

海藻糖的应用及其合酶基因 *TPS* 在植物转基因中的研究进展

刘占磊^{1,2}, 黄丛林², 张秀海², 吴忠义²

(¹首都师范大学生命科学学院, 北京 100048; ²北京市农林科学院北京农业生物技术研究中心, 北京 100097)

摘要:海藻糖是一种非还原性双糖, 具有很高的稳定性和很强的吸水性等性质, 能够提高生物体对各种非生物胁迫的抵抗能力。目前有很多研究表明通过转化海藻糖合酶基因增加体内海藻糖含量可能成为选育作物抗逆品种的新方法。该文对海藻糖的理化性质、生物学特性及其应用情况作了简要的概述, 并介绍了编码酵母海藻糖合酶复合体基因的组成以及各个组成基因的功能, 着重阐述了海藻糖合酶基因在植物转基因方面(尤其在提高植物抗逆性)的研究进展。

关键词:海藻糖; 海藻糖合酶基因; 抗逆性

中图分类号: S188 文献标识码: A

Application of Trehalose and the Study Progress of Trehalose Synthase Gene *TPS* in Transgenic Plants

Liu Zhanlei^{1,2}, Huang Conglin², Zhang Xiuhai², Wu Zhongyi²

(¹College of Life Sciences, Capital Normal University, Beijing 100048;

²Beijing Agro-Biotechnology Research Center, Beijing Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Beijing 100097)

Abstract: Trehalose is a non-reducing disaccharide, and it has particular physical and chemical features (high stability and strong water absorption), so trehalose is able to protect the organism against a variety of abiotic stresses. Many researches have shown that increasing the trehalose content through genetic transforming of plants with trehalose synthase gene, creates a new method of breeding crops tolerant to variety stresses. The physical and chemical properties and the bio-function of trehalose were summarized in this paper, and the composition and function of the *Saccharomyces cerevisiae* trehalose synthase complex gene were introduced. Moreover, the application of trehalose synthase gene in transgenic plants (especially in stress tolerance of plant) was expatiated.

Key words: trehalose, trehalose synthase gene, stress tolerance

海藻糖(Trehalose)是一种非还原双糖, 由两个葡萄糖分子以 α, α 1-1糖苷键连接而成的, 分子式为 $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot 2H_2O$, 相对分子量为378.33。1832年Wiggers等在黑麦的麦角菌中首次发现了海藻糖。随后法国化学家Berthelot在小亚细亚沙漠里一种象鼻虫分泌的糖蜜中也发现了该糖, 并将其命名为海藻糖。海藻糖广泛存在于细菌、酵母菌、霉菌、食用菌、低等植

物、昆虫和无脊椎动物等各种生命体中。另外, 在高等植物中也发现了海藻糖的存在^[1-2]。海藻糖的熔点为97℃, 甜味较弱(相当于蔗糖甜度的45%), PH值稳定, 能溶解于水和热醇中, 不溶解于乙醚, 不能使斐林试剂还原, 也不能被 α -糖苷酶水解, 无毒无害^[3]。海藻糖的非还原性决定了它对酸、碱、高温的稳定性。此外, 海藻糖还具有有良好的抗辐射性^[4]和防腐蚀性^[5]。由于海

基金项目: 北京市自然科学基金会资助项目“利用叶绿体基因工程培育耐旱节水的高羊茅草坪草”(5062012)。

第一作者简介: 刘占磊, 男, 1982年出生, 硕士, 研究方向: 菊花遗传育种。通信地址: 100097 北京市海淀区板井路北京市农林科学院生物中心308, E-mail: LZL11603@126.com。

