

## 摘要

油菜素内酯 (BRs) 是一种新型的一类固醇激素, 除了在植物生长发育方面起重要的作用外, 在植物对生物和非生物逆境的抗逆反应调控中扮演着重要的角色。研究蔬菜等农作物韧皮液中的基因、蛋白等物质对 BRs 的响应不仅对于揭示植物地上部和地下部间通过信号通讯协同植物生长、发育、抗逆等反应的机制具有重要的理论意义, 而且对于蔬菜作物生长发育及抗性调控途径的探索也具有一定的现实意义。

本文以主要设施蔬菜黄瓜为研究对象, 从韧皮液 mRNA 和蛋白质物质的运输着手, 通过结合利用消减杂交技术 (SSH) 和 RT-PCR (Real-Time PCR) 技术, 从黄瓜韧皮液中克隆获得了一系列黄瓜代谢途径中对表油菜素内酯 (EBR) 响应的关键基因; 研究还从蛋白质组学方面, 利用 2D-PAGE 技术进一步研究了响应 EBR 的黄瓜韧皮蛋白, 并就 EBR 对黄瓜生长发育及抗性的影响机制进行了探讨。所取得的主要结果如下:

1) 在 EBR 对黄瓜韧皮液 RNA 转录本影响的研究过程中, 构建了黄瓜韧皮液受 EBR 处理之后的消减抑制杂交 (SSH) 文库, 共获得 650 个克隆, 随机 260 个克隆进行测序分析, 得到 28 个独立基因, 根据 BLASTX 分析推测这些基因编码的蛋白功能, 可以分为能量与光合作用, 运输通道, 蛋白合成, 细胞骨架, 细胞分裂和分化, 激素响应及逆境调控和其它相关的 7 大类, 其中参与胁迫响应的基因占较大比例, 表明 EBR 诱导了抗性相关基因, 生长素和茉莉酸响应基因在 SSH 文库中出现, 表明 EBR 可能与其它植物生长物质互作。

2) EBR 处理黄瓜叶片 6 h 后, 编码 C60、C453、C568、C681、C579、C594、C564、C623、C637、C420 等基因的表达均上调, 说明 EBR 促进了这些基因的表达。

3) 韧皮蛋白双向凝胶电泳结果表明 EBR 处理叶片 6 h 后, 韧皮液中蛋白组成发生了明显的改变, 28 KDa 蛋白点表达明显高于对照, 另外三个蛋白点 (60 KDa、75 KDa、95 KDa) 则明显弱于对照, 说明 EBR 可能影响了相关基因的表达, 促进或抑制了蛋白的合成并通过韧皮部运输到其他器官。

综合以上结果我们认为, 表油菜素内酯促进了黄瓜韧皮液中特定 mRNA 和蛋白

表达的变化, mRNA 和蛋白通过韧皮液运输到其它生长器官, 调控植物的生长发育及抗性。

关键词: 黄瓜, 韧皮液, 长距离运输, 消减抑制杂交文库, 双向凝胶电泳, 信号运输, 抗性

## Abstract

Brassinosteroids(BRs), a new kind of steroidal hormones play important roles not only in plant growth and development but also in response to biotic and abiotic stresses. The plant long-distance translocation systems played a critical role in the development of an effective whole-plant circulatory and communication network. Studying the response of phloem sap mRNAs and proteins to BRs may be helpful to reveal the roles of phloem information network in cooperating plant growth, development and stress tolerance between aerial and under-ground organs. The study is also of significant importance for developing methods to improve systemically the whole-plant stress resistance.

Cucumber (*Cucumis sativus* L.) was used to study the BRs-regulated mRNAs and proteins in phloem sap. Through the establishment of suppression subtractive library interrogated by bioinformatic tools, those transcripts specifically expressed in response to EBR in the metabolic network of cucumber were identified. The reliability of the suppression subtractive library was also verified by using RT-PCR method. Meanwhile, changes in proteome of phloem sap after EBR treatment were studied by 2D-PAGE. The findings are as follows:

1) A cDNA library of genes which were preferentially expressed in the EBR-treated phloem sap was constructed by suppression subtractive hybridization (SSH) to study the effects of BRs on the transcripts in cucumber phloem sap, 680 clones were obtained, and 260 clones were randomly selected for sequencing, resulting in 28 unique transcripts and fall them into seven categories after analyzed by BLASTX and Go: energy generation and photosynthesis, transportation channels, transport and synthesis of protein, cytoskeleton, control of cell division, hormone response and regulation of stress response. The high occurrence of stress related genes in the SSH cDNA library points to an important roles of BRs in stress response. The appearance of auxin and gibberellin response factor genes in the library suggests that the interactions between BRs and other hormones may exist.

2) RT-PCR verified that EBR foliar application mRNA levels increased significantly for those genes: C60、C453、C568、C681、C579、C594、C564、C623、C637、C420, this prove that EBR promote this genes expression.

3) The two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of cucumber phloem protein revealed that 6 h after  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  EBR foliar application the abundance of a 28 KDa protein was upregulated and three other protein (60KDa、75 KDa、95 KDa) were downregulated by EBR. This suggests that EBR induce synthesis of some related proteins in cucumber leaves and transport to other organs through the phloem translocation stream.

In conclusion, EBR influences the expression of RNA and protein in cucumber phloem sap. We hypothesize that BRs regulate systemically the development and stress resistance of distant organs by mRNA and protein trafficking through the phloem.

Key words: *Cucumis sativus* L., phloem sap, long-distance movement, suppressive subtractive hybridisation, protein, mRNA, two-dimensiona polyacrylamide gel electrophoresis, signal transduction, Resistance

## 缩略词

ABA	Abscisic acid	脱落酸
BL	Brassinolide	油菜素内酯
BRs	Brassinosteroids	油菜素甾醇类
BR11	Brassinosteroid receptor	油菜素内酯受体
CC	Companion cell	伴胞细胞
CmNACP	Cucurbit maxima non-autonomous cell protein	葫芦科非细胞自主蛋白
CmPp16	Pumpkin phloemRNA binding proteins 16-kD C. maxima phloem protein	南瓜韧皮RNA结合蛋白16
CO	CONSTANS	锌指蛋白
2D PAGE	Two Dimensional Electrophoresis	双向凝胶电泳
EBL	24-Epibrassinolide	24-表油菜素内酯
EBR	Epibrassinolide	表油菜素内酯
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid	乙二醇二乙醚二胺四乙酸
FDA	Fluorescein diacetate	荧光素二乙酸酯
FT	FLOWERING LOCUS T	开花信号分子
IEF	Iso-Electric Focusing	等电聚焦
KN1	KNOTTED1	玉米同源域蛋白
LCM	Laser capture microdissection	激光显微切割
LDM	Long Distance Movement	长距离运输
MAPs	Assembly MAPs	装配MAPs
MDA	Malonylaldehyde	丙二醛
MP	Mobile protein	可运输的蛋白
NPC	Nuclear protein complex	核酸-蛋白复合体
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链反应
PP2	PP2	韧皮蛋白2
PR proteins	Pathogenesis-related proteins	病原相关蛋白
PTGS	Post-transcriptional gene silencing	转录后基因沉默
RT-PCR	Quantitative real-time PCR	实时定量PCR

---

SA	Salicylic acid	水杨酸
SE	Sieve-tube element	筛管分子
SAR	Systemic acquired resistance	系统获得抗性
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis	十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳
SSH	Suppressive subtractive hybridisation	削减抑制杂交
SUT1	Sucrose transporter	RNA编码的叶蔗糖转运子

## 浙江大学研究生学位论文独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得 浙江大学 或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

学位论文作者签名：郭银平 签字日期：2008年6月23日

## 学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解 浙江大学 有权保留并向国家有关部门或机构送交本论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权 浙江大学 可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索和传播，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

(保密的学位论文在解密后适用本授权书)

学位论文作者签名：郭银平

导师签名：喻子松

签字日期：2008年6月23日

签字日期：2008年6月23日

## 致 谢

本论文是在导师喻景权教授、周艳虹博士的悉心指导下完成的。从论文的选题、试验设计、实验操作到论文的撰写、修改和定稿，凝聚了导师许多的心血和智慧。两年来，学业、生活等各方面都得到了导师无微不至的关心和照顾；导师渊博的学识，敏锐的思维，严谨的治学态度，以及严以律己、宽以待人的崇高风范潜移默化地影响着我，使我不仅接受了全新的思想观念，领会了基本的思维方式，掌握了通用的研究方法，而且还明白了许多待人接物与为人处世的道理，这一切我将受用终生。我愿借此机会向导师表示衷心的感谢！祝愿导师合家欢乐，一生平安！

在研究期间，还得到了师恺、傅丰庆、丁桔、夏晓剑、王虹、张韵、姜玉萍、李苹芳、丁小涛等中心大楼南楼383生理生化实验室师兄姐妹们在实验及生活中给予的诸多帮助及勉励；2006级蔬菜专业全班同学的关心，在此一并表示由衷的感谢。

特别感谢家人二十多年的关爱和支持，正是他们默默无闻的奉献和一贯的支持与鼓励，才使我健康成长并顺利地完成了数年的求学生涯。他们一点一滴的教导我将铭记于心，他们不求回报的付出永远是我进取向上的动力。衷心地祝愿他们身体健康、永远快乐！

最后，非常感谢在我成长过程中所有支持、鼓励和帮助过我的老师、亲人、同学、领导和朋友，我愿在未来的学习和工作中，以更好的成绩来答谢所有这些关心我的人。同时向参加论文评阅及答辩委员会的各位专家、教授致以诚挚的谢意！

郭银平

2008年5月于浙江大学华家池畔

## 第一章 前言

### 1 植物韧皮部大分子运输研究进展

#### 1.1 植物韧皮部结构概述

在高等植物中，水分和有机物的运输，主要由微管系统承担。微管系统包括木质部和韧皮部，木质部主要负责运输水分、无机盐以及 ABA 等小分子物质，韧皮部主要运输光合产物，包括糖、淀粉、氨基酸、多肽等。输导组织是植物体中担负物质长距离运输的主要组织，根部从土壤中吸收的水分和无机盐，由它们运送到地上部。叶片的光合产物，则由它们运送到根、茎、花、果实中去。植物体各部分之间经常进行的物质的重新分配和转移，也要通过输导组织来进行（图 1）。

韧皮部是一种复合组织，包含筛管分子、筛胞、伴胞、薄壁细胞、纤维等不同类型的细胞，其中与有机物的运输直接有关的是筛管分子或筛胞。筛管分子是管状细胞，在植物体中纵向连接，形成长的细胞行列，称为筛管，它是被子植物中长距离运输光合产物的结构。

筛管分子只具初生壁。壁由果胶和纤维素组成。在它的上下端壁上分化出许多较大的孔，称筛孔，具筛孔的端壁特称筛板。粗的原生质联络索穿过筛孔使上下邻接的筛管分子的原生质体密切相连，在各联络索的周围有胼胝质鞘包围。筛管分子的侧壁具有许多特化的初生纹孔场，称为筛域，其上的孔较一般薄壁细胞壁上初生纹孔场的孔大，比胞间连丝更粗的原生质丝在此通过，这使筛管分子与侧邻的细胞有更密切的物质交流。

筛管分子的侧面通常与一个或一系列伴胞细胞（CC）相毗邻，伴胞是与筛管分子起源于同一个原始细胞的薄壁细胞，具有细胞核及各类细胞器，与筛管分子相邻的壁上有稠密的筛域，反映出二者关系密切。筛管的运输功能与伴胞的代谢紧密相关。

筛管运送养分的速度每小时可达 10 - 100cm，通常，筛管功能只有一个生长季，少数植物可更长，如葡萄、椴、碱蓬的筛管可保持二至多年。在衰老或休眠的筛管中，在筛板上会大量积累胼胝质，形成垫状的胼胝体（callus）封闭筛孔，当次年春

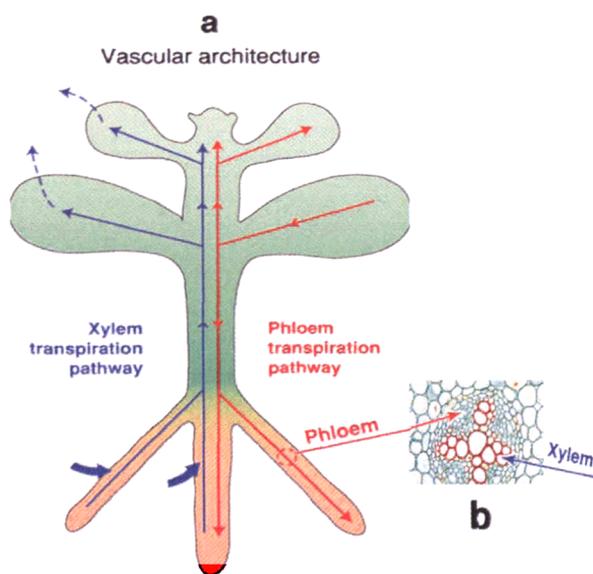


图1.植物微管系统在远距离器官之间的信息通讯中作为通道。(a)木质部和韧皮部的作用原理简图。(b)微管横切面(源自:Lough and Lucas, 2006)。

Fig. 1 The plant vascular system functions as the conduit for long-distance communication between distantly located organs. (a) Schematic illustration of the xylem and phloem, illustrating the fundamental feature that, in contrast to the animal kingdom, the flow pathway is noncircularity in nature. (b) Transverse section of a root demonstrating the

physical separation of the phloem and xylem tissues.(from: Lough and Lucas, 2006)

季筛管重新活动时,胼胝体能消失,联络索又能重新沟通。此外,当植物受到损伤或其他外界刺激时,筛管分子也能迅速形成胼胝质,封闭筛孔,阻止营养物的流失。

因此,韧皮部在植物的物质运输过程中,特别是叶片和根部之间的物质以及信息互换中扮演着重要的角色。目前,植物韧皮部的研究日益深入,微管运输的机理不断完善,在植物信号物质的研究中,具有理论性意义。

## 1.2 韧皮部 RNA 和蛋白质的运输

近年来,学者对韧皮部有广泛的研究,韧皮部是高等植物体内大分子物质运输的网络体系,是光合产物从植物体的源运输到库的主要通道。韧皮部的进化史反映出植物与外界环境的交流,例如,成熟的器官或分裂中的萌芽感受外界环境的信号等。这个长距离信号运输系统产生的结果,可以使正在形成中的器官能更好的向着产生,成熟,功能化的方向发展。韧皮液中除光合产物和一些其他的小分子物质以外,还有一系列的大分子物质,除了传统意义上的蛋白质和一些调节植物生长的小分子物质,还有 RNAs。目前已经报道了韧皮部中几种类型的 RNA 分子,如细胞 RNA,病原体 RNA,小 RNAs (Yoo 和 Lucas, 2004) 和基因沉默相关的成分等,在近来的研究进展中认为,这些大分子物质是植物体内信号物质长距离运输系统的

一部分,在韧皮部中具有调节运输,感应环境信号和病原物的功能。

随着 RNA 分子在基因表达调控中重要作用的发现, RNA 分子如何在植物体内运输移动,如何在目标组织中发挥作用等问题引起人们越来越多的关注。

目前对于携带信息的大分子物质(包括转录因子和 mRNA 分子)在细胞和整个植物系统间运输的深入研究,产生了维管植物细胞间信号的新概念。大分子物质在细胞间和整个植物中的运输,分别发生在胞间连丝和植物维管系统两种特殊结构中 (Oparka, 1999; Lucas, 1996)。

mRNA 分子作为遗传信息的载体,在产生它们的细胞中发挥作用。近来研究表明, mRNA 也作为一个活跃的信号分子,调控基因表达和植物发育 (Doering-Saad, 2004),而各种类型的 RNA 分子从合成位点长距离运输到植物不同器官的调控机制 (Yoo 等, 2004),逐渐成为人们的研究热点。

对于植物系统运输的 RNA 类型,目前已知主要有 3 种 RNA 分子能够进行系统运输,即植物病毒基因组 RNA、转录后基因沉默的 RNA 信号和内源特异 mRNA 分子。

植物病毒基因组 RNA 的研究一般通过接种,把病毒感染到宿主植物细胞中进行表达,黄瓜花叶病毒接种到南瓜上,感染其核酸 (RNA 或 DNA),并结合特定的可运输的蛋白(MP),形成核酸-蛋白复合体 (1996; Gilbertson 和 Lucas, 1996) 通过伴胞-筛管运输 (Lucas 等, 2002),在感染的过程中,病毒的可运输蛋白在伴胞中导致细胞内的 RNA 分子发生异常的长距离运输,影响植物的正常生长发育(Aart, 2004),进一步说,改变韧皮部中长距离运输的 mRNA 的数量和种类 (Ruiz-Medrano 等, 2007),是导致病毒影响植物发育的主要原因,最近有用建立抑制差减文库的手段来研究病毒对植物的作用危害,结果显示,病毒感染植物的韧皮液中只有极少的 mRNA 数量的改变,说明, mRNA 在进入植物细胞时,即伴胞和筛管间的信号大分子物质的交换时,有一个高级筛选调控机制 (Zambryski 等, 2002; Aoki 等, 2005) 病毒可运输蛋白(MP)不能大量的改变内源 mRNA,但在感染的植株内,仍有少量的细胞周期调节因子和转录因子能够被病毒诱导产生,进而影响植株的正常发育 (Ruiz-Medrano, 2007)。

