

文章编号: 1000-5641(2014)06-0101-08

## 包囊游仆虫包囊形成和解脱过程中 微管蛋白基因表达的变化

王萧慧, 吴娜, 范鑫鹏, 顾福康

(华东师范大学 生命科学学院, 上海 200062)

**摘要:** 采用干涉相差显微术和实时荧光定量 PCR (Q-PCR) 技术显示, 腹毛类纤毛虫包囊游仆虫 (*Euplotes encysticus*) 包囊形成和解脱过程中, 细胞微管胞器始终处于非装配及装配的功能活动状态, 脱包囊过程中伸缩泡的运动对细胞充分吸水用于微管胞器的再装配及细胞运动起了关键的作用, 细胞内  $\alpha$ -、 $\beta$ - 和  $\gamma$ - 微管蛋白基因的表达量相伴发生变化. 其中, 微管胞器去分化时, 细胞形成毛基非吸收型包囊, 细胞  $\alpha$ -、 $\beta$ - 和  $\gamma$ - 微管蛋白基因的表达量整体呈现逐渐减少的趋势, 其细胞微管蛋白基因的相对表达量从大到小依次是  $\beta$ -、 $\alpha$ - 和  $\gamma$ - 微管蛋白基因, 但  $\alpha$ -、 $\beta$ - 微管蛋白基因的起始拷贝数远大于后一种微管蛋白基因的表达量; 微管胞器再分化时, 伴随着伸缩泡的剧烈伸缩运动, 口纤毛器和体纤毛器微管先后形成, 细胞在包囊内做旋转运动并脱囊而出, 迅速转化为营养细胞, 期间细胞内  $\alpha$ -、 $\beta$ - 和  $\gamma$ - 微管蛋白基因的表达量呈现从小到大的趋势, 其微管蛋白基因的相对表达量从大到小依次是  $\beta$ -、 $\alpha$ - 和  $\gamma$ - 微管蛋白基因, 而前两种微管蛋白基因的起始拷贝数远大于后一种微管蛋白基因的表达量. 结果表明, 包囊游仆虫形成包囊和脱包囊过程中, 伴随着皮层微管胞器的不同分化, 细胞内  $\alpha$ -、 $\beta$ - 和  $\gamma$ - 微管蛋白基因始终处于不同的功能活动状态, 其中作为微管组织中心主要组分的  $\gamma$ - 微管蛋白也始终处于不同的功能状态.

**关键词:** 腹毛类纤毛虫; 包囊游仆虫; 微管胞器; 微管蛋白; 基因表达

**中图分类号:** Q956 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.1000-5641.2014.06.014

## Changes of the expression of tubulin genes during encystment and excystment of *Euplotes encysticus*

WANG Xiao-hui, WU Na, FAN Xin-peng, GU Fu-kang

(School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

**Abstract:** The processes of encystment and excystment of the hypotrichous ciliate *Euplotes encysticus*, were investigated using interference contrast microscopy and real-time quantitative PCR (Q-PCR). Results showed that the microtubular organelles were always in non-assembly and assembly functional states; furthermore, the activity of the contractile

收稿日期: 2013-11

基金项目: 国家自然科学基金(31172042)

第一作者: 王萧慧, 女, 硕士研究生. E-mail: wangxiaohui568@163.com.

通信作者: 范鑫鹏, 男, 助理研究员, 研究方向为原生动物分类学与细胞学.

E-mail: xpfan@bio.ecnu.edu.cn.

vacuole during excystment played an important role in reassembly of cortical microtubular organelles and cellular activities, and meanwhile, the expression level of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -tubulin genes changed relatively. During the dedifferentiation of the cortical microtubular organelles, cells formed the non-kinetosome-resorbing cysts and the expression of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -tubulin genes showed a downward trend. During the re-differentiation of the cortical microtubular organelles, oral and somatic ciliature formed in order and cells rotated inside the cyst and soon after excysted to vegetative cells, while the gene expression of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -tubulin showed an increasing tendency. During the whole process, the gene expression quantity from more to less were  $\beta$ -,  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tubulin, and the initial copies of the former two were much more than the latter's. It was revealed that during the processes of encystment and excystment of *Euplotes encysticus*, with the differentiation of the cortical microtubule organelles,  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -tubulin gene were always in the different functional states relatively intracellular, as well as the  $\gamma$ -tubulin gene which works as microtubule organizing center.

