGCTATA CATCATTACT TAACAAATGA ATTAAGTTAT ATACGCTTGT TGTATGAAAT      2220
TTTCTTTCAT TTATCAATGC AGTTTAATTT ATGATAAAAA AAAAAAAAAA AA      2272

```

<210> 2
 <211> 682
 <212> PRT
 <213> 马铃薯

01.02.98

<400>

2

```

Pro Lys Leu Arg Pro Arg Val His Pro Ser Gln His His Pro Ile Gln
1          5          10          15

Leu His Arg Pro Pro Ala Leu His Arg Gly Tyr Ser Phe Arg Tyr Phe
          20          25          30

Ala Gly Val Ser His Gly Val Leu Leu Leu Ser Ser Asn Gly Met Asp
          35          40          45

Ile Val Tyr Thr Gly Asp Arg Ile Ser Tyr Lys Val Ile Gly Gly Leu
          50          55          60

Ile Asp Leu Tyr Phe Phe Ala Gly Pro Ser Pro Glu Met Val Val Asp
65          70          75          80

Gln Tyr Thr Gln Leu Ile Gly Arg Pro Ala Ala Met Pro Tyr Trp Ser
          85          90          95

Phe Gly Phe His Gln Cys Arg Trp Gly Tyr Lys Asn Ile Asp Asp Val
          100          105          110

Glu Leu Val Val Asp Ser Tyr Ala Lys Ser Arg Ile Pro Leu Glu Val
          115          120          125

Met Trp Thr Asp Ile Asp Tyr Met Asp Gly Phe Lys Asp Phe Thr Leu
          130          135          140

Asp Pro Val Asn Phe Pro Leu Glu Arg Val Ile Phe Phe Leu Arg Lys
145          150          155          160

Leu His Gln Asn Asp Gln Lys Tyr Val Leu Ile Val Asp Pro Gly Ile
          165          170          175

Ser Ile Asn Asn Thr Tyr Asp Thr Tyr Arg Arg Gly Met Glu Ala Asp
          180          185          190

Val Phe Ile Lys Arg Asp Asn Met Pro Tyr Gln Gly Val Val Trp Pro
          195          200          205

Gly Asn Val Tyr Tyr Pro Asp Phe Leu Asn Pro Ala Thr Glu Val Phe
210          215          220

```

Trp Arg Asn Glu Ile Glu Lys Phe Gln Asp Leu Val Pro Phe Asp Gly
 225 230 235 240
 Leu Trp Leu Asp Met Asn Glu Leu Ser Asn Phe Ile Thr Ser Pro Pro
 245 250 255
 Thr Pro Ser Ser Thr Phe Asp Asp Pro Pro Tyr Lys Ile Asn Asn Ser
 260 265 270
 Gly Asp His Leu Pro Ile Asn Tyr Arg Thr Val Pro Ala Thr Ser Thr
 275 280 285
 His Phe Gly Asp Thr Met Glu Tyr Asn Val His Asn Leu Tyr Gly Leu
 290 295 300
 Leu Glu Ser Arg Ala Thr Tyr Ser Ala Leu Val Asn Val Thr Gly Lys
 305 310 315 320
 Arg Pro Phe Ile Leu Val Arg Ser Thr Phe Leu Gly Ser Gly Arg Tyr
 325 330 335
 Thr Ser His Trp Thr Gly Asp Asn Ala Ala Thr Trp Asn Asp Leu Ala
 340 345 350
 Tyr Ser Ile Pro Thr Ile Leu Ser Phe Gly Leu Phe Gly Ile Pro Met
 355 360 365
 Val Gly Ala Asp Ile Cys Gly Phe Ser Ser Asn Thr Thr Glu Glu Leu
 370 375 380
 Cys Arg Arg Trp Ile Gln Leu Gly Ala Phe Tyr Pro Phe Ala Arg Asp
 385 390 395 400
 His Ser Ala Lys Asp Thr Thr Pro Gln Glu Leu Tyr Ser Trp Asp Ser
 405 410 415
 Val Ala Ala Ala Ala Lys Lys Val Leu Gly Leu Arg Tyr Gln Leu Leu
 420 425 430
 Pro Tyr Phe Tyr Met Leu Met Tyr Glu Ala His Ile Lys Gly Thr Pro
 435 440 445
 Ile Ala Arg Pro Leu Phe Phe Ser Phe Pro Gln Asp Ala Lys Thr Phe
 450 455 460
 Asp Ile Ser Thr Gln Phe Leu Leu Gly Lys Gly Val Met Ile Ser Pro
 465 470 475 480
 Ile Leu Lys Gln Gly Ala Thr Ser Val Asp Ala Tyr Phe Pro Ala Gly
 485 490 495
 Asn Trp Phe Asp Leu Phe Asn Tyr Ser Arg Ser Val Ser Leu Asn Gln
 500 505 510

01.00.28

Gly	Thr	Tyr	Met	Thr	Leu	Asp	Ala	Pro	Pro	Asp	His	Ile	Asn	Val	His
			515					520					525		
Val	Arg	Glu	Gly	Asn	Ile	Leu	Val	Met	Gln	Gly	Glu	Ala	Met	Thr	Thr
		530				535					540				
Gln	Ala	Ala	Gln	Arg	Thr	Ala	Phe	Lys	Leu	Leu	Val	Val	Leu	Ser	Ser
	545				550					555					560
Ser	Lys	Asn	Ser	Thr	Gly	Glu	Leu	Phe	Val	Asp	Asp	Asp	Asp	Glu	Val
				565					570					575	
Gln	Met	Gly	Arg	Glu	Gly	Gly	Arg	Trp	Thr	Leu	Val	Lys	Phe	Asn	Ser
			580					585						590	
Asn	Ile	Ile	Gly	Asn	Lys	Ile	Val	Val	Lys	Ser	Glu	Val	Val	Asn	Gly
		595					600							605	
Arg	Tyr	Ala	Leu	Asp	Gln	Gly	Leu	Val	Leu	Glu	Lys	Val	Thr	Leu	Leu
	610					615						620			
Gly	Phe	Glu	Asn	Val	Arg	Gly	Leu	Lys	Ser	Tyr	Glu	Leu	Val	Gly	Ser
	625				630					635					640
His	Gln	Gln	Gly	Asn	Thr	Thr	Met	Lys	Glu	Ser	Leu	Lys	Gln	Ser	Gly
				645					650					655	
Gln	Phe	Val	Thr	Met	Glu	Ile	Ser	Gly	Met	Ser	Ile	Leu	Ile	Gly	Lys
			660					665					670		
Glu	Phe	Lys	Leu	Glu	Leu	Tyr	Ile	Ile	Thr						
		675					680								

说明书附图

