

## 综述

# 甘薯sporamin蛋白的功能及其在抗虫转基因植物中的应用

邱琳<sup>1,2</sup> 董衡<sup>1,2</sup> 黄鹂<sup>1,2\*</sup> 曹家树<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>浙江大学蔬菜研究所细胞与分子生物学实验室, 杭州 310058; <sup>2</sup>农业部园艺植物生长发育与品质调控重点开放实验室, 杭州 310058)

**摘要** Sporamin蛋白是甘薯块根中一种主要的可溶性蛋白, 具有块根特异表达、伤害诱导表达等生物学特性, 并具有胰蛋白酶抑制剂活性。sporamin具有的胰蛋白酶抑制剂活性使其广泛应用于近年植物抗虫转基因的研究。该文就其序列结构特性、表达调控、生物学功能, 以及在抗虫转基因领域的研究进展进行了综述。

**关键词** sporamin; 胰蛋白酶抑制剂; 抗虫性

Sporamin蛋白是甘薯(*Ipomoea batatas*)块根中一类主要的贮藏蛋白, 这类起初被称作ipomoein的蛋白占块根可溶性蛋白总量的80%以上<sup>[1-3]</sup>。sporamin蛋白主要以单体形式存在, 平均分子量为25 kDa, 与马铃薯(*Solanum tuberosum*)中的Patatin蛋白以及山药(*Dioscorea opposita*)中的Discorin蛋白同属于变态根茎器官中的特异贮藏蛋白质<sup>[4]</sup>。由于它们具有一般贮藏蛋白质的营养特性, 又具有某些酶的活性, 且易于分离、纯化, 便于分子水平上的操作和研究, 从1985年被发现以来<sup>[2]</sup>, sporamin蛋白就受到国内外研究学者的广泛关注。在上个世纪, 人们已经对其的类型和分布、性质和功能、编码的基因结构、表达调控特征等有了一定的认识<sup>[5]</sup>。随着生物化学和分子生物学等实验技术的不断提高, 近十年的研究则使我们对该类贮藏蛋白尤其是其表达调控特征和生物学功能有了更深的认识。

在自然状态下, sporamin主要在块根中表达, 创伤及胁迫相关的化学物质能够诱导其在茎、叶中的表达。生物学功能研究则揭示sporamin蛋白能够作为定位液泡的信号, 具有靶定蛋白到特定的细胞区室的功能, 其启动子具有驱动其他基因表达的特点, 同时其还具有多种酶活性。此外, sporamin蛋白还具有胰蛋白酶抑制剂活性, 从而使其编码基因成为新近植物抗虫基因工程的候选基因之一。为了更好地理解sporamin蛋白的特性, 并加以利用, 本文在介

绍其序列结构特征、表达调控特性的基础上, 着重对其生物学功能以及在抗虫转基因领域的研究及应用方面的相关进展作一概述。

## 1 Sporamin蛋白的分类与结构特征

编码sporamin蛋白的基因家族具有10个以上的成员, Maeshima等<sup>[2]</sup>首先根据核苷酸同源性将其分为两个基因亚家族: *sporamin A*和*sporamin B*。Murakami等<sup>[6]</sup>和Hattori等<sup>[7]</sup>通过精细分子实验证实了这一分类, 并发现同一亚家族内的基因核苷酸序列相似性在94%~98%之间, 两个亚族间的基因核苷酸序列相似性为82%~84%。

对sporamin蛋白的编码基因*SPOR5-31*、*gSPO-A1*和*gSPO-B1*等的研究发现, 这些基因均无内含子<sup>[8]</sup>。并且发现在这些基因的5'非编码区从转录起始位点开始向上游依次分布着几个保守区域: box1(含TATA box)、box2、box3和sp8<sup>[8,9]</sup>。除*gSPO-B1*之外, *SPOR5-31*和*gSPO-A1*还具有CAAT box<sup>[9]</sup>。

有研究认为, sporamin是一个球形蛋白, 其一级结构由约229个氨基酸构成, 其中分子内第45位和第94位半胱氨酸(Cys45-Cys94)以及第153位和第160

收稿日期: 2010-10-26 接受日期: 2011-02-11

浙江省科技计划科研项目(No.2009C32026)和浙江省教育厅科研项目(No.20070173)资助项目

\*通讯作者。Tel: 0571-88982188, E-mail: lihuang@zju.edu.cn

位半胱氨酸(Cys153-Cys160)之间存在两组二硫键。在非还原条件下, sporamin蛋白存在由二硫键连接的三种不同分子量的分子异构体<sup>[10]</sup>。利用sporamin蛋白与Kunitz型胰蛋白酶抑制剂具有氨基酸序列同源的特点, Yao等<sup>[10]</sup>在其它植物Kunitz型胰蛋白酶抑制剂结构的基础上, 构建了一个sporamin的结构模型(图1)。他们还使用这个模型设计了三种突变的sporamin蛋白序列, 即分别用Asp70Val、Glu72Arg和Ser73Ile取代包含在一个内链二硫键中的半胱氨酸残基来影响一个假定的活性中心环, 发现这些突变序列在大肠杆菌中的表达都能导致sporamin的抑制活性降低到只有野生型蛋白的2%~4%, 从而证实了sporamin的抑制位点。同时, 他们发现删减一个半胱氨酸(Cys45Leu)残基将导致sporamin蛋白活性下降到野生型蛋白的12%左右, 这也证实了链间二硫

