

综述 Reviews

植物冷激蛋白的研究进展

肖文斐¹, 阮松林¹, 倪深², 马华升^{1*}¹杭州市农业科学研究院生物技术研究所, 杭州310024; ²中国水稻研究所水稻生物学国家重点实验室, 杭州310006

摘要: 冷激蛋白是存在于细菌、植物与动物中的一类高度保守的核酸结合蛋白, 其通过RNA分子伴侣活性参与转录、翻译及生长发育和逆境胁迫应答等细胞生理活动。本文主要从植物冷激蛋白的结构、表达模式、生物学功能以及应用前景等几个方面介绍了植物冷激蛋白的研究进展。

关键词: 冷激蛋白; 冷适应; 冷激结构域; 抗逆应答

Advances in Research of Cold Shock Proteins in Plants

XIAO Wen-Fei¹, RUAN Song-Lin¹, NI Shen², MA Hua-Sheng^{1*}¹*Institute of Biotechnology, Hangzhou Academy of Agricultural Science, Hangzhou 310024, China;* ²*China State Key Laboratory of Rice Biology, China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China*

Abstract: Cold shock proteins (CSPs) are nucleic acid-binding proteins containing a cold shock domain (CSD), which are highly conserved in bacteria, plants and animals. They play a critical role for transcription, translation, development and stress responses by the RNA chaperones function. In this review, the progress of plant cold shock proteins were described from the structure, regulation of gene expression, function and the prospects of application research.

Key words: cold shock protein; cold acclimation; cold shock domain; stress response

生物在长期的进化过程中, 形成了多种多样的耐逆性机制。在低温、干旱、高盐等逆境胁迫下, 植物体内会发生一系列的细胞和生理生化变化, 如诱导表达多种基因并产生各种应激蛋白, 以帮助细胞在新的环境下完成其生理功能, 从而使植物对这些胁迫作出积极的反应(Roy等2011)。很多植物在经受非冰冻低温胁迫后, 其抗寒性会得到提高, 这一现象称为冷驯化或低温驯化(Chinnusamy等2010)。冷驯化过程中, 生物体一些基因在冷诱导下启动转录和翻译, 产生与抗寒性有关的蛋白质产物; 这种在低温诱导下表达的蛋白质被称为冷诱导蛋白(Chinnusamy等2010; Zhu等2007)。冷诱导蛋白与生物抗寒性紧密相关, 其种类多样, 主要有抗冻蛋白、脱水蛋白、冷激蛋白(cold shock domain proteins, CSPs)和热激蛋白等等, 其中冷激蛋白是广泛存在于生物体中的一种应激蛋白(Roy等2011; Chinnusamy等2007)。冷激蛋白在细菌、植物与动物中均有发现, 是一类高度保守的核酸结合蛋白, 其通过RNA分子伴侣活性参与转录、翻译、生长发育及逆境胁迫应答等细胞生

理活动(Chaikam和Karlson 2010)。本文中重点介绍植物冷激蛋白的一些研究进展。

1 植物冷激蛋白的结构

1.1 冷激蛋白的结构

细菌中的冷激蛋白分子量比较小, 由66~73个氨基酸组成。大肠杆菌(*Escherichia coli*)中的CspA蛋白是最早被发现和研究的冷激蛋白(Jones等1987)。CspA蛋白是一个单结构域蛋白质, 其包含的结构域由70个氨基酸残基组成, 被称为冷激结构域(cold shock domain, CSD)。后来人们在酵母、动物及植物中都发现了CSD的存在。CSD是最古老的核酸结合位点, 能结合RNA、单链DNA及双链DNA, 从细菌到高等动物、植物都高度保守(Saunders等2003)。冷激蛋白大部分功能是通过CSD与核酸结合实现的(Manival等2001)。原核生

收稿 2011-11-17 修定 2012-04-18
资助 国家转基因重大专项(2009ZX08001-027B)和浙江省自然科学基金(Y307016)。

* 通讯作者(E-mail: hzhmsma@163.com; Tel: 0571-87313241)。

物的冷激蛋白通常只包含CSD单一结构域;在动物中,除了CSD外,冷激蛋白还包含其它不同的结构域,通常被称为Y-box结合蛋白(Y-box binding protein);与动物相似,植物冷激蛋白除了N端的CSD外,在C端还包含其它结构域,被称为冷激结构域蛋白(cold shock domain protein, CSDP)。

Karlson和Imai (2003)利用表达序列标签技术通过tBLASTn比较分析,在19个不同种属植物(包括低等植物、单子叶、双子叶及木本植物)中发现了冷激蛋白的存在,这些冷激蛋白都具有高度保守CSD。根据C端是否具有辅助结构域,植物中的冷激蛋白可分为两类(图1)。第一类植物冷激蛋白除了N端的保守CSD外,C端还存在甘氨酸富集区(glycine-rich region, GR)和数目不等的CCHC型锌指结构(zinc finger, ZF),目前发现的高等植物冷激蛋白大多属于此种类型。小麦冷激蛋白WCSP1是最早被研究的植物冷激蛋白,它的C端包含3个GR和ZF结构(Nakaminami等2006)。拟南芥中共有AtCSDP1 (At4g36020)、AtCSDP2 (At4g38680)、AtCSDP3 (At2g17870)和AtCSDP4 (At2g21060)等4

