

# 原生动物伪红色双轴虫细胞纤毛器微管胞器的直接荧光标记

运迷霞 张 萌 李其利 陈季武 顾福康\*

(华东师范大学生命科学学院, 上海 200062)

**摘要** 应用荧光紫杉醇直接荧光标记法显示, 原生动物的纤毛虫伪红色双轴虫(*Diaxonella pseudorubra*)细胞纤毛器微管中, 口围带基部含小膜托架及与托架相联系的肋壁微管; 额腹横棘毛基部含前纵微管束、后纵微管束、横微管束和周围微管束, 其微管在不同棘毛基部的定向和发达程度不一; 缘棘毛基部含前纵微管束、后纵微管束。细胞形态发生过程中, 前仔虫口纤毛器微管独立发生于老口围带内侧, 在细胞形态发生末期新纤毛器微管形成时, 尚有部分老额棘毛、横棘毛和缘棘毛残存, 此后老结构逐渐被吸收。结果表明, 伪红色双轴虫的纤毛器基部微管的分化很可能具有种属级的特异性, 新纤毛器微管分化过程中老结构可能具有定位和物质贡献作用。

**关键词** 伪红色双轴虫; 皮层纤毛器; 微管胞器; 荧光紫杉醇标记

原生动物的最简单真核生物, 一个原生动物的细胞就是一个真核细胞。但原生动物的细胞(尤其是纤毛虫)作为一个完整的生物体经历了长时期进化过程, 其细胞的复杂程度是多细胞生物中的一个细胞远不能及的<sup>[1]</sup>。纤毛虫细胞具有复杂的皮层微管结构。目前, 对体纤毛排布分散的较低等草履虫(*Paramecium*)、四膜虫(*Tetrahymena*)基体微管装配中老结构的作用、微管蛋白的变化, 及与轴丝微管装配相联系的微管组织中心等方面有深入的了解<sup>[2,3]</sup>, 但在微管水平, 对纤毛基体紧密聚集排列的纤毛器基体微管的装配和基体微管装配在细胞内的启动及发生过程尚不清楚。为此, 作者所在实验室以腹毛目纤毛虫的纤毛器微管胞器为对象, 采用直接荧光标记和免疫荧光标记的方法, 在对贻贝棘尾虫(*Stylonychia mytilus*)、魏氏拟尾柱虫(*Paraurostyla weissei*)等<sup>[4,5]</sup>进行观察的基础上, 对含有色素颗粒的伪红色双轴虫(*Diaxonella pseudorubra*)进行了研究。所得结果对深入了解其细胞复杂的微管结构, 进一步揭示真核细胞结构的复杂性及细胞模式形成与调控具有重要的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

伪红色双轴虫(*Diaxonella pseudorubra*)于2008

年10月采自南京市郊区。其形态学特征与Berger<sup>[6]</sup>报道的相一致, 为此定名为该种。细胞长约160  $\mu\text{m}$ 、宽约40  $\mu\text{m}$ , 呈长椭圆形, 整个皮层细胞质内遍布红色色素颗粒。分离后, 应用麦粒液发酵富集的细菌作为饵料, 建立纯系培养。将纤毛虫培养至较高密度后, 取生长状态良好的细胞作为实验材料。

### 1.2 方法

参照荧光紫杉醇(fluorescence taxoid, FLUTAX)直接荧光标记方法<sup>[7-9]</sup>, 并调整为: ①将高浓度的细胞滴入浓度为0.5%的皂苷中渗透10 min, 用PHEM清洗1次; ②4%多聚甲醛固定5 min, PHEM清洗1次; ③1  $\mu\text{mol/L}$  FLUTAX-2(Sigma)染色5 min, 0.01 mol/L的PBS漂洗3次, 封片。Olympus BX荧光显微镜观察, Cool SNAP-Pro数码相机照相。

