广西植物 Guihaia Sept. 2020, 40(9): 1288-1299 http://www.guihaia-journal.com

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201909012

涂冬萍, 王柳萍, 赵立春, 等. 牛大力淀粉酶基因家族的生物信息学分析 [J]. 广西植物, 2020, 40(9): 1288-1299.

TU DP, WANG LP, ZHAO LC, et al. Bioinformatics analysis of amylase gene family of *Millettia speciosa* [J]. Guihaia, 2020, 40(9): 1288-1299.

牛大力淀粉酶基因家族的生物信息学分析

涂冬萍[1,2,3], 王柳萍[1], 赵立春[1,2], 黄志其[1], 翟勇进[4], 白隆华[4], 莫长明[5*]

(1. 广西中医药大学, 南宁 530200; 2. 广西壮瑶药工程技术中心, 南宁 530200; 3. 广西中医药大学 农作物废弃物功能成分研究协同创新中心, 南宁 530023; 4. 广西药用植物园, 南宁 530023; 5. 广西作物遗传改良生物技术重点开放实验室, 南宁 530007)

摘 要: 该文基于不膨大和膨大的牛大力根的转录组测序结果,采用生物信息学技术对筛选到的 28 个牛大力淀粉酶基因进行分析。结果表明:28 个牛大力淀粉酶相关蛋白基因编码的氨基酸序列分子量为 20.78~349.39 KDa;均为酸性蛋白部分;部分亚细胞定位在叶绿体;具有 PLN02784 super family、AmyAc-family super family 结构域;二级结构中除 MsAm1、MsAm7、MsAm8、MsAm15、MsAm16、MsAm22、MsAm23、MsAm28 中 α 螺旋占比最大外,无规则卷曲的比例最大;三级结构预测具有 α 淀粉酶结构、β 淀粉酶结构、异淀粉酶结构等;淀粉酶基因家族共有 86 个作用元件,MsAm9 的作用元件最多(42 个);系统发育树表明 MsAm15、MsAm16 归于 1 类,且均具有 motif 2、motif 3、motif 7,MsAm4、MsAm24、MsAm26 归于 1 类,与拟南芥淀粉酶进行比对,AtBM4 和 MsAm6 归为一类,AtAM2 和 MsAm2 归为一类,AtBM8 和 MsAm5 归为一类,AtBM4 和 MsAm6 归为一类,AtAM10 和 MsAm22 归为一类,AtIM3 和 MsAm17 归为一类。这些分析结果可为今后深入研究 28 个牛大力淀粉酶的生物学功能和调控机制提供一定的理论依据,为牛大力根部膨大的研究及品种的改良提供参考。

关键词: 牛大力, 转录组, 淀粉酶基因家族, 理化特性

中图分类号: Q949 **文献标识码:** A

文章编号: 1000-3142(2020)09-1288-12 **开放科学(资源服务)标识码(OSID):**

Bioinformatics analysis of amylase gene family of *Millettia speciosa*

TU Dongping[1,2,3], WANG Liuping[1], ZHAO Lichun[1,2], HUANG Zhiqi[1], ZHAI Yongjin[4], BAI Longhua[4], MO Changming[5*]

收稿日期: 2019-12-27

基金项目: 广西自然科学基金项目(2017GXNSFBA198094);广西教育厅中青年教师基础能力提升项目(2017KY495);广西中医药大学校级科研项目(2016QN013);杨世林教授团队人才培养建设项目(YSL17026);广西中医药大学中药学优势学科建设专项课题;广西农作物废弃物功能成分研究协同创新中心项目(CICAR 2016-P4);广西农业科学院科技发展基金项目(桂农科 2018JZ3) [Supported by Program of Guangxi Natural Science Foundation(2017GXNSFBA198094); Program of Promoting Basic Ability of Young and Middle-aged Teachers of Guangxi Education Department (2017KY495); Program of University-level Scientific Research of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine (2016QN013); Program of Team Talent Training of Professor Yang Shilin (YSL17026); Construction Speciality of Advantage Discipline of Traditional Chinese Medicine of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine Project; Program of the Center for Cooperative Innovation of Research on Functional Components of Crop Waste in Guangxi(CICAR 2016-P4); Program of Science and Technology Development Fund of Guangxi Academy of Agricultural Sciences(Guikenong 2018JZ3)]。

作者简介: 涂冬萍(1986-),女,广西桂林人,博士,讲师,从事中药、民族药的品质研究,(E-mail) fairytdp@163.com。

*通信作者: 莫长明,博士,副研究员,研究方向为分子育种,(E-mail)309258519@qq.com。

(1. *Guangxi University of Traditional Chinese Medicine*, Nanning 530200, China; 2. *Guangxi Zhuang Yao Pharmaceutical Engineering Center*, Nanning 530200, China; 3. *Collaborative Innovation Center of Research on Functional ingredients from Agricultural Residues of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine*, Nanning 530200, China; 4. *Medical Botanical of Guangxi*, Nanning 530023, China; 5. *Guangxi Crop Genetic Improvement and Biotechnology Lab*, Nanning 530007, China)

Abstract: In order to lay the foundation for revealing the growth and development law and screening the genes related to root expansion by studying the biological activity of the amylase gene family of *Millettia speciosa*. Based on the transcriptome sequencing results of non-enlarged and enlarged root of *M. speciosa*, 28 daphnia magna amylase genes were screened by bioinformatics technology. The results showed that the molecular weights of amino acid sequences encoded by 28 amylase-related protein genes ranged from 20.78 to 349.39 KDa. They were all acidic proteins, some of the subcellular localization was in chloroplast. They had PLN02784 super family and AmyAc-family super family conserved domains. The proportion of random coil in the secondary structure was the largest excluded from MsAm1, MsAm7, MsAm8, MsAm15, MsAm16, MsAm22, MsAm23 and MsAm28. Tertiary structure prediction showed that the amylase of *M. speciosa* contained α-amylase structure, β-amylase structure, and isoamylase structure. Amylase gene family had 86 functional elements, and MsAm9 had the most functional elements (42). The phylogenetic tree showed that MsAm15, MsAm16 belonged to the same category and had motif 2, motif 3, motif 7, and MsAm4, MsAm24, MsAm26 belonged to the other same category. Compared to *Arabidopsis thaliana* anylase, AtBM4 and MsAm6, AtAM2 and MsAm2, AtBM8 and MsAm5, AtBM4 and MsAm6, AtAM10 and MsAm22, AtIM3 and MsAm17 belonged to the same category, respectively. These results could provide a theoretical basis for the further study of biological functions and regulation mechanism of 28 *M. speciosa* amylase, and provide a reference for the study of root enlargement and improvement of *M. speciosa* amylase varieties.

