

- 677-680.
- [12] Van der B. et al., 1992, *Biochem Biophys Acta.*, **1125**:110-112.
- [13] Van der B. et al., 1992, *EMBO J.* **11**:2495-2501.
- [14] Karoly L. et al., 1996, *Mol Pharmacol.*, **50**:616-623.
- [15] Moolenaar W. H. 1995, *J Biochem.*, **270**:12949-12952.
- [16] kozma R. et al., 1997, *Mol Cell Biol.*, **17**(3):1201-1211.
- [17] Hotsberg F. W. et al., 1997, *J Neurochem.*, **69**:68-75.
- [18] Schulze C. et al., 1997, *J Neurochem.*, **68**:991-1000.
- [19] Tokumura A. et al., 1978, *Lipiols.*, **13**:572-574.
- [20] Tokumura A. et al., 1995, *Mol pharmacol.*, **90**:96-102.
- [21] Tokumura A. 1995, *Prog Lipid Res.*, **34**:151-184.
- [22] Tigyi G. et al., 1995, *Am J Physiol.*, **268**:H2048-2055.
- [23] Tokumura A. et al., 1994, *Am J physiol.*, **267**:c204-210.
- [24] Seewald S. et al., 1997, *Atherosclerosis*, **130**:121-131.
- [25] Natarajan V. et al., 1995, *J Lipid Res.*, **36**:2005-2016.
- [26] Inoue C. H. et al., 1995, *Circ Res.*, **77**:888-896.
- [27] Frederique Galls. et al., 1997, *Nephrol Int.*, **151**:1022-1027.
- [28] Hii CST. et al., 1994, *Biochem J.*, **1303**:475-479, **151**:1022-1027.
- [29] Einspahr K. J. et al., 1988, *J Cell Biol.*, **107**:529-538.

纤毛虫大核分化过程中 DNA 的重组

谭明

(中山大学生物学系 广州 510275)

*梁爱华

(山西大学生物工程室 太原 030006)

纤毛虫有大核和小核两种细胞核。小核为二倍体,它在有性繁殖过程中起着保存和传递遗传信息的作用。与此相反,大核由多倍体染色体组成,它负责细胞无性繁殖时基因的转录与表达。细胞配对后,原来的大核逐渐退化,新的大核由小核合子核分裂产物之一发育而来。这时,核内的 DNA 进行一系列的重组(reorganization),包括小核染色体的断裂、间隙片段的删除、大核特定序列的扩增以及在大核染色体前体的两端加上端粒^[1]。下毛类(hypotrichia)纤毛虫的大核染色体甚至只由单个基因组成,并且大核基因组也只有小核基因组的 5%—10%^[2]。下面我们将着重介绍和讨论大核分化过程中间隙片段的删除以及 DNA 重新排列方面的研究进展。

一、DNA 删除与重排的类型

纤毛虫大核分化过程中的 DNA 删除与重

排有三种类型。最早发现和进行研究的是小核染色体的断裂(chromosome fragmentation)现象, DNA 内切酶识别小核染色体中的断裂信号序列,并将该处附近的 DNA 链切开,断裂处一侧通常是未来大核染色体的末端,另一侧是小核基因之间的间隔序列(spaces),小核 DNA 断裂的程度在各类纤毛虫中有所不同,也与该纤毛虫的大核染色体的大小有关。比如,下毛类纤毛虫的小核 DNA 中有大约 40,000 断裂部位,而四膜虫(*Tetrahymena*)小核基因组里只有 50—200 个这样的断裂部位。染色体断裂的结果是形成了许多较短的片段,在端粒酶(telomerase)的作用下,端粒被加到这些片段的两边,从而形成大核染色体(图 1A)。第二类 DNA 删除与重排的类型是间隙片段的删除。间隙 DNA 片段以很大的数量出现在小核 DNA 中,在大核分化过程中被删除,它们在小核中似乎只起填充作用,由此被

