

## 棘尾虫核基质与核周层的分离及其结构和组成

鲍仕登 汪德耀

(厦门大学细胞生物学研究室)

### 提 要

应用生化方法分离了棘尾虫细胞大核的核基质与核周层。电镜观察表明,分离的核基质与核周层结构都能保持大核的原有形态,它们是由纤维颗粒状物质所组成。生化分析表明,大核核基质与核周层主要由蛋白质所组成,少量抗抽提的 DNA 和 RNA 主要是结合在核内基质结构上。

### 前 言

核基质或核骨架 (nuclear matrix or nuclear skeleton) 结构和功能的研究,是近年来细胞生物学和分子生物学的前沿领域。许多研究结果已表明,核基质是普遍存在于真核细胞中的一种重要结构<sup>[1-3]</sup>。核基质不仅对维持细胞核形态结构及核内有序组织起重要作用,而且还参与核内 DNA 复制、RNA 合成与加工和染色体构建等一系列分子过程<sup>[1-4]</sup>。不少学者还发现,核基质变化与细胞癌变<sup>[1,5]</sup>及某些病毒的感染<sup>[6,7]</sup>等亦有密切关系。这些都说明,深入探讨核基质的结构和功能具有深远的理论和实际意义。

近年来有关核基质的研究在国内也开始得到重视。饶玉树和汪德耀<sup>[8]</sup>曾研究了鸭肝细胞核基质的超微结构和蛋白质组成,并证明核基质中有 DNA 拓扑异构酶 II 的存在。翟中和等<sup>[6]</sup>发现病毒复制过程与核基质结构密切相关。我们<sup>[9]</sup>利用生物大分子铺展技术已直接观察到棘尾虫小核 DNA 是以有序的 DNA 环形式紧密结合在核基质结构上,并发现核基质纤维本身亦有非常有序的组织结构。本文报道棘尾虫大核核基质与核周层 (lamina) 的分离及其超微结构和生化组成的研究结果。

棘尾虫是属于腹毛类纤毛原生动物,这种

单细胞生物具有二种在结构和功能上高度分化的细胞核<sup>[10-12]</sup>。一是不进行转录活动的小核即遗传核,它无核仁结构,行有丝分裂;另一种是能旺盛合成 RNA 的大核即营养核,它具有多核仁结构,但它只含有小分子 DNA 即所谓的基因型 DNA (gene-size DNA)<sup>[10]</sup>,且不形成染色体而行无丝分裂,其 DNA 复制是发生在大核所特有的复制带 (replication band) 结构上<sup>[12]</sup>。此外,棘尾虫还有细胞大、繁殖快,易于培养等优点,因而是研究核基质许多重大问题的理想材料。

### 材 料 与 方 法

1. 细胞及其培养: 棘尾虫\* (*Stylonychia mytilus*) 细胞在实验前先通过克隆化培养而得到纯化。棘尾虫培养在 Preshieming 溶液中,以小麦液培养的草履唇滴虫 (*Chiolomonoas Paramecium*) 为食物,按常规方法喂养。

2. 棘尾虫大核的分离 分离方法参照文献 [11]。当细胞传代培养至所需数量后,将细胞饥饿两天以清除细胞质中的食物泡。然后按常规方法收集细胞于试管内,加入五倍于细胞体积的溶解液 LB (10 mmol/L Tris/HCl, 0.5% Triton X-100、0.05% 磷酸亚精胺, pH7.03)

\* 棘尾虫原细胞株由哈尔滨师范大学生物系史新柏教授等赠送,谨此致谢。

4℃,并同时加入2 mmol/L蛋白酶抑制剂PMSF(苯甲基磺酰氟,为上海生化所产品),随后用吸管吹打细胞以使之快速溶解而释放出细胞核。所得细胞溶浆液经35 μm和15 μm沙绢过滤,滤液经不连续蔗糖梯度(15 ml 40%蔗糖、15ml 20%蔗糖、10 ml 5%蔗糖)以250 g离心10分钟,沉淀即为大核。分离的大核可用石碳酸碱性品红染色检查。