Key words: *Millettia speciosa*, transcription group, amylase gene family, physicochemical characteristics

牛大力为豆科蝶形花亚科崖豆藤属植物美丽崖豆藤(*Millettia speciosa*)的干燥根。味甘性平,具补虚润肺、强筋活络之效,临床上对腰肌劳损、风湿性关节炎、肺结核、慢性支气管炎等慢性疾病有一定疗效(全国中草药汇编编写组,1986)。主要分布于福建、湖南、广东、广西、海南、贵州等地,是两广地区著名的补骨强筋中药,常用于制作药膳、药酒等(广西壮族自治区卫生厅,1992;广东省食品药品监督管理局,2004;南京中医药大学,2005;刘丹丹等,2009;韦翠萍等,2009;韦玉燕等,2010),为岭南地区著名的药食两用植物。现代实验研究表明,牛大力具有提高免疫功能、保肝、祛痰、镇咳、平喘、抗氧化、抗炎、抗肿瘤等作用(周添农等,2009;王呈文等,2013;罗轩等,2014;黄翔等,2014;陈蓉蓉等,2014)。随着牛大力的深入开发利用,除了加工成中成药外,鲜品制作药膳的需求迅速增长,以致价格不断攀升。1999 年牛大力干品在产地收购价为每 kg 5~6 元,2007 年牛大力鲜品产地收购价已升至 每 kg 20 元,到 2012 年品质较好的上等鲜品收购价已暴涨至每 kg 80~100 元,但目前市场无大宗货源(伍家豪,2014)。

近年来,随着野生资源的减少,牛大力种植产业显示出了广阔的发展前景。但目前牛大力栽培中遇到了根不膨大,无法结薯的难题,影响了药材的产量和质量。经过调查发现,同一个植株的牛大力不同的根性状差异显著,结薯能力不同。目前还未见牛大力根膨大的分子机理的确切研究和报道。现有研究发现基因的表达显著影响了植物膨大根的膨大,其中与木质素和淀粉合成及代谢相关的基因变化明显(Gui et al., 2011; Wang et al., 2016)。据报道,在紫薯储藏根中,膨大的根淀粉含量下降,β-淀粉酶活明显提高,淀粉降解加速。研究表明,淀粉酶的活性与储藏根发育存在一定的关系。本研究基于牛大力根系转录组测序数据,对筛选出的淀粉酶基因家族成员进行生物信息学分析,为今后研究及阐释淀粉酶对牛大力

根膨大及贮藏的分子机理提供参考,为牛大力膨大根优良品种的选育及将来转基因培育牛大力等后期基因工程研究提供理论依据和基因资源。

1 材料与方法

1.1 材料

牛大力植株采集于广西百色市那坡,经广西药用植物园白隆华研究员鉴定为豆科美丽崖豆藤(*Millettia speciosa*)的干燥根,两年生。取同一个植株中膨大根(肉质明显,较软,易折断,较脆,直径大于 2.5 cm)和不膨大根(肉质不明显,纤维性大,较硬,不易折断,直径小于 1 cm),以该牛大力膨大根和不膨大根植物材料进行转录组测序。

1.2 方法

由武汉华大医学检验所有限公司在 Illumina hiSq2500 平台对牛大力膨大根和不膨大根进行转录组测序并进行序列分析。

基于牛大力根的转录组测序数据及其注释结果,将搜索到的注释为淀粉酶的 unigene 通过开放阅读框 ORF Finder 和预测保守域 CDS Search 在线软件检测确认(图 1)。使用 ExPAsy 软件对牛大力淀粉酶基因编码的氨基酸序列的理化特性进行在线预测,并进行跨膜结构域预测(http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM)。

使用 SignalP-5.0 及 TargetP 1.1 Server 分别对 28 条牛大力淀粉酶序列进行信号肽预测和亚细胞定位。使用 SWISS-MODEL 在线工具分别对牛大力淀粉酶进行二级结构预测及三级结构建模。使用 PlantCARE (Lescot et al.,2002)对基因的顺式调控元件、增强子和抑制子等进行分析。基于淀粉酶的氨基酸序列,采用 MEGA7.0 邻接法(Neighbor-joining),构建牛大力淀粉酶系统进化树(bootstrap=1 000)。利用 MEME 在线工具对牛大力淀粉酶基因编码的氨基酸序列 motif 进行分析。

2 结果与分析

经转录组测序及分析,从转录组数据中筛选出 28 个淀粉酶,其碱基序列可扫描二维码(图 2)。

图 1 牛大力淀粉酶 ORF

Fig. 1 ORF of amylase of *Millettia speciosa*

图 2 牛大力淀粉酶碱基序列二维码

Fig. 2 Base sequence of amylase of *Millettia speciosa*

2.1 牛大力淀粉酶基因家族成员的一级结构预测

2.1.1 牛大力淀粉酶基因家族成员的鉴定与理化性质分析 基于牛大力根系转录组测序结果,搜索到注释为淀粉酶基因的 unigene 共有 28 条,然后分别经 ORF Finder 和 CDS Search 确认具有完整开放阅读框 ORF,最后共鉴定到 28 条牛大力淀粉酶 unigene,命名为 MsAm1 到 MsAm28(表 1),ORF Finder 在线预测其编码的淀粉酶前体氨基酸数目最少的为 MsAm28(256 个),最大的为 MsAm12(4 141个)。利用 ExPAsy 在线软件对牛大力淀粉酶基因编码的蛋白质进行理化性质预测结果见表 1,牛大力淀粉酶的分子量在 20.78~349.39 kDa 之间,均为酸性蛋白质,带正电残基(Arg+Lys)和带负电残基(Asp+Glu)均为 0;不稳定系数显示 MsAm1、MsAm8、MsAm15、MsAm16、MsAm18、MsAm21、MsAm25、MsAm27、MsAm28 为稳定蛋白,

表 1　牛大力淀粉酶理化特征

Table 1　Physicochemical characteristics of amylase of *Millettia speciosa*

名称 Name	理化性质 Physicochemical characteristics				
	分子量 Molecular weight (kDa)	等电点 Isoelectric point	稳定系数 Coefficient of instability	总平均亲水性 Total average hydrophilicity	脂肪系数 Fat coefficient
MsAm1	45.86	5.07	37.13	0.673	27.60
MsAm2	254.12	4.80	46.24	0.852	30.69
MsAm3	136.74	4.99	44.12	0.731	29.08
MsAm4	271.47	4.87	41.60	0.643	27.56
MsAm5	123.31	5.03	46.02	0.821	35.51
MsAm6	46.68	5.20	47.10	0.667	27.54
MsAm7	78.82	5.11	48.34	0.689	29.60
MsAm8	130.23	5.04	39.74	0.848	39.62
MsAm9	229.47	4.90	43.89	0.632	26.48
MsAm10	319.45	4.83	45.58	0.722	30.70
MsAm11	264.97	4.86	40.04	0.817	33.01
MsAm12	349.39	4.77	46.76	0.835	33.78
MsAm13	272.61	4.80	41.86	0.777	28.49
MsAm14	133.48	4.98	47.83	0.795	29.69
MsAm15	343.91	5.31	27.94	0.547	29.25
MsAm16	152.73	5.00	38.63	0.630	28.74
MsAm17	355.31	4.75	46.66	0.827	31.65
MsAm18	270.30	4.88	39.71	0.656	29.84
MsAm19	145.13	4.97	46.40	0.766	28.99
MsAm20	253.29	4.83	43.96	0.822	28.15
MsAm21	196.56	4.92	35.98	0.669	26.90
MsAm22	129.28	4.95	41.77	0.765	33.21
MsAm23	61.91	5.05	40.86	0.672	30.16
MsAm24	201.04	4.91	44.93	0.683	26.67
MsAm25	152.75	4.95	36.51	0.562	28.81
MsAm26	172.72	4.96	41.57	0.650	27.59
MsAm27	169.67	4.93	39.40	0.824	30.20
MsAm28	20.78	5.32	36.94	0.781	31.25