*联系人。

称为间隙片段(interstitial segments 或 internal eliminated segments)。间隙 DNA 片段被删除后,原来接在间隙片段两侧的序列则相互连接,成为大核染色体的序列(图 1B),这些序列被命名为大核特定序列(macronuclear destined segments)。最近,人们又在下毛类纤毛虫中观察到另一种 DNA 片段的删除和连接方式。某些基因,例如一种尖毛虫(*Oxytrichanova*)的肌动蛋白基因,其对应于大核染色体的小核 DNA 序列不但被间隙 DNA 分隔,而且它们的大核特定片段的顺序和方向也不一样^[3](图 1C),就是说,在大核的分化过程中,这种所谓的“scrambled”基因不但要删除它们的间隙片段,而且要通过某种机理连接那些大核特定序列,使得由此产生的大核基因具有正确的可读框,以表达具有正常功能的蛋白质。

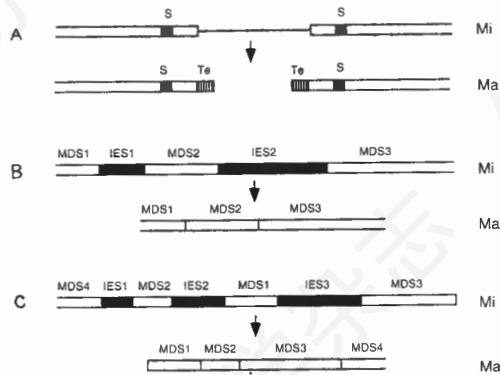


图 1 大核发育过程中 DNA 删除与重排的三种类型

根据 Klobutcher 和 Herrick^[2]稍作改动。空长方形表示大核特定序列,单线和黑长方形表示小核间隙片段。A. 小核 DNA 断裂形成两条大核染色体末端;B. 间隙片段的删除;C. “scrambled”基因重新组织形成大核染色体。Mi=小核, Ma=大核, S=断裂信号序列, Te=端粒, MDS=大核特定序列, IES=间隙片段。详见正文。

二、间隙 DNA 片段的序列特点

纤毛虫中的间隙 DNA 片段大致可以归纳为两类,即短间隙片段和长间隙片段。短间隙片段一般不超过 600 碱基对,序列之间没有同源

性,在小核里它们以低拷贝数存在。长间隙片段长达数千碱基对,并以很高的拷贝数存在于小核基因组中,它们通常具有转座子特性,可以移动。间隙片段的共同特点是 AT 碱基含量很高(70%以上),两翼为 2—19 碱基对组成的相同序列^[4-5]。此外,各类纤毛虫的间隙片段也有自己的特性。

1. 下毛类纤毛虫的间隙片段 下毛类纤毛虫的短间隙片段长度在 7—598 碱基对,迄今为止,在所有已经详细分析的小核基因里,都观察到短间隙片段,而且通常有多个,基于这些已知数据,Prescott 和 Dubois^[4]用外推算法(extrapolation)估计,在尖毛虫中大约有 200 000 个间隙片段在大核发育过程中被删除。下毛类纤毛虫的短间隙片段序列里没有明显的可读框。比较已知的短间隙片段未能发现它们之间有显著的同源性,Ribas-Aparicio 等^[6]以间隙片段作为探针未能通过杂化实验找到任何同源的序列,提示这些短间隙片段是些随机而且独特的序列。除一种游仆虫 *Euplotes. crassu* 外,这些间隙片段的两翼都是一对 2—19 碱基对组成的相同序列,这一对序列中的一个最后保留在大核基因内,另一个则连同间隙片段一起被删除。在游仆虫中,目前已经分析的间隙片段的两翼都是二联体核苷酸 TA。这些间隙片段两翼的相同序列在间隙片段的删除过程中可能起着重要的作用。

下毛类纤毛虫的长间隙片段是目前研究较多的领域之一,这类间隙片段常包含有可移动的转座成分(transposable elements),它们在小核的拷贝数通常高达数千,而且常有保守的可读框。它们的两翼是由 2—3 碱基对组成的短的不同序列。比如,在尖毛虫中发现的 TBE1 (telomere-bearing element 1)片段长约 4000 个碱基对,两端是相同的三个核苷酸 ANT,它以约 2000 个拷贝数存在小核基因组,而在大核的发育过程中则全部被删除^[7-8]。在这个片段里,人们找到五个较大的可读框,其中之一所编码的蛋白质和其他生物的转座酶有很高的同源

性,而且它们都有一个保守的模式,一个由酸性残基簇组成的 Asp-Asp-35-Glu (D-D-35-E 模式),这个模式构成转座酶活性中心的镁离子作用位点^[9]。这些资料说明 TBE1 本身是个转座子(transposon),它编码转座酶的事实也为我们探讨间隙片段的删除机理提供一个很好的思路和旁证,因为迄今分析的 D-D-35-E 转座酶通常都通过所谓“剪切-粘贴”(cut-and-paste)来进行 DNA 链的删除和转移^[10-11]。

