

厦门大学硕士研究生毕业论文

厚游仆虫(*Euplotes crassus* Dujardin)

衰老细胞的大核DNA复制带、RNA合成量变化研究

系(所、室): 生物学系

专业: 细胞生物学

研究方向: 细胞超微结构与功能

研究生姓名: 李晖

指导教师: 汪德耀教授



一九九一年六月

目 录

一、摘要.....	1
二、前言.....	2
三、材料与方法.....	9
(一) 细胞及其培养.....	9
(二) 细胞大量培养与同步化.....	9
(三) 复制带的分离.....	10
(四) 透射电子显微镜样品制备及观察.....	12
(五) 复制带多肽的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳.....	12
(六) 光镜及电镜放射自显影.....	13
(七) 主要化学药品来源.....	13
四、结果.....	14
(一) 衰老细胞复制带的超微超微结构变化.....	14
(二) 复制带的提取.....	16
(三) 衰老细胞复制带的多肽成分变化.....	16
(四) 衰老细胞大核核仁超微结构变化.....	18
(五) 衰老细胞大核 ³ H-尿苷掺入变化.....	18
五、讨论.....	20
(一) 游仆虫衰老细胞 DNA合成下降的直接原因是复制带结构的变化.....	20
(二) 关于复制带提取.....	23



曰 游仆虫衰老细胞大核的RNA合成减少.....	25
六、致谢.....	28
七、参考文献.....	29
八、英文摘要.....	42
九、图版.....	45

厦门大学博硕士论文摘要库

摘 要

本文通过超微结构观察, 多肽成分 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳研究了下毛类纤毛原生动动物厚游仆虫衰老细胞的 DNA 复制带的变化, 同时探讨了复制带提取方法, 并通过核仁超微结构观察、 ^3H -尿苷掺入的光镜及电镜放射自显影比较了衰老与年轻厚游仆虫的 RNA 合成变化。主要结果如下:

(一) 证实衰老厚游仆虫的 DNA 复制带逐渐变窄消失, 发现复制带中分子量大于 67KD 的多肽种类呈衰老相关变化。推测高分子量多肽种类的衰老变化引起复制带的核基质结构改变, 从而导致衰老细胞 DNA 合成量减少。

(二) 采用低渗、旋涡振荡、蔗糖溶液离心改进 Allen 分离阔口游仆虫复制带的方法而用之于厚游仆虫, 首次分离提纯出厚游仆虫复制带。

(三) 证实衰老厚游仆虫大核 RNA 合成量降低, 并在大核超微结构上表现为核仁融合增大, 认为衰老细胞 mRNA 合成减少大于 rRNA。

前 言

衰老是从性成熟后开始或加速的一种带普遍性、渐进性且不可逆的生命过程。在此过程中机体的功能发生衰退，对环境的适应能力下降，最终死亡。由于衰老过程是一个复杂的基本生物学课题，研究起来十分引人入胜，同时还由于社会上老年人口急剧增加，引起社会各方面的关注，衰老生物学的研究已经成为当前生命科学研究的一个热点。在真核生物中，细胞是个体的基本结构单位和功能单位。因此生物个体的衰老也是以其细胞的结构功能的衰老变化为基础的〔7-9〕，所以在细胞及分子水平探讨衰老的基本机制是揭开生物界衰老现象之谜的关键。

原生动物中的纤毛虫是研究细胞衰老较为理想的材料〔91, 92〕。因为它既是一个有机体又是一个真核细胞，以其作为研究材料，既避免了在多细胞有机体中组织与组织间相互作用的复杂性，又排除了在高体细胞培养中人为因素可能带来的假象。纤毛虫是原生动物门中进化位置最高、结构功能最为完善的一纲，它具有在形态及功能上不相同的二种细胞核：大核和小核。大核是多倍体，行无丝分裂，体积大，具核仁，是虫体的营养核，相当于多细胞个体的体细胞核；小核为二倍体，行有丝分裂，体积小，无核仁，是虫体的生殖核，相当于多细胞个体的生殖细胞核。小核不具转录活性，无性生长期间，细

胞所需的RNA几乎都在大核内转录，大核是在有性接合生殖中由小核发育而来〔76〕。这种具二种不同分化的细胞核的细胞无疑为细胞衰老过程中的核结构功能变化的研究提供了方便。纤毛虫的生命周期虽有其特点，但又类似于高等生物，其生命周期从有性接合生殖产生新生个体即接合后体开始，一般包括下述四个阶段〔95〕：(1)未成熟期，即接合生殖后，接合后体在连续分裂的一定代数内不能再进行接合生殖的这段时期；(2)成熟期，这段时期内只要条件具备，纤毛虫接合生殖能力很强，但如只让它进行无性繁殖则一段时间后进入衰老阶段；(3)衰老期，此期纤毛虫分裂速度下降，细胞及核出现畸态，接合生殖能力下降以至消失；(4)死亡。纤毛虫的年龄是以接合生殖产生新生细胞开始，无性分裂的代数来计算的〔91, 92〕。

