

纤毛病相关蛋白 CEP43 和 CCDC13 在艾美游仆虫中的细胞与亚细胞定位

尹家奇 何燕 吴俊林 生欣*

遵义医科大学 生物化学与分子生物学教研室 遵义 563000

摘要: 艾美游仆虫 (*Euplotes amieti*) 含有几乎所有已知的纤毛病基因, 但绝大多数基因及其表达产物的细胞定位和功能未知。为明确中心粒蛋白 43 (CEP43) 和卷曲螺旋域蛋白 13 (CCDC13) 在艾美游仆虫中的细胞以及亚细胞定位, 本研究采用免疫荧光和免疫电镜技术对其进行显微与超微结构观察。免疫荧光结果显示, CEP43 主要定位于艾美游仆虫的细胞核、腹面纤毛器 (口围带、尾棘毛、额腹横棘毛) 的基体及其附属微管, CCDC13 主要定位于腹面纤毛器杆部和基体以及银线系统, 附属微管及大核未见其定位。CEP43 与 γ -微管蛋白定位相同, CCDC13 与 γ -微管蛋白仅在腹面定位相同。2 种蛋白在免疫电镜下显示与荧光标记定位相同, 而且 CCDC13 在额腹棘毛基部的胶体金数量远多于 CEP43。结合已有研究推测, 纤毛形成后多余的 CEP43 受 γ -微管蛋白复合体调控且被募集于细胞核, CCDC13 参与形成银线系统, 但为增加生长期艾美游仆虫的微管再生能力, 附属微管结构不需要 CCDC13 的参与。本结果为进一步研究上述蛋白在腹毛类纤毛虫中调节和维持皮层微管类细胞骨架的装配和稳定性中的作用和机制提供资料。

关键词: 艾美游仆虫; 纤毛病蛋白; CEP43; CCDC13; 免疫荧光; 免疫电镜

中图分类号: Q952 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2022) 03-412-10

Cellular and Subcellular Localization of Ciliopathy-associated Proteins CEP43 and CCDC13 in *Euplotes amieti*

YIN Jia-Qi HE Yan WU Jun-Lin SHENG Xin*

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China

Abstract: [Objectives] Recently, many ciliopathy-associated proteins are found in the basal body of cilia, and these proteins are also located in ciliates, *Euplotes amieti*. Ciliates have thousands of basal bodies of cilia and a complicated microtubular cytoskeleton, therefore, it is an ideal material for studying the interaction between the basal body and the microtubular cytoskeleton. **[Methods]** In this experiment, immunofluorescence and immuno-electron microscopy were used to observe the cellular and subcellular localization of Centrosomal

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 31760616) ;

* 通讯作者, E-mail: xshengbio@163.com;

第一作者介绍 尹家奇, 男, 硕士研究生; 研究方向: 原生动物的形态学、纤毛疾病分子生物学; E-mail: 1154195642@qq.com。

收稿日期: 2021-07-26, 修回日期: 2022-02-22 DOI: 10.13859/j.cjz.202203010

protein 43 (CEP43) and Coiled-coil domain-containing 13 protein (CCDC13) in *Euplotes amieti*. **[Results]** The results showed that the cilia microtubular organelles of *Euplotes amieti* were composed of the adoral zone of membranelles, caudal cirrus, marginal cirrus, frontoventral cirrus, transverse cirrus, radiating microtubule, and dorsum bristle (Fig. 2). Immunofluorescence showed that CCDC13 was mainly located in the basal body and rod of cilia microtubular organelles and the silverline system (Fig. 3a, b), while CEP43 was mainly located in the basal body of cilia microtubular organelles, and cirrus accessory microtubules and nucleus (Fig. 3c). CEP43 and γ -tubulin were co-localized in the regions mentioned above (Fig. 4), while CCDC13 and γ -tubulin were only located in the same regions on the ventral side of *Euplotes amieti* (Fig. 5a, b). On the dorsum, CCDC13 was located in the silverline system (Fig. 5d), while γ -tubulin was located in the basal body of the dorsal cirri (Fig. 5e). During the cell division, CEP43 was not located in the nucleus, but in the basal body and the adoral zone of membranelles (Fig. 6a, b), while CCDC13 was observed in the adoral zone of membranelles (Fig. 6c, d). Further, the immuno-electron microscopy showed that CEP43 and CCDC13 were located in the basal bodies of the cilia, the adoral zone of membranelles, the base of the frontoventral cirrus, and the base of the transverse cirrus (Fig. 7), and the amount of colloidal gold at the base of frontoventral cirrus of CCDC13 was much more than that of CEP43 (Fig. 7h), while CCDC13 was not observed in the nucleus (Fig. 7j). **[Conclusion]** 1) CCDC13 and CEP43 are involved in the formation of cilia and basal body; 2) CEP43 can form complexes with CAP350 to provide attachment points for microtubule extension; 3) the excess CEP43 will be regulated and recruited to the nucleus after the formation of cilia; 4) the CCDC13 participates in the formation of the silverline system, in addition, it will affect the rate of microtubule regeneration. However, in order to increase the regeneration off the anterior longitudinal microtubules of *Euplotes amieti* during the growth period, CCDC13 is not required. The results provide basic data for further research on the roles and mechanisms of the above proteins in regulating and maintaining the assembly and stability of the cortical microtubule cytoskeleton in hypotrichous ciliate.

