

- organic solvents. *Biokhimiya*, 1988, **53** (2): 1013~ 1016
- 12 Leavashov A V, Klyachko N L, Pshetsky A V *et al.* Superactivity of acid phosphatase entrapped into surfactant reversed micelles in organic solvents. *Dokl Akad Nauk SSSR*, 1986, **289** (3): 1271~ 1274
 - 13 Ruckenstein E, Karpe P. On the enzymatic superactivity in ionic reverse micelles. *J Colloid Interface Science*, 1990, **139** (2): 408~ 436
 - 14 Bru R, Sanchez-Ferrer A, Garaciá-Carmona F. Kinetic models in reverse micelles. *Biochem J*, 1995, **310** (3): 721 ~ 739
 - 15 Verhart R M D, Hilhorst R, Vermue M *et al.* Description of enzyme kinetics in reversed micelles. *Eur J Biochem*, 1990, **187** (1): 59~ 72
 - 16 Bru R, Sanchez-Ferrer A, Garaciá-Carmona F. Atheoretical study on the expression of enzymic activity in reverse micelles. *Biochem J*, 1989, **259** (2): 355~ 361
 - 17 Steinmann B, Jackle H, Luisi P L. A comparative study of lysozyme conformation in various reverse micellar systems. *Biopolymers*, 1986, **25** (6): 1133~ 1156
 - 18 Brown E D, Yada R Y, Maragoni A G. The dependence of the lipolytic activity of rhizopus arrhizus lipase on surfactant concentration in aerosol-OT/isooctane reverse micelles and its relationship to enzyme structure. *Biochim Biophys Acta*, 1993, **1161** (1): 66~ 72
 - 19 Wolf P, Luisi P L. Micellar solubilization of enzymes in hydrocarbon solvents enzymatic activity and spectroscopic properties of ribonuclease in n-octane. *Biochem Biophys Res Commun*, 1979, **89** (1): 209~ 217
 - 20 Chang Q L, Liu H Z, Chen J Y. Fourier transform infrared spectra studies of protein in reverse micelles: effect of AOT/isooctane on the secondary structure of α -chymotrypsin. *Biochim Biophys Acta*, 1994, **1206** (2): 247~ 252
 - 21 Rodakiewicz-Nowak J, Maslakiewicz P, Haber J. The effect of linoleic acid on pH inside sodium bis (2-ethylhexyl) sulfosuccinate reverse micelles in isooctane and on the enzymic activity of soybean lipoxygenase. *Eur J Biochem*, 1996, **238** (2): 549~ 553
 - 22 Walde P, Mao Q, Bru R *et al.* pH artifacts in reverse micellar enzymology: A warning. *Pure Appl Chem*, 1992, **64** (11): 1771~ 1775
 - 23 Zamarro M T, Domingo M J, Ortega F *et al.* Recovery of cellulolytic enzymes from wheat-straw hydrolysis broth with dioctyl sulphosuccinate/isooctane reverse micelles. *Biotechnol Appl Biochem*, 1996, **23** (2): 117~ 125

The Enzymological Researches in Reverse Micellar Systems. ZHU Hao, SHI Nai (*Department of Technical Physics, Peking University, Beijing 100871, China*); FAN Ying-xin, ZHOU Jun-mei (*Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*).

Abstract Reverse micelles are new systems for enzymatic researches. Enzymatic properties in reverse micellar systems are different from that in aqueous buffer. The properties of reverse micellar systems and the changes of enzymatic activity and structure in reverse micelles are reviewed and the factors which affect enzymatic properties in reverse micelles are also discussed. Finally, the new progress in enzymological researches and applications of reverse micellar systems are described.

Key words reverse micelles, surfactant, enzyme

植物抗冻蛋白研究进展*

卢存福¹⁾ 王红 简令成 匡廷云

(中国科学院植物研究所, 北京 100093)

摘要 抗冻蛋白 (AFPs) 最初是从极区海鱼中发现的一种适应低温的特异蛋白质, 它能阻止体液内冰核的形成与生长, 维持体液的非冰冻状态. 对近年来植物 AFPs 的发现过程, AFP 的生化特性, 抗冻作用机制, 抗冻蛋白基因工程及其应用前景等作了系统的综述.

