

# 家蚕血液胰凝乳蛋白酶抑制剂的多态性分布

李娟<sup>1,2</sup>, 赵萍<sup>1\*</sup>, 代方银<sup>1</sup>, 孙全<sup>1</sup>, 夏庆友<sup>1</sup>, 向仲怀<sup>1</sup>

(1. 西南大学, 农业部蚕学重点开放实验室, 重庆 400716; 2. 西南大学动物科技学院, 重庆 400716)

**摘要:** 家蚕 *Bombyx mori* 的胰凝乳蛋白酶抑制剂 (chymotrypsin inhibitor, CI) 在家蚕发育过程中发挥着重要作用, 具有丰富的多态性。为了进一步研究家蚕胰凝乳蛋白酶抑制剂在群体水平上的多态性分布, 通过非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 调查了 425 个家蚕品系的血液胰凝乳蛋白酶抑制剂的分布情况。结果表明, 基因 *Ict-A*、*Ict-D* 和 *Ict-E* 在所有家蚕品系中存在, 暗示它们是家蚕正常生长发育必需的基因; 相反, 至少在 9 个家蚕品系中发现基因 *Ict-B* 和 *Ict-H* 都没有表达, 而这些品系没有明显的生理缺陷。在中国品系和日本品系家蚕之间, 胰凝乳蛋白酶抑制剂分布规律基本一致。对 52 个纯品系家蚕的胰凝乳蛋白酶抑制剂分布进行的聚类分析结果表明, 胰凝乳蛋白酶抑制剂分布与其系统、眠性和化性都没有明显的相关性。所以家蚕胰凝乳蛋白酶抑制剂广泛存在于不同家蚕品系中, 同时多态性的分布特征也表明其生理功能在进化过程中发生了明显的分化。

**关键词:** 家蚕; 品系; 血液; 胰凝乳蛋白酶抑制剂; 多态性分布

中图分类号: Q965 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2006)04-0550-06

## Polymorphism distribution of hemolymph chymotrypsin inhibitor (CI) in *Bombyx mori*

LI Juan<sup>1,2</sup>, ZHAO Ping<sup>1\*</sup>, DAI Fang-Yin<sup>1</sup>, SUN Quan<sup>1</sup>, XIA Qing-You<sup>1</sup>, XIANG Zhong-Huai<sup>1</sup> (1. The Key Sericultural Laboratory of Agricultural Ministry, Southwest University, Chongqing 400716, China; 2. College of Animal Science and Technology, Southwest University, Chongqing 400716, China)

**Abstract:** Chymotrypsin inhibitor (CI) in *Bombyx mori* may play important roles in its normal development and growth with rich polymorphism. In the experiment the distribution of CI polymorphism in hemolymph among 425 silkworm strains was investigated by native-polyacrylamide gel electrophoresis (Native-PAGE). The results indicated that three genes *Ict-E*, *Ict-D* and *Ict-A* expressed in every strain, suggesting that these genes should be necessary for the development of silkworm, and the products of genes *Ict-H* and *Ict-B* were not found in 9 strains, which had no distinct deficiency in development. The polymorphism distribution of CI exhibited the similar pattern in both the Japanese and Chinese strains. Finally, the cluster analysis of the CI polymorphism distribution in 52 pure strains showed that the clustered groups were not correlative to the strain system, moltinism or voltinism. It was so concluded that CI existed commonly in different strains of silkworm, and the characteristics of CI polymorphism distribution suggest that differentiation of their function may have occurred in evolution.

**Key words:** *Bombyx mori*; strains; hemolymph; chymotrypsin inhibitor; polymorphism distribution

昆虫血液中存在多种蛋白酶抑制剂, 它们通过调节体内蛋白酶活性, 参与昆虫的生长发育过程, 或者抑制病原微生物的侵入及繁殖, 提高机体防御能力 (Suzuki and Natori, 1985; Kannost, 1990)。胰凝乳蛋白酶抑制剂 (chymotrypsin inhibitor, CI) 作为一类重要的蛋白酶抑制剂, 属于丝氨酸蛋白酶抑制剂类。

家蚕 *Bombyx mori* 胰凝乳蛋白酶抑制剂是家蚕

血液中重要的蛋白酶抑制剂, 主要存在于脂肪体、生殖腺和血液等部位。家蚕胰凝乳蛋白酶抑制剂包括了多个成员, 具有丰富的多态性 (Matsui and Eguchi, 1991; He *et al.*, 2003)。目前在家蚕幼虫血液发现了至少 18 种胰凝乳蛋白酶抑制剂, 分别记为 CI-b1、CI-b2、CI-1、CI-2、CI-2'、CI-3、CI-4、CI-5、CI-6、CI-6'、CI-7、CI-8、CI-9、CI-10、CI-13 (包括 CI-13a、b、c) 和

