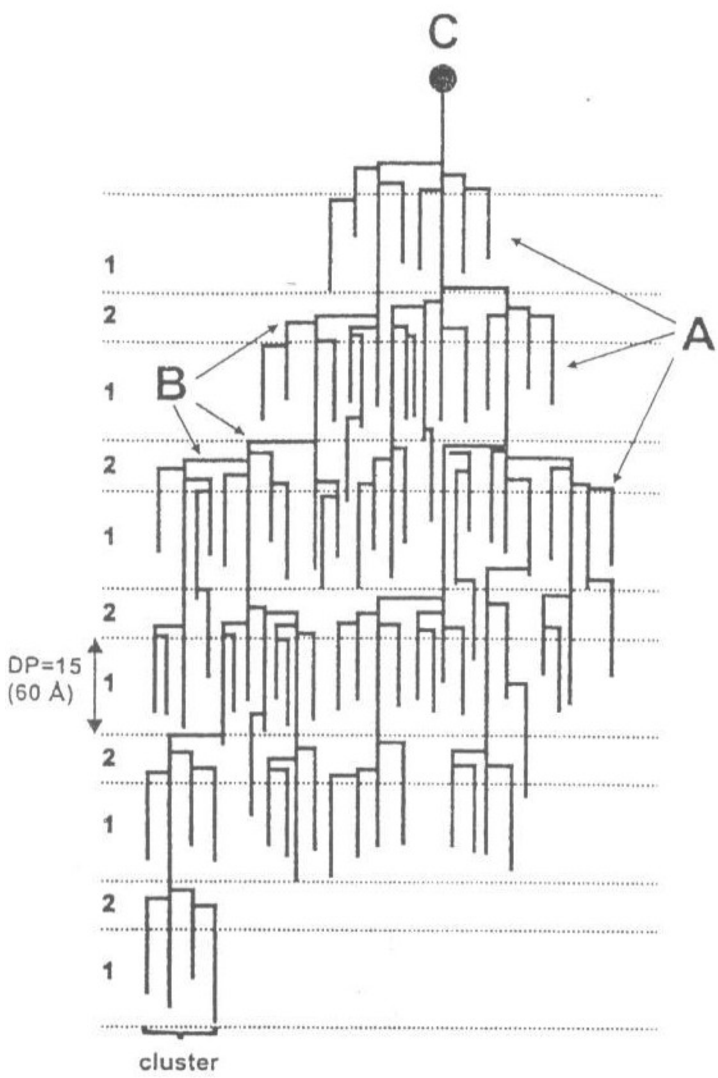
第一章　　緒論

第一節 澱粉生合成作用

1.1 澱粉的組成及結構

大部分高等植物是以澱粉為儲存醣類的形式，其在植物體中以結晶 (crystalline) 及非結晶 (amorphous) 部分組成之水不溶性 (water-insoluble) 的顆粒存在。澱粉主要是由二種葡萄糖聚合物所組成，分別為 20 - 30 % 直鏈澱粉 (amylose)，以及 70-80 %支鏈澱粉 (amylo-pectin)。直鏈澱粉主要是由 840 至 22,000 個 α-1,4 linked glucose 單位及少數 α-1,6 branch points 所形成的長直鏈結構，平均分子量為 136, 000~3.5×10^6 (Martin and Smith, 1995；Ball et al.,1996；Preiss and Sivak, 1998)，而支鏈澱粉則是具有高度 α-1,6 分支的複雜結構，可含有超過 3×10^6 的 Glc 單位，是自然界中的巨大分子，平均分子量為 10^6~10^8 (Sun et al., 1998)。 支鏈澱粉依據其鏈的分布，可分成三大類：(1) C chain，是唯一含有 glucosyl 的還原端且作為 glucan tree 的主幹；(2) B chain，是由 C chain 分支出來且自行進一步分支；(3) A chain，是最外邊的分支，其本身為直鏈 (圖一) (Robin et al., 1974；Martin and Smith, 1995)。



圖一、 支鏈澱粉的分支結構 Robin et al., 1974

Fig. 1 Branched structure of the amylopectin molecule.

1.2 澱粉的生合成與參與酵素

澱粉生合成會發生在光合作用組織 (photosynthetic tissue) 如葉子，與能源儲存組織 (sink tissue) 如根、塊莖、種子等的澱粉體

(amyloplast) 當中，前者會生成 transient starch，以蔗糖 (sucrose)運送到後者，再以生成 starch granule 形式作能源儲存。

(一) 植物澱粉體內主要合成澱粉的酵素：

(1) ADP-Glucose pyrophosphorylase (AGPase；EC 2.7.7.27) :

是澱粉生合成的第一步驟，主要作用為將 Glucose-1-phosphate 轉變為 ADP-Glucose，作為基質使用。

(2) Starch synthase (SS, α-1,4-glucan-glucosyltransferase；EC 2.4.1.21):

將 ADP-Glucose 以 α-1,4 glucosidic bond 鍵結至直鏈 glucan chain 的非還原端。根據玉米基因選殖研究證實，至少有 6 種 SS 的異構型 (Cao et al., 2000) -分別為可溶性澱粉合成酶 (soluble starch synthases, SSSI、SSSIIa、SSSIIb、SSSIII) 及澱粉粒結合性澱粉合成酶 (granule- bound starch synthases , GBSSI、GBSSII)。二者皆是以 ADP-Glucose 作為反應基質，延伸α-1,4-glucoside 的長度，但是 GBSS 與直鏈澱粉 (amylose) 生合成有關，而 SSS 則被認為同時參與直鏈澱粉 (amylose) 及支鏈澱粉 (amylopectin) 之生合成 (Visser and Jacobson, 1993)

(3) Debranching enzyme (DBE):

參與支鏈澱粉 (amylopectin) 裂解及合成，主要作用為水解 α-1, 6-glucosidic bond，移除不正確的分支點 (Myers et al., 2000 ; Nakamura Y, 2002)。 根據其對受質的專一性主要分成 isoamylase (EC 3.2.1.68) 及 pullulanases (EC 3.2.1.41) 二種，isoamylase 作用於支鏈澱粉及肝醣, 但不能作用於 pullulan (一種真菌葡聚糖，包含 α-1,6 及 α-1,4 鍵結)，然而 pullulanases 則偏好以 pullulan 作受質且對支鏈澱粉或肝醣的影響很小 (Genschel, et al., 2002)。

(4) Starch branching enzyme (SBE, α-1,4-glucan-6-glucosyltransferase；EC 2.4.1.18):

主要作用為水解直鏈或支鏈澱粉上之α-1,4- glucosidic bond，產生非還原端的直鏈葡聚醣，同時將其以α-1, 6-glucosidic bond 接到原鏈或另一條α-1,4-葡聚醣終端葡萄糖分子的 C6 hydroxyls 形成分支狀態，在支鏈澱粉 (amylopectin) 合成上扮演相當重要的角色 (Preiss and Sivak, 1998)，有二種以上 SBE 的異構型，SBEI 及 SBEII 詳述於後。

(二) 合成路徑 (圖二):

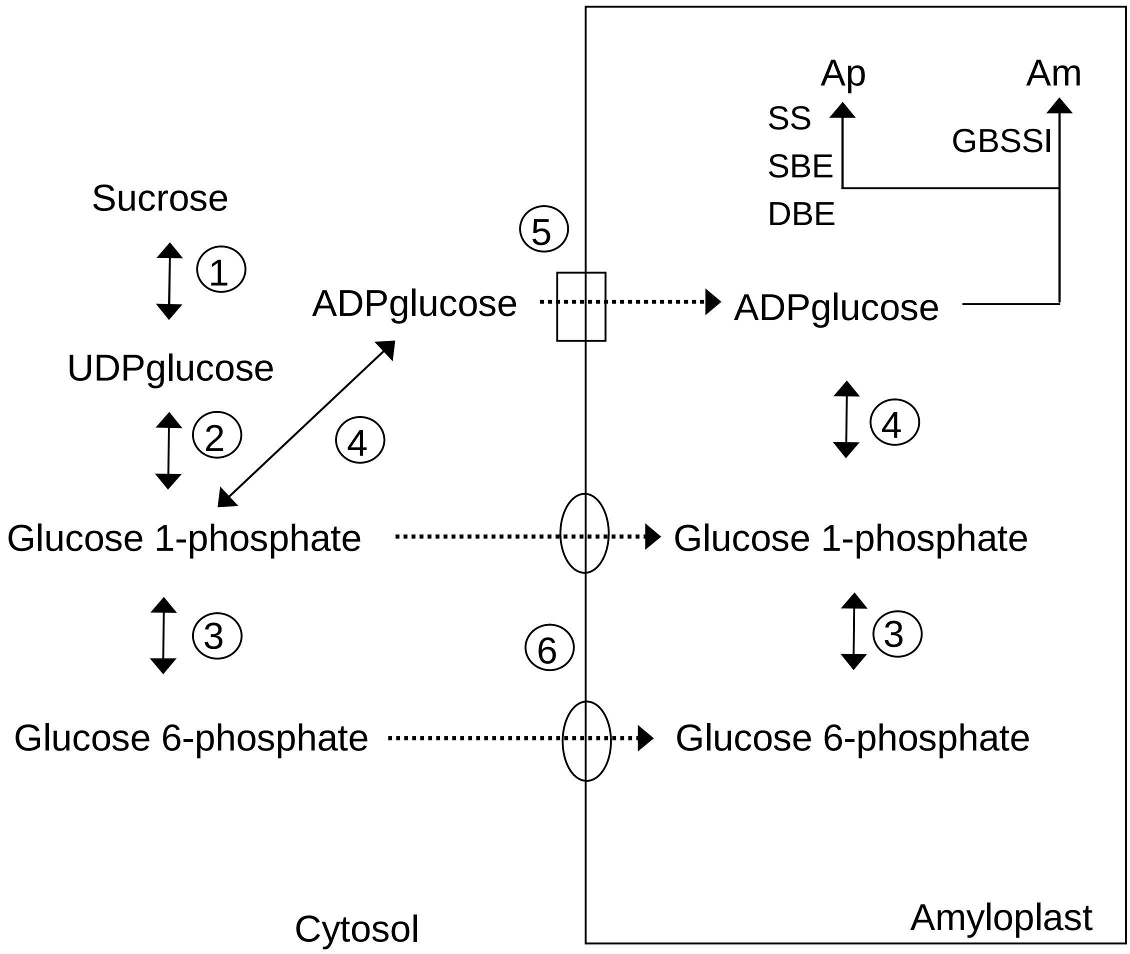
首先，由碳源供應組織生成 Sucrose 後，在韌皮部 (phloem)，經細

胞壁的蔗糖轉化酶 (Invertase，β-D-fructofuranoside fructohydro -lase；EC 3.2.1.26) 轉變成葡萄糖及果糖進入細胞質。Sucrose + UDP 經蔗糖合成酶 (Sucrose synthase，UDP-D-glucose: D-fructose 2-α-D-glucosyltransferase；EC 2.4.1.13) 轉換成 UDPglucose + Fructose，UDPglucose 經 UDPglucose pyrophosphorylase (EC 2.7.7.9) 轉變成 G-1-P，再經由二種不同的路線運送至合成澱粉組織的澱粉體胞器中：

路線一 (主要的)：G-1-P 經 phosphoglucomutase (EC 2.7.5.1) 轉變成 G-6-P 後，經由 transporter 運送至澱粉體 (amyloplast) 中，再轉變成 G-1-P，G-1-P 經 AGPase 合成 ADPglucose。

路線二：G-1-P 經 AGPase 合成 ADPglucose，直接經由特殊的 transporter 運送至澱粉體中 (Smith, 2001；Emes et al., 2003)。

而後以 ADPglucose 為先驅物，經澱粉合成酶 (包括 GBSS 或 SSS) 合成直鏈澱粉 (amylose) 後，再經可溶性澱粉合成酶 SSS、SBE 及 DBE 作用共同合成支鏈澱粉 (amylopectin)。



圖二、澱粉的生合成路徑圖　(Smith, 2001；Emes et al., 2003)

Fig. 2 The pathway of starch biosynthesis.

1.Sucrose synthase
2 UDPglucose pyrophosphorylase
3. phosphoglucomutase
4. ADPglucose pyrophosphorylase (AGPase)
5. ADPGlc transporters
6. hexose phosphate transporters
Ap-Amylopectin; Am- amylose

第二節 澱粉分支酶之分子生物學研究

在原核生物中如 *E. coli* 或其它細菌中，發現有一種是進行類似澱粉的分支酶存在，即是 glycogen synthase (Baecker et al., 1986)。然而，在植物方面，經由基因及生化分析，證實有二種以上的分支酶異構型存在(Sivak and Preiss, 1998)。

2.1 澱粉分支酶的基因選殖(gene cloning)研究

在植物方面，經過分析及鑑定不同植物 BE 的分子結構，可將澱粉分支酶分為 family A 與 B 二大類 (Burton et al., 1995) (表一、二)。

而在部分物種中，例如: maize (Boyer and Preiss, 1978 a,b; Gao et al., 1997)、*Arabidopsis* (Fisher et al., 1996)、barley (Sun et al., 1998)..等報告中均指出，SBEII 可進一步分為 SBEIIa 及 SBEIIb 二種異構型，他們有以下特色：(a) 分別由 *sbeIIa* 及 *sbeIIb* 二種不同的基因編碼； (b) 在植物生長期間，顯示出不同的表現型態 (空間性及時間性)；(c) *sbeIIb* 有組織特異性，例如在 maize 及 sorghum 研究發現，存在胚乳及胚芽，而在 barley 研究顯示僅存在胚乳中。 由上述研究證實,因為有多組的 SBE 異構型存在於不同物種中，顯示植物發育或支鏈澱粉合成期間，是需要不同形式的 SBE 參與作用。

表一、不同物種屬於 family B 之 SBE 異構型的研究

Family B (以多數 SBEI 代表)

酵素	物種	參 考 文 獻
SBEI	maize	Baba et al., 1991 Fisher et al., 1993 Gao et al., 1996
	potato	Kossman et al., 1991 Khoshnoodi et al., 1996
	cassava	Salehuzzaman et al., 1992
	wheat	Morell et al., 1997
	kidney bean	Hamada et al., 2001
RBE1	rice	Nakamura and Yamanouchi, 1992 Kawasaki et al., 1993
SBEII	pea	Burton et al., 1995

表二、不同物種屬於 family A 之 SBE 異構型的研究

Family A　(以多數 SBEII 代表)

酵素	物種	參 考 文 獻
SBEII	maize	Boyer and Preiss, 1978 a,b Fisher et al., 1993 Gao et al., 1997
	potato	Larsson et al., 1996 Larsson et al., 1998 Jobling et al., 1999
	Arabidopsis	Fisher et al., 1996
	wheat	Morell et al., 1997 Nair et al., 1997 Rahman et al., 2001
	barley	Sun et al., 1998
	kidney bean	Hamada et al., 2001 Nozaki et al., 2001 Hamada et al., 2002
RBE3 RBE4	rice	Yamanouchi and Nakamura, 1992 Mizuno et al., 1992, 1993, 2001
SBEI	pea	Smith, 1988 Bhattacharyya et al., 1990 Burton et al., 1995

2.2 基因結構 (gene structure) 的研究

根據不同物種之編碼基因序列比對及結構分析，在澱粉及醣類中，所有參與澱粉水解的相關酵素，包含水解 α-1,4 -linkages 的酵素，例如 cyclodextrin glucanotransferase、α-glucosidases、水解 α-1,6- linkages 的去分支酶 (isoamylase, pullulanase) 及 dextran glucosid -ase、影響 α-1,4 與 α-1,6- linkages 的 neopullulanase 及 α-amylase- pullulanase、以及參與 α-glucan 轉移的分支酶 (branching enzyme) 與肝醣去分支酶 (glycolgen debranching enzyme)，均屬於 α- amylase family，其包含特有的催化區 $(\beta/\alpha)_8$-barrel domain 及四個活化部位的保留區間 (active conserved region)。在所有 α- amylase family 的酵素中，只有八個胺基酸是不變的，分別為 region 1 的 **Asp**,Val,**His**；region 2 的 **Arg**, **Asp**；region 3 的 **Glu** 和 region 4 的 **His** , **Asp**,其中七個 (粗體) 為活化中心 (Jespersen et al., 1993; Svensson, 1994; Burton et al., 1995)。

2.2.1 $(\beta/\alpha)_8$- barrel domain (圖三)

結構是由八個 β-strands (β_{1-8}) 及 α-helices (α_{1-8}) 所組成,具有 βα/βα.... 連接的特性，還有一額外的 α-helice (α_0) 位於第六個 β-strand 之後。

2.2.2 活化部位的保留區間 (active conserved region)

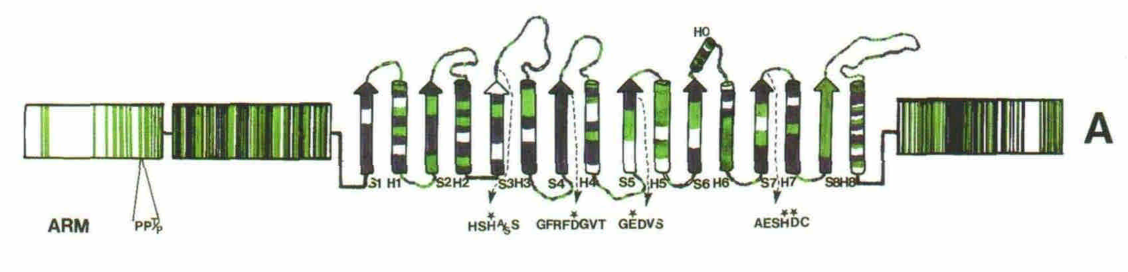
將不同物種之屬於 α- amylase family 的酵素序列，並排比對，獲得

四個保留性較高的區域 (conserved regions) 及七個活化中心的胺基酸。Kuriki et al. (1996) 指出，BE 的四個保守區域對反應的催化及基質結合很重要，經 site-directed mutagenesis 研究證實，催化部位第二、四區間的 Asp (D) 及第三區間的 Glu (E)，對於分支酶的活性有很大的影響，然而，其確切的作用機制仍不清楚。Cao and Preiss (1996)利用化學修飾法證實 Arg (R) 對基質結合很重要;同樣地,Funane and Preiss (1996; unpublished) 也確認 His (H) 與基質結合的重要性。(Preiss and Sivak, 1998)

2.2.3 胺基酸序列之 N- 和 C-端的影響

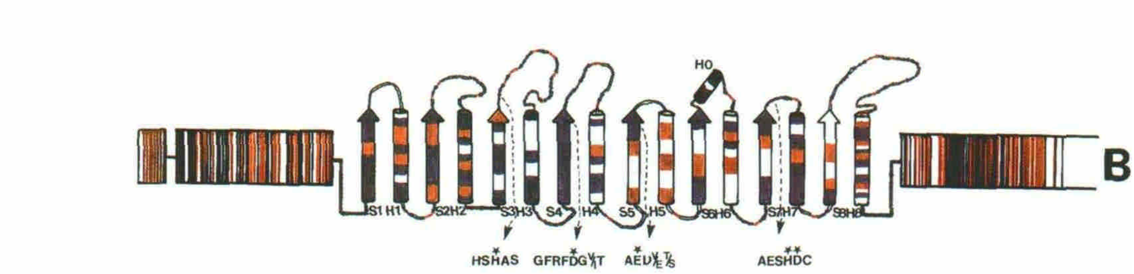
比對各物種之分支酶胺基酸序列，其差異主要在於 N- 和 C-端。Kuriki et al. (1997) 報告指出,利用 maize BEI 與 maize BEII 嵌合形基因 (chimeric gene) 在大腸菌以 T7 起動子的基因表現一系列的嵌合酵素，發現兩種異構型性質的差別,結果將 maize BEI 的 C 端以 maize BEII 的 C 端代替,所表現出的 maize BEII-I Bsp HI 嵌合酵素比野生型 maize BEI 或 maize BEII 活性更高，但對基質的特異性卻和 maize BEI 相似，顯示出 C 端對基質結合的特異性與催化能力很重要；在鏈的轉移 (chain transfer) 實驗顯示，將 maize BEII 的 N 端以 maize BEI 的 N 端代替，所表現出的 maize BEI-II Hind III 和 BEII 相似，轉移較短的 glucan 鏈，相

反的，maize BE II-I HindIII 和 BEI 相似，轉移較長的 glucan 鏈，顯示 N 端與鏈長度的轉移相關，因此 C 及 N 端可能對基質結合的特異性與催化能力、鏈的轉移及支鏈的長度都具有重要性。



SBEII

N-terminal arm



SBEI

Martin and Smith 1995

圖三、SBE family A 與 B 之基因結構

Fig. 3 Gene structure of starch branching enzyme family A and B

β-strand 及 α-helice 分別以 S 及 H 表示

Black bars：conserved regions in family A and B

Green bars：conserved regions in family A

Brown bars：conserved regions in family B

active conserved region of family A：$HSH^{A}/_{S}S$, GFEFDGVT, GEDVS, AESHDC

active conserved region of family B：HSHAS, $GFRFDG^{V}/_{I}T$, $AEV^{V}/_{E}{}^{T}/_{S}$, AESHDC

2.3 SBEII (family A)與 SBEI (family B) 異構型間的差異

2.3.1 立體結構方面

(一) N 端結構

經由稻米、豌豆、大麥及玉米等物種的 SBE 胺基酸序列並排比對的研究指出，SBEII 的 N 端序列較 SBEI 長，SBEII 的 N 端含 extra-N- terminal domain"，而 SBEI 則缺乏 (Mizuno et al., 1993；Burton et al., 1995；Sun et al., 1998)。根據 Choy-Fasman algorithm 預測，此 domain 可能是"flexible"，其末端含有二或三個連續的 proline 殘基 (Burton et al., 1995)。N-terminal domain 功能的重要性仍不清楚，推測可能影響 SBE 與其他酵素間或 SBE 與澱粉顆粒間的接觸 (Burton et al., 1995；Martin and Smith, 1995)。

(二)連接 β-strand 與 α-helice 間的 loop 結構

經細菌 (*E. coli*) 肝醣分支酶 (glycogen branching enzyme) 與玉米澱粉分支酶序列比對結果發現，連接 β-strand 7 與 α-helice 7 及 β-strand 8 與 α-helice 8 間的 β ⟶ α loop 長度差異很大，推測可能與肝糖及支鏈澱粉間分支長度的差異有關 (Jespersen et al., 1993)。

Burton et al. (1995) 研究指出，β-strand 8 與 α-helice 8 間的 loop，有一段由 11 個胺基酸組成的序列 ($^{P}/_{E}$QXLP$^{S}/_{N}$GK$^{F}/_{I}{}^{I}/_{V}$P) 存在所有的 SBE family A 族群，然而 SBE family B 則缺乏。Takeda et al. (1993) 證實此段序列與轉移的分支長度有關，此結果支持 β-strand 與 α-helice 間

的 loop 影響支鏈長度的假設 (Jespersen et al., 1993)。

2.3.2 催化特性方面：

Guan and Preiss (1993) 及 Sivak and Preiss (1998) 報告中指出出，以 amylose 及 amylopectin 為 SBE 作用基質，利用碘染的方法，使 iodine 與基質結合形成 amylose/iodine complex (OD_{660}) 及 amylopectin/iodine complex (OD_{530})，測此二種 complex 的吸光值，發現在 SBEI 作用下 amylose /iodine complex 的吸光值大量減少；同時測量 SBE 活性，發現在 amylose 存在下 SBEI 活性明顯大於 SBEII，相對的以 amylopectin 作為 primer 時，SBEII 活性則明顯大於 SBEI，尤其是 SBEIIb；結果顯示 SBEII 偏好以 amylopectin 為作用基質，而 SBEI 則偏好以 amylose 為作用基質；Takeda et al. (1993) 報告中指出，觀察 SBE 對 amylose 作用發現 SBEII 催化轉移的 glucan chain 較 SBEI 短，結果顯示，SBEII 組成 amylopectin 的支鏈長度較 SBEI 短。此不同的催化特性，很可能是因為 SBEII 與 SBEI 間 conserved structural ($(\beta/\alpha)_8$- barrel domain) 的差異造成。

表三、澱粉分支酶異構型的催化特性比較

酵素	作用基質	轉移鏈長度	參與反應
SBEII	amylopectin	短鏈	主要參與 amylopectin A chain 的合成
SBEI	amylose	長鏈	主要參與 amylopectin B chain 的合成

(Guan and Preiss, 1993; Takeda et al., 1993; Sivak and Preiss, 1998)

2.3.3 生長發育期間表現的時間點

利用北方點墨法 (Northern blot)，分別以豌豆 SBEI 及 SBEII cDNA 片段為探針，研究豌豆胚芽的發育時期發現，SBEI (family A) 活性表現在早期，而 SBEII (family B) 表現的時間則較晚 (Burton et al., 1995)。此相同的情形亦發生 rice (Mizuno et al., 1992)，maize (Gao et al., 1996)，wheat (Morell et al., 1997)，kidney bean (Hamada et al., 2001) 以及 barley (Mutisya et al., 2003)..等，表示分支酶之異構型在澱粉生合成過程中，對支鏈澱粉的分支度及鏈的長度，各自具有不同貢獻。

第三節豆科植物之澱粉分支酶的研究

3.1 豌豆 (*Pisum sativum*；Pea)

Smith (1988) 研究 round-及 wrinkled-seeded 豌豆胚芽 (pea embryo) 發育時期之 SBE，發現此二種表現型的差異主要在 r (rugosus) 基因部位，分別為 RR, Rr 及 rr 基因型。由成熟的胚芽中純化出 SBE，發現 round peas 中有二種分子大小及分支 amylose 能力不同的異構型，而 wrinkled peas 中僅有一種蛋白質，其分支的特性與 round peas 的其中一個異構型相同；同時，分析二種表現型的酵素活性，觀察到 round phenotype 在胚芽發育的早期快速增加而

wrinkled phenotype 的酵素活性僅在晚期出現，推測 SBE 活性的差異，可能與僅存在於 round phenotype 的異構型有關。

Bhattacharyya et al. (1990) 選殖出豌豆的 r (rugosus, wrinkle) 基因部位，發現 wrinkled (rr) 種子缺乏存在於 round (RR 及 Rr) 種子的 SBEI 異構型，因此認為豌豆的 SBEI 基因位於 r 基因部位。隨後，Burton et al. (1995) 利用 SBEII 抗體 (Denyer et al., 1993) 於噬菌體 λgt11 建構的 cDNA 表現庫 (expression library) 中篩選出 SBEII cDNA；而以 Bhattacharyya et al. (1990) 獲得的 SBEI 部分序列為探針，由 λgt10 cDNA 基因庫中篩選出 SBEI cDNA。SBEI cDNA 之全長

為 3549 bp，其 open reading frame (ORF) 的長度為 2766 bp，編碼出 922 個胺基酸，包含 875 個胺基酸的成熟蛋白質及 47 個胺基酸的 transit peptide，預估分子量大小為 99.8 kDa；然而，SBEII cDNA 因缺乏起始密碼子"ATG"，並未獲的全長序列，其 ORF 的長度為 2355 bp，編碼出 769 個胺基酸的成熟蛋白質，預估分子量大小為 87.7 kDa。將 SBEI 與 SBEII cDNA 演繹出之成熟蛋白質的胺基酸並排比對，觀察序列結構的差異，發現：(1) 成熟的 SBEII 較 SBEI 的 N 端缺少一段 121 個胺基酸的序列 (N-terminal domain)。在接近此序列 C 端的部分，有 3 個連續的 prolines (位於成熟 SBEI 的 113-115)，且包含大量的 serine。並經由 Chou-Fasman algorithm (Peptideplot；Chou and Fasman, 1978; Devereux et al., 1984) 分析序列的二級結構，推測此 N-terminal domain 是非常"flexible"的。(2) 有一段 11 個胺基酸組成的序列 (EQHLP NGKIVP)，僅存在於 SBEI (644-654)。(3) 有 3 個額外的胺基酸僅出現在 SBEII (298-300)。(4) 在 SBEI (590-599) 與 SBEII (496-505) 序列的相對位置，出現"break"情形。(5) 有一段由 8 個胺基酸組成的序列 (PEGIPGIP)，僅存在於 SBEII (669-676)。此外，將 SBEI 與 SBEII cDNA 演繹出的胺基酸序列與酵母菌、哺乳動物和原核生物的 glycogen branching enzyme 以及玉米、稻米、馬鈴薯、樹薯的 SBE 並排比對發

現，豌豆 SBEI 屬於澱粉分支酶 family A 而 SBEII 則歸類為 family B 族群 。

3.2 菜豆 (*Phaseolus vulgaris*；Kidney bean)

Nozaki et al. (2001) 由生長中的菜豆種子分離出二種 SBE 異構型，KBE1 與 KBE2，分子量大小分別為 80 kDa 及 77 kDa。經 N 端定序比對，發現 KBE1 與 KBE2 的相似度很高，N 端序列為" IIPRPGAGQ KIYEIDPSLLAYRDHL"。將此段序列與豌豆、阿拉伯芥、大麥、小麥、玉米、馬鈴薯及稻米之 SBE 異構型 (SBEI, SBEIIa, SBEIIb) 並排比對，發現與屬於 family A 的 SBE 異構型相似度較高，因此將 KBE1 與 KBE2 歸類於 family A 族群。分析此二種蛋白質可知除了分子量及對 amylose 的親和力外，其它的酵素特性，例如 pH 值、Tm 值及對檸檬酸 (citrate) 與鈣離子 (Ca^{2+}) 的反應等都很接近，且 KBE1 與 KBE2 N 端部分序列的相似度較其他物種之異構型 (例如 barley BEIIa, BEIIb) 間的相似度高，因此認為 KBE1 與 KBE2 是由單一基因演繹出來的。隨後，Hamada et al. (2001) 並將 KBE1, KBE2 重新命名為 PvSBEII2, PvSBEII2-1，該研究是由 PvSBE2 獲得的序列設計引子，以發育中期之菜豆種子分離出的 mRNA 為模板，進行反轉錄及 PCR 反應，得到二條不同的序列，經資料庫比對，其中一條和 family A 的相似度很高 (命名為 *pvsbe2*)，另一條

則不同於 family A (命名為 *pvsbe1*)。將 *pvsbe2, pvsbe1* 當作探針，用於篩選由生長中之菜豆種子分離出的 mRNA 所建構的基因庫，成功的獲得全長序列為 3360 的 *pvsbe2* 與 2732 bp 的 *pvsbe1*。*pvsbe2* 之 ORF (open reading frame) 長度為 2613 bp，編碼出 870 個胺基酸 (PvSBE2)，預估分子量大小為 99.8 kDa；而 *pvsbe1* 其 ORF 為 2544 bp 並編碼出 847 個胺基酸 (PvSBE1)，預估為 96.3 kDa 分子大小的蛋白質。北方點墨法分析不同生長時期 (DAF 4~16) 之澱粉分支酶的表現，發現 *pvsbe2* 主要表現在種子發育的中期，而 *pvsbe1* 則表現於晚期。

第四節 綠豆之簡介

綠豆 (mungbean)，學名 *Vigna radiata* L.，屬豆科豇豆屬。別名青小豆、植豆，原產於印度，在熱帶及亞熱帶地區都有種植。依綠豆的外觀，可分為油綠豆及粉綠豆二種，油綠豆種皮厚且具光澤，適合加工製餡用；粉綠豆種皮略帶粉質，煮後味香無硬粒，較受消費者喜愛。一般市面上多為東南亞進口的油綠豆，主要提供作為生產豆芽菜、冬粉絲及餅飴等。而國產則以粉綠豆為主，主要種植地區為嘉南平原，其品質優良且易煮爛，尤其適合加工製成綠豆湯，目前廣為栽培的品種為「台南五號」。(吳昭慧和連大進, 1996)

台南五號 (VC3890A) 是由台南區農業改良場 (台南場) 及亞洲蔬菜研究發展中心 (AVRDC) 共同選育而成之高產量、高品質、抗白粉病之品種。此品種之雜交母本為粉綠豆品系 VC2750A，為大粒種 (60 克/千粒重)，成熟具一致性及抗白粉病性優良；父本為油綠豆品系 VC2768A，亦為大粒種 (65.3 克/千粒重)，早熟且適應性廣，產量高為其特色。植物性狀為一年生直立草本雙子葉植物，植株高 45-62 公分，被有茸毛；莖呈淡綠色，表面具疏毛；葉為三小複葉，小葉全緣呈腎臟形；花數朵呈淡黃色；花後結莢，果莢具莢毛，未熟莢為綠色，成熟時轉黑；種子近方形，臍白色不凹陷，種皮色澤為粉綠色。結莢習性集中於頂端且集中，開花期整齊，早熟且成熟一致不易裂莢，採收方便 (翁廷賜和賴森雄, 1992)。

組成分方面，綠豆含約 46-54% 澱粉及 20-26% 蛋白質 (AVRDC, 1975)，其蛋白質富含米、麥中最缺乏的離胺酸 (lysine)，且脂肪多屬不飽和脂肪酸，主要為棕櫚酸和亞麻油酸 (Um et al., 1990)。綠豆澱粉中含有較多的戊聚糖、半乳聚糖、糊精和半纖維素，這些成分因為人體腸胃道沒有相應的水解酵素系統而很難被消化吸收，所以綠豆所提供的熱量較其他穀物低，對於肥胖和糖尿病患者有輔助治療的作用

