

# 植物抗冻基因最新研究进展

蔺忠龙<sup>1,3</sup>, 李维薇<sup>1</sup>, 白现广<sup>1,3</sup>, 吕广磊<sup>2,3</sup>, 程在全<sup>3</sup>

(1. 云南大学 生命科学学院 云南 昆明 650091; 2. 云南农业大学 农业与生物技术学院, 云南 昆明 650201;  
3. 云南省农业科学院 生物技术与种质资源研究所, 云南 昆明 650223)

**摘要:** 低温冻害使许多植物生存受到严重危害, 全球每年因低温冻害造成的农作物损失高达数千亿元。研究并提高植物抗冻性具有重要理论和现实意义。目前, 通过对冷诱导基因、CBF、ICE、抗冻蛋白基因、脂肪酸去饱和酶基因、脯氨酸基因、SOD 基因等与抗冻相关的基因的研究表明, 将这些抗冻相关基因进行转基因, 可以提高植物的抗冻性。现综述植物抗冻性基因的类型及其抗冻转基因植物最新研究进展。

**关键词:** 抗冻基因; 冷诱导基因; CBF; ICE; 抗冻蛋白; 转基因植物  
**中图分类号:** S 603.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001—0009(2009)01—0119—05

随着人口的增长和耕地面积的不断减少, 如何提高作物的产量越来越受到人们的广泛关注, 而气候条件是影响作物产量的重要因素之一。冻害一直制约着作物产量的提高, 低温冻害使许多植物生存受到严重危害, 全球每年因低温冻害造成的农作物损失高达数千亿元。研究并提高植物抗冻能力, 并培育出抗冻作物品种就可能延长作物的生育期, 同时也会抵御骤然低温对作物造成的不良影响, 对提高作物的产量有着非常重要的意义。因此, 培育耐寒和抗冻的作物品种无疑是一种最佳的选择。但是通过常规育种方法很难培育出抗冻的作物品种。近年来, 随着基因工程技术在作物品种改良方面取得了巨大进展。具有可控性强、效率高、周期短、成本低等优点的植物基因工程技术已经成为新品种选育的一条全新而有效的途径<sup>[1]</sup>。

## 1 植物抗冻基因的研究现状

目前已知的植物抗冻基因主要为环境诱导表达的基因及某些组成性表达的基因。前者指冷驯化(植物自身适应环境的结果), 后者是通过基因工程技术克隆出抗冻基因, 连上强启动子或冷诱导启动子转入植物, 获得转基因植株, 进而提高植株的抗冻性<sup>[1]</sup>。如有骤然低温或霜冻来得较早的年份, 前者来不及反应就受到冻害, 而后者目的性强, 对低温迅速做出反应, 因此, 育种上经常采用此种方法来培育抗冻作物品种。目前已分

离鉴定的植物冷诱导基因见表 1。Weiser 认为植物在适应低温过程中基因表达发生改变 Guy 等研究发现冷驯化能诱导和增加一些基因的表达, 使多种基因表达发生改变。这些冷诱导基因表达的产物可分为 2 类, 一是调控蛋白, 调控寒冷信号传导、抗寒基因表达和抗寒蛋白活性; 二是功能蛋白, 与植物抗寒性的提高直接相关。

