无微管稳定剂条件下植物微管蛋白的体外聚合

黄善金^① 任海云^② 袁明^{①*}

(^①中国农业大学生物学院植物科学系, 农业部植物生理生化重点开放实验室, 北京 100094; ^②北京师范大学生命科学院, 教育部细胞增殖及调控生物学重点开放实验室, 北京 100875. *联系人, Email: myuan@public.east.cn.net)

摘要 从百合花粉中提取高纯度的植物微管蛋白, 建立了无微管稳定剂和微管组织中心的植物微管的体外聚合体系, 并对植物微管蛋白在体外条件下的聚合特性进行了分析. 结果表明, 纯化的微管蛋白在体外能够很好地进行聚合, 电子显微镜下可以观察到典型的微管结构, 微管蛋白聚合的动力学曲线呈现出典型的“抛物线”曲线. 紫杉醇的存在改变了百合花粉微管蛋白的聚合特性: 非正常微管聚合增加, 体外聚合的临界浓度从无紫杉醇存在条件下的 2.8 mg/mL 降低到 0.043 mg/mL. 实验结果为进一步研究植物微管的组构和动态调节提供了重要的数据.

关键词 百合花粉 微管蛋白 微管 微管蛋白聚合

微管是细胞骨架的重要组成部分, 是由微管蛋白聚合而成的微细管状结构, 它在细胞生长、细胞分裂、物质运输等许多生理活动中起着至关重要的作用. 微管始终处于聚合和解聚的动态过程当中, 这种动态特性是微管实现其生理功能的重要特性^[1, 2].

植物微管蛋白的体外聚合比动物微管蛋白的聚合要困难得多, 通常必须有微管稳定剂——紫杉醇(taxol)的存在^[1]. 因此有关微管蛋白聚合特性的理论问题主要来自对动物微管的研究. 但是, 植物细胞中微管的组构、排列和动态明显地不同于动物细胞, 例如植物细胞中周质微管、早前期微管带、成膜体微管等都是植物细胞所特有的微管列阵^[3]; 植物细胞缺少明显的如中心体这样的作为微管组织中心的细胞器^[4]; 近年来的研究表明, 植物间期微管具有比动物微管更为活跃的动态周转^[5, 6], 而这些重要问题都涉及到植物微管的聚合和解聚的特性, 因此有关植物微管体外聚合特性的研究对于了解植物微管骨架的作用机制有特别重要的意义.

Morejohn 等人^[7]首先利用 DEAE 柱层析法从玫瑰悬浮细胞提取和纯化了植物微管蛋白, 并首次实现了植物微管蛋白的体外聚合. 之后, 人们对存在紫杉醇或 DMSO 条件下植物微管蛋白体外聚合的动力学进行了一些研究^[8, 9]. 最近一个重要的进展是, Cyr 实验室首次实现了无微管蛋白聚合稳定剂条件下植物微管蛋白在海胆鞭毛轴纤丝上的聚合, 并对植物微管蛋白体外的各项动态参数进行了测定^[10]. 但是, 由于在以往的研究中植物微管的体外聚合需要加入微管稳定剂(例如紫杉醇)或者微管组织中心(例如鞭毛轴纤丝), 这样就干扰了微管的组构和动态过程, 因此难以说明植物微管蛋白的聚合特性. 本文利用从植物花粉中制备的高纯度的微管蛋白, 实现了无外加微管稳定剂或组织中心的植物微管蛋白在体外的聚合, 并对其聚合特性进行了较全面的分析.

1 材料与方法

(i) 川百合(*Lilium davidii* Duch)花粉. 从兰州郊区百合产地采集, 经干燥后储存于 -20℃冰箱备用.

(ii) 微管蛋白的制备. 百合花粉经水合及萌发, 并制备成花粉丙酮粉后, -20℃下保存备

用^[11]. 称取约 20 g 百合花粉丙酮粉, 加入适量的冷分离缓冲液(50 mmol/L PIPES-KOH, 2 mmol/L MgCl_2 , 2 mmol/L EGTA, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TPCK, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TAME, pH = 6.9), 4 $^{\circ}\text{C}$, 100 000 $\times g$ 离心 20 min, 取上清与预先用分离缓冲液充分平衡的 DEAE-Sephadex A-50 在黑暗条件下充分结合 1 h. 上柱, 待柱床体积稳定后, 开始用 0.35 mol/L KCl-IB 进行洗脱, 直至基线. 改用 0.8 mol/L KCl-IB 进行洗脱, 收集峰管, 合并后过 Sephadex G-25 柱进行脱盐. 收集蛋白流出液, 上 DEAE-Toyopearl 柱(预先用 IB 充分平衡), 用 0~500 mmol/L KCl 的线性梯度进行洗脱, 收集富含微管蛋白的组分, 用超滤浓缩管进行脱盐浓缩. 把微管蛋白分装于小离心管中, 放于液氮中速冻并保存. 蛋白质浓度用 Bio-Rad 蛋白浓度测定试剂(Bio-Rad protein dye reagent)进行测定, IgG 为标准. 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)参照 Laemmli^[12]的方法进行. 免疫印迹参照 Towbin 等人^[13]的方法.

