

八肋游仆虫 γ -微管蛋白及其基因的研究*

梁 爱 华

(山西大学生物工程实验室, 太原 030006)

摘要 γ -微管蛋白是一种新发现的与微管形成有关的蛋白质^[1]。利用 PCR 技术从一种下毛类纤毛虫——八肋游仆虫大核 DNA 中扩增出 γ -微管蛋白基因并对其核苷酸序列进行了分析。用抗 γ -微管蛋白的多克隆抗体标记八肋游仆虫发现: γ -微管蛋白存在于八肋游仆虫的纤毛、棘毛的基部——即基体的部位。另外,在有些分裂间期及有丝分裂期的小核内以及部分大核内也发现有 γ -微管蛋白的存在。

关键词 纤毛虫,微管蛋白,聚合酶链反应

微管是真核细胞中细胞骨骼的主要组成部分,在细胞的有丝分裂、减数分裂、细胞间物质运输、信息传递、及细胞形状的维持等过程中起重要作用。微管来源于微管组成中心(MTOC: Microtubule organizing centre)。多数动物中,微管组成中心由一对中心粒和周围的不定形物质组成——二者构成中心体(Centrosome)。对真核生物中心体的成分已进行过大量的研究^[2-4],其中 γ -微管蛋白被认为是中心体的一个重要的组成成分。 γ -微管蛋白最初发现于曲霉(*Aspergillus*)中^[5],随后在哺乳动物、两栖动物、昆虫中也克隆了 γ -微管蛋白基因并对 γ -微管蛋白在这些动物细胞中的存在部位及可能的功能进行了研究探讨^[6-7],认为 γ -微管蛋白与微管的形成有关并确定微管的极性。

到目前为止,对纤毛虫微管组成中心的成分了解甚少。纤毛虫中存在有许多微管组成中心,如基体,但没有典型的中心粒和中心体。细胞分裂时纺锤体的微管由核液(Karyolymph)中的微管组成中心形成^[8-9]。利用曲霉的 γ -微管蛋白基因杂化八肋游仆虫 DNA 表明,在八肋游仆虫中也存在有 γ -微管蛋白基因^[10]。本研究的目的在于在弄清八肋游仆虫 γ -微管蛋白基因核苷酸序列的同时,研究其基因产物—— γ -微管蛋白在八肋游仆虫中存在的部位,以便进一步探讨 γ -微管蛋白的功能及纤毛虫中微管的形成机制。

1 材料和方法

1.1 细胞及培养条件 实验对象八肋游仆虫,以长绿梭藻(*Chlorogonium elongatum*)为食物。二者均培养于 SMC 培养液中(1.5mmol / L NaCl, 0.05mmol / L KCl, 0.4mmol / L CaCl₂, 0.05mmol / L MgCl₂, 0.05mmol / L MgSO₄, 2mmol / L NaH₂PO₄, 1.2mmol / L

* 国家自然科学基金资助项目(No 39570093)

1996-02-14收到

NH_4NO_3 , $4.6\mu\text{mol/L}$ FeCl_3 , $0.3\mu\text{mol/L}$ MnCl_2).

1.2 DNA 抽提及多聚酶链反应 八肋游仆虫 DNA 抽提根据 Godiska 等^[11]方法并加以改进。首先加 20ml NDS[50mmol/L Tris-Cl pH(8.0) / 0.5mol/L EDTA / 1% (w/v) SDS]并放置于 65℃ 48h 使细胞溶解,用苯酚/氯仿(1:1)抽提去除蛋白质,经透析后 DNA 用乙醇沉淀。

取 50ng DNA 为模板,分别加入缓冲液、人工合成的一对引物、dNTP、Tag 多聚酶,其最终体积用 ddH_2O 加至 100 μl 。PCR 循环 30 周期,每一循环为:94℃ 变性 1min,55℃ 退火 1min,72℃ 合成延长反应 2min。

将 PCR 扩增出的片段分别克隆到质粒载体 pGEM-T(Promega)中,用 Sanger^[12]终止法测其核苷酸序列。

1.3 抗体 本实验所用抗体由法国 Toulouse 大学 Michel Wright 教授提供。此抗体为针对 γ -微管蛋白一保守片段制得,具体制备方法见 Julian 等^[13]。