(Li , 2001)，在營養上非常重要。

物理特性方面，綠豆澱粉顆粒為不規則狀 (橢圓形、球形)，因此直徑變化很大，範圍約為 7-26μm，較其它豆類 (12-48μm) 小 (Hoover et al., 1991 1997)，糊化溫度約為 65℃ (Li et al., 1987)。

功效方面，根據 ＜開寶本草＞記載：煮食，消腫下氣，清熱解毒，生研絞之服，治丹毒煩熱，風疹，藥後發動，熱氣奔豚。＜本草綱目＞記載：綠豆，消腫治痘之功雖同予赤豆，而壓熱解毒之力過之。且益氣、厚腸胃、通經脈，無久服枯人之忌。外科治癰疽，有內托護心散，極言其效。綠豆肉平皮寒，可解金石、砒霜、草木一切諸毒。又根據＜本草求真＞記載：綠豆味甘性寒，據書備極稱善，有言能厚腸胃、潤皮膚、和五臟及資脾胃，按此雖用参、芪、歸、白术，不是過也。第所言能厚、能潤、能和、能資者，緣因毒邪內熾，凡臟腑經絡皮膚脾胃，一不受毒擾，服此性善解毒，故凡一切等症不用此奏效。由此可知，各家本草對於綠豆清熱消屬，解毒，利水等藥用功效都極力推崇 (中藥大辭典) 。

加工性質方面，Zhu et al., 1990 報導綠豆澱粉加工製作的麵條，平滑且柔軟並具有良好的烹調特性；綠豆澱粉為我國許多傳統食品的主要原料，其中綠豆冬粉具有久煮不爛的特性、良好的透明度及特殊的

咀嚼感，是因為綠豆澱粉的結構較特別，其 amylose 的含量約為 32-35%，較一般澱粉的 15-30% 為高，且 amylopectin 的分支多，使其能彼此產生架橋作用而具有適當的結合力，黏度屬於在高溫下較安定的 C 型 (Hodge and Osman 1976; Li et al., 1987; Hoover et al., 1997)，因為以上的特性而使其不能為其他種類的澱粉所取代作為製造冬粉的原料。

第五節 本論文之研究起源與目的

參與澱粉合成的酵素，在植物醣類代謝的能量儲存方面具生理上的必要性，而不同種類的澱粉合成酵素在澱粉的結構上扮演著特異性的角色。 在國內外關於綠豆澱粉生合成的研究非常有限，Tsay et al. (1983) 分析綠豆開花到結莢的種子生長期間與澱粉合成有關的酵素，包括sucrose synthetase, ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase)及starch synthase (SS)，發現在開花後 (DAF，day after flowering) 11-14天，sucrose synthetase的活性降至最低，取而代之的是AGPase和SS的活性迅速增加，然而此篇報告僅局限於對酵素活性的測試，隨後就沒有和綠豆澱粉合成酵素相關的發表。

由於目前缺乏對綠豆澱粉合成酶 (starch synthase, SS) 及綠豆澱粉分支酶 (starch beanching enzyme, SBE) 在分子生物層次的報告。因此本研究根據 Tsay et al. (1983) 的報導，取自於 DAF 14 (開花後 14 天) 天的 「台南五號」綠豆種子作為材料，針對綠豆澱粉分支酶著重於探討其基因結構，包含 cDNA 的選殖與特性分析。

第二章　材料與方法

第一節 材料

1.1 樣品

未成熟 (約 DAF14) 台南五號綠豆 (*Vigna radiate* cv. Tainan no.5；VC3890A) 於台南農業改良場的朴子分廠進行田間採收，連同豆莢一起儲存於 -80 ℃冰庫中，使用時才由豆莢中取出完整之綠豆種子。

1.2 藥品

本研究均採用分生級藥品，dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 購自 ABgene (Epsom, U.K.)。Agra, Ampicillin, Bacto- tryptone, Bacto-yeast extract, NaCl (Sodium Chloride), $MgCl_2$ 購自 Amersco,Inc. (Ohio, USA)。SDS, Tris-base 購自 Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)。Smart ™ RACE cDNA Amplification Kit 購自 Clontech (Palo Alto, CA, USA)。DNA 標準品(Gen-100 DNA ladder) 購自慕容科技有限公司(Taichung, Taiwan)。SuperScript ™ One-Step RT-PCR Systems 購自 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)。LB Broth Miller 購自 Athena Enzyme Systems (Maryland, USA)。限制酶 EcoRI, NotI 購自 New England BioLabs (Beverly, MA, USA)。EDTA (N,N,N^1, N^1-Ethylenedi aminetetraac -etic) 購自 USB (Cleveland, Ohio, USA)。pGEM-T Easy Vector Systems, PolyATtract® mRNA isolation systems 購自 Promega Corporation (Madison, WI, USA)。

IPTG, X-Gal 購自 Protech (Taipei, Taiwan)。FastStart Taq DNA Polymerase 購自 Roche (Mannheim, Germany)。Agarose 購自 Cambrex Corporation (Rockland, ME, USA)。Absolute alcohol (100%酒精), Bromophenol blue, Chloroform/iso -amylalcohol (24/1), DEPC (Diethyl pyrocarbonate), DMF (N,N'- dimethyl-formamide), EtBr (Ethidium Bromide), Formaldehyde, Formamide, Glucose, KCl (Potassium Chloride), LiCl (Lithium Chloride), Lauro-sarcrosyl, β-mercaptoethanol, MOPS (3-[N-Morpholino] propane -sulfonic acid) , Phenol, Sodium acetate, Xylene cyanol FF 購自 Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA)。Glycerol 購自 Tedia Company (Fairfield, Ohio, USA)。Gel Extraction, PCR-M™ Clean Up System, Plasmid DNA Extraction System 購自 Viogene Biotek Corp. (Taipei, Taiwan)。JM110 中興大學徐堯煇老師提供。DH5α 購自益生生技公司 (Taipei, Taiwan)。

1.3 儀器設備

(1) 分光光度計 (Amersham Biosciences GeneQuant pro)

(2) 影像文書處理系統 (AlphaImager；AlphaInnotech IS2000)

(3) pH 酸鹼度計 (pH meter；Mettler MP220)

(4) 水平電泳裝置 (Sub-Cell GT Agarose Gel Electrophoresis Systems；Bio-Rad)

(5) 高速冷凍離心機 (Speed refrigerated centrifuge；Hitachi CR21)

(6) 迴轉式震盪培養箱 (Orbital shaking incubator；Firstek scientific S300R)

(7) 搖擺式震盪器 (Rocking shaker；Firstek scientific RS101)

(8) 微量離心機 (Microcentrifuge；Labnet 16M)

(9) 超音波洗淨器 (Ultrafiltration stirred cell；Amicon model 8550)

(10) 微波爐 (microwave oven；大同 TMO-2010)

(11) 無菌操作台 (Biological Safety Cabinet；NuAire NU-425-600)

(12) 離心乾燥機 (MAXI dry plus；Heto)

(13) PCR 機器 (Bio-Rad iCycler)

(14) 水浴加熱器 (Firstek scientific B206)

(15) 紫外光觀察箱 (UV Box；Uvitec)

(16) 滅菌鍋 (Autoclave；Vertical sterilizer AS-3560)

(17) 處理型排氣櫃 (Model captair；Filtair 824)

第二節 引子的設計與合成

2.1 設計引子

利用國家衛生研究院巨分子序列分析資料庫（GCG SeqWeb）查出澱粉分支酶相似物種序列 (Lookup or StringSearch)，利用 MEME (MotifSearch) 找出序列的 conserved motif，由 Reading Frame 得到分別對 N,C-端之最遠端的二個 Motif。假設最遠端為 Motif 2 及 Motif 4，將此二段序列分別跑 Primer Selection，由 motif 4 設計 reverse primer、由

motif 2 找設計 forward primer，將找到符合條件的 Primer 跑 Blastn (確認其專一性)，相似性愈少愈好。

2.2 合成引子

設計好的引子，送交騰達行 (Taipei, Taiwan) 代為合成。得到乾燥的引子，以 DEPC -H2O 復水後，儲存於-20℃。

第三節 RNA 之抽取與分析

3.1 Total RNA 之抽取

採用 hot phenol 法: 參考自 Shirzadegan et al. (1991)

【試劑】

1.萃取緩衝液

2. Phenol、Chloroform/isoamylalcohol (24/1)、
   Phenol/ Chloroform/isoamylalcohol (25:24:1)

3. 2 M 及 4 M LiCl 溶液

4. 0.1% Lauro-sarcrosyl

5. 3 M 醋酸鈉溶液，pH 4.3 (以冰醋酸調整 pH 值)

6. 80%及 100% 酒精

【藥品配製】

萃取緩衝液 (100 mL)

試　　　　　劑	需　要　量	終 濃 度
Tris-base	1.2114 g	100 mM
LiCl	0.4239 g	100 mM
0.5 M EDTA (pH 8.0)	20 mL	100 mM
10% SDS	10 mL	1%
β-mercaptoethanol	0.7813 mL	100 mM
先以 50 mL 水溶解 Tris-base，以 HCl 調整 pH 值至 7.5 後，加入其他藥品，溶解後，加水定量至 100 mL，滅菌，於 4℃保存。		

【步驟】

先取 20 mL 萃取緩衝液預熱至 65 ℃，加入等體積之預熱 phenol，混合均勻後備用。自-80 ℃冰庫取出 4 g 綠豆種子，加入液態氮以研缽研磨呈粉末狀後，加入上述之混合溶液 (比例 4 g bean/40 mL) 並研磨至均質。將樣品轉置入離心管中，於 65 ℃水浴槽中加熱 5 分鐘，間歇震盪維持均勻，接著，再加入 1/2 體積 Chloroform：isoamyl -alcohol (24:1)，震盪 1 分鐘，於 4 ℃以 15,000 rpm 離心 20 分鐘。取出上清液，加入等體積 Phenol：Chloroform: isoamylalcohol (25:24:1)，震盪 1 分鐘，於 4 ℃以 15,000 rpm 離心 10 分鐘。又取出上清液，並加入等體積 Chloroform：isoamylalcohol (24:1)，震盪 1 分鐘，於 4 ℃以 15,000 rpm

離心 5 分鐘以去除 phenol，此步驟重複二次，均取上清液。隨後，於上清液中加入等體積 4 M LiCl 後，置於 -70 ℃冰庫 1-2 小時幫助 RNA 沈澱。接著，於 4 ℃以 15,000 rpm 離心 30 分鐘後，沈澱物回溶於 10 mL 之 2 M LiCl，再以 15,000 rpm 離心 10 分鐘，所獲沈澱物遂加入 5 mL 之 0.1% Lauro-sarcrosyl，於室溫下震盪溶解 RNA。然後準備 2 mL 之離心管數個，先加入 1 mL 之 100%酒精及 40 μl 醋酸溶液 (3 M, pH 4.3)，再將溶解之 RNA 平均分裝至離心管(約 1 mL/管)中，輕微振盪後，置於 -70 ℃冰庫過夜。隨後於 4 ℃以 14,000 rpm 離心 15 分鐘，去除上清液，取 80% 酒精清洗沈澱物，再於 4 ℃以 14,000 rpm 離心 15 分鐘後，去除上清液，以真空離心乾燥沈澱物。隨即將 RNA 沈澱物溶於 200 μL 之 0.1% Lauro-sarcrosyl，再測 total RNA 濃度及 A_{260}/A_{280} 比值，或儲存於 -80 ℃備用。每批 RNA 製備是取 20 ng total RNA 跑甲醛洋菜膠體電泳確認品質。

3.2 PolyA mRNA 之分離

原理: 利用商品化的 biotinylated oligo (dT) 在高鹽溶液下 (20x SSC) 會與 mRNA 3’端的 poly(A) tail 以氫鍵鍵結，而 biotinylated oligo (dT) 會和 SA-PMPs (streptavidin- paramagnetic particles)結合，再利用磁板吸住 SA-PMPs，以低鹽溶液 (0.5x 及 0.1x SSC) 洗去不吸附的物質，最後以

RNase-free 水將 polyA RNA 溶離出來。

【試劑】

1. PolyATtract® mRNA isolation systems (Promega, Cat. No. 5200)
2. Stock solutions:
   a) 1.2 mL：0.5x SSC: 30 μL 20x SSC+1.170 mL H_2O (RNase Free)
   b) 1.4 mL：0.1x SSC: 7 μL 20x SSC+1.393 mL H_2O
   c) 20 SSC
3. 0.1% DEPC-treated 水

【步驟】

取 0.1-1 mg total RNA 加 DEPC 水至總體積為 500 μL，在 65 ℃下反應 10 分鐘後，加入 3 μL oligo(dT) probe 及 13 μL 20x SSC，混合均勻 (勿用 vortex)，置於室溫直到完全冷卻約 10 分鐘。利用磁板抓取 SA-PMPs 原理以 0.5x SSC (300 μL/次) 清洗 SA-PMPs 三次。將準備好的樣品取至 SA-PMPs 中混勻，室溫下反應 10 分鐘，過程中每 2-3 分鐘輕輕混勻一次。以磁板吸附 SA-PMPs 移除上清液 (注意不要吸到 SA-PMP pellet)。以 0.1x SSC (300 μL/次) 清洗 SA-PMPs 四次，移除上清液。最後以 100 μL RNase Free H_2O 自 SA-PMPs 溶離出 poly A RNA，再次以 150 μL RNase Free H_2O 溶離出 poly A mRNA，測吸光時需 A_{260}/A_{280} 比例≧2.0。

第四節 DNA 片段的製備與純化

以得到的 PolyA mRNA 為模板，利用不同的引子對進行下列步驟：

4.1 反轉錄酶-聚合酶鏈鎖反應

(Reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)

【試劑】

1. SuperScript ™ One-Step RT-PCR Systems (Invitrogen, Cat. 10928 -042)
2. SBE 特異性引子 (10 μM)
3. 0.1% DEPC-treated 水

【步驟】

於 0.2 mL 離心管中依序加入 25 μL 2X Reaction Mix (0.4 mM dNTP、2.4 mM $MgSO_4$)、10 pg-1 μg polyA mRNA、10 μM 的 sense 及 antisense primer 各 1 μL 及 1 μL RT/Platinum Taq Mix，最後加水至 50 μL 混合均勻。進行 RT-PCR 的反應程式設定為：(1) cDNA synthesis and pre-denaturation：45 ℃ 30 min、94 ℃ 2 min。(2) PCR amplify -cation：94 ℃ 15 s (變性)、60 ℃ 30 s (煉合)、72 ℃ 1-3 min (延伸)，重複 35 次循環。(3) Final extension：72 ℃ 10 min。反應完成後，取 2-5 μL 產物跑電泳確認。

【備註】

1. 煉合溫度由引子的 Tm 值決定，一般約低於 primer Tm 的 5-10 ℃。
2. 延伸時間為 1 min/1 Kb，由欲放大的 DNA 長度決定。

3. 當 target DNA 濃度較低時，增加 PCR amplification 的 cycles 數。

4.2 聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)

【試劑】

1. FastStart Taq DNA Polymerase (250 U ； Roche)
2. 10 X PCR buffer
3. dNTP: dATP、dCTP、dGTP 及 dTTP (10 mM ； ABgene)
4. SBE 特異性引子(10 μM)

【步驟】

於 0.2 mL 離心管中依序加入 5 μL 10x PCR buffer、10 mM dNTP 各 1 μL、10 μM 的 sense 及 antisense primer 各 3 μL 及 0.4 μL FastStart Taq DNA Polymerase (250 U)，混合均勻後再加入 Template DNA (>500ng/ reaction)，最後加無菌水至總體積為 50 μL。進行 PCR 反應，條件為：(1) 95 ℃ 3 min。(2) 95 ℃ 30 s、60 ℃ 30 s、72 ℃ 1-3 min，重複 35 次。(3) 72 ℃ 10 min。取 2-5 μL 反應產物跑電泳確認。

【備註】

鎂離子最後濃度為 2 mM (一般建議為 1.5- 4 mM)

4.3 快速放大 cDNA 末端序列 (Rapid Amplification of cDNA Ends, RACE)

【試劑】

Smart ™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech Cat.K1811-1)

TE buffer：10 mM Tris-HCl、1 mM Na-EDTA
Tricine-EDTA buffer ：10 mM Tricine-KOH (pH8.5)、1 mM EDTA

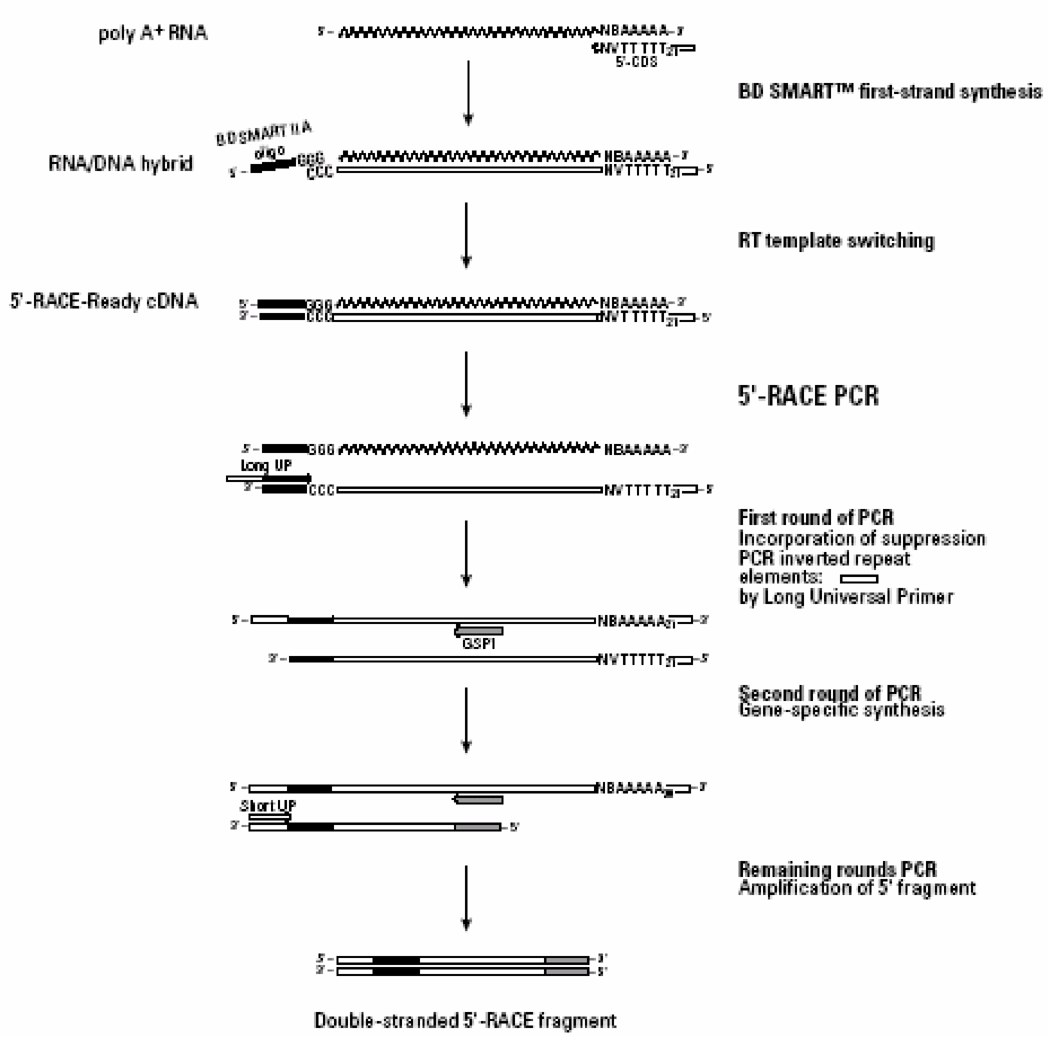
【步驟】5’RACE

1.合成第一股 cDNA

取 1-3 μL (50 ng-1 μg) polyA mRNA 加入 1 μL 5’CDS primer 及 1 μL Smart II A oligo，加滅菌水至總體積為 5 μL。於 70 ℃加熱 2 分鐘後，置於冰浴 2 分鐘，再加入 Mix reaction (2 μL 5X first-strand buffer、1 μL 20 mM DTT、1 μL10 mM dNTP Mix、1 μL PowerScript reverse transcriptase (200 U))，總體積為 10 μL。離心混合均勻，於 42 ℃下反應 1.5 小時，以 100-250 μL Tricine-EDTA buffer (kit 附的) 稀釋，於 72 ℃反應 7 分鐘後，離心數秒即可。測量其吸光值後，保存於 -20 ℃。

2.進行 RACE PCR

取 2.5 μL 合成之第一股 cDNA，加入 5 μL 10X Universal Primer A Mix (UPM) 及 1 μL antisense (reverse) primer 後，混合均勻，再加入 Mix reaction (43.6 μL 滅菌水、5 μL 10X PCR buffer、1 μL dNTP Mix (10 mM)、0.4 μL Taq DNA Polymerase (250 U))，總體積為 50 μL。進行 PCR 反應，條件為：94 ℃ 5 s、68 ℃ 10 s、72 ℃ 3 min，重複 25-35 次。取 2-5 μL 反應產物跑電泳確認。



圖四、5’-RACE 反應的機制

Fig. 4 Detailed mechanism of the 5'-RACE reactions.

3. Nested PCR 反應

當 primary RACE PCR 獲得的產物為 smear 現象時，利用 TE buffer 將產物稀釋 50-100 倍作為模板，由已知的序列片段設計趨向 5’端的基因特異性引子(GSP)，配合套組之 NUP (Nested Universal Primer A)，再次進行 RACE PCR。取 2-5 μL 反應產物跑電泳確認。

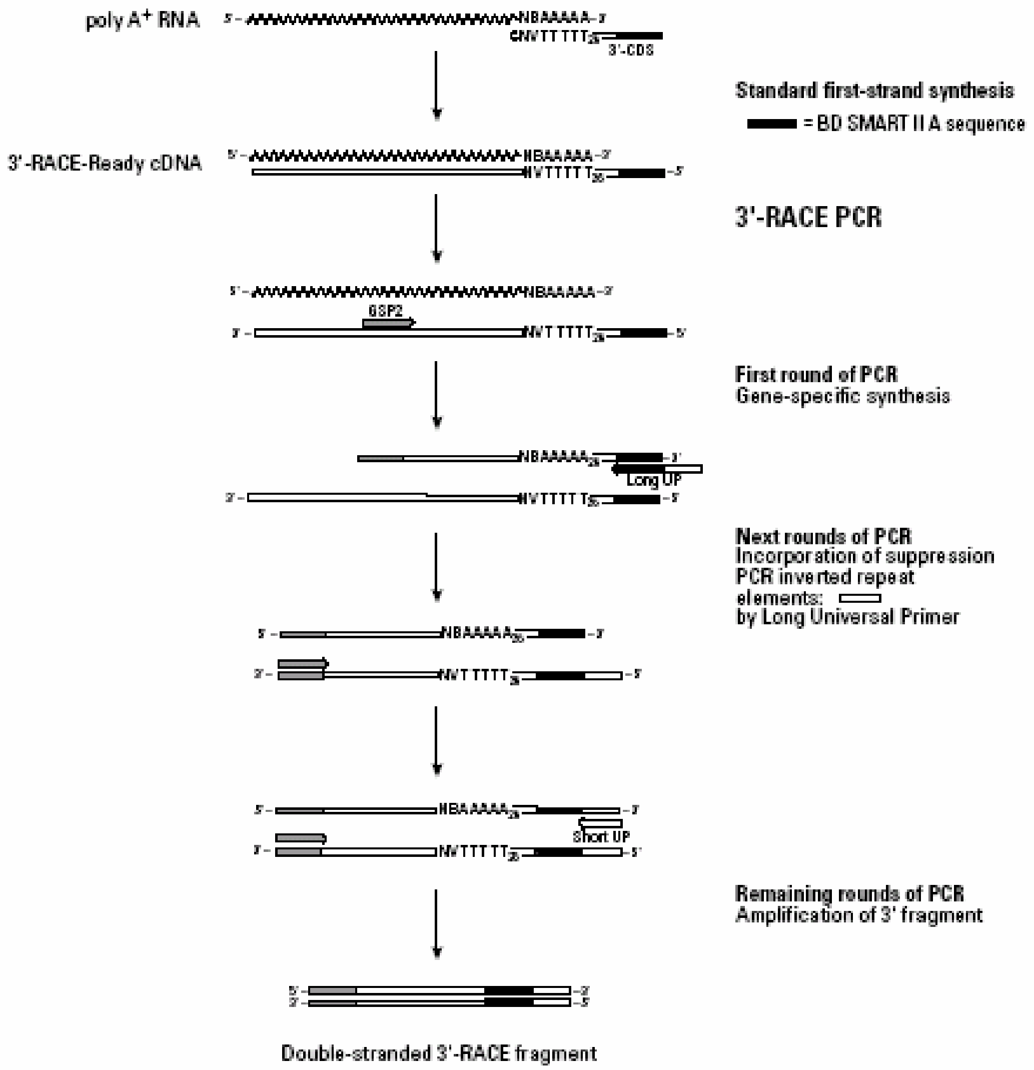
【步驟】 3’RACE：

1.合成第一股 cDNA

取 1-3 μL (50 ng-1 μg) polyA mRNA 加入 1 μL 3’CDS primerA 後，加滅菌水至總體積為 5 μL。於 70 ℃加熱 2 分鐘後，置於冰浴 2 分鐘，再加入 Mix reaction (2 μL 5X first-strand buffer、1 μL 20 mM DTT、1 μL 10 mM dNTP Mix、1 μL PowerScript reverse transcriptase)，總體積為 10 μL。離心混合均勻，42 ℃下反應 1.5 小時，以 100-250 μL Tricine-EDTA buffer 稀釋，於 72 ℃反應 7 分鐘後，離心數秒即可。測量其吸光值後，保存於 -20 ℃。

2.進行 RACE PCR

取 2.5 μL 合成之第一股 cDNA，加入 5 μL 10X Universal Primer A Mix (UPM) 及 1 μL sence (forward) primer 後，混合均勻，再加入 Mix reaction (34.5 μL 滅菌水、5 μL 10X PCR buffer、1 μL dNTP Mix (10 mM)、1 μL Taq DNA Polymerase)，總體積為 50 μL。進行 PCR 反應，條件為：94 ℃ 5 s、68 ℃ 10 s、72 ℃ 3 min，重複 25-35 次。取 2-5 μL 跑電泳確認。



圖五、3’RACE 反應的機制

Fig. 5　Detailed mechanism of the 3'-RACE reactions.

3.Nested PCR 反應

當 primary RACE PCR 獲得的產物為 smear 現象時，利用 TE buffer 將產物稀釋 50-100 倍作為模板，由已知的序列片段設計趨向 3’端的基因特異性引子(GSP)配合套組之 NUP (Nested Universal Primer A)，再次進行 RACE PCR。取 2-5 μL 反應產物跑電泳確認。

4.4 DNA 片段之純化方法

1. Ultrafree-DA (Millpore Cat. 4260　Bedford, USA)
2. PCR-M^{TM} Clean Up System (Viogene Cat. PF1001)
3. Gel Extraction (Viogene Cat. EG1001)

【方法】離心均為室溫操作

當得到的產物為單一條紋時，直接以 PCR-M™ Clean Up System 進行純化；若得到的產物有二條以上條紋時，先跑電泳，切下目標產物再以 Ultrafree-DA 或 Gel Extraction 進行純化。

1.以 Modified TAE buffer (40 mM Tris-acetate、pH 8.0，0.1 mM Na- EDTA) 製膠。取適量樣品跑膠、EtBr 染色後，以 UV 確認，切下目標條紋放入 column，5,000 xg 離心 10 分鐘，收集 Vial 中液體，測其吸光值並取 2-5 µL 跑膠確認大小後，儲存於 -20 ℃。

2.取 10-100 µL PCR 產物和 0.5 mL Px buffer 混合均勻，將 spin column 置於 2 mL 微量離心管中，加入混合物 (每次勿超過 0.7 mL) 13,000 rpm 離心 1 分鐘，丟棄流出液，此時 DNA 片段已與 column 上之 membrane 結合。接著，加入 0.5 mL WF buffer，13,000 rpm 離心 1 分鐘後，丟棄流出液，再加入 0.7 mL WS buffer，13,000 rpm 離心 4 分鐘後，將 spin column 置於新的 1.5 mL 離心管，再加入 30-50 µL 的滅菌水，放置 1-2

分鐘，13,000 rpm 離心 2 分鐘，收集含有 DNA 之溶離液，此步驟重複二次。測溶離液之吸光值及取 2-5 µL 跑膠確認大小後，儲存於 -20 ℃。

3. 將 RT-PCR、PCR 或 RACE 產物跑 1%電泳分析確認後，切下目標片段置於 1.5 mL 微量離心管中，每管膠體不可超過 300 mg。加入 0.5 mL gel solubilization buffer (GEX)，於 60 ℃水浴中作用 10-20 分鐘，至膠體完全溶解，冷卻至室溫。將 spin column 置於 2 mL 微量離心管中，加入溶解的膠體 (每次勿超過 0.7 mL)，以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，丟棄流出液，此時 DNA 片段已與 column 上之 membrane 結合。加入 0.5 mL WF buffer，13,000 rpm 離心 1 分鐘後丟棄流出液，再加入 0.7 mL WS buffer，13,000 rpm 離心 30 秒後丟棄流出液，再以 13,000 rpm 離心 3 分鐘以完全去除殘留的 ethanol。將 spin column 置於新的 1.5 mL 離心管，加入 30-50 µL 的滅菌水，放置 2 分鐘， 13,000 rpm 離心 2 分鐘，收集含有 DNA 之溶離液，測其吸光值及跑膠確認大小後，儲存於 -20 ℃。

第五節 cDNA 之選殖與分析

5.1 T-A cloning

【試劑】

1. pGEM-T Easy Vector Systems (Promega Cat.A1380)
2. Competent cells: DH5α 及 JM110
3. Gel extraction kit (Viogene Cat.GF1001)
4. LB broth Miller
5. Agar
6. N,N’-dimethyl-for-mamide (DMF)
7. IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)
8. X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside)
9. Ampicillin solution
10. NaCl 、KCl 、$MgCl_2$、Glucose
11. 限制酶：EcoRI、NotI (10,000 U/mL 酵素活性單位)

【藥品配製】

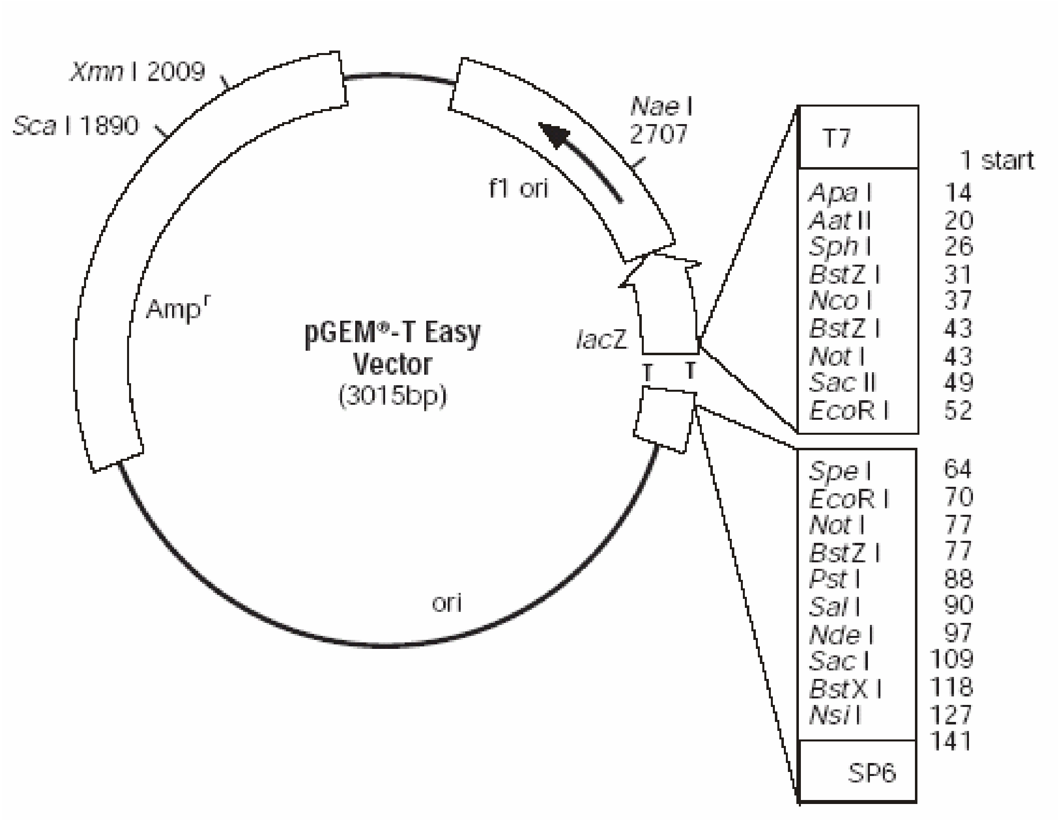
1. LB/Amp 固態培養基：12.5 g LB broth、7.5 g Agar 溶解於 0.5 L 水中，滅菌，冷卻至 55 ℃，加入 ampicillin 至終濃度為 100 μg/mL，倒入 8.5 cm 直徑培養皿中，儲存於 4 ℃。
2. LB 液態培養基：12.5 g LB broth 溶解於 0.5 L 水中，滅菌，儲存於 4 ℃。於使用前加入 ampicillin 至終濃度為 100 μg/mL。
3. LB/Amp/IPTG/X-Gal 固態培養基：在 LB/Amp 固態培養基上均勻加入 100 μL IPTG (0.1M) 及 50 μL X-Gal (50 mg/mL)，使用時配製。
4. 0.1 M IPTG：1.2 g IPTG 溶於 50 mL 無菌水並以 0.2 μm filter 過濾，每 1 mL 分裝一管，儲存於 4 ℃。

5. 50 mg/mL X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside)：100 mg X-Gal 溶於 2 mL DMF，以鋁箔紙包住避光，儲存於 -20 ℃。

6. Ampicillin solution (100 mg/mL)：1 g Ampicillin 溶於 10 mL 無菌水並以 0.2 μm filter 過濾，每 1 mL 分裝一管，儲存於 -20 ℃。

7. SOC 培養液 (液態培養基) (100 mL)

試　　　劑	需　要　量	終 濃 度
Bacto-tryptone	2 g	
Bacto-yeast extract	0.5 g	
1 M NaCl	1 mL	10 mM
1 M KCl	0.25 mL	10 mM
2 M Mg^{2+} stock	1 mL	20 mM
2 M Glucose	1 mL	20 mM
取 Bacto-tryptone、Bacto-yeast extract、 NaCl、 KCl 加水至 90 mL，滅菌後，冷卻至室溫，加入 Mg^{2+} stock 及 Glucose，調整 pH 值至 7.0，加水定量至 100 mL，以 0.2 μm filter 過濾，儲存於 4 ℃		



圖六、pGEM-T Easy 載體結構圖 (Promega)

Fig. 6 pGEM-T Easy Vector circle map and sequence reference points.

