

原生动物贻贝棘尾虫微管胞器的荧光标记与显示

曾红^{①②} 倪兵^① 顾福康^{①*}

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

摘要:采用 FLUTAX 直接荧光标记和抗 α 微管蛋白抗体的间接免疫荧光标记显示,原生动物贻贝棘尾虫 (*Stylonychia mytilus*) 细胞微管胞器由口围带、波动膜、额腹横棘毛、左右缘棘毛、背纤毛等纤毛器微管骨架、纤毛器基部附属微管和其他皮层微管骨架组成。纤毛器微管骨架和基部附属微管按皮层纤毛模式定位,皮层左、右侧微管带和领肋壁微管等其他皮层微管构成细胞特定位置的皮层微管骨架,并可能为具有背腹分化的腹毛目纤毛虫所特有,对维持细胞背腹面的形态、支持附近纤毛器(如左、右缘棘毛)的运动起作用。本文较完整地阐述了其细胞骨架的三维构形,对于深入了解纤毛虫细胞微管骨架的结构和分布特征,进一步揭示微管类胞器的功能是有意义的。

关键词:贻贝棘尾虫;微管胞器;荧光标记

中图分类号:Q954.0952 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2006)04-71-06

Microtubular Organelles in *Stylonychia mytilus* Revealed by Fluorescent Labeling

ZENG Hong^{①②} NI Bing^① GU Fu-Kang^①

(^①School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai 200062;

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

Abstract: Microtubular organelles of protozoa, *Stylonychia mytilus*, was analyzed with anti- α -tubulin antibody and FLUTAX. The results showed that the microtubular organelles consisted of ciliatures and its base-associated microtubules as well as cortex microtubular cytoskeletons. The ciliatures include adoral zone of membranelles (AZM), undulating membranes (UM), frontal-ventral-transverse cirri (FVTC), left- and right-marginal cirri (LRMC), dorsal kineties (DK), etc. The ciliatures and base-associated microtubules arrayed in the specific areas of cortex. Meanwhile, the left- and right-microtubular ribbons, oral rib-wall microtubules and other microtubules composed the cortical microtubular cytoskeletons in fixed areas and they might be owned especially by the hypotrich ciliates which had dorsoventral differentiation. Moreover, they might function in the cortex-shaping and support the movement of ciliary organelles nearby. This paper describes a three-dimension network composed of microtubular cytoskeletons and provides valuable references for a better understanding of the structure characteristics and functions of microtubular cytoskeletons in ciliates.

Key words: *Stylonychia mytilus*; Microtubular organelles; Fluorescent labeling

近年来,对四膜虫(*Tetrahymena*)、草履虫(*Paramecium*)等纤毛虫的研究表明,纤毛虫中的微管类细胞骨架的类型极其丰富^[1-5],因此以纤毛虫为材料研究微管的组装和调控具有不可比拟的优越性。但目前除游仆虫(*Euploes*)

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 30470201),福建师范大学校扶苗基金资助项目(No. FM001);

* 通讯作者, E-mail: fkgu@bio.ecnu.edu.cn;

第一作者介绍 曾红,女,博士研究生,研究方向:动物细胞及分子生物学。

收稿日期:2006-01-10,修回日期:2006-04-26

外,对微管组成更为复杂的腹毛目纤毛虫研究得甚少,特别是对其中一些大型的种类,如贻贝棘尾虫(*Stylonychia mytilus*)等也未见报道。近年来,随着微管蛋白抗体的广泛应用,免疫荧光技术开始应用于微管类胞器的形态学研究,可高效地显示纤毛类微管系统的分布^[6,7]。Arregui 等还报道了显示细胞微管的 FLUTAX 直接荧光素标记法^[8,9],利用 FLUTAX(一种水溶性紫杉醇荧光衍生物)能与微管特异接合的特性^[10-12]也可有效地显示细胞的微管类胞器。本文应用这两种方法对贻贝棘尾虫的微管系统作了显示,有助于深入揭示腹毛目纤毛虫微管骨架的结构和功能,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 所用材料为贻贝棘尾虫,2004 年 10 月采集自上海市青浦区,经纯系培养后获得。

