

RNA 沉默手段分析烟草悬浮细胞中线粒体分裂蛋白 NtFIS1A/1B 功能

刘岩厚, 赵忠芳*

(南开大学分子生物研究所, 天津 300071)

摘要: 为了解烟草悬浮细胞中的线粒体分裂蛋白的功能, 将拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的线粒体分裂复合体成员 FIS1A 和 FIS1B 在烟草(*Nicotiana tabacum*)表达序列数据库中进行序列比对, 鉴定到烟草中的同源基因 *NtFIS1A* 和 *NtFIS1B* (*NtFIS1A/1B*)。以烟草悬浮细胞为材料, 通过 RNA 干扰和人工 microRNA 干扰技术抑制 *NtFIS1A/1B* 的表达, RT-PCR 分析结果表明, RNA 沉默细胞系中 *NtFIS1A/1B* 的转录受到抑制。观察 RNA 沉默细胞系中的线粒体形态可见, 当 *NtFIS1A/1B* 的表达被抑制后, 单个线粒体的平均面积显著增加。这些表明 *NtFIS1A/1B* 参与了烟草悬浮细胞中线粒体分裂的调控, 有助于了解烟草中线粒体的形态调控。

关键词: NtFIS1A/1B; 人工 microRNA 干扰技术; 线粒体分裂; 烟草; 悬浮细胞

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2013.04.001

Functional Validation of Mitochondrial Fission Proteins, NtFIS1A/1B, in *Nicotiana tabacum* 'BY-2' Suspension Cells Using RNA Interference

LIU Yan-hou, ZHAO Zhong-fang*

(Institute of Molecular Biology, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: The aim was to understand the function of mitochondrial fission proteins. Two homologues, NtFIS1A and NtFIS1B, were identified by searching tobacco (*Nicotiana tabacum*) EST database with mitochondrial fission member of FIS1A and FIS1B in *Arabidopsis*. Expression of *NtFIS1A/1B* in tobacco 'BY-2' suspension cells were inhibited by using RNA interference and artificial microRNA interference. The RT-PCR results showed that the transcription of *NtFIS1A/1B* were knockdown in related RNAi cell lines. Thereafter, mitochondrial morphology in RNA knockdown cell lines was analyzed. The average area of single mitochondria significantly increased. It was concluded that NtFIS1A/1B participated in mitochondrial fission in 'BY-2' suspension cells. It would contribute to understand morphological regulation of mitochondria in tobacco suspension cells.

Key words: NtFIS1A/1B; Artificial microRNA interference; Mitochondrial fission; *Nicotiana tabacum*; Suspension cell

线粒体处于频繁的分裂与融合过程, 是高度动态的细胞器, 其形态可呈点状、香肠状或管状^[1-2]。在动物和酵母中, 线粒体分裂、融合调控的机制已经得到了广泛深入的研究^[3-6]。在植物中, 尚未鉴

定到参与线粒体融合调控的蛋白^[7-8]。近年来, 有关植物线粒体分裂调控的研究取得很大进展。在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中, 鉴定到 3 类参与线粒体分裂调控的蛋白, 分别是 (1) 线粒体分裂

收稿日期: 2012-12-07 接受日期: 2013-03-29

基金项目: 南开大学与美国麻省总医院合作项目(1-AI-30024)资助

作者简介: 刘岩厚(1980~), 男, 博士研究生, 主要从事分子生物学与生物化学研究。E-mail: liuyanhou@mail.nankai.edu.cn

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: zhfzhao@nankai.edu.cn

蛋白复合体的核心组分 AtDRP3A/3B^[9-12]; (2) 植物中特有的 ELM1, 负责 DRP3A (或者 DRP3B) 从胞质向线粒体分裂位点的招募^[13]; (3) 锚定于线粒体外膜的 FIS1A (也被称为 BIGYIN, TAIR 数据库编号: At3g57090) 和 FIS1B (TAIR 数据库编号: At5g12390)^[14-16]。

FIS1A 和 FIS1B 是进化上保守的整合膜蛋白, 大约有 170 个氨基酸, 通过 C 端跨膜区域在线粒体外膜上普遍分布, 蛋白的大部分都面向胞质。它们的胞质结构域由 6 个反平行的螺旋组成 1 个螺旋束^[17-18]。螺旋束的一面是凹陷的, 被认为是小肽配基的结合位点。Scott 等^[15]报道, 在拟南芥中 BIGYIN (At3g57090) 的缺失会导致线粒体分裂减少, 面积增加、数目减少。随后, Zhang 等^[16]的研究表明, 在 FIS1A 和 FIS1B 的突变体中线粒体和过氧化物酶体都表现出不完全的分裂。以拟南芥悬浮细胞为材料, Lingard 等^[19]的研究表明, FIS1B (而非 FIS1A) 通过被招募到过氧化物酶体的外膜上而参与了 G₂ 期过氧化物酶体的复制。

