

# 多头绒泡菌核仁及其骨架中原肌球蛋白 的免疫细胞化学鉴定<sup>\*</sup>

焦明大<sup>1</sup> 曾宪录<sup>1</sup> 王晓光<sup>2</sup> 郝 水<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 东北师范大学遗传与细胞研究所 长春 130024)

(<sup>2</sup> 长春师范学院生地系 长春 130024)

**提 要** 分离多头绒泡菌(*Physarum polycephalum*)细胞的核仁,先用 DNase I 消化,去除核仁内的 DNA,然后用 0.25mol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 和 2mol/L NaCl 相继抽提去掉大部分蛋白质,制备成核仁骨架。SDS-PAGE 分析结果表明,核仁骨架中含有约 20 种多肽,其中包括 37kD 左右与原肌球蛋白分子量相当的多肽。以兔抗原肌球蛋白抗体为一抗,FITC 标记的羊抗兔 IgG 抗体为二抗的间接免疫荧光检测结果表明,核仁和核仁骨架样品都能发出明亮的荧光,而对照样品未见明亮的荧光。间接免疫斑点印迹检测结果进一步证明,在核仁骨架的蛋白质成分中存在原肌球蛋白。胶体金免疫电镜检测结果显示,标记原肌球蛋白抗体的标本上有较多的金颗粒,而对照组标本上只有极少的金颗粒。金颗粒在核仁中主要呈散在分布。

**关键词** 多头绒泡菌 核仁 核仁骨架 原肌球蛋白 免疫细胞化学鉴定

**分类号** Q932 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)05-0402-07

核仁是细胞核中合成 rRNA 和生产核糖体的细胞器<sup>[1]</sup>。核仁由 rDNA、rRNA 和大量蛋白质组成<sup>[2-3]</sup>。核仁蛋白与核仁的结构和功能密切相关。一些研究表明,当用 DNA 酶、RNA 酶、低盐溶液、高盐溶液和中性去垢剂处理核仁,去除 rDNA、rRNA 和大部分蛋白质后,核仁中仍残存一种主要由酸性蛋白质构成的纤维网络状结构,称为核仁基质(nucleolar matrix)或核仁骨架(nucleolar skeleton)<sup>[2-5]</sup>。核仁骨架对于核仁结构的维持和功能的行使可能起着重要作用。目前有关核仁骨架研究报道还不多,对核仁骨架的蛋白质组成还不太清楚<sup>[3]</sup>。而识别骨架中的蛋白质成分是认识核仁骨架结构和功能的基础。本文以多头绒泡菌为材料,分离了核仁并制备了核仁骨架样品。在对核仁骨架蛋白进行电泳分析基础上,用兔抗原肌球蛋白抗体进行了识别核仁及其骨架中原肌球蛋白的实验。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料来源和培养方法

供试材料为多头绒泡菌(*Physarum polycephalum*)菌株 TU291,由法国利母兹大学细胞生物学实验室 Phillippe Albert 博士惠赠。培养方法参照文献[6]。

### 1.2 核仁的分离和核仁骨架样品的制备

以悬浮培养的微原生质团为材料,参照 Mohberg 和 Rusch 的方法<sup>[7]</sup>分离细胞核。将

<sup>\*</sup> 国家自然科学基金资助项目(No. 39131007)

收稿日期:1998-03-16,修回日期:1998-10-19

纯细胞核悬浮于分离液(0.25mol/L sucrose, 100 mmol/L  $MgCl_2$ , 0.5mmol/L PMSF, 0.1% Triton X-100, 1 mmol/L EGTA, 10 mmol/L Tris-HCl, pH7.2)中,用超声粉碎仪破碎核膜,输出功率控制在50%。破碎30s,间歇10s,至光镜下看到绝大部分核仁已游离出来为止。悬浮液经700g离心10 min,去除上清液中的染色质和破碎的核膜。沉淀重新用分离液悬浮,120g离心5 min,去除未破碎的核。上清液经1 000g离心10 min得核仁沉淀。

采用焦仁杰等<sup>[3]</sup>的分级抽提方法制备核仁骨架,即核仁组分先用200 $\mu$ g/mL DNase I 37℃消化30 min,去除核仁内的rDNA成分;然后用0.25mol/L  $(NH_4)_2SO_4$ 和2 mol/L NaCl相继抽提15 min和20 min,去除核仁骨架的结合蛋白。1 700g离心10 min,得到核仁骨架样品。

