

核糖体失活蛋白及其在植物抗立枯丝核菌基因工程中的应用

郝文胜^{1,2},孙亚卿¹,张少英^{1*}

(1. 内蒙古农业大学 农学院,内蒙古 呼和浩特 010018; 2. 内蒙古自治区马铃薯繁育中心,内蒙古 呼和浩特 010031)

摘要:核糖体失活蛋白(RIPs)是一类主要出现在植物中并具有 rRNA N-糖苷酶活性的蛋白质,大体上分为 I 型和 II 型 2 类。介绍了 RIPs 在抗真菌活性、毒性和免疫原性方面的研究进展,并对其在抗立枯丝核菌植物基因工程方面的应用进行了综述。

关键词:核糖体失活蛋白;植物;抗真菌活性;基因工程;立枯丝核菌

中图分类号:S432.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1004-3268(2015)06-0007-07

Ribosome Inactivating Protein and Its Application in Plant Genetic Engineering of Enhancing Resistance to *Rhizoctonia solani*

HAO Wensheng^{1,2},SUN Yaqing¹,ZHANG Shaoying^{1*}

(1. Agricultural College, Inner Mongolia Agricultural University, Huhehaote 010018, China;

2. Inner Mongolia Propagation Center of Virus-free Seed Potato, Huhehaote 010031, China)

Abstract: Ribosome inactivating proteins(RIPs), which have been shown to exhibit rRNA N-glycosidase activity, are mainly present in plants. They are broadly classified into two groups: type I and type II. In this review, their biological functions of toxicity to cells and animals, antigenicity and antifungal activity are discussed. In addition, the research advance in application of RIPs in plant transgenic engineering to enhance the hosts' resistance to *Rhizoctonia solani* is presented.

Key words: ribosome inactivating proteins; plant; antifungal activity; genetic engineering; *Rhizoctonia solani*

核糖体失活蛋白(ribosome inactivating proteins, RIPs)是具有 N-糖苷酶活性的一个蛋白质家族, N-糖苷酶活性表现为催化从 60S 核糖体亚基的 sarcin/ricin 环(sarcin/ricin loop)部位脱掉一个特定腺嘌呤,使多肽链的转运被阻碍、蛋白质合成被阻止^[1]。因此,RIPs 可使植物获得对病毒、真菌、细菌乃至昆虫的广谱抗性,为提高植物对病虫的抗性提供了一条新的途径^[2]。文中首先介绍了 RIPs 的分类、分布及近年克隆的植物源 RIPs,接着总结了 RIPs 抗真菌活性、毒性和免疫原性方面的研究进

展,最后对 RIPs 基因应用于植物基因工程来改善受体植物对立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani* Kühn)抗性的研究进展进行了阐述,以期今后分离和克隆新的 RIPs 基因以及将其改良(无毒、无免疫原性)后应用于植物抗立枯丝核菌基因工程提供指导。

1 RIPs 的分类、分布及植物源 RIPs 基因的克隆

1.1 RIPs 的分类

RIPs 分为 3 类,其中 I 型 RIPs 是分子质量约

收稿日期:2015-02-02
基金项目:内蒙古自然科学基金面上项目(2010MS0523)
作者简介:郝文胜(1971-),男,内蒙古赤峰人,副研究员,在读博士研究生,主要从事马铃薯组织培养与基因工程研究。
E-mail:294181309@qq.com
* 通讯作者:张少英(1962-),女,内蒙古呼和浩特人,教授,主要从事甜菜生理生化及分子生物学研究。
E-mail:syzh36@aliyun.com
网络出版时间:2015-04-16 17:42:52
网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/41.1092.S.20150416.1742.001.html>

30 ku 的单链蛋白;而Ⅱ型 RIPs 分子质量约在 56 ~ 65 ku,由具有酶促活性、功能上与Ⅰ型 RIPs 相当的 A - 链和一个略大的 B - 链(凝集素亚基)组成,B - 链对与半乳糖结构类似的糖类具有专一性^[3]。通常Ⅱ型 RIPs 的分子式为 A - B 或(A - B)₂, (A - B)₄ 或多聚化的形式较为少见^[4]。有关文献^[3]中,Ⅲ型 RIPs 专指一种来自大麦叶片的 60 ku 茉莉酸诱导蛋白(称为 JIP60)。JIP60 由与Ⅰ型 RIPs 类似的 N 端 RIP 结构域连接一个不相关且功能未知的 C 端结构域组成^[5]。此外,有人把一种以无活性前体的形式在胚乳中合成、通过去掉一个内部肽段而被激活^[6]的 34 ku 玉米 RIP 也归在Ⅲ型 RIPs 中^[1]。由于Ⅲ型 RIPs 也被认为是非典型Ⅰ型 RIPs^[7],因此在只有 2 类的分类体系中其被归类为Ⅰ型 RIPs。这就是传统上根据亚基数量区分为Ⅰ型和Ⅱ型 RIPs 2 类的分法。下文亦沿用这一分类方法讨论。

