

蓝氏贾第虫核小体的初步研究^{*}

陈泳宏^① 郭建^② 李靖炎^③ 刘平^① 盛春宁^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研究实验室 昆明 650223)

摘要: 最原始的真核生物蓝氏贾第虫虽已有五种组蛋白,但以微球菌核酸酶水解却得不到规则的 DNA 片段。鉴于贾第虫的特殊进化地位,探讨其是否具有核小体结构,对于研究核小体的起源和进化具有重要的意义。采用改进的染色质铺展技术制备核小体并进行透射电镜观察。结果表明蓝氏贾第虫已有了直径约 10 nm 的核小体结构。作者认为核小体的形成可追溯到真核生物形成的初期甚至更早,核小体的完善则在真核生物形成之后。

关键词: 源真核生物;蓝氏贾第虫;核小体;组蛋白;进化

中图分类号:Q951 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2003)05-68-03

A Preliminary Study on Nucleosome in the Most Primitive Eukaryote — *Giardia lamblia*

CHEN Yong-Hong^① GUO Jian^② LI Jing-Yan^③ LIU Ping^① SHENG Chun-Ning^①

(^①Nanjing Military Medical College of the Second Military Medical University, Nanjing 210099;

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

^③Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China)

Abstract: Although five kinds of histone exist in the most primitive Eukaryote—*Giardia lamblia*, no regular DNA fragments are observed. In virtue of the special status of this species in evolution, it is very important to find out whether it has nucleosome in order to clarify the origin and evolution of nucleosome. Nucleosomes of *G. lamblia* were prepared with a modified technique of chromatin dispersion and observed with transmission electronmicroscopy. It is shown that is concluded that the formation of nucleosome might be in the early age of the origin of eukaryotic cell, while the perfect structure of nucleosome may be formed after the origin of eukaryotic cell.

Key words: Archezoa; *Giardia lamblia*; Nucleosome; Histone; Evolution

* 国家自然科学基金资助项目(No.3937345);

第一作者介绍 陈泳宏,女,30岁,讲师,硕士;研究方向:细胞与分子生物学。

收稿日期:2002-10-08;修回日期:2003-04-17

源真核生物(Archezoa)是目前所知的最原始的真核生物类群,它们还没有线粒体和典型的高尔基氏器,核糖体与原核生物的一样,属 70S 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^[1-3]。关于真核生物核小体的起源与早期进化目前已有的线索不多,解决这一问题的关键在于了解现存最原始的真核生物(特别是双滴虫类)的组蛋白和核小体的构成情况。蓝氏贾第虫是一种单细胞动物,是目前所知的最原始的真核生物之一。吴刚等^[6]报道了双滴虫类的代表蓝氏贾第虫已具有五种组蛋白,但以微球菌核酸酶水解却得不到规则的 DNA 片段,即并不出现 160~250 bp 长度差的规律电泳条带。鉴于其特殊的进化地位,进一步探讨其是否具有核小体结构,对于研究核小体的起源和进化具有十分重要的意义。由于迄今尚未有成功分离其细胞核的报道,因此作者用改进的染色质铺展技术制备核小体^[7,8],结果表明蓝氏贾第虫已有了直径约为 10 nm 的核小体结构。

1 材料与方 法

本实验以首都医科大学寄生虫学教研室卢思奇教授提供的蓝氏贾第虫(*Giardia lamblia*) SICH/89/BTMRI (C2)株为材料,用改良的 TYI-S-23 培养基^[9],于无菌条件下在 37℃ 恒温箱中避光培养。接种后 2~5 d 虫体呈单层贴壁生长,即可收获。

将培养 3 d 的含有贾第虫滋养体的培养管于 4℃ 预冷 1 h 使虫体脱壁,160 g 离心 10 min,收集虫体以生理盐水洗涤三次。取 1 μl 虫体沉淀物,加入 19 μl 预冷的 1/15 PBS(内含 1% NP-40),0℃ 分散 10 min;再加入 5 μl 0.5 mol/L NaOH,0℃ 分散 5 min。在自制的平底离心管中放入经亲水处理的载碳膜铜网,加入 7/10 体积的 0.1 mol/L 蔗糖溶液(10% 甲醛),上盖 1/10 体积的上述样品;在水平离心机以 4 000 g 离心 5 min,取出铜网。双蒸水洗三次,吸去多余水分,4% 磷钨酸染色 30 s,95% 乙醇脱水,空气干燥;透射电镜观察。

2 结 果

作者在 Torres-Guerrero 等^[7]以及许怀庆和陈楚楚^[8]的研究基础上,采用改进的染色质铺展技术制备核小体(即在低渗的同时加稀碱直接铺展)。观察结果表明,在大多数伸展状的纤维中,存在着念珠状的核小体结构,其较大颗粒的直径约 10 nm,但颗粒间的间距不完全相同,即呈现不规则的核小体结构模式(图 1)。由于核小体呈椭圆形,垂直直径约 5.7 nm × 10 nm^[10],故颗粒所处的构成面不同,看到的颗粒直径稍有差异。

