

筛选冠突伪尾柱虫有小核细胞系和无小核细胞系 饥饿期差异表达的 ESTs

刘星吟¹ 毛永真¹ 李甘霖² 金立培¹

(1. 中山大学生命科学学院, 广州 510275; 2. 香港理工大学应用生化系)

摘要: 利用显微切割的方法建立大型腹毛目纤毛虫——冠突伪尾柱虫(*Pseudourostyla cristata*)的无小核细胞系, 分别提取有小核和无小核细胞系的总 RNA, 用 SMART-PCR 方法直接合成 dsDNA, 进而运用抑制性消减杂交技术(Suppression subtractive hybridization, SSH)对冠突伪尾柱虫去小核前后的差异表达基因进行研究, 构建了有与无小核细胞系在饥饿期差异表达基因的消减文库, 随机挑取了 284 个克隆, 应用 cDNA 阵列技术鉴定阳性克隆。将鉴定出的 17 个阳性克隆进行 Blastx 分析, 结果表明 17 个 EST (Expressed sequence tag) 均可能与小核体功能密切相关, 此为进一步阐明小核的遗传机理奠定了基础。

关键词: 抑制性消减杂交; 差异表达基因; 冠突伪尾柱虫; 大核; 小核

中图分类号: Q75 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2006)03-0333-06

纤毛虫每个细胞中有两种不同类型的细胞核: 大核(Macronucleus)和小核(Micronucleus), 这种现象称为核器两型性(Nuclear dimorphism or dualism)。一般来讲, 大核又叫营养核(Vegetative nucleus), 为多倍体核, 在营养期其基因表达活跃; 而小核又为生殖核(Germ nuclei), 载有所有的遗传信息, 但其 DNA 并不转录, 也几乎没有基因表达。过去的研究表明小核除了具有生殖功能外, 还对代谢、生长、发育及形态建成等过程发挥某些作用, 或间接施加一定影响, 即小核具有体功能(Somatic function)^[1]。本实验室在过去的研究中, 以冠突伪尾柱虫(*Pseudourostyla cristata*)为材料, 对其无小核细胞系在无性繁殖过程中的形态及形态发生过程进行了详细的研究^[2, 3], 结果表明小核对维持其在饥饿期和静止期的口器结构的稳定性发挥着至关重要的作用。为了进一步揭示这种遗传现象的分子机理, 本研究采用抑制性消减杂交技术(Suppression subtractive hybridization, SSH)构建了冠突伪尾柱虫有小核与无小核细胞系在饥饿期差异表达 cDNA 消减文库, 分离、克隆和筛选了代表有小核细胞系差异表达基因的 ESTs, 为进一步研究小核体功能的分子遗传机理奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 细胞培养与无小核细胞系的建立 实验选用的冠突伪尾柱虫采自上海, 培养方法及无小核细胞系建立的方法与以前报道的相同^[4], 蛋白银染色观察其形态与有小核细胞系的形态异同。

1.2 细胞富集与总 RNA 的提取 将有小核和无小核细胞分别移入 50mL 的离心管中, 500r/min, 4—8℃低速离心 3—5min, 弃上清液。重复两次, 将洗涤的细胞轻轻倒入培养皿内, 加无菌 Pringsheim 培养液和氨苄青霉素(100μg/mL)饥饿 72h, 重新移入 50mL 离心管中, 500r/min, 4—8℃低速离心 3—5min, 弃上清液, 余约 4mL; 分别移入两个 5mL 离心管, 加无菌预冷的 Pringsheim 培养液, 500r/min, 4—8℃低速离心 2min, 弃上清液; 重复 2 次以去除细菌和杂质。最后一次离心后迅速加入 0.25mL 预冷的 Pringsheim 培养液, 让细胞均匀悬浮备用。采用异硫氰酸胍和β-巯基乙醇使细胞变性, 酚、氯仿和异戊醇抽提, 在变性剂中两次沉淀 RNA, 以去除 DNA、蛋白质和多糖。所得 RNA 样品经电泳、紫外分光光度检测其完整性和均一性^[4]。