烟草悬浮细胞 (*Nicotiana tabacum* L. 'Bright Yellow 2', 简称 'BY-2') 作为植物细胞的模式体系之一, 在线粒体形态研究方面具有诸多优点: (1) 无自发荧光; (2) 易于转化; (3) 易于进行显微成像; (4) 细胞周期形态清晰可辨^[20]。在烟草中, 除鉴定到与 AtDRP3A/3B 同源蛋白的部分片段外^[21-22], 目前关于线粒体分裂调控的其它组分尚未见到详细的报道。本研究中, 以烟草悬浮细胞为实验材料, 首先对线粒体分裂复合体成员 FIS1A 和 FIS1B 在烟草表达序列数据库中进行序列比对, 克隆得到了烟草中的同源基因 *NtFIS1A/1B*。并利用 RNA 干扰技术和人工 microRNA 干扰技术 (Artificial microRNA interference, AmiRNA) 等基因沉默手段对其转录水平进行抑制, 通过观察线粒体的形态变化对 *NtFIS1A/1B* 在烟草悬浮细胞线粒体分裂中的作用进行了探讨, 为烟草中线粒体形态调控研究提供科学基础。

1 材料和方法

1.1 材料

烟草 (*Nicotiana tabacum* L. 'Bright Yellow 2', 'BY-2') 悬浮细胞野生型为香港中文大学姜里文教授惠赠^[23]。每周转接 1 次, 转接比例为 1 : 30, 于 25℃,

130 r min⁻¹ 摇床上避光振荡培养。用 Kaede 标记线粒体的 'BY-2' 细胞系 Mt-kaede 为实验室保存^[22]。

限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶、PrimeSTAR DNA 聚合酶购自 Takara 公司; pGEM-T Easy Vector DNA 聚合酶购自 Promega 公司; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株 DH5α 和农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101 为实验室自存。

1.2 基因克隆

利用拟南芥 *FIS1A* 和 *FIS1B* 的核苷酸序列在 NCBI 的烟草表达序列标签数据库中进行序列比对, 得到烟草的同源序列片段 EB439022 (*NtFIS1A*) 和 EB450846 (*NtFIS1B*)。利用 Primer Premier 5 分析编码序列, 设计基因特异的引物 (*NtFIS1A* F/R 和 *NtFIS1B* F/R) (表 1), 采用 RT-PCR 从烟草悬浮细胞中扩增出基因片段, 扩增产物与 pGEM-T Easy 载体进行连接, 阳性克隆经限制性内切酶酶切, 初步确认后全序列测序, 分别命名为 pGEM-T-*NtFIS1A* 和 pGEM-T-*NtFIS1B*, 测序结果与数据库序列一致性为 100%。

1.3 RNAi 载体的构建、转化与筛选

以 pGEM T-*NtFIS1A* 为模板, 先利用引物 *Sac* I-*NtFIS1A* 和 *NtFIS1A-Spe* I 扩增得到 PCR 产物, 将 PCR 产物经 *Sac* I/*Spe* I 酶切后正向插入含有 Actin 内含子的 RNAi 载体 pTCK309^[24]。再利用引物 *Bam*H I-*NtFIS1A* 和 *NtFIS1A-Kpn* I 扩增得到 PCR 产物, PCR 产物经 *Bam*H I/*Kpn* I 双酶切后反向插入上述载体中, 得到含有烟草 *NtFIS1A* 基因的反向重复序列的载体 pTCK309-*NtFIS1A*。按照类似的程序构建 *NtFIS1B* 的 RNAi 载体 pTCK309-*NtFIS1B*。构建好的载体经测序确认后转化。

先将 pTCK309-*NtFIS1A/1B* 载体转化到农杆菌 GV3101 中, 通过农杆菌侵染的方法稳定转化到标记线粒体的 'BY-2' 细胞系 Mt-kaede 中, 用含有潮霉素的 BY-2 固体培养基筛选阳性克隆。为确保存在 *NtFIS1A/1B* 的正反向重复序列, T₁ 代的阳性愈伤组织进行 PCR 鉴定。鉴定的阳性细胞系再用 RT-PCR 反应检测 *NtFIS1A* 和 *NtFIS1B* 的转录水平。

1.4 人工 microRNAs 载体的设计与构建

为对 *NtFIS1A* 和 *NtFIS1B* 同时进行基因沉默处理, 采用人工 microRNA 干扰技术, 人工 microRNAs

的设计借助网站 <http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi>^[25]。按照网站提供的筛选标准,最终选定 AmiRNA1 (*NtFIS1A/1B* 的“12~31”区域)和 AmiRNA8 (*NtFIS1A/1B* 的“269~287”区域)。其中, AmiRNA1 序列为:5'-TATTCCATGAATTTTCCGCTC-3'; AmiRNA8 序列为:5'-TAGAAGATAAATCC-TTCCCT-3',相关引物参见表1。载体构建时,以 pRS300 作为中间载体模板形成含有内含子的 AmiRNA 发夹结构^[26]。将最终的 PCR 产物(包含编码 AmiRNA 发夹结构的序列)经 *Kpn I/Spe I* 酶切后连接到 pTCK309 载体上,形成了由 35S 烟草花叶病毒启动子驱动的 AmiRNA 载体(具有与 RNA 载体相同的结构骨架和抗性)。同样的,将测序正确的 AmiRNA1/8 载体转化到农杆菌 GV3101 中,通过农杆菌侵染的方法稳定转化到标记线粒体的‘BY-2’细胞系 Mt-kaede 中,用含有潮霉素的固体培养基筛选阳性克隆。为确保存在 AmiRNA1/8

