

# 冠突伪尾柱虫接合生殖 DNA, RNA 和蛋白质的合成

金立培 刘振声

(中山大学生物学系, 广州 510275)

**摘要** 利用放射自显影术对冠突伪尾柱虫接合生殖期间其体内大分子合成进行研究, 结果表明, 接合体中除第二次成熟分裂外, 其它各次核分裂之前都须进行一次 DNA 合成. 在大核原基发育过程中, 其 DNA 合成明显分为前后两个阶段. 在接合体的老大核内持续进行低度的 RNA 合成, 并于接合后体分离时突然终止. 4 d 以后, 数枚新的大核才出现活跃的转录. 第二次皮膜改组启动之前, 细胞内的蛋白质合成速率较低, 其后显著增强. 早期合成的 RNA 以及蛋白质都参与了大核原基的发育.

**关键词** 纤毛虫, 冠突伪尾柱虫, 接合生殖, 放射自显影, 核酸、蛋白质

**分类号** Q344

冠突伪尾柱虫 (*Pseudourostyla cristata*) 有性生殖期间, 新老核器更替, 四次皮膜改组相继发生, 经历了一系列复杂的形态结构演化<sup>[1,2]</sup>. 在长达约 5 d 不进食的情况下, 有关虫体内维持这些演化的 DNA, RNA 和蛋白质的合成问题, 国内外尚未见有报道. 为此, 我们利用放射自显影术对上述三种生物大分子的合成进行了研究, 并在讨论中与其它某些纤毛虫的情况作了比较.

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞株系和培养方法

供试材料为冠突伪尾柱虫的 28 号和 46 号 2 个年青株系, 属两个不同的交配型. 细胞培养及接合生殖的诱导与以前的报道相同<sup>[1]</sup>.

### 1.2 放射自显影程序

自接合对牢固形成起, 每隔 2~4 h 分别取出不同发育时期的接合对、接合后体及拟包囊, 用培养液洗净. 为了标记 DNA, RNA 和蛋白质, 用 Pringsheim 液分别配制放射性比强度为 50 mCi/L 的 <sup>3</sup>H-胸苷(<sup>3</sup>H-T), <sup>3</sup>H-尿苷(<sup>3</sup>H-U)和 <sup>3</sup>H-亮氨酸(<sup>3</sup>H-Leu)溶液, 并将洗净的细胞分别放入这三种放射性溶液中培养 1/2~4 h (接合对培养 1/2~1 h, 后体及拟包囊培养 2~4 h), 然后用新鲜不含放射性同位素的培养液冲洗细胞 8~10 次. 洗净的细胞,

收稿日期: 1994-11-30, 修改稿收回日期: 1995-11-20 金立培, 男, 50 岁, 副教授

一部分立即固定制片,另一部分继续培养数小时至数十小时后固定制片。

取约 25 对接合体,50 只接合后体和拟包囊分别置于涂过蛋清的干净载玻片上,吸去多余的培养液,用卡诺氏液固定 10 min,然后用 95%乙醇快速滴洗数次,空气干燥保存。制片时,同一发育时期的虫体设 2~5 片重复,未标记的虫体亦同时制片作为对照。

清除未掺入生物大分子的放射性前体按 Rao 法<sup>[3]</sup>,将<sup>3</sup>H-T 或<sup>3</sup>H-U 标记的经空气干燥的制片用 5%三氯乙酸(TCA)于 5℃处理 5 min,<sup>3</sup>H-Leu 标记的则用 20% TCA 于 5℃处理 5 min,然后用 70%乙醇洗 4 次约 3 h,再经 95%乙醇后空气干燥。

