7 Kihara H. Importance cytoplasm in plant genetics. Cytologia, 1982, 47: 435~ 450

(1997_07_09 收稿, 1997_11_03 收修改稿)

百合花粉萌发过程中的肌动蛋白和肌球蛋白的研究

任东涛 韩生成 阎隆飞
(中国农业大学生物学院, 北京 100094)

摘要 对百合花粉萌发过程中的肌动蛋白和肌球蛋白进行了研究. 结果表明: 百合花粉中肌动蛋白的分子量为43 ku, 能与抗兔肌α-肌动蛋白的抗体发生免疫交叉反应; 成熟花粉及花粉萌发过程中均未检测到编码肌动蛋白的mRNA; 萌发花粉中存在一分子量为460 ku的肌球蛋白, 具Ca^{2+}-ATPase活性, 能与抗兔肌肌球蛋白的抗体发生免疫交叉反应; 用免疫印迹方法检测到该肌球蛋白含有一分子量为205 ku的重链和一分子量为20 ku的轻链; 花粉萌发过程中肌球蛋白Ca^{2+}-ATPase活性与花粉管伸长速率呈正相关.

关键词 **百合花粉 肌动蛋白 肌球蛋白**

在肌肉细胞中, 肌球蛋白是一种能水解ATP, 产生使肌动蛋白形成的细丝和肌球蛋白形成的粗丝相对滑动的力, 从而引起肌肉收缩的机械-化学酶类. 早在1963年, 阎隆飞等证明, 在高等植物中也存在肌动蛋白-肌球蛋白系统[1]. 近年大量研究表明, 非肌细胞的细胞质流动、细胞器运动、细胞有丝分裂等均与肌动蛋白-肌球蛋白系统有关[2]. 尽管在植物中肌动蛋白和肌球蛋白含量极低, 研究者也已可以从中分离得到一定数量的肌动蛋白, 测定了其部分性质并证明其与动物肌动蛋白存在一定的相似性[3], 而且用各种生化及细胞学方法鉴定出了肌球蛋白存在的广泛性和重要性[3,4]. 但肌球蛋白的分离纯化始终是植物细胞微丝系统相关的运动的分子机理研究的限制因素. 植物花粉中肌球蛋白和肌动蛋白含量较为丰富, 是研究植物细胞运动的理想材料. 本文用Dot_Blot、免疫印迹、肌球蛋白的Ca^{2+}-ATP酶活性染色等方法, 对萌发百合花粉中肌球蛋白进行了研究, 不仅首次用免疫印迹方法证明了肌球蛋白20 ku轻链的存在, 而且在成熟百合花粉中未检测到贮存形式的编码肌动蛋白的mRNA, 其萌发过程中也未发现编码肌动蛋白的mRNA重新合成.

1 材料与方法

(1) 植物材料. 川百合(*Lilium davidii* Duch)花粉采自甘肃兰州, 干燥后保存于- 80℃备用.

将低温保存的百合花粉在含15%蔗糖的培养液(含1.27 mmol/L $Ca(NO_3)_2$, 0.162 mmol/L硼酸, 0.99 mmol/L KNO_3, 1.66 mmol/L $MgSO_4$, pH5.6), 25℃振荡培养, 间隔2 h取样, 过滤收集萌发花粉, 同时用Olympus显微镜观察花粉萌发情况, 并测定萌发速率.

(2) 实验方法. ( ) 百合花粉中肌动蛋白的提取. 百合花粉中肌动蛋白的粗提取按马永泽等的方法[3]. ( ) 百合花粉总RNA的提取及Dot_Blot分析. 取未萌发及萌发的百合花粉(间隔2 h取样), 加入液氮研磨3~ 5 min后, 用RNA提取缓冲液SSC(25 mmol/L柠檬酸