其余为不稳定蛋白;总平均亲水性及脂肪指数显示该家族蛋白均属于亲水性蛋白。

2.1.2 牛大力淀粉酶基因序列预测　使用 PlantCARE 对基因的顺式调控元件、增强子和抑制子等进行分析发现,该淀粉酶基因家族共有 86 个作用元件(图 3),MsAm9 的作用元件最多(42 个),其次是 MsAm10(41 个),MsAm28 的作用元件最少(7 个)。28 个淀粉酶中均含有 Unnamed__4 作用元件,其次除了 MsAm11 外,均含有 CAAT-box;除了 MsAm1 外,均含有 STRE 。其次含量丰富的是 MYB,除 MsAm8 和 MsAm28 均含有,接下来依次为 MYC, ARE, MBS, as-1, MYB-like sequence, Unnamed__1, TGACG-motif 等。

2.2 牛大力淀粉酶基因家族成员的二级结构预测

2.2.1 牛大力淀粉酶的结构域预测　结构域分析发现,牛大力淀粉酶基因家族共有 11 个结构域,如图 4 所示,包括 PLN02784 super family、AmyAc-family super family、E-set-GDE-Isoamylase-N、PUA

表 2 牛大力淀粉酶三级结构建模特征

Table 2 Modeling characteristics of three-level structure of amylase of *Millettia speciosa*

淀粉酶名称 Amylase name	建模氨基酸数量及占比 Modeling amino acids and proportions (%)	建模 Modeling	序列同源性 Sequence homology (%)	模型名称 Model name
MsAm1	144(90)	d1m53a2	100	β,α 桶,淀粉酶催化域 β,α-Barrel, amylase catalytic domain
MsAm2	645(76)	c4j7rA	100	水解酶,异淀粉酶 Hydrolase, isoamylase
MsAm3	399(88)	c2qpuB	100	水解酶,α-淀粉酶同工酶 Hydrolase, α-amylase isoenzyme
MsAm4	152(70)	c5wwrA	100	转移酶,甲基转移酶 Transferase,methyltransferase
MsAm5	33(73)	c 5gkeB	35.7	水解酶,内切酶 Hydrolase, endonuclease
MsAm6	10(20)	c4pbzB	19.9	细胞周期,转移蛋白 Cell cycle, transfer protein
MsAm9	18(18)	c2i3sF	16.7	细胞周期,蛋白激酶 Cell cycle, protein kinase
MsAm10	360(40)	c2qpuB	100	水解酶,α-淀粉酶同工酶 Hydrolase,α-amylase isoenzyme
MsAm11	279(99)	c2qpuB	100	水解酶,α-淀粉酶同工酶 Hydrolase,α-amylase isoenzyme
MsAm12	68(69)	d2azea1	44.1	E2F-DP 异二聚化区 E2F-DP heterodimerization zone
MsAm13	81(13)	c1gcyA	99.5	水解酶,葡聚糖麦芽四氢酶 Hydrolase, dextran maltetrahydrolase
MsAm14	62(12)	c2laaA	96.4	水解酶,α/β-淀粉酶 Hydrolase,α/β-amylase
MsAm15	7(16)	c5aj3k	42.3	核聚糖 Nucleo
MsAm16	126(78)	c3bc9A	100	水解酶,α-淀粉酶催化域 Hydrolase,α-amylase catalytic domain
MsAm17	276(75)	c3amlA	100	转移酶 Transferase
MsAm18	182(98)	c2qpuB	100	水解酶,α-淀粉酶同工酶 Hydrolase,α-amylase isoenzyme
MsAm19	63(23)	c2c3wB	96	α-淀粉酶糖结合蛋白 α-amylase glycobinding protein
MsAm23	6(15)	c2l4gA	7.8	病毒蛋白 Viral protein
MsAm24	152(70)	c5wwrA	100	转移酶,甲基转移酶 Transferase,methyltransferase
MsAm25	38(46)	c4tzoC	17.9	肽结合蛋白 Peptide binding protein
MsAm26	152(70)	c5wwrA	100	转移酶,甲基转移酶 Transferase,methyltransferase
MsAm27	270(98)	c2qpuB	100	水解酶,α-淀粉酶同工酶 Hydrolase,α-amylase isoenzyme
MsAm7	16(32)	c6gdjA	32	结构蛋白 Structural protein
MsAm8	14(31)	d1m1ha1	7.7	插入域 Insert field
MsAm21	434(66)	d1fa2a	100,	β,α-桶,淀粉酶催化域 β,α-Barrel, amylase catalytic domain
MsAm22	257(97)	c2xfyA	100	水解酶,β-淀粉酶 Hydrolase,β-amylase
MsAm28	30(97)	d1wdpa1	97.9	β,α-桶,淀粉酶催化域 β,α-Barrel, amylase catalytic domain
MsAm20	726(90)	c4j7rA	100	水解酶,异淀粉酶 Hydrolase, isoamylase

super family、AmyAc-plant-lsoA、GH-D super family 等。不同类型的淀粉酶的结构域有差别。如含有 PLN02784 super family 结构域的,预测显示为 α-淀粉酶,如 MsAm5、MsAm6、MsAm10、MsAm11、MsAm12、MsAm13、MsAm14、MsAm15、MsAm16、MsAm17、MsAm18、MsAm19、MsAm23、MsAm27。

2.2.2 牛大力淀粉酶的二级结构分析 利用 SOPMA 对牛大力淀粉酶序列进行二级结构预测,结果发现(图 5),其二级结构中除 MsAm1、MsAm7、MsAm8、MsAm15、MsAm16、MsAm22、MsAm23、MsAm28 α 螺旋占比最大(占 38.46%~75.86%)外,其他淀粉酶中无规则卷曲的比例最大,占 34.15%~55.56%,MsAm28 中无规则卷曲的比例最小(3.45%),α 螺旋比例最高的是 MsAm28(75.86%),其次为 MsAm7、MsAm22、MsAm15、MsAm8、MsAm23、MsAm19、MsAm1、MsAm17