1.2 RIPs 的分布

RIPs 主要由不同的植物“种”产生,但也在一些细菌、真菌、藻类和哺乳动物组织中发现了 RIPs^[1]。植物中的 RIPs 几乎无所不在,它们可出现在种子、叶片、根、果实、茎、花或鳞茎中^[4]。从 RIPs 的种类来看,以Ⅰ型居多^[8],Ⅱ型 RIPs 在开花植物中几乎没有分布^[4,9]。另外,Ⅰ型和Ⅱ型 RIPs 能共存于同一种植物中,而其他能产生 RIPs 的生物(如真菌、细菌)尚未发现同一个体中含有 1 种以上的 RIPs^[1]。

1.3 植物源 RIPs 基因的克隆

Girbés 等^[4]较为全面地总结了 2004 年之前报道的来源于植物、藻类、真菌和细菌的 RIPs。Puri 等^[3]对 2012 年之前数年报道的来自植物的Ⅰ型和Ⅱ型 RIPs 进行了汇总。单丽波等^[10]、胡俊等^[11]分别总结了一些克隆的 RIPs,表 1 对 2006 年之后克隆的植物 RIPs 进行了补充。

表 1 2006 年之后克隆的一些 RIPs 及其来源

RIPs 名称	来源(器官)	基因序号	参考文献
滨藜核糖体失活蛋白(Arip)	滨藜(<i>Atriplex patens</i>)(叶)	DQ991968	[12]
BC - MAP30	碧翠苦瓜(<i>Momordica charantia</i> L.)(叶)	DQ643967	[13]
YT - MAP30	银田长白苦瓜(<i>Momordica charantia</i> L.)(叶)	DQ643968	[13]
玉米核糖体失活蛋白	玉米(<i>Zea mays</i>)(叶)		[14]
海芋核糖体失活蛋白 Alocasin	海芋(<i>Araceae macrorrhiza</i>)	EF183467	[15]
Tobacin	烟草(<i>Nicotiana tobaccum</i>)	EF183469	[15]
Cassin	望江南(<i>Cassia occidentalis</i>)	EF183468	[15]
Musin I	那坡指天蕉(<i>Musa spp.</i>)	EF183471	[15]
Musin II	邻水野蕉(<i>Musa spp.</i>)	EF183470	[15]
Aavaccin	剑麻(<i>Agavaccae agave</i>)	EF183466	[15]
<i>Bougainvillea xbuttiana</i>	<i>B. xbuttiana</i> (叶)		[16]
antiviral protein 1(BBAP1)			
q3	繁缕(<i>Stellaria media</i> L.)(叶片)	GQ870262	[17]
Pachyerosin	凉薯(<i>Pachyrhizus erosus</i>)(种子)		[18]

像其他防卫蛋白(如蛋白酶抑制剂、凝集素和抗真菌蛋白)一样,RIPs 并非在所有植物中都有较高含量^[4,19],因此有必要从未曾研究过的植物种类中分离 RIPs 并对其进行特征描述,研究结果将会提供新的关于 RIPs 系统发育、分布、结构和功能方面的信息^[20]。

2 RIPs 的抗真菌活性、毒性和免疫原性

RIPs 的生物学功能包括抗病毒、抗真菌、抗虫等^[20-21],因此其在植物的防御中起作用^[22]。利用 RIPs 基因通过基因工程手段改善受体植物对真菌的抗性时,需要考虑目的基因表达为蛋白质时是否具有毒性和致敏性^[23](过敏反应的基础和前提是免疫原性),因此下文对 RIPs 在抗真菌活性、毒性和免

疫原性方面的研究进展进行论述。

2.1 抗真菌活性

美洲商陆抗病毒蛋白(PAP)通过定点诱变产生一种缺失 C 端 25 个氨基酸的突变体 PAP - C,当 PAP - C 的基因在转基因烟草中表达时不具有毒性,在转基因植株中也未检测到对 rRNA 的脱嘌呤活性^[24],但其对真菌病原体立枯丝核菌却具有抗性。因此,活体毒性所必要的 C - 末端 25 个氨基酸不是抗真菌活性的关键^[25]。Park 等^[26]对 3 种 RIPs 的抗真菌活性研究表明:蓖麻毒蛋白 A 链(RAT)和肥皂草毒蛋白 - S6(saporin-S6)对立枯丝核菌、茄链格孢(*Alternaria solani* Sorauer)、里氏木霉(*Trichoderma reesei* Simmons)和白色念珠菌(*Candida albicans* Berkhout)4 种真菌的完整核糖体显示出较高的酶促活性,但不具有抗真菌活性,而来自紫茉莉属植物