表 1 已经分离鉴定的植物冷诱导基因<sup>[2-3]</sup>

试验材料	基因	胁迫因素
拟南芥	rd29A rd29B	低温胁迫、干旱胁迫
	COR78 COR6. 6 COR47	低温胁迫、干旱胁迫
	COR15B ltr78 ltr40	低温胁迫、干旱胁迫
	Kin1	低温胁迫
	Kin2	低温胁迫、盐胁迫
	CCR1 RCI1 RCI2 fad8	低温胁迫
	COR15A ltr65 Cer2	低温胁迫、干旱胁迫
苜蓿	Msac1 SM2075	低温胁迫、干旱胁迫
	SM2201 SM2358 MasC1C	低温胁迫
	Cas15 Cas17 Cas18	低温胁迫
油菜	BN115 BN19 BN26	低温胁迫
	BnC24A BnC24B	低温胁迫
	adh	低温胁迫、干旱胁迫
菠菜	cap85 cap160	低温胁迫、干旱胁迫
	ER—HSC70	低温胁迫
马铃薯	A13 C12 C17	低温胁迫、干旱胁迫、脱落酸诱导
大麦	HVA1 bht801	低温胁迫、脱落酸诱导
	bht01 bht63	低温胁迫
	bht4 bht4. 2 bht4. 9	低温胁迫、干旱胁迫、脱落酸诱导
	bht4. 1 A086	低温胁迫
小麦	WCS120 WCS200 WCS66 WCS19	低温胁迫
	COR39 Wcor410	低温胁迫、干旱胁迫、脱落酸诱导
水稻	pBC121 Phc442 pBC591 pBC601	低温胁迫
黑麦	Rht1412 rht1421	低温胁迫

### 1.1 COR 基因

COR 基因是冷诱导基因, 在它的启动子区域含有具有 5 个碱基核心序列 CCGAC 的脱水反应元素 DRE

第一作者简介: 蔺忠龙(1983-), 男, 在读硕士, 主要研究方向为植物分子生物学。E-mail: tom101@eyou.com。  
通讯作者: 程在全  
基金项目: 云南省自然科学基金资助项目(2005C0063M)。  
收稿日期: 2008—08—10

(Dehydration responsive element) DRE 做为顺式作用启动子元素,能在低温胁迫时激活 COR 基因的表达<sup>[4]</sup>。Masakazu H 等将 Cu2COR19 转入烟草,和对照烟草植株相比较,转基因植株电渗值较低、发芽率较高、抗冻性有所提高<sup>[5]</sup>。Puhakainen T 等于 2004 年将 RAB18, COR47(pTP9) 以及 LTI29, LTI30 (pTP10) 分别构建到植物表达载体 pDE1001, 之后分别电击转化到农杆菌 pGV2260 中, 以此农杆菌分别侵染拟南芥。低温条件下, 转基因拟南芥植株和对照植株相比降低了 LT50, 并且转基因植株的存活率也明显高于对照植株<sup>[6]</sup>。

## 1.2 CBF (Crepeat binding factor) 转录因子

一个典型的植物转录因子包括: DNA 结合域、低聚糖位置、转录调节区域和一个核酸定位信号<sup>[7]</sup>。CBF 转录因子的发现是近年来植物抗逆研究方面最具突破性的发现。拟南芥中的 CBF 家族包括 CBF1、CBF2 和 CBF3。CBF2、CBF3 与 CBF1 的基因序列有较高的同源性, 分别为 81% 和 84%, CBF1、CBF2 和 CBF3 位于拟南芥的第 4 号染色体, 并且串联在上面<sup>[8]</sup>。这 3 种基因的强表达使拟南芥生长缓慢、花期延迟、脯氨酸和蔗糖含量增加, 同时使拟南芥抗冻性也得到一定提高<sup>[9]</sup>。这 3 种 CBF 结合到 COR 基因的 DRE 序列上, 从而诱导一系列 COR 基因的表达, 因此有人把 CBF 转录因子看作低温时激活一些 COR 基因的开关。目前已发现 CBF 调控的抗冻基因至少有十几种, 如: rd29A、Iti78、cor78、cor15a、kin2、cor6.6、erd10、kin1、rd17、cor47、Fl325A3、Fl5277、Fl5294、Fl3227、Fl12522122 和 erd14<sup>[1]</sup>。

CBF1 连上 CaMV35S 启动子转入拟南芥, 检测未经低温处理的转基因植株发现: CBF1 持续强表达诱导了 cor6.6、cor15a、cor47 和 cor48 基因的表达, 提高了拟南芥植株的抗冻性<sup>[8]</sup>。CBF2 在拟南芥胁迫抗性中起重要作用, 有试验表明在 CBF2 被破坏的拟南芥植株中 CBF1 和 CBF3 的表达增强, 这表明: CBF2 是 CBF1 和 CBF3 表达的一个负调节子<sup>[4]</sup>。拟南芥中的 CBF3 能刺激 40 多种胁迫诱导基因的表达, 如 rd29A、cor15A、cor47 等<sup>[10]</sup>。Thomashow M F 等于 2001 年将拟南芥中的 CBF3 基因分别连上 CaMV35S 启动子、冷诱导启动子 rd29A, 之后转入烟草中, 二者都显著提高了烟草植株的耐低温能力<sup>[8]</sup>。

