

· 研究简报 ·

冠突伪尾柱虫(*Pseudourostyla cristata*) 无小核体的人工获得与快速筛选

金立培

(中山大学生物学系)

摘要 当冠突伪尾柱虫进入二裂中期,小核排列于融合大核的左侧时,在二者之间作一纵向切割,手术简便,容易获得无小核体。利用某些特定的活体特征作标记,可以快速准确地识别和筛选出无小核体并建立其细胞系。

关键词 纤毛虫,冠突伪尾柱虫,去小核,无小核体

在真核生物中,纤毛虫的核器二型化,属非常独特的一支。向来认为,纤毛虫的大核专管营养,小核专司生殖。然而,这一传统的观点近年却不断地受到质疑^[1],越来越多的证据表明某些纤毛虫的小核同时具有一定的体细胞功能^[2~6]。研究小核的体细胞功能,从细胞内除去小核以获得无小核细胞系的方法很多^[1],但 these 方法各有其不足之处。我们在研究冠突伪尾柱虫(*Pseudourostyla cristata*)小核的体细胞功能过程中,总结出了一套获得和鉴别无小核细胞的较简易的方法,现介绍如下。

1 材料和方法

1.1 细胞和培养 冠突伪尾柱虫(*Pseudourostyla cristata*) 2, 4, 6, 810, 28和46号株系,其中2, 4, 6号于1986年夏采集于上海市郊,810号是1981年秋两个原种(S_8 和 S_{10})交配的后代,28号是1986年冬2号和810号的交配后代,46号是同期4号和6号的交配后代。细胞培养的方法与以前的报道相同^[6,7]。

1.2 无小核体的获得 冠突伪尾柱虫在分裂间期通常含约60枚大核和8(5~14)枚小核,二者混合散布于细胞质内。然而,当细胞进行二裂时,所有的大核就融合成1枚,而步入有丝分裂前期的小核,常常3~6枚有规律地呈直线排列于融合大核的左侧(图版-1)。从大核开始合并至融合大核分裂5~6次,小核一直保持着这种排列位置。为除去小核,先挑选具融合大核的细胞于装有新鲜培养液的小培养皿内,用自制不锈钢针在双目镜下于大小核之间作一纵切(图版-1),然后将右侧含有大核的细胞块一一单独培养或多块一起培养,让其再生、增殖成单个的细胞系或混合群体。当每一个细胞系多达10个细胞以上时,分别取出1~2个细胞作细胞学鉴定。对于混合群体,则直接解剖镜下活体进行无小核体的鉴定。