收稿日期: 2004-10-09; 修订日期: 2006-01-20

基金项目: 国家自然科学基金(No. 30370210)资助

作者简介: 刘星吟(1975—), 女, 四川省宣汉县人, 博士, 主要从事发育分子遗传学方面的研究, E-mail: Ls67@zsu.edu.cn

通讯作者: 金立培, 教授。E-mail: Lssjp@zsu.edu.cn

1.3 cDNA 第一、第二链的合成及 *Rsa* I 酶切 以所提取的有小核和无小核细胞总 RNA 为模板, 采用 Clontech 公司 SMARTTM PCR cDNA Synthesis Kit 合成 cDNA 的第一链和第二链, 合成的 cscDNA 经柱层析纯化, 用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳对纯化产物进行分析。将纯化的 dscDNA 经 *Rsa* I (Clontech) 37℃ 酶切 6h, 电泳检测酶切结果。

1.4 抑制性消减杂交 以有小核饥饿期细胞为实验组 (Tester), 无小核饥饿期细胞为对照组 (Driver), 应用 Clontech 公司的 PCR-selectTM cDNA subtraction Kit 进行 SSH 操作, 经接头连接, 两轮消减杂交, 两轮 PCR 扩增, 富集正向消减的 cDNA, 同时以饥饿期无小核细胞为实验组, 以饥饿期有小核细胞为对照组按同样的方法富集反向消减 cDNA。实验同时分设 tester 对照即不进行消减而直接进行两次 PCR。

1.5 PCR 产物的 T/A 克隆及插入片段的验证 将富集的正向消减 cDNA 纯化后, 与 TaKaRa 公司的 pMD18T 载体连接。16℃ 连接 10h, 转化受体菌 TOP10, 进行蓝白斑筛选, 随机挑选白色菌落, 点种于含 3mL, 100μg/mL 氨苄青霉素 LB 培养液中, 37℃ 振荡培养过夜。取 1μL 菌液为模板, 继续以 PCR-selectTM cDNA subtraction Kit 中的 Nested PCR Primer 1 和 2R 为引物, 94℃ 预变性 8min。然后 94℃ 30s、68℃ 30s、72℃ 90s, 共 24 个循环, 最后 72℃ 延伸 7min。琼脂糖凝胶电泳分析确认有不同大小的插入片段后, -70℃ 保存所有克隆。

1.6 斑点印迹 取菌落插入片段验证后的 PCR 产物 5μL, 与 5μL 0.6mol/L NaOH 等量变性后, 分别取 2μL 点于两张膜上, 随后将膜浸泡在 0.5mol/L Tris-HCl (pH=7.5) 和 1.5mol/L NaCl 中和溶液 2min, 再用蒸馏水漂洗 2min, 120mJ 紫外交联后, 室温保存。

1.7 插入片段 DNA 印迹的杂交分析 正向消减 cDNA 与反向消减 cDNA, 分别与 [α -³²P] dCTP 随机引物标记探针, 两种标记 cDNA 分别与两套等等的阵列膜进行杂交, 杂交结果用 Phosphorimager 扫描, 比较两张膜上的杂交信号, 从中选出与正向消减 cDNA 有较强的杂交信号, 而与反向消减 cDNA 没有杂交信号或者仅有较弱的杂交信号的克隆测序。

1.8 序列测定 取经 cDNA 斑点杂交验证为阳性克隆的冻存菌液, 于 37℃ 过夜摇菌后提取质粒, 以 M13(-47) 和 M13(-48) 为测序引物, 在 ABI377 型自动 DNA 序列分析仪上测定序列, 测序由上海博亚生物技术公司代理。

2 结果

2.1 无小核细胞系的建立

用地衣红染色鉴定无小核, 图 1 显示有小核细胞, 图 2 显示无小核细胞。

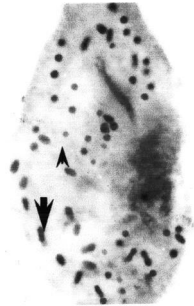


图1 有小核细胞

Fig. 1 Micronucleate cell

小箭头所指处为小核, 大箭头所指处为大核

Small arrow indicates micronucleus and big arrow showing macronucleus

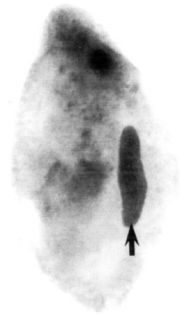


图2 无小核细胞

Fig. 2 Amiconucleate cells

箭头所指处为融合大核 Arrow indicates the amalgamated macronucleus

蛋白银染色观察表明有小核细胞的口器表型正常, 见图 3; 而无小核细胞系同以往观察的结果一样, 表现为口器不同程度的缺损, 参见图 4, 口器缺损的情况, 本研究室已有详细报道^{2-3]}。