钠, pH 7.0, 内含 4 mol/L 异硫氰酸胍, 1.5% (*W*/*V*) 十二烷基肌酸钠, 100 mmol/L β-巯基乙醇) 匀浆 30 s, 冰浴 10 min. 加入等体积的酚: 氯仿(1∶1) 抽提两次, 等体积的氯仿抽提一次, 加入 2 倍体积的无水乙醇沉淀, – 20 ℃放置 30 min, 离心收集沉淀, 70% 乙醇洗涤, 用无菌水溶解, 再用酚: 氯仿抽提两次, 氯仿抽提一次, 加十分之一体积的 4 mol/L LiCl 和 2 倍体积的无水乙醇, – 20 ℃放置备用. 当需要时离心收集沉淀, 70% 乙醇洗涤, 用无菌水溶解. 用 Shimazdu UV_240 紫外分光光度计在 260 nm 测定所提取的 RNA 浓度, 用 RNA 稀释缓冲液(DEPC-H_2O∶20×SSC∶甲醛为 5∶3∶2) 稀释 RNA 到一定的浓度, 每样品 10 μg 点在尼龙膜上, 干燥后, 紫外灯下照射 2 min 以固定 RNA, 按照 DIG DNA Labeling and Detection Kit 说明书标记豌豆肌动蛋白基因并进行 RNA 的杂交和显色. 对照为豌豆肌动蛋白基因. 用 Not iv从带有豌豆肌动蛋白基因的 pBule script 质粒上切下肌动蛋白基因, 电泳回收得到纯化的 1.7 kb 的肌动蛋白基因. ( ) 百合花粉中肌球蛋白的提取. 取花粉样品, 基本参照 Yokata 等方法[5], 用 EMP 提取缓冲液(含 10 mmol/L EGTA, 6 mmol/L $MgCl_2$, 0.5 mmol/L PMSF, 50 μg/mL TPCK, 50 μg/mL TAME, 50 μg/mL Pepstatin, 2 mmol/L DTT, 30 mmol/L PIPES_KOH, pH 7.0) 冰浴匀浆, 匀浆液于 10 000 g 4 ℃离心 15 min, 弃沉淀, 上清液即为肌球蛋白粗提取液. ( ) 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳. 肌球蛋白的非变性聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳所采用分离胶浓度为 5% ~ 10%, 浓缩胶浓度为 3.5%, 4 ℃下电泳. 电泳后, 凝胶在 100 mmol/L Tris_HCl, pH8.0, 10 mmol/L EDTA, 5 mmol/L ATP, 50 mmol/L $CaCl_2$ 的缓冲液中 35 ℃显色 30 min, 进行 ATP 酶活性染色, 具有 ATP 酶活性部位形成白色磷酸钙沉淀. SDS-聚丙烯酰胺凝胶梯度电泳按 Laemmli 方法进行[6]. 肌球蛋白的分离胶浓度为 7.5% ~ 15%, 肌动蛋白的分离胶浓度为 10%, 浓缩胶浓度为 4.5%, 室温下电泳. 电泳后的凝胶用考马斯亮蓝 R250 染色或银染色. ( ) 肌动蛋白与肌球蛋白的免疫印迹鉴定. 蛋白质经非变性凝胶电泳和 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 电转移至硝酸纤维素膜上, 按 Towbin(1987) 方法进行免疫印迹[7]. 转移效果用 0.1% 氨基黑 10B 鉴定. 所用一抗分别为抗兔肌 α-肌动蛋白单克隆抗体(Sigma 产品, 工作浓度 1∶4 000)、抗骨骼肌肌球蛋白多克隆抗体(Sigma 产品, 工作浓度 1∶2500)、抗骨骼肌肌球蛋白重链单克隆抗体 IgG(Sigma 产品, 工作浓度为 1∶2000)、抗骨骼肌肌球蛋白轻链(20 ku) 单克隆抗体(Sigma 产品, 工作浓度 1∶1000), 二抗分别为碱性磷酸酯酶连接的羊抗鼠 IgG(Sigma 产品, 工作浓度为 1∶20000) 和羊抗兔 IgG(1∶4000), 显色液为 Promega 公司的碱性磷酸酯酶显色试剂盒. 显色后双蒸水冲洗, 晾干照相.

