

技术与方法

一种用于观察纤毛虫表膜下结构的扫描电镜 样品制备新方法

高晶¹ 周围² 乔良¹ 陈瑛¹ 邱子健^{1*}¹哈尔滨师范大学生物科学与技术学院, 哈尔滨 150025; ²葫芦岛市第一高级中学, 葫芦岛 125001)

摘要 该实验摸索出通过扫描电镜观察纤毛虫表膜下三维结构的新方法: 用适当浓度的KMnO₄作为固定剂, 固定虫体细胞表膜, 调整固定液的渗透压使细胞在低渗溶液中胀破、细胞质溶出, 表膜剥落下来、内外翻转, 经脱水、冷冻干燥、喷金后, 在扫描电镜下对爽口虫(*Climacostomum* sp.)、尾草履虫(*Paramecium caudatum*)及拟尾柱虫(*Paraurostyla weissei*)的表膜下结构进行了观察。结果表明: 利用此方法能够观察到表膜下层次分明而又清晰的三维立体构象。此方法可为纤毛虫表膜及其它细胞质膜的研究提供可借鉴的样品制备新方法。

关键词 爽口虫; 尾草履虫; 拟尾柱虫; KMnO₄; 扫描电镜样品制备

原生动物的最简单的真核生物, 一个原生动物体就是一个真核细胞。但原生动物细胞(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^[1]。目前对它们的研究, 大部分是利用蛋白银染色技术和扫描电子显微镜技术对其外部形态及发生学方面的研究, 或是利用透射电镜技术对其内部亚显微结构进行研究^[2-3]。但对表膜下三维立体构象的直接观察目前尚未做到。本文主要探索实现此目的的技术方法。经摸索应用KMnO₄作为固定剂观察到了爽口虫(*Climacostomum* sp.)、尾草履虫(*Paramecium caudatum*)及拟尾柱虫(*Paraurostyla weissei*)表膜下三维结构的图像。

1 材料与方法

1.1 实验用纤毛虫

实验用爽口虫、尾草履虫及拟尾柱虫是采自哈尔滨市近郊的小湖内(45.86°N, 126.68°E), 带回实验室后镜检分离单个虫体。最初的培养液为原池水, 爽口虫和拟尾柱虫每天喂以新鲜的唇鞭虫(*Chilomonas* sp.)并逐渐用矿泉水替换原池水, 尾草履虫的培养是用细菌密度适中的稻草水替换原池水, 数日后待细胞分裂至较多数量时用于实验。

1.2 实验试剂

4%高锰酸钾(KMnO₄ 4 g; 重蒸水100 mL)、丙酮、叔丁醇。

1.3 扫描电子显微镜技术

将收集好的纤毛虫用矿泉水反复清洗, 用自制的微细玻璃吸管将虫体吸于载玻片的一角, 使水留得尽量少。

1.3.1 固定液的配制与固定 爽口虫: 4%的高锰酸钾和重蒸水的混合比例为1:5; 尾草履虫: 4%的高锰酸钾和重蒸水的混合比例为1:10; 拟尾柱虫: 4%的高锰酸钾和重蒸水的混合比例为1:6; 用配制好的固定液将载玻片一角的虫体迅速冲入凹坑, 避光固定15 min。

1.3.2 水洗 重蒸水水洗5~6次。水洗时观察虫体的变化, 待虫体刚好胀破, 缓慢用水流冲洗几次, 使未固定的细胞质流出, 为保证细胞膜的完整性应注意水洗力度。

