

负电中心的结构改变对系统素活性的影响*

姜月霞 杨顶建 李红玉**

兰州大学生命科学学院, 兰州 730000

摘要 系统素(Sys)作为植物最初内源性多肽信号分子,是从番茄损伤叶片中分离的具有18个氨基酸残基的多肽。作者通过用谷氨酸分别或全部替换系统素11位及18位天冬氨酸,产生3个新系统素类似物,并对其生物活性进行了研究,试图找出系统素负电中心结构对活性的影响,通过构效关系研究,以期发现其在植物细胞中新的具有较高诱导活性类似物。实验结果发现,保持了系统素负电中心的类似物均能够剂量依赖地提高植物的抗氧化活性。并且Glu¹⁸-Sys的诱导活性高于Glu¹¹-Sys的诱导活性,但两者的抗氧化活性均较母体有所降低;同时还表明不仅它的负电中心对系统素的活性十分重要,而且主链上不同位置的负电中心对系统素的活性的影响也不同。此外[Glu¹¹, Glu¹⁸]-Sys的诱导活性高于系统素的活性,可提高番茄的抗氧化性。说明在系统素中谷氨酸的替代不仅保持了它的负电中心,而且其构象更有利于和受体结合或与受体结合时与系统素一致。

关键词 系统素 构效关系 负电中心 抗氧化性

介导细胞与细胞之间联系的小信号分子对有机体中信号的传导至关重要^[1]。这些小的信号分子包括类固醇和多肽激素,多肽类物质作为生物体内一大类递质发挥着重要的作用。多肽的空间构象决定着其与受体结合的选择性、特异性和生物活性^[2]。而目前越来越多的证据表明,植物中存在着肽类信号分子,存在着与动物类似的激素作用方式^[3]。信号分子结构与功能的阐明,将扩展我们对植物信号系统的认识,并且为研究植物生长发育的调控和植物对环境的响应提供更为有效的生物技术手段。

系统素(Systemin)是一个来源于具有200个氨基酸残基的系统素原,是最早被鉴定的植物多肽类激素,它是在寻找对番茄叶片中蛋白酶抑制剂进行系统诱导的化学物质时发现的^[4]。当系统素被施用于番茄幼苗时,能够诱导多种基因的表达,例如诱导远离受伤部位组织中防卫基因的表达,活化蛋白酶抑制剂基因,合成蛋白酶抑制剂^[5],由此抑制昆虫肠道内蛋白水解酶的活性,扰乱昆虫的正常代谢,

导致昆虫的发育不正常甚至死亡。

在番茄幼苗对系统素诱导的应答中,植物叶片中的多聚半乳糖醛酸酶(PG)的活性增强^[6],与此同时,植物的叶片中也可以检测到H₂O₂含量的变化,并且H₂O₂的变化与PG的活性变化相联系^[7]。在植物受损后其损伤部位可以检测到H₂O₂,在损伤1h后于末梢叶片部位也可以检测得到,损伤4—6h后,H₂O₂的应答表现在全部损伤部位和在未损伤部位达到最高值,该时间与PG活性升高的时间是一致的,由此说明,PG产生的寡聚半乳糖醛酸(OGA)是产生H₂O₂的引发物^[8]。

Scheer等^[9]用¹²⁵I标记的系统素,已从番茄叶片细胞和细胞培养物细胞的表面鉴定了一个系统素结合蛋白,由于其分子质量为160ku,故命名为SR-160受体蛋白。质膜表面SR-160受体蛋白富含亮氨酸^[10]。SR-160与系统素之间的解离常数为0.17nmol·L⁻¹,这种系统素、受体之间的相互作用与动物多肽类似,该受体可以与系统素特异地、

2006-07-03 收稿, 2006-09-26 收修改稿

* 国家自然科学基金资助项目(批准号: 30170238)