Key words: *Euplotes amieti*; Ciliopathy-associated protein; CEP43; CCDC13; Immunofluorescence; Immuno-electron microscopy

艾美游仆虫 (*Euplotes amieti*) 属于纤毛门 (Ciliophora) 游仆亚纲 (Euplotia), 是进化上较为高等的纤毛虫, 在自然界分布广泛。该物种曾长期以阔口游仆虫 (*E. eurystomus*) 为名于纤毛微管骨架的研究 (Grim et al. 1980, Sheng et al. 2011), Liu 等 (2015) 基于标记基因测序及经典形态学对该物种进行了重新鉴定, 并命名为现名。艾美游仆虫与常见的模式纤毛虫 (草履虫和四膜虫) 相比, 具有十分复杂的皮层微管骨架系统和背腹分化的纤毛器, 是研究纤毛、纤毛发生和纤毛相关蛋白结构与功能的理想材料 (生欣等 2011)。

纤毛 (cilia) 是存在于细胞表面的一种毛

发状结构 (图 1), 以微管为主要成分, 在进化上高度保守; 纤毛能感知细胞外化学物质和机械力, 并通过特定的信号通路传递至细胞内。纤毛的结构分为五个主要部分, 基体 (basal body)、过渡区 (transition zone)、轴丝 (axoneme)、纤毛膜 (ciliary membrane) 和纤毛尖端 (ciliary tip)。基体位于纤毛基部, 为筒状结构, 与中心体同源, 由 9 组 3 联体微管构成, 具有调控纤毛的细胞定位和装配作用。轴丝是从基体的微管延伸至细胞外, 拥有感受外界物理化学信号和摆动功能 (Linck et al. 2016)。基体顶端和纤毛基部之间由过渡纤维连接, 基体顶端至中心微管基部为过渡区, 过渡区分布大量的纤

毛相关蛋白, 参与了中央微管的形成以及调控纤毛缺失的功能, 是纤毛非常重要的结构 (Lei et al. 2018)。纤毛尖端是连接轴丝顶端纤毛膜的部分, 组成蛋白和具体功能不详 (Dentler et al. 1984)。

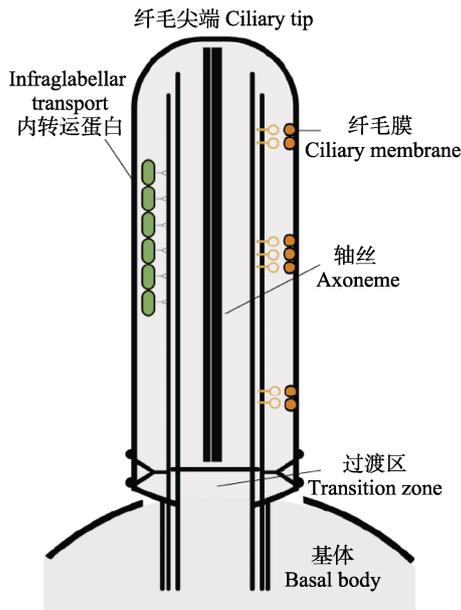


图 1 纤毛结构

Fig. 1 Cilia structure

纤毛由微管蛋白家族、中心体蛋白家族、巴德-毕德氏综合征 (Bardet-Biedl syndrome, BBS) 蛋白家族和纤毛内转运蛋白家族等 190 多种蛋白质组成, 其中, 中心蛋白家族参与了微管的装配, 决定整个细胞周期中微管列阵的几何形状, 在多种信号传递中也起着重要的作用, 更重要的是参与了纤毛发生 (Hir 2014)。本课题组前期通过对艾美游仆虫基因组测序, 筛选出了 372 个纤毛病相关基因, 其中, 148 种基因的表达产物定位于纤毛中, 并且绝大多数定位于中心体/基体 (何燕等 2021)。中心粒蛋白 43 (centrosomal protein 43, CEP43) 与一种罕见的干细胞骨髓增生性疾病有关 (Cabaud et al. 2018), 它是成纤维细胞生长因子受体 1 (fibroblast growth factor receptor 1, FGFR1)

的基因伴侣 (Acquaviva et al. 2009), 因此, 也被称作成纤维细胞生长因子受体 1 基因伴侣 (fibroblast growth factor receptor 1 oncogene partner, FOP)。卷曲螺旋域蛋白 13 (coiled-coil domain-containing protein 13, CCDC13) 属中心粒蛋白家族成员, 可防止有丝分裂过程中 DNA 损伤的积累 (Staples et al. 2014)。这两种蛋白都参与了纤毛发生, 但在基体定位、纤毛装配与解聚以及游仆虫纤毛器微管形态发生中的功能等方面仍不清楚。因此, 本研究利用免疫荧光和免疫电镜技术探索 CEP43 和 CCDC13 的细胞以及亚细胞定位, 为进一步探索其在腹毛类纤毛虫中调节和维持皮层微管类细胞骨架的装配和稳定性中的作用和机制提供资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用的艾美游仆虫 (*Euplotes amieti*) 于 2019 年 6 月在上海青浦区近郊的农田水塘中获得, 在实验室培养并建立纯系, 培养水温为 $(25 \pm 0.5) ^\circ\text{C}$, 用麦粒液发酵获得的细菌为其食物。

1.2 实验方法

1.2.1 直接荧光标记 采用何兰等 (2006) 方法进行改进, 将载玻片包被后烘干备用, 虫体收集至染缸, 4% 多聚甲醛固定 10 min, 将虫体转移至载玻片上, $1 \mu\text{mol/L}$ FLUTAX-2 (Molecular Probes Inc) 染色 60 min, 滴入 DAPI (Thermo Fisher Scientific) 后封片, 置于倒置荧光显微镜 (Olympus IX83) 下观察并拍照。

1.2.2 艾美游仆虫纤毛蛋白 CEP43 和 CCDC13 抗体荧光标记 参考 Arregui 等 (2002) 方法进行改进, 将载玻片包被后烘干备用, 收集虫体至染缸, 4% 多聚甲醛室温固定 10 min, 将虫体转移至载玻片上, 用 0.5% TritonX-100 处理 5 min, BSA 封闭液室温封闭 30 min, 用 1:1600 的兔抗人 CEP43 抗体 (Proteintech Group) 或兔抗人 CCDC13 抗体 (Abcam) 室温孵育 60 min, PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min;

