

# 玉米海藻糖含量测定及其合成酶(TPS)基因序列分析

付凤玲 阎雨 刘卫国 李晚忱

(1. 四川农业大学玉米研究所,四川 雅安 625014;2. 四川农业大学农学院,四川 雅安 625014)

**摘要:**自然界生物体内广泛存在着海藻糖。海藻糖不仅能在正常情况下为生物体新陈代谢提供能量储备,更能在干旱、高热、低温等逆境胁迫下通过大量积累来帮助生物体抵御逆境伤害。因此,对海藻糖积累及其合成途径关键酶类的研究已越来越受到人们关注。本研究以垫状卷柏(*Selaginella pulvinata* (Hook. et Grev) Maxim.)为对照,利用高效液相色谱法(HPLC)检测了玉米自交系在不同干旱条件下的叶片海藻糖含量,结果显示,在重度、中度和轻度干旱胁迫下,玉米中均未检测到海藻糖,而正常状态下的垫状卷柏海藻糖含量达10.31mg/g干重。另外,本研究结合电子克隆对玉米自交系18-599白的海藻糖-6-磷酸合成酶(*trehalose-phosphate synthase*, TPS)基因进行了序列扩增,并用RT-PCR进行验证,得到1条全长3055bp的cDNA全序列,命名为*ZmTPS*, GenBank登录号为EU659122。通过对不同物种TPS氨基酸序列进行比对分析,发现在玉米中存在许多重要的保守位点,但同其他TPS活性低的植物一样,缺失了部分保守区,推测这可能是玉米海藻糖含量太低以至于HPLC未能检测出的原因。

**关键词:**玉米;海藻糖;高效液相色谱;海藻糖-6-磷酸合成酶;序列分析

## TEST OF TREHALOSE CONTENT AND SEQUENCE ANALYSIS OF TREHALOSE-PHOSPHATE SYNTHASE GENE (TPS) IN MAIZE

FU Feng-ling YAN Yu LIU Wei-guo LI Wan-chen

(1. Maize Research Institute, Ya'an, Sichuan 625014; 2. Agronomy College, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014)

**Abstract:** The trehalose exists abroad in natural organisms. It is not only providing energy reservoir for metabolism in general condition, but also resisting hurt from adversity stress such as drought, heat, cold and so on by accumulation excessively. So, studying on the trehalose accumulating mechanism and key enzyme in its synthesis approach has been giving more and more attentions. The leaf trehalose contents of maize inbred lines under different drought treatments were tested by high performance liquid chromatography (HPLC) in this study, *Selaginella pulvinata* (Hook. et Grev) Maxim with in better water. The results showed that trehalose was not tested in all samples of maize, and 10.31mg/g drought weight in *Selaginella pulvinata* (Hook. et Grev) Maxim was measured. All 3055bp cDNA sequence of trehalose-phosphate synthase gene (TPS) was cloned from maize inbred line "18-599 Bai" by combining electronic cloning method and RT-PCR. This sequence named as *ZmTPS* and logging in GenBank as EU659122. Comparing and analysing with other species' amino acid sequences of TPS, some of conservative sequences was discovered in maize TPS, but existed partial conservative sequences, which was same as other plant species with low activity of TPS enzyme. It is estimated that the differences between TPS of maize and other species may result in too low content trehalose in maize to be tested by HPLC.

**Key words:** maize; trehalose; HPLC; TPS; sequence analysis

收稿日期:2011-01-05 接受日期:2011-03-08

基金项目:国家自然科学基金(31071433)(30971795),抗逆转基因专项(2008ZX08003-004)

作者简介:付凤玲(1962-),女,陕西蒲城人,博士,教授,研究方向为玉米育种与分子生物学。E-mail:ffl@sicau.edu.cn

通讯作者:李晚忱(1958-),男,四川自贡人,博士,教授,研究方向为玉米分子生物学和遗传育种。E-mail:aumdys@sicau.edu.cn

海藻糖是由 2 个葡萄糖单元通过  $\alpha, \alpha$ -1-1 糖苷键链接而成的非还原性双糖,既是生物体能源和碳源的贮藏类物质,更是干旱、脱水、低温、高渗透性等逆境下的应激代谢产物。自然界中,海藻糖广泛存在于藻类、细菌、真菌、低等植物、昆虫和其他无脊椎动物中<sup>[1]</sup>。植物中海藻糖的主要合成途径是由尿苷-2-磷酸-葡萄糖和 6-磷酸-葡萄糖在海藻糖-6-磷酸合成酶(trehalose-6-phosphate synthase, TPS)的作用下生成 6-磷酸-海藻糖,然后经海藻糖-6-磷酸酯酶(trehalose-6-phosphate phosphatase, TPP)的脱磷酸作用生成海藻糖,其中 TPS 是海藻糖合成过程的一个关键酶<sup>[2,3]</sup>。