键对于维持sporamin蛋白的稳定性是很重要的。

## 2 Sporamin基因的表达调控

在正常生长条件下, sporamin基因在甘薯块根中表达, 在其它器官中不存在或者含量很低<sup>[2]</sup>。其表达在宏观上主要受植株发育阶段和光合产物的调控, 并且与块根形态器官的发生有着密切的关系<sup>[11,12]</sup>。同时, sporamin基因的表达受一些外界因子的影响, 例如高蔗糖浓度(大约3%)可以诱导其在茎、叶和叶柄中的合成。类似蔗糖诱导的表达也发生在含有sporamin基因5'上游与氯霉素乙酰转移酶(CAT)融合基因转化的转基因烟草(*Nicotiana tabacum*)中<sup>[11,13]</sup>。伤害(如机械损伤)可以诱导sporamin基因的表达<sup>[12,14]</sup>。Wang等<sup>[15]</sup>证实转化sporamin基因1.2 Kb的5'上游区也能够转基因烟草的茎和叶中

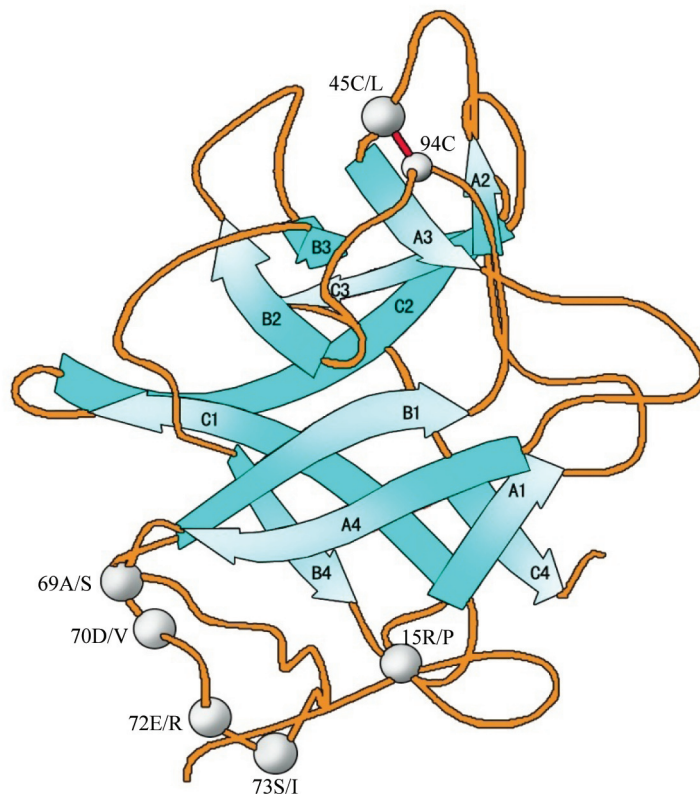


图1 根据与Kunitz型胰蛋白酶抑制剂的同源性得到的甘薯sporamin蛋白结构模型(根据文献[10]修改)

6个被修饰的残基(球体表示, 用斜线隔开野生与突变氨基酸)产生不同的抑制效果。第一个二硫键Cys45-Cys94显示为红色。蓝色箭头表示β-片层结构。标准氨基酸单字母缩写: A: 丙氨酸; C: 半胱氨酸; D: 天门冬氨酸; E: 谷氨酸; I: 异亮氨酸; L: 亮氨酸; P: 脯氨酸; R: 精氨酸; S: 丝氨酸; V: 缬氨酸。

Fig.1 A structural model for the sweet potato protein sporamin, based on homology with Kunitz trypsin inhibitors (modified from the paper [10])

Modification of six residues (shown by spheres and labelled with the wild-type and mutant amino acids separated by a slash) resulted in different effects on the inhibitory activity, as discussed in the text. The first disulfide bond Cys45-Cys94 is indicated in red. Blue arrows indicate beta-sheet structure. Standard single letter abbreviations for amino acids are used: A: alanine; C: cysteine; D: aspartic acid; E: glutamic acid; I: isoleucine; L: leucine; P: proline; R: arginine; S: serine; V: valine.

