酪氨酸蛋白磷酸酶可能影响 ABA 的积累和参与植物细胞水分胁迫信号传递

邢 宇① 王幼群② 张蜀秋② 黄从林③ 吴忠义③ 贾文锁①②*

(①中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100094; ②植物生理生化国家重点实验室, 北京 100094;
③北京农业生物技术研究中心, 北京 100089. * 联系人, E-mail: jiaws2000@yahoo.com)

摘要 以水分亏缺诱发 ABA 积累的"刺激-反应"系统为模型对玉米胚芽鞘细胞的逆境信号传递进行了研究. 结果表明, 水分亏缺诱导的 ABA 积累可被质膜 H^+-ATPase 及酪氨酸蛋白磷酸酶(protein tyrosine phosphatase, PTPase)专一抑制剂 $NaVO_3$ 阻断. 水分亏缺对质膜 H^+-ATPase 活性没有影响, 质膜 H^+-ATPase 激活剂也不能诱导 ABA 积累, 表明 ABA 积累和质膜 H^+-ATPase 没有关系. 进一步研究表明, 水分亏缺诱导的 ABA 积累可被 PTPase 专一抑制剂 PAO 抑制, 并且水分亏缺可大大激活蛋白磷酸酶活性, 表明蛋白磷酸酶参与了细胞逆境信号传递. 脱水玉米胚芽鞘中至少含有 4 种以上的蛋白磷酸酶组分, 其中仅有 1 个组分是对 $NaVO_3$ 敏感的. 对 $NaVO_3$ 敏感的蛋白磷酸酶组分进一步纯化, 最终得到了在 SDS-PAGE 上惟一的分子量为 66 kD 的蛋白组分. 该蛋白磷酸酶对 PTPase 专一底物呈现很高的活性, 最适 pH 为 6.0. 除可被 PTPase 特征抑制剂 $NaVO_3$ 抑制外, 还可被其他 PTPase 特征抑制剂如 PAO, Zn^{2+}, MO_3^{3+} 抑制, 但活性不受 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的影响, 表明该纯化的蛋白磷酸酶可能为 PTPase. 除对 PTPase 专一抑制剂敏感外, 该纯化的蛋白酶活性还对 ABA 积累的阻断剂 DTT 敏感, 这为 PTPase 参与 ABA 积累调控的细胞逆境信息传递提供了有力证据.

关键词 水分亏缺 ABA H^+-ATPase $NaVO_3$ 酪氨酸蛋白磷酸酶(PTPase)

在水分亏缺等环境胁迫下, 植物可以通过对环境胁迫的感知和反应实现植物的抗逆性. 这种感知和反应的机制是一个复杂的细胞逆境信息传递过程, 目前, 尽管对逆境应答基因进行了大量的鉴定和研究, 但对调控基因表达的上游信号传递的了解仍然十分贫乏[1~3].

众所周知, 脱落酸(abscisic acid, ABA)作为逆境信号在植物的抗逆性中具有重要的作用, 而 ABA 作为逆境信号的根本条件是水分亏缺时 ABA 可以进行快速而大量的积累[4,5]. 水分亏缺诱导 ABA 积累过程实际上是一个细胞逆境信息过程. 该过程包括细胞对水分亏缺的识别和转导, 细胞信号传递及编码 ABA 合成关键酶基因的调控. 对水分亏缺诱导 ABA 积累的研究不仅可以揭示水分亏缺触发的细胞信号传递, 而且对抗逆基因工程的研究具有重要意义.