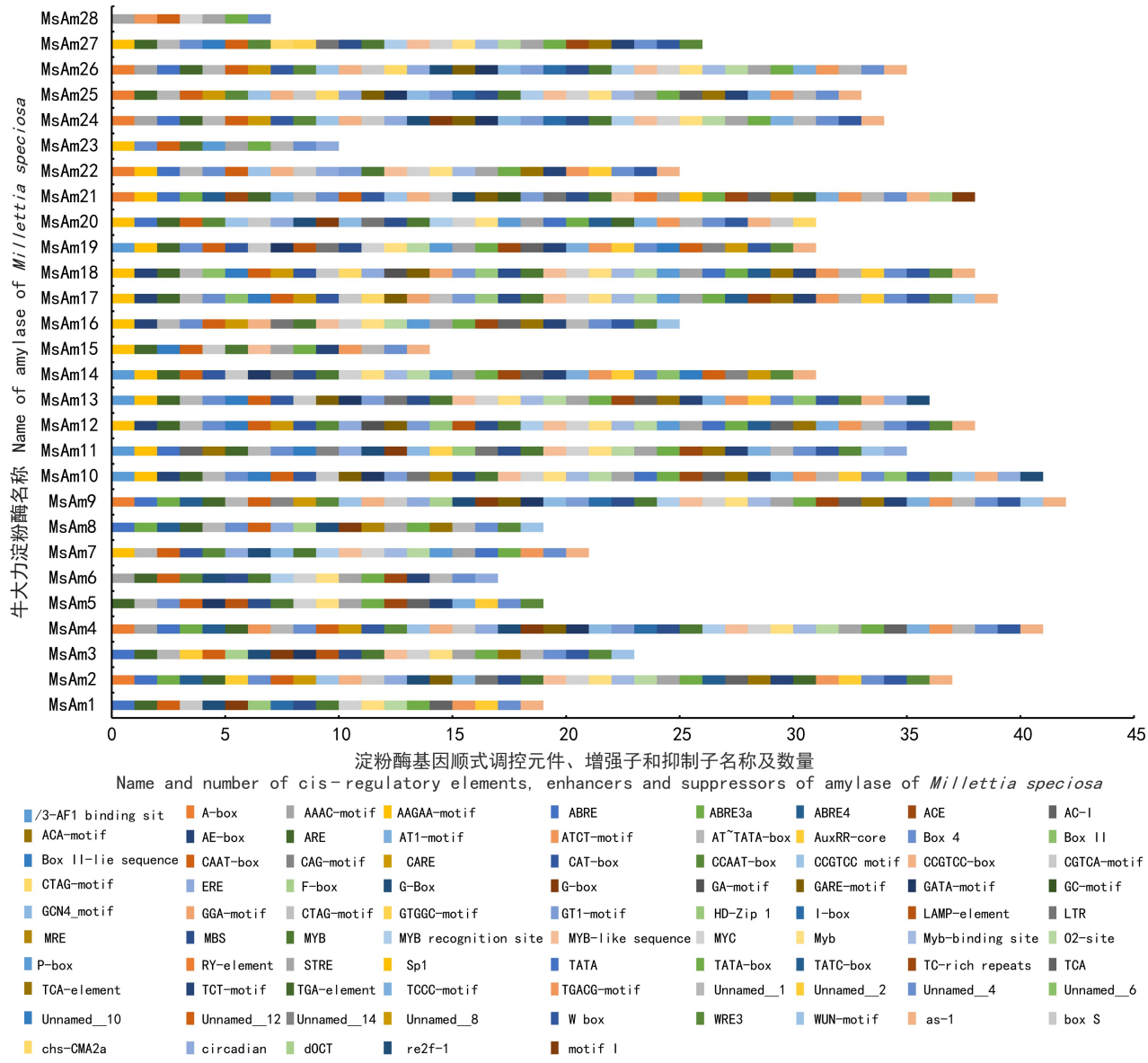

图 3　牛大力淀粉酶基因顺式调控元件、增强子和抑制子预测图

Fig. 3　Cis-regulatory elements, enhancers and suppressors of amylase of *Millettia speciosa*

(38.15%~58.00%),MsAm5 中无 α 螺旋,最小的是 MsAm6(8.16%);β 折叠比例最高的是 MsAm23(12.25%),最小的是 MsAm2(4.34%);延长链比例最高的是 MsAm5(40.00%),其次是 MsAm8、MsAm6、MsAm23、MsAm25(34.15%~37.78%),最小的是 MsAm22(13.58%)。

2.3 牛大力淀粉酶基因家族成员的三级结构预测

2.3.1 信号肽预测及亚细胞定位　跨膜预测发现该基因家族均可跨膜于胞外,且信号肽预测结果显示(图 6),MsAm5、MsAm8 和 MsAm14 可能存在信号肽段,其余均无信号肽。亚细胞定位结果显示这些淀粉酶均定位在细胞壁外,MsAm3、MsAm9、MsAm11、MsAm12、MsAm13、MsAm21、MsAm22、MsAm23、MsAm27 均较大程度定位于叶绿体中。

2.3.2 牛大力淀粉酶的三级结构分析　用 SWISS-MODEL 对牛大力淀粉酶家族进行了三级结构预测和可视化分析,结果如表 2 所示。三级结构预测具有 α-淀粉酶结构的是 MsAm3、MsAm10、MsAm11、MsAm16、MsAm18、MsAm19、MsAm27;具有 β 淀粉酶结构的是 MsAm22;具有异淀粉酶结构

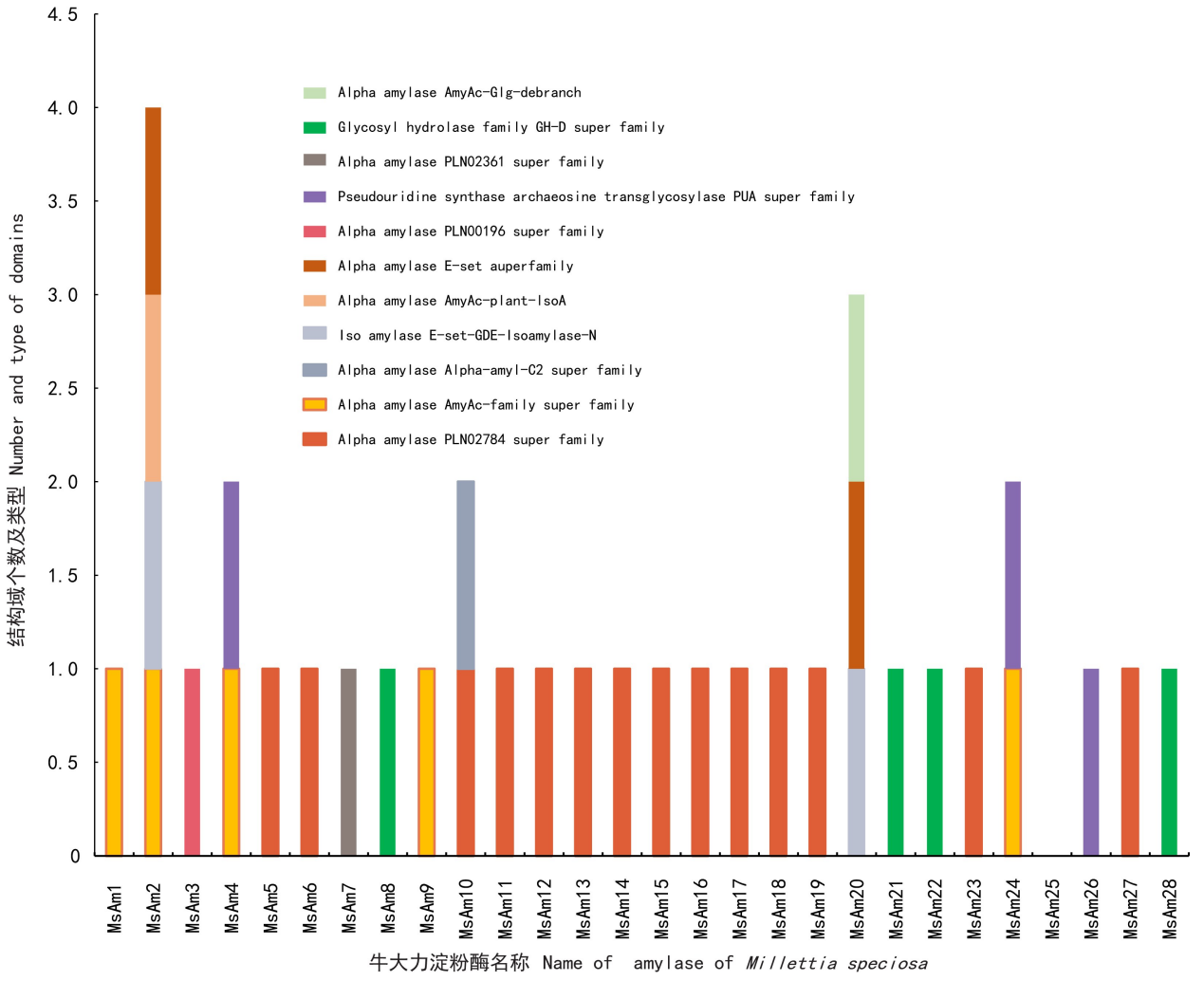

图 4 牛大力淀粉酶结构域预测图

Fig. 4 Structural domain prediction of amylase of *Millettia speciosa*

的是 MsAm2、MsAm20;具有 α、β 淀粉酶结构的是 MsAm1、MsAm14、MsAm21、MsAm28;具有甲基转移酶结构的是 MsAm4、MsAm24、MsAm26。其中,MsAm1、MsAm2、MsAm3、MsAm4、MsAm10、MsAm11、MsAm16、MsAm17、MsAm18、MsAm20、MsAm21、MsAm22、MsAm24、MsAm26、MsAm27 的序列同源性为 100%,三级结构图见图 7。