1.4 免疫荧光反应 取八肋游仆虫培养液 1ml(密度约 2000 细胞/ml),加等量含 1% 吐温 X-100 的 PHEM 缓冲液(60mmol/L Pipes, 2.5mmol/L Hepes, 10mmol/L EGTA, 2mmol/L MgCl_2),放置 5min,再加 2ml 含 4% 多聚甲醛(Paraformaldehyd)的 PHEM 缓冲液(多聚甲醛的最终浓度为 2%)。吸取八肋游仆虫放于事先用纯酒精处理过的盖玻片上(每盖玻片上 20 μl),置 37℃ 干燥 30min,使八肋游仆虫贴于盖玻片上。用 TBST 溶液[10mmol/L Tris-Cl(pH 7.4),0.15mol/L NaCl,0.01% Tween 20, 10mmol/L EGTA, 2mmol/L MgCl_2]冲洗多次后,加 20 μl 抗 γ -微管蛋白抗体,28℃ 放置 60min。用 TBST 溶液冲洗之后加 20 μl FITC-小鼠抗兔 IgG(1:200),28℃ 放置 60min。用 TBST 溶液冲洗多次后,用 Citifluor 封片液封片。最后,在荧光显微镜下观察结果。

2 结果与讨论

2.1 八肋游仆虫中的 γ -微管蛋白基因

利用 PCR 从八肋游仆虫 DNA 中扩增出 5 个互相衔接的 γ -微管蛋白基因片段。由这些片段的叠加得出八肋游仆虫大核 DNA 的 γ -微管蛋白基因的全长区域。序列分析结果表明,此八肋游仆虫的 γ -微管蛋白由 461 个氨基酸组成。与在曲霉中发现的 γ -微管蛋白具有 61% 的一致性。在开放读框(Open Reading Frame)中有两个内含子,其大小分别为 26 个碱基对(bp)和 36 个碱基对(bp)。在氨基酸序列的 321 至 336 位上,其序列为 NVIQGDVDPTQVHKSL,与制备 γ -微管蛋白抗体时所用的人工合成的多肽(NIIQGEADPTDVHKSL)仅有 4 个氨基酸不同。另一方面,在这一区域的 α 和 β -微管蛋白^[14]与 γ -微管蛋白相比有较大的差异性(图 1)。因此,选择这一抗体来研究 γ -微管蛋白在八肋游仆虫中的定位减少了与 α -和 β -微管蛋白出现交叉反应的可能,以保证了实验结果的准确性。

2.2 γ -微管蛋白在八肋游仆虫中的定位

用 γ -微管蛋白抗体标记后,荧光显微镜观察结果表明八肋游仆虫中有三种结构被 γ -微管蛋白抗体所标记:所有基体(Basal bodies)、小核内及大核内。

图版 IA 示八肋游仆虫之背面。被标记的有背触毛列(DK: dorsal kinetics)的基体和

位于身体左前方的部分口围带 (AZM: adoral zone of membranelles) 的基体。口围带和小核因不在聚焦面上而显得模糊。

图版 IB 示同一八肋游仆虫的腹面。被标记的有口侧膜 (PM: paroral membranelles) 与 18 个棘毛基部的基体 [9 个腹额棘毛 (FVC: frontoverse cirri); 5 个横棘毛 (TC: transverse cirri); 以及 4 个尾棘毛 (CC: caudal cirri)]。在左前方较亮的一点为标记了的小核 (Mi: micronuclei)。

图版 IC 示一个高倍放大的小核,核处于细胞分裂间期。核内物质标记均匀,呈点状。在其它细胞的小核内也同样发现约有 7—10 个被标记了的亮点。细胞左侧的口围带的基体恰巧位于聚焦面上。在一些大核中也有类似于在小核内观察到的点状标记物 (未附图片)。