* 中国博士后科学基金资助项目. ¹⁾ 现通讯地址: 北京林业大学生物中心, 北京 100083.

收稿日期: 1997-01-17, 修回日期: 1997-12-28

关键词 植物, 抗冻蛋白, 分子生物学

学科分类号 Q51

低温寒害是农业生产中的一种严重的自然灾害, 查明植物抗寒性的生理机制及其遗传因素, 不仅在基础理论上具有重要意义, 在解决生产实际问题上也具有广泛的应用价值. 一个世纪以来, 植物冻害机理的研究受到世界各国学者的重视. 在植物冻害的成因, 植物在抗寒锻炼过程中的代谢途径, 细胞结构 (膜磷脂含量、膜脂脂肪酸不饱和度、细胞骨架的冷稳定性等) 的变化, 以及已经对农业生产产生良好的经济效益的水稻育秧抗寒剂的研制成功等诸方面都取得了很大进展. 许多研究表明, 植物要抵抗冰冻的危害, 需要具备两个最基本的要素: 一是避免细胞内结冰; 二是细胞膜结构及核酸蛋白质等生命物质的低温稳定性. 大量研究表明, 细胞外结冰和细胞液的过冷却是植物避免细胞内结冰伤害的最主要和最普遍的两种适应机制^[1].

鉴于前人的研究结果和结论, Guy^[2]曾推测植物体内可能存在能够阻止冰核形成的物质, 并且这种物质在植物中的含量随季节温度起伏而消长. 可以改变水结冰性质的物质, 即抗冻蛋白 (AFP) 最先是动物中获得的. 在植物中发现 AFP 是近几年的事. 为了弄清抗冻蛋白的生化特性, 作用机制等, 我们以动物方面的研究资料及近年发表的有关植物 AFP 的文献为基础, 进行分析归纳.

1 AFP 的两个特性

海洋鱼类血清中的 AFP 可以使体液的冰点降至 -1.0°C 左右. 其降低水或血液冰点的效率较高. 按重量比较, 比 NaCl 效率大二倍; 按摩尔浓度比较, 比 NaCl 的效率高 200 ~ 500 倍. 一般溶液 (如 NaCl、蔗糖溶液等) 的冰点是固、液两相蒸气压平衡时的温度, 因而冰点应等于熔点. 而抗冻蛋白这类大分子只影响结冰过程, 几乎不影响熔化过程, 使冰点低于熔点. 例如: 2% 抗冻糖蛋白溶液 -0.9°C

结冰, 而结的冰直至温度上升到 -0.02°C 也不熔化, 这种现象叫做热滞效应, 热滞是一种非理想溶液的行为, 抗冻蛋白的冰点不由溶液的依数性决定, 而它的熔点却由溶液的依数性决定, 使两者出现差值, 冰点和熔点的差值称为热滞值^[3].

抗冻蛋白的另一个特性是依赖于浓度的对冰晶形态的效应. 在纯水中, 冰通常以平行于晶格基面 (a 轴) 的方式生长, 而在垂直于基面 (c 轴) 很少生长, 因此冰晶格看起来呈扁圆状. 低浓度 AFP ($\mu\text{mol/L}$) 优先抑制冰沿 a 轴的生长, 因此冰晶格的六边柱表面变得明显. 在高浓度下冰晶主要沿 c 轴生长而形成六边双棱锥及针形晶体^[4].

以上两个特性可作为判定 AFP 存在的依据.

2 植物中的 AFP

2.1 植物 AFP 的发现

AFPs 从本世纪 60 年代被发现以来, 先后引起许多实验室的研究兴趣, 研究对象先后从极区鱼到昆虫. 植物中是否存在 AFP, 一直是科学家们感兴趣的问题. 植物中的低温保护蛋白及结构类似鱼类 AFP 的蛋白是否是 AFP, 最初的研究没有给出明确的答案. 直到 1992 年, 加拿大 Griffith 等才第一次明确提出获得植物内生 AFP. 他们从经低温锻炼的能够忍受细胞外结冰的冬黑麦中发现了内源产生的 AFP, 并从冬黑麦叶片的质外体中提取并部分纯化了该蛋白. 由于它能改变冰晶的正常生长模式以及非依数性地降低水的冰点, 他们认为该蛋白就是植物中类似鱼类 AFP 的抗冻蛋白^[5]. 同年, 在 Griffith 等的发现稍后, 美国圣母大学的 Duman 实验室在多种植物中发现了有热滞效应的蛋白质^[6]. 两年之后, 中国学者费云标等从常绿抗冻植物沙冬青 (*Ammopiptanthus mongolicus*) 叶片分离到了抗冻蛋白^[7]. 从 1994 年始, 我们在高山植物