1.3 细胞学鉴定 为了确定切割再生体细胞内是否存在小核,用醋酸地衣红临时制片检查。为评估细胞纤毛系统结构变化的细节,按蛋白银染色技术制片^[8]。

2 结果

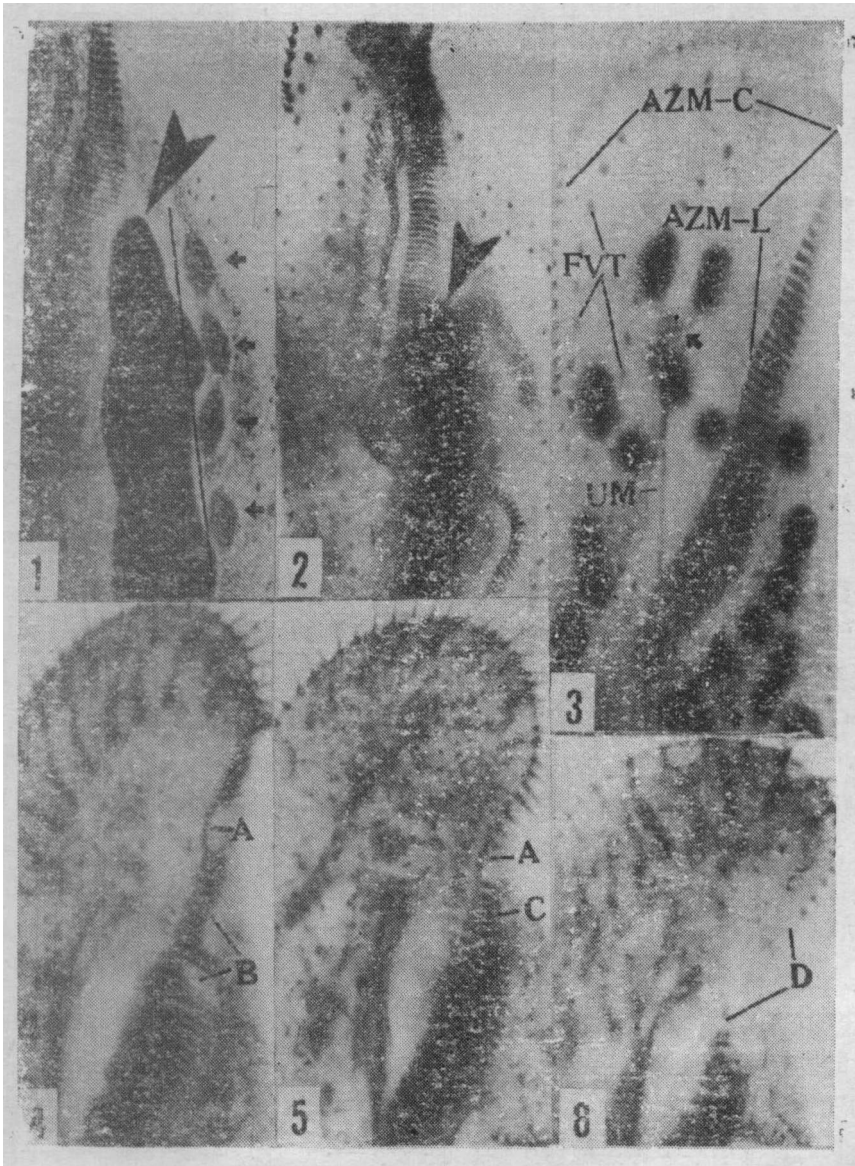
2.1 无小核细胞系的得率 从各实验细胞株系共切割细胞141个,除其中8个切割后细胞死亡外,建立切割后细胞系133个。经细胞学鉴定(图版-2),其中19个为无小核细胞系,获得率总计为14%。从各细胞株系所切割的细胞数,所得无小核系数及各自所占的百分比详见表1。其中无小核系得率最高的是来自28号,占33%;最低的来自810号,占4%。

2.2 小核对胞口结构的影响 在各无小核系建立后的第一个月中,分别取样进行蛋白银染色镜检。结果表明,所有的无小核系群体中,半数或半数以上的细胞形态异常,其中最明显的特征是口围带(AZM)的翻领部(AZM-lapel region)的小膜残缺不全(图版-3,4,5,6)。AZM-L小膜的缺损按其轻重程度又可以分为几大类型:D型是最严重的一类,前端数片至大部分AZM-L小膜完全消失(图版-6);A型次之,数片至数十片AZM-L小膜的左侧大部分消失,仅右侧留下一列毛基板仍将领部(AZM-Collar)和AZM-L联系在一起(图版-4,5);B和C型缺损程度较轻,每片小膜大约失去其长度的1/2到1/4(图版-4,5),且受影响的小膜片数较少,B型约3~10片,C型约1~8片。各无小核系群体中A、B、C、D各型所占的比率以及AZM-L各系中的畸形率列于表2。其中6am1(即来自6号的第一个无小核系,其它编号如此类推)的畸形率高达98%。作为对照,我们检测了各无小核细胞株系共755个细胞和切割后有小核的10个细胞系的共1114个细胞。除28m2(即源于28号切割后有小核的第二个细胞系)140个细胞中有一例D型虫外,均未发现AZM-L畸形。

2.3 无小核体的活体特征 从表2可知,各无小核系的细胞AZM畸形率均在50%以上,而A和D型虫的AZM小膜缺损是最严重的(见图版-4,5,6)。通过活体观察,我们发现无小核系群体中部分细胞的AZM-L中前段有一明显透明区,在此区同时伴随着细胞向内凹陷的现象,与制片观察AZM-L小膜缺损的位置和形态相符,因此推测是A和D型虫。为此我们特地从无小核系群体中挑选出33只AZM-L中前段具透明区且内陷的细胞行蛋白银染色,结果表明其中18只为A型虫,15只为D型虫,从而证实了上述推测。另外,我们还切割了2号的27只细胞并混合培养在一个皿内让它们再生和分裂。当群体增大到约200只细胞时在双目镜下观察,按上述特征共选出6个细胞并分别单独培养成6个细胞系。制片检查结果表明,这6个细胞系均是无小核系。

3 讨论

从纤毛虫细胞内除去小核,X射线、微束激光以及化学方法等是直接于细胞质内将小核击毁或使其解体^[1]。然而这些方法很难排除某些小核的基因片段仍保存在细胞质内甚至整合到大核里去,因此使实验分析复杂化。Takahashi所使用的是随机多次切割法^[4],但手续繁复、工作量大,给细胞造成的损伤较严重。本实验选择融合大核时期



