

水稻干尖线虫氨基肽酶基因克隆及功能初步分析

王步勇,王 峰,李丹蕾,马 玲,陈俏丽,王博文

(东北林业大学 林学院,黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要:为防治水稻干尖线虫病提供理论支持,研究了水稻干尖线虫氨基肽酶基因特征,并对其编码蛋白结构与功能进行分析。基于水稻干尖线虫转录组测序,并通过 RACE 技术,从水稻干尖线虫中克隆得到了一氨基肽酶基因 *Ab-Ampep*。生物信息学进行基因分析,原位杂交实验进行表达定位分析。该基因 CDS 序列全长为 2 787 bp,含有 2 个开放阅读框(ORF)。最长开放阅读框(ORF)大小 2 661 bp,可编码 886 个氨基酸,蛋白分子量为 101.74 kDa,理论等电点(PI)为 5.78。编码蛋白氨基酸序列中具有 2 个 Zn^{2+} 结合位点和 1 个 PepN 保守结构域,有特征信号序列 TISH~~EL~~AHFW,属于谷氨酸锌蛋白(GluZincin)超家族。*Ab-Ampep* 氨基酸序列同挑选的其他 9 种动物的氨基肽酶氨基酸序列进行多重序列分析,发现功能区域的氨基酸序列较为保守,*Ab-Ampep* 与猪蛔虫(*Ascaris suum*)的氨基肽酶 P(ERG83308.1)蛋白相似度最高为 50%。系统进化树分析表明,*Ab-Ampep* 与猪蛔虫(*A. suum*)的氨基肽酶 P(ERG83308.1)蛋白在同一分支上,亲缘关系最近。蛋白质结构分析显示, α -螺旋为 *Ab-Ampep* 主要结构元件,能够形成金属离子 Zn^{2+} 结合位点。原位杂交实验显示,经反义链探针处理的线虫在其生殖部位有颜色加深的杂交信号,该基因的表达位置主要在水稻干尖线虫的生殖部位。通过对水稻干尖线虫氨基肽酶基因研究,利用分子技术改造氨基肽酶或寻找氨基肽酶抑制剂,抑制氨基肽酶的表达,影响线虫生长发育,为防治水稻干尖线虫病提供新思路。

关键词:水稻干尖线虫;氨基肽酶基因;基因克隆;生物信息学分析;原位杂交

中图分类号:S435.111.48;Q786 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2015)04-0001-07

doi:10.7668/hbxb.2015.04.001

Cloning and Functional Analysis of Aminopeptidase Gene from *Aphelenchoides besseyi*

WANG Bu-yong, WANG Feng, LI Dan-lei, MA Ling, CHEN Qiao-li, WANG Bo-wen

(School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract: To study the characteristics of the aminopeptidase gene in white-tip nematode, and to provide theory support for the prevention. According to the transcriptome resequencing, an aminopeptidase gene of *A. besseyi* was isolated by RACE method, and designed as *Ab-Ampep*. Bioinformatic and in-situ hybridization were used for the gene analysis. The coding sequence was 2 787 bp including a 2 661 bp open reading frame (ORF), which encoded an 886 amino acid protein. The putative protein molecular weight was 101.74 kDa and its theoretical isoelectric point was 5.78. The deduced amino acid sequence contains two conserved zinc-binding sites and a PepN Multi-domain. It belongs to GluZincin Superfamily, which contained the characteristic conserved sequence of HExxH. The multiple sequence alignment showed that the functional region was conserved, and the highest level of similarity was 50% to a aminopeptidase(ERG83308.1) from *Ascaris suum* in GenBank. The phylogenetic tree constructed on the basis of amino acid sequences clearly showed that the relationship of *Ab-Ampep* was most intimate with aminopeptidase (ERG83308.1) from *A. suum*. Protein structure analysis indicated that the main structural element in *Ab-Ampep* protein was α -Helix. In situ hybridization indicated that enhanced hybridization signals were observed in genital area, and the expression of *Ab-Ampep* was similarly in genital area of *A. besseyi*. Though the functional analysis of aminopeptidase gene, molecular technology or enzyme inhibitor was used to inhibit the expression of aminopeptidase

收稿日期:2015-05-10

基金项目:高等学校博士学科点专项科研基金项目(20100062120002);中央高校基本科研业务专项资金项目(2572015AA09)

作者简介:王步勇(1989-),男,山东泰安人,在读博士,主要从事植物病理学研究。

通讯作者:马 玲(1963-),女,黑龙江哈尔滨人,教授,博士,主要从事森林保护学研究。

ase. It may affect the nematode development and provide a new way for prevention.