## 1.3 ICE (Inducer of CBF expression) 转录激活因子

ICE 是在低温时诱导 CBF 家族表达的转录激活因子, 它在低温时能特定地结合到 CBF 的启动子序列上, 诱导 CBF 的表达, 而后 CBF 结合到其下游目的基因启动子的 DRE 序列上, 诱导 COR 的表达, 从而提高植株的抗冻性<sup>[9]</sup>。Chinnusamy V 等于 2003 年已经从拟南芥中得到 ICE1 (Inducer of CBF expression 1), 并且连上 CaMV35S 启动子转入拟南芥, 获得了含 ICE1 基因的转

基因拟南芥植株, 通过检测证实转基因拟南芥植株的抗冻性有很大的提高<sup>[10]</sup>。

## 2 植物抗冻基因及转基因植物最新研究进展

近年来, 随着人们对植物抗冻基因进行了深入的研究, 揭示了植物抗冻性除受多基因协同调控外, 某些单基因也起了重要作用。因此, 这些单基因有可能用于植物抗冻基因工程。在不影响作物产量、品质的情况下, 利用植物转抗冻蛋白基因手段培育抗冻品种已成为一条全新而有效的途径。抗冻蛋白 (Antifreeze protein, AFPs) 是 20 世纪 60 年代从极地海鱼的血清中发现的一种具有阻止体液内冰核的形成与生长、维持体液的冰冻状态的高效抗冻活性物质。目前已发现的抗冻蛋白可分为 4 类: I 型抗冻蛋白富含丙氨酸重复序列, 具有  $\alpha$ -螺旋结构的多肽, 以美洲拟鲾的 AFP 为代表; II 型抗冻蛋白是富含胱氨酸并具有  $\beta$ -折叠结构的多肽, 以绒杜父鱼的 AFP 为代表; III 型抗冻蛋白的氨基酸组成无明显偏向性, 是无一定二级结构的多肽, 以美洲大绵的 AFP 为代表; IV 型抗冻糖肽 (Antifreeze glycopeptide, 简称 AFGP), 主要代表为南极鳕鱼, 可产生类似于糖三肽多聚体的 AFGP。抗冻蛋白存在于不同的生物体中, 包括鱼类、昆虫和植物, 但对鱼类抗冻蛋白的研究较多<sup>[11]</sup>。Huang T 等 2002 年将树状抗冻基因 dafp-1 基因转入拟南芥中, 而后和对照植株相比发现转基因植株的抗冻性提高了  $1.0 \sim 3.3^{\circ}\text{C}$ <sup>[12]</sup>。Li C M 等 2006 年从云杉蚜虫中分离得到抗冻蛋白 CfAFP-501, 并且分析出此蛋白的结构<sup>[13]</sup>。

### 2.1 鱼类 AFPs 基因及其转基因植物

对鱼类 AFPs 研究的较多并且起步较早, 早在 20 世纪 70 年代初期就已经从海洋鱼类的血清中发现了抗冻蛋白, 并且已作了比较系统深入的研究。利用鱼类抗冻蛋白基因对植物进行遗传转化的研究始于 20 世纪 80 年代末期, 1987 年 Davies 等将抗冻基因 AFPs 整合到 Ti 质粒上, 用叶圆片法转化郁金香、烟草和油菜等获得一定抗冻力。Curler 等用冬比目鱼溶液处理植物组织的研究表明, 用 AFP 真空浸润马铃薯、欧洲油菜和拟南芥叶片可使叶片自发冰点显著降低, 说明 AFP 具有抗冻作用; 用 AFP 处理雀麦草及其悬浮培养细胞, 可降低任何给定温度下冰冻的可冻水量, 表明 AFP 有低温保护作用; AFP 能降低冰晶形成的速度, 在某些极地鱼中发现的类型 I 抗冻蛋白 (AFPs) 可防止组织细胞中冰晶的形成, 并已通过转基因技术使 AFPs 在一些转基因植株中得到表达, 如已经在转基因烟草中证明 AFPs 的积累具有低温特异性, 它抑制冰晶的形成。鱼类抗冻蛋白基因转入烟草和番茄已获得较好表达, Georges F 等将人工合成的黄盖鲮鱼抗冻蛋白基因导入玉米原生质体, 在植物细胞中获得表达<sup>[14]</sup>。黄永芬等获得转美洲拟鲾抗冻

