

用于浮游纤毛虫定量研究的蛋白银染色法^{*}

徐润林 白庆笙

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

摘要 报导了一种经过改进的用于浮游纤毛虫定量研究的蛋白银染色方法. 对不同定量方法所得结果的比较和统计学处理表明: 该方法与传统的沉淀法在所得数据上没有差异. 与文献报道的定量染色法相比, 不仅保留了蛋白银染色法的优点, 而且克服了前人方法中的缺陷, 缩短了实验周期.

关键词 浮游纤毛虫, 定量研究, 蛋白银染色

分类号 Q 959. 116

浮游纤毛虫的定性研究, 国内外有许多种方法的报道^[1~3]; 其中应用最多的是蛋白银染色法. 蛋白银染色可使得纤毛虫体表纤毛结构得以清晰地显示出来. 而在计数浮游纤毛虫的丰度时, 国外常采用的是沿用了多年的 Utermohl 氏沉淀法^[4]. 而国内常采用的沉淀法是该法的改进法, 并也沿用了几十年^[5]. 在沉淀法中, 纤毛虫经 Lugol's 液固定后, 虫体被染成深棕色, 其细胞结构特别是用于分类的体表纤毛器无法识别. 因而在观察时也就无法准确地鉴定纤毛虫的种类. 因此, 在研究纤毛虫生态学中, 往往是定性研究和定量计数分别进行的. 这样不仅耗时多而且得到的数据也有误差. 如何建立一个方法使其在定量计数的同时又可准确地识别出纤毛虫的种类, 一直是人们希望解决的问题. 198年 Montagnes & Lynn 建立了一种可用于纤毛虫定量研究的蛋白银染色方法^[6], 1994年 Skibbe 对这一方法进行了修改^[7]. 虽然这两个方法的建立为准确地同步进行纤毛虫定性和定量研究提供了可能, 但在操作上不仅要消耗较多的时间, 而且不易掌握. 作者在进行浮游纤毛虫生态学研究时, 在上述两种方法的基础上, 尝试对其进行了改动并取得了较好的结果.

1 材料和方法

1.1 水样的过滤装置

直径 2.5 cm 的磨口滤器 1 个; 150 mL 的抽滤瓶 1 个; 带有压力表的真空泵 1 台; 直径 2.5

^{*} 广东省青年科学基金 (930271) 资助项目

收稿日期: 1996-10-04 徐润林, 男, 36岁, 副教授.

cm的醋酸纤维滤膜 (孔径 $0.45 \sim 0.8 \mu\text{m}$) 1盒. 整个装置按图 1的方式安装.

1.2 水样的固定

固定液采用新鲜的浓缩 Bouin's液. 其配方为: 饱和苦味酸水溶液 (15 mL); 商品甲醛 (3%, 5 mL); 冰醋酸 (1 mL, 使用前加). 水样与固定液的比例为 10 : 1.

1.3 水样的过滤

将固定的水样倒入过滤装置内, 开动真空泵, 将压力控制在 100 mm Hg 之内以防止过大的负压使虫体破损. 过滤的水样量依水中的浮游生物数量和无机颗粒的多少来定. 一般来讲, 富营养化水体或含泥沙量较大的水样需要的水量较少 (5~10 mL); 贫营养水体或泥沙较少的水样需水量较多 (20~100 mL). 以虫体单层平铺在滤膜上为最佳. 待水样将被滤干而未干时加入数毫升蒸馏水; 目的是洗去虫体上的固定液; 待蒸馏水将被滤完时, 滴加数滴 1% 的蛋清甘油的水溶液; 蛋清甘油水溶液滤完时关掉真空泵. 蛋清甘油的配制参照文献 [1].

取出滤膜, 平放在干净的玻片上; 将玻片放置在通风无尘处 1~2 h. 事先需准备一个用于支撑滤膜进行染色的托架. 托架的结构如图 2. 要求所用材料和粘合用的胶水是耐二甲苯的.

