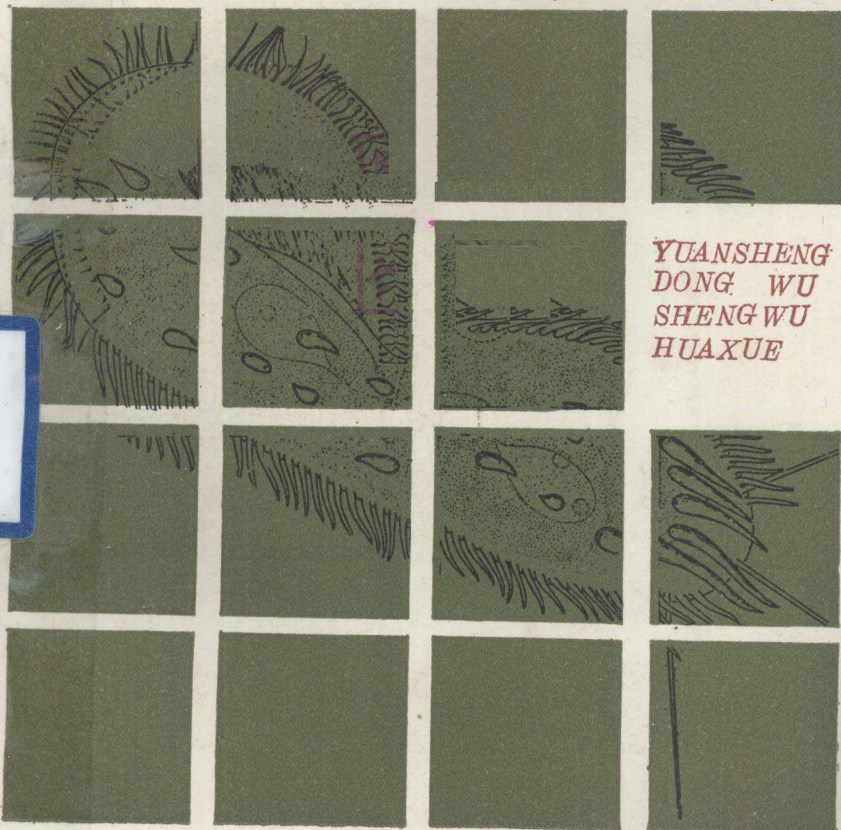
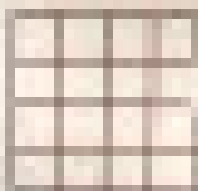


沈锡祺 编著

原生动物生物化学

华东师范大学出版社





清华大学出版社

原生动物生物化学

（第二版）



原生动物生物化学

沈锡祺 编著

华东师范大学出版社

原生动物生物化学

沈锡祺 编著

华东师范大学出版社出版发行

(上海中山北路3663号)

宁波鄞县文教印刷一厂

新华书店上海发行所经销 张家港市印刷厂印刷

开本: 850×1168 1/32 印张: 8.75 字数: 225 千字

1990年12月第一版

1990年12月第一次印刷

印数: 001—2,000本

ISBN7-5617-0557-3/N·034 定价: 4.40元

前 言

《原生动物生物化学》的雏形是作者为生物学专业大学生开设的选修课教材，主要介绍原生动物生物化学方面的研究进展、成果以及研究动向。几年来经过拓宽内容、增加章节，比较系统地介绍原生动物生物化学中最基本的、也是最重要的部分，改为给细胞学专业的硕士研究生开设的专业必修课教材。现经增删和修改，才写成目前这样比较系统、完整的《原生动物生物化学》。