产生创伤引起的表达。用多聚半乳糖醛酸(polygalacturonic acid, PGA)和脱乙酰壳多糖(chitosan)处理切割的叶-叶柄外植体能够诱导sporamin基因在叶-叶柄组织中的表达<sup>[16]</sup>。此外, sporamin基因表达还与激素相关, 脱落酸(abscisic acid, ABA)能诱导其表达, 而该表达以及蔗糖和PGA诱导的表达都会被赤霉素(gibberellane, GA)所抑制<sup>[12]</sup>。同时, 研究者还发现茉莉酸甲酯(methyl jasmonate)也能够诱导sporamin基因在甘薯受伤叶片中的表达, 该途径被乙烯(ethylene)上调, 但被水杨酸(salicylic acid, SA)下调<sup>[15]</sup>。最新关于sporamin基因表达调控的研究发现甘薯叶中的一种前体蛋白序列中包含的6个信号肽, 在伤害诱导时能够提高sporamin的表达<sup>[17]</sup>。这也是首次在植物中发现一个前体蛋白含有潜在的防御信号肽。

### 3 Sporamin蛋白的生物学功能

#### 3.1 Sporamin蛋白靶定其它蛋白到特定的细胞区室

储藏蛋白的特殊序列能够靶定其它蛋白到特定的细胞区室, 如质外体、液泡和内质网, 以避免这些蛋白的降解, 从而提高它们在组织器官中的含量<sup>[18]</sup>。尽管对于赋予储藏蛋白靶定功能的特殊序列还没有充分的描述, 但可以肯定的是, 这些序列对于储藏蛋白决定其它蛋白的命运具有至关重要的作用。基于储藏蛋白的这个特点, 研究者通过基因工程技术利用其在植物中生产某些重要的蛋白。例如, 利用烟草Pr1a蛋白的信号肽靶定一种耐热的葡聚糖酶(endo-1,4-b-D-glucanase)到拟南芥叶的质外体中, 使该酶的积累达到叶中可溶性蛋白含量的25%, 葡聚糖酶是一种能够水解纤维素的酶类, 因此这种功能性酶的积累有助于人为利用植物转化其生物量来替代燃料或者其他化学物质<sup>[19]</sup>。类似的策略被广泛应用于靶定蜘蛛丝蛋白到植物细胞内质网腔中生产重组蜘蛛丝蛋白。其中, 效果最好的例子是该靶定能使蜘蛛丝弹性融合蛋白(silk-elastin fusion protein)在马铃薯和烟草叶中的积累达到总蛋白含量的4%<sup>[20]</sup>。

Sporamin蛋白的前体在其N末端具有一段21个氨基酸组成的信号肽(MKAFTLALFLALSLLLPNPA)和16个氨基酸组成的前肽(HSRFNPIRLPTTHE-PA)<sup>[21]</sup>。大量关于sporamin蛋白靶定机制的研究证实这两个结构序列能够靶定重组蛋白到植物的多个细胞区室<sup>[18,22,23]</sup>。目前, sporamin蛋白N末端前肽(NTPP)

和烟草几丁质酶(tobacco chitinase)C末端前肽(CTPP)已经被当作模型来靶定异源蛋白到植物液泡中<sup>[23]</sup>。DP1B是蜘蛛的一种牵引丝蛋白合成类似物, 它能够纺成丝纤维, 研究证明它能够在转基因植物中表达, 从而使植物具有了生产DP1B的可能性。Yang等<sup>[18]</sup>结合sporamin蛋白N末端信号肽、前肽和内质网保留肽(ER retention peptide, KDEL)获得了一种蛋白质靶定的新方法, 用以在拟南芥细胞的质外体、内质网腔和液泡中积累DP1B。这种方法显著提高了DP1B在拟南芥叶组织中的积累, 并且揭示sporamin蛋白靶定作用可具体分为以下三种情况: (1)当sporamin蛋白N末端信号肽和前肽结合上其它蛋白的N末端, 能够将自身与异源蛋白的重组蛋白包裹进入液泡; (2)若只是sporamin蛋白的N末端信号肽结合上异源蛋白的N末端, 则重组蛋白能够分泌到质外体; (3)当sporamin蛋白的N末端信号肽结合上异源蛋白的N末端, 同时该异源蛋白的C末端又被内质网保留肽KDEL结合, 则重组蛋白在内质网腔中积累。

#### 3.2 作为定位液泡的信号

如前所述, sporamin蛋白的N末端前肽具有靶定功能, 又由于sporamin蛋白位于液泡腔中<sup>[21]</sup>, 所以当其结合上荧光染料或者绿色荧光蛋白时, 能够通过重组蛋白在细胞中的表达而起到定位液泡的作用。利用这一特点研究者将sporamin蛋白的液泡靶标功能作为一种辅助手段广泛应用于研究中。例如, Yano等<sup>[24]</sup>以sporamin-GFP重组蛋白为中央液泡标记, 在烟草细胞中发现了中央液泡组分到自溶酶体(autolysosomes)的转运现象, 并推断出胞吞作用以及中央液泡的供给可能对自溶酶体的形成起作用。

