

无核仁原生动物蓝氏贾第虫 rDNA 的分布*

陈泳宏^① 郭建^② 李靖炎^③ 刘平^① 张留宝^①

(^①第二军医大学南京军医学院组胚教研室 南京 210099; ^②南京林业大学环境学院动物学教研室 南京 210037;

^③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: 过去的工作已表明,源真核生物(Archezoa)中的双滴虫类极其原始,核中尚无核仁发生,以蓝氏贾第虫(*Giardia lamblia*)作为双滴虫类的代表,用高度特异的核仁组织区银染法(改良的 Ag-I 法,李靖炎,1985)在电镜下检视其 rDNA 在核中的分布。结果发现,代表 rDNA 之所在的银粒并不集中形成任何类似核仁组织区或核仁纤维区的结构;在作为对照的小眼虫(*Euglena gracilis*)体内,银粒则完全集中在核仁纤维区中,因此,作者以为贾第虫 rDNA 的这种分布代表着核仁组织区进化形成以前的一种原始状态。

关键词: 蓝氏贾第虫;无核仁的核;核仁组织区银染;rDNA 的分布;细胞核的起源

中图分类号: Q954.52 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2002)05-02-04

Distribution of rDNA in the Nucleus of *Giardia lamblia* : Detection by Ag - I Silver Stain

CHEN Yong-Hong^① GUO Jian^② LI Jing-Yan^③ LIU Ping^① ZHANG Liu-Bao^①

(^① Department of Histology and Embryology, Nanjing Military Medical College of the Second Military Medical University Nanjing 210099;

^② Animal Group of Environment College, Nanjing Forestry University Nanjing 210037;

^③ Laboratory of Cellular and Molecular Evolution, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences Kunming 650223, China)

Abstract: Previous investigations have already proved that diplomonads are very primitive in their cell nucleolus, nucleolus had not emerged. We detected the distribution of rDNA in diplomonad nuclei that lacked a nucleolus. *Giardia lamblia* was used as the experimental animal with *Euglena gracilllis* as the control. The distribution was demonstrated indirectly by the modified Ag-I silver technique (Jingyan Li, 1985) which can specifically indicate the nucleolus organizing region (NOR) under both light and electron-microscopes.

In the ultrathin section of the silver stained *Euglena* cells, all the silver grains concentrated in the fibrosa of the nucleolus, while no silver grains were found in the cytoplasm, nucleoplasm, condensed chromosomes or the pars granulose of the nucleus (fig. 2). In the silver stained *Giardia* cells, no nucleolus was found, a few silver grains were scattered in the nucleolus and did not concentrate in any specific region (fig. 4). This result means that the rDNA of *Giardia* does not form a NOR-like structure and that it seems to be in a very primitive state.

Key words: *Giardia lamblia*; The nucleus without nucleolus; Silver staining of NOR; The distribution of rDNA; The origin of cell nucleus

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 39370345);

第一作者介绍 陈泳宏,女,29岁,讲师,硕士;研究方向:细胞与分子生物学。

收稿日期:2002-04-20,修回日期:2002-06-21

核仁是真核生物的细胞核普遍具有的功能性结构,关于核仁的进化形成迄今尚无确切的了解,如能找到尚无核仁的原始性真核生物,对于研究核仁的起源必将大有帮助。

源真核生物是近年确定的一个极为低等的真核生物类群,它们还没有线粒体和真正的高尔基氏器,核糖体也与原核生物的一样,属 70S 型而非一般生物的 80S 型,现已确知的源真核生物有双滴虫类、微孢子虫类和原变形虫类。微孢子虫类和原变形虫类都已报道具有核仁(都还缺乏深入的检查),但有些报道表明,双滴虫类可能还没有核仁^[1-5],李靖炎实验室近年来以贾第虫作为代表,对双滴虫类究竟有无核仁进行了研究,结果确认它们还没有核仁,因此是极为原始的真核生物^[6-8]。

双滴虫类既然还没有核仁,那么它们究竟怎样制造其核糖体,这种制造方式与原核生物和一般真核生物究竟有何异同,就成为急待解决的问题,而这也正是了解核仁进化形成的关键之一。为此首先就要研究它们的 rDNA。贾第虫的 rDNA 久已为王正中先生的实验室所分离和研究^[9],但是关于它们的 rDNA 在核内怎样分布,是否构成为类似核仁组织区的结构,国际上迄今还没有任何报道。作者用高特异性的核仁组织区银染法对蓝氏贾第虫的细胞核进行了电镜检查,得到了很有意思的结果。

1 材料与方 法

所用材料为无菌培养的蓝氏贾第虫(*Giardia lamblia*)SICH/89/BTMRI(C2)株,由首都医科大学卢思奇先生惠赠,并按 TYI-S-33 改良培养基在 37℃ 下培养,对照虫株小眼虫(*Euglena gracilis*)为北京大学陈阅增教授惠赠。

