

第四双小核草履虫减数分裂产物的退化特征分析

高欣^{①②} 徐川梅^② 杨仙玉^{①②*}

① 浙江农林大学资源动物研究所 临安 311300;

② 浙江农林大学林业与生物技术学院 临安 311300

摘要:通过吖啶橙和 Hoechst 33342 两种活体荧光染料双染的方法对第四双小核草履虫 (*Paramecium tetraurelia*) 接合生殖过程中小核减数分裂产物进行观察, 结果发现位于口旁锥外的小核分裂产物呈蓝绿色或黄绿色, 表明它们以凋亡的方式发生退化。

关键词:第四双小核草履虫; 接合生殖; 核凋亡; 吖啶橙; Hoechst 33342

中图分类号: Q952.4, Q243 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2011)03-89-04

Characterization of Meiotic Nuclear Degeneration in *Paramecium tetraurelia*

GAO Xin^{①②} XU Chuan-Mei^② YANG Xian-Yu^{①②*}

① Institute of Resource Zoology, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an 311300;

② School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an 311300, China

Abstract: During the conjugation of *Paramecium tetraurelia*, one meiotic nucleus which enters the paroral region survives and undergoes mitotic division to form gametic pronuclei, while the remaining seven degenerate. To clarify if these meiotic outcomes degenerate in an apoptotic way, two kinds of vital fluorescence dyes, acridine orange and Hoechst 33342 were used. The observation showed that the degenerating nuclei outside the paroral region stained yellow-orange or greenish which indicates a programmed nuclear degeneration.

Key words: *Paramecium tetraurelia*; Conjugation; Nuclear death; Acridine orange; Hoechst 33342.

细胞程序性死亡 (programmed cell death) 又称细胞凋亡, 是受基因调控的主动的、生理性的细胞自杀行为。细胞的过度凋亡或凋亡不足都会引起机体产生疾病, 因此细胞凋亡一直是生命科学领域的热点研究内容^[1]。原生动物纤毛虫是单细胞的真核生物, 已有研究表明, 在纤毛虫如尾草履虫 (*Paramecium caudatum*) 和嗜热四膜虫 (*Tetrahymena thermophila*) 的接合生殖过程中, 存在细胞核凋亡的现象^[2-3]。第四双小核草履虫 (*P. tetraurelia*) 形似尾草履虫, 属于“aurelia”群的成员, 前端钝圆, 后端较尖, 虫体比尾草履虫略小, 有 2 个泡型小核^[4-5]。第四双小核草履虫是已报道的 30 多种草履虫中作为生命科学研究使用最多的材料, 其基因

组测序已经结束^[6], 因此确定其减数分裂产物是否以凋亡方式发生退化将为后续核凋亡机制的研究打下形态学方面的研究基础。

在第四双小核草履虫的接合生殖过程中, 2 个小核均参与减数分裂, 形成 8 个单倍体的核, 其中只有进入口旁锥的 1 个核进行第三次分

基金项目 浙江农林大学科研发展基金项目 (No. 2292000030), 浙江省教育厅科研项目 (No. Y200804256), 国家自然科学基金项目 (No. 30670297, 31071881);

* 通讯作者, E-mail: xianyu_yang@hotmail.com;

第一作者介绍 高欣, 男, 讲师; 研究方向: 动物学; E-mail: wildlife909@yahoo.cn。

收稿日期: 2010-11-03, 修回日期: 2011-01-08

裂,产生相当于多细胞动物的卵和精子的静止原核和迁移原核,其余 7 个核退化^[5]。“Apofluor”是吖啶橙(acridine orange)和 Hoechst 33342 两种活体荧光染料的混合物,用其对细胞进行双染是在活体细胞中检测凋亡核的灵敏、简便而快速的方法^[2,7-8]。本文利用“Apofluor”对第四双小核草履虫减数分裂退化核的行为进行观察,探讨了减数分裂产物的退化方式。

1 材料与方法

1.1 吖啶橙(AO)与 Hoechst 33342(HO)溶液的配制 称量 1 mg 的 AO(上海化学试剂有限公司)和 10 mg 的 Hoechst 33342(江苏海门市,碧云天生物技术有限公司),分别溶解于 1 ml 的超纯水中。再各量取 1 μl 用超纯水分别稀释至 1 ml,使 AO 和 HO 的浓度分别为 1 mg/L、10 mg/L,将它们作为原溶液,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下避光保存备用^[8]。

