

华美游仆虫皮层细胞骨架的超微结构 及免疫电镜观察^{*}

尹 飞, 赵 柳, 周 瑶, 盛 春, 倪 兵, 顾福康
(华东师范大学生命科学学院, 上海 200062)

摘 要: 应用透射和免疫电镜术, 在超微结构水平观察显示, 腹毛类纤毛虫华美游仆虫的皮层纤毛器和非纤毛器细胞骨架中, 表膜下、细胞质深部的微管或纤维束, 以及纤毛器及纤毛器附属微管等都是以 α -和 β -微管蛋白为主要成分的微管类结构; 中心蛋白定位于纤毛器的基体腔、基体基部近中心端、基体基部近中心端连接及基体中部连接结构中, 而在纤毛杆和皮层非纤毛器微管中无中心蛋白成分存在。据此认为, 该纤毛虫中, 基体部位的蛋白组成机制与纤毛杆及纤毛器附属结构是不同的, 非分裂期细胞中定位于基体主体部位的中心蛋白可能与维持相关结构的稳定性有关。

关键词: 华美游仆虫; 皮层细胞骨架; 超微结构; α -和 β -微管蛋白; 中心蛋白

中图分类号: Q 954 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2009) 05-0097-06

Ultrastructure and Immunoelectron Microscopic Observations on Cortical Microtubular Cytoskeleton of *Euplotes elegans* (Ciliophora: Hypotrichida)

YIN Fei, ZHAO Liu, ZHOU Yao, SHENG Chun, NI Bing, GU Fukang
(School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract: Cortical microtubular cytoskeleton and immunocytochemical localization of α - and β -tubulin and centrin were revealed by using transmission electron microscopy and immunoelectron microscopy. The results show that the cortical ciliated and cortical non-ciliated regions cytoskeleton of *Euplotes elegans* are composed of subpellicular and deep cytoplasmic microtubules or fiber bundles, ciliated and ciliated base-associated microtubules. These microtubules and fiber bundles are mainly constructed by α - and β -tubulin; centrin is localized in the basal body lumen, proximal level of the basal bodies (PLBB), links located at the PLBB and fibrous links located at the median level of basal bodies of ciliated, but no decoration at all has been detected within the ciliary shafts and cortical non-ciliated regions microtubules. It is concluded that the organizing mechanisms are different between basal body and ciliary shafts or ciliated base-associated microtubules of *Euplotes elegans*. Centrin which localized at basal body of interphase cell may play a key role in the stability maintenance of basal body microtubules and links of basal body.

Key words: *Euplotes elegans*; cortical cytoskeleton; ultrastructure; α - and β -tubulin; centrin

原生动物纤毛虫含有复杂的皮层纤毛器和非纤毛器细胞骨架, 作为与细胞生命活动紧密联系的基本构架, 探索其骨架基本单元微管或纤维的组装机理对揭示纤毛虫生命活动中结构的遗传及细胞调控具有重要科学价值, 也是研究真核细胞模式形成机

理的重要内容, 一直引起各个领域研究者的关注。目前, 对进化程度较低的四膜虫 *Tetrahymena*、草履虫 *Paramecium* 等纤毛虫细胞骨架组成及纤毛虫基体微管装配的了解较深入^[1-2], 但对高度进化的腹毛类纤毛虫, 由于细胞不同骨架单元进一步聚集

^{*} 收稿日期: 2008-09-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30770238)

作者简介: 尹飞 (1980 年生), 男, 博士研究生; 通讯作者: 顾福康; E-mail: fkgu@bio.ecnu.edu.cn

并特化,其中骨架单元的组成成分及建构更为复杂,仅对魏氏拟尾柱虫 *Paraurostyla weissei* 等的研究取得了初步进展^[3]。本文以腹毛类纤毛虫华美游仆虫 *Euplotes elegans* 为材料,采用超微结构和免疫电镜定位技术,在显示其皮层细胞骨架的基础上,追踪细胞骨架的 α -微管蛋白及中心蛋白的定位,探索这类纤毛虫皮层细胞骨架的建构特征,以及结构蛋白主要成分的分布和中心蛋白的功能,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