个冷激蛋白;其中AtCSDP2和AtCSDP4的C端各含有2个GR及ZF;而AtCSDP1和AtCSDP3的GR区域则被7个ZF分隔开来(Karlson和Imai 2003)。盐生模式植物盐芥中也包含TsCSDP1~TsCSDP4等4个冷激蛋白,它们与拟南芥的冷激蛋白同源性高达95%,N端为保守的CSD结构,C端GR区分别包含6、2、7、2个ZF结构(Taranov等2010)。水稻基因组中包含2个冷激蛋白基因,分别命名为*OsCSP1* (Os02g0121100)和*OsCSP2* (Os08g0129200),它们编码的冷激蛋白N端具有CSD结构,C端包含GR及4个或2个ZF结构(Chaikam和Karlson 2008)。烟草冷激蛋白NsGRP2的GR和ZF数目都是2个。第二类植物冷激蛋白只包含单一结构域CSD,其大小及序列与原核生物冷激蛋白非常相似;目前只在小麦和大麦中发现,进化分析表明这类蛋白与大肠杆菌冷激蛋白CspA亲缘关系较近(Karlson和Imai 2003)。

植物冷激蛋白的CSD区域与原核生物CSPs高度同源,是非常保守的核酸结合序列。它们保留了原核与真核生物分化前的古老结构,疏水核

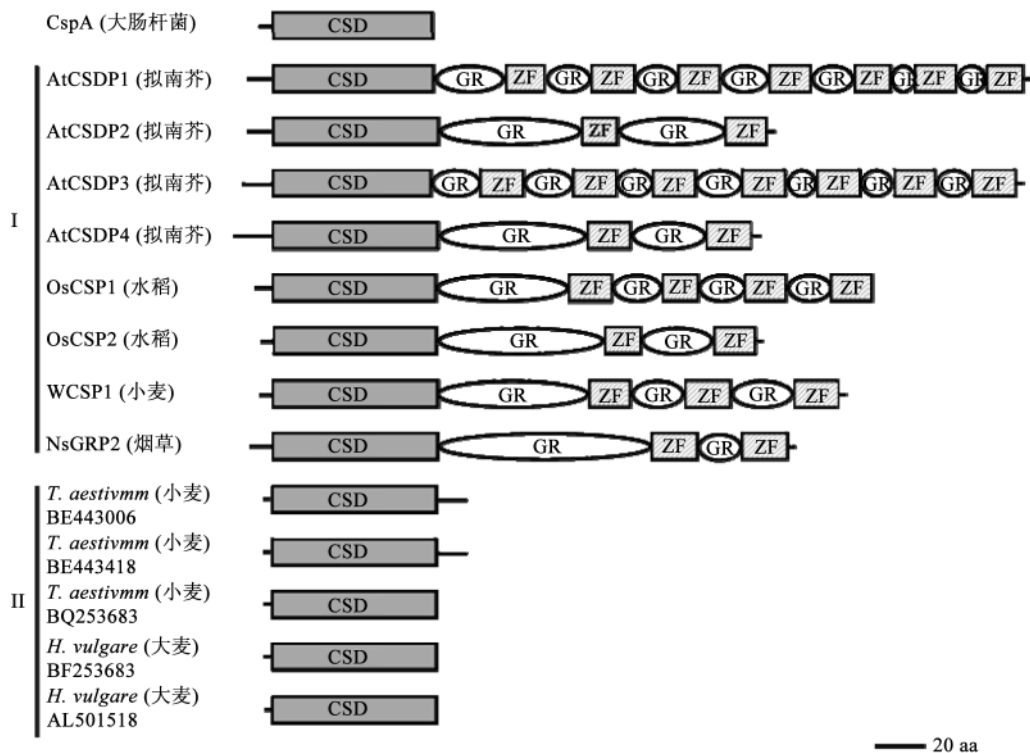


图1 植物冷激蛋白结构示意图

Fig.1 Structural schematic diagram of cold shock proteins in plants

心残基的高度保守性与结合核酸的功能相适应。大肠杆菌CspA中 β 折叠结构有6个保守的芳香族氨基酸残基, 其中5个在植物CSD中也高度保守。而CspA中 $\beta 3$ 区域的保守残基缬氨酸(Val)在第一类植物冷激蛋白中被亮氨酸(Leu)取代, 而在第二类植物冷激蛋白中仍为缬氨酸。但由于亮氨酸也同为疏水氨基酸, 因此不会改变植物冷激蛋白CSD的三级结构。大肠杆菌冷激蛋白的茎环结构是分化程度最高的区域, 而真核生物冷激蛋白在此区域一般包含4个额外的碱性残基, 但植物冷激蛋白在 $\beta 3$ 和 $\beta 4$ 间却较为保守, 也不包含额外的氨基酸, 这与含2个CCHC锌指结构的真核生物冷激蛋白LIN-28相似。序列比较发现第一类植物冷激蛋白在N末端及 $\beta 1$ - $\beta 2$ 、 $\beta 2$ - $\beta 3$ 、 $\beta 4$ - $\beta 5$ 的转角(turn)部位差异较大(Karlson和Imai 2003; 史海水等2003)。

