

# 柔嫩艾美球虫体外脱囊试验和观察

朱 冠

吴宝华

(浙江医学研究院寄生虫病研究所)

(杭州大学生物系)

**摘要** 用机械方法破碎柔嫩艾美球虫卵囊后,其孢子囊可在体外接受含 0.3%胰蛋白酶和 5.0%鸡胆汁(或 0.5%猪胆盐)的脱囊介质的作用而引起孢子囊脱囊。在 41℃条件下,脱囊约需 0.5—1.5 小时。脱囊前后的孢子非常活跃,从斯氏体消失处逸出,在孢子囊空壳中留下一明显残体。

柔嫩艾美球虫 (*Eimeria tenella*) 是引起鸡球虫病爆发的主要病原体之一<sup>[1,4]</sup>。而脱囊是球虫孢子侵袭鸡体的一个关键步骤。球虫的体外脱囊试验,对于搞清球虫的生活史、研究球虫的脱囊机理及其对宿主的侵袭机制等都是必要的,同时,也能为球虫的生理生化、细胞生物学、免疫学、体外培养和疫苗制备等方面的研究提供活体孢子材料。

有关球虫脱囊的研究国内报道不多<sup>[5]</sup>,而国外在该领域已有一定研究。莱瓦因(Levine)<sup>[6]</sup>最先发现胰液是球虫脱囊的基本物质。古德里奇(Goodrich)<sup>[6]</sup>和伊泰盖基(Hagaki)<sup>[7]</sup>发现只有机械破碎鸡球虫卵囊后,逸出的孢子囊才能受胰酶和十二指肠液的脱囊刺激。奈伯格(Nyberg)等<sup>[8]</sup>则观察到柔嫩艾美球虫的卵囊在接触二氧化碳后,卵囊壁会在微孔区域变薄和产生缺口从而使脱囊物质穿过。多伦(Doran)等<sup>[9]</sup>和希伯特(Hibbert)<sup>[6]</sup>还发现胆盐和一些表面活性剂可用来代替胆汁成份。后来,王(Wang)等<sup>[10]</sup>利用特异性的酶抑制剂研究发现了最基本的脱囊物质不是胰蛋白酶而是胰凝乳蛋白酶。

在此基础上,我们作了柔嫩艾美球虫的体外脱囊试验,并对脱囊过程作了观察。

## 一、材料和方法

(一) 基本溶液的配制 根据文献及我们

的试验结果,现介绍二种基本溶液的配方。

林格(Ringer)缓冲液。依韦根贝奇(Wagenbach)<sup>[11]</sup>为: NaCl, 9.0 克; CaCl<sub>2</sub>, 0.24 克; KCl, 0.42 克; KHCO<sub>3</sub>, 0.20 克; TRIS, 3.03 克; 加蒸馏水到 1000 毫升。用 1 N HCl 调节 pH 至 8.0。

脱囊介质。参考文献并经多次试验,我们提出的配方为: 胰蛋白酶(Difco, 1:250), 0.03 克; 鸡胆汁, 0.5 毫升; 加林格缓冲液到 10 毫升。鸡胆汁可用 0.5%猪胆盐代替。

(二) 材料准备 柔嫩艾美球虫孢子化卵囊的获得和纯化方法依朱冠等<sup>[3]</sup>。孢子囊制取方法为: 将一定量提纯干净的球虫卵囊用林格缓冲液制成约 1.0 毫升悬液,然后用小号(2 毫升左右容量)玻璃匀浆器匀浆处理。每处理几下即取微量样品于显微镜下观察,至绝大多数卵囊破裂、孢子囊逸出为止。将悬液用缓冲液冲洗到尖头离心管中,离心(2000 转/分钟, 10 分钟)后,弃去上清,即得孢子囊沉淀。将沉淀用少许林格缓冲液保存于冰箱中备用。保存时间不超过一周。

(三) 体外脱囊观察 用约 1.5 毫升的脱囊介质与适量孢子囊混合,并将其置于 16 孔塑料培养板的一个孔中。置培养板于重庆产带恒温装置的 XSJ-D 型倒置研究显微镜镜台上,调节恒温装置至鸡体温温度 41℃。在倒置显微镜上观察并拍摄孢子囊脱囊过程。根据照片绘

观察图。

一般性体外脱囊试验可在试管内进行，将试管置于 41℃ 水浴 1—2 小时即可。

## 二、结果和讨论

参考各种资料拟定的二个脱囊介质配方，经多次试验证明完全可行，其脱囊率可达 90%—98%。脱囊介质的配制和脱囊条件也较简单和易重复。适于一般实验室进行。

处理前孢子囊在光镜下斯氏体明显，子孢子折光体清晰(图 1)。脱囊介质处理后，斯氏体和子孢子内折光体逐渐消失(图 2)，子孢子开始运动。子孢子运动活跃，在孢子囊内互相转动、甚至相互扭曲缠绕。然后，两个子孢子通过斯氏体消失处先后穿出，中间相隔一定时间。子孢子穿出速度较快，以至于较难捕捉拍摄。子孢子全逸出后，孢子囊内留有一圆形残体。不久，残体在胆汁和胰蛋白酶的作用下解体成微小颗粒(图 3—6)。脱囊后子孢子极活跃，在培养板上主要作扭曲、旋转和滑行等运动(图 6)。子孢子逸出前后的行为显然是与宿主的肠内环境相适应的。整个脱囊过程最短在 20 分钟内完成，30 分钟后开始增多，至 60—90 分钟左右