2003年春采自上海市青浦区近郊的淡水池塘中,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 实验方法

1.2.1 透射电镜样品制备方法 参照顾福康等^[4]和 Arregui 等的方法^[5]并作适当修改,步骤如下:①收集生长良好的细胞,于 $\varphi=2\%$ 戊二醛固定液中固定1 h,或者[将洁净细胞转移至含 $\varphi=0.1\%$ Triton X-100的抽提缓冲液(100 mmol/L 蔗糖,1 mmol/L EDTA, 2.5 mmol/L $MgCl_2$, 10 mmol/L Hepes (pH 6.8), 0.1 mmol/L KCl)中处理5~10 min;抽提缓冲液清洗;将细胞转移至50 mmol/L Pipes 缓冲液中处理30 min]通过生化抽提除去细胞质;② $w=1\%$ 的锇酸固定1 h;③梯度酒精脱水;④Epon812 环氧树脂包埋,37℃聚合16 h,45℃聚合24 h,60℃聚合48 h,⑤超薄切片,染色,透射电镜观察、照相。

1.2.2 抗 α -微管蛋白和抗中心蛋白免疫电镜样品制备方法 参照 Chai 等^[6]方法并作适当修改,步骤如下:①收集生长良好的细胞,在 $w=2\%$ 多聚甲醛+ $\varphi=0.25\%$ 戊二醛混合液中,于4℃固定1 h;②PBS清洗后,梯度酒精脱水;③Epon812 环氧树脂包埋,37℃聚合12 h,45℃聚合72 h;④超薄切片后,金网捞片;⑤ $\varphi=1\%$ H_2O_2 处理30 min,以暴露抗原;双蒸水清洗;⑥加 $w=1\%$ BSA-0.05 mol/L TBS (pH 7.4)于室温封阻1 h;⑦鼠抗 α -微管蛋白 DM1A 抗体(Sigma)/兔抗中心蛋白单克隆抗体(Abcam) (1:1000)孵育2 h(对照组用 $w=1\%$ BSA代替一抗);⑧0.05 mol/L TBS (pH 7.4)清洗;再0.02 mol/L TBS (pH 8.2)清洗;加 $w=1\%$ BSA-0.02 mol/L TBS (pH 8.2)于37℃封阻1 h;⑨金标记二抗(1:20,淡红色为适宜稀释液)于室温孵育1 h;⑩0.02 mol/L TBS

(pH 8.2)清洗;再0.05 mol/L TBS (pH 7.4)清洗;⑪醋酸双氧铀染色, JEM2100 型透射电镜观察、照相。

2 结果

2.1 皮层微管骨架的超微结构观察

华美游仆虫皮层微管骨架包括非纤毛区皮层微管、口纤毛器、体纤毛器、纤毛器基体和基体附属结构。

2.1.1 非纤毛区皮层超微结构 (1)表膜下微管:首先,在细胞背、腹面表膜下大部分区域,分布着以少量微管规则排列组成的微管层。其中,在细胞背面,以每3根微管为一单元形成的“品”字形结构按一定间隔排列为微管层(图1:1);在细胞腹面,以单根微管为一单元按一定间隔排列形成微管层(图1:2)。其次,具有以多根微管平行于表膜排列组成的表膜下微管层,微管层与表膜间由间隔均匀的高电子密度的微管束骨架相互联系,有时可见从微管层向细胞质中发出一些细小纤维,部分纤维与线粒体相连(图1:3);另外,具有由单根或多根微管以不规则方式排列和定向的微管层,其中在微管层内发出单根微管,并伸向细胞质深处。(2)胞质深部纤维:在细胞质中,常见不规则分布的纤维束,由少数几根或多根纤维为单元形成纤维束,不连续,且与附近的细胞器无明显的直接联系(图1:4)。

