

植物抗菌蛋白 nsLTPs

李诚斌* 施庆珊 疏秀林 欧阳友生 陈仪本

广东省微生物研究所广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广州 510070

Plants Antimicrobial Proteins nsLTPs

LI Cheng-Bin*, SHI Qing-Shan, SHU Xiu-Lin, OUYANG You-Sheng, CHEN Yi-Ben

Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China

提要 植物抗菌蛋白——非特异性脂质转运蛋白(non-specific lipid transfer proteins, nsLTPs)是一类对细菌和真菌等有抑制或杀灭作用的蛋白质。它们的抗菌能力强, 有较好的耐热性, 稳定性高, 抗菌机制独特, 有证据证明nsLTPs参与植物的抗病反应。文章就此问题的研究进展作介绍。

关键词 nsLTPs; 植物抗菌蛋白; 植物病原菌; 抗菌活性

在自然条件下, 植物病原菌侵害农作物造成的危害与非生物因素造成的后果一样严重, 也是作物减产的原因之一。植物长期进化, 在其生长习性、结构、生理生化过程中形成了对病害的各种适应对策, 植物对微生物的防御有多种形式和方法, 根据它们之间的作用机制可以划成几方面: (1) 产生对病原菌直接呈现出拮抗性或抑制病菌生长的物质。这些物质包括病程相关蛋白(pathogenesis-related proteins, PRs), 如水解酶、葡聚糖酶(glucanases, PR-2)、几丁质酶(chitinases, PR-3); 抗菌蛋白: 渗透蛋白(osmotin)和类似(奇异果)甜蛋白(thaumatin-like proteins, TLP, PR-5); 抗菌肽: 硫堇或硫素(thionins)、防御素、凝集素(lectins)、核糖体失活蛋白(ribosome-inactivating proteins, RIP)、非特异性脂质转运蛋白(non-specific lipid transfer proteins, nsLTPs)、植物防卫素(defensins); 杀菌肽(cecropin B) (华志华等1999)。(2) 破坏或中和病菌产生的毒性物质, 如多聚半乳糖醛酸酶、草酸、脂肪酶。(3) 潜在的可增强植物抗性基因产物的表达, 包括提高过氧化物酶活性及木质素含量水平。(4) 诱导抗性因子调节的植物防御反应 (何培青等2005), 包括特异激发子、 H_2O_2 、水杨酸(salicylic acid, SA)、乙烯的产生。(5) 与过敏性坏死反应及无毒因子(Avr)有关的抗性基因产物的表达。其中对植物抗菌蛋白或多肽的研究一直是农业科技工作者关注的热点。在所有这些抗菌蛋白中, 对nsLTPs的研究比较活跃。作

为一种天然的抗菌剂, nsLTPs在工农业以及医药生产中有很大的利用前景。

上世纪70年代初, Abdelkader和Mazliak(1970)在检测花椰菜(*Brassica oleraceavar. botrytis* L.)小花和马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)块茎的脂质转移活性时, 发现了植物脂质转运蛋白(LTP)。Thoma等(1994)通过原位杂交方法发现它主要存在于拟南芥气生部分的表皮层中, 进一步的细胞学水平定位研究又发现它存在于植物的角质、表皮细胞壁和液泡中。30多年来, 人们对来源不同的LTP进行了全面的研究, 发现植物LTP一方面是比较专一的特异性底物, 如与磷脂酰乙醇胺(PE)的结合; 另一方面又与很多亲脂性分子结合, 对各种脂质体有广泛的亲合作用。因此常常称为非特异性脂质转运蛋白(nsLTPs)。

1 nsLTPs的来源和结构

nsLTPs广泛存在于生物界, 在哺乳动物的肝、脑、心脏、肿瘤和肺中(Zilversmit 1984)以及昆虫体内均已得到分离和纯化(Hirayama和Chino 1990), 在植物和微生物(酵母、真菌和一些细菌)中也大量存在。现已从单子叶和双子叶植物中, 如大麦(*Hordeum vulgare* L.)糊粉层(Gausling 1994)、

