

# 纤毛虫大核提取方法上的改进及其 扫描电镜观察

顾立刚 赵柳 顾福康\*

(华东师范大学生命科学学院 上海 200062)

**摘要**:以包囊游仆虫(*Euplotes encysticus*)为材料,对 Arikawa 等报道的纤毛虫大核提取方法进行了改进,提出了一种更为简便有效的方法,即:用去垢剂 Triton X-100 处理细胞,结合玻璃微吸管的物理破碎,得到完整的大核后,应用扫描电镜观察。

**关键词**:纤毛虫;大核;提取;扫描电镜

中图分类号:Q954 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2005)03-57-03

## An Improved Method of Macronuclear Isolation of Ciliates for Scanning Electron Microscopy

GU Li-Gang ZHAO Liu GU Fu-Kang

(Department of Biology, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

**Abstract**: A more simplified and effective method is employed to isolate the macronuclei from ciliates and to prepare sample for scanning electron microscopy, based on the procedure described by Arikawa. Two main steps of the improved method are to treat the cells with Triton X-100 and to lysis them with tiny glass tubes.

**Key words**: Ciliates; Macronucleus; Isolation; Scanning electron microscopy

在纤毛虫细胞核的形态学研究中,通常采用显微染色或透射电镜来显示细胞核的结构。但是,前者是应用光镜水平的观察,很难清晰分辨核的结构细节;后者是在高放大倍率下得到的超薄切片结构,需对所得结果作三维构建,才能取得核的整体结构形态。近年来,Arikawa 等尝试用化学抽提,结合扫描电镜显示纤毛虫大核的立体构型,取得了初步的成功<sup>[1]</sup>。作者在此方法的基础上,经过反复的试验摸索,改进了样品制备的方法,取得较好的结果。现报告如下。

### 1 材料与方法

**1.1 实验材料** 实验以含有一个巨大型细胞核的包囊游仆虫(*Euplotes encysticus*)为材料。

包囊游仆虫于 1998 年采自上海动物园内小湖,经分离后建立纯系。在 20℃ 条件下,每日早晚两次喂食草履唇滴虫(*Chilomonas paramecium*),数天后达到较高密度。取生命周期中不同时期的细胞进行实验。

**1.2 大核的提取** 纤毛虫用蒸馏水清洗,移入 1.5 ml 的 Eppendorf 管中,2 000 r/min 离心 5 min 收集虫液;虫液中加入等体积甲基绿溶液(2 mg/ml),处理 5 min 后,离心去上清;加等体积 0.5% Triton X-100 处理 3 min,1 000 r/min 离心 2

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No.30270160);

\* 通讯作者 E-mail: lkgu@bio.ecnu.edu.cn;

第一作者介绍 顾立刚,男,硕士研究生,研究方向:动物细胞及分子生物学。

收稿日期 2004-12-02,修回日期 2005-03-11

min 去上清;蒸馏水清洗 3 次,1 000 r/min 离心去上清;虫液用略大于细胞的微吸管吸取、吹出,直至显微镜下观察到大部分细胞破碎、暴露出大核;用微吸管将虫液滴于涂有多聚-L-赖氨酸(100 mg/ml)的小块盖玻片上,静置 20 min 后用滤纸吸去上层液体;将盖玻片放入 1% 乙酸中处理 5 min,除去核膜。

**1.3 扫描电镜样品的制备与观察** 参照顾福康等的方法<sup>[2]</sup>,在 4℃ 下,将粘有大核的盖玻片浸入 2.5% 戊二醛溶液中固定 30 min,再在 1% 的锇酸中固定 30 min;蒸馏水清洗后,用等级梯度酒精脱水,每次 10 min;在纯酒精中过渡 2 次后,依次移入 1:3、2:3 比例的酒精和醋酸异戊酯混合液中,每次 10 min,此后移入纯醋酸异戊酯,CO<sub>2</sub> 临界点干燥后喷金,扫描电镜观察和照相。

## 2 结果与讨论

应用上述方法,获得了游仆虫整个大核、染色质小体、染色质小体亚单位、DNA 复制时复制带染色质形态、染色质小体之间联系结构等图(图版 I:1~4)。

与 Arikawa 等的方法比较,本文省去了用蔗糖溶液在 -20℃ 条件下冰冻处理破碎细胞的步骤,而代之以 Triton X-100 去垢剂处理的方法。作者曾尝试用蔗糖溶液处理,并变换多种浓度,效果均不理想。但改用 0.5% Triton X-100 溶液