在非自主细胞基因沉默的研究上,采用转基因和病毒侵染的方法居多,转基因

沉默可能会引起直接自发的基因沉默或在主要区域被诱导后在整个植株内传播 (Voinnet 和 Baulcombe, 1999; Voinnet 等, 1998), 相似地, 病毒引起的基因沉默并不一定在被侵染的器官 (Ruiz-Medrano 等, 2004), 信号物质最先在伴胞中合成, 继而在韧皮部中运输到植物的各个器官 (Gilbertson 等, 1996; Klahre, 2002; Smith, 2007)。

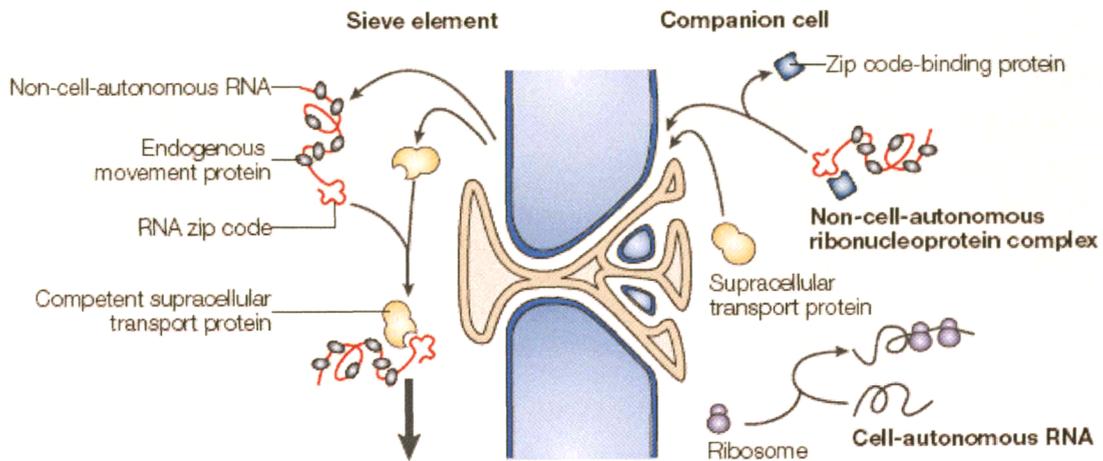


图 2. 非自主细胞RNA在韧皮液中运输调控机理: 模型中RNA分子结合cisacting序列, 即伴胞中细胞特异zip编码结合蛋白, 通过胞间连丝运输到筛分子中。(源自: Lucas. 2001)

Fig. 2 Potential mechanism for regulating the transport of non-cell-autonomous RNA into the phloem translocation stream. In this model, non-cell-autonomous RNA molecules contain *cisacting* sequence elements, termed 'zip codes', which function in combination with companion cellspecific zip code-binding proteins, transport through the plasmodesmata to sieve element.(from: Lucas. 2001)

在已知的 RNA 系统运输中(Citovsky, 2000), 内源 mRNA 细胞间运输的生物学意义最引人关注。在韧皮部中还发现其他内源 mRNA, 在某种机制作用下定位于特殊组织, 如 CmPp16 是南瓜的一个韧皮蛋白, 在 CC-SE 之间以序列非特异方式运输 RNA (Ruiz-Medrano 等, 1999)。利用 RT-PCR 方法在异质嫁接南瓜的韧皮液, 检测出有近 100 种 mRNA 存在于韧皮部中, 对其中一个 mRNA 转录物 CmNACP 做了详细研究, 发现大量转录本从南瓜砧木移动到黄瓜接穗的分生组织中, 由于 CmNACP mRNA 的选择性, 还需要一个蛋白质特异地识别这个 mRNA 并将此 mRNA

运输到顶端组织, 即 CmPp16 蛋白 (Xoconostle-C'azares 等, 2002)。有关 CmNACP mRNA 或其他 mRNA 长距离运输的生物学基本原理已有报道 (Ruiz-Medrano 等, 1999), 微注射实验表明, NtNCAPPI 在介导选择性蛋白的细胞间运输中的作用 (Ruiz-Medrano 等, 1999), NCAP(non-cell autonomous protein)传递到胞间连丝的模式具有选择性, 并且可以对植物中 RNA 运输的生物学机制其进行调控。

目前, 韧皮部内蛋白质的研究日益深入, 其中, 拟楠芥光周期诱导花芽分化的基因的特性已经研究比较深入, 光周期途径中, 完整信号的主要部分是 CO 蛋白 (Putterill 等, 1995) 和 RNF 类激酶抑制蛋白 FT (Kardailsky 等, 1999; Kobayashi 等, 1999)。FT-mRNA 是韧皮部中可运输的开花信号分子, 和 CO 相反, FT 蛋白不单在源器官的伴胞中表达会引起开花, 在其他器官 (分生组织) 表达也会引起植物开花 (An 等, 2004), 以此证实 FT 的表达是被 CO 所控制 (Samach 等, 2000), 且 FT 是促进植物开花的必要条件 (Kardailsky 等, 1999; Kobayashi 等, 1999), 这些都证实 FT 是开花信号系统中的重要组成部分。

在植物韧皮部中, 大分子信号物质如: DNA、RNA、蛋白质以及多肽的运输具有特殊形式 (Haywood, 2002; Wu, 2002), mRNA 与特定的蛋白形成核-蛋白复合体在植物韧皮部进行长距离运输 (Gomez 和 Pallas, 2004; Janssen, 2001), 韧皮部中的 P-蛋白在大多数被子植物韧皮部中存在, 这些蛋白在伴胞中合成, 通过胞间连丝进入到筛管中进而在整个植株运输 (Golecki, 1999; Aoki, 2005)。RNA 的长距离运输的特点: RNA-结合活性、胞间连丝通道尺寸大小的可改变性、核-蛋白复合体的形成和内源或病原菌 RNA 结合等。嫁接试验表明 Cmmlc17 是可运输的韧皮蛋白, 可以从甜瓜接穗运输到南瓜砧木中, 并且可运输性和 RNA 结合活性也被证实 (Gomez, 2005)。CmPp16 和 CmPp36 蛋白作为分子伴侣加强内源 mRNA 在韧皮部的运输功能, 南瓜的韧皮液蛋白 CmNACP mRNA 与它们的同源 mRNA 分子一起从伴胞运输到筛分子 (Ruiz-Medrano 等, 1999; Xoconostle-Cazares, 2002)。

韧皮液中 mRNA 和蛋白可以运输到长距离的器官中反映出, 可能存在一个机制来调节植物的生长发育和抗性。而探明植物韧皮系统中这种发挥重要作用的相关基因和蛋白, 对于从植物个体整合的角度解析植物地上部/地下部、各个器官之间如何通过信号通讯机制相互协调其生长发育及抗性调控过程有着重要的意义。

## 2 油菜素内酯及其生理作用

油菜素内酯是美国农业科学家 Grove 等 (1979) 首次从油菜花粉中分离、鉴定的一种能促进植物生长的甾族化合物。迄今, 油菜素内酯作为一种新型植物生长激素, 已受到人们的广泛重视, 至少已有 40 余种与油菜素内酯有关的化合物, 从植物中分离出来, 它们总称为油菜素甾醇类 (brassinosteroids, 简称 BRs) (Mandava 等, 1988; Moore 等, 1989)。这类化合物的生理活性功能不同于五大类植物激素 (生长素、赤霉素、细胞分裂素、脱落酸和乙烯), 因此, 将它作为第六大类植物激素 (Moore 等, 1989)。

表油菜素内酯 (EBR) 是其中的一种。它的生理作用引起了人们的广泛注意。人们最初发现它与调控植物的生长发育密切相关, 并在生理和分子生物方面进行了较为深入的研究。后来还发现 BR 与植物的胁迫反应也很密切关系, 可提高植物的抗逆性 (Sateesh K, 2006)。

目前, BR 的主要生理功能及作用机理表现在以下几个方面:

1. 促进细胞生长和分裂。适宜浓度的 BR 能促进许多植物的幼茎伸长, 其活性是其它激素的 100 - 1000 倍, 但高浓度的 BR 会抑制营养器官的伸长 (鲁旭东 等, 2005)。

2. 提高光合速率。BR 对叶片中光合产物运输有促进作用。可改善源-库的关系, 能促进同化物的运输和再分配 (侯雷平等, 2001; 胡文海 等, 2006)。

3. 保幼延衰作用。BR 有利于切花瓶插期间鲜重的保持、瓶插前期还原糖含量的增加以及延缓花瓣和叶片质膜透性的增大 (储昭庆 等, 2006)。

4. 提高植物的抗冷性。表油菜素内酯在低温下可以减缓黄瓜幼苗叶绿素的降解和电解质的外渗, 保护生物膜, 从而延缓黄瓜幼苗冷害症状的出现及生长的恢复。(Yu 等, 2002; 丁锦新 等, 1998; Kagale 等, 2007)。

5. 促进花粉管生长, 调节开花。BR 是首先从花粉中分离出来的, 而花粉又是 BR 含量最丰富的器官, BR 还可诱导雌雄同株异花的西葫芦雄花序开出两性花或雌花 (谷端银 等, 2006)。

6. 其它生理功能。BR 能够提高作物抗热性、抗旱性, 抗病性等。表油菜素内

酯 (EBR) 对黄瓜种子浸种 24 h, 能提高幼苗对热激的忍耐性, 降低植物水分的蒸腾量, 提高植物抗旱能力 (Kagale 等, 2007); BR 也能提高植物对盐害 (Clouse, 1998)、除草剂、药害、真菌侵入等逆境的抵抗力 (Cutker 等, 1991; Khripach 等, 1996), 因此有人将其称为“逆境缓和激素” (尚庆茂 等, 2006)。

在逆境条件下, BRs 可能是通过减轻植株的膜脂过氧化作用, 稳定膜系统的结构与功能, 减缓丙二醛 (MDA) 的积累, 维持较高的抗氧化酶活性, 从而减轻逆境对植株幼苗的伤害 (朱诚, 1996; Clouse, 1998; Anuradha 和 Rao, 2001; 邹华文和陈凤玉, 2001)。

BRs 还可以提高植株体内抗性物质的含量, Kulaeva 等 (1991) 观察到高温胁迫下小麦叶片细胞中的热激蛋白颗粒 (HSPs) 以小簇聚集在一起, 且 BRs 处理叶片的小簇中 HSGs 的平均数目和平均大小都高于未处理叶片。BRs 处理能减少马铃薯植株晚疫病菌侵染的发生, 其抗性的增加与脱落酸 (ABA)、乙烯的增加及酚类和萜类物质的变化有关 (Khripach 等, 1996)。

近年来, 许多学者在分子水平上对 BRs 诱导的抗逆机制进行了深入的研究。在干旱和冷害条件下, 表油菜素内酯 (EBR) 诱导的抗性与抗性相关基因的表达密切相关 (Kagale 等, 2007)。在生物胁迫中, BR 诱导烟草抗病性的提高与水杨酸 (SA) 诱导抗病相关基因 (PR) 表达的增加无关, 这表明 BR 诱导的抗性机制与系统获得抗性 (SAR) 和机械伤害诱导抗性不同 (Nakashita 等, 2003)。在盐害胁迫下, BRs 提高了核酸和可溶性蛋白的水平从而减轻植株的伤害程度 (Anuradha 和 Rao, 2001)。

EBR 喷施黄瓜叶片能够提高根部抗枯萎病能力 (Ding 等, 2008), 以往的研究大多局限于单一组织或器官中的基因表达、生理生化变化等, 而对植物地上部、地下部和各器官之间生长发育的相互协调及其信号物质的研究则相对较少。目前很少有人研究 BR 对韧皮液大分子物质的影响, 因此, 我们主要对于 mRNA 和蛋白质在韧皮液的运输以及表达展开研究。

### 3 本研究的目、内容和意义

我们实验室已有研究表明, 叶片喷施  $0.01 \text{ mg L}^{-1}$  BR 能迅速地诱导根系包括

*MAPK*, *WRKY*, *cAPX*, *PAL* 等一系列与抗性相关的信号、转录因子、抗氧化和抗病相关基因的表达, 产生包括对温度逆境、黄瓜枯萎病等一系列根部病害的抗性 (Ding 等, 2008; Ogwenon 等, 2005), 由于 EBR 本身不能移动 (Symons, 2004; Nishikawa 等, 1994), 很显然这些现象都不同程度同植物微管系统介导的长距离信号物质传递有关。韧皮部具有完整的抗氧化系统等信息传递网络 (Fiehn, 2002; Walz 等, 2002), 在受到病原菌、温度等生物和非生物胁迫时, 诱导抗性信号物质并通过韧皮部进行长距离运输 (Aart 等, 2004; van Bel 等, 2004), 从而提高植物的抗逆性。

我们在实验中采用瓜类植物作为研究对象, 主要因为其韧皮液取样方便, 蛋白含量较高, 另外在国际上, 瓜类植物微管系统大分子化合物方面积累了一定的工作基础, 是研究植物微管系统介导的长距离信号物质传递的优异材料 (Lough and Lucas, 2006)。

正是基于以上认识, 我们以黄瓜为材料, 结合 SSH 的方法、RT-PCR、2D-PAGE 等技术, 从基因和蛋白两个水平研究 EBR 协调植物地上部和地下部间逆境响应中的发挥重要作用的相关基因和蛋白, 以期探索蔬菜的抗性调控途径奠定理论基

## 第二章 黄瓜韧皮液消减抑制杂交文库的建立

消减抑制杂交 (SSH) 是一项可以快速获取两个不同生物材料中差异表达基因的分子生物学技术, 是快速筛选差异表达基因的有效方法, 也是寻找新基因的重要手段。该技术尤其适合以基因构架尚不完全清晰的物种或者以特殊材料为研究对象的生物基因分型差异的研究, 是基因芯片技术的有效补充。基本流程: 通过差减文库构建, 文库验证和筛选 (逆向斑点杂交), 获得阳性克隆, 对阳性克隆测序及生物信息分析, 可判定差异基因的情况。另外结合 RACE 技术可进一步克隆所获得的差异基因的 cDNA 全长序列, 并可用 Northern blot 或 RT-PCR 加以验证。抑制性消减杂交文库技术是一种革命性的差异表达基因筛选技术。该方法结合了抑制性 PCR 和消减杂交技术, 即用 PCR 反应链内退火有限于链间退火的特点和分子杂交二级动力学原理, 经过体系不断优化建立起来的快捷、有效的差异基因筛选方法。与传统的 DD-PCR、SAGE 及 cDNA - RNA 等技术相比, 具有低丰度 mRNA 富集效率高、假阳性低、灵敏度高重复性好等特点。

韧皮系统中信号物质包括多种 mRNA, 其在调控植物生长发育及抗性的过程中也发挥着重要的作用, 本章利用 SSH 技术对响应 EBR 的特异基因进行筛选分析。

### 1 材料与方方法

#### 1.1 实验处理及材料

实验于 2007 年 4 月-2008 年 3 月在浙江大学玻璃连栋温室及园艺系蔬菜植物生理实验室进行。表油菜素内酯 (EBR) 使用前用无水乙醇和吐温-20 作为溶剂配成  $100 \text{ mg L}^{-1}$  的母液 (含 80% 无水乙和 20% 吐温-20)。供试黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 品种为 '津研 4 号'。将预先浸种、催芽的黄瓜种子播于蛭石基质中, 片子叶充分展开时移入大棚种植, 温度为  $20-30^{\circ}\text{C}$ , 六叶一心时进行处理。喷施的浓度为  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$ , 量为 EBR 200ml/株, 喷施水平以叶片药液欲滴而未滴为度, 叶面以及叶背均喷

#### 1.2 实验方法

##### 1.2.1 韧皮液的收集方法

用消毒的刀片切割黄瓜的茎和叶柄, 用消毒过的滤纸粘吸茎和叶柄的切口, 待

韧皮液渗出时及时用移液枪吸取，收集到置于液氮中用DEPC处理的无RNA酶的1.5 ml的离心管中。

设置EBR浓度为 $0.1 \text{ mg L}^{-1}$ ，设置4个时间点收集韧皮液（3 h, 6 h, 12 h, 24 h），每个时间点收集韧皮液1 ml。

## 1.2.2 总 RNA 的抽提和纯化

### 1.2.2.1 总 RNA 的提取

- 1) 在装有韧皮液样品的1.5 ml 的离心管中加入1 ml 的Trizol试剂，混合均匀，室温放置5 min;
- 2)  $4^{\circ}\text{C}$ ，12,000 rpm，离心5 min，将上清液转移到新的无RNA酶的离心管中，弃沉淀;
- 3) 向上清中加入200  $\mu\text{l}$  氯仿，振荡混匀，室温放置15 min;
- 4)  $4^{\circ}\text{C}$ ，12,000 rpm，离心15 min，取上清液到另一个无RNA酶的离心管中，加入500  $\mu\text{l}$ 的异丙醇，混合均匀，室温放置10-30 min;
- 5)  $4^{\circ}\text{C}$ ，12,000 rpm，离心15 min，小心弃去上清，RNA沉于管底;
- 6) 加入1 ml 75% 无RNA酶的乙醇，温和振荡离心管，悬浮沉淀;
- 7)  $4^{\circ}\text{C}$ ，7500 rpm，离心5min，弃上清;
- 8) 室温晾干，用适量DEPC- $\text{H}_2\text{O}$ 溶解沉淀;
- 9) 用ND-1000紫外分光光度计测定RNA样品含量与纯度，并用甲醛变性凝胶电泳对RNA的质量进行检验。