** 通信作者, E-mail: lihy@lzu.edu.cn

可逆地相互作用。结合系统素后,植株对茉莉酸甲酯的反应速率增加几倍^[11],表明该受体是系统素的伤反应蛋白。此外,油菜素内酯(BR)与系统素这两个植物激素均与质膜表面富含亮氨酸的受体蛋白结合,并且,从番茄中发现的油菜素内酯的受体 BRI1 的特性与系统素受体 SR-160 相近^[12]。这一现象表明油菜素内酯和系统素在信号传递中与相同的表面受体结合,类似于动物体中的催产素和黄体酮受体与不止一种激素配体相结合的现象^[13]。系统素与受体结合时是十分明确的,但是,油菜素在高浓度时不能竞争性抑制系统素与受体结合,说明 BR 和系统素可能与受体的不同配基结合^[14]。此外研究已得出 BR 与受体形成内酯蛋白^[15],就是这种蛋白复合物可以竞争系统素与受体的结合位点^[14]。BR 和系统素这两种不同类型的植物激素在结构和生物学功能上有巨大差异为什么结合同一受体,目前还不是十分明确。因此,对于系统素的构效关系还需要进一步的研究。

系统素的一级结构由 18 个氨基酸残基组成,为 Ala-Val-Gln-Ser-Lys-Pro-Pro-Ser-Lys-Arg-Asp-Pro-Pro-Lys-Met-Gln-Thr-Asp,具有高度保守的氨基酸序列,在对其结构与活性的研究中,Pearce 等表明^[16],18 肽是系统素保持完整活性的最小片段,当以 N-端缺失法及 C-端缺失法进行系统素多肽链活性分析时,发现系统素 N-端的 Ala 缺失后,其活性降低为原值的 1/300,而当 C-端的 Asp 缺失后,则完全丧失活性。当以 Ala 对系统素进行氨基酸序列扫描时发现,Ala 取代 2—6,8,9,10,14 和 15 位的氨基酸后对活性没有重大的影响,说明这些氨基酸残基并不是系统素多肽链中的关键位点。以 Ala 取代 7,11,12,13,16 和 18 位的氨基酸后,取代位点在 17(Thr)和 18 位(Asp)时,系统素完全失去生物活性,当取代位点在 13(Pro)系统素活性降低了 90%以上。说明了在系统素的氨基酸序列中至少存在两个关键的残基区域,即 11—13 和 16—18。

为了探讨系统素多肽结构对系统素活性的影响,根据系统素的结构特点我们用固相合成法合成了系统素及其类似物[Glu¹¹,Glu¹⁸]-Sys,Glu¹¹-Sys 和 Glu¹⁸-Sys,并对抗氧化性的影响进行了观察。结果显示:11—13 和 16—18 这两个关键残基

区域中的负电中心(Asp)对系统素的抗氧化性有显著的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

所用苄氧羰基(Fmoc)保护氨基酸,2-(1H-7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl uronium hexafluorophosphate Methanaminium (HATU)均为吉尔生化(上海)有限公司产品,二甲氨基吡啶(DMAP),二异丙基碳二亚胺(DCC),二异丙基乙基胺(DIPEA)均为 Acros 公司产品,二甲基甲酰胺(DMF),六氢吡啶,三氟乙酸(TFA,AR)均为天津化学试剂有限公司产品,Wang 树脂为天津南开和成有限公司产品;色谱纯三氟乙酸、乙腈(ACN)均为 TEDIA 公司产品。实验材料所用番茄种子购自广州长合种子公司。

