

动蛋白相关蛋白在烟草花粉管高尔基体上的存在与分布

魏丽勤^① 柳波^② 李岩^{①*}

(^① 植物生理学与生物化学国家重点实验室, 中国农业大学生物学院, 北京 100094; ^② Section of Plant Biology, University of California-Davis, Davis, USA. * 联系人, E-mail: liyan@cau.edu.cn)

摘要 有关研究表明, 中央马达动蛋白 AtKinesin-13A 在拟南芥不同细胞中与高尔基体结合. 用简并引物, 通过 RT-PCR 方法从烟草中克隆到一个 2067 bp 的基因片段, 其编码的多肽序列与拟南芥中 AtKinesin-13A 相应序列的相似性为 77.33%, 其原核表达产物可与 AtKinesin-13A 抗体进行特异反应. 进一步研究发现, AtKinesin-13A 抗体可以与烟草不同组织提取物中一个 120 kD 的多肽进行反应. 这些结果表明, 烟草中存在 AtKinesin-13A 的同源蛋白 NtKinesin-13A, 其分子量约为 120 kD. 经免疫荧光标记, 在共焦激光扫描显微镜下观察发现, NtKinesin-13A 在烟草花粉管中呈颗粒状分布, 且与高尔基体标记蛋白 58K 共分布, 说明烟草花粉管中 NtKinesin-13A 也存在于高尔基体上. 经免疫金标, 在透射电子显微镜下观察, 发现烟草花粉管中的 NtKinesin-13A 定位在高尔基体附近的囊泡膜上. 以上结果表明, 烟草中 NtKinesin-13A 可能参与了花粉管中高尔基体运动的调控或与高尔基体囊泡的分泌有关.

关键词 动蛋白 高尔基体 花粉管 烟草

传统的动蛋白(kinesin)和动蛋白相关蛋白(KRP)组成了一个沿微管运动的马达蛋白超家族, 其成员具有依赖于ATP的微管结合特性和被微管激活的ATP酶活性, 在真核细胞内转运各种囊泡和细胞器的过程中起着核心的作用^[1~3]. 在植物细胞中, 自从1988年Moscatelli等人^[4]首次在烟草花粉管中鉴定出和动物动蛋白抗体起反应的类动蛋白的存在以来, 在玉米、西红柿、胡萝卜、拟南芥等多种植物中不断有动蛋白或其相关蛋白被发现^[5]. 然而, 目前大部分植物动蛋白的功能尚不清楚.

高尔基体是分泌途径中一个非常重要的组分, 是一个高度动态的细胞器, 以其为核心存在着活跃的膜输入和输出, 因此维持其膜流动的平衡对于高尔基体结构和功能是非常重要的^[6]. 动物细胞中高尔基体的定位和组装依赖于完整的微管骨架的存在^[6]. 而与动物细胞不同, 每个植物细胞中都有成百上千个散在的独立的高尔基体垛叠^[7]. 尽管植物细胞中以微管为基础的细胞器运动已有报道^[8,9], 并且刘国琴等人^[10]在榛木花粉富含高尔基体囊泡的膜性细胞器上鉴定并分离出类动蛋白成分, 然而微管马达动蛋白在花粉管高尔基体上的分布以及高尔基体囊泡的形成和运输方面是否起作用仍不清楚.

AtKinesin13-A是一个拟南芥中央马达动蛋白,

其在不同的拟南芥细胞中与高尔基体结合^[11]. 本研究发现烟草中也存在与AtKinesin13-A序列高度相似且细胞学分布相同的动蛋白NtKinesin-13A, 且通过共焦激光扫描显微镜和电子显微镜观察发现NtKinesin-13A结合于烟草花粉管高尔基体附近的囊泡膜上.

1 材料与方法

(i) 材料. 烟草(*Nicotiana tabacum*)种子萌发后栽培于中国农业大学植物科学系温室内. 烟草花粉自温室采集后, 室温干燥24 h, 放-20℃备用.

(ii) 烟草 Kinesin-13A 类蛋白基因 NtKinesin-13A 片段的克隆及其原核表达. 由已知的拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和棉花(*Gossypium hirsutum*)中 Kinesin-13A 蛋白和其基因序列, 合成 PCR 的简并引物 NtKINSense (5'-GANN CNGNGA(T/C)GC(A/C)-GT(T/C)ATGGC(G/A)CGGTGG-3')和 NtKINanti (5'-TGNGC(A/T)GC(A/T)ATNAGAGC(T/C)TC(T/C)TC(T/C)TCCTCAAG-3'). 通过 RT-PCR 扩增得到一个 2067 bp 的片段(GenBank 登录号: DQ156499). 该片段通过 *EcoR* I 和 *Xho* I 连接到原核表达载体 pGEX 4T-1 上并在表达宿主菌 BL21(DE3)中表达.