2.1.2 纤毛区皮层超微结构 (1)口区:口围带的每个小膜单元均由3列纤毛组成,其中1列稍短(图1:5)。从小膜基体近中心端(proximal)到纤毛轴丝(axoneme)的不同横切面观察可见,在细胞质深处,口围带纤毛基体近中心端的起始位置为一些点状分布的电子致密物质,当向纤毛杆方向靠近时,点状致密物质逐渐形成半圆环状结构,并向四周伸出细小连接结构;当3列小膜基体全部显现时,可见每个毛基体发出的细小连接结构呈辐射状并与周围基体相连;当进一步向纤毛轴丝方向靠近时,这些基体间连接消失;在到达纤毛杆轴丝位置时,“9+2”结构出现(图1:6,7);从纵切面可见,小膜纤毛由纤毛杆、基体、基体托架、基体间连接结构和附属结构组成。(2)棘毛区:从棘毛横切面观察可见,棘毛周围由围棘纤维篮包围。棘毛基部有纤维束向细胞质不同方向延伸,且每束棘毛均有数十根至上百根纤毛聚集形成多边形(图1:8,9)。相邻纤毛基体间具有连接结构(图1:10)。有时,可观察到基体基部有葡萄串状附属结

构向细胞质延伸(图1:11);由纵切面可见,纤毛由纤毛杆、基体、基体基部近中心端电子致密物、基体基部近中心端连接及基体中部连接结构组成(图1:12),另外在棘毛区两侧的表膜下具有以单根微管并列组成的微管层(图1:9,11)。(3)背纤毛区:背纤毛单元由一根纤毛和一个裸毛基体组成,位于表膜凹陷内;基体下方富含膜囊状结构,周围分布有线粒体;在纤毛单元两侧的背皮层表膜下,由每3根微管形成的“品”字形单元组成微管层(图1:13)。

2.2 免疫标记超微结构观察

2.2.1 抗 α -微管蛋白标记 细胞表膜下非纤毛区、纤毛区基体周围及纤毛杆部位均有金颗粒的排布(图2:1-3)。在细胞表膜下非纤毛区无线粒体分布的区域,金颗粒排布较为紧密,在线粒体周围的细胞质中以及线粒体与表膜间的空隙中也有金颗粒的分布。另外,在一些紧贴线粒体的膜泡状结构周围也存在着金颗粒的致密分布(图2:4)。纤毛区附近的表膜下也结合有密集的金颗粒,这些颗粒与纤毛基体中分布的金颗粒相互联系(图2:2)。从纤毛杆的横切面观察可知,在每根纤毛杆的周围微管部位有较多金颗粒的定位;而中央微管则较少(图2:2)。从毛基体横切面观察可见,基体及周围区域也有金颗粒的定位,以基体微管结构为中心散布,其中在基体间的横向及斜向连接结构都有明显的定位。基体基部附属微管也存在大量的金颗粒(图2:2,3)。

2.2.2 抗中心蛋白标记 金颗粒主要定位于纤毛基体和基体间连接结构中。从纤毛基体的横切面观察可见,相邻基体间有横向连接,前、后两列基体间由高电子密度的斜向连接,这些连接结构均有中心蛋白抗体的标记。同时,基体的三联体微管也有中心蛋白的定位,中央区域存在少量的金颗粒(图2:5,6)。从纤毛纵切面观察可知,纤毛杆和基体以基板为界,基体平面近圆柱形,基体底部近中心端有一环形的电子致密带;在基体底部近中心端和基体近中部位置,基体与基体之间均有电子致密物相连接。其中金颗粒主要分布于基体腔、基体基部近中心端、基体基部近中心端连接及基体中部连接结构中(图2:7,8)。

