

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

綠豆 cDNA Library 的建構與澱粉合成酵素基因的選殖

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2313-B-039-002-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：中國醫藥大學營養學系

計畫主持人：柯源悌

計畫參與人員：柯源悌 石韻琦

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 10 月 31 日

九十一年度國科會專題計畫成果報告

計畫編號：NSC 91-2313-B-039-002

綠豆 cDNA library 的建構與澱粉合成酵素基因的選殖

Construction of mung bean cDNA library and cloning of its starch synthase genes

執行期限：91 年 8 月 1 日至 92 年 7 月 31 日

主持人：柯源悌 中國醫藥大學 營養系 e-mail: irisko@mail.cmu.edu.tw

中文摘要：

依據參與澱粉生合成的酵素群 BE, SSS, GBSS 及 SP 保守區間所設計的基因特異性引子組，對成長中之台南五號綠豆 (*Vigna radiata* L. cv Tainan no. 5) 的 PolyA mRNA 進行反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR) 的 cDNA 選殖，只有 SBE F1 及 SBE R1 引子對，成功的量化出一段 794 bp 的 cDNA。其內部序列經過與 GCG Database 比對，發現和 *Phaseolus vulgaris* 物種的 BE I (kbe1; accession no. AB029548; 3,360 bp) 全長序列的重疊部分有 97% 的相似度，和 *Ipomoea batatas* (sweet potato) 的 SBE II (AB071286; 3,123 bp) 全長序列的重疊部分有 84% 的相似度，經過 PileUp 並排後，所得綠豆 cDNA 序列為靠近中間部位，已將此 cDNA 片段選殖到 pGEM T-Eazy 載體中作為株系保存，命名為 pVrbeIp。為了得到全長序列，目前由所得的 SBE cDNA 片段內部序列已設計引子在單股 cDNA library 中進行 5' 與 3'RACE，3'RACE 反應較平順，獲得之 1,200 bp 定序當中。

關鍵詞：綠豆、澱粉合成酶、基因選殖、RT-PCR

Abstract

Gene-specific primer pairs designed from cDNA conserved motifs of BE, SSS, GBSS and SP, a group of enzymes involved in starch biosynthesis, were used in RT-PCR cloning on the polyA mRNA of premature mung bean (*Vigna radiata* L. cv Tainan no. 5). Only SBE F1 and SBE R1 pairs were successfully amplify a partial-length of cDNA (794 bp) encoding starch branching enzyme (SBEI; 2.4.1.18). The internal

sequence of the amplicon was searched in the GCG database and found to have 97% similarity with *Phaseolus vulgaris* BE I (kbe1; accession no. AB029548; 3,360 bp) and 84% similarity with *Ipomoea batatas* (sweet potato) SBE II (AB071286; 3,123 bp) within the overlapped regions and thus designated VrbeIp. Besides, it was also shown to be located in the central region of the postulated full-length cDNA by PileUp alignment and was then cloned into pGEM T-Eazy vector, designated pVrbeIp for further use. In order to pursue a full-length clone, internal primers were designed from VrbeIp sequence to conduct RACE on the first strand cDNA library. 3'-RACE was performed more smoothly than 5'-RACE and a 1,200 bp fragment were generated and currently subjected to sequencing.

Keyword: Mung bean (*Vigna radiata* L.), Starch synthase, Gene cloning, RT-PCR

二、緣由與目的：

綠豆是亞熱帶栽種的作物，其澱粉為世界上單價最高的澱粉，是中國傳統食品製作冬粉不可或缺的原料，在化學性質方面認為綠豆澱粉的直鏈澱粉 (amylose) 含量約為 32-35%，較一般澱粉的 15-30% 為高，且 amylose 與分支澱粉 (amylopectin) 的分子構造特別，使冬粉具有久煮不爛的韌性，不能為其他種類的澱粉所取代；對於合成澱粉的酵素群，在植物醣類代謝的能量儲存方面不僅具生理上的必要性，不同種類的澱粉合成酶對澱粉的結構扮演關鍵性的角色，然而國內外的澱粉相關研究缺乏對於綠豆澱粉合成酶 (starch synthases) 的探討。

