

## 非细胞体系细胞核重建研究的进展

张传茂 翟中和

(北京大学生物学系 100871)

80年代中期以来,国外有几个实验室陆续建立起一项新的细胞生物学研究技术,称为非细胞体系细胞核重建或核重组(nuclear reassembly or reconstitution in cell-free systems)。它是在没有完整的细胞结构的情况下,将构建细胞核的各种“原料”及有关细胞质成份人为地混合在一起,并经过一定方式进行诱导,使混合物自发构建细胞核的一项研究技术。这项技术的建立与应用,加深了人们对细胞核重建过程的认识,如细胞核各组分的组装,各组分在组装过程中的相互作用,尤其在染色质与核膜、lamina相互关系等方面获得了在细胞体系内核重建研究所难以取得的研究成果。同时,人们应用这一技术,对重建核的生物活性和重建核对细胞周期调节因素的反应等,进行了较为深入的探讨,提出了许多重要论点。

与非细胞体系细胞核重建研究技术相对应的是一些在完整细胞水平上进行的研究技术,如在普通光镜下观察核周期的变化,在电镜下研究核周期中不同时期的细胞超微结构<sup>[1]</sup>,抗核物质抗体显微注射技术<sup>[2]</sup>,免疫荧光术<sup>[3]</sup>,等等。这些技术在细胞核重建研究中无疑地起到了重要作用。然而,非细胞体系细胞核重建研究技术不仅能够达到上述技术所能达到的效果,而且具有一系列优越性,在一定程度上能够人为地控制细胞核重建体系中核物质的种类、相互比例以及细胞核重建的进程等。因此,非细胞体系细胞核重建研究技术更加受到科学家们的重视,把它誉为80年代细胞生物学领域中的重要进展之一。

近年,我们实验室也开展了非细胞体系细胞核重建研究工作,在国内首次建立了非细胞体系细胞核重建实验模式,并利用这一模式开展了一些相关的研究,如在重建核的核骨架与lamina、核孔复合体组装与染色质组装等方面,均取得了一些初步的但又令人感兴趣的结果。

本文试图对非细胞体系细胞核重建研究的概况,并适当结合我们自己的工作体会,作一简要介绍。

### 一、非细胞体系细胞核重建研究技术的建立

1983年,Lohka和Masui在“Science”上首次报道,将去除核膜的精子染色质与蛙卵提取物一起温育,可以共同构建成雄原核。这种核不仅具有典型的细胞核结构,而且在一定条件下可以进入M期<sup>[4]</sup>。这一研究工作在国际上首次解决了用染色质诱导非细胞体系细胞核重建研究的技术问题。

同年,Forbes等人报道,将纯化的lambda DNA注射到成熟的蛙卵中,发现有含lambda DNA的细胞核形成;如果将lambda DNA与成熟蛙卵的提取物一起温育,也发现有含lambda DNA的细胞核重建<sup>[5]</sup>。这一工作首次解决了用外源纯化的DNA诱导非细胞体系细胞核重建这一重要技术问题。

上述两项工作为非细胞体系细胞核重建研究奠定了基础。同时也分别成为后来的两种非细胞体系细胞核重建研究的先导。这两种体系分别是:应用精子染色质与蛙卵提取物进行

非细胞体系细胞核重建研究和应用外源的纯化DNA与蛙卵提取物进行非细胞体系细胞核重建研究。

嗣后的数年间,人们分别对两个非细胞体系细胞核重建过程进行了较为细致的观察<sup>[6,7]</sup>。也有人通过分离提取物的组成成分,并将这些成分按不同比例混合在一起后,再进行细胞核重建实验。这一方法可以较具体地分析细胞核重建的一些中间步骤,加深了对这些成分在细胞核重建过程中作用的认识<sup>[8]</sup>。

近年,我们在参考前人工作的基础上,经过探索,不仅成功地建立了用外源的纯化DNA诱导非细胞体系细胞核重建的实验模式,获得了一些与前人相似的结果,而且还有一些新的补充,如核骨架、lamina、核孔复合体的组装等<sup>[9-11]</sup>。我们还发现,除lambda DNA外,腺病毒DNA也能诱导非细胞体系细胞核重建<sup>[12]</sup>。