2. 草履虫(*Paramecium*)的间隙 DNA 片段 尽管人们对草履虫已进行了许多研究,但对这种原生动物的在大核分化过程中 DNA 重组的分析才刚刚开始,至今已分析的 21 个间隙片段都来自一个编码细胞表面固定抗原(i-抗原)的多基因家族中的六个成员^[2],这些间隙片段长度在 28 到 882 碱基对之间,其中五个的长度是 28 碱基对,提示这个长度可能是草履虫的间隙片段被有效删除的最小长度^[12],像游仆虫一样,所有已知的草履虫的间隙片段的两翼均为二联体核苷酸 TA,这可能意味着,这两种纤毛虫以相似的方式删除间隙片段,与这个假定相符的结果还来自对已知草履虫间隙片段两端序列的统计^[12],由此推导出的两端保守序列 TAYAGYNR 与游仆虫 Tec 转座子的对应序列很相似。到目前为止,尚无关于草履虫转座子方面的报道。

3. 四膜虫的间隙 DNA 片段 迄今已分析的四膜虫的间隙 DNA 片段相对较少,从现有的资料看,所有的间隙片段都位于大核基因的非表达段,它们的 AT 碱基含量也较高,但没有显著的可读框,彼此之间也没有明显的同源性,它们的两翼为 4—8 个核苷酸组成相同序列^[2,12]。目前尚无明确的实验结果证明,在四膜虫小核中有高拷贝数的类转座子片段的存在。

三、DNA 删除与重排的机理

从分子水平上去理解纤毛虫间隙片段的删除机理显然是一件很有意义的事情,因为它可

以提供一定数据让我们去理解间隙片段的起源。对间隙片段删除机理的详细理解需要建立在体外重建的删除反应上,可惜迄今尚无这样的资料。通过对删除产物和中间态(intermediate form)分子的观察,已为我们对删除机理的探讨提供了许多有用的证据。此外,删除过程所必须的反式作用因子(trans-acting factors)最近也被发现,基于这些资料,研究者们提出了几个模型,其中较为人们所接受的模型是所谓转座子环状模型,下面我们讨论目前人们对这一机理的理解。

许多实验表明,纤毛虫的间隙片段在被删除时形成游离的环形结构。例如 Tausta 等^[13]设计一种 PCR 方法,用来测定细胞核中环形的 DNA 片段,结果他们只能在大核发育的一定时期测到预期大小的 PCR 产物,说明这种环形的 DNA 片段只出现在间隙片段删除期。游仆虫的 Tec 成分(也是一个间隙片段)以较高的拷贝数存在,由此在大核的分化过程中,游离的环形片段甚至可以在琼脂糖凝胶中通过非啉嗅红染色而直接被观察到^[14,15]。根据这些资料,一个所谓的转座子环状模型被提了出来^[16,17](图 2)。根据这个模型,小核 DNA 在间隙片段的两侧首先被切开(图 2A),在切口处,一条链在二联体核苷酸 TA 的内侧被切开,另一条链则在 AT 外侧第八个核苷酸处被切开。这样,在切口处形成一个 10 个核苷酸长的单链突出末端。此后,大核特定序列的一对末端以 TA 碱基配对为基础接合(图 2B 左),接口处的其余间隙通过序列复制来填充(fill in)和连接(ligase,图 2C 左)。另一方面,被切开的间隙片段的单链突出末端的 6 个碱基叠在一起(图 2B 右),尽管这些碱基通常并不能进行配对,在特定酶的作用下,重叠处的间隙被填充和连接,这样便形成了一个游离的环形间隙分子(图 2C 右),其中接口处中间的 6 个碱基构成异源双链(heteroduplex)。这个模型可以解释迄今所获的大部分实验结果。在下毛类纤毛虫如棘尾虫(*Stylonychia*)、尖毛虫中,间隙片段的两端大部分都