唐古特红景天叶片及悬浮培养细胞中获得具有抗冻活性的蛋白质 (AFP) (卢存福, 博士学位论文, 1996).

2.2 生化特性

Griffith 及其同事对冬黑麦 AFP 进行了系统的深入研究. 他们发现经 5℃ 低温锻炼后, 15~30 ku 的一组多肽在叶片的质外体中积累, 脱锻炼后这些多肽逐渐消失. 另一组多肽 (63、65、68 ku) 只有当叶片达最大抗冻力时才出现. 另外还发现, 低温诱导叶片质外体提取物冰核聚活性及抗冻活性均比对照组的高^[8]. 这表明, 质外体蛋白直接影响冰晶的形成, 是冬黑麦忍受胞外结冰机制的重要组成因子. 进一步的研究揭示, 冬黑麦抗冻蛋白中的七个多肽组分表现出明显的抗冻活性. 五种较大分子质量的多肽 (19、26、32、34、36 ku) 活性较高; 而 11、13 ku 的两条多肽抗冻活性较低. 含有二硫键的多肽, 经 DTT 处理后, 其抗冻活性并不消失. 这些多肽富含 Asp/Asn, Glu/Gln, Ser, Thr, Gly, Ala, 均缺少 His, Cys 含量达 5% 以上. 免疫电泳分析表明, 冬黑麦抗冻多肽同鱼及昆虫富含 Cys 的 AFP 没有共同的抗原决定位点^[9]. Hon 等^[4] 新近的研究揭示, 冬黑麦 AFP 具有抗冻、抗病双重功能. 经氨基酸序列分析, 免疫反应及酶活性分析证明, AFP 中存在分别同内切 β -1, 3 葡聚糖酶, 内切几丁质酶, 甜蛋白等三类病原相关蛋白结构、功能类似的多肽 (分别简称为 GLP、CLP、TLP). 而低温敏感植物烟草由病原体侵染引起的质外体病原相关蛋白没有抗冻活性. 这一发现暗示, 低温诱导的冬黑麦病原相关蛋白在结构上发生了微妙的能够吸附冰晶 (即抗冻性) 的演化.

Antikainen 等^[10] 近来的研究表明, 经 5~2℃ 低温驯化后, AFPs 只在抗冻的单子叶植物 (冬春黑麦、冬大麦、冬春小麦、春燕麦) 叶片质外体中积累, 而在不耐寒的玉米则无 AFPs 积累; 在所研究的双子叶植物中无论抗寒性强的 (菠菜、油菜、羽衣甘蓝) 还是不耐寒的 (烟草) 均未检测到 AFPs 的存在. 一种

可能的解释是双子叶植物 AFPs 可能定位在细胞内; 另一种可能的解释是双子叶植物抗冻能力需要在冰冻温度条件下才能被诱导, 抗冻蛋白才能积累.

