

· 研究简报 ·

不同介质中分化逆转对细胞粘菌 mRNA稳定性影响*

周世宁
(生物学系)

摘 要

细胞粘菌 (*Dictyostelium discoideum*) 发育后期细胞被重新分散于营养培养基或缓冲液后, mRNA稳定性在这二种介质中的变化相似。一些mRNAs稳定性下降, 快速降解, 另一些mRNAs不受影响。环状AMP选择性地保护其中一些受快速降解的mRNAs。放线菌酮有稳定mRNA作用。受检mRNAs在不同分化逆转介质中的相同效应表明, 营养条件不是引起分化逆转细胞mRNA稳定性变化的因素。

关键词 细胞粘菌, 信使RNA

细胞粘菌 (*Dictyostelium discoideum*) 是一种真核微生物, 它具有明显的分化发育过程和相对简单的生命循环, 因而已成为研究发育与分化及基因表达的理想对象。

本文研究和比较了细胞粘菌在营养培养基和缓冲液中分化逆转时对某些基因表达和mRNA稳定性的影响, 试验了环状AMP及蛋白质合成抑制剂放线菌酮对受试mRNA的影响。

1 材料和方法

1.1 细胞粘菌的培养及分化逆转^[1]

菌株Ax-3接种于MES-HL 5 丰富培养基, 22℃振荡培养至细胞密度约 2×10^6 /ml。细胞经过离心收集, 用PDF洗数次, 重悬于PDF, 并以合适浓度涂布于PDF饱和的滤纸上, 经22℃光照培养15小时, 已明显聚合成团状突起形。用强旋转混合器旋离滤纸, 并分散于缓冲液MES-PDF中或MES-HL5培养基中, 调细胞密度至 10^6 /ml后, 移到室温下的摇床, 以250rpm旋转使细胞保持互相分离。

1.2 RNA的制备及Northern杂交^[1]

细胞用裂解缓冲液裂解, 经酚氯仿提取总RNA。用20μg所制得的RNA进行甲醛-琼

本文1987年9月14日收到

● 本文承美国伊利诺大学生化系钟森文博士指导

脂糖(1.5%)电泳分离。凝胶上的RNA转移至硝酸纤维素纸,干燥后与各种以 ^{32}P 标记了的DNA探针杂交。

1.3 DNA探针的 ^{32}p 标记

所有探针用 $[\alpha\text{-}^{32}\text{p}]\text{dATP}$ 通过缺口翻译^[2]标记。探针包括细胞粘菌基因:EB4, EB5, D14, D18, D19, 253, PL1, 79和Dis。这些基因均克隆于大肠杆菌质粒(均为钟森文博士提供)。

2 结果

2.1 分化逆转时mRNA稳定性的变化

Northern杂交表明,在滤纸上发育至15小时的细胞中,与基因EB4, EB5, D14, D18, D19, PL1, 253和79相应的mRNAs已有相当的积累。这一时间点相当于分化逆转的零时,从图1A和图2A可以看到,在零时样品中上述mRNAs呈现强烈的带。据观察及文献报道^[1,3],在正常分化发育中mRNA是相当稳定的,半衰期约为3—6小时^[1,3,4]。当分化逆转于MES-HL5或MES-PDF时(图1A,图2A),EB4, EB5, D18, D19, PL1和253mRNAs的稳定性大大下降,细胞分散后2至3小时,这些mRNAs已降到不能探出的水平,表明它们的半衰期大大缩短了。形成对照的是D14和79在分化逆转后3小时,尚无明显减小,可以认为他们是几乎不受影响的。受降解的mRNAs中,不是所有的mRNAs都有相同的降解速率,D19的降解速率较慢些。Dis mRNA的特点是不同的,15小时发育细胞中,测不到它的存在,但细胞重分散于缓冲液3小时后,发现它重新生成(图1A)。

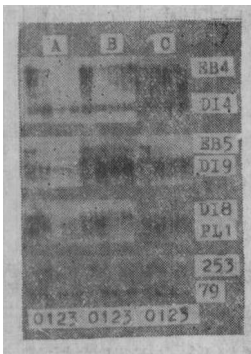


图1 缓冲液中分化逆转和药物对mRNA的影响

- A. 发育15小时细胞被重新分散在MES-PDF缓冲液中, 22°C , 250rpm振荡, 每小时取样一次, 分析mRNA。0, 1, 2, 和3表示细胞分散后的时间, 也就是取样时间点(小时)
B. 同A, 但缓冲液中含 $100\mu\text{M}$ cAMP
C. 同A, 但缓冲液中含 $400\mu\text{g/ml}$ 放线菌酮