Key words: *Aphelenchoides besseyi*; Aminopeptidase gene; Gene cloning; Bioinformatics analysis; In situ hybridization

水稻干尖线虫 (*Aphelenchoides besseyi*, white-tip nematode) 是水稻 (*Oryza sativa*) 重要病原物之一, 导致水稻叶尖发白, 直至脱落、死亡, 对世界大部分水稻种植区域造成严重危害^[1-4]。除危害水稻外, 也危害印度榕 (*Ficus elastica*)、木槿 (*Hibiscus syriacus*) 等树木, 对林业造成严重的经济和生态损失^[5]。传统的防治方法如农林防治、生物防治、化学防治等, 均有各自的弊端而无法根治水稻干尖线虫。利用 RNAi 敲除目的基因, 构建表达抑制剂的转基因植物, 防治植物寄生线虫, 已经成为分子生物学研究领域的焦点之一^[6-8]。

氨基肽酶 (Aminopeptidases) 是一类能从多肽或蛋白质肽链氨基端催化降解氨基酸序列, 使氨基酸游离出来的外肽酶, 属于金属蛋白酶。广泛存在于动物、植物及细菌等真核生物中, 在细胞质基质、溶酶体及各类亚细胞器官中含量丰富。对于机体的新陈代谢及生物调控具有重要作用, 如水解蛋氨酸 N 端残基, 肽类激素的代谢, 神经递质的传导和细胞周期的控制等^[9]。如同其他真核生物一样, 线虫中也存在大量必不可少的氨基肽酶。线虫氨基肽酶主要参与了线虫的肠道消化^[10-12]、蜕皮激素的激活^[13]、幼虫孵化繁殖^[14]、神经肽传导^[15-16]等一系列反应, 在线虫的生长发育及侵染寄生中发挥了重要作用。

植物寄生线虫相关氨基肽酶的研究, 已成为近来线虫研究的热点^[17]。而对于同是植物寄生线虫的水稻干尖线虫, 氨基肽酶的研究还少见报道。因此, 本研究从水稻干尖线虫中分离得到氨基肽酶基因 *Ab-Ampep*。利用生物信息学分析, 初步了解其结构与功能, 利用原位杂交对基因表达进行了定位分析。通过对水稻干尖线虫氨基肽酶结构与功能的研究, 对丰富线虫氨基肽酶具有重要作用, 为筛选 RNAi 靶标和鉴定基因功能, 从分子水平上揭示氨基肽酶在水稻干尖线虫侵染寄生中的作用奠定了基础。也为寻找相应的氨基肽酶抑制剂, 培育表达该蛋白酶抑制剂的转基因水稻, 探索防治水稻干尖线虫病提供了理论支持。

1 材料和方法

1.1 试验材料

所用水稻干尖线虫种群为 NCBI 国际生物标本注册种群: SAMN02420038^[18]。贝尔曼漏斗法分离、收集室内人工培养的水稻干尖线虫, 经 M9 Buffer 洗

虫后, 置于 -80 ℃ 冰箱中, 储存备用。

1.2 总 RNA 提取, 第一链 cDNA 合成

采用 Sigma® RNA 提取试剂盒 (TRI Reagent), 根据试剂盒操作要求提取线虫总 RNA, 经 Qigen 的 RNeasy 纯化试剂盒纯化后得到总 RNA。用超微量紫外分光光度计 (BioPhotometer D30) 和用 1.0% 的变性琼脂糖凝胶电泳检测其质量。

取 7 μL 的总 RNA 样品为模板, 采用 TaKaRa 公司的反转录试剂盒 (HiScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit) 进行第一链 cDNA 合成。合成的 cDNA 样品稀释 10 倍, 放置 -20 ℃ 冰箱中, 保存备用。

1.3 *Ab-Ampep* 基因 CDS 克隆

根据水稻干尖线虫转录组测序^[18], 通过比对分析设计引物, 采用 RACE 法, 按照试剂盒 (SMART RACE cDNA amplification Kit, Clontech) 使用说明, 进行基因全长克隆。以合成的水稻干尖线虫第一链 cDNA 为模板, 应用 UPM 混合引物 (5'-CTAATACG ACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'; 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'), *Ab-Ampep*-5' 引物 (5'-TGCCCGATTTCGGTGGTCGTTTCGC-3') 进行 5' 序列克隆。应用 RACE-3' 引物, *Ab-Ampep*-3' 引物 (5'-CGACGACATGATCGGTGTGGTAGCG-3') 进行 3' 序列克隆。PCR 扩增产物经 PCR 产物纯化试剂盒 (Fragment Purification Kit Ver. 2.0) 纯化, 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。再经 pGEM-T 连接, 转化至大肠杆菌 *E. coli* DH5α 感受态细胞克隆, 选取阳性 (白斑) 菌液送至上海生工进行测序。测序后利用 DNAMAN 软件拼接, 拼接 3' 序列和 5' 序列。