基於許多物種對澱粉生合成酵素 SS、GBSS、SBE 與 SP 在酵素活性方面了解，但將大分子蛋白質完全定序是花費極高的工程及所

獲資訊有限之下，促使尋找其編碼基因變得相對迫切，因為在諸多研究顯示即使同種或異種之異構酶的抗體可相互作用與辨認彼此的蛋白質，或中和彼此的活性，然而無法回答是否異構酶之間在蛋白質的三度空間構形或一級胺基酸有絕對的相似性，然而一旦在核酸層面獲得序列的資訊，得以將編碼基因推衍出其胺基酸序列、與其他基因並排作相似度比對、酵素親源的樹譜、結構的預測等；其基因可利用基因工程技術操作，轉接在不同的啟動子之後、放入不同宿主表現等作多元化分子生物學上探討。本計畫目的是選殖澱粉合成酵素之 cDNA，試驗策略是由綠豆種子先抽 total RNA，再將 total RNA 純化為 polyA RNA，接著利用基因特異性引子進行 RT-PCR，之後將 RT-PCR 得到的產物作 PCR 二次放大、純化、定序，將序列進入資料庫搜尋比對是否為目標產物，再利用 TA-cloning 方法將目標產物殖入質體中，期間抽質體 DNA 作定序，再次進入資料庫比對確認無誤後作株系(clone)保存。所得的 SBE cDNA 片段內部序列再設計引子對 cDNA library 進行 5'與 3'RACE，以獲得全長的 cDNA。

三、材料與方法

材料：

農業改良場台南朴子分廠提供之未成熟台南五號綠豆種子(*Vigna radiata* L. cv Tainan no. 5)

設計基因特異性引子-

利用 GCG SeqWeb 的 Lookup 或 StringSearch 指令搜尋出相似物種序列，利用 Motif Search 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 A 及 Motif B，由 motif A 找 forward primer，由 motif B 找 reverse primer、將此二段序列分別跑 Primer Selection，將找到符合條件的 Primer 再跑 Blastn (確認其專一性)，相似性愈少愈好，再和 α -amylose family conserved region 比對，排除 α -amylose family 的 Motif。

(1).利用 GCG SeqWeb 自行設計引子

命名	序列
SBE-F1	TGGATATTGTTACAGTCATGC

SBE-R1	CTTGGGAAATCTATCCATTTCAGGATGCC
SBE-R2	GGAAATCTATCCATTTCAGGATGCCC
SSS-F1	CTTGACAAGGGTGAGGCAGTC
SSS-F2	CCTTGACAAGGGTGAGGCAGTC
SSS-R1	GCAGTTATTCGGTGGGAAACTGGAACA
SSS-R2	GCAGTTATTCGGTGGGAAACTGGAACAC
SSI-F1	GACTGGTGGATTAGGAGATGTTTGTGG
SSI-R1	CTTAGCCCCCGTCTATGAACAAT
SP-F1	TGGATGGTGCTAATGTGGAAATCAG
SP-R1	CAGGTAACAAGGGTGTTCAGG

(2).由得到之 SBE cDNA 794 bp 片段內部序列設計引子進行 RACE

命名	序列
SBE-F2	AAGATGAGGACTGGAAAATGGGCG
SBE-F3	TCACGGGGTTATCATTGGATGTGGG
SBE-R3	CCGTCAAACCTGTATTCATCCAGCCACC
SBE-R4	TATCGCCATTTCCAGTCC

Total RNA 之抽取

先取 20 ml 抽取緩衝液(100 mM Tris-HCl [pH 7.5]、100 mM LiCl、100 mM EDTA [pH 8.0]、1% SDS、100 mM β -mercaptoethanol)預熱至 65°C，加入 20 ml 等體積之 phenol 作平衡 pH 備用。自 -80°C 冰箱取出 4 g 綠豆種子，加入液態氮以研鉢研磨呈粉末狀後，加入上述之 40 ml 混合溶液並研磨均質。將均質樣品分裝至 50 ml 離心管中，於 65°C 水浴槽中加熱 5 分鐘，震盪混勻，再加入 1/2 體積 Chloroform:isoamylalcohol = 24:1，震盪萃取 1 分鐘，於 4°C 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，再震盪萃取 1 分鐘，於 4°C 以 15,000 rpm 離心 10 分鐘。取出上清液，再加入等體積 Chloroform:isoamylalcohol = 24:1，震盪萃取 1 分鐘，於 4°C 以 15,000 rpm 離心 5 分鐘去除 phenol，此步驟重複二次，取上清液，隨後加入等體積 4 M LiCl，置於 -70°C 冰箱 1-2 小時幫助 RNA 沈澱。於 4°C 以 15,000 rpm 離心 30 分鐘，將沈澱物溶於 10 ml 之 2 M LiCl，以 15,000 rpm 離心 10 分鐘。將沈澱

