

不同生理状态下膜状急纤虫大核 DNA 和线粒体 DNA 的多态性比较

陈季武 倪 兵 顾福康*

(华东师范大学生命科学学院 上海 200062)

摘要: 为探索纤毛虫在营养及休眠条件下两套遗传系统的作用关系,对膜状急纤虫(*Tachysoma pellionella*)营养细胞和休眠包囊大核 DNA、线粒体 DNA 进行了 RAPD 比较。结果显示,在所选用的 34 条随机引物中,大核 DNA 共扩增出 203 条片段,其中以休眠包囊大核 DNA 为模板扩增出 45 条特有片段,以营养细胞大核 DNA 为模板扩增出 36 条特有片段,两者存在 40% 的差异。在所选用的 32 条随机引物中,线粒体 DNA 共扩增出 216 条片段,其中以休眠包囊线粒体 DNA 为模板扩增出 35 条特有片段,以营养细胞线粒体 DNA 为模板扩增出 47 条特有片段,两者有 38% 的差异。结果表明,膜状急纤虫休眠包囊与营养期的大核 DNA 结构存在显著的差异,两者的线粒体 DNA 结构也存在较大差异。这表明,膜状急纤虫在包囊形成过程中,大核及线粒体 DNA 结构可能都发生了一定的变化,并且这些变化可能与包囊形成过程中的形态结构和代谢活动等剧烈变化以及休眠状态下的生理生化变化密切相关。

关键词: 膜状急纤虫,大核 DNA,线粒体 DNA,休眠包囊,营养细胞

中图分类号:Q952 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2006)01-01-06

Comparison of Polymorphic Patterns of Macronuclear and Mitochondrial DNA in *Tachysoma pellionella* under Different Physiological Conditions

CHEN Ji-Wu NI Bing GU Fu-Kang

(School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract: The macronuclear and mitochondrial DNAs from vegetative and resting cells of Ciliophora protozoa *Tachysoma pellionella* (TP) were comparatively analyzed using RAPD technique to explore the relationship between two genetic systems of ciliates under vegetative and resting conditions. A total of 203 fragments were amplified from the resting cyst and the vegetative cell DNAs using 34 random primers, of which 45 fragments were specific to the resting cyst macronuclear DNA and 36 fragments were specific to the vegetative cell macronuclear DNA. The variance value was 40%. A total of 216 fragments were amplified from the resting cyst and the vegetative cell mitochondrial DNAs using 32 random primers, of which 35 fragments were specific to the resting cyst mitochondria DNA and 47 fragments were specific to the vegetative cell mitochondrial DNA. The variance value was 38%. These data suggest that there is variance in the structures of both macronuclear DNA and mitochondrial DNA in the resting cyst and the vegetative cells. Therefore, in the process of cyst formation, the structures of the macronuclear and mitochondrial DNAs undergo

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No.30270160);

* 通讯作者, E-mail: jkgu@bio.ecnu.edu.cn;

第一作者介绍 陈季武,博士,副教授,研究方向 动物细胞和分子生物学。

收稿日期 2005-06-01,修回日期 2005-11-28

some changes , which are closely related to the dramatic changes in structural features and metabolic activities and to the physiological and biochemical changes in the resting state.

Key words :*Tachysoma pellionella* ; Macronuclear DNA ; Mitochondrial DNA ; Resting cyst ; Vegetative cell

纤毛虫在特定环境条件下形成包囊是一种常见的现象。在纤毛虫包囊现象的研究中 ,对包囊形成过程中细胞结构的分化迄今已积累了较多的资料^[1 2]。其中值得注意的是 ,纤毛虫形成包囊时随着细胞结构的分化 ,大核经历了显著的变化 ,如凝缩或融合成圆球 ,染色质的形态及其大核内的定位也发生连续的改变 ,DNA 含量明显减少 ,细胞脱包囊时核又恢复为正常状态^[3~6]。对纤毛虫细胞中发生的这种核现象 ,除显微和亚显微水平的工作外 ,目前尚未进行深入的探讨 ,对细胞形成包囊过程中 DNA 的变化动态也知之不多。本文应用 RAPD 技术 ,对腹毛类纤毛虫膜状急纤虫 (*Tachysoma pellionella*) 休眠包囊与营养细胞大核 DNA、线粒体 DNA 作了比较分析 ,以期为揭示纤毛虫细胞结构的分化与细胞遗传物质的作用关系问题提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料 膜状急纤虫采自华东师范大学小湖内 ,经分离和建立纯系培养。

