

EFFECTS OF HORIZONTAL CLINOSTAT TREATMENT TO ULTRASTRUCTURE OF POTATO CELL

LIU Min XUE Huai WANG Yalin ZHANG Zan ZHANG Chunhua
(Institute of Genetics and Developmental Biology, CAS, Bei jing 100101)

ABSTRACT

Ultrastructural analysis by transmission electron microscope showed variation in Potato cell ultrastructure after the treatment of simulated microgravity. Those ultrastructural changes included plasmolysis, twist, contraction and deformation of cell walls, culvatures and loose arrangement of chloroplast lamellae, breach of mitochondria, overflow of inclusions, disappearance of cristae, and significant increase in number of starch grains per cell, etc. One week after eliminating the treatment of simulated microgravity, the variate cells return to normal on various degree.

Key words: Horizontal clinostat Microgravity Potato Ultrastructure

叶绿体分裂相关基因 *NtFtsZ2-1* 在大肠杆菌中的表达与定位*

孔冬冬^{***} 王东^{****} 胡勇^{**} 鞠传丽^{**} 何奕昆^{**} 孙敬三^{**}

(^{**}中国科学院植物研究所 100093 北京 ^{***}首都师范大学生物系 100037 北京

^{****}北京师范大学生命科学学院 100875 北京)

叶绿体是存在于植物细胞中的一种重要的细胞器。从起源上看,它来源于早期具有光合能力的原核生物和原始真核生物的内共生事件^[1,2];从分裂方式上看,它采用与细菌相同的二分裂方式,因此人们提出叶绿体和细菌的分裂过程具有相似的遗传基础^[3]。由于在光合作用中所负担的重要作用,使得有关叶绿体光合机制及其分裂机制的研究一直是人们研究的热点。近来有研究表明 *FtsZ* 基因与叶绿体的分裂过程有着密切关系^[4-6]。*FtsZ* 基因最初发现于细菌之中,是一种控制细菌分裂的关键基因。通过细菌 *FtsZ* 蛋白的同源性检索与生化分析,发现其与真核细胞骨架蛋白-微管具有相似的生化特性与结构特征^[7-9]。在大肠杆菌中当细胞分裂事件发生时,*FtsZ* 蛋白最早出现于分裂位点并聚集形成一个环状结构,进而控制原核细胞的分裂过程^[10-12]。至今在不同的真核生物中也发现了 *FtsZ* 基因的存在,并且通过聚类分析,可以将植物中所发现的 *ftsZ* 基因分为两个不同的家族^[13]。为了深入研究高等植物中 *FtsZ* 蛋白与原核生物 *FtsZ* 蛋白在功能上的差异,我们从烟草中克隆了 *FtsZ2* 家族基因的成员 *NtFtsZ2-1*,并将 *NtFtsZ2-1* 与绿色荧光蛋白基因构建成融合表达质粒,对其在大肠杆菌中的表达和定位进行了研究。以上也为烟草中不同 *ftsZ* 基因家族成员在质体分裂中的作用机制奠定了基础。

材料与amp;方法

1. 材料

pEGFP 质粒购自 Clontech 公司,烟草 *NtFtsZ2-1* 全长 cDNA 的克隆质粒由本室构建和保存。大肠杆菌菌株 JM109 由本室保存。实验所用植物材料为普通烟草 *Nicotiana tabacum* var. SR1。各种限制性内切酶及工具酶购自 Promega 及华美公司,RT-PCR Kit 购自 TaKaRa 公司,Gold beads 质粒提取 Kit 购自上海生工公司,DNA 序列测定由 TaKaRa 公司完成。