物加入 5 ml 之 0.1% lauro-sarcosyl，震盪溶解 RNA。取 2 ml 之離心管加入 1ml 之 100%酒精及 40 μ l 醋酸溶液(3M、pH 4.3)，將溶解之 RNA 分裝至離心管中，置於-70°C 冰箱過夜。於 4°C 以 14,000 rpm 離心 15 分鐘後，去除上清液，取 80%酒精清洗沈澱物，於 4°C 以 14,000 rpm 離心 15 分鐘後真空乾燥沈澱。RNA 沈澱物溶於 200 μ l 之 0.1% lauro-sarcosyl，測 total RNA 濃度及 A_{260}/A_{280} 比值，儲存於-80°C。取 5 μ l 跑 RNA 甲醛洋菜膠體電泳確認。

PolyA mRNA 之分離

利用商品化 PolyATtract^R mRNA isolation systems (Promega, Cat. No.5200)。藉由 biotinylated oligo(dT)在高鹽溶液下(20x SSC) (dT)端先會與 mRNA 3'端的 poly(A) tail 以氫鍵鍵結，接著 biotinylated oligo(dT)的 biotin 端會和 SA-PMPs (streptavidin-paramagnetic particles)結合成連結複合物，再利用磁板會物理性吸住 SA-PMPs 後，以低鹽溶液(0.5x 及 0.1x SSC)洗去不吸附的物質，最後以 RNase-free 水將複合物上的 polyA RNA 溶離出來。

取 0.1-1 mg total RNA 加 DEPC 水至總體積為 500 μ l，65°C 下反應 10 分鐘，加 3 μ l oligo(dT) probe 及 13 μ l 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 0.5 x SSC (300 μ l/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 μ l/次) 清洗 SA-PMPs 四次，移除上清液。以 100 μ l RNase Free H₂O 溶離出 poly A RNA，再以 150 μ l RNase Free H₂O 溶離出 poly A RNA，測吸光 $A_{260}/A_{280} \geq 2.0$ 。

RT-PCR

利用 SuperScriptTM One-Step RT-PCR Systems (Invitrogen Cat. No.10928-042)。於 0.2 ml 離心管中依序加入 25 μ l 2X Reaction Mix、10 pg-1 μ g polyA

RNA、10 μ M 的 sense 及 antisense primer 各 1 μ l 及 1 μ l RT/Platinum Taq Mix，最後加水至 50 μ l 混合均勻。進行 RT-PCR 反應，反應條件為：(1) cDNA synthesis and pre-denaturation：45 30 min、94 2 min；(2) PCR amplification：94°C 15 s (Denature)、60°C 30 s (Anneal)、72°C 2 min (Extend)，重複 35 次；(3) Final extension：72°C 10 min。取 5 μ l 跑電泳確認。

PCR

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

PCR 產物純化

使用 PCR-MTM Clean Up System (Viogene Cat. No.PF1001)

(1) 以 Modified TAE buffer (40 mM Tris-acetate、pH8.0，0.1 mM Na-EDTA)製膠。取適量樣品跑膠後，以 UV 確認後，切下條紋 (<100 μ l at 100mg) 放入 column，離心 5000 x g 10 分鐘，收集 Vial 中液體，測吸光值。

(2) 取 10-100 μ l PCR 產物和 0.5 ml Px buffer 混合均勻，取至 column (Millipore Ultrafree-DA, Cat. No.4260)中(每次勿超過 0.7ml)離心 1,3000 rpm 60 秒，加入 0.5 ml WF buffer，離心 1,3000 rpm 60 秒後丟棄流出液。加入 0.7 ml WS buffer，離心 1,3000 rpm 4 分鐘後，換新的 1.5 ml 離心管。加入 30 μ l 的滅菌水，放置 1-2 分鐘，離心 13000 rpm 2 分鐘，此步驟重複二次，測吸光值。

T-A cloning

使用材料有：

pGEM-T Easy Vector Systems (Promega Cat.A1380)

Competent cells:DH5 α 及 JM110

Gel extraction kit (Viogene Cat.GF1001)

抽 plasmid DNA kit (Viogene Cat.EG1001)

LB 固體培養基：LB Broth + Agar + ampicillin/IPTG/X-Gal

LB 液體培養基：LB Broth + ampicillin(100 μ g/ml)