**Key words:** hypotrichous ciliate; *Euplotes encysticus*; microtubular organelles; tubulin; gene expression

## 0 引 言

腹毛目纤毛虫在不良环境中常易发生形成包囊的现象. 例如环境中食物、温度、湿度、酸碱度和盐度及种群密度等外界条件变化可能会致使纤毛虫形成包囊<sup>[1]</sup>. 但一旦条件转变, 形成包囊的细胞又会脱包囊, 再次进入无性生殖阶段. 研究纤毛虫的包囊现象对深入了解细胞在特殊生理条件下的生命活动特征具有重要的意义. 多年来, 所在实验室以形成“毛基体非吸收型包囊”的包囊游仆虫 (*Euplotes encysticus*) 为材料, 从显微和亚显微水平阐明了纤毛虫在休眠条件下的结构分化和营养利用, 以及细胞脱包囊中结构的再分化, 为纤毛虫休眠细胞生命活动机理的研究提供了基础材料<sup>[2-6]</sup>. 目前, 在分子水平对于纤毛虫形成包囊和脱包囊过程中胞器结构的分化, 尤其在纤毛微管、微管蛋白及其细胞相关基因的表达、调控等方面的研究尚未见报道. 本文以包囊游仆虫为材料, 应用干涉相差显微术对其形成休眠包囊和脱包囊过程进行形态学的追踪的同时, 首次应用实时荧光定量 PCR 法对  $\alpha$ -,  $\beta$ - 和  $\gamma$ - 3 种微管蛋白基因表达变化进行了检测, 以期对包囊形成和解脱过程中基因的调控和细胞休眠活动的机制提供基础资料.

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

实验中所使用的包囊游仆虫由中国海洋大学原生动物学研究室提供, 经纯化后投喂纯化的草履唇滴虫 (*Chilomonas paramecium*) 得到扩大培养的纯系.

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 干涉相差显微术

将一定量的包囊游仆虫接种于含有过滤水的培养皿中, 并置于 25 °C 的恒温培养箱中培养. 在游仆虫达到最大密度时, 停止喂食, 约 2 d 后可见游仆虫形成包囊. 用新鲜的过滤水处理放置一周后的游仆虫休眠包囊, 1.5~2.5 h 后细胞便经历脱包囊的过程.

分别挑取即将形成包囊的游仆虫和包囊数个, 置于干净的载玻片上, 盖上以凡士林支撑四角的盖玻片 (以不影响虫体正常活动为标准), 于 Olympus BX51 干涉相差显微镜下观察并拍照。

### 1.2.2 实时荧光定量 PCR(Q-PCR)

据已报道的游仆虫的  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ - 微管蛋白基因的序列比对并使用 Primer 5.0 软件分别设计相应引物 (见表 1)<sup>[7-9]</sup>。引物由上海生物工程公司进行合成。

从培养皿中吸取约  $6 \times 10^3$  个细胞, 使用天根生化科技有限公司的 RNA prep pure Mico Kit 提取总 RNA, 于  $-80^\circ\text{C}$  保存备用。

使用 Thermo Scientific 的 Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit 进行 cDNA 第一链的合成, 于  $-20^\circ\text{C}$  保存。第二步 PCR 体系为: cDNA  $5\ \mu\text{L}$ ,  $10 \times$  PCR buffer ( $\text{Mg}^{2+}$  free)  $2.5\ \mu\text{L}$ , dNTP Mixture ( $2.5\ \text{mmol/L}$ )  $2\ \mu\text{L}$ , Taq DNA Polymerase ( $5\ \text{U}/\mu\text{L}$ )  $0.1\ \mu\text{L}$ ,  $\text{MgCl}_2$  ( $25\ \text{mmol/L}$ )  $2.5\ \mu\text{L}$ , CF primer ( $100\ \mu\text{mol/L}$ )  $0.5\ \mu\text{L}$ , CR primer ( $100\ \mu\text{mol/L}$ )  $0.5\ \mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 至总体积为  $50\ \mu\text{L}$ 。反应条件为:  $94^\circ\text{C}$  预变性  $5\ \text{min}$ ,  $94^\circ\text{C}$  变性  $45\ \text{s}$ , 退火  $45\ \text{s}$ ,  $72^\circ\text{C}$  延伸  $1\ \text{min}$ , 共 35 个循环,  $72^\circ\text{C}$  延伸  $10\ \text{min}$ ,  $4^\circ\text{C}$  保存。其中, Taq DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司。PCR 产物测序后进行 Q-PCR 引物设计 (见表 1), 选取 17SrRNA 为参照基因<sup>[10]</sup>。

