

文章编号:1000-5641(2012)04-0061-06

盘基网柄菌发育中尿囊酸酶表达的 定量定位研究

代卉, 侯连生

(华东师范大学 生命科学学院, 上海 200062)

摘要: 用免疫荧光技术对 KAx-3 多细胞发育不同阶段的尿囊酸酶进行定位观察, 用 Western blot 分析野生型细胞 KAx-3 和突变型细胞 AK127 多细胞发育中尿囊酸酶的表达情况. 结果显示: 在细胞聚集阶段, 尿囊酸酶在盘基网柄菌细胞膜附近存在较多; 在细胞丘阶段, 尿囊酸酶在细胞丘外层细胞中荧光强度较强; 在蛞蝓体阶段, 尿囊酸酶在前柄细胞中的表达量明显多于前孢子细胞; 在子实体成熟的过程中, 在前柄细胞区与前孢子细胞区交界处荧光强度最强, 该区域内细胞将分化成前柄细胞 B. 据此推测尿囊酸酶的定位表达可能与盘基网柄菌细胞分化的类型相关. Western blot 结果显示: 在 KAx-3 发育过程中尿囊酸酶的表达量呈现出逐渐上升的趋势, 发育至 18 h 左右达到最大值; 而 AK127 中尿囊酸酶的表达量始终在低水平徘徊. 这表明 gp150 的缺失影响了尿囊酸酶的表达. 实验结果提示, 尿囊酸酶的表达量与发育时间有关, 并且这种表达量的变化与 gp150 存在着密切的关系.

关键词: 尿囊酸酶; 定量分析; 定位观察; gp150

中图分类号: Q959.11 **文献标识码:** A **DOI:**10.3969/j.issn.1000-5641.2012.04.008

Quantitation and localization of allanoicase during the development of *Dictyosoteliium discoideum*

DAI Hui, HOU Lian-sheng

(School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract: Location and expression of allanoicase were observed in the wild type KAx-3 and mutant type AK127 cells during development by immunofluorescent technique and Western blot, respectively. The results showed that abundant of allanoicase existed near the cytomembrane at the aggregation stage. At the mound stage, the fluorescence of allanoicase in the peripheral cells of mound was stronger than other place cells. When they developed into slug stage, more allanoicase existed in prestalk cells than that in prespore cells. The fluorescence of allanoicase expressed strongly at the junction of prespore area and prestalk area at the fruiting body stage, these cells would differentiate into prestalk B cells. These data indicated that there may be some

收稿日期:2011-05

基金项目:国家自然科学基金(30970316, 30670266)

第一作者:代卉,女,硕士研究生.

通讯作者:侯连生,男,教授,研究方向为细胞粘附分子和细胞信号转导. E-mail:lshou@bio.ecnu.edu.cn.

relationships between the expression of allanoicase and cell-type differentiation during *Dictyostelium discoideum* development. The results of western blot showed that the expression of allanoicase increased gradually in the development of KAx-3 cells. The expression amount of allanoicase was maximum when the cells developed nearly 18 h. But the expression of allanoicase in AK127 cells which gene of gp150 protein was knocked out was always at a low level. It shows that the expression of allanoicase would be affected in the absence of gp150. The results indicate that the expression of allanoicase has some relationships with the developmental time of the cells, and is also associated with the expression of gp150 gene.