【方法】

PCR 反應中，Taq DNA Polymerase 會在 DNA 的 3’尾端加上幾個額外的腺核苷酸(A)。pGEM-T Easy Vector 的 MCS (multiple cloning site) 的尾端皆有一個 ”T” (位於 *lac*Z 基因上)，可與插入的 PCR 產物進行接合反應，再用藍白菌落篩選法得到正反應株。

1. PCR 產物純化：將產物跑 1%電泳分析確認後，切下目標片段，利用

Gel extraction kit 將切下的膠片純化，測吸光定量及再次跑膠確認大小。

2. Ligation (接合)：將純化後的產物與 pGEM-T Easy Vector 以 3：1 的比例進行接合反應 (取 3 μL 的樣品加 1 μL vector (50 ng)，依序加入 5 μL 2X Rapid ligation buffer 及 1 μL T4 DNA ligase (3 U)，再加滅菌水至總體積為 10 μL，室溫下作用 1 小時後，4 ℃隔夜反應。
3. Transformation (轉形)：分別取 5 μL ligation reactions 加入 50 μL 之 Competent cells (DH5α 及 JM110) 混合均勻後，置於冰浴中 20 分鐘後，42 ℃加熱 40-45 秒 (heat shock)，馬上冰浴 2 分鐘。接著加入 950 μL SOC 培養液，於 37 ℃、150 rpm 震盪培養 1.5 小時後，取出 1 mL 塗抹於 LB/Amp/IPTG/X-Gal 固態培養基，在 37 ℃培養箱培養隔夜。
4. 藍白篩選：利用菌落的藍白呈色來判別 DNA 是否有接到 vector 上，若呈現白色菌落 (positive clone)，表示 DNA 已接到 vector 上。將 plate 上之 positive clone 接種到 2 mL 的 LB 液態培養基中，37 ℃、150 rpm 震盪隔夜培養。
5. 抽取質體 DNA：以小量抽取質體 DNA 套組 (Viogene) 得到的質體 DNA，再以限制酶 (EcoRI 或 NotI) 作用，將接入載體上之 DNA 切出，確認大小後，進一步作定序確認，以作株系保存。

6.菌液冷凍保存：將剩餘菌液取 20 μL 加 2 mL LB 液態培養基，於 37 ℃、150 rpm 震盪隔夜培養。取 800 μL 菌液加 200 μL 80% glycerol 保存於 -80 ℃。

5.2 抽質體 DNA

Plasmid DNA Extraction System (Viogene Cat. EG1001)

【方法】

取 1.5 mL 菌液離心 2 分鐘，除去上清液，加 250 μL MX1 buffer 將 pellet 完全溶解後，加 250 μL MX2 buffer 混勻，室溫下反應 1-5 分鐘，加入 350 μL MX3 buffer 混勻後，13,000 rpm 離心 5-10 分鐘。將上清液取至 column 中，13,000 rpm 離心 60 秒丟棄流出液，加 0.5 mL WF buffer，13,000 rpm 離心 60 秒丟棄流出液，再加 0.7 mL WS buffer，13,000 rpm 離心 60 秒丟棄流出液，空轉 3 分鐘。將 column 取至一新的離心管中，加 100 μL 的滅菌水，靜置 1-2 分鐘後，13,000 rpm 離心 2 分鐘。收集含有質體 DNA 之溶離液，測其吸光值，並以限制酶切割進行 DNA 電泳分析，確認無誤後，保存於-20 ℃。

第六節 核酸電泳分析法

6.1 DNA 洋菜膠體電泳分析法

【藥品配製】-均使用 DEPC-H_2O 滅菌水 調配

1. 50X TAE (100 mL)

試　　　　　劑	需 要 量	終 濃 度
Tris-base	24.2 g	40 mM
Glacial acetic acid	5.71 mL	20 mM
0.5 M EDTA pH 8.0	10 mL	1 mM
加滅菌水定量至 100 mL。　　電泳緩衝液-稀釋為 1X TAE 使用		

2. 6 X Gel loading buffer (10 mL)

試　　　　　劑	需 要 量	終 濃 度
50 % Glycerol	6 mL	30 %
2 % Bromophenol blue	1 mL	0.2 %
2 % Xylene cyanol FF	1 mL	0.2 %
加水定量至 10 mL，滅菌 30 分鐘，每 1 mL 分裝，儲存於 -20 ℃		

3. 鑄膠(1%)

試　　　　　劑	需 要 量	終 濃 度
Agarose	0.3 g	1%
1X TAE buffer	30 mL	
取 agarose 加入 buffer，微波加熱溶解後，降溫至 60 ℃，混合均勻，無氣泡下倒入鑄膠器，再插入適當樣品槽梳 (comb)，待其凝固(約 30 分鐘) 後即可		

4. EtBr 染劑 (10 mg/mL)：取 10 mg EtBr 加 1 mL 滅菌水溶解，管壁以鋁箔紙包覆 (避光)，儲存於室溫。

5. DNA 分子量標準品 (Gen-100 DNA ladder)：100 bp - 3 kb 共 13 個 DNA 片段，濃度為 0.12 μg/μL。

【方法】

將製備好的膠體置入電泳槽中，加入約 300 mL 1X TAE 至蓋住膠體，將 DNA 樣品加入 1/10 體積的 loading dye，混合均勻後，注入樣品槽內，以 75 伏特進行電泳，待染劑泳動到達膠體 2/3 處即可停止，以 EtBr 進行染色，於長波 UV 燈下觀察 DNA 色帶。

6.2 RNA 甲醛洋菜膠體電泳分析法

原理: RNA 經甲醛變性處理，打開二級結構，再進行電泳，RNA 依分子大小分開，可分析出 RNA 之完整性。甲醛具毒性，需小心操作。

【藥品配製】-均以 DEPC-H_2O 滅菌水 調配

1. 10X MOPS (1 L)

試　　劑	需　要　量	終 濃 度
MOPS	41.2 g	0.2 M
Sodium acetate	6.65 g	80 mM
0.5 M EDTA pH8.0	20 mL	10 mM
加水至 800 mL，以 6 N NaOH 調整 pH 至 7.0，定量至 1000 mL，滅菌後溶液呈黃色。電泳緩衝液：稀釋為 1X MOPS 使用。		

2. 10X Gel loading buffer (10 mL)

試　　　　　劑	需　要　量	終 濃 度
Glycerol	5 mL	50 %
0.5 M EDTA pH8.0	20 μL	1mM
2 % Bromophenol blue	2 mL	0.4 %
2 % Xylene cyanol FF	2 mL	0.4%
加水定量至 10 mL，滅菌 30 分鐘，每 1 mL 分裝，儲存於-20 ℃		

3. 鑄膠 (1.2% Formaldehyde Gel)

試　　　　　劑	需　要　量	終 濃 度
Agarose	0.36 g	1.2%
DEPC-H2O	25.5 mL	
10X MOPS	3 mL	1 X
37% formaldehyde	1.5 mL	2.2 M
取 agarose 加水，微波加熱溶解後，降溫至 60 ℃，加入 MOPS 及 formaldehyde，混合均勻，倒入鑄膠器，再插入適當樣品槽梳，待其凝固(約 30 分鐘)後即可		

4. 樣品前處理

試　　　　　劑	需　要　量	終 濃 度
RNA 樣品	x μL (20 μg)	
DEPC-H2O	(4.5-x) μL	
10X MOPS	2 μL	1 X
37% formaldehyde	3.5 μL	0.22 M
Formamide	10 μL	50%
混合均勻於 60 ℃水浴 10 分鐘後，立即冰浴 3 分鐘 (避免回復二級結構)，再加入 2 μL 10X gel loading buffer 及 1 μL 之 1 μg/μL EtBr。		

【注意事項】

電泳槽每次使用前需先浸泡 3% H_2O_2 溶液 10 分鐘後，再以 DEPC- H_2O

清洗。

【方法】

將製備好的膠體置入電泳槽中，加入約 300 mL 1X MOPS 至蓋住膠體，將 RNA 樣品注入樣品槽內，以 75 伏特進行電泳，待染劑泳動到達膠體 2/3 處即可停止，以 DEPC-H_2O 清洗去除多餘的甲醛，15 分鐘洗二次，於長波 UV 燈下觀察 RNA 色帶。

第七節 DNA 序列分析

7.1 定序部份

送至中興大學生物科技發展中心核酸定序實驗室，使用 ABI PRISM 3100 genetic analyzer and ABI PRISM 377-XL 機器，以 Dideoxy-Mediated Termination 原理反應。

7.2 DNA 序列比對分析

7.2.1 NCBI (National Center for Biotechnology Information) Database

網站 www.ncbi.nlm.nih.gov

Blast-將未知的序列進入資料庫比對，搜尋任何可能的已知相似序列

Search-尋找序列的相關資訊，例如 accession number、物種…等等

7.2.2 國家衛生研究院巨分子序列分析 GCG (Genetics Computer Group) Seqweb Database

網站 gcg.nhri.org.tw:8003/gcg-bin/seqweb.cgi

Pretty-多條序列並排比對，預測出相同 (consensus) 序列

FrameAlign-密碼子與所編碼之胺基酸序列對照

MEME (MotifSearch)-尋找序列之高保留性區域

GrowTree-分析物種間的演化關係

Map-尋找限制酶切位

Primer Selection-尋找合適的引子

Translate-將核酸序列轉譯為蛋白質序列

Reverse-可獲得反向之互補序列

第三章 結果與討論

第一節 RNA 的抽取與品質分析

綠豆 total RNA 的製備方面，最初以 Clontech NucleoSpin Plant Kit 利用 column centrifugation 的方式萃取時，可能由於台南五號綠豆種子的澱粉含量高，成熟綠豆的澱粉佔乾重 46.3% (Ko, et al., 2004)，以及不明原因導致 column 容易被沉澱物塞住而無法順利的分離出 RNA。之後，參考 Shirzadegan et al. (1991) 報告利用傳統之 Hot phenol 法抽取 total RNA，才得到足夠的含量作後續實驗，收率為 0.4 mg RNA/g bean，並經 1.2%甲醛洋菜膠電泳分析，觀察到 28S 及 18S rRNA 沒有降解情形後(圖八)，確認得到不錯的品質，再使用 poly dT column 進行 Poly(A) mRNA 的純化，得到的 mRNA 之 $A_{260}/_{A280}$ 比值為 2.0 (表五)，收率為 0.006 mg mRNA/ mg total RNA，以此作為 cDNA 選殖的模板。

第二節 綠豆澱粉分支酶 cDNA 之選殖

對於綠豆澱粉分支酶 cDNA 序列之選殖共分為三階段，首先利用已知 SBE 保守區間設計的引子以 RT-PCR 方法獲得一段 SBE cDNA 序列，

再根據該段 cDNA 序列分別設計靠近 5’及 3’端之專一性引子，進行 5’ RACE 和 3’ RACE 延伸兩端序列，企圖獲得全長之 cDNA 序列，結果成功的獲得綠豆 SBE 異構型 II (*VrsbeII*) 與異構型 I (*VrsbeI*) 之全長 cDNA，分述如下。

2.1 選殖 *VrsbeII* cDNA

2.1.1 RT-PCR

以純化過之綠豆 polyA mRNA 為模板，利用 F1 與 R1 引子 (表六) 進行 RT-PCR 反應，經取產物 1/25 (2 μL) 作電泳分析與染色，發現得到一段主要約 0.8 kb DNA 條紋，但是訊號很弱，不足夠直接純化後作定序，因此將產物以 PCR-M™ Clean Up System 作純化，當作模板，再次利用 F1 與 R1 引子，進行 PCR 放大；經取產物 1/25 (2 μL)作電泳分析與染色，結果一共獲得三個大小不同的片段，分別約為 0.8 kb、0.35 kb 與 0.1 kb，其中因為 0.8 kb 大小的片段 (圖九) 與最初 RT-PCR 得到的主要產物大小相同 (序列代號 VrsbeII- 0.8)，因此切出並純化送定序，經過與資料庫比對後，發現與 *sbeII* 最為相似，而且獲得為中間的部分；隨即根據 VrsbeII-0.8 的 3’及 5’端序列，設計出 3’RACE 和 5’ RACE 所需的引子，分別為 F2 及 R5, R6。

此外，經過第一階段獲得的這段 VrsbeII- 0.8 cDNA，也以 TA cloning

方式放入 pGEM-T Easy vector 中，並轉形到 JM110 及 DH5α宿主。接著，利用小量菌液培養、抽取質體 DNA，並以 EcoRI 將接入載體上之 DNA 切出，跑膠確認其大小 (圖十三)，且進一步切出、純化、送定序確認後，便成為永久保存的部分 cDNA 株系 (partial cDNA clone；命名為 VrsbeIIp- 0.8)。

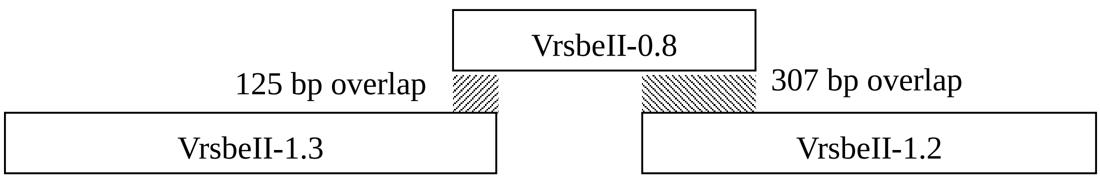
2.1.2 3' RACE

以純化的 polyA mRNA 為模板，利用 3'-CDS primer A 引子合成第一股 cDNA，並在 3'端的部分接上一段 DNA adapter 進行第二階段的 3' RACE 反應。 結果雖然使用專一性 DNA adapter 之引子 (套組專用引子 UPM，為反股) 及 F1 進行 RACE PCR 反應，經取產物 1/25 (2 μL) 作電泳分析與染色，並未得到單一產物 (smear)；因此，接續以 TE buffer 稀釋 50 倍後之 3'RACE 產物為模板，利用 F2 及 NUP (套組專用引子，當作反股) 為引子進行 nested PCR，結果得到約 1.2 kb 及 0.8 kb 大小的兩個片段 (圖十)，分別自膠體切出並純化後，經定序比對，發現此 0.8 kb 片段是屬於 1.2 kb 片段之內部序列，同時此 1.2 kb 片段 (序列代號 VrsbeII-1.2) 與前述之 VrsbeII- 0.8 有 307 bp 的重複區域 (overlap region)，因此，得以將該 1.2 kb 此片段序列與 VrsbeII-0.8 組合並連接成靠 3'端的一段約 1.7 kb 之 VrsbeII cDNA。

2.1.3　5' RACE

以純化的 polyA mRNA 為模板，5'-CDS primer 及 SMART II A oligonucleotide 為引子合成第一股 cDNA，並在 5'端的部分接上一段 DNA adapter。使用專一性 DNA adapter 之引子 (套組專用引子 UPM，為正股) 分別與 R5, R6 進行 RACE PCR 反應，結果不是沒有產物，就是沒有單一性產物 (smear)，推測可能原因為 5'RACE 的產物過大 (預期約 1.5 kb 左右)，Chenchik et al. (1996) 的報告中指出 RACE 的產物若大於 1-1.5 kb 成功率就會偏低。

幸而，3'RACE 獲得之 1.2 kb 序列 (VrsbeII-1.2)與 VrsbeII-0.8 組合成的 1.7 kb，經比對發現與菜豆 (kidney bean; *Phaseolus vulgaris*) 的相似度最高，因此參考菜豆澱粉分支酶 *pvsbeII* (Hamada et al., 2001) 之 5'端起始序列，設計 5'端引子- F6 與 R5 (表六) 進行 RT-PCR，終於成功獲得包含轉錄起始位置之 1.3 kb 左右的 5'端片段 (圖十一，序列代號 VrsbeII-1.3)，經定序比對後，確定為 *sbeII*，且與 VrsbeII-0.8 有 125 bp 的重複區域，故將此片段與 VrsbeII-0.8 左端序列連接，並和 VrsbeII-1.2 組合成假想之綠豆 SBEII 的 cDNA 全長 (*VrsbeII*)，如以下示意圖。



此外，當再度由 VrsbeII-1.3 設計更靠近 5’端的引子，R18 及 R19，進行 RACE PCR 反應 (預期大小僅約 200-250 bp)，卻仍無法得到轉譯起始位置的上游片段。

2.2 選殖 *VrsbeI* cDNA

2.2.1 RT-PCR

由於前述所獲得之 *VrsbeII* 序列比對結果與菜豆及豌豆的相似度高，因此將菜豆 *pvsbeI* (Hamada et al., 2001) 及豌豆 pea sbeII (Burton et al., 1995) cDNA 序列，並排比對找出高保留性的區域，設計合適的引子 F9, F10, R13 及 R17 引子 (表七)，試圖進一步選殖出另一個 SBE 異構型之 cDNA。

以純化過之 polyA mRNA 為模板，利用 F9 與 R13 和 F10 與 R17 二組引子對 (表七) 進行 RT-PCR 反應，分別獲得 0.82 kb (圖十六，序列代號 VrsbeI -0.82) 及 0.72 kb (圖十七，序列代號 VrsbeI-0.72) 大小的片段，經定序比對後，發現 VrsbeI -0.82 屬於前段，且包含轉錄起始位置，而 VrsbeI -0.72 屬於後段序列；因此，分別根據 VrsbeI -0.82 設計出引子 F11，根據 VrsbeI -0.72 設計出引子 R16。接著，以 F11 及 R16 為引子進行 RT-PCR 反應，成功獲得 1.2 kb 大小的片段 (圖十八，序列代號 VrsbeI-1.2)，經定序比對，發現 VrsbeI -0.82 與 VrsbeI-1.2 片段間有 142 bp

的重複，而 VrsbeI-1.2 及 VrsbeI-0.72 的片段間有 124 bp 的重複，故將此三片段連接組合成假想之綠豆 SBEI 的 cDNA 全長，如以下示意圖。

2.2.2 5’RACE

選殖過程中，很幸運的已由 RT-PCR 獲得轉譯起始位置的序列 (VrsbeI -0.82)，因此由此段序列設計 5’端的引子，R14 及 R15 (表七)，與專一性 DNA adapter 之引子 (套組專用引子 UPM，為正股)，進行 RACE PCR 反應 (預期大小僅約 100-150 bp)，但仍無法得到轉譯起始位置的上游片段。

因此，經由與已知的 SBEI 及 SBEII cDNA 比對，本論文所獲之 *VrsbeII* 的 5’端上游部分似乎尚缺約 200 bp 序列，而 *VrsbeI* 似乎尚缺約 60 bp。 推測 5’端部分的序列可能為 GC-rich 區域，因此在 cDNA 選殖過程中，不易得到 5’端完整序列。雖曾於 PCR 反應物中添加 GC-rich solution (5% glycerol or DMSO；Wang and Young, 2003)，以增加 PCR yield 及 specificity，仍無法獲得產物。

2.3 *VrsbI* 與 *VrsbII* 全長 cDNA 序列確認

為了確認上述反應獲得 cDNA 片段之連接全長序列為實際之 cDNA 產物，並且確認 *VrsbeII* 與 *VrsbeI* 是分別來自於不同轉錄出的 mRNA transcript 族群,因此針對所得到的 *VrsbeII* 與 *VrsbeI* cDNA 全長序列之 5’及 3’端各設計一對引子 F6、R9 與 F 9、R21 (表六、七),對純化的 polyA mRNA 進行 RT-PCR。結果顯示分別獲得 2.5 kb (圖十二) 及 2.2 kb (圖十九) 大小的產物，經自膠體切下、純化、定序比對後，證實上述所獲得之 *VrsbeII* 與 *VrsbeI* cDNA 片段,是分別屬於不同 mRNA transcript 族群,兩條 cDNA 將可以進一步以 TA cloning 方式殖入載體中進行株系保存。

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

3.1.1 *VrsbeII*

本研究成功獲得 *VrsbeII* 酵素編碼區全長 2571 bp cDNA，並已於 Genebank 資料庫註冊 (accession no. AY622199)，其包含起始碼 (ATG) 到終止密碼子 (TGA) 的完整 ORF，演繹出 856 個胺基酸 (VrSBEII；圖十五)，預估約 97 kDa 分子大小蛋白質，pI 為 5.47。經以 Blast 程式作序列分析比對，發現 cDNA 序列部分發現和菜豆的 *pvsbe2* (AB029548)

全長序列的重疊部分有 94%的相同性，和豌豆的 *sbeI* (X80009) 有 89 %的相同性。而胺基酸序列部分，發現和菜豆 PvSBE2 蛋白質最為相似，有高達 91%的同質性 (表八)，主要差異在於綠豆 VrSBEII 較 PvSBE2 短少 15 個胺基酸，ASSPVDVDIPAKKTS (125-139)，且綠豆亦較其它物種短少 15-18 個胺基酸 (圖二十二)，由於此段序列為菜豆 PvSBE2 N-terminal domain 的一部份，也因此綠豆 VrSBEII 的 N- terminal domain 較菜豆短，推測可能會影響 N- terminal domain 的功能，譬如影響 SBE 與其他酵素分子間的交互作用或影響 SBE 與基質或與澱粉顆粒間之分子接觸。然而，為何綠豆 VrSBEII N- terminal 較短? 是否因為此段序列賦予其他物種 SBEII 特定功能，或因此使綠豆 SBEII 功能有別於其他物種? 要明瞭這短少之 15-18 個胺基酸的確切功能，有待進一步的研究探討。

3.1.2 *VrsbeI*

VrsbeI cDNA 酵素編碼區全長為 2208 bp，並已在 Genebank 資料庫註冊 (accession no. AY667492)，其也含蓋起始 (ATG) 到終止密碼子 (TAA) 的完整 ORF，演繹出 735 個胺基酸 (VrSBEI；圖二十一)，預估分子大小約為 84 kDa，pI 為 6.35。經同上比對，其序列組成同樣與菜豆及豌豆相似度最高，cDNA 序列部分發現和菜豆的 *pvsbe1* (AB029549) 全長序列的重疊部分有 95%的相同性，和豌豆的 *sbeI* (X80009) 有 88%

的相同性。而胺基酸序列部分，發現和菜豆 PvSBE1 蛋白質最為相似，有高達 95%的同質性 (表八)，差異僅在於綠豆 VrSBEI 較 PvSBE1 (847 a.a.) 在 C 端短少 112 個胺基酸 (圖二十二)。

當單獨比較 *VrsbeII* 與 *VrsbeI* 序列，發現兩異構型之 cDNA 相同性只有 59%，胺基酸同質性也只有 56% (表八)，因此推測，*VrsbeII* 與 *VrsbeI* 是屬於不同的 mRNA 族群所表現。相對於菜豆之 *pvsbe2*、 *pvsbe1* cDNA，兩者相同性有 60%，胺基酸同質性有 57 %，因此，可預知這差異性或許也會影響綠豆 SBE 異構型的催化特性如 Km、轉移鏈的長度、對受質的專一性等。

3.2 VrSBEII 與 VrSBEI 之酵素活性區域結構

經由與各種不同植物 SBE 胺基酸序列的並排比對，顯示綠豆之 SBEI 與 II 也具有符合α-amylase family 的特徵，包括$(\beta/\alpha)_8$-barreal domain 及四個活化部位的保留區域 (Jespersen et al., 1993 ; Svensson, 1994)。此相關位置在綠豆 VrSBEII 分別為 HSH$^{S}/_{A}$S (410- 414)、GFRFDGVT (474-481)、$^{G}/_{A}$EDVS (532-536) 及 AESHDQ (597- 602)。其中值得注意的是，在 $^{G}/_{A}$EDVS 的區域中，”G”主要出現在 SBEII 異構型，而 A 則出現在 SBEI 異構型 (圖二十二) 與 Martin and Smith (1995) 報告相符合 (圖三)。

3.3 比對分析綠豆與各種植物 SBE 胺基酸序列間的差異

經利用 Pretty 程式功能作序列並排比對，發現兩種 SBE 異構型間有下列幾點差異 (圖二十二)：

3.3.1 N 端序列

前人研究指出 SBEII 的主要特徵為 N 端序列較 SBEI 長且各物種之 SBEII N 端部分序列的相似性很低 (Burton et al., 1995)；前人也發現 SBEII-specific N- terminal 序列含有許多 Ser 且末端含有二或三個連續的 Pro 殘基 (即 PP 或 PPP) (Burton et al., 1995；Sun et al., 1998)，而綠豆 VrSBEII 之序列則為 PRP。 Burton et al. (1995) 及 Martin and Smith (1995) 報告中指出，這種 N- terminal domain 可能是一個 ”flex -ible arm”，扮演著影響 SBE 與其他酵素間或 SBE 與澱粉顆粒間接觸的角色，此特性也可能適用於綠豆的情況。

3.3.2 連接 β-strand 與 α-helice 間的 loop

綠豆 VrSBEII 之序列，在 β-strand 8 與 α-helice 8 間的 loop，也發現有一段由 11 個胺基酸組成的序列 eQXLPnGsviP (675-685)，大寫表示完全相同、小寫表示並非 100%相同，而 X 則表示可為任何胺基酸，前人研究指出這 loop 特性存在所有的 SBEII，然而 SBEI 則缺乏 (Burton et al., 1995)，當綠豆 SBEII 與 I 比較時，發現亦有此特性。

綠豆 VrSBEI 之序列較 VrSBEII 多出 3 個額外的胺基酸 VGQ (367-369)，與 Burton et al., 1995 報告結果相同，且經由與各種植物 SBE 比對 (圖二十二)，結果顯示這 3 個額外的胺基酸僅存在於 SBEI；此外，尚有一段由 8 個胺基酸組成的序列 PEGiPGIP (738-745)，以菜豆 PvSBEI 序列表示，也僅出現在 SBEI，大寫表示完全相同、小寫表示並非 100%相同，然而因綠豆 VrSBEI 序列較短 (735 a.a.)，而大部分物種 SBEI 序列範圍 820-847 a.a.，所以綠豆 VrSBEI 亦缺乏此段序列。

3.4 預測訊息胜肽 (signal peptide) 之切位

根據神經網路系統工具，TargetP (www.cbs.dtu.dk/services /TargetP/) (Emanuelsson et al., 2000; Nielsen, et al., 1997) 分析綠豆 VrSBEII 及 VrSBEI 胺基酸序列，結果預測出分別在 VrSBEII 之 Lys 47-Ser 48 和 VrSBEI 之 Ser 12-Val 13 的位置，可能為訊息胜肽 (signal peptide) 之切位；並且發現 VrSBEII 之切位與菜豆及豌豆很接近 (Burton et al., 1995；Hamada et al., 2001)，然而，VrSBEI 則明顯不同 (表四)。此預測結果，仍需進一步將具有酵素活性的 VrSBEI 與 VrSBEII 從綠豆純化出來後，再經由蛋白質的 N 端定序加以證實。

表四、綠豆與菜豆及豌豆之 signal peptide 切位的比較

	Predicted Mature protein kDa / a.a.		Transit peptide a.a.		Cleavage site	
	Family A	Family B	Family A	Family B	Family A	Family B
Mungbean	92.3/809	83/722	47	13	Lys 47-Ser 48	Ser 12-Val 13
Kidney bean	82/823	88.5/777	47	70	Lys 47-Ser 48	Ala 69-Val 70
Pea	99.8/875	87.7/769	47	＞57	Tyr 47-Ala 48	KGVSer-Val

3.5 分析綠豆與各物種 SBE 之演化關係

根據 Kimura protein-distance algorithm 方法 (Kimura, 1983) 分析各物種 SBE 異構型之胺基酸序列間的關係，建立系統發生學 (phylo-genetic) 上的演化位置。此方法因為忽略序列並排當中的 gap 位置，所以得到的相似度較高。分析結果發現綠豆 SBE 和菜豆的相似度最高，分別為 VrSBEII (96.14 %)、VrSBEI (96.76 %) (表九)。 以樹狀圖來表示分子演化的相關性，發現綠豆與同屬於豆科的菜豆及豌豆的演化關係最相近，同時證實 VrSBEII 與菜豆 PvSBEII 及豌豆 SBEI 同屬於 Family A 族群，而 VrSBEI 則屬於 Family B 族群 (圖二十三)。因此，除了各物種之間的演化關係分析與 Burton et al. (1995) 報告中提出的分類結果相符合之外，本研究利用 VrSBEI 與 VrSBEII 的胺基酸序列定位出綠豆的演化位置，具有重要意義。

第四章 結論

4.1 論文總結

本論文利用生物資訊的檢索以及 RT-PCR、PCR 及 RACE 等分子生物學技術，成功的選殖出兩種綠豆澱粉分支酶異構型之 cDNA 的全長 ORF (open reading frame)序列。選殖過程是先得到 cDNA 的片段，經由 GCG SeqWeb 比對序列之間的重複區域並組合，繼而成功的量化出兩段推定性 (putative) SBE 之 cDNA 序列，並且確定內部之序列，分別命名為 *VrsbeII* 和 *VrsbeI*。

此兩段 cDNA 序列與所編碼之胺基酸特性為：

- 包含完整的 ORF，長度為 2571 bp 和 2208 bp
- 編碼出 856 個及 735 個胺基酸
- 預估分子量為 97 kDa 及 84 kDa
- pI 值為 5.47 及 6.35
- 具有 α-amylase family 的保留區間，分別為 HSH$^{S}/_{A}$S、GFRFDG VT、$^{G}/_{A}$EDVS 和 AESHDQ，及特有的催化區$(\beta/\alpha)_8$-barrel domain
- 已於 GenBank 資料庫註冊，accession No. 分別為 AY622199 及 AY667492

	VrsbeII	*VrsbeI*
編碼區之全長 cDNA	2571 bp	2208 bp
胺基酸長度	856 a.a.	735 a.a.
預估分子大小	97 kDa	84 kDa
pI 值	5.47	6.35
GenBank 註冊 accession No.	AY622199	AY667492