1.4 *Ab-Ampep* 基因生物信息学分析

利用 NCBI ORF-Finder (Open reading frame finder of NCBI) 在线工具 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 翻译编码蛋白氨基酸序列, 对全长 CDS 序列进行开放阅读框分析。利用 ExPASy ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 对编码蛋白的相对分子量、理论等电点、稳定性及亲疏水性进行分析^[19-20]。采用 SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 对编码蛋白信号肽进行预测分析^[21]。NetPhos 2.0 Server 分析蛋白质潜在的磷酸化位点。利用 NCBI Blast 筛选同源序列, Bioedit 软件进行多序列比对分析, MEGA 5.0 构建系统进化树, 进行发育树分析。HNN 软件预测编码蛋白二

级结构。利用 SWISS-MODEL 自动建模方式来筛选构建三维模型,并用 NCBI 的 VAST Search(Vector alignment search tool)对其功能位点模拟分析。

1.5 *Ab-Ampep* 基因表达定位分析

利用原位杂交实验,对 *Ab-Ampep* 基因进行了表达定位分析。选用原位杂交试剂盒 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I。根据基因序列,设计引物 *Ab-Ampep*-N(5'-GCCAAACCGACTC ACTA-3')与引物 *Ab-Ampep*-P(5'-CACGGACCACAA CATCA-3'),根据原位杂交试剂盒使用说明,进行探针合成。探针 PCR 反应:94 ℃ 预变性处理 2 min;94 ℃ 处理 30 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延迟 2 min,40 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。合成的杂交探针经紫外分光光度计及凝胶电泳检测后,4 ℃ 保存备用。反义链探针进行杂交试验,正义链探针进行对照试验。探针合成后,经预杂交、杂交,制作玻片标本,利用 Olympus 显影检测^[19]。

2 结果与分析

2.1 RNA 质量检测

以 M9 Buffer 处理的水稻干尖线虫为材料,根据 Sigma® RNA 提取试剂盒提取线虫总 RNA,凝胶电泳检测(图 1-A),发现其在 28S、18S、5.8S 处条带清晰。总 RNA 提取后,用反转录试剂盒合成第一链 cDNA,凝胶电泳检测(图 1-B),呈弥散带,满足后续试验要求。

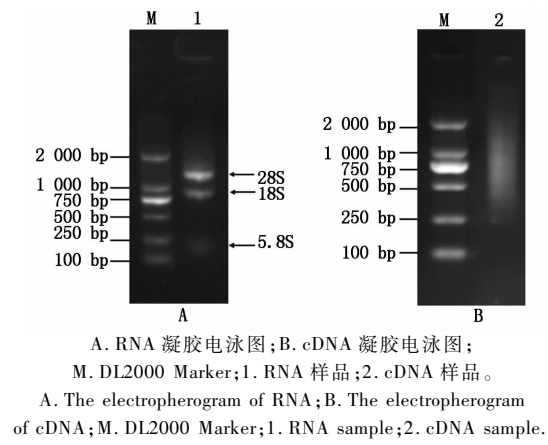


图 1 凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis

2.2 水稻干尖线虫氨基酸酶基因(*Ab-Ampep*)生物信息学分析

2.2.1 *Ab-Ampep* 基因 CDS 序列及蛋白理化性质分析 5'序列克隆与 3'序列克隆结果,经拼接后得到该基因蛋白编码区(Coding sequence,CDS)序列全长,经 Blast 分析表明该片段为氨基酸酶基因同源序列,命名为 *Ab-Ampep*。应用 ORF Finder 进行开放阅

读框分析,该 CDS 序列全长为 2 787 bp,含有 2 个开放阅读框。第 1 个开放阅读框长度为 2 661 bp,编码 886 个氨基酸;第 2 个开放阅读框长度为 126 bp,编码 41 个氨基酸。通过 BlastX 比对分析发现,该基因具有氨基酸酶基因的广义保守区 PepN。利用 ProtParam 进行理化性质分析,显示其相对分子质量为 101.74 kDa,其中亮氨酸(Leucine,Leu)占 9.60%,谷氨酸(Glutamic acid,Glu)占 8.70%,丝氨酸(Serine,Ser)占 7.90%,所占含量较高。理论 PI 值为 5.78,负电荷残基数(Asp + Glu)为 125,正电荷残基数(Arg + Lys)为 111,脂肪系数为 79.62。原子总数 14 247 个,分子式为 C₄₅₈₉H₇₀₇₀N₁₂₀₀O₁₃₅₈S₃₀,不稳定系数为 39.67(<40.0),编码蛋白为稳定性蛋白。

2.2.2 *Ab-Ampep* 蛋白亲/疏水性及磷酸化位点预测分析 利用 ProtScale 对 *Ab-Ampep* 蛋白亲/疏水性分析,发现 *Ab-Ampep* 在 222 位氨基酸处有最强的亲水性峰值 1.944,在 758 位氨基酸处有最强的疏水性峰值 -3.511。疏水性氨基酸略多于亲水性氨基酸,平均亲水性为 -0.382,预测 *Ab-Ampep* 蛋白为疏水性蛋白。磷酸化位点是蛋白质翻译后最重要、最普遍的修饰方式,磷酸化与去磷酸化是细胞信号传导、细胞分化及细胞生长等细胞生理活动的分子开关。蛋白氨基酸潜在的磷酸化位点与蛋白功能紧密相关。通过 NetPhos 2.0 Server 在线工具进行磷酸化位点分析,发现 *Ab-Ampep* 有 25 个丝氨酸磷酸化位点,15 个苏氨酸磷酸化位点和 13 个酪氨酸磷酸化位点。磷酸化位点的预测为基因表达调控、蛋白修饰提供了参考位点。

