

# 利用铁葡聚糖分离纤毛虫接合对的方法

魏锦瑜 高 欣 杨仙玉\*

(浙江林学院林业与生物技术学院 临安 311300)

**摘要:** 介绍一种制备微小铁葡聚糖颗粒以及利用微小铁葡聚糖颗粒分离纤毛虫接合对的方法, 通过本方法可以获得接合率达 95% 以上, 且发育基本同步的实验材料。

**关键词:** 纤毛虫; 接合对; 铁葡聚糖颗粒

中图分类号: Q955 文献标识码: A 文章编号: 0250 3263(2008)02-77-04

## Introducing a Method for Separating Ciliate Conjugating Pairs by Magnetic Iron dextran Particles

WEI Jiu-Yu GAO Xin YANG Xian-Yu\*

(School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang Forestry University, Lin'an 311300, China)

**Abstract:** In this report, methods for preparing magnetic iron dextran particles and separating highly synchronized (95%) ciliate conjugating pairs are introduced. When iron dextran particles are added to the mixtures of complementary mating types of ciliates, single cells and loose conjugating pairs form food vacuoles containing the iron dextran particles while absent from the tight mating pairs. By applying magnetic force, single cells and loose mating pairs can be removed from the tight conjugating pairs. This method has several advantages: simplicity, speediness, high quality, universality and practicality. No negative effects have been found when perform the experiments by this method.

**Key words:** Ciliate; Conjugating pairs; Iron dextran particles

长期以来原生动物纤毛虫一直被广泛应用于教学和科学研究工作中, 尤其被用于探讨细胞衰老与分化、信息传递、大小核的分工和核质关系等领域的研究<sup>[1]</sup>。纤毛虫虽然没有像高等动物那样的雌雄性别分化, 但存在着两个或两个以上被称作“接合型”的类群。在适宜的条件下, 混合不同接合型的细胞培养液可以诱导纤毛虫形成接合对, 启动其有性生殖即接合生殖的过程<sup>[2]</sup>。研究纤毛虫有性生殖过程需要足够的接合材料, 对其分子生物学机理研究更是如此。以往分离纤毛虫接合对的方法一般效率比较低。1999年, Yang 等利用铁葡聚糖(iron dextran)颗粒成功地分离了尾草履虫(*Paramecium caudatum*)的接合对<sup>[3]</sup>, 但对此方法未作详细描述。作者经

多次尝试发现, 利用微小铁葡聚糖颗粒分离纤毛虫接合对效果较好。本文详细介绍了微小铁葡聚糖颗粒的制备方法以及利用铁葡聚糖颗粒分离高密度同步发育纤毛虫接合对的原理和方法。

### 1 材料与方法

**1.1 铁葡聚糖颗粒的制备** (1) 在盛有 60 ml 蒸馏水(60℃左右)的锥形瓶中(图 1: ①)先后加入葡聚糖(dextran T-70) 8 g、氯化铁 9.06 g 和

基金项目 国家自然科学基金项目(No. 30670297);

\* 通讯作者, E-mail: xianyu\_yang@hotmail.com;

第一作者介绍 魏锦瑜, 女, 硕士研究生; 研究方向: 纤毛虫分子生物学; E-mail: zj1347@163.com.

收稿日期: 2007-09-29, 修回日期: 2007-11-10

氯化亚铁 3.84 g (图 1: ②), 置于恒温磁力搅拌器上加热搅拌至全部溶解, 然后用蠕动泵将 100 ml 氨水 (7.5%) 以 0.8 ml/min 的速度滴入锥形瓶中, 氨水滴入过程约需 125 min, 之后在 60℃ 保持 3 min (图 1: ③)。此时的反应液为褐色的铁葡聚糖颗粒悬浮液, 内含大小不均的铁葡聚糖颗粒。(2) 将上述反应液 160 ml 分装到 4 支 50 ml 的离心管中, 400 g 离心 2 min (图 1: ④), 回收上清并分装到 4 个 100 ml 的烧杯中,

然后将 1~ 4 个强力磁铁 (直径 12 mm, 厚度 5 mm, 宁波市江东明达磁性材料厂) 置于烧杯底部外侧, 以回收铁葡聚糖颗粒 (图 1: ⑤)。回收的铁葡聚糖颗粒用 40 ml Tris-HCl (100 mmol/L, pH 7.4) 洗涤 3~ 5 次, 除去残余的氨水成分 (图 1: ⑥)。最后将回收的铁葡聚糖颗粒悬浮于 20 ml Tris-HCl (100 mmol/L, pH 7.4) 中, 600 g 离心 2 min, 回收上清 (图 1: ⑥)。

