

洋葱核仁的超微结构与 rDNA 复制位置

郝 水 焦明大 邢 苗

(东北师范大学生物系, 长春 130024)

摘 要

本文通过常规电子显微镜观察看到洋葱核仁是由纤维中心 (FC)、纤维部分(F)和颗粒区 (G) 构成。FC 是电子透明区, 其内部有集缩或松散的染色质。F 是围绕 FC 的环状结构部分, 由密集的纤维构成, 电子密度很高。用 ^3H -尿嘧啶核苷标记的电子显微镜放射自显影观察表明, 它是 rRNA 合成的部位。颗粒区位于 F 外侧, 由直径约 25—30nm 的颗粒组成。用 ^3H -胸腺嘧啶脱氧核苷标记的电子显微镜放射自显影观察表明, 银粒大多分布在核仁边缘的颗粒区和核仁伴随染色质, 在 FC 和 F 以及核仁内部颗粒区也有银粒出现, 但频率很低。根据银粒分布频率和银粒范围的大小, 推测 rDNA 复制的位置主要在核仁周边颗粒区和核仁伴随染色质, 但在 FC 也有一些 DNA 区段开始复制, 然后向核仁周边转移。

关键词: 核仁, rDNA 复制位置, 洋葱

早期的电子显微镜观察发现核仁是由纤维区和颗粒区构成的。后来阐明 rDNA 的转录发生在纤维区, 颗粒区是 rRNA 加工并与蛋白质构建成前核糖体颗粒的区域^[1]。60 年代末 Miller 等发展了一种离体核仁的铺展技术, 使人们直观地看到核糖体基因转录的形象^[2]。70 年代以来关于核仁超微结构的原位研究也有了显著进步^[3,4], 现已阐明, 核仁纤维区中有许多电子透明区, 称为纤维中心 (fibrillar centres, 缩写 FC), 其中存在着不转录的 rDNA 和磷蛋白, 但是没有组蛋白, 也不形成核小体^[5-10]。围绕 FC 存在着一个电子密度很高的环状区域, 它是由密集的纤维组成的。Risueno 等^[6]称它为纤维部分 (fibrillar component, 缩写 F), 而 Spector 等^[8]称它为纤维壳 (fibrillar shell, 缩写 FS)。许多电子显微镜放射自显影 (EM ARG) 研究一致表明, 纤维部分是核糖体基因转录的部分, 在这里进行 rRNA 的合成过程。关于 rDNA 的复制位置过去也做过许多 EM ARG 的研究, 但迄今不同作者用各种材料所做的实验结果是分歧的^[6,11]。为了探讨核仁中 rDNA 的复制位置, 我们对洋葱根端分生组织的细胞核进行了 EM ARG 研究, 现将结果报告于下。

一、材料与方法

1. 材料 实验材料为洋葱 (*Allium cepa*) 根端分生组织细胞。用鳞茎在 $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 下

发根,待幼根长至 1.5—2cm 时切取根端分生组织。

2. 常规电子显微镜标本的制备 切取的根端分生组织用 2.5% 的戊二醛 (0.1mol/L 磷酸盐缓冲液, pH7.2) 预固定 12h, 然后用 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液冲洗, 再用 2% 锇酸 (缓冲液相同) 后固定 2h, 经乙醇丙酮系列脱水, 用 Epon 812 树脂包埋, 以 LKB-V 型切片机切片 (厚度 700 Å), 醋酸铀和柠檬酸铅双重染色。在 Hitachi 600B 透射电子显微镜上观察。

3. 电子显微镜放射自显影标本的制备 为标记 DNA, 将洋葱幼根放入 ^3H -胸腺嘧啶脱氧核苷溶液 (浓度 $20\mu\text{Ci/ml}$) 中处理 5min, 然后一组材料水洗 10min 立即固定; 另一组材料水洗 10min, 再在 20°C 条件下培养 15min, 然后固定。为标记 RNA 将洋葱幼根放入 ^3H -尿嘧啶核苷溶液 (浓度为 $20\mu\text{Ci/ml}$) 中处理 5min, 然后一组材料水洗 10min 立即固定, 而另一组材料水洗后再在 20°C 下培养 15min, 然后固定。固定和超薄切片的制备都与上述常规方法相同。