原生动物生物化学是一门迅速发展的学科，它不仅与人类的健康及畜牧、水产业的发展有关，而且与生物科学的发展、研究生命现象有关。美国、日本以及许多国家都大力地开展这门学科的研究，并取得了许多重要成果。我国学者在这门学科中的研究水平是较为落后，在原生动物学研究领域中以往的工作主要着重于分类、形态及形态发生、部分寄生原虫的生活史、药物治疗等方面。随着细胞培养技术的发展与应用，微量、超微量的分析方法的应用，原生动物生物化学才得到了重视和发展。这几年来，在多次的国内原生动物学学术会议上，愈来愈多地报道了原生动物生化研究的成果，表示了我国从80年代开始，原生动物学的研究进入了一个新的阶段即原生动物生物化学阶段，开始进入原生动物细胞内的物质变化和分子变化的研究。但是，目前在这一领域中的参考书甚缺，正如北京大学生物学系陈阅增教授在审阅本书初稿时所指出的那样，“原生动物生物化学的资料很多，但迄今国内无一本原生动物生物化学的专著，国外似乎只有类似于专题性的论文集而无系统著作”。编写这本《原生动物生物化学》就是为了满足这种当务之急的。该书的出版定会引起原生动物学家和生物化学家

等的关注和兴趣，也会吸引较多的年轻科研工作者投身到这一学科的研究中来，这是作者撰写本书的目的和愿望。

《原生动动物生物化学》一书收集了国内外比较新近的大量资料，也反映了我们实验室的一些研究成果。主要介绍原生动物研究材料的培养、收集，主要的原生动物生物化学的研究方法，原生动动物的各种结构、功能及生化基础，各类物质的代谢，原虫病的危害、治疗原虫病的生化机制等。内容比较丰富，该书可以供生物学、细胞学、环境保护、寄生虫学、医学及生物化学等专业的大学生、研究生、教师及有关的科技工作者参考。

在本书编写过程中，作者得到本实验室的张作人教授、庞延斌教授的支持、鼓励和帮助，由北京大学生物学系陈阅增教授、曹同庚教授审阅、修改并提出许多有益的意见。也得到了复旦大学生物学系盛宗斗副教授、朱孔生副教授的支持和帮助。另外许多老师在阅读初稿时给作者提出不少建议和意见等等，在这里一并表示感谢。由于本人学识有限，因此在书中错误、缺点在所难免，希望在使用过程中及时给予指正，以便再版时改正。

华东师范大学生物学系

沈锡祺 1989.3.

目 录

前言

第一章 绪论	(1)
第一节 原生动物的生物化学的现状、任务和前景	(1)
第二节 研究原生动物生物化学的材料	(5)
第三节 研究原生动物生物化学的方法	(18)
第二章 原生动物的微管、微丝及其生物化学	(26)
第一节 微管及其生物化学	(27)
第二节 微丝及其生物化学	(36)
第三章 原生动物的运动生物化学	(42)
第一节 纤毛和鞭毛的运动及其生物化学	(42)
第二节 轴足、轴杆、触毛的运动及其生物化学	(54)
第三节 纤毛虫的收缩运动及其生物化学	(57)
第四节 细胞质流、变形运动及其生物化学	(61)
第四章 原生动物钙调蛋白及其功能	(67)
第一节 原生动物钙调蛋白的分离和纯化	(68)
第二节 原生动物钙调蛋白的结构和性质	(74)
第三节 原生动物钙调蛋白的作用	(80)
第五章 原生动物的光感受和化学感受	(90)
第一节 光、化学物质对原生动物的作用	(90)
第二节 纤毛虫交配信息素及其感受	(95)
第三节 原生动物光受体及其感受机制	(105)
第四节 原生动物化学受体和感受机制	(111)
第六章 原生动物的包囊及其生物化学	(113)
第一节 自由生活原生动物的包囊及其生物化学	(113)
第二节 寄生原虫的包囊及其生物化学	(116)
第三节 沙土变形虫包囊及其生物化学	(119)
第七章 原生动物的线粒体核酸	(125)
第一节 四膜虫线粒体 DNA 及其复制	(126)