基因 AFP 的番茄, 且低温下转基因植株长势优于对照, 致死温度比对照降低  $2 \sim 4^{\circ}\text{C}$ , 一系列检测表明抗冻基因 AFP 已整合到转化番茄基因组中并获得表达。Hightower R 等利用农杆菌将比目鱼体内抗冻蛋白 (AFPs) 基因转入番茄, 发现转基因番茄不但稳定转录 AFP 的 mRNA, 还产生一种新的蛋白质, 这种转基因番茄的组织提取液在冰冻条件下能有效阻止冰晶增长<sup>[15]</sup>。

## 2.2 昆虫 AFPs 基因及其转基因植物

由于昆虫抗冻基因 AFPs 的热滞活性明显高于鱼类和植物, 因此, 其抗冻基因 AFPs 的导入可能更有效地提高转基因植物的抗冻性。冬季, 某些昆虫血淋巴的热滞活性为  $3 \sim 6^{\circ}\text{C}$ , 最高达到  $8 \sim 9^{\circ}\text{C}$ , 明显高于血清抗冻蛋白的热滞活性 ( $1 \sim 2^{\circ}\text{C}$ )。Tyshenko 等于 1997 年从甲虫和云杉卷叶蛾中分离到的抗冻蛋白的活性是鱼类抗冻蛋白的  $10 \sim 100$  倍<sup>[16]</sup>。2001 年 Holmberg 等第一次将云杉蚜虫的抗冻基因 AFPs 与 CaMV35S 及胭脂碱合成酶基因组成重组基因后转入烟草, 发现转基因烟草中质体外云杉蚜虫抗冻基因 AFP 的表达能抑制冰重结晶, 并且提高了热滞值<sup>[17]</sup>。

## 2.3 植物 AFPs 基因及其转基因植物

与鱼类和昆虫抗冻蛋白相比, 植物 AFPs 研究的较晚。直到 1998 年 10 月, Dawn orrall 等在《Science》上发表了胡萝卜 AFPs 及其基因的研究论文, 这标志着第一个植物 AFP 基因的发现, 并且将此 AFP 基因连接在表达载体上转化烟草, 获得了表达并且产生了 AFPs, 提高了转基因烟草植株的抗冻性<sup>[18]</sup>。1999 年 Michael 等从桃树 (*Prunus persica*) 的树皮中提取到一种脱水蛋白 PCA60, 这是第一次发现具有脱水素蛋白特性的抗冻蛋白, 其富含赖氨酸、甘氨酸, 分子量为 50 ku, 具有较强的修饰冰晶能力<sup>[19]</sup>。

最近克隆到的植物抗冻蛋白基因还包括黑麦草 1 117 kD 的 AFP 的 cDNA<sup>[20]</sup>; 冬黑麦<sup>[21]</sup> 中 3 117 kD 的 AFPs 的 CHT 基因, 2 418 kD 的 AFPs 的 CHT46 基因。其中来自冬黑麦中的这两个抗冻蛋白基因, 均已被转化到大肠杆菌中, 检测结果表明, 表达蛋白具有抗冻活性。2002 年 Fan Y 等以胡萝卜幼苗为模板进行 PCR 扩增, 克隆到一个 1 099 bp 的抗冻蛋白基因, 连上 CaMV35S 启动子, 构建到 pCambia2300 载体上后转入烟草,  $0^{\circ}\text{C}$  条件下, 转基因烟草所受的冻害明显低于对照烟草<sup>[22]</sup>。

