

# 拟南芥膜联蛋白2的亚细胞定位研究

褚翠萍<sup>1</sup> 任秋萍<sup>2</sup> 孔兰静<sup>1</sup> 王秀玲<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>作物生物学国家重点实验室, 山东农业大学生命科学院, 泰安 271018; <sup>2</sup>聊城大学农学院, 聊城 252059)

**摘要** 膜联蛋白(annexin)是一类依赖钙离子的多功能磷脂结合蛋白家族, 在进化上高度保守, 但不同的膜联蛋白基因的表达模式和蛋白质的亚细胞定位具有特异性。拟南芥中已经鉴定出8个编码膜联蛋白的基因, 在生长发育和对逆境胁迫响应过程中起作用。已知拟南芥膜联蛋白2参与根的分泌活动和生长素介导的根的向地性反应, 但作用机制不清楚。蛋白质的亚细胞定位能为研究其功能和作用机制提供重要参考信息。将编码膜联蛋白2的序列克隆到植物双元表达载体pCAMBIA1300-mCherry上, 在拟南芥中表达AnnAt2-mCherry。利用荧光蛋白技术、mCherry与绿色荧光蛋白标记的细胞器标记物共定位技术以及细胞器特异性荧光染料染色技术, 作者研究了膜联蛋白2的亚细胞定位。结果显示, 膜联蛋白2定位于细胞质、细胞核、高尔基体和内质网中, 表明该蛋白质可能具有非常重要的功能和复杂的蛋白质翻译与转运调控机制。更多结果发现, 转基因拟南芥中膜联蛋白2与绿色荧光蛋白标记的微丝骨架存在共定位现象, 推测该蛋白可能通过微丝骨架调节及微丝骨架介导的囊泡运输参与细胞分泌活动。该文为进一步研究膜联蛋白2蛋白质的翻译与转运调控以及作用机制提供了实验依据。

**关键词** 膜联蛋白2; 亚细胞定位; 微丝; 拟南芥

## The Subcellular Localization of AnnAt2 in *Arabidopsis*

Chu Cuiping<sup>1</sup>, Ren Qiuping<sup>2</sup>, Kong Lanjing<sup>1</sup>, Wang Xiuling<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>State Key Laboratory of Crop Biology, College of Life Sciences, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China; <sup>2</sup>College of Agronomy, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China)

**Abstract** Annexin is a highly conserved protein family binding to phospholipids in a calcium-dependent manner, while different annexins harbor various gene expression patterns and protein subcellular localizations. Eight annexins in *Arabidopsis thaliana* (AnnAt) have been identified. These annexins play important roles in growth, development and responses to stress. Annexin 2 in *Arabidopsis thaliana* (AnnAt2) is involved in root secretion and auxin-mediated geotropism growth of root cells. However, the molecular mechanism remains undefined. The subcellular localization of proteins is a crucial cue to explore their biological functions and molecular mechanisms. In the current study, the subcellular localization of AnnAt2 was investigated with fusion protein expression and colocalization with green fluorescent protein (GFP) of organelles or specific fluorescence dyes, respectively. Our results revealed that AnnAt2 was localized simultaneously in cytosol, nuclei, Golgi apparatus and endoplasmic reticulum. These data indicate that the translation and transportation of AnnAt2 are complex. AnnAt2 was colocalized with actin filaments marked by GFP in transgenic AnnAt2-mCherry *Arabidopsis* lines, suggesting that AnnAt2 might be involved in cell secretion via dynamic regulation of microfilaments and

收稿日期: 2017-02-06 接受日期: 2017-04-14

山东省自然科学基金(批准号: ZR2013CM007)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0534-8246020, E-mail: xlwang@sdau.edu.cn

Received: February 6, 2017 Accepted: April 14, 2017

This work was supported by Shandong Provincial Natural Science Foundation (Grant No. ZR2013CM007)

\*Corresponding authors. Tel: +86-534-8246020, E-mail: xlwang@sdau.edu.cn

网络出版时间: 2017-05-27 15:42:43

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170527.1542.006.html>

microfilament-mediated vesicles transport in *Arabidopsis*. These data provide the experimental evidence for further studies of protein translation, transport pathways and the functions of AnnAt2.

**Keywords** AnnAt2; subcellular localization; microfilament; *Arabidopsis thaliana*

膜联蛋白(annexin)是一类钙离子及磷脂结合蛋白超家族,广泛分布于真核生物和原核生物中,在进化上高度保守。目前已知的膜联蛋白包括动物膜联蛋白I、II、III、IV、V、VI、X、VII、VIII、XI和XXXI、真菌膜联蛋白XIV、植物膜联蛋白和膜联蛋白相似蛋白(annexin like protein)等多个亚家族<sup>[1]</sup>。膜联蛋白的结构高度保守,其C-端为核心区域,由4个或8个高度保守的膜联蛋白重复结构(annexin repeat)组成,每个膜联蛋白重复结构由约70个氨基酸重复序列K-G-X-G-T- $\{38\}$ -D/E组成。膜联蛋白重复结构包含5个 $\alpha$ -螺旋,是膜联蛋白与钙离子互作所必需的, $\alpha$ -螺旋构成了大多数膜联蛋白的二级结构<sup>[2]</sup>。膜联蛋白参与动物的多种细胞过程,如膜泡转运、离子运输、细胞骨架重排、细胞分裂和分化及细胞凋亡等<sup>[3]</sup>。对植物膜联蛋白了解相对较少,目前只在豌豆、拟南芥、棉花、芥菜和水稻等植物中分离出编码膜联蛋白的基因<sup>[4-6]</sup>。植物膜联蛋白的C-端含有4个膜联蛋白重复结构,但N-端相对较短(约10个氨基酸)。植物膜联蛋白同样受Ca<sup>2+</sup>、pH、电压和脂类物质等因素的调节<sup>[7]</sup>,在胞外分泌、微丝动态调节、过氧化物酶及胍胍质合酶活性调控和离子运输等过程中起作用<sup>[6,8]</sup>,参与植物生长、发育以及对环境胁迫的响应<sup>[9-10]</sup>。