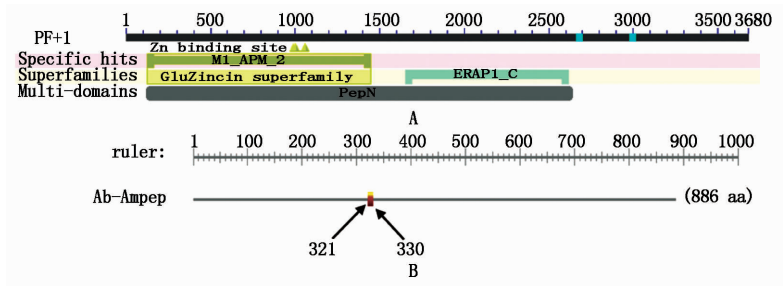
2.2.3 *Ab-Ampep* 保守区域及蛋白结构分析 利用 NCBI CDD 及 Prosite 对 *Ab-Ampep* 蛋白保守区预测分析(图 2)。通过 NCBI Conserved Domain Search 在线工具,发现 *Ab-Ampep* 含广义保守区(Multi-domains)PepN 和锌催化位点(Zn binding site),属于 GluZincin 超家族(图 2-A)。通过 Prosite 在线工具,发现 *Ab-Ampep* 编码蛋白序列特征“TISHELAHFW”,符合锌金属蛋白酶的序列特征 HE_{xx}H(“H”、“E”、“H”为锌离子配体残基)。锌催化位点在 321~330 位氨基酸(图 2-B),2 个锌催化位点分别是第 324 位氨基酸组氨酸(H)和第 328 位氨基酸组氨酸(H)。活化结合位点(ACT_SITE)是第 325 位氨基酸-谷氨酸(E)。Ab-Ampep 是谷氨酸锌蛋白酶。

利用 HNN 软件对其二级结构预测分析,发现 *Ab-Ampep* 编码蛋白中,α-螺旋(α-Helix)占 46.16%,无规则卷曲(Random coil)占 36.68%,β-折叠(β-Sheet)占 17.16%。α-螺旋是 *Ab-Ampep* 蛋

白主要结构元件。蛋白结构决定功能,α-螺旋稳定蛋白骨架。无规则卷曲多是酶功能部位区域,能显现蛋白质功能。Ab-Ampep 蛋白以 α-螺旋为主,与稳定性蛋白相吻合。36.68% 的无规则卷曲,表明 Ab-Ampep 蛋白含有大量的功能部位区域,其功能具多样性,在水稻干尖线虫的整个生长发育中具有重要作用。

应用 SWISS-MODEL 软件,在蛋白质结构数据

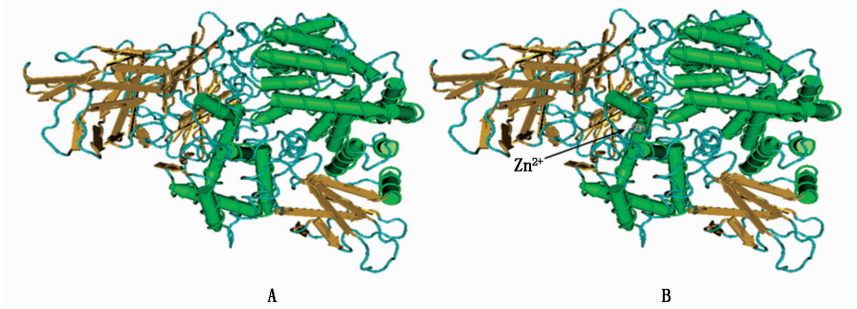
库 PDB 中寻找 *Ab-Ampep* 基因同源基因的蛋白结构,根据同源蛋白质的结构优化构建三维模拟构象。Ab-Ampep 蛋白的三维结构预测及功能位点模拟见图 3,图 3-A 是利用 SWISS-MODEL 预测得到的三维结构,图 3-B 是通过 VAST Search 预测的功能位点模拟图。从图 3 分析发现,Ab-Ampep 蛋白是一个含有 Zn^{2+} 金属催化位点,有 23 个螺旋及 31 个折叠的高聚物蛋白。



A. 利用 NCBI CDD 预测;B. 利用 Prosite 预测。
A. Analysis the conserved domains by NCBI CDD;B. Analysis the conserved domains by Prosite.