### 1.3 核仁骨架的蛋白质电泳分析

将核仁骨架样品溶解于Laemmli样品缓冲液<sup>[8]</sup>中,煮沸4 min,离心弃沉淀。选用5%的浓缩胶和12%的分离胶,用Tris-甘氨酸作电极缓冲液,13~15mA稳流电泳6h,考马斯亮兰染色,乙醇-冰醋酸脱色。

### 1.4 间接免疫荧光标记

分离的核仁和核仁骨架样品在45%冰醋酸中固定10 min,常规压片后冰冻揭片,在4%多聚甲醛中后固定20 min。PBS洗涤10 min,1%BSA封闭30 min。一抗(兔抗原肌球蛋白抗体用含0.1%BSA的PBS按1:20稀释)37℃作用1h,然后4℃过夜,二抗(与FITC偶联的羊抗兔IgG抗体用含0.1%BSA的PBS按1:40稀释)37℃作用1h。对照组不与一抗作用,只与二抗作用。90%甘油封片,用Olympus BH-2荧光显微镜观察,落射光照射。ILFORD-400全色胶卷拍照。

### 1.5 间接免疫斑点印迹检测

将溶解的核仁骨架样品转移到硝酸纤维膜上。样品的原液浓度为50mg/mL,湿样品经梯度稀释后的样品浓度依次为5 mg/mL、500 $\mu$ g/mL、50 $\mu$ g/mL、5 $\mu$ g/mL和0.5 $\mu$ g/mL,上样量为每孔100 $\mu$ L。对样品用牛血清白蛋白。硝酸纤维膜在印迹缓冲液(137mmol/L NaCl, 2.7mmol/L KCl, 4.3 mmol/L  $Na_2HPO_4$ , 1.4 mmol/L  $KH_2PO_4$ , pH7.3)中保温1h, PBST(PBS中含0.05%的Tween 20)冲洗30 min。一抗(兔抗原肌球蛋白抗体用含1%羊血清的印迹缓冲液按1:500稀释)37℃作用2h;二抗(与辣根过氧化物酶偶联的羊抗兔IgG抗体用含1%羊血清的印迹缓冲液按1:500稀释)37℃作用1h,在二氨基联苯胺(DAB)中显色。

### 1.6 常规电镜样品的制备和观察

悬浮培养的微原生质团经离心收集后,在2.5%戊二醛溶液(100mmol/L PBS配制, pH7.2)中固定4h,用100 mmol/L PBS洗三次,每次30 min。在1%锇酸中后固定2h,双蒸水冲洗20 min,乙醇-丙酮梯度脱水, Epon 812环氧树脂包埋。超薄切片(厚度为60~80nm)经醋酸铀—柠檬酸铅染色, H-600型透射电镜下观察、拍照。

### 1.7 胶体金免疫电镜标记

悬浮培养的微原生质团经离心收集后,在1.5%戊二醛和4%多聚甲醛混合液中固定

2 h ,系列乙醇脱水 ,Lowry 1 K<sub>4</sub>M 低温包埋剂包埋。超薄切片(厚度 60~80nm )经 1% 饱和 NaIO<sub>4</sub> 处理 45 min ,0.1mol/L HCl 处理 10 min ,1% BSA(溶于 PBST-glycine pH7.4 )中封闭 15 min。用兔抗原肌球蛋白抗体(用 PBST-glycine 按 1:25 稀释)室温作用 1 h 后 4℃ 过夜 ,然后与蛋白 A-胶体金(用 PBST-glycine 按 1:20 稀释)室温作用 1h。对照组不与原肌球蛋白抗体作用 ,只与蛋白 A-胶体金作用。标记后的切片用双蒸水洗涤 ,烘干 ,在 H-600 型透射电镜下观察、拍照。

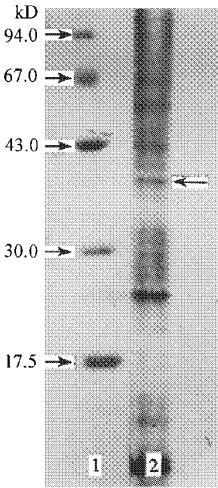


图 1 核仁骨架的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析  
1. 标准蛋白 2. 核仁骨架蛋白 箭头示 37kD 左右的蛋白质  
Fig.1 SDS-PAGE analysis of nucleolar matrix proteins.  
1. Protein standard 2. nucleolar matrix proteins ,  
showing the 37kD protein by arrow.