### 1.2.2.2 总 RNA 样品的纯化

- 1) 向利用Trizol试剂抽提得的总RNA样品中加入1 ml RNA-Solv Reagent，混匀，室温放置5 min;
- 2) 向混合物中加入200  $\mu\text{l}$  氯仿，剧烈振荡20秒;
- 3) 12,000 rpm，离心10 min;
- 4) 将上清转移到新的离心管中，加入等体积的70% 乙醇，颠倒混匀;
- 5) 将样品转入RNA纯化柱，10,000 rpm，离心15 sec，弃滤液;

- 6) 重复步骤5;
- 7) 向RNA纯化柱中加入700  $\mu$ l RNA wash buffer I , 10,000 rpm, 离心15 sec, 弃滤液;
- 8) 重复步骤7;
- 9) 向RNA纯化柱中加入700  $\mu$ l RNA wash buffer II , 10,000 rpm, 离心15 sec, 弃滤液;
- 10) 重复步骤9);
- 11) 13,000 rpm, 离心1 min;
- 12) 将纯化柱放入一干净的1.5 ml 离心管, 加适量DEPC-H<sub>2</sub>O, 室温放置5 min, 13,000 rpm, 离心1 min;
- 13) 回收的总RNA样品放置于-80℃备用。

### 1.2.3 LD-PCR 试剂盒合成 cDNA

#### 1.2.3.1 第一链 cDNA 的合成

- 1) 在DEPC处理的无RNA酶的0.5 ml 的离心管中加入:

总RNA	200 ng
3'SMART CDS primer II A(12uM)	7 $\mu$ l
SMART II a oligonucleotide(12uM)	7 $\mu$ l
DEPC-H <sub>2</sub> O	补充至64 $\mu$ l

混匀, 轻微离心;

65℃温育2 min, 再42℃温育2 min;

- 2) 在反应管中依次加入下列组分:

5 × first-strand buffer	20 $\mu$ l
DTT(20 mM)	2 $\mu$ l
50 × dNTP mix	10 $\mu$ l
RNase inhibitor	5 $\mu$ l
MMLV reverse transcriptase	5 $\mu$ l
终体积	42 $\mu$ l

吸打混匀，轻微离心。

- 3) 42℃温育1.5 h;
- 4) 加入2  $\mu$ l 0.5 M EDTA终止反应。
- 5) 所得cDNA保存于-20℃备用，直至下一反应。

### 1.2.3.2 cDNA 的纯化

- 1) 在DEPC处理的无RNA酶的0.5 ml的离心管中加入212  $\mu$ l buffer NT，混匀；
- 2) 将反应液加到nucleospin extract II 中，14000 rpm离心1 min，弃去底液；
- 3) 加入600  $\mu$ l NT<sub>3</sub>，14000 rpm离心1 min，弃去底液；
- 4) 空离2 min，除去NT<sub>3</sub>；
- 5) 用新DEPC处理的无RNA酶的1.5 ml的离心管，在柱子中加入50  $\mu$ l 的NE，在空气中开盖放置2 min；
- 6) 盖上盖子，14000 rpm离心1 min；
- 7) 加入35  $\mu$ l NE于柱子中，重复(6)；
- 8) 总样品产物应为80-85  $\mu$ l，若不足，用DEPC-H<sub>2</sub>O补足；
- 9) 产物在-20℃保存待用。

### 1.2.3.3 cDNA 的扩增

- 1) 预热PCR仪至95℃；
- 2) 在DEPC处理的无RNA酶的1.5 ml 的离心管中加入CK、EBR模版各200 ng，加水至80  $\mu$ l；
- 3) 在新的在DEPC处理的无RNA酶的0.5 ml 的离心管中加入以下反应体系：

DEPC-H <sub>2</sub> O	172 $\mu$ l
10 × advantage 2 PCR buffer	30 $\mu$ l
50 × dNTP (10mM)	6 $\mu$ l
5-PCR primer II A(12 uM)	6 $\mu$ l
50 × advantage 2 polymerase mix	6 $\mu$ l
终体积	220 $\mu$ l

混匀，轻微离心；

4) 将样品与(3)步中的反应体系混匀，将其分装成100 $\mu$ l各3管，标为A、B、C；  
每管一滴矿物油覆盖，放入PCR仪中，设置程序为：

95 $^{\circ}$ C 1 min

15循环

95 $^{\circ}$ C 5 s

65 $^{\circ}$ C 5 s

68 $^{\circ}$ C 6 min

5) 从C管中取出30 $\mu$ l用于优化，其余70 $\mu$ l放于4 $^{\circ}$ C

a) a. 15cycle PCR产物中取出5  $\mu$ l 标为1

b) b. 18cycle PCR产物中取出5  $\mu$ l 标为2

c) c. 21cycle PCR产物中取出5  $\mu$ l 标为3

d) d. 24cycle PCR产物中取出5  $\mu$ l 标为4

e) e. 27cycle PCR产物中取出5  $\mu$ l 标为5

f) f. 30cycle PCR产物中取出5  $\mu$ l 标为6

6) 电泳分析图谱，确定循环数为20个

7) 另外将A、B、C各管反应体系的PCR循环数确定为23个

8) 跑电泳检测结果。

#### 1.2.3.4 cDNA 的纯化

1) 将3管产物合并到1.5 ml离心管中，得CK、EBR各一管，各取出7  $\mu$ l 于-20 $^{\circ}$ C，备以后比较；

2) 各加入等体积的乙醇：氯仿：苯酚（25:24:1），涡旋混匀；

3) 14000 rpm离心10 min，分层；上清液转移到1.5 ml 离心管中

4) 加700  $\mu$ l 正丁醇，充分混匀，浓缩体积至40-70  $\mu$ l；

5) 室温下14000 rpm离心1 min；弃去上清；

6) 如果体积不足40-70  $\mu$ l，重复(5)；

7) 将层析柱上下颠倒，充分混匀；

- 8) 打开柱子盖子, 将底下帽子折断;
- 9) 柱子放置于1.5 ml 离心管中;
- 10) 除去柱子中的buffer, 加入1.5 ml 的1 × dNTP mix buffer;
- 11) 让柱子中的液体自然流走, 至完全胶面平整, 接近于0.75 ml, 若低于0.75 ml 则换另一个柱子;
- 12) 除去buffer, 将样品小心缓慢滴入胶床中央, 不要粘壁;
- 13) 加入25  $\mu$ l 的1 × dNTP mix buffer;
- 14) 将柱子放在新的1.5 ml 离心管中;
- 15) 加入320  $\mu$ l 的1 × dNTP Mix buffer洗dsDNA片段, 留10 ml于新的离心管中, 标为“sample B”, 存于-20 $^{\circ}$ C, 作电泳凝胶分析;
- 16) 加入75 $\mu$ l 的1 × dNTP mix buffer, 用新的离心管收集, 标为“sample C”, 存于-20 $^{\circ}$ C, 作电泳凝胶分析;
- 17) 检测PCR产物, 电泳凝胶分析G, B, C; 结果显示G、B亮度相似, C最亮; 其中C的分子量主要集中在250-500bp。

## 1.2.4 消减抑制杂交文库的建立

### 1.2.4.1 酶切

- 1) 取出10 ml 纯化后的dsDNA, 用于以后跑凝胶电泳检测;
- 2) 混匀以下体系:

10 × RsaI restriction buffer	36 $\mu$ l
酶	1.5 $\mu$ l
- 3) 混匀, 轻微离心;
- 4) 37 $^{\circ}$ C 温育3 h;
- 5) 取出5  $\mu$ l 用于检测酶的效率;
- 6) 加入等体积的苯酚乙醇: 氯仿: 苯酚 (25:24:1), 涡旋混匀, 14000 rpm 离心10 min;
- 7) 取上清液于1.5 ml 离心管中, 加入等体积的氯仿: 异戊醇 (24:1);
- 8) 重复(6)(7);

- 10) 涡旋混匀，14000 rpm离心10 min;
- 11) 去掉上层液体，用200  $\mu$ l 80%乙醇洗涤沉淀;
- 12) 小心去掉上清液;
- 13) 在超净台吹干沉淀，约5-10 min;
- 14) 沉淀溶于5.5  $\mu$ l 的水中，存放于-20℃;
- 15) 电泳凝胶检测结果。

1.2.4.2 cDNA 的接头的连接

- 1) cDNA的稀释: 取1  $\mu$ l 经Rsa I 消化后的双链CK-cDNA样品 (tester) 加到5  $\mu$ l 水中稀释至6 $\mu$ l, 混匀备用;
- 2) 连接反应体系:

DEPC-H <sub>2</sub> O	3 $\mu$ l $\times$ 3
5 $\times$ ligation buffer	2 $\mu$ l $\times$ 3
T <sub>4</sub> DNA ligase	1 $\mu$ l $\times$ 3

- 3) 在0.5ml离心管中分别加入以下体系:

	1	2
	tester1-1*	tester1-2*
diluted tester cDNA	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l
接头1	2 $\mu$ l	
接头2		2 $\mu$ l
master mix	6 $\mu$ l	6 $\mu$ l
总体积	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l

- 4) 取新的离心管，加入2  $\mu$ l tester1-1\*和2  $\mu$ l tester1-2\*, 标为1-C, 为不差减杂交的对照;
- 5) 轻微离心，16℃过夜;
- 6) 加入1  $\mu$ l EDTA终止反应;
- 7) 72℃温育5 min, 使其失活;
- 8) 轻微离心;

9) 从1-C中取出1  $\mu\text{l}$  于1 ml 水中稀释, 用于PCR扩增;

10) 产物存放于 $-20^{\circ}\text{C}$ 。

#### 1.2.4.3 第一轮杂交

杂交反应以EBR-cDNA为tester,CK-cDNA为driver

1) 在离心管中依次加入下列组分:

	杂交样品1	杂交样品2
rsa I 酶切的BR-cDNA	1.5 $\mu\text{l}$	1.5 $\mu\text{l}$
tester1-1	1.5 $\mu\text{l}$	
tester1-2		1.5 $\mu\text{l}$
4 $\times$ 杂交缓冲液	1.0 $\mu\text{l}$	1.0 $\mu\text{l}$

2) 加1滴矿物油, 稍离心,  $98^{\circ}\text{C}$ 孵育90s,

3)  $68^{\circ}\text{C}$ 杂交10 h, 立即进行第二轮杂交。

#### 1.2.4.4 第二轮杂交

1) 在离心管中依次加入下列组分:

driver-cDNA	1 $\mu\text{l}$
4 $\times$ 杂交缓冲液	1 $\mu\text{l}$
水	2 $\mu\text{l}$
总体积	4 $\mu\text{l}$

混匀后覆盖一滴矿物油;

2)  $98^{\circ}\text{C}$ 变性处理1.5 min;

3) 从热循环仪上拿出新鲜变性的driver-cDNA, 同时将其于杂交样品1和2混合, 确保杂交样品1和2只有在新鲜变性driver-cDNA存在时混合在一起, 操作如下:

a) 调移液枪至15  $\mu\text{l}$ ;

b) 将移液枪尖端轻轻地接触杂交样品2中的矿物油/样品界面;

c) 小心将全部样品吸入枪头 (若有少量矿物油吸入, 则无影响);

d) 将移液枪尖端移开离心管, 并吸入少量空气, 使样品滴下有一层微空气

层面;

- e) 重复步骤b-d (吸取新鲜变性driver-cDNA);
- f) 将整个混合液移至盛有杂交样品1的离心管中;
- g) 枪头吹吸使之混匀;
- 4) 短暂离心, 68°C过夜温育;
- 5) 加入200  $\mu$ l 稀释缓冲液, 吹吸混匀;
- 6) 68°C温育7 min, -20°C保存备用。

#### 1.2.4.5 差异表达 cDNA 的第一轮 PCR 扩增

##### 1) 准备PCR模板:

- a.取稀释过的cDNA 1  $\mu$ l 于新的离心管中;
- b.取1  $\mu$ l PCR control subtracted cDNA;

##### 2) 在PCR管中依次加入下列组分:

10 $\times$ PCR reaction buffer	8 $\mu$ l
dNTP mix	1.6 $\mu$ l
PCR 引物 1	3.2 $\mu$ l
50 $\times$ 酶	1.6 $\mu$ l
去离子 H <sub>2</sub> O	62.4 $\mu$ l
总体积	76.8 $\mu$ l

涡旋混匀, 轻微离心;

- 3) 分成3管, 每管24  $\mu$ l;
- 4) 每管加50  $\mu$ l 矿物油;
- 5) 75°C 5 min;
- 6) PCR: 94°C 25 s  
30cycle: 94°C 10 s  
66°C 30 s  
72°C 1.5 min
- 7) 取8  $\mu$ l PCR产物跑凝胶电泳检测, 或第二次PCR扩增后再检测;

8) 取3  $\mu\text{l}$  的PCR产物, 溶于27  $\mu\text{l}$  水中稀释;

9) 上述稀释产物各取1  $\mu\text{l}$ 。

#### 1.2.4.6 差异表达 cDNA 第二轮 PCR 扩增

10) 在PCR管中依次加入下列组分:

10 $\times$ PCR reaction buffer	8 $\mu\text{l}$
dNTP mix	1.6 $\mu\text{l}$
nested PCR 引物 1	3.2 $\mu\text{l}$
nested PCR 引物 2R	3.2 $\mu\text{l}$
50 $\times$ 酶 mix	1.6 $\mu\text{l}$
去离子 $\text{H}_2\text{O}$	59.2 $\mu\text{l}$
总体积	76.8 $\mu\text{l}$

涡旋混匀, 轻微离心;

11) 将(9)中的1  $\mu\text{l}$  加入, 分成3管, 每管24  $\mu\text{l}$ ;

12) 每管加一滴矿物油;

13) PCR

15cycle	94 $^{\circ}\text{C}$	10 s
	68 $^{\circ}\text{C}$	30 s
	72 $^{\circ}\text{C}$	1.5 min

14) 取8  $\mu\text{l}$  跑电泳检测;

15) 产物存放于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

#### 1.2.4.7 连接

连接体系:

5 $\times$ buffer	5 $\mu\text{l}$
载体 vector	0.5 $\mu\text{l}$
酶	0.5 $\mu\text{l}$
DNA	4 $\mu\text{l}$

DNA	4 $\mu$ l
总体积	10 $\mu$ l

22℃温育1-2小时，或4℃过夜。

#### 1.2.4.8 感受态细胞的制备

- 1) 从新鲜的大肠杆菌 (*escherichia coli*) TGI 菌株平板上挑取单菌落，接种于 LB 液体培养基中，37℃过夜培养；
- 2) 按 1:100 比例将过夜的培养物转接到新鲜的 LB 培养基中，37℃培养至菌液 OD600 达到 0.4-0.6；
- 3) 将菌液分装入灭过菌的 50 ml 离心管中，冰浴 10 min；
- 4) 4℃，4000 rpm，离心 10 min，倒尽上清；
- 5) 用 20 ml 预冷的 0.1 M 灭菌 CaCl<sub>2</sub> 溶液重悬细胞，冰浴 30 min；
- 6) 4℃，4000 rpm，离心 10 min，弃去上清；
- 7) 加入预冷的 0.1 M CaCl<sub>2</sub> 溶液 2 ml，轻轻悬浮细胞，-80℃放置备用。

#### 1.2.4.9 转化

- 1) 加热LB固体培养基，冷却后加Amp (50 ug/ $\mu$ l) 倒到培养皿上；
- 2) 从-70℃冰箱中取200  $\mu$ l 感受态细胞悬液，冰上解冻，解冻后置于冰点；
- 3) 加入PBS质粒DNA溶液 (含量不超过50 ng，体积不超过10 ml) 轻轻摇匀，冰上放置20-30分钟；
- 4) 42℃水浴热击90s，或37℃水浴5 min，热击后迅速置于冰上冷却3-5分钟；
- 5) 向管中加入1 ml LB液体培养基 (不含Amp)，混匀后37℃震荡培养基40分钟，使细胞恢复生长状态，并表达质粒编码的抗生素抗性基因Amp；
- 6) 将上述菌液摇匀后离心，去除部分上清液后，取100  $\mu$ l 涂布于含Amp的筛选板上，正面向上放置半个小时，待菌液完全干后倒置培养皿，37℃培养16-24小时，出现明显而未相互重叠的单菌落；
- 7) 培养后，将平皿置于4℃下数小时，使显色完全；
- 8) 挑斑，挑取白色单菌落于LB液体培养基中；
- 9) 37℃摇菌，待培养基明显变浑浊为止。

### 1.2.4.10 PCR 检测

目的基因的扩增采用常规的 PCR 方法

1) 在离心管中加入下列反应组分:

在装有1  $\mu$ l 菌液的PCR管中加入9  $\mu$ l 如下配置好的反应混合液

10 $\times$ PCR 缓冲液	2.5 $\mu$ l
Mg(25 mM)	2 $\mu$ l
dNTP mix(10 mM)	2 $\mu$ l
引物 1	0.5 $\mu$ l
引物 2	0.5 $\mu$ l
Tap 酶	0.125 $\mu$ l
去离子 H <sub>2</sub> O	16.375 $\mu$ l
总体积	24 $\mu$ l

轻微混匀，稍离心

2) 立即进行PCR反应：94 $^{\circ}$ C 30s,52 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 60s,35个循环；

