中国科学 (C 辑)
第 30 卷 第 3 期 SCIENCE IN CHINA (Series C) 2000 年 6 月

百合花粉与花粉管中类高尔基体 58K 蛋白*

李 岩** 阎隆飞
(中国农业大学生物学院农业部植物生理与生物化学重点开放实验室, 北京 100094)

摘要 动物细胞中, 高尔基体往往位于微管组织中心(MTOC)附近, 它们的位置部分地被 58K 蛋白所决定. 通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和免疫印迹方法, 我们发现川百合花粉与花粉管内存在类高尔基体 58K 蛋白, 其分子量与动物细胞内 58K 蛋白类似, 约为 60 ku. 通过免疫荧光标记方法, 在共焦激光扫描显微镜下观察发现, 花粉与花粉管内类高尔基体 58K 蛋白主要存在于一些颗粒状的细胞器上. 这些颗粒状细胞器的分布与植物细胞内高尔基体的分布是一致的. 进而通过免疫金标和透射电镜观察发现, 花粉与花粉管内类 58K蛋白主要存在于高尔基体附近的囊泡膜上.

关键词 高尔基体 高尔基体 58K 蛋白 植物 花粉

高尔基体是真核细胞内一种重要的细胞器, 其主要功能是对蛋白质进行修饰和分类. 近来, 动物细胞中已发现一些在高尔基体上特异存在的蛋白质[1], 58K 蛋白是其中一种细胞质一侧的高尔基体外周膜蛋白[2]. 经免疫荧光标记在荧光显微镜下观察发现, 58K 蛋白存在于动物细胞的高尔基体上[2~5], 并且, 已发现 58K 蛋白的抗体可以标记很多类型的动物培养细胞的高尔基体[6, 7]. 研究发现, 从鼠肝中分离的高尔基体膜含有稳定结合的 58K 蛋白. 通过对纯化的 58K 蛋白进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 发现它是由单一的分子量为 58 ku 蛋白亚基所组成, 同时, 人们发现纯化的 58K 蛋白也可以与微管相结合. 根据这些特征, 认为 58K 蛋白的功能可能是将高尔基体与微管骨架相连接[3, 5].

植物细胞与动物细胞中高尔基体虽然存在一定的差异, 但基本结构与功能是类似的[8, 9]. 一些动物与真菌细胞内高尔基体的特异同源蛋白, 已经在马铃薯及拟南芥内被鉴定[10],而且, 已发现植物细胞内高尔基体的位置也可能与细胞骨架有关[11]. 然而, 至今尚未见有关植物细胞高尔基体 58K 蛋白的报道.

1 材料与方法

1.1 植物材料

川百合(*Lilium davidii* Duch.)花粉采自兰州, 经室温下 24 h 干燥后, 至–20℃下保存.

1.2 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,

1999-08-18 收稿, 2000-02-16 收修改稿
* 国家自然科学基金(批准号: 39770049)和国家自然科学重点基金(批准号: 39730280)资助项目
** E-mail: liyan@mail.cau.edu.cn

0.01%硼酸, 0.03%硝酸钙, pH 5.6)于 24~26℃黑暗条件下萌发.

1.3　SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和免疫印迹

花粉丙酮粉制备参照 Liu 等人[12]的方法. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳参照 Laemmli[13]的方法. 电泳分离胶浓度为 7.5 %, 用考马斯亮蓝染色. 标准分子量购自 Bio-Rad 公司.

免疫印迹参照 Towbin 等人[14]方法. 未染色的电泳胶转移至硝酸纤维素膜上. 3% BSA-TBS (20 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, pH 7.5)封闭 2 h 后, 硝酸纤维素膜在 37℃下用一抗反应 1 h, 一抗为动物细胞高尔基体 58K 蛋白抗体(Sigma, 工作浓度为 1∶500). 经 BTBS 3 次洗涤后, 硝酸纤维素膜在 37℃下用二抗反应 1 h, 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∶10 000). 经 TBS 洗涤后, 用含有 NBT 和 BCIP 的缓冲液显色. 对照中用相应缓冲液代替一抗. 在这种情况下, 未观察到存在特异的染色.