利用sporamin蛋白的液泡靶标功能还能确定某个基因是否在液泡中表达。例如, Hurley等<sup>[25]</sup>在研究拟南芥编码紫色酸性磷酸酶(purple acid phosphatases, PAPs)的基因*AtPAP26*的细胞定位时, 就将其结合上第二代红色单体荧光蛋白(mCherry)构成重组蛋白*AtPAP26-mCherry*, 以sporamin蛋白与GFP的重组蛋白sporaminNTPP-GFP为对照, 在悬浮培养的细胞中瞬时表达发现*AtPAP26-mCherry*与sporaminNTPP-GFP在细胞相同的部位表达, 由于sporaminNTPP-GFP能标记液泡, 从而得知*AtPAP26*也在液泡中表达。

此外, sporamin蛋白作为定位液泡的信号还能够辅助研究可溶性液泡蛋白的转运过程。如在研究拟南芥液泡受体*AtVSR1*蛋白在可溶性液泡蛋白转运

中的机制时,将其突变体C2A与一种血凝素(hemagglutinin, HA)抗原表位结合后与sporamin:GFP重组蛋白同时转化到原生质体,提取原生质体中的蛋白质并通过蛋白质印迹法分析发现,当C2A:HA存在时,sporamin:GFP含量大大减少,从而说明C2A:HA抑制sporamin:GFP蛋白的转运<sup>[26]</sup>。

### 3.3 具有多种酶活性

上个世纪末,研究者们曾在甘薯块根中分离提纯得到一种胰蛋白酶抑制剂(trypsin inhibitor, TI),后来证实TI实际上就是sporamin蛋白<sup>[27]</sup>。实验证明TI具有脱氢抗坏血酸还原酶(dehydroascorbate reductase, DHAR)和单脱氢抗坏血酸还原酶(mono-dehydroascorbate reductase, MDAR)活性<sup>[28]</sup>, DHAR和MDAR在催化位点具有巯基(thiol groups),很早以前研究者就发现硫氧化还原蛋白(thioredoxin)能够作为自由基清除剂并促进氧化受损蛋白质的再生<sup>[29]</sup>,因此,我们可以推测sporamin蛋白能够保护甘薯块根免受氧化损伤的破坏。在随后的研究中证实了sporamin蛋白具有抗氧化活性, Hou等<sup>[30]</sup>报道甘薯TI具有类似谷胱甘肽过氧化酶(GPx EC 1.11.1.9)活性, GPx也具有清除自由基的功能,它能使有毒的过氧化物还原成无毒的羟基化合物,同时促进H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的分解,从而保护细胞膜的结构及功能不受过氧化物的干扰及损害。研究者为了探明sporamin蛋白具有自由基清除剂功能的原因,用胃蛋白酶水解sporamin蛋白模拟人(或动物)的肠胃消化的水解过程,并根据人工合成sporamin蛋白的多肽发现,sporamin蛋白的抗氧化活性是因为组成其蛋白的半胱氨酸残基(GTEKC或者SYCQ)具有高抗氧化活性<sup>[31]</sup>。通过类似的体外合成sporamin蛋白多肽序列的方法Huang等<sup>[32]</sup>的研究表明,sporamin蛋白对血管紧张素转换酶(angiotensin converting enzyme, ACE)具有抑制作用,并且sporamin蛋白对ACE的抑制效果具有剂量效应。ACE是一种糖蛋白并能够作为二肽释放肽链端解酶(exopeptidase)与肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system)结合调控周边血压,因此,sporamin蛋白对ACE的抑制作用就使得高血压患者食用甘薯存在安全性问题,具体影响如何还需要进一步研究证明。最近, Huang及其团队<sup>[33]</sup>又发现甘薯TI具有巯基转移酶(thioltransferase, TTase)活性和谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)活性。TTase具有抑制脱氢抗坏血酸(dehydroascorbate, DHA)转变为

抗坏血酸(ascorbate)的作用,与前面提到的DHAR功能类似,植物对化学有毒物质如除草剂的防御机制由GST调控<sup>[34]</sup>,并且植物GST通过正常的代谢过程也对病原体侵袭、重金属毒害和氧化胁迫有反应,这些进一步说明创伤及胁迫相关的化学物质能够诱导sporamin蛋白的表达。这些研究都表明甘薯TI及sporamin蛋白具有广泛的酶学特性对甘薯适应复杂环境发挥着重要作用。

### 3.4 其编码基因的启动子可驱动其他基因的表达

Sporamin基因的启动子具有驱动其他基因表达的特点, Hong等<sup>[35]</sup>将sporamin基因的启动子结合上植酸酶(phytase)基因appA编码序列上游,然后将其转入马铃薯,能够驱动植酸酶在叶、茎和块茎等多个器官中的高水平表达。

研究者还发现使用sporamin基因的一小段启动子(Spom)结合荧光素酶(LUC)基因,提高了LUC在拟南芥*hsi2*系列突变体中的表达<sup>[36]</sup>。类似地,在拟南芥*sGsL*系列中, LUC在Spomin的控制下也表现出高水平表达<sup>[37]</sup>。这些证据都说明sporamin启动子能够作为某些基因表达的增强子,提高其表达水平。

