花粉中的肌动蛋白和肌球蛋白及其在花粉管伸长中的作用*

阎隆飞 王秀珍 滕晓月 刘国琴 马永泽
（北京农业大学生物化学教研室）

植物花粉萌发后，花粉管中的细胞质流动是很活跃的．这种细胞质流动与其中的肌动蛋白和肌球蛋白有密切的关系．

花粉中存在肌动蛋白，Condeelis 曾经用电子显微技术证明用孤挺花（*Amaryllis belladonna*）的花粉原生质体和花粉管中存在 F-肌动蛋白[1]．

我们从许多种植物的花粉中提取得到肌动蛋白和肌球蛋白，用细胞松弛素等证明花粉管中的肌动蛋白与肌球蛋白是细胞质流动的动力，并且证明花粉管的伸长受 Ca^{2+} 的调节．

一、材料与方法

1. 材料 温室或露地栽培的丝瓜（*Luffa cylindrica*）、黄瓜（*Cucumis sativa*）、南瓜（*Cucurbita moschata*）、白菜（*Brassica pekinensis*）、萝卜（*Raphanus sativus*）、烟草（*Nicotiana tabacum*），苹果（*Pyrus malus*）分别于上午采取新鲜花粉，置干燥器中备用．

2. 方法

（1）花粉的萌发．取新鲜花粉放在消过毒的花粉培养基中萌发，培养基含有蔗糖20%，酵母浸出物（(Sigma 产品）0.1%，硼酸 0.01%，$CaCl_2$ 0.01*M*． 在 22℃ 恒温箱中培养 5 小时．

（2）肌球蛋白的制备．按照 Pollard（1982）的方法[2]．

（3）SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳．按照 Laemmli: 的方法[3]．

（4）肌球蛋白 ATP 酶的鉴定． 按照 Horak 与 Hill（1972）及 Kirkeby 与 Moe（1983）的方法[4,5]．

（5）细胞松弛素 B 的配制．将细胞松弛素 B(Sigma 产品)溶于二甲基亚砜中，100μg/ml 作为储备液，用时加花粉培养液稀释．对照加相同含量的二甲基亚砜．

二、结果与讨论

1. 花粉中肌动蛋白与肌球蛋白的存在

（1）聚丙烯酰胺凝胶电泳分析．将已萌发的花粉（丝瓜、黄瓜、萝卜、白菜、或烟草）分别放在含有 0.2% Triton X-100，7% 甘油，0.1*M* Tris- 马来酸缓冲液（pH7.2）中，在 0℃ 研磨成匀浆，浸提 30 分钟，经 15,000g 离心 15 分钟，取上清液作为样品．将样品加到 SDS 样品缓冲液中，100℃ 加热 2 分钟．将所得花粉的蛋白提取物与标准的肌动蛋白（Sigma 产品）及兔肌的肌球蛋白（自制）同时进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳，结果如图 1 及图 2．

本文 1984 年 9 月 11 日收到．
* 中国科学院科学基金资助的课题．

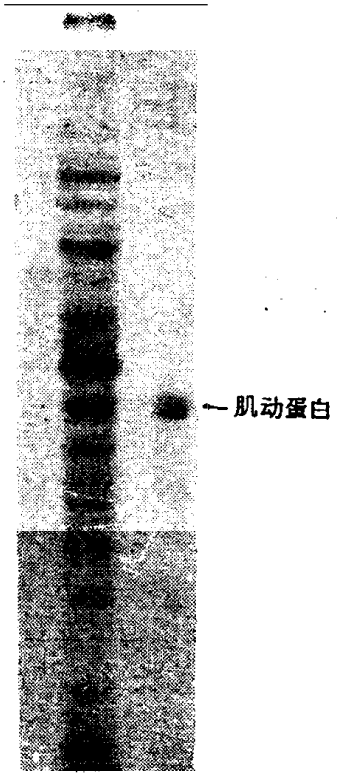


图 1　丝瓜花粉中的肌动蛋白的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱(凝胶 7.5%)

