

高等生物细胞微管蛋白的区域与 染色体微管的形成

倪祖梅 劳为德* 施履吉

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

在有丝分裂及减数分裂时纺锤体包含两组微管,即染色体微管或称动点微管和极间微管(或称极至极微管)。在纺锤体发生的后阶段动点微管的装配是一个基本和重要的过程。在高等生物细胞内,已知纺锤丝附着点(简称着丝点)(SFAs)作为微管组织中心在此过程内起着主要的作用。在有丝及减数分裂时远在核膜破裂之前,SFAs就可以从形态上识别出来。然而虽在整个细胞周期中细胞内均含有大量的微管蛋白,但却从未在这些生物细胞核内发现过任何微管,而且SFAs也仅在核膜破裂之后才组织动点微管。在前文中^[1],我们基于对分离核实验的结果得到的结论是:SFAs或它们的染色质在从间期到中期的任何时期内均能组织微管,可能的例外是中粒复制时期,以及SFAs组织动点微管的必要条件是:(1)微管蛋白(或微管蛋白加MAPs)的供应;(2)核膜的破裂。然而为什么核膜破裂是必要条件之一?这一点还需要进一步的阐明。对这一点可以提出各种工作假说。根据Occam Razor原理,我们采用了最简单的一种,即核膜是阻止微管蛋白进入核内的屏障。为了验证这个工作假说,我们用¹²⁵I标记了微管蛋白,把它们注射入黑斑蛙的卵母细胞的细胞质内,注射后4小时及24小时将这些卵母细胞固定并做石蜡切片。进行显微放射自显影观察。实验的细节和结果报告于后。

标记¹²⁵I组蛋白和¹²⁵I微管蛋白是根据Hunter和Geenwood的方法制备的^[2]。碘化反应停止后将混合液通过Sephadex G 50的柱,收集标记的蛋白质部分。

微管蛋白的制备曾用凝胶电泳加以鉴定,发现凝胶上有四条带,相应于HMW, α -微管蛋白、 β -微管蛋白及tau如图1所示。

标记微管蛋白制备的比活性约为 $5.97 \times 10^6 - 2.87 \times 10^7 \text{cpm}/\mu\text{g}$ 蛋白质。定量采用Lawry氏法以牛清蛋白质作为标准。标记组蛋白的比活性则约为 $2.0 - 8.9 \times 10^6 \text{cpm}/\mu\text{g}$ 蛋白质。

微注射方法相同于我们用于其他研究的^[3]。本研究采用了黑斑蛙两年生卵母细胞,主要由于它们易于作石蜡切片。这些卵母细胞取得后置于Barth氏液内待用。每个卵母细胞注射体积约为32.5—98nl,注射在细胞质内。注射管蛋白和组蛋白的计数分别为3300—14400和1000—6300cpm。注射后的卵母细胞置于Barth氏液内直至被固定为止。注射卵母细胞分别在注射后4和24小时用Bouin氏液固定。固定时数为24小时。此后用5%福尔马林洗涤、脱水、包埋并切片。所用的放射自显影法是常规的。曝光时间为3—4周。

从本实验所得之结果是清楚的。注射的组蛋白不仅进入卵母细胞核并且在其内堆积,有如Gurdon^[4]及Bonner^[5]所报告的。图2是注射标记组蛋白24小时后所得之卵母细胞切片的放射自显影。反之,注射标记微管蛋白及微管随同蛋白后虽经24小时,这些微管蛋白和微管随同蛋白仍旧停留在细胞质内。图3及图4分别为注射标记微管蛋白和微管随同蛋白4和24

本文1982年4月8日收到。

* 劳为德为中国科学院生物物理研究所借调我所工作人员。参加本工作的同志尚有陆雅琴和朱亚两同志。

小时后的卵母细胞切片的放射自显影。这些图片首先清楚地说明注射的微管蛋白及 MAPs 是不能进入卵母细胞核的。这并不是注射操作的人为结果,因注射的组蛋白是可进入核内的。对

核膜来说,微管蛋白及 MAPs 是不能渗透的。

核膜对微管蛋白的不可渗透性,指出了在高等生物中因为所有的蛋白质都是在细胞质内合成的,微管蛋白在其被合成后都停留在细胞质内。换言之,微管蛋白质是被区域化在细胞

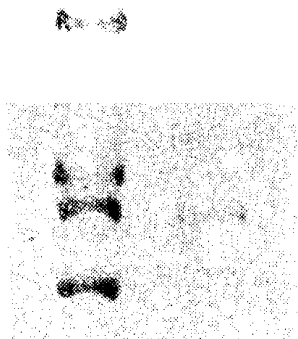


图1 注射用微管蛋白质的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱
a. 微管蛋白质; b. 小牛血清清蛋白



图2 一个二年卵的切片
该卵的细胞质内已注入标记组蛋白,于注射后 24 小时固定,多数银粒存在于核内

质内而在细胞核内是没有这种蛋白质的。此结论可以从分离的 *Xenopus* 卵母细胞质和核的直接生化分析得到支持。De Robertis, Longthorne 及 Gurdon^[6] 用双相凝胶电泳分析发现,微管蛋