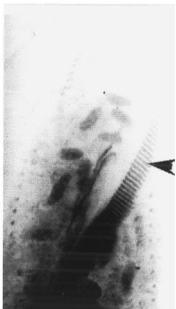


图3 有小核细胞蛋白银染色

Fig. 3 Micronucleate cell by Protargol staining

箭头显示完整的口围带 Arrow indicates intact AZM



图 4 无小核细胞蛋白银染色
Fig.4 Amicronucleate cell by Protargol staining
箭头显示缺损的口围带 Arrow indicates defective AZM

2.2 总 RNA 定量定性分析

提取有小核细胞系和无小核细胞系总 RNA 后, 琼脂糖非变性凝胶电泳检测可见两条清晰的 28S rRNA 和 18S rRNA, 且 28S 条带的亮度接近 18S 条带亮度的两倍, 而 5S rRNA 的条带亮度非常弱, 这说明所提取的总 RNA 分子完整性好, 没有降解(图 5)。另用紫外分光光度计测得所提取的总 RNA 在 260nm、280nm 的光吸收值分别为 0.168、0.084, $OD_{260}/OD_{280}=1.99$, $OD_{260}/OD_{230}=2.50$, 这说明所提取的总 RNA 基本上没有蛋白质、酚或胍盐污染, 均一性良好。

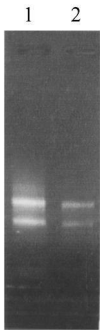


图 5 冠突伪尾柱虫总 RNA 琼脂糖凝胶电泳
1 无小核系; 2 显示有小核系
Fig.5 Agarose gel electrophoresis of total RNA
Lane 1. RNA from amiconucleate cell lines;
Lane 2 RNA from micronucleate cell lines

2.3 cDNA 合成及酶切

为了得到最好的合成效果, 对 LD-PCR 循环参数进行了优化。结果显示, 当循环参数达到 18 个循环时, PCR 反应到达平台期, 因此在正式实验时选用 17 个循环作为 cDNA 第二条链的最佳循环次数。合成双链 cDNA 长度约在 0.3—3kb, 其中在 0.4kb 和 1.2kb 各有一亮带, 代表表达丰富的基因, 见图 6。经 *Rse* I 酶切以后 cDNA 长度明显缩短, 条带前移, cDNA 酶切成功。

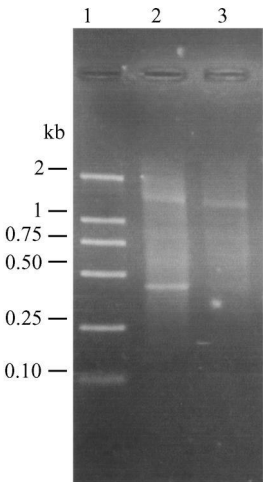


图 6 合成的 dscDNA 的琼脂糖电泳分析
1. PCR Marker(DL2000); 2 有小核细胞系 dscDNA;
3 无小核系的 dscDNA.
Fig.6 Agarose gel electrophoresis analysis of synthesized dscDNA
lane 1. PCR marker(DL2000); lane 2 dscDNA from micronucleate cells;
lane 3 dscDNA from amiconucleate cells.

2.4 消减 cDNA 文库的构建及筛选

在正向消减 cDNA 中, 未进行消减杂交和进行消减杂交后第二次 PCR 扩增产物见图 7, 两者的条带明显不同, 在消减杂交后的泳道 0.4—1.5kb 区域内, 可见未消减杂交没有的条带, 这些条带可能含有差异基因的 cDNA 片段的扩增产物。这表明通过消减杂交后差异表达的基因得到了有效扩增。将正向消减杂交的第二次 PCR 产物与载体连接转化后, 随机挑选白色菌落, PCR 检测插入效率和插入片段的长度。图 8 显示插入片段长度在 200—800bp 之间, 表明消减文库构建成功。