Key words: allanoicase; quantitative analysis; orientation observation; gp150

0 引 言

野生型盘基网柄菌多细胞发育的不同阶段形态各不相同,因此,将其大致地分为了 4 个发育阶段:细胞聚集阶段、细胞丘阶段、蛭螭体阶段和由孢子细胞与柄细胞构成的子实体阶段^[1]. 盘基网柄菌的多细胞发育始于生存环境中食物的缺乏. 饥饿的盘基网柄菌细胞会分泌 cAMP 诱导临近细胞向其聚集形成细胞丘,然后在细胞分化因子的作用下开始初步分化,形成前柄细胞(*prestalk cell*, *pst*)和前孢子细胞(*prespore cell*, *psp*). 前柄细胞分化比较复杂,又进一步分化成各种亚型:位于细胞丘顶端是前柄细胞 A (*prestalk A cell*, *pstA*),表达前柄细胞特异基因 *ecmA*;而前柄细胞 B (*prestalk B cell*, *pstB*)则位于细胞丘底部,表达 *ecmB* 特异基因. 蛭螭体阶段,细胞分化进一步明显:前端形成由前柄细胞 A 和前柄细胞 O (*prestalk O cell*, *pstO*)组成的前柄细胞区;后端则大部分为 *psp* 细胞;底部仍有少量 *pstB* 细胞存在,被称之为后卫细胞;此外,在 *pstO* 细胞与 *psp* 细胞的交界处也存在 *pstB* 细胞. 进入拔顶阶段后,可以在前柄细胞区检测到新形成的前柄细胞 AB (*prestalk AB cell*, *pstAB*),它同时表达 *ecmA* 和 *ecmB* 基因. 在盘基网柄菌的整个发育过程中,*pstO* 细胞可分化成 *pstA* 细胞,*pstA* 细胞可分化成 *pstB* 细胞,并最终形成柄细胞;而 *psp* 细胞最终形成成熟的孢子^[1,2]. 因此与前柄细胞分化相关的因子引起了我们的研究兴趣. 有研究报道氨可以抑制盘基网柄菌在多细胞发育过程中细胞对 cAMP 的趋化作用^[3];氨通过抑制细胞分化因子的累积可抑制柄细胞的发育,并促进孢子细胞的成熟;氨刺激前孢子细胞基因表达的同时抑制前柄细胞基因的表达^[4,5];嘌呤代谢途径中产生的氨在机体缺乏氮源时可作为氮的来源^[6]. 本实验室筛选到的相关基因尿囊酸酶(*allanoicase*, EC 3. 5. 3. 4)是生物体嘌呤代谢途径中一种重要的酶,可水解尿囊酸为尿素和乙醛酸,在低等生物中还可进一步分解成为氨和二氧化碳^[7],可见尿囊酸酶与氨的代谢有着密切关系. 但是盘基网柄菌发育过程中尿囊酸酶的分布位置和表达情况未见报导,故本文对此进行了研究,为深入探讨尿囊酸酶对细胞发育过程的影响提供理论依据.

1 材料与方 法

1.1 细胞株与细胞培养

盘基网柄菌 KAx-3 与 AK127 均为加拿大多伦多大学 Dr. Siu 实验室提供,按 Sussman 法^[8]将盘基网柄菌 KAx-3 和 AK127 培养于 SM 培养基上并喂食以克雷伯氏菌,收集生长对数期的细胞,并用磷酸缓冲液(pH 6. 4)将待发育的细胞洗净.

1.2 细胞发育

1.2.1 盖玻片上的细胞发育

用 PDF 缓冲液(MgCl₂ 0.5 g, 硫酸链霉素 0.5 g, KCl 1.5 g, K₂HPO₄ 1.6 g, KH₂PO₄ 1.6 g, 加水至 1 L, pH 6.4)配制成 2 × 10⁶ 个/mL 的细胞悬浮液,在预先涂有 0.1%(w/v)多聚赖氨酸的盖玻片上加 500 μL 细胞悬浮液,静置 15 min,吸去 400 μL 上清液.将盖玻片放在湿盒中,置于 24 °C 恒温培养箱中开始发育.

1.2.2 琼脂板上的细胞发育

用 PDF 缓冲液配制成 2 × 10⁸ 个/mL 的细胞悬浮液,铺 500 μL 悬浮液在 2% 的琼脂板上,放入 24 °C 恒温箱中进行发育.每隔 2 h 收集发育细胞.细胞计数,按 1 × 10⁷ 个/管分装于各 eppendorf 管中.