有较长的相同序列(4—9 碱基对^[4]),这样,它们被删除的机理更适用上述模型来解释,因为较长的重复序列本身可形成切割部位,而切割后形成的互补粘性末端使得大核特定序列之间,以及间隙片段之间更容易通过碱基配对而连接,从而避免异源双链,提高效率。在“scrambled”基因内,间隙片段两端的重复序列更长,可达9—19 碱基对,它们是同向重复或者是反向重复,取决于大核特定序列的位置和方向,较长的重复序列显然提供更多有用的信息,使得这些基因通过重复序列的同源重组(homologous recombination),将间隙片段删除的同时,把小核中按非正常顺序排列的大核特定序列引导为方向正确的排列。

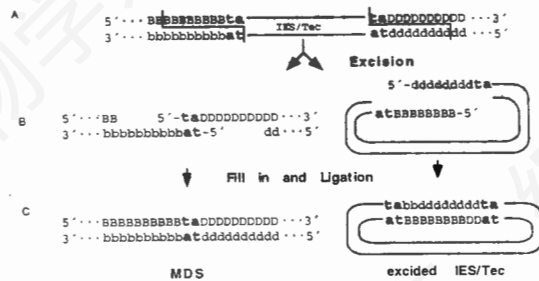


图2 间隙片段删除模型

根据 Klobutcher 和 Herrick^[2]稍作改动,详细说明见正文。

四、结束语

人们在分子水平上对纤毛虫大核分化过程中基因组重组的研究时间相对较短,所得的实验结果主要来自下毛类纤毛虫的棘尾虫、尖毛虫和游仆虫,部分来自四膜虫和草履虫。由于迄今为止积累资料有限,对这个领域里的许多基本问题,目前尚未能解答,因而积累基本数据,尤其是积累其他科种纤毛虫的基因在大核分化过程中的重组的资料,在今后一段时间内仍然很必要。其次,上面提到的关于 DNA 的删除由转座子编码的酶所催化的假设需要更深入的证明。另外,进一步分离和分析 DNA 删除过程的中间体,也

是证明切割机理的必要前提。其他问题,例如,间隙片段的起源和进化问题, Klobutcher 和 Herrick^[2]虽然提出了一个转座子的介入、扩增移位、及退化(fade)的假设,但要清楚地解答这个问题,显然还要进行更深入研究。

摘 要

纤毛虫大核分化过程中 DNA 的重组,包括小核染色体的断裂、间隙片段的删除、大核特定序列的扩增以及在大核基因的两端加上端粒。本文重点介绍和讨论了 DNA 片段删除与重排的类型、间隙 DNA 片段的序列特点,以及 DNA 删除与重排的机理。

参 考 文 献

- [1] Prescott, D. M. 1994, *Microbiol. Rev.*, **58**: 223—267.
- [2] Klobutcher, L. A. and G. Herrick, 1997, *Mol. Biol.*, **56**:1—62.
- [3] Hoffman, D. C. and D. M. Prescott, 1996, *Nucleic Acids Res.*, **24**(17):3337—3340.
- [4] Prescott, D. M. and M. L. Dubois, 1996, *J. Euk. Microbiol.*, **43**:432—441.
- [5] Prescott, D. M., 1997, *Current Opinion in Genetics & Development*, **7**:807—813.
- [6] Ribas-Aparicio, R. M. et al., 1987, *Genes Dev.*, **1**:323—336.
- [7] Herrick, G. et al., 1985, *Cell*, **43**:759—768.
- [8] Williams, K. et al., 1993, *EMBO J.*, **12**: 4593—4601.
- [9] Dyda, F. et al., 1994, *Science*, **266**:1981—1986.
- [10] Mizuuchi, K., 1992, *Annu. Rev. Biochem.*, **61**:1011—1051.
- [11] Craig, N. L., 1995, *Science*, **270**:253—254.
- [12] Klobutcher, L. A. and G. Herrick, 1995, *Nucleic Acid Res.*, **23**:2006—2013.
- [13] Tausta, S. L. and L. A. Klobutcher, 1989, *Cell*, **59**:1019—1026.
- [14] Jahn, C. L. et al., 1989, *Cell*, **59**:1009—1018.
- [15] Krikau, M. F. and C. L. Jahn, 1991, *Mol. Cell Biol.*, **11**:4751—4759.
- [16] Jaraczewski, J. W. and C. L. Jahn, 1993, *Genes Dev.*, **7**:95—105.
- [17] Klobutcher, L. A. et al., 1993, *Genes Dev.*, **7**:84—94.