4.2 未來研究方向

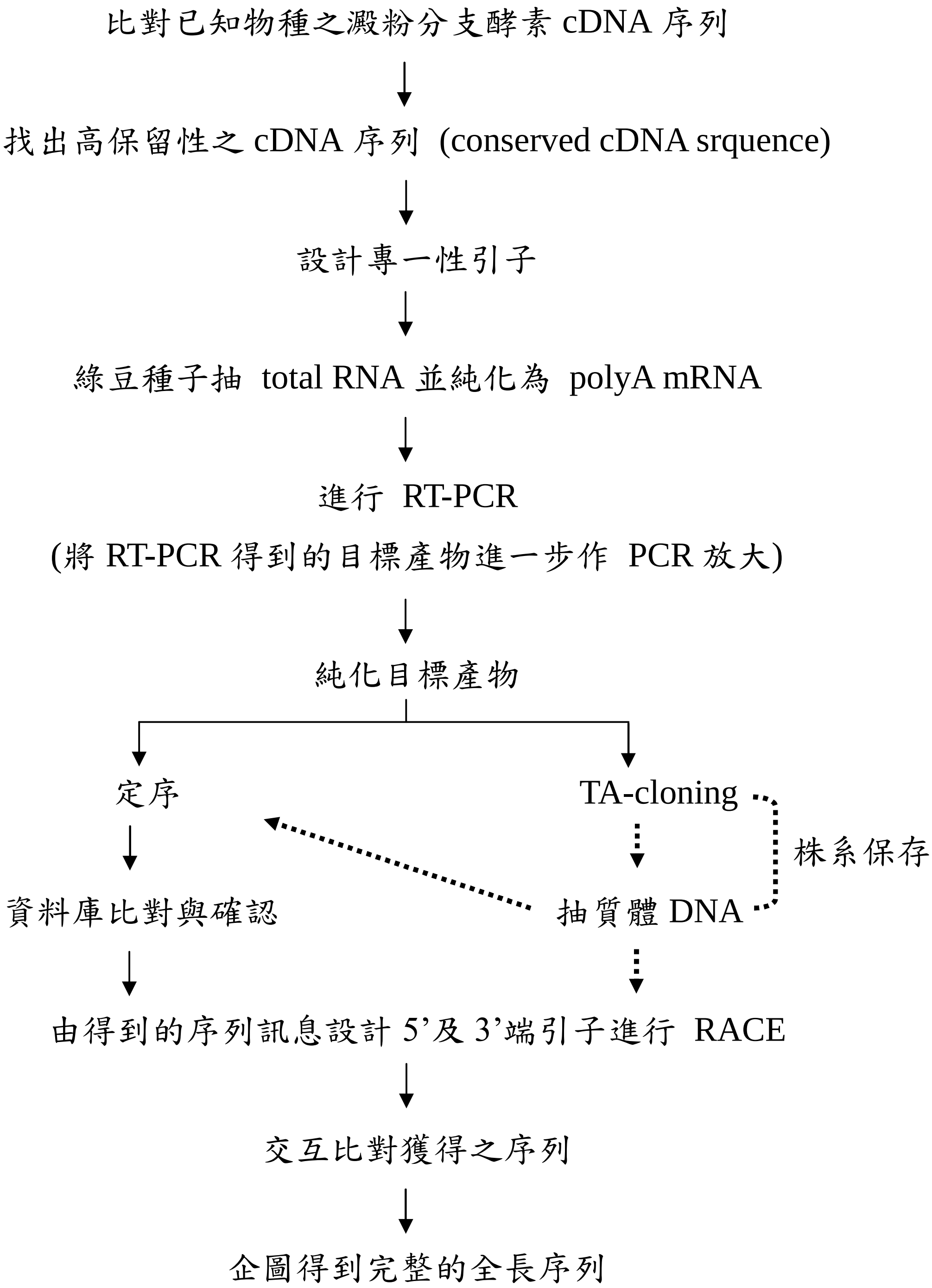
未來可以將所獲得的 *VrsbeII* 和 *VrsbeI* cDNA subclone 到表現載體，如 pET-23d (+) (Hamada et al., 2001; Libessart and Preiss, 1998)、pET-30a (Genschel et al., 2002)、pET-29 (Jobling et al., 1999) 等，再 transform 到 *E. coli* 宿主，如 BL21、BE-deficient strain KV832 (Kiel, et al., 1987) 或 yeast，如 Saccharomyces cerevisiae、Pichia pastoris (Parent, 1996; Romanos, 1995; Cregg, 1993) 中表現出 SBE 蛋白質，分析表現的 SBE 活性，以確認所選殖到的序列可表現出酵素活性，並確實為功能性蛋白質。

Tsay et al. (1983) 報告，藉由分析綠豆不同發育時期的澱粉合成酵素，包括 sucrose synthetase, AGPase 及 starch synthase 活性，證實不同階段酵素的表現量確實不同，因而需進一步分析不同階段 SBE 異構型活性的表現量是否不同。分別由純化出或宿主表現出的 SBE 蛋白質製備 SBE 抗體，以 Western blot 偵測在不同生長階段 SBE 異構型蛋白質的表現。同時，也可將 clone 的 SBE 異構型 cDNA 分別設計出

gene-specific probe，利用 Northern blot 分別對不同生長階段 total RNA 做 SBE 基因表現的定量偵測，因而可以分別得到 SBE 異構型基因在轉譯與轉錄表現上的答案，藉以探討他們在澱粉合成生理上扮演的角色。

應用方面，可參考 SBE 活性在在宿主表現的結果，進一步利用基因工程技術，藉由 SBE cDNA 序列之部分修飾，獲得特殊功能的 SBE 活性，如耐高溫、以長鏈或短鏈澱粉為基質、增加對不同基質的廣效性等，或利用 SBE 在細菌、酵母菌等的基因表現載體表現出特殊結構的澱粉或其他醣類產物；或許，也可以利用基因轉殖植物生物技術，將 SBE cDNA 放入植物表現，從事在植物體內澱粉生成時即改變它所具有的特性，來產生新品種作物，或用來生產高價值的特殊澱粉。

NATIONAL CENTRAL LIBRARY 國家圖書館 ROC



圖七、選殖綠豆 SBE cDNA 的流程圖

Fig. 7 The procedure of cloning SBE cDNA in mungbean.

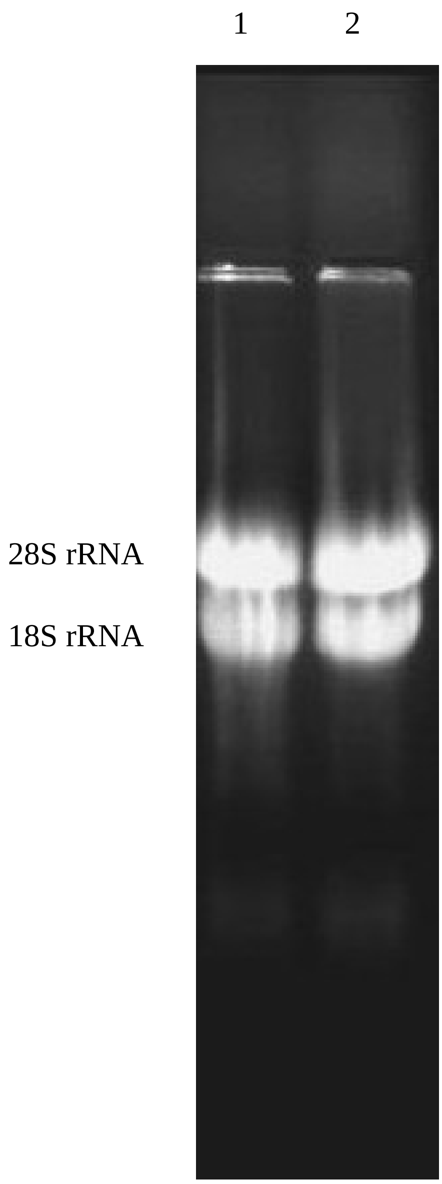
結果圖與表

表五、綠豆 total RNA 與 poly(A) RNA 之萃取純化結果

Table 5. Isolation of total RNA and poly(A) RNA from seeds of mungbean.

Method	RNA (mg)	A_{260}/A_{280}	Yield (%)
Hot phenol[a]	1.63	1.8	4.705[c]
PolyATtract® mRNA isolation systems[b]	0.006	2	0.6[d]

a. The data was obtained from 4 g of seeds of mungbean
b. The data was obtained from 1 mg of total RNA of mungbean
c. The data was obtained from total RNA/mungbean
d. The data was obtained from mRNA/1mg total RNA



圖八、綠豆 total RNA 之甲醛洋菜膠體電泳
1 和 2 為不同時間抽取的 total RNA

Fig. 8 Formaldehyde gel electrophoresis of total RNA isolated from seed of mungbean.

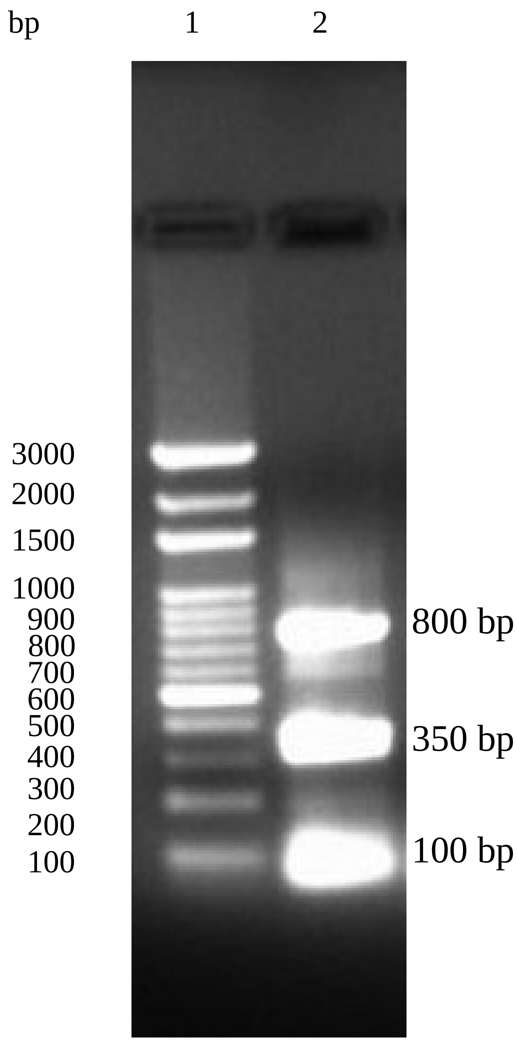
Lane1：20 μg of total RNA
Lane2：20 μg of total RNA

表六、*VrsbeII* cDNA 專一性引子對照表

Table 6. The gene-specific primers used in cloning *VrsbeII* cDNA.

Name	sequence	Length(mer) /Tm℃ /GC%
SBE F1[a]	TGG ATA TTG TTC ACA GTC ATG C	22/ 56.5/ 40.9
SBE F2[b]	AAG ATG AGG ACT GGA AAA TGG GCG	24/ 62.7/ 50
SBE F6[c]	ATG GTT TAC ACC ATC TCG GGA ATT CGA TTT CCG	33/ 68.2/ 45.5
SBE R1[a]	CTT GGG AAA TCT ATC CAT TCA GGA TGC C	28/ 65.1/ 46.4
SBE R5[b]	AAG ACG AGA ATC CCA CAT CC	20/ 57.3/ 50
SBE R6[b]	GCA TTC CAC TCA CAT CTT CAC C	22/ 60.3/ 50
SBE R9[e]	TCA AGG ATC AAC TGG CTC TGG TTC A	25/ 63/ 48
SBE R18[d]	ACA ACC GGA AAT CGA ATT CCC GAG ATG GTG	30/ 68.1/ 50
SBE R19[d]	TGAGAA AAA CAG GAA GAG ACG CTG CC	26/ 64.8/ 50

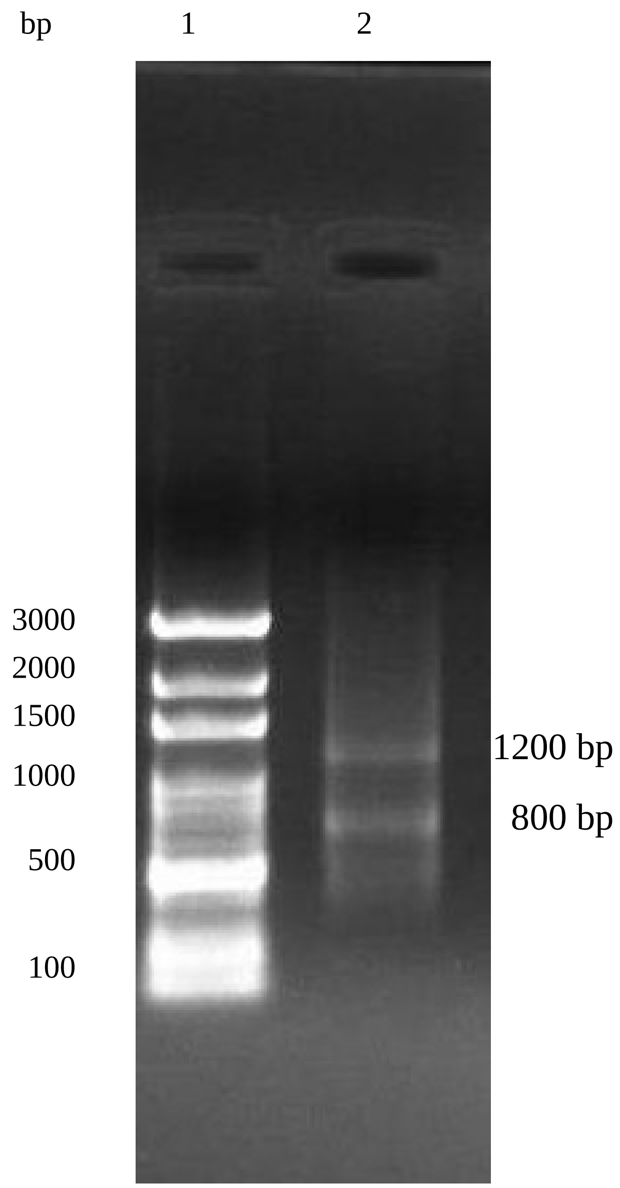
a. 由資料庫之 SBE cDNA 保守區間所設計出的引子
b. 由第一階段所獲得之 VrsbeII-0.8 所設計的 nested 引子
c. 參考菜豆澱粉分支酵素 *pvsbeII* (Hamada et al., 2001)之 5’端起始序列設計
d. 由第三階段所獲得之 VrsbeII-1.3 設計
e. 由所得到的 *VrsbeII* cDNA 之 3’端設計



圖九、以綠豆 poly (A) RNA 為模版，以 SBEF1 及 SBER1 為引子進行 RT-PCR 及 PCR 二次放大後，得到產物的洋菜膠體電泳圖

Fig. 9 Agarose gel electrophoresis of DNA fragments prepared from RT-PCR and PCR amplification using SBEF1 and SBER1 as primers.

Lane1: 3kb ladder marker
Lane2: SBEF1 and SBER1 PCR 二次放大產物

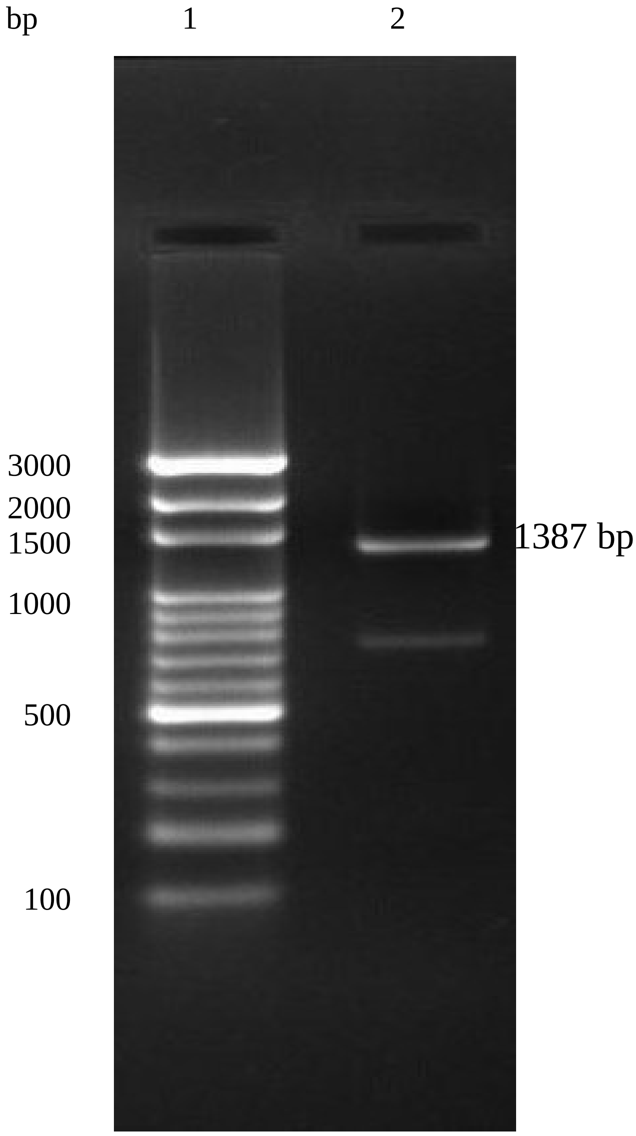


圖十、以 SBEF2 及 NPU 為引子進行 3’RACE 之產物的洋菜膠體電泳圖

Fig.10 Agarose gel electrophoresis of DNA fragments prepared from 3’RACE using SBEF2 and NPU as primers.

Lane 1：3 kb ladder marker

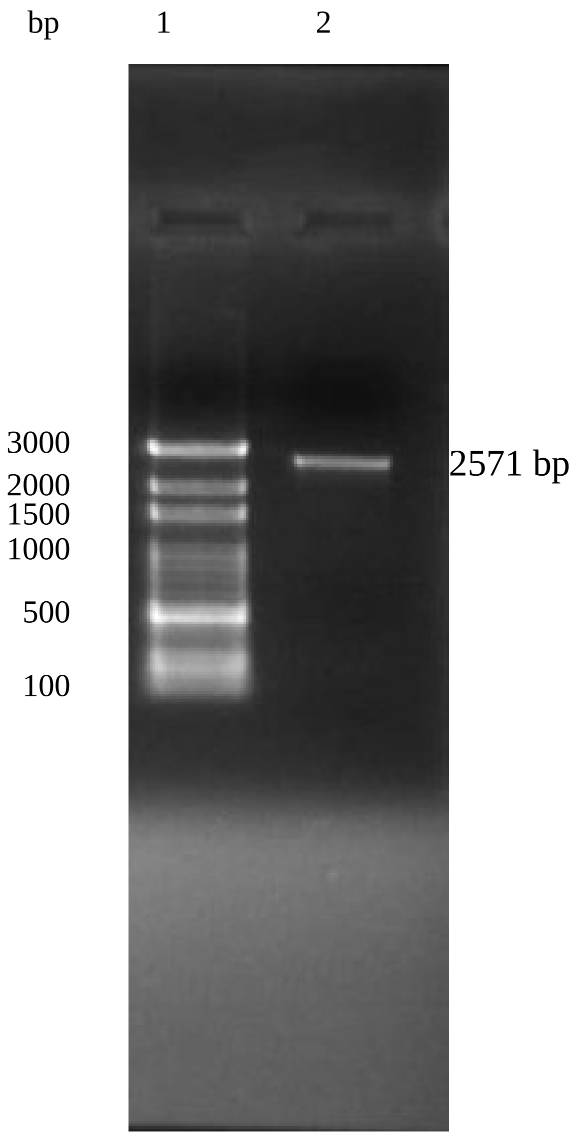
Lane 2：SBEF2 and NPU



圖十一、以綠豆 poly (A) RNA 為模版，SBEF6 及 SBER5 為引子進行 RT-PCR 及 PCR 二次放大後，得到產物的洋菜膠體電泳圖

Fig. 11 Agarose gel electrophoresis of DNA fragments prepared from RT-PCR and PCR amplification using SBEF6 and SBER5 as primers.

Lane1:　3 kb ladder marker
Lane 2：SBEF6 and SBER5

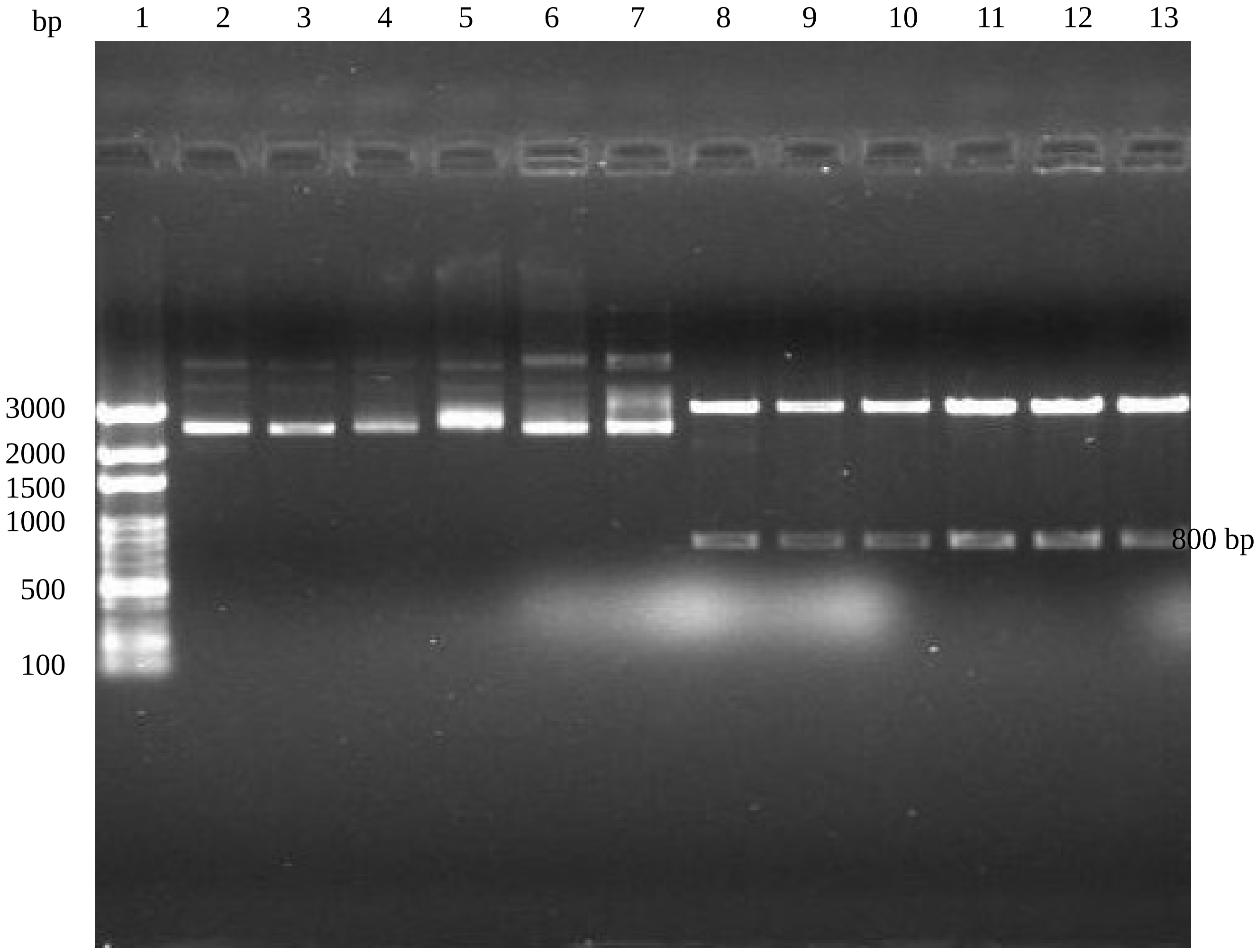


圖十二、以綠豆 poly (A) RNA 為模版，SBEF6 及 SBER9 為引子對進行 RT-PCR 放大後所得全長 *VrsbeII* cDNA 的洋菜膠體電泳圖

Fig. 12 Agarose gel electrophoresis of DNA fragments prepared from RT-PCR using SBEF6 and SBER9 as primers.

Lane 1：3 kb ladder marker

Lane 2：SBEF6 and SBER9



圖十三、由 VrsbeIIp-0.8 抽出之質體 DNA，及以 EcoRI 切出接入載體上之 DNA (VrsbeII-0.8)的洋菜膠體電泳圖

Fig. 13 Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA fragments isolated from VrsbeIIp-0.8 and treated with EcoRI.

Lane 1： 3 kb ladder marker

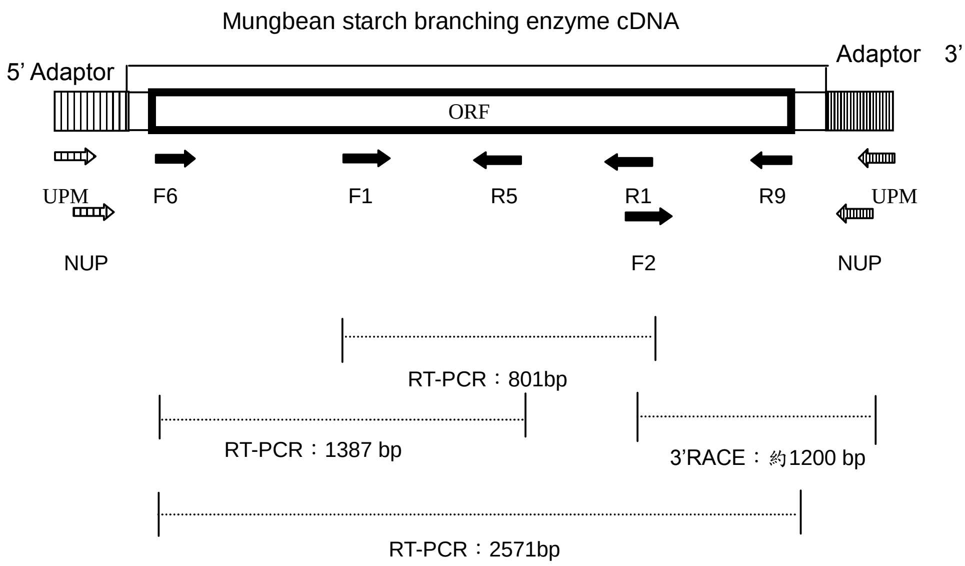
Lane 2-5： plasmid DNA from JM110

Lane 6-7： plasmid DNA from DH5 α

Lane 8-11：plasmid DNA from JM110 treated with EcoRI

Lane 12-13：plasmid DNA from DH5 α treated with EcoRI

SBEII



圖十四、SBEII cDNA 基因選殖之 RT-PCR 及 RACE 對照圖

Fig. 14 Cloning SBEII cDNA by RT-PCR and RACE.

1 ATG GTT TAC ACC ATC TCG GGA ATT CGA TTT CCG GTT GTT CCT TCG CTG AAC GTC TCC AGC CTC CGT GGC GAT CGC AGG GCA GCG TCT CTT CCT GTT TTT CTC 102

1 M V Y T I S G I R F P V V P S L N V S S L R G D R R A A S L P V F L 34

103 AGA AAG AAC GAC TTC TCT CGG AAA ATC CTT GCC GTA AAA TCT TCT CAC GAT TCT GAT TCC CCG TCT TCT GCA ATT GCT GAA TCT GAT AAG GTT CTT ATT CCT 204

35 R K N D F S R K I L A V K S S H D S D S P S S A I A E S D K V L I P 68

205 CAA GAT CAA GAT AAC TCT GCA TCC TTG ACA GAT CAA CTT GAA ACT CCT GTT ATA ACC TCA GAG GAT GCA CAT AAT TTA GAG GAT TTA ACA ATG GAA GAT GAG 306

69 Q D Q D N S A S L T D Q L E T P V I T S E D A H N L E D L T M E D E 102

307 GAT AAA TAC AGC ATT AGT GAA GCA GAT ACC AGT TAC AGA CAG ATT GAA GGT GAG CTA GGT TCT GTG GTT TCT GTT GGC AAG AAA GTA AAT ATA CCA AGT GAT 408

103 D K Y S I S E A D T S Y R Q I E G E L G S V V S V G K K V N I P S D 136

409 GAA GCT AAA CCT AAG ACC ATT CCC CGA CCT GGT GCT GGA CAG AAA ATA TAT GAG ATT GAT CCA TCT TTG CTA GCC CAC CGT GAG CAT CTT GAT TTC CGT TTC 510

137 E A K P K T I P R P G A G Q K I Y E I D P S L L A H R E H L D F R F 170

511 GGA CAA TAC AAA AGA TTG CAC GAT GAA ATT AAT AAG TAT GAA GGT GGT CTG GAT ACA TTT TCT CGT GGC TAT GAA AAA TTT GGC TTC ATA CGC AGT GCT ACA 612

171 G Q Y K R L H D E I N K Y E G G L D T F S R G Y E K F G F I R S A T 204

613 GGC GTT ACT TAC AGA GAG TGG GCA CCT GGA GCT AAG TCA GCA GCA TTA ATT GGA GAC TTC AAC AAT TGG AAT TCA AAT GCA GAT GTA ATG ACT CGG AAT GAG 714

205 G V T Y R E W A P G A K S A A L I G D F N N W N S N A D V M T R N E 238

715 TTT GGT GTT TGG GAG ATT TTT TTG CCA AAC AAT GTG GAT GGT TCA CCA CCA ATT CCT CAT GGT TCT CGG GTC AAG ATC CGC ATG GAT ACT CCC TCT GGA GTC 816

239 F G V W E I F L P N N V D G S P P I P H G S R V K I R M D T P S G V 272

817 AAG GAC TCG ATT CCT GCT TGG ATC AAG TTT TCT GTA CAG GCT CCT GGT GAA ATT CCA TAT AGC GGA ATA TAC TAT GAT CCC CCA GAA GAG GAA AAA TAT GTA 918

273 K D S I P A W I K F S V Q A P G E I P Y S G I Y Y D P P E E E K Y V 306

919 TTC AAA CAT CCA CAG CCA AAG AGA CCA AAA TCA CTT AGA ATA TAC GAG TCA CAT GTT GGA ATG AGT AGT CCG GAG CCA ATG ATC AAC ACA TAT GCC AAT TTT 1020

307 F K H P Q P K R P K S L R I Y E S H V G M S S P E P M I N T Y A N F 340

1021 AGA GAT GAT GTA CTA CCT CGC ATT AAA AAG CTT GGC TAC AAT GCT GTC CAG ATT ATG GCC ATT CAA GAA CAT TCT TAT TAT GCC AGC TTT GGG TAC CAT GTC 1122

341 R D D V L P R I K K L G Y N A V Q I M A I Q E H S Y Y A S F G Y H V 374

1123 ACA AAT TTC TTT GCA CCT AGC AGC CGA TTT GGA ACT CCA GAG GAA CTT AAA TCT CTG ATA GAC AAA GCC CAT GAA CTA GGT CTG CTT GTT CTG ATG GAT ATT 1224

375 T N F F A P S S R F G T P E E L K S L I D K A H E L G L L V L M D I 408

1225 GTA CAC AGC CAT GCC TCA AAT AAT ACT TTG GAT GGC CTA AAC ATG TTT GAT GGA ACT GAT AGT CAT TAC TTC CAT CCT GGG TCA CGG GGT TAT CAT TGG ATG 1326

409 V H S H A S N N T L D G L N M F D G T D S H Y F H P G S R G Y H W M 442

1327 TGG GAT TCT CGT CTT TTC AAT TAT GGA AGC TGG GAA GTA CTA AGG TAT CTA CTT TCA AAT GCA AGA TGG TGG CTG GAT GAA TAC AAG TTT GAC GGA TTT CGA 1428

443 W D S R L F N Y G S W E V L R Y L L S N A R W W L D E Y K F D G F R 476

1429 TTT GAT GGT GTT ACA TCA ATG ATG TAC ACT CAT CAT GGG TTG CAG GTA GCA TTC ACT GGA AAT TAC AGT GAG TAC TTT GGT ATG GCA ACT GAT GTT GAT GCT 1530

477 F D G V T S M M Y T H H G L Q V A F T G N Y S E Y F G M A T D V D A 510

1531 GTG GTT TAC CTG ATG CTG GCT AAT GAT CTC ATT CAT GGG CTC TTC CCC GAG GCT GTT ACC ATT GGT GAA GAT GTG AGT GGA ATG CCA ACA TTC TGC CTT CCT 1632

511 V V Y L M L A N D L I H G L F P E A V T I G E D V S G M P T F C L P 544

1633 ACA CAA GAT GGT GGT GTT GGT TTT GAT TAT CGC CTG CAA ATG GCC ATT GCA GAC AAG TGG ATT GAG ATT CTC AAG AAG CAA GAT GAG GAC TGG AAA ATG GGC 1734

545 T Q D G G V G F D Y R L Q M A I A D K W I E I L K K Q D E D W K M G 578

1735 GAT ATT GTC CAC ACA CTA ACA AAC AGA AGA TGG CTG GAA AAA TGT GTA GCT TAT GCT GAG AGT CAT GAT CAG GCC TTG GTT GGT GAC AAG ACA ATT GCA TTT 1836

579 D I V H T L T N R R W L E K C V A Y A E S H D Q A L V G D K T I A F 612

1987 TGG TTG ATG GAC AAG GAT ATG TAT GAC TTC ATG GCG TTA GAC AGG CCA TCT ACA CCT CGT ATA GAT CGT GGT ATA GCA TTA CAC AAA ATG ATT AGG CTT ATT 1938

613 W L M D K D M Y D F M A L D R P S T P R I D R G I A L H K M I R L I 646

1939 ACC ATG GGA CTT GGT GGT GAA GGG TAT TTG AAT TTT ATG GGG AAT GAG TTT GGC CAT CCT GAG TGG ATT GAT TTT CCA AGG GGT GAA CAA CAA CTT CCT AAT 2040

647 T M G L G G E G Y L N F M G N E F G H P E W I D F P R G E Q Q L P N 680

2041 GGC TCA GTA ATT CCA GGG AAC AAC TAC AGT TAT GAT AAA TGC AGG CGA AGA TTT GAC TTG GGA GAT GCG GAC TAT TTA AGA TAT CGA GGA ATG CAA GAA TTT 2142

681 G S V I P G N N Y S Y D K C R R R F D L G D A D Y L R Y R G M Q E F 714

2143 GAT CGA GCC ATG CAG CTT TTA GAA GAA AAG TTT GGA TTC ATG ACT GCT GAG CAC CAA TAT ATT TCA CGG AAA AAT GAA GGT GAC AAA GTT ATA ATC TTT GAA 2244

715 D R A M Q L L E E K F G F M T A E H Q Y I S R K N E G D K V I I F E 748

2245 AGG GGC AAC CTC GTC TTT GTC TTC AAT TTT CAT TGG CAT AAC AGT TAT TCA GAT TAC AGA GTT GGC TGC TCA ACC CCT GGG AAA TAT AAG ATT GTC TTG GAT 2346

749 R G N L V F V F N F H W H N S Y S D Y R V G C S T P G K Y K I V L D 782

2347 TCA GAT GAT GCC TTG TTT GGT GGC TTC AAT AGG CTC AAC CAC TCT GCT GAG TAC TTC ACT AAT GAA GGA TGG TAT GAT GAC AGA CCT CGA TCC TTT CTT GTC 2448

783 S D D A L F G G F N R L N H S A E Y F T N E G W Y D D R P R S F L V 816

2449 TAT GCA CCT TCT AGG ACA GCA GCA GTT TAT GCC CTT GCA GAT GAT GAT CTG GAA CCA GCC CTT TCA GAC GAA GCT GAA CCA GTC CTT GCA GAT GAA GCT GAA 2550

817 Y A P S R T A A V Y A L A D D D L E P A L S D E A E P V L A D E A E 850

2551 CCA GAG CCA GTT GAT CCT TGA 2571

851 P E P V D P * 856

圖十五、*Vrsbe*II cDNA 及其演繹出之胺基酸序列對照圖

Fig. 15 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *Vrsbe*II cDNA.

