

螅状独缩虫口区微纤维结构的研究

胡国群 高崇明

(北京大学生命科学学院, 北京 100871)

摘要: 常规电镜观察显示螅状独缩虫口部单毛基索(HK)、第一(P1)和第二咽膜(P2)旁各有一片微纤维结构。经一步抽提后, 这些微纤维结构仍存在。三步抽提显示它们是由直径 12nm 左右的类中间纤维构成的网格结构, 细胞松弛素 B 不能使其解体。HK 和 P1 旁的微纤维结构在口围唇处即已形成, 随着向胞口延伸, 微纤维结构逐渐变宽, 并形成典型的网格结构。

关键词: 蝌蚪独缩虫; 微纤维结构; 类中间纤维

中图分类号: Q242 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2003)04-0362-005

螅状独缩虫(*Carchesium polypinum* Linne)是一类生活在淡水中的缘毛目纤毛虫^[1]。现有的工作主要集中在用蛋白银染色显示虫体形态以及形态发生, 特别是口纤毛器的形态, Lom^[2]在 1964 年发现在单毛基索和第一咽膜之间靠近单毛基索的地方有一片 3—7μm 宽的微纤维结构, 这片微纤维结构和单毛基索平行排列, 成 S 型延伸到胞口, 很容易被蛋白银染色。同时他在缘毛目其他纤毛虫如钟虫和累枝虫中也发现了类似结构。但是对它们的组成和精细结构则一无所知。

作者采用细胞抽提的方法对螅状独缩虫口区微纤维结构做了定性的工作, 结合细胞松弛素 B 处理后蛋白银染色的方法, 证明其由直径为 12nm 左右的类中间纤维组成。并初步描绘了微纤维结构的精细形态。

1 材料和方法

1.1 材料 蝌蚪独缩虫采自中国武汉东湖。培养方法参照施心路^[3], 将标本从基质上刮下, 挑取干净的群体置于过滤湖水中, 24h 内, 虫体游离, 体柄附着于培养皿底。用蒸馏水冲洗三遍, 即可用于实验。

1.2 蛋白银染色 参考史新柏^[4]的改进方法, 虫体长在盖玻片上, 样品组用 10 μg/mL 的细胞松弛素 B (SIGMA 公司) 处理 24h, 对照组则不经细胞松弛素 B 处理, 然后用饱和升汞溶液固定 5min, 蒸馏水清洗,

0.5% 高锰酸钾溶液作用 2min, 水洗, 5% 草酸作用 2.5min, 虫体变白。蒸馏水清洗。1% protargol (Robot Surgical Instrument 公司) 在 60°C 下作用 1h, 然后用含有 0.4% 氢醌的 5% 亚硫酸钠溶液显色, 直至虫体成棕色, 在 5% 硫代硫酸钠溶液中浸泡 5min, 封片观察。

1.3 细胞的分级抽提 细胞的三步分级抽提方法参照 Fey^[5], 并稍加改进。第一步以 CSK 缓冲液 (100mmol/L NaCl, 300mmol/L sucrose, 10mmol/L Pipes [pH6.8], 3mmol/L MgCl₂, 1mmol/L EGTA, 0.05% Triton X-100) 在 18°C 下作用 4min, 抽去胞内可溶性物质; 第二步以 RSB 液 (1mmol/L EGTA, 42.5mmol/L Tris-HCl [pH8.3], 8.5mmol/L NaCl, 2.6mmol/L MgCl₂, 1% Tween-40, 0.5% DOC) 于室温下作用 5min, 除去微管和微丝; 第三步抽提时, 在 DNA 缓冲液 (50mmol/L NaCl, 300mmol/L sucrose, 10mmol/L Pipes [pH6.8], 3mmol/L MgCl₂, 1mmol/L EGTA) 中分别加入终浓度为 500 μg/mL 和 200 μg/mL 的 DNase I 和 RNase, 室温作用 40min 后, 加入 2mol/L 的硫酸铵溶液至终浓度为 0.25mol/L, 5min 后弃去抽提液。