Mirabilis expansa R&P 的 RIP(ME) 虽对立枯丝核菌核糖体的活性最低, 却对真菌生长显示出较高的抑制活性。用 N - 羟基琥珀酰亚胺对 RIPs 进行荧光素标记并进行荧光显微镜检, 确定了 ME 靶定于真菌细胞的表面并转移到细胞中, 造成核糖体脱去嘌呤并随之引起真菌死亡。与其对比, 肥皂草毒蛋白不能与真菌细胞相互作用, 故缺乏抗真菌活性^[26]。因此, 靶定于真菌细胞表面并转移至细胞中是发挥抗真菌活性的必要条件。

进行离体测试时, 大麦 RIP 的抗真菌活性比几丁质酶和 β - 1, 3 - 葡聚糖酶低, 它不能独自抑制里氏木霉和拟枝孢镰孢 (*Fusarium sporotrichioides*) 的生长。然而, 当在培养基中同时加入大麦几丁质酶

和/或大麦葡聚糖酶时, 其能够抑制真菌的生长^[27], 它们具有抗真菌协同作用。这些研究结果以及在受体植物中共表达研究的结果^[28] 提示: RIPs 可能与已知抗真菌化合物如几丁质酶、葡聚糖酶及 zeamatin (一种从玉米种子中提取到的 22 ku 抗真菌蛋白)^[29], 或其他抗性基因型所特有的、以种子内防卫作用出现的蛋白质共同起作用^[30]。

诸多关于新分离 RIPs 的报道中, 对 RIPs 的特征特性描述都包括了对 *R. solani* 的抗性鉴定 (表 2)。由表 2 可知, 对 *R. solani* 有抗性的 RIPs 来自真菌^[31] 和植物^[26, 32-34], 而以植物来源占多数, 也有一些 RIPs 对 *R. solani* 并不具有抗性^[26, 35-37]。

表 2 RIPs 对立枯丝核菌 (*R. solani*) 的离体抗性

RIPs 名称	来源	对 <i>R. solani</i> 抗性表现	参考文献
Tricholin	绿色木霉 (<i>Trichoderma virde</i>)	造成生长、氨基酸吸收和蛋白质生物合成的并行终止	[31]
Ginkbilobin	银杏 (<i>Ginkgo biloba</i>)	抗	[32]
Quinqueginsin	西洋参 (<i>Panax quinquefolium</i>)	抗	[33]
Momordin	苦瓜 (<i>Momordica charantia</i>)	在 50 μ g / mL 时抑制	[34]
Saporin	肥皂草 (<i>Saponaria officinalis</i> L.)	约 90% 菌丝生长抑制生长	[34]
ME	<i>Mirabilis expansa</i> R&P	对 <i>R. solani</i> 生长显示出相当高的抑制活性	[26]
蓖麻毒蛋白 A 链 (RAT)	蓖麻 (<i>Ricinus communis</i> L.)	不抗	[26]
Saporin - S6	肥皂草 (<i>S. officinalis</i>)	不抗	[26]
ME1、ME2	<i>Mirabilis expansa</i>	无抑制活性	[35]
Sativin	豌豆 (<i>Pisum sativum</i> var. <i>macrocarpon</i>)	不抗	[36]
<i>Lyophyllum</i> antifungal protein (LAP)	玉蕈离褶伞 (<i>Lyophyllum shimeji</i>)	不抗	[37]

2.2 毒性

直到 20 世纪 70 年代初, 毒性仍是人们关注植物 RIPs 的唯一原因。随着分离、鉴定的 RIPs 越来越多, 目前对 2 种类型 RIPs 毒性差异的基本认识是: I 型 RIPs, 如肥皂草毒蛋白、PAP 和天花粉蛋白 (TCS) 都比其 II 型对应物 (如 Abrin 和 Ricin) 的细胞毒性弱。

II 型 RIPs 比 I 型 RIPs 毒性高是由于其具有 1 条对半乳糖类似结构的糖类具有专一性的 B - 链, 它能结合到细胞上^[38-39], 随后 A 链进入细胞, 对核糖体发挥其活性。然而, 也有些 II 型 RIPs 不具有毒性^[20, 40]。I 型 RIPs 虽然细胞毒性较弱, 但一定程度上能进入哺乳动物细胞, 人们对其精确机制所知甚少^[3]。