本实验室对 Ca^{2+}, CaM, CDPK, PKC, MAPK 及细胞骨架等信息组分或信息传递链与 ABA 积累的关系进行了广泛的研究, 没有发现它们之间有何联系[6~8]. 十分有趣的是, 我们的研究发现, $NaVO_3$ 可阻断水分亏缺诱导的 ABA 积累. $NaVO_3$ 为质膜 H^+-ATPase 和酪氨酸蛋白磷酸酶(protein tyrosine phosphatase, PTPase)的专一抑制剂[9~11]. 大量研究表明, PTPase 在动物细胞的信息传递中起着非常重要的作用[9,10]. 在植物细胞中, 由于还没有发现典型的酪氨酸蛋白激酶, 人们忽视了对 PTPase 的研究. 目前, 虽然证实了植物细胞中 PTPase 的存在[11~13], 但对其生物功能的了解较少. 动物细胞中由酪氨酸蛋白激酶和 PTPase 催化的蛋白酪氨酸可逆磷酸化信息传递常常受到氧化还原的调控[14~16]. 我们以前的研究发现, ABA 积累可被还原剂阻断[7], 这意味着水分亏缺诱导 ABA 积累可能和蛋白酪氨酸可逆磷酸化信息传递链有关. ABA 积累被 PTPase 抑制剂 $NaVO_3$ 阻断进一步激发了我们对蛋白磷酸酶的兴趣. 本文以玉米胚芽鞘为材料对 PTPase 参与水分亏缺触发的细胞信号传递及 ABA 积累调控进行了研究.

1 材料与方法

(ⅰ) 材料. 玉米种子(*Zea maize*)经浸泡催芽后, 播种在装有蛭石和细沙混合物(2∶1)的 8 cm × 30 cm × 60 cm 的盘中, 28℃黑暗培养 5 d. 当胚芽鞘长度为

3 cm 左右时, 取胚芽鞘备用.

(ⅱ) 药理学实验. 将胚芽鞘用锋利双面刀片切成 1 cm 小段并从中间剖开. 将经过切割的胚芽鞘分别抽真空浸入不同浓度的 $NaVO_3$, Phenylarsine Oxide (PAO)或壳梭孢菌素(fusicoccin)溶液中, 25℃温育 30 min 后, 迅速取出并进行水分亏缺处理.

(ⅲ) 水分亏缺处理. 将经过药剂或没有药剂处理的胚芽鞘, 25℃下吹干燥空气进行脱水处理. 当失重 30%时, 将其密封在 100%湿度的容器中, 25℃继续温育 6 h 后, 用液氮速冻后, 分别进行 ABA 分析及 PTPase 的纯化. 为观察水分亏缺处理对磷酸酶活性的影响, 材料经脱水处理后, 可在不同的温育时间内取样, 然后液氮速冻, 测其 PTPase 活性.

(ⅳ) 质膜制备. 参照 Tassoni 等人[17]的方法并加以改进. 以下所有操作均在 4℃下进行. 液氮速冻的胚芽鞘样品以 4 倍体积的缓冲液 A 研磨. 缓冲液 A 组成为: 25 mmol/L MES-Tris (pH 7.2), 250 mmol/L 蔗糖, 10%甘油, 0.5% BSA, 2 mmol/L EDTA, 2 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF 和 5 mmol/L 巯基乙醇. 样品经 4 层纱布过滤后, 10000 × g 离心 30 min. 上清液以 100000 × g 离心 1 h, 沉淀即微粒体组分. 微粒体用缓冲液 B 悬浮. 缓冲液 B 组成为: 5 mmol/L KH_2PO_4 (pH 7.8), 250 mmol/L 蔗糖 和 3 mmol/L KCl. 细胞质膜用含有 6.2% (质量比)右旋糖酐 T 500/PEG 3350 的缓冲液 C 进行纯化. 缓冲液 C 的组成为: 3 mmol/L KCl, 250 mmol/L 蔗糖, 1 mmol/L BTP/MES (pH 7.0). 第 3 次纯化的上相以 7 倍体积含有 0.1 mg/mL Brij 58 的缓冲液 C 稀释, 100000 × g 离心 1 h, 沉淀即质膜组分.

(ⅴ) H^+-ATPase 分析. 反应缓冲液 A 组成为: 40 mmol/L BTP/MES (pH 6.5), 0.1 mmol/L Na_2MoO_4, 50 mmol/L KNO_3, 5 mmol/L $MgSO_4$, 5 mmol/L ATP 和 0.1 mg/mL Brij 58. 用 10 μg 蛋白样品启动反应. 30℃反应 30 min 后, 加入 0.5 mL 终止液(5% SDS, 2 mol/L H_2SO_4 配制的 0.5 mol/L $(NH4)_2MoO_4$)终止反应. 释放的 Pi 按 Chen 等人[18]的方法测定. H^+-ATPase 活性以 200 μmol/L 矾酸钠的抑制计算.