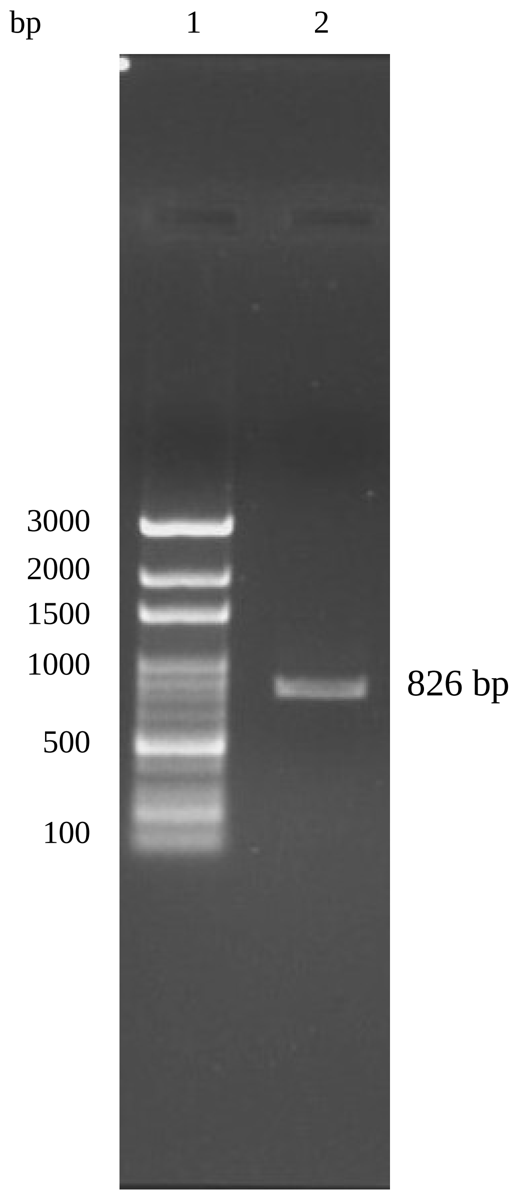
The boxed highlighted amino acids indicate four conserved regions of the α-amylase family.

表七、*VrsbeI* cDNA 專一性引子對照表

Table 7. The gene-specific primers used in cloning *VrsbeI* cDNA.

Name	sequence	Length(mer) /Tm℃ /GC%
SBE F9[a]	ATG TTT AAC TGT CTG TGC CTT AAT CCG TTC	30/ 64/ 40
SBE F10[a]	GAG GGC TAC CTT AAT TTC ATG GGC AAT G	28/ 65.1/ 46.4
SBE F11[b]	TTT GCA GCC CCA TAT GAT GGT G	22/ 60.3/ 50
SBE R13[a]	TTA TGC GAG GTT CAG AGC TAC TCA TC	26/ 63.2/ 46.2
SBE R14[b]	AGA CGC TGC CTG CTT CTT ACA GTG TGA G	28/ 68/ 53.6
SBE R15[b]	CCG ATA GCC AAG AGC AAG ATC AAC TGA C	28/ 66.6/ 50
SBE R16[c]	AGT GAT CTG TAT CCA CCA GAT TCC ACT G	28/ 65.1/ 45.4
SBE R17[a]	TTA AAT TTC CCT ATC CAA AGA AGC TGC CAC	30/ 64/ 40
SBE R21[d]	TTA CCC CCA GAG ATT AGG GCT CCT TAC TCT	30/ 58/ 50

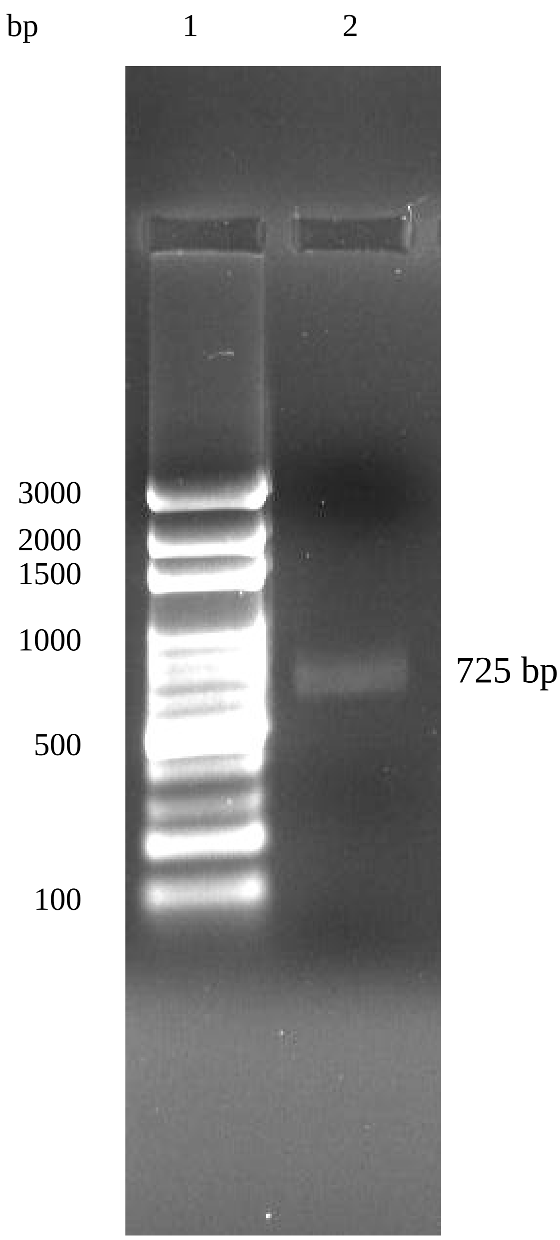
a. 參考菜豆澱粉分支酵素 *pvsbeI* (Hamada et al., 2001) 及豌豆 pea sbeII (Burton et al., 1995) cDNA 序列之保守區間所設計出的引子
b. 由第一階段所獲得之 VrsbeI-0.82 所設計的 nested 引子
c. 由第二階段所獲得之 VrsbeI-0.72 所設計的 nested 引子
d. 由所得到的 *VrsbeI* cDNA 之 3’端設計



圖十六、以綠豆 poly (A) RNA 為模版，SBEF9 和 SBER13 為引子對進行 RT-PCR 後產物的洋菜膠體電泳圖

Fig. 16 Agarose gel electrophoresis of DNA fragments prepared from RT-PCR using SBEF9 and SBER13 as primers

Lane 1：3 kb ladder marker
Lane 2：SBEF9 and SBER13

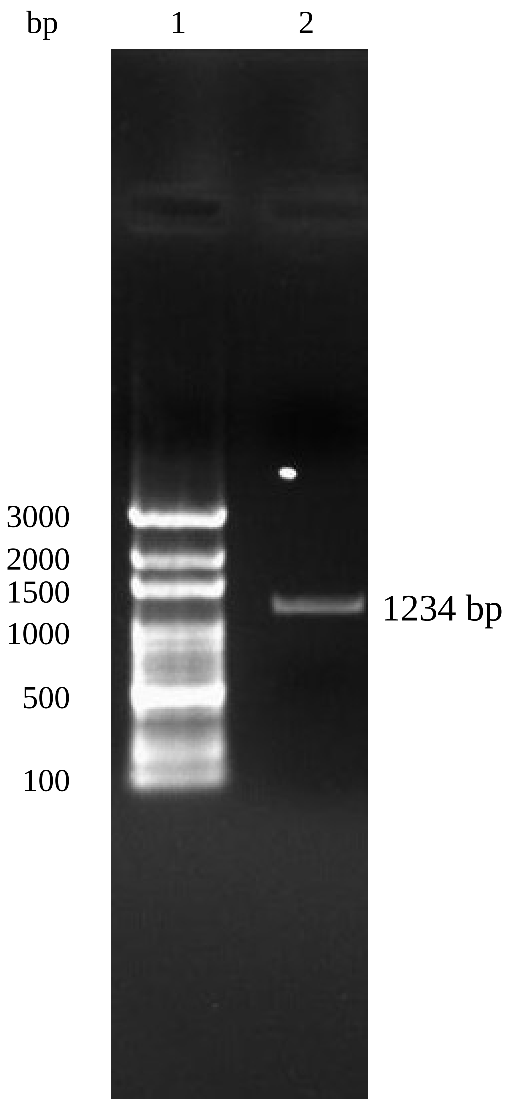


圖十七、以綠豆 poly (A) RNA 為模版，SBEF10 和 SBER17 為引子進行 RT-PCR 後，得到產物的洋菜膠體電泳圖

Fig. 17 Agarose gel electrophoresis of DNA fragments prepared from RT-PCR using SBEF10 and SBER17 as primers.

Lane 1：3 kb ladder marker

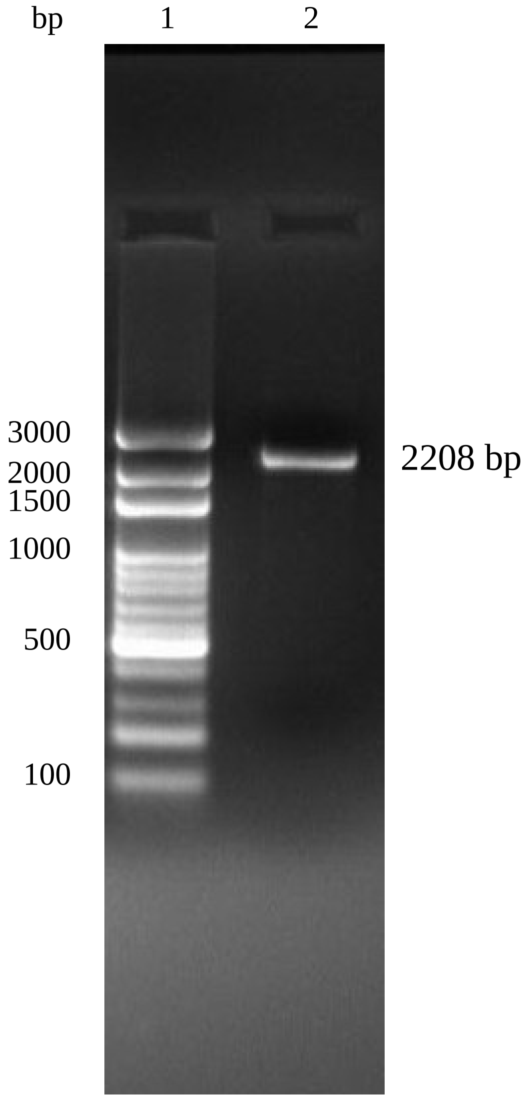
Lane 2：SBEF10 and SBER17



圖十八、以綠豆 poly (A) RNA 為模版，SBEF11 和 SBER16 為引子進行 RT-PCR 後得到產物的洋菜膠體電泳圖

Fig. 18 Agarose gel electrophoresis of DNA fragments prepared from RT-PCR using SBEF11 and SBER16 as primers.

Lane 1：3 kb ladder marker
Lane 2：SBEF11 and SBER16

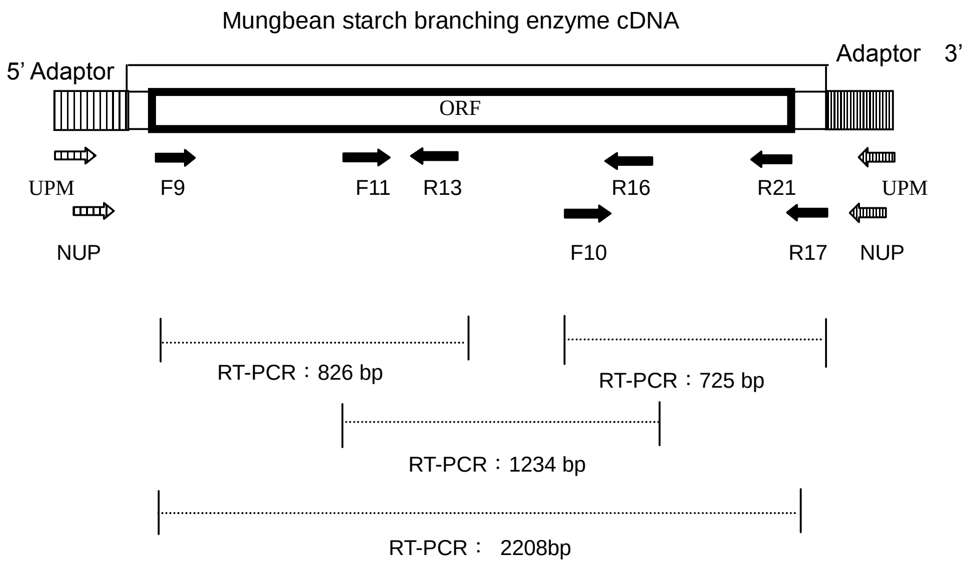


圖十九、以綠豆 poly (A) RNA 為模版，SBEF9 及 SBER21 為引子對進行 RT-PCR 及 PCR 二次放大後所得全長 *VrsbeI* cDNA 的洋菜膠體電泳圖

Fig. 19 Agarose gel electrophoresis of DNA fragments prepared from RT-PCR and PCR amplification using SBEF9 and SBER21 as primers.

Lane 1：3 kb ladder marker
Lane 2：SBEF9 and SBER21

SBEI



圖二十、SBEI cDNA 基因選殖之 RT-PCR 及 RACE 對照圖

Fig. 20 Cloning SBEI cDNA by RT-PCR and RACE.

```
1 ATG TTT AAC TGT CTG TGC CTT AAT CCG TTC ATT TCC GTC TCT TCA ACC GTT GCC TGC ACC TCT CAC ACT GTA AGA AGC AGG CAG CGT CTT GCA CCA CAA AAG 102
1 M F N C L C L N P F I S V S S T V A C T S H T V R S R Q R L A P Q K 34
103 TCA GTT GAT CTT GCT CTT GGC TAT CGG AAT CCA CTT GGA TAT GGG TTT GGT TTT GGA TTG AGA AGA TCA CTG CAC GAG ATG GTG AGC TCT CGT TTC AAG GGT 204
35 S V D L A L G Y R N P L G Y G F G F G L R R S L H E M V S S R F K G 68
205 GTA GCT GTT ATG ACT GAT GAC AAA TCA ACA ATA TCA TCC ACT GAG GAA TAC TTA GAA AAC ATT GGC ATC TTT TCT ATT GAT CCG TCC CTA AAG CCA TAT AAA 306
69 V A V M T D D K S T I S S T E E Y L E N I G I F S I D P S L K P Y K 102
307 GAT CAC TTC AAA TAT AGA CTG AAG AGA TAC GTA GAT CAG AAA AAG CTT ATT GAA GAA TAT GAA GGA GGT CTT GAG GAA TTT GCC AAA GGT TAT TTG AAA TTT 408
103 D H F K Y R L K R Y V D Q K K L I E E Y E G G L E E F A K G Y L K F 136
409 GGA TTT AAC AGA GAA GAA GGT GGA ATT GTG TAC CGC GAG TGG GCA CCT GCT GCT CAG GAA GCA CAA ATT ATT GGA GAC TTT AAT GGA TGG GAT GGT TCC AAC 510
137 G F N R E E G G I V Y R E W A P A A Q E A Q I I G D F N G W D G S N 170
511 CAC CAA ATG GAA AAA AAT CAG TTT GGT GTC TGG AGT ATT AAG ATC CCT GAT GCT GAT GGA AAT CCA GCT ATA CCA CAC AGT TCG AGA GTG AAG TTT AGA TTC 612
171 H Q M E K N Q F G V W S I K I P D A D G N P A I P H S S R V K F R F 204
613 CGC CAT GGG GAT GGA GTT TGG GTT GAT CGC ATA CCT GCT TGG ATC AAA TAT GCC ACT GTT GAT CCT AAC AGA TTT GCA GCA CCA TAT GAT GGT GTC TAC TGG 714
205 R H G D G V W V D R I P A W I K Y A T V D P N R F A A P Y D G V Y W 238
715 GAT CCA CCA CTT TCA GAG AGA TAT GAG TTT AAA TAT CCA CGT CCA CCA AAG CCG AAG GCC CCA CGG ATA TAT GAG GCT CAT GTG GGG ATG AGT AGC TCT GAA 816
239 D P P L S E R Y E F K Y P R P P K P K A P R I Y E A H V G M S S S E 272
817 CCT CGC ATA AAC TCT TAC AGG GAA TTT GCA GAT GAG ATT TTG CCC CGT ATT CGA GCA AAT AAC TAT AAT ACA GTC CAG CTG ATG GCC GTT ATG GAA CAT TCT 918
273 P R I N S Y R E F A D E I L P R I R A N N Y N T V Q L M A V M E H S 306
919 TAT TAT GCA TCG TTT GGA TAT CAT GTA ACA AAT TTT TTT GCT GTG AGC AGT AGA TCT GGA ACC CCT GAA GAT CTT AAA TAT CTG ATA GAT AAG GCT CAT AGC 1020
307 Y Y A S F G Y H V T N F F A V S S R S G T P E D L K Y L I D K A H S 340
1021 CTA GGA TTG CAG GTT TTG ATG GAT GTT ATC CAT AGT CAT GCC AGT AAT AAC ATC ACC GAT GGA CTC AAT GGC TTT GAT GTT GGC CAA ACT TCA CAA GAT TCT 1122
341 L G L Q V L M D V I H S H A S N N I T D G L N G F D V G Q T S Q D S 374
1123 TAC TTC CAT GCT GGA GAT AGA GGT TAT CAC AAG TTG TGG GAT AGT AGA CTA TTT AAC TAT GCC AAC TGG GAA GTT CTT CGT TTC CTT TTA TCT AAT TTA AGG 1224
375 Y F H A G D R G Y H K L W D S R L F N Y A N W E V L R F L L S N L R 408
1225 TGG TGG CTC GAG GAG TTT AAA TTT GAT GGA TTT CGA TTT GAT GGA GTA ACA TCA ATG CTG TAT CAT CAC CAT GGA ATC AAC ATT GCT TTT ACA GGG GAT TAT 1326
409 W W L E E F K F D G F R F D G V T S M L Y H H H G I N I A F T G D Y 442
1327 AAT GAA TAT TTT AGC GAA GCA ACA GAT GTG GAT GCT GTT GTC TAT CTG ATG CTG GCT AAT TCT CTG ATC CAC AGT ATT TTG CCA GAT GCA ACT GTA ATT GCT 1428
443 N E Y F S E A T D V D A V V Y L M L A N S L I H S I L P D A T V I A 476
1429 GAA GAT GTT TCT GGC ATG CCA GGA ATT GGT CAA CAA GTT TCT GAC GGT GGA ATT GGT TTT GAC TAT CGT CTA GCC ATG GCT ATC CCT GAT AAA TGG ATT GAT 1530
477 E D V S G M P G I G Q Q V S D G G I G F D Y R L A M A I P D K W I D 510
1531 TAC TTG AAG AAC AAG AAT GAG TAC ACA TGG TCA ATG AAG GAA ATC TCT TGG AGT TTG ACA AAT AGG AGA TAC ACT GAG AAA TGT GTT TCC TAT GCT GAA AGC 1632
511 Y L K N K N E Y T W S M K E I S W S L T N R R Y T E K C V S Y A E S 544
1633 CAT GAC CAG GCC ATC GTT GGT GAT AAG ACT GTT GCG TTT CTC CTA ATG GAT GAG GAA ATG TAT TCT GGC ATG TCT TGC TTG GTT GAT CCT TCT CCT ATT GTT 1734
545 H D Q A I V G D K T V A F L L M D E E M Y S G M S C L V D P S P I V 578
1735 GAG CGA GGC ATT GCT CTT CAG AAG ATG ATA CAC TTC ATA ACC ATG GCA TTA GGT GGA GAG GGC TAC CTT AAT TTC ATG GGC AAT GAG TTT GGC CAT CCG GAG 1836
579 E R G I A L Q K M I H F I T M A L G G E G Y L N F M G N E F G H P E 612
1837 TGG ATT GAT TTC CCA AGA GAA GGC AAT GGA TGG AGT TAT GAG AAG TGC AGG CGT CAG TGG AAT CTG GTG GAT ACA GAT CAC CTG AGA TAC AAG TTC ATG AAT 1938
613 W I D F P R E G N G W S Y E K C R R Q W N L V D T D H L R Y K F M N 646
1939 GCA TTT GAT AGG GCA ATG AAC TTG CTT GAT GAT AAA TTT TCG TTC CTT GCA TCA AGT AAA CAA ATA GTG AGC AGT GCA GAT GAT GAA GAC AAG GTT ATA GTC 2040
647 A F D R A M N L L D D K F S F L A S S K Q I V S S A D D E D K V I V 680
2041 TTT GAG CGA GGA GAT CTG ATA TTT GTA TTC AAT TTT CAT CCA GAG AAT ACA TAT GAA GGG TAT AAA GTT GGA TGT GAC TTA CCT GGG AAA TAT AGA GTT GCA 2142
681 F E R G D L I F V F N F H P E N T Y E G Y K V G C D L P G K Y R V A 714
2143 TTG GAT AGT GAT GCT TGG GAA TTT GGA GGT CAT GGA AGA GTA AGG AGC CCT AAT CTC TGG GGG TAA 2208
715 L D S D A W E F G G H G R V R S P N L W G * 735
```

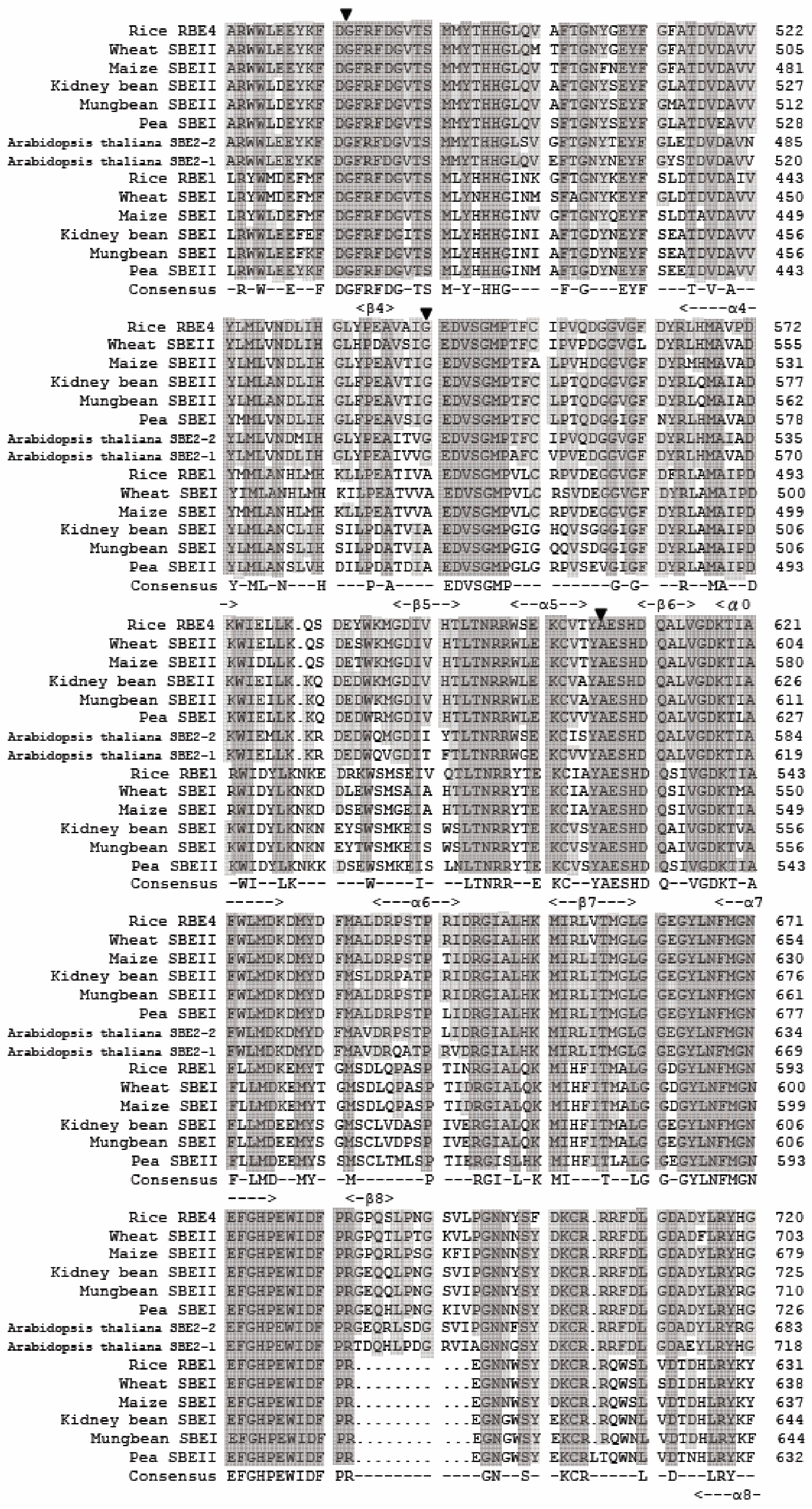
圖二十一、*VrsbeI* cDNA 及其演繹出之胺基酸序列對照圖

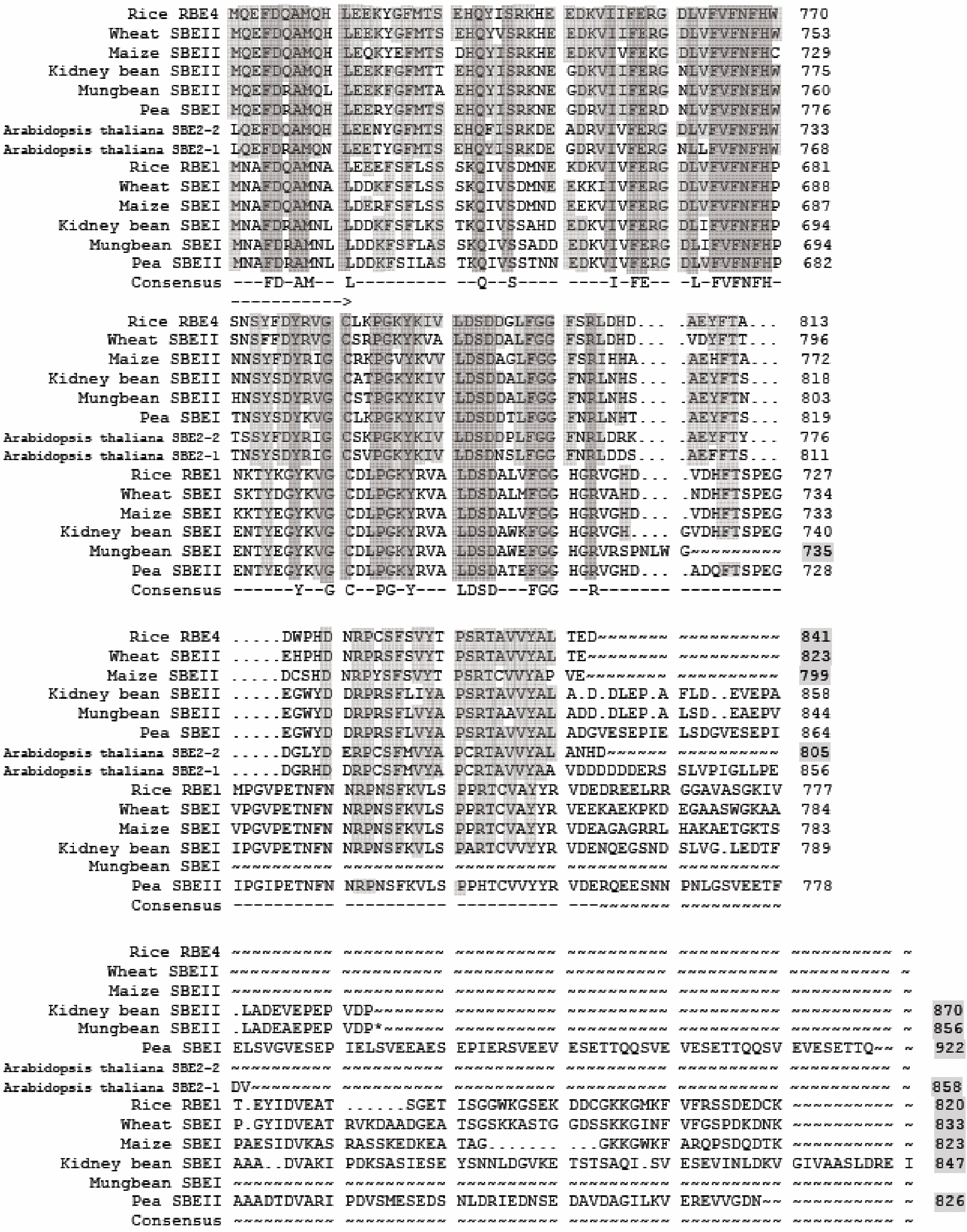
Fig. 21 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *VrsbeI* cDNA.

