

两种纤毛虫营养细胞和休眠细胞蛋白组成的比较分析

陈季武 倪兵 顾福康*

(华东师范大学生命科学学院 上海 200062)

摘要:应用生化抽提和 SDS-PAGE 方法显示,膜状急纤虫(*Tachysoma pellionella*)的营养细胞含 38 条蛋白谱带,休眠细胞含 29 条蛋白谱带,两者共有谱带为 26 条,特有谱带各为 12 条和 3 条,相似度为 77.6%;休眠细胞的包囊壁含 22 条蛋白谱带,细胞脱包囊后残留的包囊壁含 15 条蛋白谱带,两者共有谱带为 14 条,特有谱带各为 8 条和 1 条,相似度为 76%。包囊游仆虫(*Euplotes encysticus*)的营养细胞和休眠细胞均含 23 条蛋白谱带,两者共有谱带为 19 条,特有谱带各为 4 条,相似度为 82.6%;休眠细胞的包囊壁和细胞脱包囊后残留的包囊壁均含 20 条蛋白谱带,两者共有谱带为 19 条,特有谱带均为 1 条,相似度为 95%。结果表明,两种纤毛虫的营养细胞向休眠细胞转化过程中,细胞结构的主要蛋白质成分发生了明显变化,这些变化与细胞在不同生理状态下结构的分化及其生命活动特征相关。形成“毛基体吸收型包囊”的急纤虫与形成“毛基体非吸收型包囊”的游仆虫相比较,前者营养期和休眠期细胞蛋白组成有更明显的差异,这可能与其细胞结构更大程度的脱分化有关。根据纤毛虫休眠细胞的包囊壁和细胞脱包囊后残留的包囊壁两者蛋白组成的差异推测,前者包囊壁可能含有与休眠细胞生命活动相联系的“活性”成分。

关键词:膜状急纤虫,包囊游仆虫,营养细胞,休眠细胞,包囊壁蛋白

中图分类号:Q955 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2005)05-72-05

Comparative Analysis on the Protein Compositions Between Vegetative and Resting Cell of Two Ciliates

CHEN Ji-Wu NI Bing GU Fu-Kang

(School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract: The protein compositions between vegetative cell and resting cell (cyst) of two fresh water ciliates are comparatively analyzed using biochemistry extraction and SDS-PAGE technique. The results show that the vegetative and resting cell of *Tachysoma pellionella* (TP) contains 38 and 29 protein bands, respectively. The former and the latter contain 12 and 3 specific protein bands, respectively. Both have 26 common protein bands. The similarity values is 77.6%. The cyst wall of resting cell of TP contains 22 protein bands. The remaining cyst wall contains 15 protein bands after TP excystment. The former and the latter contain 8 and 1 specific protein bands, respectively. Both have 14 common protein bands. The similarity values is 76%. The results also indicate that the vegetative and resting cell of *Euplotes encysticus* (EE) all contain 23 protein bands. Both have 19 common protein bands and all contain 4 specific protein bands. Their similarity values is 82.6%. The cyst wall of resting cell of EE and the remaining cyst wall after

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 30270160);

* 通讯联系人, E-mail: jkqu@bio.ecnu.edu.cn;

第一作者介绍 陈季武,男,博士,副教授,研究方向:动物细胞和分子生物学。

收稿日期:2005-02-22,修回日期:2005-07-29

EE excystment all contain 20 protein bands. Both have 19 common protein bands and all contain 1 specific protein bands. Their similarity values is 95%. These data reveal that there are obviously variances of main protein components of two ciliates in the differentiating process of converting vegetative cell into resting cell. These variances of proteins are associated with structural differentiation of their cells and features of their life activity under different physiological condition. The protein composition in vegetative and resting cell of TP forming "kinetosome-resorbing cyst" has more variance as compared with that of EE forming "non-kinetosome-resorbing cyst", which may be related with structural dedifferentiation of TP in greater degree. From protein composition variance between the cell wall of resting cell of the ciliates and the remaining cell wall after the ciliates excystment, we infer that cell wall of resting cell of the ciliates possibly contains "active" components associated with life activity of the resting cell.