1.2 肽的合成与纯化

高效液相色谱(HPLC)为 Waters 2695 泵系统,2996 二极管阵列检测器,分析柱为 Waters Atlantis 3.9×150 mm 5 μm C₁₈,制备柱为 Varian Dynamax 250×21.4 mm Microsorb 100-5 C₁₈。质谱仪为 Waters micromass ZQ4000,ESI 离子源。系统素与其类似物的合成以 Fmoc 合成策略^[17]。用 Fmoc-Asp(otBu)-Wang 树脂为起始原料,取代值为 0.5 mmol/g。以 HATU 作缩合剂,20%六氢吡啶/DMF 脱保护,茚三酮试剂检测脱保护和缩合的完成程度。粗肽经 Sephadex G-10 脱盐,流速为 1 mL/min,紫外 210 nm 检测流分,再经 HPLC 纯化,流动相为 A: Water/0.1%TFA, B: ACN/0.1%TFA, A : B 为 10%—40%,30 min 梯度洗脱,检测波长为 220 nm,流速 6 mL/min。冷冻干燥得纯肽,纯肽经质谱鉴定,分子量分别为 Glu¹⁸-Sys 2024.25 (M+1),Glu¹¹-Sys 2023.83 (M+1),[Glu¹¹,Glu¹⁸]-Sys 1019.81 (M+2),经 HPLC 分析,纯度>95%。

1.3 生物活性实验

材料培养及药品处理按文献^[16]进行,稍有改动。

植物提取液制备:以 50 mmol·L⁻¹的磷酸缓冲溶液(pH 7.8)含 1% PVP 研磨抽提,4 °C 30000 g

离心 15 min 后, 保留上清, 沉淀再用 1% PVP 的磷酸缓冲溶液 ($50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.8) 抽提一次, 合并上清备用. 以 Lowry 法测可溶性蛋白含量, BSA 作为标准, 并以蛋白浓度作为酶液活性测定的基准. (1) H_2O_2 含量测定, 按 Pick 等的方法进行^[18]. (2) 超氧阴离子 (O_2^-) 含量测定, (3) 抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 活性测定, 均按汤章城等方法进行^[19]. (4) 过氧化氢酶活性 (CAT) 活性测定, 参考邹琦及 Mukherjee 等方法进行^[20,21], 并稍有改动. (5) 过氧化物酶 (POD) 活性测定, 参考 Miyoshi 的方法进行, 并稍做改动^[22]. (6) 谷胱甘肽还原酶 (GR) 活性测定, 按 Halliwell 方法进行^[23], 并稍有改动. (7) 超氧化物歧化酶 (SOD) 活性测定, 按 Beauchamp 方法进行^[24]. (8) 统计方法, 实验数据以 $\bar{x} \pm \text{SEM}(\delta)$ 表示, 显著性差异用 LSD 检验, $P < 0.05$ 表示有显著性差异.

2 系统素类似物对番茄叶片中活性氧及氧化酶的影响结果

2.1 H_2O_2 含量变化

番茄叶片对于 Systemin 及其类似物的诱导是相当敏感的, 随着 Systemin 和类似物诱导浓度的增加, 叶片的 H_2O_2 含量也迅速上升. 此外, 当 Systemin 结构发生变化时, 其诱导活性也不相同, 即 Glu 在取代不同位点的类似物所诱导的 H_2O_2 含量也不相同, 双取代的类似物 [Glu^{11} , Glu^{18}]-Sys 诱导活性高于 Systemin 母体, 单取代的两个类似物 Glu^{11} -Sys 和 Glu^{18} -Sys 诱导活性均低于 Systemin 母体, 且 Glu^{18} -Sys 的活性高于 Glu^{11} -Sys 的活性 ($P < 0.05$) $n=6$, $\bar{x} \pm s$.

