

阔口尖毛虫纤毛器微管的激光共聚焦显微镜观察

郭 键 张小翠 翟 楠 倪 兵* 陈季武 顾福康

华东师范大学生命科学学院 上海 200062

摘要:应用激光扫描共聚焦显微术显示经荧光紫杉醇标记的阔口尖毛虫 (*Oxytricha platystoma*) 口围带、波动膜、额腹横棘毛、左右缘棘毛等纤毛器的微管类细胞骨架。其口围带基部含小膜托架、托架间连接微管和小膜基部微管束,波动膜基部含发达的微管骨架网,口围带和波动膜后端的汇合处含有口底托架及口后微管束,额腹横棘毛和左、右缘棘毛基部含前纵微管束、后纵微管束、横微管束或周围微管束。结果表明,阔口尖毛虫的纤毛器基部微管具有其种的特异性,尤其是波动膜在其特长的纤毛列基部形成发达的微管骨架网,这种巨大型波动膜及其基部微管骨架在尖毛科乃至其他腹毛类纤毛虫中未见报道;且本文所见的纤毛虫口底托架及口后微管束可能是腹毛类纤毛虫中普遍存在的口纤毛器基部微管结构。

关键词:激光扫描共聚焦显微术;阔口尖毛虫;纤毛器微管;基部附属微管

中图分类号:Q952 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2011)02-65-05

Observation of Cortical Ciliature Microtubules by Laser Scanning Confocal Microscopy in the *Oxytricha platystoma*

GUO Jian ZHANG Xiao-Cui ZHAI Nan NI Bing* CHEN Ji-Wu GU Fu-Kang

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

Abstract: The microtubular cytoskeleton in the cortical ciliature of the *Oxytricha platystoma* was visualized by direct fluorescent labeling of FLUTAX and laser scanning confocal microscopy. The distribution pattern of base-associated microtubules was found to be in accordance with that of adoral zone membranelles (AZM), undulating membranes (UM), frontal-ventral-transverse cirri (FVTC), and left-right marginal cirri (L-RMC). The microtubular cytoskeleton of the AZM comprised of membranelle brackets and its connected microtubules as well as the base-associated microtubules. The base-associated microtubules of the UM contained well-developed microtubule cytoskeletal net. The confluence of AZM and UM contained the oral-end bracket and postoral microtubules. The base-associated microtubules of the FVTC, L- and RMC contained anterior longitudinal microtubules (ALM), posterior longitudinal microtubules (PLM) and transverse microtubules (TM) or radiate microtubules (RM). The results show that cortical ciliature base microtubules of *O. platystoma* have their species specificity, such as, UM of the *O. platystoma* form well-developed microtubule net at the base of the special long cilia series. The structure of such large AZM, UM and the base-associated microtubule skeleton have not been reported in ciliates. In addition, the oral-end bracket and postoral microtubules may be prevalent in hypotrichia ciliate base of adoral ciliature microtubules.

Key words: Laser scanning confocal microscope; *Oxytricha platystoma*; Microtubules; Associated microtubules

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 30770238, 31071875);

* 通讯作者, E-mail: bni@bio.ecnu.edu.cn;

第一作者介绍 郭键, 女, 硕士研究生; 研究方向: 动物细胞与分子生物学; E-mail: jianfeng0411@163.com。

收稿日期: 2010-11-04, 修回日期: 2011-01-05

腹毛目纤毛虫具有复杂的皮层纤毛模式,研究其与皮层纤毛结构相联系的细胞骨架的分化具有特殊意义。自从 Arregui 等提出应用 FLUTAX 方法显示纤毛虫的微管类细胞骨架结构^[1-2]后,探索纤毛虫细胞的微管胞器及其微管蛋白组分、微管胞器的功能及微管装配机理,成为本领域研究的热点。近年来,本实验室采用直接荧光标记法及荧光显微技术,研究腹毛目的皮层纤毛器微管及其附属胞器的结构,也取得了重要进展^[3-5]。本文应用激光扫描共聚焦显微术显示了腹毛目纤毛虫阔口尖毛虫 (*Oxytricha platystoma*) 皮层微管类细胞骨架及其附属微管的三维结构,取得了一些新的结果。

1 材料与方法

1.1 材料 阔口尖毛虫于 2009 年 5 月采自江苏省姜堰市的一条小河,分离后,应用麦粒发酵法获得的细菌作为饵料,室温下进行纯系培养,取生长状态良好的细胞作为实验材料。