收稿 2005-11-28 修定 2006-03-14

资助 广东省科技攻关项目(2005B10401007)及广州市自然科学基金(2005J1-C0051)。

*E-mail: c. b. lee@163.com, Tel: 020-37656335

菠菜(*Spinacia oleracea* L.)叶片(Bouillon等1987)、玉米(*Zea mays* L.)种子(Henrissat等1988)、蓖麻(*Ricinus communis* L.)种子(Takishima等1988)、胡萝卜(*Daucus carota* L.)胚(Sterk等1991)、小麦(*Triticum durum* L.)种子(Castagnaro和Garcia-Olmedo 1994)、水稻(*Oryza sativa* L.)、种子(Yu等1988)、向日葵(*Helianthus annuus* L.)、黍(*Panicum miliaceu* L.) (Bernhard和Somerville 1989)、糖用甜菜(*Beta vulgaris* L.) (Kristensen等2000)以及马铃薯块茎等的各种组织器官中分离纯化得到nsLTPs。

nsLTPs 是一类小分子可溶性蛋白,在高等植物中占全部可溶性蛋白的4%。其氨基酸残基和等电点(pI)在不同的植物中数值是不相同的,其中分子量为9~10 kDa的植物nsLTPs能用凝胶层析或SDS-PAGE电泳检测出来。与动物和微生物中nsLTPs相比,从植物中分离纯化到的nsLTPs分子量比较小。根据分子量的大小,植物nsLTPs可分为两大类,即nsLTP1和nsLTP2 (Douliez等2000),分子量分别为9和7 kDa。通常,nsLTP1

主要存在于植物的地上部分器官,而nsLTP2主要存在于根部,但两者在种子都有。在各种不同的物种中nsLTPs的生化性质不尽相同,如从粉兰烟草(*Nicotiana glauca* L.)中分离得到的NgLTP1基因能够编码一个含有117个氨基酸残基的疏水蛋白,该蛋白含有21个氨基酸残基的信号肽序列,成熟的NgLTP1分子量为9.2 kDa, pI 8.3 (Smart等2000)。

nsLTPs具有良好的稳定性,在4℃可贮存数月之久,在高温下也有较好的稳定性,能耐100℃高温而结构不发生变化,即使在有变性剂存在情况下也十分稳定(Cammue等1995; Hinch等2001)。

植物nsLTPs含有的氨基酸数目在不同的物种之间有所不同。它们缺少酪氨酸,在保守区域含有8个半胱氨酸残基,这8个半胱氨酸残基基本排列模式为2/3-C-8-C-12/15-CC-19-C-1-C-21/23-C-13-C-4/18 (图1)。通过胰蛋白酶消化来源于蓖麻种子的nsLTPs时发现,半胱氨酸残基由4个二硫键连接而成(Takishima等1988)。

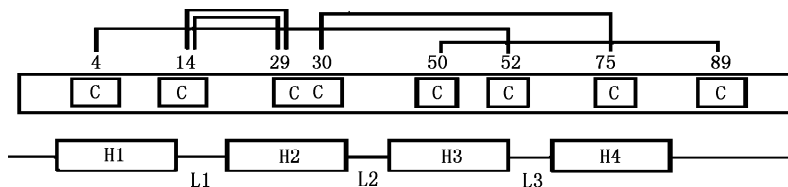


图1 植物nsLTP特征图(Takishima等1988)

nsLTP是由loops (L1~L3)连接4个 α -螺旋(H1~H4)所组成的多肽链,该肽链由91~95个氨基酸构成,其中8个保守的半胱氨酸(C)由4个二硫键连接。

起初人们根据植物nsLTPs的系列推定出其可能的三级结构主要是由 β -折叠构成的,但随后的研究发现否认了这种说法。在惰性气体存在下,采用X-射线技术和多维核磁共振(NMR)分光技术研究nsLTPs蛋白晶体(Quillin等2002)时,人们发现,nsLTPs蛋白都包含着由4个高度保守的二硫键组成4个 α -螺旋结构的稳定球状体(Heinemann等1996)。