不同的膜联蛋白基因表达模式和蛋白质的亚细胞定位具有特异性。膜联蛋白II主要在人体内皮细胞、巨噬细胞、骨髓细胞和某些肿瘤细胞中表达。植物膜联蛋白在分裂中的细胞、萌发中的花粉和种子、形成和生长中的初生根和侧根、膨大过程中的块茎、伸长中的棉纤维和衰老过程中的花瓣等多种器官中表达,表达量与生长和发育密切相关<sup>[11]</sup>。膜联蛋白的表达部位与极性生长关系密切,一些膜联蛋白在花粉管、根毛和蕨类植物假根膨大的顶端区域表达<sup>[4,12]</sup>。膜联蛋白在细胞内的亚细胞定位对于分析其功能和作用机制至关重要。目前研究发现,膜联蛋白在细胞质、质膜、线粒体、内质网、高尔基、细胞核以及植物细胞的液泡膜、叶绿体和乙醛酸循环(glyoxysome)体均有定位<sup>[13-15]</sup>,且存在同一个膜联蛋白在一个细胞的多个细胞器和细胞亚区分布

的情况<sup>[1]</sup>,表明其蛋白质合成和合成后的转运调控机制复杂。不同的膜联蛋白亚细胞定位也不完全相同。如拟南芥膜联蛋白1(annexin 1 in *Arabidopsis thaliana*, AnnAt1)和AnnAt4能够互作,原生质体瞬时表达结果表明,AnnAt1和AnnAt4都存在内质网定位,但AnnAt1同时还存在细胞质定位<sup>[13]</sup>。

动物中某些膜联蛋白与肌动蛋白结合,调节微丝动态<sup>[16]</sup>。有些膜联蛋白可以直接结合肌动蛋白调节微丝骨架的动态,而有些膜联蛋白必须与肌动蛋白结合蛋白(actin binding protein)结合形成蛋白质复合体调节微丝动态<sup>[17]</sup>。哺乳动物膜联蛋白A2通过结合G-肌动蛋白和对F-肌动蛋白的末端进行加帽来调节肌动蛋白的装配<sup>[16]</sup>。某些植物膜联蛋白也能通过结合F-肌动蛋白起作用。到目前为止,已经报道番茄、西葫芦和含羞草的膜联蛋白在体外实验中能与F-肌动蛋白结合,西葫芦膜联蛋白与肌动蛋白的结合在高盐条件下被解除<sup>[18-19]</sup>。棉花、含羞草和番茄膜联蛋白与F-肌动蛋白的结合是钙依赖性的<sup>[19]</sup>。有些植物的膜联蛋白可以通过影响与肌动蛋白的结合来抑制细胞生长,如在玉米胚芽鞘中,抑制表皮细胞的生长能促进膜联蛋白与肌动蛋白的结合<sup>[20]</sup>,但作用机制还不清楚。

拟南芥中已经鉴定出8个编码膜联蛋白的基因<sup>[21]</sup>,多个基因都在根、下胚轴、子叶和种子种表达,但它们的表达模式并不完全相同<sup>[21-22]</sup>。拟南芥AnnAt1和AnnAt2在高度分泌类型细胞根毛的顶端表达量非常高,说明AnnAt1和AnnAt2可能参与调控分泌活动<sup>[4]</sup>。AnnAt1、AnnAt2、AnnAt4和AnnAt8都已被证明在拟南芥生长和发育以及响应环境胁迫过程中起重要作用<sup>[13,23-25]</sup>。AnnAt1和AnnAt4通过互作在拟南芥响应盐和干旱过程中起作用,但二者的亚细胞定位并不完全相同<sup>[13]</sup>。最近的研究结果表明,AnnAt1和AnnAt2在拟南芥响应干旱和高温过程中起作用,在45 °C高温下,突变体annat1和annat2对热的敏感性明显增强,且在高温条件下,双突变体annat1 annat2中检测不到热激蛋白和细胞质游离钙离子([Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub>)增加的现象<sup>[26]</sup>,说明AnnAt1和AnnAt2可能通过Ca<sup>2+</sup>的信号通路在胁迫过程中起作用。