The boxed highlighted amino acids indicate four conserved regions of the α-amylase family.

```
                     Rice RBE4 ~~~~~~~~~~ ~~MASFAVSG ARLG..VVRA GGGGGG..GG GPAARSGGVD   34
                  Wheat SBEII ~~~~~~~~~~ ~~MATFAVSG ATLG..VARP AGAGGGLLPR SGSERRGGVD   36
                  Maize SBEII ~~~~~~~~~~ ~~~MAFRVSG AVLGGAVRAP RLTGGG..EG SLVFRHTGLF   35
            Kidney bean SBEII MVYTISGIRF PAVLSLHNS. ....TLRGDR RA..ASL... PVFLRKN..N   38
               Mungbean SBEII MVYTISGIRF PVVPSLNVS. ....SLRGDR RA..ASL... PVFLRKN..D   38
                     Pea SBEI MVYTISGIRF PVLPSLHKS. ....TLRCDR RA..SSH... SFFLKNNSSS   40
Arabidopsis thaliana SBE2-2 ~MVVIHGVSL TPRFTLPSR. ....PLNTGF NAGNSTL... SFFFKKHP..   39
Arabidopsis thaliana SBE2-1 MVYTISGVRF PHLPSIKKKN SSLHSFNEDL RRSNA.V... SFSLRKDSRS   46
                    Rice RBE1 ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~
                   Wheat SBEI ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~
                   Maize SBEI ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~
             Kidney bean SBEI ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~
                Mungbean SBEI ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~
                    Pea SBEII ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~
                    Consensus ~~~~~~~~~~ ~~-------- ---------- ---------- ----------

                    Rice RBE4 LPSVLFRRKD SFSRGVVSCA GAPGK.VLVP GGGSDDLLSS AEPDVETQEQ   83
                  Wheat SBEII LPSLLLRKKD S.SRAVLSRA ASPGK.VLVP DGESDDLASP A........Q   76
                  Maize SBEII LTRGA.RVGC SGTHGAMRAA AAARKAVMVP EGENDGLASR AD...SAQFQ   81
            Kidney bean SBEII FSRKILAVKS SHDSDSPSSA IAESDKVLIP Q.DHDNSASL TDQLETPVIT   87
               Mungbean SBEII FSRKILAVKS SHDSDSPSSA IAESDKVLIP Q.DQDNSASL TDQLETPVIT   87
                     Pea SBEI FSRTSLYAKF SRDSETKSST IAESDKVLIP E.DQDNSVSL ADQLENPDIT   89
Arabidopsis thaliana SBE2-2 LSRKIFAGKQ SAEFDSSSQA ISASEKVLVP D.NLDDDPRG FSQI......   82
Arabidopsis thaliana SBE2-1 .SGKVFARKP SYDSDSSSLA TTASEK.LRG H.QSDSSSSA SDQVQSRDTV   93
                    Rice RBE1 ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~MLCL    4
                   Wheat SBEI ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~MLCL    4
                   Maize SBEI ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~MLCL    4
             Kidney bean SBEI ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ MFNCLCLNPF   10
                Mungbean SBEI ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ MFNCLCLNPF   10
                    Pea SBEII ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~
                    Consensus ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

                    Rice RBE4 PEESQIPDDN KVKPFEEEEE IPAVAEASIK VVAEDKLESS EVIQDIE...  130
                  Wheat SBEII PEELQIPED. ....IEEQ.. ...TAEVNMT GGTAEKLESS EPTQGIV...  113
                  Maize SBEII SDELEVPD.. .......... .......... .......... .....IS...   91
            Kidney bean SBEII SVDAHNLEDL TMEDEDKYNI GEADSSYRQI EDGLGSVASS ...PVDVDIP  134
               Mungbean SBEII SEDAHNLEDL TMEDEDKYSI SEADTSYRQI EGELGSV... ..........  124
                      PeaSBEI SEDAQNLEDL TMKDGNKYNI DESTSSYREV GDEKGSVTSS SLVDVNTDTQ  139
Arabidopsis thaliana SBE2-2 ....FDLESQ TME....... ......YTEA .......... ........VR   97
Arabidopsis thaliana SBE2-1 SDDTQVLGNV DVQKTE.... ...EAQETET LDQTSALSTS GSISYKEDF.  135
                    Rice RBE1 TSSSSSAPPP LLP.....SL ADRPSPGIAG GGGNVRLSVV SSP...RRSW   46
                   Wheat SBEI TASSSPSPSP SLPPRPSRPA ADRPGPGIS. GGGNVRLSAV PAPSSLRWSW   53
                   Maize SBEI VSPSS.SPTP LPPPRRSRSH ADRAAPPGIA GGGNVRLSVL SVQCKARRSG   53
             Kidney bean SBEI ISVSSTIACT IHTVRSRQHL APQKSVDLAV GYRN.PLGYG F.GSGLRRSL   58
                Mungbean SBEI ISVSSTVACT SHTVRSRQRL APQKSVDLAL GYRN.PLGYG F.GFGLRRSL   58
                    Pea SBEII ~~~~ATTTTT THNSKNKQYL AKQKPVELTL GYQN.PNGCK VCSFGSKGSI   45
                    Consensus ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

                    Rice RBE4 .ENVTEGVIK DADEPTVEDK PRVIPPPGDG QKIYQIDPML EGFRNHLDYR  179
                  Wheat SBEII .ETITDGVTK GVKELVVGEK PRVVPKPGDG QKIYEIDPTL KDFRSHLDYR  162
                  Maize SBEII .EETTCGA.. GVADAQALNR VRVVPPPSDG QKIFQIDPML QGYKYHLEYR  138
            Kidney Bean SBEII AKKTSVSVGK EVKIPSVEAK PKIIPRPGAG QKIYEIDPSL LAYRDHLDFR  184
               Mungbean SBEII .....VSVGK KVNIPSDEAK PKTIPRPGAG QKIYEIDPSL LAHREHLDFR  169
                     Pea SBEI AKKTSVHSDK KVKVD....K PKIIPPPGTG QKIYEIDPLL QAHRQHLDFR  185
Arabidopsis thaliana SBE2-2 TEDQTMNVVK ERGV.....K PRIVPPPGDG KKIYEIDPML RTYNNHLDYR  142
Arabidopsis thaliana SBE2-1 .AKMSHSVDQ EVG....... QRKIPPPGDG KRIYDIDPML NSHRNHLDYR  177
                    Rice RBE1 PGKVKTNF.S VPATARKNKT MVTVVEEVDH LPIYDLDPKL EEFKDHFNYR   95
                   Wheat SBEI PRKAKSKF.S VPVSAPREYT MATAEDGFGD LPIYDLDPKF AGFKDHFSYR  102
                   Maize SBEI VRKVKSKF.A TAATVQEDKT MATAKGDVDH LPIYDLDPKL EIFKDHFRYR  102
             Kidney bean SBEI HEMVSSRFKG VAVMTDDKST ISSTEEYLEN IGIFSIDPSL KPYKDHFKYR  108
                Mungbean SBEI HEMVSSRFKG VAVMTDDKST ISSTEEYLEN IGIFSIDPSL KPYKDHFKYR  108
                    Pea SBEII YQKVSSGFKG VSVMTDDKST MPSVEEDFEN IGILNVDSSL EPFKDHFKYR   95
                    Consensus ---------- ---------- ---------- --I---D--- -----H---R

                    Rice RBE4 YSEYKRMRAA IDQHEGGLDA FSRGYEKLGF TRSAEGITYR EWAPGAQSAA  229
                  Wheat SBEII YSEYRRIRAA IDQHEGGLEA FSRGYEKLGF TRSAEGITYR EWAPGAHSAA  212
                  Maize SBEII YSLYRRIRSD IDEHEGGLEA FSRSYEKFGF NASAEGITYR EWAPGAFSAA  188
            Kidney bean SBEII FGQYKRLHDE INKHEGGLDA FSRGYEQFGF LRSATGITYR EWAPGAKSAA  234
               Mungbean SBEII FGQYKRLHDE INKYEGGLDT FSRGYEKFGF IRSATGVTYR EWAPGAKSAA  219
                     Pea SBEI YGQYKRIREE IDKYEGGLDA FSRGYEKFGF TRSATGITYR EWAPGAKSAA  235
Arabidopsis thaliana SBE2-2 YGQYKRLREE IDKYEGGLEA FSRGYEKLGF SRSDAGITYR EWAPGAKAAS  192
Arabidopsis thaliana SBE2-1 YGQYRKLREE IDKNEGGLEA FSRGYEIFGF TRSATGITYR EWAPGAKAAS  227
                    Rice RBE1 IKRYLDQKCL IEKHEGGLEE FSKGYLKFGI NTVDGATIYR EWAPAAQEAQ  145
                   Wheat SBEI MKKYLEQKHS IEKYEGGLEE FSKGYLKFGI NTENDATVYR EWAPAAKDAQ  152
                   Maize SBEI MKRFLEQKGS IEENEGSLES FSKGYLKFGI NTNEDGTVYR EWAPAAQEAE  152
             Kidney bean SBEI LKRYVEQKKL IEEYEGGLEE FAKGYLKFGF NREEGGIVYR EWAPAAQEAQ  158
                Mungbean SBEI LKRYVDQKKL IEEYEGGLEE FAKGYLKFGF NREEGGIVYR EWAPAAQEAQ  158
                    Pea SBEII LKRYLHQKKL IEEYEGGLQE FAKGYLKFGF NREEDGISYR EWAPAAQEAQ  145
                    Consensus ---------- I---EG-L-- F---Y---G- --------YR EWAP-A--A-
```

```
                    Rice RBE4 LVGDFNNWNP NADTMTRNEY GVWEISLPNN ADGSPAIPHG SRVKIRMDTP  279
                 Wheat SBEII LVGDFNNWNP NADTMTRDDY GVWEIFLPNN ADGSPAIPHG SRVKIRMDTP  262
                 Maize SBEII LVGDVNNWDP NADRMSKNEF GVWEIFLPNN ADGTSPIPHG SRVKVRMDTP  238
           Kidney bean SBEII LIGDFNNWNP NADVMTRNEF GVWEIFLPNN VDGSPPIPHG SRVKIRMDTP  284
              Mungbean SBEII LIGDFNNWNS NADVMTRNEF GVWEIFLPNN VDGSPPIPHG SRVKIRMDTP  269
                    Pea SBEI LVGDFNNWNP NADVMTKDAF GVWEIFLPNN ADGSPPIPHG SRVKIHMDTP  285
Arabidopsis thaliana SBE2-2 LIGDFNNWNS NADIMTRNEF GVWEIFLPNN TDGSPAIPHG SRVKIRMDTP  242
Arabidopsis thaliana SBE2-1 LIGDFNNWNA KSDVMARNDF GVWEIFLPNN ADGSPAIPHG SRVKIRMDTP  277
                   Rice RBE1 LIGEFNNWNG AKHKMEKDKF GIWSIKIS.H VNGKPAIPHN SKVKFRFRHG  194
                  Wheat SBEI LIGDFNNWNG SGHRMTKDNF GVWSIRIS.H VNGKPAIPHN SKVKFRFHRG  201
                  Maize SBEI LIGDFNDWNG ANHKMEKDKF GVWSIKID.H VKGKPAIPHN SKVKFRFLHG  201
            Kidney bean SBEI IIGDFNGWDG SNHQMEKDQF GVWSIKIP.D VDGNPAIPHS SRVKFRFRHG  207
               Mungbean SBEI IIGDFNGWDG SNHQMEKNQF GVWSIKIP.D ADGNPAIPHS SRVKFRFRHG  207
                   Pea SBEII IIGDFNGWNG SNLHMEKDQF GVWSIQIP.D ADGNPAIPHN SRVKFRFKHS  194
                   Consensus --G--N-W-- ----M----- G-W-I----- --G---IPH- S-VK------

                   Rice RBE4 SGV.KDSIPA WIKFAVQAPG EI..PYNGIY YDPPEEEKYV FQHPQPKRPN  326
                 Wheat SBEII SGV.KDSISA WIKFSVQAPG EI..PFNGIY YDPPEEEKYV FQHPQPKRPE  309
                 Maize SBEII SGI.KDSIPA WIKYSVQAPG EI..PYDGIY YDPPEEVKYV FRHAQPKRPK  285
           Kidney bean SBEII SGI.KDSIPA WIKFSVQAPG EI..PYSGIY YDPPEEEKYV FKHPQPKKPK  331
              Mungbean SBEII SGV.KDSIPA WIKFSVQAPG EI..PYSGIY YDPPEEEKYV FKHPQPKRPK  316
                    Pea SBEI SGI.KDSIPA WIKFSVQAPG EI..PYNGIY YDPPEEEKYV FKHPQPKRPQ  332
Arabidopsis thaliana SBE2-2 SGI.KDSIPA WIKFSVQAPG EI..PFNGIY YDPPEEEKYV FKHPQPKRPK  289
Arabidopsis thaliana SBE2-1 SGI.KDSIPA WIKYSVQPPG EI..PYNGVY YDPPEEDKYA FKHPRPKKPT  324
                   Rice RBE1 GGAWVDRIPA WIRYATFDAS KFGAPYDGVH WDPPACERYV FKHPRPPKPD  244
                  Wheat SBEI DGLWVDRVPA WIRYATFDAS KFGAPYDGVH WDPPTGERYV FKHPRPRKPD  251
                  Maize SBEI .GVWVDRIPA LIRYATVDAS KFGAPYDGVH WDPPASERYT FKHPRPSKPA  250
            Kidney bean SBEI DGVWVDRIPA WIKYATVDPT RFAAPYDGVY WDPPLSERYQ FKYPRPPKPK  257
               Mungbean SBEI DGVWVDRIPA WIKYATVDPN RFAAPYDGVY WDPPLSERYE FKYPRPPKPK  257
                   Pea SBEII DGVWVDRIPA WIKYATVDPT RFAAPYDGVY WDPPLSERYQ FKHPRPPKPK  244
                   Consensus -G---D---A -I-------- ----P--G-- -DPP----Y- F----P--P-

                   Rice RBE4 SLRIYESHIG MSSPEPKINT YANFRDEVLP RIKKLGYNAV QIMAIQEHSY  376
                 Wheat SBEII SLRIYESHIG MSSPEPKINS YANFRDEVLP RIKRLGYNAV QIMAIQEHSY  359
                 Maize SBEII SLRIYETHVG MSSPEPKINT YVNFRDEVLP RIKKLGYNAV QIMAIQEHSY  335
           Kidney bean SBEII SLRIYESHVG MSSPEPKINT YANFRDDVLP RIKKLGYNAV QIMAIQEHSY  381
              Mungbean SBEII SLRIYESHVG MSSPEPMINT YANFRDDVLP RIKKLGYNAV QIMAIQEHSY  366
                    Pea SBEI SIRIYESHIG MSSPEPKINT YANFRDDVLP RIKKLGYNAV QIMAIQEHSY  382
Arabidopsis thaliana SBE2-2 SLRIYEAHVG MSSTEPMVNT YANFRDDVLP RIKKLGYNAV QIMAIQEHSY  339
Arabidopsis thaliana SBE2-1 SLRIYESHVG MSSTEPKINT YANFRDDVLP RIKKLGYNAV QIMAIQEHAY  374
                   Rice RBE1 APRIYEAHVG MSGEEPEVST YREFADNVLP RIRANNYNTV QLMAIMEHSY  294
                  Wheat SBEI APRIYEAHVG MSGEKPEVST YREFADNVLP RIKANNYNTV QLMAIMEHSY  301
                  Maize SBEI APRIYEAHVG MSGEKPAVST YREFADNVLP RIRANNYNTV QLMAVMEHSY  300
            Kidney bean SBEI APRIYEAHVG MSSSEPRINS YREFADEILP RIRANNYNTV QLMAGMEHSY  307
               Mungbean SBEI APRIYEAHVG MSSSEPRINS YREFADEILP RIRANNYNTV QLMAVMEHSY  307
                   Pea SBEII APRIYEAHVG MSSSEPRINS YREFADDVLP RIRENNYNTV QLMAVMEHSY  294
                   Consensus --RIYE-H-G MS---P---- Y--F-D--LP RI----YN-V Q-MA--EH-Y
                               <-β1->                <---α1-->            <-β2-> ▼
                   Rice RBE4 YASFGYHVTN .FFAPSSRFG TPEDLKSLID KAHELGLLVL MDIVHSHASN  425
                 Wheat SBEII YASFGYHVTN .FFAPSSRFG TPEDLKSLID RAHELGLLVL MDIVHSHSSN  408
                 Maize SBEII YGSFGYHVTN .FFAPSSRFG TPEDLKSLID RAHELGLLVL MDVVHSHASS  384
           Kidney bean SBEII YASFGYHVTN .FFAPSSRFG TPEDLKSMID KAHELGLLVL MDIVHSHSSN  430
              Mungbean SBEII YASFGYHVTN .FFAPSSRFG TPEELKSLID KAHELGLLVL MDIVHSHASN  415
                    Pea SBEI YASFGYHVTN .FFAPSSRFG TPEDLKSLID RAHELGLLVL MDIVHSHSSN  431
Arabidopsis thaliana SBE2-2 YASFGYHVTN .FFAPSSRCG TPEELKSLID RAHELGLVVL MDIVHSHASK  388
Arabidopsis thaliana SBE2-1 YASFGYHVTN .FFAPSSRFG TPDDLKSLID KAHELGLVVL MDIVHSHASK  423
                   Rice RBE1 YASFGYHVTN .FFAVSSRSG TPEDLKYLVD KAHSLGLRVL MDVVHSHASN  343
                  Wheat SBEI YASFGYHVTN .FFAVSSRSG TPEDLKYLVD KAHSLGLRVL MDVVHSHASS  350
                  Maize SBEI YASFGYHVTN .FFAVSSRSG TPEDLKYLVD KAHSLGLRVL MDVVHSHASN  349
            Kidney bean SBEI YASFGYHVTN .FYAVSSRSG TPEDLKYLID KAHSLGLQVL MDVIHSHASN  356
               Mungbean SBEI YASFGYHVTN .FFAVSSRSG TPEDLKYLID KAHSLGLQVL MDVIHSHASN  356
                   Pea SBEII YASFWYHVTK PFFAVSSRSG SPEDLKYLID KAHSLGLNVL MDVIHSHASN  344
                   Consensus Y-SF-YHVT- -F-A-SSR-G -P--LK---D -AH-LGL-VL MD--HSH-S-
                                                  <------α2---->  <-β3->
                   Rice RBE4 NTLDGLNGFD ...GTDTHYF HGGPRGHHWM WDSRLFNYGS WEVLRYLLSN  472
                 Wheat SBEII NTLDGLNGFD ...GTDTHYF HGGPRGHHWM WDSRLFNYGS WEVLRFLLSN  455
                 Maize SBEII NTLDGLNGFD ...GTDTHYF HSGPRGHHWM WDSRLFNYGN WEVLRFLLSN  431
           Kidney bean SBEII NTLDGLNMFD ...GTDGHYF HPGSRGYHWM WDSRLFNYGS WEVLRYLLSN  477
              Mungbean SBEII NTLDGLNMFD ...GTDSHYF HPGSRGYHWM WDSRLFNYGS WEVLRYLLSN  462
                    Pea SBEI NTLDGLNMFD ...GTDGHYF HPGSRGYHWM WDSRLFNYGS WEVLRYLLSN  478
Arabidopsis thaliana SBE2-2 NTLDGLNMFD ...GTDAHYF HSGPRGYHWM WDSRLFNYGS WEVLRYLLSN  435
Arabidopsis thaliana SBE2-1 NTLDGLDMFD ...GTDGQYF HSGSRGYHWM WDSRLFNYGS WEVLRYLLSN  470
                   Rice RBE1 NVTDGLNGYD VGQNTHESYF HTGDRGYHKL WDSRLFNYAN WEVLRFLLSN  393
                  Wheat SBEI NMTDGLNGYD VGQNTQESYF HTGERGYHKL WDSRLFNYAN WEVLRYLLSN  400
                  Maize SBEI NVTDGLNGYD VGQSTQESYF HAGDRGYHKL WDSRLFNYAN WEVLRFLLSN  399
            Kidney bean SBEI NITDGLNGFD VGQTSQDSYF HTGDRGYHKL WDSRLFNYAN WEVLRFLLSN  406
               Mungbean SBEI NITDGLNGFD VGQTSQDSYF HAGDRGYHKL WDSRLFNYAN WEVLRFLLSN  406
                   Pea SBEII NVTDGLNGFD VGQSSQQSYF HAGDRGYHKL WDSRLFNYAN WK.SSFLLSN  393
                   Consensus N--DGL---D --------YF H-G-RG-H-- WDSRLFNY-- W-----LLSN
                                                                       <--α3->
```


Rice RBE4 ARWWLEEYKF DGFRFDGVTS MMYTHHGLQV AFTGNYGEYF GFATDVDAVV 522
Wheat SBEII ARWWLEEYKF DGFRFDGVTS MMYTHHGLQM TFTGNYGEYF GFATDVDAVV 505
Maize SBEII ARWWLEEYKF DGFRFDGVTS MMYTHHGLQV TFTGNFNEYF GFATDVDAVV 481
Kidney bean SBEII ARWWLDEYKF DGFRFDGVTS MMYTHHGLQV AFTGNYSEYF GLATDVDAVV 527
Mungbean SBEII ARWWLDEYKF DGFRFDGVTS MMYTHHGLQV AFTGNYSEYF GMATDVDAVV 512
Pea SBEI ARWWLDEYKF DGFRFDGVTS MMYTHHGLQV SFTGNYSEYF GLATDVEAVV 528
Arabidopsis thaliana SBE2-2 ARWWLEEYKF DGFRFDGVTS MMYTHHGLSV GFTGNYTEYF GLETDVDAVN 485
Arabidopsis thaliana SBE2-1 ARWWLEEYKF DGFRFDGVTS MMYTHHGLQV EFTGNYNEYF GYSTDVDAVV 520
Rice RBE1 LRYWMDEFMF DGFRFDGVTS MLYHHHGINK GFTGNYKEYF SLDTDVDAIV 443
Wheat SBEI LRYWMDEFMF DGFRFDGVTS MLYNHHGINM SFAGNYKEYF GLDTDVDAVV 450
Maize SBEI LRYWLDEFMF DGFRFDGVTS MLYHHHGINV GFTGNYQEYF SLDTAVDAVV 449
Kidney bean SBEI LRWWLEEFEF DGFRFDGITS MLYHHHGINI AFTGDYNEYF SEATDVDAVV 456
Mungbean SBEI LRWWLEEFKF DGFRFDGVTS MLYHHHGINI AFTGDYNEYF SEATDVDAVV 456
Pea SBEII LRWWLEEYKF DGFRFDGVTS MLYHHHGINM AFTGDYNEYF SEETDVDAVV 443
Consensus -R-W--E--F DGFRFDG-TS M-Y-HHG--- -F-G---EYF ---T-V-A--
<β4> <----α4-
Rice RBE4 YLMLVNDLIH GLYPEAVAIG EDVSGMPTFC IPVQDGGVGF DYRLHMAVPD 572
Wheat SBEII YLMLVNDLIH GLHPDAVSIG EDVSGMPTFC IPVPDGGVGL DYRLHMAVAD 555
Maize SBEII YLMLVNDLIH GLYPEAVTIG EDVSGMPTFA LPVHDGGVGF DYRMHMAVAD 531
Kidney bean SBEII YLMLANDLIH GLFPEAVTIG EDVSGMPTFC LPTQDGGVGF DYRLQMAIAD 577
Mungbean SBEII YLMLANDLIH GLFPEAVTIG EDVSGMPTFC LPTQDGGVGF DYRLQMAIAD 562
Pea SBEI YMMLVNDLIH GLFPEAVSIG EDVSGMPTFC LPTQDGGIGF NYRLHMAVAD 578
Arabidopsis thaliana SBE2-2 YLMLVNDMIH GLYPEAITVG EDVSGMPTFC IPVQDGGVGF DYRLHMAIAD 535
Arabidopsis thaliana SBE2-1 YLMLVNDLIH GLYPEAIVVG EDVSGMPAFC VPVEDGGVGF DYRLHMAVAD 570
Rice RBE1 YMMLANHLMH KLLPEATIVA EDVSGMPVLC RPVDEGGVGF DFRLAMAIPD 493
Wheat SBEI YIMLANHLMH KILPEATVVA EDVSGMPVLC RSVDEGGVGF DYRLAMAIPD 500
Maize SBEI YMMLANHLMH KLLPEATVVA EDVSGMPVLC RPVDEGGVGF DYRLAMAIPD 499
Kidney bean SBEI YLMLANCLIH SILPDATVIA EDVSGMPGIG HQVSGGGIGF DYRLAMAIPD 506
Mungbean SBEI YLMLANSLIH SILPDATVIA EDVSGMPGIG QQVSDGGIGF DYRLAMAIPD 506
Pea SBEII YLMLANSLVH DILPDATDIA EDVSGMPGLG RPVSEVGIGF DYRLAMAIPD 493
Consensus Y-ML-N---H ---P-A---- EDVSGMP--- ------G-G- --R--MA--D
-> <-β5--> <--α5--> <-β6-> <α0
Rice RBE4 KWIELLK.QS DEYWKMGDIV HTLTNRRWSE KCVTYAESHD QALVGDKTIA 621
Wheat SBEII KWIELLK.QS DESWKMGDIV HTLTNRRWLE KCVTYAESHD QALVGDKTIA 604
Maize SBEII KWIDLLK.QS DETWKMGDIV HTLTNRRWLE KCVTYAESHD QALVGDKTIA 580
Kidney bean SBEII KWIEILK.KQ DEDWKMGDIV HTLTNRRWLE KCVAYAESHD QALVGDKTIA 626
Mungbean SBEII KWIEILK.KQ DEDWKMGDIV HTLTNRRWLE KCVAYAESHD QALVGDKTIA 611
Pea SBEI KWIELLK.KQ DEDWRMGDIV HTLTNRRWLE KCVVYAESHD QALVGDKTLA 627
Arabidopsis thaliana SBE2-2 KWIEMLK.KR DEDWQMGDII YTLTNRRWSE KCISYAESHD QALVGDKTIA 584
Arabidopsis thaliana SBE2-1 KWIELLK.KR DEDWQVGDIT FTLTNRRWGE KCVVYAESHD QALVGDKTIA 619
Rice RBE1 RWIDYLKNKE DRKWSMSEIV QTLTNRRYTE KCIAYAESHD QSIVGDKTIA 543
Wheat SBEI RWIDYLKNKD DLEWSMSAIA HTLTNRRYTE KCIAYAESHD QSIVGDKTMA 550
Maize SBEI RWIDYLKNKD DSEWSMGEIA HTLTNRRYTE KCIAYAESHD QSIVGDKTIA 549
Kidney bean SBEI KWIDYLKNKN EYSWSMKEIS WSLTNRRYTE KCVSYAESHD QAIVGDKTVA 556
Mungbean SBEI KWIDYLKNKN EYTWSMKEIS WSLTNRRYTE KCVSYAESHD QAIVGDKTVA 556
Pea SBEII KWIDYLKNKK DSEWSMKEIS LNLTNRRYTE KCVSYAESHD QSIVGDKTIA 543
Consensus -WI--LK--- ---W----I- --LTNRR--E KC--YAESHD Q--VGDKT-A
-----> <---α6--> <--β7---> <--α7
Rice RBE4 FWLMDKDMYD FMALDRPSTP RIDRGIALHK MIRLVTMGLG GEGYLNFMGN 671
Wheat SBEII FWLMDKDMYD FMALDRPSTP RIDRGIALHK MIRLVTMGLG GEGYLNFMGN 654
Maize SBEII FWLMDKDMYD FMALDRPSTP TIDRGIALHK MIRLITMGLG GEGYLNFMGN 630
Kidney bean SBEII FWLMDKDMYD FMSLDRPATP RIDRGIALHK MIRLITMGLG GEGYLNFMGN 676
Mungbean SBEII FWLMDKDMYD FMALDRPSTP RIDRGIALHK MIRLITMGLG GEGYLNFMGN 661
Pea SBEI FWLMDKDMYD FMALDRPSTP LIDRGIALHK MIRLITMGLG GEGYLNFMGN 677
Arabidopsis thaliana SBE2-2 FWLMDKDMYD FMAVDRPSTP LIDRGIALHK MIRLITMGLG GEGYLNFMGN 634
Arabidopsis thaliana SBE2-1 FWLMDKDMYD FMAVDRQATP RVDRGIALHK MIRLITMGLG GEGYLNFMGN 669
Rice RBE1 FLLMDKEMYT GMSDLQPASP TINRGIALQK MIHFITMALG GDGYLNFMGN 593
Wheat SBEI FLLMDKEMYT GMSDLQPASP TIDRGIALQK MIHFITMALG GDGYLNFMGN 600
Maize SBEI FLLMDKEMYT GMSDLQPASP TIDRGIALQK MIHFITMALG GDGYLNFMGN 599
Kidney bean SBEI FLLMDEEMYS GMSCLVDASP IVERGIALQK MIHFITMALG GEGYLNFMGN 606
Mungbean SBEI FLLMDEEMYS GMSCLVDPSP IVERGIALQK MIHFITMALG GEGYLNFMGN 606
Pea SBEII FLLMDEEMYS SMSCLTMLSP TIERGISLHK MIHFITLALG GEGYLNFMGN 593
Consensus F-LMD--MY- -M-------P ---RGI-L-K MI---T--LG G-GYLNFMGN
----> <-β8>
Rice RBE4 EFGHPEWIDF PRGPQSLPNG SVLPGNNYSF DKCR.RRFDL GDADYLRYHG 720
Wheat SBEII EFGHPEWIDF PRGPQTLPTG KVLPGNNNSY DKCR.RRFDL GDADFLRYHG 703
Maize SBEII EFGHPEWIDF PRGPQRLPSG KFIPGNNNSY DKCR.RRFDL GDADYLRYHG 679
Kidney bean SBEII EFGHPEWIDF PRGEQQLPNG SVIPGNNYSY DKCR.RRFDL GDADYLRYRG 725
Mungbean SBEII EFGHPEWIDF PRGEQQLPNG SVIPGNNYSY DKCR.RRFDL GDADYLRYRG 710
Pea SBEI EFGHPEWIDF PRGEQHLPNG KIVPGNNNSY DKCR.RRFDL GDADYLRYHG 726
Arabidopsis thaliana SBE2-2 EFGHPEWIDF PRGEQRLSDG SVIPGNNFSY DKCR.RRFDL GDADYLRYRG 683
Arabidopsis thaliana SBE2-1 EFGHPEWIDF PRTDQHLPDG RVIAGNNGSY DKCR.RRFDL GDAEYLRYHG 718
Rice RBE1 EFGHPEWIDF PR........ ...EGNNWSY DKCR.RQWSL VDTDHLRYKY 631
Wheat SBEI EFGHPEWIDF PR........ ...EGNNWSY DKCR.RQWSL SDIDHLRYKY 638
Maize SBEI EFGHPEWIDF PR........ ...EGNNWSY DKCR.RQWSL VDTDHLRYKY 637
Kidney bean SBEI EFGHPEWIDF PR........ ...EGNGWSY EKCR.RQWNL VDTDHLRYKF 644
Mungbean SBEI EFGHPEWIDF PR........ ...EGNGWSY EKCR.RQWNL VDTDHLRYKF 644
Pea SBEII EFGHPEWIDF PR........ ...EGNGWSY EKCRLTQWNL VDTNHLRYKF 632
Consensus EFGHPEWIDF PR-------- ----GN--S- -KCR-----L -D---LRY--
<---α8-



圖二十二、*VrsbeII*、*VrsbeI* 與各種植物 SBE 胺基酸序列之比對

Fig. 22 Alignment of the deduced amino acid sequences of *VrsbeII* , *VrsbeI* with those of various plants. Kidney bean SBEII (BAA82348), SBEI (BAA82349)；Pea SBEI (CAA56319), SBEII (CAA56320)；Rice RBE4 (BAA82828), RBE1 (BAA01584)；Wheat SBEII (CAA72154), SBEI (AAG27622)；Maize SBEII (AAA18571), SBEI (AAA82735)；Arabidopsis thaliana SBE2-2 (CAB82930), Arabidopsis thaliana SBE2-1 (NP-181180)

表八、綠豆 SBE 與不同物種 SBE 胺基酸序列之同質性比較

Table 8 Comparison of the dentity of the amino acid sequences derived from starch branching enzyme cDNAs of mungbean and various species.