发夹结构, T₁ 代的阳性愈伤组织分别用上游引物(pRS300-A)和下游引物(pRS300-B)进行 PCR 鉴定。鉴定阳性的细胞系再用 RT-PCR 反应检测 *NtFIS1A* 和 *NtFIS1B* 的转录水平。

1.5 半定量RT-PCR检测*NtFIS1A/1B*转录水平

分别以 *NtFIS1A/1B* 的 RNAi 细胞系和 AmiRNA1/8 基因沉默细胞系为材料,按照 Trizol 试剂盒说明书(Invitrogen)提取总 RNA 后,用 DNAase I (Takara)处理以消除基因组 DNA 的污染。定量后,取等量的 RNA,以 oligo(dT)为引物,用 Superscript II 逆转录酶(Invitrogen),以 20 μL 标准体系进行 cDNA 第 1 链的合成。再取等量的 cDNA 为模板,用基因特异的 PCR 引物(NtFIS1A-EB439022, NtFIS1B-EB450846, Ntactin-EU938079)(表 1)进行扩增。PCR 反应程序为: 95℃变性 2 min; 然后 95℃变性 30 s, 54℃退火 30 s, 72℃延伸 1 min,

表 1 所用引物

Table 1 Primers used in this study

实验 Experiment	基因 Gene	引物 Primer (5'~3')
基因克隆 Gene Cloning	<i>NtFIS1A</i>	NtFIS1A-F: ATGGATGCAAAGATCGGAAAAT NtFIS1A-R: TCAATTCTTGCGGGCCAAAGCA
	<i>NtFIS1B</i>	NtFIS1B-F: ATGGAAGCGAAGATCGGAAAAT NtFIS1B-R: TCATTCTTGCGGGATAAAGCA
	<i>NtFIS1A</i>	<i>Sac I</i> -NtFIS1A: AAAGAGCTCATGGATGCAAAGATCGGA NtFIS1A- <i>Spe I</i> : AAAACTAGTATTCTTGCGGGCCAAAGC <i>BamH I</i> -NtFIS1A: AAAGGATCCATGGATGCAAAGATCGGA NtFIS1A- <i>Kpn I</i> : AAAGGTACCATTTCTTGCGGGCCAAAGC
		<i>NtFIS1B</i>
AmiRNA 载体构建 AmiRNA constructs	AmiRNA1	I miR1-s: gaTATTCCATGAATTTTCCGCTCtctctctttgtattcc II miR1-a: gaGAGCGGAAAATTCATGGAATAtcaaagagaatcaatga III miR1-*s: gaGAACGAAAATTTCTTGGAATTtcacagctgctgatatg IV miR1-*a: gaAATCCAAGAATTTCCGTTTctacatatatattcct
		AmiRNA8
	pRS300	pRS300-A: CTG CAA GGC GAT TAA GTT GGG TAA C pRS300-B: GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG GAA ACA G
	RT-PCR	<i>NtFIS1A</i>
<i>NtFIS1B</i>		RT-NtFIS1b-S: AGTTGCTGAGGCGGAAAAAGGT RT-NtFIS1b-A: TACTGCCACCCAGAGATGCTTCA
<i>Actin</i>		RT-Ntactin-S: TCTGGCATCATACATTTTACAACGA RT-Ntactin-A: ATGGCGACATACATAGCAGGAGT

共 26 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min。扩增得到的 DNA 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.6 线粒体形态观察与数据分析

用转移到新鲜培养基中 3 d 的 ‘BY-2’ 悬浮细胞为材料,放置在玻璃底的培养皿(MatTek Corp., Ashland, MA)中,用 Leica SP5 (Leica, 德国)显微镜在 63 倍物镜下进行观察。在明场显微镜下挑选处于有丝分裂间期的细胞,用 488 nm 激光对线粒体形态(包括 Mt-kaede 转化的野生型细胞系、*NtFIS1A* RNAi 细胞系、*NtFIS1B* RNAi 细胞系、AmiRNA1 细胞系、AmiRNA8 细胞系)进行扫描。用 Image J 1.42 统计线粒体面积,用 SPSS 14.0 进行 *t* 检验,显著性水平为 $\alpha = 0.05$,统计结果用 Sigmaplot 10.0 制图。

2 结果和分析

2.1 烟草线粒体分裂蛋白基因 *NtFIS1A/1B* 的克隆与序列分析

我们对 *NtFIS1A/1B* 基因进行了克隆和序列分析(图 1)。根据拟南芥的 *FIS1A* 和 *FIS1B* 的核苷酸序列,在 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)的烟草表达序列标签数据库中进行序列比对,获得了烟草中的同源序列片段;分别命名为 *NtFIS1A* (GenBank 登录号:B439022)和 *NtFIS1B* (GenBank 登录号:EB450846) (图 1)。NtFIS1A 和 NtFIS1B 氨基酸序列的相似性最高(一致性约为 85.9% 相似性约为 92.9%)。NtFIS1A/1B 同 FIS1A 的相似性(一致性约为 71.2%,相似性约为 85.0%)要高于同 FIS1B 的相似性(一致性约为 60.0%,相似性约为 75.0%)。