2.4 牛大力淀粉酶的系统发育分析及分类

基于淀粉酶氨基酸序列的 NJ 系统发育树结果如图 8 所示,28 条牛大力淀粉酶序列中:MsAm15、MsAm16 归于 1 类,且均具有 motif 2、motif 3、motif 7;MsAm4、MsAm24、MsAm26 归于 1 类,且均具有 motif 1、motif 2、motif 3、motif 4、motif 5、motif 7、motif 8。

选取拟南芥淀粉酶基因 15 个,与牛大力淀粉酶构建 NJ 系统发育树,结果见图 9。根据与拟南芥淀粉酶的系统发育情况,可知 AtBM4 和 MsAm6 归为一类,AtAM2 和 MsAm2 归为一类,AtBM8 和 MsAm5 归为一类,AtBM4 和 MsAm6 归为一类,AtAM10 和 MsAm22 归为一类,AtIM3 和 MsAm17 归为一类。

3 讨论与结论

本文对 28 个牛大力淀粉酶进行生物信息学分析,发现相关蛋白基因编码的氨基酸序列分子量为 20.78~349.39 KDa,并鉴定为酸性蛋白,部分亚

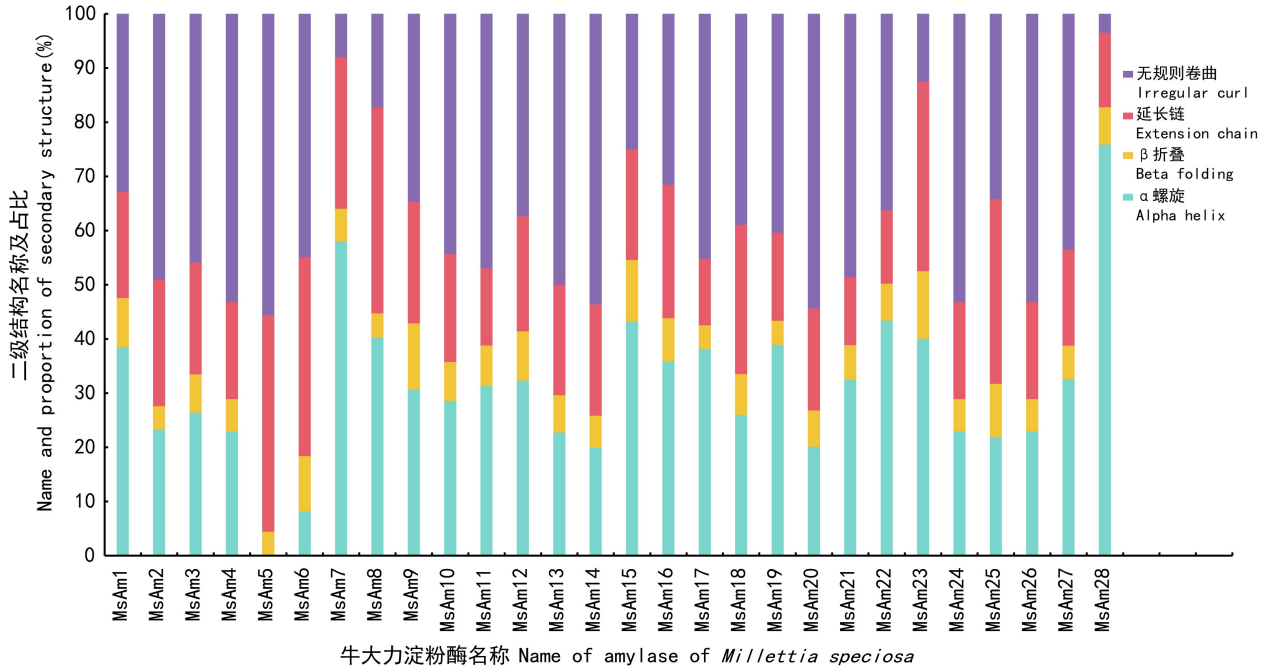

图 5　牛大力淀粉酶二级结构占比图

Fig. 5　Secondary structure proportion of amylase of *Millettia speciosa*

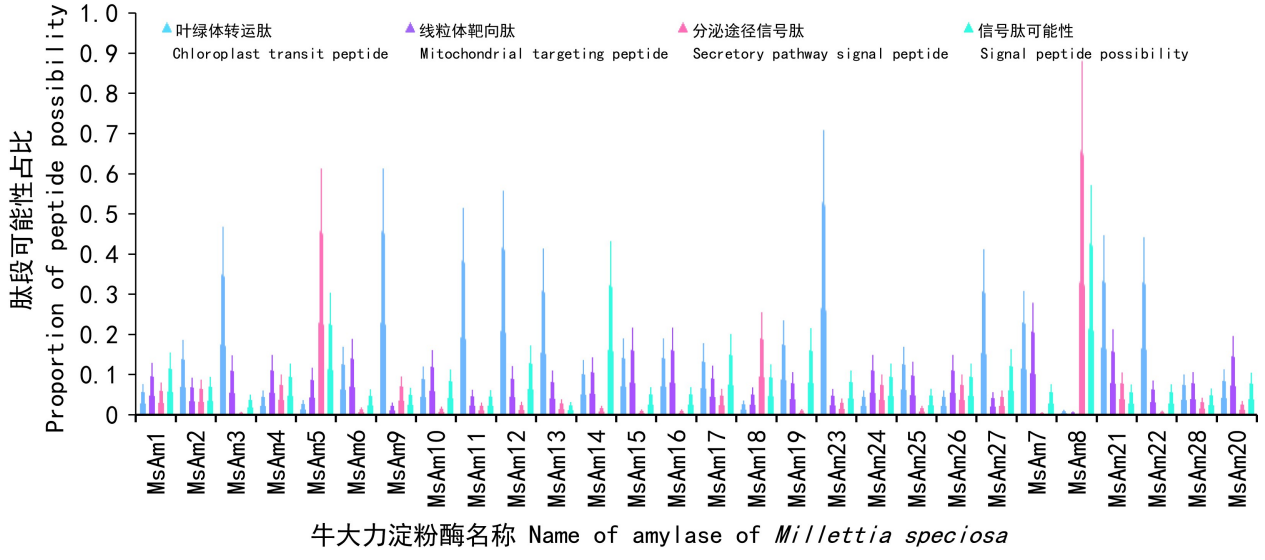

图 6　牛大力淀粉酶亚细胞预测图

Fig. 6　Subcellular prediction of amylase of *Millettia speciosa*

细胞定位在叶绿体，具有 PLN02784 super family、AmyAc-family super family 结构域，无规则卷曲的比例最大，三级结构预测具有 α 淀粉酶结构、β 淀粉酶结构、异淀粉酶结构等，该基因家族共有 86 个作用元件，系统发育树表明 MsAm15、MsAm16 归于 1 类，且均具有 motif 2、motif 3、motif 7，拟南芥 AtBM4 和 MsAm6 归为一类等。在膨大根的转录组中，这些基因表达量均显著提高，说明淀粉酶可能与根的膨大有一定的相关性。牛大力淀粉酶的生物信息学分析结果为研究牛大力根膨大的机理