基金项目: “973” 计划项目 (2005CB121000); 国家科技攻关项目 (2005BA711A07); 国家自然科学基金项目 (30471313)

作者简介: 李娟, 女, 1978 年生, 硕士, 主要从事家蚕分子生物学研究, E-mail: xfzha@swau.cq.cn

\* 通讯作者 Author for correspondence, Tel.: (023) 68250793; E-mail: zhaop@swau.cq.cn

收稿日期 Received: 2005-12-25; 接受日期 Accepted: 2006-04-03

CI-13'。遗传分析表明, CI-13 (包括 CI-13a, b, c) 和 CI-13' 由 *Ict-A* 基因控制, CI-9 和 CI-10 由 *Ict-B* 基因控制, CI-b1、CI-b2、CI-1、CI-2 和 CI-2' 由 *Ict-H* 基因控制 (Fujii *et al.*, 1996a, 1996b)。这 3 个基因 (*Ict-A*、*Ict-B* 和 *Ict-H*) 都位于第 2 连锁群 23.7 座位上。CI-3 和 CI-4 由位于第 22 连锁群的 *Ict-E* 基因控制, CI-6、CI-6'、CI-7 和 CI-8 由第 19 连锁群的 *Ict-D* 基因支配。各种胰凝乳蛋白酶抑制剂中, 只有 CI-5 的编码基因尚未知。这些胰凝乳蛋白酶抑制剂按其生化特点可以分为 3 类: 一类为 Kunitz 型, 分子量约 7 000 D, 如 *Ict-A*、*Ict-B* 和 *Ict-H* 编码的胰凝乳蛋白酶抑制剂; 另两类为 Serpsin 型, 分子量约为 40 000 D, 其中一类有寡糖链, 如 *Ict-D* 编码的胰凝乳蛋白酶抑制剂, 一类没有寡糖链, 如 *Ict-E* 编码的胰凝乳蛋白酶抑制剂 (Fujii *et al.*, 1996b)。目前一些代表性的胰凝乳蛋白酶抑制剂如 CI-b1、CI-3、CI-8 和 CI-13 等的理化性质、氨基酸序列、晶体结构、基因组序列和表达等都有研究报道。

不同基因支配的胰凝乳蛋白酶抑制剂分别在不同时期和部位表达, 具有时间和空间特异性。家蚕胰凝乳蛋白酶抑制剂通常在幼虫期特定的组织或器官合成, 分泌到血液中发挥作用或再运输到目的器官或组织, 参与家蚕的发育、免疫或其他生理过程。本实验对西南大学家蚕基因库保存的 425 个家蚕品系胰凝乳蛋白酶抑制剂的分布进行了研究, 旨在大范围的群体水平上揭示不同系统、化性和眠性的家蚕品系中胰凝乳蛋白酶抑制剂的分布特点。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

425 个家蚕品系材料保存于西南大学家蚕基因库。家蚕正常饲养到幼虫最后一龄第 3 天, 取其血液, 离心取上清液, 以去除脂肪体及血细胞,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。聚丙烯酰胺和双甲叉丙烯酰胺购于上海生工, 胰凝乳蛋白酶、N-acetyl-D, L-phenylalanine- $\beta$ -naphthylester 和 N, N'-dimethylformamide 等购于 Sigma 公司。

### 1.2 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Native-PAGE)

按照 Davis (1964) 的方法, 分别在碱性 (pH 8.3) 和酸性 (pH 4.3) 条件下将家蚕幼虫血液 (8  $\mu\text{L}$ ) 直接用于均一的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。胶浓度分别为 8.2% 和 7.8%。分别在  $4^{\circ}\text{C}$  pH 9.3 的 Glycine-Tris 缓冲液和 pH 4.5 的  $\beta$ -Alanine-HAc 缓冲液中以

恒定电流 (27 mA) 电泳 3~4 h。

### 1.3 胰凝乳蛋白酶抑制剂活性染色

Native-PAGE 后, 凝胶中的胰凝乳蛋白酶抑制剂活性用 Uriel 和 Berge (1968) 的方法进行检测: 将凝胶置于 0.07% 胰凝乳蛋白酶溶液 (0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液, pH 7.4) 中  $37^{\circ}\text{C}$  保温 15 min, 然后除去蛋白酶溶液, 用蒸馏水洗 2 次, 室温放置 15 min, 加入基质 (N-acetyl-D, L-phenylalanine- $\beta$ -naphthylester 2 mg 溶于 1 mL 的 N, N'-dimethylformamide) 和染色液 (50 mg 的邻联茴香胺溶解在 50 mL 的 pH 8.0 0.1 mol/L 磷酸缓冲液) 的混合液 (基质与染色液 10:1) 染色, 以  $37^{\circ}\text{C}$  保温 20 min, 除去基质和染色液, 加入 2% 醋酸溶液停止反应。