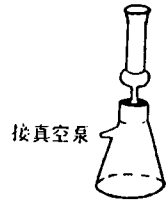


图1 抽滤装置图

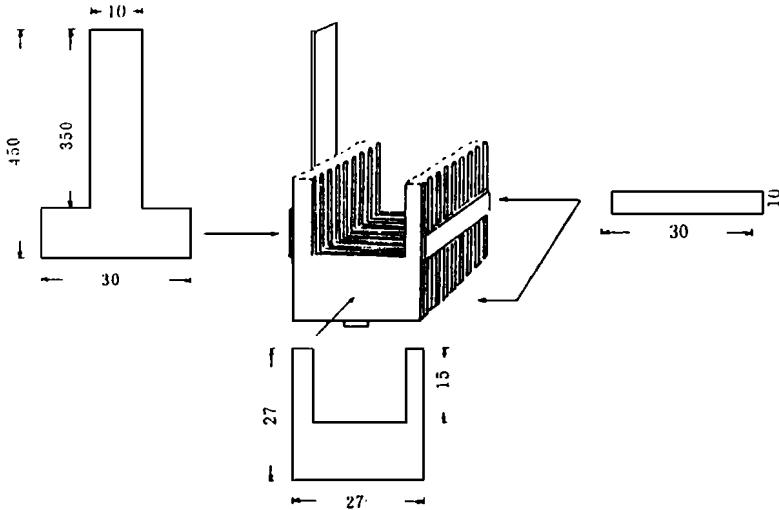


图2 托架结构图

将已干的滤膜背对背地插在滤膜架上. 将滤膜置入 70% 的异丙醇中. 染色步骤如下: ① 蒸馏水洗滤膜 2次, 每次 3 min; ② 滤膜转入 0.1% 的 KMnO_4 水溶液, 30 s; ③ 蒸馏水洗 1次; ④ 滤膜转入 2.5% 的草酸水溶液, 5 min; ⑤ 水洗滤膜 3次, 每次 3 min. ⑥ 0.4% 的蛋白银水溶液染色, 60°C 下染色 20 min; ⑦ 显影. 需在显微镜下逐片滤膜进行. 当较清晰识别出虫体外形. 细胞核和重要的纤毛器时显影终止; ⑧ 滤膜过一下水; ⑨ 定影 10 min; ⑩ 水洗 1次; ⑪ 异丙醇逐级 (50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100% 和 100%) 脱水. 每级 10 min; ⑫ 二甲苯透明, 中性树胶封片. 显影液和定影液按 Foissner 的报道配制^[1].

2 与传统沉淀法的统计学比较

取同体积的纤毛虫混合培养液, 内有代表不同大小、形状和生活方式的纤毛虫种类: 尾草履虫 (*Paramecium caudatum*)、珍珠映毛虫 (*Cinetochilum margartiaecum*)、银灰膜袋虫 (*Cyclidium glaucoma*)、颗粒右毛虫 (*Dexiotricha granulosa*)、有肋盾纤虫 (*Aspidica costata*)、暗星全列虫 (*Holosticha pullaster*) 及钟虫 (*Vorticella* sp.). 分别用 Utermohl 氏沉淀法和对本方法对其中各种类进行计数, 结果见表 1.

表 1 两种不同定量方法对培养的纤毛虫计数结果 /ind mL⁻¹

种 类	蛋白银法 $X \pm S D (n=5)$	沉 淀 法 $X \pm S D (n=5)$	显著性检验
尾草履虫 (<i>Paramecium counatum</i>)	5.958 \pm 0.389	5.928 \pm 0.349	$P > 0.05$
珍珠映毛虫 (<i>Cinetochilum margaritaecum</i>)	15.572 \pm 1.482	12.428 \pm 2.161	$P > 0.05$
颗粒右毛虫 (<i>Dexiotricha granulosa</i>)	8.714 \pm 0.780	8.844 \pm 0.623	$P > 0.05$
暗星全毛虫 (<i>Holosticha pullaster</i>)	1.360 \pm 0.112	1.014 \pm 0.191	$P > 0.05$
银灰膜袋虫 (<i>Cyclidium glaucoma</i>)	5.276 \pm 0.143	5.176 \pm 0.284	$P > 0.05$
钟 虫 (<i>Vorticella</i> sp.)	0.612 \pm 0.218	0.664 \pm 0.184	$P > 0.05$

取同体积的天然湖水分别用 Utermohl 氏沉淀法和本法进行计数. 由于 Utermohl 氏沉淀法不能对样品进行定性分析, 故该实验中的定性结果是通过其他定性方法获得的. 其结果见表 2.

表 2 两种不同定量方法对天然水样中的纤毛虫的计数结果

种 类	蛋白银法 $X \pm S D (n=5)$	沉 淀 法 $X \pm S D (n=5)$	显著性检验
淡水侠盗虫 <i>Strobilidium lacustris</i>	2.45 \pm 0.34	2.25 \pm 0.40	$P > 0.05$
尾急游虫 <i>Strombidium caudatum</i>	0.23 \pm 0.04	0.19 \pm 0.07	$P > 0.05$
绿急游虫 <i>Strombidium viridis</i>	1.76 \pm 0.23	1.69 \pm 0.35	$P > 0.05$
大弹跳虫 <i>Halteria grandinella</i>	2.78 \pm 0.27	2.53 \pm 0.35	$P > 0.05$
变色裸口虫 <i>Holophrya discolor</i>	6.00 \pm 0.67	6.23 \pm 0.52	$P > 0.05$
杯状铃壳虫 <i>Codonella cratera</i>	0.85 \pm 0.09	0.98 \pm 0.04	$P > 0.05$
单环栉毛虫 <i>Didinidium balbiani</i>	0.75 \pm 0.05	0.72 \pm 0.03	$P > 0.05$
团睥睨虫 <i>Askenasia volvox</i>	1.12 \pm 0.07	1.05 \pm 0.13	$P > 0.05$

武装尾毛虫 <i>Urotrich armata</i>	2.06 ± 0.61	—	—
柱前口虫 <i>Prorodon teres</i>	0.87 ± 0.07	—	—
片状漫游虫 <i>Litonotus fasciola</i>	1.24 ± 0.04	1.07 ± 0.09	$P > 0.05$
双核长颈虫 <i>Dileptus binucleatus</i>	2.64 ± 0.31	2.58 ± 0.46	$P > 0.05$
总 数	22.75 ± 1.13	19.29 ± 1.43	$P > 0.05$

从表 和表 可以看出, 本方法与传统的沉淀法所获的数据在统计学上没有差异.