*AnnAt2*基因在拟南芥根、茎、下胚轴、子叶和花中均有表达,且在花粉和根的伸长区、根毛区以及根冠中表达丰富<sup>[4,21,23]</sup>。*AnnAt2*的表达受温度、盐和渗透胁迫调控,高温诱导该基因表达,但低温、盐和渗透胁迫抑制该基因表达<sup>[21,26]</sup>,说明该基因在植物响应非生物胁迫中的作用机制非常复杂。*AnnAt2*参与根的分生活动、生长素介导的根的向地性反应<sup>[22,27]</sup>,但作用机制尚不清楚。蛋白质的亚细胞定位对了解其功能机制具有重要的参考作用。本研究通过基因工程和细胞生物学方法,借助于荧光蛋白技术和蛋白质共定位技术,对拟南芥膜联蛋白2的亚细胞定位进行了研究。结果表明,该蛋白质定位于细胞质、细胞核、内质网和高尔基体,并与微丝骨架存在共定位,说明其可能通过调控微丝骨架在细胞分泌、囊泡运输以及与外界环境的信号识别和转导过程中起作用。实验结果为下一步深入研究拟南芥膜联蛋白2的作用机制提供了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验所用拟南芥为哥伦比亚生态型(*Arabidopsis thaliana*, Col)。瞬时表达所用的烟草为本生烟草(*Nicotiana benthamiana*)。GFP标记的过氧化物酶体(CD3-979)、线粒体(CD3-987)和高尔基体(CD3-955)标记物购自ABRC(<http://www.arabidopsis.org>)。所用内质网荧光染料为ER-Tracker™ Green(Invitrogen公司);细胞核荧光染料为4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)(Sigma公司)。用丝束蛋白(fimbrin)微丝结合结构域(actin binding domain, ABD)与GFP融合蛋白(ABD-GFP)标记微丝<sup>[28]</sup>。转*AnnAt2-mCherry*基因拟南芥与转*ABD-GFP*拟南芥杂交,杂交后代用于观察微丝骨架与膜联蛋白2的共定位。

### 1.2 实验方法

1.2.1 实验材料培养 拟南芥种子经消毒后播种于MS(Murashige Skoog)基本培养基,在4 °C放置2 d后移至光下萌发,将7~10 d的幼苗移到培养基质中于温室中(16 h光照/8 h黑暗,20 °C)培养。瞬时表达所用的烟草在室温14 h光照(25 °C)/10 h黑暗(20 °C)生长4~5周后用于瞬时表达。

1.2.2 载体的构建 首先,将2个重复的Gly4-Ser作为linker和mCherry连接,共同克隆到pCAMBIA1300载体,创造pCAMBIA1300-linker-mCherry双元表达

载体。用特异性引物从pLVX-mCherry-C1载体上扩增mCherry序列,并分别在5'端和3'端引入*Xho* I和*Xba* I酶切位点。为避免目的蛋白与mCherry间形成2级结构而影响目的蛋白的翻译后转运,我们在mCherry的起始密码子ATG后面引入2个连续的Gly4-Ser作为linker。引物序列分别为:5'-GGA TCC CTC GAG ATG GGA GGT GGC GGA AGT GGA GGT GGA GGC AGT GTG AGC AAG GGC GAG GAG GA-3'和5'-TCT AGA TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC G-3'。PCR产物连到克隆载体(pMD18-T simple)进行测序,将测序正确的目的片段通过*Xho* I/*Xba* I连入表达载体pCAMBIA1300,通过35S启动子表达mCherry。将构建成功的pCAMBIA1300-mCherry载体分别转化农杆菌菌株*LBA 4404*(用于在烟草中瞬时表达)和*GV 3101*(用于转化野生型拟南芥)。

构建pCAMBIA1300-*AnnAt2*-mCherry。利用特异的引物扩增*AnnAt2*编码区序列(不包括终止密码子),在引物5'和3'端分别加*Sac* I和*Bam* H I的酶切位点。引物序列为:5'-GAG CTC CAA CAA TGG CGT CTC TCA-3'和5'-GGA TCC ACA GTT AGT AGC ATC GCC-3'。提取拟南芥RNA,以反转录产物cDNA作为PCR模板,扩增*AnnAt2*基因的编码区序列。用相同的方法构建pCAMBIA1300-*AnnAt2*-mCherry载体,表达*AnnAt2*-mCherry融合蛋白。用常规方法分别在烟草中进行瞬时表达和在拟南芥中进行稳定表达。

1.2.3 拟南芥遗传转化和转基因植株筛选及鉴定 将上述构建好的表达载体pCAMBIA1300-mCherry和pCAMBIA1300-*AnnAt2*-mCherry分别转化农杆菌菌株*GV3101*,利用农杆菌介导的方法浸染拟南芥花序。收获的种子经25 mg/L潮霉素筛选和PCR鉴定得到T0代拟南芥转基因株系。用稳定遗传的T3代4个株系的转基因植株进行亚细胞定位观察。

1.2.4 蛋白质的共定位研究 分别采用荧光染料标记技术和载体共转化技术研究蛋白质共定位。用10 μg/mL的DNA特异性细胞核荧光染料DAPI对生长7 d左右的转基因拟南芥幼苗染色5 min。用1 μmol/L内质网特异性荧光染料ER-Tracker™ Green进行染色处理,5 min后观察并照相。共转化方法的过程如下:将转化了pCAMBIA1300-*AnnAt2*-mCherry的农杆菌与转化了GFP标记的线粒体/过氧化物酶体/高尔基体标记物的农杆菌,共同注射温室培养4~5周的本生烟叶片,同时注射等体积的35S::P19重悬菌液以增

强目的蛋白的表达。注射后正常培养2~3 d后撕取叶片下表皮, 观察荧光蛋白发光情况。

**1.2.5 荧光观察和照相** 对MS培养基上生长7~10 d拟南芥转基因幼苗或注射农杆菌后的烟草叶片, 用Zeiss LSM 510 META型荧光共聚焦显微镜观察荧光并照相。观察mCherry、GFP、ER-Tracker™ Green和DAPI的激发光和吸收光波长分别为587/570~640 nm、488/505~550 nm、504/511 nm和358/460 nm。

## 2 结果

### 2.1 pCAMBIA1300-mCherry载体的表达

我们将mCherry从pLVX-mCherry-C1克隆到pCAMBIA1300表达载体, 为防止目的蛋白与mCherry间形成二级结构, 在mCherry的起始密码子ATG后面引入2个连续的Gly4-Ser作为linker, 同时引入多个限制性内切酶位点(见1.2.2)。为了检验构建的pCAMBIA1300-mCherry载体能正常发光, 首先将该载体在烟草叶片中进行了瞬时表达。农杆菌注射后48 h, 用激光共聚焦显微镜观察到mCherry的荧光均匀分布在细胞的细胞质中(图1A), 说明构建的载体中mCherry能正常发光。