将上述玻片浸入 5%火棉胶乙醇溶液内数秒钟后取出凉干,然后于暗房内上核子乳胶,待凉于后置暗盒内于 5℃曝光 4~6 周,经显影定影后染色。

定影后的玻片于 0.25%甲基绿溶液中染色约 10 min,然后按常规脱水、透明、封片。

## 2 结 果

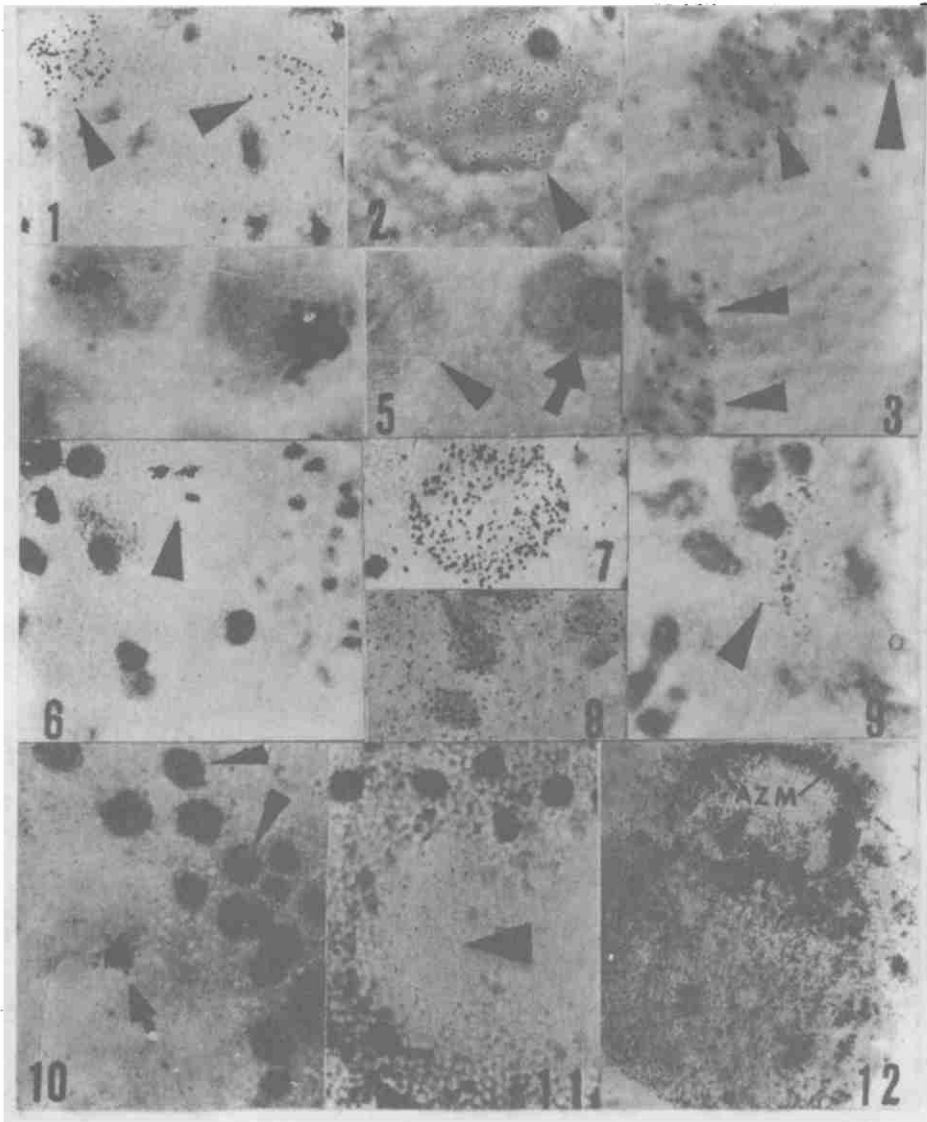
### 2.1 DNA 的合成

在冠突伪尾柱虫接合生殖过程中,自接合对牢固形成始,配偶双方各自 1 枚小核开始膨大,经预备分裂,三次成熟分裂,配子核迁移和受精,以及合子核后的两次连续分裂,才分化为大、小核<sup>[1]</sup>。经<sup>3</sup>H-T 标记观察,除第二次成熟分裂之前未发现有 DNA 前体掺入核内外,所有其它各次分裂之前都要经历一个 DNA 合成期(S 相),核内显出大量的银颗粒轨迹(图版—1)。其中,预备分裂的 S 相持续时间最长,约 4~5 h;而第二次合子后核分裂的 S 相最短,仅约 1 h。