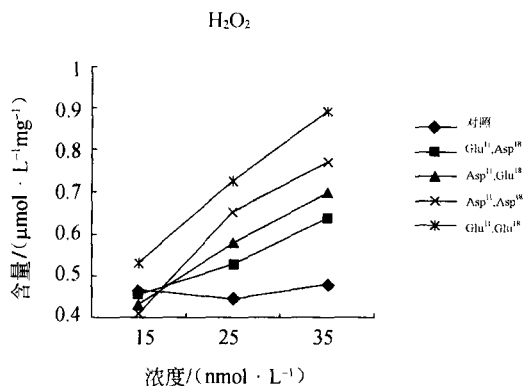


图1 番茄叶片中 Sys 和 Sys 类似物对 H_2O_2 含量的影响

2.2 O_2^- 含量变化

当以不同浓度的 Systemin 和类似物处理, 番茄幼苗叶片中的 O_2^- 含量依剂量发生变化, 随着 Systemin 以及类似物诱导浓度的增加, 叶片的 O_2^- 含量也随之升高. 当以 Glu 取代 Asp 时, Systemin 结构发生变化, 其诱导活性也不相同, 取代位点不同的类似物所诱导的 O_2^- 含量也不相同, 双取代的类似物 [Glu^{11} , Glu^{18}]-Sys 诱导活性高于 Systemin 母体, 单取代的两个类似物 Glu^{11} -Sys 和 Glu^{18} -Sys 诱导活性均低于 Systemin 母体 ($P < 0.05$) $n=6$, $\bar{x} \pm s$.

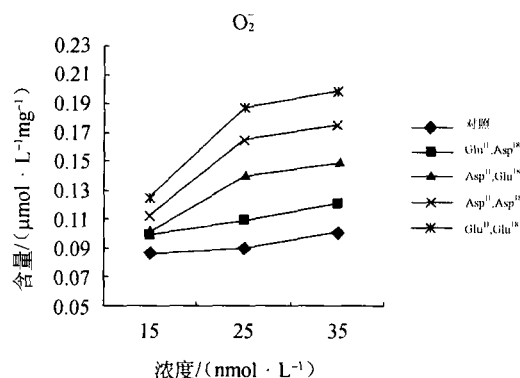


图2 番茄叶片中 Sys 和 Sys 类似物对 O_2^- 含量的影响

2.3 APX 活性变化

当不同浓度的 Systemin 和类似物对番茄幼苗进行处理时, 叶片中的 APX 活性依剂量发生变化, 随着 Systemin 以及类似物诱导浓度的增加, 叶片的 APX 活性也随之升高. 并且, 当 Systemin 结构中 Asp 被 Glu 取代后, 其活性也发生了显著的变化. 11 位、18 位双取代的类似物 [Glu^{11} , Glu^{18}]-Sys 的

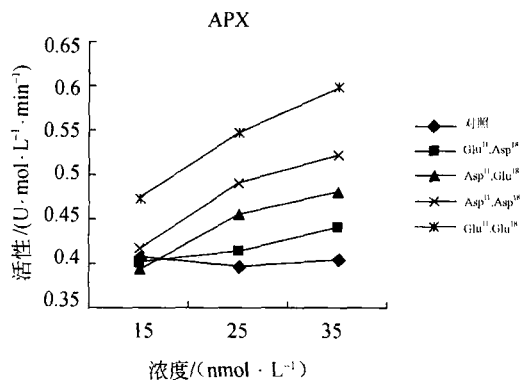


图3 番茄叶片中 Sys 和 Sys 类似物对 APX 活性的影响

诱导活性明显高于 Systemin 母体, 而类似物 Glu¹⁸-Sys、Glu¹¹-Sys 的诱导活性则明显低于 Systemin 母体 ($P < 0.05$) $n=6$, $\bar{x} \pm s$.

2.4 CAT 活性变化

双取代类似物 [Glu¹¹, Glu¹⁸] 在 15 nmol · L⁻¹ 浓度时具有活性 ($P < 0.05$), 此时 Systemin 与 Glu¹⁸-Sys 和 Glu¹¹-Sys 诱导的 CAT 活性结果均没有统计学差别, 在 25 nmol · L⁻¹ 与 35 nmol · L⁻¹ 浓度时, Systemin 活性高于单取代类似物 Glu¹⁸-Sys、Glu¹¹-Sys, 且不同取代位点的类似物诱导活性不同, Glu¹⁸-Sys 活性高于 Glu¹¹-Sys ($P < 0.05$), 并且在 35 nmol · L⁻¹ 时, 类似物与 Systemin 所诱导 CAT 活性的变化均高于 25 nmol · L⁻¹ 和 15 nmol · L⁻¹ 时其所诱导的活性变化 $n=6$, $\bar{x} \pm s$.