自 1882 年首次从黑麦的麦角菌中发现并分离出海藻糖以来,越来越多的研究证明,海藻糖是一种稳定、安全、可靠的天然糖类,对生物体具有奇特的保护作用<sup>[4-6]</sup>,尤其是在干旱、低温、高热、高渗透性等逆境下对生物体新陈代谢相关的生物大分子独特的保护作用已越来越受到广泛关注。近年来,植物学家尝试用不同来源的 TPS 基因转化植物,期望转基因株系能够通过海藻糖的过量积累达到改良植物耐逆性的目的<sup>[3,7-11]</sup>。后来的研究又进一步表明,TPS 和 TPP 基因不仅影响海藻糖的合成,还在植物逆境生长和生理调节方面起到重要的信号作用<sup>[12]</sup>。一些植物如卷柏、拟南芥、烟草等的海藻糖含量和 TPS 基因已相继被测定和克隆<sup>[13-15]</sup>,而有关玉米海藻糖含量及 TPS 序列全长还未见报道。本研究利用 HPLC 法测定了玉米海藻糖含量,并用电子克隆与 RT-PCR 及 RACE 相结合,获得了玉米 TPS 全长 cDNA。通过与其他物种 TPS 氨基酸序列的比对分析,以了解玉米 TPS 基因序列特点。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 试验材料及取样处理

不同耐旱性玉米自交系 81565、200B、N87-1、18-599 白、18-599M 和 ES40 共 6 个材料,种植于宁夏永宁县。试验按 2 因素随机区组设计,5 行区,株行距 0.3m  $\times$  0.7m,行长 3m,单株种植,重复 2 次。3 种水分处理分别为重度干旱:仅在播种前充分灌 1 次水;中度干旱:除播前充分灌 1 次水外,拔节期再灌 1 次水;轻度干旱(对照):在播前、拔节期和灌浆期各充分灌水 1 次。取授粉后 20d 的穗上叶,105℃杀青,90℃烘至恒重,粉碎后用于海藻糖检测,垫状卷柏和普通小麦作参照。

### 1.2 海藻糖含量测定

海藻糖标准曲线:海藻糖标准品用超纯水配置成

浓度为 75、150、250、500 和 1000  $\mu$ g/ml 的标准溶液,进行色谱分析,重复测定 3 次。以标准溶液的质量浓度( $x$ )为横坐标,色谱峰面积( $y$ )为纵坐标,取 3 次测定的平均值用于绘制标准曲线,得方程如下:

标准曲线方程为  $y = 144.6x - 2535 (R^2 = 0.999)$

色谱分析条件和参数:高效液相色谱仪(Agilent 公司,HP1100 型),糖分析柱为固定相,3:1 体积的乙腈:水为流动相,流速 0.8ml/min,进样量 20  $\mu$ l,柱温 35℃,差示折光检测器(RID)温度 40℃。

样品处理与海藻糖含量测定:准确称取已粉碎好的玉米样品各 2g,分别盛入 50ml 离心管中,加入定量超纯水,100℃水浴 2h,放入超声仪中超声处理 20min,经 10,000r/min 离心 20min,取 1ml 上清液转入 5ml 离心管,再加入 3ml 乙腈,并用 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜过滤,即可装柱检测。将检测结果(色谱峰面积)代入标准曲线方程即可计算出各样品海藻糖含量。

### 1.3 海藻糖-6-磷酸合成酶(TPS)基因 cDNA 全长克隆及验证

1.3.1 玉米 TPS 电子克隆 在 GenBank 数据库中,以水稻 TPS 的 cDNA 序列为信息探针,同源搜索玉米 dbEST,将高度同源的玉米 ESTs 序列(筛选条件为:重叠 100bp,identity > 85%)下载保存。用 DNASTAR 软件(www.dnastar.com)的 Seqman 程序将这些 ESTs 序列拼接组装成重叠群(Contig)。再以此 Contig 为信息探针,重复以上 Blastn 检索过程,反复进行 ESTs 重叠群的拼接和比对,直至检出的 Contig 不能继续延伸,最后得到一个较长的序列。

1.3.2 TPS 电子克隆序列验证 以电子克隆序列为基础,分段设计特异引物。提取玉米自交系 18-599 白幼叶总 RNA,以此为模板,用设计好的特异引物进行分段扩增(图 1)。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后,切胶纯化并测序比对,验证电子克隆序列。最后用快速末端扩增法(RACE 法)获得 TPS 基因 cDNA 全长。

### 1.4 不同物种来源的 TPS 序列比对与分析

从 NCBI 网站下载不同生物来源的 TPS 序列信息,用 DNAMAN 软件(www.lynnon.com)分析从玉米中克隆的 TPS 序列特点,并对其推导编码的氨基酸结构与功能域进行分析比对。

## 2 结果与分析

### 2.1 玉米海藻糖含量测定

试验测定了 6 个玉米自交系在 3 种干旱状态下叶

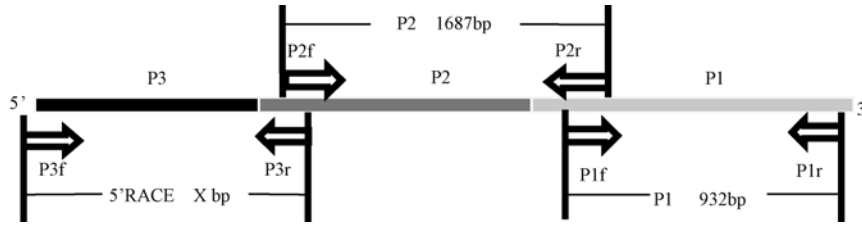


图1 玉米 TPS cDNA 序列扩增示意图

Fig. 1 Amplification sketch map of TPS cDNA sequence in maize

P1f:5'-AAATGTGTTGGCGGCAGAG-3', P1r:5'-AGCAAGTAGCGGCGCTTAGA-3'

P2f:5'-GTTGACTGCTGTCCTATTC-3', P2r:5'-CCCTCTGGCTTTACTTTGG-3'

