

小眼虫的核骨架研究

文 建 凡

(中国科学院昆明动物研究所细胞与分子进化开放实验室, 昆明 650223)

摘要: 小眼虫细胞经轻度超声处理、选择性抽提后, 利用 DGD 包埋—去包埋剂电镜技术及 Western blot 分析技术对其核骨架、核纤层进行了研究。结果显示: 细胞核内存在一个不被 DNase 所降解和热三氯醋酸所去除的纤维蛋白性网架结构; 核的周围有一层明显的核纤层结构; Western blot 分析表明其核纤层有两种阳性蛋白成分, 一为相当于高等真核细胞核纤层蛋白 lamin B 的强阳性成分, 另一为相当于 lamin A 的弱阳性成分, 但无相当于 lamin C 的成分。本文认为小眼虫这种低等的单细胞真核生物已具有了核骨架、核纤层结构, 其核纤层的蛋白组成应该代表了核纤层进化历程中早期的一个阶段。

关键词: 小眼虫; 核骨架; 核纤层; 进化

中图分类号: 959.112*5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2001)06-0551-07

不同组织细胞的细胞核经过抽提去除可溶性内含物、核膜和染色质等之后都会剩下一个相似的纤维网架结构即核骨架结构, 此结构由核内纤维网架、核膜残存结构(即核孔复合体与核纤层结构)以及核仁残存结构(即核仁骨架)三部分组成。大量研究结果表明核骨架不仅对维持细胞核的形态结构起着重要作用, 而且参与了核内染色质 DNA 的组织和 DNA 复制、基因表达及调控等一系列核内重要的功能活动^[1,2]。但迄今有关核骨架的研究多是在高等生物(尤其是哺乳动物)细胞上进行的, 而在低等真核细胞上的研究为数甚少。然而对低等真核细胞核骨架的研究不仅利于更全面地认识此结构, 且对于探讨核骨架的起源进化乃至真核细胞的起源进化都具有十分重要的意义。

眼虫类或裸藻类是一类较为低等的单细胞真核生物。它们细胞核的一个显著特点就是其染色质在整个细胞周期都呈致密的染色体状态, 即使在间期也只有局部有限的解螺旋化; 另外, 细胞分裂方式为核内有丝分裂, 即分裂过程中核膜始终不崩解而保持完整, 在核内形成纺锤体。这些特点都有别于典型的真核细胞。18S rRNA 分子进化树显示这类生物在真核生物中分支很早是较为低等的真核生物^[3]。那么此类生物是否具有核骨架? 具有什么样的核骨架? 其核骨架又是如何参与它们这种较特殊染色质的组织和功能活动的呢? 迄今还未有这方面的研究报道。

收稿日期: 1999-06-11; 修订日期: 2001-04-20

基金项目: 国家自然科学基金资助(30070362); 云南省中青年学术和技术带头人培养经费资助

作者简介: 文建凡(1965—), 男, 湖南省攸县人; 主要从事真核细胞结构、功能和基因及其起源进化研究

1 材料和方法

1.1 材料 小眼虫 (*Euglena gracilis* Klebs) 虫种由北京大学陈阅增教授惠赠, 于 20—25℃ 自然光照下无菌培养。培养基为: 100mL 蒸馏水中含蛋白胨 0.6g, 胰蛋白胨 0.1g, 牛肉膏 0.1g, 酵母粉 0.5g, NaAc 0.1g, CaCl₂ 10.001g, pH6.8—7.0。

