

华美游仆虫细胞微管胞器的直接 荧光和免疫荧光标记

赵柳 运迷霞 柳伟君 顾福康*
(华东师范大学生命科学学院 上海 200062)

摘要: 应用直接荧光和免疫荧光标记显示, 腹毛目纤毛虫华美游仆虫 (*Euplotes elegans*) 细胞微管胞器由口围带、波动膜、额腹横棘毛、缘棘毛、尾棘毛、背触毛等纤毛器微管以及纤毛器基部附属微管和非纤毛区皮层微管骨架组成。其中, 口围带基部含有小膜托架、小膜附属微管, 波动膜基部含有波动膜托架, 额腹横棘毛基部含有前纵微管束、后纵微管束、横微管束或放射微管束, 左缘棘毛和尾棘毛基部微管束分化不明显, 背纤毛基部含有玫瑰花状的基体周围骨架, 这些微管结构与细胞背腹面皮层纵微管与横微管网一起组织成该类纤毛虫的主要皮层细胞骨架。结果表明, 游仆虫皮层细胞骨架是以微管为主要成分构建而成的, 并且其棘毛基部微管的组成具有与其他类纤毛虫不同的特征; 游仆虫间期细胞及形态发生时期纤毛基体或纤毛原基中存在中心蛋白, 其可能与纤毛基体结构的维持及基体发生过程中微管的组装有关。

关键词: 华美游仆虫; 微管胞器; 荧光标记

中图分类号: Q952 文献标识码: A 文章编号: 0250 3263(2008)03-01-06

Microtubular Organelles in *Euplotes elegans* Revealed by Direct fluorescent and Immunofluorescent Labeling

ZHAO Liu YUN Mi Xia LIU Wei-Jun GU Fu Kang*
(School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract: The microtubular organelles in the hypotrich ciliate *Euplotes elegans* were analyzed with fluorescence labeling of FLUTAX, anti α tubulin and anti centrin antibody. The results showed that these organelles consist of adoral zone of membranelles (AZM), undulating membranes (UM), frontal ventral transverse cirri (FVTC), marginal cirri (MC), caudal cirri (CC), dorsal kineties (DK) and the base associated microtubules of these ciliatures. The microtubular cytoskeleton of AZM comprises membranelle brackets and its associated microtubules; the base associated microtubules of FVTC contained anterior longitudinal microtubules (ALM), posterior longitudinal microtubules (PLM), transverse microtubules (TM) or radiating microtubules (RM). The base associated microtubules of the left MC and CC differentiated less obviously, and the basal bodies of DK contained rosette like skeletal structure. All these microtubular structures together with the longitudinal microtubules and the transverse microtubules of dorsoventral cortex make up the cytoskeleton. Meanwhile, our results also indicate that the cytoskeleton of *Euplotes* is built up mainly with the microtubules as its major units, and the organization of its base associated microtubules is quite different from other ciliates. Moreover, it was found that centrin existed in the anlagen and the basal bodies during the

基金项目 国家自然科学基金项目(No. 30770238);

* 通讯作者, E-mail: flgu@bio.ecnu.edu.cn;

第一作者介绍 赵柳, 男, 博士研究生; 研究方向: 动物细胞与分子生物学; E-mail: zhaoliu@ecnu.cn.

收稿日期: 2007-11-27, 修回日期: 2008-01-08

process of the morphogenesis, which might play a role in the maintenance of basal bodies and the assembly of microtubules.

