花粉及花粉管中的膜骨架蛋白红膜肽

李 岩 阎隆飞 徐是雄④ 黄柄权④
(中国农业大学生物学院, 北京 100094; ④香港大学植物系, 香港薄扶林道)

摘要 用免疫印迹、免疫荧光定位及免疫金标方法对百合花粉与花粉管内膜骨架蛋白红膜肽的存在和分布进行了研究. 结果表明, 百合花粉及花粉管内存在类红膜肽, 其主要分布于高尔基体附近的囊泡膜上.

关键词 膜骨架 红膜肽 免疫印迹及定位 花粉 植物细胞

自从首先在红细胞膜上发现膜骨架系统以来, 已证明大多数动物细胞内都存在膜骨架蛋白主要成分红膜肽(spectrin). 而且, 研究表明, 红膜肽是一种较为保守的蛋白质, 它与其他细胞骨架成分协同作用, 参与了细胞很多生理功能的调节[1]. 近来的研究发现, 动物细胞高尔基体上也存在红膜肽和锚蛋白, 并证明高尔基体膜骨架可能是微管马达细胞质力蛋白与被运输囊泡间连接的桥梁[2]. 王育东和阎隆飞[3,4]证明高等植物细胞内存在膜骨架蛋白, 并对植物中红膜肽进行了免疫化学鉴定[4]. 以后, 其他研究者又相继用免疫印迹及免疫荧光方法证明数种植物细胞内也存在红膜肽[5~7]. 但至今为止, 红膜肽在植物细胞内存在的确切位置和功能尚不清楚. 花粉及花粉管已被证明是研究植物细胞骨架的良好材料. 本文以川百合(*Lilium davidii* Duch.)花粉为材料, 用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及免疫印迹法证明其中存在类红膜肽; 并利用免疫荧光定位技术结合共聚焦激光扫描显微镜(confocal laser scanning microscope), 对花粉及花粉管中类红膜肽的分布进行了观察; 进而用免疫金标方法在电子显微镜下证明, 类红膜肽主要存在于花粉及花粉管内高尔基体附近的囊泡膜上.

1 材料与方法

( ) 材料. 川百合花粉采自兰州, 在- 20℃下低温保存.

( ) 花粉萌发. 花粉从冰箱取出后, 经充分水合, 在花粉萌发液中(15% 蔗糖, 0.01% 硝酸钾, 0.02% 硫酸镁, 0.01% 硼酸, 0.03% 硝酸钙, pH= 5.6) 26℃黑暗条件下萌发.

( ) 猪红细胞膜的制备. 参照Yu等人[8]的方法.

( ) SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及免疫印迹. 花粉丙酮粉制备参照Liu等人[9]的方法, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳参照Laemmli[10]的方法略加修改, 免疫印迹参照Towbin等人[11]的方法, 一抗为鼠抗人红细胞红膜肽IgG抗体(Sigma, 工作浓度为1∶500), 二抗为碱性磷酸酯酶交联的羊抗鼠IgG抗体(Sigma, 工作浓度为1∶10000), 显色液为Promega公司提供的碱性磷酸酯酶显色试剂盒.

( ) 免疫荧光定位及共聚焦激光扫描显微镜观察. 参照Baskin等人[12]的方法并略加修改. 一抗为鼠抗人红细胞红膜肽单克隆抗体(Sigma, 工作浓度为1∶60). 二抗为带有FITC的羊抗鼠IgG抗体(Sigma, 工作浓度为1∶20). 对照用3%牛血清白蛋白代替一抗. 制片在Leica TCS-NT型共聚焦激光扫描显微镜下观察、拍照.

( ) 免疫金标及电子显微镜观察. 超薄切片的免疫金标参照van den Bosch和Newcomb[13]的方法进行并略加改动. 一抗是鼠抗人血红细胞红膜肽单克隆抗体(Sigma, 工作浓度

1∶60), 二抗为带有 10 nm 胶体金颗粒的羊抗鼠 IgG 抗体(Sigma, 工作浓度 1∶20). 对照用 3% gelatin fish(Sigma) 代替一抗. 用 JEM-100S 电子显微镜进行观察, 电子显微镜的电压为 80 kV.