1.3.3 脱水 用梯度丙酮(30%、50%、70%、75%、80%、90%、95%、100%)脱水, 30%~95%每级

收稿日期: 2011-05-05 接受日期: 2011-06-03

国家自然科学基金项目(No.30970311)、黑龙江省高等学校科技创新团队建设计划项目和2009年黑龙江省研究生创新基金资助项目

*通讯作者。Tel: 0451-88068286, E-mail: qjuzijian48@163.com

5 min, 100%重复脱水3次, 每次10 min, 之后转入等量丙酮和叔丁醇的混合液中并放置15 min, 然后再转入纯叔丁醇中放置15 min。

1.3.4 冷冻 放入 -60°C 冰箱冷冻30 min, 为防止样品丢失, 用小滤纸片将样品篮的口盖住。

1.3.5 干燥 用ES-2030型的冷冻干燥机进行冷冻干燥, 干燥时间为5 h, 温度为 -18°C 。

1.3.6 粘台 用睫毛笔将虫体表膜一个一个地粘到样品台上。

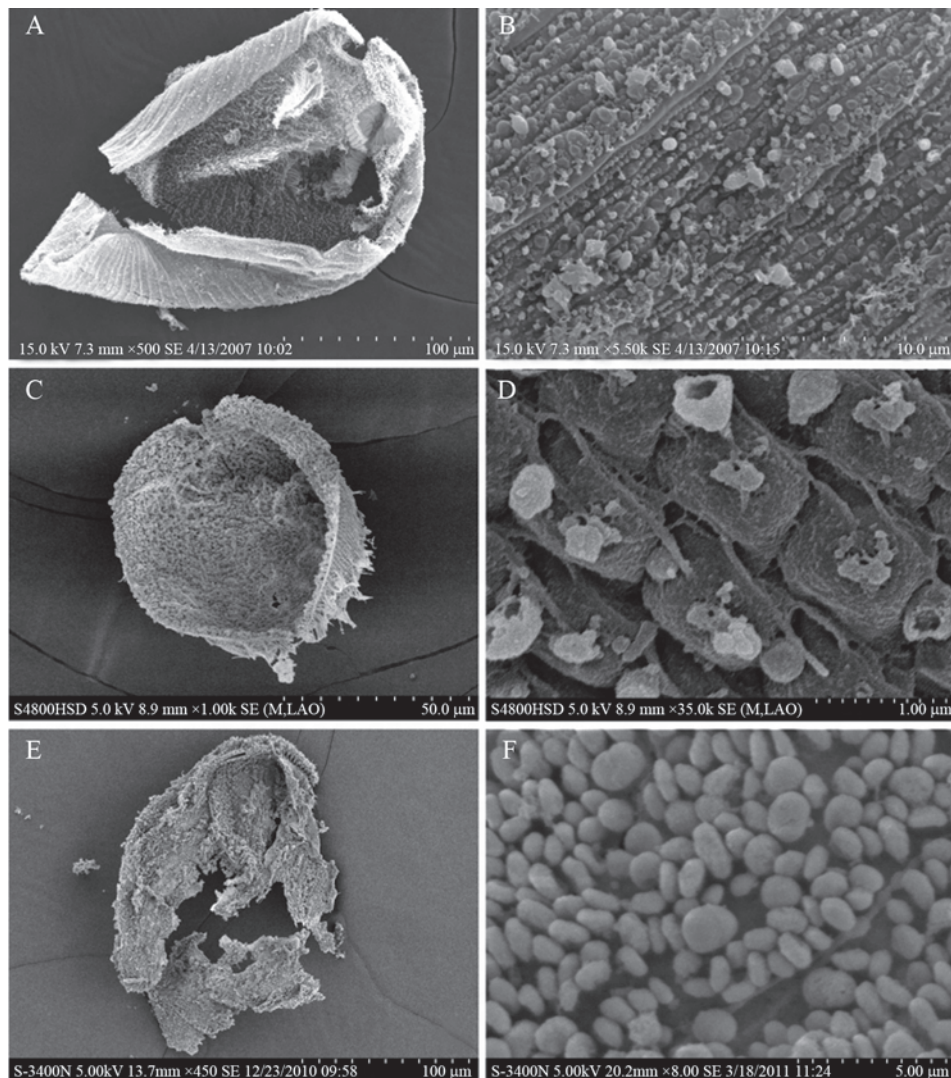
1.3.7 喷金 用E-1010型的喷金仪器进行喷金, 离子化电流强度为15 mA, 喷金时间为100 s。