1.2 细胞的分级抽提 小眼虫细胞由于具致密的表膜不易直接进行抽提, 故先将离心收集的细胞悬浮于不含 Triton X-100 的 CSK 液 (100mmol/L NaCl, 300mmol/L sucrose, 3mmol/L MgCl₂, 1.2mmol/L PMSF, 1mmol/L EGTA, 10 mmol/L pipes pH 6.8), 冰浴下进行轻度超声处理 (美国 Branson Sonic Power 公司产 Sonifer Cell Disruptor, 输出控制为 2.5, 时间 2min)。将超声处理后的细胞进行分级抽提^[4], 简述步骤如下: (1) 向上述的细胞 CSK 悬浮液中加入 Triton X-100 至终浓度为 0.5% (V/V), 于冰浴处理 6min 以除去膜系统并抽去可溶性蛋白。(2) 于 RSB-Magik 液中冰浴处理 10min, 除去细胞质中的微管、微丝及其他胞质结构。(3) 用不含 DNase 1 的消化液 (即只含 50mmol/L NaCl 的 CSK 液) 离心洗涤一次, 然后悬浮于含 DNase 1 (200u/mL) 的消化液中 20℃ 处理 30min, 在最后加硫酸铵溶液至其终浓度为 0.25mmol/L, 继续处理 5min。经此步处理后核内的染色质即 DNA 和组蛋白被去除。离心收集沉淀。一般地, 此时细胞质内主要剩下中间纤维, 细胞核内剩下核骨架、核纤层结构。

1.3 热三氯醋酸处理实验 未经抽提或经抽提但未经 DNase 处理的材料, 用 5% (W/V) 三氯醋酸 95℃ 处理 15min 以除去其核酸^[5], 使得细胞核内主要只剩下纤维蛋白性的核骨架和核纤层结构。

1.4 DGD 包埋—去包埋剂电镜技术 参考 Fey 等的方法^[6], 材料用 2.5% 戊二醛固定 30min, 再经 1% OsO₄ 固定 10min, 经乙醇系列脱水, 然后转移至正丁醇, 用 DGD (Diethylene glycol distearate, Polyscience 公司产品) 包埋, 超薄切片厚度一般为 80—120nm, 切片经正丁醇溶去包埋剂, 然后浸入乙醇, 经醋酸异戊酯置换后 CO₂ 临界点干燥, 不经染色, 直接于 H-300 电镜下观察。

1.5 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及 Western blot 分析 制得 8—16% Acr 的线性梯度分离胶, 参照 Laemmli 的方法^[7] 进行 SDS-PAGE。电泳后一部分胶经考马氏亮蓝 R₂₅₀ 染色, 另一部分胶进行如下的核纤层蛋白 (Lamin) 的 Western blot 分析。参照 Towbin 等的方法^[8], 但转移采用快速的半干法 (利用美国 W.E.P. 公司产的 Semi-Dry Blotting Apparatus, 电流强度为 4mA/cm², 时间为 2h)。一抗为兔抗大鼠肝细胞核纤层三种成分 lamin A (70kD), lamin B (67kD) 和 lamin C (60kD) 的多抗血清 (由北京大学翟中和教授惠赠), 二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (华美公司产品), 二氨基联苯胺显色。

2 结果

2.1 小眼虫核骨架的形态结构

不经任何抽提的小眼虫细胞, 用常规树脂包埋、切片, 电镜下可观察到致密完整的细胞核 (图版 I: 1)。核内有一致密的核仁, 尤其可看到不同于典型真核生物的特点, 即间期细胞核内存在许多致密的染色体, 染色体之间较致密, 难以看清结构。但用 DGD 包埋—