2 结果

2.1 花粉中类红膜肽的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及免疫印迹

经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及免疫印迹发现, 川百合花粉丙酮粉中存在与红膜肽抗体产生交叉反应的蛋白带, 而对照则呈阴性反应. 但主要交叉反应并不在 240, 220 ku 分子量处, 而是在 100 ku 左右处(图版 iv-1d, 附本刊后, 下同). 而在同样条件下, 猪红细胞膜蛋白仅在 240~ 220 ku 与红膜肽抗体有强烈的交叉反应(图版 iv-1c), 这充分说明我们所用的免疫印迹方法是可靠的.

2.2 花粉萌发过程类红膜肽分布的共聚焦激光扫描显微镜观察

经免疫荧光标记, 在共聚焦激光扫描显微镜下观察发现, 花粉萌发过程中, 类红膜肽主要以颗粒状分布在花粉及花粉管的细胞质内. 这些颗粒大小不同, 往往几个相互聚集在一起, 分布较为均匀, 似乎是一些细胞器(图版 iv-2a, b). 而且, 在花粉萌发的不同时期取样观察发现, 花粉管内类红膜肽的分布并不随花粉萌发而变化.

2.3 花粉管内类红膜肽的免疫金标及电子显微镜观察

通过免疫金标和电子显微镜观察可以发现, 川百合花粉管内类红膜肽主要存在于一些囊泡的膜上. 这些具类红膜肽的囊泡往往分布于高尔基体一侧(图版 iv-3), 从形状及分布判断这些囊泡可能是高尔基体分泌囊泡. 这与动物细胞近来关于高尔基体囊泡膜上存在膜骨架的结果相一致[2]. 而在川百合花粉及花粉管内其他细胞器上则未观察到类红膜肽的存在.

3 讨论

通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及免疫印迹等方法, 可以初步证明川百合花粉内存在膜骨架主要成分类红膜肽. 近来, 分子生物学的研究还发现, 拟南芥菜内存在膜骨架另一类主要成分锚蛋白的类似基因[14]. 因此, 有理由推测植物细胞内存在类似动物细胞的膜骨架系统. 而用动物红膜肽抗体对花粉丙酮粉进行免疫印迹, 在 100 ku 左右处呈现阳性反应, 这个结果与 de Ruijter 等人[6] 在多种植物细胞及 Lorenz 等人[15] 在藻类中对红膜肽的研究一致. 据研究红膜肽对降解非常敏感[16], 而植物细胞内含有大量的蛋白水解酶[17]. 因此极可能在蛋白质抽提过程中, 植物细胞内红膜肽被蛋白水解酶分解成小的片段.

经免疫荧光定位及共聚焦激光扫描显微镜观察, 不仅进一步确定百合花粉内存在膜骨架主要成分类红膜肽, 而且发现类红膜肽在花粉及花粉管内是以颗粒状均匀分布在细胞质中的, 这与动物红细胞内红膜肽的分布是不同的. 在红细胞中红膜肽主要是分布在质膜下面.

通过免疫金标及电子显微镜观察, 发现川百合花粉及花粉管内类红膜肽主要存在于一些囊泡膜上, 这些具类红膜肽的囊泡往往存在于高尔基体附近. 此结果与近来有关动物细胞高尔基体膜骨架的研究一致[2]. 动物细胞中, 高尔基体膜骨架的红膜肽往往是与细胞质力蛋白及 dynactin 共同存在于高尔基体上, 因此人们认为高尔基体膜骨架可能参与了力蛋白与囊泡之间的连接, 从而参与了力蛋白推动的高尔基体囊泡沿微管的运动[18]. 现在, 高尔基体膜骨架的研究已引起人们的广泛关注[19], 但植物细胞内尚未见有关报道. 值得注意的是, 高尔基体囊泡的分泌对花粉管顶端生长也具有非常重要的意义, 而花粉管生长机理一直是植物生殖

生物学研究的重点问题. 同时,近来的研究表明,花粉及花粉管内也存在类细胞质力蛋白,它们同样也是存在于一些颗粒状细胞器上[20]. 因此,是否花粉管内的红膜肽也参与了力蛋白推动囊泡的运动,这将是一个非常重要的研究课题. 此外,在动物细胞高尔基体上,红膜肽是与锚蛋白等一起共同完成膜骨架的功能的[18];这些成分在植物花粉及花粉管内是否存在、它们与红膜肽关系如何,也有待进一步研究.

