

## 謝誌

感謝恩師 柯源悌博士兩年來在課業及研究上的細心指導，使本論文得以順利完成。謝謝本校微免所 鍾景光老師、中興大學 蔣啟玲老師和傅以中老師以及台北醫學大學 李信昌老師，在百忙之中審閱本文及口試時給予指正並提供許多寶貴意見，謹此至上誠摯之感謝。

感謝中央研究院 陳慶三教授、中興大學 徐堯輝教授和李青蔚學姐以及台大農化所 許仁弘學長，在實驗上提供的寶貴經驗及建議。謝謝亞洲蔬菜中心及台南農業改良場朴子分廠提供珍貴的綠豆，使得實驗能夠順利完成，在此衷心感謝。

同時謝謝同窗好友鈺雯，可愛的學弟妹茂榮、靜怡、智弘、哲容、瑤筑、秀學、雯淳、雅婷學姐，以及親愛的朋友奇宏，謝謝你們在實驗及生活上的協助和加油打氣。

由衷感謝 父母親和家人在生活上的全力支持與鼓勵，使我在求學過程中，無後顧之憂。最後謹將此論文獻給所有關懷我、支持我與鼓勵我的師長、朋友與家人，謝謝你們。

石韻琦 謹至於  
中國醫藥大學營養所  
中華民國九十三年七月

# 總目錄

總目錄.....	I	
圖目錄.....	III	
表目錄.....	IV	
中文摘要.....	V	
英文摘要.....	VI	
第一章 緒論		
第一節 澱粉生合成作用		
1.1 澱粉的組成及結構.....	1	
1.2 參與澱粉生合成的酵素.....	2	
第二節 澱粉分支酵素之分子生物學研究		
2.1 澱粉分支酵素基因選殖研究.....	7	
2.2 基因結構的研究.....	10	
2.3 SBEII (family A)與 SBEI (family B) 異構型間的差異.....	14	
第三節 豆科植物之澱粉分支酵素的研究		
3.1 豌豆 ( <i>Pisum sativum</i> , Pea).....	17	
3.2 菜豆 ( <i>Phaseolus vulgaris</i> , Kidney bean).....	19	
第四節 綠豆之簡介.....		20
第五節 本論文之研究起源與目的.....		24
第二章 材料與方法		
第一節 材料		
1.1 樣品.....	25	
1.2 藥品.....	25	
1.3 儀器設備.....	26	
第二節 引子的設計與合成		
2.1 設計引子.....	27	
2.2 合成引子.....	28	

第三節 RNA 之抽取與分析	
3.1 Total RNA 之抽取.....	28
3.2 Poly (A) RNA 之分離.....	30
第四節 DNA 片段的製備與純化	
4.1 反轉錄酶-聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR).....	32
4.2 聚合酶鏈鎖反應 (PCR).....	33
4.3 快速放大 cDNA 末端序列 (RACE).....	34
4.4 DNA 片段之純化方法.....	38
第五節 cDNA 之選殖與分析	
5.1 T-A cloning.....	40
5.2 抽質體 DNA.....	44
第六節 核酸電泳分析法	
6.1 DNA 洋菜膠體電泳分析法.....	45
6.2 RNA 甲醛洋菜膠體電泳分析法.....	46
第七節 DNA 序列分析	
7.1 定序部份.....	48
7.2 DNA 序列比對分析.....	48
第三章 結果與討論	
第一節 RNA 的抽取與品質分析.....	50
第二節 澱粉分支酵素 cDNA 之選殖	
2.1 選殖 <i>VrsbeII</i> cDNA.....	51
2.2 選殖 <i>VrsbeI</i> cDNA.....	54
2.3 <i>VrsbI</i> 與 <i>VrsbII</i> 全長 cDNA 序列確認.....	56
第三節 綠豆 SBE 全長 cDNA 序列之特性分析	
3.1 cDNA 及胺基酸序列之特性.....	56
3.2 VrSBEII 與 VrSBEI 之酵素活性區域結構.....	58
3.3 比對分析綠豆與各種植物 SBE 胺基酸序列間的差異....	59
3.4 預測訊息生肽 (signal peptide) 之切位.....	60
3.5 分析綠豆與各物種 SBE 之演化關係.....	61