Urrutia 等^[6] 和 Duman 等^[11] 发现, AFP 在植物中的存在较动物中更普遍, 是抗冻植物对冬季低温较普遍的适应机制. 在北印第安那州的 23 种所研究的被子植物及长绿植物中, 秋季、冬季均可检测到 AFP, 但夏季这种 AFP 消失. 欧白英 (*Solnum dulcamara*) 茎的汁液表现出同动物 AFP 同样的抑制冰重结晶的活性. 免疫印迹反应证明, 这种植物的 AFP 同黄粉虫 (*Tenebrio molitor*) AFP 有共同的抗原决定位点. 进一步以欧白英的冬季枝条分离到一分子质量为 67 ku 的抗冻糖蛋白 (AFGP), 是迄今在动植物中得到的分子质量最大的 AFP. 其氨基酸组分中甘氨酸占 23.7%. β -半乳糖酶处理该 AFP 后抗冻活性消失, 表明半乳糖为一关键组分. 该 AFGP 抗冻活性较鱼及昆虫 AFP 的要低^[12]. Duman 等^[11] 还发现, AFP 不仅在被子植物中存在, 而且在冬季的裸子植物、真菌及低温 (3℃) 诱导的细菌中存在. 另外在常绿圣诞蕨 (*Polystichum acrostichoids*), 木贼属的 *Equisetum hymenale*, 石松属的 *Lycopodium dendroideum* 及三种苔藓植物也发现了有抗冻活性的特异蛋白质.

2.3 AFPs 的组织及细胞化学定位

免疫组织化学研究表明, GLPs、CLPs 及 TLPs 在冬黑麦叶表皮、叶鞘及根颈中均存在, 而根表皮中只存在 CLPs. GLPs 和 CLPs 都沿叶肉细胞及根颈皮层细胞间隙分布. 冷诱导的冬黑麦叶肉细胞原生质体蛋白提取液无 GLPs 免疫印迹反应, 表明冬黑麦 AFP 并不在细胞内积累^[12, 16]. 免疫胶体金细胞化学研究表明, 叶肉细胞内只在分泌腔 (包括粗面内质网的液泡, 高尔基体, 以及靠近质膜附近或同质膜贴近的小泡) 中有分布. 在叶肉细胞的中胶层及细胞壁面向细胞间隙的一面, 束内输导组织鞘细胞间三角形联结处, 木质部导管细胞壁次生

加厚处, 以及表皮细胞壁, GLPs 胶体金标记最为明显^[14].

从 *T. molitor* AFPs 得到的多克隆抗血清对欧白莢茎提取液进行蛋白质印迹检测, 得到六条阳性带. 进一步经过免疫定位, 发现它们定位于茎部细胞膜上, 而且质膜提取物有热滞活性. AFP 对膜系统可能提供一种保护作用, 即避免胞外冰晶透过细胞而使胞内液体结冰^[6].

2.4 AFPs 可能的生理功能

前人的研究报道^[5,6]及我们的实验结果都表明, 同极区鱼 (AFP 热滞值: 0.5~1.5℃) 和昆虫 (AFP 热滞值: 3~6℃) 相比, 植物 AFP 活性 (热滞值通常为 0.2~0.5℃) 较低. 这从植物的抗冻方式可以得到解释, 因为产生 AFP 的植物几乎都是能够耐受细胞外结冰的, 这样, 植物中 AFP 的首要作用可能不是阻止冰晶形成, 而是调控胞外冰晶的增长及抑制冰的重晶化 (recrystallization) (后者对细胞的伤害是致死性的). 所谓重晶化是指冰晶大小的重新分布 (即一些冰晶增长, 而另一些减少), 这种现象通常发生在环境温度在零下较高温度起伏变化时. 冰重晶化可使组织因冰晶增大而产生机械性损伤, 对抗冻植物来说, AFP 抑制冰重晶化的能力比热滞效应对减轻冰晶的损伤更为重要. 抗冻生物避免冰冻伤害必须满足两个条件: a. 冰必须在胞外形成; b. 冰晶的大小及形成速度要受到控制. Griffith 等^[15]通过对抗冻植物抗冻性的研究, 认为抗冻植物形成了一种特殊的控制胞外冰晶形成的机制, 即抗冻蛋白和冰核聚物质的协同作用. 前者降低冰点, 减缓冰晶形成的速度; 后者促进冰晶的形成. 这样, 在冰冻温度下, 通过两种物质的协同作用调控胞外水结冰的速度和冰晶的形态, 从而减缓或避免结冰造成的对细胞的机械损伤及渗透胁迫. 多数抗冻植物在零下温度很小的范围内质外体水即结冰. 由此可知, 抗冻植物组织内水分的冰点同植物的抗冻极限温度相去甚远, 是两个不同的概念.