### 1.4 聚类分析

根据遗传背景清晰的 52 个纯品系家蚕的胰凝乳蛋白酶抑制剂分布进行多态性分布的聚类分析。电泳中如有对应的胰凝乳蛋白酶抑制剂带用 1 表示, 无带则用 0 表示, 这样将胰凝乳蛋白酶抑制剂分布的电泳结果转变为一个由 0 和 1 组成的矩阵。对这个矩阵用软件 DPS 进行系统聚类分析 (唐启义和冯明光, 2002), 用 Nei Li 的算法计算聚类距离, 最后用 UPGMA 法构建聚类树, 以探讨聚类结果与其系统遗传背景的相关性。

## 2 结果

### 2.1 胰凝乳蛋白酶抑制剂的分布

#### 2.1.1 胰凝乳蛋白酶抑制剂多态性分布的总体特征

对家蚕血液直接进行 Native-PAGE, 活性染色后结果见图 1 和图 2。由于胰凝乳蛋白酶抑制剂对胰凝乳蛋白酶活性的抑制作用, 有胰凝乳蛋白酶抑制剂的地方显现为白色带。根据各种胰凝乳蛋白酶抑制剂的迁移率, 对其活性带进行了鉴定。碱性条件下, 从上到下胰凝乳蛋白酶抑制剂的等电点逐渐降低 (图 1); 酸性条件下则反之 (图 2)。

统计分析 425 个家蚕品系的电泳结果表明: (1) 每个家蚕品系都有多种胰凝乳蛋白酶抑制剂表达, 不同品系表达的胰凝乳蛋白酶抑制剂种类有所差异, 即存在多态性现象。如图 1 中第一个样品 J115 有 CI-b1、CI-b2、CI-1、CI-3、CI-6、CI-7、CI-8 和 CI-13 表达, 第二个样品 J106 有 CI-b2、CI-3、CI-8 和 CI-13 表达, 第三个样品 C4 有 CI-b2、CI-3、CI-4、CI-6'、CI-7、CI-9、CI-13' 和 CI-13 表达。(2) 各种胰凝乳蛋白酶抑制剂带型的浓淡表明了其活性强弱 (图 1~2),

而活性是由抑制剂的量和比活性强度所决定的。电泳结果表明, *Ict-H*、*Ict-D* 和 *Ict-A* 支配的胰凝乳蛋白酶抑制剂活性较强, 而 *Ict-E* 和 *Ict-B* 支配的胰凝乳蛋白酶抑制剂活性较弱。

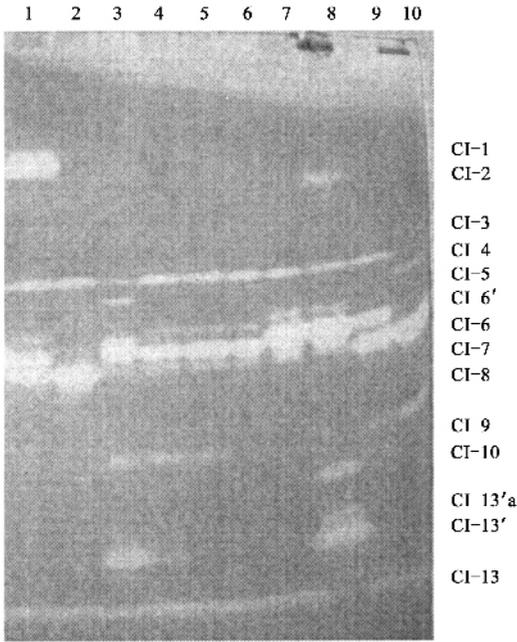


图1 碱性条件下电泳的胶图

Fig. 1 A gel run in the alkaline buffer

1~10 分别表示家蚕品系 J115, J106, C4, C145, C108, 03-130, 02-230, 02-240, 02-261 和 02-310。The samples of lane 1-10 are silkworm hemolymph from strains J115, J106, C4, C145, C108, 03-130, 02-230, 02-240, 02-261, and 02-310.