1.4　免疫荧光标记与共焦激光扫描显微镜观察

花粉与花粉管参照 Baskin 等人[15]方法进行免疫荧光标记. 简述如下: 材料在室温下用 50 mmol/L PIPES 缓冲液配制的 4%多聚甲醛固定 1 h. 用相应缓冲液清洗 3 次后, 材料经梯度乙醇脱水, 并经 BMM 包埋剂浸透和包埋(BMM: buty-methacrylate∶methylmethacrylate= 4∶1, 包含 0.5% benzoin ethyl ether).

包埋在 0℃左右进行. 用两个长波紫外灯进行照射, 包埋块聚合大约需要 12~16 h.

材料在 Leica Reichert Ultracut S 超薄切片机上切取半薄切片, 切片厚度为 1~2 μm. 切片在 45℃下展平, 并用多聚赖氨酸粘贴在盖玻片上. 进行免疫荧光定位时, 首先用纯丙酮处理材料 10~15 min, 以完全脱去 BMM 包埋剂; 然后用 3% 牛血清白蛋白(PBS 缓冲液配制, Sigma) 封闭 1h; 接着在 37℃下用一抗(PBS 缓冲液配制)处理 1 h, 一抗是单克隆高尔基体 58K 抗体 (Sigma, 工作浓度为 1:20); 经相应缓冲液清洗后, 在 37℃下用 FITC 标记的相应二抗 (Sigma, 工作浓度为 1:40) 处理 1 h, 然后用相应缓冲液进行清洗, 抗荧光衰退封片剂 (molecular probe) 进行封片. 对照用 3%牛血清白蛋白代替一抗.

观察用 Leica TCS-NT 共焦激光扫描显微镜, 用氩-氪激光作为激发光源, 激发波长为 488 nm. 用 Polaroid 6000 型照相系统进行拍照, 胶卷为 Kodak Tmax 100 黑白胶卷.

1.5　免疫金标及电子显微镜观察

川百合花粉萌发后, 参照李岩等人[16]的方法进行材料的固定、包埋与超薄切片, 简述如下: 材料用 2%多聚甲醛和 1%戊二醛(用 0.2 mol/L 磷酸缓冲液配制)在室温下固定 1 h; 然后用相应缓冲液清洗 3 次, 每次 10 min; 接着材料用 1%锇酸(用蒸馏水配制)在室温下固定 1 h, 用蒸馏水清洗 3 次, 每次 10 min; 材料再用梯度乙醇脱水, 并用乙醇: L.R.White resin 为 2∶1, 1∶1, 1∶2 进行渗透, 每次 30 min; 然后材料用纯包埋剂渗透 3 次, 每次 1 h; 最后将材料和包埋剂置于明胶胶囊内在 46℃下聚合 16 h. 包埋块经修块, 选择萌发的花粉, 用钻石刀在 Leica 超薄切片机上切取连续超薄切片, 切片厚度 80 nm 左右. 将超薄切片捞在覆有 Formvar 膜的单孔铜网上, 铜网置于铜网盒内备以后处理和观察.

超薄切片的免疫金标参照李岩等人[16]方法进行, 简述如下: 首先材料在室温下用 5% $NaIO_4$水溶液处理 15 min, 然后用蒸馏水清洗 3 遍, 每次 10 min; 在室温下材料用 3% 牛血清白蛋白封闭 1 h, 封闭液用 PBS 缓冲液配制; 接着用一抗处理材料 1 h(室温), 一抗是鼠单克隆高尔基体58K抗体 (Sigma, 工作浓度为1:20), 用PBS缓冲液配制; 经PBS 3次清洗后 (每次10 min),

材料用带有 10 nm 胶体金颗粒的相应二抗 (Sigma, 工作浓度为 1: 40)处理 1 h, 二抗也用 PBS 缓冲液配制; 然后材料用 PBS 缓冲液清洗 3 次, 每次 10 min; 接着分别用 2%醋酸双氧铀及 2%柠檬酸铅处理材料, 每次染色后用蒸馏水清洗 3 次, 每次 10 min; 最后用滤纸吸干铜网上的水分, 将其置于铜网盒内保存.