2. 烟草 *NtFtsZ2-1* cDNA 的克隆

取 25℃ - 28℃ 条件下培养的烟草材料 lg(16 小时光照/8 小时黑暗),按异硫氰酸胍-酚-氯仿一步法提取总 RNA。根据 GenBank 中公布的烟草 *NtFtsZ2-1* cDNA 序列(GenBank accession number AJ271750)设计了一对引物:NP5 5'-TCTAGAAACAATGGCTACTTGTACATCAGCGT-3'; NP6 5'-GGTACCGCTCTCTTGGGTAGCGTGAT C-3' 为方便后续操作分别在引物的 5' 端加上相应的酶切位点(*Xba* I 和 *Kpn* I)并在下游引物 NP6 中去除终止密码子,以便与绿色荧光蛋白基因同框翻译。RT-PCR 采用 TaKaRa RNA PCR Kit(AMV) Ver. 2.1,逆转录除采用 NP6 作为特异下游逆转

* 国家自然科学基金(批准号:GN39970356)和北京市自然科学基金(批准号:GN5992003)资助项目。

孔冬冬、王东对该论文有相同贡献。

**** 联系人。E-mail: yhe@duke.edu; sunjs@ns. ibcas. ac. cn

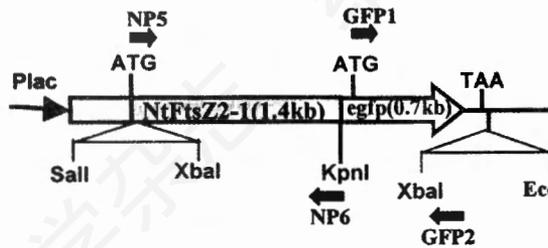
引物外,其余的操作均按 Kit 说明进行。PCR 反应条件: 94℃ 60 sec, 55℃ 40 sec, 72℃ 90sec, 共进行 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳纯化回收后, 以 *Xba* I + *Kpn* I 双酶切, 然后以无水乙醇 -20℃ 沉淀回收, 得到纯化的 *NtFtsZ2-1* 片段, 并将它克隆到 *Xba* I + *Kpn* I 双酶切的 pUC19 载体上, 转化 JM109 感受态菌, 在选择培养基上筛选转化并进行 DNA 序列测定。

3. 融合表达质粒 pKN 的构建及重组质粒的鉴定

测序鉴定的 pUC19/*NtFtsZ2-1* 重组质粒经 *Sal* I 和 *Kpn* I 双酶切后, 以琼脂糖凝胶电泳纯化回收 *NtFtsZ2-1* 片

段, 同时以 *Sal* I 和 *Kpn* I 双酶切 pEGFP 质粒, 并以无水乙醇 -20℃ 沉淀回收 pEGFP 载体。上述片段和载体连接后, 经筛选得到融合表达的 pKN 重组质粒(图 1)。将重组质粒 pKN 转化到大肠杆菌 JM109 中进行表达, 分别以 PCR 扩增和酶切方法对重组质粒 pKN 加以鉴定。PCR 扩增使用的分别为 *NtFtsZ2-1* 和 EGFP 的特异引物, 其序列见图 1。同时以 *Sal* I 和 *Kpn* I, *Kpn* I 和 *EcoR* I, *Kpn* I 及 *Xba* I 三种组合对重组质粒进行酶切鉴定。

4. 融合表达质粒 pKN 在大肠杆菌 JM109 中的表达及对照体系的建立



PCR primer sequence:

NP5: 5'-TCTAGAAACAATGGCTACTTGTACATCAGCGT-3'

NP6: 5'-GGTACCGCTCTTGGGTAGCGTGATC-3'

GFP1: 5'-GCTCTAGAGAGTAAAGGAGAAGAAGT-3'

GFP2: 5'-GGCGAGCTCTTATTGTATAGTTCATC-3'

