

一种新的中心体常驻蛋白的鉴定

陈晓波^① 王永潮^{①*} 李永哲^② 崔京涛^②

(^①北京师范大学细胞增殖及调控生物学教育部重点实验室, 北京 100875; ^②中国协和医科大学, 中国医学科学院北京协和医院, 北京 100005. * 联系人)

摘要 利用膜特异结合抗体洗脱法, 用一例自身免疫病人血清鉴定了一种新的中心体蛋白 31/29 抗原. 免疫荧光结果显示这种抗原定位于中心体处, 不依赖于细胞周期的变化, 属于一种中心体常驻蛋白. 为了研究细胞核周期与中心体复制之间的协调关系, 利用此抗血清以及 Centrin 和 γ -微管蛋白(γ -tubulin)抗体研究了 V79-8 细胞在人工诱导产生早熟染色体凝集(PCC)现象时其中心体复制周期的变化. 结果发现在羟基脲抑制 DNA 合成, 细胞阻断在 G_1/S 及 S 期时, 中心体蛋白继续表达积累, 中心体复制仍在进行. 咖啡因的加入在诱导未复制基因组的有丝分裂(MUG)细胞的同时也诱导复制后中心体的分开, 这表明细胞中 DNA 合成和中心体复制事件之间可以分离. 两者在细胞周期引擎分子的控制下正常运转, 相互协调, 使 DNA 复制一次的同时中心体也复制一次, 从而保证双极纺锤体的组装和染色体的均等分配, 以保持细胞遗传性的稳定.

关键词 抗中心体人自身免疫血清 31/29 ku 抗原 中心体 MUG 细胞 MPF

高等真核生物的中心体作为细胞内主要微管组织中心(microtubule organizing center, MTOC), 决定了细胞内微管的极性、数目和分布^[1]. 在此间期, 胞质微管从中心粒周围物质(pericentriolar material, PCM)及成熟中心粒发出; 在 M 期起始时复制后的两中心体分开并形成纺锤体的两极, 指导有丝分裂事件的进行. 双极纺锤体是染色体平均分配的前提, 异常的中心体增殖或 G_2/M 过渡中复制后中心体分离异常均会导致染色体不均等分配而增加基因组的不稳定性.

近年来, 随着中心体分离技术的不断改进, 抗中心体抗体的分离筛选, 已鉴定出 20 多种中心体蛋白成分, 根据它们在中心体处定位的时空变化特点可分为 3 类^[2]: 第 1 类是中心体常驻蛋白, 如 γ -微管蛋白(γ -tubulin)^[3], centrin/caltractin^[4]; 第 2 类是中心体乘客蛋白, 即只在 M 期才定位于中心体处, 如 POPA, NuMa 等; 第 3 类是中心体调节蛋白, 如 Cdc2, CyclinB1, CyclinA 等.

本文用一自身免疫病人血清鉴定了一种新的中心体抗原成分. 利用特异洗脱膜结合抗体技术确定了所识别抗原的分子量, 并显示出这种抗原在中心体处的分布具有不依赖于细胞周期的特点, 属于一种中心体常驻蛋白. 同时利用此抗血清以及 γ -tubulin, centrin 抗体对未复制基因组的有丝分裂(MUG)细胞的中心体分布进行了详细的研究.

1 材料与方法

(i) 试剂与材料. V79-8 细胞, 为中国仓鼠肺细胞 V79-8 化学诱变而来, 没有可测量出的 G_1/G_2 期, 由 M. D. Anderson 肿瘤中心 Rao 博士惠赠, 抗中心体人自身免疫血清从协和医院检验科获得, Centricon 10 由本室何大澄教授惠赠, γ -tubulin 兔抗血清由法国 Curie 研究所 Bornens 博士惠赠, Centrin 多抗由本室制备, NBT/BCIP 购自 Promega, 羟基脲(hydroxyurea, HU)、FITC 标记抗人二抗购自 Sigma, 碱性磷酸酶(AP)标记抗人 IgG, AP 标记抗兔 IgG, FITC 标记抗兔二抗购自 Santa Cruze.