通讯作者: 吴忠义, 男, 副研究员, E-mail: zwu22@126.com。

收稿日期: 2008-11-10, 修回日期: 2008-12-16。

海藻糖具有对酸、碱、高温的稳定性和很强的吸水性的性质,使它在生物体内具有很强的抗脱水作用,在干旱、寒冷、高盐碱等逆境条件下可保护生物膜、蛋白质等免受伤害^[6-10]。因此,生物体内的海藻糖能够提高生物体对逆境条件的抗性。目前的研究表明很多物种对不良环境的抗逆耐受能力与它们体内的海藻糖浓度有直接关系^[11-12]。海藻糖是一种典型的应激代谢产物:当生物体生长环境良好时,体内不积累海藻糖;而当生物体处于胁迫环境(如饥饿、干燥、高温和高盐碱等)时,体内就会迅速积累海藻糖^[13-14],而且这些海藻糖会随着不良环境的解除而被降解。外加的海藻糖对蛋白质、酶与细胞膜等活性物质也均有明显的保护作用^[15]。由于海藻糖的理化及生物学特性,海藻糖有广泛的应用前景,其合酶基因在转基因植物中也得到了应用。

1 海藻糖的应用

由于海藻糖具有稳定生物膜、蛋白质等生物大分子及抗逆,保鲜等作用,目前海藻糖在食品,医药,化妆品,生物制剂的保存以及农业等方面都有应用,并且展示了广阔的应用前景。

1.1 海藻糖在食品行业的应用

由于海藻糖具有非还原性、耐干燥性、耐冻性、保湿性等性质,所以海藻糖在食品行业有很大的应用前景,并且已经在各种食品中得到了广泛应用^[16]。海藻糖可以用来防止因干燥或冷冻等条件引起的含蛋白质食品的变性;可以用作食品的甜味剂(海藻糖具有甜味),能降低产生龋齿等不良的副作用。无水海藻糖具有很强的吸水性,可用它来解决干燥食品^[17]的反潮和粉末饮料的结块等问题;海藻糖还具有防止淀粉老化和微生物污染等功能。由于海藻糖具有特有的生物保护功能,可用于水果、蔬菜的保鲜^[18]。

1.2 海藻糖在医药行业的应用

海藻糖在医药上的应用主要是利用海藻糖对生物大分子的保护作用,用它作试剂和诊断药等的稳定剂,如可用于激素、疫苗、抗生素与维生素等的稳定剂等。另外,2002年 Matsuo 等^[19]报道了海藻糖能有效缓解干眼病患者的症状;2004年 Tanaka 等^[20]报道了海藻糖能缓解由于多聚谷氨酰胺引起的小鼠亨廷顿病的症状;Chen 等^[21]报道了海藻糖在肺移植上(移植肺的贮存)的应用。

1.3 海藻糖在化妆品方面的应用

由于海藻糖具有保湿性、防紫外线辐射等作用,用于各种化妆品中有护肤、保湿、防紫外线等功效。用于护肤类化妆品中,可以达到抑制皮肤干燥的效果;由于海藻糖本身的甜味,可作为甜味剂用于口腔清凉剂、口

腔芳香剂等。Kidd 和 Devorak 等^[22]报道了海藻糖在化妆品中的应用。

1.4 海藻糖在生物制剂保存方面的应用

用海藻糖保存的生物制品,放置在常温下即可。克服了以往生物制品必须用真空冷冻干燥和在低温下保存带来的保存、运输和使用的麻烦,可以达到降低生物制品的成本的目的。目前已将海藻糖用于限制性内切酶类(使其可以在常温下保存相当长时间而不丧失活性)的保存,还可以用于干 PRC 反应试剂盒等新型生化工具的保存。

1.5 海藻糖在农业上的应用

采用基因工程技术,把海藻糖合酶基因导入的植物(原来不产生海藻糖或海藻糖含量低)体内,获得可以产生海藻糖的转基因植物,改善原有物种的抗逆品质,培育抗寒、抗旱和耐盐碱的转基因植物新品种。该技术用于粮食作物和经济作物,使其体内富含海藻糖,就可以提高作物对环境的耐受能力,培育作物新品种,能够促进农业生产。如果用海藻糖合酶基因转化那些本身就具有很强抗逆性的植物,进一步提高它们抗逆能力,将来也许能用这些植物来改造沙漠、绿化荒旱地等^[23]。