P3f:5'-CTAATACGACTCACTATAGGCAAGCAGTGTATCAACGCAGAGT-3'(RACE通用引物),

P3r:5'-TTCTTGTGGCACAGCAATCTG-3'

片海藻糖含量,以垫状卷柏和普通小麦作为参照。检测结果表明,6个玉米自交系在3种不同程度的干旱胁迫下均未检测到明显的海藻糖吸收峰,未能检测出海藻糖含量,而在未胁迫的垫状卷柏中海藻糖含量高达10.31mg/g干重,出峰时间与海藻糖标样一样,在6.96~6.97min。在未胁迫的普通小麦中没有检测到海藻糖。部分样品色谱结果见图2。另外,为进一步确定玉米中是否有海藻糖存在,又对各干旱处理的籽粒进行了测定,结果仍未检测出海藻糖。分析原因,可能是玉米中海藻糖含量太低,加之其他双糖干扰,RID检测器灵敏度不够等,使得色谱基线较高,影响了玉米海藻糖的检测。

## 2.2 海藻糖-6-磷酸合成酶(TPS)基因cDNA全长克隆及验证

提取玉米自交系18-599白叶片总RNA,结合紫外吸收和电泳分离检测总RNA质量,确定纯度和完整度较好,反转录成cDNA,作为扩增玉米TPS基因全长的模板。由于TPS基因较长,试验采用分段扩增法获得目的基因全长。依据电子克隆序列设计3对正反向特异引物,按图1分别扩增P1、P2、P3片段,结果见图3。P1和P2片段的理论长度分别为932bp和1687bp,引物P1f/P1r和P2f/P2r的扩增产物经电泳检测,扩增条带与电子克隆片段长度大小相符,测序结果与电子克隆序列的相似性达99.65%,仅有9个碱基存在差异。由RACE通用引物P3f和特定引物P3r扩增得到的P3片段,长721bp,与P2片段之间含有一致的长83bp的重复区域,与预计相符合,表明电子克隆序列正确。去掉P1、P2之间重叠的202bp,P2、P3之间重叠的83bp,得到玉米TPS全长cDNA为3055bp,命名为*ZmTPS*,Genbank登录号为EU659122,序列信息及推测氨基酸序列见图4。

## 2.3 *ZmTPS* 氨基酸序列分析

将*ZmTPS*序列在NCBI进行开放阅读框(ORF)分析,发现在28~2718bp之间有一个完整的ORF,起始子为ATG,终止子是TAG,编码897个氨基酸,在3'端非翻译区有20bp的poly(A)尾巴,见图4。从*ZmTPS*翻译得到氨基酸的组成推测,该蛋白等电点PI 8.64,分子量为113093.8D。其中亮氨酸、丝氨酸、精氨酸含量较多,分别有101、82和79个。

## 2.4 玉米*ZmTPS*与其他物种TPS氨基酸序列比对

从NCBI下载包括微生物、低等植物、高等植物的TPS氨基酸序列,发现植物中TPS氨基酸序列长度均大于微生物,其中卷柏和玉米*ZmTPS*序列较长,约1000个氨基酸。而微生物如酵母、大肠杆菌、分枝杆菌和白色念珠菌长约500个氨基酸。用DNAMAN5.0软件进行序列相似性比对分析,发现微生物与植物TPS相似区域主要集中于植物TPS的中部,植物TPS相对多出了N端和C端。其中卷柏N端最长,多出约100个氨基酸。水稻、拟南芥、棉花等也有相对突出的N端,推测高等植物TPS序列中均存在类似结构。研究表明,N端多出的部分氨基酸可能抑制TPS的活性<sup>[16]</sup>,对酶活性起到负调控作用,从而使植物体内海藻糖积累较少。

进一步分析比较*ZmTPS*与其他物种TPS序列的相似性发现,结合电子克隆和5'RACE法得到的玉米*ZmTPS*序列与其他序列有较高同源性,见图5。如大肠杆菌中的Asp130、His154在各物种中均有完全一致的序列(以下氨基酸位置均以大肠杆菌为准),这2个氨基酸是与海藻糖合成底物尿苷-2-磷酸-葡萄糖和6-磷酸-葡萄糖相结合的位点。在各物种很保守的Lys267起到与葡萄糖相连的作用,在Asp361位置处均存在保守的糖原磷酸化酶或糖基转移酶模体“GPGTF”<sup>[17]</sup>。这些氨基酸是TPS酶重要的功能位点,在各物种中很保守。