用 1 : 1 000 带有 Alexa Fluor®488 偶联物的山羊抗兔的免疫球蛋白二抗 (Proteintech Group) 室温避光孵育 45 min, 滴入 DAPI (Thermo Fisher Scientific) 后封片, 置于倒置荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.3 艾美游仆虫纤毛蛋白共定位免疫荧光染色 载玻片包被后烘干备用收集虫体至染缸, 4%多聚甲醛室温固定 10 min, 将虫体转移至载玻片上, 用 0.5% TritonX-100 处理 5 min, BSA 封闭液室温封闭 30 min, 用 1 : 1 600 的兔抗人 CEP43 抗体 (Proteintech Group) 或兔抗人 CCDC13 抗体 (Abcam) 和 1 : 1 600 的鼠抗人 γ -微管蛋白抗体 (Proteintech Group) 按照体积比 1 : 1 混匀后室温孵育 60 min, PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min; 1 : 1 000 的带有 Alexa Fluor®594 偶联物的山羊抗鼠的免疫球蛋白二抗 (Abcam) 和 1 : 1 000 带有 Alexa Fluor®488 偶联物的山羊抗兔的免疫球蛋白 (Abcam) 1 : 1 混匀后室温避光孵育 45 min, 滴入 DAPI (Thermo Fisher Scientific) 后封片, 置于倒置

荧光显微镜 (Olympus IX83) 下观察并拍照。

1.2.4 免疫电镜 收集虫体, 加入 4%多聚甲醛和 0.5%戊二醛的混合溶液 (1 : 1) 固定, 梯度乙醇脱水后用 LR white 树脂包埋; 超薄切片、镍网捞片, BSA 封闭液室温封闭 60 min 后用 1 : 1600 的兔抗人 CEP43 抗体 (Proteintech Group) 和兔抗人 CCDC13 抗体 (Abcam) 室温孵育 120 min, 1 : 20 的山羊抗兔的免疫球蛋白二抗 (Abcam) 室温孵育 60 min; 2%醋酸双氧铀染色 60 min, 双蒸水清洗 15 min; 切片置于透射显微镜 (JEM-1400) 下观察并拍照, 电压为 60 kV。

2 结果

2.1 免疫荧光

2.1.1 直接免疫荧光 DAPI 染色显示, 游仆虫大核呈数字“3”的形状 (图 2a)。直接荧光标记显示, 艾美游仆虫纤毛微管胞器主要由腹面皮层的口围带 (adoral zone of membranelles, AZM)、尾棘毛 (caudal cirrus, CC)、缘棘毛

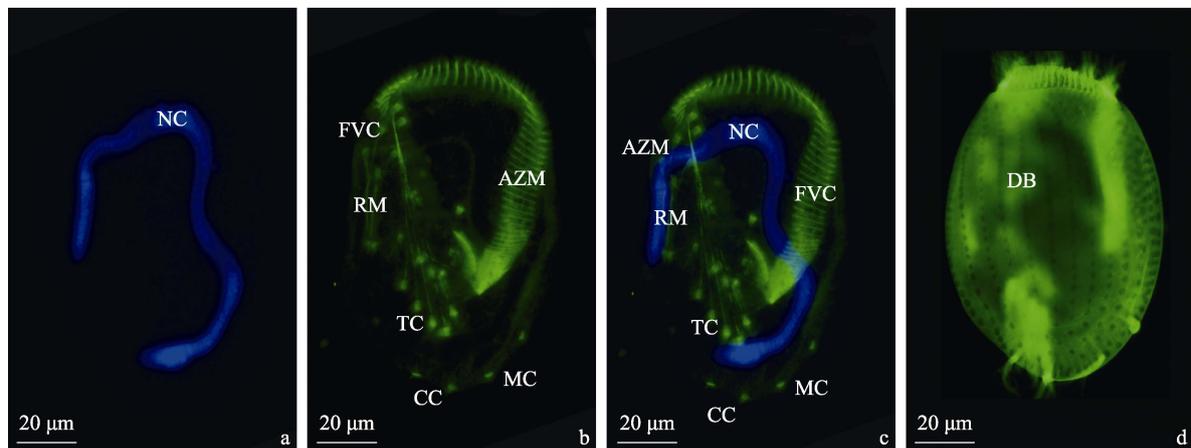


图 2 FLUTAX 与 DAPI 标记的艾美游仆虫腹面和背面结构

Fig. 2 The ventral and dorsal structure of *Euplotes amieti* labeled with FLUTAX and DAPI

a. 细胞大核 (DAPI 染色); b. 腹面微管胞器 (FLUTAX 染色); c. a 和 b 的组合图; d. 背面微管胞器 (FLUTAX 染色)。

a. Macronucleus (DAPI); b. Microtubular organelle on ventral (FLUTAX); c. Combined diagram of (a) and (b); d. Microtubular organelle on dorsal (FLUTAX).

AZM. 口围带; CC. 尾棘毛; DB. 背触毛; FVC. 额腹棘毛; MC. 缘棘毛; NC. 细胞核; RM. 棘毛附属微管束; TC. 横棘毛

AZM. Adoral zone of membranelles; CC. Caudal cirrus; DB. Dorsum bristle; FVC. Frontoventral cirrus; MC. Marginal cirrus; NC. Nucleus; RM. Radiating microtubule; TC. Transverse cirrus

(marginal cirrus, MC)、额腹棘毛(frontoventral cirrus, FVC)、横棘毛(transverse cirrus, TC)和棘毛附属微管束(radiating microtubule, RM)以及背面皮层的背触毛(dorsal bristle, DB)构成(图 2b)。口围带由 50~60 片小膜组成,约占细胞总长的 2/3,呈直角弯曲;9 根额腹棘毛位于口围带的左侧以 6+3 的形式排列;附属微管束位于各棘毛基体深部,呈放射性向四周不规则发散;5 根横棘毛以 4+1 的结构排列,左侧 4 根排成一列;2 根尾棘毛和 2 根缘棘毛分别位于后端。背面标记平行排列的 9~12 列背触毛列(图 2d),每一列含 25~30 根按一定间隔排列的背触毛。