1.3 免疫荧光

将发育至不同阶段的 KA_x-3 细胞放入 4 °C 冰箱预冷 1 min,室温下用 3.7% 甲醛溶液(pH 6.4)固定细胞 15 min,再用 -20 °C 预冷的含 1% 甲醛的甲醇溶液固定 5 min,1% BSA 封阻 20 min,然后用抗尿囊酸酶蛋白的抗体孵育 1 h(1:500),0.05% PBST 缓冲液洗 3 次后,用 FITC 标记的羊抗兔 IgG 室温孵育 1 h(1:100),再用 0.02% PBST 缓冲液洗 3 次,最后用封片液封片,置于荧光显微镜下观察.

1.4 蛋白免疫印迹

每隔 2 h 收集 KA_x-3 发育至不同阶段的细胞,按 Laemmli(1970)法进行 SDS-PAGE 电泳^[9].每管加入 100 μL 上样缓冲液,沸水煮 5 min,电泳后进行 Western blot 转膜 1.5 h,用 5% 脱脂奶粉封闭硝酸纤维薄膜,在 1:2 000 比例稀释的抗尿囊酸酶蛋白的抗体溶液和按 1:1 000 比例稀释的鼠源 GAPDH 溶液中孵育 2 h,用碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG 检测已连接的抗体,并用碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 IgG 检测内参 GAPDH.最后用 NBT/BCIP 显色,拍照,结果用 Quantity One (Bio-Rad 公司)软件分析.

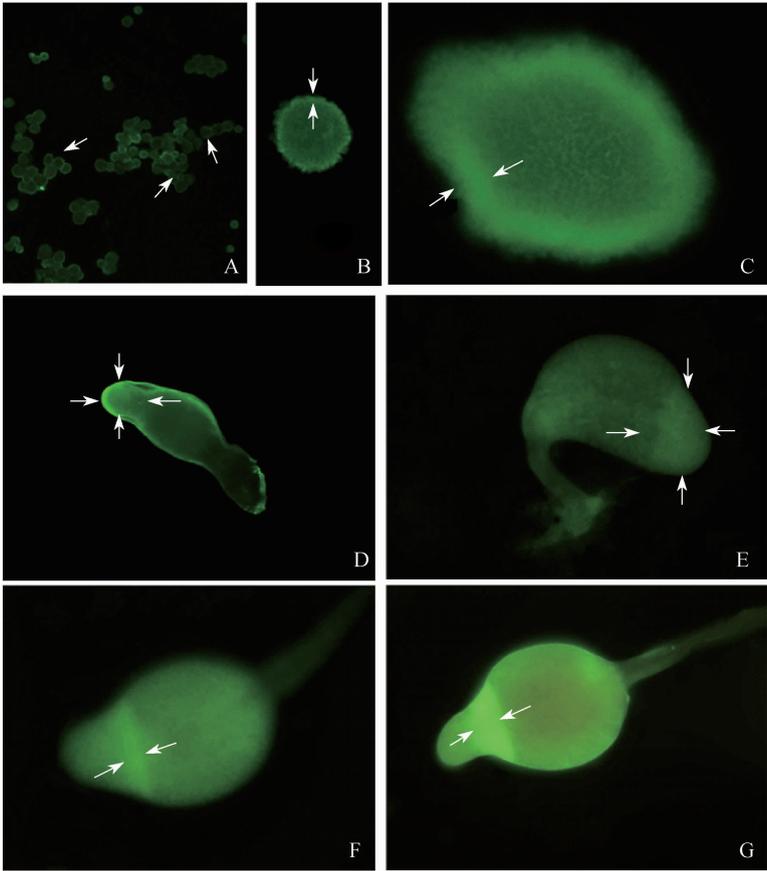
每隔 2 h 收集 AK127 发育至不同阶段的细胞,按上述步骤进行蛋白免疫印迹实验.