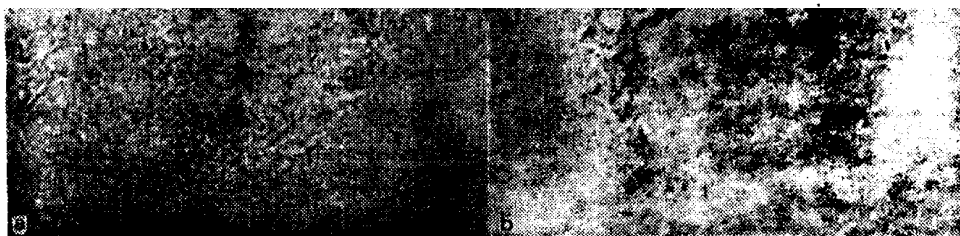


图3 一个二年卵的切片
该卵的细胞质内已注入标记微管蛋白质,于注射后 4 小时固定,银粒仅发现于细胞质内。
a. 该切片的相差显微镜照相; b. 同一切片的普通光学显微镜照相



图4 一个二年卵的切片
该卵的细胞质内已注入标记微管蛋白质,于注射后 24 小时固定,银粒仅发现于细胞质内。
a. 该切片的相差显微镜照片; b. 同一切片的普通光学显微镜照片

白存在于细胞质内而在核内则不能觉察其存在。近年来,间接荧光免疫研究^[7]也有利于现在的结论,但是由于在整个细胞的染色制片中核内外的上部结构蒙盖着下面的结构,故还不是很结论性的。然而总的讲来,它们显示出细胞核并不被抗微管蛋白抗体所结合。

我们的微管蛋白制备物包含着 MAPs。所以现在结果也指明 MAPs 也是被细胞区域化在细胞质内的。这结论也为间接荧光免疫结果所间接地支持。抗纯化的 Tau 或 HMWs 的抗体也结合抗纯化微管蛋白抗体所结合的同样细胞质纤维网状结构。这些研究提示在细胞内这些蛋白质是追随微管而定位的。更有,用我们制备的含有 MAPs 的微管蛋白获得的抗体并不与核结合(汪堃仁等未发表)^[8]。这结果也支持上述的结论。因此我们可以作出结论说,在高等生物的核内既无微管蛋白也无 MAPs。

核膜对这些蛋白质的不可渗透性并不单单由于它的功能性孔径大小的原因。微管蛋白质是 α -微管蛋白和 β -微管蛋白组成的杂合二聚体,其分子量是 110,000 道尔顿,而 Tau 蛋白的则是 55,000 至 62,000 道尔顿。这些蛋白质的分子量均小于 Bonner^[9] 及 De Robertis 等^[6] 所报告能进入核的一些蛋白质的。然而 HMWs 中有些是很大的。Keates 和 Hall 报告^[10]一种 HMW 的分子量高达 360,000 道尔顿。

核膜对微管蛋白及 MAPs 的不可渗透性,这一发现解答了我们在前文中提出的问题。这就是为什么在体外及活体内核膜破裂是 SFAs 或其染色质形成动点微管的必要条件之一。SFAs 在分离的完整核或在前中期核膜破裂之前,不能组织动点微管是由于在核内没有微管蛋白(或微管蛋白加 MAPs 即是当动点微管的形成需要 MAPs 时)作为它们工作的底物。核膜的破裂给予 SFAs 一个机会能和存在于溶液内或区域化在细胞质内的微管蛋白(或微管蛋白加 MAPs)起反应。高等生物细胞核内微管蛋白(或微管蛋白加 MAPs)的缺如,也解释了为什么在前中期以前核内虽具有 SFAs 或它们的染色质而没有可见的微管。

在高等生物的有丝分裂和减数分裂中有两套微管,即染色体微管或称动点微管及极间微管是列入纺锤体形成程序中的。我们的发现对动点微管的形成有一些帮助。显然细胞是用核膜作为“有或无”开关活门来控制染色体微管形成的。当核膜破裂时活门打开,对 SFAs 供应微管蛋白(或微管蛋白加 MAPs)。因而染色体微管得以形成。当核膜完整时提供给 SFAs 的这种供应中断,而染色体微管就不能形成。在纺锤体形成过程中 SFAs 对染色体微管的组装是核膜的破裂起动的。并且是完整核膜的形成切断了对 SFAs 供应微管蛋白(或微管蛋白加 MAPs)。后者也是我们发现的一个不可避免的结论。而在这种关系中仍有些细节有待探究。用我们所用的微管蛋白质内都带有 MAPs,它是否是 SFAs 组织微管所必需,也还需要回答。

参 考 文 献

- [1] 严绿昌、施履吉,本刊本期, 431—433.
- [2] Hunter, W. M. & Greenwood, F. O., *Nature*, 1962, 194—495.
- [3] Sze, L. C. et al., *Scientia Sinica*, 24(1981), 402—406.
- [4] Gurdon, J. B., *Proc. R. Soc. Biol.*, 176(1970), 303—314.
- [5] Bonner, W. M., *J. Cell Biol.*, 64(1975), 421—430.
- [6] De Robertis, E. M., Longthorne, R. F. & Gurdon, J. B., *Nature*, 272(1978), 254—256.
- [7] Raff, E. C., *Internat. Rev. Cytol.*, 59(1979), 1—96.
- [8] Wang, K. R., *Personal Communication*, 1981.
- [9] Bonner, W. M., *J. Cell Biol.*, 64(1975), 431—437.
- [10] Keates, R. A. B. & Hall, R. H., *Nature*, 1975, 257: 418—420.