第二节	草履虫线粒体 DNA 及其复制	(131)
第三节	小眼虫线粒体 DNA 及其复制	(133)
第四节	寄生原虫基体 DNA 及其复制	(135)
第五节	原动物线粒体 RNA 及其蛋白质合成	(141)
第八章	原动物的糖代谢	(144)
第一节	研究原动物代谢的主要方法	(145)
第二节	自由生活原动物的糖代谢	(147)
第三节	寄生原虫的糖代谢	(154)
第四节	鞭毛虫的糖代谢	(165)
第九章	原动物的脂类代谢	(168)
第一节	原动物中脂类的分布和类型	(168)
第二节	脂类的代谢	(180)
第三节	细胞膜的合成、装配和代谢	(192)
第十章	原动物的蛋白质代谢	(195)
第一节	原动物对氨基酸的需要和氨基酸代谢	(196)
第二节	原动物的表面蛋白质和酶	(207)
第三节	原动物的蛋白质合成	(215)
第十一章	原动物的核酸代谢	(219)
第一节	原动物对嘌呤和嘧啶的利用和转化	(219)
第二节	原动物的核酸及其分布	(224)
第三节	核酸、核苷酸和碱基代谢	(232)
第四节	RNA 是一种酶	(237)
第五节	原动物的细胞周期与核酸合成	(239)
第十二章	治疗原虫病的几个问题	(243)
第一节	人类的原虫病及其化学治疗	(243)
第二节	动物的原虫病及其化学治疗	(248)
第三节	治疗原虫病的生化机制	(250)
第四节	抗原虫药物的副作用	(259)
主要参考书和参考文献		(264)

第一章 绪论

原生动物是一类分布广泛、结构简单、微小而原始的单细胞真核生物。原生动物的分布领域极为广泛，不论在淡水的大河小溪、湖泊泥潭，还是在咸水的海洋中；也不论在陆地上，还是在天空中均有它们的足迹。因此它与国民经济的水产渔业、畜牧业、农业、医药和环境等方面均有着十分密切的关系。随着研究的深入，它在发展国民经济中的作用越来越显示出来了。

以往对原生动物学的研究，都是从它们的形态结构、分类地位、生活习性等方面来进行的。近20年来，形成和发展了一门理论和实践相结合的边缘学科即原生动物生物化学。它的主要任务是研究原生动物生命活动中的物质代谢和能量代谢过程。70年代初，开展了原生动物细胞内酶学，代谢途径，寄生原虫病传播的生化机理，细胞器分离、组成物质以及核酸代谢等的研究。到了80年代，本学科的研究也达到了分子生物学的研究阶段，至今在不少领域的研究中已取得了显著的成果。

实践经验告诉人们，获得满意的实验材料，建立一定的研究模式和应用、发展合适的生化研究方法是促使本学科发展的两个重要方面。

第一节 原生动物生物化学的现状、任务和前景

由于原生动物个体微小，人们不能凭肉眼看到它们，只有借助于解剖镜和显微镜才能看清它们的形态和结构。因此常常除某些致病寄生原虫外，不太引起人们的重视。其实它们与人类有

着密切的关系。在原生动物生物化学各领域的发展研究很不平衡，许多方面还未开拓或刚刚开始，需要人们去加强研究。

一、原生动物与人类的关系

原生动物在自然界中和其它生物一样，具有各种生命活动的能力——生物整体性的生理功能。细菌是某些原生动物的食物，而某些原生动物又是其它一些小动物（包括些较大的食肉性原生动物）的食物。在维持生态平衡的“食物链”中它们处于低级的，但其数量巨大，又是重要的一环；数量十分惊人的具有叶绿体的原生动物（鞭毛虫），能进行光合作用，利用 CO_2 ，放出 O_2 和制造有机物，在物质循环中它们的作用决不能低估。

由于许多原生动物是食细菌的，在环境保护、污水处理净化过程中，它们作为活性淤泥的组成部分而起着十分积极的作用。任何水体可根据原生动物出现的种类和数量来鉴定水质的好坏。原生动物还可以初测水中药物、重金属等物质的浓度。因此，原生动物越来越明显地扮演着生物指示者的角色。