1.2 第四双小核草履虫的来源及其培养 第四双小核草履虫的 2 个互补接合型(VII 和 VIII)由原香港大学吴兆宽(Ng SF)先生赠与哈尔滨师范大学史新柏教授,又由史新柏教授赠予作者。使用的第四双小核草履虫培养液与尾草履虫的培养液相同^[9-11]。用 K-DS 溶液将新鲜生菜绿汁稀释至 2.5%,然后高压灭菌。在使用前一天接种产气杆菌(*Klebsiella pneumoniae*),并加入适量的 CaCl_2 水溶液。将细胞置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养,确保细胞分裂旺盛并处于良好的生理状态。

1.3 接合生殖的诱导与接合对的分离 将第四双小核草履虫分裂旺盛的 2 种互补接合型细胞用 K-DS 溶液洗涤 3 次,饥饿过夜,然后将两者混合于培养皿中即可诱导接合生殖。混合约 2 h 后,可观察到大量接合对出现。通过饲喂微小铁葡聚糖颗粒的方法分离并浓缩接合对^[12-13]。

1.4 细胞的“Apofluor”染色、观察与拍摄 在 480 μl 含有第四双小核草履虫接合对的悬浮液中,分别加入 AO 和 HO 各 10 μl 。10 min 后利

用矿物油封闭法制备虫体临时装片^[14],即在 9.5 μl 矿物油中央,滴入 1 μl 细胞悬浮液,加盖 22 mm \times 22 mm 的盖玻片。通常多数虫体此时被压得薄而扁,运动极其缓慢,利用荧光显微镜(Nikon 50i)进行观察和拍摄。

2 结果

2.1 营养时期第四双小核草履虫细胞核 营养时期的第四双小核草履虫有 1 个大核和 2 个小核,小核通常在大核附近。当营养时期的细胞用“Apofluor”进行染色时,无论大核还是小核都呈明显的蓝色(图 1A)。

2.2 第四双小核草履虫减数分裂产物的退化

与尾草履虫减数分裂不同^[4],第四双小核草履虫减数分裂共产生 8 个单倍体的核。其中 7 个核退化,只有进入口旁锥的核被保留下来,并再进行一次有丝分裂形成 2 个配子核。通过“Apofluor”染色发现,减数分裂结束前所有时期的细胞中,大核和小核均染成蓝色(图 1B~F),表明没有核凋亡发生。图 1B 为接合生殖启动后不久,小核膨大。图 1C 的 2 个接合的细胞中,所有核也均染成蓝色,但是两者发育不同步,左侧细胞小核拉长,处于减数第一次分裂前期,右侧细胞的小核则已经进入减数第一次分裂。图 1D 为减数第一次分裂中期,可见染成蓝色的小核中整齐排列的染色体。图 1E 和 F 分别为减数第一次和第二次分裂结束之后,可见 4 个(图 1E 右侧细胞)和 8 个(图 1F 左侧细胞)小核。在一些细胞中见到少于 4 个(图 1E 左侧细胞)或 8 个(图 1F 右侧细胞)小核,这可能是部分小核与大核重叠而难于分辨的结果。图 1G 为减数分裂结束以后的接合对,位于口旁锥内的小核已开始配前第三次分裂,被染成蓝色(大箭头),位于口旁锥外的其他几个小核则被染成不同程度的蓝绿色或黄绿色(小箭头),而形成绳索状的大核则被染成蓝色。

2.3 接合后体中旧大核的退化 与尾草履虫的 3 次受精核分裂不同^[4],第四双小核草履虫在接合生殖过程中,受精核只分裂 2 次形成 4 个分裂产物,其中 2 个分化成新一代的大核,另