2 结果

2.1 百合花粉粗提液中肌动蛋白的免疫印迹

肌动蛋白粗提液经 SDS-PAGE 后进行的免疫印迹结果表明(图 1), 百合花粉中的肌动蛋白能与抗兔肌 α-

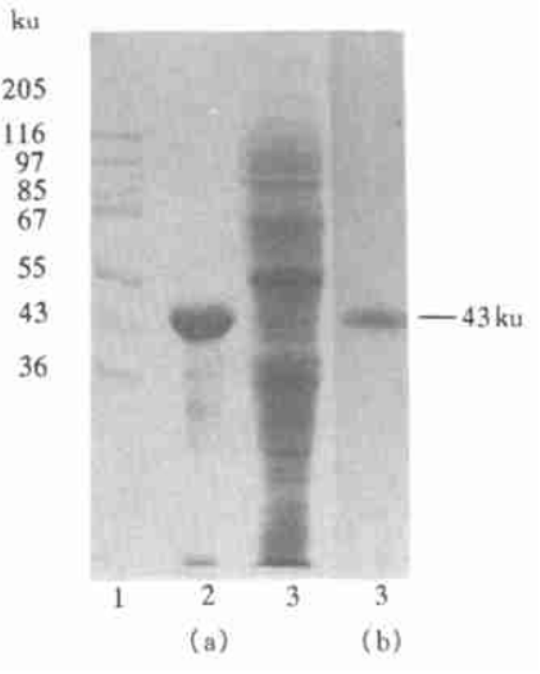


图 1 百合花粉粗提液中肌动蛋白的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(a)及免疫印迹(b)图谱

1——标准分子量蛋白, 2——兔肌肌动蛋白, 3——百合花粉粗提液

肌动蛋白的单克隆抗体发生免疫交叉反应, 在相应于兔肌肌动蛋白部位出现一相似条带, 分子量为 43 ku, 为百合花粉中的肌动蛋白.

2.2 百合花粉肌动蛋白基因表达的 **Dot-Blot**

提取未萌发及萌发后的百合花粉中 RNA, 利用 RNA 甲醛变性电泳检测所提取的 RNA 完整后, 进行 Dot-Blot 实验. 结果表明, 不仅在未萌发百合花粉中未检测到储藏形式的编码肌动蛋白的 mRNA, 而且, 萌发后的百合花粉中也未发现编码肌动蛋白的 mRNA 的重新合成.

2.3 萌发百合花粉粗提液的非变性凝胶电泳及肌球蛋白的免疫印迹

非变性凝胶电泳后, 同一块凝胶的一半用于肌球蛋白的 Ca^{2+}-ATP 酶活性染色(图 2(b)), 另一半进行免疫印迹(图 2(a)). 由上文结果可知, 非变性凝胶上具 Ca^{2+}-ATP 酶活性的蛋白条带, 在免疫印迹时能与抗骨骼肌肌球蛋白的多克隆抗体发生免疫交叉反应, 表明此具 Ca^{2+}-ATP 酶活性的蛋白条带即是百合花粉的肌球蛋白. 经与印迹至硝酸纤维素膜上的标准分子量蛋白计算比较, 百合花粉中的肌球蛋白分子量为 460 ku. 对比图 2(a)、(b) 还可以看出, 在硝酸纤维素膜上肌球蛋白条带的下方有一条着色较弱的带, 在非变性凝胶的相应部位却无 Ca^{2+}-ATP 酶活性, 推测为肌球蛋白降解产物.

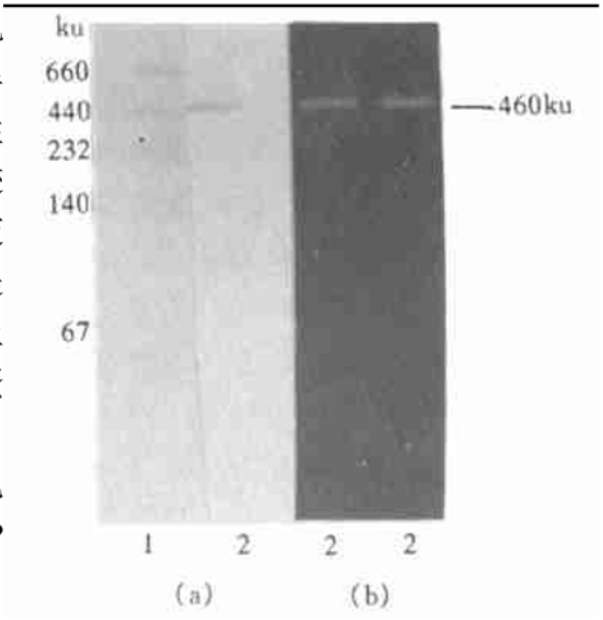


图 2 百合花粉粗提液的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(b)及肌球蛋白的免疫印迹(a)
1——标准分子量蛋白, 2——百合花粉粗提液