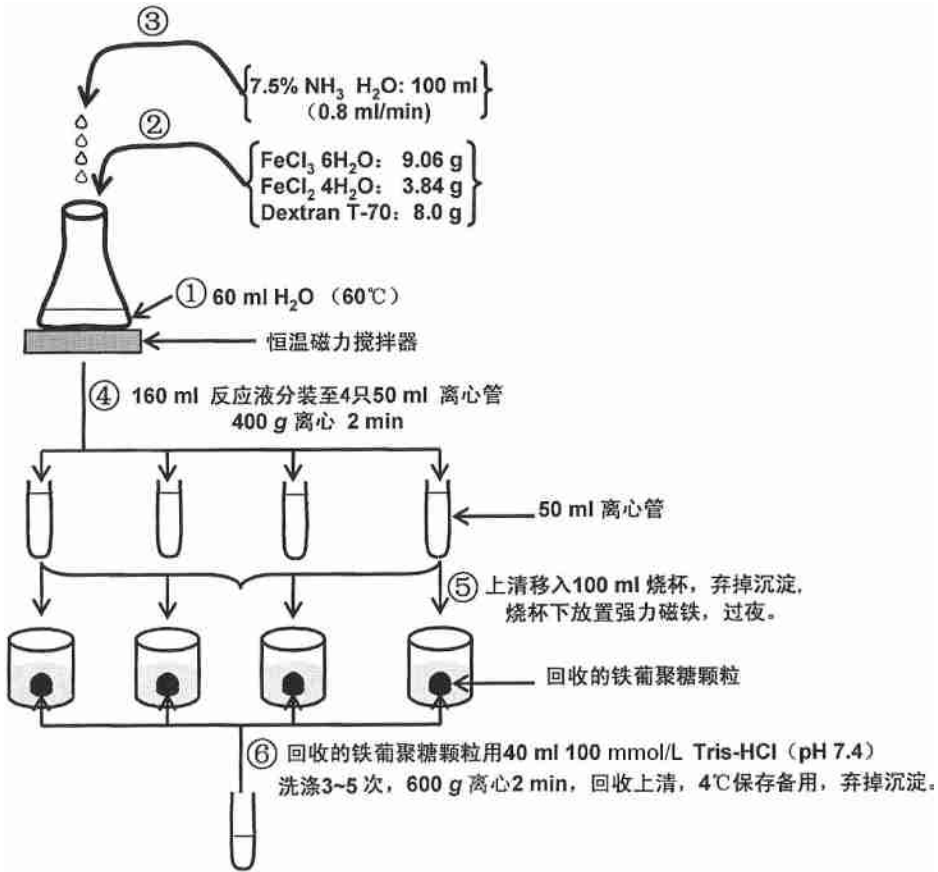


图 1 铁葡聚糖颗粒制备流程

Fig. 1 The illustration of the procedure of magnetic iron dextran particle preparation

上述铁葡聚糖颗粒的制备方法是 Vosskuhler 等在 Molday 等的基础上改良而来<sup>[4,5]</sup>, 这样得到的铁葡聚糖颗粒直径在 1 μm 左右, 容易被四膜虫 (*Tetrahymena thermophila*)、草履虫等纤毛虫吞食, 并且铁葡聚糖颗粒悬浮液可在 4℃ 冰箱长期保存。Haremakei 等利用铁葡聚糖颗粒分离到四膜虫的分裂球<sup>[6]</sup>, Yang 等

