

鼠肝细胞核仁结构与 rRNA 基因转录位点研究*

陶 伟** 焦明大 赫 杰 何孟元 郝 水***

(东北师范大学细胞与遗传研究所, 长春 130024)

摘要 通过常规电子显微镜观察了鼠肝细胞核仁的超微结构, 并采用 NAMA-Ur 细胞化学 DNA 特异染色方法分析了核仁中 DNA 的分布及其原位位置, 直观的显示了鼠肝细胞核仁 DNA 来源于核仁伴随染色质, 并在核仁 DFC 区域连续伸展, 排布于 FC 的边缘部位及 DFC 区域中, 进一步借助于 RNA/DNA 杂合体抗体选择性直接标记核仁中 rRNA 基因转录位点, 结果表明了鼠肝细胞核仁 rRNA 基因的转录位点是在 FC 的边缘及 DFC 区域.

关键词 核仁 NAMA-Ur 方法 rDNA 原位位置 rRNA 基因转录位点 鼠肝细胞

真核生物细胞核仁基本结构构成可分为纤维中心(fibrillar centres, FC)、致密纤维组分(dense fibrillar component, DFC)及颗粒成分(granular component, G). 自从 60 年代末 Miller 等直观的观察到了核糖体基因转录所形成的“圣诞树”结构以来, 具有这种结构的 rRNA 基因转录活动究竟位于核仁的哪一组分中引起了研究者的极大兴趣. 早期的电子显微镜放射自显影结果显示出核仁 rRNA 基因的转录位点位于 DFC 区域^[1], 但是, 这个观点自 80 年代以来受到了质疑. RNA 聚合酶 I 抗体免疫标记及标记的 UTP 追踪的实验结果表明, 核仁 rRNA 基因转录位点位于 FC 及其边缘区域, 而不是 DFC^[2, 3]. 到目前为止, 关于核仁中 DNA 的位置以及 rRNA 基因的转录位点尚无确切的结论^[4]. 本文在原位水平直接观察了核仁中 DNA 的分布状况及精细位置, 并采用新的选择性直接标记正在发生转录活动的 rRNA 基因实验方法, 对核仁 rRNA 基因的转录位点进行了研究.

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验材料为小白鼠乳鼠肝细胞.

1.2 常规电子显微镜标本的制备

取鼠肝细胞, 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

1999-08-27 收稿, 1999-11-30 收修改稿

* 国家自然科学基金资助项目(批准号: 39770367)

** 现在地址: 北京大学生命科学学院

*** 联系人(E-mail: ycsuo@nenu.edu.cn)

酸铀-柠檬酸铅常规染色, Hitachi-600B 透射电子显微镜下观察, 照相, 加速电压为 75 kV.

1.3 NAMA-Ur DNA 特异染色

DNA 细胞化学特异染色按照文献[5]. 关于 DNA 在核仁中的分布位置, 我们应用 Testillano^[5]报道的 NAMA-Ur 方法, 并做了一定的修改, 修改后的实验过程简述如下: 样品经 3%戊二醛加 4%多聚甲醛(0.1 mol/L 磷酸缓冲液配制) 4℃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)中过夜处理; 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: 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, Hitachi-600B 型透射电子显微镜观察照相, 加速电压 75 kV.

1.4 抗 RNA/DNA 杂合体免疫电镜标记

实验试剂: 抗 RNA/DNA 杂合体抗体^[6]由 Stollar 教授(University of Tufts, USA)惠赠. 低温包埋剂 K₄M 购自德国 Chemische Werke Lowi GMBH&Co. 蛋白 A-胶体金复合物购自 Sigma 公司.

鼠肝细胞 K₄M 低温包埋: 样品经 3%戊二醛和 4%多聚甲醛溶液中固定 2 h, 重蒸水洗涤 3 次, 每次 30 min, 乙醇系列脱水, 包埋剂渗透, 100%乙醇/K₄M(1: 1)混合液 0℃浸透 12 h, 100%乙醇/K₄M(1: 2)混合液 -10℃浸透 1 h; 纯 K₄M -30℃浸透 60 h. 样品在-30℃下紫外照射聚合 24 h 以上(用两个 6 W、波长 360 nm 的紫外灯管散射光照射, 照射距离 30~40 cm), 然后将样品放在室温下继续用紫外照射聚合 2~3 d.