3 讨论

3.1 华美游仆虫皮层纤毛器和非纤毛器骨架的微管蛋白组成

Jerka-Dziodosz^[7] 1980年运用透射电镜术对魏

氏拟尾柱虫腹棘毛的亚显微结构进行了观察,并将纤毛器基部附属结构作为基部纤维。近年来,所在实验室应用非离子去垢剂抽提并结合扫描电镜观察显示,游仆虫皮层细胞骨架以纤维物质为基本成分形成纤维层、纤维网、纤维束等不同形态单元,其中纤毛器附属结构由基部纤维组成,例如额腹横棘毛基部含前纵纤维、后纵纤维及放射纤维^[8-9];此后,又依据抗 α -微管蛋白免疫荧光标记和FLUTAX直接荧光标记结果,提出了游仆虫皮层细胞骨架中纤毛器微管、纤毛器基部微管和皮层非纤毛器微管的建构特征^[10]。本文运用透射电镜术并结合抗 α -微管蛋白免疫电镜方法,在超微结构水平显示的华美游仆虫皮层细胞骨架的形态与以前对游仆虫的观察结果是一致的。由于 α -和 β -微管蛋白总是以异质二聚体的形式存在于生物体中,且通过首尾相连的方式组装成柱状微管壁^[11],因此运用 α -或 β -微管蛋白抗体的任意一种标记,被显示的微管结构实际上均是由 α -和 β -两种微管蛋白组成的。由此,本文的结果进一步证明,游仆虫的皮层纤毛器和非纤毛器细胞骨架,其中表膜下、胞质深部的微管或纤维束,以及纤毛器附属结构等,均是以 α -和 β -微管蛋白为主要成分的微管类结构。

3.2 华美游仆虫纤毛器微管内中心蛋白的定位与作用

Oakley^[12] 1989年于构巢曲霉菌中首次发现 γ -微管蛋白,研究显示其存在于基体等微管组织中心中,当基因突变后,基体的复制也会受到抑制^[13]。在随后10多年中, δ -和 ϵ -等微管蛋白也被陆续发现,他们在细胞中也被认为是位于微管组织中心的功能性蛋白^[14-17]。而中心蛋白作为微管组织中心的又一功能性蛋白首先被发现于衣藻的核-基体的连接结构中^[18-19],之后,人们对其在细胞中的定位和功能也进行的多方面的研究,证明中心蛋白在不同物种中的功能并不完全相同^[3,20-24]。在纤毛虫四膜虫中,中心蛋白主要定位于基体、口皮层纤维、小根纤维和非基体中心蛋白体系中(non-kinetosomal centrins systems),其功能与口器发生和口器形态的转变有关^[24];草履虫的中心蛋白除了定位于基体及其附属结构外,主要作为纤毛下网格结构的组成成分,对基体复制时的几何定位和极性起到指导作用,但并不影响新基体的组装^[20,22];在魏氏拟尾柱虫中,中心蛋白定位于纤毛基体及其相联系的纹状小根中,与基体组装关系密切^[3];在华美游仆虫中,间期细胞和形态

发生期的纤毛基体和纤毛原基等位置均有中心蛋白,这可能与基体结构的维持和基体发生过程中微管的组装有关^[10]。本文由免疫电镜结果显示,华美游仆虫细胞的中心蛋白定位于基体腔、基体基部近中心端、基体基部近中心端连接及基体中部连接结构中,而在纤毛杆和皮层非纤毛器微管中无中心

蛋白成分存在。据此认为,该纤毛虫中,基体部位的蛋白组成机制与纤毛杆及纤毛器附属结构是不同的,非分裂期细胞中定位于基体主体部位的中心蛋白可能与维持基体微管和基体间连接微管的结构稳定性有关。