2.4 萌发百合花粉粗提液的 **SDS**-聚丙烯酰胺凝胶电泳及肌球蛋白的免疫印迹

百合花粉粗提液经 SDS-聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳后, 进行银染和免疫印迹. 经与抗兔骨骼肌肌球蛋白重链单克隆抗体和抗兔骨骼肌肌球蛋白轻链(20 ku)单克隆抗体反应. 显色后, 硝酸纤维素膜出现一分子量与兔肌肌球蛋白重链分子量(205 ku)位置相似的条带(图 3(b)), 而在 20 ku 位置出现一与兔肌肌球蛋白轻链(20 ku)具相似免疫化学特性条带(图 3(c)). 图 3(a)超量上样后银染结果, 经对比可知, 百合花粉粗提液中分子量为 205 ku 的多肽链是其肌球蛋白的重链, 分子量为 20 ku 的多肽链为其肌球蛋白的一条轻链.

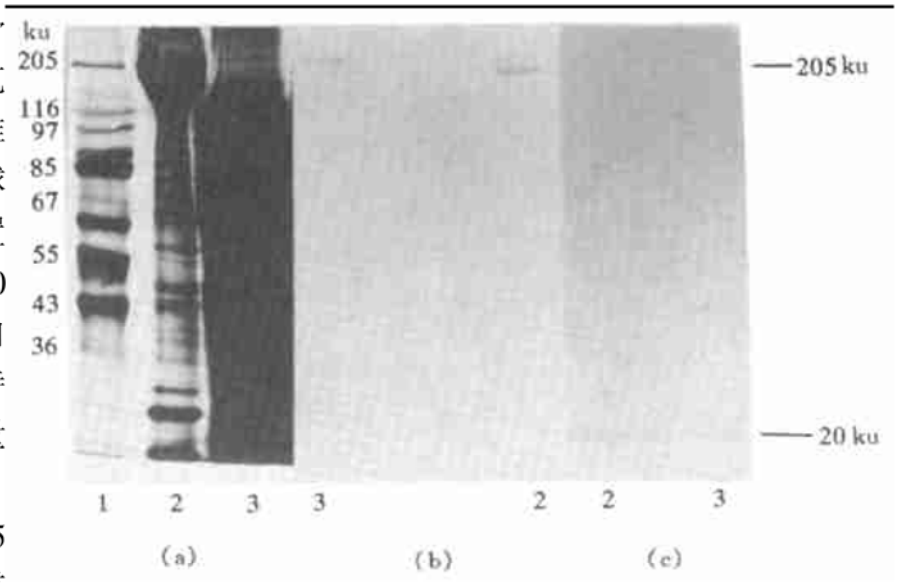


图 3 萌发百合花粉粗提液的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(a)、肌球蛋白重链(b)及轻链(c)的免疫印迹图谱
1——标准分子量蛋白, 2——兔肌肌球蛋白, 3——百合花粉粗提液

2.5 百合花粉萌发过程中粗提液肌球蛋白的 **Ca^{2+}-ATP** 酶活性变化

对百合花粉由未萌发到花粉管基本停止伸长的整个过程, 间隔 2 h 取样, 并进行肌球蛋白的提取, 粗提液经非变性凝胶电泳活性染色(取等量蛋白加样) 发现未萌发花粉中几乎无 Ca^{2+}-ATP 酶活性带, 2 h 后活性最高, 此后(4~ 10 h) 活性基本稳定, 12 h 后活性又逐渐减弱(图 4_1), 经与花粉管生长速率(图 4_2, 3) 比较可以看出, 粗提液中的肌球蛋白 Ca^{2+}-ATP 酶活性与花粉管伸长速率呈正相关.