图 1 融合表达质粒 pKN 的物理图谱

将转化有融合表达质粒 pKN 的大肠杆菌 JM109 在选择培养基上划线 (*Amp*^r 80ug/ml) 培养后, 挑取单菌落于液体培养基中 37℃ 摇培过夜, 次日以 1/100 比例取过夜培养物分别接种于含有 0 mmol/L 和 1 mmol/L IPTG 的 LB 液体培养基中 (*Amp*^r 80ug/ml), 在 37℃ 摇培 4 小时; 同时对转化有 pEGFP 质粒的大肠杆菌 JM109 做同样的处理, 最终以 1 mmol/L 的 IPTG 加以诱导以作为融合表达质粒 pKN 的对照体系。

5. 大肠杆菌 JM109 转化菌体形态的显微观察

(1) 复红染色 将转化有外源质粒的大肠杆菌 JM109 过夜培养物划于载玻片上, 并以酒精灯加热固定菌体, 滴加复红染料于室温染色 1min, 然后用清水冲击多余的复红染料, 压片镜检。

(2) 荧光观察 将转化有外源质粒的 JM109 过夜培养物与等体积预热的 0.5% 低熔点琼脂糖混匀后滴于无荧光载片上, 压片后采用蓝光激发和标准滤光片进行镜检。

上述显微观察均采用 Leica DMRE 型多功能显微镜。荧光图象通过 Leica DC200 Digital camera 采集, 菌体染色通过 Leica MPS60 自动照相系统, 用 Kodak ISP200 胶卷记录结果。

6. 烟草 *NtFtsZ2-1* 基因的序列和分子谱系分析

NtFtsZ2-1 序列通过 blast 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) 对 GenBank 的 NR 数据库进行序列同源性检索, 利用 CLUSTAL W1.7 进行序列对齐, 并通过 Neighbor-joining 方法对 *NtFtsZ2-1* 基因在进化中所处的地位进行了分子谱系分析。

结 果

1. 烟草 *NtFtsZ2-1* cDNA 的克隆

以烟草叶片的总 RNA 为模板, 利用 NP6 特异下游引物作逆转录, 反应完成后取 5ul 逆转录产物为模板, 进行随后的 PCR 扩增, 产生约 1.4kb 的单一产物。将此带回收纯化后经 *Xba* I + *Kpn* I 双酶切并克隆到相同酶切过的 pUC19 载体上, 然后转化大肠杆菌 JM109, 筛选重组质粒并对重组质粒中的 *NtFtsZ2-1* 片段进行序列测定。经测序结果比对确证。除将终止密码子 TAA 改为 GTA 外, 其余碱基序列与 GenBank 中公布的 *NtFtsZ2-1* 序列完全一致。

2. 融合表达质粒 pKN 的构建与重组质粒的鉴定

融合表达质粒 pKN 构建的物理图谱如图 1 所示, 分别以酶切和 PCR 方法对其进行鉴定。该质粒经 *Sal* I + *Kpn* I 双酶切后, 琼脂糖凝胶电泳显示有约 1400bp 的片段出现, 同时以 *NtFtsZ2-1* 特异引物进行 PCR 扩增后, 在相应大小的位置也有单一扩增条带出现, 说明融合表达质粒中含有 *NtFtsZ2-1* cDNA 的插入片段(图 2, lane 5, lane 6)。该质粒经 *Kpn* I + *EcoR* I 双酶切后, 琼脂糖凝胶电泳显示有 700bp 的条带(图 2, lane 4); 而用 *Xba* I 单切能产生 2100bp 的条带(图 2, lane 2), 同时分别以 EGFP 的特异引物及 *NtFtsZ2-1* 的特异上游引物和 EGFP 的特异下游引物进行 PCR 扩增后, 均在相应大小的位置有单一扩增条带出现(图 2, lane 3, lane 1), 表明 *NtFtsZ2-1* cDNA 片段已按预期方向插入到 pEGFP 中, 即 *NtFtsZ2-1* cDNA 与 *egfp* 基因构建成融合表