(ⅵ) ABA 放射免疫测定. ABA 的测定采用 Quarrie 等人[19]的放射免疫分析法并略加改进. 按 1∶3(质量体积比)加双蒸水冰浴研磨, 4℃黑暗震荡浸提 24 h, 15000 × g 离心 30 min, 取上清 50 μL, 分别加入 100 μL ^{3}H-ABA 和 100 μL ABA 单克隆抗体的磷酸盐缓冲液. 4℃孵育 45 min 后加入等体积的饱和硫酸铵以沉淀结合态的 ^{3}H-ABA, 50%的硫酸氨洗涤沉淀后, 11000 × g 离心. 结合态的 ^{3}H-ABA 沉淀用 100 μL 双蒸水溶解后, 加闪烁液, 在 Packard 2200CA 液闪谱仪上测放射性. 根据拟合的放免曲线计算 ABA 浓度.

(ⅶ) 磷酸酶活性测定. 总反应体系为 50 μL, 其中含 35 μL 反应缓冲液 B(50 mmol/L MOPS (pH 6.0), 1 mmol/L EDTA, 10%甘油, 500 μmol/L PMSF), 5 μL 蛋白磷酸酶底物(2 mmol/L 通用底物 pNPP 或 1 mmol/L PTPase 底物 END(pY)INASL 及磷酸酪氨酸), 10 μL 蛋白样品. 反应在 25℃进行 30 min 后, 加 Pi 分析试剂终止反应. 释放的 Pi 以 Malachite-molybdate 染料显色, 650 nm 测定光吸收值[17]. 蛋白磷酸酶活性以单位时间单位蛋白样品释放 Pi 的量计算.

(ⅷ) PTPase 的纯化. 蛋白提取和脱盐: 200 g 胚芽鞘用 3 倍体积缓冲液 D (50 mmol/L MOPS (pH 7.4), 2 μg/mL 亮抑酶肽(leupeptin), 2 μg/mL 胃蛋白酶抑制剂(pepstatin A), 1 mmol/L PMSF, 1 mmol/L EDTA, 10%甘油, 0.1% Triton X-100)研磨, 4 层纱布过滤, 10000 × g 离心 30 min, 上清液用 Sephadex G-25 柱脱盐. DEAE-Sepharose 柱层析: DEAE-Sepharose 柱(3.5 cm × 20 cm)用缓冲液 E(50 mmol/L MOPS (pH 7.4), 2 μg/mL 亮抑酶肽, 2 μg/mL 胃蛋白酶抑制剂, 1 mmol/L PMSF, 1 mmol/L EDTA, 5%甘油)平衡. 样品上柱后, 用 2000 mL 缓冲液 E 预洗脱至流出蛋白浓度为零. 用 1500 mL 0 ~ 0.7 mol/L NaCl 梯度洗脱, 每管收集 10 mL, 以 pNPP 为底物测定磷酸酶活性, 将活性管溶液(DEAE 洗脱液)合并. SP-Sepharose 柱层析: 上述 DEAE 洗脱液用缓冲液 F (50 mmol/L 乙酸钠缓冲液(pH 4.7), 1 mmol/L PMSF, 1 mmol/L EDTA, 5%甘油)透析. SP-Sepharose 柱(2.6 cm × 20 cm)用缓冲液 F 平衡上样后, 再用缓冲液 F 预洗脱至蛋白浓度为零. 0 ~ 0.6 mol/L NaCl 梯度洗脱. 每管收集 5 mL, 以 pNPP 为底物测定磷酸酶活性, 将活性管溶液(SP 洗脱液)合并. 检测各 SP 洗脱液组分对 $NaVO_3$ 反应, 将对 $NaVO_3$ 敏感的 SP 洗脱液组分用 10 kD 超滤管浓缩至 5 mL. Sephacryl S-200 分子筛层析: Sephacryl S-200 柱(2.6 cm × 100 cm)用缓冲液 F 平衡, 样品上柱, 缓冲液 F 洗脱, 每管收集 3 mL. 以 pNPP 为底物测定磷酸酶活性, 将活性管溶液(S-200 洗脱液)合并, 10 kD 超滤管浓缩至 0.5 mL, 过第二次 Sephacryl S-200

柱(1 cm × 80 cm), 用缓冲液 F 洗脱, 每管收集 0.5 mL. 以 pNPP 为底物测定磷酸酶活性, 将活性管溶液合并.

