

贾第虫 (*Giardia*) 原始特性的研究进展

沈剑钊

(首都医科大学寄生虫学教研室 北京 100054)

关键词 源真核生物 贾第虫 原始特性

贾第虫属 (*Giardia*) 是一类双核寄生性鞭毛虫, 它的宿主可为人、哺乳动物、某些鸟类和两栖类。本虫简单的生活周期共分为两个时期: 具有感染性的包囊和营养性的滋养体。受本虫感染后可引起腹泻^[1, 2]。在贾第虫属中, 蓝氏贾第虫 (*Giardialamblia* 以下简称贾第虫) 是最重要的一种。目前对它的研究资料也较多。贾第虫为一种最原始的真核生物 (archezoa 源真核生物), 在生物学分类上处于重要地位。本文将对其原始特性的研究进展做一综述。

1 贾第虫的分类

本虫属于原生动物门 (Protozoa), 鞭毛虫纲 (Mastigophora)、双滴虫目 (Diplomonadina)、六鞭科 (Hexamitidae)、贾第虫属 (*Giardia*)^[1, 2]。1987年, 著名的进化原生生物学家 Cavalier-Smith 提出这一单细胞厌氧真核生物可能处于原核细胞和真核细胞之间的过渡环节, 其主要依据是贾第虫本身缺乏线粒体, 兼性厌氧生长^[3, 4]。贾第虫能吞噬一些电镜下可见的颗粒物质。贾第虫虽属真核生物, 但它并不具有真核生物普遍具有的线粒体和典型的高尔基氏器, 它的核糖体是 70s 型的, 和原核生物的相似^[5]。Sogin 和 Peattie 等 1989 年^[6] 用分析了 54 种生物的 rRNAs 序列, 并建立了系统树, 在这一系统树中, 贾第虫的 rRNA 序列更加接近于原核生物的 rRNA 序列, 这表明贾第虫在真核细胞中处于更加原始的地位。同年, Cavalier-Smith 在划分出源真核生物的基础上, 提出了生物八界分类系统。这一新的分类系统较原来的两界 (真核生物界和原核生物界)

或五界 (动物界、植物界、真菌界、原生生物界和原核生物界) 系统更加合理。在此分类系统中, 贾第虫属于源真核生物界 (Archezoa), 双滴虫门 (Diplomonadina)。据目前所知, 源真核生物除双滴虫类 (Diplomonadina 包括贾第虫) 外, 还有微孢子虫类 (Microsporidina), 某些特殊的变形虫 (Archeamoeba) 以及毛滴虫类 (Trichomonas)^[7]。

2 贾第虫细胞核的细胞生物学和分子生物学研究

有关贾第虫细胞核形态学研究的报道甚少。50 年代曾有学者对核的结构做过光学显微镜观察, 然因其细胞核微小, 光镜观察到的核结构似不可靠^[8]。1966 年 Friend 用电镜观察了虫体的微细结构, 但对细胞核的形态结构并未做细致观察^[9]。80 年代, 国内学者也用电镜对本虫的超微结构进行过观察, 然对细胞核仅做了简单的描述^[10, 11]。以往人们一直认为贾第虫的两个细胞核内各有一大的核仁。其实, 在 1963 年苏联学者 Soloviev 曾用甲基绿-吡咯林染色法进行观察, 未发现蓝氏贾第虫细胞核具有任何富于 rRNA 的核仁样结构^[12]。1966 年, Fried 在观察鼠贾第虫时也未未发现本虫有核仁存在^[5]。最近, 国内昆明动物所李靖炎等曾用 Soloviev 的方法对鼠贾第虫的细胞核进行观察得到同样的结果, 另用铋染法也未见蓝氏贾第虫具有核仁样结构。研究表明贾第虫具有 rDNA, 由此可见, 在真核生物中, 贾第虫