1.2 方法 将棘尾虫接种在培养皿中培养,以草履唇滴虫(*Chilomonas paramecium*)为食料进行纯系培养,取生长状态良好的棘尾虫为材料。

1.2.1 FLUTAX 直接荧光标记法 对 Arregui 等的方法加以改进^[13]。(1)在解剖镜下,收集、浓缩生长状态良好的棘尾虫于凹玻片中;(2)滴加含 0.5% 皂苷的 PHEM 缓冲液(60 mmol/L PIPES, 25 mmol/L HEPES, 10 mmol/L EGTA, 2 mmol/L MgCl₂, pH 6.9)使细胞低渗数秒;(3)用含 2% 多聚甲醛的 PHEM 缓冲液固定细胞;(4)将细胞小心移至经多聚赖氨酸预处理过的洁净载玻片,用含 0.1% Triton X-100 的 PHEM 缓冲液抽提细胞 10 min,再用 PHEM 漂洗数遍;(5)滴加 1 μmol/L 的 FLUTAX-2(Molecular Probes Inc)孵育 10 min;(6)用 PBS 缓冲液漂洗数遍后,加上盖玻片。Olympus BX51 荧光显微镜观察、照相。

1.2.2 抗 α 微管蛋白的特异性免疫荧光标记法 参考 Arregui 等的方法^[8]并作适当修改,具体步骤如下:(1)收集、浓缩生长状态良好的棘尾虫于凹玻片中;(2)用含 0.5% 皂苷的 PHEM 缓冲液低渗细胞;(3)2% 多聚甲醛的 PHEM 缓

冲液固定;(4)用含 0.1% Triton X-100 的抽提缓冲液(0.1 mol/L 蔗糖, 2.5 mmol/L MgCl₂, 0.1 mmol/L KCl, 1 mmol/L EDTA, 10 mmol/L HEPES)低渗细胞。待虫体透明,用冷的抽提缓冲液冲洗;(5)用含 3% BSA 的 PBS 缓冲液漂洗 3 次,每次 3~5 min;(6)1:1000 的鼠抗 α 微管蛋白 DM1A 抗体(Sigma)孵育 1 h,后用含 3% BSA 的 PBS 缓冲液漂洗 3 次,每次 3~5 min;(7)1:100 的 FITC 标记羊抗鼠 IgG(Sigma)孵育 1 h,后用含 3% BSA 的 PBS 缓冲液漂洗 3 次,每次 3~5 min;(8)加一滴防猝灭剂 Cityfluor(Sigma),封片。Olympus BX51 荧光显微镜观察、照相。

本方法与 Arregui 等的方法相比,增加了用 0.5% 皂苷的 PHEM 缓冲液低渗细胞的步骤,随即固定。此改进可以减少棘尾虫细胞的破裂,且观察到的微管结构更清晰,制片效果更好。

2 结果

2.1 背腹面皮层纤毛器微管 贻贝棘尾虫腹面皮层微管胞器由口围带、波动膜、额腹横棘毛和左、右缘棘毛等胞器组成(图版 I:1)。口围带小膜排列成弧形,其基部起始于细胞长轴 1/2 位置,向左前侧弯曲伸展,终止于细胞右前端。整个口围带含 65~70 片小膜,其中自基部起向前约占 1/2 长度的小膜纤毛列较长,再向前约 1/2 长度的小膜纤毛列逐渐变短。波动膜 2 片,自口围带基部位置起始并向前伸展,约占细胞长轴的 1/4 部分。每片波动膜是由数十根纤毛横向排列联合而成的膜状物,纤毛向外朝左侧口围带伸展。额腹横棘毛按 8、5、5 模式分布在特定的位置上,其中 5 根横棘毛较粗大,前 4 根额棘毛次之,后 4 根额棘毛和 5 根腹棘毛粗细接近。左、右缘棘毛各 1 列,左缘棘毛列含棘毛约 30 根,右缘棘毛列含棘毛约 40 根。全部棘毛是由许多根纤毛集合特化而成的长毛笔状复合物(图版 I:2)。