Hudak 等^[41] 报道, 由酵母细胞表达的经位点定向诱变的 PAP 丧失了细胞毒性, 却并未影响对核糖体的脱嘌呤作用, 由此提示蛋白质合成的抑制对细

胞毒性而言并非充分条件^[40]。因此, RIPs 对细胞毒性及对动物的毒性均不能根据其对无细胞体系蛋白质合成的抑制以及对 DNA 的脱嘌呤作用进行预言^[42]。

B 链的存在并非 II 型 RIPs 具有高细胞毒性的充分条件。激酶的活化在 RIPs 毒性中扮演了重要的角色, 因为激酶的活化诱导了细胞因子的释放。这一点也被用来解释由 Ricin 和其他 RIPs 造成的炎症^[40]。

相比较而言, 虽然 I 型 RIPs 的酶促活性会比 II 型 RIPs 高数倍^[43], 但它对完整细胞是无毒的^[10, 43], 如来自大麦、小麦、黑麦、玉米种子的 I 型 RIPs, 因此转基因植株对人畜是安全的^[10]。

2.3 免疫原性

所有 RIPs 均具有较强的免疫原性^[42]。RIPs 的免疫原性为其在医疗上用作治疗剂以及应用于植物基因工程增加了限制因素。然而 Zhang 等^[44] 发现,

TCS 中一个新 IgE 表位 2 个起重要作用的氨基酸残基突变,导致在不影响 TCS 酶促活性的前提下其免疫原性变低。An 等^[45]也报道了类似的结果。他们认为,有希望将 TCS 开发为副作用减弱的治疗剂。因此,笔者认为,通过突变在降低 RIPs 免疫原性的同时保留其对核糖体的抑制活性在植物基因工程中具有重大应用价值。

3 利用 RIPs 改善植物对 *R. solani* 的抗性研究

目前,各种不同来源的 RIPs 在植物抗病基因工程中得到了广泛的应用^[10]。离体鉴定发现对 *R. solani* 具有抗性的 RIPs 为数不少,这启发了科技工作者将其应用于植物抗真菌基因工程。通过异源表达 RIPs 改善植物对立枯丝核菌抗性的研究报道较多^[25,28,46-53],且其中一些已成为植物抗真菌基因工程成功的典范^[28,46-47]。

3.1 单独应用 RIPs 改善植物对 *R. solani* 的抗性 or 耐性

最早以 RIPs 基因改善植物对 *R. solani* 抗性的报道来自 1992 年,Logemann 等^[46]获得了在马铃薯 *wun1* 基因创伤诱导启动子控制下表达大麦 RIP 基因的转基因烟草,分子生物学鉴定表明,表现抗性的 R_1 植株携带有目的基因。Maddaloni 等^[47]将同样由马铃薯 *wun1* 基因创伤诱导启动子控制的玉米核糖体失活蛋白 *b32* 基因转化烟草,改善了受体的耐性。Zoubenko 等^[25]报道,表达无毒美洲商陆抗病毒蛋白 (nontoxic PAP) 的烟草对 *R. solani* 的抗性得到改善。Wang 等^[48]报道,将来自美洲商陆的另一种毒性比 PAP 低的 PAP II 转化烟草,转基因植株对 *R. solani* 具有抗性。Huang 等^[49]报道,Curcin 2 是由数种胁迫诱导麻疯树 (*Jatropha curcas*) 叶片产生的一种 RIP,表达 *cur2p* (编码成熟前 Curcin 2 蛋白) 的转基因烟草株系 T_1 群体对 *R. solani* 的耐性提高,降低了由真菌病害造成的损害。Shah 等^[50]报道,在水稻中组成型表达来自香石竹 (*Dianthus caryophyllus* L.) 的 RIP 基因 *DIANTHIN*,纹枯病发病率降低了 29% ~ 42%。M'hamdi 等^[51]研究发现,大麦核糖体失活蛋白基因 *rip30* 增强了转基因马铃薯对 *R. solani* 的抗性。

从上述报道中可以看出如下特点:(1)早期在植物抗真菌基因工程中应用的 RIPs 主要来自农作物,如大麦^[46]、玉米^[47],之后则拓展至药用植物^[25,48]、花卉^[50]以及其他用途植物^[49]。这与越来越多的 RIPs 被分离、鉴定以及其基因的成功克隆有

