

洋葱细胞核仁中 DNA 的原位位置和排布构型

陶伟* 赫杰 焦明大 何孟元 郝水†

(东北师范大学遗传与细胞研究所, 长春 130024. * 现在地址: 北京大学生命科学学院. † 联系人,
Email: ycsuo@nenu.edu.cn)

摘要 真核细胞核仁中 DNA 的原位位置及排布构型是长期以来未能解决的问题. 以洋葱细胞为研究材料, 应用电子显微镜常规技术和 DNA 细胞化学特异染色技术, 观察并分析了洋葱细胞核仁的超微结构以及核仁内 DNA 的分布和特征; 并进一步对 NAMA-Ur DNA 特异染色方法进行了改进, 从而在原位水平对核仁中 DNA 的位置以及排布构型进行了直观的观察, 研究结果揭示出洋葱细胞核仁中 DNA 主要位于 FC 与 DFC 的交界处, 并呈现出环绕 FC 排布的构型.

关键词 洋葱细胞 核仁 NAMA-Ur 方法 核仁内 DNA 排布构型

核仁是真核生物细胞进行 rRNA 基因转录、转录产物加工以及核糖体前体形成的亚细胞核结构. 核仁超微结构由纤维中心(FC)、致密纤维组分(DFC)和颗粒成分(G)组成. 长期以来, 关于核仁研究一个重要的问题是核仁中 DNA 的位置及排布构型, 这个问题的阐明对于了解核仁的结构以及核仁中 rRNA 基因的转录位点都具有重要的意义. 但核仁中 DNA 的位置究竟是位于核仁的 FC 还是 DFC 一直存在较大的分歧^[1]; 对于核仁中 DNA 的排布构型, 虽然已有一些模型提出, 但都是假说性质, 缺少直接的研究证据来证实^[2].

研究核仁中 DNA 位置的实验手段主要包括钨-胺 DNA 特异染色^[3]、DNA 抗体标记^[4]以及 BrdU 引入与追踪标记^[5]等方法, 相比较来说, 钨-胺 DNA 特异染色由于能够在超微结构水平直接对核仁中 DNA 进行观察, 因而更具有直观性. 可钨-胺法比较复杂, 操作困难, 因此人们近年来建立了一个新的 DNA 特异染色方法: NAMA-Ur 法^[6]. 但无论是早期的钨-胺法还是现在的 NAMA-Ur 法, DNA 特异染色后的核仁区域除 DNA 成分被特异染色外, 其余成分皆被完全漂白, 因此不能在原位水平判断核仁中 DNA 的精细位置, 更无法进一步对核仁中 DNA 的排布构型进行分析. 我们对现有的 NAMA-Ur 方法进行了改进, 以改进后的 NAMA-Ur 方法处理, 核仁区域 DNA 被特异染色因而具有高的电子密度, 而 FC 和 DFC 成分作为弱背景保留下来, 使得我们能够对核仁中 DNA 的位置以及排布构型进行直接的原位水平的观察, 我们的实验结果为阐明核仁结构以及 rRNA 基因转录位点提供了重要实验依据.

1 材料与方 法

(1) 实验材料. 高等植物洋葱(*Allium cepa*), 取其根尖分生组织为实验材料.

(2) 洋葱根尖分生细胞常规电子显微镜制片. 取洋葱根尖分生细胞, 依次在 2.5% 戊二醛溶液(0.1 mol/L 磷酸缓冲液配制, pH = 7.4)中固定 2 h; 0.1 mol/L 磷酸缓冲液洗 3 次, 每次 30 min; 1% 锇酸后固定 2 h; 双蒸水冲洗 20 min; 乙醇-丙酮梯度脱水, Epon812 环氧树脂包埋, 用 LKB-5 型超薄切片机切片, 切片厚度为 60 ~ 80 nm, 醋酸铀-柠檬酸铅常规染色.