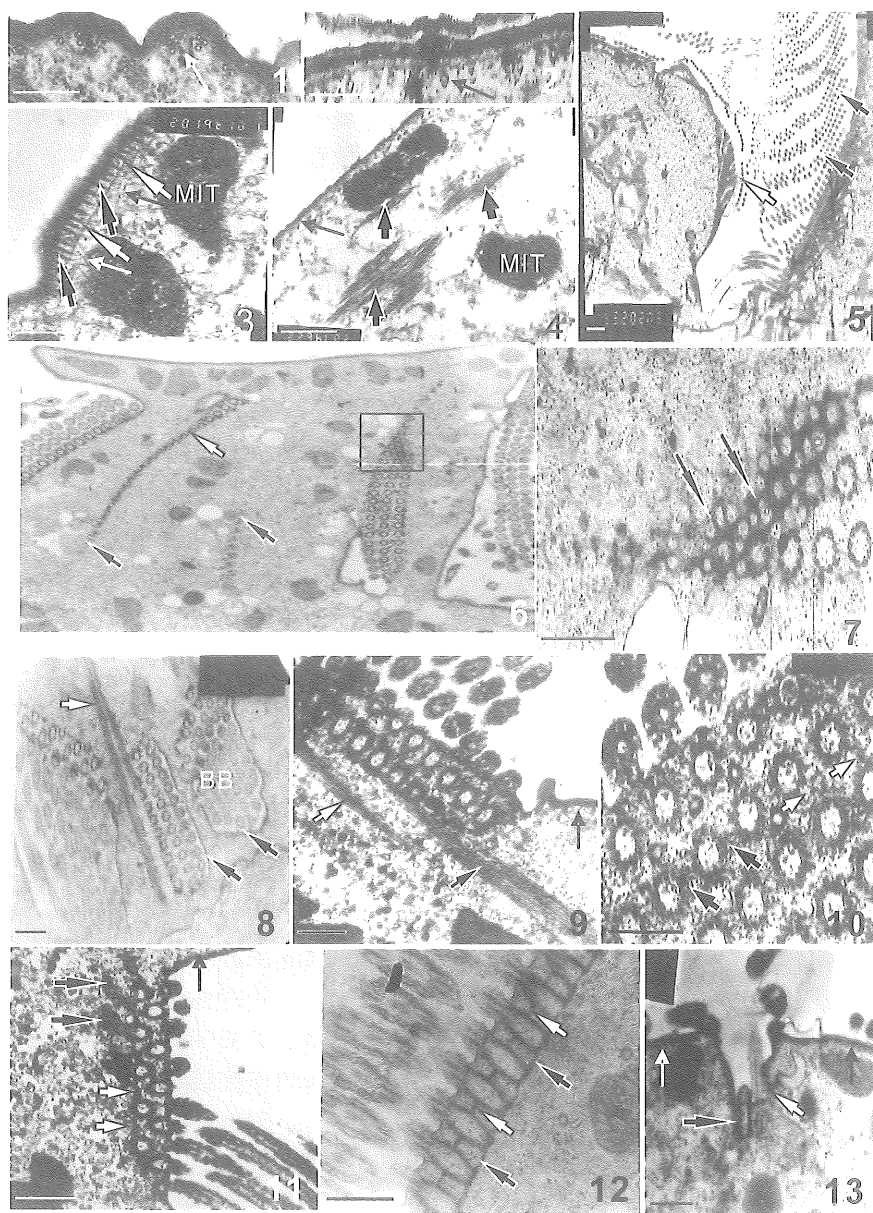


图1 细胞骨架的超微结构观察

Fig. 1 Ultrastructure observations on cortical microtubular cytoskeleton

1: 背表膜下微管层(箭头所示); 2: 腹表膜下微管层(箭头所示); 3: 平行于表膜的微管层(白箭头所示)、垂直于表膜的纤维束(黑箭头所示)及源于微管层的细小纤维(细长箭头所示); 4: 胞质深部纤维束(黑箭头所示)及表膜下微管层(细长箭头所示); 5: 口皮层横切片(黑箭头示小膜, 白箭头示波动膜); 6: 口围带小膜纤毛基体横切片(黑箭头示点状分布的电子致密物质, 白箭头示半圆环结构周围的细小连接结构); 7: 显示图6方格区域的放大(箭头示基体间呈辐射状的细小连接结构); 8: 围棘纤维篮的微管层(黑箭头所示)、棘毛基部附属纤维束(白箭头所示)及纤毛基体(BB); 9: 棘毛基体、附属微管束(粗箭头所示)及表膜下微管层(细长箭头所示); 10: 棘毛基体横切片(白箭头示基体列间斜向连接, 黑箭头示基体间连接); 11: 棘毛基体(白箭头示基体托架, 黑箭头示葡萄串状基体附属结构)及表膜下微管层(细长箭头所示); 12: 纵切基体间连接结构(白箭头示基体中部连接, 黑箭头示基体基部近中心端连接); 13: 背纤毛裸毛基体(黑箭头所示)、纤毛杆结构(白箭头所示)及其两侧背皮层表膜下微管层(细长箭头所示) 标尺=0.5 μm

