

多头绒泡菌中动蛋白的免疫化学鉴定

董志扬 阎隆飞

(北京农业大学生物学院 北京 100094)

动蛋白(kinesin)是一种微管系统的运动蛋白(motor protein),它通过水解 ATP 将化学能转化为机械能,推动微管产生运动^[1-4]。微管系统作为一种主要的细胞骨架存在于所有真核细胞中,它们对于维持细胞形态,细胞的分裂,染色体的运动及细胞内的物质运输起着重要作用^[5,6]。细胞质力蛋白(dynein)和动蛋白是公认的推动这类运动的运动蛋白^[7,8]。自从 1985 年 Vole 首次在鱿鱼大轴突(squid giant axon)中发现动蛋白以来,人们先后在许多种动物细胞中发现有动蛋白存在,甚至在低等真核生物棘状变形虫^[9],盘基网柄菌^[10]和高等植物烟草花粉管^[11]中发现有动蛋白的存在。研究结果表明,动蛋白参与了真核细胞中的许多重要生命活动,如细胞中的细胞器及囊泡的运动^[12-14],染色体排裂和分离等运动^[15]。动蛋白很可能是普通存在于所有真核细胞中的一种运动蛋白。多头绒泡菌(*Physarum polycephalum*)属于粘菌纲(Myxomycetes)的一种低等真核生物,它表现出许多显著的细胞运动特征如原生质团迁移,细胞质的穿梭运动(shuttle streaming)等,是研究非肌细胞运动和收缩蛋白的经典材料。在多头绒泡菌胞质中也具有微管系统,它们构成其纺锤丝等,参与染色体的运动及其它胞质运动^[16]。但至今国内外尚无人证明其中有与微管作用的运动蛋白——动蛋白的存在,作者利用抗牛脑动蛋白的单克隆抗体,通过免疫印迹法(western-blotting 法)对多头绒泡菌胞质中动蛋白进行了鉴定,首次证明多头绒泡菌中有类似动蛋白的蛋白质存在。

1 材料和方法

1.1 化学试剂

抗牛脑动蛋白单克隆抗体(IgM),碱性磷酸酶交联抗鼠 IgM 抗体,高分子量标准蛋白,硝酸纤维素膜(NC-膜)均为美国 Sigma 公司产品。

1.2 菌种和培养

多头绒泡菌(*Physarum polycephalum* 简称粘菌)菌种购自美国卡洛莱纳生物供应公司(Carolina Biological Supply Company)。培养方法参照 Daniel^[17]的方法,培养基(%):蛋白胨 1,干酵母粉 0.3,葡萄糖 0.9,柠檬酸 0.36,硫酸镁 0.05,氯化血红素 0.0005,于 1kg/cm² 高压下灭菌 20 分钟,生长温度为 20-30℃,在黑暗中摇床振荡培养 96 小时。

1.3 电泳方法

按照 Laemmli(1971)方法^[18],稍加改变,Acry/Bis = 100:1,聚丙烯酰胺凝胶浓度为 10%,考马斯亮蓝 R-250 染色。

1.4 免疫印迹法

按照 Towbin (1979)方法^[19],稍加改进。

2 结果

2.1 粘菌动蛋白粗提取液的制备

取新鲜的多头绒泡菌原生质团 20g,在冰浴中提取,提取液含 50mmol/L PIPES,1mmol/L MgSO₄,2mmol/L EGTA,10μg/ml Leupeptin,pH7.0,用 2 倍体积提取液提取 15 分钟,调 pH 至 7.0,在 4℃ 下 15000×g 离心 15 分钟,取上清液,用四层纱布过滤,除去脂等不溶物,滤液 100000×g 离心 1 小时,4℃,

除去细胞膜碎片,即得多头绒泡菌细胞质粗提液。

2.2 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

将上述粗提液加到 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳,恒压 150V,电泳 3 小时,取出凝胶,切割一半用考马斯亮蓝 R-250 染色,观察电泳结果并确定分子量,SDS-PAGE 结果如图 1 所示。另一半用 Bio-Rad 电转移槽电泳将蛋白质转移到硝酸纤维素膜上。