将急纤虫接种至培养皿中 ,置于 25℃ 的恒温培养箱中 ,以池塘过滤水中加入麦粒后形成的麦粒发酵液进行培养 ,每 4 ~ 6 d 更换一次培养液 ,使虫体达到较高密度和良好的营养生长状态。在虫体达到较高密度后 ,不再更换培养液 ,并中断食物供给 ,几天后大部分虫体转变为包囊。

1.2 方法

1.2.1 大核 DNA 的提取 休眠包囊与营养细胞大核 DNA 的提取按照孙军等的改良盐方法操作^[7]。

1.2.2 线粒体 DNA 的提取 休眠包囊与营养细胞线粒体 DNA 的提取参照杜宝剑等方法操作^[8]。

1.2.3 DNA 浓度及纯度的测定 利用紫外分光光度计测定吸光度 A 值 ,通过 A₂₆₀/A₂₈₀ 的比

值判断样品 DNA 纯度。此比值均大于 1.80。

1.2.4 RAPD 多态性条带的扩增及产物的分离 以大核 DNA 和线粒体 DNA 为模板 ,选用 34 个引物进行扩增分析 ,所选引物序列见表 1。

表 1 大核和线粒体 DNA 扩增所用随机引物及序列
Table 1 Random primers and sequences used in macronuclear and mitochondrial DNA amplification

随机引物 Random primer	序列 Sequence	随机引物 Random primer	序列 Sequence
S1	5' GTTTCGCTCC3'	S52	5' CACCGTATCC3'
S2	5' TGATCCCTGG3'	S55	5' CATCCGTGCT3'
S4	5' GGACTGGAGT3'	S58	5' GAGAGCCAAAC3'
S7	5' GGTGACGCAG3'	S64	5' CCGCATCTAC3'
S8	5' GTCCACACGG3'	S103	5' AGACGTCCAC3'
S18	5' CCACAGCAGT3'	S163	5' CAGAAGCCCA3'
S19	5' ACCCCCGAAG3'	S167	5' CAGCGACAAG3'
S20	5' GGACCCCTAC3'	S174	5' TGACGGCGGT3'
S23	5' AGTCAGCCAC3'	S176	5' TCTCCGCCT3'
S27	5' GTGATCGCAG3'	S180	5' TCTCCGCCT3'
S28	5' GTGACGTAGG3'	S183	5' CAGAGGTCCC3'
S30	5' GTGATCGCAG3'	S217	5' CCAACGTGCT3'
S38	5' AGGTGACCGT3'	S259	5' GTCAGTCCGG3'
S40	5' GTTGGCATCC3'	S267	5' CTGGACGTCA3'
S44	5' TCTGGTGAGG3'	S283	5' ACAGCCTGCT3'
S47	5' TTGGCACGGG3'	S319	5' TGGCAAGGCA3'
S50	5' GGTCTACACC3'	S755	5' AACCGACGGG3'

用实验所得最佳反应体系进行 RAPD 扩增 ,反应总体积为 25 μL。包括 :Tris-HCl 10 mmol/L ,KCl 50 mmol/L ,MgCl₂ 2 mmol/L ,4 种 dNTP 共 200 μmol/L ,随机引物 15 ng ,大核 DNA (或线粒体 DNA)15 ~ 20 ng ,Taq DNA 聚合酶 2.5 单位。混匀 ,加盖石蜡油。RAPD 反应过程 :预变性 94℃ 3 min ,变性 94℃ 1 min ,退火 38℃ 1 min ,延伸 72℃ 1 min ,共循环 38 次 ,完成最后一次循环后 72℃ 延伸 4 min。

扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶 (EB 终浓度为 0.5 μg/ml) 在 1 × TAE 缓冲液中 ,80 V 电压电泳 1 h 分离 ,在凝胶成像仪中观察、记录、拍照。利

用 SmartView 软件进行图像的分析处理。随机扩增电泳条带大小由 SmartView 软件根据 DNA Marker DL2000 标准条带(分子量分别为 100、250、500、750、1 000、2 000 bp)比较获得。