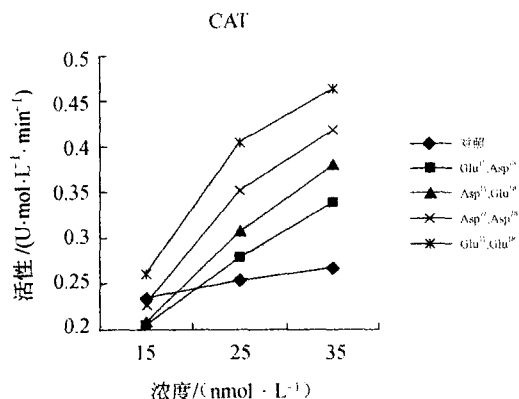


图 4 番茄叶片中 Sys 和 Sys 类似物对 CAT 活性的影响

2.5 POD 活性变化

当 Systemin 与类似物以 15 nmol · L⁻¹ 浓度处理番茄叶片时, 只有 [Glu¹¹, Glu¹⁸]-Sys 具有诱导活性, 此时其他类似物和 Systemin 都不具有诱导活性时, 负电中心位于不同位点的类似物其诱导活性是不同的, 当以 25 nmol · L⁻¹ 与 35 nmol · L⁻¹ 浓度处理时, 不同类似物和 Systemin 诱导的 POD 活性的结果与对照组比较均有显著性差别 ($P < 0.05$), 且 [Glu¹¹, Glu¹⁸]-Sys 活性最高, 单取代的类似物活性为 Systemin > Glu¹⁸-Sys > Glu¹¹-Sys ($P < 0.05$), 并且在 35 nmol · L⁻¹ 这一浓度时, 类似物与 Systemin 所诱导 POD 活性的变化均高于 25 nmol · L⁻¹ 和 15 nmol · L⁻¹ 时其所诱导的活性变化 $n=6$, $\bar{x} \pm s$.

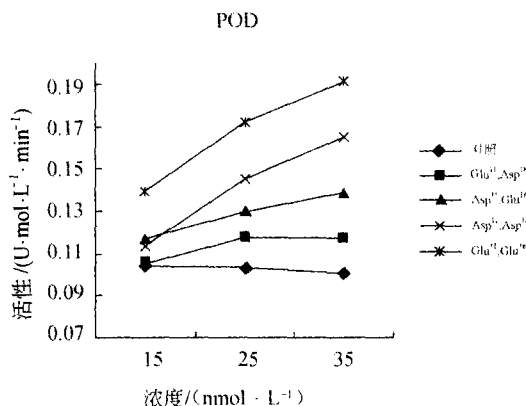


图 5 番茄叶片中 Sys 和 Sys 类似物对 POD 活性的影响

2.6 GR 活性的变化

Systemin 类似物均可依剂量诱导 GR 活性, 且双取代类似物活性最高, 单取代类似物活性低于母体. 当 Systemin 与 Glu¹⁸-Sys、[Glu¹¹, Glu¹⁸]-Sys 和 Glu¹¹-Sys 以不同剂量处理番茄时, 在 15 nmol · L⁻¹ 剂量时, [Glu¹¹, Glu¹⁸]-Sys 活性在这一诱导浓度与对照比较, 具有活性 ($P < 0.05$), 在 25 nmol · L⁻¹ 与 35 nmol · L⁻¹ 浓度时, 诱导的 GR 的活性结果为 [Glu¹¹, Glu¹⁸]-Sys > Systemin > Glu¹⁸-Sys > Glu¹¹-Sys > 对照组, 均有显著性差别 ($P < 0.05$), 并且在 35 nmol · L⁻¹ 这一浓度时, 类似物与 Systemin 所诱导 GR 活性的变化均高于 25 nmol · L⁻¹ 和 15 nmol · L⁻¹ 时其所诱导的活性变化 $n=6$, $\bar{x} \pm s$.