2 nsLTPs的功能

尽管在基因组水平和蛋白质方面,人们对nsLTPs的结构和多样性有了很深刻的研究,但这些蛋白质的确切功能还是知之甚少。

植物nsLTPs基因的多样性,表明它具有多

种功能,这些功能取决于所表达的组织部位、生长阶段以及各种环境条件。植物nsLTPs参与多种生物学过程,可能具有的生理功能包括在体内参与角质单体合成、表层蜡质的生成(Sterk等1991)、体细胞胚胎发育(Coutos-Thevenot等1993)、开花(Park等2000)、抑制半胱氨酸蛋白酶(Conti等2001; Jones和Marinac 2000)以及对各种环境胁迫[病原菌(Molina等1993)、干旱(Treviño和O'Connell 1998)、热、冷、盐(Lindorff-Larsen和Winther 2001; Wu等2005)和温度变化(Torres-Schumann等1992; Douliez等2000)等]的适应性应答。还有报道认为,nsLTP可能是一种移动信号因子,参与系统获得抗性(systemic acquired

resistance, SAR)过程(Maldonado等2002)。最近, 还有人认为nsLTPs是植物食品过敏原, 能引起植物性食品的泛过敏(pan-allergens), 是一种与过敏发病相关的蛋白(Miguel-Moncin等2003; Pastorello等2003; Hoffmann-Sommergruber 2000; Malandain 2003)。

2.1 参与抗病原细菌或真菌反应 自然环境状态下, 在植物抵御病原微生物攻击的过程中, 植物应对的策略有很多, 其中之一的办法就是积累抗病蛋白, 直接抑制病原真菌孢子的萌发, 据此认为, 病原菌蛋白是一种植物体内普遍存在的蛋白质(Boman 1995)。在过去几十年中, 人们发现了许多种在体外(*in vitro*)能抑制真菌和细菌病原菌活性的植物蛋白, 并且已分离鉴定。有人认为nsLTPs属于抗微生物的病程相关蛋白(PRs)中的一种, 但与植物抗毒素不同, 它本身不会毒害植物的生长, 通常在种子中含量较高。另外还有一些LTP-类似物(LTPs-like)也有相当的抗菌活性, 如从洋葱(*Allium cepa* L.)种子中分离到的抗微生物蛋白Ace-AMP1, 与其它植物nsLTPs有76%的同源性, 且富含精氨酸。Ace-AMP1能抑制12种植物病原真菌, 对2种革兰氏阳性菌(G^+) [巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)和藤黄链球菌(*Sarcina lutea*)]有抑制作用, 但对革兰氏阴性菌(G^-)无抑制作用和对培养的人体细胞无害(Tassin等1998)。与其它植物的nsLTPs相比, Ace-AMP1不能从脂质体或线粒体上转移磷脂, 这种蛋白虽然与nsLTPs十分相似, 但在其内部的疏水孔穴被几个芳香族侧链所阻塞, 这或许正是该蛋白不能转移磷脂的原因(Poznanski等1999)。目前已有许多证据直接或间接地证明nsLTPs在体外有抗微生物活性。至于nsLTPs在体内(*in vivo*)的活性主要是通过转基因植物得到一些表现, 但其确切功能还不是很清楚。

不同种的病原细菌或真菌之间, 甚至同种不同株间对nsLTPs的敏感程度都存在相当大的差异(Molina等1996)。经分析发现, 不同来源的植物nsLTP家族在体外抗微生物活性的能力有明显差异。例如, 洋葱nsLTPs具有较广的抗菌谱, 而来源于小麦和玉米种子的nsLTPs只有很低的抗微生物活性, 萝卜(*Raphanus sativus* L.) nsLTPs只

有在低离子浓度的培养基上才有抑制真菌的活性(Cammue等1995)。

目前, 有报道认为nsLTPs还可能具有抗病毒的功能(Park等2002)。

2.2 抗病原菌 植物nsLTPs之所以列为植物防御蛋白系列, 就是因为它具有很强的抗植物病原菌活性。研究表明, 植物nsLTPs对细菌抑制活性表现为既能抑制革兰氏阴性菌, 又能抑制革兰氏阳性菌和其他多种真菌的生长, 但依个体来源不同而有一定的差异(表1)。