(ii) 细胞培养. V79-8 细胞培养在 10%胎牛血清及抗生素(青霉素 100 U/mL, 链霉素 100

$\mu\text{g/mL}$ 的 DMEM 培养基中, 37°C , $5\%\text{CO}_2$ 湿润培养. 羟基脲(Hydroxyurea, HU)用无血清培养基配制, 工作浓度为 2.5 mmol/L , 分别阻断细胞 20, 40, 60 h. 细胞阻断 20 h 时加入咖啡因, 5 h 后收集细胞制样.

(iii) Western blot 检测. 细胞用冷 PBS 洗两次, 经 Laemmli SDS 上样缓冲液裂解, 于 100°C 煮沸 5 min, $12\ 000\text{ g}$ 离心 2 min, 取上清, Bradford 法定量, 每孔上样 $50\ \mu\text{g}$, $12\%\text{SDS-PAGE}$, 石墨电极转移到尼龙膜上, $1\%\text{BSA/TBST}(\text{TBS}+0.05\%\text{Tween20})$ 封闭 1 h, 人自身免疫血清、 γ -tubulin 以及 Centrin 抗体分别以 $1:5\ 000$, $1:2\ 000$ 以及 $1:1\ 000$ 稀释于封闭液中, 室温轻柔摇动 1 h, TBST 洗 3 次, AP 标记抗人及抗兔 IgG 以 $1:10\ 000$ 稀释, 温育洗涤后进行碱性磷酸酶底物 NBT/BCIP 显色反应.

(iv) 膜特异结合抗体洗脱^[5]. 抗体洗脱浓缩的步骤均在 0°C 条件下进行, 将待洗脱的条带经一抗温育后, TBST 洗 3 次, 再用 TBS 洗两次, 与经 Western blot 检测所得结果相对应, 将待洗脱的条带剪下(宽 $0.1\sim0.2\text{ cm}$), 并剪成小的碎片, 将其与 2 mL 冰浴洗脱液(0.2 mol/L Glycine-HCl, $\text{pH}=2.8$)温育 2 min, 立即用 NaOH 中和, 之后用 Centricon10 浓缩至 $150\sim200\ \mu\text{L}$ 的体积, 浓缩液直接进行间接免疫荧光染色或以 $1:10$ 稀释进行 Western blot 检测.

(v) 间接免疫荧光染色. 样品细胞离心电片后用 -20°C 甲醇固定 $7\sim10\text{ min}$, 自然干燥, 4°C 下保存. 人自身免疫血清、 γ -tubulin 以及 Centrin 抗体分别以 $1:400$, $1:300$ 以及 $1:100$ 稀释, 37°C 温育 1 h, 冷 PBS 洗 3 次, FITC 标记抗人及抗兔二抗分别以 $1:200$, $1:50$ 稀释, FITC 标记羊抗人 IgG $1:200$ 稀释, 37°C 温育 1 h, 冷 PBS 洗 3 次, 蒸馏水洗 1 次, 封片(封片剂: 甘油与 PBS 以 $9:1$ 混合), 镜检.

2 结果

2.1 HU 阻断的 V79-8 细胞显示抗血清荧光染色增强

图 1 中 V79-8 细胞, 间接免疫荧光显示抗中心体人自身免疫血清可识别细胞内靠近核膜边缘的一个或两个点, 用 HU 将 V79-8 细胞阻断在 G_1/S 及 S 期, 分别阻断 20, 40, 60 h, 发现随着阻断时间的延长, 抗血清染色增强, 染色体积增大, 有的沿着核膜边缘延续, 胞浆染色增强并且出现细小颗粒. 可见抗血清所识别的抗原在 G_1/S 及 S 期可进行表达, 阻断时间的延长造成表达量的持续增加.

2.2 抗中心体人自身免疫血清识别抗原的鉴定

取 V79-8 细胞的总蛋白裂解物为抗原进行 Western blot 检测, 发现此血清可识别 5 条不同的条带, 其分子量大小分别约为 66, 64, 43, 31, 29 ku. 在 HU 阻断的 V79-8 细胞中发现 31/29 ku 及 66/64 ku 出现增强的表达, 如图 2(a)所示.