将细胞划分为 5 个时期分别进行总 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成。产物稀释 10 倍后作为 Q-PCR 的模板。Q-PCR 的体系如下:  $10^{-1}$  cDNA  $10\ \mu\text{L}$ , QF primer ( $100\ \mu\text{mol/L}$ )  $0.25\ \mu\text{L}$ , QR primer ( $100\ \mu\text{mol/L}$ )  $0.25\ \mu\text{L}$ , SYBR Green I  $8\ \mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 至  $20\ \mu\text{L}$ , 预混, 预混体系依次加入 96 孔板。用 Bio-Rad CFX 96 荧光定量 PCR 仪进行如下循环:  $94^\circ\text{C}$  预变性  $7\ \text{min}$ ,  $94^\circ\text{C}$  变性  $10\ \text{s}$ ,  $55^\circ\text{C}$  退火  $30\ \text{s}$ , 共 40 个循环, 从  $65^\circ\text{C}$  到  $95^\circ\text{C}$  每  $0.5^\circ\text{C}$  每  $5\ \text{s}$  读取荧光数值。SYBR Green I 购自 Roche 公司的 Fast Start Universal SYBR Green Master (ROX), 96 孔板和封板铝膜均购自 Bio-Rad 公司。对各时期基因的相对定量采用 Livak 的  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法<sup>[11]</sup>。

表 1 3种微管蛋白基因引物

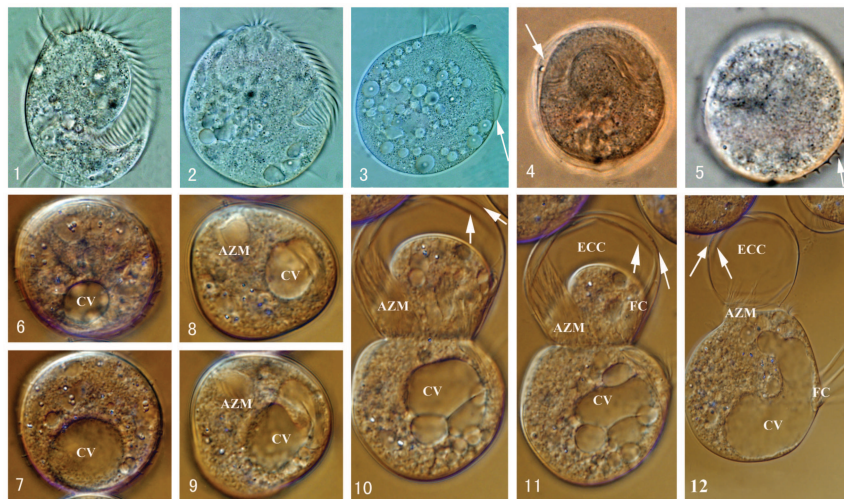
Tab. 1 Primers used for PCR with amplifying genes of the three tubulins		
基因名称	引物*(5'-3')	T <sub>m</sub> 值/ $^\circ\text{C}$
$\alpha$ -	CF1: ATACAACTCCGTTCTTTCAACTCACTC	57
	CR1: GGTAGCGTTTACATCCTTTGG	
	QF1: GCCGTCTATGACATCTGC	
	QR1: TTCGTGGTAGGCTTTCTC	
$\beta$ -	CF2: TGACGAGCACGGAGTAGA	57
	CR2: GTCCCTTAGCCCAGTTGT	
	QF2: AACGAAGCCACTGGAGGTAGA	
	QR2: TGTCCCTTAGCCAGTTGTTTCC	
$\gamma$ -	CF3: CACTCTATTGCTGGAGGAACA	55
	CFR3: TGTAGATGCTGCCATAACTGTAG	
	QF1: ATCCAACTTACTCTGTCTTCC	
	QR2: TTCAGTCATCAACCGCAA	
17SrRNA	REF: TGGTCGCAAGGCTGAACTTA	
	RER: CAGGACATCTAAGGGCATCACA	