1.2 标本制备 采用本实验室改进的荧光紫杉醇标记法^[6]制备激光扫描共聚焦标本,主要步骤为:①在载玻片上滴 100 μl 浓度为 0.5% 的皂苷,将微吸管收集的纤毛虫滴入皂苷中渗透 10 s,用 PHEM 清洗 1 次;② 4% 多聚甲醛中固定 20 s, PHEM 清洗 1 次;③ 0.2% Triton X-100 处理 10 s, PHEM 清洗 1 次;④ 1 $\mu\text{mol/L}$ FLUTAX-2 (Sigma) 染色 5 min, 0.01 mol/L 的 PBS 漂洗 6 次,中性树脂胶封片。

1.3 激光扫描共聚焦显微术 应用激光扫描共聚焦显微镜 (LEICA TCS SP5), 选用氩离子激光管道,调节激光输出功率,调整激光管电压、光电倍增功率等至最佳状态;观察、聚焦标本,设置扫描方式及各项扫描参数,选用适合于染料 FITC (波长:490 ~ 530 nm) 扫描标本,采集共聚焦单个断层图像,计算机三维重建、合成、获取并保存图像。

2 结果

2.1 皮层纤毛器 在细胞腹面,口围带呈“?”型,位于细胞左侧并延伸到细胞中部 1/3 处,其

颌部和翻颌部约由 40 片小膜组成;波动膜 2 片,两者的基体列在前部沿口腔弯曲成环形后于后部形成 X 交叉,口侧膜位于右侧口腔壁边缘,口内膜位于口腔壁内缘,前者基体伸出的纤毛紧密组排成膜片,后者的纤毛则被掩盖在口腔内。额腹横棘毛按 8-5-5 模式分布,额棘毛 3 + 5 排列,前 3 根分布在口侧膜右前方,其余 5 根定位在口侧膜右侧;腹棘毛 3 + 2 排列,前 3 根紧靠额棘毛,另 2 根定位在横棘毛右前方;横棘毛以 4 + 1 的形式排列成 \wedge 状。左、右缘棘毛各 1 列,左缘棘毛 13 ~ 21 根,右缘棘毛 19 ~ 27 根,其棘毛在细胞后端相接续 (图版 I:1)。

2.2 纤毛器基部附属微管

2.2.1 口围带和波动膜基部附属微管 口围带基部含小膜托架,托架间连接微管和小膜基部微管束。其中,小膜托架自颌部起至翻颌部相应于所在小膜逐渐弯曲变宽,构成横向平行排列的阶梯状 (图版 I:2);前端的狭带型骨架基部向口皮层深处发出短微管束,两个相邻的微管束形成 \wedge 连接 (图版 I:3);后部宽带状的翻颌部骨架在小膜托架间两端有连接微管,并在各个小膜托架右侧向口皮层内发出短微管束;小膜基部微管束与波动膜基部微管骨架相交,构成一个立体的微管网 (图版 I:3,4)。

波动膜基部形成发达的微管骨架网。其中在相应于 2 片波动膜的基部,2 列绳束样的粗微管束组合成环形波动膜骨架,于环内其骨架向皮层深部发出纵向紧密排列的微管束,形成向细胞口腔皮层深处伸展的栅栏样构造,在口腔皮层内组织成强大的微管网 (图版 I:3,4)。

在口围带和波动膜后端的汇合处含有口底托架,其托架类似于一种领结样结构将两者镶嵌在一起;口底托架基部右侧向右后方发出一束粗大的微管,形成口后微管束 (图版 I:5)。

2.2.2 额腹横棘毛基部附属微管 额腹横棘毛基部含前纵微管束、后纵微管束、横微管束和周围微管束。其中,前纵微管束由棘毛基部左前端向皮层左前方或由棘毛基部右前端向皮层右前方伸展,后纵微管束由棘毛基部右后端向皮层右后方或由棘毛基部左后端向皮层左后方

伸展,横微管束由棘毛基部左后侧以横向向皮层伸展,周围微管束由棘毛基部向皮层多个方向发射。同种棘毛其基部微管具有相似的特征,但在不同皮层位置的同种棘毛基部微管的定位及发达程度也有差异,额棘毛基部附属微管中,前3根额棘毛基部的前纵微管束向所在皮层区伸展仅短距离便与口肋壁微管交互组合在一起(图版 I:3,4),后5根额棘毛基部前纵微管束较发达,其向前伸展6~10 μm 后终止于所在皮层区;后纵微管束十分发达,其粗壮的微管束向所在皮层伸展达20 μm ;横微管束在棘毛基部的左后端仅伸展约2 μm 的短距离;周围微管束也不发达,其中前3根额棘毛基部发出的周围微管束与颈部的 Λ 形微管交错,后5根额棘毛基部周围微管束与波动膜骨架相联系的微管交互在一起(图版 I:2~4)。