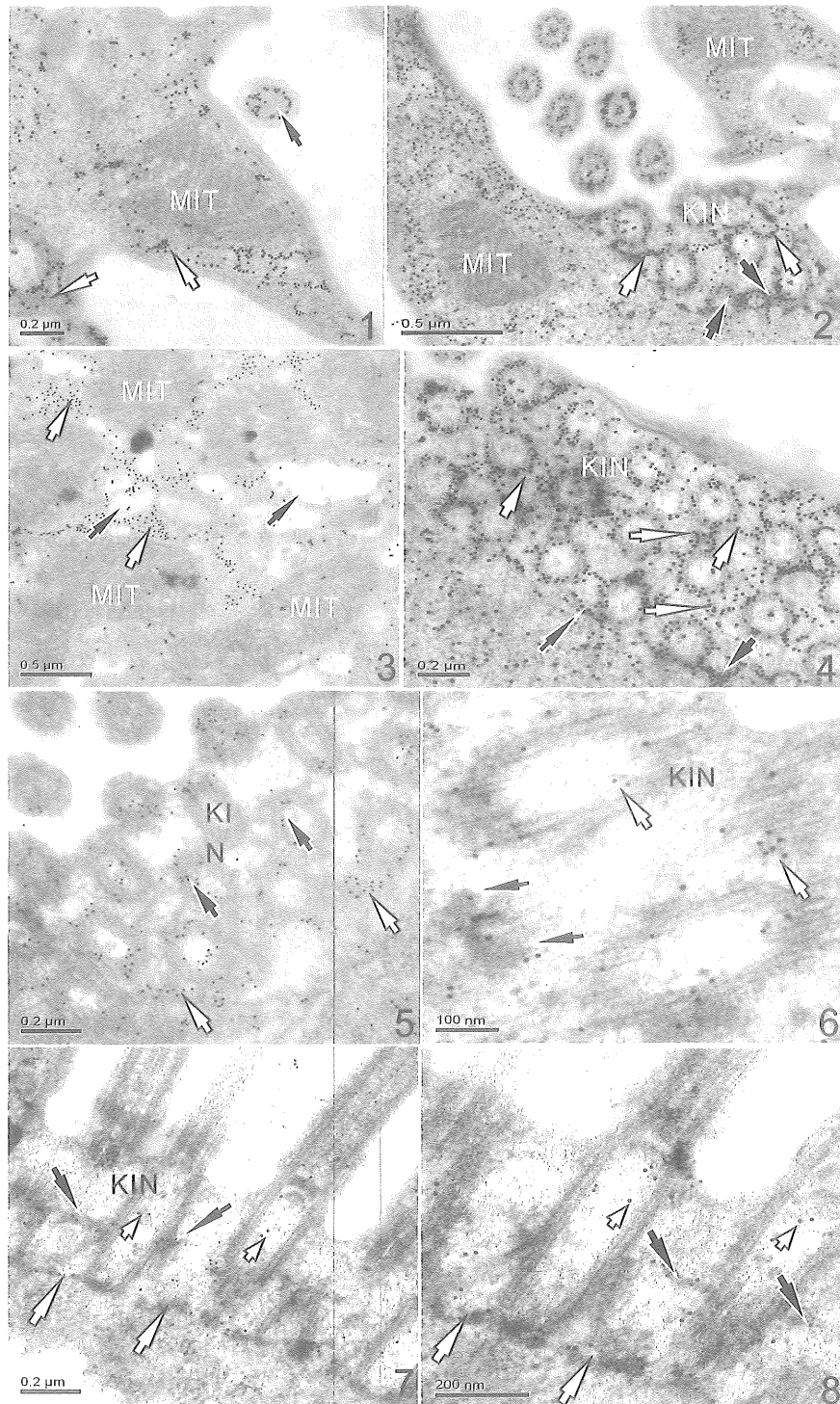


图2 皮层细胞骨架免疫电镜观察

Fig. 2 Immunoelectron microscopic observations on cortical microtubular cytoskeleton