2.1.2 CEP43、CCDC13 抗体荧光标记 免疫荧光定位显示,CCDC13 主要定位于艾美游仆虫的腹面纤毛器(口围带、尾棘毛、缘棘毛、

额腹棘毛、横棘毛)的基体和纤毛杆部以及银线系统(silverline system, SS),细胞核(nuclear, NC)与前纵微管束(anterior longitudinal microtubule, ALM)中未观察到定位(图 3a, b)。CEP43 主要定位在腹面纤毛器的基体以及棘毛附属微管和细胞核,在背面未观察到定位(图 3c)。

2.1.3 营养生长期的艾美游仆虫免疫荧光共定位 免疫荧光共定位显示,CEP43 定位于艾美游仆虫腹面的口围带、尾棘毛、额腹棘毛、和横棘毛的基体及附属微管处(图 4a), γ -微管蛋白在基体处的定位与 CEP43 定位一致(图 4b, c)。在腹面,CCDC13 主要定位于艾美游仆虫的口围带、尾棘毛、缘棘毛、额腹棘毛和横棘毛(图 5a)与 γ -微管蛋白在腹面定位一致(图 5b, c)。在背面,CCDC13 主要定位于银

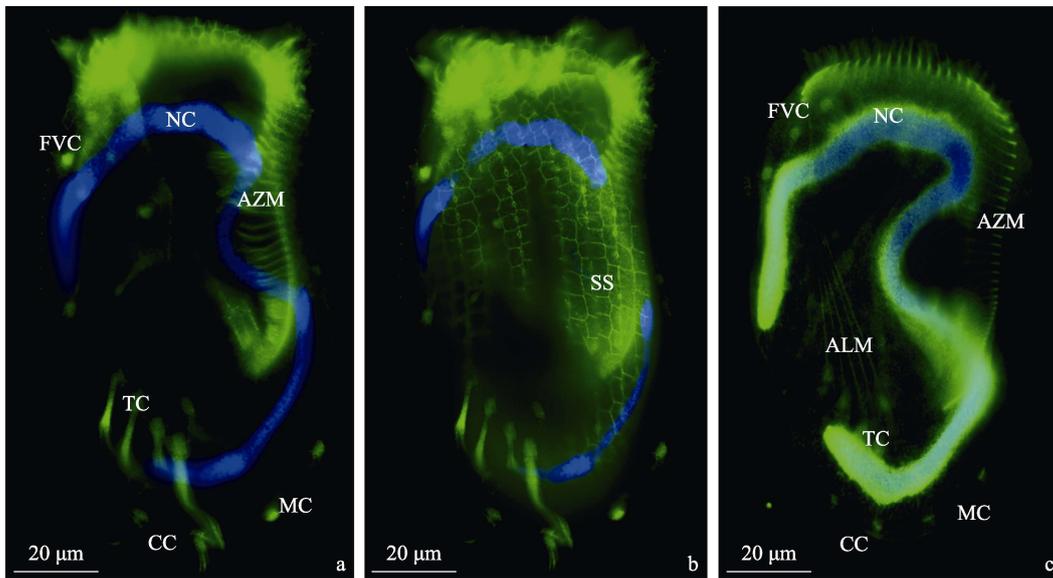


图 3 CCDC13 和 CEP43 免疫荧光定位

Fig. 3 Immunofluorescence localization of CCDC13 and CEP43

a. CCDC13 腹面定位; b. CCDC13 背面定位; c. CEP43 腹面定位。

a. Localization of CCDC13 on the ventral; b. Localization of CCDC13 on the dorsum; c. Localization of CEP43 on the ventral.

ALM. 前纵微管束; AZM. 口围带; CC. 尾棘毛; FVC. 额腹棘毛; MC. 缘棘毛; NC. 细胞核; SS. 银线系统; TC. 横棘毛

ALM. Anterior longitudinal microtubule; AZM. Adoral zone of membranelles; CC. Caudal cirrus; FVC. Frontoventral cirrus; MC. Marginal cirrus; NC. Nucleus; SS. Silverline system; TC. Transverse cirrus

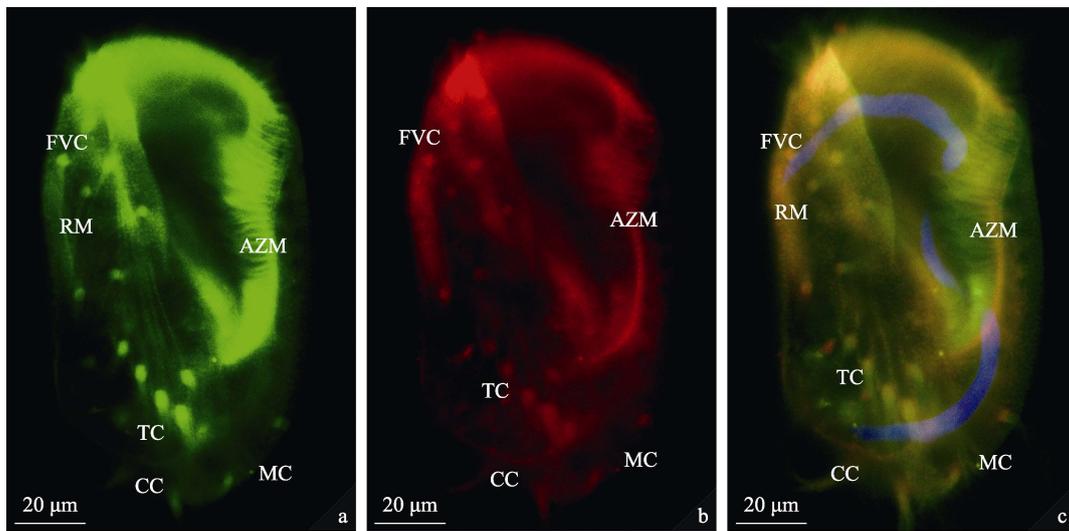


图 4 CEP43 与 γ -微管蛋白免疫荧光共定位

Fig. 4 Immunofluorescence co-localization of CEP43 and γ -tubulin

a. CEP43 腹面定位; b. γ -微管蛋白腹面定位; c. CEP43 与 γ -微管蛋白腹面共定位。

a. Localization of CEP43 on the ventral; b. Localization of γ -tubulin on the ventral; c. Co-localization of CEP43 and γ -tubulin on ventral.