外 2 个分化成新一代的小核。“Apofluor”染色发现,在第四双小核草履虫的接合后体中有 2

个大核胚基,2 个梭形的小核和许多老大核碎片,三者均被染成蓝色(图 1H)。

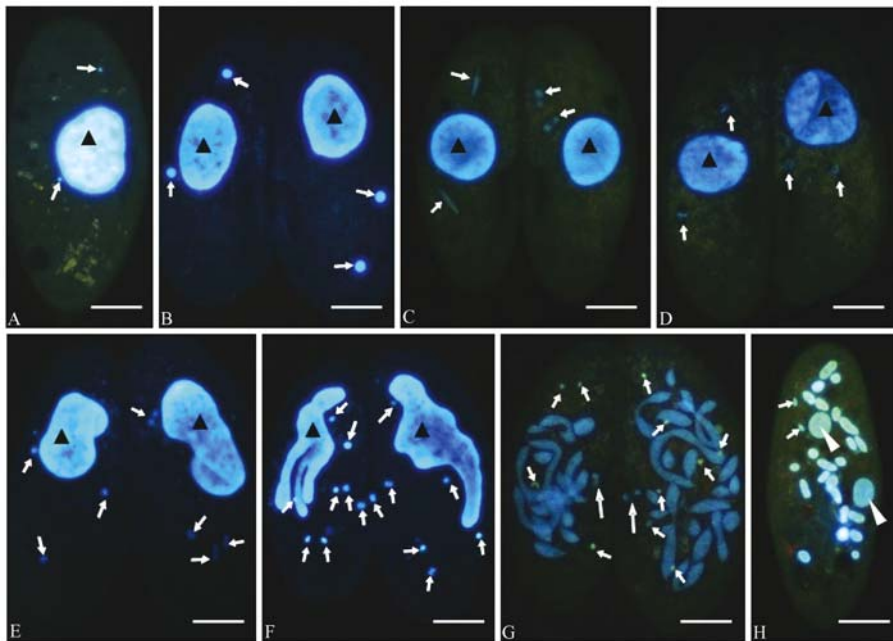


图 1 第四双小核草履虫减数分裂产物的“Apofluor”活体荧光染色观察

Fig.1 Meiotic nuclei of *Paramecium tetraurelia* stained by “Apofluor”

A: 营养时期,有 1 个大核和 2 个小核; B: 接合初期,每个细胞中均有 1 个大核和 2 个膨大的小核; C~E: 减数分裂中的接合对; C: 左侧小核处于减数第一次分裂前期,右侧小核处于减数分裂第一次后期; D: 减数第一次分裂中期,可见小核中的染色体; E: 减数分裂第一次结束,每个细胞中有 3 个(左)或 4 个小核(右); F: 减数分裂第二次结束,每个细胞中有 8 个(左)或 7 个小核(右),老大核开始抽条; G: 配前第三次分裂,每个细胞有 5 个(左)或 8 个小核(右),大核进一步抽条; 每个细胞中各有 1 个小核位于口旁锥内,呈蓝色(大箭头),其余小核呈黄绿色(小箭头); H: 接合后体,有 2 个大核胚基(无尾箭头),2 个小核以及多个老大核碎片。箭头:小核或减数分裂产物; 三角形(▲):老大核。标尺 = 40 μm 。

A: A vegetative cell with 1 macronucleus and 2 micronuclei. B: A conjugating pair soon after the initiation of conjugation. Each cell has 2 swollen micronuclei. C - E: Conjugating pairs at different stages of meiosis. C: Micronuclei in the right cell are undergoing the first meiotic division, those in the left cell at meiotic prophase. D: The first meiotic metaphase. Chromosomes in micronuclei are observed. E: After the first meiotic division. Three micronuclei in the left cell and 4 in the right one are observed. F: Soon after meiosis. Eight micronuclei in the left cell and 7 in the right cell are observed. Macronuclei have changed into skein-formed ones. G: The third prezygotic division. One meiotic products of each cell in paroral region undergoing the third prezygotic division are stained blue (large arrows), the remaining nuclei stained yellow (small arrows). Macronuclei show skein-formed shape. H: An exconjugant with 2 macronuclear anlagen (arrowheads), 2 micronuclei and many macronuclear fragments. Arrows: Micronuclei and meiotic products. Triangle: Macronucleus. Bar = 40 μm .

