

# 小麦抗虫 $\alpha$ -淀粉酶抑制因子成熟蛋白编码基因序列分析 Sequence Analysis of $\alpha$ -amylase Inhibitors Genes with Resistance to Insects in Wheat and *Aegilops*

王际睿, 颜泽洪, 魏育明, 郑有良\*

WANG Ji-Rui, YAN Ze-Hong, WEI Yu-Ming and ZHENG You-Liang\*

四川农业大学小麦研究所, 都江堰 611830

*Triticeae Research Institute, Sichuan Agricultural University, Dujiangyan 611830, China*

**摘要** 对 17 份小麦和山羊草材料的小麦抗虫 24kD  $\alpha$ -淀粉酶抑制因子成熟蛋白编码基因进行了分离克隆和序列分析。结果发现, 在二倍体材料中  $\alpha$ -淀粉酶抑制因子由单个基因编码, 而在普通小麦中是以多拷贝的形式存在。从中得到 17 个 24kD  $\alpha$ -淀粉酶抑制因子基因, 其中 2 个来自普通小麦与 1 个来自粗山羊草的基因编码的抑制因子与 WDAI 0.19 的氨基酸序列完全相同, 为同一蛋白。在普通小麦中得到 1 个编码蛋白质与 WDAI 0.53 十分相似的基因。序列分析表明, 24kD  $\alpha$ -淀粉酶抑制因子成熟蛋白编码基因在序列大小与核酸组成上都十分相似, 一致性达到 91.2%。这说明小麦和山羊草中 24kD  $\alpha$ -淀粉酶抑制因子基因可能起源于相同原始基因。

**关键词**  $\alpha$ -淀粉酶抑制因子, 序列分析, 小麦, 山羊草

中图分类号 Q754 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2005)05-0737-06

**Abstract** The  $\alpha$ -amylase inhibitors have been proposed as possibly important weapons against pests. Thus, it is of importance to identify the specificity of them. Based on the EST data of  $\alpha$ -amylase inhibitor genes that were retrieved from NCBI, BBSRC and GrainGenes, two PCR primers were designed. The coding sequences of 24 kD dimeric  $\alpha$ -amylase inhibitors with resistance to insects in 17 wheat and *Aegilops* accessions were investigated and 17 new genes were obtained. Only one 24 kD  $\alpha$ -amylase inhibitor gene was found in each diploid wheat and *Aegilops* accession, whereas 8 genes were characterized from one hexaploid wheat variety, indicating that the 24 kD  $\alpha$ -amylase inhibitors in hexaploid wheat were encoded by multi-gene. The deduced amino acid sequences of 2 genes from common wheat and 1 gene from *Ae. tauschii* were the same as the sequence of the inhibitor 0.19, and the deduced amino acid sequence of another gene from common wheat was similar to the inhibitor 0.53 with only one amino acid difference. The amino acid sequences of 24 kD dimeric  $\alpha$ -amylase inhibitors shared very high coherence (91.2%). These results suggest that the  $\alpha$ -amylase inhibitors in 24 kD family were derived from common ancestral genes by phylogenesis.

**Key words**  $\alpha$ -amylase inhibitor, sequence analysis, wheat, *Aegilops*

Received: April 22, 2005; Accepted: June 9, 2005.

This work was supported by the grants from the National High Technology Research and Development Program of China (863 program No. 2003AA207100), the Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (IRT0453), and the Foundation for the Author of National Excellent Doctoral Dissertation of China (No. 200357 and 200458).

\* Corresponding author. Tel: 86-835-2882620; E-mail: ylzhang@sicau.edu.cn

国家 863 项目(2003AA207100), 长江学者和创新团队发展计划(IRT0453), 高等学校全国优秀博士学位论文作者专项资金项目(No. 200357 和 200458)

由于受到各种害虫的攻击,每年世界上的粮食会减产 37%<sup>[1]</sup>。淀粉类的植物种子富含蛋白质、糖、脂质,因此容易受到害虫(特别是象鼻虫)的“攻击”。通常植物本身有一些抵抗害虫的机制,在一定程度上可以减低害虫的危害,这些机制是在植物长期进化过程中形成的<sup>[2]</sup>。参与植物自身的防御体系有抗生素、生物碱、萜烯、氰化物和一些蛋白质,而酶抑制因子就是蛋白质类中重要的一种。

$\alpha$ -淀粉酶抑制因子属于糖(苷)水解酶抑制因子,是一个庞大的蛋白质家族,目前在医药和农业上具有广泛的用途。临床医学上用于防治糖尿病、高血糖、高血脂等病症;农业上  $\alpha$ -淀粉酶抑制因子基因可作为抗虫基因,改良植物抗虫性,减少杀虫剂的使用。另外,在酶学研究方面,可作为探究  $\alpha$ -淀粉酶活性部位的分析工具,通过选择作用来测定  $\alpha$ -淀粉酶同工酶的反应物,也可作为建立蛋白质与蛋白质之间识别与相互作用的模拟体系<sup>[3]</sup>。麦类作物中存在可抑制  $\alpha$ -淀粉酶活性的且在胚乳中合成的多种蛋白,称为  $\alpha$ -淀粉酶抑制因子;按其分子量可分为三类:第一类抑制麦类作物  $\alpha$ -淀粉酶与枯草杆菌蛋白酶,在大麦、小麦、黑麦中都存在;第二、三类抑制哺乳动物  $\alpha$ -淀粉酶、胰蛋白酶与昆虫的  $\alpha$ -淀粉酶,在农业害虫生物防治与疾病治疗中常作为蛋白抑制物加以利用<sup>[4,6]</sup>。