用 JEM-100S 电子显微镜进行观察, 电子显微镜的电压为 80 kV. 先在低倍下找到萌发花粉, 然后在 3~5 万倍下进行观察和拍照.

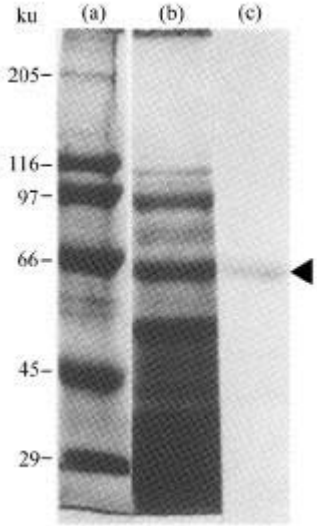

图 1 川百合花粉丙酮粉的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和免疫印迹(分离胶浓度为 7.5%)

(a) 标准蛋白分子量; (b) 川百合花粉丙酮粉; (c) 通过免疫印迹, 高尔基体 58K 蛋白抗体在川百合花粉丙酮粉中检测的阳性条带, 其分子量约为 60 ku (箭头)

2 结果

2.1 川百合花粉中类高尔基体 58K 蛋白的免疫印迹确定

川百合花粉丙酮粉与标准蛋白分子量的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳结果, 分别显示于图 1(a), (b); 高尔基体 58K 蛋白抗体免疫印迹的结果显示于图 1(c).

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及免疫印迹方法表明, 川百合花粉丙酮粉内存在一条可以与高尔基体 58K 蛋白抗体发生免疫反应的蛋白带, 其分子量约为 60 ku(图 1(b), (c), 箭头所示), 此分子量与动物细胞高尔基体 58K 蛋白的分子量相类似.

2.2 川百合花粉与花粉管中类高尔基体 58K 蛋白的免疫荧光观察

经免疫荧光标记, 在共焦激光扫描显微镜下观察发现, 花粉萌发过程中, 高尔基体类 58K 蛋白主要分布在花粉及花粉管内的颗粒状细胞器上. 这些颗粒大小及形状比较相似, 往往几个相互聚集在一起, 分布较为均匀, 与植物细胞中高尔基体的分布情况相吻合(图2).

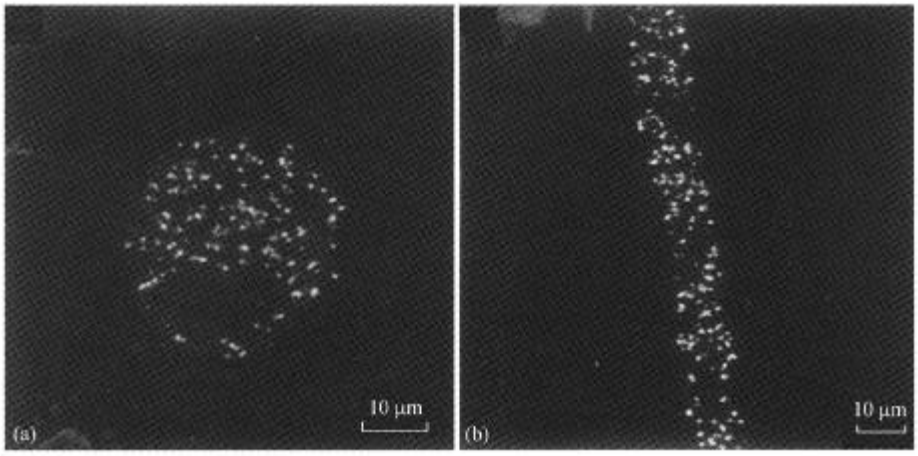

图 2 川百合花粉与花粉管中类高尔基体 58K 蛋白的免疫荧光定位

共焦激光扫描显微镜观察显示, 类高尔基体 58K 蛋白存在于花粉(a)和花粉管(b)中颗粒状细胞器上

2.3　花粉管内类高尔基体 58K 蛋白的免疫金标及电镜观察

通过免疫金标，在电子显微镜下观察发现，川百合花粉管中类高尔基体 58K 蛋白主要存在于高尔基体周围的囊泡膜上(图 3(a)). 进一步的观察发现，特异标记的胶体金颗粒主要存在于川百合花粉管高尔基体囊泡膜的表面(图 3(b)，箭头)，这说明植物细胞中的类高尔基体 58K 蛋白，可能也像动物细胞内确定的那样，是高尔基体囊泡膜的外周膜蛋白. 同时，在未经一抗处理的川百合花粉管超薄切片上，我们没有观察到高尔基体及高尔基体周围囊泡上有明显的胶体金颗粒存在.