根据 Nei 和 Li 公式: $F = 2N_{XY} / (N_X + N_Y)$ 计算样品的共享度。其中, F 为共享度。 N_{XY} 表示两个物种共有片段数; N_X 、 N_Y 分别表示 X 物种、 Y 物种扩增片段总数^[7]。

2 结果与讨论

2.1 大核 DNA 的多态性分析 膜状急纤虫大核 DNA 的 RAPD 结果如图 1 所示,在所选用的 34 条随机引物中,有 6 条引物的扩增产物完全不同,其余 28 条引物的扩增产物各有差异。34 条引物共扩增出 203 条片段,片段大小大部分在 280 ~ 1 500 bp 之间,其余在 200 ~ 1 800 bp 之间。其中以休眠包囊大核 DNA 为模板扩增出 106 条片段,以营养细胞大核 DNA 为模板扩增出 97 条片段,两者有 61 条共享片段,根据 Nei 和 Li 公式计算出两者的共享度为 60%,休眠包囊大核 DNA 扩增出 45 条特有片段,营养细胞大核 DNA 扩增出 36 条特有片段,两者存在 40% 的差异。

以 S1、S7、S40、S50、S217 和 S755 为引物,膜状急纤虫休眠包囊与营养细胞大核 DNA 扩增产物完全不同,共扩增出 17 条片段。如利用引物 S40,休眠包囊扩增出一条 857 bp 的片段,而营养细胞扩增出 629 bp、750 bp、1 000 bp 和 1 824 bp 4 条片段。余下 28 种引物扩增出来的大核 DNA 片段不尽相同,其共享度变化范围为 33% ~ 83% 之间,如利用引物 S55,休眠包囊与营养细胞大核 DNA 除了都扩增出 445 bp 和 548 bp 两条片段之外,两者还分别扩增出一条 280 bp 和 705 bp 片段。

纤毛虫生命周期中,大核形态发生规律性的变化。大核发育期间 DNA 复制过程中,其 DNA 发生重组等结构变化,包括剪接、剪切、重排和消除^[9]。但对于纤毛虫形成休眠包囊过程中其大核 DNA 结构的变化报道甚少。顾福康等发现,包囊游仆虫(*Euplotes encysticus*)形成休

眠包囊时,大核融合收缩成圆环形,大核染色质松散分布,其大核 DNA 含量只相当于营养细胞的一半^[1]。Palacios 等报告,膨大肾形虫(*Colpoda inflata*)在形成包囊过程中涉及特异 DNA 去甲基化^[10]。Karajan 等报告,双环栉毛虫(*Didinium nasutum*)形成包囊期间,大核核仁结构急剧变化^[11]。本实验结果显示,膜状急纤虫休眠包囊与营养细胞两者大核 DNA 扩增片段存在着一定的差异,提示急纤虫形成包囊时大核 DNA 结构可能发生了变化。推测这些 DNA 差异片段的产生也可能与大核 DNA 的重组、缺失和修饰有关。与营养细胞相比较,急纤虫休眠包囊大核 DNA 结构的变化与细胞由营养状态下的代谢活动向相对静止状态的转化以及休眠的生理生化特征密切相关。因此,外界环境条件的突然变化(温度的变化、食物缺乏等)致使细胞(纤毛)运动停止,胞器功能活动(尤其是胞口的摄食、食物泡的消化及其他胞器相联系的功能活动)减弱,最终细胞形成休眠包囊,这些细胞生命活动的明显变化与细胞大核基因组的变化可能是互为因果关系。

2.2 线粒体 DNA 的多态性分析 膜状急纤虫线粒体 DNA 的 RAPD 结果如图 2 所示。在所选用的 32 条随机引物中,有 1 条引物的扩增产物完全相同,3 条引物的扩增产物完全不同,其余 28 条的扩增产物不尽相同。32 条引物共扩增出 216 条片段,绝大部分片段的大小在 250 ~ 1 000 bp 之间,其余片段的大小在 200 ~ 2 000 bp 之间。其中以休眠包囊线粒体 DNA 为模板扩增出 102 条片段,以营养细胞线粒体 DNA 为模板扩增出 114 条片段,两者有 67 条共享片段,根据 Nei 和 Li 公式计算出两者的共享度为 62%,休眠包囊线粒体 DNA 扩增出 35 条特有片段,营养细胞线粒体 DNA 扩增出 47 条特有片段,两者存在 38% 的差异。