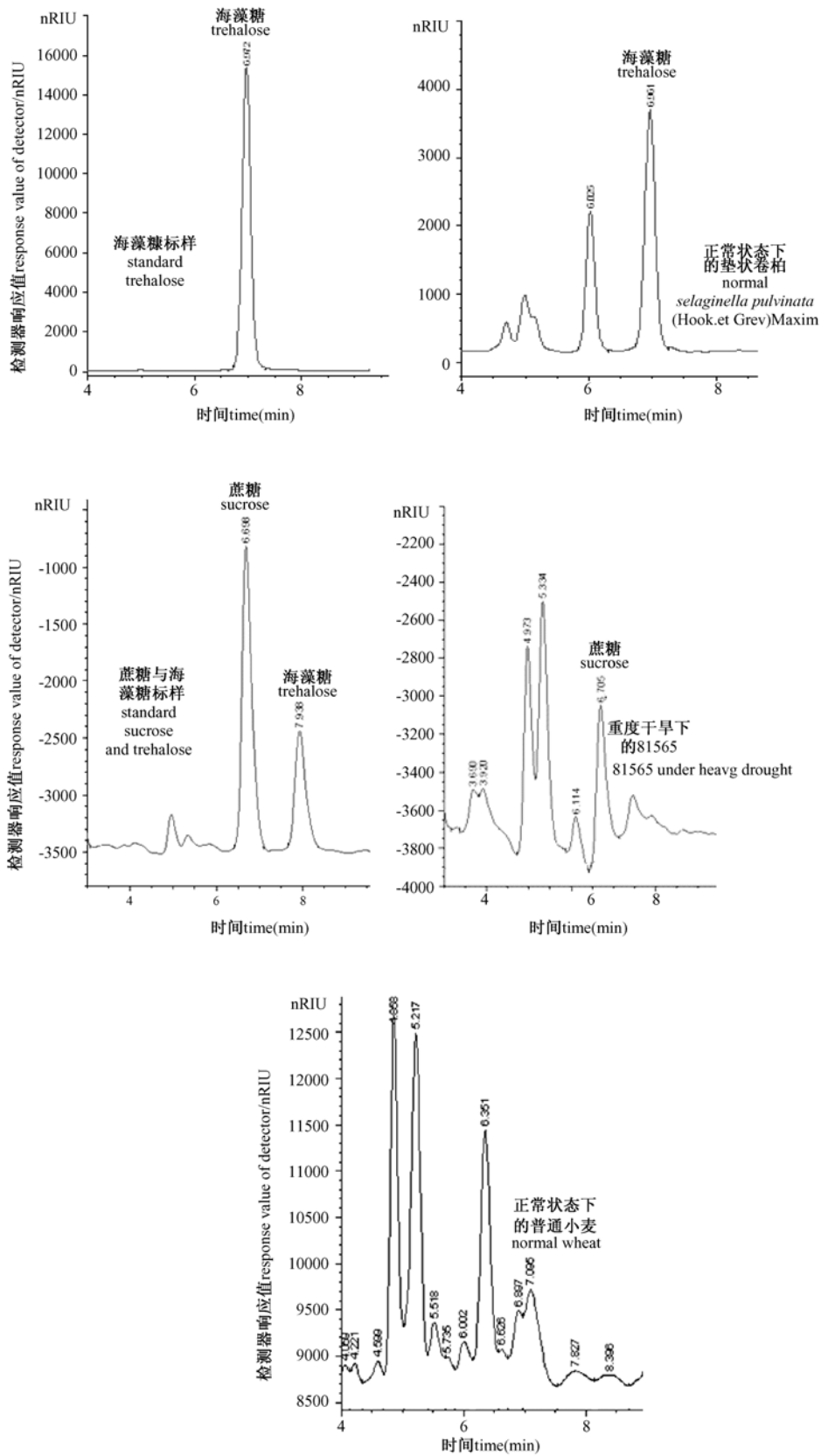


图2 各样品海藻糖液相色谱图  
Fig. 2 Liquid chromatogram of trehalose in variety samples

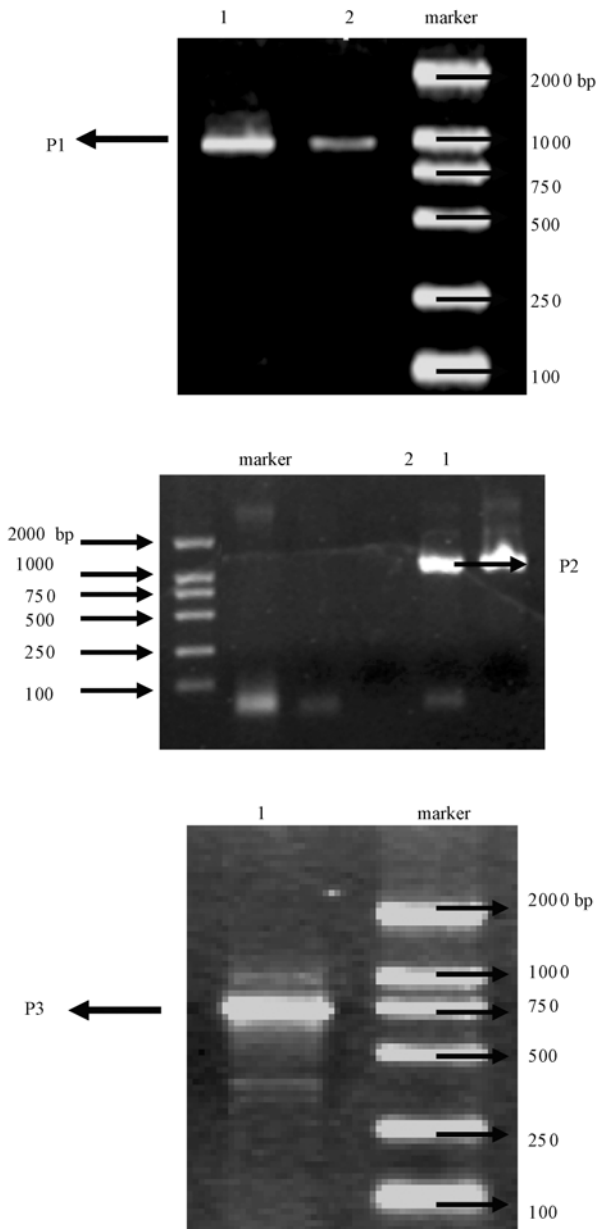


图3 玉米 TPS 基因 cDNA 分段扩增电泳图  
(1,2 泳道为 18-599 白)