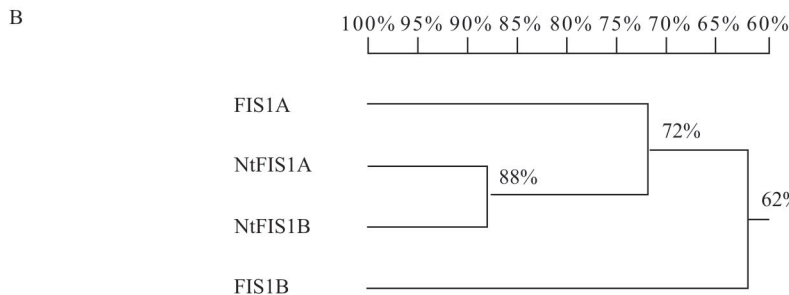
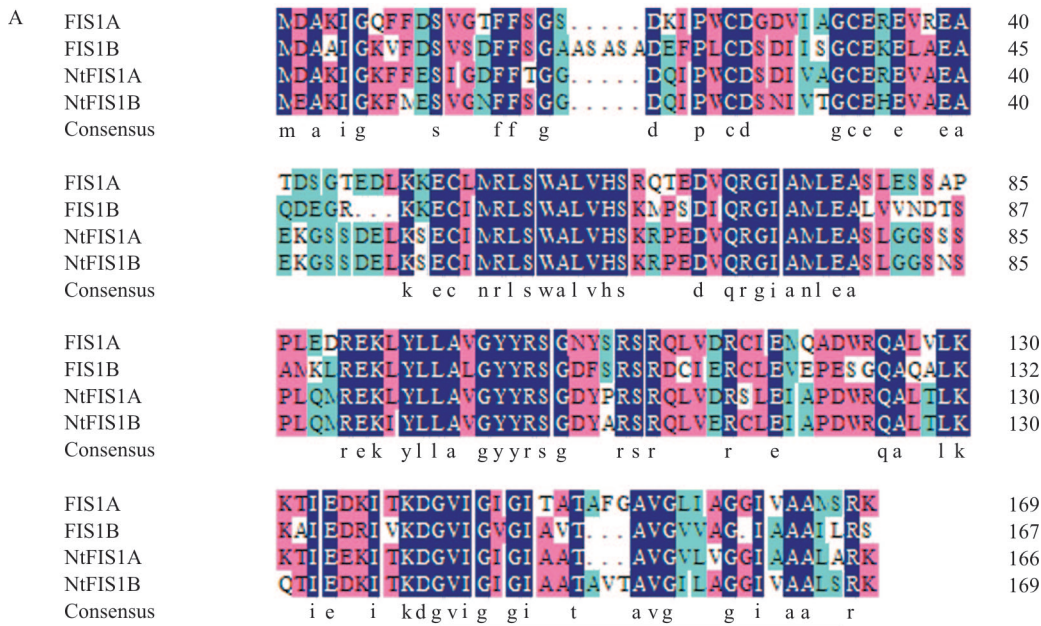


图 1 烟草 *NtFIS1A/NtFIS1B* 和拟南芥 *FIS1A/FIS1B* 的氨基酸序列比对(A)和它们的系统树(B)。下划线表示推定的跨膜结构域。

Fig. 1 Sequence alignment (A) of amino acids and homology tree (B) among *NtFIS1A/1B* in tobacco and *FIS1A/FIS1B* in *Arabidopsis*. The putative transmembrane domain (TMD) is underlined.

2.2 NtFIS1A/1B RNAi细胞系中线粒体的形态变化

为了分析 NtFIS1A/1B 的功能,我们构建了 *NtFIS1A/1B* 的 RNAi 载体 pTCK309-NtFIS1A/1B,并将其转化到标记线粒体的‘BY-2’细胞系 Mt-kaede 中。从抗性筛选平板上随机挑取 25 个阳性克隆,利用 PCR 扩增反应鉴定是否包含目的基因正反向

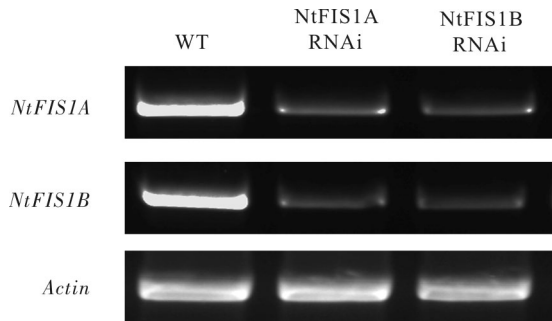


图 2 野生型(WT)、NtFIS1A 和 NtFIS1B RNAi 细胞系中 *NtFIS1A*、*NtFIS1B* 和 *Actin* 转录水平检测
Fig. 2 RT-PCR analysis of *NtFIS1A*, *NtFIS1B* and *Actin* transcriptions in wild-type (WT), NtFIS1A RNAi and NtFIS1B RNAi cell lines