电泳结果中各种胰凝乳蛋白酶抑制剂的总带数见表1。从表1可以看出, 在群体水平上各基因都表达多种胰凝乳蛋白酶抑制剂, 但只有一种或两种胰凝乳蛋白酶抑制剂在表达中占优势。如基因 *Ict-H* 编码 CI-b1、CI-b2、CI-1、CI-2 和 CI-2' 五种抑制剂, 在 425 个家蚕品种中, CI-b1 出现了 208 次, CI-b2 为 315 次, 而其余 3 种成分均在 30 次以下; 基因 *Ict-B*

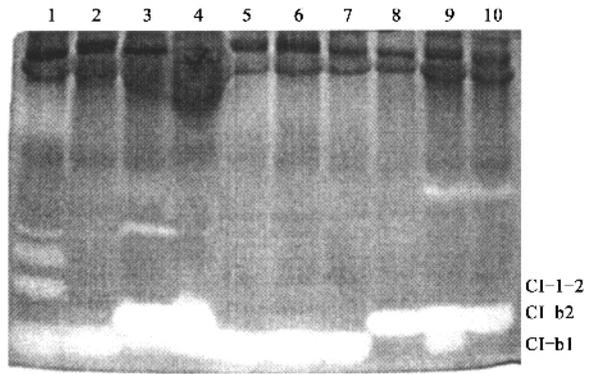


图2 酸性条件下电泳的胶图

Fig. 2 A gel run in the acid buffer

1~10 分别表示家蚕品系 18-038, 18-042, 18-050, 18-052, 18-060(有斑), 18-060(无斑), 18-070, 18-071, 18-072 和 18-072-1。The samples of lane 1-10 are silkworm hemolymph from strains 18-038, 18-042, 18-050, 18-052, 18-060 (dapple), 18-060 (no dapple), 18-070, 18-071, 18-072, and 18-072-1.

编码的两种抑制剂中, CI-9 出现的次数(179 次)也远远高于 CI-10 出现的次数(37 次); 同样, 基因 *Ict-A* 编码的 CI-13 较 CI-13'、基因 *Ict-E* 编码的 CI-3 较 CI-4 出现的频率均高; 只有基因 *Ict-D* 稍有不同, 其编码的 CI-6、CI-6'、CI-7 和 CI-8 出现的频率虽有差异, 但相对较一致, 分别为 202、115、310 和 192 次。

在供试的 425 个家蚕品系中胰凝乳蛋白酶抑制剂基因 *Ict-A*、*Ict-B*、*Ict-D*、*Ict-E* 和 *Ict-H* 表达的品系数分别为 425、217、425、425 和 409。*Ict-A*、*Ict-D* 和 *Ict-E* 各自至少有一种胰凝乳蛋白酶抑制剂表达, 所以这 3 个基因在家蚕的正常发育中是必要的。*Ict-B* 在 208 个家蚕品系中没有表达, *Ict-H* 在 16 个家蚕品系中没有表达, 而 *Ict-B* 和 *Ict-H* 同时在 9 个家蚕品系中欠缺。仔细观察这 9 个家蚕品系, 并未发现其有明显的生理缺陷。此外, *Ict-H* 编码的 CI-1、CI-2 和 CI-2' 不会出现在同一个样品中。

表1 各基因所编码胰凝乳蛋白酶抑制剂的表达情况

Table 1 The expression of all kinds of chymotrypsin inhibitor coded by the genes

基因 Gene	胰凝乳蛋白酶抑制剂 Chymotrypsin inhibitor	总带数 All bands	基因 Gene	胰凝乳蛋白酶抑制剂 Chymotrypsin inhibitor	总带数 All bands	基因 Gene	胰凝乳蛋白酶抑制剂 Chymotrypsin inhibitor	总带数 All bands
<i>Ict-A</i>	CI-13'	67	<i>Ict-H</i>	CI-b1	208	<i>Ict-D</i>	CI-6	202
	CI-13	400		CI-b2	315		CI-6'	115
<i>Ict-B</i>	CI-9	179	CI-1	18	CI-7		310	
	CI-10	37	CI-2	26	CI-8		192	
<i>Ict-E</i>	CI-3	398	CI-2'	18				
	CI-4	72						

**2.1.2 中国系统与日本系统家蚕胰凝乳蛋白酶抑制剂分布比较 :** 供试的家蚕品系材料大多数经过了杂交, 遗传背景比较复杂, 因此我们选择了 52 个自交品系为对象, 探讨胰凝乳蛋白酶抑制剂分布与系统之间的关系。52 个材料中, 有 12 个日本品系和 37 个中国品系( 其中包括 23 个土种)。对这两个系统的家蚕胰凝乳蛋白酶抑制剂分布进行比较, 结果见图 3。从图 3 可以看出, 两个系统均以 CI-b2、CI-3、CI-7 和 CI-13 等出现的频率最高, 而且胰凝乳蛋白酶抑制剂分布的整体趋势也比较一致。但是 CI-4 和 CI-9 在中国系统( 含中国土种) 中出现的频率比日本系统的高。12 个日本品系家蚕中, CI-4 没有表达, 25% 的家蚕品系表达 CI-9; 而在中国品系家蚕中有 CI-4 和 CI-9 表达的比例分别是 38% 和 49%。另外, 尽管 CI-8 分别在 42% 的日本品系和 52% 的中