小麦种子中含有丰富的抗虫  $\alpha$ -淀粉酶抑制因子,能抑制多种来自昆虫和哺乳动物的外源或内源  $\alpha$ -淀粉酶。部分  $\alpha$ -淀粉酶抑制因子只专一针对昆虫淀粉酶,因为其对来源于昆虫的酶有强抑制作用,而对来源于哺乳动物的唾液淀粉酶和胰淀粉酶作用却很小或者没有<sup>[4,7]</sup>。其中,对分子量为 12kD(0.28 家族)和 24kD(0.19 家族)的两个抑制因子家族研究较多<sup>[8]</sup>。24kD 二聚  $\alpha$ -淀粉酶抑制因子是一类天然的抗虫蛋白,对某些害虫的  $\alpha$ -淀粉酶具有抑制作用,该家族中抑制因子均为 124 个氨基酸残基的小蛋白质,其中 WDAI 0.19 和 WDAI 0.53 两个因子在氨基酸序列上仅有 7 个位置发生替换,有 94% 的同源性,但是 0.19 因子作用范围非常广泛,而 0.53 因子则专一作用于昆虫  $\alpha$ -淀粉酶,对同一淀粉酶的抑制活力也存在 100 倍的差异<sup>[1]</sup>。Oda 等对 0.19 因子的晶体结构做了详细研究,目前它是谷物  $\alpha$ -淀粉酶抑制因子中唯一一个已知 3D 结构的蛋白因子(PDB ID-code: 1HSS),对于其与哺乳动物、昆虫  $\alpha$ -淀粉酶的作用机理也有了深入的研究<sup>[9]</sup>。

植物种子和其他器官中的  $\alpha$ -淀粉酶抑制因子能

有效控制食叶类昆虫的数量<sup>[10]</sup>,特别是控制以淀粉作为主要能量来源的昆虫<sup>[11]</sup>。Bt 基因抗虫谱十分有限,无法对付西部玉米食根虫(western corn rootworm)等农作物害虫,因为 Cry 蛋白无法结合到这种害虫的肠膜上而不能发挥作用<sup>[12]</sup>。相反,  $\alpha$ -淀粉酶抑制因子对几个目的昆虫均有毒性作用,抗虫谱较广,可以弥补 Bt 毒蛋白的这一缺陷。虽然大多数害虫可以利用多种不同特性的  $\alpha$ -淀粉酶来消化植物淀粉获取能量,使得没有特效的  $\alpha$ -淀粉酶抑制因子抑制所有种类的  $\alpha$ -淀粉酶。但是,人们仍然可通过植物基因工程手段利用  $\alpha$ -淀粉酶抑制因子来控制害虫<sup>[8]</sup>。1990 年 Altabella 和 Chrispeels 将菜豆中的  $\alpha$ AI 基因转入烟草并成功表达,其表达产物可以结合到猪胰腺淀粉酶(pig pancreas -amylase, PPA)上<sup>[13]</sup>。1995 年 Hartmut 等将菜豆中  $\alpha$ AI21 的基因成功转入两种豆科作物豌豆和豇豆,利用 PHA 的启动子获得  $\alpha$ AI21 蛋白的高效表达,  $\alpha$ AI 可以抑制豌豆象岬幼虫的早期发育,这样可以减少大量损失,转基因植物具有明显的抗虫性<sup>[14]</sup>。如果将小麦 24kD 二聚  $\alpha$ -淀粉酶抑制因子用于植物转基因抗虫,安全性好,更易于人们接受。但是,目前还没有从基因水平上研究不同  $\alpha$ -淀粉酶抑制因子间的差异,而无法选择合适的抑制因子基因进行植物转基因遗传改良,以达到对不同来源的  $\alpha$ -淀粉酶的抑制作用。本研究的目的就是对小麦抗虫 24kD  $\alpha$ -淀粉酶抑制因子基因进行分离克隆与序列分析,为筛选优异抗虫基因提供基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

共选用 17 份小麦和山羊草材料用于小麦抗虫 24kD  $\alpha$ -淀粉酶抑制因子基因的分离克隆,其中包括 5 份一粒小麦(*Triticum monococcum*  $2n = 2x = 14$ ,  $A^m A^m$ )、5 份乌拉尔图小麦(*T. urartu*,  $2n = 2x = 14$ ,  $A^m A^m$ )、3 份粗山羊草(*Ae. tauschii*  $2n = 2x = 14$ , DD)、3 份拟斯卑尔脱山羊草(*Ae. speltooides*  $2n = 2x = 14$ , SS)和六倍体普通小麦川农 1(表 1)。所有材料由四川农业大学小麦研究所提供。