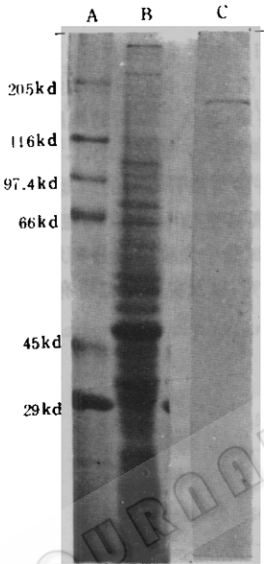


图 1 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和多头绒泡菌粗提液的免疫印迹法

- A. 高分子量标准蛋白(肌球蛋白重链 205kd,半乳糖苷酶 116kd,磷酸化酶-b 97.4kd,牛血清白蛋白 66kd,卵清蛋白 45kd,碳酸酐酶 29kd);
B. 多头绒泡菌动蛋白粗提取液;
C. 多头绒泡菌动蛋白的免疫印迹。

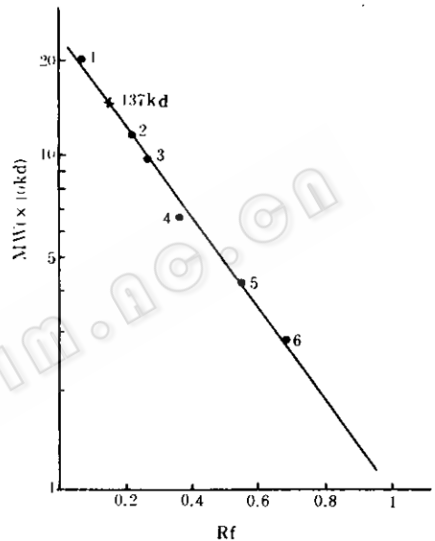


图 2 用 SDS-凝胶电泳测定分子量

1. 肌球蛋白重链 205kd; 2. 半乳糖苷酶 116kd;
3. 磷酸化酶-b 97.4kd; 4. 牛血清白蛋白 66kd;
5. 卵清蛋白 45kd; 6. 碳酸酐酶 29kd;
* 多头绒泡菌动蛋白重链

2.3 粘菌动蛋白的免疫印迹鉴定

用 Bio-Rad 转移电泳槽进行转移,电压为 20V,温度为 4℃,电泳 20 小时完毕,用 0.2% 丽春红染液对硝酸纤维素膜染色,可清楚观察到转移到膜上的蛋白质电泳条带,而用考马斯亮蓝 R-250 对转移后的凝胶染色,可观察到凝胶上已无任何蛋白条带,这说明凝胶上所有的蛋白都转移到了 NC-膜上。用重蒸馏水清洗 NC-膜,用牛血清白蛋白封闭膜上所有蛋白结合位点。再将封闭后的膜转移到第一抗体溶液——抗牛脑动蛋白单抗-TBST 缓冲液中,抗体稀释效价为 1:3 000,室温放置 3 小时,用 TBST 缓冲液清洗 NC-膜除去非特异吸附的第一抗体,再将膜转移到第二抗体溶液——碱性磷酸酶交联-抗鼠 IgM 抗体-TBST 缓冲液中,抗体的稀释效价为 1:3 000,室温放置 3 小时,用 TBST 缓冲液洗再次清洗 NC-膜除去非特异吸附的第二抗体。按照 Blake(1984)方法^[20]对膜进行显色,用 BCIP(5-bromo-4-

chloro-3-indolylphosphate) 和 NBT(nitro blue tetrazolium) 作为碱性磷酸酯酶底物, 显色 10 分钟, 用重蒸馏水冲洗 NC-膜, 终止显色反应, 在膜的上端出现一条明显的棕色条带(图 1)。该条带的 Rf 值为 0.148, 其位置与动物细胞质动蛋白重链的位置相同^[21]。结果显示在多头绒泡菌原生质团粗提液中存在有能与抗牛脑动蛋白单克隆抗体发生交叉免疫的动蛋白重链, 这表明在多头绒泡菌中存在有动蛋白。

2.4 多头绒泡菌动蛋白分子重链的分子量

根据在同一块电泳凝胶另一端用考马斯亮蓝染色确定的高分子量标准蛋白, 我们在半对数座标纸上得到其分子量与 Rf 值标准曲线(如图 2 所示), 通过测得的 NC-膜上的多头绒泡菌动蛋白重链的 Rf 值, 在分子量标准曲线计算出, 多头绒泡菌动蛋白重链的分子量为 137kd。