蓖麻种子nsLTPs对真菌茄腐镰刀菌(*Fusarium solani*)有较强的抗性, 对尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、腐霉病菌(*Pythium aphanidermatum*)、罗氏白绢小菌核菌(*Sclerotium rolfsii*)也有较明显效果; 对一些革兰氏阳性菌则有抑制效果, 但对革兰氏阴性菌鼠伤寒沙门菌(*Salmonella typhimurium*)没有作用(Wang等2004)。在向日葵种子等作物中发现nsLTPs有抗真菌活性, 其抑制茄腐镰刀菌孢子萌发的浓度为 $40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 50%抑制浓度为 $6.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ($\text{IC}_{50}=6.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) (Gonorazky等2005; Regente和de la Canal 2000)。

3 nsLTPs的抗菌机制

目前, 所有已发现的抗菌肽(蛋白)都是通过作用于微生物的质膜来表现它们抗菌活性的, 至于nsLTPs是如何抑制病原细菌和真菌的生长, 目前还不是很清楚。对此有很多种解释: 由于它有较高的等电点, 这有可能起到膜的渗透剂的作用(Kader 1996); 而有人却认为是真菌角质酶释放的角质单体引发了植物的抗原反应(Fauth等1998)。nsLTPs与角质单体组成的复合体能否就因此引发植物过敏反应或是其它防御反应呢? 这依然是一个值得讨论的问题。

有的学者认为nsLTPs的真正功能在于通过协助转运亲脂物质而保护损伤细胞免受微生物的侵害; 也有学者认为nsLTPs是通过跨越细胞膜使胞内物质溶出而达到抑制杀灭微生物效果。不过, 由于它与激发子(elicitins, 是一种可以与质膜受体结合并激活防疫反应的化合物)(Buhot等2001)有相同的生物受体、结构和生物学功能, 故可根据激发子的功能推测其在病原菌的侵入过程中具有早期识别的功能(Blein等2002)。

表1 植物nsLTPs对病原菌的抑制

植物器官	病原细菌	病原真菌
洋葱 (<i>A. cepa</i>) 种子	G ⁺ : 巨大芽孢杆菌 (<i>B. megaterium</i>)、藤黄链球菌 (<i>S. lutea</i>); G ⁻ (无抑制作用)	茄腐镰刀菌 (<i>F. solani</i>)
甜菜 (<i>B. vulgaris</i>) 叶片	—	甜菜褐斑尾孢霉 (<i>Cercospora beticola</i>)
小麦 (<i>T. durum</i>) 种子	—	交链孢霉 (<i>Alternaria brassicola</i>)、深褐斑菌 (<i>Ascochyta pisi</i>)、灰葡萄孢 (<i>Botrytis cinerea</i>)、尖孢镰刀霉 (<i>Fusarium oxysporum</i>)、大理菊轮枝霉 (<i>Verticillium dahliae</i>)
大麦 (<i>H. vulgare</i>) 叶片	茄假单胞菌 (<i>Pseudomonas solanacearum</i>) (EC ₅₀ [*] = 3×10 ⁻⁷ ~6×10 ⁻⁷ mg·L ⁻¹)	茄腐镰刀菌 (<i>F. solani</i>) (EC ₅₀ ^s = 3×10 ⁻⁶ ~2×10 ⁻⁵ mg·L ⁻¹)
蓖麻 (<i>R. communis</i>) 种子	尖孢镰刀菌 (<i>F. oxysporum</i>)、腐霉病菌 (<i>P. aphanidermatum</i>)、罗氏白绢小菌核菌 (<i>S. rolfsii</i>)	茄腐镰刀菌 (<i>F. solani</i>)
萝卜 (<i>R. sativus</i>) 种子	—	交链孢霉 (<i>A. brassicola</i>)、深褐斑菌 (<i>Ascochyta pisi</i>)、灰葡萄孢 (<i>B. cinerea</i>)、菜豆炭疽病菌 (<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>)、黄色镰刀菌 (<i>Fusarium culmorum</i>)、番茄萎凋病菌 (<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>)、豌豆尖镰孢病菌 (<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>pisii</i>)、红球赤壳菌 (<i>Nectria haematococca</i>)、甜菜多粘菌 (<i>Phoma betae</i>)、稻梨孢 (<i>Piricula ariaoryzae</i>)、钩状木霉 (<i>Trichoderma hamatum</i>)、大丽轮枝孢菌 (<i>Verticillium dahliae</i>)
向日葵 (<i>H. annuus</i>) 种子	—	链格孢菌 (<i>Alternaria alternata</i>)
豇豆 (<i>Vigna unguiculata</i> L.) 种子	—	炭疽刺盘菌 (<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>)、尖孢镰刀霉 (<i>F. oxysporum</i>)
凤仙花 (<i>Impatiens balsamina</i> L.) 种子	G ⁺ : 枯草芽孢杆菌 (<i>B. subtilis</i>)、藤黄微球菌 (<i>Micrococcus luteus</i>)、金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)、粪链球菌 (<i>Streptococcus faecalis</i>); G ⁻ : 解淀粉欧文氏菌 (<i>Erwinia amylovora</i>)、大肠杆菌 (<i>E. coli</i>)、普通变形菌 (<i>Proteus vulgaris</i>)、茄假单胞菌 (<i>P. solanacearum</i>)、野油菜黄单胞菌 (<i>Xanthomonas campestris</i>)、水稻黄单胞菌 (<i>Xanthomonas oryzae</i>)	赤斑交链孢霉 (<i>Alternaria longipes</i>)、灰葡萄孢 (<i>B. cinerea</i>)、球孢枝孢菌 (<i>Cladosporium sphaerospermum</i>)、黄色镰刀菌 (<i>F. culmorum</i>)、指状青霉 (<i>Penicillium digitatum</i>)、绿色木霉 (<i>Trichoderma viride</i>)、黑白轮枝孢菌 (<i>Verticillium albo-atrum</i>)

