

上海四膜虫接合生殖期间皮层细胞骨架蛋白的研究

王康乐* 庞延斌

(华东师范大学生物系, 上海 200062)

提 要

本文采用生化抽提, 结合电泳及显微技术, 对上海四膜虫(*Tetrahymena shanghaiensis*) S₁ 皮层细胞骨架(cortical cytoskeleton)的蛋白组份, 及其在接合生殖期间的变化进行了一系列的研究。初次探索了 S₁ 株上海四膜虫在接合生殖过程中皮层细胞骨架的蛋白组份及含量, 并分析了它们与间期、接合分开时期同类蛋白相互间的差异。发现在接合生殖时期 76–88kD 蛋白有突出的表现, 而 90kD 和 85kD 特异性地存在于接合生殖期间, 它们与接合区膜融合的进一步稳固, 小核的减数分裂过程有某种联系。

关键词 上海四膜虫, 接合生殖, 生化抽提, 皮层细胞骨架蛋白, SDS–PAGE

人们早已了解到, 在纤毛原动物细胞表面存在高度结构上的分化, 并对之已研究多年。近年来皮层的形态发生和皮层的遗传研究引人注目, 尤其是纤毛虫细胞表面重要生物学活动过程的分子基础还没有了解。Williams 等^[1]曾用嗜热四膜虫(*Tetrahymena thermophila*)做材料, 分离出表膜下的皮层结构影泡(Ghosts), 并分析了皮层骨架及内侧膜物质的主要蛋白成份。另外, 有一些是集中对骨架功能的研究, 如: 微管、居间纤维和肌动蛋白微丝的描述及胞内定位。其中较多集中在皮层和口器及它们在细胞活动中的功能上, 而对有性接合生殖时期的研究就少得多。

Geyer^[2]研究了细胞骨架在游仆虫(*Euplotes*)接合生殖过程中所具有的功能和可能起的作用。他发现随着两接合细胞质膜的融合, 融合区或称为胞质桥的部分由两接合个体共同构筑。Takagi^[3]等仔细研究了与嗜热四膜虫接合生殖中微管蛋白有关的四膜虫 14nm 丝状蛋白(49kD)的免疫荧光定位, 其结果推测, 在接合生殖中核的变化与行为不是孤立的, 而是与细胞骨架的结构相联系。

但是, 上述有关纤毛虫皮层细胞骨架的研究仅仅限于某一蛋白或某一功能。而有关纤毛虫皮层细胞骨架在有性接合生殖期间各主要阶段会发生什么变化, 这种变化与接合

* 南通师专生物系工作, 1994年9月–1995年7月作为访问学者在华东师大生物系学习。上海四膜虫 S₁ 株由北京大学生物系陈阅增先生提供, 特此致谢。

1995年7月28日收到; 1995年11月27日修回。

生殖过程中,细胞在结构、生理、生化方面的改变有些什么联系的探索却极少。开拓这方面的研究,对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及功能是极为有意义的。本文以上海四膜虫 S_1 株为材料,着重于研究探索这些问题。

1 材料与方法

1.1 材料 自接型上海四膜虫 S_1 株。

1.2 细胞培养 豚豚 1%, 酵母提取物 0.1%, 葡萄糖 0.2%, 用蒸馏水配制, pH7.1。在 27℃ 条件下虫口密度可达 8×10^6 细胞 / ml。

1.3 接合生殖 通过饥饿诱导四膜虫接合,将对数生长期的四膜虫放入无菌蒸馏水中连续洗三次,每次 15min,然后静置不动,25℃ 下接合对在 20h 左右达高峰,经计数,接合率最高达 88%,重复性良好。

1.4 染色制片 将不同时期的虫体用醋酸洋红染色整装制片,观察接合的细胞学过程,目的是为了判断收取骨架蛋白的时期^[4]。

1.5 皮层细胞骨架的生化抽提 活细胞用 0.5—1% Triton X-100 处理,其程序如 Vaudaux 等^[5]所描述。

1.6 电泳 以上收集的皮层细胞骨架蛋白用蛋白解离液处理,各蛋白样品经过 9%SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,其方法和程序根据 Laemmli 系统^[6]。