第一类植物冷激蛋白C端GR区域与一些植物的富甘氨酸RNA结合蛋白高度同源。此类富含甘氨酸的RNA结合蛋白是一类小分子蛋白, N末端包含一个或多个RNA识别模体(RNA recognition motif, RRM), C末端为GR区域(Maruyama等1999)。富含甘氨酸的RNA结合蛋白是植物重要的转录后调控蛋白, 在植物的生长发育及对低温、干旱、盐渍化等逆境胁迫的响应与适应中发挥着重要作用(Kim等2005; Carpenter等1994; Vermel等2002)。

1.2 植物冷激蛋白家族的分子进化

与细菌相似, 植物中冷激蛋白也往往以小基因家族的形式存在。Karlson等(2009)通过分析来源于56个种属的74种不同植物的121条冷激蛋白EST序列发现, 单细胞光合生物、蕨类、苔藓、裸子植物、单子叶植物和双子叶植物中都含有冷激蛋白。冷激蛋白在植物主要进化分支中均有发现, 来源于近源物种的冷激蛋白在进化树上更为接近, 而高等植物的比低等植物往往含有更多数量的模体(Karlson等2009; Thompson 2008)。原核生物的冷激蛋白通常只包含1个单一的CSD, 而定藻门的冷激蛋白却含有2个串联的CSD (Musgnug等2005)。在植物冷激蛋白中, CSD通常位于N端, 在其C端往往还会包含一些其他的结构域, 例如GR、ZF、类RGG重复(RGG-like repeat)和RRM等等, 一个绿藻冷激蛋白的C端就包含1个RRM结构域(Musgnug等2005)。ZF一般出现在高等陆生植

物中, 数目从1个到7个不等。在衣藻等低等植物的冷激蛋白中并未发现ZF的存在, 它们C端的GR结构分布与高等植物不尽相同。令人惊奇的是, 在绿藻(*Mesostigma viride*)的冷激蛋白C端含有单一的ZF结构; 而该属被认为是与陆生植物进化最为接近的一个分支(Lemieux等2007)。

张玮玮(2007)利用生物信息学的理论和方法, 分析了冷激蛋白超家族的分子进化。采用同源序列比对不同物种的冷激蛋白序列后, 发现该类蛋白UTR区域的序列保守性相对较差, 碱基间也发生了较大的突变。由此推测物种形成冷激蛋白的初期是由基因复制产生直系同源蛋白, 随着物种的进化由于选择性剪接进而产生旁系同源蛋白, 从而形成一个多功能蛋白家族。

2 植物冷激蛋白的功能

2.1 冷激蛋白的作用模式

冷激蛋白作为分子伴侣, 主要通过影响逆境相关基因mRNA的稳定性, 在蛋白质转录及翻译中行使功能。如图2所示, 低温下细胞内RNA容易形成二级结构, 抑制转录及翻译效率。转录时RNA聚合酶(RNA polymerase, RNAP)遇到RNA上的发卡环二级结构会导致转录提前终止; 蛋白质翻译过程中, 发卡环会导致核糖体从RNA上滑落, 使翻译受到抑制。低温胁迫后细胞会迅速累积冷激蛋

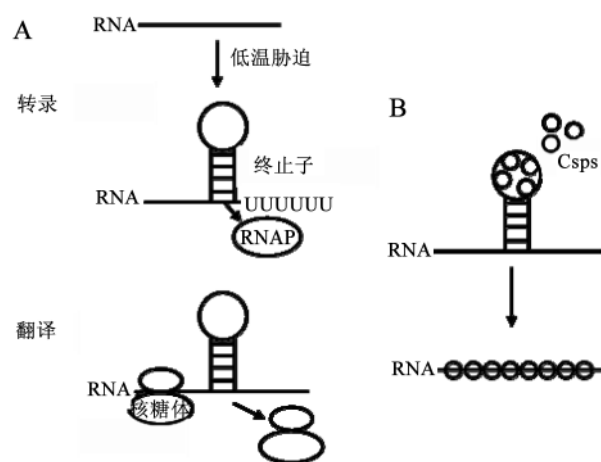


图2 冷激蛋白作用模式示意图(Phadtare 2004)

Fig.2 Schematic for simplified mode of action for cold shock proteins (Phadtare 2004)