关于纤毛虫衰老的研究〔91〕，早在1889年，Maupas就曾经描述过纤毛虫的衰老，Calkings(1926年)和Jennings(1926年)也从不同角度做了开拓性的研究，Sonneborn(1937年)发现了配对型提供了杂交分析的基础，Jennings(1944·1945年)和Sonneborn(1934年)所进行的寿命研究揭示了纤毛虫衰老的真相。50年代以来，对纤毛虫衰老的研究愈来愈多。这些研究主要以草履虫(*Paramecium*)为材料。研究表明，随草履虫分裂年龄的增

加, 分裂速率下降, 子细胞死亡率增加 [35, 64, 91, 93, 103]; 接合生殖能力下降, 生殖过程异常, 接合后体死亡率高 [64, 87, 91, 93]; 细胞活动能力减弱, 吞噬能力下降 [89]; 细胞形态异常, 线粒体结构畸形, 溶酶体数量增多, 核糖体及粗面内质网数量减少 [91-93, 98, 100], 大核核膜内陷, 染色质碎片化, 核仁融合并畸变 [40, 91-93, 99]; DNA 含量减少, 合成能力下降 [51, 88, 91-93, 104], DNA 破坏增加, 修复能力下降 [43, 82, 90, 91, 93], 从而细胞对紫外线和 X 射线的敏感性增加 [35, 91-93]; RNA 合成减少 [40, 51, 93]、基因表达呈衰老相关性变化 [101]。自由基消除酶包括过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶、超氧化物歧化酶的活性没有衰老变化 [26, 94]。此外, 通过显微手术或变异型细胞异常核分裂, 使大核 DNA 含量减少时, 其寿命明显缩短 [16, 60, 94]。Karino 等 (1981, 1984 年) [46, 47] 使用小核移植术发现, 核质相互作用能使一定衰老程度 (非过分衰老) 的小核复壮。而 Auferheide (1984 年) [107] 则发现细胞质的移植不会对衰老产生影响。以游仆虫 (*Euplotes*) 为材料进行细胞衰老研究的报告相对较少, 但其结果亦类似于草履虫 [4, 5, 33, 39, 48, 53, 105]; 衰老细胞分裂速率下降, 接合生殖异常; 细胞畸形, 超微结构包括线粒体、溶酶体等畸变; 小核核膜的超微结构异常, 染色质

减少, 大核DNA含量减少, DNA、RNA合成率降低, 复制带、核仁、染色质形态结构发生变化。细胞周期中S期、G₁期延长。其他纤毛虫的细胞衰老研究则只有零星的报道, 如, 四膜虫(*Tetrahymena*)衰老过程中, 小核中的5SrDNA丢失(11); 刀口虫(*Spathidium*)衰老时, 分裂速率下降, 细胞畸变、死亡率升高(107)。

本文所述用的实验材料——厚游仆虫(*Euplotes Crassus* Dujardin)属纤毛虫纲下毛目, 是纤毛虫中进化地位最高的一类。这类纤毛虫的大核有两个独特的性质: (1)DNA以线状、基因大小的染色质分子(Linear gene-chromatin molecules)存在, 其长度十分短(平均2—3 Kbp), 两端都为端粒序列(telomeric sequences), DNA分子由核小体组成, 核小体具有核心组蛋白、H类组蛋白、非组蛋白, 每个大核有约 20×10^3 个不同的DNA分子, 每个DNA分子又有多于 10×10^3 个拷贝(15, 21, 22, 42, 54, 55, 75, 76, 96, 102); (2)核中具有一种移动的结构——复制带(replication band, RB), 它在光镜下可见, 是短的、基因大小染色质分子复制的位置。

由于复制带结构为研究真核生物的DNA复制提供了极大的方便, 一直引起研究者的注意(54)。早期的电镜放射自显影研究(36, 50, 72—74)发现, 大核DNA复制发生于复制带