a. 丝瓜花粉蛋白；　b. 兔肌的肌动蛋白

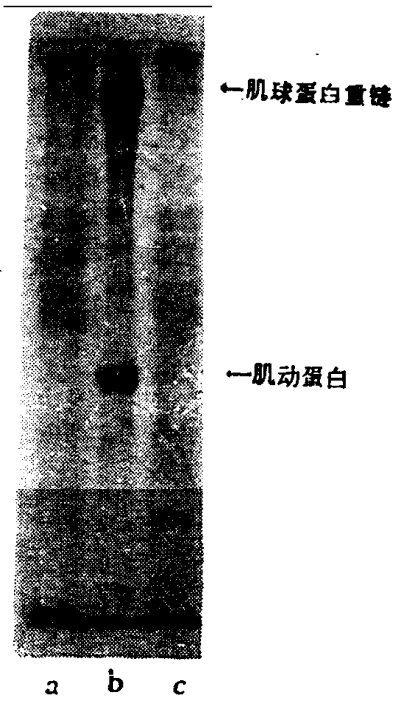


图 2　丝瓜花粉中的肌球蛋白重链及肌动蛋白的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

a、c 为丝瓜花粉中的蛋白质；

b 为兔肌的肌球蛋白重链及肌动蛋白

由图 1 及图 2 可见花粉蛋白质中含有肌动蛋白及肌球蛋白的重链。我们采用 Horak 和 Hill (1972)以及 Kirkeby 和 Moe (1983) 的方法进一步鉴定花粉中的肌球蛋白 ATP 酶的活性[4,5]. 将花粉管提取液进行天然聚丙烯酰胺凝胶电泳，电泳后将胶柱放在含有 5m *M* ATP、0.2% $CaCl_2$ 及甘氨酸缓冲液 (pH9.2) 中，在 37℃ 保温 30 分钟，在胶柱顶端下即出现一条明显的白色沉淀带. 同时以兔肌肌球蛋白为对照，在相同位置也出现白色沉淀带，表明花粉中含有肌球蛋白. 我们又进一步用 Kirkeby 与 Moe 的方法进行鉴定，以硝酸铅及硫化铵对胶柱进行染色，结果在白带处产生棕褐色带，证明此带确实具有肌球蛋白 ATP 酶活性. 我们将 5 个胶柱顶部的白色带切下，一同放在 SDS 样品缓冲液中浸提，然后进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳，同时与兔肌肌球蛋白加以比较，结果如图 3.

由图 3 可见花粉中确实含有肌球蛋白，其重链的分子量(220,000) 比兔肌肌球蛋白重链分子量(200,000) 稍大，这一点与粘菌 (*Physarum polycephalum*) 的肌球蛋白重链 (225,000) 非常相似[6].

(2) 电子显微镜分析. 将白菜花粉在培养液中萌发 1.5—2 小时，然后放在低浓度的 PHEM 缓冲液(含 60m*M* PIPES, 25m*M* HEPES, 10m*M* EGTA, 2m*M* $MgCl_2$, pH6.9)[7]中，使之涨破，取从花粉管中流出的细胞质，放在铜网上，用 2% 乙酸双氧铀进行负染，然后在 JEOL 100CX 电子显微镜下观察，在花粉细胞质中可以看到大量微丝. 这些微丝的直径为 6nm，并具有螺旋结构，其半螺距为 36.7nm，这是微丝的特征. 另外在花粉细胞质中加重酶解肌球蛋白 (HMM)，用乙酸双氧铀负染后在电子显微镜下观察. 在微丝上可以见到具有极性的箭头状装

饰(图 4). 由此可以证明这些微丝为 F-肌动蛋白.

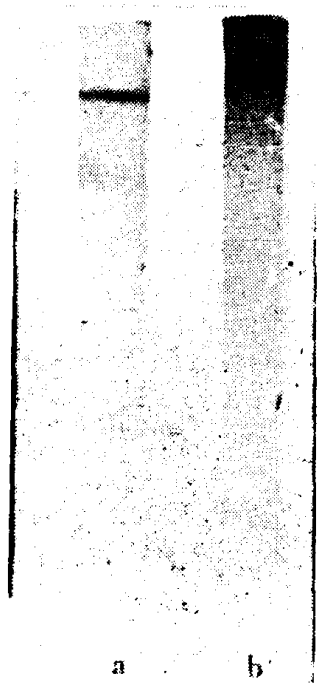


图 3 白菜花粉肌球蛋白与兔肌肌球蛋白的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(凝胶 7.5%)
a. 兔肌肌球蛋白重链; b. 花粉肌球蛋白重链



图 4 白菜花粉中的微丝在加入兔肌重酶解肌球蛋白后形成箭头状装饰的电子显微摄影(×26,585)

2. 花粉管中细胞质流动与肌动蛋白的关系 我们用使 F-肌动蛋白解聚的细胞松弛素 B 等药剂处理花粉管,以便了解花粉管中的细胞质流动是否与其中的肌动蛋白有关系.

(1) 细胞松弛素 B 的影响. 细胞松弛素 B 对微丝有解聚作用[8]. 我们取细胞质流动活跃的丝瓜花粉管进行实验,在显微镜下观察,其流动速度平均为 6.4μm/s,然后在培养液中加细胞松弛素 B (终浓度为 10μg/ml),细胞质流动立即减慢,10 分钟后细胞质流动停止. 如果将含 CB 的培养液洗去,加入不含 CB 的培养液,则细胞质流动又逐渐恢复,且可达到原有的水平.以后再加CB,流动又减慢而停止,如此可以反复多次. 结果如图 5.