Key words: *Euplotes elegans*; Microtubular organelle; Fluorescent labeling

原生动物纤毛虫中的皮层微管是与细胞生命活动紧密联系的基本骨架, 研究微管的组装和细胞调控关系, 是探索细胞结构形成的多样性及其作用机理的重要方面。目前, 对体纤毛分散排布的草履虫 (*Paramecium*)、四膜虫 (*Tetrahymena*) 等细胞中单个基体的微管装配有所了解^[1-3], 但对口纤毛和体纤毛进一步聚集并特化的腹毛目纤毛虫, 其复合纤毛器中微管的装配, 以及这些纤毛器微管装配的皮层内定位及相互的作用关系等研究资料甚少。作者于所在实验室对尖毛类纤毛虫等的微管胞器研究取得一定进展的基础上, 以游仆类纤毛虫华美游仆虫 (*Euplotes elegans*) 为材料, 采用荧光紫杉醇 (FLUTAX) 直接荧光染色以及抗 α 微管蛋白抗体和抗中心蛋白抗体免疫荧光方法对其细胞皮层微管类细胞骨架的组成及建构特征进行了观察。

1 材料与方法

1.1 材料 华美游仆虫于 2003 年春采自上海市青浦区淡水池塘, 经分离后以鞭毛虫草履唇滴虫 (*Chilomonas paramecium*) 为食料进行培养并建立纯系。

1.2 方法

1.2.1 FLUTAX 直接荧光标记 采用本实验室改进的 FLUTAX 法^[4], 主要步骤如下: ①将细胞移入 1% 的皂苷中渗透 1 min, PHEM 清洗一次; ②将渗透后的细胞移入 4% 多聚甲醛中固定 3 min, PHEM 清洗一次并将细胞转移至涂有多聚赖氨酸的载玻片上; ③0.5% Triton X-100 处理 3 min, PHEM 清洗一次; ④滴加 1 μ mol/L FLUTAX-2 (Molecular Probes Inc) 染色 10 min, 0.01 mol/L 的 PBS 漂洗, 盖片。Olympus BX 荧光显微镜观察、照相。

1.2.2 抗 α 微管蛋白抗体免疫荧光标记 采用本实验室报道的方法^[5], 主要步骤如下: ①将

细胞移入 1% 皂苷中渗透 1 min, PHEM 清洗一次; ②4% 多聚甲醛固定 1 h; ③将固定的细胞用 0.5% 的 Triton X-100 处理 10 min; ④用冷的不含 Triton X-100 的抽提缓冲液快速清洗一次; ⑤PBS+ 3% BSA 清洗 3 次, 每次 5 min; ⑥将细胞转移至涂有多聚赖氨酸的载玻片上, 用抗 α 微管蛋白抗体 (鼠抗, 1: 1 000, Sigma) 孵育 1 h, PBS+ 3% BSA 清洗 3 次, 每次 5 min; ⑦羊抗鼠免疫球蛋白的二抗 (1: 100, Sigma) 孵育 1 h, PBS+ 3% BSA 清洗 3 次, 每次 5 min, 三蒸水清洗一次; ⑧加防猝灭油、盖片。Olympus BX 荧光显微镜观察、照相。

1.2.3 抗中心蛋白抗体免疫荧光标记 参考 Arregui 等的方法并作适当改进^[6], 主要步骤如下: ①将细胞移入 1% 皂苷中渗透 1 min, PHEM 清洗一次; ②4% 多聚甲醛固定 1 h; ③0.5% 的 Triton X-100 处理 10 min; ④用冷的不含 Triton X-100 的抽提缓冲液快速清洗一次; ⑤PBS+ 3% BSA 清洗 3 次, 每次 5 min; ⑥将细胞转移至涂有多聚赖氨酸的载玻片上, 用抗中心蛋白抗体 (兔抗, 1: 800, Abcam) 孵育 1 h, PBS+ 3% BSA 清洗 3 次, 每次 5 min; ⑦羊抗兔免疫球蛋白的二抗 (1: 200, Abcam) 孵育 1 h, PBS+ 3% BSA 清洗 3 次, 每次 5 min, 三蒸水清洗一次; ⑧加防猝灭油、盖片。Olympus BX 荧光显微镜观察、照相。