Fig.3 Electrophoresis map of maize TPS  
amplification on 1% agarose gel

虽然物种间 TPS 在许多区域很保守,但 TPS 自身结构及活性存在较大差异。大肠杆菌的 Gly21-Gly22-Leu23 模体在 TPS 活性较高的微生物和卷柏中均存在,其中 Gly22 和 Arg262 起到与底物尿苷-2-磷酸-葡萄糖相结合的作用,但在 TPS 活性较低的植物中,却没有类似结构,这可能影响了底物与酶的结合。另外在大肠杆菌中 Trp39 和 Gly44 处的 2 个氨基酸只在微生物和卷柏中较保守,可能是影响 TPS 活性的位点。

综上所述表明,玉米海藻糖含量较少以至于无法

用 HPLC 检测的主要原因,可能是玉米 TPS 基因序列相比微生物缺失了部分保守位点而造成酶活性太低,加之多出的 N 端对酶活性的抑制或负调控作用,使得海藻糖不能在生物体内明显积累。

### 3 讨论

#### 3.1 玉米海藻糖含量较低的原因

海藻糖既是一种贮藏性糖类,又是应激代谢的重要产物,受环境影响较明显。当卷柏处于干旱条件下时,海藻糖的含量可达干重的 12%,恢复正常浇水时,海藻糖含量又迅速降低<sup>[18]</sup>。海藻糖的含量不仅与外界环境有关,还受自身 TPS 活性的影响。Van 等<sup>[16]</sup>研究发现将拟南芥和卷柏 TPS 酶 N 端的部分氨基酸去除后,转化酿酒酵母,发现 TPS 活性比原来完整序列增加了 10~40 倍,海藻糖的含量也增加了 20~40 倍。N 端约 100 个氨基酸可能起到抑制 TPS 活性的作用,而在海藻糖含量较高的大肠杆菌和酵母中 TPS 没有这部分氨基酸序列。玉米 *ZmTPS* 尽管有一些与底物结合的保守位点,但缺乏海藻糖积累较多的微生物和卷柏 TPS 的功能模体“Gly21-Gly22-Leu23”,再加之玉米 *ZmTPS* 序列和其他植物一样,多出的 N 端序列对酶活性产生的抑制作用,最终导致玉米海藻糖不能积累。

植物中海藻糖可被海藻糖酶降解为 2 个葡萄糖,研究认为植物中不能积累海藻糖与海藻糖酶活性过高有关。Muller 等<sup>[14]</sup>发现拟南芥体内海藻糖酶在花药中活性较高,其次是叶、茎和根部,当用有效霉素 A 抑制海藻糖酶的活性后,拟南芥体内海藻糖的含量有明显增加。同时,在花、叶和茎中蔗糖与淀粉含量减少,作者认为在植物中海藻糖和海藻糖酶可能起到调节碳水化合物分配的作用。植物中除了海藻糖还有含量更多的蔗糖、葡萄糖等糖类。研究发现蔗糖比海藻糖有较高的溶解度,因而更适合在体内运输糖份<sup>[19]</sup>。蔗糖有较高的水解自由能,通过蔗糖酶和蔗糖合酶都能分解成果糖和尿苷-2-磷酸-葡萄糖,节约了部分能量<sup>[20]</sup>,因此部分植物选择富集蔗糖而不是海藻糖。

#### 3.2 海藻糖与植物耐逆性

在干旱、高温、冷冻、高渗透压等不良环境条件下,海藻糖能起到保护、稳定蛋白质和细胞膜的作用。特别是在干旱条件下,海藻糖通过氢键与氨基酸相连,可以代替水起到防止蛋白质变性和细胞融合的作用。在高温和低 pH 环境下,海藻糖依然稳定<sup>[20]</sup>。海藻糖比蔗糖有较高玻璃态转变温度 ( $T_g$ ),能在高于  $T_g$  时提