A: RNA二级结构对转录及翻译抑制作用示意图; B: 冷激蛋白作用示意图。图中直线代表RNA单链分子, 小圆圈代表冷激蛋白分子。

白,而冷激蛋白可与RNA结合,使其双链区解链;同时它还具有RNA分子伴侣功能,可破坏RNA二级结构的稳定性、帮助RNA维持单链结构,从而促进低温下蛋白质的转录与翻译(Phadtare 2004)。冷激蛋白还以转录抗终止子形式行使作用。体内及体外实验表明CspA、CspE、CspC是不依赖 σ 终止子的转录抗终止子。此外,冷激蛋白CspE在RNA转录延伸复合体中与新生RNA结合,还可提高RNA转录酶的转录间歇效率(郭建军和龚兴国 2002)。

2.2 植物冷激蛋白在冷胁迫下的表达与功能

细菌冷激蛋白在冷胁迫中起重要作用。大肠杆菌有9个冷激蛋白,其中CspA、CspB、CspE、CspG和CspI受低温诱导表达(Jiang等1997; Yamanaoka等1998)。植物冷激蛋白在冷胁迫下表达模式也不尽相同。小麦冷激蛋白WCSP1是一个受冷胁迫特异诱导的基因。低温诱导下WCSP1转录的mRNA和蛋白质水平都稳定增加,而ABA、干旱、高盐、高温等其他非生物胁迫下其转录水平并无改变(Karlson等2002; Nakaminami等2006)。拟南芥中,低温处理后*AtCSDP1*和*AtCSDP2*表达量逐步上升,*AtCSDP2*蛋白在低温处理10 d后累积最多;而*AtCSP3*基因在根及茎中的转录则被低温瞬间诱导;与此相反,*AtCSDP4*在低温处理后表达量呈下降趋势(Karlson和Imai 2003; Sasaki等2007; Kim等2009)。拟南芥冷激蛋白对低温胁迫不同的应答模式也暗示它们可能在冷胁迫下有着不同的功能。在正常条件下,盐芥*TsCSDP1*~*TsCSDP4*的mRNA表达水平比值为10:27:1:31,低温处理可显著改变它们的表达水平,而其表达变化与对应的拟南芥基因并不完全相同(Taranov等2010)。与小麦不同,水稻是不耐低温的作物,其冷激蛋白不被低温诱导。低温胁迫下,*OsCSP1*和*OsCSP2*的转录表达只是短暂地被上升诱导,随即很快便恢复到本底水平,而蛋白水平则几乎没有变化(Chaikam和Karlson 2008)。Karlson等(2009)利用极端耐冻模式植物红柳条山茱萸(*Cornus sericea*)研究发现,其体内冷激蛋白的表达具有明显的季节变化,在寒冷季节冷激蛋白累积量最大,说明其可能与植物的抗冻性有关。

将小麦WCSP1基因转到大肠杆菌冷敏感突变

体BX04,可使该突变体获得与野生型大肠杆菌相似的抗低温能力,表明WCSP1在冷适应中与CspA有着相似的功能。同时WCSP1还具有转录本抑制活性,可与单链DNA、双链DNA及RNA聚合物相结合。WCSP1具有熔解双链DNA的能力,这种能力与该蛋白单链DNA结合能力呈正相关,还与其内部的RNA结合模体有关。GFP亚细胞定位结果显示,WCSP1定位于细胞核及类内质网膜的皮质层部位(Nakaminami等2006)。多种实验结果表明WCSP1具有RNA分子伴侣活性,并有低温条件下参与翻译调控的功能。

Kim等(2007)研究表明,*AtCSDP1*和*AtCSDP2*的表达在冷胁迫后显著上升。*AtCSDP1*在突变体BX04中异位表达后可促进该菌株在17℃下生长,而*AtCSDP2*对BX04的互补能力则非常微弱。*AtCSDP1*在体外可结合RNA及单链DNA,具有DNA解链能力并可增强RNase活性,说明该蛋白在冷适应过程中具有RNA分子伴侣活性。*AtCSDP2*也是一个核质RNA结合蛋白,同时也具有体外结合双链DNA及单链DNA的功能,且对单链DNA结合具有偏爱性,但它并不具备DNA解链能力及增强RNase活性的功能(Sasaki等2007)。在拟南芥冷敏感突变体中超量表达*AtCSDP1*和*AtCSDP2*,可以不同程度地提高突变体的抗寒能力;其中*AtCSDP1*在植物中的抗寒互补能力比*AtCSDP2*更强,这与两者在大肠杆菌冷敏感突变体中的互补能力一致(Park等2009)。Kim等(2009)又对另一个拟南芥冷激蛋白*AtCSDP3*进行了深入的功能研究。结果显示,冷处理能瞬间诱导*AtCSDP3*基因在根及茎中的转录;*AtCSDP3*蛋白是与小麦冷激蛋白WCSP1相似的RNA分子伴侣,具有熔解双链DNA的能力,体外可结合双链DNA及单链DNA,低温下能互补大肠杆菌冷敏感突变体BX04的冷敏感性。亚细胞定位显示*AtCSDP3*在细胞核和细胞质中均有存在。*AtCSDP3*基因的缺失突变会导致植株抗低温能力减弱,超量表达该基因可显著增强植株组成型及冷驯化诱导型抗低温能力(Kim等2007, 2009)。上述结果表明,植物及细菌中的冷激蛋白在冷适应中具有功能上的保守性,其RNA分子伴侣活性在冷适应中有着非常重要的作用。