AZM. 口围带; CC. 尾棘毛; FVC. 额腹棘毛; MC. 缘棘毛; RM. 棘毛附属微管束; TC. 横棘毛

AZM. Adoral zone of membranelles; CC. Caudal cirrus; FVC. Frontoventral cirrus; MC. Marginal cirrus; RM. Radiating microtubule; TC. Transverse cirrus

线系统 (图 5d), 但 γ -微管蛋白定位于背触毛基部 (图 5e); 共定位结果显示, CCDC13 与 γ -微管蛋白在背面定位不相同 (图 5f)。

2.1.4 分裂期的艾美游仆虫免疫荧光定位 免疫荧光定位显示, 在细胞无性分裂过程中, CEP43 不仅定位于老的口围带、额腹棘毛、横棘毛以及附属微管束, 也定位于新口围带、额腹棘毛和横棘毛基部, 但细胞核未被标记 (图 6a, b)。CCDC13 定位于老口围带中, 在新发生的口围带也发现了阳性标记, 但在额腹棘毛、横棘毛以及附属微管束结构并未观察到该蛋白的细胞定位 (图 6c, d)。

2.2 免疫电镜

免疫电镜结果显示, 在艾美游仆虫纤毛基体和基体周围微管、口围带基体和基体周围微管、横棘毛的棘、额腹棘毛基体和细胞核的核质中观察到 CEP43 胶体金颗粒 (图 7a~e)。纤毛基体、额腹棘毛基体、口围带基体和横棘毛

的棘部位观察到 CCDC13 胶体金颗粒 (图 7f~j), 免疫电镜显示, 额腹棘毛基体的 CCDC13 胶体金颗粒较 CEP43 多, 在细胞核中未观察到 CCDC13 的胶体金颗粒。

3 讨论

3.1 艾美游仆虫纤毛器微管特征

荧光紫杉醇能较好显示纤毛虫的纤毛基体和附属微管结构 (赵柳等 2008), 并在纤毛虫中得到了广泛应用, 如小腔游仆虫 (*E. aediculatus*) (林钦等 2013) 和伍氏游仆虫 (*E. woodruffi*) (李艺松等 2008)。直接荧光标记显示, 艾美游仆虫具有发达的横棘毛基部前纵微管束, 笔直延伸到细胞前端。额腹棘毛呈 6+3 模式, 棘毛之间不存在明显分界, 较小腔游仆虫短且笔直。同时, 背触毛基部有 9~12 列, 每一列有 25~30 根纤毛。因此, 艾美游仆虫与其他纤毛虫棘毛基部有相似的排列方式, 并且