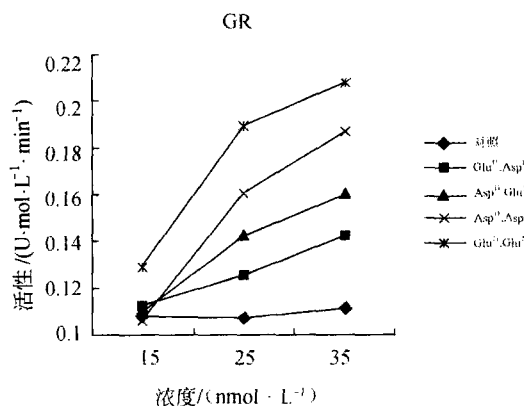


图 6 番茄叶片中 Sys 和 Sys 类似物对 GR 活性的影响

2.7 SOD 活性变化

当 Systemin 和类似物以同一剂量处理番茄幼苗时, 仅 [Glu¹¹, Glu¹⁸]-Sys 在 15 nmol · L⁻¹ 时具有

诱导活性 ($P < 0.05$), 当以 $25 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 与 $35 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度处理时 Systemin 类似物均可依剂量的诱导 SOD 活性, 且 Systemin 诱导活性高于 $\text{Glu}^{18}\text{-Sys}$ 、 $\text{Glu}^{11}\text{-Sys}$, 此时诱导的 SOD 活性的结果为, $[\text{Glu}^{11}, \text{Glu}^{18}]\text{-Sys} > \text{Systemin} > \text{Glu}^{18}\text{-Sys} > \text{Glu}^{11}\text{-Sys} > \text{对照组}$, 均有显著性差别 ($P < 0.05$), 并且在 $35 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 这一浓度时, 类似物与 Systemin 所诱导 SOD 活性的变化均高于 $25 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $15 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时所诱导的活性变化 $n=6$, $\bar{x} \pm s$.

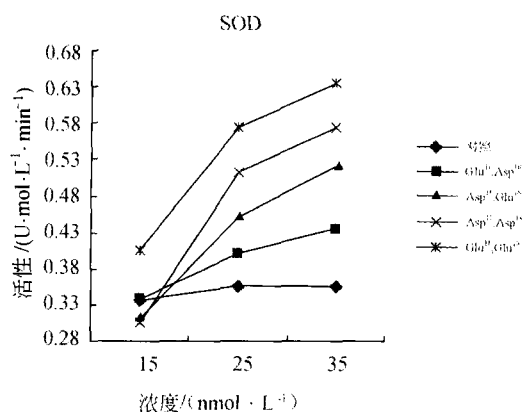


图7 番茄叶片中 Sys 和 Sys 类似物对 SOD 活性的影响

3 讨论

通过合理设计以谷氨酸取代 11 位和 18 位的天冬氨酸, 合成了系统素的 3 个类似物, 通过量效关系实验得出, 当系统素与类似物以不同的剂量处理番茄幼苗时, 在最高剂量 $35 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时系统素与 3 个类似物的活性最高, 在 $15 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时系统素与类似物活性最低, 并且系统素与 $\text{Glu}^{18}\text{-Sys}$ 和 $\text{Glu}^{11}\text{-Sys}$ 在这一剂量没有活性. 这一结果表明, 系统素与类似物均能够影响番茄幼苗中的抗氧化能力, 并且是剂量依赖性影响番茄叶片中的活性氧含量和抗氧化酶系统的活性.

通过构效关系研究我们可以看到, 当系统素与类似物以同一剂量处理番茄叶片时, $[\text{Glu}^{11}, \text{Glu}^{18}]\text{-Sys}$ 的诱导活性最高, 并且在 $15 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时其他类似物和系统素都不具有诱导活性时, $[\text{Glu}^{11}, \text{Glu}^{18}]\text{-Sys}$ 依然具有诱导活性. 说明 11 位、18 位双谷氨酸取代的系统素是一个抗氧化活性高于其母体的新类似物.