是目前唯一具有 rRNA 基因而无核仁结构的一种生物。吴纲等的研究表明在贾第虫的细胞核内存在着 4 种与核心组蛋白相似的碱性蛋白(待发表)。代嘉陵等电镜观察结果显示贾第虫虽具有核骨架,但并无核纤层(待发表)。吴传芬等免疫印迹实验结果表明,着丝粒蛋白呈阳性反应,其带形分布恰恰介于真核生物与原核生物之间(待发表)。作者等(1995)新近对蓝氏贾第虫核被膜和核分裂做了电镜观察,发现贾第虫的核被膜不完整,有很大的缺口,缺口两端呈钝圆结构。核分裂也是极其独特的,在核分裂过程中没有发现成型的纺锤体系统参与,免疫荧光检测核内未发现微管蛋白(待发表)。迄今为止,在真核生物中还未发现象贾第虫这样的核被膜结构和核分裂方式。这些发现在国内外尚未见文献报道,进一步证实了贾第虫的原始特性。随着分子生物学的发展,贾第虫的特殊形态及其在生物进化中的地位已逐渐受到人们的重视。1984年, Wieseahn 用 H^3 -Uridine 标记放射自显影法观察了贾第虫核的 DNA 复制过程,推测其世代时间(generation time)为 15h。还观察到两个核的 DNA 不仅同时进行复制,且均具有转录活性^[13]。后来, Kabnick 和 Peattie(1990年)用 DAPI 荧光染色法对核的功能做了进一步研究,结果表明核均具有转录活性^[14]。这是一种很特殊的生物学现象。在原生动物中,仍有一些具有两个细胞核的生物,如纤毛虫和脆弱双核阿米巴。但它们核的特性和功能各不相同。如前者中之四膜虫的两个核不仅体积大小不一,遗传功能也不相同。大核有多个拷贝的转录基因,小核则含有单拷贝的整个基因组^[15, 16]。

3 贾第虫的染色体

关于染色体数目,目前尚不清楚。1952年 Filice 用光镜观察估计每一个核染色体数为 4 条^[5]。1988年, Adam 等用脉冲场凝胶电泳(PFGE)对贾第虫全基因组 DNA 进行分析。根据实验结果推测贾第虫每个核内至少有 4—5 条功能紧密相关的大分子染色体 DNA 片

断。各染色体大小不一,大约在 1×10^5 — 4×10^6 bp 之间,碱基总数为 1.2×10^7 bp^[17]。1990年 Kabnick 等的荧光染色原位杂交结果显示贾第虫两个核有相同数量的 DNA,每个核有 4 条染色体^[14]。但迄今为止还没有看到成型的染色体。

关于贾第虫是多倍体还是单倍体仍无定论,但多倾向于每个核是单倍体。Fan 等^[18]1991 年对限制性酶解的贾第虫 DNA 片断进行密度扫描,推测其为单倍体,染色体数目为 5 个。但 Adam^[17, 2]从其每个染色体的分子量和总的分子量相比较,推测贾第虫含有 30—50 个具有染色体特性的 DNA 分子,所以 Adam 认为贾第虫有可能是多倍体,但目前还没有发现贾第虫存在有性生殖。Kabnick 和 Peattie 1991 年认为贾第虫每个核内是单倍体,但其共有两个核,如此就整个细胞而言则为二倍体,这种特殊的二倍体状态利于细胞在进化过程中生存和转化,并认为这种现象是从单倍体的原核生物进化成二倍体的高等真核生物过程中出现的^[6]。

4 贾第虫的核糖体及其转译功能

贾第虫的 rRNAs 是非常独特的,和其他真核细胞相比较小^[19, 20],其核糖体为 70s 型,小于其它真核生物^[21, 3]。rDNA 的基因也较小,仅仅 5566bp,且重复排列于基因组之中,编码着其亚基 23s、16s 和 5.8s^[22]。对贾第虫小亚基 rDNA 序列的分析结果表明其小亚基 rDNA 序列与源细菌有很大的相似性^[23, 8]。1991 年 Adam 等^[24]对三个贾第虫克隆株端粒的研究结果表明它们的 rDNA 序列与端粒之间的转变是连续的,但三者的转换部位并不完全相同,其中两株的转换部位接近于大亚基 rDNA 序列的起始点。另一株的则位于 rDNA 基因间的内在间隔序列中,但起始点序列均为 CCCCCGAA。1991 年 Blancq 报道贾第虫端粒区的 rDNA 重复序列有频繁的重排,重排率高达 60%、估计每次分裂的重排率高达 3%^[25]。有些虫株的 rDNA 序列中已存在着间

隔顺序,而有些虫株则没有。至于间隔顺序在编码过程中是否起作用? rDNA 内部的重排是否与间隔顺序有关? 目前还不清楚。

关于贾第虫的转译,目前了解不多,但有证据表明,其转译启动与高等真核生物的不同。从已报道的 cDNA 序列和 RNA 5' 端杂交结果来看,贾第虫具有一很短的 5' 非转译区,仅约为 1—6bp。这种特殊的现象可能与其原始特性有关。对 699 种脊椎动物 mRNA 的研究结果表明,其中仅有 4 种动物 mRNA 的前导序列少于 10 个核苷酸。一般而言,在脊椎动物中,前导序列很短的 mRNA 是不能转译的^[26]。从贾第虫 mRNA 具有很短的前导序列推测,其核糖体与 mRNA 的结合与转译启动之间的关系是很紧密的。如此短的 mRNA 前导序列在溶组织阿米巴的肌动蛋白基因(11 bases)^[27]、铁蛋白基因(9 bases)^[28]和阴道毛滴虫的铁蛋白基因中均有发现^[29]。