限制酶：EcoRI

【方法】

- (1) 純化：將 SBE 二次放大後的產物跑 1% 電泳分析確認後，切下約 800 bp 的片段，利用 Gel extraction kit (Viogene) 將切下的膠片純化，再次跑膠確認。
- (2) Ligation：取 3 μ l 的樣品依序加入試劑後，加滅菌水至總體積為 10 μ l，室溫下培養 1 小時後，4 隔夜反應。
- (3) Transformation：分別取 5 μ l ligation reactions 加入 50 μ l 之 Competent cells (DH5 α 及 JM110) 混合均勻後，置於冰浴中 20 分鐘後，42 加熱 40-45 秒(heat shock)，冰浴 2 分鐘。加入 950 μ l LB 液體培養基，於 37、150 rpm 震盪培養 1.5 小時，取 1ml 塗抹於 LB/Amp/IPTG/X-Gal 固體培養基，37 隔夜培養。
- (4) 篩選 clone：將 plate 上之 positive clone 培養於 2 ml 的 LB 液體培養基中，37 隔夜培養。以小量抽取 plasmid DNA 套組(Viogene) 得到的質體 DNA，再以限制酶(EcoRI) 作用，將接入載體上之 DNA 切出，確認大小後，進行定序。
- (5) 菌液培養：將剩餘菌液取 20 μ l 加 2ml LB 液體培養基，於 37、150 rpm 震盪隔夜培養。取 800 μ l 加 200 μ l 80% glycerol 保存於-80。

抽質體 DNA

使用抽 plasmid DNA kit (Viogene Cat.EG1001)，取 1.5 ml 菌液離心 2 分鐘，除去上清液，加 250 μ l MX1 buffer 將 pellet 完全溶解後，加 250 μ l MX2 buffer 混勻，室溫下反應 1-5 分鐘，加入 350 μ l MX3 buffer 混勻後，離心 5-10 分鐘。將上清液取至 column 中，離心 60 秒丟棄流出液，加 0.5 ml WF buffer，離心 60 秒丟棄流

出液，再加 0.7 ml WS buffer，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 μ l 的滅菌水，靜置 1-2 分鐘後，離心 2 分鐘。所有的離心轉速為 13,000-14,000 rpm。

RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)

使用 SmartTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech Cat.K1811-1)

(一) First-Strand cDNA Synthesis：

- (1) 取 50 ng-1 μ g 的 polyA mRNA，分別進行 3'-及 5'-RACE Ready cDNA 的合成。
- (2) 3'-RACE-Ready cDNA
於 70 加熱 2 分鐘後置於冰浴 2 分鐘，加入 Mix reaction (2 μ l 5X first-strand buffer、1 μ l 20 mM DTT、1 μ l 10 mM dNTP Mix、1 μ l PowerScript reverse transcriptase)，總體積為 10 μ l。離心混合均勻，42 下反應 1.5 小時，以 100-250 μ l Tricine-EDTA buffer 稀釋，於 72 反應 7 分鐘後。測吸光值，保存於-20。
- (3) 5'-RACE-Ready cDNA
取 1-3 μ l polyA mRNA 加 1 μ l 5'-CDS primer 及 Smart II A oligo，加滅菌水至 5 μ l。於 70 加熱 2 分鐘後置於冰浴 2 分鐘，加入 Mix reaction (2 μ l 5X first-strand buffer、1 μ l 20mM DTT、1 μ l 10 mM dNTP Mix、1 μ l PowerScript reverse transcriptase)，總體積為 10 μ l。離心混合均勻，42 下反應 1.5 小時，以 100-250 μ l Tricine-EDTA buffer 稀釋，於 72 反應 7 分鐘後。測吸光值，保存於-20。

(二) 3' RACE：利用自行設計之基因特異性 forward primer (SBEF1) 和套組提供之 UPM (Universal Primer A Mix) 進行 RACE，再將第一次量化之產物以 TE buffer 稀釋 50-100 倍。由已得到的 SBE cDNA 片段再往內設計 forward primer (SBEF2 及 SBEF3) 和套組提供之 NUP (Nested Universal Primer A)，以稀釋過的產物為 template 再次進行 RACE，得到一段約 1200 bp 的片段，目前進行定序中。

(三) 5' RACE：利用自行設計之基因特異性

reverse primer (SBER1) 和套組提供之 UPM (Universal Primer A Mix) 進行 RACE, 再將第一次量化之產物以 TE buffer 稀釋 50-100 倍。由已得到的 SBE cDNA 片段再往內設計 reverse primer (SBER3 及 SBER4) 和套組提供之 NUP (Nested Universal Primer A), 以稀釋過的產物為 template 再次進行 RACE, 目前尚未得到較確定的片段。