3) 取4  $\mu$ l 产物在1.5%琼脂糖胶进行电泳检测，其余产物-20 $^{\circ}$ C保存备用。

### 1.2.4.11 菌液的保存

取过夜培养的菌液300  $\mu$ l，加入等体积50%的灭菌甘油，混合均匀，做好标记，-20 $^{\circ}$ C冰箱保存。

### 1.2.4.12 测序

挑选消减文库中部分PCR的阳性克隆送到上海生物工程公司或者上海英骏生物工程公司进行测序进行测序

## 2 结果与分析

### 2.1 总 RNA 质量检测结果

对黄瓜韧皮液中总RNA进行了甲醛变性凝胶电泳检测，结果如图1所示，总RNA的电泳条带清晰明亮，28S、18S和5S三条带均清晰可见，28s rRNA条带的亮度基本

的电泳条带清晰明亮，28S、18S和5S三条带均清晰可见，28s rRNA条带的亮度基本上为18s rRNA 的两倍，说明抽提得的总RNA未发生降解。此外，总RNA样品进行的紫外分光光度计测定结果也显示，黄瓜韧皮液总RNA的 $OD_{260/280}$ 比值为1.98， $OD_{260/230}$ 的比值为2.21之间，这说明抽提得的RNA样品的纯度较高，无DNA或蛋白的污染。

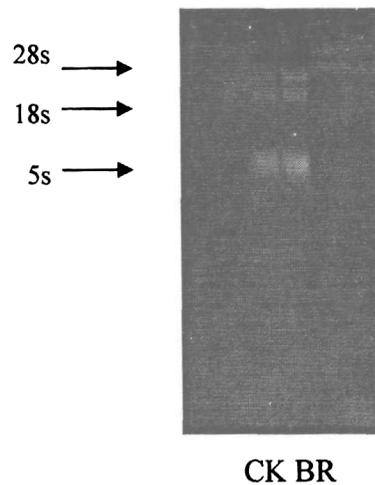


图 1 总 RNA 的变性凝胶电泳

Fig.1 Total RNA denatured formaldehyde gel analysis

## 2.2 cDNA 第二链合成扩增

从已经合成第一链的cDNA管中取出30  $\mu$ l用于优化，分别：

- a. 15cycle PCR产物中取出5  $\mu$ l 标为1
- b. 18cycle PCR产物中取出5  $\mu$ l 标为2
- c. 21cycle PCR产物中取出5  $\mu$ l 标为3
- d. 24cycle PCR产物中取出5  $\mu$ l 标为4
- e. 27cycle PCR产物中取出5  $\mu$ l 标为5
- f. 30cycle PCR产物中取出5  $\mu$ l 标为6

电泳分析图谱，确定循环数为20个

CK

BR

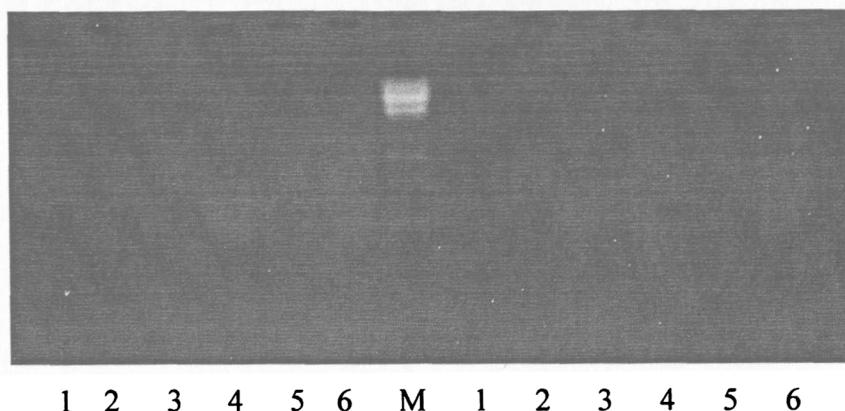


图2 总 cDNA 的 PCR 扩增后凝胶电泳

Fig.2 The analysis of amplification of total cDNA (M.marker)

从图谱上可以看出循环数为15时，没有条带出现，增至21个循环时能够明显看到明显的弥散带，最终的选用21个循环进行第二链的合成。

### 2.3 cDNA 双链的合成与纯化

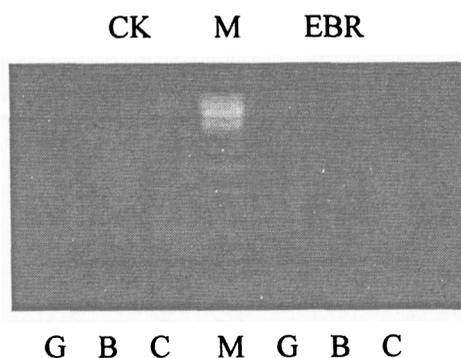


图3 cDNA 纯化后凝胶电泳

Fig.3 The analysis of cDNA after purity.M1:1kb ladder

检测PCR产物，电泳凝胶分析G, B, C; 结果显示G、B亮度相似，C最亮; 说明实验操作符合要求，其中C的分子量主要集中为250-500 bp。

取BR和CK处理的RNA进行逆转录合成cDNA双链，电泳图谱显示为涂布分布(图3)。合成的cDNA用限制性内切酶Rsa I 进行酶切，以产生大小适当的平末端片段。cDNA双链经Rsa I 酶切后，片段的带型明显下移(图4)，表明酶切效果良好。

## 2.4 cDNARsa I 酶切

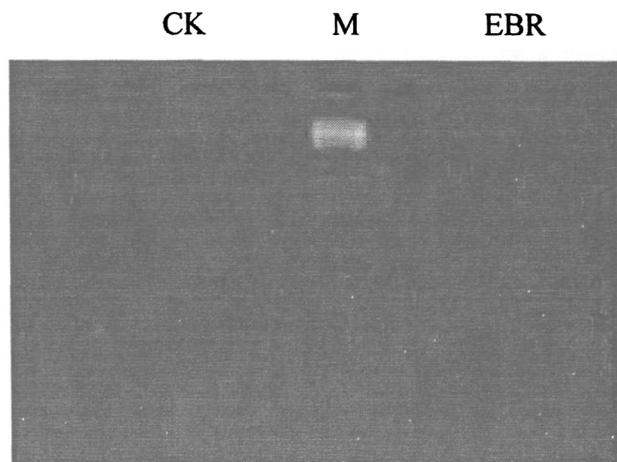


图 4. Rsa I 酶切后的 cDNA 的双链凝胶电泳

Fig.4 The analysis of DscDNA after Rsa I cut (M:1kb ladder)

## 2.5 差异表达 cDNA 的 PCR 扩增

为了筛选对照处理 (CK) 与 EBR 处理 (EBR) 中各自特异表达的基因, 以 EBR 为 tester, CK 为 driver 进行消减杂交, 酶切好的 cDNA 经接头连接, 两轮杂交及补平末端等操作后, 以杂交产物为模版进行 PCR 扩增, 第一轮循环数为 30 个。产物稀释后用做第二轮的模版。循环数增至 15 个循环时可以看到较暗的扩散带, 21 个循环时是扩散带已经非常明显。为了减少后续实验的复杂性, 最终的建库选用 21 个循环。

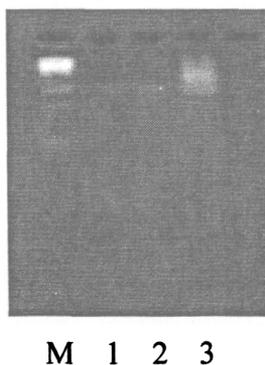


图5.第二次PCR扩增结果

Fig.5 The analysis of second PCR

## 2.6 建库保存与 PCR 鉴定

PCR扩增产物经纯化后进行T-载体克隆，转化大肠杆菌后进行大量涂板。大量挑选白色单菌培养物为模版进行PCR鉴定，结果显示片段的大小分布在200-600 bp之间，但较小片段居多（图6）。

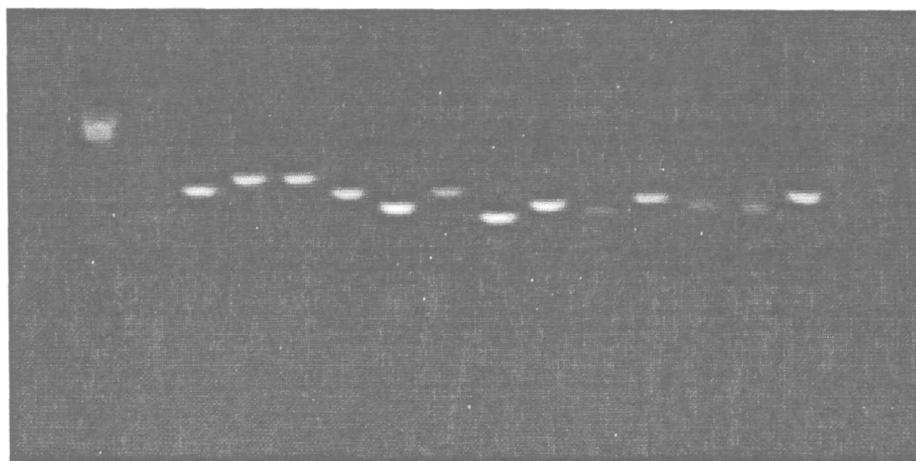


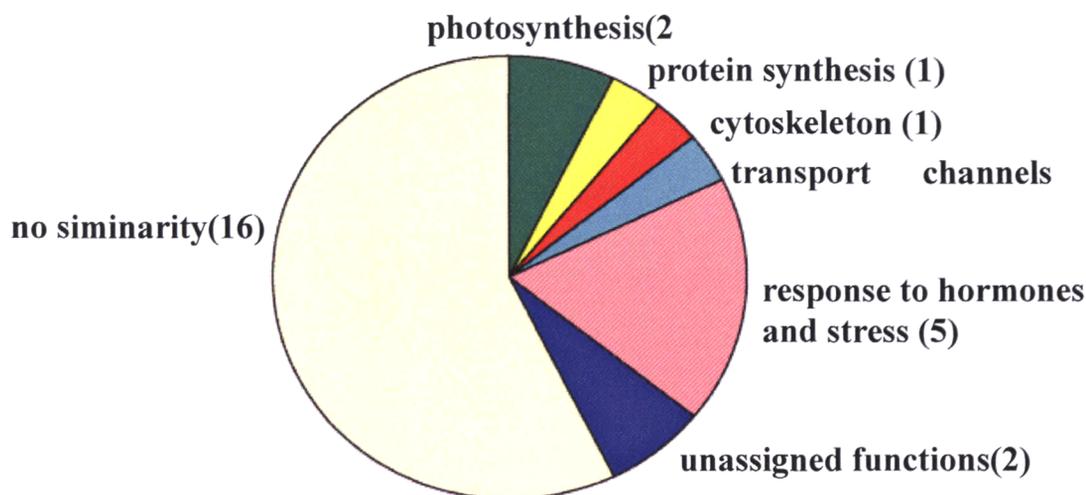
图 6. 部分白色单菌的 PCR 检测

Fig.6 PCR analysis of partial white clones

## 2.7 测序与数据分析

挑选消减文库中部分PCR的阳性克隆送到上海生物工程公司或者上海英骏生物工程公司进行测序进行测序，对所测的260个序列进行去除载体分析，得到的EST序列的长度分布如图7所示。长度小于200 bp的EST有9个，长于600 bp的EST有18条。根据测序质量分析结果，除去质量差的序列32个，得到有效EST 228条，经过去重复分析后获得28个差异表达的EST（表1），部分EST的序列见附录2。将所得EST序列在<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>中进行相似性比较，基因功能的注释和分类在Gene Ontology<sup>TM</sup>数据库中进行（<http://www.geneontology.org>）。能推测出功能的EST见表1，其它均为功能未知的序列。

Fig.1 Percentage of the putative protein products, which were highly expressed in the EBR-treated phloem sap. A total of 28 cDNA clones of the entire 650 SSH clones were sequenced and classified into seven protein categories, based on the BLASTX analysis.



### 2.9 BRs 上调基因的分析

cDNA 序列的功能是通过BLASTX分析与其它植物中已报道功能的基因的相似度 (*E-value*) 来确定的 (表1)。在7个分类中, 除相似度低的基因和未知基因, 激素和胁迫响应得基因所占比例最高, 达到18%, 包括编码yippee family protein, putative ankyrin-repeat protein, F-box family protein, auxin-induced protein, major latex protein-related等5个基因。SSH文库还包括了8%的光合作用相关基因, 如 photosystem II protein I, photosystem I P700 apoprotein A2。EBR还上调了编码细胞骨架microtubule-associated protein (4%), 蛋白合成40S ribosomal protein S7-like protein (4%)、跨膜和运输通道phosphate translocator (4%) 等的基因。

表1 消减杂交所得的EST的相似性分析结果

Table 1 The homology analysis for EST from the forward SSH

Clone number	Redundancy	Similarity	Length (bp)	e value	Accession No.
Energy generation and photosynthesis					

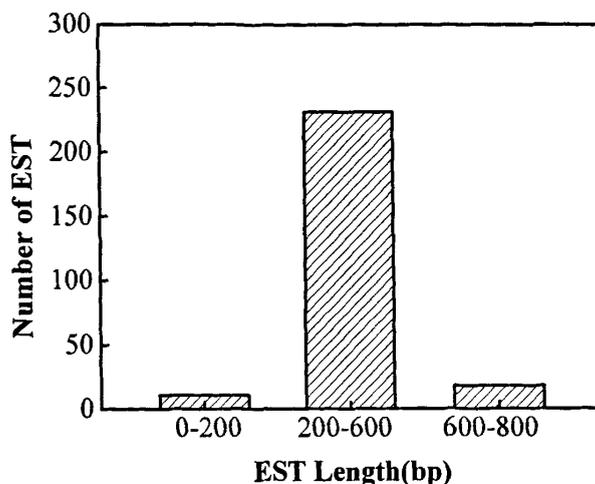


图 7. EST长度分布图

Fig.7 EST length distribution report

## 2.8 黄瓜韧皮液中 EBR 上调基因的分类

我们采用削减抑制杂交 (SSH) 的方法, 构建了 EBR 处理和对照的 cDNA 差异文库。SSH 是一个用来获得 tester 样品中高丰度基因的有效办法 (Diatchenko 等, 1996), 在本实验中, 我们以 EBR 处理韧皮液的 cDNA 作为 tester, 未处理的为 driver。因此, 我们构建的 SSH 文库是 EBR 处理后表达上调的基因文库。我们共获得 650 个克隆, 从中随机挑取 260 个克隆进行测序, 得到 228 个测序结果, 经过 Alignment 软件分析和 BLASTX 比对共得到 28 个非重复基因 (表 1)。其中包括 5 个编码未知功能蛋白的基因和 23 个编码已知功能蛋白的基因。这 23 个已知功能的基因经过 GO terms 功能分类之后, 参照其它器官中 cDNA 的归类方法 (Aharoni 和 O'Connell, 2002; Lee 等, 2007), 将其分为以下 7 类: 能量与光合作用, 运输通道, 蛋白合成, 细胞骨架, 激素及逆境响应调控和其它相关的 7 大类(图 1)。

图 1. SSH 文库基因功能分类。

C637	19	photosystem II protein 1 [ <i>Liriodendron tulipifera</i> ]	582	1.00E-16	YP_740186
C420	20	photosystem I P700 apoprotein A2 [ <i>Carica papaya</i> ]	392	8.00E-21	YP_001671682
Transport facilitators, channels and pumps					
C568	11	phosphate translocator [ <i>Nicotiana tabacum</i> ]	471	2.00E-15	CAA52979
Protein synthesis/destination/turnover					
C642	9	40S ribosomal protein S7-like protein [ <i>Solanum tuberosum</i> ]	462	8.00E-17	ABA40437
Cytoskeleton					
C60	32	microtubule-associated protein 1 light chain 3 [ <i>Gossypium hirsutum</i> ].	554	2.00E-12	AAQ76706
Cellular response to hormones and stress and defence-related					
C681	19	yippee family protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	585	4.00E-35	NP_973645
C579	3	putative ankyrin-repeat protein [ <i>Vitis aestivalis</i> ]	370	5.00E-08	AAQ96339
C594	1	F-box family protein [ <i>Oryza brachyantha</i> ]	442	7.00E-28	ABG73440
C453	3	auxin-induced protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	259	5.00E-13	BAD94452
C623	1	major latex protein-related / MLP-related [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	671	4.00E-25	NP_193142
Unassigned functions					
C454	29	hypothetical protein [ <i>Vitis vinifera</i> ]	684	3.00E-09	CAN70790
C72	1	putative polyprotein [ <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]	695	1.00E-17	AAR06323
No similarity					
C55	9	ribosomal protein S3 [ <i>Cucumis sativus</i> ]	131	0.018	YP_247638
C418	5	transposase IS630 [ <i>Listonella anguillarum</i> serovar O2].	332	6.3	CAL47051
C627	14	conserved hypothetical protein [ <i>Magnetospirillum</i> ]	239	3.7	CAM78208