为了确定构建的pCAMBIA1300-mCherry载体能够通过农杆菌菌株GV3101转化拟南芥并稳定表达, 我们将该载体转化到拟南芥中。通过抗生素筛选和PCR鉴定, 得到11个T0代转基因株系, 在转基因的幼苗中均观察到均匀分布的mCherry荧光(图1B)。以上结果显示, 我们构建的表达载体pCAMBIA1300-mCherry中的mCherry能正常发光, 并且没有出现因蛋白质表达过量而产生堆积的现象, 说明改造的pCAMBIA1300-mCherry双元表达载体可以用来进行目的蛋白的亚细胞定位研究。

### 2.2 拟南芥膜联蛋白2定位于细胞质、细胞核、内质网和高尔基体

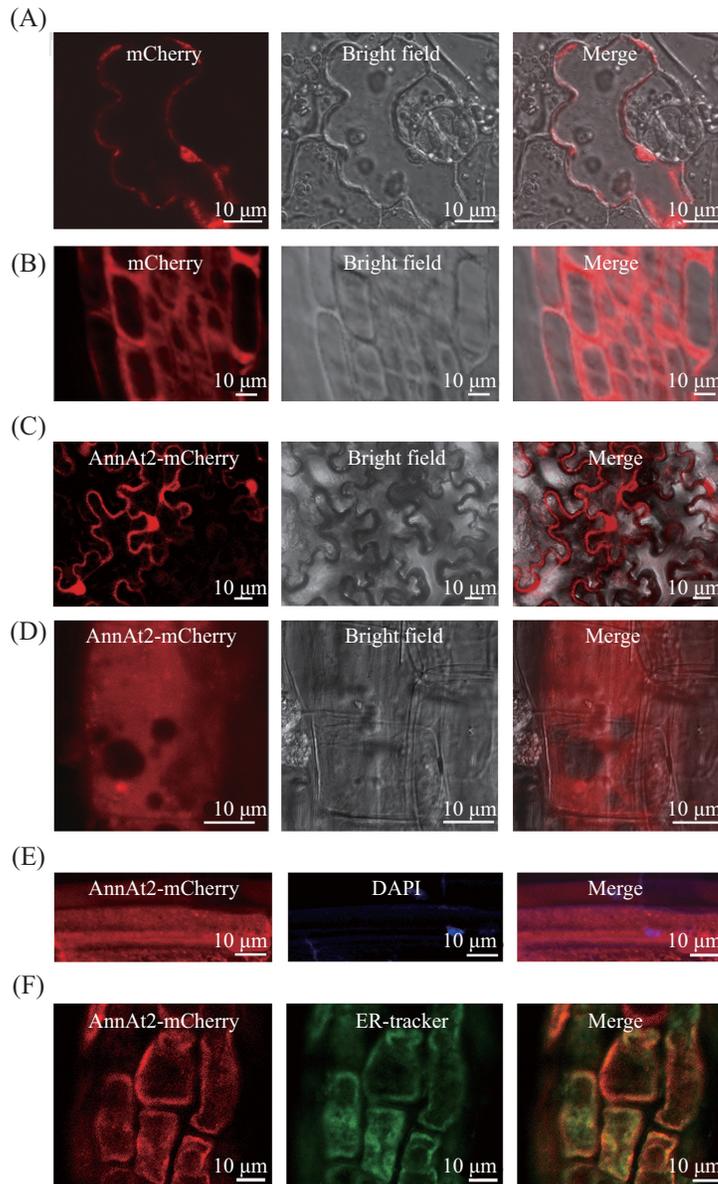
我们将构建的pCAMBIA1300-AnnAt2-mCherry载体转化烟草, 发现烟草表皮细胞中有mCherry荧光存在(图1C), 表明载体构建正确, AnnAt2和mCherry能够作为一个阅读框表达融合蛋白。取4个转基因拟南芥株系的T3代植株, 观察mCherry的荧光分布, 发现细胞的细胞质中均存在mCherry荧光(图1D)。已有报道显示, 拟南芥AnnAt1同时定位于细胞质和内质网<sup>[13]</sup>, 豌豆膜联蛋白2定位于细胞核<sup>[29]</sup>。拟南芥亚细胞定位数据库[The Subcellular Location

of Proteins in *Arabidopsis* Database (SUBA)]显示, AnnAt2可能的定位位点包括细胞质、细胞核、内质网、高尔基体、线粒体等细胞器(<http://suba.live/>)。为了确定AnnAt2是否定位于细胞核和内质网, 我们对生长7 d的转AnnAt2-mCherry基因拟南芥幼苗分别用细胞核荧光染料DAPI和内质网荧光染料ER-Tracker™ Green进行染色处理。在4个转基因拟南芥株系中DAPI的荧光和mCherry的荧光均存在共定位现象(图1E), ER-Tracker的荧光和mCherry的荧光也存在重叠现象(图1F)。以上结果表明, 拟南芥膜联蛋白2定位于细胞的细胞核和内质网。