Key words: *Tachysoma pelliionella*; *Euplotes encysticus*; Vegetative cell; Resting cell; Cyst wall protein

自由生活的许多纤毛虫在不良环境条件刺激下能分泌特殊物质形成包囊而转入休眠状态,一旦环境条件有利时,便脱包囊而出,恢复正常生命活动。研究纤毛虫的休眠现象,已成为探索真核细胞结构及其生理生化功能的重要内容之一。目前已对纤毛虫休眠包囊的结构与形态变化做了较多研究^[1~3],但对其生化变化,尤其对于形成包囊过程中所发生的蛋白质水平的变化则知之甚少。本文以形成“毛基体吸收型包囊”的膜状急纤虫(*Tachysoma pelliionella*)和形成“毛基体非吸收型包囊”的包囊游仆虫(*Euplotes encysticus*)的休眠细胞与营养细胞为材料,对这两种纤毛虫在形成休眠细胞前后的蛋白组成和脱包囊前后的包囊壁蛋白组成进行了比较分析,为探索特殊状态下细胞的结构组成及其生命活动特征提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料 膜状急纤虫于 1999 年采自华东师范大学校园小湖内,经本实验室分离和建立纯系培养。将急纤虫接种至培养皿中,置于 25℃ 的恒温培养箱中,以池塘过滤水中加入麦粒后形成的麦粒发酵液进行培养,每 4~6 d 更换一次培养液,使虫体达到较高密度和良好的营养生长状态。

包囊游仆虫于 1999 年采自上海动物园小湖内,经本实验室分离和纯系培养。将游仆虫接种至盛有池塘过滤水的培养皿中,置于 25℃ 的恒温培养箱中培养。每日于早晚以草履履滴虫(*Chilomonas paramecium*)喂食 2 次,每 2~4 d

更换 1 次培养液,数天后虫体可达到较高密度。

在游仆虫和急纤虫达到较高密度后,不再更换培养液,并中断食物供给,几天后大部分虫体转变为包囊,然后浓缩之。

1.2 方法 利用裂解液分别裂解急纤虫、游仆虫营养细胞和休眠细胞,离心后弃沉淀,取上清进行 SDS-PAGE 电泳。

急纤虫、游仆虫休眠细胞的包囊壁蛋白与细胞脱包囊后残留的包囊壁蛋白的生化提取按 Izquierdo 等^[4]报道的方法操作。其中,在冰浴中间歇超声破碎包囊,镜检破碎情况。离心分离包囊壁。将所分离的包囊壁放入含 2% SDS 和 5% β-巯基乙醇的 6 mol/L 胍溶液中,于 100℃ 孵育 10 min,然后高速离心分离出包囊壁蛋白。

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)条件为:分离胶浓度为 12%,浓缩胶浓度为 4%,电极缓冲液为 pH 8.3 Tris-Gly 系统。电泳时,浓缩胶电流为 13 mA,分离胶电流为 20 mA,待溴酚蓝泳动至距离分离胶下沿 0.5 cm 时停止电泳。银染色参照李建武等^[5]报道的方法。染色后用凝胶成像系统对凝胶进行拍照和分析。用标准低分子量蛋白定蛋白分子量。

相似度 $F = 2N_{XY} / (N_X + N_Y)$,其中 F 为相似度, N_{XY} 表示两种物种共有蛋白谱带数; N_X 、 N_Y 分别表示 X 物种、 Y 物种蛋白谱带总数。