**3. 核基质与核周层的分离** 棘尾虫大核核基质分离方法是在参照 Wunderlich 等<sup>[43]</sup>分离四膜虫核基质方法的基础上,根据棘尾虫细胞的生理特点而建立的。分离步骤如下:(1)将分离的大核于低盐溶液LS(20 mmol/L Tris/HCl、2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、3 mmol/L NaCl、20 mmol/L 蔗糖、2 mmol/L PMSF, pH 7.4)在4℃处理10分钟,然后以400 g离心10分钟,去上清液。然后再重复一次。(2)接着于高盐溶液HS(LS+0.3mol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 在4℃抽提三次,每次10分钟,然后以600 g离心10分钟,去上清液。(3)于含有DNase I和RNase A(各200 μg/ml)的核缓冲液NS(20mmol/L Tris/HCl、20 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、30 mmol/L NaCl、20 mmol/L 蔗糖、2mmol/LPMSF, pH7.4)在23℃消化60分钟,然后以750 g离心10分钟,沉淀物再用NS溶液在4℃漂洗两次。(4)于含有0.9% Triton X-100

的NS溶液在4℃抽提两次,每次10分钟。然后以850 g离心10分钟,沉淀物用NS溶液4℃漂洗三次后即为止所分离的大核核基质。

核周层分离步骤同上,但在第一步低盐溶液处理时加入2 mmol/L二巯基苏糖醇(DTT),第二至第四各步离心速度各增加150 g。分离的核基质与核周层于0℃下贮存备用。

**4. 核基质与核周层电镜观察的样品制备** 将上述所分离的大核核基质与核周层速于2.5%戊二醛(NS溶液配制)在4℃固定40分钟,经0.1 mol/L二甲砷酸钠漂洗三次后,再于1% O<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(二甲砷酸钠配制)后固定60分钟,0.1 mol/L二甲砷酸钠漂洗后,按常规方法脱水,最后以618树脂渗透、包埋。超薄切片经常规电镜染色后于JEM-100 CX II透射电镜下观察并拍照。

**5. 核基质与核周层主要生化成分的测定** 核基质与核周层的蛋白含量测定采用Forlin-酚法<sup>[44]</sup>;DNA含量测定采用二苯胺法<sup>[45]</sup>,以小牛胸腺DNA为标准;RNA含量测定使用地衣酚法<sup>[46]</sup>,以酵母RNA为标准;磷脂用乙醇-乙醚抽提,钼酸铵定磷法测定<sup>[47]</sup>。

结果与讨论

1. 大核核基质的分离及其超微结构

棘尾虫大核一般呈长椭圆形。在透射电镜

表1 棘尾虫大核核基质与核周层四种主要生化成分的测定结果

| 名称  | 含量 | 成分 | A <sup>①</sup> 剩余成分(%) |      |          |          | B <sup>②</sup> 相对含量(%) |           |          |          |
|-----|----|----|------------------------|------|----------|----------|------------------------|-----------|----------|----------|
|     |    |    | 蛋白质                    | DNA  | RNA      | 磷脂       | 蛋白质                    | DNA       | RNA      | 磷脂       |
| 大核  |    |    | 100                    | 100  | 100      | 100      | 64.2±1.34              | 28.1±1.21 | 4.6±0.23 | 3.1±0.18 |
| 核基质 |    |    | 10.6±0.67              | 0.2  | 2.0±0.21 | 1.6±0.18 | 97.2±0.57              | 0.8       | 1.3±0.05 | 0.7      |
| 核周层 |    |    | 4.8±0.72               | 0.02 | 0.3      | 0.9      | 98.5±0.69              | <0.2      | 0.4      | 0.9      |

① 假设大核在未经抽提时各成分均为100%;② 大核、核基质与核周层的蛋白质、DNA、RNA及磷脂的和均视为100%  
下可见到棘尾虫大核亦具有核膜结构,核内分布有致密的染色质,染色质相互联系而形成染色质网结构,在染色质之间分布有许多椭圆形核仁结构(图1,见图版I)。石碳酸碱性品红染色检查表明,使用细胞溶解液结合蔗糖梯度离心方法可分离得到很纯的大核(图2,见图版I)。分离的大核经低盐溶液、高盐溶液和去污剂Triton X-100抽提以及DNase I和RNase A消化后,去除了核内绝大部分DNA、RNA和磷脂以及大部分蛋白质等可溶性成分(见表1),从而分离得到大核核基质结构。透射电镜观察表明,分离的大核核基质是一种纤维颗粒

状的网状结构,且保持着大核的原有形态,它包含核周层、核内基质和残余核仁三种结构成分(图3,见图版I)。核周层分布于最外层,包绕着核内基质,而核内基质又与残余核仁相联系。大量观察表明,分离的大核核基质结构是由许多电子致密的颗粒状结构和电子密度较低的纤维状结构所组成。这种核基质结构与前人从高等动物如鼠肝细胞<sup>[1,8]</sup>中所分离得到的核基质结构是相似的。这进一步说明核基质是广泛存在于真核细胞中的一种普遍结构。