2 结果

2.1 水分亏缺诱导 ABA 积累和质膜 H^+-ATPase 及蛋白磷酸酶的关系

水分亏缺可导致玉米胚芽鞘大幅度积累 ABA, 与没有胁迫的对照相比, ABA 含量增加 10 倍左右(图 1). 水分亏缺诱导的 ABA 积累对 $NaVO_3$ 敏感, 1 mmol/L $NaVO_3$ 可完全阻断 ABA 积累. 由于 $NaVO_3$ 是质膜 H^+-ATPase 的抑制剂, 同时又是酪氨酸蛋白磷酸酶专一抑制剂, 我们首先对 ABA 积累与质膜 H^+-ATPase 的关系进行了研究. 结果表明, 水分亏缺对质膜 H^+-ATPase 活性没有影响(图 2), 同时质膜 H^+-ATPase 的激活剂壳梭孢菌素也不能诱导 ABA 的积累(图 1), 说明 ABA 积累和质膜 H^+-ATPase 没有关系.

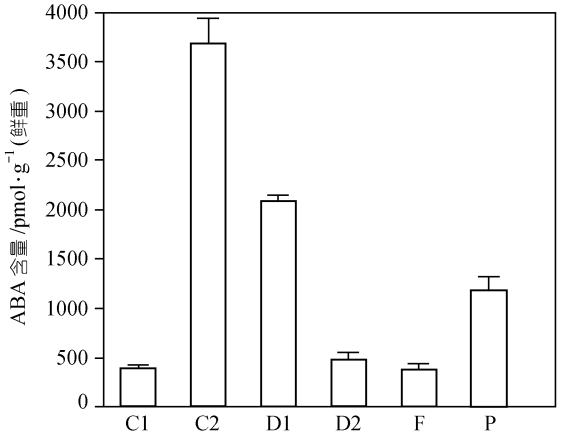

图 1 不同药剂处理对玉米胚芽鞘水分亏缺诱导 ABA 积累的影响

C1 示没有水分亏缺处理的对照, C2 示水分亏缺处理的对照, D1 示水分亏缺 + 0.5 mol/L $NaVO_3$, D2 示水分亏缺 + 1 mol/L $NaVO_3$, F 示 50 μmol/L Fusicossin 处理, P 示水分亏缺 + 100 μmol/L PAO

由于没有能证实 ABA 积累与质膜 H^+-ATPase 有联系, 我们对 ABA 积累和磷酸酶的关系进行了深入研究. 结果表明, 水分亏缺诱导的 ABA 积累可被酪氨酸蛋白磷酸酶专一抑制剂 PAO 有效地抑制(图 1), 同时水分亏缺可大大激活磷酸酶的活性(图 2). 此外, 磷酸酶激活的时间进程超前于 ABA 积累, 即在 ABA 水平大幅度上升之前磷酸酶已被有效地激活(图 2), 表明磷酸酶可能参与了水分亏缺诱导 ABA 积累的细胞信号传递.

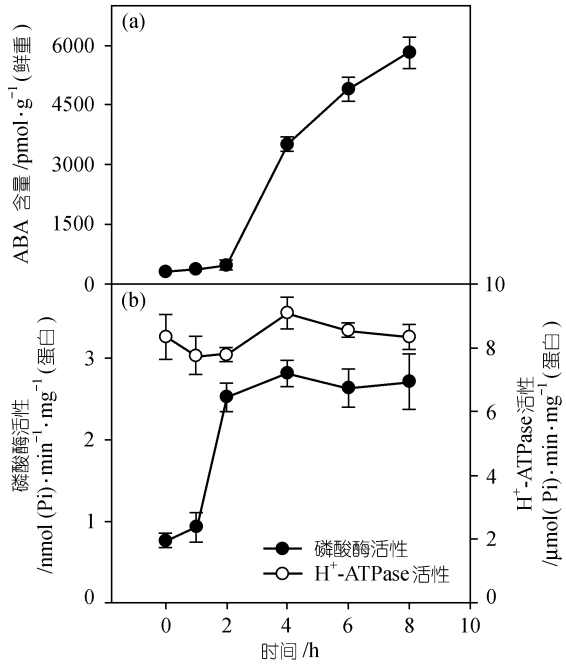

图 2 水分亏缺时 ABA 含量(a)和蛋白磷酸酶及质膜 H^+-ATPase 活性变化(b)