1.7 凝胶扫描 经考马氏亮蓝染色的电泳凝胶片,用 LKB2400 激光光密度凝胶扫描仪扫描,波长 550nm。

2 结果

2.1 上海四膜虫 S_1 的皮层细胞骨架及其蛋白

四膜虫的皮层细胞骨架是联系细胞表面的一层结构,类似于红细胞的 Spectrin 层,许多特殊的细胞构型存在其中。上海四膜虫 S_1 的皮层细胞骨架在相差镜下为一透明的“影泡”,有排列整齐的毛基体和完整的口部结构,胞质溢出总是在与口部相反的体壁部分。Williams 曾这样描述:表膜(Pellicle)在膜缺少的情况下通过细胞外质(Epiplasm)可以连在一起。在整个细胞的表膜下还有一个连续的纤维颗粒层,而与这个细胞骨架框架相接触的维管结构又与细胞外质相连,部分在外,部分在内。所收集的“影泡”正是表膜下的这一部分。

在收集虫体提取皮层细胞骨架蛋白时,对营养生长期细胞我们选择中对数期,而对于接合虫体和接合后体则做了一些预备实验,来判断收取皮层细胞骨架的时期(图 1, 2)。上海四膜虫 S_1 是自配型株系,饥饿与配对阶段不能人为分开。最初出现接合对的时间是虫体进入饥饿液后 9—11h,接合高峰开始是 19—20h,可持续到 26—28h,接合对完全分开是 36—38h。在 25.5h 为收取接合虫体皮层骨架的时间,接近合子核形成时期。在 36—38h 将收取虫体分开时期细胞,配合镜检要求虫体 100% 分开。

另外,在收集接合生殖虫体的过程中,当虫体饥饿 1—2h 就开始分泌粘液,随着时间延长,粘液分泌得越来越多,直至虫体接合为止。还发现相同培养量的虫子经过接合,所收集的虫体总体积明显减少。因此,在考虑电泳蛋白样品上样量时,以最初培养虫量相同

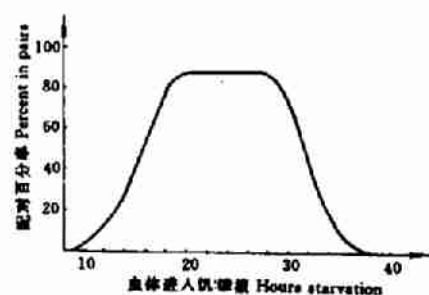


图1 虫体配对动态

Fig.1 Pairing kinetics



图2 接合虫体的细胞生物学阶段及对应时间

Fig.2 The cytological stages of conjugation and their timing

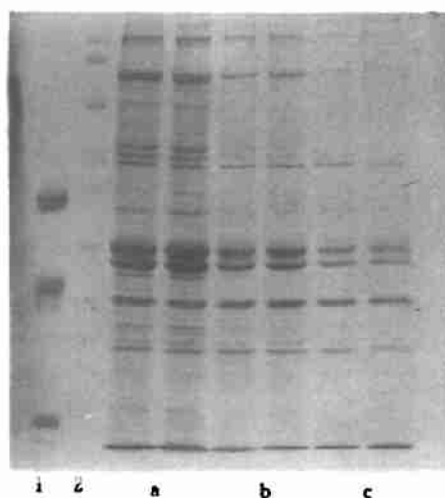
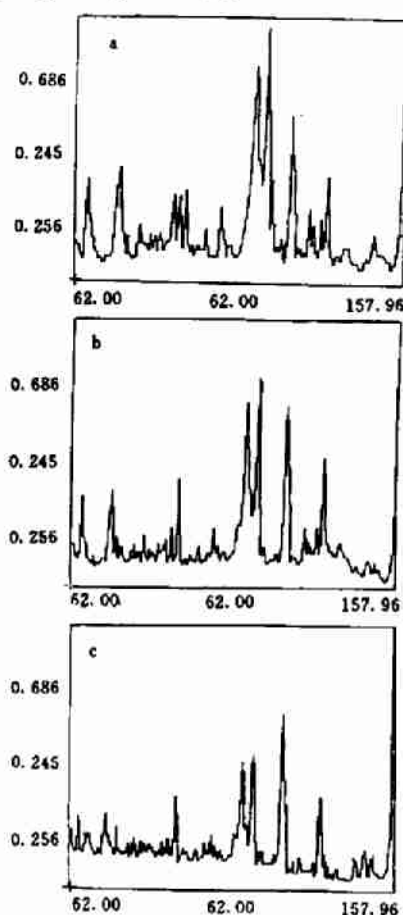
图3 上海四膜虫 S_1 皮层细胞
骨架蛋白 SDS-PAGEFig.3 Comparison of cortical cytoskeletal
proteins from different phase of *T. shanghaiensis* S_1 in one-dimensional SDS-PAGE1 Bovine serum albumin (66 kDa), ovalbumin
(45 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa);2 Myosin (212 kDa), α -macroglobulin (170 kDa),
 β -galactosidase (116 kDa), transferrin (76 kDa),
glutamic dehydrogenase (53 kDa)