(iii) 花粉萌发. 花粉从-20℃取出, 室温放置2 h后, 在花粉萌发液中(7%蔗糖, 0.01%硝酸钾, 0.02%

硫酸镁, 0.01% 硼酸, 0.03% 硝酸钙, pH 5.6), 于 26~28℃ 条件下摇动(60 r/min)萌发.

(iv) SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及免疫印迹. 烟草的根、茎、叶和花粉分别于液氮中研磨成粉末后按 1:1(质量体积比)加入提取缓冲液(5 mmol/L EDTA, 5 mmol/L EGTA, 1 mmol/L PMSF, 10 mmol/L DTT, 0.05% SDS, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0), 4℃, 20000×g 离心 10 min, 取上清. 参照 Laemmli^[12]的方法进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳.

大肠杆菌 BL21(DE3)菌液 1 mL 在 4℃, 12000×g 离心 5 min 后, 弃上清, 沉淀的菌体用 100 μL 双蒸水重悬. 参照 Laemmli^[12]的方法进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳.

免疫印迹参照 Towbin 等人^[13]的方法, 一抗为兔源多克隆抗体 anti-AtKinesin-13A(工作浓度为 1:500), 二抗为碱性磷酸酯酶交联的羊抗兔 IgG 抗体(Sigma, 工作浓度为 1:30000), 显色液为 Promega 公司的碱性磷酸酯酶显色试剂盒. 对照中不加一抗.

(v) 免疫荧光定位及共聚焦激光扫描显微镜观察. 参照 Li 和 Yen^[14]的方法, 一抗为兔源多克隆抗体 anti-AtKinesin-13A(工作浓度为 1:60)、鼠源单克隆抗体 anti-58K 蛋白(Sigma, 1:30), 二抗分别为 TRITC-交联的羊抗兔 IgG (Sigma, 1:100) 和 FITC 交联的羊抗鼠 IgG (Sigma, 1:80). 对照中用 3% 牛血清白蛋白代替一抗. 制片在 Zeiss LSM 510 META 型共聚焦激光扫描显微镜下观察、拍照.

(vi) 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^[15]的方法及李岩等人^[16]的方法. 一抗为兔源多克隆抗体 anti-AtKinesin-13A(1:60), 二抗为带有 10 nm 胶体金颗粒的羊抗兔 IgG 抗体(Sigma, 1:60). 对照用 3% 鱼胶(Sigma)代替一抗. 用 JEM-100S 电子显微镜进行观察、拍照, 电子显微镜的电压为 80 kV. 共观察 5 个($N=5$)独立的细胞, 数据以细胞中不同区域的金颗粒数占细胞质中总金颗粒数的百分数计算, 以平均数±标准差表示, 统计学分析采用 F 检验($P<0.05$).

2 结果

2.1 烟草 NtKinesin-13A 基因片段的克隆和鉴定

通过已报道^[11]的拟南芥 AtKinesin-13A 蛋白和棉花 GhKinesin-13A 蛋白和基因序列合成简并引物, 经 RT-PCR 方法从烟草中克隆到一个 2067 bp 的片段(图

1), 其翻译的多肽序列与拟南芥和棉花中相应片段的相似性达 77.33%(图 2). 用 AtKinesin-13A 抗体对该片段的原核表达后的总蛋白进行免疫印迹, 发现 AtKinesin-13A 抗体特异地识别该多肽(图 3).

2.2 烟草 NtKinesin-13A 分子量的确定

烟草花粉管总蛋白经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 用 AtKinesin-13A 抗体进行免疫印迹, 发现在分子量约 120 kD 处有特异的阳性反应(图 4, C 泳道), 表明烟草花粉管内 NtKinesin-13A 分子量稍大于拟南芥中的相应蛋白, 约为 120 kD. 同时在相同的条件下用同一抗体对拟南芥总蛋白进行免疫印迹, 在 110 kD 处有阳性反应(图 4, D 泳道), 这与 Lu 等人^[11]的结果一致.

2.3 烟草 NtKinesin-13A 的组织表达情况

用 AtKinesin-13A 的抗体分别对烟草的根、茎、叶及花粉管等不同组织总蛋白免疫印迹发现该蛋白在烟草各组织中均有表达(图 5), 说明该蛋白的表达无组织特异性.

2.4 烟草花粉管中 NtKinesin-13A 的免疫荧光标记和观察

经 AtKinesin-13A 抗体的免疫荧光单标, 在共聚焦激光扫描显微镜下观察发现, NtKinesin-13A 在烟草花粉管细胞质中呈颗粒状分布, 但在花粉管的顶端透明区没有明显分布(图 6), 推测 NtKinesin-13A 蛋白可能是存在于一些颗粒状的细胞器上.

58K 抗体可以特异标记植物细胞高尔基体^[17,18]. 用 AtKinesin-13A 抗体与 58K 蛋白抗体在烟草花粉管中进行免疫荧光双标, 在共聚焦激光扫描显微镜下发现两者存在共分布. 这些结果初步说明, NtKinesin-13A 定位于烟草花粉管高尔基体上(图 7).