## 2.4 脯氨酸基因及其转基因植物

驯化后脯氨酸含量增加, 表明脯氨酸可能与植株抗冻性有关。脯氨酸是水合能力较强的氨基酸, 其含量增加有助于细胞持水和生物大分子结构的稳定。Wanner L A 等报道, 低温处理 5 d 的拟南芥植株中脯氨酸含量比未低温处理的对照拟南芥植株高  $3 \sim 5$  倍<sup>[23]</sup>。低温处理条件下, CBF3 强表达的植株中脯氨酸的含量也

比对照植株高  $2 \sim 3$  倍<sup>[24]</sup>。Parvanova D 等于 2004 年将脯氨酸基因转入拟南芥, 转基因和对照植株经过  $22^{\circ}\text{C}$  处理 12 h, 转基因植株存活而对照植株则死亡<sup>[25]</sup>。Gleeson D 等于 2005 年利用农杆菌将 *Vigna aconitifolia* 基因转化到落叶松, 结果转基因植株的脯氨酸含量比未转基因的对照植株高 30 倍, 转基因植株的抗冻性得到很大提高<sup>[26]</sup>。

未经低温处理 CBF3 强表达的拟南芥植株中脯氨酸的含量比对照植株高 5 倍, 其含量相当于低温处理对照植株的脯氨酸含量。低温处理条件下, CBF3 强表达的植株中脯氨酸的含量也比对照植株高  $2 \sim 3$  倍。Parvanova D 等于 2004 年将脯氨酸基因转入拟南芥, 转基因和对照植株经过  $-2^{\circ}\text{C}$  处理 12 h, 转基因植株存活而对照植株死亡。Gleeson D 等于 2005 年利用农杆菌将 *Vigna aconitifolia* 基因转化到落叶松, 结果转基因植株的脯氨酸含量比未转基因的对照植株高 30 倍, 转基因植株的抗冻性得到很大提高<sup>[27]</sup>。

## 2.5 脂肪酸去饱和酶基因及其转基因植物

很多研究表明, 低温冻害导致生物膜的透性改变。低温引起膜脂的物相发生变化, 使膜脂由正常的液晶态变为凝胶态, 如果在低温下能保持膜脂的液晶状态, 则植物的抗冻性提高; 而增加膜脂中不饱和脂肪酸的比例即可维持膜的液晶状态, 防止膜类固化, 即能提高抗冻性。Murata N<sup>[28]</sup> 将南瓜藤和拟南芥中得到的甘油-3-磷酸酰基转移酶基因导入烟草中, 明显改变磷酸酰基甘油的脂肪酸组成, 并提高其抗冻力。Polshock J 等将酵母的  $\Delta^9$  脂肪酸去饱和酶基因, Kodama H 等将拟南芥的编码  $\omega-3$  脂肪酸去饱和酶基因 *fad*, Ma J 等将菠菜的硬脂酰基载体蛋白去饱和酶基因 *SAD*, 分别导入烟草中均增强了转基因烟草的抗冻性<sup>[29-30]</sup>。Kodama H 等将拟南芥叶绿体  $\omega-3$  脂肪酸脱氢酶基因 *fad7* 导入烟草中增强转基因烟草抗冷性<sup>[31]</sup>。刘丹等利用脂肪酸去饱和的关键酶 (*SAD*) 基因对烟草进行遗传转化, 结果表明转基因烟草抗寒性明显增强。Hayashi H 等将编码来自 *Arthrobacter globiformis* 或 *A. pascens* 的胆碱氧化酶的基因 *codA* 导入拟南芥获得抗冻转基因植株。

## 2.6 SOD 基因及其转基因植物

低温条件下, 细胞内活性氧的产生和消耗平衡遭到破坏, 使膜系统稳定性受到影响, 活性氧积累, 从而使膜脂发生过氧化和脱脂作用, 进而破坏膜结构。研究表明, SOD 可清除活性氧, 维护膜系统稳定性。将含有 SOD 的 cDNA 转入烟草、番茄等植物中, 强表达后都提高了植物的耐氧化能力, 这对植物抗冻具有重要意义。McKersie 将从烟草中克隆得到的 MnSOD 的 cDNA 与 35S 启动子连接后转化苜蓿, 结果转基因植株的抗冻性有所提高<sup>[32]</sup>。Lee H S 等于 1999 年从木薯的 cDNA 中