## 2 结果

### 2.1 细胞皮层纤毛器微管

伪红色双轴虫细胞皮层含口纤毛器和体纤毛器。口围带位于细胞的前部, 由近40片小膜组成, 波动膜含1片口侧膜和1片口内膜。体纤毛中额棘毛约

收稿日期: 2010-10-21 接受日期: 2010-12-13

国家自然科学基金(No.31071875)资助项目

\*通讯作者。Tel: 021-62233748, E-mail: fkgu@bio.ecnu.edu.cn

14根,其中5~8根口棘毛在波动膜右侧排成一列;中腹棘毛2列,两者成“zig-zag”形排列,每列约含21根棘毛,其后有2根分离的腹棘毛;横棘毛8根,位于腹棘毛紧后端;右缘棘毛1列约40根,左缘棘毛3~4列,各列的棘毛数从左到右依次增多,于16~30根之间(图1A)。

## 2.2 皮层纤毛器基部附属微管

**2.2.1 口纤毛器基部附属微管** 口围带基部由小膜托架单元相互平行排列成梯状,其小膜托架均向内发出1束小膜后肋壁微管,在口围带皮层内形成连续纵行排列的微管层(图1B-a);波动膜基部托架由较细小的微管向口肋壁皮层深处延伸,其中口内膜托架向口围带皮层发出短微管束,其微管与口围带皮层的小膜后肋壁微管交互在一起(图1B-b)。

**2.2.2 体纤毛器基部附属微管** 体纤毛器基部附属微管包括前纵微管束、后纵微管束、横微管束和周围微管束。不同皮层区棘毛基部微管的种类及其定位有差异。额棘毛基部前纵微管束由棘毛基部向左前方皮层伸展(图1B-c),后纵微管束由棘毛基部向后方皮层伸展(图1B-d),位于前部的额棘毛基部横微管束不明显。右列中腹棘毛基部的前纵微管束由棘毛基部向右前方发出(图1D-a),后纵微管束由棘毛基部向右后方发出(图1D-b),横微管束由棘毛基部向左后方发出(图1D-c);左列中腹棘毛前纵微管束由棘毛基部向左前方发出(图1D-d),后纵微管束由棘毛基部向左后方发出(图1D-e),横微管束由棘毛基部向左方发出(图1D-f);周围微管束由棘毛基部向周围发出(图1D-g)。另外有一对分离的中腹棘毛位于横棘毛右前方,其基部亦由前纵微管束和后纵微管束组成,后纵微管束不发达。横棘毛基部前纵微管束由棘毛基部向左前方发出,横棘毛基部的8束前纵微管束于横棘毛基部前端聚集形成三角形区,后纵微管束不发达,未见有横微管束(图1C)。缘棘毛基部的前纵微管束由棘毛基部向左前方伸展,后纵微管束由棘毛基部向后方伸展。右缘棘毛基部前纵微管束比左缘棘毛的前纵微管束发达,其基部每一基体发出的后纵微管束和其前一个基体发出的后纵微管束几乎连接在一起形成条带状(图1E和图1F)。

## 2.3 纤毛器微管胞器的形态发生

**2.3.1 口纤毛器微管胞器** 细胞形态发生初期细胞赤道线正下方,左侧中腹棘毛列左侧,出现若干簇

紧密排列成条索状的毛基体群即后仔虫的口纤毛器原基(图1G-a),之后该原基经过发育、分化、弯曲及长纤毛过程,形成后仔虫的口纤毛器。后仔虫口纤毛器原基开始形成不久,在口腔底部波动膜区出现早期前仔虫口纤毛器原基的毛基体群(图1G-b)。随后,毛基体进一步增殖,并延伸形成前仔虫口纤毛器(图1H-a),同时伴随着老结构逐渐退化、瓦解。