抗 RNA/DNA 杂合体抗体免疫标记: 鼠肝细胞超薄切片用 2×SSC 洗涤 5 min, 然后浸入 50%甲酰胺(2×SSC 配制), 25℃下作用 10 min, PBS 洗涤 3 次, 每次 1 min; 再用 5%BSA(PBS, 0.5%TritonX-100)封闭 10 min. 抗 RNA/DNA 杂合体抗体 1: 300 稀释, 在湿盒中室温下作用 1 h, PBS 充分洗涤. 二抗蛋白 A-胶体金复合物 1: 25 稀释, 室温下作用 45 min, PBS 和双蒸水充分洗涤, 5%醋酸铀染色. Hitachi-600B 型透射电子显微镜观察并照相, 加速电压 75 kV.

对照实验中, 一抗用抗体稀释液代替抗 RNA/DNA 杂合体抗体.

2 结果

2.1 核仁的超微结构

在常规电子显微镜下, 鼠肝细胞核仁可分为纤维中心(FC)、致密纤维组分(DFC)及颗粒成分(G). FC 是核仁电子密度最低的区域, 其中或多或少被一些物质成分所填充; 致密纤维组分为核仁最高电子密度区域, 环绕纤维中心排布; 鼠肝核仁的颗粒成分位于核仁的边缘部位和致密纤维成分之间; 核仁外周缘还分布着核仁伴随染色质(nucleolus-associated chromatin, NAC). 另外, 还观察到鼠肝细胞核仁常位于核膜附近, 这可能是由于细胞端粒 DNA 序列与核纤层蛋白 B(Lamin B)有较强的亲和性所造成的^[7](图 1(a), (b)).

2.2 核仁中 DNA 的分布位置

为了研究核仁中 DNA 的分布状况, 我们借助于 NAMA-Ur 细胞化学 DNA 特异染色技术对鼠肝细胞进行了处理, 结果鼠肝细胞的细胞质、染色质间以及核仁的大部分区域被漂白, 而染色质及核仁中所含的 DNA 成分由于被特异染色而具有高电子密度, 因此可被识别(图 1(c),