2 海藻糖合酶基因的研究进展

目前对大肠杆菌和酵母菌中的海藻糖合酶基因的研究已经比较透彻,另外在拟南芥、水稻等植物中也发现了海藻糖合酶基因家族的存在。下面介绍一下酵母中海藻糖合酶基因的研究进展。

合成酵母海藻糖合酶复合体的基因有四个部分组成:TPS1(先前也被称为 GGS1, CIF1, BYP1, FDP1, GLC6 和 TSS1)基因,TPS2(也被称为 HOG2 和 PFK3)基因, TSL1 基因和 TPS3(一个被识别为是 TSL1 同族体的基因)^[24]。

TPS1 基因编码 56kDa 的蛋白,该蛋白具有完整的 6-磷酸-海藻糖合成酶活性。Thevelein 等^[25]的研究表明,只有当 TPS1 基因存在时酵母细胞才具有 6-磷酸-海藻糖合成酶活性,才能使酵母在热休克时积累海藻糖,依此证明了 TPS1 基因在酵母体内是编码 6-磷酸-海藻糖合成酶的功能。TPS1 基因编码的蛋白还起稳定海藻糖合酶复合体的作用。TPS1 基因的缺失也使 6-磷酸-海藻糖酯酶活性大大降低,并导致海藻糖合酶复合体解体。

TPS2 基因编码 102kDa 的蛋白,该蛋白具有 6-磷酸-海藻糖酯酶活性,6-磷酸-海藻糖酯酶的功能是催化 6-磷酸-海藻糖脱磷酸化形成海藻糖和磷酸。Walter 等^[24]的研究表明,酿酒酵母在 TPS2 基因缺失时

丧失6-磷酸-海藻糖酯酶活性,缺失编码海藻糖合酶复合体的其它基因时,只会降低6-磷酸-海藻糖酯酶活性。由此可见酿酒酵母中还存在其它不依赖于TPS2基因的6-磷酸-海藻糖酯酶活性。

TSL1基因和TPS3基因大小相同,它们编码的蛋白都为123kDa。Walter等^[24]的研究表明,酿酒酵母中TSL1和TPS3基因的缺失破坏海藻糖合酶复合体的稳定性(比缺失TPS2基因更加严重),TSL1基因的缺失比TPS3基因的缺失影响更大,酿酒酵母体内会有更多游离的TPS1和TPS2蛋白。另外TSL1基因的缺失时,磷酸对6-磷酸-海藻糖合成的抑制调控作用会降低,而TPS3基因的缺失就不会有这种作用。

综上所述,TPS1,TPS2,TSL1,TPS3共同组成了编码酵母海藻糖合酶复合体的基因,TPS1编码的蛋白具有6-磷酸-海藻糖合成酶活性,TPS2编码的蛋白具有6-磷酸-海藻糖酯酶活性,TSL1和TPS3编码的蛋白起稳定基因复合体的作用。

3 海藻糖合酶基因在植物转基因方面的应用

如果能在植物特别是作物体内能积累海藻糖,就能使它们免受不良环境的影响,从而达到改良植物性状,实现了培育新品种的目的。由于通过转基因技术能在植物体内积累海藻糖,因此可以作为一种生产海藻糖的途径。另外,海藻糖合酶基因在植物抗逆性研究方面也是非常重要的。因此海藻糖合酶基因在植物转基因方面是植物转基因方面的一个热点。海藻糖合酶基因在植物转基因方面国内外已经有很多报道。目前已经把海藻糖合酶基因导入烟草、马铃薯、水稻和其它植物中,得到了不同表型的转化植株,转化植株的抗逆性也得到了提高。