3 讨 论

活体荧光染色方法不但可以观察到正常发育过程中的细胞核,也可以检测到程序性死亡的细胞核,通过这种方法可以观察到减数分裂

产物呈黄色、蓝绿色、黄绿色或橘红色,而正常的具有活性的细胞核则呈蓝色^[2-3, 7-8]。在嗜热四膜虫中已经利用 Tunnel 法及活体荧光染色方法证明减数分裂时核退化过程是程序性核死亡过程^[2, 15]。在第四双小核草履虫接合生

殖过程中,通过“Apofluor”活体荧光染色,观察到其他部位的小核呈蓝绿色或黄绿色,颜色上明显有别于口旁锥区域呈蓝色的小核,表明减数分裂产物的退化是程序性死亡的过程。染色结果也表明,第四双小核草履虫的核发育过程在2个接合的细胞之间并非严格同步(图1C, E),与尾草履虫的情形相同^[16]。

第四双小核草履虫接合后体中老大核碎块被染成蓝色,说明老大核仍然具有功能。老大核的退化与新大核的发育是不同步的,这一点也与尾草履虫的情况相同^[3],而与嗜热四膜虫不同^[7]。至于老大核何时启动退化,目前尚不清楚。最近的研究表明,尾草履虫的老大核碎块在接合后体进行4~5次细胞分裂以后才开始退化,而且在第9次细胞分裂时才能从细胞中完全消失^[17],这意味着老大核碎块在新大核发育过程中可能起到某种作用。

参 考 文 献

- [1] 翟中和,王喜忠,丁明孝. 细胞生物学. 3版. 北京:高等教育出版社, 2007: 441-465.
- [2] Santos M L, Lu E, Wolfe J. Nuclear death in living *Tetrahymena*; the case of the haploid nuclei. *J Eukaryot Microbiol*, 2000, 47: 493-498.
- [3] Yang X, Gao X, Shi X. Detection of haploid nuclear death in living *Paramecium caudatum*. *Jap J Protzool*, 2007, 40: 123-130.
- [4] 史新柏. 草履虫的有性生殖. *生物学通报*, 1998, 33(9): 9-12.
- [5] Wichterman R. *The biology of Paramecium*. 2nd ed. New York: Plenum Press, 1986: 259-261.
- [6] Aury J M, Jaillon O, Duret L, et al. Global trends of whole-genome duplications revealed by the ciliate *Paramecium tetraurelia*. *Nature*, 2006, 444: 171-178.
- [7] Mpoke S S, Wolfe J. Differential staining of apoptotic nuclei in living cells: Application to macronuclear elimination in *Tetrahymena*. *J Histochem & Cytochem*, 1997, 45: 675-683.
- [8] 杨仙玉,章鑫炯,黄幸. 活体荧光染色在纤毛虫研究中的应用. *水生生物学报*, 2008, 32(增刊): 80-83.
- [9] Hiwatashi K. Determination and inheritance of mating types in *Paramecium caudatum*. *Genetics*, 1968, 58: 373-386.
- [10] 杨仙玉. 尾草履虫接合后体中小核形态学的研究. *水生生物学报*, 2008, 32(增刊): 32-37.
- [11] Dryl S. Antigenic transformation in *Paramecium aurelia* after homologous antiserum treatment during autogamy and conjugation. *J Protozool*, 1959, 6: 25.
- [12] 魏锦瑜,高欣,杨仙玉. 利用铁葡聚糖分离纤毛虫接合对的方法. *动物学杂志*, 2008, 43(2): 77-80.
- [13] 孙晓婷,吴加旺,高欣,等. 超声波处理提高磁性微小铁葡聚糖颗粒的产量及对纤毛虫细胞的应用. *动物学杂志*, 2010, 45(1): 90-93.
- [14] 杨仙玉,黄幸,章鑫炯,等. 减缓草履虫虫体运动的活体观察方法. *生物学教学*, 2008, 33(9): 34-35.
- [15] Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson S. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, 1992, 119: 493-501.
- [16] Gao X, Zhang X J, Yang X Y. Morphological apoptotic characteristics of the post-meiotic micronuclei in *Paramecium caudatum*. *Europ J Protistol*, 2010, 46(3): 243-250.
- [17] Kimura A, Mikami K, Endoh H. Delayed degradation of parental macronuclear DNA in programmed nuclear death of *Paramecium caudatum*. *Genesis*, 2004, 40: 15-21.