脱囊进入高潮，90 分钟后，绝大多数已脱囊完毕。

脱囊时，胰蛋白酶能消化掉斯氏体<sup>[22]</sup>，使孢子囊的通透性改变。据斯波尔(Speer)等<sup>[23]</sup>报道，单独的胆汁或胆盐能激活寄生于哺乳动物细胞内的或游离状态的球虫裂殖子，而胰蛋白酶则不能。所以，孢子囊内原处于休眠状态的子孢子主要是受胆盐的刺激而活化的，胰蛋白酶主要是消化掉斯氏体、使得孢子囊壁对胆盐可通透。我们认为，胆盐作为表面活性剂可以改变子孢子细胞膜上的膜蛋白构型和分布状态，从而导致了膜蛋白中某些酶原的激活，并由此触发了一系列的胞内酶原激活过程，使子孢子活化。

脱囊后孢子囊空壳内有残体存在(图 2—6)，但在许多文献描述中，柔嫩艾美球虫不存在孢子囊内、外残体<sup>[1,9]</sup>。这是由于对柔嫩艾美球虫的描述多基于在光镜下对卵囊的直接观察。这时，由于残体的折射率与子孢子相近，故较难分辨和观察所至。

## 三、结 论

用林格缓冲液配制的含 0.3% 胰蛋白酶和

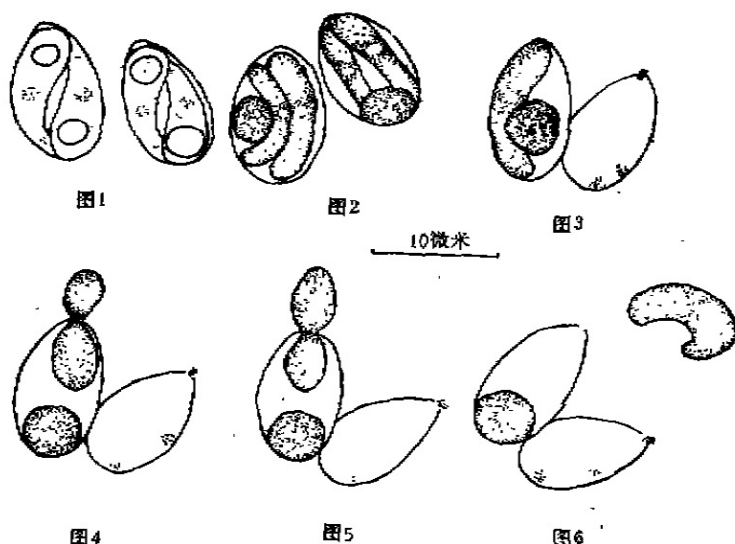


图 1—6 脱囊过程观察

图 1 示未经脱囊液处理的孢子囊；图 2 示经脱囊介质处理后，斯氏体和折光体消失；图 3—6 示子孢子脱囊全过程(本图根据照片复制)

5.0%鸡胆汁(或0.5%猪胆盐)的脱囊介质可在体外引起柔嫩艾美球虫孢子囊内子孢子的脱囊,且脱囊率较高。用带恒温装置的倒置显微镜连续观察脱囊过程,与国内外报道的定时取样观察相比,具有易跟踪、易观察、易拍摄和录像、易控制条件和重复等优点。在41℃条件下,子孢子脱囊约需0.5—1.5小时。子孢子逸出前后非常活跃。孢子囊内残体在脱囊过程中清晰可见。脱囊后子孢子经纯化后,可供形态学观察、生理生化分析、免疫学接种、细胞体外培养等等研究之用。

## 参 考 文 献

- [1] 左仰贤等 1986 拉氏等孢球虫(*Isospora lacazei*)子孢子体外脱囊的研究 云南大学学报 8(1): 112—117.
- [2] 朱冠等 1986 杭州地区鸡球虫种类的初步调查 杭州大学学报(自然科学版) 13(2): 224—230.
- [3] —— 1937 用改良韦氏法纯化鸡球虫卵囊 动物学杂志 22(2): 38—39.
- [4] 林昆华等 1981 北京地区鸡球虫种类的初步调查 北京农业大学学报 1:1—11.
- [5] Doran D. J. et al. 1962 Excystation of the poultry coccidium *Eimeria acervulina* J. Protozool. 9(2): 154—161.
- [6] Goodrich H. P. 1944 Coccidian oocysts. Parasitol. 36: 72—79.
- [7] Hagaki K. 1954 Further investigation on the mechanism of coccidial infection in fowl. J. Fac. Agric. Tozori Univ. 2: 37—53
- [8] Hibert L. E. et al. 1969 The effects of pH, buffers, bile and bile acids on excystation of sporozoites of various *Eimeria* species. J. Protozool. 16(3): 441—444.
- [9] Levine N. D. 1973 Protozoan parasites of domestic animals and of man 2nd Ed. Burgess Publishing Co. Minn. 202—222.
- [10] Levine P. P. 1942 Excystation of coccidial oocysts of the chicken J. Parasitol. 28: 426—428.
- [11] Nyberg P. A. et al. 1968 Carbon dioxide as the initial stimulus for excystation of *Eimeria tenella* oocysts. J. Protozool. 15(1): 144—148.
- [12] Ryley W. M. et al. 1979 A diagnostic chart for nine species of fowl coccidia, Research Report 355 Univ. Georg. College of Agric. Experi. Stat.
- [13] Speer C. A. et al. 1970 Stimulation of motility in merozoites of five *Eimeria* species by bile salts. J. Parasitol. 56(5): 927—929.
- [14] Wagenbach G. E. et al. 1966 A method for purifying coccidian oocysts employing Clorox and sulfuric acid-dichromate solution. J. Parasitol. 52(6): 1222.
- [15] Wang C. C. et al. 1975 Pancreatic chymotrypsin as the essential enzyme for excystation of *Eimeria tenella*. J. Parasitol. 61(5): 923—927.