原生动物中的有壳类如放射虫、有孔虫等与某些矿藏的成矿有一定的关系，古代这类原生动物大量沉积于水底淤泥中，在微生物和复盖层的压力、温度作用下可形成石油。

寄生于人体、牲畜、禽类、鱼、贝等的血液或肠腔里的原虫，给宿主造成严重的病害并引起大量死亡。例如全世界有三分之一的人口居住在疟疾流行区，每年约有一亿五千余万人染上疟疾，每年有几十万儿童因得疟疾而死，这是疟原虫(*Plasmodium*)引起的。而锥虫(*Trypanosoma*)、利什曼虫(*Leishmania*)、泰来虫(*T-heileria*)、巴贝虫(*Babesia*)等造成人和牲畜的严重病害。在这些原虫病流行的热带非洲，每年有几百万头牛得病而死亡。此外艾美球虫(*Eimeria*)也常造成鱼、贝、鸟、禽、兔等瘟病。

某些原生动物易培养，繁殖快，能进行克隆培养、无异物培养、无菌培养，可以获得较多的量，又具有无性生殖和有性生殖

两种繁殖方式，纤毛虫还具有大核和小核两类细胞核等特点，因此是研究细胞学、遗传学和生物化学的好材料，是用于研究药物作用机制和代谢活动的理想的生物模型，还可作为毒物和营养物质研究的工具（Hutner等1980）。

总之，原生动物和人类有着密切的关系，理应引起重视，必须开拓生物化学的各个领域，研究其生命活动规律。

二、原生动物生物化学的现状及其任务

从这一学科的发展史来看，它是一门极为年轻的学科。国际原生动物学家协会主办的“原生动物学杂志”从70年代初才开辟“生物化学”专栏，刊登原生动物生物化学方面的研究论文，如有关原生动物的某些酶的提取、分离和测定，某些物质的代谢，细胞内细胞器分离、物质组成、核酸研究，原虫病的发病机理及药物治疗等。80年代起，Gall主编的《原生动物纤毛虫分子生物学》一书的出版标志着原生动物生化研究进入了一个新的时期即分子生物化学时期。这一时期的特点是运用超微量分析等研究方法，对原生动物许多方面如运动、遗传、进化和分化等分子机理作了有成果的研究。在以四膜虫(*Tetrahymena*)为材料的实验中，发现RNA具有酶的催化活性，刷新和修改了酶一定是蛋白质的传统概念。一些研究机构研究了原生动物中钙调蛋白的结构和功能；研究及分离了一些纤毛虫的交配信息素。不少学者报道了纤毛虫大核和小核的基因组成；以及某些纤毛虫核糖体RNA的基因结构和表达等等。近几年来在原生动物的细胞骨架以及组成的蛋白质，细胞分化中的基因调控，核蛋白的作用，治疗原虫病新一代药物及治疗机制等方面的探索有了进一步的发展。

我国在原生动物生物化学方面的研究起步较晚，80年代才开始有这方面的报道。近几年对纤毛虫核蛋白、纤毛虫皮层骨架蛋白、寄生原虫动基体蛋白、某些纤毛虫的酶类等研究已得到了较大进展。但与国外相比还有一段差距。这主要表现为研究的面

因，为解决实际问题而开展的课题开展得不够，研究人员、设备、经费也感不足，中文参考资料几乎空白。随着学科的深入发展，随着其在国民经济中所显示的作用，定会引起人们的重视，相信研究条件会得到逐步改善，研究水平肯定会不断提高。

原生动物生物化学的任务是利用化学的理论和方法，以及借助于现代物理学先进技术，来阐明原生动物细胞的组成和分子结构，阐述糖、脂、蛋白质和核酸在其生命活动过程中的作用和代谢变化，从而掌握和控制原生动物的生命活动规律。这样一方面有利于解决某些条件成熟的实际问题，如有效地控制和治疗原虫病等，另一方面有利于开展理论研究。如建立研究模型，研究生命起源、遗传和进化等问题，从分子水平上去阐述这些问题的机理。所以原生动物生物化学是一门实用性很强的学科，又是生物学领域中很有理论研究价值的学科，因此它一定会显示出强大的生命力。

