

嗜热四膜虫接合生殖周期皮层骨架蛋白组分的比较

孙卫华 庞延斌

(华东师范大学生物系, 上海 200062)

摘要: 嗜热四膜虫(*Tetrahymena thermophila*) BF 株 BF₁、BF₅ 系细胞为材料, 根据显微观察将其接合生殖周期分为四个特定的阶段, 采用生化抽提和 SDS PAGE 及扫描、数据统计, 分析了营养期与接合生殖前期、中期、后期、末期同类蛋白质组成。发现 80KD、87KD 和 88KD 仅在营养期和接合前期; 而 90.5KD、85.5KD 和 66KD 则存在于接合生殖的各时期。这些蛋白的缺失与出现, 可能与小核的减数分裂、合子的形成及分裂、接合区膜的形成有着某种联系。

关键词: 嗜热四膜虫; 接合生殖; 皮层细胞骨架蛋白; SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

中图分类号: Q959.116 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2001)04-0381-05

Suhr Jessen^[1] 研究发现嗜热四膜虫接合生殖早期产生四个新蛋白, 但没有研究其整个接合生殖过程。王康乐和庞延斌^[2] 首次研究了自交型上海四膜虫 S₁ 营养期、接合期和接合体分开时整个皮层骨架蛋白组分及含量的变化, 发现 76—88KD 蛋白变化很大。本文以匹配交配型嗜热四膜虫为材料, 详细研究了接合生殖四个重要阶段及营养期皮层骨架蛋白组分与含量的差异。这对于全面了解纤毛虫细胞骨架在有性接合生殖过程中的组分变化与功能是极为有意义的。

1 材料与方法

1.1 材料 匹配交配型嗜热四膜虫 BF 株 F₁、F₅ 系, 由日本筑波大学教授 Mihoko Takahashi 赠送。

1.2 方法 培养基(蛋白胨 0.25%, 酵母膏 0.25%, 葡萄糖 3.5%, pH7.2)蒸馏水配制灭菌, 30℃ 培养 38h 细胞密度达对数生长期; 离心收集对数生长期细胞置于无菌的 0.01mol/L Tris-HCl pH7.0 中饥饿 23h, 白细胞计数法使两细胞等量混匀, 每隔 20min 于相差显微镜下观察接合的百分率, 重复 3 次; 以 0.4% 的甲基绿进行活体染色^[9] 把接合生殖过程分为几个重要的特定时期; 用 0.5% 的 TritonX-100 处理进行皮层骨架蛋白的生化抽提, 其程序采用 Howarde^[10] 等所描述的; 用日立 220A 双光路紫外分光光度计测总蛋白含量即 O.D 值; 用 10% 浓度进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 采用 Laemmli^[11] 的非连续系统, 胶浓度根据 Harlow 和 Lane^[12] 的资料修订; 凝胶经考马斯亮蓝 R-250 染色和脱色; 用

收稿日期: 2000-08-24; 修订日期: 2000-09-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号 39870094)

作者简介: 孙卫华(1973—), 女; 硕士; 主要研究方向: 原生动物学

FR-980 生物图象分析系统(反射/透射介质扫描仪和 Smartview 分析软件) 据标准蛋白来统计条带的分子量和相对百分含量。

2 结果

2.1 嗜热四膜虫的皮层骨架及蛋白

细胞培养 38h 后达到对数生长期, 密度可达 6×10^5 cell/mL, 经活体和甲基绿染色观察, 把接合生殖分为四个重要阶段。前期即混合后约 1h, 细胞两两刚接合, 小核和胞质暂无活动; 中期即混合后约 8h, 包括小核的第一、二、三次成熟分裂产生配子核, 接合区密度增大, 有胞质在明显流动; 后期为混合后 12h, 包括合子的形成, 合子的第一、二次分裂形成新的大、小核原基, 末期为混合后 21h, 包括形成新的大、小核, 接合体快分开, 接合区有透明粘状物质。

在分批收集等量细胞的皮层骨架蛋白时, 嗜热四膜虫的皮层骨架在相差显微镜下为一透明的“影泡”(Ghost), 基体和口部结构都完整, 胞质溢出总是与口部相反的方向。营养期和接合生殖各时期的骨架蛋白条带见图 1, 各期所培养的细胞在对数生长期均相等。F 为营养期即对数生长期, 有明显条带 32 条, 1 为接合前期, 有明显条带 27 条, 2 为接合中期, 有明显条带 28 条, 3 为接合后期, 有明显条带 29 条, 4 为接合末期即

虫体刚分开, 有明显条带 30 条, H 为标准分子量, L 为低标准分子量。图 2 是凝胶的扫描图谱。

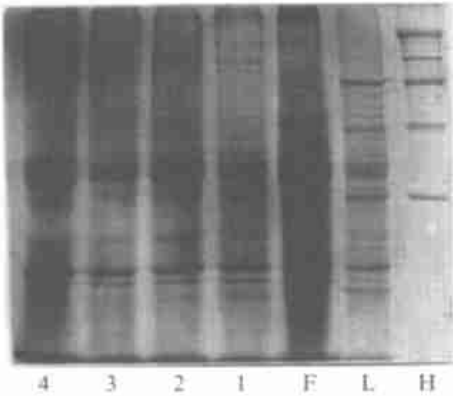


图 1 嗜热四膜虫 BF 株皮层骨架蛋白
10%的 SDS-PAGE

Fig. 1 Comparison of cortical cytoskeletal
proteins of different phases of
T. thermophila BF

