

植物转化酶蛋白抑制子研究进展

孙 威, 姜 晶

(沈阳农业大学 园艺学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘 要: 对植物转化酶蛋白抑制子的蛋白序列、结构、表达调控以及可能的生理作用进行了总结, 并进一步阐述关于转化酶抑制子在生物技术上的应用价值, 以及转化酶抑制子在拟南芥中所取得的进展。

关键词: 转化酶; 转化酶抑制子

中图分类号: Q 946.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)02-0052-03

转化酶是蔗糖代谢的关键酶, 参与蔗糖的分解, 在植物体内具有重要的生理作用。植物酸性转化酶主要有两大类: 一类结合于细胞壁上, 称之为细胞壁结合的转化酶(cell wall-bound invertase, CWI), 具有较高的 pH (约 9~10), 另一类存在于液泡中, 称之为可溶性酸性转化酶(soluble acid invertase, SAI), 其 pH 约为 5.0。酸性转化酶在调节韧皮部糖的卸载、控制贮藏器官中糖的组成、参与植物对逆境胁迫的响应、影响植物早期生长发育以及在信号转导等方面都具有重要的作用^[1-3]。因此通过改变转化酶活性来调控碳水化合物的代谢与分配, 进而特异地改变植物的生长和发育模式具有重要的意义。

内源蛋白抑制子的调节是植物酸性转化酶翻译后调节的一个重要方面, 受到很大关注。蛋白抑制子(proteinous inhibitor, INH)存在于植物发育的特定阶段, 它在植物中并非广泛存在, 其作用似乎只限于酸性转化酶^[4]。近年来, 植物转化酶蛋白抑制子结构、表达调控及生理功能的研究引起了人们广泛的重视。现就这几个方面的研究进展进行综述, 并对今后的研究作一些探讨。

1 转化酶蛋白抑制子基因及其蛋白结构

在马铃薯块茎中首先发现转化酶抑制子的存在, 但是当时并没有获得蛋白质序列^[5-7]。在后来的 30 a 中, 若干报道扩展了这些早期观察, 如在其它营养贮藏组织, 像红甜菜、甜菜和甘薯。有趣的是在玉米的胚乳中也有关于转化酶抑制子的报道^[8], 表明种子在生长过程中, 这些抑制子也参与了转化调节。1994 年 Pressey 和

Weil 等分别从番茄果实和烟草悬浮培养细胞首次分离到可能的转化酶抑制子的 N 端序列^[9-10]。但番茄抑制子在细胞内至今没有定位, 而完整烟草悬浮细胞的盐洗脱表明细胞壁抑制子是与 CWI 协同定位的。pH、蔗糖浓度和二价金属离子可影响 INH 与 CWI 的结合, INH/CWI 复合物是酸性稳定型的, 最高抑制作用在 pH 4.5, 当 pH 6.5 以上时, INH 对 CWI 的抑制消失。

比较烟草细胞和番茄果实纯化的部分蛋白抑制子使转化酶失活的时间进程发现, 来自烟草培养细胞的 CWI 和番茄果实的 SAI 的靶酶不同。抑制子对 SAI 是瞬间灭活, 而 CWI 的活性在大约 30 min 内逐渐下降, 这表明复合物在形成过程中存在本质的差异。Greiner 等人^[11]利用烟草悬浮细胞纯化抑制子蛋白, 经胰蛋白酶处理后, 测定多肽序列, 然后利用 RT-PCR 以及筛选 cDNA 文库方法首次获得了转化酶抑制子的 cDNA 克隆。烟草的液泡转化酶抑制子(Nt-VIF)和细胞壁转化酶抑制子(Nt-CIF)基因的 cDNA 片段在大肠杆菌 his- 标记蛋白重组体中表达, 并确定其活性是与不同的靶酶作用。NtCIF 对不同植物的 CWI 和 SAI 均有抑制活性, 而 NtVIF 蛋白对 SAI 有特异性; 值得注意的是两种蛋白都不能抑制真菌的转化酶活性。