### 1.2 方法

1.2.1 小麦  $\alpha$ -淀粉酶抑制因子数据的收集与分析:以小麦  $\alpha$ -淀粉酶抑制因子编码基因 BE423110 为基础,在 BBSRC 禾谷类功能基因组(<http://www.cerealsdb.uk.net/index.htm>)、NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)和 GrainGenes(<http://wheat.pw.usda.gov/>)和

gov)数据库中进行 Blast 比较,得到小麦及近缘物种  $\alpha$ -淀粉酶抑制因子核酸数据(表 1)。

1.2.2 DNA 提取:将 1 粒种子在黑暗条件下发芽,

取黄化苗,采用 CTAB 法提取 DNA。具体操作按 Yan 等(2002)的方法<sup>[15]</sup>进行。

表 1 供试材料以及克隆得到的  $\alpha$ -淀粉酶抑制因子成熟蛋白编码基因编号  
Table 1 The sequences of the  $\alpha$ -amylase inhibitor genes in wheat and *Aegilops* accessions

Species	Genome	Accession	GenBank number
<i>T. monococcum</i>	A <sup>m</sup>	As261	AY729685
		PI 428149	no sequence obtained
		PI 428152	no sequence obtained
		PI 428154	no sequence obtained
		PI 428156	no sequence obtained
<i>T. urartu</i>	A <sup>n</sup>	PI 428197	AY856086
		PI 428208	no sequence obtained
		PI 428257	no sequence obtained
		PI 428328	AY856087
		PI 487268	no sequence obtained
<i>Ae. speltoides</i>	S	PI 487231	AY856089
		PI 487232	AY856090
		PI 487233	AY856091
<i>Ae. tauschii</i>	D	As69	AY729679
		PI 499262	AY856085
		PI 486266	AY856084
<i>T. aestivum</i>	ABD	Chuamong 16 *	AY729672-AY729678 AY834214

1.2.3 PCR 扩增:为了扩增出  $\alpha$ -淀粉酶抑制因子成熟蛋白编码基因,根据序列比对的结果设计了 1 对位于编码区内的保守引物 P1 (5'-CTATGTATGCTCGTGGCGAC-3')和 P2(5'-ACTCATT/CGCTTGACTAGGC-3')。PCR 扩增使用 GeneAmp PTC-200 cycler(MJ Research, USA)型 PCR 仪。50  $\mu$ L 反应体系包括 200 ~ 300ng 总 DNA、200  $\mu$ mol/L dNTPs、引物各 4  $\mu$ mol/L、1U *Taq* polymerase、1.5 mmol/L  $Mg^{2+}$  和 1  $\times$  PCR buffer。反应程序为 95 $^{\circ}$ C 5min 预变性、然后 95 $^{\circ}$ C 1min、60 $^{\circ}$ C 30s 和 72 $^{\circ}$ C 1min 连续 40 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。

1.2.4 PCR 片段克隆、序列测定与分析:将 PCR 产物直接纯化后测序,发现二倍体材料的产物为单一组成,而普通小麦的产物为混合成分。因此,普通小麦 PCR 产物克隆到 pBlueScript SK(+)-T 载体测序,测序由商业公司(华大中生)进行。感受态细胞制作、阳性克隆筛选参照 Wang 等(2004)方法<sup>[16]</sup>。利用 NCBI 网址中的 blast 等分析软件以及 DNAMAN 4.0 进行 DNA 序列拼接、核苷酸与氨基酸序列分析。

## 2 结果和分析

### 2.1 $\alpha$ -淀粉酶抑制因子编码基因克隆与测序

对 BBSRC、NCBI 和 GrainGenes 中小麦 24kD 家族  $\alpha$ -淀粉酶抑制因子编码基因以及其同源 EST 序列比较得知, $\alpha$ -淀粉酶抑制因子编码基因内没有内含子。用 P1/P2 引物扩增 17 份供试材料,在乌拉尔图小麦 PI428208、PI428257 和 PI487268,拟斯卑尔脱山羊草 PI428149、PI428152、PI428154 和 PI428156 中未能得到扩增产物。在其他材料中得到 1 个特异性扩增片段,其分子量约为 400bp。PCR 产物显示 P1/P2 引物扩增产物为同一大小的片段,在不同物种间没有差异。将 PCR 产物纯化后直接测序,来自二倍体材料的 PCR 产物由单一 DNA 片段组成,而来自普通小麦的 PCR 产物测序结果出现多处杂峰,推测是由于产物中有多种 DNA 片段,因此将由普通小麦中克隆得到的  $\alpha$ -淀粉酶抑制因子成熟蛋白编码基因回收并连接到 pBlueScript SK(+)-T 载体,筛选得到 8 个阳性克隆,将阳性克隆分别测序。测序结果表明,在

普通小麦中 24kD 家族  $\alpha$ -淀粉酶抑制因子具有不同编码基因,且以多拷贝形式存在。

## 2.2 核苷酸序列分析

利用 DNAMAN 4.0 对 17 个来自于二倍体小麦、二倍体山羊草与普通小麦的  $\alpha$ -淀粉酶抑制因子成熟蛋白编码基因进行比对分析发现,多数基因长度均为 375bp,核苷酸组成上具有很高的一致性(96.01%),没有大片的插入与缺失,仅来自一粒小麦 As261 和拟斯卑尔托山羊草 PI487232 的两个基因为 376bp,其变异为单个碱基的插入(图 1)。在整个成熟蛋白编码基因中共有 43 处具有一定频率的单碱基突变,其中多数为单核苷酸多态性(SNP)位点。