当接合对的两个成员分离之后,大核原基在接合后体及后来转变成的拟包囊中经历了约 4 d 长时间的发育<sup>[1,2]</sup>。自大核原基开始膨大时起,其内不断有放射性 DNA 前体掺入(图版—2)。这种掺入十分活跃,并且一直持续到多线染色体形成,表明大核原基内 DNA 复制了多次,与染色体的形态变化相吻合。随着多线染色体的解体,大核原基经历了一段时间的 DNA 贫乏期。在此期间,未观察到<sup>3</sup>H-T 在大核原基内的轨迹。当大核原基开始收缩而后逐渐伸长时,其内再一次出现放射性标记,并且一直持续到大核原基伸展呈长带状而开始缢裂时止。在这新一轮 DNA 复制过程中,自显影银粒在大核原基内的分布是均匀松散的;只是当它伸展呈长带状时,银粒才局部地堆积出现(图版—3),时而可以观察到同一大核原基上有多处银粒局部聚集的现象。随后大核原基缢裂为数枚大核,第二次皮膜改组完成,虫体开始摄食<sup>[2]</sup>。此外,在第三、四 2 次皮膜改组之前,各自大核均有<sup>3</sup>H-T 掺入,分别进行了一次新的 DNA 合成。

### 2.2 RNA 的合成

在整个有性生殖过程中,经<sup>3</sup>H-U 示踪观察表明,RNA 的合成明显分成前后两个阶段,中间隔着约 4 d 的非转录时期。自接合对形成后至配偶分开成两个接合后体之前的约 24 h 内,一直有 RNA 放射性前体掺入某些老的大核(图版—4,5),但与非分裂期营养细胞比较,这一阶段的 RNA 合成率是较低的。有趣的是,放射性轨迹亦在细胞质内出现,其分布不是均匀分散的,而是集中聚积于接合体腹侧前段特定的部位(图版—6),示踪银粒堆积 1~3 团,多为两团。



图版 冠突伪尾柱虫接合生殖过程中 DNA, RNA 和蛋白质的合成

Plate Synthesis of DNA, RNA and protein during conjugation in *P. cristata*

1~3, 4~8 和 9~12 依次为 $^3\text{H-T}$ ,  $^3\text{H-U}$  和  $^3\text{H-Leu}$  标记

- 1 预备分裂前期 $\times 800$ ; 2 大核原基 $\times 800$ ; 3 伸长的大核原基 $\times 1600$ ; 4 老大核 $\times 3200$ ; 5 老大核(箭符)和合子后分裂 I 后期(三角符) $\times 2400$ ; 6 8h 接合对 $\times 800$ ;  
7 大核原基 $\times 1200$ ; 8 新大核 $\times 800$ ; 9 11h 接合体 $\times 800$ ; 10 接合后体 $\times 800$ ;  
11 大核原基 $\times 800$ ; 12 第二次皮膜改组的细胞 $\times 480$

在为期 4 d 多的接合后体和拟包囊内,老的大核逐渐瓦解,其内停止了 $^3\text{H-U}$ 的掺入.而大核原基从膨大经染色体多线化、DNA 贫乏期至伸展呈带状这一整个时期,其内亦未发现任何示踪轨迹.显然,这一 RNA 合成空白期的出现是由于老大核结构和功能的丧失而新大核的发育尚不成熟、不能行使转录功能的必然结果.然而,当将 5 h 和 20 h 的接合对分别标记 40 min,彻底洗净后继续培养至接合后体和拟包囊,在其发育的大核原基内呈现出明显的示踪轨迹(图版—7).上述结果表明,大核原基内所出现的 RNA 并非自身合成的,而是接合体内由老大核转录并储存起来的长寿 RNA 后来转移进去的.