在目前所有可能的植物细胞壁与液泡转化酶抑制子中均具有 4 个半胱氨酸残基^[12], 其中 NtCIF 是迄今为止研究最完善的植物转化酶抑制子。NtCIF 蛋白通过 4 个螺旋结构以及二硫桥形成稳定的蛋白结构。近来在杏树果实中得到的与 NtCIF 相关的转化酶抑制子证实二硫桥存在于第一和第二半胱氨酸之间及第三和第四个半胱氨酸之间。有趣的是, 2 条硫化物桥的排列在 CIF 和 PME1 中是一致的。但 PME1 蛋白不能抑制转化酶, 在结构/功能关系中需作深入的研究来描述 C/VIFs 和 PME1s 之间的哪些差异, 决定了酶严格的底物专一性。

2 转化酶抑制子的表达分析

2.1 植物生长过程中 CIF 的表达

第一作者简介: 孙威(1983-), 女, 硕士, 主要从事蔬菜生物技术方面的研究。E-mail: t_gsw@hotmail.com。

通讯作者: 姜晶。E-mail: jiangjingcau@163.com。

基金项目: 辽宁省教育厅科学研究技术计划资助项目(05L412)。

收稿日期: 2007-08-07

在开花 15 周的烟草不同组织中分析了 NtCIF 的 RNA 转录, 结果表明其在花的子房、花蕊和花瓣中有大量表达^[11]。在营养组织的茎中表达最强; 而在叶片中, 从幼叶(库叶)到衰老的叶片表达逐渐增强; 在根中 NtCIF 的表达最低。不同发育阶段叶片的 NtCIF 与 CWI 表达同时, 其可能的靶酶与其是平行的转录。在源叶和衰老叶片 CWI 和 NtCIF 免疫共表达分析也得到同样的结果。但是同 NtCIF 表达显著不同的是 经研究 CWI 的转录数量在根中含量很高, 在花器官中含量很低^[13]。在番茄的叶片和花中也观察到 CWI 和 C/VIF-RP 的共表达, C/VIF-RP 在花的后期表达增加。此外, 在整个番茄果实的生长中, C/VIF-RP 在果皮组织中表达 通过免疫杂交发现了在绿色的果实中两个推测的不同大小的 C/VIF-RPs。

2.2 细胞培养中 CIF 的表达

CWI 与 NtCIF 蛋白在整个烟草悬浮培养细胞培养期间也存在共表达^[14]。通过 ConA 的亲和层析以及丙酮酰氨凝胶电泳(NtCIF 不能糖基化, 只有当与 CWI 结合成复合物, 才能与 ConA 相偶联)说明了蛋白之间复合物的形成。在整个培育的时间内, 尽管这两种蛋白共表达 但只有当介质中的蔗糖耗尽, 才会抑制 CWI 的活性。从其他的品种中如 *Chenopodium rubrum* 和 *Daucus* 细胞培养中也观察到可能的 CIFs 大量表达, 表明 CIF 通过翻译后水平调控 CWI, 在植物细胞培养中是一个普遍的现象^[13]。

3 转化酶抑制子的生物技术潜能

3.1 抑制甜菜收获后蔗糖的降解

甜菜收获后蔗糖损失很大部分发生在最初的储存阶段, 其内在的分子机理是在收获期间甜菜主根的机械受伤会诱导转化酶活性, 这会导致收获后期蔗糖的降解。最近, 通过全面的检测 SAI 和 CWI 的 mRNA、蛋白、酶活性以及在受伤反应中己糖在组织中的浓度, 鉴定了一个单独的 SAI 片段是与伤诱导成熟甜菜主根中己糖的积累有关^[15]。

3.2 抑制马铃薯块茎低温糖化

为了抑制马铃薯在储存过程中萌芽, 其块茎用延长休眠的化学物质处理或在低温下进行储存。但在低温条件下, 淀粉被部分转化为可溶性糖 这种现象叫做低温糖化。通过美拉德 (Maillard) 反应己糖同自由氨基酸结合, 这对马铃薯块茎的品质产生了负面的影响。己糖的积累是由于淀粉的降解与糖酵解速率的不平衡造成蔗糖的积累, 然后通过转化酶将蔗糖分解为葡萄糖与果糖造成的。为抑制己糖的积累, 将烟草中编码 NtVIF 的 cDNA 在马铃薯转基因植物中进行表达。在转基因块茎中, 低温诱导己糖的积累降低了 75%, 对马铃薯产量没有任何影响^[16-17]。