利用铁葡聚糖颗粒分离到草履虫的接合对<sup>[3]</sup>。  
 1.2 利用铁葡聚糖颗粒分离纤毛虫接合对的方法 以尾草履虫为例介绍铁葡聚糖颗粒分离纤毛虫接合对的具体步骤。(1) 将具有接合活性的两个互补接合型尾草履虫细胞培养液等体积 (各 20 ml) 混合于直径 9 cm 的培养皿中静置, 几分钟后可见细胞团沉于培养皿底部, 约 1

h 左右开始出现接合对。初期接合对很容易受外界刺激(食物、机械震荡等)导致接合的两个细胞分开,通常 1.5~2 h 可形成典型接合对。(2) 静置 2 h 后,将上部培养液轻轻倒掉,然后向余下的草履虫培养液中滴入 5~10 滴铁葡聚糖悬浮液。随着铁葡聚糖悬浮液的滴入,单体细胞及初期接合对细胞内形成含有铁葡聚糖颗粒的食物泡,典型接合对不形成食物泡。(3) 静置 5~10 min(或稍长),然后将 6~8 个强力磁铁置于培养皿底部外侧。单体细胞及初期接合对被磁铁牢牢吸住,而典型接合对则自由游动于培养液中。(4) 用玻璃滴管将含有草履虫接合对的培养液移入另一个培养皿中,重复两次步骤(3)的操作。(5) 将步骤(4)收集的接合对

培养液移入 10 ml 底部较细的离心管中,用手摇离心机离心 15 s,快速倒掉上清,此时草履虫接合对沉于离心管底部。(6) 向离心管中加入 10 ml 草履虫培养用缓冲液<sup>[7,8]</sup>,重复 4 次步骤(5)的操作,除去多余的铁葡聚糖颗粒。(7) 根据接合对的数量及实验目的需要加入适量的草履虫培养用缓冲液,置于 25℃ 恒温培养箱保存备用。

## 2 结果与讨论

2.1 结果 用上述方法可获得接合率达 95% 以上的尾草履虫接合对,而且其接合生殖过程中细胞发育基本同步(图 2)。

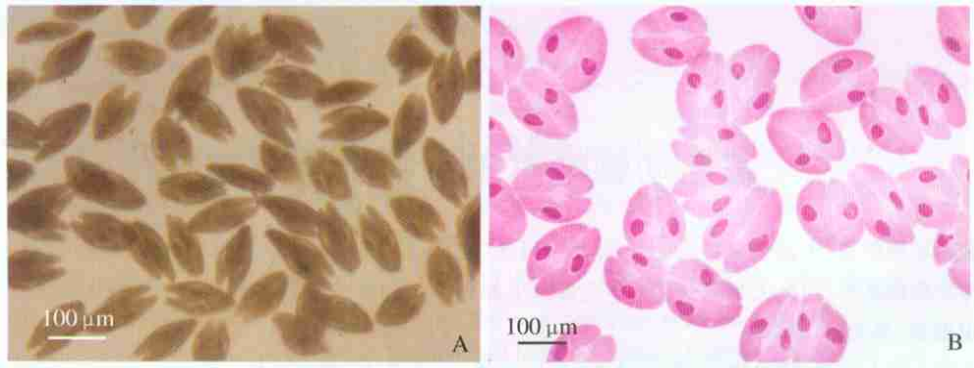


图 2 利用铁葡聚糖颗粒分离的尾草履虫接合对

Fig. 2 Conjugating pairs of *Paramecium caudatum* separated using iron dextran particles

A. 饱和升汞固定的接合对; B. 石炭酸品红染色后的尾草履虫接合对,细胞处于接合生殖过程中减数分裂前期的新月核时期。标尺= 100 μm。

A. Saturated HgCl<sub>2</sub> fixed specimens; B. Carbol fuchsin stained specimens at the crescent stage, part of the meiotic prophase during the conjugation of *P. caudatum*. Bar= 100 μm.

2.2 特点及应用 铁葡聚糖颗粒分离纤毛虫接合对是利用纤毛虫能够形成食物泡的特点。自由生活的纤毛虫具有复杂程度不同的口胞器,并通过口胞器从生活环境中收集食物颗粒,形成食物泡,从而获取营养。纤毛虫接合对通常是由互补接合型的两个细胞在口部周围接合在一起,而且在接合生殖期间口部的结构要经历一个瓦解和再生的过程,因此纤毛虫接合对不具有摄食能力,即不能形成食物泡。在单体纤毛虫和纤毛虫接合对混合存在的溶液中添加

几滴铁葡聚糖颗粒悬浮液,几分钟后单体纤毛虫体内就会形成很多含有铁葡聚糖颗粒的食物泡,而接合对细胞内则不形成食物泡。利用磁铁可将含有铁葡聚糖颗粒食物泡的纤毛虫牢牢吸住,而接合对细胞则自由游动于培养液中,这时可以用玻璃滴管将纤毛虫接合对分离出来。

