

四膜虫种间骨架蛋白组分的比较研究

庞延斌 孙卫华 李书强

(华东师范大学生物系, 上海 200062)

摘要: 以上海四膜虫 S₁ 和嗜热四膜虫 BF 株和 BT 株为材料, 结合显微观察, 采用生化抽提、SDS-PAGE 电泳、扫描及数据统计, 分析与测定了三个不同株四膜虫对数生长期皮层骨架蛋白组分与含量, 结果显示嗜热四膜虫的 BF 与 BT 株差异较小, 两者与上海四膜虫 S₁ 株差异则较大, S₁ 株细胞中有 92KD、72KD、66KD、32KD、27KD, 而 BF 和 BT 株细胞中没有, 估计这些蛋白的不同与种间亲缘关系及株系、培养条件等有着密不可分的联系。

关键词: 嗜热四膜虫; 上海四膜虫; 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)03-0241-04

纤毛虫四膜虫既是一个细胞, 又是一个具有完整结构、功能的动物, 特别是它复杂的皮层构造, 与其运动、摄食、分裂和形态的发生等有着密切的联系^[1]。由于其许多种已建立无菌培养, 增殖快, 短时间内可获得大量对数生长期细胞等特点, 并具有与真核生物一样完善的营养和生殖系统, 故已成为生物化学、遗传进化、分子生物学等实验常用的材料。Vaudaux^[2]用低离子浓度去污剂和 SDS-PAGE 电泳, 分析了四膜虫皮层骨架蛋白的主要成分, Wolf^[3]用去污剂法结合匀浆技术分离了口部骨架蛋白等, Williams^[4]进一步用免疫学方法从口部鉴定出了两种蛋白, Numata^[5]认为 49KD 蛋白与口的形态建成有关。本文以两种不同的四膜虫为材料, 研究比较了它们皮层骨架蛋白组分与含量, 以了解种和株系四膜虫之间的差异和亲缘关系。

1 材料与方法

1.1 材料: 上海四膜虫 S₁ 株 (*Tetrahymena shanghaiensis*), 由北京大学生物系陈阅增教授实验室赠送; 嗜热四膜虫 (*Tetrahymena thermophila*) BF 株和 BT 株, 由日本筑波大学教授 Mihoko Takahashi 赠送。

1.2 方法: S₁ 株培养基 (蛋白胨 0.2%, 酵母膏 0.1%, 葡萄糖 0.2%, pH7.0), 26℃培养 38h; BT 株培养基 (蛋白胨 0.5%, 酵母膏 0.2%, 葡萄糖 0.6%, pH7.2), 30℃培养 40h; BF 株培养基 (蛋白胨 0.25%, 酵母膏 0.25%, 葡萄糖 3.5%, pH7.2), 30℃培养 38h; 用 0.5% 的 Triton X-100 处理进行皮层骨架蛋白的生化抽提, 其程序采用 Howard^[6] 等

收稿日期: 1999-08-24; 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: 庞延斌(1939—), 男; 教授; 主要研究方向: 原生动物学

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^[7]的非连续系统,胶浓度根据 Harlow 和 Lane^[8]的资料修订;凝胶用考马斯亮蓝 R-250 染色;用 FR-980 生物图像分析系统(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 结果与讨论

2.1 两种四膜虫对数生长期的总蛋白含量(表 1)

表 1 两种不同四膜虫皮层骨架蛋白总含量的比较

Tab. 1 Comparison of total content of cortical cytoskeletal proteins of different species of *Tetrahymena*

	嗜热四膜虫		上海四膜虫
	<i>T. thermophila</i>		<i>T. shanghaiensis</i>
	BF 株	BT 株	S ₁ 株
280nm	0.117	0.150	0.114
O. D 260nm	0.143	0.187	0.141
蛋白质 (mg/mL)	0.638	0.791	0.610