(3) 洋葱细胞核仁 DNA 特异染色. (i) 修改前的 NAMA-Ur DNA 细胞化学特异染色按照文献[6]进行. (ii) 修改后的 NAMA-Ur 方法实验过程简述如下: 样品经 3% 戊二醛加 4% 多聚甲醛(0.1 mol/L 磷酸缓冲液配制)在 4℃ 下固定 1 h. 磷酸缓冲液充分洗涤. 浸入 NA 溶液(4%

多聚甲醛, 0.5 mol/L NaOH)中处理 14 h. 双蒸水充分洗涤 3 次, 每次 10 min. 1% 冰醋酸洗涤 3 次, 每次 10 min. 双蒸水充分洗涤 3 次, 每次 10 min. 浸入 MA 溶液(甲醇: 醋酸酐 = 1: 4.5), 25℃条件下处理 18~24 h, 直到样品适度漂白. 甲醇系列脱水, 常规 Epon812 包埋. 样品经半薄切片后, 彻底干燥, 然后 2%水溶醋酸铀 60℃染色 70 min, 冷却到室温, 双蒸水洗涤, 25℃烘干. 以上样品均在 Hitachi-600B 型透射电子显微镜下观察照相, 加速电压 75 kV.

2 结果与讨论

2.1 核仁中 DNA 的位置

核仁经超薄切片常规染色后, 在电子显微镜下观察, 可识别核仁的 3 个基本结构区域: 低电子密度区域的纤维中心(FC); 环绕 FC 的高电子密度区域, 即致密纤维组分(DFC); 位于核仁边缘和 DFC 之间的颗粒组分(G); 另外, 还可观察到核仁腔隙(图 1). 在常规染色条件下, 核仁中 RNA, DNA 及蛋白质等成分均被染色, 因此,不能直接区分各个组分在核仁中的分布情况.

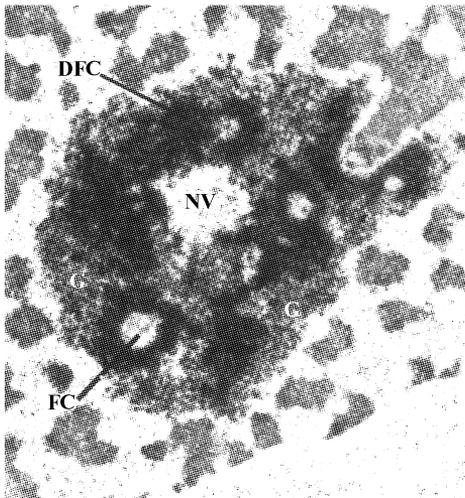


图 1 Epon812 包埋超薄切片
常规染色的洋葱细胞核仁超微结构. FC 示纤维中心, DFC 示致密纤维组分, G 示颗粒成分, NV 示核仁腔隙. ×20 000

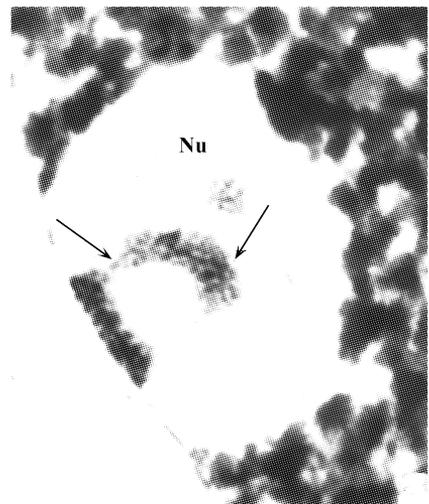


图 2 改进前的 NAMA-Ur 法处理的核仁
核仁中除 DNA 成分被特异染色外, 其余成分皆被完全漂白; 可见核仁外 DNA 伸入核仁

核仁经改进前的 NAMA-Ur 法处理后, 除 DNA 成分被特异染色外, 其余成分皆被完全漂白, 在这种条件下, 虽然可以直观看到核仁中 DNA 成分, 却无法判断 DNA 确切的原位位置(图 2). 经改进后的 NAMA-Ur 法处理, 核仁中 DNA 成分由于具有高的电子密度而被识别, 同时 FC 和 DFC 成分作为背景被保留下来, 从而可直观地判断出核仁中 DNA 的原位分布位置(图 3 和 4). 我们观察发现, 核仁所含 DNA 成分分布有 3 种情况: (i) 位于 FC(图 3(a)); (ii) 位于 DFC(图 3(b)); (iii) 位于 FC 和 DFC 的交界处(图 4(a)). 不同的核仁切面上, DNA 出现的位置各不相同; 不同位置的 DNA 成分都具有集缩和解集缩两种形态结构.