三、原生动物生物化学的发展前景

目前，原生动物生物化的研究，正是朝着基础理论和实践应用这两个方面发展的，它们是互相依赖、互相促进的。用原生动物作材料，研究真核细胞起源的分子基础，研究有性生殖的起源，研究纤毛虫小核起源的分子机理，研究细胞内分化的调控机理，研究细胞各结构的装配机理等等都是本学科主要的、也是基本的理论问题。如果这些研究课题得到满意的结果，将会对生命科学作出重大突破和贡献。研究原虫病的致病原因，研究药物作用靶靶和生化机理，设计有效地治疗原虫病的新药物。这都是比较长远的研究方向和目标。

原生动物生物化学的发展也依赖于使用的方法，尤其是将先进的科学仪器移植进来。因此，高效、高速、高精密的仪器的应用，许多研究方法的改进和发展，这乃是原生动物生物化学发展的希望所在。

问题已经清楚，在原生动物生化领域中已经取得了很大的成果。对生物化学家、分子生物学家来说，这是一个令人向往和鼓舞的领域，也是一个大有作为的、继续可以作出重大发现的领域。

第二节 研究原生动物生物化学的材料

要获得较大量的原生动物，这是进行各种生化试验的首要条件。现在常借用克隆培养技术可以得到大量的群体细胞供一般试验之用。如果要研究细胞的某一时期生化过程的性质那就要设法获得处于相同生理状态下的群体细胞，这就需要诱导细胞同步化，用同步化了的细胞进行研究各种生化变化。有时如需开展对某细胞器的离体生化试验，或要研究某细胞器的结构、组成等就必需用纯净的细胞器进行。近十几年来，随着原生动物培养技术的改进，以及超微量分析方法的应用，缓解了取材的困难，促进了这一方面研究的进展。

一、原生动物的采集、培养、收集和保存

采集是获得实验材料的第一步。由于原生动物繁多，生活习性多样。所以采集，采集后的培养和收集方法各不相同，达到长期保存的原生动物目前尚为数不多。

1. 采集。采集自由生活的淡水原生动物时，可选择没有农药和毒物污染的长有水草的水域，如池塘、小河，轻搅动水后取水样，装入容器，标记采集地点和日期等，带回实验室，在解剖镜下检查，用微吸管将所需原生动物单个吸在凹玻片中培养。采集海水自由生活的原生动物时，基本要求相似。

对寄生原虫试样的采集，主要采集感染有原虫的动物或人体的血液、肠胃液或粪便，然后从中分离。

2. 培养。采集到的水样、血样、肠胃液和粪便等样，在解剖镜下将所需要的原生动物单个挑出，行克隆培养（由一个个体的

无性繁殖系)后用于研究,根据需要有些也采用无异物、无菌培养。

在自由生活的原生动动物中,进行单克隆培养较多的是某些纤毛虫,常在凹玻片中加入经煮沸并冷却的池塘过滤水,再置玻片于装有潮湿棉花的培养皿中进行。过滤水中加切开的小麦粒,隔一、二天后麦粒表面生有大量细菌,用它作饵料喂养纤毛虫。许多食肉的纤毛虫如棘尾虫(*stylonychia*)、伪尖毛虫(*Oxytricha fallax*)、和尾柱虫(*Urostyla*)等都可以用麦粒浸出液培养出草履唇滴虫(*Chilomonas paramecium*)作饵料而喂养。用稻草水、窝苣叶水及美国市售的“Cerophyl”水培养草履虫(*Paramecium*),可得较高密度。

早在50年代对梨形四膜虫(*T. pyriformis*)进行了无菌培养。方法是在无菌条件下,先将单个四膜虫反复在低浓度的抗生素(如30~50单位/毫升的青霉素或同时加入30~50单位/毫升的链霉素)溶液中洗涤数次以后,将洗过的四膜虫吸入到含低浓度抗生素的有机培养基或脉脉培养基的凹玻片中培养。以后不断扩大可得大量无菌个体。有时在培养过程中出现污染,可在无菌条件下,离心收集一些这类细胞,然后加入高浓度的抗生素洗浴,反复数次以后,转入到含有低浓度抗生素的培养基中培养,比较容易获得无菌的四膜虫。