		<i>gryphiswaldense MSR-1</i>			
C352	9	putative ABC transporter, permease protein [ <i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>doylei</i> 269.97].	371	9.9	YP_001398923
C526	7	spermidine synthase, putative [ <i>Plasmodium vivax</i> <i>Sal-1</i> ]	306	2.8	XP_001615406
C140	2	PREDICTED: similar to WD repeat protein Gemin5 [ <i>Danio rerio</i> ]	341	4.7	XP_001339880
C118	6	cyclic nucleotide-gated channel modulatory subunit CNGA4b truncated isoform [ <i>Ictalurus punctatus</i> ]	594	6.6	AAM70510
C302	7	hypothetical protein [ <i>Vitis vinifera</i> ]	205	0.97	CAN78486
C541	5	protein kinase, putative [ <i>Leishmania braziliensis</i> <i>MHOM/BR/75/M2904</i> ].	180	0.44	XP_001561658
C564	8	unnamed protein product [ <i>Vitis vinifera</i> ]	435	0.03	CAO45651
C196	1	D111/G-patch domain-containing protein [ <i>Arabidopsis</i> <i>thaliana</i> ]	171	2.9	NP_566359
C173	5	No significant similarity found	202		
C169	1	No significant similarity found	236		
C101	2	No significant similarity found	164		
C248	2	No significant similarity found	392		
C200	1	No significant similarity found	467		

### 3 讨论

黄瓜目的基因序列的生物信息学分析:

C60-微管结合蛋白序列 微管结合蛋白与微管特异地结合在一起,对微管的功能起辅助作用,在微管结构中约占 10~15%。微管结合蛋白在调节微管的聚合和组成方面具有重要的作用,在植物中,微管结合蛋白能够在整个细胞周期中组装、重新配置和分解四种独特的微管阵列。其中的三个微管阵列:皮质阵列、细胞分裂早期阵列和成膜体在植物体中负责促进细胞壁沉积和传感信号的修饰,划分细胞分裂的平

面,并在胞质分裂中形成新的细胞板,微管结合蛋白在植物中建立和维持微管阵列,以调节细胞的生长、分裂,以及细胞对环境的反应。一类主要的 MAPs 家族叫作装配 MAPs,作用是将微管在胞质溶胶中进行交联 (Kaloriti, 2007)。这些 MAPs 的结构中具有两个结构域,一个是碱性的微管蛋白结合结构域,另一个是酸性的外伸的结构域。MAPs 具有多方面的功能:①使微管相互交联形成束状结构,也可以使微管同其它细胞结构交联。②通过与微管成核点的作用促进微管的聚合。③在细胞内沿微管转运囊泡和颗粒,因为一些分子马达能够同微管结合转运细胞的物质。④提高微管的稳定性:由于 MAPs 同微管壁的结合,自然就改变了微管组装和解聚的动力学。MAPs 同微管的结合能够控制微管的长度防止微管的解聚。由此可见,微管结合蛋白扩展了微管蛋白的生化功能。

**C594-F-box蛋白序列** F-box 蛋白家族是一个超大的蛋白家族, F-box 许多研究是在拟楠芥上进行的,在其他植物上研究的极少,拟南芥全基因组序列分析表明,它可能编码1000多个F-box蛋白质,约占全部预测蛋白质的5%,很多重要的F-box蛋白在激素信号中起作用 (薛勇彪, 2002),在真核生物中,由泛素介导的蛋白降解途径与细胞的分裂、发育、代谢、免疫等许多复杂的生理过程密切相关。F-box蛋白质通过参与SCF复合体的形成介导了泛素化蛋白底物的特异性识别,在其降解过程中发挥关键作用 (Skowyra, 1997)。目前,从拟南芥和金鱼草中发现了多个已知功能的F-box蛋白质,它们分别参与了生长素信号转导、花器官发育、开花和叶片衰老等多种生物学过程 (kipreos, 2000)。在茉莉酸信号转导途径中, F-box蛋白是一个关键的因子,包含F-box和16 LRRs,能够选择性的恢复聚泛素和蛋白质水解的受体,CO11 (F-box蛋白)能够形成E3-type Ub连接酶复合体 (Hershko, 1998),这些结果说明,F-box蛋白质介导的泛素化蛋白质降解途径可能是植物基因表达调控的一个非常重要的机制,在SCF复合体中, F-box 结合Skp1或类Skp1蛋白,但是对F-box整个功能系统还不很清楚。

**C623-类乳胶蛋白序列** 据报道,类乳汁蛋白在拟楠芥中只有一种,而在人参的EST数据库中,人参叶片中的类乳汁蛋白在高光强条件下上调,其mRNA能够被乙烯抑制 (Aggelis, 1997),但它的具体功能还不清楚,在NCBI的蛋白质数据库中,总共有15种类乳汁蛋白属于拟楠芥,它们的N端是高度保守区域,最前的两个氨基酸是

蛋氨酸和丙氨酸, 根据N端乙酰化原则, N端的氨基酸可以被乙酰化, 从而可进一步研究这类蛋白的结构和功能。

**C681-开心蛋白序列** 开心蛋白包含一个假定的类锌指金属结合结构域。目前在不同的真核细胞有机体, 它是第一个具有保守基因家族特征的蛋白质成员(Hosono, 2004), 人类cDNA克隆分离显示76%开心蛋白与果蝇相同。在果蝇和在不同的胎儿组织不同发育阶段, 开心蛋白是无所不在的, 高度保守的蛋白序列在广泛的物种中的存在表明开心蛋白在真核生物中的重要性(Lindquist, 2001)。

**C568-磷酸丙糖转运蛋白序列** 叶绿体内膜上存在有磷酸丙糖转运蛋白。在光合作用中负责碳水化合物化合物的出口。磷酸丙糖转运器能够催化磷、磷酸丙糖和3-磷酸甘油酸的反向交换运输, 从而使光合初级产物从叶绿体转运到胞质。在生理条件下, 这种转运严格遵循1:1的反向交换原则, 并且转运活性受光的调节(Walters, 2004; Sun, 2004)。目前, 已经从一些植物中分离到磷酸丙糖转运器蛋白, 并克隆了它们的cDNA。近年来, 利用基因工程手段对磷酸丙糖转运器功能的研究也取得了很重要的进展。有研究表明, 突变体拟南芥缺乏tpt比野生型增加了淀粉合成, 从而补偿它在叶绿体出口磷酸盐上的不足。

**C579-锚蛋白重复序列** 锚蛋白重复序列是普遍存在于真核、原核及病毒中的一种蛋白质序列模体, 其功能主要是参与蛋白质与蛋白质的相互作用, 锚蛋白主要在细胞内外的信号传递过程中起联系和调节作用(Sedmvick 等, 1998; Xu, 2007)。典型的ANK重复序列一般含有33个残基, 数目不等的ANK单元串联起来, 形成许多大的ANK结构域(ANKdomain), 行使生物功能。由于该蛋白质家族成员中, ANK在数目、一级序列以及空间结构上都存在差异, 使得ANK模体能够与多种配体结合, 实现纷繁复杂的生物功能。在植物蛋白中, 锚蛋白的研究比较滞后, 主要集中在有关信号转导中的自身防御, 发育调控, 物质转运以及蛋白磷酸化等, 因此, 研究ANK模体对于认识这类植物蛋白质家族成员的结构和功能具有十分重要的作用, 也必定会给植物信号传导的研究带来新的切入点。

**C453-生长素诱导蛋白序列** 系统鉴定和研究油菜素内酯的应答基因, 发现油菜素内酯可通过诱导细胞周期蛋白基因的表达而促进细胞分裂, 可在拟南芥细胞培养中替代细胞分裂素, 证实了油菜素内酯对植物细胞分裂的促进作用(Overvoorde, 2005)。

油菜素内酯是新近被确认为植物生长发育不可缺少的一种甾醇类激素，其最主要的生理功能为促进细胞的伸长。

EBR不仅能调控植物的生长发育，并且可提高植物的抗逆性，我们的研究表明对黄瓜进行叶面喷施 $0.1 \text{ mg L}^{-1}$ EBR能够显著提高其根部对枯萎病的抗性(Ding 等, 2008), 推测是由于EBR激活或促进了叶片相关抗性基因, 且这些mRNA可以通过韧皮部运输到黄瓜根部, 进而影响根部代谢途径中相关环节, 促进植物抗病性提高。为了更清楚地理解EBR在黄瓜地上部和地下部间信号通讯中所起的作用及其分子机制, 我们采用SSH方法来系统地研究了韧皮液中RNA转录本对EBR处理的响应机制。在本试验中, 我们得到包括650个克隆的SSH文库, 有效EST序列228个, 经去重复分析后获得28条差异表达EST, 大部分都小于600bp(表1)。53.1%的EST能够在GenBank搜索到功能已知的基因, 其它均为功能未知的序列。本试验采用了不同时间点混合取样的方法, 其缺点是同一时间差异表达的基因可能会被其它时间点样品中表达的基因所屏蔽, 这可能是获得的EST总数相对较少的原因。

韧皮部是植物进行信号长距离运输的通道, 在韧皮液中含有多种mRNA, 我们发现EBR处理后, 上调了很多和抗性相关基因的表达(图1), 在7个分类中, 除相似度低的基因外, 激素和胁迫响应基因所占比例最高, 达到11.8%, 包括编码yippee family protein, putative ankyrin-repeat protein, F-box family protein, auxin-induced protein, major latex protein-related等5个基因, 符合前人研究结果, EBR能够提高植物的系统抗性(Sateesh K, 2006; Clouse, 1998; Anuradha和Rao, 2001; Nakashita 等, 2003), SSH文库还包括了16.4%的光合作用相关基因, 都为光系统基因, 如photosystem II protein I, photosystem I P700 apoprotein A2, 也有实验表明, BR可以提高光合相关基因的表达(Krebbes 等, 1998; Jansson 等, 1999), 这些研究解释了在本实验中EBR处理对2个光合作用相关基因表达的上调。EBR还上调了编码细胞骨架microtubule-associated protein, 蛋白合成40S ribosomal protein S7-like protein、跨膜和运输通道phosphate translocator等的基因。

综合以上分析, 这些基因在植物的光合作用, 蛋白合成, 细胞骨架, 跨膜通道以及激素和胁迫响应等方面具有重要作用, 这些基因对EBR响应的变化, 说明EBR促进了这些基因的合成和运输, 进而提高植株的抗性。

### 第三章 EBR 对黄瓜韧皮液基因差异表达的影响

荧光实时定量 PCR (RT-PCR) 是将 RNA 的反转和 cDNA 的聚合酶链式扩增相结合的技术。首先经反转录酶的作用从 mRNA 合成 cDNA, 再以 cDNA 为模板, 扩增合成目的片段。RT-PCR 技术灵敏而且用途广泛, 可用于检测细胞中基因表达水平, 作为模板的 RNA 可以是总 RNA、mRNA 或体外转录的 RNA 产物。无论使用何种 RNA, 关键是确保 RNA 中无 RNA 酶和基因组 DNA 的污染。

从第二章 SSH 的结果可知, EBR 上调韧皮液中一些基因的表达, 为了更精确地检测文库中这些基因表达得上调程度, 选取与激素和胁迫响应、光合作用、细胞骨架、跨膜和运输通道、蛋白合成相关和四个未知功能的基因, 通过对这些基因设计特异引物, 利用 RT-PCR 技术对这些基因的在转录水平上进行研究, 也是对通过 SSH 获得差异基因的验证。

#### 1 材料和方法

##### 1.1 材料与实验处理

同上一章。在 EBR 处理 6 h 取样。

##### 1.2 目的基因 PCR 引物的设计

对于上述获得的已知黄瓜基因利用 Primer Premier 5.0 软件进行引物设计。

##### 1.3 总 RNA 的抽提

- 1) 在装有韧皮液样品的 1.5 ml 的离心管中加入 1 ml 的 Trizol 试剂; 混合均匀, 室温放置 5 min;
- 2) 4°C, 12,000 rpm 离心 5 min, 将上清液转移到新的无 RNA 酶的离心管中, 弃沉淀;
- 3) 向上清中加入 200  $\mu$ l 氯仿, 振荡混匀, 室温放置 15 min;
- 4) 4°C, 12,000 rpm, 离心 15 min, 取上清液到另一个无 RNA 酶的离心管中, 加入 500  $\mu$ l 的异丙醇, 混合均匀, 室温放置 10-30 min;
- 5) 4°C, 12,000 rpm, 离心 15 min, 小心弃去上清, RNA 沉于管底;

- 6) 加入 1 ml 75% 无 RNA 酶的乙醇，温和振荡离心管，悬浮沉淀；
- 7) 4°C，7500 rpm，离心 5 min，弃上清；
- 8) 室温晾干，用适量 DEPC-H<sub>2</sub>O 溶解沉淀；
- 9) 用 ND-1000 紫外分光光度计测定 RNA 样品含量与纯度，并用甲醛变性凝胶电泳对 RNA 的质量进行检验。

#### 1.4 RT-PCR 法克隆目的基因片段

##### 1.4.1 第一链 cDNA 的合成

- 1) 在 DEPC 处理的无 RNA 酶的 1.5 ml 的离心管中加入：

总 RNA	2 μg
ribonuclease inhibitor	0.5 μl
oligo (dT) <sub>18</sub>	2 μl
DEPC-H <sub>2</sub> O	补充至 10 μl

混匀，轻微离心；

- 2) 65°C 温育 5 min；
- 3) 室温放置 10 min，轻微离心；
- 4) 在反应管中依次加入下列组分：

5 × first-strand buffer	4 μl
DTT(20 mM)	2 μl
dNTP mix	2 μl
ribonuclease inhibitor	0.5 μl
powerscript reverse transcriptase	1 μl
终体积	20 μl

吸打混匀，轻微离心；

- 5) 37°C 温育 1 h；
- 6) 90°C 处理 5 min，立即冰浴 2 min；
- 7) 所得 cDNA 保存于 -20°C 备用。

### 1.4.2 目的基因片段的扩增和纯化

目的基因片段的扩增采用常规的 PCR 方法, 根据引物的  $T_m$  值以及目的片段的长度对 PCR 反应程序的退火温度和延伸时间做适当的调整。PCR 反应体系 (100  $\mu$ l) 如下:

10 × reaction buffer	10 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	7 $\mu$ l
dNTP (10 mM each)	2 $\mu$ l
上游引物 (10 $\mu$ M)	2 $\mu$ l
下游引物 (10 $\mu$ M)	2 $\mu$ l
模板	5 $\mu$ l
Taq DNA polymerase	1 $\mu$ l

## 2 结果与分析

### 2.1 目的基因 PCR 引物的设计

表2 关键基因引物设计

Table2 The desire of significant primer

基因	上游引物序列	下游引物序列
microtubule-associated protein	TTTCGCGGGAATCTTAATGT	TGCAAGACTGGAGTTGAAATG
phosphate translocator	GGAATTCGATTAGCGTGGTC	ACGTTTCTTCAAGCCACCTT
photosystem II protein I	TCCTGGAGATTGTGTAATGCTT	TGAGGAAGGGTGTGGAATAGA
photosystem I P700 apoprotein A2	TGGCTAATTTGATTCGATGG	CAATCAAGAAAGCCGCATAA
40S ribosomal protein	GACCCAAAGGAGAGGAACAA	CGGTTATCGGGAACCTCAAAC
auxin-induced protein	GCAGGTACCTTGGGAGATGT	ATCCATCTGTCTTGCCTCCT
yippee family protein	GATGTCTCATAAAGCGCAA	TTTCTGGTTACCCATTTCCC
Major latex protein-related	GATTGGGACACTCATGGTCA	CCTTCCAACCCAATCAAAGT
F-box family protein	GGTGGGTTGAAATAGGAGGA	TTGTTGTTGGAAACTGAGAGTTC
putative ankyrin-repeat protein	GGTGCTGAAGTTGCTTGAAA	AGGCAACTCCGGTCCTAAC
hypothetical protein	AGAGTGCTCAAAGCAAGCCT	ATCATTACTIONCCGATCCCGAA
No significant similarity	GGGATTGATTTCGATTCTCTCAT	TGCTTCCTATCCAAAGCAGA

No significant similarity	TAGTCGTCGATTTGGTCGAA	GAGAAGGGTGTGGGAATCAT
No significant similarity	AAAGCATTTAGGCCCTTGTG	GCCGAGCACATTAAGCAGT

### 2.2 目的基因在黄瓜韧皮部的表达

由上图可以明显看出,这些基因经EBR诱导后表达均上调,其中类乳球蛋白序列,光合系统蛋白和假设蛋白上调3-5倍,被强烈诱导; C60 F-box蛋白序列和C579锚蛋白上调1.5-2.5倍; C368开心蛋白序列, C60微管结合蛋白序列, C453生长素诱导序列和C568磷酸转运器上调微弱, 在1.5倍以内。

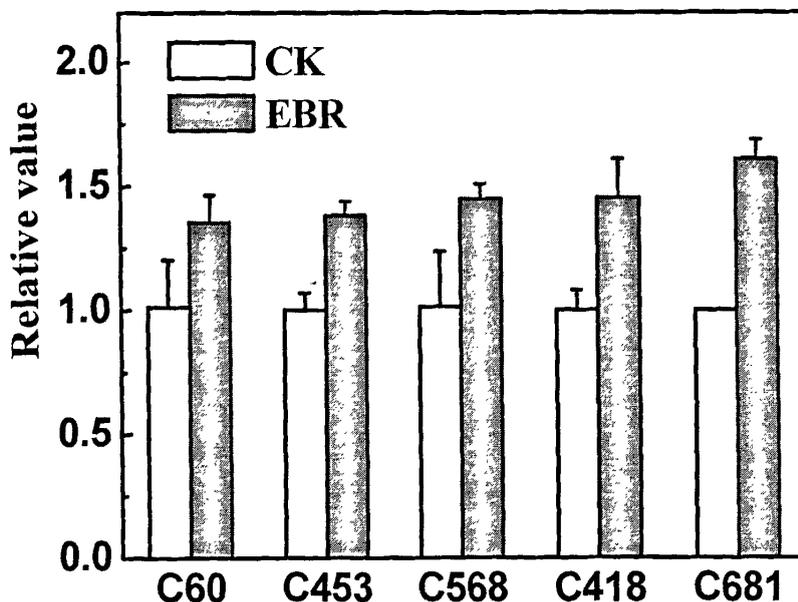


图2 黄瓜叶面喷施 24-表油菜素内酯 (EBR) 对韧皮部基因表达的影响 (C60; C453; C568; C418; C681)