2 结 果

2.1 尿囊酸酶在盘基网柄菌 KA_x-3 中的定位观察

在细胞发育初期,主要发生细胞间相互接触,然后粘连在一起的事件.这些细胞经免疫染色后,在细胞与细胞接触区域能见到明显的尿囊酸酶强荧光,而在细胞内部,荧光强度则比较均匀,表明此时尿囊酸酶主要集中在细胞膜附近区域(见图 1A 箭头所示).发育至细胞丘阶段,此时细胞分化尚不明显,但细胞丘的最外层细胞中尿囊酸酶荧光最强,表明尿囊酸酶在最外层细胞中表达量最多(见图 1B 和 1C 箭头所示).在蛞蝓体阶段,细胞出现明显分化.蛞蝓体主要分化成两个区域,前端为前柄细胞区,后部为前孢子细胞区.本文观察到蛞蝓体前端的荧光明显强于蛞蝓体后部,这意味着前柄细胞中尿囊酸酶的表达多于前孢子细胞(见图 1D 箭头所示).在蛞蝓体发育至成熟子实体的过程中,从总体上看,前柄细胞区内尿囊酸酶的表达量高于前孢子细胞区内尿囊酸酶的表达量.但是由于前柄细胞发生了亚型分化,尿囊酸酶荧光强弱也发生了变化.起初整个前柄细胞区荧光强度基本一致(见图 1E 箭头所示),但是随着发育的进行,荧光强度开始发生变化,在前柄细胞区与前孢子细胞区交界处,荧光开始变强(见图 1F 中箭头所示).随着发育时间的增加,前柄细胞和前孢子细胞

趋于成熟,两者交界处的荧光染色愈发显得强烈(见图 1G 箭头所示).



注:A 为细胞聚集阶段,B,C 为细胞丘阶段,D 为蛻蛹体阶段,E-G 为子实体的形成阶段;标尺 50 μm

图 1 KAx-3 多细胞发育不同阶段中尿囊酸酶的荧光定位

Fig. 1 Localization of allanoinase in the different development stages of KAx-3

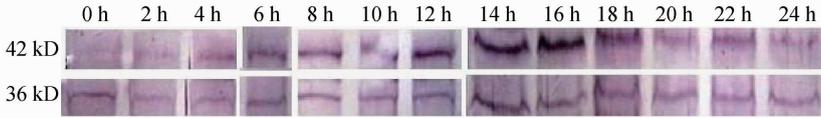
2.2 尿囊酸酶的定量表达

为了进一步探究尿囊酸酶在盘基网柄菌发育中的作用,用蛋白免疫印迹法研究了盘基网柄菌发育各时间段尿囊酸酶的表达情况.

在盘基网柄菌 KAx-3 细胞整个发育阶段,尿囊酸酶都有表达(见图 2),并且随着发育进程,呈现逐渐上升的趋势,在 18 h 达到最多,18 h 之后,其表达量骤然下降(见图 4). AK127 细胞是 gp150 蛋白的基因被剔除的盘基网柄菌突变细胞,在 AK127 整个多细胞发育期间,依然观察到尿囊酸酶能够表达(见图 3),但是除了发育 8 h 时尿囊酸酶的表达量有所增加外,其余时间段尿囊酸酶的表达量便不再呈现上升趋势,而是在一个相对较低的范围内波动(见图 4).

3 分析讨论

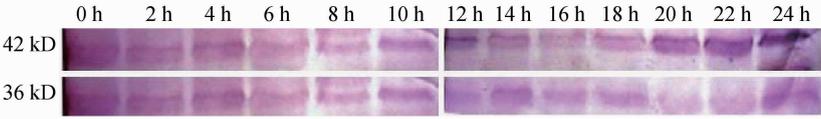
3.1 关于尿囊酸酶在盘基网柄菌多细胞发育过程中的定位分析



注:42 kD为尿囊酸酶的分子量^[10],36 kD为内参 GAPDH 的分子量

图2 盘基网柄菌 KAX-3 细胞发育不同时期尿囊酸酶免疫印迹

Fig. 2 Western blot analysis of allanoicase during different developmental stages of KAX-3