四、結果與討論:

Total RNA 之抽取:

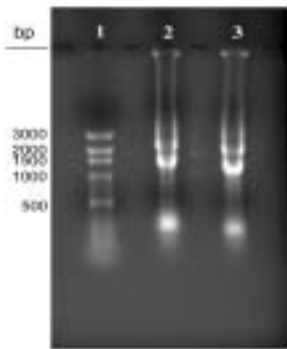


Fig. 1 綠豆的 Total RNA

Lane 1 是 DNA ladder marker; Lane 2 和 3 是同一批抽到之 total RNA, 樣品量分別為 220 ng 與 370ng。

由 4 g 綠豆種子抽得之 total RNA 總量約 1.18 mg。在 RNA gel 上看出抽得之 total RNA 主要有二條明顯的條紋分別為 28 S 及 18 S, 其中分子量較低的條紋可能為已裂解之 RNA, 因此接著純化 polyA RNA 獲得 6 μg。

RT-PCR 產物經 PCR 二次放大

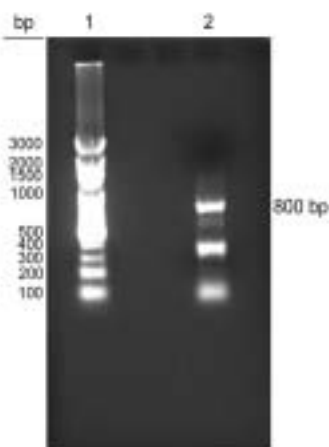


Fig. 2 以 SBE-F1 與 SBE-R1

為引子的 RT-PCR 經二次 PCR 放大的產物
Lane 1 是 DNA ladder marker 樣品量 600 ng; Lane 2 是 PCR 二次放大產物。

將 polyA RNA 以四種酵素基因特異性引子進行

RT-PCR, 只有 SBE-F1 與 SBE-R1 成功得到一條約 800 bp 的產物(結果未示), 但因條紋不明顯, 產量不足以進行定序, 因此, 將 800 bp 產物切出、純化作為模板, 以 SBE-F1 與 SBE-R1 為引子進行二次 PCR 放大。結果得到三條明顯的條紋, 其中分子量最大的 800 bp 條紋大小和原 RT-PCR 所得的 800 bp 產物相同, 因此將其切下、純化、定序、隨後確認為 BEI 的部分序列、命名為 Vrbelp。