图4 凝胶扫描图谱

Fig.4 Comparative absorbance profiles of
cortical cytoskeleton proteins in different phases

作为上样的基准,来比较不同时期蛋白带的变化。图 3 是不同时期皮层细胞骨架蛋白 SDS-PAGE 图谱。a.代表营养生长期,有明显条带 36 条;b.是接合生殖时期,有明显条带 37 条;c.是虫体分开后(分开不久,还未进入分裂)有条带 30 条。图 4 是凝胶扫描图谱,便于直观分析。

2.2 凝胶图谱重要带的描述及比较

用于现代研究的四膜虫是自由生活的真核单细胞动物,它有一个具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蛋白在暂时的空间上的调节的复杂模式。尽管最初培养虫量一致,但由于经过接合生殖一系列复杂活动,虫体的皮层细胞骨架蛋白总含量明显下降。根据扫描结果,经计算接合时期蛋白总量占营养期 73.56%,而接合分开以后蛋白总量占营养期的 63.85%。对营养生长期上海四膜虫 *S. p.* 皮层细胞骨架蛋白组分及含量将另文报告。这里将不同时期蛋白组分及含量的变化作一比较(图 5)。对照文献[1]较容易确定 52.5kD、49kD 是微管蛋白的二个亚基,接合与分开时期含量均减少。在营养期细胞中 225kD、150kD、120kD 这三种高分子量蛋白含量仅次于微管蛋白,而它们在接合时期明显减弱,特别是第三条带变化大。最显著的是 76—88kD,经过虫体接合,79kD、83kD 明显减弱,88kD 消失,新出现了 90kD、85kD。另外,还发现图谱中的 37—43kD 蛋白经过接合也减少了。以上蛋白的变化与虫体接合生殖有什么关系将在后面讨论,同时还有许多蛋白条带的变化将要在今后进一步的实验中探讨,如:105kD 略有增加、67kD 带出现、99kD、94kD 带缺失等。

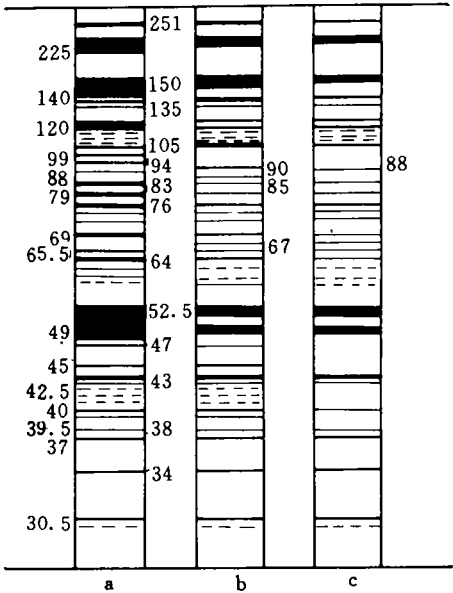


图 5 皮层细胞骨架主要蛋白图例比较
Fig.5 Comparative electrophoretic patterns of major proteins of the cortical cytoskeleton

3 讨论

3.1 接合生殖时期皮层细胞骨架蛋白的变化

纤毛虫皮层可以看作是一种极其特化的细胞“外被”。对于既是一个细胞又是一个动物的纤毛虫来说皮层的功能是相当重要的,它对于维持纤毛虫的形状、运动及各种常规的细胞生命活动是不可缺少的。经观察发现,225kD、150kD、120kD 这三种高分子量蛋白在分子量、含量和图谱位置等方面均非常接近于 Williams,文中多次提及的 A、B、C 三条带,它们随着接合的过程含量降低,其中 225kD、150kD 变化明显,而接合分开后 120kD 已基本消失。同时,微管蛋白的二个亚基含量也相应减弱,与 Williams^[9]曾描述的毛基体区域蛋白相对应的部分也发生了变化。以上这些蛋白带都是皮层细胞骨架的主要成分。庞延斌等结合光镜和电镜的观察,确定了镰游仆虫 (*Euplotes harpастein*) 在无性分裂期间

不仅其皮层上的纤毛器是全部更新的,而且皮膜结构、包括皮膜下微管系统也伴随皮层纤毛器发生新老更替的变化。纤毛虫在接合生殖过程中,其皮层会不会出现变化呢?而本实验中皮层细胞骨架蛋白的主要成分及含量的变化显然已说明了这个问题。