注:42 kD为尿囊酸酶的分子量,36 kD为内参 GAPDH 的分子量

图3 盘基网柄菌 AK127 细胞发育不同时期尿囊酸酶免疫印迹

Fig. 3 Western blot analysis of allanoicase during different developmental stages of AK127

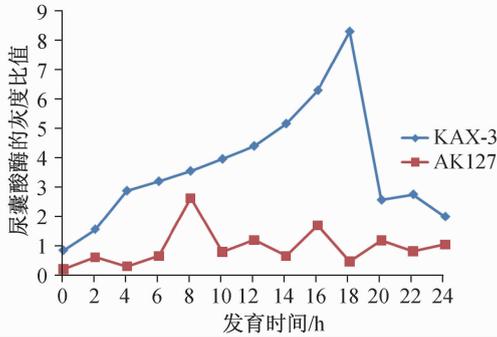


图4 KAX-3 和 AK127 发育不同阶段尿囊酸酶的表达变化

Fig. 4 Allanoicase quantitative changes of different developmental stages of KAX-3 and AK127

通过观察发现,尿囊酸酶在盘基网柄菌多细胞发育中的定位具有时空性.聚集初期,细胞尚未进行分化,尿囊酸酶在两细胞接触区域较多,说明其可能参与了细胞最初聚集过程的调控.细胞丘阶段,尿囊酸酶则在细胞丘的外层细胞中大量表达,而这些外层细胞有着分化发育为柄细胞的潜质.随着发育的进行,细胞开始了初步分化,特别是蛞蝓体阶段,在形态上能清楚地观察到蛞蝓体分成前后两个部分,前 1/5 为前柄细胞区,后 4/5 为前孢子细胞区,从实验结果可以看到,尿囊酸酶在蛞蝓体前 1/5 处的荧光强于后 4/5,表明尿囊酸酶在蛞蝓体前柄细胞中的表达量要多于前孢子细胞.在形成成熟子实体的过程中,总体上尿囊酸酶前柄细胞中的表达量多于前孢子细胞,但是随着细胞进一步分化,在前柄细胞的某一区域内荧光逐渐增强,说明这个区域内尿囊酸酶的表达量越来越高.国外学者研究认为,在前柄细胞区与前孢子细胞区交界处的细胞将会分化成 pstB 细胞^[1,2].结合实验结果,提示尿囊酸酶与 pstB 细胞的分化有着密切的关系.综上所述,细胞开始分化发育后,在前柄细胞中尿囊酸酶的表达一直多于前孢子细胞,由于前柄细胞亚型分化开始,在前柄细胞内荧光强弱出现变化,在 pstB 细胞中表达量逐渐增多.因此细胞发育的不同时期尿囊酸酶蛋白在不同类型细胞中的表达有差异,说明该蛋白定位表达与细胞类型分化有着密切的关系.