2.5 烟草花粉管 Kinesin-13A 类蛋白的免疫金标和电子显微镜观察

为了进一步确定 NtKinesin-13A 在烟草花粉管中的亚细胞定位, 用 AtKinesin-13A 抗体对烟草花粉管超薄切片进行免疫金标, 在透射电子显微镜下观察发现, 金颗粒主要分布于高尔基体附近的囊泡膜上(图 8). 统计学分析表明, 高尔基体附件的囊泡膜上的金颗粒约占细胞质中总金颗粒数的 57.4%(表 1). 以上结果表明, NtKinesin-13A 特异分布于烟草花粉管高尔基体附近的囊泡膜上.

```

1      CTTCACTCTG CGGGCTTGCA GCATCTGGCC TCTCCAATGG CAGCTTCTAC CGGTGTGGAT
61     CGCCGACTCC TAATTATGCA GGGATATGGA GCTCAGTCTA TGGAAAGAGAA ACAGAGGCTT
121    TTCAAATTAA TGAGAAACCT CAACTTTAAT GGCGAATCTG CATCCGAGCC ATATACTCCT
181    ACTGCTGAAA GTTCAGGAGG GATCGGAGCA TCAGATGGTT TCTACTCTCC TGAGTTGAGA
241    GGAGACTTTG GTGCTGGGCT TCTGGATCTG CATTCTATGG ATGACACAGA GCTCTTATCT
301    GAGCATGTAA CTTGAGAACG ATTTGAGCAG TCACCTTTTCG TGCCTGCGGT GAATGGAGCA
361    TTTGATAGTA ACTTTGATGC CCCAACCCAT TGGCAACAAA AAGCACAAAC AGAAGCTGAT
421    ATTGCAGATG GATTGCCCAT AATTGAAAAG GAAAGCAACG CAAGAGAAAA CAATGTGGCA
481    AAGATTAAAG TAGTGGTGGC GAAAAGACCT CTAACAAGA AAGAAATTC TCGGAAGGAG
541    GATGACATCG TCAGTGAAC AGACAATGCT TGTCTACTG TCCATGAACC CAACTAAAG
601    GTGGACTTGA CTGCTTATGT TGAGAAGCAT GAGTTCTGTT TTGATGCTAT TCTAGACGAG
661    CACATTACAA ATGATGAGGT TTATCGTGCT ACCGTGGAAC CAATTATTCC TACCATCTTT
721    CAGCGACAAA AAGCAACATG TTTTGCTTAT GGCCAGACAG GTAGTGGTAA GACATACACG
781    ATGCAACCAT TGCTCTCAG AGCTGCAGAT GATCTTGTC GATTGTTGTA TCAGCCAATT
841    TATCGTAATC AGAAGTTCAA GTTGTGGCTC AGCTTTTTTG AAATATATGG TGGGAAACTG
901    TTCGATCTTC TCAGTGATAG AAAGAACTT TGTATGAGAG AAGATGGGCG TCAGCAGGTT
961    TGCATCGTTG GGCTCCAGGA ATTTGAAGTT TCAGATGTGC AGGTTGTGAA AGAGTATATT
1021   GAGAGGGGAA GTGCTGCAAG AAGTACAGGT TCCACTGGTG CAAATGAGGA ATCGTCAAGA
1081   TCACACGCGA TATTACAAC TGTCATCAAG AAACACAATG AAGTAAAGGA CTCTAGGCGA
1141   AATAATGATG GAAATGAATC CAAGGGTGGG AAAGTCGTCG GAAAGATTTT TTTTATTGAC
1201   CTTGCTGGTA GTGAGAGGGG GGCGGACACA ACTGATAATG ACAGACAGAC AAGGATTGAG
1261   GGAGCAGAAA TTAACAAGAG CTTGTTGGCT CTTAAAGAGT GTATTCGTGC TCTTGACAAT
1321   GATCAGCTTC ATATACCGTT CCGTGGGAGC AAACCCACTG AAGTACTTCG TGACTCCTTT
1381   GTTGCGCACT CAAAACTGT TATGATTTCG TGCATTCTC CCAATGCTGG ATCATGTGAA
1441   CATACACTAA ATACCTTGAG ATATGCTGAC AGGGTTAAAA GTCTATCCAA AGGTGGAAC
1501   ACCAAAAAAG ATCAGAGTGC AAGCATAATA CCTCTACAA TCAAGGAACC TCCTTTAGCG
1561   ACTACATTGG CTGCTTCTGT TGAGGCAGAA AACGCTTATG AGCAACCCCA TGAATCTAAA
1621   GTATCAGAAG CAAGTAGGAG AGTTATCGAG AAAGAAAGCA CATCATACAA TTCCACAAAT
1681   GATTTTGATA AACAAACCTG TAGATTTTCT TCAAATCATA CTTTCAATTG TCTGGAGGAA
1741   GGAGCAAATT TTGGTGGGAC AGATAGGGAC AGGTTTGAGG TTAAGAATAG CTATGGTGTT
1801   CCAGCTGGTC AAAGAATGAT CTCGGCATCA AATTGTCAGA GCTCACTGA TACAGAGGAC
1861   AAGGTGCAGA AAGTGTCTCC ACCTCGGAGG AAAGTTTATC GTGATGAGAA ACTTGAAAG
1921   CCGGGAAAAT GGTCAAGAAA AGATGTATCA AGCTCTGAGT CATTCTCAAC AAGTTATAAA
1981   CAGCAAAGCG CAAGTATTCC TAATATAAGA AGTAATGGGT CGGGACAAAA TGAACCTAGT
2041   TCACCCCTC ATGATGAAAA TATCAAT