重复序列。随后将 PCR 反应阳性的愈伤组织转移到液体培养基中培养。经荧光显微镜初步筛选,挑选细胞生理状态好,荧光信号强且具有普遍性的细胞系用于 RT-PCR 和线粒体形态观察。随后用 RT-PCR 的方法对 *NtFIS1A/1B* 在转录水平上进行半定量分析。从图 2 可见, NtFIS1A 和 NtFIS1B 的 RNAi 细胞系中, *NtFIS1A/1B* 的转录水平都显著下降。

随后,我们用激光共聚焦显微镜对 NtFIS1A 和 NtFIS1B RNAi 细胞系有丝分裂间期的‘BY-2’细胞中的线粒体形态进行了观察(图 3)。对单个线粒体的面积进行统计分析,结果表明 NtFIS1A RNAi 和 NtFIS1B RNAi 细胞中线粒体的平均面积分别为 $(0.760 \pm 0.163) \mu\text{m}^2$ ($n > 1000$)和 $(0.535 \pm 0.126) \mu\text{m}^2$ ($n > 1000$),均显著高于野生型细胞中线粒体的平均面积 $(0.346 \pm 0.053) \mu\text{m}^2$ ($n > 1000$, $P < 0.05$)。

2.3 AmiRNA1/8细胞系中线粒体的形态变化

利用人工 microRNA 干扰技术对 *NtFIS1A/1B*

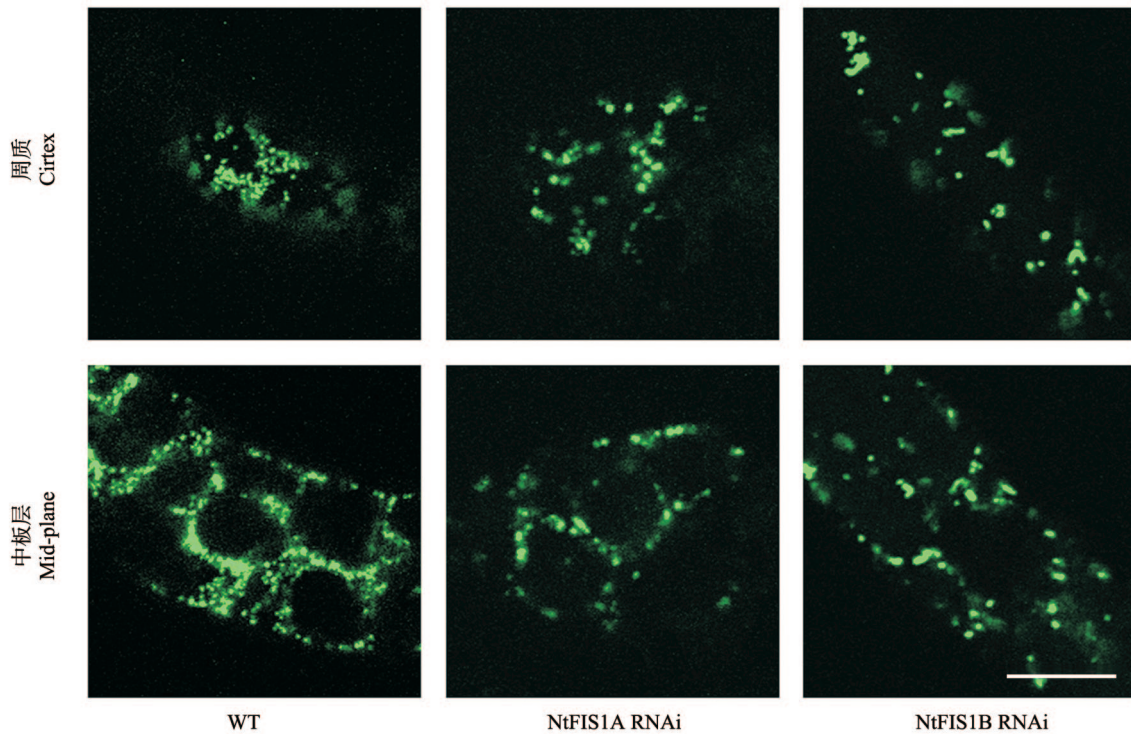


图 3 野生型(WT)、*NtFIS1A* 和 *NtFIS1B* RNAi 细胞系中同一细胞周质区域和中板区域的线粒体形态。通过在 BY-2 悬浮细胞中表达 Kaede 标记 δ -ATPase 的 N 端实现对线粒体的标记。绿色点状结构为线粒体。标尺为 20 μm 。
Fig. 3 Mitochondrial morphology at the cortex and mid-plane regions in wild-type, *NtFIS1A* RNAi and *NtFIS1B* RNAi cell lines. BY-2 suspension cells expressing mitochondrial localized N- δ -ATPase-Kaede (Mt-kaede) were imaged by fluorescence microscopy. Green dots correspond to punctate mitochondria. Scale bar = 20 μm .