我们发现, 转基因拟南芥细胞的细胞质中有一些球状的mCherry荧光颗粒(图1D)。SUBA数据库的信息也显示, 该蛋白可能定位于线粒体、高尔基体等细胞器(<http://suba.live/>)。已有研究结果表明, 膜联蛋白具有乙醛酸循环体、线粒体和高尔基体定位<sup>[15,30]</sup>。乙醛酸循环体是一种过氧化物酶体。为进一步研究转基因拟南芥中这些mCherry荧光呈颗粒状的结构是否为过氧化物酶体、线粒体和高尔基体, 我们分别用这3种细胞器GFP标记的标记物与AnnAt2-mCherry进行共定位研究。在烟草叶片中同时注射转化了AnnAt2-mCherry的农杆菌和转化了线粒体/过氧化物酶/高尔基体标记物的农杆菌, 结果发现, mCherry荧光与线粒体和过氧化物酶体的GFP荧光不存在共定位(图2A和图2B), 但与高尔基体的GFP荧光存在共定位(图2C)。以上结果表明, 拟南芥膜联蛋白2定位于高尔基体, 但不定位于线粒体和过氧化物酶体。

### 2.3 拟南芥膜联蛋白2与微丝骨架共定位

已有研究表明, 某些动物的膜联蛋白直接和肌动蛋白结合参与微丝骨架的调节, 膜联蛋白中保守的IRI模体(IRI motif)在与微丝的互动中起作用<sup>[31]</sup>。我们对拟南芥中8个膜联蛋白的氨基酸序列进行分析发现, AnnAt1、AnnAt2、AnnAt6和AnnAt7都含有该保守IRI模体(图2D)。我们将GFP标记微丝的转基因拟南芥与表达AnnAt2-mCherry的转基因拟南芥进行杂交, 观察杂交后代中微丝骨架与AnnAt2的共定位情况, 发现转基因拟南芥中mCherry荧光与微丝骨架的GFP荧光存在重叠现象, 两种荧光的Pearson相关系数(R)达到0.991(图2E), 说明拟南芥中该蛋白质与微丝骨架存在共定位, 推测拟南芥膜联蛋白2可能参与微丝的调节作用。



A~B: 空载体pCAMBIA1300-mCherry在烟草叶片(A)和拟南芥中的表达(B)结果, 说明改造的载体能够通过农杆菌*LBA4404*和*GV3101*介导在烟草中瞬时表达和在拟南芥中稳定表达mCherry荧光蛋白; C: 在烟草叶片瞬时表达pCAMBIA1300-AnnAt2-mCherry结果的代表图; D: 转化*AnnAt2-mCherry*拟南芥中mCherry表达结果的代表图, 说明AnnAt2能够和mCherry形成融合蛋白, mCherry的荧光可以用于AnnAt2的亚细胞定位研究; E: 用DAPI染色后的转*AnnAt2-mCherry*基因T3代拟南芥根细胞, DAPI荧光与mCherry荧光重叠; F: 用内质网特异性荧光染料ER-Tracker™ Green染色后的转*AnnAt2-mCherry*基因T3代拟南芥根细胞, mCherry荧光与ER-Tracker的荧光重叠。

A-B: expression of empty vector pCAMBIA1300-mCherry in tobacco leaves (A) and *Arabidopsis* (B), indicating that the mCherry can be expressed transiently in tobacco leaves and expressed stably in *Arabidopsis* plants transformed via *Agrobacterium* strains *LBA4404* and *GV3101*; C: representative image of expressing *AnnAt2-mCherry* in tobacco leaves; D: representative image of expressing *AnnAt2-mCherry* in transgenic *Arabidopsis* seedlings, suggesting that *AnnAt2-mCherry* can be expressed as a fusion protein; E: staining with DNA-specific nuclear dye in root cells of T3 transgenic *AnnAt2-mCherry Arabidopsis* seedlings, showing the merged fluorescence of DAPI with mCherry; F: mCherry and ER-Tracker fluorescences were overlapped in T3 transgenic *AnnAt2-mCherry Arabidopsis* lines.