虽然水稻冷激蛋白的转录及蛋白水平不被低

温诱导, 但对其体外及体内功能研究表明, 水稻的2个冷激蛋白与拟南芥及小麦的冷激蛋白具有相似的核酸结合活性, 也具有互补大肠杆菌突变体BX04冷敏感性的特性(Chaikam和Karlson 2008)。由此, 推测它们也可能在低温条件下有相似的作用。

2.3 植物冷激蛋白在生长发育中的表达与功能

在真核生物中, 冷激蛋白主要与生长发育相关。老鼠冷激蛋白YB-1在胚胎发育中表达, 其缺失突变会导致胚胎致死; 另一冷激蛋白MSY4也在胚胎发育中高表达, 在胚胎发育早期可以互补YB-1的缺失突变(Lu等2006)。与动物来源的冷激蛋白相似, 植物中的部分冷激蛋白也被证实与发育相关。

通过分析拟南芥全生育期不同组织的表达谱发现, 拟南芥的4个冷激蛋白都表现出相似的表达模式: 它们在分生组织及细胞分裂旺盛的组织中表达活跃, 如在顶端分生组织、花芽及早期胚胎中表达丰度都很高, 其中*AtCSDP2*表达量最高(Nakaminami等2009)。Kim等(2009)通过研究*AtCSDP3*基因启动子发现, 该基因在幼苗根尖、茎尖分生组织表达较强, 开花期后在花粉及长角果基部中表达丰度较高。此外, 冷激蛋白的转录也会被开花诱导。*AtCSDP2*和*AtCSDP4*的转录受AGL15转录因子调控, 而AGL15主要在胚胎发育及开花时间控制中起调控作用(Nakaminami等2009)。*AtCSDP2*基因沉默会使得植株开花提早, 而反义抑制该基因表达的转基因植株则出现花期缩短的表型。*AtCSDP2*的RNAi植株还表现出茎秆数减少、角果发育畸形及种子发育畸形(Fusaro等2007)。超量表达*AtCSDP4*会导致植株角果长度缩短, 胚后期发育受阻以致败育, 同时还导致几个发育相关的MADS-box基因表达量上升。T-DNA插入突变体*atcsdp4*无任何形态学上的异常, 这可能是由于*AtCSDP2*与*AtCSDP4*存在功能上的冗余(Yang和Karlson 2011)。

与拟南芥冷激蛋白相似, 水稻冷激蛋白基因*OsCSP1*和*OsCSP2*在不同发育时期的组织中表达水平差异明显。它们也在生殖器官及分生能力强的组织中表达量高度累积, 在花序发育初期表达丰度较高, 而后随着花及种子的发育成熟表达量开始下降(Chaikam和Karlson 2008)。以上数据均

表明植物的冷激蛋白在植物生长、开花及胚胎发育中有着非常重要的作用。

2.4 植物冷激蛋白的其他功能

越来越多的实验证明, 植物冷激蛋白除了参与机体的冷适应及生长发育调控, 也涉及植物对生物胁迫及非生物胁迫的应答。

Felix和Boller (2003)发现细菌的冷激蛋白可以作为激发子激发植物的防卫反应, 其活性的表达与冷胁迫蛋白中的RNA结合结构域RNP1有关。李娜等(2011)将小麦冷激蛋白WCSP1截短后得到片段TA3-13, 它表达的蛋白缺少冷激蛋白中保守的RNP1结构域, 但有一个RNP2结构域和富含甘氨酸的区域。原核表达的TA3-13蛋白能够诱导烟草产生显著的抗烟草花叶病毒(TMV)的作用。将该截短基因转入烟草后, 转基因烟草抗TMV的能力较转空载体烟草提高3~5倍。转基因烟草具有抗TMV侵入和抗病毒病害发展的作用, 同时转基因烟草可以抗细菌软腐病菌的扩展。由此可见, 植物冷激蛋白也有激发植物的免疫防卫反应的功能, 可作为抗病育种的基因资源。

冷激蛋白还可以提高植物的非生物抗性。在植物中组成型表达细菌冷激蛋白能提高植株对非生物胁迫的耐受能力。孟山都公司将大肠杆菌冷激蛋白CspA和枯草芽孢杆菌冷激蛋白CspB转入不同植物中, 得到了多种抗逆性提高的转基因植株。其中, 表达CspA和CspB的拟南芥抗寒能力较野生型显著增强; 表达CspA和CspB的转基因水稻提高了对冷、热、干旱等一系列的非生物胁迫的耐受能力, 在这些胁迫条件下转基因家系的生物量显著高于野生型对照。将CspA和CspB在玉米中表达后, 转基因玉米在缺水条件下的叶生长量、叶绿素含量及光合效率等指标明显优于对照, 产量比野生型高出12%~15% (Castiglioni等2008)。