无菌培养四膜虫的有机培养基成分如下:牛肉膏1克,酵母浸出液2克,蛋白胨2克,醋酸钠1克, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.2克, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02克, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.04克, KCl 0.03克,蒸馏水1000毫升。搅拌使各物质溶解后,用饱和 NaOH 溶液调 pH 至 7.0 ± 0.2 (过酸、过碱都会影响四膜虫生长)。然后分装、瓶口塞以棉塞、包扎,15磅高压消毒20~30分钟,冷却待用。将无菌处理的四膜虫以1%(v/v)接种量接入培养基,28℃恒温(不摇动)培养,大约40小时进入平衡期。图1—1为测得的梨形四膜虫对数生长曲线。最高密度可达每毫升 $0.5-1.0 \times 10^6$ 细胞。四膜虫

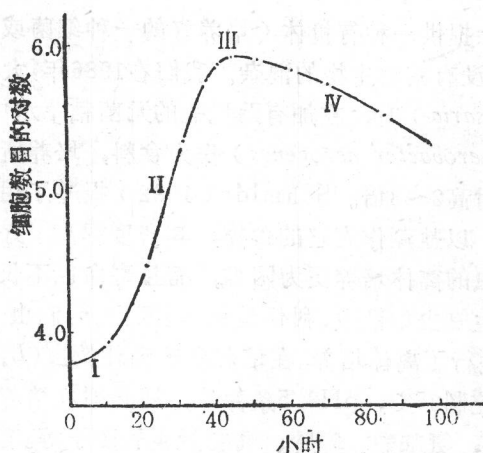


图1—1 梨形四膜虫的对数生长曲线 (28℃恒温培养)

对数生长曲线是随品系、培养温度和接种量而有所不同，但均可分为四个时期：I 是停滞期或潜伏期，II 是对数生长期，III 是平衡期，IV 是衰老期。北京大学陈阅增教授等采用豚豚培养基（豚豚1.0克，酵母浸出液0.5克，葡萄糖0.5克及少量无机盐用水配成100毫升），培养的四膜虫密度达 1×10^6 细胞/毫升，当他们用自制牛肉汤代替豚豚时，最高密度达 8.5×10^5 细胞/毫升。

有报道用固体培养基（2%豚豚，0.1%肝提取液和1.5%琼脂）可以培养四膜虫，最高密度达到 5.8×10^5 细胞/厘米²。我们把食用菌平菇（*Pleurotus ostreatus*）剪碎、加水、煮沸、过滤得水提取液，经稀释加1.5%琼脂，制成平板或斜面，接四膜虫后28℃恒温培养，2天后可达 0.5×10^5 细胞/厘米²。

草履虫无菌培养比四膜虫困难些，方法和四膜虫类同。据报道有学者设计了一种具有通气、搅拌、补料等装置的小型无菌培养罐（20升）。用这种装置培养的一种草履虫（*P. tetraurelia*），其密度达38000细胞/毫升，可得到较多的实验材料。许多纤毛虫还不能采用无菌培养，而常用无异物培养。无异物培养就是在无

菌条件下,除提供一种有机体(培养好的一种细菌或一种藻类)作为食物外,没有其它生物的混杂。我们在1986年,大量培养绿草履虫(*P. bursaria*)时,在加有无机盐的无菌稻草水中,再加一种产气杆菌(*Aerobacter aerogenes*)作为食料,培养所得密度比单纯用稻草水时高2~3倍。Schmidt(1982)报道了用无异物培养一种游仆虫,以盐藻作为它的食物,其密度提高了好几倍。