图 2 *Ab-Ampep* 编码蛋白保守区域预测与分析

Fig. 2 Analysis the conserved domains of *Ab-Ampep*



A. 蛋白三维结构预测;B. 蛋白三维结构功能位点模拟,箭头指示为金属 Zn^{2+} 催化位点。

A. The third-class structure of *Ab-Ampep*;B. The putative function sites of *Ab-Ampep*,the arrow indicates the catalytic site of Zn^{2+} .

图 3 *Ab-Ampep* 蛋白的三维结构与模拟功能位点

Fig. 3 The third-class structure and putative function sites of *Ab-Ampep*

2.3 *Ab-Ampep* 多重序列比对分析

利用 NCBI 网站 Blast 在线比对,筛选出了与水稻干尖线虫 *Ab-Ampep* 蛋白序列相似程度较高的 9 个动物氨基肽酶同源序列(表 1),Clustal W 进行多序列比对分析(图 4)。通过与其他动物氨基肽酶多序列比对,发现水稻干尖线虫氨基肽酶与所筛选动物的氨基肽酶一样,都含有保守区域 PepN 及特征序列 HExxH。与所选动物尤其线虫间的氨基肽酶的相似度在 38% 以上,最高 50%。Ab-Ampep 与猪蛔虫 (*Ascaris suum*) 的嘌呤霉素敏感氨基肽 (ERG83308.1) 相似度最高为 50% (覆盖度 97%); Ab-Ampep 与马来丝虫 (*Brugia malayi*) 的肽酶 M1 家族蛋白 (XP_001897028.1)、秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 的 PAM-1 (NP_001023209.1)、大豆孢囊线虫 (*Heterodera glycines*) 的氨基肽酶 (AAX68678.1)、非洲眼线虫 (*Loa loa*) 的氨基肽酶 N

(EFO20258.2) 相似度为 44%~49%。与果蝇 (*Drosophila yakuba*) 的 GE21157 (XP_002093133.1) 相似度最低为 38% (覆盖度 97%)。多重序列比对分析表明,Ab-Ampep 与猪蛔虫 (*A. suum*) 的嘌呤霉素敏感性氨基肽酶 (ERG83308.1) 的同源性最好,与果蝇 (*D. yakuba*) 的 GE21157 (XP_002093133.1) 同源性较低。

2.4 *Ab-Ampep* 系统进化树分析

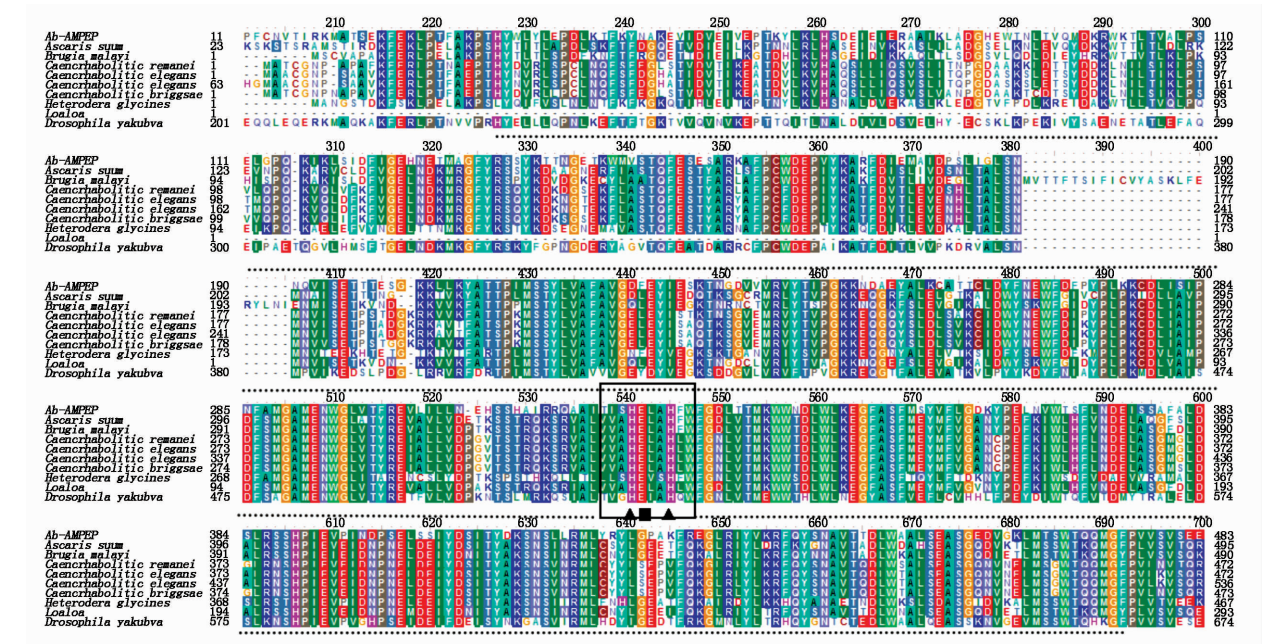
应用 MEGA 5.0 和 Modetest 3.06,根据 AIC (Akaike information criterion) 选出进化的最适模型为 WAG + G,构建最大似然树(图 5),经过 1 000 次重复,系统进化树分析结果显示:Ab-Ampep 蛋白与猪蛔虫 (*A. suum*) 嘌呤霉素敏感氨基肽 (ERG83308.1) 蛋白、非洲眼线虫 (*L. loa*) 的氨基肽酶 N (EFO20258.2)、马来丝虫 (*B. malayi*) 的肽酶 M1 家族蛋白 (XP_001897028.1) 遗传距离较小,亲缘关系较近;Ab-