总的来看, AFP 对保证抗冻植物的抗冻

能力可能是至关重要的. Urrutia^[6]结合自己的研究工作, 认为 AFP 在植物中可能具有下列功能: 抑制冰重结晶; 降低冰晶的生长速度; 在某一特定温度下降低结冰水的百分比; 保护细胞膜系统及阻止细胞内冰晶的形成. Antikainen^[16]根据冬黑麦 AFP 的研究结果, 推测 AFP 可能主要起两种作用: 一种可能是屏障作用, 即避免增长的冰晶侵入叶表皮及细胞内, 第二种可能作用是抑制冰的重晶化.

2.5 抗冻蛋白的抗冻机理

迄今, 在动植物中发现的 AFP 结构各异, 没有共同的演化规律. 有人认为在极区鱼中已发现的四类各具特色的 AFP, 演化到具有抗冻活性, 从系统演化的角度来说, 时间并不算太长. 因为在目前认可的系统分类范围内, AFP 的分布没有明显的模式. 再有, 热滞效应在无脊椎动物、真菌, 非维管植物及细菌中的存在, 也暗示 AFP 可能是在不同的有机体独立地进化而来的. 这种情况在高等植物也有例证, 如双子叶植物欧白莢 67 ku 的 AFGP 同单子叶植物冬黑麦中的六种 AFP 多肽结构明显不同^[4].

结构不同的 AFP 竟有几乎相同的降低冰点、减少冰晶生长速度的功能, 似乎难于理解. 由此推测, 不同的 AFP 其抗冻机理可能具有一致性. 有关鱼类 AFP 抗冻机制的研究已有较多的报道, 但昆虫和植物 AFP 抗冻机理的研究几乎未见报道. 通过对鱼类抗冻蛋白作用机制的研究, 曾提出多种假说, 如结合水学说、空间屏障及吸附抑制机制等. 就目前研究来看, 吸附抑制学说比较合理, 但是解释 AFPs 吸附冰晶抑制其生长的理论依据尚不完善. 吸附抑制学说最早由 Raymond 和 de Vries^[17]提出. 他们认为 AFP 吸附在冰晶表面, 通过 Kelvin 效应抑制其生长.

机制的模型: 一般晶体的生长垂直于晶体表面, 假如杂质分子吸附于冰生长通途的表面, 那么需要再外加一推动力 (冰点下降), 促使冰在杂质间生长. 由于曲率增大, 使边缘的表面积也增加. 因表面张力的影响, 增加表

面积将使体系的平衡状态发生改变, 从而冰点下降^[3].

假设 AFP 吸附在整个冰晶表面, 由表面效应造成溶液冰点降低值可以通过下式计算:

$$\Delta T = \frac{2\sigma M T_0}{L \rho_i} \left[\frac{2r\alpha c N}{1000 MW} \right]^{1/2}$$

ΔT : 冰点降低值 (抗冻活性); σ : 表面张力; T_0 : 正常冰点值 (273K); M : 水的摩尔质量; L : 摩尔分子溶化潜热; ρ_i : 冰之密度; $2r$: 抗冻蛋白分子之直径; α : 吸附到冰上的 AFP 和总数之比; c : AFP 之浓度; N : 阿佛加得罗常数; MW : AFP 之摩尔质量. 通过实验测定 r 值和 α 值, Raymond 和 DeVries 计算了四种鱼 AFPs 的冰点下降值, 并对浓度作图, 发现其中的两种 AFPs 的理论值和实验值比较吻合, 另外两种则相差较大, 究其原因可能是这个模型没有反映出浓度对其的影响^[3]. 尽管如此, 这个模型仍然具有重要的参考价值.

有实验发现了 AFP 吸附在冰上的证据, 如 AFP 在冰晶中的分布系数; 光镜、电镜观察到的结晶行为的改变等^[3, 17].

3 抗冻蛋白基因工程的研究

虽然 AFP 在动植物中均存在, 但迄今只有鱼类四种 AFPs 的基因得到了系统的研究. 有关昆虫 AFP 基因的研究鲜见报道. 在植物方面, 低温及 ABA 诱导基因表达改变的报道较多, 但真正明确地认定是抗冻蛋白基因的研究还未曾报道. 不少学者试图通过分析冷诱导蛋白来获得抗寒冻基因. 如果这一设想得以实现, 那将有极大的实际意义.