2.2 蛋白磷酸酶的纯化

鉴于酪氨酸蛋白磷酸酶专一抑制剂可阻断水分亏缺诱导 ABA 积累以及水分亏缺可有效激活磷酸酶活性, 我们对玉米胚芽鞘中的蛋白磷酸酶进行了纯化和鉴定. 总蛋白经阴离子交换介质 DEAE-Sepharose 柱层析后可检测出 2 个主要的活性峰 D1 和 D2(图 3(a)). 活性峰 D1 经阳离子交换介质 SP-Sepharose HP 柱层析后检测到 2 个主要峰 D1-SP1 和 D1-SP2(图 3(b)); 活性峰 D2 经阳离子交换介质 SP-Sepharose HP 柱层析后也得到 2 个主要的活性峰即 D2-SP1 和 D2-SP2(图 3(c)). 鉴于酶活组分甚多, 不可能对所有的酶活组分都进行彻底的分离, 为此, 我们对各酶活组分的性质进行了鉴定以期找到感兴趣的酶活组分, 即 $NaVO_3$ 敏感组分. 结果发现, 在所获得的 4 个酶活组分中只有 1 个组分即 D1-SP2 是对 $NaVO_3$ 敏感的, 500 μmol/L $NaVO_3$ 可抑制酶活 80%以上. 根据以上结果, 我们对 $NaVO_3$ 敏感的酶活组分即 D1-SP2 进行了进一步纯化. SD1-SP2 经分子筛 Sephacryl S-200 纯化后得到了一个酶活峰, 该酶活组分经 30 kD 超滤后过第 2 次分子筛后仍然是一个酶活峰(图 3(d)).

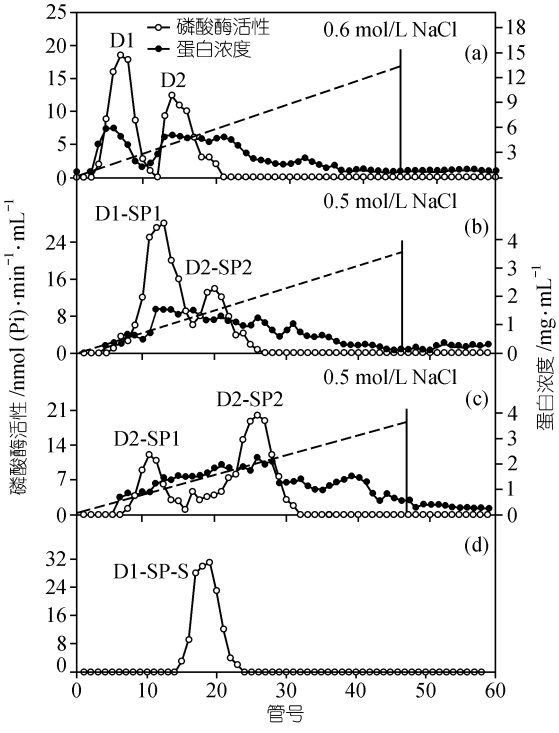

图 3 磷酸酶的纯化

(a) 示 DEAE-Sepharose 层析, (b) 示 D1 组分的 SP-Sepharose 层析, (c) 示 D2 组分的 SP-Sepharose 层析柱, (d) 示 D1-SP2 组分的第 2 次 Sephacryl S200 分子筛

图 4 为各纯化步骤蛋白磷酸酶的 SDS-PAGE. 可以看出, 蛋白经阴、阳 2 个交换柱层析后可除去大部分杂蛋白, 过 2 次分子筛后, SDS-PAGE 电泳图谱上无论是考马斯亮蓝染色还是银染色都是一条分子量为 66 kD 的蛋白带, 说明蛋白已得到均一的纯化.