2 结果

2.1 急纤虫休眠细胞与营养细胞蛋白组成的比较 急纤虫休眠细胞含 29 条蛋白谱带,营养

细胞含 38 条蛋白谱带,两者共有谱带为 26 条,分子量分别为 7.4、8.5、11.0、13.5、16.0、17.6、19.1、20.6、21.9、22.9、25.1、26.7、32.6、34.6、36.7、39.9、42.7、45.5、48.0、50.6、52.8、66.4、74.0、78.2、86.3 和 88.7 ku,相似度为 77.6%。但与营养细胞相比,休眠细胞中的 11.0、20.6、21.9、26.7、34.6、36.7、86.3 和 88.7 ku 蛋白为减弱蛋白谱带,16.0、17.6、19.1、32.6 和 66.4 ku 蛋白为增强蛋白谱带。休眠细胞特有谱带有 3 条,分子量分别为 9.7、15.3 和 38.2 ku;营养细胞特有谱带有 12 条,分子量分别为 28.1、29.0、55.2、57.1、61.6、68.8、71.5、76.4、82.7、84.9、92.0 和 100.8 ku(图 1)。

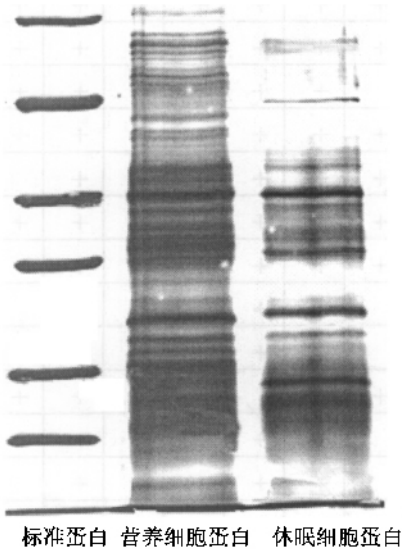
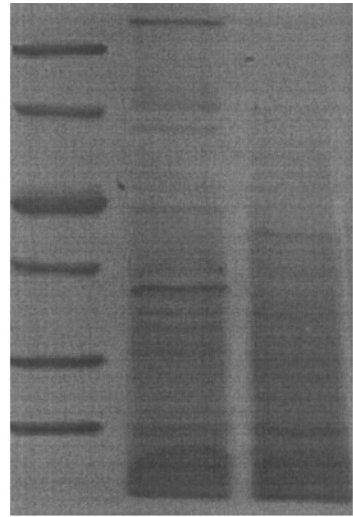


图 1 急纤虫休眠细胞与营养细胞蛋白组成的电泳图谱

2.2 游仆虫休眠细胞与营养细胞蛋白组成的比较 游仆虫休眠细胞与营养细胞各含 23 条蛋白谱带,两者共有谱带为 19 条,分子量分别为 7.8、9.6、11.3、13.7、15.7、16.6、17.6、18.7、19.2、21.8、25.1、27.3、28.6、31.0、34.3、37.3、47.2、50.3 和 67.1 ku,相似度为 82.6%。但与营养细胞相比,休眠细胞中的 11.3、13.7、18.7、19.2、25.1 和 27.3 ku 蛋白为减弱蛋白谱带,28.6 和 67.1 ku 蛋白为增强蛋白谱带。休眠细胞特有谱带有 4 条,分子量分别为 23.8、42.4、

61.9 和 71.2 ku,营养细胞特有谱带也有 4 条,分子量分别为 22.6、41.2、54.6 和 58.3 ku(图 2)。



标准蛋白 休眠细胞蛋白 营养细胞蛋白

图 2 游仆虫休眠细胞与营养细胞蛋白组成的电泳图谱

2.3 游仆虫休眠细胞的包囊壁与脱包囊后残留的包囊壁蛋白组成的比较 游仆虫休眠细胞的包囊壁和脱包囊后残留的包囊壁都含 20 条蛋白谱带,共有谱带达 19 条,其分子量分别为 15.0、17.5、19.7、22.5、23.8、26.3、31.0、35.1、37.9、40.5、42.2、47.4、53.4、60.2、67.1、71.3、77.8、97.0 和 100.2 ku,相似度高达 95%。但与休眠细胞的包囊壁相比,脱包囊后残留的包囊壁中的 19.7 和 67.1 ku 蛋白为减弱蛋白谱带,17.5、23.8 和 77.8 ku 蛋白为增强蛋白谱带。两者都只含 1 条特有蛋白谱带,其分子量分别为 32.0 和 44.9 ku,并且这 2 条蛋白谱带非常窄,显色浅,表明其含量很少(图 3)。