Kurka 等^[18]从 4℃ 或 ABA 处理的拟南芥中分离到两个基因 Kin1 和 Kin2, 两个基因对应的蛋白质同冬比目鱼的 AFP 结构相似, 推测这两个基因可能具有一定的抗冻基因的性质.

通过 AFP 基因改变动植物抗冻性的工作, 到目前为止只限于鱼类 AFP 基因工程, 这是由于只有鱼类 AFP 基因的结构、表达调控有了系统研究的缘故. 将鱼类 AFP 基因转移到

昆虫中已获成功. 将冬比目鱼 AFP 基因连接到果蝇 (*Drosophila melanogaster*) hsp 70 启动基因的下游, 并通过 P 因子介导转化法导入果蝇卵内, 在热激条件 (36.5℃) 下 AFP 基因得到了表达, 可检测到冬比目鱼 AFP 分泌到果蝇血淋巴中^[19]. 但 Duncker 等^[20]新近的研究表明, 在低温条件下, AFP 不能使转基因果蝇获得抗冷特性. 获得大西洋狼鱼 AFP 基因的果蝇, 虽然 AFP 只在雌体内产生, 但将雌雄体置于 0℃ 及 -7℃ 下, 转基因果蝇成活率明显较对照组高. 研究人员将这种成活率的提高归于黄嘌呤脱氢酶报告基因表达的结果.

金海玲等^[21]将美洲拟鲈抗冻肽基因转移到 *E. coli* 中已得到了表达. AFP 基因在原核生物 *E. coli* 中诱导表达获得 AFP, 可作为一种防冻剂, 对果蔬的冬季储藏和保鲜有重要的应用价值.

尤其令人注意的是, 鱼类 AFP 用于某些植物的试验获得了较好的效果. Cutler 等^[22]用冬比目鱼 AFP 溶液处理植物组织, 显示出三种可以改善植物抗寒冻能力的新特性: a. AFP 真空浸润马铃薯、欧洲油菜和拟南芥的叶片, 可使这些叶片的自发冰点显著降低. 这表明 AFP 在植物组织中可以起一种抗成核剂的作用. b. 将雀麦草的悬浮培养细胞暴露于 AFP 后, 可降低在任何给定温度下冰冻的可冻水的量. 这表明 AFP 有低温保护剂的作用. c. 这种 AFP 能降低冰晶形成的速度.

1987 年, de Vries 等将抗冻基因 (afp) 整合在 Ti 质粒上, 用叶圆片法转化郁金香、烟草、油菜等获得一定的抗冻力^[23]. 1990 年 Georges 等^[24]合成了冬比目鱼 AFP 基因, 并构建了含 35 S 启动子、AFP 基因和 Cat (编码氯霉素酰基转移酶 CAT) 基因的载体 pGC51, 将该质粒通过电击导入玉米原生质体, 通过 CAT 分析以及用 AFP 和 CAT 的抗血清做的蛋白质印迹, 检测到了融合肽的产生. 这些实验构成了以 AFP 来改良植物抗寒冻性的第一步.

Hightower 等^[25]用表达 AFP 的 Cafa 3 基因转化并获得了转基因的烟草和蕃茄. 在转基因

因植物叶片中, Caf3 抗冻基因以很高的稳定状态的 mRNA 水平被表达, 但研究者没有检测到 AFP 对组织提取物中冰重晶化的抑制作用. 然而在含有编码一种融合蛋白 (去掉两头的葡萄球菌蛋白 A+ 抗冻蛋白) 的嵌合基因的转基因番茄组织中, 可检测到其 mRNA 和融合蛋白, 而且对重晶化的抑制作用在这种转基因组织中也检测到了. 据报道这种番茄果实可经受冷冻不坏, 已申请大田试验.

新近, 黄永芬等^[23]将整合在 Ti 质粒上的美洲拟蝶抗冻基因 (afp) 作为供体 DNA, 用花粉管通道和子房注射方法导入番茄中, 对 D1、D2 代进行 DNA 印迹获得杂交带; 田间抗寒性试验表明, 在春季平均气温低于正常年份 4.4℃ 的条间下, 转基因植株生长势优于对照, 致死温度也比对照降低 2℃, 说明 afp 基因已整合到转化番茄基因组, 并获得表达.