2.3 亲和抗体洗脱法鉴定 31/29 ku 蛋白带是中心体识别的特异抗原成分

用 HU 阻断 20 h 的 V79-8 细胞总蛋白裂解物为抗原进行 Western blot 检测, 剪下相应于 66/64, 43, 31/29 ku 的条带, 酸冲击洗脱抗体, 然后用洗脱抗体再进行间接免疫荧光及 Western blot 检测, 结果如图 2 所示. 相应于 31/29 ku 洗脱抗体可重复洗脱前的 Western blot 染色特征, 间接免疫荧光可识别间期细胞中心体及有丝分裂纺锤体极部, 如图 2(b)所示. 相应于 43, 66/64 ku 的洗脱抗体不能识别中心体(结果未显示), 因此 31/29 ku 抗原是此血清所识别的特异中心体抗原成分.

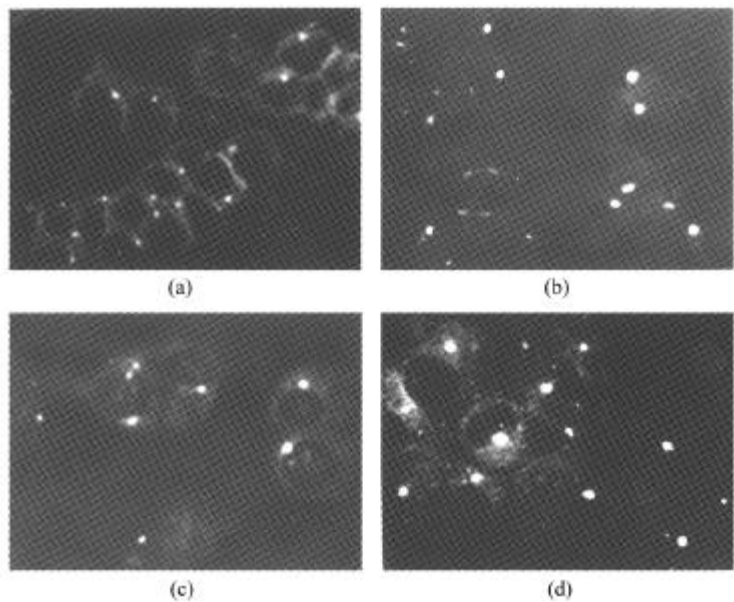


图1 HU 阻断的 V79-8 细胞显示抗中心体血清荧光染色增强(×360)
(a) 对照细胞; (b)~(d)加入 2.5 mmol/LHU 分别作用 20, 40, 60 h 的细胞