国品系家蚕中出现, 但在中国土种家蚕中只有 7% 的出现频率。这些说明家蚕胰凝乳蛋白酶抑制剂在不同地理品系中的总体分布特征比较一致, 但个别种类抑制剂的分布存在系统特异性。

**2.1.3 CI-13 的多态性分布 :** 如图 1 中最下方的一条带为 CI-13。在其他部分凝胶中, CI-13 的位置有 3 条带, 分别记为 CI-13a、CI-13b 和 CI-13c ( 图 4)。用均一的凝胶进行电泳, 这 3 条带通常分不开, 为 1 条带, 记为 CI-13。我们在 68 个家蚕品系中检测了 CI-13a、CI-13b 和 CI-13c 的分布, 其中 30 个家蚕品系同时表达 CI-13a、CI-13b 和 CI-13c, 12 个家蚕品系表达 CI-13a 和 CI-13b, 13 个家蚕品系表达 CI-13c, 13 个家蚕品系中 CI-13a、CI-13b 和 CI-13c 都没有表达, 各种情况所占的比例见图 5。从电泳结果也发现 CI-13a 和 CI-13b 总是与 CI-13c 一起表达, 不会单独出现。

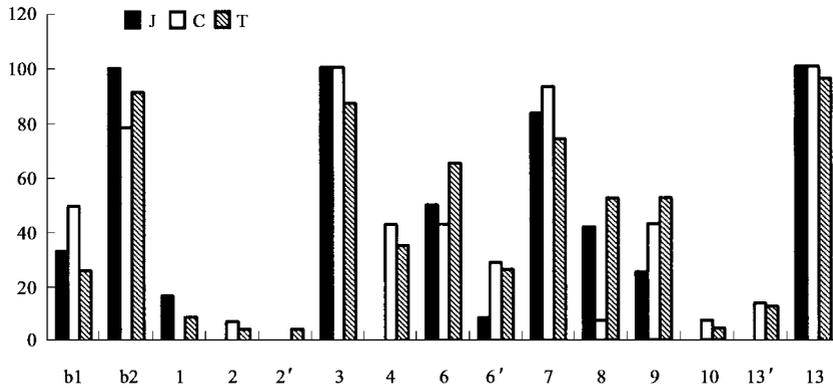


图 3 中国系统和日本系统家蚕胰凝乳蛋白酶抑制剂的分布比较

Fig. 3 Comparison of chymotrypsin inhibitor distribution between the Chinese and the Japanese silkworm strains  
横坐标表示各类胰凝乳蛋白酶抑制剂, 纵坐标表示表达了某种胰凝乳蛋白酶抑制剂的品系占此类品系总数的百分比。J: 日本系统, C: 中国系统( 不包括土种), T: 中国系统中的土种。Abscissa indicated the sort of chymotrypsin inhibitor. Ordinate indicated the percent of the strains expressing some chymotrypsin inhibitor to the total strains of their belonging system. J: Japanese strains; C: Chinese strains excluding the local strains; T: Chinese local strains.

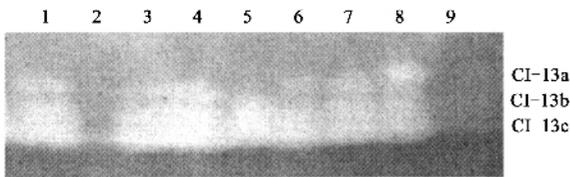


图 4 CI-13 的多态性电泳图

Fig. 4 The gel run for CI-13 polymorphism

1 ~ 9 分别表示家蚕品系 04-220, 04-240, 04-241, 04-250, b40, 04-281 ( 白血), 04-281 ( 黄血), 04-300 和 04-411。The samples of lane 1 - 9 are silkworm hemolymph from strains 04-220, 04-240, 04-241, 04-250, b40, 04-281 ( light yellow blood ), 04-281 ( yellow blood ), 04-300, and 04-411.

