非细胞体系核重建的原子力显微镜观察

杨 宁[①②] 陈忠才[①②] 张朝晖[③*] 朱 星[③] 翟中和[②] 唐孝威[④]

(①中国科学院高能物理研究所, 北京 100039; ② 北京大学生命科学学院细胞生物学与遗传学系, 北京 100871; ③北京大学物理学院, 北京 100871; ④浙江大学物理系, 杭州 310027. E-mail: zhangzh@pku.edu.cn)

摘要 非细胞体系是研究有丝分裂中核重建过程的重要方法. 原子力显微镜以其高分辨成像的功能已成为观察生物体系的有力工具, 但目前原子力显微镜在非细胞体系研究中的应用还未见报道. 提出了一种适用于原子力显微镜观察的空气干燥样品制备方法, 利用原子力显微镜观察了非细胞体系核重建过程, 得到了高分辨、高质量的非细胞体系核重建过程的形貌像, 并且清晰地分辨出直径为 100 nm 的膜泡和它在接近染色质表面的形态变化. 为进一步了解核膜的重建机理提供了方向.

关键词 原子力显微镜 核重建 非细胞体系

在高等动物真核细胞的有丝分裂前中期, 细胞核发生一系列的去组装过程: 核膜发生崩解并脱离凝集的染色体, 核纤层解聚, 核孔复合体分解[1,2]. 随后在分裂后期这些组分围绕两个子细胞的染色体重组装成细胞核. 由于上述去组装和重组装过程非常短暂, 通常在几分钟内就完成, 因而难以进行体内的动态观察[3]. 非洲爪蟾卵细胞提取物含有大量的核重建的前体物质, 为研究上述过程提供了很好的研究体系. 当外源染色质, 比如去膜精子, 加入到该系统中时, 提取物中的各组分即发生一系列有序的组装, 并最终形成结构和功能与正常细胞核相似的重建核.

自 Lohka[4] 和 Newport[5]建立非细胞体系以来, 它已经在 DNA 复制[6,7], 核膜组装, 细胞周期调控[8,9]和细胞凋亡[10~12]等领域取得了许多重要成果. 但是对于核重建的详细机理, 尤其是核纤层、核孔复合体和核膜的重建过程仍然了解得不很清楚.

研究核重建的传统方法有光学显微镜(optical microscopy)和电子显微镜(electron microscopy). 前者由于分辨率的限制, 而难以提供膜泡和细胞核相互作用的细节; 后者虽有纳米尺度的分辨率, 但无法直接得到动态过程的信息. 原子力显微镜[13]的出现则结合了电子显微镜的高分辨率和光学显微镜操作简单的优点, 因而逐渐成为生物学研究中的重要工具. 原子力显微镜可以对固定或活体的细胞表面形貌进行高分辨率成像[14,15], 同时它还能在溶液中工作, 因而可以在准生理条件下观察生物反应过程. 运用原子力显微镜已经成功地观察了细胞器、生物大分子, 如超螺旋的 DNA 分子[16]和其他多种生物系统[16~18]. 本文中我们首次利用原子力显微镜观察非洲爪蟾卵提取物的核重建过程, 得到了优于传统方法的结果. 本文作为原子力显微镜在非细胞体系中应用的初步探索, 为下一步利用原子力显微镜在溶液中成像的特点, 研究核重建过程的动态变化提供了基础.

1 材料和方法

爪蟾卵提取物的制备参照 Hartl[19]等人的方法. 爪蟾去膜精子的染色质制备根据卢萍[20]等人的方法. 50 μL 的提取物中加入 5 μL 的去膜精子, 5 μL 的膜泡, 以及 ATP 能量再生系统(2 mmol/L ATP, 20 mmol/L 磷酸肌酸, 50 μg/mL 肌酸磷酸激酶)混匀. 混合物在 23℃下孵育, 每隔 20 min 取出 2 μL 置于直径为 16 mm 盖玻片上涂匀. 样品经空气快速干燥后用原子力显微镜(Digital Instruments)以轻敲模式(tapping mode)观察, 同时同量的混合物与 2 μL 含有 5 μg/mL