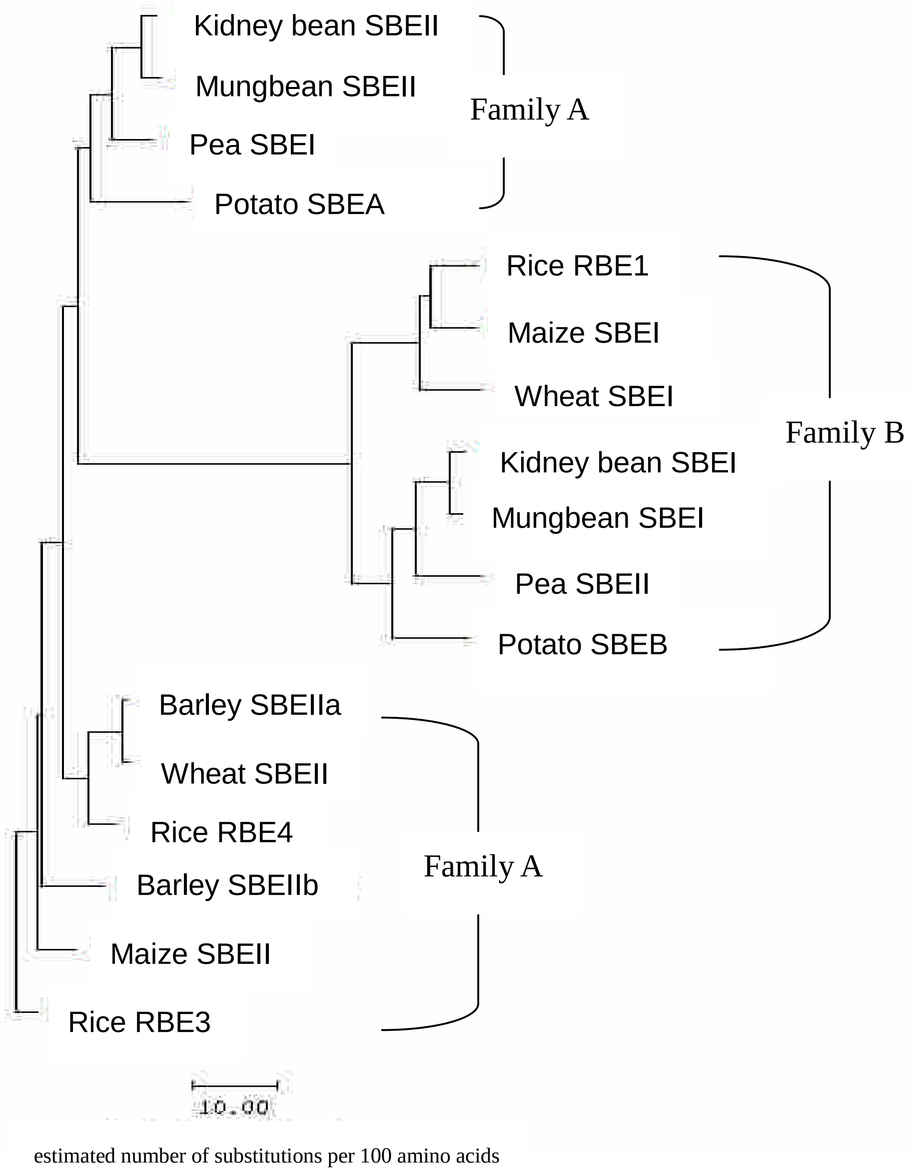
Blast

物種	綠豆 SBEII 856 a.a. %	綠豆 SBEI 735 a.a. %
Kidney bean SBEII 870 a.a. (BAA82348)	91	59
Kidney bean SBEI 847 a.a. (BAA82349)	57	95
Pea SBEI 922 a.a. (CAA56319)	81	57
Pea SBEII 826 a.a. (CAA56320)	55	83
Maize SBEII 799 a.a. (AAA18571)	80	60
Maize SBEI 823 a.a. (AAA82735)	54	74
Wheat SBEII 823 a.a. (CAA72154)	74	59
Wheat SBEI 833 a.a. (AAG27622)	57	71
Rice RBE4 841 a.a. (BAA82828)	76	59
Rice RBE1 820 a.a. (BAA01584)	58	73
Arabidopsis thaliana SBE2-2 805 a.a. (CAB82930)	76	58
Arabidopsis thaliana SBE2-1 858 a.a. (NP-181180)	73	58

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
0.00	3.86	10.22	17.40	17.78	14.42	20.19	19.71	22.91	19.91	55.81	56.13	56.88	56.56	56.13	58.79	56.00	1 Kidney bean SBEII
	0.00	10.74	17.78	18.35	14.78	21.19	19.13	22.91	19.91	57.70	57.07	58.15	56.88	56.13	58.15	56.31	2 Mungbean SBEII
		0.00	15.63	15.81	14.33	19.59	19.06	20.44	18.87	59.85	59.52	60.31	59.98	59.19	60.97	59.06	3 Pea SBEI
			0.00	1.52	8.11	15.92	16.83	16.83	21.50	58.98	59.95	59.11	57.19	57.07	59.11	57.89	4 Barley SBEIIa
				0.00	7.94	15.36	16.83	16.64	21.90	59.63	60.28	59.44	57.51	57.38	59.44	58.21	5 Wheat_SBEII
					0.00	14.24	13.87	17.21	19.71	57.70	58.66	57.51	57.51	56.44	58.47	58.21	6 Rice RBE4
						0.00	9.93	12.24	23.44	57.78	58.10	58.23	55.36	54.00	58.56	57.84	7 Maize SBEII
							0.00	13.69	22.71	57.38	57.07	57.51	55.01	54.58	57.51	55.69	8 Rice RBE3
								0.00	26.88	58.98	59.30	59.76	56.25	55.81	57.51	57.89	9 Barley SBEIIb
									0.00	61.04	60.72	60.85	57.32	56.25	61.51	58.32	10 Potato SBEA
										0.00	14.12	11.09	29.72	30.34	30.39	27.23	11 Rice RBE1
											0.00	14.51	31.76	32.62	32.68	29.50	12 Wheat SBEI
												0.00	28.00	28.39	27.78	25.84	13 Maize SBEI
													0.00	3.24	13.80	18.12	14 Kidney bean SBEI
														0.00	13.42	18.48	15 Mungbean SBEI
															0.00	19.49	16 Pea SBEII
																0.00	17 Potato SBEB

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性

Table 9. Distance between deduced amino acid sequences of plant SBE was determined by the program Distance (GCG) using the Kimura protein-distance algorithm. Kidney bean SBEII (AB029548), SBEI (AB029549)； Mungbean SBEII, SBEI； Pea SBEI (X80009), SBEII(X80010)；Barley SBEIIa (AF064560), SBEIIb (AF064561) ； Wheat SBEII (Y11282) , SBEI (AF286318) ； Rice RBE4 (AB023498), RBE3 (D16201), _RBE1 (D10752) ； Maize SBEII (L08065), SBEI (U17897) ； Potato SBEA (AJ011888), SBEB(Y08786)



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

Fig. 23 Dendrogram to illustrate the degree of relatedness between the plant SBE isoforms.

參考文獻

張敬宜 (2002) 綠豆澱粉分支酵素的鑑定。私立中國醫藥大學營養所碩士論文

吳昭慧和連大進 (1996) 綠豆。少量多樣化雜糧作物栽培手冊。臺灣省政府農林廳。

翁廷賜和賴森雄 (1992) 粉綠綠豆新品種台南五號之育成. 行政院農業委員會台南區農業改良場 研究彙報第 28 號

AVRDC 1975. Chemical analysis of mungbean seeds. Asian Vegetable Research and Development Center. Progress report, Shanhua, Taiwan; AVRDC.

Bada, T., Kimura, K., Mizuno, K., Etoh, H., Ishida, Y., Shida, O. and Arai, Y. 1991. Sequence conservation of the catalytic regions of amylolytic enzymes in maize branching enzyme-I. Biochem. Biophys. Res. Commun. 181: 87-94.

Baecker, P.A., Greenberg, E. and Preiss, J. 1986. Biosynthesis of bacterial glycogen. Primary structure of Escherichia coli 1,4-alpha-D-glucan: 1,4-alpha-D-glucan 6-alpha-D-(1, 4-alpha-D-glucano)-transferase as deduced from the nucleotide sequence of the glg B gene. J. Biol. Chem. 261: 8738-8743.

Ball, S., Guan, H.P., James, M., Myers, A., Keeling, P., Mouille, G., Buleon, A., Colonna, P. and Preiss, J. 1996. From glycogen to amylopectin : a model for the biogenesis of the plant starch granule. Cell 86: 349-352.

Bhattacharyya, M.K., Smith, A.M., Ellis, T.H.N., Hedley, C. and Martin, C. 1990. The wrinkled-seed character of pea described by mendel is caused by a transposon-like insertion in a gene encoding starch-branching enzyme. Cell 60: 115-122.

Boyer, C.D. and Preiss, J. 1978a. Multiple forms of α1- 4αD-glucan 6-glucos -yl transferase from developing Zea ma*ys L.* kernels. Carbohydr. Res. 61: 321-324.

Boyer, C.D. and Preiss, J. 1978b. Multiple forms of starch branching enzyme of maize: Evidence for independent genetic control. Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 169-175.

Burton, R.H., Bewley, J.D., Smith, A.M., Bhattacharyya, M.K., Tatge, H., Ring, S., Bull, V., Hamilton, W.D.O. and Martin, C. 1995. Starch branching enzymes belonging to distinct enzyme families are differentially expressed during pea embryo development. Plant J. 7: 3-15.

Cao, H., James, M.G. and Myers, A.M. 2000. Purification and characterization of soluble starch synthases from maize endosperm. Archives of Biochemistry and Biophysics. 373:135-146.

Cao, H. and Preiss, J. 1996. Evidence for essential arginine residues at the active sites of maize branching enzymes. J. Prot. Chem. 15: 291-304.

Chen, X.H., Liu, Q.Q., Wu, H.K., Wang, Z.Y. and Gu, M.H. 2003. cDNA Cloning and Sequence Analysis of Rice Sbe1 and Sbe3 Genes. Zhongguo Shuidao Kexue. 17: 109-112.

Chenchik, A., Moqadam, F. and Siebert, P. 1996. A new method for full- length cDNA cloning by PCR. In: A Laboratory Guide to RNA: Isolation, Analysis, and Synthesis. edited by P.A. Krieg, pp. 273-321. Wiley-Liss, Inc.

Chou, P.Y. and Fasman, G.D. 1978. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. Adv. Enzymol. 47: 45-148.

Cregg, J.M., Vedvick, T.S. and Raschke, W.C. 1993. Bio/Technology. 11: 905

Denyer, K., Sidebottom, C., Hylton, C.M. and Smith, A.M. 1993. Soluble isoforms of starch synthase and starch-branching enzyme also occur within starch granules in developing pea embryos. Plant J. 4: 191-198.

Devereux, J., Haeberli, P. and Smithies, O. 1984. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. Nucl. Acids Res. 12: 387-395.

Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S. and von Heijne, G. 2000. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. J. Mol. Biol. 300: 1005-1016.

Emes, M.J., Bowsher, C.G., Hedley, C., Burrell, M.M., Scrase-Field, E.S.F. and Tetlow, I.J. 2003. Starch synthesis and carbon partitioning in developing endosperm. J. Exp. Bot. 54 (382): 569-575.

Fisher, D.K., Boyer, C.D. and Hannah, L.C. 1993. Starch branching enzyme II from maize endosperm. Plant Physiol. 102: 1045-1046.

Fisher, D.K., Gao, M., Kim, K.N., Boyer, C.D. and Guiltinan, M.J. 1996. Two closely related cDNAs encoding starch branching enzyme from Ar*abidopsis thaliana.* Plant Mol. Biol. 30: 97-108.

Fisher, D.K., Kim, K.N., Gao, M., Boyer, C.D. and Guiltinan, M.J. 1995. A cDNA encoding starch branching enzyme I from maize endosperm. Plant Physiol. 108: 1313-1314.

Gao, M., Fisher, D.K., Kim, K.N., Shannon, J.C. and Guiltinan, M.J. 1996. Evolutionary conservation and expression patterns of maize starch branching enzyme I and IIb genes suggests isoform specialization. Plant Mol. Biol. 30: 1223-1232.

Gao, M., Fisher, D.K., Kim, K.N., Shannon, J.C. and Guiltinan, M.J. 1997. Independent genetic control of maize starch-branching enzyme IIa and IIb. Isolation and characterization of a sb*e2a c*DNA. Plant Physiol. 114: 69-78.

Genschel, U., Abel, G., Lorz, H. and Lutticke, S. 2002. The sugary-type isoamylase in wheat: tissue distribution and subcellular localisation. Planta 214: 813-820.

Guan, H.P. and Preiss, J. 1993. Differentiation of the properties of the branching isoenzymes from maize (Ze*a mays)*. Plant Physiol. 102: 1269-1273.

Guan, H.P., Baba, T. and Preiss, J. 1994. Expression of branching enzyme II of maize endosperm in Escherichia coli. Cell Mol. Biol. 40: 981-988.

Hamada, S., Ito, H., Hiraga, S., Inagaki, K., Nozaki, K., Isono, N., Yoshimoto, Y., Takeda, Y. and Matsui, H. 2002. Differential characteristics and subcellular localization of two starch-branching enzyme isoforms encoded by a single gene in P*haseolus vulgaris L.* J. Biol. Chem. 277: 16538-16546.

Hamada, S., Nozaki, K., Ito, H., Yoshimoto, Y., Yoshida, H., Hiraga, S., Onodera, S., Honma, M., Takeda, Y. and Matsui, H. 2001. Two starch-branching-enzyme isoforms occur in different fractions of developing seeds of kidney bean. Biochem. J. 359: 23-34.

Hodge, J.E. and Osman, E.M. 1976. Carbohydrates. In “Food Chemistry” pp. 102-114. Fennema, O. R. Marcel Dekker Inc., New York.

Hoover, R., Li, Y.X., Hynes, G. and Senanayake, N. 1997. Physicochemical characterization of mung bean starch. Food Hydrocolloids. 11: 401-408.

Hoover, R. and Sosulski, F.W. 1991. Composition, structure, functionality, and chemical modification of legume starches: a review. Can. J. Physiol. Pharmacol. 69: 79-92.

Jespersen, H.M., MacGregor, E.A., Henrissat, B., Sierks, M.R. and Svensson, B. 1993. Starch- and glycogen-debranching and branching enzymes: prediction of structural features of the catalytic $(\beta/\alpha)_8$-barrel domain and evolutionary relationship to other amylolytic enzymes. J. Protein Chem. 12: 791-805.

Jobling, S.A., Schwall, G.P., Westcott, R.J., Sidebottom, C.M., Debet, M., Gidley, M.J., Jeffcoat, R. and Safford, R. 1999. A minor form of starch branching enzyme in potato (Sola*num tuberosum L.)* tubers has a major effect on starch structure: cloning and characterisation of multiple forms of SBE A. Plant J. 18: 163-171.

Kawasaki, T., Mizuno, K., Bada, T. and Shimada, H. 1993. Molecular analysis of the gene encoding a rice starch branching enzyme. Mol Gen Genet. 237: 10-16.

Khoshnoodi, J., Blennow, A., Ek, B., Rask, L. and Larsson, H. 1996. The multiple forms of starch-branching enzyme I in Sola*num tuberosum.* Eur. J. Biochem. 242: 148-155.

Kiel, J.A.K.W., Vossen, J.P.M.J. and Venema, G. 1987. A general method for the construction of Escherichia coli mutants by homologous recombination and plasmid segregation. Mol. Gen. Genet. 207: 294-301.

Kimura, M. 1983. The neutral theory of molecular evolution. Cambridge University Press. Cambridge, UK.

Ko, Y.T., Chang, S.K., Chen, H.C. and Li, Y.C. 2004. GBSS activities on mungbean (*Vigna radiata L.*) starch granule and analysis of its total protein profiles. 臺灣農業化學與食品科學 42(2): 132-139

Kossmann, J., Visser, R.G.F., Muller-Rober, B., Willmitzer, L. and Sonnewald, U. 1991. Cloning and expression analysis of a potato cDNA that encodes branching enzyme: evidence for co-expression of starch biosynthetic genes. Mol Gen Genet. 230: 39-44.

Kuriki, T., Guan, H., Sivak, M. and Preiss, J. 1996. Analysis of the active center of branching enzyme II from maize endosperm. J. Protein Chem. 15: 305-313.

Kuriki, T., Stewart, D.C. and Preiss, J. 1997. Construction of chimeric enzymes out of maize endosperm branching enzymes I and II: activity and properties. J. Biol. Chem. 272: 28999-29004.

Larsson, C.T., Hofvander, P., Khoshnoodi, J., Ek, B., Rask, L. and Larsson, H. 1996. Three isoforms of starch synthase and two isoforms of branching enzyme are present in potato tuber starch. Plant Sci. 117: 9-16.

Larsson, C.T., Khoshnoodi, J., Ek, B., Rask, L. and Larsson, H. 1998. Molecular cloning and characterization of starch-branching enzyme II from potato. Plant Mol. Biol. 37: 505-511.

Li M. 2001. Research advance in chemical composion and pharmacological action of mung bean. 上海中醫藥雜誌 5: 47-49

Li, C.Y., Chu, Y.L. and Chang, Y.H. 1987. Isolation and characterization of mungbean starch. In Mungbean, Proceedings of the second International Symposium. Bangkok, Thailand, 1987. Asian Vegetable Research and Development Center. p.528-535.

Libessart, N. and Preiss, J. 1998. High-level expression of branching enzyme II from maize endosperm in Escherichia *coli.* Protein Expr. Purif. 14: 1-7.

Martin, C. and Smith, A.M. 1995. Starch biosynthesis. Plant Cell 7: 971-985.

McCue, K.F., Hurkman, W.J., Tanaka, C.K. and Anderson, O.D. 2002. Starch Branching Enzymes Sbe1 and Sbe2 from Wheat (Triticum aestivum cv. Cheyenne): Molecular Characterization, Developmental Expression, and Homolog Assignment by Diffferential PCR. Plant Mol. Biol. Rep. 20: 191-192.

Mizuno, K., Kawasaki, T., Shimada, H., Satoh, H., Kobayashi, E., Okumura, S., Arai, Y. and Bada, T. 1993. Alteration of the structural properties of starch commponents by the lack of an isoform of starch branching enzyme in rice seeds. J. Biol. Chem. 286: 19084-19091.

Mizuno, K., Kimura, K., Arai, Y., Kawasaki, T., Shimada, H. and Bada, T. 1992. Starch branching enzymes from immature rice seeds. J. Biol. Chem. 112: 643-651.

Mizuno, K., Kobayashi, E., Tachibana, M., Kawasaki, T., Fujimura, T., Funane, K., Kobayashi, M. and Bada, T. 2001. Characterization of an isoform of rice starch branching enzyme, RBE4, in developing seeds. Plant Cell Physiol. 42: 349-357.

Morell, M.K., Blennow, A., Kosar-Hashemi, B. and Samuel, M.S. 1997. Differential expression and properties of starch branching enzyme isoforms in developing wheat endosperm. Plant Physiol. 113: 201-208.

Mutisya, J., Sathish, P., Sun, C., Andersson, L., Ahlandsberg, S., Baguma, Y., Palmqvist, S., Odhiambo, B., Per, A. and Jansson, C. 2003. Starch branching enzymes in sorghum (*Sorghum bicolor)* and barley (*Hordeum vulgare): Comparat*ive analyses of enzyme structure and gene expression. J. Plant Physiol. 160: 921-930.

Myers, A.M., Morell, K.M., James, M.G. and Ball, S.G. 2000. Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal. Plant Physiol. 122: 989-997.

Nair, R.B., Baga, M., Scoles, G.J., Kartha, K.K. and Chibbar, R.N. 1997. Isolation, characterization and expression analysis of a starch branching enzyme II cDNA from wheat. Plant Sci. 122: 153-163.

Nakamura, Y. 2002. Towards a better understanding of the metabolic system for amylopectin biosynthesis in plants: rice endosperm as a model tissue. Plant Cell Physiol. 43: 718-725.

Nakamura, Y. and Yamanouchi, H. 1992. Nucleotide sequence of a cDNA encoding starch-branching enzyme, or Q-enzyme I, from rice endosperm. Plant Physiol. 99: 1265-1266.

Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. and von Heijne, G. 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. Protein Eng. 10: 1-6.

Nozaki, K., Hamada, S., Nakamori, T., Ito, H., Sagisaka, S., Yoshida, H., Takeda, Y., Honma, M. and Matsui, H. 2001. Major isoforms of starch branching enzymes in premature seeds of kidney bean (*Phaseolus vulgaris L.).* Biosci. Biotechnol. Biochem. 65: 1141-1148.

Parent,S.A. and Bostian,K.A. 1996. Yeasts. pp.121. Academic Press, London

Poulsen, P. and Kreiberg, J.D. 1993. Starch branching enzyme cDNA from *Solanum tuberosum*. Plant Physiol. 102: 1053-1054.

Preiss, J. and Sivak, M.N. 1998. Biochemistry, molecular biology and regulation of starch synthesis. Genet. Eng. 20: 177-223.

Rahman, S., Abrahams, S., Abbott, D., Mukai, Y., Samuel, M., Morell, M. and Appels, R. 1997. A complex arrangement of genes at a starch branching enzyme I locus in the D-genome donor of wheat. Genome 40 40: 465-474.

Rahman, S., Regina, A., Li, Z., Mukai, Y., Yamamoto, M., Kosar-Hashemi, B., Abrahams, S. and Morell, M.K. 2001. Comparison of starch-branching enzyme genes reveals evolutionary relationships among isoforms. Characterization of a gene for starch-branching enzyme IIa from the wheat D genome donor *Aegilops tauschii.* Plant Physiol. 125: 1314-1324.

Robin, J.P., Mercier, C., Charbonniere, R. and Guilbot, A. 1974. Lintnerized starches. Gel filtration and enzymatic studies of insoluble residues from prolonged acid treatment of potato starch. Cereal Chem. 51: 389-406.

Romanos, M.A. 1995. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. Curr. Opin. Biotechnol. 6: 527-533

Salehuzzaman, S.N.I.M., Jacobsen, E. and Visser, R.G.F. 1992. Cloning, partial sequencing and expression of a cDNA coding for branching enzyme in cassava. Plant Mol. Biol. 20: 809-819

Shirzadegan, M., Christie, P.,and Seemann, J.R. 1991. An efficient method for isolation of RNA from tissue cultured plant cells. Nucleic Acids Res. 19: 6055

Sivak, M.N. and Preiss, J. 1998. Branching enzyme. Adv. Food Nutr. Res. 41: 89-106.

Smith, A.M. 1998. Major differences in isoforms of starch-branching enzyme between developing embryos of round- and wrinkled-seeded peas (*Pisum sativum L.).* Planta 175: 270-279.

Smith, A.M. 2001. The Biosynthesis of Starch Granules. Biomacromole- cules. 2: 335-341.

Sun, C., Sathish, P., Ahlandsberg, S. and Jansson, C. 1998. The two genes encoding starch-branching enzymes IIa and IIb are differentially expressed in barley. Plant Physiol. 118: 37-49.

Svensson, B. 1994. Protein engineering in the α-amylase family: catalytic mechanism,subrate pecificity, and stability. Plant Mol. Biol. 25: 141-157.

Takeda,Y., Guan, H.P. and Preiss, J. 1993. Branching of amylose by the branching isoenzymes of maize endosperm. Carbohydr. Res. 240: 253-263.

Tsay, J.S., Kuo, W.L. and Kuo, C.G. 1983. Enzyme involved in starch synthesis in the developing mung bean seed. Phytochemistry 22: 1573-1576.

Um, S.H., Song, Y.O. and Cheigh, H.S. 1990. Compositions of lipid class and fatty acids in lipids extracted from mung bean starch. Journal of the Korean Society of Food and Nutrition. 19: 87-93.

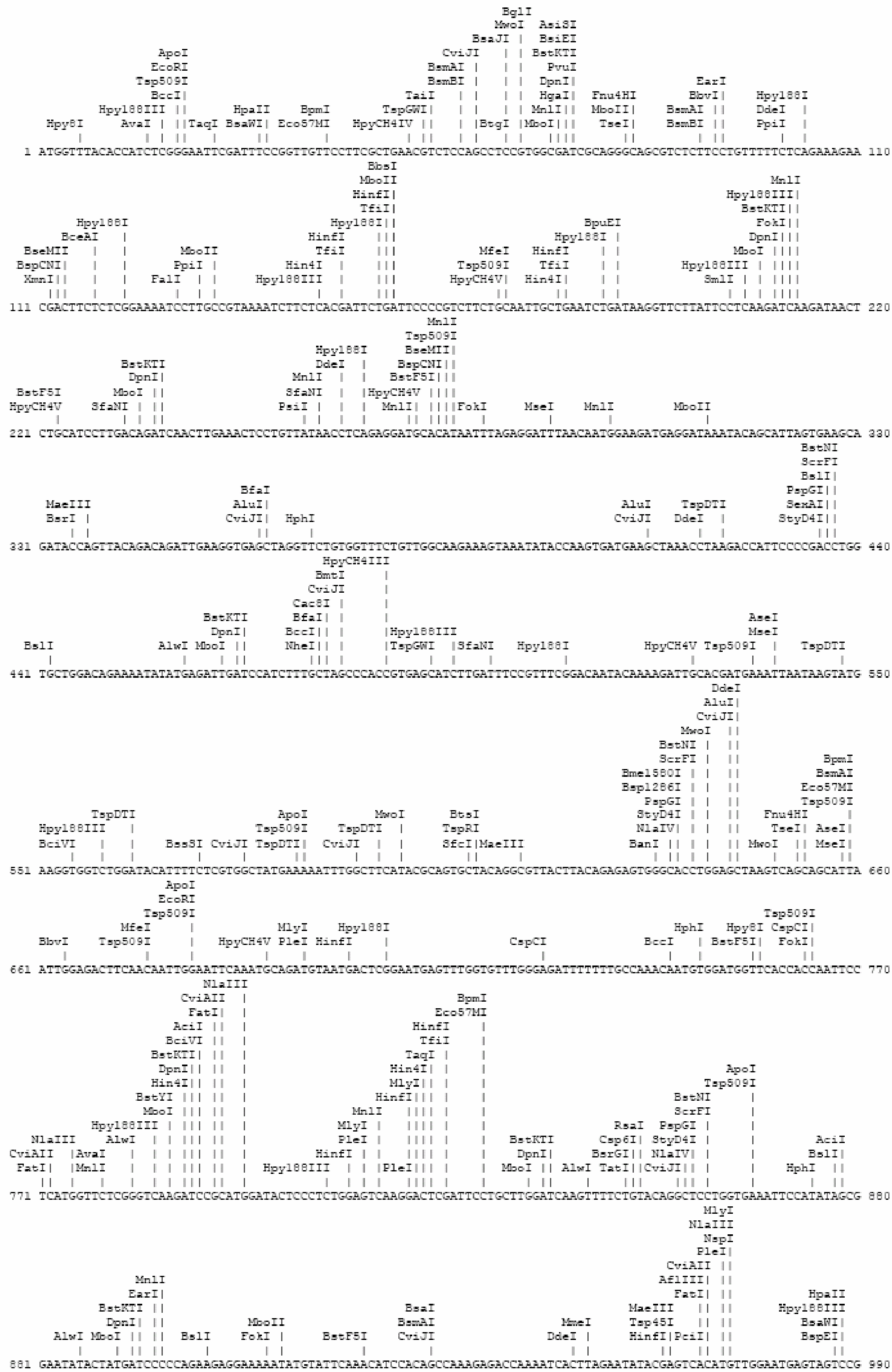
Visser, R.G.F. and Jacobson, E. 1993. Towards modifying plants for altered starch content and composition. TIBTECH. 11: 63-68.

Wang, X. and Young, W.S. 3rd. 2003. Rapid amplification of cDNA ends. Methods Mol. Biol. 226: 105-115.

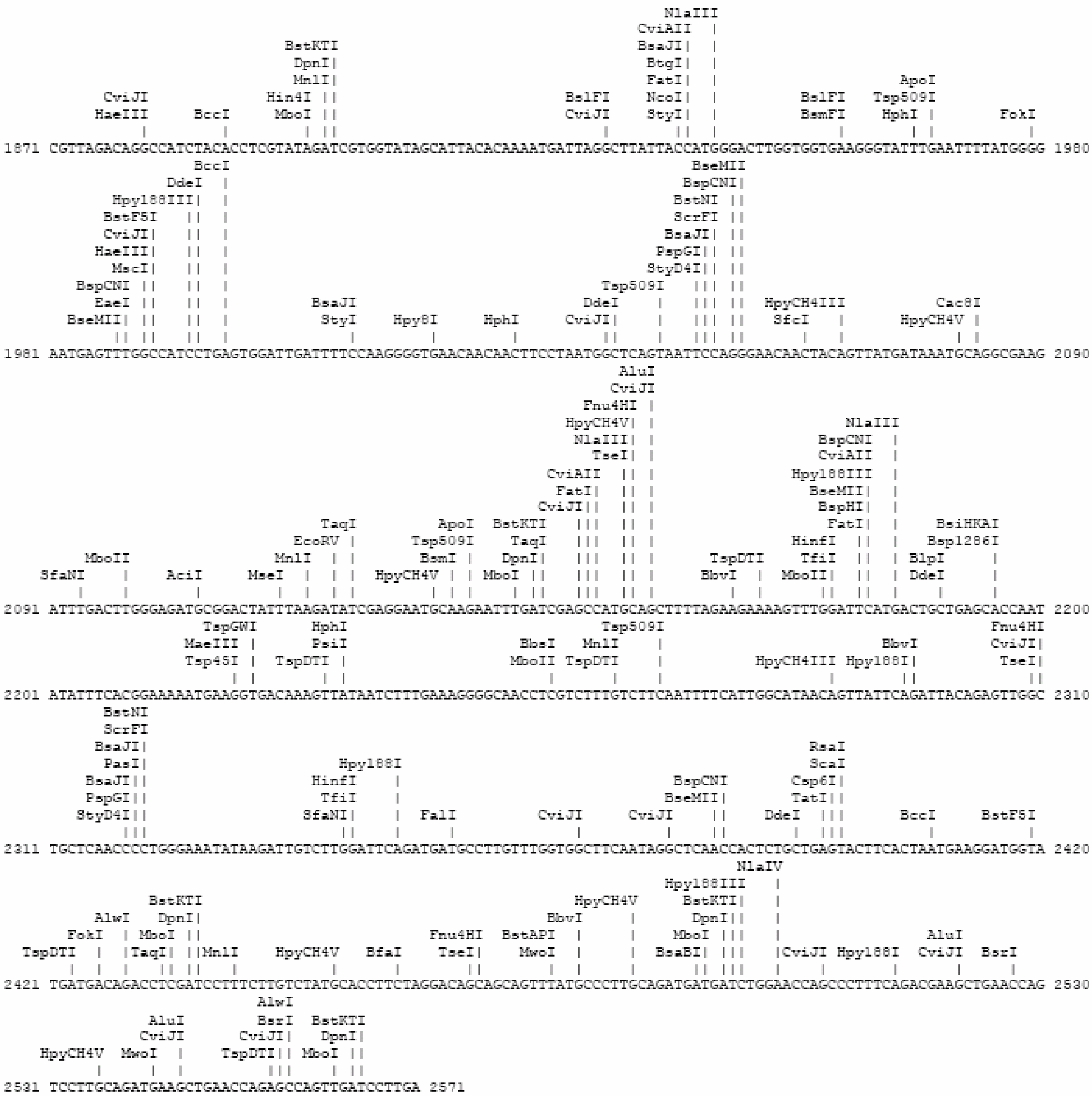
Yamanouchi, H. and Nakamura,Y. 1992. Organ specificity of isoforms of starch branching enzyme (Q-enzyme) in rice. Plant Cell Physiol. 33: 985-991.

Zhu, J.H., Haase, N.U. and Kempf, W. 1990. Starke 42: 1-4.