目前, 对于 DNA 在核仁中的位置存在不同看法, 有人认为 DNA 位于 DFC; 有人认为 DNA 位于 FC^[7]. 近年来又出现了一种新的观点, 即 DNA 分布在 FC 与 DFC 的交界处, 这个观

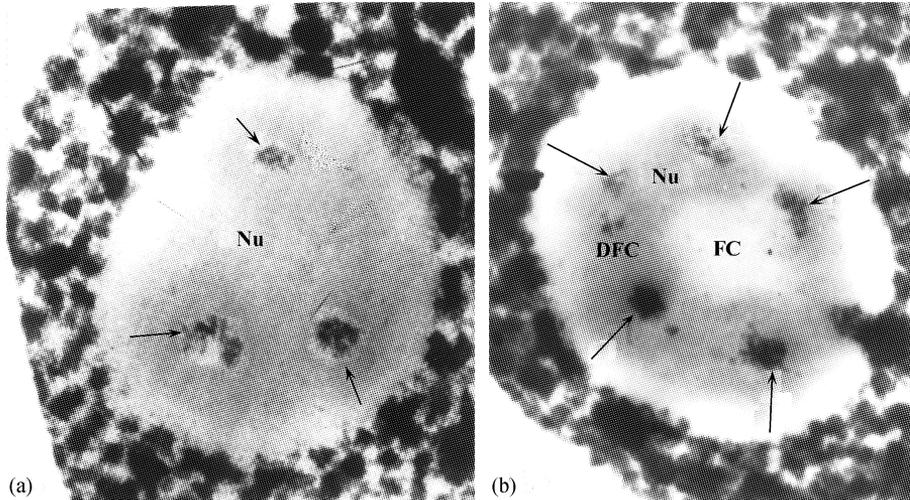


图3 改进后的 NAMA-Ur 法处理的核仁
DNA 位于 FC(a)和 DFC(b), 箭头示 DNA. $\times 20\ 000$

点越来越引起研究者的注意, 因为许多近期的研究结果都支持这一观点(有的报道将 DFC 与 FC 交界处这个位置描述为 FC 的边缘或靠近 FC 的 DFC 区域)^[1,8,9]. 现在争论的问题是除了 DFC 与 FC 的交界处, 核仁中究竟是 DFC 还是 FC 分布有 DNA.

我们的研究结果直观地显示出在 DFC, FC 以及 DFC 与 FC 的交界处都分布有 DNA, 但在不同的核仁切片切面上, DNA 出现的位置各不相同(图 3 和 4(a)). 这与前人的结果^[7]有明显差异, 前人或者认为 FC 中分布有 DNA, 或者认为 DFC 中分布有 DNA. 造成这种差异一方面可能是由于实验材料的不同, 根据我们的研究资料(结果待发表)和前人的实验结论, 动物细胞和植物细胞的核仁结构有许多明显的不同^[2]; 另一方面可能由于实验方法的不同, 核仁中 DNA 是一个立体的、连续不断的分布状况, 因此切片切面位置的不同, 显示出 DNA 的位置也不同, 我们所采用的实验方法的特点在于直接观察核仁中 DNA 的原位位置, 更便于分析, 而前人的研究受到实验方法的限制, 造成实验结果可能不够全面.

2.2 核仁中 DNA 的排布构型

我们进一步对洋葱细胞核仁中 DNA 的排布规律进行了分析研究. 一般认为, 核仁中 DNA 来源于核仁伴随染色质, 我们通过 NAMA-Ur 方法直观地看到了核仁伴随染色质伸入进核仁(图 2, 箭头所示). 值得注意的是, 根据我们的观察, 虽然不同的核仁切片上 DNA 的位置不同, 但洋葱细胞核仁中 DNA 分布在 FC 与 DFC 的交界处更具有普遍性(大量切片观察统计分析表明: DNA 分布在交界处的比率为 68%(包含在交界处及 FC 内部同时分布有 DNA 的情况); DNA 仅分布在 FC 的比率为 11%; DNA 仅分布在 DFC 的比率为 21%), 而且核仁中 DNA 在这个位置呈现出环绕 FC 而排布的构型(图 4(b)~(d)), 这些环绕 FC 而排布的 DNA 一般由 DNA 微团所组成, 在每一 DNA 微团的周缘, 可见 DNA 纤丝向四周放射状伸出(图 4(b), (c)). 另外, 我们还观察到, DNA 在环绕 FC 而排布的过程中, 有时还贯穿 FC(图 4(d)).