以 S2 为引物,急纤虫休眠包囊与营养细胞线粒体 DNA 扩增出 3 条完全相同的片段,其分子量分别为 259 bp、510 bp 和 750 bp。以 S1、S52 和 S183 为引物,休眠包囊与营养细胞线粒体 DNA 扩增出的条带完全不同,余下 28 种引

物扩增出来的线粒体 DNA 片段不尽相同 ,其共享度变化范围在 33% ~ 86% 之间 ,如利用引物 S27 ,休眠包囊与营养细胞线粒体 DNA 都扩增

出一条 698 bp 的片段 ,而营养细胞线粒体 DNA 还扩增出一条 1 029 bp 的片段。

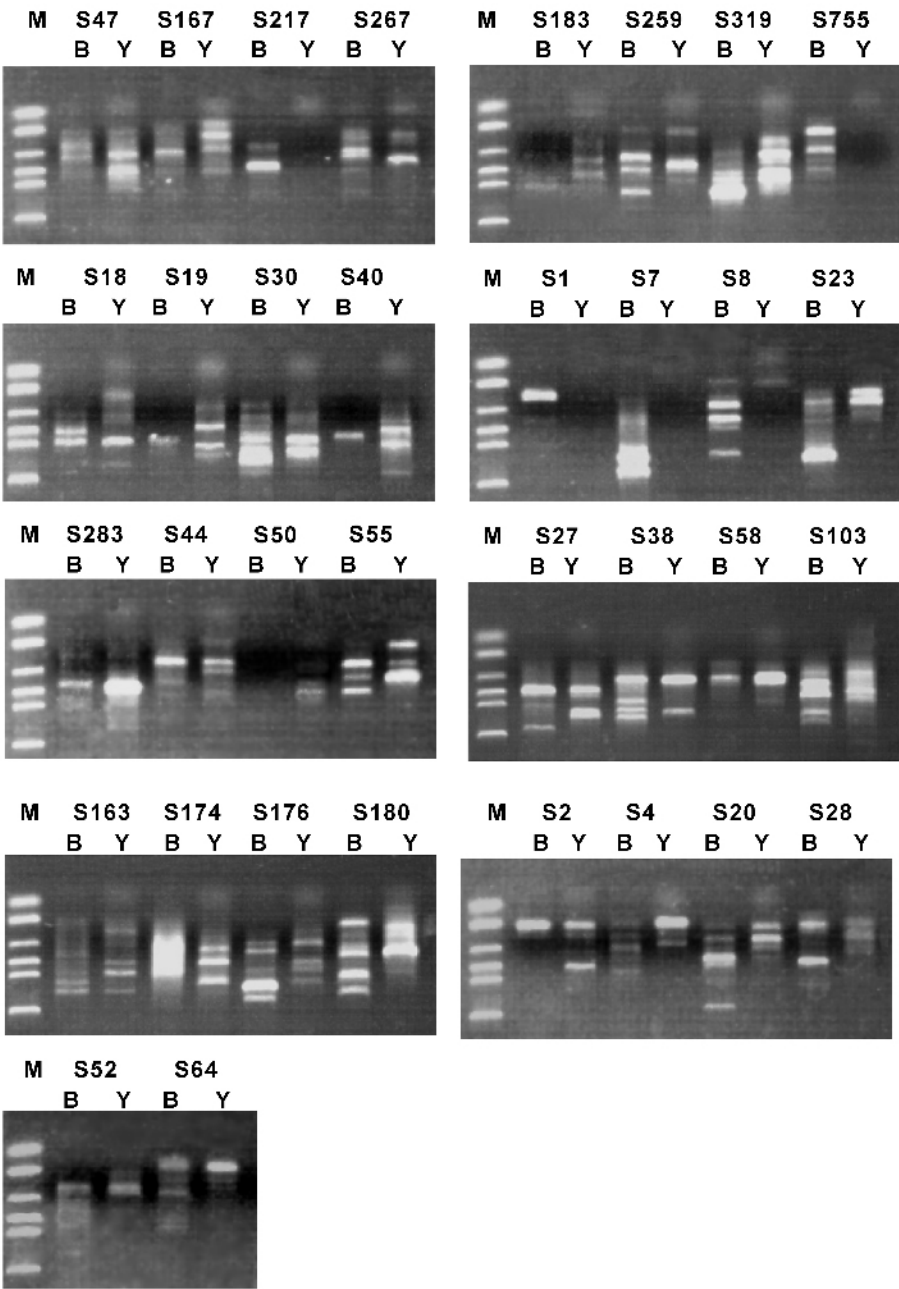


图 1 急纤虫休眠包囊与营养细胞大核 DNA 随机扩增产物电泳图谱

Fig. 1 The gel electrophoresis patterns of polymorphic fragments of the macronuclear DNA from the resting and the vegetative cells in *Tachysoma pellionella* after random amplification