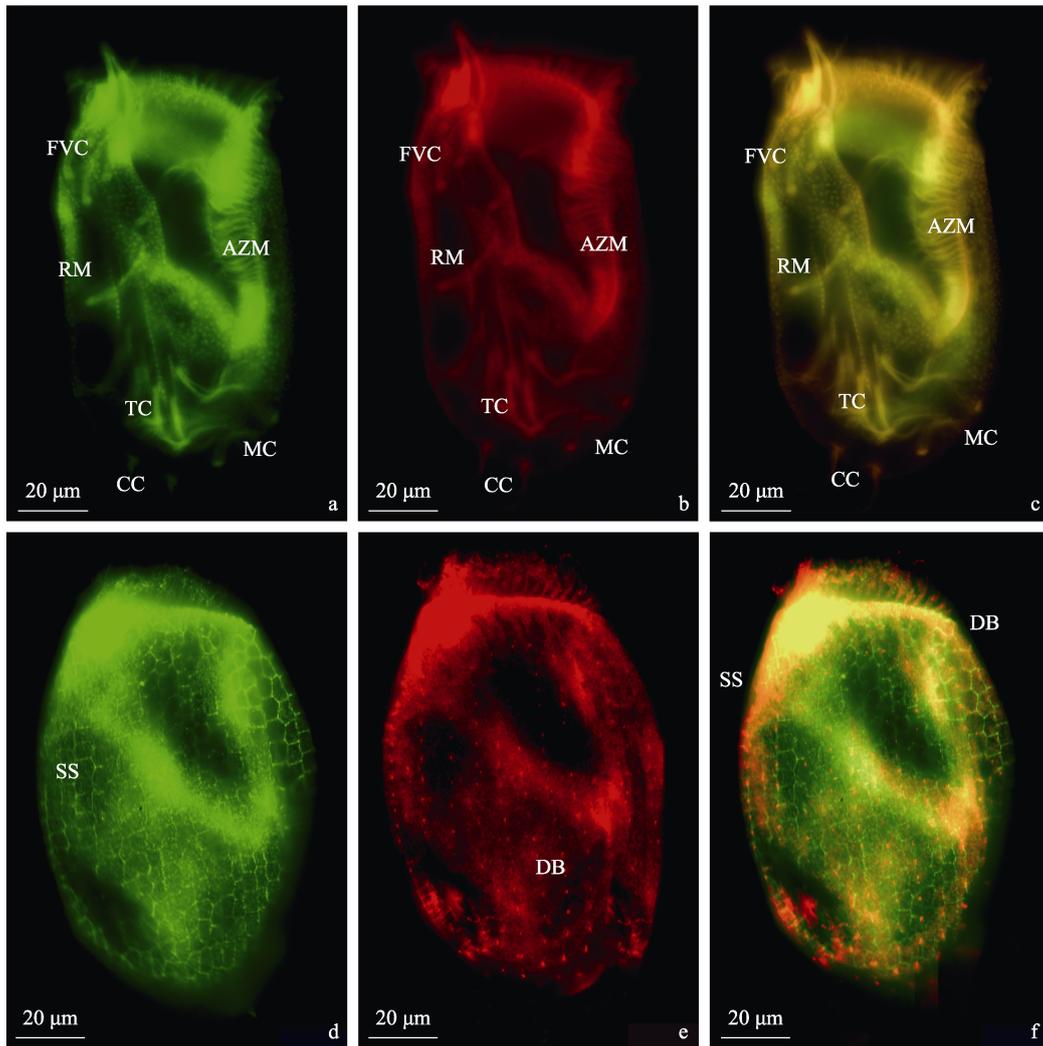


图5 CCDC13 与 γ -微管蛋白免疫荧光共定位

Fig. 5 Immunofluorescence co-localization of CCDC13 and γ -tubulin

a. CCDC13 腹面定位; b. γ -微管蛋白腹面定位; c. CCDC13 和 γ -微管蛋白腹面共定位; d. CCDC13 背面定位; e. γ -微管蛋白背面定位; f. CCDC13 和 γ -微管蛋白背面共定位。

a. Localization of CCDC13 on the ventral; b. Localization of γ -tubulin on the ventral; c. Co-localization of CCDC13 and γ -tubulin on ventral; d. Localization of CCDC13 on the dorsum; e. Localization of γ -tubulin on the dorsum; f. Co-localization of CCDC13 and γ -tubulin on the dorsum.

AZM. 口围带; CC. 尾棘毛; DB. 背触毛; FVC. 额腹棘毛; MC. 缘棘毛; RM. 棘毛附属微管束; SS. 银线系统; TC. 横棘毛
AZM. Adoral zone of membranelles; CC. Caudal cirrus; DB. Dorsum bristle; FVC. Frontoventral cirrus; MC. Marginal cirrus; RM. Radiating microtubule; SS. Silverline system; TC. Transverse cirrus

拥有发达的额腹棘毛和横棘毛前纵微管束等微管胞器组合而成的纤毛模式和皮层微管结构。

3.2 纤毛形成后 CEP43 被募集至细胞核

CEP43 不仅是中心粒卫星的重要组成部分

分, 而且定位于中心体 (Acquaviva et al. 2009)。中心粒卫星已经在苍蝇和哺乳动物中得到广泛研究, 它是致密的颗粒, 由许多参与微管组织的蛋白质组成, 并且与纤毛蛋白之间存在联系

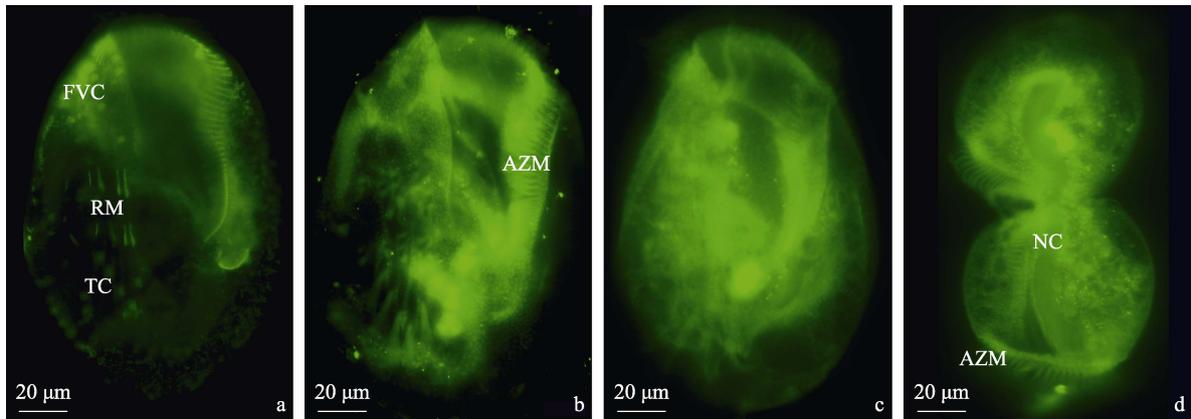


图 6 CCDC13 和 CEP43 在分裂期的免疫荧光定位

Fig. 6 Immunofluorescence Localization of CCDC13 and CEP43 during the division period

a, b. CEP43 分裂期定位; c, d. CCDC13 分裂期定位。

a, b. Localization of CEP43 during the cell division period; c, d. Localization of CCDC13 during cell division period.

AZM. 口围带; FVC. 额腹棘毛; NC. 细胞核; RM. 棘毛附属微管束; TC. 横棘毛

AZM. Adoral zone of membranelles; FVC. Frontoventral cirrus; NC. Nucleus; RM. Radiating microtubule; TC. Transverse cirrus