2 结果

2.1 核仁骨架的蛋白质分析

分离的核仁经 DNase I, 0.25mol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 和 2mol/L NaCl 相继抽提后制备成核仁骨架。核仁骨架样品用 Laemmli 样品缓冲液溶解。骨架蛋白的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳结果(图 1)显示 ,多头绒泡菌核仁骨架成分中约有近 20 种多肽。其中含量相对较高的多肽有 10kD , 11kD , 24kD , 37kD , 43kD , 57kD , 65kD 90kD 和 110kD 等。在核仁骨架的蛋白质电泳谱带中存在与原肌球蛋白的电泳迁移率相当的 37kD 左右多肽。

2.2 免疫荧光检测

为了检测核仁和核仁骨架中是否存在原肌球蛋白 ,我们以兔抗原肌球蛋白抗体作一抗 ,与 FITC 偶联的羊抗兔 IgG 抗体作二抗 ,对分离的核仁和核仁

骨架样品进行了间接免疫荧光标记。结果看到 ,核仁和核仁骨架样品都能发出明亮的荧光[图版 I -1 和 2]。对照实验中样品不与一抗作用 ,只与二抗作用 ,结果在核仁或核仁骨架的样品上都不能看到明亮的荧光[图版 I -3]。上述结果说明 ,我们在核仁(图版 I -4)和核仁骨架样品上看到的明亮荧光是抗体-抗原特异性结合的结果 ,原肌球蛋白不仅存在于核仁中 ,而且存在于核仁骨架中。

2.3 免疫斑点印迹检测

将分离的核仁骨架样品溶解 ,用抽吸的方法将蛋白质转移到硝酸纤维膜上。以兔抗原肌球蛋白抗体作一抗 ,与辣根过氧化物酶偶联的羊抗兔 IgG 抗体作二抗进行间接免疫斑点印迹检测。结果显示 ,在核仁骨架的蛋白质样品中存在能与抗体结合的原肌球蛋白抗原 ,因而呈现明显的显色反应。随着样品的逐渐稀释 ,抗原含量逐渐减少 ,显色反应减弱。最后由于样品中抗原含量过低而使显色难于分辨[图 2-NuM]。对照实验选用不含原肌球蛋白的牛血清白蛋白进行 ,结果经相同的程序处理 ,看不到由于抗体-抗原结合后呈现的显色现象[图 2-CT]。这一结果进一步证明 ,原肌球蛋白在核骨架成分中存在。

## 2.4 胶体金免疫电镜检测

经常规电镜制片,透射电镜下观察可见[图版 I-5],多头绒泡菌间期细胞核( $G_2$ 期)一般有一个位于核中央的大核仁。核仁中的纤维中心(FC)、致密纤维成分(DFC)和颗粒成分(G)清晰可见。悬浮培养的微原生质团经戊二醛和多聚甲醛固定,Lowry 1 K<sub>4</sub>M 包埋。超薄切片用兔抗原肌球蛋白抗体和蛋白 A-胶体金进行间接免疫电镜标记。结果在透射电镜下观察到,在间期细胞核的核仁中散在分布有很多金颗粒[图版 I-6],核仁的各种组分(FC、DFC 和 G 等)中都有金颗粒。如果切片标本不与原肌球蛋白抗体作用,只与蛋白 A-胶体金作用,则在核仁中只看到有极少的金颗粒[图版 I-7]。结果表明,实验组标本上的众多金颗粒主要是抗体-抗原特异性结合的结果,原肌球蛋白在核仁中主要呈散在分布。

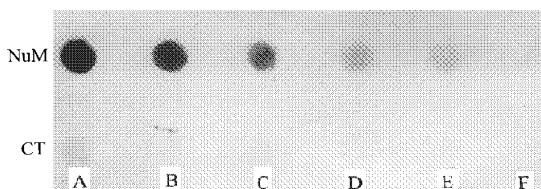


图2 核仁骨架中原肌球蛋白的间接免疫斑点印记检测结果

NuM 核仁骨架 CT 牛血清白蛋白;A~F:代表按梯度浓度(依次为:5mg, 500 $\mu$ g, 50 $\mu$ g, 5 $\mu$ g, 500ng, 50ng)稀释的蛋白质样品

Fig. 2 Indirect immunodotting analysis against tropomyosin  
NuM: Nucleolar matrix protein; CT: Bovine serum albumin; A~F: Representing gradient of sample quantity (in order: 5mg, 500 $\mu$ g, 50 $\mu$ g, 5 $\mu$ g, 500ng, 50ng).