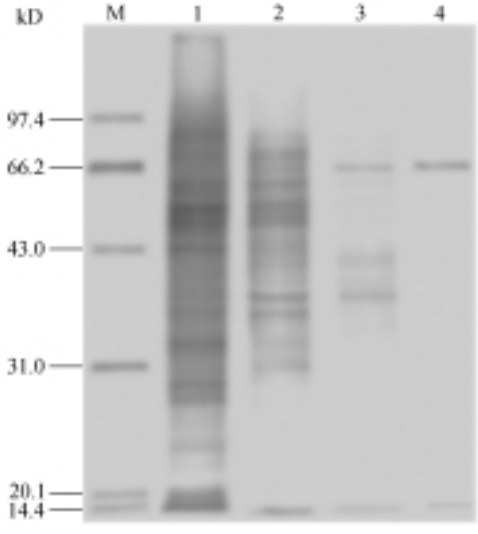

图 4 蛋白纯化过程中各蛋白组分的 SDS-PAGE

1 示总蛋白, 2 示 DEAE-Sepharose, 3 示 SP-Sepharose, 4 示 2 次 Sephacryl S2000, M 示标准分子量

2.3 纯化蛋白磷酸酶的特性分析

图 5 为所纯化的蛋白磷酸酶活性随 pH 的变化, 该酶在酸性条件下呈现较高的活性, 最适 pH 为 6.0, pH 8.0 以上时酶活性大大降低, pH 8.5 以上时酶活性已受到强烈的抑制.

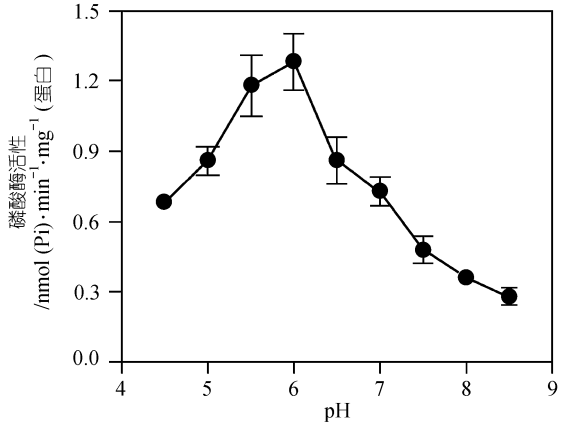

图 5 不同 pH 下磷酸酶的活性

所纯化的蛋白磷酸酶除对 $NaVO_3$ 敏感外, 还对其他酪氨酸蛋白磷酸酶特征抑制剂 Zn^{2+}, 钼酸盐和 PAO 敏感, 但是 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 对酶活性没有影响, EDTA 对酶活性有明显的促进作用. 令人感兴趣的是, DTT 可以有效地抑制酶的活性(表 1). 以上特征强烈表明, 所纯化的磷酸酶为酪氨酸蛋白磷酸酶.

表 1 酪氨酸蛋白磷酸酶的生化特性

效应物	浓度/mmol · L^{-1}	相对活性/%
无		100
$NaVO_3$	0.5	8
Ca^{2+}	2	93
Zn^{2+}	2	22
Mg^{2+}	2	96
钼酸盐	0.5	53
EDTA	1	168
DTT	1	36
PAO	0.1	38

为进一步证实所纯化的磷酸酶为酪氨酸蛋白磷酸酶, 我们对该酶的底物特异性进行了检测, 结果表明, 所纯化的磷酸酶除对 pNPP 有很高的活性外, 对酪氨酸蛋白磷酸酶底物特异 END(pY)INASL 呈现更

高的活性. 此外, 它对 O-磷酸 DL-酪氨酸也呈现较高的活性(表 2). 以上结果进一步说明, 所纯化的磷酸酶为酪氨酸蛋白磷酸酶.