当长带状的大核原基缢裂成数枚大核时,第二次皮膜形态发生已经结束,虫体具备一定的摄食能力.此时,虫体的大核及细胞质内突然出现强烈的示踪轨迹(图版—8),表明第二阶段 RNA 合成的开始.这一阶段 RNA 的合成是在新大核内进行的,其合成速率以示踪银粒的疏密多寡来判断,比第一阶段要高得多而和非分裂期营养细胞相若.

### 2.3 蛋白质的合成

$^3\text{H-Leu}$  标记示踪表明,整个有性生殖期间的蛋白质合成是一个连续的过程.就其合成强度而言,明显可以分为两个时期.前期,即接合对的形成至第二次皮膜改组启动之前的整个期间其蛋白质合成强度较弱,而后期即第二次皮膜改组始动之后的合成强度显著增加.

自接合对形成起至接合双方分离成接合后体之前的约 24 h 内,接合体细胞质内均有低度的 $^3\text{H-Leu}$ 掺入(图版—9),示踪粒子呈松散分布并多出现在细胞腹侧.在接合后体内,示踪银粒多较分散,但常伴有 1~2 团堆积的现象,而呈圆球形的大核内亦可见示踪轨迹(图版—10),这些蛋白质的出现很可能与老大核的解体有关.用 $^3\text{H-Leu}$ 标记接合后体 2h 后制片,在其大核原基内显示出银粒轨迹(图版—11),表明有一部分新合成的蛋白质进入了大核原基.在拟包囊内, $^3\text{H-Leu}$ 的掺入情况与接合后体相似,一直保持低度的蛋白质合成.然而,当大核原基收缩并开始伸长、第二次皮膜形态发生启动时,蛋白质合成显著加强, $^3\text{H-Leu}$ 大量而又广泛地掺入细胞.这一掺入过程在各纤毛器原基形成和分化时达到高潮(图版—12),整个细胞都有密集的示踪粒子分布,尤以新生的口围带为甚.这一结果表明,此时期所合成的大量蛋白质主要用于新的形态结构建造.

## 3 讨 论

(1) 在冠突伪尾柱虫新核器发生过程中,唯第二次成熟分裂之前没有 $^3\text{H-T}$ 掺入核内,不进行 DNA 复制,说明第一、二 2 次成熟分裂是真正的减数分裂,而第三次成熟分裂实质上是减数分裂后的一次有丝分裂.

(2) 在大核原基发育期间,放射自显影的结果进一步证实了我们以前的观察<sup>[1]</sup>,即大核原基内存在两个明显的 DNA 合成期,中间被一 DNA 贫乏期分隔开来.在后一时期的 DNA 合成过程中,从大核原基收缩至伸展呈长带状之前,核内的示踪轨迹分布均匀;当长带状的大核原基形成以后,其上才出现局部的示踪银粒堆积, DNA 这种典型的区域性合成与该时期观察到 DNA 复制带的出现相一致<sup>[2]</sup>.类似的 DNA 合成模式也见于游仆虫<sup>[3]</sup>,但与棘尾虫稍有区别,后者大核原基第二轮的 DNA 合成一开始就是以复制带的方式进行的.

(3) 在第三、四 2 次皮膜改组过程中,为了解释皮膜更新象生理改组、而大核的行为似二分裂这种合二而一的发育模式,我们曾假设这是由于细胞内物质的积累和结构的变化仍达不到进行二分裂的程度,尤其是大核基因的拷贝数不足所致<sup>[2]</sup>.放射自显影的结果正好为此提供了佐证,三、四两次皮膜改组之前均有大量 DNA 前体掺入大核,说明仍有增加基因拷贝数的需求.