去包埋剂电镜技术观察(图版 I :2),除同样可看到上述结构外,还可看到核内染色体之间的一些十分致密的细微纤维状结构。

细胞依次经过 CSK 液,RSB - Magik 液抽提后,细胞的质膜和内膜系统均被除去,细胞内大量的可溶性物质流失,微管微丝也被去除,DGD 包埋一去包埋剂电镜技术观察可以看到细胞比抽提前(图版 I :2)空疏得多(图版 I :3):在细胞质内主要只剩下中间纤维和一些细胞器(如叶绿体)的残存结构,细胞核周围存在一层明显的核纤层结构,核内也较疏松,但由于还未除去染色质(DNA 和组蛋白),染色体仍然十分致密,在染色体之间存在有许多纤维结构。在此基础上进一步经 DNase 和硫酸铵处理将染色质(DNA 和组蛋白)去除后,(图版 I :4),核内原来致密的染色体变得疏松、外形轮廓不如以前完整,它们只是些染色体的残存结构,此应该是残存下的非组蛋白性质的染色体骨架(Chromosomal scaffold);在这些染色体骨架结构之间有较多的纤维网架结构,此应是非染色质丝性质的核内骨架纤维,它们布满核内形成网络并伸入到染色体骨架从而二者在核内形成一个整体,这种情形只有在象眼虫这样的在间期也有致密染色体的情况下方可观察到,有别于一般的真核细胞。此外,核内的网架纤维通过核纤层与细胞质内的中间纤维相联系,形成一个贯穿细胞内的整体骨架系统。这与一般真核细胞的情形相一致。在有些切片中还可观察到核内核仁结构的残余。

热三氯醋酸处理能将核内的核酸除去。不经抽提的细胞直接经此处理(图版 I :5),核内由于核酸被除去而变得较处理前疏松些,但由于大量的可溶性蛋白未被抽去,在电镜制样中被固定下来,因此整个核内仍显得较为致密。当细胞先依次经 CSK 液,RSB - Magik 液抽提后,再经热三氯醋酸除去核酸(图版 I :6),细胞核内则比前者空疏得多,原来致密的染色体也疏松得多,但染色体之间的纤维网架仍然存在,核仁也留下有残存的结构,核周围也可观察到核纤层结构的存在。这和先经抽提再经 DNase 和硫酸铵处理的结果十分相似。只是由于热三氯醋酸处理较为剧烈,因而所显示的核内网架结构不如前者的规整。

2.2 小眼虫核纤层成分的 Western blot 分析结果

小眼虫全细胞样经电泳后显示出非常复杂的蛋白条带(图 1 左部分的 Eu),经分级抽提制成骨架系统后其电泳蛋白条带要少得多(图 1 左部分的 Enm)。Western blot 分析表

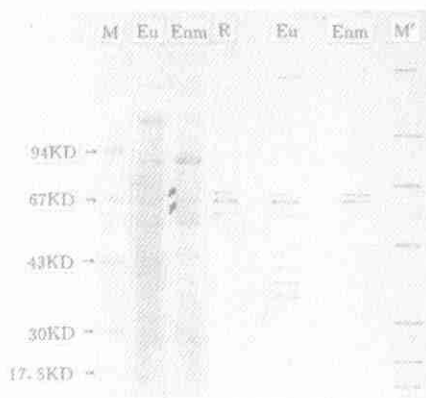


图 1 小眼虫核纤层成分的 Western blot 图谱:显示一条 67KD 的主要阳性带和一条 70KD 的次要带(右半图所示)。此两带在相应的电泳图谱(左半图)中有相应的电泳带(箭头所示)。Eu,小眼虫全细胞;Enm,制备的小眼虫骨架系统;R,大鼠肝全细胞;M,标准分子量;M',显示转移效果的标记。一抗为抗大鼠肝细胞核纤层三蛋白成分(lamin A 70KD,lamin B 67KD,lamin C 60KD)的多抗血清

Fig.1 SDS - PAGE Patterns (left part) and Western blot patterns (right part) of lamin(s) of *E. gracilis* cells, indicating the nuclear lamina of *E. Gracilis* has a major 67KD positive fraction and a minor 70KD positive fraction. Eu, whole cell of *E. gracilis*; Enm, *E. gracilis* cells after sequential extractions; R, whole cell of rat liver; M, molecular weight markers; M', markers for protein transfer. Primary antibody was rabbit polyclonal antiserum against three lamins of rat liver