Fig. 2 Effects of 24-epibrassinolide (EBR) foliar application on the gens expression in EBR-treated of cucumber plant (C60; C453; C568; C418; C681)

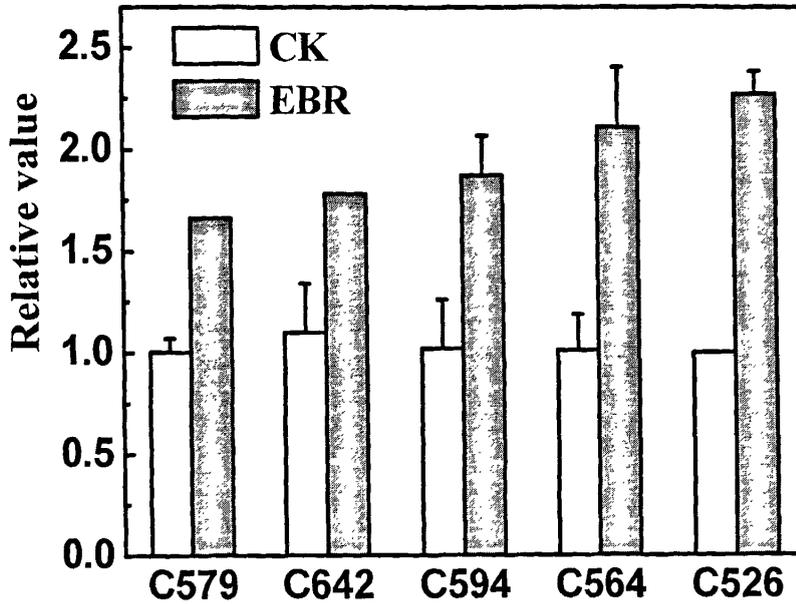


图 3. 黄瓜叶面喷施 24-表油菜素内酯(EBR)对韧皮部基因表达的影响(C579; C642; C594; C564; C526)

Fig. 3 Effects of 24-epibrassinolide (EBR) foliar application on the gens expression in EBR-treated of cucumber plant ( C579; C642; C594; C564; C526 )

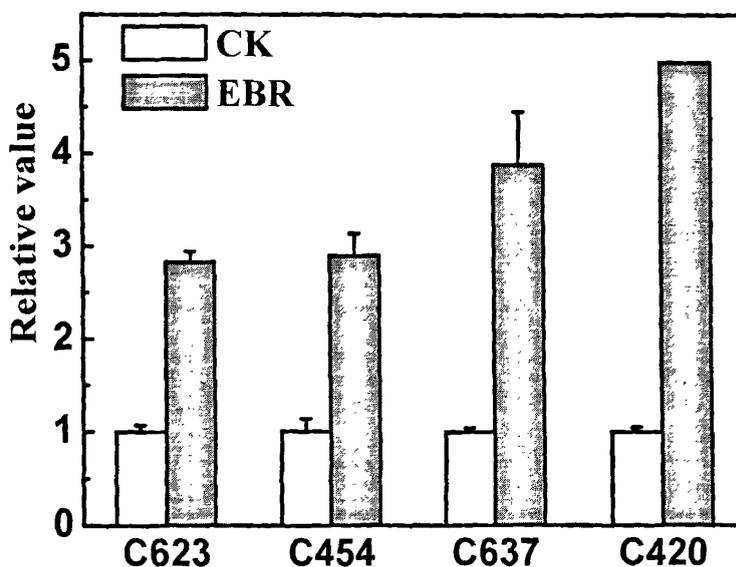


图 4 黄瓜叶面喷施 24-表油菜素内酯 (EBR) 对韧皮部基因表达的影响 (C623; C454; C637; C420)

Fig. 4 Effects of 24-epibrassinolide (EBR) foliar application on the gens expression in EBR-treated of cucumber plant (C623; C454; C637; C420)

### 3 讨论

从第二章SSH的研究结果可知, EBR上调韧皮液中一写基因的表达, 为了更精确地检测文库中这些基因表达得上调程度, 我们选取了激素和胁迫响应、光合作用、细胞骨架、跨膜和运输通道、蛋白合成和四个与其他物种相似性低的基因 (C453、C579、C681、C623、C594、C420、C637、C568、C60、C642、C418、C526、C454、C564), 通过RT-PCR的方法来检测EBR对这些基因的表达的影响 (图2)。结果发现, 14个基因中50%的表达在被EBR上调2倍, 其中C623.类乳胶蛋白序列、C454.假定蛋白、C637.光合系统II蛋白I、C420.光合系统I P700辅酶A2被上调3倍以上。C623

类乳胶蛋白在瓜类植物的茎含量较高,能够感受伤害,并和次生代谢物的储存有关,在果实发育前期能够保护果实免受病原菌的侵害(Aggelis 等, 1997),其mRNA能够被乙烯抑制(Aggelis, 1997; Renaud, 1994); C637光合系统II蛋白I和C420光合系统I P700辅酶A2被EBR上调了4-5倍,说明EBR能够显著增强植物的光合作用; EBR处理上调了茉莉酸响应基因C594 F-box家族蛋白序列, Woo等2001年证实F-box在茉莉酸途径中能够负调节ORE9,延迟叶片衰老,在泛素系统中F-box蛋白能够选择性的恢复聚泛素和蛋白质水解的受体,而泛素调节蛋白降解是在许多不同激素互话途径机制中的中心调解者(Deshaies 等, 1999; 秘彩莉 等, 2006),而C453生长素诱导蛋白为生长素响应基因,也能够被EBR诱导上调,因此推测EBR可能与其它植物生长物质存在互作。C579重复序列在蛋白质的互作中起作用(杜海宁和胡红雨, 2002),主要集中在有关信号转导中的自身防御(Sedmvick 等, 1998; Xu, 2007; Kuhlmann 等, 2003); C681开心蛋白序列在植物的各个生长阶段都存在,并具有一定的调节作用(Roxstrom-Lindquist, 2001); C454是一个编码假设蛋白的基因,被EBR处理后上调3倍,表明它有可能是BRs响应基因,它的功能还有待进一步的研究。

综上所述,本文通过SSH的方法构建了EBR处理上调的黄瓜韧皮液cDNA文库,系统地分析了EBR诱导黄瓜韧皮液所涉及的对光合作用,激素和胁迫响应,跨膜和运输通道,蛋白合成,细胞骨架等方面的调节。其中,EBR对胁迫响应的基因影响最大,这不仅表现为在SSH文库中胁迫响应相关基因所占比例较高,还表现在几个抗性相关基因在EBR处理植株的韧皮液中高表达水平。

## 第四章 EBR对黄瓜韧皮液中差异蛋白表达的影响

随着后基因组时代的到来,蛋白质组学得到了空前的发展,蛋白质组研究旨在揭示基因表达的真正执行生命活动的全部蛋白质的表达规律和生物功能。包括蛋白质组、蛋白质组学、功能蛋白质组学和结构基因组学等新的概念的提出,蛋白质组学已成为当今生物领域中极其活跃的学科。其中双向电泳(2DE)是蛋白质组研究的三大关键核心技术之一。由于双向电泳技术在蛋白质组与医学研究中所处的重要位置,它可用于蛋白质转录及转录后修饰研究,蛋白质组的比较和蛋白质间的相互作用,细胞分化凋亡研究,致病机制及耐药机制的研究,疗效监测,新药开发,癌症研究,蛋白纯度检查,小量蛋白纯化,新替代疫苗的研制等许多方面。

双向电泳由于具有高分辨率和高灵敏度已成为分析复杂蛋白混合物的基本工具。自1975年,O'Farrell等建立这种技术后,已有许多改进,使得这一技术日趋完善,2D的第一向电泳是等电聚焦电泳(IEF),然后通过十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)对蛋白质进行第二向电泳;在IEF中,蛋白质因等电点不同而被分离,在SDS-PAGE中,不同分子量的蛋白质相互间被分离开,再用考马斯亮兰或银染进行检测,经Pdquest等软件对结果进行比对、解析。由于蛋白质的等电点和分子量是两个彼此不相关的重要性质,而2DE同时利用了蛋白质间的这两个性质上的差异分离蛋白质,因此2DE的分离能力非常强大,它甚至能将细胞中的5000种蛋白分离开,2DE在分离蛋白混合样品,比较差异方面有不可替代的作用,结合质谱鉴定技术可查明大型蛋白复合物各组组分,与其它生物技术如分子生物学、分子遗传工程、免疫学、微量蛋白质的自动氨基酸序列分析相结合,可以快速准确地发现和鉴定新的蛋白质。

韧皮系统中信号物质不仅包括mRNA,也包含大量的蛋白质,其在感受外界信号,调控植物生长发育及抗性的过程中也发挥着重要的作用,本章利用2D PAGE技术对响应EBR的特异蛋白进行分析。

## 1 材料与方方法

### 1.1 实验处理与材料

表油菜素内酯 (EBR) (又名: 云大120原药)有效含量 $\geq 90\%$ , 干燥失量 $\leq 0.5\%$ , 批号0710-25Ha。使用前用无水乙醇和吐温20作为溶剂配成 $100 \text{ mg L}^{-1}$ 的母液 (含80%无水乙和20%吐温20)。供试黄瓜选用 (*Cucumis sativus L. cv. Jinyan No.4*) 品种为津研4号。将预先浸种、催芽的黄瓜种子播于蛭石基质中, 片子叶充分展开时移入大棚种植, 温度为 $20-30^{\circ}\text{C}$ , 六叶一心时进行处理。

### 1.2 实验设计

实验于2007年11月-2008年4月在浙江大学玻璃连栋温室及园艺系蔬菜植物生理实验室进行。实验主要采用的是对照实验的方法, 实验共分为两大部分, 分别研究相同EBR浓度, 相同时间下, EBR对黄瓜韧皮液蛋白的影响。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 EBR 处理方法

于黄瓜六叶一心期处理, 喷施的浓度为 $0.1 \text{ mg L}^{-1}$ , 量为EBR 200 ml/株, 喷施水平以叶片药液欲滴而未滴为度, 叶面以及叶背均喷。

#### 1.3.2 韧皮液的收集方法

EBR处理6h取样, 方法同上一章。

#### 1.3.3 蛋白提取液的配置

- (I)  $\beta$ -巯基乙醇丙酮法 0.07%  $\beta$ -巯基乙醇/丙酮
- (II) TCA-丙酮法 10%三氯乙酸/丙酮
- (III) HCL-丙酮法 0.1 M HCL 0.1% DTT 丙酮
- (IV) 酚提取法 提取液 50 mM Tris-HCL(PH 8.0)  
25 mM EDTA  
500 mM 硫脲  
0.5%  $\beta$ -巯基乙醇

### 1.3.4 韧皮蛋白的提取

#### (I) $\beta$ -巯基乙醇丙酮法:

1.5 ml的离心管置于冰上,加入 $\beta$ -巯基乙醇丙酮900  $\mu$ l,收集50  $\mu$ l的韧皮液,混匀,-20 $^{\circ}$ C过夜,14000 rpm 4 $^{\circ}$ C离心30 min,弃去上清,加入1 ml冰丙酮洗两次,14000 rpm 4 $^{\circ}$ C离心15 min;超净台干燥。

#### (II) TCA-丙酮法:

1.5 ml的离心管置于冰上,加入提取液900  $\mu$ l,收集50  $\mu$ l的韧皮液,混匀,-20 $^{\circ}$ C过夜,14000 rpm 4 $^{\circ}$ C离心30 min,弃去上清,加入等体积的冰丙酮洗两次,14000 rpm 4 $^{\circ}$ C离心15 min;超净台干燥。

#### (III) HCL-丙酮法:

1.5 ml的离心管置于冰上,加入0.1 M HCL150  $\mu$ l,收集韧皮液50  $\mu$ l,混匀,14000 rpm 4 $^{\circ}$ C离心10 min,吸取上清液,加入冰丙酮750  $\mu$ l,-20 $^{\circ}$ C过夜,14000 rpm 4 $^{\circ}$ C离心30 min,冰丙酮洗两次,14000 rpm离心15 min;超净台干燥。

#### (IV) 酚提取法:

1.5 ml的离心管置于冰上,加入提取液1ml,收集韧皮液100  $\mu$ l,混合后置于冰上10 min,14000 rpm 4 $^{\circ}$ C离心20 min,吸取上清液于新的离心管中,14000 rpm 4 $^{\circ}$ C离心10 min,去杂质;取上清液加入等体积Tris-buffered phenol(PH 8.0),冰上放置30 min,10000 rpm 4 $^{\circ}$ C离心10 min分层;取上层酚相;加入5倍体积0.1 M 苯酚/甲醇,-20 $^{\circ}$ C过夜;用预冷的丙酮洗3次,1% $\beta$ -巯基乙醇丙酮洗一次,超净台干燥。

蛋白质定量:

蛋白质裂解液: 7 M 尿素  
2 M 硫脲  
4% CHAPS  
0.1% DTT  
Millin Q 水

将蛋白质沉淀溶解在裂解液里,用考马斯亮蓝-牛血清蛋白做标线,定量。

### 1.3.5 SDS-PAGE 电泳

样品：四种蛋白质提取方法的韧皮部蛋白

12%聚丙烯酰胺凝胶

### 1.3.6 双向电泳

(一) 第一向等电聚焦(用自制的电泳上样缓冲液, 7 cm的胶条, pH 3-10)

- 1) 从冰箱取-20℃冷冻保存的IPG预制胶条(7 cm pH 3-10), 于室温放置10分钟。
- 2) 从冰箱中取-20℃冷冻保存的水化上样缓冲液(I) (不含DTT, 不含Bio-Lyte) 一小管(1 ml/管), 置室温溶解;
- 3) 在小管中加入0.01 g DTT, Bio-Lyte 3-10各2.5  $\mu$ l, 充分混匀。
- 4) 从小管中取出200  $\mu$ l 水化上样缓冲液, 加入5  $\mu$ l (30  $\mu$ g) 样品, 充分混匀;
- 5) 沿着聚焦盘或水化盘中槽的边缘至左而右线性加入样品。在槽两端各1 cm左右不要加样, 中间的样品液一定要连贯。注意: 不要产生气泡。否则影响到胶条中蛋白质的分布;
- 6) 当所有的蛋白质样品都已经加入到聚焦盘或水化盘中后, 用镊子轻轻的去 除预制IPG胶条上的保护层;
- 7) 将胶条小心放在已经加入样品的水化盘内, 胶面朝下, 从左向右, 不能有气泡产生;
- 8) 在槽内加满矿物油, 相邻槽内也要加满, 如有条件, 全部槽内都要充满油, 避免温度升高时油层挥发而导致胶条暴露于空气中。使胶条被动吸收样品, 需要12 h;
- 9) 吸收完全后, 将胶条转移到滤纸上, 用湿润的滤纸洗走多余的样品液;
- 10) 分清胶条的正负极, 轻轻地将IPG胶条胶面朝下置于聚焦盘或水化盘中样品溶液上, 使得胶条的正极对应于聚焦盘的正极。在胶条的两端, 加湿润的盐纸条, 除盐离子。电极夹在盐条上, 并确保胶条与电极紧密接触。不要使样品溶液弄到胶条背面的塑料支撑膜上, 因为这些溶液不会被胶条吸收。同样还要注意不使胶条下面的溶液产生气泡。如果已经产生气泡, 用镊子轻轻地提起胶条的一端, 上下移动胶条, 直到气泡被赶到胶条以外;

- 11) 在每根胶条上覆盖2-3 ml矿物油,防止胶条水化过程中液体的蒸发。需缓慢的加入矿物油,沿着胶条,使矿物油一滴一滴慢慢加在塑料支撑膜上;
- 12) 对好正、负极,盖上盖子,设置等电聚焦程序:

等电聚焦程序设置

7cm胶条

水化 50V 12-16小时 (20℃) 主动水化

S1 250V 线性 30分钟 除盐

S2 500V 快速 30分钟 除盐

S3 4000V 线性 3小时 升压

S4 4000V 快速 20,000伏小时 聚焦

S5 500V 快速 任意时间 保持

选择所放置的胶条数;

设置每根胶条的极限电流; (30-50  $\mu$  A/根)

设置等电聚焦时的温度; (20℃)

- 13) 聚焦结束的胶条。立即进行平衡、第二向SDS-PAGE电泳。

## (二) 第二向SDS-PAGE电泳

按照伯乐的操作说明进行

凝胶电泳完成以后进行染色(按照伯乐染色试剂盒上的操作步骤)

- a) 固定 室温10 min, 200 ml (以充分浸透为准);