1201 TTGACTGCTGTCCCTATTCATCATCTGGACCGATCTCTTGATTCCATGCCTTGTGTGCT  
401 L T A V P I H H L D R S L D F H A L C A  
1261 CTTTATGCAGTCACTGATGTTGCTCTTGTAACATCACTGAGAGATGGGATGAACCTTGTG  
421 L Y A V T D V A L V T S L R D G M N L V  
1321 AGCTATGAATATGTTGCATGCCAAGGGTCTAAGAAAGGAGTTCTGATACTTAGCGAGTTT  
441 S Y E Y V A C Q G S K K G V L I L S E F  
1381 GCTGGGGCAGCACAATCACTTGGAGCTGGGCCATTCTCGTCAACCCCTGGAATATTACA  
461 A G A A Q S L G A G A I L V N P W N I T  
1441 GAAGTTGCAGACTCAATACGGCATGCTTTAACGATGCCATCCGATGAGAGAGAGAAACGA  
481 E V A D S I R H A L T M P S D E R E K R  
1501 CACAGACACAACACTCGCACATGTCACAACCTCACCGGCTCAAGATTGGGCTGAAACTTTT  
501 H R H N Y A H V T T H T A Q D W A E T F  
1561 GTATTTGAGCTAAATGACACGGTTGCTGAAGCACTACTGAGGACAAGACAAGTTCCCTCT  
521 V F E L N D T V A E A L L R T R Q V P P  
1621 GGTCTTCTAGTCAAATGGCAATTCAGCAATATTTGCGCTCTAAAAATCGTCTGCTCATA  
541 G L P S Q M A I Q Q Y L R S K N R L L I  
1681 TTGGGTTTCAATTTCGACATTGACTGAGCCAGTCAATCCTCTGGGAGAAGGGGTGGTGAC  
561 L G F N S T L T E P V E S S G R R G G D  
1741 CAAATCAAGGAAATGGAACCTCAAGTTGCATCCTGACTTAAAGGGTCTCTGAGAGCCCTC  
581 Q I K E M E L K L H P D L K G P L R A L  
1801 TGTGAGGATGAGCGCACTACAGTTATTGTTCTTAGCGGCAGTGACAGGAGTGTCTTGAT  
601 C E D E R T T V I V L S G S D R S V L D  
1861 GAAAATTTGGAGAATTTAAAATGTGGTTGGCGGCAGAGCATGGGATGTTTTTACGCCCG  
621 E N F G E F K M W L A A E H G M F L R P  
1921 ACTTACGGAGAATGGATGACAACAATGCCTGAGCATCTGAACATGGATTGTGTTGACAGC  
641 T Y G E W M T T M P E H L N M D C V D S  
1981 GTAAAGCATGTTTTTGAATACTTTACAGAAAGAACCCCAAGATCCCATTTTGAACATCGT  
661 V K H V F E Y F T E R T P R S H F E H R  
2041 GAAACATCATTTGTGTGGAACATAAGTATGCTGATGTTGAGTTCCGGAAGGCTACAAGCA  
681 E T S F V W N Y K Y A D V E F G R L Q A  
2101 AGAGATATGCTGCAGCACTTGTGGACAGGTCCGATCTCAAATGCAGCTGTTGATGTTGTT  
701 R D M L Q H L W T G P I S N A A V D V V  
2161 CAAGGGAGTCGATCAGTTGAAGTTCCGGTCTGTTGGAGTTACCAAGGGTGTGCAATTGAT  
721 Q G S R S V E V R S V G V T K G A A I D  
2221 CGTATTTTAGGGGAGATAGTTCACAGCGAAAACATGATTACTCCAATTGACTATGTCCTG  
741 R I L G E I V H S E N M I T P I D Y V L  
2281 TGCATAGGGCATTTCCTTGGGAAGGATGAGGACATCTACGTCTTCTTTGATCCCAGTAC  
761 C I G H F L G K D E D I Y V F F D P E Y

```

2341 CCTTCTGAATCCAAAGTAAAGCCAGAGGGCGGCTCAGCATCACTTGACCGGAGGCCGAAC
781 P S E S K V K P E G G S A S L D R R P N
2401 GGGAGGCCACCATCGAATGGCAGGAGTAACTCCAGGAACCCACAGTCCAGGACACAGAAG
801 G R P P S N G R S N S R N P Q S R T Q K
2461 GCGCAGCAGGCTGCATCCGAGAGGTCATCCTCATCAAGTCACAGCAGCACGAGCAGCAAC
821 A Q Q A A S E R S S S S S H S S T S S N
2521 CACGACTGGCGGAAGGGTCCTCGGTCCTTGATCTCAAGGGCGAGAATACTTCTCCTGC
841 H D W R E G S S V L D L K G E N Y F S C
2581 GCCGTCGGGAGGAAGCGGTCTAACGCCCGCTACTTGCTGAGCTCGTCGGAGGAGGTTGTC
861 A V G R K R S N A R Y L L S S S E E V V
2641 TCCTTCTCAAAGAGTTGGCGACAGCGACAGCTGGCTTCCAGGCCACCTGTGCTGACTAC
881 S F L K E L A T A T A G F Q A T C A D Y
2701 ATGCATGTTCTTGGATAGGCAGTAAATAGACTGAAGTTGAAGCCTCCGTGCTTTACCAGA
901 M H V L G * A V N R L K L K P P C F T R
      ←
2761 GACAGAGAGAAGAAGAATATTCATTCTCGTATGCGCGACAGAGCTACACCCGTAGCTAG
921 D R E K K N I H S S Y A R Q S Y T R S *
2821 TCAGCGTGCTGTACAATCATGTACAAAATTTATGCTCGTGATAAACTGCGAGAGGGGAG
941 S A C C T I M Y K I Y A R D K T A R G E
2881 CTAGCAAATGGGAAAGGATAAAGGAGTTTAGTTGCTTCTGGTACGAGACACAATCGCCTG
961 L A N G K G * R S L V A S G T R H N R L
2941 ATTTTGAGTTCTCTTTAAAAAAAAACCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTCGAGGGGGGG
981 I L S S L * K K T Q K K K K K K L E G G
3001 CCCGGTAANCNTTCGCGGTTTTGCGAAATGATTTCAACGNGATNNGCCTCCGCT
1001 P G X X S R F C E M I S T X X X L R

```

图4 玉米 *ZmTPS* 基因 cDNA 及推导氨基酸序列信息Fig. 4 Sequence of *ZmTPS* cDNA and deduced amino acid in maize