**2.3.2 体纤毛器微管胞器** 后仔虫口纤毛器原基发育成细长的条带后不久,在其内侧形成多个条带状的原基区域,随着毛基体的进一步增殖并向细胞后方延伸,分化成多个倾斜的条带(图1I-a),这些条带最后分别发育成为后仔虫的额腹横棘毛。前仔虫的额腹横棘毛于老口围带右侧以同样的方式发生(图1I-b)。额腹横棘毛原基分化时,处于非原基区的老额棘毛依然存在一段时间(图1J-a)。与此同时,在细胞形态发生开始不久,老的右缘棘毛列靠近细胞前端和虫体中部的一些棘毛瓦解并在瓦解区形成两个相互分离的原基,即为前、后仔虫右缘棘毛原基(图1H-b),之后该原基不断向其前后延伸,并经历长纤毛过程,最终定位发育成为前、后仔虫的右缘棘毛。左缘棘毛原基作为单独的结构出现在前、后仔虫最右侧的一列左缘棘毛中,位置与右缘棘毛原基相对应(图1I-c和图1I-d)。并由最初无序的毛基体逐步分化成3列条带状原基。随后这些原基分化成4列左缘棘毛,并逐渐向背部延伸从而取代老结构(图1J)。

## 3 讨论

本文应用荧光紫杉醇直接荧光标记方法显示,伪红色双轴虫细胞皮层纤毛器含有口纤毛器和体纤毛器,纤毛器基部微管按口围带、波动膜、额腹横棘毛、左右缘棘毛等纤毛图式分布和定位,其中口纤毛器基部含小膜托架、小膜附属微管和波动膜骨架;体纤毛器基部含前纵微管束、后纵微管束、横微管束及周围微管束;它们各自在纤毛器基部向皮层内不同方向发射或延伸,在纤毛虫细胞皮层内组织成为相互联系的微管网。与冠突伪尾柱虫(*Pseudourostyla cristata*)、新伪尾柱虫(*Pseudourostyla nova*)等亲缘关系相近的纤毛虫比较,尽管三缘双轴虫细胞皮层含有其他腹毛类纤毛虫中普遍存在的微管结构成分,但其纤毛器微管的组成或发达程度、定位或定向等具有不同的特征,所得结果为伪红色