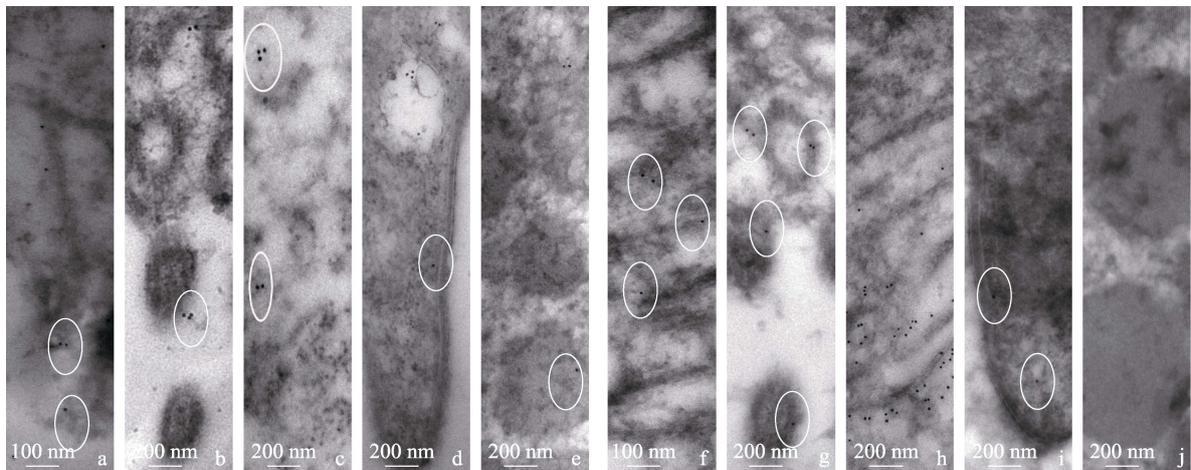


图 7 CEP43 与 CCDC13 免疫电镜图

Fig. 7 Immuno-electron microscopy view of CEP43 and CCDC13

a. CEP43 在纤毛基部定位; b. CEP43 在口围带基部定位; c. CEP43 在额腹棘毛基部定位; d. CEP43 在横棘毛的棘定位; e. CEP43 在细胞核定位; f. CCDC13 在纤毛基部定位; g. CCDC13 在口围带基部定位; h. CCDC13 在额腹棘毛基部定位; i. CCDC13 在横棘毛的棘定位; j. CCDC13 在细胞核定位。

a. Localization of CEP43 at the basal body of cilia; b. Localization of CEP43 at the basal body of adoral zone of membranelles; c. Localization of CEP43 at the basal body of frontoventral cirrus; d. Localization results of CEP43 at the cirrus of transverse cirrus; e. Localization CEP43 at the nucleus; f. Localization of CCDC13 at the basal body of cilia; g. Localization of CCDC13 at the basal body of adoral zone of membranelles; h. Localization of CCDC13 at the basal body of frontoventral cirrus; i. Localization of CCDC13 at the cirrus of transverse cirrus; j. Localization of CCDC13 at the nucleus.

(Bärenz et al. 2011)。CEP43 已经被证实为中心体蛋白质，并且在整个细胞周期中定位于中心体，能与中心体蛋白相互作用(Popovici et al. 1999)。CEP43 基因缺陷会影响纤毛形成，从而引发纤毛疾病 (Vizmanos et al. 2004)，但其在纤毛形成和基体的定位细节等方面仍然不清楚。本研究显示，CEP43 主要定位在艾美游仆虫腹面纤毛器基部和基体微管等区域，在背触毛和银线系统等背面纤毛微管胞器未观察到定位，表明该蛋白未参与背纤毛器与银线系统的装配。由于中心体是微管形成的主要部位，当中心体参与纤毛形成时被称为基体，纤毛轴丝的装配以基体作为微管组织中心。Bornens 等 (2002) 证明，基体是微管锚定的一个非常重要的结构，且 CAP350-CEP43 复合物为微管蛋白提供中心体对接位点供微管成核延伸，当干扰 CEP43 表达后会导致微管锚定功能丧失和网络的严重破坏 (Yan et al. 2006)。另一方面，共定位结果显示， γ -微管蛋白与 CEP43 之间存在共定位，且 CEP43 不仅定位于艾美游仆虫的微管胞器和纤毛基体，同时也定位在细胞核。有文献指出，G2 时期纤毛形成后多余的 CEP43 会被“隔离”(Lee et al. 2013)。 γ -微管蛋白是微管组织中心的标志性蛋白，Stearns 等 (1994) 发现，在 γ -微管蛋白复合物和腺嘌呤核苷三磷酸 (Adenosine triphosphate, ATP) 同时存在的条件下，能够在体外形成中心体，表明 γ -微管蛋白还具有调节蛋白聚集成核的能力。因此，我们推测 γ -微管蛋白复合物对 CEP43 参与纤毛的组装起到调控作用，能在纤毛形成后将多余的 CEP43 募集到游仆虫的大核上。分裂期免疫荧光定位也证实这一猜想，通常无性分裂会伴随着纤毛的解聚和重新组装，与成熟期对比，细胞分裂时期并没有观察到 CEP43 的核定位。

3.3 前纵微管束形成不需要 CCDC13

CCDC13 属于中心粒卫星蛋白，是纤毛形成所必需的。免疫荧光结果显示，CCDC13 定位于腹面微管胞器以及背面的银线系统，但前纵微管束结构上并没有观察到定位。Stearns 等

(1994) 发现，CCDC13 水平的调节改变了间期细胞的微管组织以及解聚后的微管再生能力，表明 CCDC13 在纤毛发生过程中是不可缺少的。Dammermann (2002) 通过低温处理快速解聚后的微管，发现缺失 CCDC13 的细胞显示微管再生速度增加，而过表达 CCDC13 的细胞反而显示解聚后的微管再生速度减少，说明微管再生需要中心粒蛋白参与。前纵微管束这类纤毛附属微管胞器是从仔虫的横棘毛基部逐渐生长出来，处于微管再生的状态，而腹面口围带和额腹棘毛以及背面的银线系统等结构在分裂期就已经形成，微管不再进行频繁的组装和去组装，因此 CCDC13 参与了横棘毛形成，没有参与前纵微管束的形成。此外，结合口围带、额腹棘毛、纤毛基体等结构的免疫电镜结果能够明显看出，CCDC13 的数量较 CEP43 多，说明 γ -微管蛋白虽与 CCDC13 在腹面定位相同，但不受 γ -微管蛋白复合体调控。共定位结果显示， γ -微管蛋白和 CCDC13 在艾美游仆虫腹面定位相同，但 CCDC13 在背面定位于银线系统，而 γ -微管蛋白定位于背触毛基部，表明细胞背面的银线系统也是游仆虫细胞皮层微管类细胞骨架的一部分，并且 CCDC13 参与形成背面的银线系统。背腹分化是较高等的游仆虫特有的现象，银线系统是微管细胞骨架的一部分，游仆虫分裂后即形成，其微管不再进行频繁的组装和去组装，因此，银线系统中存在 CCDC13 定位，而前纵微管束上并没有 CCDC13 定位。背面的纤毛并不是按照典型初级模式进行增殖的，它并没有形成密集排列的纤毛模式，而是以纤毛列的形式排列分布 (Liu et al. 2015)。