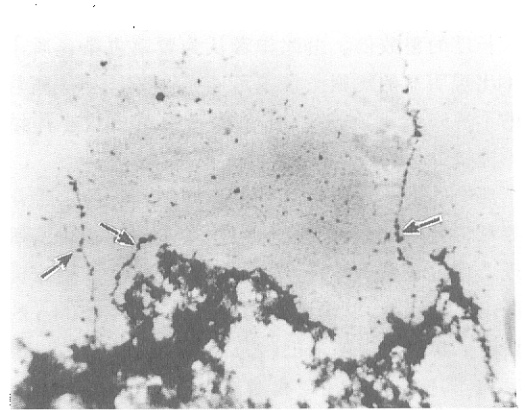


图 1 蓝氏贾第虫的核小体 ×1 000
呈不规则的串珠状结构(↑),较大颗粒的直径约 10 nm

3 讨 论

在大多数真核生物中,染色质均由核小体构成。核小体为蛋白核酸复合物,即由 200 bp 左右的 DNA 和一个组蛋白八聚体以及一个分子的组蛋白 H1 组成^[11]。当染色质在一定条件下分散开时,在电镜下可看到念珠状的核小体结构,典型的核小体直径为 10 nm。

核小体作为一种进化的产物,在不同的进化水平应具有不同的结构特征。在由原始的真核生物进化为典型真核生物的漫长过程中,应能找到其不同的进化痕迹。原核生物不存在典型的核小体,对于源真核生物核小体的了解也知之甚少。鉴于源真核生物所处的特殊进化地位,探索其核小体结构形式,或许可为研究类核小体结构如何转变为典型核小体结构提供重要的信息。

尽管在染色质铺展照片上可以很清楚地看到贾第虫核小体的结构,但以微球菌核酸酶水解染色质,却得不到规则的 DNA 片断,即在电泳后并不出现 160~250 bp 长度差的规律条带。贾第虫染色质水解物不出现规则条带的原因并非因虫体缺乏组蛋白结合于 DNA 链所致,原因是吴刚等不但已检测到了贾第虫已具有五种组蛋白,而且作者的电镜观察也显示有核小体颗粒存在。这种现象的出现有两种可能:①由于贾第虫染色质的改性核小体所形成,即由于基因表达的要求,使许多处于表达状态的基因所在的染色质结构解开;致使组蛋白的释放使 DNA 成为非保护状态,易于受微球菌核酸酶的作用,而处于活性状态的基因在染色体上的分布是不规则的,同时也造成了核酸酶水解片段的不规则性;②核小体颗粒间距的不规则性,即颗粒间的距离长短不一。在贾第虫核小体的电镜图片上的确出现

了此种现象,其核小体颗粒间的距离并不等长,也不是某一长度的整数倍。由此作者认为贾第虫染色质水解物不出现明显的规则条带极可能是由于核小体颗粒间距的不规则性所致,这一点也提示贾第虫核小体结构是不完善的,仍有原始结构的痕迹存在。

典型的真核生物都具有核小体结构。处于进化水平相对较低地位的种类,如锥虫(*Trypanisomes*),虽然在生理条件具有核小体,但结构并不稳定,若以微球菌核酸酶水解其样品,也检测不到规则的160~250 bp的电泳谱带。溶组织内阿米巴(*Entamoeba histolytica*)属源真核生物,其核小体直径与典型真核生物相似,为10 nm,但微球菌核酸酶水解片段仅为130 bp,比典型真核生物片段稍短。真核生物中最低等的蓝氏贾第虫已经有了核小体结构,较大的颗粒直径约10 nm,由于核小体呈椭圆形,垂直直径约5.7 nm×10 nm,因此由于颗粒所处的构成面不同,观察到的颗粒直径也会稍有差异。

根据本文结果推测,核小体的形成似可追溯到真核生物形成的初期甚至更早,而其结构的完善则可能在真核生物形成之后。

值得一提的是在做贾第虫的核小体铺展时,用的不是贾第虫的细胞核,而是用完整的细胞,一方面因为至今没有细胞核分离成功的例子,再者贾第虫细胞核的核被膜不完整^[12],可能无法分离到其细胞核。

致谢 感谢中国科学院昆明动物研究所细胞与分子进化研究实验室文建凡研究员、吴刚博士、电镜室刘得胜主任在工作中给予的帮助。

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] 李靖炎. 细胞在生命进化历史中的发生. 北京: 科学出版社, 1979. 93~107.
- [3] 郑国锷, 翟中和. 细胞生物学进展(第二卷). 北京: 高等教育出版社, 1989. 185~209.
- [4] 沈建钊. 贾第虫原始特性的研究进展. 动物学杂志, 1996, 31(1): 45.
- [5] 陈泳宏, 郭建, 李靖炎等. 无核仁原生动物蓝氏贾第虫rDNA的分布. 动物学杂志, 2002, 37(5): 2~5.
- [6] 吴刚, 李靖炎, 卢思奇. 蓝氏贾第虫组蛋白的初步研究. 动物学研究, 1996, 17(3): 301~305.
- [7] Torres-Guerrero H, Peattie D A, Meza I. Chromatin organization in *Entamoeba histolytica*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1991, 45: 121~130.
- [8] 许怀庆, 陈楚楚. 一种改进的制备染色质的方法. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23(1): 76~78.
- [9] Lu S Q, Wang Z Y, Zhu H. Establishment of an axenic culture of *Giardia lamblia* through preliminary passage in sucking gerbil. *Chinese Medical J*, 1990, 103(7): 583.
- [10] Wagner R P. Chromosome-A synthesis. New York: Wiley Liss, 1993. 53~64.
- [11] 翟中和. 细胞生物学. 北京: 高等教育出版社, 1993. 188~189.
- [12] 沈建钊, 李靖炎, 卢思奇. 蓝氏贾第虫核被膜缺口的电镜观察. 动物学研究, 1996, 17(3): 291~294.