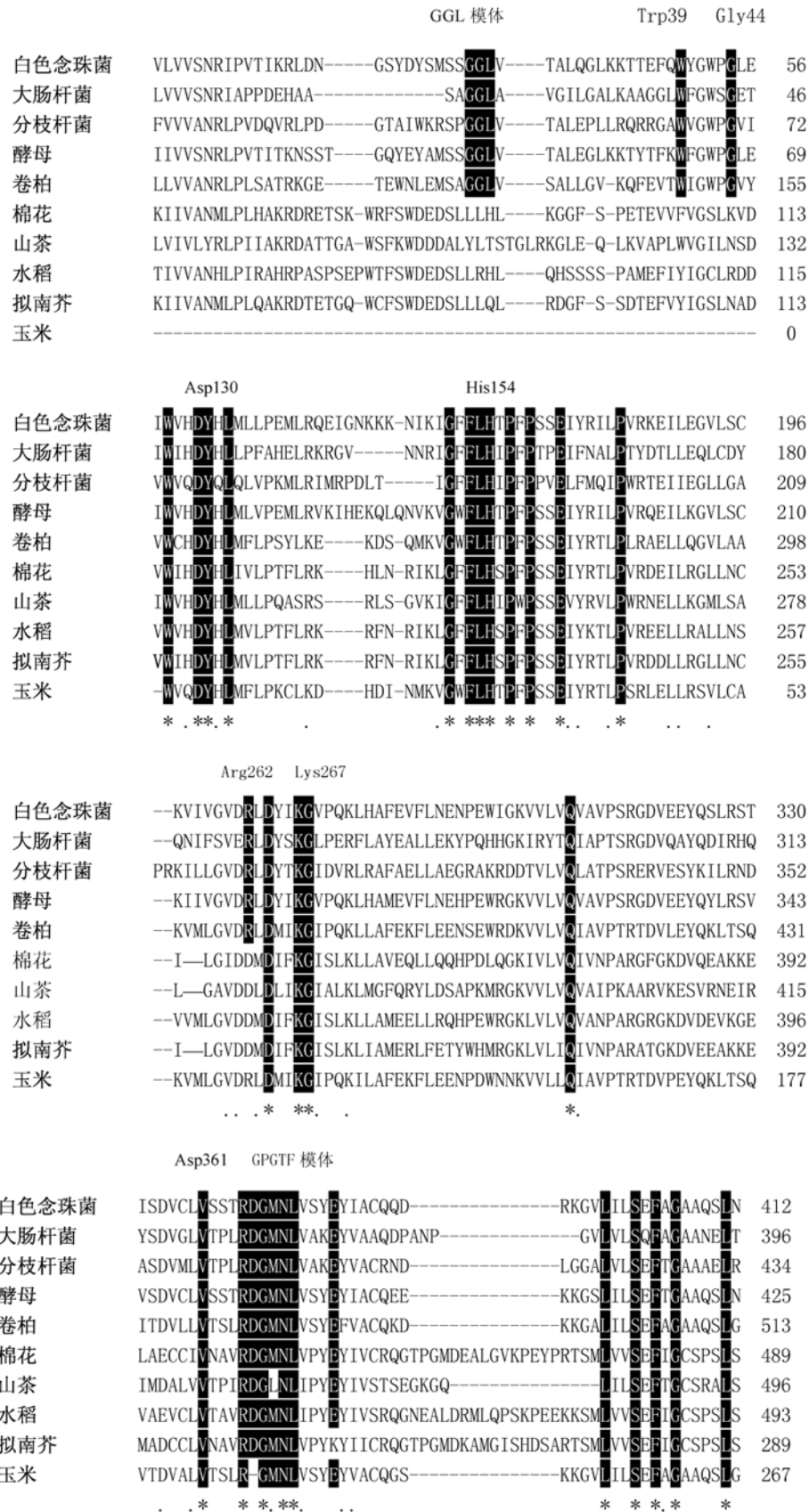
供较好的蛋白质保护作用,在相同的 Tg 下,对 6-磷酸葡萄糖脱氢酶的保护作用,海藻糖明显优于蔗糖<sup>[21]</sup>。这些保护作用是其他糖不可比拟的,海藻糖可以作为理想的应激保护物质广泛存在于动植物中。

近年来国内外许多研究者将外源海藻糖合成酶基因转入到植物中,提高了转基因植物的抗逆性,特别是抗旱的能力。美国康乃尔大学的 Ajay K Garg 等报道了他们在大肠杆菌中的 *TPS* 和 *TPP* 基因融合在一起形成 TPSP,转入印度水稻中,海藻糖含量达到非转基因水稻的 3~10 倍,当处于环境胁迫下时,转基因水稻的光合作用效率提高,产量也得到部分增加<sup>[6]</sup>。戴秀

玉等<sup>[8]</sup>将大肠杆菌海藻糖合成酶基因转入野生型烟草中,转基因烟草表现出耐盐性生长、干燥失重缓慢等抗逆表型,提高了植物的耐盐碱、耐干旱性。

Kosmas 等<sup>[22]</sup>将棉花用 PEG6000 模拟干旱处理后,用 RT-PCR 检测 *TPS* 基因在不同组织的表达,发现干旱处理后酶活表达比浇水对照有明显增加。Tarek EI-Bashiti 等<sup>[23]</sup>用 GC-MS 检测发现小麦中存在海藻糖,并用 HPLC 测定其含量,发现在干旱胁迫下,所有小麦海藻糖含量均增加,其中海藻糖含量最高可达浇水对照的 14 倍。结合上述研究,笔者认为在干旱胁迫下过量表达海藻糖可能具有提高小麦抗胁迫的能力。