细胞背面的主要微管胞器是 5 列背纤毛,其中最长的 3 列背纤毛呈平行排列,纵行于背皮层前后。每列纤毛由 35~40 根背纤毛组成,每根背纤毛以基体为中心,分别向其右前方和

左后方伸出前纵微管和后纵微管。各个背纤毛微管相互平行排列,形成一个纵形的长微管带(图版 I 3)。

2.2 口围带、波动膜骨架 口围带骨架约占虫体全长的 $1/2$ (图版 I 2)。口围带的微管骨架呈弯曲的梯子形,其中小膜托架横向平行排列,小膜间连接微管在两侧分别将前后相邻的小膜托架连接起来。每个小膜托架发出约 4 束长短不等的小膜后微管束向右后方聚集(图版 I : 4)。口围带后端约占 $1/2$ 长度的小膜托架较细长,向内还伸出末端呈倒“V”形的微管(开口朝向右侧的波动膜),与波动膜托架衔接(图版 I : 5)。细胞领部口围带的小膜托架逐渐加粗、变短,并渐弯成拱形。在细胞领前缘,以倒“U”字形微管为单元紧密排列形成坚固的领肋壁前缘骨架(图版 I 6)。

波动膜骨架位于口围带基部骨架内侧的口腔肋壁,其中由一根较粗的纵微管和其左侧约 20 多根微管横向平行排列形成微管托架网,托架左侧与口围带小膜托架的微管相互联系镶嵌在一起(图版 I 5)。

2.3 额、腹、横棘毛基部附属微管 额、腹、横棘毛基部被其周缘的的荧光衬托显示不等边形构造。棘毛基部形成向细胞质不同方向放射的附属微管,即前纵微管束、后纵微管束、横微管束和周围微管束等。其中最前端 3 根额棘毛基部发出的前纵微管束向前伸入口腔肋壁,与口腔肋壁微管交互排列在一起,其后纵微管束伸向基部左后侧(图版 I 7)。横棘毛基部呈长方形,从基部的边缘分别向前、后方皮层发出前纵微管束和后纵微管束(图版 I : 8),该五部分横棘毛基部前纵微管束在其前方集合到一点上成倒扇形分布(图版 I 9)。

此外,在各个横棘毛基部向四周伸展出数根放射状排列的周围微管束(图版 I : 10)。

2.4 左、右缘棘毛基部附属微管 左、右缘棘毛中,每个缘棘毛基部发出横微管束、前纵微管束和后纵微管束等附属微管。各个微管束按规则定位和排列,于细胞左、右侧形成坚固的立体微管网。前纵微管束自棘毛基部左侧向左前方

皮层伸展,后纵微管束自棘毛基部右后侧向右后皮层伸展。该两种微管在左、右缘棘毛列中显示相似的定位特征,但横微管束的定位则不同,其中左缘棘毛基部横微管束自棘毛基部向右伸展在皮层内,右缘棘毛基部横微管束自棘毛基部向左侧皮层伸展。横微管束的长短不一,但相应部位的左、右缘棘毛基部伸出的横微管束长度基本一致(图版 I 8)。

2.5 其他皮层微管骨架 在口围带内缘的口皮层内,含有纵向紧密排列的微管,其微管外端与口围带骨架在领部特化形成的“U”形微管接续,向内伸展至皮层深部(图版 I 6, 11)。

在细胞左、右侧分别于左缘棘毛基部微管外侧和右缘棘毛基部微管内侧纵向分布有左、右侧微管带。在口围带骨架与左缘棘毛基部交界处左侧微管带的微管紧密聚集形成三角形,之后微管向后部延伸并逐渐变窄带状(图版 I 8)。右侧微管带自细胞右前端口围带骨架的外侧起始,一直向后延伸至尾部,成一宽度一致的长条带形(图版 I 6, 12)。