首先作常规的电镜超薄切片观察:4%戊二醛-锇酸双固定,Epon 812 包埋,醋酸铀-柠檬酸铅双染。为指示 rDNA 的所在,采用可高度特异性地在光镜下和电镜下显示出核仁组织区的改进 Ag-I 法^[10],其具体过程简述如下:离心收

集虫体,4%戊二醛于 4℃ 固定 1 h,经双蒸水 5 次水洗(各 5~10 min)后用 Carnoy 氏固定液(3:1)处理 5~10 min;之后经 70%、50%、30%酒精逐步加水,再经双蒸水 5 次水洗(各 5~10 min)后,投入已配制的含 1% 醋酸钠的 50% AgNO₃ 溶液中,在 37℃ 下染 7~8 h,再经双蒸水 5 次水洗(各 5~10 min),部分材料制成光镜制片,其余材料经 Epon 812 包埋制成超薄切片,醋酸铀染色。

2 结 果

蓝氏贾第虫的常规电镜切片(图 1)所示:其细胞核中没有核仁和染色体结构。蓝氏贾第虫经银染后,在光镜下可见细胞质完全无色,两个核的轮廓依稀可见,但核中并无任何核仁样的结构被染色,电镜观察结果(图 3)所示:核中没有集聚大量银粒的核仁,银粒散布在整个细胞核中,这意味着其 rDNA 并未在核中形成类似核仁组织区的结构,细胞质中也没有银粒出现。

作为对照的小眼虫核中有一较大的核仁和多条染色体(图 2)。经银染后在光镜下可以看到核仁被染成深褐色,而核质、细胞质则完全无色;在油镜下可以看出并非整个核仁全都被着色,其周边部分是不着色的,这一结果与李靖炎先生过去用此法染示闪光双甲藻(*Peridinium*)、卡氏双甲藻(*P. cassublia*)^[10]、飞燕角藻、双角多甲藻(*P. bipes*)、尖尾藻(*Oxyrrhis marin*)^[11]等多种甲藻(涡鞭毛虫)和一些原生生物时所得到的结果完全一致,在核仁较大时,在光镜下即可看出核仁颗粒区是不着色的,着色的只是核仁纤维区;对银染后的小眼虫作电镜超薄切片观察(图 4),可见银粒完全集中在核仁纤维区中,核仁颗粒区、核质、致密的染色体及细胞质中都没有银粒,这一结果与李靖炎先生过去对涡鞭毛虫类银染后所得到的电镜观察结果也是完全一致的。

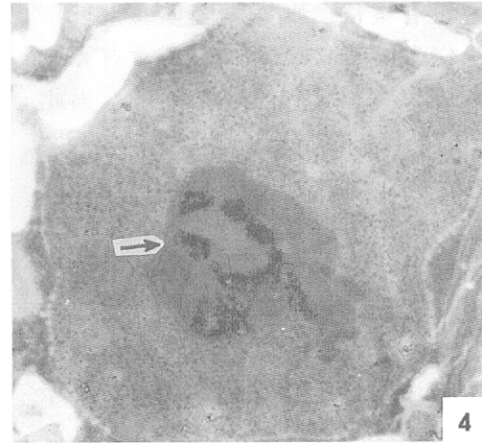
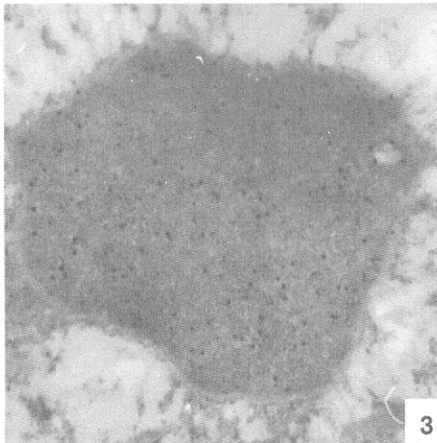
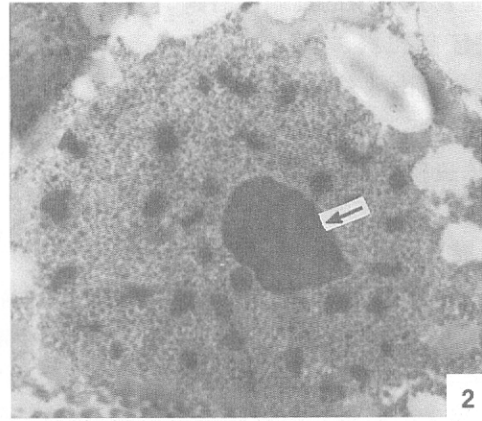
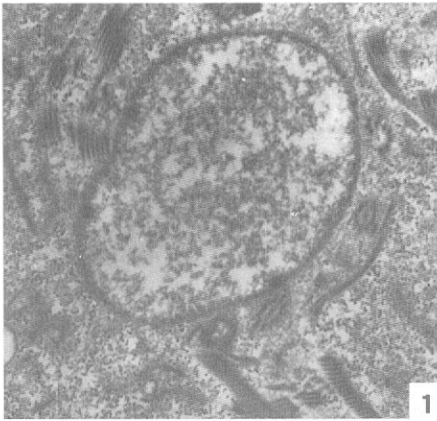