表 2 酪氨酸蛋白磷酸酶对不同底物的活性

底物	相对活性/%
pNPP	100
END(pY)INASL	157
O-磷酸-DL-酪氨酸	89

3 讨论

由丝氨酸/苏氨酸(Ser/Thr)蛋白激酶和蛋白磷酸酶以及由 Ser/Thr 和酪氨酸(Tyr)双功能蛋白激酶和磷酸酶催化的可逆蛋白磷酸化在植物细胞的信号传递中起着非常重要的作用[20~22], 与这两大类信号系统相关的信号组分或信息传递链如 Ca^{2+}, CaM, cAMP, IP_3, DG, PKC, CDPK 和 MAPK 等介导了多种多样的"刺激-反应". 因此, 我们一直试图用这些比较熟悉的信号组分或信息系统来解释植物细胞对各种刺激所作出的反应. 由酪氨酸和组氨酸蛋白激酶及磷酸酶(PTPase)催化的可逆蛋白磷酸化在动物及原核生物的细胞信息传递中起着非常重要的作用. 但是, 长期以来, 人们大大忽视了这 2 个信息系统在植物细胞中的作用. 直到最近, 在拟南芥等模式植物中证实了组氨酸蛋白激酶存在, 不仅如此, 研究还揭示了在乙烯及细胞分裂素的信号传递以及细胞的渗透感应中组氨酸蛋白激酶可能起着非常重要的作用[23,24]. 本研究不仅发现了 PTPase 专一抑制剂可以阻断水分亏缺诱导 ABA 积累的细胞信号传递, 而且还证实 PTPase 可以被水分亏缺激活. 这些结果不仅揭示了 PTPase 在植物细胞中存在的广泛性, 而且还说明 PTPase 可能在植物细胞的信号传递中具有重要的作用. PTPase 的成功纯化为采用分子生物学技术直接鉴定 PTPase 的功能打下了坚实的基础, 对深入、系统地探索 PTPase 的功能具有深远的意义.

对 PTPase 了解贫乏的主要原因之一是其分析的困难. 此外, PTPase 活性相对较低且容易失活也是 PTPase 研究的主要障碍. 目前, 常用的 PTPase 分析方法是用人工合成底物, 即用酪氨酸蛋白激酶将 γ-^{32}P-ATP 转移到底物蛋白或肽链上(如 MBP 或多聚 Glu-Tyr 等), 该方法虽可满足少量的 PTPase 分析, 但对 PTPase 的纯化来说几乎是不可能的事情, 这是因为 PTPase 的纯化不仅依赖于对 PTPase 活性的大量检测而且整个纯化过程时间较长, 而底物制备的困难及同位素衰变及操作的麻烦严重限制了对 PTPase 快速和大量的检测. 本研究采用蛋白磷酸酶的通用底物 pNPP 代替 PTPase 专一底物对 PTPase 进行了分析, 这是因为无论在动物细胞还是植物细胞, 所有的 PTPase 都对 pNPP 呈现出非常高的活性, pNPP 实际上已成为最常用的检测 PTPase 的底物之一[9,11~13], 为此, 我们可以通过分析对 $NaVO_3$ 敏感的磷酸酶组分来揭示 PTPase. 研究发现, PTPase 特别容易失活, 在稀溶液中超过 5 h, PTPase 活性将丧失殆尽. 以 pNPP 为底物进行 PTPase 分析的简便易行大大缩短了 PTPase 纯化的流程时间, 为 PTPase 的成功纯化提供了保障.

众所周知, ABA 不仅可以作为长距离信号而且还可以作为细胞信号介导一系列基因的协同表达, ABA 信号起源问题即水分亏缺诱导 ABA 积累的分子机制问题是 ABA 信号传递的核心问题, 也是提高植物抗旱性的关键问题. 本研究虽初步揭示了 PTPase 参与 ABA 积累的可能性, 但只有通过分子生物学技术才能清楚地揭示 PTPase 是否参与 ABA 积累, 进一步的工作将通过 PTPase 基因克隆进而通过基因突变、反义或过量表达等技术来研究 PTPase 的功能, 随着研究的逐步深入, 有关水分亏缺诱导 ABA 积累的信号传递链必将逐渐明朗.

致谢 本工作为国家重点基础研究发展规划(批准号: G1999011700)、国家自然科学基金(批准号: 30070071, 30270135)及北京市自然科学基金(批准号: 6002007)资助项目.