## 4 Sporamin在抗虫转基因植物中的应用

植物对于害虫和病菌的侵袭已经形成了多种形态和生物化学防御屏障,植物组织的机械损伤能够引起编码植物防御蛋白的mRNA的积累<sup>[38]</sup>。其中,植物蛋白酶抑制剂就是一种植物防御蛋白,由于它们能抑制昆虫肠道内的消化酶活性而阻碍昆虫对营养的吸收,导致昆虫发育不正常甚至死亡,从而对于植物阻止病菌和昆虫侵害起着重要作用<sup>[39]</sup>。Sporamin蛋白与Kunitz型胰蛋白酶抑制剂氨基酸序列高度同源, Yeh等<sup>[27]</sup>将sporamin全长cDNA和另外两个sporamin cDNA片段在pGEX-2T载体中表达,由IPTG诱导转化大肠杆菌获得重组蛋白,通过SDS-聚丙烯酰胺凝胶显示sporamin蛋白具有Kunitz型胰蛋白酶抑制剂活性。因此,可以利用其在转基因植物中的表达抵抗昆虫或者线虫从而保护植物免受食草性破坏<sup>[14,40]</sup>。

根据作用于酶的活性基团不同及其氨基酸序列特征,已鉴定的蛋白酶抑制剂可分为4类:半胱氨酸蛋白酶抑制剂、丝氨酸蛋白酶抑制剂、金属蛋白酶抑制剂和天冬氨酸蛋白酶抑制剂<sup>[40]</sup>。由于大多数昆虫(如大部分鳞翅目、直翅目、双翅目、膜翅目以

及某些鞘翅目)肠道内的蛋白酶主要是丝氨酸蛋白酶,因此丝氨酸蛋白酶抑制剂与抗虫关系最为密切。

*Sporamin A*基因家族的一个成员*SpTI-1*编码一种丝氨酸蛋白酶抑制剂<sup>[44]</sup>。目前,关于*sporamin*基因在抗虫基因工程方面的研究也主要集中在*SpTI-1*上。Yeh等<sup>[44]</sup>首次将*SpTI-1*转入烟草,发现转基因植株表现出对斜纹夜蛾的抗性。后来发现*SpTI-1*在台湾花椰菜(*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.)转基因植株中的表达也使植株表现出对夜蛾科灰翅夜蛾属(*Spodoptera*)的抗性<sup>[41]</sup>。同时,研究者发现*sporamin*基因阻碍转基因甜菜根毛中囊肿线虫的发育,并证实线虫发育的抑制程度与*sporamin*蛋白的活性有关,而与*sporamin*蛋白在毛状根中表达的量无关<sup>[40]</sup>。

在多数转基因烟草和花椰菜株系中,*sporamin*基因的表达水平随着连续繁殖和继代而逐渐下降。以往的研究认为启动子强度、增强子DNA片段和内含子片段都可以影响外源基因表达水平,并且启动子不仅仅影响外源基因的表达,同时,也在一定程度上影响外源基因的表达变异<sup>[42]</sup>。为了提高*sporamin*基因表达水平及其在转基因植株中的抗虫效率,研究者利用一个伤害应答的*sporamin*基因启动子(Pspoa)和*sporamin*基因中类似基质附着区(MAR)的序列(spoMAR)来驱动*sporamin*基因在甘蓝(*B.oleracea*)中的表达<sup>[42]</sup>。结果表明,携带有Pspoa启动子和spoMAR区域的*sporamin*基因表达水平稳定,表达变异性低,转基因植株在喂养试验中表现出对棉铃虫(*H.armigera*)的抗性。此外,当Pspoa结合上spoMAR时,*sporamin*基因的表达在转基因甘蓝植株T<sub>1</sub>和T<sub>2</sub>代保持了稳定且高的水平,与CaMV35S启动子驱动所表现出的不稳定的表达<sup>[43]</sup>形成鲜明对比。这也说明Pspoa和spoMAR对于外源基因在转基因植株的高效表达并在连续繁殖后代中稳定表达非常有效。

另一方面,研究中也发现Pspoa具有很高的调控活性,在伤害诱导时能够使*sporamin*基因高效、迅速地表达<sup>[15]</sup>。

最近发现Pspoa的高调控活性与其序列中的一个顺式作用类似NOS的元件相关,研究者将CaMV35S启动子的最小片段(90 bp)结合上两个这样的类似NOS元件(168 bp),能够同时启动*sporamin*和半胱氨酸蛋白酶抑制剂(cystatin)基因在烟草中的表达,转基因植株表现出对棉铃虫、软腐病菌和腐霉病