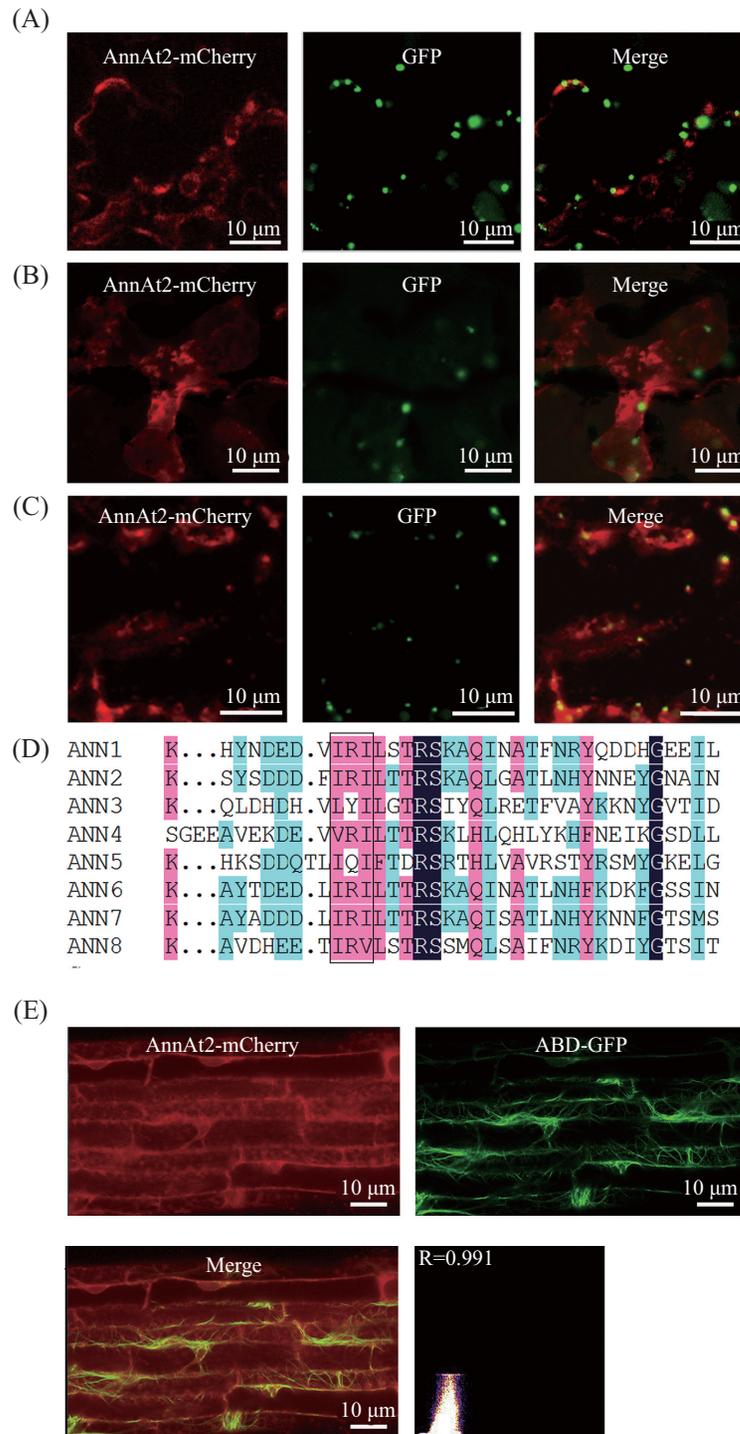
图1 拟南芥膜联蛋白2定位于细胞核和内质网

Fig.1 The nuclear and endoplasmic reticulum localization of AnnAt2

### 3 讨论

虽然膜联蛋白广泛存在于植物、动物和真菌中, 且蛋白质的同源性较高, 但不同的膜联蛋白其基因时空表达和蛋白质的亚细胞定位具有较高的

特异性。例如, 拟南芥*AnnAt5*主要在二细胞之后的花粉和花粉管形成时高量表达<sup>[23]</sup>; *AnnAt1*和*AnnAt2*在高度分泌类型细胞(如根毛的顶端和根冠)中表达量较高<sup>[4]</sup>, 暗示不同的膜联蛋白其生物学功能可能



A: AnnAt2-mCherry和GFP标记的线粒体标记物共表达结果, 2种荧光没有重叠; B: 烟草叶片中共表达AnnAt2-mCherry和GFP标记的过氧化物酶体标记物, 2种荧光基本不重叠; C: AnnAt2-mCherry和GFP标记的高尔基体标记物在烟草叶片中共表达, mCherry和GFP荧光重叠; D: 拟南芥中8个膜联蛋白的氨基酸序比对分析, 方框表示保守的IRI模体; E: 转AnnAt2-mCherry拟南芥和GFP标记微丝骨架的拟南芥(转化ABD-GFP基因)杂交后代中mCherry和GFP的共定位; R: mCherry和GFP共定位的Pearson相关系数。

A: co-expression of AnnAt2-mCherry and GFP marked mitochondria in tobacco leaves, showing that the fluorescences of mCherry and GFP were not overlapped; B: co-expression of AnnAt2-mCherry and peroxisome marker in tobacco leaves, no overlapped fluorescence was observed; C: co-expression of AnnAt2-mCherry and GFP marker of Golgi complex in tobacco leaves, showing the overlapping fluorescence of mCherry and GFP; D: amino acid analysis of 8 annexins in *Arabidopsis*, indicating the conserved IRI motif (box); E: the overlapped fluorescence of mCherry and GFP in root cells of hybrid progeny by crossing transgenic AnnAt2-mCherry line with expressing ABD-GFP *Arabidopsis* plants; R: the Pearson correlation coefficient analysis.

图2 拟南芥膜联蛋白2与高尔基体和微丝共定位

Fig.2 The colocalization of AnnAt2 with Golgi complex and actin

不同。目前研究已经发现, 膜联蛋白在动物细胞的细胞质、质膜、线粒体、内质网、高尔基、细胞核以及植物细胞的液泡膜、叶绿体和乙醛酸循环体均有定位<sup>[13,25,29-30]</sup>, 并且存在一个膜联蛋白同时在多个细胞器和细胞亚区定位的情况<sup>[1]</sup>。已知拟南芥中AnnAt8定位于细胞质。AnnAt1和AnnAt4存在互作关系, 都在内质网中表达, 但AnnAt1同时还定位于细胞质<sup>[13,25]</sup>。本研究结果表明, AnnAt2同时定位于细胞质、细胞核、内质网和高尔基体(图1和图2)。Clark等<sup>[4]</sup>免疫组织化学实验结果表明, AnnAt2在拟南芥根毛和根冠中高量表达, 说明AnnAt2可能在拟南芥根生长发育过程中参与细胞分泌活动。我们的共定位结果表明, AnnAt2定位于内质网和高尔基体(图1F和图2C), 为AnnAt2参与细胞分泌活动提供了实验证据。