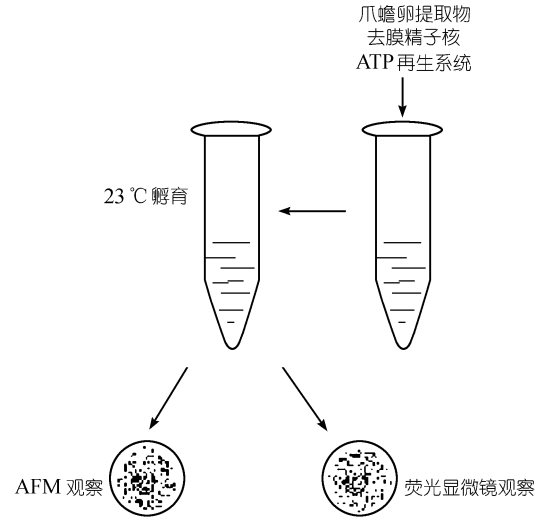

图 1 非细胞体系核重建样品的准备

DAPI 的染料混合涂于盖玻片上，用荧光显微镜观察结果(上述过程见图 1 所示).

2 结果和讨论

图 2(a)显示爪蟾卵提取物诱导染色体去凝集，并发生核重建的过程. 第 0 分钟染色体高度凝集呈蝌蚪状. 在卵提取物中孵育 20~40 min 后，去膜精子逐步去凝集并逐渐膨胀. 随后去膜精子继续膨胀，染色体去凝集，体积逐渐变大. 至 100 分钟，重建核呈圆形，染色质疏松，体积比原来增加数十倍. 由原子力显微镜所得到的结果与用荧光显微镜得到的图像(图 2(b))相一致.

核膜重建的关键步骤是膜泡结合到去膜精子表面并相互融合形成双层核膜. 图 3 显示直径约为 100 nm

图 2 非细胞体系核重建过程

(a) AFM 观察, (b) 荧光显微镜观察

图 3 膜泡结合到去膜精子的表面

膜泡结合到去膜精子的表面并与之融合(图 3 箭头所示). 即将结合到去膜精子表面的膜泡其形态发生改变(图 3 箭号所示)

的膜泡聚集在染色体的周围(箭头所示), 其中某些膜泡已经到达并结合到染色体表面. 同时膜泡的形状呈凹陷状, 其可能原因是样品的制备过程膜泡内含物的流出所致. 在图 3 中我们看到在距染色质较近的膜泡中, 其靠近染色质一边的高度要低于远离染色质的一边(图 3 箭号所示), 这表明膜泡靠近染色质一边的部分, 其结构或/和组分发生了改变. 造成这种现象的原因可能是膜泡接近染色质表面时, 靠近染色质的这一部分首先发生蛋白的结合或/和降解, 从而造成膜泡形貌和同时伴随的膜泡物理性质的改变. 上述结果在荧光显微镜中没有观察到.

由于原子力显微镜在工作过程中针尖与样品之间有相互接触, 因而可能在扫描过程中破坏核膜的形貌[21]. 而通过与荧光染色结果的对照, 我们发现上述的样品制备方法能够完好地保存重建核和膜泡的完整性, 尤其是膜泡能被清晰分辨. 用轻敲模式反复扫描样品, 未出现任何形貌上的改变, 因而我们认为上述的样品制备方法和所采用的轻敲模式几乎不对样品的表面形貌造成影响.

由此可见, 与传统的光学显微镜和电子显微镜相比, 原子力显微镜在非细胞体系核重建的观察中具有其独特的优势. 其得到的结果有助于详细研究核重建的机理和非细胞体系中核孔复合体的组装. 本文作为原子力显微镜在非细胞体系中应用的初步探索, 我们下一步的研究方向是利用原子力显微镜可在溶液中工作的优势, 在纳米分辨尺度上观察膜泡融合及核孔复合体装配的动态过程.

致谢 本工作为国家自然科学研究基金(批准号: 19890380 和 30070388)和国家重点基础研究发展规划(批准号: G19990539)资助项目.