2.5 斑点杂交

cDNA 斑点杂交的部分结果见图 9, 从图中可以看出, 来自正向消减杂交文库的克隆与正向消减的 cDNA 杂交时, 信号较强, 而与反向消减的 cDNA 杂交时, 无信号或信号变弱, 表明它们均可能为饥饿状态下有小核系表达上调的克隆。

2.6 测序分析

17 个鉴定为差异表达阳性克隆序列已提交 GenBank, 部分序列号为: AY736327、CX006468、CX006469、CX006470、CX006471、CX006472、CX006473、CX006474、CX006475、CX006476、CX006477。对所测序列进行 BLAST 分析, 其中 11 个克隆在核酸水平和氨基酸水平都没有保守域, 初步鉴定为新基因, 有 4 个克隆(CX006474、CX006476)与四膜虫的肌球蛋白在氨基酸水平同源性达 66%,

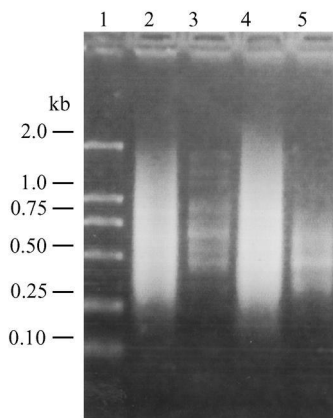


图7 第二次抑制性PCR产物分析
泳道1. PCR Marker(DL2000); 泳道2 正向未消减 cDNA;
泳道3. 正向消减 dscDNA; 泳道4 反向未消减的 dscDNA;
泳道5. 反向消减的 dscDNA

Fig. 7 Analysis of the secondary PCR products.
Lane 1. PCR marker(DL2000); Lane 2 Forward unsubtract cDNA;
Lane 3. Forward subtracted cDNA; Lane 4. Reverse unsubtract cDNA;
Lane 5 Reverse subtracted cDNA

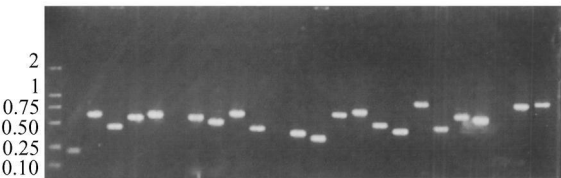


图8 插入片段 PCR 扩增产物凝胶电泳

Fig. 8 Amplify cDNA inserts by PCR

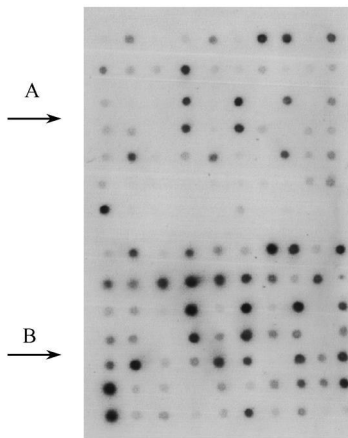


图9 cDNA 斑点杂交部分结果

Fig. 9 Part Result of cDNA by dot bbt

A: 正向消减文库的克隆与反向消减的 cDNA 杂交
Dot blot hybridized with cDNA probe made from Reverse subtracted cDNA

B: 正向消减文库的克隆与正向消减的 cDNA 杂交
Dot blots hybridized with cDNA probe made from Forward subtracted cDNA

1 个克隆(CX006469)与果蝇的细胞质苹果酸盐脱氢酶氨基酸水平相似性达 53%, 最后一个克隆(CX006472)与草履虫的热休克蛋白 HSP90 同源性达 82%, 被认为系热休克蛋白 HSP90 基因的 EST。

3 讨论

细胞在发育和分化等过程中, 常有特定功能基因的表达式开放或关闭, 通过分析不同时期细胞或组织间基因表达的差异, 可为揭示生命活动过程的规律提供重要信息^[9]。抑制性消减杂交 (SSH) 是近年来发展起来的一种寻找差异表达基因的有效方法, 尤其在克隆低丰度差异表达基因时具有极大的优势^[9]。该方法已被成功用于克隆纤毛虫大核发育时特异表达的基因^[7]。