用真空镀膜机在切片上喷涂 50 Å 厚的碳膜。用套环法在碳膜上涂布 HW4 型核子乳胶, 在 4°C 条件下曝光 60 天, 用 D-19b 显影液显影。

二、结 果

1. 核仁的超微结构

在洋葱根端分生组织的间期细胞中可以看到核仁有 3 个不同区域, 即纤维中心、纤维部分和颗粒区 (granular region, 缩写 G)。此外有时可以看到核仁腔隙 (nucleolar interstices) (图版 I-2)。纤维中心是电子透明区, 其中有凝集的块状结构或松散的纤维状结构 (图版 I-1, 4)。前者电子密度明显大于后者。用 ^3H -胸腺嘧啶脱氧核苷 (^3H -TdR) 所做的 EMARG 观察表明, 这里有 rDNA 存在 (图版 II-1, 2)。用 ^3H -尿嘧啶核苷 (^3H -UdR) 做的标记实验没有出现银粒, 说明 FC 中的 rDNA 处于非转录状态 (图版 I-3, 4)。这些 EM ARG 观察与前人的研究结果是一致的^[7,9]。纤维中心的直径大约变动于 300—600nm 之间, 有的更大。纤维部分是围绕 FC 的电子密度较大的环状区域。用 ^3H -UdR 标记的 EM ARG 观察表明, 这个区域有明显的银粒存在 (图版 I-3, 4), 说明在这里进行 rRNA 的合成过程, 即它是 rDNA 的转录区。

颗粒区位于各纤维部分的周围和核仁的周边区域 (图版 I-1, 3, 4)。其中有大量直径约 25—30nm 的前核糖体颗粒 (preribosome)。在这个区域也可看到 ^3H -UdR 的示踪银粒 (图版 I-3, 4), 说明转录形成的 rRNA 已由纤维部分转移到颗粒区^[7]。除以上 3 个区域外, 在有的核仁切面上可以看到一个较大的电子透明区, 称为核仁腔隙 (图版 I-2), 它与 FC 的主要区别是周围没有电子密度较高的纤维部分。

2. rDNA 的复制位置

用 ^3H -胸腺嘧啶脱氧核苷脉冲标记所做的电子显微镜放射自显影表明, 银粒大多分布在核仁边缘的颗粒区和颗粒区-核仁伴随染色质 (nucleolus-associated chromatin) 部位 (图版 II-1, 图版 III-1, 2)。这两个区域的银粒范围一般较大 (图版 III), 但有的很小 (图版 II-1)。在纤维部分也可见到标记的银粒, 但出现频率较低 (图版 II-2, 3)。在纤维中心我们只看到两处有银粒出现 (图版 II-1, 2 和表 1), 而且银粒范围很小。

从表 1 的统计数字可以看出, 无论是脉冲标记 5min, 经水洗 10min, 立即固定的材料, 还

表 1 ^3H -胸腺嘧啶脱氧核苷标记的银粒位置在核仁中的分布频率

标记与培养时间	观察核仁切面数	纤维中心	纤维部分	颗粒区 (核仁内部)	颗粒区 (核仁边缘)	颗粒区-核仁 伴随染色质	合计
标记 5min 水洗 10min	19	1	5	4	25	8	43
标记 5min 水洗 10min 培养 15min	9	1	3	1	19	5	29

是脉冲标记 5min, 水洗 10min, 再培养 15min, 然后固定的材料, ^3H -TdR 标记的银粒都主要出现在核仁边缘的颗粒区, 其次是颗粒区-核仁伴随染色质部位。在标记、水洗后立即固定的材料, 这两个部位出现银粒的频率加起来约占观察总数的 77%, 而在标记、水洗后又培养 15min 的材料占 83%。

三、讨 论

关于 rDNA 合成位置已有不少研究报告。Goessens 用 ^3H -TdR 标记 Ehrlich 肿瘤细胞 16.5h 或 24h, 曾看到在核仁纤维中心和核仁伴随染色质部位有银粒出现^[12]。但 Recher 等在人的 CMP 细胞核仁中只在核仁的纤维部分看到少量银粒, 而在 FC 中未看到有标记的银粒^[13]。Fakan 和 Hancock 用 ^3H -TdR 对小鼠培养细胞 P815 进行 20 或 30s 极短时间脉冲标记, 看到核仁中出现的银粒主要分布在核仁边缘与核仁伴随染色质相连接的部位, 有时在纤维部分也看到有银粒^[14]。在植物细胞方面, Ryser 等在三头绒泡菌 (*Physarum polycephalum*) 的核仁中看到, 用 ^3H -TdR 标记 105min 时银粒出现在纤维部分^[15]。Lafontaine 和 Lord 用 ^3H -TdR 标记韭葱 (*Allium porrum*) 幼根 10—30min, 看到银粒主要出现在核仁空腔 (nucleolar lacunae) 和其周围的纤维部分。从作者提供的照片看, 所谓核仁空腔相当于纤维中心。Lafontaine 和 Lord 在核仁周边的颗粒区和核仁伴随染色质处也看到有银粒分布^[16,17]。Risueno 等用 ^3H -TdR 标记洋葱根端分生组织 18h, 看到核仁的纤维中心和纤维部分有明显的银粒出现, 但在颗粒区无明显标记^[6]。