除上述两种非细胞核重建体系外, Burke和Gerace(1986)也曾报道过另一种非细胞核重建体系。他们用处于有丝分裂中期的CHO细胞的匀浆物进行非细胞体系细胞核重建实验,发现在此匀浆物中也有细胞核形成<sup>[13]</sup>。这一工作则为利用培养细胞作为基本材料进行非细胞体系细胞核重建研究开辟了道路。最近,我们用中期HeLa细胞的匀浆物也已成功地建立了自己的非细胞体系细胞核重建实验模式<sup>[14]</sup>。

另外,也有人应用早期胚胎细胞的提取物进行非细胞体系细胞核重建实验<sup>[15,16]</sup>。这些工作与用蛙卵提取物进行的工作非常相似。

## 二、非细胞体系细胞核重建的物质条件

细胞核的重建首先要有物质基础(或原料)。它应该包括构成细胞核各种结构所需的物质成分,如组蛋白、非组蛋白、DNA、lamins、核膜前体物、核孔复合体蛋白等。实验证明,卵细胞所含物质成分的种类与储量基本能够满足这一特殊要求。在非洲爪蟾卵子发

生过程中,卵细胞内积累了大量的组蛋白和其他核物质;虽然没有大量的DNA贮备,但却含有DNA快速合成系统<sup>[17-23]</sup>。也有实验证明,卵细胞内贮备的物质能够在体外与DNA一起构建成染色质和完整的细胞核。1977年, Laskey等人首先制备了含有上述成分的卵细胞提取物,然后将SV 40 DNA等成分与卵提取物混合温育,结果得到了人工SV 40染色质<sup>[24]</sup>。这一实验首次解决了人工染色质构建问题,为后来进一步研究非细胞体系细胞核重建指明了方向。我们曾对卵提取物中的核物质贮备量进行了计算,发现外源的纯化DNA能平均在一个卵提取物中诱导产生 $10^3-10^4$ 个形态和结构典型的新核<sup>[9,12]</sup>。

体细胞(包括培养细胞)在有丝分裂之前也有一个核物质的积累过程。但每个亲代细胞仅积累两份核物质,经过分裂,形成两个子核。由此可见,体细胞与卵细胞在物质贮备方面是有很大差别的。

## 三、在非细胞体系中重建的细胞核具有典型的核结构

由精子染色质在蛙卵提取物中诱导重建的细胞核,在形态、结构和大小方面与雄原核没有明显差别<sup>[4,7,8]</sup>。在中期CHO细胞匀浆物中重建的细胞核也具有一般细胞核的形态和结构<sup>[13]</sup>。外源的纯化DNA在卵提取物中诱导重建的细胞核的大小也处于一般细胞核的大小范围,绝大多数直径在 $10-15\mu\text{m}$ 之间<sup>[9,11,12]</sup>。超薄切片上显示,重建核具有典型的双层核膜、核孔复合体、核骨架和类染色体等结构。冰冻蚀刻样品显示其核孔复合体与一般细胞核核孔复合体相比无明显区别<sup>[9,12]</sup>。免疫荧光法和特殊电镜技术均证明其具有lamina结构与成分<sup>[11]</sup>。但类染色质是否具有核小体一级结构和高级结构等,目前还不太清楚。而这一问题又是最终阐明外源纯化DNA诱导的重建核是否具有典型核结构和生物活性的核心问题,需要进一步研究。

#### 四、非细胞体系细胞核重建是一个渐进的过程

非细胞体系细胞核重建过程是逐步进行的。但在不同体系之间,这一过程存在差别。将精子染色质加入卵提取物后,首先见到精子染色质去浓缩;然后,在其周围逐渐装配双层核膜和核孔复合体。用外源的纯化DNA诱导非细胞体系细胞核重建,首先看到的是DNA与卵提取物中相关成分共同构建成高度浓缩的类染色质;然后,高度致密的类染色质去浓缩,并在其周围逐渐装配双层核膜和核孔复合体。用中期CHO细胞、HeLa细胞的匀浆物进行非细胞体系细胞核重建,首先发生的是染色质去浓缩,然后在其周围装配双层核膜和核孔复合体。上述三种非细胞体系细胞核重建过程中,均有lamina的装配。一般认为,它的装配在核膜装配稍前或同时进行。