```

图1 烟草 *NtKinesin-13A* 基因片段的克隆, RT-PCR 得到的 *NtKinesin-13A* 基因片段(长度为 2067 bp)

表1 *NtKinesin-13A* 在烟草花粉管中亚细胞定位的统计学分析(平均数±标准差)($N=5$)^{a)}

高尔基体囊泡	囊泡	其他部分
57.4 ± 0.5*	19.7 ± 0.6	22.9 ± 1.2

a) 数据代表花粉管中不同部位的金颗粒占细胞质中总金颗粒的百分数(平均数±标准差), * 表示统计学分析达显著水平, $P<0.05$

3 讨论

动蛋白是目前植物细胞中含量最丰富的马达蛋白家族。在拟南芥基因组中有 61 个动蛋白或动蛋白相关基因, 但其中大多数基因产物的分布与功能尚有待研究^[19]。花粉管是研究细胞骨架的良好材料, 但其中动蛋白的分布与作用的研究较少。本文在烟草花粉管中发现了一个中央马达动蛋白 *NtKinesin-13A*,

其分子量为 120 kD; 并且通过免疫荧光标记和免疫胶体金标记技术, 发现该动蛋白定位于烟草花粉管高尔基体附近的囊泡膜上。

AtKinesin-13A 是拟南芥中一个中央马达动蛋白, 其分子量为 110 kD^[11]。Lu 等人^[11]发现棉花的 *GhKinesin-13A* 与拟南芥 *AtKinesin-13A* 不仅序列高度同源, 且在细胞中分布也很类似; *GhKinesin-13A* 和 *AtKinesin-13A* 在马达区外氨基端序列的相似性为 76%; 动蛋白的马达活性由其马达区序列决定, 动蛋白同一亚家族甚至不同亚家族间马达区的同源性都非常高, 而其细胞学功能的多样性则由其马达区以外的序列来决定。本文通过简并引物从烟草中克隆到一个 2067 bp 的片段 *NtKinesin-13A*, 其编码的多肽