达质粒,并在 Lac 启动子的控制下表达长约 2.1kb 的融合基因。

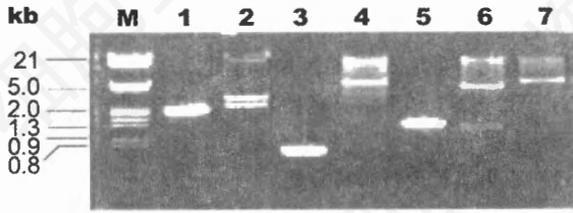


图 2 融合表达质粒 pKN 的酶切及 PCR 鉴定图谱

1. *NtFtsZ2-1* 特异上游引物与 *egfp* 特异下游引物的 PCR 扩增;2. *Xba* I 单酶切;3. *egfp* 特异引物的 PCR 扩增;4. *Kpn* I + *EcoR* I 双酶切;5. *NtFtsZ2-1* 特异引物的 PCR 扩增;6. *Kpn* I + *Sal* I 双酶切;7. *Kpn* I 单酶切;M. λ DNA/*EcoR* I + *Hind* III 双酶切 Marker.

3. 融合表达质粒 pKN 对大肠杆菌 JM109 菌体形态的影响

将转化有融合表达质粒 pKN 的大肠杆菌 JM109 在选择培养基上划线培养后,挑取单菌落于液体培养基中,37℃ 摇培过夜,次日以 1/100 比例取过夜培养物分别接种于含有 0 mmol/L 和 1 mmol/L IPTG 的 LB 液体培养基中(Amp^r 80ug/ml),在 37℃ 摇培 4 小时,诱导融合蛋白 *NtFtsZ2-1*:EGFP 的表达。同时,对转化有 pEGFP 质粒的大肠杆菌 JM109 做同样的处理,并以同样浓度的 IPTG 诱导绿色荧光蛋白 EGFP 的表达。以建立融合表达质粒 pKN 的对照体系。分别取未经 IPTG 诱导的 pKN 转化菌和以 1 mmol/L IPTG 诱导的 pKN 转化菌及 pEGFP 转化菌以复红染色镜检,观察宿主菌的形态

变化。以 pEGFP 质粒转化的大肠杆菌 JM109,在 IPTG 诱导前后菌体没有发生明显变化;而以融合表达质粒 pKN 转化的大肠杆菌 JM109,在 IPTG 诱导前后菌体形态发生了明显变化,使用 1 mmol/L IPTG 诱导的宿主菌菌体明显伸长形成丝状菌体(图 3, CD),这与大肠杆菌中 *ftsZ* 突变体表型类似^[14]。实验结果说明 *NtFtsZ2-1* 基因的表达影响了大肠杆菌的正常分裂过程。

4. 融合表达质粒 pKN 在大肠杆菌 JM109 中的荧光观察与定位分析

分别取未经 IPTG 诱导的 pKN 转化菌和 pEGFP 转化菌以及 1 mmol/L IPTG 诱导的 pKN 转化菌和 pEGFP 转化菌与等体积预热的 0.5% 的琼脂糖混匀后滴于无荧光载片上,压片后采用蓝光激发和标准滤光片进行荧光观察。经蓝光激发后,转化有 pEGFP 质粒的大肠杆菌 JM109 菌体发出绿色荧光,而且外加 IPTG 诱导前后菌体形态没有发生明显变化(图 3, E, F);与之相比,转化有融合表达质粒 pKN 的大肠杆菌 JM109 菌体形态在 IPTG 诱导前后发生了明显的变化,未以 IPTG 诱导的菌体形态大小与正常菌体基本一致。而以 1 mmol/L IPTG 诱导的菌体则表现出明显增大(图 3, G, H)。以上现象说明 *NtFtsZ2-1*:EGFP 融合蛋白在 IPTG 的诱导下大量表达,进而显著抑制了宿主菌正常的细胞分裂过程,从而形成了分裂异常的丝状菌体,这一现象与用 GFP 标记的内源 *FtsZ* 蛋白在大肠杆菌中的过量表达结果相似^[14]。