对多种纤毛虫的有小核和无小核细胞的形态学和形态发生学比较研究均表明: 小核对维持正常的口器结构, 大核数目和结构稳定性发挥着重要作用^[1-3, 8-14]。那么小核的体功能表现在哪个水平, 是直接表达蛋白质, 还是通过转录的小 RNA 分子来调控大核基因的表达则依然是未解之谜。带着这一系列疑问, 作者以冠突伪尾柱虫为材料采用抑制性消减杂交技术构建了有小核和无小核细胞系在饥饿期的 cDNA 消减文库, 试图筛选出这两个细胞系在饥饿期差异表达的候选基因, 结果表明这两个细胞系在饥饿期存在明显的基因表达差异。这显示在有小核细胞系中, 小核的存在能特异性地提高或开启某些基因的表达。除 11 个为新基因外, 另外 5 个基因分别与肌球蛋白和胞质苹果酸盐脱氢酶同源, 这两个蛋白都与能量传递有关。由此表明这两个细胞系在饥饿期的生长代谢存在差异。值得关注的是与 Hsp90 蛋白同源的阳性克隆, 据报道 Hsp90 蛋白在应激条件下, 将作为分子伴侣参与维持细胞骨架的稳定性。在四膜虫中, 特异地抑制 Hsp90 的表达, 四膜虫的口器发生严重缺损^[15], 这与冠突伪尾柱虫无小核细胞系所表现的口器缺损现象有相似之处, 然而 Hsp90 为何在有小核细胞系的饥饿期表达上调? 冠突伪尾柱虫的 Hsp90 蛋白是否也定位于口器? 小核又是如何介导该基因的上调表达还需要进一步的实验研究。最近, Mochizuki 发现在大核发育过程中, 来自小核的一些小 RNA 分子以类似 RNA 干涉的过程介导大核发育过程中基因组重排和删减^[16], 另有研究表明组蛋白 H3 第九个赖氨酸的甲基化是这一表观遗传的基因印记标记^[17]。这些研究结果启发笔者将进一步探索在无性繁殖过程中小

核是否也转录一些小 RNA 分子, 通过表现遗传的途径特异地调控大核基因的表达, 从而介导纤毛虫细胞的发育和分化。

参考文献:

[1] Ng S F. The somatic function of the micronucleus of ciliated protozoa [J] . *Prog. Protisto.* , 1986, **1**: 215—286

[2] Jin L P, Ng S F. The somatic function of the gem nucleus in *Pseudostyla cristata*: asexual reproduction and stomatogenesis[J] . *J. Protozool.* , 1989, **36**: 315—332

[3] Jin L P, Jin H Z. Micronuclear effect on structural stability of the oral apparatus in hypotrichous ciliate *Pseudostyla cristata*[J] . *Acta Zool. Sin.* , 2002, **48**(2): 258—263[金立培, 金华中. 冠突伪尾柱虫小核对胞口结构稳定性的影响. 动物学报, 2002, **48**(2): 258—263]

[4] Liu X Y, Mao Y Z, Cheng J H, *et al.* Total RNA extraction from large ciliate[J] . *Chin. J. Zool.* , 2004 **39**(5): 44—47[刘星吟, 毛永真, 陈建欢, 等. 大型纤毛虫总 RNA 的提取方法, 2004, **39**(5): 44—47]

[5] Kozian D H, Kirschbaum B J. Comparative gene-expression analysis [J] . *Trends Biotechnol.* , 1999, **17**(2): 73—78

[6] Diatchenko L, Lau Y F, Campbell A P, *et al.* Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue specific cDNA probes and libraries[J] . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* , 1996, **93**: 6025—6030

[7] Fetzer C P, Hogan D J, Lipps H J. A PIWI homolog is one of the proteins expressed exclusively during macronuclear development in the ciliate *Stybnychia lemnae*[J] . *Nucl. Acid. Res.* , 2002, **30**(20): 4380—4386

[8] Liu X Y, Jin L P. A preliminary study on somatic function of micronucleus in *Pseudokinetops monikata* [J] . *Zool. Res.* , 2002, **23**(3): 258—260[刘小意, 金立培. 念珠伪角毛虫小核体功能初步研究. 动物学研究, 2002 **23**(3): 258—260]