虽然近年来越来越多的研究者认为 FC 和 DFC 的交界处可能是核仁中 DNA 排布的核心

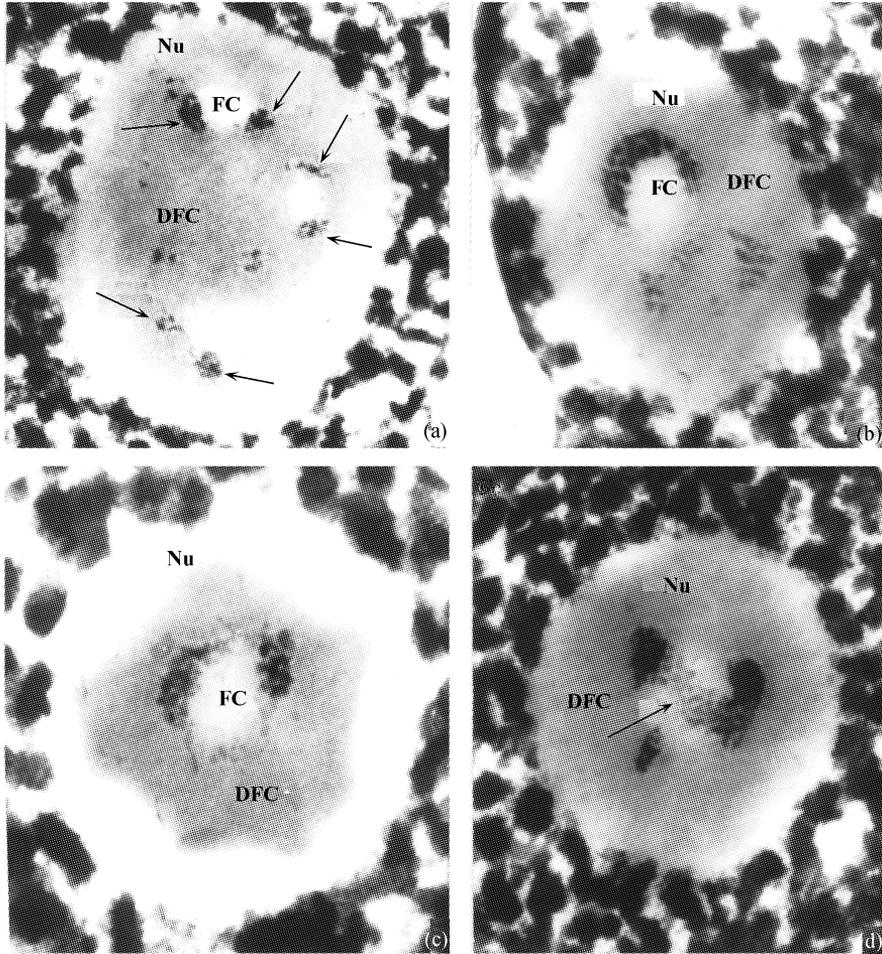


图 4 改进后 NAMA-Ur 方法处理的核仁内 DNA 特异染色

(a) DNA 位于 FC 和 DFC 的交界处(箭头示 DNA); (b)、(c) DNA 位于 FC 与 DFC 的交界处, 并环绕 FC 而排布; (d) 位于 FC 与 DFC 交界处的 DNA 横穿 FC(箭头所示). $\times 20\ 000$

位置^[1], 但都缺乏确切的实验证据, 也不知道 DNA 在这个核心位置是怎样排布的. 我们的结果直观地显示出了洋葱细胞核仁中 DNA 在 FC 和 DFC 的交界处环绕 FC 而排布的构型, 这种构型迄今尚未见到报道. 我们的研究结果还显示出在 DFC 及 FC 中也分布有 DNA, 这可能是由于 DNA 从核仁伴随染色质进入核仁, 进而形成环绕 FC 而排布的空间构型所经过的中间过程. 我们推测: 核仁中 rRNA 基因可能是在这种构型的形态下进行转录的; 虽然有报道认为 DFC 和 FC 的交界处是核仁中 rRNA 基因的转录位点^[10,11], 但还有证据表明 DFC 中也存在 rRNA 基因转录活动^[12,13]. 我们也发现 DNA 在环绕 FC 而排布的同时, 有时可伸出纤丝进入到 DFC 中, 因此推测 rRNA 基因转录可能主要发生在 DFC 与 FC 的交界处和 DFC.

