

## \* 学术论文 \*

## 蚕豆成熟叶片中扩张蛋白的存在及其功能研究\*

陈 苏<sup>1</sup> 王文龙<sup>1,2</sup> 熊艳梅<sup>1</sup> 陈 珈<sup>1</sup> 王学臣<sup>1\*\*</sup>

1. 中国农业大学生物学院植物生理生化国家重点实验室, 北京 100094;

2. 湖南文理学院生物系, 常德 415000

**摘要** 以已经停止生长的蚕豆(*Vicia faba* L.)成熟叶片为材料, 利用免疫印迹、体外重组、免疫组织化学定位和药理学实验证明: 已经停止生长的蚕豆成熟叶片中存在扩张蛋白, 主要分布于保卫细胞壁中, 而且背壁中较多; 蚕豆成熟叶片中的扩张蛋白除具有扩张蛋白的一般特性外, 其活性还可被  $K^+$  激活; 用扩张蛋白处理蚕豆表皮条可以促进光诱导的气孔开放, 提示蚕豆成熟叶片中的扩张蛋白可能参与了气孔运动的调控过程. 以上结果不仅证明了在已经停止生长的叶片中存在扩张蛋白, 而且为深入阐明细胞壁调控气孔运动的作用机理的研究提供了新的线索.

**关键词** 蚕豆 成熟叶片 扩张蛋白 气孔运动

Rayle 等于 1970 年提出了生长素作用机理的“酸生长理论”, 这是迄今为止较能圆满解释生长素诱导细胞延伸现象的理论之一<sup>[1,2]</sup>. 虽然该理论能够解释细胞生长中的许多问题, 但植物细胞延伸过程中的许多细节仍不清楚, 特别是细胞壁生长的分子机理至今仍有待研究<sup>[3,4]</sup>. 1992 年, McQueen-Mason 等<sup>[5]</sup>首先从黄瓜幼苗下胚轴中分离纯化出一类能够诱导热钝化的离体细胞壁恢复伸展特性的细胞壁蛋白质, 命名为扩张蛋白(expansin). 近年来, 有关扩张蛋白的性质、功能及其调控机制的研究日益引起人们的重视<sup>[6-9]</sup>. 已有的研究表明: 扩张蛋白普遍存在于正在生长的组织和正在成熟的果实中, 通过打断纤维素与半纤维素之间的氢键连接, 改变细胞壁的刚性结构, 进而促进膨压驱动的细胞生长和果实软化. 现已发现扩张蛋白在细胞生长<sup>[3,10,11]</sup>、果实成熟<sup>[9]</sup>、形态建成<sup>[12,13]</sup>、根毛发生<sup>[14]</sup>、花粉管生长<sup>[15]</sup>和渗透调节<sup>[16,17]</sup>中起着重要的作用. 但是在已经停止生长的成熟叶片中是否存在扩张蛋白尚未见报道.

本文以蚕豆(*Vicia faba* L.)为材料, 对已经停止生长的成熟叶片中扩张蛋白的存在、特性及其可能具有的功能进行了研究, 初步证实蚕豆成熟叶片中也存在扩张蛋白, 分子质量约为 25 ku, 具有扩张

蛋白的普遍特性, 而且可能参与了气孔运动的调节.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

蚕豆(*Vicia faba* L.)种子经浸种和 27℃ 催芽后, 播入营养土中, 温室生长 20 d 后, 剪取已经停止生长的成熟叶片于 -80℃ 冻存, 供提取细胞壁蛋白和测定活性用. 黄瓜(*Cucumis sativus* L.)种子经浸种和 27℃ 下催芽后, 播入湿蛭石中, 27℃ 暗培养 5 d, 剪取子叶下约 3~4 cm 长的下胚轴, 置于 -20℃ 冰箱中保存 1~5 d, 供测定扩张蛋白活性用.