## 2.3 氨基酸序列分析

根据通用三联体密码推导的  $\alpha$ -淀粉酶抑制因子成熟蛋白氨基酸序列对比分析发现仅有少数碱基突变能导致氨基酸序列的变化(表 2),且多数引起氨基酸序列改变的核酸突变发生在三联体密码的前两位。

将  $\alpha$ -淀粉酶抑制因子成熟蛋白氨基酸序列与 WDAI0.19、WDAI0.53 分别进行一致性比较,发现来自粗山羊草和普通小麦的  $\alpha$ -淀粉酶抑制因子 AY856084、AY856085、AY729672 和 AY729676 与

WDAI0.19 完全相同,属于同一种抑制因子;而来自普通小麦的 AY729674 和 AY729678 与 WDAI0.19 差异最大;与 WDAI0.53 最一致的是来自普通小麦的 AY834214,而差异最大的是 AY729674 和 AY729678 (表 3)。

表 2 由核苷酸突变引起的氨基酸序列变化  
Table 2 The amino acid variations in the encoding regions resulted from the nucleotide changes

No.	Position *	Nucleotide substitution	Amino acid variation
1	10	TAT-CAG	Try-Gln
2	13	AAG-CAG	Lys-Gln
3	19	GGC-GCC	Gly-Ala
4	23	CTG-GTG-TTG	Val-Leu
5	25	AAG-AGG	Lys-Arg
6	47	CCA-CGA-CAA	Asp-Asn-His
7	70	CGT-CCG	Val-Ala
8	71	GCA-GTC	Gln-Ser
9	82	AAG-ACG	Ser-Arg
10	100	CAG-CAA	Lys-Arg
11	105	CGT-CAT	Ile-Val
12	117	GGG-GGA	Gly-Asp

Note: \* From the first codon.

表 3  $\alpha$ -淀粉酶抑制因子成熟蛋白氨基酸序列与 WDAI0.19 与 WDAI0.53 的一致性比较结果

Table 3 Identity of  $\alpha$ -amylase inhibitors with WDAI0.19 and WDAI0.53

GenBank accession	Resources	Identity with WDAI0.19/%	Identity with WDAI0.53/%
AY729672	<i>T. aestivum</i>	100	94.35
AY729673	<i>T. aestivum</i>	99.19	93.55
AY729674	<i>T. aestivum</i>	88.71	87.10
AY729675	<i>T. aestivum</i>	99.13	93.55
AY729676	<i>T. aestivum</i>	100	94.35
AY729677	<i>T. aestivum</i>	90.32	92.74
AY729678	<i>T. aestivum</i>	88.71	87.10
AY834214	<i>T. aestivum</i>	95.16	99.19
AY856086	<i>T. uaratu</i>	95.16	95.97
AY856087	<i>T. uaratu</i>	95.16	95.97
AY856089	<i>Ae. speltooides</i>	90.32	89.52
AY856091	<i>Ae. speltooides</i>	91.13	91.13
AY729679	<i>Ae. tauschii</i>	99.19	93.55
AY856084	<i>Ae. tauschii</i>	100	94.35
AY856085	<i>Ae. tauschii</i>	100	94.35

AY729672	AGTGGTCCCTGGATGTGCTATCCGGGGAAGCCTTCAGGTTCCCGCGCTCCCTCCCTGTGCTGCCATTCGTGAGCTCCAGTGCATGGCAGCA	95
AY729673	AGTGGTCCCTGGATGTGCTATCCGGGGAAGCCTTCAGGTTCCCGCGCTCCCTCCCTGTGCTGCCATTCGTGAGCTCCAGTGCATGGCAGCA	95
AY729674	AGTGGTCCCTGGATGTGCTATCCGGGGAAGCCTTCAGGTTCCCGCGCTCCCTCCCTGTGCTGCCATTCGTGAGCTCCAGTGCATGGCAGCA	95
AY729675	AGTGGTCCCTGGATGTGCTATCCGGGGAAGCCTTCAGGTTCCCGCGCTCCCTCCCTGTGCTGCCATTCGTGAGCTCCAGTGCATGGCAGCA	95
AY729676	AGTGGTCCCTGGATGTGCTATCCGGGGAAGCCTTCAGGTTCCCGCGCTCCCTCCCTGTGCTGCCATTCGTGAGCTCCAGTGCATGGCAGCA	95
AY729677	AGTGGTCCCTGGATGTGCTATCCGGGGAAGCCTTCAGGTTCCCGCGCTCCCTCCCTGTGCTGCCATTCGTGAGCTCCAGTGCATGGCAGCA	95
AY729678	AGTGGTCCCTGGATGTGCTATCCGGGGAAGCCTTCAGGTTCCCGCGCTCCCTCCCTGTGCTGCCATTCGTGAGCTCCAGTGCATGGCAGCA	95
AY729684	AGTGGTCCCTGGATGTGCTATCCGGGGAAGCCTTCAGGTTCCCGCGCTCCCTCCCTGTGCTGCCATTCGTGAGCTCCAGTGCATGGCAGCA	95
AY729685	AGTGGTCCCTGGATGTGCTATCCGGGGAAGCCTTCAGGTTCCCGCGCTCCCTCCCTGTGCTGCCATTCGTGAGCTCCAGTGCATGGCAGCA	95
AY834214	AGTGGTCCCTGGATGTGCTATCCGGGGAAGCCTTCAGGTTCCCGCGCTCCCTCCCTGTGCTGCCATTCGTGAGCTCCAGTGCATGGCAGCA	95
AY856084	AGTGGTCCCTGGATGTGCTATCCGGGGAAGCCTTCAGGTTCCCGCGCTCCCTCCCTGTGCTGCCATTCGTGAGCTCCAGTGCATGGCAGCA	95
AY856085	AGTGGTCCCTGGATGTGCTATCCGGGGAAGCCTTCAGGTTCCCGCGCTCCCTCCCTGTGCTGCCATTCGTGAGCTCCAGTGCATGGCAGCA	95
AY856086	AGTGGTCCCTGGATGTGCTATCCGGGGAAGCCTTCAGGTTCCCGCGCTCCCTCCCTGTGCTGCCATTCGTGAGCTCCAGTGCATGGCAGCA	95
AY856087	AGTGGTCCCTGGATGTGCTATCCGGGGAAGCCTTCAGGTTCCCGCGCTCCCTCCCTGTGCTGCCATTCGTGAGCTCCAGTGCATGGCAGCA	95
AY856089	AGTGGTCCCTGGATGTGCTATCCGGGGAAGCCTTCAGGTTCCCGCGCTCCCTCCCTGTGCTGCCATTCGTGAGCTCCAGTGCATGGCAGCA	95
AY856090	AGTGGTCCCTGGATGTGCTATCCGGGGAAGCCTTCAGGTTCCCGCGCTCCCTCCCTGTGCTGCCATTCGTGAGCTCCAGTGCATGGCAGCA	95
AY856091	AGTGGTCCCTGGATGTGCTATCCGGGGAAGCCTTCAGGTTCCCGCGCTCCCTCCCTGTGCTGCCATTCGTGAGCTCCAGTGCATGGCAGCA	95

