

# 温度休克法诱导草履虫的同步分裂\*

杨力行 屈云芳 洪黎民

(复旦大学生命科学学院 上海 200433)

**摘要:** 运用细胞周期原理,采用温度休克法,对尾草履虫进行分裂周期同步化的研究,实验草履虫经过 3~5 h 的处理后,就能观察到大量不同阶段的无性生殖横分裂状态,并获得了大量处于分裂阶段的草履虫。运用这种技术取材容易,获取率稳定,可达 61%,可为细胞生理学等领域的研究提供大量的同步分裂个体。

**关键词:** 尾草履虫;同步分裂;温度休克法

**中图分类号:** Q952 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2002)04-02-04

## Synchronized Division of *Paramecium* Induced by Temperature Shock

YANG Li-Xing QU Yun-Fang HONG Li-Min

(School of Life Science, Fudan University Shanghai 200433, China)

**Abstract:** Division cycle of *Paramecium* was synchronized by temperature shock based on the principle of cell cycle. After shocking for 3—5 h, a vast amount of *Paramecium* were found to be at different stages of asexual proliferation, and a large number of dividing *Paramecium* could be obtained. The synchronizing division rate reaches as high as 61%. This method may provide a large number of cells in synchronized division phase for teaching and cell physiology research.

**Key words:** *P. caudatum*; Synchronous division; Temperature shock

无性二裂生殖是原生动物的—种普通的繁殖方式。横二裂是草履虫无性生殖的特点,历来为教学实验或科学研究的一种常用的实验材料。由于草履虫群体中各个体之间生长期的不一致,往往对实验观察和研究工作带来—定的影响和困难。本研究是应用温度调控配合营养补充等条件,诱导虫体缩短生长发育周期,使群体的生长处于裂体生殖的同步状态,为教学和科研提供实验材料。

## 1 材料与—方法

### 1.1 材料

**1.1.1 尾草履虫(*Paramecium caudatum*)** 采自复旦燕园池塘,稻草、枯草杆菌、恒温水浴锅、500 ml 烧杯、毛细吸管、滴管、血球计数板、肉汤

细菌培养基。

**1.1.2 纯草履虫制备** 采集河水中含草履虫的水生植物,在 28℃ 下 10% 稻草培养液中,培养 3~4 d 进行富集,再从该培养液中用毛细吸管吸取单个草履虫,进行克隆培养,用 10% 稻草培养液培养增殖,至草履虫密度达每毫升  $2 \times 10^3 \sim 5 \times 10^3$  只左右,经鉴定为尾草履虫,备用。

**1.1.3 稻草培养液制备** 称取剪成 2~3 cm 长的无农药污染的干稻草 10 g,置于烧杯中,加清

\* 复旦大学生命科学学院“学生科技基金”资助项目;

**第一作者介绍** 杨力行,男,20 岁,复旦大学生命科学学院 2000 级本科生。

收稿日期:2001-11-05,修回日期:2002-01-10

水 100 ml, 煮沸 10 min, 冷却待用。

**1.1.4 枯草杆菌菌液制备** 已冷却的稻草培养液接入枯草杆菌后, 置于 37℃ 温箱培养 24 h, 取稻草培养液 1 ml 滴入无菌肉汤细菌培养基平板涂布, 在 37℃ 温箱培养 24 h, 用 10% 稻草培养液冲洗平板上的枯草杆菌菌苔, 制成枯草杆菌液作草履虫食饵。

**1.1.5 恒温水浴锅调温** 将盛有草履虫培养液的烧杯放置在调温水浴锅内快速升温, 利用水的热传导, 可使温度在短时间内达到指定的温度。把烧杯移入冷水浴中摇动, 使培养液快速降温。

## 1.2 方法

**1.2.1 半饥饿低温同步诱导** 将 250 ml 已纯化的草履虫培养液放置于烧杯中, 在 10~12℃ 下培养 24 h, 在这阶段中, 不补充任何营养, 使虫体处于半饥饿状态(稻草培养液清, 草履虫没有聚集现象, 虫态瘦长, 食物泡不明显), 而后将试验组温度提高为 19~21℃, 加入大量的枯草杆菌液, 投入菌液的量需使试验组培养液由清变混, 并有大量草履虫向烧杯表层移集, 在此条件下, 继续培养 4~6 h。再将温度提高至 28℃, 培养约 20 min, 即可进行随机取样计数, 计算有丝分裂指数(将测试液摇匀后用毛细吸管随机