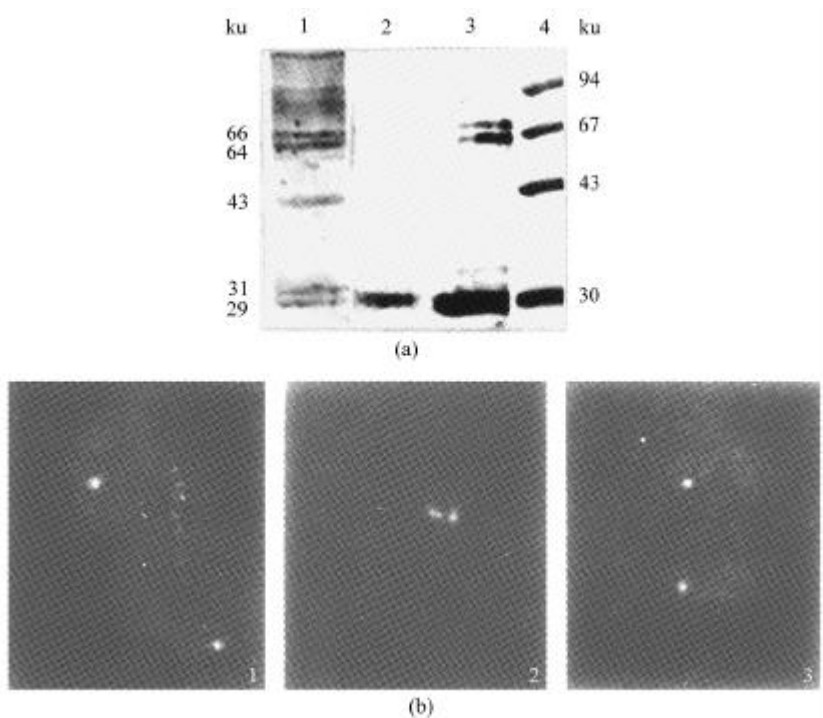


图2 抗血清识别特异中心体抗原成分的鉴定(×360)
(a) Western blot 鉴定抗血清识别的特异中心体抗原成分. 1——V79-8 细胞总蛋白裂解物, 抗血清可识别 66/64, 43, 31/29 ku 抗原成分; 2——HU 作用 20h 的 V79-8 细胞总蛋白裂解物, 特异洗脱识别 31/29 ku 的抗体可重复洗脱前的染色特征; 3——HU 作用 20h 的 V79-8 细胞总蛋白裂解物, 可见 66/64 ku, 31/29 ku 抗原出现增强表达; 4——中等分子量蛋白 Marker. (b) 免疫荧光鉴定 31/29 ku 抗原. 1——在间期细胞显示中心体; 2——复制后显示的两个中心体; 3——中期显示纺锤体极部

2.4 咖啡因诱导阻断所产生的多中心体分开

向 HU 阻断 20 h 的 V79-8 细胞培养物中加入 5 mmol/L 的咖啡因, 作用 5 h 后, 收集细胞制片, 用 Centrin 及 γ -tubulin 进行间接免疫荧光染色, 同时做 Western blot 分析.结果显示(图 3 和 4), HU 阻断及 HU 阻断并加咖啡因的细胞其 Centrin 及 γ -tubulin 的表达量较对照组细胞增高, 而两者之间变化不大, 免疫荧光染色显示出 HU 阻断的细胞和对照细胞相比染色颗粒增大、增强, 而 HU 阻断并加咖啡因的细胞中出现彼此分开的多个 Centrin 及 γ -tubulin 染色阳性点. 说明 HU 阻断的细胞其中心体蛋白 Centrin 及 γ -tubulin 仍然表现出持续的表达, 咖啡因的加入诱导细胞产生早熟染色体凝集(PCC)的同时, 也诱导复制后的多个中心体彼此分开.

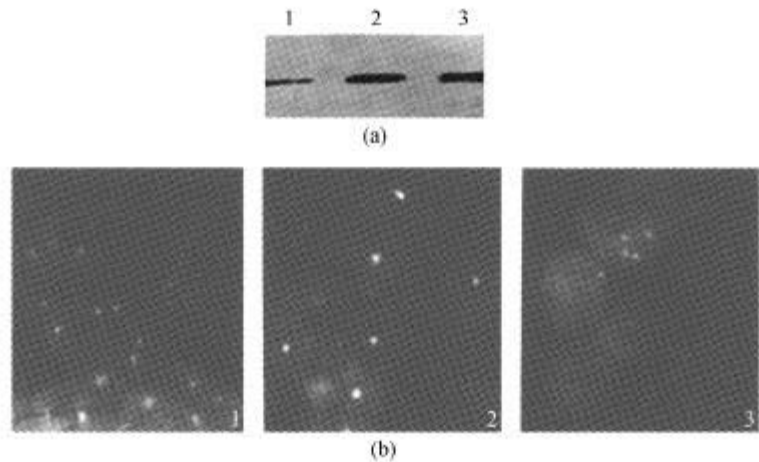


图 3 咖啡因诱导由 HU 阻断所产生的多中心体分开(×360)
(a)和(b)分别为 Centrin 抗体的 Western blots 检测及间接免疫荧光. 1——对照 V79-8 细胞; 2——HU 作用 20 h 的 V79-8 细胞; 3——HU 作用 20 h 后, 加入咖啡因 5 h 的 V79-8 细胞