AY729672	GCTG CCGCAGGCCTGCTCTAAGGGAATGCTGCCAGCAGCTCCGCAAGATCAGCGAGTGGTGGAGGTCCGCGCGCTCTACACATGTTGGACAGC	189
AY729673	GGTG CCGCAGGCCTGCTCTAAGGGAATGCTGCCAGCAGCTCCGCAAGATCAGCGAGTGGTGGAGGTCCGCGCGCTCTACACATGTTGGACAGC	189
AY729674	GGTG CCGCAGGCCTGCTCTAAGGGAATGCTGCCAGCAGCTCCGCAAGATCAGCGAGTGGTGGAGGTCCGCGCGCTCTACACATGTTGGACAGC	189
AY729675	GGTG CCGCAGGCCTGCTCTAAGGGAATGCTGCCAGCAGCTCCGCAAGATCAGCGAGTGGTGGAGGTCCGCGCGCTCTACACATGTTGGACAGC	189
AY729676	GGTG CCGCAGGCCTGCTCTAAGGGAATGCTGCCAGCAGCTCCGCAAGATCAGCGAGTGGTGGAGGTCCGCGCGCTCTACACATGTTGGACAGC	189
AY729677	GGTG CCGCAGGCCTGCTCTAAGGGAATGCTGCCAGCAGCTCCGCAAGATCAGCGAGTGGTGGAGGTCCGCGCGCTCTACACATGTTGGACAGC	189
AY729678	GGTG CCGCAGGCCTGCTCTAAGGGAATGCTGCCAGCAGCTCCGCAAGATCAGCGAGTGGTGGAGGTCCGCGCGCTCTACACATGTTGGACAGC	189
AY729684	GGTG CCGCAGGCCTGCTCTAAGGGAATGCTGCCAGCAGCTCCGCAAGATCAGCGAGTGGTGGAGGTCCGCGCGCTCTACACATGTTGGACAGC	189
AY729685	GGTG CCGCAGGCCTGCTCTAAGGGAATGCTGCCAGCAGCTCCGCAAGATCAGCGAGTGGTGGAGGTCCGCGCGCTCTACACATGTTGGACAGC	189
AY834214	GGTG CCGCAGGCCTGCTCTAAGGGAATGCTGCCAGCAGCTCCGCAAGATCAGCGAGTGGTGGAGGTCCGCGCGCTCTACACATGTTGGACAGC	189
AY856084	GGTG CCGCAGGCCTGCTCTAAGGGAATGCTGCCAGCAGCTCCGCAAGATCAGCGAGTGGTGGAGGTCCGCGCGCTCTACACATGTTGGACAGC	189
AY856085	GGTG CCGCAGGCCTGCTCTAAGGGAATGCTGCCAGCAGCTCCGCAAGATCAGCGAGTGGTGGAGGTCCGCGCGCTCTACACATGTTGGACAGC	189
AY856086	GGTG CCGCAGGCCTGCTCTAAGGGAATGCTGCCAGCAGCTCCGCAAGATCAGCGAGTGGTGGAGGTCCGCGCGCTCTACACATGTTGGACAGC	189
AY856087	GGTG CCGCAGGCCTGCTCTAAGGGAATGCTGCCAGCAGCTCCGCAAGATCAGCGAGTGGTGGAGGTCCGCGCGCTCTACACATGTTGGACAGC	189
AY856089	GGTG CCGCAGGCCTGCTCTAAGGGAATGCTGCCAGCAGCTCCGCAAGATCAGCGAGTGGTGGAGGTCCGCGCGCTCTACACATGTTGGACAGC	189
AY856090	GGTG CCGCAGGCCTGCTCTAAGGGAATGCTGCCAGCAGCTCCGCAAGATCAGCGAGTGGTGGAGGTCCGCGCGCTCTACACATGTTGGACAGC	189
AY856091	GGTG CCGCAGGCCTGCTCTAAGGGAATGCTGCCAGCAGCTCCGCAAGATCAGCGAGTGGTGGAGGTCCGCGCGCTCTACACATGTTGGACAGC	189