1.4 常规环氧树脂包埋切片 将虫体从培养皿底刮下, 离心浓缩, 1.25% 戊二醛固定 3h(室温), 1% 银酸后固定 1.5h(4°C), 用环氧树脂 spur 包埋, 切片经醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色, JEM-100CX 观察。

1.5 一步抽提后环氧树脂包埋切片 将虫体从培

收稿日期: 2002-10-09; 修订日期: 2002-12-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 39730070)

作者简介: 胡国群(1975—), 男, 浙江省慈溪市人, 硕士, 分子细胞生物学专业

通讯作者: 高崇明

养皿底刮下, 离心浓缩, 一步抽提之后, 1.25% 戊二醛固定3h(室温), 1% 银酸后固定1.5h(4°C), 用环氧树脂spur包埋, 切片经醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色, JEM-100CX观察。

1.6 DGD包埋去包埋切片 参照David^[6]的方法, 虫体经三步抽提后, 室温下1.25% 戊二醛固定3h, 乙醇系列脱水, 正丁醇过渡, DGD(Diethylene Glycol Distearate, POLYSCIENCES公司)包埋。切片厚度100nm左右, 用正丁醇溶去DGD, 经乙酸异戊酯置换后, 临界点干燥(HITACHI HCP-2 Critical Point Dryer), 电镜观察。

2 结果

2.1 口纤毛器

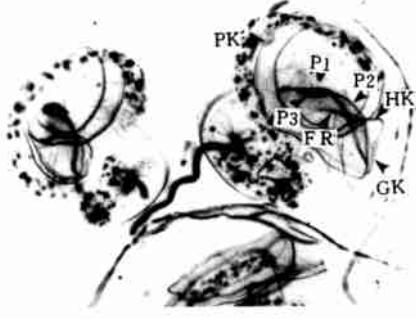


图1 蠕状独缩虫的蛋白银染色照片($\times 370$)

Fig. 1 *Carchesium polypinum* after Silver staining

如图1, 由细胞顶端的口围唇(Peristome)和内部的漏斗形口腔(Infundibulum)组成。多毛基索(Polykinety, PK)和单毛基索(Haplokinety, HK)并列起始于口围唇, 逆时针旋绕一圈半后开始分开, 多毛基索进入漏斗形口腔, 形成第一咽膜(Peniculus 1, P1), 沿前庭壁一直延伸到胞口(Cytostome, Cy)。单毛基索转到前庭壁对过, 与第一咽膜成180度伸到胞口。在多毛基索转入漏斗形口腔的地方, 第二咽膜(Peniculus 2, P2)紧贴第一咽膜出现, 与第一咽膜平行下转, 终止于第一咽膜和第三咽膜(Peniculus 3, P3)的汇合处。第三咽膜较短, 起始于近胞口处, 在第二咽膜终止的地方与第一咽膜汇合, 并继续延伸到胞口。在单毛基索和第一咽膜之间, 靠近单毛基索的地方, 有一宽约3—7μm的“S”形网状结构(Filamentous reticulum, FR, 亦称“S型”带)。生发毛基索(Germinal row of kineties, GK)只有一列动基列, 位于单毛基索上方, 起于第二咽膜起点处的上部与单毛基索平行旋绕, 终止于单毛基索的近中位处。多毛基索, 第一和第二咽膜都由三排动基列组成, 第三咽膜有二或三