图5 玉米 *ZmTPS* 与其他生物 *TPS* 推导氨基酸序列比对Fig. 5 Comparison of speculated amino acid sequence of *ZmTPS* in maize with *TPS* in other organisms

## 参考文献:

- [ 1 ] 杨平,李敏惠,潘克俭,王玉明,苏晓庆.海藻糖的生物合成与分解途径及其生物学功能[J].生命的化学,2006,26(3):233-236
- [ 2 ] Eastmond P J, van Dijken A J H, Spisman M, Kerr A, Tissier A F, Dickinson H G, Jones J D G, Smeekens S C, Graham I A. Trehalose-6-phosphate synthase 1, which catalyses the first step in trehalose synthesis, is essential for Arabidopsis embryo maturation[J]. Plant J, 2002, 29:225-235
- [ 3 ] 郭蓓,胡磊,何欣,陈雪梅,蒋湘宁.海藻糖-6-磷酸合成酶转基因烟草提高耐盐性的研究[J].植物学通报,2008,25(1):41-49
- [ 4 ] Paiva C L, Panek A D. Biotechnological applications of the disaccharide trehalose[J]. Biotechnol Annu Rev, 1996, 2:293-314
- [ 5 ] Muller J, Boller T, Wiemken A. Trehalose affects sucrose synthase and invertase activities in soybean (*Glycine max* L. Merr.) roots [J]. Journal of Plant Physiology, 1998, 153:255-257
- [ 6 ] Garg A K, Kirn J K, Owens T G, Ranwala A P, Chol Y D, Kochian L V, Wu R J. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses[J]. Proc Natl/Acad Sci USA, 2002, 99:15898-15903
- [ 7 ] Pilon-Smits E A H, Terry N, Sears T, Kim H, Zayed A, Hwang S B, van Dun K, Voogd E, Verwoerd T C, Krutwagen R W H H, Goddijn OJM. Trehalose-producing transgenic tobacco plants show improved growth performance under drought stress[J]. J Plant Physiol, 1998, 52:525-528
- [ 8 ] 戴秀玉,王忆琴,杨波,周坚.大肠杆菌海藻糖合成酶基因对提高烟草抗逆性能的研究[J].微生物学报,2001,41:427-431
- [ 9 ] 王自章,张树珍,杨本鹏,李杨瑞.甘蔗根瘤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[J].中国农业科学,2003,36:140-146
- [ 10 ] 牟禹,付凤玲,何晶,李晚忱.转酿酒酵母海藻糖合成酶基因(TPS1)玉米植株的获得[J].核农学报,2007,21(5):430-435
- [ 11 ] 张志勇,陈梅,李晚忱,付凤玲.以玉米幼胚为受体转化海藻糖合成酶基因[J].核农学报,2009,23(5):743-746
- [ 12 ] Avonce N, Leymant B, Theveleint J, Iturriaga G. Trehalose metabolism and glucose sensing in plants[J]. Biochem Soc Trans, 2005, 33:276-279
- [ 13 ] Adams R P, Kendall E, Kartha K K. Comparison of free sugars in growing and desiccated plants of *Selaginella lepidophylla* [J]. Biochem Syst Ecol, 1990, 18: 107-110
- [ 14 ] Muller J, Aeschbacher R A, Winkler A, Boller T, Wiemken A. Trehalose and trehalase in Arabidopsis[J]. J Plant Physiol, 2001, 125:1086-1093
- [ 15 ] Wang Y J, Hao Y J, Zhang Z G, Chen T, Zhang J S, Chen S Y. Isolation of trehalose-6-phosphate phosphatase gene from tobacco and its functional analysis in yeast cells[J]. J Plant Physiol, 2005, 162(2):215-223
- [ 16 ] Van Dijk P, Mascorro-Gallardo J O, De Bus M, Royackers K, Iturriaga G, Thevelein J M. Truncation of Arabidopsis thaliana and *Selaginella lepidophylla* trehalose-6-phosphate synthase unlocks high catalytic activity and supports high trehalose levels on expression in yeast[J]. Biochem J, 2002, 366: 63-71
- [ 17 ] Gibson R P, Turkenburg J P, Charnock S J, Lloyd R, Davies G J. Insights into trehalose synthesis provided by the structure of the retaining glucosyltransferase OtsA[J]. Chem Biol, 2002, 9(12): 1337-1346
- [ 18 ] Goddijn O J, Kvan Dun. Trehalose metabolism in plants [J]. Trends Plant Sci, 1999, 4(8): 315-319
- [ 19 ] Wiemken A. Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 1990, 58(3): 209-217
- [ 20 ] Winkler A. The function of trehalose biosynthesis in plants [J]. Phytochemistry, 2002, 60(5): 437-440
- [ 21 ] 聂凌鸿,宁正详.海藻糖的生物保护作用[J].生命的化学,2001,21(3):206-209
- [ 22 ] Kosmas S A, Argyrokastritis A, Loukas M G, Eliopoulos E, Tsakas S, Kaltsikes P J. Isolation and characterization of drought-related trehalose 6-phosphate-synthase gene from cultivated cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. Planta, 2006, 223(2): 329-339
- [ 23 ] Tarek EI-Bashiti, Haluk Hamamci, Oktem H A. Biochemical analysis of trehalose and its metabolizing enzymes in wheat under abiotic stress conditions[J]. Plant Science, 2005, 169: 47-54

(责任编辑 王媛媛)