AY729672	ATGTATAAGGACATGGCCGCCAGGAGGACAGGCGAGGACAGGAGCCCTTCCCACCTGCCGGAGCGGAGGTGGTGAAGCTGACGGCGCGGAGCA	283
AY729673	ATGTATAAGGACATGGCCGCCAGGAGGACAGGCGAGGACAGGAGCCCTTCCCACCTGCCGGAGCGGAGGTGGTGAAGCTGACGGCGCGGAGCA	283
AY729674	ATGTATAAGGACATGGCCGCCAGGAGGACAGGCGAGGACAGGAGCCCTTCCCACCTGCCGGAGCGGAGGTGGTGAAGCTGACGGCGCGGAGCA	283
AY729675	ATGTATAAGGACATGGCCGCCAGGAGGACAGGCGAGGACAGGAGCCCTTCCCACCTGCCGGAGCGGAGGTGGTGAAGCTGACGGCGCGGAGCA	283
AY729676	ATGTATAAGGACATGGCCGCCAGGAGGACAGGCGAGGACAGGAGCCCTTCCCACCTGCCGGAGCGGAGGTGGTGAAGCTGACGGCGCGGAGCA	283
AY729677	ATGTATAAGGACATGGCCGCCAGGAGGACAGGCGAGGACAGGAGCCCTTCCCACCTGCCGGAGCGGAGGTGGTGAAGCTGACGGCGCGGAGCA	283
AY729678	ATGTATAAGGACATGGCCGCCAGGAGGACAGGCGAGGACAGGAGCCCTTCCCACCTGCCGGAGCGGAGGTGGTGAAGCTGACGGCGCGGAGCA	283
AY729684	ATGTATAAGGACATGGCCGCCAGGAGGACAGGCGAGGACAGGAGCCCTTCCCACCTGCCGGAGCGGAGGTGGTGAAGCTGACGGCGCGGAGCA	283
AY834214	ATGTATAAGGACATGGCCGCCAGGAGGACAGGCGAGGACAGGAGCCCTTCCCACCTGCCGGAGCGGAGGTGGTGAAGCTGACGGCGCGGAGCA	283
AY856084	ATGTATAAGGACATGGCCGCCAGGAGGACAGGCGAGGACAGGAGCCCTTCCCACCTGCCGGAGCGGAGGTGGTGAAGCTGACGGCGCGGAGCA	283
AY856085	ATGTATAAGGACATGGCCGCCAGGAGGACAGGCGAGGACAGGAGCCCTTCCCACCTGCCGGAGCGGAGGTGGTGAAGCTGACGGCGCGGAGCA	283
AY856086	ATGTATAAGGACATGGCCGCCAGGAGGACAGGCGAGGACAGGAGCCCTTCCCACCTGCCGGAGCGGAGGTGGTGAAGCTGACGGCGCGGAGCA	283
AY856087	ATGTATAAGGACATGGCCGCCAGGAGGACAGGCGAGGACAGGAGCCCTTCCCACCTGCCGGAGCGGAGGTGGTGAAGCTGACGGCGCGGAGCA	283
AY856089	ATGTATAAGGACATGGCCGCCAGGAGGACAGGCGAGGACAGGAGCCCTTCCCACCTGCCGGAGCGGAGGTGGTGAAGCTGACGGCGCGGAGCA	283
AY856090	ATGTATAAGGACATGGCCGCCAGGAGGACAGGCGAGGACAGGAGCCCTTCCCACCTGCCGGAGCGGAGGTGGTGAAGCTGACGGCGCGGAGCA	284
AY856091	ATGTATAAGGACATGGCCGCCAGGAGGACAGGCGAGGACAGGAGCCCTTCCCACCTGCCGGAGCGGAGGTGGTGAAGCTGACGGCGCGGAGCA	283