图版 冠突伪尾柱虫无小核体的人工获得与快速筛选

Plate Obtainment and identification of the amicomucleates of *P. cristata*

图1~6 腹面观。其中1和3为有小核体, 2、4~6为无小核体。×1,200 1. 示细胞分裂中期的融合大核(大箭号)及其左侧的4枚小核(小箭头), 线段示切割位置。2. 示无小核体的分裂中期, 箭号指融合大核, 3. 示有小核体分裂间期的部分皮膜系统: 口围带领部(AZM-C)和翻领部(AZM-L), 额腹斜棘毛(FVT)和波动膜(UM)。箭号指2枚小核, 其余较大的黑色团块为大核。4~6. 示无小核体AZM-L缺损的数种类型(A, B, C, D)

进行切割可一次性地得到无小核体, 较为简单, 方便。至于为何无小核体的得率偏低的原因大概有二。一是小核在融合大核左侧的分布虽然有一定的规律, 但由于二者非常贴近, 切割时难免个别小核进入含融合大核的细胞块内。二是进入有丝分裂前期的小核才

排列于融合大核的左侧,有时某些细胞内仍有少数小核不进入前期因此随机分布于细胞质的其它区域^[6]。如果这种小核位于细胞右侧,则切割后仍得不到无小核体。

通过活体观察和染色标本的对照分析,我们发现无小核体AZM—L部位上的透明区及其凹陷是与AZM—L小膜的严重缺损密切相关的。由于这些小膜大部或全部消失,光线容易透过,因此看到是透明的。又由于小膜皮下的毛基板及其微管束这些构成细胞骨架的重要组分亦同时消失了,该处细胞质失去了支撑,故向内侧凹陷。根据这些特征,可以不经染色制片,直接快速而又准确地对该虫无小核体进行活体鉴定。同样,如果没有特殊的研究需要,可以将该虫的切割体混合培养,再从群体中直接选择无小核体,将能够节约大量的时间。

冠突伪尾柱虫在失去小核后,其生活力下降,分裂能力降低,虫体变小,除严重地导至AZM畸形外,亦使额、腹、斜棘毛(FVT)数明显减少。有关其小核的体细胞功能及其统计学分析已另作报道^[6]。

表1 通过切割从不同细胞株所得的无小核系数及其得率

Tab.1 The frequency of amiconucleate cell lines obtained by amputation

实验细胞株系	切割建立的细胞系数	无小核系数	无小核系数得率(%)
2	30	7	23
4	47	5	11
6	5	1	20
28	6	2	33
46	19	3	16
110	26	1	4
总计	133	19	14

表2 各无小核细胞系AZM缺损的百分比

Tab.2 The frequency of defective AZM in amiconucleate cell lines in the 1st month

细胞系	AZM缺损类型(%)				缺损率(%)	样本数(细胞)
	D	A	B	C		
2am1	14	12	11	14	51	111
2am2	27	10	5	8	50	231
4am1	18	23	9	12	62	153
6am1	92	5	0	1	98	83
28am1	22	20	10	7	59	129

参 考 文 献

- 1 Ng S F. Progress in Protistology, 1986(1): 215~286, Biopress Ltd
- 2 Chau M F, Ng S F. Eur J Protistol, 1988, 24: 40~51

- 3 Ng S F, Tam L W. Eur J Protistol, 1987,23: 141~151
- 4 Takahashi T. J Protozool, 1988,35(1):142~150
- 5 Takahashi T, Suhama M. Eur J Protistol, 1991,26: 308~318
- 6 Jin L P, Ng S F. J Protozool 1989, 36(4): 315~326
- 7 张作人等. 动物学研究, 1985, 6(2): 159~167
- 8 庞延斌等. 华东师大学报, 1983(4): 87~93

Obtainment and Identification of the Amicronucleates of *Pseudourostyla cristata*

Jin Lipai*

Abstract During binary fission of *Pseudourostyla cristata*, all of about 60 macronuclei are amalgamated into a single body, usually 4 (3-6) micronuclei entering mitotic prophase become aligned on the left side of the amalgamated macronucleus. A freehand longitudinal cut made in the region between the macro- and micronuclei is a simple but effective method to obtain amicronucleates. According to some special morphogenetic features, such as a deep indentation on the left side of the anterior part of a cell, bending of the anterior end towards the left and a transparent spot in the position, the living amicronucleates of *p. cristata* can be identified and selected from the mixture of amicro- and micronucleate regenerants by microsurgery to culture amicronucleate cell lines.

Keywords ciliate, pseudourostyla, emicronucleate, amicronucleate

* Department of Biology, Zhongshan University