2 结果

2.1 纤毛器微管 华美游仆虫细胞腹皮层纤毛器由口围带、波动膜、额腹横棘毛、左缘棘毛和尾棘毛等组成。其中, 口围带位于前端, 约含 60 片小膜, 约占细胞长度的 1/2; 波动膜呈片状, 自口围带基部向右前伸展; 额腹棘毛 9 根, 按“6+3”位于口围带的右侧; 横棘毛 5 根, 左侧一根接近口围带基部, 右侧 4 根成斜向的一列; 左缘棘毛和尾棘毛各 2 根, 位于细胞后端 (图版

I: 1)。细胞背面含背触毛 7 列, 呈平行排列纵行于背皮层前后(图版 I: 2)。

2.2 纤毛器附属微管 在口围带基部, 于各个小膜的紧下方形成与小膜相应的长条状微管托架, 小膜托架按一定的间隔依次排列, 组合成弯曲的阶梯状口围带微管骨架, 并且口围带骨架的左、右缘各有一根微管穿过, 将各个小膜托架连接起来(图版 I: 3)。波动膜基部托架呈月牙形, 其由密集的微管网组成, 后端与口围带基部小膜托架相联系(图版 I: 3)。在额腹横棘毛、左缘棘毛和尾棘毛基部, 除形成与棘毛基部相应的骨架外, 还具有显著的棘毛基部附属微管, 包括前纵微管束、后纵微管束、横微管束或放射微管束。但不同类棘毛及处于不同位置的同类棘毛, 其附属微管的形态或发达程度不一样: 额腹棘毛基部具有发达的前纵微管束、后纵微管束及横微管束或放射微管束, 其前纵微管束由棘毛基部向左前方皮层伸展, 后纵微管束由棘毛基部向右后方皮层伸展, 横微管束由棘毛基部向左侧横向伸展, 放射微管束由棘毛基部向不同方向伸展; 横棘毛基部具有发达的前纵微管束, 其 5 根前纵微管束由棘毛基部向前方皮层伸展并于前端皮层汇聚, 放射微管束由棘毛基部伸展段距离, 与相邻的同种微管束交错; 左缘棘毛和尾棘毛基部仅形成细小的放射微管束(图版 I: 3)。

背皮层各背触毛列中, 相当于背纤毛基体的基部由云雾状物质形成基体周围骨架。在未显示基体的情况下, 云雾状物质中心为圆形的空洞状, 周围则成玫瑰花状(图版 I: 4)。皮层形态发生中, 处于背纤毛发生区的基体周围骨架解体时, 其前后的玫瑰花状结构依然存在(图版 I: 5, 6)。

2.3 皮层非纤毛器微管 FLUTAX 直接荧光标记显示, 在细胞口皮层区, 一根弓形的微管束连接口围带骨架的基部和前端, 将口肋壁与其右侧的皮层分隔开来, 口肋壁含有纵微管和横微管网(图版 I: 3)。

抗 α 微管蛋白抗体免疫荧光标记显示, 细胞背腹面皮层由纵微管和横微管交错组成, 其

中纵微管几乎贯穿整个细胞纵长, 但横微管较短, 仅与相应的纵微管成短距离交错(图版 I: 7, 8)。

3 讨 论

3.1 华美游仆虫细胞微管胞器的建构特征

本文采用直接荧光标记和免疫荧光标记显示, 腹毛目纤毛虫华美游仆虫细胞微管胞器由口围带、波动膜、额腹横棘毛、左缘棘毛、尾棘毛和背触毛等纤毛器微管、纤毛器基部附属微管和其他非纤毛区皮层微管骨架组成, 其中口围带基部含有小膜托架及小膜附属微管, 波动膜基部含有波动膜托架, 额腹横棘毛基部含有前纵微管束、后纵微管束、横微管束或放射微管束, 尾棘毛和左缘棘毛基部微管束分化不明显, 背纤毛基部含有玫瑰花状的基体周围骨架, 这些微管结构与细胞背腹面皮层纵微管和横微管网一起, 组织成该类纤毛虫的主要皮层细胞骨架。