注: \*CF 和 CR, 普通 PCR 的正向和反向引物; QF 和 QR, 实时荧光定量 PCR 的正向和反向引物; REF 和 RER, 实时荧光定量 PCR 参照基因的正向和反向引物; T<sub>m</sub>, 退火温度

## 2 结 果

### 2.1 干涉相差显微术显示形成包囊和脱包囊过程中细胞结构的分化

将处于不同时期的包囊游仆虫划分为以下 5 个时期: ① 营养细胞 (见图 1-1): 培养约一周后, 所有游仆虫都处于运动活跃的状态, 在皿底爬行或捕食, 所有皮层纤毛器完整; ② 包囊形成时细胞 (见图 1-2—4): 停止喂食约 2 d 后, 所有细胞运动和摄食活动明显减弱、变圆 (见图 1-2), 或开始形成包囊壁 (见图 1-3), 细胞变圆, 可见明显的包囊壁与细胞体间的间隔 (见图 1-4), 此时, 除了口围带可见外, 其他皮层微管器都观察不到; ③ 休眠细胞 (见图 1-5): 放置一周后的包囊细胞, 全部细胞的包囊壁上都出现明显而突出的嵴, 观察不到所有皮层纤毛器; ④ 脱包囊时细胞 (见图 1-6—9): 脱包囊处理 1~1.5 h, 95% 以上的细胞开始出现明显的伸缩泡活动 (见图 1-6 和 1-7) 与细胞形变及棘毛显露 (见图 1-8 和 1-9), 棘毛显露的过程中, 依次可观察到口围带, 额棘毛和尾棘毛; ⑤ 脱包囊后细胞 (见图 1-10—12): 脱包囊处理 2~2.5 h, 包囊壁破裂, 细胞体外流 (见图 1-10). 当细胞已完全脱离包囊壁后, 细胞个体仍偏小, 形态与正常营养细胞略有不同.



注: 1 营养细胞; 2—4 包囊形成时细胞(3、4 中箭头分别示包囊壁开始形成部位、早期包囊的包囊壁); 5 休眠细胞(箭头示包囊壁上的嵴); 6—9 脱包囊时细胞(6,7 显示伸缩泡的变化; 8,9 显示细胞形变及棘毛的显露; AZM 示口围带的出现); 10—12 脱包囊后细胞(AZM, 口围带; CV, 伸缩泡; ECC, 空包囊壳; FC, 额棘毛; 箭头示包囊的外壁和外壁).

图 1 包囊游仆虫形成包囊和脱包囊过程中细胞形态的变化

Fig. 1 Observation of encystment and excystment of *Euplotes encysticus*

### 2.2 形成包囊和脱包囊过程中细胞微管蛋白基因的表达

#### 2.2.1 扩增曲线和熔解曲线

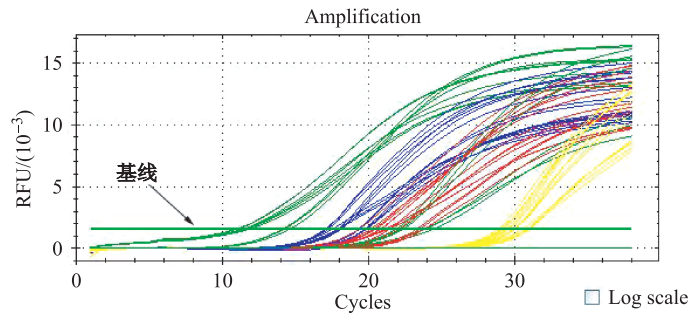
样品的实时荧光定量 PCR 的动力学曲线是 S 型的 (见图 2); 使用灭菌的三蒸水代替模板作为阴性对照, 其动力学曲线为图 2 中最下方的绿线, 荧光数值为 0.