#### 五、非细胞体系细胞核重建的机理

关于非细胞体系细胞核重建的机理问题,目前尚无定论。精子染色质或中期CHO细胞、中期HeLa细胞匀浆物中染色质诱导的细胞核重建,虽然染色质早已构建,但对其如何重排成间期核的染色质结构及核骨架的组装等问题,仍了解甚少。用外源纯化DNA诱导细胞核重建,虽然清晰地观察到了由DNA等成分共同浓缩成类染色质,但它是否具有典型染色质的各级结构,知之甚少。因而,细胞核重建过程中染色质的组装机理可能是一个很重要的课题。

核膜装配与核孔复合体装配是伴随发生的。现在比较公认的看法是,核膜组装的前体物是胞质小膜泡。但胞质小膜泡如何相互融合成双层核膜以及核孔复合体如何镶嵌入双层核膜等,目前存在两种完全不同的认识,即膜泡前体模型(vesicle precursor model)<sup>[4,8]</sup>和原核孔模型(pre-pore model)<sup>[7]</sup>。前者认为,首先由胞质小膜泡结合到染色质表面,并且相互融合

成双层核膜;然后,核孔物质结合到双层核膜上而形成核孔复合体。后者则认为,先由核孔物质结合到染色质表面,形成原核孔,随后胞质小膜泡与之结合并相互融合成双层核膜;最后,在原核孔处的内外层核膜相互融合成核孔复合体。两种观点各有一定的实验依据。所以至今仍难以断定哪一种观点更正确。关于胞质小膜泡相互融合的机理,最近有人提出GTP结合蛋白(GTP-binding protein)参与膜泡的融合。用GTP的结抗物GTP- $\gamma$ -s处理,胞质小膜泡能够照常结合到染色质表面,但不能相互融合成双层核膜<sup>[26]</sup>。也有人证明,核膜装配还需要有糖原的存在<sup>[26]</sup>。

用外源纯化DNA或精子染色质在卵提取物中诱导细胞核重建时,可见有lamina组装,但对其组装机理并不清楚。我们实验室观察到,将抗lamin单克隆抗体加入细胞核重建反应体系,不仅抑制了lamina正常组装,而且导致了核膜装配紊乱<sup>[11]</sup>。说明lamina组装与核膜装配是密切联系的。

对中期CHO细胞匀浆物细胞核重建过程中的lamina组装已有一些认识。认为首先由lamin A、C结合到染色质表面,然后由lamin B与lamin A、C结合而形成lamina结构。同时lamin B也将与之紧密结合的胞质小膜泡带到染色质表面,胞质小膜泡相互融合而形成双层核膜<sup>[13]</sup>。

#### 六、非细胞体系重建核具有一定的生物学活性

首先已证明,非细胞体系重建核具有复制DNA的能力<sup>[4,6,7,11,27-31]</sup>。但不同体系的重建核复制DNA的效率有所不同。由精子染色质诱导的重建核,最终复制DNA的比率可达70—100%;而外源纯化DNA诱导的重建核,最终能够复制DNA的一般不高于40%<sup>[28,29,32]</sup>。实验证明,只有当结构完整的核形成之后,才能开始复制DNA<sup>[6,7,29]</sup>。由于核的重建过程并不同步,不同核复制DNA的过程也不同步。

非细胞体系重建核能够从其周围主动摄取物质<sup>[33,34]</sup>。核浆蛋白(nucleoplasmin)是非洲爪蟾卵生发泡内含量最丰富的一种物质。正常情况下,爪蟾卵细胞核可以主动地从其周围摄取这种物质。实验证明,非细胞体系重建核也能选择性地摄取这种物质。摄取过程受到核孔复合体WGA(wheat germ agglutinin)结合蛋白的调节,由ATP提供能量<sup>[34]</sup>。