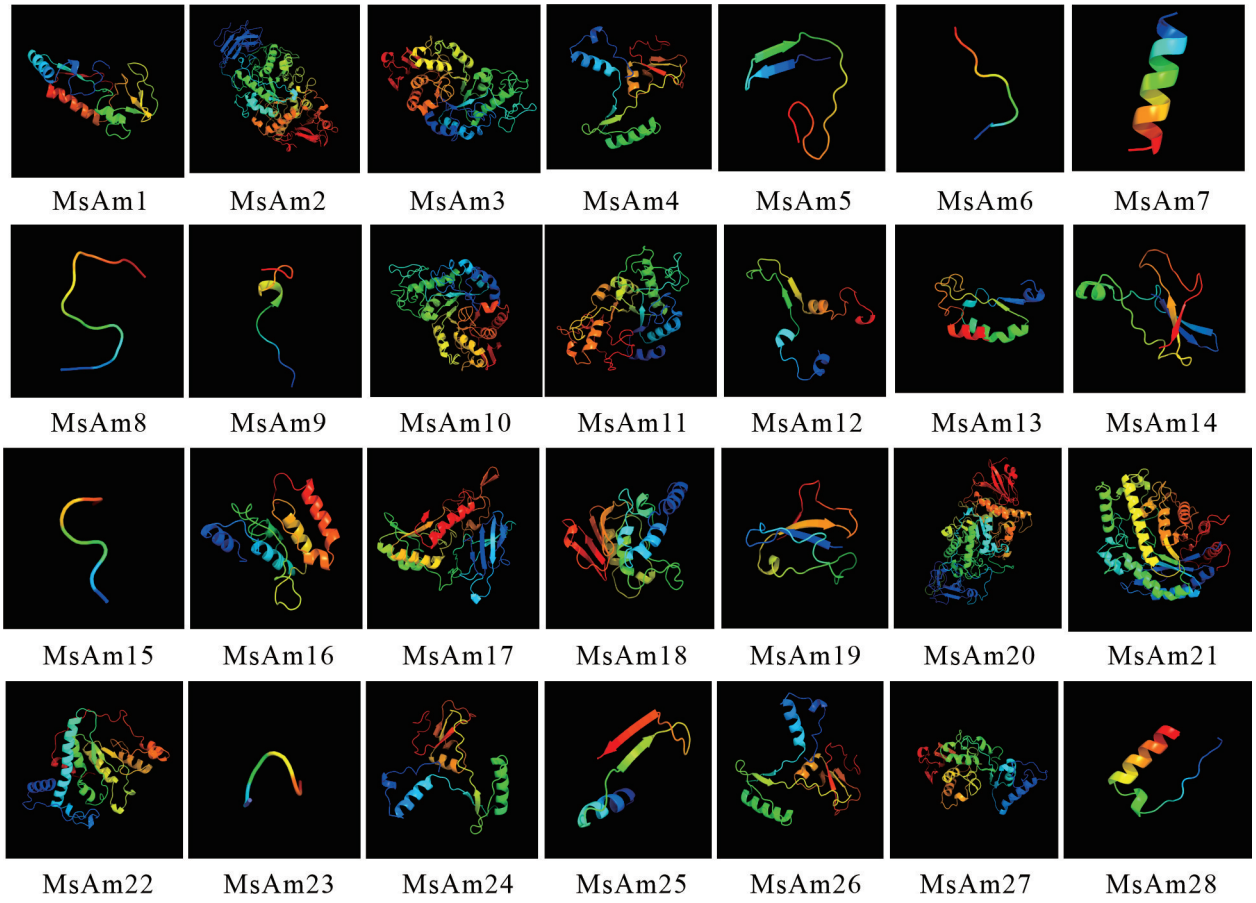

图 7 牛大力淀粉酶家族三级结构图

Fig. 7 Tertiary structure of amylase of *Millettia speciosa*

奠定了基础,提出了研究的思路和方向。

据报道,淀粉率和 β-淀粉酶活性在膨大后期和贮藏期的变化会影响甘薯的膨大及产量(谢逸萍等,2008;陶向等,2010)。不同品种的甘薯膨大与 β-淀粉酶活性和淀粉率差异明显,且与其膨大有一定的相关性(陈显让等,2013; Dziedzoave et al., 2010;Sundarram, 2014),此外,谭冬秀(2018)对不同结薯能力的牛大力种苗进行转录组测序,获得 64 036 条 unigene,发现与植物根系生长相关的基因 213 个,与淀粉代谢相关的基因 358 个,与激素代谢相关的基因 383 个,其中有 61 个基因表达差异显著,包括扩张蛋白、纤维素合酶、淀粉合成的关键酶、细胞分裂素、乙烯、生长素、独角金内酯、油菜素内酯等的相关代谢基因,以上研究与本研究有一定的一致性,但也未对这些基因进行深入的研究和验证,因此,牛大力根膨大是否与这些基因有关,是哪些基因调控了牛大力根的生长和膨大等问题尚未解决,牛大力根膨大的分子机理尚不明确,还需进一步的研究。

此外,淀粉酶的表达除了与根膨大有一定关系外,还具有广泛的生物活性。α-淀粉酶能切割淀粉、糖原或多糖的内部 α-1,4 糖苷键,产生短链糊精、寡糖、葡萄糖和麦芽糖等产物,该过程使淀粉黏度迅速降低。α-淀粉酶可以从植物、动物或微生物中获得,不同来源的 α-淀粉酶功能相似,但在最适温度、pH 等应用条件上有差异(李文钊等,2017)。刘晓丹等(2017)发现淀粉酶能显着降低小麦的糊化特性,从而降低了小麦的品质。萝卜因富含淀粉酶成为一种超低热量的蔬菜,且对胃部粘膜的修复具有很好的促进作用,能够防止胃酸过多、胃炎及胃溃疡,同时能够增强消化机能(任喜波等,2012)。β-淀粉酶可能通过促进叶片