所有样品的熔解曲线只有一个拐点或一个峰, 且曲线较光滑, 峰线较窄和尖 (见图 3 左图或右图). 其中,  $\alpha$ -微管蛋白基因 (见图 3 中红线峰值) 的  $T_m$  是  $79.0^{\circ}\text{C}$ ,  $\beta$ -微管蛋白基因 (见图 3 中蓝线峰值) 是  $80.0^{\circ}\text{C}$ ,  $\gamma$ -微管蛋白基因 (见图 3 中黄线峰值) 是  $74.0^{\circ}\text{C}$ , 参照基因

17SrRNA (见图 3 中绿线峰值) 是 79.0 °C.

### 2.2.2 3 种微管蛋白基因表达

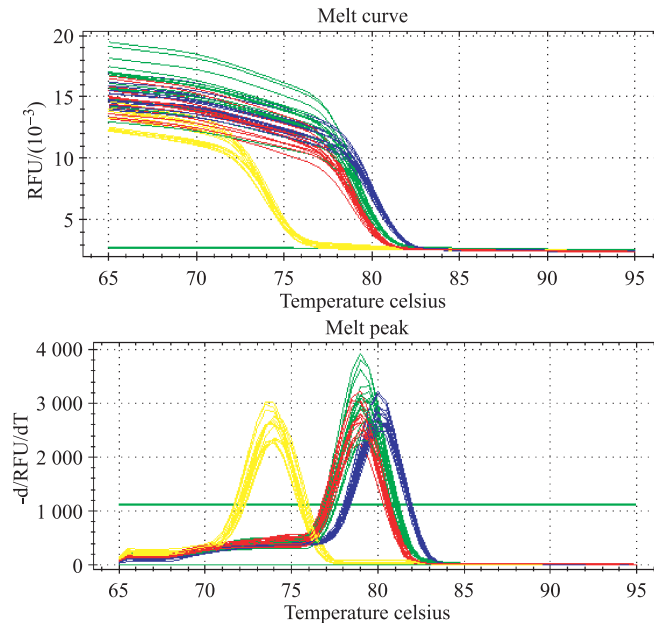
$\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ - 微管蛋白基因在 5 个时期的细胞中表达量总体呈现出先减小后增加的趋势. 但是, 从开始形成包囊的细胞至休眠细胞  $\alpha$ - 和  $\gamma$ - 微管蛋白基因的表达量趋于减少, 而  $\beta$ - 微管蛋白则趋于增加 (见图 4). 同时, 在任何一个时期这三种微管蛋白的相对表达量的规律基本一致, 即  $\beta$ - 微管蛋白基因表达量最高,  $\alpha$ - 微管蛋白基因次之,  $\gamma$ - 微管蛋白基因最少 (见图 5 和表 2).



注: 红线,  $\alpha$ - 微管蛋白基因; 蓝线,  $\beta$ - 微管蛋白基因; 黄线,  $\gamma$ - 微管蛋白基因; 绿线, 17SrRNA

图 2 样品扩增曲线

Fig. 2 The amplification graph of samples



注: 红线,  $\alpha$ -微管蛋白基因; 蓝线,  $\beta$ -微管蛋白基因; 黄线,  $\gamma$ -微管蛋白基因; 绿线, 17SrRNA