* 最大抑制效应为 50% 时的菌液浓度。

还有人认为 nsLTPs 插入到真菌膜中, 在中央疏水区形成一个孔, 这个小孔可引起胞内的离子流出, 从而导致真菌细胞死亡 (Regente 等 2005)。尽管其机制有很多种说法, 但可归结为 2 个最主要的机制: (1) 形成疏水保护层 (角质或软木脂); (2) 抑制真菌孢子的萌发 (Blein 等 2002)。但它与脂质转移之间有什么关系却不清楚 (Selitrennikoff 2001)。

4 nsLTPs 的应用研究

尽管植物本身具有防御逆境胁迫的能力, 但是植物间对非生物胁迫的耐性差别很大, 特别是

一些栽培植物的耐逆境胁迫能力较低。因此可通过植物基因工程改造, 转移外源的新基因来提高农作物的对病害抗性。鉴于 nsLTPs 具有较强的抗微生物活性, 人们曾尝试采用分子生物学手段研究其作用机制, 以求达到在植物体内得以表达, 从而提高相关植物对病原菌的抗性。目前, 在提高植物对疾病的抗性中, 一个比较常用的策略就是用组成型表达基因参与植物的抗性反应。尽管这种方法已广泛应用, 但采用组成型表达启动子也会产生一些预料外的结果, 因此, 选择内生性菌种特异性基因 (endogenous species-specific) 启动

子不仅可以克服这些缺点,而且还可以在特定的组织和阶段表达目的基因。

为了研究 nsLTPs 是否具有抗菌功能,以及抗菌功能和转脂功能间的关系,Ge 等(2003)将水稻的 nsLTPs 基因 LTP110 克隆到硫氧还蛋白融合表达载体上并导入到宿主菌 BL21 (DE3) trxB 中表达,纯化产物可以抑制稻瘟病 (*Magnaporthe grisea*) 孢子的萌发,在较低浓度 ($66 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 时即可以发挥活性。

已有越来越多的证据证明 nsLTPs 在体外具有抗菌能力 (Buhot 等 2001),但不能由此推定该蛋白在植物体内具有同样的抗菌活性,因此其在体内是否也具有这种抗菌能力便成为另一个需要解决的问题。有一些研究表明,抗菌肽在植物体内有直接的抗菌活性,特别是能通过转基因植物过表达 nsLTPs 来提高对病原微生物的抗性 (Molina 和 Garcia-Olmedo 1997)。