结构上，细胞周期中大核的S期即为复制带出现的时间，复制带从大核顶端起始向中间移动。大量的复制带超微结构研究〔24, 30, 31, 44, 45, 52, 57, 58, 66, 67, 70, 81, 84〕揭示，复制带包括前带、后带两个部分；前带的染色质纤维很有规则，其直径40—50nm，长度400—500nm，最长的前带染色质纤维可能包含200—500个核小体即40—50 Kb DNA；后带是10nm的纤维组成的弥散的网架结构，复制带上缺乏Z-DNA，表明缺乏染色质的高级结构。利用电镜放射自显影术研究〔20, 50, 56, 68, 72, 77, 97〕表明，DNA合成发生于复制带后带，前带为染色质再组织的DNA合成准备区。对复制DNA分子的电镜分析认为，复制起点是位于基因大小DNA分子的每端，这位点是从内部到末端的倒转重复序列〔63〕。近年来，OLINS和ALLEN及其同事们对复制带进行了大量深入的研究〔12—14, 66—69〕，他们以阔口游仆虫(*Euplotes eurystomus*)为材料，除超微结构的观察外，还利用细胞化学、单克隆抗体免疫标记技术对复制带的蛋白质成分进行研究，他们还利用不同的细胞溶解剂和梯度离心，分离出生化性质基本稳定的复制带。

由于下毛类纤毛虫有着如此独特的DNA复制器——复制带，以其为材料研究细胞衰老过程中的DNA复制的变化有较其他细胞更优越的条件。但是，关于这方面的研究报告很少，只有厦

门大学细胞生物化学研究室在此方面做了一些工作〔4·5〕。这些工作包括：(1)光镜观察发现衰老细胞大核两端复制带的不同步启动；(2)电镜观察发现衰老过程中，复制带的后带逐渐变窄以至消失；(3)光镜放射自显影发现，衰老细胞复制移动速度减慢；(4)电镜放射自显影发现，衰老细胞中 ^3H ——胸苷掺入复制带量显著减少。这些结果表明，衰老细胞DNA复制出现异常合成水平下降。但关于出现这些现象的原因并未见探讨。

生物中原始的遗传信息主要贮存在DNA中，DNA复制的任何错误都将导致一系列有害的后果。探讨衰老过程DNA合成的变化对阐明细胞衰老机制有着极其重要的意义〔9〕。同时，由于贮存于DNA的遗传信息是通过RNA在蛋白质上得以表达的，研究细胞衰老过程中RNA合成的变化也具有一定的意义〔38〕。但迄今为止，对纤毛虫细胞衰老过程中RNA合成的研究报告甚少。Klass(1979年)〔51〕利用 ^3H ——尿苷标记的光镜自显影和脉冲标记闪烁计数法发现双小核草履虫(*Paramecium aurelia*)细胞衰老过程中RNA合成量下降。而Heifetz(1981年)〔40〕则根据草履虫衰老时细胞核内核仁密度比例的变化推测RNA合成能力下降。游仆虫方面，则只有本研究室〔4〕利用 ^3H ——尿苷脉冲标记液体闪烁计数法初步发现在细胞衰老过程中RNA合成率下降。

因此，本文选用厚游仆虫为实验材料，在上述有关工作的

基础上，首先探讨衰老细胞的DNA合成变化，包括复制带超微结构变化、复制带多肽成分变化；其次探讨衰老细胞的RNA合成变化，包括核仁的超微结构变化，光镜及电镜自显影观察³H-尿苷掺入大核的变化。同时，本文还探讨了提取厚游仆虫大核复制带的方法，为今后深入研究复制带奠定了基础。

材 料 和 方 法

(一) 细胞及其培养

厚游仆虫原由意大利 Camerino 大学 Luporini 教授 1986 年赠送给本实验室，并一直留种培养。为得到实验用衰老细胞与年轻细胞，分别于实验前一年、二个月，促使亲代细胞结合生殖产生结合后体（新生细胞），而后采用逐日分离培养法^[53]获得分裂年龄分别为 700—900 代、100—200 代的细胞（厚游仆虫从 500 代左右开始衰老，寿命 1000—1500 代^[39]）。

游仆虫培养在经过滤（沙及活性炭）、煮沸过的新鲜海水中，以盐藻（*Dunaliella bioculata*）为其食物，置于 23±1 °C、12 小时明暗交替的生化培养箱中。

(二) 细胞的大量培养与同步化

为获得实验用大量细胞，将从逐日分离培养的凹心玻璃板上取得的数个细胞培养于小培养皿中，喂以充分量盐藻，并随细胞数量增加，使用培养皿由小到大、由少到多。

将良好培养的细胞停止喂食一天后置于 10 °C 下继续饥饿一天，细胞即基本上停留在 G₁ 期。将上述处理的细胞升温到 25 °C 培养，并充分喂以盐藻后约 6 小时，大部分（50—70%）细胞的大核出现复制带。