取样, 用血球计数板计数虫体出现横缢到即将分开的数量与细胞总数之比), 以后每 30 min 计数一次, 直至试验结束。设对照组, 除温度变化外, 培养条件与试验组相同。

**1.2.2 热休克同步诱导** 将试验组分为 8 组, 每组将 250 ml 已纯化的培养液置于烧杯中, 在调温水浴锅内进行周期性温控, 即虫体在 28℃ 下培养 40 min, 接着在预先确定热休克温度为 35℃ 下培养 30 min, 再回复到已确定的最适温度 28℃ 下培养 40 min。每经过一个周期取出一组试验组, 在 25℃ 下, 测定有丝分裂指数。

**1.2.3 半饥饿低温与热休克协同进行同步诱导** 试验组分为 5 组, 首先是半饥饿低温培养, 而后进行热休克周期性培养, 最后测定有丝分裂指数。

## 2 结果

**2.1 半饥饿低温同步诱导** 在 25~28℃ 下营养补充良好的环境中, 草履虫的有丝分裂指数平均为 6% 左右。经过诱导, 草履虫的同步分裂明显提高, 对照组有丝分裂指数只有 6%, 而试验组平均有丝分裂指数达 20% 以上, 说明半饥饿低温同步诱导具有一定的效果(图 1)。

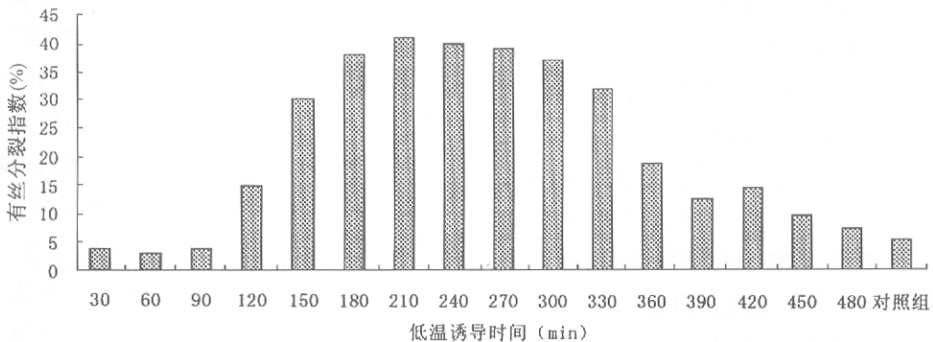


图 1 草履虫半饥饿低温同步分裂数值图

**2.2 热休克同步诱导** 试验结果表明, 热休克的同步诱导效果与休克的重复次数有关, 不同次数诱导的同步率不一样, 休克 5 次时虫体细胞同步分裂的比例最高, 可达 59%, 经 3~4 次和 6~7 次热休克处理时也能获得较好的同步

率(图 2)。

**2.3 半饥饿低温与热休克协同进行同步诱导** 试验结果表明, 经过此种方法处理, 虫体有丝分裂指数可达 61%(图 3)。

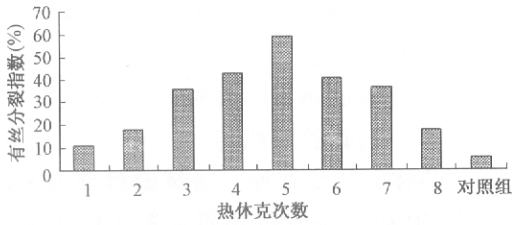


图2 草履虫热休克同步分裂数值图

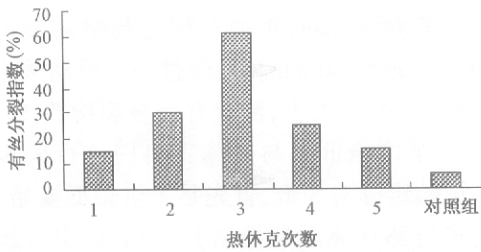


图3 草履虫半饥饿低温与热休克协同进行同步分裂数值图

### 3 讨论

**3.1 半饥饿低温同步诱导** 经过半饥饿低温同步诱导后,其中一部分虫体分裂过程受阻,停留在细胞分裂前期,其它虫体处于细胞分裂的物质合成过程,此时温度并不影响虫体的生长。结果是一部分虫体分裂受阻,另一部分虫体迅速生长,从而缩小群体间的年龄差。再经过适温条件——18~21℃下的复化期,最后使虫体进入分裂前的最佳状态,一旦给予适合分裂的温度(28℃),就可见到虫体的同步分裂现象。但虫体的同步率不太高,群体分裂过程需持续3~4 h,群体同步率最高为41%。这种方法简单可行,较适合教学实验的观察,它可以在较短时间内观察到一定数量的同步分裂过程。