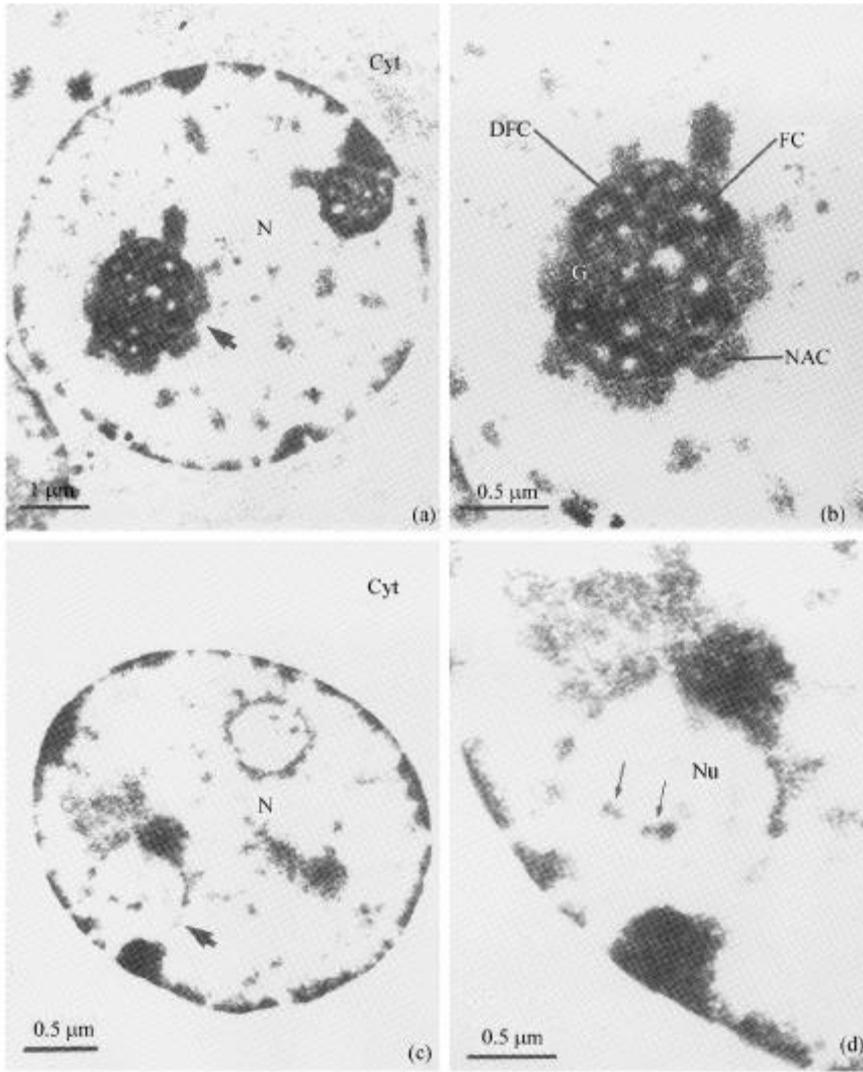


图 1 鼠肝细胞核仁超微结构及特异染色后核仁内 DNA

(a) 鼠肝细胞核(N)及核仁(箭头); (b) 为(a)箭头所示核仁的放大, 示核仁的纤维中心(FC)、致密纤维组分(DFC)、颗粒区(G)及伴随染色质(NAC), Cyt 为细胞质; (c) DNA 特异染色后的鼠肝细胞核(N), 细胞质(Cyt)、染色质间以及核仁(箭头)的大部分区域被漂白, 染色质及核仁中所含的 DNA 成分由于特异染色可被识别; (d)为(c)箭头所示核仁的放大, 特异染色后核仁(Nu)中含有 DNA 成分(箭头)

(d)). 这些观察表明, NAMA-Ur 细胞化学技术具有良好的 DNA 特异染色效果.

核仁经 DNA 特异染色技术处理后, 可以明显看出, 核仁周缘分布有大量的 DNA 成分, 呈包被核仁形式存在; 在核仁内部, 常常能够看到团块状或线状的 DNA 成分分布于核仁的中央及边缘部位, 以集缩或解集缩形式存在, 其周边可见有 DNA 纤丝伸出(图 2(a), (b)). 还可以观察到, 在一些核仁中, DNA 成分含量比较多, 且相互交织, 连续伸展排布, 占据核仁较大的区

域(图 2(c)).