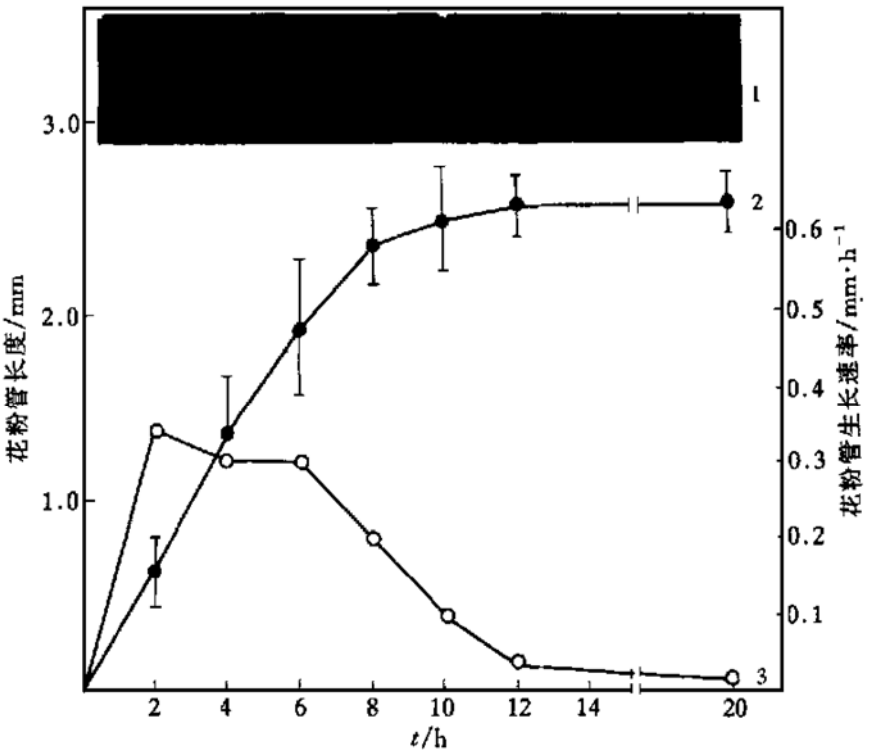


图 4　百合花粉萌发过程中粗提液肌球蛋白的 Ca^{2+}-ATP 酶活性变化与花粉管生长速率的关系

1——粗提液的 Ca^{2+}-ATP 酶活性染色, 2——花粉管生长曲线, 3——花粉管生长速率曲线

3　讨论

已经研究过的肌球蛋白依其重链可分为九个家族[8]. 近年, 肌球蛋白 ㈦头部晶体结构的解析[9]、肌球蛋白 iv, ㈣㈨的点突变分析及其他种类肌球蛋白生物物理与生物化学特征的研究结果, 为肌球蛋白的研究提供了大量信息, 肌球蛋白的研究已成为结构生物学研究的热点之一, 但对于肌球蛋白功能的研究还很不够[10]. 因为材料中肌球蛋白含量很低, 植物肌球蛋白的研究证据就更为缺乏.

研究表明, 在车轴藻(*Nitella flexilis*) 和洋葱(*Allium cepa*) 中存在 200 ku 的肌球蛋白重链[11, 12]; 豌豆(*Pisum sativvum*. L) 卷须和烟草(*Nicotiana tabacum*) 花粉管的肌球蛋白重链分子量分别为 165 ku 和 175 ku[5, 13], 而在番茄(*Lycopersicon esculentum*) 中肌球蛋白重链分子量为 100 ku[14]. 本文结果表明, 萌发百合花粉中存在肌球蛋白, 其整个分子的分子量为 460 ku. 具 Ca^{2+}-ATP 酶活性, 重链分子量为 205 ku, 均与兔骨骼肌肌球蛋白相似, 其重链分子量与植物中已知的肌球蛋白重链不同. 甚至, 与同一属的麝香百合(*Lilium longiflorum*) 的肌球蛋白重链也存在很大差异. Yokata 等的研究指出, 麝香百合花粉中未降解的肌球蛋白重链分子量为 170 ku, 且与广谱动物肌球蛋白重链的单克隆抗体也无免疫交叉反应[5]. 这与我们的结果不同. 这种差异性既可能是由于实验方法的差异造成(本实验提取液中加入了多种蛋白酶抑制剂, 如 TAME, TPCK, PMSF, Pepstatin、DTT 等), 也可能是不同植物种间其重链本身的分子量就存在着差异[13]. 已有研究指出, 肌球蛋白的调节轻链的磷酸化对肌球蛋白的 ATP 酶活性和构象的伸展或折叠起重要的调节作用[15]. 表明对其轻链的研究有非常重要的意义. 目前, 在植物中只有少量证据揭示了其轻链的存在. 马永泽等在研究豌豆卷须肌球蛋