关。(2)初期的探索未将 RIPs 的毒性考虑在内,但随着对 RIPs 酶促活性、毒性、抗真菌活性等机制的探究及它们之间相关性研究的开展,通过随机诱变产生的无毒 RIPs 基因 (*PAP - C*、*PAP - X*)^[25]或低毒基因^[48]被应用于植物抗真菌基因工程中。也就是说,用于这类研究的 RIPs 越来越趋向于有利于在实践中应用。(3)在植物表达载体的启动子选择方面,对于以组成型表达还是诱导型表达 RIPs 也进行了相关探索。Shah 等^[50]以农杆菌介导的叶圆片转化法对烟草进行转化,组成型表达 *DIANTHIN* 基因被证明对烟草具有严重的毒性,因为所有再生的潮霉素抗性转基因植株均带有缺失了 *DIANTHIN* 基因的 T-DNA;而由绿豆黄花叶病毒 (MYMV) 诱导启动子控制的 *DIANTHIN* 基因的转化未对烟草造成任何毒性,转基因烟草植株中检测到了完整的 *DIANTHIN* 基因。(4)早期的尝试无一例外均是以模式植物烟草为转基因受体进行的^[25,46-49]。在以模式植物为试材研究较为成熟的基础上,近年开始以具有重要经济价值的作物^[50-51]为转基因受体进行探索,即研究方向总体上也转向应用。

3.2 联合表达 RIPs 和其他抗真菌化合物改善植物对 *R. solani* 的抗性

一方面,目前通过转化 RIPs 以外其他抗真菌化合物单基因来改善植物对 *R. solani* 抗性的研究不乏成功的例子^[54-55];另一方面,离体条件下 RIPs 与其他抗真菌化合物(如几丁质酶、葡聚糖酶等)具有抗真菌的协同作用。因此,诸多针对联合表达 RIPs 和其他抗真菌化合物的基因来改善植物对 *R. solani* 抗性的研究逐渐开展。

Jach 等^[28]报道,同时表达大麦 RIP 基因和一种编码大麦 II 类几丁质酶基因的转基因烟草植株,与单独表达其中一种基因至相同水平的转基因株系相比,表现出对 *R. solani* 的抗性提高,认为其原因是几丁质酶的水解活性使得真菌细胞吸收 RIP 增多并因此增强了对真菌生长的抑制。Kim 等^[56]以玉米核糖体失活蛋白 *b - 32* 基因 (*Zmcrip3a*) 转化水稻,发现该基因并未赋予受体高水平抗性。其后,该团队在转基因水稻中共表达改造的玉米 RIP 基因和水稻碱性几丁质酶基因,发现水稻对 *R. solani* 引起的纹枯病抗性增强^[52]。M'hamdi 等^[53]在马铃薯中联合表达来自黏质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*) 的几丁质酶基因 (*chiA*) 和来自大麦的核糖体失活蛋白基因 (*rip30*),增强了马铃薯对 *R. solani* 的抗性。

综上所述,利用 RIPs 的广谱抗性,通过基因工程提高植物对 *R. solani* 的抗性已在多种具有重要经

济价值的作物(水稻、马铃薯)上取得重要研究成果。

4 展望

RIPs 基因相比其他植物源抗逆基因的优点是具备兼抗的特性,如同时改善对真菌和病毒的抗性^[49-50]以及同时改善对多种病毒的抗性^[57-59]。这点对常规杂交育种而言难度较大,而通过 RIPs 基因工程则快捷得多。

总的来说,鉴于 RIPs 在植物界广泛分布,将其应用于水稻和马铃薯上来改善二者对 *R. solani* 的抗性初步获得成功,关于转基因植物和转基因食品的毒性问题以及免疫原性问题也逐渐解决,为 RIPs 在粮食作物抗 *R. solani* 品种培育上的应用奠定了坚实的基础。今后,具备抗病性且无毒、去免疫原性的新 RIPs 资源的发掘和利用将是该领域努力的方向。

参考文献:

- [1] Reyes A G, Anné J, Mejía A. Ribosome-inactivating proteins with an emphasis on bacterial RIPs and their potential medical applications [J]. *Future Microbiol*, 2012, 7 (6): 705-717.
- [2] 李建国. 核糖体失活蛋白的研究进展[J]. *分子植物育种*, 2005, 3(4): 566-570.
- [3] Puri M, Kaur I, Perugini M A, *et al.* Ribosome-inactivating proteins; Current status and biomedical applications [J]. *Drug Discovery Today*, 2012, 17(13/14): 774-783.
- [4] Girbés T, Ferreras J M, Arias F J, *et al.* Description, distribution, activity and phylogenetic relationship of ribosome-inactivating proteins in plants, fungi and bacteria [J]. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2004, 4: 467-482.
- [5] Reinbothe S, Reinbothe C, Lehmann J, *et al.* JIP60, a methyl jasmonate-induced ribosome-inactivating protein involved in plant stress reactions [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 7012-7016.
- [6] Walsh T A, Morgan A E, Hey T D. Characterization and molecular cloning of a proenzyme form of a ribosome-inactivating protein from maize [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266(34): 23422-23427.
- [7] Motto M, Lupotto E. The genetics and properties of cereal ribosome-inactivating proteins [J]. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2004, 4(5): 493-503.
- [8] Barbieri L, Battelli M G, Stirpe F. Ribosome-inactivating proteins from plants [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1993, 1154: 237-282.
- [9] Peumans W J, Damme E J M V. Evolution of plant ribosome-inactivating proteins [M]. *Berlin Heidelberg, Germany: Springer-Verlag*, 2010: 1-26.
- [10] 单丽波, 贾旭. 核糖体失活蛋白及其在植物抗真菌菌基因工程中的应用 [J]. *生物工程进展*, 2000, 20(6): 74-78.
- [11] 胡俊, 孙素荣, 张智, 等. 核糖体失活蛋白的应用研究进展 [J]. *新疆大学学报: 自然科学版*, 2007, 24(2): 204-210.
- [12] 胡俊. 新疆滨藜 (*Atriplex patens*) 核糖体失活蛋白的基因克隆和表达 [D]. 乌鲁木齐: 新疆大学, 2007.
- [13] 杨洲平. 苦瓜抗 HIV 毒蛋白 MAP30 基因的克隆及原核表达 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2007.
- [14] 孙亚卿, 邵金旺, 张少英, 等. 核糖体失活蛋白 (RIP) 基因克隆及其表达载体的构建 [J]. *安徽农业科学*, 2007, 35(16): 4770-4772.
- [15] 阮小蕾, 刘丽芳, 陈秀, 等. 6 个植物核糖体失活蛋白新基因片段的克隆及特征分析 [J]. *华中农业大学学报*, 2008, 27(1): 7-11.
- [16] Choudhary N, Kapoor H C, Lodha M L. Cloning and expression of antiviral/ribosome-inactivating protein from *Bougainvillea xbtutiana* [J]. *J Biosci*, 2008, 33: 91-101.
- [17] 郑玉红, 赵海光, 单宇, 等. 繁缕核糖体失活蛋白基因克隆及序列分析 [J]. *西北植物学报*, 2010, 30(1): 14-20.
- [18] Guo J L, Cheng Y L, Qiu Y, *et al.* Purification and characterization of a novel type I ribosome inactivating protein, Pachyerosin, from *Pachyrhizus erosus* seeds, and preparation of its immunotoxin against human hepatoma cells [J]. *Planta Med*, 2014, 80: 896-901.
- [19] Shu S H, Xie G Z, Guo X L, *et al.* Purification and characterization of a novel ribosome-inactivating protein from seeds of *Trichosanthes kirilowii* Maxim [J]. *Protein Expression and Purification* 2009, 67: 120-125.
- [20] Ng T B, Wong J H, Wang H. Recent progress in research on ribosome inactivating proteins [J]. *Current Protein and Peptide Science*, 2010, 11: 37-53.
- [21] Sawasaki T, Nishihara M, Endo Y. RIP and RALyase cleave the sarcin/ricin domain, a critical domain for ribosome function, during senescence of wheat coleoptiles [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 370: 561-565.
- [22] Stirpe F. Ribosome-inactivating proteins [J]. *Toxicon*, 2004, 44: 371-383.
- [23] 基因农业网. 中国转基因食品的管理模式及政策法规 [EB/OL]. (2013-06-26) [2015-03-04]. <http://www.agrogene.cn/info-106.shtml>.
- [24] Tumer N E, Hwang D J, Bonness M. C-terminal deletion mutant of pokeweed antiviral protein inhibits viral infection but does not depurinate host ribosomes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 3866-3871.
- [25] Zoubenko O, Uckun F, Hur Y, *et al.* Plant resistance to fungal infection induced by nontoxic pokeweed antiviral protein mutants [J]. *Nature Biotechnology*, 1997, 15(10): 1111-1116.

