

FLUTAX 法显示纤毛虫微管胞器的改良

何 兰^① 曾 红^{①②} 沈 洁^① 牛延宁^① 娄慧玲^① 顾福康^{①*}

(^①华东师范大学生命科学院 上海 200062; ^②福建师范大学生物工程学院 福州 350007)

摘要:在参考 Arregui 等报道的方法的基础上,对紫杉醇荧光染色(FLUTAX)显示纤毛虫细胞微管胞器的流程进行了改进,对其中一些试剂的配方作了调整,改进了多聚赖氨酸涂布玻片、皂苷孵育、多聚甲醛固定和 Triton X-100 渗透等步骤。

关键词:纤毛虫;微管胞器;FLUTAX 方法

中图分类号:Q952 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2006)03-59-03

An Improved FLUTAX Method for Visualizing the Microtubule Organelle of Ciliates

HE Lan^① ZENG Hong^{①②} SHEN Jie^① NIU Yan-Ning^① LOU Hui-Ling^① GU Fu-Kang^①

(^① Department of Biology, East China Normal University, Shanghai 200062;

^② Bioengineering College of Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China)

Abstract: A more effective improved method for visualizing the microtubule organelle of ciliates with FLUTAX has been established based on the procedure described by Arregui et al. Four main improved steps are coating slides with polylysine incubating cells with saponin fixing cells with polyformaldehyde and infiltrating cells with Triton X-100.

Key words: Ciliates; Microtubule organelle; FLUTAX method

微管胞器一直是纤毛虫分类学和细胞学领域的重要研究对象。早期,采用银浸法(wet silver impregnation)来显示纤毛虫的毛基体等微管胞器及银线系^[1],此后又提出了蛋白银方法(protargol impregnation)来显示纤毛及其附属结构^[2]。近年来随着抗微管蛋白抗体的广泛应用,免疫荧光技术也开始应用于对微管胞器的形态学研究。

Arregui 等首次提出了紫杉醇荧光染色(Fluorescent taxoid, FLUTAX)方法^[3-4]来显示纤毛虫的微管细胞骨架。FLUTAX 是一种水溶性紫杉醇荧光衍生物,是紫杉醇耦联一个氨基自由基 7-O-(L-alanyl),再与荧光素共价结合的产物。目前使用的 FLUTAX 有 FLUTAX-1 和 FLUTAX-2 两种。这类衍生物与紫杉醇类似,能与微管特异性地结合^[5-7],具有很强的亲和力。

本实验室经实验发现,Arregui 等所述方法简便迅速,但对虫体较软的某些纤毛虫细胞不太适用,细胞容易破碎,实验效果不太稳定。作者在此基础上,对试剂的配方和实验步骤作了改进。

1 材料与方 法

1.1 实验材料 以一种游仆虫(*Euplotes* sp.)、魏氏拟尾柱虫(*Paraurostyla weissei*)、贻贝棘尾虫(*Stylonychia mytilus*)、红色伪角毛虫(*Pseudokeronopsis rubra*)和尾草履虫(*Paramecium caudatum*)为材料。其中游仆虫、魏氏拟尾柱

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No.30470201);

* 通讯作者, E-mail: fkgu@bio.ecnu.edu.cn;

第一作者介绍 何兰,女,硕士研究生,研究方向:动物细胞及分子生物学。

收稿日期 2005-11-21,修回日期 2006-03-01

虫、贻贝棘尾虫和尾草履虫由本实验室采集,经纯系培养后获得。伪角毛虫由中国海洋大学原生动物学研究室提供,经麦粒液培养后用作实验材料。

1.2 试剂 PHEM 缓冲液:60 mmol/L PIPES, 25 mmol/L HEPES, 10 mmol/L 乙二醇双(2-氨基乙基)四乙酸, 6 mmol/L $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, pH 6.9; 1% 皂苷溶液:1 g 皂苷, PHEM 缓冲液定溶至 100 ml; 固定液:2 g 多聚甲醛, PHEM 缓冲液定溶至 100 ml; 渗透液:0.5 ml Triton X-100, PHEM 缓冲液定溶至 10 ml; PBS 缓冲液:136.8 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 10.1 mmol/L Na_2HPO_4 , 1.8 mmol/L KH_2PO_4 , pH 7.4。