Geyer 等对游仆虫接合生殖期间的细胞动态进行了研究,发现在接合生殖的最初时间里,两虫体的融合区域由无特征的细胞质基质构成,很快融合区域胞质中掺和许多微管及绵连的滑面内质网。特别是胞质中的微管,促进胞质流向融合区,来稳定这一结构。Ron^[11]等和 Suhr-Jessen^[12]分别研究了嗜热四膜虫接合生殖中细胞蛋白的合成,发现接合生殖不同阶段胞内所合成的蛋白质也不同,而接合时期与营养期相比新出现的蛋白带(凝胶图谱)有十多种。Nelsen^[13]等研究了嗜热四膜虫的接合生殖与“Fenestrin”,他通过免疫学方法证明称为“Fenestrin”的蛋白在虫体接合生殖中相当活跃,与接合区的形成,配子核的交换等均有联系。为此,我们认为:在实验中出现的皮层细胞骨架主要蛋白的变化是由于虫体接合期间,整个细胞中不仅胞质发生变化,皮层及其中骨架也受到影响,甚至发生了部分的不同程度上的消溶。又因为接合期间核物质及周围胞质均发生了很大变化,这自然会影响到皮层及其中骨架的组分及含量。

3.2 接合生殖时期细胞膜融合区域蛋白的变化

在图 3、5 中均可看出,76—88kD 这组蛋白带在接合生殖时期和分开时期明显地要比营养期减弱。同时,我们还做了一些对照实验,发现在接合生殖初期所收的蛋白中,83kD 蛋白首先消失,可见这些蛋白带的减弱与缺失是逐步发展的,并且显然与虫体的接合生殖有关。Williams^[14]经多次实验,发现四膜虫口部丝状系列蛋白的主要亚单位分子量应是 79—89kD,称作“Tetrins”,不同种四膜虫其亚单位的组成、成分还略有差异,我们图谱中的 76—88kD 可以与“Tetrins”相对应,可以认为它们的变化是由于虫体接合而使口部丝状蛋白变化所致。人们观察到^[15],在四膜虫接合生殖最初的阶段,两接合体仅仅以口器前端的部分相结合,在这一结构中无纤毛,表膜显得很致密,这时可能发生了膜的融合。随后融合膜增厚,面积增大,直至二虫体的前端紧密连接,此时口的大部分结构被重吸收,在电镜下仅见一些波动膜的残余。曹同庚等^[16]用电镜观察发现上海四膜虫 S_1 接合区域有大量的高尔基体膜可以直接嵌入接合膜中,参与接合膜的生长。Wolfe^[17]用电镜观察了四膜虫接合虫体的细胞骨架,发现两细胞的连接处包含骨架结构,而且在接合点处范围内以骨架互相连接,可以说质膜的融合是骨架板紧压在一起。还有人用电镜观察到^[15],四膜虫口器部分的构造在接合膜融合的全过程中大多数被重吸收(消溶),新的口器要在接合体分开以后几小时,即第一次接合后体分裂以前才出现。这样可以判断,实验中出现的口器特有蛋白带的减弱、消失是由于虫体接合而引起口器许多结构消溶。而接合后体蛋白样品是在接合体分开以后,还未分裂,口器结构也没恢复,所以蛋白带仍是很弱、缺失。

在比较中,还发现特殊的蛋白带,在营养期为 88kD,接合时期为 90kD、85kD。其中 90kD 带最明显。由于这些蛋白带是出现在口器丝状蛋白带群中,所以我们推测:接合生殖期间口部一些结构虽然消失,但却出现了一些新的结构或蛋白来加固接合膜,适应接合生殖的需要。Ron 等利用 SDS-PAGE 和放射自显影术,研究了嗜热四膜虫在接合生殖早期全细胞蛋白的变化,首次探寻了虫体接合期间潜伏的蛋白分子变化动态,发现变化较

大的是 81kD 和 86kD, 81kD 在接合初期消失, 同时 86kD 出现, 一直维持到减数分裂时期。他推测, 86kD 蛋白的合成与减数分裂时期有关, 而不是胞膜融合初期蛋白, 特别是它在细胞周期的其它阶段不出现。这里的 90kD、85kD 蛋白在分子量上虽与 Ron 的结果不同, 但出现的时期却相似。作者曾经收集虫体接合最初时期的蛋白进行 SDS-PAGE, 发现还没有 90kD、85kD, 而虫体分开以前的皮层骨架蛋白中也没有。所以我们认为, 这一蛋白与细胞融合区的进一步稳固、小核的减数分裂有关, 是在特定时期皮层骨架上出现的特殊蛋白。