(1-4: 为抗 α -微管蛋白抗体标记结果; 5-8: 为抗中心蛋白抗体标记结果)

1: 表膜下及纤毛杆的金颗粒 (白箭头示线粒体和表膜间的金颗粒, 黑箭头示纤毛杆横切片中的金颗粒); 2: 基体部位的金颗粒 (KIN: 毛基体, 下同; 白箭头示基体间连接的金颗粒, 黑箭头示基体基部微管的金颗粒); 3: 细胞质中的金颗粒 (白箭头示线粒体和膜泡状结构间的金颗粒, 黑箭头示膜泡状结构); 4: 基体区域的金颗粒 (白箭头示基体间连接的金颗粒, 黑箭头示基体基部微管的金颗粒); 5: 基体区域的金颗粒 (白箭头示基体间连接的金颗粒, 黑箭头示基体周围微管的金颗粒); 6: 基体区域的金颗粒 (白箭头示基体周围微管的金颗粒, 黑箭头示基体连接的金颗粒); 7-8: 基体区域的金颗粒 (小白箭头示基体腔的金颗粒, 大白箭头示基体基部近中心端连接的金颗粒, 黑箭头示基体中部连接的金颗粒)

参考文献:

- [1] GAERTIG J. Molecular mechanisms of microtubular organelle assembly in *Tetrahymena* [J]. The Journal of Eukaryotic Microbiology, 2000, 47(3): 185–190.
- [2] IFTODE F, FLEURY-AUBUSSON A. Structural inheritance in *Paramecium*: Ultrastructural evidence for basal body and associated rootlets polarity transmission through binary fission [J]. Biology of the Cell, 2003, 9(1): 39–51.
- [3] LEMULLOIS M, FRYD-VERSAVEL G, FLEURY-AUBUSSON A. Localization of centrins in the hypotrich ciliate *Paraurostyla weissei* [J]. Protist, 2004, 155(3): 331–346.
- [4] 顾福康, 倪兵. 包囊游仆虫休眠包囊的超微结构研究 [J]. 实验生物学报, 1995, 28(2): 163–171.
GU Fukang, NI Bing. An ultrastructural study on resting cyst of *euplotes encysticus* [J]. Acta Biologica Experimental Sinica, 1995, 28(2): 163–171.
- [5] ARREGUI L, SERRANO S, GUINEA A. Microtubular elements of the marine antarctic ciliate *Euplotes focardii* (Ciliophora, Hypotrichia) [J]. Archiv fur Protistenkunde, 1994, 144(4): 357–364.
- [6] CHAI B F, WANG W, LIANG A H. Expression, characterization and immunolocalization of translation termination factor eRF3 in the ciliate *Euplotes octocarinatus* [J]. Research in Microbiology, 2006, 157(3): 235–240.
- [7] JERKA-DZIADOSZ M. Ultrastructural study on the development of the hypotrich ciliate *Paraurostyla weissei*, I. Formation and morphogenetic movements of ventral ciliary primordial [J]. Protistologica, 1980(16): 571–589.
- [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 [J]. 动物学报, 2003, 49(4): 514–521.
GU Fukang, ZOU Shifa, LI Yisong, et al. Scanning electron microscopic observations on the ventral cortical cytoskeleton of *Euplotes harpa* (Protozoa, Ciliophora) [J]. Acta Zoologica Sinica, 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 [J]. 动物学研究, 2004, 25(5): 422–428.
ZHU Hui, ZOU Shifa, LI Yisong, et al. Cortical cytoskeleton of *Euplotes gracilis* (Protozoa, Ciliophora) by non-ionic detergent extraction [J]. Zoological Research, 2004, 25(5): 422–428.
- [10] 赵柳, 运迷霞, 柳伟君, 等. 华美游仆虫细胞微管器的直接荧光和免疫荧光标记 [J]. 动物学杂志, 2008, 43(2): 1–6.
ZHAO Liu, YUN Mixia, LIU Weijun, et al. Microtubular organelles in *euplotes elegans* revealed by direct-fluorescent and immunofluorescent labing [J]. Chinese Journal of zoology, 2008, 43(2): 1–6.
- [11] LIBUSOVÁ L, DRÁBER P. Multiple tubulin forms in ciliated protozoan *Tetrahymena* and *Paramecium* species [J]. Protoplasma, 2006, 227(2–4): 65–76.
