

纤毛虫原生动物形态学研究的常用方法

COMMON METHODS FOR MORPHOLOGICAL STUDIES OF CILIATED PROTOZOA

宋微波 徐奎栋

(青岛海洋大学水产学院 266003)

相对于大型的多细胞动物而言,单细胞的原生动物形态学研究的主要难点在于个体小、操作困难、许多分类性状常无法直视,故需借助多种特殊染色方法加以显示,这尤其在纤毛门动物更显得突出。这些制片方法与通常组织学中的染色方法相距甚远,因此不仅对于一般从事组织学、动物学研究的人十分陌生,对于多数从事原生动物学工作的人,这些方法也往往不易掌握。结合作者的工作经验,对几种主要方法加以简化并描述如下,以期为动物学、生态学和浮游生物学研究及水产养殖中的动物病原鉴定提供一简要的方法。

1 工具准备

解剖针,镊子,胚胎皿,凹玻片,毛细吸管(可由普通吸管经两次拉制而成),透射式解剖镜,光学显微镜(带普通相差或微分干涉相差则更佳),紫外灯(可用日光代替),恒温箱,冰箱等。

2 方法简介

2.1 活体观察方法

活体观察主要用以获取纤毛虫活体细胞的大小、外形、运动、纤毛器、伸缩泡、食物泡、内质颗粒及射出体等生物学特征,以补单纯染色方法的不足。

2.1.1 具体步骤

用毛细吸管吸一小滴虫体(液量尽可能少!)于载玻片上,加盖玻片(四周涂以凡士林以避免直接压在虫体上),在低倍镜下观察虫体大小、外形、运动特征、伸缩泡(位置/数目等)、色素体的有无及虫体体色。后转至油镜下观察(轻压盖玻片至虫体无法运动为止),此时应特别注意细胞的表膜结构、纤毛运动特征、射出体的有无/分布/形态、伸缩泡的形成及变化过程、食物泡和内质/表膜下颗粒分布特点等分类学特征。观察所用光学显微镜以微分干涉相差显微镜为最好,如以普通相差显微镜,推荐正低相差为佳,若仅有明视野观察则可通过改变数

值光栏以详细观察表膜结构。

2.1.2 结果讨论

活体观察法在纤毛虫形态学研究中占有重要地位,以此可以快速地鉴别虫体所属的类群,这对野外工作者尤其适用。而且最重要的是,活体观察能够获得染色法所无法得到的一些特征,因为许多重要的种的特征在染色中难以发现或已经被改变了。但活体观察往往受到经验的限制,而且细胞在压片时也容易变形。因此,唯有通过活体观察并结合细胞染色方能对纤毛虫的形态学进行全面的描述。

2.2 甲基绿-派洛宁临时核器染色方法(改进的 Foissner 方法)

这种方法主要用以临时显示纤毛虫的核器及某些种类的粘液泡。

2.2.1 具体步骤

- (1) 解剖镜下取虫体悬液一小滴于载玻片上;
- (2) 加入 0.3% 的甲基绿-派洛宁液一小滴;
- (3) 如已加盖玻片则从一边加入,后用滤纸吸去多余的液体;
- (4) 加盖玻片至显微镜下观察拍照。

2.2.2 试剂配制

0.3% 的甲基绿-派洛宁 以冰醋酸(CH_3COOH)和 20% 的甲醛溶液(HCHO)各一份为溶剂 100ml,将 0.3g 甲基绿和 0.3g 派洛宁溶入,配成 0.3% 的染液。

2.2.3 结果讨论

通过甲基绿-派洛宁染色,大小核一般呈蓝绿/蓝紫色,细胞质则为粉红色。这种方法操作简便且效果较好。

2.3 蛋白银法

本方法对大部分纤毛虫的染色效果极佳,但对于咽膜类,肾形目类及篮环目类等类群则常常不够理想。其主要用以显示虫体的皮层及内部结构,如纤毛下器、毛基体、核器及各种表膜下纤维系统等,而银线系统则不被染色。