Romero等报道^[26],以CaMV35S启动子驱动酵母的TPS1基因转化烟草,发现转基因植株中的海藻糖含量明显增高(没有转化的对照植株中几乎检测不到海藻糖的存在):每克鲜叶中的含量为0.17 mg。转基因植株的表型发生了明显的变化:生长受阻,刀形叶片,体内蔗糖浓度下降和抗旱性的提高(经水分胁迫发现转化植株的耐旱性与形态学改变程度呈正相关)。转基因植株的离体叶片与对照植株的离体叶片水胁迫实验的结果差异不明显,文章认为海藻糖的合成不是一种渗透保护作用,而是改变了糖代谢和调控途径从而造成了植株表型的改变和抗旱性的提高。

Andre等^[27]以拟南芥的TPS1基因在CaMV35S启动子驱动下转化烟草,得到了转化植株。转化植株在甘露醇和氯化钠的胁迫下、离体叶片在干燥环境下的失水率、温度胁迫下的发芽率比对照植株的高。而且

所有转化植株在这些条件下表现一致。表明拟南芥TPS1基因的表达可以增强模式植物和其它作物在非生物胁迫时的抗逆能力。

Yeo等^[28]的研究,将酵母的TPS1基因在CaMV35S启动子驱动下转化马铃薯,转化植株与没有转化的植株相比表现出了许多外部形态的变化,包括生长迟缓,矮化,叶发黄并呈柳叶形,根发育异常,畸形等。有趣的是当转化植株移栽到土壤后,外部表型都恢复了正常,而且明显改善了植株的抗旱性。

Ibolya等^[29]的实验表明,将酵母的TPS1基因在可干旱诱导的启动子StDS2的驱动下转入马铃薯,得到了两棵转基因植株T1和T2。该表达载体在转化植株中仅有很低的TPS1基因表达(可能由于染色体位置的作用),但对转化植株观察结果显示这样的表达量足以提高转化植株的抗旱性。T1和T2的离体叶片8 h后萎蔫,而对照植株的离体叶片3 h后就萎蔫。在干旱处理中,在CO₂的饱和的最大水平上CO₂的同化率也大大提高,转化植株保持了6~9天,而对照植株只能保持3天。在最佳的生长环境下,转化植株固定的CO₂比对照植株少。T1和T2植株叶片上的气孔比对照植株上少30%~40%,这足以使转化植株较低的CO₂固定率和提高抗旱性。

Garg等^[30]用大肠杆菌的海藻糖合成基因(otsA和otsB)转化水稻,与没有转化的植株相比,转化植株表现了不同的表型:生长受阻,光和氧化损伤降低,在盐、干旱和低温的胁迫下表现更多有利的矿质营养平衡。由于生长条件,与没有转化的植株相比,转化植株积累了3~10倍的海藻糖。观察显示1 g鲜重中海藻糖的最高含量为1 mg时保持良好的状态,而且显示了海藻糖不是一种良好的溶质。然而,增加海藻糖的积累与植株提高的溶解糖水平、增强胁迫和非胁迫下的光合作用能力相一致,与糖代谢和调节糖感知信号的作用相一致。这些结果证明基因工程在提高水稻的非生物胁迫能力和通过组织特异性与胁迫诱导的过量表达海藻糖来提高生产力是可行的。

Jang等^[31]的研究表明,在玉米的Ubi1启动子的驱动下,用大肠杆菌的海藻糖合酶复合体基因在水稻体内可以表达TPS和TPP的融合体。表达的融合体酶有高而且专一的催化效率,使该实验成为引人注目的高效合成海藻糖的方法;它还有一个优点降低了对植株有潜在毒性的海藻糖-6-磷酸的含量。从转化植株的叶片和种子的鲜重中分离的海藻糖可达到1.076 mg/g。比单一转化TPS和TPP编码基因的烟草的海藻糖表达量高200倍。转化植株种子中糖的轮廓明显改变,

但叶片中没有改变。据报道单一转化大肠杆菌的TPS基因和TPP基因,或者两者同时转化的植株表型都会变化。有趣的是,在这个实验中转化植株虽然产生了高水平的海藻糖,但是没有引起生长受阻和明显的表型变化。另外,通过叶绿素荧光和生长受阻分析表明海藻糖在转化植株中的积累提高了植株对干旱,高盐和寒冷的耐受能力。研究还表明海藻糖是一个广泛的非生物胁迫的保护者,水稻对海藻糖的耐受能力比双子叶植物要强。