Vrbelp cDNA 序列比對

	1401	1450
AB029548	tgtacacagt cattcatcaa ataatacatt ggatgggcta aacatgtttg	
SBE-SBEF	-----TTT TTAGTGTCTC CGATTCTTTG AGATGGCTAG CATAGCTTTG	
Consensus	-----T -----TC-- --A-T---T- -GATGG---- -A-A---TTTG	
	1451	1500
AB029548	atggaactga tggtcattac ttccatcctg ggtcacgagg ttatcattgg	
SBE-SBEF	ATGGAACTGA TAGTCATTAC TTCCATCCTG GGTACAGGGG TTATCATTGG	
Consensus	ATGGAACTGA T-GTCATTAC TTCCATCCTG GGTACAG-GG TTATCATTGG	
	1501	1550
AB029548	atgtgggatt ctgcctttt caattatgga agctgggaag tattaaggta	
SBE-SBEF	ATGTGGGATT CTCGTCCTTT CAATTATGGA AGCTGGGAAG TACTAAGGTA	
Consensus	ATGTGGGATT CTCG-CTTTT CAATTATGGA AGCTGGGAAG TA-TAAGGTA	
	1551	1600
AB029548	tctactttca aatgcgagat ggtggctgga tgaatacaag tttgacggat	
SBE-SBEF	TCTACTTTCA AATGCAAGAT GGTGGCTGGA TGAATACAAG TTTGACGGAT	
Consensus	TCTACTTTCA AATGC-AGAT GGTGGCTGGA TGAATACAAG TTTGACGGAT	
	1601	1650
AB029548	ttcgatttga tgggtttaca tcaatgatgt acactcatca tggattgcag	
SBE-SBEF	TTCGATTTGA TGGTGTTACA TCAATGATGT ACACATCATCA TGGTGTGCAG	
Consensus	TTCGATTTGA TGGTGTTACA TCAATGATGT ACACATCATCA TGG-TTGCAG	
	1651	1700
AB029548	gtagcattca ctggaaatta cagtgagtac tttggtttgg caactgatgt	
SBE-SBEF	GTAGCATTCA CTGGAAATTA CAGTGAGTAC TTTGGTATGG CAACTGATGT	
Consensus	GTAGCATTCA CTGGAAATTA CAGTGAGTAC TTTGGT-TGG CAACTGATGT	
	1701	1750
AB029548	tgatgctgtg gtttacctga tgctggctaa tgatctcatt catggactct	
SBE-SBEF	TGATGCTGTG GTTTACCTGA TGCTGGCTAA TGATCTCATT CATGGGCTCT	
Consensus	TGATGCTGTG GTTTACCTGA TGCTGGCTAA TGATCTCATT CATGG-CTCT	
	1751	1800
AB029548	tccctgaggc agttaccatt ggtgaagatg tgagtggaat gccaacattc	
SBE-SBEF	TCCCGAGGC TGTACCATT GGTGAAGATG TGAGTGAAT GCCAACATTTC	
Consensus	TCCC-GAGGC -GTTACCATT GGTGAAGATG TGAGTGAAT GCCAACATTTC	
	1801	1850
AB029548	tgcccttcta cacaagatgg tgggttgggt ttgattatc gcctgcaaat	
SBE-SBEF	TGCCCTTCTA CACAAGATGG TGGTGTGGT TTTGATTATC GCCTGCAAAAT	
Consensus	TGCCCTTCTA CACAAGATGG TGG-GTTGGT TTTGATTATC GCCTGCAAAAT	
	1851	1900
AB029548	ggccattgca gacaagtga ttgagattct caagaagcaa gatgaggact	
SBE-SBEF	GGCCATTGCA GACAAGTGA TTGAGATTCT CAAGAAGCAA GATGAGGACT	
Consensus	GGCCATTGCA GACAAGTGA TTGAGATTCT CAAGAAGCAA GATGAGGACT	
	1901	1950
AB029548	ggaaaatggg tgatattgtg cacacactaa caaacagaag gtggctggaa	
SBE-SBEF	GGAAAATGGG CGATATTGTC CACACACTAA CAAACAGAAG ATGGCTGGAA	
Consensus	GGAAAATGGG -GATATTGT- CACACACTAA CAAACAGAAG -TGGCTGGAA	
	1951	2000
AB029548	aatgtgtag cttatgctga gactcatgac caggccttgg ttggtgacaa	
SBE-SBEF	AAATGTGTAG CTTATGCTGA GAGTCATGAT CAGGCCTTGG TTGGTGACAA	
Consensus	AAATGTGTAG CTTATGCTGA GAGTCATGA- CAGGCCTTGG TTGGTGACAA	

```

2001                               2050
AB029548 gacaattgca ttttggttga tggacaagga tatgtatgac ttcattgtctt
SBE-SBEF GACAATTGCA TTTTGTTGA TGGACAAGGA TATGTATGAC TTCATGGCGT
Consensus GACAATTGCA TTTTGTTGA TGGACAAGGA TATGTATGAC TTCATG-C-T

2051                               2100
AB029548 tagacagccc agctacacct cgtatagatc gtggtatagc attacacaaa
SBE-SBEF TAGACAGGCC ATCTACACCT CGTATAGATC GTGGTATAGC ATTACACAAA
Consensus TAGACAGGCC A-CTACACCT CGTATAGATC GTGGTATAGC ATTACACAAA

2101                               2150
AB029548 atgattagcc ttattaccat gggacttggg ggtgaaggat atttaaattt
SBE-SBEF ATGATTAGCC TTATTACCAT GGGACTTGGT GGTGAAGGAT ATTTGAATTT
Consensus ATGATTAGCC TTATTACCAT GGGACTTGGT GGTGAAGG-T ATTT-AATTT

2151                               2200
AB029548 tatggggaat gagtttggtc atcctgagtg gattgatttc ccaaggggtg
SBE-SBEF TATGGGAAT GAGTTTGGCC TCCTTGATGG GAAGAATTCC CCAAGAAAAA
Consensus TATGGGAAT GAGTTTGG-C --C-TGA--G GA---ATT-C CCAAG-----

```

Fig. 3 綠豆 VrbeIp 與 *Phaseolus vulgaris* 物種的 BE I (kbe1; accession no. AB029548; 3360 bp) cDNA 的並排序列與相同核酸區域比對