## 第四章 結論

4.1 論文總結.....	63
4.2 未來研究方向.....	64
結果圖與表.....	67
參考文獻.....	91
附錄.....	100

## 圖目錄

圖一、支鏈澱粉的分支結構.....	2
圖二、澱粉的生合成路徑圖.....	6
圖三、SBE family A 與 B 之基因結構.....	13
圖四、5'-RACE 的反應機制.....	35
圖五、3'-RACE 的反應機制.....	37
圖六、pGEM-T Easy 載體 DNA 的結構圖 (Promega).....	42
圖七、選殖綠豆 SBE cDNA 的流程圖.....	66
圖八、綠豆 total RNA 之甲醛洋菜膠體電泳圖.....	68
圖九、以 SBEF1 和 SBER1 為引子進行 RT-PCR 及 PCR 二次放大後產物的洋菜膠體電泳圖.....	70
圖十、以 SBEF2 及 NPU 為引子進行 3'RACE 所獲得之產物洋菜膠體電泳圖.....	71
圖十一、以 SBEF6 及 SBER5 為引子進行 RT-PCR 及 PCR 二次放大後產物的洋菜膠體電泳圖.....	72
圖十二、以 SBEF6 及 SBER9 為引子進行 RT-PCR 放大後所得全長 <i>Vrsbe II</i> cDNA 的洋菜膠體電泳圖.....	73
圖十三、由 <i>VrsbeIIp-0.8</i> 抽出之質體 DNA 及以 EcoRI 切出接入載體上之 DNA ( <i>VrsbeII-0.8</i> ) 的電泳圖.....	74
圖十四、 <i>VrsbeII</i> cDNA 基因選殖之 RT-PCR 及 RACE 對照圖.....	75
圖十五、 <i>VrsbeII</i> cDNA 及其演繹出之胺基酸序列對照圖.....	76
圖十六、以 SBEF9 和 SBER13 引子進行 RT-PCR 放大後產物的	

洋菜膠體電泳圖.....	78
圖十七、以 SBEF10 和 SBER17 引子進行 RT-PCR 放大後產物的 洋菜膠體電泳圖.....	79
圖十八、以 SBEF11 和 SBER16 引子進行 RT-PCR 放大後產物的 洋菜膠體電泳圖.....	80
圖十九、以 SBEF9 及 SBER21 為引子進行 RT-PCR 及 PCR 二次 放大後所得全長 <i>Vrsbe I</i> cDNA 的洋菜膠體電泳圖.....	81
圖二十、 <i>VrsbeI</i> cDNA 基因選殖之 RT-PCR 及 RACE 對照圖.....	82
圖二十一、 <i>VrsbeI</i> cDNA 及其演繹出之胺基酸序列對照圖.....	83
圖二十二、 <i>VrsbeII</i> , <i>VrsbeI</i> 與各種植物 SBE 胺基酸序列之比較....	84
圖二十三、根據綠豆與不同物種之 SBE cDNA 演繹出之胺基酸序 列所推測出之演化樹狀圖.....	90
附錄圖二十四、 <i>VrsbeII</i> cDNA 的限制酵素切位圖譜.....	100
附錄圖二十五、 <i>VrsbeI</i> cDNA 的限制酵素切位圖譜.....	103

## 表目錄

表一、不同物種之 SBEI 異構型的研究.....	8
表二、不同物種之 SBEII 異構型的研究.....	9
表三、澱粉分支酵素異構型的催化特性比較.....	16
表四、綠豆與菜豆及豌豆之 signal peptide 切位的比較.....	61
表五、綠豆 total RNA 與 poly (A) RNA 之萃取純化結果.....	67
表六、 <i>VrsbeII</i> cDNA 專一性引子序列.....	69
表七、 <i>VrsbeI</i> cDNA 專一性引子序列.....	77
表八、綠豆 SBE 與不同物種 SBE 胺基酸序列之同質性比較.....	88
表九、根據 Distance program 分析 (Kimura protein-distance algorithm) 綠豆與不同物種之 SBE cDNA 演繹出之胺基酸序列間的演化 相關.....	89
附錄表十及十一、綠豆 SBE cDNA 演繹之胺基酸序列在 NCBI 資料庫的搜尋比.....	106