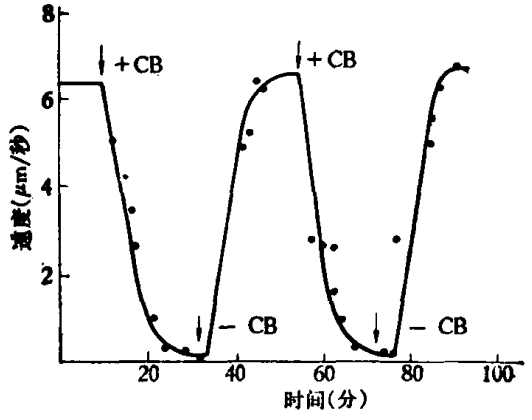


图 5 细胞松弛素 B 可逆地抑制丝瓜花粉中细胞质流动的过程(对照亦含二甲基甲砜,对流速无影响)

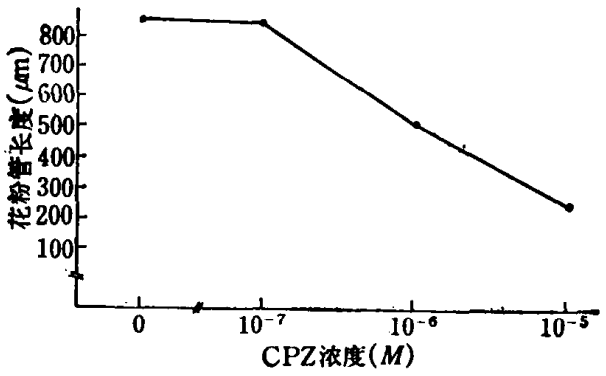


图 6 氯丙嗪对黄瓜花粉管长度的影响

细胞松弛素B对花粉管的伸长也有明显的抑制作用。用含有不同浓度CB(2.5—10μg/ml)的培养基培养丝瓜花粉，所得结果表明花粉的萌发明显地受CB的抑制。随着CB浓度的增加，花粉管长度减小，10μg/ml的CB可以完全抑制花粉粒的萌发，同时花粉管的长度与CB浓度成反比。

(2) 秋水仙碱的影响。我们用秋水仙碱与细胞松弛素B进行了比较。用秋水仙碱(Sigma产品，终浓度为20μgl/ml)处理丝瓜花粉管后，其细胞质流动速度未发生任何变化，甚至将浓度提高到40μg/ml时，流速仍未见降低。秋水仙碱对微管有解聚作用[9]，由此可见，细胞质流动与微管无关，它的动力是来自F⁻肌动蛋白。

(3) Ca^{2+} 对花粉管生长的影响。我们用氯丙嗪 (Chlorpromazine，即冬眠灵，简称 CPZ) 处理萌发的花粉，可以看到CPZ对花粉管伸长有抑制作用。在培养基中加10^{-7}—$10^{-4}M$的CPZ，花粉管长度与CPZ浓度的关系如图6。

Polito (1982) 在杏的花粉管中加入钙调蛋白(Calmodulin)可以促进花粉管伸长，而氯丙嗪则有抑制作用，氯丙嗪是钙调蛋白的专一性抑制剂[10]。上述结果可见，CPZ对黄瓜花粉管生长的抑制可能也是通过钙调蛋白而起作用的，亦即Ca^{2+}在花粉管伸长中起调节作用。我们用Ca^{2+}的专一螯合剂EGTA证明Ca^{2+}在花粉管伸长中起重要作用。如在培养基中加入EGTA，则花粉管的伸长受到抑制，当浓度达到 3mM 时，伸长即完全停止。这种抑制作用是不可逆的。

上述结果表明，花粉中不但存在肌动蛋白，而且存在肌球蛋白。花粉管中细胞质流动的动力就是由于肌动蛋白与肌球蛋白的相互作用。最近 Sheetz 与 Spudich (1982) 用荧光显微技术证明，肌球蛋白可以在车轴藻(Nitella)原生质中由F-肌动蛋白组成的绳缆上"行走"，使人可以直觉地观察到肌动蛋白与肌球蛋白的相互作用[11]。

如果用使F-肌动蛋白解聚的CB处理花粉管，细胞质流动即行停止，同时CB又抑制花粉管的伸长。花粉管生长还受 CPZ 的抑制，这可能是由于Ca^{2+}通过钙调蛋白对细胞质流动而起调节作用[12]。若用EGTA处理，则花粉管生长亦即停止。由此可以设想，花粉管生长的动力来自细胞质流动，而细胞质流动的动力则来自肌动蛋白和肌球蛋白的相互作用。

参 考 文 献

[1] Condeelis, J. S., *Expt. Cell Res.*, **88**(1974), 435—439.
[2] Pollard, T. D., *Methods in Cell Biol.*, **24**(1982), 333—371.
[3] Laemmli, U. K., *Nature*, **227** (1970), 680—685.
[4] Horak, A. and Hill, R. D., *Plant Physiol.*, **49**(1972), 365—370.
[5] Kirkeby, S. and Moe, D., *Electrophoresis*, **4**(1983), 236—237.
[6] Korn, E. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**(1978), 588—599.
[7] Schliwa, M. and Blerkom, J., *J. Cell Biol.*, **90**(1981), 222—235.
[8] Wessels, N. K., *Science*, **171** (1971), 135—143.
[9] Wilson, L. and Meza, I., *J. Cell Biol.*, **58** (1973), 709—719.
[10] Polito, V. S., in *Pollen: Biology and Implications for Plant Breeding* (Eds. Mulcahy and Ottaviano), Elserver Sci. Publ. Co., 1983.
[11] Sheetz, M. P. and Spudich, J. A., *Nature*, **303** (1983), 31—35.
[12] Cheung, W. Y., *Science*, **207**(1980), 19—27.