参 考 文 献

1 Shinozaki k, Yamaguchi-shinozaki K. Gene expression and signal transduction in water-stress response. Plant Physiol, 1997, 115: 327~334
2 刘强, 张勇, 陈受宜. 干旱、高盐及低温诱导的植物蛋白激酶基因. 科学通报, 2000, 45(6): 561~566
3 Neill S J, Burnett E C. Regulation of gene expression during water deficit stress. Plant Growth Regul, 1999, 29: 23~33
4 Leung J, Giraudat J. Abscisic acid signal transduction. Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1998, 49: 199~222
5 Davies W J, Zhang J. Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1991, 42: 55~76
6 贾文锁, 何芳莲, 张大鹏. 蚕豆叶片中水分胁迫诱导 ABA 积累

的触发机制. 中国科学, C 辑, 2001, 31(3): 213~219
7 Jia W S, Zhang J. Water stress-induced abscisic acid accumulation in relation to reducing agents and sulhydrl modifiers in maize plant. Plant Cell Environ, 2000, 23: 1389~1395
8 Jia W S, Zhang J. Initiation and regulation of water deficit-induced abscisic acid accumulation in maize leaves and roots: Cellular volume and water relations. J Exp Bot, 2001, 52: 295~300
9 Stone R L, Dixon J E. Protein tyrosine phosphatases. J Biol Chem, 1994, 269: 31323~31326
10 Stone J M, Walker J C. Plant protein kinase families and signal transmission. Plant Physiol, 1999, 108: 451~ 457
11 Guo Y L, Roux S J. Partial purification and characterization of an enzyme from pea nuclei with protein tyrosine phosphatase activity. Plant Physiol, 1995, 107: 167~173
12 Guo Y L, Terry M E, Roux S J. Characterization of a cytosolic phosphatase from pea plumules having significant protein tyrosine phosphatase activity. Plant Physiol Biochem, 1998, 36: 269~278
13 Xu Q, Fu H H, Gupta R, et al. Molecular characterization of a tyrosine-specific protein phosphatase encoded by a stress-response gene in arabidopsis. Plant Cell, 1998, 10: 849~857
14 Huyer G, Liu S, Kelly J, et al. Mechanism of inhibition of protein-tyrosine phosphatases by vanafate and pervanadate. J Bio Chem, 1997, 272: 843~851
15 Chiarugi P, Fiaschi T, Taddei M L, et al. Two vicinal cysteines confer a peculiar redox regulation to low molecular weight protein tyrosine phophatases in response to platelet-derived growth factor receptor stimulation. J Bio Chem, 2001, 276: 33478~33487
16 Frost S C, Lane M D. Evidence for the involvement of vicinal sulfhydrl groups in insulin-activated hexose transport by 3T3-L1 adipocytes. J Bio Chem, 1985, 260: 2646~2652
17 Tassoni A, Antognoni F, Bagni N. Polyamine binding to plasma membrane vesicles isolated from zucchini hypocotyls. Plant Physiol, 1996, 110: 817~824
18 Chen P S, Toribara T Y, Warner H. Microdetermination of phosphorus. Analytical Chem, 1956, 28: 1756~1758
19 Quarrie S A, Whitford P N, Appleford N E J, et al. A monoclonal antibody to (S)-abscisic acid: Its characterization and use in a radio immunoassay for measuring abscisic acid in crude extracts of cereal and lupin leaves. Planta, 1988, 173: 330~339
20 Ng D H W, Harder K W, Clark-Lewis I, et al. Non-radioactive method to measure CD45 protein tyrosine phosphatase activity isolated directly from cells. J Immunol Methods, 1994, 179: 177~185
21 Sheen J. Ca^{2+}-dependent protein kinases and stress signal transduction in plants. Science, 1996, 274: 1900~1902
22 Stone J M, Walker J C. Plant protein kinase families and signal transmission. Plant Physiol, 1995, 108: 451~457
23 Chang C, Stewart R C. The two-component system. Plant Physiol, 1998, 117: 723~731
24 Urao T, Yakubov B, Satoh R, et al. A transmembrane hybrid-type histidine kinase in arabidopsis function as an osmosensor. Plant Cell, 1999, 11: 1743~1754

(2002-07-30 收稿, 2002-11-25 收稿)