3.3 影响种子的生长

转化酶调节的蔗糖水解在植物的种子生长过程中有着重要的作用。在玉米的 *miniature1* 纯合突变体中, 特定细胞壁的转化酶片段 INCW2 的水平降低到 6%, 从而削弱种子的生长^[8]。最近研究发现, *miniature1* 突变体的细胞大小比细胞的数量更易受影响, 这一说法在蔗糖/己糖转化建立种子生长的渗透性梯度中得到支持。Weber 等利用 2 个具有不同胚芽/种子基因型的烟草证明己糖与蔗糖比率对于细胞从分化阶段向储藏阶段转换的重要性^[19]。

4 拟南芥转化酶抑制子和转化酶抑制子相关蛋白的功能基因组研究

在拟南芥基因组中与烟草两个转化酶抑制子 NtCIF 和 NtVIF 基因编码相关的蛋白质比对结果, 确定了 14 个基因其蛋白序列一致性在 41%和大于 20%之间^[20]。比对的标准在于: ①具有 4 个保守的半胱氨酸残基, 这对其功能是必要的(见 NtCIF 和 NtVIF)。②预测 Mr 大约为 18kDa。③存在 N 末端的信号肽。迄今为止, 对于大多数编码的转化酶抑制子蛋白, 其功能还未被证实。因此, 将拟南芥-C/VIF 相关蛋白作为这个蛋白家族的最初名称。最终, 这个蛋白家族将被分为 At-CIFs, At-VIFs, At-PMEIs 和其他可能靶酶的成员。功能基因组的最终目标是分离 CIFs, VIFs 和 PMEIs 以及一些在新蛋白家族中, 可能还不知道功能的成员。这一工作将会阐明质外体和液泡转化酶的分子机能和翻译后调控的生理重要性, 也将为植物生物技术提供新的视角。

5 结论

几个大规模测序项目使植物序列信息得到迅速积累, 并证实了植物转化酶抑制子样蛋白的普遍存在, 但对其生理作用的阐述还只是刚开始。不同作物转化酶抑制子异位过量表达已揭示了这些蛋白的生物技术潜能。例如马铃薯块茎低温糖化的抑制以及甜菜采后蔗糖的稳定性, 在烟草上已初步获得了正义和反义抑制子转基因植株, 但还有很多生理功能的问题没有解决。目前要充分利用模式植物拟南芥对这一蛋白家族的单独个体的 T-DNA 基因敲除突变体的研究, 对其生理作用的阐述最可能揭示其在生物技术方面的应用。

参考文献

[1] Rolland F, Moore B, Sheen J. Sugar sensing and signaling in plants [J]. *Plant Cell*, 2002, 14: 185-205.
[2] Smeekens S. Sugar-induced signal transduction in plants [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 2000, 51: 49-81.
[3] 姜晶, 李天来. 番茄蔗糖代谢关键基因的分子生物学研究 [J]. *生物技术*, 2005(1): 82-85.
[4] Bracho G E, Whitaker J R. Purification and partial characterization of potato(*Solanum tuberosum*) invertase and its endogenous proteinaceous inhibitor [J]. *Plant Physiology*, 1990, 92: 386-394.

种子萌发调控的分子机理研究进展

乌凤章^{1,2}, 刘桂丰¹, 姜 静¹, 陆天聪¹, 王柏臣¹

(1. 东北林业大学 林木遗传育种与生物技术教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040 2. 大连大学 辽宁 大连 116622)

摘 要: 休眠与萌发是植物种子对环境变化的适应特征, 受许多基因调控和环境因子的影响, 至今尚未能清楚地阐明其调控机制。近年来从拟南芥等植物的突变体中鉴定了一些与种子萌发相关的基因, 有助于阐明种子萌发的分子机制。现综述光和赤霉素、脱落酸等植物激素对种子萌发调控作用的分子机理以及相关的蛋白质组学的研究进展。

关键词: 种子萌发; 蛋白质组学; 激素; 光敏色素

中图分类号: S 604⁺.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)02-0054-05

种子萌发是种子植物个体发育中最为关键的时期, 是植物为适应环境(气候变化、温度差异等因素)以保持自身繁殖而形成的一种生物特性, 它关系到是否能够保证种群顺利繁衍和进化, 具有非常重要的生物学意义。