所在实验室曾应用蛋白银方法、生化去膜与扫描电镜相结合的方法, 显示了游仆虫口围带、波动膜和额腹横棘毛等纤毛器骨架及纤毛器基部前纵纤维、后纵纤维和放射纤维^[7-9], 本文所得的游仆虫细胞微管胞器的组成和建构特征与以前对该类纤毛虫观察到的皮层细胞骨架的纤维结构在形态上是一致的, 而又进一步表明, 游仆虫皮层细胞骨架是由微管为主要成分构建形成的。

3.2 华美游仆虫纤毛器基部微管的组成 与目前了解的腹毛目纤毛虫纤毛器基部微管的结构特征, 例如尖毛类贻贝棘尾虫 (*Stylonychia mytilus*)^[10] 和魏氏拟尾柱虫 (*Paraurostyla weissei*)^[15] 的纤毛器基部微管结构相比较, 游仆虫腹皮层棘毛基部微管中, 额腹棘毛基部前纵微管束和后纵微管束较发达, 横微管束和放射微管束则大小基本一致; 横棘毛基部前纵微管束特别发达, 横微管束分化不明显; 缘棘毛基部没有前纵微管束、后纵微管束和横微管束的分化。因此, 尽管游仆虫的棘毛基部微管有相似的结构特征, 但又是另一种组成模式。

此外, 本文在游仆虫背皮层纤毛器基部, 观

察到玫瑰花状的背触毛基体周围骨架,其基体周围骨架在背纤毛基体形态发生中经历了瓦解和进一步装配的过程。这种基体微管骨架的形态,以前未见报道。

3.3 华美游仆虫纤毛器微管胞器内中心蛋白的功能推测 原生动物中,中心蛋白是一种特殊的细胞骨架蛋白,其普遍与中心体相联系,并与形成大范围的细胞骨架网有关。由抗中心蛋白抗体免疫荧光显示,华美游仆虫间期细胞中心蛋白定位于口围带、波动膜、额腹横棘毛、尾棘毛、缘棘毛和背触毛等纤毛器,尤其在纤毛器基部或基体位置显示强荧光标记,在细胞形态发生于纤毛原基或基体位置也显示强荧光标记。由于嗜热四膜虫(*Tetrahymena thermophila*)中心蛋白定位在胞口开口和口肋壁微管的微丝网^[11],而魏氏拟尾柱虫中心蛋白定位于间期口纤毛基体、形态发生期的纤毛基体及其相联系的纹状小根^[12],因此,华美游仆虫细胞中心蛋白的定位与四膜虫有较大的差异,与魏氏拟尾柱虫有相似之处,但也不完全一致。结果表明,纤毛虫细胞的中心蛋白在不同类群具有不同的定位特征,并可能具有各自的功能。华美游仆虫的胞器中心蛋白主要存在于间期细胞及形态发生时期的纤毛基体或纤毛原基即基体位置中,其可能与纤毛基体结构的维持及基体发生过程中微管的组装有关。

参 考 文 献

[1] Libusova L, Draber P. Multiple tubulin forms in ciliated

protozoan *Tetrahymena* and Paramecium species. *Protoplasm*, 2006, **227**: 65~ 76.