菌的抗性<sup>[44]</sup>。说明类似NOS元件对于Pspoa的功能发挥具有重要的作用。

与在传统植物抗虫转基因工程中广泛使用的苏云金杆菌毒蛋白(*Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein, Bt-toxins, Bt-IC)相比,蛋白酶抑制剂具有抗虫谱广且昆虫不易通过突变对其产生耐受性等优点<sup>[45]</sup>。此外,苏云金杆菌的安全性问题越来越受到质疑<sup>[46]</sup>。而蛋白酶抑制剂通常是来自植物本身,具有无毒、安全的特点,这就使得*sporamin*等蛋白酶抑制剂在抗虫转基因方面表现出极大的优势。

## 5 分析及展望

*Sporamin*蛋白作为甘薯块根中主要的可溶性蛋白具有特殊的生理生化特性,它不仅在植物的生长发育中扮演着重要的角色,也在分子生物学研究的多个方面具有较高的利用价值。与Bt等抗虫蛋白相比,*sporamin*蛋白具有的胰蛋白酶抑制剂活性使其在植物抗虫转基因应用中显示出许多自身的优势。

除了以上概括的生物学功能外,近年的研究还表明,*sporamin*蛋白可能是一种有效的抗癌物质。因为研究者发现甘薯TI会抑制NB4骨髓性白血病细胞(NB4 promyelocytic leukemia cells)的生长<sup>[47]</sup>,并且最新的研究证实*sporamin*蛋白具有抑制人舌癌细胞增殖和诱导其凋亡的作用<sup>[48]</sup>。这也在一定程度上反映出*sporamin*蛋白具有作为抗癌物质应用于临床治疗的潜力。

在我们对*sporamin*蛋白的了解不断深入的同时,也看到关于该蛋白研究的一些方面还需要并值得进一步挖掘,例如,目前对其蛋白结构还不是很清楚,同时,抗虫性的研究也只集中在几个作物品种上,关于其其他作物上的抗虫作用还不得而知。另外,在癌症治疗中*sporamin*蛋白是否具有药用开发价值也急需后续研究证实。因此,对*sporamin*的研究是一项必要且有意义的工作。

## 参考文献(References)

- 1 Walter AM Jr, Collins WW, Purcell AE. Sweet potato protein: A review. *J Agric Food Chem* 1984; 32: 695-9.
- 2 Maeshima M, Sasaki T, Asahi T. Characterization of major proteins in sweet potato tuberous roots. *Photochem* 1985; 24: 1899-902.
- 3 Jefferson R, Goldsbrough A, Bevan M. Transcriptional regulation of a patatin-1 gene in potato. *Plant Mol Biol* 1990; 4: 995-1006.