**2.1.4 CI-5、CI-13'a 和 CI-13'b 的分布特点 :** 目前对 CI-5 的研究很少, 其氨基酸序列、基因及其遗传位点都未知。本实验中发现, 至少有 46 个家蚕品系在

CI-4 和 CI-6 的位置之间有一条带, 为 CI-5, 这时 CI-6' 带一定出现, 如图 1 中第 7、8 个样品。

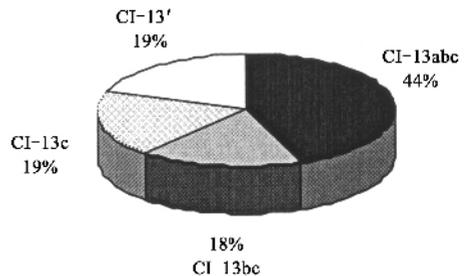


图 5 CI-13 的多态性分布比例图

Fig. 5 Proportion of CI-13 polymorphism distribution

至少有 23 个家蚕品系在 CI-10 和 CI-13' 的位置之间有 2 条带, 带比较模糊, 当这 2 条带出现时, CI-13' 一定表达。这个现象与 CI-13a、CI-13b 和 CI-13c

的带型、表达相似,因此定义这 2 条带为 CI-13'a 和 CI-13'b。如图 1 中第 8 个样品。

## 2.2 聚类分析

使用统计软件 DPS 对 52 个纯品系家蚕的胰凝乳蛋白酶抑制剂分布进行系统聚类分析,结果见图 6。聚类结果显示,52 个纯品系家蚕大致可分为 7 类,其中类 1、类 2、类 3 和类 5 包括了 47 个品系,类 4、类 6 和类 7 只包括了 5 个品系。聚类结果中,来源相同的家蚕品系常聚在一起,如类 2 中的 19-420、19-421 和 19-422 聚为一个小类,它们都是来自 19-

420 的。类 1(从 02-120 到 21-847)包括 8 品系,以日本系统家蚕为主,其他类则以中国系统家蚕为主。总的来看,各大类均包括了不同系统、化性和眠性的品系。如在类 1 中 02-120 是中国地方种(土种),一化,三眠;21-843 和 19-300 是日本品系,一化,四眠;J106 是日本品系,二化,四眠;赤熟同 21-843 等;尽管调查的材料有限,但该结果至少说明家蚕胰凝乳蛋白酶抑制剂的多态性与其眠性、化性、系统可能没有明显的相关性,其多态性广泛存在于不同品系中。

## 3 讨论

家蚕胰凝乳蛋白酶抑制剂是在家蚕血液、脂肪体、中肠等组织及器官中发现的对胰凝乳蛋白酶具有抑制活性的蛋白。对家蚕胰凝乳蛋白酶抑制剂的多态性分布研究表明,在群体水平上 3 个基因 *Ict-A*、*Ict-D* 和 *Ict-E* 及其编码的胰凝乳蛋白酶抑制剂对家蚕的正常生长发育是必要的,这与以前的研究结果相符(Fujii *et al.*, 1996a, 1996b)。家蚕胰凝乳蛋白酶抑制剂从胚胎发育的前期到成虫期都有表达,特别是幼虫最后一龄表达量迅速增加,血液、脂肪体等部位都有大量的胰凝乳蛋白酶抑制剂存在,吐丝时表达量达到最大(Eguchi *et al.*, 1986, 1994; He *et al.*, 2003)。我们知道,家蚕在最后一龄合成大量的丝蛋白,并储存大量的营养物质供后期发育和变态所需。因此推测 *Ict-A*、*Ict-D* 和 *Ict-E* 在家蚕的发育及变态中可能具有重要的生理功能,比如保护正常组织不被变态时降解组织所释放的大量蛋白酶降解;也可能保护丝蛋白不被蛋白酶降解,促进其稳定积累。胰凝乳蛋白酶抑制剂的分布特点表明 *Ict-A*、*Ict-D* 和 *Ict-E* 各自只需要有一种胰凝乳蛋白酶抑制剂表达就可以行使该基因的生理功能,并不是每种产物都要表达,这说明同一个胰凝乳蛋白酶抑制剂基因的几种产物在功能上相似甚至相同,并可以相互替换。

不同胰凝乳蛋白酶抑制剂基因编码的胰凝乳蛋白酶抑制剂表达时期和组织不同,因此推测它们的生理功能可能不同。*Ict-H* 编码的 CI-b1 在幼虫 5 龄 1~6 天的脂肪体、气管和卵巢中大量表达,推测可能是与免疫相关的蛋白。He 等(2003, 2004)分析 CI-b1 的基因组结构后证实了这个推测。同时,日本九州大学 Fujii 研究小组已从家蚕中肠分离到 CI-8 受体,具体的功能正在研究之中(个人通讯)。这些结果表明胰凝乳蛋白酶抑制剂,特别是 3 个必要的胰凝乳蛋白酶抑制剂基因编码的胰凝乳蛋白酶抑制