2.4 急纤虫休眠细胞的包囊壁与脱包囊后残留的包囊壁蛋白组成的比较 急纤虫的休眠细胞的包囊壁含 22 条蛋白谱带,脱包囊后残留的包囊壁含 15 条蛋白谱带,共有谱带有 14 条,其分子量分别为 17.1、25.7、32.0、37.5、40.0、43.6、46.9、55.1、61.2、74.0、90.4、98.3 和 104.5 ku,相似度为 76%。但与休眠细胞的包囊壁相比,脱包囊后残留的包囊壁中的 17.1、25.7、

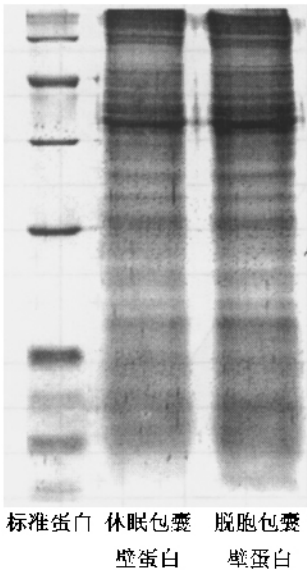


图3 游仆虫休眠细胞的包囊壁与脱包囊后残留的包囊壁蛋白组成的电泳图谱

32.0、40.0 和 98.3 ku 蛋白为减弱蛋白谱带, 46.9 ku 蛋白为增强蛋白谱带。前者的特有蛋白谱带多达 8 条, 其分子量分别为 12.9、14.6、21.9、25.0、28.7、31.2、35.2 和 51.5 ku; 后者只含 1 条特有蛋白谱带, 其分子量为 13.8 ku (图 4)。

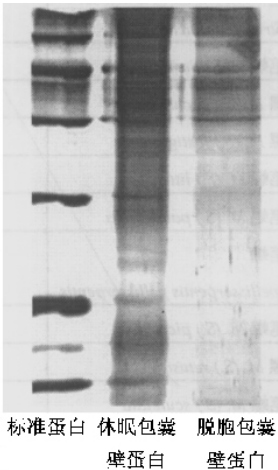


图4 急纤虫休眠细胞的包囊壁与脱包囊后残留的包囊壁蛋白组成的电泳图谱

3 讨论

3.1 两种纤毛虫营养细胞和休眠细胞蛋白组

成的比较分析 与其他尖毛虫科纤毛虫一样, 急纤虫形成包囊时, 细胞的全部毛基体、纤毛杆和微管结构被吸收, 游仆虫形成包囊时, 细胞的毛基体和大部分微管被保留下来, 仅部分纤毛杆被吸收^[3]。本文的结果显示, 两种纤毛虫的营养细胞向休眠细胞转化过程中, 细胞结构的主要蛋白质成分发生了明显变化。在急纤虫休眠细胞的 29 条谱带中, 新出现的蛋白谱带有 3 条, 有 5 条谱带的蛋白表达上调, 有 8 条谱带的蛋白表达下调, 而原先存在的 12 条蛋白谱带消失, 即缺失了营养细胞中约 32% 的蛋白谱带。在游仆虫休眠细胞的 23 条谱带中, 新出现的蛋白谱带有 4 条, 有 2 条谱带的蛋白表达上调, 有 6 条谱带的蛋白表达下调, 而原先存在的 4 条蛋白谱带消失, 即缺失了营养细胞中约 17% 的蛋白谱带。这些事实表明, 纤毛虫的营养细胞和休眠细胞蛋白组成的差异与细胞在不同生理状态下结构的分化及其生命活动特征相联系。并且, 形成“毛基体吸收型包囊”的急纤虫与形成“毛基体非吸收型包囊”的游仆虫相比较, 其营养细胞和休眠细胞两者蛋白组成有更明显的差异, 这可能与其细胞结构更大程度的脱分化有关。