- 992-996.
- [26] Park S W, Stevens N M, Vivanco J M. Enzymatic specificity of three ribosome-inactivating proteins against fungal ribosomes, and correlation with antifungal activity [J]. *Planta*, 2002, 216: 227-234.
- [27] Leah R, Tommerup H, Svendsen L, *et al.* Biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins with antifungal properties [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266(3): 1564-1573.
- [28] Jach G, Görnhardt B, Mundy J, *et al.* Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco [J]. *The Plant Journal*, 1995, 8(1): 97-109.
- [29] Darnetty, Leslie J F, Muthukrishnan S, *et al.* Variability in antifungal proteins in the grains of maize, sorghum and wheat [J]. *Physiologia Plantarum*, 1993, 88: 339-349.
- [30] Guo B Z, Brown R L, Lax A R, *et al.* Protein profiles and antifungal activities of kernel extracts from corn genotypes resistant and susceptible to *Aspergillus flavus* [J]. *Journal of Food Protection*, 1998, 61(1): 98-102.
- [31] Lin A, Lee T M, Rern J C. Tricholin, a new antifungal agent from *Trichoderma viride*, and its action in biological control of *Rhizoctonia solani* [J]. *The Journal of Antibiotics*, 1994, 47(7): 799-805.
- [32] Wang H, Ng T B. Ginkbilobin, a novel antifungal protein from *Ginkgo biloba* seeds with sequence similarity to embryo-abundant protein [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 279: 407-411.
- [33] Wang H X, Ng T B. Quinqueginsin, a novel protein with anti-Human immunodeficiency virus, antifungal, ribonuclease and cell-free translation-inhibitory activities from American ginseng roots [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 269: 203-208.
- [34] Liu F, Ng T B, Niu S M, *et al.* Antifungal activity of the ribosome-inactivating proteins momordin, saporin and luffin [C]//中国菌物学会. 中国菌物学会第三届会员代表大会暨全国第六届菌物学学术讨论会论文集. 北京: 中国菌物学会, 2003: 251-255.
- [35] Vivanco J M, Savary B J, Flores H E. Characterization of two novel type I ribosome-inactivating proteins from the storage roots of the Andean Crop *Mirabilis expansa* [J]. *Plant Physiology*, 1999, 119: 1447-1456.
- [36] Ye X Y, Wang H X, Ng T B. Sativin, a novel antifungal miraculin-like protein isolated from legumes of the sugar snap *Pisum sativum* var. *macrocarpon* [J]. *Life Sciences*, 2000, 67: 775-781.
- [37] Lam S K, Ng T B. First simultaneous isolation of a ribosome inactivating protein and an antifungal protein from a mushroom (*Lyophyllum shimeji*) together with evidence for synergism of their antifungal effects [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2001, 393(2): 271-280.
- [38] Olsnes S, Pihl A. Different biological properties of the two constituent peptide chains of ricin, a toxic protein inhibiting protein synthesis [J]. *Biochemistry*, 1973, 12(16): 3121-3126.
- [39] Olsnes S, Pihl A. Isolation and properties of abrin: A toxic protein inhibiting protein synthesis. Evidence for different biological functions of its constituents-peptide chains [J]. *Eur J Biochem*, 1973, 35: 179-185.
- [40] Stirpe F, Battelli M G. Ribosome-inactivating proteins: Progress and problems [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 2006, 63(16): 1850-1866.
- [41] Hudak K A, Parikh B A, Di R, *et al.* Generation of pokeweed antiviral protein mutations in *Saccharomyces cerevisiae*: Evidence that ribosome depurination is not sufficient for cytotoxicity [J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(14): 4244-4256.
- [42] Battelli M G. Cytotoxicity and toxicity to animals and humans of ribosome-inactivating proteins [J]. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2004, 4(5): 513-521.
- [43] Bieri S, Potrykus I, Fütterer J. Expression of active barley seed ribosome-inactivating protein in transgenic wheat [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2000, 100(5): 755-763.
- [44] Zhang X Y, Wu Y, Yan J Y, *et al.* Y55 and D78 are crucial amino acid residues of a new IgE epitope on trichosanthin [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 343: 1251-1256.
- [45] An Q, Lei Y, Jia N, *et al.* Effect of site-directed PEGylation of trichosanthin on its biological activity, immunogenicity, and pharmacokinetics [J]. *Biomolecular Engineering*, 2007, 24(6): 643-649.
- [46] Logemann J, Jach G, Tommerup H, *et al.* Expression of a barley ribosome-inactivating protein leads to increased fungal protection in transgenic tobacco plants [J]. *Nature Biotechnology*, 1992, 10: 305-308.
- [47] Maddaloni M, Forlani F, Balmas V, *et al.* Tolerance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani* AG4 of transgenic tobacco expressing the maize ribosome-inactivating protein b-32 [J]. *Transgenic Research*, 1997, 6(6): 393-402.
- [48] Wang P, Zoubenko O, Tumer N E. Reduced toxicity and broad spectrum resistance to viral and fungal infection in transgenic plants expressing pokeweed antiviral protein II [J]. *Plant Molecular Biology*, 1998, 38(6): 957-964.
- [49] Huang M X, Hou P, Wei Q, *et al.* A ribosome-inactivating protein (curcin 2) induced from *Jatropha curcas* can reduce viral and fungal infection in transgenic tobacco [J]. *Plant Growth Regulation*, 2008, 54(2): 115-123.
- [50] Shah J M, Veluthambi K. DIANTHIN, a negative selection marker in tobacco, is non-toxic in transgenic rice and

Gnomics,2004,271:566-576.