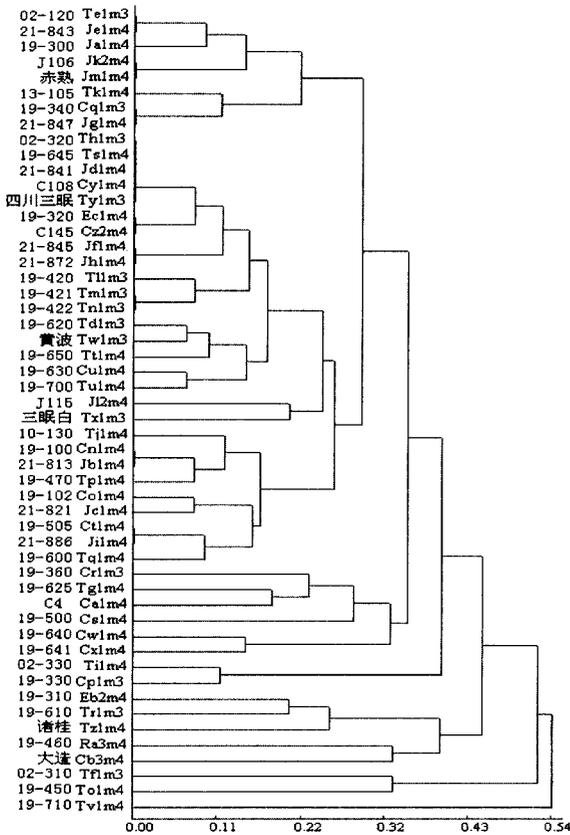


图 6 纯品系家蚕胰凝乳蛋白酶抑制剂分布的 DPS 聚类图

Fig. 6 The cluster analysis of chymotrypsin inhibitor in pure silk worm strains with DPS software

图中家蚕名称包括了系统名称及其基本性状标识。前半部分为品系的系统命名,后半部分第一个字母代表其系统,其中“J”代表日本品系;“C”代表中国品系(不包括地方种);“T”代表中国品系中的地方种。第二个字母是不同品系给出一个不同字母以示区别,后边的数字表示该品系的化性,最后的“m3”或“m4”表示其眠性,三眠或四眠。Strain name includes the name of the strain in breeding and the marker of fundamental characters. Strain name in breeding is given first. The next letter represents the system: “J” represents Japanese strains, “C” Chinese strains excluding the local strains, and “T” Chinese local strains. The second letter is given for different strain, and the following number shows the voltinism. In the end, “m3” or “m4” indicates 3-moltinism or 4-moltinism.

剂在家蚕正常生理过程中具有重要的作用。相反,像 *Ict-B* 和 *Ict-H* 这两个基因,至少在 9 个品系中都没有表达,这说明要么 *Ict-B* 和 *Ict-H* 的功能并不是很重要,要么可以被其高度相似的基因 *Ict-A* 所替代,不表达时,对家蚕正常的生长发育并不造成致命性的影响。

胰凝乳蛋白酶抑制剂基因及表达蛋白的多态性在其他生物中也有报道。四棱豆的 Kunitz 胰凝乳蛋白酶抑制剂(WCI)是由至少含有 7 个基因的多基因家族编码,其中有 4 个基因可能是功能性的,它们的表达在组织和发育时期上是特异性的,其他 3 个基因可能是假基因(Tsybina *et al.*, 2004)。小麦种子中有多个抑制胰凝乳蛋白酶的 *serpins* 基因表达(Rosenkrands *et al.*, 1994)。猪的  $\alpha$  蛋白酶抑制剂是由 5 个簇基因编码,各基因也具有多态性。位于猪常染色体上同一位点的簇基因有 P11、P01A、P12、P14 和 P13。P13 的共显性等位基因(Pi3A、Pi3B1、Pi3B2、Pi3C 和 Pi3D)编码 5 种蛋白(Pi3A、Pi3B1、Pi3B2、Pi3C 和 Pi3D),其中 4 种蛋白能够抑制胰凝乳蛋白酶的活性(Stratil *et al.*, 1990, 1995)。对于家蚕胰凝乳蛋白酶抑制剂基因到底有多少个,是否也存在簇基因和假基因,这些问题尚有待从分子水平上进行深入的研究。

本实验确认了 CI-5 与 CI-6' 常一起出现,所以推测 CI-5 可能由编码 CI-6' 的基因 *Ict-D* 编码。同时发现 CI-5 的带较细,说明其在血液中的含量不多。这一点与 CI-6 相似。同理,CI-13'a、CI-13'b 和 CI-13a、CI-13b 也可能由相同的基因即 *Ict-A*, 或者其近等位基因编码。