我们利用生物大分子铺展方法已发现棘尾虫小核核基质纤维具有非常有序的组织形式<sup>[9]</sup>,但是大核核基质纤维是否存在同样的组织形式仍有待于深入的研究。由于大核中存在多核仁结构,这为研究核内基质与核仁的关系提供了一个理想材料。在分离的大核核基质中,核内基质与残余核仁是紧密相联系的,而且常常可见到残余核仁外包绕有一层核内基质结构,这种情况与在原位核基质中所见到的结果相一致。有人已报道在分离的核仁外也常常附带有一层核基质结构<sup>[1]</sup>。这些都说明核内基质结构对维持核内核仁的位置具有重要作用,核仁结构可能是通过核基质纤维网状结构的支架作用而固定在核内的一定位置。核基质作为核的支架结构在维持核内有序组织中起着极为重要的作用。

## 2. 大核核周层的分离及其结构特点

核周层是指分布于核膜内侧面的一层纤维网状结构,也就是分离的核基质的最外层结构,它常与核内基质结构相联系。但是在核基质分离过程中,如果在第一步低盐溶液处理时同时加入2 mmol/L DTT(二硫键还原剂),就可导致核内基质结构的破坏,同时残余核仁也被释放出来,从而可分离得到大核核周层结构。透射电镜观察表明,分离的大核核周层也能保持大核的原有形态,它是由一层致密的纤维状物质所组成的一种完整结构(图4,见图版I)。分离的大核核周层能够保持大核原有形态这一结果进一步证明了核周层是核膜的支架结构。

在分离过程中适当的二硫键还原剂处理可

破坏核内基质结构,而不破坏核周层结构,这进一步证明了二硫键对维持核内基质结构的完整性是极为重要的,同时也说明核周层与核内基质对二硫键还原剂的敏感性不相同。关于二硫键在维持核内基质结构完整性中所起的作用在许多年前就已受到重视,但至今尚无一致的结果。Kaufmann等<sup>[19]</sup>首先发现在小鼠肝细胞核基质分离过程,加入二硫键还原剂如碘乙胺或N-乙二胺可导致核内基质结构破坏,而剩下中空的核周层结构。后来Berezney<sup>[1]</sup>实验室的工作也肯定了Kaufmann等的结果。但是Fisher等<sup>[20]</sup>和van Venrooij等<sup>[21]</sup>的实验结果却表明二硫键还原剂或阻断剂对核内基质结构没有明显的破坏作用。我们的实验结果则进一步支持了Kaufmann等的观点,即二硫键对于维持核内基质结构的完整性具有重要作用。

## 3. 大核核基质与核周层的主要生化组成

生化分析表明,分离的大核核基质只含有10.6%的大核总蛋白、0.2%大核总DNA、2%大核总RNA和1.6%的大核总磷脂,而分离的大核核周层仅含有4.8%核总蛋白、0.02%核总DNA、0.3%核总RNA和0.9%核总磷脂(见表1A栏)。分离的大核核基质所含四种主要生化成分的相对含量为97.2%蛋白质、0.8%DNA、1.3%RNA和0.7%磷脂,而核周层所含四种主要生化成分的相对含量为98.5%蛋白质、0.2%DNA、0.4%RNA、0.9%磷脂(见表1B栏)。从所含四种主要生化成分的相对含量来看,核基质与核周层主要是由蛋白质所组成,但也含有少量的DNA和RNA成分,这说明大核内存在有少量的DNA和RNA成分能够抵抗高盐和低盐的抽提以及核酸酶的消化,这部分DNA及RNA可能是紧密结合在核内基质或核周层上而受到保护。由于核基质上的DNA含量(占核总DNA 0.2%)和RNA含量(占核总RNA 2.0%)相应比核周层上的DNA(占核总DNA 0.02%)和RNA(占核总RNA 0.3%)含量都高得多,所以绝大

(下转第205页)