克隆到编码 152 个多肽的 mSOD1, 并将 mSOD1 基因转入木薯。转基因植株和对照植株相比抗冻性有一定提高<sup>[33]</sup>。Bagnoli F 等于 2001 年从桃树 cDNA 中克隆到 MrSOD<sup>[34]</sup>。

### 3 植物抗冻基因研究中存在的问题及发展前景

提高植物的抗冻性, 培育抗冻作物品种对于农业具有十分重要的意义。然而, 作物的抗冻性状一般受多基因控制, 且与品质低劣性状(如矮化、倒伏、结实率低等)紧密连锁。解决这个问题有两个办法: 一是转化那些翻译后修饰的转录因子基因, 如非低温胁迫时 3S; DREB2A(DRE-binding protein)植株只表现轻微的生长阻碍, 在低温时这种转录因子才诱导 COR 基因表达; 二是使用冷诱导型的启动子, 如使用冷诱导启动子 rd29A 的 CBF3 转基因时, 拟南芥的不利性状大大减小。转抗冻基因技术如何达到高效、快速、简便、适用性广, 仍然是植物抗冻基因工程的一个重要限制因子。

已研究的绝大多数植物材料中 AFP 活性大大低于鱼类和昆虫, 所研究的植物虽多达几十种, 但真正被分离纯化出来的 AFP 尚是很少。因此如何从植物中分离出更多的、活性更高的 AFP, 并通过遗传转化将其导入抗冻性弱或不抗冻的植物中进而获得抗冻性强的转基因植株, 将是今后植物抗冻性基因工程研究的主要内容之一。

目前, 抗冻蛋白在植物抗寒基因工程中的利用还非常有限, 我们还需要分离和克隆更为优良的、能用于植物基因工程的抗冻蛋白基因, 同时也需要对目前已获得的抗冻蛋白在结构、功能上进行深入分析。

尽管植物抗冻基因研究中还有许多问题等待解决, 但是完整的植物基因工程的理论和技术体系已基本建立, 植物基因工程技术已开始走向商业化的发展道路。尽管现在有关抗冻基因及转抗冻基因植物方面的研究不多, 但在不久的将来转入抗冻基因的植物一定会得到飞速的发展。

### 参考文献

- [1] 黄文功, 殷奎德, 高中超. 植物抗冻基因工程研究[J]. 生物技术通报, 2006(2): 1-4.
- [2] 陈得波. 植物抗寒基因工程研究进展[J]. 生物技术通报, 2001, 36(4): 14-20.
- [3] 马建忠. 植物的冷诱导基因[J]. 农业生物技术学报, 1996, 4(1): 8-14.
- [4] Novillo F, Alonso J M. Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana*: Affect on plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions[J]. Plant Biology, 2004(11): 3985-3990.
- [5] Steponkus P L. Role of plasma membrane in cold acclimation and freezing injury in plants. Amlu. Rev[J]. Plant Physiol 1984, 35: 543-584.
- [6] Puhakainen T, Hess M W, Mañkela P, et al. Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana*: effect on plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions[J]. Plant Molecular Biology, 2004, 54: 743-753.
- [7] Uemura M, Steponkus P L. A contrast of plasma membrane lipid com-

position of cat and rye leaves in relation to freezing tolerance[J]. Plant Physiology, 1994, 104: 479-496.