Fig. 1 Effect of dedifferentiation in buffer and drugs on mRNA

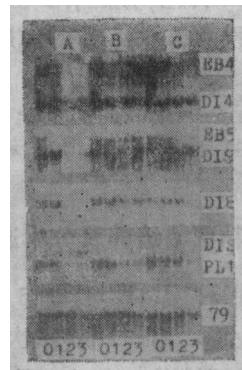


图2 营养培养基中分化逆转和药物对mRNA的影响

- A. 发育15小时细胞被重新分散在MES-HL5培养基中, 其它条件同图1A
B. 同A, 但培养基中含 $100\mu\text{M}$ cAMP
C. 同A, 但培养基中含 $400\mu\text{g/ml}$ 放线菌酮

Fig. 2 Effect of dedifferentiation in culture medium and drugs on mRNA

根据上述结果可以把这些mRNA分成3类(表1):一类是依靠细胞间紧密接触而合成的后期mRNAs^[1],如EB4, EB5, D18, D19, PL1和253,它们对发育逆转细胞分离很敏感;另一类是通用mRNAs,如D14和79,它们在细胞聚合前后都可以出现,在发育逆转时很稳定,不受影响;第三类是发育早期出现的mRNA^[5],如Dis,细胞分化逆转后可以重新被诱导合成。

2.2 环状AMP对各类mRNAs的作用

发育分化至15小时的团状细胞被打散,并重新悬浮于含100 μ m cAMP的MES-HL5营养培养基或MES-PDF缓冲液中,保持振荡速度250rpm,使细胞保持分散状态,在不同的时间点收获细胞制取RNA。分析结果表明(图1B和图2B),在cAMP存在下受到明显保护的mRNAs是EB4, EB5, D18和D19,这些mRNAs在分化逆转了3小时后还保持相当高的水平;有一定保护作用的mRNA是PL1,在cAMP存在下,PL1的降解稍为慢些。与在缓冲液中一样^[1],253在营养培养基中亦不受cAMP保护,仍然迅速降解(图2B)。D14和79在逆转3小时后仍保持接近于零时的水平,被认为不受影响。在零时至3时样品中,Dis mRNA始终没有出现,失去了复出的能力(图1B)。可见表1中的3类mRNAs对cAMP的反应也是不相同的。

2.3 放线菌酮对mRNA稳定性的影响

如前所述,细胞粘菌发育逆转时,一些后期mRNAs迅速降解消失,而另一些mRNAs却不受影响。这样,细胞的重新分散似乎触发了某些专一性降解酶的合成。为了了解这一问题,我们应用了一个蛋白质合成抑制剂放线菌酮。当发育后期(15小时)细胞重新分散于含有放线菌酮(400 μ g/ml)的缓冲液或营养培养基中,使分化过程逆转时,mRNA EB4, D18, D19, PL1和253的稳定性得到了增强,3小时样品中仍然可以看到他们(图1C和图2C)。EB5受到的保护差些,它所呈现的带也很弱。D14和79仍然象无加药物时的实验那样变化不大。Dis在3小时样品中失去了复出的能力。

3 讨论

本文给出了以下结果:①当细胞粘菌分化逆转时,一些mRNAs稳定性下降,以不一样的速率迅速降解;一些不受影响;另一些则受逆转刺激,重新出现。②分化逆转时不论介质是缓冲液或是营养培养基,对受试mRNAs的影响相似。③环状AMP或蛋白质合成抑制剂放线菌酮对后期mRNAs有保护作用。

由于分化逆转而引起的mRNA的迅速降解是有专一性的。EB4, EB5, D18, D19, 253和PL1等后期mRNAs对逆转是敏感的,79和D14却不受影响。敏感型mRNA属于后期生成的mRNA。它们与79和D14的不同在于对细胞与细胞之间紧密接触状态的依赖性。敏感mRNAs的合成依赖于细胞间的紧密接触^[1,6]。分化逆转恰恰破坏了这种接触,细胞的生化途径可能需要回复到单细胞时的模式。而在那时期多数后期mRNAs是不存在的。实验表明,缓冲液或营养培养基对逆转状况下后期mRNAs的稳定性影响都是相似的。这一结果加强了只有细胞间的密切接触才是那些后期mRNAs稳定的因素的