非细胞体系重建核在一定的调节因素作用下,可以进入M期<sup>[36]</sup>。精子染色质诱导的重建核进入M期的变化过程与将精子染色质注射到活化卵中发生的变化过程相似<sup>[36]</sup>。重建核由间期(G2)向M期转化需要一定量的蛋白质合成<sup>[29]</sup>。如果在核重建反应体系中添加蛋白质合成抑制剂放线菌酮(cycloheximide),重建核就不能进入M期。有人证明,重建核由间期向M期转化与MPF(muturation-promoting factor)诱导有关<sup>[37]</sup>。外源纯化DNA诱导的重建核也可以向M期转化。将lambda DNA诱导的重建核注射到处于分裂中期的卵细胞中,可见到重建核核膜解体和染色质凝集现象<sup>[35]</sup>。进一步研究发现,随着周期蛋白(cyclin)的周期性合成和降解以及组蛋白H1激酶(histone H1 kinase)水平的周期性上下波动,卵提取物中重建核可以重复进行DNA复制、进入M期、核重新形成及DNA再复制等过程的周期性循环<sup>[30]</sup>。重建核进入M期,其染色体仍成单簇存在,染色单体并不清晰可见,由M期重新进入间期,也没有见到染色体分裂,仍然形成单个细胞核<sup>[30]</sup>。

### 七、非细胞体系细胞核重建研究的生物学意义

非细胞体系细胞核重建研究工作虽然只有短短几年历史,但已获得了许多有价值的结果,受到越来越多的科学家的重视。

首先,它为研究细胞核重建过程和细胞核各组分在核重建过程中的相互作用等提供了一个良好的模式。应用这种模式,人们可以“方

便地”对细胞核各个组分进行拆卸与再组装,并可通过改变各组分比例分析核重建过程的中间步骤等,因而可以较精确地研究细胞核重建过程和细胞核各组分在组装时的相互作用,这是用完整细胞体系进行细胞核重建研究所难以做到的。

非细胞体系细胞核重建是研究细胞核生命活动的一个良好模式。由于重建核中可以加入许多已知成分,由此人们可进一步分析这些物质的作用。又由于重建核完全处于一种裸露状态,为研究细胞核和细胞质的相互作用及核物质运输等简化了条件。

也有人根据重建核的生命活动特点和卵提取物的性质,将二者有机结合起来,进行细胞周期调节方面的研究<sup>[38,31,35,38]</sup>,提出了许多重要论点。例如,Dasso和Newport<sup>[38]</sup>发现爪蟾卵内存在一个抑制有丝分裂的反馈系统。这一系统的活性依赖于未复制DNA的阈值浓度。DNA复制未完成,有丝分裂便不能开始。他们证明,反馈抑制系统主要通过抑制MPF的活性来达到抑制有丝分裂的目的。他们认为,反馈抑制系统主要是通过翻译后修饰而使MPF处于非活性状态,而不是抑制cyclin的合成和累积,或者阻止cyclin与cdc2蛋白(MPF的一个亚单位)结合。目前,利用非细胞体系核重建技术研究细胞周期调节是一个非常活跃的研究领域。

我们认为值得进一步探索的是,非细胞体系细胞核重建研究也许可以将不同物种的生命物质组合在一起,形成具有一定生命活动的“新型”核。这不仅可以为研究细胞起源提供一些实验依据,而且,可以设想如何应用这种“新型”核进行更为深入的工作,甚至可以设想将不同生物的遗传物质组装在一起,开辟新的细胞工程途径。当然,这种设想是否能成为现实,还要靠以后大量的工作加以验证。最后还应指出,虽然目前还难以确切评估非细胞体系核重建研究的生物学意义,但从目前研究状况来看,这个领域的工作是不容忽视的。

## 摘 要

非细胞体系细胞核重建技术是近年发展起来的一项细胞生物学研究技术。主要包括精子染色质在蛙卵提取物中诱导核重建、外源纯化DNA在蛙卵提取物中诱导核重建、有丝分裂中期细胞匀浆物核重建等几种体系。目前,应用前二者进行的研究工作较多,第三种体系的工作进展较慢。在各种体系中重建的细胞核,在结构上都基本难以与一般细胞核相区别,在功能上也表现出一定的生物活性,如DNA复制、物质的主动运输、对细胞周期调节因素作出反应并能进入M期等。应用这一模式,已经进行了核重建过程及其机理、细胞核各组分间的相互作用、细胞周期的调控与重建核生物学活性等多方面的研究。非细胞体系核重建研究工作还正在向纵深发展中。