在对照实验中,八肋游仆虫用多聚甲醛固定,经冲洗后用 TBST 取代抗 γ -微管蛋白抗体 28℃ 放置 60min,以后同步步骤 1.4。观察结果表明,在基体及核内没有标记。在另一组对照实验中,即用人工合成的用以制备抗体的短肽先与抗体混合放置于 28℃ 60min,然后再按方法 1.4 去标记八肋游仆虫。结果是在基体及核内没有标记。以上结果表明,在基体、小核、大核内观察到标记为 γ -微管蛋白的特异性标记。

此研究结果表明,在八肋游仆虫中虽然没有中心体,但仍有 γ -微管蛋白的存在。 γ -微管蛋白在八肋游仆虫中存在于所有基体中:背部纤毛 (Dorsal cilia) 的基体,棘毛 (Cirri) 的基体以及微膜 (Membranelles) 的基体,另外还存在于大小细胞核内的核液中。我们推测, γ -微管蛋白是纤毛虫中几乎所有的微管组成中心的组成成分。是这类动物中在大量的微管网络的形成过程中所必需的成分。关于在减数分裂过程中 γ -微管蛋白在八肋游仆虫大小核内的数量和位置的变化及 γ -微管蛋白在微管形成中的作用正在研究中。

参 考 文 献

[1] Oakley, B. R. γ -tubulin: the microtubule organizer? *Trends Cell Biol.* 1992, **2**: 1—5
[2] Kalt, A. and Schliwa, M. Molecular components of the centrosome. *Trends Cell Biol.* 1993, **3**: 118—128
[3] Kimble, M and Kuriyama, R. Functional components of microtubule-organizing centres. *Int. Rev. Cytol.* 1993, **136**: 1—50
[4] Stearns and Kirschner. In vitro reconstitution of centrosome assembly and function: the central role of γ -tubulin. *Cell* 1994, **76**: 623—627
[5] Oakley, C. E. and Oakley, B. R. Identification of γ -tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by mipA gene of *Aspergillus nidulans*. *Nature* 1989, **338**: 662—664
[6] Debec, A. et al., Polar organization of gamma-tubulin inacentriolar mitotic spindles of *Drosophila melanogaster* cells. *J. Cell Sci.* 1995, **108**: 2645—2653
[7] Felix, M.A. et al. Centrosome assembly in vitro: role of gamma-tubulin recruitment in *Xenopus* sperm

321	336
NIIQGEADPTDVHKSL	用于制备抗体的短肽
* *** *** *****	
NVIQGDVDPTQVHKSL	γ -tubulin of <i>Euplotes</i>
GDVVPKDVNAAVATIK	α -tubulin of <i>Euplotes</i>
MSTKEVDEQMLNVQNK	β -tubulin of <i>Euplotes</i>

图 1 用于制备抗体的短肽序列与八肋游仆虫 γ -微管蛋白第 321 至 336 个氨基酸序列的比较,及与八肋游仆虫中 α -和 β -微管蛋白中相应部位的比较。
Fig.1 Comperison between the sequence of a synthetic oligopeptide, against which the antibody was produced, and the corresponding regions of γ -, α - and β -tubulin of *E. octocarinatus*.

- aster formation. *J. Cell Biol.* 1994, **124**: 19—31
- [8] Suganuma, Z. Electron microscope studies on the mitosis of binary fission of micronucleus of the ciliate, *Urostyla*. *J. Nara Med. Assoc.* 1969, **20**: 323—335
- [9] Walker, G. K. The fine structure of micronuclear division in the hypotrich ciliate *Gastrosyla steinii*. *Protistologica*, 1976, **12**: 271—278
- [10] Liang, A. and Heckmann, K. γ -Tubulin occurs in ciliated Protozoa. *J. Cell. Biol.* 1993, **37**: 100
- [11] Godiska, R. et al. Transformation of *Paramecium* by microinjection of a cloned serotype gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1987, **84**: 7590—7594
- [12] Sanger, F., Nicklenm S. and Coulson, A. R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977, **74**: 5463—5467
- [13] Juliann, M. et al. γ -Tubulin participates in the formation of the midbody during cytokinesis in mammalian cells. *J. Cell Sci.* 1993, **105**: 145—156
- [14] Liang, A. Schmidt, J. H. and Heckmann, K. The alpha- and beta-tubulin genes of *Euplotes octocarinatus*. *J. Euk. Microbiol.* 1994, **4**: 163—169

