

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. ioz. ac. cn

管和体壁内侧,而且有聚集的倾向。畸形细胞的这几种特性都造成用常规血球计数板计数产生很大的误差,因此,我们用拉细的毛细管,在解剖镜下逐个吸取畸形细胞,一一计数。这种计数方法虽然耗时费力,但实践表明,该方法准确有效。

幼龄畸形细胞的计数 在雌蜂产卵 32hr,蜂卵将要孵化时(产卵后约 34hr 蜂卵孵化^[6]),解剖寄主,取出胚胎,用 Ringer's 生理盐水(0.805% 和 NaCl, 0.042% 的 KCl, 0.018% 的 CaCl₂)清洗后,放入有 20 μ L Sf 900 昆虫细胞培养液(Gibco 公司)的凹玻片中,每片一个胚胎,加盖载玻片,室温下用摇床振荡培养。待幼蜂孵化畸形细胞分散后,用毛细管在解剖镜下逐个吸取计数。在显微镜下,每个寄主中随机选取 30-60 个细胞,测微尺测量细胞的直径。

成熟(6日龄)细胞的计数 受寄后 7 天(细胞约 6 日龄)的黏虫称重后,在 Ringer's 中解剖,去除幼蜂和寄主中肠。用尖嘴镊撕破寄主头壳和体壁,充分漂洗,使畸形细胞完全脱离寄主,落入生理盐水。用毛细管在解剖镜下逐个吸取计数。在显微镜下,每个寄主中随机选取 30-60 个细胞,测微尺测量细胞的直径。

畸形细胞的收集 收集畸形细胞的方法类似计数的,解剖的寄主为受寄 4 天的黏虫,此时畸形细胞为 3 日龄。解剖液和清洗液用 Sf 900 代替 Ringer's 生理盐水,以保证细胞在处理过程中保持良好状态,并且用毛细管多次转移细胞,在 Sf 900 中反复清洗,直到彻底去除寄主血细胞和其他杂物,清洗好的细胞马上用于注射实验。

3. 畸形细胞注射寄主

将 3 龄黏虫浸没在蒸馏水中 10min 使其麻醉,用拉细并标定的毛细管,吸取约 200 个畸形细胞随同 0.3 μ L 的 Sf 900,从第一对腹足之一注入黏虫体内。对照注入 0.3 μ L Sf 900。注射后,寄生用小麦叶饲养,先在黑暗中恢复 12hr,然后移入光照培养箱中饲养,观察生长情况,每日称重。

4. 畸形细胞生物量的计算

利用公式 $vpw = 4/3\pi(n \times r^3)/w$ 计算单位寄主质量含有畸形细胞的体积,其中

vpw = 单位寄主质量含有畸形细胞的体积;

π = 圆周率;

n = 每个寄主的畸形细胞数;

r = 畸形细胞的半径;

w = 寄主的质量。

结果和讨论

1. 畸形细胞对寄主生长的影响

由于收集成熟畸形细胞比较困难,工作量很大,因此每头 3 龄黏虫只注射约 200 个 3 日龄的畸形细胞,相当于 1/5 的胚胎量。从图 1 可以看出,虽然注射畸形细胞量较少,但对黏虫生长的抑制作用是明显的。如果跟踪观察注射 6 天以后黏虫的生长情况,发现处理黏虫的体重逐渐恢复,虽然发育滞后于

对照,但最终多能正常化蛹。因而畸形细胞延迟寄主发育的作用是通过减小寄主的体重来实现的。抽样解剖寄主,在寄主血腔中只能发现很少量的畸形细胞,即在注射细胞以后,寄主将逐渐“消灭”其体内的畸形细胞,最后完全消除畸形细胞的影响。