- 4 Shewry PR. Tuber storage proteins. *Ann Bot* 2003; 91: 755-69.
- 5 程龙军, 郭得平, 葛红娟. 甘薯块根特异蛋白——sporamin的研究进展. *植物学通报* 2001; 18(6): 672-7.
- 6 Murakami S, Hattori T, Nakamura K. Structural differences in full-length cDNAs for two classes of sporamin, the major soluble protein of sweet potato tuberous roots. *Plant Mol Biol* 1986; 7: 343-55.
- 7 Hattori T, Nakagawa T, Maeshima M, Nakamura K, Asahi T. Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for sporamin, the major soluble protein of sweet potato tuberous roots. *Plant Mol Biol* 1985; 5: 313-20.
- 8 Wang SJ, Lin CT, Ho KC, Chen YM, Yeh KW. Nucleotide sequence of sporamin gene in sweet potato. *Plant Physiol* 1995; 108: 829-30.
- 9 Hattori T, Nakamura K. Genes coding for the major tuberous root protein of sweet potato: Identification of putative regulatory sequence in the 5' upstream region. *Plant Mol Biol* 1988; 11: 417-26.
- 10 Yao PL, Hwang MJ, Chen YM, Yeh KW. Site-directed mutagenesis evidence for a negatively charged trypsin inhibitory loop in sweet potato sporamin. *FEBS Lett* 2001; 496: 134-8.
- 11 Hattori T, Fukumoto H, Nakagawa S, Nakamura K. Sucrose-induced expression of genes coding for the tuberous root storage protein, sporamin, of sweet potato in leaves and petioles. *Plant Cell Physiol* 1991; 32: 79-86.
- 12 Ohto M, Nakamura-Kito K, Nakamura K. Induction of expression of genes coding for sporamin and  $\alpha$ -amylase by polygalacturonic acid in leaf-petiole cuttings of sweet potato. *Plant Physiol* 1992; 99: 422-7.
- 13 Hattori T, Nakagawa S, Nakamura K. High-level expression of tuberous root storage protein genes of sweet potato in stem of plantlets grown *in vitro* on sucrose medium. *Plant Mol Biol* 1990; 14: 595-604.
- 14 Yeh KW, Lin ML, Tuan SJ, Chen YM, Lin CY, Kao SS. Sweet potato (*Ipomoea batatas*) trypsin inhibitors expressed in transgenic tobacco plants confer resistance against *Spodoptera litura*. *Plant Cell Rep* 1997b; 16: 696-9.
- 15 Wang SJ, Lan YC, Chen SF, Chen YM, Yeh KW. Wound-response regulation of the sweet potato sporamin gene promoter region. *Plant Mol Biol* 2002; 48: 223-31.
- 16 Takeda S, Koyama Y, Takeuchi Y. Spatial patterns of sucrose-inducible and polygalacturonic acid-inducible expression of genes that encode sporamin and  $\beta$ -amylase in sweet potato. *Plant Cell Physiol* 1995; 36: 321-33.
- 17 Chen YC, William FS, Gregory P, Clarence AR. Six peptide wound signals derived from a single precursor protein in *Ipomoea batatas* leaves activate the expression of the defense gene sporamin. *Biol Chem* 2008; 283(17): 11469-76.
- 18 Yang J, Barr LA, Fahnestock SR, Liu ZB. High yield recombinant silk-like protein production in transgenic plants through protein targeting. *Transgenic Res* 2005; 14: 313-24.
- 19 Ziegler MT, Thomas SR, Danna KJ. Accumulation of a thermostable endo-1,4- $\beta$ -D-glucanase in the apoplast of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Mol Breeding* 2000; 6: 37-46.
- 20 Scheller J, Henggeller D, Viviani A, Conra U. Purification of spider-elastin from transgenic plants and application for human chondrocyte proliferation. *Transgenic Res* 2004; 13: 51-7.
- 21 Matsuoka K, Nakamura K. Propeptide of a precursor to a plant vacuolar protein required for vacuolar targeting. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 834-8.
- 22 Caimi PG, McCole LM, Klein TM, Kerr PS. Fructan accumulation and sucrose metabolism in transgenic maize endosperm expressing a *Bacillus amyloliquefaciens* SacB gene. *Plant Physiol* 1996; 110: 355-63.
- 23 Gnanasambandam A, Birch RG. Efficient developmental mistargeting by the sporamin NTPP vacuolar signal to plastids in young leaves of sugarcane and *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep* 2004; 23: 435-47.
- 24 Yano K, Matsui S, Tsuchiya T, Maeshima M, Kutsuna N, Hasezawa S, *et al.* Contribution of the plasma membrane and central vacuole in the formation of autolysosomes in cultured tobacco cells. *Plant Cell Physiol* 2004; 45(7): 951-7.
- 25 Hurley BA, Tran HT, Marty NJ, Park J, Snedden WA, Mullen RT, *et al.* The dual-targeted purple acid phosphatase isozyme AtPAP26 is essential for efficient acclimation of *Arabidopsis* to nutritional phosphate deprivation. *Plant Physiol* 2010; 7(153): 1112-22.
- 26 Kim H, Kang H, Jang M, Chang JH, MiaoYS, Jiang LW, *et al.* Homomeric interaction of AtVSR1 is essential for its function as a vacuolar sorting receptor. *Plant Physiol* 2010; 154: 134-48.
- 27 Yeh KW, Chen JC, Lin MI, Chen YM, Lin CY. Functional activity of sporamin from sweet potato (*Ipomoea batatas*)-a tuberous storage protein with trypsin inhibitor activity. *Plant Mol Biol* 1997a; 33: 565-70.
- 28 Hou WC, Lin HY. Dehydroascorbate reductase and monodehydroascorbate reductase activities of trypsin inhibitors, the major sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam) root storage protein. *Plant Sci* 1997; 128: 151-8.
- 29 Fernando MR, Nanri H, Yoshitake S, Nagata-Kuno K, Minakami S. Thioredoxin regenerates proteins inactivated by oxidative stress in endothelial cell. *Eur J Biochem* 1992; 209: 917-22.
- 30 Hou WC, Chen HJ, Han CH, Yang CY, Lin YH. Glutathione peroxidase-like activity of 33 kDa trypsin inhibitor from roots of sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam 'Tainong 57'). *Plant Sci* 2004; 166: 1541-6.
- 31 Huang GJ, Chen HJ, Chang YS, Sheu MJ, Lin YH. Recombinant sporamin and its synthesized peptides with antioxidant activities *in vitro*. *Bot Stud* 2007; 48: 133-40.
- 32 Huang GJ, Ho YL, Chen HJ, Chang YS, Huang SS, Huang HJ. Sweet potato storage root trypsin inhibitor and their peptic hydrolysates exhibited angiotensin converting enzyme inhibitory activity *in vitro*. *Bot Stud* 2008; 49: 101-8.
- 33 Huang SS, Huang HJ, Chiu CS, Chen HJ, Lin SS, Lin YC, *et al.* Sweet potato trypsin inhibitor with thioltransferase-like and glutathione S-transferase-like activities. *Bot Stud* 2009; 50: 443-50.
- 34 Shimabukuro RH, Swanson HR, Walsh WC. Glutathione conjugation: Atrazine detoxification mechanism in corn. *Plant Physiol* 1970; 46: 103-7.
- 35 Hong YF, Liu CY, Cheng KJ, Hour AL, Chan MT, Tseng TH, *et al.* The sweet potato sporamin promoter confers high-level