AY729672	TCACAGCGGTTGCAAGCTTACCCATCGTCTTGATGCGTCCGGAGTTGAGCGGTATCTCTGCAAGGTTGTGGCCCATACCGGACAGCCCTAG	375
AY729673	TCACAGCGGTTGCAAGCTTACCCATCGTCTTGATGCGTCCGGAGTTGAGCGGTATCTCTGCAAGGTTGTGGCCCATACCGGACAGCCCTAG	375
AY729674	TCACAGCGGTTGCAAGCTTACCCATCGTCTTGATGCGTCCGGAGTTGAGCGGTATCTCTGCAAGGTTGTGGCCCATACCGGACAGCCCTAG	375
AY729675	TCACAGCGGTTGCAAGCTTACCCATCGTCTTGATGCGTCCGGAGTTGAGCGGTATCTCTGCAAGGTTGTGGCCCATACCGGACAGCCCTAG	375
AY729676	TCACAGCGGTTGCAAGCTTACCCATCGTCTTGATGCGTCCGGAGTTGAGCGGTATCTCTGCAAGGTTGTGGCCCATACCGGACAGCCCTAG	375
AY729677	TCACAGCGGTTGCAAGCTTACCCATCGTCTTGATGCGTCCGGAGTTGAGCGGTATCTCTGCAAGGTTGTGGCCCATACCGGACAGCCCTAG	375
AY729678	TCACAGCGGTTGCAAGCTTACCCATCGTCTTGATGCGTCCGGAGTTGAGCGGTATCTCTGCAAGGTTGTGGCCCATACCGGACAGCCCTAG	375
AY729684	TCACAGCGGTTGCAAGCTTACCCATCGTCTTGATGCGTCCGGAGTTGAGCGGTATCTCTGCAAGGTTGTGGCCCATACCGGACAGCCCTAG	375
AY729685	TCACAGCGGTTGCAAGCTTACCCATCGTCTTGATGCGTCCGGAGTTGAGCGGTATCTCTGCAAGGTTGTGGCCCATACCGGACAGCCCTAG	376
AY834214	TCACAGCGGTTGCAAGCTTACCCATCGTCTTGATGCGTCCGGAGTTGAGCGGTATCTCTGCAAGGTTGTGGCCCATACCGGACAGCCCTAG	375
AY856084	TCACAGCGGTTGCAAGCTTACCCATCGTCTTGATGCGTCCGGAGTTGAGCGGTATCTCTGCAAGGTTGTGGCCCATACCGGACAGCCCTAG	375
AY856085	TCACAGCGGTTGCAAGCTTACCCATCGTCTTGATGCGTCCGGAGTTGAGCGGTATCTCTGCAAGGTTGTGGCCCATACCGGACAGCCCTAG	375
AY856086	TCACAGCGGTTGCAAGCTTACCCATCGTCTTGATGCGTCCGGAGTTGAGCGGTATCTCTGCAAGGTTGTGGCCCATACCGGACAGCCCTAG	375
AY856087	TCACAGCGGTTGCAAGCTTACCCATCGTCTTGATGCGTCCGGAGTTGAGCGGTATCTCTGCAAGGTTGTGGCCCATACCGGACAGCCCTAG	375
AY856089	TCACAGCGGTTGCAAGCTTACCCATCGTCTTGATGCGTCCGGAGTTGAGCGGTATCTCTGCAAGGTTGTGGCCCATACCGGACAGCCCTAG	375
AY856090	TCACAGCGGTTGCAAGCTTACCCATCGTCTTGATGCGTCCGGAGTTGAGCGGTATCTCTGCAAGGTTGTGGCCCATACCGGACAGCCCTAG	376
AY856091	TCACAGCGGTTGCAAGCTTACCCATCGTCTTGATGCGTCCGGAGTTGAGCGGTATCTCTGCAAGGTTGTGGCCCATACCGGACAGCCCTAG	375

图 1 来自山羊草与小麦的 17 个  $\alpha$ -淀粉酶抑制因子成熟蛋白编码基因的核苷酸序列比较

Fig. 1 The alignment of 17 nucleotide sequences of the mature protein in  $\alpha$ -amylase inhibitors

### 3 讨论

在本研究中,利用单粒种子发芽提取的 DNA 进行 PCR 扩增,从中得到特异性条带,克隆并测序,发现在小麦和山羊草二倍体物种中  $\alpha$ -淀粉酶抑制因子为单一核酸编码,而在六倍体小麦中克隆得到的基因序列显示  $\alpha$ -淀粉酶抑制因子是以多拷贝的形式存在。不同材料中的  $\alpha$ -淀粉酶抑制因子编码基因具有很高的一致性,说明该基因在进化过程中是十分保守的。由核酸推导的氨基酸序列同源性比较发现,部分  $\alpha$ -淀粉酶抑制因子与小麦  $\alpha$ -淀粉酶抑制因子 WDAI0.19 完全相同,与 WDAI0.53 一致性也达到 99% 以上,仅有 1 个氨基酸残基差异。这些结果都进一步从分子生物学水平证实了不同物种确实具有非常保守的  $\alpha$ -淀粉酶抑制因子编码基因,此类抑制因子的编码基因可能起源于很少量的原始基因<sup>[17]</sup>。前人研究表明在一粒小麦与乌拉尔图小麦中不能检测到  $\alpha$ -淀粉酶抑制因子活性<sup>[18,19]</sup>。本研究也未能从大多数二倍体小麦中克隆得到此类  $\alpha$ -淀粉酶抑制因子编码基因,仅在 1 份材料扩增出编码基因,但是由于有 1 个碱基的插入突变而不能编码成熟蛋白。