### 1.2 细胞壁蛋白的提取及扩张蛋白的纯化

**1.2.1 细胞壁蛋白的提取** 参照 McQueen-Mason 等<sup>[5]</sup>和李连朝等<sup>[7]</sup>报道的方法, 取 -80℃ 冻存的蚕豆叶片约 100 g, 加预冷的匀浆缓冲液(20 mmol/L, NaAc/HAc, 1 mmol/L EDTA, pH 4.5)高速匀浆后, 用孔径为 70 μm 尼龙网过滤, 残渣经充分洗涤后加入扩张蛋白提取液(20 mmol/L HEPES, 2 mmol/L EDTA, 3 mmol/L  $Na_2S_2O_5$ , 1 mol/L NaCl, pH 6.8), 4℃ 下提取 24 h, 过滤, 滤液加固体  $(NH_4)_2SO_4$ (0.39 g/mL), 沉淀 24 h 左右, 4℃ 下离

2003-03-04 收稿, 2003-04-28 收修改稿

\* 国家重点基础研究发展规划(批准号: G19990117)资助项目

\*\* 联系人, E-mail: xcwang@public.bta.net.cn

心(25000g) 10 min, 沉淀用少量酸性缓冲液(50 mmol/L NaAc/HAc, pH 4.5)复溶, 4℃透析, 透析液离心后, 上清液即为细胞壁蛋白提取液。

**1.2.2 扩张蛋白的纯化** 用高效阳离子交换色谱将细胞壁蛋白的提取液分离纯化。所用高效液相色谱仪为美国 Waters Holding Inc 产品。首先进行分析分离, 柱子为 PROTEIN PAK SP-5 PW( $\phi$  7.5 mm, 75 mm, 10  $\mu$ m)。流动相 A 为 20 mmol/L NaAc/HAc, pH 4.5, B 为 20 mmol/L NaAc/HAc, 600 mmol/L NaCl, pH 4.5。先用 100% 流动相 A 洗脱 14 min, 然后用 100% A 和 100% B 线性洗脱 40 min, 流速 0.8 mL/min, 在 280 nm 下检测 AUFS(0.1), 进样量为 0.5~1.0 mL; 然后进行半制备分离, 柱子为 PROTEIN PAK SP-5 PW( $\phi$  21.5 mm, 150 mm), 流动相 A 为 20 mmol/L NaAc/HAc, pH 4.5, B 为 20 mmol/L NaAc/HAc, 600 mmol/L NaCl, pH 4.5。先用 100% A 洗脱 19 min, 然后用 100% A 和 100% B 线性洗脱 40 min, 流速 6.0 mL/min, 在 280 nm 下检测 AUFS(2.0), 进样量 10~15 mL, 洗脱液按 1 管/min 收集; 最后用高效体积排阻色谱分级, 柱子为 PROTEIN PAK I-125 + I-60(7.8 mm  $\times$  300 mm, 10  $\mu$ m), 流动相为 20 mmol/L NaAc/HAc, 200 mmol/L NaCl, pH 4.5, 流速为 0.5 mL/min, 在 280 nm 下检测 AUFS(0.1), 进样量 0.2~0.4 mL, 洗脱液按 1 管/min 收集, 直接用于相关研究, 蛋白质浓度测定方法参照汪家政的方法<sup>[18]</sup>。

### 1.3 SDS-PAGE 及免疫印迹鉴定

参照 He<sup>[19]</sup>的方法进行, 分离胶浓度为 12%, 转膜后, 用封闭液(3%的 BSA 于 TBST)37℃封闭 1~1.5 h 或 4℃过夜; 倒出封闭液, 用 TBST 清洗 5 min, 重复 3 次然后用稀释好的抗体(1:200 于 10 mL TBST)37℃孵育 1 h; 倒出一抗, 用 TBST 清洗 5 min, 重复 3 次; 用稀释好的二抗(1:500 于 10 mL TBST)37℃孵育 1 h; 倒出二抗, 用 TBST 清洗 5 min, 重复 3 次; 加入 10 mL NBT/BCIP 显色液, 混匀显色 2~5 min 至条带出现, 取出 NC 膜, 置于 20 mL 重蒸水中, 终止反应并清洗 2~3 次。二抗、显色液和标准分子量均为华美公司生产, 抗体为本实验室制备的抗拟南芥扩张蛋白 AtEXP1 的多克隆抗体(待发表)。