4 问题及展望

植物中 AFP 的发现是近几年的事, 绝大多数已经研究过的植物材料中 AFP 的活性大大低于鱼类和昆虫的, 尽管被研究的植物多达 30 余种, 但真正被分离纯化出来的 AFPs 并不多; AFPs 的生理功能 (如对植物细胞膜系统、细胞骨架等是否有冷稳定作用) 仍不明确. 对植物 AFPs 的结构特性的研究只是初步的, 植物 AFPs 基因克隆仍未成功. 尽管如此, 由于鱼类 AFP 基因转化植物的初步成功, 以及植物中类似 AFPs 基因克隆的成功, 植物抗冻分子生物学的前景必定是光明的. 用植物内源 AFP 来改良植物抗冻性及果实耐冷冻贮藏性的基因工程研究可能不久会有报道. 植物内源 AFPs 基因更适合在植物体内表达, 由此产生的转基因植物在抗寒性改变上也许更明显.

参 考 文 献

- 1 简令成. 植物抗寒性的细胞及分子生物学研究进展. 见: 翟中和主编. 细胞生物学研究进展. Vol 2, 北京: 高等教育出版社, 1990. 296~ 320
- 2 Guy L C. Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol*

- Biol*, 1990, **41**: 187~ 223
- 3 朱仁华编译. 海洋低温生物学. 北京: 海洋出版社, 1984. 193~ 229
- 4 Hon W C, Griffith M, Mlynarz A *et al*. Antifreeze proteins in winter rye are similar to pathogenesis related proteins. *Plant Physiol*, 1995, **109** (3): 879~ 889
- 5 Griffith M, Ala P, Yang D S C *et al*. Antifreeze protein produced endogenously in winter rye leaves. *Plant Physiol*, 1992, **100** (2): 593~ 596
- 6 Urrutia M E, Duman J G, Knight C A. Plant thermal hysteresis proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1992, **1121** (1): 199~ 206
- 7 Fei Yunbiao, Sun Longhua, Tao Huang *et al*. An important antifreeze mechanism of overwintering protein (AFP) with high activity in *Ammopiptanthus mongolicus*. *Cryobiology*, 1994, **31** (6): 560
- 8 Marentes E, Griffith M, Mlynarz A *et al*. Proteins accumulate in the apoplast of winter rye leaves during cold acclimation. *Physiol Plant*, 1993, **87** (3): 499~ 507
- 9 Hon W H, Griffith M, Chong P *et al*. Extraction and isolation of antifreeze proteins from winter rye (*Secale cereale* L.) leaves. *Plant Physiol*, 1994, **104** (3): 971~ 980
- 10 Antikainen M, Griffith M. Antifreeze protein accumulation in freezing-tolerant cereals. *Physiol Plant*, 1997, **99** (3): 423~ 432
- 11 Duman J G, Olsen T M. Thermal hysteresis protein activity in bacteria, fungi, and phylogenetically diverse plants. *Cryobiology*, 1993, **30** (3): 322~ 328
- 12 Duman J G. Purification and characterization of a thermal hysteresis protein from a plant, the bittersweet nightshade *Solanum dulcamara*. *Biochim Biophys Acta*, 1994, **1206** (1): 129~ 135
- 13 Griffith M, Antikainen M, Hon W C *et al*. Antifreeze proteins in winter rye. *Physiol Plant*, 1997, **100** (2): 327~ 332
- 14 Pihakaski Maunsbach K, Griffith M, Antikainen M *et al*. Immunogold localization of glucanase like antifreeze protein in cold acclimated winter rye. *Protoplasma*, 1996, **191** (3~ 4): 115~ 125
- 15 Griffith M, Marentes E, Ala P *et al*. The role of ice binding proteins in frost tolerance of winter rye. In: Li P H eds. *Advance in plant cold hardiness*. Boca Raton/Ann Arbor/London/Tokyo: CRC Press, 1993. 178~ 186
- 16 Antikainen M, Griffith M, Zhang J *et al*. Immunolocalization of antifreeze proteins in winter rye leaves, crown, and root by tissue printing. *Plant Physiol*, 1996, **110** (3): 845~ 857
- 17 Raymond J A, de Vries A L. Adsorption inhibition as a mechanism of freezing resistance in polar fishes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, **74** (6): 2587~ 2593
- 18 Kurkela S, Franck M. Cloning and characterization of a cold- and ABA-inducible *Arabidopsis* gene. *Plant Molecular Biology*, 1990, **15** (1): 137~ 144
- 19 Rancourt D E, Walker V K, Davies P L. Flounder antifreeze protein synthesis under heat shock control in transgenic *Drosophila melanogaster*. *Molecular and Cellular Biology*, 1987, **7** (6): 2188~ 2195