1.3 实验方法 荧光标本的制备 (1)用微量移液器吸取 50 μ l 1% 多聚赖氨酸溶液在洁净的载玻片上涂一片 1 cm \times 1 cm 的区域, 风干待用 (2)在体视显微镜下, 用微吸管吸取生长状态良好的虫体, 置于载玻片上涂有多聚赖氨酸的区域, 滴加一滴 1% 的皂苷溶液, 渗透 30 s; (3)用微吸管吸去残留的皂苷溶液, 迅速滴加 2% 多聚甲醛固定液, 固定 30 s (4)用微吸管吸去固定液, 迅速滴加 0.5% Triton X-100, 抽提 1 min (5)用微量移液器吸取 0.01 mol/L PBS 缓冲液 100 μ l 漂洗虫体 2~3 次, 每次 3 min (6)用微吸管吸去 PBS, 迅速滴加 1 μ mol/L FLUTAX- α (Molecular Probes, Inc, Cat # P22310) 溶液进行渗透结合, 10~15 min, 吸除残余的 FLUTAX; (7)0.01 mol/L PBS 缓冲液漂洗虫体, 清洗 2~3 次, 每次 3 min, 吸去多余的溶液 (8)滴加一滴防猝灭剂 (antifade reagent: citifluor mounting Media, Sigma, Cat # 19470) 轻轻盖上盖玻片。

观察和照相:应用 Olympus BX51 荧光显微镜及 Cool SNAP-Pro 数码相机观察照相。荧光的激发波长为 492 nm, 发射波长为 520 nm。

2 结果与讨论

上述方法显示 5 种纤毛虫细胞微管胞器的荧光照片(图版 I:1~5)。结果表明, 本方法显示纤毛虫细胞微管骨架效果较为理想。所用的实验材料其中游仆虫、拟尾柱虫、棘尾虫和草履

虫为淡水种纤毛虫, 伪角毛虫为海水种, 两者比较淡水种的荧光效果要明显好于海水种。纤毛虫经 FLUTAX 染色后能清晰地观察到腹面的口围带、口侧膜、额腹横棘毛及左、右缘棘毛(图版 I:1~3); 纤毛器的基部纤维经染色后也能清晰地显示(图版 I:4); 并且草履虫背面的纤毛及其微管网可以清晰地观察到, 其中位于背面的伸缩泡微管也清楚地显示出来。

与 Arregui 等的方法相比, 本实验先将纤毛虫细胞粘贴在涂被多聚赖氨酸的载玻片上, 有助于减少实验中细胞的丢失和减少背景噪声, 同时方便实验操作。Arregui 等分别提到用 0.1% Triton X-100 抽提细胞和 0.5% 皂苷孵育及 2% 多聚甲醛固定细胞等方法可以改善显示效果^[3,4]。本实验室综合了这 3 个步骤, 荧光图片显示虫体较透明, 基部纤维显示较清晰。其中 Triton X-100 的浓度和作用时间根据不同种纤毛虫有所变化, 对较柔软易弯曲的细胞抽提时间稍短, 相反的抽提时间可以稍微延长, 但时间太长, 也会导致细胞变形, 甚至破裂。另外, 在加入 FLUTAX 前后都要采用 PBS 清洗, 以洗去未结合的 FLUTAX 以及染上 FLUTAX 的杂质, 减少观察时的干扰。本实验中, 采用了 4 种淡水种纤毛虫和 1 种海水种纤毛虫, 实验结果显示, 淡水种的荧光效果要明显好于海水种, 原因可能是: 一是伪角毛虫本身有色素颗粒, 在荧光显微镜下可能会产生自发荧光, 从而干扰观察, 致使荧光偏黄; 二是实验试剂均为过滤水配制, 对淡水种的作用效果可能好于海水种。

参 考 文 献

- [1] Corliss J O. Silver impregnation of ciliated protozoa by the Chatton-Lwoff technic. *Stain Technol*, 1953, **28**: 97~100.
- [2] Wilbert N. Eine verbesserte technik der protargol-imprägnation für ciliaten. *Mikrokosmos*, 1975, **64**: 171~179.
- [3] Arregui L, Muñoz-Fontela C, Serrano S, et al. Direct visualization of the microtubular cytoskeleton of ciliate protozoa with a fluorescent taxoid. *J Euk Microbiol*, 2002, **49**: 312~318.
- [4] Arregui L, Muñoz-Fontela C, Guinea A, et al. FLUTAX facilitates visualization of the ciliature of oxytrichid hypotrichs. *Europ J Protistol*, 2003, **39**: 169~172.
- [5] Diaz J F, Barasoain L, Andreu J M. Fast kinetics of taxol binding

to microtubules. Effects of solution variables and microtubule-associated proteins. *J Biol Chem* 2003 **278** 8 407 ~ 8 419.

[6] Diaz J F ,Strobe E ,Engelborghs Y ,Souto A A ,et al . Molecular recognition of taxol by microtubules : kinetics and thermodynamics of binding of fluorescent taxol derivatives to an

exposed site. *J Biol Chem* 2000 **275** 26 265 ~ 2 6276.