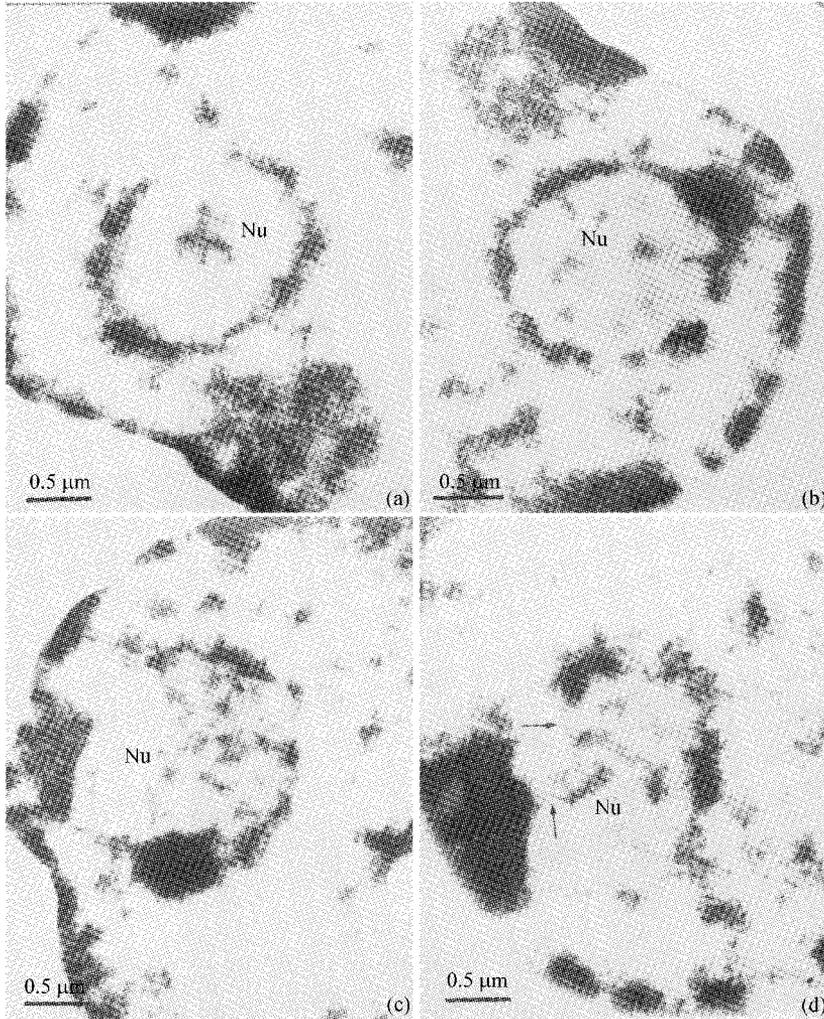


图 2 核仁内 DNA 的分布及形态特征

(a), (b)示 DNA 特异染色后的核仁(Nu), 核仁周缘分布有较多 DNA 成分包被核仁; 核仁中团块状或线状 DNA 位于核仁的中央(a)及边缘部位(b), 以集缩或解集缩形式存在, 其周边可见有 DNA 纤维伸出. (c), (d) 示 DNA 特异染色后的核仁(Nu), 核仁中 DNA 相互交织, 连续伸展排布, 占据核仁较大的区域(c), 核仁伴随染色质的 DNA 成分伸进核仁(箭头), 有的部位呈集缩状态, 而多数部位成解集缩状态(d)

从图 2(d)可以看到, 核仁中的 DNA 与核仁伴随染色质的 DNA 之间有 DNA 纤丝相连; 核仁中的 DNA 成分有的部位 DNA 呈集缩状态, 而多数部位呈解集缩状态, 这些结果说明核仁中 DNA 来源于核仁伴随染色质, 而且核仁中 DNA 的结构可能是不断变化的(图 2(d)).

为了探查 DNA 在核仁中的原位精细位置, 我们对 NAMA-Ur DNA 特异染色方法进行了一定修改, 使染色后在核仁区域保留一些背景, 从而区分出 FC 及 DFC 的结构组分, 以便能够原位分析定位核仁中的 DNA 的位置(图 3(a), (b)). 核仁周缘 DNA 进入核仁以后, 在 DFC 区域中延伸, 直达 FC, 呈现环绕 FC 排布的趋势(图 3(a));

DNA 在 DFC 区域的伸展转运是连续的, 虽然有时 DNA 成分能够到达甚至进入 FC 的边缘部位, 但是从不进入 FC 的内部(图 3(b)). 上述结果说明, 在鼠肝细胞核仁中, DNA 的位置应在 DFC 和 FC 的边缘.