与以前常用的手工微吸管分离纤毛虫接合对的方法相比,用铁葡聚糖颗粒分离纤毛虫接合对优点如下:(1) 操作简单:实验者无需具备微吸管操作方面的基础;(2) 快速高效:30 min

就可分离到大量接合率达 95% 以上且发育基本同步的实验材料, 而用微吸管分离不仅费时费力也很难分离到同步发育的接合对; (3) 无副作用: 利用本方法分离草履虫接合对, 未发现任何由于磁场效应而产生的对接合生殖过程的影响<sup>[3]</sup>; (4) 适用范围广: 不仅可以用来准备同步发育的纤毛虫接合材料, 也可以通过错开混合互补接合型细胞的时间来准备多组接合材料, 再将其混合后用本方法分离接合对, 这样可以得到大量不同发育时期的接合材料。

## 参 考 文 献

- [1] 宋微波, 徐奎栋, 施心路等. 原生动物学专论. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1999, 362.
- [2] 史新柏. 草履虫的有性生殖. 生物学通报, 1998, 33(9): 9~12.
- [3] Yang X, Takahashi M. Disturbance of determination of geminal and somatic nuclei by heat shock in *Paramecium caudatum*. *J Eukaryot Microbiol*, 1999, 46: 49-55.
- [4] Vosskühler C, Tiedke A. Magnetic separation of phagosomes of defined age from *Tetrahymena thermophila*. *J Eukaryot Microbiol*, 1993, 40: 556-562.
- [5] Molday R S, Mackenzie D. Immunospecific ferromagnetic iron dextran reagents for the labeling and magnetic separation of cells. *Immunol Meth*, 1982, 52: 353-367.
- [6] Haremagi T, Sugai T, Takahashi M. Involvement of active cellular mechanisms on the disorganization of oral apparatus in micronucleate cells in *Tetrahymena thermophila*. *Cell Struct Funct*, 1996, 21: 73-80.
- [7] Dryl S. Antigenic transformation in *Paramecium aurelia* after homologous antiserum treatment during autogamy and conjugation. *J Protozool*, 1959, 6: s25.
- [8] Hiwatashi K. Determination and inheritance of mating types in *Paramecium caudatum*. *Genetics*, 1968, 58: 373-386.

## 著名动物学家宋大祥院士病逝

我国著名动物学家、中国科学院院士、国际动物科学学会委员、国际动物学会理事、国际蛛形学会理事、第十三届中国动物学会理事长、河北大学生命科学学院博士生导师宋大祥教授因病医治无效, 于 2008 年 1 月 25 日 19 时 40 分在保定逝世, 享年 74 岁。

宋大祥院士为人正派, 严以律己, 宽以待人, 学识渊博, 治学严谨, 谦虚谨慎。他曾历任中国动物学会副秘书长、秘书长、副理事长、理事长等职务, 历任《动物学报》、《动物分类学报》主编、《蛛形学报》副主编及《动物学杂志》编委等。作为学会领导人之一, 他积极参与和推动学会的各项工作, 先后组织我国广大的动物学工作者, 经多年努力, 出色地完成了国家自然科学基金委员会交办的“动物学科发展战略研究”, 以及国家名词审定委员会交办的《动物学名词》的审定工作, 组织学会开展了海峡两岸动物学名词审定工作。在任学会理事长期间, 他代表中国动物学家积极支持希腊和以色列动物学家联合发起的关于恢复国际动物学会活动的倡议。2000 年他受学会的委托, 率领我国动物学家代表团赴希腊雅典参加了恢复后的第一次(第十八届)国际动物学大会, 并取得了 2004 年在中国北京举办第十九届大会的权利。他也当选为国际动物学大会执委, 为进一步提高我国动物学研究和动物学会在国际上的地位创造了有利的条件。2004 年第十九届国际动物学大会在北京召开, 他当选为国际动物学会理事。

宋大祥院士为我国动物学的发展及中国动物学会的国内外学术交流、扩大学会在国际动物学界的影响及学会的发展做出了卓越的贡献。他的优秀品德永远是我们学习的榜样。

宋大祥院士的逝世, 是我国动物学界和中国动物学会的一大损失, 使我们失去了一位德高望重的良师益友, 我们将永远怀念他。

张永文 (中国动物学会)

2008 年 3 月