通常情况下, 蛋白质在内质网和高尔基体定位, 表明该蛋白质通过共翻译机制在膜结合核糖体上合成并进入内质网和高尔基体进行糖基化等修饰, 驻留在内质网或高尔基体中起作用, 或经囊泡运送到液泡(溶酶体)、细胞膜或分泌到细胞外起作用。细胞质和细胞核定位则说明, 该蛋白质在细胞质游离核糖体上合成后驻留于细胞质, 或在蛋白质自身的核定位信号序列(nuclear localization signal sequence, NLS)引导下进入细胞核起作用<sup>[33]</sup>。AnnAt1同时存在细胞质和内质网定位<sup>[13]</sup>, 我们的结果显示, AnnAt2同时定位于细胞质、细胞核、内质网和高尔基体, 暗示膜联蛋白的翻译、翻译后加工以及转运过程可能受非常复杂的调控。因此, 有必要以此蛋白质为对象进行深入研究, 以了解这类蛋白质翻译及转运的调控机制。

细胞质的微丝骨架在植物的生长发育以及对外界环境的响应中起重要作用<sup>[34-35]</sup>。有些动物膜联蛋白与肌动蛋白或肌动蛋白结合蛋白结合, 调节微丝骨架的动态<sup>[8,17]</sup>。体外实验结果表明, 某些植物膜联蛋白也通过结合F-肌动蛋白起作用, 如棉花、番茄、西葫芦和含羞草的膜联蛋白在体外能与F-肌动蛋白结合<sup>[18-19,31,36]</sup>。植物膜联蛋白保守的IRI模体被认为可能在与F-肌动蛋白结合中起作用。经氨基酸序列比对我们发现, 在拟南芥的8个膜联蛋白中, AnnAt1、AnnAt2、AnnAt6和AnnAt7都含有保守的IRI模体, 且AnnAt2与微丝骨架存在共定位(图2E)。微丝骨架是囊泡和细胞器等物质运输的一种“轨道”,

AnnAt2与微丝骨架的共定位说明, AnnAt2可能在通过微丝调节囊泡和细胞器等物质的运输过程中起作用, 有必要进一步研究其作用机制。尽管很多植物膜联蛋白都有IRI模体, 但实验发现, IRI模体可能不是膜联蛋白与F-肌动蛋白结合的唯一结构<sup>[11,36]</sup>。AnnAt5没有保守的IRI模体, Zhu等<sup>[23]</sup>通过高速共沉淀的方法(high-speed co-sedimentation assay)发现, AnnAt5与微丝结合, 但过表达AnnAt5的植株用微丝解聚剂Lat B(latrunculin B)处理并不影响花粉的萌发和花粉管的生长。AnnAt2是否通过IRI模体与微丝直接结合、AnnAt2调节微丝骨架的机制以及通过调节微丝骨架参与的细胞生物学功能都值得进一步研究。

### 参考文献 (References)

- 1 Laohavisit A, Davies JM. Multifunctional annexins. *Plant Sci* 2009; 177(6): 532-9.
- 2 Hu N, Yusof A, Winter A, Osman A, Reeve A, Hofmann A. The crystal structure of calcium-bound annexin Gh1 from *Gossypium hirsutum* and its implications for membrane binding mechanisms of plant annexins. *J Biol Chem* 2008; 283(26): 18314-22.
- 3 Kirilenko A, Pikula S, Bandorowicz-Pikula J. Effects of mutagenesis of W343 in human annexin A6 isoform 1 on its interaction with GTP: Nucleotide-induced oligomer formation and ion channel activity. *Biochemistry* 2006; 45(15): 4965-73.
- 4 Clark GB, Lee DW, Dauwalder M, Roux SJ. Immunolocalization and histochemical evidence for the association of two different *Arabidopsis* annexins with secretion during early seedling growth and development. *Planta* 2005; 220(4): 621-31.
- 5 Divya K, Jami SK, Kirti PB. Constitutive expression of mustard annexin, *AnnBj1* enhances abiotic stress tolerance and fiber quality in cotton under stress. *Plant Mol Biol* 2010; 73(3): 293-308.
- 6 Zhou L, Duan J, Wang XM, Zhang HM, Liu JY. Characterization of a novel annexin gene from cotton (*Gossypium hirsutum* cv CRI 35) and antioxidative role of its recombinant protein. *J Integr Plant Biol* 2011; 53(5): 347-57.
- 7 Gorecka KM, Thouverey C, Buchet R, Pikula S. Potential role of annexin AnnAt1 from *Arabidopsis thaliana* in pH-mediated cellular response to environment stimuli. *Plant Cell Physiol* 2007; 48(6): 792-803.
- 8 McArthur S, Yazid S, Christian H, Sirha R, Flower R, Buckingham J, et al. Annexin A1 regulates hormone exocytosis through a mechanism involving actin reorganization. *FASEB J* 2009; 18(2): 113-4.
- 9 Jami SK, Clark GB, Turlapati SA, Handley C, Roux SJ, Kirti PB. Ectopic expression of an annexin from *Brassica juncea* confers tolerance to abiotic and biotic stress treatments in transgenic tobacco. *Plant Physiol Biochem* 2008; 46(12): 1019-30.
- 10 Konopka-Postupolska D, Clark G, Hofmann A. Structure, function and membrane interactions of plant annexins: An update. *Plant Sci* 2011; 181(3): 230-41.