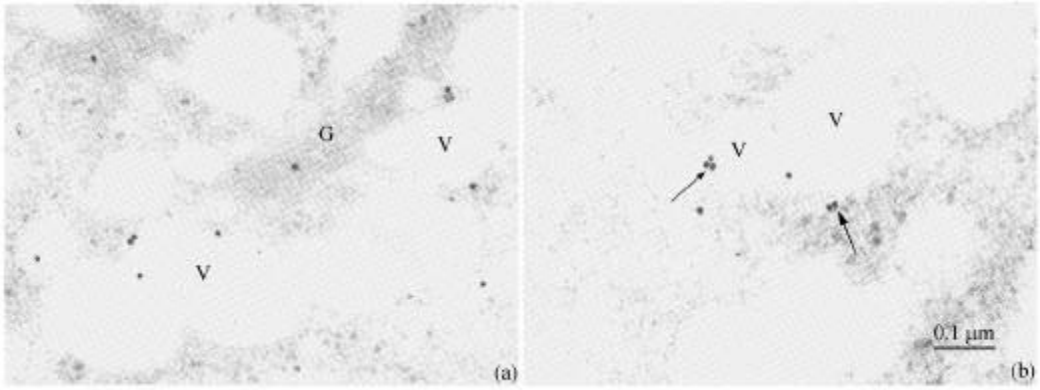

图 3　川百合花粉管中类高尔基体 58K 蛋白的免疫金标与透射电子显微镜观察

(a) 显示类高尔基体 58K 蛋白主要存在于高尔基体周围的囊泡膜上; (b) 箭头指示类高尔基体 58K 蛋白主要存在于这些囊泡膜的外表面. G 为高尔基体; V 为囊泡

3　讨论

通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及免疫印迹方法，发现川百合花粉丙酮粉中存在一条可以与高尔基体 58K 蛋白抗体发生免疫反应的蛋白带，其分子量约为 60 ku. 过去的研究发现，不同动物细胞内高尔基体 58K 蛋白的分子量是基本类似的，大约为 58 ku[2~7]. 现在发现，川百合花粉内类高尔基体 58K 蛋白的分子量与在动物细胞中所报道的相类似.

在动物细胞中，虽然通过生物化学方法证明58K蛋白是高尔基体的外周膜蛋白，但是，它在高尔基体上的具体定位及精确分布并未见报道. 通过免疫金标和透射电子显微镜观察,发现类 58K 蛋白是百合花粉与花粉管内高尔基体周围囊泡的膜蛋白，此结果与通过生物化学方法在动物细胞中取得的结果一致，并为 58K 蛋白在高尔基体上的存在位置提供了进一步的证据.

动物细胞高尔基体有很多特异的抗体和荧光探针[9]，因此，在动物细胞中，可以比较容易地利用荧光标记的方法，在荧光显微镜或共焦激光扫描显微镜下对高尔基体的分布和动态变化进行研究. 然而，植物细胞高尔基体却缺乏有关的抗体与荧光探针，这显然不利于有关研究. Horsley 等人[17]曾经利用植物细胞高尔基体取得一个抗体，他们发现这个抗体可以特异的标记植物细胞高尔基体和质膜[18, 19]，但是，至今这个抗体的抗原性质仍然不清楚，因此，其很难在植物细胞中广泛应用. 另外，58K 蛋白的抗体在动物细胞内经常被用做高尔基体的特异探针[6, 7, 20]，但在植物细胞中尚未见有关此抗体应用的报道. 现已证明，动物细胞高尔基体 58K 蛋白抗体可以特异地标记花粉与花粉管内高尔基体，这意味着，在有关研究中，58K 蛋白抗体

同样可能成为植物细胞高尔基体的特异探针.