STUDIES ON THE γ -TUBULIN AND THE γ -TUBULIN GENE IN *EUPLOTES OCTOCARINATUS*

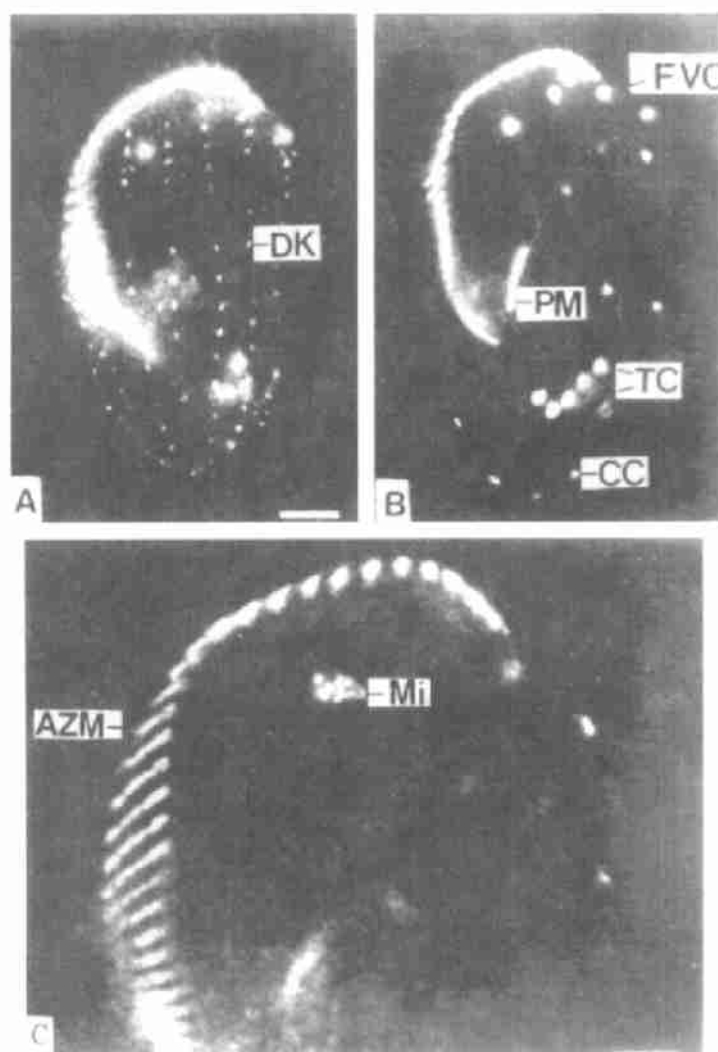
Liang Aihua

(Laboratory of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan, 030006)

Abstract γ -tubulin is a newly discovered protein, which is considered to be essential for microtubule nucleation. With the help of the polymerase chain reaction (PCR) we amplified and sequenced the γ -tubulin gene of *Euplotes octocarinatus*, a hypotrichous ciliate. Polyclonal antibody to localize this protein in *E. octocarinatus* and found, that γ -tubulin is present in the basal bodies of dorsal cilia, the basal bodies of cirri and the basal bodies of membranelles. In addition, it was found in the micronucleus and in the macronucleus.

Key words Ciliate, Tubulin, PCR

图版 I



A. 背面; B. 同一细胞的腹面; 详见正文。标尺代表 $10\mu\text{m}$; C. 放大的八肋游仆虫的前半部; 小核内有 7 个被标记了的亮点; 位于左侧的口围带的基体也被 γ -微管蛋白标记。标尺代表 $5\mu\text{m}$;

A. Dorsal face; B. Ventral face of the same cell; bar: $10\mu\text{m}$; C. Highly enlarged frontal part of an interphase cell of *E. octocarinatus* focused on the micronucleus. In the micronucleus 7 bright shining spots can be seen. The basis of some of the membranelles that from the AZM come in focus on the left side of the cell. Scale bar: $5\mu\text{m}$.