在细胞后端,其尾部微管系统特别发达,其中横棘毛基部强大的附属微管,即前纵微管束、后纵微管束和周围微管束与尾部的左、右缘棘毛基部发出的横微管束等附属微管交织在一起,形成尾部的立体微管网(图版 I 9, 10)。

3 讨论

3.1 棘尾虫细胞微管胞器的组成和建构特征

本文采用直接荧光标记和间接免疫荧光标记显示,贻贝棘尾虫细胞微管胞器由口围带、波动膜、额腹横棘毛和左、右缘棘毛、背纤毛等纤毛器及其骨架、纤毛器基部附属微管和其他皮层微管骨架组成。其中,口围带微管骨架由小膜托架、小膜间连接微管、小膜附属微管等构成;波动膜微管骨架由平行排列的微管网组成;额腹横棘毛和左、右缘棘毛基部附属微管包括前纵微管束、后纵微管束、横微管束和周围微管束等,背纤毛基部附属微管有前纵微管束和后纵微管束。此外,皮层左、右侧微管带、领部肋壁微管等其他皮层微管构成细胞特定位置的皮层微

管骨架。在腹毛目纤毛虫皮层细胞骨架研究中, Grim 依据透射电镜术和蛋白银方法获得的结果, 构建了施氏腹柱虫(*Gastrostyla steinii*) 棘毛类纤毛器微管骨架三维图形^[14, 15]; 所在实验室应用蛋白银方法、透射电镜术和生化去膜与扫描电镜术相结合的方法, 显示了游仆虫和四角翁尼科虫(*Onychodromus quadricornutus*) 皮层纤毛器骨架与其他皮层骨架的整体结构图形^[16~21], 作者在史新柏应用蛋白银方法显示棘尾虫皮层纤维结构*的基础上, 采用两种荧光标记法分别针对微管和 α 微管蛋白, 获得了棘尾虫中以微管为基本成分的细胞微管骨架的图像, 所得结果有助于深入了解纤毛虫细胞微管骨架的结构和分布特征, 对于进一步揭示微管类胞器的功能是有意义的。

3.2 棘尾虫细胞肋壁微管和左、右侧皮层微管带、尾部皮层微管网的作用 关于腹毛目纤毛虫肋壁微管和左、右侧皮层微管带、尾部皮层微管网的结构和构形未见报道。棘尾虫细胞中这些皮层微管结构的作用是显而易见的, 其中: 口皮层肋壁微管与领部口围带骨架、额棘毛基部前纵微管束交织, 一起形成细胞前部立体微管网, 除对细胞前部皮层形态的维持及口纤毛器、额棘毛的定位起重要作用外, 还可充当口围带、波动膜纤毛运动的骨架, 有助于细胞摄食等生理活动; 左、右侧皮层微管带与口围带骨架、尾部微管网连贯起来形成环绕细胞周边的强固立体微管网, 各种纤毛器通过附属微管直接或间接与左、右侧微管带交织, 使纤毛器基部得到加固, 而且左、右侧微管带可能是具有背腹分化的腹毛目纤毛虫特有的, 对维持细胞背腹面的形态、支持附近纤毛器(如左、右缘棘毛)的运动是有作用的; 此外, 尾部皮层微管网不仅巩固了横棘毛、尾部的左、右缘棘毛的定位, 而且与横棘毛、缘棘毛基部附属微管相互交织, 可能也与横棘毛和尾部缘棘毛的运动协调有关。

3.3 棘尾虫微管胞器与其他纤毛虫微管胞器的比较 在腹毛目纤毛虫中, 目前对游仆虫的皮层骨架研究和报道较多。尽管棘尾虫和游仆虫具有不同的皮层纤毛模式, 皮层细胞骨架按

其纤毛模式分布在皮层特定位置, 体现出种的特异性。但棘尾虫和游仆虫口纤毛器骨架与棘毛基部的附属微管种类及构成很相似, 如口围带骨架和波动膜骨架都是由小膜托架横向平行排列而成^[22]; 而且这两种纤毛虫横棘毛的前纵微管束都向前集结, 区别在于棘尾虫是集合在皮层内前方较近处, 而游仆虫的前纵微管束集合在细胞的最前端(几乎纵贯细胞全长)。口围带小膜后微管束、棘毛基部附属微管向不同方向放射排列表现出极性和不对称性, 在腹毛目纤毛虫中可能具有普遍性。