王自章等^[32]把担子菌灰树花(*Grifola frondosa*)的海藻糖合酶基因(TSase)在由双拷贝CaMV35S启动子驱动下导入甘蔗,发现部分转化植株根叶畸形、株型异常、生长缓慢。移栽到含PEG8000 17.4% (w/v)的MS培养基后,观察到转基因植株抗渗透胁迫能力增强。

另外植物体内本身也含有海藻糖合酶基因家族的基因通过诱导它们的过表达也能提高植物的抗逆性。Liang等^[33]通过诱导水稻体内本身的OsTPP1基因过表达,发现过表达植株的耐盐性和抗寒性得到了加强。该研究既显示了OsTPP1基因在提高水稻抗逆性的作用,也暗示了可以利用OsTPP1基因来增强其它作物的非生物胁迫的作用。

4 结语

随着研究的不断深入,海藻糖在各行各业中的应用会更加广泛,对海藻糖和海藻糖合酶基因的了解也会越来越多。但是目前对海藻糖抗逆性的机理仍然不是很清楚。海藻糖以后的研究重点应该是对其抗逆机理的研究和植物转基因方面的研究,这两者应该是相辅相成的。对海藻糖合成基因的深入研究,一定会培育出抗旱、抗寒、抗盐碱的植物新品种,为农业生产和改良环境做出贡献。更应该加强海藻糖在各个领域应用的研究,使它给人们的日常生活带来更大的方便。

参考文献

- [1] Goddijn OJM, Dun KV. Trehalose metabolism in plants. Trends in Plant Science, 1999, 4(8): 315-319.
- [2] Drennan PM, Smith MT, Goldsworth D, et al. The occurrence of trehalose in the leaves of the desiccation-tolerant angiosperm *Myrothamnus flabellifolius* Welw. Journal of plant physiology, 1993, 142(2): 493-496.
- [3] 刘传斌,云战友,冯朴荪,等.海藻糖在生物制品活性保护中的应用前景.中国医药工程杂志,1998,14(2): 182-185.
- [4] Yoshinaga K, Yoshioka H, Kurosaki H, et al. Protection by trehalose of DNA from radiation damage. Biosci Biotech Biochem, 1997, 61(1): 160-161.
- [5] 宋棋,李寅.海藻糖对面包酵母耐储存力的影响.无锡轻工大学学报,1997, 16(3): 32-36.
- [6] Wiemken A. Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. Antonie van Leeuwenhoek, 1990, 58(3): 209-217.
- [7] Eleutherio ECA, Dearaujo PS, Panek AD. Role of the trehalose carrier in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem Biophys Acta, 1993, 1156(3): 263-266.
- [8] Virgilio C, Hottiger T, Dominguez J, et al. The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. I. genetic evidence that trehalose is a thermoprotectant. European Journal of Biochem, 1994, 219(12): 179-186.
- [9] Colaco C, Kampinga J, Roser B. Amorphous stability and trehalose. Science, 1995, 268(5212): 788.
- [10] Thevelein JM. Regulation of trehalose metabolism and its relevance to cell growth and function. In: Bramb R, Marzluf GA. The Mycota. Berlin: Springer-Verlag, 1996: 395-420.
- [11] Crowe JH, Crowe LM, Chapman D. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. Science, 1984, 223(4637): 701-703.
- [12] Hottiger T, Virgilio CD, Hall MN, et al. The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. II. Physiological concentrations of trehalose increase the thermal stability of proteins in vitro. Europe Journal of Biochemistry, 1994, 219(1-2): 187-93.
- [13] Laere AV. Trehalose, reserve and/or stress metabolite? FEMS Microbiology Letters, 1989, 63(1): 201-209.
- [14] Wiemken A. Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. Antonie Van Leeuwenhoek, 1992, 58(3): 209-217.
- [15] Reshkin SJ, Cassano G, Womersley C, et al. Preservation of glucose transport and enzyme activity in fish intestinal brush border and basolateral membrane vesicles. Journal of Experimental Biology, 1988, 140: 123-135.
- [16] Kato M, Miura Y, Kettoku M, et al. Purification and characterization of new trehalose producing enzymes isolated from the hyperthermophilic archae, *Sulfolobus solfataricus* KM. Biosci Biotechnol Biochem, 1996, 60(3): 546-550.
- [17] Roser B. Trehalose a new approach to premium dry food. Trends Food Sci. Technol. 1991, 7: 166-169.
- [18] Roser B, Colaco C. A sweeter way to fresher food. New Scientist, 1993, 138: 24-28.
- [19] Masuo T, Tsuchida Y, Morimoto N. Trehalose eye drops in the treatment of dry eye syndrome. Ophthalmology, 2002, 109 (11): 2024-2029.
- [20] Tanaka M, Machida Y, Niu S, et al. Trehalose alleviates polyglutamine-mediated pathology in a mouse model of Huntington disease. Nat Med, 2004, 10(2): 148-154.
- [21] Chen F, Fukuse T, Hasegawa S, et al. Effective application of ET-Kyoto solution for clinical lung transplantation. Transplantation Proceedings, 2004, 36(9): 2812-2815.
- [22] Kidd G, Devorak J. Trehalose is a sweet target for agrobiotech. Biotechnology, 1994, 12: 1328-1329.
- [23] Serrano R, Francisco A, Cutilanz M, et al. Genetic engineering of