目前人们采用转基因方法已使一些作物产生较强的抗性。如在转基因烟草 (*N. tabacum*)、拟南芥中组成型过表达大麦 (*H. vulgare*) LTP2 基因,可以提高植株对病原菌丁香假单孢菌 (*Pseudomonas syringae*) 的抗性 (Molina 和 Garcia-Olmedo 1997)。与非转基因植株相比,转基因烟草 (*N. glauca*) 接种后接种点中坏死斑 (necrotic lesions) 所占的比例仅为 17%~38% (非转基因的为 78%); 转基因拟南芥接种点中坏死斑平均为 22%~38% (非转基因的为 76%)。

总之,随着人们对植物抗菌 nsLTPs 研究的深入,尤其是对其作用机制的认识逐步深入,其在农作物应对生物及非生物因素胁迫中的作用会更加清楚。

参考文献

何培青,柳春燕,郝林华,陈靠山,李光友(2005). 植物挥发性物质与植物病防御反应. 植物生理学通讯, 41 (1): 105~109
 华志华,汪晓玲,薛锐,高振宇,黄大年(1999). 抗菌肽 Cecropin B 对水稻植株生长的影响. 植物生理学通讯, 35 (5): 388~389
 Abdelkader AB, Mazliak P (1970). Lipid exchange between mitochondria, microsomes and cytoplasmic supernatant of potato or cauliflower cells. Eur J Biochem, 15 (2): 250~262
 Bernhard WR, Somerville CR (1989). Coidentity of putative amylase inhibitors from barley and finger millet with phospholipid transfer proteins inferred from amino acid sequence homology. Arch Biochem Biophys, 269 (2): 695~697
 Blein JP, Coutos-Thevenot P, Marion D, Ponchet M (2002).

From elicitors to lipid-transfer proteins: a new insight in cell signalling involved in plant defence mechanisms. Trends Plant Sci, 7 (7): 293~296
 Boman HG (1995). Peptide antibiotics and their role in innate immunity. Annu Rev Immunol, 13: 61~92
 Bouillon P, Drischel C, Vergnolle C, Duranton H, Kader JC (1987). The primary structure of spinach-leaf phospholipid-transfer protein. Eur J Biochem, 166 (2): 387~391
 Buhot N, Douliez JP, Jacquemard A, Marion D, Tran V, Maume BF, Milat ML, Ponchet M, Mikes V, Kader JC et al (2001). A lipid transfer protein binds to a receptor involved in the control of plant defence responses. FEBS Lett, 509 (1): 27~30
 Cammue BP, Thevissen K, Hendriks M, Eggermont K, Goderis IJ, Proost P, Van Damme J, Osborn RW, Guerbet F, Kader JC et al (1995). A potent antimicrobial protein from onion seeds showing sequence homology to plant lipid transfer proteins. Plant Physiol, 109 (2): 445~455
 Carvalhoa AO, Machadob OLT, Cunhac MD, Santosa IS, Gomesa VM (2001). Antimicrobial peptides and immunolocalization of a LTP in *Vigna unguiculata* seeds. Plant Physiology Biochem, 39 (2): 137~146
 Castagnaro A, Garcia-Olmedo F (1994). A fatty-acid-binding protein from wheat kernels. FEBS Lett, 349 (1): 117~119
 Conti A, Fortunato D, Ortolani C, Giuffrida MG, Pravettoni V, Napolitano L, Farioli L, Perono GL, Trambaioli C, Pastorello EA (2001). Determination of the primary structure of two lipid transfer proteins from apricot (*Prunus armeniaca*). J Chromatog B Biomed Sci Appl, 756 (1~2): 123~129
 Coutos-Thevenot P, Jouenne T, Maes O, Guerbet F, Grosbois M, Le Caer JP, Boulay M, Deloire A, Kader JC, Guern J (1993). Four 9-kDa proteins excreted by somatic embryos of grapevine are isoforms of lipid-transfer proteins. Eur J Biochem, 217 (3): 885~889
 Douliez JP, Michon T, Marion D (2000). Steady-state tyrosine fluorescence to study the lipid-binding properties of a wheat non-specific lipid-transfer protein (nsLTP1). Biochim Biophys Acta, 1467 (1): 65~72
 Fauth M, Schweizer P, Buchala A, Markstadter C, Riederer M, Kato T, Kauss H (1998). H_2O_2 in conditioned cucumber hypocotyl segments and enhanced activity of other H_2O_2 elicitors H_2O_2 in conditioned cucumber hypocotyl segments and enhanced activity of other H_2O_2 elicitors. Plant Physiol, 117 (4): 1373~1380
 Gausing K (1994). Lipid transfer protein genes specifically expressed in barley leaves and coleoptiles. Planta, 192 (4): 574~580
 Ge X, Chen J, Li N, Lin Y, Sun C, Cao K (2003). Resistance function of rice lipid transfer protein LTP110. J Biochem Mol Biol, 36 (6): 603~607
 Gonorazky AG, Regente MC, de la Canal L (2005). Stress induction and antimicrobial properties of a lipid transfer protein in germinating sunflower seeds. J Plant Physiol, 162 (6): 618~624
 Heinemann B, Andersen KV, Nielsen PR, Bech LM, Poulsen FM (1996). Structure in solution of a four-helix lipid binding protein. Protein Sci, 5 (1): 13~23
 Henrissat B, Popineau Y, Kader JC (1988). Hydrophobic-cluster