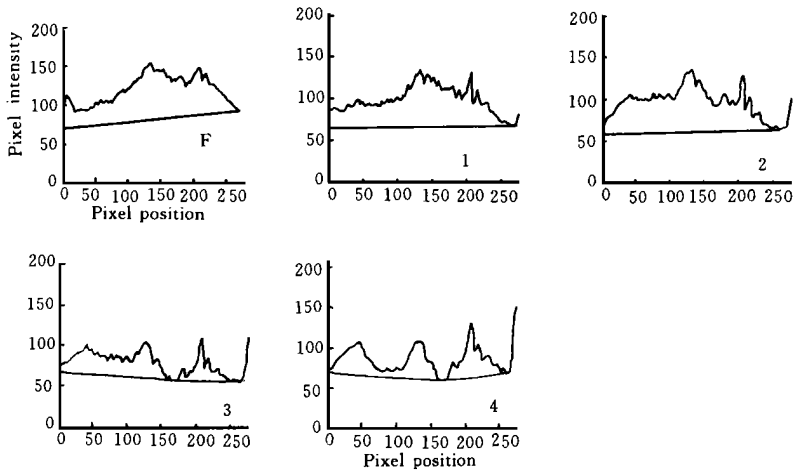


图 2 凝胶扫描图谱

Fig. 2 Comparative absorbance profiles of cortical cytoskeleton proteins in different phases

2.2 凝胶图谱重要条带的描述和比较

纤毛虫四膜虫作为自由生活的真核单细胞动物,具有极性和一定组织结构水平的皮层,这就暗示了皮层细胞骨架在暂时空间上的调节的复杂模式。尽管最初培养虫量一致,但由于经过结合生殖一系列复杂的活动,虫体的皮层细胞骨架蛋白总量是呈下降趋势的。据O.D值的测定,显示营养期含量最高,接合前期为营养期的79.3%,接合中期为66.8%,接合后期为54.7%,接合末期为62.2%。对照文献较易确定,55KD、52.5KD、49KD是微管蛋白,含量最高,分布于整个皮层骨架,在整个接合生殖过程中含量均减少;营养期225KD、150KD、130KD这三种高分子量经接合生殖后含量也下降;33KD、34KD蛋白含量较高,经接合后也下降;76~91KD之间的蛋白发生了一些重要变化,80KD、87KD、88KD蛋白在营养期时存在,接合前期也少量存在,接合中、后、末期均不存在;85.5KD、90.5KD蛋白营养期时没有,整个接合生殖过程中均存在;另外,66KD蛋白也仅少量存在于接合各时期中。以上蛋白的变化与交配型虫体接合生殖有什么关系将在后面讨论。

3 讨论

3.1 接合生殖时期皮层骨架蛋白的变化

有关纤毛虫皮层骨架蛋白在细胞表面的定位问题,Vaudaux以四膜虫为材料,经SDS-PAGE电泳,把细胞骨架的主要成分分为A、B、C,其中A包括230KD、165KD、154KD,是位于除口部以外的皮层细胞骨架,王康乐和庞延斌观察发现225KD、150KD、120KD蛋白可与之对应,本实验中的凝胶条带225KD、150KD、130KD也与之对应,它们在接合生殖过程中均明显减少;B成分包括51KD、49KD,它们是微管蛋白,在整个皮层细胞骨架包括口部都有分布,王康乐和庞延斌的结果是52.5KD和49KD,而本实验中与之对应的除52.5KD、49KD外,还有55KD,它们含量最高,在接合生殖过程中明显下降;另外,34KD和33KD含量也较高,接合过程中含量略有不同。以上这些蛋白都是皮层细胞骨架的主要成分。由上可见,皮层骨架的蛋白质中大部分在含量上不同之外,在接合生殖过程中均存在,这说明在接合过程中,皮层骨架作为细胞的有力支持,参与了接合体的形成,保持了生命活动的连续性。Nelsen^[3]等研究了嗜热四膜虫的接合生殖与“Fenestrin”即分子量为64KD的蛋白有联系,它在接合生殖中相当活跃,本实验中64KD在营养期含量也较高,在整个接合生殖过程中含量明显下降,可能如Nelsen所说的参与了接合区的形成、配子核的交换等。

以上可见,嗜热四膜虫在接合生殖过程中,核质及周围胞质发生的变化也影响了骨架蛋白的变化,推测在四膜虫接合生殖过程中皮层的改组不仅限于接合点处,可能波及整个皮层范围。

3.2 接合生殖时期细胞膜融合区蛋白的变化

实验发现接合区附近的口部电子密度特别大。Tsunemoto^[4]发现在接合前期有大量成簇的铁蛋白粒子存在于交配型细胞的接合区域和口器的外质边缘壁上,而营养期只有少量铁蛋白结合在细胞表面。可见成簇的铁蛋白粒子形成一个很厚的、电子密度很大的外质层,紧接在原生质膜的下面。