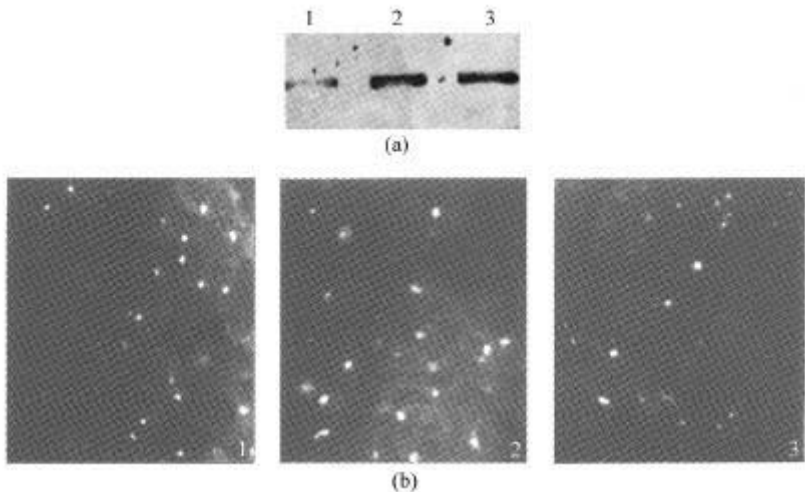


图 4 咖啡因诱导由 HU 阻断所产生的多中心体分开(×360)
(a)和(b)分别为 r-tubulin 抗体的 Western blot 检测及间接免疫荧光. 1——对照 V79-8 细胞; 2——HU 作用 20 h 的 V79-8 细胞; 3——HU 作用 20 h 后, 加入咖啡因 5 h 的 V79-8 细胞

3 讨论

本实验利用膜特异结合抗体洗脱法,从一例患自身免疫病病人的血清中鉴定了一种新的 31/29 ku 中心体抗原成分,间接免疫荧光法显示这种抗原在中心体处的定位不依赖于细胞周期的变化,属于一种中心体常驻蛋白.这种特点显示出 31/29 ku 抗原在中心体动态周期中可能发挥着重要的作用.一方面它可能作为中心体的一种结构蛋白对中心体自身结构的维持或对其微管组装活性起到重要的作用;另一方面也可能作为一种中心体调节蛋白在中心体半保留复制及细胞周期中微管组装活性的调节中起重要的调节作用.31/29 ku 抗原在细胞周期各个时期的表达量有无变化?在中心体的动态周期中是否存在磷酸化调节?它在中心体动态周期的哪些方面起作用等,都有待于进一步探讨.

HU 作为核糖核酸还原酶抑制剂,造成 DNA 合成时脱氧核糖核苷酸库的不足,从而激活 DNA 复制检验点,将细胞阻断在 G_1/S 及 S 期.咖啡因可解除这种检验点控制,诱导 MPF (mitosis promoting factor, MPF)活性,从而使处于 G_1/S 及 S 期的细胞在基因组未复制的情况下直接进入有丝分裂期.利用咖啡因的这种特点,1986 年,在 BHK^[6]细胞中发现典型的早熟染色体凝集现象(premature chromosome condensation, PCC),并将产生 PCC 现象的细胞称为 MUG 细胞.1995 年,张焕相等^[7]以 CHL 细胞为材料,研究了 MUG 细胞形成过程及 MUG 细胞中着丝粒蛋白 B(centromere protein-B, CENP-B)的表达及动粒行为等,发现 CENP-B 在 MUG 细胞形成过程中持续表达.我们以 V79-8 细胞为材料,也发现了典型的 MUG 现象(结果未显示).本实验显示 31/29 ku 抗原成分以及 Centrin 及 γ -tubulin 在 G_1/S 及 S 期均表现出累积的表达,咖啡因的加入在解除 HU 对细胞周期阻断的同时也诱导复制后的多个中心体的分开.由此可见在 MUG 细胞中,中心体蛋白和动粒蛋白的持续表达说明中心体周期和动粒周期可与核周期相互解离.