这一结果说明系统素负电中心结构对于其活性十分重要. 以谷氨酸替代 11 位及 18 位天冬氨酸后, 系统素类似物活性没有下降甚至还更优于其母体, 说明在系统素中谷氨酸的替代不仅保持了它的负电中心, 而且在构象方面更有利于和受体的结合或与受体结合时与系统素母体一致. 对 18 位的天冬氨酸, 不改变其负电中心, 仅以谷氨酸替代天冬氨酸, 使得负电中心与主链的距离稍有改变, 类似物的活性就受到明显的影响, 表现为系统素母体的抗氧化活性高于 $\text{Glu}^{18}\text{-Sys}$. 但是双取代的类似物 $[\text{Glu}^{11}, \text{Glu}^{18}]\text{-Sys}$ 与母体相比较, 其抗氧化活性高于系统素本身. 这提示我们在系统素中不仅负电中心对于其活性十分重要, 而且负电中心氨基酸所对应的与主链之间的距离, 以及负电中心的结构对系统素的活性的发挥也是十分重要的.

Pearce 等的研究表明^[16]C-末端的天冬氨酸对系统素的生物活性至关重要, 当去除 C-末端的天冬氨酸, 该类类似物成为系统素活性很强的抑制剂, 当 C-末端的天冬氨酸被 Ala 取代后系统素的活性也完全丧失, 但 C-末端用谷氨酸替代后活性有所降低但并未降低很多. 在我们所设计的几个类似物当中, 生物活性的降低都未达到一个数量级, 而 Pearce 设计的类似物即便是活性变化最小的也仅保持了母体活性的 1/800, 我们所设计的保持负电中心的类似物中双谷氨酸取代的类似物活性有所提高, 证明负电中心结构的保持对维持系统素生物活性非常重要, 谷氨酸之所以会有这种作用, 是因为其维持了系统素的负电中心和空间构象从而有利于与受体的结合^[16].

此外通过合理设计较为系统地研究了负电中心及其结构对系统素生物活性的影响, 结果发现, 11 位、18 位双谷氨酸取代的系统素是一个抗氧化活性高于母体的新类似物. 这个结果的发现与动物体内的以谷氨酸为负电中心的内源性阿片肽-新皮啡肽 II (*Tyr-D-Ala-Phe-Glu-Val-Val-Gly, deltorphin II*) 的生物活性高于新皮啡肽 I (*Tyr-D-Ala-Phe-Asp-Val-Val-Gly, deltorphin I*) 的生物活性的结果类似^[25], 其中的负电荷起到重要的作用. 消除其 4 位的负电荷将使其选择性和亲和性下降许多. 新皮啡肽 I 和新皮啡肽 II 活性的区别是由于它们结合了不同的受体亚型, 系统素类似物活性的提高可能是结

合同一受体产生的,也可能是结合同一受体的不同亚型产生的结果.至于系统素类似物活性提高的机理还有待于进一步研究.构效关系研究表明,负电中心及其结构对保持系统素的空间构象和生物活性的发挥有至关重要的作用,谷氨酸对某些多肽有可能是一个更好的形成负电中心的氨基酸.同时我们发现[Glu¹¹, Glu¹⁸]-Sys有可能成为系统素作用机理研究的工具药物之一,它是目前人工合成的活性最高的系统素类似物.

