

# 锥虫低温保存的研究和应用

沈 静 德

(第一军医大学寄生虫学教研室, 广州 510515)

锥虫属 (*Trypanosoma*) 的种类很多, 有些可寄生于人、畜的血液和组织, 引起锥虫病, 为世界卫生组织重点防治的六大热带病之一<sup>[5]</sup>。有些锥虫广泛用于化学治疗药物的研究, 和锥虫病的各种免疫学试验。已往有关试验室多以小鼠传代接种锥虫。但动物接种耗费大量人力和物力, 近年来国内外均开始低温保存锥虫的研究<sup>[2-4]</sup>, 今介绍如下。

1966年 Mieth 采用9种锥虫进行了低温保存的研究, 即冈比亚锥虫 (*T. gambiense*)、罗德氏锥虫 (*T. rhodesiense*)、布氏锥虫 (*T. brucei*)、伊氏锥虫 (*T. evansi*)、马锥虫 (*T.*

*equinum*)、马媾疫锥虫 (*T. equiperdum*)、刚果锥虫 (*T. congolense*)、克氏锥虫 (*T. cruzi*) 和路氏锥虫 (*T. lewisi*)。其低温保存的方法是, 取受感染的小白鼠(路氏锥虫为大白鼠)的血液, 加入3.8%柠檬酸水溶液中, 再加等量的20%甘油水溶液为低温保护剂, 先在4℃放置30分钟, 随后从0℃开始, 以每分钟下降0.5℃的冷却速度, 下降至-10℃, 再以2℃/分钟的速度下降至-30℃, 继以5℃/分钟的速度下降至-60℃, 最后快速移入液氮(-196℃)中低温保存。在冻存后的108天至201天, 将锥虫取出复苏, 即接种小鼠以观察低温保存后的感

染力——LogID。冻存锥虫的结果,依次为 8.1、5.8、6.1、5.4、5.8、5.5、5.3、5.8 和 6.4<sup>[8]</sup>。

Herbert<sup>[7]</sup> 和 Taylor<sup>[12]</sup> 分别观察了锥虫属和布氏锥虫低温保存于液氮中的存活力。Taylor 以 7.5% 甘油为低温保护剂,以每分钟下降 2℃ 的速度,下降至 -79℃ 后,即快速投入液氮(-196℃)中低温保存。在冻存 145 天和 208 天后观察,虫体仍有存活<sup>[7,12]</sup>。

1972 年 Dar 等将吸取了 3 种锥虫(活动锥虫 *T. vivax*、刚果锥虫和布氏锥虫)感染血的舌蝇的口器或唾液腺,置于 8% 甘油的胎牛血清中,另有感染刚果锥虫和布氏锥虫的血液,则加 8% 甘油。冷冻方法即从 0℃ 开始,以 2℃/分钟的冷却速度,下降至 -55℃ 后,即迅速移入液氮中低温保存。在冻存后 1—32 周。复苏后的活动锥虫具有感染力的舌蝇口器为 36.5%。刚果锥虫冻存 1—15 周,具有感染力的舌蝇口器为 57.7%。刚果锥虫和布氏锥虫冻存的血液,接种小白鼠的感染力——Log ID<sub>50</sub>,分别为 3.7 和 6.1。布氏锥虫感染舌蝇的唾液腺,冻存后接种小白鼠,其结果是 3.0<sup>[6]</sup>。

Miyata<sup>[9]</sup> 指出,冈比亚锥虫在感染小白鼠血液中,加 3 倍量的牛血清,与等量的 15% 甘油水溶液混合后,放置 30 分钟,后缓慢冷却,保存于 -20℃ 时,3 天内锥虫全部死亡。但保存于 -75℃ 时,经 80 天以上仍保持感染力<sup>[9]</sup>。