列动基列, 依不同亚种而定, 本文所用材料则有三列动基列, 与第一咽膜汇合后, 一列动基列消失, 形成五列动基列。单毛基索有两列动基列, 只有外面一列长有纤毛。

2.2 口区微纤维结构的电镜观察

常规电镜显示在单毛基索, 第一咽膜和第二咽膜的旁边各有一片微纤维结构(图2), 第一咽膜和第二咽膜两边的微纤维结构穿过动基列, 互相联系在一起。第一咽膜旁边的微纤维结构位于漏斗膜侧, 同多毛基索一起起源(图版I:1), 在口围唇处为一纤维束结构, 单毛基索旁边的微纤维结构也起始于口围唇处(图版I:2), 但晚于第一咽膜的微纤维结构。单毛基索和第一咽膜的微纤维结构在进入漏斗形口腔之后, 成为节状的微纤维束(图版I:3, 4), 第一咽膜的微纤维结构每两个节伸出一根粗纤维与动基列的纤毛根相连。而单毛基索旁则没有观察到此种结构。在接近漏斗形口腔的中部(图版I:5, 6), 微纤维结构已发展成网格结构, 由直径为12nm左右的纤维交织而成, 图版I:5中第一咽膜旁微纤维结构的一侧仍可见节状结构, 这两片微纤维结构具有相似的形态。在三条咽膜汇合处(图版I:7), 单毛基索, 第一咽膜和第二咽膜旁的微纤维结构互相联结, 从中分出一些单根纤维同纤毛根相连。第三咽膜旁则未发现成片的微纤维结构, 只能见到纤毛根底部的纤维同第一, 第二咽膜旁的微纤维结构有联系。

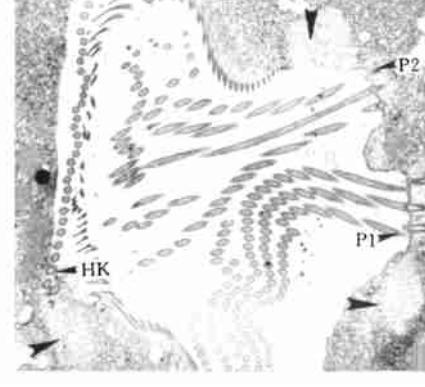


图2 常规电镜显示漏斗形口腔斜切面($\times 8000$)

Fig.2 Infundibulum under electron microscope

粗箭头表示单毛基索(HK), 第一咽膜(P1)

和第二咽膜(P2)旁的微纤维结构

2.3 细胞松弛素B处理后的微纤维结构

正常虫体用蛋白银能很容易地染出单毛基索旁的微纤维结构(图3), 但染不出第一和第二咽膜旁的微纤维结构。用细胞松弛素B处理后(图4), 蛋

白银染色仍可见单毛基索旁的微纤维结构,且单毛基索和三条咽膜在细胞松弛素 B 处理前后无明显变化。说明此微纤维结构不是由微丝组成。

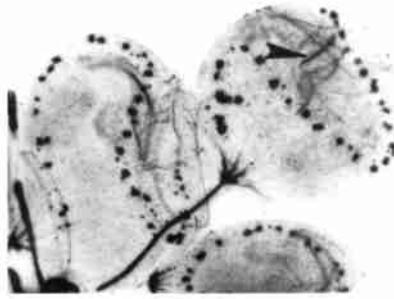


图 3 蛋白银染色后的微纤维结构
(未用细胞松弛素 B 处理)

Fig.3 Buccal filaments of *C. Polypinum*
after Silver staining
箭头显示口区微纤维结构(×370)



图 4 蛋白银染色后的微纤维结构
(细胞松弛素 B 处理 24h)

Fig.4 Buccal filamentous reticulum of *C. Polypinum*
after Silver staining
箭头显示口区微纤维结构(×670)

3 讨论

Lom^[2]在 1964 年发现缘毛目纤毛虫的口腔有一很容易被蛋白银染色的微纤维结构,在独缩虫中,它位于单毛基索和多毛基索之间靠近单毛基索的地方,起始于漏斗形口腔的顶部,与生发毛基列交错分布,分列于单毛基索两侧。Zagon^[7,8]和 Esteban^[9]在随后的工作中也发现了这一微纤维结构,但由于他们所用的方法主要是蛋白银染色,无法观察到这一微纤维结构的精细形态,Lom 和 Zagon 也做了一些电镜的工作,但只是一些关于微纤维结构的零星的照片,没有给出它在口纤毛器各个部位的分布状态。对于这片微纤维结构的成分,Zagon 认为由类肌丝组成,Lom 则不赞成这种观点,因为没有观察到独缩虫的口纤毛器有收缩的现象。