- analysis of plant protein sequences. A domain homology between storage and lipid-transfer proteins. *Biochem J*, 255 (3): 901~905
- Hincha DK, Neukamm B, Srour HA, Sieg F, Weckwarth W, Ruckels M, Lullien-Pellerin V, Schroder W, Schmitt JM (2001). Cabage cryoprotectin is a member of the nonspecific plant lipid transfer protein gene family. *Plant Physiol*, 125 (2): 835~846
- Hirayama Y, Chino H (1990). Lipid transfer particle in locust hemolymph: purification and characterization. *J Lipid Res*, 31 (5): 793~799
- Jones BL, Marinac LA (2000). Purification and partial characterization of a second cysteine proteinase inhibitor from ungerminated barley (*Hordeum vulgare* L.). *J Agr Food Chem*, 48 (2): 257~264
- Kader JC (1996). Lipid-transfer proteins in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 47: 627~654
- Kristensen AK, Brunstedt J, Nielsen KK, Roepstorff P, Mikkelsen JD (2000). Characterization of a new antifungal non-specific lipid transfer protein (nsLTP) from sugar beet leaves. *Plant Sci*, 155 (1): 31~40
- Lindorff-Larsen K, Winther JR (2001). Surprisingly high stability of barley lipid transfer protein, LTP1, towards denaturant, heat and proteases. *FEBS Lett*, 488 (3): 145~148
- Malandain H (2003). Allergies associated with both food and pollen. *Allerg Immunol (Paris)*, 35 (7): 253~256
- Maldonado AM, Doerner P, Dixon RA, Lamb CJ, Cameron RK (2002). A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in *Arabidopsis*. *Nature*, 419 (6905): 399~403
- Miguel-Moncín M, Krail M, Scheurer S, Enrique E, Alonso R, Conti A, Cistero-Bahima A, Vieths S (2003). Lettuce anaphylaxis: identification of a lipid transfer protein as the major allergen. *Allergy*, 58: 511~517
- Molina A, Diaz I, Vasil IK, Carbonero P, Garcia-Olmedo F (1996). Two cold-inducible genes encoding lipid transfer protein LTP4 from barley show differential responses to bacterial pathogens. *Mol Gen Genet*, 252 (1~2): 162~168
- Molina A, Garcia-Olmedo F (1997). Enhanced tolerance to bacterial pathogens caused by the transgenic expression of barley lipid transfer protein LTP2. *Plant J*, 12 (3): 669~675
- Molina A, Segura A, Garcia-Olmedo F (1993). Lipid transfer proteins (nsLTPs) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant pathogens. *FEBS Lett*, 316 (2): 119~122
- Park CJ, Shin R, Park JM, Lee GJ, You JS, Paek KH (2002). Induction of pepper cDNA encoding a lipid transfer protein during the resistance response to tobacco mosaic virus. *Plant Mol Biol*, 48 (3): 243~254
- Park SY, Lord EM, Walling LL, Nothnagel EA, Eckard KJ, Mollet JC, Jauh GY (2000). A lipid transfer-like protein is necessary for lily pollen tube adhesion to an *in vitro* stylar matrix. *Plant Cell*, 12 (1): 151~164
- Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Ortolani C, Fortunato D, Giuffrida MG, Perono GL, Calamari AM, Brenna O, Conti A (2003). Identification of grape and wine allergens as an endochitinase 4, a lipid-transfer protein, and a thaumatin. *J Allergy Clin Immunol*, 111: 350~359