[10] Munnebosch S, Alegrel L. Drought-induced changes in the redox state of-tocopherol, ascorbate and the diterpene carnosic acid in chloroplasts of labiatae species differing in carnisic acid contents[J]. Plant Physiology,2003,131(4):1816-1825.

[11] 严衍禄,刘心生. 叶绿素测定方法的研究[J]. 北京农业大学学报,1982,8(2):53-67

[12] Hu X L, Wu X L, Li C H, et al. Absciscic acid refines the synthesis of chloroplast proteins in maize (*Zea mays*) in response to drought and light [J]. Plos One, 2012, 7(11):e49500.

[13] Bhushan D, Pandey A, Chattopadhyay A, et al. Extracellular matrix proteome of chickpea (*Cicer arietinum* L.) illustrates pathway abundance, novel protein functions and evolutionary perspective [J]. Proteome Res, 2006, 5(7):1711-1720.

[14] 邹琦. 植物生理学实验指导[M]. 北京:中国农业出版社,2000.

[15] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemisry,1976,72:248-254.

[16] 张年辉. 优化的蔗糖密度梯度离心法分离完整叶绿体[J]. 实验技术与管理,2010,27(7):44-46.

[17] 贾岩龙,柴玉荣,曲东京,等. 杜氏盐藻完整叶绿体的分离及其蛋白提取[J]. 生物技术通报,2008(3):135-138.

[18] 朱宏,张中恒,王同昌,等. 小麦叶片蛋白质双向电泳的改良[J]. 东北林业大学学报,2004,32(4):68-69.

[19] Saravanan R S, Rose J K C. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues[J]. Proteomics,2004,4:2522-2532.

[20] Wang W, Vignani R, Scali M, et al. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues proteomic analysis [J]. Electrophoresis, 2006, 27:2782-2786.

[21] Herman E M, Helm R M, Jung R, et al. Genetic modification removes an immunodominant allergen from soybean[J]. Plant Physiology,2003,132:36-43.

[22] 刘伟霞,潘映红. 适用于小麦叶片蛋白质组分析的样品制备方法[J]. 中国农业科学,2007,40(10):2169-2176.

(上接第 12 页)

confers sheath blight resistance[J]. Biologia Plantarum, 2010,54(3):443-450.

[51] M'hamdi M, Chikh-Rouhou H, Boughalleb N, et al. Ribosome Inactivating Protein of barley enhanced resistance to *Rhizoctonia solani* in transgenic potato cultivar 'Desirée' in greenhouse conditions [J]. Biotechnol Agron Soc Environ,2013,17(1):20-26.

[52] Kim J K, Jang I C, Wu R, et al. Co-expression of a modified maize ribosome-inactivating protein and a rice basic chitinase gene in transgenic rice plants confers enhanced resistance to sheath blight [J]. Transgenic Research, 2003,12:475-484.

[53] M'hamdi M, Chikh-Rouhou H, Boughalleb N, et al. Enhanced resistance to *Rhizoctonia solani* by combined expression of chitinase and ribosome inactivating protein in transgenic potatoes (*Solanum tuberosum* L.) [J]. Spanish Journal of Agricultural Research,2012,10(3):778-785.

[54] Datta K, Tu J, Oliva N, et al. Enhanced resistance to sheath blight by constitutive expression of infection-related rice chitinase in transgenic elite indica rice cultivars [J]. Plant Science,2001,160(3):405-414.

[55] Kumar K K, Poovannan K, Nandakumar R, et al. A high throughput functional expression assay system for a defense gene conferring transgenic resistance on rice against the sheath blight pathogen, *Rhizoctonia solani* [J]. Plant Science,2003,165:969-976.

[56] Kim J K, Duan X, Wu R, et al. Molecular and genetic analysis of transgenic rice plants expressing the maize ribosome-inactivating protein b-32 gene and the herbicide resistance bar gene[J]. Molecular Breeding,1999,5:85-94.

[57] Moon Y H, Song S K, Choi K W, et al. Expression of a cDNA encoding *Phytolacca insularis* antiviral protein confers virus resistance on transgenic potato plants[J]. Mol Cells,1997,7(6):807-815.

[58] Krishnan R, McDonald K A, Dandekar A M, et al. Expression of recombinant trichosanthin, a ribosome-inactivating protein, in transgenic tobacco[J]. Journal of biotechnology,2002,97(1):69-88.

[59] Vandenbussche F, Peumans W J, Desmyter S, et al. The type-1 and type-2 ribosome-inactivating proteins from *Iris* confer transgenic tobacco plants local but not systemic protection against viruses [J]. Planta, 2004, 220:211-221.