拟南芥的*AtCSDP1*基因在干旱及高盐胁迫时表达量会下降, 而盐胁迫却导致*AtCSDP2*基因的上升表达。超量表达*AtCSDP1*会延迟拟南芥在脱水或盐胁迫条件下的种子萌发, 而超量表达*AtCSDP2*却可以加速种子在盐胁迫下的萌发(Park等2009)。干旱和ABA处理能瞬时诱导水稻*OsCSP1*和*OsCSP2*在根部的转录, *OsCSP1*在高盐胁迫表达量也略有上升(Chaikam和Karlson 2008), 但它们在

表1 植物冷激蛋白的表达及功能

Table 1 Expression profiles and function of cold shock proteins in plants

植物	蛋白名称	表达模式			功能分析				参考文献
		低温	非生物胁迫	组织及发育时期	结合核酸	解链DNA	互补BX04	转基因植株表型	
冬小麦	WCSP1	上升	表达量无明显变化		可	可	可互补	WCSP1的截短基因转入烟草可提高植株抗病毒及细菌软腐病菌的能力	李娜等2011; Nakaminam等2006
拟南芥	AtCSDP1	逐步上升	干旱、高盐胁迫诱导下降	分生及细胞分裂旺盛组织中表达活跃	可	可	部分互补	超量表达可以提高拟南芥冷敏感突变体的抗寒能力, 延迟种子在脱水或盐胁迫条件下的萌发	Karlson和Imai 2003; Kim等2007; Park等2009
	AtCSDP2	逐步上升	盐胁迫诱导上升	分生及细胞分裂旺盛组织中表达活跃; 开花诱导转录	可	不可	不能互补	超量表达可部分提高拟南芥冷敏感突变体的抗寒能力; 可以加速种子在脱水或盐胁迫条件下的萌发。基因沉默植株开花提早, 而反义抑制植株花期缩短, RNAi植株茎秆数减少、角果发育畸形及种子发育畸形	Karlson和Imai 2003; Sasaki等2007; Park等2009; Nakaminami等2009
	AtCSDP3	瞬间上升		分生组织、花粉及长角果基部表达丰度高	可	不可	可互补	超量表达则可显著增强植株组成型及冷驯化诱导型抗低温能力, 基因缺失会减弱植株抗低温能力	Karlson和Imai 2003; Kim等2007, 2009
	AtCSDP4	下降		分生及细胞分裂旺盛组织中表达活跃; 开花诱导转录				超量表达会导致植株角果长度缩短, 胚后期发育受阻以致败育	Karlson和Imai 2003; Nakaminami等2009
水稻	OsCSP1	短暂上升, 随即恢复到本底	干旱、ABA及高盐胁迫诱导上升	生殖器官及分生组织中表达量高	可	可	可互补		Chaikam和Karlson 2008
	OsCSP2	短暂上升, 随即恢复到本底	干旱、ABA诱导上升	生殖器官及分生组织中表达量高	可	可	可互补		Chaikam和Karlson 2008

这些胁迫中的具体作用还待进一步深入研究。

3 植物冷激蛋白结构与功能的关系

大量研究表明植物冷激蛋白的RNA分子伴侣活性与结构密切相关。Karlson等(2002)分析发现WCSP1的每个结构域(CSD、GR及ZF结构)都具有独立的核酸结合功能, 但缺失C端3个ZF结构后的WCSP1蛋白丧失了冷胁迫下的生长刺激活性。拟南芥冷激蛋白AtCSDP1与AtCSDP2在C端区域存在显著差异, AtCSDP1的C端GR区共有299个氨基酸, 包含7个ZF结构; 而AtCSDP2的C端只有204个氨基酸, ZF数目仅为2个。将AtCSDP1和AtCSDP2的N端CSD区域及C端区域分别转化BX04, 两者的

CSD区域均可以对BX04产生部分互补能力; AtCSDP1的C端区域能够完美地互补BX04在低温条件下的冷敏感性, 而AtCSDP2的C端区域对BX04却几乎没有互补作用。AtCSDP1蛋白C端ZF结构缺失实验证明, 缺失2~4个ZF结构的蛋白对BX04的互补能力与完整的CSDP1蛋白相似, 而缺失6个ZF后蛋白对BX04的互补性大大降低, 但仍然强于AtCSDP2的互补能力。随后研究者又将AtCSDP1与AtCSDP2的进行结构域交换, 得到2种嵌合蛋白, 即AtCSDP1蛋白N端CSD结构域嵌合AtCSDP2蛋白C端结构域的1N2C、AtCSDP2蛋白N端CSD结构域嵌合AtCSDP1蛋白C端结构域的2N1C。AtC-

SDP1和2N1C可以较成功地互补BX04冷敏感表型, 而AtCSDP2和1N2C不具备互补能力。此外, 嵌合蛋白2N1C可破坏RNA分子二级结构, 具有无可争议的RNA分子伴侣活性(Park等2010; Kim等2010)。由此可推测, 虽然CSD自身具有一定的RNA分子伴侣活性, 但C端的锌指结CSDP构数目和排列模式对冷激蛋白RNA分子伴侣活性是否能够完全发挥起着至关重要的作用。