- [8] Thomas how M F, Gilmour S J, Stockinger E J, et al. Modification of fatty acid composition in rice plants by transformation with a tobacco microsomal  $\omega$ -3 fatty acid desaturase gene (NtFAD3) [J]. Physic Plant, 2001, 112: 171-175.
- [9] Gilmour S J, Fowler S G, Michael F. Thomashow. Antifreeze protein produced endogenously in winter rye leaves[J]. Plant Molecular Biology, 2004, 54: 767-781.
- [10] Marata N, Nishizawa I. Genetically engineered alteration in the chilling sensitivity of plants[J]. Nature 1992, 356: 710-713.
- [11] Nordin K, Heino P, Palva E T. Separate signal pathways regulate the expression of a low-temperature-induced gene in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Mol Biol 1991, 16: 1061-1071.
- [12] Huang T, Nicodemus J, Zarka D G, et al. LeProT1, a *Tram* porter for Proline, Glycine Betaine and T-Amino Butyric Acid in Tomato Pollen[J]. Plant Molecular Biology, 2002, 50: 333-344.
- [13] Kaye C, Neven L, Honiguchi G. Characterization of a gene for spinach CAP160 and express of two spinach cold-acclimation proteins in tobacco[J]. Plant Physiol 1998, 116: 1367-1377.
- [14] Perl A, Perl treves R, Galili G, et al. Enhanced oxidative stress defense in transgenic potato expressing tomato Cu, Zn superoxide dismutases[J]. Theor Appl Genet, 1999, 85: 568-576.
- [15] Hightower R, Cathy B. Molecular responses to water deficit[J]. Plant Mol Biol 1991, 17(5): 1013-1021.
- [16] Tyshenko M G, Doucet D, Davies P L, et al. Molecular analysis of acclimation to cold[J]. Biotechnol 1997, 15: 887-890.
- [17] Steponkus P L. Role of plasma membrane in cold acclimation and freezing injury in plants[J]. Amlu. Rev. Plant Physiol 1984, 35: 543-584.
- [18] Worrall D, Elias L, Ashford D, et al. Cold resistance and injury in woody plants[J]. Science 1998, 282(2): 115-117.
- [19] Xu D, Duan X, Wang B, et al. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene HAV1 from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice[J]. Plant Physiol 1996, 110: 249-257.
- [20] Sidebottom G, Worrall D. Genetically engineered alteration in the chilling sensitivity of plant[J]. Nature 2000, 406: 256-263.
- [21] Yen S, Griffith M. Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress[J]. Plant Physiology, 2000, 124: 1251-1263.
- [22] Fan Y, Liu B, Wang H, et al. Cloning of an antifreeze protein gene from carrot and its influence on cold tolerance in transgenic tobacco plants[J]. Plant Cell Rep, 2002, 21: 296-301.
- [23] Leslie A, Wanner, Junttila O. Challenges and prospects of plant proteomics[J]. Plant Physiology, 1999, 120: 391-399.
- [24] Lin S Z, Zhang Z Y. Cold acclimation-induced changes in total soluble protein, RNA, DNA, RNase and freezing resistance in *Populus tomentosa* cuttings[J]. Forestry Studies in China, 2002, 4(2): 9-15.
- [25] Huang T, Nicodemus J, Zarka D G, et al. Expression of an insect (*Dendroides canadensis*) antifreeze protein in *Arabidopsis thaliana* results in a decrease in plant freezing temperature[J]. Plant Mol Biol 2002, 50: 333-344.
- [26] Deirdre Gleeson, Marie-Anne Lelu, Walter, Michael Parkinson[J]. Molecular Breeding, 2005, 15: 21-29.
- [27] Loppes R, Radoux M. Identification of short promoter regions involved in the transcriptional expression of the nitrate reductase gene in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Plant Mol Biol 2001, 45(2): 215-227.

# 超滤膜技术在香菇多糖提取中的应用

李 琚<sup>1</sup>, 钟耀广<sup>1,2</sup>, 刘长江<sup>2</sup>

(1. 上海水产大学 食品学院 上海 200090 2. 沈阳农业大学 食品学院 辽宁 沈阳 110161)