3 讨 论

由于浮游纤毛虫的个体小, 观察时相对难度较大. 加上一直没有一个较理想的研究方法, 定性研究和定量研究常常是分别进行的, 导致研究中的误差增大. 自从 Montagnes & Lynn 建立了用于浮游纤毛虫定量研究的蛋白银染色方法后, 在基本技术上有了突破. 应用蛋白银染色法进行浮游纤毛虫的定性研究有着用沉淀法无法比拟的优点^[6,7]. 其中最大的优点就是可以较准确地对纤毛虫进行识别并可同时加以计数. 样品中如虫体数量较少, 常规的纤毛虫形态分类学方法不易进行研究时, 用蛋白银定量染色技术同样可以发现新的种类^[8]. 作者在应用本法对太湖的浮游纤毛虫进行定量研究时, 发现一直被认为是常见种之一的团脾睨虫 (*Askenasia volvox*), 实际上应是顶口脾睨虫 (*Askenasia acrostomia*) (见本文集另文). 除了可用于纤毛虫的丰度研究以外, 蛋白银定量染色法所得到的信息还可用于纤毛虫种群动力学的研究. 而且这种方法所得到的封片可作为永久资料长期保留. 这一点是沉淀法望尘莫及的.

虽然纤毛虫的定量技术已有了突破性进展, 但文献报道的两种方法中都有些不足之处, Montagnes & Lynn 的方法步骤复杂; 操作要求高; 耗时长 (15~ 30 h). Skibbe 的方法虽在操作步骤上有所改良, 但仍保留了用琼脂作为包埋虫体的包埋剂. 作者在操作中发现: 当滤膜经过脱水剂, 特别是高浓度的脱水剂, 包埋用的琼脂脱水后会引引起滤膜出现向一侧的卷曲现象. 再经过二甲苯的透明, 滤膜会变硬、变脆, 使其无法恢复平整, 进而封片时不易封好. 蛋清甘油作为粘片剂和媒染剂, 在各种蛋白银染色方法中被普遍应用^[1,2]. 与在玻片上相似, 在本方法中, 蛋清甘油也是被当作粘片剂和媒染剂的. 同时, 蛋清甘油经脱水后不会引起滤膜弯曲, 这样就有利于后面的操作. 与文献的方法相比, 本方法在实验所需时间上也大大缩短 (从文献的 15~ 30 h 缩短为 3~ 4 h), 因而提高了工作效率.

参 考 文 献

- 1 Foissner W. Basic light and scanning electron microscopic methods for taxonomic studies of ciliated protozoa. *Europ J Protistol.* 1991, 27: 313~ 330
- 2 庞延斌. 原生动物学实验技术. 上海: 华东师范大学出版社, 1991. 102
- 3 宋微波, 王梅. 应用于纤毛虫银线系染色的干银法新改良. *动物学杂志*, 1995, 1: 38~ 39
- 4 Utermohl H. Zur Vervollkommnung der quantitative Phytoplankton- Methodik. *Mitt Int Verrein Limnol.* 1958, 9: 1~ 38
- 5 章宗涉, 黄祥飞. 淡水浮游生物研究方法. 北京: 科学出版社, 1991. 358~ 362
- 6 Montagnes D J S, Lynn D H. A quantitative protargol stain (QPS) for ciliates: method description and test of its quantitative nature. *Mar Microb Food Webs*, 1987, 2: 83~ 93
- 7 Skibbe O. An improved quantitative protargol stain for ciliates and other planktonic protists. *Arch Hydrobiol.* 1994, 130: 339~ 347
- 8 Lynn D H, Montagnes D J S, Dale T, et al. A reassessment of the genus *Strombidinopsis* with descriptions of four new planktonic species and remarks on its taxonomy and phylogeny. *J Mar Biol Ass U K*, 1991, 71: 597~ 612

A Protargol Stain Method for the Quantitative Study of Planktonic Ciliates

Xu Runlin * *Bai Qingsheng*

Abstract A modified protargol staining method for quantitative study of planktonic ciliate ecology has been reported. A comparison of different methods showed that the data got by this method have no differences with the traditional settle method in statistics analysis. Compared with the similar methods reported by previous authors, not only the advantages of protargol stain have been kept, but also some weaknesses have been overcome. Meanwhile, the experimental time has been shortened in the new method.

Keywords planktonic ciliates, quantitative study, protargol staining method

* School of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou 510275