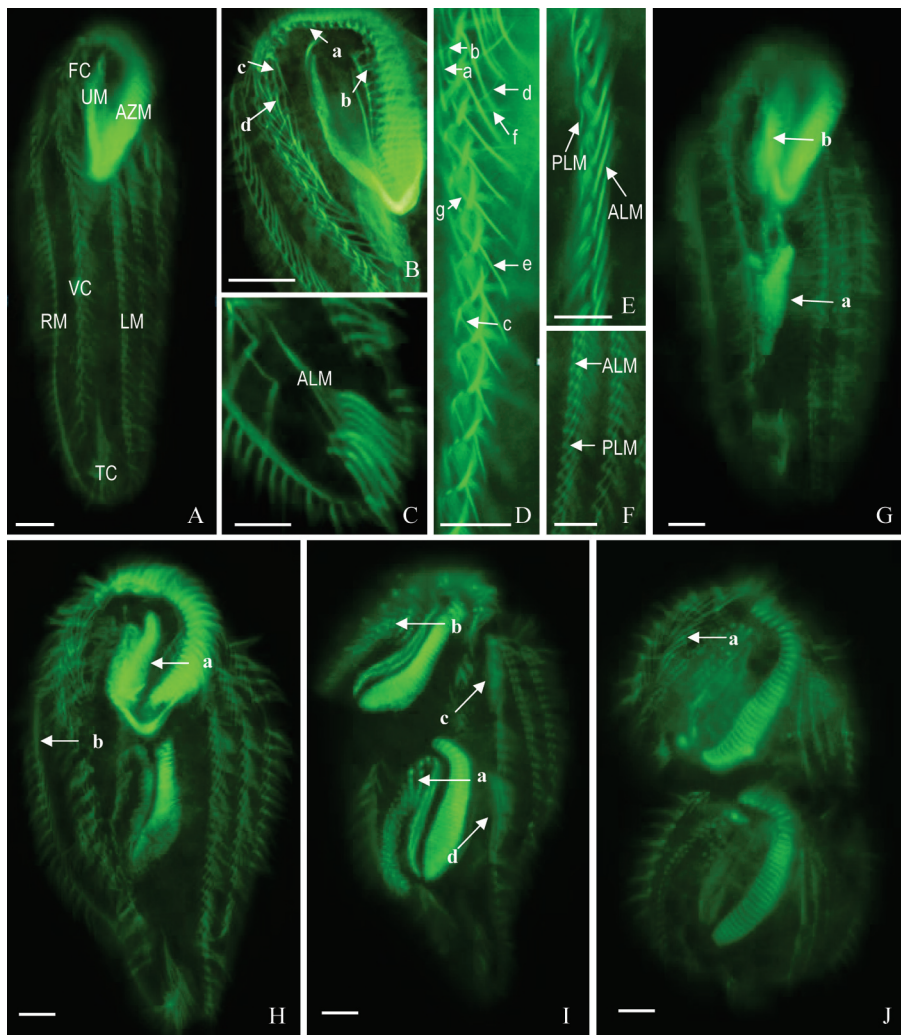


图1 伪红色双轴虫纤毛器微管、纤毛器附属微管及纤毛器微管胞器的发生(标尺=10 μm)

A: 伪红色双轴虫微管胞器(AZM: 口围带; UM: 波动膜; FVC: 额腹棘毛; TC: 横棘毛; LMC: 左缘棘毛; RMC: 右缘棘毛); B: 口纤毛器和额棘毛基部微管(a: 小膜后肋壁微管; b: 波动膜托架基部微管; c: 额棘毛基部前纵微管束; d: 额棘毛基部后纵微管束); C: 横棘毛基部微管; D: 腹棘毛基部微管(a: 右列腹棘毛基部前纵微管束; b: 右列腹棘毛基部后纵微管束; c: 右列腹棘毛基部横微管束; d: 左列腹棘毛基部前纵微管束; e: 左列腹棘毛基部后纵微管束; f: 左列腹棘毛基部横微管束; g: 左列腹棘毛基部周围微管束); E: 右缘棘毛基部微管(ALM: 前纵微管束; PLM: 后纵微管束); F: 左缘棘毛基部微管; G-J: 纤毛器微管胞器的发生(G-a: 后仔虫口纤毛器基; G-b: 前仔虫口纤毛器原基; H-a: 前仔虫口纤毛器; H-b: 前、后仔虫右缘棘毛原基; I-a: 后仔虫毛基体分化的条带; I-b: 前仔虫毛基体分化的条带; I-c: 前仔虫左缘棘毛原基; I-d: 后仔虫左缘棘毛原基; J-a: 老额棘毛)。

**Fig.1 Ciliature microtubules, ciliature base-associated microtubules and morphogenesis of *Diaxonella pseudorubra* (bar=10 μm)**

A: ciliature microtubular organelles of *Diaxonella pseudorubra*. (AZM: adoral zone of membranelles; UM: undulating membranes; FVC: frontal and ventral cirri; TC: transverse cirri; LMC: left marginal cirri; RMC: right marginal cirri); B: oral ciliature base microtubules and FC base microtubules (a: oral rib-wall microtubules; b: UM base microtubules; c: anterior longitudinal microtubules of FC base microtubules; d: posterior longitudinal microtubules of FC base microtubules); C: TC base microtubules; D: VC base microtubules (a: anterior longitudinal microtubules of the right VC base microtubules; b: posterior longitudinal microtubules of the right VC base microtubules; c: transverse microtubules of the right VC base microtubules; d: anterior longitudinal microtubules of the left VC base microtubules; e: posterior longitudinal microtubules of the left VC base microtubules; f: transverse microtubules of the left VC base microtubules; g: radiating microtubules of the left VC base microtubules); E: right marginal cirri (RMC) base microtubules (ALM: anterior longitudinal microtubules; PLM: posterior longitudinal microtubules); F: left marginal cirri (LMC) base microtubules; G-J: morphogenesis of ciliature microtubular organelles (G-a: early stage of oral ciliatures primordium of opisthe; G-b: early stage of oral ciliatures primordium of proter; H-a: oral ciliature organelles of proter; H-b: early stage of the formation of MC primordial; I-a: FVT primordia of opisthe; I-b: FVT primordia of proter; I-c: early stage of the formation of LMC primordial of proter; I-d: early stage of the formation of LMC primordial of opisthe; J-a: the old FC).