的表达水平进行抑制,以分析 *NtFIS1A/1B* 的功能。将构建好的 *AmiRNA1/8* 载体经测序鉴定后,转化到表达 *Mt-kaede* 的‘BY-2’细胞系中。从抗性筛选平板上随机挑取 25 个愈伤组织,利用 PCR 扩增反应鉴定是否包含 *AmiRNA1/8* 的发夹结构。随后将 PCR 反应阳性的愈伤组织转移到液体培养基中培养。经荧光显微镜初步筛选,挑选细胞生理状态好,荧光信号强且具有普遍性的细胞系用于 RT-PCR 和线粒体形态观察。用 RT-PCR 的方法对 *AmiRNA1/8* 细胞系在转录水平上进行半定量分析(图 4)。结果表明, *AmiRNA1/8* 细胞系中, *NtFIS1A/1B* 的转录水平都大幅度下降。

随后,我们借助激光共聚焦显微镜对 *AmiRNA1* 和 *AmiRNA8* 细胞系有丝分裂间期的‘BY-2’细胞中线粒体的形态进行了观察(图 5)。在野生型细胞中,线粒体的平均面积约为 $(0.346 \pm 0.053) \mu\text{m}^2$ ($n > 1000$)。同野生型相比,基因抑制的细胞系中线粒体面积显著增大($P < 0.05$)。 *AmiRNA1* 细胞中线粒体的平均面积为 $(0.709 \pm 0.143) \mu\text{m}^2$ ($n > 1000$), *AmiRNA8* 细胞中线粒体的平均面积为 $(0.866 \pm 0.172) \mu\text{m}^2$ ($n > 1000$)。这表明

在 *NtFIS1A/1B* 转录水平下降的细胞系中,线粒体平均面积增加。

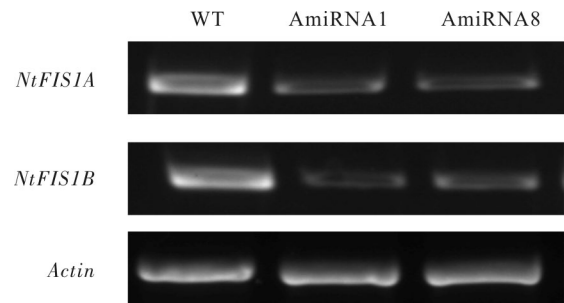


图 4 野生型(WT)、*AmiRNA1* 和 *AmiRNA8* 细胞系中 *NtFIS1A*、*NtFIS1B* 和 *Actin* 转录水平检测

Fig. 4 RT-PCR analysis of *NtFIS1A*, *NtFIS1B* and *Actin* transcriptions in wild-type (WT), *AmiRNA1* and *AmiRNA8* cell lines

3 结论和讨论

3.1 不同基因抑制方法的优缺点

我们对利用 RNAi 和人工 microRNA 干扰技术对 *NtFIS1A/1B* 进行基因沉默实验的优缺点进行了比较。首先,在 *NtFIS1A* 和 *NtFIS1B* 各自的基因

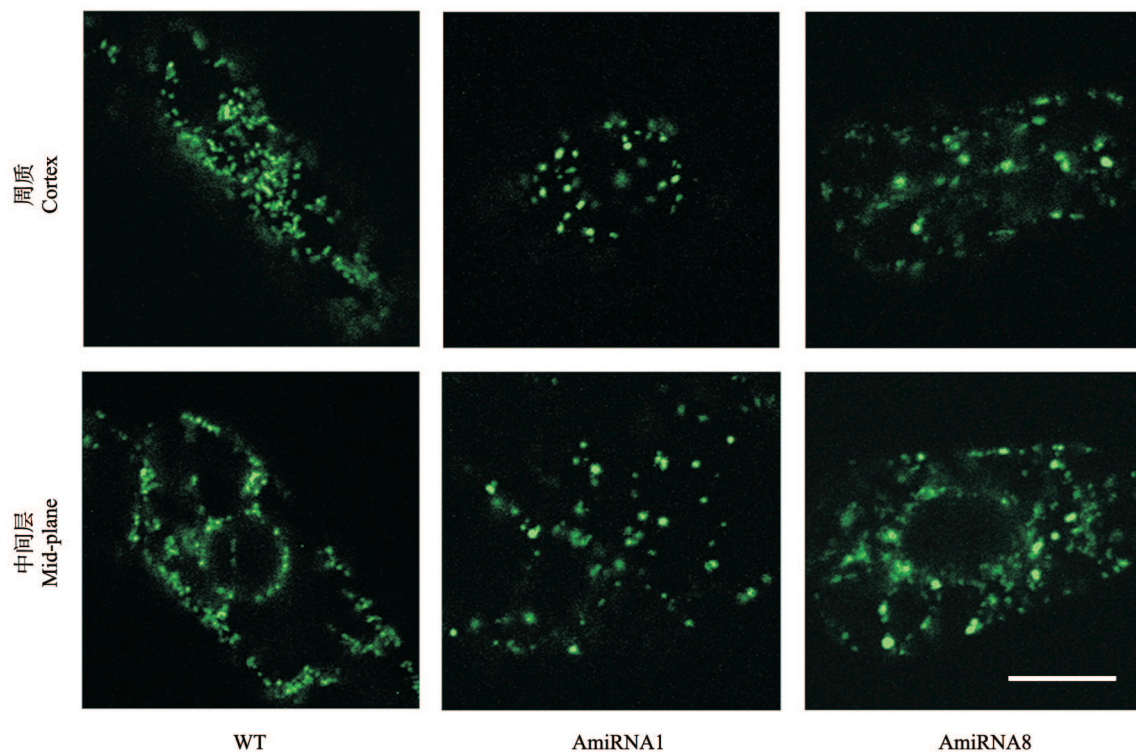


图 5 野生型(WT)、*AmiRNA1* 和 *AmiRNA8* 细胞系中的线粒体形态。标尺为 $20 \mu\text{m}$ 。

Fig. 5 Mitochondrial morphology in wild-type (WT), *AmiRNA1* and *AmiRNA8* cell lines. Scale bar = $20 \mu\text{m}$