- [2] Gaertign J. Molecular mechanisms of microtubular organelle assembly in *Tetrahymena*. *J Euk Microbiol*, 2000, **47**(3): 185 ~ 190
- [3] Iftode F, Cleorot J C, Levilliers N, *et al.* Tubulin polyglycylation: a morphogenetic marker in ciliates. *Biol Cell*, 2000, **92**: 615~ 628.
- [4] 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.
- [5] 姜慧玲, 高巍, 倪兵等. 魏氏拟尾柱虫皮层纤毛器微管胞器的形态及形态发生. *动物学报*, 2007, **53**(4): 742 ~ 749
- [6] Arregui L, Munoz-Fontela C, Serrano S, *et al.* Direct visualization of the microtubular cytoskeleton of ciliated protozoa with a fluorescent taxoid. *J Euk Microbiol*, 2002, **49**: 312~ 318
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 曾红, 倪兵, 顾福康. 原生动物贻贝棘尾虫微管胞器的荧光标记与显示. *动物学杂志*, 2006, **41**(4): 71~ 76
- [11] McLaughlin N B, Howard E B. Localization by indirect immunofluorescence of tetra, actin, and centrin to the oral apparatus and buccal cavity of the macrostomal form of *Tetrahymena vorax*. *J Euk Microbiol*, 2004, **51**(2): 253~ 257.
- [12] Lemullois M, Fryd Versavel G, Fleury Aubusson A. Localization of centrins in the hypotrich ciliate *Pararostyal wässei*. *Protist*, 2004, **155**(3): 331~ 346.

图 版 说 明

图 1、2、6 为抗中心蛋白抗体免疫荧光标本; 图 3 为 FLUTAX 直接荧光标本; 图 4、5、7、8 为抗 α 微管蛋白抗体免疫荧光标本。标尺 = 10 μm 。

1. 细胞腹皮层纤毛结构; 2. 细胞背皮层纤毛结构; 3. 口皮层微管骨架及棘毛基部附属微管; 4. 背触毛基体周围微管骨架; 5. 处于形态发生区的背触毛基体周围微管消失; 6. 形态发生中新形成的背触毛基体; 7. 背皮层微管网络; 8. 腹皮层微管网络。

AZM: 口围带; CC: 尾棘毛; FVC: 额腹棘毛; MC: 缘棘毛; TC: 横棘毛; UM: 波动膜; DK1~DK7: 背触毛基体列; A: 弓形微管束; ALM: 前纵微管束; AZMB: 口围带托架; BC: 口皮层; M: 小膜连接微管; PLM: 后纵微管束; RM: 放射微管束; UMB: 波动膜托架; R: 玫瑰花状结构; B: 新背触毛基体; L: 纵微管; T: 横微管。

Explanation of Plate

1、2、6: Immunofluorescent micrographs of *Euplotes elegans* labeled by anti centrin antibody; 3: Fluorescent micrograph labeled by FLUTAX; 4、5、7、8: Immunofluorescent micrographs labeled by anti α tubulin antibody. Bar = 10 μm .

1. Ciliatures on the ventral cortex; 2. Kineties on the dorsal cortex; 3. Buccal cortex and base associated microtubules; 4. The peripheral microtubule skeleton of dorsal kinety; 5. The peripheral microtubule skeleton of dorsal kinety disappeared during morphogenesis; 6. The dorsal kinety during morphogenesis; 7. The microtubule net on dorsal cortex; 8. The microtubule net on ventral cortex.