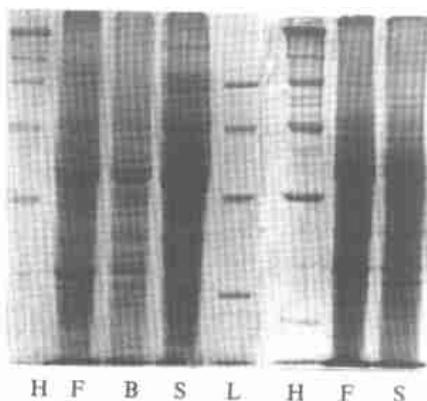


图 1 皮层骨架蛋白的 SDS PAGE 凝胶电泳

Fig. 1 SDS-PAGE of cortical cytoskeletal proteins of different species of *Tetrahymena*

B: 嗜热四膜虫 BT 株; F: 嗜热四膜虫 BF 株; S: 上海四膜虫 S₁ 株; H: 高标准分子量 200KD, 130KD, 97.4KD, 66.2KD, 43KD; L: 低标准分子量 97.4KD, 66.2KD, 43KD, 31KD

由上表可知,两种四膜虫对数生长期总蛋白含量嗜热四膜虫 BT 株细胞最高,其次是 BF 株细胞,上海四膜虫 S₁ 株细胞低一些。由此可知不仅不同种,即使同种不同株的四膜虫其皮层骨架蛋白含量也是有差异的,也可能与所培养的外界条件不同有些关系。

2.2 皮层及皮层骨架蛋白的比较

收集等量细胞的皮层骨架蛋白时,三株四膜虫的皮层骨架在相差显微镜下均为一透明的“影泡”(Ghost),基体和口部结构完整,胞质的溢出也都是与口部结构相反的方向。三株四膜虫细胞营养期皮层骨架蛋白经 10% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳见图 1。

扫描图谱见图 2。

结果显示嗜热四膜虫 BF 株有明显条带 31 条,BT 株细胞有 32 条,而上海四膜虫 S₁ 株共有 36 条,比前二者多 5—6 条,且各蛋白的相对含量也有些不同。其中含量较高一些的蛋白如 55KD、52.5KD、49KD; 64KD, 34KD、33KD; 225KD; 150KD, 130KD 等在两种四膜虫中均存在。正如 Vaudaux 所认为的这些蛋白都是细胞皮层骨架的主要成分,在整个细胞皮层骨架都有分布; 80KD 和 87KD 蛋白也存在,与 Wolf 和 Williams 分离的口部骨架蛋白一致。它们作为细胞的有力支持,保持了生命活动的连续性。

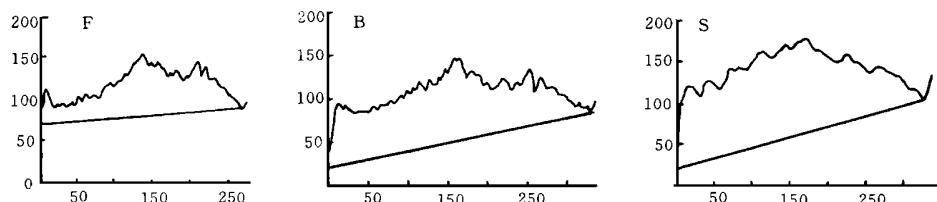


图 2 凝胶的扫描图谱

Fig. 2 Comparative absorbance profiles of different species of *Tetrahymena*

BF 株和 BT 株细胞都为嗜热性四膜虫, 其电泳图谱和蛋白的含量相对接近, 相同条带有 31 条, 只是含量略有一点不同; 而 BT 株细胞有 84KD 蛋白, 含量相对较少, BF 株细胞没有; 总蛋白含量 BT 株高于 BF 株。由上可知, 这两株嗜热四膜虫相似性很大, 其略为不同之处除由于是不同株系之外, 估计培养基成分的不同可能对其也有影响。BF 株细胞的培养液中葡萄糖含量高达 3.5%, 而 BT 株细胞培养基中葡萄糖为 0.6%, 而蛋白胨的含量是 BF 株中的两倍。