参 考 文 献

- [1] Gaertign J. Molecular mechanisms of microtubular organelle assembly in *Tetrahymena*. *J Eukaryot Microbiol*, 2000, **47** (3): 185 ~ 190.
- [2] Iftode F, Cleorot J C, Levilliers N, et al. Tubulin polyglycylation: a morphogenic marker in ciliates. *Biol Cell*, 2000, **92**: 615 ~ 628.
- [3] Iftode F, Fleury-Aubusson A. Structural inheritance in *Paramecium*: ultrastructural evidence for basal body and associated rootlets polarity transmission through binary fission. *Biol Cell*, 2003, **95**: 39 ~ 51.
- [4] Foissner W, Schlegel M, Prescott D M. Morphology and morphogenesis of *Onychodromus quadricornutus* n. sp. (Ciliophora, Hypotrichida), an extraordinary large ciliate with dorsal horns. *J Protozool*, 1987, **34**: 150 ~ 159.
- [5] Grims G W. Cortical structure in nondividing and cortical morphogenesis in dividing *Oxytricha fallax*. *J Protozool*, 1972, **19**(3): 428 ~ 445.
- [6] Arregui L, Serrano S, Guinea A. Microtubular elements of the marine Antarctic ciliate *Euplotes focardii* (Ciliophora, Hypotrichia). *Arch Protistenkd*, 1994, **144**: 357 ~ 364.
- [7] 田沁, 张莉, 隋淑光等. 休眠期和营养期包囊游仆虫的纤毛器骨架及其微管蛋白. *动物学研究*, 2002, **23**(5): 405 ~ 408.
- [8] Arregui L, Munoz-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.
- [9] Arregui L, Munoz-Fontela C, Guinea A, et al. FLUTAX facilitates visualization of the ciliature of Oxytrichid hypotrichs.

* 史新柏. 棘尾虫的纤维系统. 中国原生动物学会第三次学术讨论会论文摘要汇编, 1985. 27 ~ 28.

- Europ J Protistol* 2003, **39** :169 ~ 172.
- [10] Diaz J F, Barasoain I, 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.
- [11] Diaz J F, Strobe R, Engelborghs Y, 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 ~ 26 276.
- [12] Evangelio J A, Abal M, Barasoain I, et al. Fluorescent taxoid as probes of the microtubular cytoskeleton. *Cell Motil and Cytoskeleton*, 1998, **39** (1) :73 ~ 90.
- [13] 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) 56 ~ 61.
- [14] Grim J N. *Gastrostyla steinii*: infraciliature. *Trans Amer Micros Soc*, 1970 **89** :486 ~ 497.
- [15] Grim J N. Fine structure of the surface and infraciliature of *Gastrostyla steinii*. *J Protozoa*, 1972, **19** :113 ~ 126.
- [16] 顾福康, 张作人. 一种游仆虫棘毛基部纤维的形态及其在形态发生过程中的演化. *动物学研究*, 1989, **10** (2) :89 ~ 96.
- [17] 顾福康, 张作人. 一种游仆虫皮层纤维结构的扫描电镜研究. *动物学研究*, 1991, **12** (4) :337 ~ 341.
- [18] 顾福康, 季玲妹. 包裹游仆虫皮层和营养核的超微结构研究. *动物学研究*, 1996, **17** (1) :16 ~ 22.
- [19] 顾福康, 邹士法, 李艺松等. 镰游仆虫腹面皮层细胞骨架的扫描电镜观察. *动物学报*, 2003 **49** (4) :514 ~ 521.
- [20] 朱慧, 邹士法, 李艺松等. 用非离子去垢剂抽提获得的小游仆虫皮层细胞骨架的构形. *动物学研究*, 2004, **25** (5) :422 ~ 428.
- [21] 朱慧, 邹士法, 倪兵等. 四角翁尼科虫无性生殖中纤毛器及其基部纤维的分化. *华东师范大学学报(自然科学版)*, 2006 (2) :49 ~ 57.
- [22] 倪兵, 尤力群, 顾福康. 游仆虫细胞骨架立体结构的研究. *华东师范大学学报(自然科学版)*, 2000 (2) :86 ~ 91.