参 考 文 献

- 1 Yoshikatsu M, Heping Y, Youji S. Peptide signals and their receptors in higher plants. *Plant Science*, 2001, 6 (12): 573—577
- 2 Bryant SD, Attila M, Salvadori S, et al. Molecular dynamics conformations of deltorphin analogues advocate delta opioid binding site models. *Peptide Res*, 1994, 7(4): 175—184
- 3 Ryan CA, Pearce G. Polypeptide hormones. *Plant Physiol*, 2001, 125 (1): 65—68
- 4 Pearce G, Strydom D, Johnson S, et al. A polypeptide from tomato leaves activates the expression of proteinase inhibitor genes. *Science*, 1991, 253: 895—897
- 5 Ryan CA. The systemin signaling pathway: Differential activation of plant defensive genes. *Biochem Biophys Acta*, 2000, 1477(1): 112—121
- 6 Daniel RB, Orozco-Cardenas M, Daniel SM, et al. A wound and systemin-inducible polygalacturonase in tomato leaves. *Plant Bio*, 1999, 96 (4): 1756—1760
- 7 Orozco-Cardenas M, Clarence A, Ryan M. Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Plant Bio*, 1999, 96 (11): 6553—6557
- 8 Rizo L, Gierasch LM. Constrained peptides; models of bioactive peptides and their protein structures. *Annu Rev Biochem*, 1992, 61: 387—416
- 9 Scheer JM, Ryan CA. A 160-KD systemin receptor on the surface of lycopersicon peruvianum suspension-cultured cells. *Plant Cell*, 1999, 11: 1525—1535
- 10 Scheer JM, Ryan CA. The systemin receptor SR160 from Lycopersicon peruvianum is a member of the LRR receptor kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 9585—9590
- 11 Lindsey K, Casson S, Chilley P. Peptides: New signaling molecules in plants. *Trends Plant Sci*, 2002, 7(2): 78—83
- 12 Montoya T, Nomura T, Farrar K, et al. Cloning the tomato Cur13 gene highlights the putative dual role of the leucine-rich repeat receptor kinase tBRI1/SR160 in plant steroid hormone and peptide hormone signaling. *Plant Cell*, 2002, 14: 3163—3176
- 13 Grazzini E. Inhibition of oxytocin receptor function by direct binding of progesterone. *Nature*, 1998, 392(6675): 509—512
- 14 Miklos Szekeres. Brassinosteroid and systemin: Two hormones perceived by the same receptor. *Plant Sci*, 2003, 8 (3): 102—104
- 15 Bishop GJ, Koncz C. Brassinosteroid and plant steroid hormone signaling. *Plant Cell*, 2002, 14: S97—S110
- 16 Pearce G, Johnson S, Ryan CA. Structure activity of deleted and substituted systemin, an eighteen amino acid polypeptide induce of plant defensive genes. *Struct Biol*, 1993, 268(1): 212—216
- 17 Gregg BF. *Methods in Enzymology, Solid-Phase Peptide Synthesis*. New York: Academic Press, 1997, Volume 289
- 18 Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods*, 1980, 38(1—2): 161—170
- 19 汤章城,魏家绵,陈因,等. *现代植物生理学实验指南*. 北京: 科学出版社, 1999
- 20 Mukherjee SP, Choudhuri MA. Determination of glycoalate oxidase activity H₂O₂ content and catalase activity. *Physiol Plant*, 1983, 58: 167—170
- 21 邹琦. *植物生理生化实验指导*. 北京: 中国农业出版社, 1995
- 22 Kiyoshi T, Kiyoshi S. Role of superoxide dismutase in defense against SO₂ toxicity and increase in superoxide dismutase activity with SO₂ fumigation. *Plant&Cell Physiol*, 1980, 21(4): 601—611
- 23 Halliwell B, Foyer CH. Properties and physiological function of a glutathione reductase purified from spinach leaves by affinity chromatography. *Planta*, 1978, 139(1): 9—17
- 24 Beauchamp C, Fridorich I. Superoxide dismutase: Improved assays and assay applicable to acrylamide gels. *Biochem*, 1971, 44(1): 276—287
- 25 Bryant SD, Salvadori S, Attila M, et al. Topographical conformations of the deltorphins predicate δ opioid receptor affinity. *J Am Chem Soc*, 1993, 115: 8503—8504