长期以来  $\alpha$ -淀粉酶抑制因子都被推荐用作控制依赖  $\alpha$ -淀粉酶来消化植物淀粉以提供能量的昆虫, $\alpha$ -淀粉酶抑制因子能够有效地识别不同来源的  $\alpha$ -淀粉酶,但是不同  $\alpha$ -淀粉酶抑制因子的抑制范围以及对不同  $\alpha$ -淀粉酶的抑制活力的差异却非常大<sup>[1]</sup>。在一些情况下  $\alpha$ -淀粉酶抑制因子只对哺乳动物的  $\alpha$ -淀粉酶有作用,而另一些情况则只对昆虫  $\alpha$ -淀粉酶有抑制效果,因此可以选择专一高效的抑制因子,作为植物抵抗外来昆虫掠夺的武器<sup>[12]</sup>。目前研究显示,已经有一些不同类型的植物抗虫蛋白被转基因到作物中,成为一种经济、有效的抗虫物质<sup>[11,13]</sup>。因而,筛选特效的  $\alpha$ -淀粉酶抑制因子,并将其应用于转基因栽培作物,以增加作物抗虫能力是十分重要的。本研究中,已获得一些不同  $\alpha$ -淀粉酶抑制因子基因,下一步将对这些基因进行表达分析,从中筛选出抗虫效果好的新基因。

#### REFERENCES (参考文献)

[ 1 ] Franco OL, Rigden DJ, Melo FR *et al.* Plant  $\alpha$ -amylase inhibitors and their interaction with insect  $\alpha$ -amylases structure, function and potential for crop protection. *Eur J Biochem*, 2002, **269**: 397 - 412

[ 2 ] Schuler HT, Poppt MG, Kerry BR *et al.* Insect-resistant transgenic

plants. *Trends Biotechnol*, 1998, **16**: 168 - 174

[ 3 ] Riichiro U, Ayako N, Shoichi T *et al.* New enzymatic synthesis of 63-modified maltooligosaccharides and their inhibitory activities for human  $\alpha$ -amylases. *Carbohydrate Research*, 1998, **307**: 69 - 76

[ 4 ] Mundy J, Hejgaard J, Svendsen I. Characterization of a bifunctional wheat inhibitor of endogenous  $\alpha$ -amylase and subtilisin. *FEBS*, 1984, **167**(2): 210 - 214

[ 5 ] Hejgaard J, Bjorn SE, Nielson G. Rye chromosomes carrying structure genes for the major grain protease inhibitor. *Hereditas*, 1984, **101**: 257 - 259

[ 6 ] Masojc P, Zawitowski J, Howes NK. Polymorphism and chromosomal location of endogenous  $\alpha$ -amylase inhibitor genes in common wheat. *Theor App Genet*, 1993, **85**: 1043 - 1048

[ 7 ] Feng GH, Richardson M, Chen MS *et al.*  $\alpha$ -Amylase inhibitors from wheat: a sequences and patterns of inhibition of insect and human  $\alpha$ -amylases. *Insect Biochem Mol Bio*, 1996, **26**: 419 - 426

[ 8 ] Silva MC, Da M, Grossi MF *et al.* Analysis of structural and physico-chemical parameters involved in the specificity of binding between  $\alpha$ -amylases and their inhibitors. *Protein Engineering*, 2000, **13**: 167 - 177

[ 9 ] Payan F. Structural basis for the inhibition of mammalian and insect  $\alpha$ -amylase by plant inhibitors. *Biochim Biophys Acta*, 2004, **1696**: 171 - 180

[ 10 ] Gatehouse AMR, Gatehouse JA. Identifying proteins with insecticidal activity: use of encoding genes to produce insect-resistant transgenic crops. *Pest*, 1998, **52**: 165 - 175

[ 11 ] Franco OL, Rigden DJ, Melo FR *et al.* Activity of wheat  $\alpha$ -amylase inhibitors towards bruchid  $\alpha$ -amylases and structural explanation of observed specificities. *Eur J Biochem*, 2000, **267**(8): 1466 - 1473

[ 12 ] Titarenko E, Chrispeels MJ. cDNA cloning, bio-chemical characterization and inhibition by plant inhibitors of the  $\alpha$ -amylases of the Western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2000, **30**: 979 - 990

[ 13 ] Altabella T, Chrispeels MJ, Tobacco plants transformed with  $\alpha AI$  gene express an inhibitor of insect  $\alpha$ -amylase in their seeds. *Plant Physiol*, 1990, **93**: 805 - 810

[ 14 ] Schroeder HE, Gollasch S, Moore A *et al.* Bean  $\alpha$ -amylase inhibitor confers resistance to the pea weevil (*Bruchus pisorum*) in transgenic peas (*Pisum sativum* L.). *Plant Physiol*, 1995, **107**: 1233 - 1239

[ 15 ] Yan Z, Wan Y, Liu K *et al.* Identification of a novel HMW glutenin subunit and comparison of its amino acid sequence with those of homologous subunits. *Chinese Science Bulletin*, 2002, **47**(3): 220 - 225

[ 16 ] Wang JR, Yan ZH, Wei YM *et al.* A novel high-molecular-weight subunit gene Ee1.5 from *Elytrigia elongata* (Host) Nevski. *J Cereal Sci*, 2004, **40**: 289 - 294

[ 17 ] Buonocore V, Petrucci T, Silano V. Wheat protein inhibitors of  $\alpha$ -amylase. *Phytochemistry*, 1977, **16**: 811 - 820

[ 18 ] Bedetti C, Bozzini A, Silano V *et al.* Amylase protein inhibitors and the role of *Aegilops* species in polyploid wheat speciation. *Biochim Biophys Acta*, 1974, **362**(2): 299 - 307

[ 19 ] Vittozzi L, Morisi G, Silano V. Continuous automated assay of alpha-amylase inhibitors. *J Sci Food Agric*, 1976, **27**(5): 449 - 453