尽管贾第虫的 mRNA 与脊椎动物的 mRNA 有很大不同,但贾第虫在鼠的离体网织红细胞中可进行成功的转译^[30, 31]。有研究表明贾第虫 L_{Sr}RNA V 区的肽基转译酶序列与真核生物的相似,而源细菌和真细菌的与之相比则相差很远。在原核细胞 mRNA 分子中作为起始信号的 S. D. 顺序(同感顺序 UAAGGAGG)定位于启动密码前 5—10 个核苷酸。贾第虫也具有这个序列,但此序列与启动密码的关系并不固定。尽管贾第虫的转译机制与真核生物的相比有显著不同,但已较接近于真核生物。对贾第虫转译启动机制的研究将为其原始特性的研究提供更多的证据,其较短的 5' 前导序列和独特的 rRNA 也可能为真核生物转译进化的研究有所启示。

贾第虫的转录较类似于真核细胞。其启动密码上游的 9—134 个碱基很可能存在着 TATAA box^[32, 33, 34]。然其是否为 RNA 聚合酶的结合位点,目前尚不清楚。3' 非转译区之后是 poly(A)尾,AGTPuAAPy 与终止密码相隔 6—19 个核苷酸。终止密码与 poly(A)尾相隔 7—10 个碱基。贾第虫的 AGTPuAAPy 序

列可作为多聚核苷酸的信号标记^[31]。迄今为止,在贾第虫尚未发现内含子。

结 束 语

综上所述,贾第虫无论从形态学还是从分子角度均有许多独特的原始特性,这些特性体现了从原核生物进化成真核生物过程中出现的一种过渡状态,如核被膜不完整,没有发现核纤层和核仁结构及独特的 rRNA 序列和较短的 5' 非转译区等,所以对贾第虫的深入研究将可能对真核细胞的起源提供许多有意义的启示。

致谢 本文承蒙本室卢思奇教授和昆明动物所李靖炎教授审阅。

参 考 文 献

- 1 Shun Darlin. *Giardia lamblia* and water supply. *Journal AWWA*. February, 1985.
- 2 Adam, R. D. The biology of *Giardia* spp. *Microbiological Review*. 1991, **55**(4): 706—732.
- 3 Cavalier-Smith, T. Eukaryotes with no mitochondria. *Nature*. 1987, **326**: 332—333.
- 4 Cavalier-Smith, T. The origin of eukaryotes and achaeobacterial cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1987, **503**: 17—54.
- 5 Sogin, M. L. Gunderson, J. H., Elwood, H., Alonso, R. A. and Peattie, D. A. Phylogenetic meaning of the kingdom concept: eukaryotic ribosome RNA from *Giardia lamblia*. *Science*. 1989, **243**: 75—77.
- 6 Kabnick, K. S. and D. A. Peattie. 1991 *Giardia*: a missing link between prokaryotes and eukaryotes. *American Scientist*, **79**: 36—43.
- 7 Cavalier-Smith, T. 1989. Eukaryotic evolution—in *X. IV International Botanical Congress*. 203—223.
- 8 Flice, F. P. Studies on the cytology and life history of *Giardia lamblia* from the laboratory. *Rat. Univ. Calif. Publ. Zool*. 1952, **57**: 53—146.
- 9 Friend, D. S. The fine structure of *Giardia muris*. *J. Cell Biol* 1966, **29**. 317—332.
- 10 杜之鸣等,蓝氏贾第虫滋养体的电镜观察,河北医学院学报,1985, **6**(3): 130
- 11 卢思奇等,蓝氏贾第虫滋养体超微结构研究,动物学杂志,1990, **25**(6): 1—2
- 12 Soloviev, M. Study of the process of division of *Lambia duodenalis* in cultures. *Meditsinskaya Parazitologiya*. 1963, **32**: 96—101.
- 13 Wieschahn, G. P., E. L. Jarrell, D. G. Lindmark, E. A.