根据以上的报道,可以说明锥虫低温保存于液氮中或 -75℃ 中,均可长期保存,并可保持其感染力。据日本报道(1979),在速冻的液氮中保存锥虫,其感染力可维持 6 年以上。因此锥虫在低温下保存时间是较长的,这对实验工作者也提供了方便的条件<sup>[5]</sup>。

Schupp<sup>[11]</sup> 和 Raether<sup>[10]</sup> 等分别对布氏锥虫和克氏锥虫,在低温保存前后的超微结构、感染力和活动能力等,进行了一系列的观察<sup>[10,11]</sup>。

彭吉生<sup>[5]</sup>指出,锥虫在超低温的情况下,可保存较长的时间,如用阿氏液(Alsever 配制:葡萄糖 4.66 克,氯化钠 1.05 克,枸橼酸钠 2.0 克,蒸馏水 200.0 毫升),加 10% 马血清和 10% 甘油混合后,成为锥虫的保存液,在 -79℃ 低

温下,虫体可存活 8 个月。在 -5℃ 冰箱中保存,8 天后接种小白鼠仍有致病性。锥虫悬液保存在 10% 甘油中,在 -40℃ 和 -20℃ 其生存力分别可维持 14 天和 7 天。如不加甘油,在同样的温度下仅保存 3 天和 1 天。充分说明 10% 甘油作为低温保护剂的重要性<sup>[5]</sup>。

石榴男等<sup>[4]</sup>进行了深冻法(-196℃)保存马媾疫锥虫的研究。其方法是取感染锥虫的小鼠,眼眶静脉丛放血,滴在预温的枸橼酸缓冲液中,混匀离心,加入 20% 二甲基亚砷(DMSO)的小牛血清溶液中,分装于小安瓿,先放在浮在液氮表面上的筛网中,冷冻约 15 分钟,使其中溶液冻结后,再放入液氮液体中冻存。以后将深冻 1 年至 4 年的锥虫,在健康小鼠体内传代后,与常规用小鼠传代的锥虫,进行了生物学特性的比较,观察了在光镜和电镜下,两种传代锥虫的形态和超微结构,以及对新肿凡纳明(*Neosphenamine*)的反应能力。试验结果表明:两种传代锥虫的形态结构、生物学特性和反应能力基本一致。充分说明经深冻后传代锥虫,完全可代替常规传代锥虫,供新肿凡纳明等抗锥虫药疗效试验之用。此外北京协和医院等单位,曾用以上两种传代锥虫为底物,测定抗双键 DNA 抗体,两者均取得良好的效果。因此长期低温保存后传代锥虫,可用于免疫学的各种试验和研究<sup>[4]</sup>。

曾有人对于伊氏锥虫、泰氏锥虫(*T. theileri*)等超低温冷冻保存,进行了试验研究。即将小鼠血液内的两种锥虫,采用了直接冻存法,分别在液氮中冻存了 1399 天和 1455 天,在复苏后通过细胞和小鼠复归试验,其形态、活力、增殖力和致病性,均无明显改变。说明锥虫采用深低温长期保存,可为科研实验、临床应用以及教学,随时提供大量活锥虫,实为一种简便、经济而可靠的方法。

## 参 考 文 献

- [1] 石榴男等 1988 锥虫的深冻保存及其生物学特性观察. 药物分析杂志 8(1):13—15.
- [2] 沈静德 1983 寄生虫低温保存 国外医学寄生虫病分册 6:251—254.