### 1.4 细胞壁伸展活性的体外重组及扩张蛋白活性的测定

测定生长用的伸展仪在中国农业大学生物学院

朱果利副教授指导下设计安装(另文发表)。离体下胚轴(1.5 cm 长)放在一个有机玻璃槽中, 材料一端用一个可动的有机玻璃片固定, 另一端通过一细丝线经滑轮与动片相连。下胚轴伸长时, 动片向下运动, 动片与传感器之间的距离发生变化, 这种变化经传感器转变为电信号, 经台式自动记录仪记录。

体外重组实验参照李连朝等<sup>[7]</sup>的方法, 取 -20℃冻存的黄瓜幼苗下胚轴, 用金钢砂(45  $\mu$ m)擦破表皮, 沸水中煮 20 s, 切取上端 1.5 mm, 置于已注入 1.5 mL 中性缓冲液(pH 6.8)或酸性缓冲液(pH 4.5)的样品槽中, 下胚轴无伸展活性后(约需 1 h), 加入扩张蛋白提取液(约 6  $\mu$ g/mL), 测定下胚轴在不同缓冲液中的生长情况, 所有伸展实验均重复 3 次。

研究无机离子和二硫苏糖醇(DTT)对扩张蛋白活性影响的方法同上, 不同的是在酸性缓冲液中分别加入了同为 10 mmol/L 的 CuSO<sub>4</sub>, AlCl<sub>3</sub>, MgCl<sub>2</sub>, KCl, CaCl<sub>2</sub> 和 DTT。

### 1.5 扩张蛋白在蚕豆叶片中的免疫组织化学定位

参照余炳生<sup>[20]</sup>的方法制作蚕豆叶片的石蜡切片, 并按 Cho<sup>[21]</sup>的方法进行免疫组化染色, 第一抗体为本实验室制备的抗拟南芥扩张蛋白 AtEXP1 抗体, 二抗为碱性磷酸酶标记羊抗兔 IgG。

### 1.6 扩张蛋白对光诱导气孔开放的影响

撕取生长良好的蚕豆叶片下表皮, 用毛刷轻轻刷去残存的叶肉细胞, 浸入表皮条缓冲液(10 mmol/L MES, 50 mmol/L KCl, 100  $\mu$ mol/L CaCl<sub>2</sub>, pH 6.1)中置黑暗处 90 min, 使气孔关闭。将此处理后的表皮条放入含 6  $\mu$ g/mL 扩张蛋白的缓冲液(10 mmol/L MES, 50 mmol/L KCl, 100  $\mu$ mol/L CaCl<sub>2</sub>, pH 4.5)中, 用冷光处理, 在相同的缓冲液中加入相同浓度(6  $\mu$ g/mL)的正常兔血清作为对照, 在处理的不同时间测量气孔孔径。每个表皮条取 5 个视野, 每个视野测量 10 个气孔, 实验重复 3 次, 取平均值, 计算标准偏差。

## 2 结果与分析

### 2.1 蚕豆成熟叶片细胞壁蛋白免疫印迹鉴定及活性检测

提取的蚕豆成熟叶片的细胞壁蛋白, 经 12% SDS-PAGE 分离, 电转移至硝酸纤维素膜上, 然后用拟南芥扩张蛋白 AtEXP1 的多抗孵育并进行酶显

色反应后, 在约 25 ku 处出现一特异条带(图 1), 说明在蚕豆成熟叶片中存在扩张蛋白。

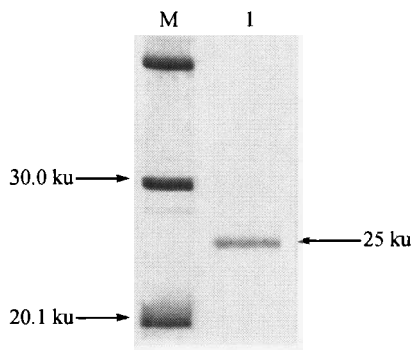


图 1 蚕豆成熟叶片细胞壁蛋白免疫印迹  
M 蛋白分子质量标准; 1 细胞壁蛋白

## 2.2 蚕豆叶片扩张蛋白的提取、纯化及免疫印迹鉴定

提取蚕豆成熟叶片的细胞壁蛋白, 利用高效液相色谱法提取、纯化扩张蛋白, 免疫印迹鉴定证明所纯化的蛋白是扩张蛋白, 分子质量约 25 ku. 电泳检测结果表明所纯化的蛋白纯度较高, 可以用来进行相关研究(图 2)。