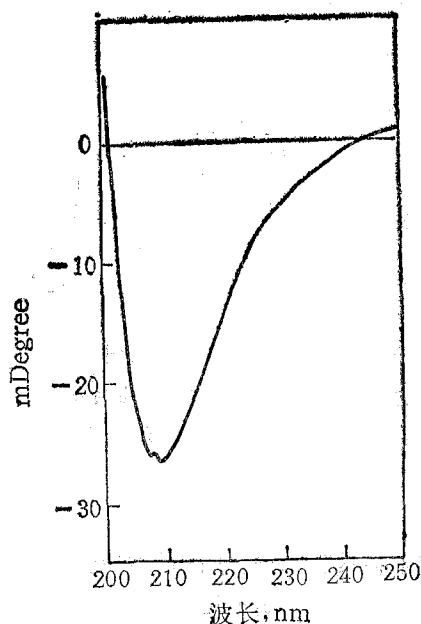


图2 修饰后 SOD 的 CD 谱

聚乙二醇层的形成,使得小分子底物与酶的接触受到一定的阻碍。然而,也正是由于聚乙二醇层的形成,在酶表面形成了屏障,保护该酶免受体内蛋白酶消化,为延长 SOD 在体内停留时间提供有利条件。

关于蛋白免疫原性问题,目前认为,蛋白质的表面抗原决定簇大多由亲水氨基酸组成,大多数情况下,亲水性较强的赖氨酸残基是其中

(上接第 208 页)

部分抗抽提和抗消化的 DNA 和 RNA 是结合在核内基质结构上。我们已用电镜铺展方法直接观察到大核 DNA 与核内基质纤维的结合关系,这一实验结果将另文报道。

### 参 考 文 献

- [1] Berezney, R.: *Chromosomal Nonhistone Proteins*, CRC Press, Inc. Boca Raton, 1984, 4, 119—180.
- [2] Bouteille, M. et al.: *Int. Rev. Cytol.*, 1983, 83, 135.
- [3] Bureau, J. et al.: *Biol. Cell*, 1986, 56, 7.
- [4] Jackson, D. A. et al.: *J. Cell Sci.*, 1984, 1(suppl.), 59.
- [5] Hemminki, K. et al.: *Cancer Lett.*, 1979, 6, 167.
- [6] Zhai Zhonghe et al.: *J. Virol.*, 1987, 61, 1007.
- [7] Smith, H. C. et al.: *J. Cell Biol.*, 1984, 99, 10a.
- [8] 饶玉树、汪德耀:《中国细胞生物学会第三次会议论文摘要汇编》,1986,63.

重要组分。本文采用的聚乙二醇是 SOD 非活性部位赖氨酸中  $\epsilon$ -氨基的化学修饰剂。Cu、Zn-SOD 含 20 个赖氨酸残基。实验表明,耦联过程中约有 80% 可滴定氨基与分子量较大的聚乙二醇连接。可以设想,蛋白质表面抗原决定簇将部分地或全部地被掩盖,免疫原性也将因而下降。1977 年 A. Abuchowski 等人研究了蛋白质的聚乙二醇修饰<sup>[7]</sup>。通过控制耦联反应中活化聚乙二醇的用量,获得了残留氨基百分比不同的加合物。随着加合物中被修饰氨基百分比的增加,蛋白质免疫原性下降。当此百分比达一定值后,加合物既无免疫原性也无抗原性。这表明耦联到蛋白质上的聚乙二醇是通过掩盖蛋白质表面的抗原决定簇而起作用的。

### 参 考 文 献

- [1] Phatak, P. S.: *Res. Commun. Chem. Pharmacol.*, 1980, 29, 113.
- [2] 张元亮:《生化药物杂志》1987,(1),17.
- [3] Von Specht, B. U.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1977, 484, 109.
- [4] Abuchowski, A.: *J. Biol. Chem.*, 1977, 252, 3582.
- [5] Habeeb, A. F. S. A.: *Anal. Biochem.*, 1966, 11, 328.
- [6] Weser, U.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1971, 243, 203.
- [7] Abuchowski, A.: *J. Biol. Chem.*, 1977, 252, 3578.
- [8] Savoca, K. V.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1979, 578, 47.
- [9] Bao Shideng(鲍仕登) & Wang Deyao: *Proceedings of Second Beijing Conference and Exhibition on Instrument Analysis*, 1987, 73—74.
- [10] Swanton, M. T. et al.: *Chromosoma*, 1982, 77, 217.
- [11] Prescott, D. M. et al.: *Chromosoma*, 1971, 34, 355.
- [12] Lin Meiying et al.: *J. Protozool.*, 1985, 32, 144.
- [13] Wunderlich, F. et al.: *J. Cell Biol.*, 1977, 73, 217.
- [14] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265.
- [15] Burton, K.: *Methods Enzymol.*, 1968, 12B, 163.
- [16] 张龙翔等编:《生化实验方法和技术》,人民教育出版社,1981,220—221.
- [17] 上海市医学化验所主编:《临床生化检验》上册,上海科学出版社,1979,185—187.
- [18] Smith, H. C. et al.: *J. Cell Biol.*, 1984, 99, 1974.
- [19] Kaufmann, S. H. et al.: *Exp. Cell Res.*, 1981, 132, 105.
- [20] Fisher, P. A. et al.: *J. Cell Biol.*, 1982, 92, 674.
- [21] van Venrooij, W. J. et al.: *The Nuclear Envelope and Nuclear Matrix*, Alan R. Liss, New York, 1982, 235.