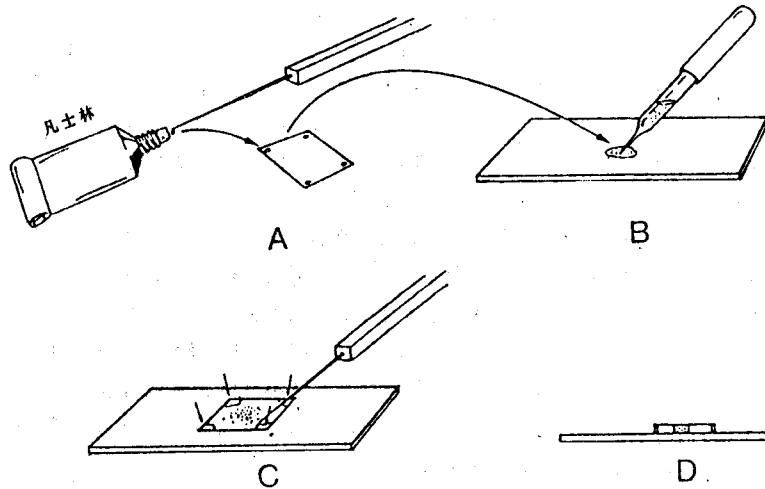


图1 活体观察操作示意图

(7) 镜检后用 5% 的硫代硫酸钠 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 定影约 10min;

(8) 蒸馏水洗一次, 入载玻片加等量的蛋白胶混匀, 调位, 除去余液后至温箱烘片约 5~10min;

(9) 常规脱水封片。

2.3.2 试剂配制

(1) Bouin 液 1 份冰醋酸 (CH_3COOH), 1 份甲醛溶液 (HCHO), 15 份苦味酸 (NO_2), $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$;

(2) 饱和升汞液 氯化高汞 (HgCl_2) 溶于水制成饱和溶液;

(3) 显影液 100ml 蒸馏水, 0.1g 对苯二酚 ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$), 5g 亚硫酸钠 (Na_2SO_3);

(4) 蛋白胶 蛋清滤液加等量甘油 ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$), 放少许麝香草酚 ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}$), 0~5℃ 保存。

2.3.3 结果讨论

蛋白银法在纤毛虫研究中是应用最广且最重要的染色法。这种方法许多人曾加以改进以应用于不同种类^[2,5,7-9]。本文所介绍的 Wilbert(1975) 变更法具有用时少, 操作较简便, 能稳定地得到较高质量的永久封片的特点。但该法对经验和操作技术依赖较大, 需要研究者不断积累经验以获得对不同种类的良好染色效果。此方法应特别注意的几点是: 1. 虫体漂白时应掌握好时机, 漂白过度则虫体不易着色 (太过将烂掉), 过轻则造成脱色不充分, 使结构不易分辨; 2. 加入的蛋白银宜适量, 量过少尚可通过补加蛋白银继续染色或进行强显影, 过多则难以补救; 3. 显影后期往往数秒即可使虫体显色过度, 因此应通过镜检把握好定影时机。

2.4 银浸法

1994 年第 6 期

2.3.1 具体步骤

(1) 虫体于胚胎皿中用 Bouin 液或饱和升汞 (HgCl_2) 固定 5~10min;

(2) 蒸馏水洗 3~5 次 (Bouin 液以水洗至无色为准);

(3) 用 0.1~0.2% 的次氯酸钠 (NaClO) [或次氯酸钾 KClO] 微量将虫体漂白至透明 (约 1~5min);

(4) 蒸馏水洗两次 (以清洗完全为佳);

(5) 将胚胎皿中蛋白银浓度控制在约 0.5%, 于 50~60℃ 的恒温箱底保持 20~40min (视不同种类的嗜染状况而调整时间);