活细胞直接经醋酸洋红（10% 洋红在 46% 冰醋酸中煮

沸5分钟后过滤)染色后,就可在普通光镜下观察其核形态及大核复制带(13)。

③复制带的分离

复制带的分离主要参照Allen^[13]分离阔口游仆虫染色质复制带的方法,并根据其游仆虫的特点和本实验室的实际条件而有所修改其具体步骤如下(所有过程均尽量低温进行):

游仆虫(经同步化而大部分具复制带)

↓

过滤、离心富集细胞

↓

加入50毫升蒸馏水(达到 2×10^4 — 2.4×10^5 个细胞/毫升)低渗8分钟

↓

加入100毫升复制带缓冲液(RB buffer)

↓

旋涡振荡12分钟

↓

加入50毫升稳定缓冲液(Stabilization buffer)

↓

800g离心3分钟,去上清液

↓
沉淀物于40%蔗糖液上, 250g离心10分钟

↓
沉淀物于50%PercolL梯度, 250g离心20分钟

↓
取提纯的复制带以分离缓冲液(Isolation buffer)
洗3次(800g离心3分钟)

各种溶液配方如下:

RE-buffer: 15mM·MES (pH6.15), 0.75% NP
-40, 2mM·PMSF

Stabilization buffer: 5mM·MES (pH6.15),
0.25% NP-40, 10mM
MgCl₂, 2mM
SPermidine

Isolation buffer: 10mM MES (pH6.15),
0.5% NP-40, 5mM MgCl₂,
1mM SPermidine,
0.1mM PMSF

40%蔗糖液: Isolation buffer中含40%蔗糖

50% PercolL梯度制备:

PercolL与2×Isolation buffer等体积混和,

27000g 离心15分钟。

(四) 透射电子显微镜样品制备及观察

游仆虫离心(100g, 1分钟)浓缩, 以2.5%戊二醛(二甲砷酸钠缓冲液配制)固定30分钟, 0.1M二甲砷酸钠缓冲液(pH7.4)漂洗, 1%四氧化钨(二甲砷酸钠缓冲液配制)后固定30分钟, 0.1M二甲砷酸钠缓冲液漂洗, 常规脱水(含块染), Spurr包埋剂渗透、包埋, LKB-2038型超薄切片机切片, 常规染色, JEM-100CX II型透射电镜观察拍照。

提取的复制带以2.5%戊二醛(Isolation buffer配制)固定30分钟, 含0.1M蔗糖的Isolation buffer漂洗, 1%四氧化钨(Isolation buffer配制)后固定30分钟, 含0.1M蔗糖的Isolation buffer漂洗, 剩余步骤同上述。

(五) 复制带多肽的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

将提取的复制带样品溶于蛋白溶解液(50mM Tris/HCl, 2.5% SDS, 7M 尿素, 3mM 二巯基苏糖醇, pH 6.8)中。蛋白质SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳参照文献(6), 凝胶浓度为10%, 电泳后蛋白带以R250考马斯亮兰染色, 常规方法脱色。电泳结果拍照并以Beckman UV-8B分光光度计扫描。

(六) 光镜及电镜放射自显影样品制备

将经饥饿低温而同步在G₁期的细胞升温至25°C，喂食半小时后洗去多余盐藻，浓缩细胞于少量海水中，直接加入³H-尿嘧啶核苷，使之终浓度为100 μci/ml，标记1小时。

光镜样品制备参照文献(2)，标记细胞以Carnoy固定液固定15分钟，滴片、风干，用50%核4乳胶(重蒸水稀释)以覆盖法涂乳胶。4°C曝光三周后，D19b显影液显影5分钟，水洗后以F—5坚膜定影液定影10分钟，充分水洗，醋酸洋红染10秒钟，系列乙醇脱水，二甲苯透明，中性树脂封片，显微镜观察。

电镜样品制备参照文献(5c)，标记细胞固定、脱水、包埋同上述常规透射电镜样品制备，超薄切片厚度约20nm，喷碳膜，环套法涂HW4核乳胶。4°C下曝光2个月后，Microdoox显影液显影6分钟，水洗后16.13%硫代硫酸钠水溶液定影10分钟，水洗凉干后，JEM-100CXII透射电镜观察、拍照。

(七) 主要化学药品来源

MES(吗啡啉代乙磺酸)、PMSF(苯甲基磺酰氟)为中科院上海生化所产品。NP-40为华美生物工程公司产品。电泳用标准蛋白包括磷酸化酶(94 kD)，牛血清白蛋白

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.