沉默细胞系中,均检测到 *NtFIS1A* 和 *NtFIS1B* 的表达水平显著下调(未完全抑制)。而前人的研究中, *FIS1B* RNAi 细胞系中,仅 *FIS1B* 的转录水平几乎被完全抑制,而 *FIS1A* 的转录水平却未受影响^[15]。产生这种差异可能是由于 *FIS1A* 和 *FIS1B* 的核苷酸一致性仅为 58.90%,而 *NtFIS1A/1B* 的核苷酸一致性则高达 85.58%。其次,在 *NtFIS1A/1B* RNAi 细胞系中,我们还观察到线粒体在细胞核周围聚集的个别现象,初步推测是由于在 RNAi 干扰实验中利用全基因进行基因沉默时,在体内被切丁酶切割后形成的 dsRNA 会非特异地定位到其它靶基因上,导致非特异的基因沉默。AmiRNA 是一类由内源 miRNA 前体生成的长度为 21 个核苷酸的人工 microRNA 分子,它能在不影响其它基因表达的情况下特异地介导单个或多个靶基因高效稳定沉默。与普通的 RNAi 相比, AmiRNA 具有特异性高、稳定性强和沉默效应可预见等优点^[25-28]。因此,我们利用 AmiRNA 进行基因沉默时,没有观察到明显的非特异性表型,这与前人的研究报道一致。

3.2 *NtFIS1A/1B*参与烟草悬浮细胞线粒体的分裂

近年来,对拟南芥中线粒体分裂复合体的研究取得了很大进展。Logan 等^[14]首次报道在拟南芥中存在线粒体分裂蛋白 *fis1p* 和 *hFis1* 的同源蛋白,分别是 *BIGYIN* (At3g57090)和 *FIS1B* (At5g12390),其中, *BIGYIN* 的 T-DNA 插入突变体表现出线粒体面积增大的特征,推测是由于线粒体分裂受到抑制导致。我们的基因沉默和线粒体形态观察结果与 Logan 等的报道一致,当烟草悬浮细胞中的 *NtFIS1A/1B* 被抑制后,突变体也表现出线粒体面积增大的特征。我们推测 *NtFIS1A/1B* 作为线粒体分裂复合体的成员参与了线粒体分裂的调控。此外, *NtFIS1A* 和 *NtFIS1B* 的单突变体之间,以及它们的双突变体之间,没有表现出明显差别,同时突变体中线粒体的分裂并没有被完全抑制。我们推测 *NtFIS1A* 和 *NtFIS1B* 二者的功能冗余,同时可能还存在其它成员参与了烟草悬浮细胞中线粒体的分裂。

3.3 *NtFIS1A/1B*是否参与过氧化物酶体的分裂和复制还有待验证

Zhang 等^[15-16]对 *FIS1A* 和 *FIS1B* 的亚细胞定位以及 *FIS1A* 和 *FIS1B* 的单突变体和双突变体中

它们的功能进行了分析,认为除了参与线粒体分裂外,它们还参与了过氧化物酶体的分裂。对拟南芥悬浮细胞的研究表明,这两个成员中,仅有 *FIS1B* 参与了 G₂ 期过氧化物酶体复制中向过氧化物酶体膜表面的招募^[19]。本研究结果表明, *NtFIS1A/1B* 和拟南芥中的 *FIS1B* 在氨基酸水平上的相似性较低。*NtFIS1A/1B* 是否参与调控过氧化物酶体的分裂和复制,还有待进一步的研究。

综上所述,我们利用序列比对的方法从烟草悬浮细胞中克隆到线粒体分裂蛋白成员基因 *NtFIS1A/1B*。经基因沉默研究和线粒体形态观察, *NtFIS1A/1B* 参与了烟草悬浮细胞中线粒体的分裂。*NtFIS1A/1B* 是否也参与了过氧化物酶体的分裂和复制,还需要更加深入的研究。