- Poznanski J, Sodano P, Suh SW, Lee JY, Ptak M, Vovelle F (1999). Solution structure of a lipid transfer protein extracted from rice seeds. Comparison with homologous proteins. *Eur J Biochem*, 259 (3): 692~708
- Quillin ML, Breyer WA, Griswold IJ, Matthews BW (2002). Size versus polarizability in protein-ligand interactions: binding of noble gases within engineered cavities in phage T4 lysozyme. *J Mol Biol*, 302 (4): 955~977
- Regente MC, de la Canal L (2000). Purification, characterization and antifungal properties of a lipid-transfer protein from sunflower (*Helianthus annuus*) seeds. *Physiol Plant*, 110 (2): 158~163
- Regente MC, Giudici AM, Villalain J, de la Canal L (2005). The cytotoxic properties of a plant lipid transfer protein involve membrane permeabilization of target cells. *Lett Appl Microbiol*, 40 (3): 183~189
- Selitrenekoff CP (2001). Antifungal proteins. *Appl Environ Microbiol*, 67 (7): 2883~2894
- Smart LB, Cameron KD, Bennett AB (2000). Isolation of genes predominantly expressed in guard cells and epidermal cells of *Nicotiana glauca*. *Plant Mol Biol*, 42 (2): 857~869
- Sterk P, Booij H, Schellekens GA, Van Kammen A, De Vries SC (1991). Cell-specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene. *Plant Cell*, 3 (9): 907~921
- Takishima K, Watanabe S, Yamada M, Suga T, Mamiya G (1988). Amino acid sequences of two nonspecific lipid-transfer proteins from germinated castor bean. *Eur J Biochem*, 177 (2): 241~249
- Tassin S, Broekaert WF, Marion D, Acland DP, Ptak M, Vovelle F, Sodano P (1998). Solution structure of *Ace*-AMP1, a potent antimicrobial protein extracted from onion seeds. Structural analogies with plant nonspecific lipid transfer proteins. *Biochemistry*, 37 (11): 3623~3637
- Thoma S, Hecht U, Kippers A, Botella J, De Vries S, Somerville C (1994). Tissue-specific expression of a gene encoding a cell wall-localized lipid transfer protein from *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 105 (1): 35~45
- Torres-Schumann S, Godoy JA, Pintor-Toro JA (1992). A probable lipid transfer protein gene is induced by NaCl in stems of tomato plants. *Plant Mol Biol*, 18 (4): 749~757
- Treviño MB, O'Connell MA (1998). Three drought-responsive members of the nonspecific lipid-transfer protein gene family in *Lycopersicon pennellii* show different developmental patterns of expression. *Plant Physiol*, 116 (4): 1461~1468
- Wang SY, Wu JH, Ng TB, Ye XY, Rao PF (2004). A non-specific lipid transfer protein with antifungal and antibacterial activities from the mung bean. *Peptides*, 25 (8): 1235~1242
- Wu YR, Wang QY, Ma YM, Chu CC (2005). Isolation and expression analysis of salt up-regulated ESTs in upland rice using PCR-based subtractive suppression hybridization method. *Plant Sci*, 168 (3): 847~853
- Yu YG, Chung CH, Fowler A, Suh SW (1988). Amino acid sequence of a probable amylase/protease inhibitor from rice seeds. *Arch Biochem Biophys*, 265 (2): 466~475
- Zilversmit DB (1984). Lipid transfer proteins. *J Lipid Res*, 25 (13): 1563~1569