参 考 文 献

- [1] Williams N E, et al. Cytoskeletal proteins of the cell surface in *Tetrahymena*. I: Identification and localization of major proteins. *Exp. Cell Res.*, 1979, **123**: 311—320.
- [2] Geyer J J, et al. Cellular dynamics of conjugation in the ciliate *Euplotes aediculatus*. I. cytoskeletal elements. *J. Morphol.*, 1987, **192**: 27—42.
- [3] Takagi I, et al. Involvement of 14nm filament-forming protein and tubulin in gametic pronuclear behavior during conjugation in *Tetrahymena*. *J. Protozool.*, 1991, **38**: 345—351.
- [4] 陈阅增, 罗泽华, 曹同庚. 一个自配型梨形四膜虫的接合及其细胞学过程. *动物学报*, 1982, **28**: 319—324.
- [5] Vaudaux P E, et al. Cytoskeletal proteins of the cell surface in *Tetrahymena*. II. Turnover of major proteins. *Exp. Cell Res.*, 1979, **123**: 321—331.
- [6] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (Lond.)*, 1970, **227**: 680—685.
- [7] Williams N E, et al. Oral filament proteins and their regulation in *Tetrahymena pyriformis*. *Exp. Cell Res.*, 1986, **164**: 295—310.
- [8] Williams N E, et al. Regional Differentiation of the membrane skeleton in *Tetrahymena*. *J. Cell Sci.*, 1987, **87**: 457—463.
- [9] Williams N E, et al. The formation of basal body domains in the membrane skeleton of *Tetrahymena*. *Development*, 1990, **109**: 935—942.
- [10] 庞延斌, 傅振幸等. 镰游仆虫 *Euplotes harpa* 的皮层细胞骨架构造. *华东师范大学学报(神经生物学和原生动物学专辑)*, 1992: 46—60.
- [11] Ron A, et al. Protein Synthesis patterns in conjugating *Tetrahymena thermophila*. *Exp. Cell Res.*, 1981, **133**: 325—330.
- [12] Suhr-Jessen P B. Stage-specific changes in protein synthesis during conjugation in *Tetrahymena thermophila*. *Exp. Cell Res.*, 1984, **151**: 374—383.
- [13] Nelsen E M, et al. "Fenestrin" and conjugation in *Tetrahymena thermophila*. *J. Euk. Microbiol.*, 1994, **41**: 483—495.
- [14] Honts J E, et al. Tetrins: Polypeptides that form bundled filaments in *Tetrahymena*. *J. Cell Sci.*, 1990, **96**: 293—302.
- [15] Elliott A M. The Biology of *Tetrahymena*. Dowden, Hutchinson and Ross: Stroudsburg, 1973: 259—306.
- [16] 曹同庚, 罗泽华, 陈阅增. 四膜虫 *S₁* 有性生殖的电镜观察 II. 接合区的形态与配子核的交换. *动物学报*, 1984, **30**: 1—6.
- [17] Wolfe J. Cytoskeletal reorganization and plasma membrane fusion in conjugating *Tetrahymena*. *J. Cell Sci.*, 1985, **73**: 69—85.

STUDIES ON PROTEINS OF CORTICAL CYTOSKELETON OF *TETRAHYMENA SHANGHAIENSIS* DURING CONJUGATION

Wang Kangle and Pang Yanbin

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

Abstract

Tetrahymena shanghaiensis S₁ is a selfer strain. By starvation, more than 85% of the cells in a clone can be induced to conjugation synchronously. Using biochemical extraction, SDS-PAGE, combining with microscopic examination, we studied the major components and contents of cortical cytoskeleton protein of *T. shanghaiensis* S₁, and explored the extraordinary changes in these proteins during conjugation for the first time. The similarity and difference between cortical cytoskeletal proteins of vegetative, conjugation and exconjugation cells are compared in this paper. The results of SDS-PAGE and protein isolation showed that the essential component of all cortical cytoskeleton proteins (225kD, 150kD, 120kD, 52.5kD, 49kD, 37–43kD) decreased during and after conjugation. We also observed great fluctuation of the 76–88kD proteins of the oral apparatus in different cell phases. Two particular bands are obvious: one is the 90kD protein and the other one is 85kD protein, both can be found after membrane fusion and during meiosis. We recognize that during the conjugation proteins change obviously in all cortical cytoskeleton of *T. shanghaiensis*.

Key words *Tetrahymena shanghaiensis*, Conjugation, Biochemical extraction, Cortical cytoskeleton proteins, SDS-PAGE