综上所述可见, 关于核仁 DNA 复制位点的研究结果是分歧的。除个别研究采用了很短时间的脉冲标记外, 许多工作用 ^3H -TdR 标记时间都很长^[6,12,15], 因此难以判断所看到的银粒是反映了 rDNA 的复制位置, 还是复制后的 DNA 区段转移到该处的结果。同时过去的一些工作主要是探讨核仁外染色质 DNA 复制位置及其与核膜的关系, 而对核仁内 rDNA 复制位置只是一般地描述了银粒出现的部位, 没有进行深入的分析。因此对 rDNA 的复制位置迄今尚无明确结论^[11,12,16,17]。我们在洋葱核仁纤维中心看到有 ^3H -TdR 标记的银粒出现。但这里的银粒范围很小, 说明复制叉不大, 因此推测 rDNA 某些区段的复制是发生在这个区域的。由于在纤维部分和颗粒区 (核仁内部和边缘的) 出现的银粒范围通常明显大于 FC 中的, 而只有少数与之大小相近, 因此 FC 中出现的银粒不像是在其它区域复制后的 DNA 区段转移到这里的结果。

我们和其他许多作者^[6,14,16]在纤维部分也看到 ^3H -TdR 标记的银粒。但过去的许多研究和本文工作都证明这个区域是 rDNA 转录的部位。因此我们推测在这个区域看到的 ^3H -TdR 标记银粒有可能是在纤维中心开始复制的 rDNA 区段转移到这个区域来的结果。图版 II-2

显示的 FC 处的银粒延伸到纤维部分似有利于这种推测。另外在纤维部分出现的银粒的范围比在 FC 看到的大,这也与这种推测相符合(图版 II-3)。

我们看到,在洋葱核仁中用³H-TdR 标记的银粒位置 70—80% 分布在核仁边缘的颗粒区和核仁伴随染色质的部位。类似的情况其他作者在不同的材料上也看到过^[4]。根据我们的观察这个区域出现的银粒可能有两种情况。一是在 FC 开始复制的 rDNA 区段边复制边转移到这个区域。有利于这一推测的事实是,在 FC 出现的银粒范围很小,而在核仁边缘颗粒区显现的银粒范围很多都显著大于前者(图版 III)。另一情况是 rDNA 的许多区段看来是在核仁边缘区开始复制的。有两个事实支持这一推测:一是我们在这一区域看到有一些标记银粒的范围也很小(图版 II-1, 图版 III-2),说明它们刚开始复制。另一事实是 Fakan 等用³H-TdR 对小鼠培养细胞进行 20—30s 极短时间脉冲标记,看到银粒出现在核仁边缘区。因为标记时间非常短,所以出现的银粒可以认为是反映复制的原位情况。

通过上述分析,我们认为 rDNA 复制的位置主要在核仁边缘的颗粒区和核仁伴随染色质部位,同时在 FC 处也有一些 DNA 区段开始复制,然后向核仁周边区转移。

参 考 文 献

- [1] Unuma, T. et al., *Exp. Cell Res.*, 52(1968), 429—438.
- [2] Miller, O. L. & Beatty, B. R., *Science*, 164(1969), 955—957.
- [3] Goessens, G. & Lepoint, A., *Exp. Cell Res.*, 87(1974), 63—72.
- [4] Goessens, G., *Int Review of Cytology*, 87(1984), 107—158.
- [5] Recher, L. et al., *J. Ultrastruct. Res.*, 29(1969), 1—14.
- [6] Risueno, M. et al., *J. Cell Sci.*, 58(1982), 313—329.
- [7] Medina, F. J. et al., *Chromosoma*, 88(1983), 149—155.
- [8] Spector, D. L. et al., *ibid.*, 90(1984), 139—148.
- [9] Derenzini, M. et al., *Exp. Cell Res.*, 157(1985), 50—62.
- [10] Derenzini, M. et al., *Chromosoma*, 95(1987), 63—70.
- [11] Fakan, S., *The Cell Nucleus, Chromatin*, Part B(Ed. Busch, H.), Acad. Press Inc, 5(1978), 3—53.
- [12] Goessens, G., *Exp. Cell Res.*, 100(1976), 88—94.
- [13] Recher, L. et al., *J. Cell Biol.*, 45(1970), 479—492.
- [14] Fakan, S. & Hancock, R., *Exp. Cell Res.*, 83(1974), 95—102.
- [15] Byser, U. et al., *ibid.*, 78(1973), 89—97.
- [16] Lafontaine, J. G. & Lord, A., *J. Cell Sci.*, 12(1973), 369—383.
- [17] Lafontaine, J. G. & Lord, A., *ibid.*, 14(1974), 263—287.