得到之 SBE 片段 (794 bp) 經 GCG Database 比對和 *Phaseolus vulgaris* 物種的 BEI (kbe1; accession no. AB029548; 3,360 bp) 序列 bp 1408-2201 之間有 97% 的相似度。此外和 *Ipomoea batatas* (sweet potato) 的 SBE II (AB071286; 3,123 bp) 全長序列的重疊部分有 84% 的相似度(比對序列未示)，因此確認找到綠豆的 BEI 部分序列、命名為 VrbeIp。

pVrbeIp 株系的保存

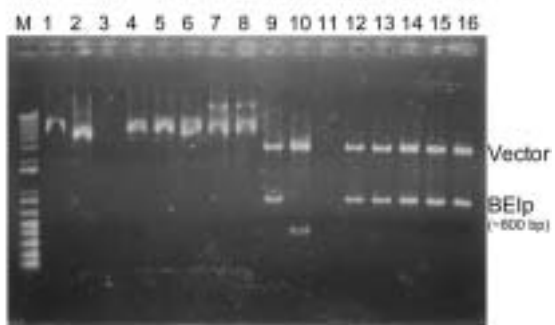


Fig. 4 轉形(transform)入宿主的 pVrbeIp 正株系確認

Lane M 是 marker; Lane 1-6 是 DH5α₁₋₆ 株系抽得之 intact plasmid DNA; Lane 7-8 是 JM110₃₋₄ 株系抽得之 intact plasmid DNA; Lane 9-14 是 DH5α₁₋₆ 株系抽得之 plasmid DNA 以限制酶 EcoRI 作用; Lane 15, 16 是 JM110₃₋₄ 株系抽得之 plasmid DNA 以限制酶 EcoRI 作用。

以 T-A cloning 將 VrbeIp 保存於 pGEM-T Easy vector 中轉形入 DH5α 與 JM110 得到 6 個與 2 個 white colonies。將這 8 個 clones 抽質體 DNA, 以 EcoRI 切, 由 Lane10 可知 DH5α₂ 得到的片段較小, 非目標基因; Lane 3、11 可知 DH5α₃ 是 False-positive clone; 其餘 6 株皆是成功獲得的 pVrbeIp clones。

3' RACE :

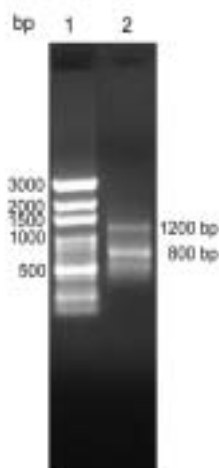


Fig. 5 3' RACE 產物

Lane1:marker; Lane2:
3'RACE 產物

3' RACE 產物獲得是先利用 forward primer (SBEF1) 和套組提供之 UPM (Universal Primer A Mix) 對 1st strand cDNA 進行 RACE 反應後, 將第一次量化之產物以 TE buffer 稀釋 50-100 倍。再利用已得到的 VrbeIp cDNA 片段往內設計之 forward primer (SBEF3) 和套組提供之 NUP (Nested Universal Primer A), 以上述稀釋過的產物為 template 再次進行 RACE, 接著將第二次 RACE 量化之產物以 TE buffer 稀釋 50-100 倍, 以 SBE F2 和套組提供之 NUP 再次進行 RACE, 結果得到三條紋, 其中第一條 band 約 1,200 bp、第二條 band 約 800 bp。已將此二 band 切下、純化、目前正在定序中。

五、計畫成果自評:

本計畫執行方向大致與原計畫相符合, 但是沒有建立綠豆的 cDNA Library 於 phage vector 而是以 1st strand cDNA 保存於溶液當中伺機利用 PCR 作選擇性的量化, 也因為目前研究以 RACE 技術獲得

full length cDNA 的研究報告很多，因而我們得以順利的選殖出 partial cDNA 的 clone，可用作 hybridization probe。本計畫在補助一年期間內，讓本實驗室建立了分子生物實驗的基礎，與指導目前碩士班二年級研究生石韻琦共同完成，目前正進入狀況，因此希望未來可繼續獲得經費支助，得以進行後續將澱粉生合成酵素當作功能性基因之具有實用價值的探討。