图 3 样品溶解曲线

Fig. 3 The melt curve graph of samples

## 3 讨 论

### 3.1 包囊游仆虫形成包囊和脱包囊过程中纤毛器微管的分化及伸缩泡的作用

Yonezawa 首先在日本广岛采集到包囊游仆虫<sup>[12]</sup>, 此后顾福康等在中国上海采集到该种

纤毛虫<sup>[2]</sup>. 比较包囊游仆虫的广岛、上海和青岛种群, 本文的游仆虫即青岛种群在形成包囊时, 各类微管胞器的纤毛杆被吸收, 而毛基体和大部分微管则被保留下来, 细胞呈现非运动状态, 这与前两个种群的描述是一致的<sup>[2,12]</sup>. 但作者观察到, 青岛种群游仆虫在形成包囊的过程中, 由口区先形成包囊壁, 此后细胞被包囊壁完全包围, 并伴随着细胞失水、收缩和变小的过程. 而广岛和上海种群并未见类似描述<sup>[2,12]</sup>. 约一周后细胞完全进入休眠状态, 其细胞体与包囊壁完全贴合, 而在包囊壁表面则出现与上海种群相似的明显且突出的嵴; 包囊游仆虫起始脱包囊过程的最明显变化是细胞内出现一个大的伸缩泡, 这与广岛及上海种群相似. 伸缩泡的运动使细胞大量吸水而变大, 其皮层纤毛器迅速发生, 细胞快速旋转并脱囊而出. 由包囊游仆虫形成包囊和脱包囊过程中细胞从非运动状态成为运动状态及其微管胞器从去分化向再分化的转变, 说明纤毛虫细胞微管胞器也始终处于非装配及装配的功能活动状态, 而脱包囊中伸缩泡的运动对细胞充分吸水用于微管胞器的再装配及细胞运动则起了关键的作用.

表 2 相对荧光定量PCR统计数值

Tab. 2 Statistical data of relative real-time PCR		
时期和基因	C <sub>t</sub> 平均值±标准差	ΔC <sub>t</sub> ±标准差
aα-	21.36±0.11	-2.78±0.35
aβ-	17.88±0.25	-6.26±0.41
aγ-	30.78±0.20	6.64±0.39
a17SrRNA	24.14±0.33	
bα	-23.60±0.27	11.83±0.36
bβ-	19.88±0.05	8.11±0.25
bγ-	31.37±0.49	19.6±0.54
b17SrRNA	11.77±0.24	
cα-	21.86±0.34	10.61±0.44
cβ-	19.53±0.24	8.28±0.38
cγ-	29.91±0.25	18.66±0.38
c17SrRNA	11.25±0.29	
dα-	20.01±0.54	5.61±0.59
dβ-	17.17±0.09	2.77±0.27
dγ-	29.06±0.15	14.66±0.29
d17SrRNA	14.40±0.25	
eα-	20.77±0.21	-1.44±0.30
eβ-	18.08±0.12	-4.13±0.25
eγ-	29.58±0.33	7.37±0.40
e17SrRNA	22.21±0.22	

注: a 营养细胞; b 包囊形成时细胞; c 休眠细胞; d 脱包囊时细胞; e 脱包囊后细胞

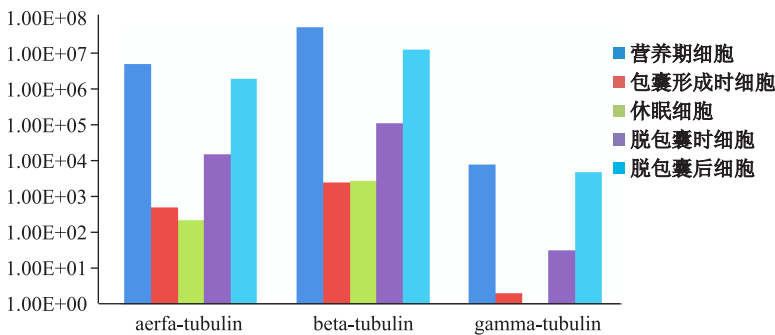


图 4 形成包囊和脱包囊过程不同时期中 3 种微管蛋白基因表达量的变化

Fig. 4 The change of the expression of three tubulin genes during encystment and excystment