研究发现, 高尔基体 58K 蛋白广泛存在于多种动物细胞内[6,7], 但其在植物细胞内的广泛存在, 还有待更多的工作加以证明. 体外实验证明, 动物细胞高尔基体 58K 蛋白具有微管结合蛋白的性质[2~5], 是否植物细胞类高尔基体 58K 蛋白具有类似的性质, 仍有待进一步研究.

致谢 对徐是雄教授在实验过程中给予的帮助表示感谢.

参 考 文 献

1 Warren G, Malhotra V. The organization of the Golgi apparatus. Curr Opin Cell Biol, 1998, 10: 493~498

2 Bloom G S, Brashear T A. A novel 58-kDa protein associates with the Golgi apparatus and microtubules. J Biol Chem, 1989, 264: 16 083~16 092

3 Henning D, Scales S J, Moreau A, et al. A formiminotransferase cyclodeaminase isoform is localized to the Golgi complex and can mediate interaction of trans-Golgi network-derived vesicles with microtubules. J Biol Chem, 1998, 273: 19 602~19 611

4 Bashour A M, Bloom G S. 58K, a microtubule-binding Golgi protein, is a formiminotransferase cyclodeaminase. J Biol Chem, 1998, 273: 19 612~19 617

5 Gao Y S, Alvarez C, Nelson D S, et al. Molecular cloning, characterization, and dynamics of rat formiminotransferase cyclodeaminase, a Golgi-associated 58-kDa protein. J Biol Chem, 1998, 273: 33 825~33 834

6 Donaldson J G, Lippincott-Schwartz J, Bloom G S, et al. Dissociation of a 110-kD peripheral membrane protein from the Golgi apparatus is an early event in brefeldin A action. J Cell Biol, 1990, 111: 2 295~2 306

7 Ktistakis N T, Roth M G, Bloom G S. PtK_1 cells contain a nondiffusible, dominant factor that makes the Golgi apparatus resistant to brefeldin A. J Cell Biol, 1991, 113: 1 009~1 023

8 Mollenhauer H H, Morre D J. Structure of Golgi apparatus. Protoplasma, 1994, 180:14~28

9 Farquhar M G, Palade G E. The Golgi apparatus: 100 years of progress and controversy. Trends Cell Biol, 1998, 8: 2~10

10 Hawes C, Satiat-Jeunemaitre B. Stacks of questions: How does the plant Golgi work? Trends Plant Sci, 1996, 1: 395~401

11 Boevink P, Oparka K, Cruz S S, et al. Stacks on tracks: the plant Golgi apparatus traffics on an actin/ER network. Plant J, 1998, 15: 441~447

12 Liu X, Yen L F. Purification and characterization of actin from maize pollen. Plant Physiol, 1992, 99: 1 151~1 155.

13 Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 1970, 227: 680~685

14 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: 4 350~4 354

15 Baskin T I, Busby C H, Fowke L C, 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

16 李 岩, 阎隆飞, 徐是雄, 等. 花粉与花粉管内膜骨架蛋白红膜肽. 科学通报, 1999, 44(6): 643~645

17 Horsley D, Coleman J, Evans D, et al. A monoclonal antibody, JIM 84, recognizes the Golgi apparatus and plasma membrane in plant cells. J Exp Bot, 1993, 44 (suppl): 223~229

18 Satiat-Jeunemaitre B, Hawes C. Redistribution of a Golgi glycoprotein in plant cells treated with brefeldin A. J Cell Sci, 1992, 103: 1 153~1 166

19 Satiat-Jeunemaitre B, Steele C, Hawes C. Golgi-membrane dynamics are cytoskeleton dependent: a study on Golgi stack movement induced by brefeldin A. Protoplasma, 1996, 191: 21~33

20 Holleran E A, Tokito M K, Karki S, et al. Centractin (ARP1) associates with spectrin revealing a potential mechanism to link dynactin to intracellular organelles. J Cell Biol, 1996, 135: 1 815~1 829