六、參考文獻：

1. Abel, G.J.W.; Springer, F.; Willmitzer, L.; Kossmann, J. Cloning and functional analysis of a cDNA encoding a novel 139 kDa starch synthase from potato (*Solanum tuberosum* L.). *The Plant Journal* 1996, 10, 981-991.
2. Baba, T.; Nishihara, M.; Mizuno, K.; Kawasaki, T.; Shimada, H.; Kobayashi, E.; Ohnishi, S.; Tanaka, K.; Arai, Y. Identification, cDNA cloning, and gene expression of soluble starch synthase in rice (*Oryza sativa* L.) immature seeds. *Plant Physiology* 1993, 103, 565-573.
3. Baga, M.; Nair, R.B.; Repellin, A.; Scoles, G.J.; Chibbar, R.N. Isolation of a cDNA encoding a granule-bound 152-kilodalton starch-branching enzyme in wheat. *Plant Physiol* 2000, 124, 253-263.
4. Clark, J.R.; Robertson, M.; Alnsworth, C.C. Nucleotide sequence of a wheat (*Triticum aestivum*) cDNA clone encoding the waxy protein. *Plant Molecular Biology* 1991, 16, 1109-1101.
5. Dry, I.; Smith, A.; Edwards, A.; Bhattacharyya, M.; Dunn, P.; Martin, C. Characterization of cDNAs encoding two isoforms of granule-bound starch synthase which show differential expression in developing storage organs of pea and potato. *The Plant Journal* 1992, 2, 193-202.
6. Fisher, D.K.; Kim, K.N.; Gao, M.; Boyer, C.D.; Guiltinan, M.J. A cDNA encoding starch branching enzyme I from maize endosperm. *Plant Physiol* 1995, 108, 1313-1314.
7. Gao, M.; Fisher, D.K.; Kim, K.N.; Shannon, J.C.; Guiltinan, M.J. Independent genetic control of maize starch-branching enzymes IIa and IIb. Isolation and characterization of a Sbe2a cDNA. *Plant Physiol* 1997, 114, 69-78.
8. Gao, M.; Chibbar, R.N. Isolation, characterization, and expression analysis of starch synthase IIa cDNA from wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genome* 2000, 43, 768-775.
9. Harn, C.; Knight, M.; Ramakrishnan, A.; Guan, H.; Keeling, P.L.; Wasserman, B.P. Isolation and characterization of the zSSIIa and zSSIIb starch synthase cDNA clones from maize endosperm. *Plant Molecular Biology* 1998, 37, 639-649.
10. Kossmann, J.; Abel, G.J.W.; Springer, F.; Lloyd, J.R.; Willmitzer, L. Cloning and functional analysis of a cDNA encoding a starch synthase from potato (*Solanum tuberosum* L.) that is predominantly expressed in leaf tissue. *Planta* 1999, 208, 503-511.
11. Lycett, G.W.; Delauney, A.J.; Zhao, X.C.; Gatehouse, J.A.; Croy, R.R.D.; Boulter, D. Two cDNA clones coding for the legumin protein of *Pisum sativum* L., sequence repeats. *Plant Mol. Biol.* 1984, 3, 91-96.
12. Nair, R.B.; Baga, M.; Scoles, G.J.; Kartha, K.K.; Chibbar, R.N. Isolation, characterization and expression analysis of a starch branching enzyme IIcDNA from wheat. *Plant Science (Limerick)* 1997, 122, 153-163.
13. Nakamura, Y.; Yamanouchi, H. Nucleotide sequence of a cDNA encoding starch-branching enzyme, or Q-enzyme I, from rice endosperm. *Plant Physiol.* 1992, 199, 1265-1266.
14. Poulsen, P.; Kreiberg, J.D. Starch branching enzyme cDNA from *Solanum tuberosum*. *Plant Physiol* 1993, 102, 1053-1054.
15. Rosa A.P.B.D.L.; Estrella A.H.; Utsumi S.; Lopez O.P. Molecular characterization, cloning and structural analysis of a cDNA encoding an amaranth globulin. *Plant Physiol.* 1996, 149, 527-532.
16. Salehuzzaman, S.N.I.M.; Jacobsen, E.; Visser, R.G.F. Cloning, partial sequencing and expression of a cDNA coding for branching enzyme in cassava. *Plant Molecular Biology* 1992, 20, 809-819.
17. Salehuzzaman, S.N.I.M.; Jacobsen, E.; Visser, R.G.F. Isolation and characterization of a cDNA encoding granule-bound starch synthase in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and its antisense expression in potato. *Plant Molecular Biology* 1993, 23, 947-962.