Ampep 蛋白与果蝇 (*D. yakuba*) 的 GE21157 (XP_002093133.1) 不在同一分支上,遗传距离较大,亲缘关系较远。果蝇的氨基酸酶序列为 Ab-Ampep 的远源外属对照序列。水稻干尖线虫与所挑选的线虫同属线虫动物门,果蝇属于节肢动物门,表明该基因进化速度与物种进化速度一致。

表 1 NCBI Blast 筛选出的 9 个同源序列

Tab.1 Nine homologous sequences of Ab-Ampep by NCBI Blast

物种 Species	NCBI 注册号 Accession No.	蛋白 Protein	相似度/% Ident	覆盖度/% Query cover	E 值 E value
猪蛔虫 <i>Ascaris suum</i>	ERG83308.1	嘌呤霉素敏感性氨肽酶	50	97	0.0
马来丝虫 <i>Brugia malayi</i>	XP_001897028.1	氨基肽酶 M1 家族	47	97	0.0
广杆属线虫 <i>Caenorhabditis remanei</i>	XP_003108043.1	线虫嘌呤霉素敏感性氨肽酶 1 蛋白	47	96	0.0
秀丽隐杆线虫 <i>Caenorhabditis elegans</i>	NP_001023209.1	嘌呤霉素敏感性氨肽酶 1 亚型 a	47	96	0.0
秀丽隐杆线虫 <i>Caenorhabditis elegans</i>	NP_001023210.1	嘌呤霉素敏感性氨肽酶 1 亚型 b	47	96	0.0
新杆状线虫 <i>Caenorhabditis briggsae</i>	XP_002633188.1	丝虫嘌呤霉素敏感性氨肽酶 1	47	97	0.0
大豆孢囊线虫 <i>Heterodera glycines</i>	AAX68678.1	氨基肽酶	44	97	0.0
非洲眼线虫 <i>Loa loa</i>	EFO20258.2	氨基肽酶 N	49	78	0.0
果蝇 <i>Drosophila yakuba</i>	XP_002093133.1	果蝇 GE21157 基因转录蛋白	38	97	0.0

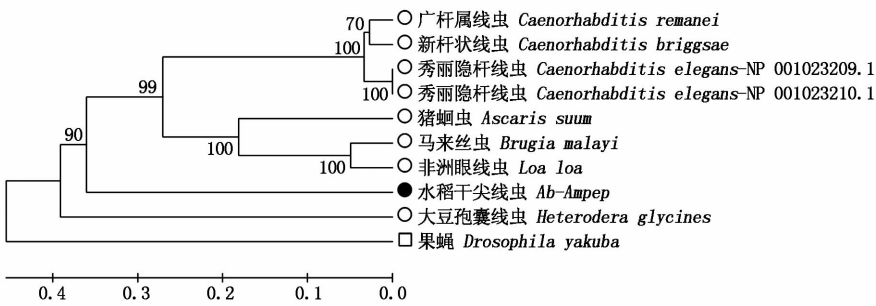


黑色虚线“...”为保守区域 PepN. NY ---- GFP; 黑色实线框“□”为特征序列. TISHELAH; 黑三角“▲”. Zn 催化位点 H; 黑方块“■”. 活化结合位点 E。

The dotted line indicates the conserved region PepN. From “NY” to “GFP”; The black line box indicates the characteristic sequence. TISHELAH; The black triangle indicates the catalytic site of Zn²⁺; The black box indicates the activation site.

图 4 Ab-Ampep 基因多序列比对分析

Fig.4 Multiple sequence alignment of Ab-Ampep



标尺在左下方, Bootsap = 1 000, 序列来源于 NCBI。

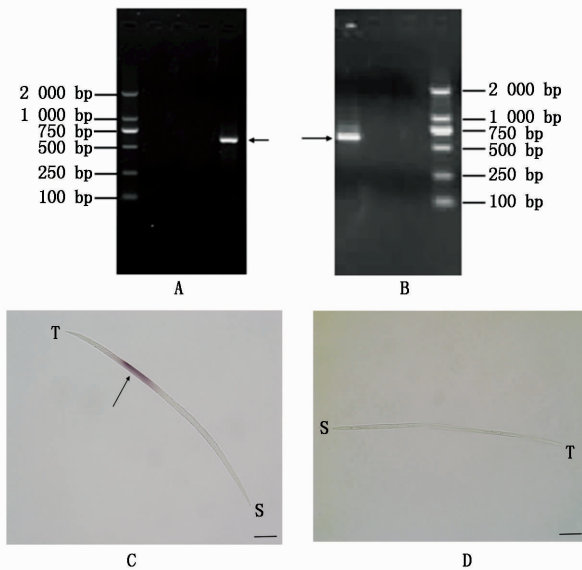
The scale was at the bottom, and the bootstrap values based on 1 000 replicates were indicated, sequences were obtained from NCBI.