白时发现其具有17和15 ku两类轻链,但并未用抗体进行免疫特性的检测[5]. 本文的免疫印迹结果则证明,在萌发的百合花粉粗提液中存在一类能与抗兔骨骼肌肌球蛋白的轻链(20 ku)单克隆抗体发生免疫交叉反应的条带,揭示了萌发百合花粉中肌球蛋白轻链(20 ku)的存在. 这在植物肌球蛋白的研究中尚属首次报道,为研究植物肌球蛋白中轻链的调节作用提供了重要证据.

Heslop_Harrison等的研究发现,未萌发的*Endymion non_scrputs*花粉内肌动蛋白以梭形颗粒聚集贮存,而花粉已被激活时则形成丝状,花粉萌发后,这种肌动蛋白丝在花粉管中排列成精细的微丝网络[16]. Pierson在麝香百合花粉管中也观察到了同样的结果[17]. 花粉中肌动蛋白由颗粒状向网状结构的变化是由于肌动蛋白的重新合成引起,还是肌动蛋白从贮藏形式的转变而来,则尚未见报道. 本文结果表明,在百合花粉中也存在肌动蛋白,其分子量为43 ku,能与抗兔肌肌动蛋白单克隆抗体发生免疫交叉反应. 虽有大量研究表明,花粉成熟过程中大量合成mRNA,成熟花粉中含有贮存形式的mRNA[18]. 但我们的结果并未发现花粉中存在贮存形式的编码肌动蛋白的mRNA,花粉萌发过程中也无编码肌动蛋白的mRNA重新合成,也即无肌动蛋白的重新合成. 由此可以推断,萌发花粉中网状结构的肌动蛋白形式是由储存形式的肌动蛋白转变而来的. 肌球蛋白是驱动沿微丝进行运输的分子马达,肌动蛋白在花粉萌发过程中形式的可变性是否也会导致肌球蛋白的变化呢? 本文对百合花粉萌发过程粗提液中肌球蛋白的Ca^{2+}-ATP酶活性变化的研究结果发现,未萌发花粉的粗提液中几乎观察不到白色磷酸钙沉淀带,而萌发后则磷酸钙带的深浅却与花粉管伸长速率呈正相关(图4),从另一方面证明,肌球蛋白也存在变化,鉴于肌动蛋白和肌球蛋白对花粉萌发及花粉管伸长有着重要作用,很有必要对萌发过程中肌动蛋白和肌球蛋白形式变化的机理作深入研究. 但百合花粉萌发过程中肌球蛋白活性的改变是由于肌球蛋白的重新合成还是由贮存形式转化而来,尚缺乏证据.

致谢 本工作为国家自然科学基金(批准号:39600073)资助项目.

参 考 文 献

1 阎隆飞,石德权. 高等植物中的收缩蛋白. 生物化学与生物理学报,1963,3: 490~495
2 Williamson R E. Organelle movements. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1993, 44: 181~202
3 Ma Y Z, Yen L F. Action and myosin in Pea tendrils. Plant Physiol, 1989, 89: 586~589
4 Yokata E, McDonald A R, Liu B, et al. Localization of a 170 KDa myosin heavy chain in plant cells. Protoplasma, 1995, 185: 178~187
5 Yokata E, Shimmen T. Isolation and characterization of plant myosin from pollen tubes of *Lily*. Protoplasma, 1994, 177: 153~162
6 Laemmli U K. Cleavages of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T_4. Nature, 1970, 227: 680~685
7 Towbin J, Sachelin T, Cordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to introcellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76: 4 350~4 354
8 Cheney R E, Riley M A, Mooseker M S. Phylogenetic analysis of the myosin superfamily. Cell Motil Cytoskel, 1993, 24: 215~223
9 Rayment I, Rypniewski W R, Schmidt_Base K, et al. Three_dimensional structure of myosin sub_fragmetn I: a molecular motor. Science, 1993, 261: 50~58