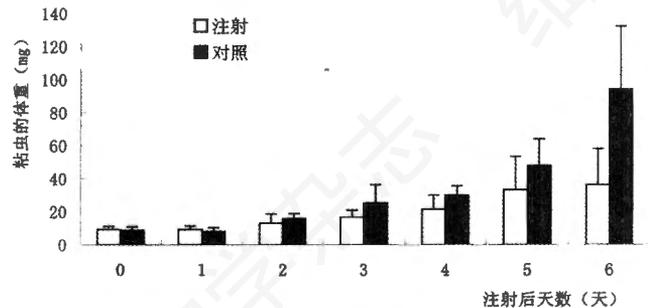


图 1 注射 3 日龄畸形细胞对 3 龄黏虫体重的影响

2. 幼龄畸形细胞的数目和大小

离体条件下,中红侧沟茧蜂幼蜂孵化后,包裹胚胎顶部和尾部的浆膜层很容易分散成单个的球状细胞,但是胚胎中部的浆膜层多不解离,细胞呈椭圆形(图 2),体内的胚胎刚孵化时也能观察到这种现象,然后逐渐分散发育成畸形细胞。此时细胞 930 ± 78 个,直径 $13.6 \pm 1.8 \mu\text{m}$ 。这一结果与红足侧沟茧蜂 *Microplitis croceipes* 的情况比较一致^[5,7]。