## 中文摘要

澱粉分支酶 (starch branching enzyme, SBE, EC 2.4.1.18) 是澱粉生合成路徑的酵素之一，作用為形成分支，在支鏈澱粉 (amylopectin) 的合成上扮演相當重要的角色。本論文目的是選殖 SBE cDNA 全長，分析其結構，並且探討其特性。依據資料庫檢索已知 SBE 的保守區間所設計的基因特異性引子，對成長中之台南五號綠豆 (*Vigna radiata* cv. Tainan no.5) 所萃取出 mRNA 進行 cDNA 選殖。先以反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR) 得到部分 cDNA 片段，經 GCG 核酸資料庫比對，確定為 SBEII 與 SBEI 異構酶形式，再由內部序列設計引子進行快速放大 cDNA 末端序列 (5' 與 3' RACE) 方法，成功的獲得兩異構酶編碼區之全長 cDNA，分別為 2571 bp 及 2208 bp，命名為 *VrsbeII* 及 *VrsbeI*，已在 Genebank 註冊 (accession no. AY622199 與 AY667492)；其包含起始到終止密碼子的完整 ORF，並分別轉譯出 856 個與 735 個胺基酸，預估約 97 kDa 及 84 kDa 分子大小蛋白質，pI 為 5.47 及 6.35；且都具有符合  $\alpha$ -amylase family 的特徵，包括四個活化部位的保留區域-分別為 HSH<sup>S</sup>/<sub>A</sub>S、GFRFDGVT、<sup>G</sup>/<sub>A</sub>EDVS 和 AESHDQ，及特有的催化區 ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>-barrel domain。與資料庫比對後，發現序列及演化關係均和菜豆 (*Phaseolus vulgaris*, kidney bean) 及豌豆 (*Pisum sativum*, pea) 最為相似，而兩者間 cDNA 的相同性為 59%，胺基酸同質性也只有 56%，並由演化分析證實這兩種 SBE 異構型分別屬於不同的演化族群 (Family A 及 B)。因此，本論文結果可得知，在綠豆種子發育過程中，至少有兩種不同的 SBE 異構酶參與澱粉生合成作用。

## Abstract

Starch branching enzyme (SBE, EC 2.4.1.18) is one of the enzymes in the starch biosynthetic pathway. It catalyzes the formation of branches, which plays a vital role in amylopectin synthesis. The objectives of this thesis are to clone full-length cDNA of SBE and analyze its structure and characteristics. Based on database search, the conserved regions from published SBE genes were obtained and used to design gene-specific primers for cloning. First, the mRNA from developing mungbean (*Vigna radiata*, cv. Tainan no.5) was extracted and used as template in RT-PCR. The cDNA sequences of the amplified RT-PCR products, after comparing with GCG nucleotide database, demonstrates that partial cDNA of two distinct mungbean SBE isoforms (SBEII and SBEI) were found. Then, primers designed from internal sequences of SBEII and SBEI were used in cloning their 5' and 3' cDNA ends by 5'/3' RACE (rapid amplification of cDNA ends). The full-length cDNAs of the two SBE isoforms were obtained successfully, which possess sequences of 2571bp and 2208bp in length (designated *VrsbeII* and *VrsbeI*), respectively. *VrsbeII* and *VrsbeI* have also been registered in GenBank with accession numbers of AY622199 and AY667492. They both contain complete open reading frame (ORF) that covers from start codon to stop codon. *VrsbeII* encodes a polypeptide of 856 amino acids with predicted molecular mass of 97 kDa and pI of 5.47. Whereas, *VrsbeI* encodes a polypeptide of 735 amino acids with predicted molecular mass of 84 kDa and pI of 6.35. Besides, their putative protein

sequences possess the properties of the  $\alpha$  - amylase family, including four active conserved region- HSH<sup>S</sup>/<sub>A</sub>S, GFRFDG VT, <sup>G</sup>/<sub>A</sub>EDVS and AESHDQ, and catalytic ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>-barrel domain. When compared in database, both *VrsbeII* and *VrsbeI* showed substantial similarity to the SBEs of kidney bean and pea.

Furthermore, the identities between mungbean SBEII and SBEI at nucleic acid and protein levels are 59% and 56%, respectively. The deduced amino acid sequences from *VrsbeII* and *VrsbeI* via phylogenetic analysis is evident that they fall into two distinct gene families (family A and B). In conclusion, there are at least two different SBE isoforms involved in starch biosynthesis during the development of mungbean.