CEP43 和 CCDC13 能够提供中心体与微管的对接点，腹面纤毛微管胞器形成需要中心粒蛋白、微管蛋白和纤毛蛋白参与，并且形成有序排列的微管胞器结构，这可能很大一部分原因是中心粒蛋白参与。从免疫荧光定位的结果来看，并没有发现 CCDC13 和 CEP43 在背触毛中存在定位。由于背腹化是高等游仆虫的特殊结构，且对游仆虫背面结构研究较少，所以

我们初步判断, 中心粒蛋白还具有将单个纤毛聚集成棘的功能。后续将通过 RNA 干扰其表达, 进一步探索其功能、关联基因及在纤毛虫的纤毛器微管胞器装配过程。

参 考 文 献

- Acquaviva C, Chevrier V, Chauvin J P, et al. 2009. The centrosomal fop protein is required for cell cycle progression and survival. *Cell Cycle*, 8(8): 1217–1227.
- Arregui L, Muñoz-Fontela C, Serrano S, et al. 2002. Direct visualization of the microtubular cytoskeleton of ciliated protozoa with a fluorescent taxoid. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 49(4): 312–318.
- Bärenz F, Mayilo D, Gruss O J. 2011. Centriolar satellites: busy orbits around the centrosome. *European Journal of Cell Biology*, 90(12): 983–989.
- Bornens M. 2002. Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms. *Current Opinion in Cell Biology*, 14(1): 25–34.
- Cabaud O, Roubin R, Comte A, et al. 2018. Mutation of fop/fgfrlop in mice recapitulates human short rib-polydactyly ciliopathy. *Human Molecular Genetics*, 27(19): 3377–3391.
- Dammermann A. 2002. Assembly of centrosomal proteins and microtubule organization depends on PCM-1. *Journal of Cell Biology*, 159(2): 255–266.
- Dentler W L. 1984. Attachment of the cap to the central microtubules of *Tetrahymena cilia*. *Journal of Cell Science*, 66(3): 167–173.
- Grim J N, Halcrow K R, Harshbarger R D. 1980. Microtubules beneath the pellicles of two ciliate protozoa as seen with the sem. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 27(3): 308–310.
- Hir H L. 2014. Centriole amplification by mother and daughter centrioles differs in multiciliated cells. *Nature*, 516(7529): 104–107.
- Lee J Y, Tim, Qi R Z. 2013. FOP is a centriolar satellite protein involved in ciliogenesis. *PLoS One*, 8(3): e58589.
- Lei W, Dynlacht B D. 2018. The regulation of cilium assembly and disassembly in development and disease. *Development*, 145(18): dev151407.
- Linck R W, Chemes H, Albertini D F. 2016. The axoneme: the propulsive engine of spermatozoa and cilia and associated ciliopathies leading to infertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 33(2): 141–156.
- Liu M J, Fan Y B, Miao M, et al. 2015. Morphological and morphogenetic redescrptions and ssu rna gene-based phylogeny of the poorly-known species *Euplotes amieti dragesco*, 1970 (Ciliophora, Euplotida). *Acta Protozoologica*, 54(3): 171–182.
- Popovici C, Zhang B, Gregoire M J, et al. 1999. The t(6;8)(q27;p11) translocation in a stem cell myeloproliferative disorder fuses a novel gene, fop, to fibroblast growth factor receptor 1. *Blood*, 93(4): 1381–1389.
- Sheng X, Zeng H, Zhang M, et al. 2011. Influences of the interference of γ -tubulin gene expression on the morphology and microtubules of ciliate *Euplotes eurystomus*. *Zoological Science*, 28(7): 476–481.
- Staples C J, Myers K N, Beveridge R, et al. 2014. Ccdc13 is a novel human centriolar satellite protein required for ciliogenesis and genome stability. *Journal of Cell Science*, 127(13): 2010–2019.
- Stearns T, Kirschner M. 1994. In vitro reconstitution of centrosome assembly and function: the central role of γ -tubulin. *Cell*, 76(4): 623–637.
- Vizmanos J L, Hernández R, Vidal M J, et al. 2004. Clinical variability of patients with the t(6;8)(q27;p12) and fgfr1op-fgfr1 fusion: two further cases. *Hematology Journal*, 5(6): 534–537.
- Yan X, Habedanck R, Nigg E A. 2006. A complex of two centrosomal proteins, cap350 and fop, cooperates with eb1 in microtubule anchoring. *Molecular Biology of the Cell*, 17(2): 634–644.
- 何兰, 曾红, 沈洁, 等. 2006. FLUTAX 法显示纤毛虫微管胞器的改良. *动物学杂志*, 41(3): 56–61.
- 何燕, 尹家奇, 生欣. 2021. 艾美游仆虫大核基因组与转录组测序及结构特征. *水生生物学报*, 45(5): 1014–1023.
- 李艺松, 柳伟君, 顾福康. 2008. 伍氏游仆虫皮层微管类细胞骨架的荧光标记. *复旦学报*, 47(3): 364–369.
- 林钦, 范鑫鹏, 孙磊, 等. 2013. 小腔游仆虫 (*Euplotes aediculatus*) 皮层微管胞器的荧光标记. *华东师范大学学报: 自然科学版*, (5): 53–60.
- 生欣, 李其利, 张小翠, 等. 2011. 纤毛虫阔口游仆虫 *Euplotes eurystomu* 微管类细胞骨架的超微结构. *华东师范大学学报: 自然科学版*, 6: 75–80.
- 赵柳, 运霞, 柳伟君, 等. 2008. 华美游仆虫细胞微管胞器的直接荧光和免疫荧光标记. *动物学杂志*, 43(3): 1–6.