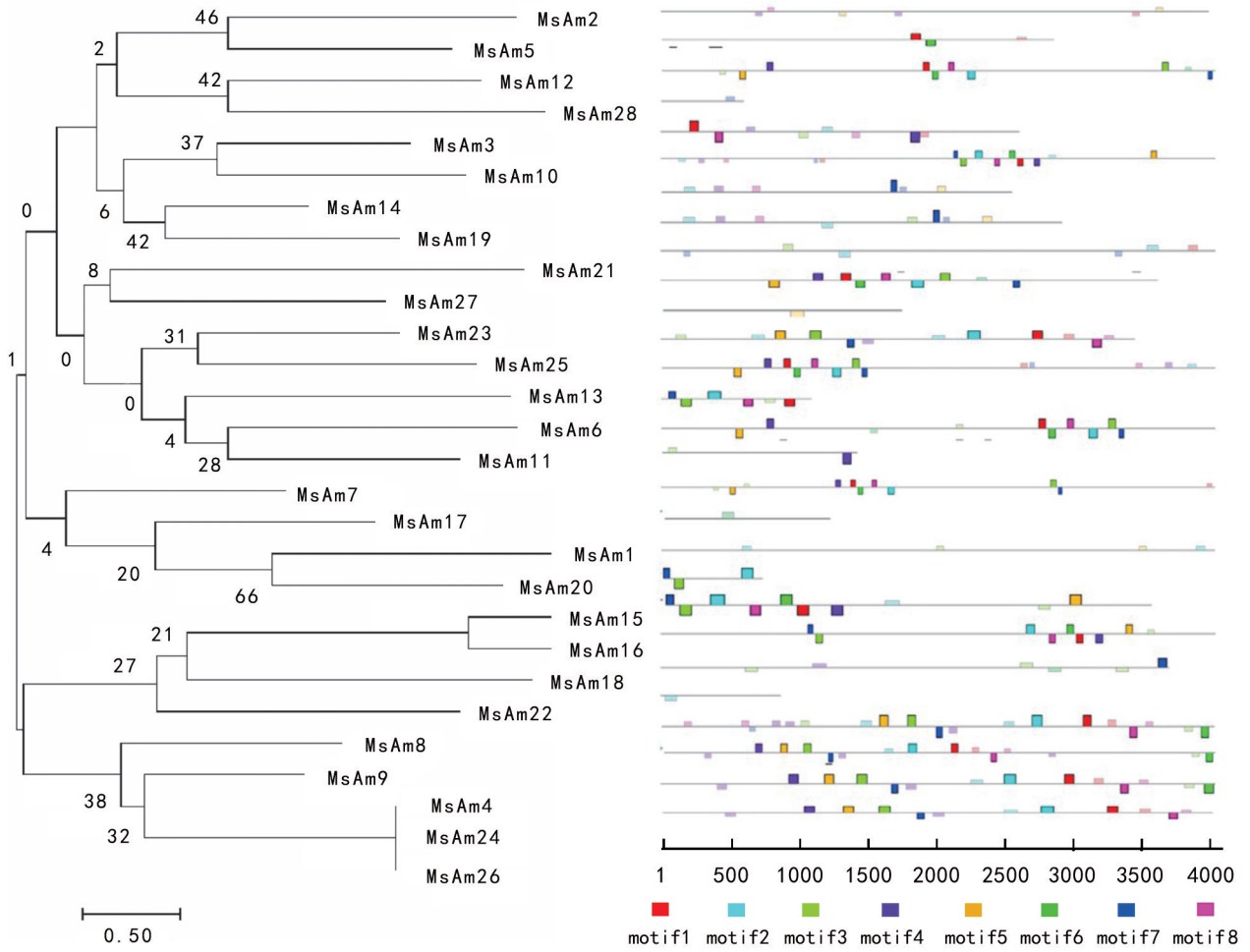

图 8　牛大力淀粉酶的系统发育树及蛋白基序

Fig. 8　Phylogenetic tree and protein motif of amylase of *Millettia speciosa*

与角果皮淀粉分解而加强光合产物向籽粒的运输强度,并参与油菜种子中淀粉的调控(靳舒荣等,2019),且 β-淀粉酶影响着糙米的发芽(陶澍等,2018)。因此,研究植物中淀粉酶也将为植物的生长发育及物质的转换等机理的阐释提供科学参考,为将来基因工程育种提供科学依据。

参考文献:

CHEN RR, PU HL, JIANG H, et al., 2014. Isolation, purification and antioxidant activity of polysaccharides from *Millettia speciosa* Champ. [J]. Food Res Dev, 35 (3): 31-34. [陈蓉蓉, 蒲含林, 姜华, 等, 2014. 牛大力多糖的分离纯化及抗氧化活性研究 [J]. 食品研究与开发, 35(3): 31-34.]

CHEN XR, LI HB, KANG L, et al., 2013. Correlation analysis of beta-amylase and starch content in late stage of sweet potato tuber swelling [J]. Food Ind Technol, (19): 93-96. [陈显让, 李红兵, 康乐, 等, 2013. 甘薯块根膨大后期 β-淀粉酶和淀粉含量相关性分析 [J]. 食品工业科技, (19): 93-96.]

Department of Health, Guangxi Zhuang Autonomous Region, 1992. Standard of Traditional Chinese Medicine in Guangxi [M]. Nanning: Guangxi Science and Technology Press: 31-32. [广西壮族自治区卫生厅, 1992. 广西中药材标准 [M]. 南宁: 广西科学技术出版社: 31-32.]

DZIEDZOAVE NT, GRAFFHAM AJ, WESTBY A, et al., 2010. Influence of variety and growth environment on β-amylase activity of flour from sweet potato (*Ipomea batatas*) [J]. Food Control, 21 (2): 162-165.

Food and Drug Administration of Guangdong, 2004. Standards of

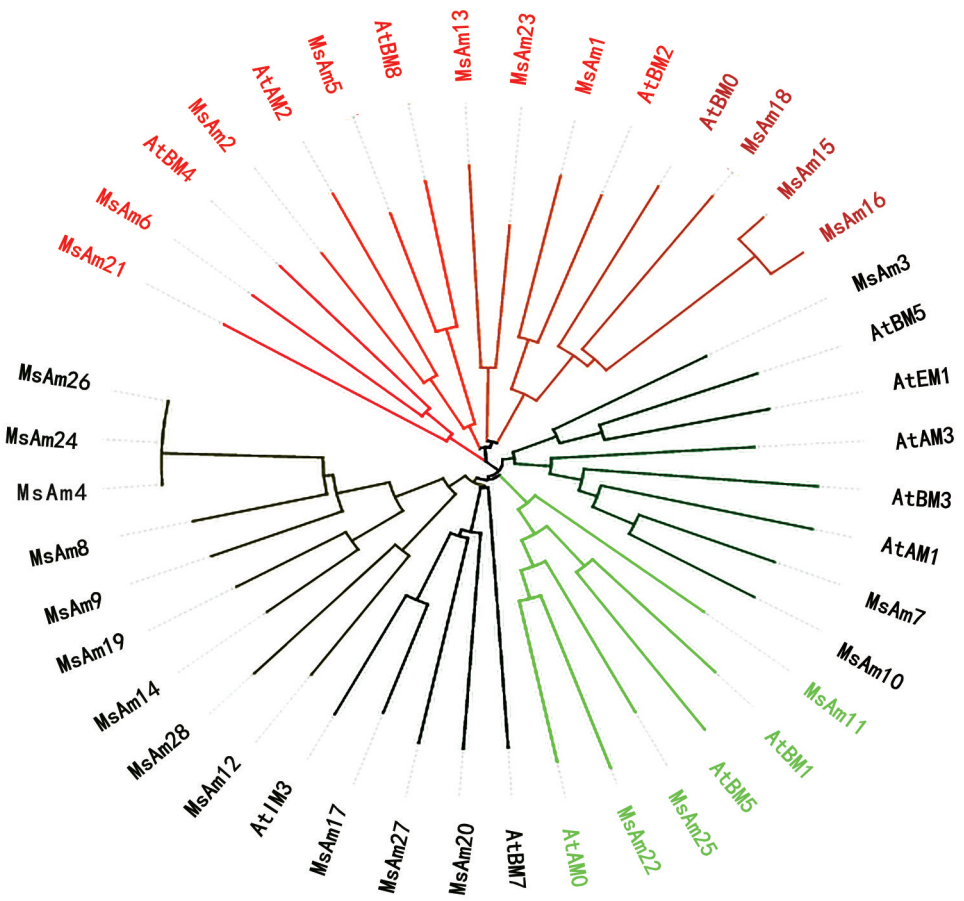

图 9 拟南芥淀粉酶与牛大力淀粉酶系统发育树

Fig. 9 Phylogenetic tree of amylase of *Millettia speciosa* and *Arabidopsis thaliana*

Traditional Chinese Medicine in Guangdong Province (Volume 1) [M]. Guangzhou: Guangdong Science and Technology Press: 40-41. [广东省食品药品监督管理局, 2004. 广东省中药材标准(第一册) [M]. 广州: 广东科学技术出版社:40-41.]