[本文于 1988 年 5 月 3 日收到]

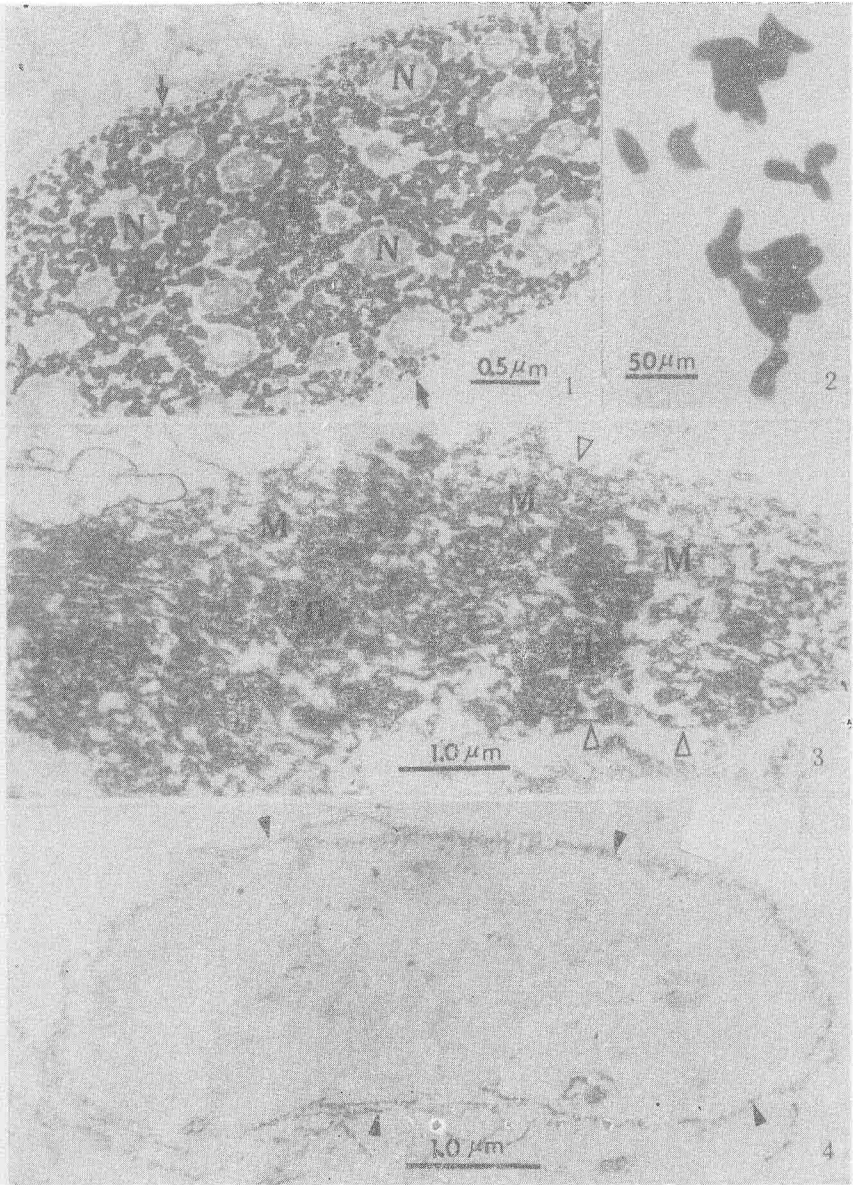


图 1 棘尾虫大核的电镜照片 C: 染色质; N: 核仁; 箭头示核膜  
图 2 分离的棘尾虫大核的光镜照片 (石碳酸碱性品红染色)  
图 3 分离的大核核基质的电镜照片 M: 核内基质; rn: 残余核仁; △: 核周层  
图 4 分离的大核核周层的电镜照片 箭头示核周层结构