## 参 考 文 献

- [1] Robbins, E. and Gonatas, N., 1964, *J. Cell Biol.*, 21: 429—463.
- [2] Benavente, R. and Krohne, G., 1986, *J. Cell Biol.*, 103: 1847—1854.
- [3] Gerace, L. and et al., 1978, *J. Cell Biol.*, 79: 546—566.
- [4] Lohka, M. J. and Masui, J., 1983, *Science*, 220: 719—721.
- [5] Forbes, D. et al., 1983, *Cell*, 34: 13—23.
- [6] Newport, J., 1987, *Cell*, 48: 205—217.
- [7] Sheehan, M. A. et al., 1988, *J. Cell Biol.*, 106: 1—12.
- [8] Lohka, M. J. and Masui, J., 1984, *J. Cell Biol.*, 98: 1222—1230.
- [9] 蔡树涛等, 1990, 科学通报, 32: 1261—1264.
- [10] 张博等, 1990, 电子显微镜学报, 9 (3): 7.
- [11] 蔡树涛等, 1991, 北京大学博士论文。
- [12] 张传茂, 翟中和, 1991, 实验生物学报, 24 (3): 287—291.
- [13] Burke, B. and Gerace, L., 1986, *Cell*, 44: 639—652.
- [14] 张传茂等, 1992, 解剖学报, 印刷中。
- [15] Ulitzur, N. and Gruenbaum, Y., 1989, *FEBS Letters*, 159 (1): 113—116.
- [16] Berrios, M. and Avilion, A. A., 1990, *Exp. Cell Res.*, 191: 64—70.
- [17] Adamson, E. D. and Woodland, H. R., 1974, *J. Mol. Biol.*, 88: 263—285.
- [18] Woodland, H. R. and Adamson, E. D., 1977, *Dev. Biol.*, 57: 118—135.
- [19] Laskey, R. A. et al., 1985, In: *Genetic Engineering, Principles and Methods*, Vol. 7, J. K. Sctlow and A. Hollaender (editors), Plenum Publishing Corp., New York, pp 135—148.
- [20] Benedetti, P. et al., 1983, *EMBO J.*, 2: 1303—1308.
- [21] De Robertis, E. et al., 1982, *Nature*, 295: 572—577.
- [22] Benbow, W. and Ford, C., 1975, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72: 2437—2441.
- [23] Pestell, R. Q. W., 1975, *Biochem. J.*, 145: 527—534.
- [24] Laskey, R. A. et al., 1977, *Cell*, 10: 237—247.
- [25] Boman, A. L. et al., 1990, *J. Cell Biol.*, 111: 374 a.
- [26] Hartl, P. and Forbes, D. J., 1990, *J. Cell Biol.*, 111: 374 a.
- [27] Blow, J. J. and Watson, J. V., 1987, *EMBO J.*, 6: 1997—2002.
- [28] Blow, J. J. et al., 1987, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 317: 483—494.
- [29] Blow, J. J. et al., 1989, *J. Cell Sci. Suppl.*, 12: 183—195.
- [30] Hutchison, C. J. et al., *J. Cell Sci. Suppl.*, 12: 197—212.
- [31] Newport, J. and Dasso, M., 1989, *J. Cell Sci. Suppl.*, 12: 149—160.
- [32] Blow, J. J. and Laskey, R. A., 1986, *Cell*, 47: 577—587.
- [33] Finlay, D. R. et al., *J. Cell Sci.*, 11: 225—242.
- [34] Finlay, D. R. and Forbes, D. J., 1990, *Cell*, 61: 17—29.
- [35] Newport, J. et al., 1985, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 50: 651—656.
- [36] Hutchison, C. J. et al., 1987, *EMBO J.*, 6: 2003—2010.
- [37] Lohka, M. J. and Maller, J. I., 1985, *J. Cell Biol.*, 101: 518—523.
- [38] Dasso, M. and Newport, J., 1990, *Cell*, 61: 811—823.