- 11 Mortimer JC, Coxon KM, Laohavisit A, Davies JM. Heme-independent soluble and membrane-associated peroxidase activity of a *Zea mays* annexin preparation. *Plant Signal Behav* 2009; 4(5): 428-30.
- 12 Blackbourn HD, Walker JH, Battey NH. Calcium dependent phospholipid binding proteins in plants their characterization and potential for regulating cell growth. *Planta* 1991; 184(1): 67-73.
- 13 Huh SM, Noh EK, Kim HG, Jeon BW, Bae K, Hu HC, *et al.* *Arabidopsis* annexins AnnAt1 and AnnAt4 interact with each other and regulate drought and salt stress responses. *Plant Cell Physiol* 2010; 51(9): 1499-514.
- 14 Carletti P, Masi A, Spolaore B, Polverino De Laureto P, Zorzi MD, Turetta L, *et al.* Protein expression changes in maize roots in response to humic substances. *J Chem Ecol* 2008; 34(6): 804-18.
- 15 Fukao Y, Hayashi M, Hara-Nishimura I, Nishimura M. Novel glyoxysomal protein kinase, GPK1, identified by proteomic analysis of glyoxysomes in etiolated cotyledons of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 2003; 44(10): 1002-12.
- 16 Hayes MJ, Shao D, Bailly M, Moss SE. Regulation of actin dynamics by annexin 2. *EMBO J* 2006; 25(9): 1816-26.
- 17 Hayes MJ, Rescher U, Gerke V, Moss SE. Annexin-actin interactions. *Traffic* 2004; 5(8): 571-6.
- 18 Hu SQ, Brady SR, Kovar DR, Staiger CJ, Clark GB, Roux SJ, *et al.* Technical advance: Identification of plant actin-binding proteins by F-actin affinity chromatography. *Plant J* 2000; 24(1): 127-37.
- 19 Hoshino D, Hayashi A, Temmei Y, Kanzawa N, Tsuchiya T. Biochemical and immunohistochemical characterization of *Mimosa* annexin. *Planta* 2004; 219(5): 867-75.
- 20 Waller F, Riemann M, Nick P. A role for actin-driven secretion in auxin-induced growth. *Protoplasma* 2002; 219(1): 72-81.
- 21 Cantero A, Barthakur S, Bushart TJ, Chou S, Morgan RO, Fernandez MP, *et al.* Expression profiling of the *Arabidopsis* annexin gene family during germination, de-etiolation and abiotic stress. *Plant Physiol Biochem* 2006; 44(1): 13-24.
- 22 Clark GB, Morgan RO, Fernandez MP, Roux SJ. Evolutionary adaptation of plant annexins has diversified their molecular structures, interactions and functional roles. *New phytol* 2012; 96(3): 695-712.
- 23 Zhu J, Wu X, Yuan S, Qian D, Nan Q, An L, *et al.* Annexin5 plays a vital role in *Arabidopsis* pollen development via Ca<sup>2+</sup>-dependent membrane trafficking. *PLoS One* 2014; 9(7): e102407.
- 24 Richards SL, Laohavisit A, Mortimer JC, Shabala L, Swarbreck SM, Shabala S, *et al.* Annexin 1 regulates the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced calcium signature in *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant J* 2014; 77(1): 136-45.
- 25 Yadav D, Ahmed I, Shukla P, Boyidi P, Kirti PB. Overexpression of *Arabidopsis AnnAt8* alleviates abiotic stress in transgenic *Arabidopsis* and tobacco. *Plants* 2016; pii: E18.
- 26 Wang X, Ma X, Wang H, Li B, Clark G, Guo Y, *et al.* Proteomic study of microsomal proteins reveals a key role for *Arabidopsis* annexin 1 in mediating heat stress-induced increase in intracellular calcium levels. *Mol Cell Proteomics* 2015; 14(3): 686-94.
- 27 Tan C, Wang H, Zhang Y, Qi B, Xu GX, Zheng HQ. A proteomic approach to analyzing responses of *Arabidopsis thaliana* root cells to different gravitational conditions using an agravitropic mutant, *pin2* and its wild type. *Proteome Sci* 2011; 9: 72.
- 28 Wang YS, Yoo CM, Blancaflor EB. Improved imaging of actin filaments in transgenic *Arabidopsis* plants expressing a green fluorescent protein fusion to the C- and N-termini of the fimbrin actin-binding domain 2. *New Phytol* 2008; 177(2): 525-36.
- 29 Clark GB, Dauwalder M, Roux SJ. Immunological and biochemical evidence for nuclear localization of annexin in peas. *Plant Physiol Biochem* 1998; 36(9): 621-7.
- 30 Ito J, Heazlewood J.L, Millar AH. Analysis of the soluble ATP-binding proteome of plant mitochondria identifies new proteins and nucleotide triphosphate interactions within the matrix. *J Proteome Res* 2006; 5(1): 3459-69.
- 31 Zhang F, Jin X, Wang L, Li S, Wu S, Cheng C, *et al.* A cotton annexin affects fiber elongation and secondary cell wall biosynthesis associated with Ca<sup>2+</sup> influx, ROS homeostasis, and actin filament reorganization. *Plant Physiol* 2016; 171(3): 1750-70.
- 32 Gerke V, Moss SE. Annexins: From structure to function. *Physiol Rev* 2002; 82(2): 331-71.
- 33 Lange A1, Mills RE, Lange CJ, Stewart M, Devine SE, Corbett AH. Classical nuclear localization signals: Definition, function, and interaction with importin alpha. *J Biol Chem* 2007; 282(8): 5101-5.
- 34 Gao XQ, Wang XL, Ren Fi, Chen J, Wang XC. Dynamics of vacuoles and actin filaments in guard cells and their roles in stomatal movement. *Plant Cell Environ* 2009; 32(8): 1108-16.
- 35 Wang XL, Gao XQ, Wang XC. Stochastic dynamics of actin filaments in guard cells regulating chloroplast localization during stomatal movement. *Plant Cell Environ* 2011; 34: 1248-57.
- 36 Calvert CM, Gant SJ, Bowles DJ. Tomato annexins p34 and p35 bind to F-actin and display nucleotide phosphodiesterase activity inhibited by phospholipid binding. *Plant Cell* 1996; 8(2): 333-42.