**3.2 热休克同步诱导** 热休克能使虫体分裂进入同步状态,这与低温同步诱导的机理是相似的。利用细胞分裂前某些反应对冷热温度变化十分敏感,短时间内的温度变化使虫体细胞分裂受阻,使部分细胞处于休克状态,但生物合成不停止,以此达到同步效应。试验结果表明,热休克的同步诱导效果与休克的重复次数有关,不同次数诱导的同步率不一样,处理次数过

少或过多都不能获得理想的效果。这是因为一次热休克作用过程只能使一部分虫体处于细胞分裂前期阶段,而草履虫是高密度的群体,虫体间的年龄差甚大,只有经过多次的热休克作用,使在分裂前的物质准备方面落后的虫体可赶上其它虫体,使草履虫群体的年龄差缩小;但这又是个有限的过程,无限制的热休克并不能使所有虫体细胞发育都同步,因为热休克虽限制虫体分裂,一旦虫体细胞分裂前的物质准备积累到一定的量,分裂仍会照常进行,所以同步率不可能达到100%。作者在观察热休克过程中发现,热休克同步诱导比低温诱导方法效果要好,同步率高,处理时间短,但操作程序繁,条件比较苛刻,尤其是热休克的温度必须反复实验才能确定。此温差范围必须严格控制在±0.5℃以内,偏低则虫体不进入休克状态,影响同步化程度,偏高会致死。这种方法较适用于原生动物细胞学的研究,通过这种手段能获得大量处于分裂阶段的草履虫样品。

### 3.3 半饥饿低温与热休克协同进行同步诱导

此方法吸收了低温和热休克的优点,可进一步提高同步率,缩短周期,比低温或热休克的单一方法更简便有效。

目前,使细胞同步化的培养方法有很多,如选择法、诱导法等。选择法是利用仪器设备从大量的细胞中直接筛选出所需的细胞,有过滤<sup>[1]</sup>、蔗糖梯度分离法<sup>[2,3]</sup>等,但所需仪器复杂、准备时间长、技术要求高、代价高。诱导法又分化学诱导和物理诱导,与选择法相比,更易获得大量分裂细胞。化学诱导主要是在一个时期限制主要营养物的供应或加入一些化学抑制剂,使细胞生长或分裂停止在某一阶段,这种方法最后获得的细胞,其周期已处于非正常状态,且细胞中的一些化学反应已被阻断或破坏<sup>[4]</sup>。物理诱导有光照诱导法(有人用光照诱导眼虫同步分裂<sup>[5]</sup>)、温度休克法等。本方法采用温度休克法(曾应用于四膜虫同步分裂的诱导<sup>[6]</sup>)操作简单,费时少,得率高,且对细胞本身的影响较小,可以广泛应用于科研和教学。

## 4 结 论

半饥饿低温同步诱导能使草履虫同步率提高,有丝分裂指数可达 41%,平均为 20%,对照组有丝分裂指数为 6%。热休克同步诱导能使草履虫同步率进一步提高,有丝分裂指数可达 59%。半饥饿低温与热休克协同进行同步诱导能使草履虫同步率提高到 61%,并使操作过程大大缩短。

## 参 考 文 献

- [1] Murayama Y. Synchrony of Cell Division and Growth. New York: Interscience Publishers, 1964. 421 ~ 432.
- [2] Sinclair R, Bishop D H L. Synchronous culture of strain-1 mouse

cells. *Nature*, 1965, **205**: 1 272 ~ 1 273.

- [3] Schindler R, Ramseier L, Schaer J C *et al.* Studies on the division cycle of mammalian cells: III preparation of synchronously dividing cell populations by isotonic sucrose gradient centrifugation. *Cell Research*, 1970, **59**: 90 ~ 96.
- [4] Pagano M(张世馥译). 细胞周期——材料和方法. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 178 ~ 189.
- [5] Carre I A, Edmunds L N. Oscillator control of cell-division in euglena-cyclic-AMP oscillations mediate the phasing of the cell-division cycle by the circadian clock. *Journal of Cell Science*, 1993, **104**: 1 163 ~ 1 173.
- [6] Zeuthen E. Independent synchronization of DNA synthesis and of cell division in same culture of tetrahymena cell: demonstration that heat-shock induced division-synchrony is by differential extension of the G2 phase. *Cell Research*, 1970, **61**(2/3): 311 ~ 325.