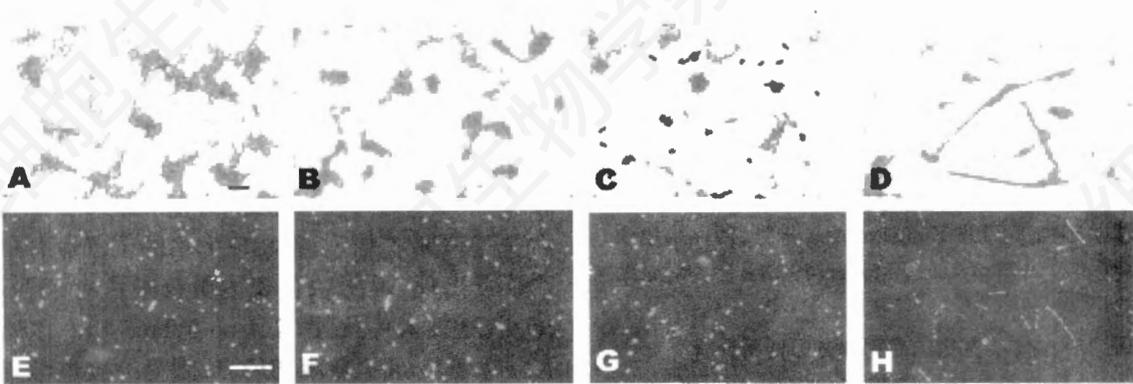


图 3 融合表达质粒 pKN 在大肠杆菌 JM109 中的染色与荧光观察

A、B、E、F:转化有 pEGFP 质粒的大肠杆菌 JM109;C、D、G、H:转化有 pKN 质粒的大肠杆菌 JM109;A、C、E、G:未加 IPTG 诱导的转化菌 JM109;B、D、F、H:以 1 mmol/L IPTG 诱导的转化菌;A、B、C、D:转化菌的复红染色观察;E、F、G、H:转化菌的荧光观察(图中标尺为 2 μ m)。

融合表达质粒 pKN 经 1 mmol/L IPTG 诱导后,在宿主菌中大量表达,并严重干扰了宿主菌自身

正常的细胞分裂周期,致使宿主菌体形态发生了明显的伸长。通过荧光观察发现,沿宿主菌菌体纵轴

方向有规律地分布着荧光点或荧光带(图3H),我们推测这些荧光聚集的区域可能是宿主菌中潜在的分裂位点。以上实验结果表明,烟草 NtFtsZ2-1 蛋白能够识别宿主菌中分裂位点的定位信号,并且可以与宿主菌中的内源蛋白相互作用而参与分裂装置的组成,在分裂位点聚集,从而在这些区域形成了荧光点或荧光带;同时,外源 NtFtsZ2-1 蛋白的过量表达也严重干扰了宿主菌的正常分裂过程。

讨 论

真核生物 FtsZ 蛋白是第一个鉴定出的叶绿体分裂相关的基本蛋白^[3,5]。由于细菌与叶绿体采用相似的分裂方式,因而在分裂过程中 FtsZ 蛋白可能行使相似的功能。在细菌分裂时,FtsZ 蛋白单体能够在分裂位点聚集而组成一个环状结构,从而控制细菌的分裂活动^[9-11]。近年来,人们通过对高等植物及某些藻类的电镜观察中也发现在质体的收缩区域存在着一种电子密度物质组成的环状结构^[15,16]。这暗示在真核生物叶绿体的分裂过程中可能遵循类似于原核生物的分裂机制。但是,与细菌中不同的是,真核生物中的 ftsZ 基因并不是单拷贝存在的,而是分为两个不同的家族^[13]。