图版说明

- 1、3 ~ 12 为抗 α -微管蛋白间接免疫荧光显示的棘尾虫照片; 2 为 FLUTAX 直接荧光标记的棘尾虫照片。标尺均为 100 μm 。
1. 细胞腹面观; 2. 细胞腹面纤毛结构(AZM : 口围带; UM : 波动膜; FC : 额棘毛; VC : 腹棘毛; TC : 横棘毛; LMC : 左缘棘毛; RMC : 右缘棘毛); 3. 背纤毛基体列(DK1, 2, 3 分别为背纤毛基体列 1, 2, 3)及附属微管(背纤毛基体(小箭头)、附属微管(大箭头)); 4. 口围带骨架: 口围带托架(AZMB), 小膜间连接微管(大箭头)、小膜后微管束(小箭头); 5. 波动膜骨架(波动膜托架(UMB))及其与口围带骨架(AZMC)衔接处(箭头); 6. 领前缘的倒“U”形微管(大箭头)和右侧皮层微管束(小箭头); 7. 额、腹、横棘毛基部: 额棘毛基部(BFC), 腹棘毛基部(BVC), 横棘毛基部(BTC)和额棘毛基部附属微管(示前纵微管束(A), 后纵微管束(P), 周围微管束(R)); 8. 左、右缘棘毛基部附属微管(示 A、P、横微管束(T))和左侧皮层微管束(LMR), 腹棘毛基部后纵微管束(VP), 横棘毛基部前纵微管束(TA); 9. 横棘毛基部的后纵微管束(箭头); 10. 横棘毛基部周围微管束(箭头); 11. 颈部微管网, 口皮层肋壁微管(箭头); 12. 右侧皮层微管束(箭头)。