我们分析了许多有关动蛋白的研究, 发现动蛋白的免疫化学性质是十分保守的, 迄今所发现的所有的动蛋白无论是高等植物, 还是低等生物的都能与牛脑动蛋白发生交叉免疫反应。1990 年 Yang 等人^[21]利用该抗体通过免疫印迹成功的在果蝇细胞中鉴定出动蛋白的重链, 我们根据动蛋白这种免疫化学的保守性, 利用该抗牛脑动蛋白单克隆, 通过 Western-blotting 鉴定, 首次在粘菌的胞质粗提蛋白中发现能与牛脑动蛋白抗体发生交叉免疫反应的粘菌动蛋白重链。其重链分子量为 137kd, 与其它生物的动蛋白的重链(100—140kd)基本相似, 对于我们进一步研究粘菌中许多与微管有关的运动有很大帮助。这也与我们的设想完全一致, 这就是动蛋白很可能普遍存在于所有真核生物中, 它参与细胞中许多重要运动。由于动蛋白在细胞中含量极少, 在分离纯化上有许多困难, 本试验中免疫印迹分析均用多头绒泡菌细胞质粗提取液进行。关于多头绒泡菌动蛋白的分离纯化, 性质研究, 以及免疫定位将有待于进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Vale R D, Reese T S, Sheetz M P. *Cell*, 1985, 42: 39—50.
- [2] Vale R D, Shpetner H S. *Ann Rev Biochem*, 1990, 59: 909—932.
- [3] McIntosh J R, Piller M E. *J Biol Chem*, 1989, 264(11): 6001—6004.
- [4] Hollenbeck P J. *J Cell Biol*, 1989, 108: 2335—2342.
- [5] Harrison J H, Harrison Y H, Cresti M et al. *J Cell Science*, 1988, 91: 49—60.
- [6] Hayden J H, Allen R D, Goldman R D. *Cell Motil*, 1983, 3: 1—19.
- [7] Paschal B M, Shpetner H S, Vallee R B. *J Cell Biol*, 1987, 105: 1273—1282.
- [8] Vale R D, Schnapp B J, Mitchison J et al. *Cell*, 1985, 43: 623—632.
- [9] Kacher B, Albanesi J P, Fujisaki H et al. *J Biol Chem*, 1987, 262: 16180—16185.
- [10] Mc Caffrey G, Vale R D. *EMBD*, 1989, 8: 3229—3234.
- [11] Tiezzi A, Moscatelli A, Cai G et al. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 1992, 21: 132—137.
- [12] Schroer T A, Schropp B J, Reese T S et al. *J Cell Biol*, 1988, 107: 1785—1792.
- [13] Pfister K K, Wanger M C, Stenoien D L et al. *J Cell Biol*, 1989, 108: 1453—1464.
- [14] Hirokawa N, Yoshitake R S, Kobayashi N et al. *J Cell Biol*, 1991, 114: 295—302.
- [15] Leslie R J, Hird R B, McIntosh J R et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84: 2771—2775.
- [16] Roobol A, Pogson C R, Gull K. *Exp Cell Res*, 1980, 130: 203—215.
- [17] Guttus E, Guttus S. *Method in Cell Physiology*, 1964, 1: 43.
- [18] Laemmli U. *Nature*, 1970, 227: 680—685.
- [19] Towbin H, Staehelin T, Gordon J. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76: 4350—4354.
- [20] Blake D A, Johnston K H, Ruesell-Jones G J et al. *Anal Biochem*, 1984, 136: 175—179.
- [21] Yang J T, Sexton W M, Stewart R J et al. *Science*, 1990, 249: 42—47.

IMMUNOCHEMICAL IDENTIFICATION OF KINESIN IN *PHYSARUM POLYCEPHALUM*

Dong Zhiyang Yan Longfei

(College of Biological Sciences, Beijing Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract *Physarum polycephalum*, a low eukaryote amoeba provides an attractive system for studying contractile proteins. In this work, we have identified a kinesin-like protein in the plasmodium of *Physarum polycephalum* by western blotting, using monoclonal antibody against kinesin (bovine brain). The molecular weight of the polypeptide which immunologically cross-reacts with kinesin from bovine brain is about 137kd. It suggests that the 137kd polypeptide is the heavy chain of the kinesin in *Physarum polycephalum*.

Key words *Physarum polycephalum*, Kinesin, Western blotting, Immunological cross-react

JOURNALS.IM.AC.CN