(iii) 百合花粉微管蛋白体外聚合的测定. 将样品从液氮中取出, 快速解冻后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 143 000 $\times g$ 离心 10 min, 取上清并加入 GTP, 使其终浓度为 1 mmol/L, 待微管蛋白充分聚合达到稳定状态后, 143 000 $\times g$ 离心 40 min, 取上清和沉淀进行电泳分析. 紫杉醇对微管聚合影响的测定基本同上, 不同之处在: 当加 GTP 时同时加入紫杉醇使其终浓度为 20 $\mu\text{mol}/\text{L}$. 微管聚合时间进程测定的反应溶液同上. 当反应溶液快速混合均匀后, 立即加入微量比色杯中. 25 $^{\circ}\text{C}$ 下, 利用岛津 DU-640 型分光光度计, 测定 350 nm 下的光吸收变化(ΔA_{350}), 通过 A_{350} 的变化来监测微管的聚合动态. 在紫杉醇不存在的情况下, 微管聚合反应是在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下进行的. 百合花粉微管蛋白体外聚合的电子显微镜观察参照 Morejohn 等人^[7]的方法.

(iv) 微管蛋白聚合临界浓度的测定. 紫杉醇诱导下微管蛋白聚合临界浓度的测定参照 Bokros 等人^[8]的方法进行. 而植物微管蛋白聚合的稳定态浓度的测定参照 Mitchison 等人^[14]的方法进行.

2 结果

2.1 植物微管蛋白的制备

采用两步阴离子交换的方法制备植物微管蛋白. 百合花粉丙酮粉充分离心, 上清液经 DEAE-Sephadex A-50 柱层析分离后, 得到初步纯化的微管蛋白(图 1(a), 第 3 泳道). 经超滤的方法脱盐后, 再用第 2 步高精度的阴离子交换柱进行分离, 得到高纯度的微管蛋白(图 1(a), 第 4 泳道). 与 β -微管蛋白抗体反应呈阳性(图 1(b)). 最后能从 10 g 百合花粉丙酮粉中得到约 5 mg 微管蛋白, 纯度达到 98.5%. 蛋白纯度分析结果表明, 经第 1 步 DEAE-Sephadex A-50 柱层析分离所得的微管蛋白纯度已经达到 80% 左右, 而此时微管蛋白的产率以 10 g 百合花粉丙酮粉为初始材料可得到约 12 mg 微管蛋白, 微管蛋白在第 2 步层析后的损失可达到约 60%.

2.2 百合花粉微管蛋白的体外聚合

利用一步纯化的微管蛋白在体外条件下进行聚合反应. 在微管蛋白浓度为 3.6 mg/mL 的

图 1 百合花粉微管蛋白提取过程中的 SDS-PAGE 分析和免疫印迹鉴定

(a) 微管蛋白提取过程中的 SDS-PAGE 分析. 1——分子量标准, 2——百合花粉丙酮粉总蛋白, 3——DEAE-Sephadex A-50 柱层析收集成分, 4——DEAE-Toyopearl 柱层析收集成分
(b) 纯化微管蛋白的免疫印迹鉴定

反应溶液中加入 GTP, 待充分反应后进行离心, 分离聚合的微管. 电泳分析表明, 沉淀中蛋白组分为微管蛋白(图 2). 取沉淀进行电子显微镜观察, 样品经醋酸铀染色后, 电子显微镜下可以观察到微细管状的结构. 这表明纯化的百合花粉微管蛋白在体外可以聚合形成微管. 用二步纯化所得微管蛋白在同样条件下聚合, 在电子显微镜下可以观察到同样的微管结构(图 3(a)). 电子显微镜观察结果还表明, 紫杉醇存在的情况下聚合形成的微管中有很多非正常的微管结构, 一些微管呈“开裂”状(图 3(b), 箭头所示), 而不存在紫杉醇的情况下形成的微管在结构上大部分都是正常的. 这可能是由于紫杉醇干扰了微管聚合的正常过程, 而出现了一些似乎是微管聚合的中间态结构.

为了进一步确定微管蛋白的聚合, 我们利用浊度测定法对两步纯化的高纯度微管蛋白体外聚合的时间进程进行了测定.