## 3 讨论

核仁是细胞核中合成 rRNA 和生产核糖体的细胞器。在核仁的组成成分中除含有多拷贝的 rDNA 和 rRNA 外,还有大量的蛋白质。核仁蛋白对于核仁的结构和功能起着重要作用<sup>[1~3]</sup>。过去应用银染、免疫细胞化学和原位杂交等技术方法确定了一些核仁蛋白<sup>[9~13]</sup>。其中包括 B<sub>23</sub>、C<sub>23</sub>、fibrillarin 和 nucleotin 等。但迄今对核仁中的许多蛋白质仍不清楚。一些研究表明,当用 DNA 酶、RNA 酶、低盐溶液、高盐溶液和中性去垢剂处理核仁,去除 rDNA、rRNA 和大部分蛋白质后,核仁中仍存在一种纤维网络状的骨架结构<sup>[2~5]</sup>。构成核仁骨架的主要是一些酸性蛋白质,然而目前有关核仁骨架蛋白的研究还不多。Franke 等报告,145kD 左右的多肽是爪蟾卵细胞核仁骨架的主要成分,另外还含有一些含量较少的蛋白质<sup>[5]</sup>。Olson 和 Thompson 用 DNase I 和 2mol/L NaCl 抽提肝癌细胞核仁,蛋白质电泳分析的结果显示,残存的核仁成分主要是 160kD 的蛋白<sup>[14]</sup>。Shio-mi 等(1986)对鼠 L 细胞核仁骨架的研究结果显示,核仁骨架的主要成分是 34kD、43kD、57kD、核纤层蛋白 A、C 和其它一些较高分子量的蛋白质<sup>[2]</sup>。Corben 等用单克隆抗体在胡萝卜细胞核仁中检测到一种分子量为 76kD 的蛋白质<sup>[15]</sup>。焦仁杰等把 HeLa 细胞的核仁骨架样品用尿素溶解,去除尿素后发现核仁骨架成分在体外能重新组装成类似骨架的结构。这种骨架结构的成分主要包括 68kD、44kD、36kD、16kD 及 43~55kD 之间的一些蛋白质,其中 68kD 和 36kD 的蛋白质含量较高<sup>[3]</sup>。我们对多头绒泡菌核仁骨架的 SDS-PAGE 分析结果显示,核仁骨架中约含有 20 种多肽,其中 24kD、37kD、43kD、57kD 和 65kD 等多肽含量较高。37kD 左右的多肽从电泳迁移率上看可能相当于原肌球蛋白。为了确定核仁和核仁骨架中是否真正存在原肌球蛋白,我们以兔抗原肌球蛋白抗体为探针,

对核仁和核仁骨架进行了免疫荧光标记,对溶解的核仁骨架样品免疫斑点印迹检测,结果都证明在核仁和核仁骨架中存在原肌球蛋白。胶体金免疫电镜标记的结果显示,原肌球蛋白在核仁中主要呈散在分布。原肌球蛋白是一种收缩蛋白,虽然目前对这种收缩蛋白在核仁中的作用还不清楚。但本文结果无疑将有助于对核仁结构和功能的进一步了解。

### 参 考 文 献

- [1] Alberts B, Bray D, Lewis J *et al.* Molecular Biology of the Cell. 3rd ed. New York & London :Garland Publishing Inc. ,1994. 379~381.3
- [2] Shionmi Y, Powers J, Bolla R I *et al.* *Biochem* ,1986 **25** : 5745~5751.
- [3] 焦仁杰, 陈建明, 朱小健等. 科学通报 ,1994 **39** : 455~457.
- [4] Berezney R, Coffey R. *J Cell Biol* ,1977 **73** : 616~637.
- [5] Franke W W, Kleinschmidt J A, Spring H *et al.* *J Cell Biol* ,1981 **90** : 289~299
- [6] Daniel J W, Baldwin H H. Methods of culture of plasmodial myxomycetes. In :Prescott D Med. Methods in Cell Physiology ,Vol I . New York :Academic Press ,1964 **1** ~41.
- [7] Mohberg J , Rusch H P. *Exp Cell Res* ,1971 **66** : 305~316.
- [8] Laemmli U K. *Nature* ,1970 **227** : 680~685.
- [9] Aris J P, Blobel G. *J Cell Biol* ,1980 **107** : 17~31.
- [10] Ochs R L, Lischwe M A, Spohn W H, Busch H. *Biol Cell* ,1985 **54** : 123~133.
- [11] Lapeyre B, Bourbon H, Amalric F. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1987 **84** : 1472~1476.
- [12] Schmidt-Zachmann M S, Hugle B, Scheer U, Franke W W. *Exp Cell Res* ,1984 **153** : 327~346.
- [13] Spector D L, Ochs R L, Busch H. *Chromosoma* ,1984 **90** : 139~148.
- [14] Olson M O, Thompson B A. *Biochemistry* ,1983 **22** : 3187~3193.
- [15] Corben E, Butcher G, Hutchings A *et al.* *Eur J Cell Biol* ,1989 **50** : 352~359.