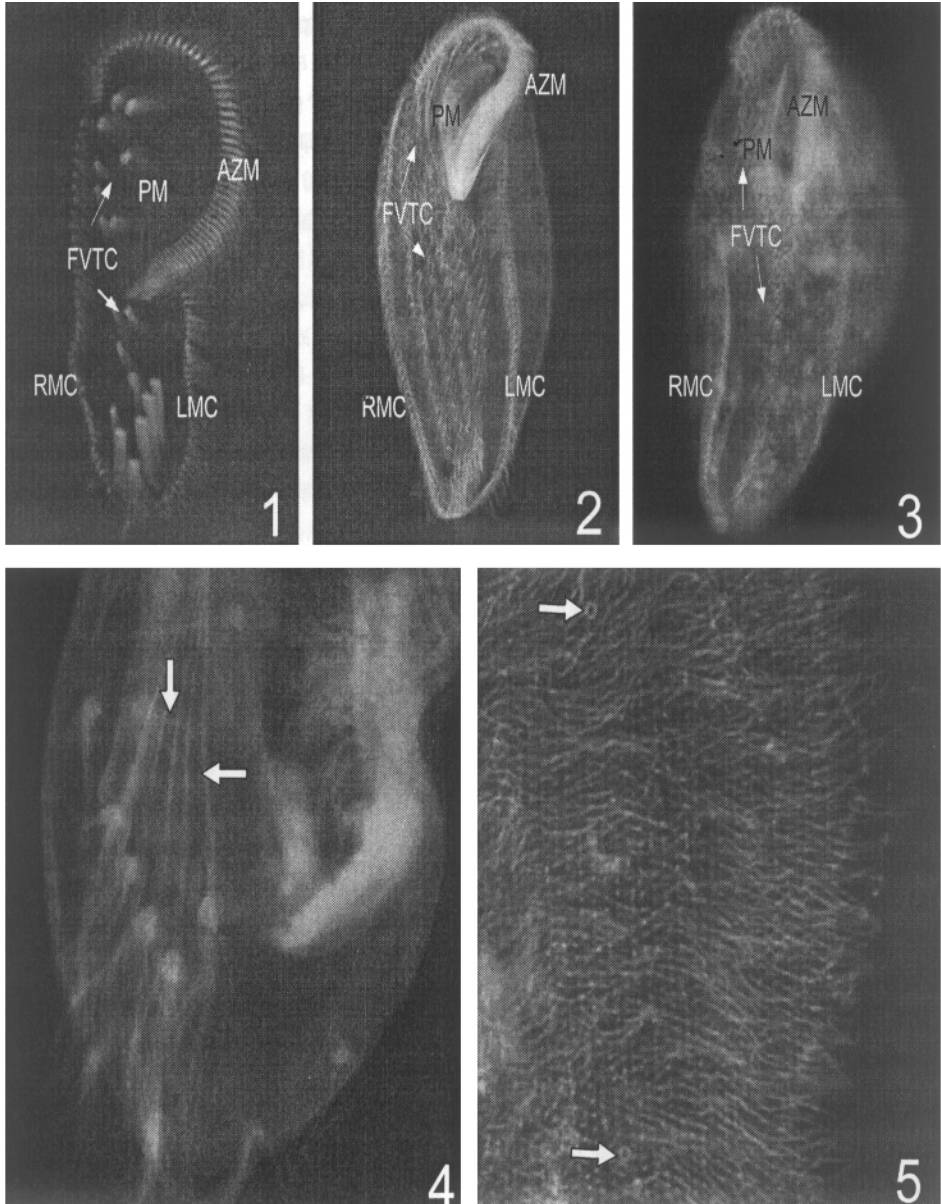
[7] Evangelio J A ,Abal M ,Barasoain I ,et al . Fluorescent taxoid as probes of the microtubular cytoskeleton. *Cell Motil and Cytoskeleton* ,1998 **39** 73 ~ 90.

何 兰等 :FLUTAX 法显示纤毛虫微管胞器的改良

图版 I

HE Lan et al . :An Improved FLUTAX Method for Visualizing the Microtubule Organelle of Ciliates

Plate I



1 ~ 3. 分别为棘尾虫、拟尾柱虫和伪角毛虫腹面的微管胞器(AZM :口围带 ; PM :口侧膜 ; FVTC :额腹横棘毛 ; LMC :左缘棘毛 ; RMC :右缘棘毛); 4. 游仆虫横棘毛及其基部微管(箭头示基部纤维); 5. 草履虫背面的纤毛及其微管网(箭头示前后伸缩泡孔微管)。1 ~ 5 放大倍数分别为 : × 248 , × 260 , × 260 , × 850 , × 875。