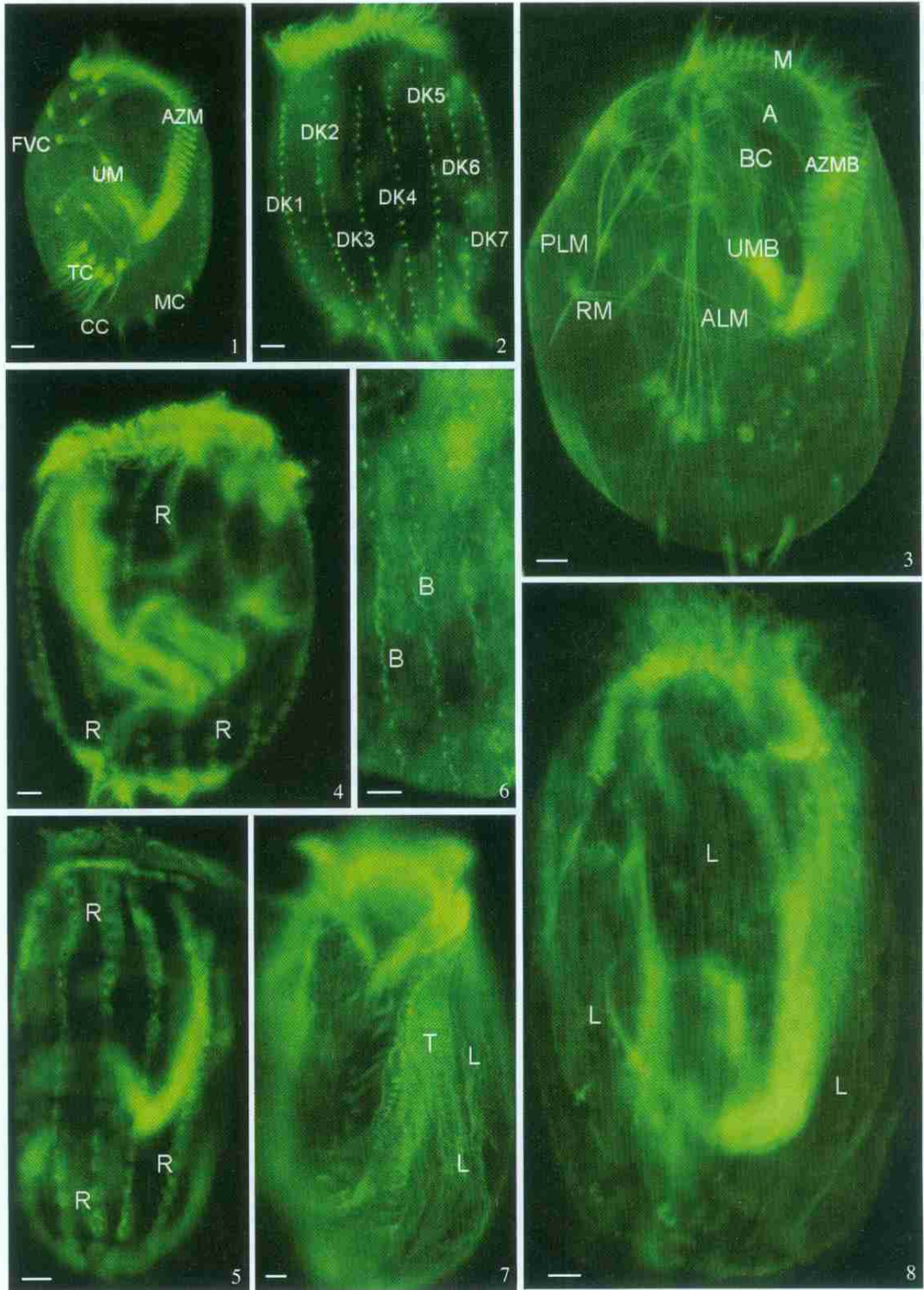
AZM: Adoral zone of membranelles; CC: Caudal cirri; FVC: Frontal-ventral cirri; MC: Marginal cirri; TC: Transverse cirri; UM: Undulating membranes; DK1~DK7: Kineties on the dorsal cortex; A: Arc shaped microtubules; ALM: Anterior longitudinal microtubules; AZMB: Adoral zone of membranelles brackets; BC: Buccal cortex; M: Microtubules link between membranelle brackets; PLM: Posterior longitudinal microtubules; RM: Radiating microtubules; UMB: Undulating membrane brackets; R: Rosette like skeletal structures; B: New basal bodies; L: The longitudinal microtubules; T: The transverse microtubules.

赵 柳等: 华美游仆虫细胞微管胞器的直接荧光和免疫荧光标记

图版 I

ZHAO Liu *et al.*: Microtubular Organelles in *Euplotes elegans* Revealed by Direct fluorescent and Immunofluorescent Labeling

Plate I



图版说明见文后