附錄一


1 ATGGTTTACACCATCTCGGGAATTCGATTTCCGGTTGTTCCTTCGCTGAACGTCTCCAGCCTCCGTGGCGATCGCAGGGCAGCGTCTCTTCCTGTTTTTCTCAGAAAGAA 110
111 CGACTTCTCTCGGAAAATCCTTGCCGTAAAATCTTCTCACGATTCTGATTCCCCGTCTTCTGCAATTGCTGAATCTGATAAGGTTCTTATTCCTCAAGATCAAGATAACT 220
221 CTGCATCCTTGACAGATCAACTTGAAACTCCTGTTATAACCTCAGAGGATGCACATAATTTAGAGGATTTAACAATGGAAGATGAGGATAAATACAGCATTAGTGAAGCA 330
331 GATACCAGTTACAGACAGATTGAAGGTGAGCTAGGTTCTGTGGTTTCTGTTGGCAAGAAAGTAAATATACCAAGTGATGAAGCTAAACCTAAGACCATTCCCCGACCTGG 440
441 TGCTGGACAGAAAATATATGAGATTGATCCATCTTTGCTAGCCCACCGTGAGCATCTTGATTTCCGTTTCGGACAATACAAAAGATTGCACGATGAAATTAATAAGTATG 550
551 AAGGTGGTCTGGATACATTTTCTCGTGGCTATGAAAAATTTGGCTTCATACGCAGTGCTACAGGCGTTACTTACAGAGAGTGGGCACCTGGAGCTAAGTCAGCAGCATTA 660
661 ATTGGAGACTTCAACAATTGGAATTCAAATGCAGATGTAATGACTCGGAATGAGTTTGGTGTTTGGGAGATTTTTTTGCCAAACAATGTGGATGGTTCACCACCAATTCC 770
771 TCATGGTTCTCGGGTCAAGATCCGCATGGATACTCCCTCTGGAGTCAAGGACTCGATTCCTGCTTGGATCAAGTTTTCTGTACAGGCTCCTGGTGAAATTCCATATAGCG 880
881 GAATATACTATGATCCCCCAGAAGAGGAAAAATATGTATTCAAACATCCACAGCCAAAGAGACCAAAATCACTTAGAATATACGAGTCACATGTTGGAATGAGTAGTCCG 990

```
                                                                                           Hpy188III
                                                                                         CviJI     |
                                                                   AluI                 HaeIII     |
          BstKTI                                                  CviJI                   MscI     |
            DpnI|                               RsaI            HindIII |                 EaeI |    |
     CviJI BclI ||       Tsp509I              Csp6I|              MnlI | |                BslI | |    |
    NlaIV| MboI ||    NdeI      |             TatI||            MseI  | | |CviJI   Hpy188III PflMI | |    |
        ||     | ||       |      |                |||              |   | | |    |          |      | | |    |
 991 GAGCCAATGATCAACACATATGCCAATTTTAGAGATGATGTACTACCTCGCATTAAAAAGCTTGGCTACAATGCTGTCCAGATTATGGCCATTCAAGAACATTCTTATTA 1100
                            ApoI
                         Tsp509I
                     NlaIII    |
                    MaeIII|    |
                    Tsp45I|    |
                  CviAII ||    |
                   FatI| ||    |
                   KpnI| ||    |
                NlaIV || ||    |
                 RsaI || ||    |
               Csp6I| || ||    |
             Acc65I|| || ||    |
               BanI|| || ||    |                 CviJI
                                                Fnu4HI |
                                                 BpmI| |                                                  BfaI
                                               Eco57MI| |                                              NlaIII |
             BslI  ||| || ||    |                  TseI| |      Hpy188III                          CviAII  | |
          AluI  |  ||| || ||    |                 BfaI  || |       MnlI   |                             FatI| | |      BccI
         CviJI  |  ||| || ||    |                                         |                                                 
        Cac8I | |  ||| || ||    |     HpyCH4V   |  || |      BbvI|   |       MseI  Hpy188I       CviJI || | |    TspDTI|
              | | |  ||| || ||    |          |    |  || |         ||   |          |        |            | || | |         ||
1101 TGCCAGCTTTGGGTACCATGTCACAAATTTCTTTGCACCTAGCAGCCGATTTGGAACTCCAGAGGAACTTAAATCTCTGATAGACAAAGCCCATGAACTAGGTCTGCTTG 1210
                                                          NlaIII                                     BccI
                                                            NspI                                   MaeIII
                                                          BccI |                                   Tsp45I
                                                          FokI |                                 BstNI  |
                 Hpy8I    NlaIII                       CviAII| |                                 ScrFI  |
                 RsaI| CviAII  |                      AflIII|| |                                BsaJI|  |
               Csp6I||  FatI|  |                 BstF5I    ||| |                                PspGI|| |
              BsrGI|||CviJI||  |          BccI    CviJI| FatI|| |                              StyD4I|| |
 Hpy188I       TatI||| MslI||  |          MnlI|   HaeIII| PciI|| |          FokI       BstF5I  |||  |
    |               ||||   |||  |             ||       ||    ||| |             |           |   |||  |
1211 TTCTGATGGATATTGTACACAGCCATGCCTCAAATAATACTTTGGATGGCCTAAACATGTTTGATGGAACTGATAGTCATTACTTCCATCCTGGGTCACGGGGTTATCAT 1320
                                                 DdeI
                                       AluI    RsaI |
          HinfI                       BseYI    ScaI |                     BaeI
           TfiI                       CviJI   Csp6I| |                  HpyCH4V                                TspDTI    BccI
       BstF5I | FokI  Tsp509I         BaeI|   TatI|| |                   BccI |        CviJI    BstF5I   FokI     |    TaqI|
             | |    |        |            ||      ||| |                    | |            |          |         |    |       ||
1321 TGGATGTGGGATTCTCGTCTTTTCAATTATGGAAGCTGGGAAGTACTAAGGTATCTACTTTCAAATGCAAGATGGTGGCTGGATGAATACAAGTTTGACGGATTTCGATT 1430
                                                Hin4I
                         Hpy8I       HpyCH4V |
                         RsaI|     NlaIII    | |                      RsaI
         Hin4I          Csp6I||   CviAII  |    | |          HpyCH4III ScaI
     MaeIII  |         BsrGI|||  BspMI|  |    | |               BsrI  |Csp6I|                                        Hpy8I
 TspGWI  |  |           TatI|||   FatI|  |    | | BsmI      Tsp509I  |TspRI|         SfaNI              SfaNI   |
       |  |  |              ||||      ||  |    | |   |          TspRI  |TatI||             |                 |   |
1431 TGATGGTGTTACATCAATGATGTACACTCATCATGGGTTGCAGGTAGCATTCACTGGAAATTACAGTGAGTACTTTGGTATGGCAACTGATGTTGATGCTGTGGTTTACC 1540
                                      MnlI
              BstKTI               BanII|
                DpnI|           Bsp1286I|
              MboI ||            CviJI ||
          TspDTI | ||         NlaIII | ||BsaJI
        CviJI  | | || CviAII  | | ||AvaI|
       Cac8I |  | | ||  FatI|  | | ||EarI| MaeIII                        MboII
     BslI | |  | | || MboII|  | | ||SapI|CviJI |                       HphI  |    BsmI              BccI
         | | |  | | ||      ||  | | ||   ||     | |                         |  |       |                   |
1541 TGATGCTGGCTAATGATCTCATTCATGGGCTCTTCCCCGAGGCTGTTACCATTGGTGAAGATGTGAGTGGAATGCCAACATTCTGCCTTCCTACACAAGATGGTGGTGTT 1650
                               HpyCH4V
                            BsrDI    |
                           CviJI|    |
                          HaeIII|    |
                            MscI|    |
                          EaeI ||    |           Hpy188III
                        BslI | ||    |              SmlI |
                  HpyCH4V  | | ||    |           HinfI  | |
                   Cac8I | | | ||    | BpuEI      TfiI  | | MnlI           BsrI            Hpy8I         BccI
                       | | | | ||    |     |          |   | |   |              |               |              |
1651 GGTTTTGATTATCGCCTGCAAATGGCCATTGCAGACAAGTGGATTGAGATTCTCAAGAAGCAAGATGAGGACTGGAAAATGGGCGATATTGTCCACACACTAACAAACAG 1760
                                                  BsaJI
                                                   StyI
                                                 CviJI|
                                                HaeIII|
                                           BstKTI    ||
                                             MlyI    ||
                                             DpnI|   ||
                                             PleI|   ||
                                          NlaIII||   ||
                                            BclI|||  ||
                                            MboI|||  ||
                                       CviAII ||||   ||
                         Hin4I    Hpy188III ||||   ||
                         AluI |       BspHI| ||||   ||                    HpyCH4V                                  NlaIII
                        CviJI |        FatI| ||||   ||     Hin4I         HphI  |                                  Hin4I |
         MboII       BspCNI| |     HinfI  || ||||   ||   MaeIII|         MfeI |  |                               CviAII| |
    CviJI     |      BseMII|| | DdeI    |  || ||||StuI|  Tsp45I|      Tsp509I |  | BccI          TspDTI          FatI|| |
          |     |          ||| |    |     |  || ||||   ||        ||            |  |  |    |                |              ||| |
1761 AAGATGGCTGGAAAAATGTGTAGCTTATGCTGAGAGTCATGATCAGGCCTTGGTTGGTGACAAGACAATTGCATTTTGGTTGATGGACAAGGATATGTATGACTTCATGG 1870
```

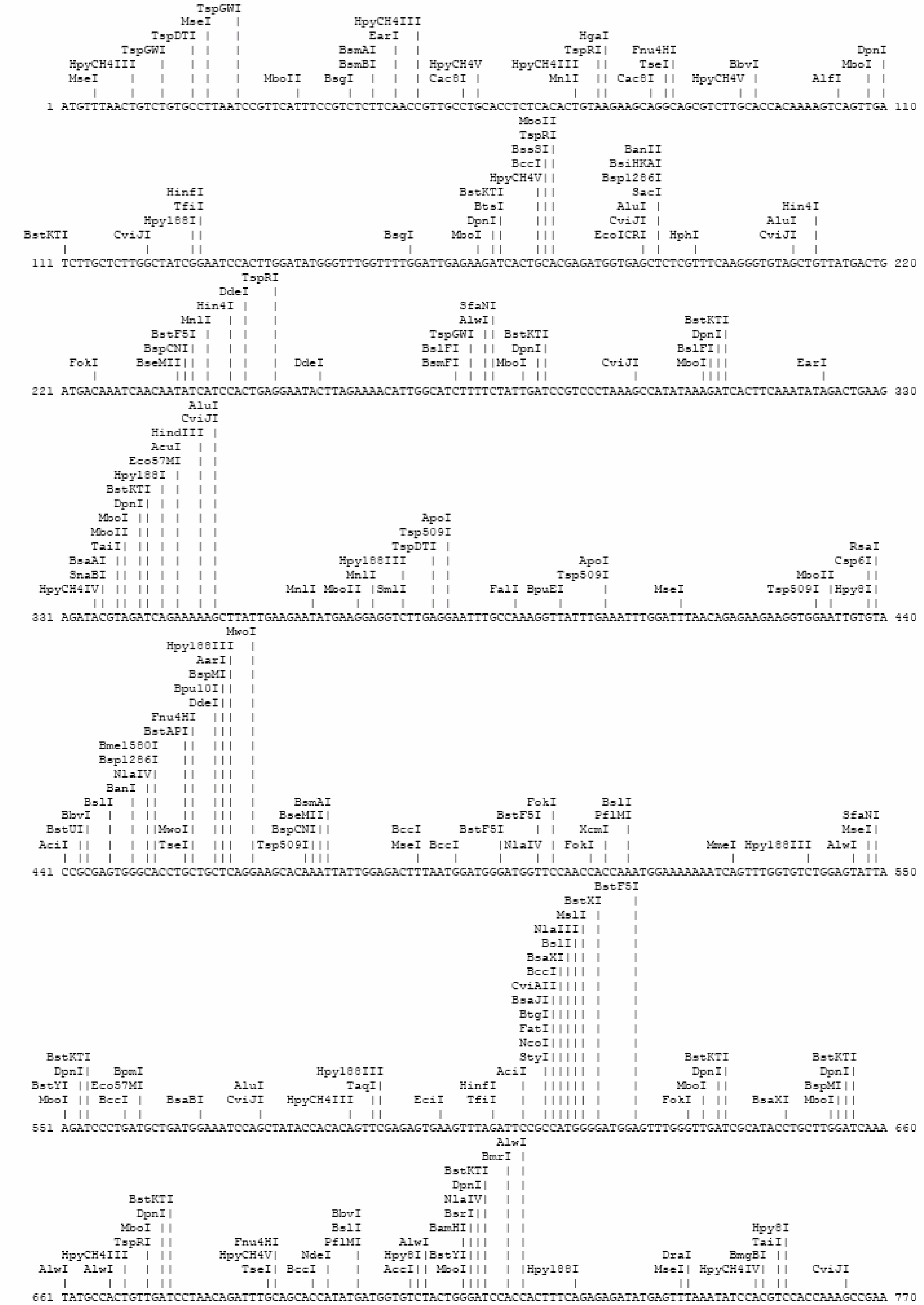


Enzymes that do cut and were not excluded	Enzymes that do not cut
Acc65I, AciI, AflIII, AluI, AlwI, ApoI, AseI, AsiSI, AvaI	AarI, AatII, AccI, AcII, AcuI, AfeI, AflII, AgeI, AhdI, AleI, AlfI, AloI, AlwNI, ApaI, ApaLI, AscI, AspCNI, AvaII, AvrII
BaeI, BanI, BanII, BbsI, BbvI, BccI, BceAI, BciVI, BclI, BfaI, BglI, BlpI, Bme1580I, BmtI, BpmI, BpuEI, BsaI, BsaBI, BsaJI, BsaWI, BseMII, BseYI, BsiEI, BsiHKAI, BslI, BslFI, BsmI, BsmAI, BsmBI, BsmFI, Bsp1286I, BspCNI, BspEI, BspHI, BspMI, BsrI, BsrDI, BsrGI, BssSI, BstAPI, BstF5I, BstKTI, BstNI, BstYI, BtgI, BtsI	BamHI, BbeI, BbvCI, BcgI, BfrBI, BglII, BmgBI, BmrI, BplI, Bpu10I, BsaAI, BsaHI, BsaXI, BseRI, BsgI, BsiWI, BsrBI, BsrFI,BssHII, BstBI,BstEII, BstUI, BstXI, BstZ17I, Bsu36I, BtgZI
Cac8I, Csp6I, CspCI, CviAII, CviJI	ClaI, DraI, DraIII, DrdI
DdeI, DpnI	EagI, EciI, EcoICRI, EcoNI, EcoO109I
EaeI, EarI, Eco57MI, EcoRI, EcoRV	FauI, FseI, FspI, FspAI
FalI, FatI, Fnu4HI, FokI	HaeII, HhaI, HinP1I, HincII, HpaI, Hpy99I KasI
HaeIII, HgaI, Hin4I, HindIII, HinfI, HpaII, HphI, Hpy8I, Hpy188I, Hpy188III, HpyCH4III HpyCH4IV, HpyCH4V, KpnI	MluI, MspA1I
MaeIII, MboI, MboII, MfeI, MlyI, MmeI, MnlI, MscI, MseI, MslI, MwoI	NaeI, NarI, NciI, NgoMIV, NotI, NruI, NsiI
NcoI, NdeI, NheI, NlaIII, NlaIV, NspI	PacI, PfoI, PmeI, PmlI, PpuMI, PshAI, PspOMI, PspXI, PsrI, PstI, PvuII, RsrII
PasI, PciI, PflMI, PleI, PpiI, PsiI, PspGI, PvuI, RsaI	SacI, SacII, SalI, SanDI, Sau96I, SbfI, SfiI, SfoI, SgrAI, SmaI, SnaBI, SpeI, SphI, SrfI, SspI, SwaI
SapI, ScaI, ScrFI, SexAI, SfaNI, SfcI, SmlI, StuI, StyI, StyD4I	TaqII, TauI, Tth111I
TaiI, TaqI, TatI, TfiI, TseI, Tsp45I, Tsp509I, TspDTI, TspGWI, TspRI	XbaI, XcmI, XhoI, XmaI, ZraI
XmnI	

圖二十四 、*VrsbeII* cDNA 的限制酶切位圖譜

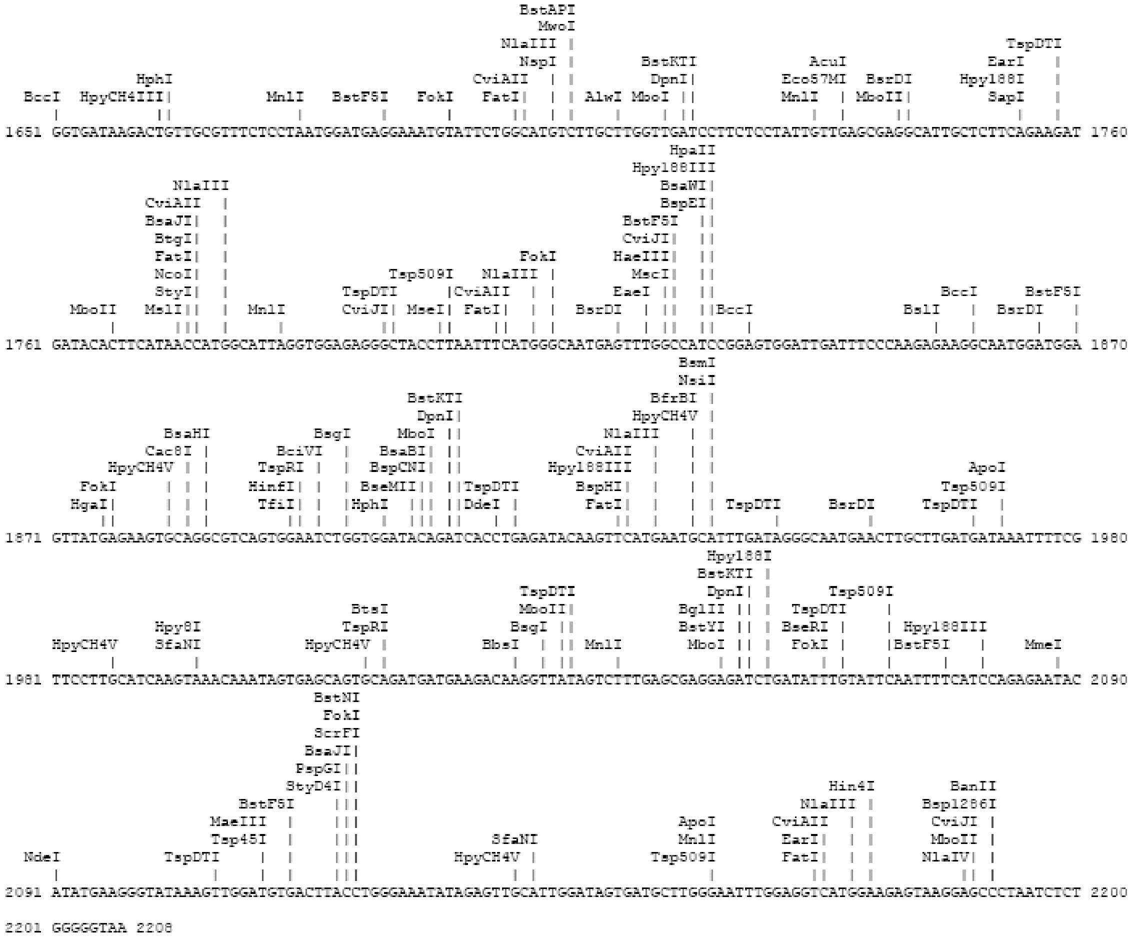
Fig. 24 The map of *VrsbeII* cDNA sequence with restriction enzyme cutting sites pointed.

附錄二



1 ATGTTTAACTGTCTGTGCCTTAATCCGTTCATTTCCGTCTCTTCAACCGTTGCCTGCACCTCTCACACTGTAAGAAGCAGGCAGCGTCTTGCACCACAAAAGTCAGTTGA 110
111 TCTTGCTCTTGGCTATCGGAATCCACTTGGATATGGGTTTGGTTTTGGATTGAGAAGATCACTGCACGAGATGGTGAGCTCTCGTTTCAAGGGTGTAGCTGTTATGACTG 220
221 ATGACAAATCAACAATATCATCCACTGAGGAATACTTAGAAAACATTGGCATCTTTTCTATTGATCCGTCCCTAAAGCCATATAAAGATCACTTCAAATATAGACTGAAG 330
331 AGATACGTAGATCAGAAAAAGCTTATTGAAGAATATGAAGGAGGTCTTGAGGAATTTGCCAAAGGTTATTTGAAATTTGGATTTAACAGAGAAGAAGGTGGAATTGTGTA 440
441 CCGCGAGTGGGCACCTGCTGCTCAGGAAGCACAAATTATTGGAGACTTTAATGGATGGGATGGTTCCAACCACCAAATGGAAAAAAATCAGTTTGGTGTCTGGAGTATTA 550
551 AGATCCCTGATGCTGATGGAAATCCAGCTATACCACACAGTTCGAGAGTGAAGTTTAGATTCCGCCATGGGGATGGAGTTTGGGTTGATCGCATACCTGCTTGGATCAAA 660
661 TATGCCACTGTTGATCCTAACAGATTTGCAGCACCATATGATGGTGTCTACTGGGATCCACCACTTTCAGAGAGATATGAGTTTAAATATCCACGTCCACCAAAGCCGAA 770

```
       BsaJI
        BtgI
     NlaIV |                     NlaIII               FokI
    CviJI| |                  CviAII  |            Hpy188I
  HaeIII| |                     FatI|  |           AluI    |                             HpyCH4V
EcoO109I|| |                   TspGWI|  |         CviJI    |                       ApoI      |
  Sau96I|| | MnlI           CviJI ||  |     BstF5I  |    |          MnlI      Tsp509I     |                    TaqI
      ||| |   |               | ||  |         |  |    |            |            |        |                     |
771 GGCCCCACGGATATATGAGGCTCATGTGGGGATGAGTAGCTCTGAACCTCGCATAAACTCTTACAGGGAATTTGCAGATGAGATTTTGCCCCGTATTCGAGCAAATAACT 880
                              CviJI
                             HaeIII
                              EaeI |
                            BslI | |
                          PflMI | |
                        AluI   | | |                                                  ApoI
                       CviJI   | | |                                               Tsp509I                          NlaIV
                      MspA1I   | | |                                            NlaIII    |             Hpy188III   |
                       PvuII   | | |                                           MaeIII|    |               BstKTI|   |        BstKTI
                    BccI  |    | | |                                         CviAII ||    |                 DpnI||  |         DpnI|
       HpyCH4III  |   |    | | |                        NsiI             FatI| ||    |              BglII |||  |       BglII ||
         BceAI |  |   |    | | |                     BfrBI |          EcoRV || ||    |              BstYI |||  |       BstYI ||
                |  |   |    | | |                 HpyCH4V |  SfaNI  | || ||    |              MboI  |||  |        MboI ||
881 ATAATACAGTCCAGCTGATGGCCGTTATGGAACATTCTTATTATGCATCGTTTGGATATCATGTAACAAATTTTTTTGCTGTGAGCAGTAGATCTGGAACCCCTGAAGAT 990
                                 BfaI                                               BsrI
                AcuI          AvrII|                                            NlaIII|
             Eco57MI          BsaJI|                                         CviAII  ||
          Hpy188I  |          BspMI|                                           FatI|  ||          MlyI
       MboII   |   |            StyI|        BccI                            MslI||  ||           PleI
  MseI     |   |   |   CviJI  CviJI|| HpyCH4V  |          BstF5I    FokI|||  ||HphI   BccI    | HinfI    CviJI
991 CTTAAATATCTGATAGATAAGGCTCATAGCCTAGGATTGCAGGTTTTGATGGATGTTATCCATAGTCATGCCAGTAATAACATCACCGATGGACTCAATGGCTTTGATGT 1100
  CviJI                                    MnlI
 HaeIII                             NlaIII  |
   MscI          HinfI       CviAII  |  |                BpmI            Hpy8I                     BsrI BmrI
  EaeI |          TfiI        FatI|  |  |              Eco57MI          AccI|   MseI         MboII  |XmnI|
1101 TGGCCAAACTTCACAAGATTCTTACTTCCATGCTGGAGATAGAGGTTATCACAAGTTGTGGGATAGTAGACTATTTAACTATGCCAACTGGGAAGTTCTTCGTTTCCTTT 1210
                                                                                                 HinfI
                                                                                                  TfiI
                                                                                               NlaIII|
                   TaqI                                                                      CviAII  ||
                  AvaI|                                                                      BsaJI|  ||
                 PspXI|      ApoI                                                             BtgI|  ||
                  SmlI|      BccI                                                             FatI|  ||
                  XhoI|    Tsp509I                                                            NcoI|  ||
         MseI    CviJI||     DraI|            BccI                                            StyI|  ||
Tsp509I   |    MnlI  |||    MseI|| BseRI     TaqI|      MaeIII         HphI       MslI||   || BsrDI
1211 TATCTAATTTAAGGTGGTGGCTCGAGGAGTTTAAATTTGATGGATTTCGATTTGATGGAGTAACATCAATGCTGTATCATCACCATGGAATCAACATTGCTTTTACAGGG 1320
                                                                                       SfaNI
                                                                             HpyCH4III |
                                                                           BstKTI    | |
                                                                             DpnI|   | |
                                                                        Hpy188I ||   | |
                                                  Hpy188I           AlwI     | ||   | |
                                                 CspCI   |    Tsp509I   |     | ||   | |               Tsp509I
         CspCI      SfaNI                     SfaNI    |   |     CviJI |   |     | ||   | |            HpyCH4III |
   PsiI   SspI|  TspDTI   |                 BstF5I | FokI   | Cac8I | |   | MboI ||   | |          HpyCH4V     | |
1321 GATTATAATGAATATTTTAGCGAAGCAACAGATGTGGATGCTGTTGTCTATCTGATGCTGGCTAATTCTCTGATCCACAGTATTTTGCCAGATGCAACTGTAATTGCTGA 1430
                  BslI
                 PflMI
              Tsp509I |
               AcuI  | |
              BstNI  | |
            Eco57MI  | |
              ScrFI  | |                                                      CviJI
           NlaIII |  | |                                                   NlaIII|
              NspI |  | |                                                 CviAII  ||
             PspGI |  | |                                                  BsaJI|  ||
              SphI |  | |                                                   BtgI|  ||
            StyD4I |  | |                                                   FatI|  ||
            Cac8I |  | |  |                                                  NcoI|  ||
          CviAII| |  | |  |                  Tsp509I                          StyI|  ||
            FatI|| |  | |  |HincII      HpyCH4III    |                        CviJI||  ||
          MboII||| |  | |  | Hpy8I   Hpy188I    |    |              PshAI BfaI  |||  ||
1431 AGATGTTTCTGGCATGCCAGGAATTGGTCAACAAGTTTCTGACGGTGGAATTGGTTTTGACTATCGTCTAGCCATGGCTATCCCTGATAAATGGATTGATTACTTGAAGA 1540
                                                                                                             XcmI
                                                                                                        CviJI  |
                                                                                                      HaeIII   |
                                                                                                    BstNI  |   |
              NlaIII                                                                                ScrFI  |   |
           CviAII  |                                                                                BslI|  |   |
             FatI|  |                                                                             PspGI||  |   |
           Hpy8I ||  |                                                                           StyD4I||  |   |
            RsaI| ||  |                                                                         NlaIII|||  |   |
          Csp6I|| ||  |                                                                      CviAII  ||||  |   |
          TatI||| ||  |                                  BspCNI       TspRI                      FatI|  ||||  |   |
      MboII |||| ||  |              TspDTI             BseMII|     DdeI   |                    CviJI||  ||||  |   |
1541 ACAAGAATGAGTACACATGGTCAATGAAGGAAATCTCTTGGAGTTTGACAAATAGGAGATACACTGAGAAATGTGTTTCCTATGCTGAAAGCCATGACCAGGCCATCGTT 1650
```



Enzymes that do cut and were not excluded	Enzymes that do not cut
AarI, AccI, AciI, AcuI, AlfI, AluI, AlwI, ApoI, AvaI, AvrII	AatII, Acc65I, AclI, AfeI, AflII, AflIII, AgeI, AhdI, AleI, AloI, AlwNI, ApaI, ApaLI, AscI, AseI, AsiSI, AspCNI, AvaII
BamHI, BanI, BanII, BbsI, BbvI, BccI, BceAI, BciVI, BfaI, BfrBI, BglII, Bme1580I, BmgBI, BmrI, BpmI, Bpu10I, BpuEI, BsaAI, BsaBI, BsaHI, BsaJI, BsaWI, BsaXI, BseMII, BseRI, BsgI, BsiHKAI, BslI, BslFI, BsmI, BsmAI, BsmBI, BsmFI, Bsp1286I, BspCNI, BspEI, BspHI, BspMI, BsrI, BsrDI, BssSI, BstAPI, BstF5I, BstKTI, BstNI, BstUI, BstXI, BstYI, BtgI, BtsI	BaeI, BbeI, BbvCI, BcgI, BclI, BglI, BlpI, BmtI, BplI, BsaI, BseYI, BsiEI, BsiWI, BsrBI BsrFI, BsrGI, BssHII, BstBI, BstEII, BstZ17I, Bsu36I, BtgZI
Cac8I, Csp6I, CspCI, CviAII, CviJI	ClaI
DdeI, DpnI, DraI	DraIII, DrdI
EaeI, EarI, EciI, EcoICRI, Eco57MI, EcoO109I, EcoRV	EagI, EcoNI, EcoRI
FalI, FatI, Fnu4HI, FokI	FauI, FseI, FspI, FspAI
HaeIII, HgaI, Hin4I, HincII, HindIII, HinfI, HpaII, HphI, Hpy8I, Hpy188I, Hpy188III, HpyCH4III, HpyCH4IV, HpyCH4V	HaeII, HhaI, HinP1I, HpaI, Hpy99I
MaeIII, MboI, MboII, MlyI, MmeI, MnlI, MscI, MseI, MslI, MspA1I, MwoI	KasI, KpnI
NcoI, NdeI, NlaIII, NlaIV, NsiI, NspI	MfeI, MluI
PflMI, PleI, PshAI, PsiI, PspGI, PspXI, PvuII, RsaI	NaeI, NarI, NciI, NgoMIV, NheI, NotI, NruI
SacI, SapI, Sau96I, ScrFI, SfaNI, SmlI, SnaBI, SphI, SspI, StyI, StyD4I	PacI, PasI, PciI, PfoI, PmeI, PmlI, PpiI, PpuMI, PspOMI, PsrI, PstI, PvuI, RsrII
TaiI, TaqI, TatI, TfiI, TseI, Tsp45I, Tsp509I, TspDTI, TspGWI, TspRI	SacII, SalI, SanDI, SbfI, ScaI, SexAI, SfcI, SfiI, SfoI, SgrAI, SmaI, SpeI, SrfI, StuI, SwaI
XcmI, XhoI, XmnI	TaqII, TauI, Tth111I
	XbaI, XmaI, ZraI

圖二十五、*VrsbeI* cDNA 的限制酶切位圖譜

Fig. 25 The map of *VrsbeI* cDNA sequence with restriction enzyme cutting sites pointed.

附錄三

表十　綠豆 SBEII cDNA (*VrsbeII*) 演繹之胺基酸序列在 NCBI 資料庫的搜尋比對

Enzyme	Accession no.	Species	Full length (amino acids)	Matched region (location)	Matched length (amino acids)	Identity %	Reference
SBEII	BAA82348 (AB029548)	*Phaseolus vulgaris* (kidney bean)	870	1-870	796/871	91	Hamada et al., 2001 Biochem. J. 359 (1): 23-34
SBEIIa	AAB67316 (U65948)	*Zea mays* (corn)	814	108-809	596/702	84	Gao, et al., 1997 Plant Physiol. 114 (1): 69-78
1,4-alpha-D-glucan 6-alpha-D-(1,4-alpha-D-glucanotransferase)	AAB17086 (U66376)	*Triticum aestivum* (wheat)	729	38-729	575/692	83	Kroeger, et al., 1996 online Submission
SBEIIa	AAC69753 (AF064560)	*Hordeum vulgare* (barley)	734	43-734	581/692	83	Sun et al., 1998 Plant Physiol. 118 (1): 37-49
SBEIIa	AAK26822 (AF338432)	*Triticum aestivum* (wheat)	768	77-768	579/692	83	Rahman et al., 2001 Plant Physiol. 125 (3): 1314-1324

SBEII	AAB33385	*Zea mays* (corn)	738	49-735	557/687	81	Guan, et al., 1994 Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand) 40 (7): 981-988
SBEI	CAA56319 (X80009)	*Pisum sativum* (pea)	922	1-865	713/873	81	Burton et al., 1995 Plant J. 7 (1): 3-15
SBEII	AAA18571 (L08065)	*Zea mays* (corn)	799	110-796	554/687	80	Fisher, et al., 1993 Plant Physiol. 102 (3): 1045-1046
SBEIIb	AAP72267 (AY304540)	*Sorghum bicolor* (sorghum)	803	69-800	564/732	77	Mutisya, et al., 2003 J. Plant Physiol. 160: 921-930
1,4-alpha-glucan branching enzyme isoform SBE2.2 precursor	AAB03100 (U22428)	*Arabidopsis thaliana*	800	24-800	616/806	76	Fisher, et al., 1996 Plant Mol. Biol. 30 (1): 97-108
SBE RBE4	BAA82828 (AB023498)	*Oryza sativa* (rice)	841	39-841	620/810	76	Mizuno et al., 2001 Plant cell Physiol. 42 (4): 349-357
SBEIIb	AAC69754 (AF064561)	*Hordeum vulgare* (barley)	829	87-826	565/751	75	Sun et al., 1998 Plant Physiol. 118 (1): 37-49

SBEII	CAA72154 (Y11282)	*Triticum aestivum* (bread wheat)	823	32-823	605/811	74	Nair, et al., 1997 Plant Sci. 122: 153-163
SBE2	AAG27623 (AF286319)	*Triticum aestivum* (wheat)	823	32-823	606/811	74	McCue et al., 2002 Plant Mol. Biol. Rep. 20 (2): 191-192
SBEII	BAB64912 (AB071286)	*Ipomoea batatas* (sweet potato)	868	1-866	645/874	73	Kimura and Saito, 2001 online Submission
RBE3	BAA03738 (D16201)	*Oryza sativa* (rice)	825	19-825	602/828	72	Mizuno et al., 1993 J. Biol. Chem. 268 (25): 19084-19091

附錄四

表十一　綠豆 SBEI cDNA (*VrsbeI*) 演繹之胺基酸序列在 NCBI 資料庫的搜尋比對

Enzyme	Accession no. Protein (Nucleotide)	Species	Full length (amino acids)	Matched region (location)	Matched length (amino acids)	Identity %	Reference
SBEI	BAA82349 (AB029549)	*Phaseolus vulgaris* (kidney bean)	847	1-722	688/722	95	Hamada et al., 2001 Biochem. J. 359 (1): 23-34
SBEII	CAA56320 (X800010)	*Pisum sativum* (pea)	826	8-716	594/710	83	Burton et al., 1995 Plant J. 7 (1): 3-15
1,4-alpha-glucan branching enzyme	CAA49463 (X69805)	*Solanum tuberosum*	861	75-734	544/660	82	Poulsen and Kreiberg. 1993 Plant Physiol. 102 (3): 1053-1054
1,4-alpha-glucan branching enzyme	CAA54308 (X77012)	*Manihot esculenta* (cassava)	852	1-732	574/732	78	Salehuzzaman, et al., 1997 online Submission
SBE	AAD50279 (AF169833)	*Sorghum bicolor* (sorghum)	832	50-721	505/674	74	Hsieh, et al., 2002 online Submission
SBE1	BAA01584 (D10752)	*Oryza sativa* (japonica cultivar-group)	820	43-715	495/674	73	Nakamura and Yamanouchi, 1992 Plant Physiol. 99: 1265-1266

SBE1	AAP68993 (AY302112)	*Oryza sativa* (japonica cultivar-group)	820	43-715	495/674	73	Chen, et al., 2003 Zhongguo Shuidao Kexue 17: 109-112
starch branching enzyme I	AAP72268 (Y304541)	*Hordeum vulgare* (barley)	775	14-664	479/651	73	Mutisya, et al., 2003 J. Plant Physiol. 160: 921-930
starch branching enyzyme 1	AAG27622 (AF286318)	*Triticum aestivum* (wheat)	833	49-726	486/679	71	McCue, et al., 2002 Plant Mol. Biol. Rep. 20 (2): 191-192
starch branching enzyme I	AAD30187 (AF525764)	Aegilops tauschii subsp. Strangulate (wheat)	829	46-722	474/679	69	Rahman, et al., 1997 Genome 40 (4): 465-474
starch branching enzyme	BAB40334 (AB042937)	*Ipomoea batatas* (sweet potato)	696	8-651	394/651	60	Abe and Orichi, 2001 online Submission
RBE4	BAA82828 (AB023498)	*Oryza sativa* (rice)	841	162-804	388/650	59	Mizuno, et al., 2001 Plant Cell Physiol. 42(4): 349-357