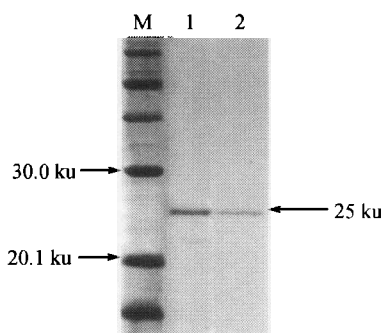


图 2 蚕豆叶片扩张蛋白电泳及免疫印迹鉴定  
M 蛋白分子质量标准; 1 SDS-PAGE 后; 2 免疫印迹后

## 2.3 扩张蛋白的活性检测

以热钝化的黄瓜幼苗下胚轴伸长区为材料, 在 pH 4.5 和 6.8 条件下, 测定了下胚轴生长变化. 结果表明: 热钝化的黄瓜下胚轴在中性和酸性条件下均不再伸长. 在 pH 4.5 时, 外加扩张蛋白 (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 可以使热钝化的黄瓜下胚轴恢复伸展活性, 伸展特性与活体下胚轴伸展特性相似; 而在 pH 6.8 时, 即使加入扩张蛋白, 下胚轴仍然不再伸长(图 3), 说明所纯化的蛋白质是具有生物活性的扩张蛋白, 且其活性与环境的酸碱性明显相关, 在酸性环境下其催化活性较强, 而在中性条件下催化活性几乎完全消失。

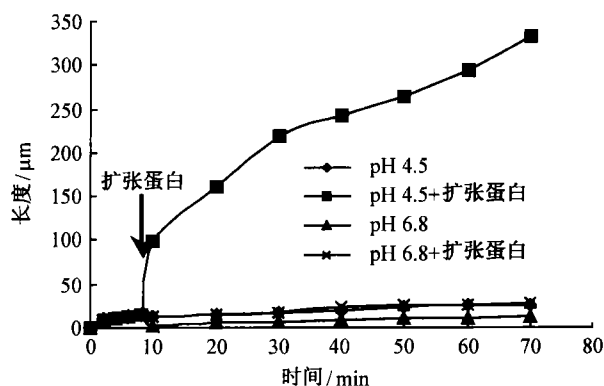


图 3 不同 PH 条件下扩张蛋白对热钝化黄瓜下胚轴伸展活性的影响

## 2.4 不同浓度扩张蛋白对下胚轴伸展活性的影响

用不同浓度的扩张蛋白和热钝化黄瓜下胚轴进行的细胞壁伸展活性重组实验发现, 即使蛋白提取液浓度降低到 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 热钝化下胚轴仍然能够明显伸展, 但当浓度超过 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 伸展活性几乎不再增加(图 4), 说明重组细胞壁的伸展活性对扩张蛋白浓度具有依赖性, 最适浓度为 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

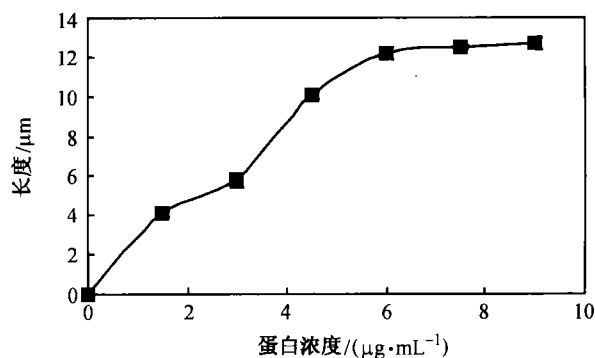


图 4 不同浓度扩张蛋白对热钝化黄瓜下胚轴伸展活性的影响

## 2.5 无机离子和 DTT 对扩张蛋白活性影响

用 10 mmol/L  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{CaCl}_2$  和 DTT (含 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  扩张蛋白) 分别处理热钝化的黄瓜下胚轴, 发现  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  和  $\text{Ca}^{2+}$  对扩张蛋白的活性均具有抑制作用, 这与 McQueen-Mason 等<sup>[5]</sup>的研究结果一致; 而 DTT 对扩张蛋白的激活作用不很明显, 这与 McQueen-Mason<sup>[5]</sup>等的研究结果不一致, 而与 Keller<sup>[22]</sup>的研究结果一致;  $\text{K}^+$  和  $\text{Mg}^{2+}$  对扩张蛋白具有明显的激活作用(图 5)。