GUI J, SHEN J, LI L, 2011. Functional characterization of evolutionarily divergent 4-coumarate:coenzyme a ligases in rice [J]. Plant Physiol, 157(2): 574-586.

HUANG X, WANG XP, CHEN XB, 2014. Experimental study on the anti-fatigue and anti-stress effects of Chinese herbal medicine *Millettia speciosa* Champ. [J]. J Yulin Norm Univ, 35 (2): 55-58. [黄翔, 王晓平, 陈晓白, 2014. 中药牛大力抗疲劳抗应激作用的实验研究 [J]. 玉林师范学院学报, 35(2): 55-58.]

JIN SR, WANG YM, CHANG Y, et al., 2019. Analysis of beta-amylase activity and gene family expression in *Brassica napus* with different harvestindices [J]. J Crop Sci, 45(8): 1279-1285. [靳舒荣, 王艳玫, 常悦, 等, 2019. 不同收获指数甘蓝型油菜 β-淀粉酶活性及其基因家族成员的表达分析 [J]. 作物学报, 45(8): 1279-1285.]

KELLY LA, MEZULIS S, YATES CM, et al., 2015. The Phyre2 veb portal for protein modeling, prediction and analysis [J]. Nat Prot, 10: 845-858.

LESCOT M, DEHAIS P, MORENU Y, et al., 2002. Database issue [J]. Nucl Acid Res, 30(1): 325-327.

LI WZ, ZANG CG, LI Y, et al., 2017. Progress in research and application of alpha-amylase [J]. Contemp Chem Ind, (11): 122-126. [李文钊, 臧传刚, 李义, 等, 2017. α-淀粉酶的研究与应用进展 [J]. 当代化工, (11): 122-126.]

LIU DD, TANG LH, WANG Y, et al., 2009. Experimental study of *Millettia speciosa* Champ. expectorant, antitussive and antiasthmatic effects [J]. J Guangzhou Univ Trad Chin Med, 26 (3): 266-269. [刘丹丹, 唐立海, 王艳, 等, 2009. 牛大力祛痰、镇咳和平喘作用的实验研究 [J]. 广州中医药大学学报, 26(3): 266-269.]

LUO X, LIN CW, CHEN JJ, et al., 2014. Anti-fatigue effects of *Millettia speciosa* Champ. polysaccharide on mice [J]. Nat Prod Res Dev, 26 (3): 324-328. [罗轩, 林翠梧, 陈洁

晶，等，2014. 牛大力多糖对小鼠抗疲劳作用的研究［J］. 天然产物研究与开发，26(3)：324-328.］

LIU XD，PAN ZF，QU LL，et al.，2017. Effects of alpha-amylase on gelatinization properties of wheat［J］. J Appl Environ Biol，23（6）：1052-1058.［刘晓丹，潘志芬，琚亮亮，等，2017. α-淀粉酶对小麦糊化特性的影响［J］. 应用与环境生物学报，23(6)：1052-1058.］

National Compilation Group of Chinese Herbal Medicines，1986. National Compilation of Chinese Herbal Medicines（Volume 1）［M］. Beijing：People's Health Press：200.［全国中草药汇编编写组，1986. 全国中草药汇编：（上册）［M］. 北京：人民卫生出版社：200.］

Nanjing University of Traditional Chinese Medicine，2005. Dictionary of Traditional Chinese Medicine：（Volume 1）［M］. Shanghai：Shanghai Science and Technology Press：573.［南京中医药大学，2005. 中药大辞典（上册）［M］. 上海：上海科学技术出版社：573.］

REN XB，DAI XY，ZHANG JH，et al.，2012. Study on the difference of amylase activity among different radish varieties［J］. N Hortic，(22)：21-23.［任喜波，戴希尧，张俊花，等，2012. 不同萝卜品种淀粉酶活性的差异研究［J］. 北方园艺，(22)：21-23.］

SUNDARRAM A，2014 . α-Amylase production and applications：A review［J］. J Applenviro Mic，2(4)：166-175.

TAN DX，2018. Analysis of gene expression related to root enlargement of *Millettia speciosa* Champ. based on transcriptome sequencing［D］. Nanning：Guangxi University：2.［谭冬秀，2018. 基于转录组测序的牛大力根系膨大相关基因表达分析［D］. 南宁：广西大学：2.］

TAO S，SONG Y，CAO L，et al.，2018. Changes of amylase activity and related metabolites during brown rice germination［J］. Anhui Agric Sci，46（6）：151-153.［陶澍，宋玉，曹磊，等，2018. 糙米发芽过程中淀粉酶活力及其相关代谢产物变化研究［J］. 安徽农业科学，46(6)：151-153.］

TAO X，ZHANG YW，JIANG YS，et al.，2010. Changes of starch content in sweet potato tuber roots during storage［J］. J Appl Environ Biol，16(5)：741-744.［陶向，张勇为，姜玉松，等，2010. 甘薯块根储藏过程中的淀粉含量变化［J］. 应用与环境生物学报，16(5)：741-744.］

WANG CW，JI MH，SHU HM，et al.，2013. Extraction technology of total flavonoids from *Millettia speciosa* Champ. and antioxidant activity of different extracts［J］. Chem Res Appl，25（5）：713-717.［王呈文，纪明慧，舒火明，等，2013. 牛大力总黄酮提取工艺及不同萃取物的抗氧化活性研究［J］. 化学研究与应用，25(5)：713-717.］

WANG H，YANG J，ZHANG M，et al.，2016. Altered phenylpropanoid metabolism in the maize Lc-expressed sweet potato（*Ipomoea batatas*）affects storage root development［J］. Sci Rep，6：18645.

WEI CP，LIU DD，TANG LH，et al.，2009. Effects of *Millettia speciosa* Champ. on immune function in mice［J］. J Guangzhou Univ Trad Chin Med，26（6）：539-542.［韦翠萍，刘丹丹，唐立海，等，2009. 牛大力对小鼠免疫功能的影响［J］. 广州中医药大学学报，26(6)：539-542.］

WEI YY，WU FJ，ZENG HS，et al.，2010. Overview research of *Millettia speciosa* Champ.［J］. J Guangxi Acad Sci，26（3）：380-382.［韦玉燕，巫繁菁，曾海生，等，2010. 牛大力研究概况［J］. 广西科学院学报，26(3)：380-382.］

WU JH，2014. Planting *Millettia speciosa* Champ. is a new bright spot of future agricultural income generation in Guangxi［J］. Chin Agric Inform，（23）：154.［伍家豪，2014. 种植牛大力是广西未来农业创收新亮点［J］. 中国农业信息，（23）：154.］

XIE YP，LI HM，WANG X，2008. Trend of amylase activity in sweet potato tubers during storage［J］. J Jiangsu Agric，24（4）：406-409.［谢逸萍，李洪民，王欣，2008. 贮藏期甘薯块根淀粉酶活性变化趋势［J］. 江苏农业学报，24(4)：406-409.］

ZHOU TR，LIU DD，TANG LH，et al. 2009. Protective effect of *Millettia speciosa* Champ. on acute liver injury induced by carbon tetrachloride and alcohol in mice［J］. Shizhen Med Nat Med Res，20（10）：2585-2587.［周添浓，刘丹丹，唐立海，等，2009. 牛大力对四氯化碳及酒精所致小鼠急性肝损伤的保护作用［J］. 时珍国医国药，20(10)：2585-2587.］

（责任编辑　周翠鸣）