双轴虫右列中腹棘毛基部的纵微管束由棘毛基部向右前方发出, 后纵微管束由棘毛基部向右后方发出, 横微管束由棘毛基部向左后方发出; 左列中腹棘毛前纵微管束由棘毛基部向左前方发出, 后纵微管束由棘毛基部向左后方发出, 横微管束由棘毛基部向左方发出, 这与其他两种纤毛虫中腹棘毛基部附属微管定向不同; 另外, 伪红色双轴虫两列腹棘毛基部附属微管在纤毛虫细胞皮层的定位定向与其他种纤毛虫不同; 伪红色双轴虫还有一对分离的中腹棘毛位于横棘毛右前方, 这一特点也是很多纤毛虫所没有的。这些特点说明伪红色双轴虫细胞的纤毛器的定位和纤毛器基部微管的定向很可能具有种属级的特异性。这些研究结果为深入认识纤毛虫细胞及真核细胞中微管建构的多样性、细胞结构的复杂性提供基础资料。

伪红色双轴虫前仔虫口纤毛器原基独立发生于老口围带内侧区域, 口纤毛器原基形成以后, 经过不断增殖完成小膜组排和成熟过程后形成前仔虫的口纤毛器。在新结构形成过程中老结构逐渐退化、瓦解。该发生模式不同于亲缘关系较近的冠突伪尾柱虫和新伪尾柱虫<sup>[10,11]</sup>。其中, 冠突伪尾柱虫和新伪尾柱虫中, 前仔虫口纤毛器是由部分老结构瓦解产生新小膜和其他保留的老结构共同组成的; 伪红色双轴虫细胞发生时, 各类原基形成过程中, 原基区部分老纤毛器瓦解, 产生的分散毛基体参与了原基的形成, 同时非原基区的老结构并不随着新结构的出现而瓦解, 而是在新纤毛器形成一段时间后才逐渐瓦解消失, 被新细胞吸收为胞质成分, 如最右侧的几根老额棘毛直到分裂后期才逐渐被吸收, 在虫体后部的部分老腹棘毛和横棘毛在相当长的时间内依然存在。据结果, 认为伪红色双轴虫在新纤毛器微管的分化过程中, 老纤毛器对新结构的形成也起到了定位和物质贡献作用。

伪红色双轴虫同其他腹毛目纤毛虫一样, 与膜口目纤毛虫(如草履虫和四膜虫)相比其纤毛器微管胞器有了较明显的进化。首先, 前者细胞体有了“背、腹”之分, 在腹面不同位置各由许多纤毛聚集在一起形成具有功能上“分工”的纤毛器, 如口围带、波动

膜、额-腹-横棘毛等, 而背面的纤毛则以单根为单元分散排布, 类似于膜口目纤毛虫的体纤毛; 但膜口目纤毛虫的“背、腹面”仅依细胞体中口的位置来区分, 除口纤毛器的纤毛发生聚集外, 全部体纤毛并不聚集, 而以单根纤毛为单元分布在细胞背、腹面, 因此该类纤毛虫仅有口纤毛的分化<sup>[1]</sup>。其次, 作为腹毛目纤毛虫的三缘双轴虫其纤毛器基部附属微管较为发达, 且不同种类纤毛虫的纤毛器基部附属微管的定位也有较大区别; 但草履虫的纤毛基部附属微管不发达, 并具有基本一致的定位特征<sup>[2]</sup>。因此, 本文的结果也进一步证明, 腹毛目纤毛虫是纤毛虫中最为进化的一类群。