实验中发现 76—91KD 蛋白的变化特别显著, 85. 5KD、90. 5KD 蛋白在接合生殖过程中特殊存在, 而 80KD、87KD、88KD 蛋白在营养期和接合前期存在, 但接合前期明显减少, 后来消失, 推测这些蛋白的变化是由于虫体接合而使口部的骨架蛋白在消失的同时, 又出现了一些新的结构蛋白来加固接合膜, 以适应接合生殖的需要。85. 5KD、90. 5KD 和 66KD 蛋白的出现, 还可能与小核的减数分裂、合子的形成及合子的减数分裂、口器的形成有关。而 90. 5KD、85. 5KD 的出现与 Ron^[5] 和王康乐等有点不同, 他们认为这两种蛋白只在接合高峰期存在, 接合开始阶段和接合体快分开时未出现。而本实验中接合前期和末期均少量存在, 只是含量没中期、后期高, 可能由于四膜虫虫种差异造成的。估计在接合前期的少量存在是为小核的减数分裂准备好所需条件, 而末期的存在与口器的形成有关。Williams 用免疫学方法从口部骨架鉴定出两种蛋白 OF-1 (87KD) 和 OF-2 (80KD)。Honts^[6] 在体外进一步实验发现口部这些复杂的网络纤维是由分子量在 79~89KD 之间的多肽簇组成, 有四个主要的多肽, 称为“Tetrins”。可见, 本实验中这些蛋白的变化可与 OF-1、OF-2 和“Tetrins”对应起来。

在整个接合生殖过程中, 蛋白总含量一直呈下降趋势, 可见口部结构部分被消融, 而接合末期, 即接合体刚分开时蛋白含量稍高于后期, 但还是低于中期及以前。可能是由于在大、小核分化时, 也就是合子在进行两次减数分裂后, 新的骨架蛋白开始形成, 直至接合对刚分开时, 口器结构仍未恢复, 所以蛋白带仍很弱。正如 Elliott^[7] 所观察的那样, 新的口器要在接合体分开后的较长一段时间即第一次接合后体分裂以前才全部完成新的口部骨架成分的形成。

由上可见, 四膜虫在接合生殖时期的骨架蛋白变化是渐进的, 其蛋白含量的减少和增加是逐步的, 有的蛋白消失, 有的蛋白出现, 这种渐进过程对于维持皮层骨架的稳定性以及生命活动的连续性是非常必需的。

参考文献:

- [1] Suhr Jessen P B. Stage specific change in protein synthesis during conjugation in *Tetrahymena thermophila* [J]. *Exp. Cell Res.*, 1984, **151**: 374
- [2] 王康乐, 庞延斌. 上海四膜虫接合生殖期间皮层骨架蛋白的研究[J]. *水生生物学报*, 1997, **21**: 8
- [3] Nelsen E M. “Fenestrin” and conjugation in *Tetrahymena thermophila* [J]. *Euk. Microbiol.*, 1994, **41**: 483
- [4] Tsunemoto M. Aanalysis of Oral replacemently scanning electron microscopy and immunofluorescence microscopy in *Tetrahymena thermophila* during conjugation[J]. *Zoological Sci. (Tokyo)*, 1988, (2): 323—330
- [5] Ron A, et al. Protein synthesis patterns in conjugation of *Tetrahymena thermophila*[J]. *Exp. Cell Res.*, 1981, **133**: 325
- [6] Honts J E. Tetrins: Polypeptides that form bundled filaments in *Tetrahymena*[J]. *J. Cell Sic.*, 1990, **96**: 293
- [7] Elliott A M(Ed). *Biology of Tetrahymena*[M]. New York: Appleton, century crofts, Inc., 1971

STUDIES ON CORTICAL CYTOSKELETAL PROTEINS IN IMPORTANT PHASES DURING CONJUGATION OF *TETRAHYMENA THERMOPHILA*

SUN Wei-hua and PANG Yarr-bin

(Department of Biology, East China Normal University, Shanghai 200062)

Abstract: To study the changes of cortical cytoskeletal proteins of *Tetrahymena thermophila*, we used the cells of mating type *Tetrahymena thermophila* BF₁ and BF₅. When mixed, the cells underwent a sexual phase involving conjugation. The conjugation course was divided into four important phases in accordance with the changes of cellular nucleuses and their form with microscopic examination. Cortical cytoskeleton proteins had been prepared by biochemical extraction with Tritonx-100, SDS-PAGE and scan. The data statistics had been analyzed by a computer. The results showed that 55KD, 52.5KD, 49KD and 225KD, 150KD, 130KD decreased during conjugation. The 80KD, 87KD, 88KD only appeared in vegetation and early of conjugation, but 90.5KD, 85.5KD and 66KD appeared in the whole conjugation course. These proteins were involved in cortical reorganization during conjugation. They also had some connections with the meiosis of small nucleus and the formation of conjugation fields.

Key words: *Tetrahymena thermophila*; Conjugation; Cortical cytoskeletal proteins; SDS-PAGE