作者用三步抽提 DGD 包埋去包埋的方法,观察到这片微纤维结构由直径 12nm 左右的纤维组成规则的网格结构,Penman^[6]认为微管和微丝在第二步

抽提时除去,第三步抽提后剩下中间纤维,结合这片微纤维区的纤维直径为 12nm,证实螅状独缩虫口区微纤维结构由类中间纤维构成。另外,虫体用细胞松弛素 B 处理 24h 后,微纤维结构仍存在,作者还用抗 actin 的抗体与虫体作用,发现口部呈阴性反应,说明它不是由微丝组成。

Lom,Zagon 和 Esteban 只观察到螅状独缩虫单毛基索旁边有一微纤维结构,作者用电镜观察发现,在第一和第二咽膜两边也各有一微纤维结构,而且这三片微纤维结构似乎是互相联系的。第三咽膜旁未见有微纤维结构,但由于作者只观察到第三咽膜的部分,对确定旁边是否有微纤维结构的问题,尚待进一步研究证实。

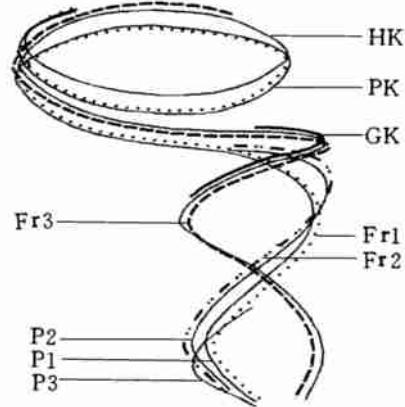


图 5 口部微纤维区示意图
Fig.5 The distribution of filamentous reticulum
虚线 Fr1,Fr2 和 Fr3 分别表示 P1,P2 和 HK 旁的微纤维结构

在电镜观察的基础上,作者初步构建了这些微纤维结构在螅状独缩虫口纤毛器中的分布情况。如图 5 所示,第一咽膜旁的微纤维结构起始于多毛基索起源处(图版 I : 1),并伴随整个多毛基索和第一咽膜,在刚起始时,微纤维区成一带节的纤维束状,每两个节上伸出一根粗纤维与纤毛根相连,随着向漏斗形口腔内部延伸,逐渐变宽,形成网格结构(图版 I : 4),同时节与纤毛根相连的纤维消失,这种网格结构一直伸展到胞口。单毛基索旁的微纤维结构形成晚于第一咽膜旁的微纤维结构,但在口围唇处即已形成,由于电镜切片未切到它的起始部位,因此具体在口围唇的哪一部位形成则未知。这片微纤维结构同样具有分布均匀的节,但与第一咽膜旁的微纤维结构不同的是,它的节上没有粗纤维与单毛基索的纤毛根相连,在转入漏斗形口腔之后纤维结构变得较宽呈“S”形伸到胞口。第二咽膜旁的微纤维结构,在第二咽膜近中部时已发展成网格结构,与第

—咽膜旁的微纤维结构具有相似的形态, 终止于三条咽膜相汇处。另外在三条咽膜相汇处, 这三片微纤维结构互相汇合成一较宽的纤维区, 这一结构延伸至何处, 尚需作进一步的工作来确定。

参考文献:

- [1] Shen Y F. Protozoology [M]. Beijing: Science Press. 1999, 467—474[沈韫芬. 原生动物学[M]. 北京: 科学出版社, 1999, 467—474]
- [2] Lom J. The Morphology and morphogenesis of the buccal ciliary organelles in some peritrichous ciliates [J]. *Arch. Protistenk. Bd.*, 1964, **107**: 131—162
- [3] Shi Xin lu, Yu Yuhe, Shen Yunfen. Infraciliature and morphogenesis of *Carchesium polypinum* (Ciliophora: peritrichida) [J] *Acta Zoologica Sinica*, 2001, **47**(1): 13—18[施心路, 余育和, 沈韫芬. 虫状独缩虫表膜下纤毛系及形态发生[J]. 动物学报, 2001, 47(1): 13—18]
- [4] Shi X B, Frankel J. Morphology and development of mirror-Image doublets of *Styloynchia mytilus* [J]. *J. Protistol.*, 1990, **37**(1): 1—13
- [5] Fey E G, Krochmalnic G, Penman S. The Nonchromatin substructures of the nucleus; the ribonucleoprotein (RNP)-containing and RNP-depleted matrices analyzed by sequential fractionation and resinless section electron microscopy [J]. *J. Cell Biol.*, 1986, **102**, 1654—1665
- [6] David G C, Krochmalnic G, Penman S. A new method of preparing embedment-free sections for transmission electron microscopy: Applications to the cytoskeletal framework and other three-dimensional networks [J]. *J Cell Biol.*, 1984, **98**, 1878—1885
- [7] Zagon I S, Small E B. *Carchesium polypinum*; somatic and buccal structure analysis after protargol staining [J]. *Trans. Am. Microsc. Soc.*, 1970, **89**(3): 443—449
- [8] Zagon I S. *Carchesium polypinum*; cytostructure after protargol silver deposition [J]. *Trans. Am. Microsc. Soc.*, 1970, **89**(3): 450—468
- [9] Esteban G, Dimas F G. Morphology and morphogenesis in *carchesium polypinum* [J]. *Trans. Am. Microsc. Soc.*, 1989, **108**(4): 345—353

THE BUCCAL FILAMENTOUS RETICULUMS IN *CARCHESIUM POLYPINUM*

HU Guo-Qun and GAO Chong-Ming

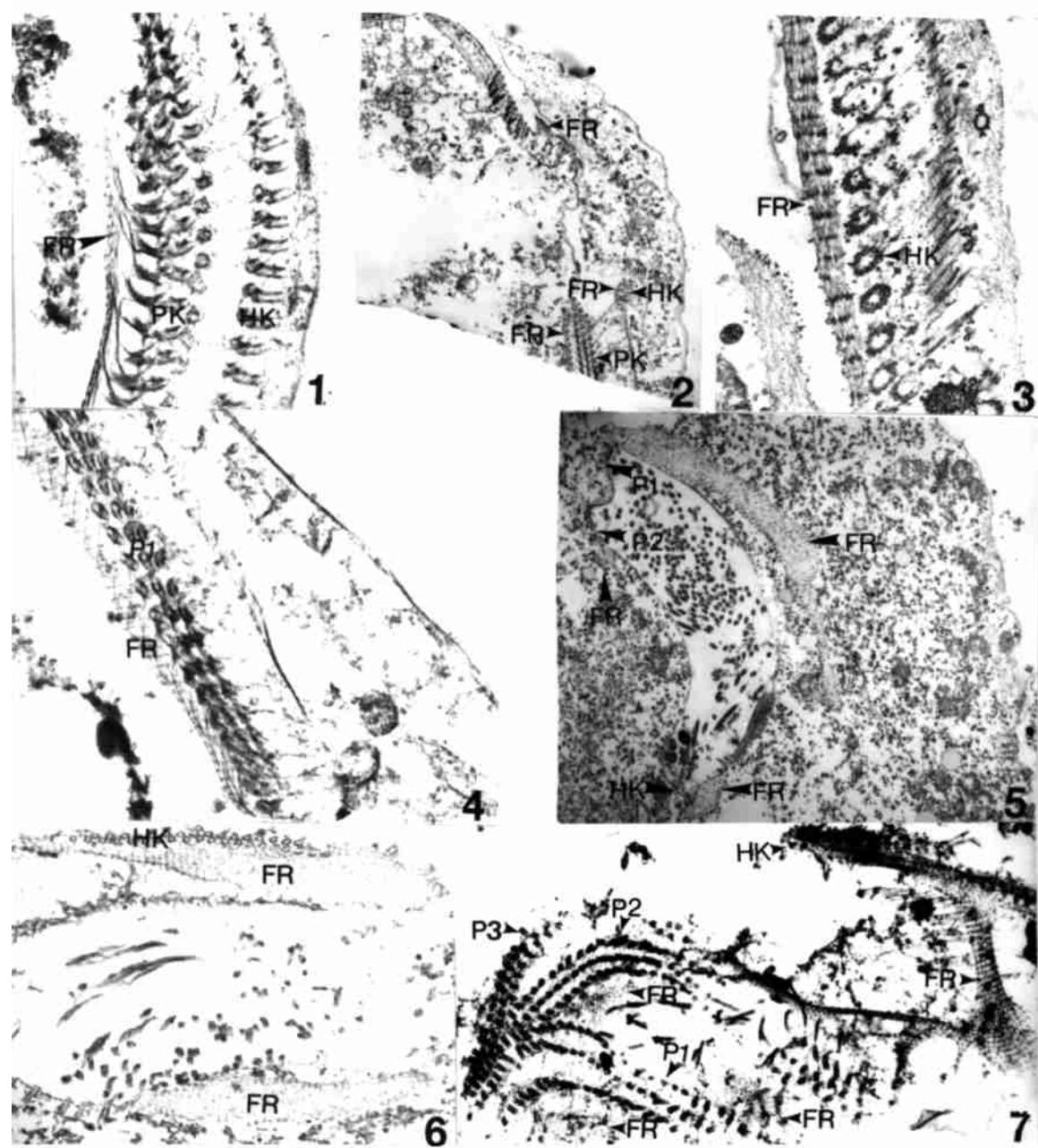
(College of Life Science, Beijing University, Beijing 100871)