### 参考文献(References)

- 1 顾福康. 原生动物学概论, 第一版. 北京: 高等教育出版社, 1991, 2-97.
- 2 Iftode F, Fleury A. Structural inheritance in *Paramecium*: ultrastructural evidence for basal body and associated rootlets polarity transmission through binary fission. *J Biol Cell* 2003; 95: 39-51.
- 3 Shang YH, Li B, Gorovsky M. *Tetrahymena thermophila* contains a conventional  $\gamma$ -tubulin that is differentially required for the maintenance of different microtubule-organizing centers. *J Cell Biol* 2002; 158(7): 1195-206.
- 4 曾红, 倪兵, 顾福康. 原生动物贻贝棘尾虫微管胞器的荧光标记与显示. *动物学杂志* 2006; 41(4): 71-6.
- 5 娄慧玲, 高巍, 顾福康. 魏氏拟尾柱虫腹皮层纤毛器微管胞器的形态及形态发生. *动物学报* 2007; 53(4): 742-9.
- 6 Berger H. Monograph of the Urostyleoidea (*Ciliophora Hypotricha*). *Monogr Biol* 2006; 85: 1-1303
- 7 何兰, 曾红, 沈洁, 顾福康. FLUTAX法显示纤毛虫微管胞器的改良. *动物学杂志* 2006; 41(3): 56-61.
- 8 Arregui L, Muñoz-fontela C, Serano S, Barasoain I, Guinea A. Direct visualization of the microtubular cytoskeleton of ciliate protozoa with a fluorescent taxoid. *J Euk Microbiol* 2002; 49: 312-8.
- 9 Arregui L, Muñoz-Fontela C, Guinea A, Serrano S. FLUTAX facilitates visualization of the ciliature of oxytrichid hypotrichs. *Europ J Protistol* 2003; 39: 169-72.
- 10 周素娟, 尹飞, 生欣, 顾福康. 冠突伪尾柱虫腹皮层纤毛器微管胞器的形态及其形态发生. *动物学报* 2008; 54(2): 299-308.
- 11 周瑶, 余齐耀, 俞丽丽, 顾福康. 新伪尾柱虫腹皮层纤毛器微管胞器的形态和其形态发生. *动物学杂志* 2009; 44(6): 74-80.

## FLUTAX Labeling of the Ciliature Microtubular Organelles in *Diaxonella pseudorubra*

Mi-Xia Yun, Meng Zhang, Qi-Li Li, Ji-Wu Chen, Fu-Kang Gu\*  
(School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

**Abstract** The microtubular organelles of a hypotrichous ciliate, *Diaxonella pseudorubra*, were visualized by FLUTAX (fluorescence taxoid) labeling. The results showed that these organelles consisted of adoral zone of membranelles (AZM), frontal-ventral-transverse cirri (FVTC) and the base associated microtubules of these ciliatures. The microtubular cytoskeleton of AZM comprises membranelle brackets and the associated microtubules. There are four types of microtubules at the base of FVTC, anterior longitudinal microtubules (ALM), posterior longitudinal microtubules (PLM), transverse microtubules (TM) and radiating microtubules (RM). These different types of microtubules differ from each other in developmental degree. The base associated microtubules of marginal cirri (MC) contain ALM and PLM. All of the old AZM were renewed during the process of morphogenesis. AZM of the proter was formed at the site where the inner of the old AZM. At the end of the differentiation of the cell, some part of old FC, TC and MC remain unchanged for a long time. Meanwhile, our results also indicated that the microtubular organization of *Diaxonella pseudorubra* was quite different from other ciliates. Moreover, during the period of defferetiation and maturation of the new structures, the collapse of old cirri may contribute to the new structure's orienting and constituting while the function of old cirri is losing gradually.

**Key words** *Diaxonella pseudorubra*; Protozoa; ciliature microtubular organelles; FLUTAX labeling

---

Received: October 21, 2010 Accepted: December 13, 2010

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.31071875)

\*Corresponding author. Tel: 86-21-62233748, E-mail: fkgu@bio.ecnu.edu.cn