处理,再辅以微吸管吹吸,能有效地破碎细胞。很可能由于 Triton X-100 对纤毛虫细胞骨架及细胞膜成分有很强的抽提作用<sup>[3]</sup>,加上乙酸的脱核膜作用,去垢剂处理能得到表面污染更少的洁净细胞核。在实验过程中,作者又增加了用多聚-L-赖氨酸将所得细胞核粘贴在小块盖玻片(用砂轮将 18 mm × 18 mm 的盖玻片切割成 1/3 大小)上的处理。这样可使细胞核在后续处理过程中不致丢失,并且便于进行扫描电镜的样品制备。此外,应用甲基绿溶液处理显示标记细胞核,可使操作者更容易观察到细胞核。

本方法对于细胞体积大、大核数量少的纤毛虫操作容易,对于体积小、细胞核多的纤毛虫操作难度较大。所用的扫描电镜样品制备方法是原生动物的常用方法。用此法显示细胞核内部结构,样品处理的每一步都必须注意试剂之间平稳过渡,以免样品变形。

## 参 考 文 献

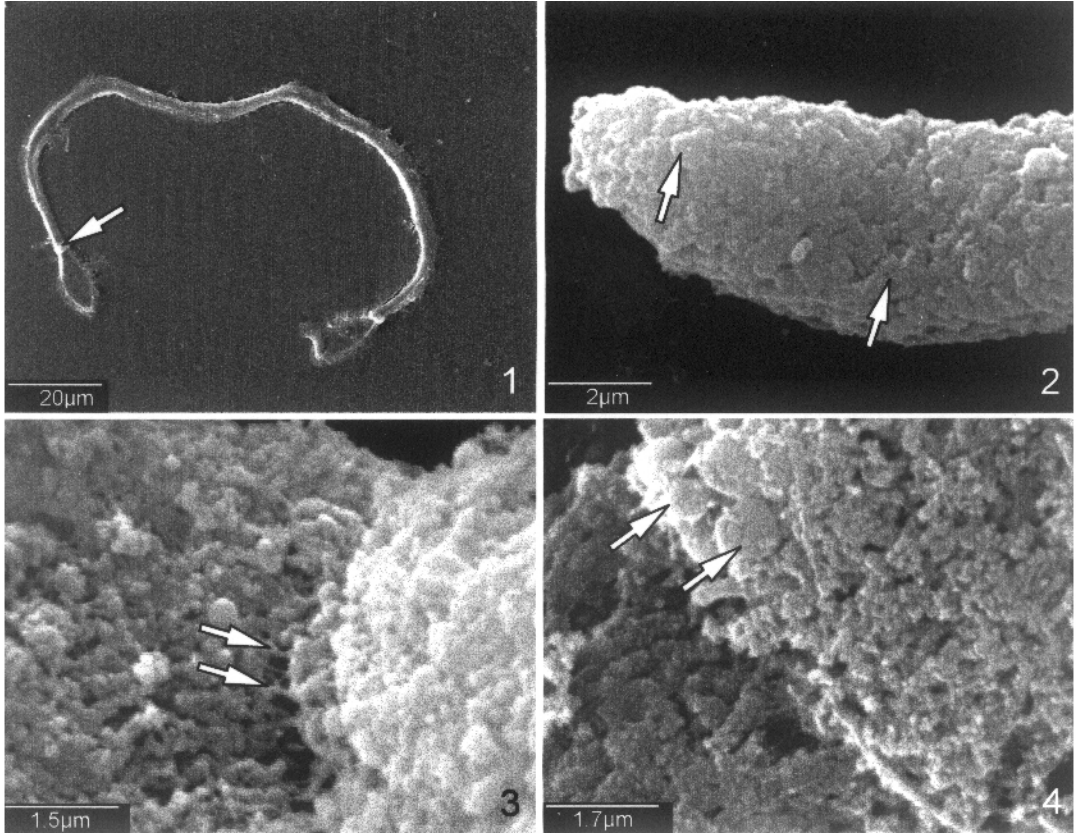
- [1] Arikawa M, Watanabe A, Watanabe K, et al. High-resolution scanning electron microscopy of chromatin bodies and replication bands of isolated macronuclei in the hypotrichous ciliate *Euplotes encrystomus*. *Eur J Protistol* 2000, **36**: 40~45.
- [2] 顾福康,倪兵.原生动物的扫描电镜样品制备方法的探讨. *电子显微学报*, 1993, **12**(6): 525~529.
- [3] 顾福康,邹士法,李艺松等.镰游仆虫皮层细胞骨架的扫描电镜观察. *动物学报*, 2003, **49**(4): 514~521.

顾立刚等 纤毛虫大核提取方法上的改进及其扫描电镜观察

图版 I

GU Li-Gang *et al.* :An Improved Method of Macronuclear Isolation of Ciliates for Scanning Electron Microscopy

Plate I



1. DNA 复制期的大核(箭头所指为复制带); 2. 大核局部放大(箭头所指为染色质小体); 3. 大核复制带局部区域(箭头所指为染色质小体间的连接); 4. 复制带染色质小体分解为小颗粒(箭头所指为尚未变化的染色质小体)。