为了研究真核生物 FtsZ 蛋白与原核生物 FtsZ 蛋白的相互作用及 FtsZ 蛋白在分裂过程中的作用机制。我们从烟草中克隆了 FtsZ2 家族成员 NtFtsZ2-1,将其与 EGFP 构建成融合表达质粒后,转化大肠杆菌并做了表达与定位分析。通过对转化菌体形态的显微观察,未能在转化有 pKN 融合表达质粒(表达 NtFtsZ2-1-EGFP 融合蛋白)的大肠杆菌中观察到类似于原核细胞分裂时所形成的分裂环结构。此外,我们从烟草中还克隆了 FtsZ1 家族的两个基因,他们在大肠杆菌中的荧光定位分析结果与上文报告的 NtFtsZs 的结果相似^[17],即烟草中两个家族的 ftsZ 基因均能够正确的识别宿主菌体内的分裂位点并参与其分裂过程而在分裂部位聚集形成荧光点或荧光带,同时在外加 IPTG 诱导下均可干扰宿主菌正常的分裂活动并导致宿主菌形成丝状细胞,说明烟草中不同家族的 ftsZ 基因与大肠杆菌的 ftsZ 基因在维持正常的细胞分裂过程中所担负的功能是相似的。另一方面,上述实验结果也说明,真核生物中 ftsZ 基因数目的增加以及不同 ftsZ 基因家族的分化都预示着作为内共生起源的叶绿体的分裂机制将是一个更加复杂的问题。本文的研究

工作为叶绿体乃至整个质体分裂机制的深入研究奠定了扎实的基础。

摘 要

FtsZ 蛋白在细菌的分裂中担任着重要作用,能够在分裂位点形成一个环状结构而控制细菌的分裂过程。胞内 FtsZ 蛋白浓度的明显降低或异常升高均可阻断正常的细胞分裂过程进而导致丝状菌体的产生。我们为了研究烟草 FtsZ 蛋白与大肠杆菌 FtsZ 蛋白的异同,构建了烟草全长 ftsZ2-1 与绿色荧光蛋白 EGFP 的融合表达质粒并转化大肠杆菌 JM109。融合表达质粒的过量表达导致宿主菌形成了丝状菌体。通过荧光显微镜观察发现 NtFtsZ2-1-EGFP 融合蛋白沿着宿主菌体的纵轴方向有规律地聚集成荧光点或荧光带,说明烟草 FtsZ2-1 蛋白能够识别宿主菌内分裂位点的定位信号并参与其细胞分裂复合物的组装。

关键词:FtsZ 蛋白 融合表达 细胞分裂

参 考 文 献

- [1] Dauglas, S. E., 1998, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **8**: 655-661.
- [2] Gray, M. W., 1998, *Biochem. Cell Bio.*, **66**: 325-348.
- [3] Chaly, N., et al., 1980, *J. Cell Sci.*, **46**: 87-96.
- [4] Osteryoung, K. W., et al., 1995, *Nature*, **376**: 473-474.
- [5] Osteryoung, K. W., et al., 1998, *Curr. Opin. Plant Biol.*, **1**: 475-479.
- [6] Strepp, R., et al., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**: 4368-4373.
- [7] De Boer, P., et al., 1992, *Nature*, **359**: 254-256.
- [8] Erikson, H. P., 1997, *Trends Cell Biol.*, **7**: 362-367.
- [9] Löwe, J., et al., 1998, *Nature*, **391**: 203-206.
- [10] Lutkenhaus, J. F., 1993, *Mol. microbial.*, **9**: 403-409.
- [11] Addinall, S. G., et al., 1996, *J. Bacteriol.*, **178**: 3877-3884.
- [12] Bi, E., Lukenhaus J., 1991, *Nature*, **354**: 161-164.
- [13] Osteryoung, K. W., et al., 1998, *Plant Cell*, **10**: 1991-2004.
- [14] Ma, X., et al., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 12988-13003.
- [15] Kunitani, S., et al., 1994, *European Journal of Cell Biology*, **63**: 280-288.
- [16] Kuroiwa, T., 1998, *Int. Rev. Cytol.*, **181**: 1-41.
- [17] 王东等, 2002, *植物学报*, **44**(8).