观点。逆转时的介质的营养条件不是影响后期mRNA稳定性的因素,因而尚不能解释为什么细胞分散在营养培养基时会发生快速重演发育过程的作用被消除的现象,而在缓冲液中则不会⁽⁷⁾。

环状AMP对专一性受降解的mRNAs有保护作用(图1B和图2B)。除PL1和253外,对EB4, EB5, D18和D19的保护效果都很明显。这种效果可由2种因素促成。其一是cAMP能稳定那些被降解的mRNAs,使其半衰期延长。另外, cAMP可以刺激那些mRNAs的转录⁽⁸⁾。在我们的实验中,由于早期取样次数增加,因此可以看到在cAMP存在下分化逆转后3小时, EB4, EB5, D18和D19 mRNA量达到几乎和零时一样的水平,甚至更高,而1小时和2小时样品中相对地低,这可能是由于稳定作用发挥得快些,而刺激转录的功能发挥得慢些。环状AMP不但有稳定mRNA及促进某些mRNAs合成的作用,它也有封锁某些mRNAs合成的功能。在分化发育15小时细胞里检测不到Dis mRNA,发育逆转3小时,它能重新出现(图1A)但如有cAMP存在, Dis mRNA不能出现。Dis基因在正常发育中,也可受到外源cAMP的控制^[5,9]。因此环状AMP在基因表达调节中起着重要而复杂的作用。

放线菌酮对受降解mRNAs也有保护作用,但相信它的作用机理是不同于cAMP的。由于它能抑制蛋白合成,当它存在时,酶的合成应受到抑制。这似乎可以认为mRNA之所以受到保护,是有关的降解酶不能合成之故。这是对mRNA受逆转刺激而降解的解释之一,即降解需要新合成酶。但是,放线菌酮抑制蛋白质合成有着特殊的机理,它可以使核糖体“冻结”在mRNA分子上,使转译无法进行⁽¹⁰⁾。假如多个核糖体停留在mRNA上,那么也将会起到保护mRNA的作用。因此, mRNA受分化逆转刺激而迅速降解是否需要新合成专一性降解酶仍需进一步探讨。

表1 各类mRNAs的特点
Tab.1 Characteristics of different mRNAs

分类	mRNA	出现时间	分化逆转影响	cAMP影响	放线菌酮影响
后期mRNA	EB4, EB5 D18, D19 PL1, 253	发育 15小时	迅速降解	稳定作用 促进合成 (253例外)	保护作用
通用mRNA	D14, 79	营养生长 和发育期	不明显	不明显	不明显
早期mRNA	Dis	发育早期	诱导合成	抑制合成	抑制合成

参 考 文 献

- [1] Chung, S. et al., *Cell* 24, (1981)785-797
 [2] Maniatis, T. et al., *Molecular Cloning, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1982

- [3] Mangiarotti, G. et al., *Devel. Biol.*, **89**, (1982) 82-91
- [4] Margolskee, J. P. and H.F. Lodish *Devel. Biol.*, **74**(1980) 37-49
- [5] Williams, J. G. et al., *In Symposium of the Society for General Microbiology*, Regulation of Gene Expression, Cambridge University Press, 1986
- [6] Blumerg, D. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S. A.*, **79**(1982), 127-131
- [7] Finney, R. et al., *Devel. Biol.*, **73**(1979), 290-303
- [8] Landfear, S. M. et al., *Mol. Cell. Biol.*, **2**(1982), 1417-1426
- [9] Williams, J. G. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **77**(1980), 7171
- [10] Wettstein, F. O. et al., *Biochem. Biophys. Acta* **87**(1964), 525-528

Effect of Dedifferentiation on mRNA Stability of *Dictyostelium discoideum* in Buffer and Culture Medium

Zhou Shining*

Abstract

When the developing of *Dictyostelium discoideum*, cells are disaggregated in buffer or culture medium, the changes in mRNA stability present a similar pattern. The late mRNAs are degraded rapidly and the common messages are not affected. Cyclic AMP protects some of the late messages from rapid degradation. Cycloheximide protects all of the late mRNAs tested.

Keywords dictyostelium, mRNA

* Department of Biology