Native-PAGE 显示北碚野蚕的血液中有 CI-1、CI-3、CI-6、CI-7、CI-9、CI-10、CI-13' 和 CI-13 表达(待发表),说明野蚕具有家蚕所有已发现的胰凝乳蛋白酶抑制剂基因。聚类结果表明胰凝乳蛋白酶抑制剂分布没有明显的规律性,与家蚕的生物学特征也没有明显的相关性,但还是发现几种主要的胰凝乳蛋白酶抑制剂出现频率比较一致;且多数的日本品系家蚕聚在一起,即来源相同的品系聚在一起的趋势。根据该结果,我们认为家蚕多数胰凝乳蛋白酶抑制剂的起源早于被驯化,各个家蚕系统都保留了主要的胰凝乳蛋白酶抑制剂种类。但是,多种必需胰凝乳蛋白酶抑制剂的基因和非必需胰凝乳蛋白酶抑制剂的基因共存,这表明家蚕的胰凝乳蛋白酶抑制剂基因是一类进化速度很快的基因,并在进化过程中伴随着功能的分化。因此无论是其起源还是其功能,家蚕胰凝乳蛋白酶抑制剂都是一个值得进一步

研究的基因模型。

## 参 考 文 献 (References)

- Davis BJ, 1964. Disc electrophoresis II method and application to human serum protein. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121(Part 2):404-427.
- Eguchi M, Itoh M, Nishino K, Shibata H, Tanaka T, Kamei-Hayashi K, Hara S, 1994. Amino acid sequence of an inhibitor from the silkworm (*Bombyx mori*) hemolymph against fungal protease. *J. Biochem. (Tokyo)*, 115(5):881-884.
- Eguchi M, Matsui Y, Matsumoto T, 1986. Developmental change and hormonal control of chymotrypsin inhibitors in the haemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 84B(3):327-332.
- Fujii H, Aratake H, Doira H, Koga K, 1996a. Genetic analysis of hemolymph chymotrypsin inhibitors in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 65:334-341.
- Fujii H, Aratake H, Doira H, 1996b. Genetic analysis of hemolymph chymotrypsin inhibitors-3 and 4 in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 65:385-389.
- He NJ, Aso Y, Fujii H, Banno Y, Yamamoto K, 2004. *In vivo* and *in vitro* interactions of the *Bombyx mori* chymotrypsin inhibitor b1 with *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68(4):835-840.
- He NJ, Yakiyama M, Fujii H, Banno Y, Yamamoto Y, 2003. Genomic structure and expression analysis of the gene encoding a silkworm basic Kunitz-type chymotrypsin inhibitor. *Biochim. Biophys. Acta*, 1628(1):71-77.
- Kannost MR, 1990. Isolation and characterization of for serine protease inhibitors (serpin) from hemolymph of *Manduca sexta*. *Insect Biochem.*, 20:141-147.
- Matsui Y, Eguchi M, 1991. Purification and relationship of chymotrypsin inhibitors from the fat body and haemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 99B(2):851-857.
- Rosenkrands I, Hejgaard J, Rasmussen SK, Bjorn SE, 1994. Serpins from wheat grain. *FEBS Lett.*, 343(1):75-80.
- Stratil A, Cizova D, Hojny J, Hradecky J, 1990. Polymorphism of pig serum alpha-protease inhibitor-3 (PI3) and assignment of the locus to the Pi1, Po1A, Po1B, Pi2, Igh linkage group. *Anim. Genet.*, 21(3):267-276.
- Stratil A, Cizova-Schrofflova D, Gabrisova E, Pavlik M, Coppieters W, Peelman L, van de Weghe A, Bouquet Y, 1995. Pig plasma alpha-protease inhibitors PI2, PI3 and PI4 are members of the antichymotrypsin family. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 111(1):53-60.
- Suzuki T, Natori S, 1985. Purification and characterization of an inhibitor of the cysteine protease from the hemolymph of *Sarcophaga peregrina* larvae. *J. Biol. Chem.*, 260(8):5115-5120.
- Tang QY, Feng MG, 2002. DPS Data Processing System for Practical Statistics. Beijing: Science Press. [唐启义, 冯明光, 2002. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统. 北京: 科学出版社]
- Tsybina T, Dunaevsky Y, Musolyamov A, Egorov T, Larionova N, Popykina N, Belozersky M, 2004. New protease inhibitors from buckwheat seeds: properties, partial amino acid sequences and possible biological role. *Biol. Chem.*, 385(5):429-434.
- Uriel J, Berges J, 1968. Characterization of natural inhibitors of trypsin and chymotrypsin by electrophoresis in acrylamide-agarose gels. *Nature*, 218:578-580.