(6) 室温下用 0.1% 的显影液显影 1~5min (或更短);

银浸法又称湿银法, 由法国人 Chatton-Lwoff 首次使用, 经 Corliss^[3] 介绍后被广泛应用于纤毛虫银线系研究。这种方法对大多数种类均具有良好的染色效果, 特别是膜口类, 前口类, 多数肾形类和一部分腹毛类。而对于缘毛目类, 异毛目类, 寡毛目类及大多数腹毛目类则几无令人信服的显示结果。银浸法主要用以揭示纤毛虫的表面纤毛图式以及银线系, 内部结构 (核除外) 则不能显示。

2.4.1 具体步骤

(1) 虫体于胚胎皿中以 Champy 液固定 5~10min;

(2) 吸除余液, 用蒸馏水洗 3~4 次, 然后转入 Da Fano 液中 10min 以上 (可久存);

(3) 标本清洗两次后至温热载玻片上, 滴一小滴 45℃ 的盐明胶, 搅匀涂成薄膜;

(4) 迅即 (1) 入冰化之培养皿上固化 (冰箱内, 5℃) 50~60s;

(5) 滴 3% 的硝酸银溶液 (5~10℃) 于标本上, 用紫外灯或日光照射 5~10min (或更长), 直至明胶变为棕黄色; 或日光下以手持放大镜照射数秒, 光斑直径约 1cm;

(6) 用冷蒸馏水冲洗后入 50% 的冷酒精中 (低于 10℃);

(7) 快速 (1) 脱水封片。

2.4.2 试剂配制

(1) Champy 液 7 份 3% 重铬酸钾 ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), 7 份 1% 三氧化铬 (CrO_3), 4 份 2% 锇酸 (OsO_4) 现用现配;

(2) Da Fano 液 1g 硝酸钴 ($\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 1g

氯化钠(NaCl), 10ml 福尔马林(HCHO), 90ml 蒸馏水;

(3) 盐明胶 10g 明胶粉, 0.1g 氯化钠(NaCl), 100ml 蒸馏水, 溶化后入冰箱保存。

2.4.3 结果讨论

银浸法能显示出蛋白银法所无法显示的银线系, 同时细胞形状通常可完好地保存。因明胶层厚度可直接影响染色效果, 涂层太厚, 硝酸银难以浸染而达不到预期效果; 涂层太薄, 则易造成细胞变形。此外, 由于虫体部位无法控制, 该过程对虫体数量也要求较高。此外步骤(3)须快速操作以防明胶干燥。对某些海洋种类, Da Fano 液后应充分清洗以减少明胶着色。

2.5 黑色素-Feulgen 复染法

(改进的 Borrer 及史新柏方法①)。

黑色素主要用来显示细胞的表面纤毛器, 这特别适用于腹毛类纤毛虫。Feulgen 反应则可以非常有选择地显示核器, 特别是小核的显示, 因为小核在蛋白银染色时往往不能明确显现。二者结合, 可获得良好的纤毛器及核器的染色效果, 这对于那些核器不明的纤毛虫尤其适用。

2.5.1 具体步骤

(1) 虫体在 Borrer 氏染液(A : B = 10 : 1)中固定染色 15~30s;

(2) 漂洗液数次洗至无色;

(3) 将虫体移至涂有蛋白胶的载玻片上, 吸除余液(尽可能充分), 液体将干时加一滴 70% 的酒精(数秒), 移入甲醛酒精液(甲醛 : 纯酒精 = 1 : 1)中固化约 5min;

(4) 入 1mol/L 的冰盐酸约 1s, 至 5mol/L 的盐酸中水解 15~20min, 完毕再入 1mol/L 的冰盐酸浸约 10s, 蒸馏水冲洗;

(5) Schiff 液中染色 15~20min, 镜检虫体至红色时取出;

(6) 用亚硫酸水洗 3 次(10min/次), 然后以蒸馏水冲洗;