M :Marker ; S1 , S2 , S4... 随机引物 ; B :休眠包囊 ; Y :营养细胞。
M :Marker ; S1 , S2 , S4... :Random primers ; B :Resting cyst ; Y :Vegetative cell.

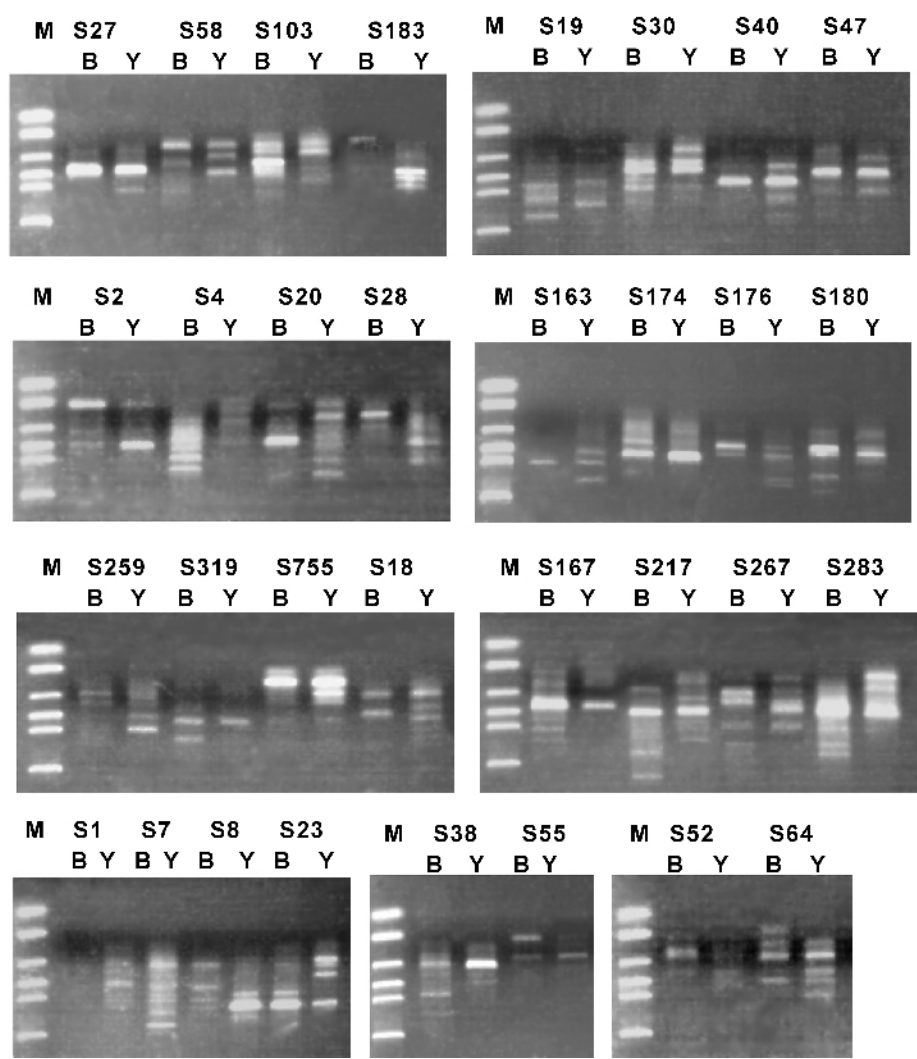


图 2 急纤虫休眠包囊与营养细胞线粒体 DNA 随机扩增产物电泳图谱

Fig. 2 The gel electrophoresis patterns of polymorphic fragments of mitochondrial DNA from the resting and the vegetative cells in *Tachysoma pellionella* after random amplification

M :Marker ; S1 , S2 , S4... 随机引物 ; B :休眠包囊 ; Y :营养细胞。

M :Marker ; S1 , S2 , S4... :Random primers ; B :Resting cyst ; Y :Vegetative cell .