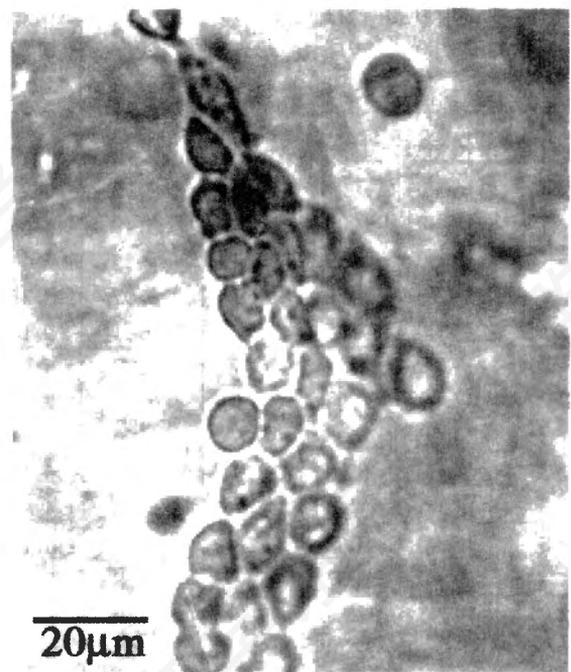


图 2 初孵时胚胎中部的浆膜不分散,呈椭圆形

3. 畸形细胞的生物量

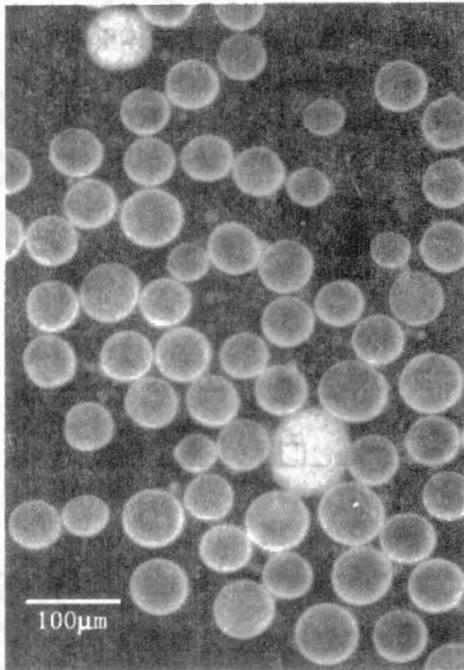


图3 5日龄的畸形细胞,示细胞大小不一

表1 寄主质量同6日龄畸形细胞数量和体积的关系

胚胎数/ 寄主	寄主质量 w(mg)	细胞数目 n	细胞半径 r(μm)	半径标准差 (μm)	单位质量 所含细胞 的体积 $\text{vpr}(10^{-3}\text{cm}^3/\text{mg})$
1	22.00	594	37.73	3.50	6.07
1	19.00	1081	30.92	3.53	7.04
1	22.00	511	39.79	4.85	6.13
1	22.00	918	32.17	2.66	5.82
1	20.00	1097	29.43	3.33	5.85
1	19.00	482	39.73	7.21	6.66
1	19.00	586	36.30	3.96	6.18
1	16.00	902	29.03	2.73	5.77
1	16.00	1009	27.77	3.19	5.65
1	18.00	1079	30.55	4.55	7.16
1	18.00	1076	29.38	3.97	6.35
1	24.00	585	36.92	6.61	5.14
2	19.00	1522	26.99	5.72	6.60
2	17.00	864	32.15	6.44	7.07
2	24.00	1406	28.65	4.00	5.77
3	24.00	1490	28.04	5.06	5.73
3	15.00	1764	22.77	4.76	5.81
3	26.00	2068	26.36	5.56	6.10
4	19.00	1607	25.22	3.78	5.68
平均	19.95	1086.37	29.86	4.50	6.14
标准差	3.12	453.83	6.54	1.32	0.55
变异系数	15.63	41.77	21.92	29.46	8.95

对于成熟的畸形细胞,前人认为每头幼蜂所产生细胞的数目和直径比较一致,变化不大^[3,7]。而

我们研究的结果表明,细胞的数目和大小在不同的寄主个体中差别很大(图3),体内畸形细胞数多的个体,细胞直径相对较小,而细胞数较少的个体,细胞直径相对较大。进一步的研究发现,单位质量的寄主含有畸形细胞的体积比较恒定(表1)。中红侧沟茧蜂的1龄幼蜂存在种内竞争的现象^[6],如果雌蜂在寄主体内产出多粒卵,孵化的幼蜂之间将进行争斗,最终只能有一头成功发育,而孵化时散落的多胎量的畸形细胞却能够在寄主血腔内继续生长。这种情况下,仍然符合单位质量的寄主含有畸形细胞的体积比较恒定的结论(表1中大于2胚胎数/寄主)。

4. 生物学意义的探讨

变异系数表示变数之间相对变异程度的大小,在数值上等于变数的标准差除以平均数后的100倍(表1的变异系数=标准差/平均 $\times 100$)。其数值越大,表示样本越不整齐,变化越大。从表1的数据看出,不同寄主个体间畸形细胞的数目变化最大,变异系数达41.77,而单位质量的寄主所含细胞的体积间变化最小,变异系数是8.95。也就是说,虽然不同寄主个体之间畸形细胞的数目(变异系数等于41.77)和半径(变异系数等于21.92)变化很大,但是单位质量寄主所含细胞的体积却非常恒定(变异系数等于8.95)。由表1的数据,至少要产生两个疑问:畸形细胞在不同寄主个体中,数目可以相差1倍以上,是什么原因导致大量的细胞“失踪”,单位质量寄主所含畸形细胞体积相对恒定的生物学意义何在?



图4 寄主体内被黑化的畸形细胞

成熟畸形细胞的减少不可能是幼蜂取食造成的。因为1胚胎量的6日龄畸形细胞的最大数目达到1,000个以上(表1),约等于初孵细胞的数目(930 ± 78 个),细胞数并没有减少。那么其他个体中细胞数目的减少一定另有原因。中红侧沟茧蜂畸形细胞的命运跟不同个体寄主的免疫功能的强弱、幼蜂生长状态或幼蜂是否存活、萼液的存在与否等因素有关^[8,9]。不同于Tanaka等^[10]和Kitano等^[11]研究的结果,我们的实验表明,成熟畸形细胞(5日龄)的匀浆液没有酚氧化酶抑制活性,而且在寄主血腔中可以观察到被包裹和/或被黑化的畸形细胞(图4)。这也就是说,在寄生周期中,寄主免疫系统可能被激活,动员浆血细胞(plasmatocytes)将畸形细胞包裹化(encapsulation),同时激活前酚氧化酶级联系统(prophenoloxidase cascade system),将被包裹的畸形细胞黑化,杀死一些畸形细胞。畸形细胞注射寄主的实验结果表明,畸形细胞能够延缓寄主的生长,降低其体重(图1),但寄主最终能够克服畸形细胞的影响而正常化蛹,并且使体内的畸形细胞大量减少。