实验结果表明, 无论是存在或不存在紫杉醇, 在 350 nm 波长下, 反应溶液都有一个明显的浊度变化过程, 聚合反应呈典型的“抛物线”曲线(图 4). 在紫杉醇存在条件下, 15 min 内 350 nm 光吸收 A_{350} 增加很快, 表明微管蛋白聚合成微管的反应在快速地进行; 15 min 后, 聚合反应基本完成, A_{350} 处于较平稳的状态(图 4(a)). 在紫杉醇不存在的情况下, 浊度变化曲线也呈现出类似的曲线, 当反应液从冰上移到 37℃ 环境中时, 聚合反应就开始快速地进行, 但达到平稳状态所需的时间要长, 大概在 25 ~ 30 min, 反应才基本完成(图 4(b)).

图2 离心沉淀实验的 SDS-PAGE 分析

1——分子量标准; 2——聚合反应前的样品; 3——聚合反应后的上清; 4——聚合反应的沉淀

图3 纯化的百合花粉微管蛋白体外聚合的电子显微镜负染观察($\times 80\,000$)

(a) 未加任何微管聚合促进剂情况下, 体外聚合的百合花粉微管; (b) 紫杉醇存在情况下, 体外聚合的百合花粉微管. 箭头所示为一些“开裂”状微管

2.3 植物微管蛋白聚合的临界浓度

为了测定临界浓度, 百合花粉微管蛋白聚合的动力学通过检测 350 nm 波长下光吸收的变化来观察^[8]. 25℃下, 不同浓度的微管蛋白(0.2 ~ 0.8 mg/mL)在 20 $\mu\text{mol/L}$ 紫杉醇的诱导下聚合.

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2000-45-11-1158>

浊度增加的速率和程度随着微管蛋白浓度的增加而增加. 为了估计百合花粉微管蛋白聚合的临界浓度, 把起始的微管蛋白浓度与稳定态最大浊度值进行绘图, 最后得到在 25℃ 下, 百合花粉微管蛋白聚合的临界浓度为 0.043 mg/mL (图 4(a), 附图). 在紫杉醇不存在的情况下, 微管体外聚合的稳定态浓度则采取离心沉淀的方法进行测定, 设计几个不同微管蛋白浓度的反应体系, 在同样的条件下聚合一定的时间, 然后离心沉淀. 把反应前的微管蛋白总浓度作为横坐标, 而对应的聚合微管量作为纵坐标, 根据它们之间的关系作出一条回归直线, 这条直线与 X 轴相交的点为微管聚合量为零时的稳定态浓度, 即临界浓度, 从图 4(b)附图可以得出百合花粉微管蛋白体外聚合的临界浓度为 2.8 mg/mL.

图 4 纯化的百合花粉微管蛋白体外聚合过程的浊度变化以及临界浓度的测定

(a) 紫杉醇存在条件下的微管蛋白体外聚合浊度变化, 附图为由浊度实验而来的微管体外聚合临界浓度的测定; (b) 未加任何微管聚合促进剂条件下的微管蛋白体外聚合浊度变化, 附图为由聚合沉淀实验而来的微管体外聚合临界浓度的测定

3 讨论

植物微管蛋白的提取和纯化通常受到两方面的限制: 首先是植物微管蛋白难以在体外的条件下聚合, 因此植物微管蛋白的纯化常采用离子柱层析的方法进行分离、纯化; 再者, 植物细胞的细胞质只占植物细胞体积的较小部分, 大部分为中央大液泡和细胞壁, 并且植物中央大液泡中存在许多蛋白酶, 因此通常提取微管蛋白需要大量的植物细胞, 同时要加入大量的蛋白酶抑制剂^[10]. 植物花粉是比较理想的制备植物微管蛋白的材料. 我们的研究表明, 利用两步离子柱层析可以制备较大量的植物微管蛋白, 从约 20 g 花粉丙酮粉中一次可制备约 10 mg 微管蛋白, 而且, 由于制备过程中花粉细胞的蛋白酶对微管蛋白的破坏作用并不严重, 蛋白酶抑制剂的用量亦可大量减少, 因此与从约 12 L 烟草悬浮细胞中制备约 10~20 mg 植物微管蛋白的方法相比^[10], 简化了实验材料的准备, 大大降低了实验的费用. 此外, 根据我们的实验结果, 第一步离子柱层析所得的微管蛋白纯度已经达到 80%左右, 对于一些对微管蛋白纯度并不苛刻的实验来说, 一步纯化可以大大提高产率, 并且缩短了制备的时间, 有利于制备微管蛋白活性的提高.