(7) 常规脱水封片。

2.5.2 试剂配制

(1) Borrer 氏染液(黑色素-升汞-福尔马林液) 母液 A 10ml 饱和升汞(HgCl₂), 2ml 冰醋酸(CH₃COOH), 2ml 福尔马林(HCHO) 10ml 叔丁醇(C₄H₁₀O)。母液 B 4g 黑色素, 20ml 福尔马林, 100ml 蒸馏水用时将 A 液和 B 液以 10 : 1 混合;

(2) 漂洗液 3 份纯酒精(C₂H₅OH), 1 份冰醋酸(CH₃COOH), 8 份蒸馏水;

(3) Schiff 试剂 将 0.5g 碱性品红加入 100ml 煮

沸的蒸馏水中, 继续煮 5min 至完全溶解。待溶液冷至 50℃ 时过滤, 在滤液中加 1mol/L 盐酸 10ml。溶液 25℃ 时再加入 1g 偏重亚硫酸钠(Na₂S₂O₅)或偏重亚硫酸钾(K₂S₂O₅), 摇匀后装入棕色瓶中, 置于暗处。约 24h 后取出加入 0.25g 中性活性炭, 剧烈振荡后过滤即得;

(4) 亚硫酸水 10ml 10% 亚硫酸氢钠(NaHSO₃), 10ml 1mol/L 盐酸, 20ml 蒸馏水。用时新配。

2.5.3 结果讨论

黑色素-Feulgen 复染技术, 拉大了细胞质和表面纤毛器及核器的反差, 从而可对核器进行更精确地显示和定位。而这通常是在其他染色效果达不到要求的情况下进行的, 因此一般较少使用。在进行 Feulgen 染色时应掌握好盐酸水解的时间, 水解不够则会导致对非特异性结构的褪染不充分, 过度则易造成核器中 DNA 分子降解, 导致染色失败。

3 小结

以上 5 种研究方法, 连同扫描电镜法及作者曾介绍过的干银法和氨银法② 是纤毛虫原生动动物形态学研究的基本方法。通常, 运用这些方法(或变更法)是完全可以成功地进行分类鉴定工作。上述方法的显示效果也各有侧重, 没有一种单一的方法能显示各种必需的分类学性状, 同样地, 没有一种染色法能不加变更地适用于各种纤毛虫。一般来说, 一个纤毛虫形态学全面的描述至少应包括活体观察, 银浸法染色, 蛋白银或氨银法染色。通过染色可获得纤毛虫的细微结构, 但不能因此而忽视活体观察的重要性。相反, 准确完整的活体观察在很大程度上弥补了单纯染色的不足, 从而完善了纤毛虫的形态学研究, 二者缺一不可, 相辅相成。

参考文献

- [1] 宋微波, 1993. 海洋科学 5: 4~5.
- [2] 庞延斌、顾福康、邹士法, 1983. 华东师范大学学报(自然版) 4: 87~93.
- [3] Corliss J. O., 1953. *Stain Technol.* 28: 97-100.
- [4] Foissner W., 1977. *Acta Biol. Hung.* 28: 59-72.
- [5] Foissner W., 1991. *Europ. J. Protistol.* 27: 313-330.
- [6] Klein B. M., 1958. *J. Protozool.* 5: 99-103.

① 史新柏, 1983. 中国原生动物学学会第二次学术讨论会论文摘要集. p. 27.

② 王梅、宋微波, 1993. 中国原生动物学学会第七次学术讨论会论文摘要集. p. 32.

[7] Lee J. J. , Small E. B. , Lynn D. H. in Lee J. J. and Bovee E. C. , 1985. An Illustrated Guide to the Protozoa. Society of Protozoologists , Allen Press , Lawrence, Kansas. 1-7.

[8] Tuffrau M. , 1967. *Protistologica* 3; 91-98.

[9] Wilber N. , 1975. *Mikrokosmos* , Jahr 1975. 6; 171-179.