一定量的寄主(单位质量)需要由一定量的畸形细胞(体积或质量)来“处理”或控制;或者可以认为,一定量的寄主只能供养一定量的畸形细胞。数量减少时,畸形细胞将有多余的资源(寄主的“量”)用来增大体积进行补偿;数量增加时(发生过寄生的情况),畸形细胞将没有足够的可利用资源来增大体积,只能维持较小的直径。即相对于寄主的质量,畸形细胞的生物量一直保持在比较恒定的水平,这种情形暗示了寄主和畸形细胞两者之间存在一种营养关系,而我们以前的研究表明,畸形细胞通过向寄主血腔中分泌胶原酶,打散寄主的脂肪体供幼蜂取食^[8],也反映了一种营养上的关系。

摘 要

中红侧沟茧蜂 *Microplitis mediator* 不同个体的畸形细胞在开始形成时,数目和大小比较恒定,为 930 ± 78 个,直径 $13.6 \pm 1.8 \mu\text{m}$ 。到寄生后期,不同个体间的数目和大小变化很大,其变异系数分别为 41.77 和 21.92(半径),但单位质量的寄主所含细胞的体积却相对比较恒定,变异系数为 8.95。畸形细胞注射黏虫的实验表明,畸形细胞通过降低寄主的体重来抑制寄主的发育,但寄主可以克服这种抑制作用。这些结果暗示了寄主和畸形细胞两者之间存在一种营养上的关系。

关键词: 畸形细胞 中红侧沟茧蜂 生物量
营养关系

参 考 文 献

- [1] Vinson, S. B., 1970, *J. Int. Path.*, **16**: 93-101.
- [2] Hashimoto, K., and Kitano, H., 1971, *Zool. Mag.*, **80**: 323-329.
- [3] Vinson, S. B., and Iwantsch, G. F., 1980, *Ann. Rev. Ent.*, **25**: 397-419.
- [4] Sluss, R. R., 1968, *J. Int. Path.*, **10**: 9-27.
- [5] Schepers, E. J., et al., 1998, *J. Insect Physiol.*, **44**: 767-777.
- [6] 秦启联等, 2000, *昆虫学报*, **43**: 282-285
- [7] Zhang, D., et al., 1994, *Int. J. Insect Morphol. Embryol.*, **23**: 173-187.
- [8] Qin, Q. L., et al., 2000, *J. Int. Path.*, **76**: 79-80.
- [9] 秦启联等, 2002, *细胞生物学杂志*, **24**(2): 124-127.
- [10] Tanaka, T. and Wago, H., 1990, *Arch. of Insect Biochem. Physiol.*, **13**: 187-197.
- [11] Kitano, H., et al., 1990, *Arch. of Insect Biochem. Physiol.*, **13**: 177-185.

BIOLOGICAL SIGNIFICANCE OF TERATOCYTES BIOMASS IN MEDIATING RELATIONSHIP BETWEEN PARASITOID AND ITS HOST

QIN Qi Lian* LI Xuan* MIAO Lin* SONG Xian Jun** REN Lu*** DING Cui* GONG He*

(* State Key Laboratory of Integrated Management of Insects & Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080,

** Shenyang Agricultural University, Shenyang 110000, *** Agricultural College, Yangzhou University, Yangzhou 225009)

ABSTRACT

The number and volume of neonate *Microplitis mediator* (Hymenoptera: Braconidae) teratocytes in different individual is relative steady, whose number is 930 ± 78 and the diameter is $13.6 \pm 1.8 \mu\text{m}$, respectively. In the late period of parasitism, the number and volume of the cell in different parasitoid wasp individual diversifies fiercely. The variation coefficients are respective 41.77 and 21.92(radius). However, the volume of the cell in unit host weight is relative constant, whose variation coefficient is 8.95. Injection of the terato-

cytes into the host haemocoel shows that the cells inhibit the host development by decreasing the host's weight. The results imply a nutrition relation exists between the host and the teratocytes from its parasitoid wasp.