腹棘毛基部附属微管中,前纵微管束十分发达,其向左前方伸展15~18 μm 后终止于皮层深处;后纵微管束发达程度不一,其中前3根棘毛基部后纵微管束向后方伸展10~20 μm 后终止于所在皮层区,后2根棘毛的后纵微管束向后方伸展5~8 μm 后终止于所在皮层区;横微管束由棘毛基部左后端伸出2 μm 的短距离;周围微管束不发达(图版 I:6)。

全部横棘毛基部附属微管中,前纵微管束均特别发达,其由棘毛基部向左前方伸展17~22 μm ,与后2根腹棘毛基部的前纵微管束前端汇聚到一点,于所在皮层区形成锥形式构架;但后纵微管束较细、短,其他微管结构不发达(图版 I:6)。

2.2.3 左、右缘棘毛基部附属微管 左、右缘棘毛基部含前纵微管束、后纵微管束和横微管束,该两列棘毛基部的同种微管束均显示相同的定位特征,在细胞左、右侧形成按规则排列的强固微管带。其中,前纵微管束发达,其微管束由棘毛基部向皮层区左前方伸展11~15 μm ,终止于所在皮层区;横微管束较发达,其微管束由棘毛基部向左后方伸展10~14 μm 后终止于所在皮层区,但口区两侧和尾部区的微管束相对较短;后纵微管束较短、细(图版 I:7,8)。

3 讨 论

3.1 阔口尖毛虫皮层纤毛器附属微管的建构特征

阔口尖毛虫是一种常见的腹毛类尖毛科纤毛虫,早期曾应用蛋白银方法对该种纤毛虫的皮层纤毛器形态及形态发生过程进行了观察^[7],但对其纤毛器微管骨架的特征则尚无所知。作者应用激光扫描共聚焦显微术显示,阔口尖毛虫细胞皮层中,由口围带、波动膜、额腹横棘毛、左右缘棘毛等纤毛器组成微管类细胞骨架,其口围带基部含小膜托架、托架间连接微管和小膜基部微管束,波动膜基部含发达的微管骨架网,口围带和波动膜后端的汇合处含有口底托架及口后微管束,额腹横棘毛和左、右缘棘毛基部含前纵微管束、后纵微管束、横微管束或周围微管束。结果表明,该纤毛虫的微管胞器除额腹横棘毛和左、右缘棘毛基部微管外,口围带微管骨架约占细胞腹皮层的1/3范围,波动膜在其特长的纤毛列基部形成发达的微管骨架网,比较目前所知的纤毛虫口纤毛器微管骨架^[8-10],这种大型口围带和巨大型波动膜及其基部微管骨架在尖毛科乃至其他腹毛类纤毛虫中未见报道;并且,尽管在许多情况下应用蛋白银方法及荧光标记方法也能显示腹毛类纤毛虫口纤毛器基部后端的结构成分,但至今尚未对相关结构进行命名,因此作者观察到的阔口尖毛虫口底托架及口后微管束也可能是腹毛目纤毛虫中普遍存在的口纤毛器基部微管结构。

3.2 阔口尖毛虫纤毛器附属微管与其他纤毛虫的比较

目前对腹毛类纤毛虫的研究表明,其口纤毛器基部与小膜托架及波动膜骨架相联系,体纤毛器基部与前纵微管束、后纵微管束和横微管束或周围微管束等微管骨架相联系。尽管阔口尖毛虫其纤毛器基部微管也具有相似于其他腹毛类纤毛虫的基本结构成分,但与同科的其他种纤毛虫相比,其纤毛器基部微管结构也有明显的差异,例如除上述口纤毛器结构外,其腹棘毛基部的前纵微管束和后纵微管束均发达粗壮,横微管束短小;而同科的异毛虫(*Allotricha curdsi*)^[9]腹棘毛基部横微管束细

长,后纵微管束短小。阔口尖毛虫横棘毛基部前纵微管束发达,后纵微管束和横微管束不发达;而鬃棘尾虫(*Stylonychia pustulata*)^[8]横棘毛基部的横微管束和后纵微管束均发达。阔口尖毛虫的左、右缘棘毛基部横微管束均向左侧皮层伸展,形成非镜像对称的图像;与同科的贻贝棘尾虫(*S. mytilus*)^[10]的镜像对称图像不同。据此认为,阔口尖毛虫的纤毛器基部附属微管具有其种的特异性,所得结果为深入揭示腹毛目纤毛虫皮层微管建构特征的多样性提供了基础性资料。

参 考 文 献

[1] Arregui L, Munoz-Fontela C, Serrano S, et al. Direct visualization of the microtubular cytoskeleton of ciliate protozoa with a fluorescent taxoid. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2002, 49: 312 - 318.