GhKinesin-13	LOSAGLCHLASFSSSIDRLFLLMQGYGACSEERK	40
AtKinesin-13	LOSAGLCHLASFSSSIDRLFLLMQGYGACSEERK	40
NtKinesin-13	LOSAGLCHLASFSSSIDRLFLLMQGYGACSEERK	38
Consensus	lqsaglgqlasp a l ngyvgag eekq	
GhKinesin-13	RLFLMRNLNLSGEPGSEHYTPPTASLSGFTSGFSPPE	80
AtKinesin-13	RLFLMRNLNLSGEPGSEHYTPPTASLSGFTSGFSPPE	80
NtKinesin-13	RLFLMRNLNLSGEPGSEHYTPPTASLSGFTSGFSPPE	78
Consensus	rif lmrlnlf ge se ytppta s qf spe	
GhKinesin-13	FRGDFGAGLLDLHMDTELLSEHVTEPFESPPVESIN	120
AtKinesin-13	FRGDFGAGLLDLHMDTELLSEHVTEPFESPPVESIN	120
NtKinesin-13	FRGDFGAGLLDLHMDTELLSEHVTEPFESPPVESIN	118
Consensus	frgdfgaglldlh mdtellsehvt epfe spf p n	
GhKinesin-13	KEFEDELIVTNRQCEISFASASISANBEMSPHEN	160
AtKinesin-13	KEFEDELIVTNRQCEISFASASISANBEMSPHEN	154
NtKinesin-13	KEFEDELIVTNRQCEISFASASISANBEMSPHEN	157
Consensus	f l k a l k en	
GhKinesin-13	NVAKIKVVVRKPLNKKKEISKEDIVTVTSNGLTVHE	198
AtKinesin-13	NVAKIKVVVRKPLNKKKEISKEDIVTVTSNGLTVHE	193
NtKinesin-13	NVAKIKVVVRKPLNKKKEISKEDIVTVTSNGLTVHE	196
Consensus	n vakikvvvrkplnkke iskedi vtv n ltvhe	
GhKinesin-13	PKVKVDLTAYVEKHEFCFADLDEVDNDEVYRTNEPII	238
AtKinesin-13	PKVKVDLTAYVEKHEFCFADLDEVDNDEVYRTNEPII	233
NtKinesin-13	PKVKVDLTAYVEKHEFCFADLDEVDNDEVYRTNEPII	236
Consensus	p kvldtayvekhefcfda lde ndevyr t epii	
GhKinesin-13	PIFORTKATCFAYGCTSSGKTITMLPIPARADLRML	278
AtKinesin-13	PIFORTKATCFAYGCTSSGKTITMLPIPARADLRML	273
NtKinesin-13	PIFORTKATCFAYGCTSSGKTITMLPIPARADLRML	276
Consensus	p ifgktatcfaygctsgskt t m plp ra dl r l	
GhKinesin-13	POFYVNRKFKLWLSFEIYGGKLFDDLRRKKLCMRDGG	318
AtKinesin-13	POFYVNRKFKLWLSFEIYGGKLFDDLRRKKLCMRDGG	313
NtKinesin-13	POFYVNRKFKLWLSFEIYGGKLFDDLRRKKLCMRDGG	316
Consensus	qp y nq fklwls feiyggklfdlls rkkclmrdgg	
GhKinesin-13	RQCVCIVGLQBEVSVLVQVWREIERSAARSTGSTGANE	358
AtKinesin-13	RQCVCIVGLQBEVSVLVQVWREIERSAARSTGSTGANE	353
NtKinesin-13	RQCVCIVGLQBEVSVLVQVWREIERSAARSTGSTGANE	356
Consensus	rgqvcivqlge evsdvq vk ie g a rstgstqane	
GhKinesin-13	ESSRSHAILQLVKKHEDNRKRNDESGEKGKVVGKI	398
AtKinesin-13	ESSRSHAILQLVKKHEDNRKRNDESGEKGKVVGKI	393
NtKinesin-13	ESSRSHAILQLVKKHEDNRKRNDESGEKGKVVGKI	396
Consensus	essrshailqlv kkh e k r n gkvvgki	
GhKinesin-13	SFIDLAGSERGADTTENDRCTRIEGAEINKSLALKECIR	438
AtKinesin-13	SFIDLAGSERGADTTENDRCTRIEGAEINKSLALKECIR	433
NtKinesin-13	SFIDLAGSERGADTTENDRCTRIEGAEINKSLALKECIR	436
Consensus	sfidlagsergadttndroctriegaeinkslalkecir	
GhKinesin-13	ALINDQHIFPRGSKLITEVLKDSFVGNSTVMISCISPNA	478
AtKinesin-13	ALINDQHIFPRGSKLITEVLKDSFVGNSTVMISCISPNA	473
NtKinesin-13	ALINDQHIFPRGSKLITEVLKDSFVGNSTVMISCISPNA	476
Consensus	aldndq hipfrgsklitevlrdsfvgnstvmiscispna	
GhKinesin-13	GSCEHTINTLRVADRVKLSKSGNKKKAVISFCISMD	518
AtKinesin-13	GSCEHTINTLRVADRVKLSKSGNKKKAVISFCISMD	513
NtKinesin-13	GSCEHTINTLRVADRVKLSKSGNKKKAVISFCISMD	516
Consensus	gscehtintlryadvrkslsk gn kk q p k	
GhKinesin-13	SSSSSLPTAVIEDINRQPHQVWDGRRVAEKVYTT	558
AtKinesin-13	SSSSSLPTAVIEDINRQPHQVWDGRRVAEKVYTT	547
NtKinesin-13	SSSSSLPTAVIEDINRQPHQVWDGRRVAEKVYTT	556
Consensus	l e e e v rrv ek	
GhKinesin-13	DEKOPTESSGYENGEESGKASGPIITREHEEN	594
AtKinesin-13	DEKOPTESSGYENGEESGKASGPIITREHEEN	579
NtKinesin-13	DEKOPTESSGYENGEESGKASGPIITREHEEN	595
Consensus	n ee d re	
GhKinesin-13	NNGSSGQRYVYSNSGNADGSKVKVSPERKATRE	633
AtKinesin-13	NNGSSGQRYVYSNSGNADGSKVKVSPERKATRE	619
NtKinesin-13	NNGSSGQRYVYSNSGNADGSKVKVSPERKATRE	635
Consensus	gr s q d e kv kvsprr k t	
GhKinesin-13	ERKTRTWARHGGSSSYASNSRVIIVNNJETNTIGH	673
AtKinesin-13	ERKTRTWARHGGSSSYASNSRVIIVNNJETNTIGH	649
NtKinesin-13	ERKTRTWARHGGSSSYASNSRVIIVNNJETNTIGH	675
Consensus	ek w d s a	
GhKinesin-13	QYDPEEKQEKTR	687
AtKinesin-13	QYDPEEKQEKTR	649
NtKinesin-13	QYDPEEKQEKTR	689
Consensus		