Abstracts: Using silver staining, sequential fractionation and electron microscopy technologies, we invested the buccal filamentous reticulum (Fr) of *Carchesium polypinum*.

In contrast to the previous reports which discovered that there was one Fr between Polykinety and Haplokinety, we found that there were three Fr in the buccal structure of *Carchesium polypinum*, accompanying respectively the Haplokinety, Peniculus 1 and Peniculus 2. Sequential fractionation followed by electron microscopy revealed that these Fr consisted mainly of filaments with diameters of 12 nm. In addition, these Fr were not sensitive to cytochalasin B, and resisted to sequential fractionation. Based on these findings, we concluded that these Fr consisted of like-intermediate filaments.

Using electron microscopy, we reconstructed the Fr in the buccal structure of *Carchesium polypinum*. The two Fr paralleling the Haplokinety and Peniculus 1 begin at the Peristome, gradually widen and develop into reticulation in the Infundibulum. The Fr which parallels Peniculus 2 may begin at the upper part of the Infundibulum. It has the similar morphometrics with the other two Fr. Near the Cytostome, the three Fr converge into a wider filamentous reticulum.

Key words: *Carchesium polypinum*; Filamentous reticulum; Intermediate filament



图版 I

1,4,6,7 为三步抽提后的 DGD 切片;2,3,5 为一步抽提后的 spur 切片。P₁;第一咽膜;P₂;第二咽膜;P₃;第三咽膜;HK;单毛基索;PK;多毛基索;FR;微纤维结构。1 PK 和 HK 起始处,×12,000;2 PK 和 HK 进入漏斗形口腔(×2,500);3 HK 在漏斗形口腔的上部(×18,000);4 P₁ 上部,×9,600;5 漏斗形口腔近中部的斜切,×3,000;6 漏斗形口腔近中部的纵切(×6,000);7 三条咽膜汇合处,×5,300

1,4,6,7 Show the electron microscope photo of *Carchesium polypinum* after three consecutive extractions;2,3,5 Show the electron microscope photo of *Carchesium polypinum* after one extraction. P₁:peniculus 1;P₂:peniculus 2;P₃: peniculus 3;HK:Haplokinety;PK:Polykinety;FR:filamentous reticulum. 1 The beginning of PK and HK×12,000;2 PK and HK entering the infundibulum,×2,500;3 HK at the upper part of the infundibulum,×18,000;4 The upper part of P₁,×9,600;5 Oblique section of the middle part of infundibulum,×3,000;6 Longitudinal section of the middle part of infundibulum,×6,000;7 The convergence of three peniculus,×5,300