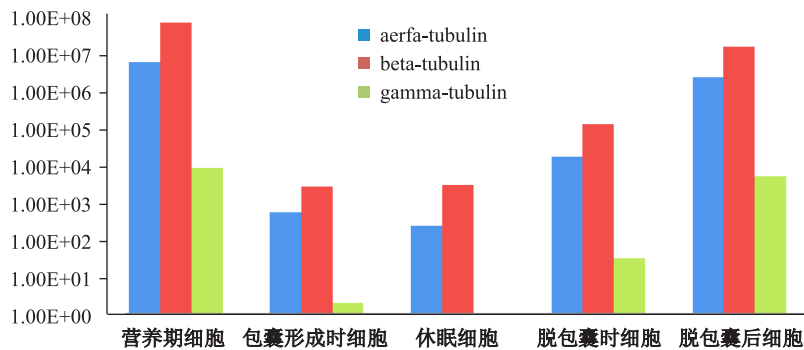


图 5 不同时期 3 种微管蛋白基因相对表达量

Fig. 5 The relative expression of the three tubulin genes during different stages

### 3.2 微管蛋白基因表达量的变化及其功能的分析

由溶解曲线是单峰, 峰线窄且尖可知, 扩增产物是单一的, 荧光信号是比较真实可靠的<sup>[13]</sup>.

分析数据发现, 微管胞器去分化时,  $\alpha$ -、 $\beta$ - 和  $\gamma$ - 微管蛋白基因的表达量呈现减小的趋势. 在游仆虫形成包裹的过程中, 纤毛器微管胞器的纤毛杆会被吸收, 同时因细胞失水、体积缩小, 非纤毛器的微管骨架也会相应地发生变化<sup>[2,14]</sup>. 而  $\beta$ - 和  $\alpha$ - 微管蛋白是这些微管胞器的重要组成成分<sup>[15]</sup>,  $\gamma$ - 微管蛋白则主要起微管组织中心的作用<sup>[16]</sup>, 使得在这些变化中, 这 3 种微管蛋白表现为解聚、降解和需求下降, 基因的表达量也随之降低. 微管胞器再分化时, 细胞内  $\alpha$ -、 $\beta$ - 和  $\gamma$ - 微管蛋白基因的表达量呈现出从小到大增加的趋势. 此时, 细胞除了会重新长出纤毛杆及重建非纤毛器的微管骨架外, 还伴随剧烈的伸缩泡活动. 有报道发现  $\gamma$ - 微管蛋白还可定位于四膜虫和草履虫的伸缩泡结构中<sup>[17,18]</sup>, 推测在包裹游仆虫的伸缩泡中  $\gamma$ - 微管蛋白可能也有分布. 因此, 在此过程中不仅作为微管骨架的  $\beta$ - 和  $\alpha$ - 微管蛋白所对应的基因表达量上升,  $\gamma$ - 微管蛋白基因或因伸缩泡剧烈扩张的需求也有较高的表达量. 脱包裹后的细胞纤毛器虽已完成再分化, 但形态与正常营养细胞仍略有不同, 推测其细胞中非纤毛器的微管还尚未完成重建, 因此各种微管蛋白基因的表达量与营养期相比略低.

在不同时期细胞内 3 种微管蛋白基因的表达量均为  $\beta$ -、 $\alpha$ - 远大于  $\gamma$ - 微管蛋白基因. 已有研究表明  $\beta$ -、 $\alpha$ - 微管蛋白广泛定位于构成纤毛器的纤毛的各个部位, 以及非纤毛器的细胞骨架中<sup>[14,19]</sup>, 而  $\gamma$ - 微管蛋白作为微管组织中心则仅少量定位于纤毛器的基体腔、基体基部近中心端、基体基部近中心端连接及基体中部连接等部位. 因此, 本研究所揭示的不同微管蛋白基因表达量的差异与前人报道的形态学结果基本一致<sup>[14-16,19]</sup>. 同时, 因  $\alpha$ - 与  $\beta$ - 两种微管蛋白总以二聚体形式作为细胞骨架的主要组成成分行使功能<sup>[15]</sup>, 两者所对应基因的相对表达量理应一致, 但本研究中,  $\alpha$ - 微管蛋白基因的相对表达量总是略低于与  $\beta$ - 微管蛋白基因, 具体原因有待进一步研究.

综上所述, 在细胞形成包裹及脱包裹过程中, 微管蛋白基因的不同活动状态与细胞微管胞器所处的装配与非装配的功能状态基本同步, 而不同微管蛋白基因的表达量与其微管蛋白的不同功能和定位也基本对应.