- Meyer and L. M. Hallick. Giardia lamblia: autoradiographic analysis of nuclear replication. *Exp Parasitol* 1984, **58**: 94—100.
- 14 Kabnick, K. S., and D. A. Peattie. In situ analysis reveals that the two nuclei of Giardia lamblia are equivalent. *J Cell Sci.* 1990, **95**: 353—360.
- 15 Prescott, D. M. and Stone, G. E. 1967. Replication and function in the protozoan nucleus. In *Research in Protozoology*, Vol. 2 (ed. T. T. Chen), 117—146. New York: Pergamon Press.
- 16 Woodard, J., Kaneshiro, E. and Corovsky, M. A. Cytochemical studies on the problem of micronuclei in Tetrahymena. *Genetics* 1972, **70**: 251—260.
- 17 Adam, R. D., T. E. Nash and T. E. Wellems. The Giardia lamblia trophozoite contains sets of closely related chromosomes. *Nucleic Acids Res.* 1988, **16**: 4555—4567.
- 18 Fan, J. B., S. H. Korman, C. R. Canter and C. L. Smith. Giardia lamblia, haploid genome size determined by pulsed field gel electrophoresis is less than 12Mb. *Nucleic Acids Res.* 1991, **19**: 1905—1908.
- 19 Boothroyd, J. C., A. Wang, D. A. Campbell and C. C. Wang. An unusually compact ribosomal DNA repeat in the protozoan Giardia lamblia. *Nucleic Acids Res.* 1987, **15**: 4065—4084.
- 20 Edlind, T. D., P. R. Chakraborty. Unusual ribosomal RNA of the intestinal parasite Giardia lamblia. *Nucleic Acids Res* 1987, **15**: 7889—7901.
- 21 Cavalier-Smith, T. 1989. Archaeobacteria and Archezoa. *Nature*, **339**: 100—101.
- 22 Healey, A., R. Mitchell, J. A. Upcroft, P. E. L. Boreham and P. Upcroft. Complete nucleotide sequence of the ribosomal RNA tandem repeat unit from Giardia intestinalis. *Nucleic Acids Res* 1990, **18**: 7889—7901.
- 23 Edlind, T. D., C. Sharetzsky, and M. E. Cha. 1990. Ribosomal RNA of the primitive eukaryote Giardia lamblia: large subunit domain and potential processing signals. *Gene* 1990, **96**: 289—293.
- 24 Adam, R. D., T. E. Nash and T. E. Wellems. 1991. Telomeric location of Giardia lamblia rDNA genes. *Mol. Cell Biol.* 1991, **11**: 3326—3330.
- 25 Le Blancq, S. M., S. H. Korman, and L. H. T. Van der Ploeg. Frequent rearrangements of rRNA encoding chromosomes in Giardia lamblia. *Nucleic Acids Res.* 1991, **19**: 4405—4412.
- 26 Kozak, M. 1987. An analysis of 5'—noncoding sequence from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* 1987, **15**: 8125—8148.
- 27 Edman, V., I. Meza, and N. Agabian. Genomic and cDNA actin sequences from a virulent strain of Entamoeba histolytica. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987, **84**: 3024—3028.
- 28 Huber, M., L. Carfinkel, C. Gitler, D. Mirelman, M. Revel, and S. Rozenblatt. Nucleotide sequence analysis of an Entamoeba histolytica ferredoxin gene. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1988, **31**: 27—34.
- 29 Johnson, P. J., C. E. d' Oliveira, T. E. Gorrel and M. Muller. Molecular analysis of the hydrogenosomal ferredoxin of the anaerobic protist Trichomonas vaginalis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990, **87**: 6907—6910.
- 30 Aggarwal, A., and T. E. Nash. Giardia lamblia: RNA translation products. *Exp. Parasitol.* 1987, **64**: 336—341.
- 31 Peattie, D. A., R. A. Alonso, A. Hein, and J. P. Coulfield. Ultrastructural location of giardins to the edges of disk microribbons of Giardia lamblia and the nucleotide and deduced protein sequence of alpha giardin. *J. Cell Biol.* 1989, **109**: 2323—2335.
- 32 Aggarwal, A., V. F. de la Cruz, and T. E. Nash. 1990. A heat shock protein gene in Giardia lamblia unrelated to HSP70. *Nucleic Acids Res* 1990, **18**: 3409.
- 33 Gillin, F. D., P. Hagblom, J. Harwood, S. A. Aley, D. S. Keener, M. McCaffery, M. So, and D. G. Guiney. Isolation and expression of the gene for a major surface protein of G. lamblia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, **87**: 4463—4407.
- 34 Kirk-Mason, K. E., M. J. Turner, and P. R. Chakraborty. 1989. Evidence for unusually short tubulin mRNA leaders and characterization of tubulin genes in Giardia lamblia. *Mol. Biochem. Parasitol* 1989, **36**: 87—100.