## 2.6 扩张蛋白在蚕豆叶片中的免疫组织化学定位

目前认为扩张蛋白普遍存在于正在生长的组织或

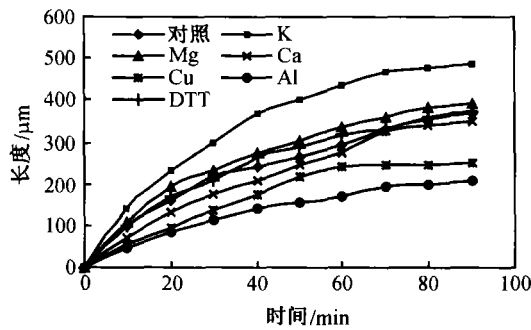


图5 DTT 和无机离子对扩张蛋白活性的调节

正在成熟的果实中,通过打断纤维素和半纤维素之间的氢键连接,破坏细胞壁的刚性结构,促进细胞的膨大或果实软化<sup>[23]</sup>.而在成熟的叶片中,生长已经完全停止,扩张蛋白起什么作用呢?为了进一步研究扩张蛋白在成熟叶片中的功能,我们对蚕豆成熟叶片中的扩张蛋白进行了免疫组织化学定位(图版I).结果发现,扩张蛋白主要存在于保卫细胞壁中,而且在背壁分布较多,腹壁相对较少,除保卫细胞外,微管束和叶肉细胞中也存在扩张蛋白,但量比较少.

### 2.7 扩张蛋白对光诱导气孔运动的影响

撕取生长良好的蚕豆下表皮,用毛刷轻轻刷去残存的叶肉细胞,暗处理使气孔完全关闭,再移至含  $6 \mu\text{g}/\text{mL}$  扩张蛋白的缓冲液中,用冷光处理使气孔开放,在相同的缓冲液中加入相同浓度( $6 \mu\text{g}/\text{mL}$ )的正常兔血清作为对照,然后在处理的不同时间观察并记录气孔孔径变化(图6).观察结果表明,扩张蛋白明显地促进了光照诱导的气孔开放,说明在成熟叶片中扩张蛋白可能参与了气孔运动的调节过程.

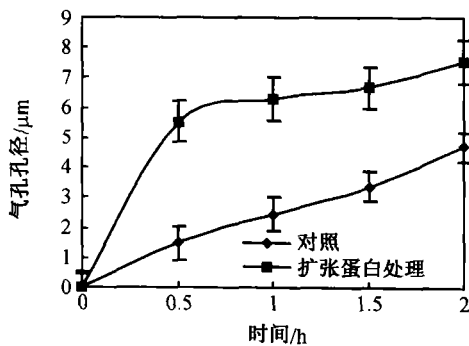


图6 扩张蛋白促进光诱导的气孔开放

## 3 讨论

扩张蛋白是近年来发现的一类细胞壁蛋白.自发现以来,已相继从拟南芥<sup>[24]</sup>、番茄<sup>[25]</sup>、草

莓<sup>[26]</sup>、棉花<sup>[27]</sup>、水稻<sup>[28]</sup>、玉米<sup>[29]</sup>、燕麦胚麦鞘<sup>[6,30]</sup>和离体培养的栝楼根尖<sup>[31]</sup>等多种植物中发现扩张蛋白的存在.目前,已从20多种植物中克隆到100多个扩张蛋白基因,因此,扩张蛋白普遍存在于双子叶和单子叶植物中<sup>[9]</sup>.由于扩张蛋白在植物生长发育过程中起着极为重要的作用,已越来越多受到研究者的注意,但是成熟叶片中是否存在扩张蛋白国内外尚未见报导.本文对蚕豆成熟叶片扩张蛋白进行初步鉴定,证实蚕豆成熟叶片中也存在扩张蛋白,分子质量约为25 ku.