- [12] OAKLEY C E, OAKLEY B R. Identification of a gamma-tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by mipA gene of *Aspergillus nidulans* [J]. Nature, 1989, 338(6217): 662–664.
- [13] RUIZ F, BEISSON J, ROSSIER J, et al. Basal body duplication in *Paramecium* requires γ -tubulin [J]. Current Biology, 1999, 9(1): 43–46.
- [14] DUTCHER S K, TRABUCO E C. The UN13 gene is required for assembly of basal bodies of *Chlamydomonas* and encodes delta-tubulin, a new member of the tubulin superfamily [J]. Mol Biol Cell, 1998, 9(6): 1293–1308.
- [15] CHANG P, STEARNS T. Delta-tubulin and epsilon-tubulin: two new human centrosomal tubulins reveal new aspects of centrosome structure and function [J]. Nature Cell Biology, 2000, 2(1): 30–35.
- [16] GARREAU DE LOUBRESSE N, RUIZ F, BEISSON J, et al. Role of delta-tubulin and the C-tubule in assembly of *Paramecium* basal bodies [J]. BMC Cell Biology, 2001, 2(4): 1–7.
- [17] CHANG P, GIDDINGS Jr T H, WINEY M, et al. Epsilon-tubulin is required for centriole duplication and microtubule organization [J]. Nature Cell Biology, 2003, 5(1): 71–76.
- [18] SALISBURY J L, BARON A, SUREK B, et al. Striated flagellar roots - isolation and partial characterization of a calcium-modulated contractile organelle [J]. Journal of Cell Biology, 1984, 99(3): 962–970.
- [19] WRIGHT R L, SALISBURY J, JARVIK J W. A nucleus-basal body connector in *chlamydomonas-reinhardtii* that may function in basal body localization or segregation [J]. J Cell Biology, 1985, 101(5): 1903–1912.
- [20] BEISSON J, CLÉROT J-C, FLEURY-AUBUSSON A, et al. Basal body-associated nucleation center for the centrin-based cortical cytoskeletal network in *Paramecium* [J]. Protist, 2001, 152(4): 339–354.
- [21] KLOTZ C, DELOUBRESSE N G, RUIZ F, et al. Genetic evidence for a role of centrin-associated proteins in the organization and dynamics of the infraciliary lattice in *Paramecium* [J]. Cell Motility and the Cytoskeleton, 1997, 38(2): 172–186.
- [22] RUIZ F, GARREAU DE LOUBRESSE N, KLOTZ C, et al. Centrin deficiency in *Paramecium* affects the geometry of basal-body duplication [J]. Current Biology, 2005, 15(23): 2097–2106.
- [23] MCLAUGHLIN N B, BUHSE Jr H E. Localization by indirect immunofluorescence of tetra, actin, and centrin to the oral apparatus and buccal cavity of the macrotomal form of *Tetrahymena vorax* [J]. Journal of Eukaryotic Microbiology, 2004, 51(2): 253–257.
- [24] DIOGON M, HENOU C, RAVET V, et al. Evidence for regional differences in the dynamics of centrin cytoskeletal structures in the polymorphic hymenostome ciliate *Tetrahymena paravorax* [J]. European Journal of Protistology, 2001, 37(2): 223–231.