4 展望

相对于原核生物及哺乳动物, 人们对植物冷激蛋白的研究尚处于初步阶段, 研究主要还集中在基因的结构、表达及功能分析等方面。但从当前已有的研究可以看出, 植物冷激蛋白与原核生物冷激蛋白一样具有RNA分子伴侣活性, 参与细胞的多种生理活动, 尤其在植物的冷适应、生长发育及对抗干旱、高温、病害等其它多种逆境胁迫中发挥重要作用。一些转化植物冷激蛋白的转基因植株可以提高对低温、高盐、病害等逆境的抗性。因此, 可以预见植物冷激蛋白在今后的植物抗逆基因工程中将有广泛的应用前景。在原核生物及哺乳动物中, 冷激蛋白通过其核酸结合活性调节细胞的多种生理活动, 它们在转录、翻译、DNA重组及修复中都发挥了重要的作用。而植物冷激蛋白是否参与了这些过程, 它们在不同的生长阶段及逆境应答中结合的RNA是否具有特异性, 基因的调控方式如何等等目前都还不清楚, 这些都将是以后的研究重点。

参考文献

- 郭建军, 龚兴国(2002). 冷激蛋白的研究进展. 生物化学与生物物理进展, 29 (5): 691~695
- 李娜, 杜秀贞, 潘小玫, 王金生, 宋从凤(2011). 转小麦冷胁迫蛋白截短基因烟草及其抗病性分析. 遗传, 33 (5): 520~526
- 史海水, 廖祥儒, 尚丹(2003). 植物中的冷激蛋白. 生命科学, 15 (5): 307~311
- 王振雄, 周培瑾(1999). 冷激蛋白CspA家族. 生物工程学报, 15 (2): 131~134
- 张玮玮(2007). 基于生物信息学的冷休克结构域蛋白家族进化研究 [学位论文]. 大连: 辽宁师范大学
- Carpenter CD, Kreps JA, Simon AE (1994). Genes encoding glycine-rich *Arabidopsis thaliana* proteins with RNA-binding motifs are influenced by cold treatment and an endogenous circadian rhythm. *Plant Physiol*, 104: 1015~1025
- Castiglioni P, Warner D, Bensen RJ, Anstrom DC, Harrison J, Stoecker M, Abad M, Kumar G, Salvador S, D'Ordine R et al (2008). Bacterial RNA chaperones confer abiotic stress tolerance in plants and improved grain yield in maize under water-limited conditions. *Plant Physiol*, 147 (2): 446~455
- Chaikam V, Karlson D (2008). Functional characterization of two cold shock domain proteins from *Oryza sativa*. *Plant Cell Environ*, 31: 995~1006
- Chaikam V, Karlson DT (2010). Comparison of structure, function and regulation of plant cold shock domain proteins to bacterial and animal cold shock domain proteins. *BMB Rep*, 43 (1): 1~8
- Chinnusamy V, Zhu J, Zhu JK (2007). Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends Plant Sci*, 12 (10): 444~451
- Chinnusamy V, Zhu JK, Sunkar R (2010). Gene regulation during cold stress acclimation in plants. *Methods Mol Biol*, 639: 39~55
- Felix G, Boller T (2003). Molecular sensing of bacteria in plants: the highly conserved RNA-binding motif RNP-1 of bacterial cold shock proteins is recognized as an elicitor signal in tobacco. *J Biol Chem*, 278 (8): 6201~6208
- Fusaro AF, Bocca SN, Ramos RL, Barroco RM, Magioli C, Jorge VC, Coutinho TC, Rangel-Lima CM, De-Rycke R, Inze D et al (2007). AtGRP2, a cold-induced nucleocytoplasmic RNA-binding protein, has a role in flower and seed development. *Planta*, 225: 1339~1351
- Jiang W, Hou Y, Inouye M (1997). CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone. *J Biol Chem*, 272: 196~202
- Jones PG, VanBogelen RA, Neidhardt FC (1987). Induction of proteins in response to low temperatures in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 169: 2092~2095
- Karlson D, Imai R (2003). Conservation of the cold shock domain protein family in plants. *Plant Physiol*, 131: 12~15
- Karlson D, Nakaminami K, Thompson K, Yang Y, Chaikam V, Mulinetti P (2009). Plant cold shock domain proteins: on the tip of an iceberg; In: Gusta LV, Wisniewski ME, Tanino KK (eds). *Plant Cold Hardiness From the Laboratory to the Field*. CABI: Cambridge, USA, 43~54
- Karlson D, Nakaminami K, Toyomasu T, Imai R (2002). A cold-regulated nucleic acid-binding protein of winter wheat shares a domain with bacterial cold shock proteins. *J Biol Chem*, 277: 35248~35256
- Kim JS, Park SJ, Kwak KJ, Kim YO, Kim JY, Song J, Jang B, Jung CH, Kang H (2007). Cold shock domain proteins and glycine-rich RNA-binding proteins from *Arabidopsis thaliana* can promote the cold adaptation process in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 35 (2): 506~516
- Kim MH, Sasaki K, Imai R (2009). Cold shock domain protein 3 regulates freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 284: 23454~23460
- Kim WY, Kim JY, Jung HJ, Oh SH, Han YS, Kang H (2010). Comparative analysis of *Arabidopsis* zinc finger-containing glycine-rich RNA-binding proteins during cold adaptation. *Plant Physiol Biochem*, 48 (10~11): 866~872
- Kim YO, Kim JS, Kang H (2005). Cold-inducible zinc finger-containing glycine-rich RNA-binding protein contributes to the enhancement of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant*

