

用改良韦氏法纯化鸡球虫卵囊

朱冠 吴宝华

(杭州大学生物学系)

在球虫的细胞生物学、生理生化及免疫学等方面的研究中,常常需要纯化大量的卵囊。在各种收集纯化方法中,盖玻片漂浮法^[1]、连续及不连续梯度漂浮法^[2-4]能收集和纯化到一定量的卵囊,但所得的卵囊中仍混合有大量的杂质碎片,而且收获量亦有限;维特林(Vetterling)的连续流动差速密度漂浮法^[6](Continuous-flow differential density flotation)和斯托蒂什(Stotish)的离心淘洗法^[5](Centrifugal elutriation),尽管能得到大量较纯的卵囊,但由于需要专用的器材设备,故一般条件的实验室难以应用。而韦根贝奇(Wagenbach)等创立的次氯酸钠和硫酸-重铬酸钠卵囊洗液处理方法(韦氏法)^[7],由于简便易行、获得的卵囊纯净无菌,并且有较大的收获量,故一直乐于被许多实验室采用。

我们在使用该法收集卵囊时,注意到其步骤较多,卵囊损失很大,故对该法进行了一些改良,并获得良好效果。现报道如下:

材料和 方法

(一) 球虫卵囊的准备 所用材料是本实验室经过单卵囊分离和感染法得到的柔嫩艾美球虫(*Eimeria tenella*)。首先将纯种卵囊感染给一日龄雏鸡若干,进行隔离饲养。待一周后粪便里大量出现球虫卵囊时,开始采集鸡粪。将鸡粪用自来水搅拌均匀后,经细塑料网纱过滤,待过滤液沉淀后,弃去上清,得含卵囊沉淀,备用。

或在沉淀中加入2.5%重铬酸钾,置恒温箱中29℃孵育一周,得含孢子化卵囊沉淀,备用。

(二) 浓硫酸-重铬酸钠卵囊洗液的配制

卵囊洗液的配制按韦根贝奇等的方法来作修改。先配好20%重铬酸钠液100毫升于500毫升锥形瓶中,然后在冰浴条件下逐渐加入浓硫酸174毫升,边加边充分搅拌。用玻璃纤维漏斗或离心方法将其中结晶去掉之后,备用。

(三) 卵囊的纯化 取上述含卵囊沉淀于100毫升塑料离心管中,含重铬酸钾的沉淀还须用清水离心洗涤数次(2000转/分钟,15分钟),最后保持每管沉淀不超过10毫升。搅拌加入饱和硫酸镁液约75毫升。静置一段时间后,离心(1000转/分钟,10分钟),用角匙捞取表层漂浮着的卵囊至5—2号砂芯漏斗过滤,并用一定量的清水冲洗至全部卵囊都滤下为止。将过滤液离心洗涤数次以去除残留硫酸镁,得到仍含有许多杂质碎片的粗提卵囊沉淀。这时,在冰浴条件下,边搅拌边在粗提卵囊沉淀中缓慢滴加2—5毫升的卵囊洗液。然后,立即将该混合液逐滴加入另一支冰浴准备着、盛有60—70毫升卵囊洗液的离心管中,边加边充分搅拌。离心后(1000转/分钟,5—10分钟)可见卵囊洗液的表面有一较厚的卵囊层。用角匙将卵囊捞取到另一支盛有清洁碎冰和蒸馏水的离心管中。注意,以上卵囊与卵囊洗液的接触时间不要超过30分钟。以后可用蒸馏水(生理盐水或林格缓冲液也可)离心洗涤多次以去除残留的卵囊洗液。洗涤最好在尖头离心管中进行,以减少卵囊损失。取微量卵囊沉淀制片镜检、拍照后,将卵囊沉淀于冰箱中保存供各方面研究用。

结果和讨论

我们开始在按韦氏法进行卵囊纯化时,发现用次氯酸钠处理后,卵囊中仍有大量碎片。同时,由于要经过数次离心洗涤以去除氯气,中间卵囊损失较大。而且,用20%氯化钠漂浮法收集卵囊效果较差。故省略了原来用次氯酸钠处理步骤;改原法中的20%氯化钠漂浮法为饱和硫酸镁漂浮法;并添加了用5—2号砂芯漏斗过滤一步,以去除大颗粒碎片和粪便中的蜱螨类几丁质外壳。这样获得的卵囊粗提物与原来方法比较,体会是获得量增加,杂质碎片的含量比例则差不多,而且由于没有大颗粒碎片,便于后面处理液的消化处理。

按韦氏法是逐滴将约80毫升的卵囊洗液加到卵囊粗提物中。这样,由于卵囊洗液的高粘性,底部的卵囊不能在短时间内(30分钟)漂浮到溶液表面。曾对离心后离心管中的卵囊洗液中各层次取样观察,发现除了表层有相对多

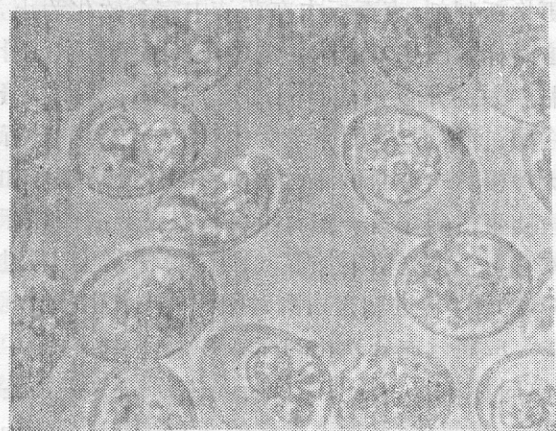


图1 纯化后的柔嫩艾美球虫卵囊(×200)

的卵囊外,中、下层也都含有大量的卵囊。所以,该法浪费很大。据此,特改处理方法为先将2—5毫升卵囊洗液与卵囊粗提物混匀后,再将粗提物——卵囊洗液混合液滴加到卵囊洗液上面。这样,卵囊避免了从高粘性的处理液底部上升到表面的过程,从而能在离心后立即大量地漂浮于卵囊洗液表面,提高了收获量。

镜检结果表明这样收获的卵囊不含任何杂质碎片(见图1)。

结 论

用改良韦氏法来纯化球虫卵囊,具有比原方法更简便易行的特点,而且卵囊损失小,量多,得到的卵囊无任何杂质碎片。该法可供各实验室纯化球虫卵囊使用。

参 考 文 献

- [1] Lane, C. 1924 The mass diagnosis of ankylostome infestation. *Tr. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 17: 407—436.
- [2] Marquardt, W. C. 1961 Separation of nematode eggs from fecal debris by gradient centrifugation. *J. Parasit.* 47: 248—250.
- [3] Patnaik, B. 1966 A technique of obtaining oocysts of coccidia in pure state from chicken feces by modified Marquardt's method. *Indian Vet. J.* 43: 414—422.
- [4] Sharma, N. N., et al. 1963 A cleaning method for coccidial oocysts using density-gradient sedimentation. *J. Parasit.* 49: 159—160.
- [5] Stotish, R. L., et al. 1977 Separation of sporozoites, sporocysts, and oocysts of *Eimeria tenella* by centrifugal elutriation. *J. Parasit.* 63: 1124—1126.
- [6] Vetterling, J. M. 1969 Continuous-flow differential density flotation of coccidial oocysts and a comparison with other methods. *J. Parasit.* 55: 412—417.
- [7] Wagenbach, G. E., et al. 1966 A method for purifying coccidial oocysts employing clorox and sulfuric acid-dichromate solution. *J. Parasit.* 52: 1222.