图 5 Ab-Ampep 的系统进化树

Fig.5 Phylogenetic tree analysis of Ab-Ampep

2.5 *Ab-Ampep* 表达定位分析

利用 PCR 扩增法得到杂交探针,经过凝胶电泳发现,模板(图 6-A)及反义链探针(图 6-B)电泳条带约 700 bp 左右。紫外分光光度计检测符合杂交试验要求。反义链探针杂交结果发现:水稻干尖线虫的生殖部位有明显的杂交信号,颜色变深(图 6-C);正义链探针(对照试验)则没有观察到杂交信号,无颜色变化(图 6-D)。表明 *Ab-Ampep* 基因在水稻干尖线虫的生殖部位表达。



A. 模板扩增;B. 反义链探针检测;C. 反义链探针杂交结果;D. 正义链(对照试验)杂交结果;C、D. 右下方黑色线端代表 40 μm 的标尺。S. 口针;T. 尾部。C 中箭头所指位置为 *Ab-Ampep* 基因表达位置,水稻干尖线虫的生殖部位。

A. Amplification of template; B. SDS-PAGE of hybridization positive probe; C. The results of positive; D. The results of control experiment; C, D. The black lines represent 40 μm . S. Stylet; T. Tail tip. The position of the arrow is the expression site of *Ab-Ampep*, the genital area.

图 6 探针检测与原位杂交结果

Fig. 6 SDS-PAGE of hybridization probe and the results of in situ hybridization

3 结论与讨论

水稻干尖线虫严重危害了水稻、树木等宿主植物的正常生长发育,对全球造成了严重的经济损失。传统防治措施浪费大量劳力、财力,收效较小,且对环境造成一定污染,寻找一种安全无污染的防治技术已迫在眉睫。蛋白酶抑制剂是一类能够抑制蛋白水解酶活性的小分子蛋白质,在植物抵御昆虫取食和病原入侵中发挥了重要作用^[22]。Olson 等^[23]发现通过合成半胱氨酸蛋白酶抑制剂可有效防治原生生物。Atkinson 等^[24]发现通过饲喂表达半胱氨酸和丝氨酸蛋白酶抑制剂的转基因植物,可以防控植物寄生线虫的生长发育。随着分子技术的发展,蛋白水解酶作为潜在的候选疫苗和药物靶点,受到人

们的高度重视。氨基肽酶在线虫侵染寄生中的重要作用,使其逐渐成为新兴的抗寄生物靶标热点之一。

本研究根据水稻干尖线虫转录组测序,并通过 RACE 技术进行了 *Ab-Ampep* 基因克隆。运用生物信息学对基因进行分析,运用原位杂交实验对基因表达进行定位分析。*Ab-Ampep* 基因具有氨基肽酶特有的特征序列 **HExxH**。通过 Blast 比对发现,水稻干尖线虫氨基肽酶与其他动物氨基肽酶的氨基酸序列相似度高达 50%。生物信息学分析表明,得到 *Ab-Ampep* 基因为水稻干尖线虫氨基肽酶基因。原位杂交结果显示,*Ab-Ampep* 基因主要在水稻干尖线虫的生殖部位表达。通过对水稻干尖线虫氨基肽酶的结构与功能深入研究,可用分子技术改造关键氨基酸,以降低酶的活性和稳定性,影响线虫的消化,达到防治线虫目的;也可以寻找 *Ab-Ampep* 相应的蛋白酶抑制剂,培育表达蛋白酶抑制剂的转基因水稻,通过取食,抑制水稻干尖线虫氨基肽酶功能,影响线虫生长发育,达到防治水稻干尖线虫的目的。因此,对氨基肽酶结构与功能研究,成为后续抑制剂研究与线虫防治的基础与关键。通过后续 RNA 干扰试验等,对水稻干尖线虫氨基肽酶的功能进一步验证,寻找相应抑制剂,最终为防治水稻干尖线虫病提供理论支持。

参考文献:

- [1] Mcveigh P, Leech S, Mair G R, *et al.* Analysis of FMR-Famide-like peptide (FLP) diversity in phylum Nematoda[J]. International Journal for Parasitology, 2005, 35 (10): 1043 - 1060.
- [2] McGawley E C, Rush M C, Hollis J P. Occurrence of *Aphelenchoides besseyi* in Louisiana rice Seed and its interaction with sclerotium oryzae in selected cultivars[J]. Journal of Nematology, 1984, 16(1): 65 - 68.
- [3] Hoshino S, Togashi K. Effect of water-soaking and air-drying on survival of *Aphelenchoides besseyi* in *Oryza sativa* seeds[J]. Journal of Nematology, 2000, 32 (3): 303 - 308.
- [4] Duncan L W, Moens M. Migratory endoparasitic nematodes[M]. Plant Nematology: CABI publishing, 2006: 123 - 152.
- [5] Bridge J, Jim L Starr. Plant Nematodes of Agricultural Importance: A Color Handbook[M]. Boca Raton: Academic Press, 2007.
- [6] Chen Q, Rehman S, Smant G, *et al.* Functional analysis of pathogenicity proteins of the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* using RNAi[J]. Molecular Plant-microbe Interactions, 2005, 18(7): 621 - 625.

- [7] Yadav B C, Veluthambi K, Subramaniam K. Host-generated double stranded RNA induces RNAi in plant-parasitic nematodes and protects the host from infection[J]. Molecular and Biochemical Parasitology, 2006, 148(2): 219 – 222.
- [8] Fairbairn D J, Cavallaro A S, Bernard M, *et al.* Host-delivered RNAi: an effective strategy to silence genes in plant parasitic nematodes[J]. Planta, 2007, 226(6): 1525 – 1533.
- [9] Taylor A. Aminopeptidases: towards a mechanism of action[J]. Trends in Biochemical Sciences, 1993, 18(5): 167 – 171.
- [10] Smith T S, Graham M, Munn E A, *et al.* Cloning and characterization of a microsomal aminopeptidase from the intestine of the nematode *Haemonchus contortus*[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1997, 1338(2): 295 – 306.
- [11] Joshua G W. Functional analysis of leucine aminopeptidase in *Caenorhabditis elegans*[J]. Molecular and Biochemical Parasitology, 2001, 113(2): 223 – 232.
- [12] Laurent V, Brooks D R, Coates D, *et al.* Functional expression and characterization of the cytoplasmic aminopeptidase P of *Caenorhabditis elegans*[J]. European Journal of Biochemistry, 2001, 268(20): 5430 – 5438.
- [13] Rhoads M L, Fetterer R H, Urban J F. Effect of protease class-specific inhibitors on *in vitro* development of the third-to fourth-stage larvae of *Ascaris suum*[J]. The Journal of Parasitology, 1998, 84(4): 686 – 690.
- [14] Tefft P M, Bone L W. Leucine aminopeptidase in Eggs of the soybean cyst nematode *Heterodera glycines*[J]. Journal of Nematology, 1985, 17(3): 270 – 274.
- [15] Rogers C, Reale V, Kim K, *et al.* Inhibition of *Caenorhabditis elegans* social feeding by FMRFamide-related peptide activation of NPR-1[J]. Nature Neuroscience, 2003, 6(11): 1178 – 1185.
- [16] Kim K, Li C. Expression and regulation of an FMRFamide-related neuropeptide gene family in *Caenorhabditis elegans*[J]. The Journal of Comparative Neurology, 2004, 475(4): 540 – 550.
- [17] Lilley C J, Goodchild S A, Atkinson H J, *et al.* Cloning and characterisation of a *Heterodera glycines* aminopeptidase cDNA[J]. International Journal for Parasitology, 2005, 35(14): 1577 – 1585.
- [18] Wang F, Li D, Wang Z, *et al.* Transcriptomic analysis of the rice white tip nematode, *Aphelenchoides besseyi* (Nematoda: Aphelenchoididae)[J]. PLoS One, 2014, 9(3): e91591.
- [19] Wilkins M R, Gasteiger E, Bairoch A, *et al.* Protein identification and analysis tools in the ExPASy server[J]. Methods in Molecular Biology, 1999, 112: 531 – 552.
- [20] Walker J M. The proteomic protocols handbook[M]. New York: Humana Press, 2005.
- [21] Dyrlov Bendtsen J, Nielsen H, Von Heijne G, *et al.* Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0[J]. Journal of Molecular Biology, 2004, 340(4): 783 – 795.
- [22] Rai S, Aggarwal K K, Mitra B, *et al.* Purification, characterization and immunolocalization of a novel protease inhibitor from hemolymph of tasar silkworm, *Antheraea mylitta*[J]. Peptides, 2010, 31(3): 474 – 481.
- [23] Olson J E, Lee G K, Semenov A, *et al.* Antimalarial effects in mice of orally administered peptidyl cysteine protease inhibitors[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 1999, 7(4): 633 – 638.
- [24] Atkinson H J, Urwin P E, Mcpherson M J. Engineering plants for nematode resistance[J]. Annual Review of Phytopathology, 2003, 41: 615 – 639.