明:作为对照的大鼠肝全细胞样显示出核纤层三成分的阳性带即 70kD 的 lamin A, 67kD 的 lamin B 和 60kD lamin C(图 1 中的 R), 但小眼虫不论是全细胞还是经抽提后的结构都只显示出—条分子量为 67kD 的强阳性带和—条稍弱的 70kD 的阳性带(图 1 右部分的 Eu 和 Enm), 在经抽提细胞的蛋白电泳图谱中也恰恰有此两分子量的电泳条带(图 1 中箭头所示)。此外, 小眼虫全细胞样中还显示出另外几条很弱的阳性带, 但它们远离核纤层蛋白成分的分子量区, 在经抽提细胞的蛋白电泳图谱中又无对应电泳带, 因而它们可能是与核纤层蛋白有相近抗原决定簇的其他蛋白。

此结果说明小眼虫细胞的核纤层主要由相当于高等真核细胞 lamin B 的成分和少量相当于 lamin A 的成分组成。但不具相当于 lamin C 的成分。

3 讨 论

3.1 小眼虫的核骨架及核骨架的起源进化问题

目前制备核骨架的最常用方法是“选择性分级抽提”^[6]。眼虫类存在坚韧的表膜(Pellicle), 难以直接抽提。本研究中将细胞事先进行轻度超声处理再行分级抽提很好地解决了这一问题。DGD 包埋—去包埋剂电镜技术较之常规树脂包埋电镜技术对研究像核骨架这样的精细结构有其独到的优越性^[6]。利用这些技术方法, 本研究在小眼虫的细胞核内显示出了一个纤维网架结构, 此结构不被 CSK 液、RSB—Magik 液所抽提, 也不被 DNase 1 降解和热三氯醋酸所去除, 说明此结构是一个非 DNA 性质的纤维蛋白性结构。这与高等真核细胞的核骨架十分一致; 另外在小眼虫细胞核的周围也存在一层明显的核纤层结构, 并且核内的骨架纤维通过核纤层与细胞质中的中间纤维相联系形成一个统一的结构体系, 这也都与高等真核细胞的观察结果^[6]相一致。但由于小眼虫间期也存在染色体结构, 在显示其核骨架的同时也观察到了其染色体骨架, 且核骨架的纤维是伸入到染色体骨架中从而在核内形成一个整体结构的。在这里核骨架和染色体骨架看来是一个整体。Berezney 曾认为“中期每个染色体的骨架结构可能代表间期核骨架的一个亚单位”^[9]。Razin 和 Gromova 则提出: 间期染色质和分裂期染色体之间的转化可能就是通过核内骨架系统的组织作用(如折叠和去折叠等)^[10]。根据这些观点来看, 核骨架和染色体骨架应该是同一结构在不同细胞周期的表现形式。但这只是个推测而已, 一直未有直接的实验证据。但本研究中, 由于小眼虫在间期也存在染色体, 因而本结果同时显示了核骨架和染色体骨架, 并直接观察到了这二者是一个统一的结构。这就从实验上证实了上述推测。因此至少在眼虫类生物上, 核骨架和染色体骨架是作为一个整体对染色质进行组织的。虽然前人的一些低等生物核骨架的研究未涉及进化, 但这些研究结果则让我们知道了像粘菌类、真菌类和纤毛虫类等低等单细胞真核生物都已具有了核骨架、核纤层结构^[11]。本研究在眼虫这样一类特殊的低等单细胞真核生物上又证明了核骨架、核纤层结构已经存在。

近来在另两类具重要进化地位的生物类群—涡鞭毛虫类和源真核生物类上也证明了核骨架、核纤层结构的存在^[4,5,12,13]。其中的涡鞭毛虫类曾一度被认为是原核细胞向真核细胞进化的过渡类群, 但进一步的研究表明尽管它们具有特殊的进化地位, 但并非以前所认为的那样为重要的过渡类群^[14]。源真核生物是目前已知的现存最原始的真核生物, 对