- J, 42: 890~900
- Lemieux C, Otis C, Turmel M (2007). A clade uniting the green algae *Mesostigma viride* and *Chlorokybus atmophyticus* represents the deepest branch of the Streptophyta in chloroplast genome-based phylogenies. *BMC Biol*, 5: 2
- Lu ZH, Books JT, Ley TJ (2006). Cold shock domain family members YB-1 and MSY4 share essential functions during murine embryogenesis. *Mol Cell Biol*, 26 (22): 8410~8417
- Manival X, Ghisolfi-Nieto L, Joseph G, Bouvet P, Erard M (2001). RNA-binding strategies common to coldshock domain- and RNA recognition motif-containing proteins. *Nucleic Acids Res*, 29: 2223~2233
- Maruyama K, Sato N, Ohta N (1999). Conservation of structure and cold-regulation of RNA-binding proteins in cyanobacteria: probable convergent evolution with eukaryotic glycine-rich RNA-binding proteins. *Nucleic Acid Res*, 27: 2029~2036
- Mussnug JH, Wobbe L, Elles I, Claus C, Hamilton M, Fink A, Kahmann U, Kapazoglou A, Mullineaux CW, Hippler M et al (2005). NAB1 is an RNA binding protein involved in the light-regulated differential expression of the light-harvesting antenna of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell*, 17: 3409~3421
- Nakaminami K, Hill K, Perry SE, Sentoku N, Long JA, Karlson DT (2009). *Arabidopsis* cold shock domain proteins: relationships to floral and silique development. *J Exp Bot*, 60 (3): 1047~1062
- Nakaminami K, Karlson DT, Imai R (2006). Functional conservation of cold shock domains in bacteria and higher plants. *Proc Natl Acad Sci*, 103 (26): 10122~10127
- Park SJ, Kwak KJ, Jung HJ, Lee HJ, Kang H (2010). The C-terminal zinc finger domain of *Arabidopsis* cold shock domain proteins is important for RNA chaperone activity during cold adaptation. *Phytochemistry*, 71 (5~6): 543~547
- Park SJ, Kwak KJ, Oh TR, Kim YO, Kang H (2009). Cold shock domain proteins affect seed germination and growth of *Arabidopsis thaliana* under abiotic stress conditions. *Plant Cell Physiol*, 50 (4): 869~878
- Phadtare S (2004). Recent developments in bacterial cold-shock response. *Curr Issues Mol Biol*, 6: 125~136
- Roy SJ, Tucker EJ, Tester M (2011). Genetic analysis of abiotic stress tolerance in crops. *Curr Opin Plant Biol*, 14 (3): 232~239
- Sasaki K, Kim MH, Imai R (2007). *Arabidopsis* COLD SHOCK DOMAIN PROTEIN2 is a RNA chaperone that is regulated by cold and developmental signals. *Biochem Biophys Res Commun*, 364: 633~638
- Saunders NF, Thomas T, Curmi PM, Mattick JS, Kuczek E, Slade R, Davis J, Franzmann PD, Boone D, Rusterholtz K et al (2003). Mechanisms of thermal adaptation revealed from the genomes of the Antarctic Archaea *Methanogenium frigidum* and *Methanococcoides burtonii*. *Genome Res*, 13: 1580~1588
- Taranov VV, Berdnikova MV, Nosov AV, Galkin AV, Babakov AV (2010). Cold shock domain proteins in the extremophyte *Thellungiella salsuginea* (salt cress): gene structure and differential response to cold. *Mol Biol (Mosk)*, 44 (5): 889~897
- Thompson KB (2008). Composition, conservation, evolution, and function of the cold shock domain proteins in plants [dissertation]. Morgantown: West Virginia University
- Vermel M, Guermann B, Delage L, Grienberger JM, Marechal-Drouard L, Gualberto JM (2002). A family of RRM-type RNA-binding proteins specific to plant mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 5866~5871
- Yamanaka K, Fang L, Inouye M (1998). The CspA family in *Escherichia coli*: multiple gene duplication for stress adaptation. *Mol Microbiol*, 27: 247~255
- Yang Y, Karlson DT (2011). Overexpression of AtCSP4 affects late stages of embryo development in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*, 62 (6): 2079~2091
- Zhu J, Dong CH, Zhu JK (2007). Interplay between cold-responsive gene regulation, metabolism and RNA processing during plant cold acclimation. *Curr Opin Plant Biol*, 10 (3): 290~295