- [3] 沈树满等 1990 我国寄生虫低温保存的研究概况 动物学杂志 25(1):37—41。
- [4] 金连缘译 1982 微生物保存法 474—475 上海科学技术出版社。
- [5] 彭吉生 1987 家畜锥虫病 32—33 江西科学技术出版社。
- [6] Dar F. K. et al. 1972 Cryopreservation of pathogenic African trypanosomes in situ: Metacyclic and bloodstream forms. *J. Protozool* 19: 494—497.
- [7] Herbert W. J. 1968 Survival of *Trypanosomes* after rapid cooling and storage at  $-196^{\circ}\text{C}$ . *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 62(2): 209—212.
- [8] Mieth H. 1966 Tiefgefrierkonservierung verschiedener Blutund Gewebe-Protozoon in flüssigem Stickstoff. *Z Tropenmed Parasitol* 17: 103—108.
- [9] Miyata A. 1973 On the cryo-biological studies of the parasitic protozoa. (2) The low temperature preservation in freezers. *Tropical Med* 15: 204—213.
- [10] Raether W. et al. 1988 Effects of DMSO and the deep freezing process on the infectivity motility and ultrastructure of *T. cruzi*. *Parasitol Res* 74(4): 307—313.
- [11] Schupp E. 1980 The changes on the ultrastructure, infectivity and motility of *T. brucei* before and after cryopreservation in liquid nitrogen. *Z. Parasitenkd* 62 (3): 213—215.
- [12] Taylor E. L. 1972 The cryopreservation of *T. brucei* in polythene tubing. *Cryobiology* 9: 212—215.

## 蜘蛛的感觉和感觉器官

尚玉昌

(北京大学生物系, 100871)

(一) 蜘蛛的眼、视觉和色觉 大多数蜘蛛都具有 8 只眼, 少数蜘蛛有 6 只眼, 锡兰蛛 (*Tetrablemma*) 有 4 只眼, 产于南美的异出蛛属 (*Nops*) 只生有 2 只眼, 而穴居蛛 (*Anthrobia*) 则完全没有眼。

蜘蛛的眼着生在头胸部的前方, 有的向上, 有的向前, 有的位于两侧。几只眼可排成二列(平腹蛛科 Gnaphosidae, 管巢蛛科 Clubionidae, 沙蛛科 Ammoxenidae 和漏斗蛛科 Agelenidae 等)、三列(狼蛛科 Lycosidae、盗蛛科 Pisauridae 和跳蛛科 Salticidae 等)或四列(猫蛛科 Oxyopidae 等)。蜘蛛眼的排列方式是区分科属的重要依据之一。

蜘蛛的眼属于单眼, 最外面的角膜由表皮特化而成, 呈双凸镜状, 起聚光作用。蜘蛛蜕皮时角膜也会随之蜕去, 因此会暂时看不见东西。角膜下是真皮层, 再下就是视网膜, 组成视网膜的视细胞呈长形, 每个都有视神经与其相连并具有一对视杆, 视杆彼此并列在视网膜上排列成层。在昼行眼中视杆层位于视细胞核的上方靠近真皮层处; 在夜行眼中视杆层位于眼

的基底部。此外, 夜行眼还具有反光色素层(猫和蛾类的眼中也有), 其功能是将进入眼内的光再次反射给视细胞, 以便增强在黑暗条件下的视力。

不同蜘蛛的视力相差很大。跳蛛、狼蛛和其他猎蛛的视力最好, 依靠网的震动和依靠触觉发现猎物的蜘蛛则视力较差。P. Cambridge 曾多次观察到蜘蛛从网中央的停栖处垂下一根丝, 借以捕捉从网下经过的昆虫, 这一观察后来曾被许多人证实过, 这说明, 即使是很典型的织网蛛也有一定的视力。

一位澳大利亚蜘蛛学家曾作过一些试验, 在试验中狼蛛能直接捕向它所看到的猎物。蟹蛛(蟹蛛科 Thomisidae) 常常潜伏在隐蔽处, 当有昆虫从附近经过时便猛冲过去将其捕获, 如果猎物在被捆绑前挣脱并逃出一定距离, 蟹蛛便不可能再把它追回, 这说明, 蟹蛛的视力虽弱但确实能看到东西。

狼蛛科 (Lycosidae) 的视力要比蟹蛛科锐利得多。一种狼蛛 (*Lycosa godeffroyi*) 可直接跳向 8 厘米以外的甲虫并将它捕获, 而狡蛛