**致谢** 感谢中国海洋大学原生动生物学研究室为本研究提供实验材料.

## [参 考 文 献]

- [1] TOMARU A. Encystment-inducing factors in the ciliate *Euplotes elegans* [J]. Zoological Science, 2002, 19: 741-746.
- [2] 顾福康, 张作人. 包裹游仆虫包裹形成和解脱过程中纤毛器的分化 [J]. 动物学报, 1991, 38(2): 287-292.
- [3] 顾福康, 季玲妹. 包裹游仆虫皮层和营养核的超微结构研究 [J]. 动物学研究, 1996, 17(1): 16-22.
- [4] 牛延宁, 吴月华, 顾福康, 等. 包裹游仆虫纤毛器微管在不同生理状态下的分化 [J]. 华东师范大学学报: 自然科学版, 2007(6): 106-111.
- [5] 顾福康, 倪兵. 包裹游仆虫休眠包裹的超微结构研究 [J]. 实验生物学报, 1995, 28(2): 163-171.
- [6] SHENG X, ZENG H, GU F, et al. Influences of the interference of  $\gamma$ -tubulin gene expression on the morphology and microtubules of ciliate *Euplotes eury stomus* [J]. Zoological Science, 2011, 28(7): 476-481.
- [7] 田永红, 熊锦文, 熊承良, 等. 大鼠尿激酶 SYBR Green I real-time RT-PCR 引物设计 [J]. 生物信息学, 2006, 5(2): 53-57.
- [8] 张新宇, 高燕宁. 引物设计及软件使用技巧 [J]. 生物信息学, 2004, 2(4): 15-19.
- [9] 李扬, 顾慧, 戚存扣, 等. 甘蓝型油菜木质素合成关键基因 F5H、4CL 和 COMY 的定量表达 [J]. 中国油料作物学报, 2013, 35(1): 24-28.
- [10] LIU X, LEE K L, MAO Y, et al. Differential gene expression during stationary phase between amiconucleates and micronucleates of the ciliated protist, *Pseudourostyla cristata* [J]. Current Genetics, 2005, 48: 401-411.
- [11] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the  $2^{-CT}$  method [J]. Methods, 2001, 25: 402-408.
- [12] YONEZAWA F. New hypotrichous ciliate *Euplotes encysticus* sp. nov. [J]. Journal of science of the Hiorshima University. Ser B, Division 1, 1985, 32(1): 35-45.
- [13] 徐丽华, 刘春雷, 常玉梅, 等. 双标准曲线相对定量 PCR 试验原理与方法 [J]. 生物技术通报, 2011(1): 70-75.
- [14] 尹飞, 赵柳, 顾福康, 等. 华美游仆虫皮层细胞骨架的超微结构及免疫电镜观察 [J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2009, 48(5): 97-102.

(责任编辑 李万会)

(上接第 107 页)

- [15] PERRET E, DAVOUST J, ALBERT M, et al. Microtubule organization during the cell cycle of the primitive eukaryote dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii* [J]. Journal of Cell Science, 1993, 104: 639-651.
- [16] JOACHIMIAK E, PUCCIARELLI S, BARCHETTA S, et al. Cell cycle-dependent expression of  $\gamma$ -tubulin in the amiconuclear Ciliate *Tetrahymena pyriformis* [J]. Protist, 2007, 158: 39-50.
- [17] SHANG Y, Li B, GOROVSKY M. *Tetrahymena thermophila* contains a conventional gamma-tubulin that is differentially required for the maintenance of different microtubule-organizing centers [J]. Journal of Molecular Cell Biology, 2002, 158(7): 1195-1206.
- [18] KLOTZ C, RULZ F, GARREAU L, et al. Gamma-tubulin and MTOCs in *Paramecium* [J]. Protist, 2003, 154(2): 193-209.
- [19] YIN F, SHENG X, GU F. et al. Localization of  $\alpha$ -,  $\gamma$ - and  $\delta$ -tubulin in the hypotrich ciliate *Stylonychia pustulata*(Hypotrichida, Ciliophora) [J]. Animal Cells and Systems, 2013, 17(4): 259-268.

(责任编辑 李万会)