10 Bement W M, Mooseker M S. Molecular motors keeping out the rain. Nature, 1993, 365: 785~ 786
11 Kato T, Tonomura Y. Identification of myosin in *Nitella flexilis*. J Biochem, 1977, 88: 777~ 782
12 Parke J, Miller C, Anderton B H. Higher plant myosin heavy_chain identified using a monoclonal antibody. Eur J Cell Biol, 1986, 41: 9~ 31
13 Tang X J, Hepler P K, Scordilis S P. Immunochemical and immunocytochemical identification of a myosin heavy chain peptide in *Nicotana* pollen tubes. J Cell Sci, 1989, 92: 569~ 574
14 Vahey M, Titus M, Trautwein R, et al. Tomato actin and myosin: contractile proteins from a higher land plant. Cell Motil, 1982, 2: 131~ 147
15 Trybus K M. Filamentous smooth muscle myosin is regualted by phosphorylation. J Cell Biol, 1989, 109: 2 887~ 2 894
16 Heslop_Harrison J, Heslop_Harrison Y, Cresti M, et al. Actin during pollen germination. J Cell Sci, 1986, 86: 1~ 8
17 Pierson E S. Rhodamine_phalloidin staining of F_actin in pollen after dimethyl_sulphoxide permeabilization. Sex Plant Reprod, 1988, 1: 83~ 97
18 Frankis R, Mascarenhas J P. Messenger RNA in the ungerminated pollen grain: a direct demonstration of its presence. Ann Bot, 1980, 45: 595~ 599

(1997-05-26 收稿, 1997-08-26 收修改稿)

钙调素拮抗剂诱导人肺癌细胞 PLA_801 凋亡机理研究

张 弘 柳惠图*
(北京师范大学细胞增殖与调控生物学实验室, 北京 100875. * 联系人)

摘要 用 20 μmolL^{-1}的 TFP 处理人肺癌细胞 PLA_801, 强烈抑制了细胞的增殖. 软琼脂实验发现加药组细胞集落形成率为对照组的 63.6%, 这表明部分细胞失去了在软琼脂中形成集落的能力. 流式细胞光度术显示, 加药组细胞 G_1 期峰前出现了程序性细胞死亡的特征峰, 荧光染料 $Heochst_{33342}$ 染色后, 荧光显微镜下观察, 可见到部分细胞凋亡时核凝集、边化、断裂的情形. 提取细胞总 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳, 可见加药组细胞出现了凋亡细胞特有的 DNA"梯子". 这些结果表明: 20 μmolL^{-1}TFP 诱导了细胞的凋亡, 这可能是细胞增殖受到抑制的原因之一. 进一步测定 20 μmolL^{-1}TFP 处理细胞时细胞内 CaM 的活性和细胞内 cAMP 的水平, 发现 20 μmolL^{-1}TFP 处理使细胞内钙调素的活性抑制了 95.1% 而 cAMP 水平迅速上升至 2.8 倍. 在细胞内钙离子的主要受体—钙调素的活性被强烈抑制时, cAMP 水平的迅速上升可能是 PLA_801 凋亡的主要原因.

关键词 **钙调素 三氟拉嗪 细胞凋亡 环腺苷酸**

细胞凋亡是生物发育过程中普遍存在的死亡现象, 不同于坏死, 这种死亡是受基因调控的主动死亡过程, 不引起炎症反应, 对机体自身没有损伤. 如果能利用对机体本身毒性小的药物诱导细胞凋亡, 无疑对肿瘤治疗具有划时代的意义, 因此, 凋亡是近年来研究的热点. 但是, 最容易被诱导凋亡的细胞, 是发育过程中自身通过凋亡死亡的细胞, 糖皮质激素诱导胸腺细胞的凋亡[1], 是最典型的模型. 此外, 淋巴血液系统、内分泌系统的细胞比较容易诱导, 如 HL_60 细胞是一个较好的实验材料. 上皮细胞、成纤维细胞的诱导较困难. 已有动物实验表明: 钙调