CLONING OF CHLORPLAST DIVISION RELATED GENE *NtFtsZ2-1* AND THE EXPRESSION IN *E. COLI*

KONG Dong Dong SUN Jing San

(*Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093*)

WANG Dong

(*Institute of Life Science, Beijing Normal University, Beijing 100875*)

HU Yong JU Chuan Li HE Yi Kun

(*Department of Biology, Capital Normal University, Beijing 100037*)

ABSTRACT

The FtsZ protein plays a key role in bacterial cell division. It forms a ring structure at the site of division to control the process of division. The deficiency or production of FtsZ can block the normal cell division and lead to a filamentation of the cell. We constructed a plasmid encoding the full-length *NtFtsZ2-1* fused to enhanced green fluorescent protein (EGFP) at the C-terminal. Overexpression of the fusion protein in *E. coli* resulted in a filamentous phenotype. Fluorescence microscopy reveals the *NtFtsZ2-1*-EGFP fusion protein as regularly spaced dots or bands along the bacterial filaments. These results suggest that *NtFtsZ2-1* can recognize the signals for division site positioning in bacteria and take part in the bacterial division complexity.

Key words: FtsZ protein Fusion expression Cell division

畸形细胞生物学意义的探讨

秦启联* 李 瑄* 苗 麟* 宋宪军** 任 璐*** 丁 翠* 龚 和*

(* 中国科学院动物研究所 农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室 北京 100080

** 沈阳农业大学 沈阳 110000 *** 扬州大学农学院 扬州 225009)

畸形细胞(teratocyte)是某些膜翅目内寄生蜂中地位十分特殊的细胞,在寄主体内的寄生蜂胚胎孵化时,胚胎的浆膜(serosal membrane)同幼蜂分离,掉落并分散在寄主的血腔中,成为畸形细胞伴随整个寄生过程。到寄生后期,细胞直径一般增加5-10倍,但并不分裂^[1],只是染色体倍性增加,成为多倍体细胞^[2]。因而畸形细胞的数目不会多于从浆膜释放出来的细胞数。不同的寄生蜂有不同的畸形细胞数,具有种类的特异性^[3],变动的范围在8到900个之间。同一寄生蜂,随蜂种不同,畸形细胞在整个寄生期间,细胞数或者保持不变^[2],或者大量减少^[4]。关于畸形细胞的超微结构和生理功能已有大量的研究报道^[5,6],一般认为,畸形细胞表面大量致密的微纤毛活跃地向寄主血腔中分泌蛋白质和多肽物质,并通过这些物质影响寄主的生理,将之调整到适合寄生蜂幼蜂生长发育的状态。

我们在研究畸形细胞形态和生理功能的过程中发现,该细胞的数目和生物量有一定的生物学意义,

从侧面印证了畸形细胞的某些功能,因而对之进行了探讨。

材料与方 法

1. 昆虫的饲养

黏虫 *Pseudaletia separata* 用人工饲料饲养于16hr光周期,26±0.5℃的光照培养箱中。中红侧沟茧蜂 *Microplitis mediator* 成蜂交配后,喂饲10%的蜜糖水,在室温或4℃下,黑暗中保存。

取单头2龄或3龄的黏虫,暴露在交配过的雌蜂下,根据各实验的要求,控制雌蜂在黏虫上产卵的次数,获得含不同胚胎量的寄主,16hr光周期,26±0.5℃下饲养。

2. 畸形细胞的计数和收集

实践中发现,刚释放的畸形细胞的大小同黏虫血细胞相近,但密度较大;成熟的细胞有许多吸附在寄主脂肪体、马氏

* 本文2002年5月10日收到,9月10日接受。

国家自然科学基金项目(批准号:3987009和30000017)及中国科学院知识创新工程领域前沿项目资助。

E-mail: qinqi@panda. icz. ac. cn