- salt and drought tolerance with yeast regulatory genes. *Scientia Horticulturae*, 1999, 78: 261-269.
- [24] Bell W, Sun W, Thevelein JM, et al. Composition and functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* trehalose synthase complex. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(50): 33311-33319.
- [25] Thevelein JM, Hohmann S. Trehalose synthase: Guard to the gate of glycolysis in yeast? *Trends in Biochemical Sciences*, 1995, 20(1): 3-10.
- [26] Romero C, Belles JM, Vaya JL, et al. Expression of the yeast trehalose-6-phosphate synthase gene in transgenic tobacco plants: pleiotropic phenotypes include drought tolerance. *Planta*, 1997, 201(3): 293-297.
- [27] Andre MA, Enrique V, Susana SA, et al. Transformation of tobacco with an *Arabidopsis thaliana* gene involved in trehalose biosynthesis increases tolerance to several abiotic stresses. *Euphytica*, 2005, 146: 165-176.
- [28] Yeo ET, Kwon HB, Han SE, et al. Genetic engineering of drought resistant potato plants by introduction of the trehalose-6-phosphates synthase (TPS1) gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cells*, 2000, 10(3): 263-268.
- [29] Ibolya S, Sa'ndor D, Miha'ly K, et al. Effects of drought on water content and photosynthetic parameters in potato plants expressing the trehalose-6-phosphate synthase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Planta*, 2008, 227(2): 299-308.
- [30] Garg AK, Kim JK, Owens TG, et al. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *PNAS*, 2002, 99(25): 15898-15903.
- [31] Jang IC, Oh SJ, Seo JS, et al. Expression of a bifunctional fusion of the *Escherichia coli* genes for trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase in transgenic rice plants increases trehalose accumulation and abiotic stress tolerance without stunting growth. *Plant Physiology*, 2003, 131: 516-524.
- [32] 王自章,张树珍,杨本鹏,等.甘蔗根癌农杆菌介导转化海藻糖合酶基因获得抗渗透胁迫能力增强植株. *中国农业科学*, 2003, 36(2): 140-146.
- [33] Ge LF, Chao DY, Shi M, et al. Overexpression of the trehalose-6-phosphate phosphatase gene *OsTPP1* confers stress tolerance in rice and results in the activation of stress responsive genes. *Planta*, 2008, 228: 191-201.