上海四膜虫 S₁ 株与嗜热四膜虫 BT 株、BF 株蛋白组分和含量变化相对于 BT 株、BF 株两者其差异较大, 它出现的 92KD、72KD、66KD、32KD、27KD 蛋白在 BT 株和 BF 株中均不存在, 而 58KD 它没有, BT 株和 BF 株都有。S₁ 株和 BT 株细胞都存在 84KD, 而 BF 株细胞没有。这是因为 S₁ 株与 BT 株、BF 株细胞亲缘关系较远, 属于同属不同种。S₁ 株与两者的较大差异原因估计除属于不同种之外, 还可推测为两个原因: 一是培养基成分的差异导致的, 上海四膜虫 S₁ 株中葡萄糖含量为 0.2%, 蛋白胨为 0.2%; BT 株中葡萄糖是它的 3 倍, 蛋白胨是它的 2 倍多; BF 株葡萄糖含量是它的 17 倍多。二是培养条件的不同, 上海四膜虫 S₁ 株培养温度为 26℃, 而嗜热四膜虫 BT 和 BF 株培养温度为 30℃。大量研究表明, 四膜虫属各种, 甚至同种不同的株系, 都对培养基和培养条件的要求有所不同, 无法在同一培养条件下作不同种、系间的比较^[9]。而 Aaroson.^[10] 等又证实在含不同脂类的培养液中虫体所含脂量也不相同, 因而也可以推测由于培养基成分和环境的不同影响到蛋白质的合成。当然这些可在今后的进一步研究中加以确证, 同时亦可用 DNA 的变化来进一步探讨。

参考文献:

- [1] 庞延斌等. 镰游仆虫 *Euplotes harpa* 的皮层细胞骨架构造 [J]. 华东师范大学学报(神经生物学与原生动物学专辑), 1992, 46—60
- [2] Vaudaux P E. Isolation and identification of specific cortical proteins in *Tetrahymena pyriformis* stain [J]. *J. Protozool.*, 1976, 23(3): 458—464
- [3] Wolf J. Structural analysis of the isolated oral apparatus of *Tetrahymena pyriformis* [J]. *J. Cell Sci.*, 1970, 6: 679
- [4] Williams N E. et al. Oral filament proteins and their regulation in *Tetrahymena pyriformis* [J]. *J. Cell Res.*, 1986, 164: 295
- [5] Numata D. et al. *Tetrahymena* 14-nm filament forming protein has citrate synthase activity [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 1991, 174: 1028
- [6] Howare E, Bushe J R. et al. Comparison of cortical protein in *Tetrahymena vorax* microstomes and macrostomes

- [J]. *J. Protozool.*, 1982, 29(2): 222
- [7] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the Assembly of the Head of *Bacteriophage T₄* [J]. *Nature*, 1970, 227(15): 680
- [8] 萨姆布鲁克等. 分子克隆实验指南(第二版) [M]. 北京: 科学技术出版社, 1995
- [9] Elliot A M. *Biology of Tetrahymena* [M]. New York: Appleton, century crofts, Inc., 1971
- [10] Aaronson S, Baker H. Lipid and Sterol content of some Protozoa [J]. *J. Protozool.*, 1961, 8: 274

STUDIES ON CORTICAL CYTOSKELETAL PROTEINS OF DIFFERENT SPECIES OF *TETRAHYMENA*

PANG Yar bin, SUN Weihua and LI Shiqiang

(Department of Biology East China Normal University Shanghai 200062)

Abstract: Cortical cytoskeletal proteins had been prepared by biochemical extraction with Tritonx- 100, SDS- PAGE and scan, in order to study their difference of *Tetrahymena thermophila* BT, *Tetrahymena thermophila* BF and *Tetrahymena shanghaiensis* S₁. The data statistics had been analyzed by a computer. The results showed that the difference between *T. thermophila* BT and *T. thermophila* BF was little. The *T. shanghaiensis* S₁ had more protein patterns than those of two strains of *T. thermophila*. These proteins were 92KD, 72KD, 66KD, 32KD and 27KD. So the difference between *Shanghaiensis* S₁ *thermophila* and the two strains of *T. thermophila* was greater. We think that it was because of the difference of cultive medium and conditions that affected the components and contents of proteins.

Key words: *Tetrahymena thermophila*; *Tetrahymena shanghaiensis* S₁; Cortical cytoskeletal protein; SDS- PAGE