Cosgrove<sup>[32]</sup>早在1989年就发现在酸性环境中DTT能稳定和提高了离体黄瓜细胞壁的内源延伸,DTT可能激活了扩张蛋白,提高了重组的黄瓜细胞壁的延伸活性; $\text{Cu}^{2+}$ 和 $\text{Al}^{3+}$ 对内源酸诱导延伸具有强烈的抑制性,可能同样地抑制了扩张蛋白重组的细胞壁延伸活性.另一方面,他们的结果表明, $\text{Al}^{3+}$ 和 $\text{Cu}^{2+}$ 通过结合到扩张蛋白而不是结合到细胞壁的其他结构组分上发挥对细胞壁延伸的抑制作用.本实验直接在扩张蛋白溶液中加入 $\text{K}^+$ , $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ , $\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Al}^{3+}$ 和DTT,然后进行离体细胞壁伸展活性体外重组试验,结果表明, $\text{K}^+$ 和 $\text{Mg}^{2+}$ 对扩张蛋白具有激活作用,可提高蛋白活性,促进细胞壁延伸,特别是 $\text{K}^+$ 对扩张蛋白的激活作用非常明显,而 $\text{Al}^{3+}$ 和 $\text{Cu}^{2+}$ 对扩张蛋白的抑制作用显著,可降低蛋白活性,抑制细胞壁延伸,证实 $\text{K}^+$ 和 $\text{Mg}^{2+}$ 很可能是细胞壁扩张蛋白的辅因子, $\text{Al}^{3+}$ 和 $\text{Cu}^{2+}$ 是细胞壁扩张蛋白的抑制剂,而DTT对扩张蛋白的激活作用不显著,这与McQueen-Mason<sup>[5]</sup>的研究结果不太一致,但是与Keller<sup>[22]</sup>的研究结果一致,可能是由于扩张蛋白的来源不同所致,McQueen-Mason所用的扩张蛋白从黄瓜下胚轴提取,而Keller从番茄生长的叶片中提取.此外,本研究首次发现 $\text{K}^+$ 对扩张蛋白具有激活作用.

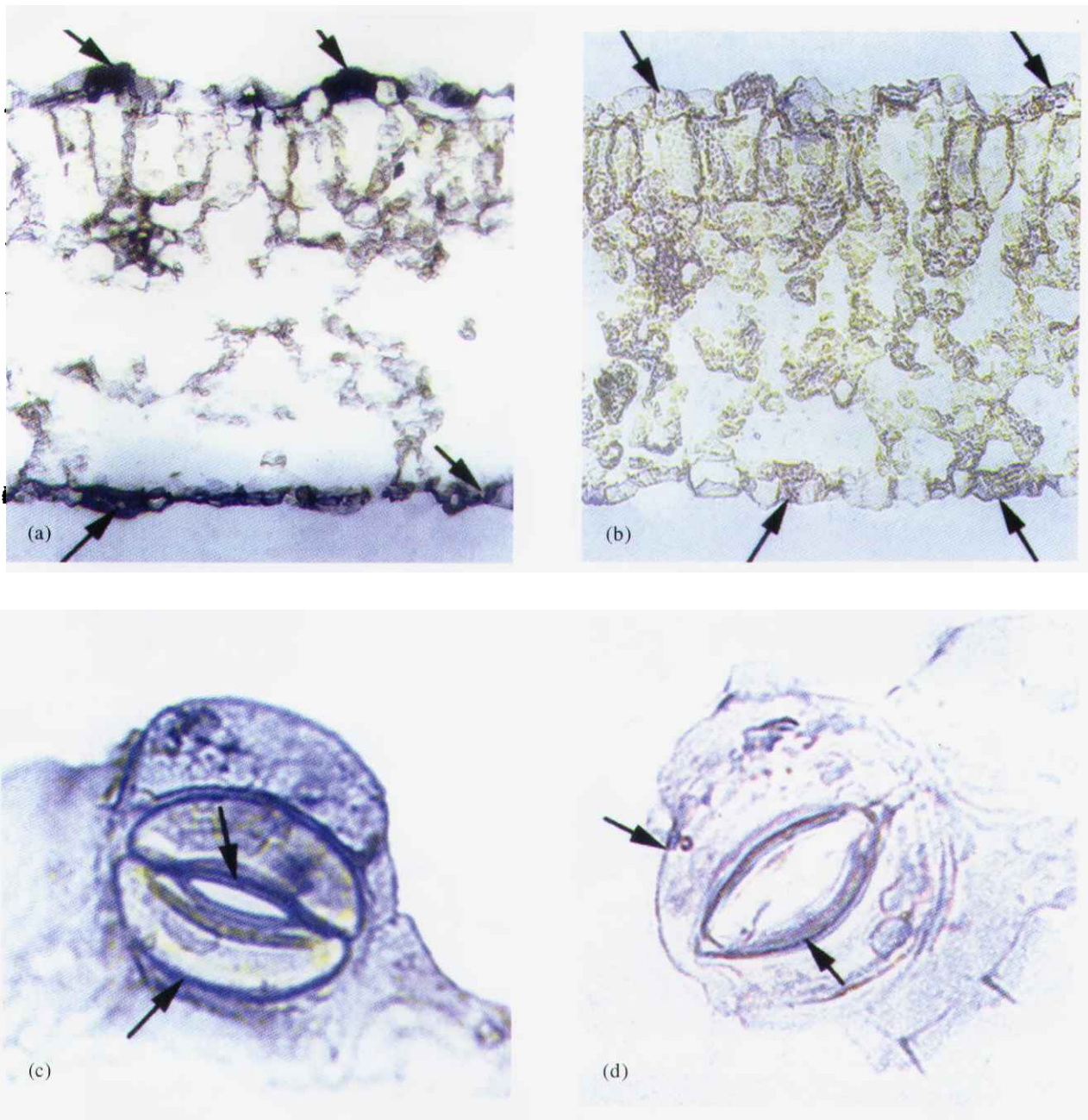
植物酸生长学说是迄今为止较能圆满地解释生长素诱导细胞延伸生长现象的一种理论.目前,尽管有关该理论的争论仍很激烈<sup>[1,2]</sup>,但对植物生长过程中细胞壁的偏酸性环境( $\text{pH} 4 \sim 6$ )却达成共识,恰好与扩张蛋白的最适 $\text{pH}$ 范围相符,所以植物细胞壁内源伸展的生物化学过程可能有扩张蛋白介导.在成熟组织中,生长已经完全停止,细胞不再膨大,其中不应该存在扩张蛋白,但我们却发现蚕豆成熟叶片中仍然存在扩张蛋白.那么扩张蛋白在成熟叶片中起什么作用呢?是否与生长有关系呢?