图 2 烟草中 NtKinesin-13A 片段蛋白序列与拟南芥和棉花中相应片段的多序列比对结果
三条序列的相似性为 77.33%

的马达区序列与 AtKinesin-13A 和 GhKinesin-13A 马达区序列相似性为 94%，全部序列的相似性为 77.33%。序列的高度相似性说明，NtKinesin-13A 与 AtKinesin-13A 和 GhKinesin-13A 可能具有相似的功能。同时，通过免疫印迹，AtKinesin-13A 的抗体

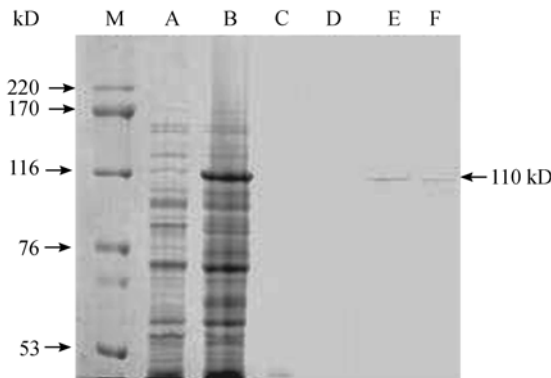


图 3 烟草中 NtKinesin-13A 片段的原核表达细菌总蛋白 SDS-PAGE(A, B 和 C)及免疫印迹(D, E 和 F)
M 为标准分子量, A 和 D 为诱导表达前大肠杆菌总蛋白, B 和 E 为诱导表达后大肠杆菌总蛋白, C 和 F 为诱导表达后大肠杆菌总蛋白稀释 50 倍。箭头显示 AtKinesin-13A 抗体特异地识别该多肽

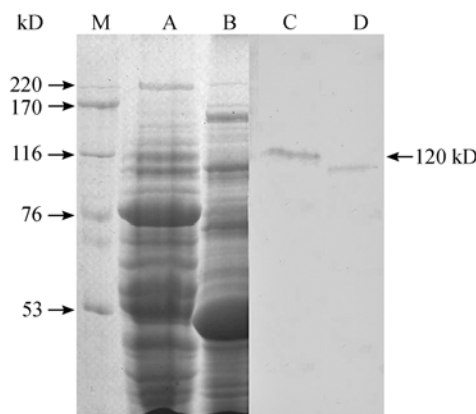


图 4 烟草花粉管和拟南芥中总蛋白的 SDS-PAGE(A 和 B)和 NtKinesin-13A 与 AtKinesin-13A 的免疫印迹(C 和 D)
M 为标准分子量; A 和 C 为烟草花粉管; B 和 D 为拟南芥。箭头示 AtKinesin-13A 抗体特异地识别烟草花粉管中一个约 120 kD 蛋白

不仅能特异识别这一片段原核表达产物，也特异识别烟草中一个 120 kD 的蛋白，说明烟草中存在与 AtKinesin-13A 和 GhKinesin-13A 序列高度同源的蛋白，其分子量约为 120 kD。另外，我们通过搜索发现水稻基因组中也预测存在 AtKinesin-13A 同源蛋白，相似性为 63%。以上结果说明，此中央马达动蛋白在植物细胞中广泛存在并具有重要的功能。此外，通过对烟草根、茎、叶和花粉的免疫印迹说明 NtKinesin-13A 在烟草中的分布无组织特异性，这与植物细胞中高尔基体的分布是一致的。

AtKinesin-13A 属于 MCAK/Kinesin-13 中央马达动蛋白亚家族，但其与动物细胞的 MCAK/Kinesin-13 中央马达动蛋白在分布方面存在明显不同 [11]。动物

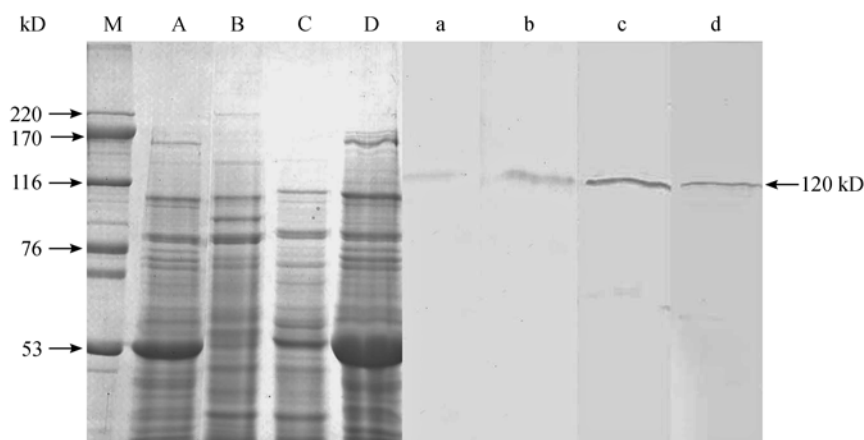


图5 烟草不同组织器官总蛋白的 SDS-PAGE(A, B, C, D)及 NtKinesin-13A 的免疫印迹(a, b, c, d)
M 为标准分子量; A 和 a 为烟草根; B 和 b 为烟草茎; C 和 c 为烟草叶; D 和 d 为烟草花粉管。免疫印迹表明该蛋白在烟草各组织中均有表达