[2] Arregui L, Munoz-Fontela C, Guinea A, et al. FLUTAX facilitates visualization of the ciliature of *Oxytrichid hypotrichs*. *European Journal of Protistology*, 2003, 39:

169 - 172.

[3] 姜慧玲, 高巍, 倪兵, 等. 魏氏拟尾柱虫腹皮层纤毛器微管胞器的形态及形态发生. *动物学报*, 2007, 53(4): 742 - 749.

[4] 史磊, 运迷霞, 顾福康. 草丛土毛虫皮层纤毛器的微管胞器研究. *分子细胞生物学报*, 2009, 42(2): 109 - 117.

[5] Li Y S, Shi L, Gu F K. Comparison of ciliature microtubule organelles in three hypotrichous ciliate species. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2010, 28(3): 443 - 450.

[6] 何兰, 曾红, 沈洁, 等. FLUTAX 法显示纤毛虫微管胞器的改良. *动物学杂志*, 2006, 41(3): 59 - 61.

[7] 顾福康, 张作人. 阔口尖毛虫无性生殖和生理改组过程的比较. *动物学研究*, 1992, 13(4): 375 - 380.

[8] 尹飞, 生欣, 顾福康. 腹毛目纤毛虫鬃棘尾虫纤毛器基部微管的荧光标记. *四川动物*, 2009, 28(3): 350 - 353.

[9] 高巍, 史磊, 顾福康. 异毛虫 *Allotricha curdsi* 皮层纤毛器基部微管的荧光标记. *复旦学报*, 2007, 46(6): 976 - 980.

[10] 曾红, 倪兵, 顾福康. 原生动物贻贝棘尾虫微管胞器的荧光标记与显示. *动物学杂志*, 2006, 41(4): 71 - 76.

图 版 说 明

1. 阔口尖毛虫腹面微管胞器 AZM-C:口围带颈部;AZM-L:口围带翻颈部;LMC:左缘棘毛;RMC:右缘棘毛;TC:横棘毛;UM:波动膜;VC:腹棘毛;FC:额棘毛;×800。2. 腹皮层微管系统 FBM:额棘毛基部微管;LMBM:左缘棘毛基部微管;RMBM:右缘棘毛基部微管;TBM:横棘毛基部微管;VBM:腹棘毛基部微管;×900。3. 口纤毛器和额棘毛基部微管 a:口围带小膜托架;b:口皮层肋壁微管;ALM:额棘毛基部前纵微管束;PLM:额棘毛基部后纵微管束;RM:额棘毛基部周围微管束;UBM:波动膜基部微管;×700。4. 波动膜基部微管骨架 c:波动膜微管骨架网;d:口皮层肋壁微管;×750。5. 非纤毛器微管骨架 e:口底托架;f:口后微管束;×950。6. TBM:横棘毛基部微管;VBM:腹棘毛基部微管;×1 000。7. 缘棘毛基部附属微管 g:前纵微管束(ALM);h:后纵微管束(PLM);i:横微管束(TM);×800。8. 缘棘毛基部附属微管 j:前纵微管束(ALM);k:后纵微管束(PLM);l:横微管束(TM);×800。标尺 = 10 μm。

Explanation of Plate

1. Microtubular organelle of ventral cortex of *Oxytricha platystoma*, AZM-C: Collar region of adoral zone of membranelles; AZM-L: lapel region of adoral zone of membranelles; LMC: left marginal cirri. RMC: right marginal cirri; TC: transverse cirri; UM: undulating membranes; VC: ventral cirri; FC: frontal cirri. ×800. 2. Microtubular system of ventral cortex, FBM: FC base microtubules; LMBM: LMC base microtubules; RMBM: RMC base microtubules; TBM: TC base microtubules; VBM: VC base microtubules. ×900. 3. Oral ciliature base microtubules and FC base microtubules, a: membranelle brackets in AZM-L; b: oral rib-wall microtubules; ALM: FC base anterior longitudinal microtubules; PLM: FC base posterior longitudinal microtubules; RM: FC base radiate microtubules; UBM: UM base microtubules. ×700. 4. Microtubular skeleton of UM, c: microtubule cytoskeletal net of undulating membranes; d: oral rib-wall microtubules. ×750. 5. Microtubular skeleton of nonciliature microtubules, e: aoral-end bracket; f: postoral microtubules. ×950. 6. TBM: TC base microtubules; VBM: VC base microtubules. ×1 000. 7. Marginal cirri (MC) base-associated microtubules g: anterior longitudinal microtubules (ALM); h: posterior longitudinal microtubules (PLM); i: transverse microtubules (TM). ×800. 8. Marginal cirri (MC) base-associated microtubules j: anterior longitudinal microtubules (ALM); k: posterior longitudinal microtubules (PLM); l: transverse microtubules (TM). ×800. Bar = 10 μm.