线粒体是真核细胞内一种重要的半自主性细胞器 ,其功能活动受自身 DNA 和核 DNA 双重调控 ,纤毛虫形成包囊过程中大核 DNA 的变化可能也伴随着线粒体 DNA 的变化。与此相对应 ,纤毛虫在形成包囊过程中 ,除自噬泡内的线粒体已显异常 ,处于不同消化阶段 ,如有的线粒体正在瓦解 ,有的线粒体正在消失外 ,其线粒体不仅数量急剧减少 ,而且高度浓缩 ,大量聚集在一起 ,并呈不规则状态^[12,13]。这表明 ,营养细

胞形成休眠包囊时 ,为大大减少能量代谢 ,线粒体大量退化和消亡。提示在形成休眠包囊过程中 ,休眠包囊不需要相当于营养细胞中的大量线粒体参与生命活动过程 ,许多线粒体 DNA 因此消失或正在消亡或结构发生相应变化。据急纤虫休眠包囊及营养细胞的线粒体 DNA 扩增片段的差异提示 ,急纤虫休眠包囊及营养细胞两者的线粒体 DNA 结构的改变可能与线粒体的形态结构和能量代谢的变化是有联系的 ,也

是与纤毛虫休眠细胞的生理生化活动相一致的。因此,线粒体 DNA 的变化既可能受大核 DNA 变化的影响,继而又可能反过来影响休眠包囊的生命活动,甚至又可能影响大核 DNA 的变化。

参 考 文 献

- [1] 顾福康,张作人.纤毛虫形成包囊和脱包囊的研究及其意义.动物学杂志,1992,27(5):48~43.
- [2] 吴月华,季玲妹,顾福康.原生动物细胞休眠现象的研究进展.动物学杂志,2004,39(5):91~95.
- [3] 顾福康,倪兵.包囊游仆虫休眠包囊的超微结构研究.实验生物学报,1995,28(2):163~171.
- [4] Gu F K, Xu J M. A TEM study on Pre-encystment cellular structures of *Euplotes encystius*. *Cell Research*, 1995, 5(1): 125~133.
- [5] 顾福康,季玲妹,倪兵等.阔口尖毛虫形成包囊期间细胞超微结构的观察.动物学报,1997,43(3):227~231.
- [6] 顾福康,倪兵,杨振云等.冠突伪尾柱虫营养期和形成包囊期间细胞超微结构.动物学报,2002,48(2):251~257.
- [7] 孙军,顾福康.含小球藻和无小球藻绿草履虫的基因组 DNA 多态性的研究.动物学研究,2000,21(4):257~261.
- [8] 杜宝剑,张莹,倪兵等.冠突伪尾柱虫休眠与营养细胞线粒体 DNA 的比较.华东师范大学学报,2003,2:86~90.
- [9] Fetzter C P, Hogan D J, Lipps H J. A PIWI homolog is one of the proteins expressed exclusively during macronuclear development in the ciliate *Stylonychia lemnae*. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(20):4380~4386.
- [10] Palacios G, Martin-Gonzalez A, Gutierrez J C. Macronuclear DNA demethylation is involved in the encystment process of the ciliate *Colpoda inflata*. *Cell Biol Int*, 1994, 18(4):223~228.
- [11] Karajan B P, Popenko V I, Leonova O G. Fine structure of nucleoli in the ciliate *Didinium nasutum*. *Protistology*, 2003, 3(2):99~106.
- [12] 顾福康,倪兵,季玲妹等.魏氏拟尾柱虫休眠包囊及其细胞器超微结构的观察.动物学研究,1999,20(6):406~410.
- [13] 陈灵,倪兵,顾福康.魏氏拟尾柱虫休眠包囊的电镜酶细胞化学研究.动物学研究,2000,21(3):199~203.