Key words: Teratocytes *Microplitis mediator* Biomass Nutrition relation

尿激酶型纤溶酶原激活物的表达与毛囊细胞增殖关系的研究

崔志鸿 杨 恬* 曾益军

(第三军医大学细胞生物学教研室 重庆 400038)

尿激酶型纤溶酶原激活物(urokinase plasminogen activator, uPA)是丝氨酸蛋白酶家族的成员,近年来发现它与表皮细胞的增殖和迁移有关,在皮肤的发育及创伤愈合中起重要作用^[1,2],但是关于uPA在毛囊中的表达及作用尚缺乏研究。作者以前的工作发现,人和小鼠毛囊发育的早期在毛囊的外根鞘(outer root sheath, ORS)及毛母质等角质形成细胞中有uPA强表达^[3],从而推测:uPA的表达与毛囊细胞的快速增殖有关,但对此推论尚缺乏直接的证据。本实验在原有工作的基础上研究ORS细胞uPA表达与其细胞周期的关系,试图为以上推论提供有力证据。

材料和方法

1. ORS细胞的原代及传代培养

参照文献的方法进行^[4],所用毛囊来源于新生昆明小鼠的触须。

2. ORS细胞细胞周期的测定

原代及三代ORS细胞用0.25%胰蛋白酶消化为单细胞悬液,离心后用PBS(pH7.2)洗2次,分别收集 $0.5-1 \times 10^6$ 个细胞,将细胞沉淀加入70%冷乙醇中固定过夜,清洗细胞后加入含1%RNA酶的PI染色液1ml,于4℃染色30min,于B.D公司FACS Calibur型流式细胞仪上测细胞周期,激发光源为15mW氩离子激光,波长488nm,细胞周期分析软件为ModFit LT2.0。

3. 原代及三代ORS细胞uPA的免疫细胞化学染色及图像分析

将原代及三代细胞消化后,按 2×10^5 /ml接种于盖玻片(预先用多聚赖氨酸处理)上,次日取出用4%多聚甲醛固定30min, PBS漂洗5min \times 3次后用山羊抗兔ABC试剂盒(Vectastain)进行免疫细胞化学染色,所用抗体为兔抗小鼠uPA IgG,用正常山羊血清代替uPA抗体设阴性对照。在显微镜下对每一组免疫细胞化学结果随机选取5个视野,用Tiger图像分析系统对其平均积分光密度(AOD)值进行测

量,对所测数据进行Student t检验。

4. RNA抽提

参照Tripure试剂盒(Bohringer Mannheim)说明书的方法进行,分别提取原代、第一代及第三代ORS细胞的总RNA。

5. RT-PCR检测

uPA:上游引物:5'TGCCCAAGGAAATTCAGGG 3'

下游引物:5'GGCAATCTGCACATAGCACC 3'可扩增255bp片段

β -actin:上游引物:5'ATGGATGACGATATCGCTGC 3'

下游引物:5'GCTGGAAGGTGGACAGTGAG 3'可扩增1040bp片段

按RT-PCR试剂盒(Amersham Pharmacia Biotech)要求的量加入细胞总RNA 100ng,引物10pmol,及试剂盒提供的M-MuLV反转录酶及pd(N)₆反转录引物,反应总体积50 μ l,反应条件为:逆转录:42℃ 30min, 95℃ 灭活逆转录酶 5min; PCR条件:95℃ 1min, 55℃ 1min, 72℃ 1min, 共32个循环,加强延伸72℃ 10min。

反应完毕,取反应产物10 μ l,加2 μ l点样缓冲液,于2%琼脂糖凝胶中以 $0.5 \times$ TBE为电泳缓冲液以5V/cm电压电泳1h,于Bio-Rad(Gel Doc 2000)凝胶分析仪上扫描、分析、照相。

结 果

1. 不同代龄的ORS细胞的细胞周期测定

原代及第3代ORS细胞的细胞周期(表1)显示,原代ORS细胞处于增殖期的细胞较多,细胞增殖指数(proliferation index)达25.16%,第3代细胞处于增殖期的细胞数明显下降,细胞增殖指数下降到9.22%。这一数据与我们在细胞培养与传代过程中观察到的现象一致。

本文2002年4月1日收到,7月15日接受。

国家自然科学基金资助项目:No. 39870390

*通讯作者。E-mail: tianyi @163.net