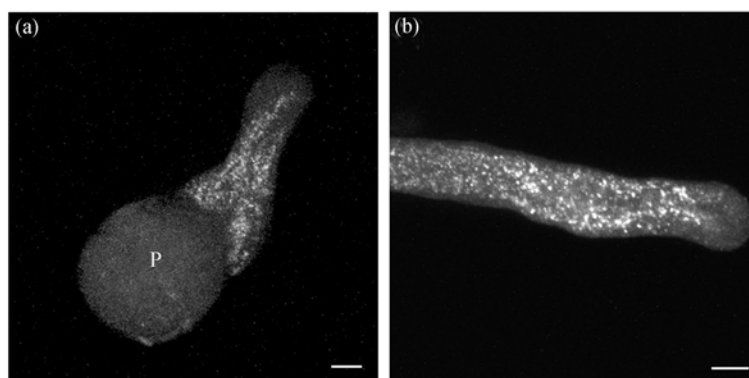


图6 烟草花粉管内 NtKinesin-13A 的免疫荧光定位及共焦激光扫描显微镜观察
示 NtKinesin-13A 在烟草花粉管中呈颗粒状分布。(a) 示短花粉管; (b) 示长花粉管。P 示花粉。标尺: 5 μm

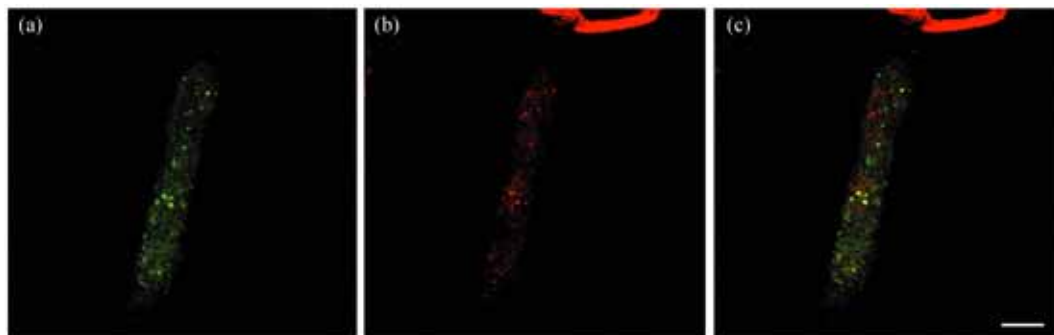


图7 烟草花粉管内 NtKinesin-13A 与 58K 蛋白免疫荧光双标记
(a) 为 58K 蛋白在烟草花粉管中的免疫荧光定位; (b) 为 NtKinesin-13A 在烟草花粉管中的分布; (c) 为 A 和 B 的叠加图, 示烟草花粉管中 NtKinesin-13A 与 58K 蛋白部分共定位。标尺: 10 μm

细胞中的大多数MCAK/Kinesin-13 蛋白作为微管末端解聚剂定位于着丝粒和中心体的微管末端, 在染色体的分离和纺锤体的组装方面起主要作用^[20]。Lu 等人^[11]的研究表明, Kinesin-13A在拟南芥的不同细胞中与高尔基体的标记蛋白共分布, 说明Kinesin-

13A是与植物高尔基体有关的动蛋白。我们通过电子显微镜观察发现, 在烟草花粉管中Kinesin-13A定位于高尔基体附近的囊泡膜上。这些结果说明, AtKinesin-13A做为植物细胞特异的一类中央马达动蛋白, 可能参与了植物细胞高尔基体结构与功能的调节。