配方: 乙醇: 冰乙酸: 水=4:1:5

- b) dH<sub>2</sub>O漂洗充分, 200 ml, 10 min;

- c) 加敏化剂, 室温5 min, 200 ml (以充分浸透为准)

配方: 戊二醛(成品: 25%水溶液) 200  $\mu$ l

甲醛: (成品: 37%) 10  $\mu$ l

乙醇: 40 ml, 稀释成100 ml

- d) 40%乙醇(V/V)充分漂洗, 200 ml, 20 min;

- e) dH<sub>2</sub>O充分漂洗, 200 ml, 20 min;

- f) 加敏化剂, 100 ml, 1 min;

配方：0.02%硫代硫酸钠（w/v）即0.2 g/L；  
dH<sub>2</sub>O充分漂洗，200 ml，2次，1-2 min/次；  
加0.5%硝酸银（w/v），200 ml室温20min；  
以先配成20%母液（2 g/10 ml）新鲜配制使用；

- g) dH<sub>2</sub>O充分漂洗，200 ml，2次，1-2 min/次；
- h) 加显色剂100 ml至胶转黄（约1 min）；
- i) 重新换新的显色剂直到所需显色情况（约15 min）

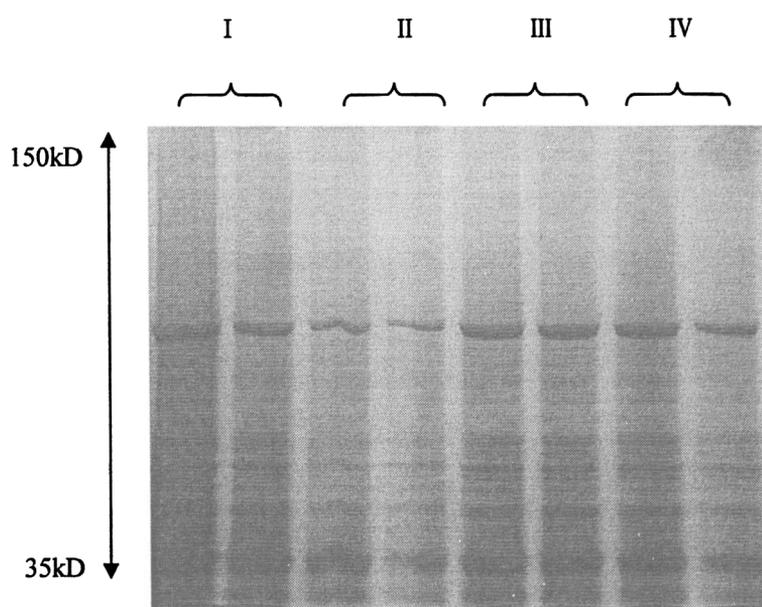
配方：碳酸钠 5g，甲醛（37%） 0.02%（v/v）加水200 ml即成。

- j) 终止：5%冰乙酸，5 min；
- k) 保存，于0.03%碳酸钠中。

## 2 结果与分析

### 2.1 四种蛋白提取方法

$\beta$ -巯基乙醇丙酮法、TCA-丙酮法、HCL-丙酮法、酚提取法提取的韧皮蛋白样品定量后做 SDS-PAGE 分析，如图 6，处理和对照相比都没有明显的新条带出现，从样品质量上判定，HCL-丙酮法提取得蛋白条带较多且清晰不弥散，说明样品制备较好，因此，在后续试验中，采用 HCL-丙酮法制备双向电泳的样品。



CK BR CK BR CK BR CK BR

图 6. 黄瓜韧皮蛋白 SDS-PAGE 电泳检测( I.  $\beta$ -巯基乙醇丙酮法; II. TCA-丙酮法;  
III. HCL-丙酮法; IV. 酚提取法)

Fig.6 The SDS-PAGE analysis of phloem protein( I .  $\beta$ -mercaptoethanol-acetone;  
II .TCA-acetone; III.HCL-acetone; IV. phenol-methyl alcohol)

## 2.2 双向电泳分析

由图可知, 处理 (图7-2)和对照(图7-1)有明显差异, 其中EBR处理的黄瓜韧皮蛋白 (图7-2, n=1, )在PH=8.0,分子量为25kDa, 其表达上调, 是一种碱性蛋白, EBR对其它三种蛋白(图7-1, n=2, 75Kda; n=3, 95 Kda; n=4, 60 KDa)则起到了抑制的效果。n=2的蛋白点位于PH=7.5, 属于微碱性蛋白, n=3的蛋白PH=7, 属于中性蛋白, n=4的蛋白位于PH=4, 属于酸性蛋白。

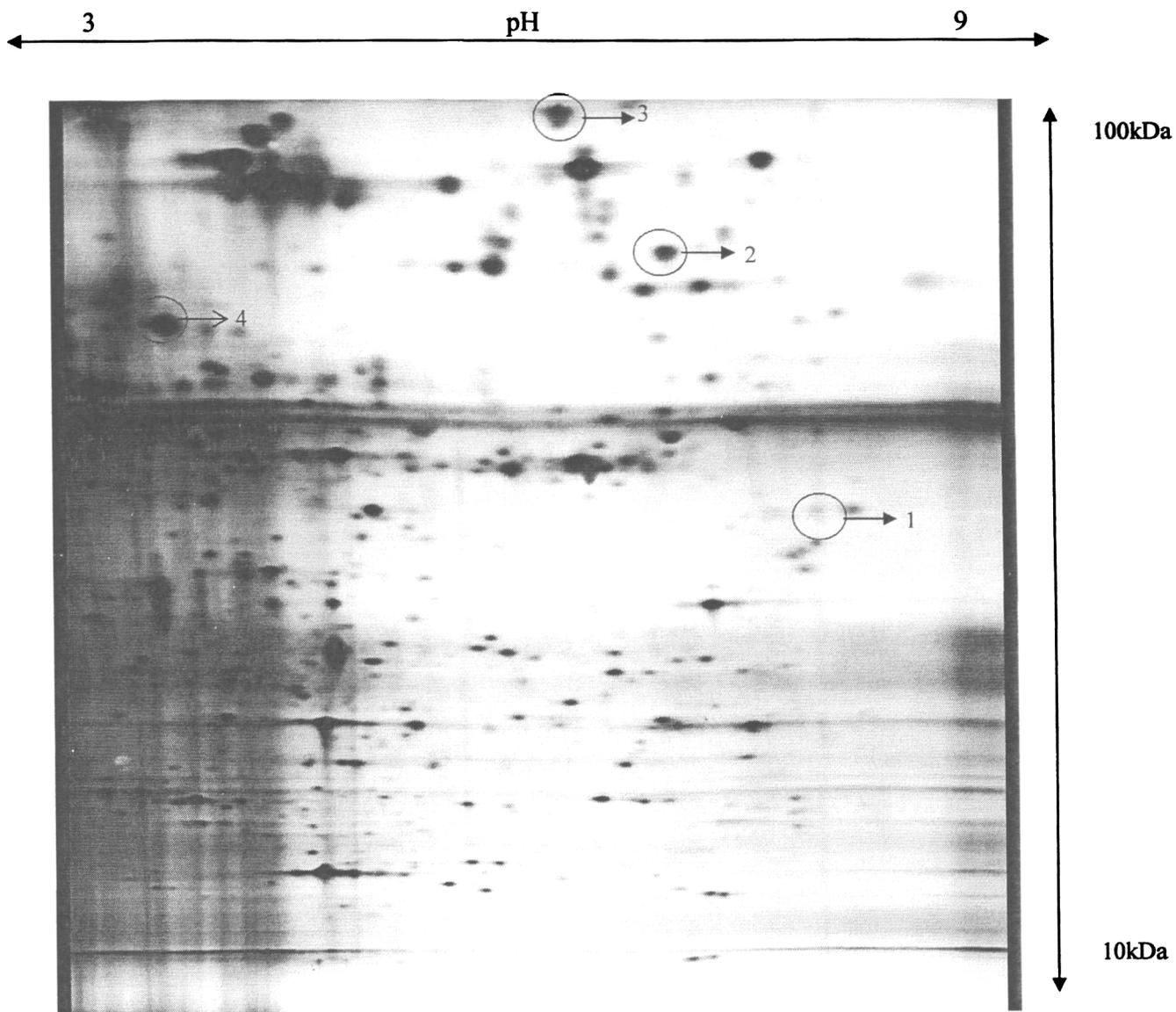


图 7-1 黄瓜韧皮蛋白 2D PAGE 分析 (CK)

Fig.7-1 The 2D PAGE analysis of phloem protein (CK)

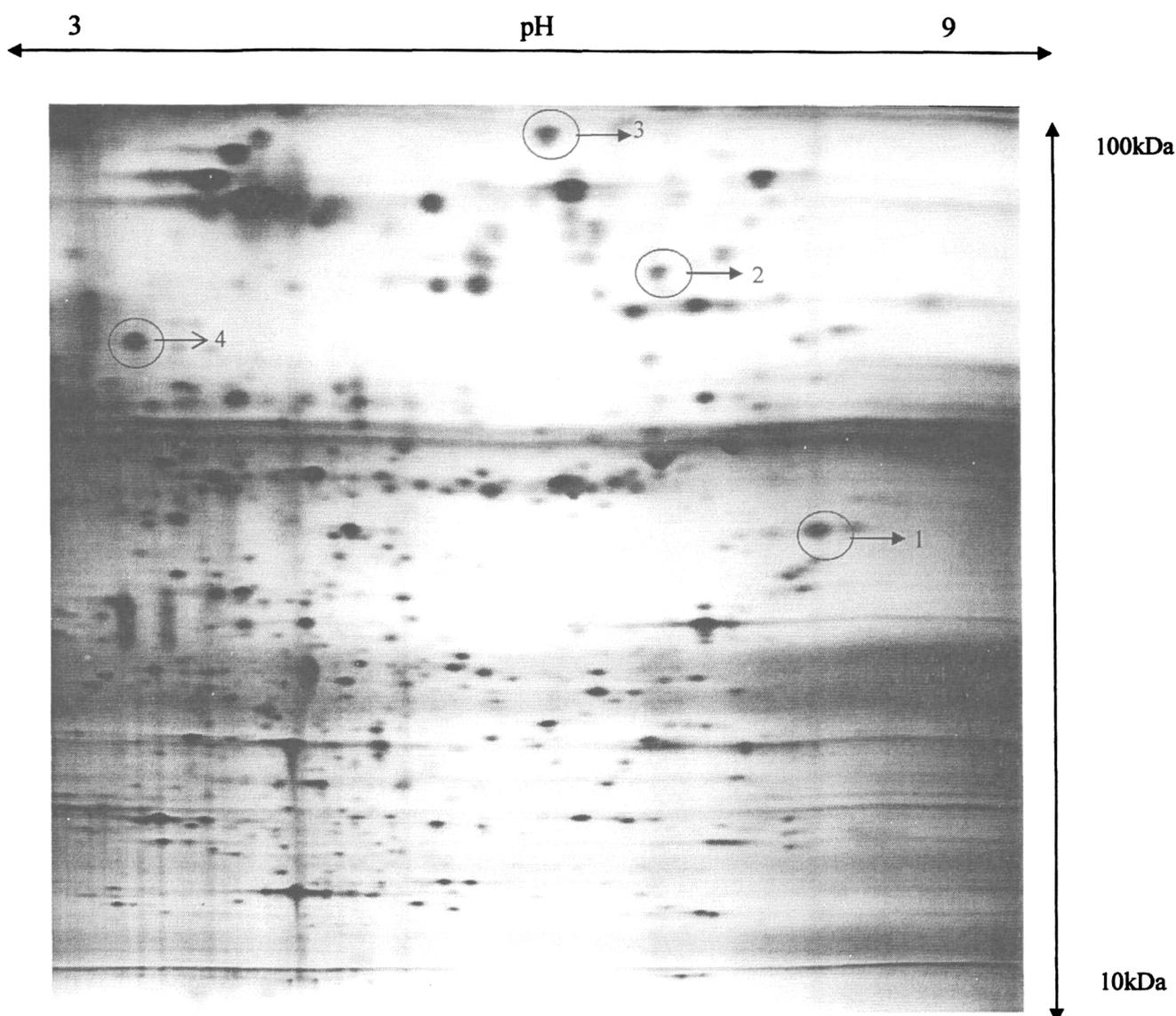


图 7-2 黄瓜韧皮蛋白 2D PAGE 分析 (BR) (n=1 上调, n=2、3、4 下调)

Fig.7-2 The 2D PAGE analysis of phloem protein (BR) (n=1 upexpression, n=2、3、4 downexpression)

### 3 讨论

前人已研究证实, 在黄瓜的韧皮部, PP2蛋白是高丰度蛋白 (Golecki, 1999; Walz, 2004), 分子量约48 kDa lectin的二聚体, PP2结合RNA通过胞间连丝运输, PP2能够增大胞间连丝通道的尺度, 促进致病性病原菌和其他RNA的运输 (Owens等, 2001)。Lectin 26能够结合RNA形成核蛋白复合体, 在细胞-细胞间运输和韧皮

部长距离运输中能够维持RNA结构的稳定性 (Gomez, 2005); 在信号转导途径中, lectin 26能够促进细胞和分子的信号识别 (Gomez和Pallas, 2004), 在光信号途径中和病毒侵染过程中介导植物的防御反应, 调节蛋白-蛋白间互作 (Dinant 等, 2003)。lectin 17也是一种植物凝集素,在植物韧皮部中, 能够促进致病性病原菌和其他RNA的运输 (Owens 等, 2001), 并且lectin 17能够被细胞分裂素抑制 (Toyama 等, 1995), 在韧皮部中结合生长素, 在脉管的分化中起作用。

本试验研韧皮蛋白双向凝胶电泳显示EBR处理和对照存在差异, 其中有一个28 KDa蛋白点的表达明显高于对照, 另外三个蛋白点 (60 KDa、75 KDa、95 KDa) 则明显弱于对照, 说明EBR调控了黄瓜叶片内某些相关蛋白的合成及其在韧皮部的运输。但这些蛋白的结构和功能还未明确, 需要进一步利用质谱鉴定。

综上所述, 外源EBR影响了黄瓜韧皮液中蛋白质的表达, 促进28 KDa蛋白的合成和运输, 抑制了60 KDa、75 KDa、95 KDa三种蛋白的合成和韧皮部运输, 但这些蛋白质的生理功能以及分子生物学的研究有待进一步探讨。

## 第五章 主要结论

在本实验室以往相关研究的基础上, 本文以黄瓜为研究对象, 从韧皮液 RNA 和蛋白质运输着手, 通过结合利用抑制消减文库技术和 RT-PCR (Real-Time PCR) 技术, 从黄瓜韧皮液中克隆获得了一系列黄瓜代谢途径中对表油菜素内酯 (EBR) 响应的关键基因; 研究还从蛋白质组学方面, 利用 2D-PAGE 技术进一步研究了与响应 EBR 的黄瓜韧皮蛋白, 并就 EBR 对黄瓜生长发育及抗性的影响机制进行了探讨。得出以下结论:

一、通过建立 SSH 筛选获得了 28 个可能存在差异表达的 EST 片段, 主要涉及能量产生和光合作用、运输通道、蛋白合成运输和转运、细胞骨架、细胞的分裂调控、激素响应以及逆境相关调控方面, 通过生物信息学手段深入分析后获得了有关 EST 功能的相关信息, 确切的功能还有待于深入而细致的研究。

二、采用生物信息学手段, 以所获 EST 片段为基础, 利用网络数据库中已有的序列信息, 结合 RT-PCR 方法, 进一步验证 EBR 处理黄瓜叶片对韧皮液中编码类乳脂蛋白、光合系统 II 蛋白 I、光合系统 I P700 脱辅基蛋白 A2、锚蛋白、40s 类核糖体蛋白、F-box 家族蛋白、微管结合蛋白、植物激素诱导蛋白、磷酸盐转运蛋白、开心蛋白等基因的表达有明显促进作用, 说明 EBR 促进了黄瓜韧皮液内基因的表达。

三、韧皮蛋白双向凝胶电泳显示 EBR 处理和对照存在差异, 其中有一个 28 KDa 蛋白点的表达明显高于对照, 另外三个蛋白点 (60 KDa、75 KDa、95 KDa) 则明显弱于对照, 说明 EBR 调控了黄瓜叶片内某些相关蛋白的合成及其在韧皮部的运输。

综上所述, 黄瓜叶片喷施表油菜素内酯引起了了黄瓜韧皮液中 mRNA 和蛋白表达的变化。这些 mRNA 和蛋白是否在介导油菜素内酯调控植物的生长发育及抗性的过程中起到了一定的作用及其作用机理还需要进一步的