3.2 关于尿囊酸酶在两种类型的细胞中表达量的初步分析

对尿囊酸酶在两种类型盘基网柄菌发育中的表达情况进行比较发现,尽管尿囊酸酶在

KAx-3 多细胞发育过程中一直都有表达,但其呈现出与发育过程相关的变化趋势.在发育前 18 h,尿囊酸酶的表达量呈现缓慢上升的趋势,至 18 h 表达量最多,随后尿囊酸酶的表达量急剧下降,此时正处于子实体的形成阶段.子实体是由纤维化的柄支持着大量的休眠孢子,分析认为导致尿囊酸酶急剧下降的原因有二:一是细胞发育至子实体阶段,柄细胞开始发生凋亡逐步成为死细胞,尿囊酸酶蛋白的表达量逐渐减少;二是前孢子细胞开始发育成成熟的孢子,孢子细胞是休眠细胞,新陈代谢处在很低的水平,所以随着前孢子细胞分化的进行,细胞的新陈代谢也逐渐减慢,结果导致了尿囊酸酶蛋白含量的下降.虽然在 AK127 多细胞发育过程中尿囊酸酶蛋白一直都有表达,但是发育 8 h 时后尿囊酸酶的表达量不升反降,并在一个相对较低的范围内波动.从实验结果中可看到 KAx-3 细胞和 AK127 细胞中尿囊酸酶的表达趋势有明显差别. AK127 是 *LagC* 基因被剔除的细胞,其发育只能停滞在细胞松散聚集阶段,不能完成整个发育过程. *LagC* 基因编码膜蛋白 gp150 分子,而 gp150 是通过异嗜性相互作用来调节盘基网柄菌多细胞的发育^[11]. 这也就意味着 gp150 的缺失影响了尿囊酸酶的表达,而且据报道 gp150 是在多细胞发育 10 h 后才开始表达的^[12]. KAx-3 细胞发育 10 h 后,尿囊酸酶的表达量明显增加,这与 gp150 蛋白的表达时间存在一定的相关性.与此相反, AK127 细胞除了在发育 8 h 时,作为一种补偿效应,尿囊酸酶的表达突然上升外,其他时间段都在一个较低的表达范围内波动,与 KAx-3 细胞中尿囊酸酶的表达有明显差别.因此,尿囊酸酶的表达受到了 gp150 的影响,但是两者间是直接地相互影响,还是间接地相互影响,尚不清楚,需要做进一步的研究.

[参 考 文 献]

- [1] 付卓敏,侯连生. 盘基网柄菌(*Dictyostelium discoideum*)细胞的分化及其调控[J]. 细胞生物学杂志, 2002, 24(5): 289-293.
- [2] WEEKS G. Signaling molecules involved in cellular differentiation during *Dictyostelium* morphogenesis[J]. Current Opinion in Microbiology, 2000, 3(6): 625-630.
- [3] MANN S K, FIRTEL R A. cAMP-dependent protein kinase differentially regulates prestalk and prespore differentiation during *Dictyostelium* development[J]. Development, 1993, 119(1): 135-146.
- [4] NOUYE K. Induction by acid load of the maturation of prestalk cells in *Dictyostelium discoideum*[J]. Development, 1988, 104: 669-676.
- [5] FEIT I N, PAWLIKOWSKI J, ZAWILSKI C. A model for cell type localization in the migrating slug of *Dictyostelium discoideum* based on differential chemotactic sensitivity to cAMP and differential sensitivity to suppression of chemotaxis by ammonia[J]. Bioscience, 2007, 32(2): 329-338.
- [6] LEULLIOT N, QUEVILLON-CHERUEL S, SOREL I, et al. Crystal structure of Yeast allantoicase reveals a repeated jelly roll motif[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2004, 279: 23447-23452.
- [7] XU Z W, ZHOU H X, HUANG W N. Some properties of the allantotote amidohydrolase from French bean seedlings[J]. Acta Photophysiological Sinica, 2004, 30(4): 460-468.
- [8] SUSSMAN M. Cultivation and synchronous morphogenesis of *Dictyostelium* under controlled experimental conditions[J]. Methods Cell Biology, 1987, 28: 9-29.
- [9] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227: 680-685.
- [10] EICHINGE L, PACHEBAT J A, GLOCKNER G, et al. The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*[J]. Nature, 2005, 435: 43-57.
- [11] BROCK D A, BUCZYNSKI G, SPANN T P, et al. *Dictyostelium* mutant with defective aggregate size determination[J]. Development, 1996, 122: 2569-2578.
- [12] WANG J, HOU L S, AWERY D. The membrane glycoprotein gp150 is encoded by the *LagC* gene and mediates cell-cell adhesion by heterophilic binding during *Dictyostelium* Development[J]. Developmental Biology, 2002, 227: 734-745.