图1 蓝氏贾第虫的细胞核 核质较均匀,无染色体和核仁结构 ×15 000
 图2 眼虫的细胞核 核中有一较大的核仁(↑)和多条染色体 ×7 000
 图3 银染后的蓝氏贾第虫的细胞核 银粒在核内呈弥散分布 ×17 000
 图4 银染后的小眼虫细胞核 银粒集中分布在核仁纤维区(↑) ×17 000

3 讨 论

几乎所有有翻译活性的真核细胞的间期核中都有显著的核仁结构。核仁的功能是制造核糖体(转录 rRNA 和装配核糖体亚单位),它主要由 DNA、RNA 和蛋白质组成,有一些蛋白较特异地定位于核仁中或在核仁中含量较丰富,如 RNA 聚合酶 I、Nucleolin、核仁蛋白、Ag-NOR 蛋白等。在光镜下,核仁是均质而致密的结构;在电镜下,按其细微结构可以分为三个区:①颗粒区,含有核糖体前身颗粒;②纤维区,含有正在转录的 RNA 分子;③核仁内染色质区,它主要由伸入核仁的染色质纤环构成。现在的研究

已基本证明 rDNA 的转录发生在核仁纤维区。

就目前所知,核仁组织区(NOR)有两个作用:一个是制造 rRNA;另一个则是为前核仁物质或前核仁小体提供一个集合中心,以构成核仁。已知用银染法显示核仁组织区(NOR)时,显示的并不是 rDNA 本身,而是与 rDNA 的转录特异相关的一种酸性蛋白^[12],因此银染所间接显示出来的只是有转录活动的 rDNA,后者在核仁中的分布仅在纤维区,因此银染后也只有核仁纤维区有银粒。

本工作表明最原始的单细胞真核生物贾第虫虽然没有核仁结构形成,但其 rDNA 的转录活动已集中在核内,从银染后银粒在核中的分

布来看,其 rDNA 并未集中在一起,也许是因为在双滴虫类的细胞核中,诸染色体彼此分化的程度极低,每个染色体上都只有很少的几个 prRNA 基因,从而不可能起到核仁组织者的作用。其转录活动不足以促成核仁的形成,这也许正代表着进化过程中核仁发生以前的一种原始状况^[13]。

致谢 感谢中国科学院昆明动物研究所细胞与分子进化开放研究实验室文建凡研究员、电镜室刘得胜主任的帮助。

参 考 文 献

- [1] Soloviev M M. Cytochemical study of lamblia duodenahs. *Parazitoli Bilezni*, 1963(6):675 ~ 678.
- [2] Friend D S. The fine structure of *Giardia muris*. *J Cell Biol*, 1966, **29**:310 ~ 332.
- [3] Brugerolle G, Joyon L, Oktem N. Contribution a l'etude cytologique et phyletique desdiplozoairse. II Etude ultrastructurale du genre Spironucleus. *Protistologica*, 1973, **9**(4): 495 ~ 502.
- [4] Desser S S, Hong H, Siddull M E. An ultrastructured study of *Brugerolleia algonquinensis* gen. nov. sp. nov. *Eur. J Protistol-*
ogy, 1993, **29**:72 ~ 80
- [5] Ferguson H W. Scanning and transmission electron microscopy, observation on Hexamita Salmonis related to mortalities in rainbow trout fry salmo gairdneri. *J Fish Dis*, 1979, **21**:57 ~ 67.
- [6] Li J Y. Characterozation of *Giardia* cell nucleus: its implication on the nature and origin of the primitive cell nucleus. *Cell Res*, 1995, **5**(1):115 ~ 124.
- [7] 李靖炎. 双滴虫类与细胞起源问题的探索. *动物学研究*, 1996, **17**(3):275 ~ 280.
- [8] Li J Y, He Y H, Chen S F. The primitive cell nucleus, in which nucleolus has not emerged yet. *Endosymbiosis & Cell Res*, 1997, **12**:65 ~ 70.
- [9] Boothroyd J C, Wang Campbell, Wang C C. An unusually compact rDNA repeat in the protozoan *Giardia lamblia*. *Nuc Acids Res*, 1987(10):4 065 ~ 4 084.
- [10] Li J Y. On the nucleoli of the dinoflagellates *Protoctenium*. *Hydrobiologia*, 1985, **124**:45 ~ 48.
- [11] Gao X P, Li J Y. The nuclear division of the marine dinoflagellate *Oxyrrhis marina*. *J Cell Sci*, 1986, **86**:161 ~ 175.
- [12] Hernandez Venun. The morphological relationship in electron microscopy between NOR-silver proteins and intranucleolar chromatin. *Chromosomal (Berl.)*, 1982, **85**:461 ~ 467.
- [13] 李靖炎. 细胞在生命进化历史中的发生——真核细胞的起源. 北京:科学出版社, 1979. 93 ~ 133.