[9] Jin L P, Liu X Y. Study on the somatic function of the micronucleus in *Paraurostyla weisei*[J] . *Acta Scien. Natur. Univ. Sun Y. S.* , 2000 **39**(5): 120—122[金立培, 刘小意. 魏氏拟尾柱虫小核体功能的研究. 中山大学学报(自然科学版), 2000, **39**(5): 120—122]

[10] Lu L, Ng S F. Somatic function of the micronucleus in *Stybnychia mytilus* during asexual propagation[J] . *Europ. J. Protistol.* , 1991, **27**: 26—39

[11] Liu X Y, Cheng L, Jin L P. Studies on the Production of Amicronucleate clones of *Histriculus smiles* by cis-platin Treatment[J] . *Acta Scien. Natur. Univ. Sun Y. S.* , 2003, **42**(6): 60—63[刘星吟, 陈琳, 金立培. Cis-platin 去似织毛虫 *Histriculus smiles* 小核的研究. 中山大学学报(自然科学版), 2003, **42**(6): 60—63]

[12] Jin L P, Liu X Y, Zhang Z L, *et al.* Micronuclear effect on structural stability of oral apparatus in *Uroleptus pisis*[J] . *Jpn. J. Protozool.* , 2002, **35**(suppl.): 41

[13] Takahashi, T I. Reorganization in amiconucleates with defective mouth of the ciliate *Pseudostyla levis*[J] . *J. Protozool.* 1988, **35**: 142—150

[14] Haremak T, Sugai T. The vegetative micronucleus has a critical role in maintenance of cortical structure in *Tetrahymena thermophila*[J] . *Cell Struct Funct.* , 1995, **20**(3): 239—244

[15] Frankel J, Williams N E, Nelsen E M, *et al.* An evaluation of Hsp90 as a mediator of cortical patterning in *Tetrahymena*[J] . *J. Eukaryot Microbiol.* , 2001, **48**(2): 147—160

[16] Mochizuki K, Fine N A. Analysis of a piwi-related gene implicates small RNAs in genome rearrangement in *Tetrahymena* [J] . *Cell*, 2002 **110**(6): 689—699

[17] Liu Y, Mochizuki K, Gorovsky M A. Histone H3 lysine 9 methylation is required for DNA elimination in developing macronuclei in *Tetrahymena*[J] . *Proc Natl Acad Sci USA.* , 2004 **101**(6): 1679—1684

IDENTIFICATION OF ESTs EXPRESSED DIFFERENTIALLY BETWEEN MICRONUCLEATES AND AMICRONUCLEATES OF HYPOTRICHOUS CILIATE, *PSEUDOUROSTYLA CRISTATA* DURING STARVATION

LIU Xing-Yin¹, MAO Yong-Zhen¹, LI Gan-Lin² and JIN Li-Pei¹

(¹ Life Science School, Zhongshan University, Guangzhou 510275;

² Department of Applied Biology and Chemical Technology, Hong Kong Polytechnic University)

Abstract: Based on morphologically comparative studies on amiconucleates and micronucleates of a ciliate protozoa, *Pseudourostyla cristata*, it is supposed that the micronucleus absence may result in abnormal development of the subsurface cytoskeleton and/or other supportive elements in the vicinity of the AZM during depression phase such as starvation. To understand the molecular events governing this mode, we employed suppression subtractive hybridization (SSH) to identify candidate genes which express in micronucleate cells but not in amiconucleate specimens during starvation. A total of 284 transcripts were screened by cDNA array. 17 clones were confirmed to be differentially expressed among micronucleate cells. The ESTs (expressed sequence tags) were analyzed by blaster matching in GeneBank at nucleotide and deduced amino acid sequence: 11 clones showing no homologous protein; 4 clones showing myoglobin protein; 1 clone showing cytosolic malate dehydrogenase. Interestingly, the last clone, homolog of hsp90. Traditionally, heat shock proteins are known for their function during cellular stress as molecular chaperones responsible for the folding, refolding and transport of newly synthesized protein. As to whether Hsp90 homolog is associated with microtubules in AZM to hold up its structure, and why it is significantly enhanced in micronucleate cells during starvation, further research need to be carried out.

Key words: Suppression subtractive hybridization; Differentially expressed genes; *Pseudourostyla cristata*; Macronuclei; Micronuclei