致谢 本工作部分实验在香港大学植物系完成. 本工作为国家自然科学基金(批准号:39770049. 39730280)资助项目.

参 考 文 献

1 Bennett V, Gilligan D M. The spectrin-based membrane skeleton and micron-scale organization of the plasma membrane. Annu Rev Cell Biol, 1993, 9: 27~66
2 Holleran E, Tokito M, Karki S, et al. Centractin (Arp1) associates with spectrin revealing a potential mechanism to link dynactin to intracellular organelles. J Cell Biol, 1996, 135: 1815~1829
3 王育东,阎隆飞. 蚕豆叶细胞膜膜蛋白的研究. 科学通报,1986,31: 1826~1829
4 王育东,阎隆飞. 蚕豆叶细胞质膜中红膜肽的免疫化学鉴定. 科学通报,1990, 35: 1328~1331
5 Michaud D, Guillet G, Rogers P A, et al. Identification of a 220 KD membrane-associated plant cell protein immunologically related to human β-spectrin. FEBS Lett, 1991, 294: 77~80
6 de Ruijter N, Emons A M. Immunodetection of spectrin antigens in plant cells. Cell Biol Int, 1993, 17: 169~182
7 Faraday C D, Spanswick R M. Evidence for a membrane skeleton in higher plant. A spectrin-like polypeptide co-isolates with rice root plasma membranes. FEBS Lett, 1993, 318: 313~316
8 Yu J, Fischman D A, Steck T L, et al. Selective solubilization of proteins and phospholipids from red blood cell membrane by nonionic detergents. J Supramolec Struct, 1973, 1: 233~248
9 Liu X, Yen L F. Purification and characterization of actin from Maize pollen. Plant Physiol, 1992, 99: 1151~1155
10 Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 1970, 227: 680~685
11 Towbin J, Sachelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to introcellulose sheets: procedure and some application. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76: 4350~4354
12 Baskin T I, Busby C H, Fowke, et al. Improvements in immunostaining samples embedded in methacrylate: localization of microtubules and other antigens throughout developing organs in plants of diverse taxa. Planta, 1992, 187: 405~413
13 van den Bosch K A, Newcomb E H. Immunogold localization of nodule-specific uricase in developing soybean root nodules. Protoplasma, 1986, 167: 425~436
14 Bevan M, Bancroft I, Bent K, et al. Analysis of 1.9 Mb of contiguous sequence from chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana*. Nature, 1998, 391: 485~488
15 Lorenz M, Bisikiska B, Hanus-Lorenz B, et al. Proteins reacting with anti-spectrin antibodies are present in chlamydomonas cells. Cell Biol Int, 1995, 19(7): 625~632
16 Chailly B, Frappier T, Regnouf F, et al. Immunological detection of spection during differentiation and in mature ciliated cells from quail oviduct. J Cell Sci, 1989, 93: 683~690
17 Jervis L, Pierpoint W S. Purification technologies for plant proteins. J Biotechnol, 1989, 11: 161~168
18 Lippincott-Schwartz J. Cytoskeletal proteins and Golgi dynamics. Cur Opin Cell Biol, 1998, 10: 52~59
19 Hirokawa N. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. Science, 1998, 279: 519~526
20 Moscatelli A, Cai G, Ciampolin F, et al. Dynein heavy chain-related polypeptides are associated with organelles in pollen tubes of *Nicotiana tabacum*. Sex Plant Reprod, 1998, 11: 31~40

(1998-09-08 收稿,1998-11-09 收修改稿)