其核骨架的研究无疑对了解核骨架的起源进化具有重要价值。

因此,可以说迄今所研究过的低等单细胞真核生物(包括最原始的真核生物)都表明已经具有了核骨架、核纤层结构。这一事实提示核骨架、核纤层无疑是在原核细胞进化成真核细胞这一过程的极早时期就已起源形成。它们的起源应该是原核进化成真核的重要前提条件。

3.2 小眼虫的核纤层及核纤层蛋白(基因)家族的起源分化问题

现已知组成核纤层的蛋白成分(称为 lamin)有 A - 型和 B - 型,A - 型包括有 lamin A 和在其基础上由于转录后加工截短而成的 lamin C,B - 型至少有三种亚型 lamin B1、B2 和 B3;A - 型和 B - 型所有这些亚型之间彼此都是十分相似、具很高同源性的,在进化地位不同的物种间也是非常保守的,它们是来源于一个共同祖先的蛋白家族。更有趣的是在细胞发育分化过程中,核纤层蛋白的表达存在这样一个次序:在早期发育阶段 A - 型不表达,只有 B - 型的表达,当细胞出现分化时 A - 型才表达,而 B 型在整个发育分化过程中都持续表达^[15,16]。

最原始真核细胞—源真核生物上的研究结果表明其核纤层只有一种相当于 B 型的 lamin B 的成分。这相当于高等真核细胞发育分化早期时的情形^[4]。

本结果表明小眼虫的核纤层主要由相当于高等真核细胞的 B 型的 lamin B 成分和少量相当于 A 型的 lamin A 成分构成。但不具有相当于 A 型的 lamin C 成分。这一情形看来是介于高等真核细胞和原始的源真核生物之间。

作者曾根据源真核生物上的研究结果和上述发育生物学的资料认为:核纤层成分的分化过程是首先 B 型成分(基因)形成,在此基础上再分化出 A 型成分(基因)^[4]。现在看来,在 A 型中首先是 lamin A(基因)的分化形成,在此基础上再进化出“在 lamin A 基础上经转录后加工形成 lamin C”的机制,于是形成了现存高等真核细胞核纤层的情形,即同时具有 lamin A、lamin B 和 lamin C 三种成分。因此,眼虫类核纤层成分的情形可能代表了核纤层成分起源分化历史中的一个阶段。

参考文献:

- [1] Verheijen R. van Venrooij W, Ramaekers F. The nuclear matrix: structure and composition [J]. *J Cell Sci*, 1988, **90**: 11—36
- [2] 文建凡. 核骨架—细胞核内的重要结构体系 [J]. *动物学研究*, 1998, **19**(4): 382—385
- [3] Cavalier-Smith T. Membrane heredity, symbiogenesis, and the multiple origins of algae. In *Biodiversity and evolution* (ed. R. Arai, M. Kato, and Y. Doi), The national science museum foundation, Tokyo. 1995. 69—107
- [4] 文建凡, 李靖炎. 最原始的真核生物—源真核生物(Archaezoa)的核骨架研究 [J]. *中国科学(C 辑)*, 1998, **28**(5): 423—430
- [5] 文建凡, 吴传芬, 李靖炎. 特殊涡鞭毛虫—尖尾藻的核骨架 [J]. *动物学研究*, 1992, **13**(1): 89—94
- [6] Fey E G, Krochmalnic G, Penman S. The nonchromatin substructures of the nucleus: the ribonucleoprotein (RNP)-containing and RNP-depleted matrices analyzed by sequential fractionation and resinless section electron microscopy. [J]. *J Cell Biol*, 1986, **102**: 1654—1665
- [7] Laemmli U K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T 4 [J]. *Nature*, 1975, **226**: 680—685
- [8] Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some application [J]. *Proc Natl Sci. USA*, 1979, **76**: 4350—4354