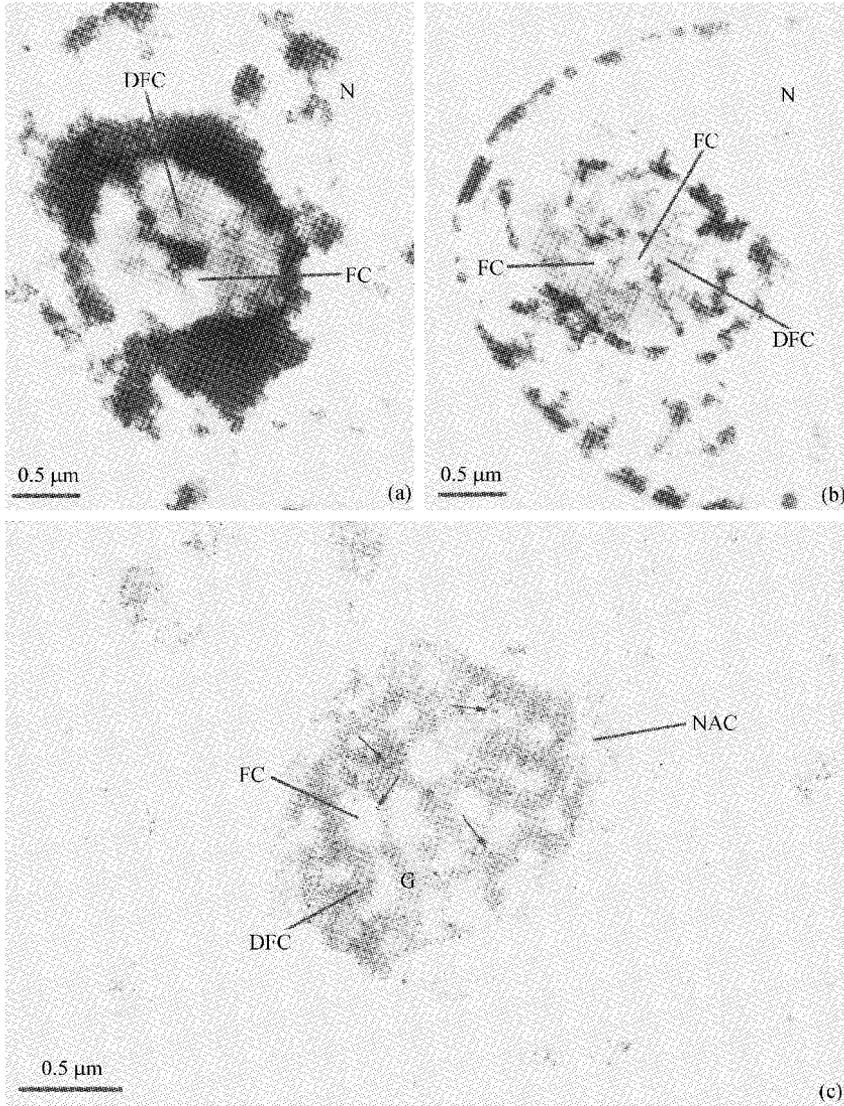


图 3 核仁内 DNA 的原位位置及 rRNA 基因转录位点

(a), (b) 示经改进的 NAMA-Ur DNA 特异染色方法处理的核仁, 核仁区域可区分出纤维中心(FC)及致密纤维组分(DFC), 核仁周缘 DNA 进入核仁, 在 DFC 区域延伸至 FC, 环绕 FC 排布((a)); DNA 在 DFC 区域的伸展转运是连续的, 可进入 FC 的边缘部位, 但不进入 FC 的内部((b)); N 为细胞核.
 (c) 示经 RNA/DNA 杂合体抗体标记的核仁, 转录活动的标记信号(箭头)位于 FC 的边缘和 DFC 区域; G 为颗粒成分; NAC 为核仁伴随染色质

2.3 核仁中 rRNA 基因转录位点

DNA 在转录时, 能够形成暂时的 DNA/RNA 杂合体双链结构, 我们借助于抗 DNA/RNA

杂合体抗体来选择性直接标记 rRNA 基因的转录位点, 对照实验表明该抗体标记系统具有很好的特异性。

rRNA 基因转录位点标记结果显示, 在细胞核质中, 一些 DNA 转录活动的标记信号出现在解集缩的染色质上或集缩染色质边缘部位; 在核仁中, 转录活动的标记信号位于 FC 的边缘和 DFC 区域, 而在核仁伴随染色质、颗粒成分及 FC 内部从未观察到标记信号, 因此, 鼠肝细胞核仁 rRNA 基因的转录位点应位于 FC 的边缘和 DFC 区域(图 3(c))。

3 讨论

关于核仁中 DNA 的分布位置已有不少研究报道。研究者们采用钨-胺 DNA 特异染色、DNA 抗体标记^[8]、电子显微镜原位杂交^[9]等许多实验手段对核仁中 DNA 位置进行了研究, 研究的结果是有分歧的, 争论的焦点在于 DNA 是位于 FC 还是 DFC。虽然研究者曾采用钨-胺 DNA 特异染色方法直观地观察了核仁中 DNA 分布的一些形态特征, 但钨-胺 DNA 特异染色方法比较复杂, 其应用受到了限制。近年来逐步建立起一个新的 DNA 特异染色方法, 即 NAMA-Ur^[5]。目前对这种实验方法的运用还不多见, 我们试用这种方法, 结果表明这种实验系统具有很好的 DNA 特异染色性, 可显示核仁中 DNA 分布的形态等特征, 同时显示了核仁中 DNA 来源于核仁伴随染色质。

关于核仁中 DNA 的位置, 正如 Jordan 所指出, 最有力的证据应来自直接的观察^[10]。由于以前采用 DNA 特异染色方法时(包括钨-胺法和 NAMA-Ur 法), 核仁中除 DNA 成分外都被完全漂白, 因此难以判断 DNA 分布的原位位置, 只能根据 DFC 和 FC 各自所占的区域来推测 DNA 的位置, 结果的可信度受到影响。为了解决这一问题, 我们适当修改了 NAMA-Ur 方法, 以便在超微结构的水平获得核仁中 DNA 原位位置的直观证据, 结果清楚地表明鼠肝细胞核仁中 DNA 位于 FC 的边缘和 DFC, 而 FC 内部则未见 DNA 分布。这是首次运用细胞化学方法直观地观察 DNA 在核仁中的原位位置, 与 rDNA 分子杂交以及 DNA 抗体免疫标记等实验方法相比, 这个方法更具有说服力。