Explanation of Plate

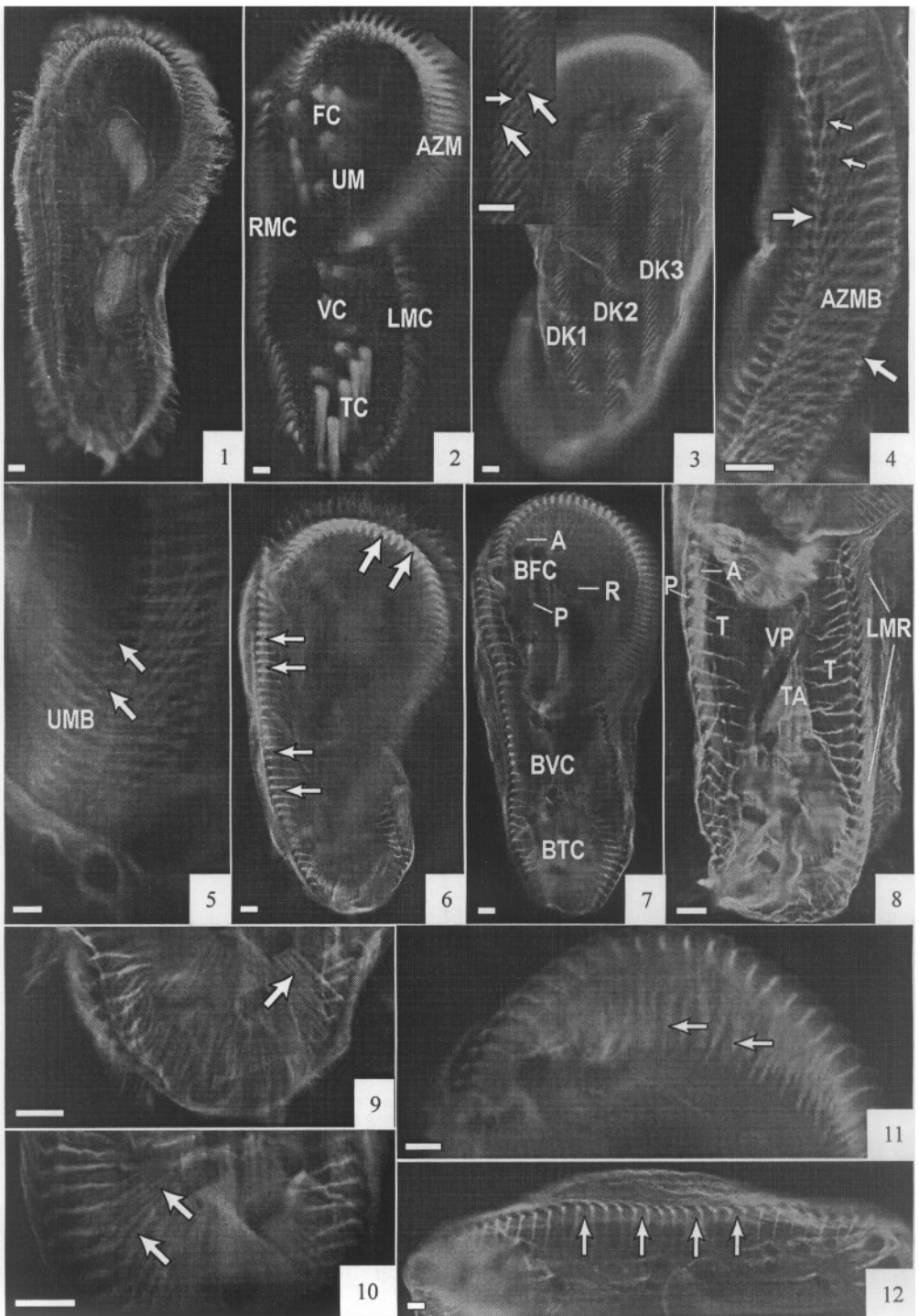
- 1, 3 - 12 : Immunofluorescent micrographs of *Stylonychia mytilus* labeled by anti- α -tubulin antibody; 2. Fluorescent micrographs labeled by FLUTAX. The length of all the bars in the graphs is 10 μm .
1. Ventral side of the cell.
2. Ciliatures on the ventral side include adoral zone of membranelles(AZM), undulating membranes(UM), frontal cirr(FC), ventral cirr(VC), transverse cirr(TC), left marginal cirr(LMC) and right marginal cirr(RMC).
3. Dorsal kinyety lines on the dorsal side, showing DK1, 2, 3 and DK-base-associated microtubules including basal body(small arrow) and other associated microtubules(big arrows).
4. Adoral zone of membranelles cytoskeleton, showing membranelle brackets(AZMB), microtubules link between membranelle brackets(big arrows) and post-bracket microtubules(small arrows).
5. Undulating membrane cytoskeleton(UMC), showing UMB(membrane brackets) and the links(arrows) between UMC and AZMC.
6. Converse “ U ” shape microtubules(big arrows) on the top of the collar and right-microtubular ribbons(small arrows) of the cortex.
7. Bases of the FVTC (BFC, BVC, BTC respectively) and FC-base-associated microtubules, showing anterior longitudinal microtubules(A), posterior longitudinal microtubules(P), and radiate microtubules(R).
8. LMC- and RMC- base-associated microtubules(A, P, transverse microtubules(T)) , left-microtubular ribbons(LMR) of the cortex, VC- base-associated microtubules(VP) and TC- base-associated microtubules(TA).
9. TC- base-associated posterior longitudinal microtubules(arrow).
10. TC- base-associated radiate microtubules(arrows).
11. Microtubular cytoskeleton of the collar, showing oral rib-wall microtubules(arrows).
12. Right-microtubular ribbons(LMR) of the cortex(arrows).

曾 红等 :原生动物贻贝棘尾虫微管胞器的荧光标记与显示

图版 I

ZENG Hong *et al.* :Microtubular Organelles in *Stylonychia mytilus* Revealed by Fluorescent Labeling

Plate I



图版说明见文后