种子萌发是指有活力的种子, 当其受潮吸水后, 开始进行呼吸、物质合成及其它代谢活动, 经过一定时期

种胚突破种皮, 露出胚根的过程。种子萌发在本质上是将胚轴恢复到静止或休眠期间暂时停止的连续生长状态, 开始进行新的遗传程序即基因的相异转录。

种子萌发一直都是人们重点研究的问题之一。目前在这些研究领域已取得了长足的进步。研究表明种子的萌发和萌发后幼苗的建成是内外因素相互作用的结果。外因是指适宜的光照、温度、水分和氧气, 内部因素是指种子自身是否具有足够的储备和是否具有利用这些储备在接受外部信号后启动各种生命活动的生物化学反应的能力。现主要概述近年来种子萌发研究在分子水平上的进展, 并对今后的研究工作做一展望。

第一作者简介: 乌凤章(1965-), 男, 副教授, 东北林业大学在读博士, 从事生物化学与分子生物学研究工作。E-mail: wuzf1965@126.com.

通讯作者: 王柏臣。E-mail: wangbaichen@gmail.com.

收稿日期: 2007-11-30

- [5] Schwimmer S, Makower RU, Rorem ES. Invertase and invertase inhibitor in potato [J]. *Plant Physiol* 1961, 36: 313-316.
- [6] Pressey R. Separation and properties of potato invertase and invertase inhibitor [J]. *Arch Biochem Biophys* 1966 113: 667-674.
- [7] Pressey R. Invertase inhibitor from potatoes: purification, characterization, and reactivity with plant invertases [J]. *Plant Physiol* 1967, 42: 1780-1786.
- [8] Jaynes T A, Nelson O E. An invertase inactivator in maize endosperm and factors affecting inactivation [J]. *Plant Physiol* 1971, 47: 629-634.
- [9] Pressey R. Invertase inhibitor in tomato fruit [J]. *Phytochemistry*, 1994, 36: 543-546.
- [10] Weil M, Krausgrill S, Schuster A, et al. A 17-kDa *Nicotiana tabacum* cell-wall peptide acts as an in vitro inhibitor of the cell-wall isoform of acid invertase [J]. *Planta* 1994 193: 438-445.
- [11] Greiner S, Krausgrill S, Rausch T. Cloning of a tobacco apoplasmic invertase inhibitor. Proof of function of the recombinant protein and expression analysis during plant development [J]. *Plant Physiol* 1998, 116: 733-742.
- [12] Camardella L, Carratore V, Ciardiello M A, et al. Kiwi protein inhibitor of pectin methylesterase amino acid sequence and structural importance of two disulfide bridges [J]. *Eur J Biochem* 2000, 267: 4561-4565.
- [13] Greiner S, Koester U, Lauer K, et al. Plant invertase inhibitors: expression in cell culture and during plant development [J]. *Aust J Plant Physiol*

2000 27: 807-814.

- [14] Krausgrill S, Greiner S, Koester U, et al. In transformed tobacco cells the apoplasmic invertase inhibitor operates as a regulatory switch of cell wall invertase [J]. *Plant J* 1998 13: 275-280.
- [15] Rosenkranz H, Vogel R, Greiner S, et al. In wounded sugar beet (*Beta vulgaris* L.) tap root, hexose accumulation correlates with the induction of a vacuolar invertase isoform [J]. *J Exp Bot* 2001, 52: 2381-2385.
- [16] Greiner S, Rausch T, Sonnwald U, et al. Ectopic expression of a tobacco invertase inhibitor homolog prevents cold-induced sweetening of potato tubers [J]. *Nat Biotech* 1999, 17: 708-711.
- [17] 成善汉, 宋波涛, 谢从华等. 烟草液泡转化酶抑制子基因调控马铃薯块茎低温还原糖累积的研究 [J]. *中国农业科学* 2007, 40(1): 140-146.
- [18] Miller M E, Chourey P S. The maize invertase-deficient miniature-1 seed mutation is associated with aberrant pedicel and endosperm development [J]. *Plant Cell* 1992 4: 297-305.
- [19] Weber H, Buchner P, Bonjuk L, et al. Sucrose metabolism during cotyledon development of *Vicia faba* L. is controlled by the concerted action of both sucrose phosphate synthase and sucrose synthase: expression patterns, metabolic regulation and implications for seed development [J]. *Plant J* 1996 9: 841-850.
- [20] Rausch T, Greiner S. Plant protein inhibitors of invertases [J]. *Biochim Biophys Acta* 2004; 253-261.