**摘 要:** 采用超滤膜技术提取纯化香菇多糖具有收率高、不易破坏多糖的生物活性、能耗低等特点, 适于工业化生产。现就超滤膜分离技术的发展现状及其在香菇多糖提取中的应用进行了综述。

**关键词:** 香菇多糖; 超滤; 分离; 纯化

**中图分类号:** S 646.1<sup>+</sup>2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)01-0123-03

香菇是侧耳科的担子菌, 世界名贵食药兼用菌之一, 它含有多种有效药用组分, 主要是香菇多糖 (lentinan, 简称 LNT)。研究表明分子量在 400 000 ~ 800 000 的 LNT 具有显著的抗病毒、抗肿瘤、调节免疫功能和抗感染活性<sup>[1]</sup>, 还有研究证明其对艾滋病有很好的疗效,

在临床上具有很好的应用前景<sup>[2]</sup>。具有的生物活性已经引起了人们越来越多的关注。

香菇多糖的功能性与多糖的纯度有很大关系。近年来, 有采用超滤法提取香菇多糖的研究, 研究表明该方法可以降低成本, 提高产率。现简要介绍超滤膜技术在香菇多糖提取、纯化中的应用及研究进展。

## 1 超滤膜分离技术的应用

### 1.1 超滤膜技术的发展现状

膜分离是指以选择性透过膜为分离介质, 当膜两侧存在某种推动力(如压差、浓度差、电位差等)时, 原料组分可选择透过膜, 从而达到分离提纯的过程。人们发现

**第一作者简介:** 李琚(1984-), 女, 硕士, 研究方向为食品安全。  
**通讯作者:** 钟耀广。E-mail: zhongyaoguang@126.com。  
**基金项目:** 上海水产大学引进优秀人才科研基金资助项目; 上海水产大学研究生科研基金资助项目 (A-2501-08-192)。  
**收稿日期:** 2008-08-10

[28] Polashock J, Lipson D. A comparison of freezing injury in cat and rye; Two cereals at extremes of freezing tolerance [J]. Plant Physiol 1993, 102: 160.  
[29] Kodama H. Expression of a lateembryogenesis abundant protein gene HVA 1, from barely confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice [J]. Plant Physiology, 1995, 107: 1177-1185.  
[30] Ma J, Liu D. Chitinase genes response to cold encodes antifreeze proteins in winter cereals [J]. Plant Physiology, 1996, 111(2): 814.  
[31] Kodama H. Winter rye antifreeze activity increases in response to cold

and drought, but no abscisic acid [J]. Plant Physiol 1994, 105: 601.  
[32] Mckersie B D, Chen Y, de Beus M, et al. Superoxide dismutase enhances tolerance of freezing stress in transgenic alfalfa (Medicago sativa L.). [J]. Plant physiology, 1993, 103: 1155-1163.  
[33] Levitt J. Responses of Plants to Environmental Stresses [M]. Vol I. New York: Academic Press, 1980; 228-230.  
[34] Ma J Z, Liu D, Tang P. Cloning of spinach SAD gene, its construction and transformation to tobacco [J]. Plant Physiology (Supp), 1996 111(2): 814.

## Recent Advances in Research on Cold Resistance Gene of Plants

LIN Zhong-long<sup>1,3</sup>, LI Wei-wei<sup>1</sup>, BAI Xian-guang<sup>1,3</sup>, LV Guang-lei<sup>2,3</sup>, CHENG Zai-quan<sup>3</sup>

(1. College of Life Science Yunnan University, Kunming, Yunnan 650091, China; 2. Academy of Agricultural and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201, China; 3. Biotechnology Institute Yunnan Academy of Agricultural Science, Kunming, Yunnan 650223, China)

**Abstract:** The low temperature freeze injuries have done several harm to the plant survival and caused great losses to many crops yields. So, it has important theoretical and practical significance to study and improve the plant freezing resistance. At present, people has carried out widespread research on the COR, CBF, ICE, AFP genes, fatty acid desaturase genes, proline genes, SOD genes, furthermore people has worked out the relations between these genes and freezing tolerance. It turned out to prove to improve the freezing tolerance for plant by carrying out transgenic for plant with these relevant genes. This paper overviewed recent research of plant freezing resistance gene and antifreeze transgenic plants.

**Key words:** Cold resistance gene; Cold induced genes; CBF; ICE; Antifreeze protein; Transgenic plants