扩张蛋白是否还有其他未被发现的功能? 这些问题仍然有待于进行深入细致的研究. 本研究利用免疫组织化学定位方法证明蚕豆叶片中扩张蛋白主要定位于保卫细胞壁, 而且在背壁分布较多, 腹壁较少, 意味着扩张蛋白可能参与了气孔运动的调节. 用扩张蛋白处理蚕豆表皮条, 促进了光诱导的气孔开放, 说明扩张蛋白可能参与了气孔运动的主动调节过程. 同时, 研究结果表明  $K^+$  可以大大提高扩张蛋白的活性, 而  $K^+$  [33,34] 在气孔运动过程中具有重要的调控作用, 因此,  $K^+$  对气孔运动的调节作用可能是双重的, 即促进细胞吸收水分膨压增加和激活扩张蛋白. 扩张蛋白一旦被激活, 保卫细胞的细胞壁可能在扩张蛋白的调控下可以主动、适时地改变自身的弹性模量, 增加其可塑性, 从而更有利于气孔的启闭运动. 至于扩张蛋白如何调控保卫细胞壁的弹性模量, 进而调节气孔的启闭运动尚需进一步的研究.

参 考 文 献

- 1 Rayle D L, et al. The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiol*, 1992, 99: 1271
- 2 Kutschera U, et al. The current status of acid-growth hypothesis. *New Phytol*, 1994, 126: 549
- 3 Cosgrove D J. Plant cell enlargement and the action of expansins. *Bioessays*, 1996, 18: 553
- 4 Cosgrove D J. How do plant cell walls extend. *Plant Physiol*, 1993, 102: 1
- 5 McQueen-Mason S J, et al. Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *Plant Cell*, 1992, 4: 1425
- 6 Cosgrove D J, et al. Role of expansin in cell enlargement of oat coleoptiles: Analysis of developmental gradients and photocontrol. *Plant Physiol*, 1993, 103: 1321
- 7 李连朝, 等. 大豆幼苗下胚轴扩张蛋白的存在及其特性. *植物学报*, 1998, 40: 627
- 8 Link B M, et al. Acid-growth response and  $\alpha$ -expansins in suspension cultures of bright yellow 2 tobacco. *Plant Physiol*, 1998, 118: 907
- 9 Cosgrove D J. Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature*, 2000, 407: 321
- 10 Cosgrove D J. Creeping walls, softening fruit, and penetrating pollen tubes: The growing roles of expansins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 5504
- 11 Cosgrove D J. Cell wall loosening by expansins. *Plant Physiol*, 1998, 118: 333
- 12 Andrew J, et al. Analysis of expansin-induced morphogenesis on the apical meristem of tomato. *Planta*, 1999, 208: 166
- 13 Andrew J, et al. Induction of leaf primordia by the cell wall protein

- expansin. *Science*, 1997, 276: 1415
- 14 Cho H T, et al. Regulation of root hair initiation and expansin gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2002, 14: 3237
- 15 Lee Y, et al. Expansins: Ever-expanding numbers and functions. *Current Opinion in Plant Biology*, 2001, 4: 527
- 16 Yajun W, et al. Adptation of roots to low water potentials by changes in cell wall extensibility and cell wall proteins. *Journal of Experimental Botany*, 2000, 51: 1543
- 17 Yajun W. Growth maintenance of the maize primary root at low water potentials involves increases in cell wall extension properties, expansin activity, and wall susceptibility to expansins. *Plant Physiol*, 1996, 111: 765
- 18 汪家政, 等. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社, 2002. 38~39
- 19 He Z H, et al. A cell wall-associated receptor-like protein kinase. *J Biol Chem*, 1996, 271: 19789
- 20 余炳生, 等. 生物学显微技术. 北京: 北京农业大学出版社, 1989. 3~46
- 21 Cho H T, et al. Expansins in deepwater rice internodes. *Plant Physiol*, 1997, 113: 1137
- 22 Keller E, et al. Expansins in growing tomato leaves. *Plant J*, 1995, 8: 795
- 23 Cosgrove D J. Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1999, 50: 391
- 24 Cho H T, et al. Altered expression of expansin modulates leaf growth and pedicel abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 9783
- 25 Jocelyn K C, et al. Detection of expansin proteins and activity during tomato fruit ontogeny. *Plant Physiol*, 2000, 123: 1583
- 26 Civello P M, et al. An expansin gene expressed in ripening strawberry fruit. *Plant Physiol*, 1999, 121: 1273
- 27 Ruan Y L, et al. The control of single-celled cotton fiber elongation by developmentally reversible gating of plasmodesmata and coordinated expression of sucrose and  $K^+$  transporters and expansin. *Plant Cell*, 2001, 13: 47
- 28 Cho H T. Expansins in deepwater rice internodes. *Plant Physiol*, 1997, 113: 1137
- 29 Nenggang Z, et al. Distribution of expansins in graviresponding maize roots. *Plant Cell Physiol*, 2000, 41(12): 1305
- 30 Li Z C, et al. An oat coleoptile wall protein that induces wall extension *in vitro* and that is antigenically related to a similar protein from cucumber hypocotyls. *Planta*, 1993, 191: 349
- 31 Wang P, et al. Production of expansin from light/dark growing *Trichosanthes kirilowii* var. Japonicum 200t cultures. *Biotech Lett*, 1994, 16: 955
- 32 Cosgrove D J. Characterization of long-term extension of isolated cell walls from growing cucumber hypocotyls. *Planta*, 1989, 177: 121
- 33 Talbott L D, et al. Central roles for potassium and sucrose in guard cell osmoregulation. *Plant Physiol*, 1996, 111: 1051
- 34 Ilan N, et al. The role of potassium channels in the temperature control of stomatal aperture. *Plant Physiol*, 1995, 108: 1161



蚕豆叶片扩张蛋白免疫组织化学定位  
(a)和(c)分别为横切和平切处理, 用一抗和二抗孵育, NBT/BCIP染色;  
(b)和(d)分别为横切和平切对照, 用未免疫兔血清孵育, 其他步骤同(a)和(c).  
(a)和(b)图中箭头所示为保卫细胞, (c)和(d)图中箭头所示为保卫细胞壁