1.3.8 照相 用HITACHI S-3400N型的扫描电子显微镜照相, 强度为20.0 kV, 42.0 μA 。

2 结果

2.1 爽口虫

爽口虫表膜完整并向外翻转(图1A)。表膜下发现有许多指状或颗粒状的突起, 大小不等。将可区分的颗粒状物质分为三类: I类, 个体较小, 形状为小圆球形或椭圆形, 直径为 $0.2\ \mu\text{m}$ 左右, 排列较规则; II类, 个体稍大, 形状为长锥形, 大小在 $0.2\ \mu\text{m}\times 0.5\ \mu\text{m}$ 左右, 排列不规则; III类, 个体较大, 直径为 $0.5\ \mu\text{m}$ 左



A: 爽口虫; C: 尾草履虫; E: 拟尾柱虫; B、D、F分别为图A、图C、图E的局部放大。

A: *Climacostomum* sp.; C: *Paramecium caudatum*; E: *Paraurostyla weissei*; B, D, F: the partial enlargements of figure A, C, E, respectively.

图1 扫描电镜下爽口虫、尾草履虫、拟尾柱虫表膜下结构

Fig.1 The structure under pellicle of *Climacostomum* sp., *Paramecium caudatum* and *Paraurostyla weissei* under the scanning electron microscope

右, 形状不规则, 排列也不规则。总的来说, 这些颗粒或突起均按虫体纵轴方向排列(图1B)。

2.2 尾草履虫

尾草履虫的表膜完整展开(图1C)。表膜下为有规律分布着的囊泡状结构, 除特殊位置, 大小基本为 $0.9\ \mu\text{m}\times 0.7\ \mu\text{m}$ 。并且两个囊泡状结构之间存在数量大小不等的颗粒状物质, 排列较规则, 多数直径为 $0.25\ \mu\text{m}$ 。囊泡状的正中心有两个相连的球形结构存在, 每个直径基本为 $0.2\ \mu\text{m}$ 。每个囊泡的中心发出一根纤维, 向右往前伸展, 并与相邻的囊泡结构发出的纤维并合在一起。这些结构按虫体的纵轴方向排列(图1D)。

2.3 拟尾柱虫

拟尾柱虫的表膜平整展开(图1E)。表膜下有許多球状或颗粒状的突起, 大小不等。初步区分为三类: I类, 个体很大, 形状规则, 近似于球形和椭球形, 直径为 $1.6\ \mu\text{m}$ 左右, 排列不规则; II类, 个体稍小一些, 形状规则, 呈手指形, 数量不多, 大小在 $1.9\ \mu\text{m}\times 0.8\ \mu\text{m}$ 左右, 排列不规则; III类, 个体最小, 形状规则, 呈扁球形, 直径为 $1.0\ \mu\text{m}$ 左右, 排列不规则, 数量众多, 密布于虫体的内表面。表膜下还可见几根沿虫体纵轴走向的纤维(图1F)。

3 讨论

原生动物, 特别是纤毛虫的皮层结构是指细胞外层, 包括表膜、表膜下纤维系统和其他多种结构。例如: 纤毛及其联系的纤维结构, 表膜的表膜泡, 各种脊结构, 表膜下微管, 纤维结构, 还有皮层线粒体, 射出体, 皮层颗粒及色素颗粒等, 结构复杂^[4]。以往的研究都是基于光镜下的活体或经一些特殊的染色方法后的观察及描述, 也有一些透射电镜下的亚显微结构的观察及描述, 至于它们的三维立体构象只能是在以上观察的基础上、经人脑的思考而建立起来, 真实的立体构象尚未见报道。但这些可通过扫描电镜的观察得到, 而这前提是要获得一个较完整的、从虫体上剥离下来的表膜, 并将其内面翻转过来, 然后经一系列的扫描电镜样品制备处理过程, 才可在扫描电镜下展现其表膜下的结构。本文主旨是探索实现此目的技术方法。

KMnO_4 作为一种固定剂, 它的作用主要是固定

磷脂蛋白, 对膜结构固定效果很好, 而细胞内其它的结构则不能固定。对 KMnO_4 的固定作用在一些书中也有所提到^[5-6]。本实验室多年来, 在利用 KMnO_4 作为固定剂应用于原生动物细胞学研究的试验过程中, 不断地探索、改良。邱子健等^[7]曾用 KMnO_4 与升汞混合液替代四氧化锇与升汞混合液作为固定剂, 用于纤毛虫扫描电镜样品的制备, 来显示纤毛虫表膜及纤毛, 效果很好。陈晶等^[8-9]在免疫荧光细胞化学技术样品制备和蛋白银染片技术样品制备中, 大胆地采用 KMnO_4 作为固定剂, 对传统的实验技术方法进行了改进, 在表现纤毛虫表膜、纤毛及消化胞器方面的效果很好。