参 考 文 献

1 Gant T M, Wilson K L. Nuclear assembly. Annu Rev Cell Dev Biol, 1997, 13: 669~695

2 Almouzni G, Wolffe A P. Nuclear assembly, structure, and function: the use of Xenopus *in vitro* systems. Exp Cell Res, 1993, 205(1): 1~15

3 Ellenberg J, Siggia E D, Moreira J E, et al. Nuclear membrane dynamics and reassembly in living cells: targeting of an inner nuclear membrane protein in interphase and mitosis. J Cell Biol, 1997, 138: 1193~1206

4 Lohka M J, Masui Y. Formation *in vitro* of sperm pronuclei and mitotic chromosomes induced by amphibian ooplasmic components. Science, 1983, 220(4598): 719~721

5 Newport J, Spann T. Disassembly of the nucleus in mitotic extracts: membrane vesicularization, lamin disassembly and chro-

mosome condensation are independent processes. Cell, 1987, 48(2): 219~230

6 Blow J J, Laskey R A, A role for the nuclear envelope in controlling DNA replication within the cell cycle. Nature, 1988, 332(6164): 546~548

7 Costanzo V, Robertson K, Bibikova M, et al. Mre11 protein complex prevents double-strand break accumulation during chromosomal DNA replication. Mol Cell, 2001, 8(1): 137~147

8 Maller J, Gautier J, Langan T A, et al. Maturation-promoting factor and the regulation of the cell cycle. J Cell Sci Suppl, 1989, 12: 53~63

9 Kang D, Chen J, Wong J, et al. The checkpoint protein Chfr is a ligase that ubiquitinates Plk1 and inhibits Cdc2 at the G2 to M transition. J Cell Biol, 2002, 156(2): 249~259

10 Newmeyer D D, Farschon D M, Reed J C. Cell-free apoptosis in Xenopus egg extracts: inhibition by Bcl-2 and requirement for an organelle fraction enriched in mitochondria. Cell, 1994, 79(2): 353~364

11 Kuwana T, Smith J J, Muzio M, et al. Apoptosis induction by caspase-8 is amplified through the mitochondrial release of cytochrome c. J Biol Chem, 1998, 273(26): 16589~16594

12 Ahsen V O, Newmeyer D D. Cell-free apoptosis *in Xenopus* laevis egg extracts. Methods Enzymol, 2000, 322: 183~198

13 Binnig G, Quate G F, Gerber C. Atomic force microscope. Physical Review Letters, 1986, 56(9): 930~933

14 Sasaki S, Morimoto M, Haga H, et al. Elastic properties of living fibroblasts as imaged using force modulation mode in atomic force microscopy. Arch Histol Cytol, 1998, 61(1): 57~63

15 Ushiki T, Hitomi J, Umemoto T, et al. Imaging of living cultured cells of an epithelial nature by atomic force microscopy. Arch Histol Cytol, 1999, 62(1): 47~55

16 Lyubchenko Y L, Shlyakhtenko L S. Visualization of supercoiled DNA with atomic force microscopy in situ. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(2): 496~501

17 Stoffler D, Goldie K N, Feia B, et al. Calcium-mediated structural changes of native nuclear pore complexes monitored by time-lapse atomic force microscopy. J Mol Biol,1999, 287(4): 741~752

18 Yamada T, Arakawa H. Okajima T, et al. Use of AFM for imaging and measurement of the mechanical properties of light-convertible organelles in plants. Ultramicroscopy, 2002, 91(1-4): 261~268

19 Hartl P, Olson E, Dang T, et al. Nuclear assembly with lambda DNA in fractionated *Xenopus* egg extracts: an unexpected role for glycogen in formation of a higher order chromatin intermediate. J Cell Biol, 1994, 124(3): 235~248

20 Lu P, Zhai Z H. Nuclear assembly of demembranated *Xenopus* sperm in plant cell-free extracts from Nicotiana ovules. Exp Cell Res,2001, 270(1): 96~101

21 You H X, Lau J M, Zhang S, et al. Atomic force microscopy imaging of living cells: a preliminary study of the disruptive effect of the cantilever tip on cell morphology. Ultramicroscopy, 2000, 82(1-4): 297~305

(2003-05-12 收稿, 2003-07-23 收修改稿)