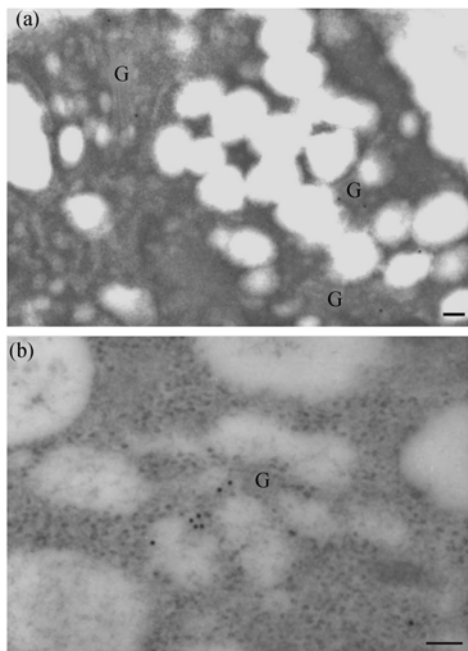


图 8 NtKinesin-13A 在烟草花粉管中的免疫金标和电子显微镜观察

(a)和(b)示 NtKinesin-13A 定位在高尔基体附近的囊泡膜上。
G 示高尔基体。标尺: 100 nm

动物细胞中高尔基体在中心体周围组装, 顺面囊池锚定在微管的负端, 高尔基体的定位和组装及其囊泡的运输依赖于微管和微丝骨架的存在。在高等植物细胞中, 存在很多独立的高尔基体垛叠, 并且呈有特征的“stop-and-go”运动^[21]。有关研究发现, 微丝-肌球蛋白系统参与了植物细胞高尔基体的运动和分布的调控^[22]。目前, 愈来愈多的研究表明, 动物细胞与植物细胞高尔基体在结构与功能方面具有很多明Kinesin-13A可能并不驱动高尔基体在植物细胞中的运动, 他们认为Kinesin-13A可能在某种程度上参与了其中的“stop”一环节的调控。目前, Kinesin-13A类蛋白被发现定位于植物高尔基体附近的囊泡膜上, 因此我们认为其也可能参与了高尔基体囊泡分泌过程的调控。当然, 该动蛋白在植物细胞高尔基体上的具体作用机理还有待进一步研究。

致谢 本工作为国家自然科学基金资助项目(批准号: 30470109, 30421002)。

参 考 文 献

- Dagenbach E M, Endow S A. A new kinesin tree. *J Cell Sci*, 2004, 11: 3~7[DOI]
- Kim A J, Endow S A. A kinesin family tree. *J Cell Sci*, 2000, 113: 3681~3682
- Hirokawa N. Kinesin and dynein superfamily protein and the mechanism of organelle transport. *Science*, 1998, 279: 519~526[DOI]
- Moscattelli G, Tiezzi A, Vignani R, et al. Presence of kinesin in tobacco pollen tube. In: Cresti M, Pacini E, Cori P, eds. *Sexual Reproduction Higher Plants*, Berlin: Springer Verlag, 1988. 205~209
- Liu B, Lee J Y R. Kinesin-related proteins in plant cytokinesis. *J Plant Growth Regul*, 2001, 20: 141~150[DOI]
- Burkhardt J K. The role of microtubule-based motor proteins in maintaining the structure and function of the Golgi complex. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1404: 113~126[DOI]
- Dupree P, Sherrier D J. The plant Golgi apparatus. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1404: 259~270[DOI]
- Mizukami M, Wada S. Action spectrum for light-induced chloroplast accumulation in a marine coenocytic alga, *Bryopsis plumosa*. *Plant Cell Physiol*, 1981, 22: 1245~1255
- Mineyuki Y, Furuya M. Involvement of colchicine-sensitive cytoplasmic element in premitotic nuclear positioning of *Adiantum* protonemata. *Protoplasma*, 1986, 130: 83~90[DOI]
- Liu G Q, Cai G, Casino C D, et al. Kinesin-related polypeptide is associated with vesicles from *Corylus avellana* pollen. *Cell Motil Cytoskel*, 1994, 29: 155~166[DOI]
- Lu L, Lee J Y R, Pan R, et al. An internal motor kinesin is associated with the Golgi apparatus and plays a role in trichome morphogenesis in *Arabidopsis*. *Mol Biol Cell*, 2005, 16(2): 811~823[DOI]
- Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227: 680~685
- Towbin J, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transferr of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some application. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76: 4350~4354
- Li Y, Yen L F. Plant Golgi-associated vesicles contain a novel α -actinin-like protein. *Eur J Cell Biol*, 2001, 80: 703~710[DOI]
- van den Bosch K A, Newcomb E H. Immunogold localization of nodule-specific uricase in developing soybean root nodules. *Planta*, 1996, 167: 425~436[DOI]
- 李岩, 阎隆飞, 黄柄权, 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
- 李岩, 阎隆飞. 百合花粉与花粉管中类高尔基体 58K 蛋白. *中国科学, C 辑*, 2000, 30(3): 300~304
- Baluska F, Hlavacka A, Samaj J, et al. F-actin-dependent endocytosis of cell wall pectins in meristematic root cells. *Plant Physiol*, 2002, 130: 422~431[DOI]
- Reddy A S N, Day I S. Kinesins in the *Arabidopsis* genome: A comparative analysis among eukaryotes. *BMC Genomics*, 2001, 2: 2[DOI]
- Walczak C E. The Kin I kinesins are microtubule end-stimulated ATPases. *Mol Cell*, 2003, 11: 286~288[DOI]
- Nebenführ A, Gallagher L A, Dunahay T G, et al. Stop-and-go movements of plant Golgi stacks are mediated by the acto-myosin system. *Plant Physiol*, 1999, 121: 1127~1141[DOI]
- Boevink P, Oparka K, Santa Cruz S, et al. Stacks on tracks: The plant Golgi apparatus traffics on an actin/ER network. *Plant J*, 1998, 15: 441~447[DOI]

(2004-12-26 收稿, 2005-07-21 收修改稿)