## IMMUNOCYTOCHEMICAL IDENTIFICATION OF TROPOMYOSIN IN NUCLEOLI AND NUCLEOLAR MATRIX OF *PHYSARUM POLYCEPHALUM*\*

Jiao Mingda<sup>1</sup> Zeng Xianlu<sup>1</sup> Wang Xiaoguang<sup>2</sup> Hao Shui<sup>1</sup>

( Institute of Genetics and Cytology ,Northeast Normal University ,Changchun 130024 )

( Department of Biology ,Changchun Normal College ,Changchun 130032 )

**Abstract** Nucleoli were isolated from *physarum polycephalum* and nucleolar matrix was prepared by digesting the nucleoli respectively with DNase I 0.25mol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 2mol/L NaCl to remove DNA and most proteins. SDS-PAGE analysis indicated that there were about 20 polypeptides in nucleolar matrix component, including the 37kD polypeptide which was similar to tropomyosin in molecular weight. The result of indirect immunofluorescence treated with anti-tropomyosin antibody and sheep anti-rabbit IgG antibody labelled with FITC showed that bright fluorescence was observed in the nucleoli and nucleolar matrix, but no bright fluorescence in the controls. Indirect immunodotting detection further verified that tropomyosin existed in nucleolar matrix. Protein A-colloidal gold immunoelectron microscopic study showed that there were many gold particles in the specimens labelled

with tropomyosin antibody and there were few gold particles found in the controls. Tropomyosin distributed dispersely in nucleoli.

**Key words** Physarum polycephalum , Nucleolus ,Nucleolar matrix ,Tropomyosin ,Immunocytochemical identification

图 版 说 明  
Explanation of plant

1~3 间接免疫荧光检测结果。1~2. 以兔抗原肌球蛋白抗体为一抗 ,与 FITC 偶联的羊抗兔 IgG 抗体为二抗标记的核仁( 1 )和核仁骨架( 2 )( 1 500× )。3. 没有一抗标记的对照组核仁。4. 分离的核仁( 卡宝品红染色 )( 1 000× )。5. 核仁超微结构的电镜照片 ,示纤维中心( FC )、致密纤维成分( DFC )和颗粒成分( G )( 30 000× )。6~7. 间接免疫电镜检测结果。6. 以兔抗原肌球蛋白抗体和蛋白 A-胶体金标记的间期细胞核仁。示核仁( NU )中有很多金颗粒 ,这些金颗粒散在分布于核仁的各种组分( FC ,DFC 和 G 等( 30 000× )。7. 没有一抗标记的对照组间期细胞核仁( NU ) ,示核仁中只有极少的金颗粒分布( 30 000× )。标尺=0.5μm。

1~3. Indirect immunofluorescence detection of tropomyosin. 1~2. Nucleoli( 1 )and nucleolar matrix( 2 )labelled respectively with rabbit-anti-tropomyosin antibody as primary antibody and sheep-anti-rabbit IgG antibody labelled with FITC as second antibody( 1 500× )。3. Control ,nucleoli without labelling of anti-tropomyosin antibody。4. Isolated nucleoli( stained with carbol fuchsin )( 1 000× )。5. Ultrastructure of nucleolus ,showing the fibrillar center ,dense fibrillar component and granular component ( 30 000× )。6~7. Indirect immunoelectron microscopic detection. 6. Interphase nucleolus labelled with anti-tropomyosin antibody and protein A-colloid gold ,showing that many gold particles distributed spersely in the nucleolus( 30 000× )。7. Control ,interphase nucleolus without labelling of tropomyosin ,showing there are only few gold particles in nucleolus( 30 000× )。Bar=0.5μm.