2.3 关于核仁结构模型

目前关于核仁中 rDNA 转录构型主要有两个模型: 螺旋模型(rDNA 在 DFC 螺旋环绕 FC

排列)和放射环模型(rDNA 在 DFC 放射状排列)^[2]. 这两个模型都是推测性质的, 尚待实验证据来证实. 现在看来, 螺旋模型和我们的观察结果更为接近一些, 但是, 螺旋模型和我们的观察结果有一个重要的区别, 螺旋模型认为螺旋排列的转录的 rDNA 构成 DFC, 也就是说, 转录的 rDNA 完全占据 DFC; 而我们的观察结果表明核仁中 DNA 是在 DFC 和 FC 的交界处进行环绕排列, 而不是占据整个 DFC; 另外, 螺旋模型认为 FC 中没有 DNA 分布, 而我们的观察表明环绕 FC 而排布的 DNA 有时还贯穿 FC(图 4(d)).

Raska 等人^[14]指出: FC 与 DFC 应是一个统一的功能单位, 但在核仁的 rRNA 基因转录活动中起着不同的作用. 联想到我们所观察到的在洋葱细胞核仁中, DNA 位于 FC 与 DFC 的交界处并环绕 FC 排布的构型, 我们推测, 也许 FC 与 DFC 的交界处是 FC 和 DFC 实现其各自功能的最有利的位置. 至于洋葱细胞核仁中这种 DNA 排列构型是否适用于其他细胞, 是否和核仁 rRNA 基因高效转录机制有关等问题还有待于进一步研究和探讨.

致谢 本工作作为国家自然科学基金资助项目(批准号: 39770367).

参 考 文 献

- 1 Shaw P J, Jordan G E. The nucleolus. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1995, 11: 93 ~ 121
- 2 郝 水. 核仁结构与功能研究进展. 郑国锷, 翟中和, 主编. 细胞生物学进展, 第 3 卷. 北京: 北京师范大学出版社, 1993. 177 ~ 186
- 3 Pession A, Farabegoli F, Trere D, et al. The Ag-NOR proteins and transcription and duplication of ribosomal genes in mammalian cell nucleoli. *Chromosoma*, 1991, 100: 242 ~ 250
- 4 Martin M, Espina M D D, Medina F J. Immunolocalization of DNA at nucleolar structural components in onion cells. *Chromosoma*, 1989, 98: 368 ~ 377
- 5 Thiry M. Immunoelectron microscope localization of bromodeoxy uridine incorporated into DNA of Ehrlich tumor cell nucleoli. *Exp Cell Res*, 1988, 179: 204 ~ 213
- 6 Testillano P S, Sanchez-Pina M A, Olmedilla I A, et al. A specific ultrastructural method to reveal DNA: the NAMA-Ur. *J Histochem Cytochem*, 1991, 39(10): 1427 ~ 1438
- 7 Thiry M, Goessens G. Where, within the nucleolus, are the rRNA genes located? *Exp Cell Res*, 1992, 200: 1 ~ 4
- 8 Puvion-Dutilleul F P, Bachelier J P, Puvion E. Nucleolar organization of HeLa cells as studied by in situ hybridization. *Chromosoma*, 1991, 100: 395 ~ 409
- 9 Lazdins I B, Delannoy M, Sollner-Webb B. Analysis of nucleolar transcription and processing domains and pre-rRNA movements by in situ hybridization. *Chromosoma*, 1997, 105: 481 ~ 495
- 10 Meeceak I, Risueno M C, Raska I. Ultrastructural nonisotopic mapping of nucleolar transcription sites in onion protoplasts. *J Struct Biol*, 1996, 116: 253 ~ 263
- 11 de Carcer G, Medina F J. Simultaneous localization of transcription and early processing markers allows dissection of functional domains in the plant cell nucleolus. *J Struct Biol*, 1999, 128: 139 ~ 151
- 12 郝 水, 焦明大, 邢 苗. 洋葱核仁的超微结构与 rDNA 复制位置. *中国科学, B 辑*, 1990, (8): 818 ~ 821
- 13 陶 伟, 焦明大, 赫 杰, 等. 鼠肝细胞核仁结构与 rRNA 基因转录位点研究. *中国科学, C 辑*, 2000, 30(3): 252 ~ 258
- 14 Raska L, Risueno M C, Torok L. Does the synthesis of ribosomal RNA take place within nucleolar fibrillar centers or dense fibrillar components? A critical appraisal. *J Struct Biol*, 1995, 114: 1 ~ 22

(1999-12-09 收稿, 2000-04-12 收修改稿)