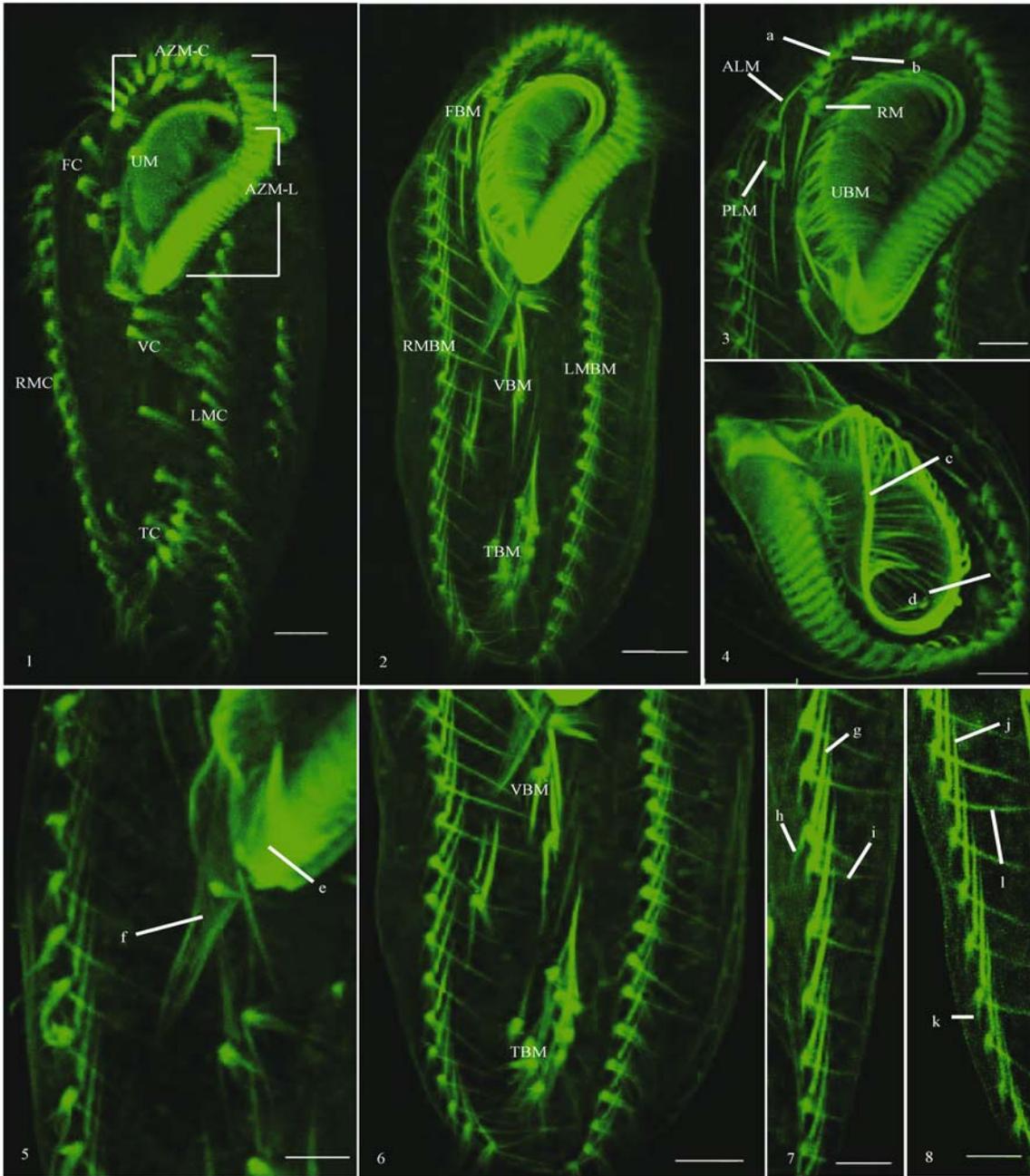
郭 键等:阔口尖毛虫皮层纤毛器微管的激光扫描共聚焦显微镜观察

图版 I

GUO Jian *et al.* : Observation of Cortical Ciliature Microtubules by Laser Scanning

Confocal Microscopy in the *Oxytricha platystoma*

Plate I



图版说明见文后