致谢 本工作主要在中国科学院植物研究所植物分子生理重点实验室完成,期间得到了林金星研究员,胡玉熹研究员和实验室老师及同学的热情帮助,特此表示感谢。

参考文献

- [1] Han Y R. Molecular Cell Biology [M]. 2nd ed. Beijing: Science Press, 2001: 288-309.
韩怡仁. 分子细胞生物学 [M]. 第二版. 北京: 科学出版社, 2001: 288-309.
- [2] Logan D C. Mitochondrial fusion, division and positioning in plants [J]. Biochem Soc Trans, 2010, 38(3): 789-795.
- [3] Chan D C. Mitochondrial fusion and fission in mammals [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2006, 22(1): 79-99.
- [4] Hoppins S, Lackner L, Nunnari J. The machines that divide and fuse mitochondria [J]. Annu Rev Biochem, 2007, 76(1): 751-780.
- [5] Okamoto K, Shaw J M. Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes [J]. Annu Rev Genet, 2005, 39(1): 503-536.
- [6] Jiang C S, Xiao W M, Chen Q. Mitochondrial fission, fusion and apoptosis [J]. Acta Biophys Sin, 2007, 23(4): 256-264.
蒋春笋, 肖伟明, 陈隼. 线粒体分裂、融合与细胞凋亡 [J]. 生物物理学报, 2007, 23(4): 256-264.
- [7] Arimura S, Yamamoto J, Aida G P, et al. Frequent fusion and fission of plant mitochondria with unequal nucleoid distribution [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(20): 7805-7808.
- [8] Logan D C. Plant mitochondrial dynamics [J]. Biochim Biophys Acta, 2006, 1763(5/6): 430-441.
- [9] Arimura S, Tsutsumi N. A dynamin-like protein (ADL2b), rather than FtsZ, is involved in *Arabidopsis* mitochondrial division [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(8): 5727-5731.
- [10] Hong Z, Bednarek S Y, Blumwald E, et al. A unified nomenclature

- for *Arabidopsis* dynamin-related large GTPases based on homology and possible functions [J]. *Plant Mol Biol*, 2003, 53(3): 261–265.
- [11] Jin J B, Bae H, Kim S J, et al. The *Arabidopsis* dynamin-like proteins ADL1C and ADL1E play a critical role in mitochondrial morphogenesis [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(10): 2357–2369.
- [12] Logan D C, Scott I, Tobin A K. ADL2a, like ADL2b, is involved in the control of higher plant mitochondrial morphology [J]. *J Exp Bot*, 2004, 55(397): 783–785.
- [13] Arimura S, Fujimoto M, Doniwa Y, et al. *Arabidopsis* elongated mitochondrial is required for localization of dynamin-related protein3A to mitochondrial fission sites [J]. *Plant Cell*, 2008, 20(6): 1555–1566.
- [14] Scott I, Tobin A K, Logan D C. *BIGYIN*: An orthologue of human and yeast *FIS1* genes functions in the control of mitochondrial size and number in *Arabidopsis thaliana* [J]. *J Exp Bot*, 2006, 57(6): 1275–1280.
- [15] Zhang X C, Hu J P. Two small protein families, Dynamin-related protein3 and Fission1, are required for peroxisome fission in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2009, 57(1): 146–159.
- [16] Zhang X C, Hu J P. Fission1A and Fission1B proteins mediate the fission of peroxisomes and mitochondria in *Arabidopsis* [J]. *Mol Plant*, 2008, 1(6): 1036–1047.
- [17] Dohm J A, Lee S J, Hardwick J M, et al. Cytosolic domain of the human mitochondrial fission protein Fis1 adopts a TPR fold [J]. *Proteins*, 2004, 54(1): 153–156.
- [18] Suzuki M, Neutzner A, Tjandra N, et al. Novel structure of the N terminus in yeast Fis1 correlates with a specialized function in mitochondrial fission [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(22): 21444–21452.
- [19] Lingard M J, Gidda S K, Bingham S, et al. *Arabidopsis* Peroxin11c-e, Fission1B, and Dynamin-related protein3A cooperate in cell cycle-associated replication of peroxisomes [J]. *Plant Cell*, 2008, 20(6): 1567–1585.
- [20] Nagata T, Matsuoka K, Inzé D. Tobacco BY-2 Cells from Cellular Dynamics to Omics [M]. Berlin: Springer-Verlag, 2006: 225–240.
- [21] Hamada T, Igarashi H, Yao M, et al. Purification and characterization of plant dynamin from tobacco BY-2 cells [J]. *Plant Cell Physiol*, 2006, 47(8): 1175–1181.
- [22] Wang F, Liu P, Zhang Q, et al. Phosphorylation and ubiquitination of dynamin-related proteins (AtDRP3A/3B) synergically regulate mitochondrial proliferation during mitosis [J]. *Plant J*, 2012, 72(1): 43–56.
- [23] Lam S K, Siu C L, Hillmer S, et al. Rice SCAMP1 defines clathrin-coated, trans-golgi-located tubular-vesicular structures as an early endosome in tobacco BY-2 cells [J]. *Plant Cell*, 2007, 19(1): 296–319.
- [24] Zou L P, Sun X H, Zhang Z G, et al. Leaf rolling controlled by the homeodomain leucine zipper class IV gene *Roc5* in rice [J]. *Plant Physiol*, 2011, 156(3): 1589–1602.
- [25] Schwab R, Ossowski S, Riester M, et al. Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2006, 18(5): 1121–1133.
- [26] Ossowski S, Schwab R, Weigel D. Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs [J]. *Plant J*, 2008, 53(4): 674–690.
- [27] Chen Y, Peng X J, Guan J, et al. Gene targeting and its applications in plants [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 2012, 20(6): 642–648.
陈莹, 彭晓珏, 官杰, 等. 植物基因打靶技术及其应用 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2012, 20(6): 642–648.
- [28] Haney C H, Long S R. Plant flotillins are required for infection by nitrogen-fixing bacteria [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(1): 478–483.