20 Duncker B P, Chen C P, Davies P L *et al.* Antifreeze protein does not confer cold tolerance to transgenic *Drosophila melanogaster*. *Cryobiology*, 1995, **32** (5): 521~ 527

21 金海翎, 商慧深, 张庆琪等. 美洲拟鲾抗冻肽基因在 *E. coli* 中的表达. *实验生物学报*, 1995, **28** (1): 77~ 83

22 Cutler A J. Winter flounder antifreeze protein improves the cold hardiness of plant tissues. *J Plant Physiol*, 1989, **135** (3): 351~ 354

23 黄永芬, 汪清胤. 美洲拟鲾抗冻基因导入番茄的研究. *生物化学杂志*, 1997, **13** (4): 418~ 422

24 Georges F, Saleem M, Cutler A J. Design and cloning of a synthesis gene for the flounder antifreeze protein and its expression in plant cells. *Gene*, 1990, **91** (2): 159~ 165

25 Hightwoer R, Cathy B, Ranela D. Expression of antifreeze proteins in transgenic plants. *Plant Molecular Biology*, 1991, **17** (5): 1013~ 1021

Progress in Study of Plant Antifreeze Proteins.

LU Cur-fu, WANG Hong, JIAN Ling-cheng, KUANG Ting-yun (*Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China*).

Abstract Antifreeze proteins (AFPs), which

depress the freezing point of water below the melting point (producing a characteristic thermal hysteresis), are well known for their antifreeze activity in both fish and terrestrial arthropods, but have only recently been identified in plants. The discovery, biochemical characteristics and the role in freezing tolerance of plant AFPs have been reviewed. Furthermore, the general mechanism of depressing the freezing point of water of AFPs has been discussed. The discovery of AFPs intrinsically produced by frost-tolerant plant is very significant. Isolation and characterization of genes for AFPs may provide the targeting information essential for the successful transformation of freezing-sensitive crops and fruits with genes encoding AFPs.

Key words plant, antifreeze protein, molecular biology

逆境胁迫诱导基因的结构、功能与表达调控*

翟大勇 沈黎明

(中国农业大学生物学院, 北京 100094)

摘要 对有关逆境响应基因的最新进展作了一简要的综述. 在逆境条件下, 脱落酸 (ABA) 浓度增加, 诱导许多新的基因表达及蛋白质合成. 已克隆到几百种逆境响应基因, 其中大多数可受外源 ABA 的诱导. 对这些基因及蛋白质的功能已有所了解, 认为它们可能与植物的抗逆能力有关. 目前认为有多条信号传递途径参与胁迫信号的转导.

关键词 Rab 基因, 逆境胁迫, 功能, 信号转导

学科分类号 Q756

脱落酸 (ABA) 是一种广泛存在于各种植物的植物激素, 在植物生长发育中起多方面的调节作用, 如气孔开闭、胚成熟、芽休眠、叶片脱落等等. 在逆境胁迫条件下, 植物体内 ABA 的含量会发生明显的变化, 诱导许多新基因表达及蛋白质合成. Rab 基因 (responsive

to ABA) 是指对 ABA 响应的一类基因的总称, 一般认为这类基因可在外源 ABA 的诱导下表达. 根据对 ABA 依赖程度的不同, 又可分为 ABA 依赖型、ABA 诱导型. 当然, 并不是所

* 国家自然科学基金资助项目 (39670088).

收稿日期: 1997-01-21, 修回日期: 1997-06-20