- phytase expression and improves organic phosphorus acquisition and tuber yield of transgenic potato. *Plant Mol Biol* 2008; 67: 347-61.
- 36 Tsukagoshi H, Saijo T, Shibata D, Morikami A, Nakamura K. Analysis of a sugar response mutant of *Arabidopsis* identified a novel B3 domain protein that functions as an active transcriptional repressor. *Plant Physiol* 2005; 6(138): 675-85.
- 37 Masaki T, Mitsui N, Tsukagoshi H, Nishii T, Morikami A, Morikami A, *et al.* ACTIVATOR of Spomin::LUC1/WRINKLED1 of *Arabidopsis thaliana* transactivates sugar-inducible promoters. *Plant Cell Physiol* 2005; 46(4): 547-56.
- 38 Bowles DJ. Defense related proteins in higher plants. *Annu Rev Biochem* 1990; 59: 873-907.
- 39 Koiwa H, Shade RE, Salzman KZ, D'Urzo MP, Murdock LL, Bressan RA, *et al.* A plant defensive cystatin(soyacystatin) targets cathepsin L-Like digestive cysteineproteinases (DvCALs) in the larval midgut of western corn rootworm (*Diabrotica virgifera*). *FEBS Lett* 2000; 471: 67-70.
- 40 Cai D, Thurau T, Tian Y, Lange T, Yeh KW, Jung C. Sporamin-mediated resistance to beet cyst nematodes (*Heterodera schachtii* Schm.) is dependent on trypsin inhibitory activity in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) hairy roots. *Plant Mol Biol* 2003; 51: 839-49.
- 41 Ding LC, Hu C, Yeh KW, Wang PJ. Development of insect-resistant cauliflower plants expressing the trypsin inhibitor gene isolated from local sweet potato. *Plant Cell Rep* 1998; 17: 854-60.
- 42 Chen HJ, Wang SJ, Chen CC, Yeh KW. New gene construction strategy in T-DNA vector to enhance expression level of sweet potato sporamin and insect resistance in transgenic *Brassica oleracea*. *Plant Sci* 2006; 171: 367-74.
- 43 De Bolle MFC, BUtaye KMJ, Coucke WJW, Goderies IJW, Wouters PFJ, Van Boxel N, *et al.* Analysis of the influence of promoter elements and a matrix attachment region on the inter-individual variation of transgene expression in populations of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* 2003; 165: 169-79.
- 44 Senthilkumar R, Cheng CP, Yeh KW. Genetically pyramiding protease-inhibitor genes for dual broad-spectrum resistance against insect and phytopathogens in transgenic tobacco. *Plant Biotechnol J* 2010; 8: 65-75.
- 45 Jongsma MA, Beekwilder J. Induced plant resistance to herbivory. Netherlands: Springer Science+Business Media BV Press, 2008, 235-51.
- 46 Rasko DA, Altherr MR, Han CS, Ravel J. Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiol Rev* 2005; 29(2): 303-29.
- 47 Huang GJ, Sheu MJ, Chen HJ, Chang YS, Lin YH. Growth Inhibition and Induction of apoptosis in NB4 promyelocytic leukemia cells by trypsin inhibitor from sweet potato storage roots. *J Agric Food Chem* 2007; 55: 2548-53.
- 48 Yao J, Qian CJ. Sporamin induce apoptosis in human tongue carcinoma cells by down-regulating Akt/GSK-3 signaling. *Fundam Clin Pharmacol* 2011; 25(2): 229-36.

## The Function of Sweet Potato's Special Tuber Storage Protein and Its Application in Engineering Plant Research

Lin Qiu<sup>1,2</sup>, Heng Dong<sup>1,2</sup>, Li Huang<sup>1,2\*</sup>, Jia-Shu Cao<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Cell & Molecular Biology, Institute of Vegetable Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;

<sup>2</sup>Department of Horticulture, the State Agricultural Ministry Laboratory of Horticultural Plant Growth, Development & Quality Improvement, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

**Abstract** Sporamin protein, a major soluble protein in sweet potato tuber, has root-specific, wound-induced expression pattern and Kunitz-type trypsin inhibitor activity. Potential protease inhibitor makes sporamin protein widely used in recent years' engineering plant research. This review is a summary of the current knowledge of sporamin protein on its structural features, expression regulation, biological activities as well as researches on engineering plant resistance against insects.

**Key words** sporamin; Kunitz-type trypsin inhibitor; insect resistance

Received: October 26, 2010 Accepted: February 11, 2011

This work was supported by Sci-Technology Project of Zhejiang Province (No.2009C32026) and Scientific Research Fund of Zhejiang Provincial Education Department (No.20070173)

\*Corresponding author. Tel: 86-571-88982188, E-mail: lihuang@zju.edu.cn