3.2 两种纤毛虫休眠细胞的包囊壁与脱包囊后残留的包囊壁蛋白组成的比较分析

在纤毛虫包囊形成过程中, 包囊壁的形成是最重要的事件。据研究认为, 包囊壁是纤毛虫细胞质内通过胞器分泌的形式将有关物质输送到细胞膜外形成的片层状结构, 是对细胞生命活动具有特殊保护作用的细胞质衍生物^[6]。对多种纤毛虫的生化分析表明, 包囊壁的主要成分是蛋白质和碳水化合物, 一定的种类其包囊壁蛋白组分是相对稳定的^[7,8]。但本实验显示, 急纤虫休眠细胞脱包囊后残留的包囊壁蛋白谱带只有 15 条, 缺失了休眠细胞包囊壁的 8 条蛋白谱带, 表明其在脱包囊过程中, 包囊壁蛋白质组成变化较大, 提示其休眠细胞的包囊壁中的蛋白质是与细胞生命活动相联系的活性成分。而游仆虫休眠细胞脱包囊后残留的包囊壁有 20 条蛋白谱带, 虽然只缺失了休眠细胞包囊壁的 1

条蛋白谱带,但其 5 条蛋白谱带含量发生变化并产生了 1 条新蛋白谱带,表明其在脱包囊过程中,包囊壁蛋白质组成和含量也有一定的变化。由于用透射电镜术观察到,魏氏拟尾柱虫 (*Paraurostyla wessei*) 休眠包囊壁中其细胞表膜和包囊壁颗粒层间存在物质交换的结构^[9]。因此作者推测,所述的两种纤毛虫休眠细胞的包囊壁中可能存在与细胞生命活动相联系的“活性”成分。

与休眠细胞的包囊壁相比,急纤虫脱包囊后,其包囊壁蛋白组成变化较大,而游仆虫脱包囊后,其包囊壁蛋白质组成变化较小,这从一个侧面揭示“毛基体吸收型包囊”脱包囊过程可能比“毛基体非吸收型包囊”更为复杂。

参 考 文 献

[1] 吴月华,季玲妹,顾福康. 原生动物细胞休眠现象的研究进展. *动物学杂志*, 2004, 39(5): 91~95.

- [2] Gutierrez J C, Callejas S, Bomiquel S, *et al.* Ciliate cryptobiosis: a microbial strategy against environmental starvation. *Int Microbiol* 2001 **4**(3):151~157.
- [3] 顾福康,张作人. 纤毛虫形成包囊和脱包囊的研究及其意义. *动物学杂志*, 1992, 27(5): 48~43.
- [4] Izquierdo A, Marti-Gonzalez A, Gutierrez J C. Resting cyst wall glycoproteins isolated from two colpodid ciliates are glycine-rich proteins. *Cell Biol Int* 2000 **24**(2):115~119.
- [5] 李建武,萧能,余瑞元等编. 生物化学实验原理和方法. 北京: 北京大学出版社, 1994, 224~226.
- [6] 顾福康编著. 原生动物学概论. 北京: 高等教育出版社, 1991, 39~41.
- [7] Rosati G, Verni F, Nieri L. Investigation of the cyst wall of the hypotrich ciliate *Gastrostyla steini* Engelman. *Monit Zool Ital*, 1983, **17**:19~26.
- [8] Calvo P, Torres A, Navas P, *et al.* Complex carbohydrates in the cyst wall of *Histiculus similis*. *J Gen Microbiol*, 1983, **129**: 829~832.
- [9] 顾福康,倪兵,季玲妹等. 魏氏拟尾柱虫休眠包囊及其细胞器超微结构的观察. *动物学研究*, 1999, **21**(3):199~203.