定位核仁中 rRNA 基因转录位点的常用方法主要为标记物引入与追踪。郝水等人采用的电子显微镜放射自显影方法, 标记洋葱细胞核仁 rRNA 基因转录位点, 得出的结论继续支持传统的观点, 即 DFC 是洋葱核仁 rRNA 基因转录位点^[11]。然而, Thiry 和 Goessens 同样采用电子显微镜放射自显影方法研究 Ehrlich 肿瘤细胞核仁的转录位点, 发现标记信号集中于 FC, 因此, 认为 rRNA 基因转录位点应位于 FC^[3]。近年来, 常用的方法是将 BrUTP 引入细胞进行追踪标记。Hozak 等人^[12]将 BrUTP 引入到 HeLa 细胞, 无论引入时间多长, 标记信号毫无例外地出现在 DFC, 而在 FC 的内部从来没有标记信号。Meecak 等人^[13]从洋葱根尖分生组织制备原生质体, 进行渗透处理, 然后再以一定的时间梯度, 将 BrUTP 引入到核中, 结果标记信号集中于 FC 的边缘^[13]。

综上所述, 关于核仁中 rRNA 基因转录位点的研究结果是分歧和不确定的。造成这种状况的一个重要的原因是目前大多数的研究转录位点的方法还存在着缺陷, 各种标记物引入方法由于存在一个客观的引入过程和不确定性的引入时间造成实验结果尚存在疑问, 尤其是转录模板的快速延伸, 可能造成标记已经不是最初的转录位点^[8]。

针对目前研究方法存在的缺陷, 借助于抗 RNA/DNA 杂合体抗体来直接选择性标记正在

发生转录活动的 rRNA 基因就具有重要意义. 已有研究者采用 RNA/DNA 杂合体抗体对多线染色体涨泡的转录活动进行了荧光标记^[5], 我们进一步利用这种方法在超微结构水平对鼠肝细胞核仁 rDNA 转录位点进行了研究, 结果表明, 在鼠肝细胞核仁中, rRNA 基因的转录位点位于 FC 的边缘和 DFC 区域. 需要补充说明的是, 我们观察的核仁 rRNA 基因转录位点标记与 DNA 原位位置观察结果是一致的.

另外, 有研究报道认为在 FC 的边缘和 DFC 区域分布着 RNA 聚合酶 I^[14]及 RNA 聚合酶 I 转录因子^[15]等和转录密切相关的蛋白质分子, 这些实验证据和我们的研究结果一致.

参 考 文 献

- 1 Littau V C, Allfrey V G, Frenster J H. Active regions of nuclear chromatin as revealed by electron microscopy autoradiography. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1964, 52: 93~100
- 2 Scheer U, Rose K. Localization of RNA polymerase I in interphase cells and mitotic chromosomes by light and electron microscopic immuno-cytochemistry. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81: 1 431~1 435
- 3 Thiry M, Goessens G. Distinguishing the sites of pre-RNA synthesis and accumulation in Ehrlich tumor cell nucleoli. *J Cell Sci*, 1991, 99: 759~767
- 4 Shaw P J, Jordan G E. The nucleolus. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1995, 11: 93~121
- 5 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): 1 427~1 438
- 6 Rudkin G T, Stollar B D. High resolution detection of DNA/RNA hybrids *in situ* by indirect immunofluorescence. *Nature*, 1977, 265: 472~473
- 7 汪国顺, 罗文捷, 潘惟钧, 等. HeLa 细胞端粒 DNA 与核骨架的特异性结合. *中国科学, B 辑*, 1993, 23(7): 723~729
- 8 Martin M, Espina M D D, Medina F J. Immunolocalization of DNA at nucleolar structural components in onion cells. *Chromosoma*, 1989, 98: 368~377
- 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 Jordan E G. Interpreting nucleolar structure: where are the transcribing genes? *J Cell Sci*, 1991, 98: 437~442
- 11 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
- 12 Hozak P, Cook P R, Schofer C, et al. Site of transcription of ribosomal RNA and intranucleolar structure in HeLa cells. *J Cell Sci*, 1994, 107: 639~648
- 13 Meeceak I, Risueno M C, Raska I. Ultrastructural nonisotopic mapping of nucleolar transcription sites in onion protoplasts. *J Struct Biol*, 1996, 116: 253~263
- 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 Structural Biology*, 1995, 114: 1~22
- 15 Rendon M C, Rodrigo R M, Goenechea L G, et al. Characterization and immunolocalization of a nucleolar antigen with anti-NOR serum in HeLa cells. *Exp Cell Res*, 1992, 200: 393~403