中心体复制与 DNA 复制具有许多相似的特点.首先,两者在每一个细胞周期中复制且仅复制一次,事实上它们在复制周期中是紧密协调的;其次两者均遵循半保留的复制机制;最后在复制上都必须具备两个条件:一是复制模板活性,二是要有充足的核苷酸库或可利用中心体蛋白库.将细胞阻断在 G_1/S 期,随着阻断时间的延长,中心体呈现 2-3-4-5-6 逐一增加的趋势^[8],阻断在 G_2 期,随着时间延长中心粒却没有增多,说明只有母中心粒而且只在 G_1/S 期时才具有模板活性.用蛋白合成抑制剂处理蛙卵及海胆卵,此时其周期蛋白含量处于很低的水平,但中心体仍然正常复制^[9, 10],最近的研究表明在一些胚胎细胞中周期蛋白 E 始终保持在—个稳定的水平,显微注射 P21 抗体抑制周期蛋白 E/CDK2 激酶复合物的活性时,发现中心体复制被抑制^[11],说明周期蛋白 E/CDK2 激酶决定着中心体复制与否.

咖啡因诱导 HU 阻断的 V79-8 细胞进行早熟染色体凝集时,复制后的中心体要完成其功能还需要通过 M 期的 MPF 的调节中心体才能成熟及分离.细胞周期引擎分子系统在推动核周期运转时,也控制着中心体的复制和成熟,并将中心体周期与核周期紧密协调.尽管中心体蛋白的合成可以不依赖于 DNA 的复制状态,但要完成中心体周期还必须有引擎分子系统的调节,同样, DNA 复制或中心体周期的异常,通过反馈机制又制约着引擎分子系统的周期变化,由此可见,核周期与中心体周期通过引擎分子系统的控制和反馈控制而彼此偶联协调,使得在一个核周期中,中心体也复制一次,从而保证双极纺锤体的形成及染色体的均等分配.

致谢 感谢 M. D. Anderson 肿瘤研究中心 P. N. Rao 博士惠赠 V79-8 细胞系以及法国 Curie 研究所 M. Bornens 博士惠赠 γ -tubulin 抗体。本工作为国家重点基础研究(No. G1999053901)、国家自然科学基金(批准号: 39430080)及教育部博士点基金(No. 96002713)资助项目。

参 考 文 献

- 1 Kellogg D R, Moritz M, Alberts B M. The centrosome and cellular organization. *Annu Rev Biochem*, 1994, 63: 639 ~ 674
- 2 Kalt A, Schlömann M. Molecular components of the centrosome. *Trends in Cell Biol*, 1993, 3: 118 ~ 128
- 3 Moritz M, Braunkopf M, Sedat J, et al. Microtubule nucleation by γ -tubulin-containing rings in the centrosome. *Nature*, 1995, 278: 638 ~ 640
- 4 Salisbury J. Centrin, centrosome, and mitotic spindle poles. *Curr Opin Cell Biol*, 1995, 7: 39 ~ 45
- 5 Olmsted J. Affinity purification of antibodies from diazotized paper blots of heterogeneous protein samples. *J Biol Chem*, 1981, 256: 11955 ~ 11957
- 6 Schlegel R, Pardee A. Caffeine-induced uncoupling of mitosis from the completion of DNA replication in mammalian cells. *Science*, 1986, 232: 1264 ~ 1266
- 7 张焕相, 钟瑾惠, 王永潮. 着丝粒蛋白 B 在基因组未复制的有丝分裂期细胞中的表达. *解剖学报*, 1995, 26: 387 ~ 390
- 8 Balczon R, Bao L, Zimmer W, et al. Dissociation of centrosome replication events from cycles of DNA synthesis and mitotic division in hydroxyurea arrested CHO cells. *J Cell Biol*, 1995, 130: 105 ~ 115
- 9 Sluder G, Miller F, Rieder C. The reproduction of centrosomes: nuclear versus cytoplasmic controls. *J Cell Biol*, 1986, 103: 1873 ~ 1887
- 10 Sluder G, Miller F, Cole R, et al. Protein synthesis and the cell cycle: centrosome reproduction in sea urchin eggs is not under translational control. *J Cell Biol*, 1990, 110: 2025 ~ 2032
- 11 Stearns T, Winey M, Rose M. The cell center at 100. *Cell*, 1997, 91: 303 ~ 309

(1999-10-21 收稿, 2000-04-10 收修改稿)