寄生原虫的离体培养更为困难,而且寿命也不长久,但是一些常见的寄生原虫如锥虫、利什曼虫、疟原虫、毛滴虫(*Trichomonas*)等都已进行了离体培养。在培养泰氏利什曼虫(*L. tarentolae*)时,除严格控制25℃, pH8.5条件外,还必须在培养基中加入无机盐、葡萄糖、氨基酸、嘌呤、嘧啶及生长因子等。有人设计了一种体外培养疟原虫的方法,使培养基在人的红细胞沉降层中缓缓的连续通过,来进行培养恶性疟原虫(*P. falciparum*)。用这种方法培养2~3天后,原虫感染可达10%(正常感染不到1%),每个容器每周可收获3次,每次得寄生原虫可达 $0.6 - 1.0 \times 10^9$ 个。

离体培养寄生原虫所得材料有限,因此大多数情况下采用感染动物活体培养法。

3. 收集。克隆培养、无菌培养等取得的自由生活原生动物,可以用绸布、尼龙过滤收集,也可用低速离心或连续离心收集。Schmidt(1982)介绍收集游仆虫的方法,就是利用纤毛虫在电场中朝阴极移动的特点制成特殊的、不接触虫体的装置,使在阴极附近的小室内浓集並收集。

收集寄生原虫的方法比较复杂。以前用离心法,目前应用柱层析、分子筛等方法来收集。例如要获得纯净的锥虫,可在二乙氨基纤维素(DEAE)柱上进行。DEAE浸泡在磷酸-盐水-葡萄糖或Tris-盐水-葡萄糖溶液中,缓冲到合适的pH和离子强度后再装柱。将加有抗凝的肝素的感染有锥虫的血液上柱,过柱,离心过柱液可得纯净的锥虫。应用此法从脾脏巨噬细胞中分

离得到杜氏利什曼虫 (*L. donovani*) 的无鞭毛型细胞(图1—2)。

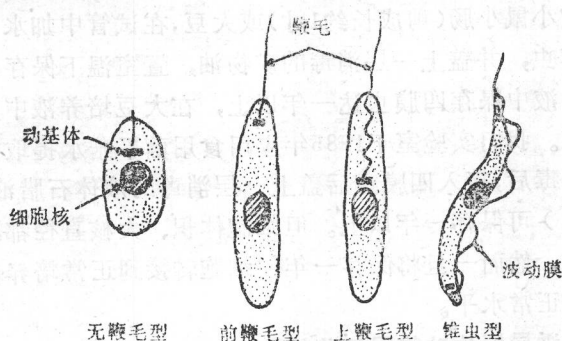


图1—2 动基体目 (Kinetoplastid) 鞭毛的形态型

诺氏疟原虫 (*P. knowlesi*) 感染的恒河猴疟症达15%以上，在原虫发育成熟8个核的裂殖体期为主时取血，用2%阿拉伯胶液，密度梯度离心进行分离裂殖体感染的红细胞，按每毫升感染的红细胞加120毫升营养液和12毫升马血清的比例，在烧瓶中混匀，置37℃恒温箱中培养，不通电，不振荡，培养4—5小时后出现大量裂殖子，低速离心(1000转/分)15分钟，裂殖子培养物，除去沉淀杂质，再离心(3200转/分)20分钟，沉淀即是较纯的裂殖子。近来也采用分子筛技术分离裂殖子，其原理是感染的血液温育在带有2微米微孔的聚碳酸盐分子筛的培养室内，使裂殖子繁殖，而细胞裂解释放出裂殖子，可透过筛孔跑到小室，再分离即得纯的裂殖子。被感染而未裂解的红细胞不能透，即留在大室，不分离。

原生动物长期保存。长期保存原生动物是一个重要的课题，保存遗传纯系品种，在教学科研方面有很大的价值。人们发现许多原生动物在不利的环境条件下会形成包裹。这种包裹对于干燥、低温、较高温、压力及缺氧等不良环境条件具有较强的抗性。利用这一特点可以长期(有的达几年)保存这类原生动物。有报道用液氮低温的方法，可保存某些原生动物如纳虫。