- [9] Berezney R. Organization and functions of the nuclear matrix. in: *Chromosomal Nonhistone Proteins-Structural Associations*, Vol. IV. Hnilica, L.S. CRC Press, Inc. Boca Raton. 1984, 4:119—180
- [10] Razin S V, Gromova II. The channels model of nuclear matrix structure[J]. *BioEssays*, 1995, 17:443—450
- [11] 文建凡. 从低等单细胞真核生物的核骨架看核骨架的起源进化[J]. 大自然探索, 1996, 15(2):59—64
- [12] 蔡树涛, 翟中和, 曾从梅, 等. 寇氏隐甲藻细胞核骨架与中间纤维的研究[J]. 实验生物报, 1991, 24:33—38
- [13] 方志林, 吴传芬, 李靖炎. 前环藻细胞核骨架及其真实性的研究[J]. 动物学研究, 1993, 14(1):80—85
- [14] 文建凡. 涡鞭毛虫类的染色质碱性蛋白研究及其进化地位的重新认识[J]. 科学通报, 1998, 43(16):1523—1535
- [15] Lehner C F, Stick R, Eppenberger H M, et al. Differential expression of nuclear lamin proteins during chicken development[J]. *J Cell Biol*, 1987, 105:577—587
- [16] Steward C, Burke B. Teratocarcinoma stem cells and early mouse embryos contain only a single major lamin polypeptide closely resembling lamin B[J]. *Cell*, 1987, 51:383—392

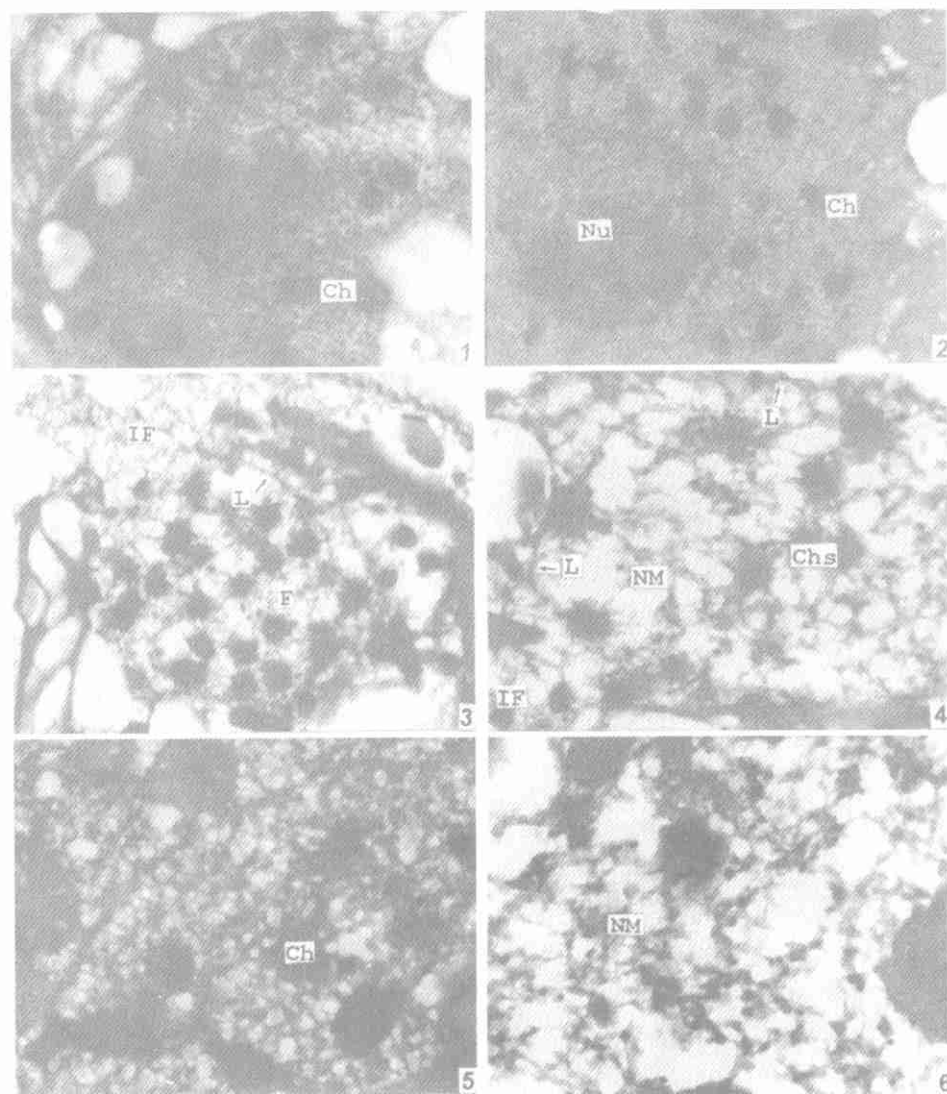
NUCLEAR MATRIX AND NUCLEAR LAMINA OF *EUGLENA GRACILIS*