(4) 在为期约 24h 的接合体内,部分老大核一直保持着低度的转录活性,所合成的 RNA 在细胞质的特定区域内还有集中堆积的现象,很可能其细胞质内设有专供贮存 RNA 的仓库.至接合后体分开后,细胞内突然终止了 RNA 的合成并且一直持续到大核原基缢裂,中间隔着 4d 多的 RNA 合成空白期.这一现象与棘尾虫的情况相似<sup>[5]</sup>.接合对形成后,棘尾虫仅进行约 6h 的 RNA 合成,以后的发育全赖于这些预先合成的长寿 mRNA,而新的大核(原基)要到收缩期之后才开始转录.然而,游仆虫、四膜虫、和赭虫等的情况与上述现象形成鲜明的对照,这些纤毛虫的老大核一直保持着转录活性,直至完全解体被吸收,且新老大核交替过程中没有 RNA 合成空白期.在纤毛虫新老核器交替过程中的 RNA 合成模式为何有如此显著的差异,这是否反映了它们各自在进化上的分歧状况及其亲缘关系,看来很有必要进行更广泛的研究.

(5) 鉴于大核原基缢裂成数枚大核时才开始大量 RNA 的合成,此时第二次皮膜改组已近完成,说明为期 4d 多的大核原基的发育以及第二次皮膜改组时的形态建造(后者如果不是全部也主要是)有赖于接合体内所合成的长寿 RNA,发现接合时期合成的 RNA 后来转移到了大核原基内为此提供了实验证据.至于大核原基的发育为何需要 RNA 的参与,这些 RNA 的种类、功能及其作用的机制是完全不清楚的,尽管已经发现某些 RNA 可以作为核糖核酸拟酶(ribozymes)起作用<sup>[6]</sup>,但进一步的研究可以从中受到某些启发.

(6) 自接合始至第二次皮膜改组发动之前,其细胞内持续地进行低度的蛋白质合成,某些蛋白质同样转移进了大核原基,表明大核原基的发育不仅需要 RNA,也需要蛋白质的参与.

## 参 考 文 献

- 1 张作人,庄豪,金立培.冠突伪尾柱虫接合生殖的研究, I. 动物学研究, 1985, 6(2): 159~167
- 2 金立培.冠突伪尾柱虫有性周期中的四次皮膜改组. 中山大学学报(自然科学版), 1995, 34(2): 68~78
- 3 Rao M V N. Macronuclear development in *Euplotes woodruffi* following conjugation. *Exp Cell Res*, 1968, 49: 411~419
- 4 金立培.“降落伞”核的演化和大核原基的发育. 中山大学学报(自然科学版), 1991, 30(1): 81~88
- 5 Sapra G R, Ammermann D. PNA synthesis and acquisition of actinomycin D insensitivity during conjugation in *Stylonychia mytilus*. *Exp Cell Res*, 1973, 78: 168~174
- 6 Cech T R. The generality of self-splicing RNA; relationship to nuclear mRNA splicing. *Cell*, 1986, 44: 207~210

## Synthesis of DNA, RNA and Protein during Conjugation in *Pseudourostyla cristata*

Jin Lipei\* Liu Zhensheng

**Abstract** Synthesis of DNA, RNA and protein during conjugation in *Pseudourostyla cristata* was studied by autoradiography. Before every nuclear division in the conjugants, except the second maturation division, a new DNA synthesis occurs. During development of the macronuclear anlage DNA synthesis is divided into two phases. A low level of RNA synthesis in the old macronuclei of conjugants is a continuous process, but it abruptly stops when the conjugating partners separate. And a round of active transcription occurs de novo in the cells when the macronuclear anlage has divided into several new macronuclei after four days. After the beginning of conjugation there is a continuous but slow synthesis of protein, and the synthesis speeds up to the onset of the second cortical reorganization. Autoradiographic experiment also showed that some RNAs synthesized in the conjugants and some proteins synthesized in the exconjugants actively participate in the development of the macronuclear anlagen.

**Keywords** ciliate, *Pseudourostyla cristata*, conjugation, autoradiography, nuclear acid, protein

---

\* Department of Biology, Zhongshan University, Guangzhou 510275