植物细胞具有不同于动物微管的组构、分布和动态转换特性, 这些特性对于植物微管在植物细胞中的特殊功能是至关重要的. 而植物微管蛋白自身的、不同于动物微管蛋白的聚合特性可能是造就如此特性的重要原因. 在已报道的对植物微管动态特性的研究中, 一般都需

要加入微管稳定剂或微管组织中心成分,但是微管稳定剂的存在抑制了微管的解聚或者加速了微管的聚合过程,所得结果可能并不说明植物微管的真实动态过程;而微管组织中心成分的存在又改变了微管的成核条件,因而难以对植物微管的成核过程进行研究.我们的实验结果表明,在紫杉醇存在的条件下,微管蛋白体外聚合的临界浓度大大降低,微管的聚合明显高于无紫杉醇条件下的微管聚合,微管蛋白体外聚合进程加快,并且存在许多非正常的微管聚合,植物微管的动态特性显然发生了改变.因此,建立无微管稳定剂和微管“核”的微管体外聚合体系对于微管动态特性的研究是非常重要的.我们利用从花粉提取纯化的微管蛋白实现了无微管稳定剂和微管“核”的微管体外聚合,并对植物微管蛋白的体外聚合特性进行了分析,为进一步研究植物微管动态特性的调控建立了基础.

微管蛋白在体外的聚合要经历成核和延长两个过程. Moore 等人^[10]的研究表明,如果不加入微管“核”,植物微管蛋白难以在体外聚合,同时植物微管具有比动物微管更快的解聚速率.我们对植物微管蛋白聚合的临界浓度的测定结果说明,植物微管蛋白的聚合需要较高的浓度条件.无论植物微管蛋白聚合的困难在于成核过程或者延长过程,较高的微管蛋白浓度都有利于微管蛋白的聚合.

微管蛋白聚合的临界浓度是微管聚合条件的重要参数.在过去的研究报道中,只有在紫杉醇存在条件下植物微管蛋白聚合临界浓度的报道,尚未见在无微管稳定剂条件下植物微管蛋白聚合临界浓度的报道.由于紫杉醇可以降低微管蛋白聚合的临界浓度,因此在过去报道的微管蛋白聚合临界浓度可能并不能反应植物微管蛋白聚合的真实条件.本文中,在紫杉醇存在条件下我们所得的百合花粉微管蛋白聚合的临界浓度为 0.043 mg/mL,与文献报道大致相同^[8],而在无紫杉醇存在条件下百合花粉微管蛋白聚合的临界浓度则高达 2.8 mg/mL,比动物微管蛋白在无微管蛋白稳定剂条件下的临界浓度 1.4 mg/mL^[14]更高,说明植物微管蛋白的聚合需要更高的蛋白浓度.这一结果似乎与植物间期微管具有比动物微管更高的周转速率的观察现象^[6]相符合.

致谢 本工作作为国家自然科学基金(批准号: 19892380, 39670355, 39870052)、国家杰出青年科学基金(批准号: 39625003)和国家重点基础研究规划(批准号: G19990117)资助项目.

参 考 文 献

- 1 Hepler P K, Hush J M. Behavior of microtubules in living plant cells. *Plant Physiol*, 1996, 112: 455~461
- 2 Hiroh S, Reiko N. The plant cytoskeleton. *Curr Opin in Cell Biol*, 1994, 6: 10~15
- 3 Goddard R H, Wick S M, Silflow C D, et al. Microtubule components of the plant cell cytoskeleton. *Plant Physiol*, 1994, 104: 1~6
- 4 Vaughn K C, Harper J D L. Microtubule-organizing centers and nucleating sites in land plants. *Int Rev Cytol*, 1998, 181: 75~149
- 5 Yuan M, Shaw P J, Warn R M, et al. Dynamic reorientation of cortical microtubules, from transverse to longitudinal, in living plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 6050~6053
- 6 Hush J M, Wadsworth P, Callaham D A, et al. Quantification of microtubule dynamics in living cells using fluorescence redistribution after photobleaching. *J Cell Sci*, 1994, 107: 775~784
- 7 Morejohn L C, Fosket D E. High plant tubulin identified by self-assembly into microtubules *in vitro*. *Nature*, 1982, 297: 426~428
- 8 Bokros C L, Hugdahl J D, Hanesworth V R, et al. Characterization of the reversible taxol-induced polymerization of plant

- tubulin into microtubules. *Biochemistry*, 1993, 32: 3437~3447
- 9 Mizuno K. *In vitro* assembly of microtubules from tubulins of several higher plants. *Cell Biol Int Rep*, 1985, 9(1): 13~21
 - 10 Moore R C, Zhang M, Cassimeris L, et al. *In vitro* assembled plant microtubules exhibit a high state of dynamic instability. *Cell Motil Cytoskeleton*, 1997, 38: 278~286
 - 11 Zhang H, Liu G Q, Yan L F. Purification and characterization of tubulin from ginkgo pollen. *Sex Plant Reprod*, 1997, 10: 136~141
 - 12 Laemmli U K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227: 680~685
 - 13 Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76: 4350~4354
 - 14 Mitchison T J, Kirschner M W. Microtubule assembly nucleated by isolated centrosomes. *Nature*, 1984, 312: 232~237

(2000-01-24 收稿, 2000-03-29 收修改稿)