本实验利用 KMnO_4 的特性将其作为固定剂, 结合红细胞血影技术, 将细胞质溶出、将膜剥落下来, 利用扫描电镜对虫体表膜下结构进行了观察, 得到了预期的结果。表明这种新方法在剥离纤毛虫表膜并对表膜下结构进行研究是可行的, 并可为细胞学中细胞膜的研究提供方法上的借鉴。

KMnO_4 作为固定剂其使用浓度因不同纤毛虫的个体大小以及表膜结构的不同而有一定的差异。只有浓度适中才能得到完整的细胞膜, 浓度过低会使膜固定不好容易出现破洞, 过高则因其强烈的氧化能力使得虫体变脆容易损坏。

参考文献 (References)

- 1 顾福康. 原生动物学概论. 北京: 高等教育出版社, 1991: 92-7.
- 2 Borror AC, Wicklow BJ. The suborder Urostyliina Jankowski (Ciliophora, Hypotrichida): Morphology, systematics and Identification of species. Actaprot-ozoological 1983; 22(2): 97-126.
- 3 顾福康, 邹士法, 李艺松. 鞭游仆虫皮层细胞骨架的扫描电镜观察. 动物学报 2003; 49(4): 514-21.
- 4 Hausmann K, Huelsmann N, Radek R. 原生生物学. 青岛: 宋微波等, 译. 中国海洋大学出版社, 2007: 27-64.
- 5 付洪兰. 实用电子显微镜技术. 北京: 高等教育出版社, 2004: 118-78.
- 6 翟中和, 王喜忠, 丁明孝. 细胞生物学, 3rd. 北京: 高等教育出版社, 2007: 48-72.
- 7 邱子健, 张大维, 史新柏. 贻贝棘尾虫形态及二分裂期间形态发生的扫描电镜观察. 海洋与湖沼 1996; 27(3): 319-22.
- 8 陈晶, 邱子健, 王瑞青, 秦宇虹. 运用激光扫描共聚焦显微术研究大草履虫口胞器与消化胞器. 动物学报 2005; 51(4): 718-22.
- 9 陈晶, 关萍, 邱子健. 食物在贻贝棘尾虫(原生动物, 纤毛虫)细胞内的消化过程. 动物学报 2008; 54(3): 510-6.

A New Method of Sample Preparation for Scanning Electron Microscope Used to Observe the Structure under Pellicle in Ciliates

Gao Jing¹, Zhou Wei², Qiao Liang¹, Chen Ying¹, Qiu Zijian^{1*}

(¹Department of Biology, Harbin Normal University, Harbin 150025, China; ²The First Senior Middle School, Huludao City, Huludao 125001, China)

Abstract A new method of observing three-dimensional structure under pellicle of ciliates by scanning electron microscope was established. The suitable concentration of KMnO_4 was used to fix cell pellicle. The cell bursts and the cytoplasm overflows in the hypotonic solution by adjusting the osmotic pressure of fixative. Then the pellicle peels off and the inside out. After removing the cytoplasm and dehydration, freeze drying and spraying gold, the structure under pellicle was observed by scanning electron microscope in *Climacostomum* sp., *Paramecium caudatum* and *Paraurostyla weissei*. The result shows that a clearly and stratified three-dimensional images of structure under pellicle can be observed by this method. It could provide a new way for the study on the pellicle of ciliates and other cell memberanes.

Key words *Climacostomum* sp.; *Paramecium caudatum*; *Paraurostyla weissei*; KMnO_4 ; sample preparation of scanning electron microscope

Received: May 5, 2011 Accepted: June 3, 2011

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30970311), Program for the Science and Technology Innovation Team in Universities and Colleges of Heilongjiang Province and Foundation for the 2009 Graduate Student Innovation of Heilongjiang Province

*Corresponding author. Tel: 86-451-88068586, E-mail: qiuzijian48@163.com