WEN Jian-fan

(Laboratory of Cellular and Molecular Evolution, Kunming Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, Kunming, Yunnan 650223, China)

Abstract: Lightly sonicated *E. gracilis* cells were extracted sequentially, and then their nuclear matrix and nuclear lamina were investigated by DGD embedment-free electron microscopy and Western blot analysis. The results showed that in the nucleus there were a fibrous network and a layer of lamina beneath the nuclear membrane, both of which could not be removed by DNase and hot trichloroacetic acid. Western blot analysis (with polyclonal antiserum against three lamins of rat liver) showed that its nuclear lamina possessed a major and a minor positive polypeptides, which were similar to mammalian lamin B and lamin A respectively. It was suggested that the lower unicellular eukaryote *E. gracilis* already had nuclear matrix and nuclear lamina, its lamina polypeptide (lamin) should reflect a historical stage of nuclear lamina evolution.

Key words: *Euglenoa gracilis*; Nuclear matrix; Nuclear lamina; Evolution



图版 I

1. 常规电镜照片。Ch, 致密染色体 $\times 12,000$; 2. DGD 包埋—去包埋剂电镜照片。除染色体(Ch)外, 还可见染色体之间十分致密的网络结构。Nu, 为核仁 $\times 13,000$; 3. 细胞先经超声处理, 再依次经 CSK 液、RSB-Magik 液抽提的 DGD 包埋—去包埋剂电镜照片。IF, 中间纤维; F, 网架纤维; L, 核纤层 $\times 12,000$; 4. 在图版之 3 的基础上再经 DNase 1 和硫酸铵处理后的 DGD 包埋—去包埋剂电镜照片。Chs, 可能的染色体骨架; NM, 核骨架纤维体骨架; L, 核纤层; IF, 中间纤维 $\times 30,000$; 5. 细胞直接经热三氯醋酸处理后的 DGD 包埋—去包埋剂电镜照片。 $\times 40,000$; 6. 先经 CSK 液和 RSB-Magik 液抽提, 再经热三氯醋酸处理后的 DGD 包埋—去包埋剂电镜照片。 $\times 25,000$

1. Conventional electron micrograph of *E. gracilis*. Ch, dense chromosomes $\times 12,000$; 2. Embedment-free electron micrograph of *E. gracilis* shows dense chromosomes (Ch) and a dense lattice among them. Nu, nucleolus. $\times 13,000$; 3. Embedment-free electron micrograph of sonicated *E. gracilis* after CSK and RSB-Magik extractions. IF, intermediate filament; F, nuclear fibrous network; L, lamina $\times 12,000$; 4. Embedment-free electron micrograph of sonicated *E. gracilis* after extracted by CSK, RSB-Magik and DNase 1. Chs, probable chromosomal scaffolds; NM, nuclear matrix; L, lamina; IF, intermediate filament $\times 30,000$; 5. Embedment-free electron micrograph of *E. gracilis* treated by hot trichloroacetic acid. $\times 40,000$; 6. Embedment-free electron micrograph of *E. gracilis* which was previously extracted by CSK and RSB-Magik and then treated by hot trichloroacetic acid. $\times 25,000$