## 参考文献

- Aart E, Vanbel and Gaupels F. Pathogen-induced resistance and alarm signals in the phloem. *Molecular plant pathology*, 2004, 5 (5):495–504
- Aggelis A, John I, Karvouni Z, Grierson D. Characterization of two cDNA clones for mRNAs expressed during ripening of melon (*Cucumis melo* L.) fruits. *Plant Molecular Biology*, 1997, 33:313-322
- An H, Roussot C, Suarez-Lopez P, Corbesier L, Vincent C. CONSTANS acts in the phloem to regulate a systemic signal that induces photoperiodic flowering of *Arabidopsis*. *Development*, 2004, 131:3615-3626
- Anuradha S, Rao SSR. Effect of brassinosteroids on salinity stress induced inhibition of seed germination and seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Growth Regulation*, 2002, 33:151-153
- Aoki K, Suzui N, Fujimaki S, Dohmae N, Yonekura-Sakakibara K, Fujiwara T, Hayashi H, Yamaya T and Sakakibara H. Destination-Selective Long-Distance Movement of Phloem Proteins. *The plant cell*, 2005, 17:1801-1814
- Barrick D, Ferreira DU and Komives EA. Folding landscapes of ankyrin repeat proteins: experiments meet theory. *Current Opinion in Structural Biology*, 2008, 18:27-34
- Citovsky V, Zambryski P. Systemic transport of RNA in plants. *Trends Plant Science*, 2000, 5:52-54
- Clouse SD, Sasse JM. Brassinosteroids: Essential regulators of plant growth and development. *Annual Review Plant Physiology & Plant molecular Biology*, 1998,49:427-451
- Deshaias RJ. SCF and Cullin/Ring H<sub>2</sub>-based ubiquitin ligases. *Annual Review of Cell Development Biology*, 1999; 15:435–467
- Dinant S, Clark AM, Zhu Y, Vilaine F, Palauqui JC, Kusiak C, and Gary A. Thompson. Diversity of the Superfamily of Phloem Lectins (Phloem Protein 2) in Angiosperms. *Plant Physiology*, 2003, 131: 114-128
- Doering-Saad C, Newbury HJ, Couldridge CE, Bale JS and Pritchard J. A

- phloem-enriched cDNA library from *Ricinus*: insights into phloem function. *Journal of Experimental Botany*, 2006, 57 (12):3183-3193
- Fiehn O. Metabolic networks of *Cucurbita maxima* phloem. *Phytochemistry*, 2003, 62:875-886
- Gilbertson RL, Lucas WJ. How do viruses traffic on the “vascular highway”? *Trends Plant Science*, 1996, 1:260–268
- Golecki B, Schulz A, Thompson GA. Translocation of structural P proteins in the phloem. *Plant cell*, 1999, 11:127-140
- Gomez G, Torres H, Pallas V. Identification of translocatable RNA-binding phloem proteins from melon, potential components of the long-distance RNA transport system. *Plant Journal*, 2005, 41:107-116
- Gomez G and Palla's V. A Long-Distance Translocatable Phloem Protein from Cucumber Forms a Ribonucleoprotein Complex In Vivo with Hop Stunt Viroid RNA. *Journal of Virology*, 2004, 78(18):10104-10110
- Grove MD, Spencer FG, Rohwedder WK, Mandava N, Worley JF, Warthen JD, Steffens GL, Anderson F, Cook JC, Brassinolide, a plant growth promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. *Nature*, 1979, 281(2):216-217
- Haywood V, Kragler F, Lucas WJ. Plasmodesmata: Pathways for Protein and Ribonucleoprotein Signaling. *The Plant Cell*, 2002, 303-32
- Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annual Review of Biochemistry*, 1998, 67:425-479
- Hosono K, Sasaki T, Minoshima S, Shimizu N. Identification and characterization of a novel gene family YPEL in a wide spectrum of eukaryotic species. *Gene*, 2004, 340:31-43
- Janssen RP. mRNA localization: message on the move. *Nature reviews of molecular cell biology*, 2001, 2: 247-256
- Kagale S, Divi U, Krochko J, Keller W, Krishna P. Brassinosteroid confers tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* to a range of abiotic stresses. *Planta*, 2007, 225:353-364
- Kaloriti D, Galva C, Parupalli C. Microtubule associated proteins in plants and the

- processes they manage. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2007, 49(8):1164-1173
- Kardailsky I, Shukla VK, Ahn JH, Dagenais N, Christensen SK. Activation tagging of the floral inducer FT. *Science*, 1999,286:1962-1965
- Khripach VA, Zhabinskii VN, Litvinovskaya RP, Zavadskaya MI, Savel'eva EA, Karas II, Kilcchevskii AV, Titova SN. A method for protection of potato from phytophthorosis. *Pathological Application* BY 960346. 1996, 298-310
- Kipreos ET and Pagano M. The F-box protein family. *Genome Biology*, 2000, 1(5):3002-3002
- Klahre U, Crete P, Leuenberger SA, Iglesias VA, Meins F. High molecular weight RNAs and small interfering RNAs induce systemic posttranscriptional gene silencing in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99:11981-11986
- Kobayashi Y, Kaya H, Goto K, Iwabuchi M, Araki T. A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science*, 1999, 286:1960-1962
- Kulaeva ON, Burkhanova EA, Fedina AB, Khokhlova VA, Bokebayeva GA, Vorbrodt HM, Adam G. Effect of brassinosteroids on protein synthesis and plant-cell ultrastructure under stress conditions. *Washington DC, American Chemical Society*. 1991.141-155
- Lee JY, Yoo BC, Rojas MR, Gomez-Ospina N, Staehelin LA, Lucas WJ. 2003. Selective trafficking of non-cell-autonomous proteins mediated by NtNCAPP1. *Science*, 2003, 299:392-396
- Lough TJ and Lucas WJ. Integrative Plant Biology: Role of Phloem Long-Distance Macromolecular Trafficking. *Annual review of plant biology*, 2006, 57:203-232
- Lucas WJ. Plasmodesmata: intercellular channels for macromolecular transport in plants. *Current Opinion in Cell Biology*, 1995, 7:673-680
- Lucas WJ, Lee JY. Plasmodesmata as a supracellular control network in plants. *Nature Reviews of Molecular Cell Biology*, 2002, 5:712-726
- Lucas WJ, Yoo BC, Kragler F. RNA as a long-distance information macromolecule in plants. *Nature Reviews of Molecular Cell Biology*, 2001, 2:849-857

- Mandava NB. Plant growth-promoting brassinosteroids. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1998, 39:23-52
- Moore TC. Biochemistry and Physiology of Plant Hormone 2nd ed. Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin, 1998, 33:863-874
- Nakashita H, Yasuda M, Nitta T, Asami T, Fujioka S, Arai Y, Sekimata K, Takatsuto S, Yamaguchi I, Yoshida S. Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice. *Plant Journal*, 2003, 33: 887-898
- Nishikawa N, Toyama S, Shida A, Fatatsuya F. 1994. The uptake and transport of <sup>14</sup>C-labeled epibrassinolide in intact seedlings of cucumber and wheat. *Journal of Plant Research*, 1994, 107:125-130
- Oparka KJ, Turgeon R. Sieve elements and companion cells-traffic control centers of the phloem. *Plant Cell*, 1999, 11:739-750
- Overvoorde PJ, Okushima Y, Alonso JM, Chan A, Chang C, Ecker JR, Hughes B, Liu A, Onodera C, Quach H, Smith A, Yu GX, Theologis A. Functional genomic analysis of the AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID gene family members in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 2005, 17(12):3282-3300
- Owens RA, Blackburn M, Ding B. Possible involvement of the phloem lectin in long-distance viroid movement. *Molecular plant-microbe interactions*, 2001, 14(7):905-909
- Putterill MS, Rohrer TC. A causal model of employee commitment in a manufacturing setting. *International Journal of Manpower*, 1995, 16(5): 56-71
- Roxstrom-Lindquist K, Faye I. The *Drosophila* gene Yippee reveals a novel family of putative zinc binding proteins highly conserved among eukaryotes. *Insect Molecular Biology*, 2001, 10(1):77-86
- Ruiz-Medrano R, Moya JH, Xoconostle-Cazares B and Lucas WJ. Influence of cucumber mosaic virus infection on the mRNA population present in the phloem translocation stream of pumpkin plants. *Functional Plant Biology*, 2007, 34:292-301
- Ruiz-Medrano R, Xoconostle-Cazares B, Kragler F. The plasmodesmatal transport pathway for homeotic proteins, silencing signals and viruses. *Current Opinion*

- in Plant Biology*, 2004, 7:641-650
- Ruiz-Medrano R, Xoconostle-Cazares B, Lucas WJ. Phloem long-distance transport of CmNACP mRNA: implications for supracellular regulation in plants. *Development*, 1999, 126:4405-4419
- Samach A, Onouchi H, Gold SE, Ditta GS, Schwarz-Sommer Z, Yanofsky MF, Coupland G.. Distinct roles of CONSTANS target genes in reproductive development of *Arabidopsis*. *Science*, 2000, 288(5471):1613-1616
- Sateesh K, Uday K, Joan E. Brassinosteroid confers tolerance in *Arabidopsis Thaliana* and *Brassica napus* to a range of abiotic stresses. *Plant Biology*, 2006, 225(2):353-364
- Sedmvick SG, Smerdon S J. The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends Biochem Science*, 1999, 24 (8):311-316
- Skowrya D, Craig KL, Tyers M, Elledge SJ, Harper JW. F-Box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell*, 1997, 91:209-219
- Smith LM, Pontes O, Searle I, Yelina N, Yousafzai FK, Herr AJ, Pikaard CS and Baulcombe DC. An SNF2 Protein Associated with Nuclear RNA Silencing and the Spread of a Silencing Signal between Cells in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2007, 19:1507-1521
- Sun JY, Wang QM, Chen J, Wang XC. Characteristics of triose phosphate/phosphate translocator from wheat and its role in the distribution of assimilate. *Acta Botanica Sinica*, 2004, 46 (3): 294-301
- Symons GM, Reid JB. Brassinosteroids do not undergo long-distance transport in pea. Implications for the regulation of endogenous brassinosteroid levels. *Plant Physiology*, 2004, 135:2196-2206
- Toyama T, Teramoto H, Takeba G, Hideo T. Cytokinin induces a rapid decrease in the levels of mRNAs for catalase, 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase, lectin and other unidentified proteins in etiolated cotyledons of cucumber. *Plant Cell Physiology*. 1995. 36:1349-1359
- van Bel AJE, Gaupels F. Pathogen-induced resistance and alarm signals in the phloem.

- Molecular plant pathology*, 2004, 5:495-504
- Voinnet O, Pinto YM, Baulcombe DC. Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96:14147-14152
- Voinnet O, Vain P, Angell S, Baulcombe DC. Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell*, 1998, 95:177-187
- Walters RG, Ibrahim DG, Horton P, Kruger NJ. A mutant of Arabidopsis lacking the triose-phosphate/phosphate translocator reveals metabolic regulation of starch breakdown in the light. *Plant Physiology*. 2004, 135(2): 891-906
- Walz C, Giavalisco P, Schad M, Juenger M, Klose J, Kehr J. Proteomics of curcubit phloem exudate reveals a network of defence proteins. *Phytochemistry*, 2004, 65:1795-1804
- Walz C, Juenger M, Schad M, Kehr J. Evidence for the presence and activity of a complete antioxidant defence system in mature sieve tubes. *Plant Journal*, 2002, 31:189-197
- Wasternack C. Jasmonates: An Update on Biosynthesis, Signal Transduction and Action in Plant Stress Response, Growth and Development. *Annals of Botany*. 2007, 100: 681-697
- Woo HR, Chung KM, Park JH, Oh SA, Ahn T, Hong SH, Jang SK, Nam HG. ORE9, an F-box protein that regulates leaf senescence in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 2001, 13: 1779-1790.
- Wu X, Weigel D, Wigge PA. Signaling in plants by intercellular RNA and protein movement. *Genes Development*, 2002, 16:151-158
- Xoconostle-Cazares B, Ruiz-Medrano R, Lucas WJ. Proteolytic processing of CmPP36, a protein from the cytochrome b(5) reductase family, is required for entry into the phloem translocation pathway. *Plant Journal*, 2002, 24:735-747
- Xoconostle-Cazares B, Xiang Y, Ruiz-Medrano R, Wang HL, Monzer J. Plant paralog to viral movement protein that potentiates transport of mRNA into the

- phloem. *Science*, 1999, 283:94-98
- Xu XJ, Jiang CZ, Linda D and Michael SR. Functional analysis of a RING domain ankyrin repeat protein that is highly expressed during flower senescence. *Journal of Experimental Botany*, 2007, 58(13):3623-3630
- Yoo BC, Kragler F, Varkonyi-Gasic E, Haywood V, Archer-Evans S, Lee YM, Lough TJ, and Lucas WJ. A Systemic Small RNA Signaling System in Plants. *The Plant Cell*, 2004, 16:1979-2000
- Yu JQ, Zhou YH, Ye SF, Huang LF. 24-epibrassinolide and abscisic acid protect cucumber seedlings from chilling injury. *Journal Horticultural Science & Biotechnology*, 2002, 7(4):470-473
- Zambryski P, Crawford K. Plasmodesmata: gatekeepers for cell-to-cell transport of developmental signals in plants. *Annual Review Cell Development in Biology*, 2002, 16:393-421
- 丁锦新, 陶晓东, 黄素青. 表油菜素内酯对黄瓜幼苗抗冷性的影响. *浙江农业科学*, 1998, 4: 195-197
- 丁锦新. 表油菜素内酯对黄瓜的生理效应. *浙江农业大学学报*, 1995, 21(6): 615-621
- 丁文明. 表油菜素内酯对黄瓜子叶过氧化物酶活性和可溶性蛋白质含量的影响. *植物生理学报*, 1995, 21(3): 259-263
- 董朝蓬, 杜林方, 段真. 植物凝集素研究进展. *天然产物研究与开发*. 2003, 15(1): 71-76
- 杜海宁, 胡黎雨. 锚蛋白重复序列介导的蛋白质-蛋白质相互作用. *生物化学与生物物理进展*, 2002, 29(1): 6-9
- 谷端银, 王秀峰, 张慎好, 张仁堂. 油菜素内酯在瓜类作物上的研究及应用进展. *中国瓜菜*, 2006(2): 24-27
- 侯雷平, 李梅兰. 油菜素内酯(BR)促进植物生长机理研究进展. *植物学通报*, 2001, 18(5): 560-566
- 胡文海, 黄黎锋, 毛伟华, 周艳虹, 喻景权. 油菜素内酯对黄瓜苗期叶片光合机构调节作用的研究. *园艺学报*, 2006, 33 (4): 762-766

- 康云艳, 郭世荣, 段九菊. 外源2, 4-表油菜素内酯对低氧胁迫下黄瓜幼苗抗氧化系统及蛋白含量的影响. 农业工程学报, 2005, 2 (12): 82-86
- 秘彩莉, 刘旭, 张学勇. F-box 蛋白质在植物生长发育中的功能. 遗传, 2006, 28(10): 1337-1342
- 邱丽娟. 油菜素内酯(BR)对大豆疫霉根腐病抗性的影响. 大豆科学, 2002, 26: 713-727
- 尚庆茂, 宋士清, 张志刚, 郭世荣. 外源BR诱导黄瓜 (*Cucumis sativus* L. ) 幼苗的抗盐性. 中国农业科学, 2006, 39(9): 1872-1874
- 尚庆茂, 张志刚, 董涛, 宋士清, 李晓芬. 油菜素内酯诱导黄瓜幼苗抗灰霉病研究. 应用与环境生物学报, 2007, 13(5): 630-633
- 徐如涓, 赵毓橘. 表油菜素内酯对黄瓜幼苗下胚轴过氧化物酶和IAA氧化酶活性的影响. 植物生理学报, 1989, 15(3): 263-267
- 薛勇彪, 赖钊, 黄剑, 王洪云. 植物F-box蛋白质及其研究进展, 科学通报, 2002, 12: 31-34
- 赵毓橘. 油菜素内酯的研究进展. 植物学通报, 1995, 12: 30-34
- 朱诚, 曾广文, 刘非燕. 表油菜素内酯对黄瓜幼苗热激忍耐和抗氧化代谢的关系. 浙江农业大学学报, 1996, 22(3): 284-288
- 朱广廉, 张建国. 油菜素内酯促进绿豆上胚轴伸长与蛋白质和核酸合成的关系. 植物学报, 1994, 36(8): 607-613
- 邹华文, 陈凤玉. 表高油菜素内酯浸种对玉米幼苗某些生理特性的影响. 沈阳农业大学学报, 2002, 32(6): 452-454

## 作者简历

郭银平，女，1982年7月28日出生，籍贯河北邯郸，2002年9月-2006年6月就读于河北农业大学，2006年9月考入浙江大学农业与生物技术学院园艺系攻读硕士学位，进入农业部园艺植物生长发育与生物技术重点开放实验室进行学习和科研，师从喻景权教授。两年间，受到了良好的熏陶和锻炼，具备了从事科学研究人员所必需的品格和素质，参与了“H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>介导的油菜素内酯诱导黄瓜植株广谱抗性的生理与分子机制”等在内的多个国家自然科学基金重点项目和面上项目的科研试验工作，发表的论文主要有：

1. Ding J, Guo YP, Sun Y, Xiao CL, Shi K, Zhou YH, Yu JQ. (2008) Selective cinnamic acid uptake impairs [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> homeostasis and growth in *Cucumis sativus* L. *Phytochemistry* (已录用). (IF=2.42).
2. Ding J, Guo YP, Shi K, Zhou YH, Yu JQ. (2008) Effects of root and foliar applications of 24-epibrassinolide on Fusarium wilt and antioxidant metabolism in cucumber roots. *Journal of Plant Growth Regulation* (修改中). (IF=2.23)
3. Ding J, Shi K, Guo YP, Zhou YH, Yu JQ. (2008) Microbial community responses associated with the development of *Fusarium* pathogens on roots of cucumber plants with contrasting resistance. *Environmental and Experimental Botany* (投稿中). (IF=1.82).